

**Sähkökemiallisen leima- ja pesuvapaan
DNA-sensorin kehittäminen
PCR-pohjaiseen
nukleiinihappodiagnostiikkaan**

**Diplomityö
Turun Yliopisto
Biokemian laitos
Biotekniikka
Huhtikuu 2020
Eero Aarikka**

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

AARIKKA EERO: Sähkökemiallisen leima- ja pesuvapaan DNA-sensorin kehittäminen PCR-pohjaiseen nukleiinihappodiagnostiikkaan

Diplomityö, 58 s.

Biotekniikka

Huhtikuu 2020

Nukleiinihappojen havaitsemiseen soveltuvat molekulaarisen diagnostiikan menetelmät mahdollistavat infektioitauteja aiheuttavien patogeenien tunnistamisen nopeasti ja tarkasti. Menetelmät vaativat kuitenkin usein kehittyneet laboratoriotilat ja koulutetun henkilöstön, mikä rajoittaa testien käytön usein vain keskuslaboratoriotasolle. Tämä voi johtaa pidempään testin kokonaissuoritusajaksi muun muassa näytteen kuljetukseen ja käsittelyyn liittyvien viiveiden vuoksi. Kehittämällä testeistä helppokäyttöisempiä, voidaan niitä suorittaa yksinkertaisemmissa olosuhteissa, jopa vastaanotolla potilaan läsnä ollessa. Tällaisten potilasläheisten vieritestien kehittäminen vaatii menetelmien automatisointia ja määritykseen käytettävältä laitteistolta riittävän pientä kokoa. Optisiin merkkiaineisiin perustuvissa nukleiinihappotesteissä mittauksen vaatima optiikka ja siihen liittyvät komponentit ovat yksi laitteiston kokoa rajoittava tekijä, johon helposti elektroniikkaan integroitava sähkökemiallinen mittausteknologia voi olla mahdollinen ratkaisu.

Diplomityön tavoitteena oli tutkia ja vertailla kahta eri sähkökemiallista mittaustekniikka DNA:n havaitsemiseen, joita voitaisiin hyödyntää vieritestaukseen soveltuvan polymeerasiketjureaktioon (engl. polymerase chain reaction, PCR) perustuvan diagnostisen nukleiinihappotestin kehittämisessä. Työssä vertailtiin potentiometristä kanavatransistoriin (engl. field-effect transistor, FET) perustuvaa ja impedanssispektroskopiaan (engl. electrochemical impedance spectroscopy, EIS) perustuvaa menetelmää. Menetelmät perustuivat elektrodin pinnalle kiinnitettyihin nukleiinihappokoettimiin ja niistä pyrittiin kehittämään leima- ja pesuvapaita menetelmiä, jotta työvaiheiden määrä olisi mahdollisimman vähäinen. Näin menetelmien automatisointi on yksinkertaisempaa ja ne soveltuvat mahdollisesti myös reaaliaikaiseen PCR-reaktion seurantaan.

Työn aikana EIS-tekniikkaan perustuvalla sensorilla saatiin lupaavia tuloksia, mutta FET-tekniikkaan perustuvalla sensorilla ei kyetty havaitsemaan DNA-kohteita edes suhteellisen korkeissa pitoisuuksissa. Työn rajallisen ajan vuoksi ongelmalle ei löydetty varmaa syytä tai selitystä. EIS-sensorilla kyettiin havaitsemaan DNA-kohde ilman hybridisaation ja mittauksen välistä pesua, minkä perusteella se saattaa soveltua PCR-reaktion reaaliaikaiseen seurantaan. Sensorin käyttöä ei kuitenkaan ehditty testaamaan PCR-reaktion mittaamisessa.

Asiasanat: biosensorit, diagnostiikka, impedanssispektroskopia, kanavatransistori, nukleiinihapot, polymeerasiketjureaktio, vieritestit

UNIVERSITY OF TURKU

Department of Biochemistry

AARIKKA EERO: Development of electrochemical label- and wash-free DNA-sensor for PCR-based nucleic acid diagnostics

Master's Thesis in Technology, 58 p.

Biotechnology

April 2020

Molecular diagnostic methods for detecting nucleic acids provide rapid and specific means to detect pathogens causing infectious diseases. However, these methods often require advanced and dedicated laboratory and trained laboratory staff, which limits the use of these tests to central laboratories. This can lead to longer turn-around time for the test resulting delays from transportation and handling the specimen. By developing more user-friendly tests, they can be used in less advanced environments, even at the outpatient clinics while the patient is waiting. Developing point-of-care tests for the near-patient use requires automatizing the test and minimize the test device to a sufficient size. Nucleic acid tests utilizing optical labels require optics and related components for detecting the labels, which is one of the limiting factors for the size of the test device. One solution for this is electrochemical detection technology which is easily integrable with small portable electronics.

The aim of this master's thesis was to research and compare two electrochemical detection technologies for DNA detection, which then could be integrated for polymerase chain reaction (PCR) based point-of-care test. The two methods were field-effect transistor (FET) based potentiometric sensing and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Both methods were based on probes immobilized on electrode surface. The aim was to develop a label- and wash-free sensors to keep the detection method as simple as possible for automatization and to possibly implement it for real-time detection of PCR.

Results with EIS-based sensor were promising, but FET-based sensor was not able to detect DNA-targets even in rather high concentrations. Due to limited time a definitive explanation was not found for the problem. EIS-sensor on the other hand was able to detect DNA-target without wash between hybridization and detection. Based on the results EIS-sensor might be suitable detection technology for PCR-based test. However, this integration remains to be tested.

Keywords: biosensor, diagnostics, electrochemical impedance spectroscopy, field-effect transistor, nucleic acids, point-of-care testing, polymerase chain reaction

Sisällys

| | |
|--|----|
| Lyhenteet | 2 |
| 1 Johdanto | 3 |
| 1.1 Kliininen mikrobiologia ja antimikrobiresistenssi | 4 |
| 1.2 Nukleiinihapon monistustestit | 5 |
| 1.3 Vieritestauksen haasteet nukleiinihappodiagnostiikassa | 6 |
| 1.4 Nukleiinihappojen sähkökemiallinen mittaaminen | 9 |
| 1.4.1 Amperometriset tekniikat | 11 |
| 1.4.2 Potentiometria kanavatransistorilla | 14 |
| 1.4.3 Impedanssispektroskopia | 19 |
| 1.5 Kaupallisia määritysalustoja | 24 |
| 1.6 Työn tavoite | 26 |
| 2 Materiaalit ja menetelmät | 27 |
| 2.1 Työssä käytetyt nukleiinihapot | 27 |
| 2.2 DNA-kohteiden konjugointi europium-kelaatilla | 28 |
| 2.3 Elektrodien valmistus ja pinnoitus | 28 |
| 2.4 Fluoresenssimittaukset | 29 |
| 2.5 FET-mittaukset | 30 |
| 2.6 EIS-mittaukset | 31 |
| 3 Tulokset | 32 |
| 3.1 Biosensorin aktiivisuuden todennus fluoresenssilla | 32 |
| 3.2 FET-sensori | 35 |
| 3.3 EIS-sensori | 37 |
| 3.3.1 Elektrolyytin ionivahvuuden pienentäminen | 39 |
| 3.3.2 DNA-koetin impedanssimittauksissa | 40 |
| 3.3.3 Herkkyyden määrittäminen laimealla elektrolyytillä | 41 |
| 4 Pohdinta | 42 |
| 5 Loppupäätelmät | 48 |
| 6 Lähteet | 49 |

Lyhenteet

| | |
|--------------|--|
| AMR | antimikrobiresistenssi |
| C_{DL} | kaksoiskerroksen kapasitanssi, engl. double-layer capacitance |
| C_{FET} | transistorin hilan kapasitanssi |
| CPE | vakiovaihe-elementti, engl. constant phase element |
| DNA | deoksiribonukleiinihappo, engl. deoxyribonucleic acid |
| E_G | transistorin hilan potentiaali |
| EGFET | jatketun hilan kanavatransistori, engl. extended-gate field-effect transistor |
| EIS | sähkökemiallinen impedanssispektroskopia, engl. electrochemical impedance spectroscopy |
| FET | kanavatransistori, engl. field effect transistor |
| g_m | transistorin transkonduktanssi |
| HIV | ihmisen immuunikatovirus, engl. human immunodeficiency virus |
| HPLC | korkean erotuskyvyn nestekromatografia, engl. high performance liquid chromatography |
| I_d | transistorin nieluvirta |
| I | liuoksen ionivahvuus |
| ISFET | ioniselektiivinen kanavatransistori, engl. ion-sensitive field-effect transistor |
| IVD | <i>In-Vitro</i> –diagnostiikka |
| k | Boltzmannin vakio, $1,380649 * 10^{-23}$ J/K |
| MCH | 1-merkaptto-6-heksanoli, engl. 1-mercapto-6-hexanol |
| MOS | metalli-oksidi-puolijohde, engl. metal-oxide-semiconductor |
| MOSFET | metallioksidi-puolijohdekanavatransistori, engl. metal-oxide-semiconductor field-effect transistor |
| N_A | Avogadron vakio, $6,02214076 * 10^{23}$ |
| NAAT | nukleiinihapon monistustesti, engl. nucleic acid amplification test |
| NGS | uuden sukupolven sekvensointi, engl. next-generation sequencing |
| PNA | peptidinukleiinihappo, engl. peptide nucleic acid |
| q | alkeisvaraus, $1,602176634 * 10^{-19}$ C |
| Q | vakiovaihe-elementin symboli laskukaavassa |
| R_s | elektrolyytin resistanssi, engl. solution resistance |
| RFU | suhteellinen fluoresenssin yksikkö, engl. relative fluorescence unit |
| R_{CT} | elektroninsiirtoresistanssi, engl. charge transfer resistance |
| RNA | ribonukleiinihappo, engl. ribonucleic acid |
| SWV | kanttiaaltovoltammetria, engl. square wave voltammetry |
| T | lämpötila |
| tris | tris(hydroksimetyyli)aminometaani |
| W | Warburgin impedanssi |
| ϵ_0 | tyhjiön permittiivisyys, $8,854187817 * 10^{-12}$ F/m |
| ϵ_r | suhteellinen permittiivisyys, kutsutaan myös aineen dielektriseksi vakioksi |
| λ_D | Debyen pituus |
| σ_0 | kokonaisvaraus |
| ω | taajuus, yksikkönä rad/s |

1 Johdanto

Molekulaarinen diagnostiikka tarkoittaa pääosin deoksiribonukleiini- (DNA, engl. deoxyribonucleic acid) ja ribonukleiinihappojen (RNA, engl. ribonucleic acid) havaitsemiseen ja analysoimiseen kehitettyjä molekyylibiologian tekniikoita ja menetelmiä. Termiin voidaan sisällyttää myös muita moderneja teknologian mahdollistamia *In-Vitro* –diagnostiikan (IVD) menetelmiä erotuksena perinteisistä IVD-menetelmistä, kuten immunomäärityksistä, vaikka nekin perustuvat molekyyliin ja niiden vuorovaikutuksiin. Nukleiinihappotestien lisäksi esimerkiksi massaspektrometrian käyttö IVD-käytössä, kuten kliinisessä mikrobiologiassa voidaan luokitella molekulaariseksi menetelmäksi. (Patrinos ja muut 2017.) Molekulaarista diagnostiikkaa ja erityisesti nukleiinihappotestejä hyödynnetään laajasti myös muilla tieteenaloilla. Monistettujen DNA-juosteiden kokoja vertailemalla voidaan selvittää henkilöiden sukulaissuhteita ja samaa menetelmää hyödynnetään myös rikoslaboratorioissa. Elintarviketeollisuuden laadunvalvonnassa ja vesistöjen tilan tarkkailussa molekulaarista diagnostiikkaa hyödynnetään haitallisia tai toksiineja erittävien mikrobien tunnistamiseen havaitsemalla näytteistä spesifejä DNA- tai RNA-sekvenssejä. Modernien sekvensointimenetelmien ja bioinformatiikan avulla voidaan rutiininomaisesti sekvensoida kokonaisia genomeja sekä transkriptomeja ja sekvensoinnin tuottamaa massiivista datamäärää voidaan hyödyntää esimerkiksi eliöiden sukulaissuhteiden määrittämisessä, geneettisten riskitekijöiden tutkimisessa, räätälöityjen hoitojen kehittämisessä ja ravitsemustieteessä. (Patrinos ja muut 2017.) IVD-käytössä molekulaarisen diagnostiikan menetelmät soveltuvat niin sairauksien diagnosointiin, laajempaan seulontaan kuin terveydentilan seurantaan ja molekulaarinen diagnostiikka onkin arvioitu IVD-markkinoiden nopeimmin kasvavaksi osaluueeksi (Morel ja muut 2016). Vuoden 2015 molekulaarisen diagnostiikan maailmanmarkkinoiden kooksi arvioitiin 6,451 miljardia dollaria ja vuotuiseksi kasvunopeudeksi 12,1% (Grand View Research 2018). Molekulaarisen diagnostiikan menetelmistä on hyötyä erityisesti kliinisessä mikrobiologiassa, sillä niillä voidaan havaita nopeasti ja spesifisesti sekä infektioitauteja aiheuttavia patogeenejä että määrittää näiden perimästä antimikrobiresistenssiin (AMR) liittyviä sekvenssejä. Nukleiinihappotestien kehityksessä myös nopeiden vieritestauksen soveltuvien määritysten kehitys on kerännyt huomiota (Clerc ja Greub 2010; Niemz ja muut 2011; St John ja Price 2014). Vieritestaukseen soveltuvien määrityalustojen on oltava helppokäyttöisiä ja riittävän pieniä, missä helposti elektroniikkaan integroitavat sähkökemialliset mittaustekniikat voivat olla yksi mahdollinen ratkaisu määrityalustan koon pienentämisessä.

1.1 Kliininen mikrobiologia ja antimikrobiresistenssi

Kliininen mikrobiologia on olennainen osa modernia terveydenhuoltoa yhtenä kliinisen laboratoriotoinnin erikoisalana. Sen tarkoituksena on infektiotauteja aiheuttavien mikrobie eli patogeenien kuten bakteerien tai virusten havaitseminen ja yksilöiminen sekä niiden antimikrobiresistenttyyksien määrittäminen. Patogeenien havaitseminen nopeasti on tärkeää, sillä hoidon viivästyminen johtaa kohonneeseen kuolemanriskiin (Daniels 2011; Kumar ja muut 2006). Havaitsemisen lisäksi myös patogeenin riittävän tarkka tunnistaminen on tärkeää, sillä lääkehoidon teho saattaa olla heikko, jos taudinaiheuttaja on resistentti käytetylle lääkkeelle. Patogeenien lisääntyvä AMR, erityisesti bakteerien antibioottiresistenssi, on maailman terveysjärjestön mukaan yksi vakavimmista maailmanlaajuisista terveysuhista (World Health Organization 2015; World Health Organization 2018). Vaikka antibioottihoito on mullistanut bakteeri-infektioiden hoidon, on se samalla lisännyt lääkkeille resistenttejä kantoja. Laajakirjoinen antibioottihoito on houkutteleva ratkaisu erityisesti silloin, kun infektion aiheuttamaa patogeeniä ei tunneta. Haittapuolena hoito johtaa selektiopaineeseen resistenttien kantojen syntymiselle. (Daniels 2011; World Health Organization 2015; O'Neill 2016.) Joissain tapauksissa pelkkä kapeakirjoinen hoito voi olla tehokas vaihtoehto ja esimerkiksi virusten tapauksessa antibiooteista ei ole hyötyä (van Driel ja muut 2016; Sipilä ja Honkanen 2017). Antibioottihoitoa ei tule käyttää tarpeettomasti, jotta minimoidaan uusien resistenttien kantojen syntyminen, mutta toisaalta vakavien infektiosairauksien tapauksissa viivästynyt tai vääränlainen hoito voi johtaa kohonneeseen kuolemanriskiin (Rello ja muut 1997; Kumar ja muut 2006). AMR:n aiheuttamien haittojen torjumiseksi vaaditaan monia keinoja, joista yksi on nopeiden ja edullisten diagnostisten menetelmien kehittäminen kliinisen mikrobiologian käyttöön (World Health Organization 2015; Morel ja muut 2016; O'Neill 2016).

Perinteiset kliinisen mikrobiologian diagnostiset määritykset perustuvat usein viljelyyn. Se on edullinen, mutta aikaa vievä menetelmä, joka vaatii henkilökunnalta ammattitaitoa ja työhön soveltuvia laboratoriotiloja. Positiivisten tulosten saamisessa puhutaan nopeasti kasvavienkin patogeenien tapauksissa monista tunneista, yleensä yli vuorokaudesta ja negatiivisia tuloksia voidaan joutua odottamaan jopa viikkoja. Lisäksi spesifejä kasvuolosuhteita vaativien patogeenien, kuten tiettyjä isäntäsoluja vaativien virusten kasvattaminen on hankalaa, ellei jopa mahdotonta. (Doern 2000; Peters ja muut 2004; Fenollar ja Raoult 2007; Jorgensen ja Ferraro 2009; Hodinka ja Kaiser 2013; Waris ja muut 2017.) Viljelyä voidaan myös automatisoida, mutta vaikka automatisoidut järjestelmät vähentävät manuaalista työskentelyä, rajoittuu niidenkin nopeus patogeenien kasvunopeuteen. Lisäksi mikrobiologian automatisoinnin rajoitteena on laitteiston suuri investointikustannus ja koko, minkä vuoksi niitä käytetäänkin pääosin

kehittyneissä ja suurta kapasiteettia vaativissa keskuslaboratorioissa. Automaattien kasvuolosuhteiden määrä on myös rajallinen, mikä rajoittaa niillä viljeltävien patogeenien määrää. (Buchan ja Ledebøer 2014; Ledebøer ja Dallas 2014; Syal ja muut 2017.) Perinteisen viljelyn avuksi on noussut proteomiikassa paljon käytetty massaspektrometria, jonka avulla patogeeni voidaan tunnistaa suoraan viljelynäytteestä vertaamalla sen massaspekttriä tunnettuihin massaspektreihin. Mittausmenetelmä itsessään on nopea sekä tarkka ja vaikka se nopeuttaakin näytteiden analysointia perustuu se edelleen aikaa vievään viljelystä saatavaan näytteeseen. (Clark ja muut 2013; Buchan ja Ledebøer 2014.)

Muita kliinisessä mikrobiologiassa käytettyjä menetelmiä, jotka eivät välttämättä vaadi patogeenien viljelyä ovat muun muassa näytteen suora tai värjäyksen jälkeinen mikroskopointi sekä serologiset määritykset ja antigeeninosoitustestit. Nämä ovat nopeampia menetelmiä ja soveltuvatkin hyvin esimerkiksi seulontaan ja vieritestaukseen. Ne voivat ohjata sopivien jatkotestien valitsemisessa, mutta niiden spesifisyys ja herkkyys ovat viljelyyn perustuvia testejä huonompia. (Uhl ja muut 2003; Templeton ja muut 2005; Helb ja muut 2010; Chartrand ja muut 2015.) Näillä menetelmillä ei voi suoraan testata mikrobien resistenttiyttä, vaan siihen vaaditaan lähes aina viljelyyn pohjautuva menetelmä (Jorgensen ja Ferraro 2009; Syal ja muut 2017). Patogeenin AMR tai herkkyys tietylle lääkeaineelle määritetäänkin perinteisesti viljelyyn pohjautuvilla menetelmillä, kuten antimikrobisen aineen laimennossarjalla, maljapohjaisilla kiekkodiffuusiolla tai antibioottigradientin sisältävällä E-testillä (Jorgensen ja Ferraro 2009).

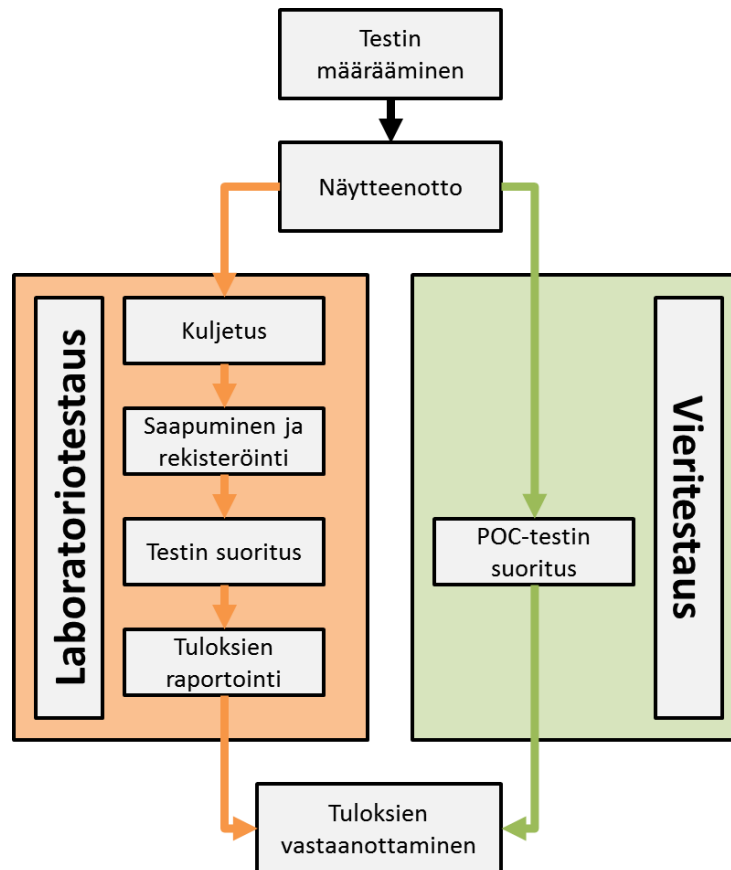
1.2 Nukleiinihapon monistustestit

Nukleiinihapon monistustestit (NAAT, engl. nucleic acid amplification test) ovat ehkä tunnetuin molekulaarisen diagnostiikan menetelmä. Ne ovat genotyyppiä määrittäviä testejä ja perustuvat patogeenin tiettyjen DNA- tai RNA-juosteiden monistamiseen ja monistetun tuotteen havaitsemiseen. Monistusvaihe on perinteisesti suoritettu polymeerasiketjureaktiolla (PCR, engl. polymerase chain reaction), jossa lämpötilanmuutosten avulla kontrolloidussa entsyymireaktiossa näytteestä eristettyjen DNA- tai RNA-juosteiden määrä kasvaa eksponentiaalisesti. Reaktion kesto on tyyppillisesti tunnista muutamaan, mutta nykyään markkinoilla on testejä, joiden suoritus aika on selvästi alle tunnin. Monistusvaihe tekee määrittämisestä erittäin herkän ja teoriassa NAATeilla voidaan havaita näytteestä jopa yksittäisiä patogeeneja, mikä mahdollistaa patogeenien havaitsemisen heti infektion alkuvaiheessa. (Gray ja Coupland 2014; Overbergh ja muut 2017.) Patogeenin genotyypin määrittämisen lisäksi testeillä voidaan määrittää myös AMR:n aiheuttavat geenit, jolloin samalla tekniikalla kyetään määrittämään sekä taudinaiheuttaja että sitä vastaan soveltuva lääkehoito. NAATeilla voidaan havaita myös hitaasti kasvavia sekä vaikeasti kasvatettavia patogeeneja, joista esimerkkeinä

ovat useat hengitystieinfektioita aiheuttavat virukset ja tuberkuloosia aiheuttava *Mycobacterium Tuberculosis*. (Peters ja muut 2004; Hodinka ja Kaiser 2013; Waris ja muut 2017; Chaisson ja muut 2018.) Genotyypin määrittämisellä on kuitenkin rajoitteensa, sillä se ei vastaa aina patogeenin fenotyyppiä. Esimerkiksi *Colstridium difficile* -bakteerin patogeenisyys riippuu myös ympäristöstä (Martin-Verstraete ja muut 2016). Lisäksi NAATEilla voidaan määrittää vain jo tunnettuja genotyyppisiä, eli niillä ei välttämättä kyetä havaitsemaan mutatoituneita patogeeneja tai uusia AMR:ää aiheuttamia geenejä. Uusien mekanismien havaitsemiseen tarvitaan fenotyyppiä testaava menetelmä kuten viljely. (Buchan ja Ledeböer 2014.) Rajoitteistaan huolimatta NAATit ovat kuitenkin nopeuden suhteen ylivoimaisia AMR:n määrittämisessä ja kun yleisimpien patogeenien genotyypit tunnetaan, voidaan NAATilla nopeuttaa huomattavasti diagnostisen testin suoritusaikaa, tarjota faktapohjaista tietoa päätöksenteon tueksi mahdollisimman aikaisessa vaiheessa hoitoprosessia ja tuottaa näin lisäarvoa terveydenhuollolle. Tämän vuoksi NAAT-pohjaiset määrytykset ovat varsin lupaavia menetelmiä sairaanhoidon ja diagnostiikan painopisteen siirtyessä lähemmäs potilasta, jossa helpoille ja nopeille diagnostisille testeille on kysyntää. (Price ja St John 2012; Danielson ja muut 2017; Sikaris 2017; Graf ja Pancholi 2020.)

