

DOI numeris <https://doi.org/10.15388/vu.thesis.310>

<https://orcid.org/0000-0001-7760-680X>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Indrė Aleknavičienė

Adsorbuotų biomolekulių tyrimas naudojant naujus Raman sklaidą stiprinančius paviršius

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2015 – 2020 metais Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Gintaras Valinčius (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

Prof. dr. Rasa Pauliukaitė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Dr. Julija Razumienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Prof. dr. Tautgirdas Ruzgas (Malmės universitetas, Švedija, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Doc. dr. Aušra Valiūnienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. birželio mėn. 8 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lietuva
Tel. +370 522 34420; el. paštas: info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

DOI numeris <https://doi.org/10.15388/vu.thesis.310>
<https://orcid.org/0000-0001-7760-680X>

VILNIUS UNIVERSITY

Indrė Aleknavičienė

Investigation of adsorbed biomolecules using new Raman scattering-enhancing substrates

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2015 and 2020 at the department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy at the Institute of Biochemistry, Vilnius University.

The dissertation is defended on an external basis

Academic consultant – Prof. Dr. Gintaras Valinčius (Vilnius University, Natural sciences, Biochemistry – N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

Prof. Dr. Rasa Pauliukaitė (Center for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry – N 003).

Dr. Julija Razumienė (Vilnius University, Institute of Biochemistry, Natural sciences, Biochemistry – N 004).

Prof. Dr. Tautgirdas Ruzgas (Malmö University, Natural sciences, Biochemistry – N 004).

Doc. Dr. Aušra Valiūnienė (Vilnius University, Institute of Biochemistry, Natural sciences, Biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 h on 8th June 2022 in meeting room R401 of the Life Science Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania.

Tel. +370 522 34420; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the Vilnius University Library as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

TURINYS	5
SANTRUMPŲ IR ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS	7
ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAS	11
UŽDAVINIAI	11
NAUJUMAS	11
LITERATŪROS APŽVALGA	12
1. Paviršiuje adsorbuotos molekulės	12
1.1. Savitvarkiai monosluoksniai.....	12
1.2. SAM sudarančių molekulių savybės.....	13
1.3. Paviršiai tinkami SAM formavimui.....	15
1.4. Alkantolių SAM savybių palyginimas ant Au ir Ag.....	16
1.5. SAM pritaikymas kuriant biologinių membranų modelius.....	18
2. Raman spektroskopija	20
2.1. Paviršiaus sustiprinta Raman sklaida (SERS).....	22
2.1.1. Raman signalo stiprinimo mechanizmai.....	22
2.2. SERS paviršių paruošimas.....	25
2.2.1. Elektrocheminis paviršių šiurkštinimas.....	25
2.2.2. Koloidiniai nanodalelių tirpalai.....	26
2.2.3. Nanodalelių imobilizavimas ant kieto pagrindo.....	28
2.2.4. Paviršių apdirbimas taikant litografijos technikas.....	29
2.2.5. Paviršių apdirbimas lazeriu.....	30
2.3. Savitvarkių monosluoksnių analizė SERS metodu.....	31
3. Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS)	33
3.1. EIS pritaikymas SAM ir tBLM tyrimuose.....	36
MEDŽIAGOS IR METODAI	39
4. Naudotos cheminės medžiagos ir tirpalai	39
4.1. Cheminės medžiagos.....	39
4.2. Tirpalai.....	39
5. Taikyti metodai	40
5.1. SERS substrato (jutiklio) paruošimas ir savybių tyrimas.....	40
5.1.1. SERS substrato paruošimas.....	40
5.1.2. SERS paviršiaus morfologijos vertinimas.....	41
5.1.3. SERS substrato savybių tyrimas.....	41
5.1.4. TF savitvarkių monosluoksnių desorbcija.....	42
5.1.5. SERS jutiklio signalo stiprinimo ir jo tolygumo tyrimas.....	42
5.2. Inkarinių savitvarkių monosluoksnių formavimas ir analizė.....	42

5.2.1.	Lygių sidabru dengtų plokštelių paruošimas	42
5.2.2.	Savitvarkių monosluoksnių formavimas	43
5.2.3.	Savitvarkių monosluoksnių SERS analizė.....	43
5.2.4.	Savitvarkių monosluoksnių RAIRS analizė	44
5.2.5.	Paviršiaus kontaktinio kampo įvertinimas.....	44
5.3.	tBLM formavimas ir elektrocheminė analizė.....	44
5.3.1.	tBLM formavimas ant mišrių SAM.....	44
5.3.2.	Elektrocheminė analizė	45
5.3.3.	tBLM vaizdinimas ir analizė AFM metodu.....	45
5.3.4.	EIS duomenų analizė	46
REZULTATAI		47
6. SERS substratai biomolekulių adsorbicijai		47
6.1.	SERS aktyvių substratų gavimas lazerinės abliacijos metodu	47
6.2.	SERS substrato morfologija	48
6.3.	Spektroskopinė SERS paviršių analizė	51
7. Inkariniai monosluoksniai fosfolipidinių membranų imobilizavimui		
sidabro paviršiuje.....		57
7.1.	Trumpagrاندžio alkantiolio parinkimas mišriam SAM formuoti	57
7.2.	Inkarinį SAM sudarančių molekulių spektroskopinė analizė.....	59
7.3.	Mišrių SAM analizė taikant EIS	66
8. tBLM konstravimas ir jų savybių tyrimas.....		73
8.1.	Mišrių SAM sudėties įtaka tBLM savybėms.....	74
8.2.	tBLM pritaikymas biologinių sistemų analizei	80
IŠVADOS		87
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....		88
APIE AUTORIŲ		106
SUMMARY.....		107
PADĖKA		157
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS		158

SANTRUMPŲ IR ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS

- ϵ – dielektrinė skvarba;
 λ – lazerio bangos ilgis, (nm);
 α – poliarizuojamumas;
3M1P – 3-merkpto-1-propanolis;
4M1B – 4-merkpto-1-butanolis;
6M1H – 6-merkpto-1-heksanolis;
9M1N – 9-merkpto-1-nonanolis;
AFM – atominės jėgos mikroskopija;
Ag/AgCl/KCl_{sotus} – palyginamasis sidabro chlorido elektrodas, sočiame KCl tirpale;
 $\arg Y_{\min}$ – laidumo fazės absoliuti vertė minimumo taške;
C – talpa;
CA – kontaktinis kampas;
CDC – nuo cholesterolio priklausomi citolizinais;
Chol – cholesterolis;
CPE – pastovios fazės elementas;
C_{SAM} – savitvarkių monosluoksnių kompleksinė talpa;
DOPC – 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinai;
EI – elektrocheminis impedansas;
EIS – elektrocheminė impedanso spektroskopija;
EM – elektromagnetinis stiprinimo mechanizmas;
EO – etilenoksido fragmentas;
f – dažnis (Hz);
FWHM – virpesinės juostos plotis ties puse aukščio, (angl. full width at half-maximum);
G – goš konformacija;
HOMO – aukščiausia užpildyta orbitalė (angl. highest occupied molecule orbital);
Y – laidumas (admitansas);
IR – infraraudonoji spektroskopija;
LUMO – žemiausia neužpildyta orbitalė (angl. lowest unoccupied molecular orbital);
MLV – daugiasluoksnės lipidinės liposomos, (angl. multilamellar lipid vesicles);
 N_{def} – defektų tankis;
P – dipolio momentas;
RAIRS – atspindžio-sugerties infraraudonoji spektroskopija;
SAM – savitvarkis monosluoksnis, (angl. self-assembled monolayer);
SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas;
SERS – paviršiaus sustiprinta Raman sklaida (angl. surface-enhanced Raman scattering);
T – trans konformacija;

tBLM – paviršiuje imobilizuota dvisluoksnė lipidinė membrana (angl. tethered bilayer lipid membrane);
TDM – pereinamasis dipolinis momentas;
VLY – vaginolizinas;
WC14 – 20-tetradeciloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano 1-tiolis, (žr. 22 pav.);
Z – impedansas;
 β ME – β -merkaptoetanolis;
 δ – deformacinis virpesys;
 ε – dielektrinė skvarba;
 v – valentinis virpesys;
 v_{as} – valentinis asimetrinis virpesys;
 v_s – valentinis simetrinis virpesys;
 C' (C_{re}) – reali talpos komponentė;
 C'' (C_{im}) – menama talpos komponentė;
 Z' – reali impedanso komponentė;
 Z'' – menama impedanso komponentė;
 $\tilde{\nu}$ – bangos skaičius, (cm^{-1})

ĮVADAS

Tauriųjų metalų paviršių funkcionalizavimas formuojant nuo kelių iki kelių šimtų nanometrų storio organinių molekulių plėveles pastaraisiais dešimtmečiais sulaukia itin daug tyrėjų dėmesio. Pagrindinis iššūkis – išanalizuoti ir suprasti įvairių medžiagų paviršiuose vykstančius molekulių susirinkimo bei savitvarkos procesus. Gerai suvokus šių procesų fundamentinius dėsnius molekulių lygmenyje, adsorbuotų molekulių principas gali būti praktiškai taikomas skirtingose srityse: optoelektroninių įrenginių kūrime, molekulinio lygmens elektronikoje, biosensoriuose, chemiškai modifikuotų implantuojamų medžiagų kūrime ir kt. Vienas iš būdų tauriųjų metalų paviršių funkcionalizavimui yra organinių (hidrofilinių arba hidrofobinių) savitvarkių monosluoksnių formavimas. Savitvarkiai monosluoksniai (SAM) – tai medžiagų paviršiuose spontaniškai susirenkantys molekulių sluoksniai, kuriems būdinga bendra organizacija ir orientacija paviršiaus atžvilgiu. Tokių struktūrų susiformavimas yra nulemtas stiprios chemisorbcijos tarp substrato ir organinės molekulės gale esančios funkcinės grupės. Vykstant šiai sąveikai, paviršiuose suformuojami labai ploni organiniai sluoksniai, kurių storis gali būti tiksliai kontroliuojamas, parenkant skirtingo ilgio molekules. SAM pritaikymo galimybės tiesiogiai priklauso nuo juos sudarančių molekulių savybių – cheminės struktūros ir orientacijos substrato atžvilgiu.

Savitvarkiai monosluoksniai yra plačiai naudojami paviršiuje imobilizuotų dvisluoksnių lipidinių membranų (tBLM) modelių kūrimui. SAM dažniausiai sudaro ilgi inkariniai junginiai, kurie hidrofobinėmis dalimis įsiterpia į lipidinį dvisluoksnį ir pritvirtina jį prie paviršiaus per kovalentinius metalo-sieros, disulfido, -silano ir kitus cheminius ryšius. Inkariųjų junginių tankiui ir pasiskirstymui paviršiuje reguliuoti yra naudojamos paviršinės skiediklio molekulės. Šiam tikslui dažnai pritaikomi trumpi hidrofiliniai tioliniai junginiai – pavyzdžiui, β -merkaptoetanolis. Tokie savaimė susirenkantys molekuliniai konstruktai paviršiuose suteikia technologinę platformą lipidinių dvisluoksnių suformavimui. tBLM fizikinius parametrus ir jų pomembraninio rezervuaro savybes lemia inkarinio savitvarkio monosluoksniu sudėtis ir cheminė struktūra. Parinkus skirtingas mišraus SAM inkarinio junginio/paviršinio skiediklio sudėtis ir koncentracijas, užtikrinamas pakankamas pomembraninio jonų rezervuaro palaikymas, bei sumažinamas paviršiaus šiurkštumo poveikis membranų tolygumui. Be to, išlaikomas reikalingas membranos takumas, kuris svarbus membraninių baltymų įsiterpimui. tBLM modeliai yra laikomi perspektyvia eksperimentine platforma kuriant biosensorius ir gali būti taikomi atliekant platus spektrą

biofizinių eksperimentų, tokių kaip baltymų (peptidų) ir membranos sąveika, antigenų ir antikūnų surišimas, lipidų fazių virsmai ir kt. Suformavus tBLM ant laidžių metalinių paviršių, galima stebėti biologiškai svarbius reiškinius taikant didelio jautrumo elektrocheminius ir spektroskopinius metodus.

Savitvarkių monosluoksnių, o tuo pačiu ir tBLM formavimui yra naudojami įvairūs substratai – auksas (Au), sidabras (Ag) ar varis (Cu). Geriausiai ištirtinėti ir plačiausiai naudojami yra auksu dengti substratai. Auksas lengvai funkcionalizuojamas naudojant molekules turinčias tiolio grupes. Be to, auksas yra pakankamai chemiškai inertiškas metalas, todėl lyginant su kitais metalais sunkiau oksiduojasi ore ir sąveikoje su biologiniais skysčiais. Nepaisant šių privalumų, auksas pasižymi itin aukšta kaina ir polinkiu į mikrobiologinį užsiteršimą. Tai skatina ieškoti alternatyvų, kurios ne tik sumažintų kainą, tačiau išlaikytų ir daugumą geriausių aukso savybių. Sidabras yra antras po aukso geriausiai ištirtas ir plačiai taikomas metalas. Pagrindinis sidabro trūkumas yra greita oksidacija ore. Dėl šios priežasties šis metalas yra rečiau naudojamas SAM formavimui. Tačiau dėl palankių plazmoninių ir optinių savybių, sidabriniai paviršiai gali būti pritaikomi ir analizuojami dauguma optinių ir spektroskopinių metodų – paviršių plazmonų rezonansu (SPR), paviršiaus sustiprinta Raman sklaida (SERS) ir paviršiaus sustiprinta infraraudonosios sugerties spektroskopija (SEIRA). Svarbu paminėti, kad sidabro atveju, paviršiaus plazmonai yra sužadunami platesniame šviesos bangų ilgių diapazone (nuo UV iki IR), o aukso – tik raudoname ruože nuo ~ 600 nm. Be to, Ag paviršiai ne tik pasižymi reikšmingai didesniu Raman signalo stiprinimo efektyvumu, lyginant su Au, tačiau gali reikšmingai slopinti fluorescencijos sukeltus trikdžius. Geros Ag šilumos laidumo savybės, suteikia pranašumo paviršius veikiant didelės galios, ilgų bangų lazerine spinduliuote, nes stebima mažesnė šviesos absorbcija bei sumažinamas paviršiaus temperatūros kilimas, taip apsaugant tiriamus pavyzdžius nuo perkaitimo. Šie sidabro privalumai išplečia pritaikymo galimybes ir leidžia to paties mėginio analizei naudoti skirtingas metodologijas. Būtent skirtingų tiek spektroskopinių, tiek elektrocheminių metodų pritaikymas suteikia išsamų analitinį vaizdą ir leidžia paviršiuje imobilizuotas molekules įvertinti visapusiškai, bei dar geriau suprasti monosluoksnių charakteristikas ir tolesnio pritaikymo galimybes.

Vienas tokių metodų – paviršiaus sustiprinta Raman spektroskopija, kuris leidžia metalų paviršiuose aptikti mažas molekulių koncentracijas, analizuoti tarp molekulinę sąveiką, molekulių ir jų funkcinių grupių orientaciją bei konformacijos kitimus. SERS spektro kokybė, stabilumas ir duomenų atsikartojamumas didžiąja dalimi priklauso nuo to, kaip paruoštas metalo

paviršius. Norint patikimai analizuoti SERS substratų paviršiuose adsorbuotas biomolekules – labai svarbu paruošti tokius substratus, kurie tolygiai stiprintų signalą visame aktyviame plote. Pasiiekus aukštą signalo stiprinimo tolygumą ir atsikartojamumą, užtikrinama, kad registruojamas biomolekulių SERS spektras, bet kuriame aktyviosios zonos taške parodys patikimą rezultatą. Siekiant vykdyti didelės apimties biocheminius analitinius tyrimus, labai svarbu, kad SERS paviršių paruošimo metodas būtų greitas, paprastas ir pigus.

DARBO TIKSLAS

Šio darbo tikslas buvo sukurti biomolekulių analizei tinkamus sidabrinius SERS substratus ir juos panaudoti tiriant mišrių inkarinių monosluoksnių pritaikomumą funkcionaliems tBLM modeliams ant sidabro konstruoti.

UŽDAVINIAI

1. Paruošti sidabrinius SERS substratus ir juos charakterizuoti.
2. Atlikti inkarinių savitvarkių monosluoksnių (SAM) struktūros tyrimus vibracinės spektroskopijos metodais.
3. Nustatyti tinkamas mišrių SAM sudėtis tBLM formavimui ant sidabro paviršiaus.
4. Ištirti suformuotų tBLM bioelektrochemines savybes ir biologinį tikroviškumą.

NAUJUMAS

Šiame darbe sukūrėme naują SERS substratų paruošimo būdą, naudojant plačiai paplitusią pigią žaliavą – natrio-kalcio silikatinį stiklą. Šiuo metodu galima greitai pagaminti didelius kiekius tolygios, atsikartojančios nanostruktūros paviršių, kuriuos padengus sidabro dangą, gaunami substratai tinkami SERS matavimams. Pasiiektas optimalus SERS signalo stiprinimo faktorius, kuris vidutiniškai siekia $\sim 3 \times 10^5$ visame aktyviajame substrato plote. Naudojant šiuos SERS substratus sukūrėme ir charakterizavome naujus pasirinktus skirtingus mišrius savitvarkius monosluoksnius, kurie galėtų būti taikomi tBLM modelių konstravimui ant sidabro dangos, nesukeliant jos korozijos bei užtikrinant stabilumą laike. Pasitelkę elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodą, įrodėme, kad taikant mūsų pasirinktus mišrius savitvarkius monosluoksnius, galime suformuoti funkcionalius ir biologiškai tikroviškus biologinių membranų modelius ant sidabro, kurie galėtų būti taikomi analitiniams biocheminiams tyrimams.

LITERATŪROS APŽVALGA

1. Paviršiuje adsorbuotos molekulės

Organinių junginių adsorbcija paviršiuose – tai sritis pastaraisiais metais sulaukianti vis daugiau tyrėjų dėmesio [1,2]. Pagrindinis iššūkis – išanalizuoti ir suprasti įvairių medžiagų paviršiuose vykstančius molekulių susirinkimo bei savitvarkos procesus. Gerai suvokus šių procesų fundamentinius dėsnius molekulių lygmenyje, adsorbuotų molekulių principas gali būti praktiškai taikomas skirtingose srityse: optoelektroninių įrenginių kūrimo [3], molekulinio lygmens elektronikoje [4], nanomechaniniuose biosensoriuose [5], chemiškai modifikuotų implantuojamų medžiagų kūrimo [6,7] ir kt.

Nedidelių neorganinių junginių, tokių kaip NO, CO ir O₂, N₂ adsorbcijos savybės (fizisorbcija, chemisorbcija, difuzija, desorbcija, disociacija) skirtinguose paviršiuose yra pakankamai plačiai ištirtos ir suprastos [8–10]. Tačiau, apie didesnių organinių molekulių adsorbcijos fizikines ir chemines savybes yra žinoma mažiau. Lyginant su mažomis molekulėmis, organinių molekulių adsorbcijos ir santvarkos paviršiuose varomosios jėgos skiriasi. Nedidelių neorganinių junginių pertvarkas paviršiuose dažniausiai nulemia krūvių pernašos tarp substrato ir adsorbato. Organinių junginių adsorbciją paviršiuose dažniau apibrėžia nekovalentinės [11–13] ir kovalentinės [14] sąveikos. Be to, proceso specifika ir didelių organinių molekulių tvarkumas monokristalinių medžiagų paviršiuose priklauso nuo paviršių sandaros ir orientacijos [15–17]. Labai svarbu įvertinti ne tik adsorbuojamų molekulių sąveiką su paviršiais, bet ir molekulėms būdingas tarpusavio sąveikas (dažniausiai nekovalentines – van der Valso [18–20] arba vandenilines [16,21,22]). Specifinė laterali šoninių grupių sąveika (pvz. vandeniliniai ryšiai) nulemia organinių molekulių susirinkimą į gerai organizuotas savitvarkes nanostruktūras, pasižyminčias skirtingomis chiralinėmis savybėmis [22,23] arba specifiskumu kitoms tiriamoms molekulėms [24–26].

Toliau šiame skyriuje detaliau aptarsime gerai organizuotus savitvarkius molekulių sluoksnius paviršiuose ir jų savybes.

1.1. Savitvarkiai monosluoksniai

Savitvarkiai monosluoksniai (SAM) – tai medžiagų paviršiuose spontaniškai susirenkantys molekulių sluoksniai, kuriems būdinga bendra organizacija ir orientacija paviršiaus atžvilgiu. Tokių struktūrų susiformavimas yra nulemtas stiprios chemisorbcijos tarp substrato ir organinės molekulės gale esančios funkcinės grupės. Vykstant šiai sąveikai, paviršiuose suformuojami labai ploni organiniai sluoksniai, kurių storis gali

būti tiksliai kontroliuojamas, parenkant skirtingo ilgio molekules [27,28]. Iš karto po suformavimo, savitvarkiai monosluoksniai pasižymi dideliu tvarkumu, tačiau būtina pažymėti, kad tai yra dinamiškos struktūros, kurių struktūra ir organizacija kinta laike, ypač panardinus į skysčius [29,30].

Šis paprastas būdas gauti gerai apibrėžtą, tvarkų paviršių, tiesiog panardinus substratą į praskiestą (~ 1 mM) adsorbato tirpalą kambario temperatūroje, pastaruosius dešimtmečius naudojamas tiriant kelis esminius reiškinius, pavyzdžiui – nuo atstumo priklausomą elektronų pernašą [31], vieno elektrono tranzistoriaus mechanizmus [32], elektronų pernašos procesus fazių riboje [33]. SAM svarbūs ne tik nagrinėjant fundamentinius reiškinius bet ir kuriant biologinius ir elektrocheminius jutiklius [34–36], molekulinės elektronikos įrenginius [37–39], ląstelių [40–43] ar biologinių membranų [44,45] biocheminius modelius. Savitvarkius monosluoksnius sudarančių molekulių tarpusavio sąveikos gali pakeisti substrato savybes [46]. Dėl šios priežasties SAM naudojami norint iširti ir pakeisti įvairias paviršių technines charakteristikas, pavyzdžiui drėkinimą ir nusidėvėjimą [47], kuriant antikorozinus [48,49], elektriškai izoliuojančius [50] ir antiadhezinius [51] sluoksnius.

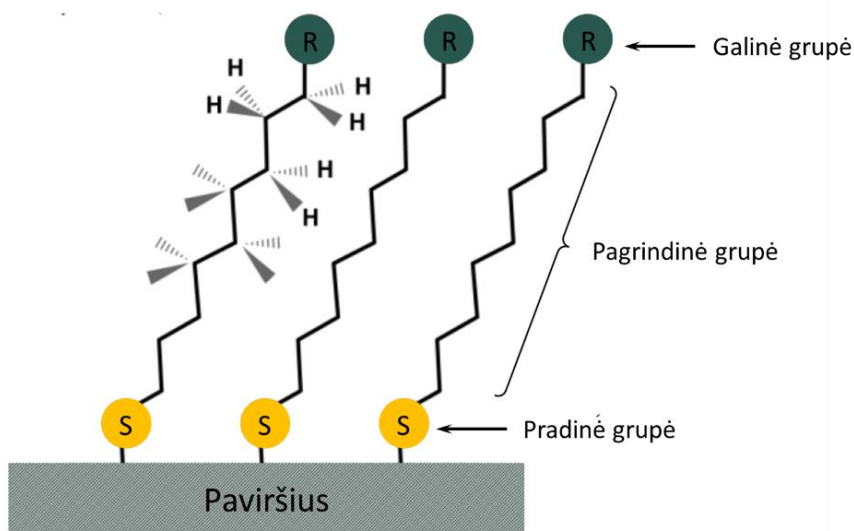
1.2. SAM sudarančių molekulių savybės

Savitvarkių monosluoksnių pritaikymo galimybės tiesiogiai priklauso nuo juos sudarančių molekulių savybių – cheminės struktūros ir orientacijos substrato atžvilgiu. Paprastai šias molekules sudaro trys pagrindiniai struktūriniai elementai (1 pav.) [36,52] :

- Pradinė grupė – stipriai jungiasi prie substrato. Dažniausiai sudaryta iš tiolio, disulfido, amino, silano, fosfato, karboksirūgšties ar kitų funkcinių grupių, kurios su paviršiumi sudaro kovalentinį ryšį [46]. Tioliai sudaro metalo-sieros ryšį, kuris ne tik stabilizuoja paviršiaus atomus bet keičia ir elektrines savybes. Tokius ryšius gali sudaryti ir sulfidai, disulfidai ir kt. [53].
- Galinė grupė – nulemia sluoksnio chemines savybes, dalyvauja sąveikoje su tirpikliu fazių riboje, modifikuoja paviršius ir sudaro galimybę prijungti kitas biomolekules bei vykdyti įvairias chemines reakcijas [50]. Literatūroje aprašoma daugybė skirtingų galinių grupių pvz: CH₃, CF₃, COOH, OH, Cl, Br, NH₂, įvairūs aromatiniai žiedai ir kt. Visos šios grupės suteikia SAM skirtingas savybes ir išplečia funkcionalumą [30,52,54]. Šioje pozicijoje esanti karboksirūgšties grupė (-COOH) yra svarbi įvairių

biomolekulių, baltymų ir ląstelių prijungimui prie monosluoksniu paviršiaus. Kitai kategorijai priklauso molekulės, turinčios hidrofobines angliavandenilių grandines. Jų funkcija yra įsiterpti į lipidines membranas ir jas imobilizuoti prie paviršiaus [55].

- **Tarpinė grupė** – jungia pradinę ir galinę grupes bei yra atsakinga už sluoksnio storį ir savitvarką. Be to, veikia kaip fizinis barjeras, keičia elektrinį laidumą bei optines sistemos savybes. Ją sudaro kelių ar keliolikos anglies atomų ilgio angliavandenilinė grandinė, kuri gali būti tiek alifatinė tiek aromatinė [38]. Ilginant alifatinę grandinę, stiprėja hidrofobinė sąveika tarp molekulių. Grandinėje esant dešimčiai ar daugiau metileno grupių, formuojamas kompaktiškas, mažiau defektų turintis monosluoksnis, kuris išlieka stabilus ore ilgesnį laiką [56,57]. Alifatinės grandinės sudėtyje esant kitoms cheminėms grupėms (pvz. amidinėms), tarp molekulių susidaro papildomi vandeniliniai ryšiai, kurie didina sistemos stabilumą [58].



1 pav. Schematinis paviršiuje adsorbuoto SAM vaizdas.

Tinkamai parenkant aukščiau aptartų grupių derinius molekulėse, galime keisti savitvarkių monosluoksnių savybes ir paskirtį. Svarbu pabrėžti, kad monosluoksniu struktūra priklauso ne tik nuo jį sudarančių organinių molekulių ypatybių bet ir nuo naudojamų paviršių morfologijos (makroskoppinės struktūros, defektiškumo ir kt.).

1.3. Paviršiai tinkami SAM formavimui

Savitvarkių monoslukšnių formavimui yra naudojami įvairūs substratai. Substratus dažniausiai sudaro paviršius, palankus SAM formavimui ir pagrindas palaikantis tą paviršių. Pagrindų tipai gali būti įvairūs: nuo plokščių paviršių (stiklo arba silicio plokštelės, laikančios plonas metalų plėveles, metalines folijas ar pavienius kristalus) iki labai išreikštų nanostruktūrų (koloidų, nanokristalų, nanostiebų). Paviršių dangoms dažniausiai naudojamas auksas, sidabras ar varis [19,30,48,59,60]. Substrato pasirinkimas priklauso nuo taikymo, kuriam bus naudojamas savitvarkis monoslukšnis [50].

Geriausiai ištyrinėti ir plačiausiai naudojami yra auksu dengti substratai. Tai nulėmė keletas priežasčių:

- Pirma – auksas lengvai funkcionalizuojamas naudojant molekules turinčias tiolio grupes. Tai suteikia galimybes formuoti įvairius, kompleksiškus savitvarkius monoslukšnius [61,62].
- Antra – paviršių padengimas auksu yra nesudėtingas procesas ir gali būti paruoštas net keliomis skirtingomis technikomis [63,64].
- Trečia – auksas yra pakankamai chemiškai inertiškas metalas, todėl lyginant su kitais metalais sunkiau oksiduojasi ore [65].
- Ketvirta – aukso paviršiai yra palankūs biologinių pavyzdžių paruošimui ir analizei [50].

Nepaisant šių privalumų, auksui būdingas mikrobiologinis užsiteršimas ir itin aukšta kaina. Tai skatina ieškoti alternatyvų, kurios ne tik sumažintų kainą, tačiau išlaikytų ir daugumą geriausių aukso savybių.

Sidabras yra antras po aukso geriausiai ištirtas ir plačiai taikomas metalas. Šio metalo panaudojimo galimybės pademonstruotos daugybėje skirtingų sričių – elektronikoje, katalizėje, antibakterinių ir priešvėžinių vaistų kūrime, mediciniame vaizdinime bei implantologijoje [66–68]. Antibakterinės sidabro savybės suteikia šiam metalui didelį pranašumą biomediciniuose taikymuose, išvengiant mikrobiologinės taršos ir bakterinių bioplėvelių formavimo paviršiuose [69]. Be to, nauji sidabriniai nanodalelių kūrimo modeliai, yra laikomi draugiškais aplinkai, taip dar labiau išplečiant ir skatinant sidabro panaudojimą [70].

Pagrindinis sidabro trūkumas yra greita oksidacija ore. Dėl šios priežasties šis metalas yra rečiau nei auksas naudojamas savitvarkių monoslukšnių formavimui. Tačiau dėl palankių plazmoninių ir optinių savybių, sidabriniai paviršiai gali būti pritaikomi ir analizuojami dauguma optinių ir spektroskopinių metodų, tokių kaip: a) paviršiaus plazmonų rezonansas

(SPR), b) paviršiaus sustiprinta Raman sklaida (SERS) ir c) paviršiaus sustiprinta infraraudonosios sugerties spektroskopija (SEIRA) [71–73]. Svarbu paminėti, kad paviršiaus plazmonai sidabro atveju yra sužadinami platesniame šviesos bangų ilgių diapazone (nuo UV iki IR), o aukso atveju paviršiaus plazmonai sužadinami tik raudoname ruože nuo maždaug 600 nm. Šis sidabro privalumas išplečia pritaikymo galimybes ir leidžia to paties mėginio analizei naudoti skirtingas metodologijas [72]. Vienas iš pavyzdžių, kur sidabro paviršiai turi reikšmingą pranašumą – yra baltymų turinčių hemo grupę (pvz. citochromas c) analizė. Pritvirtintus citochromą c prie biomimetinių organinių monosluoksnių ant sidabro elektrodų, galima stebėti redokso ir elektronų pernašos savybes, pasitelkiant paviršiaus sustiprintą rezonansinę Raman sklaidą (SERRS) [74].

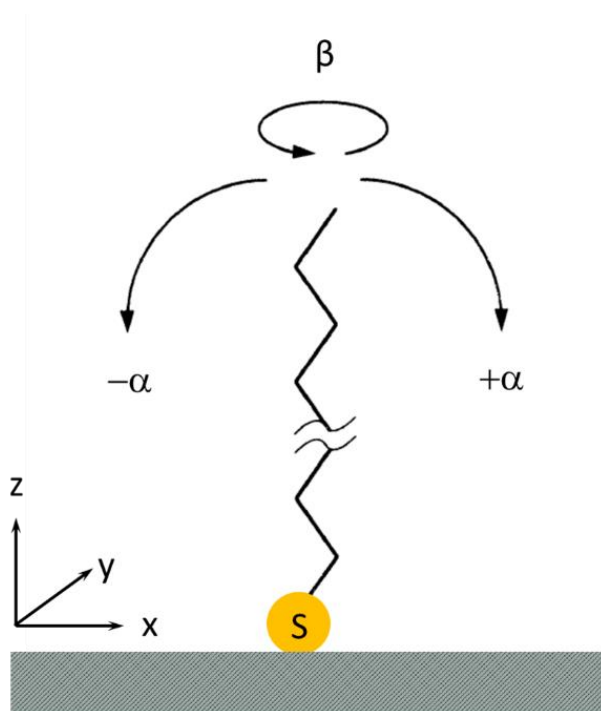
Sidabro dangos nusodinimas ant aukso yra plačiai taikomas metodas, kuomet norima paviršiaus plazmoninius reiškinius paslinkti į mėlyną šviesos spektro pusę. Tokio proceso metu, sidabru dengiant pavyzdžiui aukso nanodaleles, yra išsaugoma aukso nanodalelių įvairovė, tuo pat metu struktūroms suteikiant pranašesnes, sidabrui būdingas optines savybes. Tai ypač aktualu Raman spektroskopijoje, nes yra padidinamas aukso nanodalelių SERS aktyvumas. Literatūros duomenimis, sidabriniai paviršiai ne tik pasižymi reikšmingai didesniu Raman signalo stiprinimo efektyvumu, lyginant su aukso, tačiau gali reikšmingai slopinti fluorescencijos sukeltus trikdytus [75–77]. Be to, sidabro dangos pasižymi geromis šilumos laidumo savybėmis. Paviršius veikiant didelės galios, ilgų bangų (NIR) lazerine spinduliuote, kuri yra reikalinga spektroskopiniams metodams, stebima mažesnė šviesos absorbcija bei sumažinamas paviršiaus temperatūros kilimas, taip apsaugant tiriamus pavyzdžius nuo perkaitimo [77,78].

1.4. Alkantiolių SAM savybių palyginimas ant Au ir Ag

Ilgos grandinės alkantioliai $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ adsorbuojasi iš tirpalo ant aukso, sidabro ir kitų metalų paviršių sudarydamos tankiai supakuotus savitvarkius monosluoksnius [79]. Atspindžio-sugerties infraraudonoji spektroskopija (RAIRS) parodė, kad monosluoksniai ant sidabro ir vario (kai jie yra kruopščiai paruošti) turi tiksliai apibrėžtą molekulinę grandinių orientaciją ir įgauna kvazikristalinę struktūrą, lygiai taip, kaip buvo pastebėta ir ant aukso. Tačiau ant skirtingų metalų adsorbuoti SAM pasižymi skirtinga molekulių orientacija paviršiaus atžvilgiu [50,80].

Kiekybinė IR duomenų analizė, naudojant skaitinį modeliavimą, pagrįstą vidutiniu vienos grandinės modeliu paaiškina savitvarkių monosluoksnių skirtumus ant skirtingų metalų. Alkantiolių orientaciją paviršiuose apibrėžia

du parametrai: α – posvyrio kampas tarp metalo ir alkantiolio grandinės ir β – sukimosi kampas aplink grandinės ašį (2 pav.). α nuokrypio kampas gali turėti teigiamą arba neigiamą vertę, β parametras kinta nuo 0° iki 90° [50].



2 pav. Schematinis paviršiuje adsorbuotos angliavandenilinės grandinės modelis, pilnai trans konformacijoje. α – posvyrio kampas tarp metalo ir tiolio (Me-S-C) ir β – sukimosi kampas apie grandinės ašį. Pagal [80].

Alkilo grandinės monosluoksniuose ant sidabro pasižymi pilnai trans-zigzagine būseną ir yra nukrypusios nuo paviršiaus normalės per $\sim 12^\circ$. Aukso atveju grandinės taip pat įgyja beveik pilnai trans-zigzaginę formą, tačiau prie paviršiaus pasvyra $\sim 26^\circ$ - 30° kampu [80,81]. Be to, nustatyta, kad grandinės ilgis beveik neturi įtakos posvyrio kampui, kai molekulės adsorbuojasi ant sidabro, tačiau priklausomai ar CH_2 skaičius molekulėje lyginis ar nelyginis, skiriasi α reikšmė. Lyginiam skaičiui α įgauna teigiamą vertę, o nelyginiam – neigiamą. Aukso atveju, α vertė išlieka teigiama tiek esant lyginiam tiek ir nelyginam CH_2 skaičiui. Lyginant alkantiolio grandinės sukimosi kampus aplink grandinės ašį – β , nustatyta, kad sidabro atveju grandinės sukasi 45° , o aukso 53° [80].

α ir β parametrų skirtumus tarp Au ir Ag galima paaiškinti Me-S ryšio įtaka. Paviršiaus sustiprintos Raman spektroskopijos duomenys parodė, kad

skirtingos sąveikos tarp metalo ir sieros lemia skirtingas C-S jungčių orientacijas ties Ag ir Au. Alkantolių C-S jungtis ties Au paviršiumi yra lygiagreti, o ties Ag dažniausiai statmena. Šis skirtumas daro įtaką ne tik grandinės pasvirimo kampui bet ir sukimuisi [79].

Tokie duomenys atitinka erdvės užpildymo modelius, kurie nusako grandinės posvyrius artimiausios kaimyninės grandinės kryptimi, sudarant tvarkingą struktūrą, kuri apima ir tvarkingą šešiakampį sieros atomų išdėstymą prie metalo paviršiaus [50]. Toks grandinių išsidėstymas paviršiuose priklauso nuo sieros kiekio ant paviršiaus, atstumų tarp grandinių ir cheminės bei fizikinės sąveikos lemiančios savitvarkių monosluoksnių erdvinę struktūrą. Šios prielaidos patvirtintos difrakcijos tyrimų rezultatais [82,83].

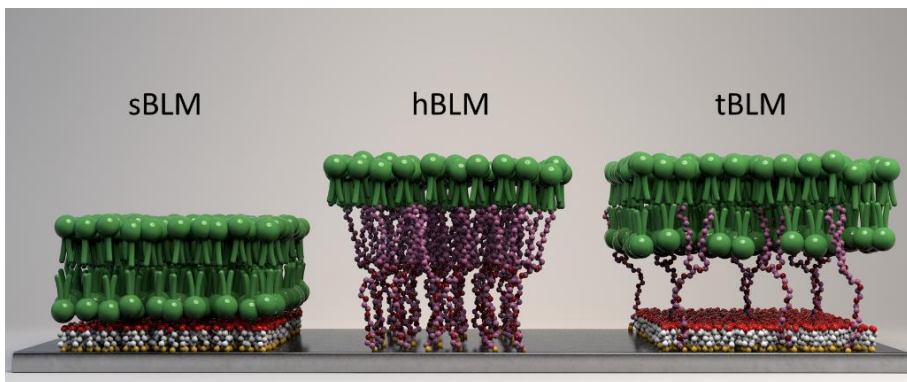
1.5. SAM pritaikymas kuriant biologinių membranų modelius

Biologinės membranos – tai struktūriškai sudėtingos sistemos, kurios pasižymi didžiule funkcijų įvairove ląstelėse. Pastarąjį šimtmetį buvo sukurta nemažai modelių, skirtų tirti natūralių membranų savybes, struktūrą ir jose vykstančius procesus [84–86]. Tokios modelinės sistemos atkartoja esminius lipidinės dvisluoksnės membranos struktūrinius ir cheminius aspektus ir yra pritaikomos vertinant membranų aktyvumą sąveikoje su įvairiais natūraliais ir sintetiniais junginiais, vaistais, baltymais [87].

Dvisluoksnių lipidinių membranų modelis ant kietų paviršių – sBLM (angl. supported bilayer lipid membranes) (3 pav.) buvo pasiūlytas McConnell ir kolegų devintajame dešimtmetyje, siekiant sistemingai tirti molekulinis procesus ir imituoti imuninės sistemos ląstelių sąveikas [88]. Vėliau buvo pasiūlyta daugybė sBLM modifikacijų, keičiant jų fizikines savybes ir tobulinant paruošimo procesą. Nepaisant to, išliko keli platformos trūkumai – sBLM nuo paviršiaus skiria tik plonas vandens sluoksnis, o pačią membraną prie paviršiaus palaiko silpna fizikinė adsorbcija. Tokie modeliai pasižymi nevientisumu, turi daug defektų ir yra nestabilūs laike [89–91]. Tai riboja sBLM tyrimus tokiomis eksperimentinėmis technikomis kurios užima daug laiko (pvz. neutronų reflektometrija), o taip pat apsunkina ir membranų sąveikos su baltymais bei tirpikliais analizę. Kitas svarbus modelio trūkumas – aiškiai apibrėžto jonų rezervuaro nebuvimas abiejose membranos pusėse. Tai ne tik sumažina biologinį tikroviškumą, bet ir apriboja šių modelių pritaikymą tiriant jonų kanalus ir didelio dydžio transmembraninius baltymus [92,93]. Lang kartu su kolegomis [94] parodė joninį rezervuarą turinčių dvisluoksnių modelių suformavimą ant chemiškai adsorbuotų savitvarkių monosluoksnių ant aukso. Tačiau lipidų dvisluoksniai buvo prastai

izoliuojantys (specifinė membranų varža buvo apie $10^4 \Omega \times \text{cm}^2$), o joninių rezervuarą turinčių dvisluoksnių susidarymo procesas buvo „sunkiai kontroliuojamas“ [95].

Kitas pasiūlytas modelis, tai hibridinės lipidinės membranos hBLM (angl. hybrid bilayer lipid membranes) (3 pav.). Jos konstruojamos vienasluoksnes liposomas adsorbuojant ant savitvarkais monosluoksniais funkcionalizuotų metalų paviršių [96]. Vykstant hidrofobinei sąveikai tarp SAM ir vidinio membranos sluoksnio, dvisluoksnis įmobilizuojamas paviršiuje. hBLM modeliai pasižymi stabilumu ir kietumu, tačiau savybės gerokai nutolusios nuo gyvų ląstelių membranos savybių, todėl pritaikymas biologinių modelių tyrimams labai ribotas. Tokiose sistemose galima tirti į išorinį membranos sluoksnį įsiterpiančius receptorius ir išskirtinai su išoriniu membranos sluoksniu sąveikaujančias molekules [97,98].



3 pav. Schematiniai biologinių membranų modeliai. sBLM – dvisluoksnių lipidinių membranų modelis ant kieto paviršiaus; hBLM – hibridinės lipidinės membranos; tBLM – inkariniais junginiais prie kieto paviršiaus imobilizuotos lipidinės membranos.

Kaip alternatyva aptartiems modeliams buvo pasiūlytos inkariniais junginiais prie kieto paviršiaus imobilizuotos lipidinės membranos – tBLM (angl. tethered bilayer lipid membranes) (3 pav.). Šiame modelyje vidinis membranos sluoksnis kovalentiškai prijungtas prie paviršiaus naudojant mišrų molekulinį inkarų savitvarkį monosluoksnį [95,99]. Kovalentiškai imobilizuotos membranos turi pranašumą prieš fiziškai adsorbuotus membranų modelius, kurie lengviau desorbuojasi nuo paviršių, pavyzdžiui paveikus elektriniu lauku [44]. Mišrių SAM sudėtis, tiesiogiai nulemia prikabinamų membranų fizikines savybes. Juos dažniausiai sudaro ilgi inkariniai junginiai, kurie hidrofobinėmis dalimis įsiterpia į lipidinį dvisluoksnį ir pritvirtina jį prie paviršiaus per kovalentinius metalo-sieros,

- disulfido, - silano ir kitus cheminius ryšius [95,100]. Inkarinių junginių tankiui ir pasiskirstymui paviršiuje reguliuoti yra naudojamos skiediklio molekulės. Šiam tikslui dažnai naudojami trumpi hidrofilingi tioliniai junginiai – pavyzdžiui, β -merkaptioetanolis [44,101]. Tokie molekuliniai konstruktai paviršiuose suteikia technologinę platformą savaiminiam lipidinių dvisluoksnių susirinkimui. Dažniausiai taikomi tirpiklio pakeitimo arba liposomų liejimo metodai [44,102]. Pastaraisiais metais dėl paprasto ir greito paruošimo, bei gero atsikartojamumo pradėtas naudoti daugiasluoksnių liposomų liejimo metodas [103]. Taikant šį metodą, ant mišraus SAM užpilamas daugiasluoksnių liposomų tirpalas. Jis inkubuojamas 20-30 min, po kurių gausiai nuplaunamas buferiniu tirpalu apsaugant paviršių nuo išdžiūvimo. Visais minėtais metodais paruošti lipidiniai dvisluoksniai ne tik pasižymi takumu, tačiau yra izoliuojantys ir mechaniškai, chemiškai bei biochemiškai stabilūs [95,99,104].

Vienas didžiausių tBLM privalumų yra gerai apsibrėžtas pomembraninis rezervuaras [44]. tBLM ir jų pomembraninio rezervuaro fizikines savybes lemia inkarinio savitvarkio monosluoksniu sudėtis ir cheminė struktūra. Parinkus skirtingas mišraus SAM inkaro/skiediklio sudėtis ir koncentracijas, užtikrinamas pakankamas pomembraninio jonų rezervuaro palaikymas bei sumažinamas paviršiaus šiurkštumo poveikis membranų tolygumui [105–107].

tBLM modeliai yra laikomi perspektyvia eksperimentine platforma kuriant biosensorius ir gali būti taikomi atliekant platų spektrą biofizinių eksperimentų, tokių kaip baltymų (peptidų) ir membranos sąveika [44,108,109], antigenų ir antikūnų surišimas [110], lipidų fazių virsmai [111] ir kt. Suformavus tBLM ant laidžių metalinių paviršių, galima stebėti biologiškai svarbius reiškinius taikant elektrocheminius ir spektroskopinius metodus [112,113].

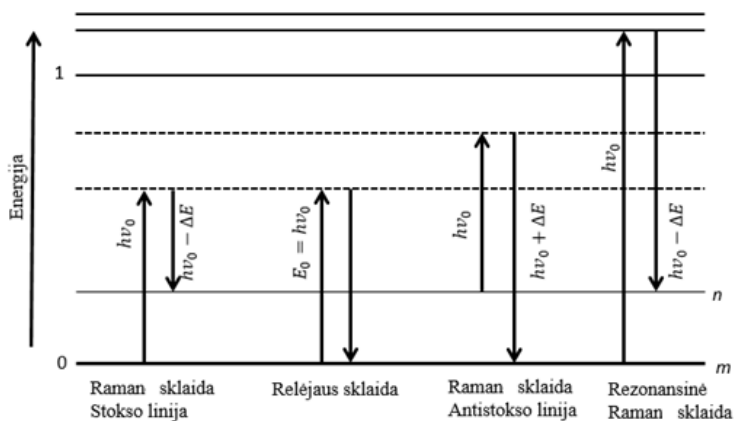
2. Raman spektroskopija

Raman spektroskopija, tai virpesinės spektroskopijos metodas, paremtas Raman sklaida, kuris suteikia informacijos apie medžiagų struktūrą, sandarą, taip pat ir sąveikas tarp molekulių. Be to ši technika yra tinkama identifikuoti cheminius junginius ir atskiras jų funkcines grupes. Pagrindinis metodo privalumas yra didelis atrankumas ir universalus panaudojimas. Raman spektroskopija yra tinkama tirti dujines, skystas, gelio pavidalo bei įvairias kietąsias medžiagas [114].

Pirmą kartą šis neelastinės sklaidos reiškinys eksperimentiškai pastebėtas ir aprašytas 1928 m. mokslininkų C. V. Raman ir K. S. Krishnan. Naudojami

teleskopo objektyvą ir skirtingų spalvų šviesos filtrus, Saulės šviesos spindulį išgrynino iki monochromatinės spinduliuotės ir ją leidami per analizuojamą skystį, išsklaidytos šviesos spektre, pastebėjo šviesos bangos dažnio pokytį. Rezultatų patikimumas buvo patikrintas su daugiau nei šešiasdešimt skirtingų skysčių, kuriuos tiriant pastebėtas toks pat efektas [115].

Raman sklaida, tai monochromatinės šviesos išsklaidymas medžiagoje, kurio metu pakinta šviesos dažnis. Šis efektas yra stebimas fotonams sąveikaujant su analizuojamos medžiagos elektronais [114]. Vykstant netampriajai sąveikai, fotonai gali netekti (Stokso Raman linijos) arba įgyti (antistoksinės Raman linijos) energijos, kuri atitinka tiriamų molekulių vibracinio perėjimo energiją ($h\nu_{\text{vib}}$) (4 pav.). Kitaip tariant, vyksta tam tikrų virpesių ir fotonų apsikeitimas energija [116]. Tačiau, dauguma tokių susidūrimų yra tamprieji – dalelių suminė kinetinė energija nekinta todėl ir išsklaidytos šviesos dažnis išlieka tas pats, gaunama Relėjaus sklaida (4 pav.) [117]. Veiksmingas apsikeitimas energija vyksta tik tarp tokių virpesių, kurie moduliuoja molekulės poliarizuojamumą. Intensyvios Raman juostos atitinka nepolinių grupių, ypač aromatinių žiedų virpesius, kuriems vykstant žymiai kinta molekulės poliarizuojamumas. Abscisių ašyje atidėję žadinančio ($h\nu_0$) ir emituoto [$h(\nu_0 - \nu_{\text{vib}})$] fotonų energijos skirtumą (cm^{-1}), gauname molekulės virpesių spektrą [116,118].

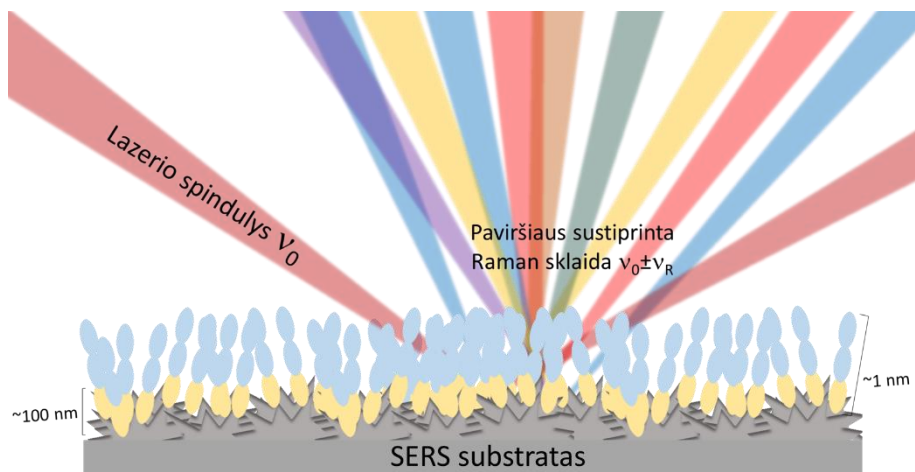


4 pav. Raman, Relėjaus ir rezonansinės Raman sklaidos schema. Pavaizduotos Stokso ir antistoksinės Raman linijos. 0 ir 1 atitinka pagrindinę ir sužadintą elektronines būsenas, o m ir n atitinka pagrindinį ir sužadintą virpesinius lygmenis.

Kadangi, molekulių judesiai yra labai specifiniai ir priklauso nuo molekulės struktūros, gauti Raman spektrai yra tarsi molekuliniai “pirštų atspaudai” [114,119].

2.1. Paviršiaus sustiprinta Raman sklaida (SERS)

Paviršiaus sustiprinta Raman sklaida pastebėta ir pirmą kartą aprašyta 1974 metais [120]. Atliekant eksperimentus, kuriuose buvo bandoma nustatyti piridino Raman sklaidos spektrą ant sidabro elektrodo, pastebėta, kad signalas žymiai stipresnis, kai elektrodo paviršius pašiurkštintas. 1977 metais Jeanmaire ir Van Duyne, o taip pat Albreicht ir Creighton pademonstravo, kad ant pašiurkštinto sidabro paviršiaus adsorbuoto piridino Raman sklaidos intensyvumas buvo 10^6 kartų stipresnis lyginant su to paties kiekio piridino Raman sklaida įvertinta tirpale [121,122]. Metodo principinė schema pateikta 5 pav.



5 pav. SERS metodo principinė schema. Vaizduojamas monochromatinio lazerio spindulio (v_0 – žadinanti spinduliuotė) išsklaidymas, sąveikaujant su paviršiuje adsorbuotomis molekulėmis. Sąveikos metu pakinta šviesos dažnis, stebima paviršiaus sustiprinta Raman sklaida ($v_0 \pm v_R$). Efektas stebimas fotonams sąveikaujant su analizuojamos medžiagos elektronais. Molekulių dydis dėl schemos aiškumo pateiktas nesilaikant tikroviško mastelio.

Toks atradimas, sukėlė didelį susidomėjimą šia technologija ir paskatino tolesnius tyrimus. Buvo nustatyta, kad šis efektas būdingas ne tik piridinui. Parodyta, kad SERS efektas yra būdingas daugeliui molekulių, kol jos yra adsorbuotos ant pašiurkštinto metalo paviršiaus [123].

