

## PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

### ELEKTROCHEMICKÁ STUDIE OLIGONUKLEOTIDOVÝCH SOND ZNAČENÝCH KVANTOVÝMI TEČKAMI PRO DETEKCI NUKLEOVÉ KYSELINY VIRU AFRICKÉHO MORU PRASAT

Článek je věnován 60. výročí udělení Nobelovy ceny za polarografickou metodu analýzy prof. Jaroslavu Heyrovskému.

**DOMINIK BANÁŠ<sup>a,b,f</sup>, DAVUT AHMET AKSU<sup>b,c,d</sup>, MARTA VALLE NOGUERA<sup>b,c,e</sup>, MERT PAY<sup>b,c,d</sup>, BOŽENA HOSNEĎLOVÁ<sup>f</sup> a RENÉ KIZEK<sup>b,c,f</sup>**

<sup>a</sup> Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno-Bohunice, Česká republika, <sup>b</sup> Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o., Tovární 342, 742 13 Studénka, Česká republika, <sup>c</sup> Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, Česká republika, <sup>d</sup> Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Adnan Menderes Bulvarı Vatan Caddesi, 34093 Fatih, Istanbul, Turecko, <sup>e</sup> UB Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentaci, Campus Diagonal, Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Španělsko, <sup>f</sup> Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Česká republika kizek@sci.muni.cz

Došlo 30.11.19, přepracováno 17.4.20, přijato 2.6.20.

**Klíčová slova:** technika adsorpčního přenosu, cyklická voltametrie, diferenční pulzní voltametrie, biosensor, virová onemocnění

#### Úvod

Africký mor prasat je velice vážné virové onemocnění, které postihuje příslušníky čeledi prasatovití (*Suidae*)<sup>1</sup>. Smrtnost se pohybuje mezi 60–100 % nakažených zvířat<sup>2</sup>. Z endemické oblasti subsaharské Afriky se v posledních letech rozšířilo přes zakavkazskou oblast do Ruska, Číny i států Evropské unie<sup>2–8</sup> (obr. 1A). Onemocnění významně ovlivnilo ekonomiku světových producentů vepřového masa (v Číně pokles produkce vepřového masa za poslední tři roky o více než 20 %), (obr. 1B)<sup>9</sup>. I přes veškeré snahy různých výzkumných týmů dosud neexistuje proti tomuto onemocnění vhodná vakcína<sup>10</sup>. Mezi metody analýzy vyu-

žívané pro detekci přítomnosti viru patří polymerázová řetězová reakce (PCR, cit.<sup>11,12</sup>), imunochemické<sup>13</sup> či enzymatické metody<sup>14</sup>. Tyto techniky však vyžadují odpovídající laboratorní vybavení a kvalifikovanou obsluhu. Vzhledem k nutnosti rychlé identifikace bakteriálních a virových patogenů narůstá zájem o využití jednoduchých a uživatelsky přívětivých biosenzorů. Ze vzorku je nutné izolovat virus, který lze identifikovat přímo (mikroskopicky) nebo je možné detegovat části virionu (obr. 1C) fotometrickou, fluorescenční nebo elektrochemickou metodou<sup>15–17</sup>. Vhodným vzorkem pro analýzu může být tělní tekutina nebo tkáň zvířete. Elektrochemické senzory založené na hybridizaci nukleových kyselin (NK) využívají ke značení elektroaktivních značek (kovy, oxidy kovů, enzymy, kvantové tečky, nanočástice)<sup>18–21</sup> (obr. 1D, 1E). Kvantové tečky (QD, quantum dots) mají velmi dobré vlastnosti pro použití v elektrochemické detekci. Povrch CdTe QD (cit.<sup>22</sup>) lze modifikovat různými molekulami, a tak je využívat pro návrhy biosenzorů nukleových kyselin. Elektrochemické chování nukleových kyselin popsal prof. Paleček před více než šedesáti lety<sup>23</sup> a těchto vlastností je nyní hojně využíváno při konstrukci senzorů<sup>21</sup>. Je známo, že NK vytvářejí strukturální motivy, které je možné využít pro detekci různých analytů (aptamery, kvadruplexy apod.)<sup>24–27</sup>. Cílem této práce bylo studium elektrochemického chování oligonukleotidů specifických pro genom (DNA) viru afrického moru prasat a kvantových teček a jejich vzájemné interakce.

