

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۵۷-۶۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۳۱

جداسازی پروتئین لایه سطحی کالوباکتر و کریستالیزاسیون آن به روی سطوح صاف

ندا حبیبی*: استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشکده نانو فناوری و مواد پیشرفته، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران، ned.habibi@gmail.com
طیبه ظهرابی: دانشجوی کارشناسی ارشد نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، kl.rozeta@gmail.com

چکیده

مقدمه: خودآرایی مولکول‌ها نقش مهمی در بسیاری از زمینه‌های نانو بیوتکنولوژی، مانند ساخت حسگرهای زیستی نوین، سیستم‌های داروسان هوشمند، ساخت کشت بافت در ترمیم زخم‌ها، تشخیص مولکول هدف و غیره دارند. پروتئین‌های لایه S جداسازی شده از سطح باکتری‌ها مولکول‌های با خاصیت خود آرایگی بر روی انواع سطوح و ایجاد گروه‌های عاملی منظم هستند. از این خاصیت می‌توان در کریستاله کردن آن‌ها بر روی سطوح و ایجاد لیگاندها با مولکول‌های دیگر استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، پروتئین لایه سطحی از سطح کالوباکتر جداسازی شده و بر روی سطوح سیلیکون و میکا دوباره کریستاله شد. ویژگی‌های خود آرایگی مولکول مورد نظر توسط میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد. آنتی بادی ایمینو گلوبولین G به عنوان مدل برای بررسی ایجاد لیگاند منظم بر روی آن تثبیت شد.

نتایج: نتایج الکتروفورز جداسازی پروتئین مورد نظر را از سطح باکتری به شکل خالص با وزن مولکولی حدود ۹۶ کیلو دالتون تایید کرد و میکروسکوپ نیروی اتمی ساختارهای منظم کریستاله شده را نشان داد. آزمون‌های ایمینولوژیک نشان دادند تثبیت آنتی بادی در حضور لایه S افزایش می‌یابد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش امکان استفاده از این پروتئین‌ها را برای افزایش گروه‌های عاملی، ایجاد لایه خود آرایه و هدفمند سازی سطح را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: خود آرایه، لایه سطحی، گروه عاملی

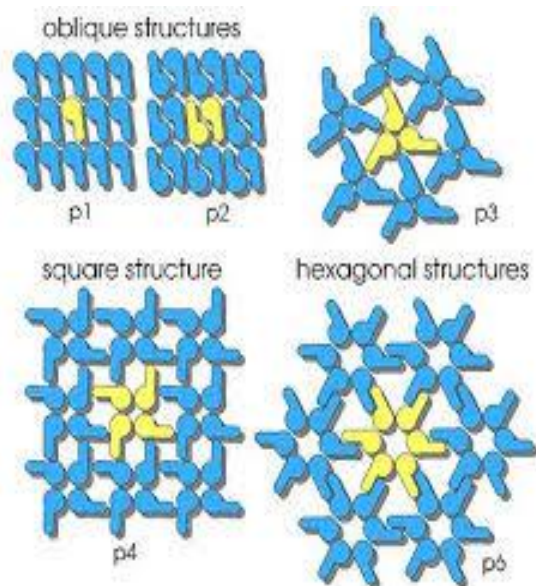
مقدمه

لایه S ساختارهای متخلخل متصل به دیواره سلولی یا غشا خارجی باکتری‌هاست که از یک گونه پروتئین یا گلیکوپروتئین ساخته شده‌است. آن‌ها توانایی مجتمع شدن به شکل شبکه‌های بسته در تمامی مراحل رشد و تقسیم سلولی را دارا بوده و ساده‌ترین نوع غشای زیستی که در روند تکامل زیستی شکل گرفته را نمایندگی می‌کند. زیرواحدهای لایه S که از تعداد وسیعی از ارگانیسم‌های پروکاریوت جداسازی شده‌است پس از جداسازی توانایی ذاتی برای مجتمع شدن به شکل آرایه‌های تک مولکولی در سوپانسیون، در سطح مشترک هوا-مایع، بر فیلم‌های چربی، لیپوزوم‌ها و پایه‌های جامد (مانند پلیمرها، فلزات، ورقه‌های سیلیکونی) را دارند (۱-۵).

