

Spis treści

1. Dane naukowe wnioskodawcy	7
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	7
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	7
4. Działalność naukowo-badawcza	8
4.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora.....	8
4.2. Po uzyskaniu stopnia doktora	9
5. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	11
5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	11
5.2. Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	11
5.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z zarysowaniem ich ewentualnego wykorzystania.....	13
5.4. Podsumowanie i dalsze kierunki rozwoju.....	50
6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	53
7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę	55
7.1. Osiągnięcia dydaktyczne	55
7.2. Osiągnięcia organizacyjne i popularyzujące naukę.....	56
8. Inne informacje, ważne z punktu widzenia wnioskodawcy, a dotyczące jego kariery zawodowej.....	57
8.1. Wykaz krajowych nagród i wyróżnień naukowych.....	57
8.2. Kursy, warsztaty, szkolenia	58

1. Dane naukowe wnioskodawcy

Imię i nazwisko: Robert Ziółkowski
ORCID: 0000-0001-7225-0904

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Doktor nauk chemicznych (2013), stopień nadany uchwałą Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej z dnia 5 listopada 2013 roku. Rozprawa doktorska zatytułowana: „*Badania warstw receptorowych biosensorów zawierających oligonukleotydy*”. Promotor: prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska.

Magister inżynier (2005), tytuł zawodowy w zakresie technologii i biotechnologii środków leczniczych uzyskany dnia 15 lipca 2005 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Tytuł pracy: „*Analiza fenotypowa i genotypowa populacji enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) izolowanych u ludzi w Polsce w latach 2002-2004*”. Praca była realizowana w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej pod opieką dr n. med. Magdaleny Kawalec. Promotorem z ramienia Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej była dr Hanna Jaworowska-Deptuch.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.05.2014 –	adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra Biotechnologii Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
01.10.2010 – 30.05.2014	asystent naukowo-dydaktyczny, Zakład Mikrobioanalityki, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
01.10.2008 – 31.08.2010	specjalista naukowo-techniczny, Zakład Mikrobioanalityki, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
01.09.2005 – 30.09.2008	specjalista naukowo-techniczny, Międzywydziałowe Centrum Biotechnologii, Politechnika Warszawska

4. Działalność naukowo-badawcza

4.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę magisterską realizowałem w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego w zakładzie Mikrobiologii Molekularnej pod opieką dr n. med. Magdaleny Kawalec. Związana była z badaniem rozprzestrzeniania się na terenie Polski oraz polskich szpitali trzech gatunków bakterii patogennych dla człowieka, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* oraz *E. avium*. Analizy te dotyczyły w szczególności szczepów o wykształconej oporności na glikopeptydy, wankomycynę i/lub teikoplaninę, często przy dodatkowej oporności na antybiotyki z innych grup. W latach 2002-2004r oporność ta była klinicznie ważna z uwagi na fakt, że antybiotyki glikopeptydowe uważane były często za leki ostatniej szansy przy zakażeniach bakteriami Gram-dodatnimi. Na szczęście nowe generacje antybiotyków z sukcesem są wykorzystywane w walce ze szczepami bakterii wankomycynoopornych. Podczas realizacji pracy magisterskiej gruntownie nauczyłem się szeregu technik pasażowania, izolacji oraz hodowli drobnoustrojów, technik wykorzystywanych w analizie fenotypowej (morfologia komórek, testy biochemiczne np. API, przesiewowe badania poziomu oporności na antybiotyki itp.) oraz genotypowej (analizy podobieństwa genomowego, plazmidowego, wykrywanie określanych genów itp.). Wyniki badań prowadzonych podczas pracy magisterskiej miały przełożenie na procedury eliminowania wektorów zakażeń oraz postępowania leczniczego w jednostkach z wykrytymi źródłami infekcji.

Bezpośrednio po skończeniu studiów (obrona 15 lipca 2005r.) znalazłem zatrudnienie w Międzywydziałowym Centrum Biotechnologii Politechniki Warszawskiej, działającym przy Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej. W trakcie mojego zatrudnienia w MCB m.in. zorganizowałem i wyposażylem ówczesną pracownię biologii molekularnej, przygotowywałem zajęcia laboratoryjne, prowadziłem zajęcia ze studentami, sprawowałem opiekę nad realizowanymi pracowniami magisterskimi w Zakładzie. Realizowałem również powierzone mi zadania badawcze, w szczególności związane z analizą chemiczną (głównie chromatografia gazowa) oraz mikrobiologiczną, techniką FISH (ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*), próbek biologicznych.

W październiku 2008 roku, w grupie prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, Zakład Mikrobioanalitiky, pojawiła się możliwość rozpoczęcia pracy nad biosensorami, czujnikami, które mogłyby znacznie uprościć prowadzenie wszelkich analiz biologicznych. Z uwagi na moje dotychczasowe doświadczenie, związane z genetycznymi analizami mikrobiologicznymi, skupiłem się na biosensorach, w których warstwa receptorowa składała się z kwasów nukleinowych. Bazując natomiast na doświadczeniu zespołu profesor Malinowskiej, w prowadzonych przeze mnie pracach zdecydowałem się na elektrochemiczną technikę detekcji (duża czułość metody, stabilność znaczników elektrochemicznych w trakcie pomiaru, relatywnie mała wrażliwość na warunki prowadzenia pomiaru czy duży potencjał miniaturyzacji gotowych czujników, a tym samym poszerzenie obszaru ich potencjalnego zastosowania). W okresie od października 2008r do obrony doktoratu, 03.11.2013r, moje prace badawcze skupiały się na: (1) opracowaniu miniaturowych przetworników elektrochemicznych w których na podłożu krzemowym zintegrowano na niewielkiej powierzchni klasyczny układ trójelektrodowy wykorzystywany w detekcji voltamperometrycznej; (2) opracowaniu metod immobilizacji kwasów nukleinowych na powierzchni złotych przetworników, tworzeniu warstw receptorowych, doboru mechanizmów detekcji prowadzonych analiz; (3) opracowaniu czujnika dedykowanego wykrywaniu genu UL55 ludzkiego cytomegalowirusa z wykorzystaniem nowego markera redoks kowalencyjnie dowiązanego do określonej sekwencji DNA, (4) udowodnieniu możliwości wykorzystania kwasów nukleinowych w oznaczaniu analitów innych niż komplementarne sekwencje DNA oraz opracowanie tego typu czujników do wykrywania m.in. jonów metali (uranylowe i rtęci) przy zachowaniu wysokiej selektywności i niskich granic detekcji. Część z tych

badan była finansowana z projektu jaki pozyskałem z Narodowego Centrum Nauki (NCN) – „Badania warstw receptorowych biosensorów zawierających oligonukleotydy”; PRELUDIUM; nr 011/01/N/ST4/03330.

Najważniejszymi osiągnięciami przedłożonej rozprawy doktorskiej było (i) zastosowanie w konstrukcji biosensorów DNA przetworników na podłożu krzemowym, charakteryzujących się znaczną gładkością powierzchni elektrody złotej, (ii) wykorzystanie w sensorach DNA nowych znaczników redoks – metalokarboranów, (iii) wykorzystanie oddziaływania między grupami fosforanowymi łańcucha DNA do opracowania sensorów selektywnych na jony UO_2^{2+} , (iv) opracowanie czujników nie wymagających każdorazowej kalibracji, dzięki zastosowaniu pomiarów różnicowych. Na uwagę zasługuje również fakt, że opracowane sensory dedykowane wykrywaniu jonów UO_2^{2+} oraz Hg^{2+} , mogłyby stanowić konkurencję dla stosowanych wówczas metod analitycznych, głównie dzięki ich selektywności i małym wartościom granic oznaczalności przy zachowaniu niskich kosztów wytwarzania oraz prostocie prowadzenia pomiarów, charakterystycznych dla technik elektrochemicznych.

Wyniki badań prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora zostały opublikowane w 8 artykułach, w tym w 6 z listy Journal Citation Reports (JCR) i zaprezentowane w postaci 20 komunikatów konferencyjnych. Szczegółowy wykaz dorobku naukowego uzyskanego w latach (2008 – 2013) przedstawiłem w **Załączniku 4** do wniosku.

4.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

Na stanowisko adiunkta w Zakładzie Mikrobioanalityki (obecnie Katedra Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego) awansowałem w maju 2014 roku, co biegło się w czasie z uzyskaniem projektu Iuventus Plus, finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW IP2012 064972). Przedmiotem moich zainteresowań pozostały czujniki chemiczne i biosensory. Skupiłem się jednak na próbach obniżenia granicy detekcji nowo opracowywanych (bio)sensorów oraz na poprawie ich parametrów pracy poprzez zastosowanie nowoczesnych nanomateriałów t.j. pochodnych grafenu oraz nanocząstek metalicznych. Głównym celem wspomnianego wyżej projektu było wprowadzenie wymienionych nanomateriałów jako warstw przejściowych w czujnikach i biosensorach. W ramach projektu przygotowałem chemicznie syntezowany tlenek grafenu oraz zredukowany tlenek grafenu. Materiały te następnie wykorzystałem do konstrukcji sensorów i biosensorów, początkowo w elektrochemicznych czujnikach DNA dedykowanych wykrywaniu sekwencji komplementarnych w analizowanych próbkach. Badania te nie przyniosły zamierzonych rezultatów, ale testowany układ z sukcesem można było zastosować w czujnikach aptamerowych, dedykowanych bezznacznikowej detekcji neuroprzekaźnika, dopaminy. Innym, ciekawym wynikiem prowadzonych prac było udowodnienie, że wprowadzanie wybranych grup funkcyjnych w strukturę płatków grafenu prowadzi do uzyskania materiału odznaczającego się czułością względem jonów uranowych (grupy karboksylowe) oraz rtęci (grupy tiolowe). Dzięki temu opracowałem i przygotowałem czujniki służące do wykrywania i oznaczania wyżej wymienionych analitów. Moje prace zwróciły uwagę naukowców z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego (NIZP), co zaowocowało zawiązaniem współpracy badawczej w tematyce dotyczącej konstrukcji czujników umożliwiających szybką diagnostykę zakażeń. Efektem wspólnych starań było otrzymanie grantu OPUS:

Narodowe Centrum Nauki – „Elektrochemiczne sensory z warstwą receptorową DNA do wykrywania sekwencji markerowych wysoce patogennych bakterii”; nr 2014/15/B/NZ6/01771 (pełniłem w nim rolę **wykonawcy**)

Wyniki prac badawczych, w szczególności dotyczących analizy próbek rzeczywistych w postaci bezpośrednich produktów reakcji łańcuchowej polimerazy, wymusiły zastosowanie innego niż dotychczas przeze mnie stosowanego, mechanizmu detekcji. Dotyczyło to zastąpienia znacznika redoks swobodnie dostępnego w roztworze na rzecz próbników redoks kowalencyjnie dołączonych do sekwencji sondy unieruchomionej na powierzchni elektrody. Sygnał analityczny w takim przypadku zależy od zmiany konformacji jednoniciowych sond DNA w wyniku związania z sekwencjami komplementarnymi i utworzeniu struktur znacznie sztywniejszych. Zmiana mechanizmu detekcji umożliwiła opracowanie czujnika elektrochemicznego dedykowanego wykrywaniu sekwencji markerowych węgla, amplifikowanych z wykorzystaniem asymetrycznej reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). W trakcie prowadzonych prac badawczych zauważyłem również, że badany przeze mnie nanomateriał, w formie tlenku grafenu, oraz zaobserwowane oddziaływania z kwasami nukleinowymi umożliwiły opracowanie przenośnego testu z detekcją potencjometryczną, dedykowanego wykrywaniu powyższej sekwencji markerowej. Należy przy tym wspomnieć, że opracowany i działający układ, umożliwiający analizę otrzymanej próbki, był tani i wymagał jedynie trzech diod LED, niewielkiej próbówki wykonanej z tworzywa sztucznego oraz multimetru. Dalsza współpraca z NIZP nad metodami szybkiego wykrywania bakterii patogennych człowieka, zaowocowała kolejnym projektem badawczym, finansowanym przez:

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju – „Przenośne mikrourządzenie do szybkiego i specyficznego wykrywania białek oraz fragmentów kwasów nukleinowe”; nr LIDER/35/0041/L-7/NCBR/2016 (pełniłem w nim rolę **kierownika**)

W ramach projektu opracowano postępowanie oraz narzędzia umożliwiające pełną elektrochemiczną diagnostykę zakażenia człowieka bakteriami maczugowca błonicy. Dotyczy to zarówno badań na wczesnym etapie zakażenia (czyli wykrywanie markerowej sekwencji DNA), jak również potwierdzenie zjadliwości danego szczepu poprzez wykrycie białka, niebezpiecznej toksyny błoniczej (produkowanej przez ten patogen). Dodatkowo, w przypadku czujników białkowych, nowy i zaproponowany przeze mnie niereceptorowy składnik warstwy bioczułej, tzw. wypełniacz, przyczynia się do zmniejszenia intensywności zjawiska niespecyficznego adsorpcji białek na powierzchni czujnika, co z punktu widzenia elektrochemii oraz pomiaru zjawisk na granicy faz, jest szczególnie pożądane.

Poza głównym obszarem zainteresowania, przedstawionym dotychczas, równolegle prowadziłem prace w ramach innych projektów badawczych realizowanych w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i/lub we współpracy z NIZP-PZH (obecnie NIZP-PIB) czy innymi jednostkami jak: Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polska Akademia Nauk, Screenmed sp. z o.o., Instytut Metrologii i Inżynierii Biomedycznej (PW), Zakład Procesów Rozdzielania Laboratorium Grafenowe PW, Instytut Maxa Plancka (Niemcy).

Wyniki prac prowadzonych po uzyskaniu stopnia doktora (lata 2014–2022) są przedmiotem łącznie 23 publikacji (w tym 19 z listy JCR) i 26 wystąpień konferencyjnych. Szczegółową listę publikacji i wystąpień konferencyjnych po uzyskaniu stopnia doktora przedstawiłem w **Załączniku 4** do wniosku.

5. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt.:

Projektowanie i parametry pracy elektrochemicznych (bio)sensorów oraz przykłady ich wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki zakażeń bakteryjnych

5.2. Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe składa się 10 prac opublikowanych w latach 2016 – 2022 w czasopismach z listy JCR, w których jestem współautorem. W dziewięciu pracach pełniłem funkcję autora korespondencyjnego.

Wybrane i zestawione poniżej prace były cytowane 94 – krotnie (w tym 85 cytowań niezależnych, dane z dnia 26.01.2022 wg Web of Science). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor wg roku publikacji) jednotematycznego cyklu prac wynosi **49,537**, zaś sumaryczna liczba punktów z listy czasopism MEiN z dnia 01.12.2021 roku wynosi **1050 (Tabela 1)**.

Opis mojego merytorycznego i szacowanego procentowego wkładu pracy w publikacje będące częścią cyklu, zawarty jest w **Załączniku 4** do wniosku, oraz w oświadczeniu (**Załącznik 5**). Dodatkowo oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład pracy każdego z nich w publikacjach [**H1–H10**] stanowią treść **Załącznika 6** do wniosku.

 jako autor korespondencyjny

- [H1] Szymczyk A, Soliwodzka K, Moskal M, Rózanowski K, **Ziółkowski R** . Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters, *Sensors Actuators, B Chem.*, 2022;354:131086.
- [H2] Marchlewicz K, Ostrowska I, Oszwałdowski S, Zasada A, **Ziółkowski R** , Malinowska E. Molecular diagnostic of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strain by DNA sensor potentially suitable for electrochemical point-of-care diagnostic. *Talanta*. 2021;227.
- [H3] **Ziółkowski R** , Jarczewska M, Górski Ł, Malinowska E . From small molecules toward whole cells detection: Application of electrochemical aptasensors in modern medical diagnostics. *Sensors (Switzerland)*. 2021;21(3):1-49.
- [H4] **Ziółkowski R** , Oszwałdowski S, Kopyra KK, Zacharczuk K, Zasada AA, Malinowska E. Toward Fluorimetric-Paired-Emitter-Detector-Diode test for *Bacillus anthracis* DNA based on graphene oxide. *Microchem J*. 2020;154.
- [H5] **Ziółkowski R** , Kaczmarek A, Kośnik I, Malinowska E. Reduced nonspecific protein adsorption by application of diethyldithiocarbamate in receptor layer of diphtheria toxoid electrochemical immunosensor. *Bioelectrochemistry*. 2020;132.

- [H6] **Ziółkowski R** , Uścińska A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Małolepszy A, Malinowska E. Directly-thiolated graphene based electrochemical sensor for Hg(II) ion. *Electrochim Acta*. 2019;305:329-337.
- [H7] **Ziółkowski R** , Jarczewska M, Drozd M, Zasada AA, Malinowska E. Studies on the development of electrochemical immunosensor for detection of diphtheria toxoid. *J Electrochem Soc*. 2019;166(6):B472-B481.
- [H8] **Ziółkowski R** , Oszwałdowski S, Zacharczuk K, Zasada AA, Malinowska E. Electrochemical detection of bacillus anthracis protective antigen gene using DNA biosensor based on stem-loop probe. *J Electrochem Soc*. 2018;165(5):B187-B195.
- [H9] **Ziółkowski R** , Górski Ł, Malinowska E. Carboxylated graphene as a sensing material for electrochemical uranyl ion detection. *Sensors Actuators, B Chem*. 2017;238:540-547.
- [H10] Jarczewska M, Sheelam SR, **Ziółkowski R**, Górski Ł . A label-free electrochemical DNA aptasensor for the detection of dopamine. *J Electrochem Soc*. 2016;163(3):B26-B31.

Tabela 1 Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych „*Projektowanie i parametry pracy elektrochemicznych (bio)sensorów oraz przykłady ich wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki zakażeń bakteryjnych*” – podsumowanie

Lp.	Publikacja	IF*	Liczba cytowań wg WoS	Liczba punktów MEiN
H1	Sensors Actuators, B Chem., 2022;354:131086	7,460	0	140
H2	Talanta. 2021;227	6,057	3	100
H3	Sensors (Switzerland). 2021;21(3):1-49	3,573	4	100
H4	Microchem J. 2020;154	4,821	5	70
H5	Bioelectrochemistry. 2020;132	5,373	2	100
H6	Electrochim Acta. 2019;305:329-337	6,215	6	100
H7	J Electrochem Soc. 2019;166(6):B472-B481	3,721	5	100
H8	J Electrochem Soc. 2018;165(5):B187-B195	3,12	10	100
H9	Sensors Actuators, B Chem. 2017;238:540-547	5,938	26	140
H10	J Electrochem Soc. 2016;163(3):B26-B31.	3,259	33	100
SUMA		49,537		1050

*wg roku publikacji lub z 2020, gdy brak nowszego

Wszystkie szczegóły dotyczące sposobu prowadzenia badań oraz otrzymanych wyników (m.in. tabele, dane liczbowe, rysunki czy odpowiednie wyjaśnienia) zawarte są w załączonych artykułach. Poniżej znajduje się zwięzłe omówienie celu naukowego prac.

5.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z zarysowaniem ich ewentualnego wykorzystania

Potrzeba selektywnego wykrywania i oznaczania niskich stężeń wybranych analitów, przy zachowaniu krótkich czasów analizy, stanowi podstawę nieustannych prac nad projektowaniem oraz tworzeniem nowoczesnych mikrouządzeń analitycznych. Dużym zainteresowaniem w tej kwestii cieszą się sensory chemiczne i wynika z możliwości jakie oferują, jak również z możliwości jakie dopiero mogą zaoferować. Sensory chemiczne, oraz ich odmiana gdzie w warstwie rozpoznającej analit umieszczane są składniki pochodzenia biologicznego (tzw. biosensory), to przenośne urządzenia o niewielkich wymiarach, charakteryzujące się prostą konstrukcją i niską ceną jednostkową. Cechy te, w połączeniu z dobrymi parametrami analitycznymi (krótki czas analizy, wysoka selektywność, czy małe wartości granic wykrywalności analitów) sprawiają, że są one interesujące z punktu widzenia nowoczesnych rozwiązań analitycznych. Obecnie komercyjnie dostępne sensory i biosensory coraz częściej wykorzystywane są w analizach żywności, analitów ważnych klinicznie i środowiskowo, czy też w szybkim badaniu próbek mogących stanowić zagrożenie biologiczne. Dodatkowo, dzięki rozwojowi nauk inżynieryjno-technicznych takich jak automatyka, elektronika, inżynieria materiałowa czy inżynieria biomedyczna, opracowywane są niewielkie, przenośne platformy analityczne, w których sensory i biosensory stanowią elementy detekcyjne. Rozwijanie tej dziedziny nauki, pełnej i automatycznej analizy pobranej próbki, w szczególności pod kątem występowania w niej określonych fragmentów kwasów nukleinowych, jest szczególnie istotne w kontekście chociażby bieżącej sytuacji epidemicznej.

Z uwagi na prostą budowę takich czujników, uzyskanie małych wartości granic wykrywalności analitów przy zachowaniu wysokiej selektywności prowadzonego oznaczenia, możliwe jest jedynie przy właściwym dopasowaniu zarówno elementów konstrukcyjnych jak i warunków prowadzenia pomiaru. Pomijając same receptorowe składniki warstwy sensorycznej w postaci odpowiednich grup funkcyjnych czy też cząstek biologicznych (kwasy nukleinowe, przeciwciała, enzymy), których oddziaływanie z analitem często jest potwierdzone i bardzo dobrze zbadane, to powierzchnia, na której dochodzi do rozpoznania molekularnego (np. związanie dedykowanego analitu) jak i środowisko prowadzenia takich analiz, często może w znacznej mierze wpływać na wydajność i „jakość” tych oddziaływań. Potwierdza to chociażby liczba doniesień literaturowych w których zjawiska te są analizowane, a powierzchnia przetworników dodatkowo modyfikowana z zastosowaniem wybranych związków chemicznych czy nanomateriałów.

Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałem w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. **„Projektowanie i parametry pracy elektrochemicznych (bio)sensorów oraz przykłady ich wykorzystania, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki zakażeń bakteryjnych”**, było opracowanie nowych sensorów i biosensorów oraz próba poprawy parametrów analitycznych względem rozwiązań już istniejących. Przeprowadzone badania można podzielić na trzy główne grupy:

- (i) próba poprawy parametrów roboczych apta-, immuno- oraz genosensorów poprzez zastosowanie jako elementów konstrukcyjnych nanomateriałów lub nowych niereceptorowych składników warstwy bioczułej ([H1], [H3], [H4], [H5], [H7], [H10])
- (ii) rozwijanie konstrukcji geno- i immunosensorów umożliwiającej pełną elektrochemiczną diagnostykę zakażeń bakteryjnych ([H2], [H5], [H7], [H8])
- (iii) przygotowanie pochodnych grafenu oraz wykorzystanie ich jako warstw receptorowych w elektrochemicznych sensorach chemicznych ([H6], [H9])

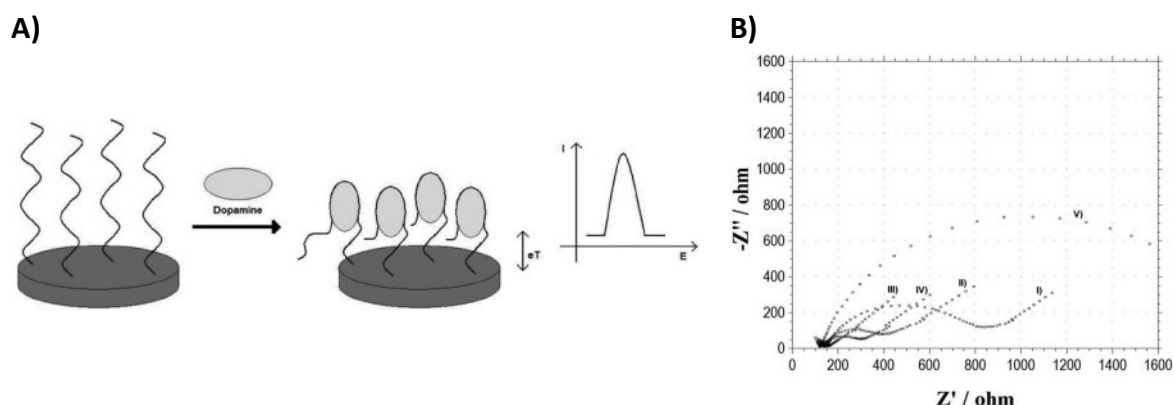
Wymienione obszary badawcze, w szczególności (i) oraz (ii), uzupełniają się, przez co w celu uproszczenia odbioru autoreferatu zostaną opisane wspólnie.

Jak wspomniano, konstrukcja oraz parametry pracy sensorów i biosensorów sprawiają, że znajdują one lub mogą znaleźć zastosowanie w oznaczeniach stężenia zarówno jonów, prostych związków chemicznych (np. antybiotyki, neuroprzekaźniki itp.) czy typowych związków pochodzenia biologicznego (białka, kwasy nukleinowe itp.), prowadzonych w wielu gałęziach przemysłu. Często rozwiązania te stosowane są jako narzędzia wstępnej/przesiewowej analizy próbek, stanowiąc z jednej strony prostszą alternatywę, ale z drugiej, uzupełnienie wiedzy otrzymywanej za pomocą zaawansowanych technik instrumentalnych. Należy jednak zauważyć, że jednym z kierunków rozwoju współczesnej chemii analitycznej, czy diagnostyki medycznej, jest uzyskanie całkowitej automatyzacji prowadzonych pomiarów, gdzie od użytkownika końcowego byłoby wymagane wyłącznie wprowadzenie do urządzenia świeżo pobranej próbki. W rozwiązaniach takich (bio)sensory zyskują coraz większe zainteresowanie jako elementy detekcyjne. Ideą takiego podejścia, poza wyeliminowaniem błędów ludzkich podczas prowadzenia pomiarów, jest również pełna mobilność urządzenia oraz możliwość prowadzenia oznaczeń poza laboratorium. To pociąga za sobą konieczność osiągnięcia jak największego stopnia miniaturyzacji wszystkich elementów gotowego urządzenia, w tym również elementów detekcyjnych. Niestety, często zmniejszanie wymiarów czujników wpływa również znacząco na zmniejszenie intensywności uzyskiwanego sygnału analitycznego, w szczególności w przypadku technik prądowych czy optycznych. Między innymi z tego względu, podejmuje się próby wykorzystania w tworzeniu warstw (bio)czułych (bio)sensorów nowych nanomateriałów i/lub związków niereceptorowych. Podejście takie, w przypadku stosowania technik elektrochemicznych, może prowadzić do poprawy przewodności stosowanego przetwornika, np. w wyniku rozwinienia jego powierzchni i/lub wprowadzenia struktur rezonansowych, czy też poprawić stabilność elementów bioreceptorowych, znajdujących się w warstwie sensorycznej. W pracy:

- [H10] Jarczewska, M., Sheelam, S.R., **Ziółkowski, R.**, Górski, L. *A label-free electrochemical DNA aptasensor for the detection of dopamine*, Journal of the Electrochemical Society, 2016, 163 (3), B26-B31.

zaprezentowałem swoje pierwsze badania nad zastosowaniem nanomateriałów w konstrukcji biosensorów elektrochemicznych. Zastąpienie złotych elektrod dyskowych elektrodami wykonanymi z węgla szklanego (GCE) o takich samych wymiarach, modyfikowanych dodatkowo redukowanym tlenkiem grafenu oraz nanocząstkami złota, doprowadziło do znacznej poprawy parametrów analitycznych czujnika dedykowanego wykrywaniu i oznaczaniu dopaminy. Wspomniane nanomateriały tworzyły warstwę przejściową między przetwornikiem a warstwą bioczułą w postaci aptamerów DNA, która umożliwiła znaczne zmniejszenie wartości granicy wykrywalności, zwiększenie selektywności prowadzonych oznaczeń czy rozszerzenie zakresu prostoliniowej odpowiedzi czujnika. Miało to o tyle znaczenie, że w przypadku czujnika skonstruowanego na bazie klasycznej złotej elektrody dyskowej, o takich samych wymiarach, uzyskane parametry analityczne nie pozwoliłyby na zbadanie występowania tego neuroprzekaźnika w organizmie ludzkim, którego stężenie mieści się w zakresie od 10^{-8} do 10^{-6} mol·L⁻¹ (największe ilości dopaminy znajdują się w mózgu, rzędu kilku mikromoli), a odchylenie od tego zakresu może być wskaźnikiem rozwoju poważnych chorób o podłożu neuronalnym. Zmniejszenie wartości granicy detekcji z 26,8 μmol·L⁻¹ (dla złotej elektrody dyskowej) do 3,36 μmol·L⁻¹ zbliżyło zatem możliwości analityczne proponowanego rozwiązania do rzeczywistych potrzeb diagnostycznych. Dodatkowo, zastosowanie nanomateriałów przyczyniło się do znacznej poprawy również selektywności proponowanego rozwiązania, w szczególności wobec kwasu askorbinowego, interferentu, występującego w znacznym nadmiarze wobec dopaminy w próbkach

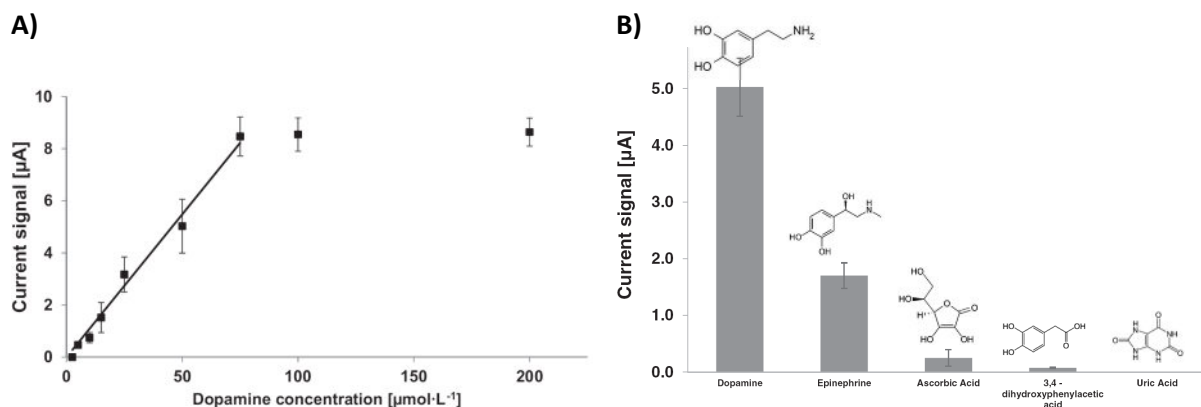
rzeczywistych. W związku z tym, że proponowane rozwiązanie jest czujnikiem beznacznikowym, w którym mechanizm detekcji (Rysunek 1 A) związany jest z prądem utleniania, pochodzącym od reakcji redoks analitu (dopaminy), to wszelkie związki o zbliżonych potencjałach redoks występujące w analizowanej próbce mogą znacznie wpływać na wiarygodność prowadzonych oznaczeń.



