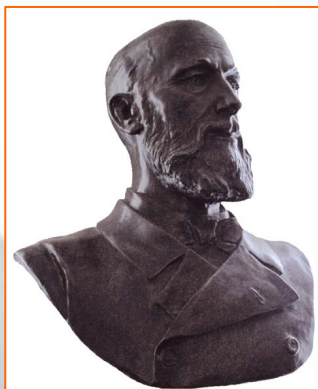
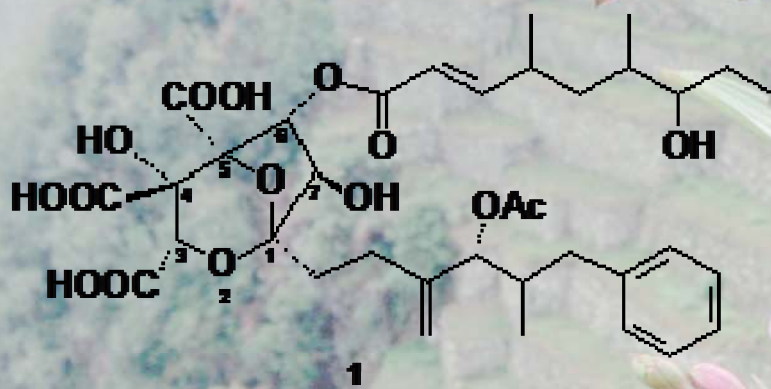


Бутлеровские сообщения

№7, том 25. 2011



ISSN 2074-0212



ISSN 2074-0948

International Edition in English:
Butlerov Communications



Влияние типа аминокислотных остатков и их последовательности в молекулах дипептидов на рецепторные свойства и морфологию тонких пленок на их основе

© Бикмухаметова Альсина Альбертовна, Ефимова Ирина Георгиевна,¹⁺
Зиганшин Марат Ахмедович,^{1*} Горбачук Валерий Виленович,¹
Зиганшина Суфия Асхатовна,² Чукланов Антон Петрович²
и Бухараев Анастас Ахметович²

¹ Кафедра физической химии. Химический институт им. А.М. Бутлерова. КФУ. Ул. Кремлевская, 18.

г. Казань, 420008. Республика Татарстан. Россия. Тел.: (843) 233-73-09. Факс: (843) 233-74-16.

² Лаборатория физики и химии поверхности. Казанский физико-технический институт им. Е.К.

Завойского КазНЦ РАН. Ул. Сибирский тракт, 10/7. г. Казань, 420029. Республика Татарстан.

Россия. Тел.: (843) 231-91-07

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: дипептид, биоцеолит, соединения включения, морфология нанопленок, гравиметрические сенсоры, атомно-силовая микроскопия.

Аннотация

Методом атомно-силовой микроскопии изучено влияние пареообразного метанола на морфологию тонких пленок дипептидов L-аланил-L-валин, L-валил-L-аланин и L-валил-L-валин. Условия насыщения и сорбционная емкость дипептидов по отношению к метанолу были определены с помощью кварцевых микровесов.

Введение

Самоорганизующиеся наноматериалы на основе ди- и трипептидов в настоящее время вызывают все больший интерес благодаря своей биосовместимости, способности к молекулярному распознаванию, доступности и простоте модификации [1,2].

В результате самоорганизации дипептидов получают нанотрубки [3], нановолокна [4], спиралевидные пористые наноструктуры [5], высокоорганизованные поверхности с различной гидрофобностью [6-9]. Формирование того или иного типа наноструктур определяется составом олигопептида [10], типом растворителя, из которого происходит кристаллизация наноматериала [11], или парами которого обрабатывают аморфную пленку дипептида [7]. Следует отметить, что вопрос о влиянии типа аминокислотных остатков, а также последовательности их соединения в молекуле дипептида, на способность дипептида формировать наноструктуры остается практически не изученным. В настоящей работе это исследование было проведено для дипептидов L-аланил-L-валин, L-валил-L-аланин и L-валил-L-валин.

