

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

URTĖ SAMUKAITĖ-BUBNIENĖ

POLIPROLU MODIFIKUOTŲ BIOLOGINIUOSE JUTIKLIUOSE NAUDOJAMŲ
SISTEMŲ TYRIMAS FLUORESCENCIJOS METODAIS

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, chemija (03P)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universiteto Chemijos fakultete ir Fizinių ir technologijos mokslų centre.

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Chemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Audrius Maruška (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Nariai:

dr. Natalia Tintaru (Moldovos valstybinis universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

prof. habil. dr. Rimantas Vaišnoras (Lietuvos edukologijos universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

prof. habil. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m. rugsėjo mėn. 28 d. 10 val. Vilniaus universiteto Chemijos fakulteto Organinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko 24, LT – 03225, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2015 m. rugpjūčio mėn. 28 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose, VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

URTĖ SAMUKAITĖ-BUBNIENĖ

STUDY OF POLYPYRROLE BASED BIOSENSING SYSTEMS BY
FLUORESCENCE METHODS

Doctoral dissertation
Physical sciences, Chemistry (03 P)

Vilnius, 2015

Doctoral dissertation was prepared at Vilnius University, Faculty of Chemistry and Center for Physical Sciences and Technology from 2010 to 2014.

Scientific supervisor – Prof. Dr. Habil. Arūnas Ramanavičius (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03P).

Doctoral dissertation will be defended at the Chemical Science Council of Vilnius University:

Chairman – Prof. Dr. Habil. Audrius Maruška (Vytautas Magnus University, physical sciences, chemistry – 03P).

Members:

Dr. Natalia Tintaru (Moldova State University, Physical Sciences, Chemistry – 03P).

Prof. Dr. Habil. Rimantas Vaišnoras (Lithuanian University of Educational Sciences, Physical Sciences, Physics – 02P).

Prof. Dr. Habil. Vida Vičkačkaitė (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03P).

Assoc. Prof. Dr. Aušra Valiūnienė (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03P).

The defence of dissertation will take place at 10 a.m. on the 28th of September, 2015 at the open meeting of the Chemical Sciences Council at the Auditorium of Organic Chemistry at the Faculty of Chemistry of Vilnius University.

Address: Naugarduko str. 24, LT – 03225, Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was distributed on the 28th of August.

The doctoral dissertation is available for review at the libraries of Vilnius University and Center for Physical Sciences and Technology, Vilnius University internet: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

IVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais buvo vykdoma nemažai tyrimų, siekiant sukurti biologinių jutiklių sistemas, kurios tiktų įvairių analičių nustatymui. Taip pat buvo siekiama detaliai iširti šių sistemų veikimą. Polimerų technologijos naujoves įdiegus biologinių jutiklių sistemose buvo sukurtos naujos kartos itin jautrios analizinės sistemos, tiksliai ir tiesiogiai nustatančios analites. Įdiegus polimerus, galima pasiekti daugelį biojutiklių sistemoms aktualių privalumų: žemas aptikimo ribas, didelius jautrumus, sumažinti foninį signalą, pagerinti elektronų perdavimą, terminį stabilumą bei biologinį suderinamumą.

Elektrai laidūs polimerai (ELP) – gana nauja medžiagų klasė, kurios fizikinės savybės (elektroninės, magnetinės, optinės) yra panašios į metalų ir (arba) puslaidininkių. Biojutiklių sistemos – tai viena iš ELP taikymo sričių. Polimerai šiuo atveju atlieka keletą labai svarbių funkcijų:

(i) jie veikia kaip signalų vertikliai. ELP apjungia biologiškai aktyvias medžiagas ir elektroninius įrenginius, bei biologinės medžiagos perduodamą signalą transformuoja į lengviau įrašomą fizinį, būtent – elektrocheminį, signalą;

(ii) jie veikia kaip imobilizavimo matricos. Imobilizuoti biologines medžiagas galima nespecifiškai adsorbuojant, kovalentiškai prijungiant bei elektrostatiškai sąveikų pagalba.

(iii) puslaidininkių nanodalelės dažnai naudojamos kaip fluorescenciniai žymenys sudėtingose bioanalizinėse sistemose. Jų pranašumai – didelė kvantinė išeiga, siauras liuminescencinis spektras ir didelis fotostabilumas.

Biologinių jutiklių sistemose fluorescencija yra naudojama kaip metodas nepažeidžiantis analizuojamų biologinių molekulių net esant labai mažoms koncentracijoms. Tuo tikslu yra naudojama vidinė molekulės fluorescencija (auto fluorescencija) arba molekulės yra „pažymimos“ prijungiant fluorescencinius dažus ar kitus fluoroforus. Efektyviai derinant polimerus su fluorescencijos metodais, biologinių jutiklių sistemose galima ženkliai padidinti signalo stiprumą.

Vaizdinimas nanodalelių pagalba sukuria pridėtinę vertę biologinių jutiklių sistemų srityje. Tokios nanodalelių savybės kaip gera šviesos sugertis ir sklaida leidžia sukurti naujus vaizdinimo metodus.

Darbo tikslas:

Fluorescencijos metodais ištirti biologinių jutiklių sistemas, kuriuose polipirolas pritaikytas kaip biomolekulių imobilizavimo matrica.

Darbo uždaviniai:

- Ištirti fluorescencijos metodais imunosensoriaus, kuriame polipirolas yra panaudotas kaip imobilizacinė matrica, savybes.
- Ištirti fluorescencijos metodais polipirolu modifikuoto fermento, gliukozės oksidazės, savybes.
- Ištirti aukso nanodalelių elektrostazines savybes ir pritaikyti jas polipirolu modifikuojant gliukozės oksidazę. Ištirti susidariusius kompozitus fluorescencijos metodais.

Ginamieji teiginiai:

- Polipirola matrica gali būti panaudota kaip efektyvus fluorescencijos gesiklis fotoluminescenciniuose imunojutikliuose ir pagerinti jų atrankumą.
- Gliukozės oksidazės fermentą imobilizavus į polipirola matricą *fermentinės* polimerizacijos metu, gliukozės oksidazės flavino adenino dinukleotido kofaktoriaus pasišalinimas iš fermento aktyvaus centro žymiai suletėja.
- Koloidinių aukso nanodalelių nusodinimo ant kieto paviršiaus procesas yra priklausomas nuo difuzijos, kuri proporcingai priklauso nuo pradinės dalelių koncentracijos; paviršiaus pasidengimas proporcingas joninėms jėgoms dalelių suspensijoje.
- Koloidinės aukso nanodalelės pasižymi neigiamu paviršiaus krūviu plačiame pH ir joninių jėgų diapazone ir yra tinkamos polipirola formavimuisi ant jų paviršiaus.

Mokslinis naujumas:

- Polipirolo polimero sinteze inicijuojant vandenilio peroksidu susidariusiu gliukozės oksidazės katalizuojamos reakcijos metu gliukozės oksidazė yra inkapsuliuojama susidariusio polipirolo sluoksnyje.

- Ištirtos aukso nanodalelių elektrokinetinės savybės, kurios buvo kiekybiškai įvertintos plačiame pH ir joninių jėgų diapazone.

- Polipirolo matrica gali būti panaudota kaip nespecifiškai adsorbuotų medžiagų fluorescencijos gesiklis, kuris gali pagerinti biologinių jutiklių atrankumą.

DISERTACIJOS SANDARA

Daktaro disertacija parašyta anglų kalba ir turi šias sudėtines dalis: įvadas; literatūros apžvalga; medžiagos, metodinė dalis – įranga ir metodai; rezultatai ir jų aptarimas; išvados; papildoma informacija; su disertacija susijusių publikacijų sąrašas; literatūros šaltinių sąrašas; padėka, santrauka lietuvių kalba. Darbe pateiktos 2 lentelės ir 34 iliustracijos, bendra apimtis sudaro 129 puslapius.

Įvadas. Įvade atskleidžiamas disertacinio darbo aktualumas, pabrėžiant fluorescencijos principų taikymo biologiniuose jutiklių sistemose privalumus. Pažymima, jog fluorescencinė spektrofotometrija yra informatyvus ir efektyvus būdas biologinių jutiklių tyrimams. Pateikiami ir detalai aprašomi disertacinio darbo tyrimų objektai – biologinių jutiklių sistemos, laidūs polimerai, fermentas – gliukozės oksidazė, koloidinės aukso nanodalelės.

1. **Literatūros apžvalga.** Literatūros apžvalgos skyriuje aprašomas pasirinktos temos iširtumas, pateikta analizė teorijų, tyrimų bei koncepcijų, kurių pagrindu buvo ieškoma atsakymo į iškeltą darbo tikslą bei suformuotus darbo uždavinius. Literatūros apžvalgą sudaro 9 skyriai:

1.1. Liuminescencija. Skyriuje pateikiamas liuminescencijos veikimo principas, pagrindinės savybės, privalumai ir jų pritaikymo galimybės tarpdisciplinėje mokslo erdvėje.

1.2. Fluorescencija. Šiame skyriuje aprašomas fluorescencijos veikimo mechanizmas, trumpai aprašyta istorinė atsiradimo ir vystymosi retrospektyva, pirminiai fotofizikiniai ir fotocheminiai vyksmai, svarbūs biologinių jutiklių sistemoms efektyviai funkcionuoti. Poskyriuose aprašomas biocheminių fluoroforų taikymas biologiniuose jutikliuose, šviesos sąveikos su biologiniais objektais procesas, aprašomi vidiniai bei išoriniai fluoroforai, išskiriamos pagrindinės jų savybės bei taikymo sritys, fluorescencijos spektro savybės, fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimų specifika ir veikimo principas. Išskiriamos svarbios fluorescencijos spektrų savybės. Pateikta informacija apie tarpmolekulinių sąveikų įtaką spektrams, fluoroforų dipolinių momentų pokyčius, išskirti polinių ir nepolinių tirpiklių spektrai bei jų įtaka fluorescencijai.

