

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet

Tudományos diákköri dolgozat

**Fotoszintetikus reakciócentrum fehérje alkalmazása hibrid
nanostruktúrákban**

Készítette:

Szabó Tibor

Témavezető:

Dr. Nagy László, egyetemi docens

Társtémavezető:

Magyar Melinda, PhD hallgató

2012.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3.
2. Irodalmi áttekintés.....	4.
3. Célkitűzés	7.
4. Anyagok és módszerek	8.
4.1. Mintaelőkészítés.....	8.
4.2. Mérési eljárások	9.
4.2.1. Atomi erő mikroszkópia.....	9.
4.2.2. Transzmissziós elektronmikroszkópia	9.
4.2.3. Optikai spektroszkópia.....	9.
4.2.4. Ellenállásváltozás mérése	10.
4.2.5. Elektrokémiai mérések.....	10.
5. Eredmények és értékelésük.....	11.
5.1. Strukturális mérések.....	11.
5.1.1. AFM	11.
5.1.2. TEM	12.
5.2. RC/ITO komplexen végzett spektroszkópiai mérések.....	13.
5.2.1. Egyensúlyi fényabszorpció mérése.....	13.
5.2.2. Fényabszorpció kinetika mérése	14.
5.3. Elektromos tulajdonságok.....	18.
5.4. Fényindukált áramok mérése elektrokémiai cellában.....	20.
6. Összegzés	22
7. Tovább lépés lehetőségei	23.
8. Köszönetnyilvánítás	24.
9. Irodalomjegyzék.....	25.

1. Bevezetés

Napjainkban folyó kutatások jelentős része irányul a nanotechnológia és a nanotechnológián alapuló alkalmazások felé. Az anyagtudomány, az (opto)elektronika, a (számítás)technika fejlődése ahhoz a felismeréshez vezetett, hogy a méretek csökkenésével az anyagok számos tulajdonsága eltér a hétköznapi mérettartományban tapasztaltakhoz képest, ezen új tulajdonságok kihasználása nagy lehetőségeket rejt magában. Ezen új tulajdonságok kihasználása értelemszerűen visszahat más tudományterületek fejlődésére is. Ennek a pozitív visszacsatolásnak vagyunk szemtanúi manapság, amikor ezeknek a tudományterületeknek a rohamos fejlődését tapasztaljuk.

Hasonló kihívást jelent a hibrid anyagok alkalmazása, mely során kettő vagy több anyagot oly módon kombinálunk, hogy előnyös tulajdonságaik még inkább erősítsék egymást, esetlegesen csak a kompozitra jellemző új tulajdonságok mutatkoznak meg.

A hibrid anyagok egy speciális csoportját képezik a bio-nanokompozit anyagok, melyek sajátossága, hogy méretüket tekintve legalább egy dimenzióban a nanoskálán mozognak és legalább egy alkotórészük biológiai eredetű. A biológiai anyagok különösen hatékony működésre specializálódtak, és ehhez specifikus felépítésük alakult ki. Nagyon sokat tudunk már a biológiai rendszerek szerkezetének és működésének kapcsolatáról, de azok (technikai) felhasználása még mindig inkább kihívás.

Dolgozatomban egy speciális fehérjét, baktériumokból kinyert, tisztított fotoszintetikus reakciócentrum fehérjét alkalmaztam hibrid nanostruktúrákba ágyazva. Ez a fehérje igen nagy fontossággal bír, fényenergia felhasználásával elektrokémiai potenciált hoz létre, megteremtve ezzel az alapot a magasabb szintű életformák számára.

A reakciócentrum fehérjét indium-ón-oxid, polietilén ecetsav és többfalú szén nanocső felhasználásával képzett kompozitba építettem. Dolgozatom tárgyát a kapott kompozit spektroszkópiai, elektromos és elektrokémiai tulajdonságainak tárgyalása képezi.

2. Irodalmi áttekintés

A természetben olyan biológiai anyagok alakultak ki, amelyek extrém érzékenységgel rendelkeznek, specifikus feladatokat látnak el és ezen feladatokat igen jó hatásfokkal végzik, így technológiai alkalmazásuk minden szempontból előnyt jelentene. A legújabb informatikai, (mikro-, opto)elektronikai és molekuláris biológiai fejlesztéseknek köszönhetően ma már a nanotechnológiai alkalmazásokra is egyre több lehetőség nyílik.

Különböző biológiai anyagok, gyógyszerek [1, 2], peptidek [3], fehérjék [4], nukleinsavak [5] kombinációi alkalmazhatók nano-hibrid rendszerekben célzott felhalmozással *in vitro* és *in vivo*, például a rákkutatásban, terápiás alkalmazásokban. Az antibiotikumokkal vagy antitestekkel jelölt nanoanyagokkal megcélozhatunk bakteriális, vírusos eredetű gyulladásokat, fertőzéseket, mivel alkalmasak azok specifikus biológiai felismerésére. A szén nanocsövek egyedülálló optikai tulajdonságaiknak köszönhetően használhatók biológiai képalkotásra [6.].

A számos nanostruktúra között (szén alapú anyagok, „quantum dot”-ok (kvantum pöttyök), önszerveződő rétegek, stb.) az indium-ón-oxid (ITO) külön figyelmet érdemel. Az áttetsző vezető oxidok (transmitting conductive oxides, TCOs) vékonyfilmjeit, mint az indiumoxidokat (In_2O_3), ónoxidokat (SnO_2) vagy ezek kombinációját az ITO-t széles körben alkalmazzák a félvezető és elektronikai eszközökben [7, 8].

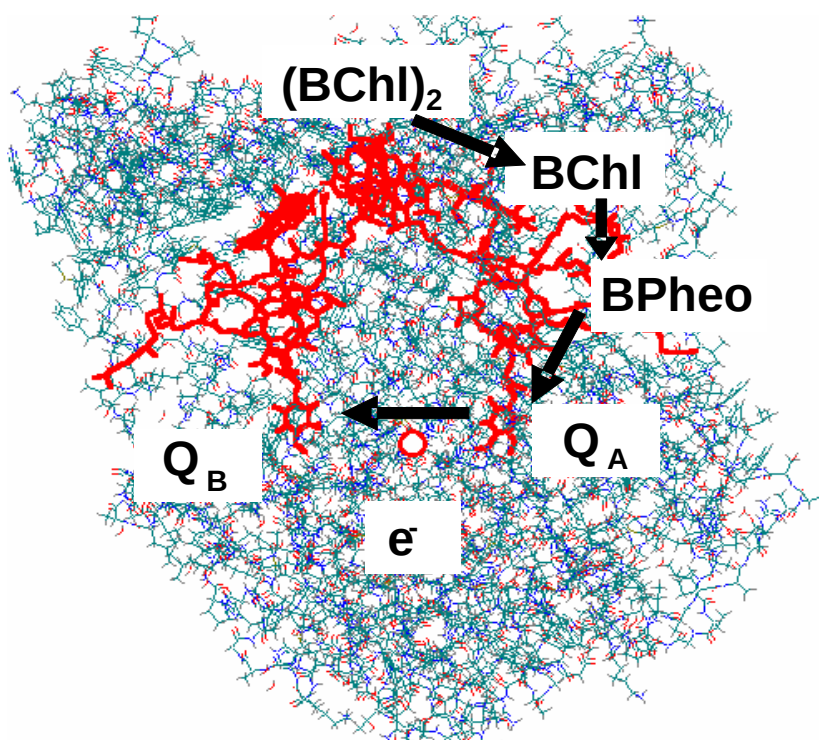
A látható tartományban való átlátszóságának köszönhetően, az ITO-t széles körben alkalmazzák elektródként, pl. folyadékkristályos kijelzőknél [9], szenzorokban [10], fény kibocsátó diódákban [11, 12], fotovoltaiikus (fotofeszültséget generáló) [13] vagy elektrokémiai cellákban [14, 15]. Egyedülálló lehetőséget jelenthet az ITO bio-hibrid rendszerekben lévő kompozit elektródok részeként történő alkalmazása [16, 17]. A hibrid rendszerek képesek arra, hogy két különböző anyag előnyös tulajdonságait egyszerre érvényesítsék. Szerves és szervetlen anyagok kombinálásával lehetőségünk van arra, hogy új előnyös tulajdonságokat érjünk el [18,19].

A fehérje-alapú bio-nanokompozit anyagok jövőbeli alkalmazása forradalmian új utat kínálhat az integrált optikai eszközök fejlesztésében, mint például az optikai kapcsolók, mikro-képalkotó rendszerek, szenzorok, telekommunikáció vagy az energia átalakítás, -raktározás területén [20-22].

Különleges helyet foglalnak el azok a speciális alkalmazások, amelyek során fénnel aktiválható biológiai anyagokat használnak. Ezek közül elsősorban a különböző rodopszinok (a szem rodopszinja, a „sensory rhodopsin” és a bakteriorodopszin), a növények fitokrómja, szerves pigmentek (flavonoidok, profirinek), a citokróm került a kutatók látókörébe. Kísérletek folynak a fotoszintetikus reakciócentrum fehérje (RC) egy rétegének immobilizálására az ITO felületén is, amelyet akár bio-fotovoltaiikus berendezésekben is lehet alkalmazni [23].

