



# **Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk**

---

Zakład Procesów Elektrodoowych

ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

prof. dr hab. Marcin Opałło

Tel. +(48 22) 343 3375  
Fax +(48 22) 343 3333  
E-mail: mopallo@ichf.edu.pl

23 kwietnia 2012

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**„Udoskonalenie warstwy modyfikującej elektrodę i detekcji procesu  
hybrydyzacji w biosensorach DNA”**

**mgr Agaty Kowalczyk**

**z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego**

Recenzowana rozprawa dotyczy konstrukcji i właściwości podłoża do elektrochemicznej i piezograwimetrycznej detekcji DNA. Została ona wykonana w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Zbigniewa Stojka. Ten obszar badawczy jest w ostatnich latach bardzo popularny, ze względu na potrzebę uproszczenia i liczne zastosowania czujników DNA m. in. (jak podkreśla Autorka) do kontroli żywności modyfikowanej genetycznie, w analizie środowiska czy diagnostyce medycznej. Niewątpliwie konstrukcja czujnika stanowi wyzwanie dla licznych badaczy zajmujących się modyfikacją powierzchni, m.in. elektrochemików.

Rozprawa ma układ standardowy i przejrzysty. Część literaturową rozpoczyna wstęp i cel a raczej cele pracy opisane bardzo jasno. Autorka szczególnie podkreśla tutaj wykorzystanie podłoża węglowego do konstrukcji bioczuJNIKA, pomimo, że tylko w jednym z sześciu skonstruowanych czujników zostało ono wykorzystane. Wydaje się to być zrozumiałe, ponieważ to zadanie jest trudniejsze niż w przypadku podłoża złotego.

W rozdziale zatytułowanym „Budowa i definicja biosensora” trudno mi było znaleźć zwięźle sformułowaną jego definicję np. zaproponowaną przez IUPAC w 1992 roku. Natomiast w najważniejszym rozdziale tej części Autorka szeroko i w przystępny sposób omawia biosensory hybrydyzacji DNA. Jednak zabrakło mi próby podsumowania i oceny ich działania z punktu widzenia ich czułości, czasu działania czy zastosowań. Przecież jest to punkt wyjścia rozprawy, której tematem jest modyfikacja sensorów DNA. Mam tutaj też kilka uwag szczegółowych. Powołując się na literaturę przedmiotu (str. 18) Autorka omawia wykorzystywany także w swoich badaniach współczynnik blokowania elektrody, który moim zdaniem nie musi wcale zależeć od stopnia uporządkowania warstw. Podobna uwaga dotyczy omawianego wykorzystania wartości oporu przeniesienia ładunku (a nie elektronu) w spektroskopii impedancyjnej do oceny regularności upakowania warstwy (str. 19). Przy okazji, tego parametru się nie mierzy bezpośrednio jakby to wynikało z tekstu, tylko wyznacza na podstawie analizy widma impedancji. Ponadto postać równania (2) (str. 19) nie zależy od jednostek jego parametrów jak sugeruje tekst.

W dalszych rozdziałach części literaturowej przystępnie omówiono działanie toksykantów na strukturę DNA oraz zastosowanie sensorów jego hybrydyzacji. Szkoda tylko, że Autorka nie podaje jaka czułość detekcji DNA jest niezbędna do praktycznych zastosowań. Część literaturową kończy zwięźle omówienie stosowanych technik pomiarowych. Jest ono poprawne, przy czym w opisie elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej zabrakło definicji impedancji. W tym samym podrozdziale, w omówieniu elementu stałofazowego pojawia się niezrozumiałe pojęcie ‘rozpraszania częstotliwości’. Wbrew temu co twierdzi Autorka tylko w szczególnym przypadku pojemność warstwy podwójnej jest reprezentowana przez element stało fazowy. Nieznane jest też pochodzenie równania (11) przytoczonego w tym rozdziale. Z kolei w opisie mikrowagi kwarcowej zabrakło warunków przy których jest spełnione równanie Sauerbrey’a. Jednak pomimo powyższych zastrzeżeń, uważam, że tematyka części literaturowej została dobrana właściwie i dobrze wprowadza w tematykę rozprawy.

Na początku części eksperymentalnej Autorka przedstawia listę odczynników, procedury eksperymentalne wraz z wyjaśnieniem doboru roztworów buforowych. Dobrym pomysłem jest podanie funkcji jaką spełnia w prowadzonych badaniach dany odczynnik. Jednak chyba przesadą jest określenie procedury przygotowania

powierzchni elektrod procedurą przygotowania idealnego podłoża tym bardziej, że zastosowany przez Autorkę test voltametryczny jest tylko dobrym testem jakościowym. Zabrakło mi także opisu układu eksperymentalnego dla pomiarów elektrochemicznych w kropli roztworu. Podsumowując, ten rozdział dobrze wprowadza w zagadnienia eksperymentalne rozprawy.

