

(19)



(10) **LT 2015 080 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2015 080**

(51) Int. Cl. (2017.01): **G01N 27/00
B01D 69/00
G01N 33/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2015-09-14**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2017-03-27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

VILNIAUS UNIVERSITETAS, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

**Tadas RAGALIAUSKAS, LT
Mindaugas MICKEVIČIUS, LT
Gintaras VALINČIUS, LT
David J. VANDERAH, US**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas

(57) Referatas:

Pareikštas paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas, panaudojant daugiasluoksnes liposomas (MLV). Šis būdas įgalina greitai, nenaudojant sudėtingos įrangos, gauti tBLM, pasižyminčias geromis izoliacinėmis savybėmis.

Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas

Išradimo sritis

Išradimas yra susijęs su pakabintomis lipidinėmis membranomis, konkrečiai, su imobilizuotų bisluoksnių fosfolipidinių membranų gavimo būdu.

Technikos lygis

Ląstelės membrana. Ląstelės membrana – skeletas (karkasas), be kurio negalėtų egzistuoti gyvybė, gaubia ląstelės vidų su visu jos turiniu ir sukuria barjerą, atskiriantį ląstelės vidų nuo išorės ir atliekantį apsauginę funkciją. Kartu ši apsauga geba vykdyti ir tam tikrą atranką, leidžianti į ląstelės vidų patekti reikalingoms medžiagoms, be kurių būtų neįmanomas gyvybinių funkcijų palaikymas. Kadangi ląstelės membrana yra iš visų pusių apsupta vandeniu, tai per ją lengvai gali judėti tik vandenyje tirpios ir mažos molekulinės masės medžiagos. Kitos reikalingos medžiagos, kaip baltymai ar angliavandeniai, transportuojamos nešiklių ir kanalų pagalba.

Pagrindinis ląstelės membranos struktūros elementas – lipidai, sudarantis membranos karkasą, ir pasižymintis amfifilinėmis savybėmis – viena dalis molekulės yra hidrofobinė, kita – hidrofilinė (1 pav.). Ši savybė sąlygota lipido cheminės sudėties ir struktūros, kur šią molekulę galima išskirti į dvi dalis: uodegą (hidrofobinę) ir galvą (hidrofilinę). Toks išskirtinumas leidžia vandeningoje terpėje sukurti tam tikras apibrėžtas struktūras, kurių viena – dvisluoksnė lipidinė membrana (1 pav.), kurią sudaro dviem eilėm išsidėstę lipidai, kur hidrofobinės uodegos nukreiptos į vidų, o hidrofilinės galvos – į išorę. Uodegą sudaro viena arba dvi riebalų rūgštys – linijinės angliavandenilių grandinės, kurių ilgis gali būti nuo 12 iki 18 anglies atomų ir užsibaigiančios karboksilo grupe. Šios grandinės gali turėti kelias dvigubas jungtis, nuo kurių, kaip ir nuo anglies atomų skaičiaus, priklauso membranos takumas, klampumas, fazinio virsmo temperatūra (T_m). Pastarosios angliavandenilių grandinės yra prijungtos prie glicerolio per vieną ar dvi esterines jungtis. O likusi trečia jungtis sudaro ryšį su lipido galva, kuri susideda iš fosfato ir tam tikros funkcinės grupės, kurios įvairiose organizmo dalyse gali būti skirtingos. Pagal funkcines grupes fosfolipidai išskiriami į kelias pagrindines dalis: fosfotidilcholinai, fosfotidiletanolaminai, fosfotidilserinai ir fosfotidilinozitolis. Tokia lipidų įvairovė leidžia sudaryti skirtingos sudėties lipidines membranas, reikalingas vienai ar kitai ląstelių grupei. Be to, membranoms

būdingas asimetriškumas, kai kiekviename sluoksnyje dominuoja skirtingas kiekis ir tipas lipidų. Toks pasiskirstymas reikalingas atlikti tam tikras funkcijas.

Membranos modeliai. Ląstelės membraną sudaro daug įvairių makromolekulių (lipidai, baltymai, angliavandeniai), kurių kiekviena gali įtakoti pačios membranos savybes ar jos sąveiką su membranai nepriklausančiais dariniais. Norint išskirti vieną ar kitą reiškinį yra naudojamos imitacinės modelinės sistemos – dirbtinės dvisluoksnės lipidinės membranos, kurių sudėtį jau galima kontroliuoti. Pirmosios tokios sistemos buvo dvisluoksnės lipidinės liposomos, kurios tolygiai pasiskirsčiusios skystyje. Bet tokios lipidinės sistemos tinkamos tik siauram tyrimo metodų ratui, kuris neturi galimybių suteikti informacijos apie pačios membranos sudėtį ir struktūrą. Membranos sudėčiai tirti naudojama tam tikra tyrimo metodų grupė, kuriai yra vienas bendras vardiklis – plokščias kietas pagrindas (QCM, SPR, AFM, NR, EIS), reikalingas kaip tam tikras atskaitos taškas. Taigi, atsiranda būtinybė liposomas sudarančias dvisluoksnės lipidines membranas perkelti ant paviršiaus. Ir šioje situacijoje labai pasitarnauja lipido savybė – amfifiliškumas, kurio dėka ant pagrindo, turinčio hidrofilinį paviršių, yra įmanoma sukurti dvisluoksnę lipidinę sistemą. Ir taip išvystomas kitas membranų modelis – plokščiosios lipidinės dvisluoksnės sistemos, kitaip dar vadinamas paprastosiomis lipidinės membranomis (sBLM) (2 pav.), kurios savo struktūra ir sudėtimi yra tapačios liposomoms. Be to, šis modelis įpatingas tuo, kad tarpas tarp pagrindo ir apatinio membranos sluoksnio yra užpildytas vandeniu, kas šią lipidinę imitaciją daro dar labiau panašia į gamtines sistemas. O vanduo kaip tik reikalingas baltymų struktūrų susidarymui. Vienas iš pagrindinių šio modelio privalumų – stabilumas, kas leidžia atlikti eksperimentus, reikalaujančius daug laiko (NR, AFM). Antra – tokiose membranose pažaidos gali būti vystomos lokaliai ir tai suteikia galimybę išlaikyti tam tikras struktūras paviršiuje, kurias jau galima tirti, kad ir su atominiu jėgos mikroskopu (AFM). Bet ši sistema nėra vien tik paprastas struktūrinis elementas, kurį būtų galima apibūdinti paprastais parametrais (membranos storis, pažaidos poros dydis ar aukštis, lipidų kiekis paviršiuje ir t.t.). Tai elementas, pasižymintis ir tam tikromis elektrinėmis savybėmis, kurias tirti naudojama elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS), kuri leidžia įvertinti membranos laidumą. Pastarasis metodas ypač tinkamas įvertinti membranos pažaidos mastą, nes susidarant poroms, didėja ir membranos laidumas. Bet šio metodo naudojimas sBLM modelio tyrimuose yra komplikotas dėl membranos judrumo, kas neleidžia registruoti laidžio pokyčius pačioje membranoje. Siekiant praplėsti šias galimybes, naudojamos hibridinės membranos (hBLM) (2 pav.), kuriose apatinis lipidų sluoksnis yra pakeičiamas alkantioliais ar tiolipidais, kurie sukuria hidrofobinį paviršių ir taip leidžia suformuoti stabilią lipidinę sistemą, tvirtai priristą prie

paviršiaus su tam tikromis elektrinėmis savybėmis, ir nustatyti membranos laidį ar talpą, kuri gali priklausyti nuo lipidų sudėties. Bet šiuo atveju tokioje sistemoje elektrinės savybės pasiekia kitą ribą, kai pomembraninio sluoksnio nebuvimas leidžia suformuoti labai izoliuojančias membranas, bet kartu ir labai kietas, kurios jau nebeleidžia įsiterpti ir susidaryti paviršiuje tam tikroms struktūroms, kurios pažeistų lokaliai lipidinį paviršių ir leistų stebėti membranos laidumo pokyčius.

