

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Biofizikos studijų programos magistrantas

Tautvilas MEČINSKAS

Magistrinis darbas

Biohibridinių metalas-baltymas kompleksų kūrimas ir tyrimai

Darbo vadovas

Dr. Justas Barauskas

Vilnius 2011

Biohidridinių metalas-baltymas kompleksų kūrimas ir tyrimai

Darbas atliktas Biochemijos institute

Tautvilas MEČINSKAS

Darbo vadovas:

Dr. Justas BARAUSKAS

Turinys

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Molekulinė biomimetika.....	7
1.1.1. Biomimetinės medžiagos.....	7
1.1.2. GEPI atranka ir savybės.....	9
1.1.3. GEPI taikymai.....	11
1.2. Nanostrypeliai.....	12
1.2.1. Nanostrypelių sintezė.....	13
1.2.2. Segmentuoti nanostrypeliai.....	15
1.2.3. Nanostrypelių taikymai.....	16
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	19
2.1. Medžiagos.....	19
2.1.1. Nanostrypeliai.....	19
2.1.2. Baltymai.....	19
2.1.3. Baltymų elektroforezei naudotos medžiagos.....	20
2.2. Metodai.....	22
2.2.1. Atominės jėgos mikroskopija.....	22
2.2.2. Baltymų elektroforezė.....	22
2.2.3. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija.....	22
3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI.....	24
3.1.1. Atominės jėgos mikroskopija.....	24
3.1.2. Elektroforezė.....	28
3.1.3. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija.....	29
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	30
IŠVADOS.....	34
SUMMARY.....	35
PADĖKOS.....	36
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	37

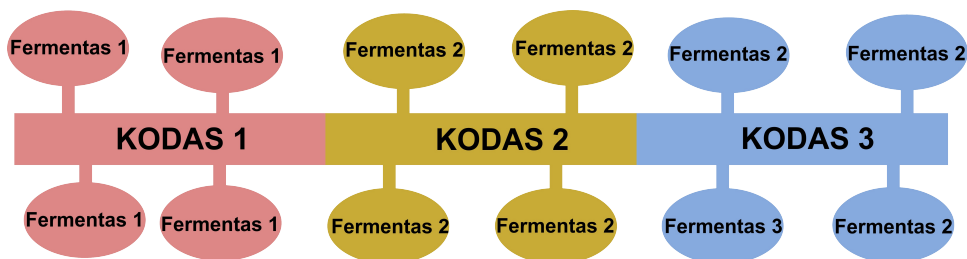
SANTRUMPOS

CSD	Ląstelės paviršiaus eksponavimas (angl. <i>Cell-surface display</i>)
PD	Fagų eksponavimas (angl. <i>Phage display</i>)
GEPI	genetinėmis metodais sukurti baltymai neorganinėms medžiagoms (angl. <i>Genetically engineered proteins for inorganics</i>)
SERS	Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija (angl. <i>Surface enhanced Raman spectroscopy</i>)
AFM	Atominės jėgos mikroskopija (angl. <i>Atomic force microscopy</i>)
TEM	Transmisinė elektronų mikroskopija (angl. <i>Transmission electron microscopy</i>)
SEM	Skenuojanti elektronų mikroskopija (angl. <i>Scanning electron microscopy</i>)
HREM	Aukštos rezoliucijos elektronų mikroskopija (angl. <i>High-resolution transmission electron microscopy</i>)
CCD	Krūvio sąsajos įtaisas (angl. <i>Charge-coupled device</i>)
SDS	Natrio laurilsulfatas (angl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
TEMED	Tetrametiletildiaminas
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgštis

ĮVADAS

Kurdami naujas technologijas bei medžiagas mokslininkai dažnai semiasi įkvėpimo iš gyvosios gamtos (Vogel 1998). Per ilgą laiką evoliucijos būdu atrinktos ir milijonus metų testuotos biologinės sistemos gali pasiūlyti originalių sprendimų įvairioms technologinėms problemoms spręsti. Molekulinė biomimetika yra nauja mokslinių tyrimų sritis, kurios tikslas yra ištirti kaip nanoinžinerijos bei biotechnologijos metodais būtų galima sukurti molekulinės sistemos, kurios savaime organizuotųsi pasitelkiant molekulinį atpažinimą ir veiktų panašiai kaip ir ląstelėse aptinkami molekuliniai mechanizmai (Sarikaya ir kiti, 2003). Tokios sistemos gali būti pritaikomos įvairių naujoviškų medžiagų sintezei bei biomedicinoje.

Kaskadinė fermentinė reakcija yra tokia cheminių reakcijų grandinė, kai vienos fermentinės reakcijos produktas yra panaudojamas kitose fermentinėse reakcijose tol, kol gaunamas galutinis rezultatas. Tokių reakcijų pavyzdžiai gamtoje yra kraujo krešėjimo reakcija, celiulozės skaidymas bei signalų perdavimas neuronuose. Norint, kad kaskadinė fermentinė reakcija vyktų efektyviai, fermentai, reikalingi reakcijai vykti, turi būti išsidėstę taip, kad po kiekvieno reakcijos etapo tarpinis produktas efektyviai pasiektų kitą reakcijai reikalingą fermentą. Tokių reakcijų efektyvumą galima bandyti pagerinti sutelkiant visus reikalingus reakcijai fermentus šalia vienas kito (1 pav.).



1 pav. Fermentus, reikalingus kaskadinei fermentinei reakcijai, galima sutelkti imobilizuojant juos ant koduojančios matricos paviršiaus. Šiuos fermentus reikėtų genetiškai modifikuoti taip, kad skirtingi fermentai turėtų didelį giminiškumą skirtingiems koduojančios matricos segmentams.

Vienas iš variantų kaip būtų galima sukurti pirmoje iliustracijoje vaizduojamą daugiafermentį kompleksą yra panaudojant segmentuotus metalinius nanostrypelius kaip koduojančią matricą bei genetiškai modifikuotas fermentų molekules. Prie fermentų molekulių būtų prijungiamos dideli giminiškumą reikalingam nanostrypelio metaliniam segmentui turinčios oligopeptidinės uodegėlės, kurios sukurtų sąlygas fermentams savaime

organizuotis ant segmentuoto nanostrypelio paviršiaus. Pirmieji žingsniai tokio biohibridinio komplekso sukūrimo link būtų segmentuotų nanostrypelių bei peptidinėmis uodegėlėmis modifikuotų baltymų sukūrimas ir tyrimai. Šio magistrinio darbo tikslas yra išsiaiškinti biohibridinių metalas-baltymas kompleksų kūrimo perspektyvas ir sudėtingumą. Magistriniame darbe keliamos šios užduotys:

1. Charakterizuoti susintetintų nanostrypelių savybes.
2. Patikrinti ar modifikuotas giminiškoms sidabru peptidinėmis uodegėlėmis streptavidinas sugeba prisijungti biotiną.
3. Palyginti modifikuoto ir nemonifikuoto streptavidino giminiškumą sidabro paviršiui.

Magistrinio darbo rezultatai leis geriau suprasti biohibridinių metalas-baltymas kompleksų kūrimo sudėtingumą ir suteiks papildomos informacijos kuriant praktiškai pritaikomas biomimetines daugiafermentes sistemas, skirtas kaskadinių fermentinių reakcijų efektyvumui gerinti.

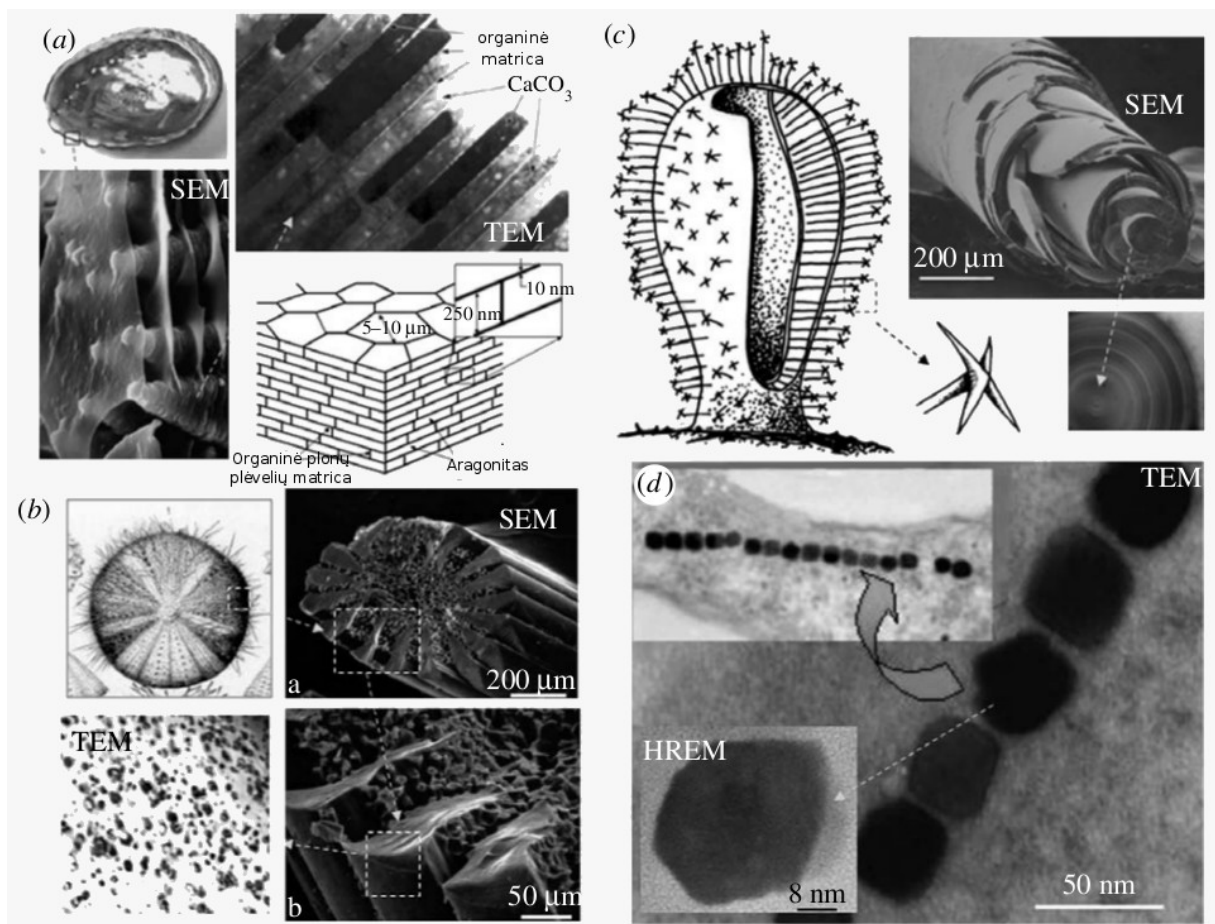
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Molekulinė biomimetika

Biomimetika (angl. *Biomimetics* arba *Bionics*) yra gamtoje vykstančių reiškinių bei stebimų struktūrų biologinių principų taikymas inžinerijoje kuriant praktiškai panaudojamas medžiagas bei sistemas (Sarıkaya ir kiti, 2003). Šiuolaikinės molekulinės biologijos žinios bei modernūs nanoinžinerijos ir molekulinės inžinerijos metodai suteikia galimybę atsirasti naujai biomimetikos sričiai – molekulinei biomimetikai. Šios hibridinės metodologijos priemonėmis mokslininkai mėgina apjungti genetiniais metodais sukurtas molekules kartu su nanoinžinerijos metodais susintetintais neorganiniais dariniais į praktiškai pritaikomas biohibridines sistemas.

1.1.1. Biomimetinės medžiagos

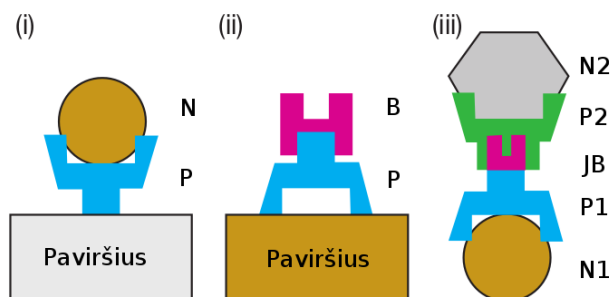
Šiuolaikinė dirbtinių medžiagų sintezė yra atliekama kombinuojant tokius gamybos metodus kaip lydimosi ir kietėjimo procesai, termomechaninis apdorojimas bei tirpalo/vakuuminis nusodinimas ir auginimas (DeGarmo ir kiti, 1998). Daugeliu atveju galutinis produktas yra sistemos kinetikos ir termodinamikos išeigos rezultatas. Tuo tarpu biologinėse sistemose baltymų gamyba vyksta molekulinio atpažinimo principais, kuriuos nulėmė evoliucija. Biologinės kilmės organinės medžiagos struktūrizuojasi ir organizuojasi jau molekuliniam lygmenyje. Tokia organizacija yra hierarchinė ir išlieka nano-, mikro- bei makroskalėse. Natūraliai save struktūrizuojančios organinės molekulės sukuria įvairiausių formų darinius, minkštuosius bei kietuosius audinius. Kietieji audiniai, tokie kaip dantys, kaulai, kiautai, spikulos bei bakterijų gaminamos nanodalelės, yra ypatingi tuo, kad šiuos audinius organizuojantys bei formuojantys baltymai yra taip pat ir pačio audinio sudėtinė dalis (1.1 pav.). Tokie audiniai demonstruoja gyvosios gamtos galimybes sukurti tvirtus ir sudėtingus funkcinius hibridinius darinius susidedančius iš neorganinių bei organinių medžiagų.