2.1.1. Raman signalo stiprinimo mechanizmai

Paviršiaus sustiprintos Raman sklaidos efektas yra aiškinamas dviem mechanizmais: cheminiu, susijusiu su rezonansinio tipo efektais, molekulėms sąveikaujant su metalo paviršiumi, ir elektromagnetiniu, kuris vyksta dėl

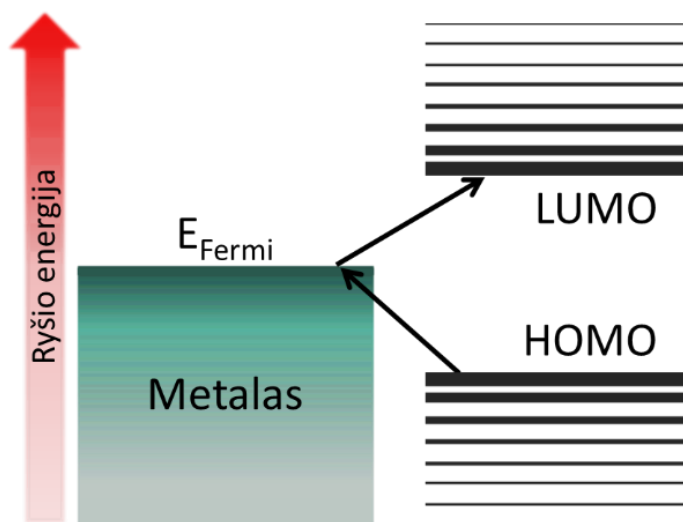
elektromagnetinio lauko sustiprinimo netoli metalinių nelygumų [124]. Šių mechanizmų ryšį apibrėžia formulė:

$$P=\alpha E$$

Kur, Raman sklaidos intensyvumas proporcingas indukuoto elektrinio lauko dipolio momento (P) kvadratui, kuris susijęs su molekulės poliarizacijos (α) padidėjimu arba/ir su elektrinio lauko (E) sustiprėjimu [118].

2.1.1.1. Cheminis mechanizmas

Cheminis mechanizmas (6 pav.) prisideda prie Raman sklaidos signalo stiprinimo vykstant molekulių cheminei sorbcijai ant metalo paviršiaus. Tokiu būdu adsorbuotų molekulių elektronai gali sąveikauti su metalo paviršiaus elektronais, vykstant krūvio pernašai arba formuojantis cheminiam ryšiui [125,126]. Mechanizmas aiškinamas molekulės ir metalo energetinių lygmenų persiklojimu susidarant krūvio pernešimo kompleksui ir vykstant rezonansinei Raman sklaidai. Persiklojimas vyksta tarp aukščiausios užpildytos molekulinės orbitalės (HOMO), metalo Fermi energetinio lygmens ir žemiausios neužpildytos molekulinės orbitalės (LUMO). Elektroninis sužadėjimas vyksta krūviui pereinant iš HOMO į Fermi lygmenį ir tada į LUMO. Tokiam, pakopiniam, perėjimui reikalinga mažesnė šuolio energija dėl to didėja Raman sklaidos efektyvumas [127].

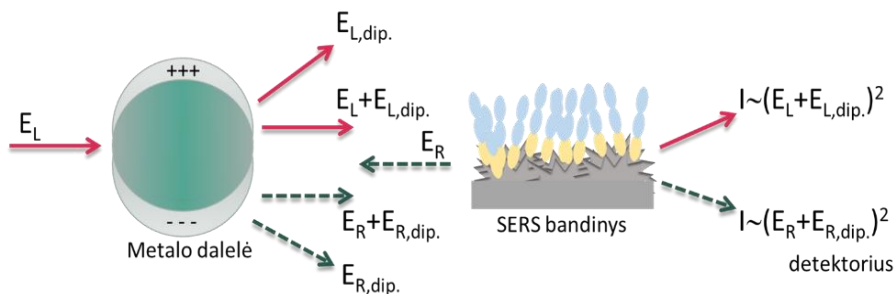


6 pav. Cheminis SERS stiprinimo mechanizmas. Kur, HOMO – aukščiausia užpildyta molekulinė orbitalė, LUMO – žemiausia neužpildyta molekulinė orbitalė (LUMO). Adaptuota pagal [127].

Įvykus tokio tipo sąveikoms signalas sustiprinamas iki 10^2 kartų. Tačiau šis mechanizmas gali skirtis naudojant skirtingo tipo SERS substratus ir molekules [125,128].

2.1.1.2. Elektromagnetinis mechanizmas

Elektromagnetinis mechanizmas (7 pav.) yra aprašomas kaip nuo bangos ilgio priklausantis efektas, atsirandantis sužadinus lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonansą (LSPR) ir yra nepriklausomas nuo cheminių ryšių susidarymo tarp molekulių ir metalų. Aktyviausiai plazmoniniai reiškiniai vyksta tauriųjų metalų paviršiuje, pavyzdžiui aukso, sidabro, taip pat vario. Tai susiję su dideliu skaičiumi laisvųjų elektronų šių metalų paviršiuje [129]. Kitas svarbus aspektas yra paviršiaus šiurkštumo laipsnis. SERS eksperimentai įtikinamai rodo, kad pagrindinį vaidmenį stiprinime vaidina lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonansas, t. y. metalo dalelėje lokalizuotų elektronų kolektyvinių virpesių sužadinimas [124]. Tokio tipo stiprinimas vyksta, kai elektromagnetinė spinduliuotė (E_L), sąveikaudama su paviršiaus elektronais, sukelia lokalizuotą plazmonų rezonansą. Plazmonų rezonansui susidaryti reikalingas šiurkštus metalo paviršius, taip pat plazmonų osciliacija turi vykti statmenai paviršiui, dėl ko sustiprėja elektromagnetinis laukas aplink tiriamąją molekulę ($E_L + E_{L,dip.}$), sustiprindamas jos Raman signalus (E_R). Sukelta molekulės Raman sklaida taip pat gali poliarizuoti metalo daleles ir sukelti papildomą stiprinimą ($E_R + E_{R,dip.}$). Kadangi, Raman signalo intensyvumas proporcingas žadinančio lauko kvadratui, tai elektromagnetinio stiprinimo proceso metu intensyvumas bus proporcingas – $(E_L + E_{L,dip.})^2$ ir $(E_R + E_{R,dip.})^2$ sumai [118,130].



7 pav. Elektromagnetinio stiprinimo schema. Kur, E_L – elektromagnetinė spinduliuotė, E_R – molekulių Raman signalas. Adaptuota pagal [127].

Paviršiaus plazmonų reiškinys sustiprina elektrinio lauko intensyvumą metalo paviršiuje nuo 10^2 iki 10^4 kartų [125,131]. Stiprinimo faktorius

ypatingai išauga, kai lazerinės spinduliuotės ir SERS elektriniai laukai yra rezonanse su paviršiaus plazmonais. Be to, krūvis paviršiuose yra linkęs telktis ties aštriais dalelių kampais, todėl didžiausias elektromagnetinis stiprinimas pasiekiamas tose paviršiaus vietose, kuriose yra nedideliu atstumu išsidėsčiusių briaunų ir viršūnių. Šiose paviršiaus vietose, vadinamose karštaisiais taškais, lokalaus elektrinio lauko stipris gali siekti 10^9 – 10^{11} kartų [132,133].

Pastebėta, kad elektromagnetinis stiprinimas smarkiai mažėja, didėjant adsorbuotos medžiagos atstumui nuo paviršiaus. Van Duyne su bendradarbiais parodė, kad analizę lokalizavus 2,8 nm atstumu nuo sidabro plėvele dengtų nanosferų, SERS signalas smarkiai susilpnėja [134].

Akivaizdu, kad norint pasiekti intensyvius SERS signalus, analizė turi būti lokalizuota per kelis nanometrus nuo substrato paviršiaus. Dėl šios priežasties dauguma SERS tyrimų yra atliekami su molekulėmis turinčiomis tiolio ar amino funkcines grupės, kurios gali tiesiogiai sąveikauti, tai yra chemiškai adsorbuotis metalo paviršiuje [125].

2.2. SERS paviršių paruošimas

SERS spektro kokybė, stabilumas ir duomenų atsikartojamumas didžiąja dalimi priklauso nuo to, kaip paruoštas metalo paviršius. Pirmieji metodai taikyti SERS paviršių gamybai buvo paremti pakartotinai vykdomais oksidacijos-redukcijos ciklais, tai elektrocheminis paviršių šiurkštinimas. Po to sekė koloidiniai nanodalelių tirpalai. Tokie substratai sulaukė didelio populiarumo, nes buvo paprastai pagaminami bet kurioje chemijos laboratorijoje, tačiau patikimai atkartoti procesą dažniausiai buvo neįmanoma. Įsibėgėjus tyrimams tapo akivaizdu, kad sidabro aukso nanodalelių koloidiniai tirpalai pasižymėjo didesniu SERS signalo stiprinimu dėl savo dielektrinių savybių (lyginant su elektrochemiškai pašiurkštiniais elektrodų paviršiais). Įtvirtinus nanodaleles ant kietų paviršių pasiekti signalo stiprinimo faktoriai nuo 10^6 iki 10^{12} lyginant su normalia Raman sklaida [135]. Suvokus SERS substratų komercializavimo potencialą, pagrindiniu paviršių gamybos iššūkiu tapo sukurti patikimus, stabilius, atkuriamus ir nebrangius substratus. Toliau šiame skyriuje detaliau aptarsime populiariausias paviršių apdirbimo technikas, taikomas SERS matavimams.

2.2.1. Elektrocheminis paviršių šiurkštinimas

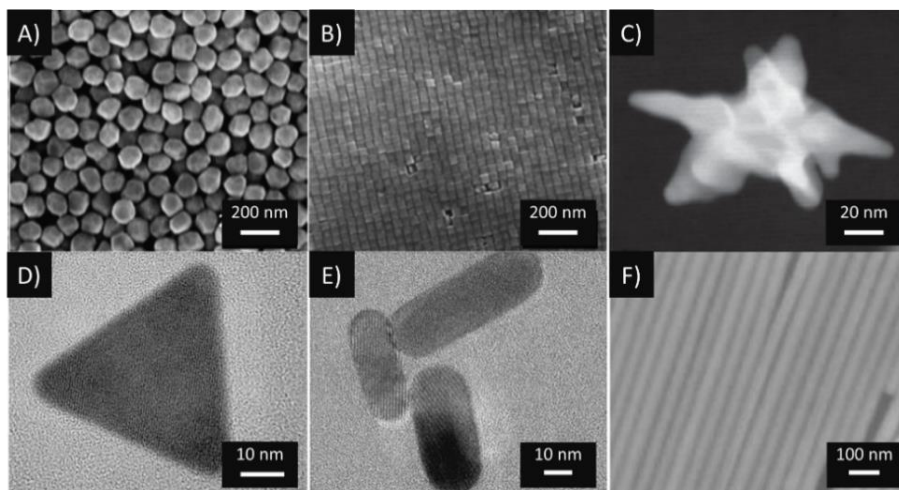
Pirmieji SERS substratai buvo gaminami bandant atkartoti Fleischman ir kolegų parodytą Raman sklaidos stiprinimo efektą ant pašiurkštintų sidabro

elektrodų. Tokio tipo sidabrinių elektrodų ruošimui buvo pritaikyti elektrocheminiai oksidacijos-redukcijos ciklai [120]. Visų pirma paviršius turi būti gerai nuplaunamas, panaikinami organinių junginių likučiai. Tada elektrodas merkiamas į elektrolitų tirpalą. Naudojant oksidacijos potencialą ant paviršiaus ima formuotis sidabro jonai. Vyksta reakcija $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$. Po to seka redukcijos potencialas ir vyksta atvirkštinė reakcija, $\text{Ag}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}$. Oksidacijos-redukcijos ciklas kartojamas keletą kartų. Sidabro elektrodų elektrocheminis valymas vykdomas 5-7 minutes 0,1 M KCl tirpale, išlaikant neigiamą potencialą, kuris pagal skirtingus šaltinius svyruoja nuo maždaug -0,2 V iki -0,9 V, taip nuo paviršiaus pašalinant oksidus. Po to, sidabro elektrodas elektrochemiškai šiurkštinamas 0,1 M KCl tirpale, skleidžiant potencialą tam tikru greičiu. Potencialo vertės ir skleidimo greitis sidabrui svyruoja lyginant skirtingus literatūros šaltinius. Skleidimo greitis gali varijuoti nuo 10 iki 200 mV/s [136,137]. Neigiamas potencialas varijuoja nuo -0,1 iki -0,9, o teigiamas nuo 0,1 V iki 0,9 V. Tiek ties neigiama, tiek ties teigiama potencialo kraštine verte yra užlaikoma nuo 30 iki 60 s. Ciklai kartojami nuo kelių iki keliasdešimties kartų, taip sukuriant skirtingos morfologijos paviršius. Pasibaigus aktyvacijai elektrodas palaikomas kelias minutes ties neigiamu potencialu [138,139]. Tokio proceso veikiamas elektrodo paviršius irsta ir formuoja įvairaus dydžio (25 nm-500 nm) išsikišusias struktūras [123]. Šia technika paruošti SERS paviršiai pasižymi dideliu Raman signalo stiprinimu, tačiau tai nėra patikimas metodas, nes sunku pasiekti rezultatų atsikartojamumą, kas yra itin svarbu didelės apimties statistiškai patikimiems tyrimams bei substratų komercializacijai [140].

2.2.2. Koloidiniai nanodalelių tirpalai

Plačiausiai SERS tyrimams yra naudojami sidabro arba aukso nanodalelių koloidiniai tirpalai. Tai lemia kelios priežastys. Visų pirma, šios dalelės pagaminamos taikant nesudėtingą cheminę sintezę. Antra, naudojami reagentai yra santykinai nebrangūs. Be to, gamybos metu galima kontroliuoti nanodalelių dydį ir formą. Struktūros dažniausiai sintetamos pasitelkus metalo jonų redukciją su natrio-borodihidridu [141], citrinų rūgštimi [142] ar kitais redukuojančiais agentais. Tačiau, nepaisant to, kad į reakcijos mišinį yra dedama dalelių agregacijai trukdantys junginiai, koloidai išlieka labai nestabilūs ir jungiasi į didelius klasterius. Siekiant apeiti šį trūkumą yra naudojamos įvairios paviršiaus aktyviosios medžiagos, pavyzdžiui, trimetilamoniumbromidas (CTAB) ir polivinilpirolidonas (PVP). Šie junginiai leidžia kontroliuoti koloidų agregaciją, tai yra valdyti susidarančių nanodalelių dydį ir formą [140,143]. Yra paskelbta nemažai publikacijų,

kuriose aprašytos įvairių formų nanodalelių sintezės metodologijos. Gamybos metu reguliuojant metalų druskų koncentracijas, taikant įvairius redukuojančius agentus ir paviršiaus aktyviausias medžiagas, nanostruktūrų forma nesunkiai reguliuojama. Įmanoma susintetinti nanosferas ir nanokubus [138], nanostrypelius ir nanotrikampius [127], nanožvaigždes [144], nanovamzdelius [145] ir kt. [127,140,146] (8 pav.).



8 pav. Nanodalelių formų pavyzdžiai. A) nanosferos; B) nanokubai; C) nanožvaigždė; D) nanotrikampis; E) nanostrypeliai; F) nanovamzdeliai. Pagal [127,138,144,145].

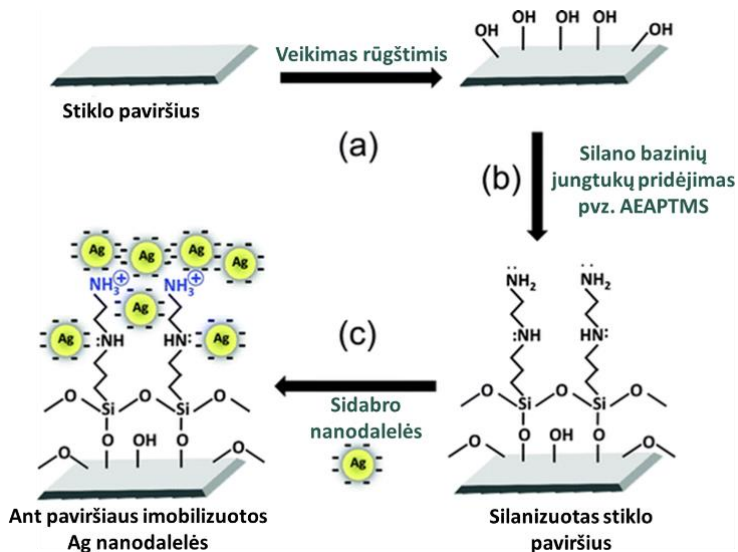
Lokaluotų paviršiaus plazmonų rezonanso sukeltas elektromagnetinio lauko amplitudės padidėjimas ties nanodariniams gali siekti iki 10^5 kartų [147]. LPPR dažnis ir stipris tampriai susijęs su nanodalelės dydžiu ir forma: nanovamzdeliai sukelia didesnį stiprinimą nei nanosferos, o žvaigždės formos nanodalelės lauko stiprinimu lenkia nanovamzdelius [148].

Esminis koloidinių tirpalų trūkumas yra tas, kad aukštą Raman sklaidos signalo stiprinimo faktorių galima pasiekti tik analizuojant tokius junginius kaip R6G [149] ar piridiną, kuriems natūraliai būdinga stipri Raman sklaida. Kitas tokių SERS substratų minusas yra kintantys atstumai tarp nanodalelių sudarančių koloidinį tirpalą ir molekulių Brauno judėjimas tirpale. Dėl šių priežasčių SERS signalas tampa nestabilus. Dar vienas signalą silpninantis faktorius yra paviršiaus aktyviosios medžiagos, naudojamos gamyboje. Šios medžiagos trukdo analizuojamoms molekulėms sąveikauti su nanodalelėmis. Be to, kartais pačios analitės pridėjimas į koloidinį nanodalelių tirpalą gali sukelti dalelių agregaciją [140].

2.2.3. Nanodalelių imobilizavimas ant kieto paviršiaus

Norint padidinti nanodalelių koloidinių tirpalų stabilumą, buvo bandoma nanodaleles nusodinti ant kietų plokščių paviršių tokių kaip stiklas ar silicio plokštelės. Nanodalelėms nusėdus, paviršius nudžiovinamas ir tuomet ant paviršiaus užliejamos analizuojamos molekulės. SERS signalo stiprinimas atsiranda viršutiniam nanodalelių sluoksniui sąveikaujant su analizuojamomis medžiagomis. Pagrindinė šiuo būdu paruoštų paviršių problema – ant paviršiaus užpylus analizuojamą tirpalą, sausos nanodalelės atkimba ir susimaišo tirpale. Tokio proceso rezultatas yra substrato paviršiaus persitvarkymas ir tai nulemia SERS signalo neatsikartojamumą.

Vienas iš būdų, nanodalelių pritvirtinimui prie stiklo paviršių, yra jų prijungimas per silano jungtuką (angl. silanization) (9 pav.).



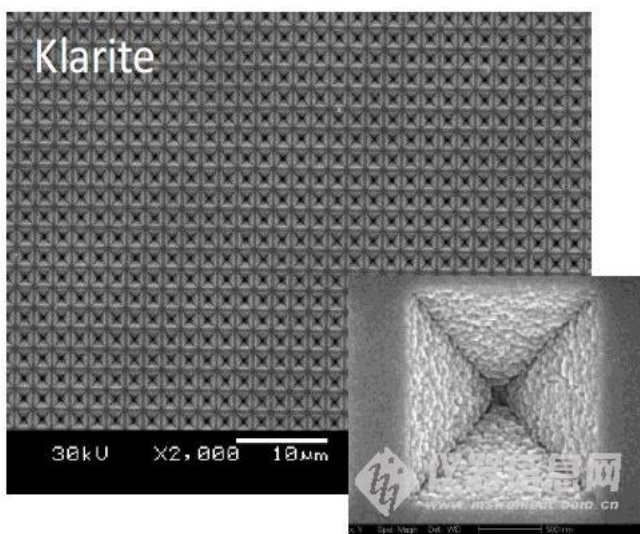
9 pav. Nanodalelių silanizacija ant kieto paviršiaus. Pagal [150].

Taikant šį metodą, labai svarbu atidžiai nuvalyti stiklo paviršius, pašalinti įvairius teršalus ir organines priemaišas [151]. Tokiu būdu paviršiuje lieka išsidėsčiusios teigiamai įkrautos hidroksi grupės prie kurių chemiškai (dažnai per tiolines grupes) sorbuojasi silano bazinis jungtukas. Kitame tokio jungtuko gale yra funkcinė amino grupė, per kurią prijungiama nanodalelė. Suformuota Si-O-Si jungtis yra pakankamai stipri išlaikyti nanodaleles prie paviršiaus [152]. Tokiu būdu suformuotas nanodalelių monosluoksnius pasižymi dideliu Raman signalo stiprinimo faktoriumi, kuris tam tikrais atvejais gali siekti 10^8 [153].

2.2.4. Paviršių apdirbimas taikant litografijos technikas

Litografijos technikų – fotolitografijos, elektronų bei jonų pluoštų litografijos, nanosferų litografijos, išvystymas ir pritaikymas SERS paviršių gamybai, pastūmėjo šią sritį link tikslesnių ir patikimesnių tyrimų vykdymo. Tokie gamybos metodai leidžia formuoti pageidaujamas, atsikartojančių parametru nanostruktūras, o tai veda prie patikimų, atsikartojančių rezultatų, registruojant analizuojamų medžiagų SERS spektrus. Pasiiekti aukštą signalo stiprinimo atsikartojamumą buvo beveik neįmanoma taikant anksčiau minėtas SERS substratų gaminimo schemas [135,140].

Viena populiariausių litografijos technikų yra fotolitografija. Naudojant UV šviesos šaltinį, paviršiai yra išsodinami ir taip suformuojami nelygumai. Tokiais pačiais parametrais pasižyminčiu struktūrų gamybai yra taikomos specialios kaukės, kurios atitinkamai paskirsto UV šviesos pluoštą, vienodų formų išgavimui. Tačiau dėl šviesos pluošto difrakcijos ribinės skiriamosios gebos $\lambda/2$ šiuo metodu negali būti suformuotos nano eilės struktūros reikalingos aukštiems SERS stiprinimo faktoriams pasiekti [135]. Todėl šis apdirbimo metodas dažnai taikomas kartu su papildomu cheminiu išsodinimu [154]. Vienas žinomiausių šia technika paruoštų SERS substratų yra Klarite (10 pav.) (Renishaw diagnostics, UK).



10 pav. Klarite SERS substrato paviršius.

Silicio padėkluose fotolitografijos būdu suformuojami mikrokateriai, turintys šiurkščias sienes. Šio substrato paviršiaus išdidintame vaizde,

matomos invertuotos piramidės iššedintos naudojant KOH. Padėklai padengti ~300 nm aukso sluoksniu. Gamintojas skelbia, kad stiprinimas siekia milijonus (10^6) kartų, lyginant su įprastu analitės Raman sklaidos spektru.

Elektronų pluošto litografija (EBL) ir frezavimas fokusuotu jonų pluoštu (FIB) – tai vieni patikimiausių metodų siekiant pagaminti atsikartojančios, pastovios nanostruktūros SERS substratus [153,155]. Deja, abiem atvejais gamyba apima keletą skirtingų etapų kurie užima daug laiko ir riboja tokių metodų taikymą masinei gamybai [135].

2.2.5. Paviršių apdirbimas lazeriu

Dar vienas būdas formuoti SERS substratus yra kietų paviršių apdirbimas lazeriu. Ultratrumpų impulsų lazerio sukelta plazmos abliacija (LIPAA) pasirodė esąs efektyvus nanostruktūrinių paviršių gamybos metodas iš praktiškai bet kokios kietosios medžiagos [156]. Ši technika suteikia galimybę formuoti SERS aktyvius paviršius dviem būdais.

Vienas jų – tai tiesioginė plazmoninių metalų (Au, Ag) arba kompozitinių plonų plokštelių, turinčių plazmoninės medžiagos sluoksnį (stiklo/TiO₂/Ag, stiklo/ITO/Au ir kt.) abliacija [157–160]. Šiuo būdu, veikiant ultratrumpiems lazerio impulsams yra išlydomas išorinis medžiagos sluoksnis, kuris vėliau kondensuojasi į amorfinės nanostruktūras. Nors metodas yra tik vieno etapo, prieš apdorojimą lazeriu plazmoniniai paviršiai turi būti specialiai apdoroti, arba plonas plazmoninės medžiagos sluoksnis turi būti nusodinamas kompozitiniuose paviršiuose.

Alternatyvus metodas – kai kieta neplazmoninė medžiaga iš pradžių yra veikama LIPAA ir tik tada padengiama plona Au arba Ag plėvele. Buividas ir kt. parodė, kad safyras ir SiC [161,162] yra tinkamos medžiagos LIPAA apdirbimui. Šiuo metodu suformuotos nanostruktūros, padengtos plazmoninio metalo sluoksniu pasižymėjo Raman signalo stiprinimu. Pagrindinis metodo privalumas yra kontroliuojamas metalo storis SERS paviršiuje. Be to iš anksto lazeriu apdirbti paviršiai gali būti padengti plazmoninio metalo danga prieš pat naudojimą, taip išvengiant paviršiaus oksidacijos.

Nanostruktūrų formavimui kietų medžiagų paviršiuje dažniausiai naudojami pikosekundiniai ar femtosekundiniai lazeriai. Tokios trukmės lazerio spinduliuotė leidžia išgauti pačias įvairiausias nanostruktūras, kurias padengus tauriuoju metalu, paviršiai pasižymi SERS stiprinimo efektu ir yra tinkami naudoti medžiagų analizei [163]. Būtent šis metodas, pasirinkus femtosekundinį lazerį, ir buvo pritaikytas SERS substratų, naudotų šiame darbe gamybai.

2.3. Savitvarkių monosluoksnių analizė SERS metodu

SERS spektrų analizė yra pakankamai komplikauta. Interpretuojant gautus spektrus, būtina atkreipti dėmesį į tai, kad analizuojant pavyzdžius ant SERS paviršių, gali atsirasti naujų vibracinių juostų, kurios nestebimos paprastos Raman sklaidos atveju. Taip pat dažnas atvejis yra, kad paprasta Raman sklaida stebimos vibracinės juostos gali būti labai silpnos arba visai išnykti SERS atveju.

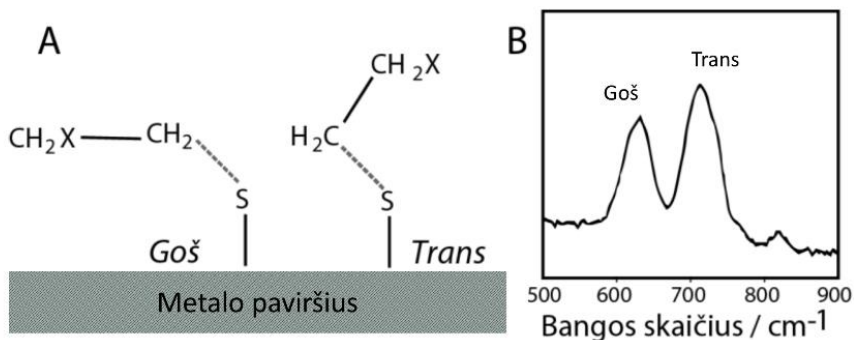
Alkantiolių savitvarkių monosluoksnių struktūros ir sąveikos su paviršiais analizei dažnai taikomi sustiprintos Raman (SERS) ir atspindžio-sugerties infraraudonosios sugerties (RAIRS) metodai. Pagrindinis metodų skirtumas – atrankos taisyklės nusakančios virpesių kilmę ir prigimtį: infraraudonojoje spektroskopijoje aktyviausi tie virpesiai, kurių metu pakinta molekulių dipolio momentas, o Raman spektruose aktyviausi tie virpesiai, kuriems vykstant smarkiai kinta molekulių poliarizuojamumas. Dėl šių priežasčių SAM analizė atlikta abiem metodais išsamiai papildo viena kitą ir suteikia išsamesnės informacijos [118,133,164].

Dar vienas svarbus aspektas yra analitės koncentracija. Panagrinėkime klasikinį pavyzdį su piridinu. Prieš šios medžiagos molekulėms suformuojant monosluoksnį ant SERS substrato paviršiaus, stebima labai neintensyvi Raman sklaida. Padidinus piridino koncentraciją, suformuojamas monosluoksnis nuo kurio gaunamas stiprus signalas. Toks efektas stebimas todėl, kad esant mažoms medžiagos koncentracijoms piridino žiedas gula plokščiai ant metalo paviršiaus, o didėjant koncentracijai žiedas orientuojamas statmenai substrato paviršiaus plokštumai. Tokia orientacija leidžia kompaktiškiau išdėstyti molekules ant paviršiaus ir tokiu būdu jų sutalpinama kur kas daugiau, dėl ko smarkiai padidėja SERS intensyvumas. Tokio efekto priežastys buvo ilgai nežinomos ir kėlė diskusijas. Galiausiai buvo prieita prie vieningos išvados – pagrindinis reikalavimas Raman sklaidos stebėjimui yra molekulės poliarizacinio komponento išsidėstymas statmenai substrato paviršiui [114]. Tuo metu kai šviesa sąveikauja su paviršiumi, stebimas efektas dėl kurio susidaro du elektriniai dipoliai komponentai – vienas lygiagretus, kitas statmenas paviršiui. Piridino atveju, kai žiedas guli plokščiai ant paviršiaus, didžioji dalis poliarizuojamumo pokyčių yra lygiagretūs metalo paviršiui, būtent todėl negalima stebėti stiprios Raman sklaidos. Kai žiedas išsidėsto statmenai paviršiui, vyksta intensyvi sklaida ir užfiksuojamas stiprus Raman signalas [72,114].

Alkantiolių SERS spektrai yra interpretuojami pagal vienai ar kelioms funkcinėms grupėms būdingų modų dažnius, kurie priklauso nuo molekulių

struktūrinių savybių, erdviųjų pokyčių ir šalia esančių molekulių įtakos. Būdingus virpesius galima skirstyti į valentinius, kurie susiję su cheminio ryšio ilgio pokyčiu, arba deformacinius, kurie susiję su ryšio kampo pokyčiais [79,165].

Su metalų paviršiais tioliniai junginiai sąveikauja sudarydami Me-S kovalentinę jungtį. SERS spektruose ši unikali valentinė moda stebima žemuose dažniuose 200-300 cm^{-1} srityje [165,166]. Analizuojant šią sritį galima nustatyti adsorbcijos prie paviršiaus metu vykstančią S-H ryšio disociaciją ir Me-S ryšio susidarymą, o taip pat S-C bei C-C ryšių orientacijas. SAM sudarančių molekulių izomerinę būseną ties pradine grupe iliustruoja $\nu(\text{S-C})$ valentinio virpesio dažnis, kuris SERS spektre stebimas ties 600-750 cm^{-1} (11 pav.). Ši moda pasireiškia goš ir trans konformacinėmis juostomis. Santykinis konformerų kiekis nusakomas intensyvumų santykiu I_T/I_G , kuris parodo adsorbuotų molekulių konformacinę pasiskirstymą [79].



11 pav. (A) goš (*G*) ir trans (*T*) konformacijų palyginimas. (B) Goš ir trans konformacija spektre tiriama S-C valentiniams virpesiams priskiriamoje srityje (600-750 cm^{-1}).

Valentinių $\nu(\text{C-C})$ virpesių sritis esanti ties 1030-1150 cm^{-1} suteikia informacijos apie konformacinę pagrindinės grupės, šiuo atveju angliavandenilinės grandinės, būseną [79]. Ši sritis priklauso simetrinėms ir asimetrinėms metilo ir metileno grupių modoms, pagal kurias nustatoma bendra molekulių orientaciją paviršiaus atžvilgiu [167]. Virpesinė juosta esanti ties 1130 cm^{-1} indikuoja angliavandenilinės grandinės pilnai-trans konformacinę būseną neturinčią goš defektų ir yra laikoma kietos molekulių būsenos ir klasterizacijos žymuo [168,169].

Kitaip nei PSRS spektruose, IR spektruose žemuose dažniuose esančios adsorbuotų alkantiolių virpesinės modos yra neintensyvios. Šiuo metodu tiriamos aukštuose dažniuose esančios virpesinės juostos. Tai νCH_2 , νCH_3 grupių simetriniai ir asimetriniai svyravimai esantys ties 2850 ir 2920 cm^{-1} ,

kurie apibūdina monosluoksniu susipakavimą. Tarpmolekulinėms sąveikoms ypač jautrūs $\nu(\text{CH}_2)$ virpesiai – padidėjusi tinkle sumažina $\nu(\text{CH}_2)$ juostų intensyvumą [170]. Esant aukštam goš konformantų skaičiui alkilinėse grandinėse šios juostos linkusios slinkti į aukštesnių dažnių pusę o jų pusplotis – didėja [28,45].

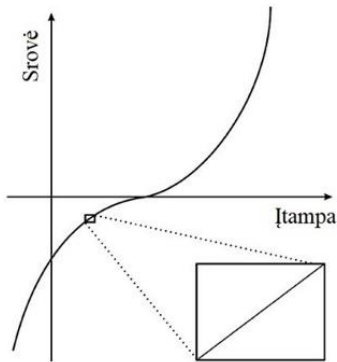
3. Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS)

Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) tai metodas, kuris nagrinėja elektrocheminės sistemos atsaką (srovės stiprio arba įtampos) į kintamosios elektros srovės arba įtampos poveikį [171]. Nuolatinės srovės atveju elektrolitų tirpaluose, yra taikomas Omo dėsnis, kuriuo vadovaujantis nusakomas laidininko priešinimasis srovės tekėjimui (šiuo atveju varža):

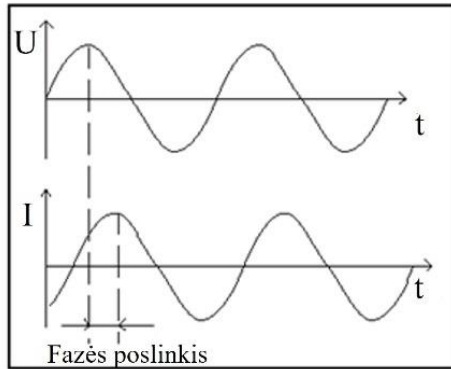
$$R = \frac{U}{I} \quad (1)$$

Kur, R – laidininko varža, matuojama omais (Ω), U – įtampa (voltai – (V)), ir I – srovės stipris, matuojamas amperais (A) [172].

Matavimus atliekant įprastu potenciostatu, elektrocheminei celei suteikiama tam tikro dydžio įtampa ir matuojama ja tekanti srovė. Tačiau padvigubinus įtampą nebūtinai gaunama dvigubai didesnė srovė. Bendru atveju, kintamosios srovės grandinėse srovės atsakas į suteiktą potencialą (U) yra netiesinis (12 pav. A), tačiau sistemas nagrinėti yra daug paprasčiau esant tiesinei priklausomybei. Todėl taikant EIS metodą, impedansas matuojamas elektrocheminei celei suteikiant mažos amplitudės (10 mV) kintamosios srovės signalą, taip sukuriant pseudo-tiesinę sistemą [173].



A



B

12 pav. A – įtampos ir srovės priklausomybės kreivė. Padidintame kvadrato atvaizduojamas tiesinis intervalas, kuriame matuojamas elektrocheminės celės impedansas [173]. B – sinusoidinės kintamosios srovės atsakas į suteiktą potencialą. Įtampa ir srovė kinta tuo pačiu dažniu, tik srovė pastumta per fazę [174].

Idealaus rezistoriaus atveju, taikant Omo dėsnį, varža dažnių intervale nekinta laike. Tačiau elektrocheminėje celėje vykstant įvairiems procesams, egzistuoja ne tik priešinimasis elektros srovės tekėjimui. Tam tikri sistemos elementai gali veikti kaip kondensatoriai ir kaupti elektrinį krūvį. Esant tokiems reiškiniams varžos sąvoka yra keičiama impedansu Z . Impedansas, yra kompleksinė sistemos varža, kuri priešinasi elektros srovės tekėjimui, ir yra apibrėžiamas kaip nuo laiko priklausanti funkcija. Panaudojant tą patį Omo dėsnį, gaunama impedanso matematinė išraiška (2):

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} \quad (2)$$

Kur, įtampa $U(t)$ ir srovė $I(t)$ yra nuo laiko t priklausančios funkcijos [175].

Elektrocheminei celei suteikus sinusoidinės amplitudės įtampą, kuri yra nuo dažnio priklausanti funkcija, gaunama $U(t)$ išraiška (3):

$$U(t) = \Delta U \sin(\omega t) \quad (3)$$

Kur ω – kampinis dažnis ($\omega = 2\pi f$, f – dažnis hercais (Hz)) laiko momentu t , ΔU – įtampos amplitudė.

Kadangi elektronai ne tik paklūsta Omo dėsniai, bet geba ir įsikrauti (išsikrauti) kondensatoriuje, atsiranda fazės poslinkis φ tarp įtampos $U(t)$ ir srovės $I(t)$ (4):

$$I(t) = \Delta I \sin(\omega t + \varphi) \quad (4)$$

Gauta nauja impedanso išraiška (5):

$$Z = \frac{\Delta U \sin(\omega t)}{\Delta I \sin(\omega t + \varphi)} = |Z| \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (5)$$

Kur $|Z|$ – absoliutus impedanso dydis [176]. Įvairius elektrocheminius procesus galima atskirti taikant EIS metodą, kadangi skirtingi kondensatoriai įkraunami ir iškraunami ties skirtingais dažniais.

Panaudojant sinuso funkcijos koreliaciją su kompleksinių skaičių teorija (6) bei Eulerio pakeitimą (7), gaunama kompleksinė impedanso išraiška (8).

$$\sin x = \frac{e^{jx} - e^{-jx}}{2j} \quad (6)$$

$$e^{jx} = \cos x + j \sin x \quad (7)$$

$$Z = |Z|(\cos \varphi + j \sin \varphi) \quad (8)$$

Kur j – menamas vienetas, kurio matematinė išraiška lygi $j^2 = -1$.

Dekarto koordinatėse impedansas užrašomas:

$$Z = Z' - Z'' \quad (9)$$

$$Z' = |Z| \cos \varphi \quad (10)$$

$$Z'' = -|Z| \sin \varphi \quad (11)$$

Kur Z' ir Z'' nurodo impedanso realią ir menamą dalis [175].

Elektrinėje grandinėje impedansą nulemia bendrieji elektriniai elementai – varža, talpa, induktyvumas. Vykdam analizę elektrocheminėje celėje, impedansas priklauso nuo difuzijos, vykstančios cheminės reakcijos ar elektrodų kinetikos. Šiuolaikiniais EIS matavimo prietaisais galima gauti išsamią informaciją apie elektrodo impedansą ir jo priklausomybę nuo dažnio. EIS yra neinvazinis, pavyzdžių nepažeidžiantis metodas, ir yra pritaikomas elektrocheminių reakcijų, antikoroziinių dangų ir kt. tyrimams. Metodą galima naudoti tiriant puslaidininkius, kūrą, baterijas ar polimerų savybes, taip pat ir įvairius biocheminius procesus [177,178].

3.1. EIS pritaikymas SAM ir tBLM tyrimuose

Interpretuojant EIS duomenis yra įprasta charakterizuoti nepriklausomus procesus nulemiančius sistemos atsaką ir sudaryti ekvivalentinę elektrinę sistemos grandinę. Siekiant tinkamai įvertinti ekvivalentinės grandinės sudėtį, privalu identifikuoti kiekvieną vykstantį reiškinį ir priskirti jį atitinkamam grandinės elementui (varža, kondensatorių ir kt.) [176]. Ekvivalentinė grandinė yra sukonstruojama taip, jog realios elektrocheminės sistemos atsakas sutaptų su modelio savybėmis.

Savitvarkių alkantiolių monosluoksnių ir fosfolipidinių dvisluoksnių elektrinės ir struktūrinės savybės, suteikia puikias galimybes panaudoti elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodą. Auksu arba sidabru dengtų stiklo plokštelių paviršiuje suformavus SAM ar tBLM ir panardinus į elektrolito tirpalą, susidaro organinis sluoksnis panašus į plokščiąją kondensatorių. Kondensatorius dažniausiai sudarytas iš dviejų laidininkų (elektrodų), tarp kurių yra plonas dielektriko sluoksnis. Šiuo atveju, organikos sluoksnis (SAM arba tBLM) elgiasi, kaip dielektrikas [179].

Tokioje sistemoje impedansas yra išmatuojamas pagal (12) formulę:

$$Z = \frac{1}{j\omega C} \quad (12)$$

Kur j – menamas vienetas, ω – kampinis dažnis (rad) ir C – talpa (F) [112].

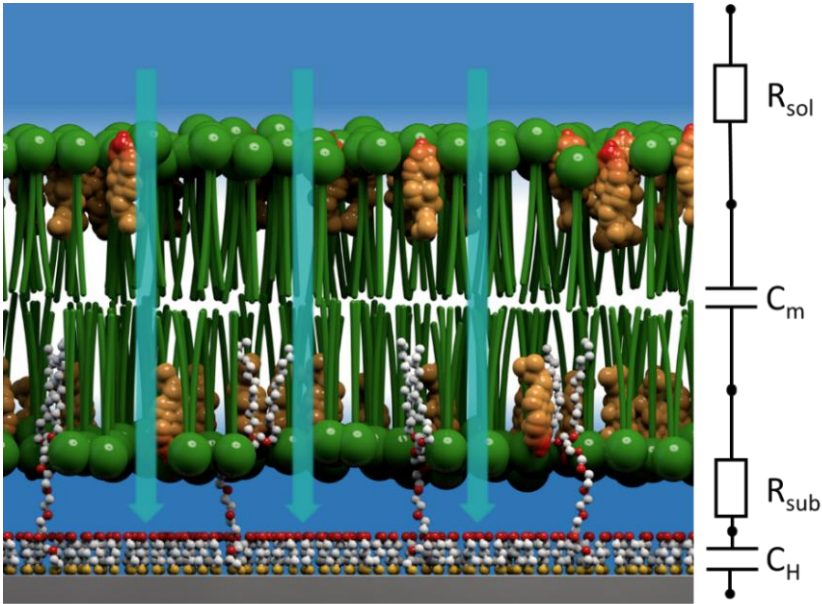
Realių elektrocheminių sistemų atveju, įmerkus elektrodą į tirpalą negaunamas idealus kondensatorius – fazės poslinkio kampas realioms sistemoms visada būna mažesnis nei 90° . Šis nuokrypis atsiranda dėl paviršiaus šiurkštumo. Todėl įvedamas pastovios fazės elementas (CPE), kuris įvertina paviršiaus talpą ir šiurkštumą. CPE fazės poslinkio kampas prilyginamas konstantai ir yra nekintantis dažnių intervale. Tokiu atveju impedansas yra apskaičiuojamas:

$$Z = \frac{1}{\text{CPE}(j\omega)^\alpha} \quad (13)$$

Kur α – CPE laipsnio rodiklis, kintantis nuo 0 iki 1. Esant idealiai lygiems paviršiams $\alpha = 1$. Realių sistemų atveju, šis dydis visada yra mažesnis už 1 [176].

Ant elektrodo suformuoto organinio sluoksnio talpa C (14) priklauso nuo vakuumo dielektrinės konstantos ϵ_0 ($8,854 \times 10^{-14}$ F/cm), sluoksnio dielektrinės skvarbos ϵ , membranos paviršiaus ploto A (cm²) bei tBLM storio d (cm) [180].

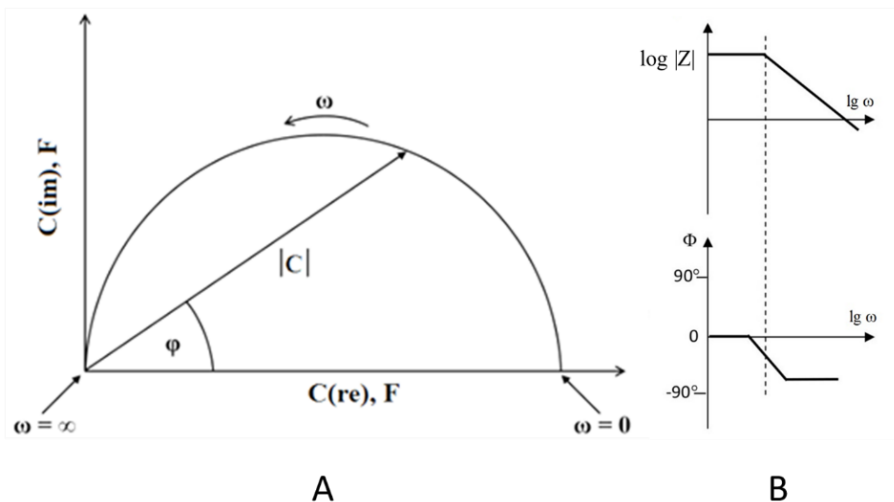
$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon A}{d} \quad (14)$$



13 pav. tBLM ekvivalentinė elektrinės grandinės schema. Šis modelis nusako nuosekliai sujungtus R_{sol} , C_m , R_{res} , C_H elementus. R_{sol} – tirpalo varža, C_m – dvisklusknio talpa, R_{sub} – pomembraninio rezervuaro varža, C_H – SAM talpa. Pagal [181].

tBLM sistemai taikomas RC modelis – čia varžos ir kondensatoriaus elementai sujungiami nuosekliai. Tinkamai parinkus ekvivalentinės grandinės elementus, galima tiksliai interpretuoti elektrocheminėje sistemoje vykstančius procesus. 13 pav. pateikta ekvivalentinė schema, vaizduojanti tBLM, kurioje nėra defektų. R_{sol} – buferinio tirpalo elektrinė varža, C_m – membranos talpa, R_{sub} – pomembraninio rezervuaro varža ir C_H – SAM talpa. Remiantis eksperimentiniais duomenimis, ekvivalentinės schemas gali būti papildytos naujais elementais, kurie apibrėžtų daugiau vykstančių procesų – membranos defektų susidarymą ar poras formuojančių toksinų veikimą [181].

Pagrindiniai elektrocheminio impedanso metodu gautų rezultatų atvaizdavimo būdai, dirbant su SAM ir tBLM sistemomis, yra Nyquist (kitai žinomas kaip Cole-Cole) kompleksinės talpos spektras ir Bode spektras (14 pav.). Cole-Cole grafikas yra grafinė menamos (C_{im}) ir realios (C_{re}) membranos talpos dalių priklausomybė. Talpos pokyčiai leidžia nuspėti apie dielektrinių SAM ir tBLM savybių bei sudėties pokyčius [182].



14 pav. A – Cole-Cole kompleksinės talpos grafikas, vaizduojantis menamos ir realios talpos dalių priklausomybę; B – Bode grafikas, vaizduojantis absoliučios impedanso reikšmės logaritmo ir fazės poslinkio kampo priklausomybę nuo kampinio dažnio. Pagal [179].

Kadangi, toks grafikas neatvaizduoja priklausomybės nuo dažnio, rezultatų analizei naudojamos ir kitos koordinatės – Bode. Bode grafikas rodo impedanso modulio $\log|Z|$ ir impedanso fazės (φ) priklausomybę nuo kampinio dažnio $\lg\omega$. Iš Bode spektrų galima apskaičiuoti ne tik jau minėtus kinetinius parametrus bet nustatyti fazės poslinkio φ maksimalias ir minimalias vertes [183]. Bode spektrai paprastai atvaizduojami logaritminėje impedanso ir dažnių skalėje, kadangi yra išmatuojamas vienodas skaičius taškų kiekvienoje dekadėje [184]. Neretai vietoj impedanso yra naudojamas ir jo atvirkščias dydis – admitansas (Y) arba tiesiog laidumas, bei jo fazės kitimo spektras [176].

MEDŽIAGOS IR METODAI

4. Naudotos cheminės medžiagos ir tirpalai

4.1. Cheminės medžiagos

2-propanolis (Sigma Aldrich, JAV);
3M1P – 3-merkpto-1-propanolis – Sigma Aldrich, Vokietija;
4M1B – 4-merkpto-1-butanolis – Sigma Aldrich, Vokietija;
6M1H – 6-merkpto-1-heksanolis – Sigma Aldrich, Vokietija;
9M1N – 9-merkpto-1-nonanolis – Sigma Aldrich, Vokietija;
Chloroformas (Sigma-Aldrich, JAV);
Cholesterolis – Avanti Polar Lipids, JAV;
Dejonizuotas vanduo – Milli-Q plus, JAV, 18,2 MW·cm;
DOPC – 1,2-dioleilo-sn-glicerolio-3-fosfocholinas Avanti Polar Lipids (JAV);
Etilo alkoholis – Vilniaus degtinė, Lietuva, 96 %;
H₂SO₄ – Roth, Vokietija;
Heksantiolis – Sigma Aldrich, Vokietija;
Na₂HPO₄·H₂O – Fluka, Šveicarija
NaClO₄ – Sigma Aldrich, Vokietija;
NaH₂PO₄·H₂O – Fluka, Šveicarija
NaOH – Sigma Aldrich, Vokietija;
Tiofenolis – Sigma Aldrich, Vokietija;
WC14 – 20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis (22 pav.). Junginį susintetino David J. Vanderah grupė (NIST Chemical Science and Technology Laboratory, Gaithersburg, Maryland, USA) pagal protokolą aprašytą [44] šaltinyje.
βME – β-merkptoetanolis – Sigma Aldrich, Vokietija;

4.2. Tirpalai

Tiofenolio tirpalas – 0.2 mM tiofenolio ištirpinama 96% etanolyje;
50 mM βME, 3M1P, 4M1B, 6M1H, 9M1N tirpalai etanolyje;
5 mM WC14 tirpalai etanolyje;
10 mM DOPC ir cholesterolio tirpalai chloroforme;
Natrio fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) (5,6; 7,2 pH) – 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, druskos tirpinamos dejonizuotame vandenyje skirtingais santykiais pagal reikiamą pH.. Tirpalas perfiltruojamas per 0,22 μm filtrą (Corning, JAV) ir laikomas kambario temperatūroje.

Natrio fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) su 0,05 M NaClO₄ (5,6; 7,2 pH) – 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, druskos tirpinamos dejonizuotame vandenyje skirtingais santykiais pagal reikiamą pH. Pridedama 0,05 M NaClO₄. Tirpalas perfiltruojamas per 0,22 μm filtrą (Corning, JAV) ir laikomas kambario temperatūroje.

Rekombinantinis vaginolizinas (VLY), N-gale turintis His inkarinę seką, klonuotas ir išgrynintas, kaip aprašyta [185]. Baltymas išskirtas kolegijų Dr. Mildos Plečkaitytės ir Dr. Mildos Zilnytės iš VU GMC Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus.

5. Taikyti metodai

5.1. SERS substrato (jutiklio) paruošimas ir savybių tyrimas

5.1.1.SERS substrato paruošimas

Kaip aprašyta anksčiau [186], SERS substratai buvo paruošti naudojant mikroskopinius natrio-kalcio silikatinis stikliukus ($25 \times 75 \times 1 \text{ mm}^3$, Thermo Fischer Scientific), kurių paviršiuje femtosekundinės lazerinės abliacijos metodu formavome struktūras tinkamas biomolekulių SERS signalo stiprinimui. Prieš lazerinį apdirbimą mikroskopiniai stikliukai buvo įrėžti deimantiniu disku.

Substratų gamybai naudota sistema buvo sudaryta iš 515 nm femtosekundinio lazerio (PHAROS) su antros harmonikos modulių, motorizuoto optinės galios silpnintuvo (UAB „Altechna“), 50 mm židinio nuotolio fokusuojančio lęšio ir tikslaus pozicionavimo stalų (Aerotech Inc.). Sistema buvo valdoma programine įranga SCA Professor (UAB "Altechna R&D"). Prieš vakuuminį sidabro plėvelės nusodinimą, nenustruktūruoti stikleliai buvo plaunami 2-propanolyje ir džiovinami filtruoto azoto srove (5 μm filtras).

Sidabro plėvelių padengimas buvo vykdomas KJLC PVD75 magnetrono kameroje. Garinimas vykdomas pasiekus vakuumą $7,8 \times 10^{-8}$ Torr, dengiamas 170 nm storio sidabro sluoksniu (jeigu nenurodyta kitaip), esant garinimo galiai 120 W ir 4,2 mTorr likutiniam slėgiui. Po garinimo kamera pripildoma azoto dujų. Ant sidabru padengto pavyzdžio iš karto formuojamas savitvarkis monoslauksnis arba pavyzdys saugomas tolimesniems eksperimentams.

5.1.2.SERS paviršiaus morfologijos vertinimas

SERS substratų paviršiaus morfologija buvo apibūdinta naudojant skenuojančią elektroninę mikroskopiją (SEM) ir atominės jėgos mikroskopiją (AFM), kaip detaliai aptarta literatūroje [186].

Lazeriu apdirbtų paviršių, padengtų 170 nm sidabro plėvele (jeigu nenurodyta kitaip), vaizdai buvo gauti naudojant skenuojančią elektronų mikroskopą JSM-6490LV JEOL (Japonija).

Paruošto sensoriaus paviršiaus topografinė analizė atlikta atominių jėgų mikroskopu Dimension Icon (Bruker, JAV). Matavimus atliko Dr. Marija Jankunec, VU, GMC, bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyrius. Vaizdavimas atliktas pusiau kontaktiniu būdu kambario temperatūroje, naudojant, FESP (galiuko spindulys 8-12 nm, spyruoklės konstanta $k = 1 - 5$ N/m, rezonansinis dažnis = 50-100 kHz) arba TESP (galiuko spindulys 7-10 nm, spyruoklės konstanta $k = 19-55$ N/m, rezonansinis dažnis = 270-370 kHz) tipo zondus. Reprezentatyvus paviršių topografinių nuotraukų plotas $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ su 512×512 pikselių rezoliucija, esant nuo 0,2 iki 0,4 Hz skenavimo greičiams. Gauti vaizdai analizuoti prietaiso gamintojo pateiktu vaizdų analizės programiniu paketu NanoscopeAnalysis v1.9 (Bruker, JAV).

5.1.3.SERS substrato savybių tyrimas

Tiofenolio savitvarkis monosluoksnis buvo formuojamas iš 0,2 mM etanolinio tirpalo, formavimas vyko 60 min, kambario temperatūroje, po formavimo medžiagos perteklius buvo nuplautas etanoliu. Tiofenolio virpesiniai spektrai pateikti 18 pav.

