



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estudo da influência de substâncias cosmotrópicas e
caotrópicas na interação de moléculas unitárias
orgânicas com nanoporos individuais protéicos**

DIJANAH COTA MACHADO

RECIFE
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIJANAH COTA MACHADO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS COSMOTRÓPICAS E CAOTRÓPICAS NA
INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS UNITÁRIAS ORGÂNICAS COM NANOPOROS
INDIVIDUAIS PROTÉICOS

ORIENTADOR: PROF. DR. OLEG VLADIMIROVICH KRASILNIKOV

RECIFE

2010

Machado, Dijanah Cota

Estudo da influência de substâncias cosmotrópicas e caotrópicas na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos individuais protéicos/ Dijanah Cota Machado. – Recife: O Autor, 2010.

51 folhas : il., fig., tab.

**Orientador: Oleg Vladimirovich Krasilnikov
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biotecnologia, 2010.**

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Nanoporo unitário 2. Íons monovalentes 3. Biotecnologia I.
Título.**

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 208

DIJANAH COTA MACHADO

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS COSMOTRÓPICAS E CAOTRÓPICAS NA
INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS UNITÁRIAS ORGÂNICAS COM NANOPOROS
INDIVIDUAIS PROTÉICOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, nível Mestrado, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração de
Biotecnologia.**

ORIENTADOR: PROF. DR. OLEG VLADIMIROVICH KRASILNIKOV

RECIFE

2010

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela graça da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov, por todo o apoio, compreensão e orientação.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues que com sua boa vontade e paciência me auxiliou nos experimentos sempre que necessário.

À minha família, meus pais e meus irmãos que muito me ajudaram e incentivaram nesta minha trajetória.

A todos os professores e amigos do laboratório de Biofísica de Membranas que me ajudaram direta ou indiretamente na execução dos experimentos.

À minha grande amiga, Lizandra, que desde a época da graduação me proporciona a alegria da sua amizade e companheirismo.

Ao meu amado, Felipe, pelo carinho, apoio e incentivo nesta jornada.

Ao seu Fredson, sempre disponível para nos dar um “help”.

À Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio sempre que solicitada.

À Adenilda pela disponibilidade em auxiliar na resolução de pendências burocráticas no decorrer desta tarefa.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas e amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Biossensor.....	12
2.2 Alfa-hemolisina como elemento sensor.....	13
2.3 Sensor Estocástico baseado no poro formado pela α -hemolisina.....	16
2.4 Série de Hofmeister.....	19
3. OBJETIVOS.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Bicamada Lipídica Plana.....	24
4.2 Sistema de aquisição e registro.....	25
4.3 Análise do transporte.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
7. CAPÍTULO I.....	38
Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors.....	38
8. CONCLUSÕES.....	46
9. PERSPECTIVAS.....	47
10. ANEXOS.....	48
10.1 Resumos publicados em Congressos.....	48

RESUMO

O biossensor baseado no nanoporo unitário formado pela α -hemolisina (α -HL) do *Staphylococcus aureus* incorporada em bicamada lipídica plana permite a detecção, identificação e quantificação de diferentes compostos em meio aquoso. Os íons em meio aquoso podem causar efeitos específicos conhecidos como efeitos de Hofmeister. De acordo com a sua atuação na estrutura da água, os íons podem ser classificados como cosmotrópicos e caotrópicos. A mudança da estrutura da água por sua vez é capaz de influenciar na solubilidade e estrutura dos co-solutos. Então, a composição iônica da solução pode alterar a interação das moléculas solubilizadas. Este trabalho teve como objetivo investigar a influência de íons monovalentes na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos protéicos visando o entendimento dos mecanismos moleculares do processo e o aumento da sensibilidade do sensor. A confecção da bicamada lipídica plana e a inserção do nanoporo unitário na membrana, bem como os registros de correntes iônicas através dos poros foram realizados em condições de fixação de voltagem. No estudo da influência da concentração do eletrólito utilizamos as soluções de KCl em concentrações de 1M à 4M. A comparação dos efeitos dos ânions da família VIIA foi feita com sais de potássio em concentração de 4M e os efeitos dos cátions da família IA mais o NH_4^+ foram estudados utilizando sais de cloreto (4M). A ligação da molécula unitária (analito) ao nanoporo causa um bloqueio característico na corrente iônica que passa através do poro protéico. A análise desses eventos moleculares (bloqueios) permite determinar as constantes cinéticas da interação analito-nanoporo. Estabelecemos que aumentando a concentração do KCl na solução banhante de 1M para 4M ocorre um aumento na frequência, profundidade de bloqueio e tempo de residência do analito (polietilenoglicol 1294; PEG 1294). Analisando a mudança da frequência dos bloqueios com relação à concentração de KCl, estabelecemos que a concentração do analito detectável pelo sensor diminui com o aumento da concentração do sal de 1M para 4M cerca de cem vezes, indicando maior sensibilidade do sensor quando banhado por uma solução de KCl 4M. O forte aumento no tempo de residência do analito dentro do nanoporo ocorre devido ao aumento da energia de interação do complexo analito/nanoporo. A constante de associação do complexo PEG/nanoporo é cerca de cem vezes maior e a constante de dissociação é cerca de cem vezes menor em KCl 4M do que em KCl 1M. Essas mudanças melhoram a detecção e tornam viável a detecção da molécula unitária. Encontramos que a interação PEG/nanoporo é dependente de voltagem transmembrana indicando que o polímero não-iônico (PEG) atua como uma molécula com carga elétrica em meio aquoso. Foi visto que a solubilidade do PEG é uma função da concentração do sal também. Uma forte correlação entre as mudanças das constantes e a solubilidade do PEG foi estabelecida. Provavelmente, o efeito salting-out é o responsável por mudanças estabelecidas na interação do analito com o nanoporo. Avaliando a influência dos íons da família IA e VIIA na interação do complexo PEG/nanoporo observamos que esta é muito dependente do tipo do sal. A sensibilidade do sensor depende fortemente do tipo de ânion da solução banhante e na solução de KF 4M é cerca de dez vezes maior e na solução de KI 4M é cerca de dez vezes menor quando comparada com a solução de KCl 4M. Estabelecemos que os valores das constantes de formação do complexo PEG/nanoporo diferem dependendo do tipo do cátion. A solução de KCl teve a maior constante de formação, enquanto que, as soluções de NH_4Cl e LiCl tiveram as menores constantes, portanto, evidencia-se que o tipo de eletrólito influencia em todos os parâmetros da interação do analito com o nanoporo. Por isso, a escolha do eletrólito ótimo é uma etapa importante para sensores estocásticos baseados em um único nanoporo.

Palavras-chaves: Nanoporo unitário; Série de Hofmeister; Polietilenoglicol; Salting-out.

ABSTRACT

The biosensor, which is based single nanopore formed by α -hemolysin (α -HL) of *Staphylococcus aureus* incorporated in planar lipid bilayer, allows the detection, identification and quantification of different compounds in aqueous environment. It is known that ions can cause specific effects on the processes in aqueous environment. According to the change in water structure in the proximity of ions they can be classified as cosmotropics and chaotropics. Such changes can influence in the solubility and the structure of co-solutes and, may alter their interaction. The goal of this study was to investigate the influence of 1:1 salts on the interaction of nonionic polymer with a protein nanopore at single molecule level aiming to understand the molecular mechanisms of the process and to find conditions which participate in determination of the biosensor sensitivity. Single protein nanopore was inserted in planar lipid bilayer and ion current passing through it was measured at voltage clamp conditions. The influence of electrolyte concentration was examined using solutions with KCl concentrations between 1M and 4M. The comparison of the effects of VIIA anions was made with potassium salts in 4M concentration and the effects of IA cations plus NH_4^+ was studied utilizing chloride salts (4M). The binding of single molecule (analyte) to the nanopore causes a blockage characteristic of ionic current passing through the nanopore. The analysis of these molecular events (blockage) permits to determine the kinetic constants of the analyte-nanopore interaction. We have established that the increasing in KCl concentration results in the increase in frequency, depth of blockage and resident time of analyte (polyethylene glycol 1294; PEG1294) in nanopore that considerably improve the sensitiveness (about two orders of magnitude) and the identification ability of the biosensor. The findings are the result of drastic changes in the association constant of PEG with nanopore (which is about one hundred times higher in 4M KCl than in 1M KCl) and the dissociation constant (which is about one hundred times smaller in 4M KCl than in 1M KCl). All together make possible the detection of single molecule. Salting-out effect is, probably, responsible for established changes in PEG/nanopore interaction because a strong correlation between the changes in the constants and the solubility of PEG was established. Studying the PEG/nanopore interaction in the presence of IA and VIIA ions a strong dependence on the type of salt was observed. So, the sensor sensitiveness to PEG was about ten times larger in KF and in ten times smaller in KI solution than in KCl. Values of the formation constants of PEG/nanopore complex differ depending on the type ions. So, formation constant had considerably larger value in KCl than in NH_4Cl and LiCl . Thus, it is evident that the type of electrolyte influences in all parameters of the analyte/nanopore interaction. Therefore, the choice of electrolyte is an important stage for stochastic sensors.

Keywords: Single nanopore; Hofmeister Serie; Polyethylene glycol; Salting-out.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Esquema geral dos componentes de um biossensor. Adaptado de VELUSAMY et al., 2010.....	12
FIGURA 2 - Modelo do nanoporo formado pela α -HL com dimensões e entradas em relação à membrana. Adaptado de SONG et al., 1996.....	14
FIGURA 3 - Exemplo de nanoporo mutante (pontos em vermelho indicam os locais de mutação) com um adaptador molecular, neste caso uma β -ciclodextrina, acoplada covalentemente no interior do poro protéico (molécula em verde). Adaptado de CLARKE et al., 2009.....	15
FIGURA 4 - Exemplo da propriedade multianalítica do biossensor baseado no poro protéico formado pela α -hemolisina de <i>Staphylococcus aureus</i> inserido em bicamada lipídica plana. a) Registro do bloqueio na corrente iônica característico do (S)-ibuprofeno; b) registro do enantiômero (R)-ibuprofeno; e, c) registro de ambas as moléculas simultaneamente, com seus respectivos histogramas de amplitude de corrente. Retirado de KANG et al., 2006.....	17
FIGURA 5 - Na ausência de qualquer molécula, a corrente iônica que passa pelo canal é máxima e estável quando um potencial é aplicado. Por difusão, a molécula chega ao lúmen do canal e interage com o poro modulando a sua corrente de maneira específica dependendo das propriedades da molécula do analito. A seta para baixo indica a adição do analito e a seta para cima indica a aplicação de um potencial. As setas em azul indicam o direcionamento do analito no lúmen do canal. Cortesia do Laboratório de Biofísica de Membranas (UFPE).....	18
FIGURA 6 - Representação esquemática do sequenciamento do DNA com o nanoporo. Adaptado de KING & GOLOVCHENKO, 2005.....	19
FIGURA 7 - Sequência dos ânions da Série de Hofmeister e exemplo de alguns efeitos específicos promovidos por cosmotrópicos e caotrópicos. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.....	20
FIGURA 8 - Sequência de alguns íons da Série de Hofmeister e sua propriedade na camada de hidratação da água.....	21
FIGURA 9 - A representação esquemática da estruturação da água ao redor de um ânion cosmotrópico. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.....	21
FIGURA 10: A bicamada lipídica plana (espessura ~ 4 nm) é formada sobre um orifício de $\sim 100\mu\text{m}$ de diâmetro de um filme de Teflon (partição) que separa duas hemicâmaras idênticas de Teflon onde cada uma acondiciona a solução banhante. O canal iônico incorpora-se na membrana pela adição da proteína formadora de canais no lado <i>cis</i> da câmara. Adaptado de KASIANOWICZ et al., 2007.....	25

	Pág.
FIGURA 11: Modelo do canal de α -hemolisina, câmara de Teflon e diagrama da interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente.....	26
FIGURA 12: Gráfico que relaciona a taxa de transição versus concentração do analito (neste caso PEG). Para facilitar a determinação da concentração do analito (linhas pretas horizontais), a frequência dos eventos da interação do nanoporo com analito dever ser igual ou maior do que 1 Hz (linha preta vertical). A solução banhante da membrana foi composta por sais de potássio com ânions da série de Hofmeister: F^- , Cl^- , Br^- e I^- (4 M), tamponado com Tris (5mM) em pH 7,5. Utilizamos como modelo de analito polimérico, o PEG 1294, uma vez que ele é monodisperso e de elevado grau de pureza.....	29
FIGURA 13: Gráfico que relaciona a taxa de transição versus concentração do analito (PEG 1294) comparando a sensibilidade do nanoporo-sensor quando banhado por solução composta por um dos cátions da família 1A (Li^+ , K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+) mais o NH_4^+ formando sais com Cl^- em uma concentração de 4M.....	30
FIGURA 14: O gráfico relaciona as constantes de formação do nanoporo protéico com o PEG versus voltagem. As soluções banhantes utilizadas foram LiCl, NH_4Cl , NaCl, RbCl, KCl, CsCl todas na concentração de 4 M, mais 5 mM de Tris e pH 7,5 ajustado com ácido cítrico.....	31

1. INTRODUÇÃO

A identificação e a quantificação de analitos são de importância fundamental em diversas áreas, das ciências básicas até aplicações tecnológicas na medicina diagnóstica, indústria farmacêutica, controle de poluentes, indústria química e biotecnologia, dentre outras. Assim sendo, o desenvolvimento de novos sensores e biossensores desperta interesse na comunidade científica.