1.1 pav. Biologiškai susintetintų hibridinių medžiagų pavyzdžiai (adaptuota iš [Tamerler ir Sarikaya, 2009](#)). (a) Jūrinės ausinukės (*Haliotis rufescens*) perlamutro augimo kraštas. Perlamutras susideda iš aragonito trombcitų, atskirtų plonomis organinės matricos plėvelėmis. (b) Jūrų ežio dyglys yra sudėtingos architektūros vieno kristalo kalcitas, kuriame yra $MgCO_3$ nuosėdų. (c) Pinties spikula (*Rosella*) yra šviesolaidis sudarytas iš sluoksniuoto amorfinio silicio dioksido su centrine baltyminga šerdimi. Spikulos viršūnė yra žvaigždės formos lęšis, kuris atlieka šviesos surinkimo funkciją. (d) Magnetinių laukų bakterija (*Aquaspirillum magnetotacticum*) turi savyje superparamagnetinio magnetito (Fe_3O_4) daleles, naudojamas kaip kompasą, kuris reaguoja į žemės magnetinį lauką.

Molekulinė biomimetika apjungia fizikos bei biologijos mokslų sritis, kadangi biologiniai molekuliniai atpažinimo mechanizmai yra panaudojami stengiantis sukurti naujoviškas medžiagas, turinčias unikalų savybių nano- bei makroskalėse. Heterofunkcinės nanostruktūros medžiagos ir sistemos gali būti įgyvendinamos panaudojant neorganinėms medžiagoms giminiškus peptidus (GEPI, angl. *Genetically Engineered Proteins for Inorganics*). Šie peptidai gali būti identifikuojami ir atrenkami naudojant molekulinės biologijos metodikas. Tokius oligopeptidus galima panaudoti įgyvendinant biomimetines hibridines sistemas trimis būdais ([Sarikaya ir kiti, 2004](#)) (1.2 pav.). Giminiški neorganinėm

medžiagom peptidai gali būti naudojami neorganinių nanodalelių imobilizavimui ant paviršiaus, funkcinių molekulių prijungimui prie paviršiaus bei kelių skirtingų neorganinių nanodalelių sujungimui.



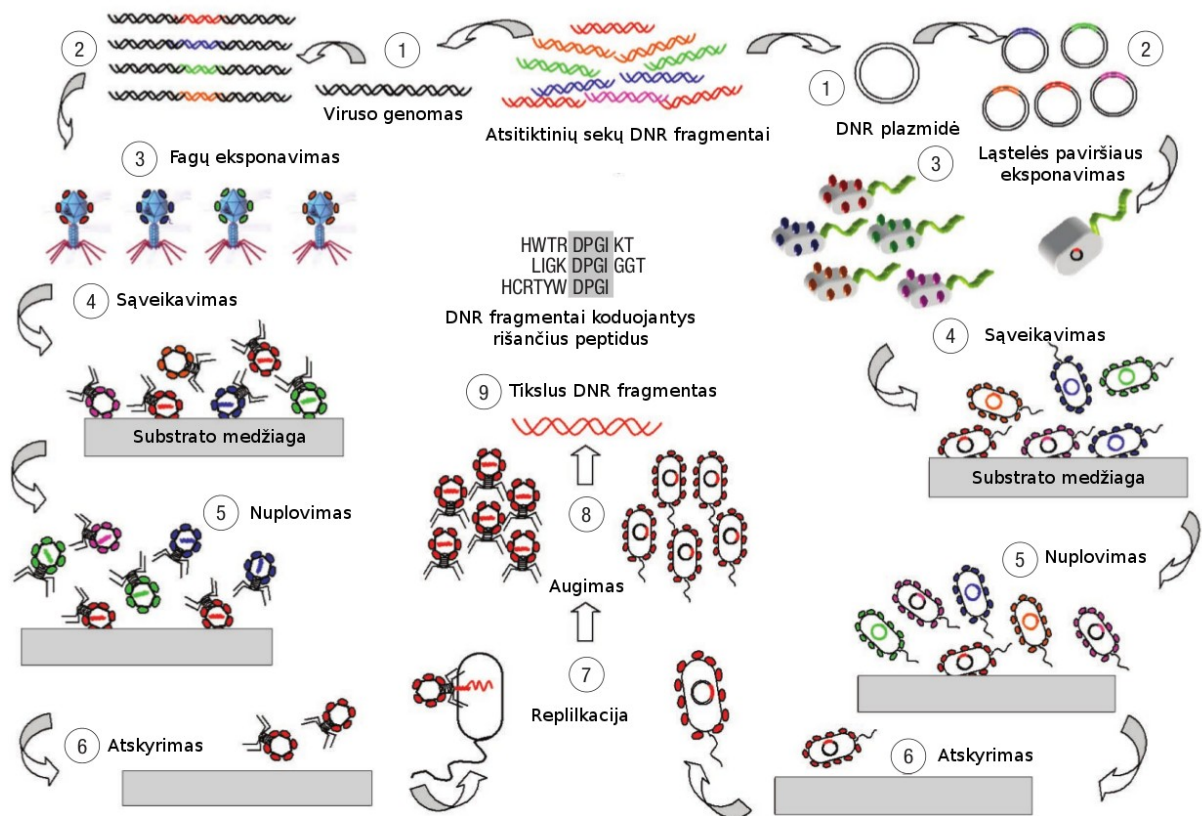
1.2 pav. Trys neorganinėms medžiagoms giminiškų peptidų panaudojimo būdai (adaptuota iš Sarikaya ir kiti, 2004). (i) Neorganinių medžiagų (N) imobilizavimui ant paviršiaus (P); (ii) Neorganinio paviršiaus funkcionalizavimas baltymais (B); (iii) Kelių neorganinių nanodalelių (N1 ir N2) sujungimas į biohibridinę sistemą naudojant du neorganinėms dalelėms giminiškus peptidus (P1 ir P2) bei peptidus jungiantį baltymą (JB).

1.1.2. GEPI atranka ir savybės

GEPI – tai neorganinėms medžiagoms jautrūs, genetiniais metodais sukurti baltymai (angl. *Genetically Engineered Proteins for Inorganics*). Šie baltymai turi didelį giminiškumą parinktai kietai neorganinei medžiagai. Tokie baltymai yra labai svarbūs molekulinėje biomimetikoje, kadangi naudojantis jų neorganikos atpažinimo savybėmis galima kontroliuoti medžiagų organizavimąsi ir specifines savybes molekuliniame lygmenyje.

Šiuolaikinės baltymų lankstymosi bei paviršių sąveikos žinios nėra pakankamos racionaliam baltymų projektavimui. Dėl šios priežasties, norint atrinkti baltymus, kurie gerai atlieka vieną ar kitą funkciją, kiekvieną genetiniais metodais sukurtą baltymą reikia empiriškai patikrinti. Šiuo metu egzistuoja keletas nusistovėjusių *in vivo* biologinių protokolų, naudojamų biologiniams ligandams identifikuoti ir nustatyti konkrečią antigeno atpažinimo sritį. Tokiems tyrimams paprastai yra naudojami fagų eksponavimo (PD, angl. *Phage Display*) (Hoess RH, 2001) bei ląstelės paviršiaus eksponavimo (CSD, angl. *Cell-surface Display*) (Wittrup KD, 2001) metodai. Šie metodai taip pat gali būti naudojami molekulinėje biomimetikoje atrenkant polipeptidų sekas, kurios turi didelį giminiškumą pasirinktam metalui ar kitai neorganinei medžiagai (1.3 pav.). Tokių polipeptidų sekų bibliotekos yra generuojamos įterpiant atsitiktines oligonukleotidų sekas į fagų genus arba į bakterijų plazmidės. To pasekoje šie mikroorganizmai pradeda gaminti įvairius skirtingus atsitiktinių

seku polipeptidus, kurie yra išskiriami ant organizmo paviršiaus (fagų išorinės sienelės arba ląstelės membranos). Vėliau į šią biomasę yra įvedama neorganinė medžiaga. Po inkubacijos neorganinė medžiaga yra kelis kartus nuplaunama, kad būtų nuvalomi visi silpnai sąveikaujantis organizmai. Tvirtai prie medžiagos prisirišę ląstelės arba fagai yra atskiriami naudojant tirpiklį. Atrinkti organizmai yra kurį laiką dauginami, o po to individualiems klonams yra atliekama sekoskaita (angl. *sequencing*) ir taip nustatoma didelį giminiškumą pasirinktai neorganinei medžiagai turinti aminorūgščių seka.



1.3 pav. Biologinių protokolų, skirtų atrinkti didelį giminiškumą pasirinktam neorganiniam substratui turinčius oligopeptidus, principai (adaptuota iš Sarikaya ir kit, 2003). Fagų eksponavimas (kairėje) ir ląstelės paviršiaus eksponavimas (dešinėje). (1, 2, 3) Atsitiktinių DNR sekų molekulių patalpymas į organizmus; (4) Organizmų sąveika su kieta neorganine medžiaga; (5) Silpnai prisitvirtinusių kandidatų nuplovimas; (6) Stipriai prisitvirtinusių organizmų atskyrimas nuo substrato; (7) Didelį giminiškumą neorganinei medžiagai demonstruojančių oligopeptidų koduojančių DNR sekų dauginimas; (8, 9) Sekoskaita ir rišančios sekos identifikavimas.

Paprastai atrenkant didelį giminiškumą neorganinėms medžiagoms turinčius peptidus buvo naudojami neorganinių medžiagų milteliai. Miltelių paviršiaus savybės nėra griežtai

apibrėžtos, todėl polipeptidai gali 'išspręsti' prisijungimo problemą skirtingais būdais, ir didžiausią giminiškumą turinčios molekulės gali būti visai nehomologiškos. Nėra lengva nustatyti, kaip tiksliai peptidai jungiasi prie neorganinių paviršių. Geresnis GEPI giminiškumo mechanizmų supratimas padėtų ateityje efektyviau kurti tikslingesnius peptidus. Oligopeptidų sąveikos su paviršiumi stiprumui tirti gerai tinka paviršiaus plazmonų rezonanso metodas. Papildomos informacijos apie sąveikas taip pat gali suteikti atominės jėgos bei skenuojanti tunelinė mikroskopija, molekulinė spektroskopija, SERS bei paviršiaus difrakcijos tyrimai.

1.1.3. GEPI taikymai

Šiuolaikinės molekulinės biomimetikos vienas pagrindinių tikslų yra sukurti kietoms neorganinėms medžiagoms giminiškų ir pilnai charakterizuotų polipeptidų bibliotekas. Turint solidžią tokių molekulių biblioteką, šiuos peptidus bus galima pritaikyti įvairiose bionanotechnologijos srityse atliekant neorganinių medžiagų sintezę bei formuojant įvairius molekulinis bei nanoskalės darinius. GEPI gali būti naudojami ne tik organizuoti neorganinių darinių sintezę, bet ir prijungti funkcinis baltymus prie neorganinių medžiagų taip sukuriant biohibridinius kompleksus.

GEPI taikymai neorganinių medžiagų sintezėje

Baltymų ir neorganinių medžiagų sąveika vaidina svarbų vaidmenį biomineralizacijos proceso metu. Tokios sąveikos pavyzdžiai gamtoje yra kaulinės struktūros, dantys, moliuskų kiaurai bei vienaląsčių organizmų formuojamos nanodalelės. Susintetinus prie neorganinių medžiagų prisijungiančius peptidus buvo atlikti tyrimai, kuriais stengiasi nustatyti, kokią įtaką šios molekulės daro kietų neorganinių medžiagų formavimuisi.

Vienas tokių tyrimų buvo atliktas su giminiškumą hidroksiapatitui (HA) turinčiais peptidais ([Gungormus ir kiti, 2008](#)). Tyrimo metu buvo pademonstruota, kad biokombinatoriškai atrinkti ir HA atpažįstantys peptidai gali veiksmingai reguliuoti kalcio fosfato nanokristalų formavimąsi. Eksperimento metu tyrimai buvo atliekami su dviem skirtingą sąveikos stiprumą su HA demonstruojančiais oligopeptidais. Atlikus eksperimentus buvo nustatyta, kad abu testuoti peptidai daro įtaką nanokristalų formavimuisi ir morfologijai. Gautos nanodalelės buvo plokščios, kelių dešimčių nanometrų ilgio ir kelių nanometrų storio. Šios dalelės savo morfologija buvo panašios į hidroksiapatito daleles aptinkamas dantų

dentine. Tokia peptidų valdoma morfogenezė ateityje galėtų būti naudojama reguliuojant kietų audinių regeneraciją bei kuriant užpildus audinių atstatymui.