Rysunek 1. A) mechanizm detekcji **B)** analiza, z wykorzystaniem spektroskopii impedancyjnej, kolejnych etapów przygotowywania czujnika: **I)** czysta GCE, **II)** GCE modyfikowana redukowanym tlenkiem grafenu (rGO), **III)** GCE/rGO z nanocząstkami złota (AuNP), **IV)** GCE/rGO/AuNP modyfikowana aptamerem DNA; **V)** GCE/rGO/AuNP/DNA po 5 minutowej inkubacji w $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ roztworze dopaminy. Pomiary wykonane w $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ buforze Tris-HCl (pH 7.4) zawierającym $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ oraz $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl przy potencjale DC 0.2 V [H10].

Obecnie dopamina (w próbce krwi lub surowicy) wykrywana jest głównie z wykorzystaniem czasochłonnych i wymagających kosztownego sprzętu technik instrumentalnych typu wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) czy spektrometria mas (MS). Można zatem uznać, że możliwość prowadzenia szybkich i prostych w wykonaniu oznaczeń, przy zachowaniu odpowiedniej selektywności oraz małej wartości granicy wykrywalności może stanowić ciekawą alternatywę i/lub uzupełnienie, szczególnie podczas przesiewowych badań diagnostycznych. Sam czujnik był przygotowywany poprzez zanurzenie oczyszczonej elektrody GCE w roztworze tlenku grafenu oraz jego elektrochemicznej redukcji. Prowadziło to do osadzenia na powierzchni elektrody nanomateriału węglowego w postaci zredukowanego tlenku grafenu (rGO). Jak można zauważyć na Rysunku 1B wynikiem takiego procesu jest zmniejszenie oporu elektrody i sprawniejsza wymiana elektronów między roztworem a powierzchnią przetwornika z udziałem wspomnianego rGO. Defekty oraz krawędzie płatków zredukowanego tlenku grafenu syntezowanego na drodze chemicznej stanowią miejsca wprowadzania elektronów w naniesioną warstwę nanomateriału. Płatki takie zawierają zazwyczaj kilka warstw a pojawienie się ich na powierzchni elektrody z węgla szklonego (wykonanej z pasty węglowej) można przyrównać do utworzenia elektrody wykonanej z wysoce uporządkowanego grafitu pirolitycznego, przy czym ułożonego w sposób pośredni między jego równoległą i prostopadłą orientacją. Dodatkowa modyfikacja takiej warstwy nanocząstkami złota (nanoszonych z wodnego roztworu kwasu tetrachlorozłotowego (III) również w sposób elektrochemiczny) z jednej strony stanowiła miejsce wiązania dla tiolowanych 57 nukleotydowych aptamerów DNA, z drugiej prowadziła do dalszego rozwinięcia powierzchni elektrochemicznej elektrody (co można zaobserwować jako dalsze zmniejszanie się oporu elektrody). Co ważne, w przypadku analizy, z wykorzystaniem spektroskopii impedancyjnej, oddziaływania dopaminy z gotową warstwą receptorową zaobserwowano większy wzrost oporu elektrody niż w przypadku warstwy bioczułej bezpośrednio naniesionej na złotą elektrodę dyskową. Zastosowanie nanomateriałów realnie przełożyło się zatem na poprawę parametrów analitycznych gotowego czujnika (Rysunek 2A, B) w porównaniu z układem, w którym warstwa bioczuła była naniesiona bezpośrednio na złotą elektrodę dyskową. Dotyczy to w szczególności, co już wspomniano, zwiększenia selektywności i zmniejszenia wartości granic

wykrywalności, ale także zwiększenia czułości, rozszerzenia zakresu pomiarowego (liniowej zależności sygnału prądowego utleniania dopaminy od jej stężenia; $5\text{--}75\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dodatkowo przy zwiększonej powtarzalności otrzymywanych wyników analiz.

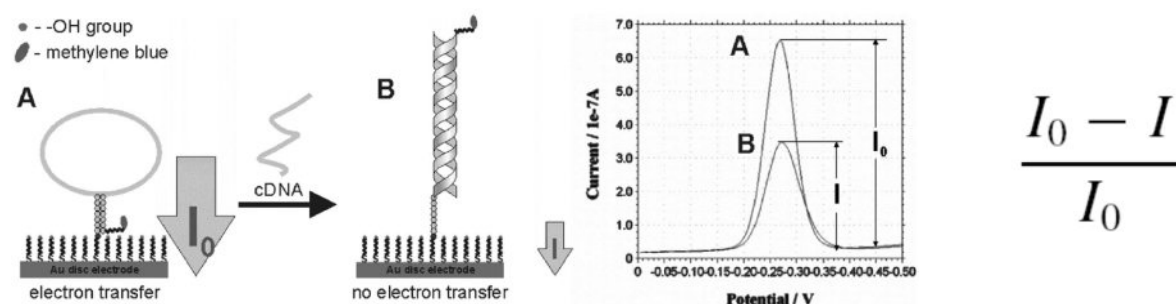


Rysunek 2. A) Zależność między odpowiedzią czujnika a stężeniem dopaminy w próbce; **B)** selektywność, stężenie analizowanych związków w próbce wynosiła $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [H10].

Skutkiem współpracy, nawiązanej z badaczami z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w Warszawie, w zakresie identyfikacji zakażeń u ludzi patogenami bakteryjnymi było, poza wspólnym projektem (NCN 2014/15/B/NZ6/01771), również ukierunkowanie prac badawczych na opracowanie elektrochemicznych (z mojej strony) biosensorów dedykowanych wykrywaniu markerów zakażeń (kwas nukleinowy i białka). Badania będące podstawą publikacji:

- [H8] **Ziółkowski, R.** , Oszałdowski, S., Zacharczuk, K., Zasada, A.A., Malinowska, E., *Electrochemical detection of bacillus anthracis protective antigen gene using DNA biosensor based on stem-loop probe*, Journal of the Electrochemical Society, 2018, 165 (5), B187-B195.

poświęcone były opracowaniu elektrochemicznego czujnika umożliwiającego wykrycie produktów asymetrycznej reakcji łańcuchowej polimerazy w próbkach rzeczywistych. Po wstępnych badaniach nad możliwością zastosowania odpowiedniego mechanizmu detekcji zdecydowałem się na układ tzw. spinki do włosów (Rysunek 3).

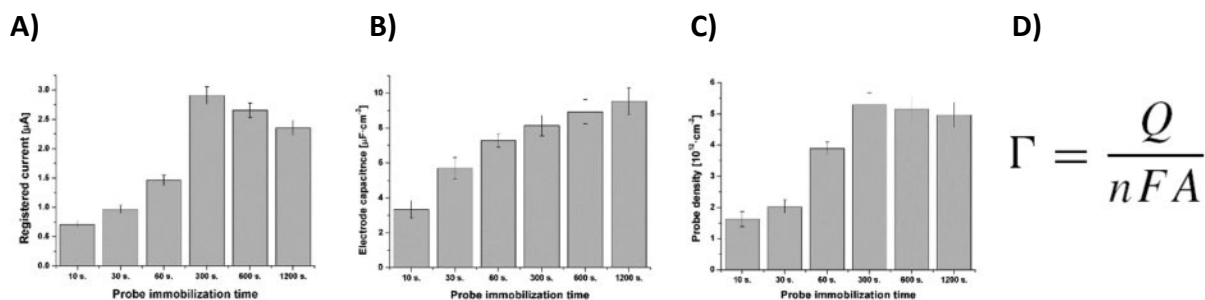


Rysunek 3. Mechanizm detekcji elektrochemicznego czujnika DNA **A)** zamknięta struktura spinki do włosów, znacznik redoks w pobliżu elektrody **B)** struktura spinki została zaburzona poprzez proces hybrydyzacji z nicią komplementarną, zwiększyła się odległość znacznika redoks od powierzchni elektrody. Przykładowe woltamperogramy oraz równanie na podstawie którego wyliczano odpowiedź czujnika [H8].

Mierzony sygnał prądowy pochodził w tym przypadku od reakcji redoks znacznika (błękitu metylenowego) kowalencyjnie dołączonego do jednego z końców sondy DNA unieruchomionej w warstwie receptorowej biosensora. Z kolei sygnałem analitycznym, proporcjonalnym do stężenia

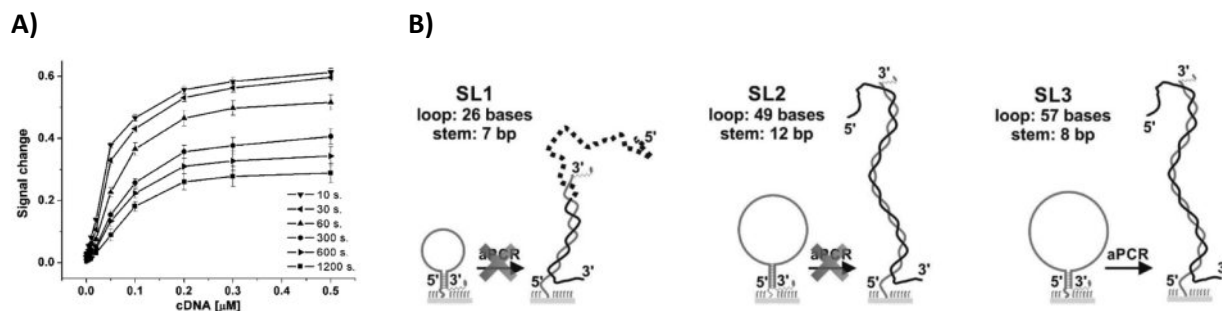
sekwencji komplementarnej znajdującej się w oznaczanej próbce, jest względna zmiana natężenia tego prądu (wyliczana na podstawie powyższego wzoru). Zmiana ta wynika z oddalania się znacznika od powierzchni elektrody na skutek zmian konformacyjnych zachodzących w warstwie receptorowej. Bowiem wraz z tworzeniem się dwuniciowych struktur DNA wzrasta sztywność kwasów nukleinowych w porównaniu do form jednociowych. Wybór takiego mechanizmu detekcji podyktowany był możliwością znacznej redukcji wpływu na rejestrowany sygnał prądowy niespecyficznej adsorpcji składników próbki, tym samym redukując możliwość powstawania wyników fałszywie dodatnich. Próbkę rzeczywistą, szczególnie w przypadku wykrywania kwasów nukleinowych, praktycznie zawsze zawierają również składniki białkowe, które wykazują dużą skłonność do niespecyficznej adsorpcji na powierzchni elektrod. Dlatego też użycie w celu generowania sygnału prądowego jakiegokolwiek znacznika znajdującego się w roztworze, który miałby za zadanie oddziaływać z warstwą receptorową jest wykluczone. Ponadto, dzięki tej pracy oraz kolejnym dwóm ([H1] i [H2]), omówionym w dalszej części autoreferatu, zidentyfikowałem oraz wyjaśniłem rolę kilku kluczowych parametrów o których należy pamiętać podczas konstruowania genosensorów dedykowanych wykrywaniu długoniciowych fragmentów kwasów nukleinowych w próbkach rzeczywistych. Była to w szczególności odpowiednia struktura przestrzenna sondy DNA, właściwa organizacja warstwy receptorowej, zawartość i typ niereceptorowych składników warstwy bioczułej i wynikającego z tego również m.in. składu roztworu w którym prowadzone są analizy. Należy bowiem pamiętać, że mimo iż stosowanie technik elektrochemicznych w detekcji kwasów nukleinowych ma swoje niewątpliwe zalety, wynikające głównie z możliwości wykrywania nawet niewielkich zmian parametrów elektrochemicznych zachodzących na powierzchni elektrody, to można również śmiało powiedzieć że często jest to również największa wada takich czujników. Kluczowe jest zatem dobranie możliwie najlepszych parametrów konkretnej warstwy receptorowej dla konkretnego zastosowania w tym jak się okazuje również pod kątem środowiska reakcji w którym dane oznaczenie będzie prowadzone. Układy bazujące na zmianach konformacyjnych sond DNA w formie spinki do włosów i wynikającej stąd odpowiedzi analitycznej były i są powszechnie opisywane w literaturze. W zdecydowanej większości dotyczą one jednak wykrywania względnie krótkich fragmentów kwasów nukleinowych, w granicach do 30 nukleotydów. Rzadko zdarza się jednak aby próbka rzeczywista, w postaci produktu reakcji amplifikacji kwasów nukleinowych, wykorzystywana jako marker w badaniach diagnostycznych, była o podobnej długości. Podjąłem się jednak zastosowania opisywanego powyżej mechanizmu detekcji również w wykrywaniu znacznie dłuższych sekwencji nukleotydowych. Wynikało to nie tylko z możliwej do uzyskania wysokiej selektywności prowadzonych oznaczeń, ale również z prostoty prowadzonych pomiarów co mogłoby spowodować, że proponowane rozwiązanie odnajdzie w przyszłości zastosowanie w bardziej zaawansowanych i automatycznych narzędziach dedykowanych analizie kwasów nukleinowych. W opisywanej pracy skupiłem się na wykrywaniu fragmentu genu *pagA*, o długości 82 nukleotydów, będącego markerem zarówno możliwej infekcji bakterią *Bacillus anthracis* jak i jego potencjalnej zjadliwości. Zaprojektowałem i przebadłem trzy sondy DNA o charakterze spinki do włosów. Różniły się one długością „pętelki” i „nóżki” a więc i ilością energii niezbędnej do „rozerwania” takiej struktury w wyniku zajścia rozpoznania molekularnego. Unieruchomienie sondy odbywało się w wyniku chemisorpcji i tworzenia wiązania siarka-złoto. Początkowa optymalizacja parametrów pracy takiego czujnika została przeprowadzona z wykorzystaniem syntetycznie wytworzonej i oczyszczonej za pomocą HPLC sekwencji *pagA*. Ostateczne parametry pracy zostały jednak obliczone z wykorzystaniem rzeczywistego produktu asymetrycznej reakcji PCR, do przeprowadzenia której wykorzystany został materiał genetyczny szczepu wąglika wyizolowanego na terenie Polski. Z punktu widzenia rozpoznania molekularnego prowadzonego na powierzchni, podczas którego dochodzi do zmian konformacyjnych, wydaje się być zasadne oszacowanie wpływu zagęszczenia sond DNA na uzyskiwany sygnał prądowy i analityczny. Posłużyłem się do tego celu równocześnie analizą zmian natężenia rejestrowanego sygnału

prądowego, pojemności elektrody oraz skorzystałem z równania (powszechnie wykorzystywanego w literaturze) dedykowanego obliczaniu zagęszczenia sond (Rysunek 4).



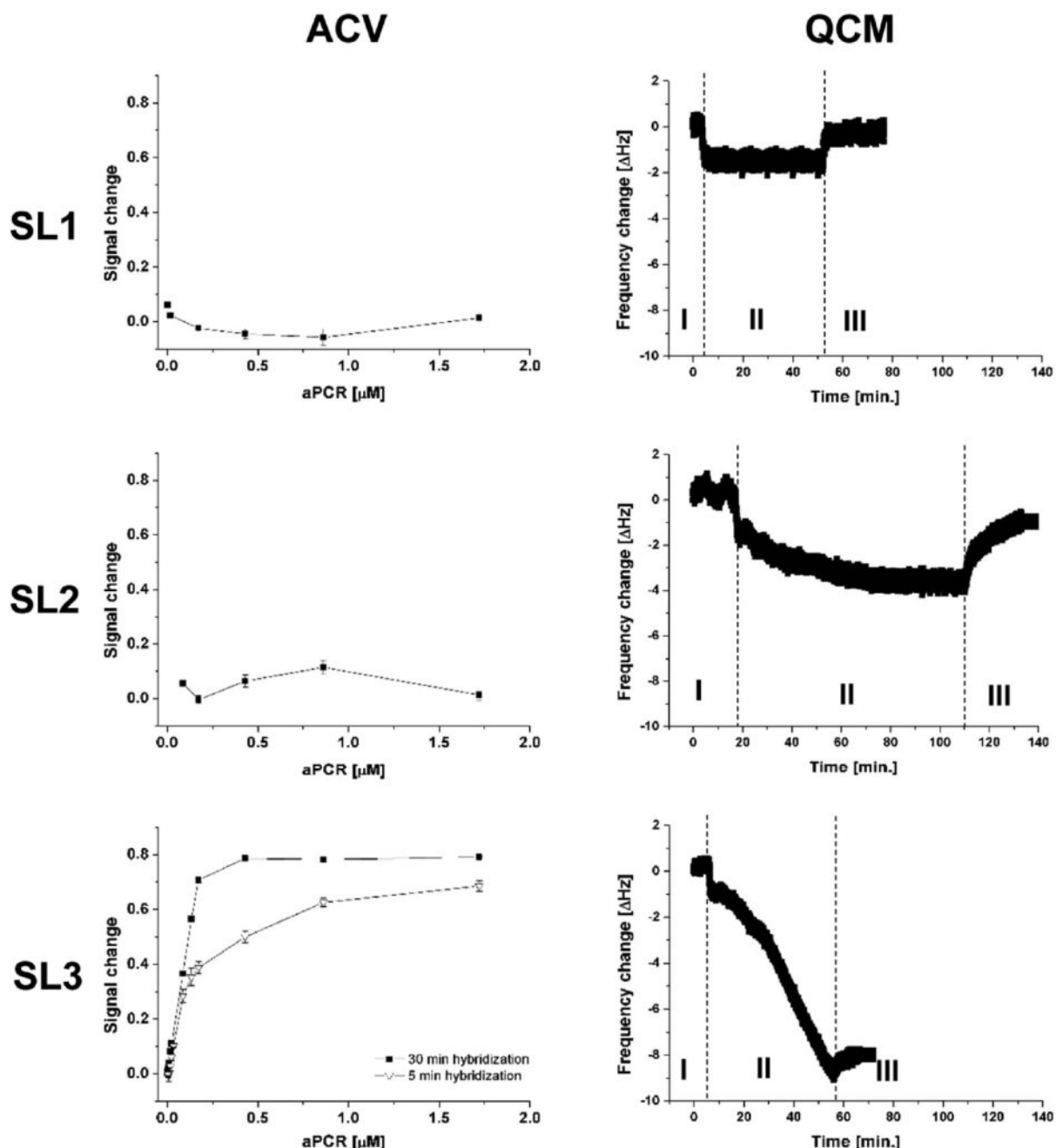
Rysunek 4. **A)** natężenie rejestrowanego prądu z wykorzystaniem techniki ACV (ang. *Alternate Current Voltammetry*); **B)** pojemność elektrody; **C)** obliczone zagęszczenie sond na przetworniku z wykorzystaniem wzoru **D)**, gdzie Q – ładunek, n – liczba elektronów (2), F – stała Faradaya, A – elektrochemiczna powierzchnia elektrody (obliczana na podstawie odrębnego wzoru) [H8].

Aby uzyskać odpowiedź biosensora w tym przypadku, na powierzchni elektrody musi dojść do rozpoznania molekularnego, rozerwania struktury spinki do włosów i utworzenia nowej dwuniciowej struktury. Zmiana ta będzie prowadziła do zmniejszenia rejestrowanego sygnału prądowego. W opisywanej pracy w procesy te zaangażowane są relatywnie długie (z punktu widzenia elektrochemicznych biosensorów DNA) fragmenty kwasów nukleinowych. Można zatem przypuszczać, że stopień zagęszczenia sond na powierzchni przetwornika, a więc i występujące ograniczenia steryczne, będą miały bezpośrednie przełożenie na wszystkie powyższe zjawiska. Analizując wyniki zaprezentowane na Rysunku 4 można zauważyć, że intensywność rejestrowanego sygnału pochodzącego od warstwy receptorowej zwiększała się wraz z wydłużaniem czasu immobilizacji, i osiągała maksimum dla 300 sekund (Rysunek 4 A). W przypadku dłuższego czasu osadzania sond z roztworu, natężenie rejestrowanego prądu zmniejszało się nieznacznie, co mogło wskazywać na zmniejszanie się ich liczby na powierzchni elektrody. Wraz z wydłużaniem czasu immobilizacji zwiększała się jednak również pojemność elektrody, co może wynikać m.in. ze zmniejszania się grubości lub pogarszania jakości warstwy rozdzielającej powierzchnię elektrody od najbliższego ładunku jonowego, wzrostu stałej dielektrycznej medium pośredniczącego (pojemność czystej, niemodyfikowanej, złotej elektrody znajdującej się w bezpośrednim kontakcie z roztworem, zazwyczaj mieści się w zakresie 20–50 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$; elektrody modyfikowanej dobrze zorganizowaną warstwą alkanotoli, obniżającą stałą dielektryczną warstwy znajdującej się bezpośrednio nad powierzchnią złota, wynosi około 1–5 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$). W prowadzonych badaniach, wartości graniczne pojemności wynosiły 3,4 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla najkrótszego czasu immobilizacji sondy (największy udział alkanotolu) oraz 97,6 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ gdy unieruchamiane były wyłącznie kwasy nukleinowe. Dlatego też można dojść do wniosku, że zmniejszanie natężenia prądu obserwowane dla dłuższych czasów immobilizacji wynikało najprawdopodobniej z braku możliwości odpowiedniej organizacji sond w postaci spinek, niż ze zmniejszania się ich liczby na powierzchni elektrody. Z kolei wyliczenia zaprezentowane na Rysunku 4C, wykonane w oparciu o powszechnie wykorzystywany wzór (Rysunek 4D) najprawdopodobniej niedoszacowują liczby sond na przetworniku. Założenia takie, w odniesieniu do zwiększania ograniczeń sterycznych wraz ze zwiększaniem się zagęszczenia sond na przetworniku powyżej 300 sekund immobilizacji, miało również swoje przełożenie na obserwowaną wydajność hybrydyzacji przeprowadzoną w czasie 1 minuty z sekwencją kodującą 82 fragment genu *pagA* (Rysunek 5A).



Rysunek 5. A) Odpowiedź czujnika w wyniku 1 minutowej hybrydyzacji z sekwencją cDNA oczyszczaną HPLC **B)** schematycznie przedstawione proporcje analizowanych sond oraz wykrywanej 82 nukleotydowej sekwencji genu *pagA* [H8].

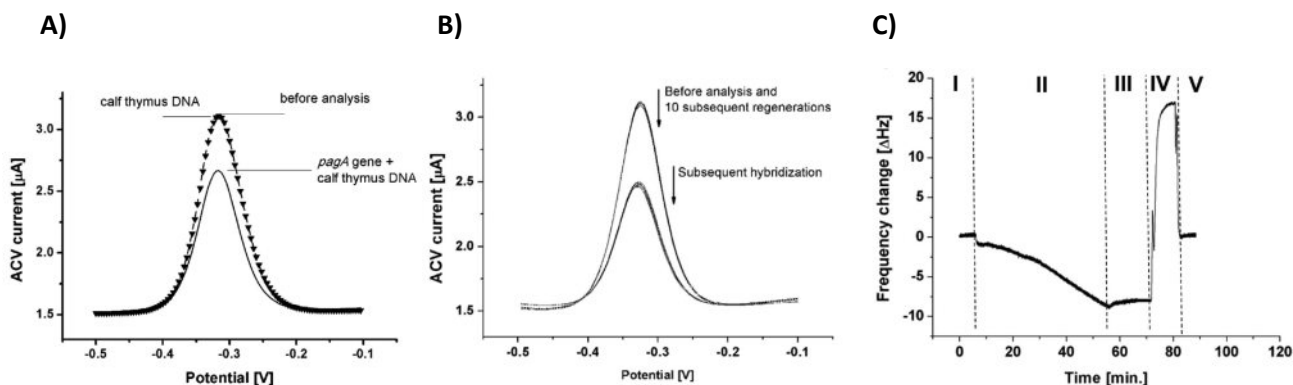
Największą odpowiedź biosensora zaobserwowano dla najkrótszego czasu unieruchamiania sondy. Z kolei wraz z jego wydłużaniem spadała wydajność rozpoznawania sekwencji komplementarnej. Z uwagi na względnie duże natężenie rejestrowanego prądu, przy wysokiej wydajności procesu hybrydyzacji zdecydowano się na 30 sekundowe unieruchamianie długoniciowej sondy DNA na powierzchni. Nie mniej, mimo pozytywnych wyników dla sondy SL1, związanych z wykrywaniem jednoniciowej syntetycznej sekwencji genu oczyszczonej z wykorzystaniem HPLC, nie udało się uzyskać odpowiedzi czujnika w takich samych warunkach prowadzenia oznaczeń ale względem próbki rzeczywistej. Była ona dostarczana z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego i stanowiła produkt asymetrycznej reakcji PCR. Oprócz jednoniciowych fragmentów genu *pagA* zawierała on również fragmenty dwuniciowe o długości 82 par zasad, startery niezbędne do przeprowadzenia reakcji, matrycę DNA izolowaną z bakterii *Bacillus anthracis* czy, co równie istotne, szereg białek niezbędnych do przeprowadzenia reakcji PCR. Z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej określono stężenie jednoniciowej formy genu *pagA* w próbce rzeczywistej na poziomie 1,72 μ M. Dopiero wykorzystanie w warstwie receptorowej sondy DNA o innej strukturze umożliwiło wykrycie pożądanej sekwencji w próbce rzeczywistej (Rysunek 5B oraz Rysunek 6).



