



(11) **LT 6992 B**

(51) Int. Cl. (2023.01):

G01N 27/00
B01D 69/02
G01N 33/483

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 533**
(22) Paraiškos padavimo data: **2021-06-30**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2023-01-10**
(45) Patento paskelbimo data: **2023-04-25**

(73) Patento savininkas:

Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, 01513 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:

Inga GABRIŪNAITĖ, LT
Aušra VALIŪNIENĖ, LT
Gintaras VALINČIUS, LT
Albinas ŽILINSKAS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Regeneruojamas fosfolipidinis biojutiklis ant silanizuotų oksidų paviršiaus

(57) Referatas:

Čia aprašomas membraninis jutiklis sudaromas panaudojant silano junginius formuojančius savitvarkį monosluoksnį ant elektrai laidžių ir nelaidžių oksidinių paviršių. Savitvarkis monosluoksnis yra maišomas su skiedikliais ir gaunama paviršiuje prikabinata bisluoksnė fosfolipidinė membrana, turinti pomembraninį vandens rezervuarą. Suformuotas jautrus fosfolipidinis sluoksnis gali būti pašalintas ir iš naujo suformuotas keletą kartų ant to paties paviršiaus.

LT 6992 B

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas yra susijęs su paviršiuje prikabinomomis lipidinėmis membranomis, konkrečiai, su regeneruojamo fosfolipidinio biojutiklio konstravimu ant elektrai laidžių ir nelaidžių oksidinių paviršių.

TECHNIKOS LYGIS

Ląstelė yra mažiausias gyvybės struktūrinis vienetas. Ją supa plazminė membrana, kuri apsaugo ir atskiria ląstelės vidų nuo išorės. Viena svarbiausių sudedamųjų dalių yra fosfolipidai. Tai yra amfifilinės medžiagos, kurios turi dvi hidrofobines anglies grandines (uodegos) ir hidrofilinę fosfato grupę (galva). Fosfolipidai suformuoja dviejų sluoksnių struktūrą, kur hidrofilinės galvos yra nukreiptos į išorę, o hidrofobinės uodegos nukreiptos į bisluoksnio vidų. Tam, kad vyktų medžiagų transportas iš ląstelės vidų į išorę ir vykdytų kitas gyvybiškai svarbias funkcijas, tokias kaip kvėpavimas, membranoje taip pat yra įsiterpę įvairių tipų baltymai. Būtent dėl šios membranos savybės - gebėti įterpti baltymus, buvo sukurti lipidinių membranų modeliai. Jie pasižymi paprastesne sudėtimi, kurią galima kontroliuoti. Membranų modeliai yra pritaikomi, kaip eksperimentinė platforma baltymų ir membranų sąveikos tyrimams, tarp jų: integralinių baltymų (poras formuojantys toksinai, jonų kanalai) ir periferinių baltymų (fermentai, elektronų pernešėjai) funkcijai įvertinti. Elektrocheminiai metodai, kartu su mikroskopiniais ir spektriniais metodais yra labai efektyvūs membraninių procesų tyrimuose, tačiau norint tokius metodus taikyti, membranų modeliai turėtų būti formuojami ant kietų elektrai laidžių paviršių (Ragaliauskas T. et al., 2017).

Vienas patogiausių membranos ant kieto paviršiaus formavimo metodų yra vezikulių liejimas. Vezikulės yra sferinės struktūros liposomos, sudarytos iš fosfolipidų bisluoksnio. Užliejus vezikulių tirpalą tiesiai ant tiriamojo paviršiaus, vyksta savaiminė lipidų savitvarka, kai fosfolipidai iš sferinės formos pereina ant kieto paviršiaus, suformuojant bisluoksnę plokščią struktūrą. Kadangi membranos formavimo metodas yra pagrįstas savitvarka, jis nereikalauja jokios brangios įrangos, todėl tai yra pigus ir prieinamas metodas. Šis membranos formavimo metodas yra patogus ir tuo, kad galima lengvai kontroliuoti bisluoksnio sudėtį, keičiant lipidų sudėtį vezikulėse.

Vienas paprasčiausių membranų modelių yra plokščioji lipidinė membrana. Ji

yra sudaryta iš dviejų fosfolipidų sluoksnių, tačiau, kitaip nei ląstelė, kuri yra sferinės formos, šis bisluoksnis yra įmobilizuotas horizontalioje plokštumoje (Castellana E.T. et al., 2006). Plokščioji lipidinė membrana pasižymi tuo, kad turi labai ploną vandens sluoksnį tarp membranos ir kieto paviršiaus. Šis vandens sluoksnis „imituoja“ ląstelės vidų. Turint tokią modelinę sistemą, baltymai gali būti įterpiami ir atliekami įvairūs tyrimai, siekiant išsiaiškinti membranos pralaidumą, defektiškumą ir kitas savybes. Nors šis membranos modelis pasižymi vidutinišku stabilumu, tačiau membranoje esantys įvairūs defektai bei jų gausa neleidžia pritaikyti elektrocheminių matavimų metodų plokščiųjų membranų integralumui įvertinti bei panaudoti tokias membranas elektrocheminiams biojutikliams bakterinių toksinų bei kitų membranų integralumą pažeidžiančiais agentų aktyvumui išmatuoti. Hibridinės membranos (Plant A.L. 1999) pasižymi nepalyginamai mažesniu defektų kiekiu. Jose pirmą sluoksnį prie paviršiaus sudaro savitvarkis monosluoksnis (SAM), o antrą sluoksnį – fosfolipidai. SAM susideda iš anglies atomų grandinę turinčių molekulių su vadinama aktyvia funkcinė grupe (galva) vienoje pusėje, kurią dažniausiai sudaro tiolio arba trialkoksisilano funkcinė grupė. SAM prie paviršiaus prikimba funkcinėi grupei su paviršiumi suformuojant stiprius kovalentinius ryšius. Aktyvios SAM funkcinės grupės parinkimas priklauso nuo to, koks substratas bus naudojamas SAM formavimui. Jeigu naudojamas auksinis paviršius – tai parenkamas SAM turintis tiolio grupę, o jeigu metalo oksidinis paviršius – tai naudojamas SAM su trialkoksisilano grupe. Vienas pagrindinių hibridinių membranų pranašumų yra tai, kad jos pasižymi labai dideliu stabilumu (palyginus su plokščiosiomis lipidinėmis membranomis) ir mažu nedidelių defektų kiekiu. Dėl to galima taikyti įvairius, taip pat ir elektrocheminius tyrimų metodus atliekant dinامينius eksperimentus. Tačiau hibridinė membrana turi ir trūkumą, - joje nėra plono vandens pasluoksnio tarp membranos ir kieto paviršiaus, kuris leistų į ją įterpti integralinius baltymus ir panaudoti tokius dvisluoksnius biojutikliams, matuojantiems bakterinių toksinų, įsiterpiančių į membranas aktyvumą. Todėl buvo sukurtas kitas membranų modelis – tai paviršiuje prikabinotos membranos (Junghans A. et al., 2010; McGillivray D.J. et al., 2007). Paviršiuje prikabinėtų membranų struktūra yra ypatinga tuo, kad jas sudaro savitvarkis monosluoksnis iš lipidų struktūrą primenančių „inkarinių“ junginių. Šie inkarai taip pat turi aktyvią funkcinę grupę, kuri suformuoja tvirtus ryšius su pagrindu, kaip ir įprastame SAM, tačiau toliau esanti uodega susideda iš polietilenglikolio (PEG) grandinės ir šis junginys užsibaigia dvejomis anglies atomų grandinėmis, kurios primena lipidų hidrofobinę dalį. Suformavus tokį savitvarkį

monosluoksnį, vezikulių liejimo metu, dėl afiniškumo susiformuoja plonas vandens sluoksnis savitvarkio monosluoksnio dalyje, kur yra PEG. Norint įterpti toksinus ar kitus baltymus, reikia „praskiesti“ inkarų kiekį ant paviršiaus, naudojant trumpagrandžius mažos molekulinės masės SAM junginius, kurie išorėje turėtų hidrofilinę grupę (pavyzdžiui, hidroksi grupę), dar vadinamus skiedikliais. Suformavus mišrų SAM iš ilgų inkarinių junginių ir trumpų skiediklių bei užliejus vezikules gaunama paviršiuje prikabinta bisluoksnė fosfolipidinė membrana, kuri turi pomembraninį vandens rezervuarą. Tokia sistema gali būti pritaikoma integralinių baltymų tyrimams, poras formuojančių toksinų detekcijai.