این ویژگی‌های بی‌همتا برای لایه‌های S کاربردهای وسیعی فراهم می‌آورد، به ویژه در زمینه نانو تکنولوژی و ایجاد ساختارهای بیومیمتیک (۶). شبکه‌های لایه S با آرایه‌های تک مولکولی و خواص تکرار شونده فیزیکی- شیمیایی تا حد مقیاس نانومتر سیستم‌های تجمعی بی‌همتایی هستند. از آن‌ها می‌توان به عنوان مبنای ساختاری برای یک کیت ساختمانی بیومولکولی شامل مولکول‌های زیستی استفاده کرد (۵). محل و ساختار شبکه‌های لایه S به طریق میکروسکوپی الکترونی و نیروی اتمی پژوهش شده است. لایه‌های S نوعی دارای تقارن مورب (p1, p2)، مربعی (p4) و ۶ وجهی (p3, p6) هستند (۷-۱۰) (شکل ۱).

ویژگی‌های مهم لایه S عبارتند از:

۱. تخلخل‌های موجود در لایه‌های S از نظر اندازه و ریخت شناسی یکسان هستند و در گستره غشاهای اولترافیلتراسیون می‌گنجند.
۲. گروه‌های عاملی موجود بر سطح و در درون تخلخل‌ها از نظر مکان و جهت در موقعیت‌های مناسبی قرار گرفته‌اند و برای امر پیوند مولکول‌های عاملی به شکلی بسیار دقیق در دسترس هستند.
۳. زیر واحدهای لایه S جداسازی شده از بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قابلیت خود تجمعی مجدد به شکل تک لایه‌های بسته به روی سطوح جامد در سطوح مشترک هوا-آب، به روی تک لایه‌های چربی، و یا روی سطح لیپوزوم‌ها را دارند (۱).



شکل ۱- تصویر شماتیک از ساختارهای خودآرایه لایه S تقارن مورب (p1, p2)، مربعی (p4) و ۶ وجهی (p3, p6)

در حال حاضر، کاربردهای بالقوه آن از ساخت شایه‌های اولترافیلتراسیون تا حسگرهای زیستی، کیت‌های تشخیص واکسن، ماتریس‌های جذب و سیستم‌های انتقال برای عاملی کردن سطوح غیرآلی است. استفاده از این لایه‌ها برای خودآرایی مولکول‌های دیگر

لایه سطحی بر روی آن وجود دارد. هدف استفاده از سطوح سیلیکون و میکا (به علت امکان به کارگیری این سطوح در حسگرهای زیستی) تیمارهای مختلف این سطوح و بررسی تأثیر نوع پوشش بر توانایی ایجاد لیگاند لایه سطحی این باکتری به مولکول مورد نظر بود. شناخت و بررسی این موارد اهمیت زیادی در تولید حسگرهای بر پایه لایه سطحی دارند.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری کالوباکتر بر روی محیط پایه با پیتون

کم: پودر لیوفلیزه شده باکتری کالوباکتر از مرکز کشت آمریکا تهیه شده (ATCC No. 19089) و بر روی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت کم پیتون (پیتون ۲ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم و ۰/۲ گرم منیزیم سولفات) کشت داده شد. پس از ۴ روز گرمخانه‌گذاری در ۲۵ درجه، نمونه به محیط کشت آگاردار منتقل شد (۲۲). پس از اطمینان از خالص بودن نمونه یک پلیت در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد و بدون گلیسرول ذخیره‌سازی و پلیت دیگر به ۵۰۰ میلی‌لیتر پیتون برات منتقل شد. پس از ۴ روز گرمخانه‌گذاری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نمونه برای جداسازی پروتئین لایه سطحی استفاده شد (۲).

جداسازی پروتئین‌های خود آرایه لایه S: ۵۰۰

میلی‌لیتر از پیتون برات در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پلت جداسازی شده ۲ بار با سرم فیزیولوژی شستشو شد و ۱۰ میلی‌لیتر گوانیدین هیدرو کلراید ۵ مولار (شکننده پیوندهای هیدروژنی) به منظور جداسازی لایه S از دیواره باکتری‌ها به آن اضافه شد. پس از ۲ ساعت نمونه سانتریفیوژ و سوپرناتانت حاوی پروتئین جداسازی شده استخراج شد (۳).

بر روی سطوح صاف مبحثی بسیار جدید بوده که امکان ایجاد سطوح هوشمند را می‌دهد. هنگامی که ماکرومولکول‌ها به روش جذب سطحی بر سطوح نشانه می‌شوند عملکرد ساختاری آن‌ها کاهش می‌یابد. علت این امر در دسترس نبودن ساختار عملگرای مولکول زیستی و غیر منظم تثبیت شدن آن است. به همین علت ساختارهای خود آرایه اهمیت زیادی دارند (۱۱ و ۱۲).