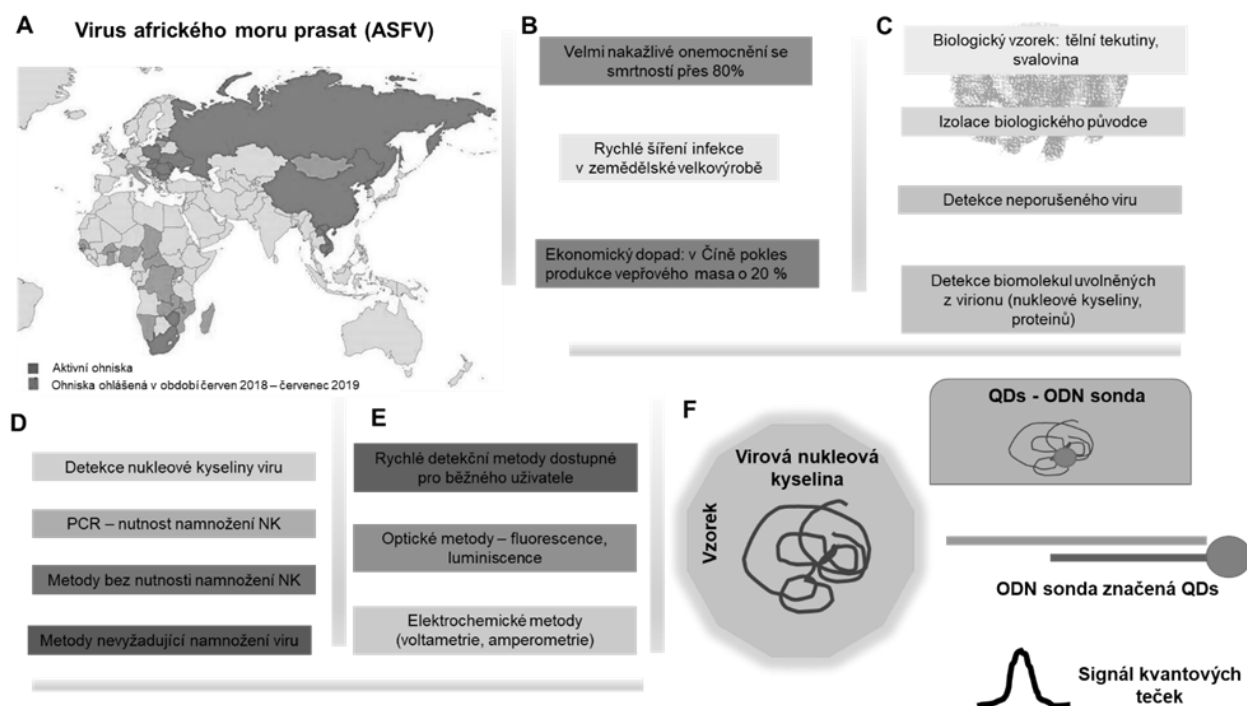
#### Experimentální část

##### Chemikálie

Kyselina octová kyselina, trihydrát octanu sodného, dihydrát octanu kademnatého, merkaptosukcinová kyselina, tetrahydridoboritan sodný, teluricitan sodný a hydroxid amonný, byly zakoupeny od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Oligonukleotidy King F (5'-CTGCTCATGG-TATCAATCTTATCGA-3', a King R (5'-GATA-CCACAAGATCAGCCGT-3')<sup>28</sup> byly syntetizovány firmou Generi Biotech v PCR kvalitě (Hradec Králové, Česká republika), 0,2 mol l<sup>-1</sup> acetátový pufr, pH 5,0, *I* = 0,14

##### Syntéza kvantových teček

Směs pro syntézu kvantových teček byla připravena smícháním Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (20 mmol l<sup>-1</sup>), merkaptosukcinové kyseliny (0,4 mol l<sup>-1</sup>) a NH<sub>3</sub> (1 mol l<sup>-1</sup>). Směs byla promíchána 2 min na elektromagnetické míchače (VMS-C4, VWR International Ltd., Darmstadt, Německo), čímž došlo ke zbarvení původně bezbarvého roztoku.



Obr. 1. Pandemie viru afrického moru prasat (ASFV) je vážným globálním problémem. Je nezbytné hledat vhodné strategie pro rychlou diagnostiku viru přímo v terénu. **A)** Mapa aktuálního rozšíření ASFV v Evropě, Asii a Africe (červen 2018–červenec 2019)<sup>7,9</sup>. **B)** ASFV postihující zástupce čeledi *Suidae* (prasatovití) je pro své socioekonomické důsledky v zemědělské velkovýrobě a vysokou smrtnost zařazen v kategorii biohazard (BSL3). **C)** Možnosti neinvazivní diagnostiky ASFV z dostupných biologických vzorků (tělní tekutina, svalová tkáň, potravina apod). **D)** Metodické přístupy analýzy nukleových kyselin viru. **E)** Analytické metody vhodné pro využití v přenosných detektorech. **F)** Schéma elektrochemické detekce založené na oligonukleotidové sondě značené kvantovou tečkou pro identifikaci přítomnosti virové nukleové kyseliny.

