

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

IEVA BALEVIČIŪTĖ

DAUGIASLUOKSNIŲ NANODARINIŲ BIOJUTIKLIAMS SPEKTROSKOPINĖ
ELIPSOMETRIJA

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai , Chemija (03 P)

Vilnius, 2014

Disertacija parengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universitete, Chemijos fakultete.

Mokslinis vadovas :

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

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Chemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

Prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Nariai:

Prof. habil. dr. Steponas Ašmontas (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, fizika – 02P)

Prof. habil. dr. Zineb Mekhalif (Namiuro universitetas, Belgija, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

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

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

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 m. spalio mėn. 3 d. 12 val. Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko g. 24, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. rugsėjo mėn. 3 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose.

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

IEVA BALEVIČIŪTĖ

SPECTROSCOPIC ELLIPSOMETRY OF MULTILAYER NANOSTRUCTURES
USED IN BIOSENSORS APPLICATIONS

Summary of doctoral dissertation

Physical sciences, Chemistry (03 P)

Vilnius, 2014

Doctoral dissertation was prepared at Vilnius University, Faculty of Chemistry from 2010 to 2014.

Scientific supervisor:

Prof. Dr. Habil. Arūnas Ramanavičius (Vilnius University, Physical sciences, Chemistry – 03P).

The Vilnius University Doctoral Dissertation Committee in Chemistry:

Chairman:

Prof. Dr. Habil. Aivaras Kareiva (Vilnius University, Physical sciences, Chemistry – 03P)

Members:

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

Prof. Dr. Habil. Steponas Ašmontas (Centre for Physical Sciences and Technology, Physical sciences, Physics – 02P)

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

The doctoral dissertation will be defended at the public meeting of Council of Scientific Field of Chemistry at 12 a.m. on October 3, 2014 in the Inorganic Chemistry lecture-hall, Faculty of Chemistry.

Address: Naugarduko str. 24, Vilnius, Lithuania.

The summary of doctoral dissertation has been mailed out on the 3^d of September, 2014. The doctoral dissertation is available for review at the libraries of Vilnius University and libraries of Centre for Physical Sciences and Technology.

Temos aktualumas

Elipsometrija tai metodas, kuriuo nustatomas atspindėtos šviesos poliarizacijos būsenos pokytis. Spektrinės elipsometrijos metodu galima atlikti poliarizacijos būsenos pokyčio matavimus plačiame elektromagnetinių bangų ruože nuo ultra violetinės iki regimosios šviesos. Tai leidžia tirti įvairių medžiagų optines savybes, draustinės juostos plotį bei struktūrą (kristalinė, amorfinė). Atliekant matavimus infraraudonųjų bangų ruože, galima rasti krūvio nešėjų koncentraciją, judrumą, girdelės vibracines modas. Dėl minėtų savybių šis metodas yra plačiai taikomas nustatant plonų sluoksnių arba daugiasluoksnių struktūrų, sudarytų iš III–V, II–VI puslaidininkių, metalų bei dielektrikų, optinius parametrus.

Ypatingai svarbi elipsometrijos metodo savybė yra ta, jog šviesai sklindant riboje tarp dviejų optiškai skirtingų medžiagų, išmatuojamas didžiausias poliarizacijos būsenų skirtumas. Būtent dėl šios priežasties elipsometrija gali būti naudojama jutikliuose, kuriuose matuojamos nanometrų storio biologinių medžiagų sluoksnių, suformuotų ant įvairių metalų paviršių, optinės savybės. Naudojant šį metodą įvairių biomolekulių tarpusavio sąveikos tyrimams yra pasiekiamas didelis jautrumas. Elipsometrija leidžia išmatuoti itin plonų sluoksnių storius (< 0.01 nm) ir nustatyti sąveiką tarp biomolekulių esant labai mažoms jų koncentracijoms (1ng/ml). Kadangi tai nekontaktinis metodas, jis neturi įtakos molekulių biologiniam aktyvumui.

Nustatant nanometrų storio biomolekulinių sluoksnių formavimosi proceso ypatumus realiame laike (*in-situ*), tinkamiausias yra spektrinės elipsometrijos metodas, sustiprintas paviršiaus plazmonų rezonansu. Šiam tikslui elipsometriją pirmą kartą 1984 m. panaudojo Muller ir Farmer [1]. Naudojant elipsometriją buvo išmatuoti elipsometrinių parametrų Δ ir Ψ spektrai, kai šviesos bangos ilgis kito nuo 410 nm iki 700 nm. Spektro matavimai šiame bangų ruože buvo atlikti per 3 s. Šiuolaikiniai spektriniai elipsometrai, tokie kaip J.A. Woollam Co. Spectroscopic ellipsometer M-2000, leidžia atlikti matavimus labai plačiame (193–1690 nm) bangų ruože, mažiau nei per 1s. Tokiu būdu pasiekiamas didelis matavimų tikslumas. Tai svarbu atliekant biomolekulių sąveikos procesų kinetikų tyrimus, t.y. nustatant tokių procesų kinetines konstantas. Tokiu būdu galima tiksliau charakterizuoti biologinį sluoksnį ne tik lūžio rodikliu ar storiu, bet ir sąveikos su analite ar neorganiniu sluoksniu parametrais. Elipsometrija yra netiesioginis matavimo metodas, nes nustačius elipsometrinius

parametrus, kurie dar vadinami elipsometriniais kampais Δ ir Ψ , registruojama tik atspindėtos šviesos bangos fazė ir amplitudė. Todėl vėliau reikia pritaikyti optinį modelį, kuris leistų nustatyti sluoksnio storį (d) ir lūžio rodiklį (n). Šie parametrai priklauso nuo sluoksnio formavimo sąlygų, tankio, molekulių orientacijos, klasterių morfologijos bei kitų daugiasluoksnių struktūrų formavimosi ypatumų [2]. Dažnai atskleidžiant optinius ir struktūrinius sluoksnių ypatumus yra sukuriamas unikalus optinis modelis, aprašantis elipsometrinių parametrų spektrines charakteristikas.

Vienas pagrindinių šios disertacijos uždavinių buvo išvystyti ir pritaikyti spektrinės elipsometrijos metodą įvairių baltymų tarpusavio sąveikoms tyrinėti. Tokie tyrimai leistų patobulinti optinių biologinių jutiklių kūrimo technologijas. Šiuo tikslu buvo iširta antikūnų, prieš galvijų leukemijos viruso (GLV) baltymą *gp51*, sąveika su GLV baltymu *gp51* (GLV-antigenu *gp51*) ir granuliocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GKSF-R) receptoriaus sąveika su šio faktoriaus monomeru (mGKSF) bei dimeru (dGKSF). Galvijų leukemijos virusas buvo pasirinktas dėl to, kad šio viruso antikūnai su antigenu sąveikauja panašiai, kaip ir leukemijos, kuria serga žmonės, antikūnai ir antigenai. Tai gali būti panaudota tyrinėjant onkologines ligas ir kuriant vakcinas prieš retrovirusus. GKSF-R receptoriaus sąveikos tyrimas su monomeru (mGKSF) ir dimeru (dGKSF) buvo pasirinktas tam, kad atskleistume, kaip spektrinės elipsometrijos metodas gali būti panaudotas tyrinėjant panašių molekulių (GKSF monomeras ir dimeras), turinčių skirtingas mases ir struktūrą, sąveiką. Tai labai svarbus uždavinys šiuolaikinių selektyvių biosensorių, naudojančių spektrinės elipsometrijos metodą ir paviršiaus plazmonų rezonanso efektą, kūrime.

Kitos rūšies optiniai biologiniai jutikliai, kurie buvo tiriami šiame darbe, yra paremti atspindėtos šviesos spalvos pokyčiu, specifinei biomolekulei sąveikaujant su tam tikros dielektrinės skvarbos sluoksniu [3,4]. Šiuose jutikliuose yra naudojami paviršiai, padengti sluoksniais, kuriuose įvyksta interferencijos reiškinys. Dėl ant sluoksnio paviršiaus vykstančios biomolekulių imobilizacijos susiformuoja papildomas monomolekulinis sluoksnis, kuris sukelia atsispindėjusios šviesos spalvos pokytį [5]. Siekiant sukurti efektyviai veikiančius biologinius jutiklius, sluoksnis, ant kurio yra nusodinami baltymai, turi atitikti tam tikras sąlygas, t.y. turi būti reikiamo storio ir lūžio rodiklio. Šiam tikslui įgyvendinti gali būti pritaikomos daugiasluoksnės struktūros (nanolaminatai), kurių bendrą storį ir efektyvinį lūžio rodiklį galima keisti naudojant

atominių sluoksnių nusodinimo (ASN) metodą. Kuriant tokius nanolaminatus, labai svarbu nustatyti atskirų sluoksnių, sudarančių nanolaminatą, ir visos sistemos optines konstantas. Todėl dar viena šio darbo užduotis buvo pritaikyti spektroskopinės elipsometrijos metodą $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų, pagamintų ASN metodu, optinių savybių tyrimui.

Darbo tikslai

Išvystyti ir pritaikyti spektroskopinės elipsometrijos metodą (1) daugiasluoksnių nanostruktūrų, skirtų galvijų leukemijos viruso (GLV) antigeno *gp51* aptikimui, (2) nanostruktūrų, sudarytų iš monomerinio ir dimerinio granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GKSF) bei jų receptoriaus ir (3) $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų, pagamintų atominių sluoksnių nusodinimo metodu, optinių savybių tyrimams:

1. Tiriant elipsometrinių parametrų Δ ir Ψ jautrumą biologiniuose jutikliuose, sudarytuose iš biologiškai aktyvių sluoksnių, nustatyti biomolekulių orientacijos skirtumus tarp sluoksnių, sudarytų iš imobilizuotų redukuotų („skaldytų“) antikūnų fragmentų ir nemodifikuotų („neskaldytų“) antikūnų prieš GLV antigeną.
2. Ištirti biologiškai aktyvių sluoksnių, sudarytų iš imobilizuotų „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną sąveikos su GLV antigenu *gp51* ir granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GKSF) receptoriaus imobilizuoto ant aukso paviršiaus, sąveikos su GKSF monomeru ir dimeru formavimosi kinetikas.
3. Pritaikant modelį, įskaitantį negrįžtamos imobilizacijos reiškinį, nustatyti monomolekulinių biologinių sluoksnių iš antikūnų prieš GLV antigeną ir GLV antigeno *gp51* bei GKSF ir jo receptoriaus formavimosi kinetines konstantas.
4. Nustatyti Al_2O_3 ir ZnO sluoksnių bei $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų, suformuotų naudojant atominių sluoksnių nusodinimo metodą, optines savybes ir ištirti galimybes šias struktūras panaudoti biologiniuose jutikliuose.

Darbo uždaviniai

1. Panaudojant spektroskopinę elipsometriją, sustiprintą paviršiaus plazmonų rezonansu (SESPR), nustatyti biomolekulių orientaciją, tiriant biologinius

- jutiklius, pagamintus iš biologiškai aktyvių monosluoksnių, sudarytų iš „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną *gp51*.
2. Palyginti elipsometrinių parametrų Δ ir Ψ jautrumą, nustatant kuris iš šių parametrų labiau tinkamas, siekiant įvertinti skirtumus tarp sluoksnių sudarytų iš „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną *gp51*.
 3. Panaudojant spektroskopinę elipsometriją, sustiprintą paviršiaus plazmonų rezonansu, ištirti sąveikos kinetikas tarp GLV antigeno *gp51* ir „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš šį antigeną.
 4. Įvertinti Δ ir Ψ parametrų jautrumą, vykstant įvairioms monomolekulinių biologinių sluoksnių formavimosi stadijoms, taip pat ištirti šių sluoksnių formavimosi kinetikas, panaudojant modelį, įskaitantį negrįžtamą analitės imobilizacijos reiškinį.
 5. Ištirti SESPPR galimybes, nustatyti sąveikos mechanizmus tarp GKSF receptoriaus, imobilizuoto ant aukso paviršiaus, ir GKSF monomero bei dimero realiame laike (*in-situ*).
 6. Ištirti galimybes taikant SESPPR nustatyti mažus skirtumus tarp GKSF monomero ir dimero sąveikos su GKSF receptoriumi asociacijos ir disociacijos trukmių.
 7. Panaudojant spektroskopinę elipsometriją nustatyti atskirų Al_2O_3 ir ZnO sluoksnių ir $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų optines konstantas, esant skirtingiems šių sluoksnių ir nanolaminatų storiams.

