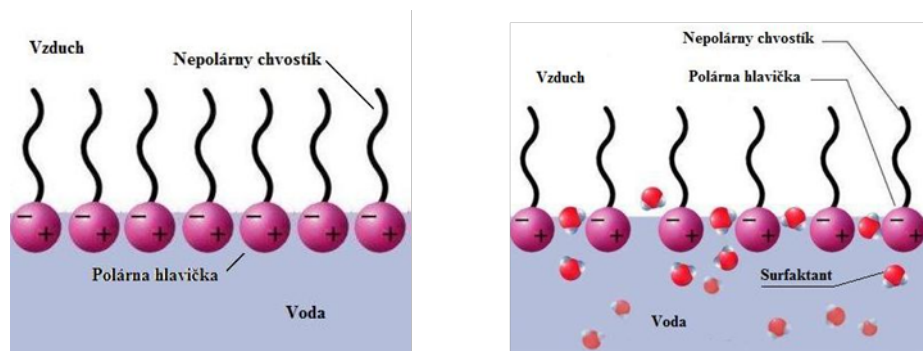


Meranie vlastností lipidových monovrstiev na hladine vody

Teoretická časť

Molekuly povrchovo aktívnych látok, ktoré sa nachádzajú na fázovom rozhraní, môžu za určitých podmienok vytvoriť nasýtenú adsorbovanú vrstvu. Už roku 1773 si Benjamin Franklin všimol, že sa vlny na hladine rybníka upokojujú po vyliatí čajovej lyžičky oleja. Vtedy si Franklin ešte neuvedomil, že olej (kyselina olejová) vytvorila na vodnej hladine monomolekulovú vrstvu. Až o storočie neskôr lord Rayleigh vypočítal, že kyselina olejová vytvorila vrstvu s hrúbkou 1,6 nm. Ak poznal objem kvapnutého oleja a veľkosť pokrytej plochy, vedel z objemu určiť hrúbku monovrstvy.



Obr. 1.1: Vytvorená monovrstva z lipidu bez prítomnosti a v prítomnosti surfaktantu [2].

Pre tento typ experimentov je dôležitý výber vhodných molekúl. V závislosti od štruktúry a elektrických vlastností rozdeľujeme molekuly na dve skupiny: polárne a nepolárne. Polárne molekuly majú vysokú relatívnu permitivitu (ϵ_r) a dobre sa rozpúšťajú v polárnych rozpúšťadlách (vo vode). Naproti tomu, nepolárne molekuly sú vo vode takmer nerozpustné [1]. Molekuly látok vytvárajúce typické monovrstvy na povrchu rozhrania voda-vzduch majú tzv. *amfifilný* charakter. Pre amfifilné molekuly, napr. lipidy, je typické, že sa dajú rozlíšiť polárne (hydrofilné) aj nepolárne (hydrofóbne) časti molekuly. Na fázovom rozhraní voda-vzduch sa molekuly orientujú tak, ako je znázornené na obrázku obr. 1.1. Hydrofilné časti molekuly (karboxylové, hydroxylové, aminové skupiny) sú v kontakte s vodou a dlhé uhľovodíkové reťazce sú obrátené kolmo na rozhranie do vzduchu. Každý lipid sa skladá z polárnej hlavičky a nepolárneho konca. Takéto usporiadanie umožňuje molekulám vo vodnom prostredí vytvorenie aj tzv. lipidovej dvojvrstvy, ktorá je základnou stavebnou jednotkou biologických membrán.

Systematickým výskumom monovrstiev sa medzi prvými zaoberali Irvin Langmuir a Katherine Blodgettová, ktorý zistili, že plocha, ktorú zaberajú amfifilné molekuly, nezávisí od dĺžky hydrofóbneho reťazca molekuly, keďže tieto sa orientujú vertikálne k rovine hladiny vody. Taktiež vyvinuli metódu na depozíciu monovrstiev molekúl na pevný substrát. Zariadenie na meranie vlastností organických monovrstiev a ich depozíciu (vanička

Langmuira-Blodgettovej) umožňuje z nameraných závislostí povrchového tlaku na ploche na jednu molekulu materiálu (izoterma pre dvojrozmerný systém) určiť, ako sa správajú rozličné molekuly v membránach a modelovať tak biologické vrstvy.

Hydrofóbná vrstva je relatívne homogénna oblasť uhľovodíkových reťazcov, ktoré vzájomne interagujú prostredníctvom van der Waalsových síl. V polárnej oblasti sú interakcie rôznorodejšie, nakoľko sa tu vyskytujú aj dipólové a elektrostatické sily, pevne viazaná voda a vodíkové väzby [1]. Pokiaľ molekuly tvoria kompaktnú monovrstvu, hydrofóbne reťazce sú orientované spravidla v smere normály k rozhraniu voda-vzduch.