1.3. Gliukozės oksidazė. Šiame skyriuje glaustai aprašomas gliukozės oksidazės fermentas, jo veikimo principas, susidarantys subproduktai katalizinės reakcijos metu, kofaktoriaus FAD įtaka fermento fotocheminėms savybėms.

1.4. Flavino adenino dinukleotidas. Šiame skyriuje aprašomas gliukozės oksidazės fermento kofaktorius, išskirtos jo pagrindinės savybės, įtakojančios fotoluminescencinius matavimus.

1.5. Galvijų leukemijos virusas ir jo paviršiaus glikobaltymas *gp51*. Skyriuje apžvelgiama galvijų leukemijos problematika, aprašomas viruso veikimo principas, išskiriamos ir trumpai aprašomos svarbiausios aptikimo metodikos.

1.6. Krienų peroksidazės fermentas. Skyriuje trumpai aprašomas peroksidazės veikimo principas, supažindinama su krienų peroksidazės fermentu, jo veikimo ir taikymo biojutiklių sistemose aspektais.

1.7. Laidūs polimerai. Šiame skyriuje trumpai apžvelgiama laidžių polimerų priešistorė, supažindinama su bene labiausiai tyrinėjamu laidžiu polimeru – polipirolu, pateikiamos jo pagrindinės savybės, sintezės būdai, privalumai pritaikant juos biojutiklių sistemose.

1.8. Katalizinių biojutiklių aspektai. Skyriuje aprašomas laidžiais polimerais modifikuotų katalizinių jutiklių aspektai. Poskyriuose supažindinama su veikimo principu, trumpai apžvelgiami fermentų, naudojamų kataliziniuose biojutikliuose, aspektai.

1.9. Koloidinės aukso nanodalelės biojutiklių sistemose. Pateikiamos aukso nanodalelių savybės tinkamos jutiklių sistemoms, sintezės aspektai, privalumai taikyti biojutiklių sistemose kartu su konjuguotais polimerais.

2. **Metodų** dalyje išskiriamos ir aprašomos disertacinio darbo metu naudotos tyrimams medžiagos (2.1. skyrius), įranga ir metodai, bandinių paruošimo technologijos.

2.2. Skyrius skirtas aprašyti polipirolu modifikuotos gliukozės oksidazės bandinių paruošimus (poskyris 2.2.1.), fluorescencinius matavimus (poskyris 2.2.2.), gyvavimo trukmės matavimus (poskyris 2.2.3.), elektrocheminius GOx/Ppy ir GOx aktyvumo įvertinimus (poskyris 2.2.4.).

2.3. Dalyje pateikiami aukso nanodalelių (AuND) monosluoksnių formavimo tyrimai. Poskyryje (2.3.1.) aprašyti koloidinių aukso nanodalelių sintezės protokolai, pateikta AuND nusodinimo metodika (poskyris 2.3.2.), aprašomas AuND dydžio įvertinimas spektrofotometrijos ir atominės jėgų mikroskopijos, skenuojančio elektrocheminio mikroskopo būdais bei ξ – potencialo nustatymas elektroforezinio šviesos išsklaidymo būdu, įvertinama koncentracija (poskyris 2.3.3.).

2.4. Skyriuje pateikta informacija apie laidžius polimerus kaip fluorescencijos gesiklių matricas. Aprašyta polipirolo sintezė ir sluoksnio modifikavimo metodika, elektrodų paruošimo būdai bei elektrocheminiai matavimai (poskyris 2.4.1.), fluorescencijos matavimai (poskyris 2.4.2.).

Metodai:

Gliukozės oksidazės modifikuotos polipirolo fluorescenciniai tyrimai buvo įvertinti naudojant fluorescencinius matavimus naudojant aptikimo sistemą, pagrįstą dvigubuoju monochromatoriumi „JY HRD1“ ir fotodaugintuvu „Hamamatsu R1463P“, veikiančiu naudojant fotonų skaičiavimo metodiką. Optiniam mėginių sužadanimui buvo naudojamas 325 nm He–Cd lazeris.

Gyvavimo trukmės (relaksacijos) matavimams buvo naudojamas „Jasco V670“ spektrofotometras tiriamų gliukozės oksidazės mėginių (GOx) spektrams. PMMA kiuvetės su 1 cm ilgio optiniu keliu buvo naudojamos visiems optiniams matavimams. Fotoluminescencijos spektrai ir fotoluminescencijos gesimo kinetika buvo įvertinamos naudojant laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo spektrometrą „Edinburgh-F900“ (Edinburgo instrumentai, Jungtinė Karalystė). Sužadanimui prie 375 nm su vidutine galia 0,15 mW / mm² buvo naudojamas pikosekundinis impulsinis diodinis lazeris „EPL-375“, spinduliuojantis pikosekundinės trukmės impulsus. Impulsų pasikartojimo dažnis buvo 2 MHz, laiko rezoliucijos nustatymas buvo apytiksliai 100 ps, atsižvelgiant į laikinos dekonvoliucijos atlikimo metodiką.

Elektrocheminiai (amperometriniai) tyrimai buvo atlikti siekiant įvertinti GOx/Ppy stabilumą ir palyginti su nemonifikuota GOx. Tam tikslui buvo paruošta GOx/Ppy, GOx-indukuotos polimerizacijos tirpale susidedančiame iš 0,05 M Na-acetato buferio (pH 6,0), kurio sudėtyje yra 1,1 mg/ml gliukozės oksidazės, 16 mM gliukozės ir 236 mM pirolas. Po 24 valandų polimerizacijos, nucentrifugavus GOx/Ppy buvo pašalinti nesureagavę pirolas, gliukozė ir neapsivilkusi polipirolo nanodalelėmis gliukozės oksidazė. Po to, GOx/Ppy vėl buvo resuspenduotos tame pačiame 0,05 M Na-acetato buferyje.

Siekiant ištirti gliukozės oksidazės fermento aktyvumą paruoštuose GOx ir GOx/Ppy tirpaluose, buvo pasirinktas amperometrinis metodas: aptikimui naudoti dviejų tipų modifikuoti anglies elektrodai – (i) modifikuotas su gliukozės oksidaze ir (ii) modifikuotas su gliukozės oksidaze ir polipirolo nanodalelėmis.

Aukso nanodalelių suspensijos ir monosluoksnių padengtų poli(alilamino hidrochloridu) (PAH) ant žėručio lakštų analizė buvo atlikta taikant šiuos metodus: ekstinkcijos spektras buvo matuojamas naudojant spektrometrą SHIMADZU UV-1800 (SHIMADZU, Tokijas, Japonija); dalelių suspensijos koncentracija buvo nustatoma naudojant didelio tikslumo tankio matuoklį DMA 5000 M (Anton Paar, Graz, Austrija); Elektroforezės mobilumas kaip joninės jėgos ir pH funkcija buvo nustatomas naudojant Zetasizer Nano ZS (Malvern, Jungtinė Karalystė); SEM matavimai buvo atliekami naudojant JSM-7500F (JEOL, Tokijas, Japonija) mikroskopą, prieš tai mėginio sluoksnį padengiant plonu chromo sluoksniu siekinat užtikrinti gerą mėginio laidumą; aukso nanodalelių ant žėručio paviršiaus koncentracija buvo įvertinta naudojant atominės jėgos mikroskopą NT-MDT su SMENA B skenavimo galvute (NT-MDT, Maskva, Rusija);

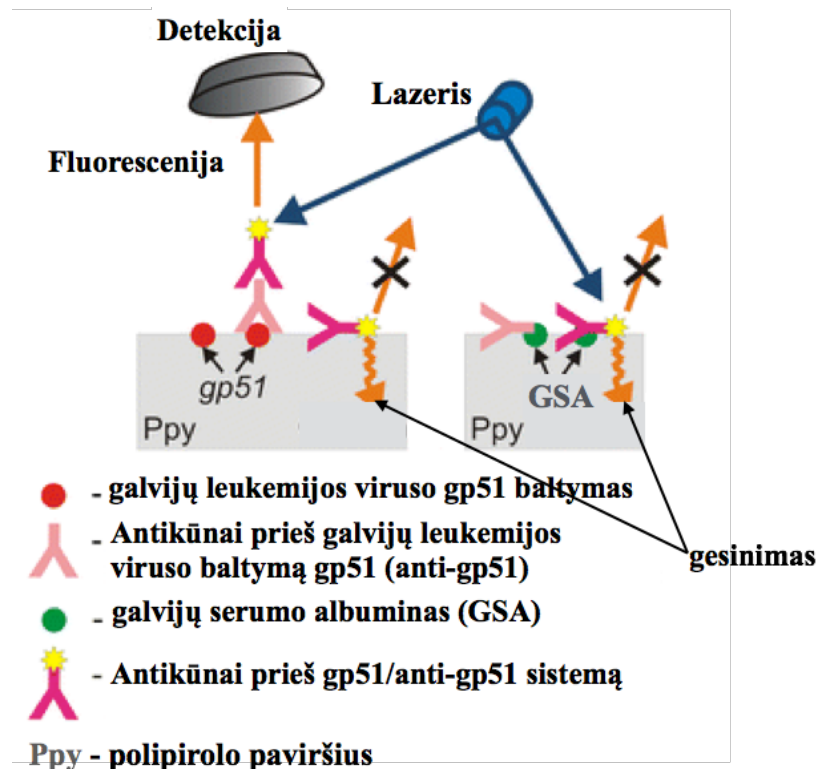
Laidaus polimero polipirolo kaip fluorescencijos gesiklio matricos tyrimas buvo atliktas naudojant tokias metodikas: Ppy buvo susintetintas elektrochemiškai ant paruošto platinos paviršiaus. Potenciostatas/galvanostatas „Pgstat 30“ (Echochemie /AUTOLAB, Utrechtas, Nyderlandai) buvo naudojamas elektrocheminiam ppy nusodinimui. Trijų elektrodų elektrocheminė celė, susidedanti iš (i) 1,0 mm skersmens platinos darbinio elektrodo ppy nusėdimui; (ii) platinos vielutės kaip pagalbinio elektrodo; (iii) Ag/AgCl/(prisotinto KCl) (AG/AgCl) palyginamojo elektrodo, buvo naudojami Ppy nusodinimui. Galvijų leukemijos viruso paviršiaus baltymo gp51 ant Ppy plėvelės elektrocheminis formavimas buvo atliktas tirpale susidedančiame iš 50 mmol⁻¹ pirolo, 100 mmol⁻¹ KCl ir 10 mgml⁻¹ gp51.