A növényekben és baktériumokban található fotoszintetikus reakciócentrumot (1. ábra) külön figyelem övezi, mivel ezt a fehérjét akár a természet napelemének is tekinthetjük. Ez az a fehérje, amely a fényenergiát kémiai energiává alakítja, biztosítva ezzel a feltételeket a szén redukciójához a sejtekben [24, 25]. Habár méretét tekintve nanoskálán működik (nagysága kb. 10 nm, [30, 41]) és az általa átalakított energia is nanoskálán van (egyetlen foton egyetlen töltéspárt indukál, [26, 41]), tulajdonképpen ez a fehérje biztosítja a szükséges energiát az egész bioszféra számára. Az elsődleges töltésválasztás extrém magas kvantumhatásfoka (közel 100%, [26]) csábítóan nagy kihívást jelent a nano-eszközökben történő alkalmazásában.

A reakciócentrum fehérje egy pigment-protein komplex a fotoszintetikus membránban (növényekben a kloroplasztiszbán, baktériumokban a sejtmembránban). Baktériumokban egy speciálisan szerveződött bakterioklorofill veszi fel a fényenergiát, majd a RC-ban megtörténik a pozitív és negatív töltések szétválasztása P^+BPheo^- , majd $P^+Q_A^-$ formában. P^+ az elsődleges oxidált donor, egy speciális bakterioklorofill dimer (BChl)₂; BPheo az elsődleges elektron akceptor, egy monomer bakteriofeofitin; a Q_A^- pedig az elsődleges redukált kinon, mely elektron-akceptorként működik. A szétválasztott töltések később tovább stabilizálódnak a $P^+Q_B^-$ redox állapotban, amelyben a Q_B^- a másodlagos redukált kinon (1. ábra, [27-29]).



1. ábra

A fotoszintetikus reakciócentrum fehérje szerkezete és kofaktorai. (BChl)₂: elsődleges elektron donor bakterioklorofill dimer, BChl: bakterioklorofill monomer, BPheo: bakteriofeofitin, Q_A: elsődleges kinon, Q_B: másodlagos kinon. A fekete nyilak az elektrontranszport irányát mutatják a töltés szeparáció során [34].

Habár az elsődleges töltésválasztás kvantumhatásfoka megközelíti az egyet, a fehérjén belüli elektrontranszport fizikai tulajdonságai a RC típusától és a környezeti hatásoktól függenek. Speciális molekulák (mint a detergens, lipidek, inhibitorok, CNT, stb.) a bíorbaktérium RC-ának speciális oldalához kötődnek [30-32], így módosítják a töltés stabilizáció kinetikáját és energetikáját.

Egyre több a bizonyíték arra, hogy a RC hozzákapcsolható nano-szerkezetekhez úgy, hogy a stabilitását nagy mértékben megőrzi, sőt elektromos kapcsolat is létrejön a két típusú anyag között [30, 33-35]. A kutatások kulcsfontosságú kérdései napjainkban értelemszerűen az új alkalmazások lehetőségei, a mérések reprodukálhatósága és a stabilitás (ez utóbbi főleg a biológiai komponens oldaláról). Sérülékeny, érzékeny természetük miatt a biológiai anyagok gyakorlati alkalmazásaira óvatos próbálkozások vannak. Szükség van azonban a bizalom erősítésére, mert olyan előnyökkel rendelkeznek, amelyek csábítóak lehetnek a bioelektronikai technológiában [21]. Jelen dolgozatomban a

RC/ITO bio-nanokompoziton végzett optikai- és elektrokémiai vizsgálataim eredményeit mutatom be.

3. Célkitűzés

Vizsgálataim során az volt a célom, hogy létrehozzak RC fehérjéből és ITO-ból fénnel gerjeszthető biohibrid kompozitanyagot. Kiderítsem, hogy van-e elektromos kapcsolat az ITO üveg és a reakciócentrum fehérje között a fénnel való gerjesztés után, és ha van ilyen kapcsolat, akkor annak mibenlétének a kiderítése.

Ennek értelmében célul tűztem ki az ITO és RC felhasználásával készített hibrid nanostruktúrák

- létrejöttének morfológiai igazolását;

fényindukált

- ellenállásváltozásának,
- abszorpcióváltozás kinetikai paramétereinek, illetve
- elektrokémiai tulajdonságainak meghatározását.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Mintaelőkészítés

A *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* R-26 bíborbaktérium-sejteket fotoheterotróf körülmények között a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetében rutinszerűen neveltük és azokból RC-ot tisztítottunk. A RC preparálás során először szolubilizáljuk a fotoszintetikus membránt detergens használatával (LDAO, *N,N*-dimethyldodecylamine-*N*-oxide, Fluka), majd frakcionált ammónium-szulfátos kicsapással tisztítjuk, amelyet a DEAE Sephacel (Sigma) anion-cserélő kromatográfia követ [36].

A preparálás után a RC Q_B oldalát helyreállítottuk ubikinon-10 hozzáadásával (UQ-10, 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaisoprenol-*p*-benzoquinone, Sigma) és centrifuga filterrel (Whatman VectaSpin 3, 10 kDa) 80-100 µM-osra töményítettük. Az optikai spektroszkópiához a RC szuszpenziót 1 µM-osra hígítottuk detergens oldatban (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 0,01% LDAO, pH 8,0). Azért, hogy a RC-ot rá tudjam rétegezni az ITO felületére, a detergenst kidializáltam az oldatból és meghatározott mennyiségű 10⁻⁶-10⁻¹ µM közötti koncentrációjú RC-ot szárítottam az ITO-ra N₂ áram alatt.

Az ITO-t (Prazisions Glas & Optik GmbH, Iserlohn, Németország, Katalógus szám: CEC020B) Visy Csaba professzor úrtól (SZTE TTIK, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) kaptuk. Mivel az ITO fizikai-kémiai tulajdonságai nagymértékben függenek a gyártási technológiától, illetve a minta „előéletétől”, fontos tudni, hogy ez a minta úgy készült, hogy indium-ón-oxid vékony vezető réteget porlasztottak jó minőségű boroszilikát-üveg felületére.

Az elektrokémiai mérések elvégzéséhez a RC-ot kémiai kötésekkel rögzítettem az ITO felülethez többfalú szén nanocsöveken (**M**ulti**W**alled carbon **N**ano**T**ubes, MWNT) keresztül a következő eljárás szerint. Az ITO felületét etanolos és acetonos mosást követően oxigén plazma tisztítóval tisztítottam. A tisztított hordozót először 5 percre foszfát pufferbe (0,1 M, pH 8,0), majd ezt követően 10 percre PDDA (Poli(dialildimetilammónium klorid), 1,9 mM, pH 1,0 HCl) oldatba helyeztem. Az előkezelést követően az elektródot 15 percre PTAA (politiofén-ecetsav, 1 mg/ml, 0,1 M-os foszfát pufferben, pH 8,0) oldatba merítettem.

Az RC/PTAA/MWNT komplex kialakításához először a PTAA oldathoz (1 mg/ml, 0,1 M-os foszfát pufferben, pH 8,0) MWNT-t (0,14 mg/ml) kevertem, majd a keveréket 2 órán át szobahőmérsékleten hagytam. A kialakult komplexet ultracentrifuga segítségével távolítottam el a PTAA oldattól (30000 x g, 20 min), majd a szeparált komplexet foszfát pufferrel mostam. A tisztított komplexhez 65 μ M-os RC oldatot kevertem, majd a keverékből a detergenst kidializáltam. Az így kialakított RC/PTAA/MWNT komplexet ultracentrifuga segítségével (30000 x g, 20 min) választottam el a RC oldattól.

4.2. Mérési eljárások

4.2.1. Atomi erő mikroszkópia

Annak érdekében, hogy a fehérjét láthatóvá tegyük az ITO felületen, atomi erő mikroszkópos (AFM) vizsgálatokat hajtottunk végre. Az AFM képeket MFP-3D típusú atomi erő mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA) készítettük. A pásztázás AC (letapogató) módban történt Olympus cantilever AC160 (Tokyo, Japan) használatával száraz körülmények között [30, 37]. Mivel a minta jó vezető, szükségessé vált az elektromos földelése a mérések alatt. A mintákat az AFM vizsgálatokhoz én készítettem elő, de a méréseket Nagy Krisztina végezte Dr. Váró György (MTA SZBK) laboratóriumában.

4.2.2. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az RC/PTAA/MWNT komplexek kialakulását transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) ellenőriztem. A méréseket Philips CM10 típusú mikroszkóppal végeztem az SZTE TTIK elektronmikroszkóp laboratóriumában, 100 kV-os gyorsító feszültséget alkalmazva.

4.2.3. Optikai spektroszkópia

A fényindukált abszorpcióváltozást egy egysugaras helyi tervezésű és kivitelezésű kinetikai spektrofotométerrel mértem [32, 38].