Paviršiaus sustiprinti Raman sklaidos spektrai buvo registruojami naudojant 785 nm žadinančią spinduliuotę. Dirbau su dviem skirtingomis Raman sistemomis:

1. Renishaw inVia Raman mikroskopu, naudojant 1200 rėžiai/mm gardelę. Lazerio galia bandinio paviršiuje buvo 1 mW, Raman spektrai registruoti naudojant $5 \times$ objektyvą. ;

2. LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon) Raman mikroskopu, naudojant 600 rėžiai/mm gardelę. Raman spektrai registruoti naudojant $10 \times$ objektyvą. Lazerio galia bandinio paviršiuje buvo 0,1 mW.

Virpesiniai spektrai buvo analizuojami naudojant GRAMS/386 (Thermo Scientific Inc.) programinę įrangą. Analitėms charakteringų juostų intensyvumai buvo gauti aprašant eksperimentinius SERS spektrus Lorencio-

Gauso komponentėmis. Grafiniam rezultatų atvaizdavimui buvo naudota programa Sigma Plot 11.0 (Systat software, Inc.).

5.1.4. TF savitvarkių monosluoksnių desorbcija

Tiolių elektrocheminės desorbcijos rezultatai suteikia informacijos apie paviršiaus padengimą, metalo-sieros ryšio stiprį ir tarpmolekulines sąveikas [187]. Elektrocheminė SAM desorbcija nuo SERS aktyvaus ir neaktyvaus sidabro paviršių buvo atlikta 0,5 M NaOH + 0,1 M Na₂SO₄ tirpale, kuriame potencialas skleistas 50 mV/s greičiu nuo 0 V iki -1,50 V palyginamojo Ag/AgCl/KCl_{sotus} elektrodo atžvilgiu, naudojant AutoLab PG101 (Methorms, The Netherlands) potenciostatą. TF savitvarkių monosluoksnių potenciodinaminės kreivės buvo lyginamos su modeliniu junginiu 1-heptantioliu (HPT). Matavimus atliko Dr. Martynas Talaikis, VU, GMC, bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyrius.

5.1.5. SERS jutiklio signalo stiprinimo ir jo tolygumo tyrimas

SERS signalo stiprinimo žemėlapių sudarymui naudojome tiofenoliu funkcionalizuotus paviršius. Vertinome pagal 1072 cm⁻¹ esančią virpesinę juostą. Matavimai atlikti 100 × 100 μm² dydžio SERS substrato plote, kai žingsnio dydis buvo 3 μm, kiekvieną spektrą registruojant 0,5 s esant 0,9 mW lazerio galiai. Spindulys fokusuotas naudojant 20 ×/0,4 NA (Leica) objektyvą. Lazerio taško skersmuo mėginyje buvo 2,4 μm. Skersmuo apskaičiuotas pagal ryšį: $d = 1,22\lambda_0 NA^{-1}$, kur λ_0 – sužadavimo bangos ilgis, o NA – skaitinė apertūra.

Paruošto SERS jutiklio stiprinimo faktorius buvo įvertintas kaip detalai pateikta literatūroje [186]. Vertinimą atliko dr. Martynas Talaikis, VU, GMC, bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyrius.

5.2. Inkarinių savitvarkių monosluoksnių formavimas ir analizė

5.2.1. Lygių sidabru dengtų plokštelių paruošimas

Mikroskopiniai stikliukai (25 × 75 × 1 mm³, Thermo Fischer Scientific) buvo naudojami kaip substratai desorbcijos, RAIRS ir EIS eksperimentuose. Prieš stiklus padengiant sidabro danga, jie yra plaunami ultragarsinėje vonelėje, gryname propanolyje. Po to 20 min. inkubuojami sieros rūgštyje kurios likučiai gausiai nuplaunama su dejonizuotu vandeniu (18,2 Ω cm², Mili-Q, Millipore, Burlington, MA, USA) ir plokštelės nudžiovinamos azoto dujų srove (99,99 % švarumo). Taip paruoštos stiklo plokštelės patalpinamos

į vakuuminę PVD75 magnetrono kamerą. Garinimas vykdomas pasiekus vakuumą $7,8 \times 10^{-8}$ Torr.

Visų pirma, stiklo plokštelės padengiamos 3 nm chromo sluoksniu (galia – 200 W, likutinis slėgis – 4,5 mTorr), siekiant pagerinti sidabro sukibimą su paviršiumi. Toliau plokštelė dengiama 170 nm storio sidabro sluoksniu (jeigu nenurodyta kitaip), esant garinimo galiai 120 W ir 4,2 mTorr likutiniam slėgiui. Po garinimo kamera pripildoma azoto dujų. Ant sidabru padengto pavyzdžio iš karto formuojamas savitvarkis monosluoksnis arba pavyzdys saugomas tolimesniems eksperimentams [188,189].

5.2.2.Savitvarkių monosluoksnių formavimas

Šviežiai paruošti SERS jutikliai ir lygios sidabro plokštelės (elektrodai) buvo panardinami į 0,1 mM (bendra tiolių koncentracija) etanolinius tiolių tirpalų mišinius. Naudojome ilgagrاندį inkarinį junginį WC14 ir keturis skirtingus trumpagrاندžius paviršinius skiediklius: 3-merkapto-1-propanolis (3M1P), 4-merkapto-1-butanolis (4M1B), 6 merkapto-1-heksanolis (6M1H) , ir 9-merkapto-1-nonanolis (9M1N) (Sigma Aldrich, Sent Luisas, MO, JAV) (2 pav.). Molinis santykis (WC14:trumpagrандis junginys) buvo 20:80 mol% atitinkamai (jeigu nenurodyta kitaip). Sidabro substratai tirpaluose buvo inkubuojami 3 valandas, kad susidarytų savitvarkiai monosluoksniai (SAM). Po inkubacijos tiolių perteklius nuo substratų nuplaunamas grynu etanoliumi, o paviršiai išdžiovinami azoto srove [188].

5.2.3.Savitvarkių monosluoksnių SERS analizė

Paviršiaus sustiprinti Raman sklaidos spektrai buvo registruojami Raman mikroskopu LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon), naudojant 600 rėžiai/mm gardelę. SERS spektrai registruoti naudojant CW 785 nm žadinančią spinduliuotę, 10×/0,25 objektyvu (Olympus). Lazerio galia bandinio paviršiuje buvo 2 mW. Bendras integravimo laikas 100 s [188].

Virpesiniai spektrai buvo analizuojami naudojant GRAMS/386 (Thermo Scientific Inc.) programinę įrangą. Analitėms charakteringų juostų intensyvumai buvo gauti aprašant eksperimentinius SERS spektrus Lorencio-Gauso komponentėmis. Grafiniam rezultatų atvaizdavimui buvo naudota programa Sigma Plot 11.0 (Systat software, Inc.).

5.2.4. Savitvarkių monosluoksnių RAIRS analizė

RAIRS spektrai buvo registruojami naudojant Vertex 80v spektrometrą (Bruker, Inc., Ettlingen, Vokietija), su skystu azotu aušinamu MCT detektoriumi ir RAIRS priedu, atspindinčiu π -poliarizuotą šviesą 80° kampu. Nustatyta spektrinė skiriamoji geba 4 cm^{-1} .

Tikslios spektrinių juostų padėtys priskirtos aprašant eksperimentinius RAIRS spektrus Lorencio-Gauso komponentėmis ir atlikta antrosios išvestinės spektrinė analizė [188].

5.2.5. Paviršiaus kontaktinio kampo įvertinimas

Švirksčiu su sukamu mechanizmu ant tiriamo pavyzdžio (SAM sluoksniu funkcionalizuoto aukso paviršiaus) atsargiai užlašinami $\sim 5 \mu\text{L}$ tūrio dejonizuoto vandens lašeliai ir fotografuojami panaudojant Krüss EasyDrop paviršiaus kontaktinio kampo matavimo įrangą. Analizuojami to paties gamintojo pateikiama programine įranga. Matavimo metu sistemoje naudojant termostatą LabTech H50-500 palaikoma 21°C temperatūra. Atliekami mažiausiai 5 matavimai kiekvienos SAM sudėties atveju, o rezultatai pateikiami kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

5.3. tBLM formavimas ir elektrocheminė analizė

5.3.1. tBLM formavimas ant mišrių SAM

Paviršiuje imobilizuotų dvisluoksnių lipidinių membranų formavimo metodika adaptuota pagal Ragaliauskas *et al.*, 2017 [103]. Pradinė metodika buvo keičiama tam, kad išvengtų sidabro paviršiaus pažeidimų, kuriuos sukelia stipri Ag-Cl sąveika, todėl pakeitėme buferinių tirpalų sudėtis atsisakant NaCl druskos.

Pradiniuose eksperimentuose su 50:50 DOPC:Chol santykiu naudojome 0,01 M fosfatinį buferį – 0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH=5,6 ir pH=7,2, kaip aprašyta [189] šaltinyje. Vėlesniuose darbo etapuose, dėl didelės tokio tirpalo varžos buferį papildėme 0,05 M NaClO_4 ir sėkmingai taikėme likusiuose eksperimentuose, kaip aprašyta [188] šaltinyje.

tBLM (paviršiuje imobilizuotos dvisluoksnės lipidinės membranos) formuojamos liejant daugiasluoksnes lipidines liposomas (MLV), sudarytas iš DOPC ir cholesterolio (50:50 arba 60:40 molinėmis proporcijomis) ant anksčiau pasiruošto mišraus 20:80 % (jeigu nenurodyta kitaip) savitvarkio monosluoksnių. MLV paruošimą sudaro šie etapai: (1) reikiamu santykiu

stikliniame buteliuke sumaišomi 10 mM koncentracijos DOPC ir cholesterolio chloroformo tirpalai. (2) chloroformas išgarinamas pučiant silpna azoto srove apie 30 min. Ant buteliuko sienelių lieka plona lipidų plėvelė; (3) į buteliuką įpilamas reikiamas tūris fosfatinio buferinio tirpalo su natrio perchloratu (0,05 M NaClO₄ + 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 5,6), kad susidarytų 1 mM lipidų tirpalas; (4) tirpalas atsargiai maišomas automatine pipete kelias minutes, kol praranda skaidrumą – jame susidaro MLV.

MLV tirpalas užpilamas ant sidabro elektrodo padengto atitinkamu mišriu SAM ir inkubuojama apie 30 min. Vėliau elektrodas gausiai plaunamas fosfatinio buferiniu tirpalu su natrio perchloratu (0,05 M NaClO₄ + 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,3) nenudžiovinant elektrodo paviršiaus.

5.3.2. Elektrocheminė analizė

Imobilizuotų membranų formavimo ir sąveikos su baltymais elektrocheminiai tyrimai buvo atliekami elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu (EIS). EIS tyrimai buvo atlikti, naudojant firmos Zahner Zennium (Vokietija) elektrocheminę darbo stotį Zennium, valdomą Thales z 2.0 programiniu paketu. Atsižvelgiant į sensoriaus paviršiaus šiurkštumo faktorių, matuojamo paviršiaus plotas vienoje celėje buvo 0,16 cm². Naudojama trijų elektrodų sistema, kurioje darbinis elektrodas yra pats sidabru padengtas sensorius, palyginamasis elektrodas Ag/AgCl/KCl_{sotus} mikroelektrodas, o pagalbinis – 0,25 mm skersmens platinos (Pt) viela (Pt 99,9 %, Sigma-Aldrich), apvyniota aplink palyginamąjį elektrodą.

EIS spektrai gauti dažnių diapazone nuo 0,1 Hz iki 100 kHz, matuojant po 10 logaritmiškai paskirstytų taškų kiekvienoje dekadėje. Matavimų sužadinančio signalo amplitudė buvo 10 mV, registruojant srovės atsaką skirtingame dažnyje. Elektrocheminio impedanso spektrai buvo registruojami potenciostatinėse sąlygose, suteikiant tiriamajam elektrodai 0 V potencialą palyginamojo Ag/AgCl/KCl_{sotus} elektrodo atžvilgiu. Taip nustatomas sistemos impedansas minėtame dažnių diapazone. Iš jo galima įvertinti SAM ir tBLM dielektrinę talpą bei sistemos laidumą. Metodika ir duomenų analizė detalai aprašyta [190].

5.3.3. tBLM vaizdinimas ir analizė AFM metodu

Paruošto sidabrinio biosensoriaus, su suformuota tBLM paviršiaus topografinė analizė atlikta skenuojančio zondo mikroskopavimo sistema Dimension Icon (Bruker, JAV). Matavimus atliko Dr. Marija Jankunec,

VU,GMC, bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyrius. Matavimai atlikti fosfatiniame buferyje 0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,3) kambario temperatūroje. Vaizdavimas atliktas pusiau kontaktiniu metodu, naudojant SNL-C zondus (galiuko spindulys 2-12 nm, spyruoklės konstanta $k = 0,12 - 0,48 \text{ N/m}$, rezonansinis dažnis = 40-75 kHz (ore)) (Bruker, JAV). Reprezentatyvus paviršių topografinių nuotraukų plotas $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ su 512×512 rezoliucija, esant nuo 0,2 iki 2 Hz skenavimo greičiams. Paruošimo ir matavimo metu paviršius visą laiką buvo panardintas skystyje. Gauti vaizdai analizuoti prietaiso gamintojo pateiktu vaizdų analizės programiniu paketu Nanoscope Analysis v1.9 (Bruker, JAV).

5.3.4.EIS duomenų analizė

EIS matavimams naudotas „Thales 2.0“ programinis paketas. Gauti spektrai analizuoti „Zview 2.0“ duomenų modeliavimo paketu.

Skaičiavimams ir duomenų pateikimui naudoti „MS Excel“ ir „Origin 9.0“ programinės įrangos paketai.

Visi eksperimentai atlikti mažiausiai 5 kartus.

REZULTATAI

6. SERS substratai biomolekulių adsorbcijai

Norint patikimai analizuoti SERS substratų paviršiuose adsorbuotas biomolekules – labai svarbu paruošti tokius substratus, kurie tolygiai stiprintų signalą visame aktyviame plote. Pasiėkus aukštą signalo stiprinimo tolygumą ir atsikartojamumą, galime būti tikri, kad registruojamas biomolekulių SERS spektras, bet kuriame aktyviosios zonos taške parodys patikimą rezultatą.

Šiame tiriamojo darbo etape, pagrindinis tikslas buvo sukurti greitą paprastą ir pigų metodą SERS substratų gamybai, kurie būtų tinkami biomolekulių nustatymui ir analizei. Siekėme, kad substratai būtų jautrūs mažoms analizių koncentracijoms. Taip pat, vienas iš svarbiausių prioritetų buvo signalo stiprinimo tolygumas visame substrato paviršiuje. Šiam tikslui buvo pritaikyta ir patobulinta E. Pabrėžos magistro darbe aprašyta paviršių apdirbimo metodika [191]. Vadovaujantis 2006 publikuotais duomenimis [192], SERS paviršiai turi atitikti eilę reikalavimų susijusių su signalo stiprinimu, paviršių stabilumu ir rezultatų atsikartojamumu, tam kad būtų galima substratus pritaikyti didelės apimties biocheminiams, analitiniams procesams ir pramonėje. Tobulindami Pabrėžos aprašytą metodą stengėmės sukurti tokią SERS substratų paruošimo techniką, kad rezultatas atitiktų mūsų išsikeltus kriterijus.

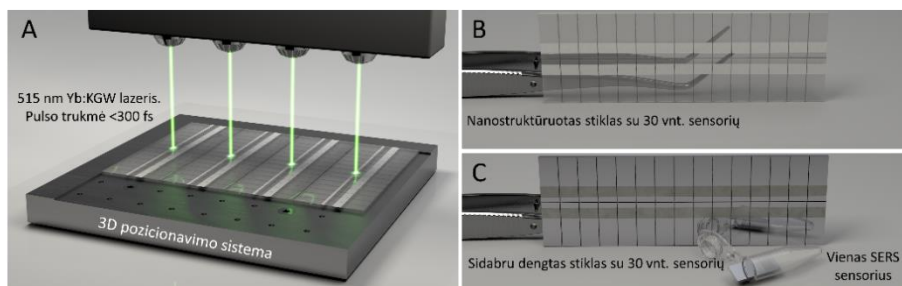
SERS substratų gamybai naudojome mikroskopinius natrio-kalcio silikatinis stikliukus ($25 \times 75 \times 1 \text{ mm}^3$, Thermo Fischer Scientific), kurių paviršiuje femtosekundinės lazerinės abliacijos metodu formavome struktūras tinkamas biomolekulių SERS signalo stiprinimui. Literatūros duomenimis beveik visos kietosios medžiagos yra tinkamos tokio tipo lazeriniam apdirbimui [193]. Natrio-kalcio silikatinis stiklas buvo pasirinktas ne atsitiktinai. Tai lengvai prieinama ir pigi medžiaga – kas yra itin svarbu, norint sukurti pigius substratus tinkamus didelės apimties biocheminiams-analitiniams taikymams.

6.1. SERS aktyvių substratų gavimas lazerinės abliacijos metodu

Gaminat SERS substratus, formuojamų amorfinių nanostruktūrų charakteristikos buvo kontroliuojamos valdant femtosekundinio lazerio ir stiklo paviršiaus sąveiką, siekiant išgauti kuo tolygesnį paviršių, kuriame nanostruktūrų dydžiai varijuotų nuo $\sim 10 \text{ nm}$ iki $1 \mu\text{m}$ (literatūros duomenimis, būtent tokio dydžio nanostruktūros yra tinkamos Raman signalo stiprinimui taikant lazerio šviesos bangų ilgus visame matomame spektre ir iki 1064 nm [129]). Keletas lazerio impulsų buvo tarpusavyje perdengiami

veikiant paviršių, ko pasekoje formavosi SERS aktyvūs nanosferų klasteriai. Lazerio srauto ir impulsų persidengimo atžvilgiu yra siauras parametų langas, kuriame susidaro pageidaujamo dydžio nanostruktūros. Naudotas lazerio spinduliuotės energijos tankis buvo $0,032 \text{ J/cm}^2$, bangos ilgis $\lambda=515 \text{ nm}$, impulsų pasikartojimo dažnis 40 kHz .

Toks lazerinis paviršių apdirbimo procesas yra labai efektyvus ir leidžia pasiekti didelį našumą stiklo atveju. 35 minutes trunkančio lazerinio proceso metu pagaminame 120 sensorių (viso substrato matmenys $12,5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$ su $3 \times 5 \text{ mm}^2$ SERS aktyvia zona) (15 pav. C).

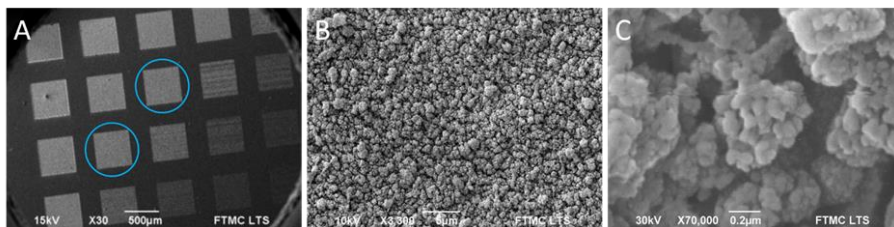


15 pav. SERS substratų gamybos schema. (A) Schematinis lazerinio apdirbimo proceso vaizdas; (B) Nanostruktūruotas mikroskopinis stiklelis su 30 vnt. sensorių. (C) Sidabru dengtas stiklas su 30 vnt. sensorių ir vieno sensoriaus schematinis atvaizdavimas 0,5 ml mėgintuvėlyje. Pagal [186].

6.2. SERS substrato morfologija

Vykdamt SERS substratų lazerinį formavimą, svarbu kontroliuoti nanostruktūrų morfologiją, siekiant sukurti palankiausias paviršius biomolekulių analizei. Gamybos metu, buvo siekiama surasti optimalias impulsų perklojimo sąlygas ir parinkti geriausią impulsų tankį į ploto vienetą, kad suformuota nanostruktūra būtų kuo tolygesnė, tačiau išliktų savitvarakis persilydžiusių nanostruktūrų raštas. 16 pav. A dalyje, parodyta, kaip vizualiai skiriasi apdirbti paviršiai, kai yra keičiamas impulsų persidengimas (lazerio veikimas į tą pačią abliacijos zoną) horizontaliai ir vertikalčiai. Horizontalčiai keičiamas impulsų persiklojimas nuo $\sim 80 \%$ (kairėje) iki 50% (dešinėje); vertikalčiai – nuo $\sim 20 \%$ (apačioje) iki 70% (viršuje). Jeigu lazario spindulys po sąveikos su stiklo paviršiumi suformuoja $100 \mu\text{m}$ kraterį, tai esant pavyzdžiui 80% impulsų persiklojimui, antras lazario impulso formuojamas krateris bus paslinktas per $20 \mu\text{m}$ pirmojo atžvilgiu. Tokie impulsų persiklojimai leidžia valdyti paviršiaus apdorojimo mastą. 16 pav. B ir C dalyse pateikti SEM vaizdai optimalios toliau šiame darbe naudotos

struktūros, kuri formuojasi kai femtosekundinio lazerio impulsais X ir Y kryptimis persidengia 40 % ir 80 % atitinkamai.



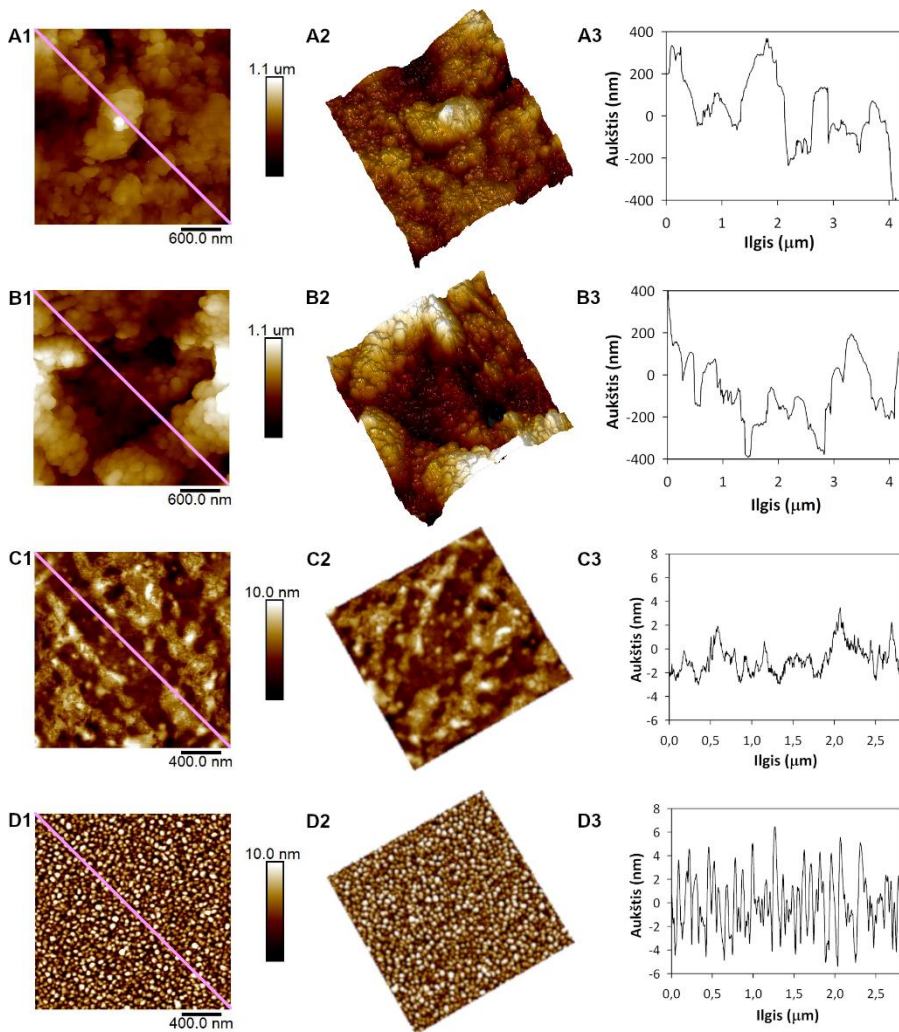
16 pav. Sidabru dengtų SERS substratų SEM nuotraukos, skirtingais didinimo režimais. (A) Ploteliai suformuoti keičiant impulsų persiklojimo ir impulsų tankio parametrus. Optimali struktūra pažymėta mėlynais apskritimais. (B) $\times 3300$ ir (C) $\times 70000$ optimalios struktūros padidinimas.

Pateikti SEM vaizdai rodo, kad lazeriu apdirbtas ir sidabro plėvele padengtas paviršius yra amorfinis, nuklotas atsitiktinėmis ~ 100 nm diametro sidabro nanostruktūromis (nanoertmėmis ir nanosferomis), kurios apsijungia į didesnius $\sim 1-3$ μm mikrodarinius (16 pav. B ir C).

Siekiant palyginti lazeriu apdirbto paviršiaus charakteristikas prieš padengiant sidabro danga ir po dengimo 170 nm Ag sluoksniu, pasitelkėme atominės jėgos mikroskopijos (AFM) metodą.

AFM duomenys parodė, kad sidabro sluoksnis neturi reikšmingos įtakos paviršiaus šiurkštumui, o RMS (angl. root mean square) praktiškai nepakito po Ag nusodinimo. Apskaičiuotos RMS vertės lazeriu apdirbto stiklo be sidabro dangos ir su 170 nm sidabro danga atitinkamai yra $270,7 \pm 109,2$ nm ($n=7$) ir $266,0 \pm 76,6$ nm ($n=6$). Aukščio profilio amplitudė 17 pav. A3 ir B3 dalyse išlieka tame pačiame maždaug 800 nm diapazone.

Taip pat siekėme išsiaiškinti tikrąjį paviršiaus plotą, kuris dėl susidariusių nanostruktūrų lazerinio apdirbimo metu, padidėja lyginant su geometriniu plotu, kuris šiuo atveju buvo 3×3 μm^2 kvadratas AFM vaizde. Apskaičiuotas ploto padidėjimas yra atitinkamai $1,95 \pm 0,21$ ($n=7$) karto lazeriu apdirbtame paviršiuje be Ag dangos ir $2,02 \pm 0,35$ ($n=6$) karto po Ag plėvelės nusodinimo. Lazeriu neapdoroto stiklo paviršiaus prieš dengimą ir padengus 170 nm Ag plėvele, aukščio profiliai neviršija 15 nm amplitudės (17 pav. C3 ir D3 dalys) ir neturi aptinkamo SERS sklaidos stiprinimo efekto, kaip parodėme vėliau (18 pav. c ir e).



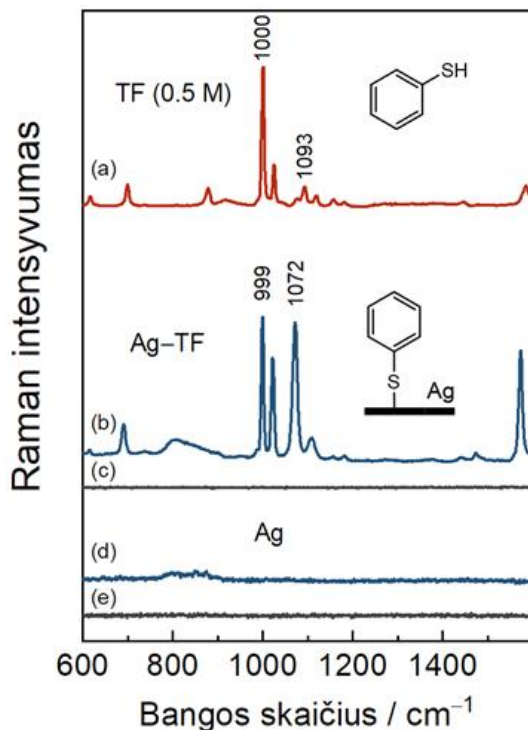
17 pav. Lazeriu apdirbto stiklo morfologija prieš (A1, A2, A3 dalys) ir po (apačioje B1, B2, B3 dalys) dengimo 170 nm storio sidabro plėvele. (A1 ir B1) 2D AFM paveikslai gauti $3 \times 3 \mu\text{m}$ skenavimo plote; (A2 ir B2) to paties ploto 3D vaizdinimas; (A3 ir B3) aukščio profilio amplitudės. Lazeriu neapdirbto stiklo paviršius prieš (C1, C2, C3 dalys) ir po dengimo 170 nm Ag plėvele (D1, D2, D3 dalys), atitinkamai.

Ploni sidabro sluoksniai stiklo paviršiuje yra plačiai ištyrinėti ir aprašyti literatūroje, siekiant susieti stiklo paviršiaus ir metalo dangos charakteristikas su SERS signalo kokybe ir intensyvumu [194–198]. Yra parodyta, kad taikant radijo dažnio metalo dengimo režimą, iki ~ 15 nm storio sidabro danga nekeičia paviršiaus šiurkštumo. Tačiau sluoksniui pasiekus 50 nm ir daugiau, Ag paviršiaus šiurkštumas didėja tiesiškai [195]. Panašius rezultatus publikavo ir Lee *et al.* [196]. Tačiau, mūsų atliktų AFM matavimų rezultatai

parodė, kad storinant Ag sluoksnį šiurkštumo rodiklis reikšmingai nekinta. Galima daryti prielaidas, kad nusodinamas Ag sluoksnis užpildo lazeriu suformuotos nanostruktūros plyšius, taip mažindamas bendrą paviršiaus šiurkštumą, bet tuo pačiu įveda papildomą paviršiaus grūdėtumą, panašiai kaip buvo stebima ant lygių paviršių [195,196]. Procesui vykstant šiomis dviem kryptimis, bendras paviršiaus šiurkštumas storinat Ag dangą nuo 10 nm iki 170 nm beveik nekinta, todėl stebime stabilias RMS vertes.

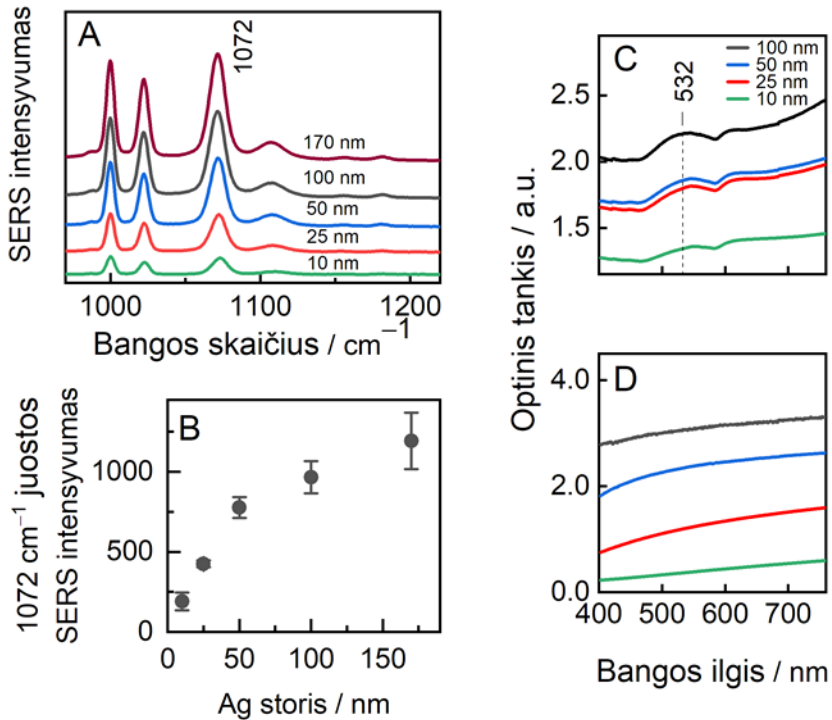
6.3. Spektroskopinė SERS paviršių analizė

Įvertinus pagamintų paviršių morfologiją, kitas svarbus žingsnis nustatyti jų pritaikomumą SERS tyrimams. SERS substratų, dengtų 170 nm Ag sluoksniu, veikimas buvo įvertintas taikant Raman sklaidos matavimus. Kaip modelinis junginys pasirinktas tiofenolis, kuris yra plačiai ištirtas ir laikomas vienu iš standartinių modeliųjų junginių Raman spektroskopijos matavimuose [199–201]. 18 pav. b ir c dalyse pateikti tiofenolio savitvarkių monosluoksnių Raman spektrai registruoti ant sidabru dengtų SERS aktyvių (b) ir neaktyvių (c) paviršiaus sričių. Lyginant šiuos du spektrus aiškiai matome, kad lazeriu apdirbtas stiklo paviršius (b) sustiprino tiofenolio Raman signalą, kuris atitinka tiofenolio Raman spektrą 0,5 M tirpale. Tai įrodo šių substratų tinkamumą SERS tyrimams. Gavus intensyvius paviršiaus sustiprintos Raman sklaidos spektrus nuo organinių tiofenolio savitvarkių monosluoksnių, galime tikėtis gero veikimo analizuojant įvairias kito tipo biomolekules.



18 pav. 0,5 M TF tirpalo Raman spektras (a), palyginimas su Ag-TF spektrais nuo SERS aktyvios (b) ir SERS neaktyvios (c) substrato zonos. Adsorbato neturintis jutiklis taip pat buvo išbandytas SERS aktyvioje (d) ir SERS neaktyvioje (e) srityse. Spektrai buvo registruojami naudojant 785 nm žadinimą. Kiekvienas SERS spektras normalizuojamas iki 1 sekundės. Intarpuose pavaizduotas TF ir Ag-TF kompleksas.

Nustačius potencialų paviršių tinkamumą mūsų planuojamiems biomolekulių tyrimams, papildomai įvertinome SERS signalo stiprinimo intensyvumą, esant skirtingo storio sidabro dangoms. Įvairaus storio (nuo 10 iki 170 nm) sidabro plėvelėmis dengtų SERS substratų spektroskopinė analizė suteikė dar daugiau informacijos apie jutiklių veikimą. 19 pav. a ir b dalyse parodytas didėjantis SERS signalo intensyvumas storinat Ag dangą. Nuo ploniausios 10 nm Ag dangos iki 50 nm stebėtas beveik tiesinis signalo intensyvumo didėjimas. Dar labiau storinant dangą buvo matomas lėtesnis signalo intensyvumo kilimas (19 pav. b), kur maksimalus signalo stiprumas pasiekiamas ties 170 nm. Be to, storesnė sidabro danga taip pat užtikrina patikimą elektros laidumą visame nanostruktūruotame paviršiuje, todėl tokie SERS substratai gali būti pritaikomi analizuojant biomolekules pasitelkus ir elektrocheminius SERS matavimus.



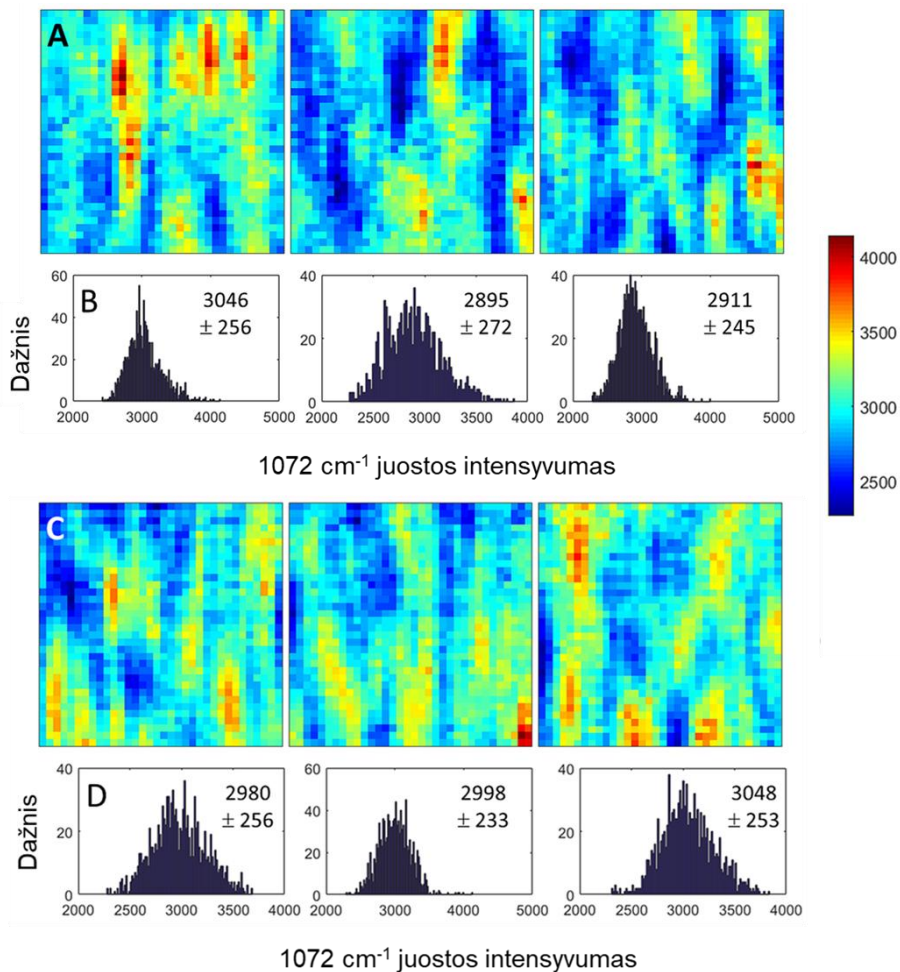
19 pav. (A) TF SERS spektrai, registruoti ant skirtingo storio Ag plėvele dengtų substratų. Spektrai registruoti žadinat 785 nm lazeriu. (B) 1072 cm⁻¹ juostos intensyvumo pokytis esant skirtingo storio Ag dangoms. (C) UV-Vis spektrai registruoti SERS-aktyviose ir (D) SERS-neaktyviose substrato vietose.

Kaip papildomas kokybinis paviršių vertinimo metodas buvo panaudotas lokalizuotas paviršiaus plazmoninis rezonansas (LSPR). LSPR smailės dažnis, intensyvumas ir pusplotis ties smailės pusaukščiu (FWHM) labai priklauso nuo medžiagos dielektrinių savybių ir nanostruktūrų formos, dydžio ir pasiskirstymo substrato paviršiuje. Paprastai didelio skersmens nanodalelės pasiekia LSPR piką esant ilgesnėms lazerio bangoms, o jo intensyvumas tiesiogiai koreliuoja su SERS signalo stiprinimo faktoriumi (EF), būdingu tiriamam paviršiui.

Šiame darbe pateikiame UV-Vis spektroskopijos duomenis, užfiksuotus nuo įvairaus storio Ag dangomis dengtų SERS paviršių. Matavimai atlikti specialioje spektroskopinėje kameroje, taikant skenuojantį transmissinį režimą, kai jautikliai išdėstyti statmenai šviesos pluoštui. 19 pav. c ir d dalys rodo absorbcijos spektrus, surinktus tiek nuo SERS aktyvių, tiek ir lygių paviršiaus zonų. 10 nm sidabro plėvele dengtų SERS paviršių optinis tankis (OD) buvo

artimas patikimai aptikimo ribai. Tačiau palaipsniui didinant Ag plėvelės storį nuo 10 iki 100 nm, stebime vis stiprėjančią OD signalą bei atsikartojančią gerai išreikšta LSPR smailę ties 532 nm ir kita mažiau intensyvią smailę ties 610 nm. Storesnių Ag dangų analizė buvo neįmanoma, dėl paviršių neperšviečiamumo. Analizuojant lygius stiklo paviršius dengtus skirtingo storio Ag dangomis matome, kad nėra gerai išreikštų LSPR smailių, o optinis tankis palaipsniui kyla ties didesniais bangų ilgiais (19 pav. D).

Ag nanodalelių dydžio ir jų optinių savybių koreliacija yra plačiai aptarta literatūroje. Yra parodyta, kad nanostruktūrų dydžio kitimas nuo 1 iki 9 nm reikšmingai paveikia paviršių optines savybes. Šiuo atveju, LSPR smailė atitinkamai pasislinko nuo 465 iki 584 nm, o kartu išaugo ir jos intensyvumas bei plotis [202]. Tačiau šis fenomenas nėra pritaikomas lygiems Ag paviršiams, kur LSPR buvo nustatytas tik esant 7 nm storio metalo plėvelei, dėl atskirų Ag salų susidarymo. Didėjant sidabro sluoksnio storiui, salos susiliejo į tolygesnės struktūros sluoksnį dėl ko LSPR mažėjo [194].



20 pav. (A) SERS signalo stiprinimo žemėlapiai, sudaryti vertinat TF virpesinę juostą ties 1072 cm^{-1} . Duomenys surinkti nuo trijų atskirų $100 \times 100 \mu\text{m}$ substratų plotų; (B) Kiekvienam žemėlapiui priskirtos signalo intensyvumo diagramos ir pateiktos vidutinės intensyvumo vertės \pm standartinis nuokrypis (SD); (C) ir (D) analogiški duomenys, kurie buvo fiksuojami ant kitos gamybos partijos SERS sensorių. Santykiniai standartiniai nuokrypiai (RSD) kiekvienam žemėlapiui pateikti tokia tvarka, kaip išdėstyti paveikslai iš kairės į dešinę: (A) 8,4 %, 9,4 % ir 8,4 % ir (C) 8,6 %, 7,8 %, 8,3 %. Atkreipkite dėmesį į skirtingas histogramų skales X ir Y ašyse.

Norint patikimai analizuoti SERS aktyviuose paviršiuose adsorbuotas biomolekules, labai svarbus vienodas signalo stiprinimo efektas visame aktyviame plote. Tik pasiekus aukštą signalo tolygumą ir atsikartojamumą, galime būti tikri, kad registruojamas spektras, bet kuriame aktyviosios zonos taške parodys patikimą rezultatą. Dėl šios priežasties, sudarėme SERS signalo

stiprinimo žemėlapius, mūsų pasirinktų parametrų SERS substratams. Analizei buvo pasirinkta vertinti TF juostos esančios SERS spektre ties 1072 cm^{-1} . Statistiškai patikimiems rezultatams užtikrinti naudojome dviejų skirtingų gamybos partijų sensorius, imant po tris vienetus iš kiekvienos. Gauti rezultatai pateikti 20 pav., kurio A ir C dalys iliustruoja įvairaus spektrinio intensyvumo zonas. Abejose dalyse matome charakteringas pailgas zonas maždaug $30\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$ ilgio ir $10\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ pločio. Nors šios zonos skiriasi spalviškai, tačiau didelio ir mažo intensyvumo zonų vidutinės signalo stiprinimo reikšmės yra nedaug nutolusios. Vidutinės vertės siekia nuo 3200 vienetų aušto intensyvumo iki 2800 vienetų žemo intensyvumo zonose. Be to, histogramos (B ir D) rodo gana siaurą Gauso formos intensyvumų dažnių pasiskirstymą (kiekvienos histogramos centras ties 3000 vienetų), o įvertinti santykiniai standartiniai nuokrypiai (RSD) svyruoja nuo 7,8 % iki 9,4 %. Šie nedideli intensyvumo svyravimai greičiausiai atsiranda dėl mikrometrų eilės paviršiaus nelygumų, kurie buvo patvirtinti AFM (6.2 skyrius, 17 pav.). Pailgos charakteringos zonos, matomos A ir C dalyse galėjo susidaryti paviršius apdirbant lazeriu ir formavosi būtent lygiagrečiai lazerio skenavimo kryptčiai.

Įvertintas vidutinis šių paviršių SERS stiprinimo faktorius (EF) siekė $3,0 \times 10^5$. Vertinimas buvo atliekamas analizuojant TF intensyviausią spektrinę juostą ties 999 cm^{-1} lyginant SERS ir Raman spektrus gautus su 785 nm lazeriu.

SERS signalo stiprinimo faktoriai gali varijuoti pakankamai plačiose ribose priklausomai nuo stiprinančio paviršiaus prigimties, naudojamos spektroskopinės sistemos ir netgi nuo pačios analitės savybių. Mūsų įvertintas vidutinis SERS EF yra viena eile didesnis, lyginant su literatūros duomenimis, kur įvertinimui buvo naudojamos nerezonansinės analitės, kaip ir mūsų atveju [203,204]. Tačiau, kiek mažesnis, lyginant su standartiškai priimtu SERS EF, kuris siekia 10^6 [114]. Tai galėjo nulemti keletas priežasčių – pirma, silikatiniam stiklui būdingas lydymasis, vykstant lazeriniam apdirbimo procesui, dėl ko formuojasi tolygesnės nanostruktūros su žemesniu erdviu pasiskirstymu (LSF) [205,206]. LSF priklauso nuo netiesinės sugerties ir tokių stiklo savybių kaip klampumas [207]. Lazeriu apdirbus natrio-kalcio silikatinį stiklą, suformuotos nanostruktūros yra aptakesnės ir labiau homogeniškos, neformuojami aštrūs kampai ar spygliai. Antras svarbus momentas yra metalo dangos storis paviršiuje [196]. Zhao *et al.* parodė, kad paviršių padengus 100 nm storio sidabro sluoksniu, gaunamas didesnis šiurkštumas, dėl to stebima daugiau „karštų taškų“ (angl. hot spots), kuriuose signalo stiprinimo efektyvumas daug didesnis [208]. Mūsų atveju buvo pasirinkta storesnė

170 nm sidabro danga, dėl ko smarkiai sumažėjo tikimybė suformuoti „karštus taškus“. Būtent tolygesnis paviršius ir nulėmė truputį mažesnę vidutinę mūsų sukurtų substratų SERS EF, tačiau, kaip ir minėjome anksčiau, mūsų prioritetas buvo tolygus ir patikimas signalo stiprinimas visame aktyviame paviršiuje.

7. Inkariniai monosluoksniai fosfolipidinių membranų imobilizavimui sidabro paviršiuje

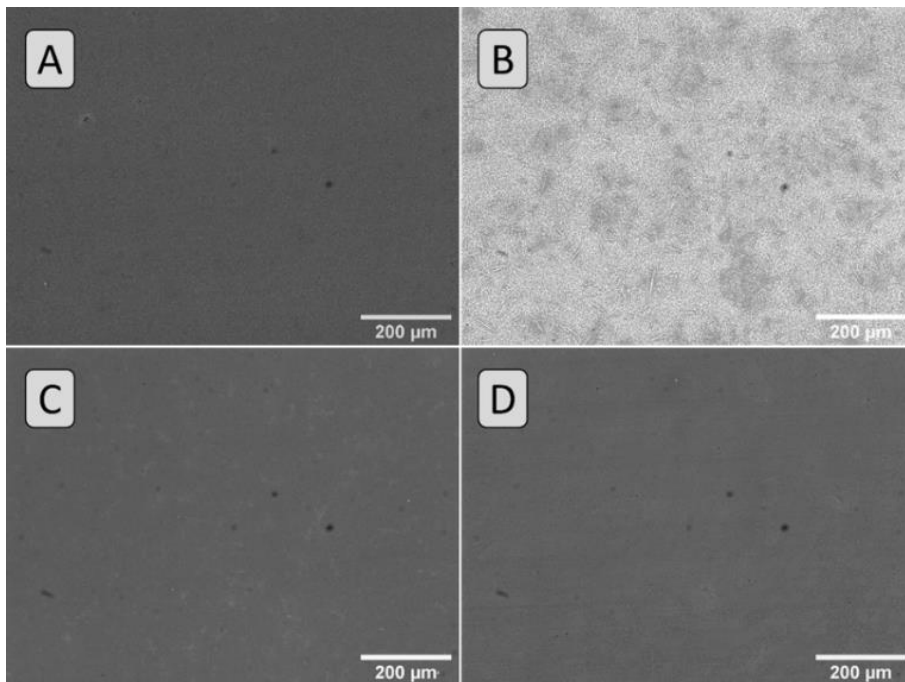
Yra žinoma, kad inkarinio savitvarkio monosluoksnių struktūra nulemia paviršiuose imobilizuotų dvisluoksnių lipidinių membranų (tBLM) savybes [169]. Inkarinis SAM atlieka svarbias funkcijas – atitraukia membraną nuo paviršiaus, taip užtikrinant pakankamo pomembraninio rezervuaro susidarymą, o taip pat sumažina metalo paviršiaus nelygumų poveikį membranai integralumui. Inkariniam savitvarkiui monosluoksniui suformuoti dažniausiai naudojamos ilgagrandės į membraną įsiterpiančios molekulės ir mažos molekulinės masės paviršiaus skiedikliai, kurie palaiko reikiamą inkarinių molekulių tankį [44,102]. β -merkaptotanolis (β ME) yra vienas plačiausiai naudojamų paviršiaus skiediklių mišriuose SAM. Jis sudaro stiprų kovalentinį ryšį su Au ir Ag paviršiais. Hidrofilinės -OH grupės esančios šių molekulių gale suriša vandenį ir taip sukuria hidrofilinę pomembraninę aplinką. Siekiant sukurti stabilias eksperimentines platformas tBLM imobilizavimui metalų paviršiuose, būtina suformuoti šiam tikslui tinkamus savitvarkius monosluoksnius atsižvelgiant į parinktų molekulių ir naudojamo metalo savybes bei tarpusavio sąveikas.

7.1. Trumpagrandžio alkantiolio parinkimas mišriam SAM formuoti

Sidabro paviršiai su tioliniais junginiais reaguoja kitaip nei auksiniai. Auksas išlieka stabilus organiniuose tiolių tirpaluose ir suformuoja funkcionalius savitvarkius monosluoksnius [84,182]. Tuo tarpu sidabras yra pažeidžiamas ir sąveikoje su β -merkaptotanolio (β ME) spiritiniu tirpalu stebima paviršiaus korozija. Sidabro korozija po sąveikos su tokiu tirpalu yra aiškiai matoma ne tik šviesiniu mikroskopu, tačiau pastebima ir plika akimi.

Palyginus 21 pav. pateiktus vaizdus, matome kaip kinta sidabro paviršius. Inkubuojant sidabro paviršius etanoliniame β ME tirpale, sidabro spalva pasikeičia iš ryškiai baltos veidrodinės (atrodo tolygiai pilka 21 pav. A) į matinę pilką (atrodo netolygiai balkšva 21 pav. B). Tam tikrais atvejais stebimas ir visiškai sidabrinės plėvelės nusilupimas nuo stiklo pagrindo. Be

to, po inkubacijos su β ME ant sidabrinio paviršiaus stebimos chaotiškai pasiskirsčiusios, maždaug 50 μm ilgio spyglio formos struktūros (21 pav. B). Kadangi β ME yra naudojamas kaip paviršinis skiediklis mišriuose SAM, prie paviršių imobilizuojant fosfolipidinius dvisluoksnius [44], pagrindinė užduotis šiame darbo etape buvo rasti kitą, sidabro paviršiaus nepažeidžiantį alkantiolį, kuris pakeistų β ME.



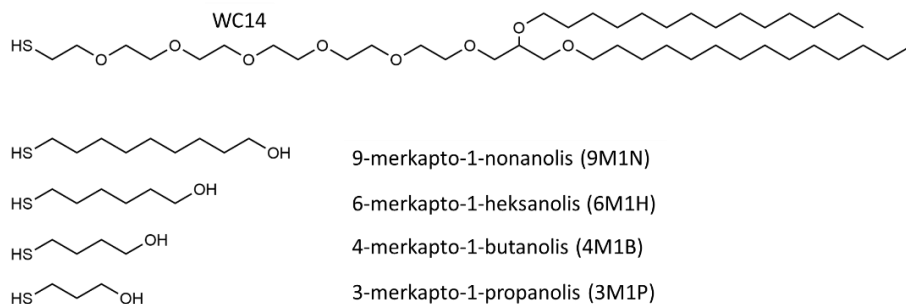
21 pav. Sidabro paviršiaus morfologija užfiksuota optiniu mikroskopu, po inkubacijos skirtinguose tirpaluose: (A) 100 % etanolis, (B) 100 % β ME, (C) 100 % 3M1P ir (D) 20:80 % WC14:3M1P mišinys. Inkubacijos laikas – 3 valandos. Bendra tiolių koncentracija inkubaciniuose tirpaluose 0,1 mM. Pastaba: juodi taškai visuose vaizduose yra mikroskopo objektyvo artefaktai, kurių nepavyko pašalinti.

Optinės mikroskopijos vaizdai rodo, kad β ME pakeitimas 3-merkapto-1-propanoliu (3M1P) gali sumažinti sidabro koroziją. Kaip matome 21 pav. C dalyje po inkubacijos su etanoliniu 3M1P tirpalu, sidabro paviršiai išlieka stabilūs, jiems nebūdingas ir metalo dangos lupimasis, kaip buvo β ME atveju. Paviršiaus koroziją dar labiau slopinama (21 pav. D), ruošiant mišrius SAM, kai bent 20 % 3M1P yra pakeičiama inkarinėmis tiolipidų molekulėmis WC14 (žr. 22 pav.). Šios ilgagrandės molekulės tarnauja kaip fosfolipidinių membranų molekuliniai inkarai.

Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad pakeitus β ME bent vienu -CH₂- motyvu ilgesniu junginiu, šiuo atveju 3-merkpto-1-propanoliu, galime kontroliuoti ir slopinti sidabro paviršiaus koroziją. Be to, kartu su inkarinėmis WC14 molekulėmis, potencialiai galime sukurti mišrų SAM tinkamą fosfolipidinių membranų imobilizavimui.