Darbo naujumas

1. Parodyta, jog elipsometrinio parametro Δ jautrumas, nustatytas esant visiško vidaus atspindžio sąlygoms, gali atskleisti biomolekulių orientacijos skirtumus tarp nanostruktūrų, suformuotų iš „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną *gp51*.
2. Pasiūlytas naujas, Δ ir Ψ parametrų netiesiškumus įvairiose sluoksnio formavimosi stadijose įskaitantis, vieno bangos ilgio elipsometrijos, sustiprintos paviršiaus plazmonų rezonansu, metodas, tinkamas antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* ir šio antigeno tarpusavio sąveikos kinetikoms tirti.

3. Parodyta, jog naudojant realaus laiko spektroskopinę elipsometriją, galima tyrinėti GKSF monomero ir dimero sąveiką su GKSF receptoriais ir šio metodo pagalba, nustatius lūžio rodiklio priklausomybę nuo šviesos bangos ilgio, aptikti labai mažus skirtumus tarp sąveikos kinetinių konstantų.
4. Nustatyta, jog auginant ZnO sluoksnius ZnO/Al₂O₃ nanolaminatais atominių sluoksnių nusodinimo metodu, Al nelegiravo ZnO sluoksniu, o difundavo į ZnO ir Al₂O₃ tarpsluoksniu ribą, sukurdamas defektus, kurie apsprendžia fotoluminescencijos draustinės juostos vertę, atitinkančią regimosios šviesos bangų ruožą. Draustinės juostos „mėlynasis poslinkis“ ir ZnO atskirų sluoksnių eksitoninės smailės ypatumai atsiranda dėl „kvantinio ribojimo“ reiškinio ZnO sluoksnyje.

Ginamieji teiginiai

1. Spektroskopinės elipsometrijos metodas leidžia atskleisti sluoksnių, susiformavusių sąveikaujant „skaldytiems“ ir „neskaldytiems“ antikūnams prieš galvijų leukemijos viruso antigeną su antigenu gp51, biomolekulių orientacijų skirtumus. Šiuo atveju elipsometrinio parametro Δ analitinis jautrumas yra 5,89 kartų didesnis už parametro Ψ jautrumą, kuris yra registruojamas paviršiaus plazmonų rezonanso metodu.
2. Elipsometrinis parametras Δ yra jautresnis nustatant baltymų monosluoksniu lūžio rodiklį šio sluoksniu formavimosi pradžioje, o parametras Ψ pasiekia didesnę jautrumą galinėje sluoksniu formavimosi stadijoje. „Skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų, prieš galvijų leukemijos viruso antigeną, imobilizacijos greitis yra artimas, o negrįžtamos imobilizacijos trukmė yra 25 kartus ilgesnė „neskaldytų“ antikūnų atveju. Tačiau „neskaldytiems“, nekryptingai orientuotiems, antikūnams sąveikaujant su antigenu gp51, ši trukmė yra 8 kartus ilgesnė nei antigenui sąveikaujant su skaldytais, kryptingai orientuotais antikūnais.
3. Vykstant granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus monomero ir dimero sąveikai su jo receptoriais, imobilizuotu ant Au sluoksniu paviršiaus, *in-situ* spektroskopinės elipsometrijos metodu, tiksliai nustatant lūžio rodiklio dispersiją ir įskaitant netiesinę optinio atsako signalo priklausomybę nuo sluoksniu lūžio

rodiklio, galima išskirti mažus skirtumus tarp biomolekulių asociacijos ir disociacijos trukmių.

4. ZnO/Al₂O₃ nanolaminatų, užaugintų naudojant atominių sluoksnių nusodinimo metodą, kuriuose atskirų sluoksnių storis buvo ne mažesnis negu 10 nm, optinės savybės yra gerai aprašomos, kai ZnO sluoksniai yra charakterizuojami vienu Psemi-MO ir dviem Gauso osciliatoriais, o Al₂O₃ sluoksnių lūžio rodiklio priklausomybė nuo šviesos bangos ilgio–Cauchy dispersijos funkcija. ZnO/Al₂O₃ nanolaminatų, kurių atskirų sluoksnių storis yra 2 nm, optinėms savybėms aprašyti gerai tinka Briugemano efektyviosios terpės artinys.

Disertacijos sandara.

Disertacija parašyta anglų kalba, ją sudaro: įvadas, metodinė dalis, rezultatų apibendrinimas, išvados, cituojamų literatūros šaltinių sąrašas, su disertacija susijusių mokslinių darbų sąrašas, santrumpas ir santrauka lietuvių kalba.

Įvadas

Įvade parodytas disertacinio darbo aktualumas, pabrėžiant elipsometrijos metodo privalumus tiriant nanometrinių sluoksnių optines savybes. Pažymima, jog spektroskopinė elipsometrija yra efektyvus būdas biologinių jutiklių kūrimui ir baltymų sąveikos kinetikų tyrimui. Pateikiami disertacinio darbo tyrimų objektai, t.y. antikūnai prieš galvijų leukemijos virusą ir šio viruso antigenai, granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus monomerai ir dimerai bei šio faktoriaus receptoriai ir nanolaminatai iš ZnO/Al₂O₃ sluoksnių.

1. Literatūros apžvalga

Literatūros apžvalgoje pateikiami pagrindiniai elipsometrijos metodo principai ir disertacijoje tirtų medžiagų savybės. Poskyryje 1.1 yra aprašomas elipsometrijos metodas, apžvelgiama poliarizuotos šviesos sąvoka, poliarizacijos būsenos, o poskyryje 1.2 – optinių modelių kūrimas ir jų taikymas elipsometrinių matavimų aprašymui, nustatant sluoksnio storį ir lūžio rodiklį. Pateikiamos įvairios funkcijos (Cauchy, Lorenzo ir Drudes), skirtos charakterizuoti skirtingus plonus sluoksnius. Poskyryje 1.3

apžvelgiami dielektrinės funkcijos artiniai, naudojami charakterizuoti įvairias daugiasluoksnes struktūras: tiesinis, Lorentz-Lorenz, Maksvelo-Garneto bei Brugemano efektyvios terpės artiniai. 1.4 poskyryje aprašomas paviršiaus plazmonų rezonanso reiškinys, o 1.5 – matematiniai modeliai, skirti biologinių sluoksnių augimo kinetikų analizei, t.y. standartinė ir apibendrinta Langmuir lygtys. Poskyriai 1.6, 1.7 ir 1.8 skirti galvijų leukemijos viruso savybėms ir jo aptikimo metodams, granulocitų kolonijas stimuliuojančiam faktoriui ir nanolaminatų panaudojimo biologiniuose jutikliuose aprašymui.

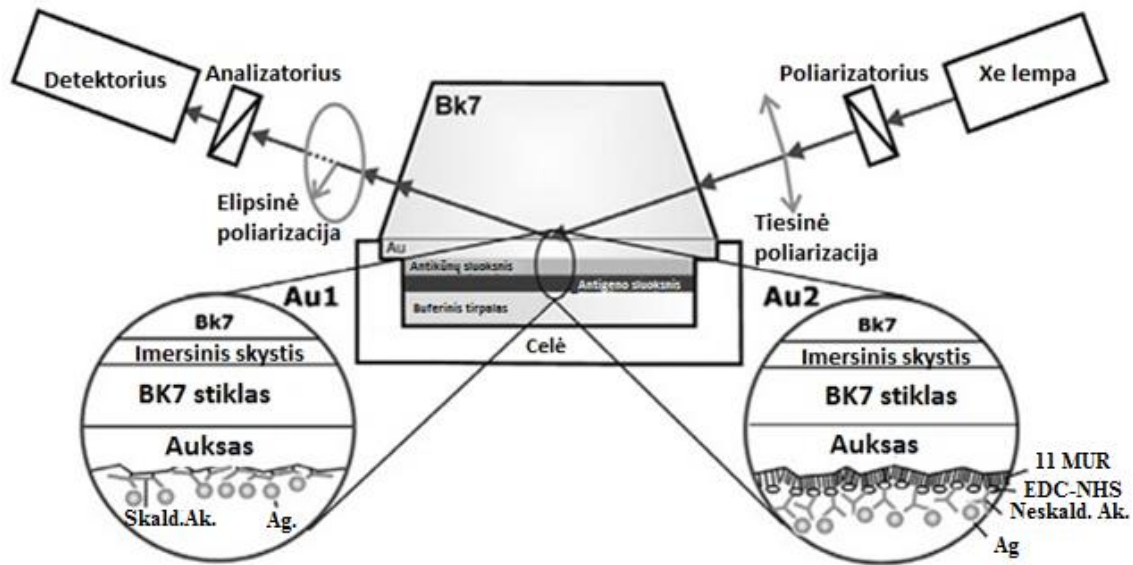
2. Metodika

Šiame skyriuje aprašyti disertacinio darbo metu naudoti metodai, bandinių paruošimo technologijos.

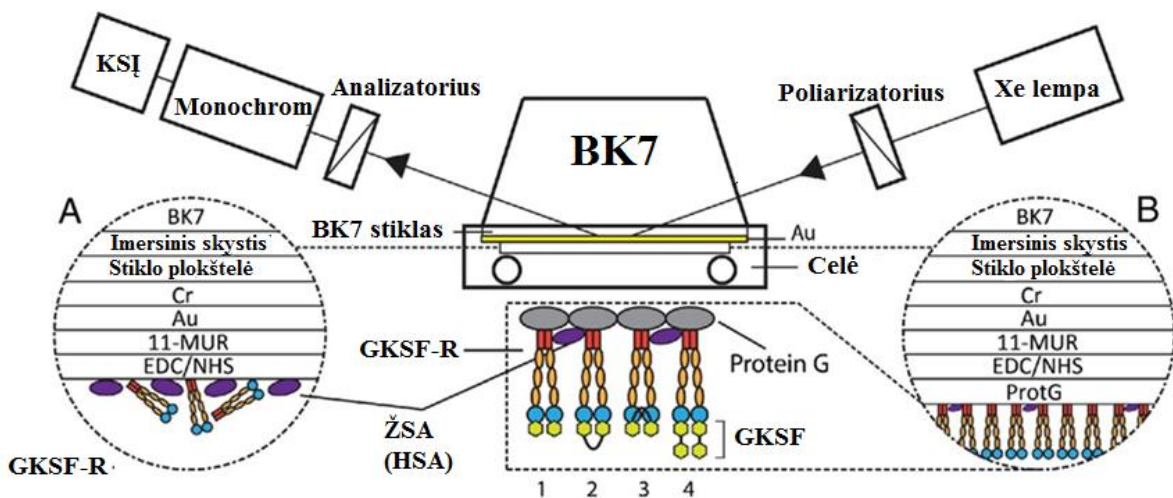
2.1 poskyris skirtas galvijų leukemijos virusui aptikti skirto sensoriaus formavimo technologijoms: antikūnų imobilizacijai ant aukso paviršiaus, naudojant amonio sulfatą ir antikūnų skaldymai naudojant merkaptetanolį, o 2.2 poskyryje aprašoma sluoksnių iš granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus monomero ir dimero bei jų receptoriaus formavimo eiga. 2.3 poskyryje pateikta $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų sluoksnių gamybos technologija, naudojant atominių sluoksnių nusodinimo metodą.