Az elsődleges elektron-donor bakterioklorofill dimer P/P^+ redox változásait és a $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer kinetikáját 771 nm-nél a bakteriofeofitin-abszorpcióváltozás elektrokróm eltolódásának mérésével határoztam meg [30, 32, 39, 40].

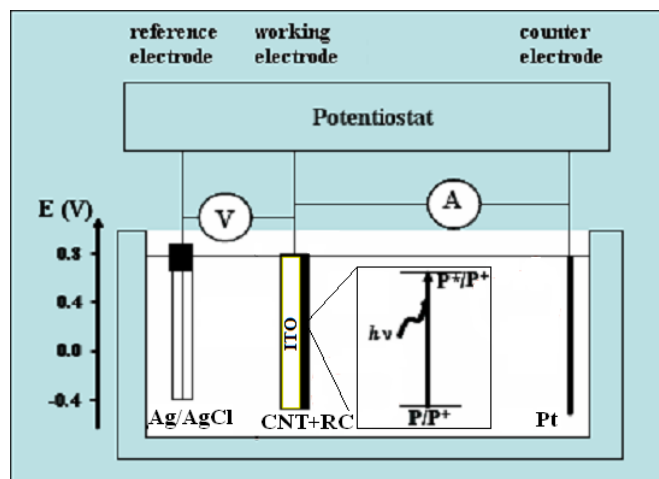
Az ITO rétegek abszorpciós spektrumát RC-mal vagy RC nélkül Unicam UV4 kétsugaras spektrofotométerrel mértem az ultraibolya-közeli infravörös (250-900 nm) tartományban.

4.2.4. Ellenállásváltozás mérése

Az RC/ITO komplex fényindukált ellenállásváltozásának mérése Keithley 2400s típusú multiméterrel történt hét digit felbontással. A mérések során négy pontos mérőelrendezést használtam. Konstans 10 mA-es áramot állítottam be és mértem a feszültséget. Az adatokat ohm mértékegységben adtam meg. A vizsgálatokhoz a Gingl Zoltán kutatócsoportja által kifejlesztett szoftveren (<http://www.noise.physx.u-szeged.hu/>) kisebb módosításokat végeztem, amely egy számítógép USB portján keresztül irányította a méréseket. A mintát egy 250 W-os wolframszálas lámpával világítottam meg és 400 nm középponti hullámhosszú, 100 nm félértékszélességű sávszűrőt alkalmaztam [34]. A gerjesztőfény infravörös komponensét vízlencse alkalmazásával kiszűrtem. A gerjesztő fényt vízlencse alkalmazásával vetítettem a mintára, így annak infravörös komponensét is kiszűrtem.

4.2.5. Elektrokémiai mérések

Az elektrokémiai mérésekhez egy általam, speciálisan erre a feladatra tervezett és kivitelezett elektrokémiai cellát használtam. A méréseket klasszikus háromelektrodos elrendezésben végeztem: munkaelektrodként ITO-t, ellenelektrodként platinát, referenciaként pedig Ag/AgCl elektródot használtam (2. ábra).



2. ábra

Az elektrokémiai cella sematikus ábrája.

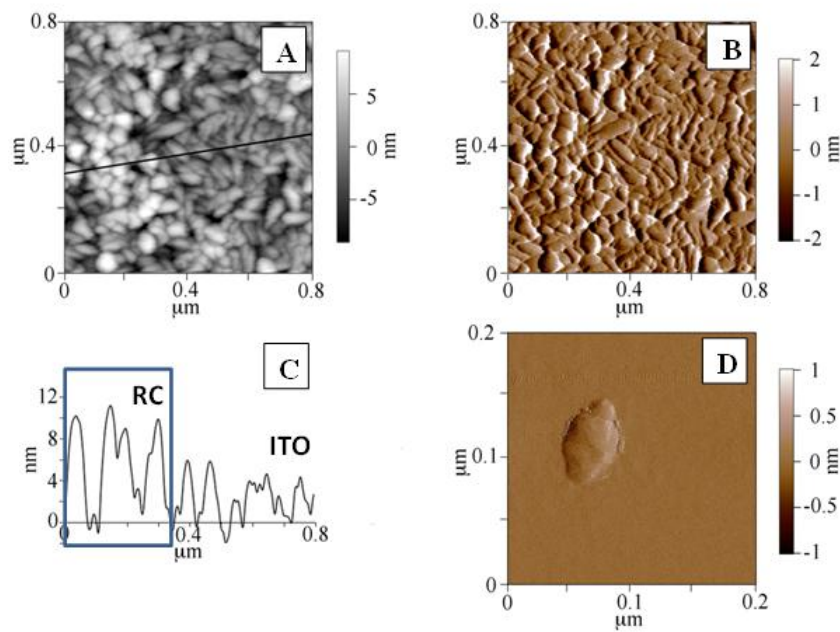
Az RC-t a munkaelektroódhoz PTAA-n keresztül kötöttem, amely egyszerre szolgál keresztkötőként és teremt elektromos kapcsolatot az ITO és a RC között. Mediátorként vízőldékony UQ-0-t (2,3-Dimetoxi-5-metil-1,4-*p*-benzokinon) alkalmaztam, mely széles körben alkalmazott mediátora a RC-nak a természetes UQ-10 mediátor mellett [42]. A mérések során a mintát egy 150 W teljesítményű wolframszálas lámpával gerjesztettem, melynek fényét optikai szál segítségével vezettem a mintára.

5. Eredmények és kiértékelésük

5.1. Strukturális mérések

5.1.1. AFM

A 3. ábrán a RC/ITO komplexről készült AFM felvétel látható. A tiszta ITO felszín mikrokristályos szerkezetű és kis felületi egyenetlenségeket (3,5-5 nm) mutat. A minta RC-mal borított részének felületi egyenetlensége jelentősebb, az itt mérhető magasságok (körülbelül 10 nm) jó egyezést mutatnak a reakciócentrum irodalomban fellelhető méretével [30, 41].

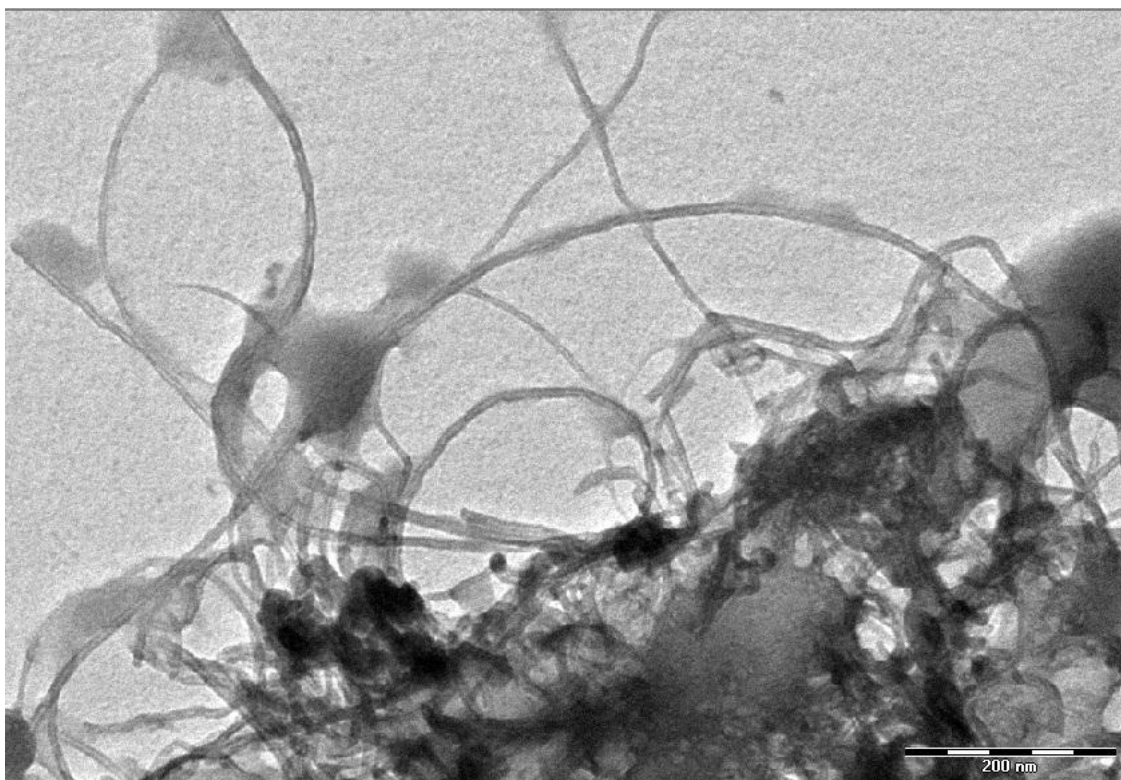


3. ábra

ITO felszínéről AFM-mel készített amplitúdó (A) és fáziskép (B). A minta egy része RC-mal borított. A mérések AC módban száraz körülmények között zajlottak. A magasságkép (C) helye az (A) ábrán jelölve van. A (D) ábra egy mica felszínen lévő külön álló RC-t mutat. (A felvételeket Nagy Krisztina készítette Dr. Váró György (MTA SZBK) laboratóriumában.)