Há diversos estudos visando desenvolver um sensor molecular utilizando nanoporos formados em diferentes materiais: inorgânicos, filmes poliméricos (KING & GOLOVCHENKO, 2005; HENG et al., 2006) e, claro, nanoporos protéicos formados em bicamadas lipídicas planas (KASIANOWICZ et al., 2007). Nesta perspectiva, nanoporos aquosos formados pela α -hemolisina do *Staphylococcus aureus* (α -HL) servirão como elementos de reconhecimento para detectar moléculas orgânicas e inorgânicas em meio aquoso, pois, oferecem condições de alterações em sua estrutura molecular (uso de mutantes), possibilitando o seu remodelamento para produzir nanoporos adaptados à detecção de analitos com características físico-químicas diversas (MOVILEANU et al., 2009).

A composição iônica da solução que banha o sensor nanoscópico pode alterar a energia de interação do analito com o nanoporo, provavelmente, pelo efeito salting-out (RODRIGUES et al, 2008; GURNEV et al., 2009). Os efeitos específicos induzidos por íons em diversas condições são conhecidos como os efeitos de Hofmeister. De acordo com a sua atuação na estrutura da água, os íons da Série de Hofmeister podem ser classificados como: cosmotrópicos (aumentam a estruturação das moléculas de água ao redor do íon) e caotrópicos (diminuem a estruturação das moléculas de água ao redor do íon). Apesar dos inúmeros estudos desde o seu primeiro relato (HOFMEISTER, 1888), não é elucidado como esse fenômeno persiste em espaços nanoconfinados. Portanto, este trabalho pretendeu investigar a influência de substâncias cosmotrópicas e caotrópicas na interação de moléculas unitárias orgânicas com poros nanoscópicos protéicos visando o entendimento dos mecanismos moleculares do processo; além, de estabelecer as condições ótimas para utilização dos poros nanoscópicos como sensores estocásticos para diversas moléculas orgânicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossensor

O biossensor é um dispositivo analítico no qual o elemento sensor é um material biológico (ex: enzima, anticorpo, proteína, DNA, etc) que detecta rapidamente analitos químicos e/ou biológicos qualitativa e quantitativamente (RODRIGUES, 2006). Nos últimos anos, houve um aumento no interesse em pesquisas com biossensores devido à sua ampla aplicabilidade em diversas áreas da saúde, de alimentos, no meio ambiente e até no controle do bioterrorismo (COOPER & CASS, 2004; FURTADO et al., 2008).

Este equipamento pode ser representado esquematicamente por três partes (figura 1). A primeira parte é o elemento biológico ou elemento sensor (camada de bioreconhecimento) que possui a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A interação resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas (modificação de pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons) que são detectadas e medidas pelo transdutor. O transdutor é a segunda parte o qual funciona como um estágio que interpreta os eventos biológicos, ocorridos na etapa de detecção, e os transformam em sinais eletrônicos proporcionais em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com o elemento sensor. A terceira parte (processamento) diz respeito à saída de dados que processa os sinais eletrônicos do transdutor para os tornar legíveis em uma interface humana qualquer como um medidor, um display ou tela de computador (RODRIGUES, 2006; FURTADO et al., 2008).

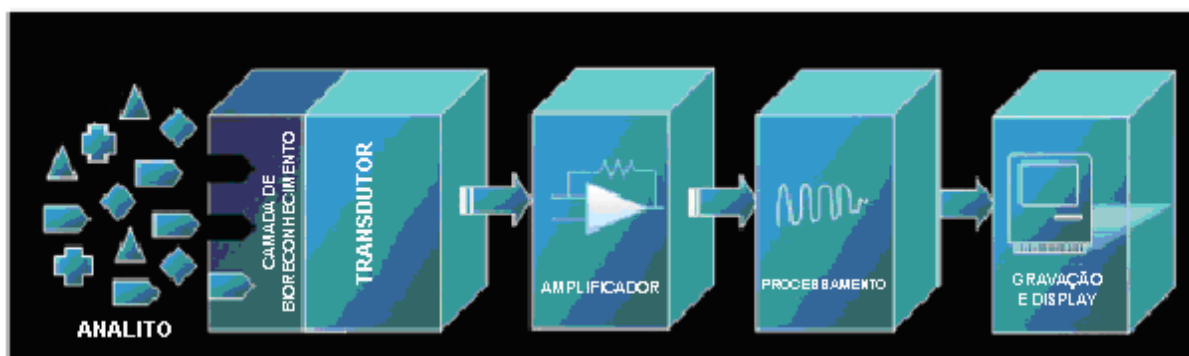


FIGURA 1: Esquema geral dos componentes de um biossensor. Adaptado de VELUSAMY et al., 2010.

Os biossensores podem ser classificados levando em consideração aspectos do mecanismo de detecção, de transdução e o modo de interação entre o analito e o elemento de reconhecimento.

Com relação à natureza do elemento de reconhecimento, os biossensores podem ser classificados como: biossensores baseados em organismos vivos, biossensores baseados em células íntegras, biossensores baseados em enzimas, biossensores baseados em anticorpos (imunossensores), biossensores baseados em receptores de membrana. De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como: eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsimetria, etc.), detector de massa ou piezoelétrico (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezoelétricos com variação da massa), termométrico. E dependendo do tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor pode ser classificado como catalítico ou de afinidade (RICCARDI et al., 2002; VELUSAMY et al., 2010).

O sensor utilizado neste trabalho é baseado no nanoporo aquoso unitário formado pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* inserido em uma bicamada lipídica plana. Este dispositivo representa uma nova classe de sensores estocásticos.

2.2 Alfa-hemolisina como elemento sensor

Um poro protéico robusto é pré-requisito para o desenvolvimento de um elemento sensor estocástico sensível. Estudos recentes nas áreas da proteômica e biologia estrutural revelam que proteínas de membrana com configuração β -barril cumprem essa exigência. A maioria das proteínas β -barril dobram-se formando poros aproximadamente cilíndricos com as cadeias laterais hidrofílicas presentes no interior do lúmen do poro e os resíduos hidrofóbicos interagindo com a bicamada lipídica. A estrutura dessas proteínas é estabilizada por uma disposição estrutural das ligações de hidrogênio entre as fitas β adjacentes no qual confere à proteína estabilidade termodinâmica (MOVILEANU, 2009).

Um modelo para elemento de reconhecimento para biossensor estocástico muito utilizado é o nanoporo formado pela α -hemolisina (α -HL) a qual é uma das várias toxinas secretadas pela bactéria *Staphylococcus aureus*. A α -HL é uma citolisina dotada da capacidade de formar poros aquosos tanto em membranas biológicas (BHAKDI et al., 1991) quanto em bicamadas lipídicas artificiais (KRASILNIKOV et al., 2000). A proteína possui peso molecular em torno de 33 kDa e é liberada na

forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos (GRAY & KEHOE, 1984) solúveis em água, os quais se inserem em membranas e então se oligomerizam para formar o poro heptamérico transmembrana (figura 2), permitindo a passagem de água e de diversas moléculas pelo seu interior (GU et al, 1999; NOSKOV et al, 2004). O nanoporo formado possui comprimento de ~ 10 nm e o diâmetro interno de ~ 2 nm (MERZLYAK et al., 2005). O conhecimento da estrutura tridimensional em alta resolução do poro formado pela α -HL (SONG et al., 1996), sua elevada condutância (~ 4 nS em 4 M KCl) (KRASILNIKOV et al., 2006) e sua estabilidade em soluções aquosas com $\text{pH} > 7.0$ (KRASILNIKOV et al., 1988) torna o registro e análise dos eventos moleculares com esse sensor relativamente simples e, conseqüentemente, atraente.

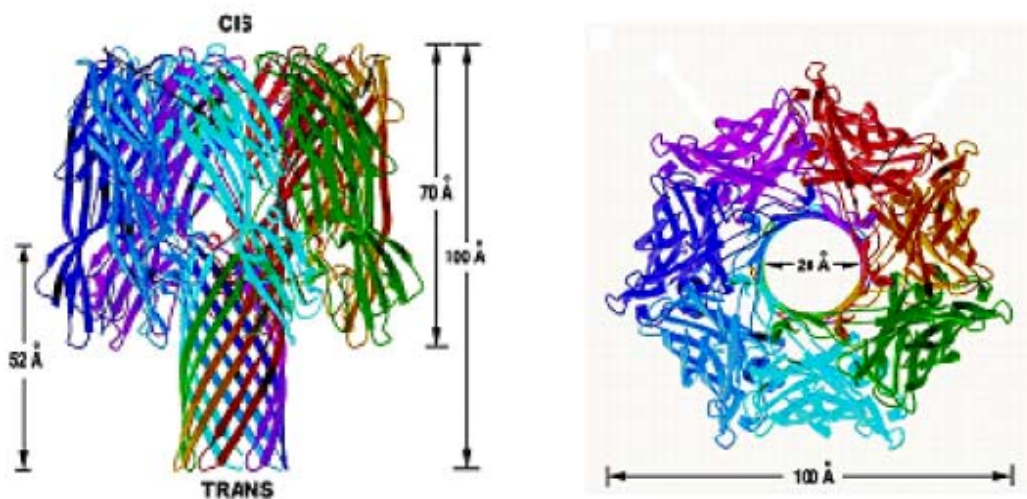


FIGURA 2: Modelo do nanoporo formado pela α -HL com dimensões e entradas em relação à membrana. Adaptado de SONG et al., 1996.

Para otimizar a identificação do analito, a α -HL pode ser usada na forma nativa, genética ou quimicamente modificada para a detecção de íons metálicos, ânions, DNA, proteínas, pequenas moléculas orgânicas, segundo mensageiro, enantiômeros de fármacos, toxinas, organofosforados, entre outros (CHELEY et al., 2002; ASTIER et al., 2006; KANG et al., 2006; WANG et al., 2009).

Nanoporos protéicos podem ser “engenheirados” utilizando a técnica de mutagênese sítio-dirigida onde um aminoácido ou um grupo de aminoácidos que compõe a estrutura protéica do nanoporo pode ser substituído por outros aminoácidos gerando uma variedade de cadeias laterais de diferentes tamanhos, formas, polaridade e reatividade. Nanoporos também podem ser modificados

quimicamente. Na modificação química um aminoácido da cadeia lateral, geralmente cisteína, é seletivamente modificado com um reagente químico permitindo uma diversidade de funcionalidades que podem ser incorporados dentro do poro (BAYLEY et al., 2004).

Além disso, há estudos para modular a seletividade do poro, com o uso de adaptadores moleculares (modificação não-covalente) introduzidos no lúmen do poro formado pela α -HL tornando ainda mais estreita a constrição presente no interior do nanoporo (figura 3), e desse modo, favorecendo uma seletividade específica com intuito de facilitar a identificação e a quantificação do analito (GU et al, 1999; KANG et al, 2006).



FIGURA 3: Exemplo de nanoporo mutante (pontos em vermelho indicam os locais de mutação) com um adaptador molecular, neste caso uma β -ciclodextrina, acoplada covalentemente no interior do poro protéico (molécula em verde). Adaptado de CLARKE et al., 2009.

Adicionalmente, α -toxinas projetadas têm sido estudadas com a finalidade de tornar mais específica a detecção do analito pelo biossensor. O uso desses nanoporos protéicos “engenheirados” abrange potenciais aplicações desde a detecção ultrasensível de moléculas unitárias até o seqüenciamento de DNA (SHIM et al, 2007, MOVILEANU, 2009).