Для этих дипептидов известно [5], что при кристаллизации из водных растворов они образуют спиралевидные наноклоны с диаметром порала 5.36 Å, 5.08 Å и 4.0 Å в случае L-аланил-L-валина, L-валил-L-аланина и L-валил-L-валина, соответственно. Свободный объем в кристаллах, рассчитанный по данным рентгеноструктурного анализа, составляет 46.3% в случае L-аланил-L-валина и L-валил-L-аланина и 38.4% в случае L-валил-L-валина. Пористость материалов на основе этих дипептидов, определенная методом гелиевой пикнометрии, составляет 12.5%, 11.2% и 6.9% для L-аланил-L-валина, L-валил-L-аланина и L-валил-L-валина, соответственно. Объем микропор находится в интервале 0.12-0.069 см³/г.

В результате исследования сорбционных свойств материалов на основе этих дипептидов было установлено, что L-аланил-L-валин способен сорбировать ксенон [12], метанол [13, 14], этанол [15], изопропанол [14], нитрометан [15], ацетонитрил [15, 14], толуол [15], воду [15], диоксид углерода и метан [16]. Для дипептида L-валил-L-аланин известно лишь, что он способен связывать ксенон [12], метан и диоксид углерода [16], ацетонитрил [17]. Для

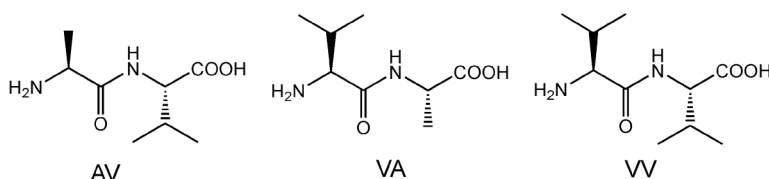
Полная исследовательская публикация _____ Бикмухаметова А.А., Ефимова И.Г., Зиганшин М.А., Горбачук В.В., Зиганшина С.А., Чукланов А.П., Бухараев А.А. дипептида L-валил-L-валин показана способность инкапсулировать молекулы воды при кристаллизации из водного раствора [18].

В настоящей работе с помощью сенсоров типа кварцевых микровесов изучены рецепторные свойства тонких пленок дипептидов L-аланил-L-валин, L-валил-L-аланин и L-валил-L-валин по отношению к парам метанола. С помощью метода атомно-силовой микроскопии исследовалась морфология тонких пленок дипептидов до и после их взаимодействия с метанолом.

Экспериментальная часть

1.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования в настоящей работе были использованы дипептиды L-аланил-L-валин (Bachem, №G-1420.0001), L-валил-L-аланин (Bachem, №G-3500.0001), и L-валил-L-валин (Bachem, №G-3595.0001).



Дополнительная очистка образцов дипептидов не проводилась. В качестве сорбата был использован метанол, очищенный по стандартной методике [19]. Чистота метанола контролировалась методом газовой хроматографии. Содержание основного компонента в органическом растворителе составляло > 99%.

1.2. Методика определения сенсорных откликов

Для исследования рецепторных свойств дипептидов в тонких пленках по отношению к парообразному метанолу было использовано сенсорное устройство оригинальной конструкции типа кварцевых микровесов на основе пьезоэлектрических резонаторов (QCM-анализ). В качестве рабочих сенсоров были использованы кварцевые резонаторы с рабочей частотой 10 МГц (ICM Co. Inc., № 131215-10).

Детально конструкция прибора описана в работе [20]. Ячейка с резонаторами термостатировалась при 298 К.

Три из четырех резонаторов были покрыты слоем рецептора. На центр золотого электрода был нанесен раствор (1 мкл) соответствующего дипептида в метаноле с концентрацией 0.8 мг/мл и покрытие осушалось потоком теплого воздуха (45-50 °С) до постоянной массы. Четвертый резонатор использовался в качестве опорного. Образовавшийся слой дипептида вызывал уменьшение частоты резонатора в среднем на 800 Гц.