5.1.2. TEM

A RC/PTAA/MWNT komplex kialakulásának igazolására TEM képeket készítettünk. A képen jól elkülöníthetők a szén nanocsövek és az őket fátýolszerűen beborító PTAA polimer (4. ábra).



4. ábra

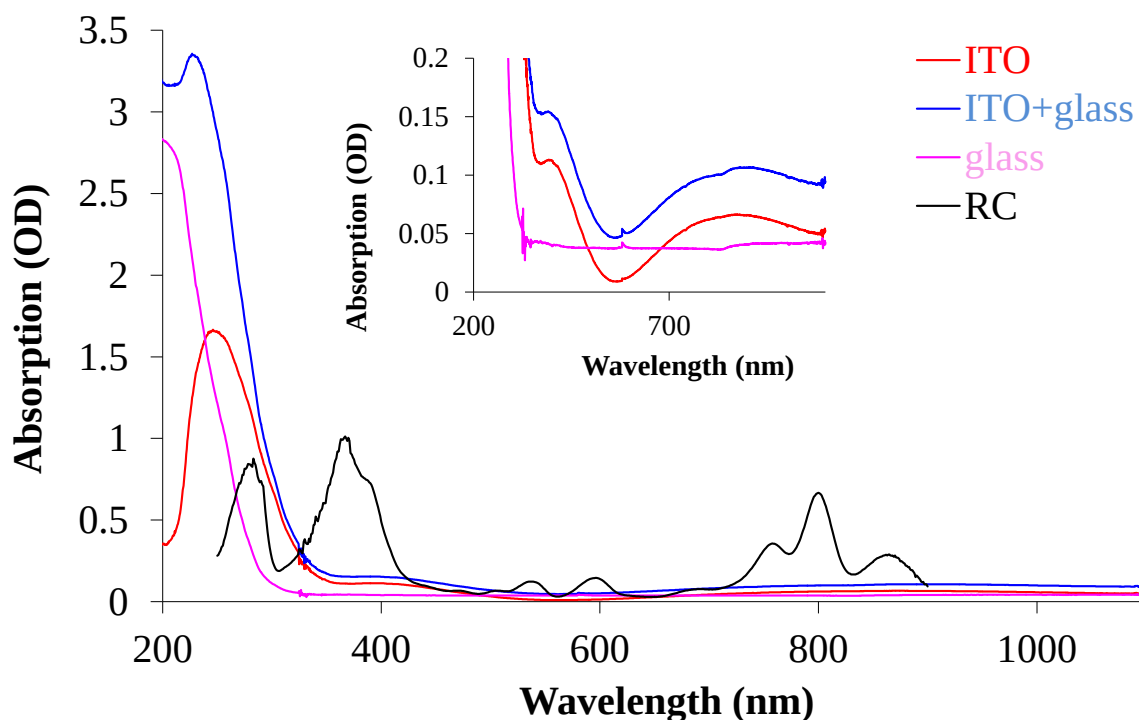
RC/PTAA/MWNT komplexről készített TEM kép.

5.2. RC/ITO komplexen végzett spektroszkópai mérések

5.2.1. Egyensúlyi fényabszorpció mérése

Az RC/ITO komplex optikai spektrumának meghatározása két okból is fontos lehet. Egyrésről az abszorpciós koefficiens segítségével az anyag tulajdonságai becsülhetők [44-46]. A rétegvastagság, elektromos vezetési tulajdonságok ismeretében a rendszer sávszerkezete meghatározható. Ezekkel az ismeretekkel ebben a pillanatban nem rendelkezünk, de célunk ezek megismerése is.

Másrésről a RC karakterisztikus fényelnyelésekkel rendelkezik a spektrum kék és a közeli infravörös tartományában. A 400 nm-es tartományban mind a RC mind az ITO rendelkezik fényelnyeléssel (5. ábra). A rendszert ezen hullámhosszú fénnel gerjesztve egyszerre keltünk P^+Q^- töltéspárt és gerjesztünk elektronokat az ITO-ban.



5. ábra

ITO, ITO üveg hordozón, az üveg hordozó és RC abszorpciós spektruma UV, látható és a közeli infravörös tartományban. Az üveg hordozót az ITO réteg lemaratásával nyertük. A maratást tömény kénsav és hidrogén peroxid 3:1 arányú elegyével végeztük. Az ITO spektrum az ITO+üveg és a lemaratott hordozó spektrumának különbségeként adódik.

A beszűrt ábra a látható tartományban felvett spektrum kinagyítása. A fekete görbe a folyadék fázisban LDAO micellákba zárt RC spektrumát ábrázolja.

A TCO anyagok ellenállását két mechanizmus határozza meg. Az ITO-ban az oxigének elektron donorként működnek és az indiumban lévő ón szennyezés is biztosít elektronokat. Ezen anyagok vezetési tulajdonságait nagyban befolyásolja a szemcseméret és rétegszerkezet, ezáltal a készítési eljárás és a minta előélete, mely az UV-ben mért optikai spektrumok alapján meghatározható [45-48].

5.2.2. Fényabszorpció kinetikai mérése

A 6. ábra a RC 771 nm-en mért fényindukált abszorpcióváltozásának kinetikáját mutatja különböző kísérleti körülmények között. A RC/ITO kompoziton mért eredmények kiértékeléséhez a boroszilikát üveglapra szárított RC és az oldatban lévő micellába

ágyazott RC mintákat használtam referenciaként. A 771 nm-en mért tranziens abszorpcióváltozás, mely a fehérjén belüli bakteriofeofitin elektrokróm eltolódását jellemzi, a környezetében bekövetkező elektrosztatikus relaxációkról adhat felvilágosítást [30, 32, 39]. Az elektrokróm eltolódás adódhat abból, hogy a feofitin környezetében a redox-aktív kofaktorok között tényleges (intrinsic) elektrontranszport van, illetve a kofaktorok környezetében lévő aminosavakon levő parciális töltések átrendeződnek. (Pl. másodlagos kötőerők (hidrogénhidak, elektrosztatikus kölcsönhatások) átalakulnak, konformációs mozgások miatt a töltések közötti távolságok megváltoznak.) Ezek a változások a bakteriofeofitin abszorpciójában változást okoznak, időbeli változásuk így követhető.

Az időablak igen széles (6 nagyságrendet ölel fel), így mind a $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow P^+Q_AQ_B^-$ elektrontranszfer és a vele járó reakciók (előre irányuló elektrontranszfer, melynek eredménye a töltések szétválasztódása, gyors fázis időállandója a k_{AB}), mind a $P^+Q^- \rightarrow PQ$ töltés rekombináció (lassú fázis, időállandója a k_{AP} , ha a töltésrekombináció a $P^+Q_A^-$, illetve k_{BP} , ha a töltésrekombináció a $P^+Q_AQ_B^-$ állapotból történik) követhető egyetlen ábrán. Az időtengely az ábránkon logaritmusos skálázású. Mind a gyors, mind a lassú fázis jól elkülöníthető további lassú és gyors ($k_{AB,fast}$ és $k_{AB,slow}$ az előre menő elektrontranszfer, és k_{AP} és k_{BP} a töltésrekombinációs) fázisokra. Az idő felbontása oldat esetén néhány mikroszekundumra, száraz minta esetén néhány tíz mikroszekundumra limitált, főként a fényszórásnak köszönhetően.

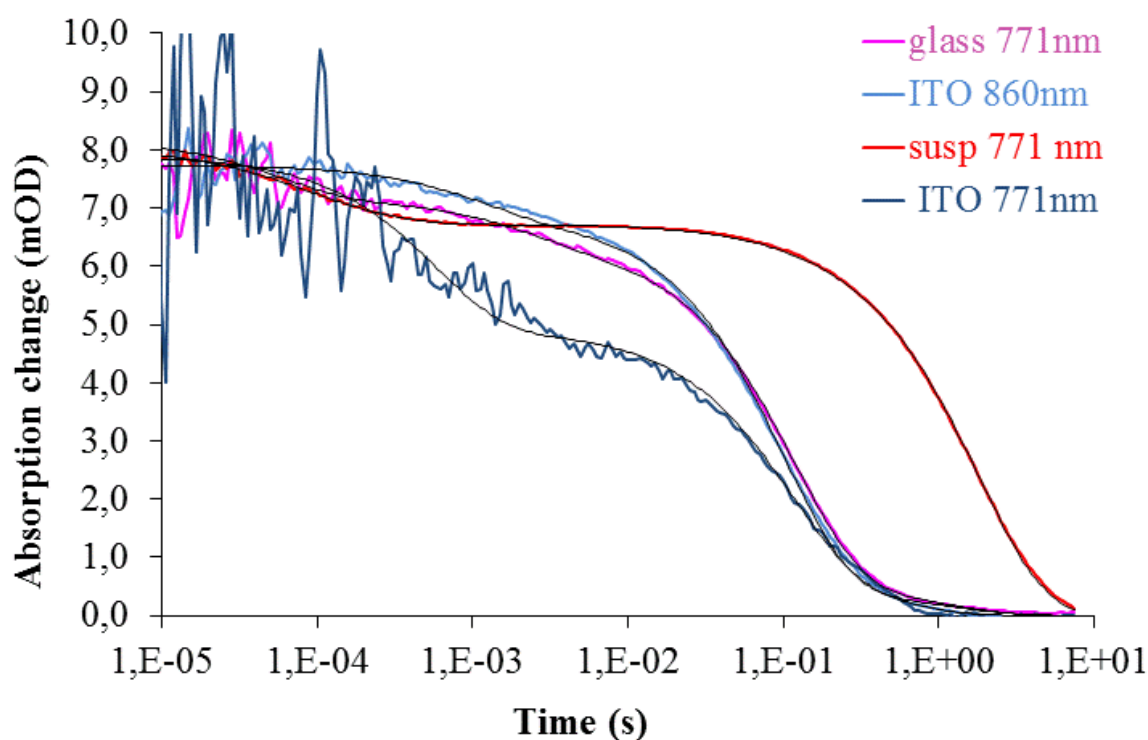
A mért görbéket elsőrendű kinetikák összegeként analizáltam, amely $A(t) = A_i \exp(-k_i t)$ alakú, ahol $A(t)$ a jel amplitúdója az idő függvényében (t), k_i és A_i pedig a jel i -edik komponensének időállandói és részarányai. A multiexponenciális bontás kinetikai paraméterei (amplitúdók és részarányok) az 1. táblázatban láthatók.