Membranos gali būti formuojamos ant skirtingų paviršių. Vienas populiariausių substratų yra atomiškai lygus aukso paviršius, kuris dažniausiai būna paruoštas magnetroninio dulkinimo metodu. Toks paviršius gali būti naudojamas su AFM, SPR ar NR metodais. Suformuotos membranos pasižymi dideliu homogeniškumu (membranos formavimo metu gaunamas minimalus kiekis defektų) ir dideliu stabilumu. Neutronų reflektometrijos metodu nustatytas vandens pomembraninio sluoksnio storis siekia 2 nm (McGillivray D.J. et al., 2007). Todėl šios membranos yra sėkmingai pritaikomos poras formuojančių toksinų tyrimams ir kuriami biologiniai jutikliai bakterinių toksinų, savaime įsiterpiančių į membranas, koncentracijos nustatymui.

Membranų modeliai ant garinto aukso paviršiaus yra gana plačiai ištirta tema ir nustatyti optimalūs parametrai membranų formavimui, todėl žengiami pirmieji žingsniai link biologinių jutiklių komercializavimo (patentas nr. LT6424B (2017) „Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas“). Žinant, kad auksas ir paviršių paruošimo procesas (magnetroninis dulkinimas) yra brangūs, yra siekiama atrasti alternatyvių substratų, kurie būtų pigesni ir lengviau komerciškai prieinami siekiant sukurti pigų ir lengvai paruošiamą biologinį jutiklį. Pastebėsime, kad membranų modeliai ant metalinių substratų, tokių kaip auksas yra neskaidrūs todėl tokiems modeliams sunkiai pritaikomi optiniai metodai, kuriems būtinas šviesos pralaidumas. Svarbu pastebėti, jog yra duomenų (Rakovska et al., 2015), kad inkariniai junginiai, aukso tiolatai gali nesunkiai migruoti aukso paviršiumi, kas lemia inkarinių junginių sankaupų paviršiuje susidarymo ir funkcinių membranų savybių blogėjimą, ypač bandant regeneruoti kontakte su vandens terpe esančias membranas.

Viena iš alternatyvų aukso substratams galėtų būti plonų plėvelių metalų

oksidai. Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio susilaukia skirtingais elementais legiruotas alavo oksidas. Tai yra optiškai skaidrūs ir elektros srovei laidūs puslaidininkiai, todėl atsiveria galimybė suformuoti sistemas pritaikyti fotovoltikoje. Taip pat suformuotų membranų tyrimams galima pritaikyti optinius tyrimų metodus.

Norint suformuoti paviršiuje prikabiną membraną ant metalo oksidinių paviršių, reikia naudoti savitvarkį monosluoksnį susidedantį iš trialkoksisilanų. Hidrolizės reakcijos metu, suformuojami stiprūs Si-O-metalas kovalentiniai ryšiai (Wasserman S.R. et al., 1989). Siekiant ant metalo oksidinių paviršių suformuoti membraną, kuri turėtų pomembraninį vandens rezervuarą ir galėtų būti pritaikyta poras formuojančių baltymų tyrimams, reikia atrasti tokius junginius SAM formavimui, kurie turėtų hidrofilinę dalį į viršų nuo funkcinės grupės (suformuoja ryšius su paviršiumi) ir hidrofobinę uodegą. Suformavus tokį SAM, hidrofilinėje dalyje susidarytų plonas vandens sluoksnis dėl vandenilinių ryšių, o hidrofobinė dalis vezikulių liejimo metu įsiterptų tarp fosfolipidų ir taptų membranos dalimi.

Taigi, apibendrinant galima būtų išskirti pagrindinius trūkumus paviršiuje imobilizuotų membranų pritaikymui biojutiklių kūrime:

1. Aukšiniai membranų substratai yra neskaidrūs, todėl yra sunkiau pritaikyti optinius tyrimų metodus. Tuo tarpu, oksidiniai substratai gali būti pagaminti optiškai skaidrūs.

2. Nebloginant jų savybių membranos ant auksinių paviršių gali būti suformuojamos tik vieną kartą, t.y. dėl aukso-tiolatų labilumo ir polinkio migruoti paviršiuje, negalima membranos regeneracija. Todėl aktualu pritaikyti oksidinius paviršius, tinkamus daugkartiniam membranų formavimui.

3. Naudojant tiolatų chemiją inkariniams junginiams suformuoti biosensoriaus substratų ratas apribotas metalais, pvz., auksu, tuo tarpu silanų inkariniai junginiai leidžia išplėsti substratų sąrašą iki puslaidininkių ir dielektrikų.

4. Įprastai naudojamas paviršius – auksas, yra brangus metalas, jo paruošimui naudojama brangi įranga, todėl siekiama pritaikyti pigesnius elektrai laidžius ir nelaidžius oksidinius ir oksiduotus metalų paviršius.

IŠRADIMO ESMĖ

Šiam išradimui įgyvendinti buvo parinkti metalų ir nemetalų oksidų paviršiai. Plonų plėvelių oksidinių paviršių pritaikymas membranų formavimui turi pranašumų, lyginant su iki šiol membranų formavimui naudojamais aukso plėvelių paviršiais, kurių minimalus storis viršija 50 nm ir dėl to nėra optiškai skaidrūs. Kadangi plonasluoksniai oksidai pasižymi optiniu skaidrumu, todėl suformuotos fosfolipidinės membranos gali būti tiriamos optiniais tyrimų metodais ir galimai pritaikomos fotosrovės generavimui ar saulės elementų kūrime.

Dėl oksidų paviršiaus chemijos savitvarkio monosluoksnio formavimui naudojami silanų junginiai su metalų oksidų paviršiumi sudarantys stiprų Si-O-metalas ryšį, kuris užtikrina kad susiformavęs savitvarkis monosluoksnis pasižymėtų dideliu stabilumu. Dėl šios priežasties silanizuoti oksidiniai paviršiai gali būti tinkami daugkartiniam tomis pačiomis savybėmis pasižyminčių fosfolipidinių membranų formavimui, priešingai nei aukso plėvelių paviršiai pasižymintys aukso tiolatų molekulių paviršiniu judrumu, sąlygojančiu inkarinių monosluoksnių nestabilumą ir inkarų susitelkimą į paviršinius telkinius bei membranų funkcinių savybių degradacija.

Šiame darbe SAM formavimui panaudota naują silanų sintezės procedūra, paremta klik-reakcijos chemija ir nereikalaujanti brangios įrangos. Sintezės metu paruošiamas ilgagrandžio ir trumpagrandžio silanų mišinys iš karto gali būti pritaikomas monosluoksnio formavimui be papildomo gryninimo. Vezikulių liejimo metu suformuotos fosfolipidinės membranos pasižymi stabilumu ir gali būti regeneruojamos.

Metalų ar nemetalų oksidai yra pigesni, nei įprastai fosfolipidinių membranų formavimui naudojami Au paviršiai, todėl atsiranda daugiau galimybių komerciškai pritaikyti fosfolipidinius biojutiklius toksinų ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų detekcijai sukonstruotus ant elektrai laidžių ir nelaidžių oksidinių paviršių.

Siūlomo būdo privalumai:

1. Panaudojant silanų inkarus galima sukonstruoti fosfolipidinius biojutiklius ant nebrangių, taip pat ir komerciškai prieinamų, elektrai laidžių ir nelaidžių oksidinių ir oksiduotų metalų paviršių.
2. Siūlomas biojutiklis gali būti regeneruojamas ir panaudojamas kelis ar daugiau kartų.

3. Siūlomas biojutiklis gali būti sukonstruojamas ant optiškai skaidraus pagrindo ir integruojamas į optinius tyrimo prietaisus/metodus.

4. Siūlomas biojutiklis gali būti sukonstruojamas ant laidžių, puslaidininkių ir dielektrinių savybių turinčių paviršių.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

1 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – švarus FTO stikliukas, balti apskritimai – FTO stikliukas funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM mišiniu heptano tirpiklyje, juodi trikampiai – tBLM, sudėtis – DOPC/Chol 6:4.