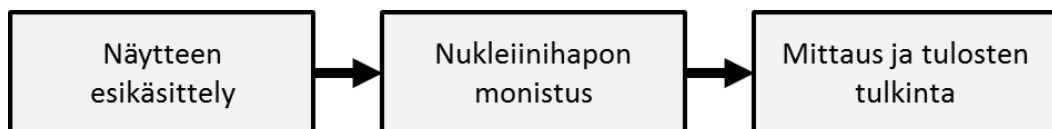
1.3 Vieritestauksen haasteet nukleiinihappodiagnostiikassa

Vieritestit ovat diagnostisia testejä, jotka suoritetaan lähellä potilasta. Vieritesti voidaan määrittellä testiksi, joka suoritetaan lähellä potilasta, kuten lääkärin vastaanotolla, terveyskeskuksessa tai jopa potilaan kotona, ja joka tuottaa tuloksen nopeasti. Testin on oltava nopeuden lisäksi mahdollisimman helppo tehdä, jotta se voidaan suorittaa luotettavasti laboratorio-olosuhteiden ulkopuolella ilman laajaa laboratoriokoulutusta. Myös potilaan itsensä tekemät testit, kuten diabeetikon tekemä verensokeripitoisuuden seuranta voidaan määrittellä vieritestiksi. Tuomalla IVD-testit lähemmäs potilasta säästytään ylimääräisiltä prosessin vaiheilta, kuten näytteiden kuljetukselta, mikä yksinkertaistaa testausprosessia (Kuva 1) lyhentäen siihen kuluva kokonaisaika. Vaikka tällaisen yksittäisen testin kustannus on usein selvästi suurempi kuin keskuslaboratoriotestin, voi vieritesti vähentää terveydenhuollon kokonaiskustannuksia juuri testin lyhyemmän kokonaisajan ansiosta, jolloin esimerkiksi antibioottihoidot voidaan räätälöidä sopivaksi empiiristen tulosten perusteella. Myös potilaiden kokemus terveydenhuollosta on parempi nopeita vieritestejä käytettäessä, mikä on yksi potilaskeskeisen terveydenhuollon tavoitteista. (Laurence ja muut 2010; Price ja St John 2012; Larsson ja muut 2015.)



Kuva 1. Laboratorio- ja vieritestausprosessien eroja kuvaava virtauskaavio. Kuva muokattu lähteistä (Price ja St John 2012; Larsson ja muut 2015)

Myös NAATien kehityksessä trendinä on entistä helppokäyttöisempien vieritesteiksi soveltuvien monianalyyttimääritysten ja laitteistojen kehittäminen. Haasteena on kuitenkin kaikkien NAATin työvaiheiden automatisointi ja yhdistäminen yhdeksi kokonaisuudeksi ja tämän kokonaisuuden pienentäminen vieritestaukseen sopivaksi. (Niemz ja muut 2011; St John ja Price 2014.) NAATin työvaiheet voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: näytteen esikäsittelyyn, nukleinihappojen monistukseen ja nukleinihappojen mittaus (Kuva 2) (Danielson ja muut 2017).



Kuva 2. NAATin vaiheet.

Näytteen esikäsittely on altis kontaminaatioille, jotka voivat haitata monistusreaktiota tai aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Se on monivaiheisuutensa vuoksi varsin työläs, mikä tekee vaiheen automatisoinnista ja määritysalustan koon pienenä pitämisestä myös haastavaa. Monistusvaiheessa erityisesti PCR:n vaatima tarkka lämpötilakontrolli ja energiantarve aiheuttavat haasteita vieritestejä suunniteltaessa. PCR:n sijaan voidaan käyttää myös muita

monistusreaktiota ja esimerkiksi isotermaalisista monistusreaktiosta onkin povattu PCR:n korvaajia vieritestauksessa. Mittausvaiheessa menetelmää rajoittaa havaittavien nukleiinihapposekvenssien määrä, eli kuinka monta eri sekvenssiä määrittämisellä kyetään havaitsemaan. Tyypillisesti monianalyyttimäärittäykseen kykenevien testien laitteiston monimutkaisuus ja koko riippuvat testattavien analyyttien määrästä, jolloin on tehtävä kompromissi laitteen koon ja testin laajuuden väliltä. (Dineva ja muut 2007; Niemz ja muut 2011; Buchan ja Ledebor 2014; St John ja Price 2014.)

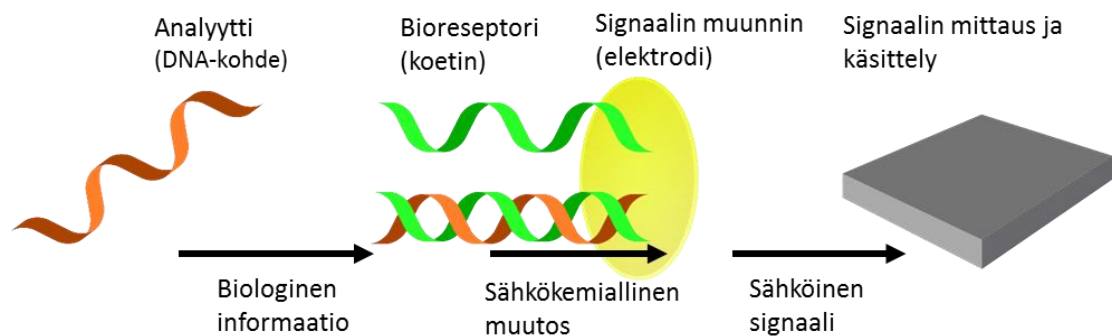
Moderneissa NAATeissa mittaus on toteutettu pääsääntöisesti fluoresoivien merkkiaineiden ja optisten lukulaitteiden avulla, joilla nukleiinihappo voidaan havaita suoraan monistusreaktiosta reaaliaikaisesti tai reaktion jälkeen päätepestemittauksena, kuitenkin suoraan reaktioastiasta. Näin näytettä ei tarvitse käsitellä enää monistusreaktion jälkeen, mikä potentiaalisesti yksinkertaistaa määrittäystä, lyhentää siihen kuluva työaika ja pienentää myös näytteiden välistä kontaminaatoriskiä. (Buchan ja Ledebor 2014; Gray ja Coupland 2014; Overbergh ja muut 2017.) Optinen menetelmä on herkkä ja spesifi, mutta mittaamiseen vaadittava optiikka tekee mittalaitteen rakentamisesta kallista ja se on hankala integroida pieneen kokoon, mikä on yksi tärkeimmistä vieritestin ominaisuuksista. Pienten ja edullisten optisten mittalaitteiden soveltuvuutta nukleiinihappodiagnostiikkaan rajoittaa niiden kyky mitata vain yhtä tai muutamaa analyyttiä kerrallaan. Näistä esimerkkinä visuaaliseen mittaukseen perustuva lateraalivirtauslastu ja isotermaalisen silmukavälitteisen monistusreaktion aiheuttama saostuma reaktioastiassa (Mori ja muut 2001; Meridian Bioscience 2018; Quidel 2018). Samasta reaktiosta mitattavien analyyttien määrä on myös kehittyneempien laitteistojen ongelma, sillä nykyisillä optisilla tekniikoilla samasta reaktiosta havaittavien leimojen määrä rajoittuu nykyisin noin kuuteen. Tätä useampien analyyttien määritykset vaativat monen rinnakkaisen reaktion suorittamista tai esimerkiksi mikrosirutekniikkaan perustuvaa mittaukseen, mikä joko lisää manuaalista työskentelyä tai vaatii monimutkaisemman ja kalliimman testilaitteiston. Nykyaikaiset joidenkin lähteiden mukaan vieritestiksi luokiteltavat tai nopeat NAATit kykenevät vain muutaman nukleiinihapon samanaikaiseen havaitsemiseen tai ovat pöytälaitteita, jotka vaativat jatkuvaa sähköä ja soveltuvatkin parhaiten sairaaloiden ja terveyskeskusten omiin laboratorioihin. (Craw ja Balachandran 2012; Danielson ja muut 2017; Niemz ja muut 2011; St John ja Price 2014.)

Pienen, käsikäyttöisen monianalyyttimäärittäykseen kykenevän NAATin kehittämiseksi on tutkittu monia vaihtoehtoisia mittausmenetelmiä, joista sähkökemiallinen mittaus on yksi lupaavimmista. Sähköisen signaalin mittaamiseen voidaan käyttää elektroniikkateollisuuden edullisia massatuotettuja elektroniikkakomponentteja. Tällainen mittalaite voidaan integroida osaksi koko määrittäyslaitetta ja pienen virrankulutuksen ansiosta siitä voidaan tehdä myös

akkukäyttöinen, jolloin laitetta voidaan käyttää myös haastavissa olosuhteissa, missä sähköä ei ole aina saatavilla. (Barbaro ja muut 2006; Kaisti ja muut 2016)

1.4 Nukleiinihappojen sähkökemiallinen mittaaminen

Nukleiinihappojen sähkökemiallisen mittaamisen peruseriaatetta voidaan kuvata sähkökemiallisen biosensorin määritelmällä, jossa biologinen informaatio siirtyy bioreseptorin ja signaalin muuntimen välityksellä mittalaitteelle. (Kuva 3) (Thévenot ja muut 2001). Muuntimena sähkökemiallisissa sensoreissa toimii liuokseen eli elektrolyyttiin fyysisessä kosketuksessa oleva elektrodi. Bioreseptori voi olla kiinnitettynä suoraan elektrodien pinnalle, sen läheisyyteen tai olla myös vapaana liuoksessa.



Kuva 3. Peruseriaate nukleiinihappojen sähkökemialliseen mittaamiseen. Vaihtoehtoisesti bioreseptori voi sijaita myös vapaana liuoksessa sen sijaan, että se on immobilisoitu kuvan mukaisesti elektrodin eli signaalin muuntimen pinnalle.

Biosensorit voidaan jakaa affiniteettisiin ja katalyyttisiin sensoreihin analyytin ja bioreseptorin välisen vuorovaikutuksen perusteella. Affiniteettisensorit perustuvat analyytin ja bioreseptorin välisen sitoutumisen havaitsemiseen, kun taas katalyyttiset sensorit perustuvat entsyymien katalysoiman reaktion havaitsemiseen. DNA-biosensorit perustuvat tyypillisesti sekvenssispesifiseen hybridisaatioon, jolloin bioreseptorina toimii DNA-kohteelle spesifinen nukleiinihappokoetin, johon kohde sitoutuu. Kyseessä on tällöin affiniteettibiosensori. (Ronkainen ja muut 2010.) PCR-reaktiota hyödyntävä biosensori voidaan mieltää affiniteettisensoriksi, jos mittausmenetelmä perustuu monistetun kohteen ja koettimen väliseen hybridisaatioon. PCR-reaktion etenemistä mittaava biosensori on luontevampaa luokitella katalyyttiseksi biosensoriksi.

Sähkökemiallisen signaalin mittaamisen tekniikat voidaan jakaa kolmeen kategoriaan, joita ovat amperometriset, potentiometriset ja impedimetriset tekniikat. Amperometrisissa tekniikoissa mitataan elektrodien läpi kulkevaa virtaa ajan funktiona. Elektrodien välinen jännite voidaan pitää vakiona, tai sitä voidaan muuttaa mittauksen aikana, jolloin puhutaan yleensä

voltammetriasta. Potentiometrinen mittaus taas perustuu tuntemattoman elektrodin potentiaalin mittaamiseen tunnettua referenssielektrodin potentiaalia vasten. Ideaalisen potentiometrin läpi ei kulje virtaa. Impedimetriset menetelmät mittaavat elektrodien ja väliaineen konduktanssia, impedanssia ja/tai kapasitanssia. Konduktanssia eli sähkönjohtavuutta mitataan tasavirralla, kun taas impedanssi tai kapasitanssi mitataan yleisesti vaihtovirralla. Impedanssimittaukset perustuvat yleensä impedanssin mittaamiseen vaihtovirran eri taajuuksilla, jolloin menetelmää kutsutaan sähkökemialliseksi impedanssispektroskopiaksi (EIS, engl. electrochemical impedance spectroscopy). Pelkkää kapasitanssia voidaan mitata myös stimuloimalla systeemiä yksittäisillä jännitepulsseilla. Tyypillisesti sähkökemialliseen mittaukseen käytetty kenno koostuu kolmesta elektrodista. Mitattavaa kohdetta kutsutaan työelektrodiksi. Kennon läpi johdettava virta kulkee työelektrodin lisäksi apu- tai vastaelektrodin läpi. Kolmannen referenssielektrodina toimivan läpi ei johdeta virtaa, vaan sen avulla vastaelektrodin potentiaali kiinnitetään tiettyyn pisteeseen. Työelektrodin potentiaali eli työ- ja vastaelektrodin välinen potentiaaliero säädetään suhteessa referenssielektrodin potentiaaliin. Tätä varten referenssielektrodin kemiallisen potentiaalin on oltava mahdollisimman vakio mittauksen olosuhteissa ja sen potentiaali on tunnettava entuudestaan. Kolmen elektrodin kennoon on luonnollisesti poikkeuksia. Esimerkiksi potentiometriassa voidaan käyttää vain työ- ja referenssielektrodia, koska elektrodien välillä ei ideaalisesti kulje virtaa. (Bard ja Faulkner 2001.)

DNA-biosensoreissa sähkökemiallinen signaali voidaan muodostaa monella eri tapaa, mikä vaikuttaa oleellisesti signaalin mittaamiseen parhaiten soveltuvaan mittaustekniikkaan. Hybridisaatioreaktioon perustuvissa affiniteettibiosensoreissa voidaan signaalin muodostamisessa hyödyntää optisten mittausten kaltaisia tekniikoita käyttämällä koettimeen kovalenttisesti konjugoitujen optisten leimojen tilalla hapetus-pelkistysreaktioon (redox, engl. reduction-oxidation) osallistuvia redox-yhdisteitä. DNA-koettiin konjugoitujen leimojen sijaan voidaan käyttää myös niin kutsuttuja leimavapaita tekniikoita, joissa koettimeen ei ole kiinnitetty merkkiainetta eli leimaa. Leimavapaissa sensoreissa merkkiaine voi olla vapaana reaktioliuoksessa tai sellaista ei käytetä ollenkaan, jolloin sensorilla mitataan suoraan DNA-kohdetta tai sen aiheuttamaa sähkökemiallista muutosta. Jälkimmäisiä on kutsuttu kirjallisuudessa hieman harhaanjohtavasti myös reagenssittomiksi biosensoreiksi, vaikka jo pelkästään signaalin välittämiseen käytetty bioreseptori tai reaktioliuos ovat reagensseja. (Thévenot ja muut 2001; Goda ja muut 2013.) Koettimia hyödyntävien biosensorien lisäksi DNA:ta voidaan havaita myös epäsuorasti mittaamalla PCR-reaktiossa monistuvan DNA:n määrää käyttämällä kaksoisjuosteeseen interkalatoituvia redox-yhdisteitä tai mittaamalla PCR-

reaktion etenemisestä johtuvaa paikallista pH:n muutosta (Deféver ja muut 2011; Toumazou ja muut 2013).

1.4.1 Amperometriset tekniikat

Virtaa mittaavissa menetelmissä on tyypillisesti kyse faradisen prosessin hyödyntämisestä, jolloin redox-reaktiossa siirtyvät elektronit mahdollistavat virran kulkemisen elektrodin ja elektrolyytin rajapinnan yli. Ilman redox-reaktiota rajapinnan yli ei kulje elektroneja, vaan se toimii kondensaattorin tavoin ja havaittu virta johtuu rajapintaan hakeutuvista tai sieltä poistuvista varauksista, elektrolyytin puolella liuoksessa olevista ioneista ja elektrodin puolella elektroneista. Kyseessä on tällöin rajapinnan kapasitanssin lataus- tai purkuvirta, joka on vain hetkellistä, koska rajapinnan kapasitanssi ja elektrolyytin ionien määrä on äärellinen. Amperometrisillä menetelmillä voidaan määrittää analyytin pitoisuus mittaamalla suoraan analyytin redox-reaktiota tai epäsuorasti käyttämällä erilisiä redox-reaktioon osallistuvia merkkiaineita. Faradayn lain mukaisesti redox-reaktiosta johtuva sähkövirta on suoraan verrannollinen reaktiossa siirtyvien elektronien määrään. (Bard ja Faulkner 2001.) Reaktioita voidaan myös ketjuttaa, jotta varsinaisen elektrodilla havaittavan redox-reaktion kemiallinen potentiaali on elektrolyytin kannalta optimaalinen eikä suuri positiivinen tai negatiivinen potentiaali aiheuta ylimääräisiä mittausta häiritseviä redox-reaktioita. Tästä esimerkkinä on tunnetuin amperometrasta mittausta hyödyntävä vieritesti eli verensokerimittari. Sormenpäästä otettavasta veripisarasta sokeripitoisuuden mittaavat laitteet perustuvat usein entsyymien katalysoimaan glukoosin redox-reaktioon. Glukoosioksidaasientsyymien laukaiseman reaktioketjun viimeisessä reaktiossa vetyperoksidi hapettuu elektrodilla ja reaktiossa siirtyneet elektronit mitataan elektrodin läpi kulkevana sähkövirtana, jonka suuruus on suoraan verrannollinen glukoosin pitoisuuteen (Guilbault ja Lubrano 1973).

Voltammetrisissa tekniikoissa virta mitataan kontrolloitujen jännitteen muutosten aikana. Näissä tekniikoissa hyödynnetään usein liuoksessa olevan merkkiaineen redox-reaktion aiheuttamaa virtaa tietyssä potentiaalissa. Reaktiosta aiheutuva virta havaitaan muutoksena jännite-virta-kuvaajassa ja virtapiikin sijainti potentiaaliakselilla riippuu reagoivan merkkiaineen reaktiopotentiaalista ja suuruus aineen konsentraatiosta. Käyttämällä merkkiaineina eri potentiaalissa reagoivia yhdisteitä, kyetään ne erottamaan toisistaan potentiaaliperusteella, jolloin samassa reaktiossa voidaan käyttää montaa merkkiainetta monianalyttimääritystä varten. Yksinkertaisimmillaan virtapiikki havaitaan pyyhkäisemällä jännite edestakaisin tietyn alueen yli. Syklisen voltammetrian lisäksi biosensoreissa voidaan käyttää esimerkiksi kanttiaaltovoltammetriaa (SWV, engl. square wave voltammetry). SWV:ssä jännitepyyhkäisyn päälle lisätään amplitudiltaan pieni kanttiaalto, jonka avulla voidaan erottaa faradinen ja

kapasitiivinen sähkövirta toisistaan. Näin pystytään havaitsemaan pienempiä faradisia virtoja ja mittaamaan pienempiä redox-yhdisteiden konsentraatioita. (Bard ja Faulkner 2001; Deféver ja muut 2011; Yan ja muut 2016.)

Amperometrisissa DNA-biosensoreissa redox-yhdisteenä voidaan käyttää esimerkiksi DNA-juosteeseen interkalatoituvia yhdisteitä (Pan ja muut 2007; Deféver ja muut 2011; Hsieh ja muut 2012). Esimerkiksi ranskalaisen Easy Life Sciencen PCR-reaktion reaaliaikaiseen seuraamiseen kehitetty DetScan® -teknologia perustuu DNA:n kaksoisjuosteeseen interkalatoituvaan $Os[(bpy)_2DPPZ]^{2+}$ -ioniin. PCR-reaktion edetessä vapaan redox-yhdisteen määrä liuoksessa vähenee sen interkalatoituessa DNA:n kaksoisjuosteeseen, jolloin SWV-tekniikalla mitattava redox-reaktion virtapiikki pienenee. Käytännössä menetelmä vastaa yleisesti molekyylibiologiassa käytettäviä optisesti havaittavia merkkiaineita, kuten SYBR Greeniä hyödyntäviä menetelmiä ja niiden tavoin DetScan® -teknologia soveltuu niin monistusreaktion reaaliaikaisen seuraamisen kuin sulamislämpöanalyysiin (Deféver ja muut 2011; Martin ja muut 2016; Easy Life Sciences 2018). Samankaltaista menetelmää on hyödynnetty myös isotermaalisen monistusreaktion reaaliaikaisessa seuraamisessa, missä interkalatoituvana redox-yhdisteenä käytettiin metyleenin sinistä (Hsieh ja muut 2012). Interkalatoituviin merkkiaineisiin perustuvat menetelmät kärsivät kuitenkin samoista heikkouksista riippumatta signaalin mittausmenetelmästä. Vieritestaukseen soveltuvien monianalyyttimääritysten kehittäminen näillä menetelmillä on haastavaa, sillä monen eri analyytin havaitseminen vaatii joko monistustuotteiden tarkkaa erottelua sulamislämpöanalyysin avulla, mikä vaatii tarkkaa lämpötilakontrollia, tai useamman rinnakkaisen reaktion ajamisen, mikä voi kasvattaa laitteen kokoa ja lisätä sen monimutkaisuutta. Lisäksi redox-yhdisteet interkalatoituvat kaikkiin liuoksessa oleviin DNA:n kaksoisjuosteisiin, mikä voi johtaa väärin positiivisiin tuloksiin kontaminaation ja epäspesifisen monistumisen vuoksi.

Amperometrisen mittausmenetelmän spesifisyyden parantamiseksi elektrodille voidaan immobilisoida koettimia ja käyttää menetelmää, jossa vain koettimiin spesifisesti sitoutuvat DNA-kohteet aiheuttavat mitattavan muutoksen signaalissa. Esimerkiksi Xiao ryhmiseen (2006) hyödynsi elektrodille pinnoitetun primäärisen koettimen lisäksi sekundääristä redox-yhdisteellä konjugoitua koetinta, joka on osittain sitoutunut primäärikoettimeen. Spesifinen DNA-kohde syrjäyttää osittain sekundäärisen koettimen sitoutuessaan primääriseen koettimeen. Syrjäytetyn sekundäärikoettimen vapaa pää, jossa redox-yhdiste on, pääsee taipumaan lähemmäs elektrodin pintaa, mikä havaitaan voltammetrisesti faradisen virtapiikin kasvuna. Yeung ryhmiseen (2007) käytti PCR-reaktion reaaliaikaiseen seuraamiseen koettimen lisäksi ferroseenillä konjugoituja uridiini-nukleosidejä. PCR-entsyymi monistaa koettimeen hybridisoitunutta templaattia ja pidentää myös koetinta, joihin leimatut nukleosidit liittyvät,

jolloin ferroseenin pitoisuus elektrodin välittömässä läheisyydessä kasvaa ja koettimen sekä monistetun templaatin redox-yhdisteet havaitaan voltammetrisesti.

GenMark Diagnosticsin ja Binx Healthin laitteet ovat esimerkkejä täysin automatisoiduista NAAT-määritysalustoista, jotka käyttävät koettimiin kiinnitettyjä ferroseenipohjaisia redox-yhdisteitä ja voltammetrista mittausmenetelmää. Kummassakin laitteessa mittaus tehdään monistusreaktion jälkeen päätepestemittauksena. (Umek ja muut 2001; Pearce ja muut 2011; Binx Health 2019; GenMark Diagnostics 2019.) GenMark Diagnosticsin ePlex[®] ja vanhempi XT-8 perustuvat molemmat Motorolan kehittämään mittausteknologiaan, joka hyödyntää elektrodille pinnoitetun primäärikoettimen lisäksi ferroseenillä konjugoituja sekundäärikoettimia. Toisiinsa spesifisesti sitoutuneet DNA-kohde ja sekundäärikoetin muodostavat primäärikoettimen kanssa kompleksin, jolloin sekundäärikoettimen ferroseenileimat ovat riittävän lähellä elektrodia, jotta redox-reaktio voi tapahtua. Koettimien lisäksi elektrodien pintaan on immobilisoitu eristeenä toimivia PEG-molekyylejä ja eräänlaisina molekyylijohtimina toimivia fenyyliasetyleenikonjugaatteja, joiden avulla vapaiden ferroseenileimojen aiheuttama taustasignaali on saatu minimoitua, mikä mahdollistaa DNA-kohteen havaitsemisen ilman hybridisaation jälkeistä pesuvaihetta. Määritysteknologialla on kyetty suorittamaan myös monianalyyttimäärityksiä kasvattamalla eri koetinsekvensseillä pinnoitettujen elektrodien määrää reaktiossa. (Umek ja muut 2001.) ePlex[®] on täysin automatisoitu kliinisen laboratorion määritysalusta, joka suorittaa näytteen esikäsittelyn, monistuksen ja nukleiinihappojen mittauksen samassa suljetussa kasetissa ilman manuaalisia työvaiheita näytteen lisäystä lukuun ottamatta. Helppokäyttöisyydestä huolimatta laitteen lähes 50 kilon paino rajoittanee sen käyttöä kliinisten laboratorioiden ulkopuolella. (GenMark Diagnostics 2019.)