W najważniejszej części pracy, Autorka omawia skonstruowane przez siebie z wykorzystaniem warstwy samoorganizujących się alkanotioli trzy sensory elektrochemiczne i jeden grawimetryczny. Według Autorki ważnym elementem procedury osadzania jest uszczelnianie warstwy cząsteczkami alkanotiolu. Nie wiem jednak na jakiej podstawie twierdzi, że „pojedyncze nici DNA są równomiernie rozmieszczone na całej powierzchni” (str. 75). Moim zdaniem obrazy AFM (rys. 39) tego nie pokazują. Co więcej nie widzę specjalnej różnicy w morfologii warstwy uszczelnionej i nieuszczelnionej. Być może analiza obrazu uzyskanego z większej liczby fragmentów powierzchni z większym powiększeniem dałaby odpowiedź na to pytanie. Natomiast wyniki pomiarów piezograwimetrycznych niewątpliwie pokazują zwiększenie masy warstwy w wyniku procedury uszczelniania, o ile nie ma w tym przypadku wpływu efektów wiskoelastycznych na mierzoną częstotliwość drgań kwarcu.

Pierwszy zaprezentowany czujnik DNA wykorzystujący oddziaływanie z błękitem metylenowym niewątpliwie działa. Natomiast nie jest dla mnie jasny mechanizm jego działania. Zabrakło mi dowodu sugerowanej przez Autorkę interkalacji (str. 81) próbnika redoks w miejscach bogatych w guaninę. Zamieszczenie krzywej voltametrii cyklicznej tak modyfikowanej elektrody ułatwiłoby później porównanie z kolejnymi czujnikami.

Autorka podjęła też udaną próbę zastosowania sfunkcjonalizowanych pochodnych antrachinonu jako próbników redoks oddziałujących z DNA. W opisie ich charakterystyki elektrochemicznej chyba pomyłką jest stwierdzenie dotyczące zakresu zależności prądu pikowego redukcji jednego z nich (str. 88) od pierwiastka z szybkości polaryzacji. Oczekiwałbym też wyjaśnienia co może powodować utrudniony transport elektronów do tego próbnika i na czym polega transport elektronu przez „dziury elektronowe” (str. 89).

Ten czujnik został dobrze scharakteryzowany spektroskopią impedancyjną i SERS. Zastosowanie tej ostatniej metody pozwala na stwierdzenie występowania

oddziaływań pomiędzy interkalatorem a DNA. Natomiast spektroskopia impedancyjna została wykorzystana do śledzenia zmian parametrów elektrycznych modyfikowanej elektrody w miarę osadzania kolejnych warstw, a oszacowane wartości oporu przeniesienia ładunku pozwoliły na optymalizację czasu hybrydyzacji. Autorka (str. 101) pokusiła się też o próbę analizy widm impedancyjnych. Jednak z opisu nie wiadomo jaki jest „odpowiedni obwód zastępczy”. Jeśli jest to obwód Randlesa to chyba brakuje jednego parametru. Z kształtu widma domyślam się, że w opisie widma powinien być uwzględniony element stałofazowy. Co najważniejsze, miarą dobroci dopasowania jest odchyłka standardowa, której wartości nie znalazłem w tabeli, a nie zadowalające pokrycie linii dopasowanej przez program z punktami eksperymentalnymi, jak pisze Autorka (str. 100).

Kolejny sensor elektrochemiczny wykorzystuje jako znacznik redoks unieruchomioną poprzez wiązanie streptawidyna-biotyna pochodną ferrocenu. Zgodnie ze schematem tego czujnika (Rys. 63), elektroaktywna grupa ferrocenowa jest odległa od powierzchni przewodzącej o co najmniej 10 nanometrów. W takim przypadku prawdopodobieństwo tunelowania elektronu poprzez warstwę roztworu (co sugeruje schemat) wydaje się być znikome. Jednak Autorka w tym miejscu tego nie komentuje.

Nieomal to samo podłoże Doktorantka wykorzystwała do detekcji grawimetrycznej z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej, która posłużyła także do śledzenia sposobu przygotowania czujnika. Szkoda, że w tym przypadku Autorka nie pokusiła się o śledzenie tego procesu także metodą spektroskopii impedancyjnej. Porównanie informacji otrzymanej obiema metodami byłoby interesujące.

