



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša STOŠICKI

**PRIPRAVA ENCIMA ZA ELEKTROSTATSKO  
VEZAVO NA NANODELCE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologije

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tjaša STOŠICKI

**PRIPRAVA ENCIMA ZA ELEKTROSTATSKO VEZAVO NA  
NANODELCE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologije

**ENZYME PREPARATION FOR ELECROSATIC IMMOBILIZATION  
ON NANOPARTICLES**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za fizikalno biologijo (IFB d. o. o.) v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila 16. 2. 2012 za mentorico predlagana prof. dr. Romana Marinšek Logar, za somentorja magistrskega dela dr. Aleš Lapanje, za recenzenta pa prof. dr. Tom Turk.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Aleš Lapanje

Inštitut za fizikalno biologijo

Član: prof. dr. Tom Turk

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje magistrske naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Tjaša Stošicki

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UD4 620.3 (043.2)  
KG nanotehnologija/encimi/elektrostatska vezava/LbL/nanodelci/antimikrobni učinki  
AV STOŠICKI, Tjaša  
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ LAPANJE, Aleš (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2012  
IN PRIPRAVA ENCIMA ZA ELEKTROSTATSKO VEZAVO NA NANODELCE  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
OP X, 51 str., 9 pregl., 27 sl., 52 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V nanotehnologiji je vedno bolj opazen prenos bazičnega znanja na aplikacije v medicini. Velik potencial se obeta pri uporabi nanodelcev kot antimikrobnih sredstev. Raziskave v nanomedicini potekajo predvsem na področju združevanj nanodelcev z zdravilnimi učinkovinami in antimikrobnimi sredstvi. Eno izmed takšnih sredstev je lizocim, ki v našem telesu deluje kot prva raven obrambe. V magistrskem delu smo analizirali elektrostatske lastnosti kokošjega lizocima, izboljšali elektrostatske lastnosti lizocima iz bakteriofaga lambda in prilagodili površino nanodelca, na katerega smo lizocim pritrdili. S tehniko »plast na plast« smo modificirali naboj površine nanodelcev. Na tako prevlečene nanodelce smo vezali lizocim z elektrostatskimi interakcijami. Vezavo smo preverili z merjenjem zeta potenciala. Da bi bila vezava močnejša, smo lizocim z uporabo tehnik molekularnega kloniranja gensko spremenili. V ta namen smo lizocim iz bakteriofaga lambda klonirali v komercialni vektor s his- značko in mu tako dali dodaten pozitiven naboj, ki stabilizira elektrostatsko interakcijo z nosilnim nanodelcem.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 620.3 (043.2)  
CX nanotechnology/enzymes/electrostatic binding/LbL/nanoparticles/antimicrobial effects  
AU STOŠICKI, Tjaša  
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ LAPANJE, Aleš (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master study in Biotechnology  
PY 2012  
TI ENZYME PREPARATION FOR ELECTROSTATIC IMMOBILIZATION ON NANOPARTICLES  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO X, 51p., 9 tab., 27 fig., 52 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In recent years we have seen a mayor development in nanotechnology. It has a great potential in the field of medicine. A lot of research has been done on using nanoparticles as antimicrobial agents. Especially interesting way of using nanoparticles in medicine is when they are combined with a drug or some other antimicrobial agent. One of such agents is lysozyme. Lysozyme is a part of our innate immune response. In this thesis we focused on optimization of lysozyme immobilization on calcium carbonate nanoparticles. One of the optimization steps was a preparation of nanoparticle area. We did that by using layer by layer technique. We consecutively deposited pozitively and negatively charged polymers onto nanoparticles. After every new layer we measured zeta potential which showed us how stable our solution is. We added five layers of polymers, for sixth layer we added lysozyme. Lysozyme binding was proven by the change of zeta potential. To make immobilization even stronger we decided to modify lysozyme with the use of molecular cloning techniques. We cloned lysozyme lambda in a commercial vector with his-tag that gave the enyzme an extra positive charge.

## KAZALO VSEBINE

Str.

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 LIZOCIM .....	1
1.2 NANODELCI.....	1
1.3 NAMEN DELA.....	1
1.4 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 LIZOCIM .....	2
<b>2.1.1 Zgradba, struktura in delovanje lizocima .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Optimalne razmere za delovanje lizocima .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Uporaba lizocima.....</b>	<b>3</b>
2.2 IMOBILIZACIJA ENCIMOV .....	3
<b>2.2.1 Vezava encima na nosilec .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Navzkrižne povezave med molekulami encima .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.3 Metoda zamreženja v polimerih .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.4 Inkapsulacija .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.5 Imobilizacija encimov z metodo »plast na plast« (LbL).....</b>	<b>5</b>
2.3 ZETA POTENCIAL.....	6
<b>2.3.1 Definicija zeta potenciala.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Vplivi na zeta potencial.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Merjenje zeta potenciala.....</b>	<b>9</b>
2.4 NANODELCI.....	10
<b>2.4.1 Tipi nanodelcev.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.2 Sinteza nanodelcev .....</b>	<b>11</b>
2.5 ANTIMIKROBNI UČINKI NANODELCEV .....	12
<b>2.5.1 Srebrovi nanodelci .....</b>	<b>12</b>

<b>2.5.2 Dendrimeri kot nanodelci .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.3 Liposomi .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.4 Antimikrobnii polimeri .....</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1 MATERIALI .....	15
<b>3.1.1 Mikroorganizmi.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2 Sestava gojišč .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.3 Raztopine za izolacijo plazmidne DNA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.4 Raztopine za agarozno elektroforezo .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.5 Raztopine za poliakrilamidno elektroforezo.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.6 Aparature .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.7 Kemikalije .....</b>	<b>17</b>
3.2 METODE .....	18
<b>3.2.1 Pomnoževanje gena za lizocim iz bakteriofaga lambda z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2 Kloniranje gena za lizocim iz bakteriofaga lambda v vektor TA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.3 Izolacija plazmidne DNA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.4 Molekularno kloniranje lizocima v vektor pRSET EmGFP.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5 Kontrola ligacije z reakcijo PCR na osnovi kolonije .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.6 Obarjanje DNA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.7 Defosforilacija vektorja pRSET EmGFP.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.8 Producija lizocima.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.9 Meritev zeta potenciala <i>Bacillus anthracis</i> in lizocima .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.10 Priprava delcev iz kalcijevega karbonata .....</b>	<b>26</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1 MOLEKULARNO KLONIRANJE GENA ZA LIZOCIM .....	29
4.2 PRODUKCIJA LIZOCIMA .....	34
4.3 PRIPRAVA NANODELCEV .....	35
4.4 ZETA POTENCIAL LIZOCIMA IN <i>B. anthracis</i> .....	36
4.5 PRIPRAVLJENI NANODELCI ZA VEZAVO LIZOCIMA .....	37
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>39</b>
5.1 MOLEKULARNO KLONIRANJE .....	39
5.2 PRODUKCIJA LIZOCIMA .....	41

<b>5.3 PRIPRAVA NANODELCEV IN SPREMINJANJE POTENCIJALA NA NJIHOVI</b>	
POVRŠINI .....	42
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>45</b>
<b>7 POVZETEK ( SUMMARY).....</b>	<b>46</b>
7.1 POVZETEK .....	46
7.2 SUMMARY .....	46
<b>8 VIRI .....</b>	<b>47</b>
<b>ZAHVALA</b>	

---

**KAZALO PREGLEDNIC**

Str.

Preglednica 1: Zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za lizocim v genomu bakteriofaga lambda.....	18
Preglednica 2: Reakcijska mešanica PCR-reakcije za namnoževanje gena za lizocim .....	19
Preglednica 3: Potek PCR-reakcije za namnoževanje gena za lizocim.....	19
Preglednica 4: Reakcijska mešanica ligacije lizocima v vektor PCR 2.1 TA TOPO.....	20
Preglednica 5: Restrikcijska mešanica vektorja pRSET EmGFP.....	22
Preglednica 6: Restrikcijska mešanica vektorja PCR 2.1 TA TOPO + lizocim.....	22
Preglednica 7: Pogoji reakcije PCR na osnovi kolonije .....	23
Preglednica 8: Reakcijska mešanica za defosforilacijo vektorja pRSET EmGFP .....	24
Preglednica 9: Prilagojena reakcijska mešanica defosforilacije vektorja pRSET EmGFP .	24

## KAZALO SLIK

Str.

Slika 1: 3D-model molekule lizocima (Lysozyme 2, 2012).....	2
Slika 2: Prikaz delovanja lizocima (Protopedia, 2012) .....	2
Slika 3: Primerjava celičnih sten gram pozitivne in gram negativne bakterije (povzeto po Madigan in sod., 2012). Slika prikazuje razlike v celični steni gram pozitivne in gram negativne bakterije.....	3
Slika 4: Tehnike imobilizacije encimov (Enzyme immobilisation, 2012) .....	4
Slika 5: Prikaz tehnike »plast za plastjo« za oblačenje delcev (Johnston in sod., 2006) .....	6
Slika 6: Možna stanja koloidnih sistemov (Malvern instruments, 2012).....	7
Slika 7: Prikaz drsne ravnine in zeta potenciala (Malvern Instruments, 2012).....	8
Slika 8: Zeta potencial v odvisnosti od pH-vrednosti raztopine (Malvern Instruments, 2012).....	9
Slika 9: Prikaz merjenja zeta potenciala (povzeto po BeckamCoulter, 2008) .....	10
Slika 10: Nanodelci iz silikatnega stekla (Gijs, 2008).....	11
Slika 11: Oznake naleganja začetnih oligonukleotidov lizocimF1 in lizocimR1 na genom bakteriofaga lambda .....	19
Slika 12: Načrt kloniranja lizocima iz vektorja PCR 2.1 TA TOPO v vektor pRSET EmGFP .....	21
Slika 13: Reaktor za pripravo nanodelcev (foto: Stošicki, 2012).....	26
Slika 14: Shematska predstavitev obdelave delcev kalcijevega karbonata z dodajanjem polimerov PAA in PAH.....	27
Slika 15: Produkt PCR-reakcije na agaroznem gelu .....	29
Slika 16: Restrikcija TA TOPO-vektorja + lizocim z EcoRI .....	30
Slika 17: Restrikcija vektorja pRSET EmGFP .....	30
Slika 18: Produkt reakcije PCR na osnovi kolonije za kontrolo ligacije na agaroznem gelu .....	31
Slika 19: Produkt PCR na osnovi kolonije za kontrolo ligacije na agaroznem gelu .....	32
Slika 20: Kontrolna restrikcija vektorja pRSET EmGFP za kontrolo ligacije .....	33
Slika 21: Rezultati sekvenciranja vektorja pRSET EmGFP + lizocim .....	34

Slika 22: Rast celic BL21, transformiranih z vektorjem pRSET EmGFP + lizocim, v odvisnosti od koncentracije dodanega IPTG .....	34
Slika 23: Primerjava lizatov celic BL21 z vnešenim vektorjem pRSET EmGFP glede na različne koncentracije dodanega IPTG.....	35
Slika 24: Velikost pripravljenih delcev iz kalcijevega karbonata, zmerjenih na Delsa Nano .....	36
Slika 25: Zeta potencial B. anthracis v različnih stopnjah rasti.....	36
Slika 26: Zeta potencial lizocima v odvisnosti od pH raztopine .....	37
Slika 27: Spreminjanje zeta potenciala nanodelcev z dodajanjem plasti polimerov PAH in PAA na nanodelce kalcijevega karbonata .....	38

## **OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

bp      bazni par

DNA    deoksiribonukleinska kislina

His- značka    zaporedje šetih histidinov v sekvenci proteina

GFP    zeleni flourescentni protein

IPTG    izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid

kDa    kilo dalton

LB    gojišče »Luria Broth«

MQ    Mili-Q voda (voda, obdelana z ionskim izmenjevalcem in filtrirana skozi 0,22  $\mu\text{m}$  filter pri prevodnosti višji od 18,2  $\text{M}\Omega \text{ cm}$ )

nm    nanometer

OD    optična gostota

PAA    poliakrilna kislina

PAH    polialanin hidroklorid

PBS    izotonični fosfatni pufer

PCR    verižna reakcija s polimerazo

RPM    obrati na minuto

$\zeta$       zeta

## 1 UVOD

### 1.1 LIZOCIM

Lizocim je antimikrobnii encim, ki ga proizvajajo mnogi organizmi kot prvo raven obrambe pred bakterijami. Proizvajajo ga tudi bakterije. Prisoten je v mnogih telesnih tekočinah, kot so solze, slina, človeško mleko, veliko ga je tudi v jajčnem beljaku. Njegova aktivnost se kaže v hidrolizi beta-glikozidne vezi v peptidoglikanu bakterijskih sten (Lysozyme, 2012).

Poznamo veliko različnih tipov lizocimov, v tej nalogi bo predstavljeni delo na lizocimu bakteriofaga lambda ter lizocimu jajčnega beljaka. Lizocim bakteriofaga lambda je majhnen encim s 158-aminokislinskimi ostanki in molekulsko maso 14,7 kDa. Ima enako funkcijo kot ostali lizocimi, kjub temu pa je njegov mehanizem delovanja drugačen. Za razliko od ostalih je lizocim bakteriofaga lambda transglikozilaza in ne hidrolaza (Evrard in sod., 1998). Lizocim, ki ga najdemo v jajčnem beljaku, pa je hidrolaza, sestavljena iz 129-aminokislinskih ostankov in ima molekulsko maso 14,3 kDa (Mine in sod., 2004).

### 1.2 NANODELCI

Nanodelci so drobni delci nanometrskega velikostnega razreda. V tem velikostnem redu se lastnosti konvencionalnih materialov močno spremenijo. Razlog za to je v njihovi veliko večji površini na enoto mase kakor pri večjih delcih, kar jih naredi bolj reaktivne (Vogel, 2009). Za raziskovalno delo v tej magistrski nalogi smo uporabili nanodelce iz kalcijevega karbonata. Tipično se pojavljajo v velikosti 10–80 nm, s specifično površino 30–75 m<sup>2</sup>/g (Avela in sod., 2006).

### 1.3 NAMEN DELA

Pri magistrski nalogi smo se osredotočili na optimizacijo vezave lizocima na nanodelce. S tem smo želeli oblikovati metodo za uporabo lizocima kot antimikrobnega sredstva. Z vezavo lizocima na nanodelce smo močno povečali število enot encima na enoto prostornine v primerjavi z večjimi delci, zaradi imobilizacije encima pa je tak sistem tudi bolj nadzorom.

Namen predstavljeni naloge je:

- modifikacija lizocima bakteriofaga lambda,
- izražanje funkcionalnega lizocima,
- priprava nanodelcev,
- priprava površine nanodelcev za vezavo lizocima,
- vezava lizocima na nanodelce.

### 1.4 DELOVNE HIPOTEZE

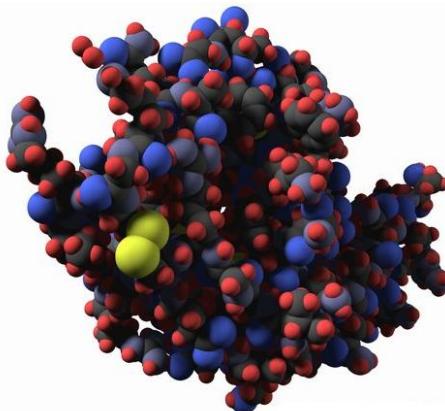
- S spremembjo naboja proteina se bo povečala vezava proteina na nanodelce zaradi elektrostatskih interakcij.
- Z uporabo nasprotno nabitih polimerov lahko ustvarimo nanodelec, oblečen v več plasti polimerov.
- Po vezavi lizocima na nanodelec se bo nanodelcu spremenil zeta potencial.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 LIZOCIM

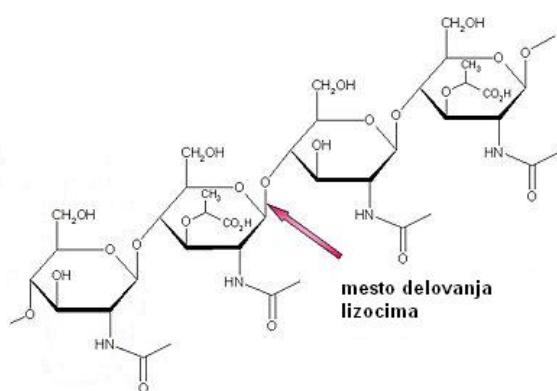
#### 2.1.1 Zgradba, struktura in delovanje lizocima

Poznamo več različnih lizocimov, ki jih delimo v različne družine in tipe na osnovi podobnosti v AK-sekvenci in 3D-strukturi. Proizvajajo ga rastline, živali, bakterije, glive, bakteriofagi in ljudje (Nakimbugwe in sod., 2005). Njegova aktivnost se kaže v hidrolizi beta-glikozidne vezi med N-acetil muraminsko kislino in N-acetil glukozaminom v peptidoglikanu bakterijskih sten (Lysozyme, 2012).



Slika 1: 3D-model molekule lizocima (Lysozyme 2, 2012)

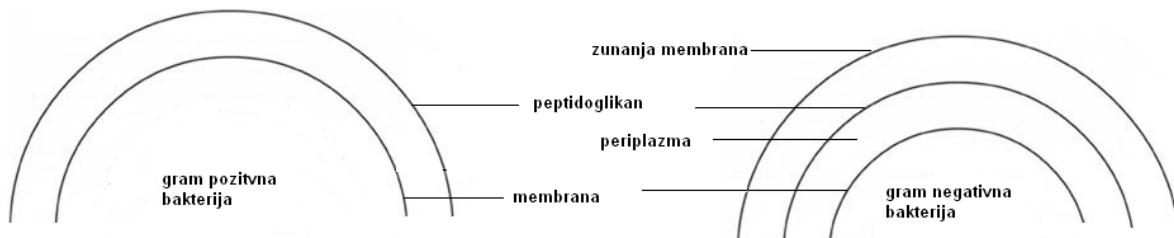
V magistrski nalogi smo se ukvarjali z lizocimom, ki izvira iz bakteriofaga lambda. Mnogi bakteriofagi proizvajajo lizocim, ki lokalno hidrolizira peptidoglikan, kar omogoči penetracijo faga oz. inducira lizo celice po končanem replikacijskem ciklu faga (Nakimbugwe in sod., 2005).



Slika 2: Prikaz delovanja lizocima (Protopedia, 2012)

Slika prikazuje mesto delovanja lizocima na molekuli peptidoglikana.

Aktivnost lizocima je močno odvisna od tipa bakterije, in sicer so v splošnem na njegovo delovanje veliko bolj občutljive gram pozitivne bakterije. Vzrok za večjo občutljivost gram pozitivnih bakterij je v zgradbi njihovih celičnih sten. Lizocim namreč v primeru gram pozitivne bakterije pride v direkten kontakt s peptidoglikanom, gram negativne bakterije pa imajo zunanjou membrano, ki ščiti peptidoglikan pred delovanjem lizocima. Obstajajo pa tudi manj občutljive gram pozitivne bakterije, ki imajo modificirano strukturo peptidoglikana (Nakimbugwe in sod., 2005).



Slika 3: Primerjava celičnih sten gram pozitivne in gram negativne bakterije (povzeto po Madigan in sod., 2012). Slika prikazuje razlike v celični steni gram pozitivne in gram negativne bakterije.

### 2.1.2 Optimalne razmere za delovanje lizocima

Aktivno mesto lizocima sestavlja dva aminokislinska ostanka, ki sta esencialna za katalizo: Glu<sup>35</sup> in Asp<sup>52</sup>. pKa-vrednosti karboksilne stranske verige teh dveh ostankov sta 5,9 in 4,5. Pri pH-vrednosti med tem dvema vrednostoma (pH 5,2) ima lizocim svoj optimum. Pri takšni pH-vrednosti je namreč Asp<sup>52</sup> večinoma deprotooniran, Glu<sup>35</sup> pa je protoniran. Pri pH-vrednosti pod 5,2 postane Asp<sup>52</sup> protoniran in aktivnost encima pada. Pri pH-vrednosti nad 5,2 pa postane Glu<sup>35</sup> deprotooniran, kar prav tako vodi do nižje aktivnosti (Nakimbugwe in sod., 2005).

### 2.1.3 Uporaba lizocima

Lizocim je poznan zaradi svojih protibakterijskih in protiglivnih lastnosti, ki so uporabne v biokemijskih in farmacevtskih aplikacijah. V molekularni biologiji ga pogosto uporabljam za ekstrakcijo in izolacijo plazmidne DNA. Veliko ga uporablajo na področju farmacije za uničevanje gram pozitivnih bakterij, uporaben je tudi za okrepitev imunskega sistema. Še posebej pa je pomemben za preprečevanje bakterijskih bolezni pri dojenčkih. Uporablja ga tudi v živilstvu za preprečevanje kvarjenja hrane (Sava, 1996).