2 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – švarus FTO stikliukas, balti apskritimai – FTO stikliukas funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM mišiniu tolueno tirpiklyje, juodi trikampiai – tBLM, sudėtis – DOPC/Chol 6:4.

3 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – švarus ITO stikliukas, balti apskritimai – ITO stikliukas funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM mišiniu heptano tirpiklyje, juodi trikampiai – tBLM, sudėtis – DOPC/Chol 6:4.

4 paveikslas. Fluorescencinio mikroskopo nuotraukos, A-D – DOPC/Chol 6:4 tBLM, (kur 1% cholesterolio yra žymėtas fluorescenciniu dažu (Chol-Cy5)) ant TOPS:ATS 1:1 SAM funkcionalizuotų mikroskopinio stiklo plokštelių, E-F – tokia pat membrana ant mikroskopinio stiklo plokštelių, kurios nebuvo funkcionalizuotos SAM. A, B ir C - membranos kraštas.

5 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – švari NP plokštelė, balti apskritimai – NP plokštelė funkcionalizuota TOPS:ATS 1:1 SAM mišiniu heptano tirpiklyje, juodi trikampiai – tBLM, sudėtis – DOPC/Chol 6:4. A – priartinta kreivės dalis.

6 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – švari garinto Ti/TiO₂ plokštelė, balti apskritimai – Ti/TiO₂ plokštelė funkcionalizuota TOPS:ATS 1:1 SAM mišiniu heptano tirpiklyje, juodi trikampiai – tBLM, sudėtis – DOPC/Chol 6:4. A –

priartinta kreivės dalis.

7 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – švari Si plokštelė, balti apskritimai – Si plokštelė funkcionalizuota TOPS:ATS 1:1 SAM mišiniu heptano tirpiklyje, juodi trikampiai – tBLM, sudėtis – DOPC/Chol 6:4.

8 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – DOPC/Chol 6:4 tBLM suformuota ant FTO, kuris buvo funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM, balti apskritimai – praėjus 60 min po 50 nM melitino įterpimo į membraną, juodi trikampiai - praėjus 60 min po 100 nM melitino įterpimo į membraną. A - priartinta kreivės dalis

9 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – DOPC tBLM suformuota ant FTO, kuris buvo funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM, balti apskritimai – praėjus 60 min po 50 nM melitino įterpimo į membraną, juodi trikampiai - praėjus 60 min po 100 nM melitino įterpimo į membraną.

10 paveikslas. DOPC:Chol 6:4 tBLM laidumo pokyčio priklausomybė nuo skirtingos melitino koncentracijos įterpimo į membraną.

11 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – DOPC/Chol 6:4 tBLM suformuota ant FTO, kuris buvo funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM, balti apskritimai – praėjus 60 min po 50 nM alfa-hemolizino įterpimo į membraną, juodi trikampiai – praėjus 60 min po 100 nM alfa-hemolizino įterpimo į membraną. A - priartinta kreivės dalis.

12 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: juodi apskritimai – DOPC tBLM suformuota ant FTO, kuris buvo funkcionalizuotas TOPS:ATS 1:1 SAM, balti apskritimai – praėjus 60 min po 100 nM alfa-hemolizino įterpimo į membraną.

13 paveikslas. DOPC:Chol 6:4 tBLM laidumo pokyčio priklausomybė nuo skirtingos alfa-hemolizino koncentracijos įterpimo į membraną.

14 paveikslas. Elektrocheminio impedanso spektrai Cole – Cole koordinatėse išmatuoti esant 0 V potencialui vs Ag/AgCl, Cl⁻_{sot.}: balti simboliai – membranos

suformavimas kelis kartus; juodi simboliai – membranos nuplovimas.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Atsižvelgiant į tai, kad ankstesnių fosfolipidinių biojutiklių kūrimo buvo naudojamas aukso paviršius, kuris nėra optiškai skaidrus, suformuoti alkiltolių savitvarkiai monosluoksniai ir fosfolipidinės membranos ant aukso paviršių nėra pakankamai stabilūs ir nėra regeneruojami, taip pat įvertinus aukso savikainą, šiam išradimui įgyvendinti buvo parinkti metalų ir nemetalų oksidų paviršiai. Pirmasis privalumas šių medžiagų panaudojime yra tai, kad oksidai plonų plėvelių forma pasižymi aukštu regimosios šviesos ir UV spinduliuotės pralaidumu. Ši savybė leidžia pritaikyti optinius tyrimų metodus biojutiklių kūrimo, ko nebuvo galima atlikti su auksiniais paviršiais. Optinių tyrimų metodai praplečia galimas tyrimų sritis ir atveria kelią fosfolipidines membranas ant kietų paviršių pritaikyti fotosrovę generuojančių sistemų kūrimo.

Fosfolipidinio biojutiklio formavimui reikalingas savitvarkis monosluoksnis pasižymintis hidrofobiškumu ir gebantis adsorbuoti ir suardyti fosfolipidų vezikules taip, kad susiformuotų vientisas fosfolipidų dvisluoksnis. Au paviršiuje monosluoksnis yra formuojamas naudojant alkiltolių junginius, kur susidaro kovalentinės Au-S jungtys. Nors susiformavę Au-S ryšiai yra stiprūs, tačiau dėl paviršinių aukso atomų labilumo, monosluoksnio molekulės yra judrios paviršiuje. Esant ilgesniam kontaktui su vandenine terpe (iki keliolikos valandų) retai, po visą paviršių išsidėsčiusios monosluoksnio molekulės suformuoja saleles, o tai trukdo vientiso fosfolipidinio bisluoksnio – fosfolipidinio biojutiklio formavimui. Tuo tarpu, savitvarkio monosluoksnio formavimui ant metalo oksidinių paviršių yra naudojami trichlorosilano (arba trialkoksisilano) funkcinę grupę turintys junginiai. Dėl oksidų paviršiaus chemijos, susiformuoja stiprūs Si-O-metalas kovalentiniai ryšiai, dėl to savitvarkiai monosluoksniai pasižymi aukštu stabilumu (Wasserman S.R. et al., 1989). Ilgas kontaktas su vandenine terpe ar su kitais fiziniais išoriniais veiksniais menkai veikia arba iš viso neveikia monosluoksnio savybių. Tai suteikia papildomus privalumus oksidinių paviršių panaudojime fosfolipidinių membranų formavimui: membranos ne tik pasižymi aukštu stabilumu ilgą laiką tarpą (keletą dienų), bet ir atsiranda galimybė regeneruoti membranas ant to paties paviršiaus, neblogėjant membranos savybėms.

Taip pat atsižvelgiant į auksinių paviršių paruošimo kainą, metalų ir nemetalų oksidiniai paviršiai yra ženkliai pigesni, o tai yra aktualu siekiant fosfolipidinį biojutiklį toksinų ir kitų membraninių baltymų bei biologiškai aktyvių medžiagų detekcijai pritaikyti komerciniam panaudojimui.

Šiame išradime siekiant pritaikyti metalų ir nemetalų oksidus fosfolipidinių biojutiklių formavimui, buvo atsižvelgta į komerciškai prieinamų trichlorosilanų inkarų trūkumą. Remiantis klik-reakcijos chemija, kuri nereikalauja brangios įrangos, buvo atlikta naujų silanų sintezė. Ši metodika yra pranašesnė už jau žinomus sintezės metodus tuo, kad yra paruošiamas ilgagrandžio ir trumpagrandžio silano mišinys, kur savitvarkio monosluoksnio formavimo metu trumpagrandis atskiedžia ilgų inkarų kiekį ant paviršiaus, suformuodamas retai išsidėsčiusį savitvarkį monosluoksnį (angl. *sparsely populated*). Tai sudaro galimybę susiformuoti paviršiuje prikabiniai membranai.