Směs byla dále míchána 2 hodiny pro vypuzení vodíku jako vedlejšího produktu reakce. Poté byla směs pipetována po 2 ml do skleněných ampulek (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) s teflonovým víčkem a uzávěrem (Anton Paar, Graz, Rakousko). Ampulky obsahující připravenou směs byly zahřívány v mikrovlnné troubě (120 W, 60–320 s). Barva kvantových teček závisela na délce mikrovlnného ohřevu (2 min – zelené tečky, 3 min – žluté tečky, 4 min – oranžové tečky a 5 min – červené tečky).

#### Gelová elektroforéza QD

Pro analýzu byl použit elektroforetický zdroj VWR E 0322-VWR-230 V a mini-horizontální elektroforetický systém (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA). Typ gelu: SDS PAGE gel složený ze dvou částí (koncentrační a separační). Složení koncentračního gelu: 15% (m/V) akrylamid, 0,5% (m/V) bisakrylamid, 0,1% dodecylsulfát sodný (SDS; m/V), 0,083% *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin (TEMED; V/V), 0,05% peroxosíran amonný (APS; m/V), 0,35 mol l<sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 8,8. Složení separačního gelu: 4,5 % akrylamidu (m/V), 0,15 % bisakrylamidu (m/V), 0,1 % SDS (m/V), 0,1 % TEMED (V/V), 0,05 % APS (m/V), 0,12 mol l<sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 6,8.

Testované QD byly zředěny 30% vodním glycerolem (v ultračisté vodě) v poměru 2 : 1. Podmínky pro elektroforézu byly: 100 V po dobu 1,5 hodiny v elektroforetickém pufru (Tris, 0,2 mol l<sup>-1</sup> glycin a 3 mmol l<sup>-1</sup> SDS). Po dokončení elektroforézy byl gel přenesen do temné místnosti, kde byl osvětlen UV lampou, a byla provedena fotografická dokumentace (Canon, 12Mpx).

#### Přístroje

Pro měření technikou adsorpční přenosové rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdTS DPV, podrobnosti v práci<sup>29</sup>) byl použit elektrochemický analyzátor AUTOLAB 101 ve spojení s 663 VA Stand (Metrohm, Herissau, Švýcarsko); pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), pomocnou grafitová elektroda a referenční Ag/AgCl/3M KCl. Diferenční pulsní voltametrie (DPV) měla následující parametry: (1. procedura) rozsah napětí od 0 V do -1,7 V, výška pulsu 25 mV, šířka pulsu 0,05 s, interval vzorkování proudu 0,025 s, čas mezi pulsy 1 s. (2. procedura) rozsah napětí -1,7 V až 0 V, výška pulsu 0,025 V, šířka pulsu 0,05 s, čas mezi pulsy 0,5 s. Pro automatizované DPV měření (Cd<sup>2+</sup>) byl použit automatický elektrochemický analyzátor 746 VA Trace Analyzer (Metrohm, Herissau, Švýcarsko). Parametry

měření: objem vzorku 50  $\mu\text{l}$ , objem acetátového pufru pro naředění vzorku 10 ml, trojnásobné promytí měřicí cely (25 ml); pracovní elektroda HMDE, pomocná grafitová elektroda, referenční elektroda Ag/AgCl/3M KCl. Parametry DPV: výška pulsu 25 mV, začátek měření  $-1,2$  V, konec měření 0 V, potenciálový krok 4 mV, šířka pulsu 40 ms, interval vzorkování proudu 10 ms, doba probublání argonem 120 s.

#### Kontrola dat a statistická analýza

Všechna experimentální data byla evidována a ukládána do laboratorního informačního systému Qinslab (Prevention Medicals, ČR). Dostupná experimentální data byla zpracována a vyhodnocena matematicky a statisticky přímo v databázi Qinslab. Vyloučení extrémních hodnot u souborů dat bylo provedeno Grubbsovým testem. Veškerá měření byla provedena nejméně třikrát. Získaná data prezentovaná v této práci jsou uvedena jako průměrné hodnoty. Pro hodnocení rozdílu byla vypočtena pravděpodobnost  $P$ . Hodnoty  $LOD$  a  $LOQ$  a další statistické parametry byly stanoveny na hladině významnosti 95 %.