2.3 Sensor Estocástico baseado no poro formado pela α -hemolisina

Poros protéicos de escala nanométrica têm sido bastante investigados para várias aplicações na nanobiotecnologia, principalmente, como sensores estocásticos para diversas moléculas biológicas, desde cátions e ânions inorgânicos, pequenas moléculas orgânicas até macromoléculas (ZHAO et al., 2008). Estes sensores podem identificar e quantificar analitos baseados na análise da mudança da condutância da corrente através do poro (MOVILEANU, 2009). Estudos mostram que os nanoporos unitários podem funcionar como elementos de reconhecimento, dada que a escala de tais nanoporos é comparável com as macromoléculas de interesse, as moléculas que entram no poro podem ser facilmente identificadas (ROBERTSON et al., 2007). Os analitos são capazes de alterar a corrente iônica dos nanoporos similarmente ao processo envolvido no funcionamento do Coulter counter. O counter é um método de contagem utilizado para detectar partículas micrométricas, como as células biológicas, suspensas em solução as quais são conduzidas através de um capilar com um diâmetro micrométrico. As medidas das mudanças da resistência elétrica no capilar permitem a quantificação e o tamanho destas partículas (COULTER, 1953). Nanoporos protéicos apresentam diâmetro interno na faixa de 1-3 nm, permitindo a concepção do Coulter counter molecular (BEZRUKOV et al., 1994). Esse tipo de contador pode detectar moléculas unitárias que se aproximam do nanoporo por difusão ocupando temporariamente o lúmen aquoso do poro produzindo mudanças mensuráveis na condutância. A distribuição dos eventos na escala de tempo é randômica, permitindo a aplicação da terminologia, detecção estocástica ou sensor estocástico (RHEE & BURNS, 2007).

Os nanoporos protéicos são ideais para serem usados como sensores por diversas razões: o analito ao interagir com o nanoporo cria um sinal pelo bloqueio estérico do poro ou pela mudança no potencial eletrostático perto ou dentro do poro; o analito não precisa, necessariamente, ser marcado (por exemplo, sonda fluorescente) para ser detectado como uma entidade unitária; a técnica permite a detecção de mais de um analito presente na solução simultaneamente (figura 4) e também apresenta alta sensibilidade e rapidez na análise (KASIANOWICZ et al., 2007).

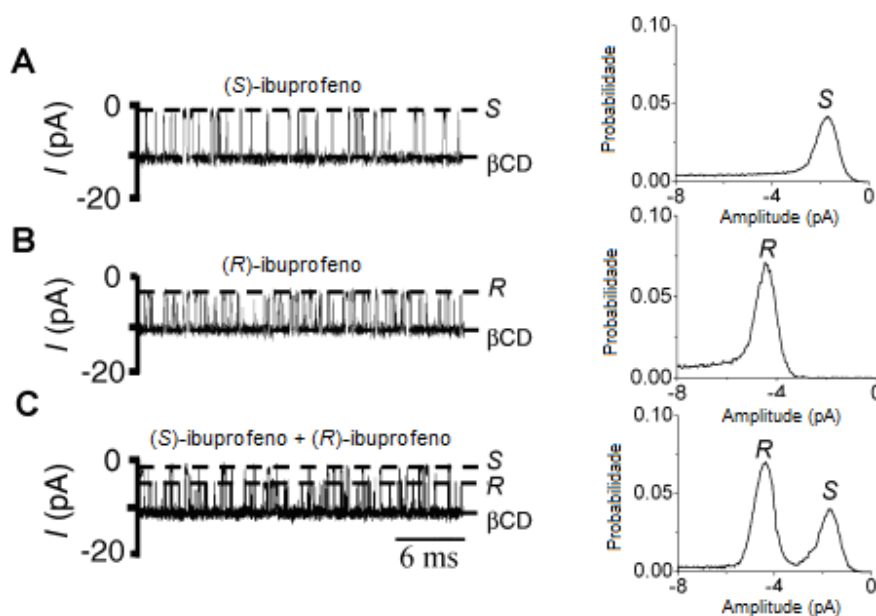


FIGURA 4: Exemplo da propriedade multianalítica do biossensor baseado no poro protéico formado pela α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* inserido em bicamada lipídica plana. a) Registro do bloqueio na corrente iônica característico do (S)-ibuprofeno; b) registro do enantiômero (R)-ibuprofeno; e, c) registro de ambas as moléculas simultaneamente, com seus respectivos histogramas de amplitude de corrente. Retirado de KANG et al., 2006.

O princípio do sensor estocástico, baseado no nanoporo protéico unitário formado pela α -HL, está na detecção das moléculas unitárias feita pelo nanoporo para identificar e quantificar diversas moléculas em solução aquosa (CHELEY et al, 2002). O resultado da cada interação se reflete na mudança transitória da corrente iônica que passa através do nanoporo. A base do seu funcionamento está esquematizada na figura 5. O poro unitário incorpora-se em uma bicamada lipídica plana a qual separa dois compartimentos com solução salina. Quando um potencial elétrico é aplicado, uma corrente iônica flui através do poro carregada pelos íons. Toda vez que o analito ocupa o lúmen, induz uma modulação, diminuindo a corrente iônica máxima. Na situação mais simples, o elemento sensor tem dois estados - ocupado (pelo analito) e não-ocupado - e uma saída característica associada a cada um dos respectivos estados. A frequência da ocorrência dos eventos está relacionada com a concentração do analito, enquanto que a “assinatura digital de corrente”, ou seja, os tempos médios de duração e profundidade de bloqueio permitem a identificação do analito.

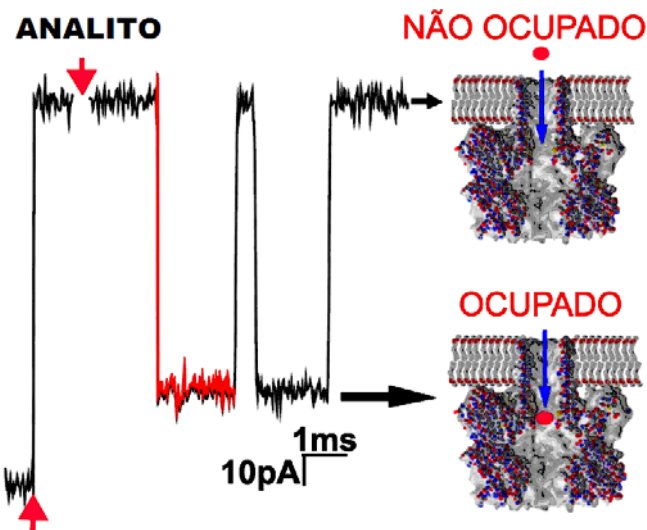


FIGURA 5: Na ausência de qualquer molécula, a corrente iônica que passa pelo canal é máxima e estável quando um potencial é aplicado. Por difusão, a molécula chega ao lúmen do canal e interage com o poro modulando a sua corrente de maneira específica dependendo das propriedades da molécula do analito. A seta para baixo (↓) indica a adição do analito e a seta para cima (↑) indica a aplicação de um potencial. As setas em azul indicam o direcionamento do analito no lúmen do canal. Cortesia do Laboratório de Biofísica de Membranas (UFPE).

Dessa maneira, uma grande variedade de substâncias pode ser identificada e quantificada, incluindo cátions, ânions (CHELEY et al., 2002), moléculas orgânicas (GU et al., 1999), enantiômeros (KANG et al., 2006), peptídeos (ZHAO et al., 2009), proteínas (PASTORIZA-GALLEGO et al., 2009), ácidos nucleicos (GUPTA, 2008; CLARKE et al., 2009; MAGLIA et al., 2009), entre outros tipos de analitos.

O nanoporo proporciona um espaço interno altamente confinado no qual os ácidos nucleicos podem ser identificados e caracterizados sem a necessidade de amplificação ou marcação química. É uma técnica que possui baixo custo e rapidez de análise da sequência das bases nucleotídicas do DNA. O sequenciamento ocorre da seguinte maneira: a fita simples de DNA transloca-se, eletroforéticamente, através do nanoporo unitário; as quatro bases nitrogenadas do DNA (adenina, guanina, citosina e timina) interagem individualmente e de forma específica com o nanoporo produzindo modulações características na corrente iônica; deste modo, a sequência das modulações na corrente reflete a sequência das bases nitrogenadas do ácido nucleico (figura 6).

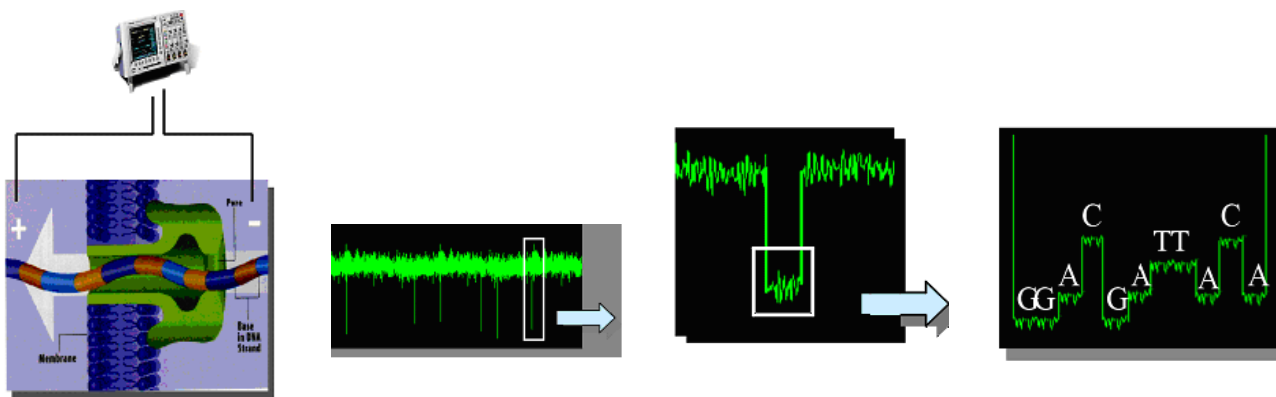


FIGURA 6: Representação esquemática do sequenciamento do DNA com o nanoporo. Adaptado de KING & GOLOVCHENKO, 2005.

2.4 Série de Hofmeister

Em 1888, Hofmeister observou uma habilidade particular de certos sais em precipitar proteínas em solução aquosa. Ele concluiu que a eficácia dos sais em precipitar as proteínas aumenta com a sua capacidade em “ordenar” a água ao seu redor e classificou um primeiro grupo de sais conforme sua eficiência em precipitar proteínas (salting-out) e um segundo grupo de sais de acordo com sua eficácia em solubilizar proteínas (salting-in) originando a Série de Hofmeister ou série liotrópica (HOFMEISTER, 1888; TADEO et al., 2007). Desde então, este nome tem sido aplicado a diversos fenômenos que envolvem especificidade iônica. Os efeitos específicos induzidos por íons em diversas condições são conhecidos como os efeitos de Hofmeister (figura 7). Os efeitos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas (TADEO et al., 2007), interações proteína-proteína, cristalização de proteínas (COLLINS, 2006), atividade enzimática (NISHIMURA et al., 1999), estruturação e desnaturação de macromoléculas biológicas (ZHANG & CREMER, 2006), crescimento bacteriano (LO NOSTRO et al., 2006), estruturas anfífilas (BARROS, 2003). Além disso, a Série de Hofmeister é observada em muitos fenômenos físico-químicos como tensão superficial (PEGRAM et al., 2007), concentração micelar crítica (WANG & SATOH, 2009) e estabilidade coloidal (LÓPEZ-LÉON et al., 2005). Acredita-se que os efeitos de Hofmeister aparentemente se realizam via mudanças na estrutura da água através de forças eletrostáticas e forças dissipativas de Debay-London (LO NOSTRO et al., 2006).

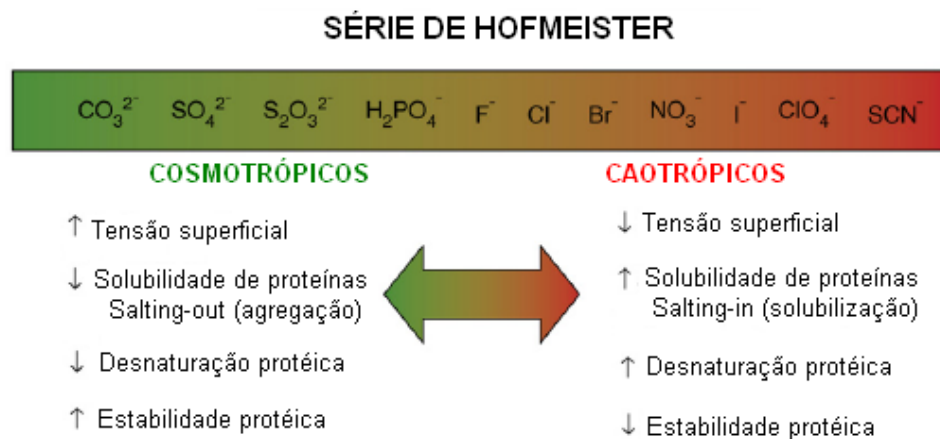


FIGURA 7: Sequência dos ânions da Série de Hofmeister e exemplo de alguns efeitos específicos promovidos por cosmotrópicos e caotrópicos. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.