یکی از کاربردهای مهم این لایه‌ها ایجاد الگویی برای ساخت لایه‌های خود آرایه از مولکول‌های دیگر زیستی است. به علت اینکه گروه‌های عاملی فعال تکرار شده‌اند با برقراری لیگاند مولکول‌های زیستی دیگر نیز به شکل خود آرایه ایجاد می‌شوند (۱۳). سطوح جامدی که به طور موفقیت آمیزی برای پوشش دهی لایه‌های S استفاده شده‌اند عبارتند از میکا، لیپوزوم‌ها و محلول‌ها. سطوح صاف سیلیکون به علت استفاده گسترده از حسگرها کاندید مناسبی برای خود آرایه کردن لایه S هستند (۱۴ و ۱۵). در فرایند کریستالیزاسیون عواملی مانند (ترکیب یونی، قدرت یونی، غلظت پروتئین، اسیدیته و دما) که شاخص‌های اساسی به شمار می‌آیند باید به دقت انتخاب شوند (۱). یکی از نکات مهم دیگر نیز اینست که ساختار لایه S تشکیل شده بر سطوح جامد در تمامی سطوح یکسان نیست و شامل حوزه‌های بلوری است که به طور تصادفی به هم اتصال داده شده‌اند بنابراین، شناخت و مطالعه خود آرایگی آن‌ها اهمیت زیادی دارد (۱۶-۱۸). در این پژوهش برای نخستین بار کریستالیزاسیون لایه سطحی کالوباکتر بر روی سطوح مختلف بررسی شد. لایه سطحی باکتری‌های گرم منفی کمتر بررسی شده‌اند، این در حالیست که مزایایی از قبیل جداسازی راحت‌تر دارند. ضمن اینکه به علت آن که باکتری کالوباکتر دارای زیاده است میزان بالاتری از

خالص سازی لایه S: به منظور خالص سازی پروتئین

از گوانیدین هیدروکلراید و سایر نمک‌های موجود، نمونه به کمک کیسه دیالیز (استات سلولز KDa MWCO 12) و در حضور آب به مدت ۸ ساعت دیالیز شد. پس از دیالیز نمونه توسط غشا پلی استیرین کات آف ۵۰ و ۱۰۰ کیلودالتون یک مرحله دیگر خالص سازی را نیز گذارند. غلظت لایه سطحی به وسیله محلول بردفورد حاوی کومسی بریلینت بلو G و اندازه گیری جذب آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر تعیین شد. محلول استاندارد با غلظت‌های معین بوین آلبومین سرم تهیه و غلظت آن‌ها به روش بردفورد تعیین شد و غلظت نمونه پروتئین براساس آن اندازه گیری شد (۲۳).

تحلیل SDS-Page الکتروفورز: نمونه پروتئین به

وسیله روش سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل تحلیل شد. ژل‌های آماده اس دی اس از شرکت سیگما تهیه شد. ژل در بافر MES و در دستگاه مخصوص قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول پروتئین با ۱۰ میکرولیتر بافر الکتروفورز ترکیب و نمونه در چاهک‌های الکتروفورز بارگزاری شد. نمونه‌ها با برقراری ولتاژ ۲۰۰ ولت و ۱۲۵ میلی آمپر به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند. سپس، ژل به وسیله کومسی بریلینت بلو R 250 رنگ آمیزی و به وسیله اسید استیک ۱۰ درصد شستشو داده شد (۱ و ۳).

کریستالیزاسیون لایه S بر روی سیلیکون و میکا:

غلظت پروتئین مورد نظر بر روی یک میلی گرم بر میلی لیتر تنظیم شد. محلول ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم در ۰/۵ میلی مولار بافر تریس هیدروکلریدریک اسید حل شده و به مدت ۲ ساعت در تماس با سیلیکون و میکا قرار داده شد. پس از ۲ ساعت سیلیکون به وسیله سرم فیزیولوژی شستشو داده شد که واحدهای کریستاله نشده شسته شوند (۴).

میکروسکوپ نیروی اتمی: سیلیکون که پروتئین بر

روی آن خود ارایه شد به منظور تحلیل AFM استفاده شد. عکس‌ها در شرایط هوا و دمای محیط و مد تماسی به وسیله میکروسکوپ آراپژوهش تحلیل و به وسیله نرم افزار (اسپپ) بررسی شد.