Rysunek 6. **ACV)** Odpowiedź czujnika w zależności od użytej sekwencji sondy oraz stężenia produktu asymetrycznej reakcji PCR; **QCM)** wyniki mikrowagi kwarcowej dla oddziaływania rzeczywistego produktu asymetrycznej reakcji PCR (aPCR) z analizowanymi sondami gdzie: I – bufor hybrydizacyjny; II – bufor hybrydizacyjny z próbką aPCR; III – bufor hybrydizacyjny [H8].

Dopiero ponad dwukrotne wydłużenie sekwencji pętli przy jednoczesnym jedynie jednonukleotydowym zwiększeniu nóżki (sekwencja sondy SL3) umożliwiło wykrycie, zarówno elektrochemiczne jak i piezoelektryczne, sekwencji komplementarnej w rzeczywistym produkcie asymetrycznej reakcji PCR (aPCR), Rysunek 6. Tak duża zmiana sekwencji sondy najprawdopodobniej znacznie wpłynęła na łatwość z jaką rozrywana jest trzeciorzędowa struktura spinki w wyniku hybrydizacji z aPCR. Tym samym równowaga oddziaływań pojedynczych nici DNA obecnych w produkcie aPCR została przesunięta z tworzenia struktur dwuniciowych (zarówno w obrębie każdej nici jak i między jednoniciowymi sekwencjami próbki aPCR) oraz kompleksów z białkami obecnymi w roztworze, w kierunku oddziaływania z sondami unieruchomionymi na powierzchni elektrody. Co równie ważne, odpowiedź opracowanego czujnika była selektywna w obecności dużego nadmiaru DNA

izolowanego z grasicy cielęcej (Rysunek 7A) a w zależności od czasu hybrydyzacji możliwe było wykrycie również produktu PCR przygotowanego w reakcji o zredukowanej liczbie cykli. Z kolei sama konstrukcja takiego czujnika sprawiła, że mógł on zostać użyty kilkakrotnie, po odpowiednio intensywnym opłukaniu wodą dejonizowaną (brak ekranowania ładunków ujemnych grup fosforanowych szkieletu fosforanowo-cukrowego DNA i rozerwanie wiązań wodorowych stabilizujących strukturę dwuniciową) (Rysunek 7B,C).



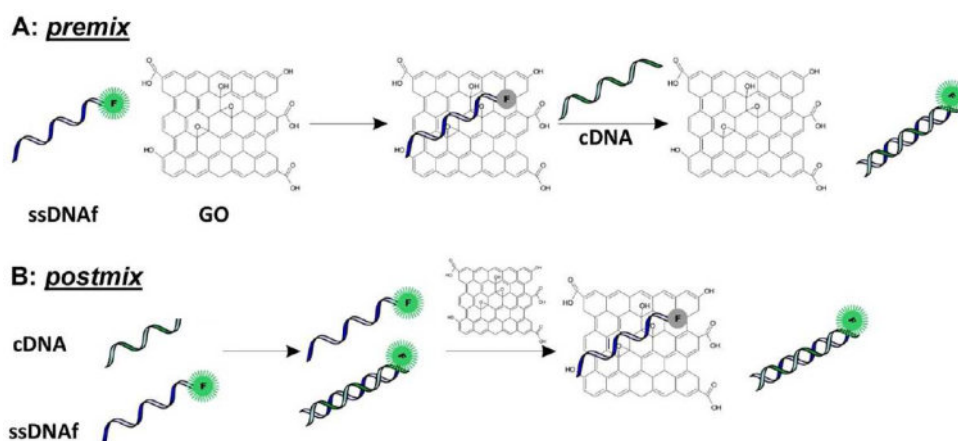
Rysunek 7. A) odpowiedź czujnika przed analizą, w obecności 500-krotnego nadmiaru DNA izolowanego z grasicy cielęcej, oraz w obecności DNA z grasicy cielęcej oraz genu *pagA*, wyniki pomiarów otrzymanych po 5-minutowej hybrydyzacji; **B)** odpowiedź biosensora przed analizą, po 30-minutowej hybrydyzacji oraz po kolejnych etapach regeneracji; **C)** analiza regeneracji czujnika z wykorzystaniem QCM, gdzie I – bufor hybrydyzacyjny; II – hybrydyzacja z aPCR; III – bufor hybrydyzacyjny; IV – woda; V – bufor hybrydyzacyjny [H8].

Kolejnym etapem moich prac badawczych było zastosowanie grafenu we fluorescencyjnych testach DNA z detekcją elektrochemiczną. Doświadczenie zdobyte w trakcie realizacji projektu Iuventus Plus „Badania nad zastosowaniem grafenu jako nowego podłoża biosensorów elektrochemicznych zawierających w warstwie receptorowej kwasy nukleinowe” pozwoliło podjąć badania nad zastosowaniem grafenu w czujnikach DNA (dedykowanych wykrywaniu sekwencji markerowych zakażenia bakteryjnego), w których zmiany w intensywności emisji fluorescencji rejestrowane były z wykorzystaniem technik elektrochemicznych. Nawet pomimo tego, że w trakcie realizacji samego projektu zauważyłem, że wprowadzenie pochodnej grafenu jako warstwy pośredniej w elektrochemicznych czujnikach DNA z mechanizmem detekcji „spinki do włosów” nie przynosiło zamierzonych efektów. Wówczas problemem było nawet uzyskanie w ogóle jakiejkolwiek zależności między odpowiedzią biosensora a stężeniem sekwencji komplementarnej obecnej w analizowanej próbce. Najprawdopodobniej wynikało to z powszechnie występujących na takich podłożach oddziaływań π - π między warstwami grafenu a odsłoniętymi pierścieniami aromatycznymi jednoniciowych sekwencji kwasów nukleinowych. Efekt ten wzmacniał fakt kowalencyjnego sposobu unieruchamiania sondy DNA na powierzchni, a tym samym znacznego ograniczenia jej swobody. Nie mniej, w pracy:

[H4] **Ziółkowski, R.** , Oszałdowski, S., Kopyra, K.K., Zacharczuk, K., Zasada, A.A., Malinowska, E. *Toward Fluorimetric-Paired-Emitter-Detector-Diode test for Bacillus anthracis DNA based on graphene oxide*, Microchemical Journal, 2020, 154, art. no. 104592.

podjąłem się badań, w których oddziaływanie π - π między jednoniciowymi sekwencjami kwasów nukleinowych a podłożem grafenowym, były kluczowe z punktu widzenia zastosowanego mechanizmu detekcji (Rysunek 8). Co jednak równie ważne to fakt, że tym razem postanowiłem unieruchomić sondy

DNA (znakowane barwnikiem fluorescencyjnym) nie poprzez wiązanie kowalencyjne z podłożem a jedynie w wyniku adsorpcji na powierzchni płatków tlenku grafenu (indukowanie zjawiska wygaszania fluorescencji) w wyniku w/w oddziaływań. Z kolei desorpcja sond (powodująca wzbudzenie fluorescencji) następowała w wyniku hybrydyzacji z nicią komplementarną. Dochodziło wówczas do tworzenia dwuniciowego fragmentu DNA, zorientowaniu zasad azotowych do jego wnętrza a tym samym zrywaniu wiązań π - π z płatkami grafenowymi. Układ taki (Rysunek 8, premix) miał stanowić alternatywę dla opisanego wyżej czujnika elektrochemicznego dedykowanego wykrywaniu 82 nukleotydowego fragmentu genu *pagA* bakterii *Bacillus anthracis*. W tej samej pracy scharakteryzowałem również drugi układ, w którym na powierzchni płatków tlenku grafenu adsorpcji ulegały jednoniciowe fragmenty DNA pozostające w roztworze w nadmiarze po procesie hybrydyzacji (Rysunek 8, postmix). Chęć zastosowania obu mechanizmów wynikała ze złożonego i niejednorodnego składu jakościowego uzyskiwanych płatków tlenku grafenu. Mnogość grup tlenowych obecnych na powierzchni płatków oraz obszary całkowicie ich pozbawione sprawiały, że ssDNA (jednoniciowe DNA) oraz struktury tlenku grafenu mogły oddziaływać nie tylko poprzez wiązania π - π ale również w wyniku oddziaływań hydro- i lipofilowych czy też poprzez tworzenie wiązań wodorowych. To z kolei, w zależności od wykorzystywanego mechanizmu detekcji, mogłoby wpływać na wydajność procesu hybrydyzacji czy adsorpcję ssDNA prowadzonych na powierzchni płatka GO.



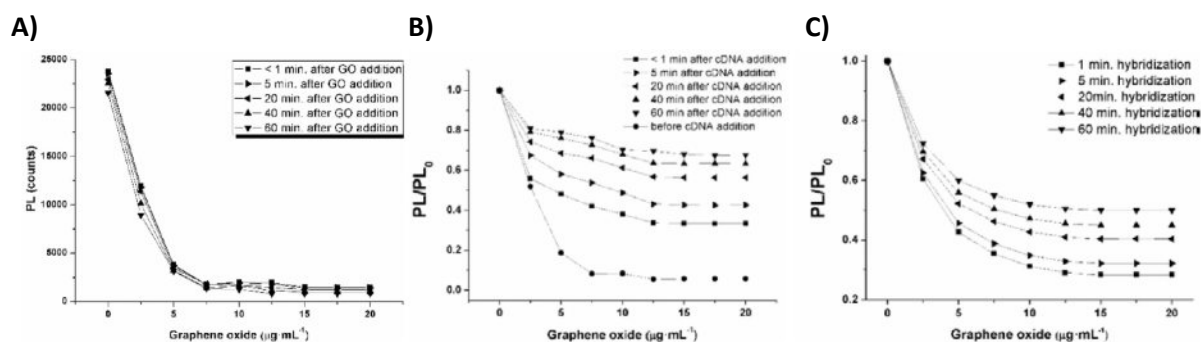
Rysunek 8. Schemat mechanizmów detekcji: A) premix, B) postmix [H4].

Duży wpływ na możliwość zachodzenia wyżej opisanego procesu miała sekwencja oznaczanego 82 nukleotydowego fragmentu DNA (aPCR), a właściwie przyjmowane przez nią w roztworze struktury drugo- i trzeciorzędowe (Rysunek 9). Charakteryzowały się one długimi fragmentami dwuniciowymi i jedynie niewielkimi odcinkami jednoniciowymi, w szczególności na końcach 3' i 5', które to były komplementarne do sekwencji sondy fluorescencyjnej (ssDNAf). We wstępnych badaniach wykorzystano sekwencję cDNA, tabela poniższej, w pełni komplementarnej do sekwencji sondy ssDNAf.

Sequence name	aPCR				cDNA
Structure					

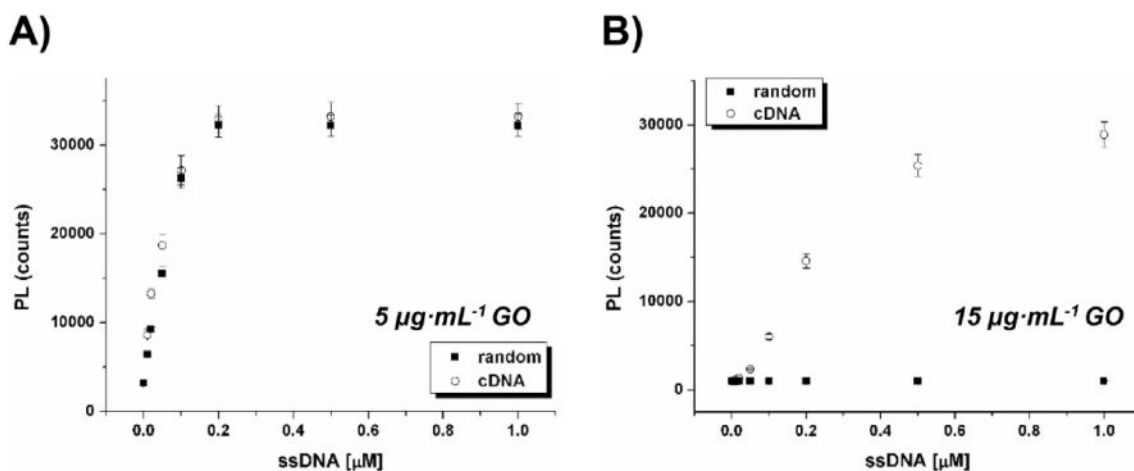
Rysunek 9. Najbardziej prawdopodobne (od lewej do prawej) struktury drugorzędowe 82 nukleotydowego fragmentu genu *pagA* oraz oczyszczonego za pomocą HPLC fragmentu cDNA [H4].

Badania prowadziłem w roztworze 20 mM HEPES (pH 5,0) z dodatkiem 2 mM $MgCl_2$ w celu kompensacji ujemnych ładunków występujących w szkieletie fosforanowo-cukrowym DNA oraz na powierzchni płatków tlenku grafenu. Taki skład buforu umożliwił szybką oraz wydajną adsorpcję ssDNA na powierzchni płatków a utworzone struktury odznaczały się trwałością (co zweryfikowano za pomocą elektroforezy kapilarnej). Po arbitralnym wyborze wyjściowego stężenia sondy fluorescencyjnej, ssDNAf, na poziomie 0,1 μM (duża intensywność sygnału fluorescencji, możliwość uzyskania małych wartości granicy wykrywalności) dobrałem stężenie tlenku grafenu umożliwiające wydajne wygaszenie tej fluorescencji (w wyniku oddziaływania z sondą) (Rysunek 10 A).



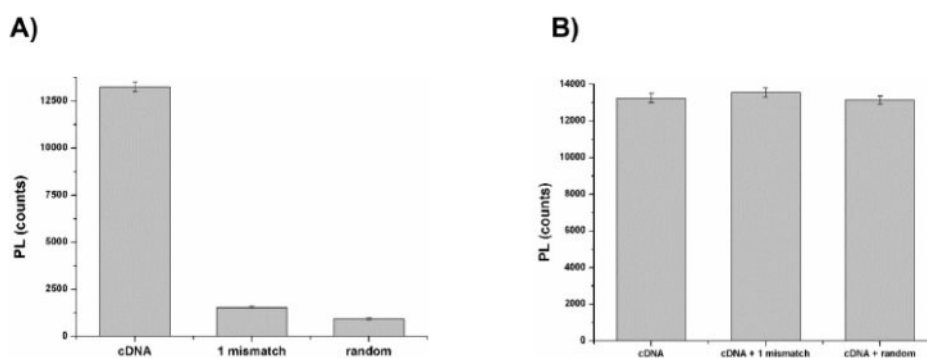
Rysunek 10. Zmiany w intensywności fluorescencji w wyniku **A)** dodania do 0,1 μM ssDNAf różnych stężeń tlenku grafenu, **B)** mechanizm premix: wzrost intensywności fluorescencji w wyniku dodania 1 μM cDNA w zależności od stężenia GO w mieszaninie wyjściowej, **C)** mechanizm postmix: wpływ czasu hybrydyzacji oraz stężenia GO na wygaszanie fluorescencji (0,1 μM ssDNAf i 0,1 μM cDNA) [H4].

Całkowite wygaszenie fluorescencji dla sondy ssDNAf o stężeniu 0,1 μM zaobserwowano stosując stężenie płatków tlenku grafenu większe bądź równe 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Zaobserwowano, że czas oddziaływania ssDNA z GO nie wpływał znacząco na przebieg procesu. Z kolei po dodaniu do roztworu sekwencji komplementarnej do ssDNAf (Rysunek 10B) można było zaobserwować wzrost intensywności fluorescencji. Jednak kinetyka tego oddziaływania była zróżnicowana a proces był najefektywniejszy gdy stężenie GO wynosiło od 5 do 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Powyżej 12,5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ znormalizowana odpowiedź sensora (PL/PL_0) była stała i wynosiła około 0,33 w pierwszej minucie hybrydyzacji. Dla każdego z testowanych stężeń GO, można było zaobserwować wzrost odpowiedzi czujnika wraz z upływem czasu (aż do osiągnięcia maksimum odpowiedzi na poziomie 0,68 po godzinnej inkubacji). W przypadku drugiego z badanych mechanizmów detekcji (Rysunek 10C), płatki GO dodawane były po procesie hybrydyzacji prowadzonej w roztworze. W tym przypadku również odpowiedź sensora silnie zależała od stężenia dodawanego GO. Powyżej 12,5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ nie obserwowano już zmian w kinetyce spadku intensywności fluorescencji a dla jednodominutowego oddziaływania mieszaniny kwasów nukleinowych i GO obserwowano odpowiedź sensora na poziomie 0,28 (0,50 dla 60 minut). Dla mniejszych stężeń GO można było zaobserwować większe wartości znormalizowanej fluorescencji, co mogło wynikać z obecności w roztworze wolnych, nie zaadsorbowanych na płatkach GO, sond ssDNAf. Jak już wspominałem, podczas dodawania sekwencji cDNA do mieszaniny, w której ssDNAf było już zaadsorbowane na powierzchni płatków GO (Rysunek 10B), można było wyróżnić dwie szybkości ponownego wzbudzenia fluorescencji. Szybszą, gdy stężenie płatków tlenku grafenu wynosiło poniżej 12,5 $\mu g \cdot mL^{-1}$, oraz wolniejszą dla stężeń większych od tej wartości. Mogło to wskazywać na występowanie różnych zjawisk odpowiedzialnych za desorpcję ssDNAf z powierzchni tlenku grafenu. W celu weryfikacji tej hipotezy przygotowałem dwa roztwory o różnym stężeniu GO, 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ (Rysunek 11A) i 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$ (Rysunek 11B) i niezmiennym stężeniu ssDNAf, 0,1 μM . Tym razem porównałem zmianę fluorescencji takich układów w wyniku dodawania do nich sekwencji DNA w pełni komplementarnej do ssDNAf (cDNA), oraz całkowicie niekomplementarnej (random).



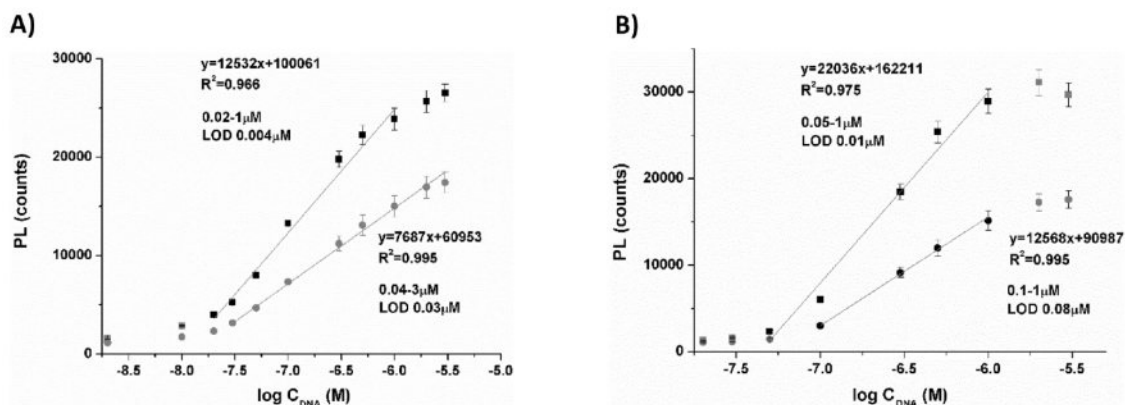
Rysunek 11. Zmiany w intensywności fluorescencji w wyniku dodawania cDNA oraz sekwencji „random” do mieszaniny zawierającej 0,1 μM ssDNAf zaadsorbowanego na **A)** 5 μg·mL⁻¹ GO; **B)** 15 μg·mL⁻¹ GO [H4].

W trakcie badań zauważyłem, że w przypadku zastosowania mniejszego stężenia grafenu sekwencja dodawanego jednoniciowego fragmentu DNA nie miała wpływu na wzbudzenie fluorescencji. Sytuacja była odwrotna gdy analizowano zdecydowanie większe stężenie GO. W tym przypadku zwiększenie intensywności fluorescencji zaobserwowano wyłącznie względem cDNA, przy niewielkich zmianach w przypadku sekwencji losowej. Można zatem przypuszczać, że aby uzyskać specyficzną odpowiedź proponowanego rozwiązania, konieczne jest zastosowanie znacznego nadmiaru płatków tlenu grafenu wobec ssDNAf, aby nie dochodziło do całkowitego wysycenia miejsc możliwej adsorpcji. Taki stan prawdopodobnie wynika z możliwości podmieniania przez nowododane fragmenty ssDNA zaadsorbowanych wcześniej sond ssDNAf. W przypadku gdy nadal będą występowały wolne miejsca adsorpcji dla dodawanych sekwencji jednoniciowych, wówczas obserwowane zwiększenie intensywności fluorescencji spowodowane będzie najprawdopodobniej selektywną hybrydyzacją sondy ssDNAf z sekwencją komplementarną. Co istotne, zastosowanie powyższego podejścia umożliwiło także wykrycie sekwencji zawierających mutacje punktowe w stosunku do sondy ssDNAf (Rysunek 12).



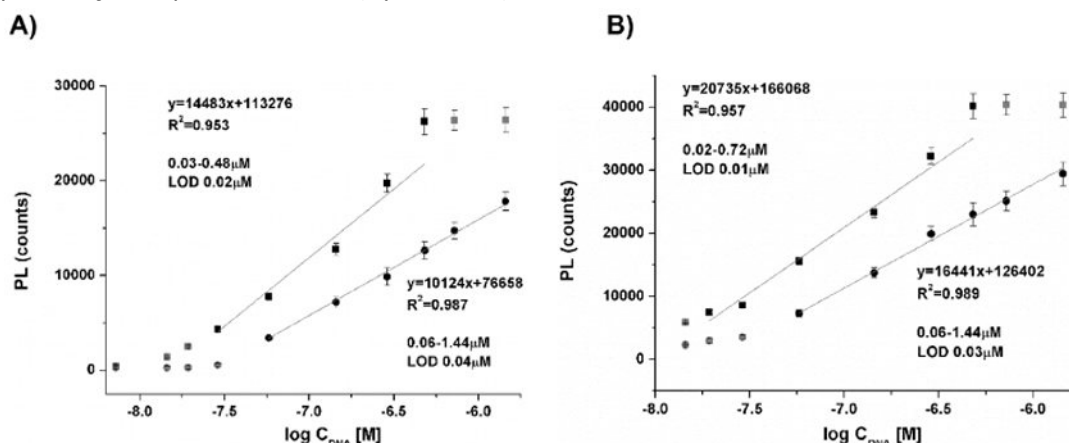
Rysunek 12. Selektowność testu dla mechanizmu postmix: **A)** odpowiedź testu dla każdej z analizowanych sekwencji; **B)** odpowiedź testu dla mieszaniny sekwencji przeszkadzających oraz sekwencji komplementarnej (stężenie ssDNAf wynosiło 0,1 μM) [H4].

Dla obu z przetestowanych mechanizmów odpowiedzi otrzymano użyteczne z analitycznego punktu widzenia parametry sensora. Przebadano dwa czasy hybrydyzacji, 1 oraz 60 minut, dla których zaobserwowano odpowiednio największy wzrost wartości odpowiedzi czujnika oraz wypłaszczenie odpowiedzi. Uzyskane parametry analityczne zostały przedstawione na Rysunku 13.



Rysunek 13. Zależność intensywności fluorescencji od logarytmu stężenia cDNA dla mechanizmu **A)** premix i **B)** postmix [H4].

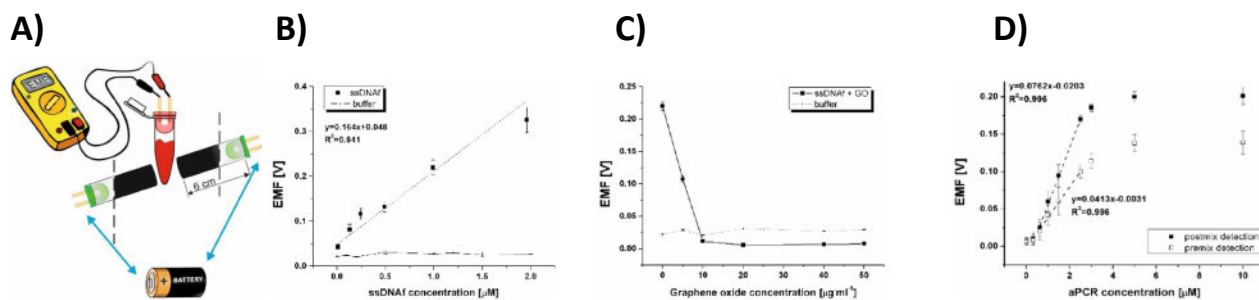
Wszystkie powyższe wyniki uzyskałem z wykorzystaniem syntetycznych fragmentów kwasów nukleinowych, ssDNAf oraz cDNA (18 nukleotydów), jak również z wykorzystaniem typowego laboratoryjnego spektrofлуorymetru. Z czysto użytkowego punktu widzenia nie stanowiły one ciekawej propozycji dla prowadzenia jakichkolwiek oznaczeń. Dlatego też, kolejnym naturalnym krokiem było oszacowanie odpowiedzi sensora na rzeczywiste produkty asymetrycznej reakcji PCR (aPCR). Dla obu opisanych wyżej mechanizmów detekcji wyznaczyłem zależność intensywności fluorescencji od logarytmu stężenia produktu aPCR (Rysunek 14).



Rysunek 14. Zależność intensywności fluorescencji od logarytmu stężenia aPCR dla mechanizmu **A)** premix i **B)** postmix [H4].

Granica wykrywalności kształtowała się na tym samym poziomie co w przypadku cDNA, jednak zakres pomiarowy uległ niemal dwukrotnemu obniżeniu. Przypuszczalnie wynika to skomplikowanej budowy przestrzennej aPCR w porównaniu z cDNA. Wraz z wydłużaniem się sekwencji DNA, jego desorpcja z powierzchni tlenku grafenu następuje coraz bardziej wydajnie. To z kolei jest ważne z uwagi na fakt, że zgodnie z danymi literaturowymi, aby doszło do desorpcji ssDNA z płatka GO musi najpierw dojść do hybrydyzacji nici kwasów nukleinowych na jego powierzchni. Ponadto obserwowane w produkcie aPCR dwuniciowe helisy DNA mogą znacznie ograniczać proces adsorpcji aPCR na powierzchni płatków GO. Przyciąganie jednoniciowych fragmentów produktu aPCR (znajdujących się na 3' końcu produktu asymetrycznej reakcji PCR, Rysunek 9) przez GO umożliwia zachodzenie procesu hybrydyzacji z ssDNAf w tym miejscu, a całkowita adsorpcja produktu aPCR jest wówczas najprawdopodobniej niemożliwa. Nie mniej, przeprowadzone badania potwierdzają możliwość wykorzystania wyżej opisanego sensora w analizach próbek rzeczywistych. W celu dalszego zwiększenia jego użyteczności pod kątem potencjalnej mobilności i ograniczenia kosztów, podjąłem próbę wykorzystania do jego przeprowadzenia układu zbudowanego z plastiku laboratoryjnego (ograniczony koszt materiału), diody LED (dwie diody zielone o $\lambda_{max} = 520$ nm do wzbudzenia fluorescencji; jedna dioda czerwona o $\lambda_{max} =$

625 nm do detekcji), oraz multimetru jako układu pomiarowego (Rysunek 15A). Co ważne, dioda czerwona rozmiarem idealnie wpasowała się w niewielką probówkę, opierając się na jej krawędziach i zapewniając stałą odległość od powierzchni roztworu analizowanej próbki.



