

## **Streszczenie**

Celem niniejszej pracy jest rozwój metod charakteryzacji struktury i właściwości powierzchni i wzorów makromolekularnych w celu optymalizacji działania ich zastosowań biotechnologicznych. Rozważane są dwie klasy wzorów i powierzchni: sfunkcjonalizowanych za pomocą szczepionych łańcuchów polimerowych oraz pokrytych nanowarstwami biologicznego rozpoznawania międzymolekularnego. Pierwszy rodzaj powierzchni znajduje zastosowanie w rozwoju podłoży biofunkcjonalnych, natomiast drugi jest stosowany w biosensorach oraz urządzeniach analitycznych typu „lab-on-a-chip”. Do charakteryzacji powierzchni zastosowano spektrometrię masową jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (ang. TOF-SIMS), obejmującą mody spektroskopowy i obrazowania oraz wielowymiarową analizę danych (w szczególności analizę głównych składników ang. PCA), a także inne techniki analizy powierzchni takie jak pomiar kąta zwilżania wodą, mikroskopię sił atomowych (ang. AFM), mikroskopię fluorescencyjną, spektroskopię fotoelektronów (ang. XPS) oraz elipsometrię.

Kontekst naukowy pracy oraz przegląd literatury został przedstawiony w rozdziale 1, natomiast zastosowane techniki eksperymentalne zostały opisane w rozdziale 2. Rozdział 3 stanowi omówienie zbioru 5 artykułów naukowych (Artykuły I do V).

**Artykuł I** oraz **Artykuł II** opisują proces wytworzenia i charakteryzację podłoży sfunkcjonalizowanych za pomocą wrażliwych na bodźce polimerów szczepionych jednorodnie do powierzchni oraz wzorów polimerów szczepionych (obdarzonych ładunkiem elektrycznym) wytworzonych z wykorzystaniem techniki litografii elektronowej. Podłoża takie mogą znaleźć zastosowanie w tworzeniu innowacyjnych powierzchni o kontrolowanym przez człowieka oddziaływaniu z białkami.

W **Artykule I** prezentowane jest nowe podejście do tworzenia pokryw polimeru POEGMA246 (poli(metakrylanu eteru etylenowego glikolu oligoetylenowego)) poprzez polimeryzację z powierzchni oligomerów nadtlenkowych szczepionych do zmodyfikowanej uprzednio powierzchni szkła. Kompleksowa charakteryzacja uzyskanych pokryw za pomocą różnych technik powierzchniowych (w tym analiza temperaturowej zależności zwilżalności i topografii rozszerzona o pomiary w warunkach różnego pH) ujawniła ich niespodziewane właściwości, takie jak wrażliwość na dwa różne bodźce (temperaturę i pH) oraz silną zależność adsorpcji białek od pH. W celu optymalizacji warunków wytwarzania pokryw, temperaturowa zależność ich zwilżalności została zbadana dla różnych czasów polimeryzacji.

**Artykuł II** opisuje udane wysokorozdzielcze wytwarzanie, z wykorzystaniem litografii elektronowej, wzorów szczepionych polimerów, które nie było dotychczas szczegółowo badane. Submikrometryczne struktury biokompatybilnego polimeru PDMAEMA (poli(metakrylanu dimetyloaminoetylu)) zostały szczepione z filmów polimeru fluorowego a następnie zmodyfikowane do formy polikationu i wykorzystane do elektrostatycznego wiązania barwników organicznych oraz

białek. Połączenie technik mikroskopowych i spektroskopowych, w tym analizy TOF-SIMS rozszerzonej do wysokorozdzielczego chemicznego obrazowania wzorów polimerowych na podłożu polimerowym oraz molekularnej charakteryzacji ich późniejszej modyfikacji, potwierdziło efektywną funkcjonalizację powierzchni. Dodatkowo, wyniki procesu litograficznego szczepienia polimerów zostały porównane dla różnych warunków naświetlania wiązką elektronów w celu wyboru tych dających najlepsze rezultaty pod kątem zastosowań biotechnologicznych.