برقراری لیگاند با مولکول‌های هدف (آنتی بادی

ایمینو گلوبولین G): به منظور اتصال گروه‌های عاملی آرایش یافته پروتئین لایه سطحی به مولکول‌های هدف، آنتی بادی ایمینو گلوبولین G به عنوان مدل انتخاب و بررسی شد. ابتدا لایه S به روش یاد شده در حضور بافر کلرید کلسیم بر روی سطوح سیلیکون آرایش یافت و به وسیله سرم فیزیولوژی شستشو شد. سطوح مورد نظر به کمک بافر ۲ میلی مولار EDC (فعال کننده گروه‌های کربوکسیل) در اسیدیته ۵ به مدت ۲۰ دقیقه تیمار شد و اسیدیته آن بلافاصله بر روی ۷ تنظیم شد تا از ادامه واکنش و تبدیل گروه‌های کربوکسیل فعال به دیگر گروه‌های عاملی جلوگیری شود. سپس، آنتی بادی متصل به آنزیم پراکسیداز در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به سطح سیلیکون اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه تیمار و سپس، به وسیله سرم فیزیولوژی شستشو شد. به منظور شناسایی میزان مولکول‌های آنتی بادی متصل شده به لایه S، میزان مولکول‌های پراکسیداز متصل شده به سطح توسط روش جذبی اندازه گیری شد. بدین منظور OPD که سوبسترای واکنش دهنده به این آنزیم پراکسیداز می‌باشد در بافر با اسیدیته ۵ آماده شد و به میزان یک میلی لیتر به سطح سیلیکون اضافه شد (تمام واکنش در تاریکی انجام شد). جذب محلول در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد (۳ و ۱۷). به وسیله رسم منحنی استاندارد با غلظت معین، میزان مولکول‌های متصل شده به سطح تعیین شدند.

نتایج

جداسازی و خالص سازی لایه S: شکل ۲ نتایج

حاصل از جداسازی و خالص سازی پروتئین های لایه S از کالوباکتر توسط ژل SDS-Page را نشان می دهد. همان طور که مشخص است وزن مولکولی پروتئین مورد نظر حدود ۹۶ کیلو دالتون است (شکل ۲). پروتئین لایه S پس از جداسازی و تأیید وجود آن در تحلیل اس دی اس، به کمک روش برد فورد تعیین غلظت شدند. نمودار غلظت های متفاوت سرم آلبومین گاوی ترسیم شد و با استفاده از آن غلظت پروتئین مورد نظر مشخص شد. نتایج نشان می دهد غلظت پروتئین ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر است.



شکل ۲- از چپ به راست ردیف ۱: پروتئین مارکر، ردیف ۲ و ۳ لایه جداسازی شده از کالوباکتر در شرایط گوانیدین هیدروکلراید ۵ و ۴ مولار

خراشیدن لایه توسط کانتیلور میکروسکوپ نیروی اتمی با اعمال نیروی بالاتر، ضخامت لایه تشکیل شده مشخص شد. به منظور بررسی نوع تیمار بستر نیز، سیلیکون با مواد هیدروفوب و پلی مرهای هیدروفیل پوشش داده شد (۲۰ و ۲۱).

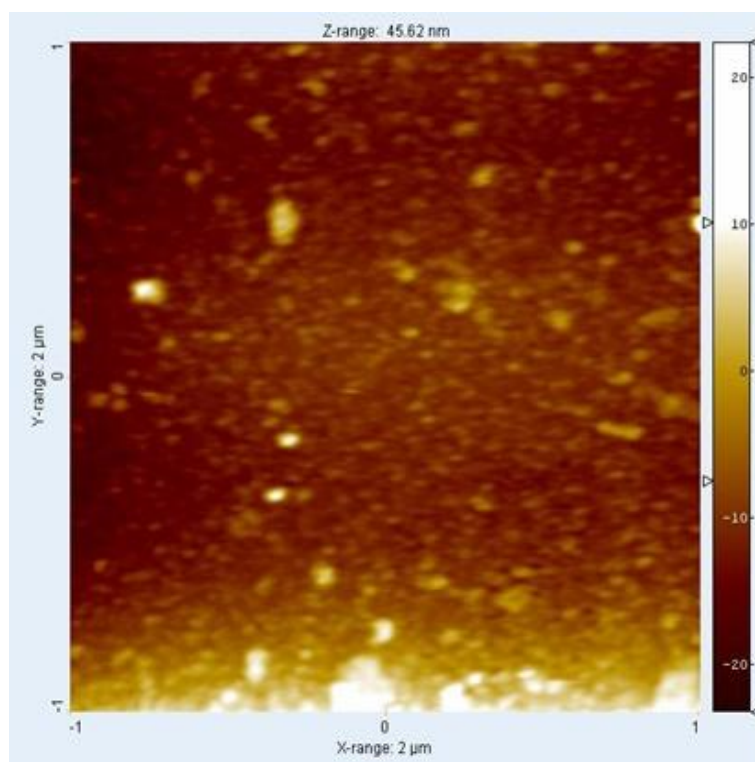
نتایج نشان می دهد لایه S بر روی هر دو سطح ساختارهای خود آرایه را ایجاد می کند که بر روی سطح میکا و سطوح باردار پلی یونی سیلیکون، این دومین های بزرگ و به اندازه ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر بوده و بر روی بستر سیلیکون هیدروفوب دومین های کوچک تر و فشرده تر تشکیل می شوند (شکل ۳). شبکه کریستال کاملاً منظم در نمونه های که بر روی سیلیکون هیدروفوب کریستاله شده بودند، یافت شد (شکل ۴) و در باقیمانده نمونه ها ساختارهای خود آرایه با دومین های بزرگ ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر مشاهده شد. ضخامت لایه ۳۲ نانومتر گزارش شد (شکل ۵)