Taigi, šie du modeliai (sBLM ir hBLM) turi tam tikrus apribojimus, kurie neleidžia taikyti tyrimo metodų, gebančių registruoti membranos laidumo pokyčius. Ir šiai problematikai išspręsti šiuo metu yra vystomas trečias membranos modelis – pakabintos lipidinės membranos (tBLM) (3 pav.), kurios pagal savo struktūrą yra tarpinis variantas tarp sBLM ir hBLM, nes išpildo du pagrindinius reikalavimus: padidinamas membranos izoliuotumas ir kartu išlaikomas jos labilumas. Toks efektas yra pasiekiamas, kai membrana per specialius junginius – inkarus pritvirtinama prie paviršiaus [US 20030054431][H. Lang, C. Duschl, H. Vogel, A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces, *Langmuir*, 10 (1994) 197-210]. Pastarieji junginiai struktūriškai yra panašūs į lipidus: turi hidrofobinę dalį, kurią sudaro sočiosios arba nesočiosios anglies grandinės, o hidrofilinėje dalyje esantis fosfatas ir funkcinės grupės yra pakeičiamos etilenoksidine (EO) grandine, prie kurios galo prijungta siera arba sierą turinti grupė, gebanti sąveikauti su aukso paviršiumi. Šio junginio anglies grandinės sudaro apatinį membranos sluoksnį, taip suteikiant sistemai stabilumą. O pomembraniniam sluoksnyje esantys EO fragmentai iškart atlieka du vaidmenis: pirma – sumažina pomembraninio rezervuaro laidį, o antra – kontroliuoja membranos aukštį nuo jutiklio paviršiaus. Bet jutiklio paviršiaus užpildymas vien šiais inkariniais junginiais visą lipidinę sistemą daro panašią į hBLM, kas sumažina membranos pažaidos detektavimo galimybes. Siekiant to išvengti, inkarinis junginys yra maišomas su skiedikliu. Pastaroji molekulė dažniausiai esti įvairaus ilgio grandinė, sudaryta iš EO fragmentų, bet be hidrofobinės dalies. Taigi, skiediklis leidžia kontroliuoti inkarinių junginių kiekį paviršiuje.

Pritaikymas. Dirbtiniai membranų modeliai šiuo metu yra vystomi kaip tam tikri biojutikliai, kuriais būtų įmanoma detektuoti įvairius baltymus, sukeliančius tam tikras pažaidas. Šie baltymai sąveikaudami su membrana sukuria tam tikras struktūras – poras, taip pažeisdami membranas (4 pav.). Ir jų detekcijai geriausiai tinka naudoti tBLM modelius, nes 1) tarp membranos ir pagrindo yra sukuriamas tarpmembraninis vandens rezervuaras, kuris reikalingas baltymų įsiterpimui ir tam tikrų struktūrų – porų susidarymui; 2) įsiterpęs baltymas suformuodamas membranoje porą padidina jos elektrinį laidį, kuris gali būti detektuojamas elektrocheminio impedanso metodu.

Paruošimas. Visų šių modelių paruošimo protokolas šiuo metu yra identiškas ir atliekamas per dvi stadijas: I stadijoje iš spiritinių tirpalų suformuojami atitinkami savitvarkiai monosluoksniai (sBLM – hidrofilinis monosluoksnis, hBLM – hidrofobinis monosluoksnis, tBLM – mišrus monosluoksnis iš inkarinių junginių ir skiediklio), o II stadijoje jau vykdomas lipidinių sluoksnių formavimas [D.J. McGillivray, G. Valincius, D.J. Vanderah, W. Febo-Ayala, J.T. Woodward, F. Heinrich, J.J. Kasianowicz, M. Losche, Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes, *Biointerphases*, 2 (2007) 21-33]. I stadija, iš esmės, nereikalauja ypatingų sąlygų, išskyrus tai, kad visi tioliai turi būti tirpūs spirite. II stadija yra atliekama pasitelkiant dvisluoksnės lipidinės liposomas (SUV), t.y. ant suformuoto savitvarkio monosluoksnio yra užnešamas vandeninis liposomų tirpalas. Problema yra ta, kad šis formavimo metodas tinkamas paruošti tik hBLM ir sBLM modelius. O tBLM paruošimas iš šių liposomų jau tampa sunkesniu uždaviniu, nes 1) lėtas formavimasis; 2) negalima formuoti ant retų inkarų, ant kurių geriausiai detektuoti membranos pažaidas EIS metodu; 3) didelis membranų defektiškumas, t.y. membranų laidumas – per aukštas, kad būtų tinkamas naudoti kaip biojutiklis.

Taip pat pati liposomų paruošimo technologija reikalauja specifinės aparatūros ir pakankamai daug laiko (5 pav.). Iš pradžių lipidų milteliai ištirpinami chloroforme, kuris pirmiausia išgarinamas po silpna azoto srove, o vėliau laikomas 12 valandų vakuume. Po šių procedūrų ant indo sienelių susidaro lipidinė plėvelė, kuri užpilama buferiniu tirpalu ir atliekamas intensyvus kratymas, kad susidarytų daugiasluoksnės liposomos (MLV). Kitame žingsnyje iš šių struktūrų jau gaunamos anksčiau minėtos dvisluoksnės liposomos, kurios ruošiamos dviem būdais: su ultragarsine maišykle, turinčia titano antgalį, atliekamas MLV ardymas iki dvisluoksnių liposomų, kurios po to dar turi būti centrifuguojamos nuo titano atliekų. Antras būdas: MLV tirpalas stumiamas pro ekstrūderio polikarbonatinę membraną, kurioje yra norimo dydžio poros.

