

Warstwa rozpoznająca epitop glutenu i jej otrzymywanie metodą wdrukowywania molekularnego z zastosowaniem pochodnych tiofenu, oraz zastosowanie tej warstwy do selektywnego wykrywania i/lub oznaczania glutenu występującego w zbożowych produktach spożywczych

Przedmiotem wynalazku jest warstwa rozpoznająca epitop glutenu i jej otrzymywanie metodą wdrukowywania molekularnego z zastosowaniem pochodnych tiofenu, oraz zastosowanie tej warstwy do selektywnego wykrywania i/lub oznaczania glutenu występującego w zbożowych produktach spożywczych. W szczególności, wynalazek obejmuje molekularnie wydrukowany polimer wytworzony za pomocą polimeryzacji pochodnych tiofenu, sposób przygotowania tego polimeru i jego zastosowanie jako elementu rozpoznającego chemicznego czujnika elektronicznego, w którym jako przetwornik zastosowano tranzystor polowy z zewnętrzną bramką (ang. extended-gate field-effect transistor, EG-FET), do wykrywania i selektywnego oznaczania glutenu występującego w zbożowych produktach spożywczych.

Stan techniki

Celiakia, potocznie zwana chorobą trzewną, jest jedną z najczęstszych ludzkich nietolerancji pokarmowych. Może ujawnić się w każdym wieku pacjenta a jej obraz kliniczny nie ogranicza się do przewlekłej biegunki i upośledzenia stanu odżywienia. Szacuje się, że na chorobę trzewną zapada do 3% populacji, z czego 10-15% chorych nie jest poprawnie zdiagnozowanych. Choroba ta to enteropatia jelita cienkiego charakteryzująca się zanikiem struktury kosmków z kompensacyjnym przerostem krypt oraz masywnym naciekiem limfocytarnym w obrębie blaszki właściwej błony śluzowej po wprowadzeniu glutenu do diety. Wycofanie glutenu z diety prowadzi do odnowy prawidłowego obrazu morfologicznego tej błony. Natomiast ponowne wprowadzenie glutenu do diety przyczynia się do nawrotu zmian histopatologicznych [J. Kruszewski, *Alergia*, 1 (2001) 8].

Gluten to ogólna nazwa białek wchodzących w skład zbóż, takich jak pszenica,

jęczmień, czy żyto. Białka pszenicy, zgodnie z klasyfikacją Osborne'a [T. B. Osborne, *The protein of the wheat kernel*, Carnegie Institute, Washington DC (1907) 84] dzieli się na cztery rodzaje, tj. albuminy, globuliny, prolaminy i gluteliny. Albuminy i globuliny spełniają funkcje strukturalne i katalityczne. Jako białka łatwo rozpuszczalne w roztworach wodnych są usuwane podczas wmywania glutenu. Wmywanie glutenu to proces, podczas którego otrzymuje się czysty gluten poprzez usunięcie skrobi. Wmyty gluten to ciągnąca się, lepka masa, która w zależności od rodzaju zboża może przybierać barwę od jasnożółtej do szarobrunatnej. W skład glutenu wchodzi gliadyny i gluteniny, stąd nazywane są również białkami glutenowymi [A. Miś, *Acta Agrophys.*, 128 (2005) 1]. Są to typowe białka zapasowe zmagazynowane wyłącznie w bielmie skrobiowym ziarniaka [S. Grzesiuk, et al., *Biologia ziarniaków zbóż*, PWN, Warszawa, 1998].

Gliadyny to białka alergenne. Zbudowane są z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych, które zgodnie z ich ruchliwością elektroforetyczną dzielimy na cztery grupy, tj. alfa- (najszybsze), beta-, gamma- i omega-gliadyny (najwolniejsze). Masa cząsteczkowa gliadyn zawiera się pomiędzy 30 i 75 kDa [S. Muller et al., *J. Cereal Sci.*, 26 (1997) 169]. U osób chorych na celiakię obecność frakcji gliadynowych w organizmie wywołuje reakcje immunologiczne objawiające się m.in. wysokim poziomem przeciwciał IgA i IgG w surowicy krwi [A. Rocher et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1247 (1995) 143]. Alergenność prolaminy zbóż zależy od liczby i sekwencji aminokwasów w nich zawartych. Badania pierwszorzędowej struktury glutenu wykazały, że najkrótszym peptydem zdolnym do reakcji z przeciwciałami IgE jest pentapeptyd o sekwencji aminokwasów QQQP [S. Tanabe et al., *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 219 (1996) 290] (P – prolina, Q – glutamina). Inne wyniki badań wskazują, że tetrapeptydy o sekwencjach PSQQ (S – seryna), PQQP i QQQP są charakterystyczne dla peptydów alergicznych w celiakii [A. Ensari et al., *Clin. Sci.*, 95, (1998), 419]. Co więcej, w omega-gliadynie pszenicy, omega-sekalinie żyta i C hordeinie jęczmienia wykazano obecność tego samego oktapeptydu, PQQFPQQ (F – fenyloalanina), odpowiedzialnego za reakcje alergiczne [A. Ensari et al., *Clin. Sci.*, 95 (1998) 419]. Oktapeptyd ten zawiera motyw PQQP charakterystyczny dla alfa-gliadyny [B. Brzozowski et al., *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 4 (2015) 17].