Další použité metody jsou uvedeny v Doplnku k této práci uveřejněném na www stránce časopisu Chemické Listy.

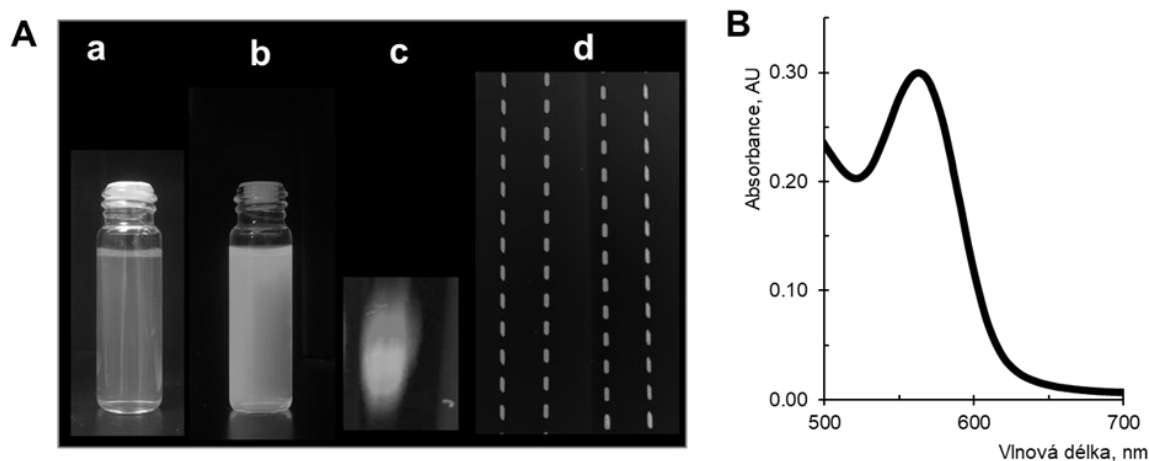
#### Výsledky a diskuse

Eivazzadeh-Keihan a spol. sumarizovali dostupná experimentální data a trendy v biosenzorovém výzkumu zaměřeném na detekci virů<sup>30</sup>. Přehled přístupů v detekci virového či bakteriálního patogenu při využití kvantovými tečkami značeného oligonukleotidu je uveden na obr. 1F. Navíc je pro tento účel možné využít dalších nanotechnologických přístupů<sup>31</sup>.

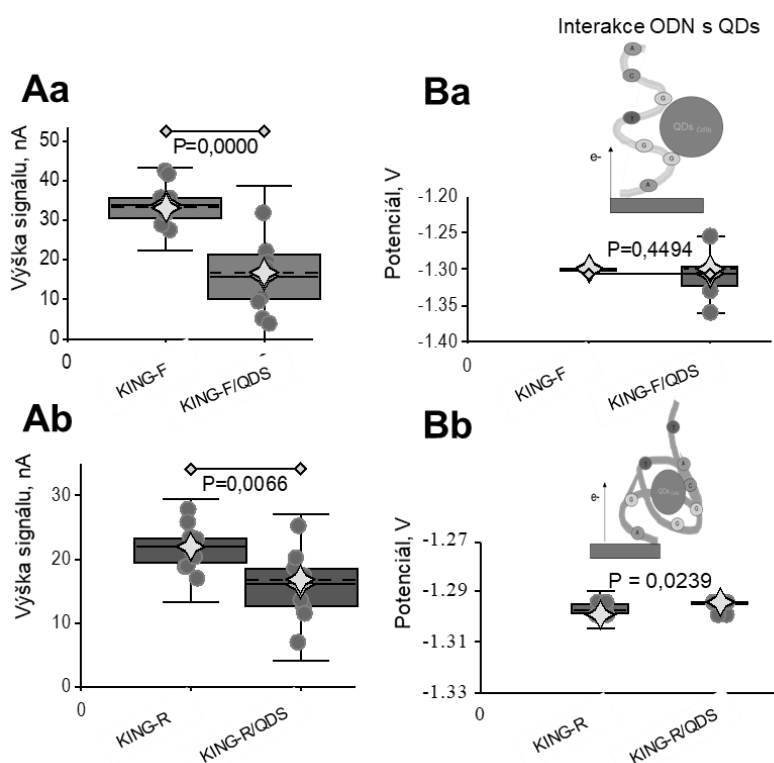
ODN King F a King R byly elektrochemicky analyzovány technikou AdTS DPV. Byla studována variabilita CA signálu (redukční signál cytosinu a adeninu v oblasti kolem  $-1,3$  V) ODN ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) po dobu 15 dnů z 10  $\mu\text{l}$  kapky ( $n = 3$ ). Vyhodnocení dat bylo uskutečněno regulačním diagramem, kde žádná z hodnot CA signálu nepřekročila hodnotu  $x \pm 2SD$ . Uspokojivé výsledky umožnily studovat závislost koncentrace ODN King F v rozsahu 0,4 až  $1,75 \mu\text{g ml}^{-1}$  a ODN King R v rozsahu 0,1 až  $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$  na CA signálu. Získané závislosti vykazovaly lineární trend a podrobně jsou popsány v Doplnku v tab. I.