II stadija taip pat gali būti atliekama ir iš spiritinio lipidų tirpalo, t.y., ant savitvarkio monosluoksnio užpilamas lipidų tirpalas ištirpintas spirite ir atliekamas viso paviršiaus praplovimas su dideliu kiekiu buferinio tirpalo [B. Raguse, V. Braach-Maksvytis, B.A. Cornell, L.G. King, P.D.J. Osman, R.J. Pace, L. Wiczorek, Tethered lipid bilayer membranes: Formation and ionic reservoir characterization, *Langmuir*, 14 (1998) 648-659]. Šis metodas vadinamas tirpiklio pakeitimo metodu (RSE – rapid solvent exchange). Privalumas tas, kad tai greitas metodas, nereikalaujantis brangios aparatūros, ir gebantis suformuoti izoliuojančias (žemo elektrinio laidumo) membranas. Šio metodo pirmas minusas yra tai, kad ne visi lipidai tirpsta spirite, ypač tai aktualu, kai norima sukurti membraną,

turinčią cholesterolio, nes cholesterolio ribotas tirpumas. Antra: kai kuriuose matavimo prietaisuose techniškai sunku naudoti du tirpiklius.

Problemos išgryninimas. Taigi, iš viso šito galima būtų išskirti kelis pagrindinius punktus, kurie susiję su tBLM, kuris būtų tinkamas naudoti kaip biojutiklis, paruošimu:

- 1) tBLM paruošimas turi būti greitas ir nereikalaus specifinės ir brangios aparatūros.
- 2) tBLM sistema turi pasižymėti izoliacinėmis elektrinėmis savybėmis, kad būtų tinkamas naudoti kaip biojutiklis, kurio pagrindiniai panaudojimo variantai:
 - a) Baltymų ir peptidų įsiterpimui į membraną tirti;
 - b) Biologinių membranų bakterijų ir toksinų pažeidai tirti bei aptikti (detektuoti);
 - c) Membranų sąveikai su mažos molekulinės masės junginiais ir asocijuotais baltymais aptikti (detektuoti) ir tirti;
 - d) Membranos struktūros tyrimams.

Trumpas išradimo aprašymas

Sutartiniai žymėjimai

KKM – kvarco kristalo mikrosvarstyklės

AFM - atominės jėgos mikroskopas

NR – neutronų reflektometrija

EIS - elektrocheminio impedanso spektroskopija

PPR - paviršiaus plazmonų rezonansas

sBLM - plokščiosios lipidinės dvisluoksnės sistemos, kitaip dar vadinamas paprastosiomis lipidinėmis membranomis

hBLM - hibridinės membranos

tBLM – pakabintos lipidinės membranos

EO - etilenoksido grandinė

SUV - dvisluoksnės lipidinės liposomos

MLV - daugiasluoksnės liposomos

RSE - tirpiklio pakeitimo metodas

Trumpas brėžnių figūrų aprašymas

1 pav. Lipido ir membranos struktūra.

2 pav. Lipidinės membranos: paprastoji ir hibridinė.

3 pav. Pakabinta lipidinė membrana.

4 pav. Membranos pažaida.

5 pav. Dvisluoksnių liposomų paruošimas.

6 pav. Reprezentatyvi paviršiaus plazmonų rezonanso padėties kitimo kreivė, gauta vykstant tBLM formavimuisi sąveikos su fosfolipidinėmis daugiasluoksniomis liposomomis.

7 pav. Reprezentatyvios EIS duomenų Cole-Cole kompleksinės talpos parametrinėje diagramoje (parametras – moduliacijos dažnis): juoda kreivė – pradinė kompleksinės talpos kreivė, registruojama nuo paviršiaus, suformuoto pagal metodą IA, raudona kreivė – sulietus molekulinio inkaro paviršių su daugiasluoksnių liposomų, paruoštų pagal metodą II.B, tirpalų ir 30 min formuojant pagal būdą IIIA.

8 pav. EIS duomenų, gautų pagal metodą III.B atvaizdavimas Bode kompleksinio laidžio (admitanso) diagramoje.

Šioje paraiškoje siūlomas anksčiau minėtos problematikos sprendimo būdas – daugiasluoksnių liposomų (MLV) (5 pav.) panaudojimas formuojant paviršiuje imobilizuotas fosfolipidines bisluoksnes membranas (tBLM). Daugiasluoksnių liposomos nėra naujai išrastos, tiesiog yra nustatytos, kad tokios egzistuoja, bet nedaug kur yra pritaikytos. Mūsų atveju naujumas ir išradimo esmė tame, kad jos taip pat gali būti naudojamos plokščiųjų membranų formavime, o ypač tBLM.

Siūlomo būdo privalumai:

1) Greitas paruošimas. SUV paruošimas gali užtrukti 8 – 24 valandas. MLV paruošiamos per 30 min.

2) Nereikalauja papildomos įrangos. SUV atveju reikia turėti vakuuminę kamerą, ultragarsinę maišyklę, centrifugą arba ekstruderį. MLV paruošimui viso šito nereikia, užtenka tik paprasčiausio dozatoriaus, kuris yra kiekvienoje laboratorijoje.

3) Liposomų dydis. Ruošiant plokščiąsias membranas (sBLM, tBLM) iš SUV, didelį vaidmenį vaidina pačių liposomų dydis. Sėkmingam rezultatui pasiekti SUV liposomų diametras turi būti ne didesnis nei 50 nm, nes kitu atveju liposomos prisikabina prie paviršiaus, bet neišsilieja.

Naudojant MLV, liposomų dydis gali variuoti plačiam diapazone (500 nm – 1,5 μ m) ir jų dydis nedaro įtakos lipidinės membranos susidarymui.

4) Inkarinio junginio kiekis tBLM sistemoje. Iš MLV galima suformuoti pakabintas lipidines membranas ant retų inkarinių junginių paviršiuje, kurios yra pakankamai stabilios, bet kartu turi didelį kiekį vandens pomembraniniame sluoksnyje. SUV atveju, turi būti pakankamas kiekis inkarinio junginio, kad liposomos gebėtų sukurti lipidinį sluoksnį.

Lipidinės membranos elektrinis izoliuotumas. MLV pagalba formuojamos pakankamai izoliuojančios tBLM, kurias jau būtų galima naudoti kaip biojutiklius. Be to, pats formavimas neužtrunka ilgiau nei 1 valanda. Membranos, kuri suformuota iš SUV, izoliacinės savybės gali būti pasiekiamos tik po kelių ar keliolikos valandų.

Detalus išradimo aprašymas

Medžiagos ir metodai

Distiliuotas vanduo	– dist. H ₂ O (Milli-Q plius, JAV)
Natrio chloridas	– NaCl (FLUKA, Šveicarija);
Natrio dihidrofosfatas	– NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (FLUKA, Šveicarija)
Etanolis	– EtOH (AB „Vilniaus degtinė“, Lietuva)
Chloroformas	– CHCl ₃ (Sigma–Aldrich, Vokietija);
2-merkaptioetanolis (beta merkaptioetanolis)	– β ME (Sigma–Aldrich, Vokietija);
20–tetradeksiloksio–3,6,9,12,15,18,22–heptaoksaheksatrikontano–1–tiolas ir [(Z 20-(Z-octadec-9-enyloxy)-3,6,9,12,15,18,22-heptaotetracont-31-ene-1-thiol, (C ₁₈ = oleoil)]	– susintetinta dr. D. J.Vanderah grupėje (University of Maryland).
Dioleoilo fosfocholinas – DOPC	(Avanti Polar Lipids, JAV);
Cholesterolis	((Avanti Polar Lipids, JAV)
EIS matavimai atlikti prietaisu Zennium	(Zahner GmbH, Vokietija)
PPR spektrai registruoti spektrometru Autolab Twingle	(Methrom Lab, Olandija)

Šiame išradime siūlomas tBLM gavimo būdas apima tris pakopas:

I. Paviršinio molekulinio inkaro sluoksnio suformavimas;

- II. Daugiasluoksnių vezikulių paruošimas;
- III. tBLM prikabinimas multilamelinių vezikulių suliejimo su inkaro paviršiumi būdu.