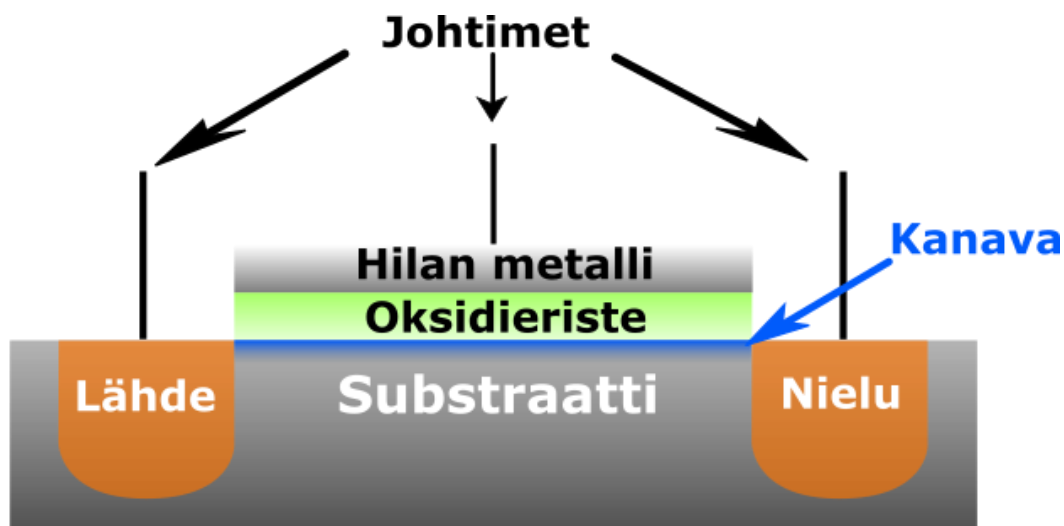
Binx Healthin, entisen Atlas Geneticsin io[®] system -määritysalusta ei perustu elektrodin pinnalle immobilisoituun koettimeen, vaan käyttää vapaita leimattuja koettimia. Koettimet hybridisoidaan templaattiin PCR-reaktion lopussa, minkä jälkeen kaksoisjuoste pilkotaan eksonukleaasin avulla yksittäisiksi nukleotideiksi. Leimatut nukleotidit kulkeutuvat elektrodille, jolla ne voidaan havaita ja erottaa differentiaalipulssivoltammetrialla kokonaisista leimatuista koettimista näiden hitaamman diffuusion ja adsorptioon liittyvien rajoitteiden ansiosta. Käyttämällä leimoina eri potentiaalissa reagoivia ferroseenijohdannaisia voidaan laitteella tehdä monianalyyttimääritys yksittäisellä elektrodilla ja lisäksi testattavien analyyttien määrä voidaan vielä moninkertaistaa jakamalla PCR-reaktiossa monistetut tuotteet useampaan mittauskammioon. Laite suorittaa kaikki NAATin vaiheet automaattisesti ja valmistajan mukaan kykenee tuottamaan tuloksen jopa 30 minuutissa. (Pearce ja muut 2011; Binx Health 2019.)

Genefluidics on ottanut hieman erilaisen lähestymistavan nukleiinihappojen mittaamiseen. Sensori perustuu bakteerien 16S ribosomaalisen RNA:n havaitsemiseen, eikä se hyödynnä määrittämissään ollenkaan monistusreaktiota. Bakterisolusta vapautettu RNA hybridisoidaan fluoreseiinilla konjugoituun sekundäärikoettiin ja kohde-koetin-kompleksi hybridisoidaan elektrodin pinnalle immobilisoituun primäärikoettiin. Antifluoreseiinivasta-aineella konjogoitu piparjuuriperoksidaasientsyymi sitoutuu lopuksi sekundäärikoettimen fluoreseiiniin. Entsyymi katalysoi liuoksessa olevan vetyperoksidin redox-reaktiota, jota seuraava redox-reaktioiden ketju päättyy tetrametyylibensidiinin redox-reaktioon elektrodilla. Tetrametyylibensidiinin redox-reaktio mitataan amperometrisesti vakipotentialiin asetetulla elektrodilla. (Gau ja muut 2001; Sun ja muut 2005; Liao ja muut 2007.) Sensorilla on kyetty havaitsemaan myös patogeenin AMR pohjautuen bakteerin fenotyyppiin kasvattamalla niitä ensin kaksi tuntia antibioottia sisältävällä kasvumaljalla ja mittaamalla bakteerin kasvu RNA:n määrään perustuen (Mach ja muut 2011).

1.4.2 Potentiometria kanavatransistorilla

Potentiometriä käytetään tyypillisesti ionin konsentraation mittaamiseen hyödyntämällä ioniselektiivisiä elektrodia. Elektrodi on herkkä vain tietyille tai tietyille ioneille, jotka muuttavat elektrodin potentiaalia kulkeutuessaan elektrodin pinnalle. Potentialin muutos riippuu ionin konsentraatiosta. Ioniselektiivisen elektrodin potentiaalia verrataan tunnetun referenssielektrodin potentiaaliin ja tästä erotuksesta voidaan laskea ioniselektiivisen elektrodin todellinen potentiaali. Esimerkiksi pH-mittari on H⁺-ioneita mittaava potentiometri. Perinteiset ioniselektiiviset elektrodit ovat varsin kookkaita, koska ne vaativat sisäisen referenssiluoksen ja ovat rakenteeltaan monimutkaisia sekä kookkaita. Niiden lisäksi on kehitetty esimerkiksi pelkällä ioniselektiivisellä kalvolla päällystetty metallielektrodi ja kanavatransistoriin (FET, engl. field-effect transistor) pohjautuva ioniselektiivinen kanavatransistori (ISFET), joista kumpikaan ei tarvitse erillistä referenssiluosta toimiakseen (Bergveld 1970; Cattrall ja Freiser 1971). Erityisesti FET-pohjaiset sensorit ovat keränneet paljon huomiota niin nukleiinihappojen mittaamisessa kuin muiden kemiallisten ja biokemiallisten sensoreiden kehityksessä, koska niiden integrointi muun elektroniikan kanssa on vaivatonta. Ne ovat pienikokoisia, edullisia ja niitä pystytään massatuottamaan jo olemassa olevilla valmistusprosesseilla (Bergveld 2003; Poghossian ja Schöning 2014; Kaisti 2017).

FET on puolijohdeista valmistettu elektroninen komponentti, transkonduktanssivahvistin, minkä läpi kulkevan sähkövirran suuruus riippuu hilalle tuodusta potentialista. Yleisesti käytetty metallioksidi-puolijohde-rakenteeseen (MOS, engl. metal-oxide-semiconductor) perustuva MOSFET on rakenteeltaan Kuva 4 kaltainen.



Kuva 4. MOSFETin rakenne.

MOSFETin nielu ja lähde koostuvat joko n- tai p-tyyppin puolijohdeesta ja substraatti näille vastakkaisesta puolijohdeesta. Niiden lisäksi rakenteeseen kuuluu oksidieriste ja sen päällä oleva metallihila. Hilalle tuotava jännite luo sähkökentän oksidieristeen yli, mikä muodostaa substraatin varauksenkuljettajista lähteen ja nielun välille kanavan, jota pitkin sähkövirta kulkee. Hilan potentiaalin ja kanavan sähkövirran muutosten suhdetta kuvataan kaavalla

$$g_m = \Delta I_D / \Delta E_G,$$

jossa g_m on transkonduktanssi, I_d nieluvirta ja E_G hilan jännitteen eli sähkökentän potentiaali.

Bergveldin (1970) kehittämän ISFETin rakenne on muutoin MOSFETin kaltainen, mutta metallinen hila on poistettu, jolloin oksidieriste on joko suoraan kontaktissa elektrolyyttiin tai sen päälle on tehty ohut ioniselektiivinen kalvo. Yksinkertaistettuna hilan, eli tässä tapauksessa oksidieristeen potentiaalin muutos ΔE_G määräytyy tällöin sen pinnalle muodostuvan ionien kokonaisvarauksen suuruudesta σ_0 ja varausten kaksoiskerroksen C_{DL} (engl. double-layer capacitance) sekä FETin C_{FET} kapasitanssista kaavan

$$\Delta E_G = \frac{\Delta \sigma_0}{C_{DL} + C_{FET}}$$

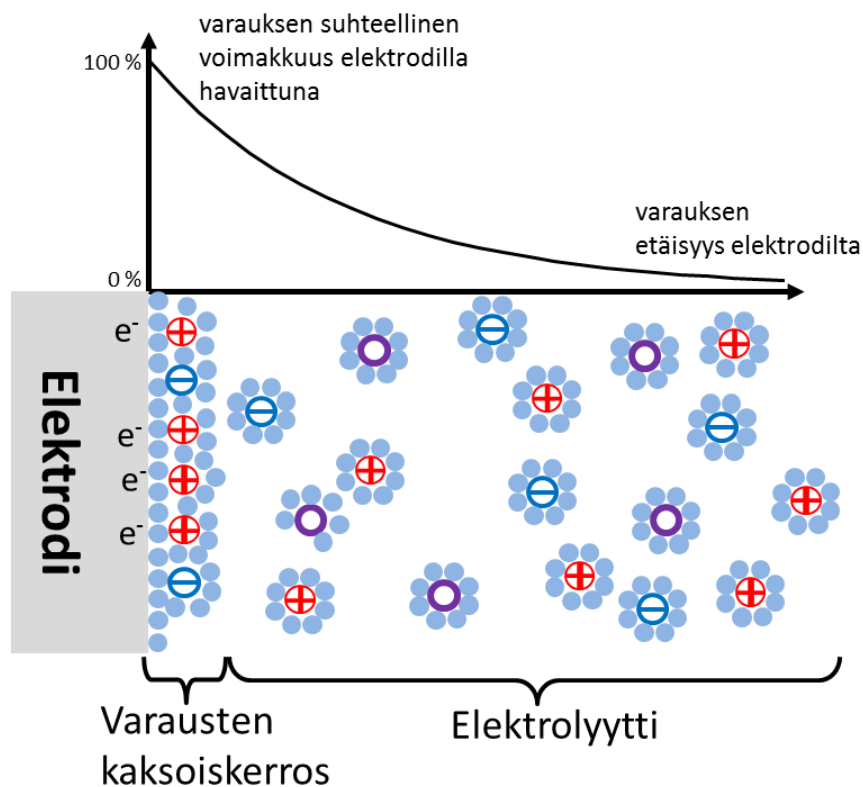
mukaan (Kaisti 2017). Varaus σ_0 voidaan jakaa kahteen osaan, kaksoiskerroksen ioneista muodostuvaan potentiaaliin ja oksidin pinnan varaukseen sitoutumispaikkateorian (engl. site binding theory) mukaan. Oksidin varaus on altis pH:n muutoksille ja sen herkkyys riippuu pinnan puskurointikapasiteetista. Ominaisuutta voidaan hyödyntää pH:n mittaamiseen ja muuttamalla FETin pintamateriaalia voidaan mitata myös muita ioneja. (Veigas ja muut 2015; Kaisti 2017.) ISFETin, jossa elektrolyytti on suoraan yhteydessä FET-rakenteeseen, sijaan voidaan sensorin pinta myös erottaa signaalin muuntimesta ja valmistaa ne erillään omilla valmistusprosesseilla. Sensorin pinta voidaan yhdistää FETin hilaan metallisella johtimella, jolloin signaalin

muuntimena toimii normaali MOSFET. Rakennetta kutsutaan jatkettun hilan FETiksi (EGFET, engl. extended gate FET). (van der spiegel ja muut 1983.) Näin sensorin pinta ja FET voidaan valmistaa erillään toisistaan ja valmistukseen käyttää kummallekin optimaalisinta valmistusteknologiaa, jolloin myös monta erilaista pintaa ja/tai bioreseptoria sisältävien sensorimatriisien valmistus monianalyyttimäärityksiä varten on helpompi optimoida. (van der spiegel ja muut 1983; Kamahori ja muut 2007; Kaisti 2017.) ISFETin ja EGFETin lisäksi on kehitetty monia muita kenttävaikutukseen perustuvia sensorirakenteita, niin MOS-rakenteeseen pohjautuvia kuin esimerkiksi nanoteknologian mahdollistamia grafeeni- ja piinanojohtosensoreita, mutta niiden kaikkien läpikäyminen ei ole tarkoituksenmukaista tämän työn laajuudessa (Poghossian ja Schöning 2014; Xu ja muut 2014; Veigas ja muut 2015; Zhang ja Lieber 2016; Kaisti 2017).

Biomolekyylien mittaaminen perustuu tyypillisesti niiden aiheuttamaan potentiaalilin muutokseen varausten kaksoiskerroksessa, jolloin ei käytetä muita merkkiaineita signaalin välittämiseen elektrodille. Menetelmän rajoitteena on nesteessä olevien muiden varausten eli ionien aiheuttama sähköisen vuorovaikutuksen heikkeneminen etäisyyden kasvaessa (Kaisti 2017). Kuva 5 on yksinkertaistettu kuvaus varausten kaksoiskerroksesta ja varauksen suhteellisen voimakkuuden heikkenemisestä etäisyyden funktiona. Tätä sähköisen varauksen vaikutuksen heikkenemistä kuvataan Debyen pituudella ja yksinkertaisella eksponentiaalisella suhteella e^{-x/λ_D} , jossa x on etäisyys ja λ_D on Debyen pituus. Debyen pituus voidaan laskea kaavan

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r kT}{2N_A q^2 I}}$$

perusteella, jossa ϵ_0 on tyhjiön permittiivisyys, ϵ_r elektrolyytin suhteellinen permittiivisyys, T lämpötila, k Boltzmannin vakio, N_A Avogadron vakio, q alkeisvaraus ja I elektrolyytin ionivahvuus. Esimerkiksi +20 °C lämpötilassa ja käyttämällä veden suhteellisen permittiivisyyden arvona 80, saadaan 10 mM ionivahvuudella Debyen pituudeksi 3 nm ja 100 mM ionivahvuudella pituudeksi 1 nm. Kaksoisjuosteisen DNA:n halkaisija on noin 2 nm ja juosteen peräkkäisten nukleotidien välinen etäisyys on noin 0,34 nm (Crick ja Watson 1954). Elektrolyytin ionivahvuuden vaikutus Debyen pituuteen onkin yksi suurimmista haasteista biomolekyylien havaitsemiseen FET-sensoreilla, sillä erityisesti biologisissa näytematriiseissa ionivahvuus on varsin suuri (Huang ja muut 2015; Kaisti ja muut 2017).



Kuva 5. Yksinkertaistettu esitys varauksen kaksoiskerroksesta elektrodin ja elektrolyytin rajapinnassa, sekä varauksen suhteellinen voimakkuus muiden varauksen peittovaikutuksen seurauksena. Isot ympyrät esittävät liuenneita yhdisteitä, varautuneita ja varauksettomia. Pienet ympyrät esittävät vesimolekyylejä.

Nukleiinihappojen mittaustekniikat perustuvat yleensä DNA:n fosfaattirungon negatiivisten varauksen aiheuttamaan muutokseen hilaelektrodin kaksoiskerroksen potentiaalissa. DNA-kohteen suora havaitseminen mahdollistaa leimavapaan ja mahdollisesti yksinkertaisen sekä halvan tavan havaita nukleiinihappoja. (Schöning ja Poghossian 2002; Barbaro ja muut 2006; Kaisti 2017.) Mittausmenetelmien spesifisyys perustuu tyypillisesti elektrodille immobilisoituun koettiin ja sekvenssispesifiseen hybridisaatioon. Koetin voidaan immobilisoida elektrodille horisontaaliseen asentoon sähköisillä vuorovaikutuksilla, jolloin koetin ja siihen kiinnittyvä kohde makaavat mahdollisimman lähellä elektrodia. Tekniikalla pyritään välttämään elektrolyytin varauksia peittävä vaikutus, mutta horisontaalisesti makaava koetin mielletään affiniteetiltään huonoksi. Tämän vuoksi yleensä käytetäänkin vain toisesta päästä vertikaaliseen asentoon immobilisoituja koettimia. (Ingebrandt ja Offenhausser 2006; Veigas ja muut 2015; Kaisti 2017.) Koetin immobilisoidaan yleensä kovalenttisesti ja käytetty kiinnitystapa riippuu pitkälti elektrodin pintamateriaalista. Kulta ja siihen sitoutuvat tioliryhmät ovat yleisesti käytetty elektrodin pinnoitusmenetelmä (Kamahori ja muut 2007; Cao ja muut 2013; Goda ja muut 2013; Kaisti ja muut 2017). Muita elektrodipintoja ja pinnoitusmenetelmiä ovat esimerkiksi grafeeni ja grafeenioksidi sekä niihin kiinnittyvät pyreenijohdannaiset ja piioksidi sekä silaanijohdannaiset

(Bunimovich ja muut 2006; Zhang ja muut 2010; Cai ja muut 2014; Xu ja muut 2017). Koettimen orientaation lisäksi koettimien tiheys elektrodin pinnalla vaikuttaa oleellisesti hybridisaatiotehokkuuteen. Liian suuri tiheys voi aiheuttaa steerisiä esteitä ja viereisten DNA-kohteiden ja -koettimien fosfaattiryhmien negatiivisista varauksista aiheutuvia sähköisiä hylkiviä voimia, mitkä heikentävät sensorin hybridisaatiotehokkuutta ja sitä kautta sen suorituskykyä. (Steel ja muut 1998; Keighley ja muut 2008.)

Elektrolyytin ionien aiheuttamaa DNA:n varauksia peittävää vaikutusta pyritään usein kiertämään mittaamalla sensorin vastetta matalassa ionivahvuudessa. Matala ionivahvuus saattaa kuitenkin heikentää hybridisaatiotehokkuutta, koska tehokas DNA-juosteiden välinen hybridisaatio tarvitsee ioneita kompensoimaan juosteiden fosfaattirunkojen negatiivisia varauksia. Hybridisaatioaikaa pidentämällä sensorin käytettävyys kärsii, minkä vuoksi se ei ole kovinkaan mielekäs vaihtoehto. Hybridisaatio voidaan suorittaa korkeassa ionivahvuudessa, minkä jälkeen elektrodi pestään ja mittaus suoritetaan matalassa ionivahvuudessa. (Cao ja muut 2013; Xu ja muut 2014) Vaiheiden lisääminen kuitenkin monimutkaistaa menetelmää ja tekee reaaliaikaisen mittauksen mahdottomaksi. Kamahori työryhmineen (2007 ja 2008) nopeutti FET-mittausta syöttämällä referenssielektrodille korkeataajuuksista vaihtovirtaa, jonka avulla he pystyivät mittaamaan hybridisaation myös suhteellisen korkeassa ionivahvuudessa. Mittaus tehtiin kuitenkin vaiheittain pesemällä sitoutumaton DNA-kohde pois ennen mittausta. Vaihtovirtaa voidaan käyttää myös varausten kaksoiskerroksen ja peittovaikutuksen ehkäisemiseksi, kun vaihtovirran taajuus on riittävän suuri. Näin kyetään mittaamaan myös kauempana elektrodilta olevia varauksia, mutta menetelmä vaatii varsin kehittyneen ja tarkkaan suunnitellun kokoonpanon, jotta mittaus on mahdollinen. (Lemay ja muut 2016; Kaisti 2017.) Hybridisaation tehostamiseksi matalassa ionivahvuudessa voidaan DNA-oligojen sijaan käyttää myös muita DNA-analogeja, kuten morfoliinoja tai peptidinukleiinihappoja (PNA, engl. peptide nucleic acid), joiden rungon varaus on neutraali. Neutraalin varauksen ansiosta esimerkiksi PNA-koettimen affiniteetti on matalassa ionivahvuudessa suurempi kuin vastaavan DNA-koettimen, minkä vuoksi se onkin varsin mielenkiintoinen vaihtoehto nukleiinihappojen sähkökemialliseen mittaamiseen. (Park ja muut 2007; Zhang ja muut 2010; Cai ja muut 2014.)

Peittovaikutuksen asettamia haasteita on pyritty kiertämään havaitsemalla DNA:ta myös epäsuorasti. Ehkäpä tunnetuin esimerkki on ISFETin pH-herkkyyttä hyödyntävä sensori, jolla havaittiin PCR-reaktiossa vapautuvien protonien aiheuttama paikallinen pH:n muutos. Toumazou työryhmineen (2013) kehitti ISFET-sensoriin pohjautuvan laitteen, joka kykeni mittaamaan PCR-reaktiota reaaliaikaisesti. Laitteen ISFET-sensorimatriisi valmistettiin komplementaarilla MOS-valmistusprosessilla ja se sisälsi sekä pH-signaalin mittaamiseen, että PCR:n lämpösykliin luomiseen tarvittavat osat. Tutkimuksessa laitetta käytettiin onnistuneesti

sekä PCR- että isotermaalisen monistusreaktion havaitsemiseen. DNA Electronics on kaupallistanut mittausteknologian ja sitä on hyödynnetty myös uuden sukupolven sekvensointilaitteen (NGS, engl. next-generation sequencing) kehittämisessä. Yritys kehittää teknologiaan perustuvaa täysin automatisoitua NAAT-määrittäystä LiDia-SEQ™:a, joka mahdollistaa DNA Electronicsin mukaan mikrobien ja AMR:n havaitsemisen suoraan verinäytteestä 3–4 tunnissa. (DNA Electronics 2019.) Yritys on myös lisensoinut teknologian ja Rothberg työryhmineen (2011) on kehittänyt Thermo Fisher Scientificin (2019) kaupallistaman ISFET-teknologiaan perustuvan tutkimuskäyttöön suunnatun NGS-laitteen, Ion Torrentin.

1.4.3 Impedanssispektroskopia

Biosensoreissa impedimetrisillä menetelmillä voidaan havaita esimerkiksi analyytin sitoutuminen elektrodin pinnalla olevaan bioreseptoriin tai tutkia entsyymillä katalysoidun redox-reaktion kinetiikkaa. Impedimetrisistä menetelmistä EIS on monipuolisuutensa vuoksi yksi käytetyimmistä tekniikoista elektrodin pinnan ja sillä tapahtuvien muutosten tutkimiseen. Mittaamalla sähkökemiallisen kennon impedanssia eri vaihtovirran taajuuksilla saadaan tietoa sekä systeemin resistiivisistä että kapasitiivisistä ominaisuuksista. Impedanssispektrin avulla voidaan määrittää kennon staattisia ja dynaamisia ominaisuuksia, mikä kertoo enemmän kuin pelkän konduktanssin tai kapasitanssin mittaaminen. EIS:ä käytetäänkin usein myös biosensorin karakterisoinnissa ja sensorin valmistusvaiheessa todentamaan immobilisaation onnistuminen. (Bard ja Faulkner 2001; Katz ja Willner 2003.) EIS voidaan jakaa karkeasti kahteen tekniikkaan, faradiseen ja ei-faradiseen impedanssin mittaukseen. Ei-faradisessa mittauksessa kyseessä on kapasitiivisesta mittauksesta, missä elektrodin pinta käyttäytyy kondensaattorin tavoin. Faradisessa mittauksessa hyödynnetään redox-yhdisteitä amperometristen menetelmien tapaan, jolloin kapasitiivisen sähkövirran lisäksi syntyy myös faradista sähkövirtaa redox-reaktion seurauksena. EIS-mittauksissa redox-yhdisteet ovat yleensä vapaina yhdisteinä elektrolyytissä. (Bard ja Faulkner 2001; Katz ja Willner 2003.)

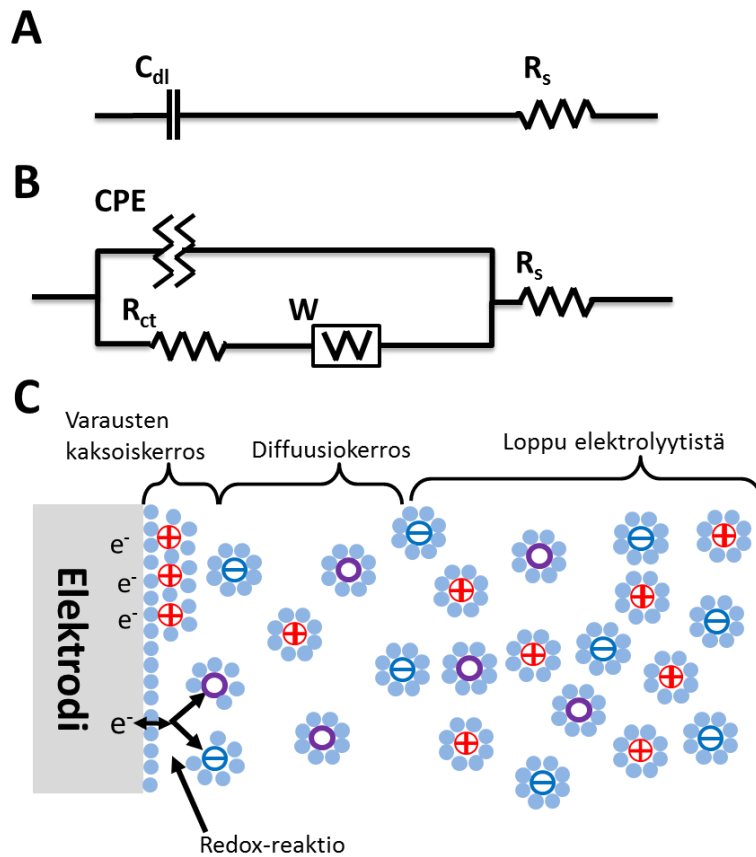
EIS-mittauksessa käytetään tyypillisesti kolmen elektrodin kennoa. Työ- ja vastaelektrodi lukitaan haluttuun potentiaaliin, minkä jälkeen elektrodeja stimuloidaan pienellä, amplitudiltaan tyypillisesti 5-10 mV vaihtovirralla. Stimuloinnin aikana mitataan elektrodien läpi kulkeva virta, jonka perusteella lasketaan impedanssi. Mittaus toistetaan halutuilla vaihtovirran taajuuksilla, minkä jälkeen mitatuista impedansseista voidaan muodostaa spektri taajuuden funktiona. Impedanssi on kompleksiluku ja kemiallisissa systeemeissä sekä sen vaihe että suuruus ovat riippuvaisia vaihtovirran taajuudesta. (Bard ja Faulkner 2001.)