Wyniki charakteryzacji wielokrokowych protokołów biofunkcjonalizacji i testu immunologicznego, które wprowadzają kolejno różne molekuly do nanowarstw rozpoznawania międzymolekularnego osadzanych na powierzchni przetwornika krzemowego, przedstawione są w **Artykułach III, IV i V**. Charakteryzacja powierzchni biosensora, rozbudowana do wielokrokowej analizy używającej wielu technik, została zademonstrowana dla urządzenia typu „lab-on-a-chip” wykrywającego szkodliwe substancje w żywności, które zostało wyprodukowane w ramach projektu 7FP Wspólnoty Europejskiej o nazwie FOODSNIFFER. W szczególności, zmiany chemii powierzchni wyznaczone zostały za pomocą metody TOF-SIMS rozróżniającej poszczególne molekuly organiczne stosowane w protokołach biofunkcjonalizacji i testu immunologicznego. Subtelne zmiany w biomolekularnym składzie nanowarstw, zachodzące dla poszczególnych kroków protokołu, zostały wykryte i sklasyfikowane za pomocą wielowymiarowej analizy danych TOF-SIMS. Dodatkowo, dane na temat nanostruktury powierzchni i jej pokrycia molekulami - dostarczone dzięki zastosowaniu różnych technik badawczych - ujawniły złożone zjawiska powierzchniowe, które mogą wpływać na aktywność biomolekularną a nawet utrudniać wykrycie analitu (np. desorpcja białka detekcyjnego). Jest to szczególnie cenne w odniesieniu do optymalizacji działania biosensorów.

Przedmiotem badań **Artykułu III** jest protokół biofunkcjonalizacji stosowany w celu detekcji (alergenu) białka krowiej  $\kappa$ -kazeiny w mleku kozim. W artykule tym narzędzia analizy powierzchniowej spektrometrii TOF-SIMS (tj. obrazowanie i analiza molekularna) zostały rozwinięte do kontroli „in-situ” mikro-strukturyzowanych obszarów biosensorycznych na scalonym układzie „lab-on-a-chip”. Dodatkowo, zbadana została jednorodność wzorów białka detekcyjnego otrzymanych za pomocą automatycznego robota nakrapiającego i dopasowanych do obszarów biosensorycznych układu „lab-on-a-chip”. Analiza ta pozwoliła na wybór optymalnych warunków immobilizacji białka detekcyjnego prowadząc do znacznej poprawy powtarzalności odpowiedzi biosensora i czułości detekcji.

W **Artykule IV** wyznaczony został, na powierzchni krzemu imitującej przetwornik biosensoryczny, skład molekularny oraz ułożenie i orientacja białek użytych w kolejnych krokach protokołu do wykrywania (mykotoksyny) ochratoksyny A. W tym przypadku zastosowany został test immunologiczny typu pośredniego, w którym sygnał wykrycia analitu zostaje wzmocniony przez powierzchniową reakcję pomiędzy przeciwciałem pierwszo- i drugorzędowym. W pracy wprowadzona została nowa metoda oszacowania masy powierzchniowej poszczególnych białek, która łączy informację o całkowitej powierzchniowej gęstości białek, dostarczaną przez elipsometrię,

składzie molekularnym, uzyskiwaną z analizy TOF-SIMS. Pozwala to na określenie stosunku molowego specyficznie wiążących się biomolekuł. Ponadto, badania nad orientacją przeciwciał immobilizowanych na powierzchni zostały po raz pierwszy rozszerzone do analizy orientacji zarówno przeciwciała pierwszo- jak i drugorzędowego. Wielowymiarowa analiza danych TOF-SIMS pozwoliła określić i porównać orientację przeciwciał zaadsorbowanych za pomocą powierzchniowych wiązań specyficznych i unieruchomionych bezpośrednio na podłożu.

Zaprezentowana analiza protokołów biofunkcjonalizacji powierzchni biosensorów została rozszerzona w **Artykule V** o porównanie dwóch sposobów nanoszenia roztworu białka detekcyjnego: za pomocą automatycznego robota nakrapiającego (przez nakładające się krople nanolitrowe) i ręcznie za pomocą pipety (jednej mikrolitrowej kropli). Zbadano również wpływ początkowej gęstości powierzchniowej białka detekcyjnego na przebieg następnych kroków protokołu funkcjonalizacji i detekcji analitu. Badany protokół mający służyć do detekcji (pestycydu) tiabendazolu był analizowany zarówno na płaskich powierzchniach krzemowych jak i na mikro-strukturyzowanych powierzchniach biosensorów na układzie scalonym. Analiza nanostruktury utworzonych warstw białek, ich gęstości powierzchniowej oraz zawartości białka detekcyjnego ujawniła zaskakującą desorpcję białka detekcyjnego, zależną od jego początkowej gęstości powierzchniowej, zachodzącą podczas procedury blokowania i wpływającą na efektywność wiązania analitu przez uzyskane nanowarstwy rozpoznawania międzymolekularnego.

Podsumowanie i końcowe wnioski rozprawy doktorskiej zaprezentowane zostały w rozdziale 4.