Kolejny sensor wykorzystuje widmo impedancji zmierzone w obecności utlenionej i zredukowanej postaci próbnika redoks. W tym przypadku Autorka zmienia sposób wiązania nici DNA z podłożem na kowalencyjny z wykorzystaniem tiolu aromatycznego zaadsorbowanego na powierzchni złota. Jako parametr zależny od stężenia wykorzystano opór przeniesienia ładunku.

W celu zwiększenia liczby nici DNA czujnika Autorka podejmuje udaną, jak można wnioskować z woltamogramu demonstrującego proces utleniania złota i redukcji jego tlenku (Rys 88), próbę rozwinięcia powierzchni aktywnej poprzez wiązanie ze złotym podłożem koloidu złota wykorzystując jako łączniki cząsteczki ditioli. Warunkiem sukcesu jest, jak pisze Autorka, obniżenie temperatury adsorpcji.

Wydaje się jednak, że obecność warstwy koloidu powoduje dość zaskakujący efekt obniżenia sygnału woltametrycznego związanej z elektrodą pochodnej ferrocenu oraz prądu pojemnościowego (porównaj rys. 69 i 102). Co ważniejsze modyfikacja powoduje zmniejszenie czułości, choć jednocześnie następuje korzystne obniżenie limitu detekcji. Autorka jednak nie komentuje tych obserwacji. Interesujące jest, że przy zastosowaniu detekcji piezograwimetrycznej pokrycie koloidem złota powoduje nie tylko wzrost zmiany sygnału towarzyszącej osadzaniu kolejnych warstw jak i wynikający z obecności komplementarnego DNA w roztworze. Być może pomogłaby analiza pomiarów impedancyjnych czujnika z niemodyfikowanym i modyfikowanym podłożem.

W konstrukcji kolejnego sensora Autorka nie ograniczyła się do podłoża złotego i wykorzystwała także węgiel szklisty. Taki dobór materiałów pozwolił na wytworzenie warstwy pośredniczącej poprzez redukcję soli diazoniowej. Autorka prześledziła ten proces metodą piezograwimetryczną wyłącznie na powierzchni złota, co jest zrozumiałe. Natomiast nie znalazłem porównania innych właściwości wytworzonych warstw choć zastosowane tu liczne metody badawcze nadają się do obu podłoży. Uważam też, że interpretacja zamieszczonych w tym rozdziale obrazów AFM (str. 158) jest zbyt daleko idąca. Autorka pisze, że „...powierzchnia elektrody pokryła się warstewką cząsteczek soli AEBD..” podczas gdy stosowana metoda pozwala jedynie wnioskować o zmianie topografii powierzchni spowodowanej zapewne osadzeniem warstwy. Z kolei powierzchnia węgla szklistego po modyfikacji solą diazoniową na pewno staje się mniej hydrofilowa. Jednak kąt zwilżania  $81^\circ$  nie pozwala jej zaliczyć do hydrofobowych. Sensor impedancyjny powstały na tych podłożach niewątpliwie działa. Nie rozumiem jednak dlaczego dobór próbnika redoks zależy od tego czy podłożem jest złoto czy węgiel szklisty. Analiza widm impedancyjnych tego czujnika jest niezrozumiała, ponieważ jak poprzednio brakuje informacji o obwodzie zastępczym.

Rozpoczynający się na stronie 175 36-stronicowy rozdział dotyczący wpływu różnych czynników na działanie skonstruowanych przez Autorkę czujników DNA stanowi wyzwanie dla czytelnika. Po pierwsze dlatego, że nie od razu można się domyślić jakiego czujnika dotyczy dany opis. Po drugie i ważniejsze, nie jest jasny klucz według którego dobierano typ czujnika do czynnika przeszkadzającego (z wyjątkiem wpływu rodników hydroksylowych). A przecież z metodycznego punktu

widzenia znacznie lepiej byłoby sprawdzić wpływ wszystkich czynników na działanie jednego lub dwóch czujników. W tym rozdziale szczególnie ciekawy wydaje wpływ błędnych dopasowań zasad azotowych w strukturze DNA na działanie czujnika. Dopiero tutaj Autorka wspomina o możliwości udziału DNA w reakcji przeniesienia elektronu, co komplikuje działanie sensora, ale być może w innych przypadkach pozwala na uzyskanie jakiegokolwiek sygnału redoks. Na pewno to zagadnienie wymaga szerszej dyskusji niż zamieszczona w pracy. Z kolei obecność rodników hydroksylowych, jak pokazuje Autorka, nie dość, że wpływa w różny sposób na właściwości DNA to jeszcze może uszkodzić sam sensor. Niewątpliwie jest także, że wpływ licznych czynników naturalnych znacznie pogarsza parametry proponowanych czujników DNA. Nasuwa się pytanie czy i jak można je wyeliminować.