EIS:ssä mittaustuloksia analysoidaan yleensä mallintamalla impedanssispektriä sitä vastaavalla sähköpiirillä, joka koostuu ideaalisista piiriteorian komponenteista ja myös kokeellisesti

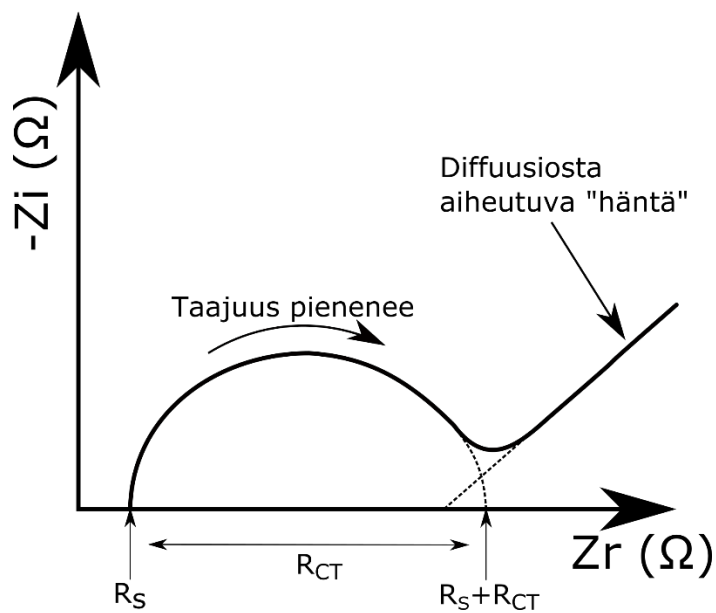
määritetyistä malleista. Kukin komponentti vastaa jotain systeemissä tapahtuvaa fysikaalista prosessia, jolloin mallin avulla piirin komponenteille saadaan arvot ja näiden perusteella voidaan määrittää myös fysikaalisten prosessien arvot. Ei-faradista systeemiä voidaan mallintaa sarjaan kytkettynä RC-piirinä, jossa vastus R_s (engl. solution resistance) kuvaa elektrolyytin resistanssia ja kondensaattori C_{DL} kaksoiskerroksen kapasitanssia. Yksinkertaista faradista systeemiä voidaan kuvata Randlesin piirillä, jossa RC-piirin kondensaattorin rinnalle on kytketty toinen vastus R_{CT} (engl. charge transfer resistance) ja niin kutsuttu Warburgin impedanssi W . Randlesin piiristä käytetään yleensä kuitenkin muokattua versiota, jossa kondensaattori C_{DL} on korvattu vakiovaihe-elementillä CPE (engl. constant phase element). R_{CT} kuvaa elektrodin ja elektrolyytin rajapinnan aiheuttamaa resistanssia redox-reaktiolle, jota kutsutaan elektroninsiirtoresistanssiksi. Toisin sanoen sen perusteella voidaan määrittää redox-reaktion nopeus. Warburgin impedanssilla kuvataan matalilla taajuuksilla esiintyvää redox-yhdisteiden diffuusiosta johtuvaa reaktion hidastumista. CPE:llä voidaan kuvata elektrodin epätasaisesta geometriasta johtuvaa epäideaalista kapasitanssia paremmin kuin ideaalisen kondensaattorin impedanssi. CPE:n impedanssi Z lasketaan kaavan

$$Z = \frac{1}{j * Q * \omega^n}$$

mukaan, jossa j on imaginääriyksikkö, Q on CPE:n arvo, ω taajuus ja n on CPE:n vaihekulma. Vaihekulman arvo on välillä $1 - 0$ ja kun se saa arvon 1 , vastaa CPE käytännössä ideaalista kondensaattoria ja Q sen kapasitanssia. (Katz ja Willner 2003.) Kuva 6 on havainnollistettu edellä mainittujen piirien piirikaaviot ja kuvattu muokatun Randlesin piiriä vastaavan faradinen prosessi ja varausten kaksoiskerros elektrodin pinnalla. Kuva 7 on havainnollistettu Randlesin piirin impedanssi Nyquistin kuvaajassa. Kuvaajassa R_{CT} :n arvo vastaa puoliympyrän halkaisijaa ja R_s :n arvo puoliympyrän alun etäisyyttä y-akselista. Warburgin impedanssin eli diffuusion vaikutus redox-reaktioon ja mitattuun impedanssiin havaitaan kuvaajassa noin 45 asteen "häntänä".



Kuva 6. EIS-mittauksissa käytetyn A) Ei-faradista impedanssia kuvaava RC-sähköpiiri ja B) faradista impedanssia kuvaava muokattu Randlesin piiri, sekä C) yksinkertaistettu kuva elektrodin ja elektrolyytin rajapinnasta faradisessa EIS-mittauksessa.



Kuva 7. Randlesin piirin impedanssi kuvattu Nyquistin kuvaajassa. X-akselilla on impedanssin reaaliosa ja y-akselilla imaginääriosan vastaluku. Piirin R_{CT} -arvo vastaa kuvaajassa puoliympyrän halkaisijaa ja ympyrän alkukohdan etäisyys y-akselista R_s :n arvoa.

Nukleiinihappojen mittaamisessa hyödynnetään tyypillisesti elektrodin pinnalle immobilisoituja koettimia, DNA-kohteen negatiivista varausta, negatiivisesti varautuneita redox-yhdisteitä ja faradista prosessia. Vaikka EIS tarvitseekin redox-yhdistettä faradisen sähkövirran luomiseen voi sensoria kutsua leimavapaaksi, koska redox-yhdiste on vapaana yhdisteenä puskuriliuoksessa, eikä sitä tarvitse konjugoida kiinni koettiin, kuten joissain amperometrisissa sensoreissa on tehty. (Katz ja Willner 2003; Lisdat ja Schäfer 2008.) Koetiimiin hybridisoituvat DNA-kohteet muodostavat elektrodin pinnalle negatiivisesti varautuneen kerroksen, joka hylkii negatiivisia redox-yhdisteitä. Hylkivä sähköinen vuorovaikutus estää negatiivisia ioneja kulkeutumasta elektrodin pinnalle hidastaen redox-reaktion nopeutta ja reaktiosta aiheutuvaa faradista sähkövirtaa aiheuttaen näin impedanssin kasvun. Potentiometrisen mittauksen tavoin varausten peittovaikutus, elektrolyytin ionivahvuus ja Debyen pituus vaikuttavat myös DNA-kohteen ja redox-yhdisteen väliseen vuorovaikutukseen ja näin EIS-mittauksen suorituskykyyn. (Katz ja Willner 2003; Keighley ja muut 2008; Zhu ja Travas-Sejdic 2018.)

EIS-sensorien suorituskyvyn parantamisessa on keskitytty paljon elektrodimateriaalien ja pinnan optimointiin hybridisaation ja mittauksen herkkyyden parantamiseksi. Elektrodin pinnoittamisessa koettimella voidaan käyttää samoja tekniikoita kuin muidenkin mittaustekniikoiden kanssa ja kultaelektrodit sekä tioliryhmillä konjugoidut koettimet ovat EIS-sensoreissakin varsin yleisiä. Gebala ja Schuhmann (2010) optimoivat DNA-koettimen orientaatiota elektrodin pinnalla lisäämällä pinnalle koettimen lisäksi negatiivisesti varautuneita merkaptopropanihappomolekyylejä. Molekyylien negatiivinen varaus elektrodin pinnalla työnsi DNA-koettimia kauemmas nostaen ne näin kohtisuoraan elektrodin pinnalla, mikä johti parempaan hybridisaatovasteeseen, koska DNA-kohteiden oli helpompi hybridisoitua kohtisuorassa oleviin kuin pinnalla makaaviin koetiimiin. He päättelivät myös, että muidenkin havaitsema hybridisaatiosta johtuva impedanssin lasku voi johtua juuri huonosti orientoituneesta koetinpinnoista, mikä korostaakin koetinpinnoituksen tarpeellisuutta. Keighley työryhmineen (2008) paransi hybridisaatiotehokkuutta optimoimalla elektrodin pinnan tiheyttä sekoittamalla koetinliuokseen 1-merkaptto-6-heksanoli-molekyylejä (MCH, engl. 1-mercapto-6-hexanol) eri suhteissa. He havaitsivat, että pienemmällä koetintihydellä mitattiin parempi hybridisaatovaste, koska DNA-kohteilla oli enemmän tilaa hybridisoitua koetiimiin ja jo pinnalle hybridisoituneet DNA-kohteet aiheuttivat pienemmän hylkivän sähköisen voiman. Bonani ja muut (2010) paransivat EIS-sensorin kykyä havaita yhden emäsparin mutaatioita inkuboimalla elektrodeja kalsium-ioneja sisältävässä liuoksessa. Myös erilaisia elektrodipintoja on tutkittu, joista esimerkkinä timanttikiteillä päällystetty elektrodi ja erilaiset johtavilla polymeereillä pinnoitetut elektrodit (Peng ja muut 2007; Vermeeren ja muut 2007; Aydemir ja muut 2015; Zhu ja Travas-Sejdic 2018) Kuten FET-sensoreissa, on EIS-

sensoreissakin tutkittu erilaisten koettimien, kuten PNA:n käyttöä DNA:n sijaan. Neutraalin runkonsa ansiosta PNA-koettimet eivät estä negatiivisen redox-yhdisteen pääsyä elektrodin pinnalle, jolloin mitattu impedanssi on pienempi, kuin DNA-koetinpinalla. Kun DNA-kohde hybridisoituu PNA-koetinpintaan, aiheuttaa tämä suhteellisesti suuremman muutoksen impedanssissa, kuin DNA-koetinpinalla. Tämä yhdistettynä korkeampaan affiniteettiin pienessä ionivahvuudessa mahdollista paremman herkkyyden verrattuna DNA-koettimeen. (Liu ja muut 2005; Keighley ja muut 2008; Zhu ja Travas-Sejdic 2018.)

Vaikka kehitetyt EIS-biosensorit ovat usein leimavapaita ja herkkiä, keskittyvät ne usein juuri herkkyyden parantamiseen eikä niiden ensisijaisena tavoitteena ole välttämättä nopeaan diagnostiikkaan soveltuvan sensorin kehittäminen. Hybridisaatioajat ovat pitkiä, tunnista jopa yön yli kestävään inkubointiin, ja usein ennen varsinaista mittausta hybridisaatioliuos pestään pois ja mittaus suoritetaan uudessa puskurissa. Työvaiheiden lisääminen monimutkaistaa menetelmää ja nostaa sen hintaa. Myös tähän ongelmaan on tartuttu ja esimerkiksi Liu työryhmineen (2005) on tutkinut reaaliaikaista EIS-mittausta. Vaikka työryhmän käyttämät mittaussajat ovat kymmeniä minutteja, pisimmillään tunteja, todistivat he, että reaaliaikainen mittaus ylimääräisen DNA:n läsnä ollessa on mahdollista ja korkeat DNA-pitoisuudet voidaan havaita jo muutamassa minuutissa. EIS-menetelmää on käytetty onnistuneesti myös PCR-reaktion reaaliaikaisessa mittauksessa. Aydemir työryhmineen (2015) käytti työelektrodina lasihiilelektrodille valmistettua polymeeripintaa ja koettimena he käyttivät toista PCR-reaktion aluketta. Työelektrodilla olevan koettimena toimivan alukkeen lisäksi reaktioliouksessa oli vapaana kumpaakin aluketta ja ainoa ero normaaliin PCR-reaktiolioukseen oli EIS-mittauksen redox-parina toimivat ferri- ja ferrosyanidi. PCR-reaktion edetessä entsyymi monisti templaattia, jonka lisäksi entsyymi pidensi myös elektrodin pinnalla olevia koettimia, koska ne toimivat samalla reaktion alukkeina. Näin pinnalla tapahtuvan redox-reaktion nopeuteen vaikuttivat sekä koettiin hybridisoituneet DNA-kohteet, että pinnalla olevat pidennetyt DNA-koettimet. Yhteisvaikutus aiheutti näin suuremman muutoksen impedanssissa, kuin pelkän DNA-kohteen sitoutuminen koettimeen. Käytetyllä menetelmällä kyettiin havaitsemaan kanan verestä eristetystä DNA:sta 844 emäsparin pituinen alue jo muutaman PCR-syklin jälkeen.

1.5 Kaupallisia määrittäsalustoja

Markkinoilla on lukusia kaupallisia NAATEja, joista suurin osa perustuu nukleiinihappojen optiseen mittaukseen. Optisten NAATien lisäksi markkinoilta löytyy ainakin kaksi sähkökemialliseen mittaukseen perustuvaa määrittäsalustaa. Tässä luvussa käydään läpi esimerkkejä erilaisten mittausmenetelmien toteutuksesta ja niiden hyödyistä sekä rajoitteista. GenMark Diagnosticsin ePlex® ja Binx Healthin Binx io ovat kumpikin amperometrillä mittausta hyödyntäviä täysin automatisoituja määrittäsalustoja. Käyttäjän tarvitsee vain lisätä näyte kertakäyttöiseen määrittäskasettiin ja asettaa kasetti laitteeseen, minkä jälkeen laite hoitaa loput. PCR-reaktion jälkeen suoritettava päätepestemittaus ei mahdollista reaktion reaaliaikaiseen seurantaan perustuvaa kvantitatiivista määrittästä, joten alustat soveltuvat paremmin kliiniseen diagnostiikkaan, missä pelkkä kvalitatiivinen tulos patogeenin läsnäolosta näytteessä on riittävä. GenMark Diagnosticsin ePlex® on kuitenkin varsin kookas laite. Yhden tornin määrittäsalusta painaa 49 kg ja vaikka laitteesta löytyy myös hieman pienempi ”near patient”-versio, on ePlex® suunnattu enemmän laboratorioiden ”näytteestä-vastaukseen” –ratkaisuksi. Valikoimasta löytyy yksi yhteinen paneeli yleisimmille hengitystieinfektioiden taudinaiheuttajille ja kolme erilaista testipaneelia veriviljelynäytteille, mikä osaltaan kertoo, että laite soveltuu paremmin veriviljelyyn kykeneville laboratorioille. (GenMark Diagnostics 2019.) Binx io laitetta taas markkinoidaan nimenomaan vieritestilaitteena, joka soveltuu myös lääkäreiden vastaanotolle. Koko on ePlexiä® pienempi ja painoa on noin 10 kg. Tällä hetkellä valikoimassa on klamydiaa ja tippuria testaava määrittä, jonka suoritusajan markkinoidaan olevan vain 30 minuuttia. Binx Healthin mukaan tämä mahdollistaa potilaan testaamisen ja mahdollisen hoidon määräämisen jo samalla lääkärikäynnillä. (Binx Health 2019) Alustojen ja määrittästeknologian samankaltaisuus selittyy osittain sillä, että Binx Health (entinen Atlas Genetics) on Bathin yliopiston ja GenMark Diagnosticsin spinoff-yritys (Butkus 2013).

Suomalais-ranskalaisen Mobidiagin kehittämä Novodiag® on ePlexin® ja Binx io:n kaltainen täysin automatisoitu kasettipohjainen määrittäsalusta ja mittaus tapahtuu myös päätepestemittauksena PCR-reaktion jälkeen. Novodiagissa® hyödynnetään mikromatriisiteknologiaa. Lasialustalle on immobilisoitu koettimia pieneksi matriisiksi, joissa kukin koetinrypäs tunnistaa tietyn kohdesekvenssin. Kohdesekvenssit hybridisoituvat optisella merkkineineellä leimattuun sekundäärikoettimeen, minkä jälkeen muodostunut kompleksi hybridisoituu mikromatriisiin primäärikoettimeen. Hybridisaatioreaktion jälkeen mikromatriisi kuvataan ja merkkiaineiden signaalin sekä sijainnin perusteella määritetään havaitut sekvenssit ja mahdolliset patogeenit sekä AMR:n aiheuttavat geenit. Mikromatriisin avulla Novodiagilla® kyetään varsin laajoihin monianalyyttimäärittäksiin ja saatavilla onkin testikasetit muun muassa

ulosteen yleisimpien parasiittien, ripulin aiheuttavien bakteerien ja yleisimpien karbapeneemiresistenssin aiheuttavien geenien havaitsemiseen. Testien suoritus aika on tunnista puoleentoista tuntiin ja yhdessä pöytämoduulissa on neljä kasettipaikkaa. Moduuleja voi yhdistellä, jolloin kokonaisuudessa voi olla jopa 16 kasettipaikkaa, joita voi käyttää toisistaan riippumatta. (Mobidiag 2019).

Rochen Cobas® Liat® edustaa pientä vieritestaukseen suunniteltua NAAT-määritysalustaa. Se koostuu pienestä määrityslaitteesta ja Liat®-reaktioastiasta, joka sisältää kaikki NAAT-määritykseen tarvittavat reagenssit. Reagenssit on eroteltu muovisessa putkessa murrettavien sinetein ja laitteessa on tarvittavat lämmityselementit ja mekaaniset toiminnallisuudet määrityksen eri vaiheiden suorittamiseen ja nesteiden liikuttamiseen putken eri segmenteissä. Putken pohjalla viimeisenä on PCR-reaktion reagenssit ja laitteessa optiikka mittausta varten, minkä avulla laite kykenee reaaliaikaiseen PCR-reaktion mittaamiseen. Reaaliaikaisen mittauksen avulla määritysalustalla voidaan suorittaa myös kvantitatiivisia NAATeja, joten sillä kyetään määrittämään esimerkiksi ihmisen immuunikatoviruksen (HIV, engl. human immunodeficiency virus) pitoisuus ja näin seuraamaan hoidon etenemistä (Tanriverdi ja muut 2010). Julkaisussa HIV-määrityksen nopeudeksi ilmoitettiin 88 minuuttia, mutta nykyään tarjolla olevien neljän eri määrityksen kestoksi ilmoitetaan vain 20 minuuttia (Roche 2019). Liat®-putken nerokas yksinkertaisuus on kuitenkin myös määritysalustan rajoitteena. Yhdessä reaktioastiassa tapahtuvan PCR-reaktion mittaaminen mahdollistaa vain muutaman eri optisen leiman samanaikaisen havaitsemisen, mikä rajoittaa monianalyyttimääritysten suorittamista Liat®-määritysalustalla. Lisäksi laitteen kapasiteetti on pieni, sillä se kykenee käsittelemään vain yhden näytteen kerrallaan.

Quidelin AmpliVue®-määritysalusta poikkeaa edellisistä optisista menetelmistä, sillä sen mittausmenetelmä ei vaadi erillistä mittalaitetta vaan tulos luetaan visuaalisesti. Menetelmä käyttää hyödyksi muun muassa raskaustesteistä tuttua lateraalivirtausteknologiaa, niin sanottua ”tikutestiä”. DNA monistetaan ensin asymmetrisesti isotermaalaisella helikaasiriippuvaisella monistusreaktiolla, jossa DNA:n kaksoisjuosteen toista juostetta tuotetaan ylimäärä ja optisella merkkiaineella leimattu koetinsekvenssi kiinnittyy tähän yksijuosteiseen DNA:han. Monistusreaktion jälkeen reaktioliuos siirretään itse määrityskasettiin, jossa reaktioliuos siirtyy lateraalivirtauslastulle ja kulkeutuu kapillaari-ilmiön ansiosta lastun läpi. Monistettujen DNA-kohteiden alukkeisiin on konjugoitu biotiini, joka kiinnittyy lastun testiviivalla oleviin sitojamolekyyleihin, jolloin DNA-koettimen optinen merkkiaine konsentroituu testiviivalle niin, että syntyy silmillä havaittava värin muutos. (Goldmeyer ja muut 2008; Quidel 2018.) Instrumentaatioiltaan yksinkertainen määritysalusta vaatii käyttäjältään kuitenkin edellä esitelyihin määritysalustoihin verrattuna enemmän työtä, koska työvaiheita ei ole täysin

automatisoitu. Lisäksi alustalla kyetään mittaamaan tällä hetkellä vain yhtä tai kahta kohdegeeniä, joten sen kyky monianalyyttimäärittysten tekoon on rajoittunut.

1.6 Työn tavoite

Diplomityö tehtiin Turun yliopistolla osana antibioottiresistenttien bakteerien nopeaan havaitsemiseen suunniteltua elektronista DNA-sensortechnikkaa kehittävää projektia. Projektin tavoitteena oli kehittää prototyyppi pienikokoisesta kannettavasta määrittelyalustasta, jossa yhdistyvät NAATin monistus- ja mittausvaihe. Ennen työn aloitusta tutkimusprojektissa huomattiin, että FET-pohjaisen sensorin suorituskyky ei vastannut odotuksia. Aikaisempia tutkimustuloksia ei kyetty toistamaan (Kaisti ja muut 2017). Tämän vuoksi projektissa tutkitun FET-pohjaisen menetelmän rinnalle otettiin mukaan EIS-mittausmenetelmä. Menetelmää käytettiin sekä sensorin valmistuksen eri vaiheiden todentamiseen että toisena sensorin vaihtoehtoisena mittausmenetelmänä.

Tämän diplomityön tavoitteena oli tutkia ja vertailla näitä kahta sähkökemiallista menetelmää, sekä jatkokehittää toisesta menetelmästä PCR-reaktion reaaliaikaiseen seurantaan soveltuva menetelmä, jota voitaisiin käyttää projektissa kehitettävän prototyypin mittausmenetelmänä. Kumpikin menetelmä perustui elektrodin pinnalla tapahtuvan koettimen ja kohteen välisen hybridisaatioreaktion epäsuoraan mittaukseen. Menetelmien samankaltaisuuksien vuoksi elektrodien pinnoituksessa voitiin käyttää samaa pinnoituskemialla. Projektissa tutkittiin myös muun muassa myös sensorin pinnan optimointia DNA-kohteen hybridisaation parantamiseksi. Diplomityössä keskityttiin kuitenkin mittausmenetelmien tutkimiseen ja vertailuun, joten projektissa tutkitut erilaiset pintakemiat ja pinnoituksen optimointi rajattiin tämän työn ulkopuolelle.

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Työssä käytetyt nukleiinihapot

Työssä käytetyt synteettiset DNA-kohdeoligot on listattu taulukossa 1 ja koetinoligot taulukossa 2. Koettimina käytettiin pääsääntöisesti PNA-oligoja, joista poikkeuksena DNA-koetin groES-koetin-2-DNA. Kaikissa koettimissa sekvenssin 5' päähän oli konjugoitu tioktiinihappo koettimen kiinnittämiseksi kultaelektrodille. Varsinaisen koetinsekvenssin ja tioktiinihapon välissä oli joko kolme tyymiini-emästä tai 8-amiini-3,6-dioksaoktaanihappo ($C_6H_{13}NO_4$), joilla sekvenssi tuotiin kauemmas koetinpinnasta hybridisaation tehostamiseksi. Liukoisuuden parantamiseksi PNA-koetin lämmitettiin $+60\text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilaan aina ennen käyttöä valmistajan ohjeiden mukaisesti, koska projektissa oli jo aiemmin havaittu ongelmia PNA-oligojen liukoisuudessa. Eu-loppuliitteisissä kohteissa oli $-C_6-NH_2$ modifikaatio sekvenssin 5' päässä Europium-leiman konjugoimista varten. Käytetyt sekvenssit ovat peräisin Turun yliopistolla aiemmin tehdyistä julkaisuista. Sekvensseistä groES-etuliitteiset ovat peräisin *Pseudomonas Aeruginosan* lämpösokkiproteiinia koodaavasta groES-geenistä ja gyrB-sekvenssit *Staphylococcus aureuksen* DNA-gyraasia koodaavasta gyrB-geenistä (Lahdenperä ja muut 2014; Lehmusvuori ja muut 2015). Kontrolli-kohteen sekvenssi alun perin suunniteltu PCR-reaktion sisäiseksi monistuskontrolliksi ja toimii negatiivisena kontrollina kummallekin koettimelle (Lehmusvuori ja muut 2015). Nukleiinihappojen pitoisuudet määritettiin ennen laimennosten tekoa Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) UV-spektrofotometrillä käyttäen Beerin ja Lambertin kaavaa ja valmistajien ilmoittamia molaarisia ekstinktiokertoimia.

