

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej



mgr Anna Pachuta

Nr albumu: 1070979

***Biosensor z układem mikrofluidycznym – badanie
immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą
metody spektroskopii impedancyjnej***

Praca doktorska na kierunku Biofizyka, dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych,

dyscyplina: nauki fizyczne

Promotor: prof. dr hab. Jakub Rysz

Kraków 2023

Oświadczenie

Ja niżej podpisana mgr *Anna Pachuta* (nr indeksu: 1070979) oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „Biosensor z układem mikrofluidycznym – badanie immobilizacji białek do podłoża polimerowych za pomocą metody spektroskopii impedancyjnej” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr hab. *Jakuba Rysza*. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia

.....

Podpis doktorantki

Spis treści

Streszczenie.....	5
Abstract.....	6
Wstęp.....	7
1. Budowa białek	9
1.1 Aminokwasy	10
1.2 Łączenie aminokwasów - wiązanie peptydowe	12
1.3 Struktury białek.....	13
1.4 Podział i funkcje białek.....	15
2. Metody wytwarzania cienkiej warstwy polimerowej na powierzchni.....	18
3. Adsorpcja białek	19
3.1 Imobilizacja protein	19
3.1.1 Fizyczna adsorpcja	21
3.1.2 Wiązanie kowalencyjne	21
3.1.3 Wiązanie specyficzne.....	24
3.2 Czynniki wpływające na adsorpcję białek	27
3.1.2 Środowisko zewnętrzne	28
3.2.2 Właściwości białek i ich wpływ na adsorpcję.....	29
3.2.3 Własności powierzchni i jej wpływ na adsorpcję	32
3.3 Desorpcja i wymiana białek.....	33
3.4 Bioczułnik - proces adsorpcji białek	33
4. Zastosowane metody badawcze	35
4.1 Spektroskopia Impedancyjna	35
4.2 Spektrometria Mas Jonów Wtórnych (ToF-SIMS).....	40
4.3 Mikroskopia fluorescencyjna	42
5. Zastosowane białka	45
5.1. Albumina wołowa (BSA).....	45
5.2 Immunoglobulina G	45
5.3 Streptawidyna.....	46
5.4 Biotyna (biotynylowane BSA – bBSA)	47
5.5 Białko C-reaktywne (CRP)	47
6. Wstęp do bioczułników.....	48
6.1 Rodzaje bioczułników	49
6.1.1 Znakowane bioczułniki	50
6.1.1.1 Znakowanie fluorescencyjne.....	50

6.1.1.2 Znakowanie izotopowe	51
6.1.1.3 Znakowanie nanocząsteczkami	52
6.1.1.4 Test immunoenzymatyczny (ELISA).....	53
6.1.2 Nieznakowane bioczuJNIki	55
6.1.2.1 BioczuJNIk oparty na tranzystorze polowym (Bio-FET).....	55
6.1.2.2 Optyczne bioczuJNIki	56
6.1.2.3 BioczuJNIk beleczkowy	58
6.2 Parametry techniczne bioczuJNIków	59
Część eksperymentalna.....	61
7. Cel pracy	61
7.1 Badania wstępne – konstrukcja układu i pomiary impedancyjne	62
7.1.1 Podłoża krzemowe SiO ₂ z elektrodami złotymi.....	62
7.1.2 Podłoża szklane z elektrodami ITO	66
7.1.3 Podłoża szklane z elektrodami ITO – pomiary w układzie mikrofluidycznym typu I – dobór polimeru.....	68
7.1.4 Podłoża szklane z elektrodami ITO – pomiary w układzie mikrofluidycznym typu I – immunoreakcja	76
7.1.4.1 Mikroskopia Fluorescencyjna – wyniki dla immunoreakcji	79
7.1.5 Wpływ amplitudy pola mierzącego na widma impedancyjne.....	80
7.2 Pomiary w układzie mikrofluidycznym typu II	89
7.3 Badania adsorpcji białek metodą TOF-SIMS	94
7.4 Prototyp biosensora – pomiary przesunięcia kąta fazowego.....	97
7.4.1 Konkurencja i desorpcja białek na podłożu	105
8. Podsumowanie i wnioski.....	109
Bibliografia	111
Spis rysunków.....	123

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było stworzenie taniego i prostego nieoznakowanego biosensora, który będzie działał w czasie rzeczywistym i będzie wykorzystywał pomiary impedancji do badania procesu adsorpcji białek i reakcji wiązania specyficznego między nimi. Biosensor taki może mieć potencjalne zastosowania w różnych dziedzinach, takich jak biotechnologia, medycyna czy produkcja i testowanie żywności. Podczas pracy nad projektem opracowano metodę pozwalającą na wykrycie i zidentyfikowanie różnych białek, wykorzystującą ich charakterystyczne właściwości impedancyjne. Urządzenie działa w czasie rzeczywistym, co pozwala na szybką analizę próbek.

Aby obniżyć koszty produkcji biosensora zdecydowano o wykorzystaniu cienkich warstw polimerowych do budowy przetworników zawierających warstwę aktywną. W pierwszej kolejności sprawdzono możliwość wykorzystania komercyjnie dostępnych podkładów Si/SiO₂ z elektrodami złotymi oraz szklanych z elektrodami ITO. Badania wykazały przewagę podłoży szklanych z elektrodami ITO. W trakcie badań sprawdzono również możliwość wykorzystania różnych polimerów. Najlepsze wyniki uzyskano dla cienkich warstw polistyrenu (PS).

W pierwszej kolejności sprawdzono możliwość analizy procesu adsorpcji białek z wykorzystaniem warstw, które były suszone. Kolejnym krokiem było zbudowanie układu mikrofluidycznego typu I, umożliwiającego wprowadzenie roztworu białka do komory mikrofluidycznej i badanie jego interakcji z powierzchnią biosensora. Układ typu I pozwalał na analizę zmian zachodzących na pojedynczej elektrodzie do czego wykorzystywany był spektrometr impedancyjny Agilent 4294A.

Kolejnym etapem było zbudowanie układu mikrofluidycznego typu II, umożliwiającego równoczesną analizę na dwóch elektrodach – badanej oraz referencyjnej. W pomiarach wykorzystywano układ dwóch spektrometrów Agilent 4294A wyzwalanych jednocześnie.

Rezultatem pracy jest opracowany prototyp biosensora, który umożliwia obserwację w czasie rzeczywistym reakcji specyficznego białko-białko poprzez rejestrację różnicy faz sygnałów z dwóch elektrod: badanej i referencyjnej. System detekcji został zbudowany z wykorzystaniem taniego i łatwo dostępnego układu elektronicznego AD8302 oraz układu mikroprocesorowego STM32F2. W biosensorze zastosowano przetwornik zawierający cienkie warstwy polimerowe pokryte odpowiednimi białkami, które zostały przygotowane na podłożach szklanych z elektrodami ITO. Taka konstrukcja umożliwia łatwy recykling i ponowne wykorzystanie podłoży, co znacznie obniża koszty pojedynczego badania.

Abstract

The aim of the present work was to develop a low-cost and simple unlabeled biosensor that will operate in real time and use impedance measurements to study the process of protein adsorption and specific binding reactions between proteins. Such a biosensor has potential applications in various fields like biotechnology, medicine or food production and testing. While working on the project, a method was developed to detect and identify various proteins using their characteristic impedance properties. The device operates in real time, allowing rapid analysis of samples.

In order to reduce the cost of manufacturing the biosensor, it was decided to use polymer thin films for the construction of transducers containing the active layer. First, the possibility of using commercially available Si/SiO₂ substrates with gold electrodes and glass substrates with ITO electrodes was tested. The study showed the advantage of glass substrates with ITO electrodes. Same studies also tested the possibility of using different polymers. The best results were obtained for polystyrene (PS) thin films.

As a first step, the possibility of analyzing the protein adsorption process using dried layers was checked. The next step was to build a type I microfluidic system, enabling the introduction of a protein solution into the microfluidic chamber and studying its interaction with the surface of the biosensor. The type I system allowed analysis of changes occurring on a single electrode for which an Agilent 4294A impedance spectrometer was used.

The next step was the construction of a type II microfluidic system, allowing simultaneous analysis at two electrodes - the test electrode and the reference electrode. The measurements used a system of two Agilent 4294A spectrometers triggered simultaneously.

The result of the work is a developed prototype biosensor that allows real-time observation of the specific protein-protein reaction by recording the phase difference of signals from two electrodes: the test and reference. The detection system was built using a low-cost and readily available AD8302 electronic circuit and an STM32F2 microprocessor chip.

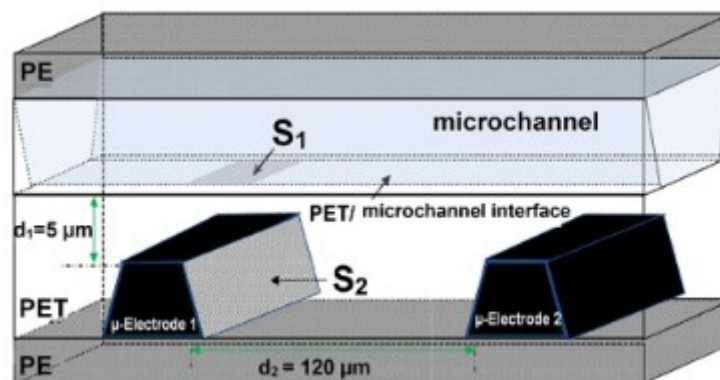
The biosensor uses a transducer containing thin polymer layers coated with appropriate proteins, which were prepared on glass substrates with ITO electrodes. This design allows easy recycling and reuse of the substrates, which significantly reduces the cost of a single test.

Wstęp

W niniejszej pracy opisano przygotowanie prostego biosensora opartego na podkładach podobnych do tranzystorów polowych z cienką warstwą izolatora, którą pełni polimer. Poszukiwano metody tworzenia układów elektronicznych, które gwarantowałyby powtarzalność w przygotowaniu biosensora z cienką warstwą polimerową z osadzonymi białkami oraz metody pomiaru przebiegu procesów fizycznych zarówno podczas osadzania samych białek jak i reakcji między nimi.

Rozwój technologii mikroczipów cieczowych spowodował duże zainteresowanie materiałami polimerowymi ze względu na ich dobre właściwości biochemiczne i niski koszt. Często stosowaną metodą badania takich układów jest Spektroskopia Impedancyjna, która pozwala na obserwację impedancji w roztworze. Największą zaletą tej metody jest możliwość przeprowadzania charakteryzacji *in situ* w celu uzyskania kilku parametrów fizycznych.

W pracach Kechadiego, et al. [1] [2] [3] [4] opisano nową metodologię bezkontaktowej impedancji roztworu w układzie mikroczipu polimerowego uwzględniając rolę, jaką odgrywa na dokładność impedancji otaczający polimer. Zbudowany mikroczip składał się z dwóch mikroelektrod wytworzonych na drodze fotoablacji światłem UV pokrytych nanocząsteczkami złota oraz mikrokanalu z politereftalanu etylenu (PET) o trapezoidalnym przekroju poprzecznym:



Rysunek 1 Schematyczne przedstawienie interfejsu PET-mikrokanal-mikroelektrody [1]

Pomiary elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej w pracach Kechadiego [1] [2] przeprowadzano przykładając przez mikroelektrody napięcie zmienne o stałej amplitudzie z daną częstotliwością, mierzono w ten sposób całkowitą impedancję czujnika. Konkluzją jest, że wyniki pomiarów impedancji pomiędzy dwiema mikroelektrodami zależą od stanu powierzchni kanału przepływowego oraz od adsorpcji zachodzącej na ściankach kanału przepływowego. Pomiary impedancji przeprowadzano na pustym i wypełnionym

roztworem urządzenia w celu zrozumienia wkładu samej impedancji materiału polimerowego PET. Urządzenie stworzone przez Kechadiego przedstawiono na Rysunku 1 przedstawiającego schematyczny interfejs PET-mikrokanal-mikroelektroda użytego do badań. Podobne badania przeprowadzono w niniejszej pracy doktorskiej w celu wyeliminowania wpływu preparatyki na eksperyment. Praca Kechadiego [1] wykazała, że bezkontaktowe pomiary impedancji mogą być z powodzeniem realizowane w izolowanym polimerze budującym podłoże mikroczipa, co miało wpływ na wybór izolatora w tej pracy.

Zastosowanie bioanalityczne powyższych badań wykorzystano w innych pracach autora prowadzonych przy stałej częstotliwości w obszarze impedancji międzyfazowej w celu monitorowania adsorpcji białek na powierzchni polimeru [2] w mikrokanale mikroczipa. Modelowanie interfejsu mikroprocesora za pomocą odpowiedniego schematu zastępczego obwodu elektrycznego pozwala na wyodrębnienie wartości pojemności międzyfazowej dla niskiego stężenia białka. W innej pracy [3] przedstawiono rozwój monitorowania w czasie rzeczywistym wiązania białek na podłożu polimerowym. Zastosowano elektryczną spektroskopię impedancyjną do monitorowania biomolekularnej detekcji dwóch ligandów na izolowanym podłożu. Wytworzono czułą na niskie stężenia białek powierzchnię z mikroelektrodami oddzielonymi polimerem od roztworu co pozwoliło na uniknięciu niespecyficznej na ich powierzchni adsorpcji.

Skonstruowany i opisany w tej pracy prosty układ biosensora został stworzony w celu przedstawienia nowego podejścia do badań immobilizacji białek na podłożach polimerowych w oparciu o wyżej opisanych eksperymentach wykorzystując metodę spektroskopii impedancyjnej.

1. Budowa białek

Białka są najbardziej uniwersalnymi makrocząsteczkami w żywych systemach i pełnią strategiczne funkcje przeważnie we wszystkich procesach biologicznych. Funkcjonują jako katalizatory, transportują i magazynują inne cząsteczki, m.in. tlen, zapewniają wsparcie mechaniczne i ochronę immunologiczną, generują ruch, przekazują impulsy nerwowe oraz kontrolują wzrost i różnicowanie. Kilka zasadniczych właściwości umożliwia białkom udział w tak szerokim zakresie funkcji.

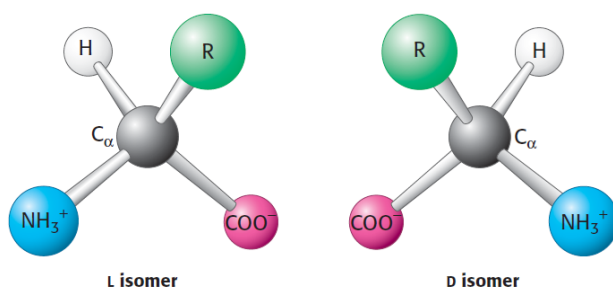
Białka są liniowymi polimerami zbudowanymi z jednostek monomeru zwanych aminokwasami. Funkcja białka zależy bezpośrednio od jego trójwymiarowej struktury. Białka spontanicznie składają się w trójwymiarowe struktury, które są określone przez sekwencję aminokwasów w polimerze białkowym. Białka są przykładem przejścia od jednowymiarowego świata sekwencji do trójwymiarowego świata cząsteczek zdolnych do różnych działań.

Białka zawierają szeroki zakres grup funkcjonalnych: alkohole, tiole, tioetery, kwasy karboksylowe, karboksamidy i różne grupy zasadowe. W połączeniu w różnych sekwencjach ten zestaw grup funkcyjnych odpowiada za szerokie spektrum funkcji białka. Reaktywność chemiczna związana z tymi grupami jest niezbędna do funkcjonowania enzymów, białek katalizujących określone reakcje chemiczne w układach biologicznych. Białka mogą wchodzić w interakcje ze sobą oraz z innymi biologicznymi makrocząsteczkami, tworząc złożone zespoły. Białka w tych zespołach mogą działać synergicznie, generując możliwości, których nie zapewniają poszczególne białka składowe. Zespoły te obejmują układy makrocząsteczkowe, które przeprowadzają dokładną replikację DNA, transmisję sygnałów w komórkach i wiele innych niezbędnych procesów.

Niektóre białka są dość sztywne, podczas gdy inne wykazują ograniczoną elastyczność. Sztywne jednostki mogą funkcjonować jako elementy strukturalne w cytoszkieletcie (rusztowanie wewnątrz komórek) lub w tkance łącznej. Części białek o ograniczonej elastyczności mogą działać jako zawiasy, sprężyny i dźwignie, które są kluczowe dla funkcji białka, łączenia białek ze sobą i innymi cząsteczkami w złożone jednostki oraz do przekazywania informacji w obrębie komórek i między nimi.

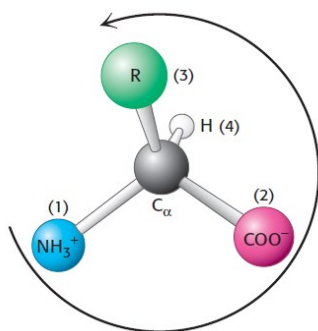
1.1 Aminokwasy

Aminokwasy są podstawowym budulcem białek, α -aminokwas zawiera centralny atom węgla (α -węgiel), który jest połączony z grupą aminową, grupę kwasu karboksylowego, atom wodoru i charakterystyczną grupę R (tzw. łańcuch boczny). Te grupy są połączone z tetraedrycznym atomem węgla tworzą chiralny α -aminokwas, który może istnieć w dwóch postaciach odbicia lustrzanego, zwanych L i D izomerem co przedstawiono na Rysunku 2:



Rysunek 2 Izomery L i D aminokwasu. Litera R odnosi się do łańcucha bocznego.
Izomery L i D to wzajemne odbicie lustrzane [5]

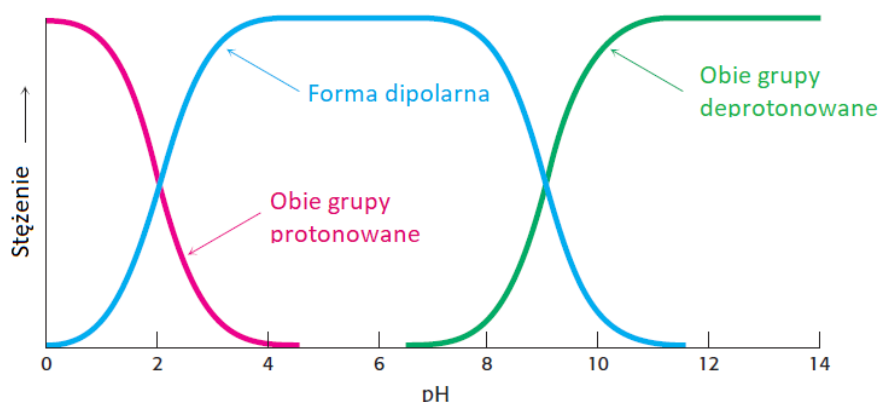
Jedynie izomer L jest obecny w białkach, ponieważ jest lepiej rozpuszczalny niż racemat izomerów L i D. Dla większości białek, izomer L ma konfigurację absolutną S. Na Rysunku 3 przedstawione są strzałki przeciwne do kierunku ruchu wskazówek zegara, które wskazują na najwyższy i najniższy priorytet podstawników w związku chiralnym.



Rysunek 3 Konfiguracja absolutna S aminokwasu L [5]

Aminokwasy w roztworze o neutralnym pH występują głównie jako dipolarne jony (zwane także obojnaczymi). W formie dipolarnej grupa aminowa jest protonowana ($-\text{NH}_3^+$), a grupa karboksylowa jest deprotonowana ($-\text{COO}^-$). Stan jonizacji aminokwasu zmienia się w zależności od pH: w kwaśnym środowisku grupa aminowa ($-\text{NH}_3^+$) jest protonowana a grupa karboksylowa ($-\text{COOH}$) nie jest zdysocjonowana. Wraz ze wzrostem pH kwas karboksylowy w pobliżu punktu izoelektrycznego $\text{pK}_a=2$ oddaje proton. Forma dipolarna zostaje

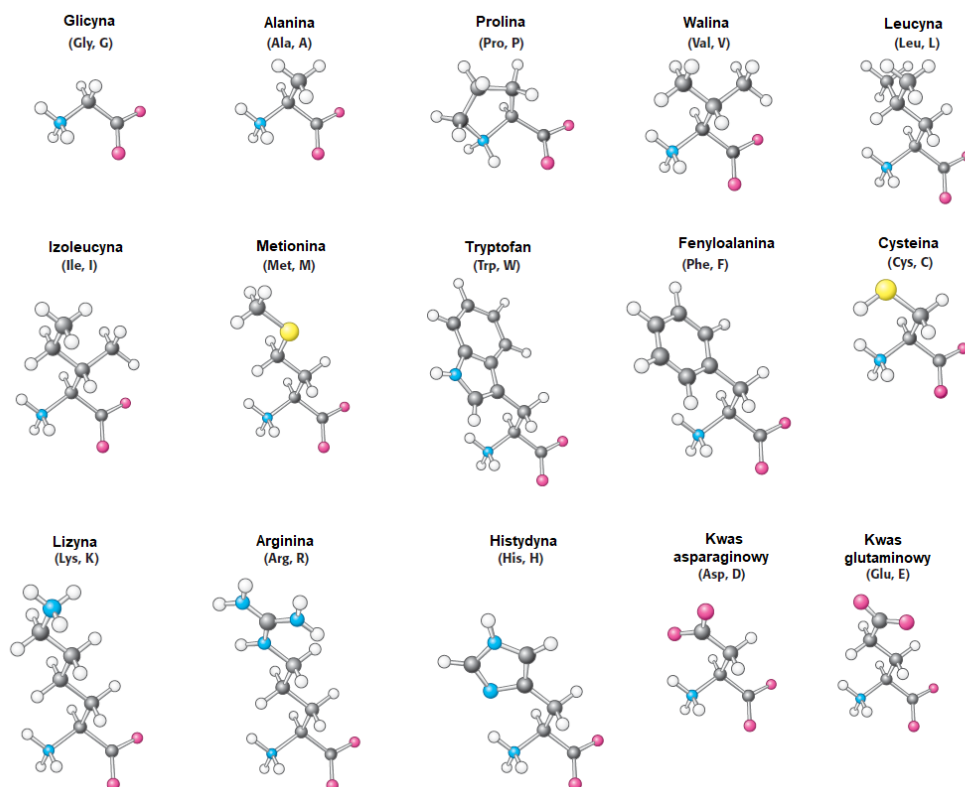
utrzymana do $\text{pH}=9$, gdzie protonowana grupa aminowa traci proton. Na Rysunku 4 przedstawiono zależność stanu jonizacji aminokwasu od wartości pH otoczenia:



Rysunek 4 Stan jonizacji aminokwasu w funkcji pH [5]

W białkach spotykanych jest dwadzieścia rodzajów łańcuchów bocznych różniących się wielkością, kształtem, ładunkiem, zdolnością do wiązania wodorowego, hydrofobowym charakterem i reaktywnością chemiczną. Aminokwasy można podzielić na 4 podstawowe grupy:

1. Hydrofobowe aminokwasy z niepolarnymi grupami R (glicyna, alanina, walina, leucyna, izoleucyna, metionina, prolina, tryptofan, fenyloalanina).
2. Aminokwasy polarne z neutralnymi grupami R, z nierównomiernie rozmieszczonym ładunkiem (cysteina, seryna, treonina, tyrozyna, glutamina, asparagina).
3. Dodatnio naładowane aminokwasy z grupami R, które mają ładunek dodatni przy fizjologicznym pH (lizyna, arginina, histydyna).
4. Ujemnie naładowane aminokwasy z grupami R, które mają ujemny ładunek w fizjologicznym pH (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy);



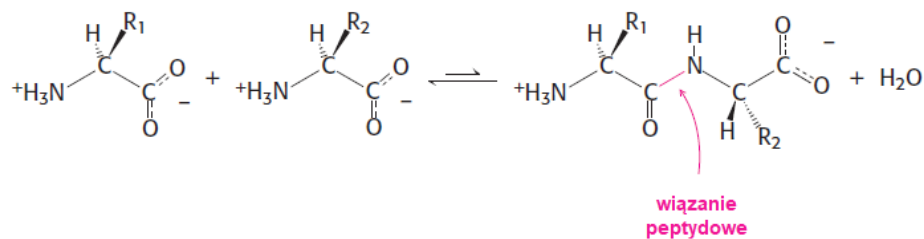
Rysunek 5 Struktury wybranych aminokwasów [5]

1.2 Łączenie aminokwasów - wiązanie peptydowe

Białka są liniowymi polimerami utworzonymi przez połączenie grupy α -karboksylowej jednego aminokwasu z grupą α -aminową innego aminokwasu. Przykładowe struktury aminokwasów przedstawiono na Rysunku 5. Ten rodzaj wiązania nazywa się wiązaniem peptydowym lub wiązaniem amidowym i jest wiązaniem kowalencyjnym. Tworzeniu dipeptydu z dwóch aminokwasów towarzyszy odwodnienie, czyli utrata cząsteczek wody [6]. Podczas wiązania jeden z aminokwasów tworzy grupę karboksylową (poprzez utratę grupy hydroksylowej) zaś drugi aminokwas traci ze swojej grupy aminowej cząsteczkę wodoru. Grupa hydroksylowa jest zastępowana przez azot w ten sposób powstaje wiązanie peptydowe. Rozmieszczenie ładunku po stronie azotu i węgla powoduje powstanie dipola elektrycznego, co sprawia, że wiązanie to jest sztywne. Pozostałe wiązania atomów węgla, znajdujących się wewnątrz każdego aminokwasu, mogą swobodnie się obracać. Stąd połączenie wielu aminokwasów tworzy sztywny łańcuch wokół wiązania peptydowego, które są połączone elastycznymi wiązaniami węglowymi. Tworzenie wiązania peptydowego zostało zobrazowane na Rysunku 6.

Możliwość zginania i obracania łańcucha pozwala na tworzenie wielu skomplikowanych konformacji. Równowaga tej reakcji leży po stronie hydrolizy

a nie syntezy w większości przypadków stąd biosynteza wiązań peptydowych wymaga wkładu energii [7]. Wiązania peptydowe są kinetycznie stabilne, ponieważ stopień hydrolizy jest dość niski (wiązanie peptydowe jest bardzo długotrwałe). Formalne wiązanie peptydowe powstaje w rybosomach, które katalizują proces tworzenia wiązania.



Rysunek 6 Tworzenie wiązania peptydowego z utratą cząsteczki wody [5]

Podstawowymi makrostrukturami złożonymi z aminokwasów są: *peptydy* (połączenie z minimum 2 reszt aminokwasowych), *oligopeptydy* (złożone do 10 reszt aminokwasowych), *polipeptydy* (złożone z powyżej 10 reszt aminokwasowych) [8]. Białka są skomplikowanymi strukturami, zbudowanymi z szeregowo połączonych reszt aminokwasów liczonych w tysiącach. W każdym organizmie schemat budowy białek jest taki sam; w genomie, który odzwierciedla dokładną sekwencję aminokwasów, znajdują się kodony charakteryzujące poszczególny aminokwas. Ta sekwencja aminokwasów stanowi dane białko o poszczególnych właściwościach. Tak więc tworzenie białek polega na nieskończonej kombinacji i wiązaniu aminokwasów a grupy peptydowe w białkach tworzą szkielety. Rodzaj dołączonej grupy peptydowej do danego aminokwasu, powoduje zginanie i zwijanie się cząsteczki w złożone struktury.

1.3 Struktury białek

Białka składają się z jednego lub więcej łańcuchów polipeptydowych, polimerów i reszt aminokwasowych. Wyróżnić można cztery podstawowe, poziomy strukturyzacji białek; pierwszo-, drugo-, trzecio- i czwartorzędowa.

- Struktura pierwszorzędowa białka to sekwencja liniowa aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym, opisuje kolejność aminokwasów w danym białku.
- Struktura drugorzędowa białka to trójwymiarowa konformacja poszczególnych części polipeptydu, wyróżniamy dwie konformacje przestrzenne struktury drugorzędowej białka: α -helisę (powstała po spiralnym, prawoskrętnym zwinięciu łańcucha polipeptydowego, utrwalona wiązaniami wodorowymi), oraz β -harmonijka (powstała po przestrzennym rozkładzie aminokwasów, w wyglądzie przypominająca

pofalowaną kartkę, utrwalona wiązaniami wodorowymi) [9], dodatkowo wyróżnić można trzeci element strukturalny białek; *β -zakręt*, czyli fragment struktury białkowej umożliwiający zwrot kierunku łańcucha polipeptydowego, co umożliwia gęste upakowanie białek.

- c) Struktura trzeciorzędowa to wzajemna, trójwymiarowa organizacja składowych części struktury drugorzędowej (α -helisy, β -harmonijki i pozostałych zmiennych fragmentów), utrwalona wiązaniami wodorowymi, wiązaniami Van der Waalsa, oddziaływaniami jonowymi oraz mostki dwusiarczkowe.
- d) Struktura czwartorzędowa białka to najbardziej skomplikowany poziom strukturyzacji, pozwalający na opisanie budowy białek. Charakteryzuje wzajemną, trójwymiarową organizację połączonych ze sobą m.in. fragmentów polipeptydu niezwiązanych żadnym wiązaniem oraz grup protetycznych, czyli niebiałkowych składników protein (np. enzymy) [10]. Struktura czwartorzędowa dotyczy tylko tych białek, które składają się z co najmniej dwóch łańcuchów polipeptydowych (podjednostek), są to tak zwane białka subunitowe (wielopodjednostkowe). Białka te mogą składać się z takich samych (homoeryczne) lub różnych (heterohemiczne) podjednostek.

Białka, które są wydzielane przez komórkę lub są przytwierdzone do zewnątrzkomórkowej powierzchni błony plazmatycznej, mogą podlegać bardziej ekstremalnym warunkom niż te występujące w białkach wewnątrzkomórkowych. Wiązania kowalencyjne stabilizują te białka, łącząc określone aminokwasy w obrębie polipeptydu lub między łańcuchami polipeptydowymi z wieloma podjednostkami. Zazwyczaj takie połączenie będzie kowalencyjnym wiązaniem siarka – siarka, które utworzy się między grupami ($-SH$) dwóch reszt cysteinowych, które znajdują się w bliskiej odległości od złożonego białka. Te kowalencyjne wiązania, nazywane wiązaniami disiarczkowymi, nie wpływają na konformację białka i powstają dopiero po zakończeniu składania. Działają zatem w celu zabezpieczenia konformacji i zwiększenia stabilności białka [11].

Większość białek ma kształt kulisty, istnieją jednak inne rodzaje białek, np. białka włókniste. Włókniste, wydłużone w swym kształcie białka pełnią w komórce głównie rolę strukturalną. Włókna wraz z mikrotubulami i mikrofilementami (które składają się z białek o kształcie kulistym) tworzą w komórce swoisty cytoszkielet. Innym przykładem białek o kształcie innym niż kulisty jest elastyna, w której polipeptydy tworzą usiatkowaną strukturę. Kolagen natomiast (zawierający białka włókniste) tworzy struktury, zbudowane z potrójnej helisy, podobne do ułożonych wzdłuż kabli, chroniąc tym samym komórkę [12].

1.4 Podział i funkcje białek

Białka można podzielić na dwie główne grupy: białka proste (składające się wyłącznie z aminokwasów) i złożone (są to proste białka połączone z substancją niebiałkową stanowiącą grupę prostetyczną uaktywniające białko). W Tabeli 1 przedstawiono ogólny podział białek ze względu na budowę i skład:

Tabela 1 Podział białek

<u>Białka proste:</u>	
Albuminy	Białka obojętne, hydrofilowe, rozpuszczalne w rozcieńczonych roztworach soli. Przykładami są <i>albumina surowicy</i> , <i>albumina mleka</i> i <i>albumina jaja kurzego</i> .
Globuliny	Są nierozpuszczalne w wodzie, ale rozpuszczalne w rozcieńczonych obojętnych roztworach soli. Stanowią główną część osocza krwi, odpowiedzialne za funkcje odpornościowe. Do tej grupy zaliczane są <i>immunoglobuliny</i> .
Gluteiny	Białka roślinne, rozpuszczalne w rozcieńczonych kwasach i zasadach, nierozpuszczalne w wodzie i obojętnych rozpuszczalnikach. Przykładem jest <i>gluteina</i> składnik pszenicy.
Prolaminy	Białka roślinne, rozpuszczalne w 70% alkoholu, nierozpuszczalne w wodzie, alkoholu bezwodnym i innych obojętnych rozpuszczalnikach. Głównie białka pełniące funkcję zapasową.
Histony	Są rozpuszczalne w wodzie i bardzo rozcieńczonych kwasach, nierozpuszczalne w rozcieńczonym wodorotlenku amonu. Składnik chromatyny w jądrze komórkowym [13].
Globiny	Są przykładami histonów, ale są często wyodrębnianą grupą, ponieważ nie są zasadowe jak histony i nie są wytrącane wodorotlenkiem amonu, np. <i>globiny w hemoglobinie</i> .
Protaminy	Najprostsze białka, duże polipeptydy bogate w podstawowe aminokwasy, są zasadowe. Rozpuszczalne w wodzie lub wodorotlenku amonu. Pełnią ważną funkcję w spermatogenezie [14].
Albuminoidy (Skleroproteiny)	Są nierozpuszczalne we wszystkich obojętnych rozpuszczalnikach, rozcieńczonych kwasach oraz zasadach, występują w tkankach podporowych, takich jak kości, chrząstki, rogi, paznokcie itp. (przykładami są m.in. <i>keratyna</i> , <i>kolagen</i>)

<u>Białka złożone:</u>	
Nukleoproteiny	Kombinacje prostych podstawowych białek: protamin lub histonów z kwasami nukleinowymi (DNA lub RNA) związane kowalencyjnie lub jonowo. Wykazują rozpuszczalność w rozcieńczonym NaCl. Przykładem są <i>rybosomy</i> biorące udział w produkcji innych białek w procesie translacji.
Glikoproteiny i mukoproteiny	Glikoproteiny to proste białka połączone z węglowodanami (glikozoaminoglikany - GAG). Glikozaminoglikany mogą być kwasem hialuronowym, siarczanami chondroityny lub heparyną. Glikoproteiny w swym składzie obejmują mniej niż 4% węglowodanów. Niektóre białka osocza, takie jak <i>fibrynogen</i> , <i>transferyna</i> są glikoproteinami zawierającymi różne ilości węglowodanów. Mukoproteiny zawierają ponad 4% węglowodanów. Większość mukoprotein jest rozpuszczalna w wodzie, np. te znajdujące się w surowicy, białko jaja kurzego. Są obecne w ścięgnach, kościach i chrząstce.
Fosfoproteiny	Białka kwasowe, zawierają kwas fosforowy, łączą się z wapniem, dlatego występują przy urazach kostnych. Przykładem jest <i>kazeina</i> białko zwierzęce stanowiące 75% składników mleka.
Chromoproteiny	Proste białka połączone z barwnymi grupami prostetycznymi, głównie hemoproteinami np. hemoglobina, flawoproteinami i cytochromami. Przykładem jest <i>rodopsyna</i> barwnik znajdujący się w siatkówce oka, odpowiedzialna za nocne widzenie.
Lipoproteiny	Składają się z białek połączonych z kwasami tłuszczowymi. Rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych i nierozpuszczalne w wodzie. Metabolizują tłuszcze. W skład tych białek wchodzi m.in. cholesterol (HDL i LDL) oraz trójglicerydy.
Metaloproteiny	Białka zawierające pierwiastki metaliczne, takie jak żelazo, kobalt, mangan, cynk, obecne m.in. w <i>ferroksydazie</i> (miedź), <i>transferynie</i> (żelazo). Białka hemowe zawierające żelazo, które są klasyfikowane jako chromoproteiny, są również zaliczane do tej grupy.

Białka są odpowiedzialne za szereg skomplikowanych biochemicznie reakcji Tabela 2 w tym odpowiedzi immunologicznej w żywych organizmach. Są jedną z najliczniejszych grup makromolekuł organicznych w żywych systemach. Ich struktury oraz funkcje odbiegają od siebie, ale każda pojedyncza komórka zawiera tysiące białek, które są swoiście wyspecjalizowane w swoich rolach.

Tabela 2 Przykłady białek i ich funkcje

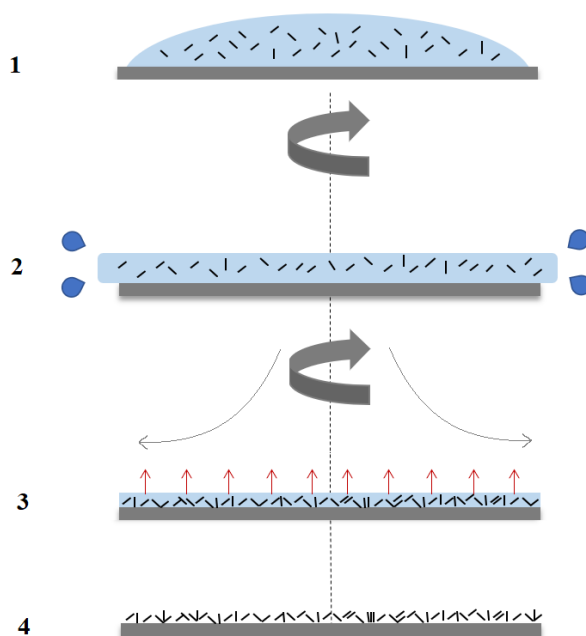
Rodzaj białka:	Rola:
Enzymy	Katalizatory reakcji biochemicznych (np. enzymy trawienne: np. <i>amylaza ślinowa</i> (trawienie węglowodanów), <i>lipaza trzustkowa</i> (rozkład trójglicerydów do kwasów trzustkowych i glicerolu).
Hormony	Cząsteczki sygnałowe; regulują, modyfikują i kontrolują działanie innych komórek w organizmie: np. <i>insulina</i> (metabolizm węglowodanów), <i>kortykotropina</i> (pobudzanie kory nadnerczy do funkcji wydzielniczej) [15].
Białka transportowe	Białka transportujące związki chemiczne do komórek i tkanek, np. <i>hemoglobina</i> (transport tlenu we krwi), <i>transferyna</i> (transport żelaza we krwi).
Białka budulcowe	Składniki budulcowe tkanej, np. <i>kolagen</i> (główny składnik strukturalny w tkankach łącznych, znajduje się m.in. w chrząstce stawowej), <i>elastyna</i> (rozciągliwe białko hydrofobowe budujące m.in. ścięgna, naczynia i tkankę płucną), <i>keratyna</i> (budulec skóry oraz jej wytworów: rogów, włosów, paznokci).
Immunoglobuliny	Biorą udział w odpowiedzi immunologicznej, wydzielane przez pobudzone limfocyty B są makromolekułami rozpoznającymi antygeny (bakterie, wirusy lub ich części), np. <i>IgG</i> (wiążą białka patogenowe i ich pochodne), <i>IgE</i> (wywołują reakcje alergiczne, odpowiedzialne za zwalczanie pasożytów) [16].
Białka receptorowe	Białka uczestniczące w przekazywaniu impulsów nerwowych, występują w neuroprzekaznikach.
Białka motoryczne	Białka generujące ruch przy wykorzystaniu energii z hydrolizy ATP, np. <i>aktyna</i> (zapewnia zmiany kształtu i ruchy komórek), <i>miozyna</i> (odpowiedzialne za skurcz tkanki mięśniowej), <i>kinezyna</i> (białko odpowiedzialne za transport wewnątrzkomórkowy organelli).

2. Metody wytwarzania cienkiej warstwy polimerowej na powierzchni

Powlekanie podłoża za pomocą metody spin coating'u jest powszechną techniką nakładania cienkich warstw na podłoża. Gdy roztwór danego materiału i rozpuszczalnika jest wirowany z dużą prędkością, siła dośrodkowa i napięcie powierzchniowe cieczy tworzą równomierne pokrycie powierzchni. Po odparowaniu jakiegokolwiek, pozostałego rozpuszczalnika pozostaje warstwa o grubości od kilku nanometrów do kilku mikronów. Na Rysunku 7 przedstawiono etapy powlekania powierzchni stałych metodą spin coating'u:

- Najpierw podłoże jest pokrywane roztworem zawierającym cząsteczki rozpuszczone w rozpuszczalniku (1).
- Następnie podłoże obraca się z dużą prędkością, a większość roztworu jest odrzucana z boku (2).
- Następnie odparowuje większość rozpuszczalnika, pozostawiając warstwę (3), która całkowicie wyschnie, pozostawiając cząsteczki na powierzchni podłoża (4).

Obrót podłoża z dużą prędkością, zwykle osiągającym 10 obrotów na sekundę (600 rpm), powoduje powstanie siły dośrodkowej, która w połączeniu z napięciem powierzchniowym roztworu, prowadzi do ciągłego pokrycia powierzchni podłoża w równomierną warstwę materiału. W trakcie pokrywania, rozpuszczalnik odparowuje, pozostawiając pożądany materiał na powierzchni podłoża w równomiernym pokryciu.



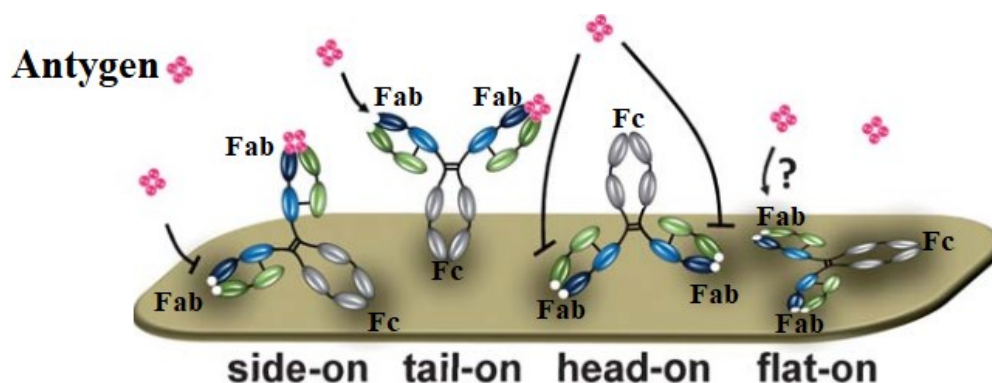
Rysunek 7 Przykład powlekania obrotowego małej cząsteczki w roztworze z zastosowaniem dozowania statycznego.

3. Adsorpcja białek

Makromolekuły biologiczne, czyli biomolekuły to białka, kwasy nukleinowe czy polisacharydy. Częsteczki te uczestniczą w różnych reakcjach w tym reakcjach wiązania. Wiele białek posiada w swej budowie miejsca wiązania, do których adsorbują inne cząsteczki zwane ligandami, dochodzić wtedy może również do reakcji specyficznych jak wiązanie białko-białko (np. CRP-aCRP). Białka jako samodzielne molekuły mogą same adsorbować do różnych powierzchni, można wyróżnić kilka rodzajów wiązania się białek do powierzchni, często jest to proces nietrywialny w swej naturze. Dzięki zdolności białek do adsorpcji do różnych powierzchni i wiązania się specyficznie z innymi cząsteczkami, mają one szerokie zastosowanie w różnego rodzaju biosensorach nazywanych też bioczujunikami, służącymi do wykrywania określonych produktów procesów biologicznych lub elementów nieorganicznych. Często białka po adsorpcji do powierzchni i unieruchomieniu mogą zmienić swoją konformację co w konsekwencji prowadzi do zmian w ich aktywności biologiczno-chemicznej a tym samym właściwości. Stanowi to utrudnienie w wyborze podłoża wiążącego dane białko przy budowie biosensora.

