

ГОДИШНИК НА УНИВЕРСИТЕТА ПО АРХИТЕКТУРА, СТРОИТЕЛСТВО И ГЕОДЕЗИЯ – СОФИЯ

Юбилейна приложна научно-техническа конференция
„65 години Хидротехнически факултет и 15 години немскоезиково обучение”

6–7 ноември 2014
6–7 November 2014

International Jubilee Conference
„65th Anniversary Faculty of Hydraulic Engineering and 15th Anniversary Hydraulic Engineering in German”

ANNUAL OF THE UNIVERSITY OF ARCHITECTURE, CIVIL ENGINEERING AND GEODESY – SOFIA

XLVII ^{том}
vol.

2014

св.
fasc. I-В

НОВИ ЕФЕКТИ В НАНО ТЪНКИ СЛОЕВЕ ОТ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МАРКИРАНИ ФОСФОЛИПИДИ ЗА БИОСЕНЗОРНИ ПРИЛОЖЕНИЯ

Г. Иванов¹

Ключови думи: Лангмюир-Блоджетови филми, тънки филми, фосфолипиди, биосензори

Научна област: нанотехнологии, нови материали, физика

РЕЗЮМЕ

За някои практически приложения като например измерване на вторичните замърсители на водата са необходими биосензори с по-висока чувствителност и селективност. При проведените от нас систематични изследвания на флуоресцентно маркирани фосфолипиди на интерфейса вода – въздух или отложени като нано тънки слоеве върху твърди подложки по метода на Лангмюир и Блоджет бяха открити няколко нови ефекта. Единият ефект е самогасене на флуоресценцията при преминаване от течна в твърда фаза на липидния слой. Другият ефект е получаване на тримерни цилиндрични структури с наноразмери над слоя фосфолипид, които дават много по-развита повърхност за повишена чувствителност. Възможните приложения на тези ефекти за химични и биосензори са разгледани.

1. Въведение

Надеждният мониторинг на околната среда силно зависи от качеството на наличните и използвани химични и биохимични сензори. Все още има някои нерешени проблеми при тях, особено когато се изисква по-висока селективност. В тази статия сме предложили нов клас материали – флуоресцентно маркирани фосфолипиди, които

¹ Георги Р. Иванов, доц. д-р, кат. “Физика”, УАСГ, бул. “Хр. Смирненски” № 1, 1046 София, e-mail: george@at-equipment.com

могат да бъдат използвани при разработката на химични и биохимични сензори с подобрени параметри. Ние сме фокусирали своето внимание върху най-обещаващите съединения – маркирани в главата с нитробензоксадиазол (NBD) фосфатидил етаноламини. Ние бяхме първите, които изучават тези съединения като еднокомпонентни слоеве. Три нови явления сме открили за този материал, които могат да се използват за успешни сензорни приложения. В нашите изследвания ние използваме метода на Лангмюир и Блоджет за изследване на органични монослоевете на интерфейса вода-въздух и за отлагането им като нано тънък покрития. Монослоевите на интерфейса вода-въздух могат също да се използват и за експресен мониторинг на качеството на водата дори в полеви условия.

2. Използване на Лангмюирови филми за експресно измерване на качеството на водата

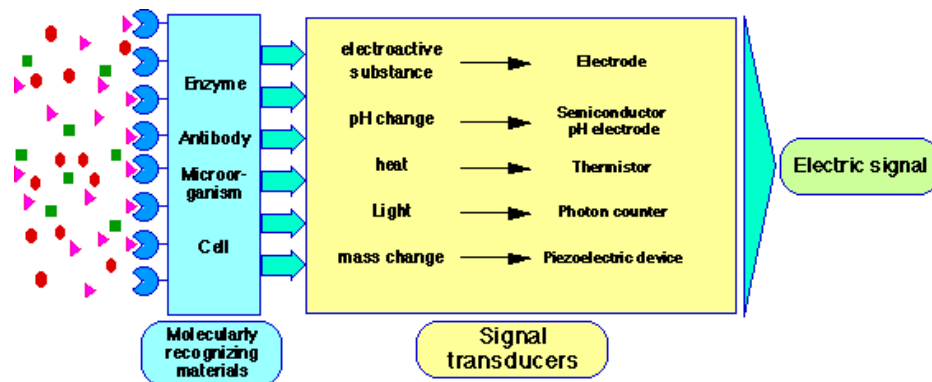
Лангмюировите филми са неразтворими монослоевете от органични молекули с подходящ хидрофилен – хидрофобен баланс, които остават на границата вода-въздух без да потъват в обема на водата. Ние систематично изследвахме слоеве от фосфолипидната молекула с 2 опашки дипалмитоил фосфатидил етаноламин, маркиран в хидрофилната глава със силно хидрофилния флуоресцентен маркер NBD (DP-NBD-PE). Този маркер се счита за един от най-добрите при евентуални сензорни приложения поради голямата му чувствителност към близкото му обкръжение. Например при локална промяна на полярността на средата се променят интензитетът на флуоресценцията, нейният максимум (530 nm) и времето на живот на флуоресценцията. Промяната е значителна и може лесно да бъде измерена.