Antriniai antikūnai paženklininti krienų peroksidaze (KP) buvo naudojami antigeno-antikūno (gp51/Anti-gp51-AB) komplekso susidarymo indikacijai. Ppy/gp51 modifikuotas Pt substratas buvo laikomas 30 min serume sveikų arba galvijų leukemijos viruso infekuotų galvijų iki pusiausvyros sąlygos su gp51/Anti-gp51-AB buvo pasiektos. Pusiausvyra buvo pasiekta po 30 min tirpalo AB* inkubacijos. Kai ppy/gp51 sluoksnis buvo inkubuojamas kraujo serume galvijų leukemijos virusu (GLV) infekuotų galvijų, kurių sudėtyje yra anti-gp51-AB antikūnų, imuninės sistemos antigeno-antikūno (antrinio antikūno pažymėto krienų peroksidaze) komplekso (gp51/anti-gp51-ab/AB*) susidarymas buvo pasiektas.

Fluorescenciniams matavimams buvo naudojamas He–Cd lazeris (8 mW, 325 nm). Surinkta šviesa buvo išsklaidyta dvigubu monochromatoriumi (Jobin Yvon Modelis

HRD-1). Fluorescencijos intensyvumui stebėti buvo naudojamas Hamamatsu R1463P fotodaugintuvas, veikiantis naudojant fotonų skaičiavimo metodiką.

Ppy matrica gesina nespecifiškai adsorbuotų fluoroforų, kurie yra arti laidaus polimero – polipirolo – paviršiaus, fluorescenciją. Gesinimas silpnėja po fluoroforo atsiskyrimo nuo polipirolo paviršiaus, susidarant dideliems baltyminiams kompleksams. Principinė fluorescencijos schema pavaizduota pav. 1.

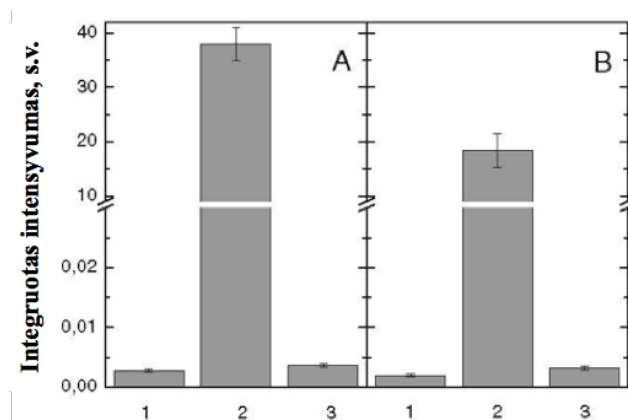


Pav. 1. Tirtos imunosenosios principinė veikimo schema.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1.1. Laidaus polimero kaip fluorescencijos gesimo matricos tyrimai.

Buvo tirtas fluorescencinių dažų (fluoresceino ir rodaminio B) fluorescencijos gesimas naudojant laidų polimerą polipirrolą (Ppy) kaip fluorescenciją gesinančią matricą. Ppy/gp51 fluorescencijos savybės buvo tiriamos prieš ir po poveikio fluoresceino tirpalu (pav. 2A). Taip pat panašūs eksperimentai buvo atlikti su Ppy/gp51 sluoksniu, kuris buvo apdorojamas rodaminio B tirpalu (pav. 2B) Pavyzdys su fluoresceino tirpalo lašu pasižymėjo dideliu fluorescencijos intensyvumu (2A pav., 2 stulpelis). Panašus fluorescencijos padidėjimas buvo pastebėtas, jeigu rodaminio B tirpalo lašas buvo nusodintas virš Ppy/gp51 sluoksnio (2B pav., 2 stulpelis).

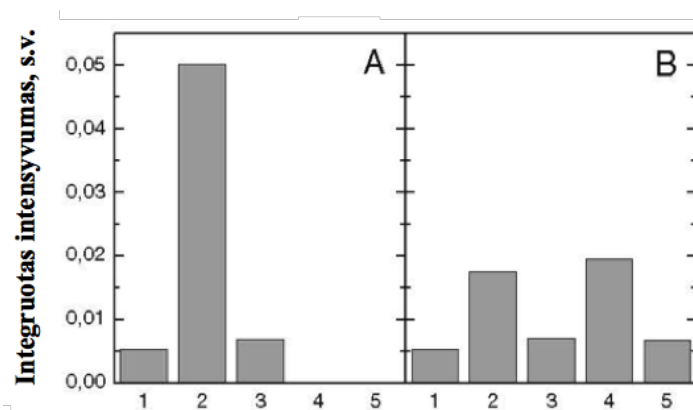


2 pav. Ppy/gp51 sluoksnio, paveikto (a) fluoresceinu ir (b) rodaminu B fluorescencijos spektrų integruotas intensyvumas (1) stulpelis prieš poveikį; (2) stulpelis po 30 min. inkubacijos su fluoresceino arba rodaminio B tirpalo lašu; (3) stulpelis po to, kai Ppy/gp51 sluoksnis buvo išdžiovintas.

Rezultatai aiškiai parodė, kad fluoresceino ir rodaminio B fluorescencijos gesimą įtakotą π - π šuolių Ppy polimero grandinėje. Panašus fluoresceino ir rodaminio B fluorescencijos gesimas buvo pastebėtas Ppy sluoksnyje be įterpto baltymo gp51. Eksperimento rezultatai parodė, kad laidus Ppy sluoksnis yra efektyvus fluorescuojančių molekulių, kurios yra pakankamai arti Ppy sluoksnio paviršiaus, gesintojas.

Antroje šio tyrimo dalyje buvo tiriamas krienų peroksidazės (KP) ir KP paženklintų antikūnų (Ab*), adsorbuotų ant Ppy/gp51 sluoksnio paviršiaus, fluorescencijos gesimas.

Ppy/gp51 sluoksnio su užlašintu KP tirpalo lašu fluorescencijos intensyvumas buvo žymiai didesnis prieš išgaruojant tirpikliui (3A pav., 2 stulpelis) negu išdžiūvusio Ppy/gp51 sluoksnio (3A pav., 3 stulpelis). Atitinkamai Ppy/gp51 sluoksnio su Ab* tirpalo lašu fluorescencijos signalas prieš išgaruojant tirpikliui buvo žymiai didesnis (3B pav., 2 ir 4 stulpeliai), negu išdžiūvusio Ppy/gp51 sluoksnio po to, kai išgaravo tirpiklis (3B pav., 3 ir 5 stulpeliai).



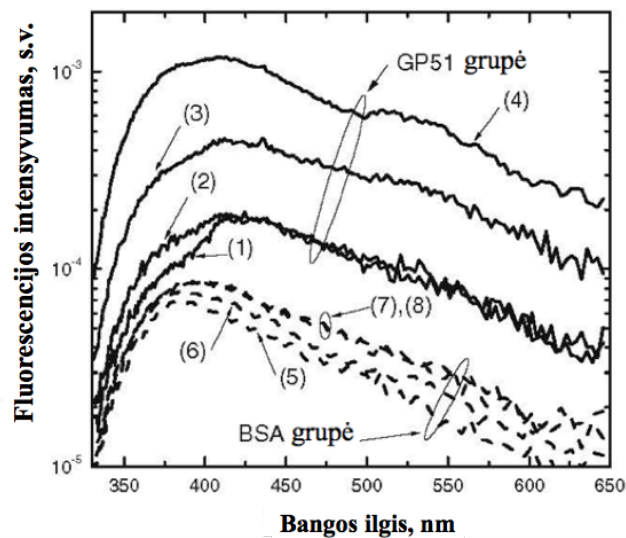
3 pav. Ppy/gp51 sluoksnio fluorescencijos spektro integruotas intensyvumas po įvairių apdorojimų naudojant fluorescencinę KP medžiagą. (a) Apdorojimas laisvu KP: (1) stulpelis prieš apdorojimą; (2) stulpelis su 2 μl lašu KP tirpalo; (3) stulpelis po to, kai tirpiklis išgaravo. (b) Apdorojimas naudojant KP, susijusį su antriniu antikūnu: (1) stulpelis prieš apdorojimą; (2) stulpelis su 2 μl lašu Ab*KP tirpalo; (3) stulpelis po to, kai tirpiklis išgaravo; (4) stulpelis po to, kai antrą kartą buvo pridėtas 2 μl lašas Ab*KP tirpalo prieš išdžiūstant Ppy/gp51 sluoksniui; (5) stulpelis po to, kai tirpiklis išgaravo antrą kartą.