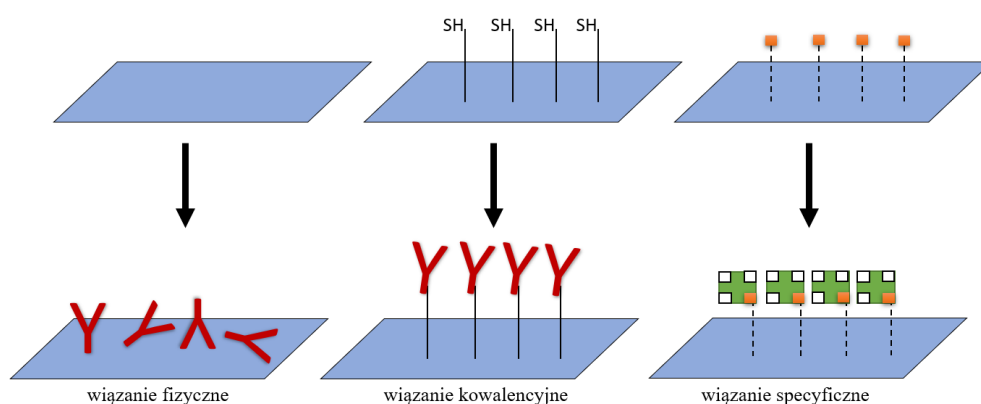
3.1 Imobilizacja protein

Jak już wcześniej wspomniano, białka to skomplikowane w swej budowie i funkcjach makromolekuły, których właściwości wciąż są badane. Białka znalazły swoje zastosowanie m.in. w bioczujujach, które stały się narzędziami diagnostycznymi, używanymi w celu pozyskania informacji o funkcjach i interakcjach białek. Głównym etapem w procesie konstrukcji bioczujujów jest imobilizacja białka na powierzchni podłoża o dużej gęstości, co umożliwia wykorzystanie małych objętości badanego roztworu.



Rysunek 8 Orientacje zaadsorbowanego przeciwciała IgG na powierzchni: side on – białko częściowo aktywne, tail on - białko aktywne, head on – białko nieaktywne, flat on – białko nieaktywne [17]

Ważnym jest by badany analit wiązał się specyficznie z warstwą na podłożu w celu poprawy wydajności bioczuownika oraz by jego aktywność biologiczna została zachowana (brak deformacji strukturalnych). Podstawowe metody immobilizacji białek bazują na trzech mechanizmach: fizycznej adsorpcji, wiązaniu kowalencyjnym i wiązaniu specyficznym. Na podstawie Rysunku 8 w kontekście adsorpcji przeciwciała IgG na powierzchni, można wyróżnić cztery różne orientacje: "side on", "tail on", "head on" oraz "flat on". W przypadku "side on", białko jest częściowo aktywne, podczas gdy w orientacji "tail on" mamy do czynienia z białkiem aktywnym. Z kolei w przypadku orientacji "head on" oraz "flat on", białko jest nieaktywne.



Rysunek 9 Mechanizmy immobilizacji białek do podłoża. Opracowanie własne na podstawie [18]

Molekuły znajdujące się w warstwie bioczuownika determinują rodzaj cząsteczek, które będą wykrywane, stąd ważnym jest, aby dobór podłoża jak i samych białek był kompatybilny; jest to ważny warunek dla selektywności i swoistości wybranego urządzenia.

Mechanizmy immobilizacji białek na powierzchni podłoża są kluczowe w procesie tworzenia bioczuowników. W zależności od rodzaju powierzchni i białka, możliwe są różne sposoby immobilizacji, takie jak wiązanie kowalencyjne, adsorpcja elektrostatyczna, adsorpcja fizyczna lub chemiczna adsorpcja. W celu uzyskania stabilnych i wydajnych bioczuowników, istotne jest zrozumienie mechanizmów immobilizacji białek oraz wybór optymalnej metody w zależności od danego przypadku. Na Rysunku 9 przedstawiono procesy immobilizacji białek do podłoża.

3.1.1 Fizyczna adsorpcja

Białka mogą adsorbować na podłożu poprzez siły międzycząsteczkowe (wiązania jonowe oraz oddziaływania hydrofobowe i polarne). Rodzaj działającej siły międzycząsteczkowej, będzie zależał od konkretnego białka i rodzaju podłoża. Tak powstała monowarstwa proteinowa jest heterogeniczna i zorientowana losowo, ponieważ każda cząsteczka może tworzyć wiele kontaktów w różnych orientacjach w celu zminimalizowania oddziaływań odpychających z podłożem i wcześniej już zaadsorbowanymi białkami. Upakowanie o wysokiej gęstości może sterycznie blokować aktywne miejsca białek, zakłócając ich właściwości funkcjonalne. Wiązanie fizyczne białek do podłoża poprzez adsorpcję jest procesem zależnym od sił van der Waalsa. Jednakże, powierzchnie podłoża modyfikowane SAM-ami (Self-Assembled Monolayers) mogą wpłynąć na stabilność adsorpcji poprzez zwiększenie liczby miejsc, w których białka mogą się przyłączyć do powierzchni, co zwiększa ich powierzchnię i specyficzność. Dodatkowo, SAM-y mogą wpłynąć na właściwości powierzchni, takie jak hydrofobowość czy hydrofilowość, co może wpłynąć na adsorpcję białek. Przykładowo, modyfikacja powierzchni podłoża za pomocą SAM-ów o hydrofilowych właściwościach może zwiększyć adsorpcję białek, ponieważ ułatwia to interakcje między białkami a powierzchnią podłoża. W zależności od właściwości SAM-ów i warunków adsorpcji, proces ten może prowadzić do zwiększenia stabilności adsorpcji białek, co może mieć wpływ na wydajność i skuteczność procesu immobilizacji białek na powierzchni podłoża [19] [20].

Głównymi wadami mechanizmu fizycznej adsorpcji są: losowa orientacja i słabe wiązanie, ponieważ białka mogą być usuwane przez niektóre bufony lub detergenty podczas pracy urządzenia.

3.1.2 Wiązanie kowalencyjne

Najczęściej białka są zaadsorbowane do powierzchni poprzez wiązania kowalencyjne, co wiąże się m.in. z immobilizacją za pomocą dostępnych grupy funkcyjnych odsłoniętych aminokwasów. Wiązania kowalencyjne powstają głównie między odsłoniętymi łańcuchami bocznymi grup funkcjonalnych białek z odpowiednio zmodyfikowanymi nośnikami, co powoduje nieodwracalne wiązanie i wytwarza wysokie pokrycie powierzchni. W Tabeli 3 przedstawiono grupy funkcyjne białek biorące udział w immobilizacji z grupami funkcyjnymi powierzchni do których się wiążą. Wiązanie chemiczne przez łańcuchy boczne aminokwasów ma charakter losowy, ponieważ opiera się na resztach znajdujących

się na zewnątrz białka. Przyłączenie może zachodzić jednocześnie przez wiele reszt, zwiększając heterogeniczność wśród unieruchomionych białek. Wiązanie chemiczne może mieć charakter kierunkowy, oznacza to, że można osiągnąć uporządkowanie unieruchomienie w wyniku reakcji z grupami aminokwasowymi, które nie są aktywne lub biorą udziału w wiązaniu do podłoża [21]. Specyficzna immobilizacja wymaga funkcjonalizacji cząsteczek, adaptacji powierzchni lub obu procesów jednocześnie. Ukierunkowane unieruchomienie, można uzyskać poprzez wykorzystanie w strukturze białka, pojedynczego, reaktywnego aminokwasu. Zatem, białka można adsorbować do podłoża w uporządkowany sposób, zachowując odtwarzalność i trwałość konformacji. Funkcjonalne grupy aminokwasów pokazane w Tabeli 3 można zastosować do bezpośredniego chemicznego sprzęgania z odpowiednimi rodzajami grup funkcjonalnych powierzchni. Na przykład reszty pochodzące z aminokwasu lizyny są najczęściej wykorzystywanymi punktami łączenia, ponieważ są one zazwyczaj obecne na zewnątrz struktury białka. Z powodu ich dużej ilości mogą występować wielopunktowe wiązania danego nośnika (grupy funkcyjnej podłoża), zwiększając heterogeniczność i ograniczając elastyczność konformacyjną białka [18].

Tabela 3 Grupy funkcyjne białek i podłoża stosowane do immobilizacji metodą wiązania chemicznego [18].

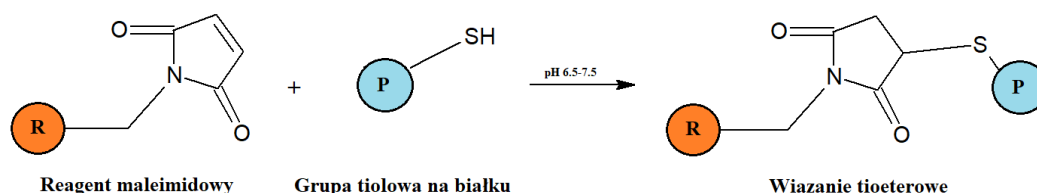
Powierzchnia	Grupy boczne białek	Aminokwasy
kwas karboksylowy epoxy aldehyd estry (NHS)	-NH ₂	Lys
maleimid disiarczek pirydylu	-SH	Cys
amina	-COOH	Asp, Glu
epoxy	-OH	Ser, Thr

I. Grupa aminowa (-NH₂)

Jak wspomniano wyżej reszty lizyny są najczęściej wykorzystywanymi punktami zakotwiczenia, ponieważ są one zwykle obecne na zewnątrz białka. N-hydroksysukcynimid (NHS) jest najczęściej stosowanym środkiem do sprzęgania z grupami aminowymi białek, tworząc stabilne wiązania amidowe [22]. Estry NHS reagują z grupami nukleofilowymi białek, tworząc silne wiązanie amidowe. Koniecznym jest, aby białka znajdowały się w buforze o niskiej sile jonowej, następnie są osadzane z roztworu na daną powierzchnię. Tworzenie stabilnych wiązań drugorzędowych amin polega na zredukowaniu nietrwałej zasady Schiffa, prowadząc tym samym do jej stabilizacji, powstaje ona poprzez reakcję między grupami aminowymi a aldehydowymi [23].

II. Grupa tiolowa (-SH)

Cysteina w swej budowie zawiera grupę tiolową, wykorzystywaną do tworzenia wewnętrznych wiązań disiarczkowych przyczyniających się do stabilności białka. W przeciwieństwie do lizyny, cysteina jest rzadziej występującym aminokwasem w białkach, stąd prawdopodobieństwo unieruchomienia jest mniejsze. Do tego celu wykorzystywany jest maleimid, którego wiązanie podwójne ulega reakcji przyłączania z grupami tiolowymi białek tworząc trwałe wiązania tioeterowe (reakcja występuje w pH 6.5-7.5), [24]. Schemat reakcji przedstawiono na Rysunku 10. Maleimid charakteryzuje się rozkładem w środowisku wodnym, co może powodować ograniczenia w sterowaniu reakcją, stąd dobrym zamiennikiem jest nierozpuszczalny w wodzie disiarczek pirydylu, ale reakcje w jego obecności wymagają środowiska wodno-organicznego.



Rysunek 10 Schemat reakcji łączenia maleimidu z grupą tiolową (-SH). R- oznacza reagent, P-oznacza białko. Opracowanie własne na podstawie [25]

III. Grupa karboksylowa (-COOH)

Immobilizacja za pomocą grup karboksylowych polega na wykorzystaniu kwasów asparaginowego i glutaminowego, które są głównymi grupami powierzchniowo czynnymi białek. Proces ten umożliwia unieruchomienie białka poprzez wiązanie kowalencyjne między grupą karboksylową białka a odpowiednim nośnikiem, co prowadzi do tworzenia stabilnego kompleksu. Opracowano metodę unieruchomienia białek na podłożu aminowych żeli agarozowych z aminami o niskiej wartości pH, w buforze o niskiej sile jonowej, gdzie adsorpcja jonowa została przekształcona w wiązanie [26].

IV. Grupa epoksydowa

Wykorzystanie grup epoksydowych daje możliwość manewrowania w środowiskach obojętnych i wodnych z racji ich stabilności. Unieruchomienie białka na podłożu epoksydowym ma charakter dwuetapowy poprzez: adsorpcję białka i reakcję bocznych grup aminokwasowych białka z grupami epoksydowymi podłoża. Ograniczeniem w stosowaniu tej metody jest wymóg użycia wysokiej siły jonowej w celu promowania fizycznej adsorpcji białek, co niekiedy jest trudne w przypadku innych białek, czułych na takie warunki. Dostępne na rynku nośniki epoksydowe również niosą ze sobą ograniczenia w unieruchamianiu białek.

W literaturze znaleziono doniesienia o zaprojektowaniu wielofunkcyjnych nośników z dwoma ugrupowaniami, zawierających grupy zdolne do promowania fizycznej adsorpcji oraz grupy epoksydowe, które umożliwiają kowalencyjne wiązanie. Celem było poprawienie wydajności unieruchomienia i stabilności białek immobilizowanych na podłożu [27], dlatego zaproponowano modyfikację podłoży epoksydowych, grupami promującymi wiązanie fizyczne (m.in. aminy i kwas miedziowo-iminodioctowy). Dodatkowo badano nośniki amino-epoksydowe z grupami epoksydowymi promującymi wiązanie kowalencyjne, na warstwie etylenodiaminy promującej wiązanie fizyczne. Wyniki badań wykazały, że nośniki te wykazują większą szybkość unieruchamiania białek w porównaniu do konwencjonalnych podłoży [27] [28].

3.1.3 Wiązanie specyficzne

Na powierzchni białek znajdują się miejsca, do których może przyłączać się ligand lub miejsce wiązania na powierzchni innego, kompatybilnego białka. Wiązanie białko-ligand lub białko-białko jest preferencyjnym rodzajem wiązania niekowalencyjnego, zachodzącego m.in. za pomocą siły Van der Waalsa, wiązania wodorowego lub jonowego. Dzięki temu rodzajowi osadzania białek do powierzchni otrzymuje się jednorodną i zorientowaną powierzchnię białek, koniecznym jest, aby wcześniej do substratu zaadsorbowane zostały ligandy lub kompatybilne białka za pomocą wiązania kowalencyjnego lub poprzez fizyczną adsorpcję.

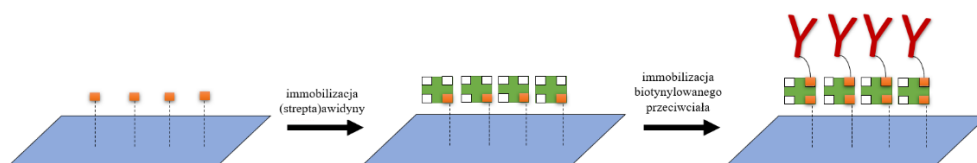
I. (Strept)awidyna-biotyna

Streptawidyna jest tetramerycznym białkiem o masie około 60 kDA izolowanym z bakterii *Streptomyces avidinii*. Białko to składa się z czterech identycznych łańcuchów polipeptydowych stąd nazwa *tetrameryczny*. Streptawidyna i homologiczne białko awidyna mają zdolność do wiązania do czterech cząsteczek biotyny o wysokim powinowactwie (stała dysocjacji $K_d = 10^{-11}$ M). Jest to wiązanie, które stanowi paradygmat wiązania ligand-białko o wysokim powinowactwie [29]. To specyficzne wiązanie spowodowało, że układ (strept)awidyna-biotyna jest szeroko stosowany do znakowania biomolekuł, oczyszczania, unieruchamiania i modelowania. Zarówno streptawidyna, jak i awidyna są tetramerami, mogą one formować tetramery koniugatów biotyny, z którymi się wiążą [30]. Powinowactwo biotyny do (strept)awidyny wynika z komplementarności kształtu miejsc wiążących do kształtu cząsteczki biotyny, dodatkowo w miejscu wiązania biotyny tworzą się wiązania wodorowe z ośmioma resztami aminokwasowymi, tworzące tzw. pierwszą powłokę wiązania. Drugą powłokę wiązania wodorowego tworzą pozostałe reszty aminokwasowe białka oddziałujące z resztami aminokwasowymi powłoki pierwszej [31]. Miejsce wiążące biotynę jest hydrofobowe, kontakty i interakcje hydrofobowe

biotyny w tych miejscach są związane siłą Van der Waalsa, co również odpowiada za wysokie powinowactwo biotyny do (strept)awidyny.

Biotyna inaczej witamina H to witamina występująca we wszystkich żywych komórkach. Wiązanie z awidyną wymaga bicyklicznego pierścienia; grupa karboksylowa w łańcuchu bocznym kwasu walerianowego (występujący w cząsteczce biotyny) nie jest zaangażowana i można ją zmodyfikować w celu wygenerowania odczynników biotynylujących, stosowanych do sprzęgania z białkami. Z racji, że biotyna jest małą cząsteczką, jej sprzężenie z innymi, większymi cząsteczkami nie wpływa na zmiany konformacyjne, rozmiar ani funkcjonalność. Ester (NHS) biotyny jest najczęściej stosowanym odczynnikiem biotynylującym do docelowych grup aminowych, gdzie hydrazyd biotyny można stosować do celowania w grupy węglowodanowe lub karboksylowe [32].

Unieruchomienie systemu białek (strept)awidyna-biotyna składa się z kilku etapów, podczas których powstaje wielowarstwa. Po pierwsze (strept)awidyna jest unieruchomiona na powierzchni poprzez wiązanie: kowalencyjne, adsorpcję fizyczną lub specyficzne wiązanie z odczynnikami biotyny wprowadzonymi na powierzchnię. Następnie biotynylowane białko jest unieruchomione na powierzchni dzięki interakcji (strept)awidyna-biotyna.



Rysunek 11 Wiązanie wykorzystujące wiązanie specyficzne układu (strept)awidyna-biotyna. Opracowanie własne na podstawie [33]

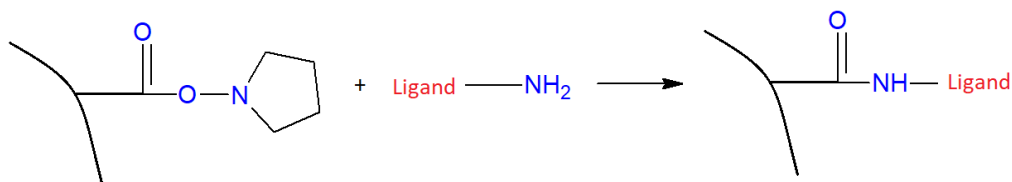
Układ (strept)awidyna-biotyna ma wiele zalet, m.in. szeroką dostępność biotynylowanych białek, oddzielne etapy unieruchomienia oraz możliwość kontrolowania gęstości powierzchni miejsc wiązania. Schemat powstania specyficznego wiązania (strept)awidyna-biotyna przedstawiono na Rysunku 11.

II. Sprzęganie ligandów

Jednokierunkowe unieruchomienie białek stosowane jest w celu przeciwdziałania heterogeniczności poprzez losowe sprzęganie białek. Jak wspomniano wcześniej, biotynylacja białek (np. przeciwciał) przez grupy węglowodanowe powoduje jednokierunkowe unieruchomienie molekuł [34]. Stosowane są również enzymy w celu wytrawiania fragmentów przeciwciał powodując redukcję wiązania dwusiarczkowego we fragmencie Fab. Powstają wtedy pojedyncze fragmenty Fab', które mogą zostać związane kowalencyjnie w sposób ukierunkowany do podłoża za pomocą tioli, (np. w bioczuJNIku) [35].

Użycie „przechwytyjących” przeciwciał lub układów, w celu ukierunkowanej orientacji ligandu jest rodzajem wiązania specyficznego białko-ligand. Zastosowany układ musi charakteryzować się wysokim stopniem

powinowactwa do ligandu w celu osiągnięcia stabilnego kompleksu. Dodatkowo, taki układ nie może zaburzać funkcji lub miejsca wiązania ligandu. Standardowy układ wychwytyjący powinowactwo złożony jest z kowalencyjnie związanego przeciwciała związanego z ligandem, będącym przedmiotem badań. Przechwytyjące przeciwciało jest unieruchamiane na podłożu przy zastosowaniu procedury sprzęgania aminy, powoduje to „dezaktywację” takiego przeciwciała, natomiast nie brakuje „aktywnych” przeciwciał w układzie.



Rysunek 12 Reakcja sprzęgania aminy

Procedura immobilizacji złożona jest z trzech etapów w przypadku konstrukcji bioczuJNIKÓW: aktywacji (wprowadzenie do układu cząstek wiążących się kowalencyjnie z podłożem czujnika), sprzęgania (wprowadzenie ligandu wiążącego się z powierzchnią czujnika) i dezaktywacji (wprowadzenie roztworu referencyjnego z cząsteczkami tłumiącymi aktywne grupy powierzchniowe).

Reakcja sprzęgania aminy przedstawiona na Rysunku 12 to jedna z metod umożliwiających immobilizację białek na powierzchni podłoża. Białka zawierają wiele grup aminowych, które mogą reagować z różnymi substratami, w tym z grupami epoksydowymi, karboksylo- i aldehydowymi, co umożliwia ich immobilizację na powierzchni podłoża. Reakcja sprzęgania aminy polega na reakcji grupy aminowej białka z grupą reaktywną na powierzchni podłoża, co prowadzi do powstania kowalencyjnych wiązań między białkiem a podłożem. Taka immobilizacja jest bardziej trwała i stabilna niż immobilizacja oparta na fizycznej adsorpcji.

III. Białko A / białko G - system immunoglobulin G

Unieruchomienie przeciwciał za pomocą białka A/G zależy od specyficznej interakcji z regionem stałym Fc przeciwciała IgG. Zastosowanie tej metody immobilizacji zapewnia, że miejsce wiązania przeciwciała, znajdujące się w regionie zmiennym Fab, pozostaje dobrze dostępne do wiązania się z antygenem. Wadą unieruchomienia za pośrednictwem białka A jest brak kontroli nad orientacją samego białka A; dlatego przedstawiono różne podejścia w celu uzyskania wyższej kontroli orientacji po unieruchomieniu. Tworzenie warstwy białka A i unieruchomienie cząsteczek IgG można monitorować za pomocą metody spektroskopii SPR i topografii AFM co przedstawiano niejednokrotnie w doniesieniach literaturowych [36] [37]. Dodanie znacznika heksha-histydyny na C-końcu białka A. pozwala na orientację białka A na podłożu a miejscu wiązania swobodnie oddziaływać z regionem Fc przeciwciała [38]. W. Lee i inni [39]

opracowali również uporządkowaną architekturę warstwa po warstwie z samoorganizującą się warstwą (SPDP) reagującą z pierwszorzędową aminą białka A. Inną wadą unieruchomienia za pośrednictwem białka A jest zdolność niewielu klas przeciwciał do wiązania białka A. G. Tanaka i inni w swojej pracy [40] opracowali białko, zawierające 3 powtarzające się domeny wiążące białko G i 72 powtórzenia pentapeptydu elastynowego, umożliwiające przylepność do powierzchni hydrofobowych.

3.2 Czynniki wpływające na adsorpcję białek

Podstawowym prawem rządzącym procesem adsorpcji białek do powierzchni stałych jest klasyczna teoria Langmuir’a dla gazów, pod warunkiem, że roztwór, z którego adsorbowane są cząsteczki jest wystarczająco rozcieńczony [41]. Spontaniczna adsorpcja białek zachodzi, kiedy uwalniana jest większa ilość energii niż ta pozyskiwana, zgodnie z prawem Gibbsa:

$$\Delta_{ads} G = \Delta_{ads} H - T\Delta_{ads} S < 0 \quad (1)$$

gdzie:

Δ_{ads} – to zmiana netto parametrów (przyjmuje wartości ujemne dla spontanicznej adsorpcji)

G – to swobodna energia Gibbsa

T – to temperatura [K]

S – to entropia [J/K]

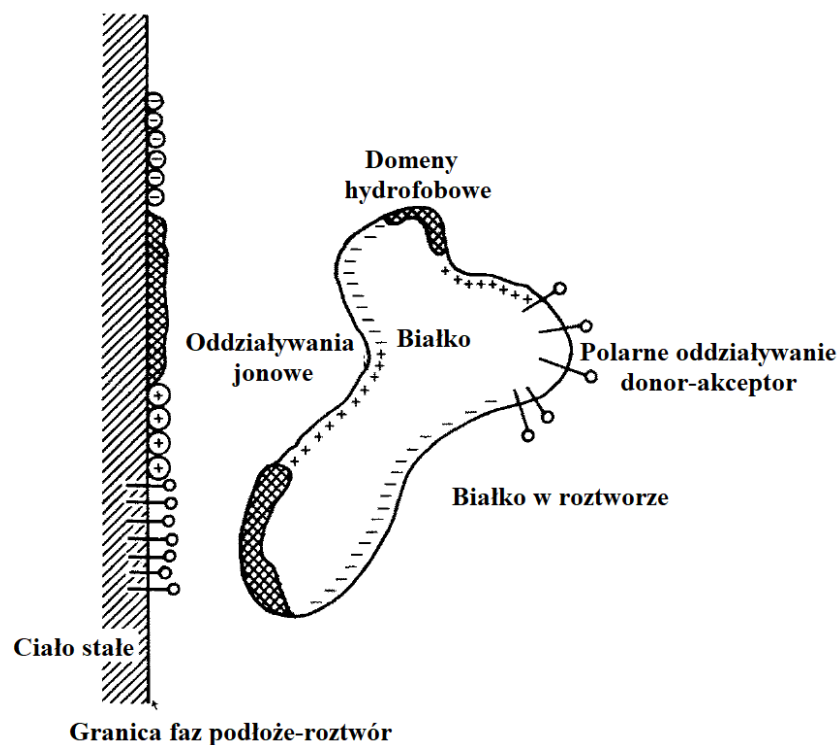
H – to entalpia [J]

*($\Delta_{ads} G$ przyjmuje wartości ujemne dla spontanicznej adsorpcji)

Ważnym jest dokładne scharakteryzowanie powierzchni, do której adsorbują białka, np. techniką Mikroskopii Sił Atomowych (AFM). Odpowiednio zmodyfikowana chemicznie powierzchnia może służyć do manipulowania oddziaływań między białkiem a podłożem, poprzez kontrolowanie gęstości powierzchniowej grup chemicznych lub ligandów [42]. Do ustalenia orientacji białka na powierzchni lub ilości zaadsorbowanego białka użyteczna może być Mikroskopia fluorescencyjna, dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych w białkach [43].

Białka jako makromolekuły nie są jedynymi cząsteczkami mającymi zdolność do adsorpcji do powierzchni stałych. Białka i inne cząsteczki rywalizują

ze sobą o miejsce wiązania na podłożu. Przebieg tego procesu opisuje efekt Vromana: liczne i małe białka jako pierwsze pokrywają powierzchnię adsorbentu, natomiast po czasie mogą być one zastępowane przez cząsteczki o większym powinowactwie do danej powierzchni, które mogą mieć większy rozmiar [44]. Na Rysunku 13 uwzględniono wpływ podłoża i budowy białka na jego wiązanie do podłoża.



Rysunek 13 Schematyczny widok oddziaływań białko-podłoże. Zdefiniowano podłoże i domeny na białku (polarność, ładunek, hydrofobowość) [41]

3.1.2 Środowisko zewnętrzne

Pierwszym czynnikiem wpływającym na proces adsorpcji białek do powierzchni, jest wpływ środowiska zewnętrznego, elementami należącymi do tej grupy są m.in.: pH, siła jonowa, temperatura oraz bufor. Środowisko zewnętrzne ma zasadniczy wpływ na zachowanie molekuł białek.

Wpływ pH powoduje zmianę stanu elektrostatycznego białek tj. rozmieszczeniu ładunku na powierzchni białka: przy pH równym punktowi izoelektrycznemu (pI) białka, ładunki na jego powierzchni równoważą się co powoduje zubożenie elektryczne cząsteczki. Kiedy wartość pH jest niższa niż pI białka ($pH < pI$) to dochodzi do rozmieszczenia ładunku dodatniego na powierzchni białka, w pH wyższym niż pI ($pH > pI$) dochodzi do sytuacji odwrotnej tj. molekula białka zostaje naładowana ujemnie [45]. Istotnym czynnikiem jest również ładunek znajdujący się na podłożu, do którego adsorbują białka, jeżeli

powierzchnia jest również naładowana to procesem adsorpcji rządzi prawo Coulomba opisujące oddziaływania elektrostatyczne. Białka posiadające ładunek elektrostatyczny mogą również oddziaływać między sobą (oddziaływania lateralne) podczas adsorbowania do powierzchni, co może skutkować zwiększeniem gęstości białek na powierzchni, bądź przeciwnie, zmniejszeniem gęstości zaadsorbowanych protein. Jest to spowodowane wzajemnym przyciąganiem lub odpychaniem białek obdarzonych ładunkiem.

Siła jonowa związana jest z długością Debye'a, ta natomiast związana jest z odległością tłumienia potencjału elektrycznego stałego ładunku w elektrolitach. Wraz ze wzrostem siły jonowej maleją oddziaływania elektrostatyczne między naładowanymi cząsteczkami. Stąd odwrotnie naładowane białka w stosunku do powierzchni, łatwiej do niej adsorbują, naładowane tak samo adsorbują trudniej. Dodatkowo duża siła jonowa powoduje agregację większych białek [46].

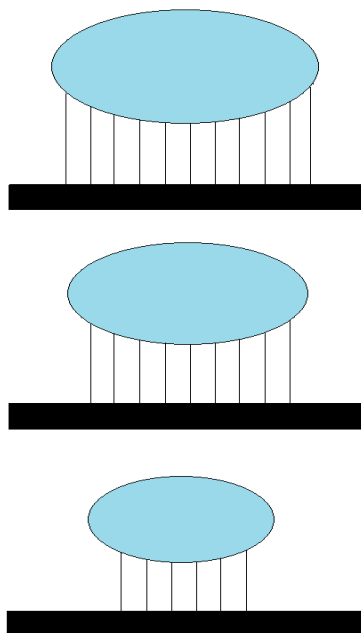
Temperatura ma wpływ zarówno na stan równowagi, jak i na kinetykę adsorpcji białek [47]. Zwiększenia szybkości adsorpcji można się spodziewać z powodu przyspieszonej dyfuzyjności białek w kierunku powierzchni sorbentu. Główną siłą napędową adsorpcji białek jest przyrost entropii wynikający z uwalniania zaadsorbowanych na powierzchni cząsteczek wody i jonów soli oraz z reorganizacji strukturalnych wewnątrz białka [48] [49]. Wraz ze wzrostem temperatury wzmożona jest dyfuzja białek w kierunku podłoża. Zmiana temperatury powoduje modyfikację konformacyjną białka co ma wpływ na adsorpcję, wtedy rośnie entropia sprzyjająca adsorpcji (Równanie 1).

Bufor może mieć znaczący wpływ na proces adsorpcji białek, ponieważ wpływa na pH roztworu, siłę jonową oraz właściwości powierzchni adsorpcyjnej. Odpowiedni dobór buforu i jego stężenie może sprzyjać adsorpcji białek do podłoża poprzez zapewnienie optymalnych warunków pH i siły jonowej, które sprzyjają oddziaływaniom między białkami a powierzchnią adsorpcyjną. Z drugiej strony, nieprawidłowy wybór buforu lub jego stężenie może prowadzić do niepożądanych skutków, takich jak konkurencja jonów buforowych z białkami o miejsce na powierzchni adsorpcyjnej lub denaturacja białek. Odpowiedni dobór buforu oraz jego koncentracja może sprzyjać adsorpcji białek do podłoża, zdarza się, że jony znajdujące się w buforze mogą konkurować z białkiem o miejsce na podłożu [50] co jest efektem niepożądanym.

3.2.2 Właściwości białek i ich wpływ na adsorpcję

Białka to skomplikowane makromolekuły złożone z 20 naturalnie występujących aminokwasów jako komórek monomerycznych oraz łańcuchów bocznych (np. fosforany, oligosacharydy lub lipidy). Klasyfikując białka pod względem ich oddziaływań z adsorbentem, należy uwzględnić takie cechy jak: rozmiar, stabilność struktury oraz skład.

Pierwotna struktura białka wpływa na jego aktywność powierzchniową, tzn. dana sekwencja aminokwasów wpływa na oddziaływania białko-podłoże. Większe białka wchodzi w reakcje z podłożem dzięki dużej liczbie miejsc na swojej powierzchni [51] co schematycznie przedstawiono na Rysunku 14.

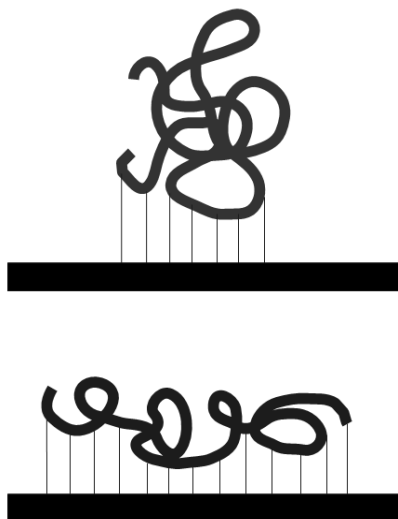


Rysunek 14 Wpływ wielkości białka na interakcję z podłożem. (Schemat uproszczony: nie uwzględniono struktury białka). Opracowanie własne na podstawie [51]

Pod wpływem zmian ładunku aminokwasów w białku może dojść do zmian struktury białka, czyli konformacji. Na skutek zmian konformacyjnych białka na jego powierzchni mogą zostać wyeksponowane aminokwasy o różnych właściwościach, co wpływa na rodzaj wiązania białka z podłożem. Białka ze względu na swoją skomplikowaną strukturę mogą się „zwijać” bądź „rozwijać”, co również wpływa na adsorpcję. Rozwijanie białka może spowodować odsłonięcie miejsc z którymi dojdzie do interakcji z podłożem, stąd białko silniej się zwiąże [52]. Zmiany w środowisku, w którym znajduje się roztwór białkowy, takie jak pH czy siła jonowa mogą wpływać na konformację białek, analogicznie białka zmieniają swą strukturę podczas kontaktu z podłożem, zachowując swą aktywność biologiczną w nieznacznie zmienionym stopniu (np. przeciwciała po adsorpcji do podłoża, zachowują zdolność do wiązania antygenów). Zmiany konformacyjne po kontakcie z podłożem zachodzą stopniowo tj. na początku cząsteczka „kontaktuje się” z minimalną liczbą miejsc na podłożu, biorą w tym udział najbardziej odsłonięte aminokwasy na powierzchni białka. Wraz ze wzrostem czasu przebywania białka na powierzchni, może się ono „rozwijać” w swej strukturze, tym samym eksponując wewnętrzne grupy funkcyjne i reagować z innymi miejscami wiążącymi na podłożu.

Reasumując wraz ze wzrostem czasu przebywania cząsteczki białka na powierzchni, rośnie ilość miejsc wiązania białka z podłożem, co zmniejsza prawdopodobieństwo desorpcji. Zmiany konformacyjne białka mogą następować

również na skutek zmian stężeń w roztworze. Przy niskich stężeniach, białka nie oddziałują ze sobą, lecz z podłożem, przy wysokim stężeniu białka dodatkowo oddziałują ze sobą, ilość miejsca na podłożu dostępnego do oddziaływania z białkiem zmniejsza się, co skutkuje mniejszym rozwinięciem struktury białka.



Rysunek 15 Wpływ rozwijania się białka na adsorpcję. (Schemat uproszczony: nie uwzględniono struktury białka). Opracowanie własne na podstawie [51]

Małe i sztywne białka (np. β -laktoglobulina lub α -chymotrypsyna), ze względu na swą budowę wykazują niewielką podatność na zmiany konformacyjne po adsorpcji do podłoża [53] [54]. Białka o średnim rozmiarze (np. białka osocza krwi: albumina, transferyna, immunoglobuliny), są podatne na zmiany konformacji po adsorpcji do podłoża. Zmiany konformacji po adsorpcji białek do powierzchni skutkują uwydatnieniem konkretnych właściwości białek takich jak: hydrofilowość/hydrofobowość, polarność/niepolarność lub ładunek elektrostatyczny [55], schemat wpływu rozwijania białka na adsorpcję przedstawiono na Rysunku 15.

Białka charakteryzujące się wysoką masą cząsteczkową (lipoproteiny i glikoproteiny) wykazują nietrwałość strukturalną (łatwość w zmianie konformacji) co wiąże się z preferencyjnością adsorpcji do powierzchni o różnych własnościach, np. lipoproteiny łatwo adsorbują do powierzchni hydrofobowych a glikoproteiny, z racji obecności hydrofilnych glikanów, łatwiej adsorbują do powierzchni hydrofilowej [56].

W mieszaninach białek zachowanie adsorpcji jest często wynikiem nakładania się różnych procesów takich jak dyfuzja, oddziaływania elektrostatyczne itp. Małe białka dyfundują szybciej niż duże i adsorbują jako pierwsze do powierzchni w początkowej fazie adsorpcji. Duże białka wiążą się

silniej z powierzchnią z powodu większej powierzchni kontaktu i mogą powodować odpychanie wstępnie zaadsorbowanych, mniejszych białek [57].

3.2.3 Własności powierzchni i jej wpływ na adsorpcję

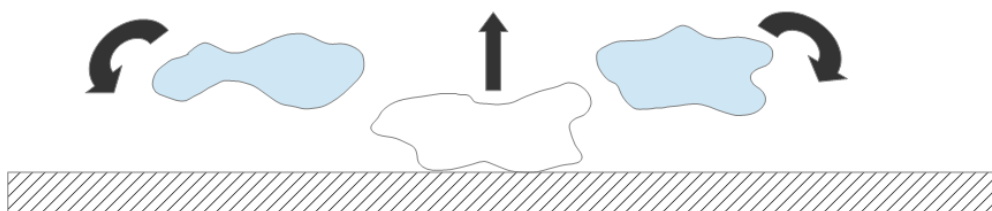
Oprócz właściwości białek, na ich adsorpcję wpływają również właściwości powierzchni, na której się osadzają. Ważnym jest w medycynie, przy wytwarzaniu nowych, biokompatybilnych materiałów, służących jako implanty, aby nie dochodziło do działań niepożądanych (infekcje, interakcje z komórkami), ponieważ adsorpcja białek do implantów może powodować odpowiedź immunologiczną organizmu podczas zmian konformacyjnych białka [58]. Do właściwości powierzchni zaliczane są m.in. polarność, energia powierzchniowa, morfologia i ładunek. Białka eksponujące dodatnio naładowane regiony chętniej adsorbują do powierzchni ujemnie naładowanej, tak więc białka „preferują” przyleganie do materiałów o wysokim napięciu powierzchniowym, do niepolarnych oraz do obdarzonych ładunkiem substratów. Niepolarne podłoża destabilizują białka i przyczyniają się do ich zmian konformacyjnych na skutek adsorpcji [59]. Badania pokazują, że chropowatość powierzchni ma wpływ na ilość zaadsorbowanego białka; zwiększając chropowatość powierzchni zwiększa się wysycenie powierzchni białkiem [60] spowodowane większą powierzchnią w porównaniu z gładkimi substratami. Nie tylko topografia odgrywa istotną rolę w interakcji białko-podłoże, również skład chemiczny powierzchni jest bardzo ważny. Określa on grupy funkcjonalne znajdujące się na powierzchni, z którymi mogą reagować grupy funkcjonalne znajdujące się na białku. Przykładowo pasywowane powierzchnie metaliczne odsłaniają jony metalu i tlenu. Inną metodą dostosowywania chemicznego powierzchni do których adsorbowane są białka jest ich silanizacja, za pomocą silanów zawierających grupę aminową lub chlorosilanów zawierających grupę hydroksylową. Dzięki temu zabiegowi, podłoża krzemowe, szklane lub modyfikowane plazmą tlenową można modyfikować w celu wydajniejszej adsorpcji białek do ich powierzchni. Potencjał powierzchniowy wpływa na strukturę i skład roztworu elektrolitu na granicy faz podłoże-roztwór, przeciwjony przyciągane są do powierzchni a wcześniej izotropowe ułożone cząsteczki wody porządkują się na powierzchni adsorbentu. Woda wiąże się zarówno z podłożem jak i z białkami, co powoduje zmianę energii całkowitą układu.

W przypadku roztworów wielobiałkowych ważnym jest m.in. w implantologii, by wiedzieć, które białka znajdują się na powierzchni materiału. Przy osadzaniu białek z wieloskładnikowego roztworu, może dojść do preferencyjnego osadzania białek na podłożu. Zmienne związane z aktywnością powierzchniową i dostępnością cząsteczek białka na podłożu określają profil cząsteczek na powierzchni. Cząsteczki zbliżając się do powierzchni adsorbentu konkurują o miejsce, którego dostępność z czasem maleje. W roztworach

jednoskładnikowych te same białka odpychają się, natomiast w rozworach wieloskładnikowych może dochodzić do wzajemnego przyciągania odmiennych białek. Białka o małych rozmiarach i w roztworach o niskim stężeniu dotrą i zwiążą się z powierzchnią jako pierwsze. Częsteczki o większym rozmiarze oraz większym powinowactwie do podłoża, które zbliżą się do powierzchni (już zajętej) później, mogą spowodować desorpcję wcześniej związanych białek, dochodzi wtedy do ich wymiany. Powierzchnia zostaje wysycona białkami o największym powinowactwie (efekt Vromana) [61].

3.3 Desorpcja i wymiana białek

Desorpcja jest zjawiskiem odwrotnym do adsorpcji; wcześniej zaadsorbowane na powierzchni cząsteczki odłączają się. Podczas desorpcji dochodzi do równoczesnego zerwania kontaktu białka z podłożem, proces ten jest bardzo powolny lub do niego nie dochodzi, ponieważ muszą zajść drastyczne zmiany w środowisku (obniżenie pH, zwiększenie siły jonowej). Duże białka tworzą większą ilość kontaktów z podłożem, co dodatkowo komplikuje proces zerwania wszystkich wiązań z podłożem. Czysta desorpcja cząsteczek białka jest mniej prawdopodobna, zazwyczaj dochodzi do wymiany biomolekuł na powierzchni podłoża. Schematyczny proces wymiany białek na powierzchni przedstawiono na Rysunku 16:

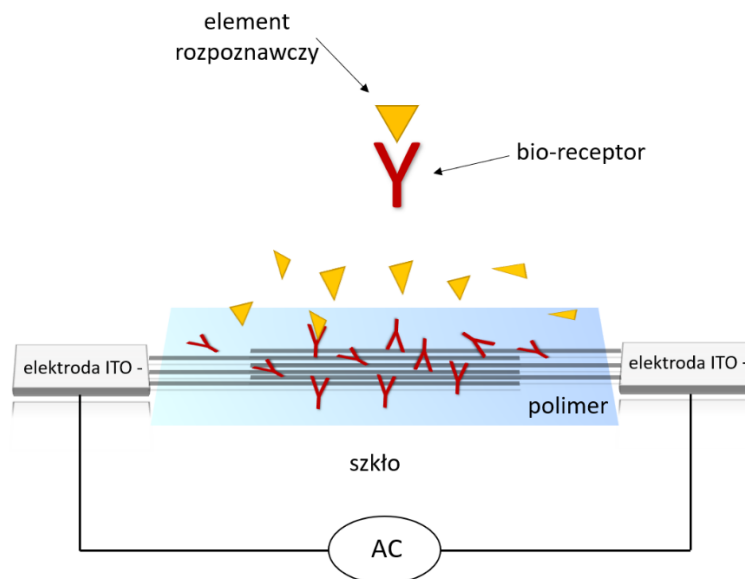


Rysunek 16 Proces wymiany białek na powierzchni. (Schemat uproszczony; nie uwzględniono struktur białek). Opracowanie własne na podstawie [41]

3.4 Bioczujnik - proces adsorpcji białek

W przypadku mikrofluidycznych układów, odpowiednim formatem dla wieloelektrodowych układów stosowanych w impedymetrii jest format oparty na mikrolitograficznie wytworzonych, elektrod sensorowych. Każdy element czujnikowy układu składa się z pary przeciwnych elektrod platynowych, złotych lub z tlenku indowo-cynkowego (ITO) o zdefiniowanej długości, szerokości oraz odległości między nimi. W tej pracy zastosowano gotowe podłoża szklane

z elektrodami ITO firmy Ossila S161, o wymiarach kanału $W \times L$: $30\text{ mm} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ i grubości elektrod ITO 100 nm. Schematyczny układ podłoża wraz z zaadsorbowanymi białkami przedstawiono na Rysunku 17:



Rysunek 17 Schematyczny rysunek układu podłoża szklanego z elektrodami ITO, polimerem i białkami podczas przepływu antygenów

Immunobiosensor można wytworzyć przez kowalencyjne unieruchomienie białka, np. pierwotnej lub wtórnej IgG (immunoglobuliny G) na podłożu szklanym z elektrodami ITO/złotymi z naniesionym polimere, do którego adsorbują inkubowane białka. Aby unieruchomić białka na podłożach z cienką warstwą polimeru, wytworzony roztwór danego białka o żądanym stężeniu nanosi się na powierzchnię i inkubuje w danym czasie, po którym powierzchnia wysycana jest białkiem. W przypadku białka IgG na powierzchni, do której adsorbuje można dodatkowo zastosować silany np. APTES (3-aminopropyl) trietoksylsilan - jest to aminosilan, który jest głównie stosowany jako dyspergator. APTES przyłącza grupę aminową do funkcjonalnego silanu w celu biokoniugacji, poprawiając tym samym adhezję białek [62].