Taulukko 1. Työssä käytetyt DNA-kohdeoligot.

| Nimi | Sekvenssi (5' - 3') | Valmistaja |
|-----------------|---------------------|---|
| kontrolli-kohde | TTTATGTCGTAAGAACCTG | Integrated DNA technologies (Yhdysvallat) |
| groES-kohde | CGATCATGCAGAGGA | Integrated DNA technologies |
| groES-kohde-Eu | CGATCATGCAGAGG | Biomers (Saksa) |
| gyrB-kohde | CTAAGTCAAGTG | Integrated DNA technologies |
| gyrB-kohde-Eu | TCTTCTAAGTCAAGTG | Thermo Fisher Scientific |

Taulukko 2. Työssä käytetyt koetinoligot. Koettimet olivat PNA-oligoja ellei nimessä toisin mainita.

| Nimi | Sekvenssi (5' - 3') | 5'-pään linkkeri | Valmistaja |
|------------------------|---------------------|------------------|------------------------|
| groES-koetin-1 | CCTCTGCATGAT | $C_6H_{13}NO_4$ | Biomers |
| groES-koetin-2 | TTTCCTCTGCATGAT | 3 x T | PNA-bio (Yhdysvallat) |
| groES-koetin-2-2 | TTTCCTCTGCATGAT | 3 x T | Panagene (Etelä-Korea) |
| groES-koetin- γ | TTTCCTCTGCATGAT | 3 x T | Panagene |
| groES-koetin-2-DNA | TTTCCTCTGCATGATCG | 4 x T | Biomers |
| gyrB-koetin-1 | CTAAGTCAAGTG | $C_6H_{13}NO_4$ | Biomers |

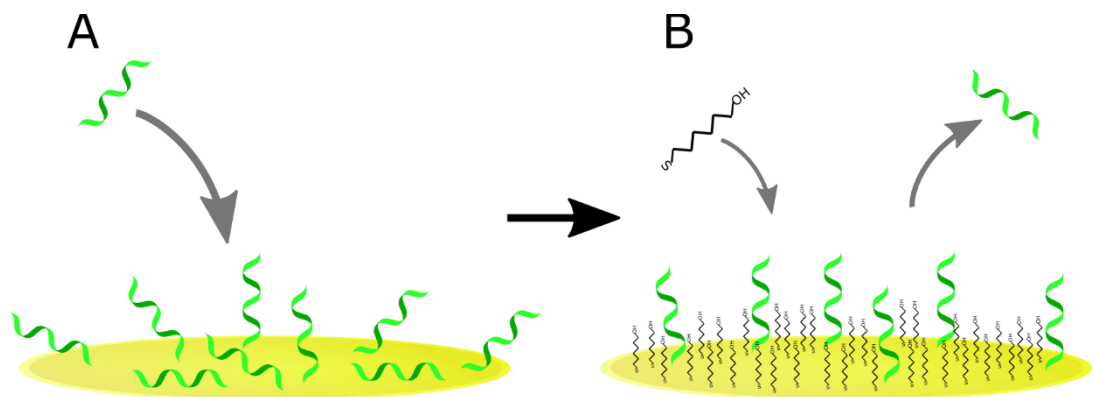
2.2 DNA-kohteiden konjugointi europium-kelaatilla

Fluoresenssimittauksissa käytettyihin DNA-kohdeoligojen 5'-pään -C₆-NH₂-ryhmään konjugoitiin yhdeksänhampainen europium(III)-kelaatti: {2,2',2'',2'''}-[[2-(4-isotiosyanaattifenyli)ethylimino]-bis(metyleenibis{4-[[4-(R-galaktopyranoksi)fenyyli]etynyli]-pyridiini-6,2-diyli}bis(metyleeninitriili)} tetrakis (asetaatti)} europium(III) (Turun Yliopisto, Suomi) (von Lode ja muut 2003). Reaktiutilavuus oli 35 µl, pH 9,8 (50 mM natriumkarbonaattipuskuri), europium-kelaatin ylimäärä suhteessa konjugoitavaan DNA-kohteeseen oli 20. Reaktiota inkuboitiin +37 °C lämpötilassa valolta suojattuna 16 h. Reaktio pysäytettiin laskemalla reaktion pH kahdeksaan laimentamalla reaktio 500 µl tilavuuteen 10 mM tris-(hydroksimetyyli)aminometaani (tris) pH 8 -puskuriin. Reaktio puhdistettiin kaksivaiheisesti, ensin geelisuodattamalla ja sen jälkeen korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC, engl. high performance liquid chromatography). Geelisuodatus tehtiin NAP-5 pylväällä (GE Healthcare, Yhdysvallat) valmistajan ohjeen mukaan. NAP-5 pylvästä näyte eluoiitiin 1000 µl tris-puskuriin ja se kuivattiin miVac Duo vakuumikuivatuslaitteistolla (Genevac, Yhdistynyt kuningaskunta). Kuivattu pelletti liuotettiin 100 µl HPLC-ajopuskuria (50 mM trietyyliammoniumasetaattipuskuri, pH 6,8), minkä jälkeen näyte puhdistettiin kolmessa erässä. Puhdistuksessa käytettiin Shimadzun (Japani) HPLC-laitteistoa ja Thermo Fisher Scientificin Synchronis C18-pylvästä. Linearisessa gradienttiajossa asetonitriilin määrää suhteessa HPLC-ajopuskuriin kasvatettiin 15 %:sta 25 %:iin 30 min aikana. Virtausnopeus oli 0,5 ml/min. Konjugoitu DNA-kohde eluoiutui pylvästä noin puolessa välissä gradienttiajaoa. Kerätyt fraktiot kuivattiin, liuotettiin säilytyspuskuriin (10 mM tris 50 mM KCl, 10 µM etyleenidiaamiinitetraetikkahappo), kvantifioitiin Nanodropilla ja säilöttiin -20 °C lämpötilassa.

2.3 Elektrodien valmistus ja pinnoitus

Työssä käytettiin itse tehtyjä kultaelektrodeita, joiden halkaisija oli 2,5 mm. Elektrodit valmistettiin sputteroimalla 100 nm kultakerros laser-leikatun maskin läpi muovilastulle. Substraattina käytettiin 1 mm paksusta Bayerin (Saksa) Vivak-levystä (glykoli modifioitu polyeteenitereftalaatti) laserleikatuja lastuja. Yhdelle lastulle valmistettiin neljä kultaelektrodia. Sputterointi tehtiin Leican (Saksa) EM ACE200 vakuumipinnoittajalla. Koettimen pinnoitus elektrodille suoritettiin välittömästi kultaelektrodin valmistuksen jälkeen kultapinnan kontamintaation välttämiseksi noudattaen projektissa aiemmin käytettyä protokollaa (Kaisti ja muut 2017). Pinnoitustilavuus oli 6 µl, pitoisuus 5 µM ja aika 16 h. Pinnoitus suoritettiin huoneenlämmössä valolta suojattuna suljetussa astiassa märän paperin päällä haihtumisen estämiseksi. Ylimääräiset pintaan sitoutumattomat koettimet huuhdeltiin pois 3 ml vedellä ja

elektrodit kuivattiin typpikaasulla. Pintaan epäspesifisesti sitoutuneet koettimet poistettiin inkuboimalla elektrodeja 1 mM MCH:ssa, 6 μ l per elektrodi. MCH sitoutuu kultaan kovalenttisesti tioliryhmänsä kautta ja korvaa näin pintaan heikoilla vuorovaikutuksilla epäspesifisesti sitoutuneet koettimet (Kuva 8). Lisäksi MCH peittää loput kultaelektrodin pinnasta estäen näin PNA- ja DNA-juosteiden epäspesifisen sitoutumisen kultapintaan ja parantaa koetinpinnan aktiivisuutta, koska koettimet ovat sitoutuneet pintaan vain spesifisesti tioliryhmänsä kautta eivätkä ne todennäköisesti makaa horisontaalisessa asennossa elektrodin pintaa vasten. (Steel ja muut 1998.)



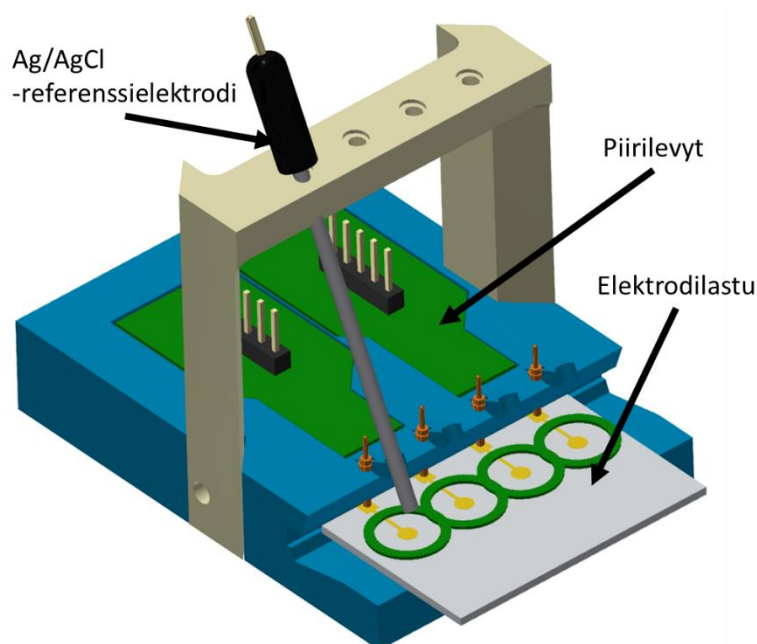
Kuva 8. Elektrodin pinnoitus A) PNA-koettimella ja B) MCH:lla. Elektrodi pinnoitettiin ensin koettimilla, jonka jälkeen pinta täytettiin MCH:lla. MCH syrjäyttää epäspesifisesti sitoutuneet PNA-koettimet ja täyttää PNA-koettimien väliin jäävät tyhjät alueet, mikä estää epäspesifisen sitoutumisen kultapintaan.

2.4 Fluoresenssimittaukset

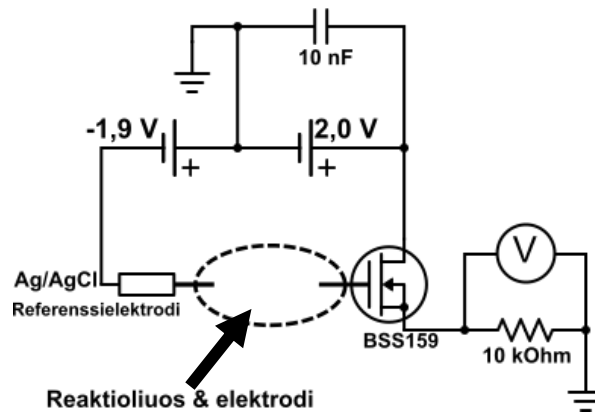
Elektrodeille valmistettujen PNA-koetinpintojen aktiivisuus todennettiin hybridisoimalla PNA-koettiin Eu-kelaatilla leimattuja DNA-kohdeoligoja. Hybridisaatiopitoisuus oli 300 nM, tilavuus oli 100 μ l ja aika 1 h. Hybridisaatio suoritettiin samoissa olosuhteissa kuin elektrodien pinnoitus. Hybridisaatiopuskurina käytettiin FET-mittauksissa käytettyä puskuria, mutta myös korkeampia suolapitoisuuksia sisältäneitä puskureita ja eri pH-arvoja testattiin. Hybridisaation jälkeen elektrodit pestiin 3 ml hybridisaatiossa käytetyllä liuoksella, kuivattiin ja fluoresenssisignaali mitattiin aikaerotteisesti EnVision monileimalukijalla (PerkinElmer, Yhdysvallat). Mittauksessa viritysvälin suodattimena käytettiin 340 nm ja emissiovalon 615 nm suodatinta. Mittausyökin pituus oli 2 ms. Aikaerotteisen mittauksen viive ja mittausikkuna olivat kumpikin 400 μ s. Mitatun fluoresenssisignaalin yksikkönä käytetään suhteellista fluoresenssia (RFU, engl. relative fluorescence unit). Tuloksia käsiteltäessä yksittäisen elektrodin signaalina käytettiin 10 x 10 pisteen mitta-alueelta valittua koko elektrodin kattavalta 5 x 5 pisteen alueelta laskettua signaalien summaa yksittäisen mittapisteen sijaan.

2.5 FET-mittaukset

Reaaliaikaiset hybridisaatiomittaukset suoritettiin Turun yliopistossa rakennetulla prototyypillä (Kuva 9). Prototyyppi koostui kahdesta piirilevystä, jotka muodostivat neljä erillistä mittaussiirä. Lisäksi prototyypissä oli 3D-tulostimella valmistettu piirilevyteline, joka sisälsi myös jousikontakteilla toimivan nelikanavaisen liittimen lastuja varten ja kiinnityspisteen referenssielektrodeja varten. Mittauspuskuri (1 mM tris pH 8, 1 mM MgCl₂, ellei toisin mainita) pipetoitiin 100 µl pisaraksi elektrodin ympärille liimatun muovitarran avulla (Genefluidics, Yhdysvallat). Jännitteet ja mittaus kytkettiin päälle ja potentiaalin annettiin tasaantua noin 30 min ennen DNA-kohteen lisäämistä reaktioliuokseen. Elektrodin potentiaalin mittaamiseen käytettiin Infineonin (Saksa) BSS159N MOSFETia ja referenssinä eDAQin (Australia) ET072 Ag/AgCl-referenssielektrodi. MOSFETin lähdejännite mitattiin Linduino One DC2026C –piirillä ja DC742C 24-bittisellä A/D-muuntimella (Linear Technology, Yhdysvallat) ja tallennettiin reaaliajassa tietokoneelle tulosten käsittelyä varten. Piirin jännitelähteenä käytettiin Agilentin (Yhdysvallat) E3631A virtalähdettä. Mittauspiirin piirikaavio on esitetty Kuva 10. MOSFET on kytketty piiriin jänniteseuraajaksi, jolloin MOSFETin jännitevahvistus on noin 1. MOSFETin lähteeltä mitattava potentiaalin muutos on siis sama kuin hilalla tapahtuva potentiaalin muutos. Lähteen ja nollapotentiaalin välillä käytettiin 10 kΩ vastusta, jonka yli jännite mitattiin. Referenssielektrodi säädettiin -1,9 V jännitteeseen, jotta MOSFETin hilan ja lähteen välinen jännite laski riittävän alas, kun nielujännitteenä käytettiin + 2,0 V.



Kuva 9. FET-mittauksia varten tehdyn prototyypin 3D-malli.



Kuva 10. Piirikaavio FET-mittalaitteen yksittäisestä mittausspiiristä. Jännitemittari V kuvaa A/D-muuntimen kytkentää mittausspiiriin.

2.6 EIS-mittaukset

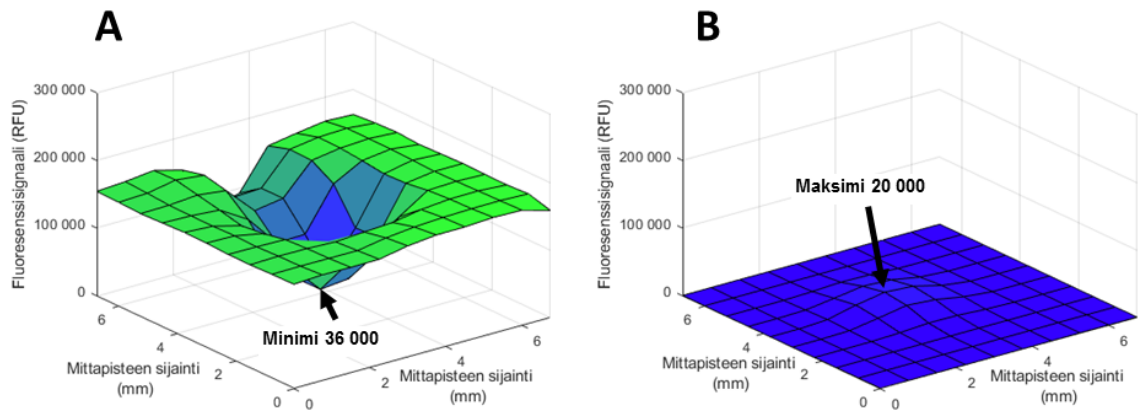
Kultaelektrodien impedanssit mitattiin IviumStat-potentiostaatilla (Ivium, Hollanti) käyttäen kolmen elektrodin kennoa, missä työelektrodina käytettiin koettimilla pinnoitettua kultaelektrodia, vastaelektrodina platinalankaa (halkaisija 0,5 mm, puhtaus 99,9 %) ja referenssielektrodina itse valmistettua Ag/AgCl-kvasireferenssielektrodia. Myös eDAQin referenssielektrodia kokeiltiin impedanssimittauksissa. Referenssielektrodi valmistettiin pinnoittamalla hopealangan (halkaisija 0,8 mm, puhtaus 99,9 %) pää hopeakloridilla sähkökemiallisesti johtamalla sen läpi 0,1 mA tasavirtaa kahden tunnin ajan. Elektrolyytinä pinnoituksessa toimi kylläinen KCl-liuos ja vastaelektrodina platinalanka. Työelektrodien ympärille valmistettiin tilavuudeltaan noin 200 μ l kaivo mittauspuskurille liimaamalla polypropeeniputki (sisähalkaisija 5 mm, korkeus noin 10 mm) pikaepoksilla työelektrodin ympärille. Vastaelektrodi kierrettiin kahden kierroksen silmukaksi putken sisälle, jotta sen pinta-ala olisi huomattavasti työelektrodin pinta-alaa suurempi, jottei se rajoittaisi virran kulkua kennon sisällä vaikuttaen impedanssispektriin. Platinalanka puhdistettiin aina ennen käyttöä polttamalla se bunsen-polttimolla puhtaaksi. Impedanssispektrit mitattiin taajuusalueella 0,1 Hz – 100 kHz (12 taajuutta per dekadi, jännitteen amplitudi 5 mV). Referenssi- ja vastaelektrodin potentiaali lukittiin mittauksen alussa kennon avoimeen potentiaaliin, joka määritettiin ennen mittausta 10 sekunnin aikana mitattujen jännitteiden keskiarvosta. Lisäksi kennon annettiin tasaantua 10 sekuntia jännitteen lukitsemisen jälkeen ennen impedanssispektrin mittaamista. Yhden mittauksen kesto oli kokonaisuudessaan noin 3 minuuttia. Mittauksissa elektrolyytinä käytettiin kahta eri ionivahvuista mittauspuskuria (100 mM natriumfosfaatti pH 7,4; 100 mM KCl sekä 5 mM ferro- ja ferrisyanidi tai 10 mM natriumfosfaatti pH 7,4 sekä 0,1 mM ferro- ja ferrisyanidi). Mitatut impedanssispektrien analysointiin käytettiin aluksi Iviumin oman

mittausohjelman piirin sovitus lisäosaa. Impedansspektreihin sovitettiin CPE:n sisältävä muokatun Randlesin piirin impedanssifunktio, josta saatiin piirin R_{CT} -parametrin arvo tulosten analysointia ja vertailua varten. Työn edetessä kehitettiin MATLAB-koodi tulosten analysoinnin nopeuttamiseksi, mitä käytettiin kaikkien impedansspektrien analysoimiseen. Automatisoinnilla vähennettiin turhaa työtä, kun yksittäisten spektrien manuaalisen käsittelyn sijaan kyettiin käsittelemään kerralla kaikki elektrodilta mitatut spektrit. MATLABin sovitusfunktion pohjana käytettiin Jean-Luc Dellisin julkaisemaa Zfit-funktiota, joka käytti MATLABin epälineaarista fminsearch-optimointifunktiota impedanssifunktion parametrien ratkaisemiseen. Optimointifunktion lähtöarvoina käytettiin aiemmin Iviumin ohjelmalla määritettyjä arvoja.

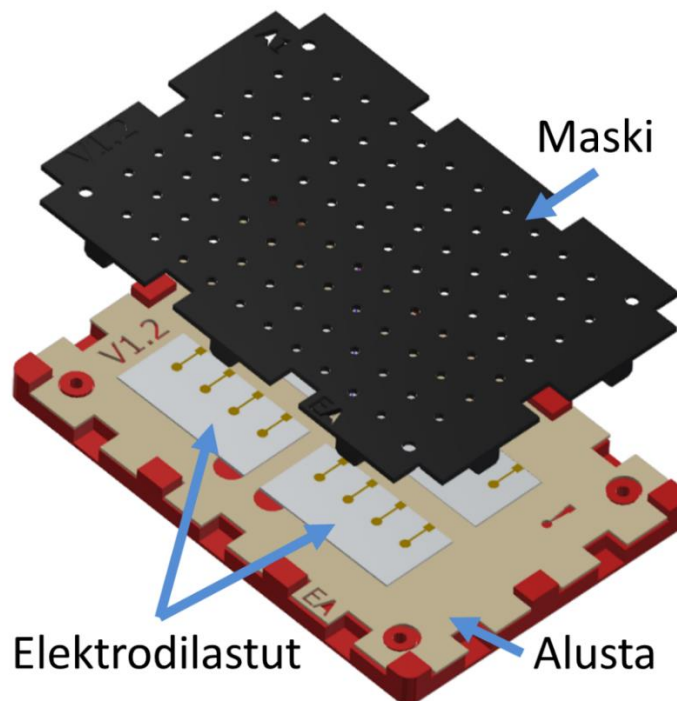
3 Tulokset

3.1 Biosensorin aktiivisuuden todennus fluoresenssilla

Valmistettujen koetinpintojen hybridisaatioaktiivisuus todennettiin fluoresoivien Eu-kelaatilla leimattujen DNA-kohteiden avulla. Alkuvaiheessa huomattiin, että substraalista johtuva fluoresenssi aiheutti erityisesti hybridisaatiokontrolleina toimivilta elektrodeilta mitattujen signaalien nousun. Kuva 11 nähdään, miten substraalista mitattiin korkeampia signaaleja kuin mittausalueen keskellä olevasta kultaelektrodista. Mittauksia varten suunniteltiin ja valmistettiin 3D-printattu mustalla mattapintaisella spraymaalilla maalattu maski (Kuva 12). Samalla valmistettiin myös levylukijan kelkkaan sopiva 96-kuoppalevyn mittojen mukaan tehty alusta, jolla helpotettiin elektrodien käsittelyä ja mittaamista mittalaitteessa. Maskin avulla substraalista aiheutuva fluoresenssisignaalin vaikutusta saatiin vähennettyä (Kuva 11). Pienemmän taustasignaalin ansiosta kontrollielektrodeilta mitatut ja lasketut signaalit putosivat jopa 90 %, Kuva 11 esimerkissä 2,7 miljoonasta 0,2 miljoonaan, mikä paransi myös elektrodien välistä signaali-taustasuhdetta. Spesifisen groES-kohde-Eu ja epäspesifisenä kontrollina toimivan gyrB-kohde-Eu:n signaalien suhde groES-koetin-1 -pinnalla oli ilman maskia 1,7 keskihajonnan ollessa 0,2 ja maskin kanssa 30,8 keskihajonnan ollessa 10,5. Testissä käytettiin korkeaa 500 mM NaCl pitoisuutta.



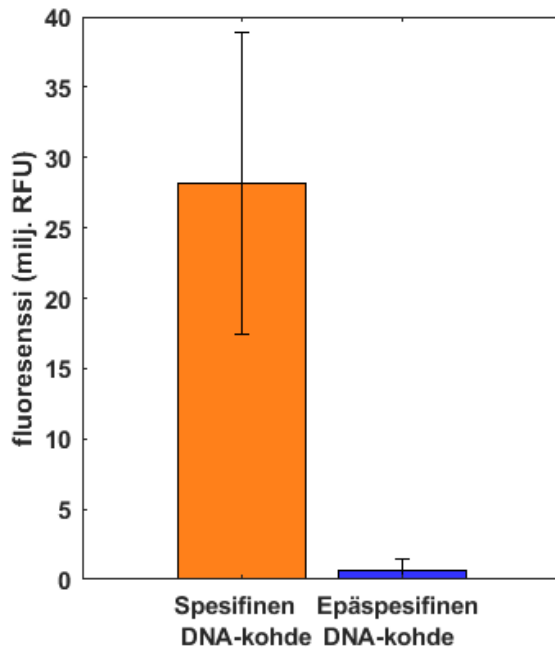
Kuva 11. Esimerkki maskin vaikutuksesta elektrodeilta mitattavaan signaaliin. A) 10 x 10 mittapisteen alueelta mitatut signaalit ilman maskia hybridisaatiokontrollina toimineelta elektrodilta. B) Samalta elektrodilta mitatut signaalit maskin kanssa.



Kuva 12. Elektrodien toimivuuden testaamiseen suunniteltu alusta ja maski. Mattapintaisella maalilla maalatulla maskilla saatiin elektrodien substraatista johtuvaa taustasignaalia pienennettyä huomattavasti.

Fluoresenssimenetelmää käytettiin todentamaan kaikkien käytössä olleiden PNA-koettimien hybridisaatioaktiivisuus elektrodin pinnalla. Spesifisen ja epäspesifisenä kontrollina toimivan DNA-kohteen välillä mitattiin kaikilla käytetyillä koettimilla selvä ero, mutta myös keskihajonnat olivat groES-koetin-1 pinnan tapaa suhteellisen suuria. Tämän lisäksi hybridisaatioreaktion toimivuus todennettiin yhdellä PNA-koettimella (groES-koetin-1) elektrodien ollessa kytkettyinä

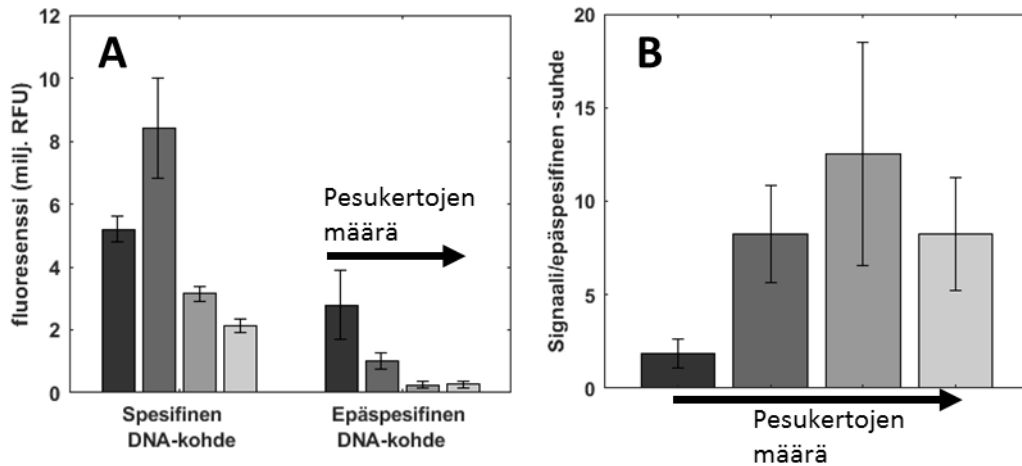
FET-mittalaitteeseen. FET-mittauksessa käytettiin leimaamattoman DNA-kohteen sijaan Eukelaatilla leimattua DNA-kohdetta ja normaalin FET-mittausprotokollan jälkeen elektrodit pestiin ja mitattiin monileimalukijalla (Kuva 13). Spesifisellä DNA-kohteella signaaliksi mitattiin 28,2 milj. RFU ja epäspesifisellä kohteella 0,6 milj. RFU. Vaikka spesifisen DNA-kohteen suhteellinen keskihajonta oli varsin suuri, 38 %, todettiin, että signaaleissa voidaan havaita ero ja hybridisaatioreaktio tapahtuu elektrodien ollessa kytkettynä FET-mittalaitteeseen.