Rezultatai, gauti KP nusėdus ant Ppy/gp51 (3A pav.) ir rezultatai, gauti KP-žymietiams antikūnams nusėdus ant panašaus Ppy/gp51 (3B pav.) sluoksnio parodo efektyvų KP fluorescencijos gesimą prie laidaus Ppy sluoksnio.

Tolimesni buvo Ppy, modifikuoto baltymais gp51 ir BSA, fluorescencijos tyrimai. Šio tyrimo tikslas buvo ištirti imunoanalizinės sistemos, pagrįstos Ppy su įterptu GLV baltymu gp51, fluorescenciją, patvirtinti antigeno /antikūno (gp51/anti-gp51–Ab) ir

antigeno/antikūno/antrinio (*gp51/anti-gp51-Ab/Ab**) antikūno kompleksų formavimąsi pagal aptiktą fermentinę KP veiklą.

4 paveikslo 3 kreivė parodo Ppy/*gp51* sluoksnio fluorescencijos intensyvumo padidėjimą po inkubacijos *Ab** tirpale. Ppy/*gp51/anti-gp51-Ab/Ab** sluoksnio spektro integruotas fluorescencijos intensyvumas yra 2,7 karto didesnis negu Ppy/*gp51* sluoksnio integruotas fluorescencijos intensyvumas. Eksperimentas su nespecifiniu *Ab** parodė, kad nespecifiškai adsorbuoto *Ab** fluorescencija buvo visiškai gesinama Ppy substratu (3 pav., 7 ir 8 kreivės).



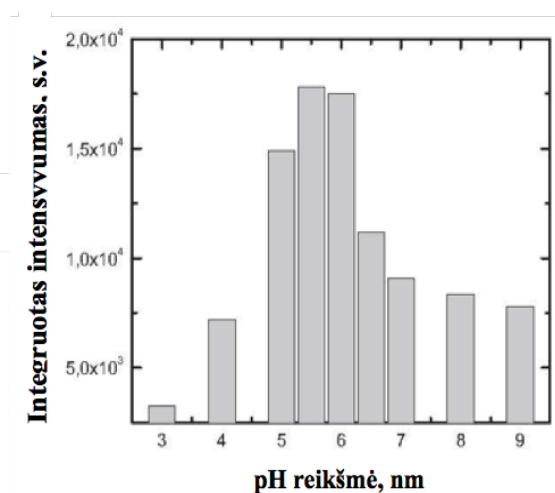
4 pav. Ppy sluoksnio, modifikuoto *gp51* (ištisinių linijų grupė) ir BSA (punktūrinių linijų grupė) fluorescencijos spektras. Ppy/*gp51* sluoksnio fluorescencijos spektras: (1) prieš apdorojimą; (2) po 30 min. inkubavimo GLV infekuoto gyvulio kraujo serume su *anti-gp51-Ab*; (3) po 30 min. inkubavimo KP paženklinto antrinio antikūno tirpale; (4) po 1 val. apdorojimo 1.0 mmol^{-1} 3,3',5,5' – tetrametilbenzidinu ir 10 mmol^{-1} H_2O_2 . BSA/Ppy sluoksnio fluorescencijos spektras: (5) prieš apdorojimą; (6) po 30 min. inkubavimo GLV infekuoto gyvulio kraujo serume; (7) po 30 min. inkubavimo KP paženklinto antrinio antikūno tirpale; (8) po 1 val. apdorojimo 3,3',5,5' – tetrametilbenzidino tirpalu.

1.2. Imuninio jutiklio, pagrįsto fermento, padengto laidžiu polimeru, fluorescencijos matavimai.

Buvo tiriama gliukozės oksidazės (GOx), padengtos polipirolo (Ppy) sluoksniu, fluorescencina. Polimerizacijos tirpalai buvo sudaryti iš keturių pagrindinių

komponentų: (i) polipirolo, kaip polimerizuojamo monomero; (ii) gliukozės oksidazės, kaip fermento, gaminančio vandenilio peroksidą; (iii) gliukozės, kaip redukuoto substrato; (iv) ištirpusio deguonies, kaip oksidacijos substrato.

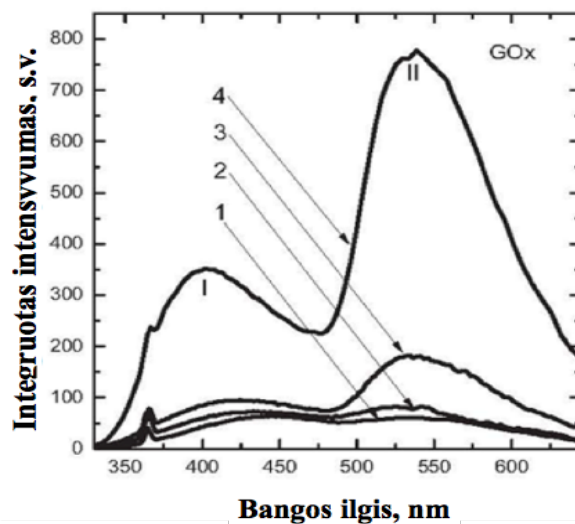
Dalyvaujant gliukozei ir ištirpusiam deguoniui, GOx pradėjo gaminti vandenilio peroksidą ir gliukono rūgšties laktoną (gliukono laktoną). Prie GOx aktyvios srities lokaliai pažemėjęs pH ir aukšta oksidatoriaus (H_2O_2) koncentracija sudarė optimalias sąlygas pirolo polimerizacijai ir savarankiškai GOx inkapsuliacijai polipirolo apvaskalu (Gox/Ppy-nanodalelės). Ištirta pH įtaką polimerizacijos tirpalų fluorescencijai (Pav. 5). Rezultatai parodė, kad pH GOx inicijuotam polipirolo formavimuisi buvo tinkamas plačiame diapazone nuo pH 3,0 iki 9,0.



5 pav. Fluorescencijos spektrų integruoto intensyvumo priklausomybė nuo pH reikšmės.

Atsižvelgiant į tai, kad rūgščioje terpėje pirolo polimerizacijos reakcija vyksta greičiau, daugiau Ppy yra pagaminama per tą patį periodą. Storesnis Ppy sluoksnis efektyviau mažina FAD fluorescencijos intensyvumą.

GOx denatūracijos procesas buvo tiriamas 14 dienų fiksuojant fluorescenciją. GOx fluorescencijos spektrai natrio acetato buferiniame tirpale prie 325 nm fotožadinimo yra pateikti 6 pav.

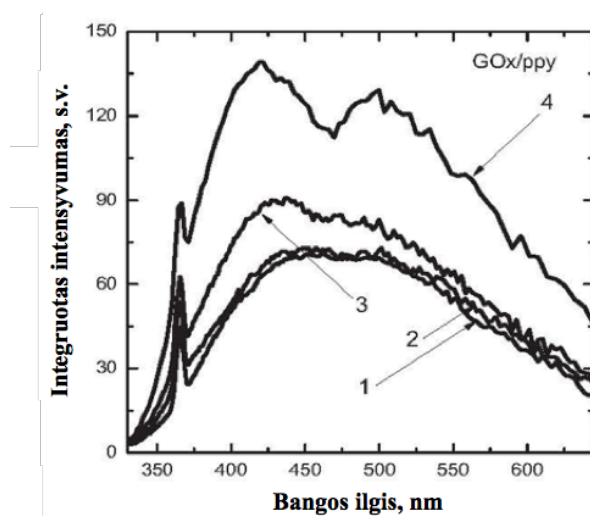


6 pav. GOx tirpalo fluorescencijos spektrai 0.05 natrio acetato buferiniame tirpale, pH 6, užfiksuoti tuoj pat po tirpalo paruošimo ir po to atitinkamai po 3, 6 ir 14 dienų. (1) Fluorescencijos spektrai po 1 dienos, (2) fluorescencijos spektrai po 3 dienų, (3) fluorescencijos spektrai po 6 dienų, ir (4) fluorescencijos spektrai po 14 dienų.

Fluorescencijos spektrai turi dvi pagrindines smailes. Spektro maksimumai, užfiksuoti pirmąją paruošimo dieną buvo užregistruoti ties 447 and 538 nm. Po 14 dienos spektas pasislenko mėlynos bangos ilgio link ir pakito atitinkamai ties 401 ir 535 nm. Yra žinoma, kad GOx pasižymi autofluorescencija ultravioletinėje ir regimojoje srityse. Dėl tirozino ir triptofano liekanų spektras pasislenka ties 401 nm, o dėl flavino liekanų spektras pasislenka ties 535 nm. Šiame tyrime pasirinktas žadinimas neapima tirozino ir triptofano liekanų žadinimo. Užfiksuotą GOx emisiją galima priskirti prie FAD fluorescencijos. FAD fluorescencija atitinka izoalaksazino molekulėje esančius $\pi - \pi^*$ perėjimus ir emisijos maksimumas ties 535 nm priskiriamas atsiskyrusiam FAD kofaktoriui. Fluorescencijos maksimumas ties 447 nm išlieka maždaug ties tuo pačiu bangos ilgiu ir yra labai panašus į aloksazino darinių ištirpintų vandenyje fluorescencijos maksimumą. GOx denatūracijos metu kofaktorių FAD atsiskiria. Fluorescencijos intensyvumas dėl FAD atsiskyrimo padidėja. 6 paveiksle matomi nežymūs pokyčiai praėjus 3 dienoms po GOx tirpalo paruošimo natrio acetato buferiniame tirpale, tačiau po 6 dienų proporcija tarp fluorescencijos pikų ties 447 and 535 nm smarkiai pasikeitė, ir fluorescencija ties 535 nm tapo dominuojančia. Po 14 dienų fluorescencijos formos ir intensyvumo spektrų pokyčiai tapo žymūs. Fluorescencijos intensyvumas gerokai išaugo ir fluorescencijos intensyvumas ties 535 nm piku padidėjo apie 14 kartų, lyginant su

fluorescencijos intensyvumu, išmatuotu pirmą dieną po tirpalo paruošimo. Šių spektrų analizė leidžia daryti prielaidą, kad po 14 dienų periodui didelė dalis gliukozės oksidazės fermento denatūravo ir FAD atsiskyrė nuo fermento.