Do wykonania warstwy rozpoznającej epitopy glutenu występującego w zbożowych produktach spożywczych w niniejszym wynalazku zastosowaliśmy wdrukowywanie molekularne [K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.*, 100 (2000) 2495]. Wdrukowywanie to

(Fig. 1) [Z. Iskierko, P. S. Sharma, K. Bartold, A. Pietrzyk-Le, K. Noworyta, W. Kutner, *Biotechnol. Adv.*, 34 (2016) 30] prowadzi do wytworzenia polimerów wdrukowanych molekularnie (ang. molecularly imprinted polymers, MIPs) zdolnych do odwracalnego i selektywnego wiązania wybranych substancji. Miarą selektywności MIPów jest ich zdolność do preferencyjnego wiązania analitu w obecności substancji przeszkadzających o podobnej budowie [P. S. Sharma et al., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 34 (2012) 60]. Do głównych zalet MIPów należy ich wysoka wytrzymałość mechaniczna i odporność chemiczna, tj. odporność na rozpuszczalniki organiczne oraz zmiany, w szerokim zakresie, pH, mocy jonowej i temperatury. Cechuje je wysoka selektywność, powtarzalność pomiaru oraz prostota ich syntezy i niski koszt wytwarzania.

Molekularne wdrukowanie małych cząsteczek jest stosunkowo proste. Jednakże wdrukowanie większych cząsteczek, np. białek, jest znacznie trudniejsze. Białko, ze względu na swoją skomplikowaną strukturę i znaczną wielkość cząsteczki, niezwykle trudno wdrukować w polimer. Powstałe po usunięciu szablonu – cząsteczki białka – luki molekularne pod względem wielkości i kształtu odpowiadają tej cząsteczce. Są więc stosunkowo duże. Dlatego mogą oddziaływać z mniejszymi cząsteczkami o podobnej budowie, przez co MIP traci na selektywności. Inny problem to rozpuszczalność białka. W zależności od stosowanego rozpuszczalnika, białko może przybierać różny kształt. Zwykle do wdrukowania białka stosowany jest inny rozpuszczalnik niż do jego oznaczania. Dlatego mogą wystąpić trudności z jego oznaczaniem. Co więcej, w trakcie wdrukowania białko może zdenaturować lub rozłożyć się na mniejsze fragmenty.

Jedno z rozwiązań powyższych trudności polega na wdrukowaniu tzw. „epitopów” [S. Li et al., *Prog. Polym. Sci.*, 39 (2014) 145], tj. swoistego peptydowego fragmentu białka, zwykle umiejscowionego na jego powierzchni, odpowiedzialnego za specyficzne jego rozpoznawanie. Dzięki temu wdrukowana w MIP luka molekularna jest mniejsza, a przez to bardziej selektywna. Jednocześnie białko, które w swojej budowie zawiera ten epitop, może być rozpoznawane przez czujnik, którego warstwę rozpoznającą stanowi MIP wdrukowany jego epitopem.

Gluten to mieszanina białek, a nie jeden jego rodzaj. Dlatego cząsteczkę glutenu trudno zidentyfikować. Stąd podejście „epitopowe” do wdrukowania jest korzystne. Co więcej, charakterystyczne toksyczne fragmenty glutenu są rozpoznane i opisane [S. Tanabe et al., *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 219 (1996) 290; A. Ensari et al., *Clin. Sci.*, 95 (1998) 419 i

B. Brzozowski et al., *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 4 (2015) 17].

Do niniejszych badań wybrano toksyczną sekwencję aminokwasów epitopu glutenu, PQQPFPQQ [A. Ensari et al., *Clin. Sci.*, 95 (1998) 419]. Za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych wyznaczono i zoptymalizowano strukturę przestrzenną tego epitopu (Fig. 2). W tym celu zastosowano modelowanie za pomocą teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT) z korelacyjno-wymiennym funkcjonałem B3LYP oraz bazami danych 3-21G* i 6-31G*. Obliczenia wykonano zarówno dla cząsteczek w próżni jak i w toluenie, tj. w rozpuszczalniku hydrofobowym, w którym białko nie zmienia swojej struktury trzeciorzędowej.

Zgodnie z wynalazkiem, warstwa rozpoznająca epitop glutenu występującego w zbożowych produktach spożywczych, charakteryzuje się tym, że zawiera polimer tiofenowy wdrukowany molekularnie (MIP) epitopem glutenu.