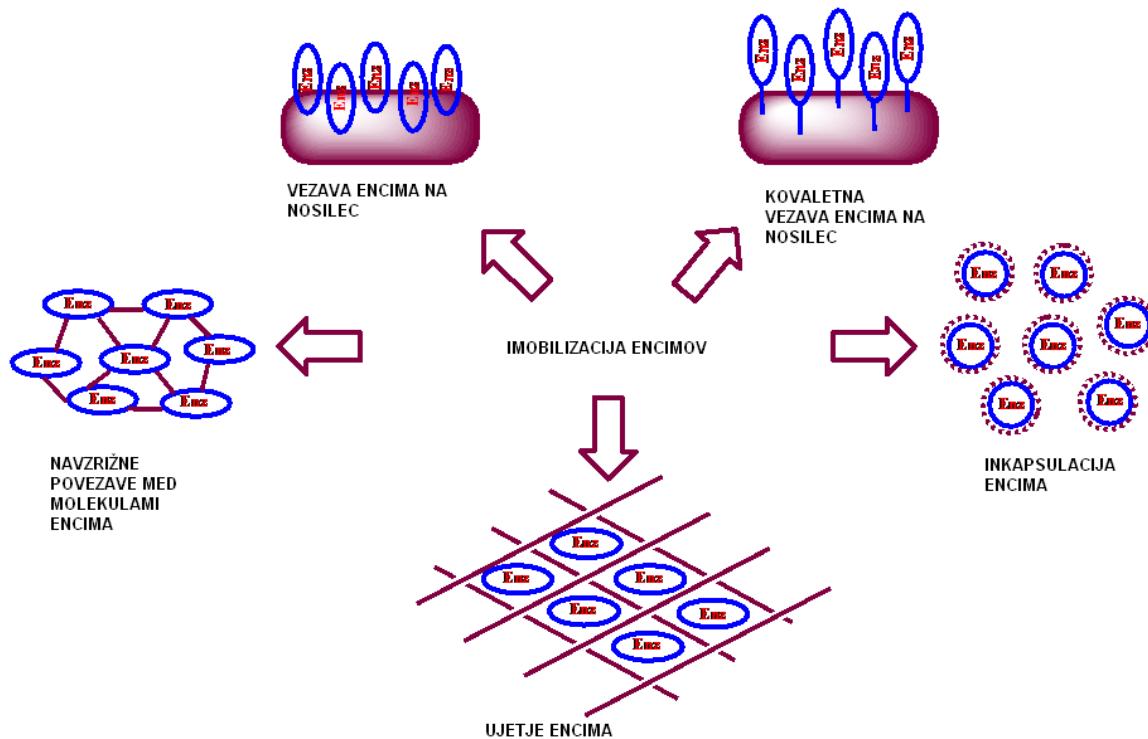
## 2.2 IMOBILIZACIJA ENCIMOV

Imobiliziran encim je encim, ki je pritrjen na trdno podporo, preko katere se pretaka substrat, ki ga encim pretvori v en ali več produktov (Chibata, 1978).

Prednosti uporabe imobiliziranih encimov so:

- večkratna oz. kontinuirna uporaba ene šarže encimov,
  - možnost hitre ustavitve reakcije z odstranitvijo encimov (in obratno),
  - z vezavo se encimi navadno stabilizirajo,
  - produkti se ne kontaminirajo z encimom,
  - cenejši procesi,
  - boljša stabilnost procesa,
  - izboljšana kontrola procesa,
  - visoko razmerje encim : substrat,
- (Enzyme technology, 2012).

V nekaterih primerih pa imobilizacija lahko privede do kemijskih in fizikalnih sprememb encima, ki poslabšajo njegovo stabilnost in zmanjšajo njegovo aktivnost. Spremenijo pa se lahko tudi lastnosti produkta (Enzyme technology, 2012).



Slika 4: Tehnike immobilizacije encimov (Enzyme immobilisation, 2012)

Na sliki so prikazane najpogosteje tehnike immobilizacije encimov: vezava encima na nosilec, kovalentna vezava encima na nosilec, inkapsulacija encima in navzkrižne povezave med molekulami encima.

### 2.2.1 Vezava encima na nosilec

Vezava na nosilec je najstarejša tehnika immobilizacije encimov. Pri tej metodi sta količina vezanega encima in njegova aktivnost odvisni od narave nosilca. Izbera primerenega nosilca je odvisna od encima samega, pa tudi od velikosti delca, površine, molarnega razmerja hidrofilnih in hidrofobnih skupin encima ter kemijske sestave. Najpogosteje uporabljeni nosilci so polisaharidi ali polisaharidni derivati, kot so: celuloza, dekstran, agarosa in poliakrilamidni gel (Enzyme technology, 2012).

Glede na način vezave encima na nosilec poznamo več metod:

- fizično adsorbcijo,
- ionsko vezavo encima na nosilec ter
- kovalentno vezavo encima na nosilec (Enzyme technology, 2012).

### 2.2.2 Navzkrižne povezave med molekulami encima

Pri navzkrižni povezavi pride do intermolekularnih povezav proteina z drugimi molekulami proteina ali s funkcionalnimi skupinami na netopnem nosilcu (Sheldon, 2007). Navadno se povežejo NH<sub>2</sub> skupine na površini encima in nosilca. Navzkrižna povezava encima samega s seboj je draga in neučinkovita, ker v tem primeru določen del encimov deluje le kot opora in ne opravlja encimske funkcije, kar vodi v zmanjšano aktivnost. Zato se navzkrižna povezava navadno uporablja v sodelovanju s še eno metodo. Najpogosteje se uporablja za stabilizacijo adsorbiranih encimov pa tudi za preprečevanje uhajanja encimov iz poliakrilamidnih gelov. Najpogosteje uporabljen reagent za navzkrižno povezavo je glutaraldehid (Enzyme technology, 2012).

### **2.2.3 Metoda zamreženja v polimerih**

Metoda temelji na zamreženju encima znotraj polimernega matriksa ali membrane (Enzyme technology, 2012). To dosežemo s hidrolitično polimerizacijo izbranega polimera v prisotnosti encima (Sheldon, 2007). Metoda se razlikuje od kovaletne vezave in navzkrižne povezave v tem, da se encim sam ne veže na matriks oz. membrano. Zaradi tega je ta metoda zelo uporabna. Onemogoči namreč uhajanje encima, istočasno pa omogoča prehajanje substrata. Pomembno je, da smo previdni pri izbiri polimera; izbrati moramo takšnega, ki bo imel čim manj vpliva na aktivnost izbranega encima. (Enzyme technology, 2012). Za izboljšanje metode pogosto dodajamo aditive, kot so polietilen glikol, polivinil alkohol in albumin (Sheldon, 2007).

### **2.2.4 Inkapsulacija**

Pri inkapsulaciji encime zapremo v semipermeabilno membransko kapsulo. Najpogosteje uporabljammo membrane iz celuloznega nitrata in najlona. Metoda je poceni in enostavna, njena učinkovitost pa je v glavnem odvisna od stabilnosti encima v kapsuli (Enzyme technology, 2012).

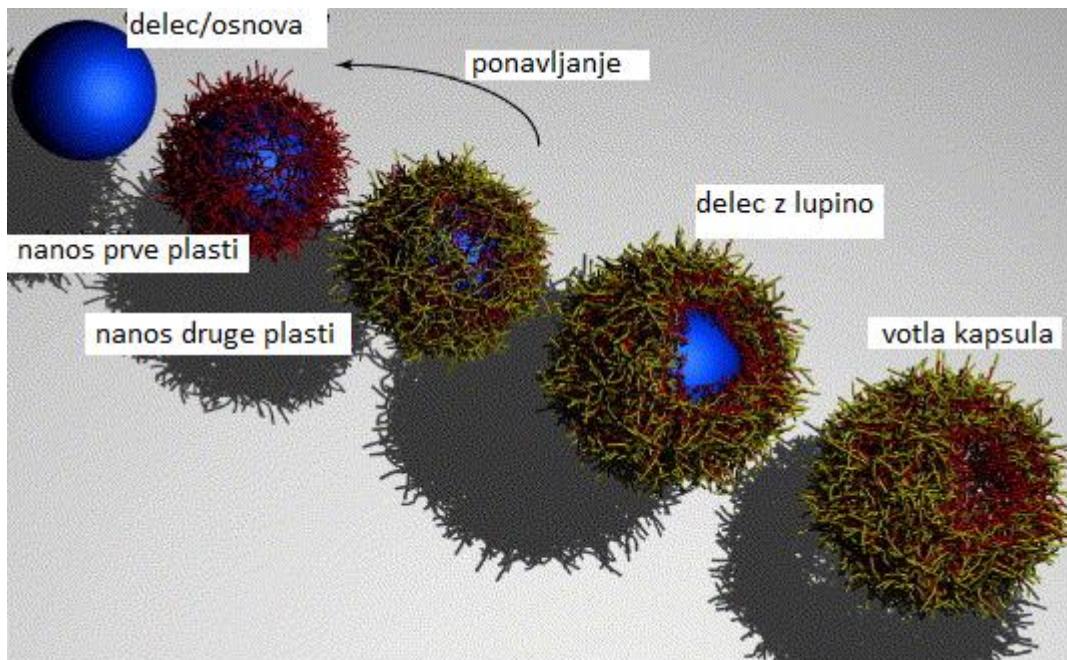
To tehniko uporabljammo v medicini, farmaciji, kmetijstvu in kozmetični industriji za razvoj kontroliranega dostavnega sistema zdravil. Sistemi koloidne narave, kot so liposomi, polimerni in mikroemulzijski delci se uporabljo za tarčno dostavo zdravil, pesticidov, okusov in drugih substanc. Čeprav je njihova uporaba široka, se pojavljajo težave z njihovo stabilnostjo in permeabilnostjo, kar omejuje njihovo uporabnost (Caruso in sod., 1999).

### **2.2.5 Imobilizacija encimov z metodo »plast na plast« (LbL)**

Metoda »plast na plast« je raznolika, nežna in enostavna metoda za imobilizacijo funkcionalnih molekul (Ariga in Hill, 2008). Encimi so v tem primeru lahko vezani na dva načina: lahko so inkapsulirani ali pa vezani na površino oblečenega delca z elektrostatskimi ali kovaletnimi vezmi. Pri tehniki »plast na plast« delce prevlečemo z nabitim polimerom. Navadno se izmenjujeta dva polimera, od katerih je eden negativno in drugi pozitivno nabit. Vezavo tako omogočijo elektrostatske sile med polimeri. V zadnjem času je ta tehnika močno izboljšala nadzor nad fizičnimi in kemijskimi lastnostmi tankih filmov. Že od predstavitve leta 1998 so kapsule, pripravljene z LbL-tehniko, zelo zanimive zaradi možnosti spremenjanja njihovih lastnosti (velikost, kompozicija, stabilnost, površinska funkcionalnost, koloidna stabilnost). Prav tako pa je mogoče tem kapsulam dodati nove funkcije, kar daje možnost za inženiring novega razreda materialov s čisto novimi strukturami in funkcijami (Johnston in sod., 2006).

Uporabljo se delci od nano do mikro velikosti, kot so anorganski in polimerni delci. Lahko pa uporabljammo tudi biomakromolekule. Površino kapsule lahko spremenimo s čimer se spremeni tudi njena funkcija in/ali izboljša koloidna stabilnost kapsule. Razne materiale lahko vnesemo v notranjost kapsule za tarčno dostavo. Navadno kapsule pripravimo tako, da na koloidni delec izmenično nanašamo negativno in pozitivno nabite polimere, na koncu pa sredico odstranimo (Ariga in Hill, 2008). Dodatek kationskega polimera negativno nabiti površini spremeni površino delca, kar se kaže v spremembi naboja. Nato sledi dodatek anionskega polimera, ki ponovno spremeni nabolj površine. Tako je omogočeno kontinuirno nalaganje plasti. To tehniko lahko uporabimo za razne nabite snovi, tudi za biomateriale, kot so proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati in delci virusov. Proses sestavljanja strukture poteka v zelo blagih razmerah, potrebujemo le stekleno posodico in mešalo. Ni pa nujno, da so plasti med seboj vedno povezane z elektrostatskimi vezmi, ampak tudi z vodikovimi ali

koordinacijskimi vezmi. Možna pa je tudi biospecifična prepoznavna, npr. med lektini in sladkorji, kar omogoča bolj specifično strukturo filma (Ariga in Hill, 2008).



Slika 5: Prikaz tehnike »plast na plast« za oblačenje delcev (Johnston in sod., 2006)

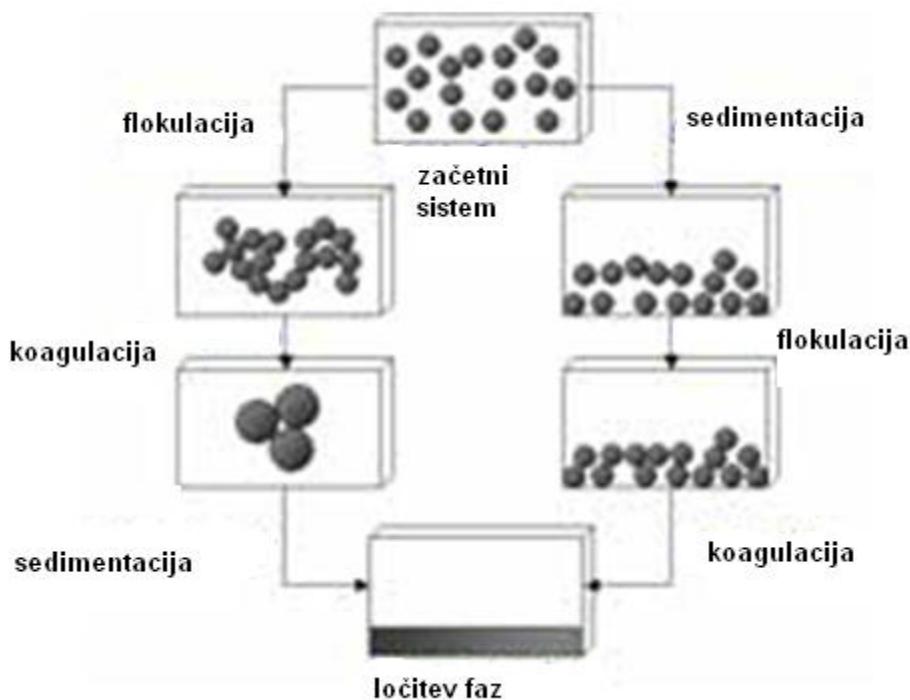
Na sliki je prikazan potek reakcije »plast na plast«. Na delec, ki predstavlja jedro, se posamično nanaša več plasti. Po zadnjem nanosu se odstrani notranjost delca in ostane le lupina.

## 2.3 ZETA POTENCIAL

### 2.3.1 Definicija zeta potenciala

Zeta potencial je fizikalna lastnost, ki jo ima vsak delec v suspenziji. Uporablja se za optimiziranje sestav suspenzij in emulzij, pomaga pa tudi pri napovedovanju dolgoročne stabilnosti suspenzije (Malvern instruments, 2012).

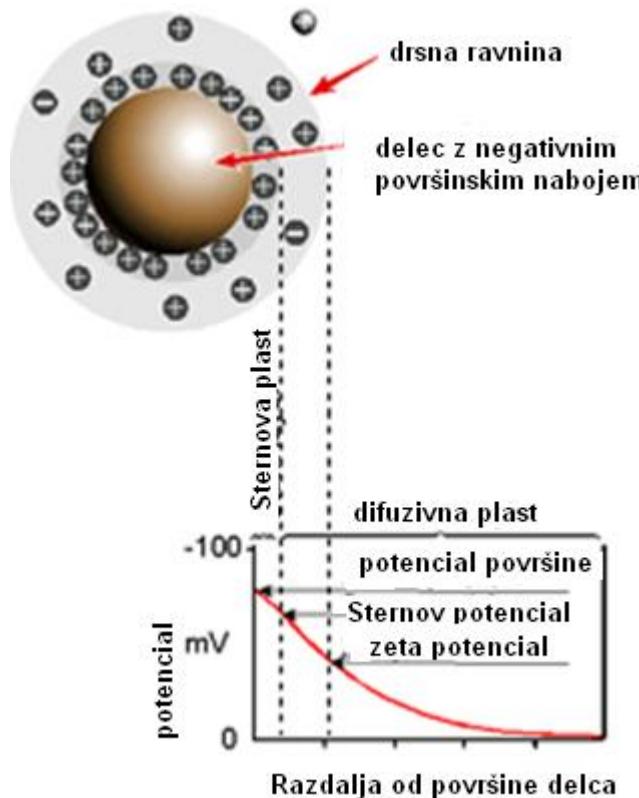
Poznamo tri osnovna agregatna stanja, v katerem se lahko nahaja snov: trdno, tekoče in plinasto. V primeru, da je trdna snov v tekočini dispergirana v obliki zelo drobnih delcev, pravimo, da je sistem koloiden. Koloidni materiali imajo posebne lastnosti, ki jim dajejo veliko uporabnost. V določenih razmerah se lahko delci primejo drug drugega in tvorijo aggregate. Začetni agregat se imenuje flokula in nastane v procesu flokulacije, če pa se agregat nato spremeni v bolj gosto obliko, pravimo, da je koaguliral. Agregat običajno ločimo od raztopine s sedimentacijo (Malvern instruments, 2012).



Slika 6: Možna stanja koloidnih sistemov (Malvern instruments, 2012)  
Slika prikazuje številne mehanizme, pri katerih lahko pride do izgube stabilnosti koloidnega sistema.

Koagulacija je navadno ireverzibilna, proces flokulacije pa je še mogoče obrniti.

Tekoča plast, ki obdaja delce, je sestavljena iz dveh plasti: Sternove plasti, kjer so ioni močno vezani, in zunanje (difuzivne) plasti, kjer so ioni šibkeje vezani. Znotraj difuzivne plasti je meja, za katero ioni in delci tvorijo stabilno strukturo. Ko se delci premaknejo (npr. zaradi gravitacije), se premaknejo tudi ioni znotraj te meje (drsna ravnina). Tisti, ki so na drugi strani meje, ostanejo dispergirani. Potencial na meji med kompaktno in difuzivno plastjo imenujemo zeta potencial (Sze in sod., 2003).



Slika 7: Prikaz drsne ravnine in zeta potenciala (Malvern Instruments, 2012)

Slika prikazuje odvisnost Sternovega in zeta potenciala od oddaljenosti od površine delca.

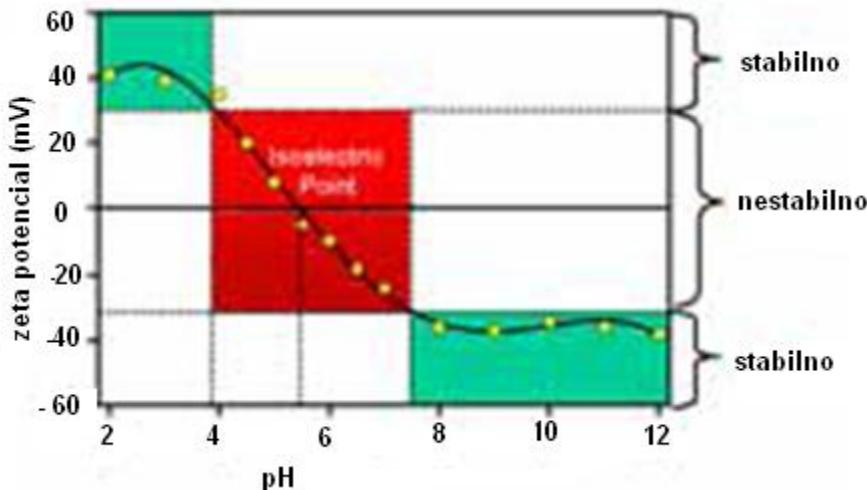
Magnituda zeta potenciala nam poda oceno o potencialni stabilnosti koloidnega sistema. Če imajo vsi delci v suspenziji velik pozitivni oz. negativni zeta potencial, bodo težili k temu, da se med seboj odbijajo in tako ne bo težnje po njihovem združevanju. Če pa imajo delci nizek zeta potencial, med njimi ne bo nobene sile, ki bi preprečila njihovo združevanje (Sze in sod, 2003).

Glavna delitev med stabilno in nestabilno suspenzijo je navadno pri vrednostih večjih od  $|30|$  mV. Za raztopine, katerih delci imajo absolutno vrednost zeta potenciala nad 30 mV, velja, da so stabilne, druge pa nestabilne (Malvern instruments, 2012).

### 2.3.2 Vplivi na zeta potencial

#### a) pH

V vodnih medijih je pH-vrednost vzorca najpomembnejši faktor, ki vpliva na zeta potencial. Vrednost zeta potenciala brez podanih lastnosti raztopine je tako le številka brez pomena. Če imamo na primer delec v suspenziji z negativnim zeta potencialom in raztopini dodamo alkalne skupine, potem delci dobijo več negativnega naboja in se absolutna vrednost zeta potenciala poveča. Če suspenziji dodamo kislino, potem bo počasi prišlo do nevtralizacije naboja. Nadaljnje dodajanje kisline pa bo povzročilo nastajanje pozitivnega naboja. Tako bo krivulja zeta potenciala v odvisnosti od pH pozitivna pri nizkih pH-vrednostih in nižja oz. negativna pri visokih pH-vrednostih. Vmes lahko pride do točke, kjer je zeta potencial enak nič. Ta točka je zelo pomembna, saj je v njej sistem najmanj stabilen in obstaja velika verjetnost, da bo prišlo do koagulacije (Malvern instruments, 2012).



Slika 8: Zeta potencial v odvisnosti od pH-vrednosti raztopine (Malvern Instruments, 2012)  
Slika prikazuje spremenjanje zeta potenciala raztopine glede na njeno pH-vrednost.

#### b) Debelina električnega dvosloja

Debelina električne dvojne plasti okoli delca je odvisna od koncentracije ionov v raztopini in jo lahko izračunamo iz ionske moči medija. Višja kot je ionska moč, bolj stisnjena bo električna dvojna plast. Na debelino plasti pa vpliva tudi valenčnost ionov. Anorganski ioni lahko interagirajo z nabitimi površinami na dva načina: z nespecifično ionsko adsorbcijo, ki ne vpliva na izoelektrično točko, in s specifično ionsko adsorbcijo, ki vodi do spremembe izoelektrične točke. Specifična adsorbcija ionov na površju delcev, tudi v nizkih koncentracijah, lahko zelo spremeni zeta potencial disperzije delcev (Sze in sod, 2003).

#### c) Ostali vplivi na zeta potencial

Koncentracije sestavin (npr. dodanih polimerov) in temperatura koloidne raztopine prav tako vplivata na vrednost zeta potenciala, ampak v precej manjši meri kakor drugi opisani dejavniki (Sze in sod, 2003).