4. Zastosowane metody badawcze

4.1 Spektroskopia Impedancyjna

Spektroskopia impedancyjna (IS) to metoda elektrochemiczna, która może być wykorzystana do wykrywania białek na powierzchni. Metoda ta polega na zmierzeniu impedancji elektrody w obecności badanego białka na jej powierzchni. Impedancja elektrody zależy od właściwości fizykochemicznych powierzchni elektrody oraz od właściwości warstwy białkowej na jej powierzchni. Aby przeprowadzić pomiary impedancyjne na powierzchni elektrody, należy wprowadzić elektrodę zanurzoną w elektrolicie do komórki pomiarowej, a następnie zanurzyć powierzchnię elektrody z białkiem w roztworze elektrolitu. Następnie, na elektrodzie aplikuje się sygnał o niskiej amplitudzie i zmiennym napięciu elektrycznym AC (2-10mV). W odpowiedzi na ten sygnał elektrody generowane są prądy, które prowadzą do zmiany napięcia na elektrodzie. Na podstawie pomiarów impedancji elektrody w zależności od częstotliwości sygnału, można określić parametry elektrody i warstwy białkowej, takie jak pojemność, opór, reaktywność chemiczna. Wykrycie obecności białka na powierzchni elektrody odbywa się poprzez zmianę impedancji elektrody w obecności białka. Większa ilość białka na powierzchni elektrody prowadzi do zmniejszenia impedancji elektrody. W ten sposób, analiza zmian impedancji elektrody pozwala na wykrycie obecności białka na powierzchni [63].

Metodę tę stosuje się również do badania mechanizmów reakcji elektrochemicznych, pomiaru właściwości dielektrycznych i transportowych materiałów, badania właściwości porowatych elektrod lub badania powierzchni pasywnych (badanie oporu warstwy pasywnej powstałej na powierzchni metalu), badać można również materiały biologiczne (w tym białka) [64] [65].

Prawo Ohma opisuje zdolność elementu obwodu do oporu przepływu prądu elektrycznego. Prawo Ohma definiuje opór (R) w stosunku napięcia (U) i prądu (I):

$$R = \frac{U}{I} \quad (1)$$

Chociaż jest to dobrze znany związek, jego użycie jest ograniczone tylko do jednego elementu obwodu - idealnego rezystora. Idealny rezystor ma kilka właściwości:

- jest zgodny z prawem Ohma na wszystkich poziomach prądu i napięcia.
- jego wartość rezystancji jest niezależna od częstotliwości.
- prąd płynący przez rezystor jest w fazie z napięciem, ponieważ opór elektryczny jest stały (prąd zależy wtedy jedynie od napięcia).

Jednak elementy rzeczywistego obwodu wykazują znacznie bardziej złożone zachowanie. Zmusza to do odejścia od prostej koncepcji rezystancji,

a zamiast niej, używana jest impedancja. Podobnie jak rezystancja, impedancja jest miarą zdolności obwodu do oporu przepływowi prądu elektrycznego, ale w przeciwieństwie do rezystancji, nie jest ograniczona przez wymienionych powyżej właściwości. Impedancja jest zwykle mierzona przez przyłożenie zmiennego potencjału do układu elektrochemicznego, a następnie pomiar prądu płynącego przez ten układ.

Jeśli do próbki zostanie przyłożony zmiennoprądowy sygnał napięciowy o małej amplitudzie:

$$U(t) = E_0 \cos(\omega t) \quad (2)$$

gdzie:

$U(t)$ – potencjał w czasie t [V],

t – czas [s],

U_0 – amplituda sygnału [V],

ω – częstotliwość kołowa ($\omega = 2\pi f$, f – częstotliwość) [Hz];

To odpowiedzią układu na ten sygnał będzie odpowiedź prądowa wyrażona równaniem:

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t + \varphi) \quad (3)$$

gdzie:

$I(t)$ – natężenie prądu w czasie t [A],

t – czas [s],

I_0 – amplituda sygnału [A],

ω – częstotliwość kołowa ($\omega = 2\pi f$, f – częstotliwość) [Hz]),

φ – kąt przesunięcia fazowego;

Impedancja [Z] jest wyrażona wzorem:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = Z_0 \frac{\tan(\varphi)}{\cos(\omega t + \varphi)} \quad (4)$$

gdzie:

Z – impedancja,

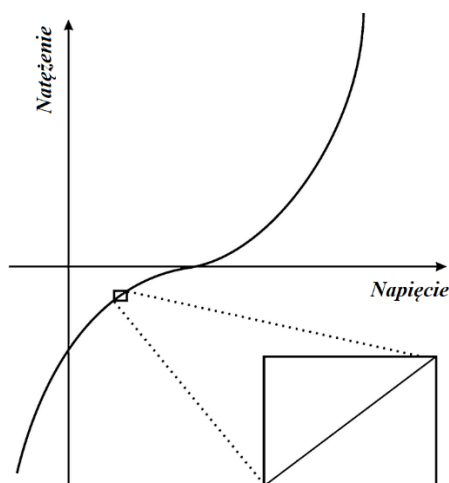
Z_0 – moduł impedancji (lub $|Z|$),

φ – kąt przesunięcia fazowego;

Jeśli zastosujemy zmiennoprądowy sygnał o określonej częstotliwości do układu elektrochemicznego, który początkowo znajduje się w równowadze, to jego odpowiedź zostanie wyrażona w postaci prądowej. Jednak amplituda tej odpowiedzi będzie mniejsza niż amplituda sygnału wejściowego z powodu oporu badanej próbki. Ponadto, odpowiedź ta będzie przesunięta w fazie względem sygnału wejściowego.

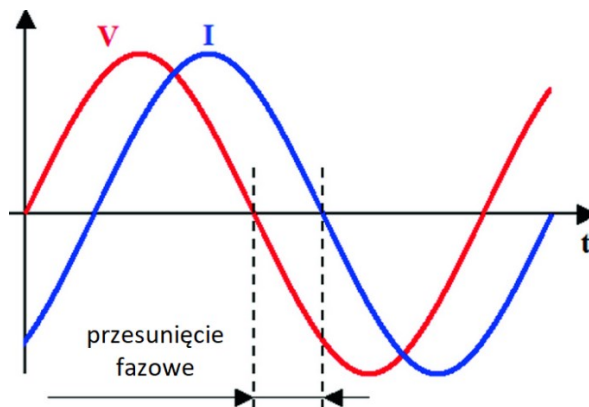
W zależności od rodzaju procesu (dyfuzja, przeniesienie ładunku itp.) stała czasowa różni się dla danego każdego z nich, stąd odpowiedź układu będzie zależeć od częstotliwości sygnału. Dzięki temu można identyfikować dane procesy.

Impedancja elektrochemiczna jest zazwyczaj badana za pomocą sygnału wzbudzenia o niskiej amplitudzie (zwykle 1-10 mV), co pozwala uzyskać liniową odpowiedź próbki. Ponieważ prąd w próbce jest zazwyczaj mierzony tylko przy częstotliwości sygnału wzbudzenia, niemożliwe jest zaobserwowanie nieliniowej odpowiedzi próbki na stały sygnał prądowy. Na Rysunku 18 przedstawiono krzywą prąd/napięcie układu pseudoliniowego:



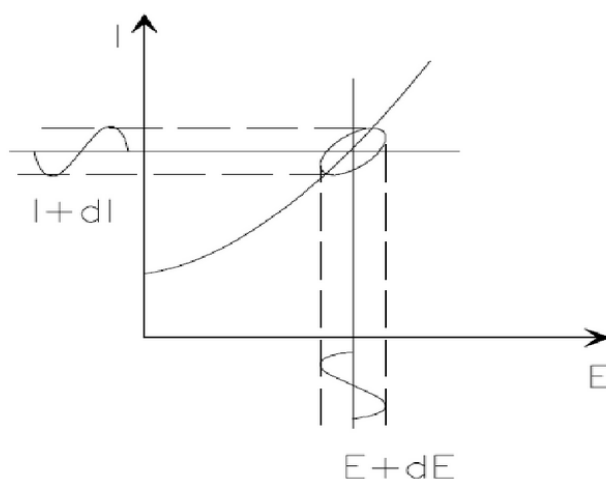
Rysunek 18 Przykład krzywej prąd/napięcie dla układu pseudoliniowego [66]

W układzie liniowym (lub pseudoliniowym) odpowiedź prądowa na potencjał sinusoidalny będzie sinusoidą o tej samej częstotliwości, ale przesuniętej w fazie co przedstawiono poniżej (Rysunek 19):



Rysunek 19 Sinusoidalna odpowiedź prądowa w układzie liniowym z wykreśleniem przesunięcia fazowego [67]

Wykreślony zastosowany sygnał sinusoidalny $E(t)$ na osi X wykresu oraz sygnał odpowiedzi sinusoidalnej $I(t)$ na osi Y da wynik owalny. Ten owal znany jest jako „figura Lissajous” (Rysunek 20). Analiza liczb Lissajousa na ekranach oscyloskopowych była przyjętą metodą pomiaru impedancji przed udostępnieniem nowoczesnej aparatury EIS [68].



Rysunek 20 Krzywa Lissajous [68]

Zgodnie z równaniem Eulera:

$$\exp(j\varphi) = \cos \varphi + j \sin \varphi \quad (5)$$

Można wyrazić impedancję jako funkcję złożoną, wtedy potencjał jest wyrażony jako:

$$E(t) = E_0 \exp(j\omega t) \quad (6)$$

A odpowiedź prądowa przyjmie postać:

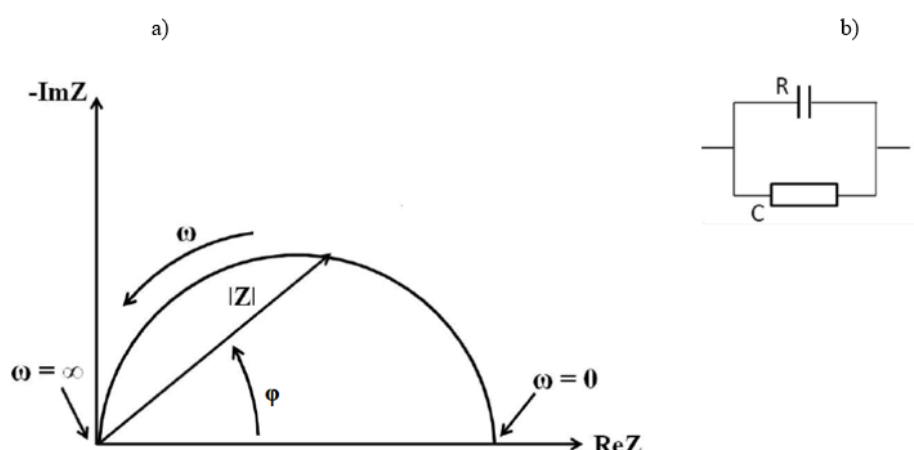
$$I(t) = I_0 \exp(j\omega t - \varphi) \quad (7)$$

Impedancja jest wtedy reprezentowana jako liczba zespolona:

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\varphi) = Z_0(\cos\varphi + j\sin\varphi) = \operatorname{Re}(Z)(\omega) + j\operatorname{Im}(Z)(\omega) \quad (8)$$

Część rzeczywista impedancji $\operatorname{Re}(Z)$ (inaczej rezystancja) to prąd płynący w fazie z napięciem, a część urojona $\operatorname{Im}(Z)$ (inaczej reaktancja) to prąd przesunięty w fazie o $\pm 90^\circ$.

Jeśli rzeczywista część zostanie wykreślona na osi X względem części urojonej wykreślonej na osi Y, wówczas otrzymany wykres jest tzw. „wykresem Nyquista”. Na tym wykresie oś Y jest ujemna, a każdy punkt wykresu Nyquista odpowiada impedancji przy jednej częstotliwości. Dane o wyższej częstotliwości znajdują się po prawej stronie, podczas gdy dane o niskiej częstotliwości znajdują się po lewej stronie tego wykresu. Na wykresie Nyquista impedancję można przedstawić jako wektor (strzałka) o długości (Z). Kąt między tym wektorem a osią X powszechnie nazywany „kątem fazowym” wynosi φ . Na Rysunku 21a wykreślono wykres Nyquista, który wynika z obwodu elektrycznego Rysunku 21b półkole to cechy charakterystyczne pojedynczej „stałej czasowej”.



Rysunek 21 Wykres Nyquista (a) przedstawiający wektor impedancji $|Z|$ dla prostego obwodu o pojedynczej stałej czasowej (b) z 1 rezystorem i 1 kondensatorem o pojedynczej stałej czasowej. Składowa rzeczywista impedancji, $\operatorname{Re}Z$, jest wykreślona na osi x; składowa urojona, $-\operatorname{Im}Z$, jest wykreślona na osi y. φ to kąt fazowy. Na wykresie nie pokazano częstotliwości kątowej ω . Przy niskiej częstotliwości (np. $\omega = 0$) impedancja jest równa R (rezystancji) [69]

Metoda spektroskopii impedancyjnej była główną metodą badawczą stosowaną w tej pracy w celu zidentyfikowania parametru przedstawiającego zaadsorbowanie do powierzchni polimerowej białka.

W celu uzyskania dokładnych wyników, pomiary za pomocą tej metody są wykonywane w szerokim zakresie częstotliwości, co pozwala na uzyskanie surowych danych liczbowych. Dzięki temu, można dokładnie zbadać zachowanie próbki w zależności od częstotliwości i określić jej impedancję w różnych

warunkach. Jednakże, takie surowe dane wymagają dalszej analizy i obróbki w celu uzyskania bardziej przejrzystych wyników interpretowanych z punktu widzenia teorii elektrochemicznej. Interpretację ogólnego znaczenia tych zmian wielkości i faz często uzyskuje się poprzez obliczenie rzeczywistych i urojonych składników, a w niektórych przypadkach dopasowanie rzeczywistych wartości do wyidealizowanego modelu. Konwencjonalnie modele mają postać obwodów, do których oprogramowanie porównuje dane pomiarowe. Model R (RC) składa się z trzech elementów: rezystancji roztworu, kondensatora międzyfazowego oraz rezystora międzyfazowego przenoszenia ładunku. Rezystancja roztworu odpowiada za opór przepływu prądu w roztworze, kondensator międzyfazowy działa jak kondensator w obwodzie elektrycznym, a oporność międzyfazowa przenoszenia ładunku jest reprezentowana przez rezystor. Takie podejście umożliwia modelowanie zachowania elektrody w elektrochemicznych systemach pomiarowych.

Procesy elektrochemiczne i fizyczne można analizować za pomocą IS poprzez interpretację ich jako elementów elektrycznych o określonych stałych czasowych. Przykładem takiego elementu jest warstwa podwójna na elektrodzie, składająca się z elektrody o określonym ładunku i warstwy złożonej z jonów o przeciwnym ładunku, którą można interpretować jako kondensator. Dielektryk (np. polimer) umieszczany jest między okładkami (elektrodami) kondensatora, następnie na powierzchni polimeru można zaadsorbować białka (np. Immunoglobuliny G, streptawidynę, BSA). Tak przygotowane podłoże szklane z elektrodami ITO, polimerem i warstwą białka umieszczane jest w układzie mikrofluidycznym z przewodami, przez które wprowadzić można do układu roztwór, np. antygenów. Mierzy się odpowiedź impedancyjną w danym zakresie częstotliwości, podczas przepływu nad powierzchnię biosensora roztworu danych białek w czasie, można tym samym uzyskać informację o przebiegu m.in. immunoreakcji lub wiązań specyficznych białko-białko.

4.2 Spektrometria Mas Jonów Wtórnych (ToF-SIMS)

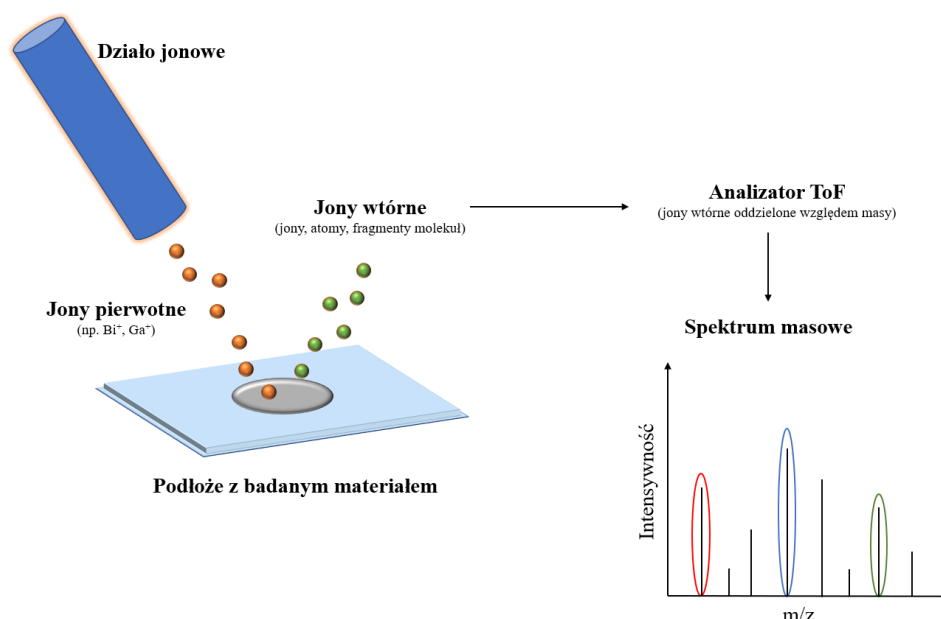
Metoda ToF-SIMS pozwoliła na określenie w jaki sposób osadzają się badane białka na powierzchni polimerowej w badanym układzie.

Spektrometria mas to technika analityczna, która w chemii organicznej służy do badania lub potwierdzania budowy związków organicznych, a także do określania właściwości i oznaczania ilościowego związków występujących w mieszaninie [70] [71]. Podstawową zasadą działania każdego spektrometru, niezależnie od jego konstrukcji, jest jonizacja cząsteczek badanej substancji, pozwalająca na przyspieszenie jej w polu elektrycznym w próżni. Niejednorodny przepływ jonów (dodatnich lub ujemnych) dzieli się na kilka składowych

w zależności od stosunku masy do ładunku (m/z). Ze stosunku masy do ładunku jonowego zwykle można wywnioskować, jaka jest masa cząsteczkowa badanego związku chemicznego lub jego fragmentu.

W przypadku spektrometrów czasu przelotu jony wchodzące do analizatora są przyspieszane przez impuls elektryczny i zaczynają dryfować przez komorę analizatora. Na końcu analizatora znajduje się detektor jonów, który jest podłączony do rejestratora, który mierzy czas od impulsu przyspieszenia do momentu, gdy do detektora trafi określony jon. Pomiar m/z opiera się na fakcie, że wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej jonów rosną ich czasy lotu. W spektrometrze mas jonów wtórnych jony są emitowane, gdy powierzchnia jest bombardowana przez energetyczne (keV) pierwotne jony (np. Bi^+ , Bi^{3+} , Ga^+ , C_{60}^+). W zależności od warunków rozpylania można wyróżnić dwa tryby pracy w SIMS: dynamiczny (d-SIMS) i statyczny (s-SIMS). W przypadku d-SIMS większa dawka jest osadzana na analizowanej powierzchni, powodując rozpylanie powierzchniowe, dlatego też d-SIMS służy do profilowania głębokości lub obrazowania 3D. W s-SIMS gęstość dawki jonów pierwotnych musi być utrzymywana na niskim poziomie, aby zapobiec uderzeniu każdego punktu obszaru powierzchni więcej niż jeden raz. Jest to spełnione dla gęstości dawki jonów pierwotnych poniżej 10^{13} jonów/ cm^2 [72]. W dostępnej skali czasu uszkodzonej jest mniej niż 1% górnej powierzchni. Takie warunki pracy pozwalają uzyskać informacje na temat pierwotnego składu chemicznego wrażliwych na promieniowanie powierzchni molekularnych z najbardziej zewnętrznej warstwy 1-2 nm. Dzięki temu statyczny SIMS jest doskonałą metodą analizy biomolekuł na stałych podłożach [73].

Zasada obrazowania TOF-SIMS jest dość prosta: próbka jest bombardowana monoatomowymi jonami pierwszorzędowymi (np. argon [Ar^+], gal [Ga^+]) lub złota [Au^{3+}], bizmutu [Bi^{3+}], fulerenów [C_{60}^+ i C_{60}^{2+}]) przyspieszonymi do energii 10-25 keV, aby zdesorbować i zjonizować cząsteczki obecne na powierzchni próbki (~5-10 nm). Schematyczny układ aparatury SIMS został przedstawiony poniżej (Rysunek 22):



Rysunek 22 Schematyczny układ aparatury SIMS z analizatorem ToF [74]

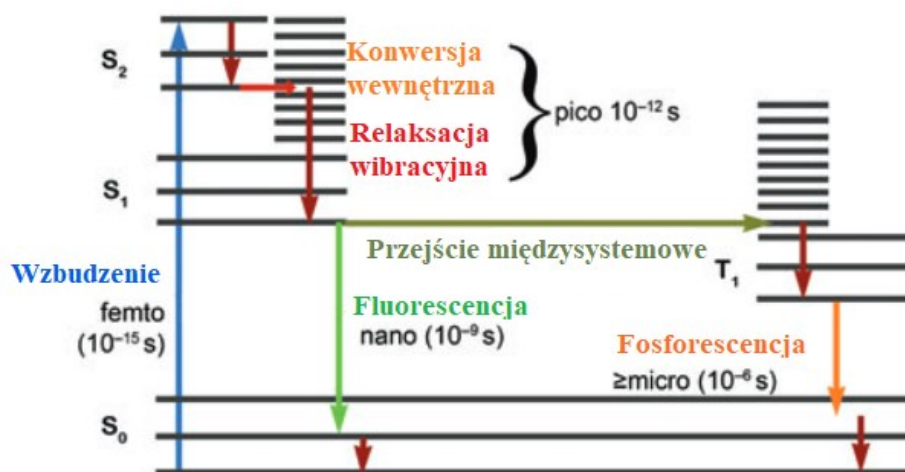
ToF-SIMS jest potężną techniką badania zaadsorbowanych warstw białkowych na powierzchni biomateriałów. W pracy [75] wykazano, że analiza składowych głównych danych ToF-SIMS może łatwo rozdzielić widma białek, nawet dla widm, które są bardzo podobne. SIMS może być wrażliwy na orientację lub konformację białka na powierzchni.

4.3 Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopia fluorescencyjna posłużyła do określenia stopnia pokrycia warstwy polimerowej białkiem i faktu zaistnienia samej adsorpcji do podłoża.

Fluorescencja to emisja światła zachodząca w ciągu nanosekund po absorpcji światła, które zazwyczaj ma krótszą długość fali. Całkowicie odfiltrowując wzbudające światło bez blokowania emitowanej fluorescencji, można zobaczyć tylko obiekty fluorescencyjne. Częsteczki stosowane jako znaczniki fluorescencyjne nazywane są fluoroforami. Najbardziej oddalone orbitale elektronowe w cząsteczce fluoroforu określają zarówno jej skuteczność jako związku fluorescencyjnego, jak i długości fali absorpcji i emisji. Gdy związki fluorescencyjne znajdują się w „stanie podstawowym” pochłaniają energię świetlną (fotony), zmienia się wtedy stan elektronowy, stan wibracyjny i rotacyjny cząsteczki. Przejście na skutek absorpcji energii światła do stanu wzbudzenia jest procesem, który czasami prowadzi do przeniesienia elektronu na inny orbital, co następuje bardzo szybko, zwykle w femtosekundach. Taki proces wzbudzenia prowadzi także do wprawienia w ruch drgań molekularnych, w których odległości między jądrami ulegają zmianie w czasie. Cała ta pochłonięta energia zostaje ostatecznie wyemitowana. Relaksacja wibracyjna i emisja fluorescencji to główne ścieżki, którymi fluorofor powraca do stanu podstawowego poziomu energii. Typowym podejściem

w mikroskopii fluorescencyjnej jest wykorzystanie zsynchronizowanych związków o pewnym stopniu sprzężonych wiązań podwójnych. Takie związki często mają struktury pierścieniowe (cząsteczki aromatyczne) z wiązaniami π , które z łatwością rozprzewodzą elektrony zewnętrznych orbitali na dużym obszarze. Związki te są optymalne dla mikroskopii fluorescencyjnej, ponieważ różnice energii między stanem wzbudzonym a stanem podstawowym są na tyle małe, że stosunkowo niskoenergetyczne fotony w widzialnej części spektrum elektromagnetycznego można wykorzystać do wzbudzenia elektronów w stan wzbudzony [76]. Diagram Jabłońskiego przedstawiony na Rysunku 23 to graficzna reprezentacja procesu relaksacji elektronów w cząsteczkach pochłaniających energię światła. Składa się z serii poziomych linii, które reprezentują różne poziomy energetyczne, oraz strzałek, które wskazują na procesy relaksacji między poziomami.



Rysunek 23 Diagram Jabłońskiego: S_0 , S_1 , S_2 , stany elektronowe singletowe, T_1 stan wzbudzony trypletowy (liczby 0,1,2,3 oznaczają poziomy oscylacyjne) [76]

Gdy fluorofor pochłania kwant światła, cała energia fotonu jest przenoszona do fluoroforu. Energia ta jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali fotonu:

$$E = h \cdot c / \lambda \quad (9)$$

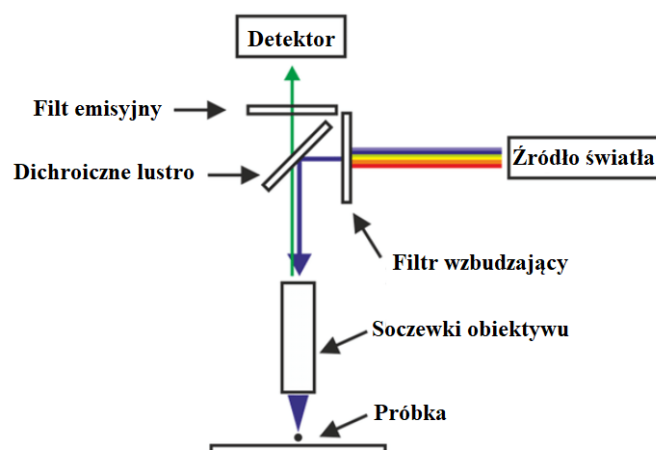
gdzie:

h – stała Plancka,

c – prędkość fali, λ – długość fali światła w próżni;

Jeśli energia zaabsorbowanego fotonu jest większa niż energia potrzebna do przejścia ze stanu podstawowego do najniższego poziomu energetycznego S_1 , to cząsteczka ulegnie zmianie vibracji, rotacji i/lub przeniesie się na jeszcze wyższy orbital elektronowy (S_2). Minimalna energia wymagana dla fluorescencji pochodzi od fotonu, który może powodować przejście elektronu w wyższy stan wzbudzony (od S_0 do S_1).

Podstawą tej metody jest napromieniowanie próbki o określonej długości fali (poprzez zastosowanie filtrów) zaadsorbowanej przez fluorofory oraz „zebranie” emitowanego światła fluorescencyjnego (oddzielonego od światła wzbudzonego przez filtry emisyjne) o niższej energii [77]. Badać w ten sposób można znakowane fluorescencyjnie białka na podłożach stałych. Schemat mikroskopu fluorescencyjnego został przedstawiony poniżej (Rysunek 24):



Rysunek 24 Schemat mikroskopu fluorescencyjnego [78]

5. Zastosowane białka

W niniejszej pracy zastosowano różne białka jako obiekty badawcze, w tym BSA (albumina surowicy bydlęcej), IgG (immunoglobulina G), streptawidyna, biotyna oraz białko CRP (białko C-reaktywne). Każde z tych białek pełni ważne role w organizmie, a ich badanie ma istotne znaczenie w wielu dziedzinach, w tym w diagnostyce medycznej, biochemii i biologii molekularnej. W niniejszej pracy przeprowadzono analizę właściwości elektrochemicznych tych białek w celu lepszego zrozumienia ich struktury i funkcji. W literaturze naukowej można znaleźć wiele doniesień o badaniach właściwości elektrochemicznych różnych białek w celu zastosowania ich w biosensorach - rozwiń jak to się ma do innych badań nad białkami odnosząc się do biosensorów oraz spektroskopii impedancyjnej. Badania nad właściwościami elektrochemicznymi białek są niezbędne w celu opracowania bardziej wydajnych i precyzyjnych biosensorów. Oprócz spektroskopii impedancyjnej, istnieją również inne techniki, takie jak spektroskopia fluorescencyjna, spektroskopia plazmonowa, spektroskopia w podczerwieni i spektroskopia mas, które są stosowane w badaniach nad właściwościami białek w biosensorach [79] [80] [81] [82]. Każda z tych technik ma swoje unikalne zalety i ograniczenia, a wybór odpowiedniej techniki zależy od specyfiki badanego białka i aplikacji, do której ma być wykorzystany biosensor.

5.1. Albumina wołowa (BSA)

Albumina surowicy bydlęcej (BSA) to albumina surowicy pochodząca od krów domowych. Jest to względnie duże białko globularne o masie cząsteczkowej 66,3 kDa i wymiarach 5,5×5,5×9,5 nm [83]. Punkt izoelektryczny BSA wynosi około 4,6-4,7. BSA jest jednym z najczęściej stosowanych odczynników blokujących w celu zmniejszenia interakcji niespecyficznych (np. biosensorów lub testu immunoenzymatycznego (ELISA)). użytym białkiem w badaniach było BSA firmy VWR (Fraction V, pH=5, 96.0-100.0% protein, Acros Organics)

5.2 Immunoglobulina G

Immunoglobulina G (IgG) należy do rodziny antygenów, która odgrywa kluczową rolę w układzie odpornościowym i jest odpowiedzialna za rozpoznawanie i wiązanie antygenów. IgG składa się z czterech łańcuchów peptydowych - dwóch łańcuchów ciężkich i dwóch łańcuchów lekkich. Łańcuchy polipeptydowe są pogrupowane w trzy regiony: jeden Fc i dwa Fab, które są połączone elastycznym

The diagram illustrates the structure of an antibody molecule, showing the heavy chain (C_H) and light chain (C_L) regions. The heavy chain is composed of C_{H1}, C_{H2}, and C_{H3} domains, while the light chain consists of C_L and C_{L1} domains. The variable regions (V_L, V_H) are located at the tips of the arms, and the constant regions (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) are at the base. The molecule is labeled with Fab (antigen-binding fragment) and Fc (crystallizable fragment) regions. The heavy chain regions are connected by disulfide bonds (SS). The variable regions are labeled V_L and V_H, and the constant regions are labeled C_L, C_{L1}, C_{H1}, C_{H2}, and C_{H3}. The diagram also shows the C_D region (CD) and the C₁ region (C₁).

5.3 Streptawidyna

46

5.4 Biotyna (biotynylowane BSA – bBSA)

Biotyna jest małą cząsteczką (0,244 kDa), a jej obecność z biologicznie aktywnymi makrocząsteczkami nie wpływa na funkcje biologiczne makrocząsteczki. System biotyny (strept)awidyny jest używany do różnych zastosowań, np. systemach detekcji, takich jak testy immunologiczne, testy hybrydyzacji DNA, immunohistochemia i cytometria przepływowa. Biotyna, zwana także witaminą H lub B7, składa się z pierścienia tetrahydroimidazalonu połączonego z pierścieniem tetrahydropyridynu, do którego przyłączony jest kwas walerianowy. Tylko pierścień bicykliczny jest ważny w swoistym wiązaniu z jednym z czterech miejsc wiązania obecnych na powierzchni streptawidyny lub awidyny. Łańcuch kwasu walerianowego można zmodyfikować w celu wygenerowania odczynników biotynylowanych. Odczynniki takie można zastosować w celu wprowadzenia do biotyny grupy funkcyjnej dendrymerów, tioli lub wstępnie silanizowanych powierzchni. Ponadto biotyna może być również sprzężona z białkami (np. BSA) [87], ich fragmentami lub innymi biomolekułami. W związku z tym, że cząsteczki biotyny są małe, biotynylacja nie wpływa na konformację i właściwości białka. Każdy protomer ma powierzchnię rozpoznawczą z miejscem wiązania fosfocholiny składającym się z dwóch skoordynowanych jonów wapnia przylegających do kieszeni hydrofobowej.

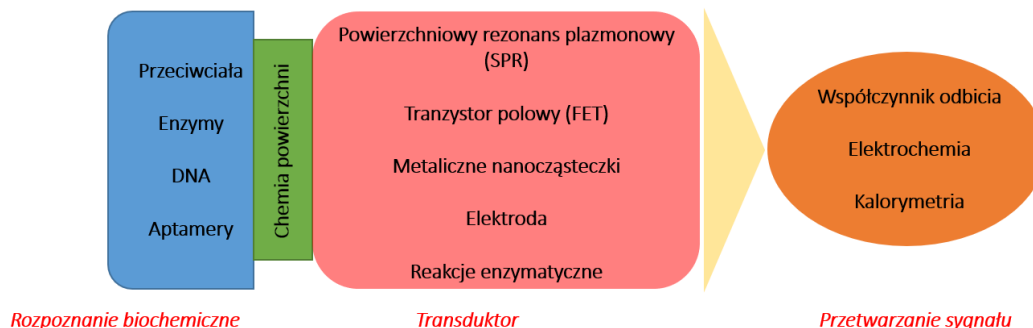
5.5 Białko C-reaktywne (CRP)

Białko CRP to pentameryczne białko pierścieniowe, obecne w osoczu krwi, którego poziom wzrasta w reakcji na stan zapalny. Składa się z pięciu identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 23 kDa, rozmieszczonych symetrycznie wokół porów centralnych, co klasyfikuje je do rodziny białek pentaksyny. Każda z podjednostek składa się z 206 aminokwasów, a całe białko ma masę cząsteczkową około 115 kDa. Strukturalnie składa się z dwóch β -skrętów połączonych ze sobą przez dwa antyrównoległe łańcuchy β . Białko CRP przybiera kształt dysku o grubości około 23 Å i średnicy około 117 Å, z niewielką kieszenią w centrum, do której mogą wiązać się fosfolipidy lub ligandy o niskiej masie cząsteczkowej [88] [89].

6. Wstęp do bioczuźników

Bioczuźnik jest urządzeniem, które konwertuje sygnał chemiczny lub biologiczny na odpowiedź, mierzalną różnymi metodami, niosącą wiele informacji na temat badanego materiału. Badania nad bioczuźnikami stają się coraz bardziej dynamiczne, ponieważ łatwo dostępne, szybkie, efektywne, tanie, o wysokiej selektywności i czułości biosensory stały się kluczem w postępie rozwoju leków nowej generacji i markerów chorób. Postępy w chemii powierzchni zapewniają szereg nowych metod projektowania systemów rozpoznawania cząsteczek docelowych. Postęp w nanotechnologii rokuje w powstawanie nowatorskich przetworników oraz miniaturyzację i integrację bioczuźników o wysokiej przepustowości. Dlatego ważne są interdyscyplinarne prace w celu tworzenia innowacyjnych bioczuźników.

Bioczuźniki (Rysunek 26) standardowo składają się z komponentu biorozpoznawczego do selektywnego/swoistego wiązania z docelowymi analitami i elementu przetwornika do przekształcania informacji pochodzących ze zjawiska wiązania na sygnały elektryczne lub optyczne. Enzymy, przeciwciała i DNA, które selektywnie rozpoznają docelowe biomolekuły, są one immobilizowane jako składniki rozpoznające na podłożu czujnika.



Rysunek 26 Schemat komponentów podstawowego bioczuźnika. Opracowanie własne na podstawie [90]

Pierwszym elementem budującym bioczuźnik jest warstwa biocząsteczek, która rozpoznaje i wykrywa obecność lub aktywność badanego analitu w próbce. Jako fragment rozpoznający stosuje się białka (np. enzymy lub przeciwciała), oligonukleotydy lub komórki. Biomolekuły w warstwie czujnikowej określają, jakie cząsteczki zostaną wykryte, stąd szerokie zastosowanie znalazły bioczuźniki w różnych dziedzinach nauki począwszy od medycyny [91] po nauki środowiskowe [92]. Ważnym jest, w celu zapewnienia selektywności i swoistości bioczuźnika, aby warstwa biomolekularna była przygotowana i dobrana w odpowiedni sposób.

Drugim komponentem wchodzącym w skład elementów budujących bioczuźnik jest przetwornik (transduktor), odpowiedzialny za przekształcanie

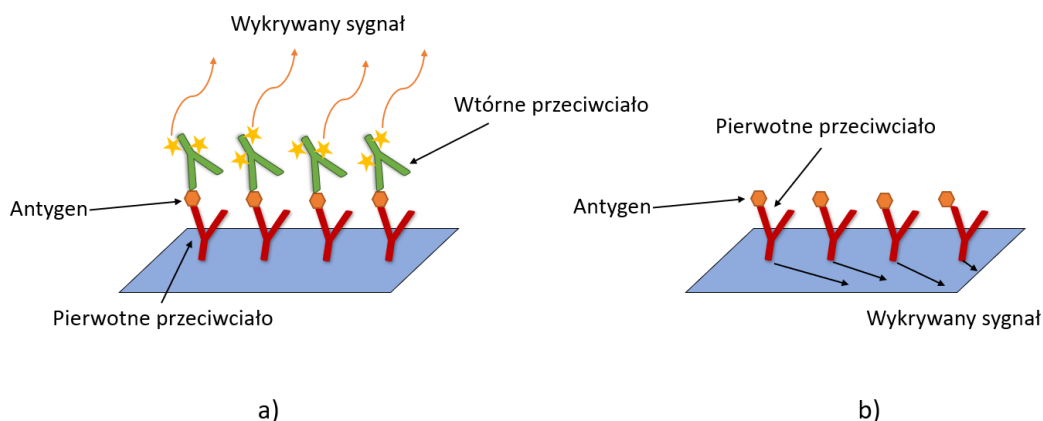
biochemicznego rozpoznania na sygnał wyjściowy, dający się zmierzyć dostępnymi metodami. Oddziaływania zachodzące w warstwie sensorowej mają wpływ na fizyczne właściwości transduktora, takie jak masa, impedancja, przewodność czy załamanie światła, od tego zależy dobór odpowiedniego przetwornika. Istnieją bioczujniki wymagające znakowania cząstek (np. znacznikami fluorescencyjnymi), w celu ich wykrycia, co może wpływać na aktywność znakowanej cząsteczki i zmieniać jej właściwości, dlatego odrębną grupę stanowią bioczujniki nie wymagające znakowania (tzw. *label-free*). Zasada działania takich bioczujników zwykle opiera się na detekcji parametrów fizycznych, również w czasie rzeczywistym [93]. Stąd trwają szeroko zakrojone badania nad bioczujnikami o małych wymiarach, pracujących „na żywo”, które reagują już przy niewielkiej ilości badanego analitu.

6.1 Rodzaje bioczujników

W ostatnich latach badania w dziedzinie zintegrowanego wykrywania chemicznego i biologicznego w czasie rzeczywistym umożliwiło udoskonalenie procedur wytwarzania lub wzrost mocy obliczeniowej do predykcyjnego modelowania wydajności urządzeń. Stworzenie zintegrowanych, nanoczujników umożliwiło niemalże natychmiastowe wykrywanie m.in. bakterii [94]. Techniki nanofabrykacji umożliwiły m.in. stworzenie opartych na krzemowych nanodrutach czujników [95] [96] wykorzystywanych w wielu dziedzinach nauki. W zależności od zapotrzebowania oraz typu badanych substancji/cząstek, tworzone są różnego rodzaju konfiguracje biosensorów. Postępy w mocy obliczeniowej ułatwiły wykrywanie i analizę w czasie rzeczywistym bardziej złożonych sygnałów, ponieważ zintegrowane czujniki mogą być wytwarzane w wielu formatach, mają wpływ na prawie każdy aspekt społeczeństwa, od przemysłu i motoryzacji po medycynę i rozwój technologii leków. Istnieje wiele rodzajów zintegrowanych czujników i różne podejścia do ich kategoryzacji. Jedną metodą jest wykorzystanie fizycznego mechanizmu przetwarzania do stworzenia klas zintegrowanych czujników. Na tej podstawie wyróżnić można typy czujników: elektryczny, mechaniczny i optyczny.

Innym podejściem do klasyfikacji bioczujników jest ich podział na metody oparte na znakowaniu i nieznakowaniu co porównano na Rysunku 27. Detekcja wolna od stosowania znaczników umożliwia bioczujnikom bezpośrednie wykrywanie badanego analitu. W przypadku znakowanych bioczujników wychwytywany analit, będący przedmiotem zainteresowania, przechwytywany jest przez pierwotne przeciwciała, ale wykrywany dopiero przez wtórne przeciwciała znakowane fluorescencyjnie. Wykrywanie cząstek bez znaczników umożliwia detekcję w czasie rzeczywistym bez pośrednich etapów. Zaletą znakowanych bioczujników jest zmniejszenie fałszywych odczytów, powstają również

znakowane czujniki pracujące w czasie rzeczywistym [97]. Poniżej opisano kilka rodzajów bioczuJNIKÓW opartych na różnych technologiach.

