

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„Jedno- i wieloskładnikowe matryce do kontrolowanego unieruchamiania enzymów i nici DNA na różnych podłożach”**

*Promotor pracy: prof. dr hab. Zbigniew Stojek*

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują, że związki ważne biologicznie, takie jak kwasy nukleinowe i enzymy pozostają elektroaktywne po odpowiednim osadzeniu na materiałach metalicznych i niemetalicznych. Stwarza to szansę ich ilościowego oznaczenia na powierzchni i monitorowania zmian ich właściwości. Jednakże dokładne i precyzyjne wyizolowanie charakterystycznego sygnału biomolekuły z często złożonego sygnału tła i zapewnienie efektywnej komunikacji elektronowej pomiędzy podłożem a biomolekułą stanowią nadal duże wyzwanie. Zrozumienie mechanizmu przeniesienia elektronu poprzez warstwę pośredniczącą dla związków biologicznie aktywnych może pozwolić na udoskonalenie konstrukcji elektrod enzymatycznych i biosensorów. Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy charakterystyki warstw pośredniczących na elektrodzie, umożliwiających kontrolę aktywności i orientacji (na powierzchni) związków o dużym znaczeniu biologicznym (DNA, enzymy).

W swojej pracy doktorskiej skupiłem się na wykorzystaniu soli diazoniowych, hydrożeli oraz kompozytów polimerowych z dodatkiem nanocząstek złota do modyfikacji podłoża elektrodowego. Modyfikację podłoża jednorodną warstwą fenylową uzyskuje się w wyniku jednoelektronowej redukcji soli diazoniowej. Ważnym etapem w procesie osadzenia odpowiednio zmodyfikowanych grup fenylowych jest utworzenie rodnika, za pośrednictwem którego grupa fenylowa łączy się z podłożem. Niestety, głównym mankamentem wykorzystania soli diazoniowych był niekontrolowany rozrost tworzonej przez nie warstwy i tworzenie struktury wielowarstwowej, która w przypadku unieruchamiania związków biologicznie ważnych jest niepożądana. Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że wbrew powszechnemu przekonaniu, parametrem limitującym tworzenie

mono- czy też wielowarstwy nie jest czas elektroosadzania ale potencjał elektroredukcji soli diazoniowej. Jeśli przyłożony potencjał był wystarczający do redukcji wszystkich cząsteczek jonu diazoniowego na powierzchni elektrody, wówczas po utworzeniu monowarstwy nie obserwowano jej dalszego rozrostu. Dodatkowo, warstwa taka charakteryzowała się najlepszą regularnością. Potwierdziły to wyniki uzyskane technikami AFM oraz PM IRRAS. Jakość i regularność uzyskanej warstwy fenyloaminowej miała bezpośrednie przełożenie na aktywność unieruchamianych na jej powierzchni nici DNA. Tylko i wyłącznie w przypadku utworzenia monowarstwy wszystkie nici DNA unieruchomione na łączniku fenyloetyloaminowym były zdolne do procesu hybrydyzacji.

Synteza soli diazoniowych jest etapem czasochłonnym i niestety jej trwałość w temperaturze pokojowej jest bardzo niska. W związku z tym, próbuje się modyfikować podłoża warstwą fenylową w warunkach *in situ*. Podejście to zdecydowanie skraca czas modyfikacji i minimalizuje koszty badań, jednakże ma również swoje ograniczenia. Z uwagi na fakt, że sól diazoniowa syntezowana jest na drodze spontanicznej reakcji pomiędzy odpowiednią I-rzędową aromatyczną pochodną aminową i azotanem(III) sodu w środowisku 0.5 M HCl, produkty reakcji ubocznych mogą również adsorbować się na powierzchni elektrody. Udział reakcji ubocznych bezpośrednio przekłada się na stabilność i funkcjonalność takiego filmu. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że w warunkach *in situ* bardzo ważną rolę odgrywa czas, jaki upłynął od momentu sporządzenia mieszaniny I-rzędowej aminy aromatycznej i azotanu(III) sodu. Udowodniono, że analogicznie jak w warunkach *ex situ*, wartość potencjału elektroredukcji, jak i odpowiedni stosunek molowy substratów decyduje o jednorodności i grubości uzyskiwanej warstwy fenyloaminowej osadzonej na powierzchni elektrody. Im grubsza jest warstwa, tym bardziej jest ona zróżnicowana pod względem topograficznym. Defekty warstwy w postaci jej nierówności zdecydowanie pogarszają efektywność pracy urządzeń, w których została ona zastosowana: biosensorów DNA i bioogniw.