В сенсорном эксперименте жидкий сорбат дозировался микрошприцем в сенсорную ячейку в двукратном избытке по сравнению с количеством необходимым для создания насыщенного пара в объеме ячейки. Относительное давление паров сорбата в условиях динамического равновесия составляло $P/P_0 = 0.80 \pm 0.05$. Эта величина была определена с помощью газохроматографического анализа, как описано в работе [20]. Полное насыщение пленки дипептида метанолом в условиях эксперимента контролировалось следующим образом: после того как частота сенсора достигала постоянного максимального значения в сенсорную ячейку додозировалось дополнительное количество метанола, – при этом было показано, что величина сенсорного отклика не изменяется. Ошибка определения отклика пьезоэлектрического сенсора не превышала 10%. Шум базовой линии сенсора не превышал 2 Гц.

После эксперимента связавшийся метанол удалялся продувкой теплым воздухом (45 °С) в течение 2-3 минут. Критерием полноты регенерации сенсорного покрытия служило возвращение частоты колебаний кварцевого резонатора к исходному значению.

1.3. Изучение морфологии тонких пленок дипептидов с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ)

Морфология поверхности тонких пленок дипептидов была изучена с помощью сканирующего зондового микроскопа «*Solver P47*» (НТ-МДТ, Россия) в полуконтактном режиме, как описано в работе [15].

Пленки дипептидов диаметром 3 мм для АСМ эксперимента были приготовлены на поверхности высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) по той же методике, что и для кварцевых резонаторов. Объем наносимого раствора составлял 0.4 мкл, что исключало наслоение пленок и позволяло получить более четкое изображение поверхности.

Средняя квадратичная шероховатость поверхности (R_q) определялась по полученным АСМ изображениям по методике, описанной в работе [21].

Результаты и их обсуждение

2.1. Рецепторные свойства тонких пленок дипептидов по отношению к метанолу

Для исследования рецепторных свойств дипептидов L -валил- L -аланин и L -валил- L -валин по отношению к парообразному метанолу были использованы оригинальные кварцевые микровесы (QCM-сенсор). Полученные сенсорные отклики на введение в измерительную ячейку пара метанола ($P/P_0 = 0.8$) при температуре 298 К представлены на рис. 1. Сенсорный отклик дипептида L -аланил- L -валин (AV) на парообразный метанол, приведенный на рис. 1, построен по данным из работы [13].

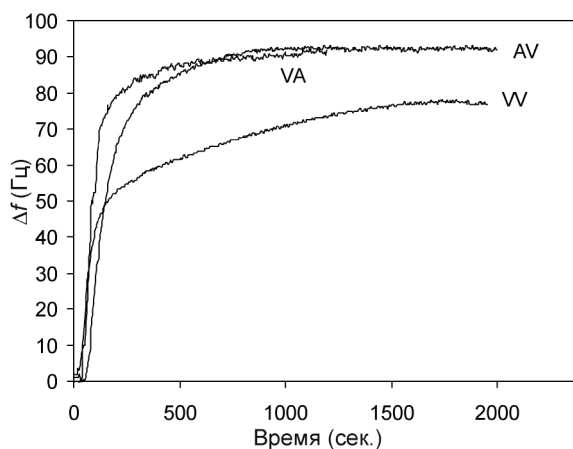


Рис. 1. Сенсорные отклики дипептидов L -валил- L -аланин (VA) и L -валил- L -валин (VV) на пары метанола с термодинамической активностью $P/P_0 = 0.8$ при 298 К. Сенсорные отклики Δf приведены к массе покрытия, соответствующей изменению частоты кварцевого резонатора $\Delta f = 800$ Гц. Сенсорный отклик дипептида L -аланил- L -валин (AV) построен по данным из работы [13].

