

# Zastosowanie nanostrukturalnych modyfikacji na powierzchni polimeru z użyciem molekularnego drukowania dla uzyskania selektywności w adsorpcji białka

Ewa NAWROCKA, Barbara WANDELT - Politechnika Łódzka, Wydział Chemii, Katedra Fizyki Molekularnej; Łódź

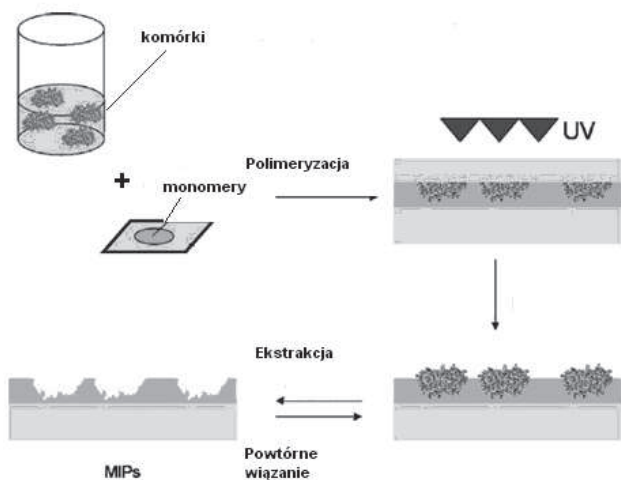
Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 2, 98-104

## Wprowadzenie

W wyniku potrzeby kontroli oraz szybkiego i efektywnego reagowania na poziom skażenia, w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym rozwinęło się wiele nowych metod analitycznych. Potrzeby ciągłego monitoringu różnych procesów przemysłowych w sposób precyzyjny, sprawny a przy tym tani, spowodowały duży rozwój nowych technologii opartych na molekularnym drukowaniu polimerów (*Molecular Imprinting of Polymers* – MIP's). Literatura naukowa wskazuje, że w ostatnim dziesięcioleciu, szczególnie rozwinęła się technologia molekularnego drukowania polimerów w masie i w cienkich warstwach [1 ÷ 3]. Powstały, z użyciem tej techniki materiały sensorowe dla ogromnej ilości związków chemicznych i leków, które są zdolne do selektywnej adsorpcji tych molekuł. Takie materiały sensorowe były w ostatnim 15-leciu przedmiotem badań prowadzonych w Katedrze Fizyki Molekularnej Politechniki Łódzkiej i prezentowane wcześniej w niniejszym czasopiśmie [3A, 3B]. Rozwijająca się diagnostyka medyczna spowodowała również wzrost zainteresowania molekularnym drukowaniem związków biologicznie ważnych: białek i mikroorganizmów. Ze względu na charakter aplikacyjny materiałów biosensorowych, ważne jest, aby specyficznie wiążące miejsca były łatwo dostępne dla większych obiektów biologicznych. Takie właściwości materiałów tworzy powierzchniowe molekularne drukowanie polimerów (*Surface Molecular Imprinting of Polymers* – SMIP's). Materiały sensorowe typu SMIP's w połączeniu z mikroskopią fluorescencyjną pozwalają na śledzenie molekuł, określenie ich stężenia, rozkładu, ale także na obserwację przebiegu procesów, w których molekuły te uczestniczą. Mikroskopia fluorescencyjna pozwala na obserwację przebiegu procesów w biologicznym materiale w sposób bezinwazyjny [4]. Badania takie mogą być wykonywane z czułością, na jaką pozwalają obecnie techniki spektroskopii fluorescencyjnej i z rozdzielczością, jaką zapewnią dobry mikroskop.