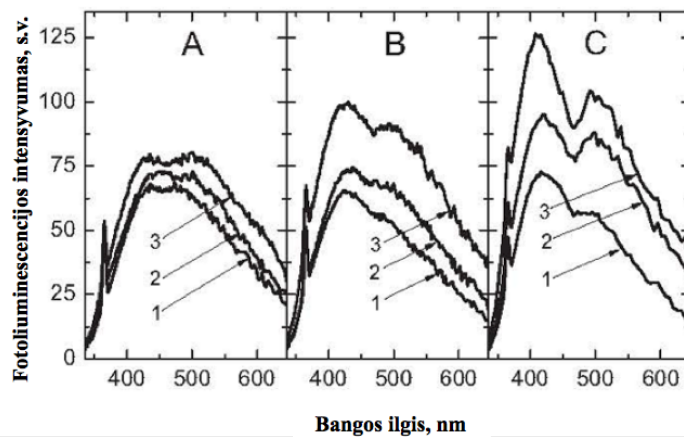
Biokatalizinės reakcijos metu pagamintas vandenilio peroksidas skatina pirolo polimerizaciją. Susiformavusių GOx/Ppy-nanodalelių kiekis didėja ilgėjant laiko tarpui dėl specialių sąlygų, tinkamų polimerizacijai GOx ir tirpalo sąveikoje. Polimerizacijos tirpalo fluorescencijos savybės buvo tiriamos 14 dienų laikotarpyje. Pav. 7. pateikti fluorescencijos spektrai polimerizacijos tirpalo paruošimo dieną ir po 3, 6 ir 14 dienų.



7 pav. Polimerizacijos tirpalo fluorescencijos spektrai, užfiksuoti tuoj pat po tirpalo paruošimo ir po to atitinkamai po 3, 6 ir 14 dienų. (1) Fluorescencijos spektrai 1 dieną, (2) fluorescencijos spektrai po 3 dienų, (3) fluorescencijos spektrai po 6 dienų, ir (4) fluorescencijos spektrai po 14 dienų.

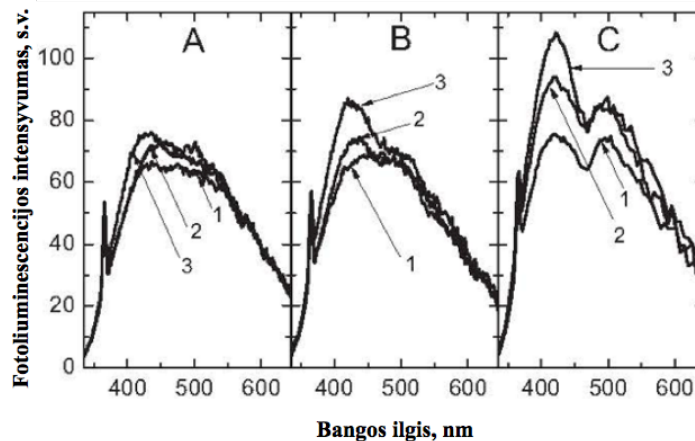
Didžiausi pokyčiai buvo užregistruoti po 14 dienų. Fluorescencijos spektre dominuoja dvi juostos su pikais ties 419 ir 500 nm. Fluorescencijos intensyvumas ties 419 nm padidėja iki 1,96 karto, lyginant su intensyvumu, buvusiu pirmąją dieną.

Taip pat buvo ištirta fluorescencijos priklausomybė nuo skirtingų sudėtinių tirpalo medžiagų kiekių. Buvo vertinama kiekvieno komponento koncentracijos įtaka fluorescencijos emisijos intensyvumui. 8 pav. parodyti polimerizacijos tirpalo su skirtingomis GOx koncentracijomis fluorescencijos spektrai.



8 pav. Fotoluminescencijos intensyvumo priklausomybė nuo GOx koncentracijos tirpale: (1) 0.57mg/ml, (2) 1.1mg/ml ir (3) 4.5mg/ml. Fluorescencijos spektrai, užfiksuoti po 3 dienų (A), 6 dienų (B) ir 14 dienų (C).

Kaip matyti iš 7 paveikslėlio, fluorescencijos intensyvumas didėja, didėjant GOx koncentracijai tirpale. Tai patvirtina prielaidą, teigiančią, kad fluorescencijos intensyvumas yra proporcingas fluorescuojančių molekulių skaičiui, t.y. tokių kaip kofaktorių FAD tirtoje sistemoje. 9 pav. pavaizduoti tirpalų su skirtingomis gliukozės koncentracijomis fluorescencijos intensyvumo spektrai.

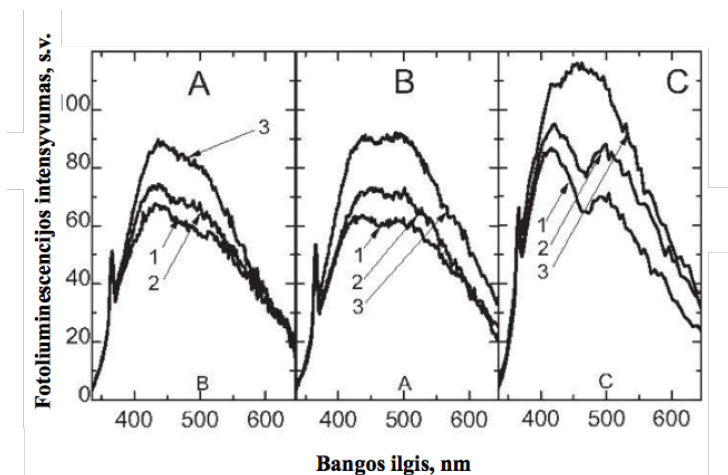


9 pav. Fotoluminescencijos intensyvumo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tirpale: (1) 28.2 mM, (2) 16.0 mM ir (3) 8.9 mM. Fluorescencijos spektrai buvo užfiksuoti po 3 dienų (A), 6 dienų (B) ir 14 dienų (C).

Fluorescencijos intensyvumas mažinant gliukozės koncentraciją padidėja ties 425 nm (pav. 9A-C). Gliukozė gesina FAD kofaktoriaus fluorescenciją. Pikių

intensyvumai ties 360 nm, priskiriami vandens molekulių svyravimų Ramano sklaidai, nedaug skiriasi visuose trijuose tirpaluose su skirtingomis gliukozės koncentracijomis.

10 pav. pateikiami fluorescencijos spektrai, kai pirola koncentracijos tirpale yra skirtingos. Ties trumpesniais bangos ilgiais pikų intensyvumas yra didesnis lyginant su ilgesniais bangos ilgiais.



10 pav. Fotoluminescencijos intensyvumo priklausomybė nuo pirola koncentracijos tirpale: (1) 119 mM, (2) 236 mM and (3) 464 mM. Fluorescencijos spektras buvo užfiksuotas po 3 dienų (A), 6 dienų (B) ir 14 dienų (C).

Fotoluminescencijos intensyvumas mažėja, mažinant pirola koncentraciją. Daroma prielaida, kad pirolas ženkliai sumažina GOx fluorescencijos gesinimą, įtakotą gliukozės.

Nemodifikuotos gliukozės oksidazės fluorescencija padidėja beveik 14 kartų matuojant tirpalą, praėjus 14 dienų nuo jo paruošimo. Tai sietina su santykinai greitu kofaktoriaus pasišalinimu iš gliukozės oksidazės fermento. Gliukozės oksidazės, dengtos polipirola sluoksniu, fluorescencija padidėja mažiau nei du kartus, per tą patį laikotarpį. Daroma išvada, kad šis “likutinis” fluorescencijos padidėjimas yra dėl neaktyvios GOx, kuri liko nepasidengusi Ppy sluoksniu ir todėl kofaktorių FAD laisvai galėjo disocijuoti iš fermento.

Siekiant nustatyti Ppy sluoksnio įtaką GOx stabilumui GOx/Ppy sistemoje, buvo atlikta GOx fermentų ir GOx/Ppy aktyvumų lyginamoji analizė (GOx ir GOx/Ppy buvo laikomi 20°C temperatūroje). Buvo pastebėta reikšminga GOx, padengtos Ppy sluoksniu, stabilizacija (1 lentelė).

	Pirma diena	Trečia diena	Šešta diena	Keturiolika diena
^a GOx tirpalas	8 ± 2 %	11 ± 2 %	21 ± 5 %	100 ± 10 %
^a Gox/Ppy suspensija	55 ± 5 %	56 ± 5 %	62 ± 8 %	100 ± 8 %
^b GOx tirpalas	100 ± 11 %	42 ± 5 %	22 ± 5 %	6 ± 4 %
^b Gox/Ppy suspensija	100 ± 8 %	84 ± 9 %	48 ± 5 %	25 ± 5 %

^aRezultatai gauti registruojant fotoluminiscencijos intensyvumą esant 500 nm bangos ilgiui; maksimali GOx ir GOx/Ppy fotoluminiscencija keturioliktą dieną yra normalizuota kaip 100%.

