



Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej genetycznie

Jerzy Radecki¹, Hanna Radecka¹, Jarosław Cieśla²,
Barbara Tudek^{2,3}

¹Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polska Akademia Nauk, Olsztyn

²Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

³Instytut Genetyki i Biotechnologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Chemical sensors and biosensors for the control of GM food

Summary

European Community regulations concerning the control of use and distribution of genetically modified organisms and products resulted in creation of European and National GMO Laboratories Networks, which are specialized in GMO identification and quantification in food, feed and seed. The analyses are mainly based on PCR methods, however, cheaper and less time consuming methods are elaborated for GMO detection. This article summarizes the research on electrochemical biosensors based on nucleic acids hybridization and the perspectives these tools create.

Key words:

GMO laboratory, biosensors, DNA hybridization, food.

1. Wprowadzenie

Unia Europejska przykłada dużą wagę do kontroli wytwarzania, użytkowania i obiegu produktów genetycznie zmodyfikowanych (GMO), czyli takich, które bądź zawierają GMO, bądź pochodzą z surowców GMO. Ma to swój wyraz w szeregu uregulowań prawnych, między innymi nakładających obowiązek organizacji laboratoriów analitycznych, których zadaniem jest kontrola produktów GMO. Laboratoria takie zostały powołane we wszyst-

Adres do korespondencji

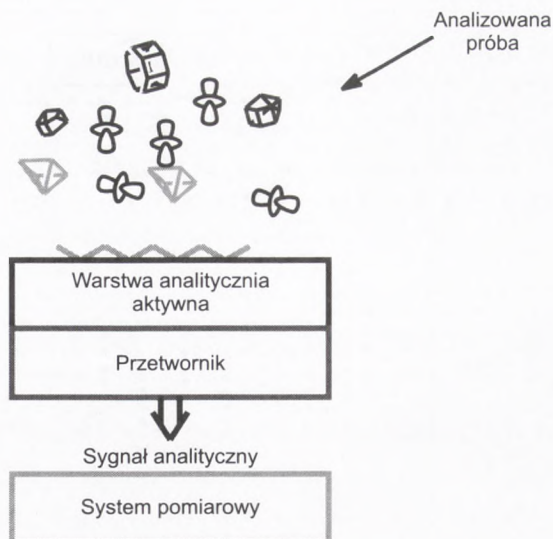
Barbara Tudek,
Instytut Biochemii
i Biofizyki,
Polska Akademia Nauk,
ul. Pawińskiego 5a,
02-106 Warszawa.

kich krajach Unii Europejskiej (z wyjątkiem Malty). W niektórych z nich, np. w Niemczech czy Szwajcarii liczba laboratoriów kontroli GMO jest znaczna i wynosi ponad 20, w innych (np. Węgry) jest ich kilka (dwa do trzech). Codzienna praca tych jednostek opiera się na zasadach wypracowanych wspólnie przez Europejską Sieć Laboratoriów GMO (ENGL, ang. *European Network of GMO Laboratories*), a opiera się przede wszystkim na technikach PCR, jakościowych i ilościowych. ENGL stanowi zaplecze naukowe dla Centralnego Laboratorium Referencyjnego (CRL), którego siedzibą jest Centrum Badań Połączonych (JRC, ang. *Joint Research Center*), Ispra, Włochy. W Polsce zostało otworzonych kilkanaście laboratoriów zrzeszonych w Polską Sieć Laboratoriów GMO, z których pięć włączonych jest do sieci europejskiej. Pomimo dostępu do informacji odnośnie do metod analitycznych oraz możliwości wymiany doświadczeń polskie laboratoria kontroli GMO napotykać szereg trudności zarówno natury legislacyjnej jak i techniczno-ekonomicznej. Prawodawstwo europejskie opiera się bowiem na ocenie procentowej zawartości GMO w produktach, podczas gdy możliwości analityczne są ograniczone do oceny liczby kopii transgenu w stosunku do haploidalnego genomu. Ze względu na różną ploidalność w różnych częściach nasion, ocena ilościowa zawartości GMO w produktach zgodnie z obowiązującymi przepisami jest bardzo trudna. Druga grupa problemów to bardzo duże koszty prowadzenia analiz (w Polsce około 400 zł za analizę jakościową i 1300 zł za analizę ilościową). Tak wysokie koszty niejednokrotnie zniechęcają klientów do korzystania z usług laboratoriów. Szczególnie dotyczy to drobnych eksporterów żywności, dla których koszt ekspertyzy może poważnie ograniczać zysk z transakcji. Również planowane kontrole sklepowe i graniczne skutkują olbrzymim obciążeniem dla budżetu państwa.

