

AGAROVÁ PRACOVNÁ ELEKTRÓDA AKO PODKLAD PRE DVOJVRSTVOVÚ LIPIDOVÚ MEMBRÁNU: ÚČINKY JEDNOSMERNÉHO NAPÄTIA

GALINA LAPUTKOVÁ, MICHAL LEGIŇ
a JÁN SABO

Ústav lekárskej biofyziky, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika,
Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská
republika

galina.laputkova@upjs.sk

Došlo 3.11.08, prepracované 9.7.09, prijaté 29.10.09.

Kľúčové slová: dvojvrstvomá lipidová membrána na agarovom podklade, napätie, impedančná spektroskopia

Úvod

Počas minulých dekád bola venovaná značná pozornosť riešeniu problémov, ktoré súvisia s aplikáciou planárnych lipidových dvojvrstvomých membrán pri konštrukcii biosenzorov. Krehkosť klasických dvojvrstvomých lipidových membrán (BLM) však predstavovala hlavné obmedzenie, ktoré bránilo ich využitiu pri zisťovaní prítomnosti a koncentrácie biologických vzoriek či liečiv. Jedným zo spôsobov, ako prekonať tento zásadný nedostatok, bolo umiestnenie lipidového filmu na tuhú podložku, napríklad Au, Pt alebo hydrogél. Ide o vytváranie tzv. lipidových dvojvrstvomých membrán na tuhom podklade – s-BLM. Práve povrchy tvorené agarom/agarózou ponúkajú širokú paletu atraktívnych vlastností dôležitých z hľadiska ich možných aplikácií. Agaróza je polysacharid pripravený chemickou modifikáciou agaru. Polysacharidové reťazce vytvárajúce sieťovú štruktúru majú podobu dvojitej závitnice¹. Veľkosť pórov v hydrogéli závisí od koncentrácie agarózy, obyčajne sa pohybuje medzi 100 a 300 nm. Prvý krát bol ako gélová podložka na prípravu s-BLM použitý hrot soľného mostíka^{2,3}. Týmto spôsobom pripravené membrány majú elektrické vlastnosti podobné klasickým planárnym BLM a s-BLM umiestneným na kovových podkladoch. Okrem toho sa svojou stabilitou nelíšia od s-BLM vytváraných na ostatných druhoch tuhých podkladov. S cieľom rozšíriť hranice aplikácie s-BLM pri konštrukcii biosenzorov, bol navrhnutý spôsob vytvárania membrány horizontálne uloženej na vrstve agarózy umiestnenej na skle⁴. Vývoj lipidovej membrány až po vytvorenie dvojvrstvy bol v tomto prípade regulovaný pomocou hydraulického tlaku. Ďalšia z modifikácií spôsobu prípravy (cit.⁵) využíva umiestnenie membrány medzi dve vrstvy gélu tak, aby sa zvýšila jej ochrana pred poškodením. Pri dlhodobom sledovaní autori nezaznamenali poruchy celist-

vosti takto pripravenej lipidovej dvojvrstvy, v priebehu troch týždňov došlo dokonca k poklesu presakovania membrány na hodnoty porovnateľné s hodnotami uvádzanými pre klasické BLM. Podporná vrstva agarózy bola tiež úspešne použitá pri vytváraní dvojvrstvy na silikónovej fólii s otvorom s možnosťou pridania druhej vrstvy gélu pre stabilizáciu štruktúry membrány a obmedzeniu vyparovania⁶. Podklad z agaru/agarózy dovoľuje rovnako úspešne prekonať jednu z hlavných nevýhod systémov na pevných substrátoch – asymetriu dvoch vrstiev membrány vzhľadom na prostredie, s ktorým susedia. Voľba gélového substrátu môže zlepšiť spoľahlivosť s-BLM a zvýšiť jej stabilitu i s ohľadom na aplikované napätie. Ďalšie vlastnosti ako napríklad fluidita a samotesniaca schopnosť radí s-BLM na agare ku konvenčným BLM. V protiklade k s-BLM umiestnenej na kovovom podklade, s-BLM na agare neblokuje transport iónov. Otvára sa teda možnosť zostrojiť s-BLM senzor nielen výlučne na základe transportu elektrónov, ale aj iónového transportu⁷.

S-BLM môžu byť podrobené skúmaniu pomocou rôznych citlivých analytických metód vhodných pre štúdium povrchov, vrátane elektrochemickej impedančnej spektroskopie (EIS), za predpokladu, že podklad je elektricky vodivý. EIS používa excitačné napätie s nízkou amplitúdou, ktoré môže spôsobiť iba minimálne perturbácie systému. EIS ako nedeštruktívna a citlivá metóda poskytuje široké spektrum informácií o dominujúcich elektrických procesoch v študovanom systéme sa intenzívne využíva práve pri skúmaní rozhraní elektróda/elektrolyt. Vo veľkom počte prác bola potvrdená účinnosť EIS pri testovaní širokého spektra biomateriálov, predovšetkým pri štúdiu povrchov pokrytých lipidmi (napr. cit.^{8,9}) alebo povrchov s imobilizovanými biomolekulami rôzneho pôvodu (napr. cit.¹⁰). Výhodou EIS je možnosť použiť na interpretáciu získaných dát elektrický model pozostávajúci z kombinácie najmä rezistívnych a kapacitných prvkov, ktoré predstavujú skúmaný elektrochemický systém. Teoretická analýza EIS dát fitovaním – nájdením najlepšej aproximácie k experimentálnym krivkám – s pomocou modelu zastúpeného ekvivalentným elektrickým obvodom dovoľuje pochopiť chemické premeny a procesy spojené s elektródovým povrchom pokrytým biomateriálom.