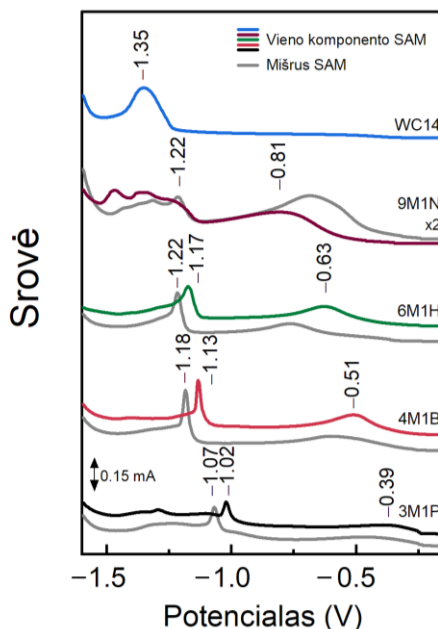
7.2. Inkarinį SAM sudarančių molekulių spektroskopinė analizė

Nustačius, kad sidabro korozija yra suvaldoma ilginant trumpagrandžių molekulių alkaninę grandinę, nusprendėme išanalizuoti daugiau pasirinktų junginių, kurie potencialiai tiktų mišrių SAM formavimui, siekiant ne tik imobilizuoti tBLM sidabro paviršiuje, bet ir išlaikyti pakankamą pomembraninį rezervuarą bei membranos integralumą. Pasirinktų trumpagrandžių bei molekulinio inkaro WC14 molekulių struktūros pateiktos 22 pav.



22 pav. Molekulių, naudotų mišrių SAM formavimui molekulinė struktūra. Pagal [188].

Šioje darbo dalyje analizavome mišrius savitvarkius monosluoksnius sudarančių komponentų – trumpagrandžių alkantiolių (paviršiniai skiedikliai) ir ilgagrandžio WC14 junginio, tarpusavio sąveikas. Elektrocheminės desorbcijos metodas leidžia įvertinti ne tik molekulių sąveikas, taip pat galime gauti informaciją apie paviršiaus padengimą molekulėmis bei metalo ir sieros ryšio stiprumą [187]. Molekulių desorbcijos potencialas tiesiogiai priklauso nuo metalo-tiolio ryšio stiprumo, lateraliųjų grupių sąveikos bei molekulių ir eksperimentiniame tirpale esančių jonų sąveikos [209].

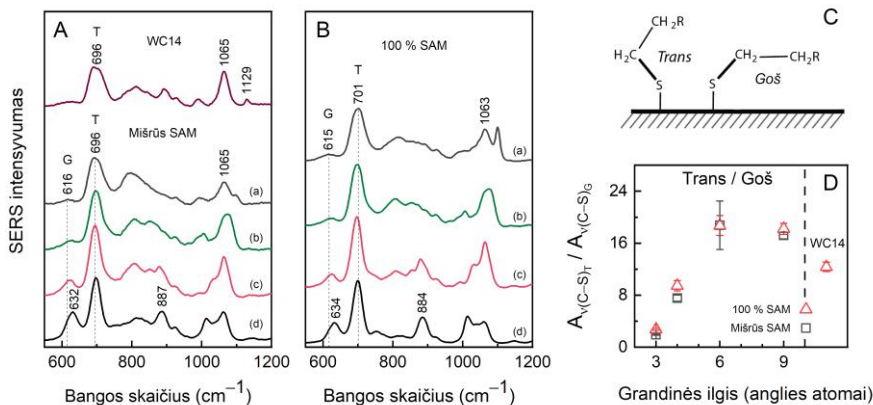


23 pav. Vieno komponento SAM (spalvotos linijos) ir mišrių SAM (80 % paviršiniai skiedikliai: 20 % WC14) (pilkos linijos) potenciodinaminės kreivės. Redukcinė desorbicija buvo atlikta ant Ag plėvelės 0,5 M NaOH + 0,1 M Na₂SO₄ deaerutuame vandeniniame tirpale -50 mV/s greičiu. 9M1N ir 9M1N + WC14 SAM desorbicijos kreivės buvo padaugintos iš dviejų.

Vieno komponento SAM desorbicijos kreivės (23 pav. spalvotos kreivės) rodo, kad anglies grandinės ilgis molekulėse lemia Ag-S ryšio skilimo ir SAM sudarančių molekulių atsiskyrimo nuo paviršiaus potencialo vertes. Anglies atomų skaičius alkantiolių grandinėse lemia desorbicijos potencialo vertę, nes jis apsprendžia Van der Valso sąveikų kiekį. Literatūros duomenimis, kristalinio aukso Au (111) paviršiuje imobilizuotų alkantiolių, turinčių -CH₃ ir -COOH galines grupes, desorbicijos potencialas slenkasi per -15 mV pailginus grandinę vos vienu -CH₂- motyvu [210]. Pateiktame grafike matome, kad alkantiolių grandinės pailgėjimas nuo 3 iki 6 anglies atomų, stumteli desorbicijos potencialo maksimumą nuo -1,02 iki -1,17 V. Į savitvarkių monosluoksnių inkubacinius tirpalus pridėjus 20 mol% WC14 inkarinio junginio, padidėjo bendras SAM stabilumas. Tai įrodo desorbicijos potencialų poslinkis į neigiamą pusę (pilkos linijos 23 pav.). Toks efektas rodo, kad trumpagrandės molekulės sąveikauja su inkarinėmis WC14 molekulėmis ir taip stabilizuoja mišrius savitvarkius monosluoksnius.

Nustatytas katodinis poslinkis visiems mišriems SAM buvo stabilus ~ 50 mV, išskyrus 9M1N:WC14. Toks rezultatas indikuoja, kad sąveikos

stiprumas tarp trumpagrاندžių junginių ir WC14 inkaro nėra nulemiamas anglies grandinės ilgio trumpagrاندžiuose junginiuose. Desorbcijos piko intensyvumas taip pat koreliuoja ir su molekulių kiekiu paviršiuje. Be to, desorbcijos kreivėje gali būti keletas smailių arba smailių plotis gali skirtis, nes, molekulės užima energetiškai skirtingas būsenas paviršiuje.



24 pav. (A) SAM SERS spektrai nuo Ag paviršiuje adsorbuoto 100 % WC14 (viršutinė kreivė) ir mišrių SAM, turinčių skirtingus paviršinius skiediklius. (B) vieno komponento SAM SERS spektrai. Kreivių tvarka yra 9M1N (a), 6M1H (b), 4M1B (c), 3M1P (d). Raidės *G* ir *T* žymi goš ir trans konformacijas. (C) Paviršiuje adsorbuotų tiolio molekulių schematinis vaizdas goš ir trans konformacijose. Konformacijas apibrėžė -S-C- ryšio kampas. (D) *T/G* santykio priklausomybė nuo anglies grandinės ilgio paviršinių skiediklių molekulėse. Mišrių SAM sudėtis buvo 80 % trumpagrاندžių skiediklių ir 20 % WC14. Vidurkis ± SD buvo apskaičiuotas iš 3 matavimų.

Siekdami išsamiau išanalizuoti ir suprasti inkarinių savitvarčių monosluoksnių struktūrą sidabro paviršiuje, pasitelkėme virpesinės spektroskopijos metodus.

Paviršiaus sustiprinta Raman spektroskopija, analizuojant alkantiolių molekulių SAM, suteikia informacijos apie pradinės ir pagrindinės (alkilinė grandinė) grupių struktūras ir išsidėstymą paviršiaus atžvilgiu. Gauti spektriniai duomenys pateikti 24 pav. Pradinės grupės C-S motyvas spektruose indikuojamas pagal goš $\nu(C-S)_G$ ir trans $\nu(C-S)_T$ virpesines modas, aptinkamas 600-750 cm⁻¹ regione. Būtina pastebėti, kad šių juostų intensyvumas priklauso nuo molekulių koncentracijos paviršiuje. Šiuo atveju, analizuojant mišrius savitvarčius monosluoksnius, kurių inkubacinių tirpalų kompozicija yra 80:20 % trumpagrاندžio junginio:WC14, galime tikėtis, kad

intensyviausi virpesiai bus fiksuojami nuo paviršiuje adsorbuotų trumpagrandžių junginių.

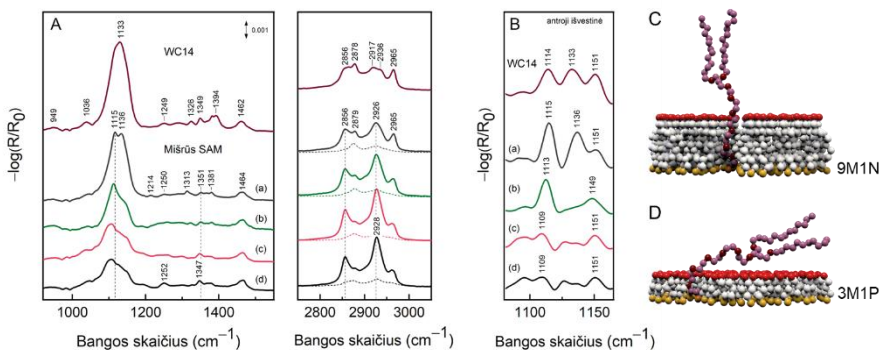
Prie paviršiaus esančių $\nu(\text{C-S})_G$ virpesinių juostų bangos skaičius, naudojant vis ilgesnes paviršinio skiediklio molekules, iš 632 cm^{-1} pozicijos slenkasi į žemesnius dažnius per 16 cm^{-1} . Tai rodo, kad goš konformacijoje esančių C-S ryšių stiprumas mažėja, ilgėjant pagrindinės grupės anglies grandinei. Tačiau kita C-S ryšio esančio trans konformacijoje, virpesinė moda $\nu(\text{C-S})_T$ esanti 696 cm^{-1} pozicijos nekeitė. Iš visų analizuotų trumpagrandžių molekulių ir jų mišrių SAM, tik 3M1P būdinga ryški ir aiškiai identifikuojama goš konformacijos moda. Tai gali būti nulemta santykinai silpnos Van der Valso sąveikos tarp trumpų 3M1P anglies grandinių. Ilginant paviršinių skiediklių anglies grandines, su goš konformacija siejamų juostų intensyvumas ryškiai sumažėja ir stebimos intensyvios juostos siejamos su trans C-S ryšio konformacija. Šią priklausomybę gerai iliustruoja kiekybinė trans-goš modų (T/G) analizė, kurią nustatėme pagal integruotus $A\nu(\text{C-S})_T/A\nu(\text{C-S})_G$ intensyvumus. Įvertinus gautus rezultatus, pamatėme, kad 100 % vieno komponento savitvarkiuose monosluoksniuose, T/G santykis nuo 2,8 – 3M1P atveju, kyla iki 18,2 – 9M1N atveju. Mišriuose SAM išlieka ta pati tendencija ir santykis kinta nuo 1,9 iki 17,2 (24 pav. C). 100 % WC14 SAM įvertinta T/G santykio vertė siekė 11,5 ir buvo žemesnė lyginant su 6M1H bei 9M1N. Tai galėjo priklausyti nuo WC14 molekulėms būdingos, pakankamai didelės hidrofobinės dalies, sudarytos iš dviejų alkano grandinių, kurios lemia molekulės lankstumą ir galimybę užimti įvairesnes konformacines būsenas S-C bei etilenoksidinėse (EO) molekulės dalyse. Didesnės T/G santykio vertės ilgesnių molekulių monosluoksniuose gali būti susijusios su didėjančiu molekulių tvarkumu ir labiau statmena orientacija paviršiaus atžvilgiu. Tokia molekulių organizacija formuojant mišrius SAM, gali reikšmingai sumažinti pomembraninį rezervuarą tBLM modeliuose ir apriboti šių modelių sistemų pritaikymus. Dėl šios priežasties, toliau (7.3 skyrius) pateikiame detalesnę skirtingų mišrių SAM analizę.

Nors SERS metodu fiksuoti spektriniai duomenys daugiausiai apibūdina mūsų pasirinktus trumpagrandžius junginius, tačiau 1129 cm^{-1} pozicijoje esanti virpesinė juosta suteikia informacijos apie ilgus molekulinis inkarus (WC14). Ši virpesinė moda yra stebima 100 % WC14 SAM ir yra specifinis žymuo rodantis pilnai trans konformacijos $\nu(\text{C-C})_T$ virpesius. Ankstesniuose darbuose, ši juosta buvo pastebėta ir įvertinta kaip molekulinis WC14 žymuo, rodantis vandens ir elektrinio potencialo sukeltus hidrofobinių alkaninių grandinių persitvarkymus ir klasterizaciją aukso paviršiuose [113,168]. Būtent klasterizacija yra aiškiai susiejama su defektuotų tBLM susiformavimu

[113,169]. Šiame darbe pateiktuose mišrių SAM spektruose nematome $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ virpesinės modos. Todėl, manome, kad nei mišrių SAM formavimo metu nei atliekant SERS matavimus WC14 klasterizacija nepasireiškia. Galime daryti prielaidą, kad pasirinktos molekulės formuos stabilius ir tolygius SAM, tinkamus tolesniam tBLM sistemų kūrimui.

Išsamesnius WC14 savitvarkos sidabro paviršiuje vertinimus atlikome pasitelkę RAIRS spektroskopijos techniką. Skirtingai nei anksčiau aprašyti SERS duomenys, RAIRS suteikia gilesnio supratimo apie ilgos grandinės inkarinius junginius. Gauti spektriniai duomenys pateikti 25 pav.

Pirmiausia, atkreipiame dėmesį į C-H asimetrinių virpesių juostas ties $2750\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$, kurios mišrių SAM spektruose yra vidutiniškai 5 kartus didesnės pagal plotą lyginant su vieno komponento SAM (ištinės ir punktyrinės linijos 25 pav. A). Tai rodo, kad nepaisant mažesnės koncentracijos, pagrindinė informacija mišriuose SAM yra gaunama apie WC14 virpesines modas. Intensyviausia plati juosta esanti ties 1133 cm^{-1} 100 % WC14 spektre yra priskiriama asimetriniam EO fragmento išsitempimui – $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ [45,211]. EO fragmente esančių metileno grupių (-CH₂-) sukamieji deformaciniai virpesiai stebimi ties $1250\text{-}1252\text{ cm}^{-1}$, o vėdukliniai ir žirkliniai virpesiai matomi ties $1347\text{-}1351$ ir $1460\text{-}1464\text{ cm}^{-1}$, atitinkamai [211]. Būtina pastebėti, kad WC14 molekulės gali užimti kelias skirtingas konformacines būsenas, įskaitant spiralinę struktūrą su būdingais pasikartojančiais vidiniais trans-goš-trans pasisukimais aplink ryšius (CH₂-CH₂-O)₆ segmente [212]. Šių skirtingų EO fragmento konformacijų paplitimą rodo plati $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ virpesinė moda, kuri gali būti išdalinta į kelis, spektre smarkiai tarpusavyje persidengiančius elementus. Tikslios EO komponentų virpesių pozicijos buvo nustatytos pagal antrąją RAIRS spektrų išvestinę (25 pav. B). 100 % WC14 savitvarkiams monosluoksniams šios pozicijos buvo ties 1114 , 1133 ir 1151 cm^{-1} , kur mažiausios energijos virpesys ties 1114 cm^{-1} yra siejamas su labiausiai tvarkia kristaline spiralės struktūra [45,213], o dvi modos esančios aukštesniuose dažniuose priskiriamos amorfinei spiralės būsenai [211]. Būdingos ir kitos virpesinės juostos randamos tvarkiose (949 ir 1349 cm^{-1}) ir netvarkiose (1326 , 1249 , 1036 cm^{-1}) EO struktūrose [211,212].



25 pav. (A) Ag paviršiuje adsorbuoto WC14 (viršutinė kreivė) ir mišrių SAM, turinčių skirtingus paviršinius skiediklius, RAIRS spektrai tokia tvarka: 9M1N (a), 6M1H (b), 4M1B (c), 3M1P (d). Spektrų regionai 900-1600 ir 2750-3050 cm^{-1} . Mišrių SAM sudėtis yra 80 % trumpagrاندžių ir 20 % WC14 molekulių. Brūkšninės kreivės C-H virpesių srityje rodo vieno komponento monosluoksnius, kurių plotas po kreive yra vidutiniškai 5 kartus mažesnis nei atitinkamų mišrių SAM. (B) $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ srities antroji RAIRS spektrų išvestinė (padauginta iš -1). Spektrų išdėstymo tvarka, tokia pati kaip (A) dalyje. (C) ir (D) dalys – siūlomas WC14 molekulių orientacijos ant Ag paviršiaus modelis: (C) WC14 praskiestas 9M1N santykiu 20:80 % WC14:9M1N; (D) WC14 praskiestas 3M1P santykiu 20:80 % WC14:3M1P. Pagal [188].

Pagal paviršių atrankos taisyklę, spektroskopiškai galime stebėti tik tuos virpesius, kurių pereinamasis dipolinis momentas (TDM) vertinant paviršiaus normalės atžvilgiu nėra nulinis. Mūsų tiriamoje sistemoje, $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ modos intensyvumo didėjimas rodo, kad EO fragmentas tampa vis labiau statmenas paviršiui, kai sąveikauja su vis ilgesnes alkilines grandines turinčiais trumpagrاندžiais junginiais. Kitaip tariant, vertikalus trumpagrاندžių junginių išsidėstymas, skatina ir EO fragmentą užimti vertikalią poziciją. Šis efektas ryškiausiai stebimas su 9M1N ir atitinkamai silpnėja trumpėjant alkilinėms grandinėms. Su 3M1P ir 4M1B stebimas silpniausias efektas, dėl žemesnio laipsnio molekulių lateraliųjų sąveikų. Antra RAIRS spektrų išvestinė rodo, kad žemesnės energijos virpesys nuo 1109 slenkasi į aukštesnius dažnius iki 1115 cm^{-1} , o juostų ties 1136 ir 1151 cm^{-1} intensyvumas kyla, kai WC14 molekulių EO fragmentas yra sąveikoje su 9M1N. Be to, $-\text{CH}_2-$ (EO) vėduokliniai virpesiai ties 1347 cm^{-1} slenkasi į aukštesnius dažnius per 4 cm^{-1} , o tai rodo kristalinės EO struktūros “lydymąsi” (angl. melting) [211,214]. Šie duomenys leidžia manyti, kad ilgesni trumpagrاندžiai junginiai, ne tik orientuoja EO segmentus vertikaliau paviršiaus atžvilgiu, bet

ir padidina WC14 molekulių skaičių paviršiuje, kurioms labiau būdinga ne kristalinė, o amorfinė EO struktūra.

Metileno grupėms būdingų C-H virpesių regionas yra sudarytas iš simetrinių $\nu_s(\text{CH}_2)$ ir asimetrinių $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ modų ties 2856 ir 2917-2928 cm^{-1} ir atitinkamai – WC14 galinių metilo grupių virpesių $\nu_s(\text{CH}_3)$ ir $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ ties 2878 ir 2965 cm^{-1} . Literatūroje šie spektriniai regionai yra plačiai išanalizuoti ir priskiriami WC14 alkilinių grandinių, o ne EO segmentų modoms [27, 31]. Tai leidžia analizuoti hidrofobinių WC14 grandinių konformacines būsenas nepriklausomai nuo EO. Labai tvarkūs, kristalinės struktūros, sidabro paviršiuje adsorbuoti alkaniniai junginiai pasižymi ν_s ir ν_{as} metileno grupių virpesiais ties ~ 2847 ir ~ 2916 cm^{-1} [215]. Šių modų poslinkis į aukštesnius dažnius yra siejamas su didėjančiu molekulinės struktūros lankstumu ir atsirandančiomis goš konformacinėmis būsenomis. Nepriklausomai nuo šalia esančių trumpagrandžių junginių, WC14 molekulių alkaninės grandinės yra labiau amorfinės struktūros, kaip rodo metileno grupių ν_s ir ν_{as} virpesių pozicijos. Mišrių SAM atveju, toks WC14 molekulių netvarkumas gali būti susiejamas su maža WC14 molekulių koncentracija sidabro paviršiuje. Dar vertingesnės informacijos suteikia $\nu(\text{CH}_3)$ ir $\nu(\text{CH}_2)$ modų intensyvumai. Pereinamasis dipolinis momentas metilo ir metileno grupėse sutampa su C-CH₃ kryptimi ir yra statmenas C-C grandinės ašiai, todėl šių grupių virpesių santykinio intensyvumo analizė parodo bendrą alkaninių grandinių orientaciją. Kadangi C-H virpesių spektrinis regionas yra pakankamai sudėtingas, mes jo neskaidėme į atskirus komponentus. Tačiau, nustatėme, kad $I[\nu_{as}(\text{CH}_3)] / I[\nu_{as}(\text{CH}_2)]$ santykis kinta nuo $\sim 1/3$ iki $\sim 2/3$ kai 3M1P pakeičiame į 9M1N. Tai rodo, kad metilo grupės TDM tampa vertikalesnis paviršiaus atžvilgiu. Tokie rezultatai leidžia manyti, kad ne tik EO grandinė WC14 molekulėse išsidėsto arčiau paviršiaus normalės, kai yra sąveikoje su ilgesnėmis trumpagrandėmis molekulėmis, bet ir hidrofobinės alkanų grandinės tampa labiau statmenomis (25 pav., C ir D).

Apibendrinant 7.2 skyriuje pateiktus spektroskopinius SERS ir RAIRS duomenis, matome, kad naudojant skirtingo ilgio trumpagrandes molekules (nuo 3C iki 9C), galima kontroliuoti WC14 inkaro molekulių orientaciją sidabro paviršiuje. Vis ilgesnių paviršiaus skiediklių panaudojimas mišrių SAM formavimui, gali būti susijęs su didėjančiu monosluoksnių tvarkumu ir vertikalesne WC14 orientacija tiek hidrofiliiniame etilenoksido segmente, tiek ir hidrofobinėse alkanų grandinėse, kurios sąveikauja su lipidų dvisluoksniais formuojant tBLM. Be to, spektriniai duomenys nerodė WC14 molekulėms būdingų klasterizacijos žymenų. Manome, kad nei mišrių SAM formavimo metu, nei atliekant SERS matavimus WC14 klasterizacija nepasireiškia, todėl

pasirinktos molekulės galimai formuos stabilius ir tolygius savitvarkius monosluoksnius. Šių inkarinių SAM pritaikymo galimybės, siekiant sukurti funkcionalius tBLM modelius, buvo toliau analizuojamos pasitelkiant elektrocheminį impedansą (EIS).

7.3. Mišrių SAM analizė taikant EIS

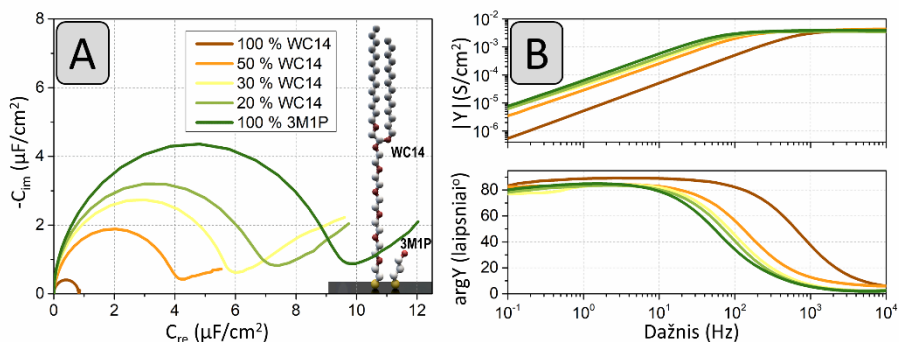
Atlikus detalią mišrių inkarinių savitvarkių monosluoksnių analizę virpesinės spektroskopijos metodais ir įvertinus jų potencialą funkcionalių tBLM modelių kūrimui ant sidabro, toliau atlikome išsamią elektrocheminę mišrių SAM analizę. Šis metodas išplečia SAM analizės ribas ir leidžia dar geriau suprasti mišrių inkarinių monosluoksnių charakteristikas ir tolesnio pritaikymo galimybes. Tiriamojo darbo metu, tiek spektroskopinė tiek ir elektrocheminė analizės buvo vykdomos lygiagrečiai.

Nustačius, kad sidabro paviršiaus korozija yra suvaldoma, mišriuose SAM β ME keičiant į 3M1P (7.1 skyrius), elektrocheminis impedansas buvo pasitelktas siekiant įvertinti struktūrines ir funkcines tokių inkarinių SAM savybes. Šioje dalyje analizavome inkarinių monosluoksnių elektrocheminius parametrus priklausomai nuo komponentų (3M1P:WC14) procentinio santykio tirpaluose, iš kurių buvo formuojami mišrūs SAM. Kadangi SAM sudarančių molekulių koncentracija paviršiuje nėra tiesiogiai proporcinga koncentracijai SAM tirpaluose, todėl toliau mūsų minimas molekulių santykis atspindi būtent tirpalų sudėtis. Elektrocheminio impedanso spektrai, gauti nuo skirtingų santykių 3M1P:WC14 SAM, pateikti 26 pav.

26 pav. A dalyje pateiktuose kompleksinės elektrinės talpos spektruose matome tipines, beveik pilno pusapskritimio formos kreives. Didžiausias diametras atspindintis didžiausią elektrinę talpą (C_{SAM}), kuri 100 % 3M1P monosluoksniuose yra lygi $\sim 10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Didėjant procentinei ilgagrاندžio inkarinio junginio WC14 daliai SAM tirpaluose, talpa palaipsniui mažėja [45]. Šis reiškinys gali būti paaiškinamas tuo, kad didėjant WC14 junginio koncentracijai sidabro paviršiuje, susidaro vis storesnis ir kompaktiškesnis dielektrinis sluoksnis. Ant Ag paviršiaus turint grynus 100 % WC14 SAM, C_{SAM} vertės nukrenta žemiau $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Tai įrodo, kad paviršiuje susidaro kompaktiškas dielektrinis sluoksnis, su minimaliu vandens kiekiu, kas buvo pastebėta ir ant aukso paviršių [44]. Elektrinės talpos vertės beveik tiesiškai krenta žemyn, kai monosluoksnių sudėtis keičiasi nuo 100 % 3M1P iki 100 % WC14 (31 pav. A), o tai rodo, kad 3M1P:WC14 paviršiaus koncentracija koreliuoja su komponentų procentine koncentracija tirpale. Gautos talpų vertės yra nedaug nutolusios nuo literatūroje aprašytų 100 % β ME ir 100 % WC14 monosluoksnių C_{SAM} tirtų ant aukso paviršių [44]. Tačiau

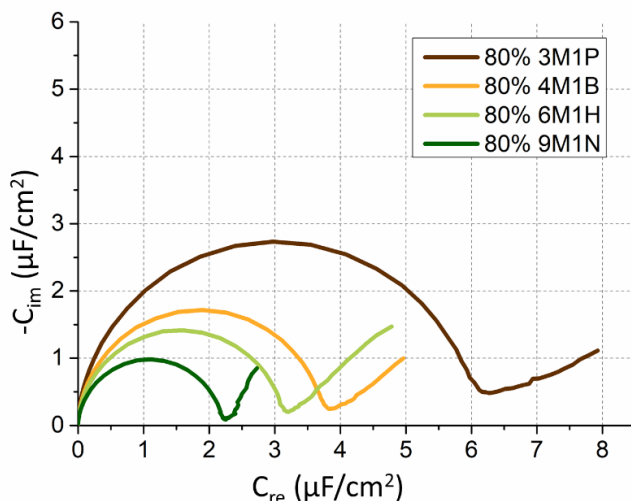
mišrių SAM, suformuotų iš skirtingo 3M1P:WC14 santykio tirpalų elektrinės talpos vertės (31 pav. A) skiriasi nuo mišrių SAM (β ME:WC14) ant aukso [44]. Tai rodo skirtingą inkarinių molekulių pasiskirstymą sidabro paviršiuje, kai parenkami skirtingo ilgio trumpagrandžiai paviršiniai skiedikliai, o tai gali reikšmingai nulemti inkarinio SAM savybes.

26 pav. B dalyje yra pateikti Bode spektrai, rodantys analizuotų SAM laidumą – admitansą (viršuje) ir jo fazės priklausomybę nuo dažnio (apačioje). Aukščiausių dažnių srityje EI spektrinį atsaką labiausiai nulemia buferinio tirpalo elektrinės savybės, todėl visų procentinių koncentracijų SAM laidumo kreivės, šiame intervale eina tolygiai ties panašia laidumo verte. Žemesnių dažnių srityje, kreivių pozicijos kinta. Jau ties 1000 Hz atsiskiria 100 % WC14 laidumo spektras (ruda kreivė), nes dėl didesnio organinio sluoksnio storio, tokio SAM laidumas ima mažėti aukštesniame dažnyje nei mišrių SAM atveju. Regione nuo 100 Hz SAM laidumo vertės mišriems SAM išsiskiria priklausomai nuo monosluoksnių sudėties ir koreliuoja su 26 pav. A dalyje pateiktomis elektrinės kompleksinės talpos vertėmis. Visais atvejais stebimas tiesiškas laidumo mažėjimas, prasidedantis žemesniame dažnyje, priklausomai nuo didesnio 3M1P kiekio. Žemiausiame matavimo dažnyje (0,1 Hz) galiausiai stebimos atitinkamos laidumo vertės – mažėjant WC14 molekulių kiekiui savitvarkiame monosluoksnyje, gaunamas vis didesnis sluoksnio laidumas. Atitinkami 3M1P:WC14 santykio nulemti EI spektriniai pokyčiai stebimi ir admitanso fazės grafikuose (26 pav. B apačioje). Gautos kreivės būdingos RC grandinėms ir pasižymi sigmoidine forma, kur fazė priartėja prie 90° vidutinių-žemų dažnių srityje. Didėjant WC14 koncentracijai savitvarkiuose monosluoksniuose, kreivės ima leisti žemyn ties vis aukštesnėmis dažnių vertėmis. Šis reiškinys atsiranda dėl mažėjančios laiko konstantos (τ), kuri tiesiogiai priklauso nuo SAM elektrinės talpos, o ji mažėja augant WC14 molinei daliai (26 pav. A).



26 pav. EIS spektrai užregistruoti nuo skirtingų 3M1P: WC14 santykių savitvarkių monosluoksnių. (A) Cole-Cole kompleksinės talpos diagramos, (B) Admitanso modulis (viršuje) ir fazė (apačioje). Dažnių diapazonas 10 kHz -0,1 Hz.

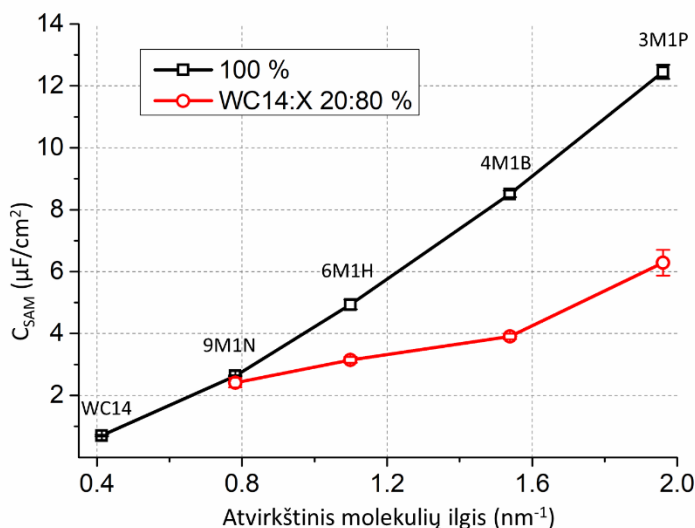
Toliau analizavome mišrius savitvarkius monosluoksnius, kurie ant sidabro buvo formuojami iš 80:20 % skirtingų trumpagradžių:WC14 molekulių tirpalų. SAM formavimą vykdėme su visomis 22 pav. pateiktomis molekulėmis, o mūsų nuomone, optimaliausias 80:20 % molekulinis junginių santykis SAM tirpaluose buvo parinktas pagal 26 pav. pateiktas kompleksines elektrines SAM talpas, kurių vertės buvo artimiausios sėkmingai sukurtoms tBLM sistemoms ant aukso [45]. Mišrių SAM elektrocheminio impedanso spektrai, pateikti 27 pav. kompleksinės talpos koordinatėse.



27 pav. Mišrių SAM kompleksinės talpos diagramos. SAM sudėtis – 80:20 % trumpagrandžių:WC14 molekulių. Naudoti skirtingi trumpagrandžiai junginiai: 3M1P, 4M1B, 6M1H ir 9M1N.

Visos užfiksuotos kreivės pasižymi talpinei sistemai būdinga puslankio forma, kur puslankio spindulys yra proporcingas sluoksnio elektrinei talpai. Didžiausias spindulys buvo pastebėtas mišriuose SAM su 3M1P trumpagrandėmis molekulėmis, kur atitinkamai C_{SAM} talpos vertė siekia maždaug $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (27 pav.). Tokia talpa būdinga ir sistemoms ant aukso, kur mišrūs SAM buvo formuojami iš 30:70 % HC18: β ME ir vėliau sėkmingai panaudoti tBLM formavimui [45]. Didėjant paviršinių skiediklių molekulių ilgiui, puslankio spindulys traukiasi, atitinkamai mažėjant ir SAM talpos vertėms.

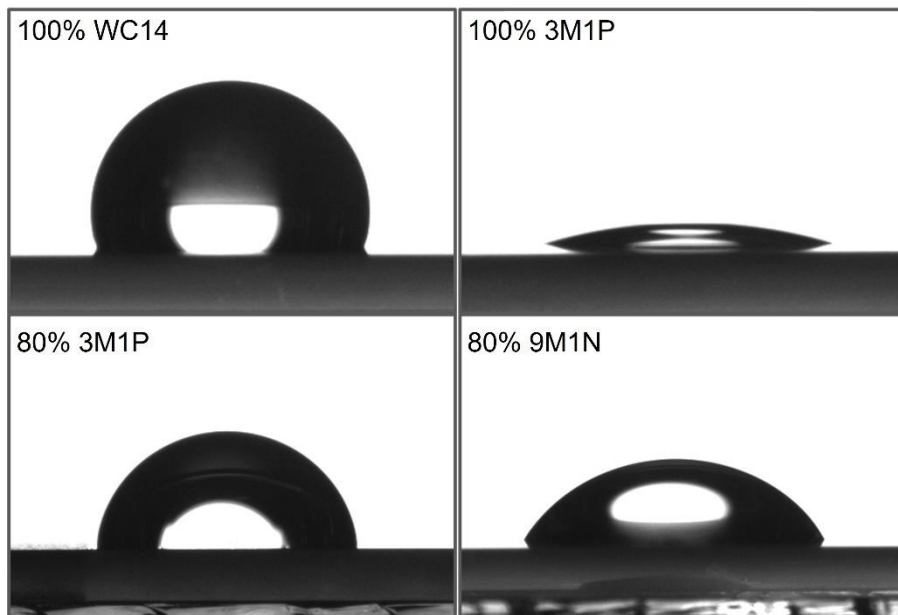
Detalesnei analizei mišrių SAM talpiniai spektrai buvo modeliuojami pagal atitinkamos ekvivalentinės grandinės modelį (pagal [190]), taip gaunant tikslesnes C_{SAM} , kurios palygintos su 100 % SAM talpos vertėmis (28 pav.). Įvertintos 100 % trumpagrandžių junginių SAM talpos (28 pav. juoda kreivė) beveik tiesiškai krito nuo $\sim 12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 3M1P atveju iki $\sim 2,63 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 9M1N atveju. Mažiausia elektrinė talpa $\sim 0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ buvo stebima 100 % inkarinio junginio WC14 SAM atveju. Įvertinus talpų skirtumą tarp to paties trumpagrandžio junginio 100 % SAM ir mišinio kuriame yra pridėta 20 % WC14, nustatėme aiškią tendenciją. Ilgėjant paviršinio skiediklio molekulėms, skirtumas tarp 100 % SAM (juoda kreivė) ir mišraus 20:80 % SAM (raudona kreivė) elektrinių talpų mažėja. 3M1P ir 4M1B atvejais talpos pokytis siekia $\sim 50 \%$, 6M1H $\sim 36 \%$, o 9M1N atveju yra tik $\sim 8 \%$. Tai indikuoja, kad trumpesnių paviršinių skiediklių atveju, galimai paviršiuje turime daugiau WC14 molekulių, kurios lemia C_{SAM} sumažėjimą, lyginant su ilgesnėmis molekulėmis.



28 pav. C_{SAM} priklausomybė nuo atvirkštinio trumpagrاندžių molekulių ilgio (nm^{-1}). Juoda kreivė vaizduoja 100 % skirtingų molekulių C_{SAM} . Raudona kreivė vaizduoja skirtingų mišrių (20:80 % WC14:trumpagrاندis skiediklis) monosluoksnių C_{SAM} .

Tikėtina, kad skirtingų trumpagrاندžių junginių pridėjimas į SAM tirpalus, iš kurių buvo formuojami mišrūs SAM ant Ag, pakeitė molekulinio inkaro WC14 koncentraciją paviršiuje, nors bendros komponentų koncentracijos tirpale buvo pastovios. Tokį pokytį galėjo sukelti paviršinių skiediklių hidrofobiškumo kitimas nuo santykinai mažo 3M1P atveju iki didesnio 9M1N atveju. Didėjantis hidrofobiškumas didina trumpagrاندžių molekulių cheminį potencialą, taip palengvindamas hidrofobinių komponentų sąveiką su sidabro paviršiumi. Panašus efektas buvo stebimas eksperimentuose ant aukso [216]. Vadinasi, mūsų atveju 9M1N paviršiaus koncentracija greičiausiai buvo didesnė, lyginant su 3M1P koncentracija. Manome, kad 9M1N atveju paviršiuje turėjome mažiau WC14 inkarų, o tai galėjo lemti mažesnę C_{SAM} talpos pokytį lyginant su trumpesnėmis molekulėmis.

Norėdami patikrinti mūsų išsikeltas hipotezes apie WC14 koncentracijos mažėjimą paviršiuje ilginant paviršinių skiediklių molekules, atlikome kontaktinio kampo (CA) matavimus. Šie eksperimentai leido mums įvertinti paviršiaus hidrofobiškumo pokyčius, keičiant molekulių ilgius ir jų santykius.

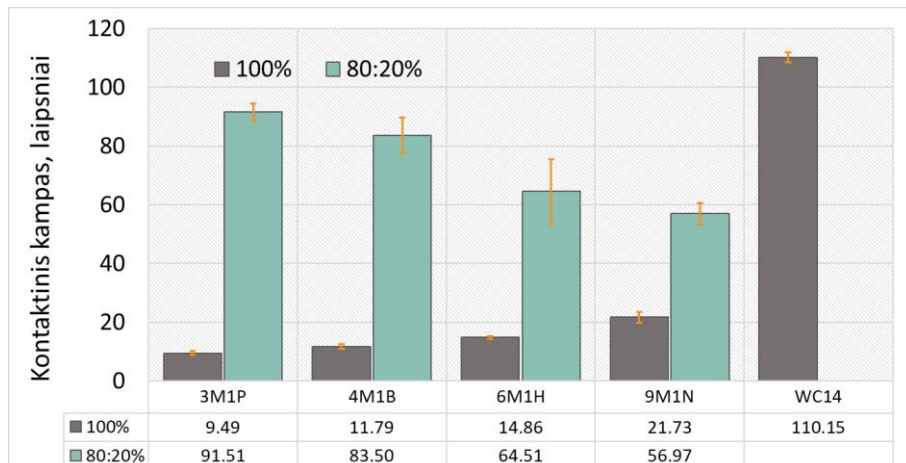


29 pav. Vandens lašo ir sidabro paviršiaus su skirtingais SAM kontaktinio kampo vaizdai. Viršuje: kairėje 100 % WC14, dešinėje 100 % 3M1P savitvarkiai monosluoksniai. Apačioje: kairėje 3M1P:WC14 (80:20 %), dešinėje 9M1N:WC14 (80:20 %) savitvarkiai monosluoksniai.

29 pav. pateiktuose vaizduose, net plika akimi aiškiai matome, kaip skiriasi vandens lašo forma ant skirtinguose tirpaluose inkubuotų sidabro paviršių. Kuomet vanduo lašinamas ant hidrofobiškiausio 100 % WC14 tirpale inkubuoto Ag paviršiaus (29 pav. viršuje kairėje), lašelis formuoja charakteringą mažo diametro pusapskritimio formą, maksimaliai sumažinant sąlyčio su hidrofobiniu sidabro paviršiumi plotą. Priešingas efektas stebimas ant labiau hidrofilinio 100 % 3M1P tirpale inkubuoto Ag paviršiaus (29 pav. viršuje dešinėje), kur vandens lašas išsiplėtęs ir drėkina didelį paviršiaus plotą. Šie vaizdiniai duomenys tiksliai iliustruoja 30 pav. pateiktuose grafikuose matomas kontaktinio kampo vertes, kur 100 % WC14 stebimas būdingas $\sim 110^\circ$ kontaktinis kampas rodantis paviršiaus hidrofobiškumą, o 100 % 3M1P tik $\sim 9,5^\circ$ kampas rodantis paviršiaus hidrofiliskumą. Ilgėjant trumpagrandžiams junginiams, 100 % tirpalų kontaktinio kampo vertės palaipsniui kyla nuo $\sim 11,8^\circ$ iki $\sim 21,73^\circ$, atitinkamai (30 pav. pilki stulpeliai).

Analizuojant sidabro paviršių savybes, kurie buvo inkubuojami mišrių (80:20 %) SAM tirpaluose pastebėjome aiškią tendenciją, kad ilgėjant trumpagrandėms molekulėms, atitinkamai mažėja kontaktinio kampo vertės, o tai indikuoja silpnėjančią paviršių hidrofobiškumą, kas šiuo atveju rodo vis mažesnę WC14 molekulių kiekį sidabro paviršiuje (30 pav. turkio spalvos

stulpeliai). 4M1B ir 6M1H mišrių SAM vidutinės CA vertės pasižymėjimo didžiausiais standartiniais nuokrypiais, visoje matavimų serijoje. Tai indikuoja netolygių ir skirtingų mišrių SAM formavimą, kuomet dėl molekulių konkurencijos sidabro paviršiuje adsorbuojasi kintantis WC14 molekulių kiekis.



30 pav. Kontaktinio kampo matavimų duomenys. Pilki stulpeliai rodo 100 % SAM CA vertes. Turkio spalvos stulpeliai rodo mišrių SAM CA vertes, kai monosluksnis formavome tirpaluose kuriuos sudaro 20 % WC14 junginio ir 80 % skirtingo trumpagrاندžio junginio, atitinkamai. 100 % SAM $SD \pm 0,47-1,82$. 80:20 % SAM $SD \pm 1,78-10,97$.

3M1P:WC14 atveju (29 pav. apačioje kairėje), 20 % WC14 pridėjimas į mišraus SAM tirpalą smarkiai pakeitė paviršiaus savybes. Lyginant 100 % 3M1P ir mišrų (80:20 %) SAM, vidutinės kontaktinio kampo vertės reikšmingai kinta nuo 9,49 laipsnių iki 91,51, atitinkamai. Tai rodo, kad 3M1P:WC14 (80:20 %) SAM tirpale inkubuojant sidabro paviršius, yra suformuojamas mišrus SAM, turintis reikšmingą kiekį inkarinio WC14 junginio, kuris kaip parodė EIS duomenys (31 pav.) yra pakankamas kokybiškų tBLM suformavimui. Be to, literatūros duomenimis tokios CA vertės ($\sim 90^\circ$) yra palankios funkcionalių tBLM formavimui [44,45]. Kaip paviršiaus skiediklį panaudojus ilgiausią trumpagrاندį junginį – 9M1N (29 pav. apačioje dešinėje), 20 % WC14 pridėjimas į mišraus SAM tirpalą nedaug pakeitė vidutinės CA vertes nuo $\sim 21,73^\circ$ (100 % 9M1N) iki $\sim 56,97^\circ$ (80:20 % 9M1N:WC14), atitinkamai (30 pav.). Nors ir yra stebimas paviršiaus hidrofobiškumo padidėjimas, tačiau akivaizdu, kad 9M1N molekulės smarkiai riboja WC14 inkarų adsorbciją sidabro paviršiuje, kaip ir nuspėjome.

Elektrocheminio impedanso duomenys, gauti nagrinėjant mišrius savitvarkius monosluoksnius, papildoma ir patvirtina atliktos spektroskopinės analizės rezultatus (23 pav., 24 pav., 25 pav.) Ilginant paviršinių skiediklių molekulių ilgį, buvo stebimos mažėjančios elektrinės talpos vertės (nuo $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ naudojant 3M1P, iki $\sim 2,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ naudojant 9M1N). Toks rezultatas koreliuoja su spektroskopiniais duomenimis, kurie parodė, kad ilgėjant trumpagrandėms molekulėms, didėja SAM tvarkumas ir molekulės užima labiau vertikalias orientacijas sidabro paviršiuje. Be to, sausų mėginių SERS analizė parodė, kad mišrių SAM spektruose nėra WC14 molekulėms būdingų $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ modų, kurios siejamos su šių inkarinių junginių klasterizacija [169]. Tokie duomenys rodo, kad mišrus SAM ant sidabro pasižymi panašiomis dielektrinėmis savybėmis kaip ir mišrus $\beta\text{ME}:\text{WC14}$ SAM ant aukso [44,45]. Be to, galime daryti prielaidą, kad visi naudoti mišrių SAM komponentai galėtų būti tinkami tBLM sistemų kūrimui. Todėl, tolesniuose šio darbo etapuose toliau analizavome visus pasirinktus trumpagrandžius junginius (3M1P, 4M1B, 6M1H ir 9M1N), kurie kartu su WC14 molekulėmis galėtų būti panaudojami sėkmingam tBLM modelių konstravimui. Taip pat siekėme išsiaiškinti, kokią įtaką lipidinių dvisluoksnių formavimui turės vis mažesnis WC14 molekulių kiekis, mišriuose SAM ilgėjant paviršinio skiediklio molekulėms.

8. tBLM konstravimas ir jų savybių tyrimas

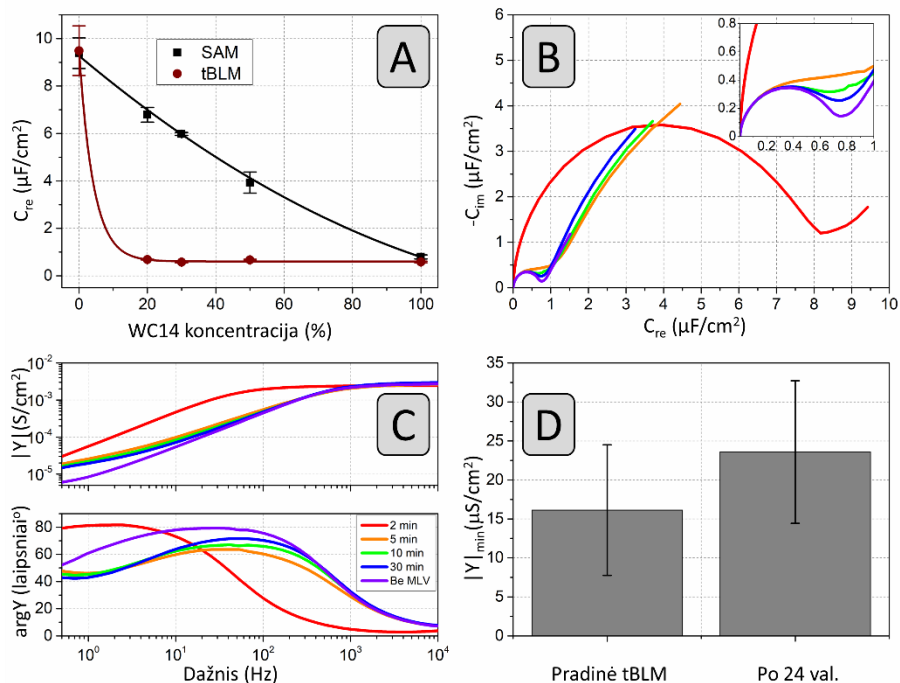
Kaip aprašyta anksčiau, tBLM formavimo strategijos ir suformuotų membranų fizinės savybės yra tiesiogiai priklausomos nuo mišrių inkarinių savitvarkių monosluoksnių sudėties. 7 skyriuje aptarti duomenys leidžia teigti, kad visi mūsų analizuoti trumpagrandžiai junginiai kartu su ilgu inkarinių junginių WC14 gali būti pritaikomi tBLM modelių kūrimui. Tačiau svarbu pasirinkti ne tik tinkamas paviršinių skiediklių molekules, bet ir tinkamas skirtingų molekulių koncentracijas SAM tirpaluose, nes būtent nuo molekulių santykio priklauso dvisluoksnių standumas ir tolesnio pritaikymo potencialas [44]. Dideles inkarinių junginių (WC14) koncentracijas turinčių SAM paviršiuje lipidai išsidėsto per tankiai ir formuoja itin standžias biologiškai netikroviškas membranas (žr. toliau). Tokie tBLM modeliai nėra tinkami įsiterpiančių membraninių baltymų analizei, nes membranos standumas slopina tokių baltymų įsiterpimą ir oligomerizaciją [217]. Iš kitos pusės – jeigu inkarinių junginių koncentracija per maža, suformuoti lipidiniai dvisluoksniai, gali pasižymėti itin dideliu pradiniu sistemos defektiškumu. Dėl šių priežasčių, labai svarbu įvertinti, kaip skirtingi inkariniai savitvarkiai monosluoksniai lemia formuojamų tBLM savybes ir kokios SAM, bei pačių

tBLM sudėtys yra tinkamiausios tolesniems biocheminiams-analitiniais taikymams.

8.1. Mišrių SAM sudėties įtaka tBLM savybėms

Kaip aprašyta anksčiau, tBLM spontaniškai susiformuoja inkariniais savitvarkiems monosluoksniams sąveikaujant su daugiasluoksnių liposomų (angl. multilamellar vesicle – MLV) tirpalais ir gali būti kokybiškai bei kiekybiškai įvertinamas EIS metodu [103]. Lipidinio dvisluoksnio susiformavimas ant paviršiaus elektrocheminėje sistemoje nulemia atitinkamus elektrinių parametrų pokyčius dėl atsirandančio papildomo kelių nanometrų storio talpinio elemento.

50:50 % DOPC-Cholesterolio liposomų liejimo eksperimentų metu, kai inkariniai SAM buvo formuojami iš skirtingo 3M1P:WC14 santykio tirpalų, nustatėme, kad izoliuojančių, vientisų tBLM susidarymui, mišrių SAM procentinė sudėtis didelės įtakos neturėjo. Toks rezultatas skiriasi nuo literatūroje aprašytų izoliuojančių tBLM sistemų ant aukso, kur inkariniame mišriame SAM (β ME:WC14), mažiausias WC14 kiekis buvo 30 % [22]. Mūsų gauti rezultatai rodo, kad mišriuose SAM pakanka 20 % inkarinio WC14 junginio, tam, kad būtų gautos labai panašios elektrinės talpos vertės, nurodančios izoliuojančio lipidinio sluoksnio susiformavimą ant sidabro paviršiaus. Užfiksuotos tBLM talpos, išliko siaurame diapazone ties $\sim 0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ su visomis vertintomis WC14 > 20 % koncentracijomis. tBLM elektrinės talpos buvo užfiksuotos po 30 min. mišrių SAM sąveikos su DOPC:Chol liposomų tirpalais (31 pav. A).



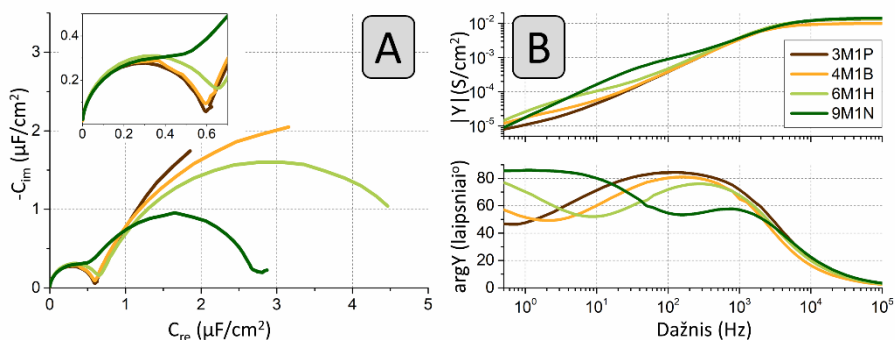
31 pav. EIS analizės duomenys apie daugiasluoksnių liposomų liejimosi specifika ant 3M1P:WC14 SAM. (A) Kompleksinių talpų priklausomybė nuo WC14 % koncentracijos mišriuose SAM. Juodi kvadratai – skirtingų santykių 3M1P:WC14 SAM talpos. Raudoni apskritimai – tBLM talpos ant skirtingų sudėčių SAM. (B) Kompleksinės talpos pokyčiai vykstant tBLM formavimuisi. Dažnių diapazonas 10 kHz-0,5 Hz Viršuje išdidintas aukštų dažnių regionas. (C) Admitanso modulis (viršuje) ir fazė (apačioje). Dažnių diapazonas 10 kHz-0,5 Hz. (D) Admitanso modulio pokyčiai f_{min} taške suformavus tBLM ir po 24 val. tBLM formavimui naudoto SAM sudėtis 3M1P:WC14 80:20 mol%. MLV sudėtis – DOPC-Chol 50:50 mol %.