Rysunek 15. A) Układ pomiarowy z diodami LED oraz multimetrem; B) wartość potencjału w zależności od stężenia ssDNAf (■) oraz w samym buforze pomiarowym (□) C) (■) zamiana potencjału po dodaniu do 1 μM ssDNAf różnych stężeń GO (□) oraz dla samego buforu pomiarowego; D) (□ - premix) zależność SEM od stężenia aPCR dodawanego do mieszaniny 1 μM ssDNAf zaadsorbowanego na 20 μg·mL⁻¹ GO; (■ - postmix) SEM zmierzona po 1 minucie inkubacji 1 μM ssDNAf z odpowiednim stężeniem aPCR i po 1 minucie od dodania do 20 μg·mL⁻¹ roztworu GO [H4].

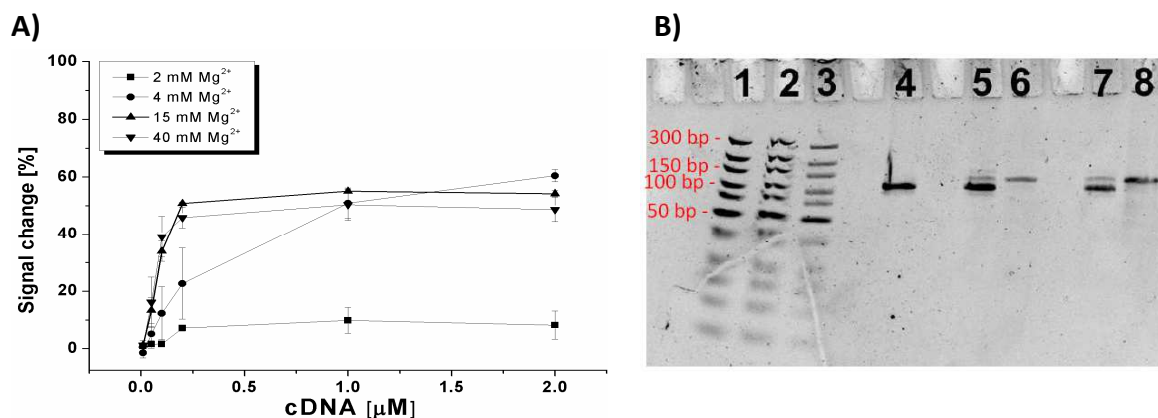
W układzie takim konieczne było jednak dziesięciokrotne zwiększenie stężenia sondy ssDNAf w roztworze aby możliwe było uzyskania zadowalającej odpowiedzi (rejestrowanej z wykorzystaniem multimetru), w postaci generowanego potencjału (Rysunek 15B). Pociągało to za sobą konieczność dopasowania stężenia GO (Rysunek 15C). Pozostałe, wybrane parametry analityczne (Rysunek 15D) gotowego czujnika wyznaczono dla jednonuminutowego czasu hybrydyzacji. Wynikało to z zaproponowanej konstrukcji oraz realnej możliwości stosowania takiego rozwiązania w warunkach pozalaboratoryjnych. Jak można zaobserwować, możliwe było uzyskanie liniowej zależności między rejestrowaną siłą elektromotoryczną a stężeniem jednoniciowego fragmentu DNA (w postaci produktu asymetrycznej reakcji PCR). Dla obu analizowanych mechanizmów detekcji odpowiedź liniowa była podobna i wynosiła odpowiednio 0,6÷2,5 μM. Różniły się jednak czułością prowadzonych analiz, przy czym dla oznaczonego jako „postmix” była niemal dwukrotnie wyższa niż dla mechanizmu nazwanego jako „premix”. Znaczna wartość granicy oznaczalności, wynosząca 0,6 μM, z punktu widzenia prowadzenia rzeczywistych analiz produktów asymetrycznej reakcji PCR nie stanowi jednak przeszkody z uwagi na odpowiednio duże stężenie takiego produktu w próbce.

Współpraca z Narodowym Instytutem Zdrowia Publicznego zaowocowała również kolejnym grantem (NCBiR, LIDER/35/0041/L-7/NCBR/2016), tym razem jego kierowanie zostało powierzone mi. Dotyczył on dalszych badań nad opracowaniem czujników umożliwiających pełną elektrochemiczną diagnostykę zakażeń, tym razem na przykładzie zjadliwych szczepów bakterii *Corynebacterium diphtheriae*, wywołujących chorobę zwaną błonicą. O ile uważa się, że dzięki wprowadzeniu powszechnych szczepień w latach 40-tych XX wieku błonica została praktycznie całkowicie wyeliminowana w krajach rozwiniętych, to zgodnie ze statystykami podawanymi przez EU/EEA, liczba zakażeń błonicą na terenie unii europejskiej wzrosła trzykrotnie na przestrzeni lat 2011-2015. Pałeczki maczugowca występują endemicznie na terenie wielu krajów Azji, południowego Pacyfiku czy Bliskiego Wschodu a wykrycie ich obecności na terenie obozów dla uchodźców znajdujących się na terenie Europy tylko potwierdza wprowadzanie tam nowych szczepów. Można zatem śmiało powiedzieć, że masowe migracje ludności, intensywna turystyka, wszechobecna globalizacja, obserwowane zmiany klimatu czy ruchy antyszczepionkowe nieodwrotnie będą prowadziły do pojawiania się nowych (czego przykładem jest wirus SARS-Cov-2) lub wznawiania zapomnianych patogenów człowieka. Niezbędne jest zatem rozwijanie testów czy czujników umożliwiających szybką identyfikację zakażeń, co sprawia, że z wyboru powinny bazować one na analizie występowania fragmentów DNA/RNA

charakterystycznych dla danego czynnika patogenego czy też jego zjadliwości. W przypadku zakażenia bakterią *Corynebacterium diphtheria*, w szczególności w początkowym jego stadium, często jest ono mylone z infekcją gardła i migdałków wywołaną przez paciorkowce. Z kolei testy prowadzone w kierunku bakterii maczugowca błonicy, wykonywane na późniejszym etapie zakażenia, są czasochłonne i obejmują izolację czystych szczepów bakterii z wymazu a następnie ocenę ich zjadliwości (test immunoprecypitacji Eleka). Postępowania te, z zastosowaniem metod tradycyjnych, fenotypowych, ograniczone są również miejscem ich wykonywania, co dodatkowo wydłuża czas ich prowadzenia. Jest to niezwykle ważne z uwagi na czas, w którym należy podać przeciwciała neutralizujące toksynę produkowaną przez zjadliwe szczepy niektórych gatunków *Corynebacterium*. Tylko taki krok może uchronić pacjenta przed ciężkim przebiegiem choroby, trwałym kalectwem lub nawet śmiercią. Z kolei z uwagi na panujące przekonanie o wyeliminowaniu tej choroby, antytoksyna nie jest powszechnie dostępna i często niezbędnych jest kilka dni na jej sprowadzenie. Z punktu widzenia diagnostyki, wydaje się być zatem zasadne opracowanie zestawu czujników (np. elektrochemicznych) umożliwiających szybkie i wiarygodne wykrycie zarówno gatunku bakterii wywołującej dane zakażenia [H2], np. genosensor, jak i potwierdzenie jej toksygenności [H5, H7], np. immunosensor. W pracy:

[H2] Marchlewicz, K., Ostrowska, I., Oszałdowski, S., Zasada, A., **Ziółkowski, R.**  Malinowska, E. *Molecular diagnostic of toxigenic Corynebacterium diphtheriae strain by DNA sensor potentially suitable for electrochemical point-of-care diagnostic*, Talanta, 2021, 227, pp. 122161.

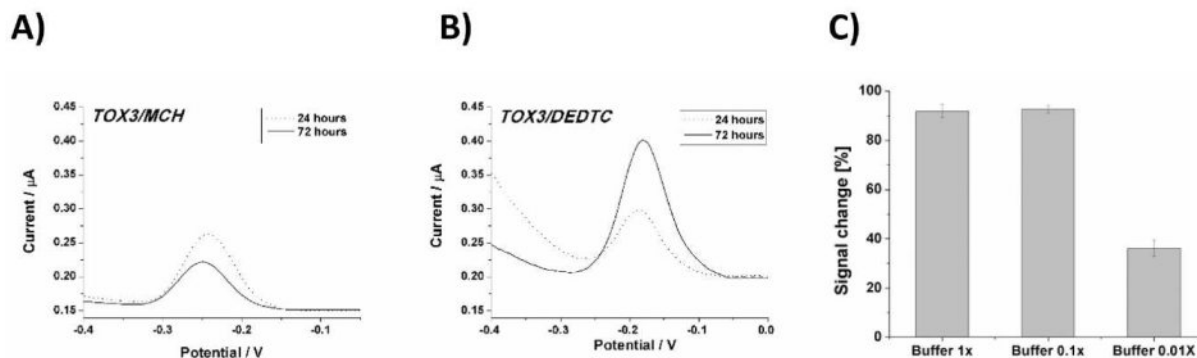
zaprezentowałem badania dotyczące opracowania czujnika DNA dedykowanego wykrywaniu sekwencji markerowej maczugowca błonicy, *tox*, o długości 107 nukleotydów, kodującej fragment genu toksyny błonicy i amplifikowanej w asymetrycznej reakcji polimerazy. W badaniach skorzystałem z mechanizmu detekcji zaprezentowanego na Rysunku 3. Bazując na doświadczeniu pozyskanemu dzięki badaniom opisanych w [H8], zaprojektowałem sondy, w których długość nóżki wynosiła od 6 do 7 par zasad oraz pętliki od 35 do 57 nukleotydów. Tym razem jednak wyzwaniem okazało się już uzyskanie odpowiedzi względem syntetycznego fragmentu jednoniciowego DNA. Zastosowanie tych samych co w pracy [H8] warunków (2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7) nie pozwoliło na uzyskanie satysfakcjonującej odpowiedzi gotowego czujnika (Rysunek 16A).



Rysunek 16. A) Wpływ stężenia jonów magnezu w buforze hybrydazyjnym na odpowiedź czujnika; **B)** elektroforeza 107 nukleotydowego fragmentu genu *tox* amplifikowanego w klasycznej reakcji PCR (ścieżka 4) oraz w reakcji PCR asymetrycznego (ścieżki 5 i 7). W ścieżkach 6 i 8 znajduje się chemicznie syntezowany i oczyszczony za pomocą HPLC jednoniciowy fragment genu *tox*. Ścieżki 1-3 to marker wielkości o nazwie GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (żel i zdjęcie wykonane przez dr hab. inż. Sławomira Oszałdowskiego) [H2].

Należy jednak pamiętać, że w tym przypadku wykrywana sekwencja, a tym samym i wykorzystane sondy DNA w postaci tzw. spinki do włosów, były dłuższe niż w przypadku sensora zaproponowanego w ramach [H8]. Można zatem uznać, że to ta zmiana wpłynęła na możliwość efektywnego zachodzenia

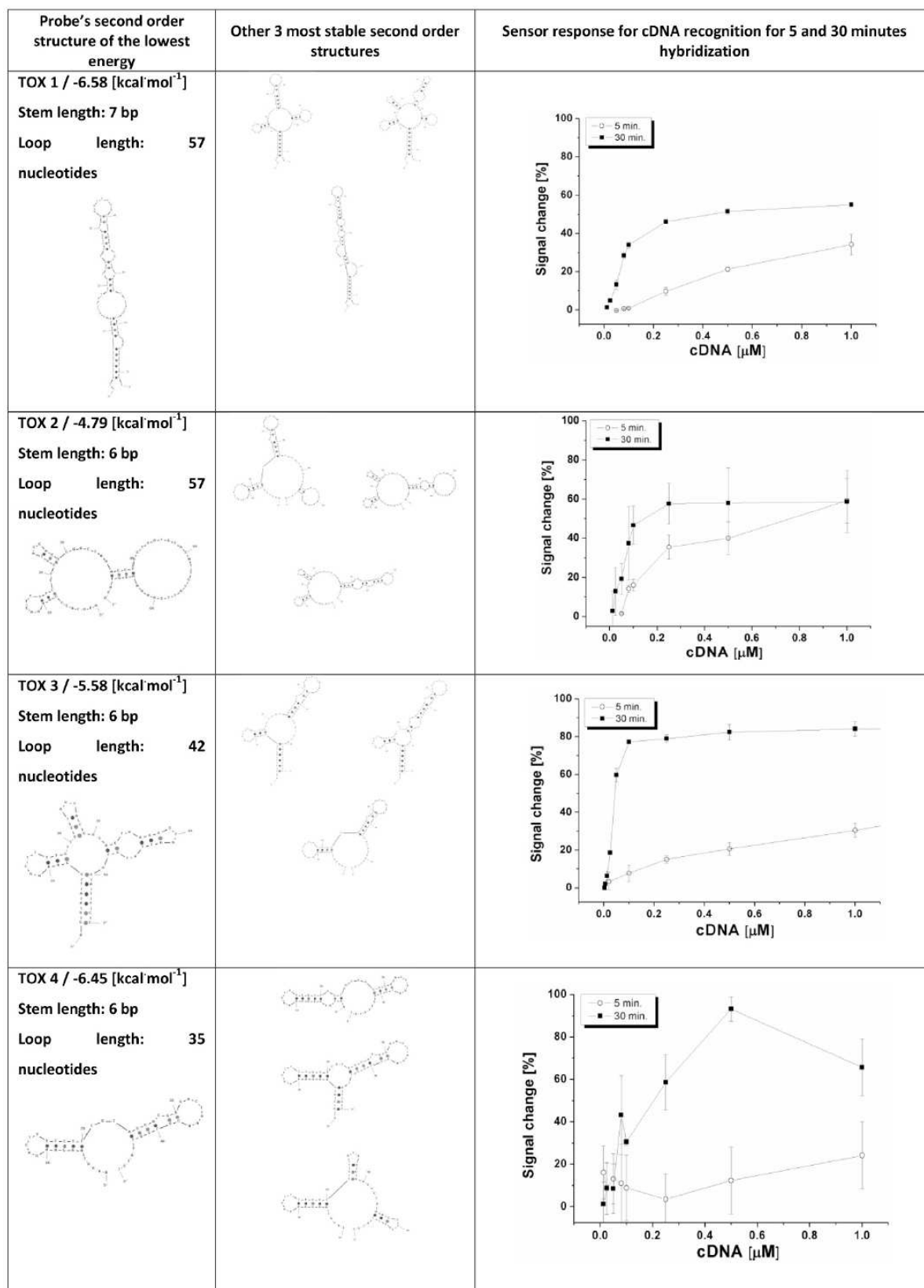
procesu hybrydyzacji na powierzchni przetwornika. Sam proces hybrydyzacji jest niezbędnym etapem nie tylko rozpoznania molekularnego na powierzchni elektrody ale również reakcji amplifikacji, powielania DNA, która to jak można zauważyć na Rysunku 16B zachodziła wydajnie (w warunkach zbliżonych do podanych wyżej). Wynika stąd, że ten sam proces prowadzony w roztworze oraz na powierzchni wymaga różnych warunków, a tym samym różne czynniki wpływają na jego efektywność, co w drugim z wymienionych przypadków może dotyczyć głównie (i) ograniczeń sterycznych, (ii) stabilności drugorzędowych struktur DNA (tzw. spinek do włosów), (iii) odpychania elektrostatycznego między składnikami warstwy receptorowej (ujemnie naładowane grupy fosforanowe sondy DNA, wypadkowy ładunek ujemny spolaryzowanych grup $-OH$ związku blokującego powierzchnię, merkaptoheksanolu) a wykrywaniem analitem (grupy fosforanowe DNA komplementarnego). Wpływ pierwszych dwóch czynników został już omówiony i wyeliminowany w ramach prac zaprezentowanych w [H8]. Tym razem podjąłem próbę oszacowania wpływu trzeciego z wymienionych parametrów na odpowiedź elektrochemicznego genosensora. Stopniowo zwiększałem stężenie jonów magnezu (zwarty rozkład i najlepsze dopasowanie do struktur DNA niż jakiegokolwiek inne kationy jedno- czy dwuwartościowe) w roztworze w którym prowadziłem proces detekcji z wykorzystaniem biosensora DNA (Rysunku 16A). Zmiana ta przyniosła zamierzony efekt i można było zaobserwować wzrost odpowiedzi czujnika przy zwiększonej ilości jonów Mg^{2+} w roztworze. W przypadku zastosowania największego ze stężeń (40 mM) dochodziło jednak do pogorszenia jakości odpowiedzi czujnika, jak i zwiększania się odchylenia standardowego otrzymywanych wyników. Należy przy tym pamiętać, że selektywność wiązania pojedynczych nici kwasów nukleinowych wynika m.in. z równowagi między tworzeniem wiązań wodorowych na całej długości sekwencji komplementarnych, jak i ich rozrywania w przypadku występowania nukleotydów niekomplementarnych (głównie w wyniku elektrostatycznego odpychania między pojedynczymi nićmi DNA i konkurencją w tworzeniu wiązań wodorowych z rozpuszczalnikiem). Z tego względu duże stężenie jonów ekranujących ładunki ujemne może znacznie ograniczać możliwość odpychania się pojedynczych nici, a tym samym uniemożliwiać selektywne prowadzenie oznaczeń, a nawet całkowicie wyeliminować jakąkolwiek selektywność. To z kolei może skutkować również całkowitą przypadkowością miejsca związania się dwóch nić DNA ze sobą, a z punktu widzenia zastosowanego mechanizmu detekcji również brakiem możliwości rozerwania trzeciorzędowej struktury spinki nawet pomimo przyłączenia się do niej drugiej nici komplementarnej. W przypadku prac prowadzonych z 107 nukleotydowym fragmentem genu *tox*, za optymalne uznałem stężenie jonów w buforze hybrydyzacyjnym równe 15 mM. Oszacowałem również wpływ ujemnego ładunku jaki znajduje się w warstwie receptorowej takiego czujnika, pochodzącego nie od kwasów nukleinowych a od cząsteczek wykorzystywanych do blokowania niezajętych przez sondy DNA miejsc na powierzchni elektrody. W tym celu, jako niereceptorowy składnik takiej warstwy wykorzystałem dietyloditiokarbaminian (DEDTC), związek o strukturze rezonansowej i energii Fermiego zbliżonej do złota oraz o wypadkowym obojętnym ładunku po unieruchomieniu go na powierzchni elektrody. Związek ten ma właściwości przeciwne do merkaptoheksanolu (MCH), alifatycznego merkaptoalkanolu o cząstkowym ładunku ujemnym wynikającym z obecności grupy hydroksylowej w jego składzie, powszechnie wykorzystywany w tworzeniu warstw receptorowych (Rysunek 17). Wykorzystanie takich związków w tworzeniu warstw receptorowych, zwanych jako binarnych (składających się z dwóch składników), jest równie ważne, co samych receptorów. Mają one bowiem za zadanie (i) porządkowanie warstwy bioczułej, (ii) redukowanie niespecyficznej adsorpcji składników próbki na powierzchni.



Rysunek 17. A) oraz B) Wpływ rodzaju czynnika blokującego powierzchnię oraz czasu jego unieruchamiania na sygnał elektrochemiczny rejestrowany dla warstwy receptorowej gotowego do użycia biosensora elektrochemicznego; monowarstwy binarne TOX3/MCH i TOX3/DEDTC; **C)** odpowiedź czujnika z warstwą TOX3/DEDTC na 0,2 mM 107 nukleotydowy fragment oczyszczanego HPLC genu *tox* w zależności od stopnia rozcieńczenia buforu hybrydacyjnego [H2].

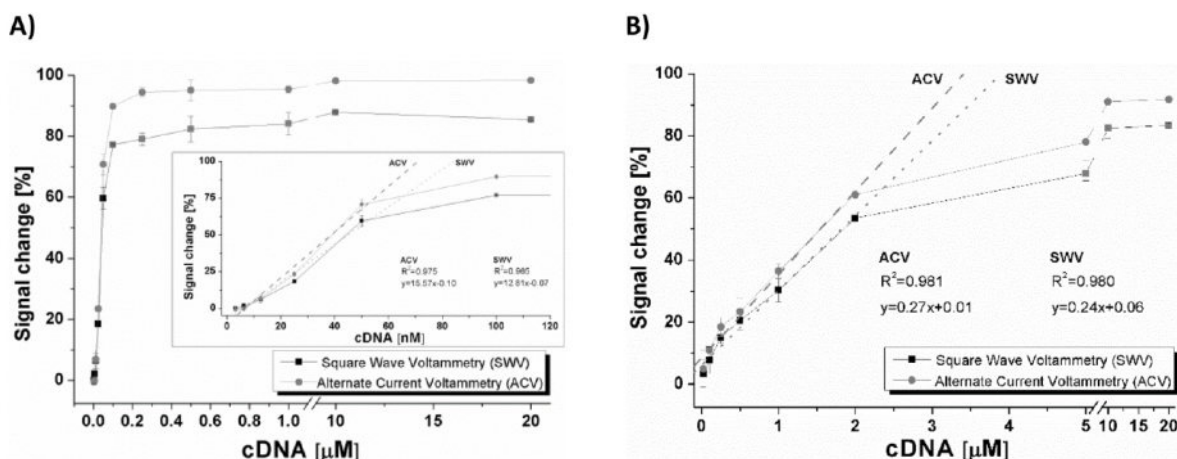
Wpływ wypadkowego ładunku całej warstwy receptorowej, w wyniku zastąpienia MCH przez DEDTC, na odpowiedź czujnika został zaprezentowany na Rysunku 17C. W przypadku 30 minutowej hybrydyzacji, prowadzonej w buforze hybrydacyjnym zawierającym 15 mM jonów Mg^{2+} , odpowiedź biosensora z warstwą receptorową w postaci TOX3/DEDTC była na zbliżonym poziomie co biosensora z warstwą TOX3/MCH. Jednak nawet 10-krotne rozcieńczenie tego buforu (stężenie wszystkich jonów zmalało dziesięciokrotnie, stężenie sekwencji komplementarnej pozostało na tym samym poziomie 0,2 μM) nie wpłynęło znacząco na odpowiedź czujnika. Dopiero 100-krotne rozcieńczenie zmniejszyło efektywność hybrydyzacji na powierzchni elektrody, co mogło wskazywać już na znaczną przewagę sił elektrostatycznego odpychania pomiędzy komplementarnymi niciami DNA nad tworzeniem wiązań wodorowych. Wyniki te są o tyle istotne, gdyż wskazują nie tylko na wpływ wypadkowego ładunku ujemnego znajdującego się na powierzchni elektrody na wydajność hybrydyzacji, jak również na konieczność każdorazowego doboru warunków prowadzenia procesu rozpoznania molekularnego na powierzchniach spolaryzowanych – zarówno pod kątem używanych sekwencji kwasów nukleinowych, ale także receptorowych i niereceptorowych składników warstwy bioczułej. Z kolei poprzez odpowiedni dobór tych warunków można w istotny sposób wpływać na selektywność oznaczenia, jak również na kinetykę zachodzących reakcji. Dodatkowo, jako, że stężenie jonów Mg^{2+} wymagane do efektywnego procesu hybrydyzacji w binarnej warstwie receptorowej o składzie DEDTC/TOX3 było nawet poniżej wymaganego stężenia tych jonów dla reakcji PCR, taki wypełniacz wydaje się być odpowiedniejszy w czujnikach dedykowanych próbkom rzeczywistym genu *tox*, w szczególności jeżeli byłaby planowana integracja czujnika z układami mikroprzepływowymi. Ponadto, jak można zauważyć na Rysunku 17A i B, uzyskiwany dla tego wypełniacza bezwzględny sygnał prądowy jest znacznie większy niż dla merkaptoheksanolu. Dalsze badania nad możliwością wykorzystania tego wypełniacza w biosensorach zaprezentowano w omówionych w dalszej części autoreferatu pracach [H1 i H5].

Dla każdej z czterech zaprojektowanych sond wykreśliłem krzywe ilustrujące zmiany odpowiedzi czujnika od stężeń sekwencji komplementarnej w roztworach (dla dwóch czasów hybrydyzacji, 5 i 30 minut) (Rysunek 18). Charakterystyczną odpowiedź, przy zadowalająco niskich odchyleniach standardowych, uzyskano jedynie dla spinek oznaczonych jako TOX3 oraz TOX1. Natomiast największą wydajność hybrydyzacji (całościowa zmiana sygnału) zaobserwowano dla czujnika z sondą TOX3, co można wytłumaczyć większą wartością jej energii Gibbsa (mniejsza ilość energii wymagana do rozerwania drugorzędowej struktury spinki).



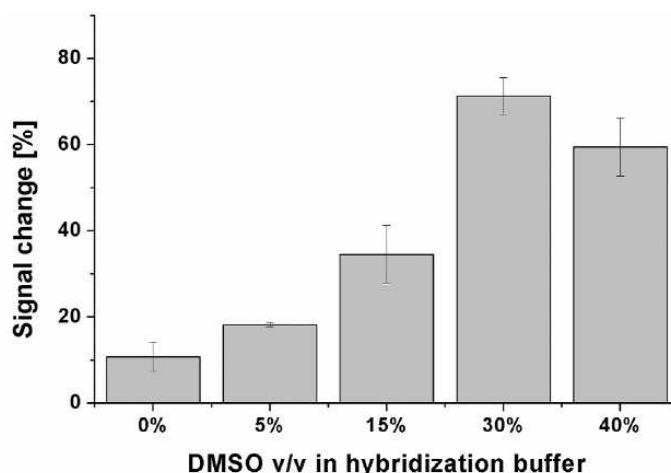
Rysunek 18. Wpływ sekwencji oraz prawdopodobnych struktur przestrzennych zaprojektowanych sond DNA na odpowiedź biosensorów na różne stężenia oczyszczonej HPLC sekwencji komplementarnej cDNA [H2].

Reasumując, uzyskiwane odpowiedzi biosensorów były w dużym stopniu zależne od struktury przestrzennej wykorzystanej sondy (szczegóły opisano w artykule [H2]) a najlepsze parametry analityczne uzyskano dla czujnika przygotowanego na bazie sondy o nazwie TOX3 (Rysunek 19).



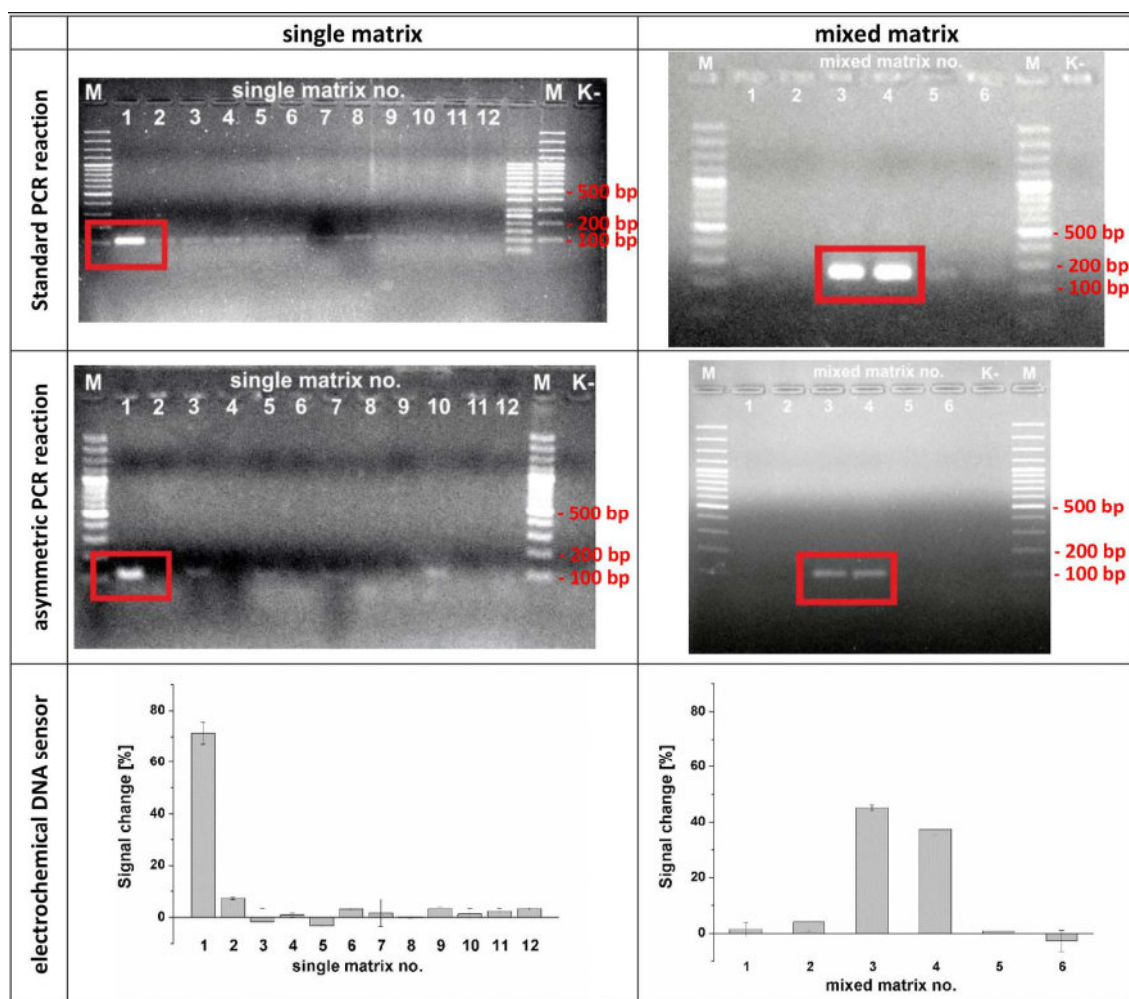
Rysunek 19. Porównanie odpowiedzi biosensora z warstwą receptorową w postaci TOX3/DEDTC dla dwóch różnych czasów hybrydyzacji **A)** 30 minut oraz **B)** 5 minut, i przy zastosowaniu dwóch różnych technik detekcji. Badania prowadzono z wykorzystaniem jednoniciowej sekwencji oczyszczanej za pomocą HPLC [H2].