نتایج ایجاد لیگاند به آنتی بادی: لایه S کریستاله

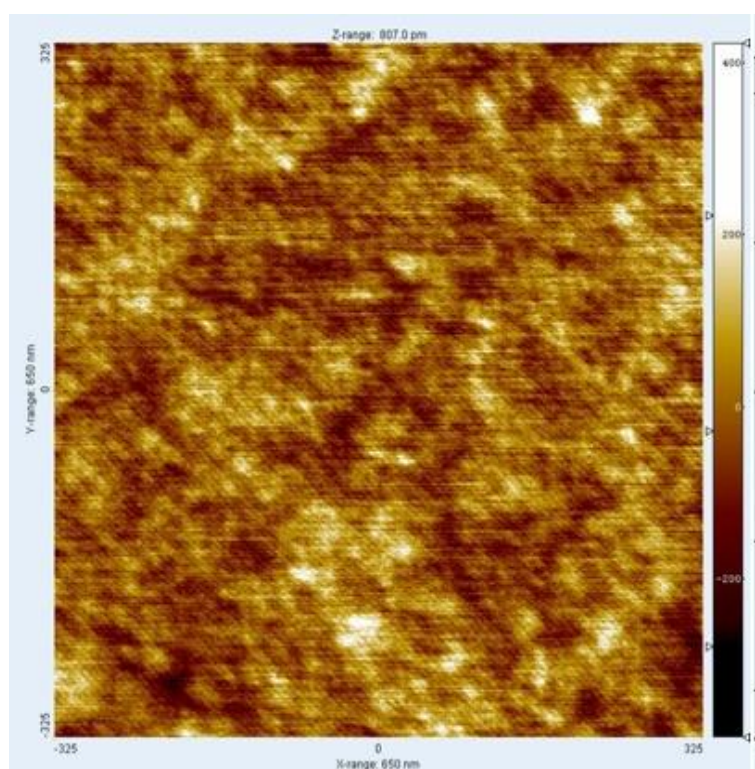
شده بر سطوح سیلیکونی به منظور اتصال لیگاند با آنتی بادی استفاده شد. به این منظور ابتدا گروه های کریوکسیل آن فعال سازی شد و سپس، به آنتی ایمینو گلوبولین G پراکسیدازدار متصل شد. نتایج نشان داد که آنتی بادی تثبیت شده بر سطوح هیدروفوب در حضور لایه S و بدون حضور آن به ترتیب ۱۰۰ و ۲۰ میکروگرم آنتی بادی بر روی سطح ۱*۱ سانتی متر است. در مورد سطوح سیلیکون هیدروفوب میزان توانایی سطح در اتصال نسبت به سیلیکون های هیدروفیل (۷۰ میکروگرم) بالاتر گزارش شد.

کریستالیزاسیون لایه S به روی سطوح جامد: برای

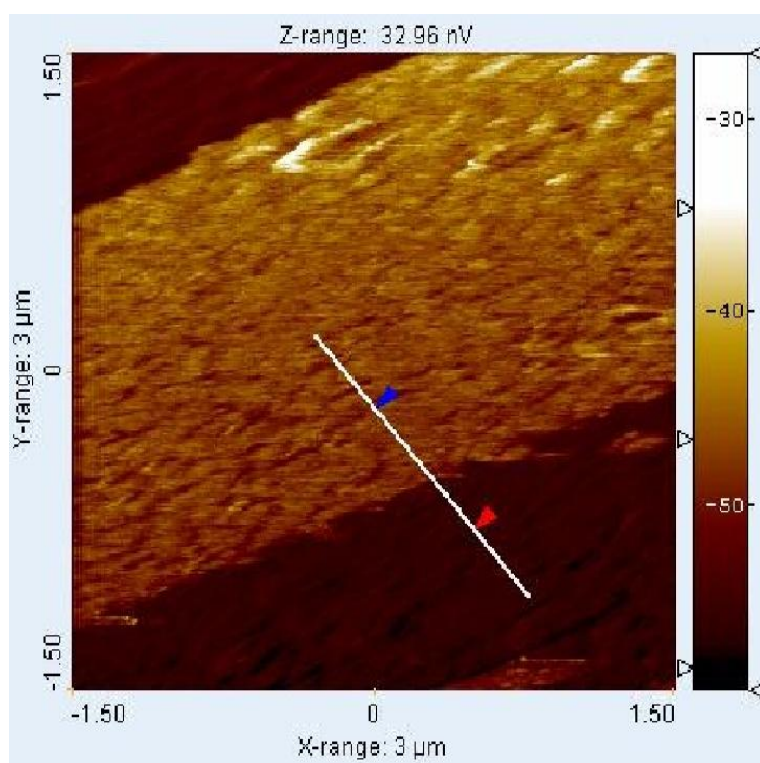
نشان دادن تاثیر نوع سطح جامد بر خود آرایه لایه S، پروتئین مورد نظر به همراه بافر حاوی کلرید کلسیم (که برای کریستالیزاسیون مجدد آن ها ضروری است) بر بستری سیلیکون و میکا نشانده و ساختار آن ها به کمک میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد. به کمک