Kuva 13. Hybridisaation toimivuuden varmistus FET-mittalaitteessa (n = 4). Koettimena groES-koetin-1.

Optista menetelmää käytettiin myös hybridisaatiopuskurin suolapitoisuuksien ja pH:n optimointiin, mutta mitattujen signaalien suuri keskihajonta teki luotettavien johtopäätösten tekemisestä hankalaa. Suuren keskihajonnan yhdeksi todennäköiseksi syyksi paljastui hybridisaatioreaktion jälkeinen liian kevyt pesuvaihe, mikä näkyi signaalin suurena keskihajontana erityisesti epäspesifisenä kontrollina toimineilla elektrodeilla (Kuva 14A). Samankaltainen trendi havaittiin kummallakin käytetyllä koetinsekvenssillä. Käytetty pesumenetelmä ei riittänyt huuhtelemaan riittävästi epäspesifisesti sitoutuneita kohteita pois elektrodilta. Kasvattamalla pesukertoja spesifisen ja epäspesifisen DNA-kohteen signaalien suhde parani tiettyyn pisteeseen asti ja mitattujen signaalien keskihajonta pieneni, vaikkakin tässä tapauksessa myös signaalien suhteen keskihajonta kasvoi (Kuva 14). Kolminkertaistamalla pesut, saavutettiin suurin spesifisen ja epäspesifisen signaalien suhde. Yhdellä pesukerralla signaalien suhde oli 1,9 ja keskihajonta 0,7, kun kolmella pesulla suhde oli 12,5 ja keskihajonta 6,0. Tämän jälkeen pesukertojen lisääminen ei enää laskenut epäspesifistä signaalia. Myös Kuva 14

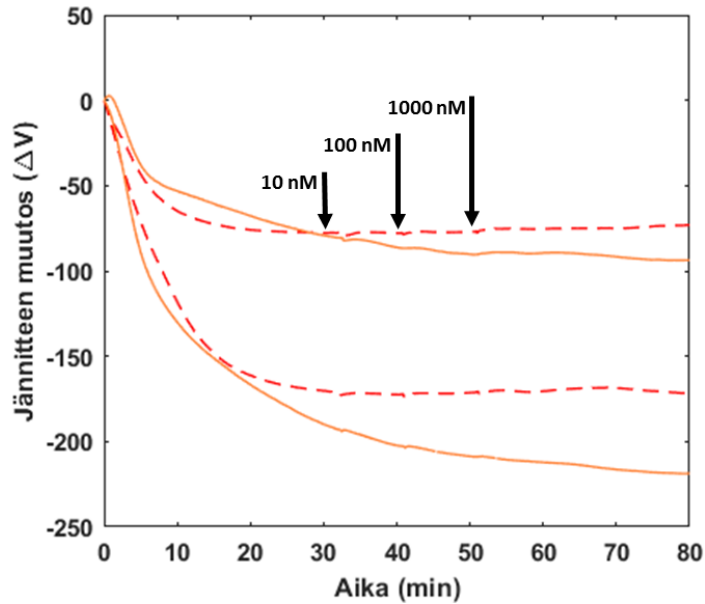
spesifisellä DNA-kohteella hybridisoiduilta elektrodipinnoilta mitatun signaalin erikoinen kohoaminen kaksinkertaisen pesun jälkeen selittyy pesuprotokollalla. On mahdollista, että toisen pesun aikana elektrodeille päätyi elektrodin ympärillä olleita epäspesifisesti sitoutuneita kohteita, jotka eivät olleet peseytyneet pois vielä ensimmäisellä pesukerralla, mikä nosti mitattua signaalia. Myös signaalin kasvanut keskihajonta tukee tätä päätelmää.



Kuva 14. Pesukertojen kasvattamisen vaikutus signaalitasoihin. Koettimena oli gyrB-koetin-1. Tummin vasen pylväs kuvaa yhtä pesukertaa ja vaalein oikealla neljää pesukertaa. A) Elektrodeilta mitattujen signaalien keskiarvo ja keskihajonta (n = 4). B) Spesifisen ja epäspesifisen DNA-kohteen signaalien suhde.

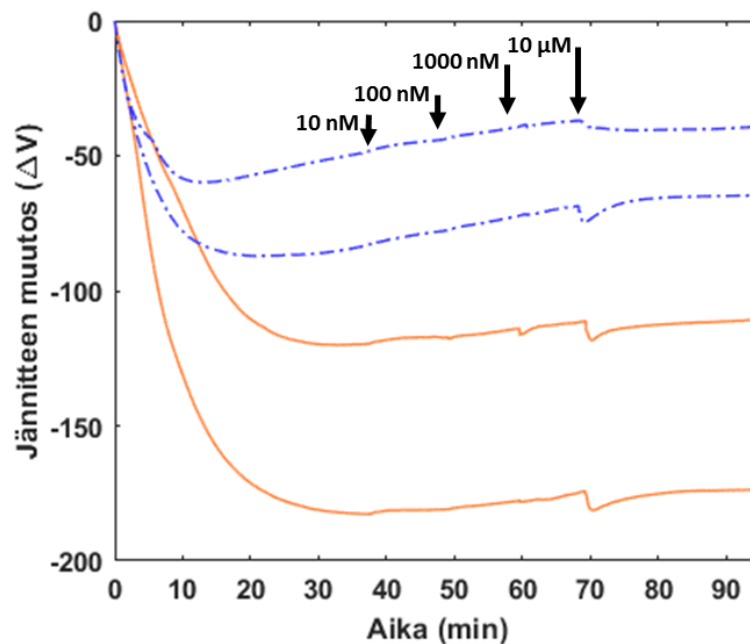
3.2 FET-sensori

FET-mittalaitteen reaaliaikaisen mittauksen testaaminen aloitettiin toistamalla projektin aikaisemman vaiheen protokolla (Kaisti ja muut 2017). Mitatut jännitteet tasaantuivat odotetusti noin 30 minuutin odotusajan puitteissa, mutta testissä havaittiin, että komplementaarisen DNA-kohteen lisääminen ei aiheuttanut mitatuissa jännitteissä muutosta (Kuva 15), vaikka käytössä oli samat koettimet kuin vuoden 2017 julkaisussa. Kuvaajassa mitattujen jännitekäyrien profiilit poikkeavat hieman toisistaan, mikä selittyy todennäköisesti yksilökohtaisilla eroilla BSS159N MOSFETin transkonduktanssissa. Työtä ennen mittalaitteen toimivuutta oli jo testattu käyttämällä pinnoittamatonta kultaelektrodia ja muuttamalla elektrolyytin pH:ta. Testissä pH:n muutos aiheutti välittömän muutoksen mitatussa jännitteessä, joten mittalaitteen tiedettiin toimivan ja kykenevän mittaamaan ainakin selkeitä työelektrodin potentiaalin muutoksia.



Kuva 15. Esimerkki FET-mittalaitteella mitatuista jännitteistä. Jännitteen muutokset esitetty suhteessa jännitteeseen mittauksen alussa. Oranssi tasainen viiva on groES-koetin-1:llä päällystetty elektrodi ja punainen katkoviiva on groES-koetin-2:lla päällystetty koetin. Nuolilla on osoitettu spesifisen DNA-kohteen lisäysajankohdat (n. 30 min, 40 min ja 50 min ajan hetkillä).

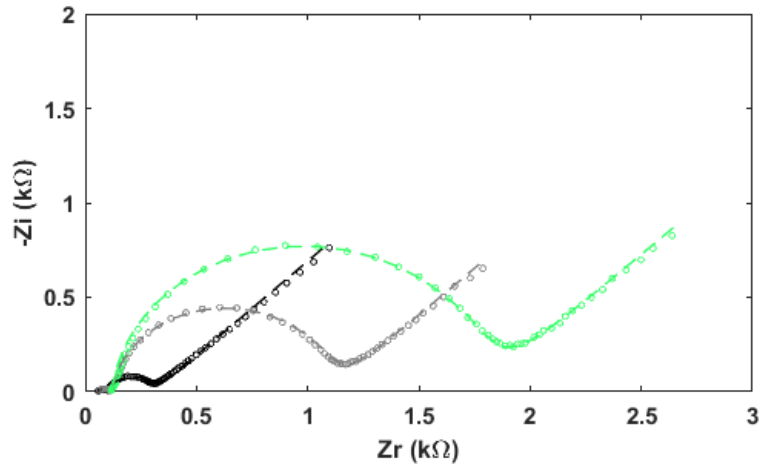
Ensimmäisten hybridisaatiomittausten jälkeen kokeiltiin eri elektrolyyttiliuoksia. Mittauspuskurin ionivahvuutta kasvatettiin lisäämällä mittauspuskuriin natriumkloridia 1 – 100 mM ja puskurin pH:ta muutettiin välillä 7 – 9, mutta spesifisen DNA-kohteen lisäyksestä johtuvia signaalivasteita ei havaittu ja mitatut jännitteet vastasivat Kuva 15 esimerkkiä. Työn aikana kokeiltiin myös eri valmistajilta hankittuja koettimia (groES-koetin-2-2 ja gyrB-koetin-1), mutta näilläkään ei havaittu olevan vaikutusta signaalivasteeseen. Hybridisaatioreaktiota yritettiin tehostaa käyttämällä koettimena myös modifioitua groES-koetin- γ PNA-oligoa. Oligon rungon γ -hiileen oli lisätty lyhyitä PEG-molekyylejä, mikä valmistajan mukaan parantaa PNA:n liukoisuutta ja affiniteettia (Panagene 2019). Signaalissa ei havaittu hybridisaation aiheuttamaa muutosta. FET-mittalaitteessa kokeiltiin myös EIS-mittauspiiriä varten valmistettuja itse tehtyjä referenssielektrodeita. Referenssielektrodien välillä ei havaittu eroa mittalaitteen jännitevasteessa. Kasvattamalla DNA-kohteen pitoisuutta 10 μ M pitoisuuteen havaittiin pieni muutos jännitteissä (Kuva 16). Koska samankaltainen signaalivaste havaittiin sekä spesifisen DNA-kohteen, että negatiivisena kontrollina toimivan kontrolli-kohteen kanssa, pääteltiin vasteen olevan todennäköisesti epäspesifistä.



Kuva 16. Modifioidun groES-koetin- γ PNA-koettimen hybridisaatiotestien tulokset. Oranssi tasainen viiva vastaa spesifistä DNA kohdetta ja sininen katkonainen viiva koettimelle epäspesifistä kohdetta. Nuolilla on osoitettu spesifisen DNA-kohteen lisäysajankohdat (n. 35 min, 50 min, 60 ja 70 min ajan hetkillä).

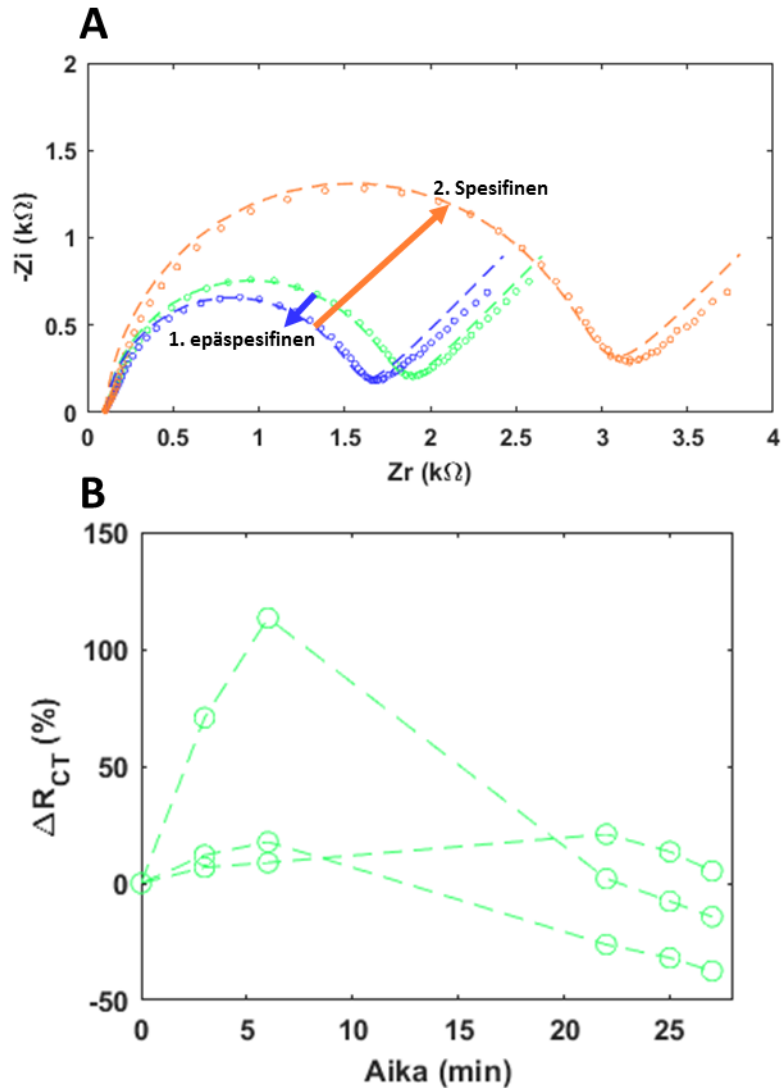
3.3 EIS-sensori

EIS-mittaukseen tehdyn kennon toimivuus varmistettiin aluksi mittaamalla pinnoittamattoman kultaelektrodin impedanssispektri korkeapainoisessa elektrolyytissä. Aluksi mittaustulokset olivat epäloogisia ja mittalaite rekisteröi jopa negatiivisia impedanssin reaali-osan arvoja, jotka eivät vastanneet kennon todellista impedanssia. Varsin nopeasti havaittiin, että eDAQin referenssielektrodi ei toiminut EIS-mittauksissa ja vaihtamalla se väliaikaisesti pelkkään platinalankaan kyettiin mittalaitteella mittaamaan metallielektrodille tyypillinen impedanssispektri. Tästä pääteltiin, etteivät käytössä olleet eDAQin pienoisreferenssielektrodit soveltuneet EIS-mittauksiin ja työssä päädyttiin käyttämään itse pinnoitettua Ag/AgCl-kvasireferenssielektrodia, koska se oli helposti saatavilla ja pieni. Puhtaan kultapinnan impedanssispektriä verrattiin tämän jälkeen pelkällä MCH:lla pinnoitettuun kultaelektrodiin sekä protokollan mukaisesti pinnoitettuun elektrodiin (Kuva 17). Spektrien muodot vastasivat varsin selkeästi muokatun Randlesin piirin impedanssia niin puolikaaren kuin diffuusion osalta. Spektriin sovitetun Randlesin piirin R_{CT} -arvoiksi saatiin kultapinnalle 0,2 k Ω , MCH-pinnalle 1,0 k Ω ja PNA-pinnalle 1,7 k Ω . Kuvaajasta sekä R_{CT} -arvoista nähtiin, että pintojen välillä oli selkeä ero, mikä viittaa kultaelektrodin onnistuneeseen pinnoitukseen sekä pelkällä MCH:lla että PNA-koettimilla.



Kuva 17. Eri elektrodien impedanssispektrit Nyquistin kuvaajassa: pinnoittamaton kultaelektrodi (musta), MCH:lla (harmaa) ja PNA:lla (vihreä) pinnoitettu elektrodi. Mitatut impedanssispektrit on merkattu ympyröin ja spektriin sovitettu funktio katkoviivalla. Impedanssispektrit on mitattu 30 min tasapainotusajan jälkeen.

Hybridisaatiotestejä suoritettiin aluksi korkealla $2,5 \mu\text{M}$ DNA-kohteen pitoisuudella. Elektrodille lisättiin ensin epäspesifistä kontrolli-kohdetta ja 30 min hybridisaatioajan jälkeen spesifistä gyrB-kohdetta. Testissä havaittiin, että epäspesifisen kontrolli-kohteen lisääminen saattoi jopa laskea impedanssia ja R_{CT} -arvoa, kun taas spesifisen DNA-kohteen lisääminen kasvatti impedanssia ja R_{CT} -arvoa (Kuva 18) Vastaava muutos havaittiin käyttämällä epäspesifisenä kontrollina myös groES-kohdetta. Kolmen rinnakkaisen näytteen suhteelliset R_{CT} -arvojen muutokset olivat 55 % spesifisellä DNA-kohteella ja -31 % epäspesifisellä kontrollilla. Keskihajonta oli 29 % spesifiselle ja 13 % epäspesifiselle. Mittauksissa havaittiin myös impedanssispektrin epäsäännöllistä ajalehtimistä erityisesti mittausten ensimmäisten minuuttien aikana. Tämä liittyy luultavasti elektrodin rajapinnan hakeutumisesta tasapainoon, kun mittauspuskuri lisätään elektrodille. Impedanssin muuttuminen ajan myötä ja yksittäisten elektrodien välinen vaihtelu oli osatekijänä rinnakkaisten testien suureen hajontaan. Tämä ajalehtiminen saattaa selittää myös R_{CT} -arvon negatiivisen muutoksen, kun elektrolyyttiin lisättiin epäspesifistä DNA-kohdetta. Kuva 18B on esitetty testin kolmen elektrodin R_{CT} -arvot 30 min tasapainotuksen aikana ennen DNA-kohteen lisäämistä. Kaikissa elektrodeissa trendi on tasapainotusajan lopussa laskeva.

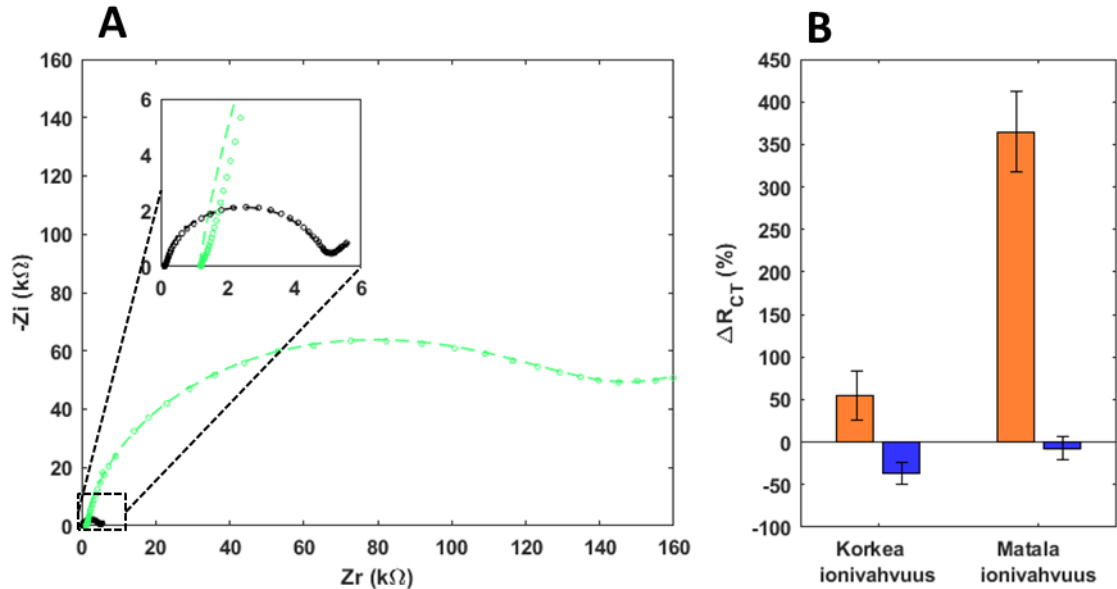


Kuva 18. A) Spesifisen ja epäspesifisen DNA-kohteen vaikutus GyrB-koetin-1-elektrodipinnan impedanssispektriin. Mitatut impedanssispektrit on merkattu ympyröin ja spektriin sovitettu funktio katkoviivalla. B) Kolmen gyrB-koetin-1 PNA:lla pinnoitetun elektrodin R_{CT} -arvojen muutokset 30 min tasapainotusajan aikana ennen DNA-kohteen lisäämistä. EIS-mittauksien aikapisteet merkattu ympyröin.

3.3.1 Elektrolyytin ionivahvuuden pienentäminen

Suuremman hybridisaatiovasteen saavuttamiseksi elektrolyyttiliuoksen ionivahvuutta pienennettiin laskemalla sekä muiden ionien että redox-parin konsentraatiota. Elektrodin impedanssi kasvoi odotetusti (Kuva 19). Elektrodin R_{CT} -arvo kasvoi noin 88 kertaiseksi ja uudessa elektrolyytissä se oli 150 $k\Omega$. Kuvaajasta voidaan havaita myös liuoksen resistanssia kuvaavan R_s :n kasvu, mikä näkyy spektrin kaaren alkupisteen siirtymisenä x-akselilla, eli impedanssin reaali-osan kasvulla. Myös spesifisen DNA-kohteen lisäyksen aiheuttama muutos R_{CT} -arvossa oli suurempi, niin absoluuttisesti kuin suhteellisestikin mitattuna. Suhteellinen R_{CT} -arvon muutos hybridisaatiotestistä oli kolmen rinnakkaisen testin keskiarvona 365 % ja keskihajonta 47 %.

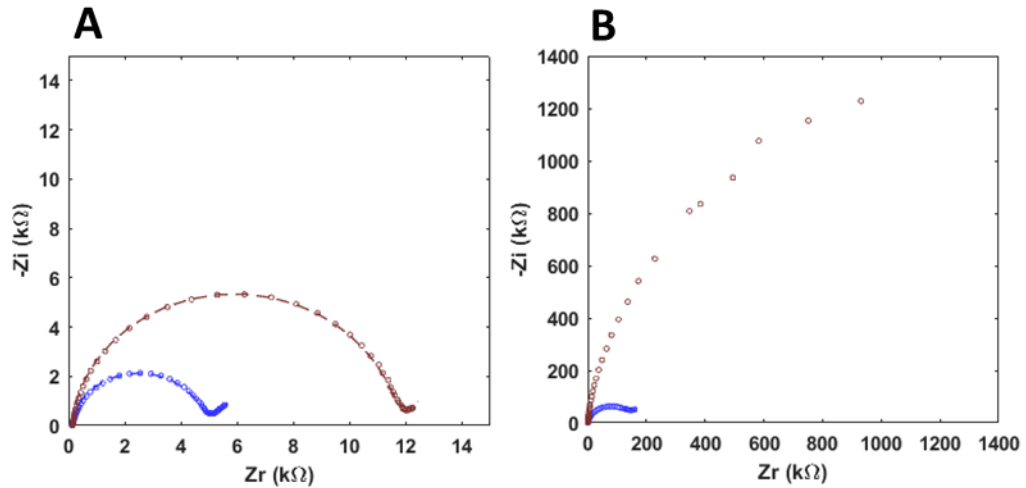
R_{CT} -arvon muutos oli -7 % ja keskihajonta 13 % kun elektrolyyttiin lisättiin epäspesifistä kontrolli- kohdetta. Suuremman spesifisen muutoksen lisäksi suhteellinen keskihajonta oli pienempi. Laimeammalla elektrolyytillä se oli 13 % ja vahvemalla 53 % keskiarvosta.



Kuva 19. Mittauspuskurin ionivahvuuden vaikutus impedanssiin. A) Pinnoitetun elektrodin impedanssispektri mitattu korkeassa (vihreä) ja matalassa (musta) ionivahvuudessa 30 min tasapainotusajan jälkeen. Impedanssispektriin sovitettu funktio on merkattu katkoviivalla. B) Mittauspuskurin ionivahvuuden vaikutus R_{CT} -arvon suhteelliseen muutokseen, kun puskurii on lisätty 2,5 μ M spesifistä (oranssi) tai epäspesifistä (sininen) DNA-kohdetta.