Sutartiniai žymėjimai:

EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija

CV – ciklinė voltamperometrija

AFM – atominių jėgų mikroskopas

SPR – paviršiaus plazmonų rezonansas

NR – neutronų reflektometrija

SAM – savitvarkis monosluoksnis

PEG - polietilenglikolis

BMR – branduolių magnetinis rezonansas

tBLM – paviršiuje prikabinos fosfolipidinės bisluoksnės membranos

FTO – fluoru legiruotas alavo oksido stiklas

ITO – indžio alavo oksidas

ATS – aliltrichlorsilanas

TOPS – trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silanas

ODT – oktadekantiolis

DMPA - 2,2-dimetoksi-2- fenilacetofenonas

Medžiagos ir metodai:

Fluoru legiruotas alavo oksido stiklas – FTO, 300 mm × 300 mm × 2,2 mm

Indžio alavo oksidas – ITO, 150 mm × 150 mm × 0,7 mm

Nerūdijantis plienas – NP, 316L lydinys pagal AISI nomenklatūrą:
sudėtis: Fe/Cr 18%/Ni 10%/Mo 3%, 150 mm × 150 mm × 0,5 mm

Stiklo plokštelė – 25 mm × 75 mm

Trichloro(3-(oktadeciltio)propil)silanas – TOPS

Dejonizuotas vanduo – dejon. H₂O

Natrio chloridas – NaCl

Natrio dihidrofosfatas – NaH₂PO₄·2H₂O

Natrio hidroksidas – NaOH

Aliltrichlorosilanas – H₂C=CHCH₂SiCl₃

Oktadekantolis – CH₃(CH₂)₁₇SH

2,2-dimetoksi-2-fenilacetofenonas – C₁₆H₁₆O₃

Heptanas – C₇H₁₆

Toluenas – C₇H₈

Chloroformas – CHCl₃

1,2-dioleoil-3-fosfoglicerocholinas – DOPC

Cholesterolis – chol

Melitinas – mel, iš bičių nuodų

Alfa hemolizinas – aHL, iš *Staphylococcus aureus*

Cholesterolio darinys su merocianino dažu: 2-(1E,3E,5E)-5-(1-(5-carboksipentil)-3,3-dimetilindolin-2-iliden)penta-1,3,3-trimetil-3H-indolo bromidu – Chol-Cy5

UV lempa – 365 nm 5W

¹³C ir ¹H BMR spektrai užrašyti prietaisu Bruker Ascend 400 spektrometru (400 MHz dažnis ¹H BMR ir 100 MHz - ¹³C NMR), naudojant tirpiklio likučių (CDCl₃) signalus.

Cheminis poslinkis pateikiamas δ skalėje (ppm).

EIS matavimai atlikti potenciostatu/galvanostatu μ Autolab Type III su instaliuota programine įranga FRA. Matavimai buvo vykdomi standartinėje trijų elektrodų celėje, kurioje darbinis elektrodas – metalo oksidinis paviršius (darbinis plotas $0,32 \text{ cm}^2$), palyginamasis – Ag/AgCl, $\text{Cl}^-_{\text{sot.}}$, pagalbinis – platinos viela. Elektrocheminiams matavimams naudojamas fosfatinis buferinis tirpalas susidėjo iš $0,01 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ ir $0,1 \text{ M NaCl}$, naudojantis NaOH pH koreguojamas iki 7,1 vertės.

Fluorescencinė mikroskopija buvo atlikta naudojantis Olympus BX61WI fluorescenciniu mikroskopu, į vandenį įmerkiamu objektyvu UMPlanFN-W (10X/0.30 NA) ir Qimaging EXi Aqua kamera. Hg lempa ir Olympus U-MWG2 filtras buvo naudojami nustatyti Chol-Cy5 paviršinį pasiskirstymą. Stiklo plokštelės buvo pritvirtintos ant Petri lėkštelių dugno ir, prieš nuotraukų registravimą, vezikulių tirpalas buvo pilnai išplaunamas iš sistemos su švairiu PBS pH 7,1.

IŠRADIMO REALIZAVIMO PAVYZDŽIAI

1 pavyzdys

1. TOPS junginio sintezė atliekama klik-reakcijos mechanizmu (Tucker-Schwartz A. K. et al., 2011). ATS ir ODT yra sumaišomi moliniu santykiu 2:1 skaidriame mėgintuvėlyje. Įdedama 2 mol% DMPA iniciatoriaus ir maišoma ant magnetinės maišyklės kol gaunamas homogeninis mišinys. Šis mišinys yra apšvitinamas 365 nm bangos ilgio 5 W galingumo UV lempa 24 val. Po šios sintezės procedūros turime paruoštą naudoti silanizavimo mišinį (TOPS:ATS 1:1) SAM formavimui. TOPS:ATS 1:1 mišinys laikomas suvyniotas į aliuminio foliją, kad būtų išvengta tiesioginių saulės spindulių, kurių poveikis galimai mažina susintetinto mišinio cheminį aktyvumą.

2. Prieš membranos formavimą, FTO dengta stiklo plokštelė buvo supjaustoma į $25 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ dydžio elektrodus ir atliekama plovimo procedūra. Ultragarsinėje vonelėje plaunama 2 skirtingose terpėse po 10 min: (i) 2% „Micro 90“ tirpale; (ii) dejonizuotame vandenyje. Toliau, FTO plokštelė 1 val. yra inkubuojama konc. H_2SO_4 , po to skalaujama dejon. H_2O ir laikoma 2-propanolyje ultragarso vonelėje 10 min. Paskutiniame žingsnyje, FTO yra laikomas dejon. H_2O apytikriai 18-20 val. (per naktį) ir išdžiovinamas N_2 dujų sraute.

3. Paruoštas mėginys toliau naudojamas SAM formavimo – silanizavimo procedūroje. 20 ml heptano (ar kito sotaus alkano) nedidelėje stiklinėje kaitinama iki 60°C ir įpilama 30 µl susintetinto TOPS:ATS mišinio. Tada elektrodas įstatomas vertikaloje padėtyje į maišomą silanizavimo tirpalą 1 val. 60°C temperatūroje. Po to mėginys nuplaunamas švarių heptanu, išdžiovinamas N₂ dujų sraute ir iškaitinamas 100°C temperatūroje 1 valandą.

4. tBLM formavimas atliekamas naudojant vezikulių liejimo metodą (1 pav.) (patentas nr. LT6424B (2017)). Paruošiami lipidų 10 mM tirpalai chloroforme, kurie laikomi -20°C temperatūroje. Į kitą indą paimamas toks kiekis tirpalo, kad būtų paruošiama 1 mM koncentracijos norimo tūrio tirpalas. Chloroformas yra išgarinamas azoto dujų srove (pučiama apie 30 min), kol ant indo dugno lieka baltos spalvos lipidinė plėvelė. Ji užpilama buferiniu tirpalu, kurio pH – 4,4, o sudėtis yra 0,1 M NaH₂PO₄ ir 0,01 M NaCl. Į tirpalą yra merkiama automatinė pipetė, ir kartojami įtraukimo ir išstūmimo ciklai, kol lipidinė plėvelė atsoka nuo sienelių, ji soliubilizuojasi ir susidaro homogeninis tirpalas.

2 pavyzdys

Atliekama taip pat kaip aprašyta 1 pavyzdyje, tik 3 punkte silanizavimas atliekamas aromatiname tirpiklyje (pvz., toluene) (2 pav.), tačiau galima naudoti ir benzeną.

3 pavyzdys

Atliekama taip pat kaip aprašyta 1 pavyzdyje, tik 2 punkte naudojamas:

(i) ITO stiklas (3 pav.), tačiau galima naudoti ir kitais oksidais dengtą stiklo plokštelę: kadmio alavo oksidą (CdSnO₄), cinko oksidą (ZnO), aliuminiu legiruoto cinko oksidą (Al:ZnO), stibio alavo oksidą (SnO₂/Sb₂O₅), indžio stibio oksidą (InSbO), galio cinko oksidą (GaZnO), indžio cinko oksidą (InZnO), stibio indžio alavo oksidą (InSbSnO), indžio galio cinko oksidą (InGaZnO), bismuto selenitą (Bi₂SeO₅), itrio bario kupratą, metalų oksidų perovskitus;

(ii) stiklo plokštelė (4 pav.), tačiau galima ir naudoti ir spalvotą stiklą, kvarcą, safyrą, žėrutį;

(iii) nerūdijantis plienas (5 pav.), tačiau galima naudoti ir aliuminį, titaną, varį, nikelį, nikelio-titano lydinį, kobaltą ir kobalto lydinį;

(iv) garinto Ti/TiO_2 plokštelė (6 pav.), tačiau galima naudoti ir garinto Zn/ZnO , Zr/ZrO_2 , $\text{Cr/Cr}_x\text{O}_y$ plokšteles;

(v) Si/SiO_2 plokštelė (7 pav.), tačiau galima ir naudoti ir Ge/GeO_2 .