Os íons induzem efeitos na estrutura da água alterando a formação natural das pontes de hidrogênio, consequentemente, as moléculas de água se ordenam de forma diferente ao redor de cada íon. Assim, pode-se classificar o íon em fracamente hidratado ou fortemente hidratado dependendo da quantidade de moléculas de água que se ordenam ao redor do íon (figura 8). De acordo com a sua atuação na estrutura da água, os íons da Série de Hofmeister podem ser classificados como:

- Cosmotrópicos: sulfato (SO_4^{2-}), fluoreto (F^-), cálcio (Ca^{+2}), magnésio (Mg^{+2}), entre outros.
- Caotrópicos: tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), iodeto (I^-), amônio (NH_4^+), entre outros.

De modo geral, os cosmotrópicos possuem a capacidade de estruturar as moléculas de água e estabilizar proteínas, enquanto que, os caotrópicos desestruturaram as moléculas de água e desestabilizam proteínas (ZHANG & CREMER, 2006).

FORTEMENTE HIDRATADO	FRACAMENTE HIDRATADO
$SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > F^- > Cl^- > Br^- > I^- > NO_3^- > ClO_4^-$	
$Mg^{2+} > Ca^{2+} > H^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+ > N(CH_3)_4^+$	
COSMOTRÓPICOS	CAOTRÓPICOS

FIGURA 8: Sequência de alguns íons da Série de Hofmeister e sua propriedade na camada de hidratação da água.

Quando um íon é adicionado a um dado volume de água, ele liga-se às moléculas mais próximas do solvente deste modo, causa uma reorientação dos dipolos moleculares ao redor do seu campo elétrico. Os íons cosmotrópicos possuem interação mais forte com moléculas de água do que às moléculas de água entre si (figura 9), já os caotrópicos no contrário, interagem com a água mais fracamente do que às moléculas de água entre si (LO NOSTRO et al., 2006).

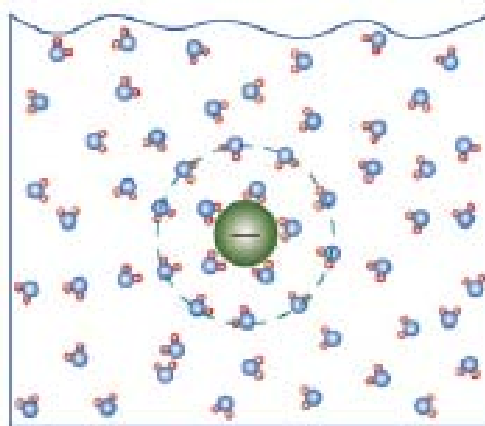


FIGURA 9: A representação esquemática da estruturação da água ao redor de um ânion cosmotrópico. Adaptado de ZHANG & CREMER, 2006.

A sequência dos íons de Hofmeister apresentada nas figuras 7 e 8 representa a influência dos íons na água. Porém, esta sequência não é fixa e depende do sistema em estudo, alguns íons podem mudar a sua posição na série ou até mesmo invertê-la. Por exemplo, um dado íon pode interagir com

apenas moléculas de água ou com uma macromolécula podendo apresentar um comportamento caotrópico ou cosmotrópico a depender do sistema (LYKLEMA, 2009; KUNZ, 2010).

Os ânions hidratam mais do que os cátions para o mesmo raio iônico. Os átomos de hidrogênio da água se aproximam do ânion de modo mais eficiente do que os átomos de oxigênio, hidratando assim melhor o ânion. Íons monovalentes como por exemplo: Γ^- , K^+ , Cs^+ , NH_4^+ , apresentam interação mais fraca com a água do que a interação de dipolo entre as moléculas de água (interação água-água), são caotrópicos. No entanto, íons menores ou com múltiplas cargas são cosmotrópicos, por exemplo: F^- , Mg^{+2} , Al^{+3} , exibindo uma interação mais forte com a água do que a interação água-água (BARROS, 2003; COLLINS, 2004).

Em geral, e somente para íons inorgânicos, os efeitos específicos do cátion são menos pronunciados do que os efeitos específicos do ânion, pois as interações dos ânions com a água são mais forte do que com os cátions para o mesmo tamanho e densidade de carga absoluta. Contudo, isto é apenas válido quando as interações íon-água são dominantes para os efeitos específicos do íon. Quando as interações direta íon/íon ou íon/co-soluto são dominantes, os efeitos específicos do cátion podem ser da mesma ordem de intensidade como nos efeitos específicos do ânion (KUNZ, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar a influência de substâncias cosmotrópicas e caotrópicas na interação de moléculas unitárias orgânicas com poros nanoscópicos protéicos visando o entendimento dos mecanismos moleculares do processo.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar os parâmetros cinéticos da interação do polietilenoglicol (PEG) com o nanoporo protéico unitário aumentando a concentração de KCl de 1M para 4M na solução banhante.
- Investigar a influência do aumento da concentração do KCl na identificação do PEG e sensibilidade do sensor estocástico baseado no nanoporo unitário.
- Investigar a influência dos ânions do grupo dos halogênios (Cl^- , I^- , F^- e Br^-) na interação do PEG com o nanoporo protéico unitário.
- Investigar a influência dos cátions do grupo dos metais alcalinos (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) mais o NH_4^+ na interação do PEG com o nanoporo protéico unitário.

4. METODOLOGIA

4.1 Bicamada Lipídica Plana

Para a formação da bicamada lipídica plana, utiliza-se a técnica de Montal e Mueller (1972). A técnica consiste na formação da bicamada pela aposição de duas monocamadas lipídicas em um orifício contido em uma película de Teflon[®] (politetrafluoretileno), denominada “partição” (figura 10). A partição possui um orifício (~100 μm) e divide a câmara experimental, também de Teflon, em duas hemicâmaras (*cis/trans*) que foram mantidas unidas através de um suporte metálico. Uma vez montada a câmara, acrescenta-se 0.7 ml da solução salina nos dois lados (ficando o nível da solução abaixo do orifício) e após adicionar, também nas duas hemicâmaras, 10 μl da solução de lipídeo (5 mg/ml em hexano). O lipídeo usado foi o difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC), um lipídeo sintético que aumenta a estabilidade da membrana. Em seguida o orifício é tratado com 1% de solução de hexadecano em hexano. É necessário esperar um tempo de cerca de 10 minutos para a evaporação do solvente para posteriormente elevar o nível líquido do compartimento *trans* (estabelecendo o nível da solução acima do orifício) pela adição de mais 0.7 ml da solução, formando, assim, a primeira monocamada, para em seguida elevar o lado oposto (*cis*) e completar a formação da bicamada no orifício. A formação da membrana é monitorada visualmente com ajuda de uma lupa e pela resposta capacitiva da membrana observada no osciloscópio.

Com essa bicamada formada, adiciona-se no lado *cis* uma concentração pré -estabelecida da α -hemolisina para a incorporação do canal protéico unitário. A corrente iônica fluirá através do canal incorporado em uma membrana formada no interior do orifício da partição de Teflon[®] que se encontra banhada por soluções aquosas das substâncias cosmotrópicas ou caotrópicas em diferentes concentrações com o tampão Tris 5mM e pH ajustado para o valor desejado. Neste trabalho, utilizou-se solução banhante composta por um dos cátions da família 1A - Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ - mais o NH_4^+ formando sais com o Cl^- ou composta por um dos ânions halogênicos: Cl^- , I^- , F^- e Br^- formando sais com o K^+ . Todas as soluções banhantes foram preparadas a uma concentração de 4M do sal, 5 mM Tris e pH 7.5 ajustado com ácido cítrico.

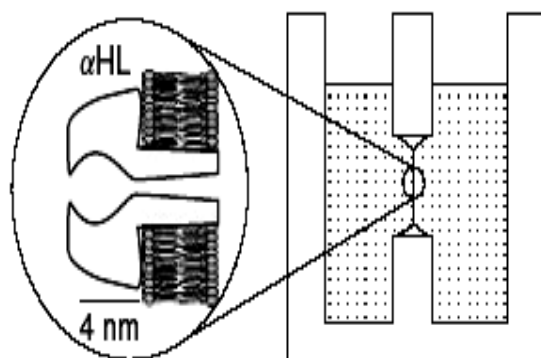


FIGURA 10: A bicamada lipídica plana (espessura ~ 4 nm) é formada sobre um orifício de $\sim 100\mu\text{m}$ de diâmetro de um filme de Teflon (partição) que separa duas hemicâmaras idênticas de Teflon onde cada uma acondiciona a solução banhante. O canal iônico incorpora-se na membrana pela adição da proteína formadora de canais no lado cis da câmara. Adaptado de KASIANOWICZ et al., 2007.

Após a inserção do poro unitário na bicamada adiciona-se no compartimento *trans* o analito a ser identificado e analisado pelo biossensor. No nosso caso, utilizamos o polímero polietilenoglicol de peso molecular 1294 (PEG 1294) em concentrações crescentes. Tanto a inserção do canal como os registros dos eventos moleculares unitários pela interação do analito com o nanoporo são realizados em modo de fixação de voltagem. Os processos são visualizados no osciloscópio e registrados no computador.

Todos os experimentos são executados sob as seguintes condições: temperatura ambiente de 25 ± 1 °C; todas as partições de Teflon[®] utilizadas possuem 25 μm de espessura e orifício de 100 à 300 μm de diâmetro. Com a finalidade de minimizar a interferência de perturbações mecânicas e eletromagnéticas, toda a montagem do sistema experimental está sobre uma mesa de amortecimento de alta performance (TMC 63-500) e blindada por uma gaiola de Faraday.

4.2 Sistema de aquisição e registro

Em todos os experimentos o sistema utilizado para estimulação, monitoração e aquisição dos registros é constituído por um gerador de onda triangular, um amplificador de patch clamp Axopatch

200B (Axon Instruments, Foster City, CA), uma placa conversora analógico-digital (PCI 6024E da National Instruments Corporation ou DIGIDATA 1440 da Molecular Devices) acoplada a um microcomputador IBM PC compatível (figura 11). Os registros de corrente através dos canais são filtrados a 15 kHz por um filtro passa-baixa Bessel (Model 902, Frequency Devices, Haverhill, MA) e gravados em uma amostragem de 50 kHz. A conexão dos compartimentos da câmara ao sistema de medidas elétricas é feita através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl).

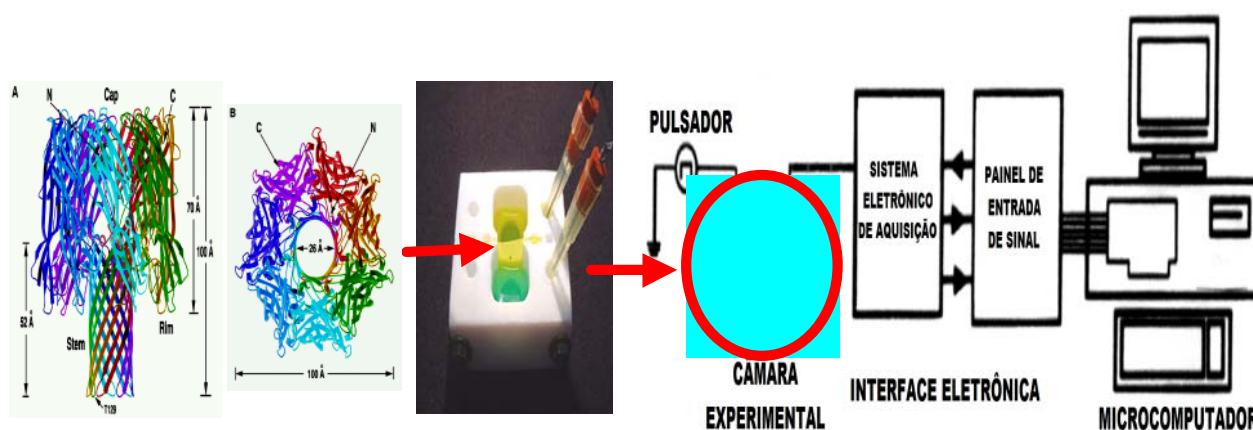


FIGURA 11: Modelo do canal de α -hemolisina, câmara de Teflon e diagrama da interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente.