### 2.3.3 Merjenje zeta potenciala

Zeta potencial je ključen dejavnik v modelih električnih dvojnih slojev in njihovih lastnosti, zato so njegove meritve zelo pomembne. Zaradi pomembnosti zeta potenciala so razvili številne tehnike za njegovo merjenje, ki temeljijo na enem izmed treh elektrokinetskih učinkov: elektroforezi, elektroosmozi, dielektroforezi (Sze in sod., 2003).

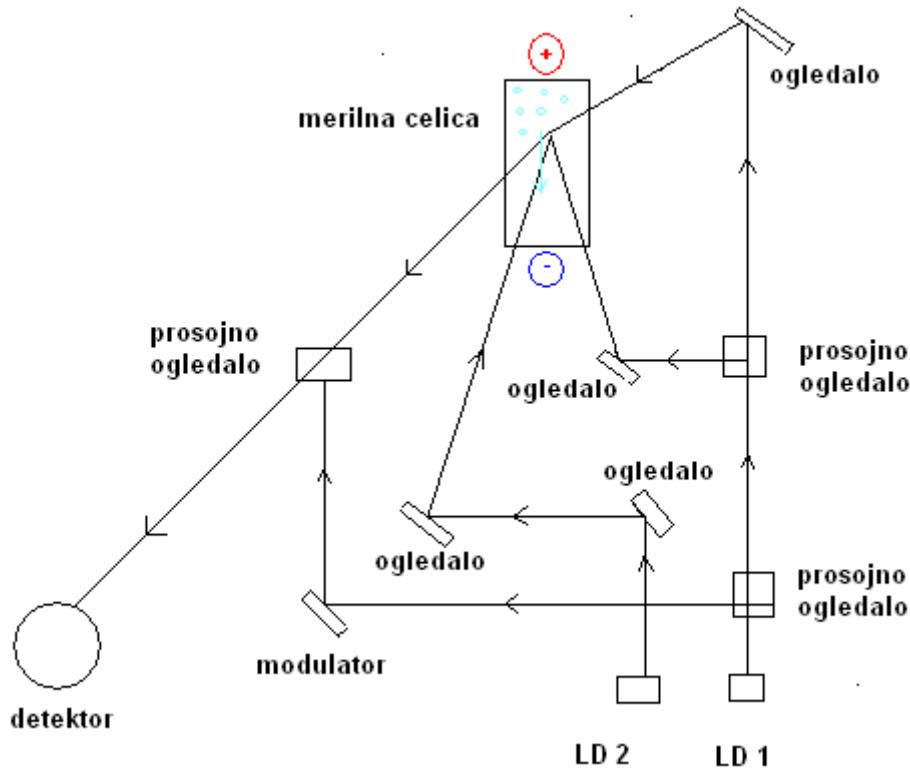
Najpogosteje uporabljamo merjenje na osnovi elektroforeze. V tem primeru zeta potencial merimo z apliciranjem električnega polja na disperzijo delcev v raztopini (Malvern instruments, 2012).

V električnem polju bodo v raztopini raztopljeni nabiti delci potovali proti elektrodi z nasprotnim nabojem. Hitrost gibanja je odvisna od moči električnega polja, dielektrične konstante medija, viskoznosti medija in zeta potenciala. To hitrost imenujemo elektroforetska mobilnost. Zeta potencial je povezan z elektroforetsko mobilnostjo v Henryjevi enačbi:

$$U_E = 2\epsilon Zf(\kappa a)/3\eta \quad \dots (1)$$

kjer je  $U_E$  dielektrična konstanta,  $Z$  zeta potencial,  $\eta$  viskoznost,  $f(\kappa a)/3\eta$  pa Henryjeva funkcija (Malvern instruments, 2012).

Hitrost merimo po teoriji Dopplerjevega učinka. Na delce je usmerjen laserski žarek, nato pa se detektira sipana svetloba. Žarek vsebuje fazni zamik, ki je posledica hitrosti premikajočih se delcev. Žarek gre potem na fotopomnoževalko, ki ojača signal. Iz faznega zamika se nato izračuna mobilnost delcev in posledično tudi zeta potencial (Malvern instruments, 2012).



Slika 9: Prikaz merjenja zeta potenciala (povzeto po BeckamCoulter, 2008)

Slika prikazuje optični diagram naprave DelsaNano HC. Z LD 1 in LD 2 sta označena laserja.

## 2.4 NANODELCI

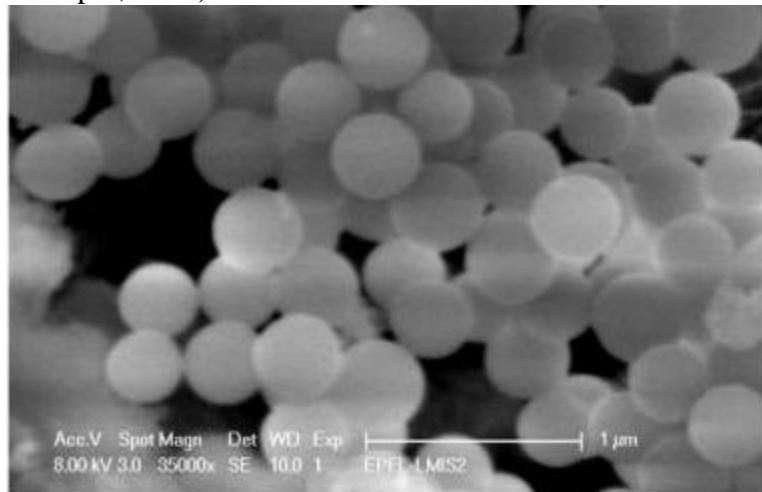
### 2.4.1 Tipi nanodelcev

Trenutno še ni definicije, ki bi nanodelec natančno opredelila (Duncan in Gaspar, 2011). Obstaja več različnih definicij glede na material nanodelcev in glede na področje njihove uporabe. V ožjem smislu so nanodelci definirani kot delci manjši 10–20 nm (Hosokawa in sod., 2007). V mnogih primerih (tudi v primeru nanomedicine) so med nanodelce uvrščeni delci velikosti od 1 do 1000 nm (Duncan in Gaspar, 2011).

V velikostnem razredu nanodelcev se njihove kemijske, biološke in fizikalne lastnosti močno spremenijo. Nanodelci imajo tako številne posebne lastnosti:

- morfološke/strukturne lastnosti: manjši delci lažje prehajajo skozi membrane, velika specifična površina pa je tudi razlog za večjo reaktivnost in topnost.
- Termične lastnosti: temperatura taljenja na ravni nanodelcev se navadno zniža.
- Elektromagnetne lastnosti: pri nanodelcih se zveča dielektrična konstanta materialov, ki lahko dobijo tudi supermagnetne lastnosti.
- Optične lastnosti: z manjšanjem velikosti se spreminja intenziteta absorbcije pri določenih valovnih dolžinah.

- Mehanske lastnosti: z manjšanjem delcev se navadno veča njihova trdnost (Duncan in Gaspar, 2011).



Slika 10: Nanodelci iz silikatnega stekla (Gijs, 2008)

Slika prikazuje nanodelce iz silikatnega stekla, ki so veliki približno 100 nm.

Nanodelce sintetizirajo iz več vrst različnih materialov, najpogosteje pa iz kovin, kovinskih oksidov, ne-oksidne keramike, polimerov, ogljika in iz biomolekul. Obstajajo v številnih različnih oblikah, kot so cevke, kroglice, cilindri ... Navadno so površinsko modificirani, tako da ustrezajo določenemu namenu uporabe. Najpomembnejša posledica nano velikosti je prisotnost velikega deleža atomov/molekul na površini nanodelca namesto v njegovi notranjosti in velika površina na enoto prostornine materiala. Ti dve lastnosti se z manjšanjem velikosti delcev materiala še stopnjujeta in sta odgovorni za vse posebne lastnosti nanodelcev (Hosokawa in sod., 2007).

## 2.4.2 Sinteza nanodelcev

Pri sintezi nanodelcev poznamo dva pristopa, in sicer »od zgoraj dol« in »od spodaj gor«. Uporabljajo se različne strategije:

- Sinteza v plinasti fazi  
Obstaja veliko različnih metod sinteze nanodelcev v plinasti fazi. Njihov glavni princip je segrevanje in evaporacija, ki ji sledi hitro ohlajanje. Sem spada plinska piroliza, evaporacija, sinteza plazme, kemijska sinteza pare in laserska ablacija. Kot generatorje delcev najpogosteje uporabljamо elektrosprejne sisteme, saj proizvajajo zelo majhne monodisperzne delce (Cruis in sod. 1997).
- Sinteza v tekoči fazi  
Najbolj uporabna je sinteza v tekoči fazi. Večinoma uporabljamо tehnike, pri katerih iz ionov ali molekul naredimo večje delce. Koloidne metode temeljijo na precipitacijskih procesih v raztopini. Raztopine različnih ionov mešamo pod nadzorovanih razmerah in jih tako pretvorimo v netopne precipitate. S kontroliranjem nukleizacije in kinetike rasti lahko proizvedemo delce raznih velikosti in oblik. Proses kontroliramo z ultrazvočnimi in zvočno-kemičnimi načini.
- Superkritična-hidrotermalna metoda  
Lastnosti vode se zelo spremenijo v območju njene kritične točke. Posledično se spremeni tudi ravnotežje in hitrost reakcij. Pri tej metodi izkoristiščamo lastnosti superkritičnih tekočin, katerih gostota in dielektrična konstanta sta odvisni od

temperature in tlaka, kar nam omogoča kontrolo topnosti raztopine in stopnjo supersaturacije.

- Sinteza v trdni fazi

Pri sintezi v trdni fazi za izhodišče vzamemo večje delce, ki jih nato z mletjem oz. drobljenjem zmanjšamo. Tako pridobimo zelo drobne delce. Da bi se izognili agregaciji, proces drobljenja in mletja navadno izvajamo v prisotnosti koloidnih stabilizatorjev

(Hosokawa in sod., 2007).

## 2.5 ANTIMIKROBNI UČINKI NANODELCEV

Zaradi izbruha nalezljivih bolezni, ki jih povzročajo različne patogene bakterije, in zaradi razvoja antibiotske rezistence raziskovalci intenzivno iščejo nova antibakterijska sredstva. Kot zelo obetavni se zdijo nanodelci, saj imajo veliko površino na enoto prostornine, pa tudi zaradi svojih unikatnih kemijskih in fizikalnih lastnosti. (Kenawy in sod., 2007). Nanodelce se lahko direktno uporablja za zdravljenje, lahko pa predstavljajo nosilce za tarčno dostavo zdravil (Duncan in Gaspar, 2011).

Antimikrobna aktivnost delca je v veliki meri odvisna od njegove molekulske mase. Njegova velikost ima namreč pomembno vlogo pri prehajanju delca skozi membrano celice. Do velikosti, pri kateri delec še preide skozi membrano celice, njegova antimikrobna aktivnost z velikostjo raste. Ko pa delec preseže velikost, ki mu omogoča prehod skozi membrano, začne njegova antimikrobna aktivnost z večanjem njegove velikosti padati. V primeru manjših delcev se jih namreč več veže na zunanjost celice (Kenawy in sod., 2007). Velikost, primerna za uporabo, pa je odvisna od tipa delca. V primeru liposomov se uporablja delci velikosti 80–200 nm, v primeru nanodelcev 20–1000 nm, v primeru polimerov 5–25 nm, v primeru kristalov pa 100–1000 nm (Duncan in Gaspar, 2011).

Poleg popolne zamenjave zdravljenja z nanodelci se raziskujejo tudi možnosti kombiniranega zdravljenja z antibiotiki in novimi antimikrobnimi učinkovinami. V kombinaciji srebrovih nanodelcev z beta-laktamskimi antibiotiki so odkrili, da se je učinkovitost delovanja antibiotikov povečala (Rai in sod. 2009).

### 2.5.1 Srebrovi nanodelci

Pri uporabi nanodelcev kot antimikrobnih učinkovin so raziskovalci preizkušali več različnih nanodelcev: titanijeve, magnezijeve, alginatne in srebrove. Kot najbolj učinkoviti so se izkazali srebrovi nanodelci, saj imajo dobre antimikrobne lastnosti proti bakterijam, virusom in evkariontskim mikroorganizmom (Rai in sod., 2009).

Uporaba srebra kot antimikrobnega sredstva je znana že dolgo. Že stoletja se namreč uporablja za zdravljenje opekl in kroničnih ran (Rai in sod., 2009). Je učinkovita snov z majhno toksičnostjo za sesalce.

Antimikrobne lastnosti srebra so odvisne od količine srebra in hitrosti njegovega sproščanja. V elementarnem stanju je srebro inertno, v reakciji s kožo in tekočino rane pa se ionizira. Ionizirano srebro je močno reaktivno, saj se veže na proteine in povzroči strukturne spremembe v bakterijski celični steni in membrani jedra, kar vodi v celično smrt. Veže se tudi na bakterijsko DNA in RNA in tako inhibira delitev celice. Njegova aktivnost pa je močno odvisna tudi od velikosti in oblike delcev. Manjši kot je delec, večjo površino ima na voljo za stik z bakterijo; različne oblike delcev imajo različne učinke na celico (Rai in sod., 2009).

Srebrovi sulfonamidi so kombinacija srebra in sulfadiazina in delujejo kot antibiotiki širokega spektra (Rai in sod., 2009). Srebrovi sulfonamidi (AgSD) se že dolgo uporabljajo za zdravljenje opeklina. Glavni funkciji AgSD naj bi bili počasno sproščanje sredstva v rano in neopazna absorbcija srebra (Balogh in sod., 2000).

Delovanje srebrovih nanodelcev je veliko močnejše v primeru gram negativnih bakterij, saj imajo tanjšo plast peptidoglikana in tako lažje predrejo skozi celično steno. Točen mehanizem delovanja srebrovih nanodelcev sicer še ni znan. Nanodelec se lahko prime celične stene, lahko pa prodre tudi v celico. Ko nanodelci pridejo skozi celično steno, se vežejo na DNA, ki posledično spremeni svojo obliko, kar vodi v prekinitev celične delitve. Pogosto pa se vežejo na proteine dihalne verige in tako povzročijo celično smrt (Rai in sod., 2009).

Med znanstveniki vseeno obstaja skrb glede množične uporabe srebrovih delcev zaradi možnega pojava na srebro rezistentnih sevov. Znanstveniki so zaključili, da so srebrovi delci učinkovita alternativa za antibiotike. Poudarili so le, da bi se v prihodnosti za problematično lahko izkazala uporaba srebrovih sredstev z nizkim deležem srebrovih ionov. V takšnih primerih je namreč večja verjetnost, da določene bakterije mutirajo in preživijo. Zato je pomembno, da se uporablajo koncentracije srebrovih ionov, ki zagotovo uničijo bakterijsko aktivnost (Rai in sod., 2009).

Uporaba srebrovih nanodelcev:

- nanodelci  $\text{FeO}_3\text{Ag}$  se lahko uporabijo za čiščenje voda in se lahko odstranijo z magnetnim poljem, s čimer preprečimo kontaminacijo okolja s srebrom.
  - Srebrov sulfadiazin se uporablja za zdravljenje opeklina, zaradi svojega počasnega sproščanja.
  - S srebrom oblečene kirurške maske zmanjšujejo kontaminacijo.
  - Srebрова nanobarva je okolju prijazna.
  - Za zdravljenje opeklina in raznih infekcij.
  - Srebrov zeolit se uporablja kot konzervans v hrani.
- (Rai in sod., 2009; Panaček in sod., 2006)

### 2.5.2 Dendrimeri kot nanodelci

Dendrimeri so simetrične sferične makromolekule, sestavljene iz jedra, vej in terminalnih skupin. Njihova notranjost je lahko zelo podobna ali pa zelo različna od zunanjosti. Kemische in fizikalne lastnosti, kot so reaktivnost, tvorjenje kompleksov ali soli, hidrofilnost itd., se lahko spreminjajo in optimizirajo. Dendromeri poliamidoamina (PAMAM) so sestavljeni iz ponavlajočih se enot  $\beta$ -alanina. Zaradi okolju prijazne narave in posebnih nosilnih lastnosti so zelo obetavni na področju medicine. V vodi so stabilni in netopni. Pri povezavi dendrimerov s protitelesi so ugotovili, da se dendrimeri lahko uporabijo kot netoksična sredstva, ki prepoznavajo specifične celice. Pri testiranju konjugatov dendrimerov s protitelesi so se izkazali za netoksične agense, ki so lahko usmerjeni proti specifičnim celicam (Balogh in sod., 2000).

### 2.5.3 Liposomi

Liposomi so majhni vezikli s fosfolipidnim dvoslojem (Hosokawa in sod., 2007), sestavljeni iz ene ali več lipidnih dvojnih plasti, urejeni v koncentrično obliko in vključujejo enako število prostorov z vodo (Štrukelj in Kos, 2007). Sprva so jih uporabljali kot modelne sisteme za preučevanje membran, do danes pa se je njihova uporaba razširila na različna področja

medicine, ekologije, živilske industrije in kozmetike. Zanimanje za liposome je posledica njihove vezikularne strukture, ki jo omejuje ena ali več plasti. Od načina priprave je odvisno, kako veliki bodo delci in koliko plasti bodo imeli. Liposom se lahko poveže s celico na več načinov: z adsorbcijo, endocitozo, izmenjavo lipidov in fuzijo. Njihova sredica navadno vsebuje le vodno fazo, lahko pa je v njej raztopljeni zdravilo, hidrofobna zdravila pa se lahko vgradijo v fosfolipidni dvosloj (Hosokawa in sod., 2007). Učinkovitost liposomov so preučevali že na mnogih primerih. Ugotovili so, da so  $\beta$ -laktamski antibiotiki in antibiotiki za zdravljenje kroničnih infekcij veliko bolj učinkoviti, če so inkapsulirani v liposome. Pokazali so tudi inhibitoren vpliv liposomov na rast mikrobakterij (Pinto-Alphandary in sod., 1999).

#### 2.5.4 Antimikrobnii polimeri

Problem pri uporabi večine antimikrobnih nanodelcev je v njihovem vplivu na okolje in hitri izgubi antimikrobnih lastnosti zaradi nizke molekulske mase. Da bi rešili to težavo, so antimikrobnia sredstva vezali na polimere. Tako obdelani nanodelci so zelo učinkoviti, specifični in imajo dolgo življenjsko dobo (Kenawy in sod., 2007).

Idealni antimikrobeni polimer naj bi imel naslednje lastnosti: nastane z enostavno in poceni sintezo, je stabilen v razmerah delovanja, je dolgoročno uporaben pri določeni temperaturi, je netopen v vodi, nerazgradljivost, ne sprošča toksičnih produktov, ne sme biti toksičen oz. dražeč za ljudi, ki z njim delajo, se lahko obnovi po izgubi aktivnosti ter ima širok spekter delovanja v kratkem kontaktnem času (Kenawy in sod., 2007).

Velik potencial uporabe takšnih nanodelcev je v medicini za dezinfekcijo delovnih površin, ki bi jih lahko dodajali obvezam, katetrom in drugim vsadkom. Pritrditev zdravila na makromolekularni nosilec bi upočasnila njegovo izločanje in omogočila dolgotrajno in kontrolirano sproščanje učinkovine. Glavni problem uporabe katetrov so namreč okužbe. Ena izmed metod za sintezo antimikrobnih polimerov je dodatek organskega ali anorganskega biocida med polimerizacijo. Njihova prednost je v tem, da so nehlapni, ne prehajajo skozi kožo, so kemijsko stabilni in nestrupeni za bolnika (Kenawy in sod., 2007).

Antimikrobeni polimerni delci se veliko uporabljajo tudi za čiščenje voda. Danes se namreč pitna voda večinoma čisti s klorom, ki je toksičen in lahko pride do njegovega kopičenja v prehranjevalni verigi. To se lahko reši z odstranitvijo mikroorganizmov iz vode z netopnimi snovmi. Možen način je uporaba kontaktnih dezinfekcijskih sredstev, ki inaktivirajo, ubijejo ali odstranijo mikroorganizme brez sproščanja reaktivnih agensov (Kenawy in sod., 2007).

Potencial pa imajo tudi v prehranskem sektorju. Antimikrobeni substance, dodane v pakirni material, bi lahko inhibirale rast mikroorganizmov (Kenawy in sod., 2007).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Mikroorganizmi

- Sev *Bacillus anthracis*,
- *E. coli* elektrokompetentne celice: One Shot Top10 (Invitrogen),
- *E. coli* kemično kompetentne produkcijske celice: BL21 Star(DE3) (Invitrogen).

##### 3.1.2 Sestava gojišč

###### GOJIŠČE LBA(Sigma)

Tripton 10 g/L

Kvasni ekstrakt 5 g/L

NaCl 10 g/L

Ampicilin (Sigma) 100 µg/mL

Gojišče smo raztopili v destilirani vodi in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Pri pripravi plošč X-gal LBA smo osnovnemu LBA-gojišču dodali še 0,8 mg/mL X-gal (Sigma).

###### GOJIŠČE TSB

Kazeinski pepton (Fluka) 17 g/L

Sojin pepton (Fluka) 3 g/L

D-glukoza (Sigma) 2,5 g/L

NaCl (Sigma) 5 g/L

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka) 2 g/L

Gojišče smo raztopili v destilirani vodi in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

##### 3.1.3 Raztopine za izolacijo plazmidne DNA

###### PUFER ZA RAZTAPLJANJE PELETA(pufer Invitrogen CONCERT™ RNase A (Cat.

No. 12091-039))

Tris-HCl 50 mM

RNAza A 20 mg/mL

EDTA 10 mM

###### PUFER ZA ALKALNO LIZO

NaOH (Merck) 0,2 M

SDS (Fluka) 1 %

Raztopino smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

###### NEVTRALIZACIJSKA RAZTOPINA

Gvanidinijev hidroklorid (Sigma) 4 M

Na/K-acetat (Fluka) 0,5 M

pH-vrednost raztopine smo uravnali na 4,2 in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

###### PUFER ZA SPIRANJE KOLON

NaCl (Riedel-de Haen) 20 mM

Tris-HCl (Sigma) 20 mM

Etanol (Riedel-de Haen) 80 %

pH-vrednost raztopine smo uravnali na 7,5 in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

### ELUCIJSKI PUFER

Tris-HCl (Sigma) 10 mM

pH-vrednost raztopine smo uravnali na 8,5 in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

### **3.1.4 Raztopine za agarozno elektroforezo**

#### 5X TBE

Tris baza (Sigma) 54 g

Borova kislina 27,5 g

0,5 M EDTA (pH 8) 20 mL

H<sub>2</sub>O do 1000 mL

Pred uporabo smo 5X pufer TBE redčili 10 x. 5X pufer TBE hranimo na sobni temperaturi.

