

**Bc. Lucie Zárybnická**

### **Elektrochemická detekce proteinů pomocí tištěných tříelektrodoých senzorů**

Předložená diplomová práce se věnuje testování vybraných elektrochemických senzorů, připravených technikou tlusté vrstvy, pro detekci proteinu ovalbuminu. Jako modelový systém enzym – substrát pro testování senzorů byla využita křenová peroxidáza, imobilizovaná na magnetických kuličkách, jejímž substrátem je peroxid vodíku. V teoretické části práce autorka uvádí čtenáře do problematiky biosenzorů a různých fyzikálně-chemických převodníků, které se v nich využívají. Následuje popis několika technik přípravy tzv. tlustých vrstev, které se používají pro přípravu elektrochemických senzorů a výčet aplikací těchto čidel. Úvodní část uzavírá přehled komerčně vyráběných tištěných senzorů a pojednání o možnostech jejich modifikace pro zlepšení analytických parametrů.

V experimentální části diplomantka navazovala na téma loňské diplomové práce a pokračovala v optimalizaci průkazu proteinu ovalbuminu v sendvičovém uspořádání s využitím specifické protilátky, imobilizované na magnetických částicích, a sekundární protilátky, značené enzymem. Pokles množství substrátu peroxidu vodíku, úměrný množství přítomného imunokomplexu, byl zjišťován po jeho oxidaci na různých tištěných senzorech. Byla testována možnost snížení objemu roztoku k měření, modifikace elektrod oxidem rutheničitým a použití thioninu jako mediátoru přenosu elektronů.

Diplomová práce je sepsána srozumitelně, s menším množstvím překlepů a nepřesností. K vlastnímu obsahu předložené diplomové práce bych měl tyto připomínky a dotazy:

Seznam zkratk – nadbytečné mezery v názvech organických sloučenin, SAM – samsopřádané (ne *samoskladné*) monovrstvy, SPR místo SRP (Surface Plasmon Resonance).

str. 18, 1. odst. – „vyžívá“ místo „využívá“, nepřesné „referentní elektrody mají svůj potenciál předem stanovený“.

str. 19, 1. odst. – v přehledu převodníků biosenzorů chybí zmínka o voltametrických metodách (změna potenciálu v čase a proudová odezva v podobě píku).

str. 19, posl. odst. – kalorimetrické převodníky se používají i pro enzymové reakce. Krkolonná definice piezoelektrického převodníku.

str. 20, 1. odst. – nepřesnost ve funkci poteciostatu – nastavuje potenciál pracovní elektrody vůči referentní, který může být konstantní (amperometrie) nebo se mění v čase (voltametrické metody). Rovněž jeho schéma na Obr. 4 a popisky tamtéž jsou zavádějící (zřejmě nevhodný překlad z angličtiny), referentní elektroda není připojená do obvodu.

**str. 23 – 24 – co znamená „cermet“? Termín není v textu vysvětlen.**

**str. 29, kap. 2.6 a kap. 2.7 – uvedené aplikace nemají vztah k tématu diplomové práce, společné mají pouze to, že se v nich využívá tištěných senzorů. V kap. 2.7 se navíc objevují elektrody ze skelného uhlíku (ne ze „skleněného uhlíku“) a dokonce piezoelektrické a FET senzory. Mohl být také prezentován krátký přehled použití magnetických částic ve spojení s tištěnými senzory, což je náplň experimentální části diplomové práce.**

str. 45, 1. odst. – spojení „Přebytečný roztok se „vytočí“ z povrchu pryč...“ lze nahradit srozumitelnějším „odstředí“.

**str. 64, 2. odst. – co se myslí slovy, že přítomnost 10 mg l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> „...nadměrně zatěžuje elektrody“?**

str. 74 – ftalocyanin Co, ne *Co-ftalokyanin*.

str. 75 – nevhodné termíny „Měření bylo provedeno v duplikátu.“ a „Blankem byl vzorek...“.

**str. 76, Obr. 43 – k poklesu signálu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dochází i bez přítomnosti enzymu (Blank v legendě), je pro to nějaké vysvětlení?**

**str. 81, Obr. 48 a str. 82, Obr. 49 a 50 – je vysvětlení pro pokles signálu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po delších časových intervalech měření po kápnutí na senzor na nemodifikované uhlíkové elektrodě a elektrodě s RuO<sub>2</sub>?**

str. 84, kap. 4.6 – pro názornost mohl být uveden voltamogram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bez a s přidavkem thioninu jako mediátoru.

**str. 92 a 93 – kalibrace ovalbuminu jsou zmatečné. Pokud je větší koncentrace ovalbuminu, je i více imunokomplexu s navázaným enzymem a tím více se spotřebovává substrát (klesá proudový signál). Kalibrace by tedy měly mít zápornou směrnici, jako v rozmezí 0,5 – 2 µg/ml proteinu, a ne kladnou, jak je uváděna na Obr. 64. Můžete to blíže komentovat?**

V rámci diplomové práce bylo provedeno velké množství experimentů k optimalizaci elektrochemické detekce ovalbuminu, získané výsledky byly však zhodnoceny pouze stručně. V práci chybí bližší popis, jakým způsobem mají použité mediátory zvyšovat proudový signál H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Je zarážející, že použití modifikovaných uhlíkových elektrod nevedlo ke zlepšení elektrochemické detekce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, když se ke stejnému účelu v enzymatických biosenzorech úspěšně využívají např. elektrody s RuO<sub>2</sub>. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a vzhledem k výše uvedeným nedostatům ji hodnotím známkou

**v e l m i d o b ř e**



V Pardubicích 30. 5. 2012

Ing. Radovan Metelka, Ph.D.