2.4 poskyryje aprašomos disertaciniame darbe naudotos matavimo metodikos: atominių jėgų mikroskopija, įvairių tipų elipsometrai, baltymų imobilizavimo kinetikų tyrimo celė, pateiktos rentgeno spindulių difrakcijos matavimo sąlygos. Spektroskopinės elipsometrijos įtaiso, naudoto antikūnų prieš galvijų leukemijos virusą ir šio viruso antigenų sąveikos tyrimams, vaizdas pateiktas 1 pav., o 2 pav. – elipsometrinių matavimų schema, panaudota granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GKSF) sąveikoms su jo receptoriumi tirti.

Bandinių charakterizavimas pateiktas 2.5 poskyryje, jame aprašyta atominių jėgų mikroskopijos būdu nustatyta aukso sluoksnių bei $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų paviršiaus morfologija, įvertintas paviršiaus nelygumas. Rentgeno spindulių energijos dispersijos (angl.EDX) ir mažo kampo rentgeno spindulių difrakcijos (angl.GIXRD) metodikomis nustatyta nanolaminatų cheminė sudėtis. Toliau (2.6 poskyryje) aprašyta aukso lustų modifikavimo antikūnų fragmentais, savitvarkių monosluoksnių (SAM) formavimo ir



1 pav. Spektroskopinės elipsometrijos matavimų schema, kurioje panaudotas Sopra GES5 elipsometras, skirta tirti GLV antikūnų ir antigenų sąveikoms.



2 pav. Spektroskopinės elipsometrijos matavimų schema, kurioje panaudotas Wollam M2000X elipsometras, skirta tirti GKS F sąveikoms su jo receptoriais.

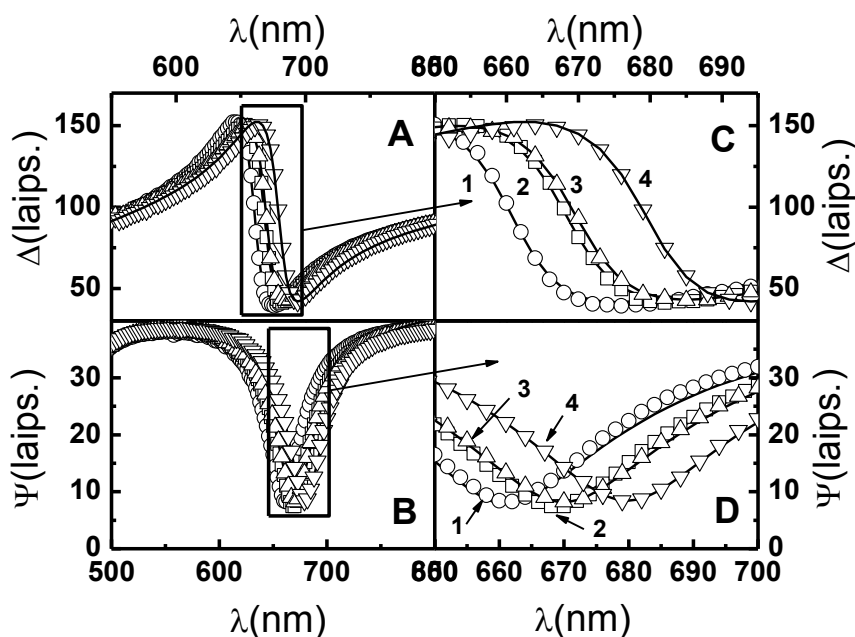
„neskaldytų“ antikūnų kovalentinio imobilizavimo ant SAM technologija bei nanolaminatų sluoksnių tyrimas ir jų storio įvertinimas.

3. Tyrimų rezultatai

Šis skyrius sudarytas iš keturių dalių: (3.1) imunojutiklio iš „skaldytų“, kryptingai orientuotų ir „neskaldytų“, nekryptingai orientuotų, antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* pagrindu tyrimo, (3.2) antikūnų prieš GLV antigeną ir GLV antigeno *gp51* sąveikos kinetikos tyrimas visiško vidaus atspindžio elipsometrijos metodu (VVAE), (3.3) granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus *in-situ* sąveikos su jo receptoriumi tyrimas VVAE metodu ir (3.4) Al_2O_3/ZnO nanolaminatų, pagamintų atominių sluoksnių nusodinimo (ASN) metodu, optinių savybių tyrimas.

3.1 Imunojutiklio iš „skaldytų“, kryptingai orientuotų ir „neskaldytų“, nekryptingai orientuotų, antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* tyrimas [1*]

GLV antigeno *gp51* jutiklio pagrindas buvo daugiasluoksnė struktūra, sudaryta iš gryno aukso sluoksnio, sluoksnio modifikuoto 11-merkaptoundekanoine rūgštimi (11-MUR), sluoksnio suformuoto po grupių aktyvavimo 1-Etil-3-(3-dimetil hilaminopropil)



3 pav. Elipsometrinių parametrų $\Delta(\lambda)$ (A) ir $\Psi(\lambda)$ (B) spektrai: bandinys Au2. 1 – gryno aukso sluoksnis; 2 – aukso sluoksnis, modifikuotas 11-MUR; 3 – (2) sluoksnis po grupių aktyvavimo EHDK/NHS; 4 – sluoksnis (3) modifikuotas „neskaldytais“ antikūnais. Paveikslas (C) padidinta (A) paveikslo dalis; paveikslas (D) padidinta (B) paveikslo dalis, pažymėta stačiakampiu.

Karbodimidinu ir *N*-Hydroksisusimidinu (EHDK/NHS) ir sluoksnio, modifikuoto „neskaldytai“, nekryptingai orientuotais antikūnais. Tyrimai buvo atlikti visiško vidaus atspindžio elipsometrijos (VVAE) metodu 661-670 nm bangos ilgių (λ) ruože. Taikant daugiasluoksnį modelį, aprašantį elipsometrinių parametrų priklausomybę nuo šviesos bangos ilgio (dispersiją) ir įskaitant aukso sluoksnio paviršiaus nelygumą, buvo nustatytas atskirų monosluoksnių storis. 3-ame paveiksle parodytas eksperimento (taškai) ir modelio (linija) atitikimas. Lūžio rodiklio dispersija, apskaičiuota naudojant efektyvios terpės artinį [6].

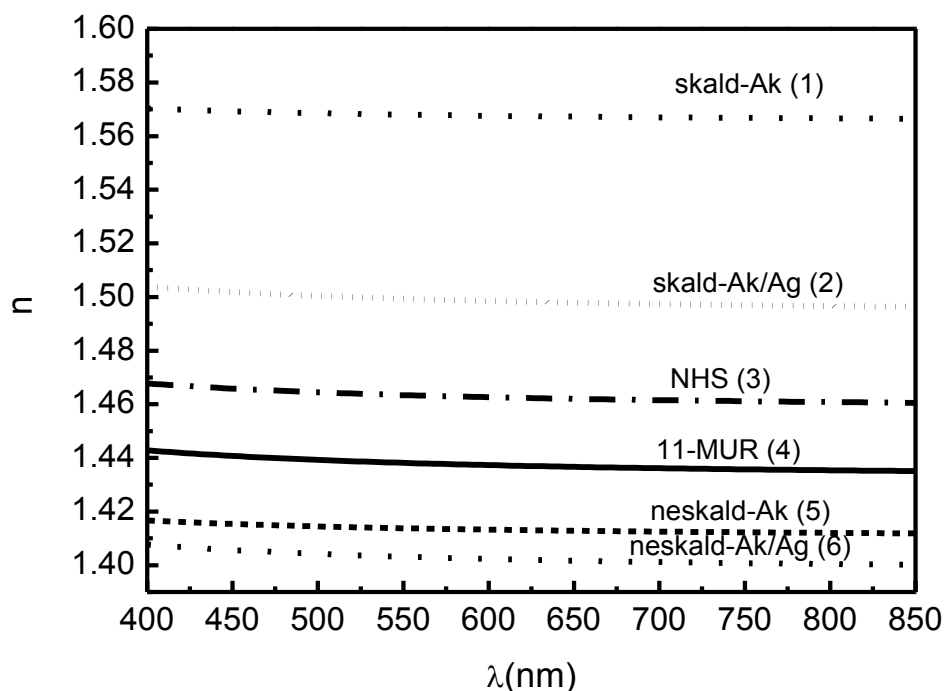
3.1.1. Sluoksnio, suformuoto iš „skaldytų“ GLV antikūnų prieš GLV antigeną, tyrimas

Atvirkštinio uždavinio sprendimas parodė, kad optinis modelis geriausiai atitinka eksperimentą, kai antikūnų prieš GLV antigeną sluoksnio storis yra artimas „skaldytų“ antikūnų vienai iš dimensijų ($d = 4$ nm). Visiems organiniams sluoksniams aprašyti buvo taikoma Cauchy dispersijos funkcija [7]. Buvo gauta, kad paviršinis „skaldytų“ antikūnų masės tankis yra $0.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Tai parodė, jog „skaldyti“ antikūnai prieš GLV antigeną padengia 98% jutiklio paviršiaus. Parametrų Δ (λ) ir Ψ (λ) jautrumo sluoksnio lūžio rodiklio (n) ir storio (d) pokyčiams įvertinimas parodė, jog parametras Δ (λ) yra 5.89 jautresnis nei parametras Ψ (λ).

3.1.2. Sluoksnio iš „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną tyrimas

Sluoksnis iš „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną buvo suformuotas ant savitvarkio 11-MUR monosluoksnio po grupių aktyvavimo EHDK/NHS. Iš eksperimento ir modeliavimo buvo nustatyta, jog paviršinė „neskaldytų“ antikūnų koncentracija yra lygi $0.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Lūžio rodiklio dispersijos tyrimas ($A = 1.494$, $B = 1.550 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$) parodė, kad gautos šio rodiklio vertės buvo mažos (4 pav., 5 kreivė) lyginant jas su vertėmis, gautomis naudojant „skaldytus“ antikūnus (4 pav., 2 kreivė). Atliekant atvirkštinio uždavinio sprendimą, „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną sluoksnio storis buvo fiksuotas parametras ir pasirenkamas kaip visų dimensijų vidurkis (9 nm) [8]. Paskutiniame tyrimo etape buvo iširtos „neskaldytų“, nekryptingai imobilizuotų, antikūnų prieš GLV antigeną ir jų sąveikos su antigenu *gp51* optinės savybės. Antigeno sluoksnio storis buvo vienodas „skaldytų“, kryptingai imobilizuotų ir „neskaldytų“, nekryptingai imobilizuotų antikūnų atveju ($d = 3.5$ nm). Cauchy

dispersijos funkcijos parametrai antigeno sluoksniui buvo $A = 1.395$, $B = 1.552 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ (4 pav., 6 kreivė). Atvirkštinio uždavinio sprendimas parodė, kad sąveika su antigenu, „skaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną (paviršinis tankis $0.115 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) atveju buvo 2.5 didesnė nei „neskaldytų“ antikūnų (paviršinis tankis $0.047 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).