#### 1 % Agaroza

Agaroza (Sigma) 0,5 g

0,5X TBE 50 mL

### **3.1.5 Raztopine za poliakrilamidno elektroforezo**

#### 10X ELEKTROFOREZNI PUFER

Tris (Sigma) 250 mM

glicin (Sigma) 1920 mM

SDS (Fluka) 10 %

#### 10 % POLIAKRILAMIDNI LOČEVALNI GEL

Akrilamid (Sigma) 3,26 mL

Bis-akrilamid (Sigma) 1,69 mL

Tris (pH 8,8 Sigma) 2,5 mL

10 % SDS (Fluka) 100 µL

10 % APS (Sigma) 100 µL

Temed (Sigma) 6 µL

MQ 1,34 mL

#### 4 % VSTOPNI POLIAKRILAMIDNI GEL

Akrilamid (Sigma) 315 µL

Bis-akrilamid (Sigma) 165 µL

Tris (pH 6,8 Sigma) 250 µL

10 % SDS (Fluka) 20 µL

10 % APS (Sigma) 20 µL

Temed (Sigma) 2 µL

MQ 1,226 mL

### **3.1.6 Aparature**

- centrifugi: 2–16 K (Sigma); Centric 200 R (Tehnica)

- tehnica: Kern, ALS 120–4 N

- pH-metra: WTW-Inolab, pH/cond 720; Hanna Instruments, HI1221

- inkubator: Memert

- avtomatske pipete: Eppendorf

- avtoklav: A-21CA (Kambič)

- PCR blok: T Gradient (Biometra)
- komora za pripravo PCR-reakcijske mešanice: DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR
- elektroforeza (BioRad)
- aparat za slikanje gelov: BioDoc Analyze (Biometra)
- homogenizator (Tehnica)
- sprektofotometer: Ocean Optics inc., USB2000
- kolone za izolacijo DNA: Spin Column for DNA (EcoSpin)
- flurimeter za merjenje koncentracije DNA: Qubit<sup>TM</sup> flurometer (Invitrogen)
- merilec zeta potenciala in velikosti delcev: Beckamn Coulter, DelsaNano HC
- infuzija Alaris medical systems
- homogenizator Silent crusher (Heidolph)
- vrtinčnik: IKA vortex genius 3
- elektroporator: Electroporator 2510 (Eppendorf)
- termoblok: Bioshake iQ (Q instruments)

### 3.1.7 Kemikalije

- nanašalno barvilo: 6 x DNA Loading Dye (Fermentas)
- pRSET EmGFP vektor (Invitrogen)
- restrikcijski encim EcoRI (Fermentas)
- EcoRI-pufer (Fermentas)
- T4 DNA ligaze (Fermentas)
- T4-ligazni pufer (Fermentas)
- amonijev acetat (Sigma)
- etanol (Riedel-de Haen)
- fosfataza: FastAP Thermosensitive Alkaline phosphatase (Thermo scientific)
- fosfatazni pufer: FastAP thermosensitive Alkaline phosphatase buffer (Thermo scientific)
- IPTG (Roth)
- steklene kroglice (Sigma)
- reducent: reducing agent (Fermentas)
- nanašalno barvilo: 4 x Dual colour protein loading buffer
- lestvice: Spektra<sup>TM</sup> high range (Fermentas), Spektra<sup>TM</sup> low range (Fermentas)
- lizocim (Fluka)
- kalcijev nitrat (Sigma)
- natrijev karbonat (Sigma)
- PAH (Aldrich)
- PAA (Aldrich)
- 0,01 M PBS (Sigma)
- agarozna (Sigma)
- SYBR Green (Sigma)
- lestvice: Lambda DNA PstMarker (Fermentas), Gene ruler 100 bp (Fermentas)
- ampicilin (Fluka)
- agar (Sanolabor)
- sybr green (Sigma)
- nanašalno barvilo: 6 x DNA Loading Dye (Fermentas)

- fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)
- kit za merjenje koncentracije DNA: Quant<sup>TM</sup> dsDNA HS Assay kit (Invitrogen)
- kit za čiščenje PCR produkta iz gela: Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega)
- kit za kloniranje: TOPO TA Cloning kits (Invitrogen)
  - vektor PCR 2.1 TA TOPO
  - solna raztopina

### 3.2 METODE

#### **3.2.1 Pomnoževanje gena za lizocim iz bakteriofaga lambda z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)**

Za namene magistrske naloge smo potrebovali gen za lizocim. Namnožili smo ga iz genoma bakteriofaga lambda, ki je bil razrezan z restriktičnim encimom PstI. Pred namnoževanjem smo preverili, kje v genomu se nahaja gen za lizocim in če vsebuje restriktivna mesta za Pst. Ker gen za lizocim ne vsebuje restriktivnih mest za Pst, smo genom lahko uporabili kot vzorec za pomnoževanje gena za lizocim. Za namen kloniranja smo dizajnirali več različnih začetnih oligonukleotidov, ki so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena za lizocim v genomu bakteriofaga lambda

začetni oligo- nukleotid	zaporedje (5'-3')	temperatura taljenja	temperatura taljenja sekundarnih struktur	dolžina (bazni pari)
lizocimF1	5'-CGC TTA TCA AAC GCT TCG CTG-3'	57,1 °C	22,8 °C	21 bp
lizocimR1	5'-TAA TCG CGG TGA CTC TGC TC-3'	56,9 °C	38,2 °C	21 bp
lizocimF2	5' -GCT TAT CAA ACG CTT CGC TGC- 3'	57,4 °C	22,8 °C	21 bp
lizocimR2	5'-GGC AGA CGA TGA TGC AGA TAA CC-3'	57,9 °C	40,5 °C	23 bp

Uporabljen par smo izbrali glede na naslednje kriterije:

- uporabljena začetna oligonukleotida morata imeti čim bolj podobno temperaturo taljenja,
- uporabljen začetni oligonukleotid naj ne tvori dimerov in drugih sekundarnih struktur,
- v kolikor začetni oligonukleotid tvori sekundarne strukture naj bo njihova temperatura taljenja vsaj 5 °C nižja od temperature taljenja začetnega oligonukleotida.

Glede na opisane kriterije smo izbrali začetna oligonukleotida lizocimF1 (Sigma) in lizocimR1 (Sigma).

```

Cgc tta tca aac gct tag ctg cta aaa aag ccg gag tag aag atg gta gaa atc aat
aat caa cgt aag gcg ttc ctc gat atg ctg gcg tgg tcc ggg gga act gat aac gga
cggt cag aza acc aca aat cat ggt tat gac gtc att gta ggc gga gag cta ttt act
gat tac tcc gat cac ccc cgc aza ctt gtc acg cta aac cca aza ctc aza tca
aca ggc gcc gga cgc tac cag ctt ctt tcc cgt tgg tgg gat gcc tac cgc aag cag
ctt ggc ctg aza gac ttc tct ccc aza atg cag gac gct gtt gca ttg cag cag att
aag gag cgt ggc gct tta cct atg att gat cgt ggt gat atc gtc agg cza tcc acc
gtt gca gca ata tct ggg ctt cac tcc cgg ggg ctg gtt atg gtc agt tcc aca atc
agg ctg aca gca tga ttg cza aat tca aag aag cgg ggg gaa cgg tca gag aca ttg
atg tat gag cag atg cac cgc gat ta

```

Slika 11: Oznake naleganja začetnih oligonukleotidov lizocimF1 in lizocimR1 na genom bakteriofaga lambda. Na sliki so z rumeno označena mesta naleganja začetnih oligonukleotidov, z modro pa je označen gen, ki kodira lizocim.

Pred PCR-reakcijo smo morali deaktivirati restriktivni encim Pst, ki ga je vsebovala uporabljeni DNA (Fermentas). To smo dosegli s 30-minutnim segrevanjem DNA bakteriofaga lambda na 80 °C. Sledila je reakcija PCR. Sestava uporabljeni reakcijske mešanice je navedena v preglednici 2. Pogoje reakcije, ki so opisani v preglednici 3, smo določili glede na temperaturo taljenja začetnih oligonukleotidov in dolžine pomnožka.

Preglednica 2: Reakcijska mešanica PCR-reakcije za namnoževanje gena za lizocim

PCR-reakcijska mešanica	založna koncentracija	končna koncentracija	proizvajalec
začetni oligonukleotid lizocimF1	10 Mm	0,5 µM	Sigma
začetni oligonukleotid lizocimR1	10 Mm	0,5 µM	Sigma
taq polimerazni pufer	10 x	1 x	Fermentas
Magnezij	25 mM	3 mM	Fermentas
TAQ-polimeraza	5 U/µL	1 U	Fermentas
DNA (Lambda Pst)	5 ng/Ml	0,2 ng/µL	Fermentas
deoksinukleotidi	25 mM	0,2 mM	Fermentas
bidestilirana voda		do 25 µL	

Preglednica 3: Potek PCR-reakcije za namnoževanje gena za lizocim

proces	temperatura	čas	ponovitve
predhodna denaturacija	95 °C	120 s	1 x
denaturacija	95 °C	45 s	30 x
prileganje	51 °C	45 s	30 x
podaljševanje	72 °C	45 s	30 x
končno podaljševanje	72 °C	120 s	1 x
hlajenje	4 °C		

Rezultate verižne reakcije s polimerazo smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

Priprava vzorca za nanos na 1 % agarozni gel:

- 1,2 µL 10 x Sybr Greena,
- 2 µL 6 x nanašalnega pufra,
- 8 µL vzorca,
- MQ do 12 µL.

Elektroforeza je potekala pri napetosti 5–7 V/cm (100 V), 30 min v TBE-pufru. Iz gela smo nato izrezali liso (570 bp) in jo očistili s kitom Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega).

### 3.2.2 Kloniranje gena za lizocim iz bakteriofaga lambda v vektor TA

Po uspešnem pomnoževanju gena za lizocim smo gen vstavili v vektor PCR 2.1 TA TOPO. Ker smo pri PCR uporabili TAQ-polimerazo je naš pomnožek na 5' in 3' imel adenin, vektor TA pa je na obeh koncih vseboval timin, kar je omogočalo enostavno ligacijo brez restrikcije. Uporabljeni reakcijski mešanici je opisana v preglednici 4.

Preglednica 4: Reakcijska mešanica ligacije lizocima v vektor PCR 2.1 TA TOPO

sestavina	volumen
očiščen PCR-produkt	4 µL
4 x redčena solna raztopina	1 mL
vektor	1 µL

Pri pripravi ligacijske mešanice smo bili pozorni, da smo vektor PCR 2.1 TA TOPO dodali kot zadnjo sestavino. Tako smo močno zmanjšali pogostost avtoligacije vektorja. Pripravi ligacijske mešanice je sledila transformacija vektorja v elektropotentne celice *E.coli* TOP 10.

Transformacija vektorja PCR 2.1 TA TOPO z lizocimom v elektrokompetentne *E. coli* celice:

- Ligacijsko mešanico smo premešali in nato 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi.
- 40 µL elektrokompetentnih celic smo dodali 2 µL ligacijske mešanice in vse skupaj odpipetirali v ohlajeno kiveto.
- Elektroporacija (1700 V).
- Tako po elektroporaciji smo v kiveto dodali 1 mL gojišča LB.
- Celotno vsebino kivete smo nato odpipetirali v 1,5 mL Eppendorfove epruvete.
- Inkubirali smo 45 minut pri 37 °C in 250 RPM.
- Razmazali 100 µL kulture na plošče X-gal LBA.
- Inkubirali plošče čez noč pri 37 °C.

Naslednji dan smo pregledali plošče, na katerih so bile bele in modre kolonije. 100 belih kolonij smo prepikirali na svežo ploščo LBA in inkubirali čez noč pri 37 °C. Dan po tem smo 5 kolonij nacepili v 5 mL tekočega gojišča LBA in inkubirali čez noč pri 37 °C in 250 RPM.

### 3.2.3 Izolacija plazmidne DNA

Po prekonočni inkubaciji smo iz tekočega gojišča izolirali plazmidno DNA. To smo naredili po naslednjem postopku.

Izolacija plazmidne DNA:

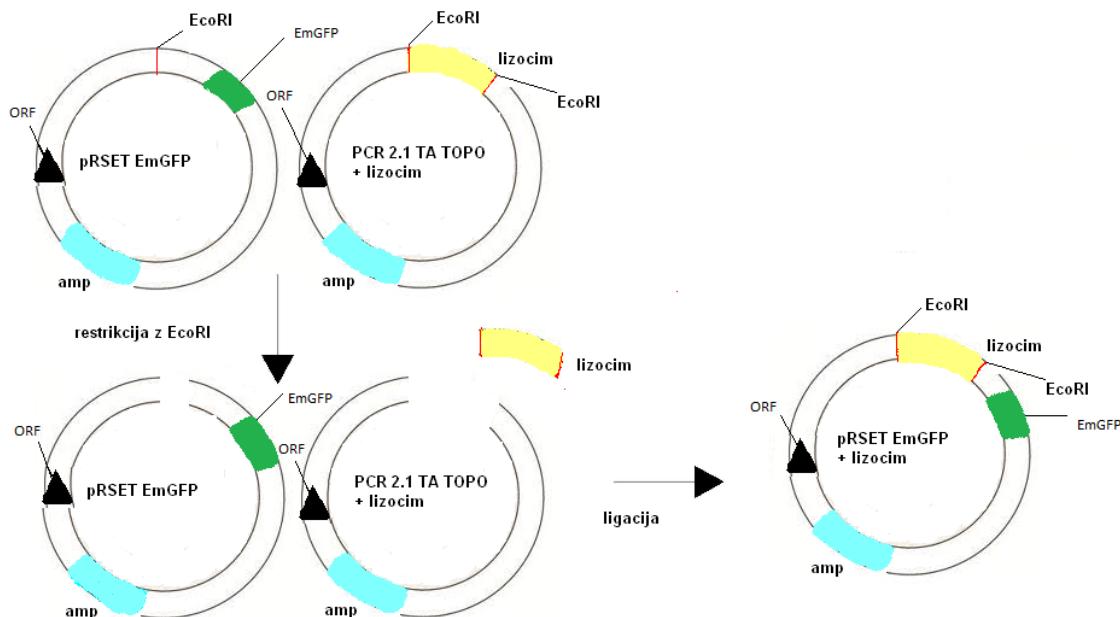
- centrifugirali smo 2 mL prekonočne kulture 1 minuto pri 10 000 RPM,
- odstranili supernatant,
- resuspendirali pelet v 250 µL pufra,
- dodali 250 µL pufra za alkalno lizo,
- premešali,
- dodali 350 µL nevtralizacijske raztopine,
- centrifugirali 10 minut pri 13 000 RPM,
- odpipetirali supernatant,
- nanesli supernatant na kolono za vezavo DNA (Eco Spin),
- centrifugirali 1 minuto pri 16 000 RPM,

- dodali 750 µL pufra za spiranje kolon,
- centrifugirali 1 minuto pri 16 000 RPM,
- odstranili supernatant,
- dodatno centrifugirali 1 minuto pri 16 000 RPM z odprto Eppendorfovo epruveto,
- prestavili kolone v novo Eppendorfovo epruveto,
- dodali 50 µL elucijskega pufra,
- inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi,
- centrifugirali 3 minute pri 16 000 RPM.

Po izolaciji smo rezultate preverili z agarozno gelsko elektroforezo in izmerili koncentracijo plazmidne DNA s fluorimetrom (Qubit).

### 3.2.4 Molekularno kloniranje lizocima v vektor pRSET EmGFP

Po uspešni namnožitvi gena za lizocim v vektorju TOPO TA smo ga želeli klonirati v vektor, ki je bolj primeren za naš eksperiment. Gen za lizocim smo klonirali v vektor z zelenim floorescentnim proteinom (GFP) in his- značko. Izbran vektor je bil pRSET EmGFP (Invitrogen).



Slika 12: Načrt kloniranja lizocima iz vektorja PCR 2.1 TA TOPO v vektor pRSET EmGFP

Na sliki je prikazan načrt kloniranja gena za lizocim. Gen smo najprej namnožili v vektorju PCR 2.1 TA TOPO in ga nato vnesli v pRSET EmGFP, pred ligacijo smo oba vektorja rezali z restriktionskim encimom EcoRI.

V prvem koraku kloniranja smo vektorja PCR 2.1 TA TOPO in pRSET EmGFP razrezali z restriktionskim encimom EcoRI (Fermentas). Sestavi restriktionskih mešanic sta opisani v preglednicah 5 in 6.

Preglednica 5: Restriktivna mešanica vektorja pRSET EmGFP

sestavine restriktivne mešanice	založna koncentracija	končna koncentracija
pRSET EmGFP-vektor	100 ng/µL	1 ng/Ml
EcoRI-restriktivni encim	5 U/µL	0,05 U/µL
EcoRI-pufer	10 x	1 x
bidestilirana voda		Do 20 µL

Preglednica 6: Restriktivna mešanica vektorja PCR 2.1 TA TOPO + lizocim

sestavine restriktivne mešanice	založna koncentracija	končna koncentracija
PCR 2.1 TA TOPO vektor + insert	50 ng/µL	1 ng/µL
EcoRI-restriktivni encim	5 U/µL	0,05 U/µL
EcoRI-pufer	10 x	1 x
bidestilirana voda		do 20 µL

Obe restriktivne mešanici smo nato inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo ju nanesli na 1 % agarozni gel.

Za nanos restriktivne mešanice na agarozni gel smo zmešali:

- 20 µL posamezne restriktivne mešanice,
- 3 µL Sybr Greena,
- 5 µL 6 x nanašalnega barvila.

Po poteku elektroforeze smo s skalpelom iz gela izrezali dve lisi:

- v primeru restriktivne mešanice vektorja pRSET EmGFP smo izrezali liso, ki je ustrezala velikosti 2900 bp in je predstavljala lineariziran vektor.
- V primeru restriktivne mešanice vektorja PCR 2.1 TA TOPO in lizocima pa smo izrezali liso 570 bp, ki je predstavljala lizocim.

Irezano DNA smo potem očistili s kitom Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega). Koncentraciji vključka in vektorja smo izmerili na fluorimetru (Qubit).

Restriktivni je sledila ligacija rezanega vektorja pRSET EmGFP in gena za lizocim. Vektor pRSET Em GFP in gen za lizocim smo zlepili skupaj z ligazo T4, ki tvori fosfodiesterne vezi med dvema koncem DNA-molekule. Ligacija je potekala v molarnem razmerju vektor : insert je enako 1 : 5.

Ligacijska mešanica je vsebovala:

- 15 ng vektorja,
- 13 ng vključka,
- 1 enoto T4 DNA-ligaze (Fermentas),

- 1 x T4-ligazni pufer,
- MQ-vodo do 20 µL.

Ligacija je potekala čez noč pri 16 °C.

Naslednji dan je sledila deaktivacija ligaze: 10 minut pri 65 °C.

Po deaktivaciji smo izvedli elektroporacijo celic. 2 µL ligacijske mešanice smo dodali 50 µL celic TOP 10 in elektroporirali po istem postopku kot pri kloniranju z vektorjem TA.

Nato smo celice razmazali na plošče LBA in inkubirali čez noč pri 37 °C. Dan po tem smo kolonije prepikirali na svežo ploščo LBA in ponovno inkubirali čez noč pri 37 °C.

### 3.2.5 Kontrola ligacije z reakcijo PCR na osnovi kolonije

Čez noč so zrasle kolonije, pri katerih smo testirali, ali vsebujejo vključek s tehniko PCR na osnovi kolonije.

Uporabili smo enako reakcijsko mešanico kot v primeru klasične PCR-reakcije (preglednica 2), le da smo namesto 1 µL plazmidne DNA v vsako Eppendorfovo epruveto nacepili eno kolonijo. Postopek reakcije PCR je prikazan v preglednici 7.

Preglednica 7: Pogoji reakcije PCR na osnovi kolonije

proses	temperatura	čas	ponovitve
predhodna denaturacija	92 °C	180 s	1 x
denaturacija	95 °C	45 s	30 x
prileganje	58 °C	45 s	30 x
podaljševanje	72 °C	45 s	30 x
končno podaljševanje	72 °C	120 s	1 x
hlajenje	4 °C		

Rezultate smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

### 3.2.6 Obarjanje DNA

Ker postopek ligacije ni bil uspešen, smo se lotili optimizacije procesa. Najprej smo poskusili uporabiti večje koncentracije DNA za sestavo ligacijske mešanice. Večje koncentracije plazmida in inserta smo dobili z obarjanjem DNA.

#### DNA smo obarjali po sledečem postopku:

- združili smo izolirano DNA (končni volumen 500 µL),
- dodali 1/4 volumna (125 µL) 10 M amonijevega acetata (ohlajenega na 4 °C),
- premešali,
- dodali 2 volumna 96 % etanola (ohlajenega na -20 °C),
- inkubirali 1 uro na -20 °C,
- centrifugirali 30 minut pri 14 000 RPM in 4 °C,
- opipetirali supernatant,
- spirali z 1 mL 80 % etanola (ohlajenega na -20°C),
- centrifugirali 15 minut pri 14 000 RPM in 4 °C,
- odpipetirali supernatant, ponovno dodali 80 % etanol in ponovili spiranje,
- DNA smo posušili ob gorilniku,
- raztopili v poljubnem volumnu MQ-vode.