Otrzymane wartości granic wykrywalności (dla hybrydyzacji trwającej 5 i 30 minut) były znacznie mniejsze niż stężenia jednoniciowego produktu reakcji asymetrycznej PCR w analizowanym roztworze, oszacowanym na poziomie 0,54 µM (Rysunek 16B). Co ciekawe, tym razem znów, jak w przypadku prac opisanych w [H8], początkowo nie udało się uzyskać odpowiedzi tak przygotowanego czujnika na asymetryczny produkt PCR. Zaniechano jednak dalszej optymalizacji struktury sondy, a postanowiono dopasować skład medium w którym prowadzono pomiary. Było to powodowane obserwacją, iż podniesienie temperatury w której prowadzono pomiar do 40°C znacznie poprawiło odpowiedź czujnika na rzeczywisty produkt reakcji PCR, w szczególności, gdy był on rozcieńczany w stosunku 1:1 v/v buforem doprowadzającym stężenie jonów magnezu do 15 mM. Z kolei, w analizach prowadzonych w temperaturze pokojowej nierozcieńczonej próbki PCR, obserwowano zwiększenie sygnału prądowego co było w sprzeczności z założonym mechanizmem detekcji. Założono, że może to wynikać z niespecyficznych oddziaływań składników próbki (głównie białek) z powierzchnią elektrody. Aby obniżyć temperaturę, w której prowadzone będą analizy, jak również ograniczyć aktywność białek, podjęto próby uzupełnienia medium pomiarowego nie tylko o jony magnezu, ale również o drobnocząsteczkowy, amfipatyczny rozpuszczalnik organiczny, dimetylosulfotlenek (DMSO). Zgodnie z danymi literaturowymi jest to jeden z wielu czynników wpływających na siłę oddziaływania białka/kwasy nukleinowe. Obecność małych stężeń DMSO w mieszaninie skutkuje zwiększoną hydratacją cząstek biologicznych (negatywne wiązanie DMSO), natomiast jego zwiększanie prowadzi do zmiany preferencji cząsteczek biologicznych na rzecz zwiększonego wiązania się i otaczania tym rozpuszczalnikiem organicznym. To z kolei skutkuje zmianami konformacyjnymi białek (rozwijanie), a tym samym do ograniczania siły ich docelowego działania, co w przypadku białek wykorzystywanych w reakcji PCR wiąże się z redukcją efektywności wiązania do nici kwasów nukleinowych. Przyjmuje się, że spadek aktywności białek (wiązania ligandów) jest na poziomie 10-krotności na każde 10% DMSO w roztworze. W literaturze znajdują się również informacje, że dodatek DMSO do roztworu w którym zachodzi proces hybrydyzacji zwiększa zarówno wydajność jak i poprawia selektywność tego procesu. Również w moich badaniach dodatek DMSO przyczynił się znacznie do zwiększenia odpowiedzi biosensora na asymetryczny produkt reakcji PCR (Rysunek 20).



Rysunek 20. Wpływ stężenia DMSO w buforze hybrydazyjnym na odpowiedź czujnika na asymetryczny produkt reakcji PCR [H2].

Opracowany czujnik oraz dobrane parametry prowadzenia analiz zostały wykorzystane również w analizie próbek symulujących wymazy z gardła od osób chorych. Dotyczyło to analiz produktów asymetrycznej reakcji PCR przeprowadzonej na materiale genetycznym uzyskanym z czystych kultur bakterii (Rysunek 21, single matrix), jak i na mieszane matryce z różnych gatunków bakterii (Rysunek 21, mixed matrix).



Rysunek 21. Zestawienie zdjęć elektroforezy żelowej klasycznej oraz asymetrycznej reakcji PCR (aPCR) (żele i zdjęcia wykonane przez naukowców z NIZP) jak również odpowiedzi biosensora na uzyskane produkty aPCR [H2].

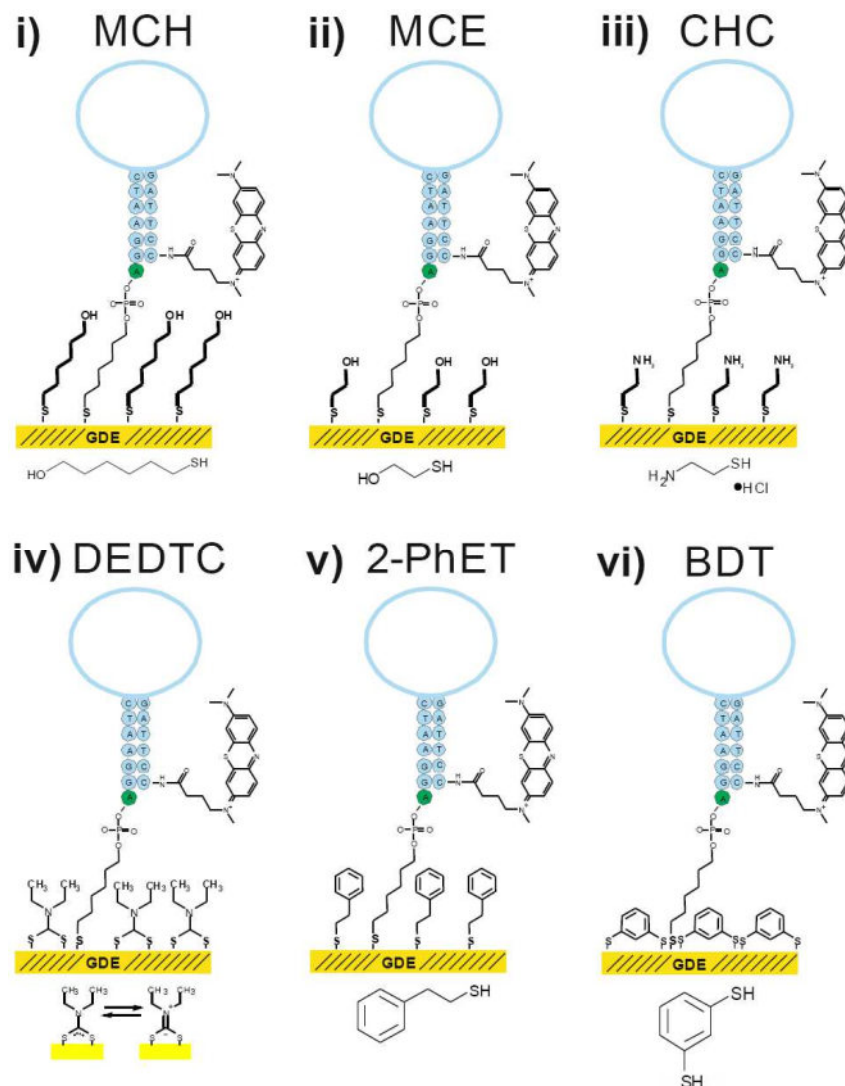
Próbki były przygotowane w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego i zawierały matrycowe DNA pochodzące od zjadliwego szczepu maczugowca błonicy i/lub od innych drobnoustrojów mogących występować w górnych drogach oddechowych człowieka. Odpowiedź opracowanego czujnika była nieznacznie niższa dla układów, w których matrycę do amplifikacji DNA stanowiła mieszanina genomowego materiału genetycznego izolowanego z szeregu odpowiednio dobranych drobnoustrojów. Wynikało to najprawdopodobniej z mniejszej wydajności samej amplifikacji oznaczanego produktu w przypadku bardziej skomplikowanych próbek.

W ramach pracy potwierdziłem także możliwość zastosowania zintegrowanych przetworników trójelektrodowych jako podłoża biosensorów na bazie opracowanych monowarstw binarnych, oraz wykorzystania ich w analizach rzeczywistych próbek asymetrycznej reakcji PCR. Pomijając dość małą powtarzalność wytwarzania komercyjnych czujników sitodrukowanych, to po ich wstępnej analizie i wyborze najbardziej obiecujących, uzyskałem odpowiedź porównywalną z biosensorami tworzonymi na powierzchni złotych elektrod dyskowych. Stwarza to realną możliwość wykorzystania takich biosensorów jako elementów detekcyjnych w zaawansowanych mikroprzepływowych platformach diagnostycznych, w szczególności w połączeniu z układami do amplifikacji kwasów nukleinowych (badania i artykuły niewchodzące w prezentowany cykl publikacji). To, w połączeniu z prostymi metodami pobierania próbki biologicznej oraz izolacji kwasów nukleinowych (badania i artykuły nie wchodzące w prezentowany cykl publikacji) może stanowić ciekawą propozycję w molekularnej diagnostyce zakażeń maczugowcem błonicy.

Wyniki uzyskane dla monowarstwy binarnej TOX3/DEDTC sprawiły, że podjąłem dalsze badania nad zastosowaniem innych niereceptorowych składników warstwy o strukturze rezonansowej w warstwie bioczułej genosensorów bazujących na mechanizmie spinki do włosów. W pracy:

- [H1] Szymczyk, A., Soliwodzka, K., Moskal, M., Różanowski, K., **Ziółkowski, R.** , *Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters*, Sensors and Actuators, B: Chemical, 2022;354:131086.

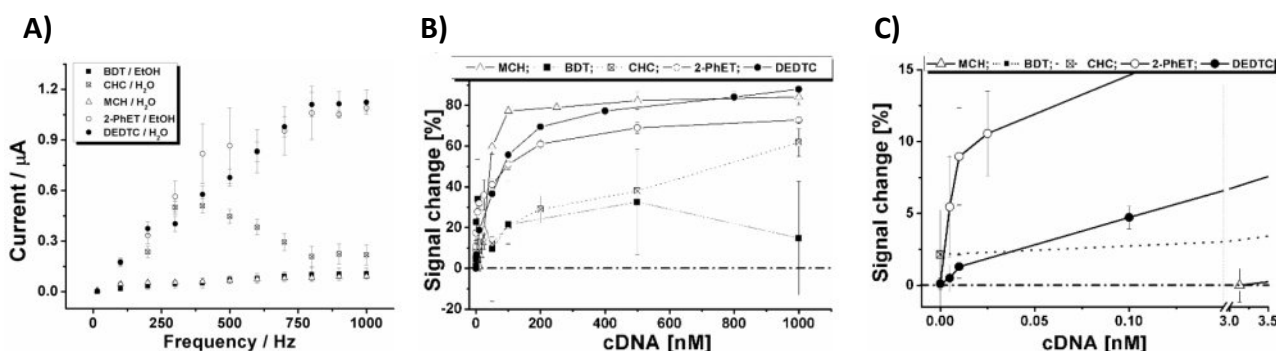
oszacowałem wpływ rodzaju zastosowanego czynnika blokującego elektrodę (tzw. wypełniacza) nie tylko na parametry analityczne gotowego czujnika ale również na parametry samej warstwy bioczułej. Pomimo, że mechanizm taki jest od lat powszechnie wykorzystywany, to przygotowana praca jako jedna z nielicznych przekrojowo nakreśla i opisuje wpływ wybranych zjawisk międzycząsteczkowych na jakość warstwy receptorowej, jej wybrane parametry jak również na odpowiedź gotowych czujników. Pod uwagę były brane wyłącznie warstwy binarne, składające się z sekwencji DNA przyjmującej na elektrodzie strukturę spinki do włosów opisaną już w pracy [H2] oraz jednego odpowiedniego rodzaju wypełniacza. Związki wykorzystane przeze mnie w tej roli można podzielić na cztery grupy: (i) pochodne tiolowe alkanoli posiadające częściowy ładunek ujemny zgromadzony na tlenie grupy –OH, 6-merkapt-1-heksanol (MCH) oraz 2-merkapt-2-etanol (MCE), (ii) posiadające częściowy ładunek dodatni zgromadzony na azocie grupy aminowej, cysteamina (CHC) (iii) cząsteczka obojętna, posiadająca dwie struktury rezonansowe, dietyloditiokarbaminian sodu (DEDTC), (iv) pierścienie aromatyczne, które po unieruchomieniu wykazują zróżnicowane ukierunkowanie w stosunku do płaszczyzny elektrody, prostopadle do płaszczyzny, fenyloetylotiol (2-PhET) oraz niemal poziomo, 1,3-benzenoditiol (BDT) (Rysunek 22).



Rysunek 22. Schematyczne przedstawienie budowy analizowanych warstw bioczułych [H1].

W prezentowanej pracy oszacowano m.in. wpływ środowiska nanoszenia opisanych wyżej grup wypełniaczy na jakość utworzonych monowarstw. Stężenie nanoszonych wypełniaczy, 2mM, oraz czas ich nanoszenia, 24 lub 48 godzin, były znacznie większe niż stężenie i czas nanoszenia sondy DNA, odpowiednio 0,2 μ M oraz 30 sekund. Wynikało to z konieczności ograniczenia zawał przestrzennych podczas procesu rozpoznania molekularnego (hybrydyzacja nici komplementarnych) na powierzchni elektrody. Taki sposób nanoszenia warstwy umożliwia interpretację uzyskanych wyników pod kątem jakości warstw bioczułych, poprzez traktowanie ich jako dielektryka umieszczonego między elektrodą a elektrolitem. Grubość takiego dielektryka regulowana byłaby głównie wielkością cząsteczki wypełniacza, wpływającego tym samym na ograniczenie pojemności elektrycznej podwójnej warstwy elektrycznej. To z kolei wpływa na wielkość rejestrowanego prądu niefaradajowskiego (prądu pojemnościowego), zazwyczaj znacznie go zmniejszając, w porównaniu z elektrodą niemodyfikowaną. Jest to o tyle istotne, że prąd pojemnościowy może być znacznie większy niż prąd faradajowski wynikający z reakcji redoks leżącej u podstaw analizy ilościowej. Ponadto dobrze uporządkowana monowarstwa, której cząsteczki zajmują wszystkie lub większość elektroaktywnych miejsc na powierzchni złota, może znacznie redukować katalizowane złotem reakcje elektrochemiczne występujące przy niskich potencjałach (np. redukcja tlenu rozpuszczonego w roztworze badanym). Tym samym, dobrze dobrany skład binarnej warstwy receptorowej, nanoszonej w odpowiedni sposób, może umożliwić utworzenie długotrwałych i stabilnych warstw bioczułych (tym samym gotowych do użytku biosensorów elektrochemicznych), charakteryzujących się wydajną kinetyką przeniesienia ładunku oraz odpowiednio dużym stosunkiem sygnału do szumu. Jak zauważyłem, największy spadek

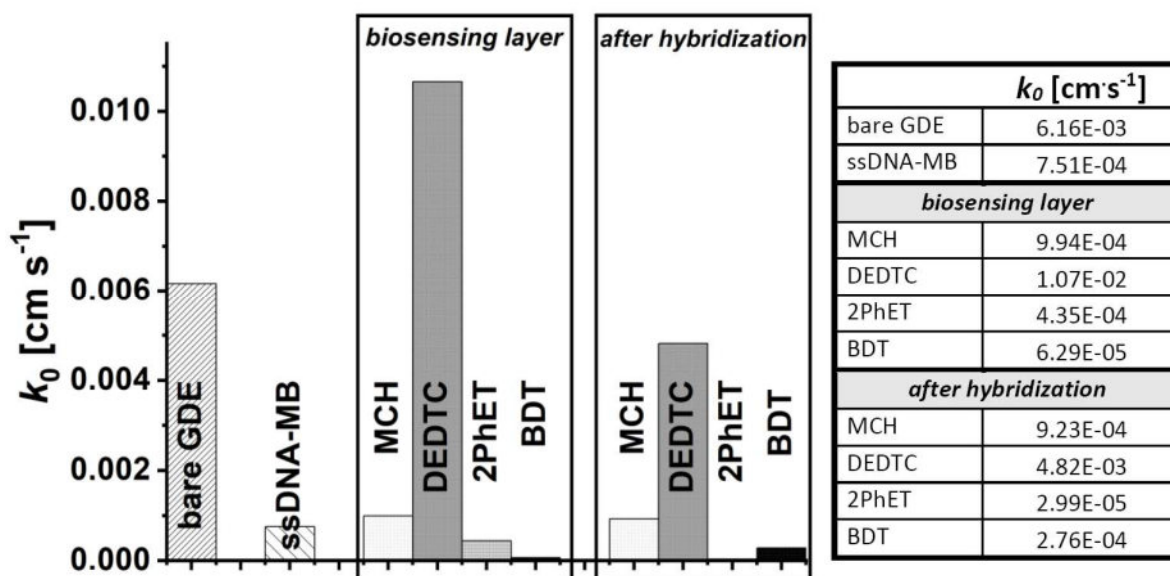
prądu pojemnościowego w stosunku do złotej elektrody niemodyfikowanej uzyskano dla MCH, DEDTC, 2PhET oraz BDT. Z kolei dla wypełniaczy CHC oraz MCE spadek ten był jedynie czterokrotny. Dodatkowo w przypadku MCE wielkość prądu pojemnościowego całkowicie uniemożliwiała uzyskanie odpowiedzi prądowej, zaś dla CHC brak odpowiedzi prądowej występowała jedynie przy najmniejszych częstotliwościach skanowania SWV (ang. *square wave voltammetry*). Z kolei największy stosunek sygnału do szumu uzyskano stosując wypełniacze posiadające w swojej budowie struktury rezonansowe. W przypadku klasycznego wypełniacza, MCH, wykrywalność uległa znacznej poprawie, gdy był on nanoszony bezpośrednio z wody, zamiast z etanolu. Brak występowania sygnału prądowego w przypadku MCE może zostać wytłumaczony wypieraniem znakowanych sond DNA z powierzchni elektrody przez wypełniacz, jednak założenie to zostało wykluczone, szczególnie gdy dla CHC pojawił się sygnał przy wyższych częstotliwościach skanowania SWV (Rysunek 23A).



Rysunek 23. A) wpływ częstotliwości prowadzenia pomiaru woltamperometrii fali prostokątnej (SWV) na natężenie prądu rejestrowane dla warstw receptorowych; B) zależność odpowiedzi biosensora przygotowanego z odpowiednim niereceptorowym składnikiem warstwy bioczułej od stężenia DNA komplementarnego w próbce (cDNA), badania wykonane techniką SWV dla częstotliwości 100 Hz; C) zwężenie prezentowanego zakresu stężeń cDNA [H1].

Wskazuje to głównie na bardzo słabą organizację i bardzo niską jakość monowarstw binarnych, w których rolę wypełniacza pełni merkaptoetanol. Obecne są w nich obszary, przez które do powierzchni elektrod swobodnie mogą docierać składniki próbki, co w wyniku reakcji elektrodowej może prowadzić do dalszej degradacji warstwy bioczułej (np. redukcja tlenu do nadtlenu wodoru). Niezmiernie ważne w przypadku warstw receptorowych gdzie mechanizm detekcji bazuje na zmianach konformacyjnych zachodzących na powierzchni elektrody, jest osiągnięcie przez warstwę bioczułą stanu równowagi, której zaburzenie będzie wynikało tylko z prowadzonych pomiarów ilościowych. Pomijając MCE (brak jakiegokolwiek sygnału), proces stabilizacji każdej warstwy, z wyjątkiem tych zawierających wypełniacze w postaci pierścieni aromatycznych, charakteryzował się gładką linią zmiany sygnału (piki rejestrowane techniką SWV, technika później wykorzystywana również w analizie ilościowej) o łagodnym spadku, aż do osiągnięcia stabilizacji sygnału prądowego na stałym poziomie. W przypadku BDT oraz 2PhET przebieg zmian sygnału SWV podczas stabilizacji był zdecydowanie bardziej burzliwy, a uznane za końcowe natężenie prądu oscylowało wokół pewnej wartości. Najprawdopodobniej stan taki wynikał z obecności znacznej liczby pierścieni aromatycznych na powierzchni elektrody i obecności oddziaływań $\pi-\pi$ między pierścieniami aromatycznymi obecnymi w sondzie DNA oraz unieruchomionych cząsteczek wypełniacza. Fakt zachodzenia tego zjawiska potwierdziłem za pomocą techniki mikrowagi kwarcowej, gdzie elastyczność warstwy receptorowej, wyrażonej w postaci dyssypacji energii, była znacznie mniejsza dla wypełniaczy pozbawionych ujemnego ładunku wypadkowego, niż dla MCH (ukierunkowanie jednoniciowych struktur kwasów nukleinowych prostopadle do powierzchni elektrody). Z kolei po procesie hybrydyzacji elastyczność (wartość dyssypacji energii) warstwy z MCH malała (dsDNA posiada większą sztywność niż ssDNA), gdy dla pozostałych rosła (najprawdopodobniej prostopadle ukierunkowanie kwasów nukleinowych

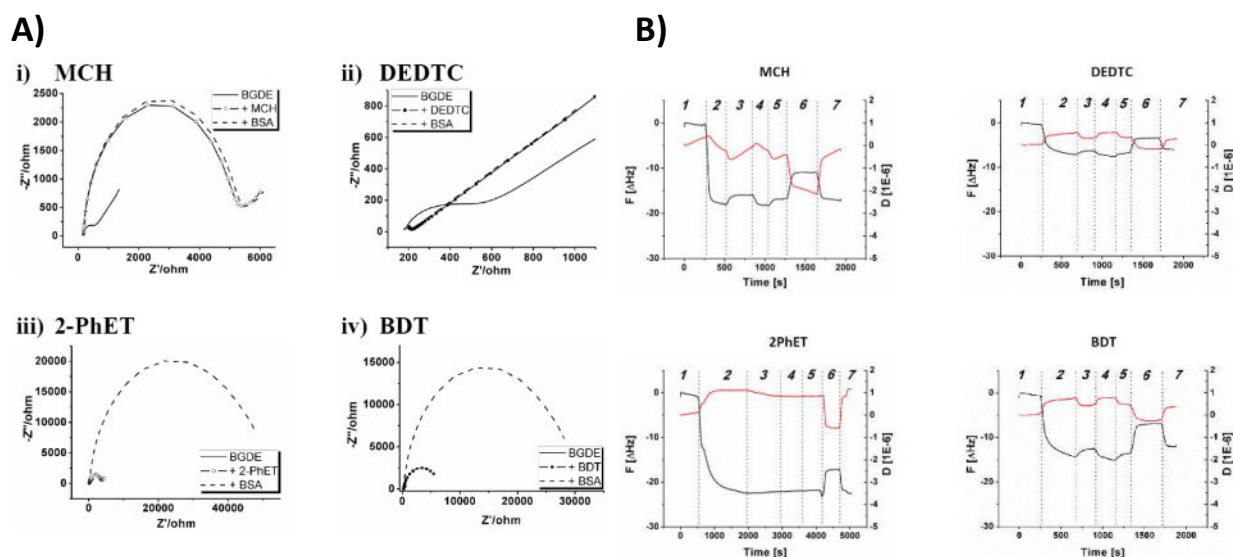
względem powierzchni elektrody, zrywanie wiązań π - π). Dodatkowo podczas badania zmian kinetyki transferu elektronów po każdej z modyfikacji elektrody (Rysunek 24) jedynie dla warstwy binarnej z BDT szybkość wymiany elektronów zwiększyła się, podczas gdy dla każdego innego wypełniacza malała.



Rysunek 24. Szybkość transferu elektronów obliczona dla czystej złotej elektrody dyskowej, po modyfikacji sondą DNA, po utworzeniu odpowiedniej monowarstwy binarnej, oraz po procesie hybrydyzacji ze 107 nukleotydowym fragmentem DNA oczyszczanym HPLC [H1].

Najprawdopodobniej związane jest to ze wspomnianą zmianą ustawienia kwasów nukleinowych z horyzontalnej dla jednoniciowego DNA na co najmniej zbliżoną do pionowej dla dsDNA. Dodatkowo, jako że dwuniciowe DNA jest w stanie przewodzić elektrony, struktury takie stanowiły miejsca wprowadzania ich do przewodnika metalicznego jakim jest złota elektroda dyskowa. Tym bardziej, że jak można było zauważyć opór elektryczny elektrody modyfikowanej BDT był największy ze wszystkich analizowanych wypełniaczy co mogło wynikać z horyzontalnego ułożenia pierścieni aromatycznych, o pewnej analogii do warstwy grafenu. Miejsce wprowadzania elektronów w struktury grafenowe, jak już wcześniej wspomniano, są bowiem ich krawędzie i wszelkie defekty występujące na powierzchni (zależność zmian wartości prądu przy większych częstotliwościach skanowania techniką SWV, Rysunek 23A, podobna jak dla wypełniaczy bez struktur rezonansowych). Powyższe obserwacje mogą również tłumaczyć czemu podczas badań w ramach projektu Iuventus Plus nie udało mi się uzyskać jakiegokolwiek zależności sygnału prądowego czujników DNA wykorzystujących mechanizm spinki do włosów z warstwą przejściową w postaci zredukowanego tlenku grafenu. Oczywiście wyklucza to możliwość stosowania BDT jako wypełniacza w analizowanym mechanizmie detekcji, tym bardziej, że jak można zaobserwować na Rysunku 23B,C, nie udało się również uzyskać zadowalającej zależności między odpowiedzią biosensora a stężeniem sekwencji komplementarnej w próbce. Z drugiej jednak strony, zastosowanie tego wypełniacza w warstwie receptorowej pozwoliło na uzyskanie interesujących informacji na temat zachowania unieruchomionych kwasów nukleinowych na powierzchni o strukturze zbliżonej do płaskiej struktury grafenu. Jak wspomniano, w przypadku cysteaminy, CHC, zaobserwowano ciekawą zależność rejestrowanego natężenia prądu od częstotliwości przy której prowadzony był pomiar SWV. O ile dla 15 Hz nie uzyskiwano żadnych pików, o tyle wraz ze zwiększaniem częstotliwości obserwowano również zwiększanie natężenia prądu pochodzącego od reakcji redoks błękitu metylenowego znajdującego się w warstwie bioczułej (Rysunek 23A). Tendencję tę obserwowano jedynie w pewnym zakresie częstotliwości, powyżej którego natężenie prądu zaczęło się zmniejszać. Początkowy brak sygnału możemy tłumaczyć zbyt dużym prądem pojemnościowym

monowarstwy binarnej przygotowanej z tym wypełniaczem, podobnie jak miało to miejsce w przypadku MCE. Z kolei możemy również przypuszczać, że wolna para elektronów, znajdująca się na atomie azotu, może katalizować reakcje elektrochemiczne z udziałem znaczników redoks co skutkowało początkowym zwiększaniem sygnału prądowego. Jednak szybkość tego procesu jest najprawdopodobniej ograniczona co przy wyższych częstotliwościach zmian potencjału prowadziło do spadku wartości natężenia rejestrowanego prądu. Tutaj, podobnie jak dla pomiarów realizowanych z wypełniaczem BDT, nie udało się uzyskać satysfakcjonującej zależności między odpowiedzią gotowego biosensora a stężeniem sekwencji cDNA w próbce (Rysunek 23B,C). Nie mniej, jak można zaobserwować na tym samym rysunku, zastosowanie w roli wypełniacza związków posiadających strukturę rezonansową tj. DEDTC i 2PhET, pozwoliło nie tylko na znaczne zwiększenie rejestrowanego prądu, ale również na znaczne zmniejszenie wartości granicy wykrywalności w porównaniu do biosensora bazującego na klasycznym, alifatycznym wypełniaczu merkaptoheksanolu, MCH. Co jednak równie istotne to fakt, że powierzchnia złota modyfikowana DEDTC wykazywała dużą (największą z analizowanych wypełniaczy) niewrażliwość na niespecyficzną adsorpcję białek (nieodczyny element każdej próbki rzeczywistej związanej z analizami kwasów nukleinowych) (Rysunek 25).