Technologię molekularnego drukowania na powierzchni polimeru symbolicznie przedstawia schemat (rys. 1). Technologia ta była już wcześniej prezentowana na łamach tego miesięcznika [3]. Wzorcem (rys. 1) może być atom, jon, molekula, kompleks, ale także wielkocząsteczkowy układ jak białko lub mikroorganizm. Po usunięciu wzorca poprzez ekstrakcję, z otrzymanego usiecianego polimeru pozostaje w rezultacie puste miejsce, które jest gotowe do zaadsorbowania właśnie cząsteczki wzorca. Preferencje w adsorpcji cząsteczki wzorca w stosunku do innych cząsteczek w środowisku polimeru wynika z preferencji pod względem rozmiaru i kształtu, ale także, albo przede wszystkim, wynika z rozkładu grup funkcyjnych w modyfikowanym polimerze. Technologia molekularnego drukowania zapoczątkowana przez Wulffa [5] znalazła zastosowanie między innymi w przemyśle farmaceutycznym do oczyszczania leków [1, 6, 7]. Gdy cząsteczka farmaceutyku występuje w dwu formach enancjomerycznych, może się zdarzyć, że jedna z tych form daje efekt pozytywny (leczy), a druga jest wręcz szkodliwa dla organizmu, jak miało to miejsce w przypadku talidomidu. Obecnie enancjomery leków są łatwo rozdzielane z użyciem MIP-ów [6]. Zdolność MIP-ów do wysokiej selektywności w wykrywaniu określonych cząsteczek lub cząstek czyni je bardzo atrakcyjnymi w wielu dziedzinach życia a technologię modyfikowanej polimeryzacji coraz bardziej popularną. MIP-y mogą być też przydatne w walce z epidemiami i terroryzmem, bowiem mogą być wykorzystane w czujnikach wykrywających chorobotwórcze drobnoustroje i toksyny obecne w organizmie lub w środowisku. Polimery molekularnie drukowane mogą przyspieszać opracowywanie nowych leków przy stosunkowo niskich kosztach; mogą one pomóc w oczyszczaniu i rozdzielaniu preparatów farmaceutycznych za pomocą chromatografii, gdzie fazę stałą stanowią polimery w postaci granulatu z molekularnie wdrukowanymi śladami molekuł leku lub półproduktu [1, 6 ÷ 8]. Inną bardzo ważną dziedziną zastosowania molekularnie drukowanych polimerów, która rozwija się wraz z rozwojem poziomu wiedzy biochemicznej, jest powstawanie nowych testów diagnostycznych opartych na określeniu stężenia odpowiedniego preparatu lub cząstki. Najczęściej są one tanie i znacznie przyspieszają wynik testu.

Molekularne drukowanie większych obiektów biologicznych, jak mikroorganizmy i białka, opiera się, ze względów głównie praktycznych, na tworzeniu śladów na powierzchni polimeru [9]. Technologię tę pokazywaliśmy w poprzedniej publikacji [3]. Ten sposób nanostrukturalnej modyfikacji powierzchni polimeru znacząco zmienia właściwości powierzchni polimeru w porównaniu do niemodyfikowanej powierzchni. Nadaje jej właściwości zwiększonej adhezji w stosunku do molekuł i mikroorganizmów, które wcześniej były użyte w procesie molekularnego drukowania [10]. Oddziaływania w interfejsie biologiczno-polimerowym podczas procesu drukowania powodują, że powierzchnia polimeru ma zwiększoną ilość tzw. specyficznych miejsc wiążących. Preparatyka polimeru z użyciem technologii mole-



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie procesu molekularnego drukowania

Składniki mieszaniny polimeryzującej dla otrzymywania MIP-ów

Nazwa	Wzór strukturalny
<b>Monomery</b>	
metakrylan 2-hydroksy etylu (HEMA)	
trójmetakrylan trójmetylopropanu (TRIM)	
<b>Inicjator</b>	
eter etylowy benzoiny (BEE)	
<b>Wzorzec i analit</b>	
α - laktoalbumina	14 176 Da
owoalbumina	44 000 Da

kularnego drukowania na powierzchni polega na wprowadzeniu znanej techniki stempla, jak to przedstawiono [3] dla wdrukowywania śladów mikroorganizmów.

Technikę stempla zastosowano również w procesie molekularnego drukowania białek. W niniejszej pracy skupiono się na badaniach molekularnego powierzchniowego drukowania białek z grupy albumin. Zastosowano dwa pokrewne białka: α – laktoalbuminę i owoalbuminę.