Ako alternatíva k umiestneniu s-BLM na hrote soľného mostíka sa javí využitie hrotu pracovnej elektródy naplnenej agarom slúžiacom ako podklad pre membránu vytváranú tzv. tip-dip metódou. Pretože pracovná elektróda s hydrogélom bude použitá ako podložka pri štúdiu modelových lipidových membrán, je dôležité, aby bol systém stabilný v širokom intervale napätí, keďže vlastnosti podporného systému obsahujúceho gél môžu byť ovplyvnené i použitým dc napätím. Aplikované dc napätie môže hrať dôležitú úlohu aj pri formovaní sa s-BLM, čo sa v konečnom dôsledku môže odraziť na jej vlastnostiach a štruktúre. Zároveň môžu byť určité hodnoty použitého dc napätia užitočné pri inkorporácii a charakteristike niektorých zložiek membrány, napríklad proteínov. Vplyv dc napätia aplikovaného cez asymetrickú s-BLM umiestnenú na hrote 0,3 mm Ag drôtu pokrytého vrstvou teflónu

(cit.¹¹) sa prejavuje v zložitej závislosti Youngovho modulu pružnosti a kapacity membrány od napätia. Bolo preukázané, že zmeny kapacity membrány a jej mechanických parametrov závisia nielen od polarít, ale aj smeru a rýchlosti zmeny napätia. Podľa autorov pozorovaná závislosť elektrických a mechanických vlastností s-BLM od aplikovaného napätia môže byť vysvetlená zmenami povrchového potenciálu a redistribúciou rozpúšťadla. Cyklické meranie prúd/napätie boli použité i pri skúmaní integrity membrán (cit.¹²). Interval napätí bol počas experimentu obmedzený na 500 mV. Bolo stanovené, že stabilita membrán depozitovaných na Ag povrchu sa zlepšila a počet defektov sa znížil pri aplikácii negatívnych hodnôt dc napätia počas formovania sa dvojvrstvy. Podobne napätie rádovo ~ mV bolo aplikované naprieč membránou umiestnenou na Pt elektróde (cit.¹³). Pri nízkych hodnotách napätia boli zaznamenané lineárne voltampérové závislosti. Nad určitou kritickou hodnotou napätia sa stali nelineárnymi a vodivosť sa prejavila ako funkcia napätia.

Napätová závislosť si zasluhuje pozornosť aj z hľadiska možného elektroforačného vplyvu – javu, ktorý je zodpovedný za indukciu a následnú expanziu defektov v lipidovej bariére, či už ide o modelové alebo bunkové membrány^{14–16}. Dramatická zmena elektrického odporu môže značne uľahčiť transport veľkých makromolekúl¹⁷, pretože adsorbcia nabitých makromolekúl na povrchu lipidovej dvojvrstvy je obvyčajne nasledovaná elektroforačnou penetráciou cez povrch elektroforovaných membránových fragmentov. Výhody agarovej elektródy boli potvrdené tiež úspešnou inkorporáciou nemodifikovanej ssDNA do s-BLM depozitovanej na agarovom podklade¹⁸.

Cieľom tejto EIS štúdie sa preto stalo skúmanie vplyvu dc napätia na vlastnosti agarovej pracovnej elektródy s ohľadom na zabezpečenie optimálnych podmienok pre vytváranie stabilných s-BLM s jednoznačne definovanými vlastnosťami na jej hrote.

Experimentálna časť

Materiály

L- α -fosfatidylcholín z vaječného žĺtka (Sigma) bez úpravy, tak ako bol zakúpený, bol použitý na prípravu tzv. formovacieho roztoku. Formujúci roztok pozostával z etanolového roztoku lipidu a *n*-dodekánu v takom množstve, aby konečná koncentrácia lipidu bola 5% pri pomere etanolu k *n*-dodekánu 1:1 (v/v). Rovnako ako ostatné použité chemické látky *n*-dodekán (Sigma) bol čistoty p.a. Všetky elektrochemické experimenty boli uskutočnené v 0,1 mol l⁻¹ KCl. Na prípravu roztokov bola použitá deionizovaná voda (Millipore, Milli-Q-System, $R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, pH 5,5).

Použité prístroje a zariadenia

Na elektrochemickú analýzu bol použitý elektrochemický analyzátor Zahner IM6e (Kronach), ktorý umožňuje

plne počítačovo riadenú EIS. Absolútne hodnoty impedancie $|Z|(f)$ a fázového posunu $\varphi(f)$ boli zaznamenávané vo frekvenčnom intervale 1–1·10⁴ Hz resp. 1 MHz s amplitúdou perturbačného signálu 20 mV. EIS dáta boli analyzované fitovaním impedančných spektier k modelu reprezentovaného ekvivalentným elektrickým obvodom softvérom Zview2.