W związku z tym w wielu krajach UE rozpoczęto poszukiwanie alternatywnych metod identyfikacji i ilościowego oznaczania produktów GMO. W Polsce kilka laboratoriów pracuje nad stworzeniem biosensorów opartych na hybrydyzacji kwasów nukleinowych, które mogłyby stać się znacznie tańszą i prostszą alternatywą dla obecnie obowiązujących metod wykrywania GMO. W opracowaniu tym przedstawiono możliwości i ograniczenia chemicznych sensorów i biosensorów do identyfikacji określonych sekwencji kwasów nukleinowych.

2. Ogólna charakterystyka sensorów

Sensorem chemicznym nazywamy urządzenie przetwarzające informację chemiczną, dotyczącą np. stężenia określonego składnika próbki na sygnał użyteczny analitycznie (rys. 1). Sensor chemiczny składa się z dwóch elementów: warstwy analitycznie aktywnej oraz elementu przetwornikowego. W warstwie analitycznie aktywnej następuje proces rozpoznania międzymolekularnego (receptor – analit). W trakcie tego procesu zostaje wygenerowany sygnał chemiczny lub fizykochemiczny. Przetwornik jest to ta część sensora, w której sygnał ten zostaje zamieniony na sygnał analityczny.



Rys. 1. Blokowy schemat biosensora.

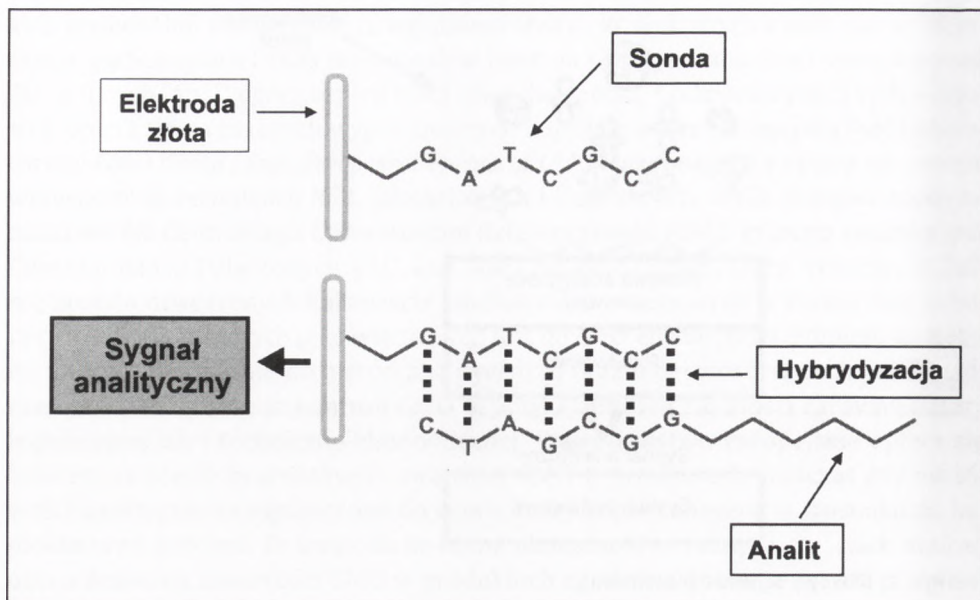
W zależności od natury zastosowanego materiału analitycznie aktywnego sensory można zakwalifikować do dwóch grup:

– **Sensory chemiczne** – materiałem analitycznie aktywnym w tej grupie są syntetyczne molekuly (receptory) zdolne do selektywnego rozpoznania cząsteczek analitu.

– **Biosensory** stanowią grupę sensorów, których analitycznie aktywną warstwę stanowi materiał biologiczny. Najczęściej są to enzymy, przeciwciała, naturalne receptory, mikroorganizmy, DNA, RNA. Ze względu na metody pomiarowe zastosowane w konstrukcji sensora, można je podzielić na: elektrochemiczne, optyczne, termiczne, masowe, spektroskopowe.