Albuminy są białkami o małej masie cząsteczkowej. Dobrze rozpuszczają się w wodzie i roztworach soli w zakresie pH od 4 do 8,5. Do tej grupy zalicza się: albuminy surowicy, α-laktoalbuminy, owoalbuminę jaja kurzego oraz albuminy roślinne. Albuminy są głównym składnikiem białek plazmy, występującym w ilości ok. 60%. α-laktoalbumina występuje w mleku ssaków, masa cząsteczkowa 14 178 Da. Pierwszorzędowa struktura tego białka jest zgodna ze strukturami α-laktoalbuminy u innych gatunków ssaków, np. mleka krowiego. Owoalbumina, masa cząsteczkowa 44 000 Da, zawiera 3,2% węglowodanów oraz resztę kwasu fosforowego, która przyłączona jest do łańcucha bocznego seryny. Znaczne różnice masy cząsteczkowej, a także rozmiaru α – laktoalbuminy i owoalbuminy, ale jednocześnie podobieństwo struktury pierwszorzędowej, zdecydowały o wyborze tych białek jako materiału biologicznego do badań nad molekularnym drukowaniem powierzchni polimerów i selektywności adsorpcji.

Adsorpcję białka na powierzchni polimeru: modyfikowanej i niemodyfikowanej śledzono z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon Eclipse 2000U z kamerą fluorescencyjną, komputerem oraz monitorem wraz z odpowiednim programem przetwarzania obrazu.

Znakowanie białka fluoroforem z zastosowaniem jednocześnie technologii molekularnego drukowania polimerów (MIPs) stwarza możliwość otrzymania chemicznego sensora, który posiada dwie ważne cechy: i) bezinwazyjność pomiaru oraz ii) najważniejszą cechą MIPów – selektywność adsorpcji. Białka znakowano z użyciem fluoroforu styrylopirydynowego (dimetylstyrylopiridiny) zalecanego przez katalog „Molecular Probes” do znakowania białka [4]. Fluorofor ten i jego właściwości fotofizyczne były także przedmiotem naszych badań [11].

Adsorbowana molekula białka oddziałuje z funkcjonalizowaną wnęką-obszarem na powierzchni polimeru, utworzoną przez działanie stempla podczas preparatyki SMIPów. Silne oddziaływania białka z polimerem i zwiększona adhezja powodują selektywną adsorpcję na powierzchni sensora polimerowego.

Pod wpływem wzbudzenia światłem o odpowiedniej długości fali, charakterystycznej dla stosowanego znacznika białka, polimerowy sensor, umieszczony na stoliku mikroskopu fluorescencyjnego, jest źródłem emisji fluorescencji, której intensywność zależy od stężenia zaadsorbowanych na powierzchni polimeru cząstek białka. Sygnał ten był rejestrowany i analizowany. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badania procesów adsorpcji białka α – laktoalbuminy oraz owoalbuminy na powierzchni polimeru modyfikowanej przez zastosowanie molekularnego drukowania z użyciem owoalbuminy. Pokażemy badania nad selektywną adsorpcją białka na powierzchni sensora polimerowego, posiadającego miejsca wiążące dzięki istnieniu specyficznych oddziaływań między białkiem a powierzchnią polimeru. Takie specyficzne miejsca wiążące, które wytworzono w procesie molekularnego drukowania, są efektywne w oddziaływaniach z białkiem będącym wzorcem.

### Przygotowanie mieszanin polimeryzujących oraz filmów polimerowych

Matryce polimerowe stanowiące podstawę do dalszych badań analitycznych wykonane były na bazie monomerów TRIM i HEMA, rozpuszczalnikiem był THF. Jako inicjator polimeryzacji zastosowano eter etylowy benzoiny. Struktura chemiczna substratów w procesie jest przedstawiona w tablicy I.

W celu otrzymania filmu, opisaną powyżej mieszaninę w ilości ok. 60 μm nanoszono na szklane płytki, starając się, by uzyskać gładką powierzchnię. Tak wykonaną warstwę poddano fotopolimeryzacji. Kopolimeryzację inicjowano światłem UV o szerokim spektrum z maksimum intensywności lampy przy 350 nm. Proces odbywał się w warunkach beztlenowych (środowisko argonu) przez 20 s.