Habár az elektrontranszport és a fehérje dinamika kapcsolata számos érdekes munka tárgyát képezi [49, 50], még mindig nem világos, hogy melyik változás befolyásolja a fehérjén belüli elektrontranszportot. Nyilvánvaló, hogy az elektrontranszfer fehérjén belüli parciális töltések átrendeződésével és/vagy hidrogénkötések módosulásával jár fehérjén belül [27] és a konformációs változások limitálják az elektrontranszfert [39, 40, 51]. A flash-gerjesztést követő fehérje relaxáció széles tartományt fed le (100 ms-ig), ahogy azt a késleltetett fluoreszcencia mérések is mutatják [52].

A 771 nm-en mért abszorpcióváltozás kinetikai jellemzőit erősen befolyásolják a környezeti faktorok. Ezek közé tartozik a pH, hőmérséklet, viszkozitás és ionerősség, amelyek a konformációs változások szerepét és a hidrogénkötések hálózatának újrarendeződését jelzik [39, 40, 51]. Lipidkörnyezetben, az *in vivo* körülményekhez

hasonlóan a fényindukált töltéspár stabilizációjának energetikája módosul, ami termodinamikailag kontrollálja az e^- -transzfert [32, 53]. A RC szén nanocsőhöz történő kapcsolása szintén hatással van a relaxációs kinetikára különböző mechanizmussal [30, 34, 35].

A 860 nm-en mért abszorpcióváltozás közvetlenül jelzi az elsődleges donor (BChl)₂ redox állapotának változását. A 5. ábra és az 1. táblázatban szereplő illesztési paraméterek azt mutatják, hogy míg a gerjesztés után az elsődleges donor redox állapotában elhanyagolható változás van (kis változás a gyors átmenetnél 860 nm-en), addig mind a feofitin shift amplitúdója, mind részaránya nagyobb, ha a RC az ITO felületére van helyezve.



6. ábra

Rb. sphaeroides R-26-ból származó RC abszorpció változása 771 nm-en üveglapon és ITO felszínen telítési lézerpulzus után. Az eredmények kiértékeléséhez referenciaként az ITO felületre szárított reakciócentrum 860 nm-en mért és a RC 771 nm-en oldatban mért abszorpcióváltozását tüntettem fel. A fekete görbék az illesztett görbéket jelölik, melyek paramétereit az 1. táblázat foglalja össze.

	$(Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-)_{fast}$		$(Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-)_{slow}$		$P^+ Q_A^- \rightarrow PQ_A$		$P^+ Q_B^- \rightarrow PQ_B$		
	$A_{AB,fast}$ (%)	$k_{AB,fast}$ (s ⁻¹)	$A_{AB,slow}$ (%)	$k_{AB,slow}$ (s ⁻¹)	$A_{fast} + A_{slow}$	A_{AP} (%)	k_{AP} (s ⁻¹)	A_{BP} (%)	k_{BP} (s ⁻¹)
susp	9.1	1.5E+4	7.3	4699	16.4	2.4	8.3	81.3	0.56
glass	12.5	1.7E+4	9.3	448	21.8	71.8	8.5	6.5	0.89
ITO771	n.r.	n.r.	39.9	1711	39.9	53.1	9.9	9.1	1.92
ITO860	n.r.	n.r.	11.6	868	11.6	82.7	10	5.7	0.86

1. táblázat

Telítési lézerimpulzus utáni abszorpció kinetikai mérések (5. ábra) illesztéseinek paraméterei.

A nagyobb fényszórásnak köszönhetően nem tudtuk feloldani az ITO/RC minta gyors fázisának két kinetikai komponensét ($k_{AB,fast}$ és $k_{AB,slow}$), ami oldatban megtehető, de tisztán látszik, hogy az előre irányuló elektron transzfer aránya, k_{AB} , jelentősen megnövekedett az üveglapra szárított RC-ban mérhetőhöz képest. $k_{AB, lassú} = 448 \text{ s}^{-1}$ és 1711 s^{-1} üveglapon és ITO-on.

Az a tény, hogy a 771 nm-en mért abszorpcióváltozás nem jár együtt a 860 nm-es változással azt mutatja, hogy a RC és az ITO közötti kölcsönhatás sokkal inkább a fehérje és az ITO közötti elektrosztatikus kölcsönhatás megváltozásán alapul, mint esetleg redox (oxidációs/redukciós) folyamatok következményén a fénnel való gerjesztés után.

Ellentmondás látszik abban, hogy míg az ITO esetében jelentős részarányban látszik a Q_A^- -ről Q_B^- -re előreirányuló elektrontranszfer, k_{AB} , a töltésrekombinációs fázis ($P^+ Q^- \rightarrow PQ$) begyorsul, mintha nem lenne másodlagos kinonaktivitás. A jelenség ésszerű magyarázatára több hipotézisünk is lehet, ebben a pillanatban nem tudjuk, mi a tényleges magyarázat. Ilyen okok lehetnek: 1) Nem tudjuk, hogy oldatban ugyanannyi, és ugyanúgy változik-e az extinkciós koefficiens, mint a szárított mintában. Valószínűleg nem. 2) Oldatban a kinetikát befolyásolja a kinonleválás/bekötődés kinetikája is, ami nyilvánvalóan nincs jelen szárított mintában. 3) Az előreirányuló elektrontranszfer hajtóereje az elsődleges és a másodlagos kinonok közötti ΔG szabadenergiakülönbség, ami a kinonok kémiai természetén kívül azok környezetétől is függ, például erősen befolyásolja a

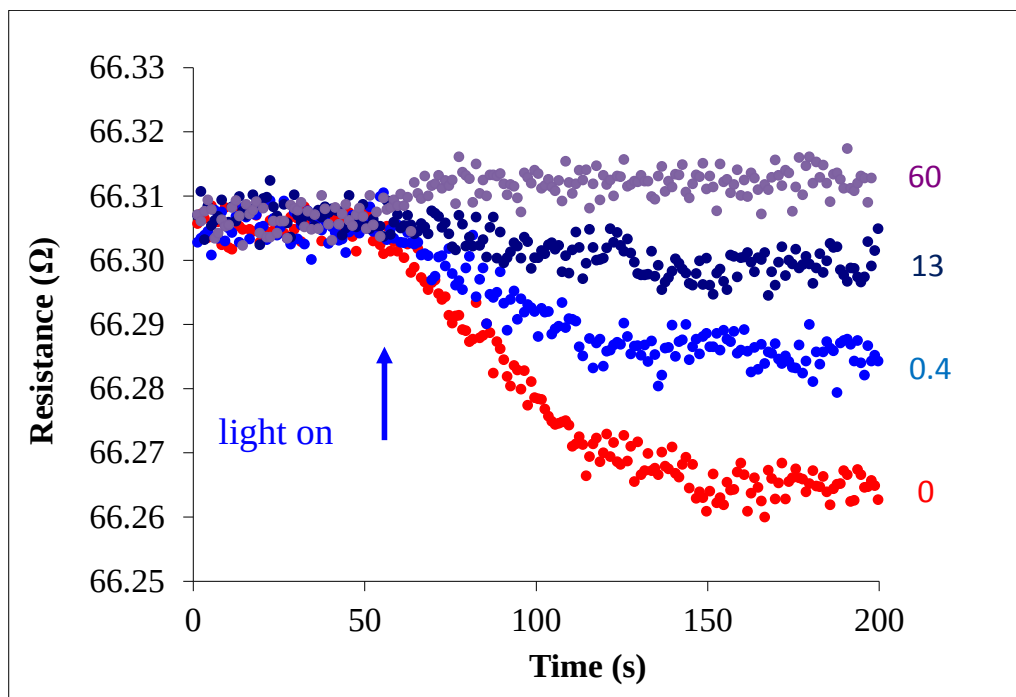
lipidkörnyezet is [32]. Nem lenne meglepő, ha ez az oldatbeli és a szárított mintában különbözne.