### 3.2.7 Defosforilacija vektorja pRSET EmGFP

Ker smo bili pri ligaciji še vedno neuspešni, smo preizkusili modificirati konce vektorja, da bi preprečili avtoligacijo. Testirali smo namreč 100 kolonij, med katerimi nobena ni vsebovala inserta. Za modifikacijo koncev vektorja smo uporabili fosfatazo. Reakcijska mešanica, ki smo jo uporabili za defosforilacijo, je opisana v preglednici 8.

Preglednica 8: Reakcijska mešanica za defosforilacijo vektorja pRSET EmGFP

reakcijska mešanica	
pRSET EmGFP-vektor	100 ng
fosfataza	1 U
fosfatazni pufer	1 x
bidestilirana voda	do 20 µL

Defosforilacija je potekala 10 minut na 37 °C, ki ji je sledila deaktivacija fosfataze 5 minut pri 75 °C.

Ker ligacija še vedno ni bila uspešna, smo prilagodili postopek defosforilacije s povečanjem količine dodane fosfataze in podaljšanjem časa reakcije (preglednica 9).

Preglednica 9: Prilagojena reakcijska mešanica defosforilacije vektorja pRSET EmGFP

reakcijska mešanica	
pRSET EmGFP-vektor	100 ng
fosfataza	2 oz. 5 U
fosfatazni pufer	1 x
bidestilirana voda	do 20 µL

Defosforilacija je potekala 90 minut na 37 °C, ki ji je sledila deaktivacija fosfataze 10 minut na 75 °C.

### 3.2.8 Producija lizocima

Po uspešni ligaciji smo plazmid z vnešenim genom za lizocim transformirali v produkcijske celice (BL21).

#### Transformacija vektorja pRSET EmGFP in lizocim v produkcijske celice *E. coli*:

- Na ledu smo odtalili 50 µL kemično kompetentnih celic.
- Odtaljenim celicam smo dodali 5–10 ng plazmidne DNA in nežno pretresli Eppendorfovno epuveto.
- Nato smo mešanico 30 minut inkubirali na ledu.
- Toplotni šok: 30 sekund pri 42 °C.
- Po topotnem šoku smo celice takoj dali nazaj na led.
- Nato smo dodali 250 µL LB-gojišča.
- Sledilo je 1 urno tresenje celic pri 37 °C in 250 RPM.
- Po eni uri smo 100 µL celic razmazali na ploščo LBA.
- Plošče smo nato inkubirali čez noč pri 37 °C.

Po transformaciji smo izbrali nekaj kolonij in poskušali inducirati produkcijo lizocima. Uporabili smo različne koncentracije IPTG in spremljali njihovo rast.

### Indukcija produkcije lizocima:

- Kolonije z lizocimom smo nacepili v tekoče gojišče LBA.
- Inkubirali gojišče smo inkubirali čez noč pri 37 °C in 250 RPM.
- 1 mL prekonočne kulture smo nacepili v 25 mL svežega gojišče LBA.
- Kulturo smo inkubirali pri 37 °C in 250 RPM, dokler OD<sub>600</sub> ni dosegel vrednost 0,8.
- Dodali smo različne koncentracije IPTG (0; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM ter 3 mM).
- Inkubirali smo pri 30 °C in 250 RPM.
- Merili optično gostoto (OD<sub>600</sub>) 1 in 3 ure po indukciji.

Po končani indukciji celic smo pripravili vzorce za nanos na poliakrilamidni gel. Najprej je bilo potrebno lizirati celice.

### Liza celic:

- centrifugirali smo 1 mL inducirane kulture 1 minuto na 10 000 RPM,
- raztopili celice v 1 mL fiziološke raztopine,
- dodali 375 mg steklenih kroglic,
- homogenizirali (2, 5, 10, 15, 30 minut) na 30 Hz,
- centrifugirali 10 minut na 10 000 RPM,
- odpipetirali supernatant (lizata) in celičnega debrija.

Lizate smo nato nanesli na proteinski gel, da bi videli, kateri proteini so se izražali v kulturi, in preverili potencialne razlike v izražanju pri različni količini dodanega IPTG.

### Priprava poliakrilamidnega gela

Gel smo pripravili tako, da smo najprej vlili 10 % poliakrilamidni ločevalni gel, počakali 30 minut, da se je strdil, nato pa vlili še 4 % poliakrilamidni nanašalni gel. Vzorčke smo začeli nanašati dve uri kasneje, ko se je gel popolnoma strdil.

Priprava lizata za nanos na poliakrilamidni gel:

- 1,5 µL reducenta,
- 7,5 µL nanašalnega pufra,
- 21 µL vzorca.

Mešanico smo nato 3 minute segrevali na 100 °C, potem pa vzorce nanesli na gel. Elektforeza je najprej potekala pri napetosti 8 V/cm gela, ko so se vzorčki zbrali na liniji med zbiralnim in nanašalnim gelom, pa smo napetost povišali na 15 V/cm gela.

### 3.2.9 Meritev zeta potenciala *Bacillus anthracis* in lizocima

Za čim boljšo vezavo lizocima na nanodelec smo morali ugotoviti, kakšen zeta potencial ima lizocim pri določenih pogojih. Temu primerno smo prilagodili obdelavo nanodelca. Prav tako nas je zanimalo, kakšen zeta potencial ima bakterija *B. anthracis*, da bi celoten sistem lahko prilagodili tako, da bi omogočili najboljšo vezavo konjugata encim in nanodelec na *B. anthracis*, na katerega bi deloval antimikrobnno.

Priprava vzorca *B. anthracis*:

- kolonije *B. anthracis* smo nacepili v 5 mL tekočega gojišča TSB,
- inkubirali 16 ur pri 37 °C in 250 RPM,
- 1 mL prekonočne kulture *B. anthracis* smo nacepili v sveže gojišče TSB (25 mL),
- merili optično gostoto ((OD<sub>600</sub>) vsakih 30 minut),

- pri OD<sub>600</sub> 0,1; 0,6; 0,8 in 1 smo odvzeli 1 mL kulture in jo centrifugirali (1 min pri 15000 RPM),
- pelet smo resuspendirali v fiziološki raztopini,
- 100 µL kulture smo nato redčili z 2 mL razplnjene MQ-vode,
- mešanico smo vstavili v kiveto za meritev zeta potenciala.

Priprava vzorca lizocima:

- pripravili smo raztopino lizocima (redčenje z MQ-vodo do koncentracije 0,78 mg/mL),
- 20 µL raztopine lizocima smo dodali 100 µL PBS (z določeno pH-vrednostjo) in 1200 µL razplnjene MQ-vode,
- mešanico smo vstavili v kiveto za meritev zeta potenciala.

Merjenje zeta potenciala

- na elektrodah smo nastavili konstantno napetost (60 V) ter avtomatsko spremjanje polaritete,
- aparatura je gibljivosti delcev z največjo intenziteto preračunavala v zeta potencial po teoriji Smulchowskega.

### 3.2.10 Priprava delcev iz kalcijevega karbonata

Pripravljali smo delce iz kalcijevega karbonata. Pripravili smo jih z mešanjem kalcijevega nitrata in natrijevega karbonata pri 18 000 RPM. V stekleničko smo odpipetirali 6 mL 1 M natrijevega karbonata in postopoma dodajali 1 mL 0,1 M kalcijevega nitrata (1 mL/h).



Slika 13: Reaktor za pripravo nanodelcev (foto: Stošicki, 2012)

Nanodelce smo pripravljali v suspenziji natrijevega karbonata, v katero smo dodajali raztopino kalcijevega nitrata. Med postopkom dodajanja smo raztopino mešali pri 18 000 RPM.

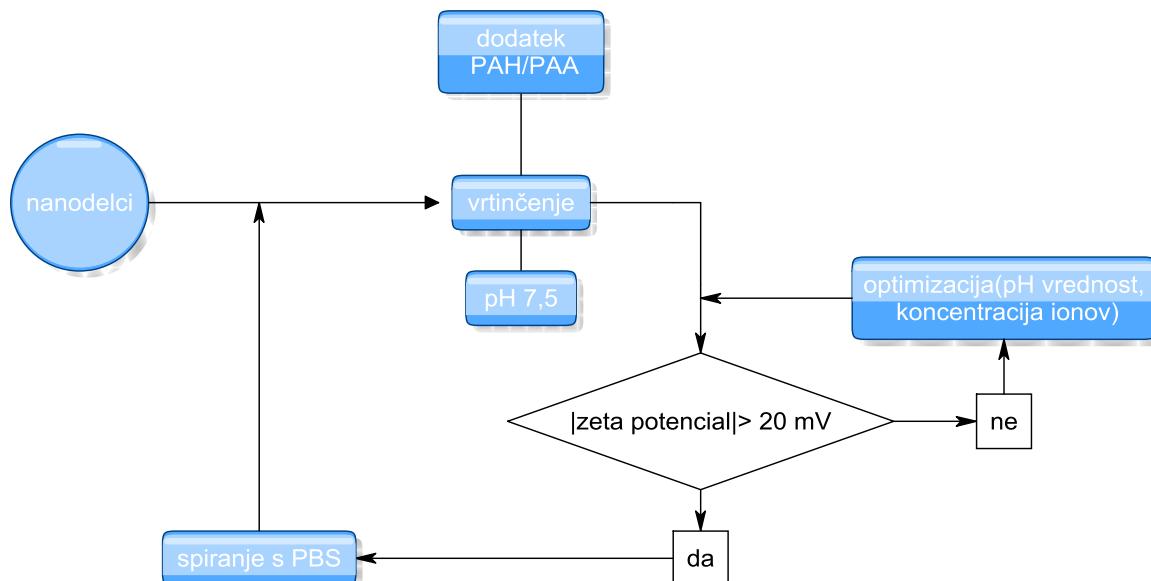
Po eni uri smo pustili raztopino stati 15 minut, da so se največji delci posedli, ostale pa smo odpipetirali v novo stekleničko. Nato smo izmerili velikost in zeta potencial delcev.

Z namenom priprave površine nanodelcev za vezavo encima smo delce oblekli z več plastmi polimerov. To smo naredili z uporabo tehnike »plast na plast«, kjer smo izmenjujoče dodajali

pozitivno (PAH- polialanin hidroklorid) in negativno (PAA- poliakrilna kislina) nabit polimer. Zaradi negativne narave nanodelcev smo za prvi sloj uporabili pozitivno nabit polimer.

### Postopek oblačenja delcev v polimere:

- centrifugirali smo 12 mL delcev 15 minut na 5000 RPM,
- nanesli prvi sloj:
  - dodali 1 mL PAH,
  - uravnali pH na 7,5,
  - inkubirali 1 uro na vrtinčniku (2. stopnja hitrosti),
  - merili zeta potencial (200  $\mu$ L mešanice v 2 mL razplnjene MQ-vode, konstantna napetost 60 V, avtomatsko spremicanje polaritete, preračunavanje mobilnost delcev v zeta potencial po teoriji Smulchowskega),
  - centrifugirali 15 minut na 1000 RPM,
  - odstranili supernatant,
  - resuspendirali delce v 200  $\mu$ L PBS,
  - centrifugirali 15 minut na 1000 RPM.
- Naredili smo 5 takšnih slojev. Pri prvem, tretjem in petem sloju je bil dodan pozitivno nabit polimer PAH, pri drugem in četrtem pa negativno nabit polimer PAA.



Slika 14: Shematska predstavitev obdelave delcev kalcijevega karbonata z dodajanjem polimerov PAA in PAH. Slika prikazuje dodajanje plasti na delce kalcijevega karbonata. Po vsaki dodani plasti smo umerili pH-vrednost raztopine. Nove plasti nismo dodajali dokler absolutna vrednost zeta potenciala raztopine ni bila večja od 20 mV.

Kot šesto plast smo nanodelcem dodali lizocim. Na podlagi prejšnjih meritev smo pH lizocima naravnali na 9. Lizocim ima namreč pri tej vrednosti negativen zeta potencial in ima tako več možnosti za vezavo na pozitivno nabite delce kot pri nevtralni oz. kisi pH-vrednosti.

### Vezava lizocima na obdelane delce:

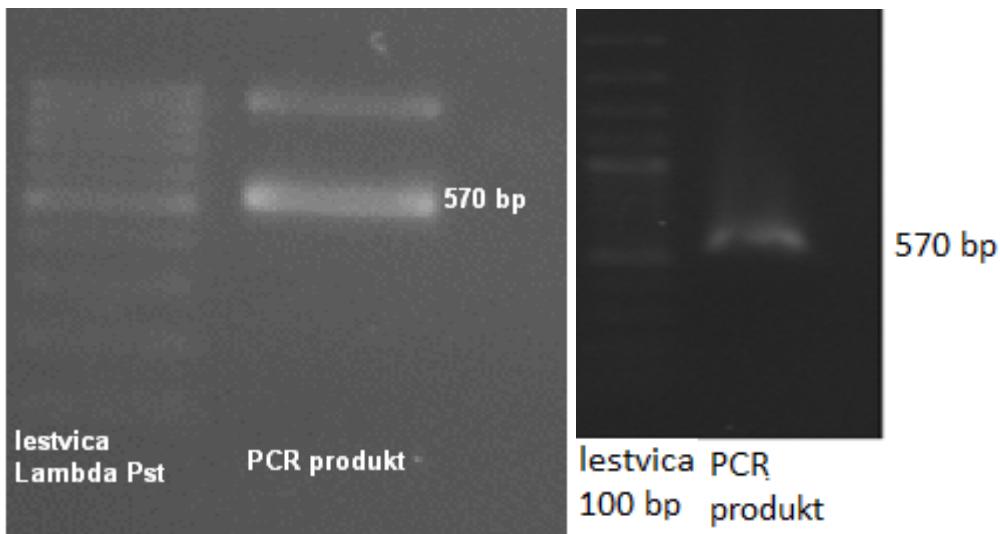
- pripravili smo raztopino lizocima ( $10^{-5}$   $\mu$ g/mL),
- uravnali pH raztopine lizocima na 9,
- dodajali delce v raztopino lizocima,
- 1 uro inkubirali na vrtinčniku (2. stopnja hitrosti).

Po dodani šesti plasti (lizocim) smo ponovno izmerili zeta potencial. Sprememba zeta potenciala iz pozitivnega v negativni potencial je bila pokazateljica vezave lizocima.

## 4 REZULTATI

### 4.1 MOLEKULARNO KLONIRANJE GENA ZA LIZOCIM

Gen za lizocim smo dobili s pomnoževanjem genoma bakteriofaga lambda s PCR-reakcijo. S slike 15 levo je razvidno, da smo poleg želenega produkta (570 bp), ki je predstavljal lizocim, dobili še nespecifičen pomnožek. Da bi to preprečili, smo spremenili razmere PCR-reakcije tako, da smo povečali temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov na 58 °C. Na sliki 15 desno vidimo, da v tem primeru ni prišlo do nespecifičnega naleganja, dobili smo le želen produkt pri 570 bp, ki predstavlja lizocim. PCR-produkt smo nato očistili s kitom za čiščenje PCR-produkta iz gela Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega).

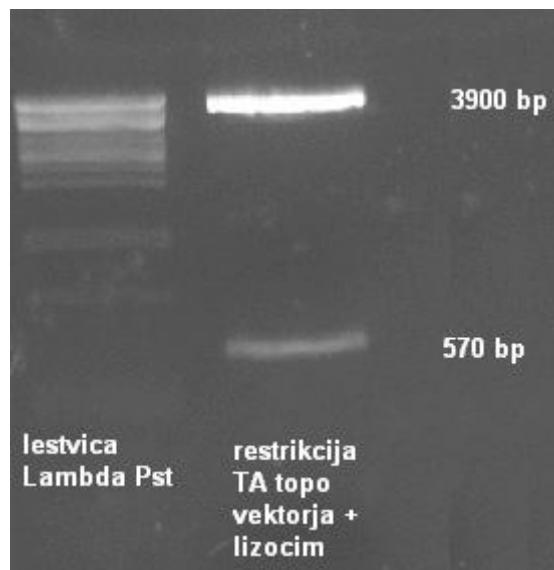


Slika 15: Produkt PCR-reakcije na agaroznem gelu

Slika prikazuje produkt reakcije PCR z uporabo začetnih oligonukleotidov lizocimF1 in lizocimR1. Levi del slike prikazuje produkt PCR-reakcije pred optimizacijo, desni pa po optimizaciji.

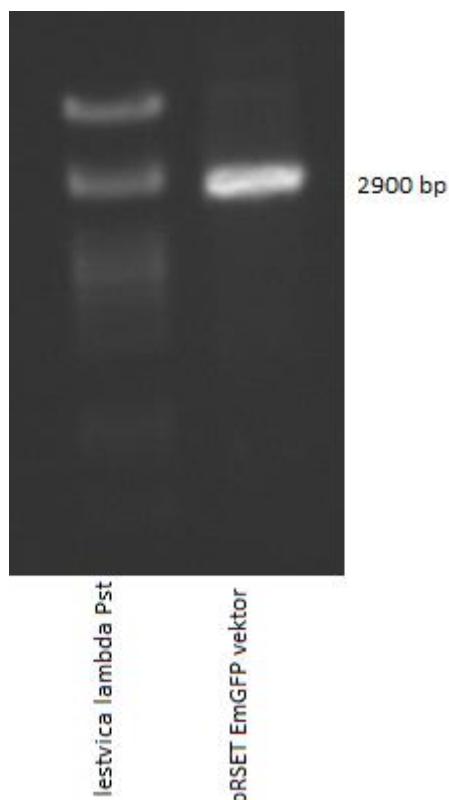
Očiščen PCR-produkt (gen za lizocim) smo v postopku TA-kloniranja vstavili v vektor PCR 2.1 TA TOPO. Vektor z genom za lizocim smo nato transformirali v celice *E. coli*, katere smo ga namnožili in izolirali. Izolacija ni bila uspešna, saj se lizocim očitno sploh ni izražal ali pa ga nismo uspeli izolirati. Reševanja problema izolacije smo se lotili s pripravo svežega pufera za alkalno lizo. Z uporabo svežega pufera je bila izolacija uspešna.

Po izolaciji plazmidne DNA smo izvedli restrikcijo vektorja 2.1 PCR TA TOPO z lizocimom (slika 16) in vektorja pRSET EmGFP (slika 17). Pri restrikciji vektorja 2.1 PCR TA TOPO smo iz gela izrezali in očistili liso pri 570 bp, pri restrikciji vektorja pRSET EmGFP pa liso pri 2900 bp.



Slika 16: Restrikcija TA TOPO-vektorja + lizocim z EcoRI

Na sliki je restrikcija vektorja PCR 2.1 TA TOPO z lizocimom z restriktijskim encimom EcoRI. Po restrikciji smo dobili 2 lis: eno pri 2900 bp, ki predstavlja lineariziran vektor PCR 2.1 TA TOPO, in drugo pri 570 bp, ki predstavlja gen za lizocim.



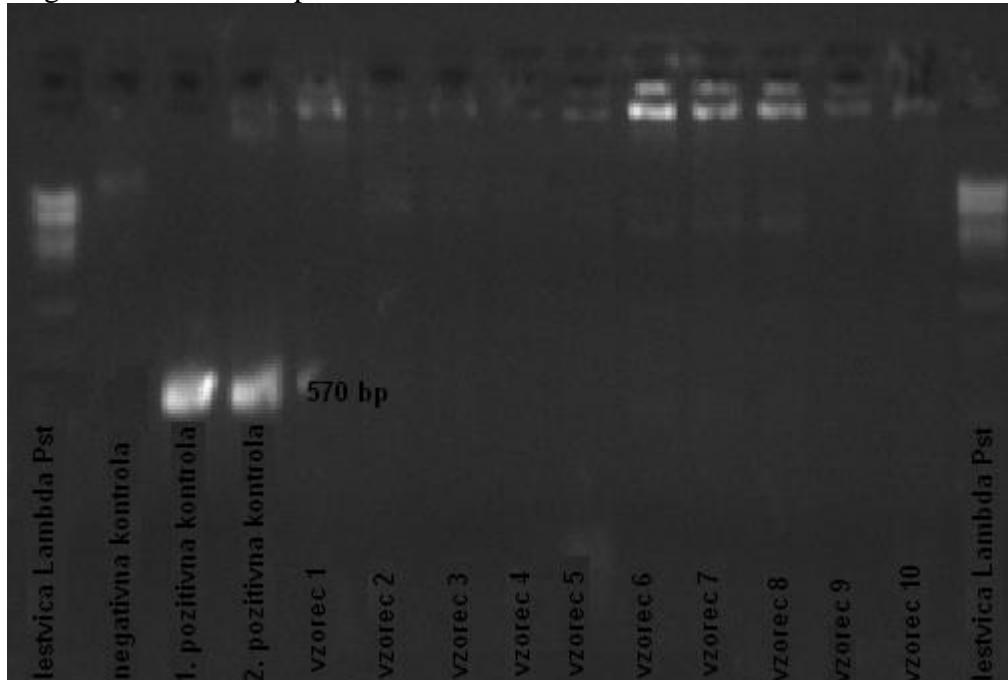
Slika 17: Restrikcija vektorja pRSET EmGFP

Slika prikazuje produkt restrikcije vektorja pRSET EmGFP z restriktijskim encimom EcoRI na agaroznem gelu. Opazna je lisa pri 2900 bp, ki ustreza dolžini vektorja.