Korzystnym epitopem glutenu jest epitop glutenu o sekwencji PQQPFPQQ **1**.

Wynalazek ponadto obejmuje sposób otrzymywania warstwy rozpoznającej gluten, według wynalazku, metodą wdrukowywania molekularnego z zastosowaniem pochodnych tiofenu, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

(a) wytworzenie w roztworze zmieszanych rozpuszczalników organicznych, toluenu i acetonitrylu, o stosunku objętościowym jak 9 : 1 pre-polimeryzacyjnego kompleksu epitopu glutenu **1** z monomerem funkcyjnym zawierającym grupę karboksylową **2** jako miejsce rozpoznające epitop glutenu **1** i monomerem funkcyjnym zawierającym podstawnik cytozynowy **3** jako miejsce rozpoznające epitop glutenu **1**, oraz 2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-yl)-3,3'-bitiofenem **4** w stosunku molowym jak 1 : 2 : 1 : 2 w 0,1 M (TBA)ClO₄, po czym

(b) osadzenie drogą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej powyższego kompleksu na elektrodzie otrzymując przewodzącą warstwę polimeru wdrukowanego epitopem glutenu **1** (MIP-1); a następnie

(c) usunięcie szablonu epitopu glutenu **1**, z warstwy MIP-1, aby opróżnić luki molekularne wdrukowane w polimerze z uzyskaniem warstwy rozpoznającej epitop glutenu.

Korzystnie, w etapie (a) tego sposobu stosuje się epitop glutenu, PQQPFPQQ **1**, o stężeniu w zakresie od 0,1 mM do 1 mM, korzystnie 0,1 mM.

Korzystnie, w etapie (a) tego sposobu stosuje się roztwór zmieszanych

rozpuszczalników organicznych, toluenu i acetonitrylu, korzystnie o stosunku objętościowym jak 9 : 1.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, monomerem funkcyjnym zawierającym grupę karboksylową **2** jako miejsce rozpoznające epitop glutenu **1** jest kwas *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowy.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, monomerem funkcyjnym zawierającym podstawnik cytozynowy **3** jako miejsce rozpoznające epitop glutenu **1** jest *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoan 2-(cytozyn-1-ylo)etylowy.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, jako elektrodę w etapie (b) stosuje się platynową elektrodę dyskową, płytkę szklaną z naporowaną warstwą złota na podłożu tytanowym lub elektrodę złotą rezonatora kwarcowego (ang. quartz crystal resonator, QCR).

Korzystnie, w etapie (b) tego sposobu, kontroluje się grubość osadzanych warstw polimeru za pomocą liczby cykli zmian potencjału, korzystnie 3 cykli.

Korzystnie, etap (b) tego sposobu prowadzi się w warunkach potencjodynamicznych w zakresie potencjałów od 0,20 do 1,20 V względem Ag/AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s.

Korzystnie, etap (c) prowadzi się drogą ekstrakcji za pomocą organicznego rozpuszczalnika polarnego rozkładającego epitop glutenu, korzystnie wodnego roztworu kwasu solnego o stężeniu w zakresie od 1 mM do 1.0 M, etanolu lub acetonu.

Wynalazek również obejmuje zastosowanie warstwy rozpoznającej epitop glutenu, według wynalazku albo wytworzonej sposobem opisanym powyżej, do selektywnego wykrywania i/lub oznaczania glutenu występującego w zbożowych produktach spożywczych.

Korzystnie, wynalazek ma zastosowanie w czujnikach chemicznych.

Według danych z kwietnia 2016 r., w handlu dostępne są różne czujniki do wykrywania glutenu w zbożowych produktach spożywczych (Tabela 1). Jeden z nich to Gluten Tox Home (Hiszpania) [<https://glutentox.com/glutentox-home/>] a drugi – Nima Sensor (USA) [<https://nimasensor.com/>]. W obu tych czujnikach do wykrywania glutenu wykorzystywana jest immunodetekcja. Czujniki te są stosunkowo drogie i nadają się do jednorazowego użytku. Co więcej, nie są to czujniki łatwo dostępne. Obecnie można je kupić jedynie przez Internet.

Tabela 1. Porównanie właściwości dwóch najważniejszych komercyjnych czujników do wykrywania glutenu w zbożowych produktach spożywczych.