### Przygotowanie stempli białka

Matryce drukowane były dwoma białkami pochodzenia odzwierzęcego. W celu wykonania stempli sporządzono wodne zawiesiny białek owoalbuminy i α- laktoalbuminy o stężeniach wagowych 0,03%. Stemple wykonano z roztworów o tak niskim stężeniu w celu uzyskania jednorodnych i jednowarstwowych powierzchni. Powierzchnie matryc polimerowych nadrukowane owoalbuminą, zwłaszcza w zakresie wyższych stężeń, wykazywały niejednorodność w swojej strukturze oraz tendencje do agregacji. Proces przygotowywania stempli białek zachodził w temperaturze pokojowej. Na szkiełko laboratoryjne wylewano ok. 200 μl zawiesiny, pozostawiając w temperaturze pokojowej na 24 h do całkowitego wyschnięcia.

### Preparatyka polimerowych matryc drukowanych powierzchniowo białkami

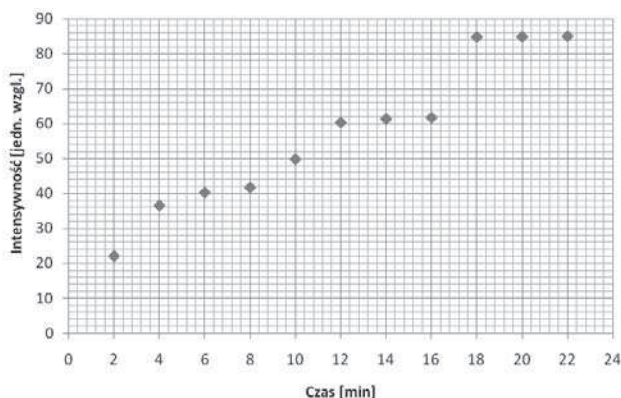
Na przygotowane według opisu w poprzednim rozdziale częściowo spolimeryzowane filmy nałożono gotowe stemple. Całość pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej, w środowisku gazu obojętnego-argonu. Po upływie 24 h białka wymywano wodą. Powierzchnia polimeru oglądana w mikroskopie optycznym wykazywała pewne, słabo widoczne zmiany struktury powierzchni. Próbkę polimeru kontrolnego, niedrukowanego wykonano analogicznie, dla takiego samego składu mieszaniny polimeryzującej, ale bez nakładania stempla. Otrzymywano gładkie filmy polimerowe, które następnie poddawano tym samym procesom ekstrakcji oraz inkubacji.

### Badania adsorpcji białka na powierzchni polimerowych matryc modyfikowanych przez molekularne drukowanie

W celu określenia wpływu modyfikacji powierzchni polimeru z zastosowaniem molekularnego drukowania na efektywność adsorpcji

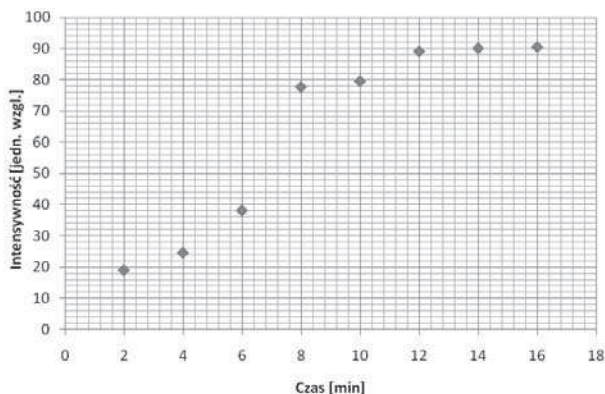
białka na tej powierzchni wykonano szereg eksperymentów ekstrakcji i adsorpcji na filmach polimeru o powierzchni modyfikowanej jak opisano wcześniej. Zastosowano dwa białka z grupy albumin:  $\alpha$  – laktoalbuminę i owoalbuminę, dobrze rozpuszczalne w wodzie, różniące się rozmiarem:  $\alpha$  – laktoalbuminę o masie cząsteczkowej 14 178 Da, owoalbuminę o masie cząsteczkowej 44 000 Da. Przygotowano wodne roztwory białek o stężeniu procentowym 0,03% oraz wodny roztwór fluorosensora vbDMASP o stężeniu  $10^{-3}$ M. Przygotowane roztwory zmieszano ze sobą w stosunku 1:1. Tak przygotowany roztwór do inkubacji naniesiono na filmy, które następnie inkubowano 0,5 h.