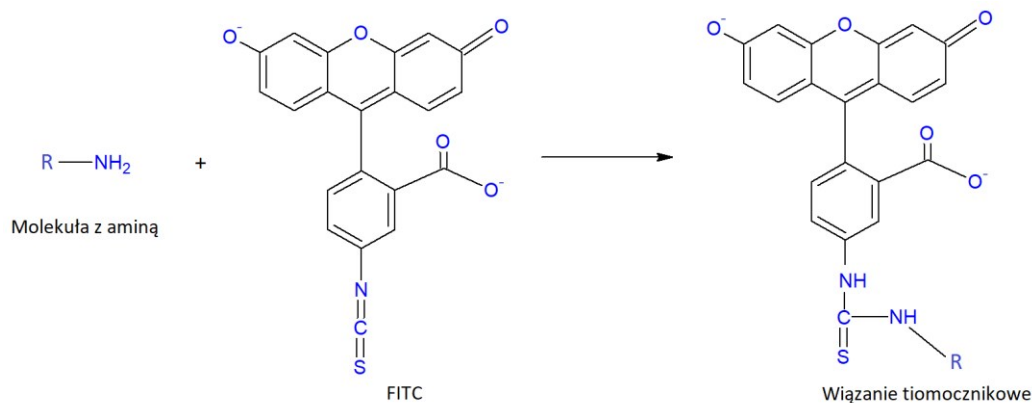


Rysunek 27 Porównanie między metodami wykrywania (a) znakowanymi i (b) wolnymi od znakowania. Opracowanie własne na podstawie [93]

6.1.1 Znakowane bioczuJNIKI

6.1.1.1 Znakowanie fluorescencyjne

Wykorzystywanie reaktywnych znaczników fluorescencyjnych zapewnia zdolność wykrywania białek, które samoistnie jej nie posiadają (np. przeciwciała). Jednym z najpopularniejszych znaczników fluorescencyjnych jest FITC (ang. *Fluorescein Isothiocyanate*), izotiocyaniany reagują z nukleofilami, takimi jak aminy, sulfhydryl i jony fenolowe łańcuchów bocznych. Stabilnym produktem są pierwszorzędowe grupy aminowe, tak więc FITC jest prawie całkowicie selektywny do modyfikowania ϵ - i N-końcowych amin w białkach. Reakcja obejmuje „atak” nukleofilu na centralny, elektrofilowy węgiel grupy izotiocyanianowej. Powstałe przesunięcie elektronu tworzy wiązanie tiomocznikowe między FITC i białkiem bez grupy opuszczającej [98]. Właściwości fluorescencyjne FITC obejmują maksimum absorpcji przy około 495 nm i długość fali emisji 520 nm. FITC jest wykorzystywany w wielu aplikacjach: przeciwciała lub ich fragmenty mogą być znakowane w celu wykrycia antygenów w komórkach, skrawkach tkanek lub na powierzchniach. Znakowanie cząsteczek za pomocą FITC jest również przydatne w analizie cząsteczek za pomocą elektroforezy w strefie kapilarnej [99], oraz w śledzeniu i wykrywaniu cząsteczek biorących udział w różnych interakcjach biologicznych.



Rysunek 28 Reakcja FITC z ze związkami aminowymi tworząca wiązanie izotiomocznikowe. Opracowanie własne na podstawie [98]

Metody wykrywania znaczników fluorescencyjnych są najczęściej wybieranymi i wygodnymi technikami przekazywania informacji o zdarzeniach molekularnych. Znaczniki fluorescencyjne są stabilne, łatwe w użytkowaniu przy tym samym zapewniają dobrą czułość i rozdzielczość. Znaczniki fluorescencyjne są dostępne w wielu postaciach: kropki kwantowe [100] i mikrocząsteczki organiczne, białka znakowane fluorescencyjnie o zakresie jasności i swoistości, które można wybrać w zależności od potrzeb [101]. Wykorzystywane są różne techniki oparte na zjawisku fluorescencji: FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy*) wykorzystuje różnice w intensywności fluorescencji donora i akceptora [102], BiFC (ang. *Bimolecular Fluorescence Complementation*) technologia oparta na badaniu oddziaływania między białkami, analiza BiFC opiera się na wzmocnieniu asocjacji między fluorescencyjnymi fragmentami białka poprzez fuzję fragmentów z białkami, które oddziałują ze sobą [103], FSC (ang. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) opiera się na analizie korelacji fluktuacji natężenia fluorescencji, m.in. analiza fluktuacji stężeń cząstek fluorescencyjnych w roztworze [104], metoda ta zapewnia również rejestrowanie danych dla korelacji czasoprzestrzennych między fluktuującymi sygnałami świetlnymi w połączeniu z pułapką pojedynczych cząsteczek w polu elektrycznym [105].

6.1.1.2 Znakowanie izotopowe

Jedną z najwcześniejszych metod wykrywania molekularnego było zastosowanie radioizotopów, które umożliwiają dokładne określenie ilościowe obfitości białka. Sama w sobie radioaktywność jest odpowiednia do analizy aktywności białek, szczególnie do enzymatycznej fosforylacji ze względu na czułość i swoistość, a także możliwość detekcji fluorescencji [106], stosowanie cząsteczek znakowanych izotopowo budziło obiekcje ze względu na bezpieczeństwo, natomiast powstają nowoczesne metody zabezpieczające przed

szkodliwością znaczników izotopowych [107] jak i nowe znaczniki izotopowe, które są w pełni stabilne [108].

6.1.1.3 Znakowanie nanocząsteczkami

Wiele rodzajów nanocząstek, w tym nanocząstki metali, tlenkowe, półprzewodniki, a także nanocząstki kompozytowe są stosowanych w czujnikach elektrochemicznych i bioczujnikach. Nanocząstki te odgrywają różnorodne funkcje w układach elektrochemicznych w oparciu o ich swoiste właściwości, podstawowe funkcje nanocząstek to:

- a) unieruchomienie biomolekuł,
- b) kataliza reakcji elektrochemicznych,
- c) wzmocnienie transferu elektronów,
- d) znakowanie biomolekuł,
- e) działanie jako reagent [109];

Ze względu na dużą powierzchnię właściwą i wysoką swobodną energię powierzchniową nanocząstki mogą silnie adsorbować biomolekuły i odgrywać ważną rolę w ich unieruchomieniu w konstrukcji bioczujnika. Adsorpcja biomolekuł bezpośrednio na powierzchniach niektórych materiałów, może często powodować ich denaturację a także utratę bioaktywności. Dzięki zastosowaniu nanocząstek adsorpcja biomolekuł na tego typu powierzchniach może zachować ich bioaktywność z powodu biokompatybilności nanocząstek. Większość nanocząstek przenosi ładunki, mogą one elektrostatycznie adsorbować biomolekuły o różnych ładunkach. Niektóre nanocząstki mogą unieruchomić biomolekuły poprzez inne interakcje, np. nanocząstki złota unieruchamiają białka poprzez wiązania kowalencyjne utworzone między atomami złota i grupami aminowymi oraz resztami cysteinowymi białek [110].

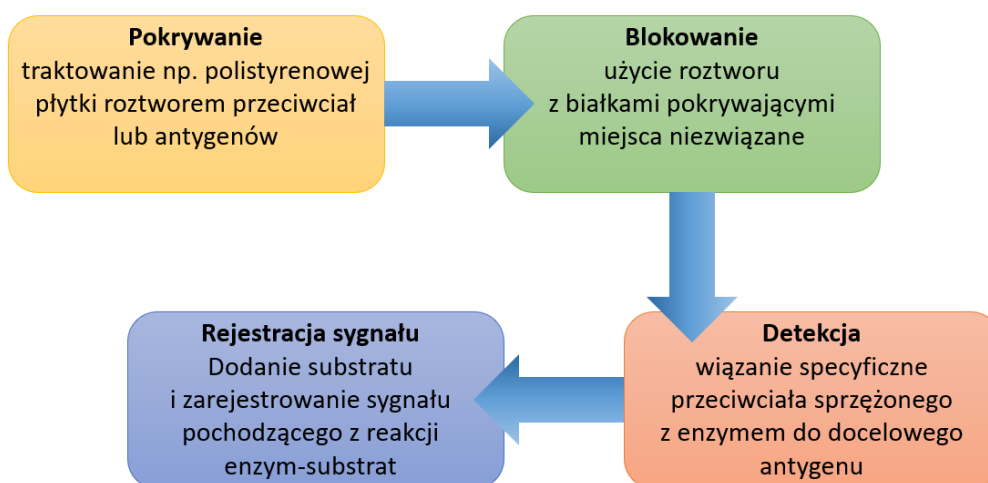
Najczęściej wykorzystywanymi nanocząsteczkami używanymi do unieruchomienia białek są nanocząstki złota [111] [112]. W badaniach wykazano, że wykorzystanie znakowanych złotymi nanocząstkami biomolekuł stosowane jest do wzmocnienia sygnału w Spektroskopii Ramanna [113] i SPR [114], ponieważ taki układ pochłania więcej energii światła z lokalizacji efektów rezonansowych na określonej długości fali.

6.1.1.4 Test immunoenzymatyczny (ELISA)

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) jest testem immunoenzymatycznym fazy stałej, który służy do wykrywania i ilościowego oznaczania białek, np. przeciwciał, antygenów białkowych [115].

Przeprowadzenie testu ELISA (Rysunek 29) angażuje przynajmniej jedno przeciwciało ze swoistością dla danego antygeny. Obejmuje to kilka etapów:

- Próbka z nieznaną ilością antygeny jest unieruchomiona na stałym podłożu: niespecyficjnie (adsorpcja) lub specyficjnie (wychwytywanie przez specyficzne przeciwciało dla danego antygeny; „*ELISA sandwich*”).
- Po unieruchomieniu antygeny dodaje się przeciwciało wykrywające, tworzy się kompleks z antygenem. Przeciwciało wykrywające może być kowalencyjnie połączone z enzymem lub samo może być wykryte przez przeciwciało wtórne, które jest połączone z enzymem poprzez biokoniugację.
- Pomiędzy każdym etapem płytka przemywana jest łagodnym roztworem detergentu w celu usunięcia niespecyficjnie związanych białek lub przeciwciał.
- Po dodaniu enzymatycznego substratu do próbki w teście, reakcja enzym-substrat generuje widzialny sygnał, który jest proporcjonalny do ilości antygeny obecnego w próbce [116].



Rysunek 29 Schemat przebiegu testu ELISA

Testy ELISA są wykonywane zazwyczaj na płytkach polistyrenowych 96-dołkowych, do których wprowadza się roztwór przeciwciał/antygenów. Do blokowania wolnych, niezablokowanych miejsc na powierzchni służy roztwór BSA, co uniemożliwia wiązanie innych białek do podłoża przy kolejnych etapach

testu. Reakcja antygen-przeciwciała uwidaczniana jest dzięki sprzężeniu z odpowiednim enzymem, zazwyczaj stosowane są fosfataza alkaliczna, peroksydaza chrzanowa, oraz oksydaza glukozowa.

Wyróżnić można kilka odmian testów ELISA (Rysunek 30): bezpośredni i pośredni, test podwójnego wiązania („*ELISA sandwich*”) oraz test kompetycyjny. W zależności od rodzaju badanych biomolekuł stosuje się jeden z typów testów.

I. Test bezpośredni i pośredni

W teście bezpośrednim, gdy do płytki polistyrenowej zaadsorbowane zostaną antygeny, dodaje się roztwór przeciwciał specyficznych dla tych antygenów. Następnie enzymy katalizując tę reakcję dają barwny odczyn, który może zostać zanalizowany metodami spektrofotometrycznymi. Wadami tego rodzaju testu są: konieczność użycia jednego, specyficznego przeciwciała znakowanego enzymem, wysokie koszty przeprowadzenia wielu testów dla pozostałych antygenów. Zaletą zaś jest to, że metoda jest szybka i prosta w wykonaniu.

W teście pośrednim stosowane są przeciwciała monoklonalne (pierwszorzędowe) wiążące się specyficznie z antygenem. Kolejnym krokiem jest dodanie przeciwciał drugorzędowych znakowanych enzymem, łączą się one z przeciwciałami pierwszorzędownymi rozpoznając dany izotyp (odnosi się do fenotypowych różnic w regionach stałych łańcucha ciężkiego i lekkiego przeciwciała) [117]. Następnie po dodaniu substratu enzym daje barwną reakcję, również analizowaną spektrofotometrycznie. Zaletą tej metody jest brak konieczności stosowania specyficznych przeciwciał. Wadą jest długi czas przygotowania testu w porównaniu do testu bezpośredniego.

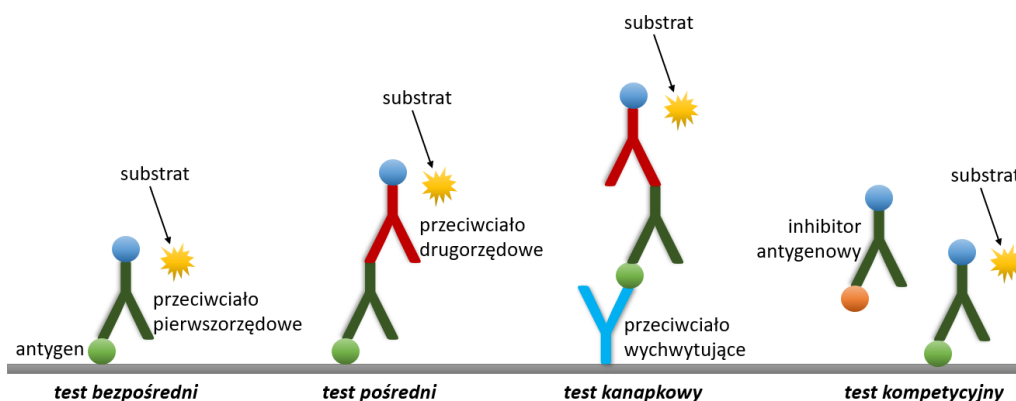
II. Test podwójnego wiązania („*ELISA sandwich*”)

Dzięki tej metodzie można określić stężenie danego antygeny w próbce. Pierwszym etapem jest zaadsorbowanie do stałego podłoża specyficznego dla danego antygeny przeciwciała, następnie wymycie niezwiązanych białek. Dodawane są przeciwciała pierwszorzędowe, które również łączą się z antygenem a następnie przeciwciała drugorzędowe znakowane enzymem (antygen znajduje się między dwiema warstwami przeciwciał; stąd pochodzi nazwa testu „kanapka”). Ostatnim etapem jest dodanie substratu, z którym enzym daje reakcję barwną.

III. Test kompetycyjny (c-ELISA)

W tym rodzaju testu stosuje się mieszaninę znakowanych antygenów lub przeciwciał, które są dodawane do badanego roztworu białkowego (surowicy). Przeciwciała znakowane i te pochodzące z surowicy będą ze sobą konkurować. Dzięki tej metodzie określić można ilość przeciwciał znajdujących się w surowicy. Im więcej przeciwciał w surowicy, tym mniej przeciwciał znakowanych

enzymatycznie połączy się z antygenem, dlatego reakcja barwna będzie mniej intensywna.

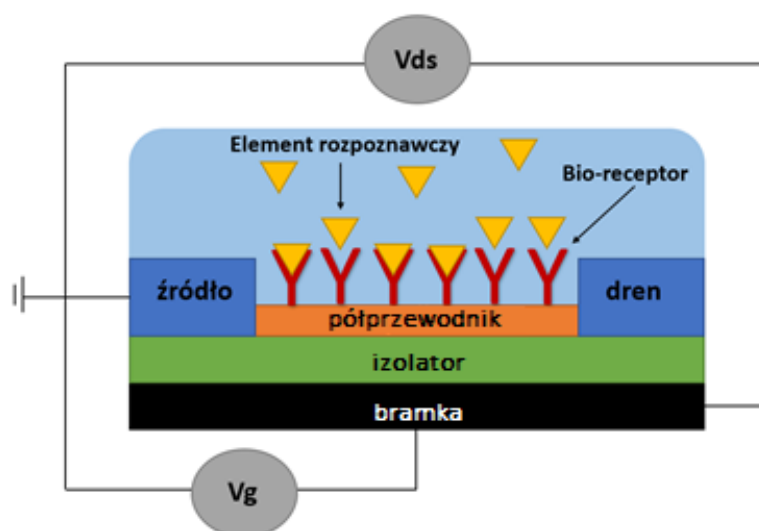


Rysunek 30 Schemat różnych wariantów testu ELISA

6.1.2 Nieznakowane bioczuJNIKI

6.1.2.1 BioczuJNIK oparty na tranzystorze polowym (Bio-FET)

BioczuJNIKI oparte na tranzystorze polowym FET (głównie MOSFET) [118] są bramkowane przez zmiany potencjału powierzchniowego indukowanego przez wiązanie cząsteczek. Zasada działania polega na tym, że biomolekuły wiążące się z bramką tranzystora efektu polowego (FET) powodują zmianę rozkładu ładunku w obszarze poniżej materiału półprzewodnikowego, co prowadzi do zmiany przewodnictwa kanału FET [119]. Bio-FET składa się z dwóch głównych elementów (Rysunek 31): część służąca do rozpoznawania biologicznego oraz z tranzystora polowego, działającego jak przetwornik oddzielony warstwą izolatora (np. SiO_2) od elementu rozpoznawania biologicznego (np. enzymy, przeciwciała lub receptory), selektywnego do analitu. Podczas gdy dany analit wiąże się z elementem rozpoznającym, rozkład ładunku na powierzchni zmienia się wraz ze zmianą potencjału elektrostatycznego powierzchniowego półprzewodnika. Zmiana potencjału powierzchniowego półprzewodnika w tym przypadku odgrywa rolę napięcia bramki w klasycznym tranzystorze MOSFET. Innymi słowy, taka zmiana powoduje zmianę ilości prądu, który może przepłynąć między źródłem a drenem w kanale FET. Tę zmianę prądu można zmierzyć, dzięki czemu można wykryć wiązanie analitu [120]. Kiedy gęstość ładunku powierzchniowego zmienia się w wyniku zdarzeń rozpoznawania biomolekularnego na powierzchni bramki, odpowiednia krzywa napięcie-prąd-źródło ($V_{DS} - I_D$) jest przesuwana wzdłuż osi napięcia. Przesunięcie krzywej zależy od stężenia docelowej biomolekuły jako analitu, ponieważ gęstość nośnika jest wrażliwa na zmiany pola elektrycznego w kierunku prostopadłym do powierzchni bramki.



Rysunek 31 Ogólny schemat bioczuownika Bio-FET

Za pomocą bioczuowników Bio-FET można monitorować bezpośrednio wiązanie docelowych biomolekuł z powierzchnią bramki ze względu na zmiany w rozkładzie ładunku w kierunku prostopadłym do powierzchni bramki, warunkiem jest mała odległość, która odpowiada długości Debye'a, aby pokonać tę barierę stosuje się stopniowe dodawanie docelowych biomolekuł [121]. Metoda ta jednak ma swoje ograniczenia. Stworzenie całego czujnika wymaga skomplikowanej technologii.

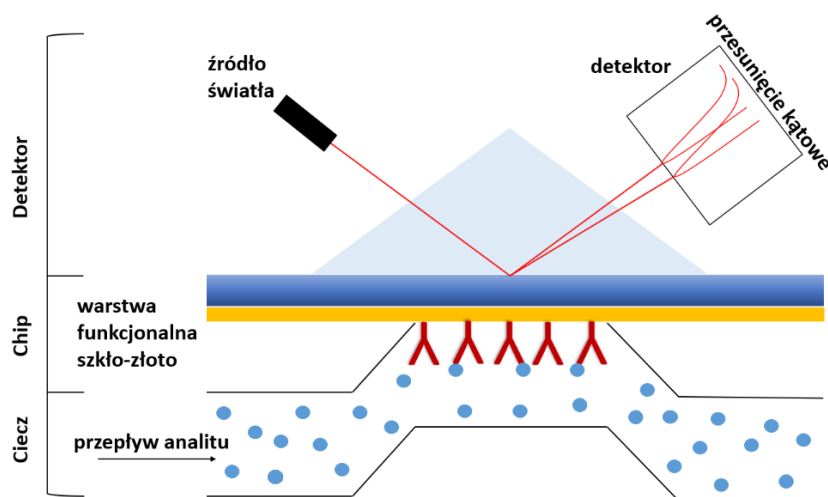
6.1.2.2 Optyczne bioczuowniki

Zintegrowane czujniki optyczne, (chemiczne lub biologiczne) oparte są na pomiarze zmiany współczynnika załamania światła, długości fali lub straty optycznej urządzenia, gdy dane cząsteczki wiążą się na jego powierzchni. Optyczne bioczuowniki mają wiele zalet w porównaniu z tradycyjnymi technikami analitycznymi, ponieważ umożliwiają bezpośrednie, w czasie rzeczywistym i bez oznaczania, wykrywanie wielu substancji biologicznych i chemicznych. Ich zalety obejmują wysoką specyficzność, czułość, mały rozmiar i niskie koszty. Wykrywanie optyczne odbywa się poprzez wykorzystanie interakcji pola optycznego z elementem bioreferencji. Biosensor optyczny można podzielić na dwa rodzaje: nieoznakowany i oznakowany. W układzie nieoznakowanym wykrywany sygnał jest generowany bezpośrednio przez interakcję analizowanego materiału z przetwornikiem. Wykrywanie oparte na znakowaniu wymaga użycia znacznika, a sygnał optyczny jest następnie generowany metodą kolorymetryczną, fluorescencyjną lub luminescencyjną. Biosensor optyczny wykorzystuje materiały biologiczne takie jak: przeciwciała, antygeny, enzymy, kwasy nukleinowe, całe komórki, receptory i tkanki jako elementy rozpoznawane. Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), fluorescencja fali zanikającej

i interferometri światłowodowe wykorzystują pole zanikające w bliskiej odległości od powierzchni bioczuownika w celu wykrycia interakcji elementu rozpoznania biologicznego z analitem.

I. Biosensor powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR)

Zjawisko SPR występuje na powierzchni materiałów przewodzących (np. metalu) na styku dwóch ośrodków (np. szkła lub cieczy), gdy jest oświetlone spolaryzowanym światłem pod określonym kątem. Generowane są wtedy plazmony powierzchniowe, a w konsekwencji zmniejsza się intensywność światła odbitego pod określonym kątem, znanym jako kąt rezonansu. Sensogram można uzyskać poprzez pomiar przesunięcia współczynnika odbicia, kąta lub długości fali w funkcji czasu [122]. Bioczuowniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) należą do technologii bioczuowników optycznych bez znaczników. Metoda SPR (Rysunek 32) opiera się na optycznym pomiarze zmian współczynnika załamania światła spowodowane związaniem się molekuł analitu w próbce na powierzchni czuownika SPR [123].



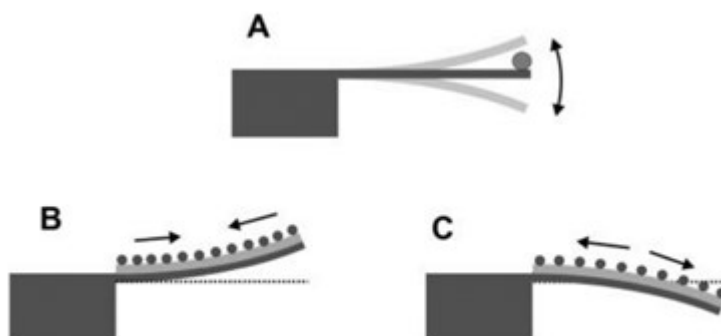
Rysunek 32 Zasada działania biosensora SPR. Opracowanie własne na podstawie [124]

II. Obrazowanie SPR (SPRi)

Obrazowanie SPR (SPRi) pozwala na badanie przestrzenne w formacie mikromacierzy, umożliwiając jednoczesną analizę wielu różnych interakcji. Aparatura SPRi zbudowana jest z trzech głównych części: przetwornika, elementu optycznego (laser, soczewki, pryzmat, polaryzatory) oraz układu rejestrującego dane (kamera CCD). Często stosuje się modyfikację warstwy złota, np. tiolami w celu stworzenia odpowiedniego środowiska dla biomolekuł, które do niej adsorbują.

6.1.2.3 Bioczułnik beleczkowy

Głównym elementem bioczułników beleczkowych jest beleczka o wymiarach mikrometrowych, która jest unieruchomiona za pomocą wspornika na jednym z jej końców. Wyróżnić można dwa tryby pracy: tryb dynamiczny wykrywający zmiany masy na wsporniku na podstawie zmian częstotliwości rezonansowej; oraz tryb naprężenia powierzchniowego (statyczny), w którym asymetryczne wiązanie molekularne z górną lub dolną powierzchnią wspornika prowadzi do ogólnego zgięcia wspornika [125] co przedstawiono poniżej na Rysunku 33:



Rysunek 33 Mody pracy bioczułnika beleczkowego: A – tryb dynamiczny, B, C– tryb naprężenia powierzchniowego (statyczny) [125]

W trybie dynamicznym lub rezonansowym beleczki są wzbudzone blisko częstotliwości rezonansowej, która zwykle mieści się w zakresie kHz lub MHz. W pracy A.D. Pastina i innych tryby rezonansowe beleczki dochodziły do 2 MHz [126]. Kiedy dodatkowa masa jest przymocowana do oscylującej beleczki, jej częstotliwość rezonansowa zmienia się (dla dodatkowej masy częstotliwość rezonansowa maleje).

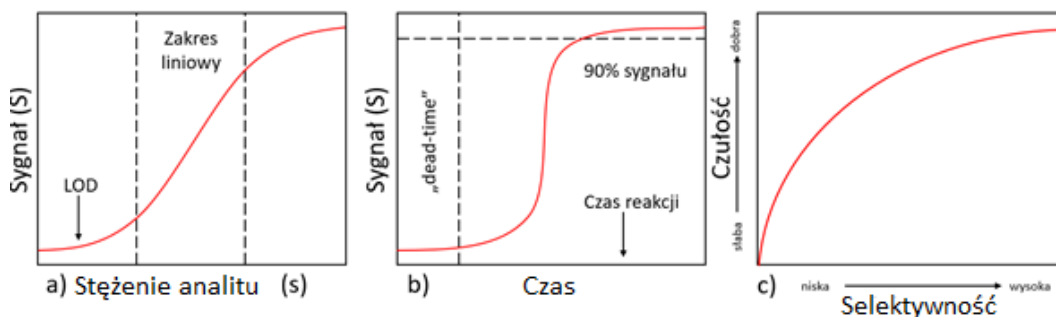
W trybie statycznym zmiany otoczenia wokół lub na powierzchni beleczki prowadzą do wywołania naprężenia mechanicznego w jej powierzchni, co skutkuje jej skurczeniem lub rozszerzeniem. W przypadku, gdy naprężenie działa tylko na jedną stronę beleczki, jej struktura ulega wygięciu z niejednakowym naprężeniem, zarówno wzdłuż beleczki, jak i w innych kierunkach [127].

Działanie bioczułników beleczkowych w trybie statycznym opiera się na wiązaniu cząsteczek docelowych tylko do jednej strony beleczki, dodatkowe naprężenie przeciwległej strony powoduje zniesienie działających sił, wtedy beleczka nie wygnie się. Jedna powierzchnia ma za zadanie zapewnić receptory dla cząsteczek docelowych, podczas gdy inne zapobiegają specyficznej lub niespecyficznej adsorpcji cząsteczek do próbki. Dlatego bardzo ważne jest odpowiednie sfunkcjonalizowanie powierzchni beleczek. Każda beleczka charakteryzuje się odmienną budową tj. górna strona może być pokryta złotem

a dolna ditlenkiem krzemu, dlatego można zastosować funkcjonalizację takich powierzchni, np. tiolami (złoto) lub silanami (ditlenek krzemu) [128] [129].

6.2 Parametry techniczne bioczuźników

Ze względu na liczne rodzaje bioczuźników opracowano podstawowe wskaźniki do porównywania wydajności urządzeń. Są one związane z reakcją lub zachowaniem urządzenia. Główne wskaźniki wydajności pracy bioczuźników obejmują: wartość sygnału, poziom szumów, stosunek sygnału do szumu (SNR), zakres liniowy (zakres roboczy), czas i szybkość odpowiedzi oraz selektywność. Rysunek 34 obrazuje idealnie działający czuźnik: sygnał wyjściowy (S), który jest generowany przy danym wejściu lub wielkości mierzone. W zakresie liniowym czuźnika relacja wynosi $S=a+bs$ (a- tło, poziom szumu, b- czułość, s- wejście). Bioczuźnik może być w stanie działać lub wykrywać poniżej lub powyżej zakresu liniowego, ponieważ wykracza poza liniowy zakres roboczy, który można skalibrować, sygnały te będzie trudno dokładnie przeliczyć na ilość analitu obecnego w próbce. Wartość stosunku sygnału do szumu (SNR) jest kluczowym parametrem przy rozważaniu przydatności czuźnika do rzeczywistych zastosowań i jest to intensywność sygnału podzielona przez poziom szumu.



Rysunek 34 Charakterystyka bioczuźnika [93]

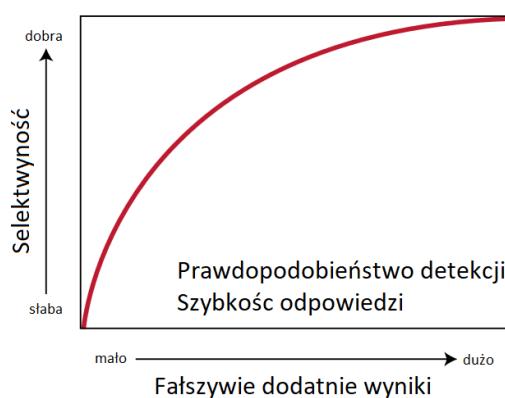
Granica wykrywalności (LOD) jest najmniejszym stężeniem wielkości badanej molekuly, którą można wykryć. Czas reakcji i szybkość czasu detekcji opisują zachowanie się bioczuźnika w czasie. Czas reakcji to czas wymagany do osiągnięcia przez czuźnik 90% (typowo) wartości końcowej dla danego stężenia substancji mierzonej, a szybkość reakcji to nachylenie tej krzywej [93]. Selektywność (czułość) układu bioczuźnika jest ogólnie rozumiana jako minimalne wykrywalne stężenie analitu i jest zazwyczaj podawana w jednostkach cząstek lub masy na jednostkę objętości powietrza (cząstki/litr lub mg/m^3) [130].

Wyróżnić można parametry określające przydatność urządzenia:

- dokładność przeprowadzanych pomiarów;

- czułość, powinowactwo;
- powtarzalność otrzymywanych wyników;
- zakres dynamiczny – zakres stężeń, w których czułość jest większa od zera;
- selektywność, czyli specyficzność względem badanego analitu– zdolność bioczujujnika do pomiaru stężenia jednego składnika w obecności innych;
- czas odpowiedzi oraz szybkość czasu detekcji;
- trwałość sensora.

Czułość układu nieodłącznie związana jest z wykrywalnością i współczynnikiem fałszywie dodatnich wyników, co wynika z krzywej ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*). Pewność wykrycia to prawdopodobieństwo wykrycia (detekcji) czynnika, gdy w rzeczywistości jest on obecny w określonym stężeniu lub powyżej niego. Fałszywie dodatni wskaźnik to współczynnik (zdarzenia na jednostkę czasu), przy którym bioczujujnik omyłkowo wykrywa obecność czynnika, podczas gdy w rzeczywistości żaden nie jest obecny. Do określenia czułości (selektywności) wymagane jest określenie prawdopodobieństwa wykrycia i wskaźnika fałszywie dodatnich wyników. Czułość bioczujujnika, pewność wykrywania, współczynnik fałszywie dodatnich i czas odpowiedzi są powiązane i zależą od środowiska pracy bioczujujnika [130].



Rysunek 35 Krzywa ROC: dla stałego prawdopodobieństwa wykrycia [130]

Krzywa ROC bezpośrednio odnosi się do dwóch ważnych wskaźników czujnika: czułości i współczynnika fałszywie dodatniego. Gdy krzywa jest rysowana dla stałego prawdopodobieństwa wykrycia czas odpowiedzi wpływa na prawdopodobieństwo wykrycia i odsetek wyników fałszywie dodatnich. W miarę zwiększania czułości czujnika, zwykle wzrasta również liczba wyników fałszywie dodatnich. Innymi słowy, im bardziej czuły jest czujnik, tym większe prawdopodobieństwo, że zarejestruje sygnał od niewielkiej ilości analitu lub od innych czynników, które mogą być obecne w próbce, ale nie są istotne z punktu widzenia badania.

Część eksperymentalna

7. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było stworzenie taniego i prostego bioczuJNIKA nieoznakowanego, który będzie działał w czasie rzeczywistym i będzie wykorzystywał pomiary impedancji do badania procesu adsorpcji białek. BioczuJNIK taki miałby potencjalne zastosowania w różnych dziedzinach, takich jak biotechnologia, medycyna czy produkcja i testowanie żywności. Otrzymane wyniki były porównywane z wynikami uzyskanymi za pomocą innych metod i urządzeń, aby określić, czy bioczuJNIK jest skuteczny i precyzyjny.

Podczas pracy nad projektem należało opracować metodę, która pozwoli na wykrycie i zidentyfikowanie różnych białek, wykorzystując ich właściwości impedancyjne. Urządzenie musi działać w czasie rzeczywistym, co pozwoli na szybką analizę próbek. Wszystkie wyniki z przeprowadzonych pomiarów powinny być łatwo przetwarzalne na sygnał elektryczny, który może zostać odczytany za pomocą komputera w celu dalszej analizy.

Wprowadzenie do pracy zawiera opis etapów eksperymentalnych, które zostały przeprowadzone w celu osiągnięcia określonych celów badawczych. Poniżej przedstawiono ogólny przebieg tych badań:

1. Poszukiwanie odpowiedniego podłoża:
 - Przeprowadzono analizę różnych parametrów, takich jak przewodnictwo, przezroczystość, stabilność chemiczna i dostępność podłoża.
 - Na podstawie analizy literaturowej oraz własnych potrzeb badawczych, wybrano podłoża Si/SiO₂ oraz ITO.
2. Poszukiwanie odpowiedniego polimeru:
 - Analizowano parametry różnych polimerów w celu równomiernego pokrycia podłoża Si/SiO₂ oraz ITO.
 - Na podstawie analizy literaturowej oraz eksperymentalnej, wybrano odpowiednie polimery do badań nad adsorpcją białek do jego powierzchni i reakcji białko-białko.
3. Analiza adsorpcji białek dla suchych próbek:
 - Przeprowadzono eksperymenty mające na celu sprawdzenie możliwości adsorpcji białek na podłożach Si/SiO₂ oraz ITO pokrytych cienką warstwą polimeru dla suchych próbek.
4. Budowa układu mikrofluidycznego typu I:
 - Zaprojektowano i skonstruowano układ mikrofluidyczny typu I, który umożliwiał wprowadzenie roztworu białka do komory mikrofluidycznej i badanie jego interakcji z powierzchnią.

- Przeprowadzono eksperymenty, analizując spektra uzyskane za pomocą spektrometru impedancyjnego Agilent 4294A.
- 5. Budowa układu mikrofluidycznego typu II umożliwiającego równoczesną analizę na dwóch elektrodach:
 - Rozbudowano wcześniejszy układ mikrofluidyczny typu II, umożliwiając równoczesną analizę dwóch elektrod jednej próbki – referencyjnej i badanej, na której dochodzi do immunoreakcji, za pomocą dwóch spektrometrów Agilent 4294A.
- 6. Budowa układu elektronicznego opartego o układ AD8302 – prototyp biosensora:
 - Wykorzystano komercyjnie dostępny układ AD8302 do budowy układu elektronicznego związanego z badanym układem mikrofluidycznym.
 - Skonfigurowano układ elektroniczny w celu pomiaru parametrów elektrochemicznych i analizy wyników pomiarów.

7.1 Badania wstępne – konstrukcja układu i pomiary impedancyjne

Badania impedancyjne podłoży polimerowych i białkowych polegają na badaniu reakcji elektrody pokrytej próbką na zmienne sygnały elektryczne. Impedancja elektrody zmienia się w zależności od składu i struktury próbki, co umożliwia identyfikację charakterystycznych właściwości powierzchni.

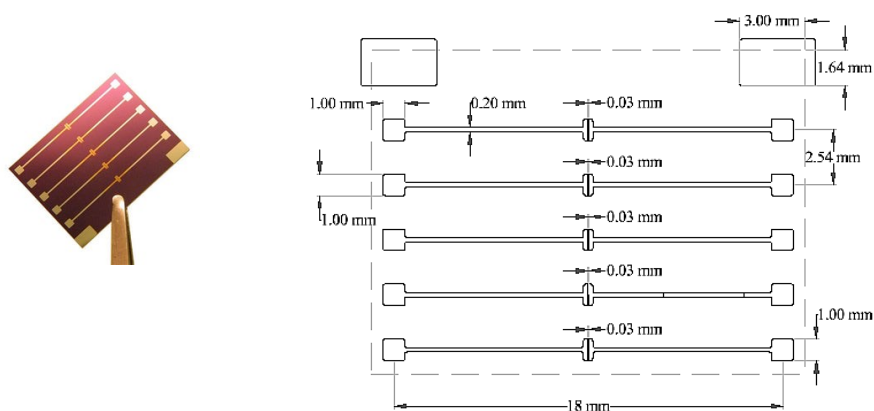
W przypadku podłoży polimerowych, jak podaje literatura badania impedancyjne pozwalają na analizę właściwości mechanicznych [131], chemicznych i strukturalnych powierzchni polimerów [132]. Te badania mogą być stosowane do monitorowania zmian w strukturze polimeru na powierzchni podczas procesów chemicznych, w tym procesów adsorpcji lub zmian pH. Badania impedancyjne mogą także pomóc w określeniu jakości powłok polimerowych [133].

W przypadku białek, badania impedancyjne mogą pomóc w zrozumieniu interakcji między białkami i ich otoczeniem. Impedancja elektrody zmienia się w zależności od stopnia adsorpcji białek na powierzchni elektrody i od zmian w strukturze białek. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, badania impedancyjne mogą potencjalnie przyczynić się do określenia kinetyki adsorpcji białek, analizy interakcji między różnymi białkami oraz oceny wpływu pH i siły jonowej na te interakcje [65].

7.1.1 Podłoża krzemowe SiO₂ z elektrodami złotymi

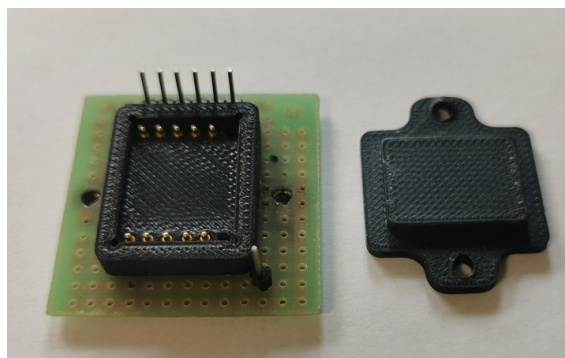
Aby móc rozpocząć prace badawcze, konieczne było znalezienie odpowiedniego podłoża, które byłoby w stanie zapewnić jednorodną powierzchnię dla naniesienia warstwy polimeru, a i osadzenie białek w trakcie dalszych etapów

eksperymentu. Pierwszym podłożem, które poddano badaniu były podłoża krzemowe Si/SiO₂ o grubości warstwy SiO₂ równej 300 nm. Zastosowano zakupione podkłady firmy Ossila S181 przedstawione na Rysunku 36:



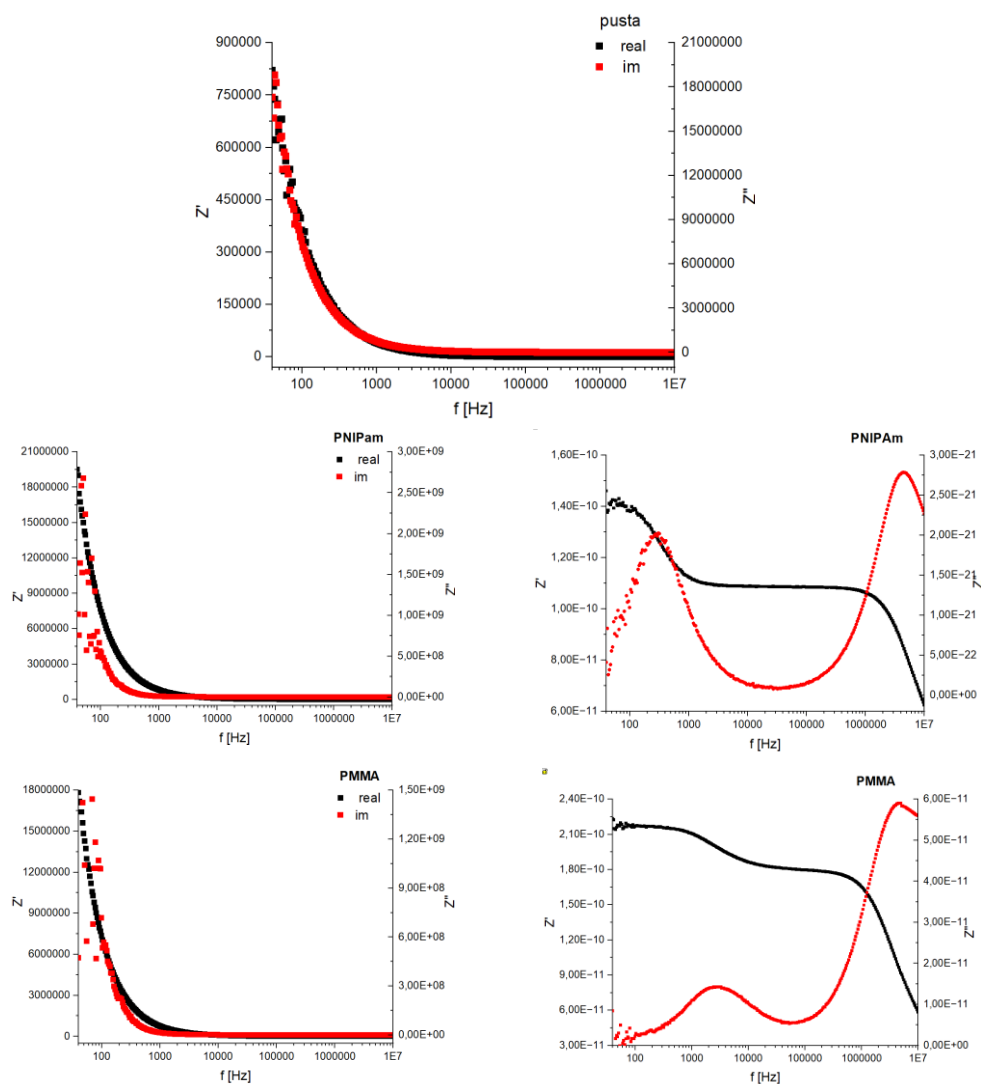
Rysunek 36 Podłożo krzemowe Si/SiO₂ firmy Ossila (S181) z termicznie naparowanymi elektrodami złotymi

Na uprzednio wyczyszczone podkłady naniesiono cienką warstwę wybranego polimeru metodą spin coating'u. Selekcja odpowiedniego polimeru stanowiła kluczowy etap w badaniach, gdyż celem było znalezienie takiego polimeru, który nie wprowadzałby znaczącej reakcji impedancyjnej do pomiaru, a przez to nie zakłócałby detekcji białek i był odpowiednim podłożem, do którego białka chętnie by adsorbowały. Właściwe dobranie polimeru pozwala na uzyskanie stabilnej i powtarzalnej odpowiedzi impedancyjnej oraz umożliwia dokładną identyfikację wpływu białek na powierzchnię elektrod. W ramach tego etapu przeprowadzonych badań przetestowano dwa rodzaje polimerów: polimetakrylan metylu (PMMA) oraz poli(N-izopropylakryloamid) (PNIPAm). Aby przeprowadzić pomiary w temperaturze pokojowej, co było istotne dla PNIPAm, który poniżej temperatury 32°C wykazuje właściwości hydrofobowe i nie rozpuszcza się w wodzie, konieczne było usieciowanie tego polimeru za pomocą czynnika PETA (poli(etylenoglikol) tetraakrylan) o stężeniu 20% oraz naświetlenie światłem UV. Jednak może to wpływać na orientację zaadsorbowanego białka do powierzchni PNIPAm [134]. Powodem włączenia wspomnianych wyżej polimerów do badań była ich efektywna zdolność do adsorpcji białek na swojej powierzchni, co zostało wykazane w badaniach innych członków naszej grupy badawczej. Badania impedancyjne przeprowadzano w stworzonym do tego celu układzie przedstawionym na Rysunku 37, umożliwiającym pomiar odpowiedzi impedancyjnej materiału na powierzchniach krzemowych z elektrodami złotymi. Układ zaprojektowano tak, by zapewnić powtarzalność warunków pomiarowych. Dzięki uchwytowi kontakt elektrod złotych na próbce z układem był zapewniony na każdym etapie eksperymentu.