3M1P:WC14 (80:20 %mol) SAM įtaką tBLM formavimosi dinamikai įvertinti, liejimąsi realiu laiku stebėjome EIS metodu (31 pav., B-C). 31 pav. B dalyje pateiktos kompleksinės talpos kreivės rodo, kad tBLM formavimasis yra greitas procesas. Pradinis talpos pusapskritimis (raudona spalva), atitinkantis pradinę mišraus SAM elektrinę talpą, sumažėja apie dešimt kartų, praėjus 5 minutėms po liposomų injekcijos. Kitas 30 min talpinis puslankis toliau traukiasi, kol pasiekia galutinę poziciją, atitinkančią $0,68 \pm 0,13 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ tBLM talpos vertę.

To paties proceso, Bode diagramose stebimas pasiektas laidumo fazės minimumas, maždaug ties 1 Hz dažniu (31 pav. C apačioje), koreliuojantis su laipsnišku laidumo sumažėjimu ties ta pačia dažnio verte (31 pav. C, viršuje).

Būtent tokie elektrocheminiai sistemos parametrai atsiranda maždaug 5-tą minutę po liposomų užlijimo ant mišraus SAM. Pasiektos galutinės vertės yra ~ 42 laipsniai ($\arg Y_{\min}$) ir $\sim 2,7 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ ($|Y|_{\min}$), kai pasiektas fazės minimumas (f_{\min}) stebimas ties $\sim 0,7$ Hz. EIS matavimo celėse liposomų tirpalus pakeitus buferiu yra stebimas f_{\min} poslinkis į žemesnius dažnius $< 0,7$ Hz. Manome, kad tokį efektą sukėlė lipidų viršsluoksnių pašalinimas nuo lipidinių dvisluoksnių paviršiaus. Toks reiškinys buvo stebimas ir sistemose ant aukso taikant neutronų reflektometrija [38]. Tiek spektriniai pokyčiai, tiek ir absoliučios parametrų vertės būdingos izoliuojančių tBLM susiformavimui, o proceso greitis itin panašus, kaip panašiose sistemose ant aukso paviršiaus [103].

Suformuotų lipidinių dvisluoksnių stabilumas buvo įvertintas paliekant suformuotą sistemą 24 valandoms kambario temperatūroje ir atlikus pakartotinius EIS matavimus po to. Gautuose duomenyse nematėme reikšmingų laidumo pokyčių (31 pav. D). Todėl manome, kad ant 80:20 % 3M1P:WC14 mišrių SAM suformuotos membranos išlieka stabilios mažiausiai 24 valandas.

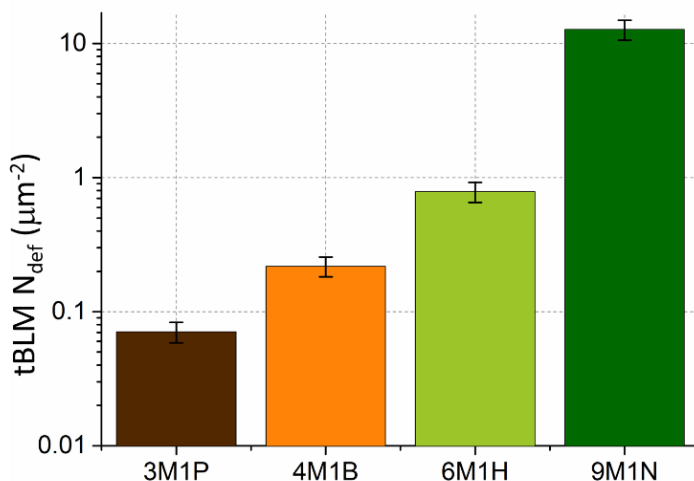


32 pav. (A) tBLM kompleksinės talpos diagramos. Viršuje išdidintas aukštų dažnių regionas (100 kHz to 30 Hz) (B) Admitanso modulis (viršuje) ir fazė (apačioje). Dažnių diapazonas 100 kHz-0,1 Hz. tBLM formavimui naudotos DOPC:Chol 60:40 % liposomos. Formavimas vykdytas ant skirtingus trumpagrandžius junginius turinčių mišrių SAM: 3M1P, 4M1B, 6M1H ir 9M1N.

Tolesniuose darbo etapuose siekėme išanalizuoti tBLM formavimosi specifiką ant mišrių SAM, kurių formavimui naudojome skirtingus trumpagrandžius paviršinius skiediklius (3M1P, 4M1B, 6M1H ir 9M1N). Bandėme skirtingo ilgio trumpagrandes molekules ir šiam tikslui naudojome 20 % inkarinio WC14 junginio koncentraciją SAM tirpaluose, kuri pasirodė optimali pagal 31 pav. A dalyje pateiktus duomenis. Atlikome seriją eksperimentų su DOPC:Chol (60:40 %) liposomomis. EIS grafikuose

pateiktuose 32 pav. matome skirtingomis sąlygomis formuotų tBLM modelių kompleksinės talpos (A) ir laidumo parametrų fazines diagramas (B). Visais užfiksuotais atvejais EIS spektrai rodo lipidinio dvisluoksnio susiformavimą, po liposomų užliejimo ant skirtingų sudėčių mišrių SAM. Lyginant su 27 pav. pateiktomis SAM kompleksinės talpos diagramomis, visais atvejais stebime ryškų pusapskritimių diametro sumažėjimą (32 pav. A). Užliejus liposomas, aukštuose dažniuose esantis puslankis rodo $\sim 0,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ elektrinės talpos vertes visais tirtais atvejais, nepriklausomai nuo naudotų skirtingų trumpagrandžių molekulių. Net ir mišriuose SAM, savo sudėtyje turinčiuose 80 % 6M1H arba 9M1N, kurių C_{SAM} buvo $> 4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (27 pav.), po liposomų užliejimo talpos sumažėjo, o tai rodo sėkmingą lipidų dvisluoksnio susidarymą. Vertinant bendrą kompleksinės talpos diagramų vaizdą (32 pav. A) matome būdingą „dviejų puslankių“ formą, kuri dažnu atveju rodo suformuoto tBLM nevientisumą. Pagal Valinčius *et al.*, atliktos matematinės analizės duomenis, toks gerai išreikštas antrinis puslankis kompleksinės talpos EIS diagramose rodo didesnę, pradinėje membranoje esantį natūralių defektų skaičių [218].

32 pav. B dalyje pateiktose Bode diagramose stebimas pasiektas laidumo fazės minimumas $\arg Y_{\min} \sim 47^\circ$, maždaug ties 1 Hz dažniu, o atitinkamos $|Y|_{\min}$ reikšmės siekia $10^{-5} \mu\text{S}/\text{cm}^2$, kai mišriuose SAM naudojome 3M1P. Šie du parametrai atitinkamai persistūmė į aukštesnius dažnius ilginant paviršinius skiediklius tokia tvarka: 3M1P, 4M1B, 6M1H, ir 9M1N. EIS spektrai rodo, kad ilginant paviršinių skiediklių molekules, susiformuoja vis mažiau izoliuojantys lipidiniai dvisluoksniai.



33 pav. Pradinių tBLM defektų tankis naudojant skirtingus trumpagrandžius junginius mišriuose SAM.

Pagal labai panašioms sistemoms ant aukso sukurtą matematinį modelį [190] admitanso fazės minimumo padėtis f_{min} leidžia tiesiogiai įvertinti membranos defektų tankį N_{def} . Atlikus skaičiavimus nustatyta, kad mišriuose SAM naudojant 3M1P pradinis membranų defektiškumas siekia $\sim 0,1 \mu\text{m}^{-2}$ (33 pav.). Defektų tankis nuosekliai auga didėjant trumpagrandžių molekulių ilgiui ir 9M1N atveju pasiekia $\sim 13 \mu\text{m}^{-2} N_{def}$ vertes.

Manome, kad defektiškumo augimas galėtų būti nulemtas vienos iš dviejų pagrindinių priežasčių: 1) ilgėjanti skiediklio molekulė gali nulemti WC14 junginio klasterių susidarymą paviršiuje, todėl stebimas dalinis paviršiaus ploto padengimas lipidiniu dvisluoksniu; Tačiau pastaroji priežastis yra mažai tikėtina, nes ilgėjant paviršinių skiediklių molekulėms, tikimybė, kad WC14 molekulės laisvai migruos ir sidabro paviršiuje ir sudarys klasterius mažėja. Be to, mūsų atlikta spektroskopinė SERS ir RAIRS analizė nerodė WC14 klasterių formavimo. 2) hidrofobiškesnė ilgesnio skiediklio molekulė nulemia mažesnę WC14 kiekį ant paviršiaus, todėl susiformuoja tolygus, tačiau labai defektuotas lipidinis dvisluoksnis. Būtent tokį efektą rodo ir mūsų atlikta kontaktinio kampo analizė (30 pav.).

Defektų tankiui įvertinti panaudotas modelis paremtas prielaida, kad defektai membranoje pasiskirstę tolygiai heterogeniškai, todėl itin svarbu įvertinti, ar suformuotose tBLM defektai nesusitelkę į klasterius (paviršiuje yra lipidiniu dvisluoksnių nepadengtų plotų).

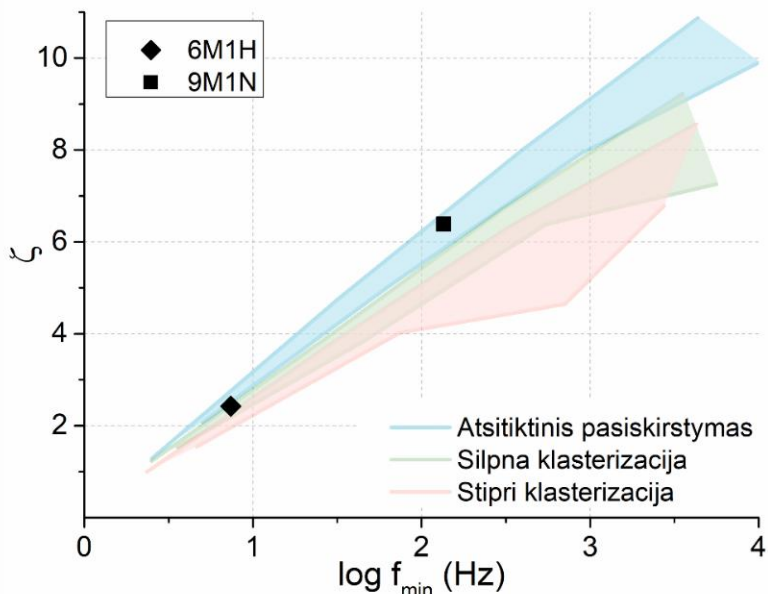
Galimi pradinių tBLM defektų klasteriai buvo analizuojami panaudojant kolegų (prof. dr. Gintaro Valinčiaus ir dokt. Filipo Ambrulevičiaus) pagal eksperimentinius duomenis atliktų skaičiavimo ir modeliavimo darbus, kurie leido identifikuoti naują parametą ζ (zeta), apibrėžiantį defektų klasterizaciją tBLM paviršiuje [218]:

$$\zeta = \frac{\log_{10} f_{min}}{\log_{10} f_2 - \log_{10} f_1}$$

Kur, f_1 ir f_2 yra dažnio vertės, atitinkančios laidumo fazės $\arg Y$ reikšmes, kai $0,5 \arg Y + 45^\circ$.

Remiantis skirtingais modeliavimo parametrais sudarytos trys zonos, kuriose atidėjus eksperimentinių spektrų ζ vertes, galime įvertinti ar defektai membranoje pasiskirstę tolygiai heterogeniškai ar telkiasi į klasterius (34 pav.). Naudojant 3M1P ir 4M1B mišrius SAM, gaunamos tBLM kurių defektų tankis yra per mažas įvertinti jų pasiskirstymo pobūdį. 6M1H atveju $\zeta_{6M1H} \approx 2,5$ (juodas rombas) patenka į silpnos klasterizacijos ir mažo defektų dydžio zoną. 9M1N atveju $\zeta_{9M1N} \approx 6,3$ (juodas kvadratas) stebimas

atsitiktinio defektų pasiskirstymo zonos viduryje. Tokia taško pozicija leidžia įvertinti, kad paviršiuje dominuoja vidutinio dydžio ($r_{def} < 10$ nm) defektai.



34 pav. Pradinių membranų defektų klasterizacijos indentifikavimo grafikas. Zeta (ζ) parametras, apskaičiuotas iš charakteringų modeliuotų EIS spektrų taškų. Defektų spindulys kinta nuo r_{def} 0,5 nm spalvotos zonos viršuje iki 25,5 nm zonos apačioje. Skirtingi juodi simboliai – ζ parametras apskaičiuotas iš eksperimentinių EIS spektrų, tBLM formuojant ant SAM turinčių skirtingus paviršinius skiediklius.

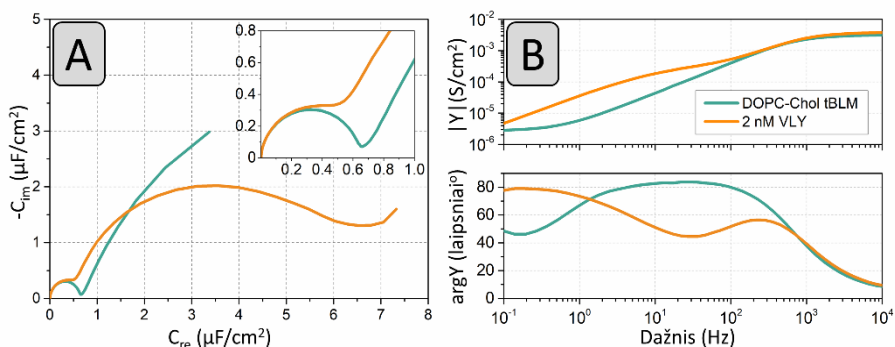
Tokios ζ vertės ir pozicijos nurodo, kad net ir didelio defektiškumo tBLM atveju (ant 9M1N mišraus SAM) turime heterogeniškai pasiskirsčiusius defektus. Toks pasiskirstymas ir įvertintas vidutinis defektų dydis leidžia teigti, kad labiau tikėtinas antrasis iš anksčiau minėtų dviejų SAM susiformavimo scenarijų, ilgėjant paviršinio skiediklio molekulos anglies grandinei. Bandant skirtingus trumpagrاندžius junginius (3M1P, 4M1B, 6M1H ir 9M1N) mišriuose SAM, turime skirtingą WC14 molekulių koncentracija paviršiuose, nors komponentų moliniai santykiai visų skiediklių atvejais buvo vienodi. Gauti duomenys koreliuoja su kontaktinio kampo matavimų rezultatais (30 pav.), taip pat nurodančiais, jog 9M1N paviršiaus koncentracija buvo didesnė, lyginant su 3M1P koncentracija, todėl pirmu atveju paviršiuje greičiausiai WC14 inkarų, o tai nulemia didesnę pradinių lipidinių dvisluoksnių defektiškumą.

8.2. tBLM pritaikymas biologinių sistemų analizei

Siekdami įvertinti sidabro paviršiuje imobilizuotų lipidinių dvisluoksnių atitikimą natūralioms biologinėms membranoms, o taip pat ir jų pritaikymo galimybes atlikome eilę eksperimentų su membranose poras formuojančiais baltymais.

Pirmiausia išanalizavome DOPC:Chol 50:50 mol % tBLMs, kurie buvo formuoti ant mišrių 3M1P:WC14 (80:20 %) savitvarkių monosluoksnių. Tokie membranų modeliai buvo veikiami 2 nM poras formuojančio bakterinio toksino – vaginolizino (VLY). VLY yra nuo cholesterolio priklausantis citolizinas (CDC), kurį produkuoja gram-neigiamos bakterijos *Gardnerella vaginalis* ir yra laikomas pagrindiniu šio mikroorganizmo virulentiškumo faktoriumi. Bakterijų susintetinti VLY baltymo monomerai prisijungia prie ląstelės plazminės membranos ir tada oligomerizuojasi į žiedo formos poras, kurios prasiskverbia į lipidų dvisluoksnį sluoksnį ir sukelia citolizę ir ląstelių mirtį. VLY sąveika su cholesterolio turinčiomis tBLM ant aukso plačiai aptarta literatūroje [101,219,220].

VLY sukelti EIS spektrų pokyčiai, analizuojant sidabro paviršiuje imobilizuotas tBLM yra pateikti 35 pav. Kompleksinės elektrinės talpos diagramose (35 pav. A) matomi spektriniai pokyčiai būdingi porų susidarymo poveikiui tBLM modeliuose. Pradinėms membranoms talpos vertės žemiausiame puslankio taške siekia $0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. tBLM sąveikaujant su VLY stebime mažojo pusapskritimio esančio aukštuose dažniuose atsilenkimą šiaurės vakarų kryptimi, iš to seka didelio pusapskritimio formavimas vidutiniuose-žemuose dažniuose, per visą C_{re} sritį.

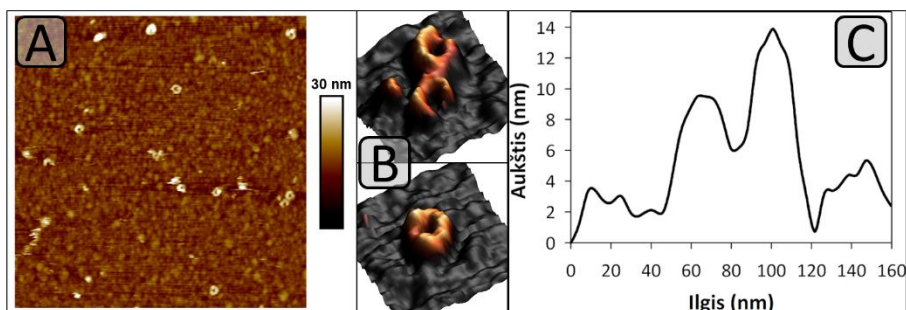


35 pav. EIS spektriniai pokyčiai tBLM paveikus vaginolizinu. (A) tBLM kompleksinės talpos diagramos. Viršuje išdidintas aukštų dažnių regionas. (B) Admitanso modulis (viršuje) ir fazė (apačioje). Dažnių diapazonas 10 kHz-0,1 Hz. Spektrai registruoti nuo pradinės (DOPC:Chol 50:50 %) membranos ir po 30 min veikiant 2 nM VLY.

Bode diagramos rodo, kad tBLM paveikus vaginolizinu, didėja sistemos laidumas ir admitanso kreivė slenkasi aukštyr į didesnes laidumo vertes (35 pav. B viršus). Be to stebimas ir fazės minimumo poslinkis į aukštesnius dažnius. Toks efektas yra būdingas pažeistoms membranoms ir yra apibrėžtas teorinės EIS analizės [221]. tBLM sąveikaujant su VLY, po 30 min stebime f_{min} padėties pokytį. Nuo 0,16 Hz ties $\arg Y_{min} = 46,11^\circ$ pradinėje membranoje į $f_{min} = 31,7$ Hz, ties $44,48^\circ$. Ryškus tBLM laidumo padidėjimas ($\sim 312 \mu\text{S}/\text{cm}^2$), lyginant su tBLM stabilumo analize (31 pav. D), rodo toksino sukeltus membranos integralumo pokyčius.

Pagal šiuos EIS duomenis, galime manyti, kad tBLM modeliai ant sidabro naudojant 3M1P turinčius SAM pasižymi panašiomis savybėmis, kaip ir analogiškos sistemos ant aukso [219,222], ir turi biologinę prasmę analizuojant poras formuojančius bakterinius toksinus.

Fizines lipidinių dvisluoksnių pažaidas užfiksavome EIS metodu, tačiau vis dar išlieka neaiški susidariusių defektų geometrija ir pasiskirstymas. Šie parametrai itin svarbūs tolimesnei sistemos analizei. Pasitelkę atominės jėgos mikroskopiją bandėme įvertinti tBLM integralumą suardžiusių VLY struktūrų morfologiją. (36 pav.). Tie patys mėginiai, kuriuos naudojome atliekant EIS matavimus, buvo perkelti iš elektrocheminės matavimo sistemos į AFM vaizdinimui skirtą kamerą. Mėginiai vertinti vandeninėje terpėje, taip išlaikant pastovias eksperimentines sąlygas.

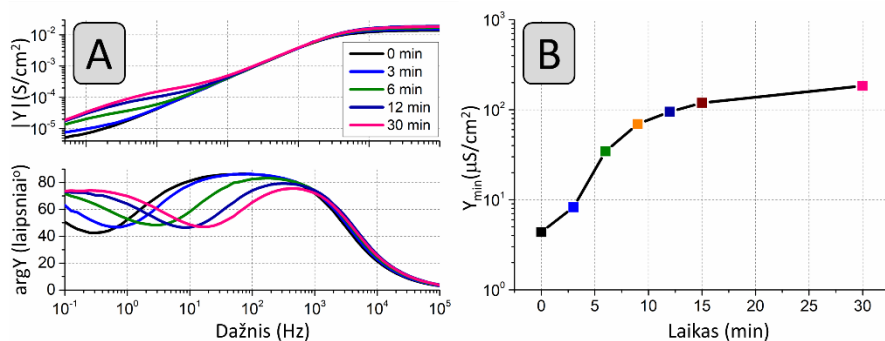


36 pav. Vaginolizino formuojamų porų AFM vaizdai ir profilis. (A) 2D vaizdas $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ plote. (B) 3D vaizdas $200 \text{ nm} \times 200 \text{ nm}$ plote. (C) Stebėtų VLY porų profiliai.

36 pav., pateikti AFM vaizdai rodo, kad VLY formuojamiems dariniams būdingos pilnų žiedų ir pusžiedžių formos. 36 pav. B dalyje matome padidintus šių baltyminių struktūrų 3D vaizdus, o C dalyje, parodytas viršutinės poros pateiktos B dalyje – skerspjūvio profilis. Šio baltymų komplekso išorinis skersmuo yra apie 58 nm, o vidinis skersmuo yra ~ 22 nm. Tai atitinka literatūroje aprašytus VLY žiedo matmenis tBLM modelyje ant

aukso substrato [222] ir yra panašios vertės su įprastai kitų CDC kompleksų suformuotais pilnais žiedais, kuriems būdingas 40-50 nm skersmuo, o vidinis žiedo (poros) spindulys būna ~ 15 nm [223–225]. 36 pav. A dalyje suskaičiavome 11 VLY struktūrinių darinių, kurie gali būti aiškiai identifikuojami kaip baltymų kompleksai, pasiskirstę 4 μm^2 plote. Tokiu atveju įvertinta N_{def} vertė yra ~ 2,75 μm^{-2} , kuri yra šiek tiek didesnė lyginant su N_{def} verte (~1,8 μm^{-2}) gauta iš EIS duomenų. Šis nuokrypis nėra didelis, atsižvelgiant į tai, kad šiais metodais analizavome skirtingus paviršiaus plotus EIS – 16 mm^2 , o AFM 4 μm^2 . Be to, negalime atmesti galimybės, kad ne visi AFM metodu užfiksuoti VLY dariniai (ypač nepilni žiedai ir linijinės struktūros) sukelia žymius laidumo pokyčius stebimus EIS metodu.

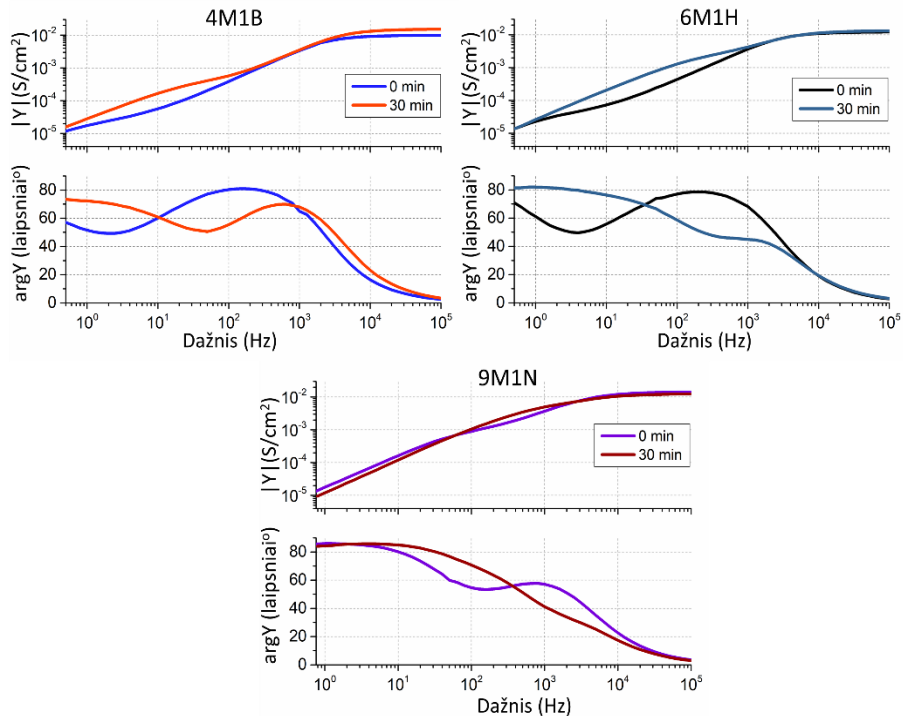
Įvertinę tBLM modelių formuotų ant 3M1P:WC14 (80:20 %) mišrių SAM liejant DOPC:Chol (50:50 %) liposomas, siekėme išanalizuoti kitų trumpagrandžių paviršiaus skiediklių įtaką tBLM funkcionalumui. Šiuose eksperimentuose (kaip ir 32 pav. pateiktoje analizėje), sumažiname cholesterolio kiekį liposomose iki 40 %, kad suformuotos tBLM būtų artimesnės natūralių membranų sudėčiai, tačiau kiekis išliktų pakankamas CDC įsiterpimui. Ant skirtingų mišrių SAM suformavus tBLM, visas jas veikėme 2 nM VLY tirpalu.



37 pav. EIS spektriniai pokyčiai laike tBLM paveikus vaginolizinu (pradinė tBLM ir po: 3 min, 6 min, 9 min, 30 min.). (A) Admitanso modulis (viršuje) ir fazė (apačioje). (B) Admitanso vertės f_{min} taške kitimas laike, tBLM paveikus 2 nM VLY. tBLM (DOPC:Chol 60:40 %) formuotos ant 3M1P:WC14 (80:20 %) SAM.

37 pav. pateiktuose Bode grafikuose matome, kaip kinta ant 3M1P:WC14 mišraus SAM formuoto lipidinio dvisluoksniu laidumo parametrai laike, po sąveikos su 2 nM VLY. 37 pav. A dalyje (viršuje) matome, kaip kreivės žemuose dažniuose palaipsniui kyla į viršų. Tai indikuoja apie tBLM laidumo didėjimą. tBLM sąveikaujant su toksinu, per 30 min admitanso modulio vertė

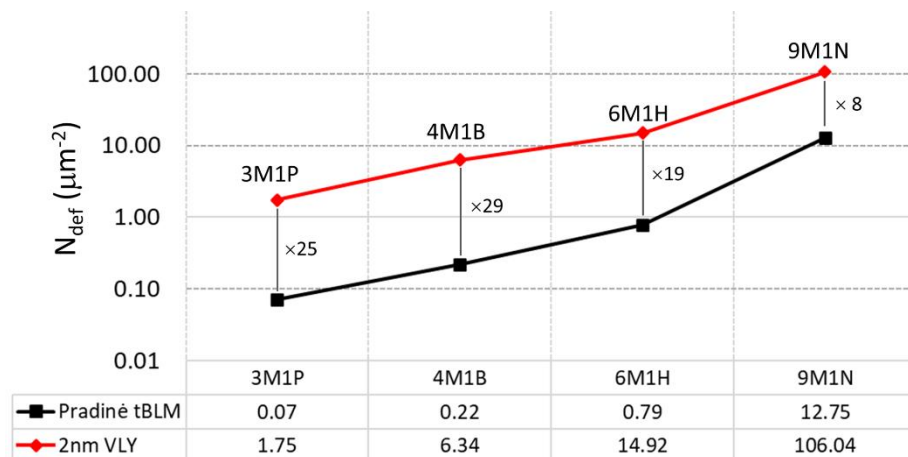
f_{min} taške padidėjo beveik dviem eilėmis. Be to, admitanso fazės diagramose matome, kaip ilgėjant inkubacijos laikui, f_{min} padėtis nuosekliai slinkosi link aukštesnių dažnių (37 pav. A apačioje). Toks nuoseklus fazės minimumo judėjimas aukštesnių dažnių kryptimi rodo, kad poras formuojantis toksinas ilgainiui daro vis didesnę žalą ir didina tBLM defektiškumą. Identiškas efektas buvo stebimas ir ant aukso [101].



38 pav. tBLM modeliai ant mišrių (80:20 %) SAM su 4M1B, 6M1H, 9M1N.

Lipidinius dvisluoksnius suformavus ant kitų sudėčių mišrių SAM (su 80 % 4M1B, 6M1H ir 9M1N), stebime vis prastesnius pradinius elektrocheminius tBLM sistemų parametrus, dar prieš paveikiant bakteriniu toksinu VLY (38 pav.), dėl skirtingų trumpagrandžių molekulių savybių. Toks efektas sumažina inkarinių WC14 molekulių tankį sidabro paviršiuje, o tai lemia mažiau izoliuojančių ir labiau defektuotų lipidinių dvisluoksnių susidarymą.

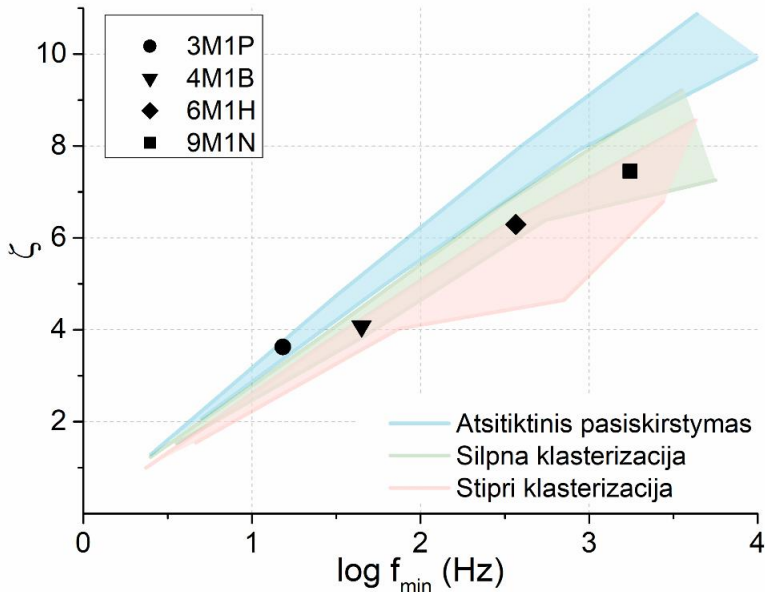
Nepaisant prastesnių pradinių tBLM parametrų, poras formuojančio toksino poveikis buvo aiškiai matomas EIS spektruose, visais pateiktais atvejais (38 pav.) Tokie duomenys rodo, kad net ir esant didesniai pradinių tBLM defektiškumui, jautrumas poras formuojantiems baltymams išlieka ir gali būti stebimas naudojant ilgesnės grandinės paviršinius skiediklius.



39 pav. Pradinių membranų N_{def} verčių palyginimas su N_{def} vertėmis membranas paveikus 2 nM bakterinio toksino VLY, naudojant skirtingus trumpagrandžius junginius mišriuose SAM.

39 paveiksle pateiktame grafike palyginome pradinių membranų N_{def} vertes su N_{def} vertėmis membranas paveikus 2 nM bakterinio toksino VLY. Gauti duomenys rodo, kad naudojant trumpesnius paviršinius skiediklius 3M1P ir 4M1B, VLY sukeltas tBLM pažaidų mastas yra panašus. Šiais dviem atvejais pradinių membranų N_{def} vertės buvo mažesnės ~ 25-29 kartus lyginant su N_{def} vertėmis po tBLM sąveikos su VLY. Ilgėjant paviršiaus skiediklių molekulėms pokytis buvo mažesnis – 6M1H atveju siekė ~ 19 kartų ir ~ 8 kartus sistemose su 9M1N. Pirmiausia, tokie rezultatai patvirtina, kad nepaisant didelio pradinių natūralių membranų defektų kiekio, visais analizuotais atvejais nustatomi ir VLY indukuoti defektai. Mažesnis defektiškumo pokytis naudojant ilgesnes 9M1N molekules, greičiausiai gali būti paaiškinamas atsirandančiais fiziniais apribojimais naujų defektų susidarymui ženkliai prastesnės kokybės membranose, lyginant su kitais paviršiniaus skiedikliais. Tokie duomenys leidžia manyti, kad mišriuose SAM taikant 3M1P ir 4M1B, VLY sukelia didesnio masto tBLM pažeidimus, kas rodo didesnę sistemos jautrumą lyginant su tBLM formuotais ant 6M1H ir 9M1N turinčiais SAM.

Kaip ir natūralių defektų atveju, VLY indukuotų pažaidų pasiskirstymo pobūdis taip pat gali būti įvertinamas panaudojant ζ parametą ir matematinio modeliavimu sugeneruotą klasterizacijos identifikavimo grafiką (40 pav.)



40 pav. Galimos defektų klasterizacijos indentifikavimo grafikas. Zeta (ζ) parametras, apskaičiuotas iš charakteringų EIS spektrų taškų. Defektų spindulys kinta nuo r_{def} 0,5 nm kiekvienos spalvotos zonos viršuje iki 25,5 nm zonos apačioje. Skirtingi juodi simboliai žymi ζ parametą apskaičiuotą iš eksperimentinių EIS spektrų, kiekvieno paviršinio skiediklio atveju.

Atidėjus eksperimentinių spektrų ζ vertes, galime įvertinti ar VLY sukelti defektai membranoje pasiskirstę tolygiai heterogeniškai ar telkiasi į klasterius (40 pav.). 3M1P atveju $\zeta_{3M1P} \approx 1,6$, ties $\log f_{\min} = 1,2$ (juodas apskritimas) ir patenka į atsitiktinio pasiskirstymo, bei mažo – vidutinio defektų dydžio zoną. 4M1B atveju $\zeta_{4M1B} \approx 1,8$, ties $\log f_{\min} = 1,7$ (juodas trikampis) patenka į silpnos ir stiprios klasterizacijos zonų ribą. Šiuo atveju, galima manyti, jog stebima silpna didelių defektų arba stipri mažesnių defektų klasterizacija. Ant 6M1H turinčių SAM formuotas membranas paveikus VLY, stebime didesnę tBLM defektiškumą, o $\zeta_{6M1H} \approx 2,7$, ties $\log f_{\min} = 2,5$ (juodas rombas), taip pat kaip ir 4M1B, patenka į silpnos ir stiprios klasterizacijos zonų ribą. 9M1N atveju $\zeta_{9M1N} \approx 3,2$, ties $\log f_{\min} = 3,2$ (juodas kvadratas), parametro pozicija išlieka rausvos (stiprios mažesnių defektų klasterizacijos) zonos viršuje. VLY poveikio membranai tyrimuose naudojama fiksuota toksino koncentracija ir identiškos sudėties tBLM kiekvienos skirtingos trumpagrandės SAM molekulės atveju, todėl natūralu, jog VLY defektų dydis iš esmės nekinta. Heterogeniškas VLY defektų pasiskirstymas koreliuoja su AFM gautais vaizdais. Stebimas klasterizacijos

masto išaugimas, pakeitus 3M1P į 4M1B. Klasterizacija išlieka panaši ilgesnių (6M1H, 9M1N) skiediklių atveju. Didesnė defektų klasterizacija galimai nulemta sumažėjusio pomembraninio tBLM sluoksnio ilgesnių skiediklių atveju ir vis didesnio pradinių membranų defektiškumo. Pažaidos susidariusios pradinėse tBLM potencialiai sumažino VLY įsiterpimui tinkamą membranų plotą, dėl ko baltymo formuojamos poros telkėsi arčiau vienos kitų (didėjo porų tankis tBLM ploto vienetu) ir galimai jungėsi į klasterius. Augant defektų tankiui, VLY linkęs į klasterizaciją ir kitose, panašiose, tBLM sistemose [190,218].

Apibendrinant galime tarti, kad tBLM sistemoje su 3M1P stebimas tolygesnis VLY sukeltų defektų pasiskirstymas, kas leidžia tikėtis geresnio rezultatų atsikartojamumo – o tai, būtų didelis privalumas analitinėse biosensorinėse sistemose, lyginant su kitais tirtais paviršiniais skiedikliais, kur stebėjome didelę duomenų sklaidą ir nekontroliuojamą defektų klasterizaciją. Nepaisant to, gauti eksperimentiniai duomenys dar kartą patvirtina, kad visi tirti trumpagrandžiai junginiai gali būti pritaikomi biologiškai funkcionalių tBLM modelių konstravimui, kurie tinka su membranomis sąveikaujančių baltymų nustatymui ir analizei. Nors buvo stebimas didesnis pradinių membranų defektiškumas naudojant ilgesnius paviršinius skiediklius, kas galimai nulėmė ir didesnę VLY klasterių formavimą, gauti duomenys indikuoja, kad tiksliau parinkus pradinių mišrių SAM tirpalų procentines sudėtis, galėtume padidinti WC14 inkaro kiekį paviršiuje. Tai teoriškai leistų formuoti geresnės kokybės pradines membranas, su visais tirtais paviršiniais skiedikliais, kurios būtų tinkamos biocheminiams-analitiniais taikymams.

IŠVADOS

1. Pagaminti ir charakterizuoti SERS substratai tinkami ant sidabro adsorbuotų biomolekulių tyrimams, kuriems būdingas aukštas SERS signalo stiprinimo atsikartojamumas.
2. Spektroskopiniais metodais nustatyta, kad vis ilgesnių paviršiaus skiediklių panaudojimas mišrių savitvarkių monosluoksnių (SAM) formavimui, lemia didėjantį monosluoksnių tvarkumą ir vertikalesnę WC14 inkaru orientaciją paviršiaus atžvilgiu.
3. Paviršiaus kontaktinio kampo metodu įrodyta, kad išlaikant pastovią SAM formuojančių organinių junginių koncentraciją tirpaluose, WC14 ir paviršinių skiediklių santykį ant sidabro paviršiaus lemia skiediklių molekulių ilgis: didėjant grandinės ilgiui paviršinio skiediklio afiniškumas sidabro paviršiui auga, o WC14 inkaru kiekis ant paviršiaus mažėja.
4. EIS metodu nustatyta, kad visi pasirinkti mišrūs SAM yra tinkami lipidinių dvisluoksnių (tBLM) formavimui, tačiau ilgėjant paviršinių skiediklių molekulių ilgiui, didėja pradinių tBLM defektiškumas.
5. Suformuotų tBLM funkcionalumas įrodytas EIS metodu, nustatant poras formuojančio toksino VLY įsiterpimą į membraną. Parodyta, kad tBLM išlaiko funkcionalumą, nepriklausomai nuo SAM paviršinio skiediklio molekulės ilgio.
6. EIS duomenų analizė pritaikant matematinius modelius parodė, jog trumpesnės grandinės paviršiniai skiedikliai 3M1P ir 4M1B yra tinkamiausi tBLM formavimui ant sidabro, nes užtikrina sistemos stabilumą ir tolygesnį VLY defektų pasiskirstymą membranoje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Migliorini, E.; Weidenhaupt, M.; Picart, C. Practical guide to characterize biomolecule adsorption on solid surfaces (Review). *Biointerphases* **2018**, *13*, 06D303, doi:10.1116/1.5045122.
2. Otero, R.; Gallego, J.M.; Parga, A.L.V. de; Martín, N.; Miranda, R. Molecular Self-Assembly at Solid Surfaces. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5148–5176, doi:10.1002/ADMA.201102022.
3. Meyer zu Heringdorf, F.J.; Reuter, M.C.; Tromp, R.M. Growth dynamics of pentacene thin films. *Nature* **2001**, *412*, 517–520, doi:10.1038/35087532.
4. Joachim, C.; Gimzewski, J.K.; Aviram, A. Electronics using hybrid-molecular and mono-molecular devices. *Nature* **2000**, *408*, 541–548, doi:10.1038/35046000.
5. Fritz, J.; Baller, M.K.; Lang, H.P.; Rothuizen, H.; Vettiger, P.; Meyer, E.; Güntherodt, H.J.; Gerber, C.; Gimzewski, J.K. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science (80-.)*. **2000**, *288*, 316–318, doi:10.1126/science.288.5464.316.
6. Jones, F.H. Teeth and bones: Applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf. Sci. Rep.* 2001, *42*, 75–205.
7. Kaufmann, C.R.; Mani, G.; Marton, D.; Johnson, D.M.; Agrawal, C.M. Long-term stability of self-assembled monolayers on 316L stainless steel. *Biomed. Mater.* **2010**, *5*, 025008, doi:10.1088/1748-6041/5/2/025008.
8. Rosei, F.; Rosei, R. Atomic description of elementary surface processes: Diffusion and dynamics. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 395–413, doi:10.1016/S0039-6028(01)01552-7.
9. Stampfl, C.; Veronica Ganduglia-Pirovano, M.; Reuter, K.; Scheffler, M. Catalysis and corrosion: the theoretical surface-science context. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 368–394, doi:10.1016/S0039-6028(01)01551-5.
10. Besenbacher, F. Scanning tunnelling microscopy studies of metal surfaces. *Reports Prog. Phys.* **1996**, *59*, 1737–1802, doi:10.1088/0034-4885/59/12/004.
11. Schunack, M.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Johannsen, I.; Besenbacher, F. A Chiral Metal Surface. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2623–2626, doi:10.1002/1521-3773(20010716)40:14<2623::AID-ANIE2623>3.0.CO;2-X.
12. Rosei, F.; Schunack, M.; Jiang, P.; Gourdon, A.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Joachim, C.; Besenbacher, F. Organic Molecules Acting as Templates on Metal Surfaces. *Science (80-.)*. **2002**, *296*, 328–331, doi:10.1126/SCIENCE.1069157.
13. Grill, L.; Moresco, F.; Jiang, P.; Joachim, C.; Gourdon, A.; Rieder, K.-H. Controlled manipulation of a single molecular wire along a copper atomic nanostructure. *Phys. Rev. B* **2004**, *69*, 035416, doi:10.1103/PhysRevB.69.035416.

14. Flink, S.; Veggel, F.C.J.M. van; Reinhoudt, D.N. Sensor Functionalities in Self-Assembled Monolayers. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1315–1328, doi:10.1002/1521-4095(200009)12:18<1315::AID-ADMA1315>3.0.CO;2-K.
15. Barlow, S.M.; Raval, R. Complex organic molecules at metal surfaces: bonding, organisation and chirality. *Surf. Sci. Rep.* **2003**, *50*, 201–341, doi:10.1016/S0167-5729(03)00015-3.
16. Barth, J. V.; Weckesser, J.; Lin, N.; Dmitriev, A.; Kern, K. Supramolecular architectures and nanostructures at metal surfaces. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2003**, *76*, 645–652, doi:10.1007/s00339-002-2003-6.
17. Rosei, F.; Schunack, M.; Naitoh, Y.; Jiang, P.; Gourdon, A.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Joachim, C.; Besenbacher, F. Properties of large organic molecules on metal surfaces. In Proceedings of the Progress in Surface Science; Pergamon, 2003; Vol. 71, pp. 95–146.
18. Otero, R.; Naitoh, Y.; Rosei, F.; Jiang, P.; Thostrup, P.; Gourdon, A.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Joachim, C.; Besenbacher, F. One-Dimensional Assembly and Selective Orientation of Lander Molecules on an O–Cu Template. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 2092–2095, doi:10.1002/ANIE.200353586.
19. Schunack, M.; Rosei, F.; Naitoh, Y.; Jiang, P.; Gourdon, A.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Joachim, C.; Besenbacher, F. Adsorption behavior of Lander molecules on Cu(110) studied by scanning tunneling microscopy. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 6259, doi:10.1063/1.1498475.
20. Schunack, M.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Besenbacher, F. Bonding and ordering of decacyclene molecules on Cu(110) studied by scanning tunneling microscopy. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 8493, doi:10.1063/1.1512644.
21. Otero, R.; Schöck, M.; Molina, L.M.; Lægsgaard, E.; Stensgaard, I.; Hammer, B.; Besenbacher, F. Guanine Quartet Networks Stabilized by Cooperative Hydrogen Bonds. *Angew. Chemie* **2005**, *117*, 2310–2315, doi:10.1002/ange.200461586.
22. Weckesser, J.; De Vita, A.; Barth, J. V.; Cai, C.; Kern, K. Mesoscopic correlation of supramolecular chirality in one-dimensional hydrogen-bonded assemblies. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 961011–961014, doi:10.1103/PhysRevLett.87.096101.
23. Kühnle, A.; Linderoth, T.R.; Hammer, B.; Besenbacher, F. Chiral recognition in dimerization of adsorbed cysteine observed by scanning tunnelling microscopy. *Nature* **2002**, *415*, 891–893, doi:10.1038/415891a.
24. Griessl, S.; Lackinger, M.; Edelwirth, M.; Hietschold, M.; Heckl, W.M. Self-Assembled Two-Dimensional Molecular Host-Guest Architectures From Trimesic Acid. *Single Mol.* **2002**, *3*, 25–31, doi:10.1002/1438-5171(200204)3:1<25::AID-SIMO25>3.0.CO;2-K.
25. Stepanow, S.; Lingenfelder, M.; Dmitriev, A.; Spillmann, H.; Delvigne, E.; Lin, N.; Deng, X.; Cai, C.; Barth, J. V.; Kern, K. Steering molecular organization and host-guest interactions using two-dimensional nanoporous

- coordination systems. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 229–233, doi:10.1038/nmat1088.
26. Theobald, J.A.; Oxtoby, N.S.; Phillips, M.A.; Champness, N.R.; Beton, P.H. Controlling molecular deposition and layer structure with supramolecular surface assemblies. *Nature* **2003**, *424*, 1029–1031, doi:10.1038/nature01915.
 27. Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*; Elsevier, 2013; ISBN 9780080926315.
 28. Dubois, L.H.; Nuzzo, R.G. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 437–463, doi:10.1146/annurev.pc.43.100192.002253.
 29. Badia, A.; Lennox, R.B.; Reven, L. A Dynamic View of Self-Assembled Monolayers. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 475–481, doi:10.1021/ar9702841.
 30. Yang, G.; Liu, G. New Insights for Self-Assembled Monolayers of Organothiols on Au(111) Revealed by Scanning Tunneling Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8746–8759, doi:10.1021/jp0219810.
 31. Becka, A.M.; Miller, C.J. Electrochemistry at ω -hydroxy thiol coated electrodes. 4. Comparison of the double layer at ω -hydroxy thiol and alkanethiol monolayer coated Au electrodes. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6233–6239, doi:10.1021/j100125a024.
 32. Feldheim, D.L.; Keating, C.D. Self-assembly of single electron transistors and related devices. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 1–12, doi:10.1039/a827001z.
 33. Polavarapu, P.L. Ab initio vibrational Raman and Raman optical activity spectra. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8106–8112, doi:10.1021/j100384a024.
 34. Wang, J. Modified electrodes for electrochemical sensors. *Electroanalysis* **1991**, *3*, 255–259, doi:10.1002/elan.1140030404.
 35. Berggren, M.; Richter-Dahlfors, A. Organic Bioelectronics. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3201–3213, doi:10.1002/adma.200700419.
 36. Chen, D.; Li, J. Interfacial design and functionalization on metal electrodes through self-assembled monolayers. *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61*, 445–463.
 37. Kim, S.; Yoo, H. Self-Assembled Monolayers: Versatile Uses in Electronic Devices from Gate Dielectrics, Dopants, and Biosensing Linkers. *Micromachines* **2021**, *12*, 565, doi:10.3390/mi12050565.
 38. Casalini, S.; Bortolotti, C.A.; Leonardi, F.; Biscarini, F. Self-assembled monolayers in organic electronics. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 40–71, doi:10.1039/c6cs00509h.
 39. Akkerman, H.B.; Blom, P.W.M.; de Leeuw, D.M.; de Boer, B. Towards molecular electronics with large-area molecular junctions. *Nat.* **2006**, *441*, 69–72, doi:10.1038/nature04699.
 40. Mrksich, M. What can surface chemistry do for cell biology? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 794–797.
 41. Mrksich, M. Using self-assembled monolayers to model the extracellular matrix. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 832–841.

42. Parviz, M.; Gaus, K.; Gooding, J.J. Simultaneous impedance spectroscopy and fluorescence microscopy for the real-time monitoring of the response of cells to drugs. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1831–1840, doi:10.1039/C6SC05159F.
43. Yandrapalli, N.; Lubart, Q.; Tanwar, H.S.; Picart, C.; Mak, J.; Muriaux, D.; Favard, C. Self assembly of HIV-1 Gag protein on lipid membranes generates PI(4,5)P2/Cholesterol nanoclusters. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39332, doi:10.1038/srep39332.
44. McGillivray, D.J.; Valincius, G.; Vanderah, D.J.; Febo-Ayala, W.; Woodward, J.T.; Heinrich, F.; Kasianowicz, J.J.; Lösche, M. Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases* **2007**, *2*, 21–33, doi:10.1116/1.2709308.
45. Budvytyte, R.; Valincius, G.; Niaura, G.; Voiciuk, V.; Mickevicius, M.; Chapman, H.; Goh, H.-Z.; Shekhar, P.; Heinrich, F.; Shenoy, S.; et al. Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules. *Langmuir* **2013**, *29*, 8645–8656, doi:10.1021/la401132c.
46. Chaki, N.K.; Vijayamohan, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 1–12.
47. Bain, C.D.; Whitesides, G.M. Correlations between wettability and structure in monolayers of alkanethiols adsorbed on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3665–3666, doi:10.1021/ja00219a055.
48. Laibinis, P.E.; Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of n-alkanethiolates on copper are barrier films that protect the metal against oxidation by air. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9022–9028, doi:10.1021/ja00049a038.
49. Quiñones, R.; Gawalt, E.S. Polystyrene formation on monolayer-modified nitinol effectively controls corrosion. *Langmuir* **2008**, *24*, 10858–10864, doi:10.1021/la801906e.
50. Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170, doi:10.1021/cr0300789.
51. Torres, N.; Oh, S.; Appleford, M.; Dean, D.D.; Jorgensen, J.H.; Ong, J.L.; Agrawal, C.M.; Mani, G. Stability of antibacterial self-assembled monolayers on hydroxyapatite. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3242–3255, doi:10.1016/j.actbio.2010.02.032.
52. Waske, P.A.; Meyerbrö, N.; Eck, W.; Zharnikov, M. Self-Assembled Monolayers of Cyclic Aliphatic Thiols and Their Reaction toward Electron Irradiation. **2012**, doi:10.1021/jp210768y.
53. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554, doi:10.1021/CR9502357.
54. Jin, Q.; Rodriguez, J.A.; Li, C.Z.; Darici, Y.; Tao, N.J. Self-assembly of aromatic thiols on Au(111). *Surf. Sci.* **1999**, *425*, 101–111, doi:10.1016/S0039-6028(99)00195-8.