Główne zalety biosensorów predestynujące je do zastosowania w analizie żywności to ich relatywnie niska cena, wysoka selektywność, duże możliwości ich miniaturyzacji, a przez to potencjalne ich zastosowanie w analizie ciągłej. W przemysłowej analizie żywności najbardziej atrakcyjnym obszarem, gdzie biosensory mogą znaleźć szerokie zastosowanie, jest analiza patogenów, monitorowanie zawartości pestycydów, antybiotyków, mikroorganizmów oraz toksyn.

W ostatnich latach w związku z wprowadzeniem na rynek żywności genetycznie zmodyfikowanej pojawiła się potrzeba określenia jej genetycznej autentyczności. W pracy skupiliśmy się na opisie trendów badawczych zmierzających do konstrukcji elektrochemicznych biosensorów przeznaczonych do identyfikacji żywności genetycznie zmodyfikowanej, w których procesem rozpoznania międzymolekularnego jest reakcja hybrydyzacji nici DNA.



Rys. 2. Schemat działania elektrochemicznego biosensora opartego na reakcji hybrydyzacji.

Biosensor przeznaczony do identyfikacji produktów genetycznie zmodyfikowanych oparty jest na reakcjach hybrydyzacji komplementarnych nici DNA. Jego warstwą analitycznie aktywną jest powierzchnia przetwornika, na której zostały umocowane pojedyncze nici DNA (sondy). Proces rozpoznania międzymolekularnego odpowiedzialny za generację sygnału analitycznego jest realizowany poprzez reakcję hybrydyzacji pomiędzy pojedynczym łańcuchem DNA, sondą umocowaną na powierzchni przetwornika a komplementarną do niej nicią znajdującą się w roztworze analizowanej próbki.

O praktycznej przydatności każdego sensora analitycznego decydują następujące parametry: jego dolny i górny limit detekcji, selektywność, powtarzalność wyników, czas odpowiedzi. O większości tych parametrów decyduje warstwa analitycznie aktywna danego sensora. W przypadku biosensora opartego na reakcjach hybrydyzacji wybór metody immobilizacji sondy na powierzchni przetwornika ma podstawowe znaczenie dla jego czułości i selektywności.

Generalnie metoda ta powinna zapewnić:

a) dokładną kontrolę gęstości upakowania i przestrzennej orientacji poszczególnych sond w immobilizowanej warstwie w celu umożliwienia najwydajniejszego przebiegu procesu rozpoznania (warstwa zbyt upakowana utrudnia ten proces, natomiast warstwa zbyt luźna umożliwi niespecyficzną adsorbcję na powierzchni elektrody, adsorbcja taka jest źródłem szumów aparaturowych);

b) utworzenie stabilnej warstwy analitycznie aktywnej w warunkach prowadzenia eksperymentu;

c) powtarzalność i łatwość realizacji.

3. Metody przygotowania sond

W literaturze naukowej można znaleźć wiele opisów metodyki immobilizacji sond na powierzchni elektrod. Przedstawiamy kilka najbardziej popularnych i krótką ich ocenę.

3.1. Metoda adsorpcji

Ta metoda najczęściej była stosowana w stosunku do elektrod grafitowych (1), później także stosowano ją do elektrod złotych (2,3). Celem zwiększenia wydajności metody prowadzono immobilizację na powierzchni elektrod, do których przykładano niewielki potencjał dodatni. Przyłożony dodatni potencjał powoduje, że adsorpcja polianionów, jakimi są łańcuchy DNA, realizuje się poprzez grupy fosforanowe szkieletu fosfocukrowego. W efekcie, zasady DNA zorientowane są w kierunku do roztworu. Ta orientacja ułatwia hybrydyzację pomiędzy sondą i poszukiwaną nicią DNA (analitem) (4). Jednak warstwa analityczna utworzona tą techniką jest mało stabilna.

3.2. Metoda tworzenia filmu

Metoda ta polega na wbudowaniu sondy w warstwę polimerową na powierzchni elektrody. Stosowano tu polimery przewodzące (5,6) oraz polimeryczne powierzchnie kationowe (7,8). Podobnie jak poprzednio, sterowana potencjałem adsorpcja nici DNA na tak przygotowanych powierzchniach elektrody powoduje, że są one zorientowane zasadami w kierunku roztworu.

Umieszczanie nici kwasów nukleinowych w polimerze powoduje ich duże upakowanie, ale zarazem mocno ogranicza ich elastyczność konformacyjną. Prowadzi to do pogorszenia kinetyki procesu hybrydyzacji.