Paviršinio molekulinio inkaro suformavimas atliekamas iš technikos lygio žinomu būdu [].

MLV pradedamos ruošti panašiai kaip ir SUV, bet su tam tikrais pakeitimais.

Iš pradžių lipidų milteliai ištirpinami chloroforme, kuris garinamas po silpna azoto srove apie 30 min (kol pasišalina chloroformas). Po šios procedūros ant indo sienelių susidaro lipidinė plėvelė, kuri užpilama buferiniu tirpalu ir vietoj intensyvaus kratymo atliekamas lėtas lipidinių plėvelių maišymas su buferiniu tirpalu dozatoriaus pagalba, kad susidarytų daugiasluoksnės liposomos (MLV), kurios jau naudojamos formavimui.

Žemiau pateikiami išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai iliustruoja išradimą, neribodami jo apimties.

I. Paviršinio molekulinio inkaro gavimas

I.A pavyzdys

1. 25x75x1 mm arba kitokių matmenų stiklo plokštelė pamerkiama į 50 g/l amonio persulfato tirpalą koncentruotoje sieros rūgštyje ir išlaikoma šiame tirpale 30 min. Plokštelė išimama iš šio tirpalo ir praplaunama dideliu (didesniu nei 100 ml/plokštelei) kiekiu dejonizuoto vandens. Plokštelės paviršius džiovinamas sauso azoto (99,99% grynumo) srovėje.

2. Plokštelė įnešama į vakuuminę magnetroninio garinimo kamerą (naudota PVD 75 Kurt J. Lesker Company, USA garinimo sistema), įjungiamas vakuuminis siurblys ir pasiekiamas mažesnis nei 10^{-7} mTorr likutinis slėgimas.

3. Pasiekus nurodytą vakuumo lygį, ant plokštelės magnetroniškai užgarinamas 1 nm storio Ti sluoksnis ir ant jo paviršiaus užgarinamas 50 nm Au sluoksnis. Galima naudoti šiuos magnetroninio garinimo parametrus: Ti sluoksniui – magnetrono galia – 100 W, argono slėgis garinimo metu – 4,5 mTorr, o Au sluoksniui galia – 120 W, argono slėgis – 4,2 mTorr. Garinimui naudoti 50 mm skersmens Au (999,9) ir Ti (999,9) magnetroninio garinimo metaliniai taikiniai. Garinamo metalo kiekis registruojamas pjezoelektrinėmis kvarco mikrosvarstyklėmis.

4. Baigus garinimą magnetroninio garinimo kamera devakuuojama ir Ti/Au sluoksneliais padengta plokštelė perkeliama į molekulinio inkaro formavimo tirpalą, kurio sudėtis

tokia: tirpiklis 95,6% (ar didesnės koncentracijos) etanolis, tirpiniai: 0,03 mM 20-(tetradeciloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatriakontan-1-tiolas ir 0,07 mM 2-merkaptioetanolis. Šiame tirpale mėginys laikomas 4 val.

5. Pabaigus molekulinio inkaro sluoksnio formavimąsi mėginys (stiklo plokštelė su Ti/Au sluoksneliais) išimamas ir nuplaunamas gausiu kiekiu (ne mažiau nei 50 ml/plokštei) gryno tirpiklio, 95,6% (ar didesnės koncentracijos) etanolio. Po nuplovimo plokštelė džiovinama sauso dujinio azoto srovėje.

I.B pavyzdys

1. Atliekamos procedūros taip, kaip aprašyta I.A pavyzdyje punktuose A.1 iki A.3; tačiau stiklo pagrindu naudojama apskritimo formos 25 mm (ar kitokio diametro) 1 mm (ar kitokio storio) storio BK-7 markės stiklo plokštelė.

2. Baigus garinimą magnetroninio garinimo kamera devakuojama ir Ti/Au sluoksneliais padengta plokštelė perkeliama į molekulinio inkaro formavimo tirpalą, kurios sudėtis tokia: tirpiklis 95,6% (ar didesnės koncentracijos) etanolis, tirpiniai: 0,03 mM 20-(tetradeciloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatriakontan-1-tiolo disulfidas ir 0,07 mM 2-merkaptioetanolio disulfidas. Šiame tirpale mėginys laikomas 1 val.

3. Pabaigus molekulinio inkaro sluoksnio formavimąsi mėginys (stiklo plokštelė su Ti/Au sluoksneliais) išimamas ir nuplaunamas gausiu kiekiu (ne mažiau nei 50 ml/plokštei) gryno etanolio (95,6% ar didesnio grynumo). Po nuplovimo plokštelė džiovinama sauso dujinio azoto srovėje.

II. Daugiasluoksnių liposomų (MLV) paruošimas

II.A pavyzdys

1. Dioleoilo fosfocholinas (sausie milteliai) ištirpinamas chloroforme iki 10 mM koncentracijos ir gautas tirpalas naudojamas iš karto arba, jei reikia, gali būti laikomas, neprarandant funkcinių savybių, -20 °C temperatūroje iki 6 mėn. Vietoj chloroformo gali būti naudojami ir kiti tirpikliai, tokie kaip chloroformo mišinys su kitu organiniu tirpikliu, pavyzdžiui, etanolio, propanolio, izopropanolio, butanolio, pentanolio, 2-etilpropanolio, arba heksanas, arba pentanas, arba heptanas, arba oktanai, arba nonanai, arba skvalenai.

2. Iš gauto tirpalo į atskirą stiklinį indą – buteliuką paimamas 1 ml gauto dioleoilo fosfocholino tirpalo.

3. Chloroformas išgarinamas azoto dujų pagalba (pučiant dujas apie 30 minučių). Išgarinimo pabaiga galime laikyti momentą, kai indelyje nebelieka skysčio plus dar apie 20 min pučiant į indą, ant kurio sienelių susidaro pusiau matinė lipidinė plėvelė.

4. Lipidinė plėvelė užpilama 10 ml buferinio tirpalo, kurio pH – 4,4, o sudėtis yra 10 mM NaH_2PO_4 ir 100 mM NaCl.

5. Į tirpalą merkiamas pusiau automatinis rankinis dozatoriaus su antgaliu ir įsiurbimo – išstūmimo ciklais veiksmu lėtai soliubilizuojama lipidinė plėvelė, susidariusi ant indo sienelių. Procesas (išsiurbimas-išstūmimas) kartojami nuo 50 iki 200 kartų, kol nebestebima plėvelės liekanų ant indo sienelių, o indo turinys tampa matinis ir homogeniškas.