4.3 Análise do transporte

Inicialmente determinamos o valor da condutância dos canais unitários, e apenas os canais cujo valor de condutância estejam próximos da média, são utilizados nos experimentos com os polímeros. A condutância de um único canal, determinada em voltagens aplicadas de -200 à +200 mV, é utilizada para construção do gráfico G-V (condutância-voltagem) dependente nas condições controle e experimental, na ausência e presença de um polímero adicionado a um lado ou simultaneamente aos dois lados da câmara, respectivamente. Os resultados obtidos em diferentes concentrações das substâncias são analisados. O transporte de moléculas através de poros aquosos manifesta-se basicamente de duas formas: como aumento do ruído basal de corrente e como eventos de bloqueios

individuais. Estudou-se a segunda forma procurando condições que regulem o tempo da interação (permanência) das moléculas unitárias com o nanoporo.

Utilizando o programa TauHist (desenvolvido por Dr. M.A. Pustovoit; Petersburg, Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia), foi realizada a análise cinética convencional dos registros temporais de corrente, determinando o tempo de permanência do canal em cada um dos estados aberto ou bloqueado pelas moléculas orgânicas e, como resultado, as constantes de associação e dissociação como descrito por Colquhoun & Sigworth em 1995. As duas constantes da cinética de interação das moléculas unitárias com o nanoporo são denominadas como: τ_{on} e τ_{off} , que representam o tempo da permanência do poro no estado desocupado e ocupado, respectivamente. Os parâmetros são obtidos através da análise da distribuição de milhares dos respectivos eventos. Através desses parâmetros primários, obtemos as constantes da velocidade de entrada ($k_{on} = 1/(\tau_{on} \times C)$) e saída das moléculas ($k_{off} = 1/\tau_{off}$) e, claro, a constante de equilíbrio ($K_d = k_{on} / k_{off}$) e o valor das energias de interação do analito com o sítio no interior do poro ($\Delta G^{app} \sim kT \ln K^{app}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Taxa de transição

Estudamos a influência dos sais de halogênios e dos metais alcalinos (mais o amônio) na sensibilidade do sensor estocástico. Estabelecemos que a sensibilidade do sensor depende muito fortemente do tipo do eletrólito que compõe a solução banhante. Na presença dos halogênios extremos (menor e maior tamanho, F^- e I^-) difere cerca de cem vezes. Contudo, a diferença entre os metais alcalinos extremos (Li^+ e Cs^+) chega a quarenta vezes.

Nas figuras 12 e 13 apresentamos a influência dos sais em um parâmetro do sensor estocástico, a taxa de transição. Para melhor compreensão do parâmetro citado anteriormente, precisamos relembrar a interação analito-nanoporo. O analito ao interagir com o nanoporo induz uma modulação na corrente iônica que passa através do nanoporo unitário causando um bloqueio característico. Dois parâmetros caracterizam o analito, a profundidade e o tempo de residência, os quais são intrínsecos ao analito permitindo a sua identificação e distinção de outros analitos presentes no mesmo meio simultaneamente. A frequência dos bloqueios induzidos pelo analito no nanoporo permite a determinação da concentração dele na solução. Na prática, estima-se o tempo característico entre os bloqueios, τ_{on} , quanto maior a frequência, menor a τ_{on} . Como foi descrito por Movileanu e colaboradores em 2003, o parâmetro inverso da τ_{on} ($1/\tau_{on}$), denominado taxa de transição, é linearmente proporcional à concentração do analito. A menor concentração do analito detectável pelo sensor estocástico (com o nanoporo protéico inserido em bicamada lipídica plana) pode ser definido como tal que provoca o aparecimento dos eventos da interação com a frequência de 1 Hz.

Exatamente, as mudanças nos valores da taxa de transição na presença de sais (apresentadas nas figuras 12 e 13) demonstram uma relação linear com a concentração do analito. Na figura 12 há uma comparação das taxas de transição do PEG quando presente em solução dos seguintes sais: KF, KCl, KBr, KI.

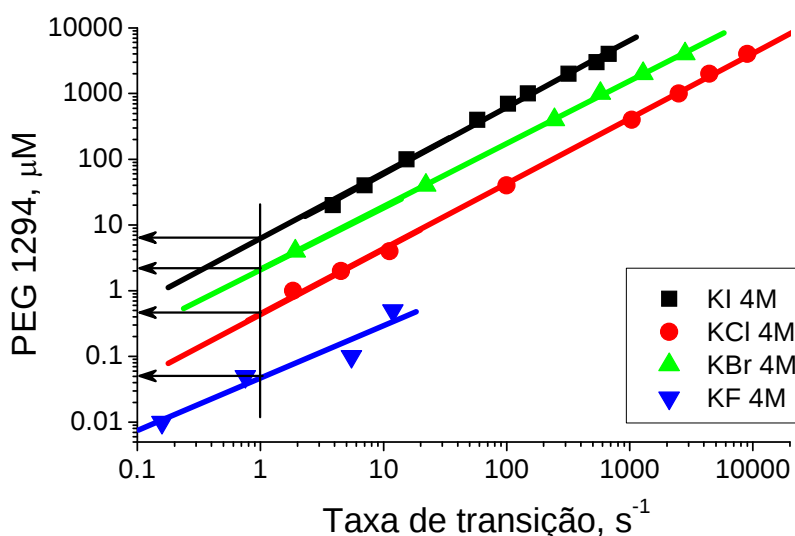


FIGURA 12: Gráfico que relaciona a taxa de transição versus concentração do analito (neste caso PEG). Para facilitar a determinação da concentração do analito (linhas pretas horizontais), a frequência dos eventos da interação do nanoporo com analito deve ser igual ou maior do que 1 Hz (linha preta vertical). A solução banhante da membrana foi composta por sais de potássio com ânions da série de Hofmeister: F^- , Cl^- , Br^- e I^- (4M), tamponado com Tris (5mM) em pH 7,5. Utilizamos como modelo de analito polimérico, o PEG 1294, uma vez que ele é monodisperso e de elevado grau de pureza.

Estabelecemos que o tipo de ânion presente na solução banhante do biossensor, altera drasticamente a frequência dos eventos de interação das moléculas do PEG com o nanoporo protéico. A eficácia do ânion obedece a série de Hofmeister: $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$ (COLLINS et al., 2007). As menores concentrações detectáveis do PEG 1294 capazes de induzir os eventos de interação com a frequência de 1 Hz foram de 0,05 μM , 0,5 μM , 2 μM e 7 μM , para os ânions F^- , Cl^- , Br^- e I^- , respectivamente. A solução banhante composta por KF 4M aumenta a sensibilidade do canal, com relação a nossa solução padrão de KCl 4M, cerca de dez vezes.

Utilização dos cloretos dos metais alcalinos e amônio mostraram que os cátions monovalentes também possuem os efeitos específicos na interação do PEG com o nanoporo protéico. Na figura 13, há um comparativo das taxas de transição do na presença das soluções banhantes de LiCl, NaCl, RbCl, KCl, CsCl e NH_4Cl (4M).

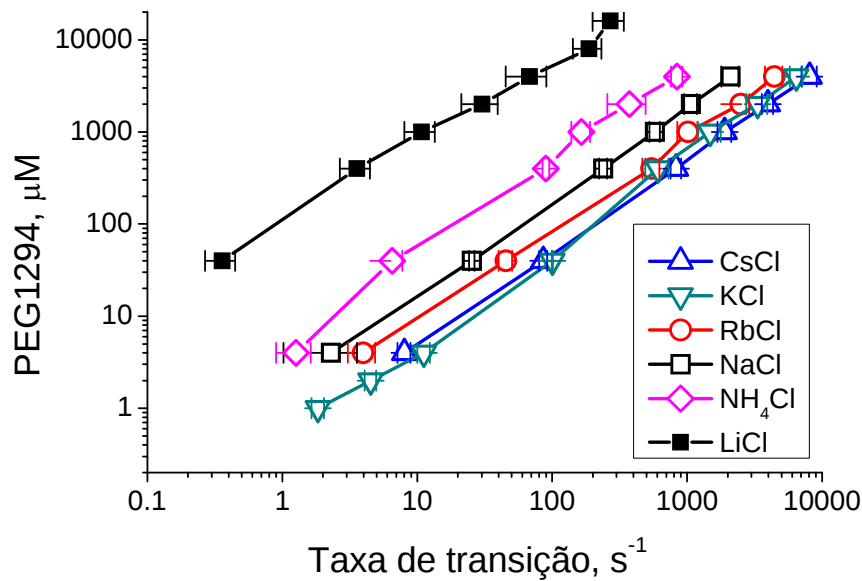


FIGURA 13: Gráfico que relaciona a taxa de transição versus concentração do analito (PEG 1294) comparando a sensibilidade do nanoporo-sensor quando banhado por solução composta por um dos cátions da família 1A (Li^+ , K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+) mais o NH_4^+ formando sais com Cl^- em uma concentração de 4M.

Com relação à eficácia dos cátions na determinação da menor concentração detectável pelo sensor, obtém-se a sequência: $\text{K}^+ \approx \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$. Esta sequência não obedece a Série de Hofmeister (COLLINS et al., 2007). O resultado indica que a influência dos cátions na interação PEG/nanoporo é mais complexa do que a influência dos ânions e que os cátions mediam os seus efeitos através da influência tanto na água quanto na molécula do analito (PEG). A conclusão está em acordo com os relatos que a posição de alguns cátions na Série pode ser alterada dependendo do sistema em estudo (LYKLEMA, 2009; KUNZ, 2010).

5.2 Constante de formação

A constante de formação (K_f) está relacionada com a energia de interação a qual influencia no tempo de residência da molécula unitária no nanoporo protéico, ou seja, quanto menor a energia de interação, menor o tempo de residência e quanto maior a energia, maior o tempo de residência. Avaliamos a influência dos cátions da família 1A (Li^+ , K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+) mais o NH_4^+ , formando sais

com o Cl^- , na energia de interação do PEG 1294 com o poro protéico formado pela α -toxina de *Staphylococcus aureus* em bicamada lipídica plana. Os resultados obtidos, representados na figura 14, revelam mudança nos valores das constantes de formação e consequentemente na energia de interação do PEG com nanoporo quando banhado por diferentes soluções.

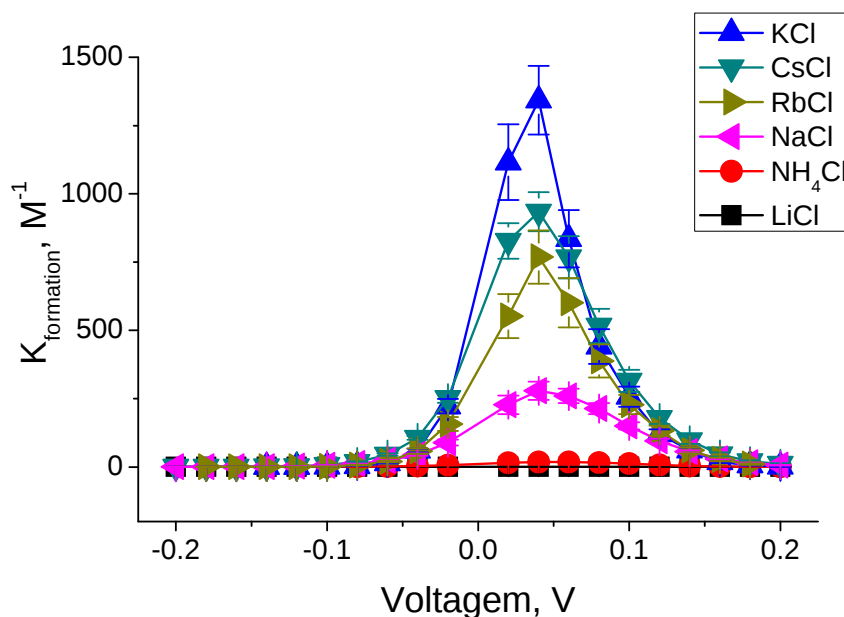


FIGURA 14: O gráfico relaciona as constantes de formação do nanoporo protéico com o PEG 1294 versus voltagem. As soluções banhantes utilizadas foram LiCl, NH₄Cl, NaCl, RbCl, KCl, CsCl todas na concentração de 4 M, mais 5 mM de Tris e pH 7,5 ajustado com ácido cítrico.

Além disso, estabelecemos que em todos os casos (menos o LiCl) a interação é muito dependente do potencial transmembrana, com máximo da energia em aproximadamente 40-60 mV. A dependência estabelecida demonstra que o PEG adquire cargas elétricas nestas soluções (RODRIGUES et al., 2008).