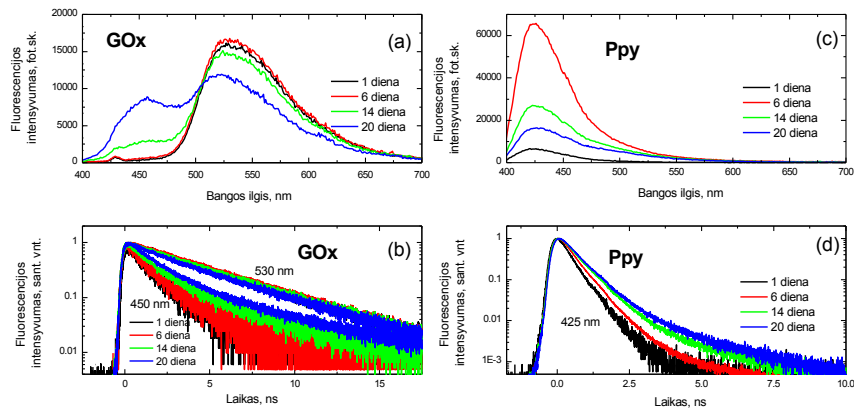
^bRezultatai gauti elektrocheminiais matavimais; didžiausias kiekvieno elektrodo tipo aktyvumas yra normalizuotas kaip 100%.

1 lentelė. GOx, esančios GOx tirpale ir GOx/Ppy suspensijoje santykinio katalizinio aktyvumo ir santykinų fluorescencijos signalų palyginimas, stebimas įvairiais inkubacijos laikotarpiais 20°C temperatūroje.

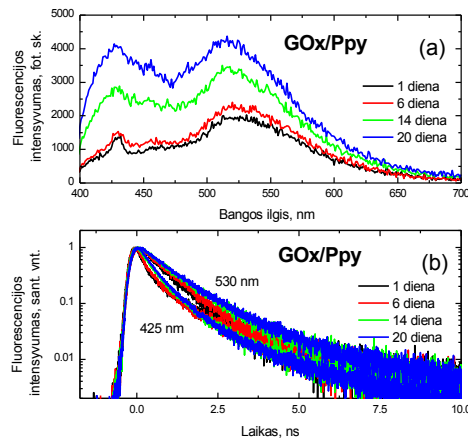
Vis dėlto bendras GOx aktyvumas žymiai sumažėjo, kai fermentas buvo padengtas Ppy, tačiau turėtų būti atsižvelgiama į tai, kad toks neveiklumo efektas dažniausiai yra stebimas jeigu fermentų substratai praeina polimerinius sluoksnius, o tai mažina substrato difuzijos greitį link fermento aktyvios srities.

Gliukozės oksidazės fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimai buvo atlikti ties fiksuotais 425 nm, 450 nm ir 530 nm bangos ilgiais. Fluorescencijos emisijos maksimumas nemodifikuotos gliukozės oksidazės yra ties 530 nm bangos ilgiu, kai žadinama ties 375 nm bangos ilgiu (pav. 11 (a)).

Gliukozės oksidazės fermentas pasižymi keliomis erdvinėmis konformacijomis, kurių metu aktyvusis centras FAD deformuojasi, gali būti ‘susuktos’ (spiralinės) arba ‘išvyniotos’ struktūros. Fluorescencijos relaksacijos kinetika ties 530 nm yra dviekponentinė su 1,3 ns ir 4,5 ns komponentėmis. Trumpa FAD fluorescencijos gesimo komponentė yra priskiriama ‘susuktos’ struktūros formai, o ilga – ‘išvyniotos’ struktūros formai.



11 pav. Nemodifikuotos gliukozės oksidazės (a, b) ir polipirola (c, d) fluorescencijos spektrai (a, c) bei fluorescencijos relaksacijos kinetikos (b, d) ir jų dinamika trijų savaitių laikotarpyje nuo tirpalo paruošimo dienos.



12 pav. Polipirolu modifikuotos gliukozės oksidazės fluorescencijos spektrai (a) bei fluorescencijos relaksacijos kinetikos (b) ir jų dinamika trijų savaitių laikotarpyje nuo tirpalo paruošimo dienos.

Polipirola fluorescencijos kinetika ties 425 nm bangos ilgiu (pav. 11 (d)) gėsta vienkspontentiškai su 0,4 ns charakteringu relaksacijos laiku. Jau po kelių dienų polipirola tirpale pradeda formuotis agregatai, kurie turi labai plačią fluorescencijos juostą ties 500 nm (pav. 11 (c)) su charakteringu fluorescencijos relaksacijos laiku apie 2 ns. Taip pat galima matyti polipirola kompleksų formavimo įtaka ir ties 425 nm – po kelių dienų fluorescencijos gesimo kinetika tampa neeksponentinė su 0,4 ns ir 2 ns relaksacijos laikais. Laikui bėgant 2 ns komponentės įnašas didėja. Polipirola fluorescencijos spektro intensyvumas po 6 dienų pradeda mažėti – tirpale formuojasi

didesni kompleksai, kurie stipriai pradeda gesinti polipirolo fluorescenciją.

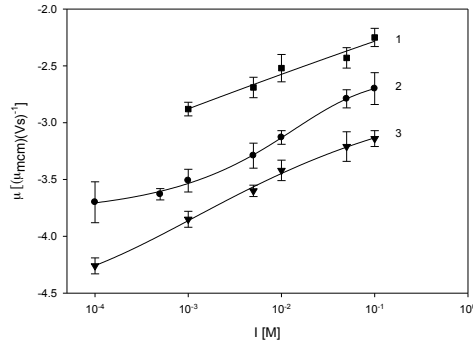
Suformavus polipirolo ir gliukozės oksidazės kompleksą, stebima 5-8 kartus silpnesnė fluorescencija (pav. 12 (a)). Fluorescencijos gesimas gerai aproksimuojamas dviejų eksponenčių modeliu, kurio charakteringosios gyvavimo trukmės τ yra 0,7 ns ir 2,5 ns. Polipirolas įtakoja fermento aktyviojo centro relaksacijos procesus. Eksponentinis narys, kurio gyvavimo trukmė apytiksliai lygi 2,5 ns, siejamas su FAD kofaktoriumi.

Palyginus nemodifikuotos ir modifikuotos polipirolo gliukozės oksidazės fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimus, matyti aiški polipirolo įtaka fluorescencijos intensyvumo bei gyvavimo trukmės sumažėjimui. Polipirolas efektyviai gesina gliukozės oksidazės fluorescenciją. Taip pat matome, kad polipirolas stabilizuoja fermentą, neleidamas aktyviam centrui FAD kofaktoriui greit pasišalinti iš gliukozės oksidazės.

1.3. Koloidinių aukso nanodalelių monosluoksnių formavimas ir nanodalelių nusodinimo kinetikos matavimai.

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama aukso mono- ir multi- sluoksnių formavimui paprastais ir patikimais metodais. Todėl labai svarbu visapusiškai įvertinti koloidinių nanodalelių elgseną nusodinimo ant paviršių metu. Papildomai prie dalelių dydžio, elektroforezinis molekulių judėjimas ir zeta potencialas (ζ) yra pagrindiniai parametrai dalelių stabilumo suspensijose kiekybiniam įvertinimui. Šiame tyrime elektroforetinis mobilumas buvo matuojamas, naudojant lazerinį Doplerio greitmatį (LDG technika). Kadangi joninė jėga yra svarbiausias parametras, kuris paveikia sąveiką tarp nanodalelių, elektroforezinio molekulių judėjimo priklausomybė nuo joninės jėgos įvairiems pH taip pat buvo nustatyta.

Kaip galima pastebėti (13 pav.), aukso dalelių elektroforezinio molekulių judėjimo didėja didinant joninę tirpalo jėgą nepriklausomai nuo jų pH.



13 pav. Aukso dalelių elektroforezinio mobilumo priklausomybė nuo joninės jėgos: 1) (■) pH 3.0, 2) (●) pH 5.9, 3) (▼) pH 9.0, $T=298\text{ K}$, tirpalo koncentracija 50 mg l^{-1} . Išvestos linijos nurodo eksperimentinių duomenų netiesinius atitikimus.

Zeta potencialo ζ parametras buvo vertinamas skaičiavimui naudojant Henry lygtį. Aukso nanodalelių išsamesniam apibūdinimui dvimatis elektrokinetinio krūvio tankis buvo apibrėžtas, naudojant lygtį:

$$\sigma_e = \frac{N_c}{\pi d_p^2}$$

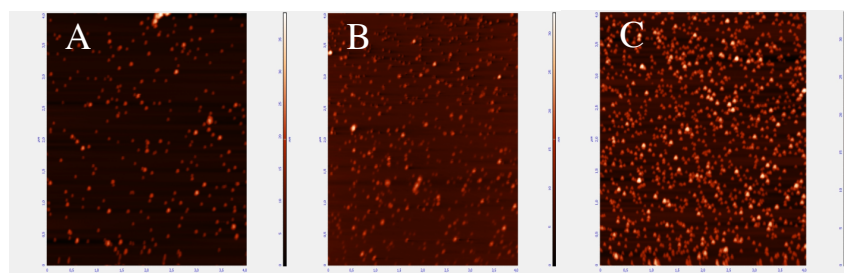
kur N_c – krūvių kiekis tenkantis vienai dalelei, d – dalelės skermuo.

Detalesnei analizei, elektroforezinio molekulių judėjimo ir krūvių tankių reikšmės plačiam joninės jėgos ir pH diapazonui pateiktos 2 lentelėje. Reikia pažymėti, kad anksčiau tokie duomenys mokslinėje literatūroje nebuvo pateikti.