6. Taip paruoštas MLV tirpalas naudojamas iš karto arba gali būti laikomas +5 °C temperatūroje iki 2 savaičių.

II.B pavyzdys

1. Dioleoilo fosfocholino ir cholesterolio (sausų miltelių) mišinys molekulinio santykiu 60%/40% ištirpinamas chloroform (90% pagal tūrį) ir etanolio (10% pagal tūrį) iki 10 mM bendros lipidų koncentracijos.

2. Iš gauto tirpalo į atskirą stiklinį indą – buteliuką paimamas 1 ml gauto mišraus dioleoilo fosfocholino ir cholesterolio tirpalo.

3. Chloroformo-etanolio tirpalas išgarinamas azoto dujų pagalba (pučiant dujas apie 30 minučių). Išgarinimo pabaiga galime laikyti momentą, kai indelyje nebelieka skysčio plus dar apie 20 min pučiant į indą, ant kurio sienelių susidaro pusiau matinė lipidinė plėvelė.

4. Lipidinė plėvelė užpilamos 10 ml buferinio tirpalo, kurio pH – 4,4, o sudėtis yra 10 mM NaH_2PO_4 ir 100 mM NaCl.

5. Į tirpalą merkiamas pusiautomatinis rankinis dozatoriaus su antgaliu ir įsiurbimo – išstūmimas ciklais veiksmu lėtai soliubilizuojama lipidinė plėvelė, susidariusi ant indo sienelių. Procesas (išsiurbimas-išstūmimas) kartojami nuo 50 iki 200 kartų, kol nebestebima plėvelės liekanų ant indo sienelių, o indo turinys tampa matinis ir homogeniškas.

6. Paruoštas MLV tirpalas naudojamas iš karto arba gali būti laikomas +5 °C temperatūroje iki 2 savaičių.

Visos aprašytos procedūros pagal būdą A ir būdą B atliekamos kambario temperatūroje (20 ± 2 °C).

III. tBLM suformavimas daugiasluoksnių liposomų suliejimo su inkaro paviršiumi būdu

III.A pavyzdys

1. Plokštelė, padengta molekulinio inkaru, pagal gamybos pavyzdį I.A, įmerkiama ar kitaip suliečiama su MLV tirpalu, pasigamintu būdu, aprašytu II.A. Plokštelė laikoma kontakte su tirpalu 1000 s. tBLM spontaniškai padengia paviršių, su užpildymo laipsniu geresniu nei 99%. tBLM susiformavimą galima stebėti realiu laiku, panaudojant paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopiją (žr. 6 pav.).

2. MLV tirpalas pakeičiamas grynu, norimo pH buferiu, pavyzdžiui pH 7,0, kuriame ištirpinta Na HPO_4 ir $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ (bendra fosfatų koncentracija 10 mM) ir 100 mM NaCl.

3. Paruošta tBLM naudojama tyrimams iš karto, arba ji gali būti saugoma kambario temperatūroje 72 val.

III.B pavyzdys

1. Plokštelė, padengta molekulinio inkaru, pagal gamybos pavyzdį I.A arba I.B įmerkiama ar kitaip suliečiama su MLV tirpalu, pasigamintu būdu, aprašytu II.B. Plokštelė laikoma kontakte su tirpalu 3600 s. tBLM spontaniškai padengia paviršių, su užpildymo laipsniu geresniu nei 99% ir likutiniu defektų tankiu, mažesniu nei $0,5 \mu\text{m}^{-2}$.

2. tBLM formavimasis ir defektų tankio mažėjimą galima stebėti realiu laiku, panaudojant paviršiaus elektrocheminio impedanso spektroskopiją (žr. žemiau).

3. Praėjus 3600 s MLV tirpalas pakeičiamas grynu, norimo pH buferiu, pavyzdžiui pH 7,0, kuriame ištirpinta Na HPO_4 ir $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ (bendra fosfatų koncentracija 10 mM) ir 100 mM NaCl.

4. Paruošta tBLM naudojama tyrimams iš karto, arba ji gali būti saugoma kambario temperatūroje 72 val.

IV. Lipidinių sluoksnių formavimosi stebėjimas

IV.1 tBLM formavimosi stebėjimas realiu laiku paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopijos metodu

Eksperimentas atliekamas, pasiruošiant tBLM pavyzdį, naudojant molekulinį inkarą pagal metodą I.B. Daugiasluoksnių liposomų tirpalas pasiruošiamas pagal metodą II.A. Plokštelė, pasiruošta pagal metodą I.A įstatoma į paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) spektrometro Autolab Twingle laikiklį. Ant plokštelės paviršiaus uždedamas maždaug 30 ml daugiasluoksnių liposomų, pasiruoštų pagal metodą II.A, tirpalas. Įjungiamas paviršiaus plazmonų rezonanso spektrometras ir registruojama rezonansinės kreivės minimumo padėties kitimas (mililaipsniais, m°). Minimumo padėtis gali būti susieta su prisijungusio fosfolipido, šiuo atveju dioleoilo fosfocholino) kiekiu, taigi, galima įvertinti membranos susiformavimo pilnumą. Reprezentatyvi tBLM formavimosi kreivė pateikta 6 pav.

Bandymo metu, stebime, jog PPR minimumo padėtis staigiai, per maždaug 1000 s pasiekia reikšmę, didesnę nei $400 m^\circ$. Vėliau, kreivė kinta nežymiai, kas atspindi paviršiaus įsisotinimą fosfolipidine medžiaga, pernešama iš daugiasluoksnių liposomų. Praplovimas, kuris atitinka "laiptelį" įvykdytas praėjus 1800 s nuo sąveikos su daugiasluoksniomis liposomomis pradžios, nustato galutinę PPR minimumo reikšmę $410 m^\circ$. Mūsų atliktos kalibracijos duomenimis, $1 m^\circ$ PPR signalo pokyčio atitinka $0,62 \text{ ng/cm}^2$ lipidinės medžiagos prijungimą. Tokiu būdu, bendras fosfolipido kiekis prijungtas šiame pavyzdyje prie paviršiaus lygus $410 \times 0,62 = 254,2 \text{ ng/cm}^2$. Šis kiekis lipido, atsižvelgus į tai, jog molinė dioleoilo masė yra $786,11 \text{ g/mol}$, atitinka $3,23 \cdot 10^{-10} \text{ molių/cm}^2$, arba $1,95 \cdot 10^{14} \text{ molekulių/cm}^2$. Žinoma, kad 1 dioleoilo fosfocholino molekulė užima planarinėje fosfolipidinėje membranoje $72,5 \text{ \AA}^2$ paviršiaus ploto. Iš PPR duomenų radus bendrą molekulių skaičių, perneštą iš liposomų į paviršių, randame, jog perneštas dioleoilo fosfocholinas užima $1,41 \text{ cm}^2$ paviršiaus, kas atitinka pilną dvisluoksnį, jeigu atsižvelgsime į tai, jog inkarinio junginio dioleoilo grandinės užima $0,60 \text{ cm}^2$ paviršiaus ploto. Taigi bendras pernešto iš daugiasluoksnių liposomų dioleoilo fosfocholino kiekis atitinka geresnį nei 99% paviršiaus padengimą fosfolipidiniu dvisluoksniu.