Po izolaciji DNA iz gela smo v postopku ligacije lizocim vključili v vektor pRSET EmGFP. Da bi preverili uspešnost ligacije, smo izvedli PCR na osnovi kolonije. V reakcijo smo vključili tri kontrole:

- negativno kontrolo, pri kateri v reakcijsko mešanico nismo dodali DNA. S tem smo preverili morebitno okužbo reagentov.
- 1. pozitivno kontrolo, v kateri smo uporabili PCR-produkt iz prejšnje točke. Tako smo preverili, če reakcija res poteče.
- 2. pozitivno kontrolo, v kateri smo uporabili kolonijo, z vsebovanim plazmidom PCR 2.1 TA TOPO + lizocim. Tako smo preverili, če celice med reakcijo lizirajo in s tem omogočijo PCR-reakcijo.

Testirali smo 100 kolonij. Rezultat, ki je bil pri vseh vzorcih enak, je prikazan na sliki 18. Na sliki vidimo pomnožek pri 570 bp v primeru obeh pozitivnih kontrol in nobenega pomnožka v primeru negativne kontrole in pri vseh testiranih vzorcih.

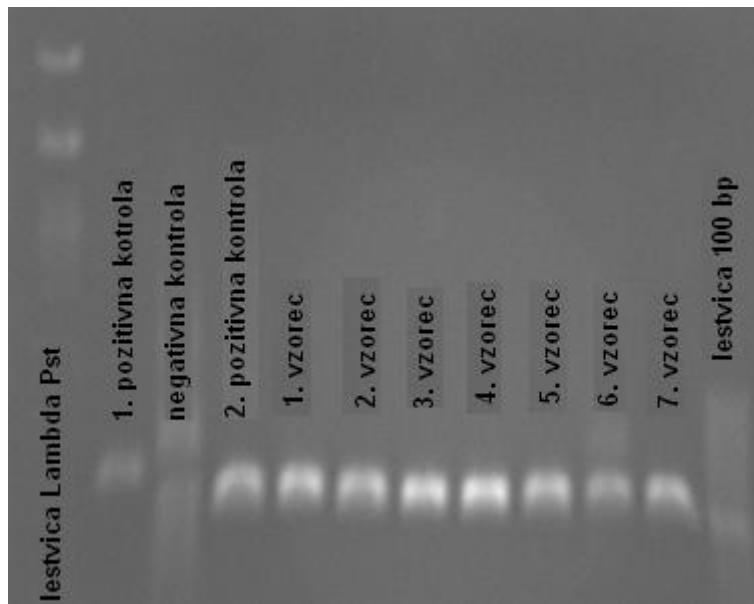


Slika 18: Produkt reakcije PCR na osnovi kolonije za kontrolo ligacije na agaroznem gelu

Slika prikazuje produkt reakcije PCR na osnovi kolonije na 10 različnih vzorcih. Pri nobenem vzorcu ni opazne lise pri 570 bp, ki bi predstavljala gen za lizocim.

Po neuspešni ligaciji smo začeli z optimizacijo procesa.

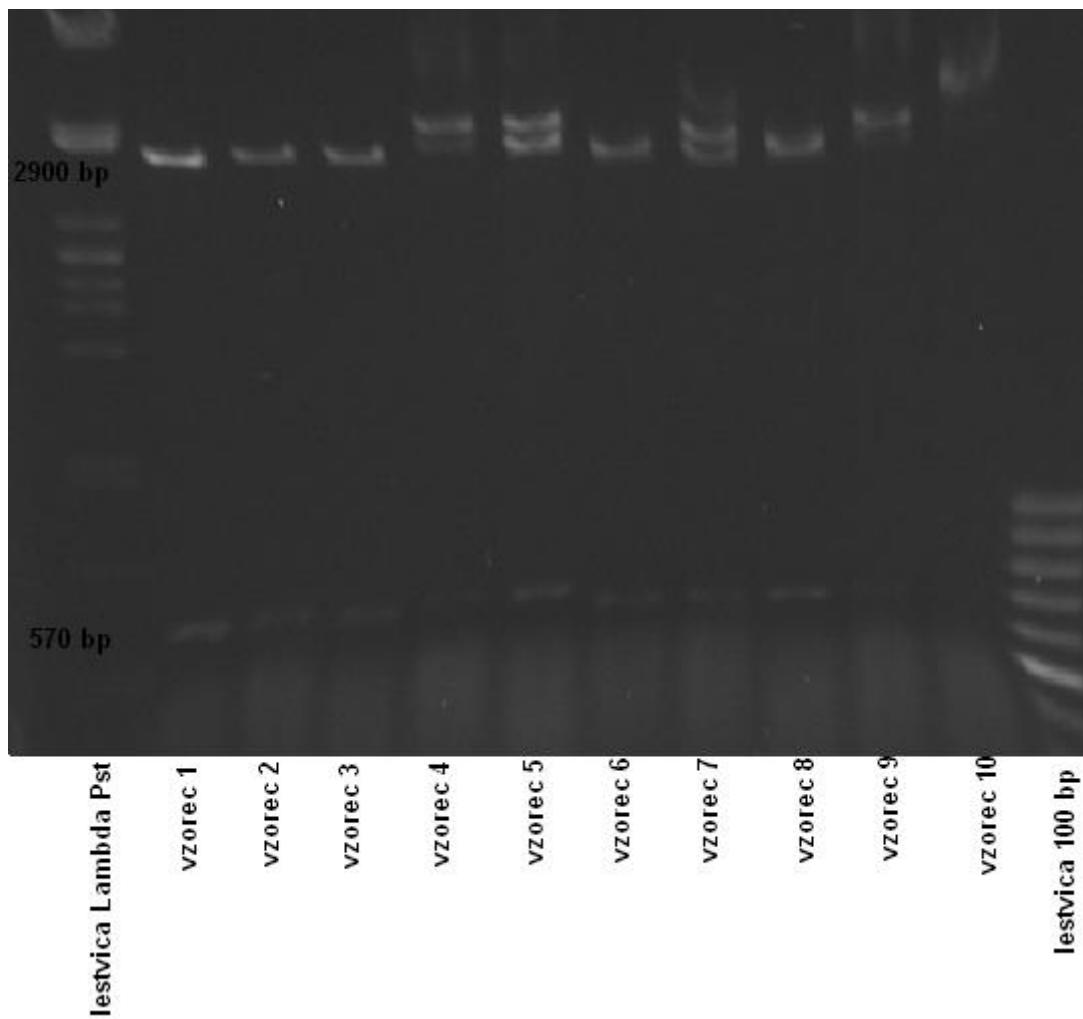
- V prvem koraku smo povečali molarno razmerje med dodanim insertom in vektorjem, in sicer na 1 : 10. Ostali koraki so ostali nespremenjeni. Tudi v tem primeru ni prišlo do ligacije.
- V drugem koraku smo poskušali s povečanjem koncentracije DNA v ligacijski mešanici in s tem zmanjšali število prostostnostnih stopenj za ligacijo. Dodali smo 50 ng vektorja in 50 ng inserta, a do ligacije ni prišlo.
- V tretjem koraku smo se odločili za modifikacijo koncev vektorja pRSET EmGFP, da bi s tem zmanjšali možnost samoligacije. Uporabili smo fosfatazo za defosforiliranje vektorja. Defosforilacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca in ponovno dobili negativen rezultat.
- V četrtem koraku smo se odločili za spremembo postopka defosforilacije, in sicer smo uporabili 2 x oz. 5 x več fosfataze kot v navodilih in čas inkubacije povečali iz 10 na 90 minut. V tem primeru je bila ligacija uspešna. Rezultati so prikazani na sliki 19, kjer je razvidno, da je pomnožek odstoten le v primeru negativne kontrole, pri pozitivnih kontrolah in pri vseh testiranih vzorcih pa je prisotna lisa pri 570 bp.



Slika 19: Produkt PCR na osnovi kolonije za kontrolo ligacije na agaroznem gelu

Slika predstavlja produkt reakcije PCR na osnovi kolonije na 7 različnih vzorcih. Pri vseh je opazna lisa pri 570 bp, ki predstavlja lizocim.

Da bi rezultate PCR na osnovi kolonije potrdili, smo izvedli še kontrolno restrikcijo z EcoRI. Tudi v tem primeru so bili rezultati pozitivni, kot lahko vidimo na sliki 20. V primeru, da so vsebovali želen vključek, smo pričakovali na gelu dve lisi: eno na višini 570 bp (vključek) in drugo na 2900 bp (lineariziran vektor). V nekaterih primerih (vzorec 4, 5, 7, 9) je prisotna tudi dodatna lisa pri 5000 bp, ki predstavlja nerezan vektor. Pri devetem vzorcu ni lise pri 570 bp, a ker je ni tudi pri 2900 bp, temveč se je pojavila le ena lisa na višini 5000 bp, predvidevamo, da restrikcija ni potekla in na gelu vidimo le nerezan vektor. Nerezan vektor je dolžine 3470 bp, a je na gelu malo višje. Razlog je v njegovi obliki, saj ni lineariziran, ampak cikličen, kar pomeni, da potuje v gelu počasneje, in je lisa višje na gelu.



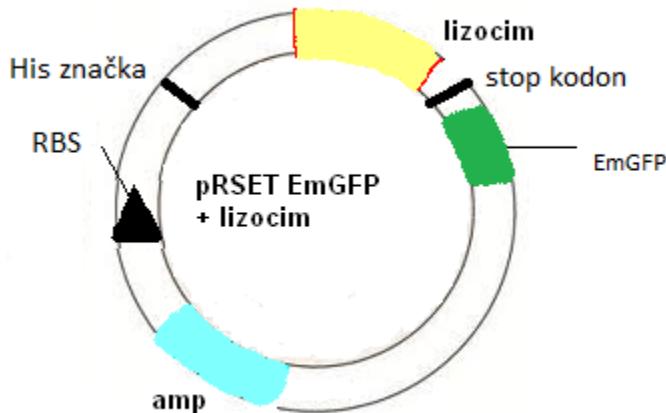
Slika 20: Kontrolna restrikcija vektorja pRSET EmGFP za kontrolno ligacijo

Na sliki je nanos kontrolne restrikcije vektorja pRSET EmGFP + lizocim z EcoRI 10-vzorcev na agarozni gel.

Pri vseh je opazna lisa pri 2900 bp, ki predstavlja vektor pRSET EmGFP in pri 570 bp, ki predstavlja gen za

lizocim.

Tako smo s PCR na osnovi kolonije in kontrolno restrikcijo potrdili, da plazmid vsebuje naš vključek. Ker pa smo pri restrikciji uporabili le en encim, nismo vedeli, ali je insert pravilno orientiran ali ne. To smo preverili s sekvenciranjem. 96 vzorcev smo poslali na sekvenciranje v Macrogen (Amsterdam), kjer so izvedli sekvenciranje z njihovim začetnim oligonukleotidom T7 promoter (TAATACGACTCACTATAGGG). Rezultati sekvenciranja so pokazali, da je 70 vzorcev imelo pravilno orientiran vključek, 26 pa napačno. Poleg tega smo iz rezultatov sekvenciranja ugotovili, da je prišlo do točkovne mutacije v vektorju pRSET EmGFP. Posledica točkovne mutacije je bil stop kodon pred genom za protein EmGFP.

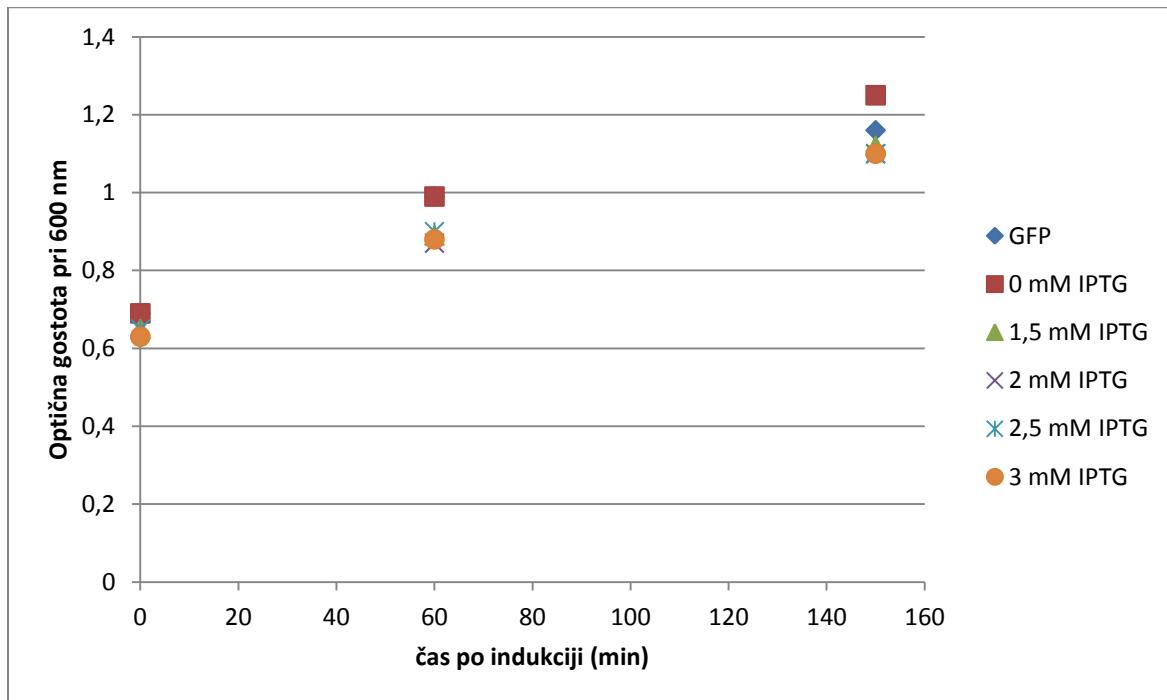


Slika 21: Rezultati sekvenciranja vektorja pRSET EmGFP + lizocim

Na sliki je prikazan vektor pRSET EmGFP, ki smo mu dodali gen za lizocim. Med postopkom je prišlo do točkovne mutacije, ki je povzročila nastanek stop kodona pred genom za protein EmGFP.

#### 4.2 PRODUKCIJA LIZOCIMA

Po uspešni ligaciji smo plazmid transformirali v produkcijske celice (BL21). Celice so bile kemično kompetentne, zato smo izvedli transformacijo s toplotnim šokom. Po transformaciji je sledila produkcija lizocima z dodajanjem različnih koncentracij IPTG celični kulturi. Med produkcijo smo spremljali rast celic (slika 22). Na sliki je prikazana primerjava rasti celic, ki smo jim dodali različne koncentracije IPTG. Kontrolo indukcije predstavljajo celice BL21, ki imajo vnešen originalen vektor pRSET EmGFP, drugo kontrolo pa predstavljajo celice BL21 z vnešenim vektorjem pRSET EmGFP z lizocimom. Celice brez dodanega IPTG so rasle malenkost hitreje, vse druge pa so rastle z enako hitrostjo ne glede na različne koncentracije dodanega IPTG.

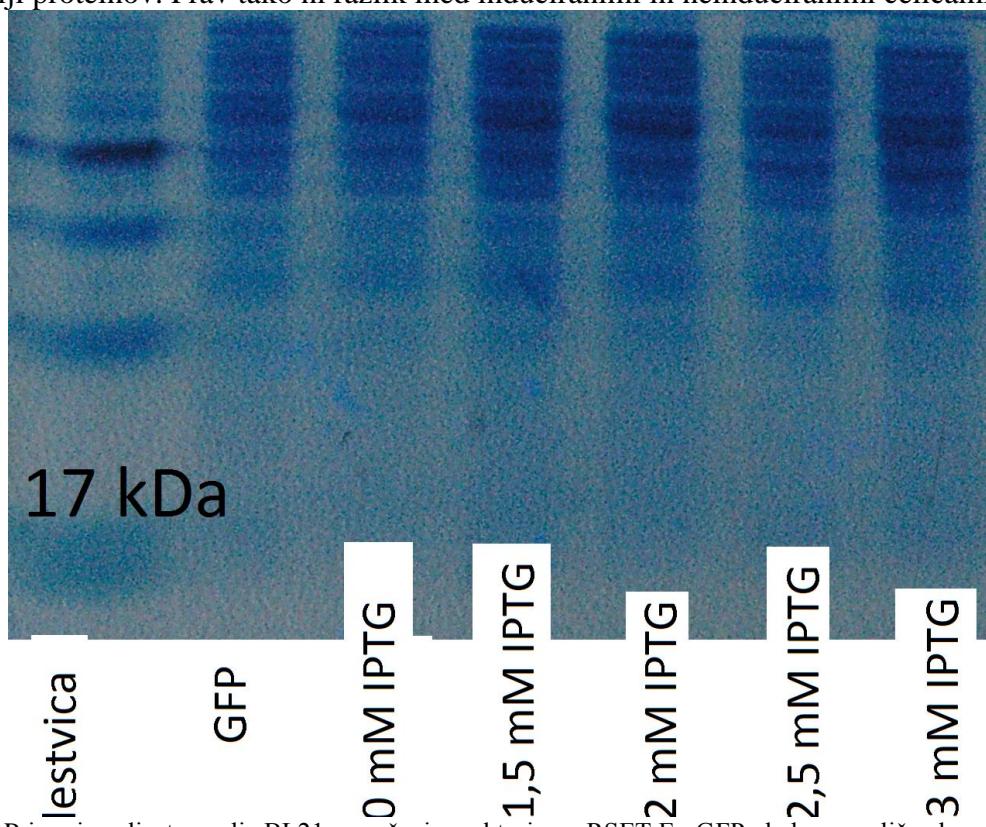


Slika 22: Rast celic BL21, transformiranih z vektorjem pRSET EmGFP + lizocim, v odvisnosti od koncentracije dodanega IPTG

Na grafikonu je prikazana rast celic *E. coli*, ki vsebujejo vektor pRSET EmGFP z lizocimom po dodatku različnih koncentracij IPTG. Med različnimi koncentracijami dodanega IPTG ni prihajalo do razlik v hitrosti rasti.

Produciji je sledila liza celic s homogenizatorjem Mill Mix 2000. Celice z dodanimi kroglicami smo stresali pri 30 Hz. Potrebno je bilo določiti čas stresanja, ki ga potrebujemo, da razbijemo stene celic. Poskusili smo 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min in 30 min. Lizate smo nato razmazali na plošče LBA in naslednji dan ocenili, pri katerem času dosežemo lizo celic. Po 2 in 5-minutah tresenja je bilo na ploščah še veliko kolonij, od 10-minut naprej pa smo dosegli 99 % lizo celic. Zato smo v nadaljevanju uporabljali 10-minutno homogeniziranje.

Lizate smo nato nanesli na 10 % poliakriramidni gel (slika 23). Na sliki vidimo, da med celicami, ki so rastle v gojiščih z različnimi koncentracijami IPTG, ni prihajalo do razlik v ekspresiji proteinov. Prav tako ni razlik med induciranimi in neinduciranimi celicami.

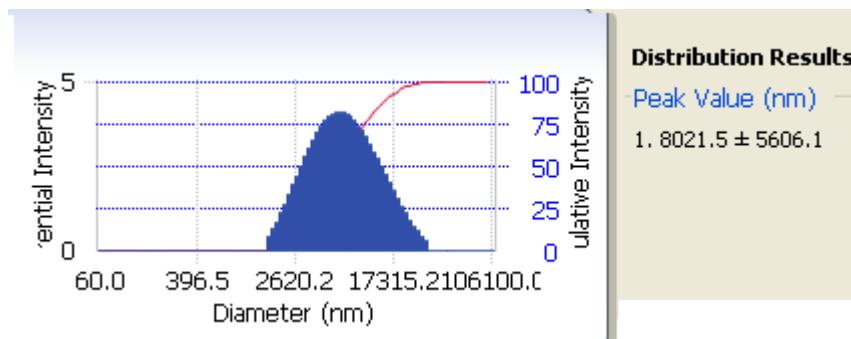


Slika 23: Primerjava lizatov celic BL21 z vnešenim vektorjem pRSET EmGFP glede na različne koncentracije dodanega IPTG

Pri 17 kDa smo pričakovali liso, ki bi predstavljala lizocim, vendar se ni pojavila pri nobenem vzorcu. Prav tako ni razlik v izražanju proteinov med celicami, ki so rastle v gojišču z različnimi koncentracijami IPTG.

#### 4.3 PRIPRAVA NANODELCEV

Pripravili smo delce iz kalcijevega karbonata in izmerili njihovo velikost (slika 24). Dobili smo zelo polidisperzno mešanico delcev od nano do mikrovelikosti. Največ delcev je bilo velikosti približno 1800 nm.

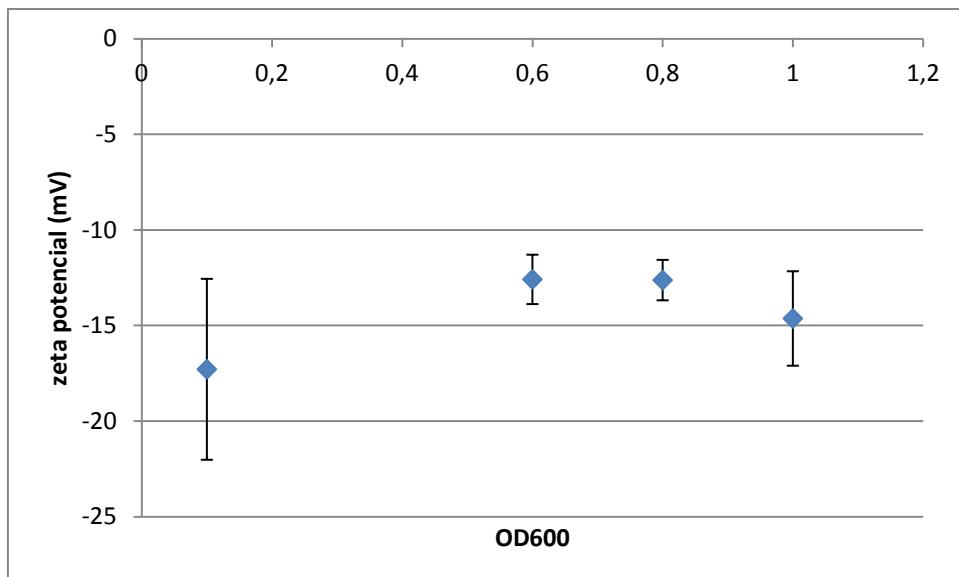


Slika 24: Velikost pripravljenih delcev iz kalcijevega karbonata, zmerjenih na Delsa Nano  
Na sliki je prikazana porazdelitev velikosti dobljenih delcev kalcijevega karbonata. Dobili smo zelo polidisperzno mešanico, v kateri so glavni delež predstavljal delci velikosti 1.8021 nm.