Kvantové tečky CdTe byly připraveny mikrovlnnou syntézou ve 20 různých barevných odstínech (od zelených až po červené). Pro experiment byly QD nejdříve sráženy a následně znovu dispergovány ve vodě. Na základě analýzy fluorescence byly vybrány QD s největším Stokesovým posunem (280 nm) a vysokou relativní intenzitou excitace a emise (kvantový výtěžek byl 0,25 v porovnání s fluoresceinem). Typický vzhled získaných oranžových kvantových teček je na obr. 2A (2Aa – neozářené kvantové tečky, 2Ab – ozářené kvantové tečky UV zářením s vlnovou délkou 305 nm). Další podrobnější charakteristika QD je uvedena v Doplnku v tab. II. Na obr. 2Ac jsou patrné QD separované na PAGE gelu, kde je zřetelná výrazná distribuce převážně červených a oranžových QD. Stabilita připravených CdTe QD byla zjišťována jejich tisknutím na filtrační papír. Částice vykazovaly fluorescenční vlastnosti po více než 60 dnech (obr. 2Ad). Na obr. 2B je znázorněno absorpční spektrum vybraných QD s charakteristickým maximem při 550 nm.

Byl proveden interakční experiment ( $n = 10$ ), kdy byl měřen signál ODN King F ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a King R ( $300 \text{ ng ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 3 min), následně byla zkoumána interakce mezi: a) King F a oranžovými QD ( $6 \mu\text{mol l}^{-1}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 2 min), b) King R a oranžovými QD ( $6 \mu\text{mol l}^{-1}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 2 min). Byl měřen CA signál a signál  $\text{Cd}^{2+}$  interakce oligonukleotid-



Obr. 2. Charakterizace mikrovlnnou syntézou připravených CdTe QD. Fotografie přirozeného zabarvení (Aa), pod UV světlem 305 nm (Ab), na agarovém gelu (Ac) a natisklé na filtrační papír (Ad), absorpční spektrum (B), ředění roztoku 1:9 ultračistou  $\text{H}_2\text{O}$ , délka optické dráhy kyvety 1 cm



Obr. 3. Studium interakce ODN s CdTe QD. Porovnání změny CA signálu pro variantu King F, resp. King R a King F/QD, resp. King R/QD (Aa, Ab). Dále je vyobrazena změna potenciálu píku CA signálu (Ba, Bb). Další podrobnosti jsou uvedeny v kapitole Experimentální část

tečka a QD. Na obr. 3 je znázorněn statisticky signifikantní rozdíl signálů mezi variantou King F, King R a King F/QD, King/R/QD. Průměrný CA signál byl pro King F ( $33 \pm 5$  nA) a King F / QD ( $16 \pm 9$  nA),  $P = 0,00001$  ( $P$  je hladina pravděpodobnosti shody výsledků) a pro King R ( $22 \pm 3$  nA) a King R /QD ( $16 \pm 9$  nA),  $P = 0,0056$ , byl také prokázán rozdíl mezi potenciálem CA signálu pro variantu King R a King R s tečkami,  $P = 0,0239$  (obr. 3Aa, 3Ab). Dále byla interakce prokázána měřením signálu  $\text{Cd}^{2+}$ : průměr King F/QD ( $62 \pm 16$  nA) a King R/QD ( $89 \pm 18$  nA). Byly též vzájemně porovnány rozdíly potenciálů CA skupiny při interakci a bez interakce. Toto měření neprokázalo statisticky signifikantní rozdíly (obr. 3Ba, 3Bb).

