

Michaela Dyntarová

Využití elektrochemického imunosenzoru pro průkaz proteinů

V teoretické části autorka práce shrnuje základní typy biosenzorů klasifikovaných podle jejich fyzikálně-chemického převodníku a podrobněji popisuje elektrochemické biosenzory. Druhá polovina teoretické části je pak věnována bioafinitním sensorům, několika technikám imunologických stanovení s využitím různých metod imobilizace protilátek a elektrochemickým imunosenzorům. Závěrem je uveden přehled různých typů imunosenzorů rozdělených opět podle jejich převodníku, kde se využívá imobilizace protilátek na magnetické částice jako relativně nová technika umožňující zvýšení citlivosti a selektivity stanovení.

Experimentální část je věnována konstrukci elektrochemického imunosenzoru na bázi tištěného tříelektrodového senzoru a možností průkazu vybraného modelového proteinu ovalbuminu s využitím specifické protilátky pomocí sendvičové ELISA techniky. Pro zlepšení parametrů stanovení byla nově použita imobilizace vhodné protilátky na magnetické částice a k detekci využita sekundární protilátka, značená enzymem křenovou peroxidasou. Pokles množství substrátu peroxidu vodíku, úměrný množství přítomného sendvičového imunokomplexu, byl zjišťován po jeho oxidaci na platinové pracovní elektrodě. Elektrochemická technika detekce byla také porovnána s dosud užívanou spektrofotometrickou koncovkou.

Diplomová práce je sepsána srozumitelně, jednotlivé části na sebe logicky navazují. Jsou dobře popsány provedené experimenty a vyvozeny odpovídající závěry na základě obdržených výsledků. Téma práce je v elektrochemii nové a otevírá další možnosti aplikace jednoduchých technik a levných senzorů pro detekci proteinů významných v klinické analýze. S tím jsou ovšem spojeny experimentální obtíže, kterým se na začátku nelze nevyhnout a na které autorka práce vhodně poukazuje. K vlastnímu obsahu předložené diplomové práce bych měl tyto připomínky a dotazy:

- seznam zkratk:

LED má být *light-emitting diode*,

MES – mix českého a anglického názvu, správně 2-[*N*-morfolino]ethansulfonová kyselina,

špatné psaní předpon vyjadřující substituci na aromatickém jádře – má být *o*-aminofenol, ne *o* – aminofenol.

- str. 16, 2. odst. – při dvouelektrodovém uspořádání se měření provádí s pracovní a **referentní elektrodou**, ne pomocnou, ta je využívána až v tříelektrodovém uspořádání (přitom je to správně napsáno na str. 15, odst. 2). Potenciál na pracovní elektrodě se nastavuje vždy oproti referentní elektrodě.

- **str. 17, tamtéž – tvrzení v poslední větě je mylné, uvedené techniky (LSV a CV) jsou pouze dvě z většího počtu voltametrických technik. Které další to mohou být?**

- str. 17, 2. odst. – výchozí potenciál E_0 u LSV techniky neznamená stav, kdy neprobíhá žádná elektrodová reakce, je to jen zvolená hodnota potenciálu pro daný elektrochemický experiment – i při aplikaci E_0 může na elektrodě podle jeho hodnoty probíhat oxidace nebo redukce.

- str. 18, 1. odst. – slovo „vratnost“ je krásný český ekvivalent pro „reverzibilitu“, působí však archaicky, častěji se používá druhý výraz.

- str. 18, 3. odst. – veličina vyjádřená v jednotkách mV/s je rychlost změny potenciálu, ne velikost napěťové změny. Prakticky se nižší rychlosti než jednotky mV/s nepoužívají, naopak nejsou výjimkou měření při rychlostech jednotek kV/s, tj. 1000x víc než hodnota uvedená v diplomové práci.

- str. 19, 1. odst. – správnější jsou termíny „anodický“ a „katodický“ místo „anodový“ a „katodový“.

- str. 19, kap. 2.2.4 – text kapitoly o konduktometrických převodnicích obsahuje několik nepřesností, zaviněné zřejmě špatným překladem literatury – na elektrody se přivádí střídavé napětí (proud) s frekvencí stovek Hz, ne konstantní napětí, srovnávací (pokud je míněno ve smyslu referentní) elektroda se v konduktometrii nepoužívá.

- **na str. 25 – 27 jsou uvedeny pouze dva typy ELISA techniky, můžete uvést některé další?**

- **str. 29, 1. odst. – chybné psaní mezer v názvech organických látek. Co je správně, *o*-tilidin nebo *o*-toluidin?**

- str. 30, 2. odst. – jelikož se tištěné senzory připravují levně ve velkých sériích, lze je používat jednorázově a po použití pak zlikvidovat, což je nezbytné např. v klinické analýze.

- str. 33, titulek Obr. 9 – esej je literární útvar, správně by měla být „analýza“ (z angl. „assay“).

- str. 53, Tab. 5 – je zbytečné uvádět všechny varianty použitého typu senzoru, které uvedená firma vyrábí.

- str. 54, 1. odst. – kontakty nejsou pokryty izolační vrstvou, jen tělo senzoru.

- str. 55, 3. odst. – přídavek NaCl spíše stabilizuje potenciál tištěné pseudoreferentní elektrody.

- **v kap. 4.1.1 při výběru pracovní elektrody není uvedeno, jaký roztok byl měřen, jestli pouze pufr nebo přídavek H₂O₂. Pokud jen pufr, tak bylo velmi předčasné usoudit na nevhodnost uhlíkové pracovní elektrody pouze na základě průběhu základní linie – přitom hodnoty proudu jsou velmi nízké, v jednotkách nA, což je spíše výhoda. (Na kompozitní uhlíkové materiály jsou to ale podezřele nízké hodnoty, opravdu platí?)**

- **str. 57, 1. odst. – jak si představit zapojení referentní části tištěného senzoru do článku s klasickou referentní elektrodou pomocí můstku? Není to spíš jen spojení s klasickou referentní elektrodou se solným můstkem?**

str. 58, 2. odst. – zaznamenaný pík v amperometrické technice souvisí s nadávkováním H₂O₂, měla by se odečíst hodnota proudu v určitém časovém okamžiku po nadávkování a relativním ustálení signálu. Podobně jako u technik uvedených dále lze měřit hodnotu proudu až po přidání H₂O₂, není nutné provádět dávkování během měření a vyhodnocovat proudový skok.

Obr. 14, 15 a 20 – na ose x by nemusely být uvedeny hodnoty jako např. 0,499 V, ale 0,5 V, atd.

Výše uvedené nedostatky nesnižují celkově výbornou úroveň diplomové práce, která se věnuje současné tematice a která bude určitě inspirací pro další výzkum v této oblasti, práci **doporučuji** k obhajobě a hodnotím ji známkou

v ý b o r n ě