Observa-se que os valores das constantes de formação do complexo nanoporo-PEG diferem dependendo do tipo da composição iônica da solução banhante. Essa dependência obedece a seguinte sequência: $\text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ \approx \text{Li}^+$. A sequência observada é similar àquela observada para a taxa de transição. A solução composta por KCl teve a maior constante de formação e a solução de NH₄Cl e LiCl tiveram as menores constantes. Então, evidencia-se que o tipo do eletrólito realmente tem uma grande influência no tempo de residência do analito e isso é determinado pelo aumento da energia de interação com o nanoporo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTIER, Y., BRAHA, O., BAYLEY, H. Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter. **J. AM. CHEM. SOC.**, v. 128, p. 1705-1710, 2006.

BARROS, V.P. Efeito dos Íons da Série de Hofmeister em Sistemas Micelares. 2003. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Física. São Paulo.

BAYLEY, H., BRAHA, O., CHELEY, S., GU, L.-Q. Engineered Nanopores. *In: Nanonotechnology*. Editores: Christof Niemeyer and Chad Mirkin. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim. p. 93-112, 2004.

BEZRUKOV, S.M., VODYANOY, I., PARSEKIAN, V.A. Counting polymers moving through a single ion channel. **Nature**, v. 370, p. 279-281, 1994.

BHAKDI, S. & TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v. 55, p. 733-751, 1991.

CHELEY, S., GU, L.Q., BAYLEY, H. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 829-838, 2002.

CLARKE, J., WU, HAI-CHE, JAYASINGHE, L., PATEL, A., REID, S., BAYLEY, H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. **Nature Nanotechnology**, v.4, p. 265-270, 2009.

COLLINS, K.D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. **Methods**, v. 34, p. 300-311, 2004.

COLLINS, K.D. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization. **Biophysical Chemistry**, v. 119, p. 271-281, 2006.

COLLINS, K.D., NEILSON, G.W., ENDERBY, J.E. Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. **Biophysical Chemistry**, v. 128, p. 95–104, 2007.

COLQUHOUN, D. & SIGWORTH, F. J. Fitting and statistical analysis of single channel records. *In* Single-channel recording. B. Sakmann, editor. Plenum Press, New York. 483-587. 1995.

COOPER, J. & CASS, T. Biosensors: a practical approach. 2004. Oxford University Press 2^a edição.

COULTER, W. H. 1953. U.S.Patent No.2,656,508; Issued 20 Oct.1953.

FURTADO, R.F., DUTRA, R.A.F., ALVES, C.R., PIMENTA, M.G.R., GUEDES, M.I.F. Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ISSN 1677-1915. Novembro, 2008.

GRAY, G.S. & HEHOC, M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 615-618, 1984.

GU, L.Q., BRAHA, O., CONLAN, S., CHELEY, S., BAYLEY, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. **Nature**, v. 398, p. 686-690, 1999.

GUPTA, P.K. Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. **Trends in Biotechnology**, v.26, p. 602-611, 2008.

GURNEV, P.A., HARRIES, D., PARSEGIAN, V.A., BEZRUKOV, S.M. The Dinamic Side of the Hofmeister Effect: A Single-Molecule Nanopore Study of Specific Complex Formation. **ChemPhysChem**, v.10, p. 1445-1449, 2009.

HENG, J.B., AKSIMENTIEV, A., HO, C., MARKS, P., GRINKOVA, Y.V., SLIGAR, S., SCHULTEN, K., TIMP, G. The electromechanics of DNA in a synthetic nanopore. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 1098-1106, 2006.

HOFMEISTER F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. **Arch Exp Pathol Pharmacol**, v. 24, p. 247-260, 1888.

KANG, X.F., CHELEY, S., GUAN, X., BAYLEY, H. Stochastic detection of enantiomers. **J. AM. CHEM. SOC.** v.128, p.10684-10685, 2006.

KASIANOWICZ, J.J., HENRICKSON, S.E., MISAKIAN, M., LERMAN, J.C., PANCHAL, R.G., HALVERSON, K.M., BAVARI, S.M., GUSSIO, R., NGUYEN, T., SHENOY, D.K., V.M. STANFORD. The Detection and Characterization of Ions, DNA and Proteins Using Nanometer-Scale Pores. In *Handbook of Biosensors and Biochips*. R.S. Marks, D.C. Cullen, I. Karube, C.R. Lowe, and H.H. Weetall, editors. John Wiley & Sons. p. 1-20. 2007.

KING, G.M. & GOLOVCHENKO, J.A. Probing nanotube-nanopore interactions. **Phys Rev. Lett.**, v. 95, p. 216103. 2005.

KRASILNIKOV, O.V., MERZLYAK, P.G., SABIROV, R.Z., TERNOVSKY, V.I., ZARIPOVA, R.K. Influence of pH on the Potential-Dependence of Staphylococcal Toxin Channels Functioning in Phosphatidylcholine Bilayer. **Ukr. Biokhim. Zh**, v. 60, p. 60-66, 1988.

KRASILNIKOV, O.V., MERZLYAK, P.G., YULDASHEVA, L.N., RODRIGUES, C.G., BHAKDI, S., VALEVA, A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1372-1378, 2000.

KRASILNIKOV, O.V., RODRIGUES, C.G., BEZRUKOV, S.M. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. **Physical Review Letters**, v. 97:018301, 2006.

KUNZ, W. Specific ion effects in colloidal and biological systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 34-39, 2010.

LYKLEMA, J. Simple Hofmeister Series. **Chemical Physics Letters**, v. 467, p. 217-222, 2009.

LO NOSTRO, P., NINHAM, B.W., MILANI, S., LO NOSTRO, A., PESAVENTO, G., BAGLIONI, P. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. **Biophysical Chemistry**, v. 124, p. 208-213, 2006.

LÓPEZ-LEON, T., JÓDAR-REYES, A.B., VINUESA, O., BASTOS-GONZÁLEZ. Hofmeister effects on the colloidal stability of an IgG-coated polystyrene látex. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 139-148, 2005.

MAGLIA, G., HENRICUS, M., WYSS, R., LI, Q., CHELEY, S., BAYLEY, H. DNA Strands from Denatured Duplexes are Translocated through Engineered Protein Nanopores at Alkaline pH. **Nano Letters**, 2009.

MERZLYAK, P.G., CAPISTRANO, M.F., VALEVA, A., KASIANOWICZ, J.J., KRASILNIKOV, O.V. Conductance and ion selectivity of a mesoscopic protein nanopore probed with cysteine scanning mutagenesis. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 3059-3070, 2005.

MONTAL, M. & MUELLER, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and A Study of Their Electrical Properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, p. 3561-3566, 1972.

MOVILEANU, L., CHELEY, S., BAYLEY, H. Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 897-910, 2003.

MOVILEANU, L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 333-341, 2009.

NISHIMURA, J.S., NARAYANASAMI, R., MILLER, R.T., ROMAN, L.J., PANDA, S., MASTERS B.S.S. The Stimulatory Effects of Hofmeister Ions on the Activities of Neuronal Nitric-oxide Synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p.5399-5406, 1999.

NOSKOV, S.YU., IM, W., ROUX, B. Ion permeation through the α -Hemolysin channel: theoretical studies based on brownian dynamics and poisson-nernst-plank electrodiffusion theory. **Biophysical Journal**, v. 87, p. 2299-2309, 2004.

PASTORIZA-GALLEGO, M., GIBRAT, G., THIEBOT, B., BETTON, J-M, PELTA, J. Polyelectrolyte and unfolded protein pore entrance depends on the pore geometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 1377–1386, 2009.

PEGRAM, L.M. & RECORD, JR. M.T. Hofmeister Salt Effects on Surface Tension Arise from Partitioning of Anions and Cations between Bulk Water and the Air-Water Interface. **J. Phys. Chem B**, v.111, p. 5411-5417, 2007.

RHEE, M. & BURNS, M.A. Nanopore sequencing technology: nanopore preparations. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 174-181, 2007.

RICCARDI, C.S, COSTA, P.I., YAMANAKA, H. Amperometric immunosensor. **Química Nova**, v. 25, p. 316-3250, 2002.

ROBERTSON, J.W., RODRIGUES, C.G., STANFORD, V.M., RUBINSON, K.A., KRASILNIKOV, O.V., KASIANOWICZ, J.J. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8207-8211, 2007.

RODRIGUES, C.G. Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários. 2006. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RODRIGUES, C.G., MACHADO, D.C., CHEVTCHENKO, S.F., KRASILNIKOV, O.V. Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. **Biophysical Journal**, v.95, p. 5186-5192, 2008.

SHIM, J. W. & GU, L. Q. Stochastic Sensing on a Modular Chip Containing a Single-Ion Channel. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2207-2213, 2007.

SONG, L., HOBAUGH, M.R., SHUSTAK, C., CHELEY, S., BAYLEY, H., GOUAUX, J.E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, p. 1859-1866, 1996.

TADEO, X., PONS, M., MILLET, O. Influence of the Hofmeister Anions on Protein Stability As Studied by Thermal Denaturation and Chemical Shift Perturbation. **Biochemistry**, v.46, p. 917-923, 2007.

VELUSAMY, V., ARSHAK, K., KOROSTYNSKA, O., OLIWA, K., ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232-254, 2010.

WANG, D., ZHAO, Q., DE ZOYSA, R.S.S., GUAN, X. Detection of nerve agent hydrolytes in an engineered nanopore. **Sensors and Actuators B**, v. 139, p. 440-446, 2009.

WANG, J. & SATOH, M. Novel PVA-based polymers showing an anti-Hofmeister Series property. **Polymer**, v. 50, p. 3680-3685, 2009.

ZHANG, Y. & CREMER, P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister Series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p. 658-663, 2006.

ZHAO, Q., WANG, D., JAYAWARDHANA, D.A., GUAN, X. Stochastic sensing of biomolecules in a nanopore sensor array. **Nanotechnology**, v. 19, p.1-8, 2008.

ZHAO, Q., JAYAWARDHANA, D.A., WANG, D., GUAN, X. Study of Peptide Transport through Engineered Protein Channels. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, p. 3572-3578, 2009.

7. CAPÍTULO 1

Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors.

Autoria: Cláudio G. Rodrigues, Dijanah C. Machado, Sérgio F. Chevtchenko e Oleg V. Krasilnikov.

Biophysical Journal, 95:5186–5192 (2008).

Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors

Claudio G. Rodrigues, Dijanah C. Machado, Sérgio F. Chevtchenko, and Oleg V. Krasilnikov

Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ABSTRACT The mechanisms of KCl-induced enhancement in identification of individual molecules of poly(ethylene glycol) using solitary α -hemolysin nanoscale pores are described. The interaction of single molecules with the nanopore causes changes in the ionic current flowing through the pore. We show that the on-rate constant of the process is several hundred times larger and that the off-rate is several hundred times smaller in 4 M KCl than in 1 M KCl. These shifts dramatically improve detection and make single molecule identification feasible. KCl also changes the solubility of poly(ethylene glycol) by the same order of magnitude as it changes the rate constants. In addition, the polymer-nanopore interaction is determined to be a strong non-monotonic function of voltage, indicating that the flexible, nonionic poly(ethylene glycol) acts as a charged molecule. Therefore, salting-out and Coulombic interactions are responsible for the KCl-induced enhancement. These results will advance the development of devices with sensor elements based on single nanopores.

INTRODUCTION

Recent studies have demonstrated that single, nanometer-scale pores, including the ion channels formed by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α HL), can be used to detect and quantify specific monovalent ions (1,2), divalent metal cations (3,4), small organic molecules (5–7) nucleic acids (8,9), proteins (10,11), and polymers (12–17). Because these pores are so small, their interaction with an analyte can alter the ionic current that would otherwise flow freely. Analytes apparently change the electrostatic potential profile inside the pore or simply block the ion-conduction pathway.

Binding of analytes to nanopores is random and reversible, and it causes characteristic fluctuations in the ionic current. For this reason, single nanopores inserted in thin membranes have recently been referred to as *stochastic sensors* (18). Studies (1,2,5,7,19–21) have shown that the frequency of these fluctuations reveals the kinetic rate constants for the analyte-pore interaction. As a result, the concept of a molecular Coulter counter was developed (22).

If an analyte associates with a nanopore for periods longer than the measurement bandwidth, discrete states of ionic current blockade can be directly observed. The degree to which pore conductance is blocked is often characteristic of the analyte (5–7,19,23). Moreover, studies (9,14,17,23,24) have demonstrated that different polymers can cause complex but characteristic blockade patterns. In a manner similar to infrared-ultraviolet-visible (IR-UV-VIS) spectra and mass spectrometry, these patterns provide a fingerprint of polymers that thread through the nanopore (17).