## Závěr

Od udělení Nobelovy ceny za polarografii uběhlo 60 let a moderní elektrochemické metody jsou nedílnou součástí chemického a bioanalytického výzkumu včetně nukleových kyselin<sup>21,32–34</sup>. Africký mor prasat jakožto vysoce nakažlivé virové onemocnění postihující divoká i domácí prasata si zasluhuje velkou pozornost. Byly navrženy a sestaveny kvantovými tečkami značené oligonukleotidové sondy pomocí interakce ODN a QD. Interak-

ce byla prokázána elektrochemicky, přičemž byl využit signál CA v oblasti potenciálu  $-1,3$  V a signál  $\text{Cd}^{2+}$  v oblasti  $-0,6$  V. Uvedené poznatky je možné využít pro návržení nových typů biosenzorů<sup>35,36</sup>.

Internetová verze této práce obsahuje navíc doplňující část. Pro vyhledání plné verze článku včetně příslušného Doplňku je třeba otevřít aktuální webovou stránku Chemických listů.

*Experimentální práce byla financována projektem EU programme for education, training, youth and sport ERASMUS+ a z projektu MZe QK1920113. Autoři děkují Dagmar Uhlířové za provedení experimentů s gelovou elektroforézou. Za poskytnutí ODN a odbornou konzultaci autoři děkují Dr. Králíkovi a Dr. Vašíčkové. Speciální poděkování patří RNDr. Josefovi Růžičkovi za vývoj laboratorního informačního systému (Qinslab) a za statistickou analýzu experimentálních dat.*

## Seznam zkratk

AdTS DPV	adsorpční přenosová technika spojená s diferenční pulsní voltametří
ASFV	virus afrického moru prasat

CA (signál)	redukční signál cytosinu a adeninu
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
ODN	oligonukleotid
P	hladina pravděpodobnosti
QD	kvantové tečky

## LITERATURA

- Wang N. a 10 spoluautorů: *Science* 366, 640 (2019).
- Rowlands R. J., Michaud V., Heath L., Hutchings G., Oura C., Vosloo W., Dwarka R., Onashvili T., Albina E., Dixon L. K.: *Emerg. Infect. Dis* 14, 1870 (2008).
- Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D.: *Virus Res.* 173, 198 (2013).
- Li L. a 21 spoluautorů: *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 1395 (2019).
- Zhou X. a 11 spoluautorů: *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1482 (2018).
- Garigliany M., Desmecht D., Tignon M., Cassart D., Lesenfant C., Paternostre J., Volpe R., Cay A. B., van den Berg T., Linden A.: *Emerg. Infect. Dis* 25, 184 (2019).
- Higgins J.: [https://www.upi.com/Top\\_News/US/2019/08/14/African-swine-fever-continues-relentless-spread-through-Asia-and-Europe/6191565729073/?ur3=1](https://www.upi.com/Top_News/US/2019/08/14/African-swine-fever-continues-relentless-spread-through-Asia-and-Europe/6191565729073/?ur3=1), staženo 30. 11. 2019.
- Capua I., Monti M.: *Nature* 566, 326 (2019).
- FAO: <http://www.fao.org/news/story/en/item/1193381/icode/>, staženo 30. 11. 2019.
- Pikalo J., Zani L., Huhr J., Beer M., Biome S.: *Virus Res.* 271, 8 (2019).
- Aguero M., Fernandez J., Romero L., Mascaraque C. S., Arias M., Sanchez-Vizcaino J. M.: *J. Clin. Microbiol.* 41, 4431 (2003).
- Viedma M. D. M., Puri V., Oldfield L. M., Shabman R. S., Tan G. S., Pickett B. E.: *Virus Res.* 263, 173 (2019).
- Li J., Wang G., Yang D., Zhao B., Zhao Y. P., Liu Y. G., Cai X. H., Nan Y. C., Zhou E. M., Wu C. Y.: *BMC Biotechnol.* 18, 11 (2018).
- Wang Y., Liu J., Zhou H.: *Sensors* 19, 12 (2019).
- Faria A. M., Mazon T.: *Talanta* 203, 153 (2019).
- Dick J. E., Hilterbrand A. T., Boika A., Upton J. W., Bard A. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5303 (2015).
- Chowdhury A. D., Takemura K., Li T. C., Suzuki T., Park E. Y.: *Nat. Commun.* 10, 12 (2019).
- Mills D. M., Foguel M. V., Martin C. P., Trieu T. T., Kamar O., Calvo-Marzal P., Kolpashchikov D. M., Chumbimuni-Torres K. Y.: *Sens. Actuators, B* 293, 11 (2019).
- Kokkinos C. T., Giokas D. L., Economou A. S., Petrou P. S., Kakabakos S. E.: *Anal. Chem.* 90, 1092 (2018).
- Polsky R., Harper J. C., Brozik S. M., *Nanomaterial-Based Electrochemical DNA Detection*, Pan Stanford Publishing Pte Ltd, Singapore 2012.
- Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K.: *Nat. Biotechnol.* 21, 1192 (2003).
- Chen H. Z., Gong Y., Han R.: *PLoS One* 9, 13 (2014).
- Palecek E.: *Nature* 188, 656 (1960).
- Luan Y. X., Lu A. X., Chen J. Y., Fu H. L., Xu L.: *Appl. Sci. - Basel* 6, 6 (2016).
- Xu L., Liang J., Wang Y. H., Ren S. Y., Wu J., Zhou H. Y., Gao Z. X.: *Molecules* 24, 11 (2019).
- Zhu Y. F., Wang Y. S., Zhou B., Yu J. H., Peng L. L., Huang Y. Q., Li X. J., Chen S. H., Tang X., Wang X. F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 4951 (2017).
- Zuou B., Chen Y. T., Yang X. Y., Wang Y. S., Hu X. J., Suo Q. L.: *Anal. Sci.* 35, 277 (2019).
- Gallardo C. and Nieto R.: *European Union Reference Laboratory for ASF, (EURL-ASF) CISA-INIA, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain.*, 1 (2018).
- Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* 75, 2663 (2003).
- Eivazzadeh-Keihan R., Pashazadeh-Panahi P., Mahmoudi T., Chenab K. K., Baradaran B., Hashemzaei M., Radinekiyan F., Mokhtarzadeh A., Maleki A.: *Microchim. Acta* 186, 24 (2019).
- Chowdhury A. D., Ganganboina A. B., Nasrin F., Takemura K., Doong R. A., Utomo D. I. S., Lee J., Khoris I. M., Park E. Y.: *Anal. Chem.* 90, 12464 (2018).
- Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Chem. Listy* 103, 889 (2009).
- Trnkova L., Kizek R., Dracka O.: *Electroanalysis* 12, 905 (2000).
- Boussicault F., Robert M.: *Chem. Rev.* 108, 2622 (2008).
- Siriwong K., Voityuk A. A.: *Wiley Interdiscip. Rev. - Comput. Mol. Sci.* 2, 780 (2012).
- Kelley S. O., Barton J. K.: *Science* 283, 375 (1999).