Rysunek 37 Układ do pomiarów widm impedancyjnych skonstruowany do użytku własnego. Układ składał się z miejsca na próbkę, pinów łączących elektrody złote z układem, dwóch elektrod łączących układ ze spektrometrem impedancyjnym Agilent 4294A oraz wieczka mocującego.

Na wykresach poniżej (Rysunek 38) porównano odpowiedzi impedancyjnej czystego podłoża oraz podłoża krzemowego z naniesioną warstwą polimeru PMMA oraz PNIPAm w warunkach „suchych” (po odparowaniu rozpuszczalnika z roztworu polimeru):



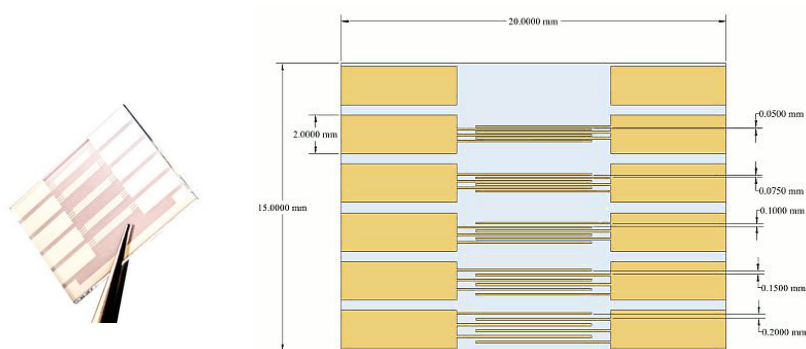
Rysunek 38 Widma impedancyjne – część rzeczywista Z' i urojona Z'' dla czystego podłoża Si/SiO₂/Au oraz pokrytego cienką warstwą polimerów PNIPAm oraz PMMA

W badaniach impedancyjnych przeprowadzonych dla polimeru PMMA, uzyskane widma nie były powtarzalne, co oznacza, że wyniki nie były spójne i nie można było uzyskać jednoznacznych wniosków. Mimo, że w pracy J.Hie i innych [135] udowodniono, że sulfonowane mikrosfery PMMA wykazują adsorpcję BSA do swojej powierzchni. Postanowiono zrezygnować z dalszych badań polimeru PMMA. W przypadku polimeru PNIPAm uzyskane wyniki były bardziej powtarzalne, jednakże, aby uzyskać dokładniejsze wyniki, konieczne było przeprowadzenie dodatkowego etapu - sieciowania, który wydłużał czas eksperymentu.

Podłoża krzemowe podłoża Si/SiO₂/Au nie dawały powtarzalnych wyników, co skłoniło do dalszych poszukiwań innych rodzajów podłoża. Jedną z przyczyn takiego zachowania może być, że powierzchnia elektrod wynosiła zaledwie około 2-3m², a więc niewielka była ilość próbkowanego materiału.

7.1.2 Podłoża szklane z elektrodami ITO

Kolejnym podłożem, które wytypowanym do badań były podłoża szklane z elektrodami ITO. Wybrano do tego celu gotowe podłoża firmy Ossila S161 ze stałą długością kanału wynoszącą 50 mikronów przedstawionego na Rysunku 39. W tym przypadku całkowite pole powierzchni elektrod jest dużo większe niż w przypadku podkładu S181 co pozwala zarejestrować sygnał z większego obszaru.



Rysunek 39 Podłoża szklane firmy Ossila (S161) z elektrodami ITO

Do wszystkich badań opisanych dalej w pracy wykorzystano podłoża szklane z ITO z cienką warstwą polimeru wraz z zaadsorbowanym do niego białkiem. Na uprzednio wymyte (w płuczce ultradźwiękowej z izoropropanolem) i osuszone w strumieniu azotu podłoża szklane z ITO, za pomocą metody spin coating'u nanoszono cienką warstwą polimeru. Na tym etapie do tworzenia cienkich warstw polimerowych wykorzystano polistyren.

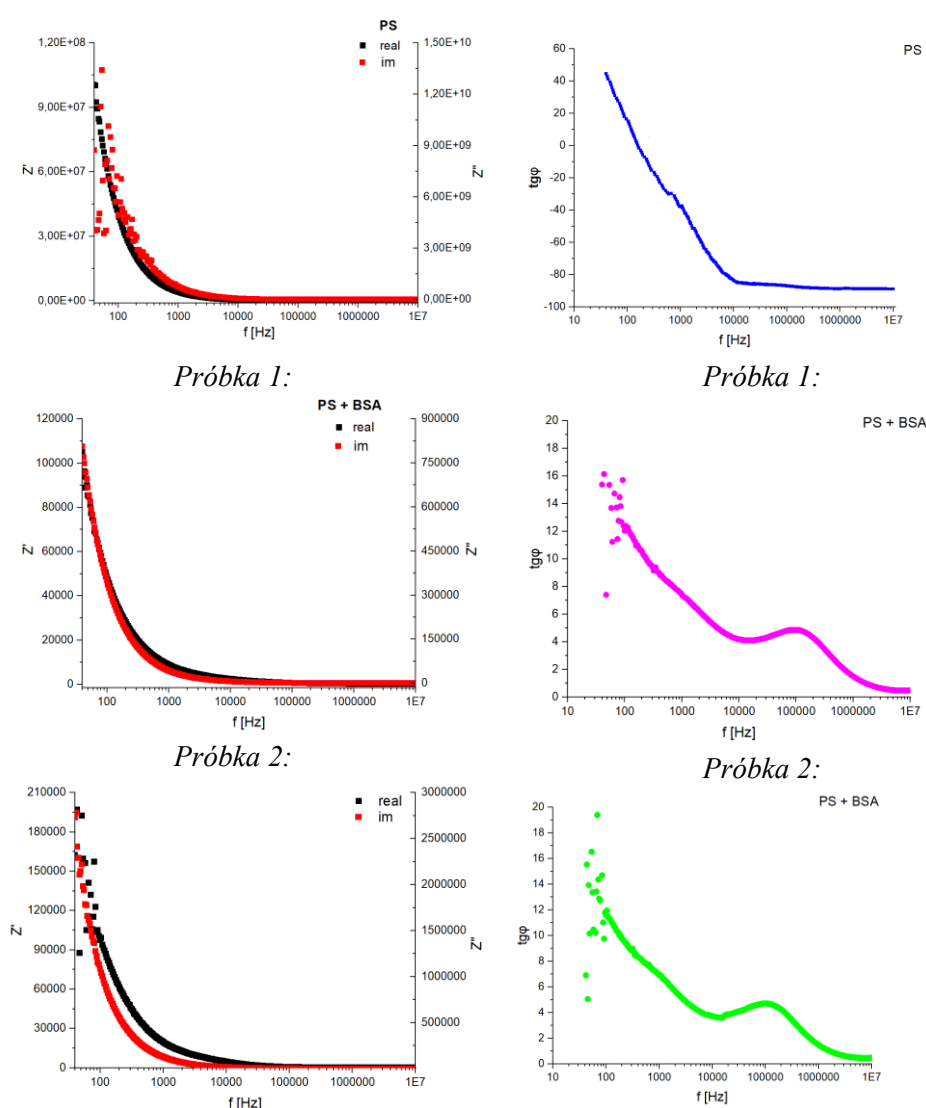
W pierwszych badaniach adsorpcji białek przygotowano dwa rodzaje próbek: z czystym polimerem PS oraz z polimerem PS wraz z osadzonym na jego powierzchni białkiem BSA. Po 24h od momentu wylania cienkiej warstwy polimeru na podłożu szklanym z ITO osadzono BSA (inkubacja 30-60 minut) w celu wysycenia powierzchni polimerowej białkiem. Tak przygotowane podłoża z samym polimerem PS oraz PS z białkiem BSA umieszczono w układzie pomiarowym (Rysunek 37) i podłączono do Spektrometru Impedancyjnego Agilent 4294A. Mierzono odpowiedź impedancyjną układu z umieszczoną w środku próbką badaną w zakresie 40Hz-10MHz, amplituda pola mierzącego wynosiła 100mV.

Eksperyment przeprowadzono w następujących krokach:

- a) przygotowanie roztworów polimeru i białek,
- b) przygotowanie podłoży szklanych z elektrodami ITO – wymycie w izopropanolu w płuczce ultradźwiękowej przez 10 minut,
- c) suszenie podłoży w strumieniu azotu,

- d) wylanie cienkiej warstwy polimeru za pomocą metody spin coating'u,
- e) inkubowanie białka BSA na powierzchni polimerowej w czasie 30-60 minut,
- f) umieszczenie podłoża z białkami w układzie pomiarowym i podłączenie do Spektrometru Impedancyjnego Agilent 4294A,
- g) wykonanie pomiaru próbki z polimerem oraz próbki z polimerem wraz z osadzonym białkiem BSA;

Przykładowe wyniki z powyżej opisanych pomiarów przedstawiono na Rysunku 40.



Rysunek 40 Widma impedancyjne – część rzeczywista i urojona oraz kąt fazowy komórki szklanej z elektrodami ITO z cienką warstwą polimeru PS oraz PS z białkiem BSA

Badania przeprowadzone na podłożach szklanych ITO w warunkach „suchych” przyniosły zadowalająco lepsze wyniki w porównaniu do podłoży

Si/SiO₂. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że podłoża szklane z elektrodami ITO firmy Ossila S161 nadają się do dalszych badań nad adsorpcją białek do podłoży polimerowych. Problematyczny okazał się proces suszenia, czyli odparowywanie buforu z powierzchni próbki co skutkowało tym, że pomiary były niepowtarzalne.

7.1.3 Podłoża szklane z elektrodami ITO – pomiary w układzie mikrofluidycznym typu I – dobór polimeru

Po otrzymaniu obiecujących wyników na podłożach szklanych z elektrodami ITO utworzono kolejny prototyp układu pomiarowego, który umożliwiał rejestrowanie widm impedancyjnych w czasie rzeczywistym adsorpcji białek do podłoży polimerowych. Układ przedstawiono na Rysunku 41. Widoczne na zdjęciach przełączniki typu dip switch umożliwiają wybór pary elektrod, które są podłączone do spektrometru. Przez dwa otwory widoczne w uchwycie za pomocą elastycznych wężyków, wprowadzone były roztwory białek, które obmywały podłoże z naniesioną warstwą polimerową.

Na tym etapie poszukiwano odpowiedniego polimeru, który zapewniałby powtarzalność wyników pomiarów impedancyjnych, nie zakłócałby odpowiedzi próbki i pozytywnie wpływał na adsorpcję białek do swojej powierzchni. W tym celu zbadano trzy rodzaje polimerów PS, PS domieszkowany bromem (10.6% oraz 29.5%) i PnBMA (poli(N-butylo-metakryloamid). Na warstwach polimerowych osadzano białko BSA z roztworu o stężeniu 5mg/mL w PBS. Dodatkowo zarejestrowano również widma impedancyjne buforu PBS w celu ustalenia jego wpływu na odpowiedź próbki.

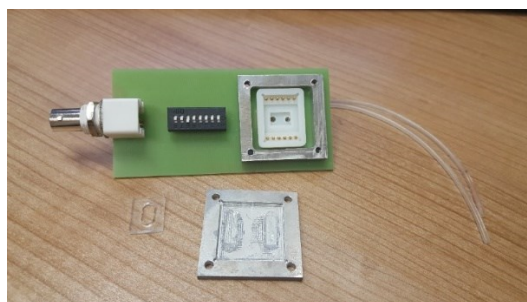
Proces przygotowania próbki badanej i podłoży szklanych/ITO z cienką warstwą polimerową odbywał się tak samo jak opisano w podrozdziale 7.1.2. Na podłoża szklane z ITO i naniesionym polimerem wprowadzono za pomocą silikonowych rurek układu mikrofluidycznego typu I (Rysunek 41) roztwór białek w buforze PBS. Odpowiedź impedancyjna próbek była rejestrowana za pomocą Spektrometru Agilent 4294A w czasie 30 lub 60 minut (interwał rejestracji wyników wynosił 5 minut) podobnie jak poprzednio wartość amplitudy pola mierzącego wynosiła 100mV a zakres częstotliwości 40Hz -10MHz. Eksperyment przeprowadzono w następujących krokach:

- a. Umieszczenie podłoża szklanego/ITO z cienką warstwą polimeru w układzie mikrofluidycznym (Rysunek 41).
- b. Podłączenie układu mikrofluidycznego do Spektrometru Impedancyjnego Agilent 4294A.
- c. Wprowadzenie na powierzchnię próbki z polimerem za pomocą kanału wprowadzającego roztworu buforu PBS i pomiar odpowiedzi impedancyjnej w czasie.

- d. Wprowadzenie roztworu białka na powierzchnię próbki za pomocą strzykawki lub pompy perystaltycznej (o przepływie 1mL/min) i pomiar odpowiedzi impedancyjnej w czasie.

Wspomniany układ mikrofluidyczny typu I (Rysunek 41) pozwala na badanie odpowiedzi impedancyjnej próbki z polimerem i/lub białkiem dzięki odpowiedniemu miejscu na próbkę.

Roztwory białek jak i bufor PBS wprowadzano do komory mikrofluidycznej za pomocą strzykawki lub pompy perystaltycznej mierząc odpowiedź impedancyjną układu w czasie rzeczywistym. Dodatkowo obecne w układzie przełączniki, umożliwiają wybór danej pary elektrod na próbce, której odpowiedź impedancyjną w danym momencie można zmierzyć (nasze podłoża szklane z ITO cechowały się jednakową odległością elektrod ITO w kanale, ale komercyjnie dostępne są różne warianty podłoża S161 co przedstawiono na Rysunku 39.



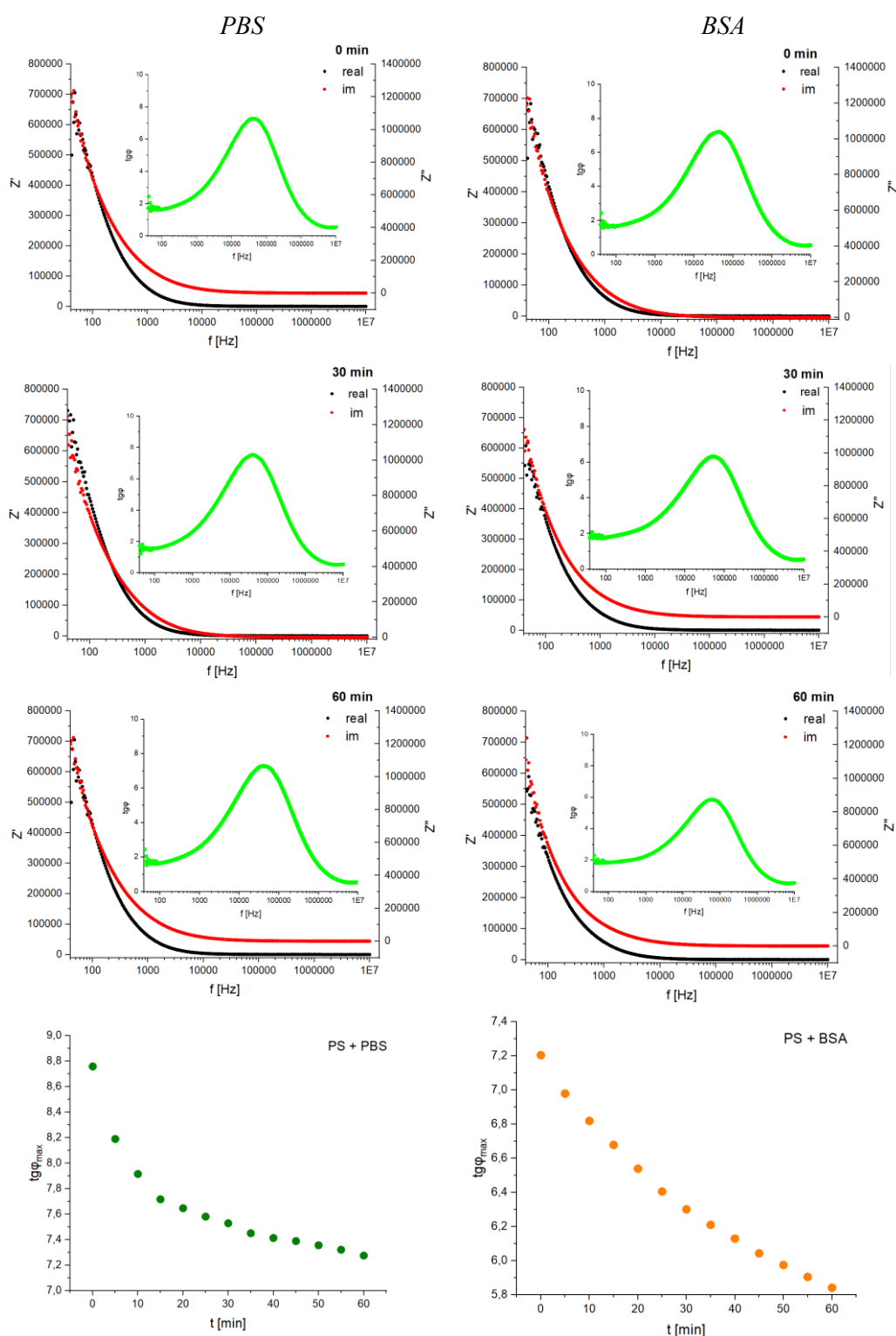
Rysunek 41 Mikrofluidyczny układ do pomiarów impedancyjnych podłoży szklanych z ITO typu I z: miejscem na próbkę wraz z pinami umożliwiającymi kontakt z elektrodami ITO, przełącznikiem doboru pary elektrod ITO, silikonowymi kanalikami doprowadzające i odprowadzające roztwór, wieczkiem mocującym i uszczelką

W celu analizy ilościowej otrzymywanych widm wybrano procedurę polegającą na znalezieniu maksimum tangensa kąta przesunięcia fazowego $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$ jako pojedynczej wartości charakterystycznej dla danego widma zmieniającego się w czasie.

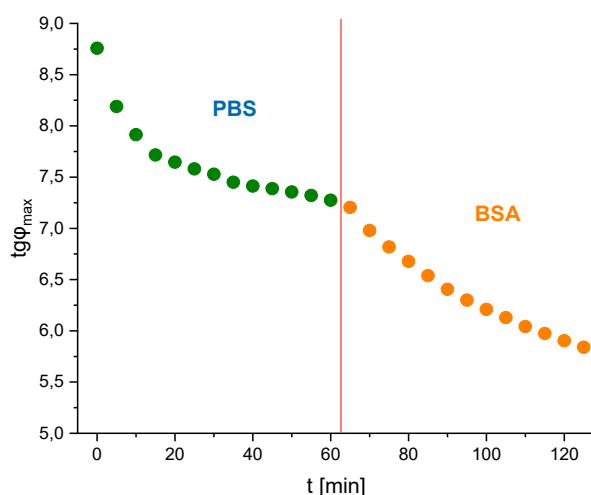
Założono, że widma impedancyjne będą zależne również od zastosowanego buforu PBS, który był używany do przygotowania roztworów białek. Dlatego przed wprowadzeniem białek badana była odpowiedź układu w obecności czystego roztworu PBS.

Przykładowe wyniki dla poszczególnych polimerów przedstawiono na Rysunku 42.

W układzie mikrofluidycznym typu I umieszczono gotowe podłoże i za pomocą silikonowych kanalików oraz strzykawki wprowadzono roztwór buforu PBS. Widma były rejestrowane przez czas 60 minut. Pomiar oznaczony jako czas 0 min odpowiadał momentowi, w którym roztwór został wprowadzony do komory mikrofluidycznej. Natomiast kolejne pomiary, oznaczone odpowiednio czasami 30 min i 60 min, odzwierciedlały czas, który minął od momentu wprowadzenia buforu do układu i rejestracji kolejnych widm. Następnie wstrzyknięto roztwór BSA w buforze PBS i kontynuowano pomiary.



Rysunek 42 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $\varphi_{\max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS po wprowadzeniu na jego powierzchnię buforu PBS oraz białka BSA (pomiaru zarejestrowane w czasach 0 min, 30 min 60 min)

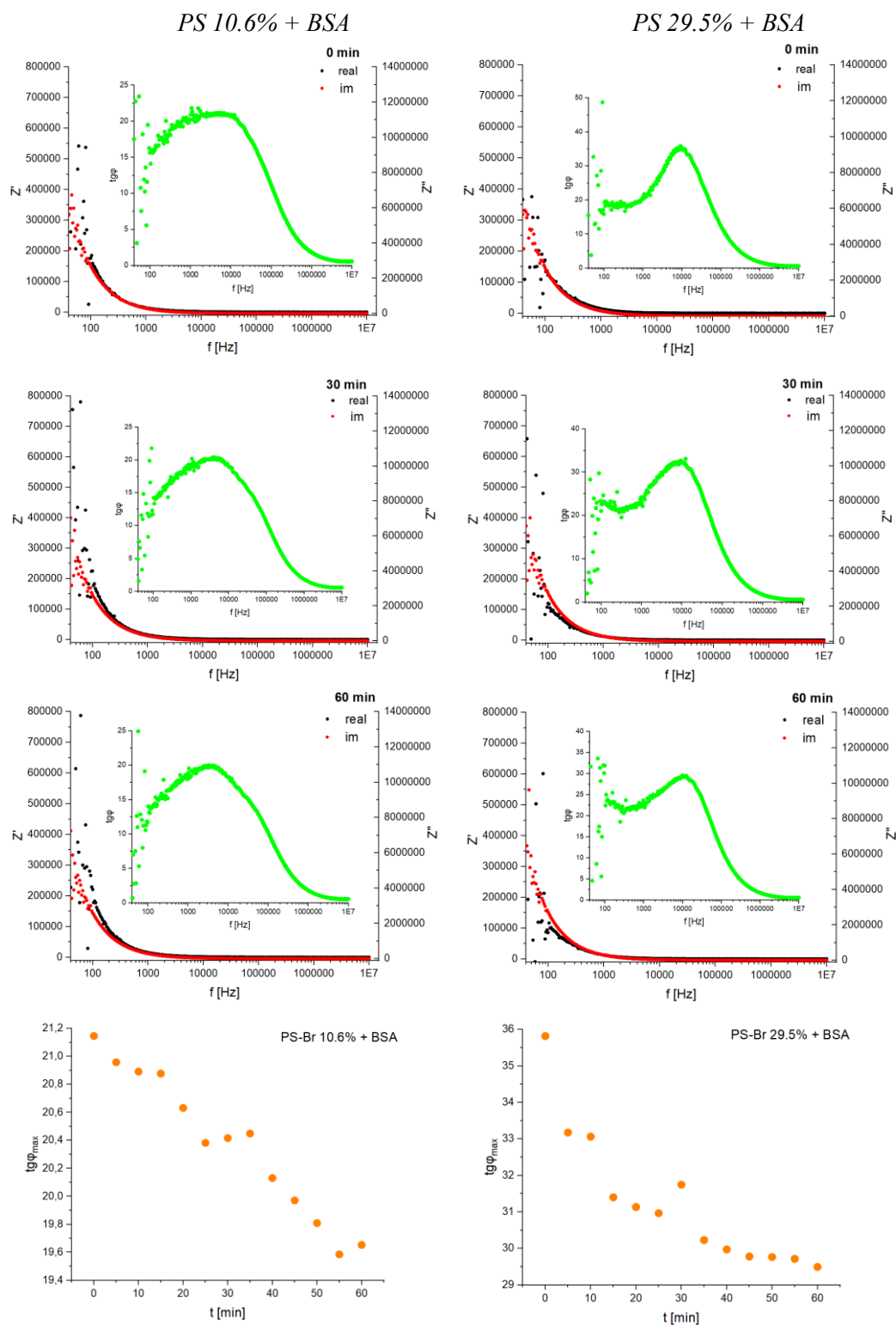


Rysunek 43 Zestawienie maksimów tangensa kąta przesunięcia fazowego dla podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS po wprowadzeniu buforu PBS i białka BSA

Otrzymane wyniki pokazują, że zarówno bufor jak i białko BSA mają wpływ na widma impedancyjne, kąty przesunięcia fazowego dla buforu i białka różnią się. Można stwierdzić, że możliwym jest za pomocą zaprojektowanego układu mikrofluidycznego typu I prowadzenie badania nad adsorpcją białek do powierzchni polimerowych.

Kolejnym przeprowadzonym eksperymentem było zbadanie wpływu innych polimerów na adsorpcję białek do ich powierzchni w warunkach ciekłych. Przykładowe wyniki dla polistyrenu domieszkowanego bromem (odpowiednio 10.6% i 29.5%) przedstawiono poniżej (Rysunek 44).

Eksperyment, tak jak poprzednie, polegały na przygotowaniu podłoży szklanych z ITO z naniesioną cienką warstwą polimeru, umieszczenie go w układzie mikrofluidycznym i przeprowadzeniu pomiarów w celu analizy procesu adsorpcji białka BSA za pomocą Spektrometru Agilent 4294A w czasie 60 minut.

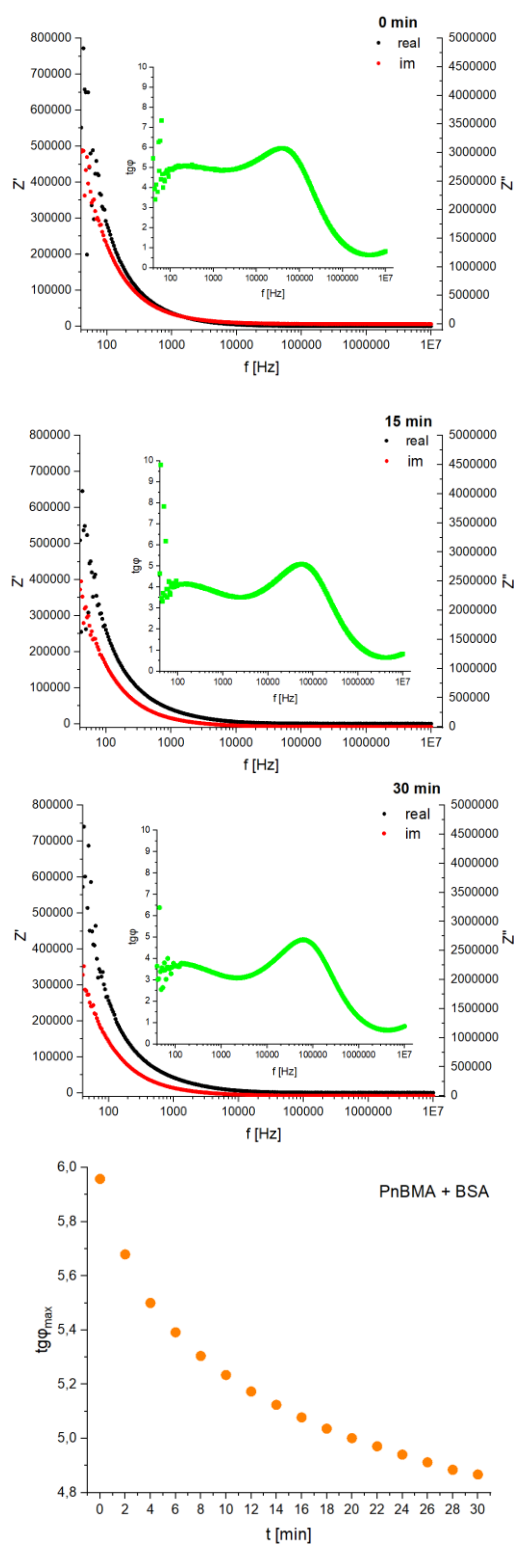


Rysunek 44 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS domieszkowanym bromem po wprowadzeniu na jego powierzchnię oraz białka BSA (pomiar zarejestrowane w czasach 0 min, 30 min 60 min)

Przeprowadzone pomiary impedancyjne dla polimeru PS domieszkowanego bromem (10.6% oraz 29.5%) nie przyniosły zadowalających wyników. Widma charakteryzowały się dużym rozrzutem danych i fluktuacjami.

Zdecydowano, że domieszkowany bromem polistyren nie będzie stanowił odpowiedniego podłoża służącego do dalszych badań.

Kolejnym zbadanym polimerem był PnBMA i jego wpływ na adsorpcję BSA. Eksperyment przeprowadzono analogicznie jak w przypadku trzech poprzednich polimerów z różnicą, że roztwór białka BSA wprowadzono do układu za pomocą pompy perystaltycznej o przepływie 1mL/min połączonej z kanalikami silikonowymi układu mikrofluidycznego typu I. Na Rysunku 45, przedstawiono najlepsze widma impedancyjne otrzymane, dlatego polimeru oraz zależność maksymalnej wartości tangensa kata fazowego w funkcji czasu. W pozostałych próbach widma impedancyjne cechował duży rozrzut wyników, dlatego zrezygnowano z zastosowania PnBMA do kolejnych badań.



Rysunek 45 idma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $\tan \delta_{max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PnBMA po wprowadzeniu na jego powierzchnię oraz białka BSA (pomiaru zarejestrowane w czasach 0 min, 15 min 30 min)

Otrzymane wyniki dla polimeru PnBMA cechowały się stabilniejszymi widmami niż w przypadku domieszkowanego bromem polistyrenu.

Zrezygowano jednak z zastosowania PnBMA do kolejnych badań, ponieważ wyniki nie były powtarzalne.

Zaprojektowany układ mikrofluidyczny typu I pozwala na śledzenie procesu osadzania się białek na powierzchni polimerowej w czasie rzeczywistym. Spośród przebadanych polimerów, najlepszym, który pozwala na otrzymanie powtarzalnych i stabilnych wyników był polistyren PS, dlatego to on stanowił dalszą podstawę do badań adsorpcji białek w czasie rzeczywistym.

7.1.4 Podłoża szklane z elektrodami ITO – pomiary w układzie mikrofluidycznym typu I – immunoreakcja

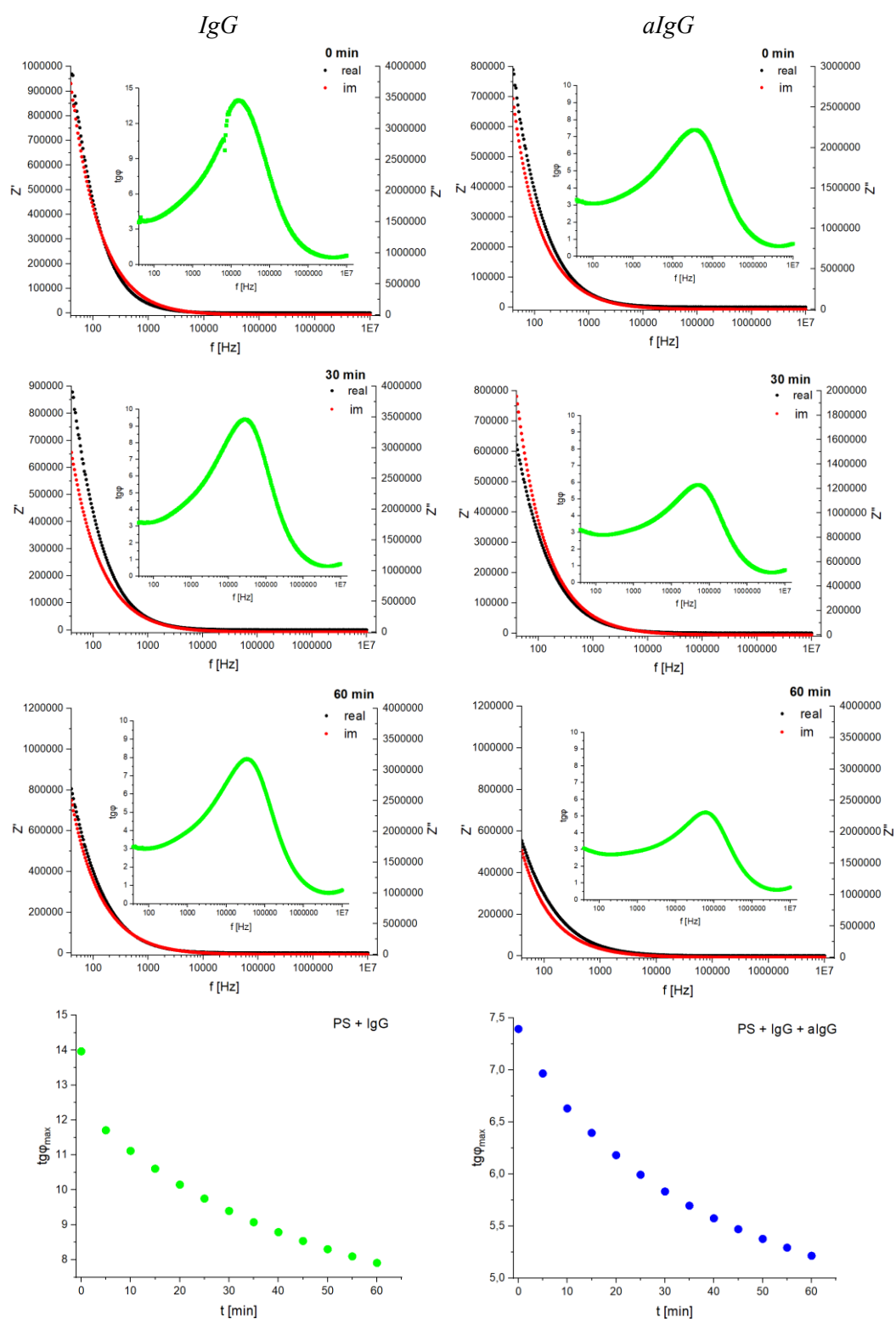
W oparciu o wcześniej przeprowadzone badania adsorpcji białka albuminy wołowej BSA, stanowiącym białko referencyjne, do podłoży polimerowych zdecydowano się na przebadanie immunoreakcji na podłożach szklanych z elektrodami ITO z polimerem PS w układzie mikrofluidycznym typu I przedstawionego na Rysunku 41. Przeprowadzono dwa rodzaje eksperymentów, gdzie badane białko było wprowadzone na podłoże polimerowe za pomocą pompy perystaltycznej o stałym przepływie dla roztworu białka badanego wynoszącym 1mL/min. Pierwszy z eksperymentów polegał na rejestracji widm impedancyjnych podczas przepływu buforu PBS, podczas przepływu i adsorpcji roztworu białka IgG (królicza immunoglobulina firmy Sigma Aldrich) o stężeniu 50µg/mL rozpuszczone w buforze PBS, podczas przepływu i immunoreakcji roztworu białka aIgG (anty-królicze przeciwciało firmy Sigma Aldrich) o stężeniu 50µg/mL rozpuszczone w buforze PBS do wcześniej zaadsorbowanej immunoglobuliny IgG na PS. Wartość amplitudy pola mierzącego wynosiła 100mV a zakres częstotliwości 40Hz-10MHz. Widma pomiarowe rejestrowano w czasie rzeczywistym z zapisem widm co 5 minut. Opis eksperymentu przedstawiono poniżej:

- I. Wprowadzenie białek na podłoże z polimerem PS za pomocą pompy perystaltycznej – pomiar dynamiczny w czasie rzeczywistym:
 - a. Przygotowanie podłoża szklanych z elektrodami ITO i wylanie na nie cienkiej warstwy polimerowej PS o stężeniu 20mg/mL rozpuszczonego w toluenie metodą spin coating'u.
 - b. Umieszczenie podłoża szklanego/ITO z polimerem w układzie mikrofluidycznym typu I i podłączenie go do spektrometru Agilent 4294A.
 - c. Pomiar dla roztworu buforu PBS – rejestracja widm impedancyjnych w czasie 60 minut przy stałym przepływie buforu 1mL/min.
 - d. Adsorpcja białka IgG, wprowadzenie do komory mikrofluidycznej roztworu białka IgG za pomocą pompy

perystaltycznej – rejestracja widm impedancyjnych w czasie 60 minut przy stałym przepływie roztworu białka 1mL/min, rejestrując pomiary co 5 minut.

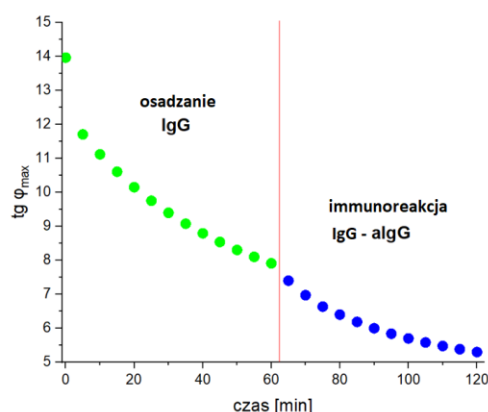
- e. Immunoreakcja - wprowadzenie do komory mikrofluidycznej roztworu białka aIgG za pomocą pompy perystaltycznej – pomiar widm impedancyjnych w czasie 60 minut przy stałym przepływie roztworu białka 1mL/min.

Otrzymane wyniki widm impedancyjnych dla poszczególnych etapów eksperymentu przedstawiono poniżej (Rysunek 46):



Rysunek 46 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $\lg \phi_{\max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS po wprowadzeniu na jego powierzchnię oraz białka IgG oraz aIgG (pomiary zarejestrowane w czasach 0 min, 30 min 60 min)

Na Rysunku 47 przedstawiono zmiany wartości maksimów tangensa kąta przesunięcia fazowego w czasie osadzania białka IgG i immunoreakcji z aIgG:



Rysunek 47 Zestawienie maksimów tangensa kąta przesunięcia fazowego dla podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS przed i po immunoreakcji

Otrzymane wyniki cechowały się powtarzalnością widm impedancyjnych, bez zaburzeń i fluktuacji, które sugerowałyby na niestabilność układu. Na podstawie widm z Rysunku 46 i porównanych maksimów tangensa kąta przesunięcia fazowego dla IgG oraz aIgG z Rysunku 47 pokazano, że odpowiedź układu różni się w przypadku adsorpcji IgG do powierzchni polimeru oraz późniejszej immunoreakcji IgG-aIgG.

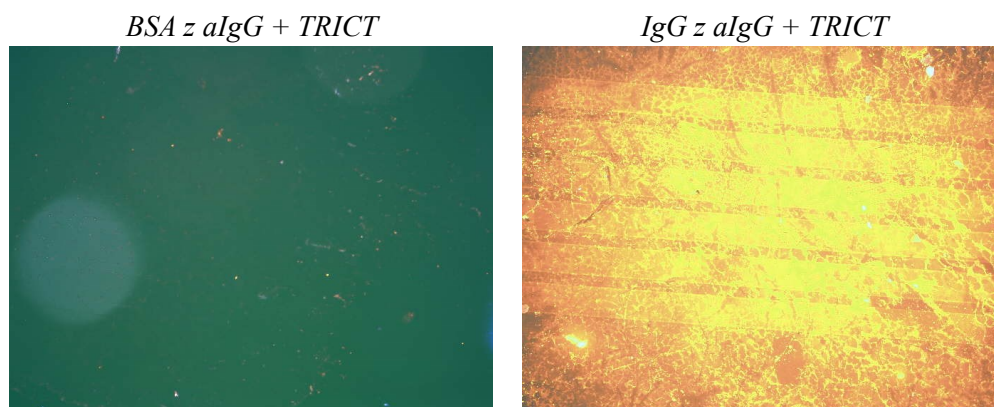
7.1.4.1 Mikroskopia Fluorescencyjna – wyniki dla immunoreakcji

W celu potwierdzenia łączenia białka IgG z aIgG, czyli do powstania reakcji immunologicznej na podłożu szklanym ITO pokrytym polistyrenem, odtworzono eksperyment przeprowadzony w układzie mikrofluidycznym typu I i przeprowadzono obserwacje pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Przygotowano dwie serie próbek na podłożach szklanych z ITO oraz cienką warstwą polimeru PS o stężeniu 20mg/mL w toluenie oraz białkami: BSA o stężeniu 5mg/mL, IgG o stężeniu 200μg/mL oraz aIgG + TRICT o stężeniu 5μg/mL. TRICT to jeden ze znaczników fluorescencyjnych wykorzystywanych w biologii molekularnej i biochemii. Jest to organiczny barwnik, który połączony jest z przeciwciałami lub innymi biomolekułami, aby umożliwić wizualizację i wykrywanie tych cząsteczek w badaniach. TRICT wykazuje emisję w zakresie bliskiej podczerwieni, co pozwala na penetrację przez tkanki i innych materiałów biologicznych, a także zapewnia większą czułość i specyficzność detekcji [136]. Białka były rozpuszczone w buforze PBS. Każde z białek inkubowano przez 60 minut.

Pierwsza seria próbek stanowiła odniesienie, na której nie dochodzi do immunoreakcji. W tym przypadku podłoża szklane z ITO i cienką warstwą

polimeru pokryte zostały białkiem BSA a następnie zanurzone w roztworze białka znakowanego fluorescencyjnie (aIgG + TRICT). Druga seria próbek stanowiła test kontrolny i składała się z tych samych podłoży, ale pokrytych białkiem IgG i zainkubowanym na nim aIgG + TRICT. Otrzymane obrazy z mikroskopii fluorescencyjnej przedstawiono poniżej (Rysunek 48).



Rysunek 48 Obrazy z mikroskopii fluorescencyjnej podłoży szklanych z ITO pokryte cienką warstwą polimeru oraz białkami: BSA z aIgG + TRICT oraz IgG z aIgG + TRICT

Przeprowadzony eksperyment potwierdził zajście immunoreakcji na podłożu pokrytym IgG. Brak fluorescencji w przypadku podłoży pokrytych BSA i zanurzonych w roztworze aIgG TRICT świadczy o tym, że białko to nie adsorbuje do podłoża. Jasny obraz podłoży polimerowych pokrytych IgG i zanurzonych aIgG TRICT świadczy o zajściu immunoreakcji IgG-aIgG podobnie jak w eksperymencie, którego wyniki przedstawiono na Rysunkach 46 i 47.

7.1.5 Wpływ amplitudy pola mierzącego na widma impedancyjne

W niniejszej części przeprowadzono eksperymenty mające na celu porównanie wpływu amplitudy pola mierzącego na widma impedancyjne badanych podłoży z cienką warstwą polimeru oraz zaadsorbowanymi białkami na jego powierzchni. Poprzednio przeprowadzone i opisane pomiary zostały wykonane przy wartości amplitudy napięcia zmiennego (AC) wynoszącego 100 mV. Wykonano również pomiary dla tych samych warunków, ale przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 10 mV. W literaturze można znaleźć różne badania dotyczące impedancyjnych pomiarów białek, w których użyto amplitud pola mierzącego AC w zakresie 5-100 mV [137] [138] [139].