Было установлено, что время достижения максимального значения сенсорного отклика $\Delta f_{\text{метанол}}$ при связывании паров метанола тонкой пленкой L -аланил- L -валина составляет ~ 12 мин [13], L -валил- L -аланина – 9 мин, а L -валил- L -валина – 25 мин, соответственно. При этом 90% метанола от максимального количества связывалось дипептидами L -аланил- L -валин и L -валил- L -аланин за 4-7 минут, дипептидом L -валил- L -валин за 15 мин.

Для изученных пленок дипептидов была проанализирована обратимость связывания паров метанола. Критерием полной обратимости служил возврат частоты кварцевого резонатора на значение, соответствующее чистому дипептидному покрытию. Было установлено, что метанол обратимо связывается и полностью удаляется из тонкого слоя дипептида продувкой теплым воздухом (45 °C) в случае дипептидов L -аланил- L -валин и L -валил- L -аланин. После удаления метанола рецепторные свойства пленок этих дипептидов полностью восстанавливались.

В случае дипептида L -валил- L -валин частота кварцевого резонатора после регенерации оказывалась больше на 1.5-3% по сравнению с первоначальной, а сорбционная емкость пленки при повторной сорбции паров метанола уменьшалась на 20-30%. Причиной десорбционного гистерезиса, а также более медленной сорбционной кинетики, может быть то, что дипептид L -валил- L -валин образует гидрофобные каналы с наименьшим диаметром портала среди изученных дипептидов [5], что затрудняет диффузию молекул «гостя» в фазе рецептора.

На основе полученных сенсорных откликов $\Delta f_{\text{метанол}}$ рассчитывали содержание метанола в комплексе с дипептидами S (моль связанного метанола на 1 моль дипептида) по уравнению:

$$S = (\Delta f_{\text{метанол}} / \Delta f_{\text{дипептид}}) (M_{\text{дипептид}} / M_{\text{метанол}}),$$

где $\Delta f_{\text{дипептид}}$ – изменение частоты кварцевого резонатора при нанесении на его поверхность слоя дипептида, $M_{\text{дипептид}}$ – молекулярная масса дипептида: 188.2 г/моль (AV и VA) и 216.3 г/моль (VV), $M_{\text{метанол}}$ – молекулярная масса метанола.

Результаты QCM-анализа представлены в табл. 1.

Табл. 1. Результаты QCM-анализа для дипептидов L-аланил-L-валин (AV), L-валил-L-аланин (VA) и L-валил-L-валин (VV) при 298 K*

Дипептид	$\Delta f_{\text{метанол}}$, Гц	S (моль метанола / моль дипептида)
AV	92	0.67**
VA	91	0.68
VV	77	0.65

* сенсорные отклики приведены к равным массам сенсорного покрытия, соответствующей изменению частоты кварцевого резонатора $\Delta f_{\text{дипептид}} = 800$ Гц. ** данные из работы [13].

Рассчитанные значения составов клатратов S дипептидов AV и VA имеют близкие значения, в то время как сорбционная емкость дипептида VV оказалась меньше емкости AV (VA).

Полученные результаты QCM-анализа согласуются с литературными данными рентгеноструктурного анализа кристаллов изученных дипептидов, согласно которым доля свободного пространства одинакова в кристаллах дипептидов AV и VA и меньше, чем в кристаллах VV [5].

2.2. Влияние метанола на морфологию тонких пленок дипептидов

Для изучения влияния метанола на морфологию тонких пленок дипептидов методом АСМ была охарактеризована морфология поверхности тонких пленок VA и VV до и после связывания паров метанола в условиях аналогичных сенсорному эксперименту. Полученные АСМ изображения приведены на рис. 2-3. Результаты АСМ анализа тонкой пленки AV представлены в работе [13].