V termostatickej elektrochemickej bunke vyrobenej zo skla bola umiestnená pracovná elektróda, platínová pomocná elektróda a argentchloridová (3,5 mol l⁻¹ KCl) referenčná elektróda. Pracovná elektróda pozostávala z Ag/AgCl drôtika umiestneného v teflónovej trubičke s 0,5 mm vnútorným priemerom naplnenej 3% agarovým gélom v 0,1 mol l⁻¹ KCl. Kvôli minimalizácii rušivého elektrického šumu bola bunka umiestnená vo Faradayovej klietke. Všetky experimenty boli uskutočnené pri teplote 21,0 ± 0,2 °C v 0,1 mol l⁻¹ KCl s pH 7.

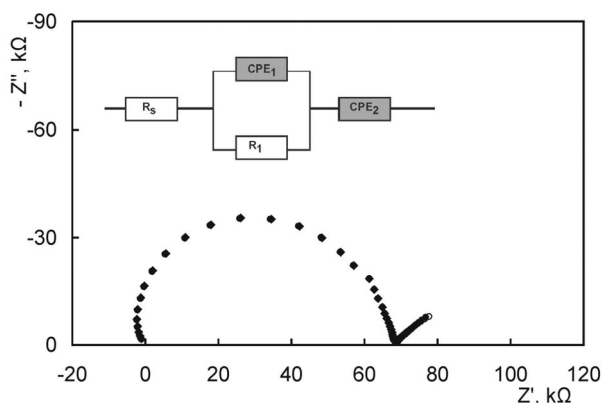
Príprava s-BLM

S-BLM boli vytvárané podobne ako v procedúre popísanej v prácach^{2,3} na hrote pracovnej elektródy tip-dip metódou. Teflónový obal elektródy poskytoval pre lipidovú membránu hydrofóbne ohraničenie, gél slúžil ako hydrofilný podklad. Hrot trubičky bol najprv zrezaný ostrým skalpelom a ponorený do formujúceho roztoku. Po uplynutí krátkej doby bol z formujúceho roztoku vyňatý a ponorený do vodného roztoku, čím sa začal proces samovoľného formovania sa membrány. Vystavenie vplyvu vodného prostredia podporuje také usporiadanie amfifilných molekúl lipidu, ktoré viedlo k vytváraniu lipidovej dvojvrstvy.

Výsledky a diskusia

Vplyv dc napätia na agarovú elektródu

Kvôli vlastnostiam gélových povrchov priaznivých pre vytváranie symetrických lipidových membrán bola najprv študovaná elektrochemická impedančná odozva agarovej pracovnej elektródy bez lipidového filmu ponorenej vo vodnom roztoku. Obr. 1 znázorňuje v Nyquistovom zobrazení impedančné spektrum pri rôznych hodnotách dc napätia (kvôli prehľadnosti sú uvedené len krivky pre (-0,2 V; 0 V; -0,2 V)) v prítomnosti 0,1 mol l⁻¹ KCl pri pH 7. V študovanom intervale frekvencií 1 Hz až 1 MHz pozostáva impedančné spektrum elektródy z dvoch častí. V oblasti vyšších frekvencií (1 MHz až 200 Hz) má tvar nepravidelnej polkružnice. Na zobrazení impedančného spektra v komplexnej rovine reálna časť impedancie v časti ramena spektra pri vyšších frekvenciách nadobúda záporné hodnoty. Záporné hodnoty impedancie môžu mať mnohoraké príčiny, môžu byť spôsobené osciláciami prúdu v potenciostatickom režime kvôli elektrostatickému efektu pri nízkych iónových silách alebo poklesom dostupného povrchu elektródy s rastom polarizácie^{19,20}. V intervale aplikovaných napätí (-0,4 V; -0,2 V; 0 V; -0,2 V; 0,4 V) sa



Obr. 1. Impedančné spektrum Ag/AgCl elektródy umiestnenej v teflónovej trubičke naplnenej 0,1 mol l⁻¹ KCl a ekvivalentný elektrický obvod zodpovedajúci membránou nepokrytej agarovej elektróde. Nyquistov diagram. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: 0,1 mol l⁻¹ KCl pri pH 7. R_s – odpor elektrolytu, kontaktov a spojov; CPE_1 – prvok s konštantnou fázou modelujúci pohyb nabitých častíc cez vrstvu agaru; R_1 – odpor vrstvy agaru; CPE_2 – prvok s konštantnou fázou modelujúci kapacitné vlastnosti rozhrania elektrolyt/agar, ○ +0,2 V, ● 0 V, ◆ -0,2 V

všetky tieto segmenty zodpovedajúce impedančným spektrám pre rôzne hodnoty napätí prekrývajú. V druhom úseku spektra (200 Hz až 1 Hz) je možné pozorovať odlišný obraz, tieto časti kriviek predstavujú priamky, ktoré sa mierne líšia navzájom v závislosti od použitého napätia.