Kitas GEPI poveikio neorganinės medžiagos formavimuisi pavyzdys yra aukso dalelių morfologijos kontrolė, naudojantis didelį giminiškumą aukso paviršiui demonstruojančiais polipeptidais (Hnilova ir kiti, 2008). 12nm dydžio nanodalelės gali būti sintetamos redukuojant $AlCl_3$ Na-citratu. Sumažinus aukso koncentraciją bei temperatūrą reakcijos greitis sulėtėja, ir įvestas į tirpalą giminiškas auksui peptidas spėja sąveikauti su besiformuojančių aukso dalelių paviršiumi ir taip keisti jų morfologiją. Eksperimento metu buvo atrasti keli GEPI variantai, kurie pagreitino aukso kristalizacijos procesą, ir vietoj kubinių aštuonsienių (standartinės aukso nanodalelių formos tomis sąlygomis) buvo gautos plonos, plokščios aukso plėvelės.

Visi šie pavyzdžiai rodo, kad genetiniais metodais sukonstruoti ir neorganinėms medžiagoms giminiški baltymai gali turėti fermentinį poveikį neorganinių medžiagų sintezei bei morfologijos formavimuisi. Parenkant skirtingomis savybėmis pasižyminčius peptidus galima kontroliuoti neorganinių medžiagų sintezę ir taip pasiekti norimų rezultatų.

GEPI taikymai nanodalelių organizavimui

Molekulių tvarkingas organizavimas ant neorganinio paviršiaus yra svarbus konstruojant baltymų bei DNR mikrogardeles, kurios plačiai naudojamos genomikoje, proteomikoje bei klinikiniuose tyrimuose. Molekulės ant kietų paviršių gali būti imobilizuojamos įvairiais litografiniais metodais. Biomolekulių imobilizacijai ant stiklo arba metalo paviršių paprastai yra reikalingi savitvarčiai monosluoksniai. Savitvarkių monosluoksnių trūkumai yra nestabilumas, atsitiktinė prijungiamų baltymų orientacija bei sudėtingas paruošimas. GEPI yra pranašesni už savitvarkius monosluoksnius tuo, kad jie gali būti tiksliai parenkami specifiniam paviršiui. Kitas privalumas yra tas, kad GEPI galima genetiškai arba sintetiškai sujungti su molekule ar nanodalele, kuria norima funkcionalizuoti paviršių ir taip iš karto sukurti savitvarkį funkcinį sluoksnį. GEPI jau buvo panaudotas organizuojant kvantinius taškus ir fluorescuojančias molekules ant siličio oksido paviršiaus naudojant litografiją bei savaiminį molekulių organizavimąsi (Kacar ir kiti, 2009).

1.2. Nanostrypeliai

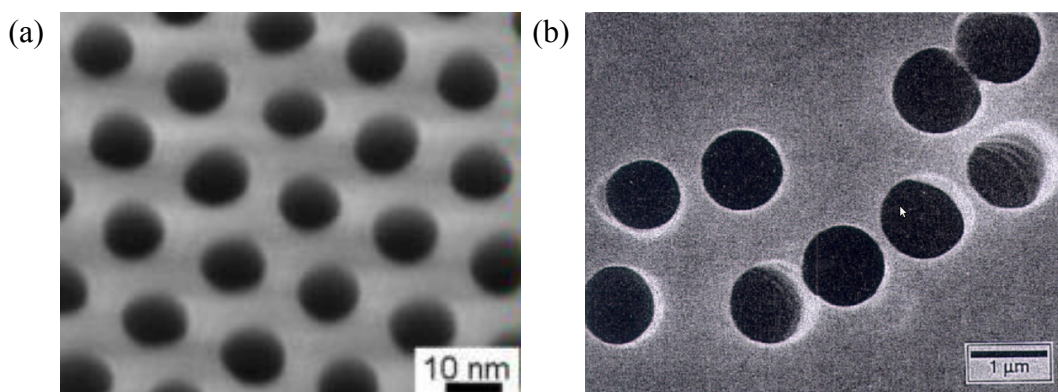
Nanostrypeliai (angl. *Nanorod* arba *Nanowire*) yra pailgos cilindrinės fizinės

struktūros, kurių diametras svyruoja nuo dešimčių iki šimtų nanometrų (1 nanometras = 10^{-9} metro), o ilgis būna keliais, keliolika ar dar daugiau kartų didesnis negu diametras. Nanostrypeliai gali būti daromi iš metalų, puslaidininkių, izoliacinių medžiagų ar netgi molekulių. Tokie dariniai yra dažnai apibūdinami kaip vienos dimensijos (1D) objektai.

1.2.1. Nanostrypelių sintezė

Vienas pagrindinių nanostrypelių sintetavimo būdų yra sintezė naudojant šablonus (Ying 1999, Martin 1996). Šablonu gali būti įvairios porėtos medžiagos, kurių porose galima sintetinti nanostrypelius. Susintetintų strypelių parametrai priklauso nuo porų dimensijų. Kaip šablonai dažnai yra naudojamos anodinės aliuminio oksido (Al_2O_3) membranos, porėtas stiklas, jonais išsėdinti polimerai bei žėručio plėvelės (1.4 pav.).

Porėtų anodinių aliuminio oksido membranų šablonų sintezė atliekama anodizuojant gryno aliuminio plėvelės įvairiose rūgštyse (Diggle ir kiti, 1969). Kruopščiai parinkus anodizavimo sąlygas plėvelėje gaunamas tvarkingas šešiakampis beveik apvalių porų masyvas. Porų saviorganizacijos procesas plėvelėje susideda iš dviejų pagrindinių procesų: vienodo diametro porų formavimosi ir porų rikiavimosi. Priklausomai nuo anodizacijos sąlygų porų diametras gali svyruoti nuo $<10\text{nm}$ iki 200nm . Porų tankis gali svyruoti nuo 10^9 - 10^{11} porų/ cm^2 . Mokslininkams taip pat pavyko nustatyti, kad dvigubas anodizacijos procesas pagerina porų tankio bei diametro pasiskirstymo savybes. Tokio proceso metu po pirmos anodizacijos susiformavęs aliuminio oksido sluoksnis yra ištirpinamas rūgštyje ir anodizavimas pakartojamas antrą kartą.



1.4 pav. (a) Aliuminio oksido membranos, kurios vidutinis porų diametras 10nm, SEM mikrografija. (b) SEM mikrografija jonais bombarduoto polikarbonato, kurio porų diametras 1μm (Martin 1996).

Kitas porėtų medžiagų gaminimo būdas yra cheminis šablono paruošimas išsėdinant

griovelius, sukurtus jonais bombarduojant medžiagą. Tokie šablonai yra gaminami iš žėručio bei polikarbonato paviršių (Ferain ir Legras, 1993). Nanostrypelių šabloninei sintezei taip pat yra naudojamos tokios medžiagos kaip nano-kanalinis stiklas (angl. *Nano-channel glass*), dviblokiniai kopolimerai ir kt.

Vienas iš nanostrypelių sintetavimo būdų šablonuose yra elektrocheminis nusodinimas. Elektrochemija yra plačiai naudojama plonų plėvelių auginimui ant laidžių paviršių. Kadangi elektrocheminį auginimą galima kontroliuoti substrato paviršiaus normalės kryptimi, šis metodas taip pat gali būti pritaikytas 1D fizinių struktūrų sintetavimui, kai dengimo plotas yra apribotas porėto šablono. Pasirinktas šablonas turi išlikti stabilus elektrolite elektrolizės metu. Įvairūs šablono defektai yra žalingi nanostrypelių augimui, kadangi nusėdimo procesai pirmiausia vyks nepažeistose porose, ir deformuotos poros liks neužpildytos. Prieš atliekant elektrocheminį nusodinimą, pirmiausia reikia plonu laidžiu metaliniu sluoksniu padengti šablono apačią, kad šablonas veiktų kaip katodas. Sintetavimų nanostrypelių ilgis gali būti reguliuojamas nustatant skirtingą elektrolitinio dengimo trukmę. Dalelėm bombarduotas žėrutis ir polimerų membranos paprastai yra naudojamos kintamos srovės elektrolizei. Norint šiam procesui naudoti aliuminio oksido membranas pirmiausia reikia nuo membranų pašalinti izoliuojančią membranų apačią ir po to užgarinti ploną metalinį sluoksnį ant membranų paviršiaus (Almawlawi ir kiti, 1994). Sintetaviant strypelius elektrocheminiu metodu dažniausiai, tačiau ne visada, gaunamos polikristalinės struktūros. Elektrocheminio metodo privalumu laikoma tai, kad taip įmanoma susintetinti segmentuotus, iš kelių medžiagų susidedančius strypelius. Keičiant katodo potencialus elektrolite, kuriame yra kelių rūšių metalo jonų, gali būti nusodinami skirtingų rūšių metalų sluoksniai.

Slėgio injekcija yra dar vienas būdas nanostrypelių sintetavimui šablonuose. Jį galima naudoti tada, kai nanostrypeliai sintetaviami iš žemą lydimosi tašką turinčios medžiagos, kuri gerai kristalizuojasi, arba naudojamas šablonas pasižymi fiziniu tvirtumu. Slėgio injekcijos sintetavimo metu nanostrypeliai yra formuojami slėgio pagalba įstumiant skystą medžiagą į šablono poras. Atliekant šį procesą išsiskiria nemažai šilumos. Pasirinktas šablonas turi išlikti chemiškai stabilus ir nesuirti. Atliekant sintetavimą slėgio injekcijos pagalba paprastai yra naudojamas nano-kanalinis (angl. *nano-channel*) stiklas.

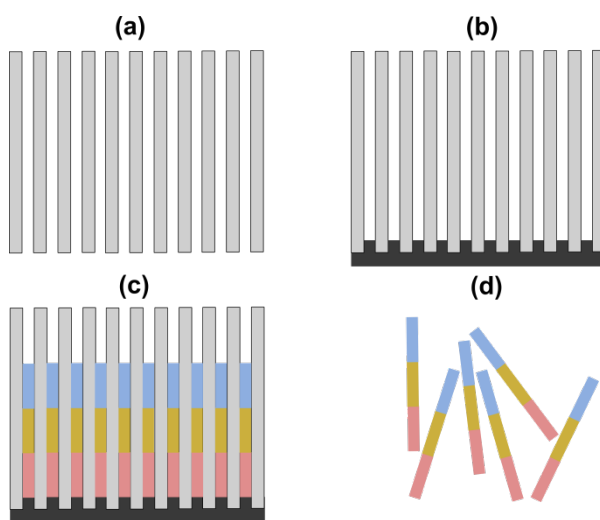
Kitas panašus metodas nanostrypelių sintetavimui yra vadinamas gariniu nusodinimu (angl. *Vapor deposition*) (Heremans ir kiti, 2000; Cheng ir kiti, 2000). Medžiaga, iš kurios

sintetinami strypeliai, yra kaitinama tol, kol pavirsta garais. Garais užpildomos šablono poros, ir medžiaga atšaldoma iki kietos būsenos. Šiuo atveju porėtas šablonas turi pasižymėti geru atsparumu karščiui. Šiame metode slėgis nėra naudojamas, todėl šablonas neturi pasižymėti atsparumu slėgiui.

Nanostrypelių sintetinimui gali būti naudojami ir ne šablonais paremti metodai. Vienas tokių metodų yra garų-skysčio-kieto kūno (VLS, angl. *vapor-liquid-solid*) metodas (Wagner ir Ellis, 1964). Šio metodo metu kristalinė struktūra yra auginama iš dujų panaudojant procesą katalizuojantį skystį.

1.2.2. Segmentuoti nanostrypeliai

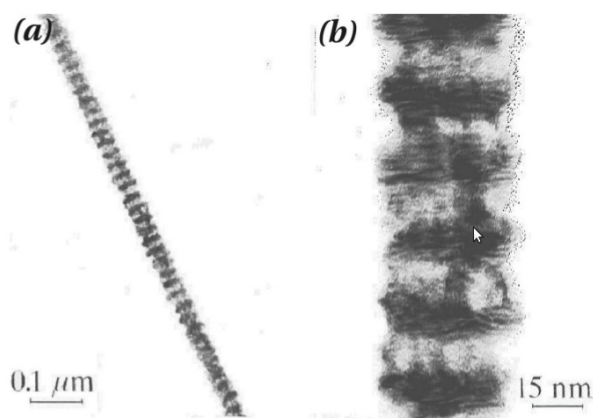
Segmentuoti nanostrypeliai pasižymi tuo, kad vienas strypelis būna sudarytas iš dviejų arba daugiau skirtingų medžiagų (1.6 pav.). Tokį efektą galima pasiekti sintetinant strypelius elektrocheminio nusodinimo būdu ir reguliariai keičiant elektrolitą arba naudojant skirtingus katodo potencialus tame pačiame elektrolite, kuriame yra skirtingų metalų jonų. Taip susiformuoja skirtingų medžiagų sluoksniai (1.5 pav.). Segmentuotų nanostrypelių gamybos procesas gali būti pilnai automatizuotas, kad būtų galima greitai ir efektyviai pagaminti reikiamos segmentacijos strypelius (Zhang ir kiti, 2009). Daugiasluoksniai nanostrypeliai dar gali būti vadinami 'brūkšninio kodo nanostrypeliais' (angl. *barcoded nanowires*), kadangi skirtingais sluoksnių ilgiais galima keisti strypelių savybes bei koduoti informaciją. Tokios nanomedžiagos paviršiaus funkcionalizavimo savybės suteikia įvairių galimybių taikant segmentuotus strypelius nanoinžinerijoje.