Skúmanie štruktúry a vlastností monomolekulárnych vrstiev je dôležité, nakoľko pomáha lepšie pochopiť procesy na biologických membránach spojené s ich mechanickými a transportnými vlastnosťami. Ide o prenos excitácií nervom, vplyv farmakoterapie na činnosť bunkových orgánov, narkózu a pod. Rovnako využívame štúdium monomolekulárnych vrstiev v základnom výskume na simulovanie interakcií chemických látok s membránami buniek.

Experimentálna časť

Úlohy

1. Pomocou LB vaničky odmerajte izotermu monovrstvy lipidu DPPC a opíšte jednotlivé fázy vznikajúcej monovrstvy.
2. Zo získaných parametrov určte plochu monovrstvy pripadajúcu na jednu molekulu v tuhej fáze.

Prístroje a pomôcky

LB vanička, rukavice, Wilhelmov pásik, počítač, kadičky, odsávačka, striekačka s pevnou ihlou (typu Hamilton).

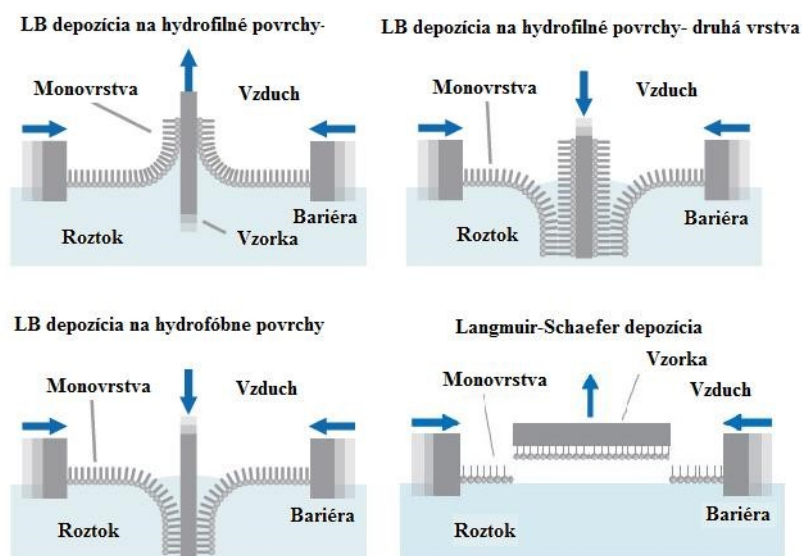
Chemikálie

Destilovaná voda, lipid – dipalmitoyl fosfatidylcholín DPPC, chloroform.

Opis zariadenia a metóda merania

LB vanička je užitočná pri vytváraní tzv. SAM (self-assambled monolayer) samousporiadaných povrchov na rozhraní subfáza (v našom prípade voda) – vzduch. Takto vytvorené vrstvy následne môžu byť prenesené (deponované) na povrchy v dvoch konfiguráciách: otočené polárnou alebo nepolárnou časťou nahor a v jednej alebo viacerých vrstvách (obr. 1.2).

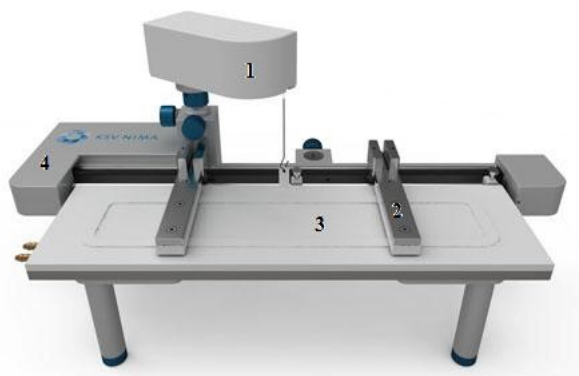
Základné meracie zariadenie sa skladá z vaničky s jednou alebo dvoma bariérami, Wilhelmovho pásika a nosného rámu (obr. 1.3). Vanička je vyrobená z vodou nezmáčavého materiálu – teflónu. Do vaničky sa po vyčistení naplní destilovanou vodou do výšky tak, aby vytvorila meniskus nad jej okrajom. Následne sa niekoľkokrát stlačia bariéry, aby prípadné nečistoty zostali v strede (na kraji) a mohli byť pomocou odsávačky odstránené.



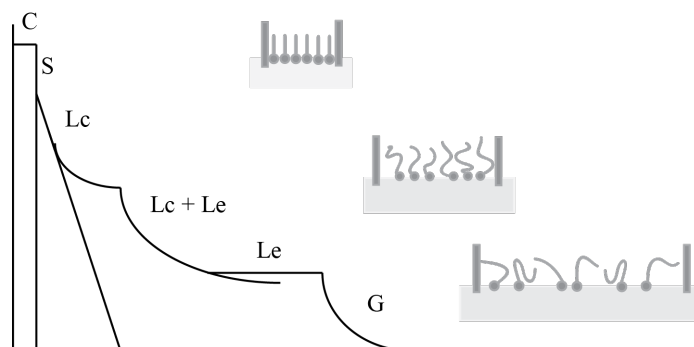
Obr. 1.2: Možnosti depozície monovrstiev na tuhé substráty [3].