شکل ۳- پروتئین لایه S کریستاله شده بر روی سیلیکون هیدروفوب (مقیاس ۲ میکرومتر)



شکل ۴- کریستال تشکیل شده لایه S بر روی سیلیکون هیدروفوب در بزرگنمایی بالاتر (مقیاس ۶۵۰ نانومتر)



شکل ۵- ضخامت لایه S اندازه گیری شده توسط ایجاد خراش به وسیله کانتیلور میکروسکوپ نیروی اتمی

بحث و نتیجه گیری

تشکیل نمی شود (۱۸). نتایج این پژوهش نشان داد که کریستالیزاسیون پروتئین ها بر روی سطوح تیمار شده به وسیله پلی مرها به مراتب آهسته تر شکل گرفت و این دو امر می تواند یکی از علت های عدم مشاهده شبکه منظم تر در مورد این سطوح باشد. مارتین و همکاران نشان دادند که کریستالیزاسیون لایه S به شاخص های مختلفی از جمله بار سطح، حرکت مولکول های سطح و زبری سطح بستگی دارد (۱۹). برای مثال نشان داده شده است که زبری کمتر برای ایجاد کریستالیزاسیون منظم مناسب تر است. در مورد سطوحی که پلی مرهای باردار بر روی آن پوشش داده شده اند به علت پستی و بلندی پلی یون ها، سطوح زبرتر تشکیل می شود. در این سطوح کریستالیزاسیون به شکل جزیره مانند رشد می کند و نمی توان شبکه کامل منظم را در همه سطوح مشاهده کرد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. به طور کلی نشان داده شده است که پروتئین های جدا

وزن مولکولی لایه S ۹۶ کیلو دالتون تعیین شد که با وزن مولکولی پروتئین های جدا شده از همین باکتری در مطالعات پیشین همخوانی دارد (۱). نشان داده شده است که وزن مولکولی لایه سطحی بسته به نوع باکتری بین ۹۰ تا ۱۲۰ کیلو دالتون است. نتایج SDS جداسازی لایه سطحی و خالص بودن آن را تأیید کرد. گوانیدین هیدروکلراید در دو غلظت ۴ و ۵ مولار برای جداسازی لایه S استفاده شد. هنگامی که غلظت ۵ مولار استفاده شد، باند قوی تر و خالص در ژل مشاهده گردید. نتایج حاصل از کریستالیزاسیون لایه سطحی بر روی سیلیکون مناسب بودن سیلیکون آبگریز را برای این امر تأیید کرد. یثو و همکاران نشان دادند که لایه S به روی سطوح هیدروفیل نقطه کریستالیزاسیون در نقاط متفاوت ایجاد می کند و این نقاط رشد می کنند (رشد جزیره مانند). بنابراین، شبکه کاملاً منظم در همه سطح به شکل یکسان

خود آرایه ایجاد شده بود که در مورد سطوح هیدروفیل این دومین‌ها بزرگ‌تر و بر روی سطوح هیدروفوب سیلیکونی ساختارهای خود آرایه کوچک‌تر و فشرده‌تر مشاهده شد. شبکه کاملاً منظم کریستالی در نمونه‌هایی که بر روی سیلیکون هیدروفوب تثبیت شده بودند مشاهده شد. با فعال‌سازی گروه‌های عاملی و تثبیت آنتی‌بادی ایمینو گلوبولین G بر روی لایه S مشخص شد که تثبیت نسبت به حالت جذبی افزایش پیدا کرده بود که نشان دهنده افزایش گروه‌های عاملی سطح است. این سطوح در انواع کاربردهای نانو بیو فناوری مانند هدفمندسازی سامانه‌های دارویی و حسگرها استفاده فراوان دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله توسط صندوق حمایت از پژوهشگران با شماره طرح ۹۱۰۴۱۸۲۸ حمایت شده است.