3.3.2 DNA-koetin impedanssimittauksissa

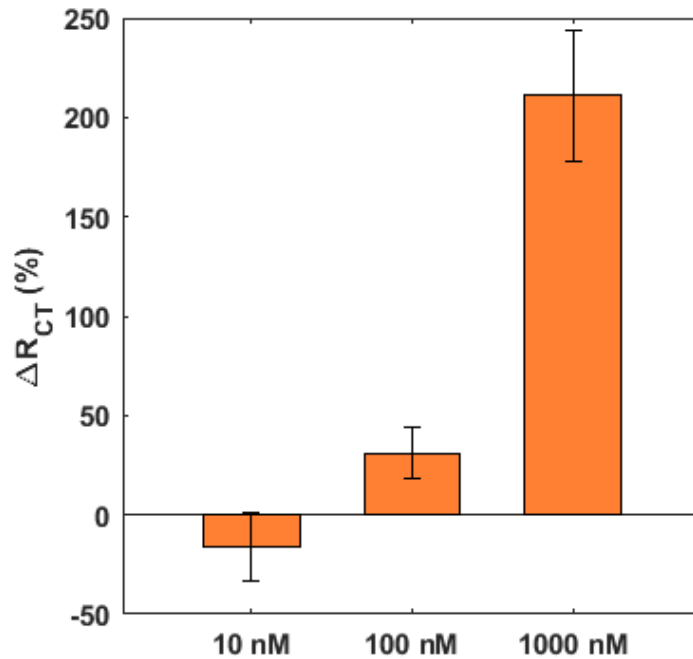
Vertailun vuoksi EIS-mittaukset tehtiin molemmilla elektrolyyteillä pinnoittamalla elektrodi myös DNA-koetinta. Impedanssit olivat odotetusti suurempia PNA-koettimeen verrattuna. (Kuva 20) Laimeassa elektrolyytissä DNA-koettimella pinnoitetun elektrodin impedanssispektriin ei suuren impedanssin vuoksi muodostunut muilla pinnoilla havaittua puolikaarta, vaan spektrissä havaitaan vain kaaren alkuosa.



Kuva 20.21 DNA-koettimella (ruskea) ja PNA-koettimella (sininen) pinnoitettujen elektrodien impedanssispektrit korkeassa (A) ja matalassa (B) ionivahvuudessa. Katkoviivalla spektriin sovitettu impedanssifunktio. B-kuvassa sovitusta ei tehty.

3.3.3 Herkkyyden määrittäminen laimealla elektrolyytillä

EIS-mittauksen prototyypille tehtiin lopuksi suppea herkkyydestä käyttäen gyrB-koetin-1 koetinta ja kolmea spesifisen DNA-kohteen pitoisuutta, jotta diplomityön jälkeen tiedettiin kehitetyn prototyypin suorituskyky (Kuva 22). DNA-kohteen pitoisuudet olivat 10, 100 ja 1000 nM. Impedanssispektrin R_{CT} -arvosta laskettiin suhteellinen muutos. Normalisointiin käytettiin elektrodin R_{CT} -arvoa ennen DNA-kohteen lisäämistä. Kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvo 1000 nM pitoisuudella oli 211 %, 100 nM pitoisuudella 31 % ja 10 nM pitoisuudella -16 %. Keskihajonnat olivat vastaavassa järjestyksessä 33 %, 13 % ja 17 %. Ajanpuutteen vuoksi testissä ei ollut negatiivista kontrollia. On kuitenkin huomioitava, että aikaisemmissa mittauksissa, kuten Kuva 19B tuloksissa epäspesifisen DNA-kohteen lisääminen ei kasvattanut R_{CT} -arvoa matalassa ionivahvuudessa.



Kuva 22. EIS-prototyypin herkkyden määrittäminen kolmella DNA-kohteen pitoisuudella. Koettimena käytettiin gyrB-koetin-1 PNA-oligoa.

4 Pohdinta

Diplomityössä vertailtiin kahta sähkökemiallista mittaustekniikkaa ja tutkittiin niiden soveltuvuutta elektrodin pinnalla tapahtuvan hybridisaatioreaktion havaitsemiseen. Ennen diplomityön aloitusta tutkimusprojektissa havaittiin, että aiempia tuloksia ei kyetty toistamaan FET-mittaustekniikalla (Kaisti ja muut 2017). Yhdeksi syyksi epäiltiin sensoripintojen toimivuutta. Työn alussa sensoripintojen toimimattomuuden mahdolliseksi syyksi epäiltiin myös ensimmäiseksi käytössä olleita groES-koetin-1 ja -2 koettimia, jotka olivat eri valmistuserää kuin 2017 julkaisussa käytetty koetin. Siitä syystä koetinpinnoja valmistettiin käyttäen eri valmistajilta hankittuja koettimia, minkä lisäksi hankittiin myös γ -modifioitu koetin ja koetin eri sekvenssillä. Ne eivät osoittautuneet paremmiksi FET-mittauksissa. Myös mittauspuskurin pH:n ja suolapitoisuuden muuttamista kokeiltiin. Vaikka suolapitoisuudella ei ole suurta vaikutusta PNA-DNA-juosteiden väliseen hybridisaatioon, voi se kuitenkin vaikuttaa elektrodin pinnalla tapahtuvan hybridisaatioreaktion tehokkuuteen, koska vierekkäisissä koettimissa olevat negatiiviset DNA-kohteet saattavat hylkiä toisiaan ja näin heikentää affiniteettia ja koettimiin hybridisoituvien kohteiden määrää (Park ja muut 2007). Suolapitoisuuden kasvattamisella on kuitenkin kääntöpuolensa, koska se lisää varausten peittovaikutusta ja näin DNA-kohteen vaikutus elektrodin potentiaaliin on pienempi. Suolojen lisäksi pH:lla on havaittu selkeä vaikutus

hybridisaation tehokkuuteen DNA-koettimia käytettäessä (Zhang ja muut 2012). Vaikka mittauspuskurin pH oli jo lähellä artikkelissa todettua hyvää arvoa, päätettiin testata myös mittauspuskurin pH:n muuttamista. Mittauspuskurin olosuhteiden muuttaminen ei parantanut tulosta.

FET-mittauksen ongelman selvittämiseksi sensoripintojen toimivuutta ja hybridisaatioaktiivisuutta tutkittiin julkaisun tapaan käyttäen myös fluoresenssipohjaista mittausmenetelmää. Diplomityössä käytettiin eri fluoresoivaa leimaa kuin julkaisussa ja aluksi mittausmenetelmän herkkyyttä haittasi käytetyn elektrodilastun substraatin autofluoresenssi, joka vaikutti elektrodilta mitattaviin signaaleihin. Ratkaisuna ongelmaan mittausalue päätettiin rajata fyysisesti mattapintaiseksi maalatulla maskilla, jolla substraatista aiheutuva taustasignaali saatiin peitettyä ja elektrodilta mitattava taustasignaali väheni. Optimoimalla mittausmenetelmää ja käsittelemällä mittaustuloksia eri tavalla, olisi häiritsevän signaalin vaikutusta voitu todennäköisesti vähentää entisestään, mutta tähän käyttötarkoitukseen maski osoittautui riittäväksi ratkaisuksi. Menetelmällä kyettiin todentamaan elektrodeille valmistettujen koetinpintojen olevan aktiivisia kaikilla käytössä olevilla koettimilla, jonka perusteella todettiin, ettei FET-mittausten toimimattomuus ole ainakaan koettimissa. Työn aikana havaittiin, että mittausta varten käytetty protokolla ei kuitenkaan ollut optimaalinen. Kaikissa mitatuissa signaaleissa oli havaittavissa varsin suurta hajontaa rinnakkaisten näytteiden välillä, erityisesti negatiivisina hybridisaatiokontrolleina käytetyiltä elektrodeilta mitatuissa signaaleissa. Yhdeksi todennäköiseksi syyksi paljastui protokollan hybridisaatioreaktion jälkeinen pesuvaihe, joka ei riittänyt pesemään kaikkea epäspesifisesti sitoutunutta leimaa pois elektrodeilta. Runsaammalla hybridisaation jälkeisellä pesulla epäspesifistä signaalia saatiin vähennettyä ja spesifisen sekä epäspesifisen DNA-kohteen välinen signaalien suhde kasvoi. Koska syy paljastui vasta työn loppupuolella, päätettiin ettei aikaisemmin erityisesti FET-mittauksia varten tehtyjen hybridisaatiopuskurin optimointitestin tuloksia huomioida signaalien suurien keskihajontojen vuoksi, eikä niitä ehditty enää toistamaan työn puitteissa. Työn etenemisen kannalta oli kuitenkin tärkeää, että valmistettujen sensoripintojen toimivuus kyettiin todentamaan optisella mittausmenetelmällä suurista keskihajonnoista huolimatta. Työn aikana heräsi myös epäily, josko jokin itse FET-prototyypissä, esimerkiksi referenssi- ja työelektrodin välillä mahdollisesti vallitseva potentiaaliero häiritsee hybridisaatioreaktiota. Käyttämällä Eu-kelaatilla leimattua kohdetta FET-mittauksessa voitiin fluoresenssimittauksen perusteella todeta, että hybridisaatio tapahtuu, eikä mittalaitteesta aiheudu ainakaan suurta häiriötä hybridisaatioreaktiolle.

Työn aikana ei saatu selville siitä, minkä vuoksi FET-menetelmällä ei pystytty havaitsemaan hybridisaatioreaktiota, vaikka tässä oli aiemmin onnistuttu. Aiempien pH-testien perusteella ja

jo pelkästään referenssielektrodin potentiaalia muuttamalla nähtiin, että FETin konduktanssi muuttuu hilan potentiaalimuutosten seurauksena ja että mittauspiiri toimii jänniteseuraajana. Lisäksi samaa MOSFETia on käytetty aiemmin EGfET tyyppisessä kokoonpanossa pH:n mittaamiseen (Prodromakis ja muut 2011a; Prodromakis ja muut 2011b). Koska tulosten perusteella voitiin sanoa, että sensorin biokemiallinen osa toimii ja että MOSFETin toiminnassa ei havaittu selkeitä ongelmia, on todennäköistä, että DNA-juosteiden aiheuttama potentiaalinen muutos on liian pieni elektrodin pinnalla. Tämä voi johtua esimerkiksi prototyypin rakenteesta aiheutuvista parasiittisistä kapasitansseista, jotka heikentävät varausten aiheuttamia potentiaalinen muutoksia.

EIS-mittausta varten tehdyn prototyypin toimivuus varmistettiin ensin mittaamalla pinnoittamattoman ja pinnoitetun kultaelektrodin impedanssispektrit. Samalla todennettiin pinnoituksen vaikutus elektrodin impedanssiin ja havaittiin, että myös pelkällä MCH:lla pinnoitetun ja koettimella sekä MCH:lla pinnoitetun elektrodin impedanssispektreissä on havaittava ero. Ensimmäisissä mittauksissa päädyttiin käyttämään muiden impedanssimittausta käyttävien ryhmien tapaan fosfaatilla puskuroitua elektrolyyttiä, jonka ionivahvuus oli korkea (Kafka ja muut 2008; Keighley ja muut 2008). Näin myös pH poikkesi hieman FET-mittausten tris-puskurista. Jatkossa puskuri tulee kuitenkin vaihtaa, koska fosfaattipuskuri inhiboi PCR-reaktiota (Zhu ja muut 2015). Hybridisaatioreaktion mittaaminen tässä puskurissa onnistui ja 30 minuutin hybridisaatioajalla havaittiin selkeä muutos R_{CT} -arvossa korkealla 2,5 μ M DNA-kohteen pitoisuudella. Epäspesifisellä kontrolli-kohteella havaittu negatiivinen R_{CT} -arvon muutos oli odottamatonta. Mitatuissa R_{CT} -arvoissa havaittiin kuitenkin laskeva trendi myös ennen DNA-kohteen lisäämistä, minkä perusteella oli mahdollista, ettei kontrollinäytteissä havaittava negatiivinen muutos johtunut DNA-kohteesta vaan johtui samasta syystä kuin tasapainotusajan aikainen trendi. R_{CT} -arvon ja impedanssin pieneneminen on saattanut johtua käytettyjen elektrodien ominaisuuksista, minkä seurauksena redox-reaktion olosuhteet ovat parantuneet ajan myötä. Esimerkiksi kvasireferenssielektrodin käyttämiseen sisältyy oletus, että elektrolyytin koostumus säilyy referenssielektrodin ympärillä samankaltaisena, jotta elektrodin potentiaalissa ei tapahdu muutoksia (Bard ja Faulkner 2001). Muutos referenssielektrodin kemiallisessa potentiaalissa muuttaa myös työ- ja vastaelektrodin potentiaalia, mikä vaikuttaa suoraan redox-reaktioon ja näin mitattuun impedanssiin. Koska prototyypin rakennetta täytyy tulevaisuudessa muuttaa, jotta sillä voidaan tehdä myös PCR-reaktio, päätettiin asia jättää tässä kohtaa huomiotta ja tarkastella sitä uudestaan tarkemmin, kun mittausdataa on kertynyt lisää ja seuraavan prototyypin suunnittelu on ajankohtaisempaa.

Mittauspuskurin suola- ja redox-yhdisteiden pitoisuuksia pienennettiin mukailleen Keighleyn ja muiden (2008) julkaisemaa tutkimusta, jossa PNA-koettimella oli saatu hyviä tuloksia matalassa

ionivahvuudessa. Uudessa mittauspuskurissa mitattiin odotetusti suurempia impedansseja, koska puskurin redox-yhdisteiden pitoisuus oli pienempi. Myös hybridisaation aiheuttama R_{CT} -arvon muutos oli suurempi ja lisäksi impedanssin suhteellinen negatiivinen muutos kontrollikohteella oli pienempi. Vertaamalla DNA- ja PNA-koettimella pinnoitettujen elektrodien spektrejä toisiinsa havaittiin varsin selvästi DNA:n negatiivisen fosfaattirungon vaikutus impedanssiin ja ettei DNA-koetin sovellu EIS-mittauksen ainakaan näin pienessä ionipitoisuudessa, koska käytetyillä mittaustaajuuksilla Nyquistin kuvaajassa impedanssispektriin ei edes muodostu selvää puolikaarta, vaan vain sen alku, jolloin R_{CT} -arvon määrittäminen on vaikeaa. Myös kirjallisuudesta löytyvissä tutkimuksissa on osoitettu DNA- ja PNA-koettimien välinen ero ja niissä on osoitettu myös PNA-koettimella pinnoitetun neutraalin elektrodipinnan hyöty hybridisaatioreaktion mittaamisessa (Keighley ja muut 2008; Riedel ja muut 2014; Zhu ja Travas-Sejdic 2018).

Työn lopuksi tehdyllä herkkyuden määrittämisellä saatiin osviittaa prototyypin suorituskyvystä. Mittalaitteella kyettiin havaitsemaan DNA-kohde 100 nM pitoisuudessa, mutta testissä pienimmän 10 nM pitoisuuden tulos oli negatiivinen, joka johtui todennäköisesti samasta syystä kuin jo aiemmin mittauksissa havaittu impedanssin laskeva trendi. Julkaistuissa tutkimuksissa on päästy parempiin herkkyyksiin. Tämä ei sinällään tullut yllätyksenä, koska sensoria ei työn aikana ehditty optimoimaan. Esimerkiksi Liu työryhmineen (2005) demonstroi artikkelissaan reaaliaikaiseen mittaukseen kykenevää EIS-sensoria, joka havaitsi spesifisen DNA-kohteen 1 nM pitoisuudessa. Menetelmä ei kuitenkaan ollut nopea, sillä kyseisen titrauskokeen hybridisaatioajat olivat noin 10 tuntia. Keighleyn työryhmineen (2008) saavutti 1 nM havaitsemisrajan kahden tunnin hybridisaatioajalla, kun taas Zhu työryhmineen (2018) kehitti sensorin, jonka havaitsemisraja oli 7,8 pM yhden tunnin hybridisaatioajalla. Kumpikin tutkimusryhmä käytti PNA-koettimia, mutta hybridisaatio suoritettiin korkeassa suolapitoisuudessa ja elektrodit pestiin ennen mittausta matalassa suolapitoisuudessa. Lisäksi kummassakin tutkimuksessa osoitettiin, että elektrodin pinnan koetintihyden optimointi ja säätely on tärkeä osa sensorin suorituskyvyn parantamista. Sensorin jatkokehityksen näkökulmasta koetintihyden säätelyn ja mittauspuskurin optimoinnin lisäksi on myös huomioitava, että sensorilla mitattavat PCR-tuotteet ovat moninkertaisesti työssä käytettyjä DNA-kohteita pidempiä. Esimerkiksi Riedel työryhmineen (2014) tutki pidempien DNA-kohteiden sekä niiden sitoutumispaikan sijainnin vaikutusta sekä elektrodin impedanssiin että absoluuttisesti pinnalle sitoutuvan DNA-kohteen määrään. He osoittivat, että sitoutumispaikalla on vaikutus pinnalle sitoutuvan kohteen määrään ja hybridisaation aiheuttamaan R_{CT} -arvon muutokseen.

Sensorin kehityksen ja erityisesti PCR-reaktion reaaliaikaisen mittaamisen kannalta työssä käytetty 30 minuutin hybridisaatioaika on liian pitkä ja sitä tulee lyhentää. Optimoimalla hybridisaatio-olosuhteita ja nostamalla mittauslämpötilaa kyetään hybridisaatioaikaa todennäköisesti lyhentämään ja esimerkiksi Aydemirin työryhmineen (2015) kehittämässä sensorissa 60 sekunnin mittausyksi suoritettiin heti PCR-reaktion 30 sekunnin ekstensiovaiheen jälkeen +72 °C lämpötilassa. Hybridisaatioreaktion nopeuttamisessa voidaan mahdollisesti hyödyntää myös elektrodien potentiaalia ja sähkökenttää. Edman työryhmineen (1997) demonstroi jo viime vuosituonnalla, miten työelektrodin positiivinen potentiaali matalassa ionivahvuudessa ja tietyissä puskureissa voi kasvattaa hybridisaationopeutta jopa 30-kertaiseksi. Sähkökentän avulla DNA-juosteet kulkeutuvat kohti elektrodia, jolloin DNA-juosteiden pitoisuus kasvaa paikallisesti elektrodin läheisyydessä ja hybridisaatioreaktio nopeutuu. Hassmannin ja muiden (2001) tutkimuksessa elektrodin positiivinen potentiaali muutettiin 60 sekunnin jälkeen negatiiviseksi epäspesifisten DNA-juosteiden poistamiseksi elektrodin pinnalta. Fixe työryhmineen (2005) tutki potentiaaliavustusta pulssien muodossa ja kykeni saavuttamaan alle sekunnissa tapahtuvan hybridisaation. Heidän mukaansa pulssin muodolla, erityisesti jännitteen nousunopeudella oli merkitystä potentiaaliavusteisen immobilisaation ja hybridisaation nopeuteen. Myös Tymoczko työryhmineen (2014) tutki hybridisaation tehostamista potentiaalipulsseilla ja huomasi, että se nopeuttaa hybridisaatiota verrattuna pelkään positiivisen potentiaaliin. Toisaalta he esittivät myös, että diffuusion tehostaminen potentiaalilla ei välttämättä nopeuta hybridisaatiota pienessä ionivahvuudessa, jossa reaktionopeus saattaa tulla rajoittavaksi tekijäksi. Vaihtoehtoisesti, mikäli reaaliaikainen mittaus pidentää liikaa määrittämisen suoritusaikaa, voidaan harkita myös päätepistemittausta Binx Healthin ja GenMark Diagnosticsin määrittämisalustojen tapaan, erityisesti mikäli pelkkä kvalitatiivinen tulos on riittävä.

Sensorin seuraavan prototyypin kehityksessä tulee huomioida mahdollisuus PCR-reaktion lämpösykliin suorittamiseen, sillä diplomityössä kehitetyllä prototyypillä se ei vielä ollut mahdollista. Samalla on hyvä huomioida myös muita valmistusteknisiä seikkoja, joiden muuttaminen myöhemmässä kehitysvaiheessa voi olla haastavampaa. Nyt työssä käytettiin kolme eri elektrodimateriaalia, mutta todennäköisesti ainakin vastaelektrodin voisi työelektrodin tapaan valmistaa kullasta. Työn kannalta platinaelektrodin käyttö oli perusteltua, sillä se oli helppo puhdistaa mittausten välissä polttamalla. On mahdollista, että referenssielektrodinkin voi valmistaa kullasta, ilman, että siitä on suurta haittaa sensorin suorituskykyyn, sillä elektrodien läpi kulkeva virta on pieni, jolloin virta ei juurikaan vaikuta elektrodien potentiaaliin (Bard ja Faulkner 2001). Esimerkiksi Genefluidicsin SC-1000-X lastuilla kaikki kolme elektrodia on valmistettu kullasta (Genefluidics 2019). Lisäksi elektrodien on oltava

riittävän pieniä, jotta reaktioon voidaan lisätä riittävän monta elektrodi monianalyttimääritystä varten ilman, että reaktiivilavuus, reagenssikulut ja laitteen koko kasvavat liian suuriksi. Monianalyttimäärityksiä varten pitää myös testata useamman työelektrodin integroimista samaan reaktioon, mikä sekin aiheuttaa omat haasteensa. Monen eri elektrodin samanaikainen mittaaminen EIS-tekniikalla ei välttämättä onnistu, sillä työelektrodille johdettava pieni vaihtovirta saattaa häiritä muiden samassa liuoksessa olevien elektrodien mittaamista. Sarjassa mittaaminen taas onnistuu varsin helposti käyttämällä multiplekseriä, joita on saatavilla lähes jokaiselle kaupalliselle potentiometrille, jolloin mittaukset voi suorittaa yhdellä mittalaitteella. Multiplekserin integroiminen pieneen sähkökemialliseen mittauspiiriin ei myöskään ole haaste, mistä esimerkkinä Prodrimakiksen ja muiden (2011b) tutkimuksessa esitetty FET-mittalaite, jossa multiplekserien avulla 10 mittausyksiköllä kyettiin mittaamaan 80 työelektrodi. Mittausaika on kuitenkin suoraan verrannollinen mitattavien elektrodien määrään ja työssä käytetty 3 minuuttia kestävä mittausyksi on liian pitkä sarjassa mittaamiseen, mikäli mitattavia elektrodeja on monta. Protokollaa voitaneen nopeuttaa jo pelkästään vähentämällä mitattavan taajuusspektrin mittapisteitä, joita oli 12 per dekad. Lisäksi pelkästään korkeampien taajuuksien mittaaminen on nopeampaa, koska jaksonaika on lyhyempi, mutta mitattavat taajuudet määräytyvät kuitenkin työelektrodin impedanssin mukaan, jotta elektroninsiirtoresistanssin muutos kyetään havaitsemaan. Kasvattamalla mittauspuskurin redox-yhdisteen ja suolojen pitoisuutta, voidaan impedanssia pienentää, mutta se voi myös heikentää myös sensorin herkkyyttä. Impedanssispektrin mittaamisen ja elektroninsiirtoresistanssin määrittämisen sijaan sensorin mittauslukemana voisi mahdollisesti käyttää myös yksittäisen taajuuden impedanssilukemaa, jolloin mittausaika lyhenisi huomattavasti verrattuna koko impedanssispektrin mittaamiseen. Näin ei myöskään tarvitse sovittaa impedanssifunktiota mitattuun spektriin, jolloin tulosten käsittely vaatii vähemmän laskentatehoa käytetyltä laitteelta. Käytännössä yksittäisen taajuuden käyttö vaatii mahdollisimman tasalaatuiset mittausolosuhteet ja sensorin ominaisuuksien riittävää karakterisointia, jotta sopiva mittaustaajuus voidaan määrittää. Työelektrodien lisääminen reaktioon voi mahdollistaa monianalyttimäärityksen lisäksi myös elektrodin impedanssiin vaikuttavien muiden tekijöiden huomioon ottamisen. Jos yksi työelektrodi pinnoitetaan niin, ettei sen impedanssi muutu DNA-kohteen aiheuttaman hybridisaation seurauksena, voidaan sitä mittaamalla ottaa huomioon muita impedanssiin vaikuttavia epäspesifisiä muutoksia, kuten työssä havaittu impedanssin pieneneminen tasapainotusajan aikana. Näin kyetään mahdollisesti vähentämään mittaukseen liittyvää häiriötä ja vaihtelua, mikä voi mahdollistaa pienempien DNA-pitoisuuksien havaitsemisen.

5 Loppupäätelmät

Diplomityön tulosten perusteella voidaan todeta, että tutkituista menetelmistä EIS on lupaavampi menetelmä nukleiinihappojen leimavapaan sensorin mittaamenetelmäksi. FET-menetelmää ei kuitenkaan voida sulkea täysin pois laskuista, koska työn rajallisen keston vuoksi sensorin toimimattomuudelle ei ehditty löytämään selitystä ja kirjallisuudesta löytyy kuitenkin monia esimerkkejä toimivista DNA-sensoreista. Lisäksi kehitetty EIS-sensori vaatii vielä työtä, jotta se saadaan integroitua osaksi PCR-reaktiota ja sen soveltuvuutta reaktion mittaamiseen voidaan testata. Vieritestaukseen soveltuvan sensorin kehittämisessä on huomioitava erityisesti mittauksen kesto, sillä liian pitkä hybridisaatio- tai mittausaika pidentää koko määrittämiseen kuluvaa aikaa liikaa, jos reaktiota seurataan reaaliaikaisesti. Tällöin voidaan harkita sensorin käyttöä pelkkään päätepistemittaukseen. Myös monianalyyttimäärittysten mittaamista EIS-sensorilla tulee testata mahdollisimman aikaisessa vaiheessa. Ilman mahdollisuutta monen eri analyysin mittaamiseen samasta reaktiosta ei sensorin välttämättä tarjoa etua nykyisiin vieritestehin verrattuna.