IV.2 tBLM formavimosi stebėjimas realiu laiku elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu

Šis metodas registruoja elektrinių savybių kitimą tBLM formavimosi proceso metu. tBLM formavimosi metu iš liposomų ant inkaru padengto paviršiaus yra pernešamas fosfolipidas, turintis hidrofobinį molekulinį fragmentą, kuris, susidarant dvisluoksniui, tampa dielektriko sluoksniu. Papildomo dielektriko sluoksnio ant paviršiaus susidarymą lydi paviršiaus elektrinės talpos sumažėjimas. Ši procesą galima stebėti EIS metodo pagalba

Ekperimentui pasiruoštas pavyzdys, pagal metodą I.A. Taip pat pasiruoštas daugiasluoksnių liposomų tirpalas pagal metodą II.B. Pavyzdys (plokštelė) įstatyta į EIS spektroskopijos periferinį įrenginį, aprašytą [Budvytyte, M. Mickevicius, D. J. Vanderah, F. Heinrich, and G. Valincius, Modification of Tethered Bilayers by Phospholipid Exchange with Vesicles. *Langmuir*. 29, (13), 4320–4327, (2013)]. Iš pradžių užregistruotas inkariniu junginių padengto paviršiaus EIS spektras, kuris Cole-Cole- (kompleksinės talpos) diagramos pavidalu pateiktas 7 pav., juoda kreivė. Kreivė, kaip ir būdinga dielektrinių savybių paviršiams, pasižymi pusiau apskritimo forma. Dešinysis pusapskritimio lankas, šiose diagramose, atitinkantis žemų EIS spektrų dažnių sritį, rodo apytikslę paviršiaus elektrinės talpos reikšmę, kuri šiuo atveju lygi $8,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Įleidus į sistemą vezikulių tirpalą, pradedamas tBLM formavimosi procesas pagal metodą, aprašytą III.B. Po 3600 s užrašytas antras spektras (7 pav., raudona kreivė), kuris rodo, jog pusapskritimio pavidalo kreivės segmentas sumažėjo iki maždaug $0,70\text{--}0,80 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Šis sumažėjimas sutampa su laukiamu elektrinės talpos sumažėjimo efektu, kurį galima įvertinti, pasitelkus plokščio kondensatoriaus formulę:

$$C = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{d}, \quad (1)$$

Ši lygtis, ją pertvarkius leidžia apskaičiuoti susidarančio fosfolipidinio darinio storį:

$$d = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{C}. \quad (2)$$

kur ε yra santykinė dielektrinio sluoksnio skvarba, ε_0 yra vakumo dielektrinė konstanta, lygi $8,85 \cdot 10^{-8} \mu\text{F}/\text{cm}$, o d yra dielektrinio sluoksnio storis. Santykinė dielektrinė dioleoilo sluoksnio skvarba yra 2,9 [D. J. McGillivray, G. Valincius, F. Heinrich, J. W.F. Robertson, D. J. Vanderah, W. Febo-Ayala, I. Ignatjev, M. Lösche, J. J. Kasianowicz. Structure of Functional Staphylococcus aureus α -Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biophys. J*, 96 (4) 1547 – 1553, (2009)]. Kadangi šiam pavyzdyje buvo naudojamas 40% cholesterolio ir 60% dioleoilo, dielektrinės konstantos reikšmė yra 2,3 [R. Budvytyte, G. Valincius, G. Niaura, V. Voiciuk, M. Mickevicius, H. Chapman, H.Z. Goh, P. Shekhar, F. Heinrich, S. Shenoy, M. Losche, D.J. Vanderah, *Langmuir*, 29 (2013) 8645–8656. R. Budvytyte, M. Mickevicius, D. J. Vanderah, F. Heinrich, and G. Valincius, Modification of Tethered Bilayers by Phospholipid Exchange with Vesicles. *Langmuir*. 29, (13), 4320–4327, (2013)]. Įstatę šias konstantas, bei eksperimentinę talpos reikšmę $C=0,70 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (2 pav., 2 kreivė) į (2) lygtį, susidariusio dvisluoksnio hidrofobinės dalies storį 2.9 nm. Ši reikšmė gerai sutampa su neutronų

reflektometrijos metodu nustatyta dioleoilo sluoksnio storis 3,0 nm. Tai įrodo, kad metodu III.B gaunamas fosfolipidinis, mišrios sudėties (dioleoilo fosfocholino ir cholesterolio) dvisluoksnis.

Liekamųjų defektų tBLM membranoje tankiui įvertinti EIS duomenis tikslinga atvaizduoti kitokiose koordinatėse. 8 pav. Bode diagramos pavidalu pateikti tie patys, kaip ir 7 pav. EIS duomenys.

Matome, kad iki pradedant tBLM formavimą (1 kreivė, raudona) paviršinis kompleksinis laidis pasižymi didelėmis reikšmėmis. Vidurinių dažnių dalyje, stebimas laidžio "laiptelis", kuriam būdingos $2 \cdot 10^{-3}$ S ir didesnio laidžio reikšmės. Fazės grafike (8 pav, apatinis langas) ši kreivė beveik neturi minimumo, jis stebimas vidutinių dažnių srityje (apie 500-600 Hz) ir dažnai būna susiliejęs su žemėjančia aukštų dažnių (>1000 Hz) spektro dalies kreive.

Suformavus pagal metodą III.B tBLM, Bode kreivės transformuojasi. Admitanso kreivė (8 pav., viršutinis langas, 2 kreivė) sumažėja. Plokščiosios dalies laiptelis pasislenka į žemų dažnių pusę ir sumažėja beveik 1000 kartų iki maždaug $2 \cdot 10^{-6}$ S verčių lygio.

Suformavus tBLM pagal III.B būdą, fazės kreivėje (7 pav., apatinis langas, 2 kreivė) susiformuoja aiškiai išreikštas minimumas, kurio padėtį lemia likutinis defektų tankis [Valincius G, Meškauskas T, Ivanauskas F., Langmuir. 2012 Jan 10;28(1):977-90.]. Pasinaudojus matematiniu EIS spektrų interpretacijos algoritmu [Valincius G, Meškauskas T, Ivanauskas F., Langmuir. 2012 Jan 10;28(1):977-90.], randame, kad likutinis pateikiamame pavyzdyje defektų tankis, esant prielaidai, jog natūralių defektų spindulys 1 nm, yra $<0,32 \mu\text{m}^{-2}$. Iš čia gauname, kad paviršiaus dalis, kurią užima likutiniai defektai yra ne didesnė nei $2,5 \cdot 10^{-7}$.

Išradimo apibrėžtis

1. Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas, apimantis paviršinio inkaro sluoksnio suformavimą, lipidinių liposomų paruošimą ir lipidinių liposomų suliejimą su inkaro paviršiumi, besiskiriantis tuo, kad minėtam suliejimui naudojamos paruoštos daugiasluoksnės lipidinės liposomos.