Rozloženie získanej multifrekvenčnej ac odozvy na zmysluplné komponenty bolo uskutočnené modelovaním pomocou ekvivalentného elektrického obvodu. Zvolený ekvivalentný obvod (viď obr. 1) pozostáva z troch častí usporiadaných v sérii: rezistívneho prvku R_s , obvodu pozostávajúceho z paralelne zapojeného rezistívneho prvku

R_1 a prvku s konštantnou fázou CPE_1 a prvku s konštantnou fázou CPE_2 . Veľké množstvo údajov získaných analýzou EIS dát uvádzaných v literatúre potvrdzuje, že membránové systémy na tuhom podklade môžu byť vhodne reprezentované ekvivalentnými obvodmi, ktorých súčasťou sú práve prvky s konštantnou fázou CPE namiesto ideálnej kapacity. Takéto modely lepšie odrážajú neideálnu kapacitnú odozvu skúmaného systému^{21,22}. Hodnoty jednotlivých prvkov obvodu získané fitovaním v intervale frekvencií 1–1.10⁴ Hz sú uvedené v tab. I. Kvalitu fitovania je možné posúdiť podľa hodnôt χ^2 predstavujúcich druhú mocninu smerodajnej odchýlky experimentálnych dát od vypočítanej krivky, rovnako ako pomocou tzv. „Sum Squares“, čo je vážená suma štvorcov úmerná priemernej percentuálnej chybe medzi experimentálnymi dátami a vypočítanou krivkou. Zvolený model viedol k dobrým výsledkom fitovania. χ^2 dosiahli v meranej sérii hodnoty približne 1,8·10⁻⁶ a vážené sumy štvorcov približne 3,9·10⁻⁵.

Prvok CPE_1 elektrického obvodu môže modelovať pohyb nabitých častíc cez tuhú vrstvu agaru. Vypočítaná kapacita dosiahla hodnotu približne 1,1·10⁻¹⁰ F. Parameter neideálnosti CPE_1 -P sa blížil k hodnote 0,9; to znamená, že prvok s konštantnou fázou sa vlastnosťami približuje k vlastnostiam kondenzátora. Vlastnosti CPE_1 sa môžu prejaviť intenzívnejšie vďaka nehomogenitám v rozmeroch a tvare kapilárnych pórov v agare. Zodpovedajúci odpor R_1 dosahoval hodnotu okolo 7,5·10⁴ Ω.

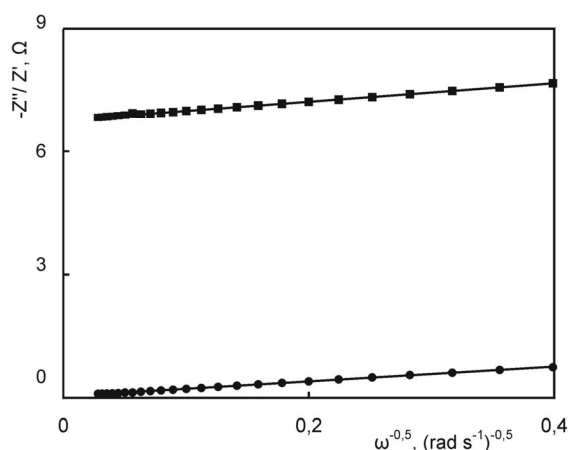
Modelovať kapacitné vlastnosti rozhrania elektrolyt/agar môže prvok s konštantnou fázou CPE_2 , ak rozhranie nie je ideálne hladké, je porózne alebo má povrch zodpovedajúci fraktálovej geometrii. Príslušná časť impedančného spektra môže byť dôsledkom difúzneho transportu náboja, ktorý dominuje v oblasti nižších frekvencií. Fitovanie prvku s konštantnou fázou CPE_2 k experimentálnej krivke viedlo k hodnote parametra neideálnosti CPE_2 -P približne 0,5. Takéto hodnoty CPE_2 -P môžu svedčiť o Warburgovej impedancii. Procedúra fitovania však preukázala lepšiu

Tabuľka I

Parametre agarovej elektródy bez lipidovej vrstvy získané fitovaním pre ekvivalentný elektrický obvod (viď obr. 1)

U [V]	R_s^a [kΩ]	CPE_1 -T ^b [10 ⁻¹⁰ F]	CPE_1 -P	R_1^c [10 ⁴ Ω]	CPE_2 -T ^d [10 ⁻⁵ F]	CPE_2 -P	$\chi^2 \cdot 10^6$ ^e	Sum Sq · 10 ⁵ ^f
0,4	0,1	1,10	0,90744	7,48	3,74	0,46001	1,93	4,43
0,2	0,1	1,06	0,91181	7,47	3,51	0,45928	3,49	8,02
0	0,2	1,10	0,90806	7,52	3,68	0,46641	1,92	2,74
-0,2	0,2	1,17	0,90234	7,55	4,05	0,47341	0,80	1,85
-0,4	0,1	1,13	0,90017	7,57	4,11	0,48054	0,96	2,20

^a R_s – odpor elektrolytu, kontaktov a spojov; ^b CPE_1 – prvok s konštantnou fázou modelujúci pohyb nabitých častíc cez vrstvu agaru (T – kapacita, P – parameter neideálnosti); ^c R_1 – odpor vrstvy agaru; ^d CPE_2 – prvok s konštantnou fázou modelujúci kapacitné vlastnosti rozhrania elektrolyt/agar (T – kapacita, P – parameter neideálnosti); ^e χ^2 – druhá mocnina smerodajnej odchýlky experimentálnych dát od vypočítanej krivky; ^f Sum Sq – vážená suma štvorcov



Obr. 2. Randlesov diagram agarovej elektródy v kontakte s $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri $0,4 \text{ V}$; ■ Z' , ● $-Z''$

zhodu teoretických a experimentálnych dát pri použití frekvenčne závislého prvku s konštantnou fázou namiesto Warburgovej impedancie. V intervale frekvencií 1 až $1 \cdot 10^4 \text{ Hz}$ CPE_2 závisel od aplikovaného napätia v porovnaní s ostatnými prvkami ekvivalentného obvodu najvýraznejšie. Ako sa v priebehu experimentu menilo napätie od kladných po záporné hodnoty, bol pozorovaný mierny rast kapacity CPE_2 a zároveň rástla i hodnota parametra neideálnosti $\text{CPE}_2\text{-P}$. Pri záporných hodnotách napätia sa mobilné nosiče náboja akumulujú na rozhraní. Pri nižších alebo kladných hodnotách sa väčšina nosičov pohybuje smerom od rozhrania.