Przygotowanie podłoży odbywało się w taki sam sposób jak w przypadku poprzednich eksperymentów; na wymytą powierzchnię szklaną z elektrodami ITO, naniesiono cienką warstwę polimeru PS (o stężeniu 20mg/mL w toluenie) metodą spin coating'u, umieszczano w układzie mikrofluidycznym typu I, podłączano do

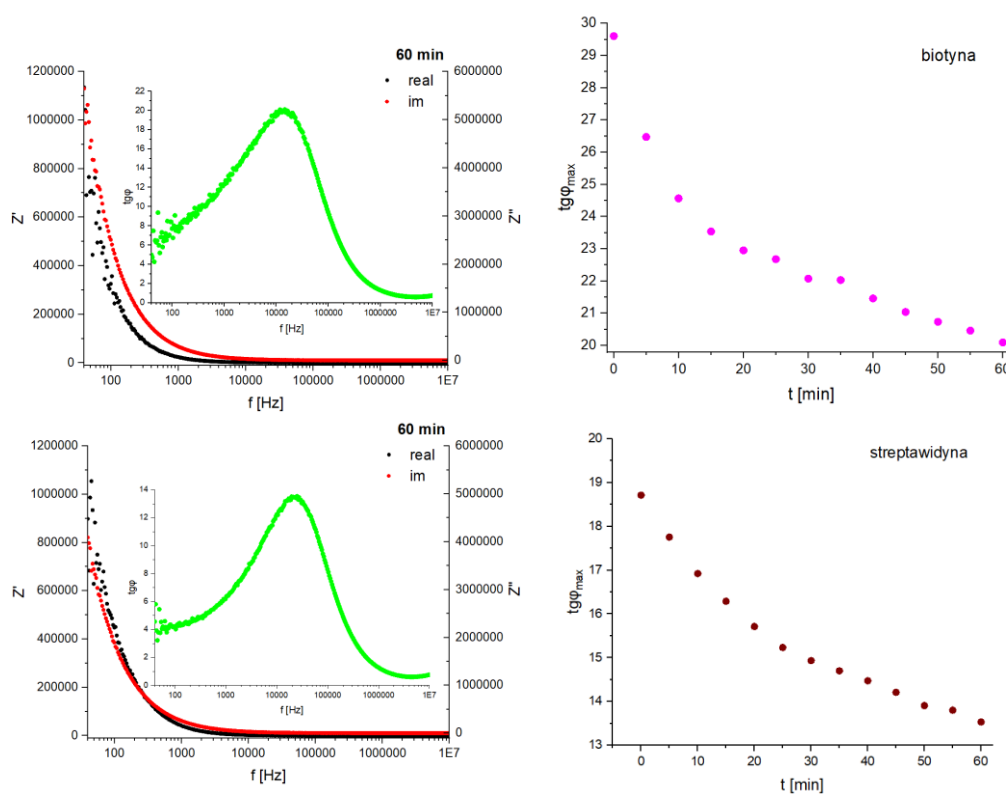
spektrometru impedancyjnego Agilent 4294A i po wprowadzeniu roztworu białek prowadzono pomiary w czasie rzeczywistym.

Zmierzono widma dla dwóch amplitud pola mierzącego (10 mV oraz 100 mV) dla następujących białek:

- biotyna ze streptawidyną (o stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$ w PBS),
- biotynylowane BSA (bBSA) (o stężeniu 200 $\mu\text{g/mL}$ w PBS) ze streptawidyną (o stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$ w PBS).
- IgG (o stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$ w PBS) z aIgG (o stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$ w PBS),

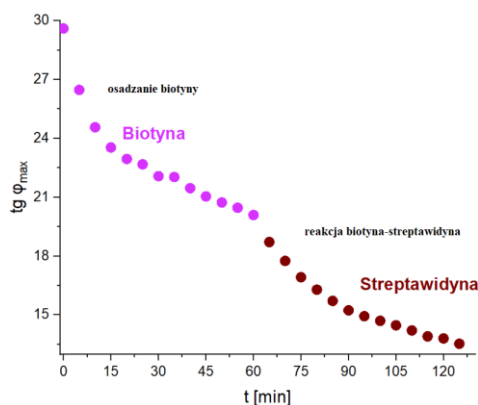
W przypadku immunoreakcji - IgG z aIgG wprowadzono dodatkowy krok mający na celu zablokowanie wolnej powierzchni podłoża z zaadsorbowanym już IgG poprzez wprowadzenie białka BSA (o stężeniu 5 mg/mL w PBS).

W pierwszym przeprowadzonym eksperymencie badano proces reakcji między białkami: biotyną oraz streptawidyną tworzące wiązanie specyficzne białko-białko. Wyniki przedstawiono poniżej (Rysunek 49):



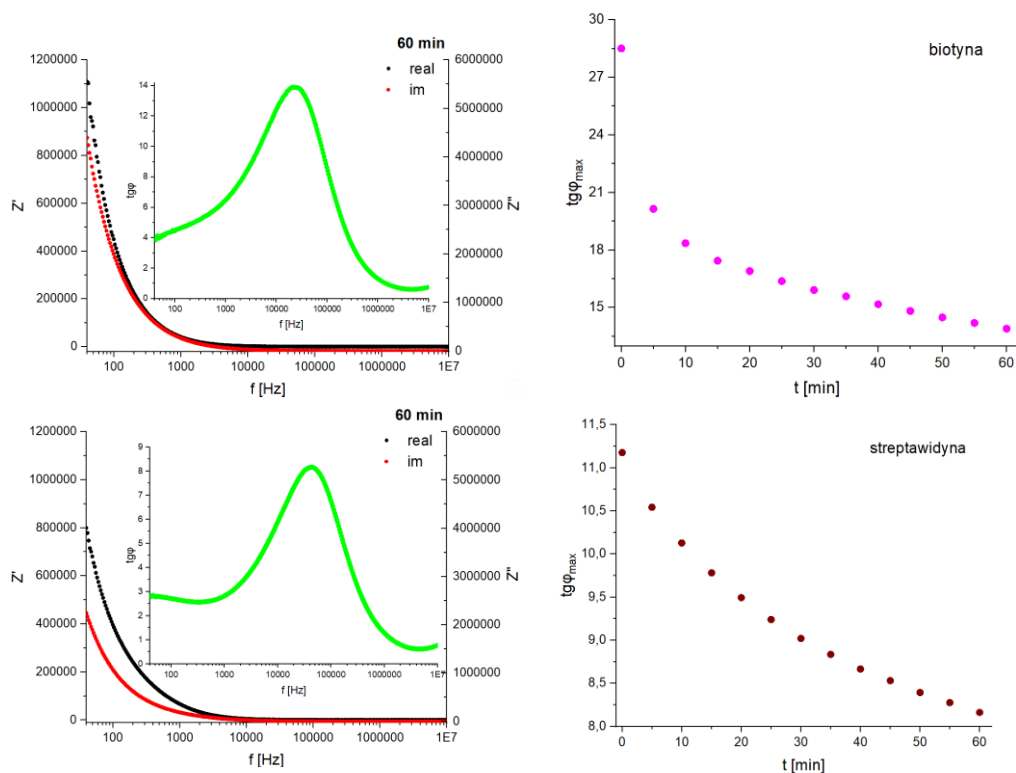
Rysunek 49 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji biotyna – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV

Na Rysunku 50 zestawiono otrzymane wyniki dla pomiarów przeprowadzonych dla wszystkich białek na podłożu szklanym z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 10 mV:



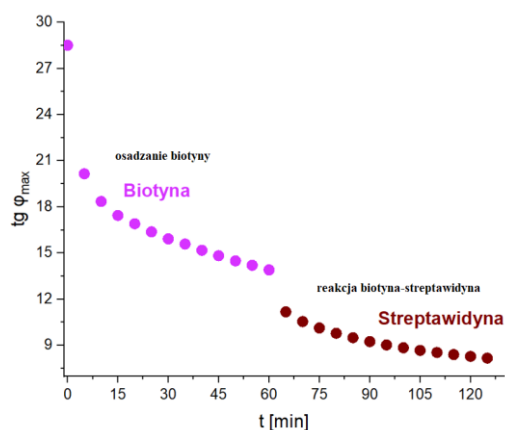
Rysunek 50 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania biotyna- streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV

Wyniki dla wiązania biotyna - streptawidyna przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV przedstawiono poniżej (Rysunek 51):



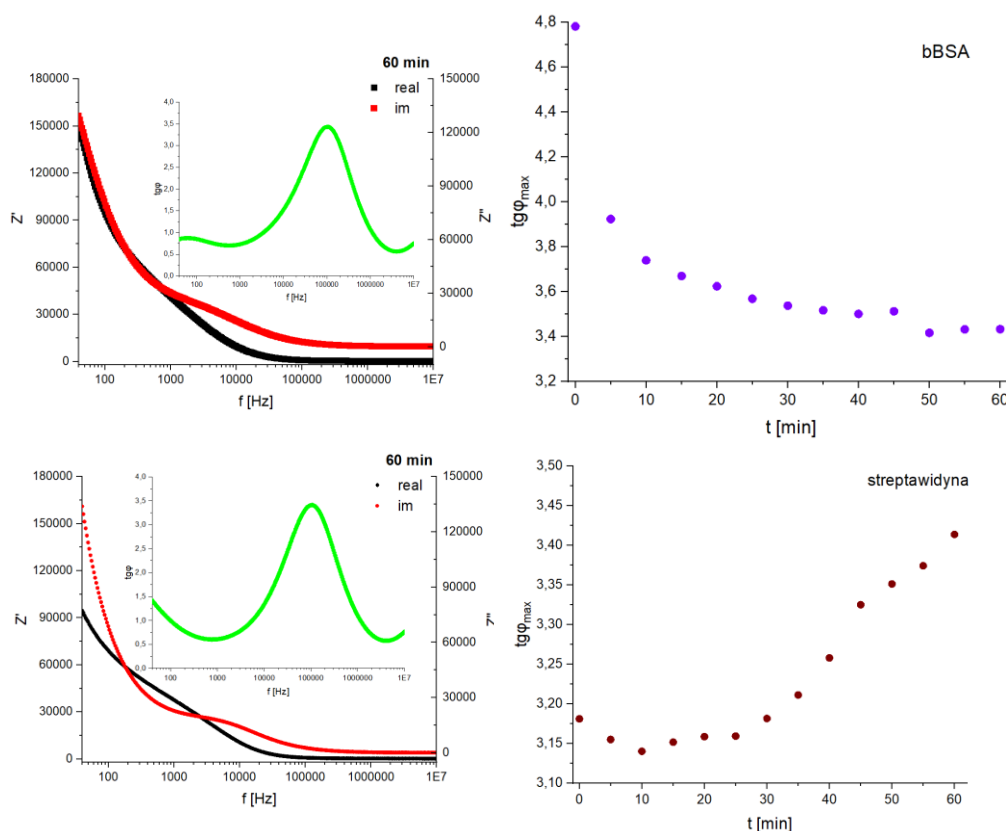
Rysunek 51 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji biotyna – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV

Na Rysunku 52 zestawiono otrzymane wyniki dla pomiarów przeprowadzonych dla wszystkich białek na podłożu szklanym z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 100 mV:



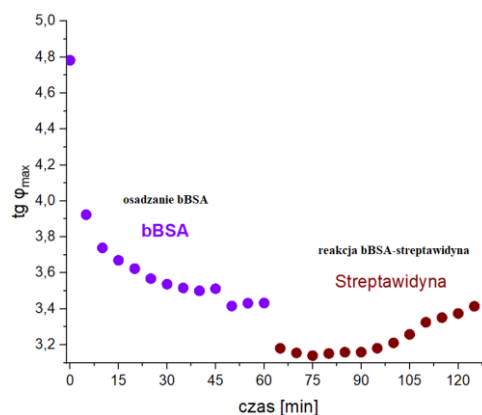
Rysunek 52 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania biotyna- streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV

Ostatnim zestawem białek, dla których porównano wpływ amplitudy pola mierzącego (10 mV i 100 mV) było biotynylowane BSA (bBSA) wraz ze streptawidyną tworzące wiązanie specyficzne białko-białko. Wyniki przedstawiono poniżej (Rysunek 53):



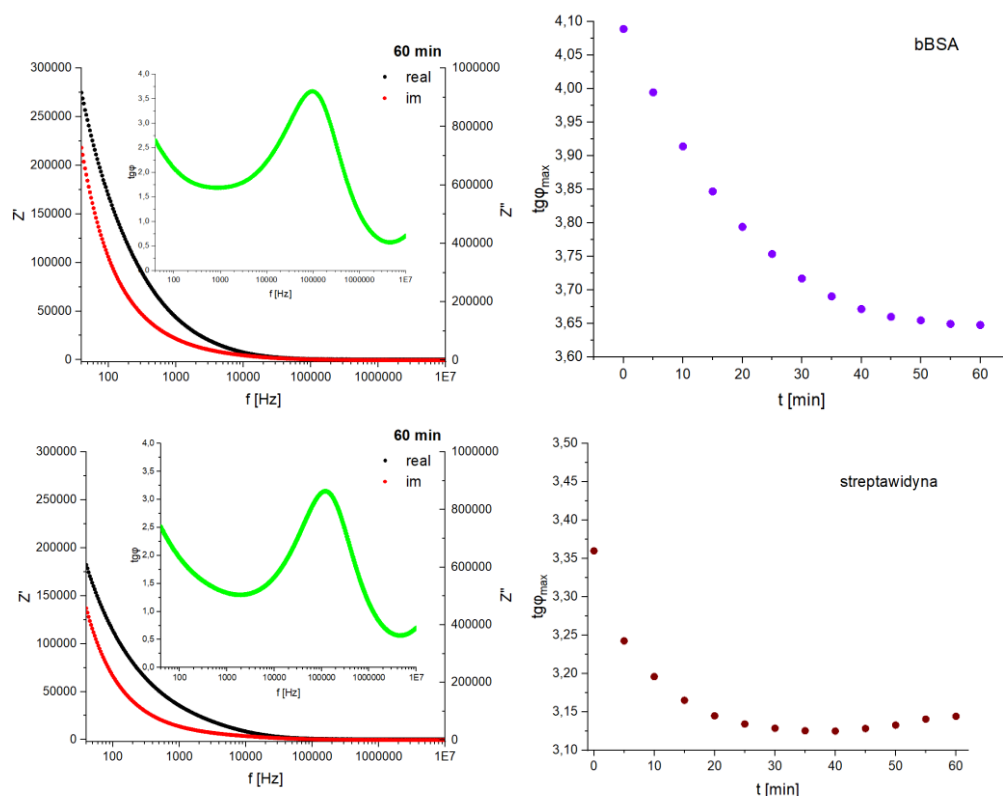
Rysunek 53 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji bBSA – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV

Na Rysunku 54 zestawiono otrzymane wyniki dla pomiarów przeprowadzonych dla wszystkich białek na podłożu szklanym z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 10 mV:



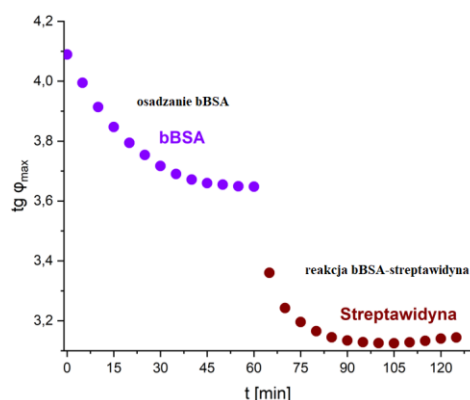
Rysunek 54 Zestawienie maksimum wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania bBSA - streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV

Wyniki dla wiązania biotyna - streptawidyna przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV przedstawiono poniżej (Rysunek 55):



Rysunek 55 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji bBSA – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV

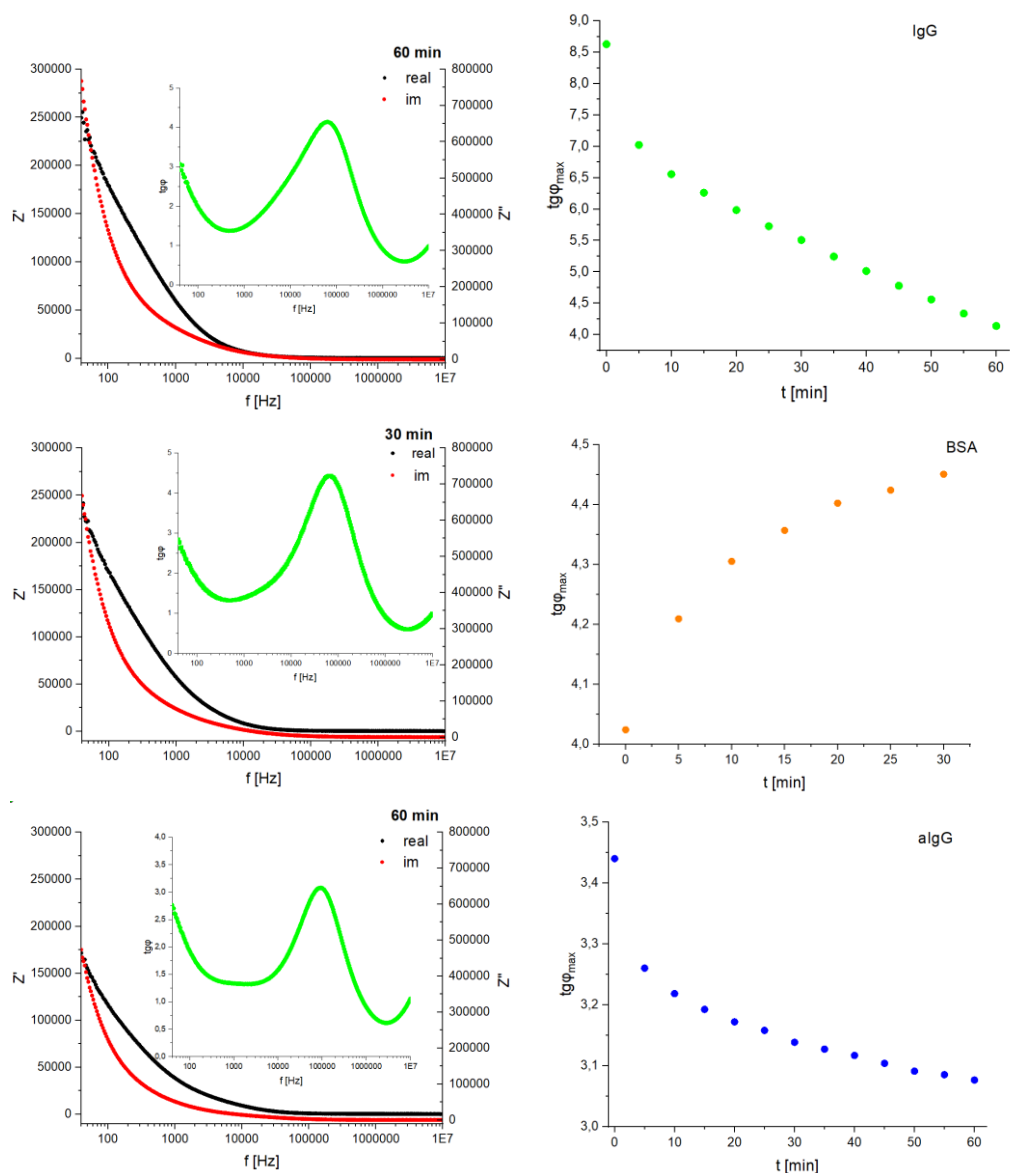
Na Rysunku 56 zestawiono otrzymane wyniki dla pomiarów przeprowadzonych dla wszystkich białek na podłożu szklanym z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 10 mV:



Rysunek 56 Zestawienie maksimum wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania bBSA - streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV

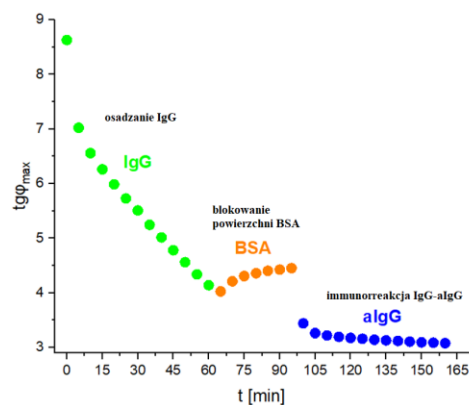
W kolejnym przeprowadzonym eksperymencie badano proces immunoreakcji IgG-aIgG. Przygotowane podłoża szklane z ITO i cienką warstwą

polimeru umieszczono w układzie mikrofluidycznym typu I i przeprowadzono pomiary w czasie rzeczywistym odpowiednio przez 60 minut dla białek IgG i aIgG oraz 30 minut dla białka blokującego BSA dla dwóch amplitud pola mierzącego 10 mV i 100 mV. Wyniki przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV przedstawiono poniżej (Rysunek 57):



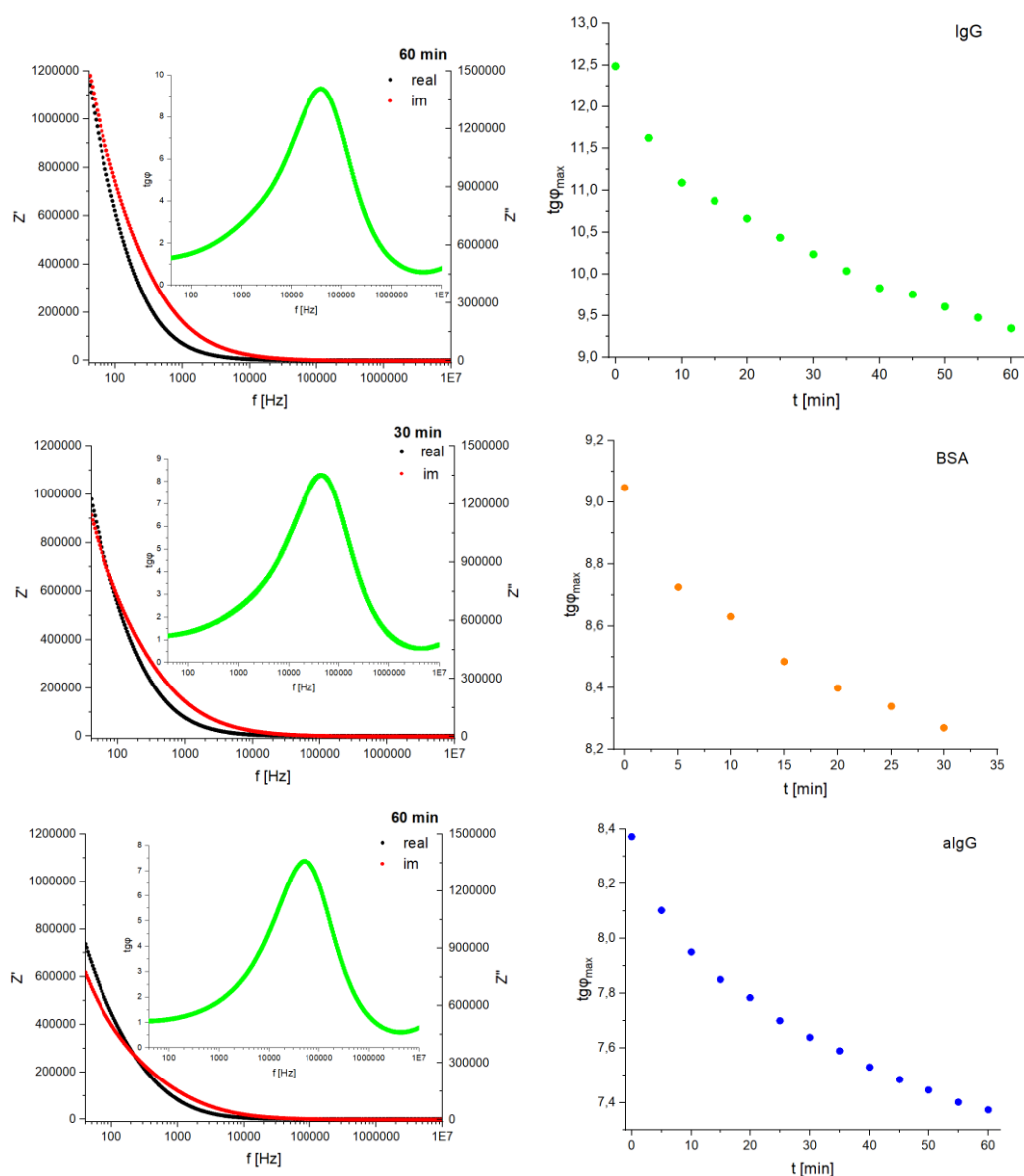
Rysunek 57 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla IgG, BSA oraz aIgG na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV

Na Rysunku 58 zestawiono otrzymane wyniki dla pomiarów przeprowadzonych dla wszystkich białek na podłożu szklanym z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 10 mV:



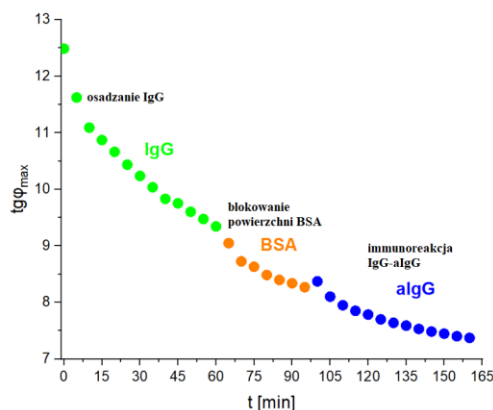
Rysunek 58 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla immunoreakcji wraz z blokowaniem wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS białkiem BSA amplitudzie pola mierzącego 10 mV

Wyniki dla immunoreakcji IgG-algG przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV przedstawiono poniżej (Rysunek 59):



Rysunek 59 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla IgG, BSA oraz aIgG na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV

Na Rysunku 60 zestawiono otrzymane wyniki dla pomiarów przeprowadzonych dla wszystkich białek na podłożu szklanym z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 100 mV:



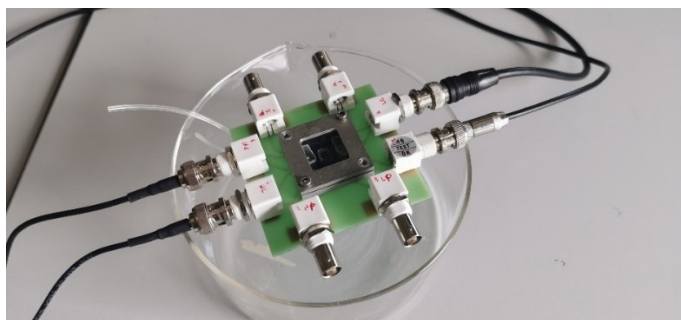
Rysunek 60 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla immunoreakcji wraz z blokowaniem wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS białkiem BSA przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV

Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że stosując zarówno małą (10mV) jak i dużą (100 mV) amplitudę pola mierzącego można zaobserwować zamiany odpowiedzi impedancyjnych badanych próbek zachodzące na skutek adsorpcji jak i immunoreakcji.

7.2 Pomiary w układzie mikrofluidycznym typu II

Po uzyskaniu obiecujących wyników z pomiarów impedancyjnych podczas adsorpcji białek do podłoża polimerowych jak i reakcji między białkami skonstruowano nowy układ mikrofluidycznym typu II przedstawiony na Rysunku 61, umożliwiający jednoczesny pomiar na dwóch elektrodach ITO podłoża szklanego z naniesioną cienką warstwą polimerową. Dzięki nowemu układowi możliwe było wykrywanie w czasie rzeczywistym reakcji specyficznego wiązania między białkami przy równoczesnym pomiarze wpływu medium w jakim były rozpuszczone. W tych badaniach wykorzystano trzy typy pary białek: IgG z aIgG (królicze), CRP z aCRP (wyizolowane z surowicy ludzkiej) oraz bBSA (biotynylowane BSA) ze streptawidyną.

Układ mikrofluidyczny typu II umożliwił jednoczesny pomiar odpowiedzi impedancyjnej dwóch elektrod, z których jedna pokryta była białkiem wiążącym specyficznym wykrywanym białkiem (elektroda testowa), a druga pokryta była białkiem blokującym, czyli BSA (elektroda referencyjna). Dzięki temu możliwe było rejestrowanie odpowiedzi związanej z obecnością roztworu i adsorpcji specyficznej (elektroda I) i odpowiedzi związanej tylko z obecnością roztworu (elektroda II).



Rysunek 61 Układ mikrofluidyczny typu II z widocznym miejscem na próbkę wraz z wieczkiem, silikonowymi kanalikami do-/odprowadzającymi roztwór oraz elektrodami umożliwiającymi podłączenie do spektrometrów Agilent 4294A

Przeprowadzono pomiary widm impedancyjnych dla następujących par białek:

- IgG z aIgG (o stężeniu $5\mu\text{g/mL}$ w PBS),
- CRP z aCRP (o stężeniu $5\mu\text{g/mL}$ w PBS).

W celu weryfikacji zajścia immunoreakcji wykorzystano również białka znakowane fluorescencyjnie.

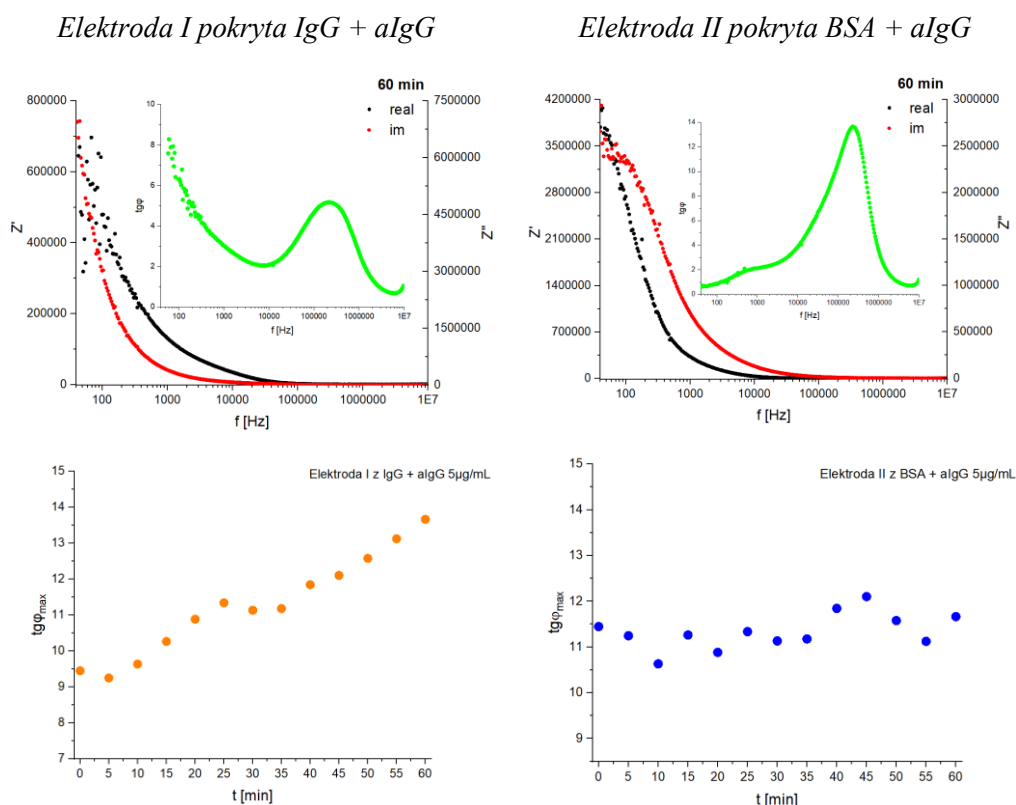
Pierwsze białka z wyżej wymienionych par (IgG, CRP) inkubowano na powierzchni polimerowej w czasie 60 minut na powierzchni elektrody I badanej próbki. W celu pokrycia dwóch elektrod badanymi białkami, oddzielano je parafilmem i nakrapiano dany roztwór białka. Elektroda II (referencyjna) była pokrywana białkiem blokującym BSA o stężeniu 5mg/mL w PBS przez 60 minut. Do badania procesu immunoreakcji wykorzystano stężenie białek wynoszące $5\mu\text{g/mL}$ typowe dla testów [156].

Przebieg eksperymentów przebiegał następująco:

- Przygotowanie podłoża szklanych z elektrodami ITO i wylanie na nie cienkiej warstwy polimerowej PS o stężeniu 20mg/mL rozpuszczonego w toluenie metodą spin coating'u.
- Inkubacja białek na elektrodach I (IgG, CRP,) i II (BSA) w czasie 60 minut o stężeniu roztworu $200\mu\text{g/mL}$ w PBS.
- Umieszczenie podłoża szklanego/ITO z cienką warstwą polimerową i zaadsorbowanymi białkami w układzie mikrofluidycznym typu II i podłączenie go do spektrometrów Agilent 4294A I i II – elektroda I do spektrometru I natomiast elektroda II do spektrometru II.
- Wprowadzenie roztworu białka (aIgG, aCRP) i rejestracja widm impedancyjnych w czasie 60 minut. *Dodatkowo przy pomiarze IgG-aIgG TRICT wprowadzono roztwór białka blokującego BSA o stężeniu $100\mu\text{g/mL}$ w PBS w celu zablokowania

ewentualnych wolnych miejsc na podłożu i rejestracja widm impedancyjnych w czasie 20 minut.

Otrzymane wyniki z pomiarów impedancyjnych dla pary białek IgG-aIgG przedstawiono na Rysunku 62. Zauważyć można, że po wprowadzeniu na powierzchnię obu elektrod I i II widoczna jest zmiana przesunięcia kąta fazowanego i $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$ tylko na elektrodzie I pokrytej białkiem IgG zaś sygnały na elektrodzie II pokrytej białkiem blokującym BSA nie wykazują zmian charakterystycznych dla reakcji między białkami, co było zachowaniem oczekiwanym. Eksperyment ten potwierdził praktyczne zastosowanie skonstruowanego układu mikrofluidycznego jako podstawę do budowy prototypu biosensora bazującego na pomiarach przesunięcia kąta fazowego $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$.

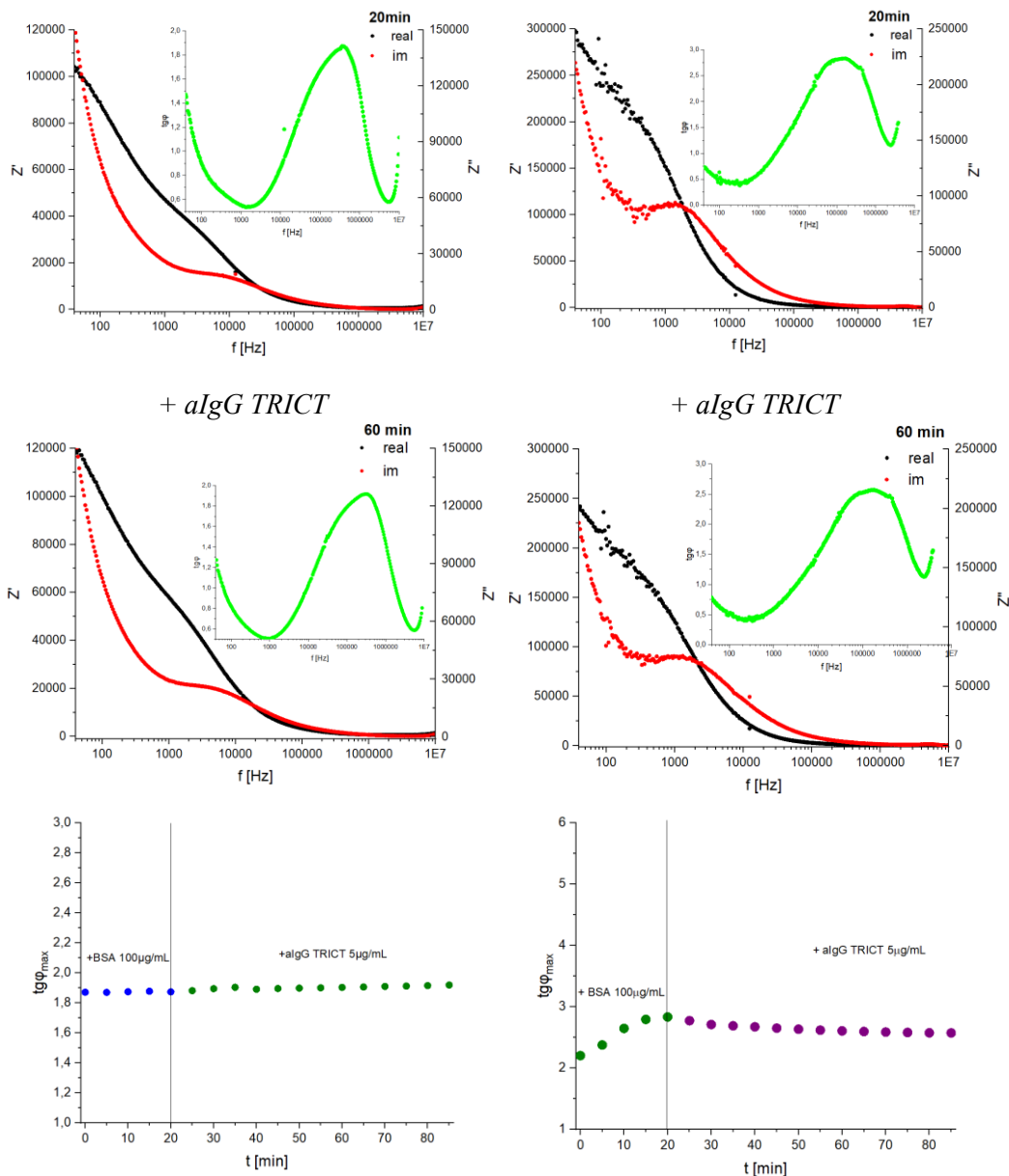


Rysunek 62 Przykładowe widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$ dla pary białek IgG-aIgG (amplituda pola mierzącego 10 mV)

Powtórzone eksperyment dla pary białek IgG-aIgG, gdzie aIgG było znakowane fluorescencyjnie TRICT. Dodatkowym krokiem w przeprowadzonym eksperymencie dla tej pary białek było wprowadzenie roztworu białka blokującego BSA o stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$ w PBS w celu zablokowania ewentualnych wolnych miejsc na elektrodach I i II. Próbkę bezpośrednio po przeprowadzonych pomiarach impedancyjnych poddano analizie pod mikroskopem fluorescencyjnym w celu potwierdzenia zajścia immunoreakcji na elektrodzie I. Wyniki z pomiarów przedstawiono poniżej (Rysunek 63):

Elektroda I pokryta IgG + BSA

Elektroda II pokryta BSA + BSA

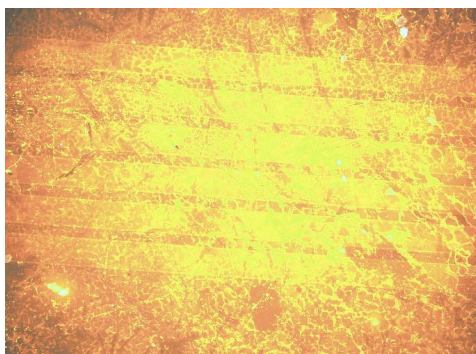


Rysunek 63 Widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$ dla pary białek IgG-algG z algG znakowanym fluorescencyjnie TRICT (amplituda pola mierzacego 10 mV)

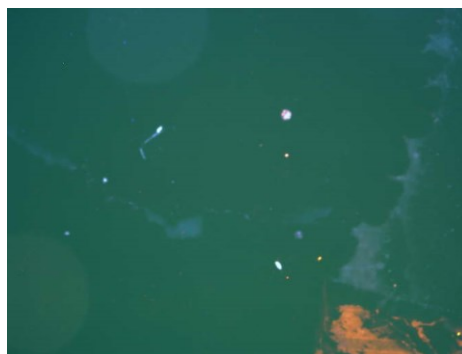
Sygnały na elektrodzie I wykazywały bardzo niewielkie zmiany mogące świadczyć o zajściu immunoreakcji. Dla elektrody II zablokowanej białkiem BSA po wprowadzeniu roztworu BSA na jej powierzchnię obserwujemy niewielką zmianę $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$, może to świadczyć o zmianie właściwości pokrytej powierzchni elektrody II w wyniku desorpcji BSA na skutek konkurencji o miejsce wiązania na powierzchni. Podobne zachowanie zostało zaobserwowane przez M. Holmberg w przypadku IgG na powierzchni polimeru PET (politereftalan etylenu) [140]. Wprowadzenie do układu roztworu białka algG znacznikowanego fluorescencją nie wywołuje znaczących zmian $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$.

Po przeprowadzeniu pomiarów impedancyjnych próbki wyjęte z układu mikrofluidycznego poddano analizie pod mikroskopem fluorescencyjnym. Miało to na celu weryfikację zajścia reakcji między białkami IgG-aIgG TRICT oraz sukcesywne zablokowanie powierzchni białkiem BSA. Wyniki przedstawiono poniżej (Rysunek 64).

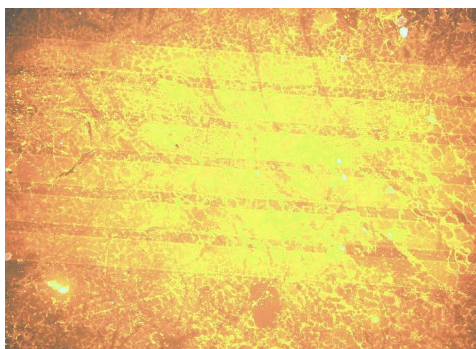
*Elektroda I pokryta IgG + aIgG TRICT –
bez pomiarów impedancyjnych:*



*Elektroda I pokryta IgG + aIgG TRICT –
bez pomiarów impedancyjnych:*



*Elektroda I pokryta IgG + aIgG TRICT –
po pomiarach impedancyjnych:*



*Elektroda I pokryta IgG + aIgG TRICT –
po pomiarach impedancyjnych”*

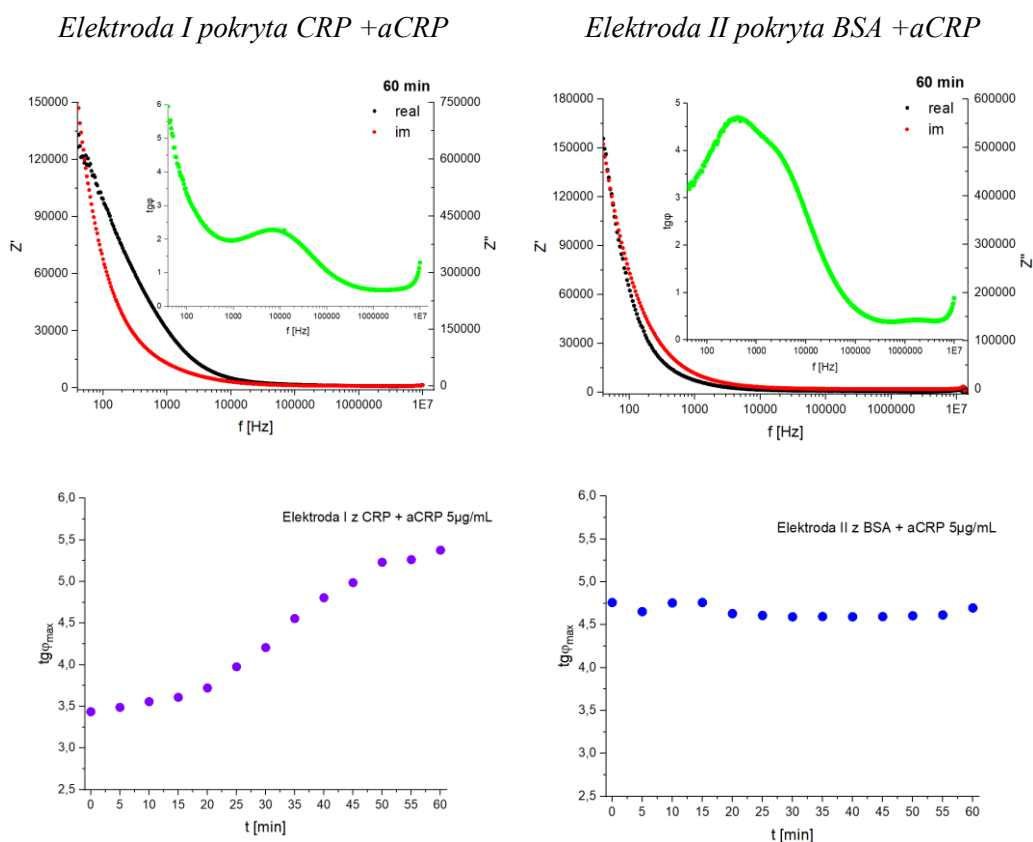


Rysunek 64 Widma fluorescencyjne dwóch próbek z elektrodami I (pokrytymi IgG) oraz elektrodami II (pokrytymi BSA) po wprowadzeniu na ich powierzchnię znakowanego fluorescencyjnie TRICT aIgG bez pomiarów i po przeprowadzonych pomiarach impedancyjnych

Jasne obrazy zarejestrowane dla elektrod pokrytych IgG świadczą o zajściu reakcji wiązania aIgG. Na elektrodzie referencyjnej również widoczne są niewielkie jasne plamki, można przypuszczać, na podstawie powyższych pomiarów, że elektroda II po pomiarach impedancyjnych wykazuje ślady białka aIgG znakowanego fluorescencyjnie TRICT, co może świadczyć o konkurowaniu białek o miejsce na powierzchni i desorpcję BSA. Mimo dowodu na wiązanie białka znacznikowanego fluorescencyjnie, nie widzimy jego wpływu na odpowiedź impedancyjną badanego układu.