Warstwa utworzona tą techniką jest stabilna w warunkach prowadzonego eksperymentu. Dlatego potencjalnie mogłaby być wykorzystana do immobilizacji przeciwciał skierowanych względem białek wytwarzanych przez organizmy GMO i zastąpić testy ELISA.

3.3. Metoda oparta na powinowactwie chemicznym

Jedną z bardziej popularnych metod immobilizacji sondy na przetworniku jest metoda oparta na silnej interakcji pomiędzy awidyną i biotyną (9,10). Immobilizacja sondy w przypadku tej techniki przebiega według dwóch schematów:

- a) elektroda/ awidyna/ biotynylowany oligonukleotyd,
- b) elektroda/ biotyna/awidyna/ biotynylowany oligonukleotyd.

Uzyskana tą metodą warstwa analityczna cechuje się dużą trwałością. Daje ona możliwość kontroli gęstości upakowania sond na powierzchni przetwornika.

3.4. Chemisorpcja sond na powierzchni elektrody złotej (przetwornika) poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego Au-S

Jest to najbardziej rozpowszechniona metoda polegająca na spontanicznej reakcji pomiędzy powierzchnią złotej elektrody a sondą zmodyfikowaną na jednym końcu grupą alkenotiolową. Metoda ta:

- daje bardzo dobre możliwości sterowania ustawieniem sondy w stosunku do powierzchni elektrody i gęstością jej rozmieszczenia,
- zapewnia dużą dynamikę konformacyjną zimmobilizowanej sondy,
- umożliwia tworzenie tak zwanych warstw mieszanych zawierających oprócz sondy, np. alkenotiole eliminujące możliwości niespecyficznego adsorbpcji na powierzchni elektrody biomolekuł pochodzących z analizowanej próby.

Technika ta ze względu na opisane zalety, a także relatywnie łatwą procedurę przygotowania jest najszerszej stosowana do konstrukcji biosensorów opartych na reakcji hybrydyzacji (11,12).

Wspomniano, że generowany przez biosensor sygnał analityczny jest efektem procesu rozpoznania między analitem i jego warstwą analitycznie aktywną. W przypadku kwasów nukleinowych jest to reakcja hybrydyzacji analizowanej sekwencji DNA z sekwencją komplementarną (sondą) zimmobilizowaną na powierzchni elektrody. Fyzykochemiczny sygnał będący efektem tej reakcji za pomocą przetwornika zostaje zamieniony na sygnał analityczny.

W przypadku biosensorów opartych na reakcji hybrydyzacji najczęściej stosowane są przetworniki optyczne (13), elektrochemiczne (14,15) i mikrogravimetryczne (16).

W ostatnim dziesięcioleciu elektrochemiczne techniki detekcji i analizy DNA zyskują coraz większą popularność jako metody molekularnej diagnostyki w medycynie, ochronie środowiska, a także do testowania genetycznej autentyczności produktów żywnościowych. Metody te są relatywnie tanie, łatwe w obsłudze i mogą być stosowane poza laboratorium. Dlatego w tym opracowaniu ograniczymy się do technik elektrochemicznych.

Generalnie stosuje się dwie strategie generowania elektrochemicznego sygnału analitycznego przez biosensory oparte na reakcji hybrydyzacji: metodę bezpośrednią i metodę pośrednią.

3.4.1. Metoda bezpośrednia

Metoda ta opiera się na elektroaktywności kwasów nukleinowych. Związana jest z katalitycznym utlenianiem zasad i cukrów wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Metody bezpośrednie stosowane były raczej we wczesnym stadium rozwoju elektrochemicznych metod detekcji kwasów nukleinowych. Ponad czterdzieści lat temu Palecek i wsp. opisali metodę rozróżniania pojedynczej nici DNA od podwójnej w oparciu na reakcji jego bezpośredniej redukcji na kroplowej elektrodzie rtęciowej (17). Ten sam autor w 1988 r. opracował metodę opartą na adsorpcyjnej woltamperometrii stryppingowej (ASV) (18). W technice tej etap redukcji kwasu nukleinowego poprzedzony jest okresem, w którym następuje jego zagęszczenie na powierzchni elektrody rtęciowej. Technika ta wyróżnia się bardzo wysoką czułością.