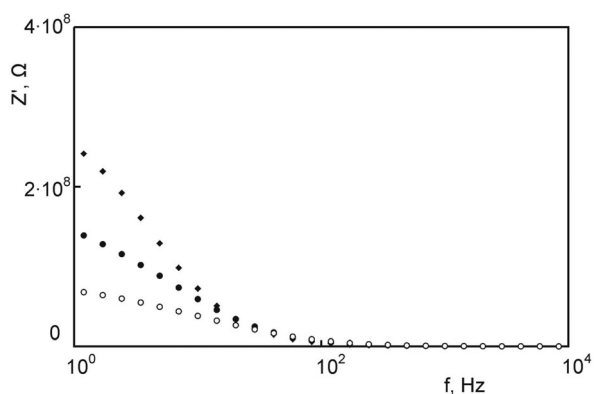
Užitočným indikátorom toho, či je difúzny proces významným prejavom študovaného systému, môže slúžiť Randlesov diagram. Zobrazenie reálnej

a imaginárnej časti impedancie Z vs. $\omega^{-1/2}$ by malo poskytnúť navzájom paralelné priamky ako potvrdenie procesov kontrolovaných difúziou. Ako je znázornené na obr. 2, získané priamky pre $0,4 \text{ V}$ sú paralelné. Podobný trend je možné pozorovať i pre ostatné hodnoty napätia.

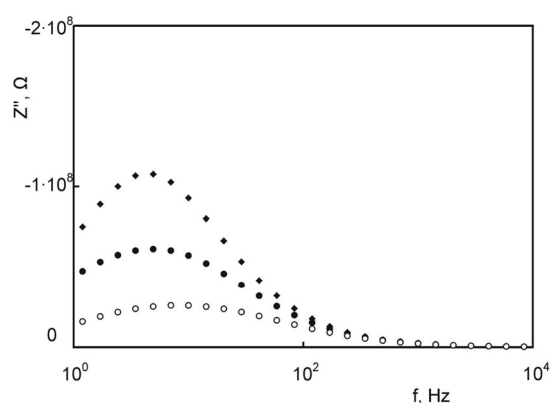
Odpor R_s zapojený v sérii predstavuje príspevok elektrolytu, kontaktov a spojov. V ideálnom prípade na hodnotu R_s nemá vplyv modifikácia povrchu elektródy. Určené hodnoty predstavovali $R_s \sim 0,1 \text{ k}\Omega$.

Vplyv dc napätia na vlastnosti s-BLM na agarovom podklade

Formovanie sa lipidovej dvojvrstvy v režime pokojového potenciálu sa prejavilo nápadnými zmenami impedancie študovaného systému. Lipidy použité na prípravu s-BLM boli elektricky neutrálne, aby bol vplyv napätia na lipidový film viac zreteľný. Utváranie sa membrány s veľkým odporom na hrote elektródy v určitej miere záviselo aj od objemu formujúceho roztoku adheujúceho k povrchu agaru, čo môže ovplyvňovať kvalitu a opakovateľnosť s-BLM^{23,24}. Následne po tom, ako sa vlastnosti s-BLM ustálili, tj. celková impedancia a fázový posun sa nemenili v čase, bola na sledovanie zmien vlastností membrány spôsobených aplikovaným napätím použitá EIS. Hodnoty reálne a imaginárnej časti impedancie na spektrách znázornených na obr. 3 a obr. 4 sumarizujú efekty spôsobené zmenou napätia (kvôli prehľadnosti sú uvedené len krivky pre $-0,2$ až $0,2 \text{ V}$). Na obr. 3 je znázornená zmena reálnej časti impedancie Z' ako funkcie frekvencie v intervale $1\text{--}1 \cdot 10^4 \text{ Hz}$. Aby bolo zaručené, že skúmaná membrána sa nachádza v stabilnom stave, medzi snímaním jednotlivých spektier bol zvolený časový interval 30 min. V aplikovanom intervale napätí sa v systéme prejavil pokles hodnôt reálnej časti impedancie Z' a súčasne došlo k jej znižovaniu i s rastom frekvencie. Pri každom z uvedených napätí krivky v oblasti vyšších frekvencií



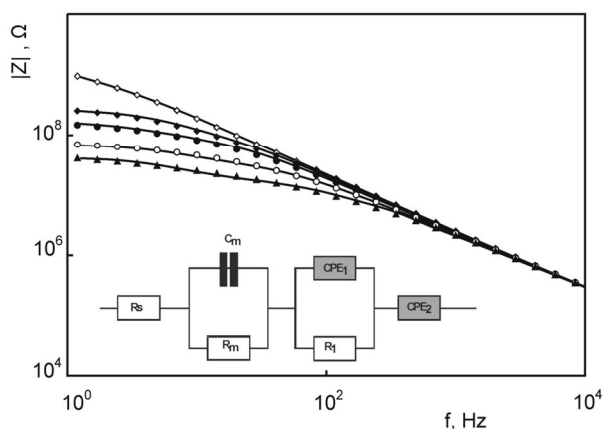
Obr. 3. Frekvenčná závislosť reálnej zložky impedancie Z' s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7, ◆ $+0,2 \text{ V}$, ● 0 V , ○ $-0,2 \text{ V}$