1.5 Pav. Elektrocheminė segmentuotų metalinių nanostrypelių sintezė nanoporinėse Al_2O_3

membranose: (a) Aliuminio oksido membrana; (b) Ag nusodinimas ant apatinės membranos pusės; (c) Nuoseklus skirtingų metalų jonų elektrocheminis nusodinimas membranos porose; (d) Laidaus sidabro sluoksnio ir nanoporinės membranos ištirpinimas, nanostrypelių suspensijos atskyrimas.

Naudojant elektrocheminio dengimo metodiką mokslininkams pavyko susintetinti daugiasluoksnius Ni-Pt (Liang ir kiti, 2005), Fe-Au (Lee ir kiti, 2007), Au-Pt (Martin ir kiti, 1999), Au-Ag (Nicewarner-Pena ir kiti, 2001), Ni-Cu (Guo ir kiti, 2003), Co-Pt (Choi ir kiti, 2005), Co-Cu (Piroux ir kiti, 1994) nanostrypelius. Nanostrypelių kodavimas skirtingų metalų sluoksniais gali būti naudojamas norint suteikti strypeliams unikalių fizinių savybių arba panaudoti tokį brūkšninį kodą įvairių medžiagų identifikavimui, molekulių aptikimui bei genų inžinerijoje (Pearce ir kiti, 2006).



1.6 pav. (a) Vieno Co(10nm)/Cu(10nm) daugiasluoksni nanostrypelio TEM vaizdas. (b) To paties strypelio regionas iš arčiau (Piroux ir kiti, 1994).

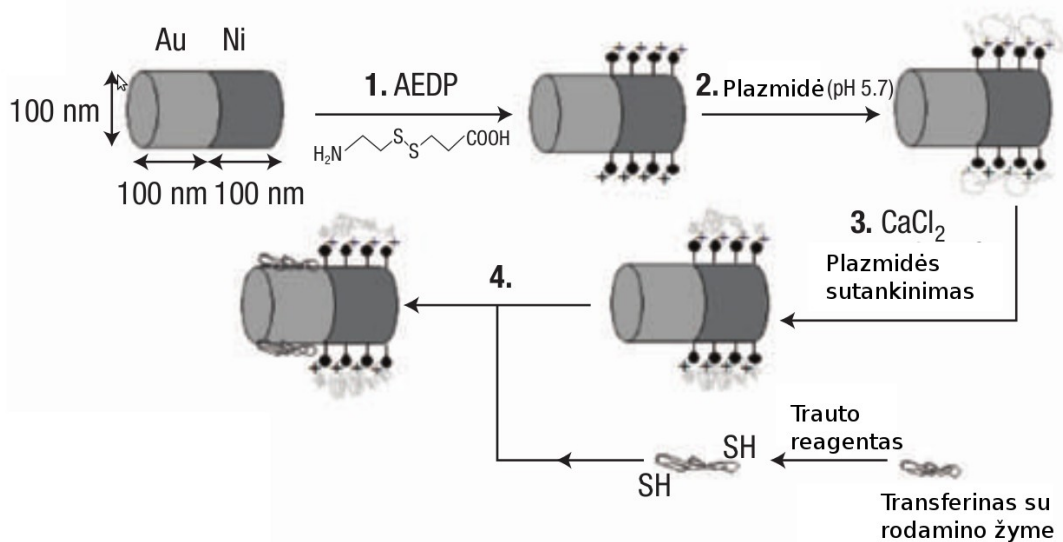
Kadangi segmentuotus nanostrypelius galima sintetinti iš įvairių medžiagų, tai suteikia galimybę sukurti tokius strypelius, kurių segmentai turėtų mažesnę ar didesnę trauką vienai ar kitai molekulei. Patalpinus tokį strypelį į tirpalą galima selektyviai prijungti molekules prie tų strypelių regionų, kuriems jos turi giminiškumą. Konstruojant biohibridines sistemas, organines molekules prie nanostrypelių segmentų galima prijungti ir per tarpininkus. Vienas iš būdų tai padaryti yra genų inžinerijos metodais prie organinės molekulės prijungti oligopeptidą (trumpą amino rūgščių polimerą), kuris turi didelį giminiškumą pasirinktai nanostrypelio segmento medžiagai. Tokios modifikuotos organinės molekulės galės per oligopeptidinę grandinę prisijungti prie reikiamo nanostrypelio segmento.

1.2.3. Nanostrypelių taikymai

Viena iš potencialių nanostrypelių taikymo sričių yra bioelektroniniai sensoriai

(Patolsky ir kiti, 2006). Dėl unikalių elektronų transportavimo savybių, kurias lemia didelis paviršiaus ir tūrio santykis, nanostrypelių elektroninis laidumas yra labai jautrus paviršiaus struktūros pokyčiams. Prie receptoriais funkcionalizuotų nanostrypelių prisijungusios molekulės pakeičia elektros krūvio nešėjų kiekį nanostrypelio kūne, ir tai atsispindi pakitusiame nanostrypelio laidume. Dėl šių savybių nanostrypeliai gali būti naudojami konstruojant biologinių tyrimų prietaisus, kurie greitai ir efektyviai identifikuotų įvairių ligų biomarkerius.

Segmentuoti nanostrypeliai gali būti sėkmingai taikomi genų inžinerijoje (Salem ir kiti, 2003). Al_2O_3 šablono sintezės būdu sukurti Au-Ni nanostrypeliai buvo sėkmingai panaudoti genų pernešimui į ląstelę. Plazmidės buvo prijungtos prie Ni segmento, o į ląstelę padedantis patekti baltymas transferinas – prie Au segmento (1.7 pav.). Toks kompleksas geriau patekdavo į ląstelę negu DNR molekulės padrikai plaukiojančios tirpale.



1.7 pav. Segmentuotų nanostrypelių panaudojimas genų pernašoje (adaptuota iš Salem ir kiti, 2003).

(1) Nanostrypeliai buvo inkubuoti su 3-[(2-aminoetil) ditio] propioninės rūgšties (AEDP) rišančia molekule. Šios molekulės prisijungia prie nikelio segmento per karboksilato grupes. (2) Plazmidės per elektrostatinę sąveiką prisijungia prie AEDP aminių. (3) CaCl_2 sutankina plazmides ir padaro jas kompaktiškesnes. (4) Transferinas su rodamino žyme yra selektyviai prijungiamas prie nanostrypelio aukso segmento.

Fermentais aktyvuoti nanostrypeliai gali būti naudojami įvairiems nanoprietaisams, tokiems kaip biosensoriai, biokuro celės bei bioaktuatoriai, kurti. Cinko oksido nanostrypeliai buvo funkcionalizuoti gliukozės oksidaze taip sukuriant efektyvų gliukozės nanosensorių (Zang ir kiti, 2007). Šio sensoriaus efektyvumą nulėmė didelis nanostrypelių paviršiaus ploto ir tūrio santykis. Silicio oksido nanostrypeliai taip pat buvo naudojami kaip atraminės

matricos gliukozės oksidazei (Chen ir kiti, 2006). Šie gliukozės detektoriai buvo labai jautrūs ir jų pagalba buvo galima aptikti 0.01mM gliukozės koncentraciją.

Fermentais funkcionalizuoti nanostrypeliai taip pat buvo pritaikyti kaip perjungiami bioelektrokatalitiniai prietaisai (Laoharoensuk ir kiti, 2007). Toks perjungimas (aktyvacija) buvo įgyvendintas naudojant Au/Ni nanostrypelius. Prie aukso segmento buvo prijungtas gliukozės oksidazės segmentas, o nikelio segmentas buvo reikalingas nanostrypelio valdymui magnetiniu lauku. Reguluojant magnetinį lauką strypeliai atsidurdavo arba horizontalioje, arba vertikalioje pozicijoje. Skirtinga nanostrypelių pozicija keisdavo gliukozės oksidazės sąveiką su prie paviršiaus prijungtu ferocenu. Tokie perjungiami bioelektrokatalitiniai prietaisai gali būti panaudoti biokuro celėse, bioreaktoriuose bei biosensoriuose.

Dar viena galima ateities nanostrypelių taikymo sritis galėtų būti vaistų išnešiojimas (Eghedari ir kiti, 2009). Sferinės nanodalelės susilaukė daug dėmesio šioje srityje, tačiau vienas pagrindinių jų minusų yra tas, kad jas sunku pritaikyti multifunkciniam procesui, kadangi jos turi vienintelį išorinį paviršių (skirtingai nei segmentuoti nanostrypeliai). Segmentuotus nanostrypelius galima funkcionalizuoti skirtingomis molekulėmis, todėl vienas nanostrypelis galėtų atlikti kelias funkcijas, tokias kaip vaistų nukreipimas bei vaizdinimas. Žinoma, medžiagos iš kurių gaminami nanostrypeliai turi pasižymėti mažu toksiškumu ir žala sveikatai.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Nanostrypeliai

Tyrimams naudoti metaliniai bei bimetaliniai nanostrypeliai buvo gauti iš dr. Arūno Jagmino (Chemijos institutas). Šie strypeliai buvo susintetinti naudojant elektrocheminį nusodinimą Al_2O_3 membranose, kurių porų diametras 15nm bei 30nm. Nanostrypeliai buvo gauti vandens suspensijos pavidalu. Tirti nanostrypelių mėginiai:

Membranos porų diametras 15nm, ilgis > 10 μ m:

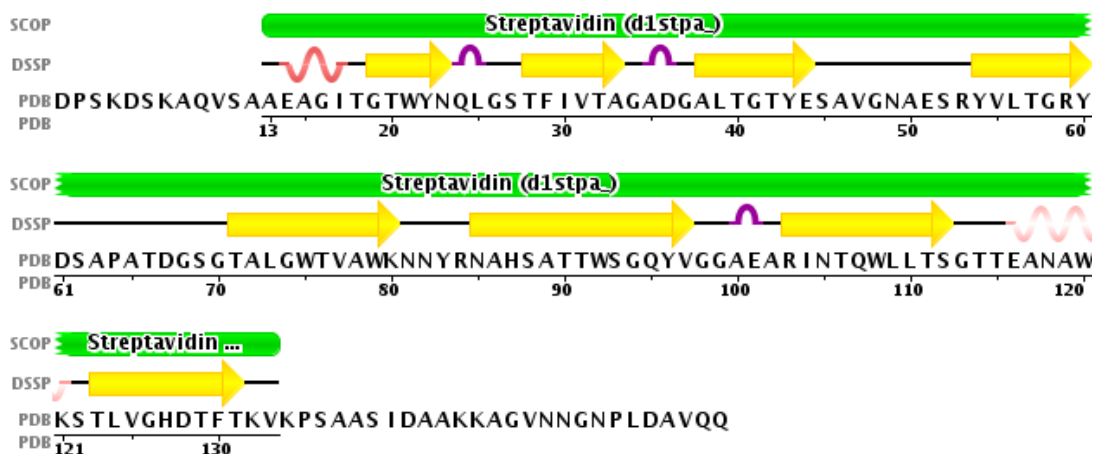
1. Vieno segmento Ag
2. Trijų segmentų Ag-Au-Ag
3. Dviejų segmentų Ag-Au

Membranos porų diametras 30nm, ilgis > 10 μ m

1. Vieno segmento Ag

2.1.2. Baltymai

Baltymai buvo gauti iš dr. Vidos Časaitės (Biochemijos institutas). Tyrimuose naudoti baltymai buvo tetramerinis streptavidinas bei tetramerinis streptavidinas su dideli giminiškumą sidabru turinčiomis oligopeptidinėmis uodegėlėmis.



2.1 pav. Streptavidino monomero aminorūgščių seka ir antrinė struktūra.