Rodzaj czujnika	Nima Sensor	Gluten Tox Home
Cecha		
Kraj pochodzenia	USA.	Hiszpania, Francja.
Dostępne rynki	Tylko USA.	USA, Kanada, Australia, większość krajów Europy w tym Polska.
Metoda detekcji	Immunodetekcja.	Immunodetekcja.
Wykrywalność	20 ppm.	20 ppm (opcja 5 ppm).
Liniiowy zakres stężeniowy	Oba czujniki wykazują odpowiedź dodatnią bądź ujemną. Użytkownik uzyskuje jedynie informację czy produkt zawiera gluten czy nie (czy bezpiecznie może spożyć dany produkt). Jeżeli produkt zawiera mniej niż 20 ppm glutenu, to wg norm jest „bezglutenowy”.	
Jednorazowe/wielorazowe	Urządzenie elektroniczne z jednorazowymi wkładami.	Płytki jednorazowego użytku, podobne do testów ciążowych.
Cena	Ok. 200 USD lub 250 USD z 12 jednorazowymi wkładami.	Ok. 100 zł za 2 jednorazowe testy.
Czas pomiaru	2 min.	Od 5 do 10 min. Wcześniej należy zmielić i wyekstrahować gluten z próbki żywności, co zajmuje ok. 10 do 15 min.
Wynik	Obecność glutenu: tak/nie, bez pomiaru stężenia.	Obecność glutenu: tak/nie, bez pomiaru stężenia.
Strona internetowa	https://nimasensor.com/	http://www.glutentoxhome.com/en.html
Uwagi	Przenośny czujnik o niewielkich wymiarach. Wygodny w użyciu poza domem, na przyjęciach i w restauracjach.	Test nieporęczny, ponieważ pomiar jest wieloetapowy. Możliwość wykonania testu właściwie tylko w warunkach domowych.
Sposób zakupu	Tylko przez Internet, niedostępny w sklepach stacjonarnych.	Tylko przez Internet, niedostępny w sklepach stacjonarnych.

Wynalazek zostanie teraz bliżej przedstawiony w korzystnym przykładzie wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków.

Fig. 1. Poglądowa ilustracja wdrukowania molekularnego prowadzącego do wytworzenia polimeru do selektywnego rozpoznawania oznaczanej substancji [Z. Iskierko, P. S. Sharma, K. Bartold, A. Pietrzyk-Le, K. Noworyta, W. Kutner, *Biotechnol. Adv.*, 34 (2016) 30].

Fig. 2. Zoptymalizowana za pomocą metody DFT z korelacyjno-wymiennym funkcjonałem B3LYP i bazą danych 3-21G* struktura cząsteczki epitopu glutenu o sekwencji PQQPFPQQ w próżni [A. Ensari et al., *Clin. Sci.*, 95, (1998), 419]

Fig. 3. Wzory strukturalne monomerów funkcyjnych, tj. kwasu *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowego **2** i *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoenu 2-(cytozyn-1-ylo)etylowego **3** oraz monomeru sieciującego, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofenu **4**.

Fig. 4. Fotografia przedstawiająca toluenowe roztwory epitopu glutenu, PQQPFPQQ **1** (bezbardwy), monomerów funkcyjnych, tj. kwasu *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowego **2** (fioletowy) i *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoenu 2-(cytozyn-1-ylo)etylowego **3** (pomarańczowy) oraz monomeru sieciującego, 2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofenu **4** (żółty).

Fig. 5. Zoptymalizowana, za pomocą metody DFT z korelacyjno-wymiennym funkcjonałem B3LYP i bazą danych 3-21G*, struktura cząsteczki kompleksu epitopu glutenu o sekwencji PQQPFPQQ **1** z dwoma cząsteczkami kwasu *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowego **2** i **2'** i jedną cząsteczką *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoenu 2-(cytozyn-1-ylo)etylowego **3** w próżni. $\Delta G = -334$ kJ/mol.

Fig. 6. Zoptymalizowana, za pomocą metody DFT z korelacyjno-wymiennym funkcjonałem B3LYP i bazą danych 3-21G*, struktura cząsteczki kompleksu epitopu glutenu o sekwencji PQQPFPQQ **1** z dwoma cząsteczkami kwasu *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowego **2** i **2'** i jedną cząsteczką *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoenu 2-(cytozyn-1-ylo)etylowego **3** w próżni; zmiana entalpii swobodnej tworzenia kompleksu wynosi, $\Delta G = -334$ kJ/mol.

Fig. 7. Krzywe potencjałowej zależności prądu zarejestrowane w trakcie osadzania warstwy MIP-1 za pomocą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej na (a) platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm i (b) złoczonej płytce szklanej o powierzchni ~ 30 mm². Do polimeryzacji zastosowano roztwór 0,1 mM **1**, 0,2 mM **2**, 0,1 mM **3**, 0,1 mM **4** w 0.1 M

(TBA)ClO₄, rozpuszczalników, toluenu i acetonitrylu, zmieszanych w stosunku objętościowym jak 9 : 1. Szybkość zmian potencjału 50 mV/s.