References

- (1) Toca-Herrera JL., Krastev R., Bosio V., Kupcu S., Pum D., Fery A., et al. Recrystallization of Bacterial S-Layers on Flat Polyelectrolyte Surfaces and Hollow Polyelectrolyte Capsules. *Small* 2005; 3: 339- 48.
- (2) Pastorino L., Caneva Soumetz F., Giacomini M., Ruggiero C. Development of a piezoelectric immunosensor for Paclitaxel measurement. *Journal of Immunological Methods* 2006; 313: 119- 98.
- (3) Habibi N., Pastorino L., CanevaSoumetz F., Sbrana F., Raiteri R., Ruggiero C. Nanoengineered polymeric S-layers based capsules with targeting activity. *Colloid and Surfaces B* 2011; 88 (1): 366- 72.

شده از باسیلوس‌ها تمایل بیشتری برای کریستالیزاسیون مجدد بر روی سطوح هیدروفوب نشان می‌دهند (۱) و (۱۸). نتایج این پژوهش نیز نشان داد لایه S کالوباکتر بر روی سیلیکون‌هایی که با مواد هیدروفوب تیمار شده بودند شبکه کریستال منظم تشکیل می‌دهد.

به علت آن که کانلیور میکروسکوپ نیاز به اعمال نیروی بالاتر به منظور خراشیدن سطح هیدروفیل داشت نتیجه‌گیری می‌شود که لایه S پیوندهای محکم‌تری با سطح باردار این پلی یون‌ها برقرار کرده است. علت این امر را می‌توان به باردار بودن سطح لایه S نسبت داد. این نتیجه از این نظر اهمیت دارد که سطوح با مقاومت بالاتر و ماندگاری بیشتری برای استفاده در حسگرها تولید می‌شوند. نتایج نشان داد ضخامت لایه‌ها کریستاله شده ۳۲ نانومتر است (شکل ۵).

افزایش میزان تثبیت آنتی‌بادی در حضور لایه S اهمیت گروه‌های عاملی خود آرایه را در تثبیت این مولکول‌ها نشان می‌دهد. همچنین، نشان داده شده است که تیمارهای مختلف سطوح بر ایجاد لیگاندها اثر می‌گذارند. سطوح هیدروفوب به علت وجود شبکه منظم کریستال باعث در دسترس بودن میزان بیشتری از گروه‌های عاملی فعال برای ایجاد پیوند شده و این علت بالاتر گزارش شدن تثبیت مولکول در سیلیکون‌های هیدروفوب است.

نتایج این پژوهش امکان کریستالیزاسیون لایه سطحی خود آرایه کالوباکتر را بر روی سطوح سیلیکونی و میکا و استفاده از آن‌ها برای افزایش گروه‌های عاملی سطح را اثبات می‌کند. همچنین، نقش نوع بستر در نحوه کریستالیزاسیون و ایجاد لیگاندها لایه‌ها در این پژوهش نشان داده شده است. بر روی هر دو بستر سیلیکونی هیدروفیل و هیدروفوب ساختارهای