4 pavyzdys

Atliekama, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, tik stebima DOPC/Chol 6:4 ir DOPC membranos pažaida su skirtingų koncentracijų baltymais - poras formuojančiais toksinais: (i) melitinu (8 ir 9 pav.); (ii) alfa-hemolizinu (11 ir 12 pav.), sudaromos fosfolipidinio biojutiklio kalibracinės kreivės – membranos laidumo pokyčio priklausomybės nuo toksino koncentracijos (10 ir 13 pav.)

5 pavyzdys

Atliekama, kaip aprašyta 1 pavyzdyje, tik stebimas fosfolipidinio bisluoksniu pašalinimas ir pakartotinis suformavimas ant to paties paviršiaus keletą kartų (14 pav.).

Pateikti pavyzdžiai parodo, kad pasitelkiant klik-reakcijos cheminį procesą galima susintetinti naudojimui tinkamą silanų mišinį, į kurį įmerkus metalo oksidini paviršių, pavyzdžiui stiklo plokštelę padengtą FTO sluoksniu, arba ITO sluoksniu, arba gryno stiklo, spalvoto stiklo, kvarco, safyro plokštelę, žėrutį, arba nerūdijantį plieną, aliuminį, titaną, varį, nikelį, nikelio-titano lydinį, kobalto ir kobalto lydinį, arba garinto Ti/TiO_2 plokštelę, arba Si/SiO_2 plokštelę, arba kitą metalo ar puslaidininkio gaminį padengtą oksidu, pvz., kadmio alavo oksidą (CdSnO_4), cinko oksidą (ZnO), aliuminiu legiruotą cinko oksidą (Al:ZnO), stibio alavo oksidą ($\text{SnO}_2/\text{Sb}_2\text{O}_5$), indžio stibio oksidą (InSbO), galio cinko oksidą (GaZnO), indžio cinko oksidą (InZnO), stibio indžio alavo oksidą (InSbSnO), indžio galio cinko oksidą (InGaZnO), bismuto selenitą (Bi_2SeO_5), itrio bario kupratą, perovskitą, gaunamas inkarinis monosluoksniu, tinkamas paviršiuje imobilizuotų membranų, tBLM, prikabinimui daugiasluoksnių vezikulių liejimo metodu, aprašytu patente Nr. LT6424B (2017). tBLM sudėtis gali būti lengvai varijuojama priklausomai nuo su membrana sąveikaujančio ir įsiterpiančio į membraną poras formuojančio baltymo-toksino, taip pat gaunami tBLM gali būti lengvai regeneruojami neprarandant funkcinių tBLM savybių. Sukurti fosfolipidiniai biojutikliai yra tinkami toksinų koncentracijos nustatymui, naudojant kalibracinę kreivę, pvz., membranos laidumo pokyčio priklausomybė nuo toksino koncentracijos.

Literatūra

1. Castellana E. T, Cremer P. S., Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surface Science Reports* 61 (2006) 429–444.
2. Eicher-Lorka O., Charkova T., Matijoška A., Kuodis Z., Urbelis G., Penkauskas T., Mickevicius M., Bulovas A., Valincius G., Cholesterol-based tethers and markers for model membranes investigation, *Chemistry and Physics of Lipids* 195 (2016) 71-86.
3. Junghans A., Köper I., Structural Analysis of Tethered Bilayer Lipid Membranes, *Langmuir* 26 (2010) 11035–11040.
4. McGillivray D. J., Valincius G., Vanderah D. J., Febo-Ayala W., Woodward J. T, Heinrich F., Kasianowicz J. J., Lösche M., Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes, *Biointerphases* 2 (2007) 21-33.
5. Plant A.L., Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics, *Langmuir* 15 (1999) 5128–5135.
6. Ragaliauskas T., Mickevicius M., Rakovska B., Penkauskas T., Vanderah D. J., Heinrich F., Valincius G., Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2017) 669–678.
7. Rakovska B. Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Jankunec, M., Niaura, G., Vanderah, D.J., Valincius G.. Structure and Function of Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, 31, (2015) 846-857
8. Tucker-Schwartz A. K., Farrell R. A., Garrell R. L., Thiol-ene Click Reaction as a General Route to Functional Trialkoxysilanes for Surface Coating Applications, *Journal of American Chemical Society* 133 (2011) 11026-11029.
9. Wasserman S. R., Tao Y. T., Whitesides G. M., Structure and Reactivity of Alkylsiloxane Monolayers Formed by Reaction of Alkyltrichlorosilanes on Silicon Substrates, *Langmuir*, 5 (1989) 1074-1087.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Membraninis biojutiklis, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima silano junginius, kurie formuoja silano-organinių molekulių inkarinį savitvarkį monosluoksnį, kuris suformuoja vientisą fosfolipidų dvisluoksnį.

2. Biojutiklis pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savitvarkio monosluoksnio formavimui naudojami organiniai tirpikliai tokie kaip alkanai ir (arba) jų mišiniai, įskaitant heptaną, aromatiniai angliavandeniliai ir (arba) jų mišiniai, įskaitant tolueną ir benzeną.

3. Biojutiklis pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad membranos formavimui naudojami paviršiai parinkti iš FTO, ITO, kadmio alavo oksido (CdSnO_4), cinko oksido (ZnO), aliuminiu legiruoto cinko oksido (Al:ZnO), stibio alavo oksido ($\text{SnO}_2/\text{Sb}_2\text{O}_5$), indžio stibio oksido (InSbO), galio cinko oksido (GaZnO), indžio cinko oksido (InZnO), stibio indžio alavo oksido (InSbSnO), indžio galio cinko oksido (InGaZnO), bismuto selenito (Bi_2SeO_5), itrio bario kupratų ir metalų oksidų perovskitų.

4. Biojutiklis pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad membranos formavimui naudojami paviršiai parinkti iš stiklo, spalvoto stiklo, kvarco, safyro, žėručio.

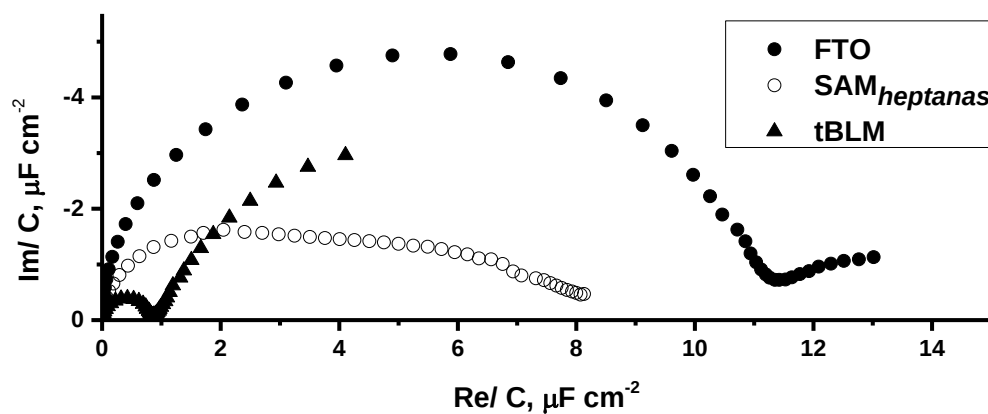
5. Biojutiklis pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad membranos formavimui naudojami paviršiai parinkti iš nerūdijančio plieno, aliuminio, titano, vario, nikelio, nikelio-titano lydinių, kobalto ir kobalto lydinių.

6. Biojutiklis pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad membranos formavimui naudojami plonų aktyvių metalų plėvelių paviršiai, gaunami magnetroninio ar terminio garinimo būdu, ore suformuojantys natūralų ar dirbtiniu būdu gautą oksidinį sluoksnį parinkti iš Ti/TiO_2 , Zn/ZnO , Zr/ZrO_2 ir $\text{Cr/Cr}_x\text{O}_y$.