Zastosowanie materiału kompozytowego polimer przewodzący – nanocząstki Au, jak i hydrożelu, zdecydowanie rozwija powierzchnię pracującą podłoża. Może to mieć szczególne znaczenie w poprawie czułości biosensorów DNA, również tych stosowanych w badaniach skażenia żywności czy w testach potwierdzających obecność żywności genetycznie modyfikowanej. Granica detekcji biosensora DNA ściśle zależy od efektywności procesu hybrydyzacji i od ilości nici DNA tworzących warstwę sensorową. Im więcej zdolnych do hybrydyzacji nici DNA, tym lepsza czułość danego biosensora. Nanocząstki złota odpowiednio rozłożone w warstwie polimeru powinny stworzyć szczególnie dobre

warunki do utworzenia efektywnej warstwy sensorowej. Grubość polipirolu w matrycach kompozytowych miała istotny wpływ na strukturę warstwy nanocząstek Au. Wartość oporu przeniesienia ładunku w przypadku kompozytu o najcieńszej warstwie polipirolu (10 nm) była zbliżona do wartości tego parametru dla czystej elektrody, co potwierdza jednorodność badanej warstwy kompozytowej i równomierne rozłożenie w niej nanocząstek Au. Zwiększanie grubości polipirolu w matrycach kompozytowych skutkowało wzrostem oporności przeniesienia ładunku.

Również hydrożel pNIPA zmodyfikowany grupami –COOH sprawdził się w roli trójwymiarowej matrycy do efektywnego i kontrolowanego unieruchamiania nici DNA. Kluczowym etapem podczas konstrukcji trójwymiarowej matrycy była optymalizacja zawartości procentowej grup karboksylowych, która pozwoliła wybrać hydrożel charakteryzujący się jednocześnie najefektywniejszym wykorzystaniem grup –COOH oraz najlepszymi parametrami mechanicznymi. Najbardziej powtarzalne wyniki uzyskano dla zawartości grup –COOH w przedziale 2 ÷ 5 %. Unieruchamianie nici DNA w matrycy hydrożelowej następowało na skutek utworzenia wiązania amidowego pomiędzy grupą aminową modyfikującą nić DNA, a grupą karboksylową hydrożelu. Trójwymiarowość matrycy hydrożelowej pozwoliła praktycznie wyeliminować „efekt domina” i wprowadzić o jeden rząd wielkości większą ilość nici DNA, w porównaniu z tradycyjnymi, popularnymi warstwami pośredniczącymi, tj. samoorganizującymi się monowarstwami tiolowymi i warstwami fenyłowymi. Pomimo stosunkowo wysokiej gęstości DNA w trójwymiarowej matrycy polimerowej wszystkie nici DNA były zdolne do brania udziału w procesie hybrydyzacji, ponieważ każda z unieruchomionych w strukturze żelu nici DNA miała wystarczająco dużo miejsca w porównaniu do tradycyjnych matryc. Zostało to potwierdzone badaniami z wykorzystaniem SEM, EQCM oraz LA ICP MS. Z uwagi na fakt, że unieruchomione nici DNA można było łatwo usunąć z matrycy hydrożelowej w środowisku słabo kwaśnym, matryce mogły być wykorzystane wielokrotnie.

Wyniki badań uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach międzynarodowych: dwie w *Biosensors and Bioelectronics* i *Electrochimica Acta* oraz po jednej w *Analytical Chemistry* i *Electroanalysis*.