Despite the proof of concept for the use of single nanopores in sensor applications, recent theoretical studies necessitate a better understanding of how polymers interact with nanoscopic pores (25–28). Previous studies (14,17) demonstrated that high-resolution recording of poly(ethylene glycol) (PEG)- α HL nanopore interactions is achievable in 4 M KCl. The goal of this study was to discover the underlying mechanism(s) of the stochastic sensing enhancement observed at high KCl concentrations. Our key finding is that molecules of PEG in aqueous salt solutions act as charged molecules. The salting-out effect, the Coulombic interaction of PEG with the α HL nanopore, and the decrease in PEG chain flexibility with increasing KCl concentrations are responsible for the observed enhancement.

MATERIALS AND METHODS

Bilayer lipid membranes of 40 pF capacitance were formed by the lipid monolayer apposition technique, using 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, as described previously (29). The membrane-bathing aqueous solution contained 1 M to 4 M KCl in 5 mM Tris-citric acid buffer (pH 7.5). PEG was used as a representative of neutral polymers, because it is used widely in both scientific studies and technological applications. PEGs of various molecular weights (Fluka, Seelze, Germany) and monodisperse PEG 1294 (Polypure, Oslo, Norway) were added from the *trans* side of the membrane. α HL (Calbiochem, Madison, WI) was added from the *cis* side of the membrane in a concentration sufficient to form unitary protein nanopore in planar lipid membranes. If not mentioned specially, the applied potential was 40 mV. A positive current is defined by cation flow from *trans* to *cis*.

Experiments were carried out using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage clamp mode. Membrane potential was maintained using silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrodes in 3 M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200 μL pipette tips. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Butterworth filter (model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50 to 100 kHz. In experiments, we used dilute polymer solutions in which nonideality effects (30) and polymer-polymer repulsion that could increase PEG partitioning into the

Submitted June 24, 2008, and accepted for publication August 25, 2008.

Address reprint requests to Oleg V. Krasilnikov, Dept. of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitaria, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP 50670-901. E-mail: kras@ufpe.br.

Editor: Toshihori Hoshi.

© 2008 by the Biophysical Society
0006-3495/08/12/5186/07 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.108.140814

protein nanopore (31) are virtually nonexistent. The greatest PEG concentration used in bilayer experiments was 4 mM for PEG 3000 (1.2%, w/w), which is well below the overlap concentration for this PEG molecule ($\sim 13\%$) (30), and solubility in 4 M KCl (see Results and Discussion). The obtained dependencies were qualitatively similar for all PEG molecules examined (PEG 600, 1000, 1500, 2000, 3000, and 4000); however, only the data for PEG 1500 and 2000 are presented in this study.

The limit of PEG solubility was estimated by the modified cloud-point method (32). In brief, small amounts of PEG (usually between 2 and 40 mg) were added to 10 mL glass vials. Then, small volumes (300–500 μL) of KCl solution were added stepwise at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). After each addition, vials were closed using screw caps with Teflon seals, carefully shaken to achieve full PEG solubility, and placed in a boiling water bath ($\sim 100^\circ\text{C}$) for 10 to 30 min. Cloud formation was determined visually. Polymer molarities were calculated on a mass percent basis. The mean value of the PEG concentration between two neighboring solutions (one of which still showed — and the other of which no longer showed — a phase split) in each experiment, represented the PEG solubility under those conditions. The difference in concentration between those neighboring solutions determined the inaccuracy of the experimental results. To determine the cloud point more accurately, the experiment was repeated several times with a mixture already close to the phase boundary. Smaller increments of KCl solution were then added to narrow the inaccuracy to $< 1\%$.

Parameters of the molecular signature (mean duration and amplitude of the blockage), transition rate, and kinetic constants of the PEG-nanopore interaction were obtained essentially as described in the works by Krasilnikov et al. (14) and Movileanu et al. (16).

RESULTS AND DISCUSSION

Appearance

Voltage clamping was used to examine the interaction of individual PEG molecules with solitary protein nanopores. The ionic current through the αHL nanopore bathed by a polymer-free solution is quiescent (8,12,31,33,34). Addition of PEG to the subphase causes well-defined current blockades (Fig. 1 A) of which the frequency, amplitude, and duration increase with KCl concentration. Compared to 1 M

KCl, the aforementioned blockade parameters are strongly dependent on polymer molecular weight in the presence of 4 M KCl and become useful in the identification of the polymer (14,17). When polydisperse PEG molecules are used in the presence of 4 M KCl, analysis of blockade events reveals the distinct PEG populations. They are clearly observed in the two-dimensional distribution of the events (residence time versus normalized residual conductance) (Fig. 1 B). The obtained resolution (better than the repeat unit) makes it possible to detect and quantify each PEG population in the sample in real time, using software developed in our laboratory.

On-rate constant

To determine the on-rate constant, k_{on} , defined as $1/(\tau_{\text{on}} \times C_{\text{PEG}})$, data were first collected on the time intervals between the end of one blockade event and the onset of the next to establish the characteristic time τ_{on} . We observed that the k_{on} value for all used PEGs increased in a hyperlinear manner with KCl concentration. For PEG 2000, k_{on} is several hundred times greater in 4 M KCl than in 1 M KCl, and $k_{\text{on}}(\text{KCl})$ dependence is fitted well with a power function (Fig. 2 A).

The salting-out effect may be one of several reasons for the established enhancement in the on-rate constant. To explore this possibility, the solubility of PEGs at different KCl concentrations was investigated. Studies (35,36) have shown that PEGs have an unusual property in water: they exhibit an upper temperature limit of solubility, which is better known as a cloud point. There also are reports (35,37) that increased salt concentration can lower the precipitation temperature of PEG molecules. However, the limiting PEG concentration, beyond which insolubility and formation of two phases oc-

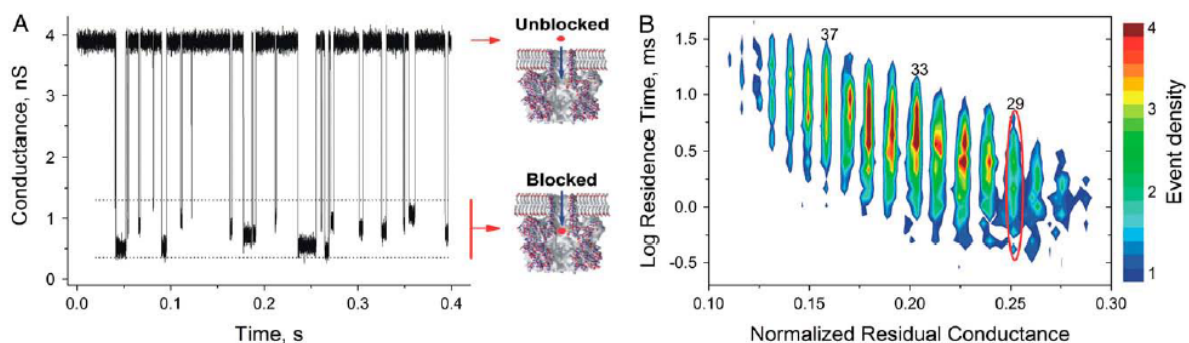


FIGURE 1 Influence of polydisperse PEG 1500 (0.4 mM) on the single αHL pore current. (A) This typical trace of the ion current through the αHL pore exhibits stepwise transitions between completely open and partially blocked states that are caused by the entrance of a single PEG molecule into the pore lumen. Time averaging is 0.01 ms. Transmembrane voltage was maintained at 40 mV. The solution contains 4 M KCl. The horizontal dashed lines delimit the location of the blockages. (B) Two-dimensional visualization of the residence time/normalized residual conductance density distribution (two-dimensional contour plot) of $> 18,000$ events like those presented in A. Each colored “island” represents an individual monodisperse PEG with a number of repeat units shown in the figure. Colored bars denote the number of events at a given residual conductance and residence time. The difference between each of the successive colors is ~ 10 events/(Log ms $\times$ pA). Such a representation is suitable to build a database for the identification and characterization of a single molecule based on the analysis of an individual blockade event. The ambit of the residual conductance-residence time distribution for monodisperse PEG 1294 is shown in the red ellipse.

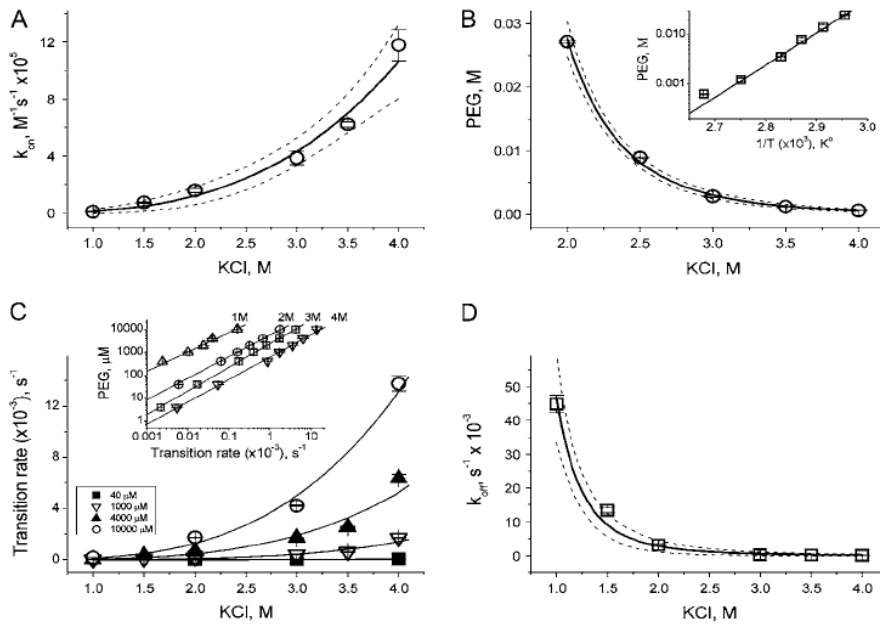


FIGURE 2 Dependence of the kinetic parameters of the PEG 2000- α HL pore interaction (A, C, and D) and PEG solubility (B) on KCl concentration. (A) The dependence of the on-rate constant of PEG capture by the α HL pore. The solid line is drawn according to the equation $k_{on} \propto [KCl]^{3.2 \pm 0.6}$ with an adjustable multiplier to fit the k_{on} data. (B) Solubility of PEG 2000 in different KCl solutions at 100°C and at different temperatures (*inset*). The line is drawn according to the equation $[PEG] \propto [KCl]^{-3.4 \pm 0.3}$ with an adjustable multiplier to fit the data. (*Inset*) Arrhenius plot of PEG solubility in 4 M KCl. The solid line is the first-order regression fit of the data. Temperature coefficient Q_{10} is 3.3 ± 0.3 . Each point represents the mean ($\pm$ SD) of three to eight independent experiments. (C) Influence of KCl concentration on the transition rate obtained in the presence of PEG. The line is drawn according to the equation $Y \propto [KCl]^{3.9 \pm 0.6}$ with an adjustable multiplier to fit the data. (*Inset*) The concentration of PEG as a function

of the transition rate at different KCl concentrations. The lines are the first-order regression fits of the data. (D) The dependence of the average off-rate constant of the PEG- α HL pore interaction. The line is drawn according to the equation $k_{off} \propto [KCl]^{-4.0 \pm 0.5}$ with an adjustable multiplier to fit the k_{off} data. For A, C, and D, each point represents the mean ($\pm$ SD) of at least three single protein nanopores reconstituted in separate experiments with > 9000 events as in Fig. 1 A. Dashed lines show 95% confidence limits.

curs in high KCl concentrations, is unknown, and so we examined it in this study. Our results show that the solubility of PEG (at 100°C) actually decreases with increasing KCl concentration in a sublinear manner (Fig. 2 B). It is fitted well with a power function in which the magnitude of the exponent has a value similar to that of the $k_{on}(KCl)$ dependence (Fig. 2 A).

Therefore, it seemed reasonable that the salting-out phenomenon, surmised in a molecular dynamics simulation study (37), might be involved in the observed $k_{on}(KCl)$ dependence. However, the level of PEG solubility in 4 M KCl, even at 100°C, remains high (~ 1 mM for PEG 2000). Moreover, PEG solubility increases remarkably at lower temperatures (Fig. 2 B, *inset*), so that the predicted PEG concentration (at 25°C) becomes preposterously high (~ 9.2 M or 18.4 kg/L, for PEG 2000). These results affirm that, at the highest PEG concentration used in this study (4 mM), all

PEGs are completely dissolved. Thus, other mechanisms may also be responsible for the strong hyperlinear $k_{on}(KCl)$ dependence.