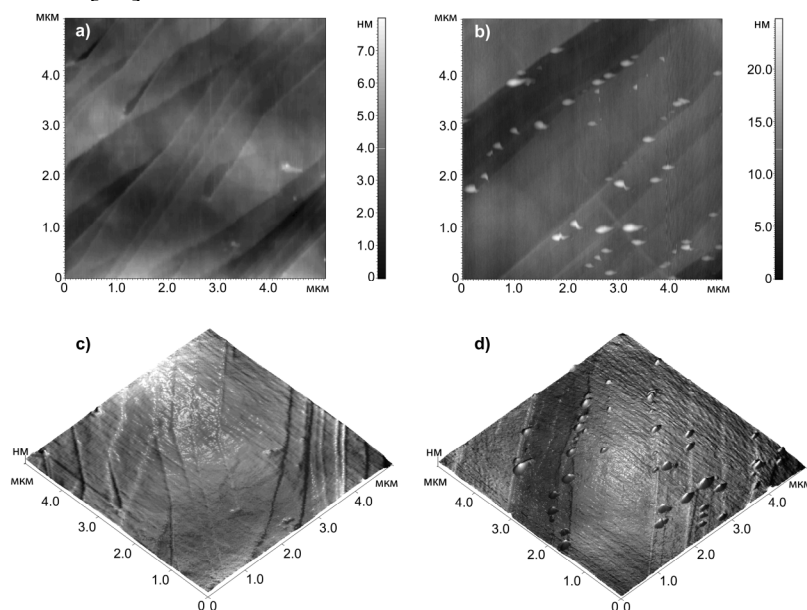


Рис. 2. АСМ изображения поверхности пленки дипептида L-валил-L-аланин, нанесенной на ВОПГ из раствора в метаноле, (а, с) до и (b, d) после насыщения парами метанола в течение 20 минут и последующей осушкой в течение 2 минут в токе теплого воздуха (45 °С)

Средняя квадратичная шероховатость поверхности R_q исходной пленки дипептида VA составила 0.67 ± 0.1 нм, рис. 2а, с, AV – 1.6 ± 0.2 нм [13], VV – 23.6 ± 0.1 нм, рис. 3а, с. После насыщения тонких пленок дипептидов парообразным метанолом величина R_q на участке свободном от крупных дефектов составила 1.8 ± 0.2 нм, рис. 2b, d, 1.5 ± 0.2 нм [13] и 17.9 ± 0.1 нм, рис. 3b, d в случае VA, AV и VV, соответственно.

Было обнаружено, что в результате связывания метанола пленкой дипептида VA на поверхности образуются nanoостровки с размерами 300-400 нм по длине, 150-230 нм по ши-

рине, 5-14 нм по высоте. Формирование нанообразований происходит главным образом вдоль кристаллографических ступеней на пирографите, аналогично тому, что наблюдалось для тонкой пленки дипептида AV (нановыступы с латеральными размерами 20-60 нм и высотой 2-5 нм [13]). Следует отметить, что в случае дипептида VA площадь образующихся частиц в среднем на порядок больше площади частиц, образующихся на поверхности дипептида AV, при близких значениях высоты.