Rozprawę kończy bardzo ważne zestawienie parametrów skonstruowanych biosensorów, które przynosi znacznie więcej pytań niż odpowiedzi. Służy temu m.in. specjalnie dedykowana seria eksperymentów pozwalająca na oszacowanie nadmiaru powierzchniowego obu rodzajów DNA. Interesujące jest to, że wartości te dla różnych elektrod płaskich praktycznie nie różnią. Zastosowanie podłoża z nanocząstek zwiększa nadmiar powierzchniowy DNA o rząd wielkości co czasem przekłada się na obniżenie limitu detekcji o ponad dwa rzędy wielkości a czasem nie ma żadnego wpływu na ten parametr (Tabela 12). Nasuwa się pytanie dlaczego? Z kolei porównanie czułości wszystkich czujników na powierzchniach płaskich jest trudne, ponieważ często różnią się one jednocześnie składem warstw i sposobem detekcji i trochę to przypomina porównywanie jabłek z gruszkami. Wydaje się też, że w przypadku wszystkich czujników na podłożu złotym mogła być wykorzystana detekcja grawimetryczna a we wszystkich przypadkach impedancyjna. Wyniki pracy mogą też prowokować do wniosku, że detekcja piezograwimetryczna jest najbardziej atrakcyjna ze względu na brak konieczności wprowadzenia znaczników do badanego roztworu. Wreszcie w tym podsumowującym rozdziale, tak jak i w całej pracy zabrakło mi porównania parametrów skonstruowanych sensorów z opisanymi w literaturze. To poważny mankament rozprawy, której celem jest przecież skonstruowanie udoskonalonego urządzenia o potencjalnym zastosowaniu praktycznym.

Słowo „udoskonalenie” pojawia się także w tytule rozprawy. O ile jest dla mnie jasne, że w kilku przypadkach zmiana struktury warstwy modyfikującej spowodowała

uzyskanie lepszych parametrów czujnika to nie wiem na czym polega w recenzowanej pracy udoskonalenie detekcji także wynikające z jej tytułu. Ponadto uważam, że użycie słowa „udoskonalenie” w tytule znacznie zawęża zakres rozprawy, która zawiera także obszerny rozdział dotyczący wpływu toksykantów na działanie sensorów DNA.

W celu śledzenia tworzenia sensora, detekcji oraz zrozumienia działania czujników Autorka wykorzystwała liczne metody badawcze co stanowi zaletę pracy. Doktorantka podobnie jak liczni badacze na całym świecie ma pewien kłopot ze spektroskopią impedancyjną. Zapomina, że opis wykorzystania procedury dopasowania obwodu zastępczego wymaga jego prezentacji a w analizie wyników niezbędne jest podanie dobroci dopasowania. Popularne dzisiaj stosowanie spektroskopii impedancyjnej jako metody detekcji wymaga pewnej ostrożności. Należy pamiętać, że jest to metoda bardzo czuła, ale niespecyficzna. Natomiast wykorzystanie tej metody do zrozumienia mechanizmu procesów przebiegających w warstwie przyelektrodowej jest szczególnie trudne w przypadku skomplikowanych układów, np. takich jakie stworzyła Doktorantka. Powodem jest m.in. niejednoznaczna interpretacja poszczególnych parametrów obwodu zastępczego a szczególnie elementu stałofazowego.

Praca liczy ponad 250 stron co stanowi wyzwanie dla autorki (musi ją napisać) oraz promotora i recenzenta (muszą ją uważnie przeczytać). Na szczęście (i jest to zaleta pracy) jest ona dość spójna i przejrzysta, a sama edycja nie budzi zastrzeżeń. Jednak nie jestem przekonany czy wszystkie wyniki powinny się w niej znaleźć np. te dotyczące czujnika z warstwą złota koloidalnego znakowanego enzymem i mediatorem. Rozumiem jednak, że pokusą był tu jego imponujący limit detekcji. Zbędne też są moim zdaniem niektóre fragmenty Części Eksperymentalnej powtarzające informację zawartą w Części Literaturowej jak np. pierwszy paragraf rozdziału 9 (str. 73). Objętość rozprawy zwiększają liczne schematy, ale one rzeczywiście ułatwiają jej zrozumienie. Wśród nich zabrakło mi tylko wzoru strukturalnego błękitu metylenowego. Natomiast wiele informacji jest powtarzanych niepotrzebnie. Opisy modyfikacji elektrody na str. 77-78 oraz str. 85-86 różni tylko czas postawienia elektrody pod przykryciem. Z kolei wykres Bodego na rys. 61 jest powtórzony na rys. 152.