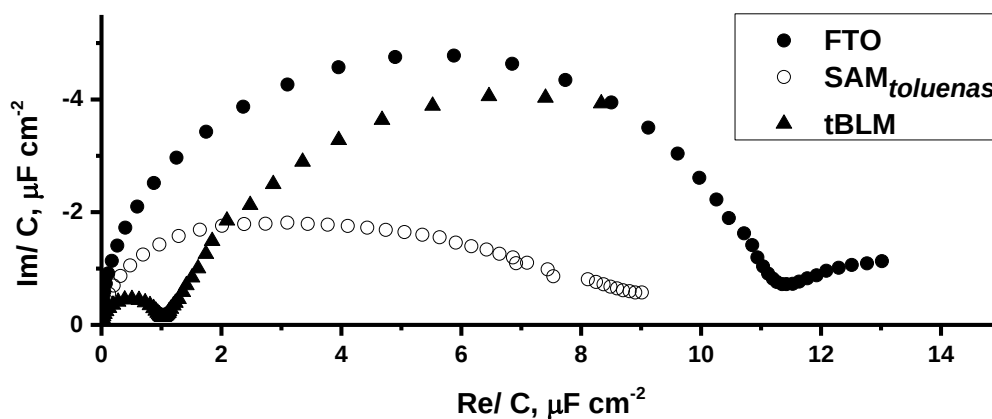
7. Biojutiklis pagal 1-2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad membranos formavimui naudojami puslaidininkių paviršiai, turintys oksidinį sluoksnį, yra parinkti iš Si/SiO₂ ir Ge/GeO₂.

8. Biojutiklis pagal 1-7 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad suformuotas jautrus fosfolipidinis sluoksnis gali būti pašalintas ir iš naujo suformuotas vieną ar kelis kartus ant to paties paviršiaus.

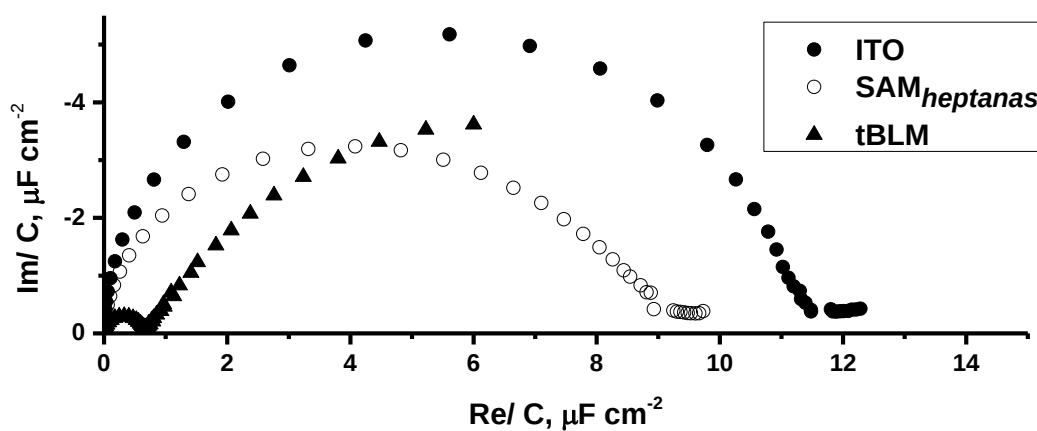
9. Biojutiklio pagal 1-8 punktus panaudojimas membranas pažeidžiančių baltymų agentui identifikuoti.



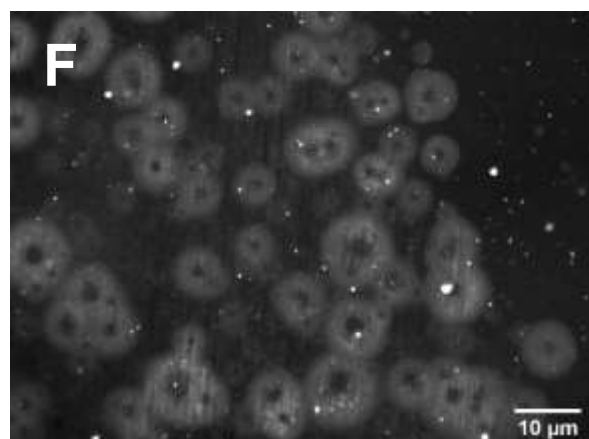
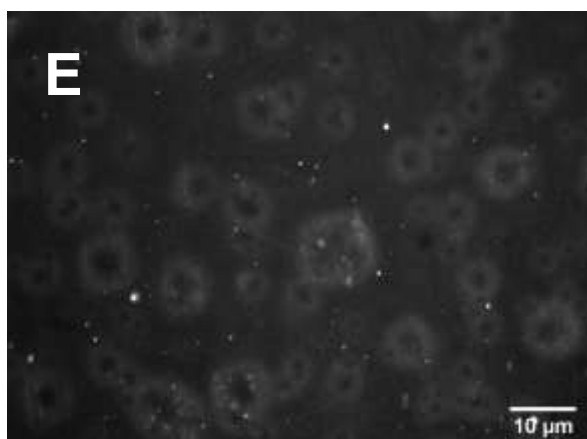
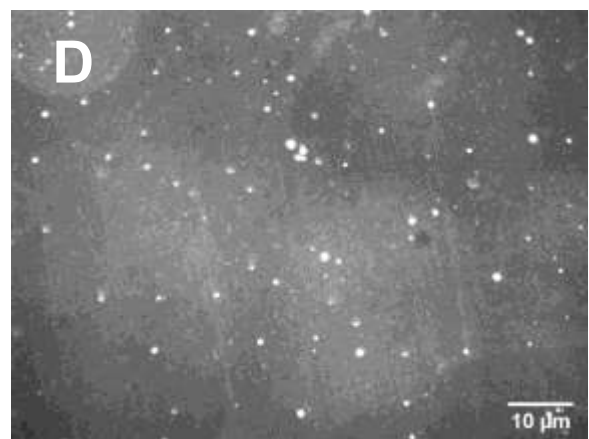
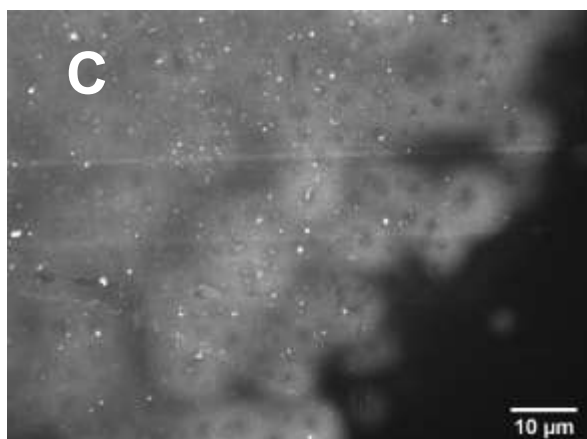
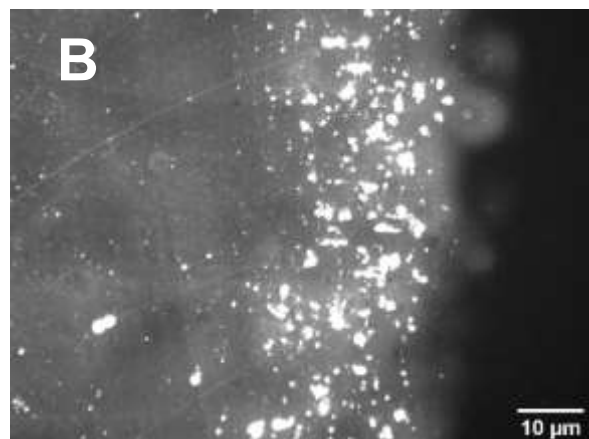
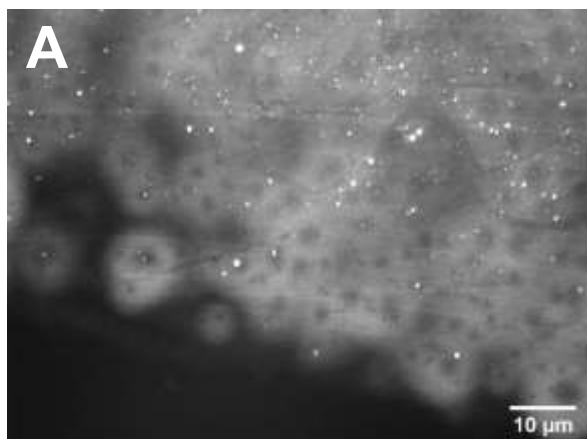
1 pav.