Развитието на бързи, икономични и чувствителни техники за характеризиране на чистотата на природната и питейната вода, представлява водещ екологичен проблем. Повърхнинните свойства на природните води (проби взети от реки, езера и заливи) вече успешно се използват за оценка на качеството, екологията и чистотата на водните басейни. Наскоро Rogozelski и др. вж. [1] са предложили техника, базирана на Лангмюиров монослой, при която чрез измерване на изотермата повърхностно налягане – площ за една молекула на събраните от редица естествени водни басейни проби, се получават така наречените "структурни отпечатъци" на водата, чрез които адекватно да се предсказва качеството и чистотата на басейна. Основното предимство на тази Лангмюирова монослойна техника е съчетаването на лекота на използване (включително тестване в полеви условия), висока чувствителност и възможност за бързо прилагане с много по-ниска цена в сравнение с най-често използваните хроматографски техники. По-подробно този експресен метод за анализ на качеството на водата е разгледан в наша глава от книга [2].

Друг вариант за този метод за анализ е върху водата, която трябва да бъде анализирана да се разстели слой, Лангмюиров филм от DP-NBD-PE, след което да се изчака малко време замърсителите във водата да взаимодействат с молекулите от този слой. Това ще доведе до промяна на флуоресцентните параметри на този слой, които лесно могат да бъдат измерени и с полеви спектрофотометър. Допълнително предимство са новите ефекти, открити от нас при слоеве от тези молекули, описани по-надолу. Тези ефекти могат значително да повишат селективността на сензорите и тяхната чувствителност.

3. Нови ефекти при слоеве от DP-NBD-PE и възможности за използването им при химични и биосензорни приложения

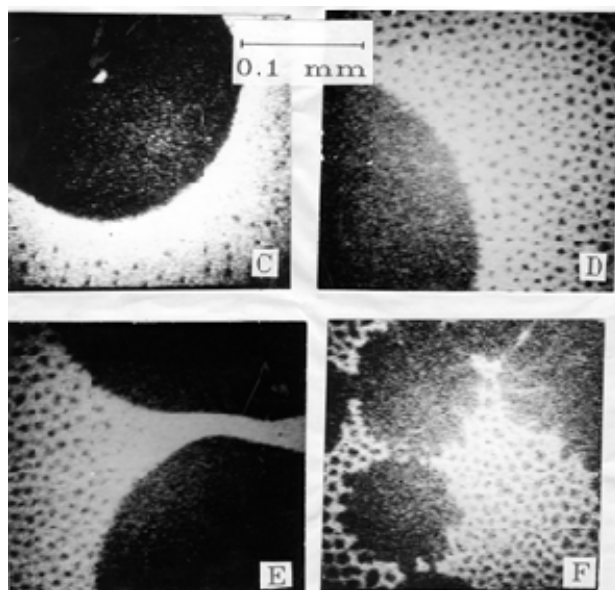
Принципът на работа на биосензорите е показан на фиг. 1. В лявата част схематично е показана частта, която „разпознава“ анализираното вещество и която осигурява селективността и до голяма степен чувствителността на сензора. Това най-често е ензим или молекула, която осъществява реакция от типа ключ–ключалка. Тези молекули обаче трябва да бъдат поставени в матрица от обикновено липидни молекули, което да позволи формирането на слой, като в същото време осигурява необходимата гъвкавост, подвижност и запазване на свойствата на селективно реагиращите молекули. Допълнително предимство би било, ако тази матрица спомога за снемането на сигнала от сензора. Точно такава матрица би могла да бъде слой от DP-NBD-PE молекули предвид сходното им поведение с фосфолипидните молекули, които са матрица за белтъците в биологичната мембрана, особено предвид откритите от нас и описани по-долу нови ефекти. Допълнително предимство е, че тези молекули формират стабилен слой и много добре и качествено се пренасят върху твърда подложка, което не е така за фосфолипидните молекули.