W tekście znalazłem kilka niezręczności językowych jak np. stała wiązania (str. 17), „...detekcja odbywa się na podstawie elektrochemii zasad purynowych...” (str. 27), „na elektrodzie szklanej pokrytej warstwą tlenku indowo-cynowego” (str. 73) czy nieprecyzyjnych stwierdzeń np. że w przypadku nieodwracalności procesu redoks „zwykle” wzrasta różnica potencjałów pików woltametrycznych, że krzywe „opadają” (str. 90) czy, że „Rysunek 75 przedstawia lokalne odrywanie warstwy...” (str. 115) Nie jest jasne co Autorka miała na myśli posługując się takimi pojęciem jak „jakość krzywych woltametrycznych (str. 89)”. Autorka zadbała też o czytelność wykresów, schematów i zdjęć, których jest aż 157, ale niewątpliwie ułatwiają czytanie rozprawy. Również ich podpisy czy nagłówki wydają się nieomal bez zarzutu. Brak informacji o rodzaju mediatora w podpisie rysunku 84 czy pomyłka w nagłówku Tabeli 6 to wyjątki.

Pożyteczny w lekturze jest „Spis skrótów i symboli” (w którym dominują akronimy), „Spis skrótów stosowanych we wzorach” (w którym znajdziemy prawie wyłącznie symbole) oraz symboli greckich. Nie rozumiem jednak dlaczego wiele z nich jest ponownie definiowanych w tekście i to czasem wielokrotnie jak np. „żywność genetycznie modyfikowana (GMO)” na str. 1,2,5, 49 i 73 czy „woltamperometria cykliczna (CV)” na str. 18, 104, 218 oraz dwukrotnie na str. 53. Wartości stałej gazowej jest podana nie tylko w skorowidzu, ale także na str. 54 i 58. Podobnie, wartość stałej Faradaya znajdziemy także na str. 54, 58 i 215.

Pomimo, że rozprawa zawiera 364 odnośniki to tylko w jednym przypadku zauważyłem pomyłkę w cytowaniu: odnośniki 327 i 328 są błędnie cytowane na str. 103. Mimo tak dużego zakresu cytowanej literatury niektóre informacje pojawiają się bez odnośników literaturowych np. dotyczące kąta nachylenia łańcuchów alkilowych do powierzchni złota. Z kolei przykładem niewłaściwego cytowania jest podrozdział dotyczący modyfikacji podłoża czujnika opartego na polimerze osmowym gdzie informacja, o tym że czujnik niezmodyfikowany został już wcześniej opisany w publikacji 332 pojawia się dopiero na samym końcu.

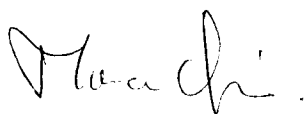
Podsumowując, Doktorantka osiągnęła cel pracy konstruując lub udoskonalając szereg biosensorów DNA. Zakres wykonanych eksperymentów jest imponujący i świadczy o pracowitości Doktorantki. Zgadza się, że największym osiągnięciem jest opracowanie trwałego sposobu unieruchomienia na elektrodzie węglowej (a także złotej). Autorka tu niewątpliwie wykorzystwała obserwowany w



ostatnich kilku latach rozwój metod modyfikacji powierzchni poprzez redukcję soli diazoniowych. Nie jestem natomiast przekonany czy z powodów opisanych wyżej, przy pomocy zgromadzonych danych można, tak jak sugeruje Autorka, dokonać wyboru najlepszej metody hybrydyzacji i porównać przydatność różnych podłoży.

Na podkreślenie zasługuje opublikowanie materiału przedstawionego w rozprawie w 5 publikacjach w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o wysokim współczynniku wpływu, m. in Biosensors Bioelectronics czy Biophysical Chemistry co świadczy o aktualności poruszanych zagadnień. Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch a drugim trzech z wymienionych prac, co wskazuje na jej duży wkład w ich powstanie.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska „Udoskonalenie warstwy modyfikującej elektrodę i detekcji procesu hybrydyzacji w biosensorach DNA” spełnia wymagania ustawowe i wnoszę o dopuszczenie mgr Agaty Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Marcin Opatło