Wilhelmov pásik je pásik filtračného papiera zavesený na citlivom mechanizme, umožňujúci merať povrchový tlak, ktorý vzniká na rozhraní. Tlak sa mení v závislosti od vzájomnej vzdialenosti a teda silových interakcií molekúl materiálu na rozhraní. Ešte pred začatím merania je potrebné pásik namočiť do vody, aby bol rovnomerne nasiaknutý vodou.

Meranie je založené na rovnomernom stláčaní amfifilnej vrstvy bariérou tak, aby sa vrstva nepoškodila. Pritom sledujeme izotermu, t. j. závislosť povrchového tlaku od plochy pripadajúcej na jednu molekulu materiálu. Ide o dvojrozmernú analógiu izotermy plynu, kedy sa zaujímate o závislosť tlaku od objemu. Priebeh tejto krivky opisuje jednotlivé fázové stavy a môžeme z nej určiť termodynamické a mechanické vlastnosti vrstvy.



Obr. 1.3: LB vaňa: 1 – senzor povrchového tlaku (Wilhelmova platnička/pásik), 2 – pohyblivé bariéry, 3 – vanička, 4 – rám [3].



Obr. 1.4: Priebeh izotermy, G – gas, Le – liquid expanded, Lc – liquid condensed, S – solid, C – collapse [4].

Stláčané molekuly lipidov prechádzajú pri tvorení monovrstiev viacerými fázami (obr. 1.4): plynnou (G), tekuto-expandovanou (Le), tekuto-kondenzovanou (Lc), tuhou (S). Následne nastáva kolaps vrstvy (C). V závislosti od druhu molekuly a teploty majú izotermy rozličný priebeh a jednotlivé fázy sa vyskytujú pri rozličných povrchových tlakoch.

Použitý DPPC je jeden z druhov fosfolipidu, ktorý sa nachádza v biomembránach buniek živých organizmov. Na rozhraniach buniek tieto molekuly tvoria dvojvrstvu, ktorá oddeľuje vnútorné cytoplazmatické prostredie od okolia. Meraním vlastností takýchto vrstiev sa dá odhadnúť správanie biomembrán za prítomnosti rôznych surfaktantov, prípadne zmeny ich vlastností pri zmene okolitých podmienok.

Postup merania a vyhodnotenie

1. LB vaničku dokonale vyčistíme pomocou chloroformu a špeciálnych bezvláknových obrúskov. Každá nečistota môže viesť k problémom s vytvorením vrstvy.
Pozor! Chloroform je veľmi prchavá látka, vystavujme sa jej pôsobeniu len na čas nevyhnutný na vyčistenie povrchu.
2. Otvoríme bariéru a postupne nalievame vodu do vaničky tak, aby vytvorila meniskus nad úroveň okraja vaničky. Bariéru zatvoríme a z povrchu hladiny odstránime prítomné nečistoty pomocou odsávačky.
3. Bariéru necháme otvorenú a pomocou hamiltonky aplikujeme pripravený roztok DPPC v chloroforme ($c = 1 \text{ mmol/l}$) v malých kvapkách na hladinu v objeme asi $100 \mu\text{l}$. Malé kvapky lipidu jemne ukladáme na hladinu vody. Pokúšame sa zabrániť vniknutiu roztoku do subfázy.
4. Počkáme 10 min na úplné odparenie chloroformu.
5. Nastavíme rýchlosť stláčania bariéry na hodnotu $20 \text{ cm}^2/\text{min}$.
6. Sledujeme vytvorenú krivku fázových prechodov lipidu až po kolaps vrstvy, kedy meranie zastavíme.

7. Získanú krivku vyhodnotíme z hľadiska vznikajúcich fázových prechodov.
8. Zo získaných parametrov určíme plochu monovrstvy pripadajúcu na jednu molekulu v tuhej fáze a porovnáme s hodnotou pre DPPC uvádzanou v literatúre.

Literatúra

- [1] Cirák, J., Ottova, A.: Bioelektronika – Návody na cvičenia. Skriptá. 1984. SVŠT v Bratislave, s. 107.
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Surfactant.jpg> – upravené.
- [3] <http://www.nordtest.it/scheda2uk.asp?id=20111125165634&primo=Chemical&secondo=Interfacial%20and%20surface%20science&setto=Monolayer%20study%20and%20deposition> – upravené.
- [4] <http://www.lot-qd.de/fr/fr/home/surfacechemistry/> – upravené.