Фиг. 1. Принцип на действие на биосензор

От ляво надясно: слой, който разпознава анализираното вещество чрез селективно взаимодействие; преобразувател на сигнала, който дава изходящ електричен сигнал за по-нататъшна обработка

Първият нов ефект, открит от нас за този вид молекули [3], се наблюдава и в случая на слой от молекули на интерфейса вода–въздух (Лангмюиров филм), така и при пренасяне на слоя върху твърда подложка по метода на Лангмюир и Блоджет. Ефектът се състои в самогасене на флуоресценцията на молекулите при фазов преход от течна фаза в твърда фаза. Ефектът се наблюдава с флуоресцентна микроскопия както при по-ниски температури, така и при стайни температури, и е показан на фиг. 2. При преминаване от течна фаза в твърда фаза молекулите се разполагат на по-малки разстояния една от друга, което, както показахме [2], води и до промяна на конформацията на молекулата, като от почти хоризонтално разположение на хидрофилната глава тя заема почти вертикална посока. С оглед на възможните сензорни приложения е важно да се изясни механизмът на самогасене на флуоресценцията. Няколко са тези възможности като например сблъсък на оптично възбудена молекула с гасяща молекула или безизлъчвателен пренос на енергия между молекулите.



Фиг. 2. Флуоресцентна микроскопия на монослой на интерфейса вода–въздух от DP-NBD-PE при 5° С при покачващи се повърхностни налягания Π

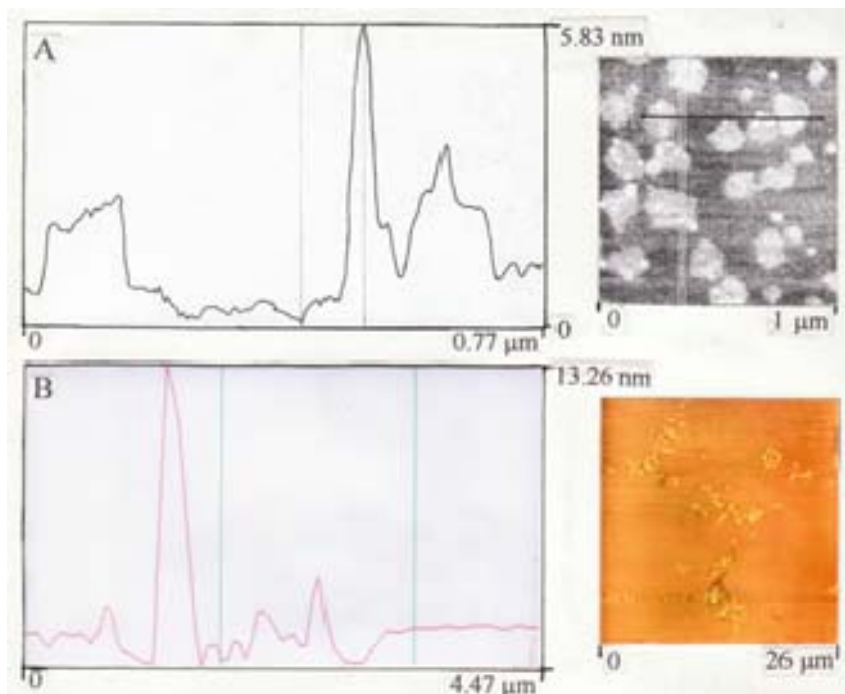
Твърдата фаза се наблюдава като тъмни области (флуоресценцията се е самозагасила) и тя съществува със светлата течна фаза (С). Поява на втора популация на твърдата фаза (малки черни точки), която се отблъсква от големите твърди области, $\Pi = 6 \text{ mN/m}$, (D). Малките области на твърдата фаза преодоляват отблъскването на големите области и започват да се прилеват към тях, $\Pi = 9 \text{ mN/m}$, (E). Големите области от твърда фаза затварят разстоянието между тях, $\Pi = 12 \text{ mN/m}$, (F). Областите на твърдата фаза придобиват дендридна форма и започват да се сливат по между си, $\Pi = 15 \text{ mN/m}$