Fig. 8. Krzywe potencjałowej zależności (a) prądu jak również zmian (b) częstotliwości rezonansowej i (c) oporności dynamicznej równocześnie zarejestrowane w trakcie osadzania warstwy MIP-1 za pomocą elektropolimeryzacji potencjodynamicznej na elektrodzie złotej Au-QCR o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Do polimeryzacji zastosowano roztwór 0,1 mM **1**, 0,2 mM **2**, 0,1 mM **3**, 0,1 mM **4** i 0,1 M (TBA)ClO₄, rozpuszczalników, toluenu i acetonitrylu, zmieszanych w stosunku objętościowym jak 9 : 1. Szybkość zmian potencjału 50 mV/s.

Fig. 9. Krzywe różnicowej woltamperometrii pulsowej zarejestrowane w trakcie ekstrakcji szablonu, epitopu glutenu PQQPFPQQ, z warstwy MIP za pomocą (a) acetonu, krzywa **1** – przed ekstrakcją, krzywa **2** – po 1 godz. ekstrakcji, krzywa **3** – po 2 godz. ekstrakcji, krzywa **4** – po 3 godz. ekstrakcji, (b) etanolu, krzywa **1** – przed ekstrakcją, krzywa **2** – po 1 godz. ekstrakcji, krzywa **3** – po 2 godz. ekstrakcji, (c) 0,1 M HCl, krzywa **1** – przed ekstrakcją, krzywa **2** – po 1 godz. ekstrakcji, krzywa **3** – po 2 godz. ekstrakcji.

Fig. 10 Zależności prądu źródło-dren od napięcia źródło-dren (charakterystyki tranzystora) dla następujących stężeń analitu (epitopu PQQPFPQQ) krzywa **1** – 0; krzywa **2** – 0,5; krzywa **3** – 1; krzywa **4** – 7; krzywa **5** – 13; krzywa **6** – 20; krzywa **7** – 30 μM PQQPFPQQ, przy napięciu bramki, V = 1,5 V.

Fig. 11. Krzywe kalibracyjne dla czujnika EG-FET z warstwą rozpoznającą (a) **1** – MIP i **2** – NIP dla epitopu glutenu, PQQPFPQQ, przy napięciu bramki 1,5 V; granica wykrywalności (ang. limit of detection, LOD), LOD = 2,8 μM, pozorny współczynnik wdrukowania (ang. apparent imprinting factor, AIF), AIF = 20 (b) odpowiedź czujnika (zmiana prądu źródło-dren) na: krzywa **1** – epitop glutenowy PQQPFPQQ oraz substancje przeszkadzające: krzywa **2** – PQQPSPQQ i krzywa **3** – PQQQFPQQ, przy napięciu bramki 1,5 V.

Fig. 12. Krzywe kalibracyjne dla czujnika EG-FET z warstwą rozpoznającą (a) krzywa **1** – MIP i krzywa **2** – NIP dla epitopu glutenu, PQQPFPQQ, przy napięciu bramki 2,0 V; granica wykrywalności, LOD = 4,7 μM, pozorny współczynnik wdrukowania, AIF = 22 (b) odpowiedź czujnika (zmiana prądu źródło-dren) na: krzywa **1** – epitop glutenu PQQPFPQQ oraz substancje przeszkadzające: krzywa **2** – PQQPSPQQ i krzywa **3** – PQQQFPQQ, przy napięciu bramki 2,0 V.

Korzystny przykład wykonania wynalazku

Poniżej przedstawiono przykład wykonania warstwy rozpoznającej gluten według wynalazku:

(1) Obliczenia kwantowo-chemiczne

Tworzenie kompleksu do polimeryzacji, jego struktura i skład były modelowane za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych.

Zoptymalizowano struktury epitopu PQQPFPQQ (Fig. 2) i monomerów funkcyjnych (2 i 3 na Fig. 3), umożliwiającą przygotowanie kompleksu pre-polimeryzacyjnego w roztworze (Fig. 4). Następnie obliczono zmiany entalpii swobodnej kompleksowania, ΔG . Obliczenia wykonano metodą DFT z korelacyjno-wymiennym funkcjonałem B3LYP i bazą danych 3-21G* (Fig. 5) za pomocą oprogramowania Gaussian 09 (M. J. Frisch et al. Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford CT, USA). Ze względu na otrzymaną nietypowo wysoką wartość entalpii swobodnej, ΔG , obliczenia powtórzono stosując tę samą bazę danych 3-21G* (pozycje 2 i 3 w Tabeli 2) jak również bazę 6-31G* (Pozycja 1 w Tabeli 2 i Fig. 6).

Wszystkie obliczone wartości ΔG zestawione są w Tabeli 2.

Tabela 2. Zmiany entalpii swobodnej związane z tworzeniem kompleksów przedstawionych na Fig. 5 i Fig. 6, obliczone za pomocą DFT i różnych baz danych.