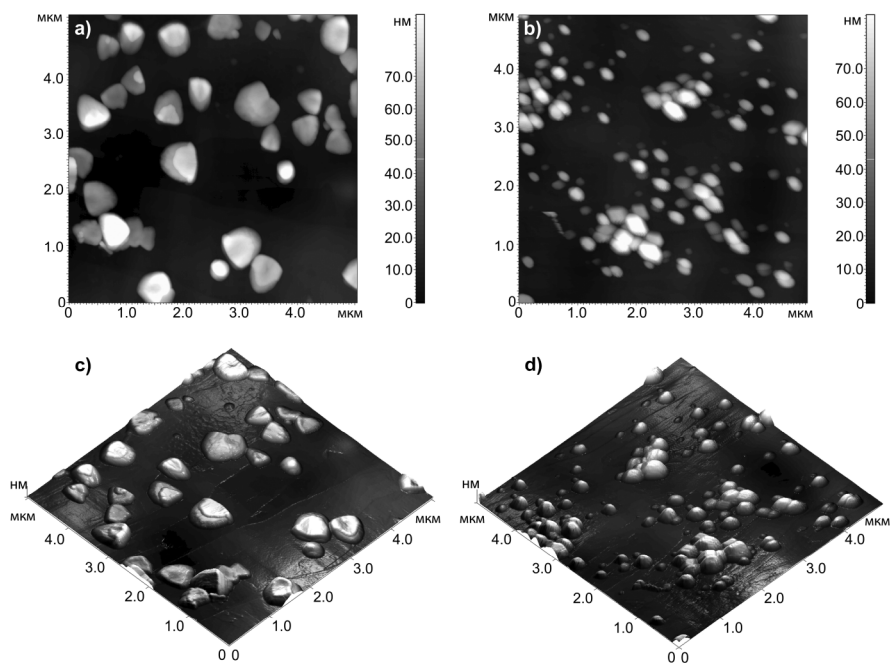


Рис. 3. АСМ изображения поверхности пленки дипептида L-валил-L-валин, нанесенной на ВОПГ из раствора в метаноле, (а, с) до и (b, d) после насыщения парами метанола в течение 20 минут и последующей осушкой в течение 2 минут в токе теплого воздуха (45 °С)

В отличие от гладких пленок дипептидов VA и AV, образующихся из раствора в метаноле, на поверхности исходной пленки дипептида VV были обнаружены микро- и наноостровки треугольной формы высотой 100-160 нм с длинной грани 600-800 нм, рис. 3а,с. После насыщения пленки VV парами метанола наблюдается существенное изменение морфологии: исходные кристаллики трансформируются во множественные нанообразования со средним диаметром 150-350 нм и высотой 50-80 нм, количество которых более чем в 3 раза превышает количество исходных наноостровков.

Выводы

1. Установлено, что порядок следования аминокислотных остатков в дипептидах L-аланил-L-валин и L-валил-L-аланин не оказывает существенного влияния на их сорбционную емкость по отношению к метанолу. Замена аминокислотного остатка аланила на валил в дипептиде приводит к уменьшению его сорбционной емкости по отношению к метанолу и появлению десорбционного гистерезиса. При этом рецепторная способность тонкой пленки дипептида L-валил-L-валин после регенерации теплым воздухом частично инактивируется.
2. В результате связывания паров метанола дипептидами L-аланил-L-валин и L-валил-L-аланин на поверхности изначально гладких пленок происходит формирование нанообразований, размер которых в случае VA на порядок больше размера нанообразований на поверхности AV, при близких значениях высоты. При кристаллизации дипептида L-валил-L-валин из раствора в метаноле на поверхности тонкой пленки образуются наноостровки треугольной формы, которые под действием парообразного метанола трансформируются в агломераты более мелких частиц.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №09-03-97011-р_поволжье и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (Госконтракт №П2345).