Подробният анализ на експерименталните резултати ни води до следната най-вероятна причина за гасене на флуоресценцията за DP-NBD-PE молекулите. Разработен е модел, който взема предвид вероятността от статично гасене чрез формиране на безизлъчвателни капани, състоящи се от двойки статистически молекули DP-NBD-PE, които са под критично разстояние R_c за формиране на капан [4]. Изчисленията дават стойност за R_c от 0,94 nm при тази молекула. Тази стойност е по-голяма от междумолекулните разстояния в твърда фаза при слоеве от DP-NBD-PE и по-малко от разстоянието в течна фаза при стайна температура. Добавянето на кобалтови йони във водната субфаза и последващото им свързване с две молекули води до повишаване на междумолекулните разстояния до 0,93 nm, което може да обясни един друг нов ефект, който наблюдавахме – възстановяването на интензитета на флуоресценцията на твърдата фаза в присъствие на този йон, който иначе е известен като добър флуоресцентен гасител. Така този модел обяснява гасенето на флуоресценцията в твърдата фаза, липсата на гасене в течната фаза и възстановяването на флуоресценцията в твърда фаза при добавянето на кобалтови йони във водата. Предвид наблюдавания пренос на енергия на аномално дълги разстояния при Лангмюир-Блоджетови слоеве става ясно, че от решаващо значение е формирането на безизлъчвателни капани, което е точно това, което ние наблюдавахме.

При евентуални химични или биосензорни приложения този нов ефект може да се използва по следния начин. Нека предположим, че като активен чувствителен и селективен елемент на сензора е нанесен тънък слой от смес от ензимни молекули и DP-NBD-PE молекули, които са удобна „мека“ биосъвместима (DP-PE молекулите са едни от основните градивни молекули на биологичните мембрани) матрица. При селективна реакция на ензимните молекули с търсеното вещество от течната среда (при наличие на такова) се променят локалните свойства на средата (поляризираност, pH) и, това директно ще промени параметрите на флуоресценция на NBD хромофора, който, както упоменахме, е особено чувствителен към промяна на средата. Подобни сензори вече са направени в лабораторни условия за няколко вещества [4]. Ако отлагането обаче на този слой е извършено в зоната на съществуване на течната и твърдата фаза и селективната реакция доведе до промяна на конформацията на ензимните молекули или пък до свързване на допълнителни молекули, то това би могло да доведе до промяна на повърхностното налягане в слоя и съответна промяна в съотношението течна–твърда фаза. Тъй като в твърдата фаза флуоресценцията се самогаси над 95%, то това променено съотношение ще промени съществено общия интензитет на флуоресценцията от слоя, което лесно може да бъде измерено. И така да бъдат направени оптични биосензори със значително повишена чувствителност. Голямата селективност на тези сензори ще се осигурява от ензимната или друга селективно реагираща молекула. Слой само от DP-NBD-PE молекули, отложен, в твърда фаза, може да се използва за тестване на водите към някои тежки метали, например кадмий, поради упоменатия ефект на възстановяване на флуоресцентния сигнал.

Друг нов ефект, открит от нас при слоеве от DP-NBD-PE, получени по метода на Лангмуир и Блоджет е свързан с възможността при някои условия на отлагане на монослое да се получат и цилиндрични наноструктури в третото измерение. Този ефект е показан на фиг. 3 при измервания с атомно-силова микроскопия. Отлагането на фиг. 3 А е направено малко над точката на главен преход от течна в твърда фаза при компресиране на монослоя на интерфейса вода–въздух. Ясно се вижда твърдата фаза, която изглежда по-светла, поради по-голямата си височина. На напречното сечение от ляво на фигурата направено по дължината на черната линия, се вижда структура с височина от 5,83 nm и ширина около 50 nm. При предишни наши изследвания с малко-ъглова рентгенова дифракция, височината на слой от тези молекули, отложени в твърда фаза, беше измерена на 3,1 nm. Като вземем предвид взаимното проникване на опашките на молекулите, то това е участък с 2 слоя молекули един върху друг. Двумерното налягане от 7 mN/m, при което е отложен този слой, е далеч под термодинамично равновесното налягане от 19,6 mN/m. Такъв ефект на тримерни структури в еднокомпонентен монослой, отложен под равновесното налягане, се наблюдава за пръв път. Отлагания в течна фаза при налягания под главния преход показват равномерно гладък слой. При отлагания при по-високо налягане като на фиг. 3 (В) височината на цилиндрите нараства. Ако обаче така отложеният образец с по-високи цилиндри престои известно време, то цилиндрите намаляват до двуслойни структури, които остават стабилни поне в рамките на 50 дена, за които имаме измервания. Тези наблюдения ни убеждават, че двуслойните цилиндри не са артефакт, получен в процеса на отлагане върху твърдата подложка и/или поради кинетични ефекти, получени по време на компресията на филма, а са присъщи за тази молекула. От гледна точка на сензорните приложения тези цилиндри значително увеличават площта на взаимодействие на DP-NBD-PE молекулата с тестваната течност, като в същото време запазват тънкостта на филма. И така би се получила значително по-голяма чувствителност на евентуалния