Täytyy kuitenkin muistaa, ettei pelkkä sensorin kehittäminen tee menetelmästä valmiita vieritestaukseen soveltuvaa määrittämistä. Määrittämissä tuleekin jatkossa huomioida miten PCR:n lämpötilakontrolli ja nukleiinihappojen esikäsittely toteutetaan. Lämpötilojen tarkka hallinta on tärkeää reaktion toistettavuuden kannalta ja kannettavan määrittämissä näkökulmasta myös laitteen energiatehokkuus tulee huomioida. Suuri virrankulutus vaatii suurempaa tehonlähdettä, jolloin akkukäyttöisen määrittämissä tekeminen voi osoittautua haastavaksi. Nukleiinihappojen esikäsittelyssä manuaalisten vaiheiden minimoiminen ja mahdollisesti täysin automatisoidut vaiheet olisivat käytön kannalta helpoin vaihtoehto, mutta se vaatii kehitystyötä ja tarkoittaa todennäköisesti kalliimpaa ja monimutkaisempaa järjestelmää.

6 Lähteet

Aydemir, N., McArdle, H., Patel, S., Whitford, W., Evans, C. W., Travas-Sejdic, J. & Williams, D. E. (2015) A label-free, sensitive, real-time, semiquantitative electrochemical measurement method for DNA polymerase amplification (ePCR). *Anal Chem* **87**:5189–5197.

Barbaro, M., Bonfiglio, A., Raffo, L., Alessandrini, A., Facci, P. & Barák, I. (2006) Fully electronic DNA hybridization detection by a standard CMOS biochip. *Sensors Actuators, B Chem* **118**:41–46.

Bard, A. J. & Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. (2. painos). John Wiley & Sons, New York.

Bergveld, P. (1970) Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Trans Biomed Eng* **BME-17**:70–71.

Bergveld, P. (2003) Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors Actuators B Chem* **88**:1–20.

Binx Health. Binx io rapid molecular point of care (POC) STI testing. <<https://mybinxhealth.com/point-of-care/>> (Luettu 17.3.2019)

Bonanni, A., Pumera, M. & Miyahara, Y. (2010) Rapid, sensitive, and label-free impedimetric detection of a single-nucleotide polymorphism correlated to kidney disease. *Anal Chem* **82**:3772–3779.

Buchan, B. W. & Ledebor, N. A. (2014) Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **27**:783–822.

Bunimovich, Y. L., Shin, Y. S., Yeo, W.S., Amori, M., Kwong, G. & Heath, J. R. (2006) Quantitative real-time measurements of DNA hybridization with alkylated nonoxidized silicon nanowires in electrolyte solution. *J Am Chem Soc* **128**:16323–16331.

Butkus, B. (2013) Atlas Genetics aims to market POC MDx platform, first test for chlamydia, by end of 2014. <https://www.genomeweb.com/pcrsample-prep/atlas-genetics-aims-market-poc-mdx-platform-first-test-chlamydia-end-2014#.XI_uRaBS9aQ> (Luettu 18.3.2019)

Cai, B., Wang, S., Huang, L., Ning, Y., Zhang, Z. & Zhang, G.-J. (2014) Ultrasensitive label-free detection of PNA–DNA hybridization by reduced graphene oxide field-effect transistor biosensor. *ACS Nano* **8**:2632–2638.

Cao, Z., Xiao, Z. L., Zhang, L., Luo, D. M., Kamahori, M. & Shimoda, M. (2013) Molecule counting with alkanethiol and DNA immobilized on gold microplates for extended gate FET. *Mater Sci Eng C* **33**:1481–1490.

Cattrall, R. W. & Freiser, H. (1971) Coated wire ion-selective electrodes. *Anal Chem* **43**:1905–1906.

Chaisson, L. H., Duong, D., Cattamanchi, A., Roemer, M., Handley, M. A., Schillinger, D., Sur, M., Pham, P., Lin, M. A., Goldman, L. E., Quan, J., Perez, S., Healy, M., Higashi, J., Winston, L., Haller, B., Luetkemeyer, A. F. & Davis, J. L. (2018) Association of rapid molecular testing with duration of respiratory isolation for patients with possible tuberculosis in a US hospital. *JAMA Internal Med* | **06510**:1–9.

Chartrand, C., Tremblay, N., Renaud, C. & Papenburg, J. (2015) Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* **53**:3738–3749.

Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. & Wolk, D. M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* **26**:547–603.

Clerc, O. & Greub, G. (2010) Routine use of point-of-care tests: Usefulness and application in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* **16**:1054–1061.

Craw, P. & Balachandran, W. (2012) Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip* **12**:2469.

Crick, F. H. C. & Watson, J. D. (1954) The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proc R Soc London Ser A Math Phys Sci* **223**:80–96.

Daniels, R. (2011) Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). *J Antimicrob Chemother* **66**:11–23.

Danielson, P. B., McKiernan, H. E. & Legg, K. M. (2017) Integrated polymerase chain reaction technologies (sample-to-answer technologies). Kirjassa: G. P. Patrinos, W. J. Ansorge, & P. B. Danielson (toim.), *Molecular Diagnostics* (3. painos, s. 59–78). Academic Press.

Deféver, T., Druet, M., Evrard, D., Marchal, D. & Limoges, B. (2011) Real-time electrochemical PCR with a DNA intercalating redox probe. *Anal Chem* **83**:1815–1821.

Dineva, M. A., Mahilum-Tapay, L. & Lee, H. (2007) Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. *Analyst* **132**:1193.

DNA Electronics. Homepage. <<https://www.dnae.com/>> (Luettu 3.4.2019)

Doern, G. V. (2000) Detection of Selected Fastidious Bacteria. *Clin Infect Dis* **30**:166–173.

Easy Life Sciences. Technology: DetScan®. <<http://www.elice.fr/detscan.html>> (Luettu 26.5.2018)

Edman, C. F., Raymond, D. E., Wu, D. J., Tu, E., Sosnowski, R. G., Butler, W. F., Nerenberg, M. & Heller, M. J. (1997) Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res* **25**:4907–4914.

Fenollar, F. & Raoult, D. (2007) Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* **30**:7–15.

Fixe, F., Branz, H. M., Louro, N., Chu, V., Prazeres, D. M. F. & Conde, J. P. (2005) Electric-field assisted immobilization and hybridization of DNA oligomers on thin-film microchips. *Nanotechnology* **16**:2061–2071.

Gau, J.-J., Lan, E. H., Dunn, B., Ho, C.-M. & Woo, J. C. . (2001) A MEMS based amperometric detector for E. Coli bacteria using self-assembled monolayers. *Biosens Bioelectron* **16**:745–755.

Gebala, M. & Schuhmann, W. (2010) Controlled orientation of DNA in a binary SAM as a key for the successful determination of DNA hybridization by means of electrochemical impedance spectroscopy. *ChemPhysChem* **11**:2887–2895.

Genefluidics. Home. <<https://www.genefluidics-lifescience.com/>> (Luettu 16.1.2019)

GenMark Diagnostics. ePlex®: The True Sample-to-Answer Solution™. <<https://www.genmarkdx.com/solutions/systems/eplex-system/>> (Luettu 7.10.2019)

Goda, T., Singi, A. B., Maeda, Y., Matsumoto, A., Torimura, M., Aoki, H. & Miyahara, Y. (2013) Label-free potentiometry for detecting DNA hybridization using peptide nucleic acid and DNA probes. *Sensors* **13**:2267-2278.

Goldmeyer, J., Li, H., McCormac, M., Cook, S., Stratton, C., Lemieux, B., Kong, G., Tang, W. & Tang, Y. W. (2008) Identification of Staphylococcus aureus and determination of methicillin resistance directly from positive blood cultures by isothermal amplification and a disposable detection device. *J Clin Microbiol* **46**:1534–1536.

Graf, E. H. & Pancholi, P. (2020) Appropriate Use and Future Directions of Molecular Diagnostic Testing. *Curr Infect Dis Rep* **22**:5.

Grand View Research. Molecular diagnostics market size, growth | industry report, 2013-2024. <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/molecular-diagnostics-market>> (Luettu 25.9.2018)

Gray, J. & Coupland, L. J. (2014) The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections. *Epidemiol Infect* **142**:1–11.

Guilbault, G. G. & Lubrano, G. J. (1973) An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal Chim Acta* **64**:439–455.

Hassmann, J., Misch, A., Schüle, J., Krause, J., Graßl, B., Müller, P. & Bertling, W. (2001) Development of a molecular diagnosis assay based on electrohybridization at plastic electrodes and subsequent PCR. *Biosens Bioelectron* **16**:857–863.

Helb, D., Jones, M., Story, E., Boehme, C., Wallace, E., Ho, K., Kop, J., Owens, M. R., Rodgers, R., Banada, P., Safi, H., Blakemore, R., Ngoc Lan, N. T., Jones-López, E. C., Levi, M., Burday, M., Ayakaka, I., Mugerwa, R. D., McMillan, B., Winn-Deen, E., Christel, L., Dailey, P., Perkins, M. D., Persing, D. H. & Alland, D. (2010) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* **48**:229–237.

Hodinka, R. L. & Kaiser, L. (2013) Is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory?. *J Clin Microbiol* **51**:2–8.

Hsieh, K., Patterson, A. S., Ferguson, B. S., Plaxco, K. W. & Soh, H. T. (2012) Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Angew Chemie Int Ed* **51**:4896–4900.

Huang, W., Diallo, A. K., Dailey, J. L., Besar, K. & Katz, H. E. (2015) Electrochemical processes and mechanistic aspects of field-effect sensors for biomolecules. *J Mater Chem C* **3**:6445–6470.

Ingebrandt, S. & Offenhausser, a (2006) Label-free detection of DNA using field-effect transistors. *Phys Status Solidi A - Appl Mater Sci* **203**:3399–3411.

Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* **49**:1749–1755.

Kafka, J., Pänke, O., Abendroth, B. & Lisdat, F. (2008) A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. *Electrochim Acta* **53**:7467–7474.

Kaisti, M., Boeva, Z., Koskinen, J., Nieminen, S., Bobacka, J. & Levon, K. (2016) Hand-held transistor based electrical and multiplexed chemical sensing system. *ACS Sensors* **1**:1423–1431.

Kaisti, M. (2017) Detection principles of biological and chemical FET sensors. *Biosens Bioelectron* **98**:437–448.

Kaisti, M., Kerko, A., Aarikka, E., Saviranta, P., Boeva, Z., Soukka, T. & Lehmusvuori, A. (2017) Real-Time wash-free detection of unlabeled PNA-DNA hybridization using discrete FET sensor. *Sci Rep* **7**:1–8.

Kamahori, M., Ishige, Y. & Shimoda, M. (2007) DNA detection by an extended-gate FET sensor with a high-frequency voltage superimposed onto a reference electrode. *Anal Sci* **23**:75–79.

Kamahori, M., Ishige, Y. & Shimoda, M. (2008) Detection of DNA hybridization and extension reactions by an extended-gate field-effect transistor: Characterizations of immobilized DNA-probes and role of applying a superimposed high-frequency voltage onto a reference electrode. *Biosens Bioelectron* **23**:1046–1054.

Katz, E. & Willner, I. (2003) Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* **15**:913–947.

- Keighley, S. D., Estrela, P., Li, P. & Migliorato, P. (2008) Optimization of label-free DNA detection with electrochemical impedance spectroscopy using PNA probes. *Biosens Bioelectron* **24**:906–911.
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A. & Cheang, M. (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* **34**:1589–1596.
- Lahdenperä, S., Manninen, J., Joki, L., Karhunen, U. & Soukka, T. (2014) Spacer length, label moiety interchange and probe pair orientation in a homogeneous solid-phase hybridization assay utilizing lanthanide chelate complementation. *Anal Methods* **6**:5360–5368.
- Larsson, A., Greig-Pylypczuk, R. & Huisman, A. (2015) The state of point-of-care testing: a european perspective. *Ups J Med Sci* **120**:1–10.
- Laurence, C. O., Gialamas, A., Bubner, T., Yelland, L., Willson, K., Ryan, P. & Beilby, J. (2010) Patient satisfaction with point-of-care testing in general practice. *Br J Gen Pract* **60**:e98–e104.
- Ledeboer, N. A. & Dallas, S. D. (2014) The automated clinical microbiology laboratory: Fact or fantasy? *J Clin Microbiol* **52**:3140–3146.
- Lehmusvuori, A., Soikkeli, M., Tuunainen, E., Seppä, T., Spangar, A., Rantakokko-Jalava, K., von Lode, P., Karhunen, U. Soukka, T. & Wittfooth, S. (2015) Ready to use dry-reagent PCR assays for the four common bacterial pathogens using switchable lanthanide luminescence probe system. *J Microbiol Methods* **118**:64–69.
- Lemay, S. G., Laborde, C., Renault, C., Cossettini, A., Selmi, L. & Widdershoven, F. P. (2016) High-frequency nanocapacitor arrays: concept, recent developments, and outlook. *Acc Chem Res* **49**:2355–2362.
- Liao, J. C., Mastali, M., Li, Y., Gau, V., Suchard, M. A., Babbitt, J., Gornbein, J., Landaw, E. M., McCabe, E. R. B., Churchill, B. M. & Haake, D. A. (2007) Development of an advanced electrochemical DNA biosensor for bacterial pathogen detection. *J Mol Diagnostics* **9**:158–168.
- Lisdat, F. & Schäfer, D. (2008) The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem* **391**:1555–1567.
- Liu, J., Tian, S., Nielsen, P. E. & Knoll, W. (2005) In situ hybridization of PNA/DNA studied label-free by electrochemical impedance spectroscopy. *Chem Commun* **23**:2969.
- Mach, K. E., Mohan, R., Baron, E. J., Shih, M.-C., Gau, V., Wong, P. K. & Liao, J. C. (2011) A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples. *J Urol* **185**:148–153.
- Martin-Verstraete, I., Peltier, J. & Dupuy, B. (2016) The regulatory networks that control clostridium difficile toxin synthesis. *Toxins* **8**:153.

- Martin, A., Grant, K. B., Stressmann, F., Ghigo, J. M., Marchal, D. & Limoges, B. (2016) Ultimate single-copy DNA detection using real-time electrochemical LAMP. *ACS Sensors* **1**:904–912.
- Meridian Bioscience. Illumigene. <<http://www.meridianbioscience.eu/illumigene/>> (Luettu 14.11.2018)
- Mobidiag. Novodiag®. <<https://mobidiag.com/products/novodiag/>> (Luettu 8.10.2019)
- Morel, C., McClure, L., Edwards, S., Victoria, G., Dale, S., Thomas, J. & Mossialos, E. (2016) Ensuring innovation in diagnostics for bacterial infection. s. 209–215 <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/302489/Ensuring-innovation-diagnostics-bacterial-infection-en.pdf> (Luettu 1.3.2018).
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T. (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:150–154.
- Niemz, A., Ferguson, T. M. & Boyle, D. S. (2011) Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol* **29**:240–250.
- O’Neill, J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. < https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final_paper_with_cover.pdf> (Luettu 1.3.2018).
- Overbergh, L., Vig, S., Coun, F. & Mathieu, C. (2017) Quantitative polymerase chain reaction. Kirjassa G. P. Patrinos, W. Ansorge, & P. B. Danielson (toim.), *Molecular Diagnostics* (3. painos, s. 41–58). Academic Press.
- Pan, D., Zuo, X., Wan, Y., Wang, L., Zhang, J., Song, S. & Fan, C. (2007) Electrochemical interrogation of interactions between surface-confined DNA and methylene blue. *Sensors* **7**:2671–2680.
- Panagene. Custom PNA oligonucleotide synthesis. <http://www.panagene.com/_ENG/html/dh_product/prod_view/31/?cate_no=3> (Luettu 7.2.2019)
- Park, H., Germini, A., Sforza, S., Corradini, R., Marchelli, R. & Knoll, W. (2007) Effect of ionic strength on PNA-DNA hybridization on surfaces and in solution. *Biointerphases* **2**:80–88.
- Patrinos, G. P., Ansorge, W. & Danielson, P. B. (2017) Molecular diagnostics: Past, Present, and Future. Kirjassa *Molecular Diagnostics* (3. painos, s. 1–9). Academic Press.
- Pearce, D. M., Shenton, D. P., Holden, J. & Gaydos, C. A. (2011) Evaluation of a novel electrochemical detection method for *Chlamydia trachomatis*: application for point-of-care diagnostics. *IEEE Trans Biomed Eng* **58**:755–758.
- Peng, H., Soeller, C. & Trivas-Sejdic, J. (2007) Novel conducting polymers for DNA sensing. *Macromolecules* **40**:909–914.

Peters, R. P. H., van Agtmael, M. A., Danner, S. A., Savelkoul, P. H. M. & Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2004) New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* **4**:751–760.

Poghossian, A. & Schöning, M. J. (2014) Label-free sensing of biomolecules with field-effect devices for clinical applications. *Electroanalysis* **26**:1197–1213.

Price, C. P. & St John, A. (2012) Point-of-Care Testing: Making Innovation Work for Patient-Centered Care. AACC Press, Washington, D.C.

Prodromakis, T., Liu, Y. & Toumazou, C. (2011a) Low-cost implementations of pH monitoring platforms. 2011 *IEEE SENSORS Proceedings*. s.1082–1084.

Prodromakis, T., Liu, Y., Yang, J., Hollinghurst, D. & Toumazou, C. (2011b) A novel design approach for developing chemical sensing platforms using inexpensive technologies. 2011 *IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)*. s. 369–372.

Quidel. AmpliVue. <<https://www.quidel.com/molecular-diagnostics/amplivue-products>> (Luettu 14.11.2018).

Rello, J., Gallego, M., Mariscal, D., Sonora, R. & Valles, J. (1997) The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **156**:196–200.

Riedel, M., Kartchemnik, J., Schöning, M. J. & Lisdat, F. (2014) Impedimetric DNA detection—steps forward to sensorial application. *Anal Chem* **86**:7867–7874.

Roche. Cobas® Liat® System. <<https://diagnostics.roche.com/us/en/products/systems/cobas-liat-system.html#productSpecs>> (Luettu 16.10.2019).

Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. (2010) Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev* **39**:1747.

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J. Williams, A., Roth, G. T. & Bustillo, J. (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**:348–352.

Schöning, M. J. & Poghossian, A. (2002) Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs). *Analyst* **127**:1137–1151.

Sikaris, K. A. (2017) Enhancing the clinical value of medical laboratory testing. *Clin Biochem Rev* **38**:107–114.

- Sipilä, R. & Honkanen, P. (2017) Antibiootit keuhkoputkitulehduksen hoidossa aikuisilla - Käypä hoito suositus. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=dnd00011>> (Luettu 3.11.2018)
- St John, A. & Price, C. P. (2014) Existing and emerging technologies for point-of-care testing. *Clin Biochem Rev* **35**:155–167.
- Steel, A. B., Herne, T. M. & Tarlov, M. J. (1998) Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Anal Chem* **22**:4670-4677.
- Sun, C.-P., Liao, J. C., Zhang, Y.-H., Gau, V., Mastali, M., Babbitt, J. T., Grundfest, W. S., Churchill, B. M., McCabe, E. R. B. & Haake, D. A (2005) Rapid, species-specific detection of uropathogen 16S rDNA and rRNA at ambient temperature by dot-blot hybridization and an electrochemical sensor array. *Mol Genet Metab* **84**:90–99.
- Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Wang, S., Gryns, T. E., Haydel, S. E. & Tao, N. (2017) Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics* **7**:1795–1805.
- Tanriverdi, S., Chen, L. & Chen, S. (2010) A Rapid and automated sample-to-result HIV load test for near-patient application. *J Infect Dis* **201**:S52–S58.
- Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., van den Eeden, W. C., Graffelman, A. W., van den Broek, P. J. & Claas, E. C. J. (2005) Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* **41**:345–351.
- Thermo Fisher Scientific. Ion Torrent. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/ion-torrent.html>> (Luettu 3.4.2019)
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. (2001) Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* **16**:121–131.
- Toumazou, C., Shepherd, L. M., Reed, S. C., Chen, G. I., Patel, A., Garner, D. M., Wang, C. A., Ou, C., Amin-Desai, K., Athanasiou, P., Bai, H., Brizido, I. M. Q., Caldwell, B., Coomber-Alford, D., Georgiou, P., Jordan, K. S., Joyce, J. C., La Mura, M., Morley, D., Sathyavrudhan, S., Temelso, S., Thomas, R. E. & Zhang, L. (2013) Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system. *Nat Methods* **10**:641–646.
- Tymoczko, J., Schuhmann, W. & Gebala, M. (2014) Electrical potential-assisted DNA hybridization. how to mitigate electrostatics for surface DNA hybridization. *ACS Appl Mater Interfaces* **6**:21851–21858.
- Uhl, J. R., Adamson, S. C., Vetter, E. A., Schleck, C. D., Harmsen, W. S., Iverson, L. K., Santrach, P. J., Henry, N. K. & Cockerill, F. R. (2003) Comparison of LightCycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A *Streptococci* from throat swabs. *J Clin Microbiol* **41**:242–249.

- Umek, R. M., Lin, S. W., Vielmetter, J., Terbrueggen, R. H., Irvine, B., Yu, C. J., Kayyem, J. F., Yowanto, H., Blackburn, G. F., Farkas, D. H. & Chen, Y. P. (2001) Electronic detection of nucleic acids: A versatile platform for molecular diagnostics. *J Mol Diagnostics* **3**:74–84.
- van der Spiegel, J., Lauks, I., Chan, P. & Babic, D. (1983) The extended gate chemically sensitive field effect transistor as multi-species microprobe. *Sensors and Actuators* **4**:291–298.
- van Driel, M. L., De Sutter, A. I., Habraken, H., Thorning, S. & Christiaens, T. (2016) Different antibiotic treatments for group A streptococcal pharyngitis. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27614728>> (Luettu 3.11.2018).
- Veigas, B., Fortunato, E. & Baptista, P. (2015) Field effect sensors for nucleic acid detection: recent advances and future perspectives. *Sensors* **15**:10380–10398.
- Vermeeren, V., Bijmens, N., Wenmackers, S., Daenen, M., Haenen, K., Williams, O. A., Ameloot, M., Vandeven, M., Wagner, P. & Michiels, L. (2007) towards a real-time, label-free, diamond-based DNA sensor. *Langmuir* **23**:13193–13202.
- von Lode, P., Rosenberg, J., Pettersson, K. & Takalo, H. (2003) A Europium chelate for quantitative point-of-care immunoassays using direct surface measurement. *Anal Chem* **75**:3193–3201.
- Waris, M., Ruuskanen, O. & Oksi, J. (2017) Multiplex-PCR-virusdiagnostiikan kliininen käyttö hengitystieinfektioissa. *Duodecim* **133**:1991–1998.
- World Health Organization (2015) Global action plan on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1> (Luettu 17.10.2018)
- World Health Organization. Antibiotic resistance. <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>> (Luettu 17.10.2018)
- Xiao, Y., Lubin, A. A., Baker, B. R., Plaxco, K. W. & Heeger, A. J. (2006) Single-step electronic detection of femtomolar DNA by target-induced strand displacement in an electrode-bound duplex. *Proc Natl Acad Sci* **103**:16677–16680.
- Xu, G., Abbott, J., Qin, L., Yeung, K. Y. M., Song, Y., Yoon, H., Kong, J. & Ham, D. (2014) Electrophoretic and field-effect graphene for all-electrical DNA array technology. *Nat Commun* **5**:4866.
- Xu, S., Zhan, J., Man, B., Jiang, S., Yue, W., Gao, S., Guo, C., Liu, H., Li, Z., Wang, J. & Zhou, Y. (2017) Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor. *Nat Commun* **8**:1–10.
- Yan, Y., Ding, S., Zhao, D., Yuan, R., Zhang, Y. & Cheng, W. (2016) Direct ultrasensitive electrochemical biosensing of pathogenic DNA using homogeneous target-initiated transcription amplification. *Sci Rep* **6**:18810.

- Yeung, S. S. W., Lee, T. M. H. & Hsing, I.-M. (2007) Electrochemistry-based real-time PCR on a microchip. *Anal Chem* **80**:363–368.
- Zhang, G.-J., Luo, Z. H. H., Huang, M. J., Tay, G. K. I. & Lim, E.-J. A. (2010) Morpholino-functionalized silicon nanowire biosensor for sequence-specific label-free detection of DNA. *Biosens Bioelectron* **25**:2447–2453.
- Zhang, J., Lang, H. P., Yoshikawa, G. & Gerber, C. (2012) Optimization of DNA hybridization efficiency by pH-driven nanomechanical bending. *Langmuir* **28**:6494–6501.
- Zhang, A. & Lieber, C. M. (2016) Nano-Bioelectronics. *Chem Rev* **116**:215–257.
- Zhu, Y., Zhang, Y.-X., Liu, W.-W., Ma, Y., Fang, Q. & Yao, B. (2015) Printing 2-dimensional droplet array for single-cell reverse transcription quantitative PCR assay with a microfluidic robot. *Sci Rep* **5**:9551.
- Zhu, B. & Travas-Sejdic, J. (2018) PNA versus DNA in electrochemical gene sensing based on conducting polymers: Study of charge and surface blocking effects on the sensor signal. *Analyst* **143**:687–694.