Badania wydajności adsorpcji białka na powierzchni filmu polimerowego przeprowadzono zarówno dla powierzchni modyfikowanej jak i niemodyfikowanej. W tym celu badane matryce inkubowano w opisanym wcześniej roztworze z odpowiednim białkiem, którym drukowana była matryca. Płytkę z filmem polimerowym umieszczano następnie na stoliku mikroskopowym dla wykonania pomiaru intensywności fluorescencji. Mikroskop pracował w układzie o ustalonych parametrach. Pomiar intensywności fluorescencji wykonywano co dwie minuty, za każdym razem lekko spłukując matrycę z nadmiaru roztworu. Na rysunku 2 przedstawiono zależność intensywności emisji fluorescencji zbieranej z powierzchni filmu  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  drukowanego białkiem  $\alpha$  – laktoalbuminą, przy ustalonych ustawieniach mikroskopu.



Rys. 2. Readsorpcja  $\alpha$ - laktoalbuminy na powierzchni polimeru modyfikowanej z użyciem  $\alpha$ - laktoalbuminy

Wykres przedstawia zależność od czasu inkubacji w obecności tego samego białka, tj.  $\alpha$  – laktoalbuminy.

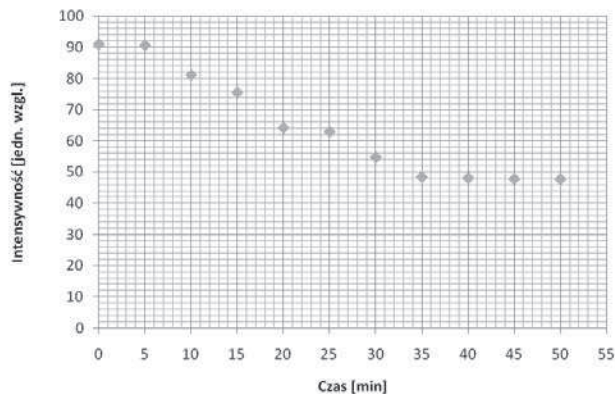


Rys. 3. Readsorpcja owoalbuminy na powierzchni polimeru modyfikowanej z użyciem owoalbuminy

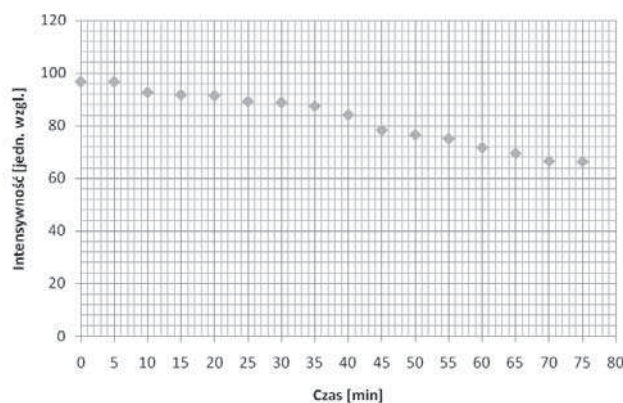
Podobną zależność przedstawiano na rysunku 3 dla filmu polimerowego modyfikowanego przez molekularne drukowanie z użyciem owoalbuminy.

Porównanie tych dwu zależności wskazuje, że readsorpcja  $\alpha$  – laktoalbuminy z wodnego roztworu następuje po 20 min. natomiast owoalbuminy po 15 min. jest to maksymalna ilość białka adsorbowanego z danego środowiska. Badając proces ekstrakcji, film polimerowy po readsorpcji inkubowano w wodzie destylowanej. Na rysunkach 4 i 5 przedstawiono krzywe ekstrakcji białka w funkcji czasu. Analiza tych

krzywych wskazuje na zależność zarówno ekstrakcji jak i readsorpcji od rodzaju białka. Ekstrakcja owoalbuminy, białka o dwukrotnie większej masie cząsteczkowej, trwa dłużej aniżeli  $\alpha$  – laktoalbuminy. Poza obserwowaną zależnością od masy cząsteczkowej białka, należy się spodziewać wpływu innych czynników uzależnionych od oddziaływań białko-polimer.