сензор при запазване на голямо бързодействие поради липса на бавни дифузионни процеси в обема.



Фиг. 3. Атомно-силова микроскопия и напречни сечения на Лангмюир-Блоджетови монослоеви от DP-NBD-PE, нанесени при температура 20 °С и повърхностни налягания от: (А) 7 mN/m; (В) 33 mN/m.

4. Заключение

Представили сме наши изследвания на флуоресцентно маркирани фосфолипидни молекули, по-специално DP-NBD-PE като неразтворими монослоеви на интерфейса вода-въздух и като нано тънки слоеви върху твърди подложки, отложени по метода на Лангмюир и Блоджет. Открити са 3 нови ефекта, които могат да се използват за химични и биосензорни приложения, например за следене качеството на водата. Първият нов ефект е цялостното гасене на флуоресценцията на молекулата при преминаване от течна в твърда фаза. Вторият ефект е възстановяването на флуоресценцията на филм при взаимодействието му с тежки двувалентни метални йони. Третият ефект описва появата на двуслойни стабилни във времето структури при някои условия на отлагане, което води до много по-голяма площ на взаимодействие. Използването на тези ефекти при химични и биологични сензори ще доведе до тяхната значително по-голяма чувствителност, селективност и бързодействие. Описан е също така и метод за експресен полеви анализ на качеството на водата, като се измерва изотермата с използване на система за Лангмюирови филми.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pogorzelski, S. J. and Kogut, A. D.* Structural and thermodynamic signatures of marine microlayer surfactant films, *J. Sea Research*, Vol. 49 pp. 347–356, 2003.
2. *Ivanov, G. R., Georgiev, G. and Lalchev, Z.* Book chapter: "Fluorescently Labeled Phospholipids – New Class of Materials for Chemical Sensors for Environmental Monitoring in "Relevant Perspectives in Global Environmental Change", Julius Ibukun Agboola (Ed.), 2011.
3. *Ivanov, G. R.* First observation of fluorescence self-quenching in Langmuir films, *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 193, p. 323, 1992.
4. *Shrive, J. D. A., J. A. Brennan, R. S. Brown and U. J. Krull.* *Appl. Spectroscopy*, Vol. 49, p. 304, 1995.

NEW EFFECTS IN NANO THIN LAYERS FROM FLUORESCENTLY LABELLED PHOSPHOLIPIDS FOR BIOSENSOR APPLICATIONS

G. Ivanov¹

Keywords: Langmuir-Blodgett films, thin films, phospholipids, biosensors

Research area: nanotechnology, new materials, physics

ABSTRACT

For certain practical applications such as measurement of the secondary water contaminants biosensors with higher sensitivity and selectivity are necessary. In our systematic studies of fluorescently labeled phospholipids at the air-water interface or deposited as nano-thin layers on solid substrates by the Langmuir and Blodgett method several new effects were discovered. One effect is fluorescence selfquenching when going from liquid to solid phase in the lipid layer. The other effect is the origin of three-dimensional cylindrical nano-sized structures over the phospholipid layers that give much more developed surface for increased sensitivity. Possible applications of these effects for chemical and biosensors are discussed.

¹ George R. Ivanov, Assoc. Prof. Dr., Dpt. „Physics“, UACEG, 1 H. Smirnski Blvd., Sofia 1046,
e-mail: george@at-equipment.com