Литература

- [1] T.J. Burchell, D.V. Soldatov, G.D. Enrighta, J.A. Ripmeester. The ability of lower peptides to form co-crystals: inclusion compounds of Leu-Leu-Leu tripeptide with pyridine and picolines. *CrystEngComm*. **2007**. Vol.9. P.922-929.
- [2] Yan X., Zhu P., Li J. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* **2010**. Vol.39. P.1877-1890.
- [3] M. Reches, E. Gazit. Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science*. **2003**. Vol.300. P.625-627.
- [4] Wei-Wen Tsai, Liang-shi Li, Honggang Cui, Hongzhou Jiang, Samuel I. Stupp. Self-assembly of amphiphiles with terthiophene and tripeptide segments into helical nanostructures. *Tetrahedron*. **2008**. Vol.64. P.8504-8514.
- [5] D.V. Soldatov, I.L. Moudrakovski, E.V. Grachev, J.A. Ripmeester. Micropores in Crystalline Dipeptides as Seen from the Crystal Structure, He Pycnometry, and ¹²⁹Xe NMR Spectroscopy *J. Am. Chem. Soc.* **2006**. Vol.128. No.20. P.6737-6744.
- [6] J. Ryu, C.B. Park. High-Temperature Self-Assembly of Peptides into Vertically Well-Aligned Nanowires by Aniline Vapor. *Adv. Mater.* **2008**. Vol.20. P.3754-3758.
- [7] J. Ryu, C.B. Park. High stability of self-assembled peptide nanowires against thermal, chemical, and proteolytic attacks. *Biotechnology and Bioengineering*. **2010**. Vol.105. P.221-230.
- [8] J. Ryu, C.B. Park. Solid-phase growth of nanostructures from Amorphous peptide thin film: effect of water activity and temperature. *Chem. Mater.* **2008**. Vol.20. P.4284-4290.
- [9] J.S. Lee, J. Ryu, C.B. Park. Bio-inspired fabrication of superhydrophobic surfaces through peptide selfassembly. *Soft Matter*. **2009**. Vol.5. P.2717-2720.
- [10] C.H. Görbitz. Microporous Organic Materials from Hydrophobic Dipeptides. *Chem. A. Eur. J.* **2007**. Vol.13. No.4. P.1022-1031.
- [11] Li H., Zhang F., Zhang Y., He J., Hu J. Organic Solvents Mediate Self-assembly of GAV-9 Peptide on Mica Surface. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. **2007**. Vol.39. No.4. P.285-289.
- [12] D.V. Soldatov, I.L. Moudrakovski, J.A. Ripmeester. Dipeptides as microporous materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**. Vol.43. P.6308-6311.
- [13] Ефимова И.Г., Зиганшин М.А., Горбачук В.В., Солдатов Д.В., Зиганшина С.А., Чукланов А.П., Бухараев А.А. Образование nanoостровков на поверхности тонких пленок дипептидов под действием паров органических соединений. *Физикохимия поверхности и защита материалов*. **2009**. Т.45. №5. С.474-477.
- [14] C.H. Görbitz. An exceptionally stable peptide nanotube system with flexible pores. *Acta Cryst.* **2002**. Vol.B58. P.849-854.
- [15] Ефимова И.Г., Зиганшин М.А., Горбачук В.В., Зиганшина С.А., Бухараев А.А. Рецепторные свойства нанопористого материала на основе дипептида аланил-валин по отношению к органическим соединениям и воде. *Бутлеровские сообщения*. **2010**. Т.21. №9. С.29-36.
- [16] A. Comotti, S. Bracco, G. Distefano, P. Sozzani. Methane, carbon dioxide and hydrogen storage in nanoporous dipeptide-based materials. *Chem. Commun.* **2009**. P.284-286.
- [17] C.H. Görbitz. Monoclinic nanoporous crystal structures for L-valyl-L-alanine acetonitrile solvate hydrate and L-valyl-L-serine trifluoroethanol solvate. *CrystEngComm*. **2005**. Vol.7. P.670-673.
- [18] C.H. Görbitz. Nanotubes from hydrophobic dipeptides: pore size regulation through side chain substitution. *New J. Chem.* **2003**. Vol.27. P.1789-1793.
- [19] W.L.F. Armarego, C.L.L. Chai. Purification of laboratory chemicals, 6th ed. *Oxford: Butterworth-Heinemann*. **2009**. P.760.
- [20] L.S. Yakimova, M.A. Ziganshin, V.A. Sidorov, V.V. Kovalev, E.A. Shokova, V.A. Tafeenko, V.V. Gorbachuk. Molecular recognition of organic vapors by adamantylcalix[4]arene in QCM sensor using partial binding reversibility. *J. Phys. Chem. B*. **2008**. Vol.112. No.49. P.15569-15575.
- [21] Арутюнов П.А., Толстихина А.Л. *Микроэлектроника*. **1999**. Т.28. №6. С.405-414.