Streptavidino monomero aminorūgščių seka:

mdpskdskaqvsaeeagigtwynqlgstfivtagadgaltgtyesavгнаesryvltgrydsapatdgsгал
gwtvawknnrynahsattwsgqyvvgaeearintqwltsgtteanawkstlvghdtftkvkpsaasidaakkagvnnngnpl
davqqrwlehhhhh

Streptavidino monomero su oligopeptidine uodegėle aminorūgščių seka:

mdqnpsslfrylpsddpskdskaqvsaeeagigtwynqlgstfivtagadgaltgtyesavгнаesryvltgry
dsapatdgsгалgwtvawknnrynahsattwsgqyvvgaeearintqwltsgtteanawkstlvghdtftkvkpsaasid
aakkagvnnngnpldavqqrwlehhhhh

Šios sekos pradžioje esančios didelį giminiškumą sidabru turinčios oligopeptidinės uodegėlės NPSSLFRYLPSD seka buvo parinkta pagal Mehmet Sarikaya grupės atliktus peptidų atrankos rezultatus (Sarikaya ir kiti, 2003). Streptavidino be NPSSLFRYLPSD uodegėlės aminorūgščių seka skiriasi nuo natyvaus streptavidino (2.1 pav.) tuo, kad sekos pabaigoje dar buvo prijungiamas polihistidinė uodegėlė, kad būtų lengviau baltymą išgryninti. Polihistidinė uodegėlė taip pat prijungta ir prie sidabru giminišką seką turinčio streptavidino.

2.1.3. Baltymų elektroforezei naudotos medžiagos

Streptavidino ir biotino sąveikai patikrinti buvo naudojamas fluorescuojantis stilbazolo ir biotino junginys. Elektroforezės gelis susidėjo iš skirstomojo (2.1 lentelė) bei koncentruojamojo (2.2 lentelė) gelių. Elektroforezėje naudoto baltymų pavyzdžio dažo sudėtis nurodoma 2.3 lentelėje, leidimo buferio – 2.4 lentelėje, o dažo, kuriuo gelis buvo dažomas atlikus elektroforezę sudėtis – 2.5 lentelėje.

2.1 lentelė. Elektroforezėje naudoto skirstomojo gelio sudėtis

<i>Medžiaga</i>	<i>Kiekis</i>
Akrilamidas	14%
H ₂ O	4,2 ml
Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8	3 ml
SDS 10% (w/v)	50 ml
Akrilamidas/Bisakrilamidas 40%(29:1)	4,2 ml
TEMED 10% (v/v)	5 μl
APS 10% (w/v)	120 μl

2.2 lentelė. Elektroforezėje naudoto koncentruojamojo gelio sudėtis

<i>Medžiaga</i>	<i>Kiekis</i>
Akrilamidas	5%
H ₂ O	3,1 ml
Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	1,25 ml
SDS 10% (w/v)	50 ml
Akrilamidas/Bisakrilamidas (29:1)	0,562 ml
TEMED 10% (v/v)	4 µl
APS 10% (w/v)	20 µl

2.3 lentelė. Baltymų pavyzdžio dažo sudėtis

<i>Medžiaga</i>	<i>Kiekis</i>
Tris-HCl, pH 6,8	320 mM
EDTA	20 mM
β-merkaptoetanolis	40% (v/v)
Glicerolis	20% (v/v)
SDS	10% (w/v)
Bromfenolio mėlis	0,05% (w/v)

2.4 lentelė. SDS – PAGE leidimo buferis

<i>Medžiaga</i>	<i>Kiekis</i>
Glicinas	14,4 g
Tris-HCl	3,0 g
SDS	1,0 g
H ₂ O	iki 1 l, pH 8,3

2.5 lentelė. Coomassie Brilliant Blue baltymų dažas

<i>Medžiaga</i>	<i>Kiekis</i>
Coomassie Brilliant Blue R 250	0.5 g
Etanolis	425 ml
H ₂ O	425 ml
Acto rūgštis	100 ml
Metanolis	50 ml

2.2. Metodai

2.2.1. Atominės jėgos mikroskopija

Nanostrypeliai buvo tiriami naudojant atominės jėgos mikroskopijos stotį Agilent 5500 (Agilent technologies). AFM matavimams atlikti buvo naudojami du skirtingi AFM zondai, skirti platesniems ($< 50 \times 50 \mu\text{m}$) bei siauresniems ($< 8 \times 8 \mu\text{m}$) skenavimo režimams. Skenavimo metu buvo naudojami virpesinis bei kontaktinis skenavimo režimai. Dėl didelių mėginių paviršiaus nelygumų skenavimo greitis buvo gana lėtas – 0.5-2 linijos/s, esant skenavimo raiškai 256x256 taškų. Nanostryelių AFM gauti vaizdai buvo apdoroti programine įranga Gwyddion.

Mėginys mikroskopijai buvo paruošiamas keliais etapais:

- 1) Nanostryelių suspensija yra sukratoma, kad strypelių nuosėdos sukiltų ir homogeniškiau pasiskirstytų.
- 2) Dalis suspensijos atskiriama į atskirą mėgintuvėlį ir patalpinama į ultragarso vonelę 15-30 minučių laikotarpiui, kad nanostrypeliai labiau atsiskirtų vienas nuo kito.
- 3) Po ultragarso vonelės paimamas 10 μl lašelis suspensijos ir užlašinamas ant žėručio paviršiaus.
- 4) Žėručio paviršius porai valandų paliekamas natūraliai nudžiūti.
- 5) Žėručio paviršius dar 5 minutes padžiovinamas azoto dujų srove.
- 6) Žėručio paviršius pritvirtinamas prie AFM bandinio stalelio.

2.2.2. Baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezė buvo atliekama denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant 5% koncentruojantį ir 14% skirstomąjį gelius. Prieš elektroforezę baltymo pavyzdys buvo sumaišomas su baltymų pavyzdžio dažu santykiu 1:5. Elektroforezė buvo vykdoma, esant 15 – 40 mA srovės stiprumui, kol baltymų pavyzdžio dažė esantis bromfenolio mėlis pasiekia gelio galą. Po elektroforezės gelis buvo dažomas 1 val. Coomassie dažu, ir atplaunamas.

2.2.3. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija

Peptidų SERS spektrai buvo registruojami naudojantis RamanFlex 400 (PerkinElmer

Inc.) spektrometru su termoelektriškai šaldomu (-50° C) CCD detektoriumi. Spektrų žadinimui buvo naudojama 785 nm lazerinė spinduliuotė. Matavimai buvo atlikti ant sidabro elektrodo. Elektrodo paruošimo metodika:

- 1) Elektrodas nušveičiamas sudrėkintu švitrinu popieriumi.
- 2) Elektrodas nuplaunamas.
- 3) Elektrodas 10 minučių poliruojamas Al₂O₃ milteliais.
- 4) Elektrodas nuplaunamas.
- 5) Elektrodas panardinamas į vandenį ir palaikomas ultragarso vonelėje 5 minutes.
- 6) Elektrodas nuplaunamas.
- 7) Elektrodas 2 minutes laikomas panardintas į acetoną.
- 8) Elektrodas nuplaunamas.
- 9) Elektrodas panardinamas į CaCl tirpalą aktyvacijos celėje.
- 10) Elektrodas redukuojamas celėje 5 minutes prie -1V.
- 11) Elektrodas redukuojamas celėje kaitaliojant įtampą tarp -400mv ir 400mV 4 kartus. Po kiekvieno įtampos pakeitimo laukiama 30 sekundžių.
- 12) Elektrodas nuplaunamas.
- 13) Ant elektrodo paviršiaus užlašinamas tiriamasis tirpalas.

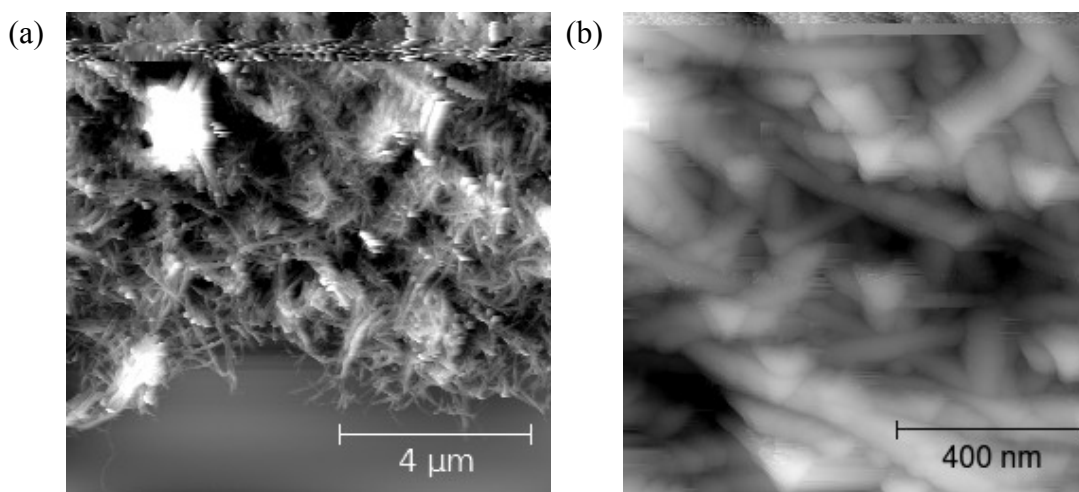
Matavimai buvo atlikti sausai - baltymas sodintas iš 10⁻⁴ mol./l vandeninio tirpalo ant elektrodo paviršiaus, tada elektrodas buvo inkubuojamas 30 min. ir po to nuplaunamas H₂O bei nudžiovinamas. Spektro matavimo programinės įrangos parametrai: I = 20 mW; T = 10s×30c = 300s. Matavimai buvo vykdomi judėjimo režimu. Gauti baltymų SERS spektrai buvo apdoroti naudojantis programine įranga GRAMS. Galutiniai spektrų grafikai buvo suformuoti naudojantis programine įranga SigmaPlot 10.0.

3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI

Kuriami metalas-fermentas kompleksai bus sudaryti iš segmentuotų metalinių nanostrypelių bei genetiškai modifikuotų baltymų. Aš tyriau kelis skirtingus segmentuotų bei vieno segmento nanostrypelių mėginius naudodamas atominės jėgos mikroskopiją ir bandžiau charakterizuoti susintetintus nanostrypelius bei įvertinti šių nanostrypelių tinkamumą tolimesniam biohidridinių kompleksų kūrimui. Kita mano užduotis buvo patikrinti ar streptavidinas su genetiniais metodais prijungtomis giminiškomis sidabru oligopeptidinėmis uodegėlėmis išlaiko savo cheminę struktūrą ir sugeba prisijungti biotiną taip pat gerai kaip ir nemodifikuotas tetramerinis streptavidinas. Taip pat aš palyginau modifikuoto bei nemodifikuoto streptavidino sąveiką su sidabro paviršiumi naudodamas paviršiaus sustiprintą Ramano spektroskopiją.

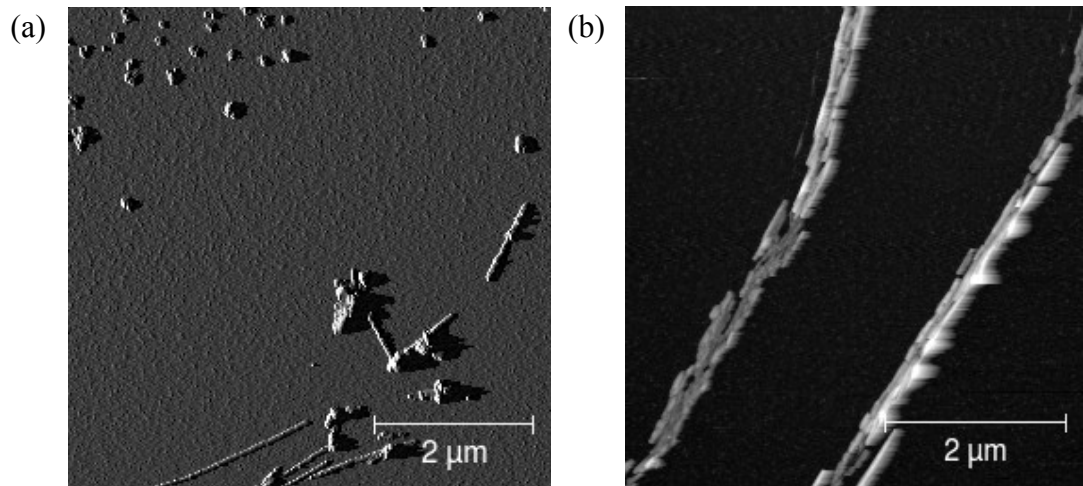
3.1.1. Atominės jėgos mikroskopija

Naudojantis atominės jėgos mikroskopu buvo bandoma charakterizuoti nanostrypelius, sintetintus 15nm ir 30nm diametro aliuminio oksido membranose. 3.1 paveiksle pateikiamos 15nm diametro porose sintetintų vieno segmento sidabrinių nanostrypelių nuotraukos. Nanostrypeliai po mėginį buvo pasiskirstę netolygiai ir tam tikruose regionuose sudarydavo masyvus (agregacijas). Tokios nanostrypelių agregacijos vaizdas ir matomas 3.1 paveiksle.