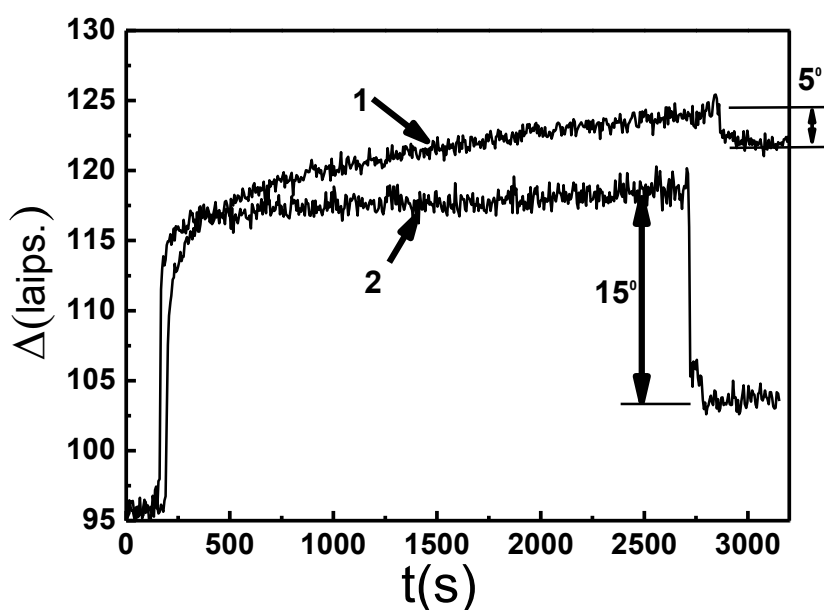
4 pav. Lūžio rodiklio priklausomybė nuo šviesos bangos ilgio (dispersija), nustatyta taikant daugiasluoksnį modelį. (1)–Au sluoksnis, modifikuotas „skaldytais“ antikūnais; (2)–sluoksnis (1), modifikuotas GLV antigenu; (3)–Au sluoksnis, modifikuotas 11-MUR po grupių aktyvavimo EHDK/NHS; (4)–Au sluoksnis, modifikuotas 11-MUR; (5) – (4) sluoksnis po kovalentinio „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV imobilizavimo; (6)–„neskaldytų“ antikūnų prieš GLV sluoksnis po sąveikos su GLV antigenu gp51.

Buvo padaryta išvada, kad tai galėjo lemti nekryptinga „neskaldytų“ antikūnų imobilizacija ant paviršiaus. Atlikti eksperimentai parodė, kad „skaldyti“, kryptingai ant aukso paviršiaus imobilizuoti, antikūnai prieš GLV sąveikauja su GLV antigeno gp51 sluoksniu efektyviau negu „neskaldyti“ nekryptingai imobilizuoti antikūnai prieš GLV antigeną.

3.1.3. Sąveikos tarp antikūnų prieš GLV antigeną gp51 ir antigeno gp51 kinetikų tyrimas

Šiame poskyryje aprašyti „skaldytų“, kryptingai imobilizuotų ir „neskaldytų“, nekryptingai imobilizuotų antikūnų prieš GLV antigeną gp51 sąveikos su antigenu gp51

kinetikų tyrimai. Kinetikų matavimai buvo atlikti esant fiksuotam šviesos bangos ilgiui ($\lambda=670$ nm), bei didžiausiam elipsometrinių parametrų jautriui [9]. 5 pav. pateiktas parametro Δ kitimas laike. Po suformuoto sluoksnio iš *gp51* antigeno nuplovimo Δ signalas „skaldytų“ antikūnų sąveikos su antigenu *gp51* atveju buvo tris kartus didesnis negu „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* atveju (5 pav). Kinetikų tyrimai antikūno -antigeno komplekso formavimosi metu ir kinetinės konstantos, apskaičiuotos taikant Langmuir lygtį [10], parodė ryšį tarp antikūnų sluoksnių struktūros ir antigeno imobilizacijos efektyvumo.



5 pav. Sąveikos tarp kryptingai imobilizuotų „skaldytų“ antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* (1) ir nekryptingai imobilizuotų „neskaldytų“ šių antikūnų (2) su GLV antigenu *gp51* kinetikos, gautos tiriant elipsometrinio parametro Δ kitimą laike.

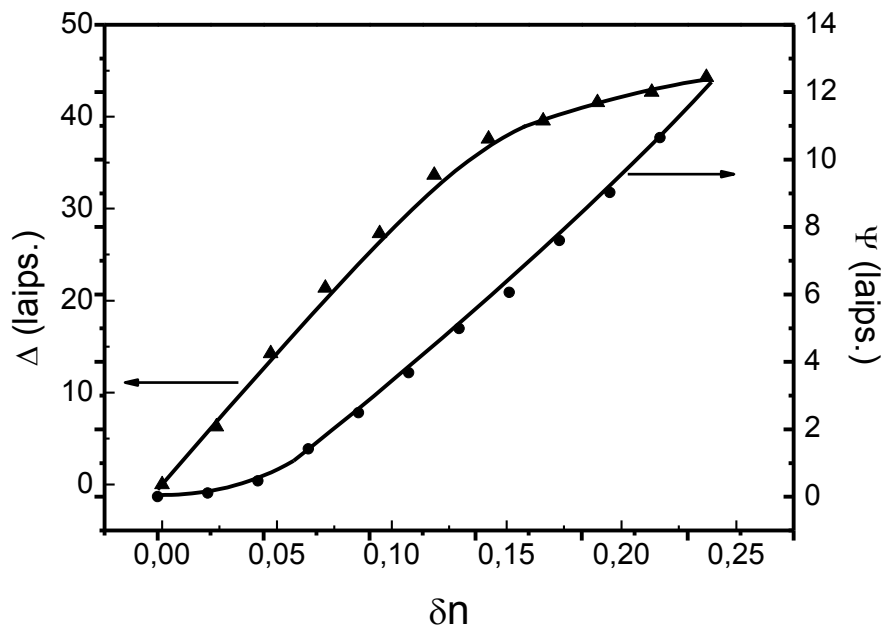
Elipsometrinių parametrų kinetika parodė, kad „skaldyti“, kryptingai ant aukso imobilizuoti antikūnai prieš GLV antigeną *gp51* sąveikauja su didesne antigeno paviršinė koncentracija nei „neskaldyti“, nekryptingai imobilizuoti antikūnai, o didelis šio metodo jautrumas ir daugiasluoksnis optinis modelis leidžia įvertinti antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* ir GLV antigeno *gp51* sluoksnių struktūrą. Naudojant VVAE metodą buvo patvirtinta, kad „skaldyti“ antikūnai prieš GLV antigeną *gp51* ant aukso paviršiaus yra imobilizuoti kryptingai. Elipsometrinio parametro Δ jautrumas yra ženkliai didesnis nei parametro Ψ , todėl Δ matavimu paremti biologiniai jutikliai yra jautresni nei jutikliai, kuriuose naudojamas paviršiaus plazmonų rezonansas.

3.2 Antikūnų prieš GLV antigeną ir GLV antigeno gp51 sąveikos kinetikų modeliavimas [2*]

Šiame poskyryje aprašytas „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV sąveikos su GLV antigenu gp51 kinetikų tyrimas ir modeliavimas naudojant modelį, įskaitantį negrįžtamos imobilizacijos reiškinį.

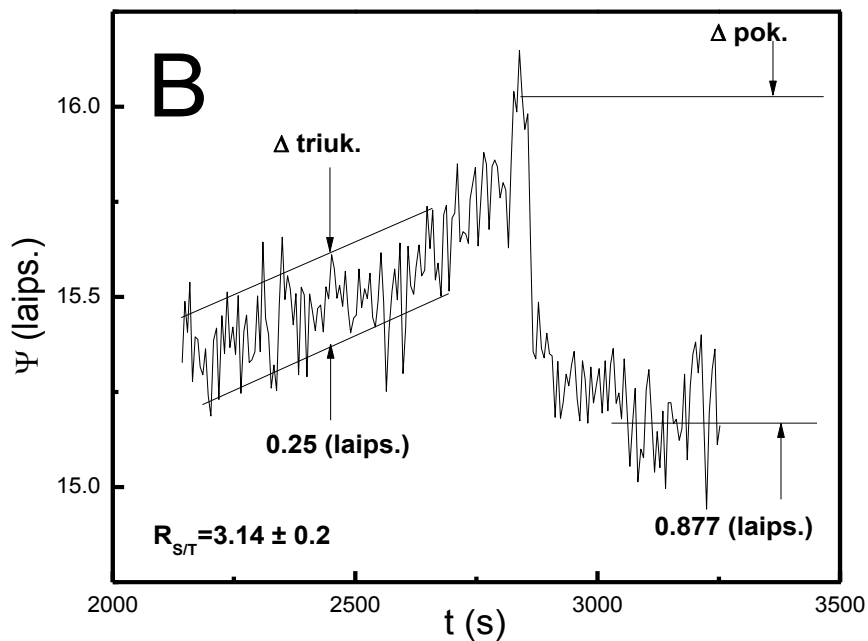
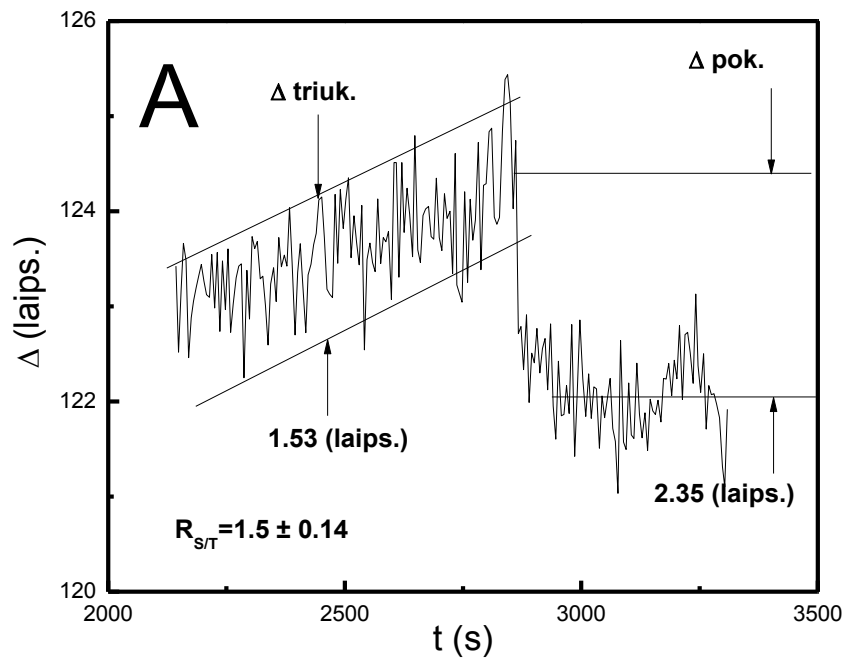
3.2.1 Sluoksnių lūžio rodiklio n priklausomybės nuo Ψ ir Δ netiesiškumo įvertinimas

Darant prielaidą, kad monosluoksniu, suformuoto iš antikūnų, storis proporcingas vidutiniam molekules dydžiui, o elipsometrinių parametrų rezonanso bangos ilgio poslinkis $\lambda_{R\Psi}$ ir $\lambda_{R\Delta}$ yra tiesiogiai proporcingas efektyvinio lūžio rodiklio (n_e) pokyčiui, buvo apskaičiuotos kalibracinės $\delta\Psi=f(\delta n_e)$ ir $\delta\Delta=f(\delta n_e)$ funkcijos (6 pav.). Čia $\delta\Psi$ ir $\delta\Delta$



6 pav. Kalibracinės elipsometrinių parametrų Δ ir Ψ priklausomybės nuo efektyvinio lūžio rodiklio pokyčio (δn).