Obr. 4. Frekvenčná závislosť imaginárnej zložky impedancie Z'' s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7, ◆ $+0,2 \text{ V}$, ● 0 V , ○ $-0,2 \text{ V}$

splývajú. Z obr. 3 je rovnako zreteľný rast ac vodivosti, či už s rastom frekvencie alebo zmenou napätia, pri prechode z kladných po záporné hodnoty. Pozorované zmeny môžu byť spojené s redukciou schopnosti s-BLM vytvárať efektívnu bariéru vodivosti a môžu byť dôvodom pre vzostup ac vodivosti s-BLM pri vyšších frekvenciách. Na obr. 4 je znázornená séria frekvenčných závislostí imaginárnej zložky celkovej impedancie Z'' . Takýto typ závislosti je v literatúre označovaný ako „loss spectrum“. V iónových vodičoch dielektrické straty pozostávajú z dvoch zložiek: dc vodivostných strát a strát súvisiacich s dipólovou relaxáciou, ktorá je atribútom dipólovej relaxácie polarizácie priestorového náboja. Týmto typom spektra môže byť dokumentované obmedzenia pohybu iónov cez lipidovú vrstvu pod vplyvom elektrického poľa. Absencia Z'' píku v študovanom intervale frekvencií označuje absenciu disipácie prúdu v systéme. Na obr. 4 je pre každé spektrum viditeľný pík. Frekvencia zodpovedajúca tomuto širokému asymetrickému píku sa posúva do vyšších hodnôt pri poklese hodnôt napätia a pokračuje i po zmene jeho polaritý k záporným hodnotám. Rozširovanie píku pri raste napätia je potvrdením existencie napäťovo závislých relaxačných procesov v systéme. Okrem toho, hodnota impedancie tak isto klesá s posunom k záporným hodnotám, čo svedčí i o poklese kapacity membrány umiestnenej na podklade, pretože signifikantným príspevkom k Z'' je kapacita elektrickej dvojvrstvy. Nakoniec, všetky krivky splývajú v oblasti vysokých frekvencií, čo môže byť spôsobené akumuláciou priestorového náboja v materiáli.

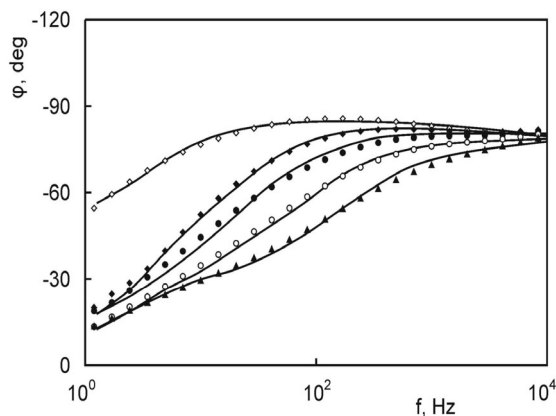
Obr. 5 a obr. 6 znázorňujú v uvedenom poradí frekvenčnú závislosť absolútnej hodnoty impedancie $|Z|$ a fázového posunu φ s-BLM umiestnenej na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri napätí meniacom sa



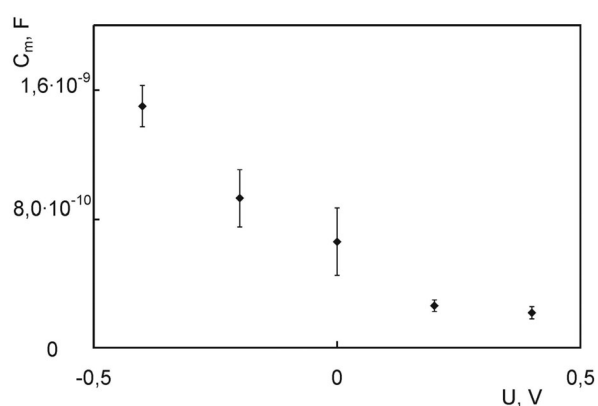
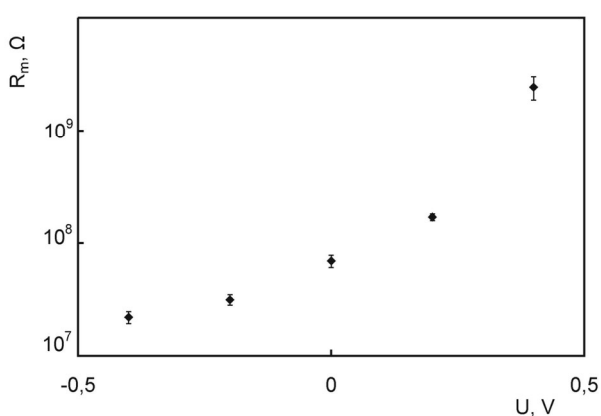
Obr. 5. Frekvenčná závislosť absolútnej hodnoty impedancie $|Z|$ s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí a ekvivalentný elektrický obvod zodpovedajúci s-BLM na agarovej elektróde. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7. Čiary – fit k ekvivalentnému elektrickému obvodu, \diamond +0,4 V, \blacklozenge +0,2 V, \bullet 0 V, \circ -0,2 V, \blacktriangle -0,4 V