#### 4.4 ZETA POTENCIAL LIZOCIMA IN *B. anthracis*

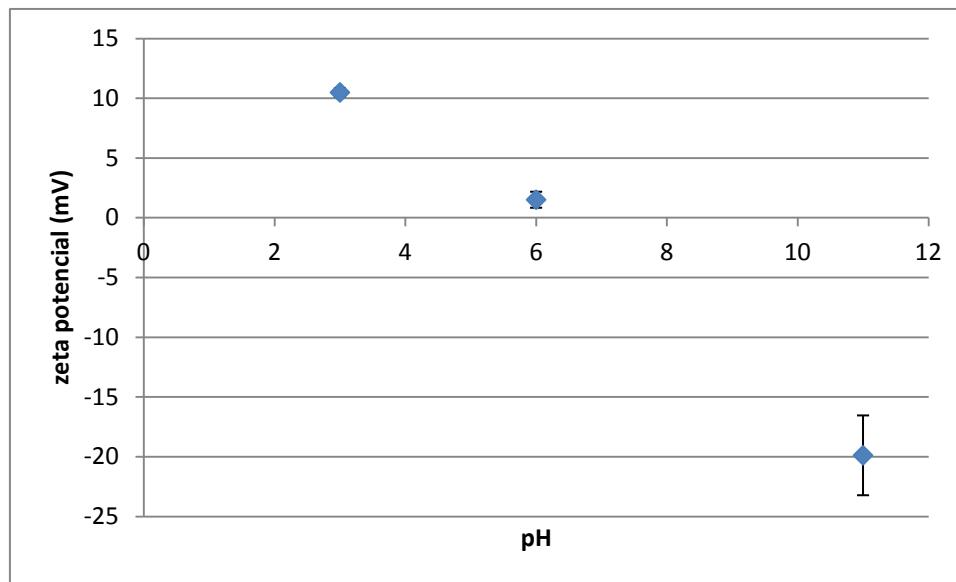
Za namen naše raziskave je bilo pomembno, da smo izmerili zeta potencial *B. anthracis* in lizocima. Ti podatki so nam pomagali pri določanju naboja zadnje plasti oblačenja nanodelcev.

Zeta potencial *B. anthracis* smo merili v različnih fazah rasti (slika 25). Opazili smo, da je zeta potencial med rastjo konstanten, in sicer je ves čas približno 14 mV. Nihanja, ki smo jih opazili, so namreč v okviru napake.



Slika 25: Zeta potencial *B. anthracis* v različnih stopnjah rasti  
Slika prikazuje spremenjanje zeta potenciala *B. anthracis* v različnih stopnjah rasti. Zeta potencial se med rastjo bakterije ne spreminja.

Pri določanju zeta potenciala lizocima smo meritve izvajali pri različnih pH-vrednostih. Iz meritev je razvidno, da ima lizocim v bazičnih raztopinah (pH 11) negativen zeta potencial (-20 mV), pri nevtralnih pH-vrednostih je zeta potencial blizu 0 (1,5 mV), pri kislih vrednostih (pH 3) pa je zeta potencial pozitiven (10,5 mV), kar prikazuje slika 26.



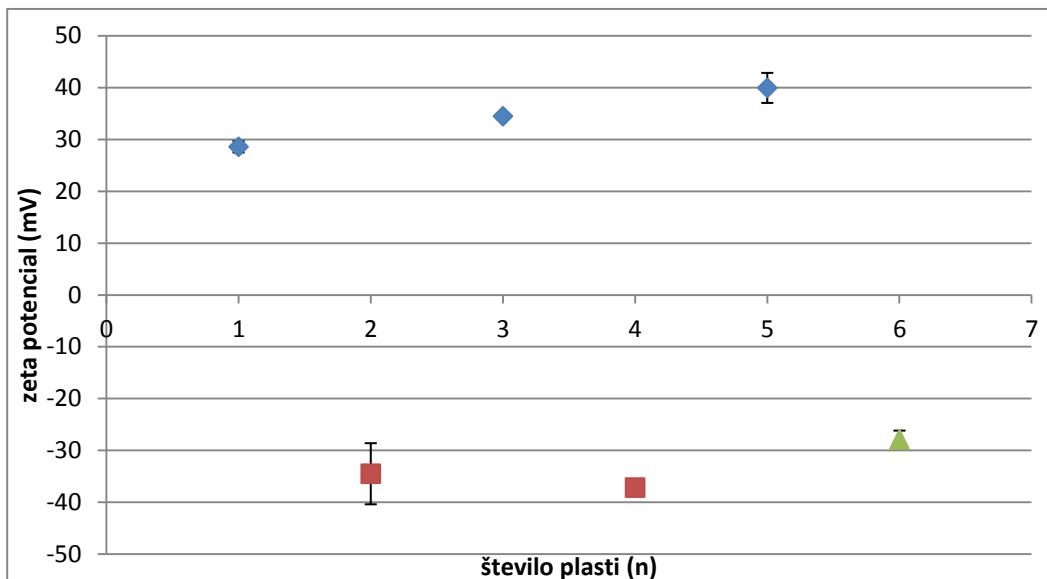
Slika 26: Zeta potencial lizocima v odvisnosti od pH raztopine

Na sliki je prikazana odvisnost zeta potenciala lizocima od pH-vrednosti raztopine. Pri kislih pH-vrednostih je zeta potencial pozitiven, pri nevtralnih blizu nič, pri bazičnih pH-vrednostih pa ima negativno vrednost.

Na osnovi pridobljenih rezultatov smo se odločili, da bomo oblačenje delcev zaključili s pozitivno nabitimi polimeri (PAH) in na tako obdelane delce vezali bazično raztopino lizocima (negativen zeta potencial).

#### 4.5 PRIPRAVLJENI NANODELCI ZA VEZAVO LIZOCIMA

Delce smo začeli oblačiti v polimere. Prva dodana plast je bila pozitivno nabit polimer PAH, ki je zeta potencial delcev spremenil v pozitivno vrednost. Druga plast (negativno nabit polimer PAA) je zeta potencial spremenila v negativno vrednost, tretja plast (PAH) v pozitivno vrednost, četrta plast (PAA) v negativno vrednost in peta plast (PAH) ponovno v pozitivno vrednost. Vezava lizocima pri pH-vrednosti 9 je spremenila zeta potencial delcev v negativno vrednost. Pri tem je ob dodatku pozitivnega polimera zeta potencial z dodajanjem plasti naraščal, pri dodajanju negativnih plasti pa je ostajal enak, kar je prikazano na sliki 27.



Slika 27: Spreminjanje zeta potenciala nanodelcev z dodajanjem plasti polimerov PAH in PAA na nanodelce kalcijevega karbonata

Slika prikazuje spremjanje zeta potenciala delcev glede na dodajanje nabitih polimerov. Rdeče točke predstavljajo delce v fazi, ko smo dodajali negativno nabit polimer (PAA), modre v fazi dodajanja pozitivno nabitega polimera (PAH), zelena točka pa prikazuje vrednost zeta potenciala delcev, ko smo dodali šesto plast – lizocim.

## 5 RAZPRAVA

Na področju nanotehnologije se v zadnjem času močno razvijajo inovativni materiali, ki so sposobni preprečevati rast neželenih organizmov (Cioof in Rai, 2012). Za zdravljenje raznih bolezni namreč potrebujemo nova antimikrobna sredstva. V tej magistrski nalogi smo naredili nanodelce iz kalcijevega karbonata. Delci iz kalcijevega karbonata so tema številnih študij zaradi širokih možnosti njihove uporabe v industriji, tehnologiji, medicini in na mnogih drugih področjih (Sukkhorukov in sod., 2004). Dobljene delce smo nato oblekli v več plasti polimerov s tehniko »plast na plast«. Tehnika se množično uporablja že več kot 20 let in je močno izboljšala kontrolo nad fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi kapsul (Johnston in sod., 2006). Na tako obdelane nanodelce se lahko vežejo oz. inkapsulirajo antimikrobna sredstva. V našem primeru smo na oblečene delce vezali lizocim.

### 5.1 MOLEKULARNO KLONIRANJE

Molekularno kloniranje zajema tehnike, s pomočjo katerih prenesemo želeni DNA segment iz danega organizma v drug (Štrukelj, Kos, 2007). V našem primeru smo iz bakteriofaga lambda namnožili gen za lizocim in ga vnesli v celice *E. coli*. Razlog za kloniranje lizocima je bil v spremenjanju njegovih lastnosti, ki bi optimizirale/ izboljšale njegovo vezavo na nanodelce.

Postopek smo začeli s PCR-reakcijo s Taq-polimerazo. Za pomnoževanje gena za lizocim iz bakteriofaga lambda smo dizajnirali dva para začetnih oligonukleotidov (preglednica 1). Za par lizocimF1 in lizocimR1 smo se odločili na podlagi stabilnosti sekundarnih struktur začetnih oligonukleotidov. Ker so imele sekundarne strukture para lizocimF1 in lizocimR1 nižjo temperaturo taljenja ( $22,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $38,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), kot sekundarne strukture para lizocimF2 in lizocimR2 ( $(22,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $40,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), smo PCR-reakcijo izvedli z njima. Prvotna temperatura naleganja začetnih oligonukleotidov je bila  $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kar je približno  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  nižje od predvidene temperature razpada 50 % začetnih oligonukleotidov ( $T_m$ ). Ker smo v tem primeru poleg želenega pomnožka dobili še en nespecifičen pomnožek (slika 16 levo), smo se odločili za povišanje temperature naleganja začetnih oligonukleotidov. Z višanjem temperature naleganja smo dobili več želenega pomnožka in manj ostalih (slika 16 desno). To je bilo pričakovano, saj nižja temperatura omogoča posamezna neujemanja oz. le delno naleganje. Pri previsoki temperaturi pa reakcija ne uspe, ker začetni oligonukleotid ni več stabilen (Sambroock, 2001). Tako smo si za temperaturo naleganja v končni fazi izbrali  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri tej temperaturi prileganja smo dobili le želen pomnožek pri 570 bp.

PCR-reakciji je sledilo kloniranje gena za lizocim v vektor PCR 2.1 TA TOPO. Ker smo pri PCR-reakciji uporabili Taq-polimerazo, je naš pomnožek na obeh koncih pridobil adenin. Taq-polimeraza namreč pri pomnoževanju segmenta na 3` koncu pri vsakem pomnoževanju doda adenin, tak segment pa je tako možno vstaviti v vektor, ki ima na svojih 5` koncih timin (Štrukelj in Kos, 2007). Takšen vektor je vektor PCR 2.1 TA TOPO. Ligacija je bila zato enostavna in brez potrebne restrikcije. Po uspešni ligaciji in transformaciji plazmida v *E. coli* smo želeli izolirati plazmid. Izolacijo smo izvedli po standardnem postopku, a ni bila uspešna. Celice so namreč vsebovale lizocim, ki lahko povzroči njihovo lizo oz. oslabi njihovo celično steno (Morita in sod., 2001). Predvidevamo, da so prezivele le celice z najodpornejšo celično steno, ki so bile odporne na pufer za alkalno lizo. Zaradi visoke odpornosti je bilo potrebno optimizirati razmere alkalne lize, kar smo dosegli z uporabo svežega pufra za alkalno lizo. Izolacija je nato uspela.

Gen za lizocim smo tako najprej namnožili v vektorju PCR 2.1TA TOPO, nato pa smo ga želeli klonirati v vektor pRSET EmGFP. Za kloniranje v drug vektor smo se odločili zaradi raznih dodatkov, ki jih ima vektor pRSET EmGFP. Opremljen je namreč s His- značko, ki olajša postopke izolacije in čiščenja proteina, zaradi pozitivnega naboja histidina pa bi pripomogla tudi k večji vrednosti zeta potenciala lizocima in s tem omogočila lažjo vezavo na nanodelec. Na vektorju pa je prisoten tudi gen za flourescentni protein (EmGFP), ki bi nam pomagal pri oceni ekspresije in pri opazovanju dogajanja. Prav tako pa ima močan T7-promotor, ki se uporablja v primerih, ko je želen visok nivo izražanja genov (Madigan in sod., 2012).

Kloniranja smo se lotili z restrikcijo vektorja pRSET EmGFP in PCR 2.1 TA TOPO- vektorja + lizocim z restrikcijskim encimom EcoRI (sliki 16 in 17). Restrikcija pRSET EmGFP-vektorja je omogočila linearizacijo vektorja, restrikcija PCR 2.1 TA TOPO + lizocim vektorja pa je povzročila, da je iz vektorja izpadel gen za lizocim. V postopku ligacije smo nato združili gen za lizocim in lineariziran vektor pRSET EmGFP. Novo nastali vektor smo nato transformirali v celice *E. coli*.

Po transformaciji smo izvedli PCR na osnovi kolonije, da bi preverili uspešnost ligacije. V primeru uspešne ligacije bi po nanosu produkta PCR-reakcije z začetnima oligonukleotidama lizocimF1 in lizocimR1 na agarozni gel opazili liso pri 570 bp. Testirali smo 100 različnih kolonij, a pri vseh smo dobili isti rezultat, in sicer brez pomnožka. Rezultat nakazuje, da so vse kolonije vsebovale le vektor pRSET EmGFP, brez inserta (slika 18). Po priročniku smo se nato lotili reševanja problemov samoligacije vektorja (Fermentas, 2012). Najprej smo poskusili povečati koncentracijo uporabljene DNA, saj bi tako zmanjšali število prostostnostnih stopenj vektorja v ligacijski mešanici. Koncentracijo dodane DNA v ligacijski mešanici smo tako iz 1,4 ng/µL povišali na 5 ng/µL. Ker spet nismo bili uspešni, smo spremenili tudi razmerje molarnih koncentracij vektorja in inserta. Razmerje smo spremajali v korist inserta, in sicer do vrednosti 1 : 10. Ker tudi pri 10 x večji molarni koncentraciji inserta v primerjavi z vektorjem ligacija ni uspela, smo se odločili za modifikacijo koncov vektorja. Modifikacijo smo izvedli z encimom fosfatazo, ki odvzame fosfatno skupino na koncih vektorja in tako onemogoči njegovo samoligacijo (Sambrook, 2001). Reakcijo smo najprej izvedli po navodilih proizvajalca (Fermentas). Zaradi uporabe topotnetno občutljive fosfataze je bila za njeno deaktivacijo dovolj le inkubacija na povišani temperaturi. Če bi uporabili teličjo fosfatazo pa bi bila potrebna še ekstrakcija s fenolom (Protocol for..., 2012). Ker postopek še vedno ni bil uspešen, smo poskusili optimizirati postopek defosforilacije. Zaradi ponovne samoligacije vektorja smo namreč sklepali, da defosforilacija ni bila uspešna. Ko smo povečali število dodanih enot fosfataze (iz 1 na 2 oz. 5 enot) in podaljšali čas inkubacije ligacijske mešanice s fosfatazo (iz 10 na 90 minut), smo dobili pozitiven rezultat (slika 19). Probleme s samoligacijo vektorja bi lahko rešili tudi na druge načine. Lahko bi spremenili celoten potek kloniranja in uporabili dva restrikcijska encima namesto enega. Lahko pa bi tudi v drugem koraku uporabili TA vektor z His značko npr. pET 302 NT-His (Sambrook, 2001).

Da bi rezultate o uspešnosti ligacije, dobljene s PCR-reakcijo, dodatno potrdili, smo izvedli še kontrolno restrikcijo. Izoliran plazmid smo rezali z EcoRI in restrikcijo nato pregledali na agaroznem gelu (slika 20). Opazili smo dve lisi: eno pri 2900 bp, ki je predstavljal vektor pRSET EmGFP, in drugo pri 570 bp, ki je predstavljal lizocim. V nekaterih primerih je bila prisotna tudi lisa večje velikosti, ki je predstavljal nerezan vektor, ki zaradi svoje oblike potuje počasneje kot linearni fragmenti iste velikosti.

Ker smo restrikcijo izvedli z enim restrikcijskim encimom (EcoRI, smo morali preveriti še, če je naš insert pravilno orientiran. To smo naredili s sekvenciranjem. Na sekvenciranje smo poslali 96 vzorcev od katerih jih je 70 imelo pravilno orientiran vključek, 26 pa nepravilno. Enega izmed 70-vzorcev s pravilno orientacijo vključka smo nato uporabljali naprej za produkcijo lizocima. Med pregledovanjem rezultatov sekveniranja smo ugotovili, da je v vektorju prišlo do točkovne mutacije, posledica katere je bil vnešen stop kodon pred gen za EmGFP (slika 21). Stop kodon je onemogočil izražanje celotnega fuziranega lizocima z EmGFP-proteinom.

## 5.2 PRODUKCIJA LIZOCIMA

Za produkcijo lizocima smo vektor z vsebujočim genom za lizocim najprej prenesli v produkcijske celice *E. coli* (BL21). Z dodatkom IPTG smo sprožili izražanje genov pod T7-promotorsko sekvenco (Sambrook, 2001), ki je bil v našem primeru lizocim. IPTG se navadno dodaja, ko OD<sub>600</sub> bakterijske kulture doseže vrednost 0,4 (Invitrogen). Mi pa smo ga dodali, ko je OD<sub>600</sub> bakterijske kulture dosegla vrednost 0,8. Razlog za kasnejši dodatek IPTG je bil v morebitni toksičnosti lizocima za celice. Ker je T7-promotor inducibilen, smo počakali, da se je bakterijska kultura približevala stacionarni fazi in nato dodali IPTG. Pričakovali smo, da se bo tako nastalo največ lizocima, saj je bilo največ celic, ki bi ga lahko proizvajale. Smrt celic zaradi produkcije lizocima ni imela pomembne vloge, saj jih nismo potrebovali za nadaljevanje raziskovalne naloge.

V iskanju optimalne metode za produkcijo lizocima smo preizkusili indukcijo celic z različnimi koncentracijami IPTG (0; 1,5; 2; 2,5 in 3 mM). Da bi zmanjšali verjetnost nastajanja inkluzijskih teles, smo temperaturo gojenja zmanjšali na 30 °C (Soetaert in Vandamme, 2010). Po dodatku IPTG smo spremljali rast celic (slika 22). Na podlagi že izvedenih raziskav smo pričakovali, da bodo celice zaradi izražanja lizocima začele odmirati (Morita in sod., 2001). Pričakovali smo tudi, da bodo celice, ki smo jim dodali višje koncentracije IPTG, začele odmirati hitreje. Iz grafikona na sliki 22 vidimo, da se to ni zgodilo. Celice so rasle enako ne glede na koncentracijo dodanega IPTG. Hitrejša rast je bila opazna le pri vzorcu z dodanim 0 mM IPTG. To bi lahko bil pokazatelj odmiranja celic zaradi produkcije lizocima, zato smo primerjali rast teh celic s celicami, ki vsebujejo originalen vektor pRSET EmGFP in katerim smo prav tako dodali IPTG. Opazili smo, da med hitrostjo rasti ni razlik. Na podlagi tega smo zaključili, da je počasnejša rast le posledica dodanega IPTG, ki predstavlja za celico nek šok in ne lize celic zaradi produkcije lizocima. Sklepamo, da bi razlog za neliziranje celic lahko bil v neučinkoviti indukciji ali pa v nastajanju nefunkcionalnega proteina. V primeru izražanja funkcionalnega lizocima namreč pride do upočasnjenih rasti celic *E. coli*, ki je posledica lize celic (Morita in sod., 2001).

Na vzorcih iz produkcije lizocima smo izvedli tudi proteinsko analizo. Lizate vzorcev smo nanesli na 10 % poliakrilamidni gel in pogledali, če je prisotna lisa pri 17 kDa, ki bi predstavljal lizocim (slika 23). Rezultati so se skladali z rezultati spremljanja rasti celic. V nobenem primeru namreč ni bilo lise pri 17 kDa, prav tako nobena lisa ni posebej izstopala, kar bi nakazovalo, da je posledica dodatka IPTG in s tem sprožene produkcije. Zato sklepamo, da je bilo nekaj narobe v postopku indukcije produkcije lizocima oz. pri pripravi vzorca za nanos na proteinski gel. Za natančnejšo analizo problema bi bilo potrebno testirati aktivnost produciranih proteinov na substratu za lizocim, npr. celice *Micrococcus lysodeikticus* (Chakraborti in sod., 2009). V primeru, da bi ugotovili, da do izražanja proteina ne pride, bi bilo potrebno optimizirati razmere indukcije. Pri optimizaciji indukcije se lahko spreminja mnogo različnih dejavnikov: gostota celice, pri kateri se inducira produkcijo,

koncentracija dodanega IPTG, produkcijsko gojišče, ekspresijski vektor, izbrani bakterijski sev, temperatura gojenja, nivo kisika, število kopij vektorja, zamenjava promotorja ... (Jana in Deb, 2005). V primeru izražanja nefunkcionalnega proteina pa bi lahko poskusili klonirati lizocim v vektor tako, da bi bila His- značka na desni strani lizocima namesto na levi. V primeru, da tudi to ne bi pomagalo, pa bi lahko poskusili še z dodatkom povezovalca med lizocimom in His- značko, s tem bi namreč zmanjšali oviranje delovanja lizocima zaradi His-značke.