Rysunek 25. Analiza niespecyficznego adsorpcji białek na powierzchni złota modyfikowanej odpowiedniego rodzaju wypełniaczem **A)** elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, **B)** mikrowaga kwarcowa wyposażona w moduł dyssypacji energii (pomiar oznaczony linią czerwoną) [H1].

Z kolei na powierzchni modyfikowanej 2PhET pod wpływem oddziaływania z białkami dochodziło do największych zmian zarówno w częstotliwości drgań przetwornika kwarcowego, zmian jego dyssypacji oraz największego wzrostu oporu elektrody (elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna). Fakt ten znacznie ogranicza możliwość wykorzystania takiego wypełniacza jako niereceptorowego składnika warstwy bioczułej. Jednak na podstawie powyższych danych można uznać, że parametry powierzchni złota modyfikowanej DEDTC mogą stanowić ciekawą alternatywę dla obecnie najpowszechniej wykorzystywanego środka blokującego powierzchnię elektrod, MCH. Dotyczy to zarówno obserwowanych natężeń prądu, parametrów analitycznych gotowego czujnika, zredukowanej niespecyficznego adsorpcji białek, czy też jakości samej monowarstwy. Wypełniacz ten, najprawdopodobniej z uwagi na swoją budowę przestrzenną wymaga jednak znacznie dłuższego czasu immobilizacji niż MCH. Ponadto, jak zostało to zaprezentowane w artykule [H2], brak cząstkowego ładunku ujemnego cząsteczki DEDTC, w przeciwieństwie do MCH, może skutkować lepszym dopasowaniem środowiska przewodzenia hybrydyzacji kwasów nukleinowych na powierzchni elektrody do warunków panujących podczas reakcji ich amplifikacji.

Ostatnią pracą w prezentowanym cyklu dotyczącą biosensorów na bazie kwasów nukleinowych jest praca przeglądowa:

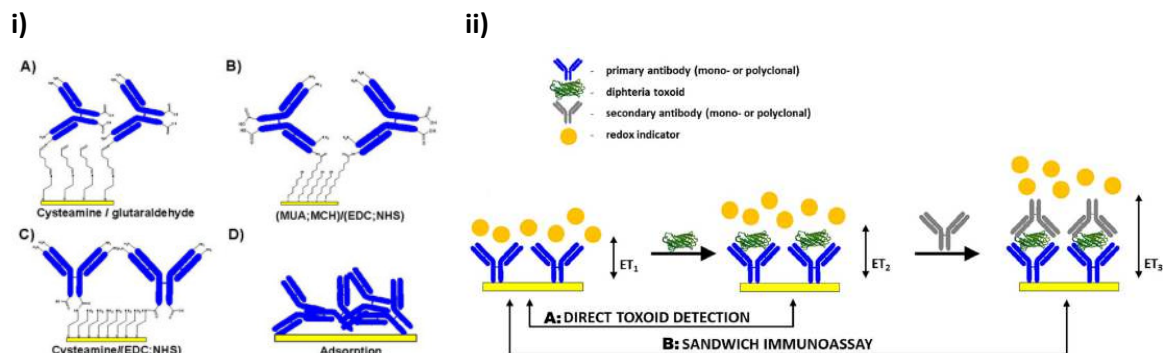
- [H3] **Ziółkowski, R.** , Jarczewska, M., Górski, Ł., Malinowska, E. *From small molecules toward whole cells detection: Application of electrochemical aptasensors in modern medical diagnostics*, Sensors (Switzerland), 2021, 21 (3), 1-49.

w której opisałem bieżące przykłady wykorzystania takich czujników w wykrywaniu analitów innych niż sekwencje komplementarne oraz trendy w rozwoju konstrukcji i mechanizmów detekcji takich czujników. Zawarłem w niej przykłady wykorzystania nanomateriałów umożliwiających dalszą miniaturyzację czujników, a tym samym obniżenia granicy detekcji i stabilizacji sygnału jak również wykorzystania gotowych czujników jako elementów detekcyjnych w bardziej zaawansowanych układach mikroprzepływowych.

Jak już wyżej wspomniano, pełna diagnostyka zakażeń nieodzownie związana jest nie tylko z wykryciem gatunku drobnoustroju za nie odpowiedzialnego, np. poprzez rozpoznanie specyficznego fragmentu kwasu nukleinowego, ale również z potwierdzeniem ewentualnej zjadliwości danego szczepu. Wykrycie genu kodującego toksynę biorącą udział w procesie zjadliwości, daje informację wyłącznie o potencjalnej możliwości ostrego przebiegu zakażenia. Potwierdzeniem patogenności danego szczepu będzie potwierdzenie produkowania przez niego odpowiedniego białka. W swoich badaniach podjąłem próbę opracowania czujnika umożliwiającego również przeprowadzenie takiego badania, w kontekście zakażenia zjadliwym szczepem maczugowca błonicy. Badania dotyczyły czujników dedykowanych wykrywaniu białka, toksoidu błoniczego, nieaktywnej formy toksyny błonicznej. Jak się okazało, zastosowanie odpowiednich nanomateriałów czy też niereceptorowych składników warstwy bioczułej tym razem również przyczyniło się do poprawy parametrów analitycznych biosensorów. Z kolei jako receptory w tych układach wykorzystałem przeciwciała, które nadal stanowią metodę z wyboru w tego typu rozwiązaniach. Powyższe zagadnienia zostały opisane w pracach:

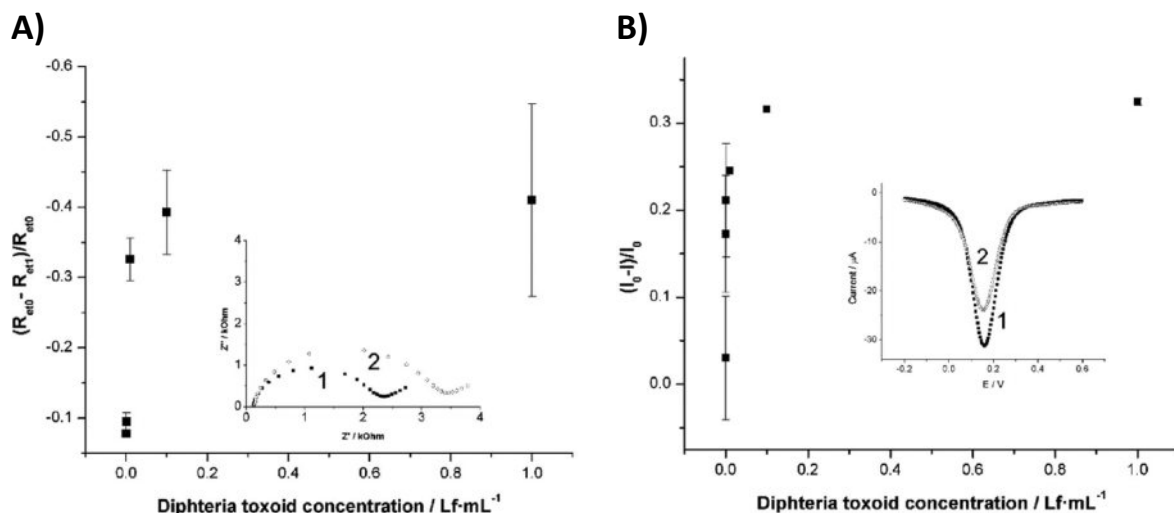
- [H5] **Ziółkowski, R.** , Kaczmarek, A., Kośnik, I., Malinowska, E., *Reduced nonspecific protein adsorption by application of diethyldithiocarbamate in receptor layer of diphtheria toxoid electrochemical immunosensor*, Bioelectrochemistry, 2020, 132, art no. 107415.
- [H7] **Ziółkowski, R.** , Jarczewska, M., Drozd, M., Zasada, A.A., Malinowska, E., *Studies on the development of electrochemical immunosensor for detection of diphtheria toxoid*, Journal of the Electrochemical Society, 2019, 166 (6), B472-B481.

Chronologicznie pierwsza [H7], związana była z badaniem wpływu, na uzyskiwany sygnał analityczny, m.in. wykorzystanego mechanizmu detekcji (Rysunek 26, ii), rodzaju techniki pomiaru (SWV, EIS), rodzaju przeciwciał jako elementów receptorowych (monoklonalne i poliklonalne), jak również sposobu ich unieruchamiania w warstwie bioczułej (Rysunek 26, i), włącznie z zastosowaniem warstwy przejściowej w postaci nanosfer złota. Przeciwciała, jako cząstki biologiczne, zostały ewolucyjnie ukierunkowane na specyficzne wiązanie się z antygenem, przy czym wiązanie to następuje w konkretnym miejscu cząsteczki przeciwciała. Dlatego sposób ich unieruchomienie na powierzchni elektrody może mieć kluczowe znaczenie dla uzyskania wysokiej selektywności reakcji z antygenem czy małych wartości granic wykrywalności opracowanego czujnika.



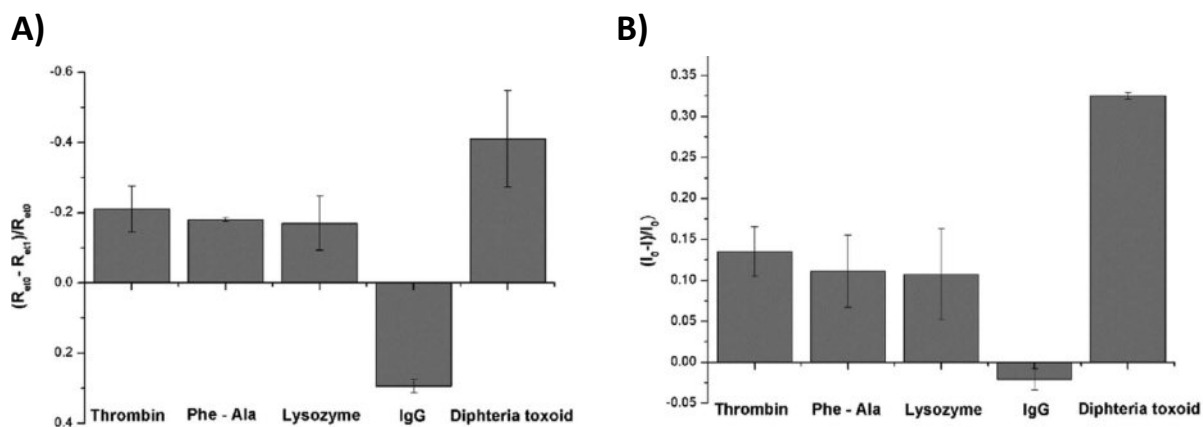
Rysunek 26. Schematycznie przedstawione analizowane i) sposoby unieruchamiania przeciwciał w immunosensorze elektrochemicznym; ii) mechanizmy detekcji, tzw. bezpośredni oraz kanapkowy [H7].

Istotne jest także zachowanie właściwości biologicznych białka po jego immobilizacji (związanych z ich trzeciorzędową strukturą). Unieruchamianie przeciwciał może prowadzić bowiem do rozrywania np. wiązań wodorowych czy mostków siarczkowych, stabilizujących te struktury, a tym samym prowadzić do utraty swoistości przeciwciała. Zauważono również, że w celu wydajnego wiązania antygenu nie jest konieczne pionowe ukierunkowanie przeciwciała na powierzchni elektrody. Z punktu widzenia czujników, najodpowiedniejsze wydaje się być kowalencyjne unieruchomienie przeciwciał z wykorzystaniem dostępnych grup funkcyjnych. Powinno to zagwarantować najwyższą stabilność i powtarzalność otrzymanych wyników pomiarów. Zastosowanie, w prezentowanych badaniach, sprzęganie z wykorzystaniem grup $-\text{COOH}$ oraz $-\text{CHO}$ było odpowiedzialne za najprawdopodobniej skośne ustawienie przeciwciał na powierzchni elektrod (spowodowane poprzez wiązania kowalencyjne z końcowymi grupami aminowymi łańcuchów peptydowych). Z kolei łącznik $-\text{NH}_2$, jako że tworzył wiązanie z terminalną grupą karboksylową, prowadził do pionowego ukierunkowania przeciwciał na powierzchni elektrody. W ramach badań oszacowałem również odpowiedź immunosensora gdy przeciwciała były unieruchamiane w wyniku adsorpcji. Jako, że wpływ na wypadkową siłę wiązania antygenu przez przygotowaną warstwę bioczułą może mieć rodzaj zastosowanego przeciwciała, w każdym z powyższych układów testowane były zarówno przeciwciała poli- jak i monoklonalne. Odpowiedź prądowa immunosensora związana była z reakcją redoks znacznika obecnego w roztworze. Spośród powyższych metod tworzenia warstwy bioczułej najciekawszymi parametrami pod kątem otrzymywanych wielkości natężenia prądu, odpowiedzi czujnika czy powtarzalności wyników pomiarów uzyskano dla łącznika $-\text{NH}_2$ (cysteamina/glutaraldehyd) w połączeniu z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Jednak z uwagi na nadal obserwowane dość wysokie odchylenie standardowe uzyskiwanych odpowiedzi biosensora, postanowiono wprowadzić w strukturę warstwy receptorowej elementy blokujące powierzchnię. Pod uwagę wzięto białka (BSA, kazeina, IgG) oraz polietylenoglikol (PEG). Spośród analizowanych jedynie albumina bydlęca nie prowadziła do znacznej redukcji rejestrowanego sygnału prądowego pochodzącego od reakcji redoks znacznika. Zastosowanie jej pozwoliło również nieznacznie poprawić powtarzalność uzyskiwanych wyników pomiarów. Dla tak skonstruowanego czujnika wyznaczono zależność między jego odpowiedzią a stężeniem toksoidu błoniczego w próbce, zarówno z wykorzystaniem techniki elektrochemicznej impedancji spektroskopowej jak i woltamperometrii fali prostokątnej (Rysunek 27 A i B). Stężenie toksoidu zostało wyrażone w jednostce 1Lf/ml (ang. *Limit of Flocculation*) określającej zawartość antygenu wiążącego się w stosunku 1:1 z jedną jednostką antytoksyny. W przypadku toksoidu błoniczego jednostka ta odpowiada jego stężeniu wynoszącemu około $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Rysunek 27. Wykresy zależności odpowiedzi elektrochemicznego immunosensora od stężenia toksoidu błoniczego w próbce uzyskane z wykorzystaniem techniki **A)** elektrochemicznej impedancji spektroskopowej oraz **B)** voltamperometrii fali prostokątnej [H7].

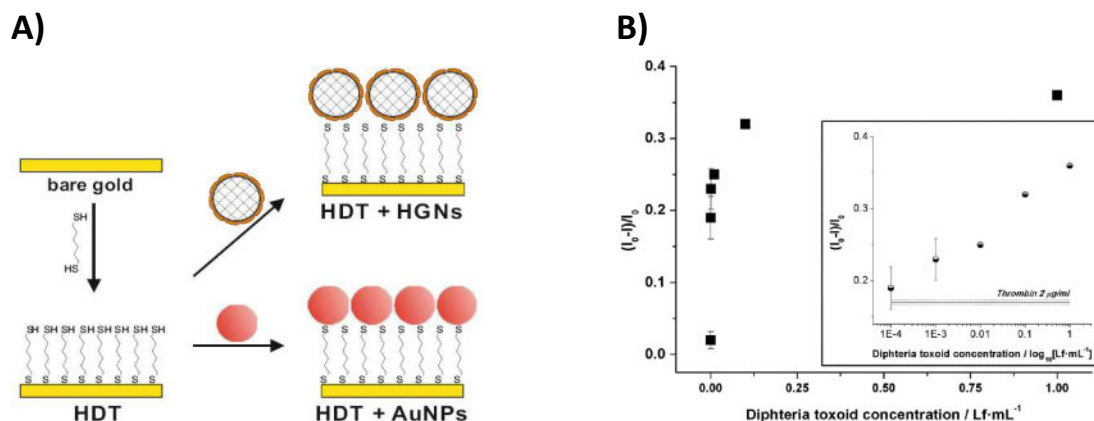
Uzyskane granice wykrywalności wynosiły w przypadku SWV $1 \cdot 10^{-4}$ Lf·mL $^{-1}$, oraz $1 \cdot 10^{-3}$ Lf·mL $^{-1}$ dla spektroskopii impedancyjnej. Co ciekawe, mniejsze wartości tego parametru oczekiwano w przypadku prowadzenia analiz z wykorzystaniem spektroskopii impedancyjnej. Możliwe jednak, że ze względu na wysoki stopień złożoności nie tylko samych białek ale również warstwy receptorowej z ich udziałem, jak również możliwości jej reorganizacji podczas pomiaru, uzyskano zależność odwrotną (pomiar EIS trwa kilka minut w porównaniu do kilku sekund dla SWV). Potwierdzeniem możliwości reorganizacji jest uzyskana selektywność względem obu technik detekcji (taki sam czujnik, takie same analizy, różne techniki pomiarowe) (Rysunek 28).



Rysunek 28. Selektywność opracowanego elektrochemicznego immunosensora w zależności od wykorzystanej techniki detekcji **A)** elektrochemiczna impedancja spektroskopowa oraz **B)** voltamperometria fali prostokątnej. Stężenie białek przeszkadzających wynosiło $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a toksoidu błoniczego $0,1 \text{ Lf} \cdot \text{mL}^{-1}$ [H7].

Według doniesień literaturowych, poprawa selektywności czujników wykorzystujących białka jako elementy receptorowe warstw bioczułych możliwa jest poprzez zastosowanie m.in. złota koloidalnego jako warstwy pośredniej. Wynika to m.in. ze zmiany planarnej struktury powierzchni dyskowej elektrody pracującej na powierzchnię heterogeniczną. Powierzchnia taka jest odpowiedzialna m.in. za zwiększenie wydajności odprowadzania elektronów z warstwy bioczułej do elektrody, a tym samym stwarzając bardziej sprzyjające środowisko dla przeciwciał i utrzymując ich aktywność biologiczną (mniejsze ryzyko denaturacji). W opisywanej pracy do wytworzenia warstwy przejściowej wykorzystałem dwa rodzaje złota koloidalnego, nanocząstki złota ($45,8 \pm 0,7 \text{ nm}$) oraz nanosfery złota ($15,4 \pm 0,6 \text{ nm}$) (Rysunek 29). Pierwsze z wymienionych charakteryzowały się jednorodną i pełną

strukturą sferyczną, drugie stanowiły swojego rodzaju sferę o nieciągłej strukturze przypominającą gąbkę, zawierającą liczne pory, co powodowało zwiększenie ich powierzchni elektrochemicznej.



Rysunek 29. A) Schemat struktury nanocząstek (AuNPs), nanosfer (HGNs) złota oraz sposobu ich unieruchamiania na powierzchni elektrody; **B)** zależność odpowiedzi immunosensora (przygotowanego z wykorzystaniem HGNs) od różnych stężeń toksoidu błoniczego [H7].

Po przygotowaniu czujnika do analizy toksoidu błoniczego, nie zaobserwowałem wyraźnych zmian w parametrach analitycznych dla pierwszego z wymienionych nanomateriałów. W przypadku czujnika z HGNs, jedynie nieznacznie wzrosła odpowiedź czujnika na toksoid błoniczy, przy podobnej odpowiedzi dla pozostałych białek przeszkadzających. Co jednak istotne, poprawie uległa powtarzalność prowadzonych pomiarów (Rysunek 29, B), w porównaniu z czujnikiem bez warstwy przejściowej (Rysunek 27, B). Opracowany czujnik umożliwił również rozróżnienie występowania toksoidu błoniczego w próbce śliny ludzkiej do której został dodany, od śliny niezawierającej takiego białka.

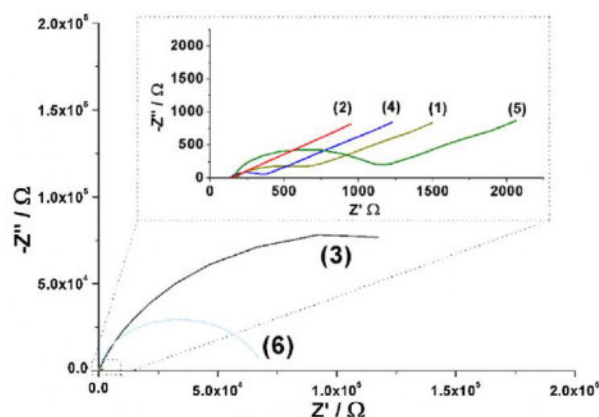
W drugiej pracy [H5] dotyczącej tego samego tematu, podjąłem z kolei dalsze próby zwiększenia selektywności prowadzonych analiz. Zwróciłem w niej szczególną uwagę na redukcję niespecyficznej adsorpcji białek na powierzchni, przy jednocześnie maksymalnym zachowaniu specyficzności przeciwciał wykorzystanych w warstwie receptorowej. Usprawnienie pierwszej z wymienionych kwestii możliwe jest poprzez wprowadzanie czynników blokujących elektrodę (wypełniaczy) w postaci białek (jak w przypadku wyżej opisanej pracy), jak również poprzez zastosowanie monowarstw samoorganizujących. Monowarstwy takie powinny charakteryzować się: (i) hydrofilowością, (ii) powinny zawierać cząsteczki w roli akceptorów wiązań wodorowych, (iii) nie powinny zawierać cząsteczek jako donorów wiązań wodorowych, (iv) ich wypadkowy ładunek powierzchniowy powinien być obojętny. Powyższe kryteria spełniają np. PEG (glikol polietylenowy), maltoza czy też związki zawierające trzeciorzędowe grupy aminowe. W omawianym rozwiązaniu wykorzystałem w tej roli opisywany powyżej ditiokarbaminian sodowy (DEDTC). Dzięki zastosowaniu tego czynnika do pokrycia wolnej, nie zajętej ligandami, powierzchni złota, możliwe było zachowanie dużej przewodności elektrody. Było to o tyle istotne, że tym razem do unieruchamiania przeciwciał (w pracy wykorzystano biotynylowe przeciwciała poliklonalne) wykorzystano niekowalencyjne i naturalne oddziaływania jakie występują w przyrodzie, między biotyną i streptawidyną. Najprawdopodobniej umożliwiło to zachowanie specyficzności przeciwciał unieruchomionych na powierzchni elektrody. Podejście takie wyeliminowało bowiem konieczność wykorzystania chemicznych czynników sprzęgających, które podczas reakcji wystawiają przeciwciała na niekorzystne dla nich warunki, co może prowadzić do ich stopniowej denaturacji. Jednak by umożliwić unieruchomienie przeciwciał w opisany sposób niezbędne było wprowadzanie na powierzchnię elektrody biotyny, co wiązało się praktycznie z całkowitą blokadą przewodnictwa takiej elektrody. Zastosowanie monowarstwy binarnej z udziałem DEDTC rozwiązało ten problem. Natomiast dopracowanie warunków jej nanoszenia umożliwiło nie tylko zachowanie dużej przewodności elektrody (Rysunek 30B, Rysunek 31B), ale również pozwoliło na

jak się okazało, znaczną redukcję stopnia niespecyficznej adsorpcji białek (Rysunek 30C, Rysunek 31C) jednocześnie z zachowaniem wysokiej selektywności opracowanego rozwiązania (Rysunek 31C).

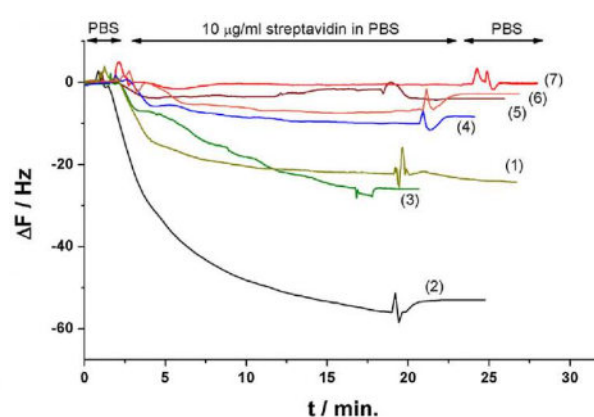
A)



B)



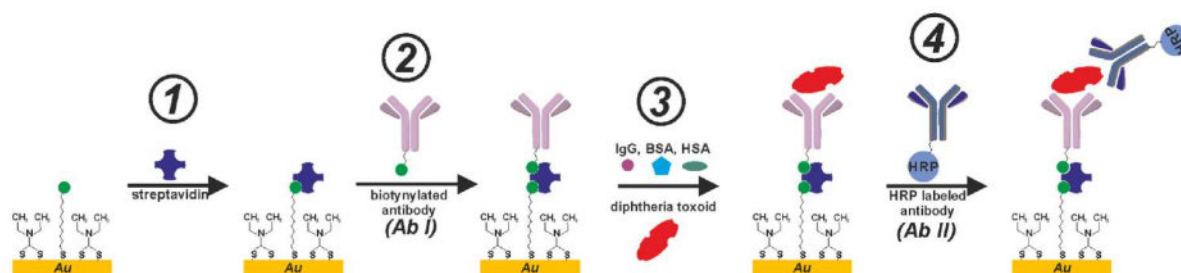
C)



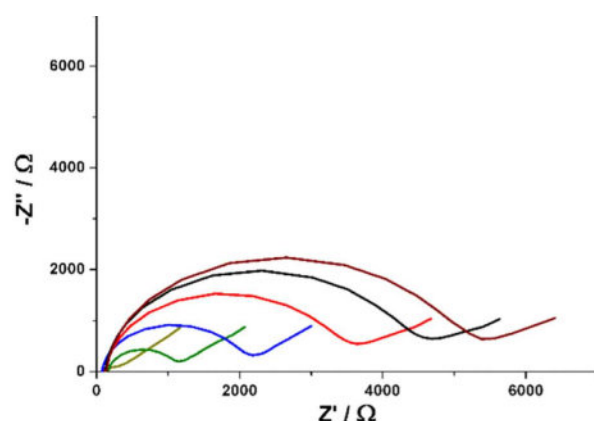
Rysunek 30. A) Schemat przygotowania monowarstwy binarnej oraz wprowadzenia streptawidyny jako punktu zaczepienia poliklonalnych przeciwciał biotynylowanych dedykowanych wykrywaniu toksoidu błoniczego; **B)** opór (1) czystej elektrody niemodyfikowanej, po modyfikacji jej monowarstwą składającą się wyłącznie z (2) DEDTC lub wyłącznie z (3) tiolu biotynylowanego oraz modyfikowanej monowarstwami binarnymi w proporcjach tych składników (4) 1:1; (5) 1:2; (6) 1:5; **C)** analiza mikrowagą kwarcową niespecyficznego osadzania streptawidyny na powierzchni (1) złotego przetwornika, dodatkowo modyfikowanego (2) tiolem biotynylowany, (3) merkaptioheksanolem; (4) kwasem 11-merkaptoundekanowym; (5) cysteaminą; (6) 1-oktantiolem; (7) DEDTC [H5].