v intervale od $-0,4$ do $0,4$ V. Interpretácia impedančných spektier bola uskutočnená pomocou ekvivalentného elektrického obvodu zobrazeného na kresbe vlozenej v obr. 5. Schéma obsahuje v porovnaní s obvodom zobrazeným na obr. 1 dva dodatočné prvky R_m a C_m zodpovedajúce odporu a kapacite lipidovej dvojvrstvy umiestnenej na hrote pracovnej elektródy. Zvolený model poskytol v intervale frekvencií $1-1 \cdot 10^4$ Hz fit k experimentálnym dátam s χ^2 rovným $7,7 \cdot 10^{-4}$ a váženou sumou štvorcov približne $1,6 \cdot 10^{-2}$ spriemerených pre sériu spektier. Fitovanie bolo uskutočnené pri zafixovaných hodnotách R_s , ktoré boli získané z príslušných spektier pre holú nepokrytú pracovnú elektródu. Výsledky fitovania sú horšie ako tie, ktoré boli dosiahnuté pre holú elektródu.

Odpor a kapacita lipidovej dvojvrstvy pri $0,4$ V stanovené pomocou ekvivalentného elektrického obvodu predstavovali $R_m = 2,45 \cdot 10^9 \Omega$, $C_m = 2,15 \cdot 10^{-10} \text{ F}$. Zodpovedajúci špecifický odpor a kapacita membrány dosahovali hodnoty $4,81 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-2}$ a $0,11 \mu\text{F cm}^{-2}$. Tak ako sa napätie menilo od kladných k záporným hodnotám, menili sa i hodnoty R_m a C_m znázornené na obr. 7 a obr. 8. Zmeny napätia spôsobili pokles odporu membrány na hodnotu $R_m = 2,19 \cdot 10^7 \Omega$ pri $-0,4$ V. Súčasne sa menila i kapacita membrány, ktorá kontinuálne rástla po hodnotu $C_m = 1,50 \cdot 10^{-9} \text{ F}$. Zodpovedajúce hodnoty špecifického membránového odporu a kapacity predstavujú $0,04 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-2}$ a $0,76 \mu\text{F cm}^{-2}$. Hodnoty špecifickej kapacity dosiahnuté pri $-0,4$ V sú porovnateľné s hodnotami, ktoré sa v literatúre udávajú pre konvenčné planárne BLM bez rozpúšťadla^{25,26}, rovnako ako pre BLM pripravené z hydrogenovaného vaječného lecitínu²⁷. Sú približne rovnako veľké aj pre BLM vytvárané z natívneho vaječného lecitínu pre napätie pohybujúce sa v intervale od 0 do $-0,2$ V



Obr. 6. Frekvenčná závislosť fázového posunu φ pre s-BLM na agarovom podklade v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri rôznom dc napätí. 20 mV ac vstupné napätie. Elektrolyt: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl pri pH 7. Čiary – fit k ekvivalentnému elektrickému obvodu (obr. 5), \diamond +0,4 V, \blacklozenge +0,2 V, \bullet 0 V, \circ -0,2 V, \blacktriangle -0,4 V

Obr. 7. Závislosť kapacity membrány C_m od napätiaObr. 8. Závislosť odporu membrány R_m od napätia

(cit.²⁸). Z výsledkov našich experimentov vyplýva, že s-BLM vystavené kladným hodnotám napätia môžu sotva spĺňať kritéria kladené na regulárne lipidové dvojvrstvy, hoci ich špecifický membránový odpor svedčí o vysokej miere kompaktnosti lipidového filmu. Údaje zobrazené na obr. 7 vypovedajú o výraznej zmene kapacity, ktorá môže byť čiastočne vysvetlená spätným pohybom rozpúšťadla z lipidového filmu k okrajom agarového podkladu susediacim s teflonovým obalom. Skutočne, bolo zistené, že špecifická kapacita membrány dosahuje hodnotu $0,4 \mu\text{F cm}^{-2}$ vtedy, keď obsahuje také uhľovodíkové rozpúšťadlo ako je *n*-dekán^{25,29}. V našich experimentoch bola súčasne so zmenou kapacity membrány pozorovaná i výrazná zmena membránového odporu. Tak ako sa napätie menilo z kladných po záporné hodnoty, odpor membrány klesal súčasne s rastom kapacity membrány. Posun napätia smerom k záporným hodnotám by mohol spôsobiť oslabenie väzieb membrána/agarový podklad vedúce k destabilizácii štruktúry membrány. Zároveň by sa mohol zvyšovať počet

defektných miest a možných poškodení v štruktúre membrány, ktoré by pri hodnotách napätia prevyšujúcich $-0,4$ V mohli spôsobiť jej úplnú deštrukciu. Defektné miesta v lipidovej dvojvrstve môžu byť vyplnené molekulami vody, čo môže tiež prispieť k zmene dielektrických vlastností lipidového filmu pokrývajúceho podklad.