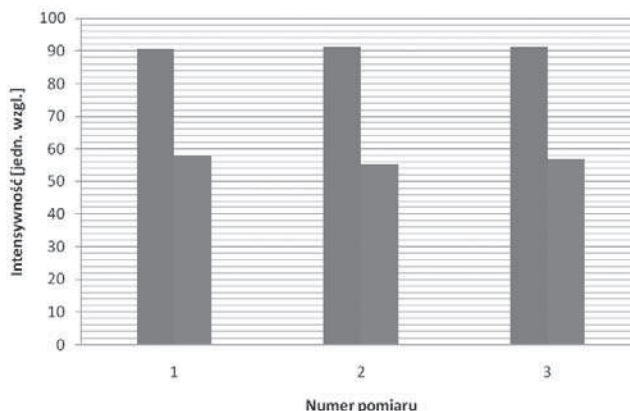
Rys. 4. Ekstrakcja filmu modyfikowanego z użyciem  $\alpha$ - laktoalbuminy



Rys. 5. Ekstrakcja polimeru modyfikowanego z użyciem owoalbuminy

### Selektywność adsorpcji białka i specyfika miejsc wiążących

Rysunek 6 przedstawia słupkowy wykres intensywności emisji fluorescencji otrzymanej z powierzchni polimeru modyfikowanej przez molekularne drukowanie owoalbuminą poddanej inkubacji: kolejno w obecności owoalbuminy i  $\alpha$ -laktoalbuminy. Mimo że  $\alpha$ -laktoalbumina jest znacznie mniejszym białkiem, jego adsorpcja na powierzchni polimeru modyfikowanego owoalbuminą jest znacznie słabsza. Intensywność fluorescencji, która jest miarą stężenia zaadsorbowanego białka, jest większa o 35% dla owoalbuminy aniżeli dla  $\alpha$ -laktoalbuminy. Trzeba wziąć pod uwagę, że struktura pierwszorzędowa obu białek jest podobna.



Rys. 6. Histogram intensywności fluorescencji z powierzchni polimeru modyfikowanej owoalbuminą po inkubacji w obecności: A) owoalbuminy, B)  $\alpha$ -laktoalbuminy



Eksperyment ten powtarzano trzykrotnie, wykonując po każdym procedurę ekstrakcji. Z danych intensywności przedstawionych za pomocą histogramu wynika powtarzalność wyników eksperymentu oraz trwałość materiału, co stanowi wielką zaletę otrzymanego sensora polimerowego.

### Podsumowanie

Molekularnie drukowane polimery (*molecularly imprinted polymers* – MIPs) charakteryzują się specyfiką oddziaływań z białkiem, które wcześniej służyło jako wzorzec w procesie modyfikacji powierzchni i związaną z tymi oddziaływaniami selektywnością adsorpcji tego białka. Wyniki badań są powtarzalne, a materiał otrzymanego sensora polimerowego trwały. MIPy są tanie w produkcji, ponieważ monomery funkcyjne wykorzystywane do otrzymywania tworzyw sztucznych nie są drogie, a sam proces wytwarzania MIP-ów jest stosunkowo prosty i trwa krótko. Molekularnie drukowane, usieciowane polimery są stabilne przez długi czas. Wytworzony przez nas polimer użyliśmy trzykrotnie, ale wykonane eksperymenty wskazują, że takie matryce polimerowe mogą być używane wielokrotnie. Przedstawione tutaj badania wykonano dla białek z grupy albumin różniących się znacznie rozmiarem. Próba adsorpcji  $\alpha$ -laktoalbuminy na powierzchni matrycy polimerowej molekularnie drukowanej owoalbuminą, która jest znacznie większym białkiem także z grupy albumin, wykazała dużo mniejszą efektywność adsorpcji. Świadczy to o specyfice miejsc wiążących na powierzchni polimeru. Niemodyfikowane filmy poddane inkubacji w obecności białka wykazują bardzo niską intensywność fluorescencji, a zatem niską adsorpcję w stosunku do obu białek.

### Literatura

1. Allender C.J., Richardson C., Woodhouse B., Heard C.M., Brain K.R.: *International Journal of Pharmaceutics* 2000, **195**, 39-43.
2. Nicholls I.A., Rosengren J.P.: *Bioseparation* 2002, **10**, 301-305.