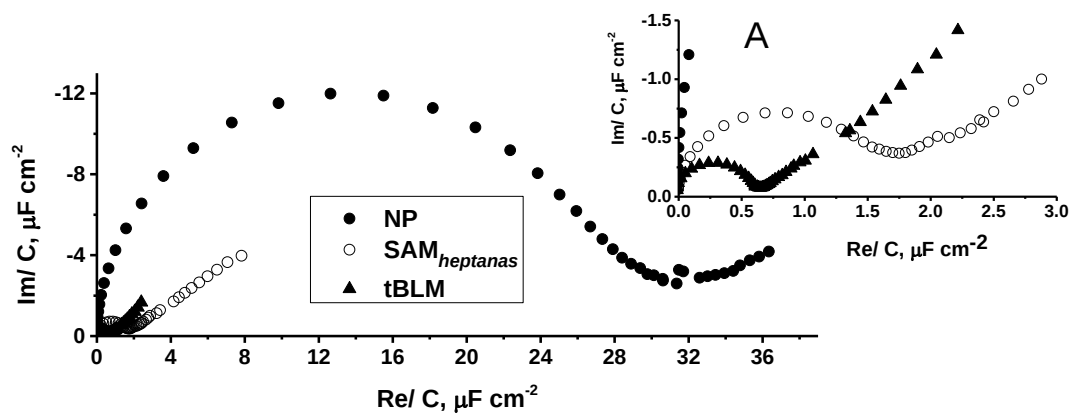


2 pav.

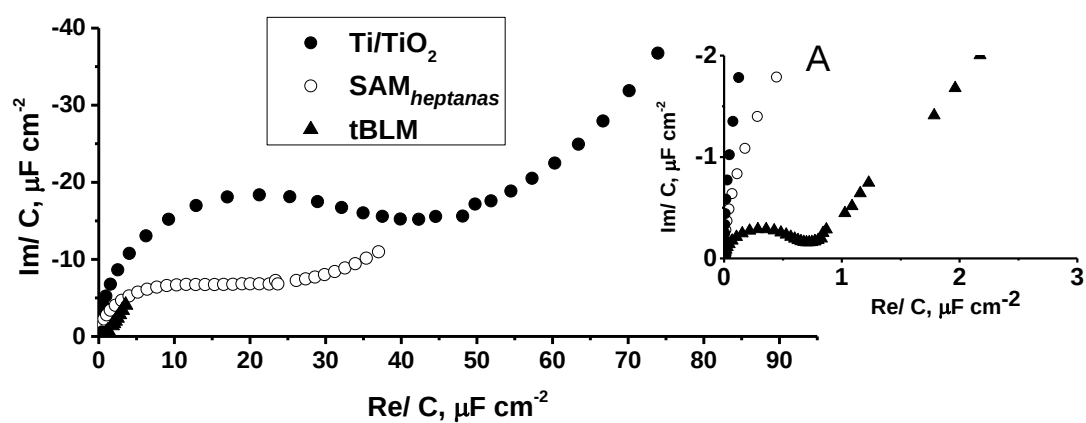


3 pav.

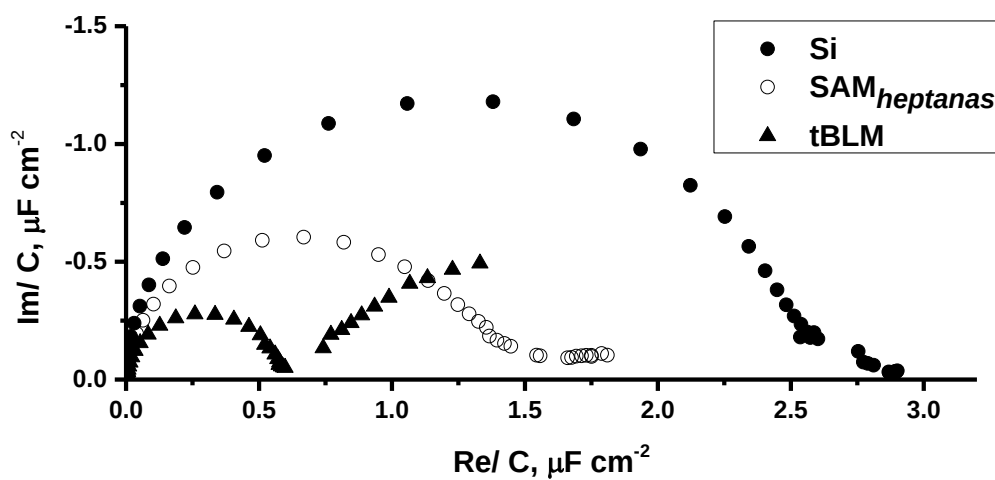




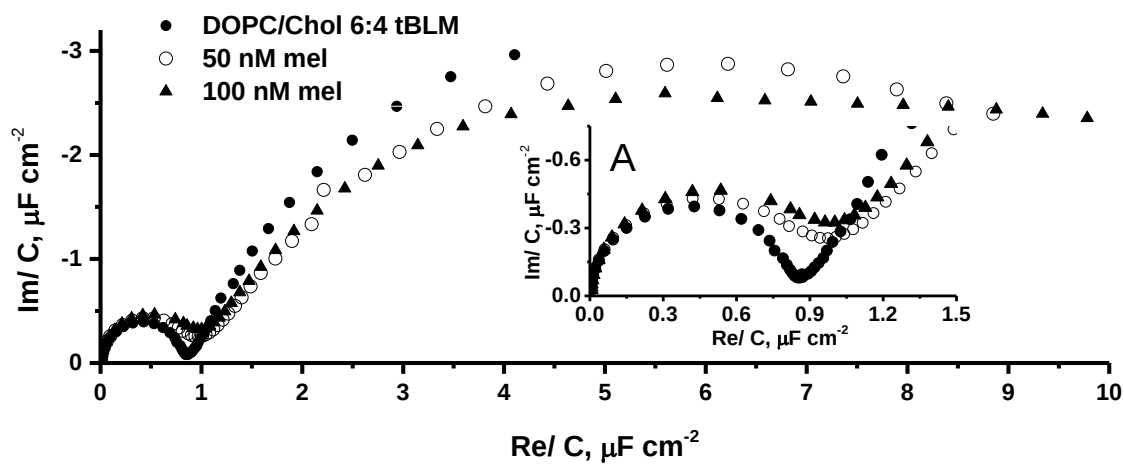
5 pav.



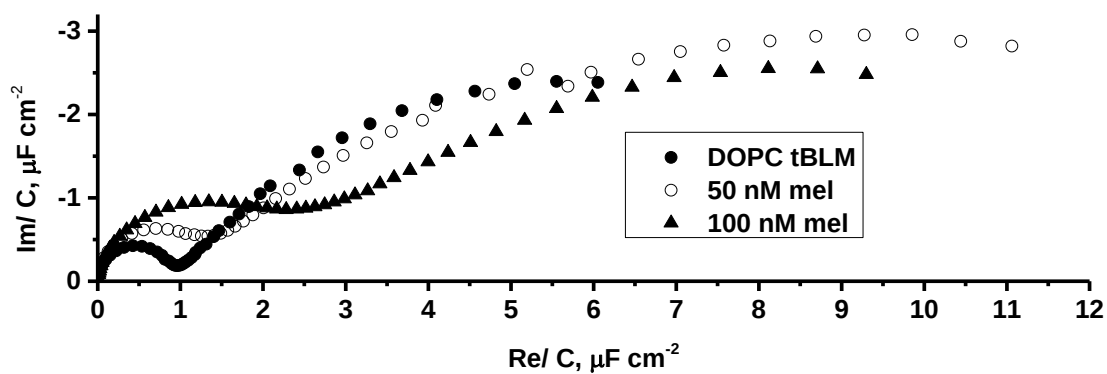
6 pav.