Główną wadą opisanych technik jest konieczność zastosowania wysokiego potencjału, dla przeprowadzenia bezpośredniego utlenienia DNA na powierzchni elektrod stałych. W celu ominięcia tego problemu zaproponowano dwustopniową procedurę detekcji kwasów nukleinowych. Pierwszy etap polega na przeprowadzeniu reakcji hybrydyzacji pomiędzy sondami DNA zimmobilizowanymi na magnetycznych mikrokulkach a analizowanym kwasem nukleinowym z roztworu badanej próbki. W następnym etapie kulki te zostają magnetycznie wydzielone z całej próby. Zebrany w ten sposób DNA zostaje depurynowany w roztworze kwaśnym, a uwolnione guanina i adenina są analizowane za pomocą techniki ASV. Stosując tę procedurę autorom udało się oznaczyć DNA na poziomie 40 femtomoli ($\sim 2 \times 10^{10}$ cząsteczek) (19).

3.4.2. Metody pośrednie

Metody te są oparte na:

- zmianach elektrochemicznych właściwości przewodzących polimerów wywołanych reakcją hybrydyzacji. Pierwszy zastosował to Korii-Youssoufi. Wykorzystał on fakt, że reakcja hybrydyzacji przeprowadzona na powierzchni elektrody modyfikowanej pirolowymi pochodnymi kwasów nukleinowych powoduje przesunięcie potencjału utleniania pirolu w kierunku potencjału bardziej dodatniego (20);

- zmianach jonowego przewodnictwa podwójnej błony lipidowej w wyniku zajścia reakcji hybrydyzacji. W tej metodzie wykorzystano fakt, że wprowadzenie do podwójnej błony lipidowej sondy w postaci oligonukleotydów zmodyfikowanych łańcuchami alkilowymi podwyższa przewodnictwo jonowe błony. Po wewnątrz błonowej hybrydyzacji sondy z komplementarnym oligonukleotydem pochodzącym z roztworu badanej próbki przewodnictwo jonowe membrany maleje. Wywołane jest to wypłukiwaniem z błony powstałej dwuniciowej helisy na skutek jej większej hydrofilowości. Opisywana metoda jest bardzo czuła i relatywnie prosta w wykonaniu. Problemem jest jej powtarzalność (21,22).

3.5. Reakcje redox markerów niekowalencyjnie związanych z dwuniciowym DNA

W tej technice wykorzystuje się różne powinowactwo markerów elektrochemicznych do pojedynczych i podwójnych nici DNA. Markery te wiążą się z DNA poprzez:

- elektrostatyczne przyciąganie,
- wiązanie w rowkach helisy,
- interkalacji do wnętrza helisy.

Markery związane w rowkach DNA ze względów oczywistych mają znacznie większe powinowactwo do dsDNA niż do pojedynczej nici. W przypadku markerów związanych przez przyciąganie elektrostatyczne, ich powinowactwo jest mniejsze w stosunku do helisy niż w stosunku do pojedynczej nici DNA. Oczywiście markery interkalujące do wnętrza helisy mają powinowactwo do dwuniciowego DNA i nie są związane przez pojedynczą nić. Wykorzystując te różnice w powinowactwie konstruuje się biosensory selektywne dla poszczególnych form DNA. Biosensory otrzymane tą techniką wykazują zadowalającą czułość, są relatywnie łatwe w przygotowaniu, ale charakteryzują się niską selektywnością.

Marker redox, który byłby idealny do zastosowania w biosensorych opartych na reakcji hybrydyzacji powinien wykazywać następujące cechy:

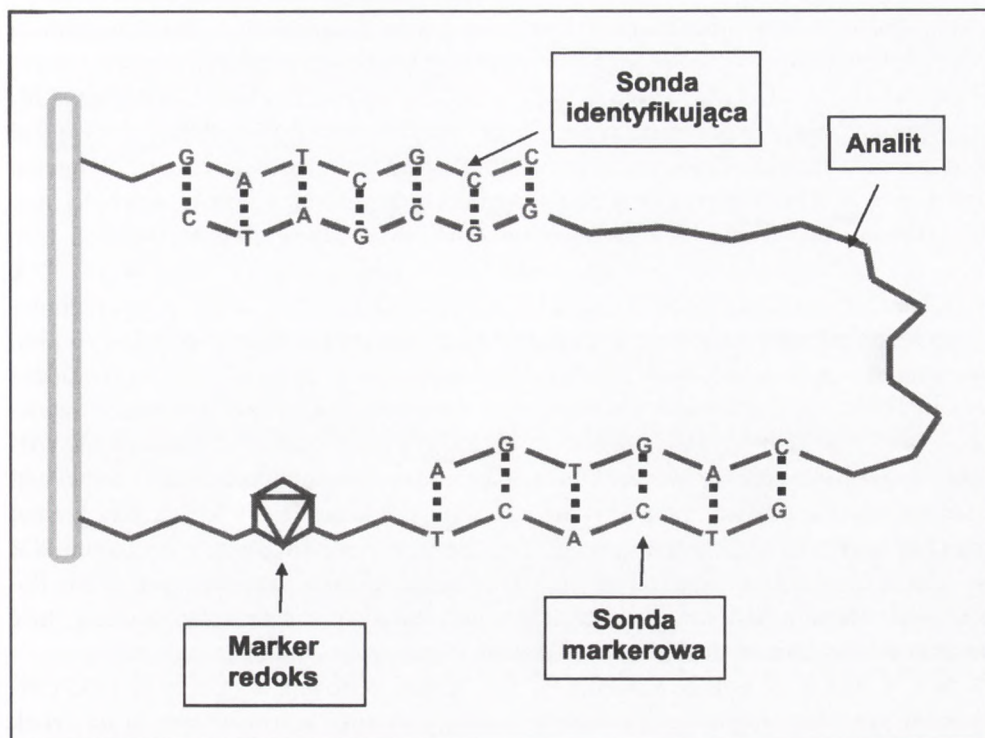
- zdecydowanie większe powinowactwo do jednej z form DNA (nici pojedynczej lub podwójnej),
- potencjał redox markera powinien znajdować się poza potencjałem redox kwasów nukleinowych,
- reakcja redox z udziałem markera powinna być odwracalna i szybka, a powstające w jej wyniku produkty powinny być stabilne.

W literaturze można znaleźć wiele opisów sensorów pracujących w oparciu na takich markerach (23-25).

3.6. Reakcje redox markerów kowalencyjnie związanych z sondą lub analitem

W pierwszych próbach zastosowania tej techniki analit DNA był modyfikowany markerem redoks. W wyniku reakcji hybrydyzacji pomiędzy znakowaną nicią DNA i zimmobilizowaną na powierzchni elektrody sondą powstaje helisa z przyłączonym markerem redox. Potwierdzeniem utworzenia helisy jest pojawienie się na woltamogramie piku utlenienia lub redukcji przy potencjale charakterystycznym dla danego markera (26,27).

W ostatnim czasie pojawiły się nowe sposoby wykorzystania kowalencyjnie związanych markerów redox. Innowacja polega na tym, że marker jest związany z syntetyczną sekwencją DNA wiążącą się z analizowaną nicią w miejscu oddalonym od sekwencji komplementarnej do sekwencji sondy. Obie sekwencje sondy i sekwencja



Rys. 3. Schemat wiązania analitu w mieszanej warstwie analitycznej.

modyfikowana markerem są immobilizowane w mieszanej warstwie na powierzchni elektrody. W wyniku reakcji hybrydyzacji analizowana sekwencja DNA jest wiązana z elektrodą w dwóch miejscach, poprzez sondę i sondę modyfikowaną markerem (rys. 3). Reakcja modyfikowanej sondy z analitem powoduje zmiany właściwości redox markera, a także wartości generowanego prądu faradajowskiego, będącego konsekwencją przebiegu reakcji utleniania i redukcji. Technika ta pozwala na konstrukcje nie tylko czułych, ale bardzo selektywnych biosensorów (28,29).

4. Przykłady stosowania biosensorów opartych na hybrydyzacji kwasów nukleinowych do wykrywania GMO

Pomimo potencjalnych korzyści z zastosowania biosensorów do kontroli GMO w produktach rynkowych, metody te wciąż są na etapie badań naukowych. Przyczyn takiego stanu rzeczy jest wiele. Mogą one wynikać z faktu, że metoda identyfikacji i ilościowej oceny GMO jest „dostarczana” wraz z produktem do Komisji Europejskiej przez firmę wytwarzającą GMO. Aby metoda taka mogła wejść do oficjalnie