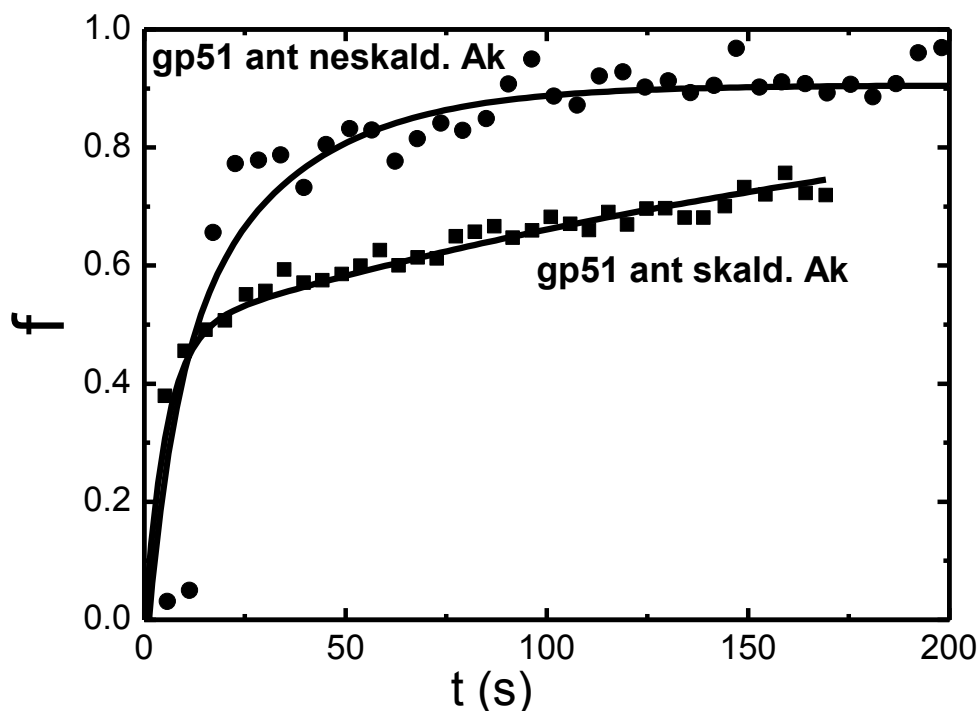
yra elipsometrinių parametrų pokyčiai sluoksniu formavimosi metu, o δn_e - pokytis tarp sluoksniu (n_e) ir buferio (n_b) lūžio rodiklių. Kaip matyti iš 6 pav. parametro Δ jautrumas yra didesnis pradinėje monosluoksniu formavimosi fazėje, tuo tarpu Ψ priklausomybė nuo δn sustiprėja esant didesnėms lūžio rodiklio pokyčio vėrtėms. Jautrumo santykis



7 pav. Sluoksni formavimosi paskutinės fazės ir „nuplovimo“ kinetikos. $\Delta(t)$ signalas vykstant antigeno gp51 sąveikai su „skaldytų“ antikūnų sluoksniu (A) ir $\Psi(t)$ signalas vykstant antigeno gp51 sąveikai su „skaldytų“ antikūnų sluoksniu (B). tarp elipsometrinių parametrų $S_{n\Delta}/S_{n\Psi}$ „skaldytų“ antikūnų monosluoksni formavimosi metu kito nuo 25,5 iki 0,726, tuo tarpu pilnas efektyvinio lūžio rodiklio n_e pokytis buvo

0,2375. Todėl išmatavus elipsometrinių parametrų spektrinių priklausomybių $\Psi=f(\lambda)$ ir $\Delta=f(\lambda)$ kitimą, formuojantis antigeno gp51 sluoksniui ant „skaldytų“, kryptingai orientuotų ir „neskaldytų“, nekryptingai orientuotų, antikūnų prieš GLV antigeną, buvo įskaitytas šių funkcijų netiesiškumas pradinėje ir paskutinėje sluoksnio formavimosi stadijoje. Buvo nustatyta, jog paskutinėje antigeno gp51 monosluoksnio formavimosi fazėje lūžio rodiklio pokytis tampa nežymus ir jautrumas ženkliai priklauso nuo optinio signalo vertės santykio su triukšmo signalu (7 pav. A ir B). 7 pav. A ir B rodo, kad absoliutus elipsometrinių parametrų pokytis laipsniais po „nuplovimo“ buvo didesnis Δ parametro atveju. Tuo tarpu signalo ir triukšmo santykis ($R_{s/n}$) buvo 3,14 ir 1,50 parametrams Ψ ir Δ atitinkamai. Taigi Ψ parametras paskutinėje formavimosi stadijoje buvo 2 kartus jautresnis nei Δ . Tokius jautrumo pokyčius įtakoja elipsometro, su besisukančiais optiniais elementais konstrukcija [11].

6-ame paveiksle pateikti duomenys iliustruoja, kad šiame darbe naudoto prietaiso jautrumas buvo didžiausias parametrai Δ sluoksnio formavimosi pradžioje, tuo tarpu



8 pav. Santykinio paviršiaus užpildymo laipsnio (N/N_t) kitimas laike antigeno gp51 sąveikos su „skaldytais“ ir „neskaldytais“ antikūnais prieš GLV antigeną gp51 metu (šviesos bangos ilgis $\lambda=670$ nm, o kritimo kampas - 70°).

parametras Ψ galinėje fazėje, nors ir nebuvo jautresnis, bet kito tiesiškai ir jo signalo

santykis su triukšmo signalu buvo mažesnis nei parametro Δ . Todėl buvo padaryta išvada, jog norint sumažinti triukšmo įtaką matavimams, reikia atsižvelgti į elipsometro modelį ir atlikti matavimus jo didžiausio jautrumo srityje. Darant prielaidą, jog lūžio rodiklis tiesiai proporcingas imobilizuotų molekulių masei buvo gautas santykinis paviršiaus užpildymo laipsnis (f) kuris yra lygus imobilizuotų (N) molekulių skaičiaus ir imobilizacijos vietų (N_t) santykiui (8 pav. juodi apskritimai).

3.2.2 Monomolekulinių sluoksnių formavimosi kinetikos modelis

Tyrimų rezultatai parodė, jog susiformavę antikūnų prieš GLV ir GLV antigenų sluoksniai išlieka pakankamai stabilūs ir po „nuplovimo“, todėl jų augimo kinetikų aprašymui buvo pritaikytas matematinis modelis, paremtas apibendrinta Langmuir'o lygtimi [12]. Taikant šį modelį buvo daromos šios prielaidos: (1) monosluoksnis charakterizuojamas storiumi (d), kuris nekinta augimo metu, ir efektyviu lūžio rodikliu (n_e), kuris kinta augant monosluoksniui; (2) imobilizuotų molekulių skaičius (N) ploto vienetu, kuriame bendras galimų imobilizacijos vietų skaičius (N_t) yra proporcingas efektyviam lūžio rodikliui (n_e) ir gali būti charakterizuojamas taikant efektyvios terpės artinį 2D objektams:

$$f = \frac{N}{N_t} = \frac{n_e^2 - n_b^2}{n_l^2 - n_b^2}; \quad (1)$$

Čia indeksai e , b ir l atitinka efektyvinį sluoksnio lūžio rodiklį, buferio lūžio rodiklį ir pilnai suformuoto monosluoksnio lūžio rodiklį, atitinkamai. Iš 5 pav. matyti, kad po susiformavusio sluoksnio nuplovimo buferio tirpalu be baltymų, elipsometrinių parametrų vertės pakito nežymiai. Tai rodo, kad tik dalis molekulių buvo grįžtamai imobilizuotos, t.y. nuplovimo metu atsiskyrė nuo jutiklio paviršiaus, tokiu atveju galima taikyti apibendrintą Langmuir'o lygtį kinetikoms aprašyti [12,13]:

$$\frac{dN_1}{dt} = k_a \cdot c \cdot (N_t - N_1 - N_2) - (k_d + k_r) \cdot N_1; \quad (2)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_r \cdot N_1; \quad (3)$$

Čia k_a - asociacijos koeficientas, c - antikūnų koncentracija tirpale prie modifikuojamojo paviršiaus, k_d - disociacijos koeficientas, k_r - koeficientas, parodantis molekulių negrįžtamos imobilizacijos spartą, N_1 ir N_2 - paviršinė, grįžtamai ir negrįžtamai

imobilizuotų molekulių koncentracija atitinkamai. Lygčių sistemos (2) ir (3) sprendinys pažymint, kad $k_1 = k_a c$; $k_2 = k_d + k_r$ ir $k_3 = k_r$ kai $k_1/k_2 \approx 1$:

$$\frac{N}{N_t} = \frac{k_1}{r_1 - r_2} \left[\left(\frac{k_3}{r_1} + 1 \right) \cdot \exp(r_1 \cdot t) - \left(\frac{k_3}{r_2} + 1 \right) \cdot \exp(r_2 \cdot t) \right] + \frac{k_1}{k_2}; \quad (4)$$

$$r_1 = -\frac{k_1 + k_2}{2} + \sqrt{\frac{(k_1 + k_2)^2}{4} - k_1 \cdot k_3}; \quad r_2 = -\frac{k_1 + k_2}{2} - \sqrt{\frac{(k_1 + k_2)^2}{4} - k_1 \cdot k_3} \quad (5)$$

Taip pat kinetinių koeficientų vertės turi tenkinti papildomas sąlygas, t.y. $k_1 \leq k_2 > k_3$. Naudojant (4), buvo aprašyti eksperimento rezultatai pateikti 8 pav. (išsitiesinės linijos) bei apskaičiuoti kinetiniai koeficientai antigeno *gp51* ir „skaldytų“, kryptingai orientuotų bei „neskaldytų“, nekryptingai orientuotų, antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* kompleksų formavimosi metu (1 lentelė).

1 lentelė. Kinetinės konstantos, nustatytos naudojant dalinės, negrįžtamos imobilizacijos modelį „skaldytų“, kryptingai orientuotų bei „neskaldytų“, nekryptingai orientuotų, antikūnų prieš GLV antigeną *gp51*, ir jų sąveikos su GLV antigenu *gp51* kinetikoms aprašyti: (1) „skaldyti“ antikūnai (*skal-Ak*) imobilizuoti ant aukso paviršiaus, (2) „neskaldyti“ antikūnai (*neskal-Ak*) imobilizuoti ant savitvarkio monosluoksnio, suformuoto ant aukso paviršiaus, (3) antigeno *gp51* sąveikos su „skaldytais“ antikūnais metu (*gp51/skal-Ak*), (4) antigeno *gp51* sąveikos su „neskaldytais“ antikūnais metu (*gp51/neskal-Ak*). τ_r – charakteringoji baltymų negrįžtamos imobilizacijos proceso trukmė ($\tau_r = 1/k_3$).

| Monosluoksnis | $k_1(s^{-1})$ | $k_2(s^{-1})$ | $k_3(s^{-1})$ | $k_a(s^{-1}mol^{-1}L)$ | $\tau_r(s)$ |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------|-------------|
| Skal.-Ak | 0,3252 | 0,3943 | 0,2869 | $5,42 \cdot 10^4$ | 3,5 |
| Neskal.-Ak | 0,1164 | 0,1165 | 0,0113 | $3,88 \cdot 10^4$ | 88,4 |
| <i>gp51/skal-Ak</i> | 0,085 | 0,086 | 0,0075 | $8,67 \cdot 10^3$ | 133 |
| <i>gp51/neskal-Ak</i> | 0,088 | 0,097 | 0,0586 | $8,96 \cdot 10^3$ | 17,1 |

Taikant apibendrintą Langmuir'o lygtį, buvo nustatyta, kad negrįžtamos imobilizacijos efektas yra reikšmingas „skaldytų“ kryptingai orientuotų bei „neskaldytų“, nekryptingai orientuotų, antikūnų prieš GLV antigeną, afiniškumo

konstantų nustatymui ir jų sąveikos su GLV antigenų tyrimui. „Skaldytų“ antikūnų imobilizacijos ant aukso atveju, negrįžtamos imobilizacijos trukmė buvo trumpesnė negu tuo atveju, kai „neskaldyti“ antikūnai buvo imobilizuoti ant 11-MUR savitvarkio monosluoksnio. Negrįžtamos imobilizacijos trukmė GLV antigeno *gp51* sąveikos su „skaldytais“ antikūnais prieš GLV antigeną *gp51* atveju buvo ilgesnė lyginant su imobilizacija ant „neskaldytų“ antikūnų.