5.3. Elektromos tulajdonságok

Annak érdekében, hogy feltérképezsem az ITO és a RC közötti kölcsönhatás természetét, mértem az ITO hordozó fényindukált ellenállásváltozását. A mérések négy pontos elrendezésben történtek. A mintára 10 mA áramot kapcsoltam és a feszültséget mértem folytonos kék gerjesztő fény mellett (400 nm, 7-8. ábra).

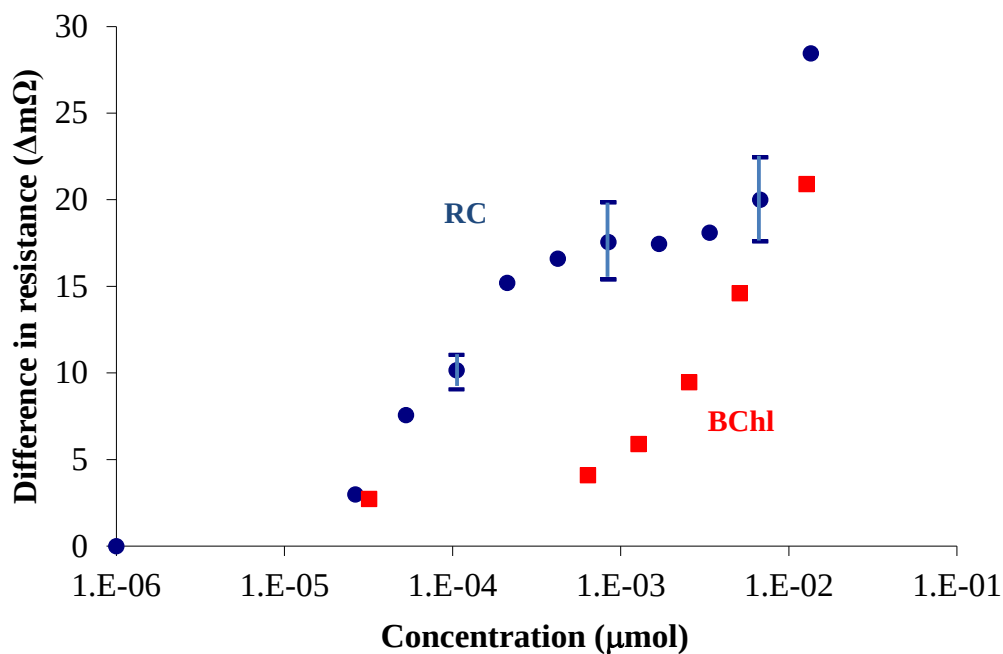
Az üres (fehérjével nem fedett) ITO ellenállása kék gerjesztő fény hatására csökken. RC-ot elhelyezve a felszínen a változás kisebb, mely a felvitt RC koncentrációval változik. A koncentráció növelésével a jel szigmoid telítési jelleget mutat. Ha a reakciócentrum fehérjét 10 nm átmérőjű gömbökkel közelítjük és szoros illeszkedést feltételezve kiszámítjuk a monoréteghez tartozó fehérje mennyiségét, akkor a számolt fehérje mennyiség jó egyezést mutat a görbe telítési szakaszához tartozó fehérje mennyiséggel. A koncentráció további növelésével az ellenállásváltozás újból növekedni kezd.

A referenciaként használt bakterioklorofill az elnyelt gerjesztési energiát hő formájában sugározhatja szét, így a rendszer hőmérséklet változása arányos a hő disszipációval [54]. A mérések ezt az arányosságot igazolják, az ITO ellenállás változása arányos a hőmérséklettel ezen a hőmérsékleti tartományon. Ezek az eredmények arra a következtetésre juttattak, hogy az BChl/ITO komplex ellenállás változását csak a hődisszipáció okozza. A telítési szakaszt követően a RC-ot és a fotokémiaiilag inaktív bakterioklorofillt tartalmazó mintákon mérhető jel jó egyezést mutat, ami a fenti hipotézisünket látszik igazolni.



7. ábra

Az ITO ellenállása az idő függvényében (0 μM) és különböző mértékű (0,4 μM , 13 μM , 60 μM) RC borítás esetén folytonos fénygerjesztés hatására. A fény bekapcsolását a nyíl mutatja. A gerjesztő fény 400 nm hullámhosszú és $3,2 \text{ W/cm}^2$ intenzitású volt.



8. ábra

Az ITO ellenállásváltozása a rávitt RC (kék) és bakterioklorofill (piros) koncentrációjának függvényében.

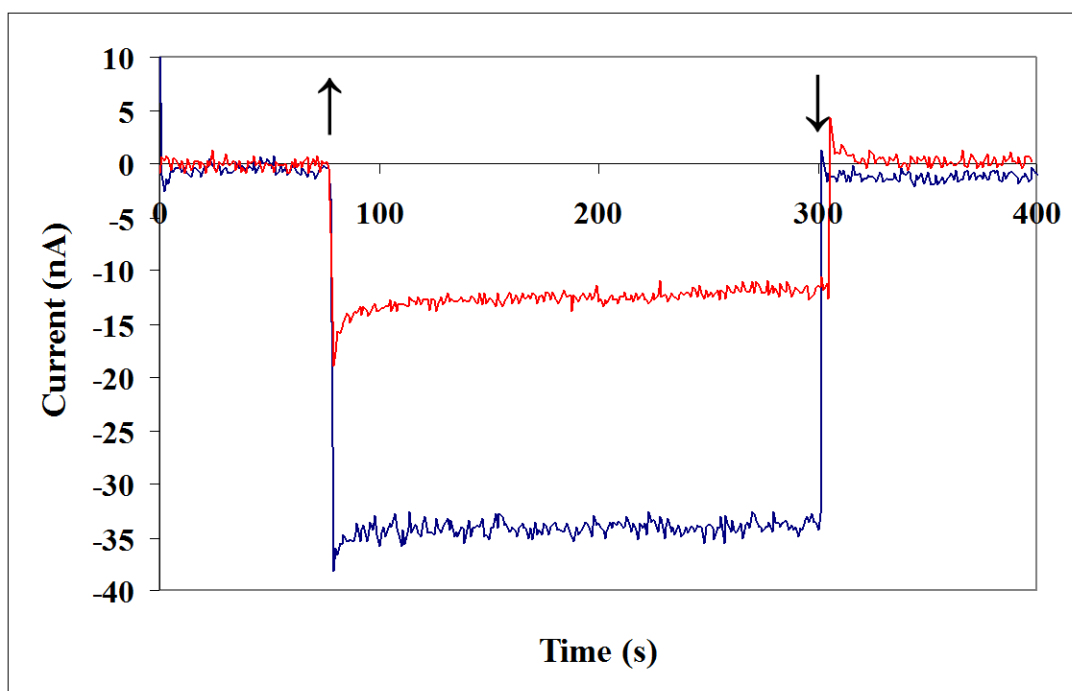
A RC/ITO komplex ellenállásváltozása nem monofázikus. A 400 nm-es kék fény mind a RC-t mind az ITO-t gerjeszti. A gerjesztett elektronok és a fehérje fotoaktív kofaktorai kölcsönhatásba kerülhetnek, amely megmutatkozik a rendszer ellenállásváltozásában. Ha a felhasznált fehérje mennyiségét növeljük, akkor a minta felszínén a fehérje rétegződik, ezáltal a hő disszipáció hatása fogja dominálni a mérhető jelet.

5.4. Fény indukált áramok mérése elektrokémiai cellában

Az elektrokémiai méréseket egy speciális cellában végeztem háromelektrodos elrendezésben, amelyet ezekhez a mérésekhez terveztem. Minden mérést sötétben beállt nyitott áramköri potenciálon végeztem. A rendszert egy 150 W teljesítményű wolframszálas lámpa fehér fényével gerjesztettem, amelynek a fényét száloptikával vezettem a mintára. A 9-11. ábrák az ITO munkaelektrodon lévő PTAA, RC/PTAA és RC/PTAA/MWNT komplex fotokémiai aktivitását mutatják.