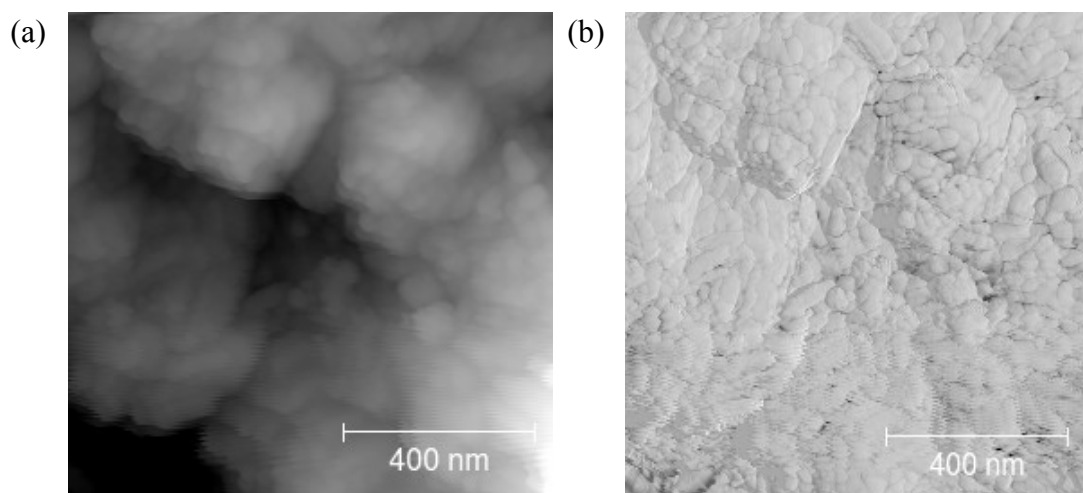
3.1 pav. 15nm diametro aliuminio oksido membranos porose sintetintų Ag nanostrypelių mėginio AFM topografiniai vaizdai. Skenavimas atliktas virpesiniu režimu. (a) Nanostrypelių masyvas; (b) Tas pats nanostrypelių masyvas iš arčiau.

AFM skenavimai taip pat buvo atliekami mėginio regionuose, kuriuose optiškai nesimatė nanostrypelių. Nuskenavus tokį regioną jis dažnai būdavo tuščias tačiau taip pat pasitaikydavo atveju, kai būdavo galima aptikti mažiau suagregavusių nanostrypelių fragmentų bei įvairių nanostrypelių nuolaužų. 3.2 paveiksle yra pateikiamos kelios tokių regionų nuotraukos. Vaizdai gauti skenuojant 15nm diametro membranose sintetintų vieno segmentų sidabrinių nanostrypelių mėginį.



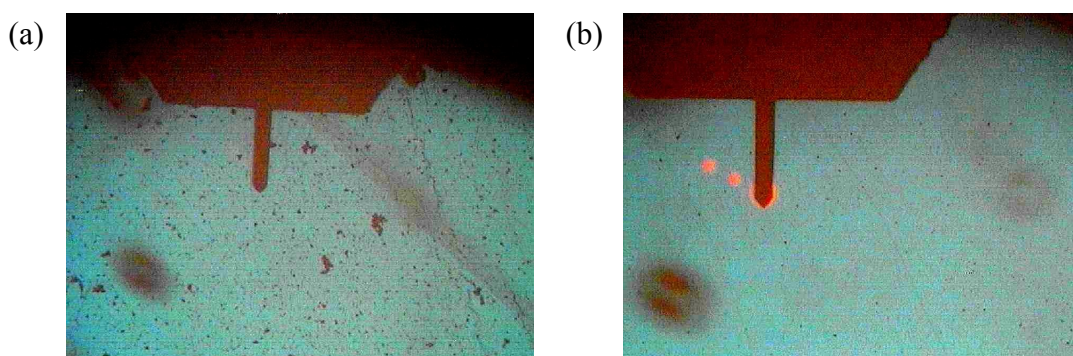
3.2 pav. 15nm diametro membranos porose sintetintų Ag nanostrypelių mėginio AFM vaizdai. Skenavimas atliktas virpesiniu režimu. Skenuojant šalia didelių nanostrypelių sankaupų buvo galima aptikti įvairių nuolaužų bei mažiau agregavusių nanostrypelių fragmentų. (a) Topografinis vaizdas; (b) Fazinis vaizdas. Skenavimai atlikti skirtinguose regionuose.

Nagrinėjant 15nm diametro porose sintetintų segmentuotų Ag-Au bei Ag-Au-Ag nanostrypelių mėginius buvo aptinkamos įvairios gruoblėtos struktūros (3.3 pav.). Pailgų, nanostrypelius primenančių nanostruktūrų šiuose mėginiuose nebuvo aptikta.



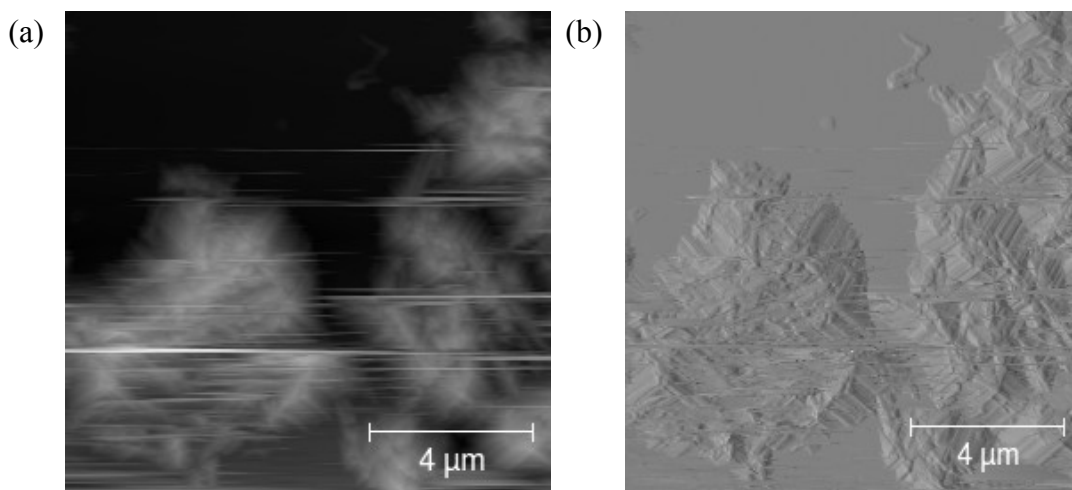
3.3 pav. 15nm diametro membranos porose sintetintų Ag-Au-Ag nanostrypelių mėginio AFM (a) topografinis ir (b) fazinis vaizdai. Skenavimas atliktas virpesiniu režimu.

3.4 paveiklėse matomose nuotraukose demonstruojama 30nm diametro membranų porose sintetintų sidabrinių nanostrypelių polinkis homogeniškiau pasiskirstyti po suspensiją mažinant nanostrypelių koncentraciją. 3.4 (a) nuotraukoje taip pat aiškiai optiškai matomos anksčiau minėtos nanostrypelių agregacijos.



3.4 pav. Optinio mikroskopo nanostrypelių nuotraukos. Nuotraukose matomi 30 nm diametro porose sintetinti nanostrypeliai, pasiskirstę ant žėručio paviršiaus, ir atominės jėgos mikroskopo zondas. (a) nuotraukoje nanostrypelių koncentracija mėginio suspensijoje buvo didesnė negu (b) atveju.

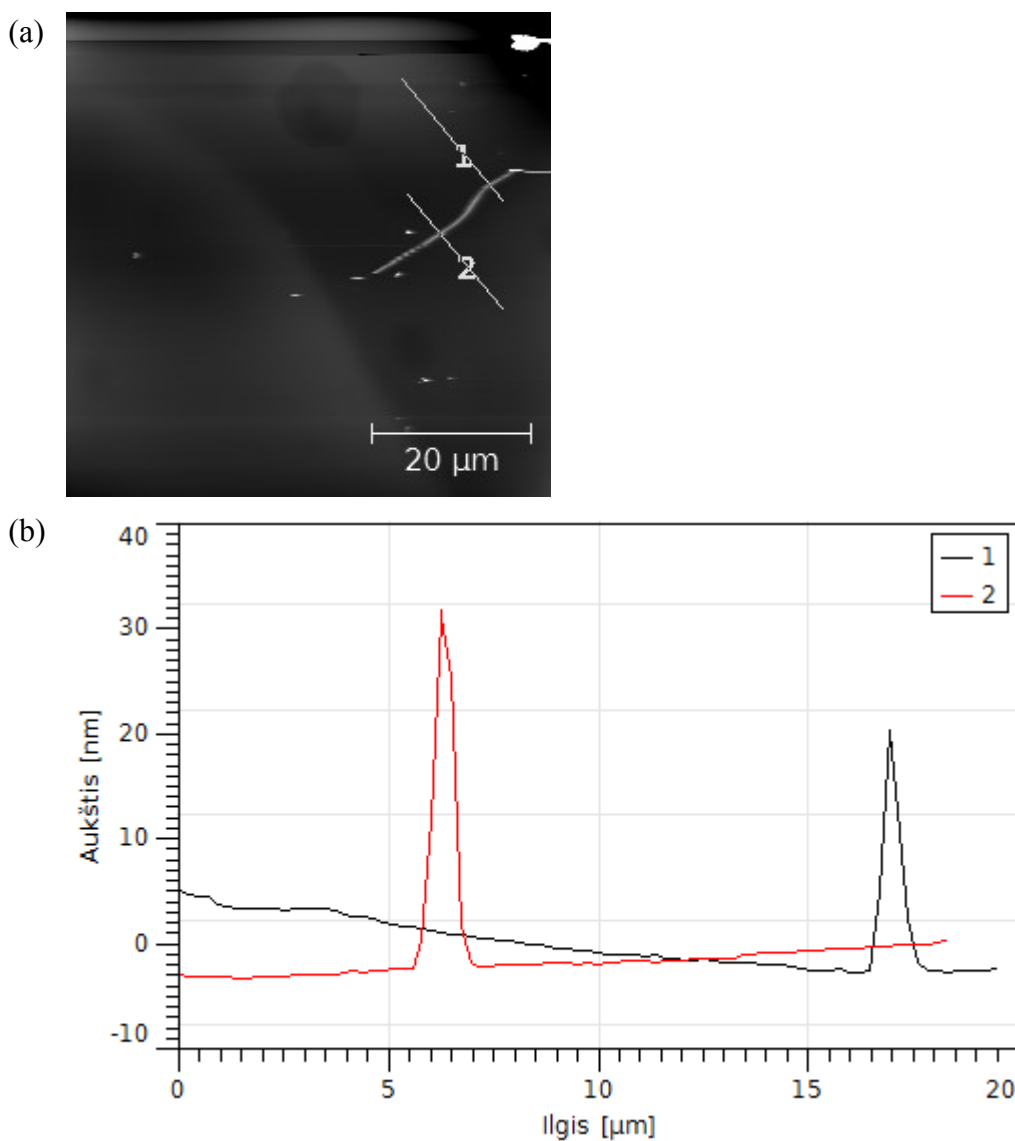
Tiriant 30 nm diametro porose sintetintų nanostrypelių mėginį buvo galima aptikti kristalus primenančių tvarkingų struktūrų (3.5 pav.).



3.5 pav. 30nm diametro membranos porose sintetintų Ag nanostrypelių mėginio AFM topografinis (a) ir deflekcinis (b) vaizdai. Skenavimas atliktas kontaktiniu režimu.

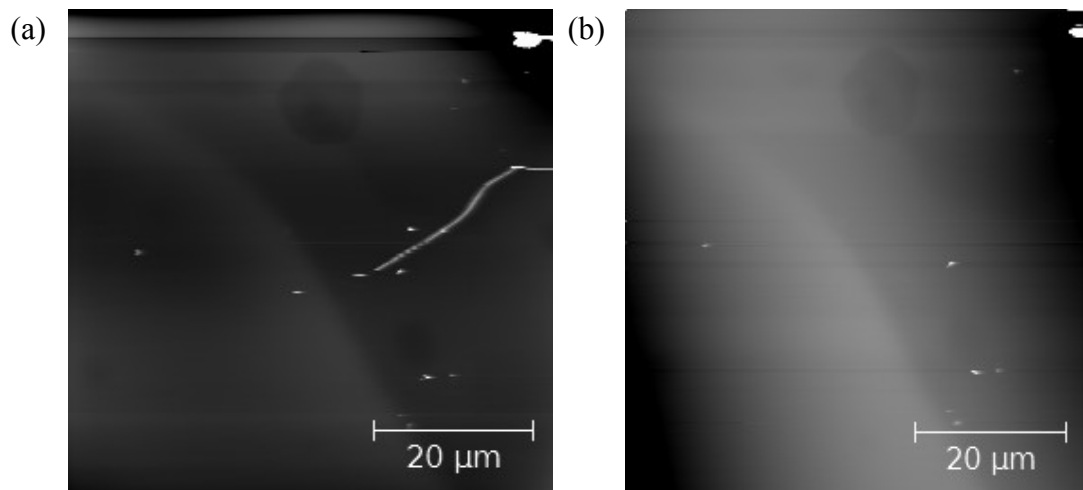
Skenuojant 30nm diametro membranų porose susintetintų vieno segmento sidabrinių

nanostrypelių mėginį pavyko aptikti pavienių nanostrypelių (3.6 pav. a). Apie nanostrypelių morfologiją galima spręsti iš topografinio vaizdo bei topografinių pjūvių (3.6 pav a, b). Iš topografinių pjūvių matoma, kad nanostrypelio diametras svyruoja nuo 20 iki 30nm.