L.p.	Baza danych	ΔG (kJ/mol)	Środowisko
1.	B3LYP 6-31G*	-88	próżnia
2.	B3LYP 3-21G*	-334	próżnia
3.	B3LYP 3-21G*	-347	próżnia
4.	B3LYP 3-21G*	-303	toluen

(2) Przygotowanie kompleksu pre-polimeryzacyjnego

Fotografie toluenowych roztworów służących do przygotowania roztworu kompleksu pre-polimeryzacyjnego są przedstawione na Fig. 4. Roztwór ten zawierał epitop glutenu

PQQFPQQ **1**, kwas *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowy **2**, *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylo-benzoosan 2-(cytozyn-1-ylo)etylowy **3** i 2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **4** w stosunku molowym **1 : 2 : 3 : 4** jak 1 : 2 : 1 : 2. Ten stosunek molowy został wybrany na podstawie przeprowadzonych obliczeń kwantowo-chemicznych.

(3) Osadzanie polimeru na elektrodzie za pomocą elektropolimeryzacji

Skład roztworu do elektropolimeryzacji

- Elektrolit podstawowy: chloran(VII) tetrabutylamoniowy, (TBA)ClO₄, 0,1 M.
- Analit/szablon **1**: epitop glutenu PQQFPQQ, 0,1 mM.
- Monomer funkcyjny **2**: kwas *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoowy, 0,2 mM
- Monomer funkcyjny **3**: *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoosan 2-(cytozyn-1-ylo)etylowy, 0,1 mM
- Monomer sieciujący **4**: 2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen, 0,2 mM [F. Sannicolò, et al., *Chem. Eur. J.*, (2016) w druku].
- Rozpuszczalnik: mieszanina toluenu i acetonitrylu w stosunku objętościowym jak 9 : 1.

Warunki osadzania polimeru

Warstwy MIP-**1** przygotowano za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych w zakresie potencjałów od 0 do 1,25 V vs Ag/AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s. Do polimeryzacji zastosowano roztwór rozpuszczalników organicznych, toluenu i acetonitrylu, o stosunku objętościowym jak 9 : 1. Stężenie epitopu w ww. roztworze wynosiło od 0,1 mM do 1 mM, korzystnie 0,1 mM. W celu zapewnienia trwałości luk molekularnych w powstającym polimerze, do roztworu do elektropolimeryzacji dodano monomer sieciujący **4** w stosunku molowym PQQFPQQ : **4** jak 1 : 2. Wystarczającą przewodność roztworu do elektropolimeryzacji zapewnił elektrolit podstawowy, 0,1 M (TBA)ClO₄. W tym roztworze umieszczono odpowiednią elektrodę badaną, na której osadzono polimer, MIP-**1**. Grubość polimeru kontrolowano za pomocą liczby cykli zmian potencjału, korzystnie trzech cykli. Warstwę MIP-**1** osadzono na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm (Fig. 7a), na płytce szklanej z naparowaną warstwą złota na podkładzie tytanowym (Fig. 7b) oraz na elektrodzie złotej Au-QCR o średnicy 5 mm (Fig. 8), o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz. Przygotowane w celach porównawczych warstwy polimeru niewdrukowanego (ang. non-imprinted polymer, NIP) osadzono na takich

samych elektrodach z roztworu do elektropolimeryzacji nie zawierającego szablonu stosując taką samą procedurę jak procedura stosowana do osadzania warstw MIP-1.

Warstwę MIP-1 osadzono na elektrodzie Au-QCR za pomocą trzech cykli zmian potencjału w zakresie od 0,20 do 1,20 V vs Ag/AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s (Fig. 8). W trakcie osadzania na krzywej zależności prądu od potencjału obserwowano anodowy prąd utleniania monomerów poniżej 1,0 V i pik anodowy przy potencjale $\sim 0,90$ V (Fig. 8a). W kolejnych cyklach prąd anodowy związany z utlenianiem nie tylko monomerów w roztworze, ale również warstwy polimeru osadzonej na elektrodzie wzrastał. Na krzywych zależności prądu od potencjału nie zaobserwowano katodowych prądów redukcji powstającego polimeru. Nasze wcześniejsze badania procesów elektrodowych epitopu PQQFPQQ w nieobecności monomerów wykazały, że jest on elektronieaktywny w stosowanym do niniejszej elektropolimeryzacji zakresie potencjałów.

Rejestrowane równocześnie ze zmianami prądu zmiany częstotliwości rezonansowej Au-QCR (Fig. 8b) wykazały, że elektroutlenianiu monomerów towarzyszy spadek częstotliwości rezonansowej. Spadek ten wskazuje na wzrost masy Au-QCR w wyniku osadzania polimeru. Spadek częstotliwości obserwowany był w każdym cyklu po osiągnięciu potencjału piku anodowego. Spadek częstotliwości wzrastał w kolejnych cyklach wraz ze wzrostem prądu anodowego. To zachowanie wskazuje na wzrost powierzchni elektrody w trakcie osadzania stosunkowo dobrze przewodzącej warstwy polimeru.