55. Sagiv, J. Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92–98, doi:10.1021/ja00521a016.
56. Porter, M.D.; Bright, T.B.; Allara, D.L.; Chidsey, C.E.D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559–3568, doi:10.1021/ja00246a011.
57. Schoenenberger, C.; Jorritsma, J.; Sondag-Huethorst, J.A.M.; Fokkink, L.G.J. Domain Structure of Self-Assembled Alkanethiol Monolayers on Gold. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3259–3271, doi:10.1021/j100010a042.
58. Špandryeva, M.; Ignatjev, I.; Matulaitienė, I.; Kuodis, Z.; Niaura, G. Sum frequency generation spectroscopy probing of formation of self-assembled monolayers from thiols with terminal phenylalanine ring and intrachain amide groups. *Chemija* **2018**, *29*, 219–226, doi:10.6001/chemija.v29i4.3837.
59. Hattori, Y.; Takahashi, H.; Ikematsu, N.; Kitamura, M. Chain-Length Dependence of Optical Properties for an Alkanethiol Monolayer on an Ultrathin Gold Film Revealed via Reflected Light Microscopy. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125*, 14991–14999, doi:10.1021/acs.jpcc.1c03080.
60. Schoenfisch, M.H.; Pemberton, J.E. Air Stability of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4502–4513, doi:10.1021/ja974301t.
61. Bain, C.D.; Evall, J.; Whitesides, G.M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7155–7164, doi:10.1021/ja00200a039.
62. Laibinis, P.E.; Fox, M.A.; Folkers, J.P.; Whitesides, G.M. Comparisons of Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold: Mixed Monolayers Derived from HS(CH₂)₂1X and HS(CH₂)₁₀Y (X, Y = CH₃, CH₂OH) Have Similar Properties. *Langmuir* **1991**, *7*, 3167–3173, doi:10.1021/la00060a041.
63. Twardowski, M.; Nuzzo, R.G. Chemically mediated grain growth in nanotextured Au, Au/Cu thin films: Novel substrates for the formation of self-assembled monolayers. *Langmuir* **2002**, *18*, 5529–5538, doi:10.1021/la020138q.
64. Meni Wanunu; Alexander Vaskevich, and; Rubinstein*, I. Widely-Applicable Gold Substrate for the Study of Ultrathin Overlayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5569–5576, doi:10.1021/JA0396448.
65. and, F.T.; Bernasek*, S.L. Understanding Odd–Even Effects in Organic Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1408–1453, doi:10.1021/CR050258D.
66. Siddiqi, K.S.; Husen, A.; Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol* **2018**, *16*, 14, doi:10.1186/s12951-018-0334-5.
67. Wei, L.; Lu, J.; Xu, H.; Patel, A.; Chen, Z.S.; Chen, G. Silver nanoparticles:

- synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 595–601, doi:10.1016/J.DRUDIS.2014.11.014.
68. Lara, H.H.; Garza-Treviño, E.N.; Ixtapan-Turrent, L.; Singh, D.K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 1–8, doi:10.1186/1477-3155-9-30/FIGURES/4.
 69. Yin, I.X.; Zhao, I.S.; Mei, M.L.; Li, Q.; Yu, O.Y.; Chu, C.H. Use of Silver Nanomaterials for Caries Prevention: A Concise Review. **2020**, doi:10.2147/IJN.S253833.
 70. Lokina, S.; Stephen, A.; Kaviyaran, V.; Arulvasu, C.; Narayanan, V. Cytotoxicity and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 256–263, doi:10.1016/J.EJMECH.2014.02.010.
 71. Griffiths, P.R. Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy: principles and applications. *Spectrosc. Prop. Inorg. Organomet. Compd.* **2013**, *44*, 95–122, doi:10.1039/9781849737791-00095.
 72. Aroca, R. Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy. *Surface-Enhanced Vib. Spectrosc.* **2007**, 1–233, doi:10.1002/9780470035641.
 73. Le Ru, E.C.; Etchegoin, P.G. Introduction to plasmons and plasmonics. *Princ. Surface-Enhanced Raman Spectrosc.* **2009**, 121–183, doi:10.1016/B978-0-444-52779-0.00009-X.
 74. Królikowska, A. Surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) as a tool for the studies of electron transfer proteins attached to biomimetic surfaces: Case of cytochrome c. *Electrochim. Acta* **2013**, *111*, 952–995.
 75. Hong, S.; Li, X. Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions. *J. Nanomater.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/790323.
 76. Garcia-Leis, A.; Garcia-Ramos, J.V.; Sanchez-Cortes, S. Silver nanostars with high SERS performance. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 7791–7795, doi:10.1021/jp401737y.
 77. Wijesuriya, S.; Burugapalli, K.; Mackay, R.; Ajaezi, G.C.; Balachandran, W. Chemically roughened solid silver: A simple, robust and broadband SERS substrate. *Sensors (Switzerland)* **2016**, *16*, doi:10.3390/S16101742.
 78. Fales, A.M.; Yuan, H.; Vo-Dinh, T. Development of Hybrid Silver-Coated Gold Nanostars for Nonaggregated Surface-Enhanced Raman Scattering. **2014**, doi:10.1021/jp4091393.
 79. Bryant, M.A.; Pemberton, J.E. Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols at Ag. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3629–3637, doi:10.1021/ja00010a001.
 80. Laibinis, P.E.; Whitesides, G.M.; Allara, D.L.; Tao, Y.T.; Parikh, A.N.; Nuzzo, R.G. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7152–7167, doi:10.1021/ja00019a011.

81. Laibinis, P.E.; Whitesides, G.M. ω -Terminated alkanethiolate monolayers on surfaces of copper, silver, and gold have similar wettabilities. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1990–1995, doi:10.1021/ja00032a009.
82. Fenter, P.; Eisenberger, P.; Liang, K.S. Chain-length dependence of the structures and phases of CH₃(CH₂)_{n-1} SH self-assembled on Au(111). *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *70*, 2447–2450, doi:10.1103/PhysRevLett.70.2447.
83. Ulman, A. *Self-Assembled Monolayers of Thiols*; 1 edition.; Academic Press: San Diego, 1998; Vol. 24; ISBN 9780125330244.
84. Chan, Y.-H.M.; Boxer, S.G. Model membrane systems and their applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 581–587, doi:10.1016/j.cbpa.2007.09.020.
85. Lagny, T.J.; Bassereau, P. Bioinspired membrane-based systems for a physical approach of cell organization and dynamics: Usefulness and limitations. *Interface Focus* **2015**, *5*, doi:10.1098/RSFS.2015.0038.
86. Andersson, J.; Köper, I.; Knoll, W. Tethered membrane architectures—design and applications. *Front. Mater.* **2018**, *5*, doi:10.3389/FMATS.2018.00055.
87. Eeman, M.; Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. <https://popups.uliege.be/1780-4507> **2010**.
88. McConnell, H.M.; Watts, T.H.; Weis, R.M.; Brian, A.A. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *BBA - Rev. Biomembr.* **1986**, *864*, 95–106, doi:10.1016/0304-4157(86)90016-X.
89. Nikoleli, G.-P.; Nikolelis, D.; Siontorou, C.; Nikolelis, M.-T.; Karapetis, S. The Application of Lipid Membranes in Biosensing. *Membranes (Basel)*. **2018**, *8*, 108, doi:10.3390/membranes8040108.
90. Andersson, J.; Köper, I. Biomimetic membranes. *Compr. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *1–5*, 49–64, doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10447-3.
91. Alvarez-Malmagro, J.; García-Molina, G.; De Lacey, A.L. Electrochemical biosensors based on membrane-bound enzymes in biomimetic configurations. *Sensors (Switzerland)* **2020**, *20*, 1–17, doi:10.3390/s20123393.
92. Spinke, J.; Yang, J.; Wolf, H.; Liley, M.; Ringsdorf, H.; Knoll, W. Polymer-supported bilayer on a solid substrate. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1667–1671, doi:10.1016/S0006-3495(92)81742-3.
93. Naumann, R.; Jonczyk, A.; Kopp, R.; van Esch, J.; Ringsdorf, H.; Knoll, W.; Gräber, P. Incorporation of Membrane Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34*, 2056–2058, doi:10.1002/ANIE.199520561.
94. Lang, H.; Duschl, C.; Grätzel, M.; Vogel, H. Self-assembly of thiolipid molecular layers on gold surfaces: optical and electrochemical characterization. *Thin Solid Films* **1992**, *210–211*, 818–821, doi:10.1016/0040-6090(92)90413-6.
95. Raguse, B.; Braach-Maksvytis, V.; Cornell, B.A.; King, L.G.; Osman, P.D.J.; Pace, R.J.; Wieczorek, L. Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir* **1998**, *14*, 648–659,

doi:10.1021/la9711239.

96. Plant, A.L. Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold. *Langmuir* **1993**, *9*, 2764–2767, doi:10.1021/la00035a004.
97. Sabirovas, T.; Valiūnienė, A.; Valincius, G. Hybrid bilayer membranes on metallurgical polished aluminum. *Sci. Reports 2021 111* **2021**, *11*, 1–11, doi:10.1038/s41598-021-89150-2.
98. Zhang, H.; Catania, R.; Jeuken, L.J.C. Membrane Protein Modified Electrodes in Bioelectrocatalysis. *Catalysts* **2020**, *10*, 1427, doi:10.3390/catal10121427.
99. Cornell, B.A.; Braach-Maksvytis, V.L.B.B.; King, L.G.; Osman, P.D.J.J.; Raguse, B.; Wieczorek, L.; Pace, R.J. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* **1997**, *387*, 580–583, doi:10.1038/42432.
100. Atanasov, V.; Knorr, N.; Duran, R.S.; Ingebrandt, S.; Offenhäusser, A.; Knoll, W.; Köper, I. Membrane on a chip: A functional tethered lipid bilayer membrane on silicon oxide surfaces. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1780–1788, doi:10.1529/biophysj.105.061374.
101. Budvytyte, R.; Pleckaityte, M.; Zvirbliene, A.; Vanderah, D.J.; Valincius, G. Reconstitution of Cholesterol-Dependent Vaginolysin into Tethered Phospholipid Bilayers: Implications for Bioanalysis. *PLoS One* **2013**, *8*, e82536, doi:10.1371/journal.pone.0082536.
102. Naumann, R.; Schiller, S.M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K.B.; Kärcher, I.; Köper, I.; Lübber, J.; Vasilev, K.; Knoll, W. Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir* **2003**, *19*, 5435–5443, doi:10.1021/la0342060.
103. Ragaliauskas, T.; Mickevicius, M.; Rakovska, B.; Penkauskas, T.; Vanderah, D.J.; Heinrich, F.; Valincius, G. Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859*, 669–678, doi:10.1016/j.bbmem.2017.01.015.
104. Lang, H.; Duschl, C.; Vogel, H. A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir* **1994**, *10*, 197–210, doi:10.1021/la00013a029.
105. McGillivray, D.J.; Valincius, G.; Heinrich, F.; Robertson, J.W.F.; Vanderah, D.J.; Febo-Ayala, W.; Ignatjev, I.; Lösche, M.; Kasianowicz, J.J. Structure of Functional Staphylococcus aureus α -Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1547–1553, doi:10.1016/j.bpj.2008.11.020.
106. Vockenroth, I.K.; Atanasova, P.P.; Jenkins, A.T.A.; Köper, I. Incorporation of α -hemolysin in different tethered bilayer lipid membrane architectures. *Langmuir* **2008**, *24*, 496–502, doi:10.1021/la7030279.
107. Junghans, A.; Köper, I. Structural Analysis of Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Langmuir* **2010**, *26*, 11035–11040, doi:10.1021/la100342k.
108. Köper, I. Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane proteins. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 651–657, doi:10.1039/B707168J.

109. Valincius, G.; Heinrich, F.; Budvytyte, R.; Vanderah, D.J.; McGillivray, D.J.; Sokolov, Y.; Hall, J.E.; Lösche, M. Soluble Amyloid β -Oligomers Affect Dielectric Membrane Properties by Bilayer Insertion and Domain Formation: Implications for Cell Toxicity. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4845–4861, doi:10.1529/biophysj.108.130997.
110. Song, H.; Sinner, E.-K.; Knoll, W. Peptid-tethered bilayer lipid membranes and their interaction with Amyloid β -peptide. *Biointerphases* **2007**, *2*, 151–158, doi:10.1116/1.2804746.
111. Becucci, L.; Martinuzzi, S.; Monetti, E.; Mercatelli, R.; Quercioli, F.; Battistel, D.; Guidelli, R. Electrochemical impedance spectroscopy and fluorescence lifetime imaging of lipid mixtures self-assembled on mercury. *Soft Matter* **2010**, *6*, 2733, doi:10.1039/b923895f.
112. Valincius, G.; Meškauskas, T.; Ivanauskas, F. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes. *Langmuir* **2012**, *28*, 977–990, doi:10.1021/la204054g.
113. Talaikis, M.; Valincius, G.; Niaura, G. Potential-Induced Structural Alterations in the Tethered Bilayer Lipid Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 19033–19045, doi:10.1021/acs.jpcc.0c04636.
114. Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2005; ISBN 9780471497943.
115. Raman, C. V.; Krishnan, K.S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature* **1928**, *121*, 501–502, doi:10.1038/121501c0.
116. Šablinskas, V. Čeponkus, J. Modernioji molekulių virpesinė spektrometrija. **2014**, 240.
117. Mickevicius, D. Cheminės analizės metodai: Spektrinė analizė. Vilnius: Žiburio I-kla. Available online: <https://www.ebooks.ktu.lt/eb/936/spektrine-analize/> (accessed on Oct 29, 2021).
118. Ferraro, J.R.; Nakamoto, K.; Brown, C.W. *Introductory Raman Spectroscopy*; Elsevier, 2003; ISBN 9780122539909.
119. Schmitt, M.; Popp, J. Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 20–28, doi:10.1002/JRS.1486.
120. Fleischmann, M.; Hendra, P.J.; McQuillan, A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163–166, doi:10.1016/0009-2614(74)85388-1.
121. Jeanmaire, D.L.; Van Duyne, R.P. Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84*, 1–20, doi:10.1016/S0022-0728(77)80224-6.
122. Albrecht, M.G.; Creighton, J.A. Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5215–5217, doi:10.1021/ja00457a071.

123. VoDinh, T.; Hiromoto, M.Y.K.; Begun, G.M.; Moody, R.L. Surface-Enhanced Raman Spectrometry for Trace Organic Analysis. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1667–1670, doi:10.1021/ac00273a029.
124. Schatz, G.C.; Young, M.A.; Duyne, R.P. Electromagnetic Mechanism of SERS. In *Surface-Enhanced Raman Scattering*; Springer Berlin Heidelberg, 2006; pp. 19–45.
125. McCreery, R.L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2000; ISBN 9780471721642.
126. McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W.E.; Faulds, K.; Graham, D. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications: <http://dx.doi.org/10.1366/11-06365> **2011**, *65*, 825–837, doi:10.1366/11-06365.
127. Fateixa, S.; Nogueira, H.I.S.S.; Trindade, T. Hybrid nanostructures for SERS: Materials development and chemical detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21046–21071, doi:10.1039/c5cp01032b.
128. Zhao, L.L.; Jensen, L.; Schatz, G.C. Surface-Enhanced Raman Scattering of Pyrazine at the Junction between Two Ag 20 Nanoclusters. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1229–1234, doi:10.1021/nl0607378.
129. *Surface-Enhanced Raman Scattering*; Kneipp, K., Moskovits, M., Kneipp, H., Eds.; Topics in Applied Physics; Springer Berlin Heidelberg, 2006; Vol. 103; ISBN 978-3-540-33566-5.
130. V. Vaičiškauskas, G.J. Babonas, Z. Kuprionis, G. Niaura, V.Š. *Paviršiaus optinė spektroskopija*; TEV: Vilnius, 2008;
131. Haes, A.J.; Haynes, C.L.; McFarland, A.D.; Schatz, G.C.; Van Duyne, R.P.; Zou, S. Plasmonic materials for surface-enhanced sensing and spectroscopy. *MRS Bull.* 2005, *30*, 368–375.
132. Le Ru, E.C.; Etchegoin, P.G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 65–87, doi:10.1146/annurev-physchem-032511-143757.
133. LeRu, E.; Etchegoin, P. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects. **2008**, 121–183.
134. Camden, J.P.; Dieringer, J.A.; Zhao, J.; Van Duyne, R.P. Controlled plasmonic nanostructures for surface-enhanced spectroscopy and sensing. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1653–1661, doi:10.1021/ar800041s.
135. Fan, M.; Andrade, G.F.S.; Brolo, A.G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 2011, *693*, 7–25.
136. Bazzazoui, E.A.; Aubard, J.; Félidj, N.; Laurent, G.; Lévi, G. Ex situ and in situ SERS analyses of polybithiophene using roughened Ag and Cu electrodes and multilayer SERS-active systems. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 817–823, doi:10.1002/jrs.1368.

137. Bazzaoui, E.A.; Lévi, G.; Aeiyaich, S.; Aubard, J.; Marsault, J.P.; Lacaze, P.C. SERS spectra of polythiophene in doped and undoped states. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 6628–6634, doi:10.1021/j100017a052.
138. Wu, D.-Y.; Li, J.-F.; Ren, B.; Tian, Z.-Q. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1025, doi:10.1039/b707872m.
139. El Guerraf, A.; Aouzal, Z.; Bouabdallaoui, M.; Ben Jadi, S.; El Jaouhari, A.; Wang, R.; Bazzaoui, M.; Bazzaoui, E.A. Electrochemically roughened silver surface versus fractal leaf-shaped silver crystals for surface-enhanced Raman scattering investigation of polypyrrole. *J. Solid State Electrochem.* **2019**, *23*, 1811–1827, doi:10.1007/s10008-019-04288-4.
140. Lin, X.-M.; Cui, Y.; Xu, Y.-H.; Ren, B.; Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1729–1745, doi:10.1007/s00216-009-2761-5.
141. Mulfinger, L.; Solomon, S.D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S.A.; Boritz, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 322, doi:10.1021/ed084p322.
142. Lee, P.C.; Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **2002**, *86*, 3391–3395, doi:10.1021/J100214A025.
143. Chou, K.-S.; Ren, C.-Y. Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. *Mater. Chem. Phys.* **2000**, *64*, 241–246, doi:10.1016/S0254-0584(00)00223-6.
144. Rodríguez-Lorenzo, L.; Álvarez-Puebla, R.A.; Pastoriza-Santos, I.; Mazzucco, S.; Stéphan, O.; Kociak, M.; Liz-Marzán, L.M.; García de Abajo, F.J. Zeptomol Detection Through Controlled Ultrasensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4616–4618, doi:10.1021/ja809418t.
145. Tao, A.R.; Huang, J.; Yang, P. Langmuir–Blodgetty of Nanocrystals and Nanowires. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1662–1673, doi:10.1021/ar8000525.
146. Tao, A.R.; Habas, S.; Yang, P. Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. *Small* **2008**, *4*, 310–325, doi:10.1002/SMLL.200701295.
147. Le Ru, E.C.; Etchegoin, P.G. Quantifying SERS enhancements. *MRS Bull.* **2013**, *38*, 631–640, doi:10.1557/mrs.2013.158.
148. Li, M.; Cushing, S.K.; Zhang, J.; Lankford, J.; Aguilar, Z.P.; Ma, D.; Wu, N. Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold-Raman-probe-silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 115501, doi:10.1088/0957-4484/23/11/115501.
149. Hildebrandt, P.; Stockburger, M. Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5935–5944, doi:10.1021/j150668a038.
150. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the

- mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale* **2013**, *5*, 7328, doi:10.1039/c3nr00024a.
151. Cras, J.; Rowe-Taitt, C.; Nivens, D.; Ligler, F.. Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 683–688, doi:10.1016/S0956-5663(99)00043-3.
 152. Lv, Y.; Liu, H.; Wang, Z.; Hao, L.; Liu, J.; Wang, Y.; Du, G.; Liu, D.; Zhan, J.; Wang, J. Antibiotic glass slide coated with silver nanoparticles and its antimicrobial capabilities. *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, n/a-n/a, doi:10.1002/pat.1138.
 153. Brown, R.J.C.; Milton, M.J.T. Nanostructures and nanostructured substrates for surface-enhanced Raman scattering (SERS). *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 1313–1326, doi:10.1002/jrs.2030.
 154. Baumberg, J.J.; Perney, N.M.B.; Kelf, T.; Cole, R.; Sugawara, Y.; Abdelsalam, M.E.; Cintra, S.; Russell, A.E.; Bartlett, P.N.; Zoorob, M.E.; et al. Tuning localized plasmons in nanostructured metamaterials for surface-enhanced Raman scattering applications. In Proceedings of the Photonic Metamaterials: From Random to Periodic; OSA: Washington, D.C., 2006; Vol. 14, p. WB5.
 155. Tripp, R.A.; Dluhy, R.A.; Zhao, Y. Novel nanostructures for SERS biosensing. *Nano Today* **2008**, *3*, 31–37, doi:10.1016/S1748-0132(08)70042-2.
 156. Bonse, J.; Hohm, S.; Kirner, S. V.; Rosenfeld, A.; Kruger, J. Laser-Induced Periodic Surface Structures-A Scientific Evergreen. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2017**, *23*, 109–123, doi:10.1109/JSTQE.2016.2614183.
 157. Luo, X.; Liu, W.; Chen, C.; Jiang, G.; Hu, X.; Zhang, H.; Zhong, M. Femtosecond laser micro-nano structured Ag SERS substrates with unique sensitivity, uniformity and stability for food safety evaluation. *Opt. Laser Technol.* **2021**, *139*, 106969, doi:10.1016/j.optlastec.2021.106969.
 158. Naqvi, T.K.; Bajpai, A.; Bharati, M.S.S.; Kulkarni, M.M.; Siddiqui, A.M.; Soma, V.R.; Dwivedi, P.K. Ultra-sensitive reusable SERS sensor for multiple hazardous materials detection on single platform. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *407*, 124353, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124353.
 159. Stankevičius, E.; Garliauskas, M.; Laurinavičius, L.; Trusovas, R.; Tarasenko, N.; Pauliukaitė, R. Engineering electrochemical sensors using nanosecond laser treatment of thin gold film on ITO glass. *Electrochim. Acta* **2019**, *297*, 511–522, doi:10.1016/j.electacta.2018.11.197.
 160. Hong, R.; Shi, J.; Li, Z.; Liao, J.; Tao, C.; Wang, Q.; Lin, H.; Zhang, D. Surface enhanced Raman scattering of defective TiO₂ thin film decorated with silver nanoparticles by laser ablation. *Opt. Mater. (Amst).* **2020**, *109*, 110338, doi:10.1016/j.optmat.2020.110338.
 161. Buividas, R.; Rosa, L.; Šliupas, R.; Kudrius, T.; Šlekys, G.; Datsyuk, V.; Juodkazis, S. Mechanism of fine ripple formation on surfaces of (semi)transparent materials via a half-wavelength cavity feedback. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 055304, doi:10.1088/0957-4484/22/5/055304.

162. Buividas, R.; Stoddart, P.R.; Juodkazis, S. Laser fabricated ripple substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Ann. Phys.* **2012**, *524*, L5–L10, doi:10.1002/andp.201200140.
163. Ebstein, S.M. Applications of laser-processed substrate for molecular diagnostics. *Science (80-)*. 2009.
164. Prochazka, M. Basics of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **2016**, 21–59, doi:10.1007/978-3-319-23992-7_3.
165. Kudelski, A. Characterization of thiolate-based mono- and bilayers by vibrational spectroscopy: A review. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *39*, 200–213, doi:10.1016/j.vibspec.2005.03.005.
166. Bulovas, A.; Dirvianskytė, N.; Talaikytė, Z.; Niaura, G.; Valentukonytė, S.; Butkus, E.; Razumas, V. Electrochemical and structural properties of self-assembled monolayers of 2-methyl-3-(ω -mercaptoalkyl)-1,4-naphthoquinones on gold. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *591*, 175–188, doi:10.1016/j.jelechem.2006.04.006.
167. Pemberton, J.E.; Bryant, M.A.; Sobocinski, R.L.; Joa, S.L. A simple method for determination of orientation of adsorbed organics of low symmetry using surface-enhanced Raman scattering. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3776–3782, doi:10.1021/j100188a039.
168. Talaikis, M.; Eicher-Lorka, O.; Valincius, G.; Niaura, G. Water-Induced Structural Changes in the Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Isotope-Edited SERS. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 22489–22499, doi:10.1021/acs.jpcc.6b07686.
169. Rakovska, B.; Ragaliauskas, T.; Mickevicius, M.; Jankunec, M.; Niaura, G.; Vanderah, D.J.; Valincius, G. Structure and function of the membrane anchoring self-assembled monolayers. *Langmuir* **2015**, *31*, 846–857, doi:10.1021/la503715b.
170. Meuse, C.W.; Niaura, G.; Lewis, M.L.; Plant, A.L. Assessing the Molecular Structure of Alkanethiol Monolayers in Hybrid Bilayer Membranes with Vibrational Spectroscopies. *Langmuir* **1998**, *14*, 1604–1611, doi:10.1021/la9700679.
171. Sacco, A. Electrochemical impedance spectroscopy: Fundamentals and application in dye-sensitized solar cells. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *79*, 814–829, doi:10.1016/J.RSER.2017.05.159.
172. Loveday, D.; Peterspm, P.; Rodgers, B. Evaluation of organic coatings with electrochemical impedance spectroscopy part 2: Application of EIS to coatings. *CoatingsTech* **2004**, *1*, 88–93.
173. K. Kampouris, D.; Xiaobo Ji; P. Randviir, E.; E. Banks, C. A new approach for the improved interpretation of capacitance measurements for materials utilised in energy storage. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 12782–12791, doi:10.1039/C4RA17132B.
174. Instruments, G. *Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance*; 2007;
175. Yoho, R.A.; Popat, S.C.; Fabregat-Santiago, F.; Giménez, S.; Heijne, A. ter;

- Torres, C.I. Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Powerful Analytical Tool for the Study of Microbial Electrochemical Cells. In *Biofilms in Bioelectrochemical Systems*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 249–280.
176. Muñoz-Berbel, X.; Godino, N.; Laczka, O.; Baldrich, E.; Muñoz, F.X.; del Campo, F.J. Impedance-Based Biosensors for Pathogen Detection. *Princ. Bact. Detect. Biosensors, Recognit. Recept. Microsystems* **2008**, 341–376, doi:10.1007/978-0-387-75113-9_15.
 177. Randviir, E.P.; Banks, C.E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Anal. Methods* **2013**, 5, 1098, doi:10.1039/c3ay26476a.
 178. Lasia, A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*; Springer New York: New York, NY, 2014; Vol. 9781461489; ISBN 978-1-4614-8932-0.
 179. Elliott, J.; Petralli-Mallow, T.; Meuse, C.; Woodward, J.; Plant, A.; Krueger, S.; Silin, V. Biomimetic Membranes on Metal Supports. In; 2003.
 180. Gufler, P.C.; Pum, D.; Sleytr, U.B.; Schuster, B.; PC, G.; D, P.; UB, S.; B, S. Highly robust lipid membranes on crystalline S-layer supports investigated by electrochemical impedance spectroscopy. **2004**, 1661, 154–165.
 181. Valincius, G.; Mickevicius, M. Tethered Phospholipid Bilayer Membranes. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*; Elsevier B.V., 2015; Vol. 21, pp. 27–61.
 182. Budvytyte, R.; Mickevicius, M.; Vanderah, D.J.; Heinrich, F.; Valincius, G. Modification of tethered bilayers by phospholipid exchange with vesicles. *Langmuir* **2013**, 29, 4320–7, doi:10.1021/la304613a.
 183. Zia, A.I.; Mukhopadhyay, S.C. Electrochemical Sensing: Carcinogens in Beverages. **2016**, 20, doi:10.1007/978-3-319-32655-9.
 184. Yuan, X.Z.; Song, C.; Wang, H.; Zhang, J. Electrochemical impedance spectroscopy in PEM fuel cells: Fundamentals and applications. *Electrochem. Impedance Spectrosc. PEM Fuel Cells Fundam. Appl.* **2010**, 1–420, doi:10.1007/978-1-84882-846-9.
 185. Zvirbliene, A.; Pleckaityte, M.; Lasickiene, R.; Kucinskaite-Kodze Indre, I.; Zvirblis, G. Production and characterization of monoclonal antibodies against vaginolysin: Mapping of a region critical for its cytolytic activity. *Toxicon* **2010**, 56, 19–28, doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.007.
 186. Aleknavičienė, I.; Pabrėža, E.; Talaikis, M.; Jankunec, M.; Račiukaitis, G. Low-cost SERS substrate featuring laser-ablated amorphous nanostructure. *Appl. Surf. Sci.* **2022**, 571, 151248, doi:10.1016/j.apsusc.2021.151248.
 187. Matulaitiene, I.; Kuodis, Z.; Matijoška, A.; Eicher-Lorka, O.; Niaura, G. SERS of the Positive Charge Bearing Pyridinium Ring Terminated Self-Assembled Monolayers: Structure and Bonding Spectral Markers. *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119, 26481–26492, doi:10.1021/acs.jpcc.5b07687.
 188. Aleknavičienė, I.; Talaikis, M.; Budvytyte, R.; Valincius, G. The Impact of

- an Anchoring Layer on the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes on Silver Substrates. *Molecules* **2021**, *26*, 6878, doi:10.3390/molecules26226878.
189. Aleknavičienė, I.; Jankunec, M.; Penkauskas, T.; Valincius, G. Electrochemical properties of tethered lipid bilayers on thin film silver substrates. *Electrochim. Acta* **2021**, *389*, 138726, doi:10.1016/j.electacta.2021.138726.
 190. Penkauskas, T.; Ambrulevičius, F.; Valinčius, G. Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Convenient Tool to Characterize Tethered Bilayer Membranes. In *Methods in Molecular Biology*; Methods Mol Biol, 2022; Vol. 2402, pp. 31–59.
 191. Pabrėža, E. Lazerių tekstūruotas paviršiumi aktyvuotos Ramano sklaidos jutiklis, Vilnius University, 2013.
 192. Natan, M.J. Concluding remarks: Surface enhanced Raman scattering. In *Proceedings of the Faraday Discussions*; The Royal Society of Chemistry, 2006; Vol. 132, pp. 321–328.
 193. Shaheen, M.E.; Gagnon, J.E.; Fryer, B.J. Femtosecond laser ablation behavior of gold, crystalline silicon, and fused silica: A comparative study. *Laser Phys.* **2014**, *24*, 106102, doi:10.1088/1054-660X/24/10/106102.
 194. Wang, L.; Li, L.; Chen, W.-D. Investigation of the properties of silver thin films deposited by DC magnetron sputtering. *Surf. Rev. Lett.* **2017**, *24*, 1750053, doi:10.1142/S0218625X17500536.
 195. Kapaklis, V.; Pouloupoulos, P.; Karoutsos, V.; Manouras, T.; Politis, C. Growth of thin Ag films produced by radio frequency magnetron sputtering. *Thin Solid Films* **2006**, *510*, 138–142, doi:10.1016/j.tsf.2005.12.311.
 196. Lee, C.; Robertson, C.S.; Nguyen, A.H.; Kahraman, M.; Wachsmann-Hogiu, S. Thickness of a metallic film, in addition to its roughness, plays a significant role in SERS activity. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11644, doi:10.1038/srep11644.
 197. RAKOCEVIC, Z.; PETROVIC, R.; STRBAC, S. Surface roughness of ultra-thin silver films sputter deposited on a glass. *J. Microsc.* **2008**, *232*, 595–600, doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02123.x.
 198. Eberle, R.; Kresser, T.; Pietralla, M. Elastic properties of thin silver films: hexagonal model and influence of corrugation effects. *Thin Solid Films* **2002**, *408*, 169–175, doi:10.1016/S0040-6090(02)00080-9.
 199. Sun, F.; Galvan, D.D.; Jain, P.; Yu, Q. Multi-functional, thiophenol-based surface chemistry for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 4550–4561, doi:10.1039/c7cc01577a.
 200. Tripathi, A.; Emmons, E.D.; Christesen, S.D.; Fountain, A.W.; Guicheteau, J.A. Kinetics and reaction mechanisms of thiophenol adsorption on gold studied by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 22834–22842, doi:10.1021/jp407105v.
 201. Carron, K.T.; Hurley, L.G. Axial and azimuthal angle determination with surface-enhanced Raman spectroscopy: Thiophenol on copper, silver, and

- gold metal surfaces. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 9979–9984, doi:10.1021/j100177a068.
202. Cook, A.L.; Haycook, C.P.; Locke, A.K.; Mu, R.R.; Giorgio, T.D. Optimization of electron beam-deposited silver nanoparticles on zinc oxide for maximally surface enhanced Raman spectroscopy. *Nanoscale Adv.* **2021**, *3*, 407–417, doi:10.1039/D0NA00563K.
203. Rodrigues, D.C.; De Souza, M.L.; Souza, K.S.; Dos Santos, D.P.; Andrade, G.F.S.; Temperini, M.L.A. Critical assessment of enhancement factor measurements in surface-enhanced Raman scattering on different substrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21294–21301, doi:10.1039/c4cp05080k.
204. He, S.; Chua, J.; Tan, E.K.M.; Kah, J.C.Y. Optimizing the SERS enhancement of a facile gold nanostar immobilized paper-based SERS substrate. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 16264–16272, doi:10.1039/C6RA28450G.
205. Bonse, J.; Krüger, J.; Höhm, S.; Rosenfeld, A. Femtosecond laser-induced periodic surface structures. *J. Laser Appl.* **2012**, *24*, 042006, doi:10.2351/1.4712658.
206. Höhm, S.; Rosenfeld, A.; Krüger, J.; Bonse, J. Femtosecond laser-induced periodic surface structures on silica. *J. Appl. Phys.* **2012**, *112*, 014901, doi:10.1063/1.4730902.
207. Gräf, S.; Kunz, C.; Müller, F.A. Formation and Properties of Laser-Induced Periodic Surface Structures on Different Glasses. *Materials (Basel)*. **2017**, *10*, 933, doi:10.3390/ma10080933.
208. Zhao, Y.; Liu, X.; Lei, D.Y.; Chai, Y. Effects of surface roughness of Ag thin films on surface-enhanced Raman spectroscopy of graphene: Spatial nonlocality and physisorption strain. *Nanoscale* **2014**, *6*, 1311–1317, doi:10.1039/c3nr05303b.
209. Liu, Y.-F.; Lee, Y.-L. Adsorption characteristics of OH-terminated alkanethiol and arenethiol on Au(111) surfaces. *Nanoscale* **2012**, *4*, 2093, doi:10.1039/c2nr11495j.
210. Shin-ichiro Imabayashi; Minehiko Iida; Daisuke Hobaru; Zhi Qiang Feng; Katsumi Niki; Takashi Kakiuchi Reductive desorption of carboxylic-acid-terminated alkanethiol monolayers from Au(111) surfaces. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *428*, 33–38, doi:10.1016/S0022-0728(97)00006-5.
211. Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G.M.; Laibinis, P.E. Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426–436, doi:10.1021/jp972635z.
212. Leitch, J.; Kunze, J.; Goddard, J.D.; Schwan, A.L.; Faragher, R.J.; Naumann, R.; Knoll, W.; Dutcher, J.R.; Lipkowski, J. In Situ PM-IRRAS Studies of an Archaea Analogue Thiolipid Assembled on a Au(111) Electrode Surface. *Langmuir* **2009**, *25*, 10354–10363, doi:10.1021/la900907d.
213. Herrwerth, S.; Eck, W.; Reinhardt, S.; Grunze, M. Factors that Determine the

- Protein Resistance of Oligoether Self-Assembled Monolayers – Internal Hydrophilicity, Terminal Hydrophilicity, and Lateral Packing Density. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9359–9366, doi:10.1021/ja034820y.
214. Vanderah, D.J.; Arsenault, J.; La, H.; Gates, R.S.; Silin, V.; Meuse, C.W.; Valincius, G. Structural Variations and Ordering Conditions for the Self-Assembled Monolayers of HS(CH₂CH₂O)₃-6-CH₃. *Langmuir* **2003**, *19*, 3752–3756, doi:10.1021/la026580q.
 215. Nelson, P.N. Chain Length and Thermal Sensitivity of the Infrared Spectra of a Homologous Series of Anhydrous Silver(I) n-Alkanoates. *Int. J. Spectrosc.* **2016**, *2016*, 1–9, doi:10.1155/2016/3068430.
 216. Tumenas, S.; Ragaliauskas, T.; Penkauskas, T.; Valanciute, A.; Ambrulevicius, F.; Valincius, G. Solvent effects on composition and structure of thiolipid molecular anchors for tethering phospholipid bilayers. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *509*, 145268, doi:10.1016/j.apsusc.2020.145268.
 217. Glazier, S.A.; Vanderah, D.J.; Plant, A.L.; Bayley, H.; Valincius, G.; Kasianowicz, J.J. Reconstitution of the Pore-Forming Toxin α -Hemolysin in Phospholipid/18-Octadecyl-1-thiahexa(ethylene oxide) and Phospholipid/n-Octadecanethiol Supported Bilayer Membranes. *Langmuir* **2000**, *16*, 10428–10435, doi:10.1021/la000690k.
 218. Raila, T.; Ambrulevičius, F.; Penkauskas, T.; Jankunec, M.; Meškauskas, T.; Vanderah, D.J.; Valincius, G. Clusters of protein pores in phospholipid bilayer membranes can be identified and characterized by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* **2020**, *364*, 137179, doi:10.1016/j.electacta.2020.137179.
 219. Valincius, G.; Mickevicius, M.; Penkauskas, T.; Jankunec, M. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes: An Effect of Heterogeneous Distribution of Defects in Membranes. *Electrochim. Acta* **2016**, *222*, 904–913, doi:10.1016/j.electacta.2016.11.056.
 220. Raila, T.; Penkauskas, T.; Jankunec, M.; Dreižas, G.; Meškauskas, T.; Valincius, G. Electrochemical impedance of randomly distributed defects in tethered phospholipid bilayers: Finite element analysis. *Electrochim. Acta* **2019**, *299*, 863–874, doi:10.1016/j.electacta.2018.12.148.
 221. Kwak, K.J.; Valincius, G.; Liao, W.-C.; Hu, X.; Wen, X.; Lee, A.; Yu, B.; Vanderah, D.J.; Lu, W.; Lee, L.J. Formation and finite element analysis of tethered bilayer lipid structures. *Langmuir* **2010**, *26*, 18199–208, doi:10.1021/la1021802.
 222. Ragaliauskas, T.; Plečkaitytė, M.; Jankunec, M.; Labanauskas, L.; Baranauskienė, L.; Valincius, G. Inerolysin and vaginolysin, the cytolytins implicated in vaginal dysbiosis, differently impair molecular integrity of phospholipid membranes. *Sci. Reports* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-019-47043-5.
 223. van Pee, K.; Neuhaus, A.; D'Imprima, E.; Mills, D.J.; Kühlbrandt, W.; Yildiz, Ö. CryoEM structures of membrane pore and prepore complex reveal cytolytic mechanism of Pneumolysin. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.23644.

224. Leung, C.; Dudkina, N. V; Lukoyanova, N.; Hodel, A.W.; Farabella, I.; Pandurangan, A.P.; Jahan, N.; Pires Damaso, M.; Osmanović, D.; Reboul, C.F.; et al. Stepwise visualization of membrane pore formation by sulilysin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin. *Elife* **2014**, *3*, e04247, doi:10.7554/eLife.04247.
225. Podobnik, M.; Marchioretto, M.; Zanetti, M.; Bavdek, A.; Kisovec, M.; Cajnko, M.M.; Lunelli, L.; Dalla Serra, M.; Anderluh, G. Plasticity of listeriolysin O pores and its regulation by pH and unique histidine. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9623, doi:10.1038/srep09623.
226. Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J.M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 013705, doi:10.1063/1.2432410.

APIE AUTORIŲ

Išsilavinimas

- 2013 m. rugsėjis – 2015 m. sausis – Molekulinės biologijos magistras. Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas
- 2009 m. rugsėjis – 2013 m. birželis – Molekulinės biologijos studijų programa, įgytas biologijos bakalauro laipsnis.

Darbo patirtis

- Nuo 2020 – iki dabar – VU, Biochemijos institutas, jaunesnioji mokslo darbuotoja.
- Nuo 2015–2020 – VU, Biochemijos institutas, doktorantė. Veiklos sritis – spektroskopijos metodų pritaikymo molekulinėje diagnostikoje tyrimai.
- Nuo 2013–10 iki 2015–09 mokslinė praktika biochemijos institute, bioelektrochemijos ir spektroskopijos skyriuje. Tyrimų sritis – Raman spektroskopijos pritaikymo molekulinėje diagnostikoje tyrimai.
- Nuo 2012–09 iki 2013–10 mokslinė praktika biotechnologijų institute, taikomosios biokatalizės sektoriuje. Tyrimų sritis – fermentų paieška metagenominėse DNR bibliotekose.
- Nuo 2011–11 iki 2012–06 mokslinė praktika citogenetikos laboratorijoje, Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakultete. Tyrimų sritis – augalinių ekstraktų genotoksiškumo tyrimas molekulinės citogenetikos metodais.

Įvertinimai ir apdovanojimai

- Skatinamoji doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus, skiriama Lietuvos Mokslo Tarybos, 2018.

Dalyvavimas projektuose

- 2020-09 – 2023-04. Biojutiklių tyrimų ir inžinerijos kompetencijų ir technologijų perdavimo centro kūrimas – BIOSENSE. Finansuojamas CPVA, Projekto Nr. 01.2.2-CPVA-K-703-03-0010. Projekto vadovas Dr. Marius Dagys.

SUMMARY

Introduction

The functionalisation of noble metal surfaces by forming films of organic molecules from several to several hundred nanometres thick has received much research attention in recent decades. The main challenge is to analyse and understand the processes of molecular assembly and self-assembly on the surfaces of various materials. With a good understanding of the fundamental laws of these processes at the molecular level, the principle of adsorbed molecules can be applied in practice in different fields: the development of optoelectronic devices, molecular-level electronics, biosensors, the development of chemically modified implantable materials, and more. One way to functionalised noble metal surfaces is to form organic (hydrophilic or hydrophobic) self-assembled monolayers. Self-assembled monolayers (SAMs) are layers of molecules that spontaneously accumulate on the surfaces of materials and have a familiar organisation and orientation on the surface. The formation of such structures is due to strong chemisorption between the substrate and the functional group at the end of the organic molecule. During this interaction, thin organic layers are formed on the surfaces. The thickness can be precisely controlled by selecting molecules of different lengths. The applicability of self-assembled monolayers depends directly on the properties of the molecules that make them up – the chemical structure and orientation concerning the substrate.

Self-assembled monolayers are widely used to develop models of surface-immobilized bilayer lipid membranes (tBLMs). SAMs usually consist of long anchor compounds that hydrophobically attach to the lipid bilayer and immobilise it to the surface via covalent metal sulfur, disulfide, silane, and other chemical bonds. Surface diluent molecules control the density and surface distribution of anchor compounds. Short hydrophilic thiol compounds, such as β -mercaptoethanol, are often used for this purpose. Such self-assembling molecular constructs on surfaces provide a technological platform for forming lipid bilayers. The physical parameters of tBLM and their submembrane reservoir properties are determined by the composition and chemical structure of the anchor self-assembly monolayer. The choice of different compositions and concentrations of the anchor compound/surface diluent in mixed SAMs ensures sufficient maintenance of the submembrane ion reservoir. It also reduces the effect of surface roughness on membrane uniformity. In addition, the required membrane fluidity, which is essential for the incorporation of membrane proteins, is maintained. tBLM models are

considered a promising experimental platform for developing biosensors and can be applied to a wide range of biophysical experiments, such as protein (peptide)-membrane interactions, antigen-antibody binding, lipid phase transformations, and more. By forming tBLM on conductive metal surfaces, biologically essential phenomena can be observed using high-sensitivity electrochemical and spectroscopic methods.

Various substrates – gold, silver or copper – are used to form self-assembled monolayers and thus tBLM. Gold-plated substrates are the best-studied and most widely used. Gold is easily functionalised using thiol-containing molecules. In addition, gold is a sufficiently chemically inert metal, making it more difficult to oxidise in air and interact with biological fluids than other metals. Despite these advantages, gold is costly and prone to microbiological contamination. This encourages the search for alternatives that would lower the price and retain most of the best properties of gold. Silver is the second-best studied and widely used metal after gold. The main disadvantage of silver is the rapid oxidation in the air. For this reason, it is less commonly used to form self-assembled monolayers. However, due to its favourable plasmonic and optical properties, silver surfaces can be applied and analysed by most optical and spectroscopic methods, such as surface plasmon resonance (SPR), surface-enhanced Raman scattering (SERS), and surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA). It is important to note that in the case of silver, surface plasmons are excited in a broader range of light wavelengths (from UV to IR), and gold only in the red range from 600 nm. This advantage of silver extends the applicability and allows different methodologies to analyse the same sample. The application of various spectroscopic and electrochemical methods provides a comprehensive analytical picture. It will enable the molecules immobilised on the surface to be thoroughly evaluated, and the characteristics of monolayers and the possibilities for further applications to be better understood.

One such method is surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), which allows the detection of low concentrations of molecules on metal surfaces, the analysis of intermolecular interactions, the orientation of molecules and their functional groups, and conformational changes. The quality, stability, and repeatability of the SERS spectrum largely depend on how the metal surface is prepared. To reliably analyse the biomolecules adsorbed on the surfaces of SERS substrates, it is essential to prepare such substrates that would uniformly amplify the signal over the entire active area. By achieving high signal amplification uniformity and repeatability, we can be sure that recording the SERS spectrum of biomolecules at any point in the core will show a reliable

result. To perform large-scale biochemical analytical studies, the preparation method of SERS surfaces must be fast, inexpensive and straightforward.

Work objective

This work aimed to develop silver SERS substrates suitable for biomolecular analysis and to use them to investigate the applicability of mixed anchor monolayers for the construction of functional tBLM models on silver.

Tasks

1. Prepare and characterise silver SERS substrates;
2. Analyse the structure of anchored self-assembled monolayers (SAM) by vibrational spectroscopy methods.
3. Identify the appropriate composition of mixed SAMs for the formation of tBLM on a silver surface;
4. Investigate the bioelectrochemical properties and biological relevance of the formed tBLMs.

Novelty

In this work, we developed a new fast and scalable manufacturing method of low-cost SERS substrates using inexpensive raw material – soda-lime glass. This method allows the rapid production of large quantities of uniform, repetitive nanostructured surfaces that produce substrates suitable for SERS measurements when coated with a silver coating. The optimal SERS signal amplification factor, which averages $\sim 3 \times 10^5$ over the entire active area, has been achieved. Using these SERS substrates, we developed and characterised new different mixed self-assembled monolayers that could be applied to the construction of tBLM models on silver without causing corrosion and ensuring stability over time. In addition, using the EIS method, we have demonstrated that using our selected mixed self-assembled monolayers, we can generate functional and biologically relevant models of biological membranes on silver that could be applied to analytical biochemical studies.

Materials and methods

1. Chemicals and solutions

1.1. Chemical materials

2-propanol – (Sigma Aldrich, USA);
3M1P – 3-mercapto-1-propanol – Sigma Aldrich, Germany;
4M1B – 4-mercapto-1-butanol – Sigma Aldrich, Germany;
6M1H – 6-mercapto-1-hexanol – Sigma Aldrich, Germany;
9M1N – 9-mercapto-1-nonanol – Sigma Aldrich, Germany;
Chloroform – (Sigma-Aldrich, USA);
Cholesterol – Avanti Polar Lipids, USA;
Deionised water – Milli-Q plus, USA, 18.2 M Ω ×cm;
DOPC – 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine – Avanti Polar Lipids (USA);
Ethyl alcohol – Vilniaus degtinė, Lithuania, 96%;
H₂SO₄ – Roth, Germany;
Hexantiol – Sigma Aldrich, Germany;
Na₂HPO₄ · H₂O – Fluka, Switzerland
NaClO₄ – Sigma Aldrich, Germany;
NaH₂PO₄ · H₂O – Fluka, Switzerland
NaOH – Sigma Aldrich, Germany;
Thiophenol – Sigma Aldrich, Germany;
WC14 – 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaohexatricycano-1-thiol (22 pav). The compound was synthesised by David J. Vanderah (NIST Chemical Science and Technology Laboratory, Gaithersburg, Maryland, USA) according to the protocol described in.
 β ME – β -mercaptoethanol – Sigma Aldrich, Germany;

1.2. Solutions

Thiophenol solution – 0.2 mM thiophenol is dissolved in 96% ethanol;
Solutions of 50 mM β ME, 3M1P, 4M1B, 6M1H, 9M1N in ethanol;
5 mM WC14 solutions in ethanol;
10 mM DOPC and cholesterol solutions in chloroform;

Sodium phosphate buffer solution (PBS) (5.6 and 7.2 pH) – 0.01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, the salts are dissolved in deionised water in different

proportions according to the required pH. The solution was filtered through a 0.22 μm filter (Corning, USA) and stored at room temperature.

Sodium phosphate buffer solution (PBS) with 0.05 M NaClO_4 (5.6 and 7.2 pH) – 0.01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, the salts are dissolved in deionised water in different proportions according to the required pH. 0.05 M NaClO_4 is added. The solution was filtered through a 0.22 μm filter (Corning, USA) and stored at room temperature.

Recombinant vaginolysin, N-terminally-His-tagged, expressed and prepared as described in [185]. The protein was isolated by a colleagues Dr. Milda Plečkaitytė and Dr. Milda Zilnytė from VU GMC Institute of Biotechnology, Department of Immunology and Cell Biology.

2. Methods

2.1. SERS sensor preparation and properties study

2.1.1 SERS sensor preparation

As previously described [186], SERS substrates were made of microscope glass slides in dimensions of $25 \times 75 \times 1 \text{ mm}^3$ from ThermoFisher Scientific (London, UK). The slides were prescribed in advance with a diamond wheel into 30 equal parts (15×2). Amorphous SERS active nanostructures were fabricated using a micro-machining system FemtoMaster (ELAS, UAB, Vilnius, Lithuania), equipped with a femtosecond laser PHAROS (Light Conversion, UAB, Vilnius, Lithuania) working at the second harmonics at 515 nm. The position of the samples was controlled using precision positioning stages (Aerotech Inc. Pittsburgh, PA, USA), which were synchronised with the pulse picker to deliver 500 pulses/mm, allowing up to 150 mm/s fabrication speed to be reached. Fabrication was carried out in the air, removing most ablated particles from the working zone with a particle exhaust system. All devices were controlled by automation software (Direct Machining Control, Vilnius, Lithuania). Before the vacuum deposition of silver, nanostructured glass slides were washed in 2-propanol and blow-dried with a filtered (5 μm filter) nitrogen stream. A metal film of silver ca. 170 nm thick was deposited by magnetron sputtering using the PVD75 system (Kurt J. Lesker Co., Pittsburg, PA, USA), working in a direct current (DC) regime under the re-al-time quartz microbalance control.

A self-assembled monolayer is immediately formed on the silver-coated sample or stored for further experiments.

2.1.2 Evaluation of SERS surface morphology

The surface morphology of SERS substrates was described using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), as discussed in detail in the literature [186].

Laser-treated surfaces coated with 170 nm silver film (unless otherwise indicated) were obtained using a scanning electron microscope JSM-6490LV JEOL (Japan).

Topographic AFM analysis of the prepared sensor surface was performed by Dr Marija Jankunec from VU LSC Institute of Biochemistry. AFM imaging was done using DimensionIcon (Bruker, US) microscope with AFM probes of approximately 40 N/m spring constant (TESP) working in the air in tapping mode. The $3 \times 3 \mu\text{m}$ sized images had a resolution of 512 pixels. The surface area was calculated via a roughness tool in the image analysis software supplied by the instrument manufacturer (NanoscopeAnalysis version 1.9, Bruker, CA, US). The surface area is the three-dimensional area of the region enclosed by the image frame.

2.1.3 Investigation of SERS sensor properties

SERS substrates were functionalised with a reporter molecule by immersing the freshly magnetron-sputtered slides into thiophenol (TF) solution (0.2 mM, in ethanol) for 60 min. Then, the slides were washed with pure ethanol and dried under the nitrogen stream.

Surface-enhanced Raman scattering spectra were recorded using 785 nm excitation radiation. Two different Raman systems were used:

1. Renishaw inVia Raman microscope using a 1200 rpm/mm grid. The laser power on the sample surface was 1 mW, and Raman spectra were recorded using a $5 \times$ lens. ;

2. LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon) under a Raman microscope using a 600 grit / mm grid. Raman spectra were recorded using a $10 \times$ lens. The laser power on the sample surface was 0.1 mW.

The wavenumber axis was adjusted according to silicon's band at 520.7 cm^{-1} .

Vibrational spectra were analysed using GRAMS / 386 (Thermo Scientific Inc.) software. The intensities of the bands characteristic of the analytes were obtained by describing the experimental spectra of SERS with Lorentz-Gaussian components. The program Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc.).

2.1.4 Electrochemical Reductive Desorption of TF self-assembled monolayers

Reductive desorption was performed for a single component and mixed SAMs adsorbed at Ag surface in deaerated 0.5 M NaOH + 0.1 M Na₂SO₄ aqueous solution at a sweep rate of -50 mV/s using AutoLab PG101 (Metrohm, Netherlands) potentiostat. Experiments were conducted in a three-electrode system with the Ag/AgCl/KCl_{sat.} electrode as a reference. Performed by Dr. Martynas Talaikis (LCS VU, Institute of Biochemistry).

2.1.5 Investigation of SERS sensor signal amplification and its uniformity

Thiophenol-functionalized surfaces were used to generate SERS signal enhancement maps. Spectroscopic measurements were carried out using the InVia Raman microscope (Renishaw, UK) equipped with a thermoelectrically cooled (-70 °C) CCD detector and 785 nm radiation-emitting laser. SERS mappings of 1072 cm⁻¹ vibrational mode were accomplished from the 100 × 100 μm² size area of the SERS substrate with the step size of 3 μm by collecting each spectrum for 0.5 s at the 0.9 mW laser power focused using a 20×/0.4NA (Leica) objective lens. The laser spot diameter at the sample was 2.4 μm. The diameter was calculated according to the relation: $d=1.22 \lambda_0 NA^{-1}$, where λ_0 – excitation wavelength, and NA – numerical aperture.

The amplification factor of the prepared SERS sensor was evaluated by Dr Martynas Talaikis from VU LSC Institute of Biochemistry, as detailed in the literature [186].

2.2. Formation and analysis of anchor self-assembly monolayers

2.2.1 Preparation of plain silver slides

Microscopic glass slides in dimensions of 25 × 75 × 1 mm³ from ThermoFisher Scientific (UK) were used as a substrate for desorption, RAIRS, and EIS experiments, respectively. Before the vacuum deposition of metals, the substrates were sonicated in propanol. After washing in sulfuric acid, rinsed thoroughly with a generous amount of deionised (18.2 Ω×cm², Mili-Q, Millipore, Burlington, MA, USA) water and dried down under a stream of nitrogen (99.99%). The metal films of chromium ± 3 nm and silver ± 120 nm were deposited by the magnetron sputtering using the PVD75

system (Kurt J. Lesker Co., Pittsburg, PA, USA) under the real-time quartz microbalance control. Sputtering parameters for 2-inch diameter metal targets were as follows: Cr-power 200 W, sputtering current 0.50 A at 4.5 mTorr argon pressure; Ag-power 120 W, sputtering current 0.26 A at 5.5 mTorr argon pressure. Before coating, the deposition chamber was evacuated to $<10^{-6}$ mTorr to the residual pressure. Ultrahigh purity, scientific grade argon (AGA, Malmö, Sweden) was used for the plasma sputtering.