Najprawdopodobniej wynikało to z faktu, że dietyloditiokarbaminian był czynnikiem idealnie wpisującym się w wymagania monowarstwy redukującej niespecyficzną adsorpcję białek. Dodatkowo jego budowa, struktury rezonansowe, znacznie poprawiły przodownictwo elektrody, przez co możliwe było wykorzystanie oddziaływań biotyna/streptawidyna do unieruchamiania przeciwciał przy zachowaniu przewodnictwa warstwy receptorowej. Wykorzystanie takiego oddziaływania w immobilizacji przeciwciał może wpływać na znaczne ograniczenie procesu ich denaturacji na powierzchni elektrody, czy w trakcie ich unieruchamiania, jak mogło to mieć miejsce w przypadku wykorzystania czynników sprzęgających w badaniach zaprezentowanych w artykule [H7].

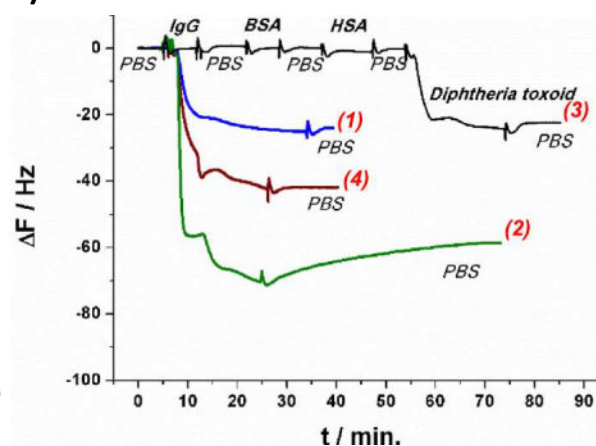
A)



B)



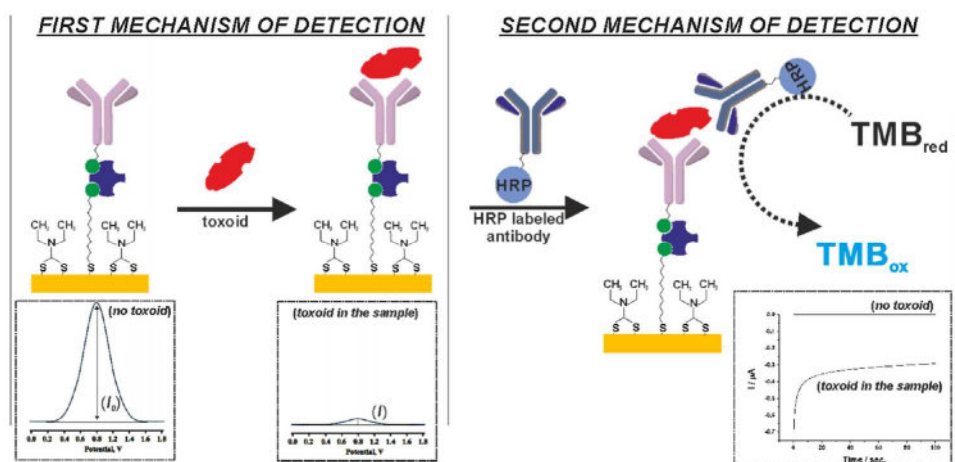
C)



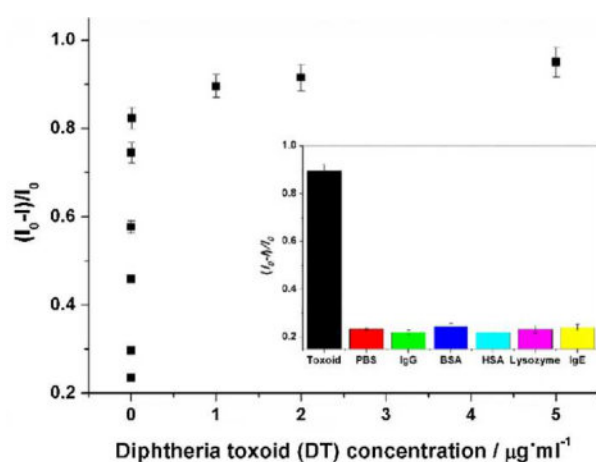
Rysunek 31. A) Schemat przygotowania czujnika oraz przeprowadzenia kolejnych etapów rozpoznania toksoidu błoniczego w próbce; B) analiza spektroskopią impedancyjną kolejnych modyfikacji powierzchni elektrody, kolory wykresów: ciemnożółty (złota elektroda dyskowa); zielony (mieszanina tioli); niebieski (streptawidyna); czerwony (przeciwciało pierwszorzędowe); czarny (toksoid błoniczy); brązowy (przeciwciało drugorzędowe); C) analiza mikrowagą kwarcową oddziaływań zaprezentowanych na schemacie A) [H5].

Dla opracowanego immunosensora oszacowano funkcję zależności odpowiedzi czujnika od stężenia toksoidu błoniczego w próbce. Wykorzystano w tym celu dwa mechanizmy detekcji (Rysunek 32A). Pierwszy z nich był taki sam jak w przypadku zależności ilościowych zaprezentowanych w artykule [H7]. Drugi wykorzystywał przeciwciało drugorzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową a rejestrowane natężenie prądu pochodziło od elektrochemicznej redukcji enzymatycznie utlenionego substratu dla enzymu (tetrametylobenzydyny). Przy czym jako technikę detekcji dla drugiego mechanizmu wykorzystano amperometrię. Tak skonstruowana warstwa receptorowa znacznie poprawiła powtarzalność otrzymywanych oznaczeń, jak również selektywność czujnika w stosunku do podejścia zaprezentowanego w artykule [H7].

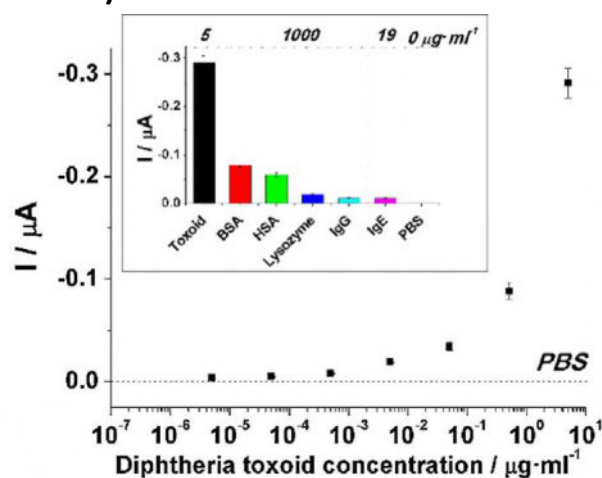
A)



B)



C)



Rysunek 32. Schematycznie zaprezentowane analizowane mechanizmy detekcji (A) oraz zależność odpowiedzi czujnika od stężenie toksoidu błoniczego w próbce i uzyskana selektywność dla pierwszego (B) i drugiego (C) mechanizmu detekcji [H5].

Przygotowano następnie próbki imitujące próbki rzeczywiste. Była to rozcieńczona ślina wzbogaćana toksoidem błoniczym w różnych stężeniach. Wyniki oznaczeń zawartości toksoidu w tych próbkach były zgodne wynikami jakie uzyskano dla próbek w oparciu o które przygotowano zaprezentowany na Rysunku 32 krzywe kalibracji.

Powyższe dwa artykuły zamykają część badań poświęconą opracowaniu elektrochemicznej diagnostyki zakażenia wybranym drobnoustrojem. Dotyczy to, z jednej strony, opracowania samych czujników umożliwiających w prosty sposób wykrycie długoniciowych fragmentów kwasów nukleinowych bezpośrednio w produkcie reakcji PCR, czy selektywnego wykrywania białka, ale również badań nad poprawą parametrów analitycznych gotowych rozwiązań konstrukcyjnych. Udowodniono ponadto, że zastosowanie nanomateriałów czy innych, nie stosowanych dotychczas związków w charakterze czynników blokujących wolną powierzchnię elektrody, potrafi znacznie wpłynąć, a odpowiednio zastosowane, znacznie poprawić odpowiedź opracowanych czujników. Jest to o tyle istotne, że obserwowana i nieuchronna miniaturyzacja czujników elektrochemicznych sprawia, że coraz większe znaczenie w procesie detekcji nabierają zjawiska międzyfazowe występujące w warstwie bioczułej. Opisane powyżej badania nad diagnostyką zakażeń maczugowcem błonicy uzupełniają również dwa inne artykuły, niewchodzące do zaprezentowanego i omawianego cyklu rozprawy habilitacyjnej:

- [PH9] Zasada, A., Zacharczuk, K., Woźnica, K., Głowska, M., Ziółkowski, R., Malinowska, E., *The influence of a swab type on the results of point-of-care tests*, AMB Express, 2020, 10, 46.
- [PJ3] Marchlewicz, K., et. al, *Miniaturized device for performing PCR, integrated with an electrochemical DNA biosensor for detection of corynebacterium diphtheriae*, MicroTAS 2020 - 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2020, 1183–1184.

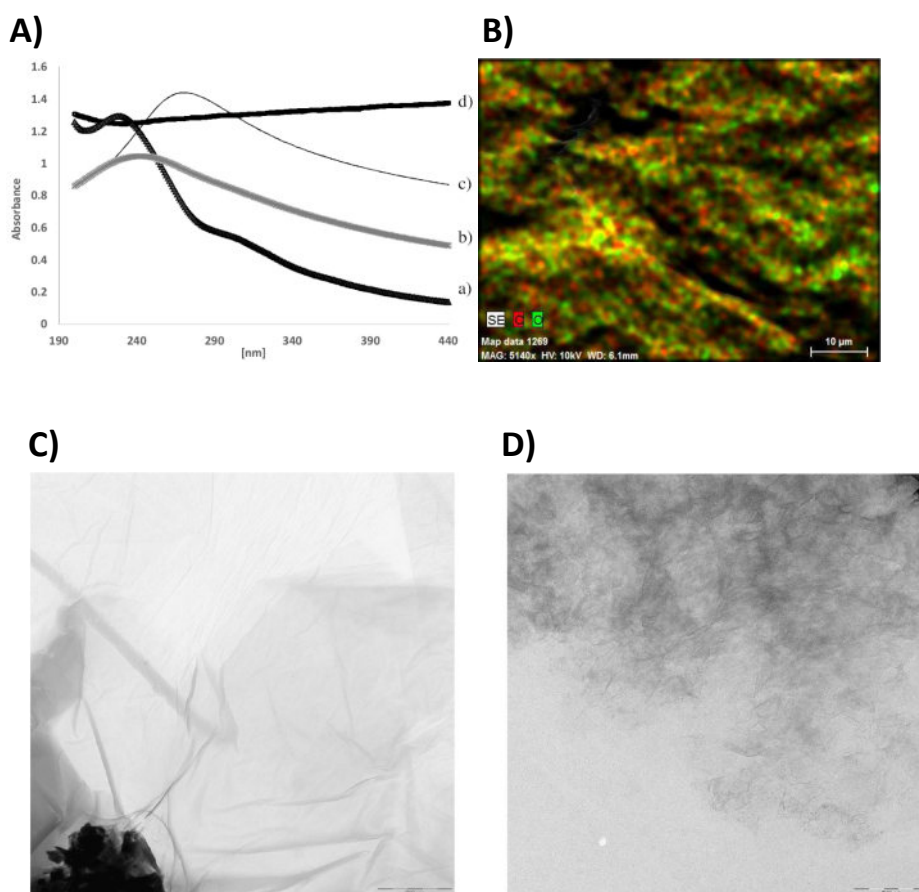
w których podjęto się badań nad opracowaniem przenośnego układu mikroprzepływowego umożliwiającego szybkie powielenie wybranego fragmentu genu maczugowca błonicy, jak również badań nad wpływem materiału wymazówki na wyniki uzyskiwane z zastosowaniem urządzeń diagnostycznych.

Kolejną podjętą w ramach cyklu habilitacyjnego tematyką (choć chronologicznie pierwszą po obronie rozprawy doktorskiej), była próba zastosowania grafenu jako warstwy przejściowej w biosensorach DNA. Jak już wyżej wspomniano miała ona dotyczyć badań nad zmniejszeniem wartości granicy wykrywalności czujników DNA z wykorzystaniem tego nanomateriału. Badania te nie przyniosły jednak zamierzonego rezultatu. Najważniejszym efektem badań okazało się być opracowanie warstwy receptorowej z warstwą przejściową w postaci zredukowanego tlenku grafenu oraz nanocząstek złota, która znacznie poprawiła parametry analityczne sensora dopaminy w stosunku do tego przygotowanego z wykorzystaniem aptamerów DNA, unieruchamianych bezpośrednio na powierzchni złota [H10]. Przeglądając literaturę naukową w tamtym czasie można było się jednak natknąć również na inne, nowatorskie zastosowanie modyfikowanych nanomateriałów węglowych. Było to m.in. oczyszczanie wody gdzie modyfikowane nanomateriały węglowe były wykorzystane jako selektywne sorbenty niklu, jodu¹²⁹, ołowiu czy rtęci. W każdym z tych przypadków w strukturę grafenu zostały wprowadzone odpowiednie zmiany, tak aby oddziaływał on z jonami wybranych zanieczyszczeń. Z uwagi na potwierdzone powinowactwo modyfikowanych struktur grafenu do wybranych jonów czy związków chemicznych, znalazły one również zastosowanie w chemii analitycznej jako elementy receptorowe. Sfunkcjonalizowany grafen oraz kompozyty grafenowe były wykorzystane do przygotowania elektrod umożliwiających wykrywanie nadtlenu wodoru, kwasu askorbinowego czy glukozy. Ze względu na doświadczenie w opracowywaniu czujników selektywnych względem jonów metali (UO_2^{2+} , Hg^{2+}), w kolejnych badaniach postanowiłem wykorzystać nowy nanomateriał w takiej właśnie roli (materiał tani i łatwo dostępny w dużych ilościach jako alternatywa dla kwasów nukleinowych). Wyniki tych badań zaprezentowałem w pracach:

- [H6] **Ziółkowski, R.** , Uścińska, A., Mazurkiewicz-Pawlicka, M., Małolepszy, A., Malinowska, E., *Directly-thiolated graphene based electrochemical sensor for Hg(II) ion*, Electrochimica Acta, 2019, 305, 329-337.
- [H9] **Ziółkowski, R.** , Górski, Ł., Malinowska, E., *Carboxylated graphene as a sensing material for electrochemical uranyl ion detection*, Sensors and Actuators, B: Chemical, 2017, 238, 540-547.

Praca [H9] motywowana była wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi dotyczącymi wysokiego powinowactwa tlenku grafenu do jonów uranilowych. Wynika ono z występowania w strukturze tego materiału grup zawierających tlen, takich jak epoksydowe, hydroksylowe czy karboksylowe. Autorzy doniesień opisywali również, że stopień powinowactwa jest niezależny od siły jonowej roztworu jednak

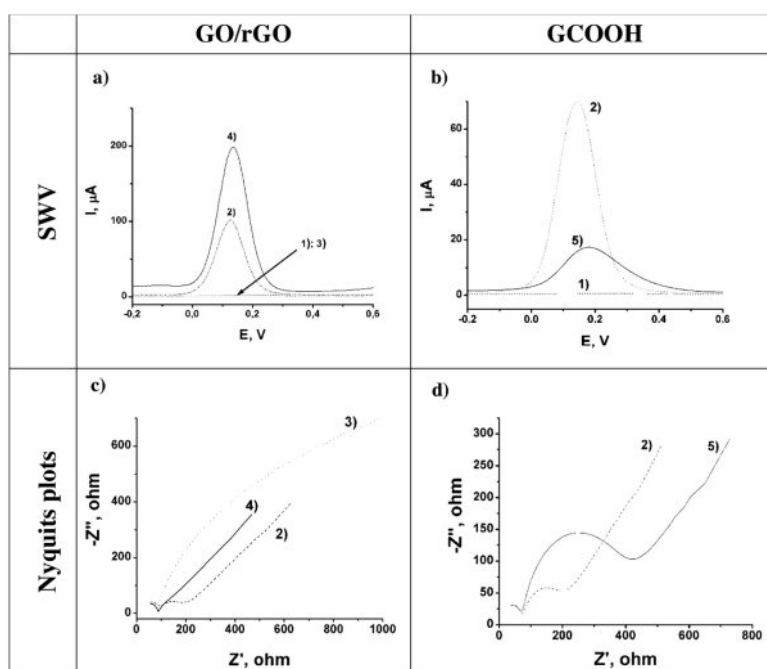
znacznie maleje w pH poniżej 4 oraz powyżej 7,5. W przypadku wyższych wartości pH grupy funkcyjne GO ulegają deprotonacji przez co powierzchnia płatków grafenowych uzyskuje ładunek ujemny tym samym prowadząc do elektrostatycznego odpychania anionów uranylowych ($(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})^{3-}$, $\text{UO}_2(\text{OH})^{3-}$, $\text{UO}_2(\text{OH})_4^{2-}$). Z kolei brak zależności od siły jonowej wynika z tworzenia w takim przypadku kompleksów powierzchniowych sfery wewnętrznej jonów metali. Jako, że jony UO_2^{2+} wykazują silne powinowactwo do ligandów donorowych, np. zawierających tlen, można je traktować jako silne kwasy Lewisa. Z tego też względu, duża zawartość grup zawierających tlen na powierzchni płatków tlenku grafenu prowadzi do tworzenia stabilnych kompleksów sfery wewnętrznej z jonami UO_2^{2+} na rzecz klasycznej sorpcji na powierzchni. Zjawisko to dotyczy oczywiście wyłącznie wspomnianego wyżej optymalnego zakresu pH. Badania tego zjawiska np. dla pH 7,6 pokazują, że dochodzi do precypitacji powierzchniowej jonów U(VI) podczas której jonem dominującym jest $\text{UO}_2(\text{OH})^{3-}$. Dalsze badania termodynamiczne wykazały również, że energia Gibbsa uzyskuje najmniejsze wartości dla kompleksów jonów uranylowych z płatkami grafenu zawierającymi jony hydroksylowe oraz karboksylowe. Opisane badania, potwierdzające występowanie oddziaływań pomiędzy jonami U(VI) oraz płatkami grafenu były dobrym prognostykiem przed zastosowaniem takiego materiału jako warstwy receptorowej czujnika elektrochemicznego. W swoich badaniach zdecydowałem się na materiał receptorowy w formie tlenku grafenu dodatkowo wzbogacanego w grupy karboksylowe. Prace rozpocząłem od jego przygotowania i scharakteryzowania (Rysunek 33).



Rysunek 33. **A)** Widma UV-VIS rejestrowane dla każdego z materiałów (a) tlenek grafenu; (b) karboksylowany tlenek grafenu (GCOOH); (c) elektrochemicznie redukowany tlenek grafenu (rGO); (d) grafit; **B)** mapa EDS GOCOOH; **C)** zdjęcie TEM GO; **D)** zdjęcie TEM GCOOH [H9].

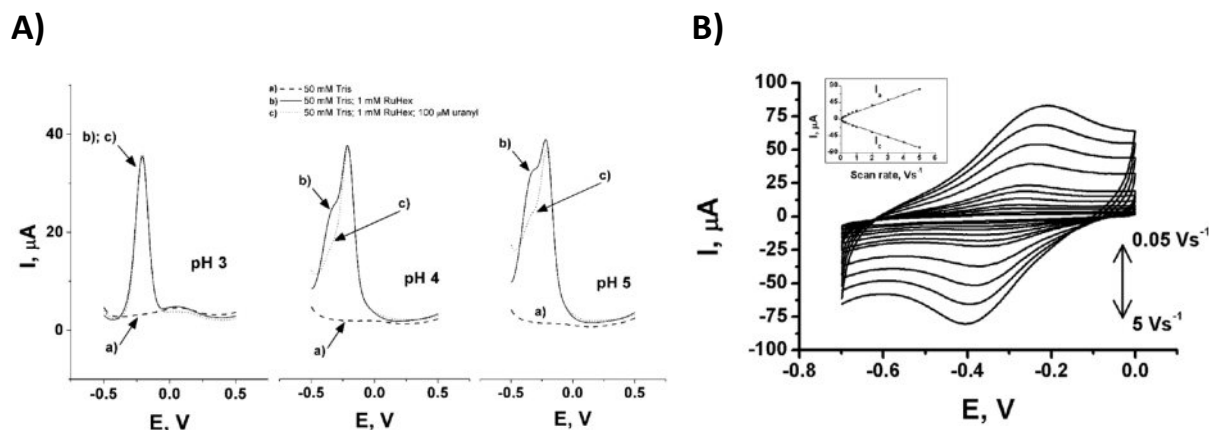
Widma absorpcji w zakresie UV-VIS, zarejestrowane dla każdego z analizowanych materiałów (Rysunek 33 A) posiadały charakterystyczny kształt, odpowiednie maksima absorpcji oraz przesunięcia maksimów. Zasadnicze różnice między strukturą GO i GCOOH widoczne były również na zdjęciach z

transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), (Rysunek 33 C i D), zaś skład pierwiastkowy, w tym udział tlenu, zaprezentowano na Rysunku 33B, jako mapę EDS (ang. *energy-dispersive X-ray spectroscopy*). Otrzymany grafen karboksylowany był stabilny w roztworze o $\text{pH} \geq 5$. Poniżej tej wartości dochodziło do jego wytrącania (najprawdopodobniej w wyniku protonowania grup karboksylowych), przy czym proces ten był odwracalny. Badania elektrochemiczne potwierdziły zmiany w strukturze przygotowanej pochodnej grafenu, w porównaniu z tlenkiem grafenu oraz elektrochemicznie zredukowanym tlenkiem grafenu (Rysunek 34), przy jednoczesnym zachowaniu przewodności elektrody modyfikowanej.



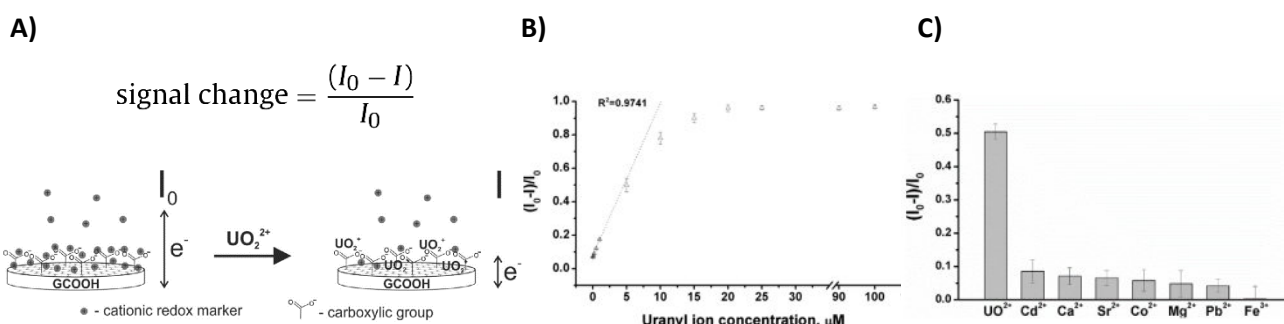
Rysunek 34. Woltamperogramy SWV oraz widma EIS dla: (1) czystej dyskowej elektrody z węgla szklanego (GCE), $100 \text{ mM L}^{-1}\text{KCl}$ ($\text{pH } 7,0$) oraz pomiary wykonane w $100 \text{ mM L}^{-1}\text{KCl}$ z $5 \text{ mM L}^{-1}\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\text{pH } 7,0$) dla (2) GCE, (3) GCE z naniesioną warstwą GO, (4) GCE z rGO 5) GCE z GCOOH [H9].

Powyższy wynik, zachowana przewodność elektrody po adsorpcji na niej nanomateriału węglowego GCOOH, pozwolił sądzić, że możliwe będzie obserwowanie zmiany parametrów prądowych tak zbudowanej elektrody po zanurzeniu w roztworze zawierającym jony uranowe. W przypadku sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów metali, oczywistym mechanizmem detekcji wydaje się być wykorzystanie ich właściwości redukująco-utleniających. Podobnie jak miało to miejsce w przypadku czujnika dedykowanego wykrywaniu dopaminy [H10]. Jednak w przypadku zaprezentowanego rozwiązania podejście takie, ze względu na zbyt skrajne potencjały przykładane do elektrody, mogłoby doprowadzić do desorpcji warstwy sensorycznej. Aby uniknąć tego zjawiska wykorzystuje się znaczniki redoks o znacznie mniejszych wartościach potencjału redoks, dodawane do roztworu pomiarowego, w tym przypadku heksaaminoruten. Posiada on ładunek dodatni i co ważne pozbawiony jest struktur aromatycznych, które mogłyby oddziaływać z warstwą receptorową poprzez wiązania $\pi-\pi$ (jak w przypadku innego ze znaczników np. błękitu metylenowego). Powyższe założenia potwierdzono podczas pomiarów wykonanych techniką SWV oraz woltamperometrii cyklicznej (CV) (Rysunek 35, A i B).



Rysunek 35. A) Woltamperogramy SWV dla GCE modyfikowanej GCOOH wykonane w środowisku pomiarowym o różnym pH gdzie linia kreskowana to 50 mM Tris, linia ciągła to 50 mM Tris z dodatkiem 1 mM heksaaminorutenu; linia kropkowana to pomiar wykonany z dodatkiem 100 μM octanu uranylu; **B)** woltamperometria cykliczna dla opracowanego czujnika wykonana dla szybkości skanowania od 5 do 0,05 V s⁻¹ w obecności 50 μM heksaaminorutenu (Inset) zależność szybkości skanowania od natężenia prądu anodowego/katodowego [H9].

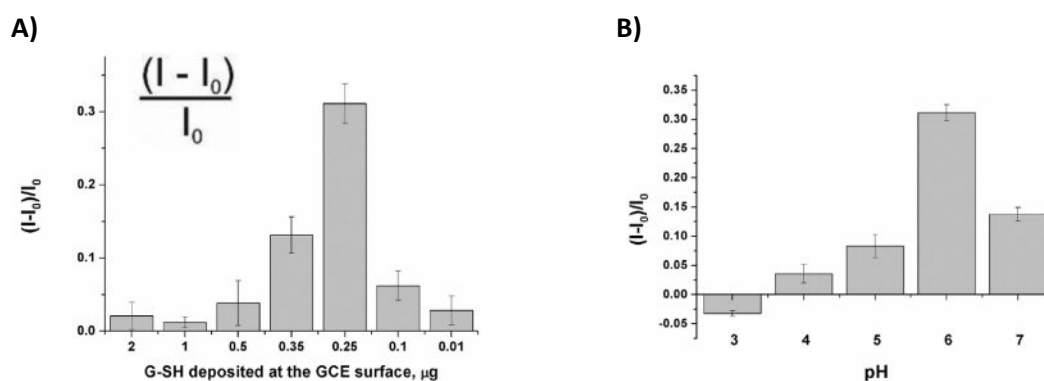
W szczególności potwierdza to zarejestrowana odpowiedź czujnika dla 100 μM stężenia jonów uranilowych uzyskana w 1 mM roztworze heksaaminorutenu w różnych warunkach pH (Rysunek 35, A). O ile piki uzyskane na woltamperogramach wykonanych w roztworach o pH 3, bez jonów uranilowych i je zawierające, były symetryczne i nie różniły się między sobą, o tyle zwiększenie pH doprowadziło do pojawienia się piku niesymetrycznego. Wynikało to z pojawienia się na powierzchni modyfikowanej elektrody miejsc o innej strukturze niż przy niższych wartościach pH (powolna deprotonacja) i zmiany wydajności wymiany elektronów między markerem redoks a powierzchnią elektrody w tych miejscach. Potwierdzono przy tym brak adsorpcji markera redoks na powierzchni elektrody modyfikowanej karboksylowanym tlenkiem grafenu (Rysunek 35, B). Dodatkowo zanurzenie czujnika w roztworze zawierającym jony uranilowe doprowadziło do dalszych zmian w tych rejonach warstwy sensorycznej, w wyniku związania się jonów uranilowych, przez co nowopowstały pik malał. Zmniejszenie stężenia markera redoks z 1 mM do 50 μM znacznie zredukowało wysokość piku przy większych potencjałach redoks (ilość markera nie uczestnicząca w odpowiedzi czujnika) i z wykorzystaniem opisanego wyżej mechanizmu detekcji wykreślono zależność odpowiedzi czujnika od stężenia jonów uranilowych w próbce, jak również określono jego selektywność względem wybranych jonów metali (Rysunek 36).