2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtos daugiasluoksnės lipidinės liposomos gaunamos tirpinant fosfolipidą organiniame tirpiklyje, atskyrus 1 ml gauto tirpalo, iš jo azoto dujų pagalba išgarinamas organinis tirpiklis, o likutis užpilamas atitinkamu buferiniu tirpalu ir, lėtai maišant, gaunamas daugiasluoksnių lipidinių liposomų tirpalas buferyje, kuris iš karto gali būti naudojamas suliejimui su inkaro paviršiumi.

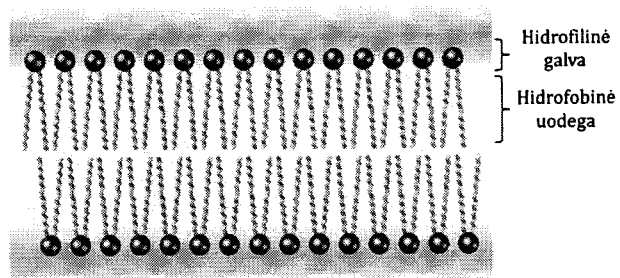
3. Būdas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas organinis tirpiklis yra chloroformas, arba chloroformo mišinys su kitu organiniu tirpikliu, pavyzdžiui, etanolio, propanolio, izopropanolio, butanolio, pentanolio, 2-etilpropanolio, arba heksanas, arba pentanas, arba heptanas, arba oktanai, arba nonanai, arba skvalenai.

4. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad savitvarkio inkarinio monosluoksnio suformavimui naudojamas inkarinis junginys 20-(tetradeciloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatriakontan-1-tiolas arba [(Z 20-(Z-oktadeka-9-eniloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetrakontan-1-en-1-tiolas, (C₁₈ = oleoil)] arba šių junginių disulfidai, sumaišant inkarą su paviršiniu skiedikliu 1-merkaptioetanoliu arba jo disulfidu santykiu nuo 1:9 iki 9:1.

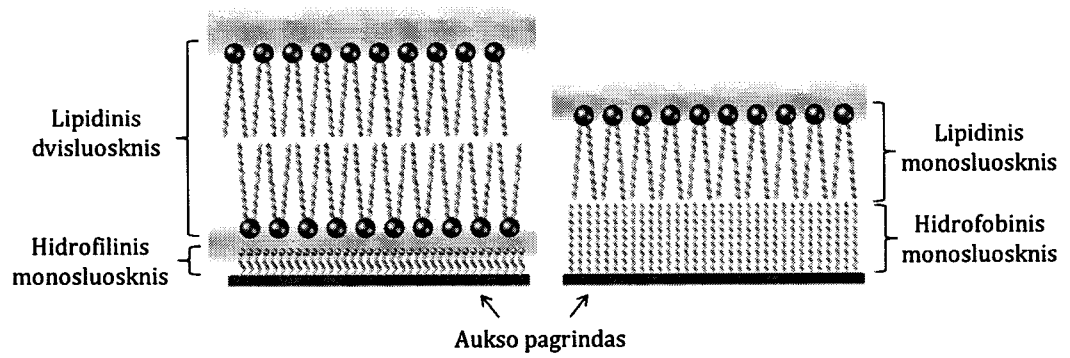
5. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas paviršius yra stiklo plokštelė, padengta titano pasluoksniu, užtikrinančiu sukibimą su stiklo plokšte ir aukso sluoksniu.

6. Paviršiuje imobilizuota fosfolipidinė bisluoksnė membrana (tBLM), gauta būdu pagal 1 punktą.

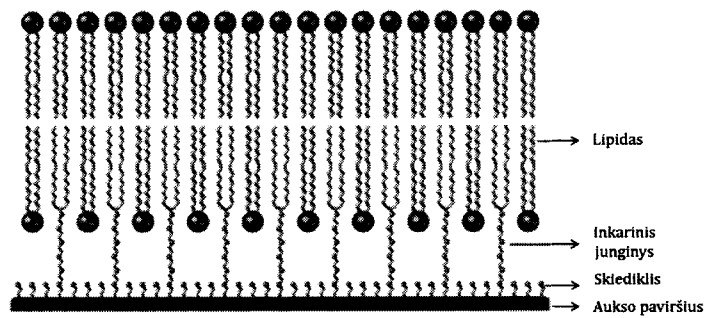
7. Membranos pagal 6 punktą panaudojimas biojutiklio gamyboje.



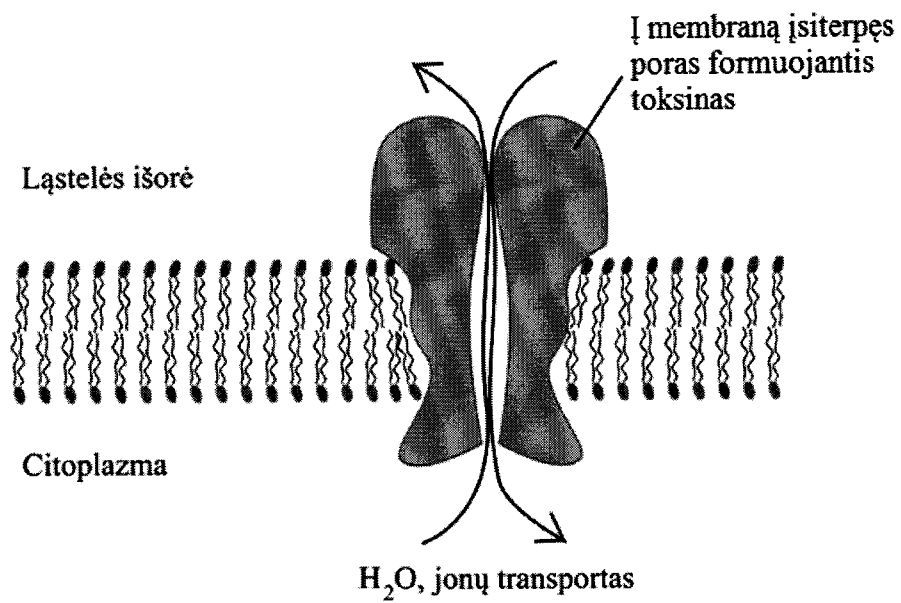
1 pav.



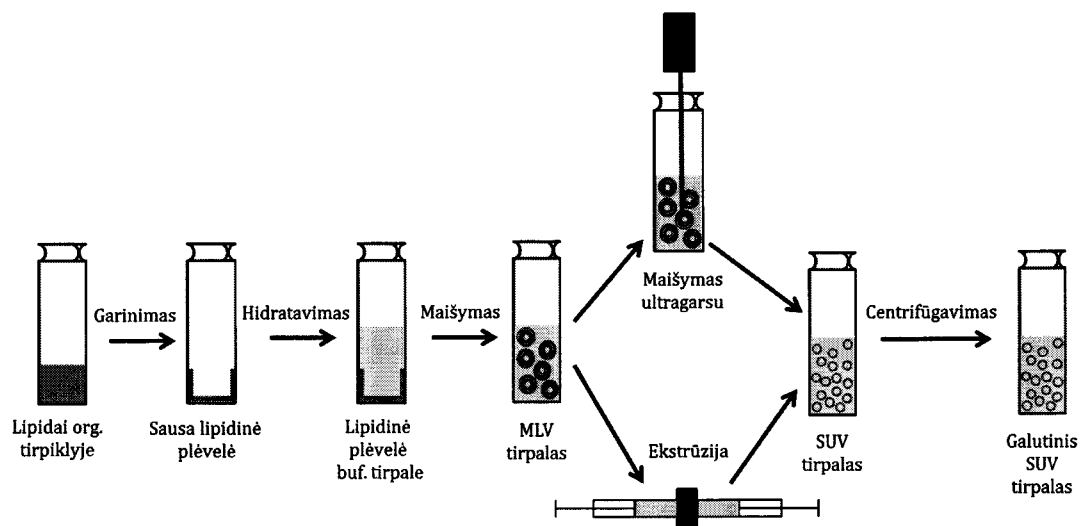
2 pav.