### 5.3 PRIPRAVA NANODELCEV IN SPREMINJANJE POTENCIALA NA NJIHOVI POVRŠINI

Za pripravo delcev iz kalcijevega karbonata smo se odločili zaradi njihove visoke biokompatibilnosti, visoke specifične površine in njihovih agregacijskih sposobnosti (Shan in sod., 2006). Proizvedli so jih že številni raziskovalci. Klasična metoda sinteze je mešanje topnih soli  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{CO}_3^{2-}$ , ki precipitirajo v kalcijev karbonat (Sukhorukov in sod., 2004). Pripravljeni smo jih z mešanjem kalcijevega nitrata in natrijevega karbonata. Pri tem je prihajalo do nastanka kristalov kalcijevega karbonata. Običajno se za pripravo delcev iz kalcijevega karbonata uporablja kalcijev klorid (Hassin A. In Rachmawati, 2010). Mi pa smo uporabili kalcijev nitrat, ker smo tako dobili delce manjših velikosti. Kalcijev karbonat je bil uporabljen že v prejnjih raziskavah, kjer so dobili delce velikosti 20- 30 nm (Babou- Kammoe in sod., 2012). Glede na raziskave Sukhorukova in sodelavcev smo pričakovali uniformne in homogene delce. Dobili pa smo precej drugačne rezultate, in sicer množico delcev, katerih velikost je variirala od nekaj nm pa do nekaj  $\mu\text{m}$  (slika 24).

Za bolj homogene delce nano velikosti bi bila potrebna optimizacija njihove priprave. Optimizacija je možna na večih korakih, saj na morfologijo delcev pomembno vpliva več dejavnikov: pH vrednost raztopine, temperatura, koncentracija kalcijevega karbonata, dodatek polimerov (npr. PAA), dodatek soli, hitrost mešanja, koncentracija dodanega polimera, molarno razmerje med kalcijevim karbonatom in dodanim polimerom... (Yu in sod., 2004; Chang in sod., 2003). Delce kalcijevega karbonata pogosto pripravljajo pri višjih pH vrednostih (9), saj pri višjih pH vrednostih nastajajo manjši delci (Chang in sod., 2003). Lahko pa bi uporabili postopek sinteze nanodelcev v emulziji v prisotnosti stabilizatorja. Postopek priprave delcev v emulziji ima namreč mnoge prednosti: enostavna izvedba, proces je termodinamsko stabilen, hitra sinteza delcev. Slabosti pa so v ozkem naboru materialov in v pomankanju kontrole procesa (Shukin D.G., 2004).

Sintezi nanodelcev je sledila tehnika »plast na plast«. Za to smo najprej potrebovali podatke o zeta potencialu delcev. Izmerjen zeta potencial delcev je bil  $-30 \text{ mV}$ , zato smo pri oblačenju nanodelcev za prvo plast izbrali pozitivno nabit polimer (PAH). Izmenično smo nato dodajali PAH in PAA-polimere. Izbran par polimerov PAH in PAA je pri tehniki »plast na plast« že zelo dobro uveljavljen. Med drugim so jih že uporabili za oblačenje silikatnih delcev (Wang in sod., 2005) in  $\text{TiO}_2$  nanodelcev (Kim in Sohn, 2002). Pogosto uporabljen par polimerov je tudi PAH in PSS (Johnston in sod., 2006; Sukhorukov in sod., 2004). Tudi mi smo ga preizkusili, a smo dobili boljše rezultate pri uporabi para PAH/PAA.

Pri dodajanju plasti je bilo ves čas potrebno zagotavljati stabilnost sistema. V primeru, da se je zeta potencial približeval vrednosti 0, je namreč sistem močno izgubil na stabilnosti in so delci agregirali.

Preizkušali smo različne možnosti optimizacije procesa:

- spremjanje hitrosti centrifugiranja: iskali smo ustrezno hitrost centrifugiranja, pri kateri delci še ne agregirajo, a tudi ne prihaja do prevelikih izgub. Za najboljšo hitrost se je izkazalo centrifugiranje pri 1000 RPM.
- Spreminjanje pH-vrednosti: za zelo dobro možnost optimizacije procesa se je izkazalo uravnavanje pH-vrednosti raztopine. Teoritično napovedane pKa-vrednosti uporabljenih polimerov so 8,8 za PAH in 6,5 za PAA (Goichoichea in sod., 2007). Ob upoštevanju teh podatkov smo po dodatku polimera raztopini vedno uravnali pH, in sicer na 7,5. Pri tem naboju sta namreč oba polimera nabita, prav tako pa pH ustreza delcem. Pri pH pod 6,5 se namreč delci raztopijo, pri pH nad 11 pa dodatno precipitirajo.
- Spreminjanje koncentracije ionov: dodajali smo različne koncentracije ionov. Preizkušali smo, v katerem primeru je sistem bolj stabilen. Primerjali smo razlike med dodajanjem polimerov v destilirani vodi in v fiziološki raztopini. Rezultati so bili boljši pri dodajanju polimerov, raztopljenih v fiziološki raztopini. Rezultat se sklada s teorijo, saj dodatek ionov odebeli dvojno plast okoli delcev, kar naredi sistem bolj stabilen (Sze in sod., 2003).

Po petih plasteh polimerov smo na delce nanesli še zadnjo plast, lizocim. Za optimiziranje te reakcije smo prej izmerili zeta potencial lizocima pri različnih pH-vrednostih (slika 26). Izoelektrična točka lizocima je pri pH vrednosti 10,6- 10,9 (Lysozyme 3, 2006), zato smo pričakovali, da se bo pri tej pH vrednosti zeta potencial lizocima približeval 0 mV.

Videli smo, da je pri kislem pH nabit pozitivno, pri bazičnem negativno, pri nevtralnem pH pa ima zeta potencial 0, kar se ne sklada s teoretičnimi podatki o izoelektrični točki lizocima. Za to obstaja več razlag. Kot prvo smo meritve izvajali pri drugačnih pogojih in uporabljali različne pufre, kot jih pri 2D gelski elektroforezi (Celic in Gromov, 1999), kjer določujejo izoelektrično točko proteinov. Sklepamo, da so se pozitivno nabiti fosfati vezali na negativno nabit lizocim in tako znižali vrednost pH pri kateri lizocim ni imel naboja. Prav tako pa so tehnike merjenja zeta potenciala zelo občutljive, na meritev tako močno vplivajo tudi kontaminacije (Malvern instruments, 2012). Upoštevati pa je potrebno tudi dejstvo, da se je meritev izvedla le enkrat, zato so možnosti za napako velike. Vsi dejavniki skupaj so tako povzročili spremembo izoelektrične točke lizocima v fosfatnem pufru.

Na podlagi meritev smo si za nanos plasti lizocima izbrali pH 9. Pri tej vrednosti ima lizocim močan negativen nabojo, prav tako pa pH še ni previsok, da bi encim denaturiral. S slike 27 lahko vidimo, da se je zeta potencial po vsaki dodani plasti spremenil iz pozitivne vrednosti v negativno oz. obratno. Sprememba zeta potenciala nakazuje dejansko vezavo polimera oz. lizocima na nanodelce. Vezave so potekale na osnovi elektrostatskih interakcij med polimeri in lizocimom. Za elektrostatsko vezavo lizocima smo se odločili zaradi enostavnosti izvedbe in učinkovitosti.

Razlog za vezavo lizocima na površje delcev je povezan z uporabo nanodelcev kot antimikrobnih učinkov. Zaželeno je namreč, da delec pride v čim tesnejši kontakt s celico. Z vezavo lizocima na nanodelec smo tako opornašali delovanje bakteriofaga lamda, ki lizocim uporablja za lažje približanje membrani celice (Young R., 1992). Lizocim so že uspešno

vezali tudi na srebrove nanodelce in z vezavo dosegli bolj stabilen koloiden sistem (Cioffi in Rai, 2012).

Z nalogo smo dokazali, da tehnika »plast na plast« lahko služi kot dobra metoda za pripravo površine nanodelcev, na katere se nato vežejo encimi.

## 6 SKLEPI

- Za uspešno kloniranje lizocima v pRSET EmGFP je potrebna modifikacija vektorja z encimom fosfataza.
- Indukcija produkcije izocima z dodatkom IPTG ni bila uspešna, kar smo videli na poliakrilamidnem gelu in pri opazovanju rasti celic.
- Pri uporabi metode »plast na plast« za oblačenje delcev v polimere je najpomembnejša regulacija pH-vrednosti. pH-vrednost mora biti takšna, da je polimer v nabitem stanju, drugače sistem ni stabilen.
- Med oblačenjem nanodelcev je potrebno paziti tudi na hitrost centrifugiranja. Pri prevelikih obratih delci agregirajo.
- Metoda »plast na plast« je primerna za pripravo površine nanodelcev pred imobilizacijo encima.

## 7 POVZETEK ( SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

V magistrskem delu smo se ukvarjali z optimizacijo vezave lizocima na delce iz kalcijevega karbonata. Pri optimizaciji smo žeeli spremeniti lizocim tako, da bi se bolje vezal na nanodelce, in primerno obdelati površino nanodelcev. Naredili smo delce iz kalcijevega karbonata, in sicer z mešanjem kalcijevega nitrata in natrijevega karbonata. Za sintezo homogene mešanice delcev bi bilo potrebno metodo še optimizirati, saj smo dobili zelo polidisperzno mešanico delcev. Delcem smo izmerili tudi zeta potencial in ugotovili, da je negativen. Na podlagi te ugotovitve smo tehniko »plast na plast« začeli s pozitivno nabitim polimerom (PAH). Izmenično smo nato na delce nanesli 5 plasti polimerov (PAH/PAA). Po vsaki dodani plasti se je spremenil zeta potencial koloidne suspenzije. Pri dodatku polimera PAH je suspenzija imela pozitiven zeta potencial, pri dodatku PAA pa negativen. Najpomembnejše pri oblačenju delcev je bilo uravnavanje pH-vrednosti, zato smo po vsaki dodani plasti umerili pH raztopine na 7,5. Kot šesto plast pa smo dodali lizocim. Lizocimu smo že prej izmerili zeta potencial pri različnih pH-vrednostih. Ugotovili smo, da ima pri bazični pH-vrednosti negativen zeta potencial, zato smo kot zadnjo plast polimerov na delce dodali PAH in nato lizocim pri pH 9. Sprememba vrednosti zeta potenciala iz pozitivne na negativno je pokazala, da se je lizocim res vezal na delce.

### 7.2 SUMMARY

In this thesis we tried to optimize binding of the lysozyme on a calcium carbonate particles. Optimization process involved lysozyme changes and preparation of nanoparticles surface. We made calcium carbonate particles from sodium carbonate and calcium nitrate. The result was a very polydisperse mixture of particles. To get a homogenous mixture of particles the method for producing nanoparticles should also be optimized. We measured zeta potential of the particles and found out that it is negative. Because of the negative zeta potential we started LbL technique with positively charged polymer (PAH). After that we added four more layers of polymers (PAA/PAH). After each added layer the zeta potential of the compound had changed. When we added positively charged polymer the zeta potential was positive and when we added negatively charged polymer the zeta potential was negative. The most important parameter using LbL technique was pH, and we adjusted it after every added layer to 7,5. As a sixth layer we added lysozyme at pH 9. At pH 9 lysozyme is negatively charged which is why the last layer of polymers added to the particles was positively charged. As a result of lysozyme binding zeta potential of nanoparticles changed from positive to negative.

## 8 VIRI

- Ariga K., Hill J.P. 2008. Layer by Layer Assembly, a Gentle yet Flexible Method Towards Functional Biomaterials. *Material Matters*, 57: 1–8.
- Avella M., Errico M.E., Gentile G. 2006. Nylon 6/Calcium Carbonate Nanocomposites: Characterization and Properties. *Macromolecular Symposia*, 234:170–175.
- Balogh L., Swanson D. R., Tomalia D. A., Hagnauer G. L., McManus A. T. 2000. Dendrimer- Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents. *Nano letters*, 1: 18–21.
- Babou- Kammoe R., Hamoudi S., Larachi F., Belkacemi K. 2012. Synthesis of CaCO<sub>3</sub> nanoparticles by controlles precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 90: 26- 33
- Callewaert L., Aertsen A., Deckers D., Vanoirbeek K. G. A. ,Vanderkelen L., Van Herreweghe J. M. , Masschalck B., Nakimbugwe D., Robben J., Michiels C.W. 2008. A New Family of Lysozyme Inhibitors Contributing to Lysozyme Tolerance in Gram-Negative Bacteria. *Plos Pathogens*, 4, 3: 1–9.
- Caruso F., Trau D., Mohwald H., Renneberg R. 1999. Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules. *Langmuir*, 16: 1485–1488.
- Celis J. E., Gromov P. 1999. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 1: 16- 21
- Chakraborti S., Chatterje T., Joshi P., Poddar A., Bhattacharyya B., Singh S. P., Gupta V., Chakrabarti P. 2009. Structure and Activity of Lysozyme on Binding to ZnO Nanoparticles. *Langmuir*, 26: 3506–3513.
- Chang B., Lei M., Yu J., Zhao X. 2003. Preparation of monodispersed cubic calcium carbonate particles via precipitation reaction. *Materials Letters*, 58: 1565- 1570
- Chang K. Y., Carr C. W. 2003. Studies on the Structure and Function of Lysozyme: I. The Effect of pH and Cation Concentration on Lysozyme Activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 229, 2: 496–503.
- Chibata I. 1978. Immobilized Enzyme. Scribd.  
<http://www.scribd.com/doc/31429014/Immobilized-Enzymes> (5. avgust 2012).
- Cioffi N., Rai M. 2012. Nano-antimicrobials. 1<sup>st</sup> ed. London. Springer: 556 str.
- Duncan R., Gaspar R. 2011. Nanomedicine(s) under Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8: 2101–2141.
- Enzyme Immobilisation. 2012. Gebze Institute of Technology.  
<http://turqase.com/research/5/> (20. julij 2012).

Enzyme technology. 2012. An Online Botanical Encyclopedia. MoorHeart Infotech.  
[http://www.eplantscience.com/index\\_files/biotechnology/Microbial%20biotechnology/Enzyme%20Technology/biotech\\_enzyme\\_immobilization.php](http://www.eplantscience.com/index_files/biotechnology/Microbial%20biotechnology/Enzyme%20Technology/biotech_enzyme_immobilization.php) (20. avgust 2012).

Evrard C., Fastrez J., Declercq J-P. 1998. Crystal Structure of the Lysozyme from Bacteriophage Lambda and its Relationship with V and C-type lysozymes. *Journal of Molecular Biology*, 276, 1: 151–164.

Fermentas. 2012. Troubleshooting guide for molecular cloning.  
[http://www.fermentas.com/templates/files/tiny\\_mce/media\\_pdf/4\\_Cloning\\_Troubleshooting.pdf](http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/media_pdf/4_Cloning_Troubleshooting.pdf) (10. september 2012).

Fissan H., Peled A. 1997. Synthesis of Nanoparticles in the Gas Phase for Electronic, Optical and Magnetic Applications Data Review. *Journal of Aerosol Science*, 29, 5/6: 511–535.

Gijs M. 2008. Nanoparticles. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.  
[http://www.nanotech-now.com/news.cgi?story\\_id=30574](http://www.nanotech-now.com/news.cgi?story_id=30574) (10. september 2012).

Goicoechea J., Arregui F. J., Corres J. M., Matias I. R. 2007. Study and Optimization of Self-Assembled Polymeric Multilayer Structures with Neutral Red for pH Sensing Applications. *Journal of Sensors*: 142854: 1–8.

Hassin A. In Rachmawati. 2010. Preparation and characterization od Calcium Carbonate Nanoparticles. The Tthird Nanoscience and Nanotechnology Symposium 2010: 195- 198

Hosokawa M., Nogi K., Naito M., Yokoyama T. 2007. Nanoparticle Technology Handbook. 1.<sup>st</sup> ed .Oxford. Elsevier: 620 str.

Jana S., Deb J.K. 2005. Strategies for Efficient Production of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 289–298.

Johnston A. P.R., Cortez C., Angelatos A.S., Caruso F. 2006. Layer by Layer Engineered Capsules and their Applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11: 203– 209.

Kenawy E. R., Worley S. D., Broughton R. 2006. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: a State of the Art Review. *Biomacromolecules*, 8: 1359–1384.

Kim T. H., Sohn B.H. 2002. Photocatalytic Thin Films Containing TiO<sub>2</sub> Nanoparticles by the Layer-by-Layer Self-Assembling Method. *Applied surface science*, 201:109–114.

Lee I., Sang W.H., Lee S.J., Choi H.J., Kim K. 2002. Formation of Patterned Continuous Calcium Carbonate Films on Self Assembled Monolayers via Nanoparticle Directed Crystallization. *Advanced Materials*, 14, 22: 1640–1643.

Lysozyme. 2012. Worthington Biochemical Corporation.  
<http://www.worthington-biochem.com/ly/default.html>. (23. julij 2012).

- Lysozyme 2. 2012. Equinox Graphics.  
<http://www.e-nox.net/illustration.php?page=8> (15. avgust 2012).
- Lysozyme 3. 2006. Roche. Mannheim.  
<http://www.airseadalian.com.cn/Shop/UploadPhotos/200605/20060520111129717.pdf> (19. september 2012)
- Madigan M., Martinko J., Sthal D., Clark D. 2012. Biology of Microorganisms. 13.<sup>th</sup> ed. San Francisco. Pearson, 1150 str.
- Malvern instruments. 2012. Zetasizer Nano Series Technical Note.United kingdom.  
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20-%20An%20introduction%20in%2030%20minutes.pdf> (20. julij 2012).
- Mine Y., Ma F., Lauriau S. 2004. Antimicrobial Peptides Released by Enzymatic Hydrolysis of Hen Egg White Lysozyme. Journal of agriculture and food industry, 52: 1088–1094.
- Morita M., Asami K., Tanji Y., Unno H. 2001. Programmed *Escherihia coli* cell lysis by expression of cloned T4 phage lysis genes. Biotechnology Progress., 17: 573–576.
- Nakimbugwe D., Masschalck B., Deckers D., Callewaert L., Aertsen C., Aertsen A., Michiels W. 2006. Cellwall Substrate Specificity of six Different Lysozymes and Lysozyme Inhibitory Activityof Bacterial Extracts. Microbiology Letters, 259: 41–46.
- Pinto- Alphandary H., Andremont A., Couvreur P. 1999. Targeted delivery of Antibiotics using Liposomes and Nanoparticles Research and Applications. International Journal of Antimicrobial Agents, 13: 155–168.
- Protocol for Dephosphorylating with CIP. 2012. New England Biolab.  
<http://www.neb.com/nebcomm/products/protocol18.asp> (18. september 2012)
- Protopedia.2012 Hen Egg-White (HEW) Lysozyme.  
[http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Hen\\_Egg-White\\_%28HEW%29\\_Lysozyme](http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Hen_Egg-White_%28HEW%29_Lysozyme), (20. avgust 2012).
- Rai M., Yadav A., Gade A. 2008. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. Biotechnology advances, 27: 76–83.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning- a laboratory manual, volume 1. 3.<sup>th</sup> ed. Melbourne. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2344 str.
- Sava G.1996. Lysozymes: Model Enzymes Biochemistry and Biology. Switzerland, Springer.
- Shan D., Zhum M., Xue H., Cosnier S. 2006. Development of amperometric biosensors for glucose based on a novel enzyme immobilization matrix: Calcium Carbonate nanoparticles.Biosensors and Biomaterials, 22: 1612- 1617

- Sheldon R.A. 2007. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Advanced Synthesis and Catalysis, 349: 1289–1307.
- Soetaert W., Vandamme E. 2010. Industrial biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success. Wiley- VCH: 20–60.
- Sukhorukov G.B., Volodkin D. V., Gunther A. M., Petrov A. I., Shenoy D. B., Mohwald H. 2004. Porous Calcium Carbonate Microparticles as Templates for Encapsulation of Bioactive Compounds. Journal of Materials Chemistry, 14: 2073–2081.
- Sze A., Erikson D., Ren L., Li D. 2002. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current- time relationship in electroosmotic flow. Journal of Colloid and Interface Science, 261: 402–410.
- Štrukelj B., Kos J. 2007. Od gena do učinkovine. 1. Izd. Slovensko farmacevtsko društvo: 671 str.
- User's manual. Delsa<sup>TM</sup> Nano Submicron Particle Size and Zeta Potential Particle Analyzer. 2008. Fullerton, Harbor Blvd., Beckman Coulter Inc.: 175 str.
- Vogel V. 2009. Nanotechnology, Volume 5: Nanomedicine. 1.<sup>st ed</sup>. Zurich. Wiley-VCH: 51– 80.
- Wang Y., Yu A., Caruso F. 2005. Nanoporous Polyelctrolyte Spheres Prepared by Sequentially Coating Sacrificial Mesoporous Silica Spheres. Nanoporous Materials, 117: 2948–295.
- Young R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiological reviews, 56, 3: 430- 481
- Yu J., Lei M., Chang B., Zhao X. 2004. Effects of PAA additive and temperature on morphology of calcium carbonate particles. Journal of Solid State Chemistry, 177, 3: 681- 68



## ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila dr. Alešu Lapanji, da me je sprejel v svojo raziskovalno skupino na Inštitutu za fizikalno biologijo in mi tako omogočil izdelavo magistrske naloge. Zahvalila bi se mu tudi za vso pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu naloge ter pri interpretaciji rezultatov.

Za vso pomoč pri eksperimentalnem delu v laboratoriju in za potrpežljivost bi se lepo zahvalila dr. Tomažu Rijavcu in Fani Oven.

Zahvala gre tudi mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za nasvete in strokovni pregled naloge.

Hvala tudi Janji, Tjaši, Roku in Donu za tolažbo prvih 5 mesecev, ko ni in ni bilo rezultatov.

Nenazadnje pa bi se zahvalila tudi staršem, ki so me podpirali ves čas študija.