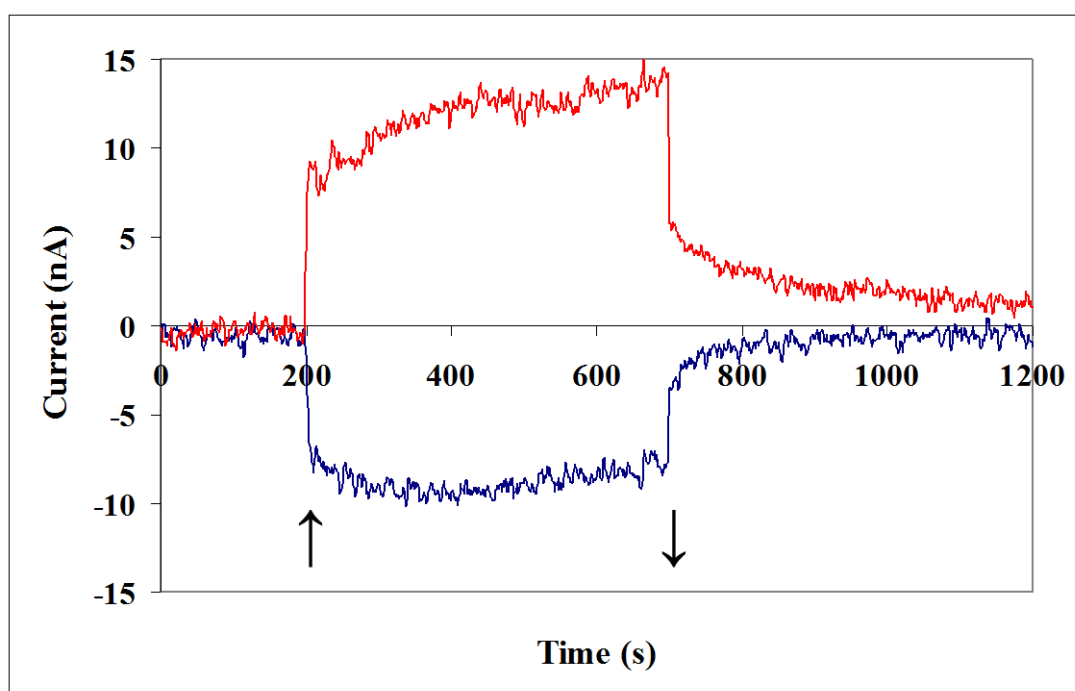
A PTAA-t fehér fénnel megvilágítva a rendszerben fény által generált áram mérhető. Ennek oka, hogy a méréseket oxigén jelenlétében végeztem. A jelen levő oxigén a gerjesztett PTAA-nak mediátora tud lenni, így katódos fotoáram alakul ki a rendszerben. Az oxigénmolekulák elektront képesek felvenni, redukálódnak. UQ-0 mediátor hozzáadásával újabb mediátor komponens lép be a folyamatba, melynek hatása meg is mutatkozik a fotoáram nagyságában (9. ábra). Amellett, hogy az oxigén jelenléte ilyen irányú áram létrejöttét igazolja, a mérés nitrogén atmoszférában történő megismétlése mindenképp hasznos lenne, mely további munka tárgyát fogja képezni.

RC/PTAA komplex-szel borított ITO munkaelektrod esetén a mérhető fotoáram jelentős eltérést mutat UQ-0 jelenlétében. A kezdetben katódikus áram mediátor jelenlétében anódikussá válik (10. ábra), ami a redukált kinon keletkezésére utal a RC fotokémia során. A mérésekhez UQ-10-zel rekonstruált RC-ot használtunk, tehát a RC másodlagos kinonkötő helyén nagy valószínűséggel a természetes UQ-10 található. Az UQ-0 az alkalmazott koncentrációban nem képes az UQ-10-et kiszorítani a helyéről (sem annak oxidált, sem redukált formájában), de képes a RC és az elektrodok közötti elektrontranszfer mediálására. A folyamat során keletkezett redukált UQ-0 lehet az anódikus áram megjelenésének magyarázata.



9. ábra

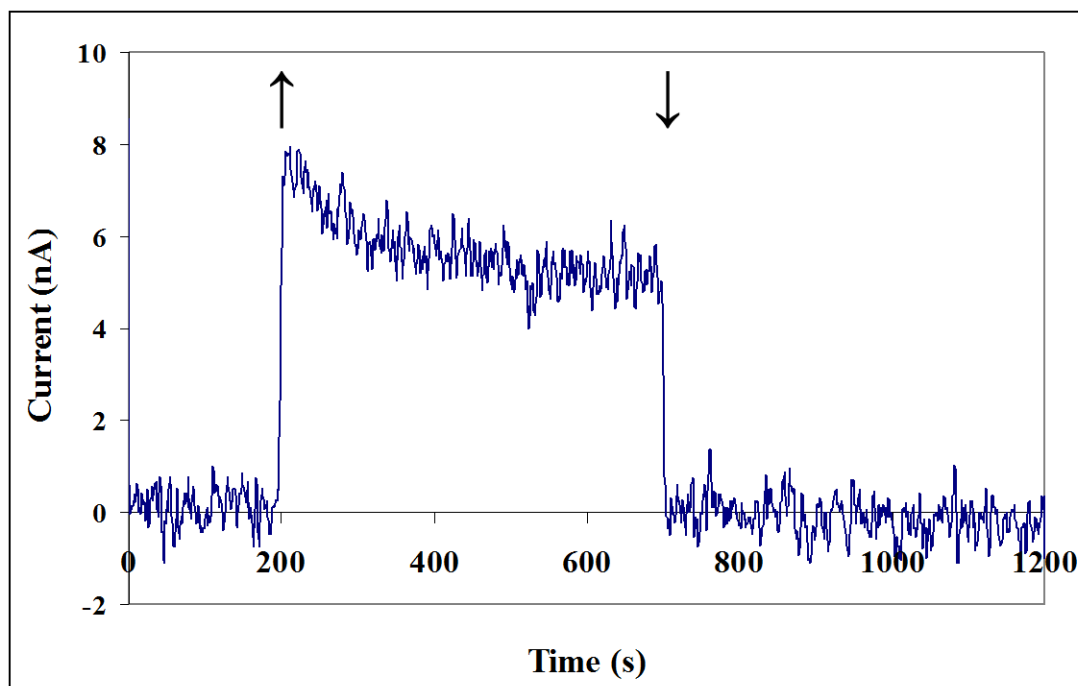
PTAA-val borított ITO munkaelektroddal mért fotoáram mediátor nélkül (kék) és UQ-0 mediátor alkalmazásával (piros). A gerjesztőfény be- és kikapcsolását az ábrán jelöltem.



10. ábra

RC/PTAA komplex-szel borított ITO munkaelektroddal mért fotoáram mediátor nélkül (kék) és UQ-0 mediátor alkalmazásával (piros). A gerjesztőfény be- és kikapcsolását az ábrán jelöltem.

Az ezt követő mérés arra irányult, hogy kapok-e fotoáramot, ha a kompozitba szén nanocsöveket építünk. Az ITO felületre helyezett RC/PTAA/MWNT kompozit is generál fotoáramot, bár meglepő módon az RC/PTAA-val ellentétben az áram anodikus jellegű (11. ábra). Ennek a magyarázatát ebben a pillanatban még nem ismerjük, a további kísérleteink a jelenség okának kiderítésére irányulnak.



11. ábra

RC/PTAA/MWNT komplex-szel borított ITO munkaelektróddal mért fotoáram mediátor nélkül. A gerjesztőfény be- és kikapcsolását az ábrán jelöltem.

6. Összegzés

Munkám során fotoszintetikus reakciócentrum fehérjéből és átlátszó vezető oxidból, ITO-ból készített bio-nanokompozitok tulajdonságait vizsgáltam, spektroszkópiai, vezetőképesség mérési és elektrokémiai módszerek felhasználásával.

Eredményként megállapítható, hogy a RC a kompozitban fotokémiai aktivitását nagy mértékben megtartja, még a szárított minták esetében is. A bakteriofeofitin elektrokróm eltolódásához rendelhető abszorpcióváltozás során mind az amplitúdó és az időállandó megváltozása arra utal, hogy az ITO jelenléte befolyásolja a töltésáramlást és a -relaxációs

folyamatokat is a fehérjében. A RC/ITO komplex ellenállásváltozása csökken, amely a vezető oxid és a fehérje közötti direkt elektrontranszferrel is magyarázható. Az eljárás érzékenysége igen nagy, néhány pikomol RC mérhető fényindukált ellenállás változást okoz.

Megállapítható, hogy képesek vagyunk RC-okat PTAA-n keresztül MWNT-hez kötni, a komplex a preparálás után is megőrzi aktivitását és elektrokémiai cellába helyezve a rendszerben fény által generált, ún. fotoáram mérhető.

Ezen bio-nanokompozit modellként szolgálhat új generációs alkalmazások számára, például az integrált optoelektronikai eszközök területén.

7. Tovább lépés lehetőségei

Az ellenállásmérés időfeloldása a folyamatok időállandóihoz képest igen durva volt (s nagyságrendű), így csak „kvázi” steady-state vizsgálatokra adott lehetőséget, finomabb kinetikai vizsgálatokra semmiképpen sem. Folyamatban van egy hasonló pontosságú, de jelentősen nagyobb mintavételezési frekvenciájú mérőrendszer megtervezése és megépítése, amellyel kinetikai mérésekre is lehetőség nyílik.

Az elektrokémiai mérések során a fehérje orientációjának kulcsszerepe van, jelenleg dolgozunk speciálisan orientált kötések kidolgozásán.