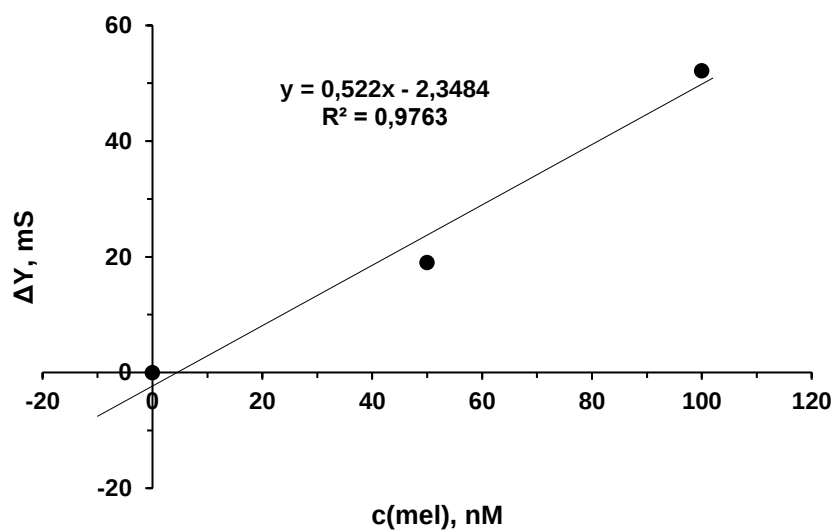
7 pav.



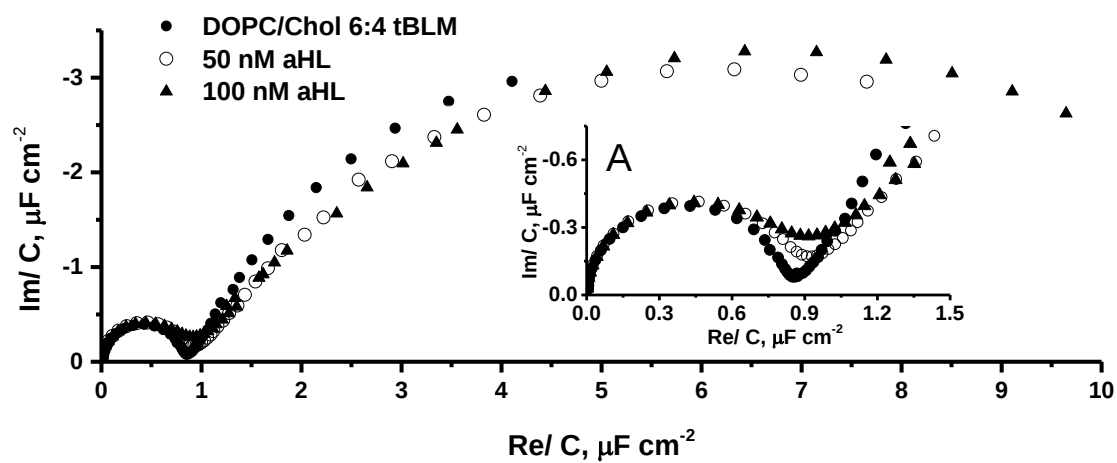
8 pav.



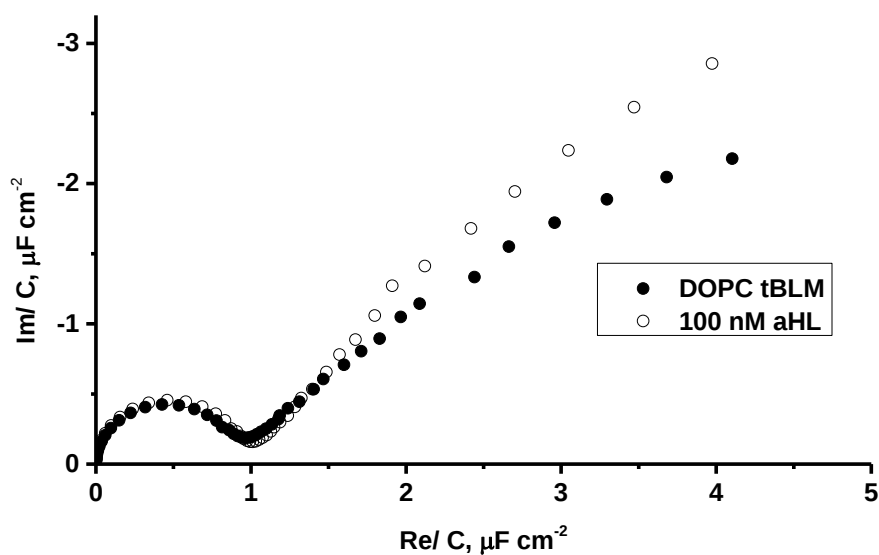
9 pav.



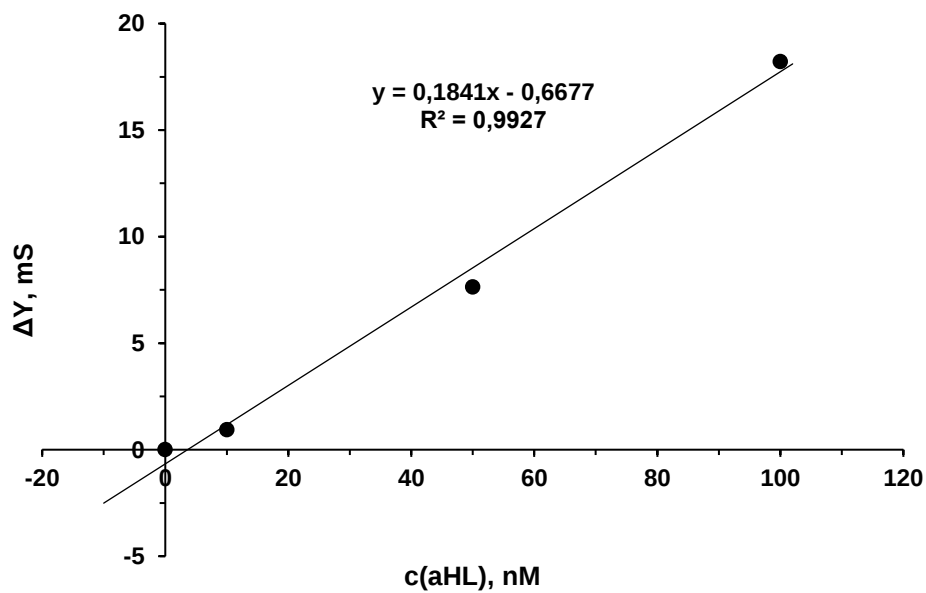
10 pav.



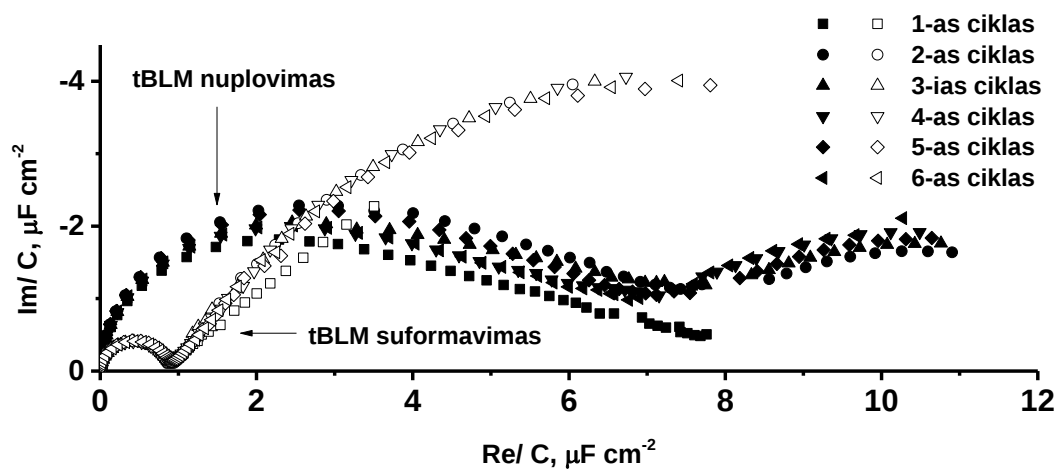
11 pav.



12 pav.



13 pav.



14 pav.