A self-assembled monolayer is immediately formed on the silver-coated surface or stored for further experiments.

2.2.2 Formation of self-assembled monolayers

Freshly prepared SERS sensors and smooth silver plates (electrodes) were immersed in 0.1 mM (total thiol concentration) ethanol mixtures of thiol solutions. We used the long-chain anchor compound WC14 and four different short-chain surface diluents: 3-mercapto-1-propanol (3M1P), 4-mercapto-1-butanol (4M1B), 6-mercapto-1-hexanol (6M1H), and 9-mercapto-1-nonanol (9M1N) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Fig. 2). The molar ratio (WC14: short-chain compound) was 20:80 mol%, respectively (unless otherwise indicated). Silver substrates in the solutions were incubated for 3 h to form self-assembled monolayers (SAM). After incubation, the excess thiols are washed off the substrates with pure ethanol, and the surfaces are dried with a stream of nitrogen.

2.2.3 SERS of self-assembled monolayers

For SERS measurements, we employed a LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon) Raman microscope equipped with a thermoelectrically cooled (-90 °C) CCD camera (DU920P-BR-DD) and 600 lines/mm grating. Spectra were excited with a CW 785 nm laser radiation. The laser power was restricted to 2 mW at the sample and focused using a $10\times/0.25$ objective lens (Olympus). The overall integration time was 100 s. Three independent measurements were taken to calculate mean intensity \pm SD. Vibrational spectra were analysed using GRAMS / 386 (Thermo Scientific Inc.) software. The intensities of the bands characteristic of the analytes were obtained by describing the experimental spectra of SERS with Lorentz-Gaussian components. The program Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc.).

2.2.4 RAIRS analysis of self-assembled monolayers

RAIRS spectra were collected using Vertex 80v spectrometer (Bruker, Inc., Ettlingen, Germany) equipped with liquid nitrogen-cooled MCT narrow band detector and the RAIRS accessory reflecting p-polarized light at grazing 80° angle. The spectral resolution was set to 4 cm⁻¹, an aperture to 3.5 mm, the spectra were acquired by averaging 500 interferogram scans. The spectrometer and sample chamber were evacuated (~2 mbar) during the measurements. The spectrum of a silver-adsorbed hexane-d₁₃-thiol monolayer was used as a reference. The fitting of the experimental spectrum with Gaussian/Lorentzian shape components and the second derivative spectrum analysis was carried out to determine the precise positions of spectral bands.

2.2.5 Evaluation of surface contact angle

Using a syringe with a rotating mechanism, droplets of ~ 5 µL of deionised water are carefully applied to the test sample (SAM-layer-functionalized silver surface) and photographed using a Krüss EasyDrop surface contact angle measuring equipment. Analysed with software provided by the same manufacturer. The LabTech H50-500 thermostat maintains a temperature of 21 ° C during the measurement. At least 5 measurements were made for each SAM composition. Results presented as mean ± standard deviation.

2.3. tBLM formation and electrochemical analysis

2.3.1 Formation of tBLM on mixed SAMs

The methodology for forming tethered bilayer lipid membranes was adapted according to Ragaliauskas *et al.*, 2017. The original method was modified to avoid damage to the silver surface caused by strong Ag-Cl interactions, so we changed the composition of the buffer solutions by omitting the NaCl salt.

In the initial experiments with a 50:50 DOPC:Chol ratio, we used 0.01 M phosphate buffer -0.01 M NaH₂ PO₄ /Na₂ HPO₄, pH=5.6 and pH=7.2 as described in [189]. In the subsequent work steps, due to the high resistance of such a solution, we added 0.05 M NaClO₄ to the buffer and successfully applied it in the remaining experiments as described in [188].

tBLMs are formed by pouring multilayer lipid liposomes (MLVs) composed of DOPC and cholesterol (50:50 or 60:40 in molar proportions) onto a previously prepared mixed 20:80 % (unless otherwise specified) self-

assembly monolayer. The preparation of MLV consists of the following steps: (1) Mix 10 mM DOPC and cholesterol chloroform solutions in the required ratio in a glass vial; (2) The chloroform is evaporated by blowing with a gentle stream of nitrogen for about 30 minutes. A thin film of lipids remains on the vial walls; (3) Add the required volume of phosphate buffer with sodium perchlorate (0.05 M NaClO₄ + 0.01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 5.6) to the vial to form a 1 mM lipid solution. (4) Mix the solution gently with an automatic pipette for a few minutes until it loses clarity, forming an MLV.

The MLV solution is poured onto a silver electrode coated with an appropriate mixed SAM and incubated for about 30 minutes. The electrode is then washed extensively with phosphate buffer solution with sodium perchlorate (0.05 M NaClO₄ + 0.01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.3) without drying the electrode surface.

2.3.2 Electrochemical analysis

Electrochemical impedance spectroscopy measurements of SAMs and tBLMs were performed using Zennium electrochemical workstation (Zahner GmbH, Karlsruhe, Germany). The EI spectra were recorded in a potentiostatic mode with a 10 mV alternating current perturbation voltage at 0 V vs Ag/AgCl/KCl_{sat.} with a potential 0 mV respective to the standard hydrogen electrode while the auxiliary electrode was a platinum wire (99.99% purity, Aldrich; diameter 0.25 mm) coiled around the glass cylinder of the reference electrode. Measurements were carried out in a home-built Teflon electrochemical cell holder, which contained 14 separate vials with the surface area of the working electrode 0.16 cm² in each vial. This allowed us to conduct 14 independent experiments on the same metal-plated glass slide. Measurements were carried out in the frequency range from 0.1 Hz to 100 kHz with 10 logarithmically distributed measurement points per decade unless otherwise indicated. The methodology and data analysis are described in detail [190].

2.3.3 tBLM imaging and analysis by AFM

Atomic force microscopy images were obtained by Dr Marija Jankunec from VU LSC Institute of Biochemistry.

Imaging was performed by Dimension Icon (Bruker, USA) atomic force microscopy system. The sensors after EIS measurements were reassembled under excess water. Imaging was done in the liquid at room temperature using triangular ScanAsystFluid+ (tip radius 2-12 nm, spring constant

$k = 0.12 - 0.48 \text{ N/m}$, resonance frequency 40-75 kHz) probes (Bruker, USA). Multiple images of different scanning areas and angles were taken for each surface. Typically, a $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}$ size area with an image depth of 512×512 pixels was scanned. Scan rates were from 0,2 to 2 Hz. Raw images were flattened using the 3rd order polynomial with Nanoscope Analysis (Bruker, USA) or freeware WsXM [226]. The surface analysis was performed via available tools: height and profile analysis.

2.3.4 Data analysis

Thales 2.0 (Zahner) or Zview 2.0 software packages used EIS measurements, data analysis and modelling.

Images obtained by AFM were analysed with WSxM and DNA Trace software packages.

MS Excel and Origin 9.0 software packages were used for calculations, data analysis and presentation.

Data are presented as typically obtained spectra or mean parameter values \pm standard deviation. All experiments were performed at least five times.

RESULTS AND DISCUSSION

3. SERS substrates for biomolecule adsorption

To reliably analyse the biomolecules adsorbed on the surfaces of SERS substrates, it is essential to prepare such substrates that would uniformly amplify the signal over the entire active area. By achieving high signal amplification uniformity and repeatability, we can be sure that recording the SERS spectrum of biomolecules at any point in the substrate will show a reliable result.

At this research stage, the main goal was to develop a fast, simple and inexpensive method for producing SERS substrates suitable for biomolecule detection. We aimed for substrates to be sensitive to low concentrations of analytes. Also, one of the top priorities was the uniformity of signal amplification over the entire surface of the substrate. For this purpose, the surface treatment methodology is described in [191]. According to data published in 2006 [192], SERS surfaces must meet several requirements related to signal amplification, surface stability and repeatability of the results to adapt substrates to large-scale biochemical, analytical processes and industry. To improve the method described in the emphasis, we tried to develop a technique for preparing SERS substrates to meet our criteria.

According to the literature, almost all solids are applicable for this type of laser processing [193]. The soda-lime glass is an easily accessible and inexpensive material – which is crucial for developing low-cost substrates suitable for large-scale biochemical-analytical applications.

3.1. Preparation and characterisation of SERS active substrates

In this work, the properties of amorphous nanostructures were controlled on the interaction of femtosecond laser pulses and the glass surface. Multiple pulses were spatially overlapped at the surface, promoting the self-formation of glass nanosphere clusters. Such a laser ablation process is very efficient and allows high performance in the case of soda-lime glass. A 35-min-laser-fabrication-cycle produces 120 sensors with dimensions of $12.5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$ and a SERS-active area of $3 \times 5 \text{ mm}^2$ (Figure 1C). Flexible manufacturing technique allows changing the size of the SERS area on-demand.

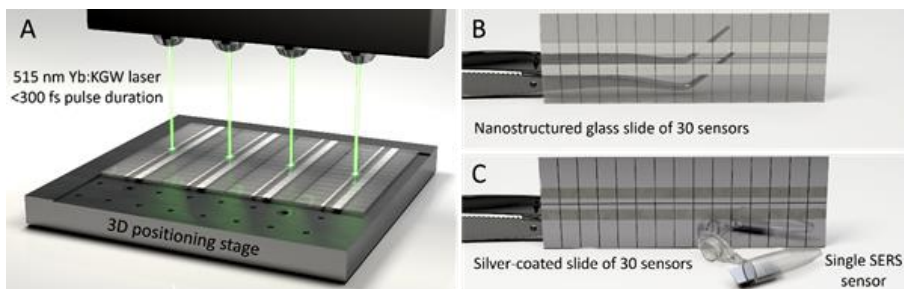


Figure 1. SERS sensors fabrication scheme. (A) Schematic representation of femtosecond laser ablation process; (B) Nanostructured microscope glass slide of 30 SERS sensors; (C) Silver-coated slide of 30 SERS sensors and schematic representation of single SERS sensor in 0.5 ml tube According to [186].

Figure 2A indicates visual differences of the laser-processed slide when the overlap of pulses in the scanning direction and the transversal direction was changed. The goal was to reach a uniform surface with the feature sizes in the nanostructure ranging from tens of nanometres to about 1 μm . Such features could result in decent Raman enhancement for various wavelengths throughout the visible spectrum and up to 1064 nm. There is a narrow parameter window in terms of laser fluence and pulse overlap at which the nanostructures are formed the way it was sought for. The optimal conditions were found (circled in light blue) when the energy fluence was set to 0.032 J/cm^2 per pulse. The pulses overlap was 40 % and 80 % in the X and Y directions, depending on the focusing conditions.

Overexposure with too high laser fluence led to melting of glass surface and disappearance of the nanostructure. At the same time, too low fluence modified the refractive index of glass and did not affect surface morphology. The self-formed nanostructure on the soda-lime glass surface did not exhibit any directional orientation concerning the scanning direction and polarisation of incident laser light; therefore, it differed from the nano-ripple formation on crystalline materials [162].

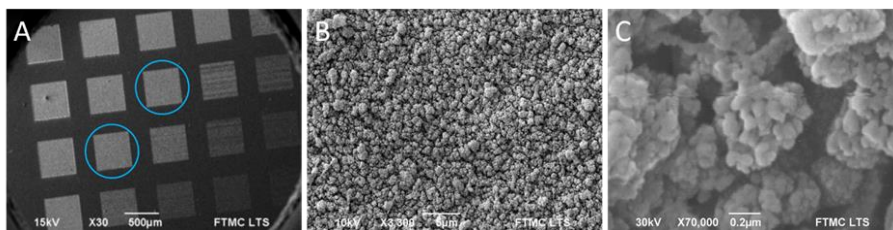


Figure 2. SEM micrographs of the fabricated and silver-coated soda-lime glass in different magnification modes. (A) The pulse overlap along the fabrication trajectory has been changed from 80 % (left) to 50 % (right), and the overlap in transversal direction has been changed from 20 % (bottom) to 70 % (top); (B) $\times 3300$ and (C) $\times 70000$ magnification of optimal structure.

The presented SEM images demonstrate that the slides are covered with random Ag nanostructures (nanocavities and nanospheres) of about 100 nanometres in diameter clustered into larger 1-3 μm microstructures (Figure 2 B and C). A direct comparison of processed soda-lime glass surfaces without and with 170-nm-Ag-film deposit was only possible through the AFM imaging (Figure 3). AFM data indicates that the Ag layer has no significant effect on the surface roughness, with RMS remaining practically unaltered after the Ag deposition. The calculated RMS are 270.7 ± 109.2 nm ($n=7$) and 266.0 ± 76.6 nm ($n=6$) for glass and Ag surfaces. Supporting that, the amplitude of the height profile in Figure 4e and f remains in the same range of about 800 nm. In addition, the actual surface area due to its roughness deviates from the geometrical area defined by a square of $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ in the AFM image. The calculated increases are 1.95 ± 0.21 ($n=7$) and 2.02 ± 0.35 ($n=6$) times for laser-treated areas before and after Ag film deposition. On the contrary, the unprocessed glass (SERS-inactive area) and unprocessed glass coated with 170 nm Ag film have surface height profiles that do not exceed 15 nm in amplitude and have no detectable SERS scattering (Figure 4c and e).

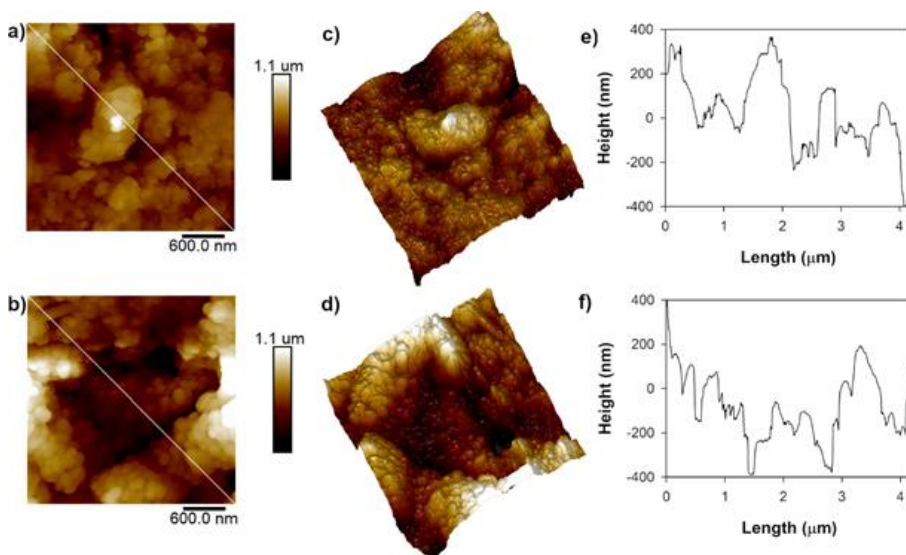


Figure 3. The morphology of laser-treated area before (upper panels) and after (bottom panels) deposition of 170 nm silver film. (a and b) 2D AFM images of $3 \times 3 \mu\text{m}$ scan area; (c and d) 3D representation of the same area; (e and f) diagonal profiles from upper left to bottom right of 2D images.

The glass-supported silver thin films have been extensively studied in the past to link properties of the glass support and the film deposition conditions to the resulting surface roughness and related SERS performance [194–198]. For example, in the RF sputtering regime, the deposition of the first 60 Ag monolayers ($\sim 15 \text{ nm}$) on a smooth glass was found not to affect the surface roughness; however, later, as the thickness increased from ca. 50 to 320 nm, the Ag grain size (given in RMS) increased linearly [195]. A study conducted by Lee *et al.* provided similar observations of roughness increase towards thicker Ag film on a smooth glass substrate [196]. Linking to our results, the deposition of the Ag layer might level the glass surface by filling the cracks and crevices. At the same time, it introduces additional grain coarseness in a similar way that was observed for smooth surfaces [195,196]. Such a bidirectional effect leaves the observed RMS value almost unaltered.

3.2. Spectroscopic analysis of SERS surfaces

After evaluating the morphology of the manufactured surfaces, the next important step is to determine their applicability to SERS studies. Using Raman scattering measurements, SERS substrates coated with 170 nm Ag layer were evaluated. Thiophenol was chosen as the model compound widely studied and considered one of the standard model compounds in Raman

spectroscopic measurements [199–201]. Figure 4 shows Raman spectra of the thiophenol self-assembled monolayers. In parts b and c spectra were recorded on the active (b) and inactive (c) surface areas of the silver-coated SERS. Comparing these two spectra, we can see that the laser-treated glass surface (b) amplified the Raman signal of thiophenol, which corresponds to the Raman spectrum of thiophenol 0.5 M solution. This demonstrates the suitability of these substrates for SERS assays. By obtaining intense surface-enhanced Raman scattering spectra from organic thiophenol self-assembled monolayers, we can expect good performance in analysing various other types of biomolecules.

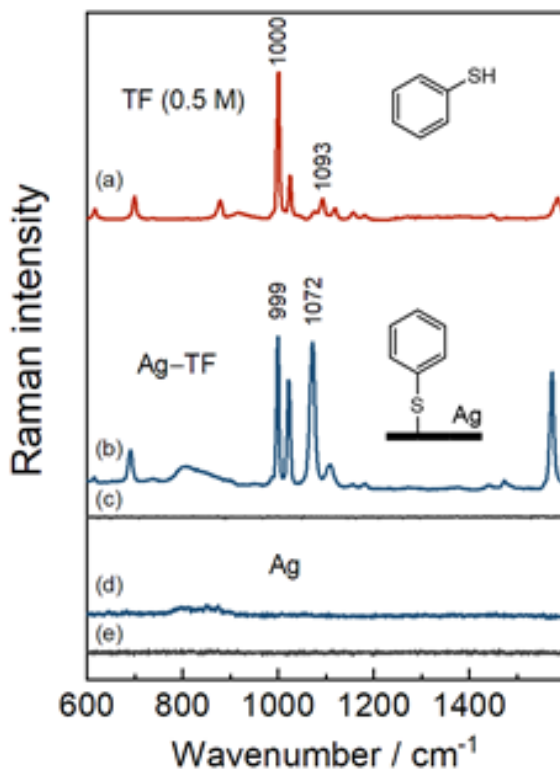


Figure 4. Raman spectrum of 0.5 M TF solution (a) compared to the surface Ag-TF spectra from the SERS-active (b) and SERS-inactive (c) substrate areas. The adsorbate-free sensor was tested in SERS-active (d) and SERS-inactive (e) areas. Spectra were collected using 785 nm excitation. Each SERS spectrum is normalised to 1 second, whereas the intensity Raman spectrum (a) is adjusted to match (b) according to 999 cm⁻¹ intensity. Insets depict TF and Ag-TF complex.

After determining the potential suitability of the surfaces for our planned biomolecular studies, we additionally evaluated the intensity of SERS signal amplification in the presence of silver coatings of different thicknesses.

Spectroscopic investigation of varied thickness Ag films from 10 to 170 nm provided further insight into the performance of glass-supported SERS sensors. Figure 5 A and B show increasing SERS intensity towards thicker films with a somewhat logarithmic dependency that approaches maximum intensity near 170 nm. The thicker film also ensures reliable electrical conductivity across the corrugated surface, enabling their application in SERS-spectroelectrochemistry studies.

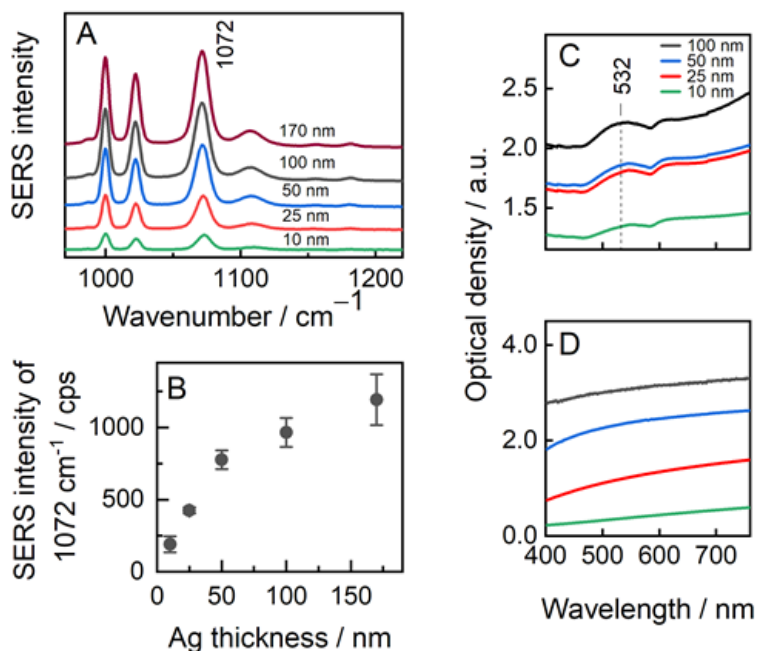


Figure 5. (A) SERS spectra of TF monolayer adsorbed Ag films varied with different thicknesses. Spectra were recorded at 785 nm excitation; (B) The intensity of 1072 cm^{-1} plotted as a function of Ag-film thickness; (C) UV-Vis spectra collected from the SERS-active and (D) SERS-inactive substrate areas.

Localised surface plasmon resonance (LSPR) provides means to describe the substrates qualitatively. LSPR peak frequency, intensity, and full-width at half maximum (FWHM) strongly depend on material dielectric properties and the shape, diameter, proximity, and distribution of nanoparticles on a surface. Typically, large-diameter particles give rise to LSPR peak at longer wavelengths, while its intensity correlates with SERS EF directly. We

employed UV-Vis spectroscopy for varied thickness SERS sensors, scanned in transmission mode by placing the sensors perpendicularly to the light beam in the spectrometry chamber. Figure 5 C and D show absorption spectra collected from the sensor's SERS-active and smooth surface areas. The 10-nm-film in a SERS-active area already had an optical density (OD) close to the reliable detection limit. Further, an increase in film thickness from 10 to 100 nm resulted in a repeated absorption pattern with a well-resolved LSPR peak at 532 nm, a less intense peak above 610 nm and an augmented OD. Even thicker films were unsuitable for UV-Vis working in transmission mode due to low substrate throughput. Notably, smooth Ag films have featureless spectra, with their OD constantly increasing towards higher wavelengths. The correlation between Ag nanoparticle sizes and their optical properties is well illustrated in the literature. For example, size increase from 1 to 9 nm drastically affected optical properties of surface-nanoparticles by redshifting the LSPR peak from 465 to 584 nm and increasing its intensity and breadth [202]. Although, this is not the case for the smooth Ag films, where LSPR was only identified for 7 nm film due to the formation of individual Ag islands. The islands merged into a more even layer as the thickness increased and LSPR diminished [194].

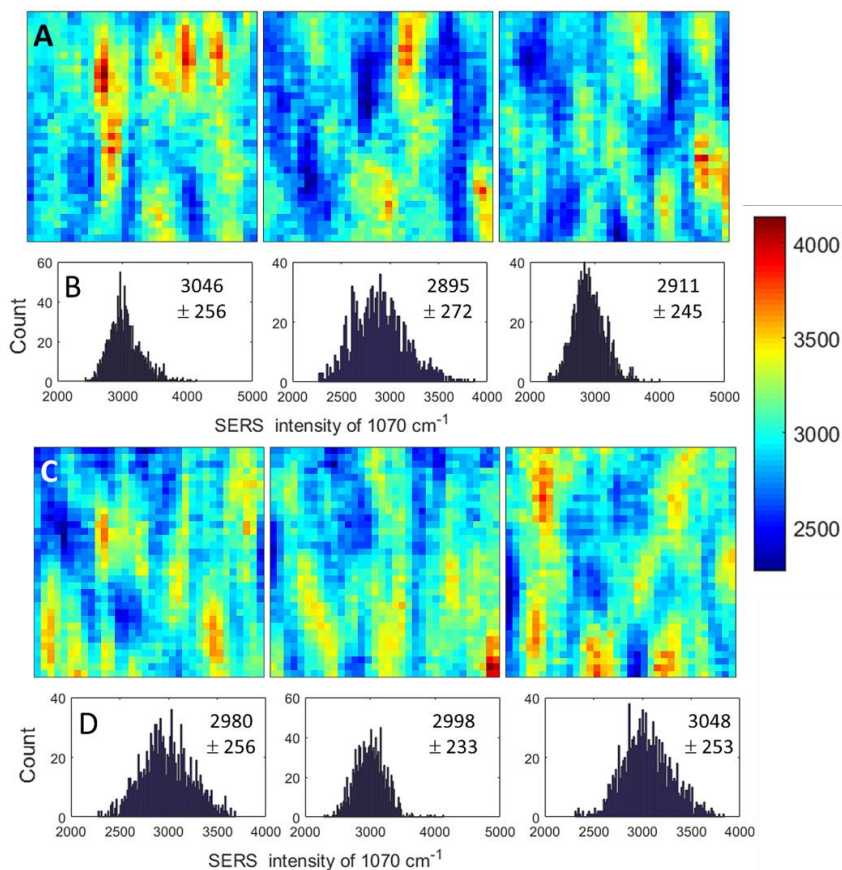


Figure 6. (A) SERS signal amplification maps generated by estimating the TF oscillation band at 1072 cm^{-1} . Data were collected from three separate $100 \times 100\ \mu\text{m}$ substrate areas; (B) Signal intensity plots assigned to each map and \pm standard deviation of the mean intensity value (SD) given; (C) and (D) comparable data that was recorded on another batch of SERS sensors. The relative standard deviations (RSD) for each map are presented in the order shown in the figures from left to right: (A) 8.4%, 9.4%, and 8.4%, and (C) 8.6%, 7.8%, 8.3%. Note the different scales of the histograms on the X and Y axes.

For reliable analysis of biomolecules adsorbed on active surfaces of SERS, a uniform signal enhancement effect is essential throughout the active area. Only when a high signal uniformity and repeatability is achieved can we be sure that the recorded spectrum will show a reliable result at any point in the core. For this reason, we generated SERS signal amplification maps for our selected parameters for freshly prepared SERS substrates.

Figure 6 plots the TF 1072 cm^{-1} SERS band intensity collected from the three different locations of two individual batches. Maps show the distribution of elongated shape regions of the different spectral intensities, with the

geometrical size variation in the range of 30-50 μm in length and 10-20 μm in width. However, the mean values of high and low-intensity areas are not far separated, with them having 3200 and 2800 counts on average, respectively. Moreover, the histograms show a relatively narrow Gaussian-shaped distribution of intensities centred at 3000 counts with relative standard deviations (RSD) varying from 7.8% to 9.4%. Such an intensity fluctuation is most likely to arise from the micrometre range surface height irregularities evidenced by AFM. The elongated shape suggests that these patterns formed during the glass LIPAA processing parallel to the laser scanning direction.

To calculate the EF (enhancement factor) of the SERS slides, the intensity of the dominant TF peak at 999 cm^{-1} in the SERS spectrum was compared with the corresponding peak in the Raman spectrum according to the (1) equation in [186]. The results indicate a moderate EF of 3.0×10^5 for Ag surface adsorbed TF excited at 785 nm laser radiation. EF varies broadly depending on the nature of enhancing material, spectroscopic setup, or even analyte. For example, calculated average EF is higher by one order of magnitude than those found in literature, where non-resonant analytes were used for evaluation [203,204]. Several aspects can explain the relatively modest SERS enhancement factor compared with conventional SERS EF 10^6 [27]. In particular, soda-lime glass exhibits remarkable melt-formation during the laser ablation procedure and mainly forms nanostructures with low spatial frequency (LSF) [205,206]. LSF arise due to differences in the non-linear absorption behaviour and viscosity of glasses [207]. The laser-fabricated soda-lime glass surface resulted in a smoother and more homogenous nanostructure formation where no sharp spikes and edges appeared. Moreover, the thickness of a metallic film also plays a significant role in SERS activity [196]. Zhao *et al.* showed the effect of roughness on 100 nm-thick silver film on SERS as they observed higher activity for rougher surfaces due to the generation of more hot spots [208]. In our case, 170 nm silver film was deposited, leading to a character with fewer hot spots and more consistent SERS enhancement over the whole substrate surface.

4. Anchor monolayers for immobilisation of phospholipid membranes on the silver surface

It is known that the structure of the anchor self-assembly monolayer determines the properties of surface-immobilized bilayer lipid membranes (tBLMs) [169]. Anchor SAM performs essential functions – pulling the membrane away from the surface, thus ensuring the formation of a sufficient submembrane reservoir and reducing the effect of metal surface irregularities

on the membrane integrity. Long-chain membrane-embedding molecules and low-molecular-weight surface diluents that maintain the required density of anchor molecules are commonly used to form an anchor self-assembly monolayer [44,102]. β -mercaptoethanol (β ME) is one of the most widely used surface diluents in mixed SAM. It forms a strong covalent bond with Au and Ag surfaces. The hydrophilic -OH groups bind water at the end of these molecules, thus creating a hydrophilic submembrane environment. To develop stable experimental platforms for the immobilisation of tBLM on metal surfaces, it is necessary to form self-assembled monolayers suitable for this purpose, taking into account the properties and interactions of the selected molecules and the metal used.

4.1. Selection of short-chain alkanethiols for mixed SAM formation

To assemble tBLMs, one needs to design a molecular anchor self-assembled monolayer (SAM). Silver reacts differently with thiols than gold. While the gold remains stable in organic solvents containing thiols and readily forms SAMs [84,182], we found that the silver is prone to corrosion in β -mercaptoethanol (β ME) solutions in ethanol. The corrosion can be observed by the eye of light microscopy if silver coated glass slides are immersed into ethanolic β ME solution. Incubation leads to a change of silver colour from the bright white (looks evenly grey in Figure 7A) to the matte grey (looks heterogeneously whitish in Figure 7B). Visible by eye metal film delamination was observed in some cases. Also, chaotically distributed spike-shaped structures about 50 μ m in length were observed on the silver surface after incubation in β ME (Figure 7B). Because β ME serves as a surface backfiller in mixed SAMs anchoring phospholipid bilayer [44], one needs to find substitute material for this role.

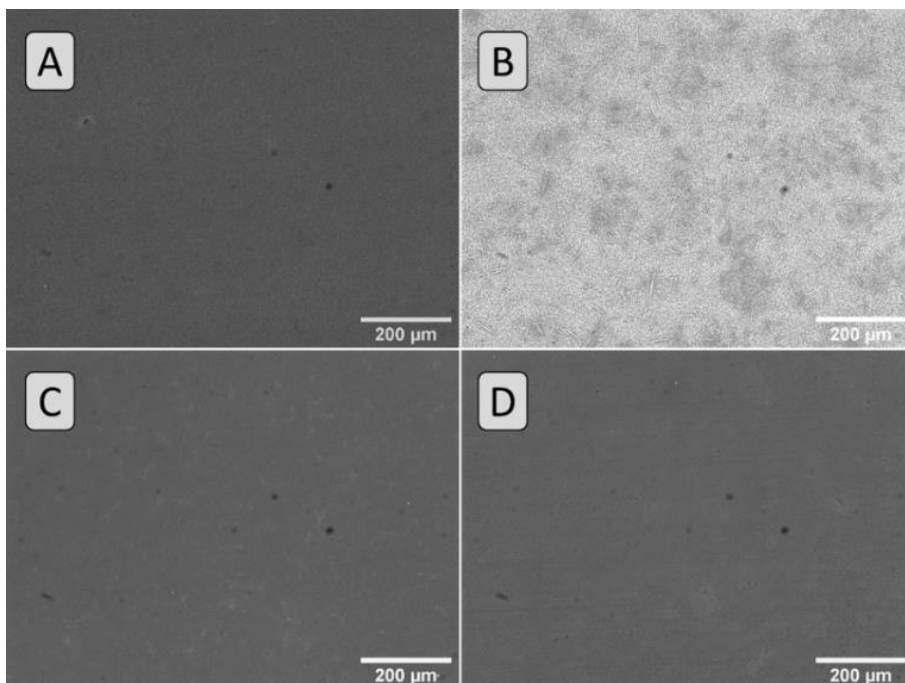


Figure 7. Representative optical microscopy images of silver substrate surface morphology. Visualisation of the magnetron-coated silver film after incubation in (A) Thiol-free ethanol, (B) 100 % β ME, (C) 100 % 3M1P and (D) 20:80 % WC14:3M1P solution. Incubation time – 3 hours. Total thiol concentration 0.1 mM. Note: Black dots throughout all images are artefacts in-camera lens system that was failed to eliminate.

By exploring a group of other hydroxyl-terminated short-chain thiols, we found that substitution of β ME with – 3-mercapto-1-propanol (3M1P) is capable of reducing silver corrosion as judged by the light microscopy (Figure 7 C). The corrosion was even further suppressed by the preparation of mixed SAMs by replacing at least 20 % of 3M1P with a thiolipid molecule WC14 (Figure 8 [44]), which serves as a molecular anchor for phospholipid membrane (Figure 7 D). This hints at the possibility of inhibiting silver surface corrosion by replacing β ME with (3M1P) during the formation of the molecular anchor layer necessary to assemble tBLM.

4.2. Spectroscopic analysis of molecules forming an anchor SAM

After finding that silver corrosion is controlled by elongation of the alkane chain of backfiller molecules, we decided to analyse more potentially suitable compounds for the formation of mixed SAMs to immobilise tBLM on the silver surface maintain sufficient submembrane reservoir and membrane

integrity. The structures of selected short-chain backfillers and molecular anchor WC14 are shown in Figure 8.

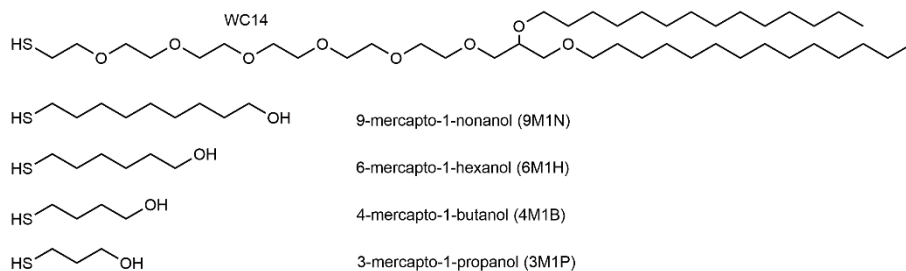


Figure 8. Molecular structure of molecules used to form mixed SAMs. According to [188].

In this part of the work, the interactions between components of self-assembled monolayers deposited from mixture solutions of long-chain WC14 and short-chain backfillers (mixed SAMs) were explored by electrochemical reductive desorption. From the desorption curves of a single component SAMs (coloured lines in Figure 9), it can be seen that the length of the carbon chain in the backfiller affects the Ag-S cleavage potential and the onset of the detachment of SAM molecules. The desorption potential depends on (a) the metal-thiolate bond strength, (b) the magnitude of lateral interactions between the surface molecules, and (c) the interactions between surface molecules and solution ions [209].

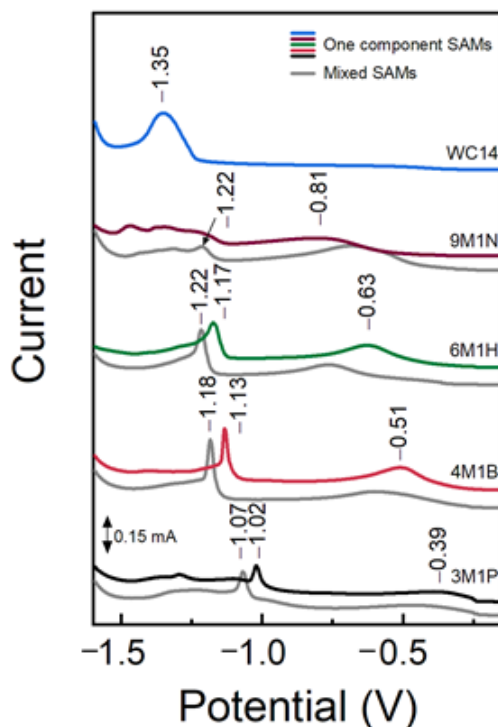


Figure 9. Potentiodynamic curves of one component SAMs (coloured lines) and mixed component SAMs (80 % backfiller:20 % WC14) (grey lines). Reductive desorption was performed from Ag film in 0.5 M NaOH + 0.1 M Na₂SO₄ deaerated aqueous solution at the sweep rate of -50 mV/s. The desorption curves of 9M1N and 9M1N + WC14 SAMs were multiplied by two.

Here an increase in the backfiller carbon number from 3 to 6 pushed the desorption potential maxima from -1.02 to -1.17 V. Addition of 20 mol% of WC14 to the bathing mixture increased the resultant SAM stability, which is attested by the shift of the desorption maxima to more negative potentials (grey lines in Figure 9). Such a shift indicates that backfiller and anchor molecules mutually stabilise each other in a mixed monolayer. However, the cathodic shift remained constant at about -50 mV for all but 9M1N/WC14 mixed SAMs. This suggests that the strength of interactions between the lipid-like anchors and the backfillers is independent of the carbon chain length of the backfiller molecules. It is noteworthy that the intensity of the desorption peak correlated with the amount of surface adsorbed molecules. As the molecules occupy energetically different surface domains, the desorption curve may contain several peaks, or the peaks may differ in broadness. For the

studied system, the nonzero intensity beyond the first desorption peak (to the negative portion of the potential window) is also attributed to the more strongly bound molecules to the surface, therefore rendering it challenging to inspect the relative amount of surface adsorbed molecules.

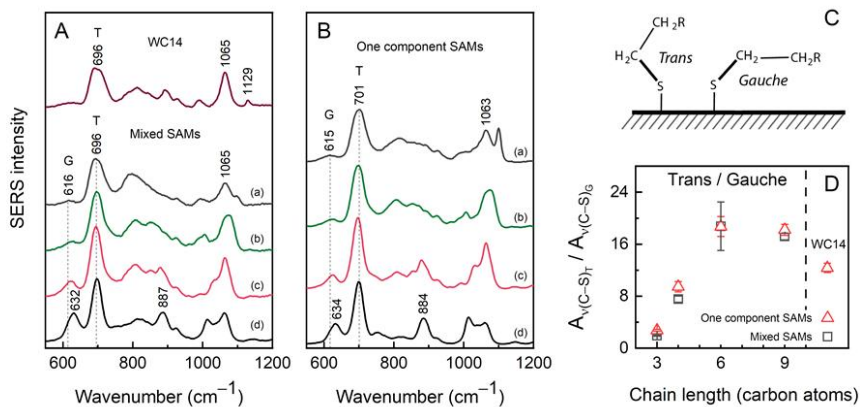


Figure 10. (A) SERS spectra of Ag adsorbed WC14 (top curve) and mixed SAMs containing different backfillers and (B) one component SAMs. The order of curves is 9M1N (a), 6M1H (b), 4M1B (c), 3M1P (d). Letter G and T denote gauche and trans conformation. (C) Schematic representation of surface adsorbed thiol molecules in the gauche and trans conformation. The conformation was defined by the dihedral angle of the -S-C- bonding (D) T/G ratio dependence on the chain length in carbon atoms of the backfiller. The composition of mixed SAMs was 80 % backfiller and 20 % WC14. Mean \pm SD were calculated from 3 measurements.

To gain a deeper understanding of anchoring monolayer structure in the electrochemical double layer, the surface vibrational spectroscopy measurements were carried out for Ag-adsorbed SAMs. To probe the state of the headgroup and the structure of the alkyl chains, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was employed (Figure 10). The headgroup's conformer structure of the S-C motif was recognised from the gauche $\nu(C-S)_G$ and trans $\nu(C-S)_T$ vibrational modes typically found in 600-750 cm⁻¹ range. The two conformers are depicted in Figure 10 C. It should be noted that molecules contribute to the C-S stretching modes according to their surface concentration, therefore for the mixed monolayers (80:20 % for backfiller:WC14), most of the spectral intensity was expected from the short-chain backfillers. The $\nu(C-S)_G$ wavenumbers downshifted from 632 cm⁻¹ by 16 cm⁻¹ indicating the reduction in the C-S force constant with increasing carbon number. On the other hand, no significant shift was observed for the $\nu(C-S)_T$ at 696 cm⁻¹.

Only the shortest molecule tested, the 3M1P, the gauche conformational mode (632 cm^{-1}) was of considerable intensity compared to trans (696 cm^{-1}) because of relatively small attractive van der Waals interactions among carbon chains. Trans and gauche conformations were considered for the molecules, which adopted vertical and more flat-lying configurations with the surface, respectively (Figure 10 C).

As the chain length increased, the gauche band sharply diminished. The more quantitative analysis was given by the trans-to-gauche ratio (T/G) calculated from the integrated intensities, $Av(C-S)_T/Av(C-S)_G$. The T/G increased from 2.8 for 3M1P to 18.2 for 9M1N in one-component monolayers and from 1.9 to 17.2 for that of mixed SAMs (Figure 10 D). For 100 % WC14, the calculated 11.5 T/G ratio was less than that for 6M1H and 9M1N, presumably due to the relatively bulky hydrophobic part composed of two alkane chains that give enough room for conformational flexibility in the S-C and ethylene oxide (EO) parts of the molecule. The higher T/G ratio in longer backfiller SAMs may increase molecular order and more vertical orientation of backfillers on the surface, effectively shrinking the submembrane reservoir volume when incorporated into tBLM architecture.

Specific to the backfiller, SERS give little information on the long-chain anchoring molecules. Typical for WC14, all-trans $\nu(C-C)_T$ spectral mode at 1129 cm^{-1} was only observed for the WC14 monolayer composed from the 100 % anchor concentration. This band was previously shown to diagnose water and electric potential induced rearrangement of hydrophobic alkane chains into molecular surface clusters [113,168]. The clustering effect was linked with the formation of defected lipid tBLM membranes [113,169]. In the present study, the absence of the $\nu(C-C)_T$ spectral mode suggests that no clustering takes part in the formation of mixed SAMs or during the SERS measurements, indicating the principal suitability of mixed-component SAMs to be employed in a subsequent tBLM formation.

Contrary to SERS, the RAIRS spectra of mixed SAMs presented in Figure 11 were dominated by the WC14 spectral lines. Considering the area under the curve in the C-H stretching range ($2750\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$), mixed SAMs had on average five times the area of the corresponding single component SAMs (solid and dashed lines in Figure 11). Therefore, regardless of lower concentration, the significant contribution to the mixed monolayers came from WC14. The most intense broad feature near 1133 cm^{-1} in the 100 % WC14 spectrum was assigned to the asymmetric stretching of the EO fragment $\nu_{as}(C-O-C)$ [45,211]. Twisting of CH_2 of the EO fragment was found at $1250\text{-}1252\text{ cm}^{-1}$, wagging and scissoring at $1347\text{-}1351$ and

1460 - 1464 cm^{-1} , respectively [211]. It is noteworthy that WC14 can adopt several conformations, including helical structure with repeated trans-gauche-trans internal rotations around the bonds in the $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_6$ segment [212]. The distribution of different EO conformations was revealed by a broad $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ mode that decomposed into several highly overlapped elements. The precise positions of the EO components were determined from the analysis of the second derivatives of the RAIRS spectra. For the 100 % WC14 monolayer, the positions were found at 1114, 1133, and 1151 cm^{-1} . The lowest energy component at 1114 cm^{-1} was related to highly ordered crystalline helical structure [45,213], while the higher frequency modes were assigned to amorphous structure [211]. Several other spectral modes were found to indicate both the ordered (949 and 1349 cm^{-1}) and unordered (1326, 1249, and 1036 cm^{-1}) EO structures [211,212].

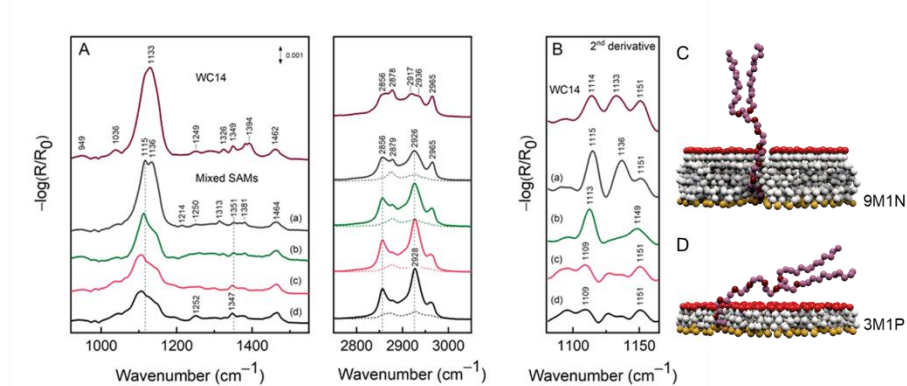


Figure 11. (A) RAIRS spectra of Ag adsorbed WC14 (top curve) and mixed SAMs containing different backfillers in the following order: 9M1N (a), 6M1H (b), 4M1B (c), 3M1P, (d) in the 900-1600 and 2750-3050 cm^{-1} range. The composition of mixed SAMs was 80 % backfiller and 20 % WC14. Dashed curves in C-H stretching region represent one-component monolayers that had, on average, a 5-times lower area under the curve than the corresponding mixed SAMs. (B) The second derivative RAIRS spectra in $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ region (multiplied by -1). The arrangement of the spectra corresponded to that of the (A) panel. Panels (C) and (D) proposed model of WC14 molecules orientation on Ag surface (at air/solid interface): (C) WC14 diluted with 9M1N in ratio 20:80 % WC14:3M1P; (D) WC14 diluted with 3M1P in ratio 20:80 % WC14:9M1N. According to [188].

Owing to the surface selection rule, only the vibrations with a nonzero component of transition dipole moment (TDM) to surface normal were spectroscopically allowed. A sharp increase in the intensity of $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ mode revealed that EO becomes more vertically oriented when contacting longer backfiller molecules. In other words, the more vertical arrangement of

backfiller molecules pushes the EO segment into adopting vertical orientation. This effect was the most pronounced with C9 and had the slightest impact with C3 and C4 due to different degrees of lateral interactions between molecules of the same and distinct natures, respectively. The second derivative RAIRS spectra clearly showed that the position of the lower frequency component upshifted from 1109 to 1115 cm^{-1} , while the modes at 1136 and 1151 cm^{-1} became increasingly stronger for EO when in contact with 9M1N. Supporting that, the CH_2 (EO) wagging mode 1347 cm^{-1} upshifted by 4 cm^{-1} , indicating the melting of crystalline-like EO structure [211,214]. These data suggest that longer backfiller molecules orient EO segments more vertically with the surface and increase the surface fraction of WC14 molecules, which have melted structure in EO.

The C-H stretching region was composed of symmetric $\nu_s(\text{CH}_2)$ and asymmetric $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ stretching modes of methylene groups at 2856 and 2917- 2928 cm^{-1} and WC14 terminal methyl group modes $\nu_s(\text{CH}_3)$ and $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ at 2878 and 2965 cm^{-1} , respectively. There has already been discussion of these modes being mainly from the alkyl chains of the WC14 rather than the EO segment, [45,214] allowing the analysis of the conformational order of the hydrophobic WC14 chains independent EO. Highly ordered crystalline Ag-adsorbed alkanes have their ν_s and ν_{as} methylene vibrations at around 2847 and 2916 cm^{-1} [215]. A departure to the higher wavenumbers from those positions attests increased structural flexibility and gauche defects. Regardless of the backfiller, WC14 alkane chains appeared to be melted as determined from the spectral positions of ν_s and ν_{as} of methylene groups. The disorder in hydrophobic chains could be easily ascribed to the low surface concentration of long-chain molecules for the mixed SAMs.

Yet more valuable information can be extracted from the intensities of $\nu(\text{CH}_3)$ and $\nu(\text{CH}_2)$ modes. The TDM for methyl and methylene lay in the direction of C- CH_3 and perpendicular to the C-C chain axis, respectively. Therefore the analysis of their relative intensities provided a measure for the collective orientation of alkane chains. We refrained from decomposing the experimental spectra into components because of the complex C-H stretching region. However, it was pretty clear that the $I[\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)]/I[\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)]$ ratio changed from $\sim 1/3$ to $\sim 2/3$ when 3M1P was replaced with 9M1N. Thus, the TDM for the methyl group became more vertical with the surface. These data indicate that the EO chain in WC14 tilt closer to the surface normal with an introduction of increasingly longer surface backfiller molecules in the mixed

SAM and the hydrophobic alkane chains situated further from the surface (Figure 11 C, D).

Summarising the spectroscopic data of SERS and RAIRS presented in Section 4.2, we see that the orientation of WC14 anchor molecules on the silver surface can be controlled using short-chain molecules of different lengths (3C to 9C). Using longer and longer surface diluents to form mixed SAMs may be associated with increasing monolayer ordering and more vertical orientation of WC14 in both the hydrophilic ethylene oxide segment and the hydrophobic alkane chains that interact with lipid bilayers to form tBLM. In addition, the spectral data did not show clustering markers specific for WC 14 molecules. We believe that WC14 clustering does not occur during the formation of mixed SAM or during SERS measurements; therefore, the selected molecules are likely to form stable and uniform self-assembled monolayers. The applicability of these anchor SAMs to the development of functional tBLM models was further analysed using electrochemical impedance spectroscopy.

4.3. Analysis of mixed SAM using EIS

After a detailed analysis of mixed anchor self-assembly monolayers by vibrational spectroscopy and evaluating their potential for developing functional tBLM models on silver, we performed a detailed electrochemical analysis of mixed SAM. This method extends the scope of SAM analysis and provides an even better understanding of the characteristics of mixed anchor monolayers and their potential applications for tBLM formation. During the study, both spectroscopic and electrochemical analyses were performed in parallel.

When the corrosion of the silver surface was found to be controlled by converting the mixed SAM β ME to 3M1P (Section 4.1), the electrochemical impedance was used to evaluate the structural and functional properties of such anchored SAMs. This section analysed the electrochemical parameters of anchored monolayers depending on the percentage of components (3M1P:WC14) in the solutions from which mixed SAMs were formed. Since the concentration of SAM-forming molecules on the surface is not directly proportional to the concentration in SAM solutions, the ratio of molecules we mention below reflects the composition of the solutions. EIS responses from those SAMs are shown in Figure 12. Spectra plotted in Cole-Cole representation (Figure 12 A) exhibits a typical nearly semi-circular shape with the 100 % 3M1P SAM having the largest radius, thus reflecting the highest capacitance value C_{SAM} of about $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. The increased molar ratio of the

long-alkyl-chain WC14 results in the increase of the dielectric material on the surface. This follows with a decrease of SAM capacitances [45]. Presumably, a thicker and more compact layer is formed as the WC14 concentration increases. For pure, 100 % WC14 SAMs, the C_{SAM} drops below $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, hinting at forming a compact dielectric layer with a minimum amount of water as observed for gold substrates [44]. The capacitance exhibits an almost linear decrease when the monolayer composition changes from 100 % 3M1P to 100 % WC14 (Figure 12 A) SAMs, suggesting the WC14:3M1P surface concentration correlates well with the solution concentration of components. The slight bend of the C_{SAM} curve (Fig. 3A) may indicate a slightly higher binding affinity of WC14 anchor molecules compared to the 3M1P. The SAM capacitance values are similar to those observed for gold substrates with 100 % β ME and 100 % WC14 SAMs atop [44]. However, mixed WC14:3M1P SAM capacitance values as a function of WC14 concentration (Figure 12 A) demonstrate different dependence from that observed in β ME:WC14 SAMs on gold [44]. This suggests the different distribution of individual tethers, which presumably may result in different functional properties of anchor SAMs.

The admittance magnitude curves in the Bode representation (Figure 12 B, upper panel) exhibit a plateau with conductivity at the high-frequency range determined by the solution resistance. A capacitive behaviour can be identified in the lower frequency area. The curves are almost linear below 10Hz, and in this range, the magnitude values $f = const$ exhibit a clear correlation with the WC14:3M1P ratio. The admittance magnitude decreases with the percentage of WC14 in SAMs. The WC14:3M1P ratio-dependent differences in electrochemical parameters are also visible in the admittance phase plots (Figure 12 B, lower panel). The curves exhibit a sigmoidal shape with a phase approaching 90 degrees in the low-frequency range.

As expected for series RC-element dominated EIS spectra at $arg Y = const$, the midpoint of the descending curve shifts towards higher frequencies with WC14 concentration increase. This is the result of decreasing the time constant of the interphase, which occurs due to decreasing capacitance of the SAMs as WC14 content increases. This data concludes that mixed SAMs on silver exhibit similar dielectric properties and possibly structural arrangement as WC14 molecules on gold. Therefore, we expect such SAMs to be applicable for the assembly of tBLMs.

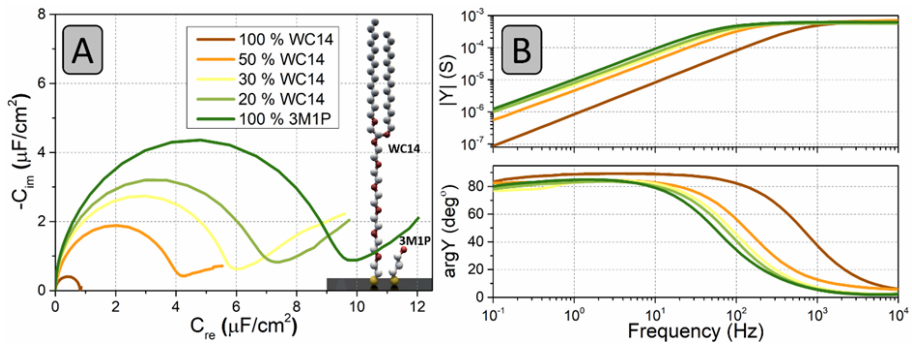


Figure 12. Representative EIS spectra of different compositions WC14:3M1P SAMs. (A) Cole-Cole complex capacitance plots, (B) Admittance modulus and phase (Bode) plots. Frequency range 10 kHz-0.1 mHz.