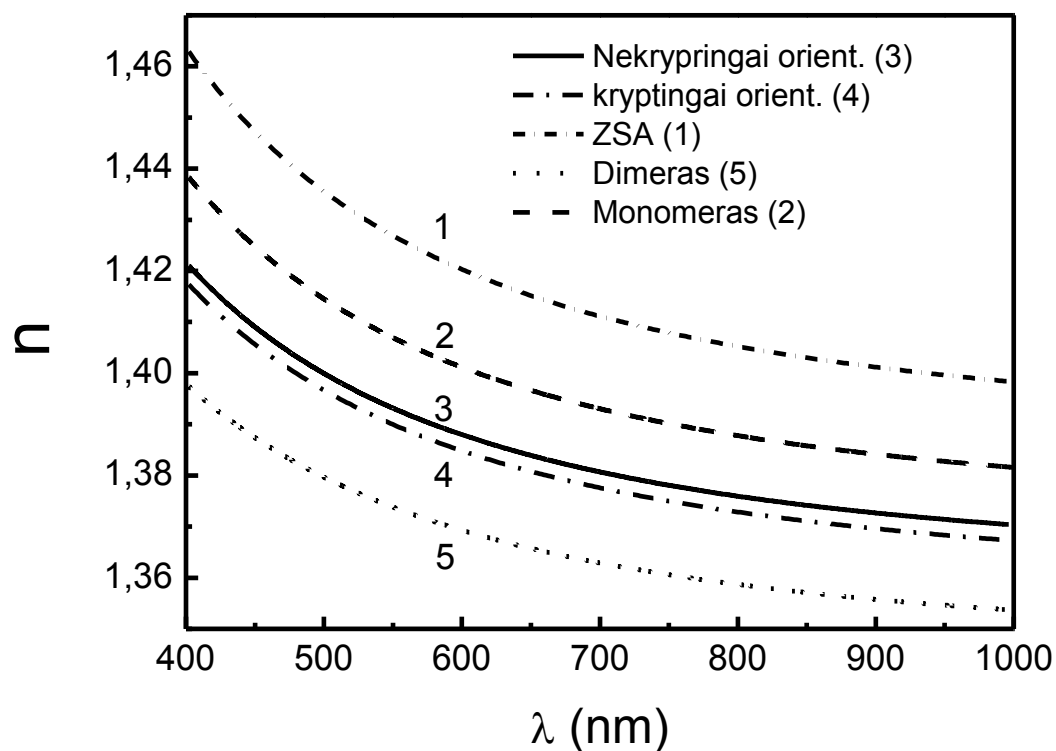
3.3 *Granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GKSF) „in-situ“ sąveikos su jo receptorium tyrimas [3*]*

Šioje disertacinio darbo dalyje yra pateikiami GKSF monomerų ir dimerų *in-situ* sąveikos su jo receptorium tyrimai naudojant spektroskopinę elipsometriją. Parodyta, jog šis metodas *in-situ* matavimuose turi didelį pranašumą, lyginant su vieno bangos ilgio elipsometrija, nes lūžio rodiklio dispersija plačiame šviesos bangų ruože (400-1000 nm) nustatoma kas 1 s. Panaudojant spektroskopinės elipsometrijos, sustiprintos paviršiaus plazmonų rezonansu, metodą buvo tiriama GKSF receptoriaus-ligando sąveikos kinetika, kai šviesos bangos ilgis kito nuo 300 nm iki 1000 nm.

3.3.1 *GKSF receptoriaus sluoksnio formavimosi tyrimas*

Spektroskopinės elipsometrijos, sustiprintos paviršiaus plazmonų rezonansu, metodu buvo ištirta nekryptingai ir kryptingai orientuoto GKSF receptoriaus imobilizacijos kinetika, naudojant daugiasluoksnį modelį [12]. Lūžio rodiklio dispersija gauta darant prielaidą, jog GKSF sluoksnio storis yra artimas žmogaus serumo albumino (ŽSA) molekulių matmenims ir lygus 6 nm. Aprašant sluoksnių lūžio rodiklius buvo panaudota Cauchy dispersijos funkcija [11] (9 pav. 1 kreivė). GKSF receptoriaus sluoksnio lūžio rodiklis buvo įvertintas naudojant Bruggeman'o efektyviosios terpės modelį. Sluoksnis buvo sudarytas iš žmogaus serumo albumino (ŽSA) molekulių monosluoksnį atitinkančio lūžio rodiklio ir PBS buferio.

Kryptingai ir nekryptingai orientuoto receptoriaus afiniškumo konstantoms įvertinti buvo taikoma apibendrinta Langmuir'o lygtis [12]. Skaičiavimai parodė, kad kryptingai orientuoto receptoriaus afiniškumo konstantos buvo du kartus didesnės negu nekryptingai orientuoto receptoriaus (2 lentelė).



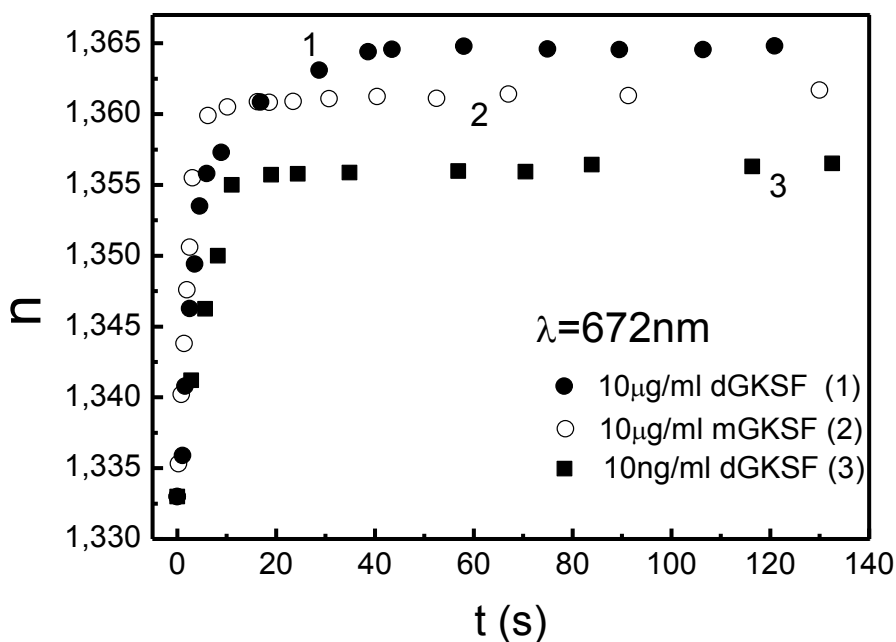
9 pav. GSKF sluoksnių lūžio rodiklio priklausomybė nuo šviesos bangos ilgio. Modeliavimui panaudota Cauchy dispersijos funkcija ir Bruggeman'o efektyvios terpės artinys.

2 lentelė. GSKF receptoriaus kinetinės ir afiniškumo konstantos gautos naudojant apibendrintą Langmuir'o lygtį [12].

| GKSF | k_a ($s^{-1}M^{-1}$) | k_d (s^{-1}) | K_a (M^{-1}) | K_d (M) | k_r (s^{-1}) |
|---|--------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| A (nekryptingai orientuotas receptorius) | $6,6 \cdot 10^3$ | $4,4 \cdot 10^{-2}$ | $1,5 \cdot 10^5$ | $6,58 \cdot 10^{-6}$ | $7,93 \cdot 10^{-3}$ |
| B (kryptingai orientuotas receptorius) | $1,1 \cdot 10^6$ | $3,7 \cdot 10^{-2}$ | $2,9 \cdot 10^7$ | $3,47 \cdot 10^{-8}$ | $4,05 \cdot 10^{-3}$ |
| m-GKSF | $5,6 \cdot 10^5$ | $1 \cdot 10^{-1}$ | $5,6 \cdot 10^6$ | $1,78 \cdot 10^{-7}$ | |
| d-GKSF | $9,8 \cdot 10^5$ | $5,2 \cdot 10^{-2}$ | $1,9 \cdot 10^7$ | $5,25 \cdot 10^{-8}$ | $1,84 \cdot 10^{-1}$ |

3.3.2 GKSF monomero ir dimero adsorbcijos kinetikos tyrimas

Buvo pademonstruota galimybė, taikant spektroskopinės elipsometrijos, sustiprintos paviršiaus plazmonų rezonansu, metodą tyrinėti monomerinio (mGKSF) ir dimerinio (dGKSF) granuliocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus sąveikos su receptoriais (GKSF-R) kinetiką. 10 pav. parodyta efektyvinio lūžio rodiklio, nustatyto taikant daugiasluoksnį optinį modelį, kinetika.



10 pav. Lūžio rodiklio (n) kitimas laike mGKSF ir dGKSF monosluoksnių formavimosi metu ant kryptingai orientuoto GKSF-R monosluoksniu, 1 kreivė - 10 µg/ml dGKSF, 2 kreivė - 10 µg/ml mGKSF, 3 - kreivė 10 ng/ml dGKSF.

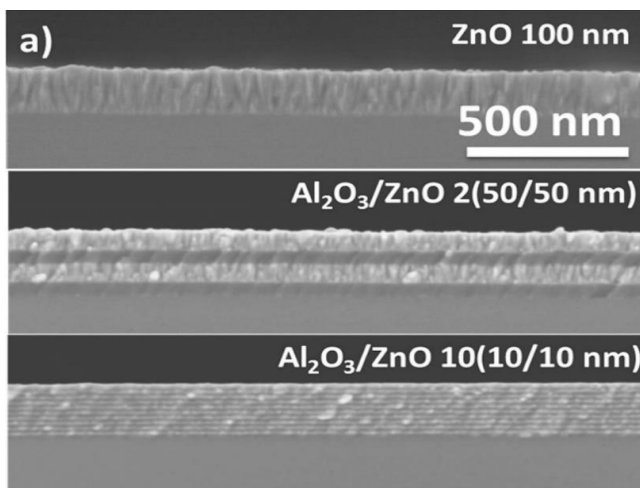
Kreivės 1 ir 2 rodo dGKSF ir mGKSF kinetiką esant 10 µg/ml PBS koncentracijai. Kreivė 3 rodo dGKSF sluoksniu formavimosi kinetiką, kai PBS koncentracijos buvo 10 ng/ml. Gautos dGKSF lūžio rodiklio vertės prie 10 ng/ml ir 10 µg/ml 10 pav. (3 ir 1 kreivės) patvirtina prielaidą, kad 10 µg/ml koncentracija yra pakankama suformuoti monosluoksnį iš minėtų baltymų. Nustatyti skirtumai tarp monomerinio ir dimerinio GKSF rodo skirtingus jų sąveikų mechanizmus. Nustatant kinetines ir afiniškumo konstantas, mGKSF kinetika buvo aprašoma taikant standartinę Langmuir'o lygtį, o dGKSF kinetika aprašyta taikant apibendrintą Langmuir'o lygtį. Gautos afiniškumo konstantos pateikiamos 2 lentelėje.

Taikant skirtingus matematinius modelius kinetikoms aprašyti, gaunama afiniškumo konstantos K_a reikšmė skiriasi. Monomerinio GKSF atveju ($K_a=5,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) ji aprašo tiesioginę asociaciją ant paviršiaus, tuo tarpu dimerinio GKSF atveju ($K_a=1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) aprašo vienos dimero dalies asociaciją, o k_r aprašo antros dimero dalies asociaciją su receptoriu. Taigi buvo parodyta, jog dėl tikslaus lūžio rodiklio nustatymo galimybės ir signalo netiesiškumo eliminavimo, spektroskopinės elipsometrijos, sustiprintos paviršiaus plazmonų rezonansu, metodas gali išskirti nežymius skirtumus tarp asociacijos ir disociacijos trukmių. Šie mGKSF ir dGKSF lūžio rodiklio skirtumai leidžia taikyti skirtingus kinetinius modelius, reikalingus aprašyti panašių molekulių sąveikos mechanizmus su receptoriu.