Rysunek 36. A) mechanizm detekcji oraz wzór na podstawie którego liczone odpowiedzi czujnika; **B)** uzyskana zależność między stężeniem jonów uranilowych w próbce a odpowiedzią czujnika; **C)** selektywność opracowanego rozwiązania [H9].

Modyfikowane struktury grafenu wykorzystałem również w ocenie możliwości wykrywania jonów rtęci. Do tego celu zastosowałem płatki grafenu wzbogacone o grupy tiolowe (miękkie zasady),

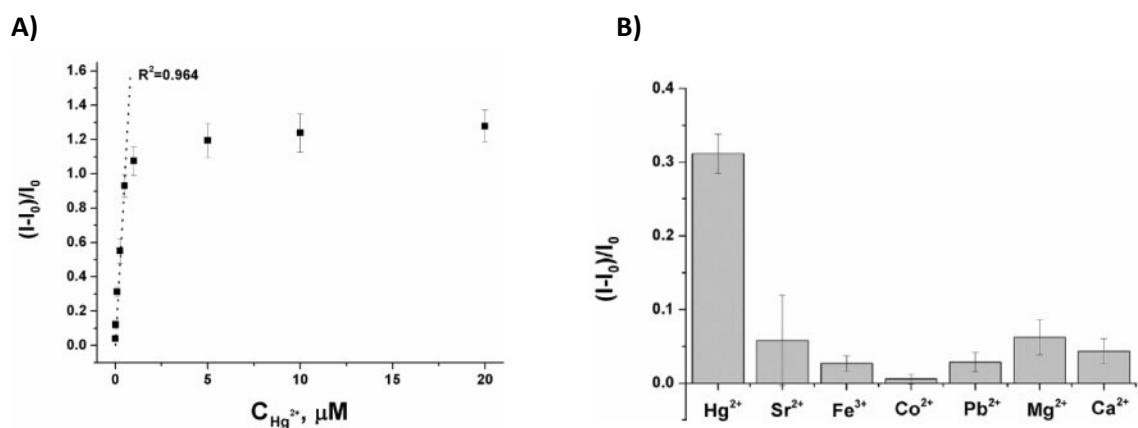
a możliwość wiązania jonów Hg^{2+} (miękki kwas), podobnie jak poprzednio wynikała z teorii kwasów i zasad Lewisa. W literaturze można było znaleźć już rozwiązania, gdzie oddziaływania siarka/rtęć stanowiły podstawę oznaczania tych jonów. W pracach tych jako warstwę receptorową wykorzystano m.in. elektropolimeryzowany 2-merkaptobenzotiazol, 1-oktadekanotiol, disiarczek benzylu czy też nanocząstki złota sfunkcjonalizowane kwasem tioglikolowym. W tamtym czasie jedna z grup potwierdziła również syntezę płatków grafenu bezpośrednio modyfikowanych grupami tiolowymi (G-SH). Opisane postępowanie umożliwiło wprowadzenie tych grup na całej powierzchni płatków, w miejsce m.in. grup hydroksylowych i epoksydowych. Według autorów grafen taki charakteryzował się dobrą przewodnością. Z uwagi na hydrofilowość, rozwiniętą powierzchnię oraz potwierdzone zwiększone powinowactwo takich struktur do jonów rtęci, autorzy zaproponowali wykorzystanie go w ekstrakcji jonów rtęci z wód środowiskowych. Ja z kolei zdecydowałem się na zastosowanie analogicznych struktur nanometrycznych jako warstw receptorowych czujników elektrochemicznych. Zaproponowany mechanizm detekcji był podobny do tego zaprezentowanego na Rysunku 36A, gdzie wykorzystałem zewnętrzny znacznik redoks w postaci chlorku heksaaminorutenu. Zaobserwowałem jednak zasadniczą różnicę, tym razem bowiem rosło natężenie rejestrowanego prądu po związaniu analitu (rtęci) z warstwą receptorową. Analogicznie do badań prowadzonych nad opracowaniem czujnika dedykowanego wykrywaniu jonów uranowych, konieczne było dobranie ilości nanoszonego nanomateriału na powierzchnię elektrody. Zbyt małe stężenie nanoszonych płatków grafenu prowadziło bowiem do zmniejszania przewodności warstwy międzyfazowej. Było to związane z wydajniejszym oddziaływaniem płatków grafenu z powierzchnią elektrody wykonanej z węgla szklanego, tworzenie wiązań π - π , i tworzenie względnie jednorodnej powierzchni struktur grafenu ustawionych poziomo („basal plane”) na powierzchni takiej elektrody. Zwiększanie ilości nakładanego grafenu prowadziło do wydajniejszego oddziaływania płatków grafenu między sobą już w roztworze, tym samym do zwiększenia liczby krawędzi, defektów oraz połączeń między nimi. Z kolei zwiększenie ich ilości na powierzchni elektrody, pozwalające na osiągnięcie tzw. progu perkolacji (stopień aglomeracji grafenu na powierzchni), prowadzi do znacznego zwiększenia przewodnictwa warstwy grafenowej złożonej z wielu płatków. Odpowiedź elektrody GCE modyfikowanej różnymi ilościami tiolowanego grafenu względem jonów rtęci zaprezentowano na Rysunku 37A. Jako, że w trakcie badań obserwowano zwiększanie natężenia prądu po inkubacji czujnika z jonami Hg^{2+} , postanowiono zmienić wzór, na podstawie którego obliczano względną odpowiedź czujnika.



Rysunek 37. A) Odpowiedź czujnika względem jonów rtęci w zależności od ilości naniesionego nanomateriału oraz wzór na podstawie którego ta odpowiedź była obliczana; **B)** odpowiedź czujnika na jony rtęci w zależności od pH roztworu, w którym prowadzono pomiary [H6].

Często zmiany natężenia prądu po wykryciu analitu w czujnikach, gdzie mechanizm detekcji wykorzystuje znaczniki redoks dodawane do roztworu pomiarowego, wiążą się ze zmianami ładunku powierzchniowego elektrody. W prezentowanym rozwiązaniu nie spodziewałem się jednak takich zmian. Wynikało to z faktu, że zastosowana metoda wprowadzania grup tiolowych ($\text{pK}_a=13$)

zastępowała nimi grupy karboksylowe ($pK_a=4,3$ i $pK_a=6,6$), hydroksylowe ($pK_a=9,7$), epoksydowe oraz karbonylowe. Prowadziło to zatem do zwiększenia wartości stałej dysocjacji płatków grafenu tiolowanego w stosunku do materiału wyjściowego jakim był tlenku grafenu. Z uwagi na „miękką” naturę jonów rtęci, można zakładać ich oddziaływanie z grupami $-SH$. Nie zmienia to zatem liczby zdeprotonowanych grup tlenowych jakie mogły pozostać na powierzchni po procesie wprowadzania grup tiolowych. Nie zmienia zatem również i wypadkowego ładunku prezentowanego na powierzchni elektrody modyfikowanej. Dlatego odpowiedź czujnika po inkubacji z jonami Hg^{2+} , obserwowana jako zwiększenie natężenia rejestrowanego prądu, mogła wynikać wyłącznie ze zmiany przewodności warstwy międzyfazowej w wyniku związania jonów rtęci. W prowadzonych badaniach zaobserwowałem także znaczną zależność odpowiedzi czujnika od pH roztworu w którym prowadzono badania (Rysunku 37B). Wartość pH, podobnie jak w przypadku jonów uranowych, może mieć wpływ m.in. na formę jonów rtęci występujących w roztworze. W przypadku pomiarów prowadzonych w roztworze o pH poniżej 6, obserwowano gorszą odpowiedź czujnika. Mogło to wynikać ze słabszego oddziaływania jonów rtęci i grup tiolowych poprzez możliwość tworzenia kompleksów $HgCl_3^-$ oraz $HgCl_4^{2-}$. Z kolei odwrócona odpowiedź czujnika, zaobserwowana w przypadku pH roztworu o wartości 3, może wynikać z tworzenia nierozpuszczalnego Hg_2Cl_2 oraz jego sedimentacji na powierzchni elektrody. W $pH > 6$ może dojść do hydrolizy jonów Hg^{2+} , prowadzącej do powstania $Hg(OH)^+$ oraz $Hg(OH)_2$. Nie mniej, w prowadzonych badaniach największą wartość odpowiedzi czujnika zaobserwowano dla roztworu o pH 6, w którym jony rtęci mogą przejmować wolne elektrony z atomów siarki, znajdujące się w grupach tiolowych, prowadząc do kompleksowania ich na powierzchni czujnika. Dla warunków, w których obserwowano największą odpowiedź czujnika wyznaczono zależność zmiany intensywności sygnału prądowego od stężenia jonów rtęci w próbce (Rysunek 38A), jak również oszacowano selektywność otrzymanego czujnika (Rysunek 38B).



Rysunek 38. A) Zależność odpowiedzi czujnika od stężenia jonów rtęci w próbce; **B)** selektywność czujnika na wybrane jony metali [H6].

5.4. Podsumowanie i dalsze kierunki rozwoju

W trakcie prowadzenia badań, których wyniki stanowią podstawę prezentowanej rozprawy, zaprojektowałem oraz przygotowałem nowe (bio)czujniki z elektrochemiczną techniką detekcji sygnału analitycznego. Zaproponowałem również konstrukcję testu na bazie nanomateriałów umożliwiającego wykonanie oznaczenia stężenia jednoniciowego DNA (produktu asymetrycznej reakcji PCR) poza laboratorium i z wykorzystaniem powszechnie dostępnych elementów o znikomej cenie. Zwróciłem uwagę na konieczność każdorazowego doboru nie tylko odpowiednich receptorów do wykrywania danego analitu, ale również otoczenia w jakim te receptory będą unieruchomione, czy też warunków w jakich dana warstwa sensoryczna będzie pracować jako całość. Podejście takie umożliwiło m.in.

przygotowanie czujników pozwalających na selektywne wykrycie jednoniciowych fragmentów DNA, nawet w próbce o złożonej matrycy, a więc rozwiązania które z punktu widzenia bieżącej sytuacji pandemicznej jest szczególnie interesujące.

Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji na temat możliwych oddziaływań zachodzących na powierzchni przetworników elektrochemicznych, oraz ich wpływu na wydajność rozpoznania molekularnego. Umożliwiły tym samym opracowanie czujników, w których **po raz pierwszy** (i) zostały wykorzystane modyfikowane struktury grafenu jako warstwy receptorowe; (ii) zastosowano długoniciowe sondy DNA o strukturze przypominającej „spinkę do włosów” w efektywnej detekcji produktów asymetrycznego PCR, (iii) zaproponowano nowy wypełniacz, dietyloditiokarbaminian sodu, znacznie zwiększający rejestrowany sygnał prądowy oraz wpływający na zmniejszenie niespecyficznych oddziaływań białek z powierzchnią przetwornika. W trakcie prowadzenia badań wytypowałem ponadto szereg parametrów, dotyczących zarówno struktury przestrzennej receptorów (DNA), składu warstwy bioczułej jak i warunków prowadzenia oznaczeń, które powinny być brane pod uwagę przy projektowaniu elektrochemicznych (bio)czujników, które w przyszłości mogłyby znacznie uprościć prowadzenie pomiarów analitycznych.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w cyklu publikacji [H1–H10], stanowiące istotny wkład w rozwój nauk chemicznych uważam w szczególności:

- zastosowanie funkcjonalizowanych struktur grafenu jako warstw sensorycznych elektrochemicznych czujników dedykowanych wykrywaniu jonów metali (UO_2^{2+} oraz Hg^{2+});
- zaproponowanie nowego elementu blokującego/zabezpieczającego powierzchnię elektrochemicznych geno- i immunosensorów zwiększającego przewodność warstwy sensorycznej oraz redukującego niespecyficzną adsorpcję białek;
- udowodnienie możliwości poprawy parametrów analitycznych (granica oznaczalności, selektywność, powtarzalność, zakres prostoliniowości) biosensorów elektrochemicznych poprzez zastosowanie w ich konstrukcji nowoczesnych nanomateriałów jako warstw przejściowych;
- udowodnienie możliwości zastosowania w elektrochemicznych czujnikach DNA, bazujących na mechanizmie spinki do włosów, sond długoniciowych w roli receptorów oraz potwierdzenie poprawności ich działania w analizach próbek rzeczywistych uzyskanych w wyniku amplifikacji kwasów nukleinowych techniką asymetrycznej reakcji łańcuchowej polimerazy;
- udowodnienie możliwości konstrukcji taniego i przenośnego fluorescencyjnego (z detekcją potencjometryczną) testu DNA, którego mechanizm działania bazuje na nowoczesnych nanomateriałach;
- udowodnienie możliwości opracowania elektrochemicznej diagnostyki zakażenia bakteryjnego.

W ramach realizacji kolejnych celów naukowych planuję kontynuację i rozszerzanie podjętych tematów, a także rozpoczęcie prac w nowych obszarach. W najbliższej przyszłości moje badania będą dotyczyły m.in.:

- rozwijania i dostosowania konstrukcji elektrochemicznych czujników DNA oraz warunków wykrywania produktów izotermicznych reakcji amplifikacji. Tematyka ta będzie wymagała nawiązania współpracy z grupą oferującą efektywne monitorowanie oddziaływań białka/DNA w roztworze;

- modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych umożliwiającą efektywną ekstrakcję oraz oczyszczanie kwasów nukleinowych z próbek o złożonej matrycy;
- dalszej miniaturyzacji oraz prób poprawy parametrów analitycznych sensorów i biosensorów elektrochemicznych, w szczególności poprzez zastosowanie w ich konstrukcji nanomateriałów oraz nowych niereceptorowych składników warstwy bioczułej;
- integracji czujników elektrochemicznych w układy mikroprzepływowe, w szczególności dedykowane badaniu kwasów nukleinowych;
- analizie możliwości zastosowania biosensorów oraz konstrukcji mikroprzepływowych do wykrywania wybranych bioanalitów stanowiących nowe markery chorobowe (np. egzosomy, komórki nowotworowe we krwi itp.);
- rozwijanie diagnostyki spersonalizowanej tzw. teranostyki, w szczególności z uwzględnieniem badania kwasów nukleinowych.

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W 2014 roku nawiązałem i od tego czasu aktywnie współpracuję z dr hab. n. med. Aleksandrą Zasadą oraz Jej zespołem badawczym z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego. Współpraca dotyczy przede wszystkim badań nad opracowaniem czułych i selektywnych testów i biosensorów dedykowanych wykrywaniu sekwencji markerowych wysoce patogennych bakterii i wirusów w próbkach biologicznych. Wynikiem prowadzonej współpracy są zarówno wspólne projekty badawcze:

- 2020-2021 Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, projekt „Przenośne mikrourządzenie do szybkiej diagnostyki zakażeń beta-koronawirusami, w tym SARS-CoV, MERS-CoV oraz nowym koronawirusem SARS-CoV-2”, TANGO-IV-A/0015/2019-00, NCBiR
- 2017-2019 Wydział Chemiczny PW, projekt „Przenośne mikrourządzenie do szybkiego i specyficznego wykrywania białek oraz fragmentów kwasów nukleinowe”, LIDER/35/0041/L-7/NCBR/2016, NCBiR
- 2015-2018 Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, projekt „Elektrochemiczne sensory z warstwą receptorową DNA do wykrywania sekwencji markerowych wysoce patogennych bakterii”, NCN 2014/15/B/NZ6/01771, NCN

jak i prace naukowe opublikowane w czasopismach z listy JCR:

1. Marchlewicz K, Ostrowska I, Oszwałdowski S, Zasada A, Ziółkowski R , Malinowska E. Molecular diagnostic of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strain by DNA sensor potentially suitable for electrochemical point-of-care diagnostic. *Talanta*. 2021;227.
2. Zasada AA , Zacharczuk K, Woźnica K, Głowska M, Ziółkowski R, Malinowska E. The influence of a swab type on the results of point-of-care tests. *AMB Express*. 2020;10(1).
3. Ziółkowski R , Oszwałdowski S, Kopyra KK, Zacharczuk K, Zasada AA, Malinowska E. Toward Fluorimetric-Paired-Emitter-Detector-Diode test for *Bacillus anthracis* DNA based on graphene oxide. *Microchem J*. 2020;154.
4. Ziółkowski R , Jarczewska M, Drozd M, Zasada AA, Malinowska E. Studies on the development of electrochemical immunosensor for detection of diphtheria toxoid. *J Electrochem Soc*. 2019;166(6):B472-B481.
5. Ziółkowski R , Oszwałdowski S, Zacharczuk K, Zasada AA, Malinowska E. Electrochemical detection of *Bacillus anthracis* protective antigen gene using DNA biosensor based on stem-loop probe. *J Electrochem Soc*. 2018;165(5):B187-B195.
6. Zasada AA , Zacharczuk K, Formińska K, Wiatrzyk A, Ziółkowski R, Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. *Anal Biochem*. 2018;560:60-66.

Wspólnie opublikowane prace były podstawą do uzyskania nagrody zespołowej II stopnia im Ludwika Rajchmana przyznawanej przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny.

Poza współpracą ściśle naukową, w porozumieniu zorganizowaliśmy również praktyki w laboratorium biologii molekularnej dla studentki piątego roku studiów magisterskich.

Kopia potwierdzenia współpracy stanowi **Załącznik 7** do wniosku.

Oprócz wyżej opisanej wiodącej współpracy uczestniczyłem/uczestniczę:

w projektach prowadzonych wraz z:

- Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polska Akademia Nauk i dr Dr inż. Anna Zawistowska-Deniziak
2015-2016 „Oni tam są - czyli jak wykryć cichego mordercę” FNP 131/UD/SKILLS/2015, FNP
- Screenmed sp. z o.o.
2020-2022 “Opracowanie konstrukcji i technologii wytwarzania miniaturowych urządzeń diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusa SARS-CoV-2 w trybie POCT”, NCBiR, POIR.01.01.01-00-0638/20, NCBiR

badaniach prowadzonych wraz z:

- Instytutem Maxa Plancka (Niemcy):
Tassler S, Dobner B, Lamp P, **Ziółkowski R**, Malinowska E, Wölk C, Brezesinski G. DNA Delivery Systems Based on Peptide-Mimicking Cationic Lipids - The Effect of the Co-Lipid on the Structure and DNA Binding Capacity. Langmuir. 2019; 35 (13), 4613-4625.
- Instytutem Metrologii i Inżynierii Biomedycznej działającego przy Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej:
Pełowski A, Rathi S, Piotrowski B, **Ziółkowski R**, Janczak D, Krzemiński J, Brosch M, Jakubowska M. Electrochemistry of Graphene Nanoplatelets Printed Electrodes for Cortical Direct Current Stimulation. Frontiers in Neuroscience. 2020; 14, art. no. 594235
Ponadto byłem promotorem pomocniczym obronionej rozprawy doktorskiej dr inż. Andrzeja Pełowskiego pt: „Drukowane czujniki potencjometryczne do monitorowania pH w leczeniu ran”, promotor: prof. dr hab. inż. Małgorzata Jakubowska z Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej.
- Zakładem Procesów Rozdzielania, Laboratorium Grafenowe, działające przy Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej:
Ziółkowski R , Uścińska A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Małolepszy A, Malinowska E. Directly-thiolated graphene based electrochemical sensor for Hg(II) ion. Electrochim Acta. 2019;305:329-337.

W ostatnim czasie nawiązałem również współpracę z naukowcami z Institute of Biosciences and BioResources National Research Council of Italy – CNR we Włoszech. Efektem było złożenie wspólnego projektu badawczego do Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej, dotyczącego badań nad systemem izotermicznego powielania kwasów nukleinowych z niebadanych dotąd pod tym kątem mikroorganizmów oraz konstrukcji czujników DNA dopasowanych do tego systemu. Współpraca będzie dalej rozwijana.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

7.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Moje osiągnięcia dydaktyczne skupiają się głównie w trzech polach: prowadzeniu zajęć dydaktycznych dla studentów (12 rodzajów zajęć, **Tabela 2**), pełnieniu funkcji promotora pomocniczego prac doktorskich (2 prace, **Tabela 3**) oraz kierowania lub sprawowania opieki naukowej nad pracami dyplomowymi na stopień inżyniera lub magistra (**łącznie ponad 30 prac**), realizowanych w Politechnice Warszawskiej.

Tabela 2. Zajęcia dydaktyczne prowadzone dla studentów Politechniki Warszawskiej

Funkcja	Typ przedmiotu	Nazwa przedmiotu	Kod	Kierunek i stopień studiów	Okres
Kierownik	wykład / laboratorium	Analityczne metody instrumentalne	CH.BIOB05 / CH.BIOB18	Biotechnologia, I	2019 - obecnie
udział w prowadzeniu	wykład	Sensory i biosensory	CH.BMS1009	Biotechnologia, II	2021 - obecnie
udział w prowadzeniu	wykład	Analityczna kontrola bioprocessów	CH.BMK2001	Biotechnologia, II	2021 - obecnie
prowadzący	laboratorium	Laboratorium analizy instrumentalnej	CH.TIK4001.A	Technologia Chemiczna, I	2010 - obecnie
prowadzący	laboratorium	Chemia analityczna	IC.IK311.A	Inżynieria Chemiczna i Procesowa, I	2010 – obecnie
prowadzący	projekt	Analytical Methods in Biotechnology	CH.BMSA124.A	Biotechnologia, II	2017 – obecnie
prowadzący	laboratorium / projekt	Projektowanie metod bioanalitycznych	CH.BMS1011	Biotechnologia, II	2017 – obecnie
prowadzący	laboratorium	Podstawy analizy chemicznej i instrumentalnej	CH.PRAK33	Technologia Chemiczna, I	2019 - 2021
prowadzący	laboratorium	Laboratorium metrologii chemicznej	CH.IOB6001	Technologia Chemiczna, I	2012 – obecnie

prowadzący	laboratorium	Technologia informacyjna	CH.TIK110	Technologia Chemiczna, I	2010 – obecnie
prowadzący	laboratorium	Informatyka 1	CH.BIK206	Biotechnologia, I	2014 – obecnie
prowadzący	laboratorium	Informatyka 2	CH.BIK309	Biotechnologia, I	2014 – obecnie

W 2016 roku otrzymałem nagrodę zespołową za opracowanie dwóch nowych przedmiotów dla kierunku Biotechnologia, przeznaczonych dla studentów drugiego (Informatyka 1) oraz trzeciego (Informatyka 2) semestru. **Nagroda zespołowa stopnia II Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia dydaktyczne w latach 2014-2015.**

Tabela 3. Promotorstwo pomocnicze prac doktorskich realizowanych w Politechnice Warszawskiej

Dane doktoranta	Status studiów/przewodu	Okres
dr inż. Andrzej Peplowski	Uzyskanie stopnia doktora: 14.06.2019; tytuł: Drukowane czujniki potencjometryczne do monitorowania pH w leczeniu ran; rozprawa wyróżniona; promotor: prof. dr hab. inż. Małgorzata Jakubowska z Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej	2015 - 2019
mgr inż. Anna Szymczyk	Uczestnik II roku Szkoły Doktorskiej nr 1	2020 - obecnie

7.2. Osiągnięcia organizacyjne i popularyzujące naukę

- a) Dwa wystąpienia ustne na targach branżowych **EuroLab**:
 - 2014r „Grafen, nanocząstki, DNA...czyli nowoczesne czujniki biologiczne”
 - 2018r „Zastosowania biosensorów w układach przepływowych dedykowanych diagnostyce przyłóżkowej”
- b) W latach 2009-2019 prowadziłem zajęcia w ramach kursów:
 - "Sensory i biosensory" oraz „Sensors and Biosensors” - dla studentów Politechniki Warszawskiej, realizowanych dzięki Programowi Rozwojowemu Politechniki Warszawskiej
 - PW Junior – dla uczniów szkół podstawowych oraz gimnazjalnych organizowanych z inicjatywy Politechniki Warszawskiej oraz jej absolwentów
- c) Prowadzenie zajęć laboratoryjnych w ramach praktyk zawodowych uczniów Zespół Szkół Nr 21 w Warszawie ul. Saska 78 (od 2021 roku)

- d) Uczestnictwo w programie wolontariatu naukowego organizowanego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej wspierającego rozpoczynanie pracy badawczej studentów na wczesnych etapach studiów I stopnia (od 2017 roku)
- e) Podczas studiów na Wydziale Chemicznym (2003 rok), wraz z dwoma innymi studentami, założyłem, działające do dziś, Koło Naukowe Biotechnologów Herbion. W latach 2014-2019 pełniłem rolę opiekuna tego koła. W tym czasie wraz ze studentami z KNB Herbion m.in. pozyskaliśmy granty rektorskie na badania, przygotowaliśmy i zorganizowaliśmy pokazy prezentowane na Piknikach Naukowych Polskiego Radia na Stadionie Narodowym. Jako opiekun organizowałem oraz brałem udział w wycieczkach naukowo-dydaktycznych do zakładów przemysłowych o profilu biotechnologicznym i chemicznym.
- f) Podczas egzaminów inżynierskich prowadzonych na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pełnię funkcję członka komisji w roli eksperta w dziedzinie chemii analitycznej i nieorganicznej (2017 – obecnie)
- g) Udział w organizowaniu konferencji: Biotechnologia - od badań podstawowych do konstrukcji systemów analitycznych i produkcji nowych leków, 2014, Warszawa, Polska
- h) Członek komisji rekrutacyjnej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej (2021 – obecnie)
- i) Członek Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej (2020 – obecnie)

8. Inne informacje, ważne z punktu widzenia wnioskodawcy, a dotyczące jego kariery zawodowej

8.1. Wykaz krajowych nagród i wyróżnień naukowych

- **za osiągnięcia naukowe**

2021	Nagroda zespołowa II stopnia Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny im. Ludwika Rajchmana
2018	Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w 2016-2017
2016	Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w 2015 roku
2015	Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w latach 2013-2014
2014	Nagroda zespołowa II stopnia Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w latach 2012-2013
2011-2012	Stypendium doktoranckie Samorządu Województwa Mazowieckiego

- **za osiągnięcia dydaktyczne**

2015 Nagroda zespołowa stopnia II Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia
dydaktyczne w latach 2014-2015

8.2. Kursy, warsztaty, szkolenia

- 10.2015 Lund, Szwecja, TransFormation.doc, szkolenie z przedsiębiorczości i umiejętności miękkich niezbędnych do współpracy z gospodarką
- 11.2014 Wrocław, kurs Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Komercjalizacja wyników prac badawczych”
- 09.2014 Kraków, kurs Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Prezentacja wyników badań naukowych”
- 03.2014 Poznań, kurs Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Negocjacje dla naukowców”
- 02.2014 Gdańsk, kurs Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Zarządzanie zespołem naukowym”
- 06.2007 Poznań, „Szkola letnia biologii molekularnej”
- 09.2006 Warszawa, Zakład Genetyki Molekularnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego – szkolenie „Bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR”
- 09.2006 Lublin, Szkoła letnia, „Podstawy hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych”
- 06.2006 Warszawa, Zakład Genetyki Molekularnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego - szkolenie „Metody wykrywania mutacji punktowych” Warszawa
- 03.2006 Warszawa, Zakład Genetyki Molekularnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego – szkolenie „Metody izolacji DNA oraz polimorfizm STR w genotypowaniu, Warszawa”
- 07.2004 Warszawa, Laboratorium Biotechnologii, Instytut Chemii Przemysłowej
- 10.2003 Warszawa, Laboratorium mikrobiologiczne a Unia Europejska – szkolenie organizowane przez Centrum Mikrobiologii Klinicznej, Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej oraz Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego



(podpis wnioskodawcy)