**D. Banáš<sup>a,b,f</sup>, D. A. Aksu<sup>b,c,d</sup>, M. V. Noguera<sup>b,c,e</sup>, M. Pay<sup>b,c,d</sup>, B. Hosnedlová<sup>f</sup>, and R. Kizek<sup>b,c,f</sup>**  
 (<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>b</sup> Department of Research and Development, Prevention Medicals, s.r.o., Czech Republic, <sup>c</sup> Department of Human Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, <sup>d</sup> Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Istanbul, Turkey, <sup>e</sup> UB Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentaci, Barcelona, Spain, <sup>f</sup> Department of Safety of Food and Feed, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic): **Electrochemical Study of Quantum Dots-Labeled Oligonucleotide Probes for Detecting Nucleic Acid of African Swine Fever Virus**

The study presents the cornerstone of the design of a biosensor for rapid detection of African swine fever virus (ASFV), affecting members of the Suidae family, in meat and meat products. Due to the widespread and serious socio-economic impact of this virus, there is an effort to

prevent its spread by using a rapid detection, which can also be done by unprofessional operators (e.g., farmers). There are several methodological approaches utilizing nucleic acid amplification, e.g. PCR or RT-PCR, which require several technical steps or a high concentration of pathogen in the sample. Another technique that could overcome the above problems is the electrochemical nucleic acid detection. In this experimental work, the adsorptive transfer technique was used when the nucleic acid was accumulated on the electrode and a non-specifically linked oligonucleotide was washed away. To verify the stability of the ODN CA signal, the signals for King F and King R were measured for 15 days and control charts were generated. No measurement exceeded the 2 SD limit. The results show good reproducibility of measurements among individual days. QDs of 5 nm, with an excitation maximum at 327 nm and an emission maximum at 607 nm with an absorption maximum at 550 nm interacted with ODN. The adsorptive transfer technique was used in which the

oligonucleotide was first bound to the electrode and then quantum dots was bound to the oligonucleotide, which was detected by measuring the signal of the separate oligonucleotide probes (King F and King R) ( $n = 10$ ) and measuring the cadmium signal ( $n = 10$ ). The oligonucleotide signals were: King F  $33 \pm 5$  nA, King R  $22 \pm 3$  nA, King F/QDs  $16 \pm 9$  nA and King R/QDs  $16 \pm 5$  nA (oligonucleotide signal) and King F/QDs  $62 \pm 16$  nA and King R/QDs  $89 \pm 18$  nA (cadmium signal). These findings can be used for further experimental work in hybridizing oligonucleotide probes to viral DNA.