Záver

Cieľom práce bolo informovať o možnostiach použitia pracovnej elektródy naplnenej agarom ako hydrogélového podkladu pre formovanie stabilnej lipidovej dvojvrstvovej membrány tip-dip metódou. Z uskutočnených experimentov v predloženej práci vyplynuli nasledujúce závery. Vlastnosti podporného systému obsahujúceho gél sú dostatočne stabilné v aplikovanom intervale dc napätí. Na základe výsledkov získaných pre EIS možno konštatovať, že použitie agarovej elektródy poskytuje uspokojivé výsledky v intervale frekvencií $1-1 \cdot 10^4$ Hz. Prezentované vlastnosti v skúmanom intervale napätí preukázali vhodnosť pre depozitovanie s-BLM. Elektrické vlastnosti takto umiestnenej membrány významne záviseli od aplikovaného dc napätia. Hodnoty špecifickej kapacity s-BLM dosiahnuté pri $-0,4$ V sú porovnateľné s hodnotami, ktoré sú udávané pre konvenčné planárne BLM. Posun napätia smerom k záporným hodnotám bol sprevádzaný výraznou zmenou membránového odporu spôsobený rastom počtu defektných miest a možných poškodení v štruktúre membrány.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore VEGA MŠ SR a SAV – č. grantu: 1/3403/06 a 1/0802/09.

LITERATÚRA

- Deriu A., Cavatorta F., Dicola D., Middendorf H. D.: *J. Phys.* 3, 237 (1993).
- Yuan H., Leitmannova-Ottova A., Tien H. T.: *Mat. Sci. Eng.* 4, 35 (1996).
- Lu X. D., Ottova A. L., Tien H. T.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39, 285 (1996).
- Ide T., Yanagida T.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 265, 595 (1999).
- Costello R. F., Peterson I. R., Heptinstall J., Walton D. J.: *Biosens. Bioelectron.* 14, 265 (1999).
- Maurer J. A., White V. E., Dougherty D. A., Nadeau J. L.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 2577 (2007).
- Asaka K., Tien H. T., Ottova A.: *J. Biochem. Biophys. Meth.* 40, 27 (1999).
- Steinem C., Janshoff A., Ulrich W. P., Sieber M., Galla H. J.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1279, 169 (1996).
- Legiš M., Laputková G., Sabo J., Vojčíková L.: *Physiol. Res.* 56, S85 (2007).
- Terretaz S., Ulrich W. P., Vogel H., Hong Q., Dover L. G., Lakey J. H.: *Protein Sci.* 11, 1917 (2002).

11. Hianik T., Passechnik V. I., Sargent D. F., Dlugopolsky J., Sokolikova L.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 37, 61 (1995).
12. Haas H., Lamura G., Gliozzi A.: *Bioelectrochemistry* 54, 1 (2001).
13. Basu R., De S., Ghosh D., Nandy P.: *Physica A (Amsterdam)* 292, 146 (2001).
14. Pliquett U., Langer R., Weaver J. C.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1239, 111 (1995).
15. Kotulska M., Kubica K., Koronkiewicz S., Kalinowski S.: *Bioelectrochemistry* 70, 64 (2007).
16. Kakorin S., Brinkmann U., Neumann E.: *Biophys. Chem.* 117, 155 (2005).
17. Rols M.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1758, 423 (2006).
18. Zhou H., Liu N., Gao Z., Wang H., Fang Y.: *Electrochem. Commun.* 10, 787 (2008).
19. Survila A., Mockus Z.: *Electrochim. Acta* 44, 1707 (1999).
20. Koper M. T. M.: *J. Electroanal. Chem.* 409, 175 (1996).
21. MacDonald R. J.: *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*. J. Wiley, New York 1987.
22. Vallejo A. E., Gervasi C. A., v knihe: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (Tien H. T. Ottova A. ed.), str. 331. Elsevier, Amsterdam 2006.
23. Zhang H., Zhang Z., Li J., Cai S.: *Electrochem. Commun.* 9, 605 (2007).
24. Bordi F., Cametti C., Gliozzi A.: *Bioelectrochemistry* 57, 39 (2002).
25. Montal M., Mueller P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3561 (1972).
26. Purrucker O., Hillebrandt H., Adlkofer K., Tanaka M.: *Electrochim. Acta* 47, 791 (2001).
27. Antonov V. F., Anosov A. A., Norik V. P., Korepanova E. A., Smirnova E. Y.: *Eur. Biophys. J.* 32, 55 (2003).
28. Antonov V. F., Smirnova E. Yu., Shevchenko E. V.: *Lipid Membranes at the Phase Transitions*. Nauka, Moscow 1992.
29. Fujiwara H., Fujihara M., Ishiwata T.: *J. Chem. Phys.* 119, 6768 (2003).

G. Laputková, M. Legiň, and J. Sabo (*Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine, Šafárik University, Košice, Slovak Republic*): **Agar Working Electrode as a Support for Bilayer Lipid Membrane: Effects of Direct Current Bias Voltages**

The agar working electrode as a hydrogel support for bilayer lipid membranes (BLM) was studied by electrochemical impedance spectroscopy. The aim was to study the influence of dc bias voltage on the formation of a stable supported bilayer lipid membrane (s-BLM) on the electrode tip. It was concluded that the hydrogel support is sufficiently stable in the applied range of bias voltages. The agar electrode provides satisfactory results in the frequency range $1-1 \cdot 10^4$ Hz. The electrode properties suggest applicability in deposition of s-BLM. Electric properties of s-BLM significantly depend on the dc bias voltage. The specific membrane capacitance of s-BLM at -0.4 V was comparable with that of a conventional planar BLM. However, a shift to negative bias voltages led to a significant change of membrane resistance, possibly due to the increasing number of pores or defective structures in the lipid bilayer.