Next, we analysed mixed self-assembled monolayers formed on silver from 80:20 % solutions of different backfiller: WC14 molecules. We performed SAM formation with all the short-strand molecules shown in Figure 8 – 3M1P, 4M1B, 6M1H and 9M1N. An optimal 80:20 % molecular ratio of the compounds in the SAM solutions was selected according to Figure 12. C_{SAM} values closest to the successfully developed tBLM systems on gold [45]. The electrochemical impedance spectra of mixed SAMs are shown in Figure 13.

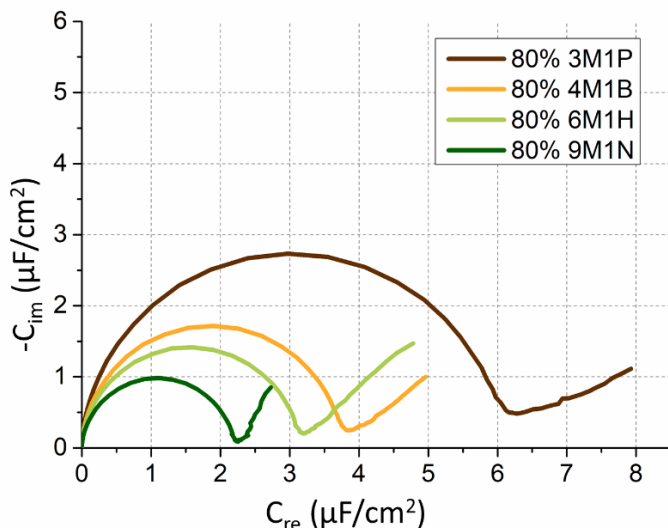


Figure 13. Representative EIS spectra of mixed WC14:backfiller (in ratio 20:80 %) SAMs contain different backfillers: 3M1P, 4M1B, 6M1H, and 9M1N. Frequency range 100 kHz-0.1 Hz.

The spectra are presented in the complex capacitance plots (Figure 13). They exhibited a semi-circular shape, consistent with the capacitive behaviour of a near ideally insulating dielectric layer. The radius of a semicircle was proportional to the electrical capacitance of the layer. The largest radius was observed for the 3M1P backfiller layer, indicating the highest capacitance value C_{SAM} of about $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, which did not differ significantly from those of the 30 % mixed HC18: β ME SAMs used to accomplish tBLMs via vesicle solvent exchange procedure [45]. An increasing molecular length of a backfiller was followed by a decrease in SAM capacitances. The mixed SAM containing 9M1N backfiller exhibited the lowest capacitance SAMs of $\sim 2.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. C_{SAM} values differed significantly from 100 % WC14 SAM [44].

For more detailed analysis, the capacitive spectra of the mixed SAMs were modelled according to the corresponding equivalent circuit model, resulting in more accurate C_{SAMs} values compared to the 100 % SAM capacitance values (Figure 14). The estimated SAM capacities of 100 % short-chain compounds decrease from $12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ for 3M1P to $\sim 2.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ to 9M1N. The minimum electrical capacitance of $\sim 0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ was observed for 100 % of WC14 SAM. We found a clear trend when assessing the difference in capacitance between the same short-chain compound 100 % SAM and the mixture containing 20 % WC14. As the surface diluent molecules lengthen, the difference between the electrical capacitance of 100 % SAM (black curve) and mixed 20:80 % SAM (red curve) decreases. In the case of 3M1P and 4M1B, the change in capacitance values is $\sim 50 \%$, in the case of 6M1H $\sim 36 \%$, and in the case of 9M1N, it is only $\sim 8 \%$. This indicates that we may have more WC14 molecules on the surface in the case of shorter surface diluents, leading to a decrease in C_{SAM} compared to longer molecules.

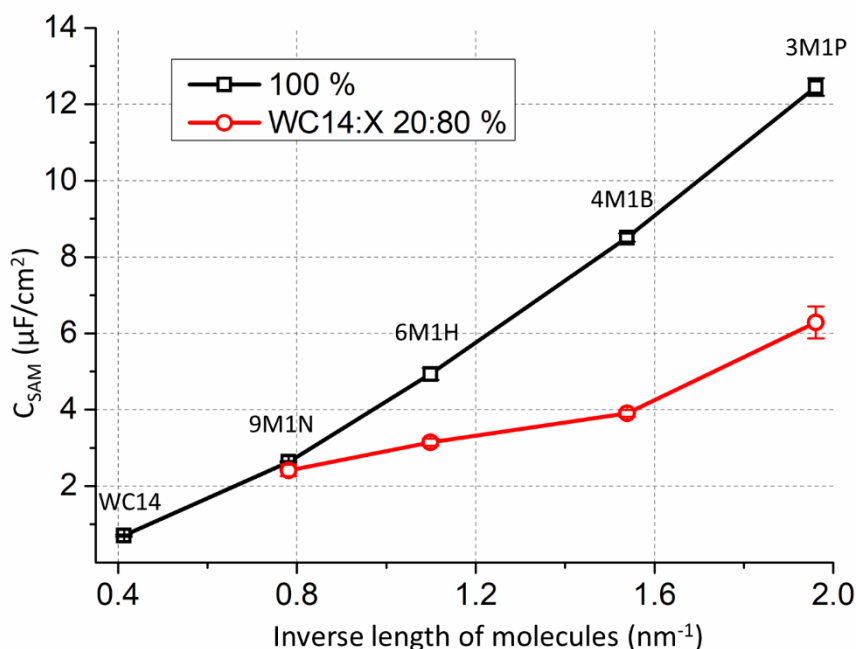


Figure 14. C_{SAM} dependence on the inverse length of backfiller molecules (nm^{-1}). The black curve represents 100 % of the different molecules in the SAM. The red curve represents the C_{SAM} of mixed (20:80 % WC14:backfiller) monolayers.

It is likely that the addition of different short-chain compounds to the SAM solutions from which mixed SAMs were formed on Ag, altered the surface concentration of the molecular anchor WC14. However, the total concentrations of the components in the solution were constant. This change may have been due to a change in the hydrophobicity of the surface diluents from relatively low for 3M1P to higher for 9M1N. Increasing hydrophobicity increases the chemical potential of short-chain molecules, thus facilitating the interaction of hydrophobic components with the silver surface. A similar effect was observed in experiments on gold [216]. Therefore, in our case, the surface concentration of 9M1N was probably higher than the concentration of 3M1P. In the case of 9M1N, we believe that we had fewer WC14 anchors on the surface, which may have led to a more minor change in C_{SAM} capacity than shorter molecules.

To test our hypothesis about a decrease in WC14 concentration at the surface by elongation of surface diluent molecules, we performed contact angle (CA) measurements. These experiments allowed us to evaluate changes in surface hydrophobicity by varying the lengths of the molecules and their ratios.

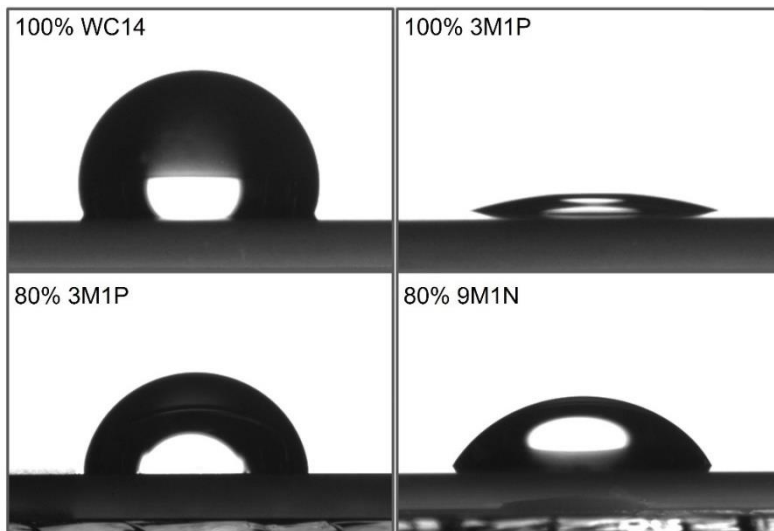


Figure 15. Images of water drop and silver surface with different SAM contact angles. Top: 100 % WC14 on the left, 100 % 3M1P self-cleaning monolayers on the right. Bottom: left 3M1P: WC14 (80:20 %), right 9M1N: WC14 (80:20 %) self-assembling monolayers.

In the images of Figure 15, we can see with the naked eye the difference in the shape of a drop of water on silver surfaces incubated in different solutions. When water is dropped on the most hydrophobic Ag surface incubated in 100 % WC14 solution (Figure 15, top left), the droplet forms a characteristic small-diameter semi-circular shape, minimising the contact area with the hydrophobic silver surface. The opposite effect is observed on the more hydrophilic Ag surface incubated in 100 % 3M1P solution (Figure 15, top right), where the water droplet expands and wets a large surface area. These visual data accurately illustrate exact CA values showed in graphs (Figure 16). Here 100 % WC14 shows a characteristic contact angle of $\sim 110^\circ$ indicating surface hydrophobicity, and 100 % of 3M1P shows only $\sim 9.5^\circ$ angle indicating surface hydrophilicity. As the short-chain compounds lengthen, the contact angle values of 100 % of the solutions gradually increase from 11.8° to 21.73° , respectively (grey bars in Figure 16).

Analysing the properties of silver surfaces incubated in mixed (80:20 %) SAM solutions, we observed a clear tendency for the contact angle values to decrease with increasing short-chain molecules, indicating a decreasing surface hydrophobicity in the silver surface. (turquoise columns in Figure 16). 4M1B and 6M1H mixed SAM mean CA values with maximum standard deviations throughout the measurements. This indicates the formation of

uneven and different mixed SAMs when the varying amount of WC14 molecules is adsorbed on the silver surface due to molecular competition.

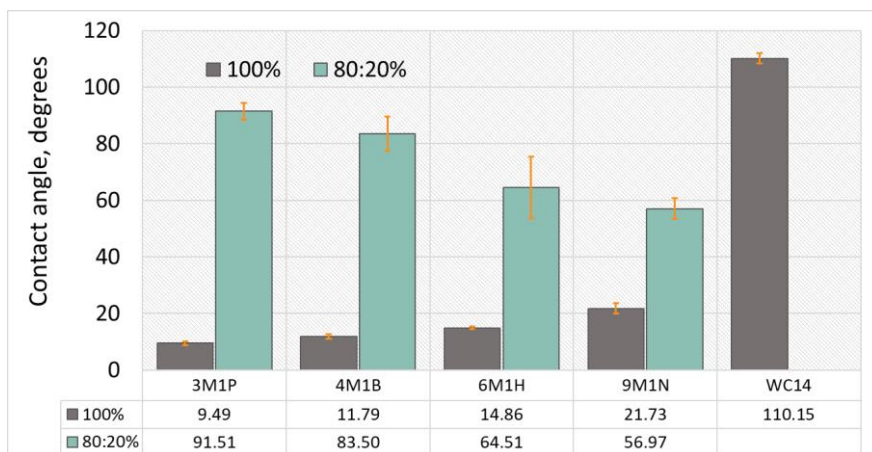


Figure 16. Contact angle measurement data. The grey bars show 100 % SAM CA values. Turquoise-coloured bars show mixed SAM CA values when monolayers were formed in solutions containing 20 % WC14 and 80 % different short-chain compounds, respectively. 100 % SAM SD ± 0.47 -1.82. 80:20 % SAM SD ± 1.78 -10.97.

In the case of 3M1P:WC14 (Figure 15, bottom left), 20 % WC14 to the mixed SAM solution significantly altered the surface properties. Comparing 100 % 3M1P and mixed (80:20 %) SAM, the mean contact angle values vary considerably from 9.49 degrees to 91.51, respectively. This indicates that incubation of the silver surface with a 3M1P:WC14 (80:20 %) SAM solution produces a mixed SAM with a significant amount of anchored WC14 compound. In addition, such CA values (90°) are favourable in the literature for forming functional tBLMs [44,45]. Using 9M1N (Figure 15, bottom right), the addition of 20 % WC14 to the mixed SAM solution slightly changed the mean CA values from 21.73° (100 % 9M1N) to 56.97° (80:20 % 9M1N:WC14), respectively (Figure 16). Although an increase in surface hydrophobicity is observed, it is clear that 9M1N molecules severely limit the adsorption of WC14 anchors on the silver surface, as predicted.

The EIS data complement and confirm the spectroscopic analysis (Figures Figure 10 Figure 11) performed. Decreasing capacitance values (from $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ with 3M1P to $\sim 2.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ with 9M1N) by prolonging the backfiller correlated with spectroscopic data showed an increased molecular order and more vertical orientation of backfillers on the surface. Moreover, SERS analysis of dry samples showed the absence of the $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ spectral mode of

WC14 molecules in mixed SAMs spectra. This suggests that no clustering of WC14 in alkane chains takes part in the formation of mixed SAMs [169]. Such data indicate the principal suitability of mixed-component SAMs to be employed in a subsequent tBLM formation. Therefore, in the next steps of this work, we further analysed all selected short-chain compounds (3M1P, 4M1B, 6M1H, and 9M1N) that could be used in conjunction with WC14 molecules to construct tBLM models successfully. We also sought to elucidate the effect of decreasing amounts of WC14 molecules on the formation of lipid bilayers as surface diluent molecules elongate in mixed SAMs.

5. Construction of tBLM and investigation of their properties

As described previously, the tBLM formation strategies and the physical properties of the formed membranes are directly dependent on the composition of the mixed anchor self-assembled monolayers. The data discussed in Section 7 suggest that all the short-chain compounds we analysed, together with the long anchor compound WC14, can be applied to the development of tBLM models. However, the physical properties of the tBLM could be controlled by a mixed SAM WC14:backfiller ratio, which determined the rigidity of the bilayer [44]. Densely packed tether lipids at the surface (no backfilling with spacer) typically lead to remarkably high membrane resistance; however, this can be a problem to the functional reconstitution of protein [217]. On the other hand, if the concentration of anchor compounds is too low, the formed lipid bilayers may have a high initial system defect density. For these reasons, it is essential to evaluate how different anchor self-assembly monolayers determine the properties of the formed tBLMs and what SAMs and the tBLM compositions themselves are most suitable for further development biochemical-analytical applications.

5.1. Influence of mixed SAM composition on tBLM properties

As described previously, tBLM is spontaneously formed by the interaction of anchored self-assembled monolayers with multilamellar vesicle (MLV) solutions and can be qualitatively and quantitatively assessed by the EIS method [103].

The multilamellar DOPC-Cholesterol 50:50 mol% vesicle (MLVs) solution was used to interrogate the process of vesicle fusion on silver supported WC14:3M1P SAMs. The formation process can be easily monitored in real-time by the EIS method (Figure 17, B-C). As it follows from Figure 17 B-C, the formation of tBLM occurs within the first 5-10 min with

minimal variation of the EIS afterwards. Some EIS changes occur after replacing vesicle solution with pure buffer (Figure 17 B-C, purple curve).

The ability of WC14:3M1P SAMs to form intact tBLMs by vesicle fusion is almost independent of the content of WC14 in mixed anchor SAM. In contrast to gold supported tBLMs, where at least 30 % WC14:βME were required to form electrically insulating bilayers [169], the silver support with only 20 % of WC14 anchor SAM was enough to complete intact bilayers. This can be attested by evaluating the tBLMs capacitance, which stays within a narrow range at $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ for the whole interval of WC14 > 20 % is observed within 30 min of incubation with vesicles (Figure 17 A).

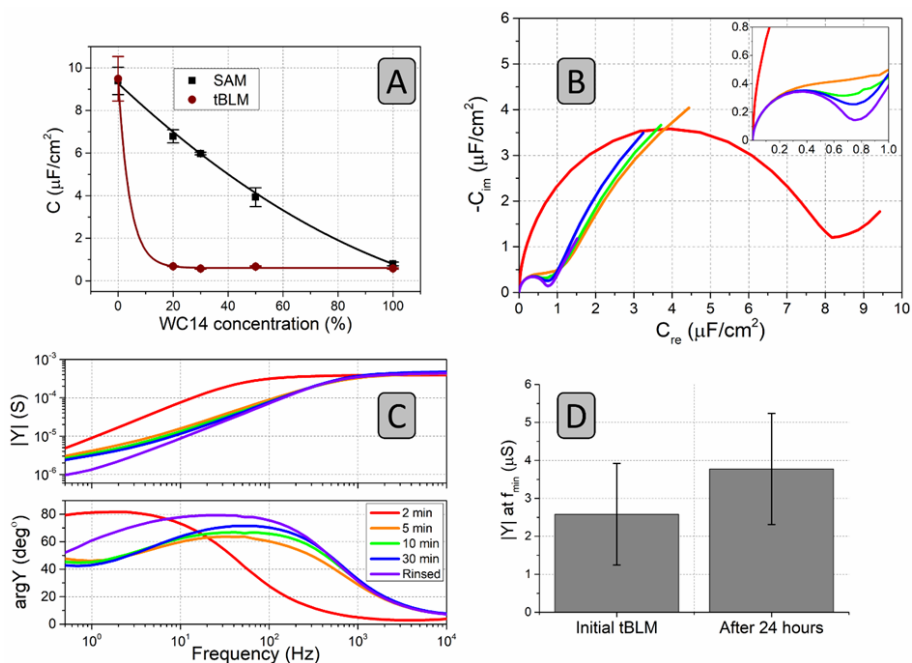


Figure 17. EIS data of multilamellar vesicle fusion on WC14:3M1P SAMs. (A) Capacitance values of SAMs (black squares) with various WC14:3M1P ratios (only WC14 concentration displayed on the abscissa) and tBLMs (red circles) formed on that specific SAM composition. (B) Alteration of complex capacitance during tBLM formation. Frequency range 100 kHz -0.5 mHz. Inset displays magnified high-frequency range of the complex capacitance plot. (C) Bode plots of admittance modulus (upper panel) and phase (lower panel). Frequency range 10 kHz-0.5 mHz (D) Changes of tBLMs admittance modulus at f_{min} point during 24 hours. SAM composition for the fusion presented – WC14:3M1P 20:80 mol%. MLV composition – DOPC:Cholesterol 50:50 mol%, total lipid concentration – 1 mM.

The dynamics of the formation of tBLMs is fast *vide ultra*. The initial Cole-Cole semi-circular spectrum of anchor SAM (Figure 17 B) shrinks ten-fold in approximately 2 min after the liposome injection. However, the capacitive semicircle continues to decrease next 30 min until it reaches the final limit of $0.68 \pm 0.13 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. In parallel, the Bode plots exhibit a minimum of the admittance phase spectra, which appears at around 1 Hz (Figure 17 C lower panel), correlating with a step-like feature in the admittance magnitude (Figure 17 D upper panel) curve at the same frequency point. The previously indicated characteristic points appear at around 5th minute after the MLV injection and shift towards both (abscissa and ordinate) axes until the final value of $\text{arg}Y \approx 42 \text{ deg}$ and $|Y| \approx 2.7 \mu\text{S}$ at $f_{\text{min}} \approx 0.7 \text{ Hz}$ is reached.

The replacement of the vesicle solution with MLV-free buffer shifts $f_{\text{min}} < 0.7 \text{ Hz}$. Such an effect is presumably caused by the clean-up of the tBLM surface from the lipid overlayers as observed in gold supported systems by the neutron reflectometry [103]. Both spectral changes and absolute parameter values are characteristic for the formation of isolating tBLMs, and the process velocity is very similar to that in similar systems on the gold surface [103].

The stability of such tBLMs was determined by leaving the measuring setup for 24 hours and registering EI spectra afterwards. No significant changes were observed in the tBLM admittance modulus (Figure 17 D), suggesting lipid bilayer stays intact for 24 hours. In conclusion, we observed the formation of intact tBLMs on silver supported SAMs exhibiting extremely low residual defect densities as estimated from the f_{min} values in the Bode plots.

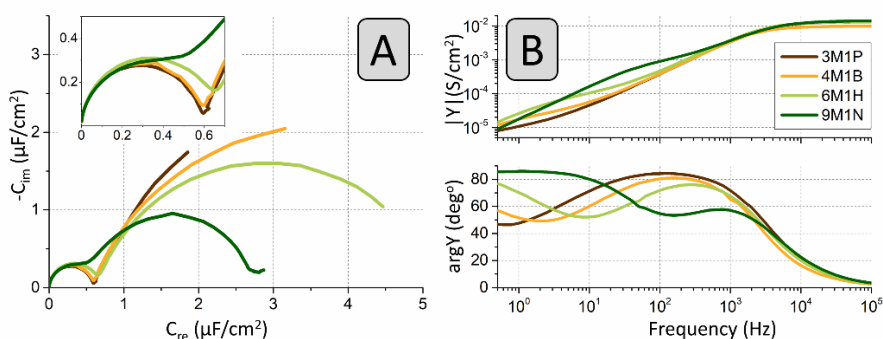


Figure 18. (A) tBLM complex capacity diagrams. High-frequency region (100 kHz to 30 Hz) magnified at the top (B) Admittance module (top) and phase (bottom). Frequency range 100 kHz to 0.1 Hz. DOPC:Chol 60:40 % liposomes were used to form tBLM. The formation was performed on mixed SAMs with different short-chain compounds: 3M1P, 4M1B, 6M1H and 9M1N.

In the following stages of the work, we aimed to analyse the specifics of tBLM formation on (80:20 %) mixed SAMs, for which we used different short-chain surface diluents (3M1P, 4M1B, 6M1H and 9M1N). We tested short-chain molecules of various lengths and employed 20 % of the anchored WC14 compound for this purpose. To compare the propensity of the different molecular lengths of backfillers to form tBLMs, a series of vesicle fusion experiments with DOPC:Chol (ratio 60:40 %) were carried out. Figure 18 displays EIS spectra in Cole-Cole and Bode plots of tBLM, created by vesicle fusion on a functionalised silver surface. EIS features in all cases suggested the formation of the lipid bilayer after vesicle fusion. Upon membrane formation, all tBLMs with different backfillers showed proportional spectral changes in EIS with the phospholipid bilayer formation.

In all cases, the semi-circular part of the EIS spectra sharply decreased (Figure 18 A compared to Figure 13). After vesicle fusion, the high-frequency semi-circular arch pointed to all values spanning around $\sim 0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, not depending on the SAM backfiller. Even the capacitances of mixed SAMs, containing 6M1H and 9M1N below $4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, have decreased after vesicle fusion, suggesting the lipid bilayer formation (Figure 13). The whole Cole-Cole plot exhibited a typical “two semicircle” shape, which is a characteristic of disrupted integrity of tBLM. From the mathematical analysis by Valincius *et al.*, such a well-expressed secondary semicircle in Cole-Cole EIS plots signal a higher number of natural defects occurring in the initial membrane [218].

In parallel, the Bode plots exhibited a minimum of the admittance phase spectra and a step-like feature of the admittance modulus spectra, which appeared at the same frequency point f_{min} , below 1 Hz in the case of 3M1P. Those two significant points moved towards higher frequencies as the molecular length of the backfiller increased in sequence: 3M1P, 4M1B, 6M1H, and 9M1N (Figure 18 B lower panel). This EI spectral feature indicates an impaired isolation property of tBLM in the case of longer backfillers.

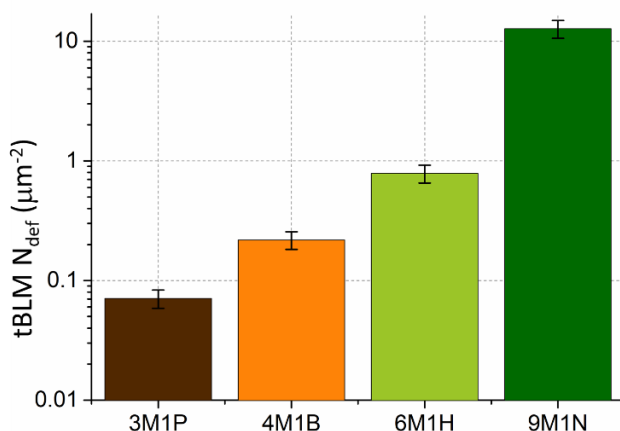


Figure 19. The density of initial tBLM defects using different short-chain compounds in mixed SAM.

According to a mathematical model developed for similar systems on gold [190]. The f_{min} of admittance phase allows a direct estimation of the membrane defect density N_{def} . Calculations showed that the initial membrane defect in mixed SAM using 3M1P is $\sim 0.1 \mu\text{m}^{-2}$ (Figure 19). The density of defects increases consistently with the increasing length of short-chain molecules and, in the case of 9M1N, reaches $\sim 13 \mu\text{m}^{-2} N_{def}$ values.

We believe that the increase in defect could be due to one of two main reasons: 1) the elongating diluent molecule may lead to the formation of WC14 clusters on the surface, resulting in partial lipid coating of the surface area; However, the latter reason is unlikely because as the surface diluent molecules lengthen, the likelihood that WC14 molecules will migrate freely to the silver surface and form clusters decreases. In addition, our spectroscopic analysis of SERS and RAIRS did not show the formation of WC14 clusters. 2) the more hydrophobic molecule of the longer diluent results in a lower amount of WC14 on the surface, resulting in a smooth but highly defective lipid bilayer. This is the effect shown by our contact angle analysis (Figure 16).

The model used to estimate the defect density is based on the assumption that the defects in the membrane are evenly heterogeneous, so it is crucial to assess whether the defects in the formed tBLMs are not clustered (there are lipid bilayer uncoated areas on the surface).

Possible clusters of initial tBLM defects were analysed using computational and modelling work performed by colleagues (Prof. dr. Gintaras Valinčius and doctoral student Filipas Ambrulevičius)

based on experimental data, which allowed to identify of a new parameter ζ (zeta) defining defect clustering on the tBLM surface [218]:

$$\zeta = \frac{\log_{10} f_{\min}}{\log_{10} f_2 - \log_{10} f_1}$$

Where f_1 and f_2 are the frequency values corresponding to the conduction phase arg modes $0.5 \arg Y + 45^\circ$.

Three zones were formed, in which, after deferring the ζ values of the experimental spectra, we can assess whether the defects in the membrane are evenly heterogeneously distributed or clustered (Figure 20). Using 3M1P and 4M1B mixed SAMs, tBLMs with defect densities are too low to assess the nature of their distribution. In the case of 6M1H $\zeta_{6M1H} \approx 2.5$ (black diamond), it falls into the zone of weak clustering and small defect size. In the case of 9M1N $\zeta_{9M1N} \approx 6.3$ (black square), a random defect distribution zone is observed in the middle. This point position allows us to estimate that the surface is dominated by medium-sized ($r_{def} < 10$ nm) defects.

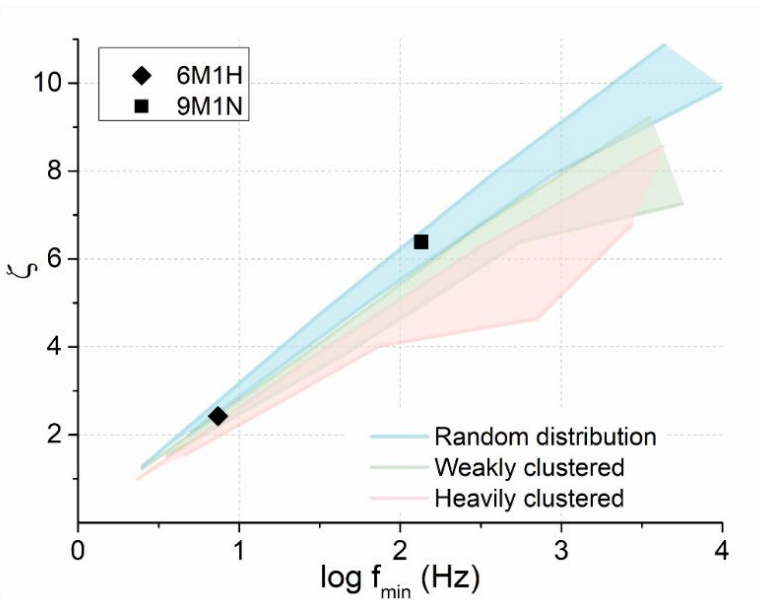


Figure 20. Graph for identification of clustering of primary membrane defects. Zeta (ζ) parameter calculated from characteristic points of the simulated EIS spectra. The defect radius varies from r_{def} at the top of the 0.5 nm colour zone to 25.5 nm at the bottom. Different black symbols shows different backfiller. The ζ parameter was calculated from the experimental EIS spectra by forming tBLM on SAMs with varying backfillers on the surface.

Such ζ values and positions indicate that we have heterogeneously distributed defects even in the case of high-defect tBLM (on 9M 1N mixed SAM). This distribution and the estimated average defect size suggest that the second of the two scenarios for the formation of SAM mentioned above, with the elongation of the carbon chain of the surface diluent molecule, is more likely. When testing different short-chain compounds (3M1P, 4M1B, 6M1H, and 9M1N) in mixed SAM, we have different surface concentrations of WC14 molecules. However, the molar ratios of the components were the same for all diluents. The obtained data correlate with the results of contact angle measurements (Figure 16), which also indicate that the surface concentration of 9M1N was higher compared to the concentration of 3M1P, so in the first case, WC14 anchors are likely on the surface, leading to higher defects in the initial lipid bilayers.

5.2. Application of tBLM to the analysis of biological systems

To evaluate the biological relevance of silver-supported tBLMs, we carried out experiments of membrane-inserting proteins.

Firstly, the DOPC-Cholesterol 50:50 mol% tBLMs were exposed to a 2 nM solution of vaginolysin (VLY). VLY is a cholesterol-dependent cytolysin (CDC) produced by the gram-negative bacteria *Gardnerella vaginalis*, and it is considered as the main virulence factor of this microorganism and secreted as monomer VLY binds to the cell plasma membrane and oligomerises into ring-shaped pores that penetrate the lipid bilayer leading to cytolysis and cell death [185]. EIS previously demonstrated reconstitution of VLY into cholesterol-containing tBLMs on gold was [101,219,220].

The effect of the VLY on the EIS of the silver-supported tBLMs is shown in Figure 21. The Cole-Cole plots (Figure 21 A) exhibit changes typical of the formation of pores in tBLMs. In particular, the minimum point at around $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ shifts “north-west” direction after incubation with VLY, leading to the development of a significant (low frequency) semi-circular feature along with the C_{re} range.

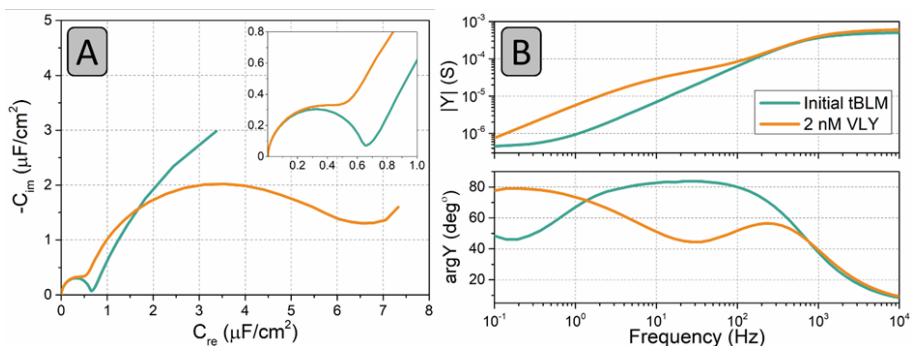


Figure 21. EIS spectral transformations of DOPC-Cholesterol 50:50 % tBLMs upon exposure to VLY. (A) Complex capacitance plots, (B) Bode admittance modulus and phase plots. EIS was recorded 30 min after the injection of 2 nM VLY solution. Frequency range 10 kHz-0.1 mHz.

In Bode representation, the step-like feature on the admittance magnitude plots (Figure 21 B upper panel) shifts upwards upon exposure of tBLMs to VLY. The transformation of the Bode magnitude plot is followed by the phase minimum f_{min} shift to the higher frequency domain, as predicted by theoretical analysis of the EIS [221]. Assuming a random distribution, one may evaluate both the medium size and the global defect density of VLY pores in tBLM, as shown in [220]. This was done using the positions of $arg Y_{min}$ at f_{min} point in the Bode phase plot. After 30 min exposure of tBLMs to VLY solution, the position of f_{min} shifted from 0.16 Hz with the initial value of $arg Y_{min} = 46.11$ deg on the Bode plot to 44.48 deg $^{\circ}$ with $f_{min} = 31.7$ Hz. A significant increase ($\approx 50 \mu S$) in tBLM admittance value at f_{min} compared to stability analysis (Figure 17 D) also demonstrates toxin-induced tBLM integrity changes. Defect density (N_{def}) of pristine tBLMs was calculated using the equation from earlier work [112] and determined to be $\approx 0.06 \mu m^{-2}$. The N_{def} value after VLY exposure was found using the nomogram in ref [220] (Fig. 12 of the reference). It significantly increased and reached $1.8 \mu m^{-2}$. The mean size of VLY defects was $r_{def} \approx 17$ nm, which suggests the presence of incomplete protein pores of VLY in the bilayer, which is confirmed by the direct visualisation of tBLMs on silver support by the atomic force microscopy, vide infra. In conclusion, the EIS data in Figure 21 strongly supports the hypothesis that the silver supported tBLMs parallel well properties of those formed on gold films [219,222] and exhibit biological relevance in experiments with the pore-forming proteins.

While EIS demonstrated the physical membrane penetration, the geometry and distribution of defects arranged in the lipid bilayer are still unclear. We

attempted to directly visualise VLY entities that disrupt the dielectric barrier in tBLMs (Figure 22). The same samples used in EIS measurements were transferred from the electrochemical sample holder to AFM experimental set-up, allowing direct imaging of tBLMs in an aqueous environment.

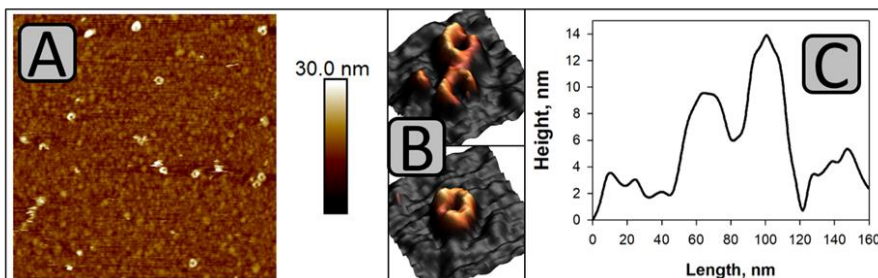


Figure 22. AFM images and profiles of Vaginolysin pores. (A) 2D $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ and (B) 3D views, $200\ \text{nm} \times 200\ \text{nm}$, (C) Profiles of observed structures.

A representative AFM image in Figure 22 A shows that the VLY entities are mainly organised in the full ring and half-ring shapes. Figure 22 B displays enlarged images of these species, while Figure 22 C shows the cross-sectional profile of the upper pore shown in Figure 22 B. The outer diameter of the protein complex is about 58 nm, and the inner diameter is $\sim 22\ \text{nm}$. This goes in line with observed dimensions of reconstituted VLY rings in tBLMs fused on the gold substrate [222].

In Figure 22 A, we calculated 11 VLY entities identified as protein complexes, distributed in $4\ \mu\text{m}^2$. That gives the defect density value N_{def} of $2.75\ \mu\text{m}^{-2}$ which is slightly higher when compared to the N_{def} defined by EIS ($1.8\ \mu\text{m}^{-2}$). The discrepancy does not look drastic given vastly different surface areas interrogated by EIS (millimetres, $16\ \text{mm}^2$) and AFM (micrometres, $4\ \mu\text{m}^2$) techniques. At the same time, one may not exclude the possibility that not all entities visualised by the AFM, specifically the incomplete rings and linear species, provide significant conductivity to be detected by the EIS methodology.

After evaluating the liposomes of tBLM models formed on 3M1P:WC14 (80:20 %) mixed SAM by pouring DOPC:Chol (50:50 %), we aimed to analyse the influence of other backfillers on tBLM functionality. In these experiments (same with analysis in Figure 1832 pav), we reduced the cholesterol content in the liposomes to 40 %. The formed tBLMs were closer to the composition of the natural membranes. Still, the amount remained sufficient for CDC incorporation.

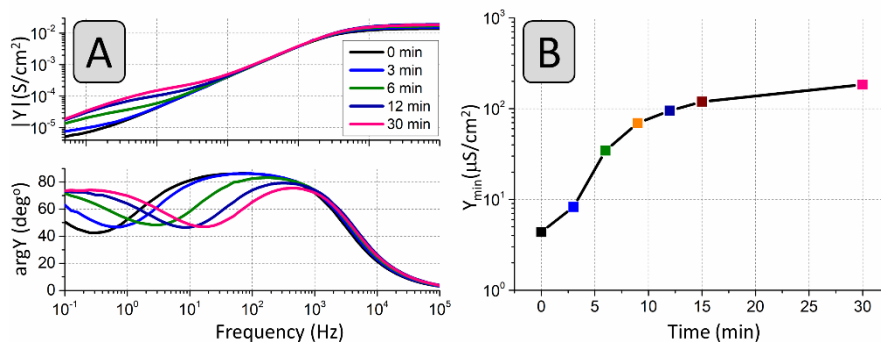


Figure 23. (A) EIS spectral transformations of tBLMs upon exposure to VLY on time (initial, 3 min, 6 min, 9 min, 30 min). Admittance modulus (upper panel) and phase (lower panel) (Bode) plots. (B) admittance values at phase minimum (f_{min}) point as a function of time. 2nM VLY kinetics on tBLM were formed on mixed WC14:3M1P SAM and completed with DOPC:Chol (in molar ratio 60:40) phospholipid mixture.

Figure 23 displays EIS Bode plots of the tBLMs after interaction with 2 nM of VLY depending on incubation time. The step-like feature in the admittance modulus curve dropped down after interaction with VLY, signalling an increase in the conductance of tBLMs (Figure 23 (upper panel)). During the 30 min incubation, the value of admittance modulus in the f_{min} point increased nearly two-fold. Additionally, on an admittance phase vs frequency plot, minima developed, which shifted towards a high-frequency edge as the incubation time of VLY increased (Figure 23 (lower panel)). The continuous phase shift in EIS spectra attests to the increasing damage of tBLMs by the pore-forming toxin with time, as observed in tBLMs assembled on gold supports [101].

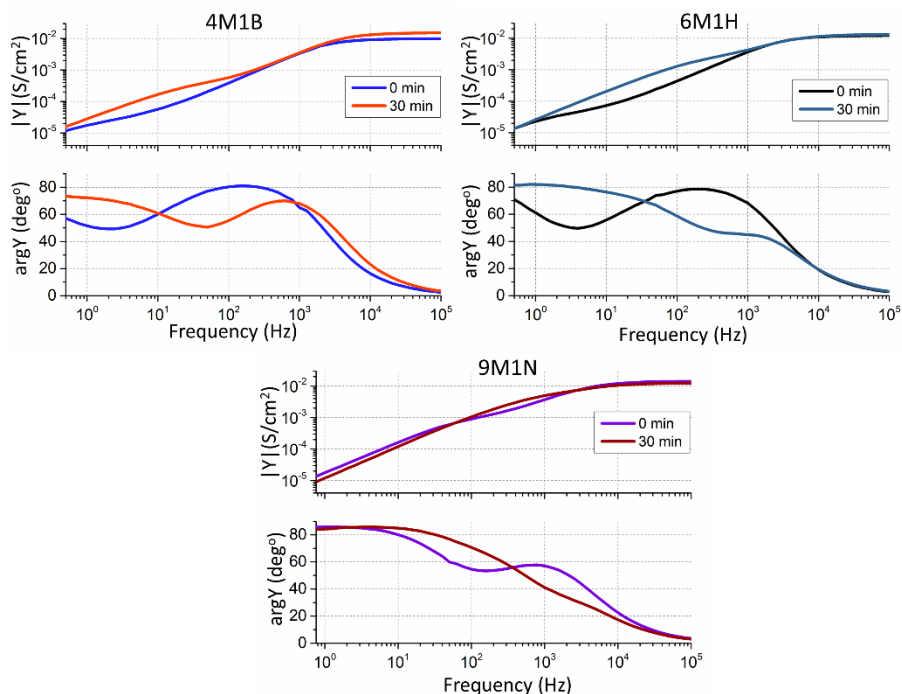


Figure 24. tBLM models on mixed (80:20 %) SAM with 4M1B, 6M1H, 9M1N.

Despite the inferior initial electrical properties of tBLMs on SAMs composed using longer backfillers (4M1B, 6M1H, and 9M1N), the impact of VLY was still clearly visible in spectral changes (Figure 24). Such data suggest that despite significantly higher defectiveness of tBLM, the sensitivity to pore-forming proteins can still be observed for tBLMs assembled using longer chain backfillers.

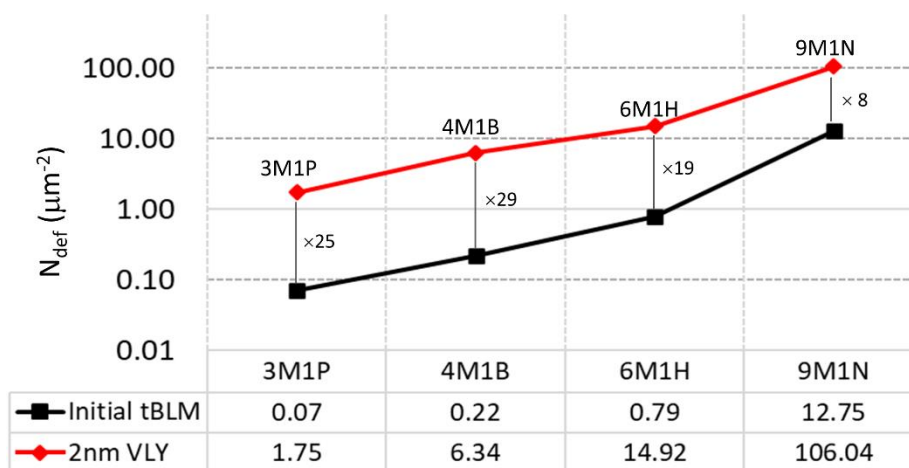


Figure 25. Comparison of initial membrane N_{def} values with N_{def} values after exposure of membranes to 2 nM bacterial toxin VLY using different short-chain compounds in mixed SAM.

In Figure 25, we compared the N_{def} values of the initial membranes with the N_{def} values of the membranes exposed to 2 nM bacterial toxin VLY.

The data obtained show that the extent of tBLM damage induced by VLY using shorter surface diluents 3M1P and 4M1B is similar. In these two cases, the N_{def} values of the initial membranes were 25-29-fold lower than the N_{def} values after tBLM interaction with VLY. As the surface diluent molecules elongated, the change was more minor – 19-fold for 6M1H and 8-fold for systems with 9M1N. First of all, such results confirm that despite the high number of initial defects in natural membranes, VLY-induced defects are also detected in all cases analysed. The minor change in defect amount with longer 9M1N molecules is likely explained by the resulting physical constraints on the forming new defects in significantly lower quality membranes than other surface diluents. Such data suggest that using 3M1P and 4M1B in mixed SAMs results in larger-scale tBLM damage, indicating a higher system sensitivity than tBLMs formed on 6M1H and 9M1N-containing SAMs.

As in the case of natural defects, the nature of the distribution of VLY-induced defects can also be assessed using the ζ parameter and the clustering identification graph generated by mathematical modelling (Figure 26).

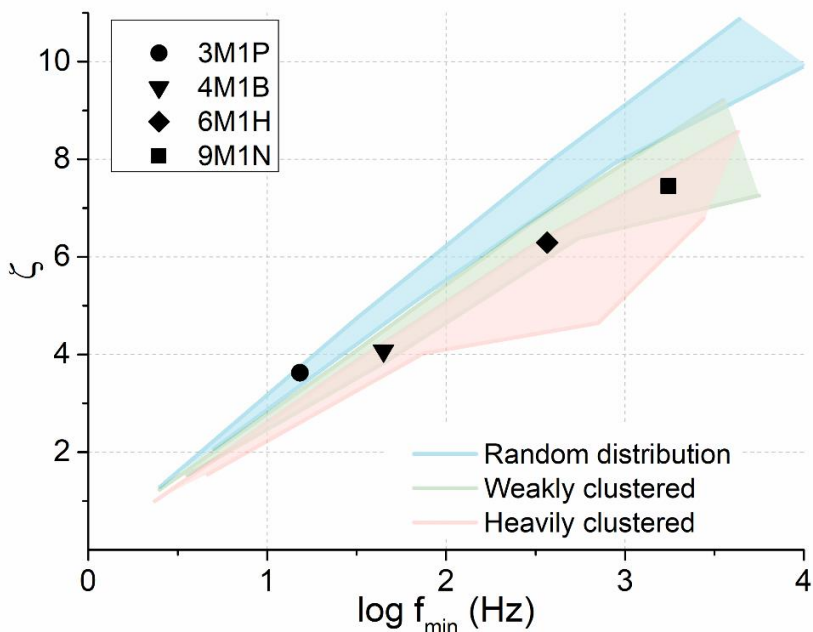


Figure 26. Schedule for identification of possible defect clustering. Zeta (ζ) parameter calculated from characteristic points in the EIS spectra. The defect radius varies from $r_{def} 0.5$ nm at the top of each coloured zone to 25.5 nm at the bottom. Different black symbols indicate the ζ parameter calculated from the experimental EIS spectra for each surface diluent.

By subtracting the values of the experimental spectra ζ , we can assess whether the defects caused by VLY are evenly heterogeneously distributed in the membrane or clustered (Figure 26). In the case of 3M1P $\zeta_{3M1P} \approx 1.6$, at $\log f_{min} = 1.2$ (black circle) and falls within the range of random distribution and small to medium defect size. In the case of 4M1B $\zeta_{4M1B} \approx 1.8$, at $\log f_{min} = 1.7$ (black triangle), it falls within the boundaries of weak and strong clustering zones. In this case, a weak clustering of large defects or a strong clustering of smaller defects can be assumed. Upon exposure of VLY to 6M1H-containing SAM-formed membranes, we observed a higher tBLM defect, and $\zeta_{6M1H} \approx 2.7$ at $\log f_{min} = 2.5$ (black diamond), as well as 4M1B, it falls within the boundaries of weak and strong clustering zones. In the case of 9M1N $\zeta_{9M1N} \approx 3.2$, at $\log f_{min} = 3.2$ (black square), the parameter's position remains at the top of the pink (strong clustering of minor defects) zone. VLY reconstitution studies use a fixed concentration of toxin and an identical composition of tBLM for each different short-chain SAM molecule, so, naturally, the size of VLY defects does not change significantly. The

heterogeneous distribution of VLY defects correlates with AFM-derived images. An increase in the scale of clustering is observed when 3M1P is changed to 4M1B. Clustering remains similar for longer (6M1H, 9M1N) diluents. Higher defect clustering may be due to the decreased submembrane reservoir in the case of longer diluents and increasing primary membrane defect. The lesions in the initial tBLMs potentially reduced the area of membranes suitable for VLY insertion, causing the protein-forming pores to converge closer to each other (increased pore density per tBLM area unit) and possibly cluster. VLY tends to cluster in other, similar tBLM systems [190,218].

More even distribution of VLY-induced defects is observed in the tBLM system with 3M1P, which suggests a better reproducibility of the results, which would be a significant advantage in analytical biosensor systems compared to other surface diluents studied. Nevertheless, the experimental data obtained confirm that all the short-chain compounds studied can be applied to construct biologically functional tBLM models suitable for detecting and analysing membrane-interacting proteins. Although higher initial membrane defects were observed with longer surface diluents, which may have led to higher VLY cluster formation, the data suggest that a more accurate selection of the percentages of initial mixed SAM solutions could increase the amount of WC14 anchor on the surface. This would theoretically allow the formation of better quality starting membranes, with all the surface diluents studied, suitable for biochemical-analytical applications.

CONCLUSIONS

1. The prepared and characterised SERS substrates are suitable for studying biomolecules adsorbed on silver.
2. It has been found that the use of longer backfillers for the formation of mixed self-assembled monolayers (SAMs) results in an increasing orderliness of the monolayers and a more vertical orientation of the WC14 anchor concerning the surface.
3. The surface contact angle method shows that by maintaining a constant concentration of SAM-forming organic compounds in solutions, the ratio of WC14 to surface diluents on the silver surface is determined by the length of diluent molecules: as the backfiller length increases, the molecular affinity for the silver surface increases and the amount of WC14 anchor on the surface decreases.
4. The EIS method has shown that all selected mixed SAMs are suitable for forming lipid bilayers (tBLMs), but as the length of the surface diluent molecules increases, the defectiveness of the initial tBLMs increases.
5. The functionality of the formed tBLMs was demonstrated by EIS by determining the incorporation of the pore-forming toxin VLY into the membrane. tBLM has been shown to retain functionality regardless of the molecular length of the SAM surface diluent.
6. Analysis of EIS data using mathematical models showed that shorter-chain backfillers 3M1P and 4M1B are most suitable for the formation of tBLM on silver because they ensure system stability and even distribution of VLY defects in the membrane.

PADĖKA

Visų pirma dėkoju savo šeimai ir artimiausiems draugams už nuolatinį palaikymą, išklausymą, supratimą ir pagalbą. Ruošiant disertaciją, man tai buvo labai svarbu.

Noriu padėkoti visiems kolegoms, partneriams ir mokslininkams, su kuriais man teko garbė susitikti ir bendradarbiauti. Visa tai vienaip ar kitaip prisidėjo prie disertacijos rengimo.

Už reikšmingiausią akademinį bendradarbiavimą dėkoju:

- **Dr. Martynui Talaikiui** – už pagalbą įsisavinant naujus spektroskopinius metodus, labai vertingas diskusijas, įžvalgas ir gerą nuotaiką.
- **Dr. Tadui Penkauskui** – už kantrybę ir pagalbą įsisavinant elektrocheminius metodus, nuolatinį bendradarbiavimą ir motyvaciją sunkiausiu metu.
- **Dr. Marijai Jankunec** už AFM vaizdus ir vertingas diskusijas apie jų interpretavimą.
- **Prof. David J. Vanderah** už WC14 inkarinį junginį.
- **Dr. Mildai Plečkaitytei** ir VU GMC Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriui už Vaginoliziną.

Esu labai dėkinga savo darbo vadovui **prof. Gintarui Valinčiui**, už nuolatinį pasitikėjimą, optimizmą, motyvaciją, pagarbą ir konstruktyvią kritiką.

Ačiū visiems kolegoms iš **Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos** skyriaus. Jūsų patarimai, idėjos ir draugiška aplinka motyvavo kiekvieną dieną.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijų sąrašas disertacijos tema:

1. **Aleknavičienė I**, Pabrėža E, Talaikis M, Jankunec M, Račiukaitis G. Low-cost SERS substrate featuring laser-ablated amorphous nanostructure. *Appl Surf Sci.* 2022;151248. doi: 10.1016/j.apsusc.2021.151248;
2. **Aleknavičienė I**, Jankunec M, Penkauskas T, Valincius G. Electrochemical properties of tethered lipid bilayers on thin film silver substrates. *Electrochim Acta.* 2021;389:138726. doi: 10.1016/j.electacta.2021.138726;
3. **Aleknavičienė I**, Talaikis M, Budvytyte R, Valincius G. The Impact of an Anchoring Layer on the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes on Silver Substrates. *Molecules.* 2021;26(22):6878. doi: 10.3390/molecules26226878.

Pranešimai konferencijose:

1. Stendinis pranešimas „ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION ON NOVEL SERS ACTIVE BIOSENSOR“. The 2nd plenary ARBRE-MOBIEU meeting. Varšuva, Lenkija. 2018/03 19-21 d. **Geriausio pranešimo apdovanojimas.**
2. Stendinis pranešimas „ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION ON NOVEL SERS ACTIVE BIOSENSOR“. Open Readings. Vilnius, Lietuva. 2018/03-22.
3. Stendinis pranešimas „ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION ON NOVEL SERS ACTIVE BIOSENSOR“. Biosensors 2018. 28th Anniversary World Congress on Biosensors. Miami (Florida), JAV. 2018/06 12-15.
4. Stendinis pranešimas „ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION ON NOVEL SERS ACTIVE BIOSENSOR“. Gordon Research Conference on Biointerface Science. Lucca (Barga), Italija. 2018/06 17-22.

5. Žodinis pranešimas „EIS AND SERS ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION“. The 3rd plenary ARBRE-MOBIEU meeting. Zagrebas, Kroatija. 2019/03 18-20 d.
6. Stendinis pranešimas „EIS AND SERS ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION“. XXV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Limerikas, Airija. 2019/05 26-30.
7. Stendinis pranešimas „EIS AND SERS ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION“. Joint 12th EBSA European Biophysics Congress / 10th IUPAP International Conference on Biological Physics (ICBP). Madridas, Ispanija. 2019/06 20-24.
8. Stendinis pranešimas „EIS AND SERS ANALYSIS OF ANCHOR MOLECULES FOR TETHERED BILAYER LIPID MEMBRANE FORMATION“. The 4th plenary ARBRE-MOBIEU meeting. Praha, Čekija. 2020/02 24-26 d.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 12 egz.