Keywords: adsorptive transfer technique, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, biosensor

*Acknowledgements*

*The study was supported by the EU programme for education, training, youth, and sport Erasmus+and project AMOR QK1920113.*

## DOPLNĚK

### Pracovní postupy

#### UV/Vis spektrofotometrie

Pro měření absorpčních spekter připravených kvantových teček byl použit spektrofotometr UV-3100PC (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA). Absorpční spektrum kvantových teček bylo změřeno v rozsahu 200 až 800 nm, přičemž charakteristický pík byl lokalizován v oblasti 500–600 nm. Absorpční spektrum ODN bylo změřeno v rozsahu 190–400 nm, charakteristický pík v oblasti 260 nm byl použit pro výpočet koncentrace ODN.

#### Fluorimetrie

Pro měření excitačních a emisních spekter připravených kvantových teček byl použit fluorimetr Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). V prvním kroku bylo změřeno excitační spektrum v rozsahu od 200 do 700 nm při fixní emisi 750 nm (čas měření 100 ms, šířka excitačního pásma 5 nm). Následně

byla vybrána hodnota nejvyšší intenzity excitace a při této vlnové délce bylo přeměřeno emisní spektrum. Pro měření byla použita 96jamková destička (CAT F-0234) od firmy Institute of Applied Biotechnologies (Praha, Česká republika).

#### Tisk QD

Pro tisk CdTe QD na papír byl použit přístroj Lino-mat 5 od firmy Camag (Muttensz, Švýcarsko). Tisk CdTe QD měl následující parametry: hnací plyn – dusík, šířka pásu 2,5 mm, vzdálenost mezi pásy 5,8 mm, rychlost tisku 10 nl s<sup>-1</sup>, objem CdTe QD použitý na tisk jednoho pásu 2  $\mu$ l.

### Výsledky

Tabulka I

Parametry lineárních rovnic sledovaných ODN v prostředí acetátového pufru. Modifikace pracovní elektrody byla provedena technikou adsorpčního přenosu (AdTS DPV) z 10  $\mu$ l vzorku

Oligo-nukleotid	Koefficienty regresních rovnic		R <sup>2</sup>	r	SD [y,x]	RSD [%]	LOD	LOQ	Pracovní rozsah [ $\mu$ M]	koef. k <sub>0</sub> T	P	koef. k <sub>1</sub> T	P	QC koef [5 %]
	k <sub>1</sub> (b)	k <sub>0</sub> (a)												
King F	40,54	-1,91	0,9886	0,9943	2,57	6,5	0,28	0,92	0,92–1,75	1,18	*	26,34	***	6,5
King R	132,6	-2,31	0,9699	0,9849	8,21	11,2	0,15	0,49	0,49–0,60	0,84	*	16,07	***	11,49

Regresní rovnice ve tvaru:  $y = k_0x + k_1$ . Počet opakování:  $n = 3$ , celkový počet analýz: 30; LOD – limit detekce, určeno metodou ISO; LOQ – limit kvantifikace, určeno metodou ISO; QC – koeficient linearity; R<sup>2</sup> – koeficient determinace; r – korelační koeficient; RSD – relativní směrodatná odchylka; SD (y,x) – směrodatná odchylka; P – statistická významnost, \* – 0,05, \*\*\* – 0,001, T – statistický t-test, hodnoty LOD, LOQ a pracovního rozsahu jsou v jednotkách  $\mu$ M

Tabulka II

Základní charakteristika použitých CdTe QD

Nanočástice	Absorbance, pík max [nm]	Velikost částic [nm]	Excitace [nm]	Emise [nm]	Posun	Kvantový výtěžek
CdTe QD	552	5	310	600	290	25,0

Počet opakování:  $n = 3$

Dynamický rozptyl světla (Dynamic light scattering) byl použit k určení velikosti nanočástic

Kvantový výtěžek byl určen relativně ke kvantovému výtěžku fluoresceinu ve vodě (0,95; resp 95 %)