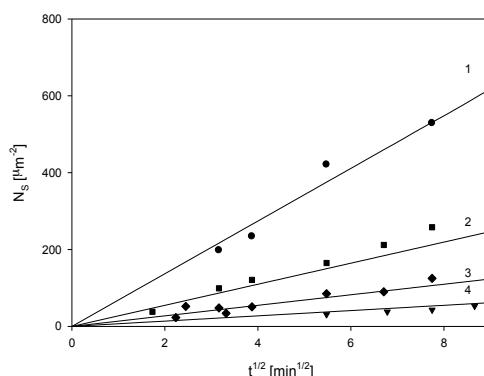
pH	joninė jėga [M]	$\mu_e, [\mu\text{m cm (Vs)}^{-1}]$	N_c	$\sigma [e\text{ nm}^{-2}]$	ζ_p [mV] Smoluchovskio modelis	ζ_p [mV] Henrio modelis
3	0.001	-2.88	-23	-0.0319	-36.7	-53.6
	0.005	-2.69	-21	-0.0298	-34.2	-48.6
	0.01	-2.52	-20	-0.0279	-32.1	-44.7
	0.05	-2.43	-19	-0.0269	-30.9	-39.9
	0.1	-2.25	-18	-0.0249	-28.6	-35.3
5.9	0.0001	-3.70	-29	-0.0410	-47.1	-70.4
	0.001	-3.51	-27	-0.0389	-44.7	-65.3
	0.005	-3.29	-26	-0.0364	-41.9	-59.4
	0.01	-3.13	-24	-0.0346	-39.8	-55.5
	0.05	-2.80	-22	-0.0310	-35.6	-45.9
9	0.01	-2.70	-21	-0.0299	-34.3	-47.8
	0.0001	-4.26	-33	-0.0472	-54.2	-80.9
	0.001	-3.85	-30	-0.0426	-48.9	-71.6
	0.005	-3.60	-28	-0.0398	-45.8	-64.9
	0.01	-3.42	-27	-0.0379	-41.2	-57.4
	0.05	-3.21	-25	-0.0355	-40.8	-52.6
	0.1	-3.14	-25	-0.0348	-39.9	-49.2

2 lentelė. Aukso nanodalelių elektroforezinis molekulių judėjimas, krūvis ir zeta potencialas skirtingoms joninėms jėgoms ($T=298\text{ K}$, koncentracija 50 mg l^{-1}).

Taip pat šiame tyrime buvo įvertinta aukso nanodalelių nusėdimo ant žėručio lakštų kinetika. Kaip galima matyti iš 14 pav., aukso nanodalelių skaičius ant žėručio sistemingai didėja, ilgėjant nusėdimo laikui. Kiekybiškai, kinetinės eigos, gautos skirtingoms suspensijų koncentracijoms, yra pateiktos 15 pav., kaip dalelių paviršiaus koncentracijos priklausomybė nuo kvadratinės šaknies iš adsorbcijos laiko.



14 pav. Aukso nanodalelių, adsorbuotų ant žėručio, modifikuoto PAH monosluoksniu, AFM vaizdai ($4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ skenavimo plotas): (A) nusėdimo laikas 6 min., (B) nusėdimo laikas 11 min., (C) nusėdimo laikas 25 min. Nusodinimo sąlygos: suspensijos koncentracija 20 mg l^{-1} , $\text{pH } 5.9$, $I = 10^{-2} \text{ M NaCl}$, $T = 293 \text{ K}$.



15 pav. Aukso nanodalelių adsorbcijos ant PAH modifikuoto žėručio kinetika, nustatyta įvairioms pradinėms suspensijos koncentracijoms: 1) (●) 50 mg l^{-1} , 2) (■) 20 mg l^{-1} , 3) (◆) 10 mg l^{-1} , 4) (▼) 5 mg l^{-1} , $I=10^{-2} \text{ M NaCl}$, $\text{pH}=5.9$, $T=293 \text{ K}$. Taškai žymi eksperimentinius rezultatus, gautus naudojant AJM; ištisinės linijos nurodo gautus teorinius duomenis, apskaičiuotus naudojant RSA modelį.

Kaip galima matyti, nanodalelių paviršiaus koncentracija didėja tiesiškai su $t^{1/2}$, su nuolydžiu, proporcingu tūrinei dalelių koncentracijai. Tai atitinka teorinius modelius (ištisinės linijos 15 pav.), kildinamus iš hibridinio modelio, kuriame tūrinės difuzijos

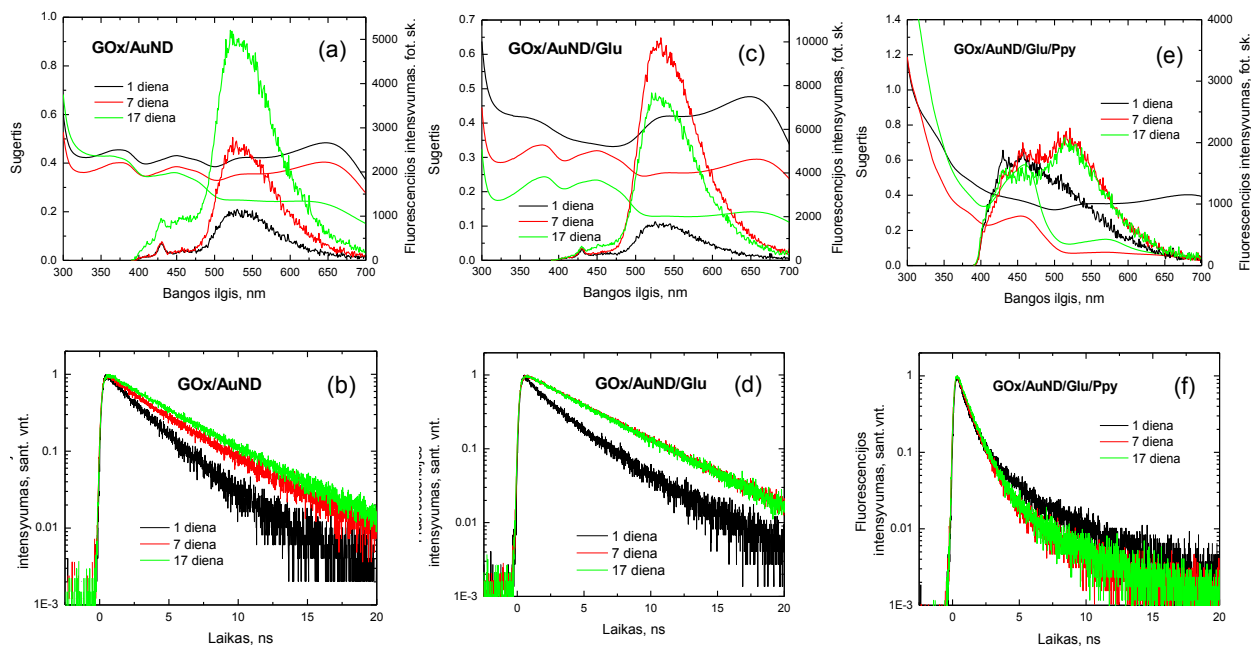
pernešimo lygtis, skaitmeniškai išspręsta baigtinių skirtumų metodu su ribine būkle (blokuojanti funkcija), yra gauta iš atsitiktinės sekos adsorbcijos (ATA) modelio.

Be to, aukso dalelių monosluoksnių maksimalus padengimas buvo nustatytas kaip joninės jėgos funkcija, naudojant AJM ir SEM vaizdus. 10^{-4} M NaCl koncentracijai maksimalus padengimas buvo 10%, didėjantis iki 13% 10^{-3} M NaCl koncentracijai, ir 15% 10^{-2} M NaCl koncentracijai. Gauti rezultatai parodė, kad yra įmanoma pagaminti norimo padengimo ploto aukso nanodalelių monosluoksnius, kontroliuojant tirpalų koncentraciją ir joninę jėgą.

1.4. Aukso nanodalelių, polipirolo ir gliukozė oksidazės kompozito fluorescencijos matavimai.

Efektyviai elektronų pernašai fermentinės reakcijos metu dažnai naudojamos aukso nanodalelės, kaip redoks mediatorius, kurios pasižymi dideliu elektrochemiškai aktyviu paviršiumi. Gliukozės oksidazės kofaktorius FAD, atsakingas už fermento fluorescenciją, kovalentiškai prisijungia prie aukso nanodalelių. Aukso nanodalelės leidžia fermento molekulėms laisvai judėti, taip padidindamos galimybę aktyvaus centro FAD prostetinėms grupėms lengvai sąveikauti su metaliniu nanodalelių paviršiumi. Tokiu būdu palengvėja elektronų pernaša. Matome, kad GOx fluorescencijos relaksacijos laikas didėja (pav. 16 (b)) nuo 2,6 ns iki 4,3 ns laikui bėgant, patvirtindamas FAD atsiskyrimą nuo fermento ir stabilizuoja 'išvyniotos' struktūros FAD kofaktorių. 16 ir 17 pav. iliustruoja, kad FAD išėjimas iš fermento centro paspartėja ~2 kartus, lyginant su kompozitu be aukso nanodalelių, dėl FAD elektronų sąveikos su aukso nanodalelėmis, tarsi efektyviau 'ištraukiančioms' elektronų pernašos pagalba aktyvųjį fermento centrą.

Papildomai pridėjus 16 mM gliukozės į gliukozės oksidazės ir aukso nanodalelių tirpalą fluorescencijos relaksacijos kinetika ties 530 nm (pav. 16 (d)) po 7 dienų nesikeičia ir vienksoponentiškai relaksoja su 4,6 ns gesimo trukme. Tai rodo, kad gliukozė pagreitina 'išvyniotą' FAD kofermento stabilizaciją. Taip pat galima pastebėti, kad gliukozė pristabdo redukuoto FAD atsiradimą (pav. 16 (c)).