działających laboratoriów kontroli GMO, musi zostać poddana walidacji w testach międzylaboratoryjnych, które są organizowane przez CRL w oparciu na sieci europejskich laboratoriów GMO. Koszty takiej walidacji są bardzo duże, a pokrywa je firma wprowadzająca produkt na rynek. Poza tym, jak dotąd, nie udało się stworzyć biosensora o odpowiedniej czułości, który mógłby być stosowany bez powielenia transgenu w reakcji PCR, a zatem bez pominięcia najbardziej kosztownej części analizy jakościowej. Niemniej jednak udało się opracować kilka systemów detekcji, które mogą konkurować ze stosowaną oficjalnie metodą analizy ilościowej – PCR w czasie rzeczywistym. Jednym z takich rozwiązań jest zastosowanie powierzchniowego rezonansu plazmonowego do ilościowego oznaczania kukurydzy Bt-176 (30). W metodzie tej biotynylowane produkty multipleksowej reakcji PCR przeprowadzonej na DNA pochodzącym z kukurydzy nietransgenicznej oraz kukurydzy zawierającej 0,5 lub 2% modyfikacji genetycznej BT-176 zostały immobilizowane w różnych przepływowych kuwetach biosensora. Do immobilizowanych sekwencji wstrzykiwano sondy komplementarne do genu odniesienia dla kukurydzy (zeiny) oraz transgenu. Czułość uzyskiwanego sygnału była porównywalna z wynikami PCR w czasie rzeczywistym i pozwalała na odróżnienie próbek zawierających różne ilości GMO. Metoda jest interesująca, niemniej jednak wymaga zastosowania dość kosztownej aparatury do zbierania sygnału.

Innym ciekawym opracowaniem jest stworzenie genosensora dla genu NOS (terminator syntetazy nopaliny) stosowanego w większości wprowadzanych na rynek modyfikacji genetycznych (31). W metodzie tej 25-nukleotydomowa jednoniciowa sekwencja komplementarna do genu NOS jest immobilizowana na drukowanej jednorazowej elektrodzie grafitowej. Zbierany jest sygnał prądu pochodzącego z redukcji błękitu metylenowego, fotouczulacza wiążącego się specyficznie z resztami guaniny w DNA. Hybrydyzacja sekwencji komplementarnej zmniejsza wielkość sygnału emitowanego przez błękit metylenowy. Różnica w emisji sygnału jest miarą zawartości GMO w badanym materiale. Limit detekcji wynosi w tej metodzie 1,9-2,5 µg/ml, a zatem metoda jest bardzo czuła.

W Polsce zespół Uniwersytetu Gdańskiego kierowany przez Grzegorza Węgrzyńca pracuje nad stworzeniem biosensorów do wykrywania infekcji bakteriofagowych w bioreaktorach zawierających kultury bakteryjne. Sensory te oparte są albo na wykrywaniu specyficznych sekwencji nukleotydowych faga (32) albo specyficznych białek fagowych (33). W obu metodach elektroda zawieszona w celi przepływowej, przez którą przepompowywana jest zawartość bioreaktora zbiera sygnał elektryczny pochodzący z redukcji paraaminofenolu do chinonu na anodzie sensora. Chinon jest powrotnie utleniany do paraaminofenolu na katodzie sensora i w ten sposób powstaje prąd mierzony przez sensor. Ilość paraaminofenolu dostępnego w takim cyklu redoks zależy od liczby reakcji hybrydyzacji badanych sekwencji nukleotydowych z sondą lub od liczby reakcji badanych białek wirusowych z przeciwciałami umieszczonymi na chipie. Metody są bardzo czułe i wykazują dobre parametry ilościowe. Poza tym detektory charakteryzują się niewygórowaną ceną.

Autorzy tego artykułu również pracują nad stworzeniem elektrycznych sensorów do wykrywania zmodyfikowanej genetycznie soi (RoundupReady®). We wstępnych wynikach wskazuje się na możliwość identyfikacji obecności transgenu w DNA izolowanym z ziaren GMO bez amplifikacji specyficznych sekwencji, jednak limit detekcji nie jest jeszcze oznaczony.

5. Podsumowanie

Tak jak pokazaliśmy w ostatniej dekadzie prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem elektrochemicznych biosensorów opartych na reakcji hybrydyzacji. Zainteresowanie to jest spowodowane możliwościami jakie narzędzia te oferują. Najważniejsze to ich wysoka czułość, selektywność, łatwość w obsłudze. Cechy te czynią z nich narzędzia umożliwiające prowadzenie na szeroką skalę monitorowania jakości genetycznej produktów żywnościowych na wielu etapach ich drogi z pola do talerza.