3. A) Wandelt B., Cywiński P., Sadowska M., Hachulka K.: *CHEMIK* 2007, **2**, 115-119, 3 B) Wandelt B., Sadowska M., Hachulka K.: *CHEMIK* 2008, **2**, 65-69.
4. Haugland R.P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Molecular Probes* 2002.
5. Wulff G., Knorr K.: *Bioseparation* 2002, **10**, 257 – 276.
6. Glad M., Reinholdsson P., Mosbach K.: *Reactive polymers* 1995, **25**, 47-54.
7. Sellergren B., Allender Ch.J.: *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005, **57**, 1733-1741.
8. Ye L., Haupt K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, **378**, 1887.
9. Dickert F.L., Hayden O., Lieberzeit P. *Synthetic Metals* 2003, **138**, 65.
10. Hachulka K., Lekka M., Okrajni J., Ambroziak W., Wandelt B.: *Biosensors and Bioelectronics* 2010, **26**, 50-54.
11. Wandelt B., Cywiński P., Darling G.D., Stranix B.R.: *Biosensors & Bioelectronics* 2005, **20**, 1728-1736.

Ewa NAWROCKA jest studentką trzeciego roku kierunku Nanotechnologia Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Jest uczestnikiem koła naukowego Nanotechnologów przy Politechnice Łódzkiej.

Prof. dr hab. Barbara WANDELT pracuje na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Jej obszarem badań naukowych są optyczne sensory molekularne i polimerowe, jest specjalistą w zakresie fotofizyki polimerów oraz molekularnego drukowania polimerów. Prof. Barbara Wandelt jest autorem ponad 70. prac naukowych publikowanych w renomowanych czasopismach, odbyła wielokrotnie staże naukowe w Wielkiej Brytanii i Kanadzie.

## Z półki księgarskiej

Book review



Andrzej Cygański  
**Chemiczne metody analizy ilościowej**

ISBN 978-83-204-3686-0  
s. 592, A5  
Wydawnictwa Naukowo – Techniczne  
cena: 79 PLN

Duże zainteresowanie podręcznikiem spowodowało zaktualizowanie wydania przeznaczonego przede wszystkim dla studentów wyższych uczelni. Celem nowszego, siódmego już wydania, jest rozszerzenie niektórych zagadnień związanych z podstawami współczesnych metodach analizy ilościowej. Szczególnemu rozszerzeniu uległy wiadomości o metodzie analitycznej rozpatrywanej pod względem ogólnym (podział, charakterystyka, zastosowanie), jak również szczegółowym (wybór metody, sprawdzenie, certyfikacja, walidacja, niepewność laboratoryjny).

W książce omówiono zagadnienia ogólnoanalityczne dotyczące metod chemicznych i instrumentalnych, teorię i praktykę analizy wagowej i miareczkowej oraz metody zągęszczania i rozdzielania, w tym

ekstrakcję i wymianę jonową. W każdym rozdziale zamieszczono podstawy teoretyczne metody, opisy wykonania najczęściej stosowanych ćwiczeń laboratoryjnych, ćwiczenia rachunkowe przeznaczone do samodzielnego rozwiązywania oraz pytania kontrolne. W siódmym wydaniu podręcznika opracowano również dwa nowe rozdziały. Jeden zawiera charakterystykę rodzaju równowag w chemii analitycznej, a w drugim omówione jest zastosowanie w analizie chemicznej hydrolyzy nieodwracalnej, która w przeciwieństwie do hydrolyzy odwracalnej nie może być wyjaśniona w oparciu o teorię Brönsteda. Wyniki ćwiczeń rachunkowych podano na końcu książki.

W nowym wydaniu rozszerzono rozdziały omawiające analizę procesową, rodzaje próbek pobieranych do analizy chemicznej, ekstrakcyjne metody rozdzielania substancji, a także dodano rozdział, w którym przedstawiono kierunki rozwojowe współczesnej chemii analitycznej ze wskazaniem na metody analizy śladowej, specjacje i analizę specjacyjną oraz analizę środowiska. Podręcznik jest przeznaczony dla studentów wydziałów chemii, farmacji i medycyny. Mogą z niego także korzystać uczniowie szkół technicznych o profilu chemicznym. (db)

Prof. dr hab. inż. Andrzej Cygański jest wybitnym specjalistą w dziedzinie chemii analitycznej, od 1952 r. związanym z Wydziałem Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Jest autorem lub współautorem ok. 120 prac badawczych i in. Tematyka jego badań to: analiza termiczna i termiczne metody analityczne, spektrofotometria absorpcyjna cząsteczkowa, analiza śladowa. (db)