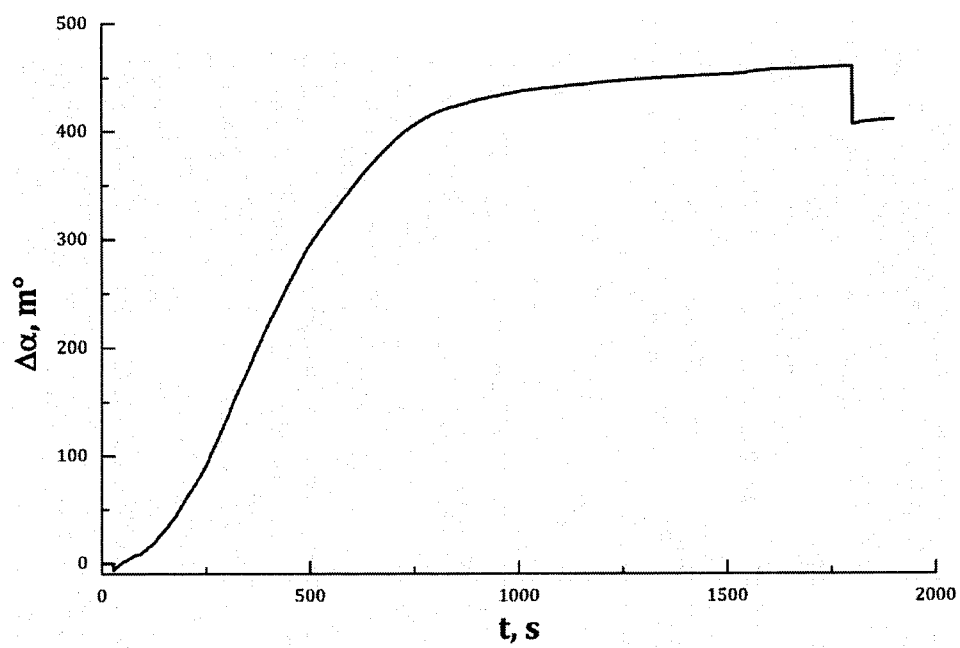
3 pav.



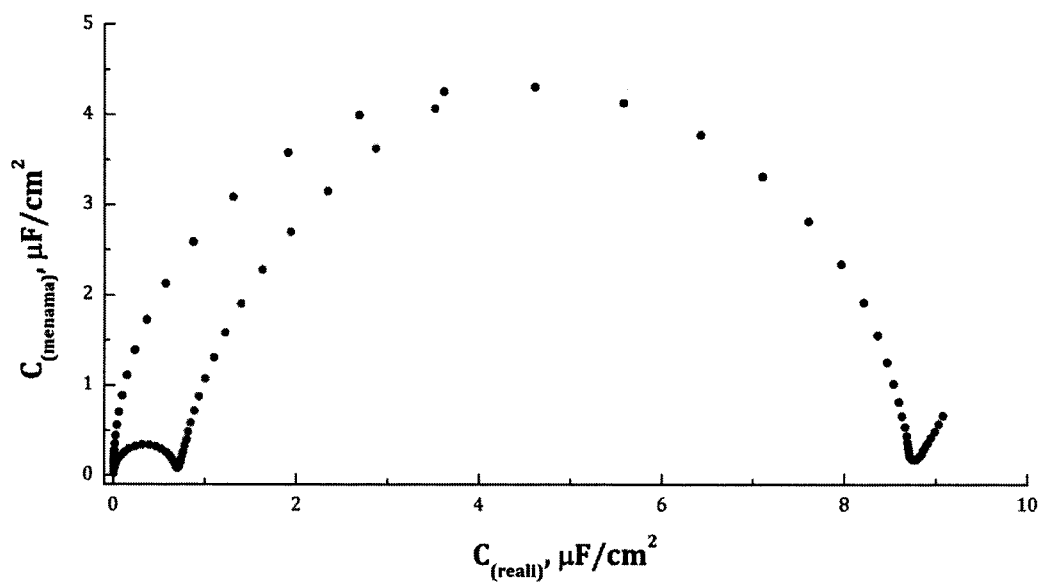
4 pav.



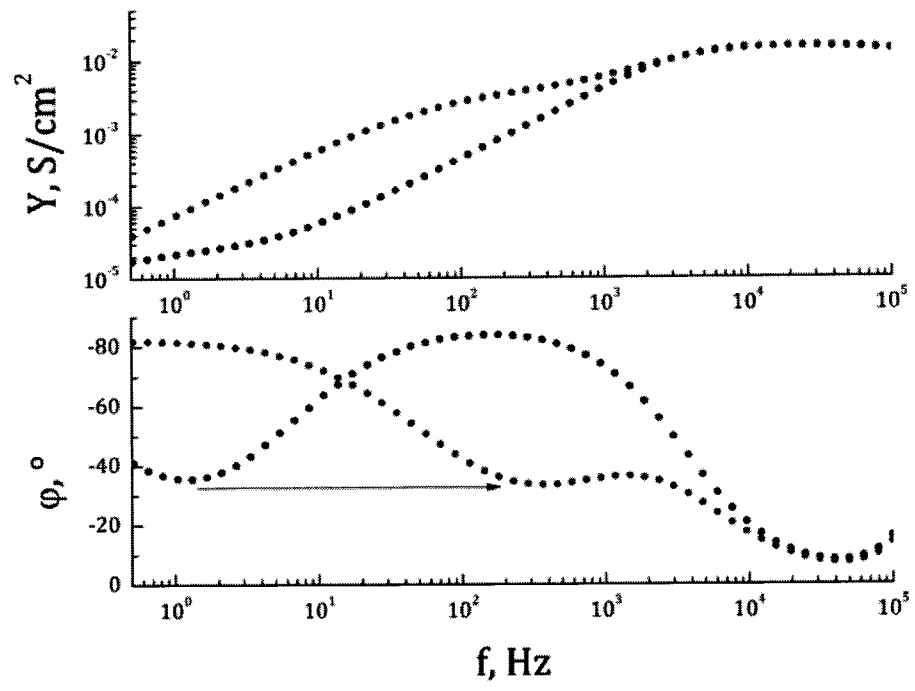
5 pav.



6 pav.



7 pav.



8 pav.