Artykuł ten był częściowo finansowany ze środków projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Edukacji 2P06T 01429.

Literatura

1. Wang J., Fernandes J. R., Kubota Lt., (1998), *Anal. Chem.*, 70, 3699-3702.
2. Wang J., Jiang M., Mukherjee B., (2000), *Bioelectrochem.*, 52, 111-114.
3. Xu J., Zhu Y., Gu K., Chen H. Y., (2002), *Anal. Lett.*, 34, 503-512.
4. Lin X., Zheng S., Miao W., Jin B., (2002), *Anal. Lett.*, 35, 1373-1385.
5. Wang J., Jiang M., Fortes A., Mukherjee B., (1999), *Anal. Chim. Acta*, 402, 7-12.
6. Jiang M., Wang J., (2000), *J. Electroanal. Chem.*, 500, 584-589.
7. Xu C., Cai H., Xu Q., He P. G., Fang Y. Z., (2001), *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369, 428-432.
8. Kara P., Kerman K., Ozakan D., Meric B., Redeem A., Nielsen P. E., Ozsoz M., (2002), *Electroanalysis*, 14, 1685-1690.
9. Alfonta L., Singh A. K., Willner L., (2001), *J. Anal. Chem.*, 73, 91-96.
10. Okahata Y., Kawase M., Niikura K., Ohatake I., Furusawa H., Ebra Y., (2002), *Chem. Commun.*, 470-471.
11. Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K., (2003), *Nature Biotechnology*, 21, 1192-1199.
12. Shu-feng L., Young-fang L., Jin-ru L., (2005), *Biosensors & Bioelectronic*, 21, 789-795.
13. Selinger D. W., Cheung K. J., Mei R., Johansson E. M., Richmond C. S., Blattner Fr., Lockhart D. J., Church G. M., (2000), *Nature Biotechnology*, 18, 1262-1268.
14. Wang J., (2002), *Analytica Chimica Acta*, 469, 63-71.
15. Park N. Y., Halm J. H., (2004), *Anal. Chem.*, 76, 9000-9006.
16. Liu T., Zhao H. Q., Deng Y. P., Jiang L., (2002), *Langmuir*, 18, 5624-5626.
17. Palecek E., (1960), *Nature*, 188, 656-657.
18. Palecek E., (1998), *Anal. Biochem.*, 170, 421-341.
19. Wang J., Kawade A. B., (2002), *Analist*, 127, 383-386.
20. Korri- Youssoufi H., Makrouf B., (2002), *Anal. Chim. Acta*, 469, 85-92.

21. Siontouri C., Nikolelis D., Piumno P., Krull U., (1997), *Electroanalysis*, 9, 1096-1099.
22. Hianik J., Fajkus M., Sivak B., Rosenberg P., Kois P., Wang J., (2000), *Electroanalysis*, 495-498.
23. Yang W., Ozsoz M., Hibbert D. B., Gooding J. J., (2002), *Electroanalysis*, 14, 1299-1302.
24. Erdem A., Kerman K., Meric B., Akarca U. S., Ozsoz M., (2000), *Anal. Chim. Acta*, 286, 219-224.
25. Tai A., Thomson A. J., Butt J. N., (2001), *Analyst*, 126, 1756-1759.
26. Yu C. J., Wan Y., Yowanto H., Li J., Tao C., James M. D., Tan C., Blackburn G. F., Meade T. J., (2001), *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 11155-11161.
27. Brazill S. A., Kim P. H., Kuhr W. G., (2001), *Anal. Chem.*, 73, 4882-4890.
28. Umek R. M., (2001), *J. Mol. Diag.*, 3, 74-84.
29. Wang J., Liu G. D., (2003), *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3214-3215.
30. Feriotto G., Grdenghi S., Bianchi N., Gambari R., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4640-4646.
31. Meric B., Kerman K., Marrazza G., Palchetti I., Mascini M., Ozsoz M., (2004), *Food Control*, 15, 621-626.
32. Gabig-Cimińska M., Los M., Holmgren A., Albers J., Czyż A., Hintsche R., Węgrzyn G., Enfors S. O., (2004), *Anal. Biochem.*, 324, 84-91.
33. Łoś M., Łoś J. M., Blohm L., Spillner E., Grunwald T., Albers J., Hintsche R., Węgrzyn G., (2005), *Lett. Appl. Microbiol.*, 40, 479-485.