3.6 pav. 30nm diametro porų membranoje sintetinto nanostrypelio paviršiaus morfologija. AFM skenavimas atliktas kontaktiniu režimu. (a) Topografinis nanostrypelio vaizdas; (b) Topografiniame vaizde pažymėtų pjūvių 1 ir 2 paviršiaus morfologija.

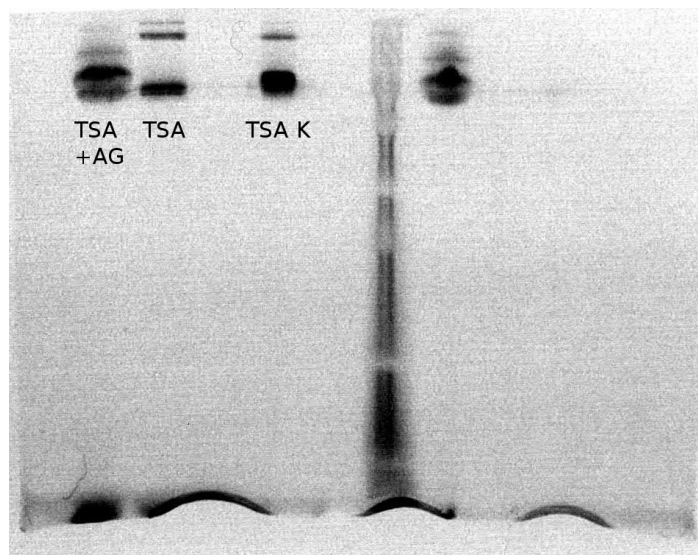
Bandant kelis kartus nuskenuoti atrastus pavienius nanostrypelius buvo pastebėta, kad AFM zondas smarkiai sąveikauja su strypeliais ir juos nuvalo nuo žėručio paviršiaus. 3.7 iliustracijoje matoma, kaip (a) vaizde esantis nanostrypelis yra nuvalomas ir (b) vaizde jo jau nebelieka nors žėručio regionas yra tas pats.



3.7 pav. 30nm Ag nanostrypelių mėginio AFM nuotraukos. Skenavimas atliktas kontaktiniu režimu. (a) Pavienis nanostrypelis; (b) Vieta, kurioje buvo aptiktas pavienis nanostrypelis, nuskenuota dar vieną kartą.

3.1.2. Elektroforezė

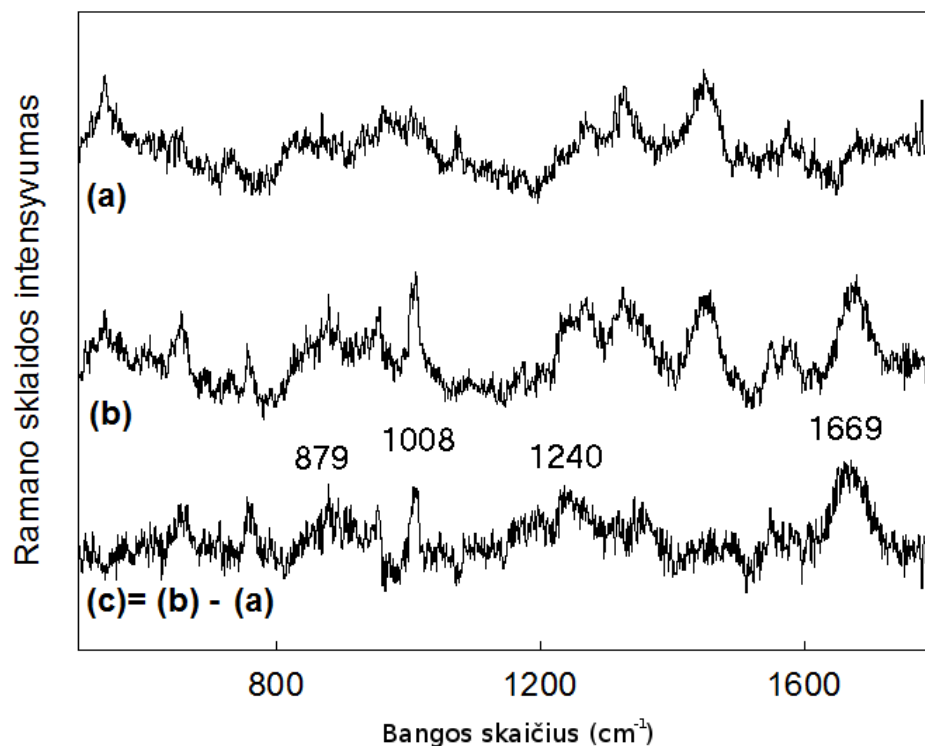
Baltymų elektroforezė buvo atlikta streptavidinui su giminiškais sidabru peptidinėmis uodegėlėmis bei nemodifikuotam streptavidinui. Prieš atliekant elektroforezę baltymai buvo sumaišomi su fluorescuojančio biotino dažu. 3.8 paveiksle pateikiama elektroforezės gelio, apšviesio ultravioletine šviesa nuotrauka. Tamsios dėmės nuotraukoje yra fluorescuojantys gelio regionai.



3.8 pav. Baltymų fluorescencija atlikus elektroforezę. Eksperimentas atliktas su tetrameriniu streptavidinu (TSA), tetrameriniu streptavidinu modifikuotu sidabru giminiškais oligopeptidais (TSA+AG) bei kontroliniu tetrameriniu streptavidinu (TSA K).

3.1.3. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija

Paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos eksperimentai buvo atliekami su sidabru giminiškomis oligopeptidinėmis uodegėlėmis modifikuotu streptavidinu bei paprastu streptavidinu neturinčiu šių uodegėlių. 3.9 paveiksle demonstruojami šių medžiagų SERS spektrai naudojant sidabrinį elektrodą: (a) Paprasto streptavidino spektras; (b) Modifikuoto streptavidino spektras; (c) skirtuminis b – a SERS spektras.



3.9pav. Paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos spektrai. (a) Tetramerinis streptavidinas; (b) Tetramerinis streptavidinas su oligopeptidinėmis uodegėlėmis; (c) Skirtuminis spektras.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Eksperimentų metu buvo tiriami vieno, dviejų bei trijų segmentų nanostrypelių mėginiai. Nanostrypelių tyrimų tikslas buvo charakterizuoti susintetintus nanostrypelius ir išsiaiškinti ar jie yra tinkami biohibridinių kompleksų formavimui. Šiame projekto etape yra svarbu išobulinti nanostrypelių gamybos metodologiją ir įsitikinti, kad yra galimybė sukurti reikalingų matmenų ir segmentų organizacijos nanostrypelius. Kitame eksperimentų etape tirtas baltymas streptavidinas nėra fermentas tačiau jis buvo modifikuojamas tokiu pačiu būdu, koku ateityje turėtų būti modifikuojami reikalingi fermentai (prijungiant didelį giminiškumą pasirinktam metalui turinčias peptidines uodegėles). Šių eksperimentų tikslas buvo įsitikinti ar pavyksta prijungti šias uodegėles prie baltymo ir ar jis su šiomis uodegėlėmis išlaiko savo konformaciją bei savybes. Taip pat svarbu patikrinti ar iš tiesų modifikuotas baltymas stipriau sąveikauja su pasirinkto metalo paviršiumi lyginant su nemonifikuotu baltymu. Įsitikinus, kad pavyksta sukurti kokybiškus nanostrypelius bei tinkamai modifikuoti baltymus bus galima pradėti formuoti konkrečią daugiafermentę biohibridinę nanosistemą.

Pirmiausia buvo tiriami nanostrypeliai, kurie buvo sintetinti aliuminio oksido membranų 15nm diametro porose. Gautose suspensijose nanostrypeliai buvo plika akimi matomi kaip tamsios nuosėdos. Palaikius mėginį ultragarso vonelėje buvo tikimasi, kad nanostrypeliai tolygiai išsisklaidys po suspensiją tačiau jie nebuvo linkę homogeniškai pasiskirstyti. Dėl to ant žėručio paviršiaus išdžiovintas nanostrypelių mėginys pasižymėjo dideliais sulipusių nanostrypelių masyvais (3.1 pav.). Pavienių nanostrypelių skenavimo metu nebuvo aptikta. Dėl didelių paviršiaus nelygumų nanostrypelių agregacijas buvo sudėtinga skenuoti ir išgauti švarų vaizdą. Šalia stambių nanostrypelių masyvų buvo galima aptikti nanostrypelių nuolaužų bei labiau atsiskyrusių nanostrypelių fragmentų (3.2 pav.). Norint geriau atskirti nanostrypelius buvo bandoma juos sonikuoti etanolio suspensijoje, tačiau geresnių rezultatų negu tyrimuose su vandenine suspensija nebuvo pastebėta. Tiriant segmentuotus Ag-Au-Ag bei Ag-Au nanostrypelius nepavyko gauti AFM vaizdų, kuriuose būtų galima vienareikšmiškai identifikuoti nanostrypelių egzistavimą. Gautuose vaizduose nebuvo matyti plonų pailgų struktūrų (3.3 pav.). Įtariama, kad segmentuoti nanostrypeliai galėjo suirti ištirpdžius membraną arba pati membrana galėjo ne iki galo ištirpti.

Norint sumažinti nanostrypelių paviršiaus ploto ir tūrio santykį, taip sumažinant

nanostrypelių tarpusavio sąveiką ir agregaciją, buvo užsakytas didesnio diametro nanostrypelių mėginys. Naujame mėginyje nanostripeliai buvo sintetinti aliuminio oksido membranose, kurių porų diametras 30nm. Šie nanostripeliai pasižymėjo mažesne agregacija. Palaikius mėginį ultragarso vonelėje nuosėdos būdavo išblaškomos ir vizualiai jų nebesimatydavo, nanostrypelių suspensija įgaudavo tolygią pilkšvą spalvą. Ultragarso paveiktoje suspensijoje po 5-10 minučių pradėdavo vizualiai matytis iš naujo susidaranti nuosėdos ir po kelių valandų nanostripeliai vėl pilnai nusėdavo. Nepaisant mažesnės agregacijos, paruošus nanostrypelių mėginį ant žėručio paviršiaus optiniu mikroskopu būdavo galima įžiūrėti susidariusius nanostrypelių masyvus. Nėra aišku, ar stripeliai nebuvo pilnai išsklaidyti ultragarsu, ar šie masyvai susidarė džiuvimo metu. Nanostrypelių suspensijos koncentracijos mažinimas buvo efektyvi priemonė nanostrypelių AFM mėginio homogeniškumui gerinti (3.4 pav.).

Tiriant nanostrypelių, sintetintų 30nm diametro porose, mėginius buvo pastebėta, jog agregavę nanostripeliai yra linkę tarpusavyje sudaryti organizuotas stuktūras, panašias į kristalus (3.5 pav.). Skenuojant šiuos mėginius atominės jėgos mikroskopu pavyko aptikti pavienius stripelius (3.6 pav. a), tačiau charakterizuoti jų morfologiją buvo nelengva dėl per didelės AFM zondo ir nanostrypelių sąveikos. 3.7 pav. matyti, kaip nanostripelis yra nuvalomas nuo žėručio paviršiaus: (a) nuotraukoje nanostripelis matomas, o (b) nuotraukoje – jau nebe, nors skenavimas atliekamas toje pačioje vietoje (kad vieta ta pati galima matyti iš žėručio paviršiaus artifaktų). Kenksminga sąveika tarp AFM adatos ir nanostrypelių buvo pastebėta skenuojant tiek kontaktiniu, tiek virpesiniu režimu. Gali būti, jog tiriant mėginius virpesiniu režimu nanostripeliai prisikabindavo prie AFM adatos, nes staiga pasikeisdavo pačios adatos rezonansinis dažnis, ir skenuojamame vaizde atsirasdavo triukšmas. Skenuojant kontaktiniu režimu vaizduose pasitaikydavo mažiau triukšmų. Vis dėlto galima manyti, jog 3.5 pav. matomi triukšmai taip pat galėjo būti sąveikos tarp adatos ir pavienių nanostrypelių, kurie yra nuvalomi atominės jėgos mikroskopo, rezultatas. Norint pagerinti nanostrypelių bei paviršiaus sąveiką ir sumažinti AFM adatos įtaką buvo bandoma mėginius džiovinti ant stiklo paviršiaus, tačiau tai geresnių rezultatų nedavė. 3.7 pav. matomi keli AFM nuotraukos topografiniai pjūviai. Šie pjūviai parodo, kad aptiktas stripelis yra 20-30nm diametro, o jo ilgis apie 15-20 μ m.