16 pav. Gliukozės oksidazės ir aukso nanodalelių (a, b); gliukozės oksidazės, aukso nanodalelių ir gliukozės (c, d); gliukozės oksidazės, aukso nanodalelių, gliukozės ir pirolo (e, f) kompozito sugerties ir fluorescencijos spektrai (a, c, e) bei fluorescencijos relaksacijos kinetikos ties 530 nm (b, d, f) natrio acetato buferiniame tirpale prie 375 nm fotožadinimo, pH 6.

Pirolas (pav. 16 (e, f)) stipriai gesina FAD fluorescenciją. Fluorescencijos intensyvumas ties 530 nm sumažėja daugiau nei 2 kartus. Laikui bėgant aukso nanodalelės sustiprina FAD fluorescenciją ties 530 nm (pav. 16 (e)). Tai reiškia, kad FAD išėjimas iš fermento centro paspartėja ~2 kartus dėl FAD elektronų sąveikos su aukso nanodalelėmis.

IŠVADOS

- 1) Nustatyta, kad fermentą gliukozės oksidazę imobilizavus į polipirolo polimero matricą “fermentinės” polimerizacijos būdu gliukozės oksidazės flavino adenino dinukleotido kofaktoriaus pasišalinimas iš fermento aktyvaus centro žymiai suletėja.
- 2) Polipirolo pasluoksnis padidina fotoluminescencinių jutiklių jautrumą, kadangi gesina nespecifiškai absorbuotų medžiagų fotoluminescenciją.
- 3) Monodispersinių, sferinių, neigiamą paviršiaus krūvį turinčių aukso nanodalelių nusėdimo kinetikos procesas ant kieto paviršiaus yra kontroliuojamas difuzijos ir priklauso nuo pradinės aukso nanodalelių koncentracijos.
- 4) Koloidinės aukso nanodalelės pasižymi neigiamo paviršiaus krūvio stabilumu plačiame pH ir joninių jėgų ruože ir yra tinkamos polipirolo formavimuisi ant jų paviršių.

Autoriaus mokslinių darbų, apibendrintų daktaro disertacijoje, sąrašas.

Paskelbtos mokslinės publikacijos:

U. Bubniene, M. Ocwieja, B. Bugelyte, Z. Adamczyk, M. Nattich-Rak, J. Voronovic, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius (2013), Deposition of gold nanoparticles on mica modified by poly(allylamine hydrochloride) monolayers, pp. 204-210, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*.

A. Ramanavicius, N. Ryskevicius, A. Kausaite-Minkstiniene, **U. Bubniene**, I. Baleviciute, Y. Oztekin, Almira Ramanaviciene (2012), Fluorescence study of glucose oxidase self-encapsulated within polypyrrole, pp. 753-759, *Sensors and Actuators B: Chemical*.

A. Ramanavicius, N. Ryskevicius, Y. Oztekin, A. Kausaite-Minkstiniene, S. Jursenas, J. Baniukevicius, J. Kirlyte, **U. Bubniene**, A. Ramanaviciene (2010), Immunosensor based on fluorescence quenching matrix of the conducting polymer polypyrrole, pp. 3105-3113, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Parengti rankraščiai:

U. Bubniene, B. Bugelyte, P. Genys, A. Ramanavicius, Gold nanoparticle multilayers formation by Layer-by-Layer technique.

U. Bubniene, R. Karpicz, V. Gulbinas, A. Ramanavicius, Time-resolved fluorescence measurements of glucose oxidase self-encapsulated with conducting polymer polypyrrole.

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės:

N. Ryskevicius, **U. Bubniene**, S. Jursenas, J. Baniukevicius, J. Kirlyte, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Conducting polymer based fluorescence quenching matrix for immunosensor design, 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 25-29 Rugsėjis, 2011, Izmir, Turkija.

A. Ramanavicius, N. Ryskevicius, A. Kausaite – Minkstiniene, **U. Bubniene**, A. Ramanaviciene, Glucose oxidase self-encapsulated within polypyrrole research in fluorescence spectroscopy, 2nd International Conference on Competitive Materials and Technology Processes, 8 - 12 Spalis, 2012, Miskolc-Lillafüred, Vengrija.

U. Bubniene, M. Ocwieja, B. Bugelyte, Z. Adamczyk, M. Nattich, A. Ramanavicius, J. Voronovic, Metal Nanoparticle Adsorption Study, Bio-Tribocorrosion Training Courses - Conference, 11 -15 Vasaris, 2013, Ecole CentraleParis, Paryžius, Prancūzija.

U. Bubniene, B. Bugelyte, M. Ocwieja, Z. Adamczyk, M. Nattich, J. Voronovic, A.

Ramanavicius, Metal nanoparticle Characteristic Study for Fluorescence Applications, The International Conference of Young Chemists “Nanotechnology and Nanomaterials”, 7 -9 Gruodis, 2012, Palanga, Lietuva.

B. Bugelyte, **U. Bubniene**, M. Ocwieja, Z. Adamczyk, M. Nattich, J. Voronovic, A. Ramanavicius, Gold Nanoparticles Study of absorption kinetics, The International Conference of Young Chemists “Nanotechnology and Nanomaterials”, 7 -9 Gruodis, 2012, Palanga, Lietuva.

U. Bubniene, Z. Balevicius, A. Ramanaviciene, B. Bugelyte, A. Ramanavicius, Adsorption of gold nanoparticle multilayers, 2nd International conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 18 – 20 April, 2013, Kišiniovas, Moldova.

U. Bubniene, B. Bugelyte, A. Ramanavicius, Gold nanoparticle multilayers formation by Layer-by-Layer deposition technique, 18th International Scientific Conference “EcoBalt 2013”, 25 – 27 Spalis, 2013, Vilnius, Lietuva.

U. Bubniene, A. Ramanavicius, E.-J. Podlaha-Murphy, Synthesis of gold nanoparticles and deposition onto solid surfaces, IRSES FP7 workshop, Aleksandras Stulginskis University, Lapkričio 13 d., 2013, Kaunas, Lietuva.

U. Bubniene, R. Karpicz, V. Gulbinas, A. Ramanavicius, Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Polypyrrole Polymer Immobilized Glucose Oxidase, Functional Materials and Nanotechnologies Conference (FM&NT-2015), 5 - 8 Spalis, 2015, Vilnius, Lietuva. (priimta ir patvirtinta santrauka)

SUMMARY

Study of Polypyrrole based Biosensing Systems by Fluorescence Methods

In this work glucose oxidase enzyme self-encapsulated within polypyrrole polymer fluorescence measurement was investigated and it has been found that the enzyme glucose oxidase immobilized in the polypyrrole polymer matrix "enzymatic" polymerisation of glucose oxidase flavin adenine dinucleotide cofactor depletion of the active center of the enzyme significantly slowed down. This process was determined by time-resolved fluorescence measurements.

The conducting polymer polypyrrole was also used as a matrix for immobilization of BLV surface proteins *gp51* that enables biological recognition of the analyte, and as a fluorescence quencher, which increases the selectivity of fluorescence-based detection. In this study, bovine leukemia virus proteins *gp51* were immobilized within the Ppy matrix and formed a polymeric layer with affinity for antibodies against protein *gp51* (anti-*gp51*). Polypyrrole substrate increases the sensitivity of fluorescent sensors, since quenches non-specifically absorbed fluorescence materials.

Also in this work, gold nanoparticle influence on polypyrrole based biosensing systems were analysed, some aspects of nanoparticles absorbance onto surfaces were determined. The electrophoretic mobilities and electrokinetic charge of particles were quantitatively evaluated for a broad range of pH and ionic strength. Additionally, the maximum coverage of particle monolayers, which monotonically increased with ionic strength, was determined by SEM. The obtained data were in agreement with theoretical predictions derived from the random sequential adsorption (RSA) model. It was also confirmed that by varying the bulk suspension concentration and ionic strength one can prepare homogeneous gold particle monolayers of controlled coverage

Colloidal gold nanoparticles indicated stability of negatively charged surface for a broad range of pH and ionic strength and was suitable for polypyrrole polymer formation on their surface. The study of glucose oxidase, polypyrrole and gold nanoparticles system was examined by time-resolved fluorescence measurements.

Trumpas autoriaus aprašymas

Urtė Samukaitė-Bubnienė gimė Vilniuje. Baigė Vilniaus Salomėjos Nėries gimnaziją. 2004 metais įstojo į Edukologijos universitetą (buvęs Vilniaus pedagoginis universitetas), fizikos ir technologijos fakultetą (FTF), kuriame 2008 metais apgynė bakalauro diplominį darbą tema: “Fotoninių kristalų užpildytų 5CB skystuoju kristalu stop juostos padėties valdymas”. Tais pačiais metais įstojo tęsti tolimesnių studijų FTF magistrantūroje ir 2010 metais apgynė magistro diplominį darbą tema: “Nanostruktūrinių polimerų fluorescencinių savybių tyrimai”. Tais pačiais metais įstojo į chemijos krypties doktorantūrą Vilniaus universitete, chemijos fakultete, fizikinės chemijos katedroje, kurioje dirba iki šiol. Doktorantūros studijų metu stažavosi:

Katalizės ir paviršiaus chemijos institutas, Lenkijos mokslų akademija, Krokuva, Lenkija, 01/07/2012 – 30/09/2012.

Cheminės inžinerijos departamentas, *Northeastern* universitetas, Bostonas, JAV, 01/07/2013 – 31/10/2013.

Ecole Centrale Paris, Paryžius, Prancūzija, 11/02/2013 – 15/02/2013.