W celu przeprowadzenia pomiarów elektrochemicznych, warstwę MIP-1 osadzono również na platynowej elektrodzie dyskowej. Natomiast w celu scharakteryzowania tej warstwy i przygotowania chemoczuJNIKA EG-FET warstwę tę osadzono również na płytce szklanej z napyłonym złotem na podłożu tytanowym. W opisanych powyżej przypadkach zastosowano taką samą procedurę jak procedura opisana powyżej, zastosowana do osadzenia warstwy na elektrodzie złotej Au-QCR.

W wyniku polimeryzacji, zarówno na Au-QCR, elektrodzie platynowej, jak i na płytkach szklanych z napyłonym złotem osadzały się brązowe warstwy polimerów dobrze przylegające do przewodzącego podłoża. Po zakończeniu elektropolimeryzacji warstwy te przemyto acetonitrylem w celu usunięcia z nich śladów elektrolitu podstawowego i niespolimeryzowanych monomerów.

(4) Usuwanie szablonu epitopu glutenu, PQQPFPQQ, z warstwy MIP

W celu opróżnienia luk molekularnych wdrukowanych w polimerze, z przygotowanych warstw MIP-1 wyekstrahowano szablony epitopu acetonem w ciągu 2 godz. w temperaturze pokojowej. Do ekstrakcji zastosowano aceton, ponieważ ten rozpuszczalnik rozkłada epitop. Postęp ekstrakcji monitorowano za pomocą próbnika redoks śledząc tzw. „efekt bramkowania” (Fig. 9) w pomiarach różnicowej voltamperometrii pulsowej (ang. differential pulse voltammetry, DPV). Jako próbnik redoks zastosowano wodny roztwór heksazelazocyjanianu(II) potasu o stężeniu 10 mM w 0,1 M chlorku potasu, spełniającym rolę elektrolitu podstawowego. Wraz z usuwaniem cząsteczek szablonu epitopu z luk molekularnych obserwowano wzrost piku DPV w czasie ekstrakcji do 2 godzin. Obserwowany następnie nagły wzrost prądu piku świadczył o niekorzystnym usuwaniu warstwy polimeru z powierzchni elektrody (krzywa 4 na Fig. 9).

(5) Oznaczenie epitopu glutenu, PQQPFPQQ, za pomocą czujnika chemicznego EG-FET z warstwą rozpoznającą MIP-1

Wykonano pomiary stężenia epitopu glutenu o sekwencji PQQPFPQQ (analitu) w roztworach wodnych za pomocą wytworzonych czujników chemicznych (EG-FET). Jako zewnętrzną bramkę tranzystora polowego zastosowano złożoną płytkę szklaną z osadzoną na niej cienką warstwą molekularnie wdrukowanego (MIP) lub niewdrukowanego (NIP) polimeru. Bramkę polaryzowano napięciem 1,5 V (Fig. 11) lub 2,0 V (Fig. 12). Im wyższe było stężenie analitu w roztworze badanym tym wyższa była zmiana prądu źródło-dren. Przy napięciu bramki 1,5 V zmiany prądu sięgały nanoamperów, natomiast przy 2,0 V – mikroamperów.

Dla porównania skonstruowano analogiczne krzywe kalibracyjne dla analitu z wykorzystaniem cienkiej warstwy NIPu (krzywa 2 na Fig. 10a i krzywa 2 na Fig. 11a). W tym przypadku zarówno przy napięciu bramki 1,5 V jak i 2,0 V zmiany prądu źródło-dren ze wzrostem stężenia analitu były niewielkie.

Ze stosunku nachylenia krzywych kalibracyjnych MIP i NIP dla analitu PQQPFPQQ (krzywe 1 i 2 na Fig. 10a oraz krzywe 1 i 2 na Fig. 11a) wyznaczono wartości pozornych współczynników wdrukowania (ang. apparent imprinting factor, AIF). Dla napięcia bramki 1,5 V i 2,0 V wartość AIF wynosiła, odpowiednio, 20 i 22 (Tabela 3).

Określono również selektywność wytworzonych czujników. W tym celu

skonstruowano krzywe kalibracyjne dla stężeń dwóch różnych epitopów o strukturze podobnej do struktury oznaczanego epitopu (analitu), ale z wymienionym jednym, PQQPSPQQ, lub dwoma, PQQQFPPQ, aminokwasami (odpowiednio, Fig. 11b i Fig. 12b). Ze zmian prądu dla ww. epitopów przeszkadzających w oznaczaniu analitu, PQQPFPQQ, wyznaczono współczynniki selektywności (Tabela 3). Równania krzywych kalibracyjnych wyrażone są przez ogólne równanie regresji liniowej

$$I_{z-d}(\text{nA}) = a c_{\text{ep}}(\mu\text{M}) + b \quad (1)$$

gdzie c_{ep} to stężenie epitopu, I_{z-d} to prąd źródło-dren przy zadanym napięciu bramki, natomiast współczynniki a i b przedstawione są w Tabeli 4.