- (4) Habibi N., Caneva Soumetz F., Giulianelli M., Pastorino L., Herrera O., Sbrana F., et al. Self-assembly and Recrystallization of Bacterial S-layer Proteins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* on Silicone., Mica and Quartz Crystal Supports. *Proceed IEEE EMBS* 2010; 3739- 42.
- (5) Habibi N., CanevaSoumetz F., Pastorino L., Herrera O., Ruggiero C. Layer by layer self assembly of polyelectrolytes and S-layers. *Proceed IEEE Nano* 2010; Article No. 5697853: 999- 1002.
- (6) Pastorino L., Habibi N., CanevaSoumetz F., Giulianelli M., Ruggiero C. Polyelectrolyte multilayers for cell and tissue engineering. *European Cells and Materials* 2011; 22 (3): 66.
- (7) Habibi N., Pastorino L., Herrera O., Ruggiero C., Polyelectrolyte based molecular carriers: the effect of S-Layer in permeability variation. *Journal of Biomaterial Application* 2013; 28: 262- 70.
- (8) Habibi N., Pastorino L., Caneva Soumetz F., Ruggiero C. Permeability of S-layer coated polyelectrolyte capsules. *Proceed IEEE Nano* 2011., Article no: 6144339: 1657- 660.
- (9) Ikeda T., Hata Y., Ninomiya KI., Ikura Y., Takeguchi K., Aoyagi S., et al. Oriented immobilization of antibodies on a silicon wafer using Si-tagged protein A. *Analytical Biochemistry* 2009; 385: 132- 7.
- (10) Liu Y., Yu X., Zhao R., Shangguan D H., Bo Z Y., Liu G Q. Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular drug. *Biosensors Bioelectronics* 2003; 19: 9- 19.
- (11) Nakamura H., Karube I., Current research activity in biosensors. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2003; 377: 446- 68.
- (12) Lu B., Smyth M. R., Kennedy R O. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst* 1996; 121: 29- 32.
- (13) Kissinger PT. Biosensors a perspective. *Biosensors and Bioelectronics* 2005; 20: 2512- 16.
- (14) Hidalgo- Alvarez R., Galisteo-Gonzalez F. The adsorption characteristics of immunoglobulins. *Heterogeneous Chemical Review* 1995; 2: 249- 68.
- (15) Schuster B., Pum D., Sára M., Sleytr U. B. S-Layer Proteins as Key Components of a Versatile Molecular Construction Kit for Biomedical Nanotechnology. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2006; 6: 909- 20.
- (16) Weiner C., Sa'ra M., Sleytr UB. Novel protein A affinity matrix prepared from two-dimensional protein crystals. *Biotechnology and Bioengineering* 1994; 43: 321- 30.
- (17) Vo'llenkle C., Weigert S., Ilk N., Egelseer E., Weber V., Loth F., et al. Construction of a Functional S-Layer Fusion Protein Comprising an Immunoglobulin G-Binding Domain for Development of Specific Adsorbents for Extracorporeal Blood Purification. *Applied Environmental Microbiology* 2004; 70 (3): 1514- 21.
- (18) Yeo S J., Shin S-Ho., Nam K T., Yoo P J. Multidimensional Assembly of S-Layer Proteins on Mobility-Controlled Polyelectrolyte Multilayers. *ACS Macro Lett*; 2012; 1: 1254- 7.
- (19) Martín-Molina A., Moreno-Floresy S., Perez E., Pum D., Sleytr Uwe B., Toca-Herrera J. L. Structure, Surface Interactions., and Compressibility of Bacterial S-Layers through Scanning Force Microscopy and the Surface Force Apparatus. *Biophysical Journal* 2012; 9: 1821- 9.
- (20) Habibi N., Karimi B. Fabrication and characterization of zinc oxide nanoparticle coated magnetic iron oxide: Effect of S-layers adsorption on surface of oxide., *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* doi. org/10. 1016/j. jiec. 2013; 11. 039.
- (21) Habibi N. Immobilization of bacterial S-layer proteins from *Caulobacter crescentus*

on iron oxide-based nanocomposite: Synthesis and spectroscopic characterization of zincite-coated Fe₂ O₃ nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A* 2014; 125 (5): 362- 59.

(22) Jalalpoor S., Kasra Kermanshahi R., Nouhi A., Zarkesh Esfahani H. Prevalence of nano structure S-layer and β-lactamase in *Bacillus cereus* strains. *Medical sciences Journal* 2010; 20 (3): 157- 63.

(23) Siroosi M., Amoozegar M., Khajeh K., Habibi Rezaei M., Fazeli M. Purification and characterization of an extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from a haloarchaeon., *Halorubrum* sp. strain Ha25. *Biological journal of microorganism* 2013; 2 (7): 1- 14

Isolation of S-Layer from *Caulobacter* and re-crystallization on planar supports

Neda Habibi*

Assistance Professor of Biotechnology, Nanotechnology and Advanced Material Institute, Isfahan University of Technology, Iran,
ned.habibi@gmail.com

Tayebe Zohrabi

M. Sc. Student of Nanobiotechnology, University of Isfahan, Iran, kl.rozeta@gmail.com

Abstract

Introduction: Self- assemble structures play an important role in many aspects of nanotechnology field such as biosensors, drug delivery, tissue engineering and targeting activity. S-layers proteins are an example of such molecules. These molecules possess the ability of re-crystallization after isolation from the surface of bacteria and therefore could be used for fabrication of assembled functional groups.

Materials and methods: To this regard in this work S- Layers were isolated from *Caulobacter* and were assembled on mica and silicon wafers. S-Layers re-crystallization were characterized by means of AFM. In order to evaluate the production of assembled functional groups Immunological methods were used.

Results: S-Layer with molecular weight of 96 KDa were successfully isolated from the surface of *Caulobacter* and crystallized on solid silicone and mica support. AFM results indicated assembled domains on mica and silicone. IgG immobilization was induced in the presence of S-Layer structures.

Discussion and conclusion: The results confirmed the effect of S-Layer crystallization on fabrication of assembled functional groups.

Key words: Self- assembly, S- Layer, Functional group

* Corresponding author, Nanotechnology and advanced material institute, Isfahan University of Technology, Iran

Received: April 14, 2014 / **Accepted:** June 21, 2014