Kolejną parą białek poddaną badaniom impedancyjnym, mierzone równolegle na dwóch elektrodach były CRP-aCRP (bez blokowania elektrod I i II

dotatkowo białkiem BSA 100 μ g/mL w PBS). Wyniki przedstawiono na Rysunku 65.



Rysunek 65 Widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $\text{tg}\phi_{\text{max}}$ dla pary białek CRP-aCRP (amplituda pola mierzącego 10 mV)

Na podstawie powyższych wyników dla pary białek CRP-aCRP na elektrodzie I zauważyć można zmiany po wprowadzeniu przeciwciała na powierzchnię elektrody pokrytej CRP, co świadczy o reakcji między tymi białkami. Kolejny raz udowodniono, że skonstruowany układ jak i mierzone parametry ($\text{tg}\phi_{\text{max}}$) pozwalają na wykrycie reakcji specyficznej białko-białko. Elektroda II pokryta białkiem blokującym BSA jak się spodziewano nie wykazywała żadnych zmian, co jednoznacznie świadczy o efektywnym zablokowaniu powierzchni podłoża.

7.3 Badania adsorpcji białek metodą TOF-SIMS

Równolegle do badań spektroskopowych przeprowadzono badania za pomocą techniki ToF-SIMS, które umożliwiły sprawdzenie czy białka adsorbują do powierzchni pokrytej polimerem. Do badań wykorzystano podłoża szklane z powłoką ITO, pokryte cienką warstwą polimeru PS naniesionego za pomocą metody spin coating'u. W przypadku pary białek IgG-aIgG oraz CRP-aCRP

przeprowadzono eksperyment udowadniający wiązanie specyficzne z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie aIgG i aCRP. W celu potwierdzenia specyficznego wiązania streptawidyna-biotyna wykorzystano metodę ToF-SIMS.

Do przygotowanych podłoży ITO z warstwą polimeru PS adsorbowano wybrane białka (firmy Sigma Aldrich) o następujących stężeniach:

- BSA (5mg/mL w PBS) stanowiące referencję oraz pełniące funkcję białka blokującego wolną powierzchnię,
- Biotynylowane BSA - bBSA (200µg/mL w PBS) zmodyfikowana forma białka albuminy wołowej BSA z przyczepioną cząsteczką biotyny, który ma zdolność silnego wiązania m.in. ze streptawidyną lub awidyną.
- Streptawidyna (100µg/mL w PBS) białko tworzące kompleks streptawidyna-biotyna, czyli silne wiązanie z powinowactwem do biotyny.



Rysunek 66 Schemat tworzenia próbki do pomiarów ToF-SIMS wraz z kolejnością nakładanych warstw (1-5)

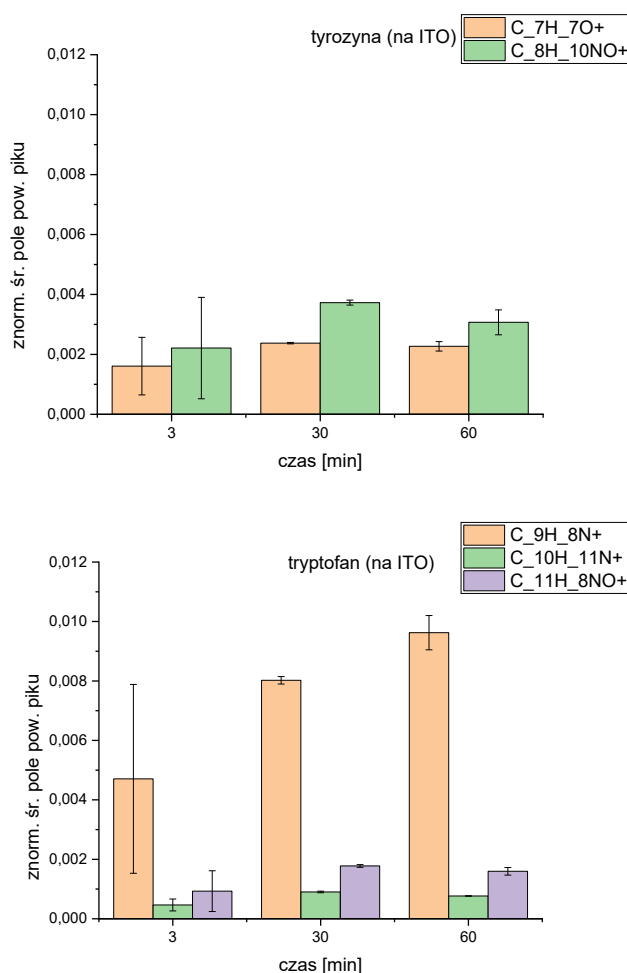
Na Rysunku 66 przedstawiono schemat tworzenia próbek do pomiarów ToF-SIMS. Odpowiednio numery 1-5 odpowiadają kolejności przygotowania podłoża i kolejność nakładanych warstw polimeru oraz białek: 1 – wyczyszczenie podłoża ITO, 2 – wytworzenie cienkiej warstwy polimerowej (PS), 3 – osadzenie białka bBSA, 4 – blokowanie powierzchni białkiem BSA, 5 – tworzenie kompleksu streptawidyna - biotyna. Czasy inkubacji dobrano tak jak w eksperymentach opisanych w rozdziale 7.2.

Bazując na danych literaturowych wybrano do analizy następujące fragmenty aminokwasów budujących poszczególne związki.

Tabela 4 Kationy fragmentów aminokwasów budującymi poszczególne białka [141]
[142]

BSA	Streptawidyna
Lizyna (Lys): $C_5H_{10}N^+$	Treonina (Thr): $C_4H_5O^+$, $C_3H_8NO^+$
Leucyna (Leu): $C_5H_{12}N^+$	Tyrozyna (Tyr): $C_7H_7O^+$, $C_8H_{10}NO^+$
Kwas glutaminowy (Glu): $C_4H_6NO^+$, $C_4H_8NO_2^+$	Tryptofan (Trp): $C_9H_8N^+$, $C_{10}H_{11}N^+$, $C_{11}H_8NO^+$
Feniloalanina (Phe): $C_8H_{10}N^+$, $C_9H_8O^+$	

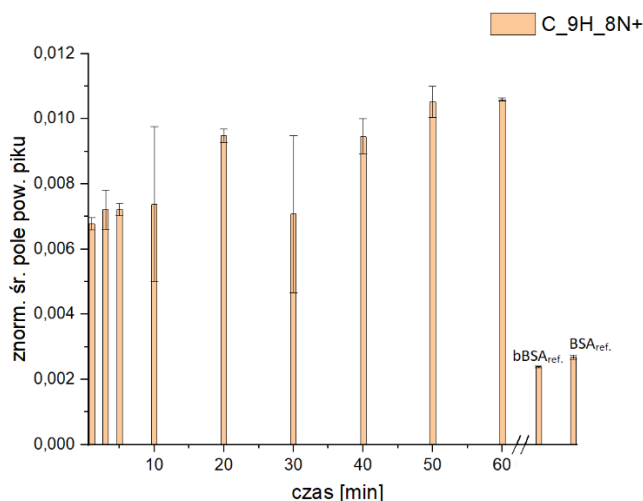
Otrzymane rezultaty składu chemicznego powierzchni badanej powierzchni dla Si oraz ITO przedstawiono na rysunkach poniżej:



Rysunek 67 Porównanie jonów charakterystycznych aminokwasów budujących streptawidynę osadzoną na podłożu polimerowym

Na Rysunku 67 przedstawiono jony charakterystycznych aminokwasów budujących streptawidynę na podłożach szklanych z ITO użytych do pomiarów impedancyjnych. Wraz z czasem inkubacji zauważyć można wzrost intensywności

pików jonów charakterystycznych aminokwasów dla streptawidyny co jest oznaką efektywnego wiązania do podłoża wspomnianego białka.



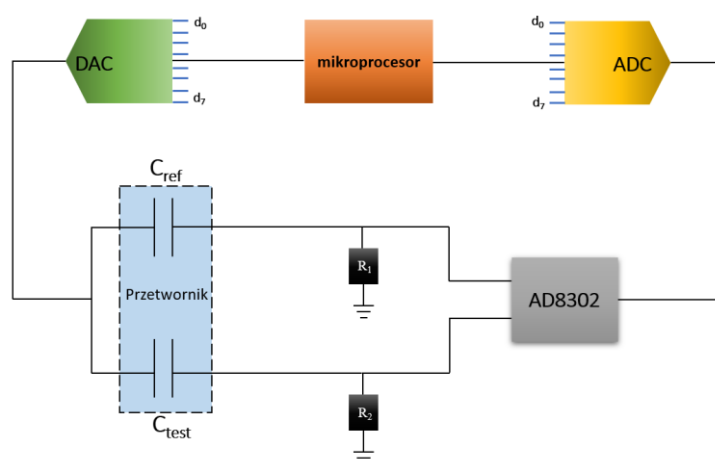
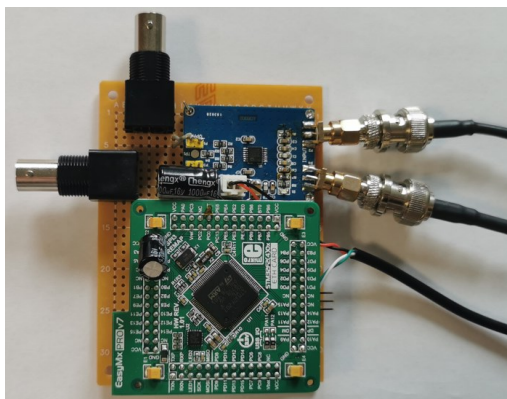
Rysunek 68 Porównanie intensywności pików jonu charakterystycznego dla streptawidyny po reakcji białko-białko w czasie z pikami referencyjnymi podłoża Si pokrytego polimerem (PS) oraz białkami bBSA i BSA

Na Rysunku 68 przedstawiono porównanie intensywności pików jonu charakterystycznego dla streptawidyny (wchodzącego w skład tryptofanu), próbek po reakcji pary białek bBSA - streptawidyna oraz referencji (białek osadzonych na bBSA i BSA). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że wiązanie streptawidyny do bBSA miało miejsce co jest jednoznaczne z dojściem do wiązania białko-białko.

7.4 Prototyp biosensora – pomiary przesunięcia kąta fazowego

Pomiary impedancyjne z wykorzystaniem układów mikrofluidycznych typu I i II wykazały, że możliwą jest analiza procesu adsorpcji i reakcji specyficznej między białkami, pokazano również, że miarą zmian zachodzących na elektrodach może być kąt fazowy (jego tangens). Bazując na tej wiedzy zaprojektowano i zbudowano prototyp prostego układu elektronicznego służącego do analizy zmian zachodzących na elektrodach w trakcie procesu adsorpcji biomolekuł bazujący na układzie scalonym AD8302 oraz układzie mikroprocesorowym STM32F2. Schemat bokowy układu przedstawiony jest na Rysunku 69. Za pomocą tego urządzenia bezpośrednio odczytywano różnicę przesunięcia fazowego sygnału dla elektrody referencyjnej i elektrody pokrytej białkiem wiążącym umieszczonej w układzie mikrofluidycznym typu II (Rysunek 61). Układ AD8302 porównuje dwa sygnały z elektrody I oraz II, a jego odpowiedzi są proporcjonalne do stosunku amplitud (wyjście 1) i do przesunięcia fazowego między sygnałami (wyjście 2). Za pomocą układu mikroprocesorowego i przetwornika DAC na obie elektrody podawany był sygnał sinusoidalny o zadanej częstotliwości i amplitudzie.

Za pomocą ADC odczytywana była wartość sygnału z układu AD8302 proporcjonalna do przesunięcia fazowego. Stworzony w grupie programu umożliwiał analizę wyników w czasie rzeczywistym po wprowadzeniu na powierzchnię podłoża szklanego z ITO, cienką warstwą polimeru PS, białka zaadsorbowanego (np. IgG, CRP) oraz roztworu białka wiążącego się z białkiem zaadsorbowanym na podłożu polimerowym (streptawidyna, aIgG, aCRP).



Rysunek 69 Zdjęcie i schemat układu elektronicznego bazującego na układzie scalonym AD8302 oraz układzie mikroprocesorowym STM32F2 użytego do pomiarów

Pomiary przebiegały w następujących krokach:

- a. Przygotowanie podłoży szklanych z elektrodami ITO i wylanie za pomocą metody spin coating'u na nie cienkiej warstwy polimerowej PS o stężeniu 20mg/mL rozpuszczonego w tolunie.
- b. Inkubacja białek na elektrodach w czasie 30 minut:
 - Elektroda I - BSA (5mg/mL w PBS) – próba referencyjna.
 - Elektroda II - IgG, CRP (100μg/mL w PBS) – próba badana.
- c. Umieszczenie podłoża szklanego/ITO z cienką warstwą polimerową i zaadsorbowanymi białkami w układzie

mikrofluidycznym typu II wraz z układem elektronicznym i podłączenie do układu elektronicznego. Pomiary przy amplitudzie pola mierzącego wynoszącego 100 mV i różnych częstotliwościach (1kHz, 5kHz, 10kHz, 50kHz).

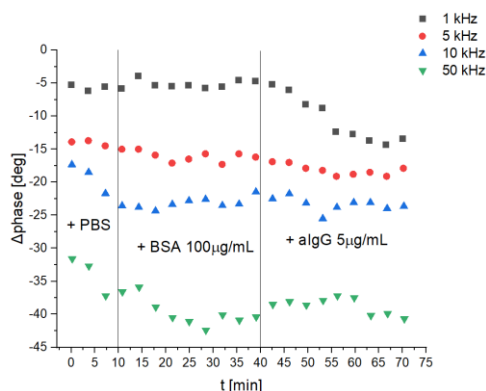
d. Wprowadzenie roztworów:

- PBS - rejestracja pomiaru przez 10min
- BSA (100µg/mL w PBS) - rejestracja pomiaru przez 30min - w celu zablokowania wolnych miejsc na podłożu.
- aIgG lub aCRP (5µg/mL w PBS) gdzie aIgG oraz aCRP były nieznakowane i znakowane fluorescencyjnie FITC, TRICT i ALEXA FLUOR 488 - rejestracja pomiaru przez 30min.

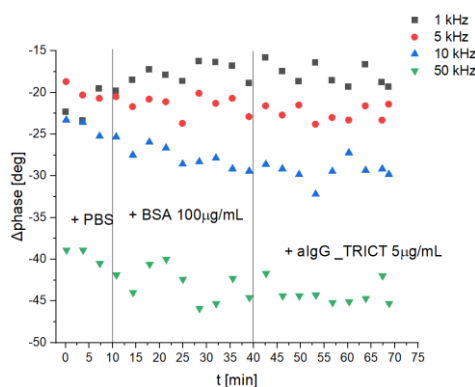
Poniżej przedstawiono wyniki dla poszczególnych białek, wraz z reprezentatywnymi przykładami pomiarów, które charakteryzowały się powtarzalnością w zachowaniu odpowiedzi impedancyjnej. W tych badaniach mierzono różnicę przesunięcia fazowego Δphase [deg] między dwiema elektrodami, aby wyeliminować wpływ impedancji medium. Przeprowadzono serię pomiarów dla poszczególnych wartości częstotliwości (1kHz, 5kHz, 10kHz, 50kHz) w celu zarejestrowania najsilniejszej odpowiedzi próbki badanej z zaadsorbowanymi białkami i reakcji specyficznej białko-białko na podłożu polimerowym, pozwalającej na śledzenie zmian zachodzących nad powierzchnią elektrod ITO.

Pierwszą przebadaną parą białek była immunoglobulina G (IgG) z serum króliczego oraz jego przeciwciało aIgG. Wyniki przedstawiono poniżej:

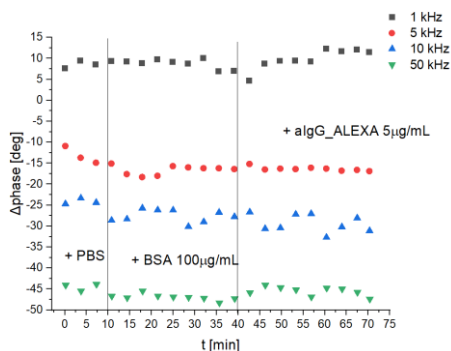
IgG+alIgG nieznakowane fluorescencyjnie



IgG+alIgG znakowane TRICT



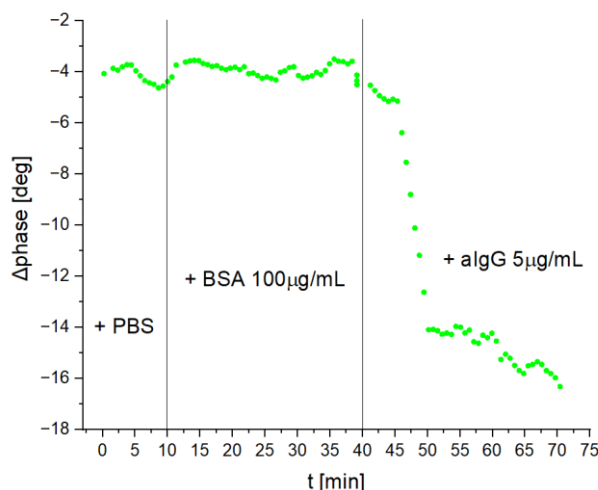
IgG+alIgG znakowane ALEXA FLUOR 488



Rysunek 70 Różnica przesunięcia fazowego między dwiema elektrodami: mierzonej (pokrytej białkiem IgG) oraz referencyjnej (pokrytej BSA) po wprowadzeniu roztworów PBS, BSA oraz alIgG w różnych częstotliwościach.

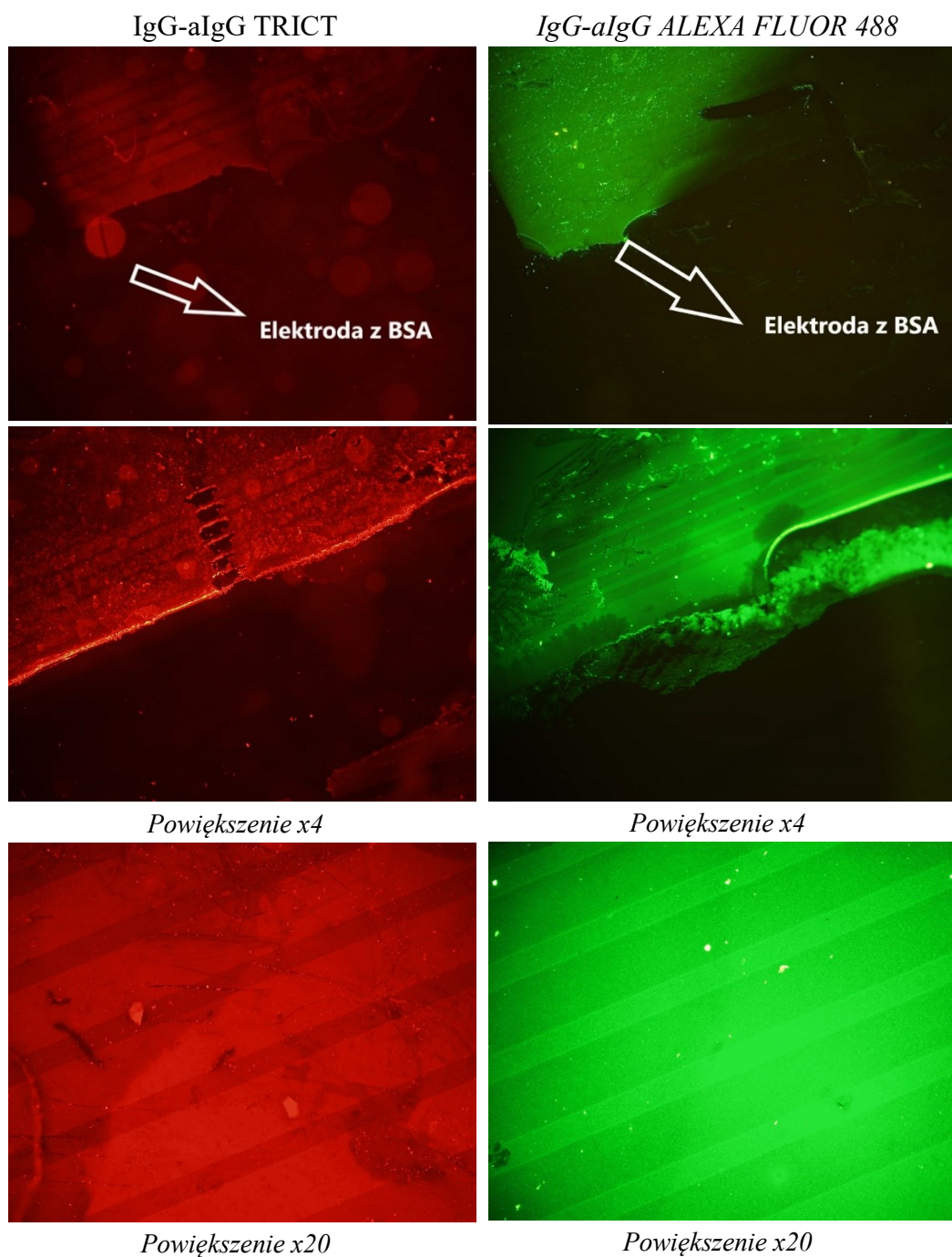
Otrzymane wyniki (Rysunek 70) pokazują, że najsilniejszą odpowiedź układu IgG-alIgG nieznakowanego fluorescencyjnie zaobserwować można przy częstotliwości sygnału próbkującego wynoszącej 1 kHz. Podobnie jak w przypadku badań z wykorzystaniem dwóch spektrometrów impedancyjnych (Rysunek 63), w przypadku białka alIgG znakowanego fluorescencyjnie TRICT i ALEXA FLUOR 488 nie zaobserwowano zmian, wpływ na to może mieć swoista budowa samych

znaczników wpływających na odpowiedź próbki. Przeprowadzono serię pomiarów dla układu IgG-aIgG nieznakowanego fluorescencyjnie przy częstotliwości, gdzie różnica faz była największa – 1kHz. Przykładowe wyniki przedstawiono na Rysunku 71.



Rysunek 71 Różnica przesunięcia fazowego układu IgG-aIgG w częstotliwości 1kHz

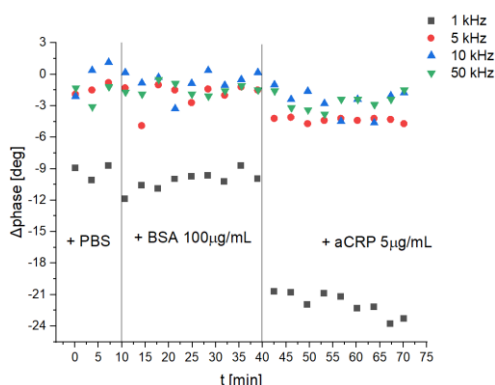
W celu potwierdzenia zajścia wiązania białko-białko w czasie rzeczywistym na podłożach polimerowych przeprowadzono dodatkowe pomiary fluorescencyjne próbek po przeprowadzonych pomiarach różnicy przesunięcia fazowego, których wyniki przedstawiono na Rysunku 72. Jasny obraz fluorescencyjny dla elektrody pokrytej białkiem IgG świadczy o zajściu reakcji po wprowadzeniu roztworu przeciwciała aIgG. Na tej samej próbce elektroda referencyjna pokryta białkiem blokującym BSA nie wykazała żadnych zmian fluorescencyjnych, co oznacza, że jej powierzchnia została efektywnie zablokowana. Pomimo braku widocznych zmian w wynikach impedancyjnych, wyniki z mikroskopii fluorescencyjnej wskazują na występowanie immunoreakcji na nieblokowanej elektrodzie.



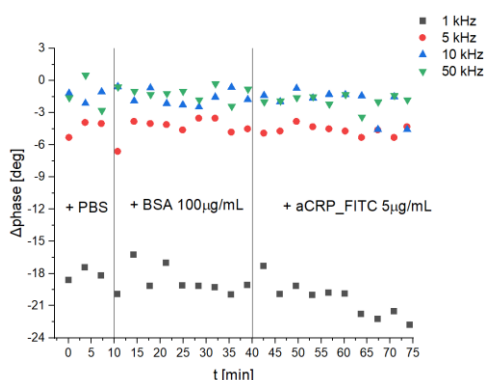
Rysunek 72 Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego dla elektrod referencyjnej (zablokowanej BSA) oraz po immunoreakcji ze znakowanym fluorescencyjnie aIgG TRICT I ALEXA FLUOR 488 po przeprowadzonych pomiarach.

Kolejną parą dla których przetestowano działanie biosensora białko C-reaktywne (CRP) z surowicy ludzkiej wraz z jego przeciwciałem aCRP. Pomiary przeprowadzano dla dwóch rodzajów białka aCRP – nieznakowanego fluorescencyjnie, znakowanego fluorescencyjnie FITC. Wyniki z pomiarów przedstawiono poniżej:

CRP+aCRP nieznakowane fluorescencyjnie



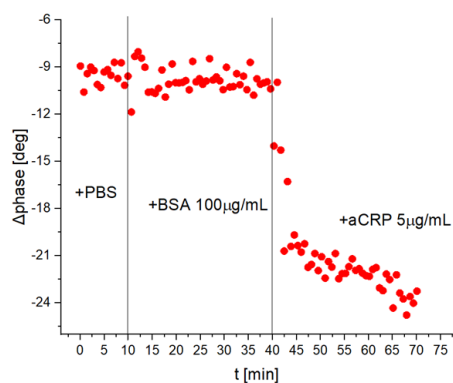
CRP+aCRP znakowane FITC



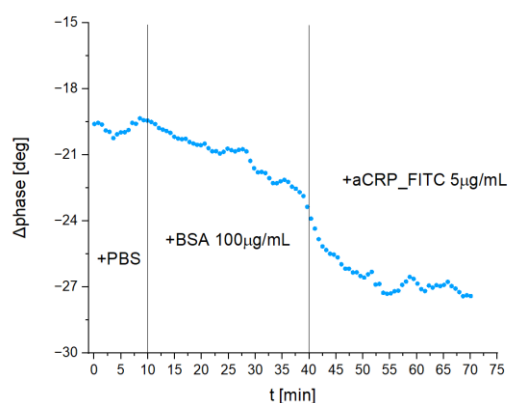
Rysunek 73 Różnica przesunięcia fazowego między dwiema elektrodami: mierzonej (pokrytej białkiem CRP) oraz referencyjnej (pokrytej BSA) po wprowadzeniu roztworów PBS, BSA oraz aCRP w różnych częstotliwościach.

Na podstawie otrzymanych wyników (Rysunek 73) wnioskuje się, że najsilniejszą odpowiedź układu CRP-aCRP nieznakowanego i znakowanego fluorescencyjnie zaobserwować można przy częstotliwości wynoszącej 1 kHz. Przeprowadzono serię pomiarów dla układu CRP-aCRP nieznakowanego fluorescencyjnie przy częstotliwości, gdzie różnica faz była największa – 1 kHz, dodatkowo przetestowano działanie układu dla pary białek aCRP-CRP, gdzie na powierzchni elektrod z polimerem zaadsorbowano najpierw aCRP (o stężeniu 100 μg/mL w PBS) a do układu wprowadzono roztwór białka CRP (o stężeniu 5 μg/mL w PBS). Wyniki przedstawiono na Rysunku 74.

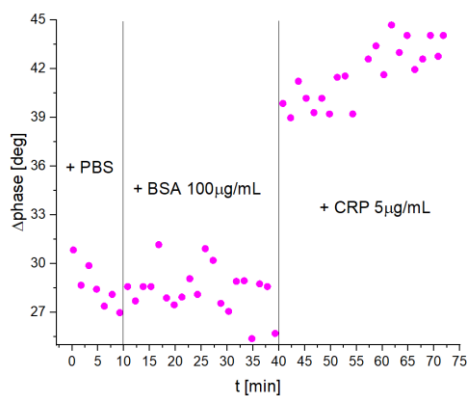
CRP + aCRP nieznakowane fluorescencyjnie



CRP + aCRP znakowane fluorescencyjnie FITC



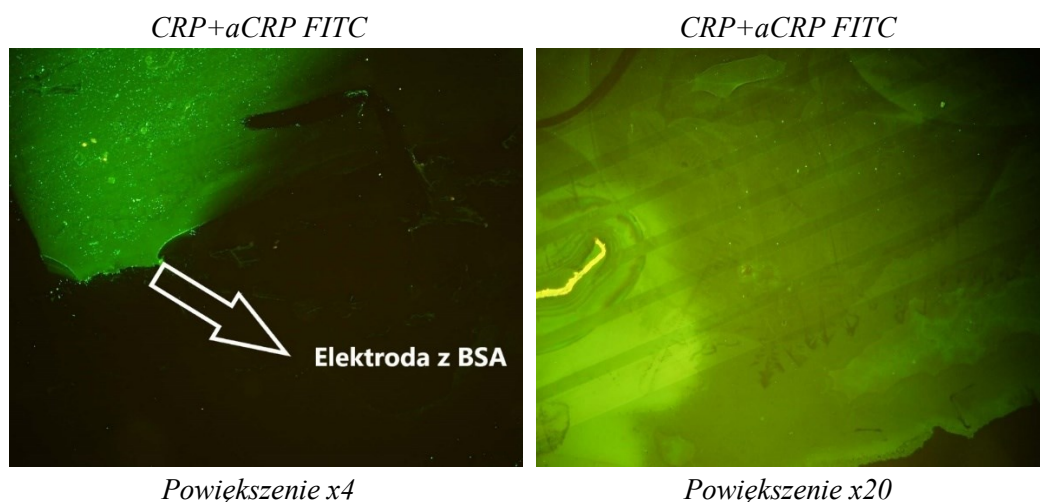
aCRP + CRP nieznakowane fluorescencyjnie



Rysunek 74 Różnica przesunięcia fazowego układu CRP-aCRP oraz aCRP-CRP przy częstotliwości 1kHz

W celu potwierdzenia zajścia wiązania białko-białko na podłożach polimerowych przeprowadzono dodatkowe pomiary fluorescencyjne próbek po przeprowadzonych pomiarach różnicy przesunięcia fazowego, których wyniki przedstawiono na Rysunku 74. Analiza obrazów fluorescencyjnych wskazuje na to, że po wprowadzeniu roztworu przeciwciała aCRP na elektrodę pokrytą białkiem

CRP, następuję reakcja wiązania między białkami. Na tej samej próbce elektroda referencyjna pokryta białkiem blokującym BSA nie wykazała żadnych zmian fluorescencyjnych, co oznacza, że jej powierzchnia została efektywnie zablokowana. Niestety podobnie jak w przypadku poprzedniej testowanej pary białek, zmiany różnicy przesunięcia fazowego dla układów CRP-aCRP z przeciwciałem znakowanym fluorescencyjnie są niewielkie mimo potwierdzonego obserwacjami za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wiązania się tych białek.



Rysunek 75 Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego dla elektrod referencyjnej (zablokowanej BSA) oraz po wiązaniu CRP-aCRP

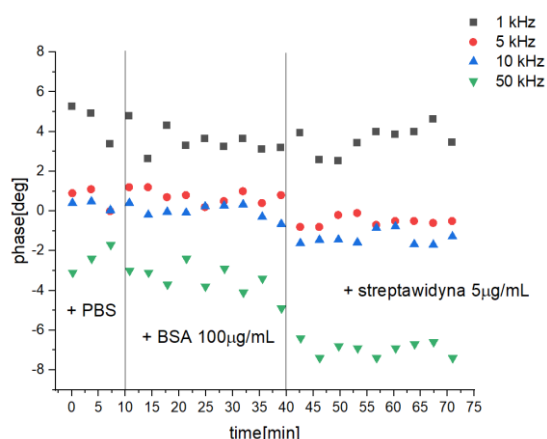
7.4.1 Konkurencja i desorpcja białek na podłożu

Jednym z często stosowanych układów w badaniach wiązania specyficznego jest układ streptawidyna-biotyna. Również w niniejszej pracy analizowano reakcję między tymi białkami za pomocą układu mikrofluidycznego typu II oraz zbudowanego przez nas układu do pomiaru przesunięcia kąta fazowego. Badania te nie dawały jednoznacznych wyników, dlatego w tym wypadku przeprowadzono również pomiary z wykorzystaniem układu mikrofluidycznego typu II i dwóch spektrometrów.

Eksperyment miał na celu zweryfikowanie na etapie projektowania układu z biomolekułami jaki wpływ na odpowiedź próbki ma elektroda referencyjna (pokryta BSA) i czy zachodzi na jej powierzchni zjawisko konkurencji o miejsce na powierzchni przez roztwór białka wprowadzonego (streptawidyna) wraz z desorpcją BSA. W pierwszej kolejności za pomocą prototypowego układu Przeprowadzono pomiar różnicy przesunięcia fazowego Δphase dla elektrody badanej i referencyjnej dla czterech częstotliwości 1kHz, 5kHz, 10kHz, 50kHz w celu zarejestrowania najsilniejszej odpowiedzi próbki badane

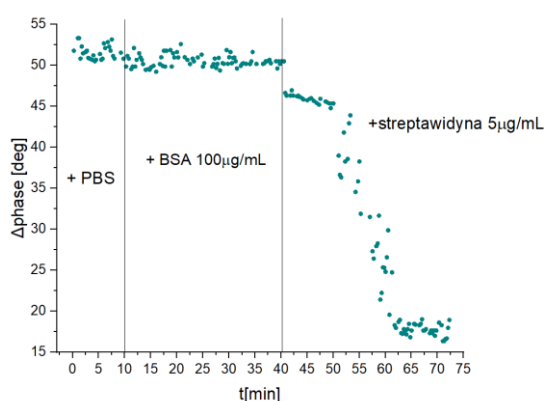
z zaadsorbowanymi białkami i reakcji specyficznej białko-białko. Następnie podobny pomiar wykonano jak w rozdziale 7.2. z wykorzystaniem dwóch spektrometrów rejestrujących pełne widmo impedancyjne. Wyniki pomiarów przesunięcia fazowego Δphase dla elektrody badanej i referencyjnej dla czterech częstotliwości 1kHz, 5kHz, 10kHz, 50kHz wykonanych z użyciem prototypowego układu przedstawiono poniżej.

bBSA+streptawidyna



Rysunek 76 Różnica przesunięcia fazowego między dwiema elektrodami: mierzonej (pokrytej białkiem bBSA) oraz referencyjnej (pokrytej BSA) po wprowadzeniu roztworów PBS, BSA oraz streptawidyny w różnych częstotliwościach.

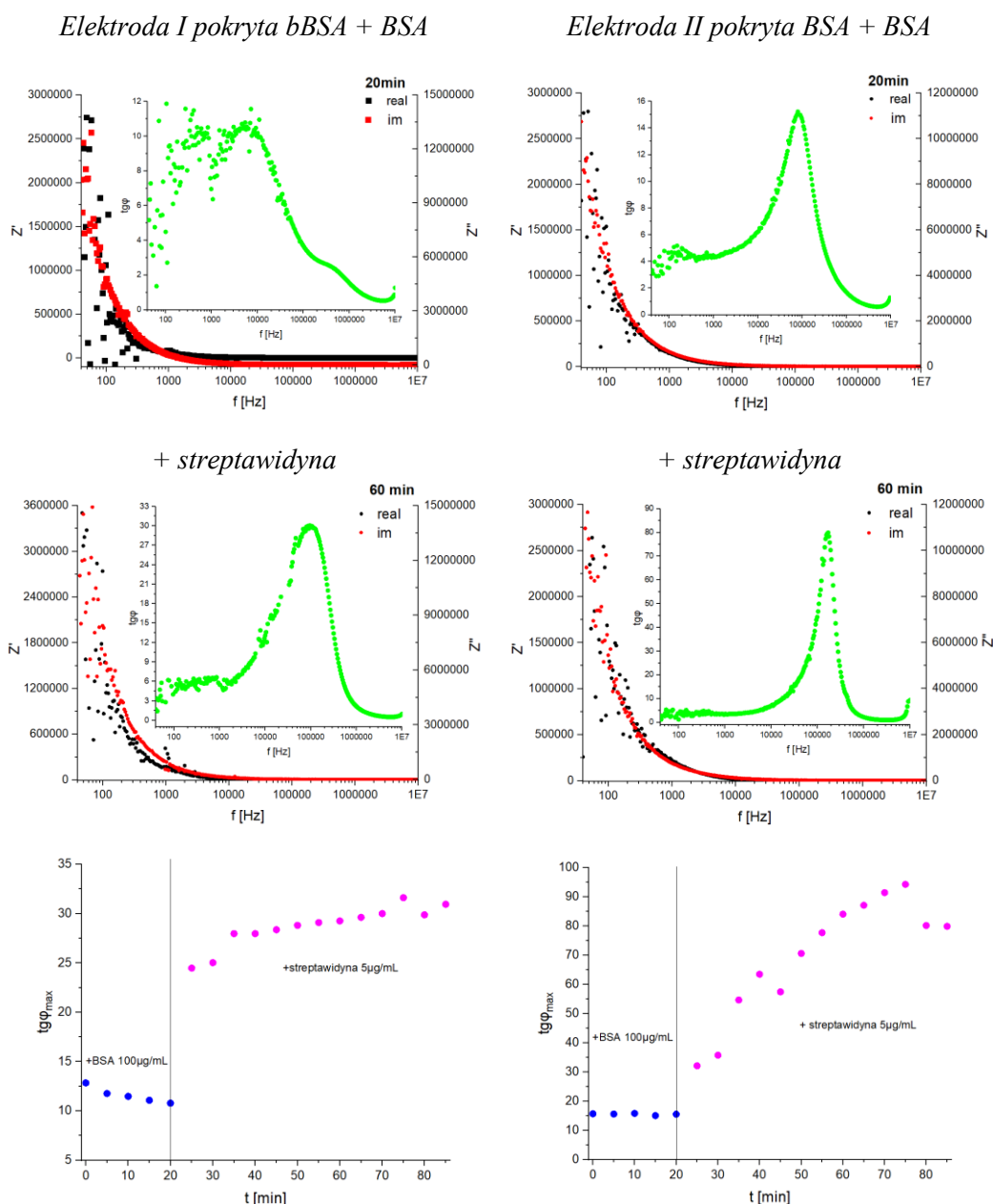
Otrzymane wyniki (Rysunek 76) pokazują najsilniejszą odpowiedź układu bBSA-streptawidyna przy częstotliwości wynoszącej 50kHz. Przeprowadzono serię pomiarów dla układu bBSA-streptawidyna przy częstotliwości, gdzie różnica faz była największa – 50kHz, przykładowe wyniki przedstawiono na Rysunku 77.



Rysunek 77 Różnica przesunięcia fazowego układu bBSA-streptawidyna przy częstotliwości 50kHz

Przypadku pomiarów dla pary CRP-aCRP, co pokazano na Rysunku 65, jak i pary IgG-aIgG (Rysunek 62) można zaobserwować, że maksimum kąta przesunięcia fazowego uległo zmianie tylko dla elektrody, na której zachodziła

reakcja wiązania specyficznego. Nie zaobserwowano żadnych zmian na elektrodzie referencyjnej, na której zaadsorbowano białko BSA. Późniejsze badania wykonane za pomocą prototypowego układu (Rysunek 71,73) potwierdziły zmiany przesunięcia kąta fazowego w wyniku immunoreakcji. To sugeruje, że powierzchnia elektrody referencyjnej została w pełni pokryta białkiem oraz że nie doszło do desorpcji już zaadsorbowanego białka lub/i konkurencji o miejsce na powierzchni, białek w roztworze [140].



Rysunek 78 Widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego φ_{max} dla pary białek bBSA-streptawidyna

Aby wykluczyć ewentualny wpływ na odpowiedź układu prezentowaną na Rysunku 77 efektów desorpcji oraz konkurencji o miejsce przeprowadzono pomiary widm impedancyjnych dla elektrody testowej (pokrytej bBSA)

i referencyjnej (pokrytej BSA) przy użyciu układu mikrofluidycznego typu II i dwóch spektrometrów impedancyjnych Agilent 4294A. Wyniki przesunięcia maksimum kąta fazowego dla układu przedstawia Rysunek 78. Zaobserwowano, że po wprowadzeniu roztworu streptawidyny na powierzchnię polimerową zmiany zachodzą zarówno dla elektrody testowej, jak i elektrody referencyjnej. Wyniki te sugerują, że doszło do efektu desorpcji białka wraz z konkurencją o miejsce na powierzchni próbki [140].

W kontekście projektowania biosensora, ograniczenie się do pomiarów na jednej tylko elektrodzie zawierającej białko testowe jest niewystarczające. Zmiany zachodzące na elektrodzie referencyjnej również mogą mieć wpływ na wyniki pomiarów. Rezultaty powyższego eksperymentu pokazują, że dane uzyskane z pomocą skonstruowanego prototypu biosensora uznać można za wiarygodne, tylko wtedy, gdy na elektrodzie referencyjnej (zablokowanej) nie dochodzi do reakcji z wprowadzonym w roztworze białkiem badanym.

8. Podsumowanie i wnioski

Celem pracy było skonstruowanie prostego i taniego w eksploatacji biosensora zdolnego do wykrywania zajścia reakcji specyficznej białko-białko, wykorzystującego analizę pomiarów impedancyjnych.

W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę odpowiedzi impedancyjnej dla podłoży Si/SiO₂ z elektrodami złotymi i podłoży szklanych z elektrodami ITO pokrytymi cienką warstwą polimerową. Badania dotyczyły pojedynczych elektrod, na które nanoszono różne powłoki polimerowe i białka, a pomiary prowadzono w warunkach suchych. Uzyskane wyniki stanowiły, podstawę do kontynuacji badań nad adsorpcją biomolekuł na powierzchniach polimerowych.

Następnie zaprojektowano układ mikrofluidyczny typu I, który umożliwił analizę w obecności roztworu zawierającego biomolekuły. Przeprowadzono pomiary impedancyjne w czasie adsorpcji białek do powierzchni polimerowej oraz reakcji wiązania specyficznego między białkiem zaadsorbowanym na powierzchni i białkiem w roztworze. Zarejestrowano widma impedancyjne, dla których analizowano zmiany tangensa kąta przesunięcia fazowego, jako parametru obrazującego zmiany zachodzące w czasie adsorpcji białek do powierzchni polimerowej. Układ mikrofluidyczny typu I umożliwiał badanie zmian zachodzących na jednej z wybieranych elektrod.

W kolejnym kroku zaprojektowano i wykonano układ mikrofluidyczny typu II, w którym możliwa była rejestracja zmian na dwóch elektrodach jednocześnie w czasie rzeczywistym. Przeprowadzono szereg analiz odpowiedzi impedancyjnej dwóch elektrod - elektrody, na której zachodziła reakcja i elektrody referencyjnej. Elektroda referencyjna była blokowana białkiem BSA, aby nie wykazywała zmian po wprowadzeniu roztworu białka, które reagowało z zaadsorbowanym białkiem na elektrodzie badanej.