Napjainkban kiterjedt kutatások folynak az ITO más transzparens elektróddal való helyettesítésére. Erre egyik lehetőség a szén nanocső vagy grafén alapú elektródok alkalmazása. Kutatócsoportunk is lépéseket tett szén alapú transzparens, vezető elektródok alkalmazására.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Nagy Lászlónak témavezetőmnek és Magyar Melinda társtémavezetőmnek (SZTE TTIK Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézet) a munkám elkészítéséhez nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Gingl Zoltánnak (SZTE TTIK Műszaki Informatika Tanszék) a digitalizálás során nyújtott segítségét és hasznos mérés technikai tanácsait.

Köszönöm Dr. Visy Csabának és Endrődi Balázsnak és Bencsik Gábornak (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) az elektrokémiai mérések elvégzéséhez adott hasznos szakmai tanácsaikat.

Köszönöm Nagy Krisztinának (MTA SZBK) az AFM képek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Németh Zoltánnak (SZTE TTIK Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék) a TEM képek készítése során nyújtott segítségét.

8. Irodalomjegyzék

- [1] R.P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 8438.
- [2] Z. Liu, A.C. Fan, K. Rakhra, S. Sherlock, A. Goodwin, X. Chen, Q. Yang, D.W. Felsher, H. Dai, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 7668.
- [3] D. Pantarotto, J.P. Briand, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Comm.* 1 (2004) 16.
- [4] N.W.S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 6021.
- [5] Y. Liu, D.C. Wu, W.D. Zhang, X. Jiang, C.B. He, T.S. Chung, S.H. Goh, K.W. Leong, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 4782.
- [6] A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, T.-J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B.P. Khuri-Yakub, S.S. Gambhir, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 557.
- [7] C.G. Granqvist, A. Hultaker, *Thin Solid Films* 411 (2002) 1.
- [8] S. Lany, A. Zunger, *Phys. Rev. Lett.* 98 (2007) 045501.
- [9] T.H. Chou, K.Y. Cheng, T.L. Chang, C.J. Ting, H.C. Hsu, C.J. Wu, J.H. Tsai, T.Y. Huang, *Microelectron. Eng.* 86 (2009) 628.
- [10] M. Nagasaka, K. Yosida, S. Takahashi, K. Sato, J. Anzai, *Mat. Sci. Engineering, C* 31 (2011) 258.
- [11] C.D. Müller, A. Falcou, N. Reckefuss, M. Rojahn, V. Wiederhirn, P. Rudati, H. Frohne, O. Nuyken, H. Becker, K. Meerholz, *Nature* 421 (2003) 829.

- [12] G. Gozzi, D.L. Chinaglia, T.F. Schmidt, o.N. Oliveria Jr., *Mat. Sci. Engineering, C* 31 (2011) 969.
- [13] B. O'Regan, M. Grätzel, *Nature* 353 (1991) 737.
- [14] G. Bencsik, Zs. Lukacs, Cs. Visy, *Analyst* 135 (2010) 375.
- [15] P.S. Toth, Cs. Janaky, Z. Hiezl, Cs. Visy, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 3447.
- [16] A. Uygun, L. Oksusz, S. Chowdhury, V. Bhethanabotla, *Mat. Sci. Engineering, C* 30 (2010) 868.
- [17] S.A. Kumar, H.W. Cheng, S.M. Chen, S.F. Wang, *Mat. Sci. Engineering, C* 30 (2010) 86.
- [18] K. Hajdu, Cs. Gergely, M. Martin, T. Cloitre, L. Zimányi, K. Tenger, P. Khoroshyy, G. Palestino, V. Agarwal, K. Hernádi, Z. Németh, L. Nagy, *Langmuir*, 28 (2012) 11866.
- [19] M. Darder, P. Aranda, E. Ruiz-Hitzky, *Advanced Materials*, 19 (2007) 1309.
- [20] L. Fabian, Zs. Heiner, M. Mero, M. Kiss, E.K. Wolff, P. Ormos, K. Osvay, A. Der, *Optics Express* 19 (2011) 18861.
- [21] N. Vsevolodov, *Biomolecular electronics*, Birkhauser, Boston, 1998.
- [22] A. Der, S. Valkai, L. Fabian, P. Ormos, J.J. Ramsden, E.K. Wolff, *Photochem. Photobiol.* 83 (2007) 393.
- [23] Y. Lu, Y. Xu, B. Liu, J. Kong, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1173.
- [24] R.J. Cogdell, J.G. Lindsay, *Tibtech.* 16 (1998) 521.
- [25] F. Milano, M. Trotta, M. Dorogi, B. Fischer, L. Giotta, A. Agostiano, P. Maroti, L. Kalman, L. Nagy, J. Bioenerg. Biomembr. 44 (2012) 373.

- [26] C.A. Wraight, R. Clayton, *Biochim. Biophys. Acta.* 333 (1974) 246.
- [27] P. Sebban, P. Maroti, M. Schiffer, D. Hanson, *Biochemistry* 34 (1995) 8390.
- [28] J.P. Allen, J.C. Williams, *FEBS Lett.* 438 (1998) 5.
- [29] C.A. Wraight, *Frontiers Biosci.* 9 (2004) 309.
- [30] M. Dorogi, Z. Balint, Cs. Miko, B. Vilenó, M. Milas, K. Hernadi, L. Forró, Gy. Varó, L. Nagy, *J. Phys. Chem., B* 110 (2006) 21473.
- [31] M. Trotta, F. Milano, L. Nagy, A. Agostiano, *Mater. Sci. Eng., C* 22 (2002) 263.
- [32] L. Nagy, F. Milano, M. Dorogi, M. Trotta, G. Laczko, K. Szebenyi, Gy. Varó, A. Agostiano, P. Maroti, *Biochemistry* 43 (2004) 12913.
- [33] N. Lebedev, S.A. Trammell, S. Tsoi, A. Spano, J.H. Kim, J. Xu, M.E. Twigg, J.M. Schnur, *Langmuir* 24 (2008) 8871.
- [34] K. Hajdu, T. Szabo, M. Magyar, G. Bencsik, Z. Nemeth, K. Nagy, L. Forró, Gy. Varó, K. Hernadi, L. Nagy, *Phys. Status Solidi, B* 248 (2011) 2700.
- [35] M. Magyar, K. Hajdu, T. Szabo, K. Hernadi, A. Dombi, E. Horváth, L. Forró, L. Nagy, *Phys. Status Solidi, B* 248 (2011) 2454.
- [36] J. Tandori, L. Nagy, A. Puskas, M. Droppa, G. Horváth, P. Maroti, *Photosynth. Res.* 45 (1995) 135.
- [37] Z. Balint, K. Nagy, I. Laczko, S. Bottka, G.A. Vegh, Zs. Szegletes, Gy. Varó, *J. Phys. Chem., C* 111 (2007) 17032.
- [38] M. Lakatos, G.I. Groma, C. Ganea, J.K. Lanyi, G. Varó, *Biophys. J.* 82 (2002) 1687.
- [39] D.M. Tiede, J. Vázquez, J. Córdova, P. Marone, *Biochemistry* 35 (1996) 10763.

- [40] D.M. Tiede, L. Utschig, D.K. Hanson, D.M. Gallo, *Photosynth. Res.* 55 (1998) 267.
- [41] L. Nagy, K. Hajdu, B. Fisher, K. Hernadi, K. Nagy, J. Vincze, *Notulae Scientia Biologica* 2 (2010) 07.
- [42] Angela Agostiano , Maurizio Caselli, Pinalysa Cosma, Mario Della Monica (2000) *Electrochimica Acta*, 45, 1821–1828
- [43] E. Burstein, *Phys. Rev.* 93 (1954) 632.
- [44] T.S. Moss, *Proc. Phys. Soc., B* 67 (1954) 775.
- [45] H.R. Fallah, M. Ghasemi, A. Hassanzadeh, H. Steki, *Materials Research Bulletin* 42 (2007) 487.
- [46] A. El Amrani, F. Hijazi, B. Lucas, J. Bouclé, M. Aldissi, *Thin Solid Films* 518 (2010) 4582.
- [47] S. Laux, N. Kaiser, A. Zoëller, R. Goëtzelmann, H. Lauth, H. Bernitzki, *Thin Solid Films* 335 (1998) 1.
- [48] S. Luo, K. Okada, S. Kohiki, F. Tsutsui, H. Shimooka, F. Shoji, *Materials Letters* 63 (2009) 641.
- [49] G. Palazzo, A. Mallardi, M. Giustini, D. Berti, G. Venturolli, *Biophys. J.* 79 (2000) 1171.
- [50] B.H. McMahon, J.D. Müller, C.A. Wraight, G.U. Nienhaus, *Biophys. J.* 74 (1998) 2567.
- [51] M.S. Graige, G. Feher, M.Y. Okamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 11679.

- [52] Z. Filus, G. Laczko, C.A. Wraight, P. Maroti, *Biopolymers* 74 (2004) 92.
- [53] F. Milano, M. Dorogi, K. Szebenyi, L. Nagy, P. Maroti, Gy. Varo, L. Giotto, A. Agostiano, M. Trotta, *Bioelectrochemistry* 70 (2007) 18.
- [54] L. Nagy, V. Kiss, V. Brumfeld, S. Malkin, *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 81.