Tabela 3. Wartości parametrów analitycznych wyznaczonych za pomocą czujników EG-FET z warstwą rozpoznającą MIP-1 lub NIP dla różnych wartości napięcia bramki.

Parametry analityczne	Napięcie bramki, V	
	1,5	2,0
Granica wykrywalności, LOD*, (μM) przy N/S = 3	2,8	4,7
Czułość, MIP ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	$-4,81 \times 10^{-5}$	$-4,04 \times 10^{-2}$
Czułość, NIP ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	$-2,42 \times 10^{-6}$	$-1,82 \times 10^{-3}$
Pozorny współczynnik wdrukowania (AIF)	20,0	22,0
Współczynnik selektywności względem PQQPSPQQ	4,85	4,25
Współczynnik selektywności względem PQQQFPPQ	21,10	-6,76

* ang. limit of detection, LOD.

Tabela 4. Wartości współczynników a i b w Równaniu (1).

Krzywa kalibracyjna	a (nA· μ M ⁻¹)	b (nA)
Krzywa 1 na Fig. 11a	$-4,81 \times 10^{-5}$	$-1,76 \times 10^{-4}$
Krzywa 2 na Fig. 11a	$-2,42 \times 10^{-6}$	$1,49 \times 10^{-5}$
Krzywa 2 na Fig. 11b	$-9,92 \times 10^{-6}$	$2,85 \times 10^{-5}$
Krzywa 3 na Fig. 11b	$-2,28 \times 10^{-6}$	$7,15 \times 10^{-5}$
Krzywa 1 na Fig. 12a	$-4,04 \times 10^{-2}$	$-1,23 \times 10^{-1}$
Krzywa 2 na Fig. 12a	$-1,82 \times 10^{-3}$	$6,09 \times 10^{-2}$
Krzywa 2 na Fig. 12b	$-9,49 \times 10^{-3}$	$6,45 \times 10^{-2}$
Krzywa 3 na Fig. 12b	$5,97 \times 10^{-3}$	$4,90 \times 10^{-2}$

Wnioski

1. Obliczenia kwantowo-chemiczne wykazały możliwość tworzenia kompleksu epitopu PQQPFPQQ z monomerami funkcyjnymi **2** i **3** w stosunku 1 : 2 : 1. Wyniki obliczeń dają wgląd w strukturę i stechiometrię tworzonego kompleksu pre-polimeryzacyjnego.
2. Elektropolimeryzacja potencjodynamiczna w zakresie dodatnich potencjałów wykazała przydatność do otrzymywania warstw polimerów pochodnych tiofenu wdrukowanych epitopem PQQPFPQQ. Opracowana metoda polimeryzacji pozwala na szybkie przygotowanie warstw MIPów dobrze przylegających do podłoża metalicznego zarówno o dużej (Au-QCR) jak i małej szorstkości (Au-szkło, elektrody platynowe). Metoda ta umożliwia dogodną kontrolę grubości osadzanych warstw polimerów za pomocą liczby cykli zmian potencjału.
3. Opracowana metoda osadzania warstwy polimeru wdrukowanego epitopem PQQPFPQQ umożliwia łatwe scalenie tej warstwy z przetwornikami chemicznego sygnału rozpoznawania na analityczny sygnał elektryczny takimi jak tranzystory polowe z zewnętrzną bramką (EG-FETy).
4. Czujnik chemiczny EG-FET wykazał najwyższą wykrywalność, LOD = 2,8 μ M, epitopu PQQPFPQQ przy napięciu bramki 1,50 V.
5. Czujnik chemiczny EG-FET nadaje się do wykrywania i oznaczania epitopów glutenu PQQPFPQQ w roztworach wodnych, co umożliwia jego zastosowanie do oznaczania glutenu

w zbożowych produktach spożywczych.

6. W przeciwieństwie do komercyjnie dostępnych immunologicznych bioczuJNIKÓW jednorazowego użYtku do wykrywania glutenu, czujnik chemiczny EG-FET z syntetycznym elementem rozpoznającym MIP według wynalazku nadaje się nie tylko do jednorazowego wykrywania, ale i do wielokrotnego oznaczania stężenia epitopów glutenu.

Podziękowania

Badania przedstawione w niniejszym wniosku zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki (Grant nr NCN 2013/11/N/ST5/01907 dla Z.I. i częściowo grant nr 2014/15/B/NZ/01011 dla W.K.), częściowo sfinansowane ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (Grant nr MPD/2009/1/styp15 w ramach EFRR PO IG 2007-2013 dla MS) oraz częściowo ze środków US National Science Foundation (Grant No. 1401188 dla F.D.) jak i Fondazione Cariplo (Granty nr 2011-0417 i 2011-1851).