Tiek 15nm, tiek 30nm membranų porose sintetintų nanostrypelių mėginiuose pavyko aptikti sidabrinis vieno segmento nanostripelius, tačiau susidurta su nanostrypelių

agregacijos bei AFM zondo ir mėginio sąveikos problemomis. Šiuo metu negalima tiksliai pasakyti, ar pavyko susintetinti biohibridiniams fermentams tinkamus nanostrypelius kadangi dėl AFM zondo ir mėginio sąveikos nebuvo įmanoma patikimai charakterizuoti mėginiuose aptinkamų nanodarinių. Zondo ir nanostryelių sąveiką galima bandyti sumažinti keliais būdais:

- 1) Keičiant pačių nanostryelių išmatavimus. Norint suteikti nanostryeliams daugiau stabilumo ant žėručio paviršiaus reikėtų didinti jų diametrą. Didesnio diametro nanostryeliai būtų sunkesni, turėtų didesnę paviršiaus plotą ir todėl stabiliau prisitvirtintų prie žėručio paviršiaus.
- 2) Keičiant charakterizavimo metodą. Norint patikimiau charakterizuoti nanostryelius taip pat būtų galima naudoti TEM, o ne AFM metodiką.
- 3) Keičiant mėginio paruošimo metodiką taip, kad nanostryeliai stipriau prisitvirtintų prie paviršiaus.

Nanostryelių agregacijos problemą padėtų išspręsti pačių nanostryelių ilgio sutrumpinimas. Sutrumpinus strypelių ilgį sumažėtų nanostryelių paviršiaus ploto ir tūrio santykis ir to pasekoje nanostryeliai mažiau sąveikautų ir pintųsi tarpusavyje.

Kita užduotis buvo patikrinti sukurtus baltymus (streptavidiną bei streptavidiną su prijungtomis didelę giminiškumą sidabru turinčiomis uodegėlėmis). Baltymų funkcionalumo patikrinimas buvo atliktas sumaišant streptavidino mėginius su fluorescuojančiu biotinu. Atlikus elektroforezę, elektroforezės gelis buvo apšviestas ultravioletine šviesa. 3.8 pav. matomi fluorescuojantys regionai. Pirma iš kairės fluorescuojanti juosta yra tetramerinis streptavidinas su uodegėlėmis, antra – streptavidinas be uodegelių, o trečia – kontrolinis tetramerinis streptavidinas. Visos šios juostos fluorescuoja, todėl galima teigti, kad tiek natyvus, tiek modifikuotas streptavidinas yra sukurti bei išgryninti korektiškai ir nepraranda savo biotino prisijungimo savybių. Pirmoji juosta yra ganėtinai išplitusi. Tai galima aiškinti baltymo apirimu elektroforezės metu.

Sekantis eksperimentų etapas buvo atlikti sustiprintos paviršiaus ramano spektroskopijos tyrimus ir palyginti sukurtų baltymų sąveiką su sidabro paviršiumi. 3.9 pav. pateikiamas eksperimento rezultatas, kuriame matomi (a) streptavidino, (b) modifikuoto streptavidino su oligopeptidinėmis uodegėlėmis ir (c) skirtuminis spektrai. Skirtuminiame

spektre matomą intensyvią 1669 cm^{-1} srityje esančią juostą galima priskirti amido I atsitiktinės spiralės virpesiams, 1240cm^{-1} virpesių juostą – amido III virpesiams, o 1008cm^{-1} bei 879cm^{-1} juostas – triptofano virpesiams ([Galarreta ir kiti, 2011](#)). Kadangi streptavidino funkcionalizuoto sidabruo giminiškais uodegėlėmis SERS spektras išsiskiria būtent baltymams būdingomis intensyviomis juostomis galima teigi, jog šis baltymas sąveikauja su sidabro paviršiumi stipriau negu paprastas tetramerinis streptavidinas. Paprasto streptavidino SERS spektras taip pat pasižymi įvairiomis juostomis tačiau jų negalima priskirti baltymų sudedamųjų dalių vibracijoms. Šias spektrų juostas gali skleisti įvairios priemonės likę po baltymų gryninimo iš ląstelių biomasės.

IŠVADOS

1. 30nm diametro nanostrypeliai agreguoja mažiau negu 15nm diametro nanostrypeliai.
2. Naudojantis AFM nepavyko patikimai charakterizuoti nanostrypelių dėl per didelės mėginio ir AFM zondo sąveikos.
3. Tetramerinis streptavidinas prijungus giminiškas sidabru oligopeptidines uodegėles išlaiko savo biotino prisijungimo savybę.
4. Tetramerinis streptavidinas su giminiškomis sidabru oligopeptidinėmis uodegėlėmis sąveikauja su sidabro paviršiumi stipriau negu nmodifikuotas tetramerinis streptavidinas.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Tautvilas Mečinskas

SYNTHESIS AND STUDY OF BIOHYBRID METAL-PROTEIN COMPLEXES

Master thesis

Summary

Biochemical enzyme cascade is a series of chemical reactions in which the products of one reaction are consumed in the next reaction. If one could organize all the necessary enzymes for the reaction in close quarters this could possibly lead to more effective cascade reactions. One way of organizing enzymes is by fusing them on barcoded nanowire matrices. This could be achieved by tailoring enzyme molecules with genetically engineered proteins for inorganics (GEPs). My assignment was to characterise possible nanowire candidates for these biohybrid complexes using AFM and examine silver binding characteristics of GEPI tailored streptavidin using SERS. I could not reliably characterise nanowires because the interaction between AFM probe and nanowires was too interfering. Also the nanowires used to aggregate and it was difficult to separate them using ultrasound. 15nm diameter nanowires aggregated more than 30nm diameter nanowires. Streptavidin tailored with Ag binding GEPs showed stronger interaction with Ag electrode surface than ordinary streptavidin. Also this modified streptavidin was capable of binding with biotin. This proves that added oligopeptide chains did not negatively affect the chemical structure of streptavidin.

PADĖKOS

Dėkoju darbo vadovu dr. Justui Barauskui už tikslingą vadovavimą bei patarimus atliekant magistrinį darbą. Taip pat norėčiau padėkoti dr. Arūnui Jagminui už glaudų bendradarbiavimą tobulinant nanostrypelius. Dr. Vidai Časaitei už pagalbą atliekant baltymų elektroforezės eksperimentą. Habil. dr. Gediminui Niaurai už patarimus atliekant SERS eksperimentus. Ievai Kairytei už pagalbą atliekant SERS eksperimentus bei apdorojant eksperimentų rezultatus. Prof. dr. Rolandui Meškiui už naudingas mokslines konsultacijas baltymų genetinės inžinerijos tema. Marijai Jankunec už naudingus AFM metodikos patarimus. Dėkoju recenzentui dr. Kasčiui Krikštopaičiui už vertingus komentarus padėjusius tobulinti magistrinio darbo aprašymą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Almawlawi D, Liu CZ ir Moskovits M (1994). Nanowires formed in anodic oxidenanotemplates. *J of Mater Res.* **9**:1014–1018 (1994).
2. Chen WW, Yao H, Tzang CH, Zhu JJ, Yang MS ir Lee ST. Silicon nanowires for high sensitivity glucose detection. *Appl Phys Lett.* **88**:213104-213106 (2006).
3. Cheng GS, Zhang LD, Chen SH, Li Y, Li L, Zhu XG, Zhu Y, Fei GT ir Mao YQ. Ordered nanostructure of single-crystalline GaN nanowires in a honeycomb structure of anodic alumina. *J Mater Res.* **15**:347–350 (2000).
4. Choi J, Oh SJ, Ju H ir Cheon J. Massive fabrication of free-standing one-dimensional Co/Pt nanostructures and modulation of ferromagnetism via a programmable barcode layer effect. *Nano Lett.* **5**:2179-2183 (2005).
5. DeGarmo EP, Black JT ir Kohner RA. *Materials and Processes in Manufacturing.* New York:McMillan (1988).
6. Diggle JW, Downie TC, ir Goulding CW. Anodic oxide films on aluminum. *Chem Rev.* **69**:365–405 (1969).
7. Eghtedari M, Liopo AV, Copland JA, Oraevsky A ir Motamedi M. Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. *Nano Lett.* **9**:287-291 (2009).
8. Ferain E ir Legras R. Track-etched membrane - dynamics of pore formation. *Nucl. Instrum. Methods B,* **84**:331–336 (1993).
9. Galarreta BC, Norton PR ir Lagugn-Labarhet. SERS detection of streptavidin/biotin monolayer assemblies . *Langmuir.* **27**:1494-1498 (2011).
10. Gungormus M, Fong H, Kim IW, Evans JSE, Tamerler C ir Sarikaya M. Regulation of in vitro calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides. *Biomacromolecules* **9**:966–973 (2008).
11. Guo Y, Wan L, Zhu C, Yang DC ir Bai C. Ordered Ni-Cu nanowire array with enhanced coercivity. *Chem. Mater.* **15**:664-667 (2003).
12. Heremans J, Thrush CM, Lin YM, Cronin S, Zhang Z, Dresselhaus MS ir Mansfield JF. Bismuth nanowire arrays: synthesis and galvanomagnetic properties. *Phys Rev B.* **61**:2921–2930.
13. Hnilova M, Oren EE, Seker UOS, Wilson BR, Collino S, Evans JS, Tamerler C ir Sarikaya M. Effect of molecular conformations on the adsorption behavior of gold-binding peptides. *Langmuir* **24**:12 440–12 445 (2008).
14. Hoess RH. Protein design and phage display. *Chem Rev.* **101**:3205–3218 (2001).

15. Kacar T, Ray J, Gungormus M, Oren EE, Tamerler C & Sarikaya M. Quartz binding peptides as molecular linkers towards fabricating multifunctional micropatterned substrates. *Adv. Mater* **21**:295-299 (2009).
16. Laocharoensuk R, Bulbarelo A, Mannino S ir Wang J. Adaptive nanowire–nanotube bioelectronic system for on-demand bioelectrocatalytic transformations. *Chem Commun*. 3362-3364 (2007).
17. Lee JH, Wu JH, Liu HL, Cho JU, Cho MK, An BH, Min JH, Noh SH ir Kim YK. Iron-gold barcode nanowires. *Angewandte Chemie*. **46**:3663-3667 (2007).
18. Liang H, Guo Y, Hu J, Zhu C, Wan L ir Bai C. Ni-Pt Multilayered nanowire arrays with enhanced coercivity and high remanence ratio. *Inorganic Chemistry*. **44**:3013-3015 (2005).
19. Martin BR, Dermody DJ, Reiss BD, Fang M, Lyon A, Natan MJ ir Mallouk TE. Orthogonal self-assembly on colloidal gold-platinum nanorods. *Adv. Matter*. **11**:1021-1025 (1999).
20. Martin CR. Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials. *Chem. Mater*. **8**:1739-1746 (1996).
21. Nicewarner-Pena SR, Freeman RG, Reiss BD, He L, Pena DJ, Walton ID, Cromer R, Keating CD, Natan ir MJ. Submicrometer metallic barcodes. *Science*. **294**:137-141 (2001).
22. Patolsky F, Zheng GF ir Lieber CM. Nanowire-based biosensors. *Anal Chem*. **78**:4260-4269 (2006).
23. Pearce ME, Melanko JB ir Salem AK. Multifunctional nanorods for biomedical applications. *Pharmaceutical Research*. **24**:2335-2352 (2007).
24. Piraux L, George JM, Despres JF Leroy C, Ferain E, Legras R, Ounadjela K ir Fert A. Giant magnetoresistance in magnetic multilayered nanowires. *Phys Lett*. **65**:2484-2486 (1994) .
25. Salem AK, Searson PC ir Kam Leong KW. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nature materials*. **2**:668-671 (2003).
26. Sarikaya M, Tamerler C, Jen AKY, Schulten K ir Baneyx F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials*. **2**:577-585 (2003).
27. Sarikaya M, Tamerler C, Schwartz DT ir Baneyx F. Materials assembly and formation using engineered polypeptides. *Annu Rev Mater Res*. **34**:373-408 (2004).
28. Tamerler C ir Sarikaya M. Molecular biomimetics: nanotechnology and biotechnology using genetically engineered peptides. *Phil Trans R Soc A*. 1-24 (2009).
29. Vogel, S. *Cats' Paws and Catapults*. New York: W. W. Norton & Company (1998).
30. Wagner RS ir Ellis WC. Vapor-liquid-solid mechanism of single crystal growth. *Appl Phys Lett*, **4**:89–91 (1964).
31. Walton ID, Norton SM, Balasingham A, He L, Oviso DF, Gupta D, Raju PA, Natan MJ ir Freeman RG. Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy. *Analytical Chemistry*. **74**:2240-2247 (2002).

32. Wittrup KD. Protein engineering by cell surface display. *Curr Opin Biotechnol.* **12**:395–399 (2001).
33. Ying JY. Nanoporous systems and templates. *Science Spectra.* **18**:56–63 (1999).
34. Zang JF, Li CM, Cui XQ, Wang JX, Sun XW, Dong H ir Sun CQ. Tailoring zinc oxide nanowires for high performance amperometric glucose sensor. *Electroanalysis.* **19**:1008-1014 (2007).
35. Zhang W, Hu J, Ding H, Wan L ir Song W. Programmed fabrication of bimetallic nanobarcodes for miniature multiplexing bioanalysis. *Analytical Chemistry.* **81**:2815-2818 (2009).