3.4 Nanolaminatų, sudarytų iš $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$, pagamintų atominių sluoksnių nusodinimo (ASD) metodu, optinių savybių tyrimas [4*,5*]

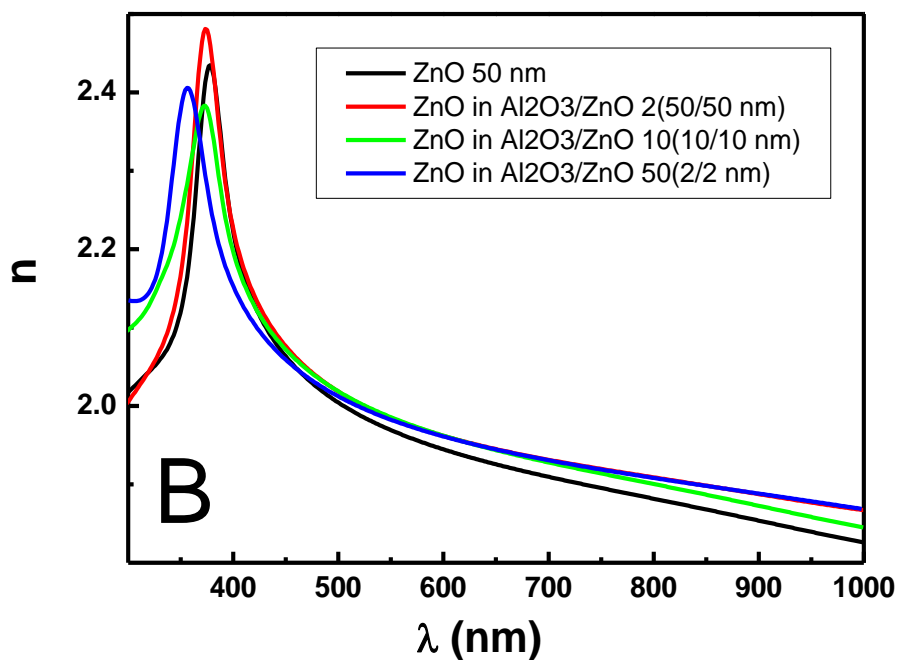
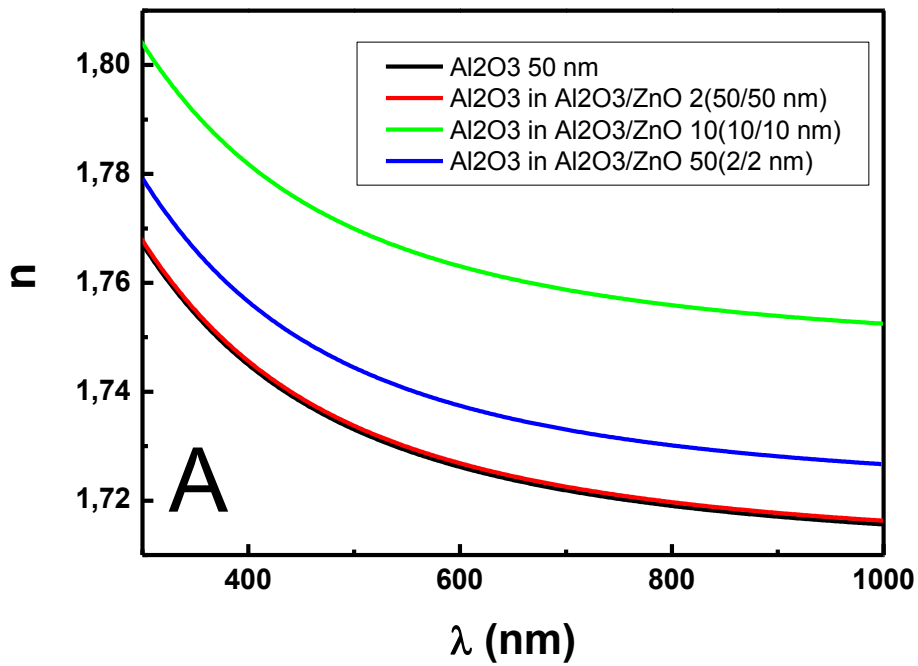
$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų SEM vaizdas pateiktas 11 pav. Matyti pasikartojančių Al_2O_3 ir ZnO sluoksnių struktūra. Visuose nanolaminatuose pirmasis sluoksnis ant Si padėklo buvo Al_2O_3 , o viršutinis ZnO. Nanolaminatų sluoksnių augimo greičiai auginant

Al_2O_3 ir ZnO buvo nuo 1,4 iki 2 Å ir nuo 1,8 iki 2 Å vieno ciklo metu, atitinkamai.



11 pav. ZnO sluoksnių (100 nm) ir $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų, sudarytų iš skirtingo storio bisluoksnių SEM lūžio vaizdas.

Spektroskopinė elipsometrija buvo panaudota atskirų sluoksnių iš ZnO ir Al_2O_3 bei $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminatų storiui ir optinėms konstantoms nustatyti (12 pav.).



12 pav. A) atskiro Al_2O_3 sluoksnio lūžio rodiklio reali dalis ir skirtingų storių Al_2O_3 lūžio rodiklio reali dalis $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminate; B) atskiro ZnO sluoksnio lūžio rodiklio reali dalis ir skirtingų storių ZnO sluoksnių nanolaminate $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ lūžio rodiklio reali dalis.

Nanolaminatų iš $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ optinio pralaidumo spektrų tyrimai parodė, kad visi tirti bandiniai buvo skaidrūs 550–1100 nm bangų ruože. Sugerties kraštas buvo stebimas tarp 370 nm ir 410 nm, o „mėlynasis“ sugerties krašto poslinkis – mažėjant nanolaminato bisluoksnio storiui. Draustinės juostos vertės buvo apskaičiuotos darant prielaidą, jog Al_2O_3 sluoksnis yra skaidrus visame spektro ruože, o sugerties kraštas atsiranda dėl ZnO sluoksnių (3 lentelė).

3 lentelė. Nanolaminatų iš $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ ir ZnO sluoksnio, esant skirtingiems bisluoksnių storiams, draustinės juostos vertės. $E_{g,p}$ – iš optinio pralaidumo matavimų, $E_{g,el}$ – iš elipsometrijos tyrimų.

| Nanolaminatas | $E_{g,p}$ (eV) | $E_{g,el}$ (eV) |
|--|----------------|-----------------|
| $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ 50 (2/2 nm) | 3,41 | 3,45 |
| $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ 10 (10/10 nm) | 3,30 | 3,36 |
| $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ 2 (50/50 nm) | 3,28 | 3,31 |
| ZnO (50 nm) | 3,24 | 3,25 |

Buvo nustatyta, kad Al_2O_3 sluoksnis buvo skaidrus visame UV ir regimosios šviesos spektro ruože (12a pav.). ZnO sluoksniui yra būdinga sugerties smailė spektro ruože nuo 360 iki 410 nm (12b pav.). Taip pat buvo aptikta, kad vidutinė ZnO sluoksnio lūžio rodiklio vertė nanolaminatė buvo didesnė negu atskirai auginto sluoksnio. Tiriant nanolaminatus „mėlynasis“ smailės poslinkis lūžio rodiklio dispersijos kreivėse buvo stebimas mažėjant ZnO sluoksnio storiui ir sutapo su pralaidumo matavimų rezultatais (3 lentelė).

Išvados

1. Elipsometrinių parametrų tyrimai parodė, kad biologiniuose jutikliuose, kuriuose naudojami „skaldyti“ kryptingai ant aukso įmobilizuoti antikūnai prieš GLV antigenus *gp51*, susidaro didesnė GLV antigeno *gp51*/ antikūno prieš GLV antigeną *gp51* paviršinė koncentracija nei biologiniuose jutikliuose, kuriuose naudojami „neskaldyti“, nekryptingai įmobilizuoti antikūnai. Didelis šio metodo jautrumas ir daugiasluoksnio

optinio modelio panaudojimas leidžia įvertinti imobilizuotų antikūnų ir GLV antigeno sluoksnių struktūrą.

2. Elipsometrijos metodo pritaikymas parodė, kad „skaldyti“ antikūnai prieš GLV ant aukso paviršiaus yra imobilizuoti kryptingai, o elipsometrinio parametro Δ jautrumas yra ženkliai didesnis nei parametro Ψ , todėl biologiniai jutikliai, kuriuose matuojamas parametras Δ , yra jautresni nei jutikliai, kuriuose naudojant paviršiaus plazmonų rezonansą yra matuojamas parametras Ψ .

3. Elipsometrinių parametrų atsako nuo antikūnų prieš GLV ir GLV antigenų monosluoksnių tyrimai parodė, kad šių parametrų jautrumas sluoksnio storio ir lūžio rodiklio kitimui yra skirtingas įvairiuose monosluoksnio formavimosi stadijose. Parametras Δ yra jautresnis pradinėje sluoksnio formavimosi stadijoje, o parametras Ψ – paskutinėje. Į tai turi būti atsižvelgta aprašant sąveikos kinetikas, išmatuotas elipsometrijos metodu.

4. Taikant apibendrintą Langmuir'o lygtį, buvo nustatyta, kad negrįžtamos imobilizacijos efektas yra reikšmingas „skaldytų“ ir „neskaldytų“ antikūnų prieš GLV kinetinių ir afiniškumo konstantų nustatymui ir jų sąveikos su GLV antigenu tyrimui. „Skaldytų“ antikūnų imobilizacijos ant aukso atveju, negrįžtamos imobilizacijos trukmė buvo trumpesnė negu tuo atveju kai „neskaldyti“ antikūnai buvo imobilizuoti ant 11-MUR-savitvarkio monosluoksnio. Negrįžtamos imobilizacijos trukmė GLV antigeno sąveikos su „skaldytais“ antikūnais atveju buvo ilgesnė lyginant ją su „neskaldytų“ antikūnų imobilizacijos trukme.

5. Spektroskopinės elipsometrijos, sustiprintos paviršiaus plazmonų rezonansu, metodas leidžia tiksliai nustatyti lūžio rodiklį ir įskaityti optinio signalo netiesiškumus, todėl yra tinkamas nustatant nežymius skirtumus tarp mGKSF ir dGKSF asociacijos ir disociacijos konstantų. Šio metodo naudojimas duoda galimybę taikyti skirtingus kinetinius modelius, reikalingus aprašyti panašių GKSF molekulių sąveikos mechanizmus su jų receptoriūmi.

6. Atominių sluoksnių nusodinimo metodas leidžia kryptingai kontroliuoti optines bei struktūrines nanolaminatų savybes t.y. atskirų sluoksnių sudarančių nanolaminatus storius, kristališkumą, draustinės juostos plotį ir fotoluminescensiją.

7. Nustatyta, kad formuojant ZnO sluoksnius nanolaminate, jie nebuvo legiruojami Al, kuris greičiausiai difunduoja į ribą tarp ZnO ir Al₂O₃ sluoksnio, suformuodamas

defektus, dėl kurių išauga regimosios spektro dalies fotoluminescencija. „Mėlynasis“ draustinės juostos poslinkis ir eksitoninės smailės vieta ZnO sluoksnių spektre atsiranda dėl kvantinio ribojimo reiškinio ir ZnO kristališkumo padidėjimo.

8. Dėl gero suderinamumo su biologinėmis medžiagomis ir galimybės nesunkiai ASN metodu valdyti ZnO/Al₂O₃ nanolaminatų storį ir efektyvinių lūžio rodiklių jie gali būti panaudojami kuriant optinius biologinius jutiklius, kuriuose registruojami atspindėtos šviesos spektriniai pokyčiai.