Na podstawie otrzymanych wyników opracowano prototyp prostego biosensora, wykorzystującego układ AD8302, którego zasada działania opiera się na pomiarze różnicy przesunięcia fazowego sygnałów na elektrodzie badanej i referencyjnej. Wykazano skuteczność zaproponowanego rozwiązania w przypadku reakcji specyficznej między IgG-aIgG (królicze) oraz CRP-aCRP (ludzkie). Zauważono, że w przypadku układu bBSA-streptawidyna może zachodzić zjawisko konkurencji i desorpcji wcześniej zaadsorbowanego białka.

Stosując pomocnicze metody badawcze, takie jak mikroskopia fluorescencyjna oraz ToF-SIMS, potwierdzono występowanie reakcji wiązania specyficznego między badanymi białkami, włączając immunoreakcję.

Rezultatem pracy jest prototyp biosensora umożliwiający obserwację w czasie rzeczywistym zajścia reakcji specyficznej białko-białko poprzez rejestrację różnicy faz sygnałów pochodzących z dwóch elektrod (badanej i referencyjnej). System detekcji zbudowany jest w oparciu o tani i łatwo dostępny układ elektroniczny AD8302 i układ mikroprocesorowy STM32F2. W biosensorze tym przetwornik zawierający powierzchnie aktywne stanowiły cienkie warstwy polimerowe pokryte odpowiednimi białkami, które były przygotowane na podłożach szklanych z elektrodami ITO. Dzięki temu podłoża te są łatwe do recyklingu i ponownego wykorzystania, co znacząco może obniżyć koszty pojedynczego badania.

Bibliografia

- [1] M. Kechadi, J. Gamby, L. Chaal, et al., „Polymer microchip impedance spectroscopy through two parallel planar embedded microelectrodes: Understanding the impedance contribution of the surrounding polymer on the measurement accuracy”, *Electrochim. Acta*, tom 105, pp. 7-14, 2013.
- [2] M. Kechadi, B. Tribollet, J. Gamby, „Dielectric Impedance Spectroscopy in Flexible Polymer Microchip: Towards the Non Contact Biosensors”, *ECS Meet. Abstr*, nr 41, p. 2148, 2015.
- [3] M. Kechadi, B. Sotta, L. Chaal, et al., „A real time affinity biosensor on an insulated polymer using electric impedance spectroscopy in dielectric microchips”, *Analyst*, 2014.
- [4] M. Kechadi, L. Chaal, B. Tribollet, et al., „An Improved the Impedance Spectroscopy Measurements with Non-Contact Microelectrodes Embedded into a Flexible Polymer Comprising a Microfluidic Network”, *ECS J. Electrochem. Soc.*, tom 75, nr 38, 2017.
- [5] J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry* 7th ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2012.
- [6] J. Parker, *Peptide Bond*, Sydney: Elsevier Science Inc. , 2001, pp. 1429-1430.
- [7] H. Borsook, „Peptide Bond Formation”, *Advances in Protein Chemistry*, tom 8, pp. 127-174, 1953.
- [8] S. J. Chalk, „IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications”, 09 10 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- [9] D. Eisenberg, „The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, tom 100, 2003.
- [10] J. M. Berg, *Biochemia*, Warszawa: PWN, 2007.
- [11] A. A. Dombkowski, K. Z. Sultana, D. B. Craig, „Protein disulfide engineering”, *FEBS Letters*, tom 588, 2014.
- [12] X. Wang, „Fibrous proteins and tissue engineering”, *Materials Today*, tom 9, 2006.
- [13] P. Goulak, „Znaczenie modyfikacji histonów w transformacji nowotworowej”, *Postępy Biochemii*, tom 58, nr 3, 2012.
- [14] M. Akmal, A. Aulanni'am, M. A. Widodo, et al., „The important role of protamine in spermatogenesis and quality of sperm: A mini review”, *Asian. Pac. J. Reprod.*, tom 5, 2016.

- [15] I. Hanukoglu, R. Feuchtwanger, A. Hanukoglu, „Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells”, *J. Biol. Chem.*, tom 265, nr 33, 1990.
- [16] G. B. Pier, J. B. Lyczak, L. M. Wetzler, Immunology, infection, and immunity, Washington, D.C. : ASM Press , 2004.
- [17] A. K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuillhof, „Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview”, *Analyst*, tom 138, pp. 1619–1627, 2013.
- [18] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, „Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips”, *Biomacromolecules*, tom 8, pp. 1775-1789, 2007.
- [19] J. W. Lee, S. J. Kim, S. M. Cho, et al., „Self-Assembled Monolayers of Carboxylate-Terminated Thiols for Protein Immobilization: Surface Characterization and Optimization”, *Langmuir*, tom 24, nr 12, pp. 6409-6415, 2008.
- [20] E. Beilis, B. Belgorodsky, L. Fadeev, et al., „Surface-induced conformational changes in doped bovine serum albumin self-assembled monolayers”, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 136, nr 17, pp. 6151-4, 2014.
- [21] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, „Oriented immobilization of proteins”, *MCA*, tom 128, pp. 127–143, 1998.
- [22] O. Klykov, M. G. Weller, „Quantification of N-hydroxysuccinimide and N-hydroxysulfosuccinimide by hydrophilic interaction chromatography (HILIC)”, *Anal. Methods*, pp. 6443-6448, 2015.
- [23] G. MacBeath, S. L. Schreiber, „Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination”, *Science*, tom 289, nr 5485, pp. 1760-1763, 2000.
- [24] S. Ravi, V. R. Krishnaumurthy, J. M. Caves, et al., „Maleimide–thiol coupling of a bioactive peptide to an elastin-like protein polymer”, *Acta Biomater.*, tom 8, pp. 627-635, 2014.
- [25] G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3rd edition, London: Academic Press, 2013.
- [26] R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodriguez, et al., „Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method”, *Enzyme Microb. Technol.*, tom 15, pp. 546-550, 1993.
- [27] C. Mateo, R. Torres, G. Fernandez-Lorente, et al., „Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method”, *Biomacromolecules*, tom 4, pp. 772-777, 2003.
- [28] C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, O. Abian, et al., „Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The

- Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage”, *Biomacromolecules*, tom 1, nr 4, pp. 739-745, 2000.
- [29] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wensoloski, et al., „Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin”, *Science*, tom 243, pp. 85-88, 1989.
 - [30] M. Howarth, D. J-F. Chinnapen, K. Gerrow, et al., „A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site”, *Nat Methods*, nr 4, pp. 267-273, 2006.
 - [31] J. DeChancie, K. N. Houk, „The Origins of Femtomolar Protein–Ligand Binding: Hydrogen Bond Cooperativity and Desolvation Energetics in the Biotin–(Strept)Avidin Binding Site”, *J Am Chem Soc.*, tom 17, pp. 5419–5429., 2007.
 - [32] C. L. Smith, J. S. Milea, G. H. Nguyen, „Immobilization of Nucleic Acids Using Biotin-Strept(avidin) Systems”, *Top Curr Chem*, tom 261, pp. 63-90, 2006.
 - [33] S. B. Nimse, K. Song, M. D. Sonawane, et al., „Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications”, *Sensors*, tom 14, pp. 22208-22229, 2014.
 - [34] W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, „Solid supports for microarray immunoassays”, *JMR*, tom 16, pp. 165-176, 2003.
 - [35] A. A. Kortt, G. W. Oddie, P. Iliades, et al., „Nonspecific Amine Immobilization of Ligand Can Be a Potential Source of Error in BIAcore Binding Experiments and May Reduce Binding Affinities”, *Anal Biochem.*, tom 253, pp. 103-111, 1997.
 - [36] E. Servoli, D. Maniglio, M. R. Aguilar, et al., „ Quantitative analysis of protein adsorption via atomic force microscopy and surface plasmon resonance”, *Macromol Biosci*, tom 8, nr 12, pp. 1126-1134, 2008.
 - [37] H-S. Lee, T-Y. Seong, W. M. Kim, et al., „ Enhanced resolution of a surface plasmon resonance sensor detecting C-reactive protein via a bimetallic waveguide-coupled mode approach”, *Sens. Actuators B Chem.*, tom 266, pp. 311-317, 2018.
 - [38] C. P. Johnson, I. E. Jensen, A. Prakasam, et al., „ Engineered protein a for the orientational control of immobilized proteins”, *Bioconjugate Chem.*, tom 14, pp. 974-978, 2003.
 - [39] W. Lee, D-B. Lee, B-K. Oh, et al., „Nanoscale fabrication of protein A on self-assembled monolayer and its application to surface plasmon resonance immunosensor”, *Enzyme Microb. Technol.*, tom 37, pp. 678-682, 2004.
 - [40] G. Tanaka, H. Funabashi, M. Mie, et al., „Fabrication of an antibody microwell array with self-adhering antibody binding protein”, *Anal Biochem.*, tom 350, 2006.
 - [41] J. D. Andrade, V. Haldy, „Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses”, *Adv. Polym. Sci.*, tom 79, pp. 1-63, 1986.

- [42] V. Hlady, J. Buijs, „Protein adsorption on solid surfaces”, *Current Opinion in Biotechnology*, tom 7, pp. 72-77, 1996.
- [43] A. Fujimori, H. Naito, T. Miyazaki, „Adsorption of Complement, Cytokines, and Proteins by Different Dialysis Membrane Materials: Evaluation by Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy”, *Artificial Organs*, tom 22, pp. 1014-1017, 1998.
- [44] S-Y. Jung, S-M. Lim, F. Albertorio, et al., „The Vroman Effect: A Molecular Level Description of Fibrinogen Displacement”, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 125, pp. 12782-12786, 2003.
- [45] K. L. Jones, C. R. O'Melia, „Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength”, *Journal of Membrane Science*, tom 165, pp. 31-46, 2000.
- [46] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, „Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces”, *Adv Colloid Interface Sci.*, tom 162, pp. 87-106, 2011.
- [47] G. Anand, „Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces”, Rensselaer Polytechnic Institute ProQuest Dissertations Publishing, 2010.
- [48] P. G. Koutsoukos, W. Norde, J. Lyklema, „Protein adsorption on hematite (α -Fe₂O₃) surfaces”, *J. Colloid Interface Sci.*, tom 95, nr 2, pp. 385-397, 1983.
- [49] M. Malmsten, „Formation of Adsorbed Protein Layers”, *J. Colloid Interface Sci.*, tom 207, nr 2, pp. 186-199, 1998.
- [50] T. Wei, S. Kaewtathip, K. Shing, „Buffer Effect on Protein Adsorption at Liquid/Solid Interface”, *J. Phys. Chem. C*, tom 113, pp. 2053-2062, 2009.
- [51] K. C. Dee, D. A. Puleo, R. Bizios, *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*, New Jersey: Wiley, 2002.
- [52] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition., New York: Garland Science, 2002.
- [53] A. Kumar, P. Venkatesu, „Overview of the Stability of α -Chymotrypsin in Different Solvent Media”, *Chem. Rev.*, tom 112, nr 7, pp. 4283-4307, 2012.
- [54] Y. Fang, D. G. Dalgleish, „Conformation of β -Lactoglobulin Studied by FTIR: Effect of pH, Temperature, and Adsorption to the Oil–Water Interface”, *J. Colloid Interface Sci.*, tom 196, nr 2, 1997.
- [55] R. Lumry, „Conformation changes of proteins,” *J. Phys. Chem. A*, nr 58, 1953.
- [56] D. Atkinson, D. M. Small, „Recombinant Lipoproteins: Implications for Structure and Assembly of Native Lipoproteins”, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, tom 15, pp. 403-456, 1986.

- [57] Y. Wang, C. Li, G. J. Pielak, „Effects of Proteins on Protein Diffusion”, *J. Am. Chem. Soc.*, tom 132, nr 27, pp. 9392-9397, 2010.
- [58] L. Tang, P. Thevenot, W. Hu, „Surface chemistry influence implant biocompatibility”, *Curr Top Med Chem.*, tom 8, pp. 270-280, 2008.
- [59] C. Gao, *Polymeric Biomaterials for Tissue Regeneration: From Surface/Interface. From Surface/Interface Design to 3D Constructs*, Singapore: Springer, 2016.
- [60] K. Rechendorff, M. B. Hovgaard, M. Foss, et al., „Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness”, *Langmuir*, tom 26, pp. 10885-10888, 2006.
- [61] S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, et al., „The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates”, *Colloids Surf. B.*, tom 103, nr 1, pp. 395-404, 2013.
- [62] N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, et al., „Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption”, *Langmuir*, nr 1, pp. 656-665, 2012.
- [63] Y. Shen, „Electrochemical Impedance Spectroscopy for Protein Detection”, *Biosensors*, tom 3, nr 4, pp. 304-327, 2013.
- [64] A. Bogomolova, E. Komarova, K. Reber, et al., „Challenges of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Protein Biosensing”, *Anal. Chem.*, tom 81, nr 10, pp. 3944-3949, 2009.
- [65] O. A. Sadik, H. Xu, E. Gheorghiu, et al., „Differential Impedance Spectroscopy for Monitoring Protein Immobilization and Antibody–Antigen Reactions”, *Anal. Chem.*, tom 74, nr 13, pp. 3142-3150, 2002.
- [66] D. K. Kampouris, X. Ji, E. P. Randviir, et al., „A new approach for the improved interpretation of capacitance measurements for materials utilised in energy storage”, *RSC Adv.*, tom 5, pp. 12782-12791, 2015.
- [67] N. S. Mazlan, M. M. Ramli, M. M. A. B Abdullah, et al., „Interdigitated electrodes as impedance and capacitance biosensors: A review”, *AIP Conference Proceedings*, tom 1885, nr 1, pp. 29-30, 2017.
- [68] H. Maab, *Preparation and Characterization of Carbon Molecular Sieve (CMS) / SPEEK bilayer Membranes and SPEEK /Polyimide (PI) Blend Membranes for Direct Alcohols Fuel Cell (DAFC) performance*, 2009.
- [69] D. Lin, A. M. Mohhamed, D. J. Harrison, et al., „Self-assembled nanostructures for bioanalysis”, Defence Research and Development Canada, 2015.
- [70] A. M. Belu, D. J. Graham, D. G. Castner, „Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces”, *Biomaterials*, tom 24, pp. 3635-53, 2006.

- [71] A. Sosnik, R. N. S. Sodhi, P. M. Brodersen, et al., „Surface study of collagen/poloxamine hydrogels by a 'deep freezing' ToF-SIMS approach”, *Biomaterials*, tom 27, pp. 2340-2348, 2006.
- [72] J. C. Vickerman, D. Briggs, ToF-SIMS: Surface Analysis by Mass Spectrometry, Manchester: SurfaceSpectra; Chichester, 2001.
- [73] B. J. Tyler, G. Rayal, D. G. Castner, „Multivariate analysis strategies for processing ToF-SIMS images of biomaterials”, *Biomaterials*, tom 28, nr 15, pp. 2412–2423, 2007.
- [74] M. Sugden, M. Holness, „Time-of-flight secondary ion mass spectrometer: A novel tool for lipid imaging”, *J Clin Lipidol*, tom 6, nr 4, pp. 437-445, 2011.
- [75] M. S. Wagner, D. G. Castner, „Characterization of Adsorbed Protein Films by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis”, *Langmuir*, tom 17, nr 15, pp. 4649-4660, 2001.
- [76] J. W. Lichtman, J-A. Conchello, „Fluorescence microscopy”, *Nature Methods*, tom 2, pp. 910-919, 2005.
- [77] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, et al., „Fluorescence Microscopy”, *Cold Spring Harb Protoc.*, tom 10, pp. 1042-1065, 2014.
- [78] T. Majtner, *Texture-Based Image Description in Fluorescence Microscopy*, Brno, 2015.
- [79] B. Perez-Fernandez, A. de la Escosura-Muniz, Electrochemical biosensors based on nanomaterials for aflatoxins detection: A review (2015–2021)”, *Anal. Chim. Acta.*, tom 1212, 2022.
- [80] H. Khoshbin, „A highly sensitive immunosensor for cancer antigen 125 based on Pd nanoparticles decorated nitrogen-doped graphene/poly-l-lysine modified glassy carbon electrode”, *Biosens.*, tom 112, pp. 159-165, 2018.
- [81] Y. Wang, G. Zhao, H. Wand, et al., „Label-free electrochemical immunosensor based on biocompatible nanoporous Fe₃O₄ and biotin–streptavidin system for sensitive detection of zearalenone”, *Analyst.*, tom 145, nr 4, 2020.
- [82] M. Thangamuthu, C. Santschi, O. J. F. Martin, „Label-Free Electrochemical Immunoassay for C-Reactive Protein”, *Biosens.*, tom 8, nr 2, pp 34. , 2018.
- [83] B. Jachimska, A. Pajor, „Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and asdeposited on surfaces”, *Bioelechem.*, tom 87, pp. 138-146.
- [84] K-B. Lee, S-J. Park, C. A. Mirkin, et al., „Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography”, *Science*, tom 295, pp. 1702–1705, 2002.

- [85] L. R. Loureiro, M. A. Carrascal, A. Barbas, et al., „Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens”, *Biomolecules*, tom 5, pp. 1783-1809, 2015.
- [86] K. Kaur, J. A. Forrest, „Influence of Particle Size on the Binding Activity of Proteins Adsorbed onto Gold Nanoparticles”, *Langmuir*, tom 28, pp. 2736-2744, 2012.
- [87] D. Shah, V. Salbilla, R. Richerson, et al., „Determination of biotin in biotin-conjugated protein by measuring fluorescence polarization”, *Clinical Chemistry*, tom 40, pp. 2112–2113, 1994.
- [88] A. K. Shrive, G. M. T. Gheetham, D. Holden, et al., „Three dimensional structure of human C-reactive protein”, *Nature*, tom 3, pp. 346-354, 1996.
- [89] S. Black, I. Kushner, D. Samols, „Minireview: C-reactive Protein”, *J. Biol. Chem.*, tom 279, nr 47, pp. 48487–48490, 2004.
- [90] A. Kwamura, T. Miyata, „Enzyme-Based Electrochemical Biosensors for Measuring Relatively Small Biomolecules”, *Biomaterials Nanoarchitectonics*, pp. 157-176, 2016.
- [91] S. K. Metkar, K. Girigoswarmi, „Diagnostic biosensors in medicine – A review”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, tom 17, pp. 271-283, 2019.
- [92] V. A. Bogdanovskaya, M. R. Tarasevich, „Electrochemical biosensors for medicine and ecology”, *Biosens. Bioelectron*, tom 11, pp. 853-861, 1996.
- [93] S. Mehrabani, A. J. Maker, A. M. Armani, „Hybrid Integrated Label-Free Chemical and Biological Sensors”, *Sensors*, tom 14, pp. 5890–5928, 2014.
- [94] G. Kim, J. H. Moon, C. Y. Lim, et al., „A microfluidic nano-biosensor for the detection of pathogenic Salmonella”, *Biosens. Bioelectron*, tom 67, pp. 243-247, 2015.
- [95] A. Agarwal, K. Buddharaju, I. K. Lao, et al., „Silicon nanowire sensor array using top–down CMOS technology”, *Sensors and Actuators A: Physical*, tom 145-146, pp. 207-213, 2008.
- [96] G-J. Zhang, L. Zhang, M. J. Huand, et al., „Silicon nanowire biosensor for highly sensitive and rapid detection of Dengue virus”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, tom 146, pp. 138-144, 2010.
- [97] B. Li, Q. Yu, Y. Duan, „Fluorescent labels in biosensors for pathogen detection”, *Crit Rev Biotechnol.*, tom 35, pp. 82-93, 2015.
- [98] G. T. Hermanson, „Fluorescent Probes,” w *Bioconjugate Techniques (Third edition)*, Rockford, IL, Academic Press, 2013, pp. 395-463.

- [99] F. Dang, Y. Chen, „Capillary electrophoresis of FITC labeled amino acids with laser-induced fluorescence detection”, *Sci. China, Ser. B: Chem.*, tom 42, pp. 663-669, 1999.
- [100] E. Petryayeva, W. R. Algar, „Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging”, *Appl Spectrosc.*, tom 67, pp. 215-252, 2013.
- [101] G. T. Hanson, B. J. Hanson „Fluorescent Probes for Cellular Assays”, *Comb Chem High Throughput Screen.*, tom 11, pp. 505-13, 2008.
- [102] S. Lasota, „Zastosowanie biosensorów typu FRET w badaniach mikroskopowych procesu migracji komórkowej”, *Postępy Biochemii*, tom 63, nr 1, pp. 16-33, 2017.
- [103] T. K. Kerppola, „Biomolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein in living cells”, *Annu Rev Biophys*, tom 37, pp. 465-487, 2008.
- [104] A. Ghosh, N. Karedla, J. C. Thiele, et al., „Fluorescence lifetime correlation spectroscopy: Basics and applications”, *Methods*, tom 140-141, pp. 32-39, 2018.
- [105] A. Syahir, K. Usui, K. Tomizaki, et al., „Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays”, *Microarrays*, tom 4, pp. 228-244, 2015.
- [106] R. Raijmakers, C. R. berkens, A. de Jong, et al., „Automated Online Sequential Isotope Labeling for Protein Quantitation Applied to Proteasome Tissue-specific Diversity”, *MCP*, tom 7, nr 9, pp. 1755-1762, 2008.
- [107] M. A. Crusak, R. R. Rogers, G. C. Yousef, et al., „An enclosed-chamber labeling system for the safe ¹⁴C-enrichment of phytochemicals in plant cell suspension cultures”, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plan*, tom 40, pp. 80–85, 2004.
- [108] M. J. MacCoss, C. C Wu, D. E. Matthews, et al., „Measurement of the Isotope Enrichment of Stable Isotope-Labeled Proteins Using High-Resolution Mass Spectra of Peptides”, *Anal. Chem.*, tom 77, pp. 7646-7653, 2005.
- [109] X. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, et al., „Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors”, *Electroanalysis*, tom 18, pp. 319-326, 2006.
- [110] A. Gole, C. Dash, V. Ramakrishnan, „Pepsin–Gold Colloid Conjugates: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity”, *Langmuir*, tom 17, nr 5, pp. 1674-1679, 2001.
- [111] Y. Wang, E. C. Alocilja, „Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens”, *J Biol Eng.*, tom 9, nr 16, pp. 1-7, 2015.
- [112] J. M. Pingarron, P. Yáñez-Sedeño, „Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors”, *Anal Bioanal Chem.*, tom 382, pp. 884–886, 2005.

- [113] T. Li, D. Liu, Z. Wang, „Microarray-based Raman spectroscopic assay for kinase inhibition by gold nanoparticle probes”, *Biosens Bioelectron.*, tom 24, nr 11, pp. 3335-3339, 2009.
- [114] E. Hutter, J. H. fendler, D. Roy, „Surface Plasmon Resonance Studies of Gold and Silver Nanoparticles Linked to Gold and Silver Substrates by 2-Aminoethanethiol and 1,6-Hexanedithiol”, *J. Phys. Chem. B*, tom 105, nr 45, pp. 11159-11168, 2001.
- [115] J. R. Crowther, „Elisa Theory and Practice”, *Methods Mol Biol*, tom 42, nr 1, 1995.
- [116] R. M. Lequin, „ Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”, *Clin. Chem.*, tom 51, nr 12, 2020.
- [117] J. G. Salfeld, „Isotype selection in antibody engineering”, *Nat. Biotechnol.*, tom 25, p. 1369–1372, 2007.
- [118] P. Bergveld, „The impact of MOSFET-based sensors”, *Sensors and Actuators*, tom 8, nr 2, pp. 109-127, 1985.
- [119] M. C. Lin, C. J. Chu, L. C. Tsa, et al., „Control and Detection of Organosilane Polarization on Nanowire Field-Effect Transistors”, *Nano Lett.*, tom 12, nr 7, pp. 3656-3661, 2007.
- [120] A. Matsumoto, Y. Miyahara, „Current and emerging challenges of field effect transistor based bio-sensing”, *Nanoscale*, tom 5, pp. 10702-10718, 2013.
- [121] T. Goda, Y. Miyahara „Detection of Microenvironmental Changes Induced by Protein Adsorption onto Self-Assembled Monolayers using an Extended Gate-Field Effect Transistor”, *Anal. Chem.*, tom 82, nr 5, pp. 1803-1810, 2010.
- [122] A. Sankiewicz, B. Puzan, E. Grodkiewicz, „Bioczujniki SPRI – narzędzie diagnostyczne przyszłości”, *Chemik*, tom 68, nr 6, pp. 528–535, 2014.
- [123] R. G. Woodbury, C. Wendin, J. Clendenning, et al., „Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor”, *Biosens. Bioelectron*, tom 13, nr 10, pp. 1117-1126, 1998.
- [124] P. Damborský, J. Svitel, J. Katrlík, „Optical biosensors”, *Essays Biochem.*, tom 60, nr 1, p. 91–100, 2016.
- [125] J. Fritz, „Cantilever biosensors”, *The Analyst*, tom 133, pp. 855–863, 2008.
- [126] A. De Pastina, F. Padovani, G. Brunetti, et al., „Multimodal real-time frequency tracking of cantilever arrays in liquid environment for biodetection: Comprehensive setup and performance analysis”, *Rev Sci Instrum*, tom 92, nr 6, pp. 65001-10, 2021.
- [127] M. Alvarez, K. Zinoviev, M. Moreno, et al., „Cantilever Biosensors”, *Optical Biosensors: Today and Tomorrow (2nd Edition)*, pp. 419–452, 2008.
- [128] A. Boisen, T. thundat, „Design & fabrication of cantilever array biosensors”, *Mater. Today*, tom 12, nr 9, pp. 32-38, 2009.

- [129] A. Wańczyk, B. Łabędź, Z. Rajfur, „Mikrobiosensory beleczkowe w mikrobiologii” *Post. Mikrobiol.*, tom 55, nr 2, pp. 225–231, 2016.
- [130] J. Carrano, „Chemical and Biological Sensor Standards Study”, Defense Technical Information Center, Arlington, VA, 2005.
- [131] M. Ates, „Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces”, *Prog. Org. Coat.*, tom 71, nr 1, pp. 1-10, 2011.
- [132] J. Anthi, V. Kolivoska, B. Holubova, et al., „Probing polymer brushes with electrochemical impedance spectroscopy: a mini review”, *Biomater. Sci*, tom 22, pp. 7379-7391, 2021.
- [133] C. C. Lee, F. Mansfeld, „Automatic classification of polymer coating quality using artificial neural networks”, *Corros. Sci.*, tom 41, nr 3 pp. 439-461, 1998.
- [134] C. Feng, Y. Liu, C-I. Ren, „ Temperature-regulated protein adsorption on a PNIPAm layer”, *Soft Matter.*, tom 14, nr 31, pp. 6521-6529, 2018.
- [135] J. Hu, S. Li, B. Liu, „Adsorption of BSA onto sulfonated microspheres”, *Biochem. Eng. J.*, tom 23, nr 3, pp. 259-263, 2005.
- [136] L. Zhu, T. Zhang, B. Wang, „Real-time detection of attenuated blood polarity in mouse models of circulating tumor based on a fluorescent probe”, *Sens. Actuators B Chem.*, tom 348, nr 1, pp. 1306-64, 2021.
- [137] S. V. de Lima, H. P. de Oliveira, C. P. de Melo, „Electrical impedance monitoring of protein unfolding”, *RSC Adv.*, tom 6, nr 109, pp. 107644-107652, 2016.
- [138] N. Rivera-Serrano, M. Pagan, J. Colon-Rodriguez, et al., „Static and Dynamic Measurement of Dopamine Adsorption in Carbon Fiber Microelectrodes Using Electrochemical Impedance Spectroscopy”, *Anal. Chem*, tom 90, nr 3, pp. 2293-2301, 2019.
- [139] J. S. Daniels, N. Pourmand, „Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges”, tom 12, nr 19, pp. 1239–1257, 2008.
- [140] M. Holmberg, X. Hou, „ Competitive protein adsorption of albumin and immunoglobulin G from human serum onto polymer surfaces”, *Langmuir*, tom 26, nr 2, pp. 938-42, 2009.
- [141] M. Dubey, K. Emoto, H. Takahashi, et al., „Affinity-based Protein Surface Pattern Formation by Ligand Self-Selection from Mixed Protein Solutions”, *Adv Funct Mater.*, tom 19, nr 19, pp. 3046-3055, 2009.
- [142] M. S. Wagner, D. G. Castner „Characterization of Adsorbed Protein Films by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis”, *Langmuir* , tom 17, nr 15, pp. 4649-4660, 2001.

- [143] E. C. Griffith, V. Vaida, „In situ observation of peptide bond formation at the water–air interface”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, tom 109, nr 39, pp. 15697-15701, 2012.
- [144] Y. Kabe, S. Sakamoto, M. Hatakeyama, et al., „Application of high-performance magnetic nanobeads to biological sensing devices”, *Anal Bioanal Chem.*, tom 9, pp. 1825–1837, 2019.
- [145] I. L. Batalha, A. Hussain, A. C. A. Roque, „Gum Arabic coated magnetic nanoparticles with affinity ligands specific for antibodies”, *J. Mol. Recognit.*, tom 23, nr 5, pp. 462 - 471, 2010.
- [146] S. Mehrabani, A. J. Maker, A. M. Armani, „Hybrid Integrated Label-Free Chemical and Biological Sensors”, *Sensors*, tom 14, nr 4, pp. 5890–5928, 2014.
- [147] C. R. Taitt, G. P. Anderson, F. S. Ligler, „Evanescent wave fluorescence biosensors”, *Biosens. Bioelectron*, tom 20, nr 76, pp. 2470-2487, 2005.
- [148] E. Barsoukov, J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, 2nd Edition, New Jersey: Wiley & Sons, Inc. ISBN:9780471647492, 2005.
- [149] D. J. O'Connor, B. A. Sexton, R. St. C. „Smart, Surface Analysis Methods in Materials Science: SIMS-Secondary Ion Mass Spectrometry”, *Springer Series in Surface Sciences*, tom 23, 2003.
- [150] H. Fujiwara, *Spectroscopic ellipsometry: principles and applications*, Tokyo, Japan: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [151] J. Kim, P. Seidler, L. S. Wan, et al., „Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates”, *J. Colloid Interface Sci*, tom 329, nr 1, pp. 114-119, 2009.
- [152] X. Z. Y-S. Sun, „Characterization of Bovine Serum Albumin Blocking Efficiency on Epoxy-Functionalized Substrates for Microarray Applications”, *J. Lab. Autom.*, tom 21, pp. 625 –631, 2016.
- [153] Y. L. Jeyachandran, J. A. Mielczarski, E. Mielczarski, et al., „Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces”, *J. Colloid Interface Sci*, tom 341, nr 1, pp. 136-142, 2010.
- [154] S. Hideshima, R. Sato, S. Inoue, et al., „Detection of tumor marker in blood serum using antibody-modified field effect transistor with optimized BSA blocking”, *Sens. Actuators B Chem.*, tom 161, nr 1, pp. 146-150, 2012.
- [155] G. Rodrigo, M. Gruvegard, J. M. Van Alstine, „Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography”, *Antibodies*, tom 4, nr 3, pp. 259-277, 2015.

- [156] P. Poltronieri, „Protein chips for biological assays and biosensors”, *Biosen Bioelectron*, tom 1, nr 1, pp. 24-26, 2016.

Spis rysunków

Rysunek 1 Schematyczne przedstawienie interfejsu PET-mikrokanal-mikroelektrody [1]	7
Rysunek 2 Izomery L i D aminokwasu. Litera R odnosi się do łańcucha bocznego. Izomery L i D to wzajemne odbicie lustrzane [5]	10
Rysunek 3 Konfiguracja absolutna S aminokwasu L [5]	10
Rysunek 4 Stan jonizacji aminokwasu w funkcji pH [5]	11
Rysunek 5 Struktury wybranych aminokwasów [5]	12
Rysunek 6 Tworzenie wiązania peptydowego z utratą cząsteczki wody [5]	13
Rysunek 7 Przykład powlekania obrotowego małej cząsteczki w roztworze z zastosowaniem dozowania statycznego.	18
Rysunek 8 Orientacje zaadsorbowanego przeciwciała IgG na powierzchni: side on – białko częściowo aktywne, tail on - białko aktywne, head on – białko nieaktywne, flat on – białko nieaktywne [17]	19
Rysunek 9 Mechanizmy immobilizacji białek do podłoża. Opracowanie własne na podstawie [18]	20
Rysunek 10 Schemat reakcji łączenia maleimidu z grupą tiolową (-SH). R- oznacza reagent, P-oznacza białko. Opracowanie własne na podstawie [25]	23
Rysunek 11 Wiązanie wykorzystujące wiązanie specyficzne układu (strept)awidyna-biotyna. Opracowanie własne na podstawie [33]	25
Rysunek 12 Reakcja sprzęgania aminy	26
Rysunek 13 Schematyczny widok oddziaływań białko-podłoże. Zdefiniowano podłoże i domeny na białku (polarność, ładunek, hydrofobowość) [41]	28
Rysunek 14 Wpływ wielkości białka na interakcję z podłożem. (Schemat uproszczony: nie uwzględniono struktury białka). Opracowanie własne na podstawie [51]	30
Rysunek 15 Wpływ rozwijania się białka na adsorpcję. (Schemat uproszczony: nie uwzględniono struktury białka). Opracowanie własne na podstawie [51]	31
Rysunek 16 Proces wymiany białek na powierzchni. (Schemat uproszczony; nie uwzględniono struktur białek). Opracowanie własne na podstawie [41]	33
Rysunek 17 Schematyczny rysunek układu podłoża szklanego z elektrodami ITO, polimerem i białkami podczas przepływu antygenów	34
Rysunek 18 Przykład krzywej prąd/napięcie dla układu pseudoliniowego [66]	37
Rysunek 19 Sinusoidalna odpowiedź prądowa w układzie liniowym z wykreśleniem przesunięcia fazowego [67]	38
Rysunek 20 Krzywa Lissajous [68]	38
Rysunek 21 Wykres Nyquista (a) przedstawiający wektor impedancji $ Z $ dla prostego obwodu o pojedynczej stałej czasowej (b) z 1 rezystorem i 1 kondensatorem o pojedynczej stałej czasowej. Składowa rzeczywista impedancji, ReZ , jest wykreślona na osi x; składowa urojona, $-ImZ$, jest wykreślona na osi y. ϕ to kąt fazowy. Na wykresie nie pokazano częstotliwości kątowej ω . Przy niskiej częstotliwości (np. $\omega = 0$) impedancja jest równa R (rezystancji) [69]	39
Rysunek 22 Schematyczny układ aparatury SIMS z analizatorem ToF [74]	42
Rysunek 23 Diagram Jabłońskiego: S_0 , S_1 , S_2 , stany elektronowe singletowe, T_1 stan wzbudzony trypletowy (liczby 0,1,2,3 oznaczają poziomy oscylacyjne) [76]	43
Rysunek 24 Schemat mikroskopu fluorescencyjnego [78]	44
Rysunek 25 Schemat struktury IgG: część stała (C) i zmienna (V) łańcucha lekkiego (L) i ciężkiego (H). Łańcuch ciężki składa się z trzech domen stałych (C_H) i jednej zmiennej (V_H) a łańcuch lekki zawiera jedną domenę stałą (C_L) i jedną zmienną (V_L) [85]	46
Rysunek 26 Schemat komponentów podstawowego bioczuJNIKA. Opracowanie własne na podstawie [90]	48
Rysunek 27 Porównanie między metodami wykrywania (a) znakowanymi i (b) wolnymi od znakowania. Opracowanie własne na podstawie [93]	50
Rysunek 28 Reakcja FITC z ze związkami aminowymi tworząca wiązanie izotiomocznikowe. Opracowanie własne na podstawie [98]	51
Rysunek 29 Schemat przebiegu testu ELISA	53

Rysunek 30 Schemat różnych wariantów testu ELISA	55
Rysunek 31 Ogólny schemat bioczułnika Bio-FET	56
Rysunek 32 Zasada działania biosensora SPR. Opracowanie własne na podstawie [124]	57
Rysunek 33 Mody pracy bioczułnika beleczkowego: A – tryb dynamiczny, B, C– tryb naprężenia powierzchniowego (statyczny) [125].....	58
Rysunek 34 Charakterystyka bioczułnika [93]	59
Rysunek 35 Krzywa ROC: dla stałego prawdopodobieństwa wykrycia [130]	60
Rysunek 36 Podłoże krzemowe Si/SiO ₂ firmy Ossila (S181) z termicznie naparowanymi elektrodami złotymi	63
Rysunek 37 Układ do pomiarów widm impedancyjnych skonstruowany do użytku własnego. Układ składał się z miejsca na próbkę, pinów łączących elektrody złote z układem, dwóch elektrod łączących układ ze spektrometrem impedancyjnym Agilent 4294A oraz wieczka mocującego.....	64
Rysunek 38 Widma impedancyjne – część rzeczywista Z' i urojona Z'' dla czystego podłoża Si/SiO ₂ /Au oraz pokrytego cienką warstwą polimerów PNIPAm oraz PMMA .	65
Rysunek 39 Podłoże szklane firmy Ossila (S161) z elektrodami ITO	66
Rysunek 40 Widma impedancyjne – część rzeczywista i urojona oraz kąt fazowy komórki szklanej z elektrodami ITO z cienką warstwą polimeru PS oraz PS z białkiem BSA	67
Rysunek 41 Mikrofluidyczny układ do pomiarów impedancyjnych podłoży szklanych z ITO typu I z: miejscem na próbkę wraz z pinami umożliwiającymi kontakt z elektrodami ITO, przełącznikiem doboru pary elektrod ITO, silikonowymi kanalikami doprowadzające i odprowadzające roztwór, wieczkiem mocującym i uszczelką.....	69
Rysunek 42 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\varphi_{max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS po wprowadzeniu na jego powierzchnię buforu PBS oraz białka BSA (pomiaru zarejestrowane w czasach 0 min, 30 min 60 min)	71
Rysunek 43 Zestawienie maksimów tangensa kąta przesunięcia fazowego dla podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS po wprowadzeniu buforu PBS i białka BSA.	72
Rysunek 44 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\varphi_{max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS domieszkowanym bromem po wprowadzeniu na jego powierzchnię oraz białka BSA (pomiaru zarejestrowane w czasach 0 min, 30 min 60 min).....	73
Rysunek 45 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\varphi_{max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PnBMA po wprowadzeniu na jego powierzchnię oraz białka BSA (pomiaru zarejestrowane w czasach 0 min, 15 min 30 min)	75
Rysunek 46 Widma impedancyjne wraz z maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\varphi_{max}$ podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS po wprowadzeniu na jego powierzchnię oraz białka IgG oraz aIgG (pomiaru zarejestrowane w czasach 0 min, 30 min 60 min) ..	78
Rysunek 47 Zestawienie maksimów tangensa kąta przesunięcia fazowego dla podłoża szklanego z ITO pokrytego polimerem PS przed i po immunoreakcji	79
Rysunek 48 Obrazy z mikroskopii fluorescencyjnej podłoży szklanych z ITO pokryte cienką warstwą polimeru oraz białkami: BSA z aIgG + TRICT oraz IgG z aIgG + TRICT	80
Rysunek 49 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji biotyna – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV	81
Rysunek 50 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania biotyna- streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV	82
Rysunek 51 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji biotyna – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV	82

Rysunek 52 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania biotyna- streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV.....	83
Rysunek 53 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji bBSA – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV.....	84
Rysunek 54 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania bBSA - streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV.....	84
Rysunek 55 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla reakcji bBSA – streptawidyna na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV.....	85
Rysunek 56 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla wiązania bBSA - streptawidyna wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV.....	85
Rysunek 57 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla IgG, BSA oraz aIgG na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 10 mV.....	86
Rysunek 58 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla immunoreakcji wraz z blokowaniem wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS białkiem BSA amplitudzie pola mierzącego 10 mV	87
Rysunek 59 Widma impedancyjne wraz z maksimum przesunięcia tangensa kąta fazowego dla IgG, BSA oraz aIgG na podłożach szklanych z ITO na cienkiej warstwie polimeru PS przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV.....	88
Rysunek 60 Zestawienie maksimów wartości tangensa kąta przesunięcia fazowego dla immunoreakcji wraz z blokowaniem wolnej powierzchni szklanej z ITO i cienką warstwą polimeru PS białkiem BSA przy amplitudzie pola mierzącego 100 mV	89
Rysunek 61 Układ mikrofluidycznym typu II z widocznym miejscem na próbkę wraz z wieczkiem, silikonowymi kanalikami do-/odprowadzającymi roztwór oraz elektrodami umożliwiającymi podłączenie do spektrometrów Agilent 4294A	90
Rysunek 62 Przykładowe widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\phi_{max}$ dla pary białek IgG-aIgG (amplituda pola mierzącego 10 mV)	91
Rysunek 63 Widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\phi_{max}$ dla pary białek IgG-aIgG z aIgG znakowanym fluorescencyjnie TRICT (amplituda pola mierzącego 10 mV).....	92
Rysunek 64 Widma fluorescencyjne dwóch próbek z elektrodami I (pokrytymi IgG) oraz elektrodami II (pokrytymi BSA) po wprowadzeniu na ich powierzchnię znakowanego fluorescencyjnie TRICT aIgG bez pomiarów i po przeprowadzonych pomiarach impedancyjnych	93
Rysunek 65 Widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $tg\phi_{max}$ dla pary białek CRP-aCRP (amplituda pola mierzącego 10 mV).....	94
Rysunek 66 Schemat tworzenia próbki do pomiarów ToF-SIMS wraz z kolejnością nakładanych warstw (1-5).....	95
Rysunek 67 Porównanie jonów charakterystycznych aminokwasów budujących streptawidynę osadzoną na podłożu polimerowym	96
Rysunek 68 Porównanie intensywności pików jonu charakterystycznego dla streptawidyny po reakcji białko-białko w czasie z pikami referencyjnymi podłoża Si pokrytego polimerem (PS) oraz białkami bBSA i BSA	97
Rysunek 69 Zdjęcie i schemat układu elektronicznego bazującego na układzie scalonym AD8302 oraz układzie mikroprocesorowym STM32F2 użytego do pomiarów	98
Rysunek 70 Różnica przesunięcia fazowego między dwiema elektrodami: mierzonej (pokrytej białkiem IgG) oraz referencyjnej (pokrytej BSA) po wprowadzeniu roztworów PBS, BSA oraz aIgG w różnych częstotliwościach.	100
Rysunek 71 Różnica przesunięcia fazowego układu IgG-aIgG w częstotliwości 1kHz.	101

Rysunek 72 Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego dla elektrod referencyjnej (zablokowanej BSA) oraz po immunoreakcji ze znakowanym fluorescencyjnie aIgG TRICT I ALEXA FLUOR 488 po przeprowadzonych pomiarach.	102
Rysunek 73 Różnica przesunięcia fazowego między dwiema elektrodami: mierzonej (pokrytej białkiem CRP) oraz referencyjnej (pokrytej BSA) po wprowadzeniu roztworów PBS, BSA oraz aCRP w różnych częstotliwościach.	103
Rysunek 74 Różnica przesunięcia fazowego układu CRP-aCRP oraz aCRP-CRP przy częstotliwości 1kHz	104
Rysunek 75 Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego dla elektrod referencyjnej (zablokowanej BSA) oraz po wiązaniu CRP-aCRP	105
Rysunek 76 Różnica przesunięcia fazowego między dwiema elektrodami: mierzonej (pokrytej białkiem bBSA) oraz referencyjnej (pokrytej BSA) po wprowadzeniu roztworów PBS, BSA oraz streptawidyny w różnych częstotliwościach.	106
Rysunek 77 Różnica przesunięcia fazowego układu bBSA-streptawidyna przy częstotliwości 50kHz	106
Rysunek 78 Widma impedancyjne z zestawieniem wartości maksimum kąta przesunięcia fazowego $\text{tg}\varphi_{\text{max}}$ dla pary białek bBSA-streptawidyna	107