Santrumpos

ASN – atominių sluoksnių nusodinimas

EHDK – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodimido hidrochloridas

GKSF-R – granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus receptoriaus

GLV – galvijų leukemijos virusas

dGKSF – granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus dimeras

mGKSF – granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus monomeras

NHS – N-hidroksisukcinimidas

SE – Spektroskopinė elipsometrija

VVAE – visiško vidaus atspindžio elipsometrija

ŽSA – žmogaus serumo albuminas

11-MUR – 11-merkaptoundekano rūgštis

„Skaldyti“ antikūnai – merkaptio etanoliu redukuotų antikūnų fragmentai

„Neskaldyti“ antikūnai – natyvūs, nemonifikuoti antikūnai

Literatūra

[1] R.H. Muller, J.C. Farmer, Fast, self-compensating spectral-scanning ellipsometer // *Rev. Sci. Instrum.*, 55, (1984), p. 371

[2] H. Arwin, Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges // *Thin Solid Films*, 313-314 (1998), pp.764-774

[3] T.Sandstrom, M. Stenberg & H. Nygren, Visual detection of organic monomolecular films by interference colors // *Appl. Optics*, 24, (1985), pp. 472–479

- [4] R. Ostroff, D. Hopkins, A.B. Haeberli, W. Baouchi & B. Polisky, Thin film biosensor for rapid visual detection of nucleic acid targets // *Clin. Chem.*, 45, (1999), pp.1659–1664
- [5] R. Jenison, S. Yang, A. Haeberli, and B. Polisky, Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon // 2001 *Nature Publishing Group*, <http://biotech.nature.com>
- [6] H. Liang, H. Miranto, N. Granqvist, J.W. Sadowski, T. Viitala, B. Wang, M. Yliperttula, Surface plasmon resonance instrument as a refractometer for liquids and ultrathin films // *Sens. Actuators B*, 149, (2010), pp. 212–220
- [7] H.G. Thompkins, E.A. Irene, Handbook of Ellipsometry // *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*, 2005
- [8] M. Poksinski, H. Arwin, Protein monolayers monitored by internal reflection ellipsometry // *Thin Solid Films*, 455, (2004), pp. 716–721
- [9] H. Arwin, M. Poksinski, K. Johansen, Total internal reflection ellipsometry: principles and applications // *Appl. Opt.*, 43, (2004), pp. 3028–3036
- [10] X. Jin, Z. Ma, J. Talbot, N.-H.L. Wang, A model for the adsorption equilibria of solutes with multiple adsorption orientations // *Langmuir*, 15, (1999), pp. 2321–3333
- [11] H. Fujiwara, Spectroscopic ellipsometry Principles and applications, *John Wiley & Sons*, Chichester, 2007, Chapter 7.
- [12] J. Talbot, Time Dependent Desorption:A Memory Function Approach // *Adsorption*, 2 , (1996), pp. 89–94
- [13] Z. Balevičius, V. Vaicikauskas, J. Babonas, The role of surface roughness in total internal reflection ellipsometry of hybrid systems // *Appl. Surf. Sci.*, 256, (2009), pp. 640-644

Tyrimų rezultatai paskelbti 5-iuose recenzuojamų žurnalų straipsniuose ir 8 tarptautinių konferencijų darbuose:

Straipsniai

- 1*. Z.Balevicius, A. Ramanaviciene, I. Baleviciute, A. Makaraviciute, L. Mikoliunaite, A. Ramanavicius, Evaluation of intact- and fragmented- antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry, *Sensors and Actuators B Chemical*, 160 pp. 555-562, 2011.
- 2*. I. Baleviciute, Z.Balevicius, A.Makaraviciute , A.Ramanaviciene , A. Ramanavicius, Study of antibody/antigen binding kinetics by total internal reflection ellipsometry, *Biosensors and Bioelectronics*, 39, pp. 170–176, 2013.
- 3*. Z. Balevicius, I. Baleviciute, S. Tumenas, L. Tamosaitis, A. Stirke, A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene , A. Ramanavicius, Study of antibody/antigen binding kinetics by total internal reflection ellipsometry. *Thin Solid Films* dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2013.10.090, 2013.
- 4*. A. A. Chaaya, R. Viter, I. Baleviciute, M. Bechelany, A. Ramanavicius, Z. Gertnere, D. Erts, V. Smyntyna and P. Miele, Tuning Optical Properties of Al₂O₃/ZnO Nanolaminates Synthesized by Atomic Layer Deposition, *Journal of Physical Chemistry C*, 118, pp. 3811-3819, 2014.
- 5*. A. A. Chaaya, R. Viter, I. Baleviciute, M. Bechelany, A. Ramanavicius, D. Erts, V. Smyntyna and P. Miele, Tuning Optical Properties of Al₂O₃/ZnO Nanolaminates Synthesized by Atomic Layer Deposition, *Physica Status Solidi C*, DOI:10.1002/pssc.201300607, 2014.

Konferencijos

1. Z. Balevičius, A. Ramanavičienė, I. Balevičiūtė, N. Ryškevič, A. Kaušaitė-Minkštimienė, A. Makarevičiūtė, Y. Oztekin, J. Baniukevič, A. Ramanavičius, Total internal reflection ellipsometry for immunosensor design, „The magnet for scientific innovation: PITTCON conference and EXPO 2011“, Atlanta, Georgia, March 13-18, 2011: abstracts. art. no. 1720-10P.
2. I. Baleviciute, Z. Balevicius, A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Study of Antibody-Antigen Binding Kinetics by Total Internal

- Reflection Ellipsometry, 14th international conference and summer school „Advanced Materials and Technologies“, August 27 – 31, 2012, Palanga. p. 32
3. A. Ramanavičienė, A. Kaušaitė-Minkštimienė, J. Kirlytė, Z. Balevičius, I. Balevičiūtė, A. Makarevičiūtė, Y. Oztekin, A. Ramanavičius, Evaluation of immobilization techniques on the efficiency of immunosensors, „The magnet for scientific innovation: PITTCON conference and EXPO 2011“, Atlanta, Georgia, March 13-18, 2011: abstracts. art. no. 2200-12P.
 4. A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė, Z. Balevičius, I. Balevičiūtė, A. Kaušaitė-Minkštimienė, R. Bubnienė, Surface plasmon resonance and ellipsometry biosensor for direct detection of antibodies, „PITTCON conference and EXPO 2010“, February 28 - March 5, 2010, Orlando, Florida: abstracts. art. no. 2820-9.
 5. I. Balevičiūtė, A. Makaravičiūtė, Z. Balevičius, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, Study of bovine leukemia virus antigen growth kinetics by total internal reflection ellipsometry, „ERPOS-12“, July 11-13, 2011, Vilnius.
 6. A. Ramanavičienė, A. Kausaitė-Minkštimienė, A. Makarevičiūtė, J. Kirlytė, I. Balevičiūtė, Y. Oztekin, A. Ramanavičius, J. Voronovic, N. German, Immunosensors Based on Surface Plasmon Resonance and Electrochemical Techniques, „PITTCON conference and EXPO 2012“, March 11-15, 2012, Orlando, Florida: abstracts. art. No. 550-10.
 7. Z. Balevičius, I. Balevičiūtė, S. Tumenas, A. Stirke, A. Makaravičiūtė, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, In situ study of ligand-receptor interaction by total internal reflection ellipsometry, „ICSE VI“, 26-31 May 2013, Kyoto research park, Japan.
 8. A. A. Chaaya, R. Viter, I. Balevičiūtė, M. Bechelany, P. Miele, A. Ramanavičius, D. Erts and V. Smyntyna, Optical and structural properties of Al₂O₃/ZnO nanolaminates, deposited by ALD method, E-MRS 2013 FALL MEETING, September 16-20, Warsaw University of Technology, Poland.

Abstract (General conclusions)

1. The analysis of the ellipsometric parameters obtained by the total internal reflection method (TIRE) has shown that the layer prepared from the antibody against BLV by indirect immobilization via a 11-MUA self-assembled monolayer of mercaptoundecanoic acid and EDC-NH-antibody linking groups can interact with a 2.5 times higher amount of the BLV antigen layer when compared to the randomly oriented intact antibody layer prepared by direct immobilization onto a Au thin film surface. For this reason, it can be concluded that the fragmented antibody layer deposited onto a nanometer thick Au film can be very suitable for the design of BLV immune-sensors.
2. For BLV antigen sensing, it is preferable to use the ellipsometric parameter Δ whose analytical sensitivity is 5.89 times better when compared to the sensitivity for the Ψ parameter. This demonstrates that the application of the ellipso-metric method for BLV sensing is preferable compared to the measurement of SPR, which in fact, measures the parameter Ψ .
3. The application of TIRE for the *in-situ* study of the immobilization of fragmented and intact antibodies against BLV and the antibodies interaction with the BLV antigen glycoprotein *gp51* shows that the sensitivities of Ψ (t) and Δ (t) were nonlinear and different at different stages of the formation of the bio-molecular layer. The Δ (t) shows a larger sensitivity at the initial phase of the process, while Ψ (t) is less sensitive at the initial phase. Therefore, this fact should be taken into account during the evaluation of the formation of the biomolecular layer formation kinetics.
4. Analysis based on the partial reversibility model has shown that the residence time effect has to be taken into consideration in both cases: (i) when determining the affinity constants of the fragmented and intact antibodies against BLV in the immobilization kinetics study and (ii) when characterizing the immobilized antibodies against BLV interaction with the BLV antigen. In the case of the fragmented antibody interaction with the gold layer, the residence time was relatively short (≈ 25 times) when compared with that obtained for the interaction of the intact antibodies with the 11-MUA-based self-assembled monolayer. In contrast, the residence time of the BLV antigen interaction

with the fragmented antibody against BLV monolayer was longer (≈ 8 times) than that calculated for the BLV antigen interaction with the intact antibody layer.

5. The preparation of the immune-sensor using the BLV fragmented antibody based sensing layer is faster than that using the intact BLV antibody-based layer. The preparation of the sensor based on the intact antibody based layer takes a minimum 1.5min. However, due to the slower association of the fragmented BLV antibody-based layer with the BLV antigen, this kind of layer is more preferable for multi-fold use immune-sensors and even for implantable sensors, while the intact antibody-based layer with its faster association with the antigen, is more suitable for the development of immune-sensors with enhanced selectivity and sensitivity.
6. The application of the spectroscopic dynamic TIRE method for the characterization of the *in-situ* interactions of the monomeric and dimeric granulocyte colony stimulating factor with its receptor immobilized onto a thin gold layer demonstrated that this method in its spectroscopic dynamic acquisition mode is able to reveal minuscule differences of the association and dissociation times. This can be realized through the precise determination of the refractive index dispersion and the elimination of signal non-linearity using regression analysis of the spectroscopic ellipsometry data.
7. From the analysis of these optical and structural properties, it was determined that during the synthesis of the $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminates prepared by atomic layer deposition methods, the ZnO single layer was not doped by Al, which, most probably, diffused into the interface of the $\text{ZnO}/\text{Al}_2\text{O}_3$ bilayer, forming defect states which increased the visible band of the photoluminescence. This blue shift of the band gap and the excitonic peak position of the ZnO single layers can be due to the quantum confinement effect and the improvement of the crystalline quality of the ZnO layer. The improved properties of the nanolaminates such as biocompatibility, easy surface modification and enhanced photoluminescence at room temperature can provide an added capabilities for the development of nanolaminates based optical biosensors.

Trumpos žinios apie autorių

Ieva Balevičiūtė gimė 1985 m. sausio 31d. Vilniuje. 2008 m. baigė Vilniaus pedagoginio universiteto (VPU) Fizikos ir technologijos fakultetą (FTF), kuriame apgynė bakalauro diplominį darbą „Tarpžvaigždinės ekstinkcijos nustatymas iš trimačio galaktikos ekstinkcijos modelio“. Tais pačiais metais įstojo į VPU FTF magistratūrą ir 2010 m. apgynė diplominį darbą „Paviršiaus plazmonų rezonanso elipsometrijos taikymas antikūnų (IgG) prieš antigeną *gp51* imunojutikliams tirti“ ir įgijo fizikos magistro laipsnį su pagyrimu. Tais pačiais metais įstojo į chemijos krypties doktorantūrą Vilniaus universitete, Chemijos fakultete, fizikinės chemijos katedroje, kurioje dirba iki šiol. Taip pat dirba šiuose projektuose: “Puslaidininkinėse ir nano-technologijose perspektyvių medžiagų kūrimas ir charakterizavimas nuostoviosios ir ultrasparčiosios spektrometrijos metodais plačioje spektrinėje srityje” Projekto numeris: VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-004, “Polimerais ir biologiniu atpažinimu pasižyminčiomis struktūromis modifikuoti fermentai selektyviam ląstelių poveikiui“. Projekto kodas VP1-3.1-ŠMM-07-K-02-042.