To clarify these mechanisms, the on-rate constant for different PEG molecules, $k_{on}(Mw)$, was analyzed at different KCl concentrations. The value of k_{on} decreased with increasing PEG molecular weight (Fig. 3). However, the magnitude of the decrease was dependent on KCl concentration — it was considerably more flat at 4 M than at 1 M KCl. To describe the established $k_{on}(Mw)$ dependence, we have used the formalism that was developed by Douglas and Garboczi (38) and successfully used in our previous study (14). This formalism assumes that the dependence of both the on-rate constant and the diffusion coefficient, $D(Mw)$, on PEG molecular weight can be written as $k_{on}(Mw) \propto D(Mw) \propto Mw^{-4/5}$, indicating that the on-rate constant is diffusion limited. The experimental data for the

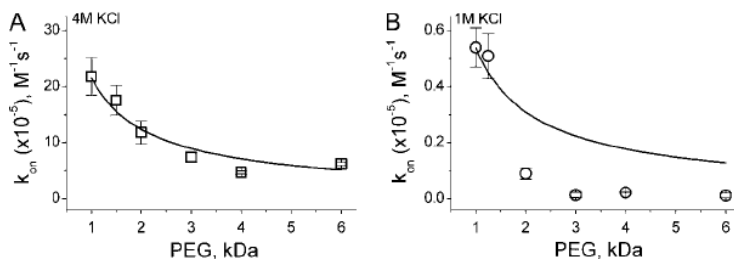


FIGURE 3 The average on-rate of polymer capture by α HL pores as a function of polymer mass at 4 M (A) and 1 M KCl (B). The solid line is drawn according to the equation in the work by Douglas and Garboczi (38), $k_{on}(Mw) \propto D(Mw) \propto Mw^{-4/5}$, with an adjustable multiplier to fit the data for the smallest PEG molecule. Note the 50-fold difference in scales. Each point represents the mean ($\pm$ SD) of at least three single protein nanopores reconstituted in separate experiments with > 9000 events as in Fig. 1 A.

solution containing 4 M KCl (Fig. 3 A) obey this simple function and can be fitted satisfactorily. At 1 M KCl (Fig. 3 B), the dependence is much more a function of polymer mass than at 4 M KCl (Fig. 3 A) and could not be ascribed to a decrease in the diffusion coefficient. Hence, in the presence of the lower KCl concentrations, diffusion is not the only determinant for the on-rate constant of PEG capture by the α HL pore. It appears that the role of entropy part of PEG- α HL pore interaction increases with decreasing salt concentration and becomes dominant at low salt concentrations (34,39), which allows pore sizing by polymer partitioning (15,40,41).

The $k_{\text{on}}(Mw)$ dependence established at 1 M KCl is qualitatively similar to that presented in a previous study by Movileanu and colleagues (16). However, there is considerable quantitative difference — the obtained k_{on} values for each PEG are $\sim 5\times$ smaller than demonstrated previously (16). The transmembrane voltages, 40 mV and 100 mV, comprise the only methodological difference between this study and that by Movileanu and colleagues (16). This observation suggests that PEG entry into an α HL pore could be voltage dependent. Additional experiments performed at different voltages (± 200 mV) confirmed this hypothesis (Fig. 4). k_{on} is dependent on voltage in a nonlinear manner. The difference in the k_{on} value measured at different voltages could reach 2 to 3 orders of magnitude. This behavior demonstrates that PEG senses the transmembrane voltage even in solution, probably when it is in the access regions of the pore. The decrease in k_{on} observed at a high positive voltage probably results from PEG depletion in the region. To our knowledge, this phenomenon has not been noted before. The data resemble the known effect of charged analyte depletion near the opening of nanoscopic pores (42–44). The effect is

specific for diffusion-limited transport and confirms our conclusion that PEG entrance into the pore is diffusion limited. The depletion is observed at low concentrations of charged analytes and relatively high transmembrane voltage, which are conditions similar to those in our experiments with PEG molecules. Thus, the neutral polymer PEG appears to be charged, and the Coulombic interaction between PEG and the α HL pore (which is decorated with fixed charges) may occur. This finding is consistent with the observation (45,46) that PEGs can form complexes with cations. The latter could also be responsible for the observed $k_{\text{on}}(\text{KCl})$ dependence and for the divergence between $k_{\text{on}}(Mw)$ values obtained both previously (16) and in this study. The phenomenon is very important and worthy of further investigation.

Transition rate

As a consequence of the $k_{\text{on}}(\text{KCl})$ dependence (Fig. 2 A), the transition rate, defined by Movileanu and colleagues (16) as $C \times k_{\text{on}}$, is dozens of times larger at 4 M KCl than at 1 M KCl. Examples of such dependencies established for PEG 2000 are shown in Fig. 2 C. Accordingly, the high KCl concentrations shift the background equivalent concentration of all PEGs used in this study. At an event frequency of 1 Hz, then, the background equivalent PEG concentration comprises: 120.0, 9.0, 2.0, and 0.8 μM (PEG 2000) and 20.0, 2.5, 1.4, and 0.5 μM (PEG 1500) at 1 M, 2 M, 3 M, and 4 M KCl, respectively (Fig. 2 C, *inset*). For all PEGs reported in this study and in related, previous studies (14,16), the transition rate is directly proportional to polymer concentration with a slope of ~ 1 (0.97 ± 0.06). This finding suggests that the partitioning of PEG into the α HL pore can be described by a first-order

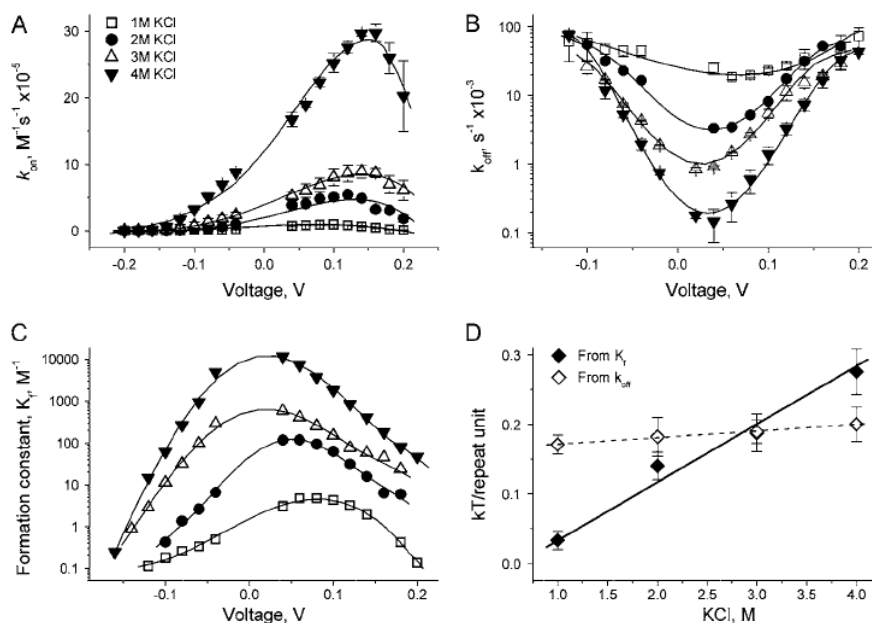


FIGURE 4 Voltage dependence and energy of PEG 1500- α HL pore interaction. The average on-rate (A), off-rate (B), and PEG- α HL pore complex formation (C) constant as a function of transmembrane voltage at different KCl concentrations. The minimal values of k_{off} are at 40 ± 10 mV. The data presented in A and B were used to build the dependence shown in C. (D) The energy of PEG- α HL pore interaction measured at 40 mV as a function of KCl concentration. Values were estimated from the equilibrium formation constant (solid line) and from the formalism outlined in the work by Muthukumar (27) (dashed line). k_{on} , k_{off} , and τ_{off} essential for calculations were obtained at 40 mV in three to five independent experiments ($\pm$ SD) with > 9000 events as in Fig. 1 A in each point.

reaction between the pore and polymer and that only one polymer molecule is responsible for a single blockade event. Similar conclusions have been drawn for the partitioning of polynucleotides into a single α HL pore (47).

Residence time

All the aforementioned data demonstrate that the association rate constant, k_{on} , is a function of both the KCl concentration and voltage. To comprehend the mechanism of the influence of KCl concentration on PEG- α HL pore interactions, understanding the behavior of the dissociation rate constant k_{off} at the same conditions is essential. This study shows that both factors have a considerable influence on k_{off} (Figs. 2 D and 4 B). It is interesting to note that the magnitude of the exponent value for k_{off} (KCl) dependence closely resembles those of k_{on} (KCl) (Fig. 2 A) and $\text{PEG}_{\text{solubility}}$ (KCl) (Fig. 2 B) dependencies. Such similarity reinforces the hypothesis about the important role of salting out on the observed phenomenon. The dependence of the off-rate constant, k_{off} , on voltage (Fig. 4 B) strengthens the involvement of the Coulombic interactions between PEG molecules and the α HL pore. As a result, the constant of the PEG- α HL pore complex formation, K_f , is also voltage dependent (Fig. 4 C).

Energy of interaction

Two approaches were used to estimate the energy of PEG- α HL pore interactions. First, the equilibrium formation constant, K_f , was used, where the energy (in kT -units) is determined as $\ln(K_f)$. The constant was calculated by using the association k_{on} and dissociation k_{off} rate constants obtained at different KCl concentrations like those shown in Fig. 2, A and D. As a result, the maximal values of the free energy of confinement (observed at 40 mV) were established as 0.27 ± 0.03 , 0.19 ± 0.02 , 0.13 ± 0.02 , and 0.03 ± 0.01 kT /PEG repeat unit in the presence of 4 M, 3 M, 2 M, and 1 M KCl, respectively (Fig. 4 D, *solid diamonds*).

The value $0.27 kT$ established for 4 M KCl is close to the value that was recently estimated (14) using the assumption specified by Muthukumar (27), whereby the residence time for PEG inside the pore, τ_{off} , is proportional to depth of an attractive potential well, ΔF , that, in turn, is proportional to the number of repeat units in the PEG chain, N , as follows: $\tau_{\text{off}} \propto A \exp(\Delta F/kT)$, $\Delta F = \chi N$. This formalism results in a weak KCl dependence (Fig. 4 D, *open diamonds*).

In contrast, the approach based on the equilibrium formation constant indicates a strong KCl dependence. The latter is consistent with earlier data (34) showing measurable increases in PEG- α HL pore interaction with KCl concentration augmented from 0.1 M to 1 M. The absence of any adjustable parameters is another advantage of this direct approach. The established strong dependence of the energy of the PEG- α HL pore interaction on KCl concentration could result from both the decrease in a repulsive interaction be-

tween PEG and its image charge (induced in low-dielectric surroundings such as the membrane and protein pore wall) (48–50) and the simultaneous increase in van der Waals interactions. Such a suggestion seems logical for two reasons. First, PEG molecules are charged. Second, it has previously been demonstrated (51) that the increase in KCl concentration in the bathing solution decreases the long-range action of the charges even though they are inside of the nanopore. The decrease in PEG chain flexibility, observed in the presence of inorganic cations (37), should slow the PEG creeping through the α HL pore, also increasing its residence time and the energy of PEG- α HL pore interactions.

CONCLUSIONS

Our previous data (14,17) and the results of this study clearly demonstrate that increased salt concentration improves the sensitivity of stochastic sensing with protein pores, such as the α HL pore. The increase in salt concentration decreases the lowest detectable concentration of analytes and considerably refines analyte identification. It is achieved thanks to changes in both (on- and off-) rate constants of the analyte-nanopore interaction. This study shows that the change in the on-rate constant with salt correlates with the change in solubility of the analytes. In other words, the constant could increase, decrease, non-monotonously behave, or remain the same with salt concentration. This finding opens the possibility that the effect of salt on the on-rate constant of novel analytes for the nanopore sensor can be predicted. The salt dependence of off-rate constant seems to be uniform (decreasing with salt) (52) for charged and noncharged molecules.

Our study illuminates the ability of neutral analyte molecules to form complexes with ions and to change solubility depending on the salt concentration. Both effects have significant influence on the stochastic sensing of analytes. Specifically, we our study resulted in two findings:

1. Molecules of PEG are charged in high KCl solutions, leading to nonlinear voltage dependence in rate constants; and
2. There is a striking similarity in the magnitude of power dependencies of both PEG solubility and the rate constants of PEG- α HL pore interactions in KCl.

The enhancement in stochastic sensing with KCl involves two factors: 1), qualitative changes in PEG polymer partitioning that provide two parameters: the residence time and the blockade amplitude; and 2), a significant increase in the on-rate of PEG capture and the free energy of PEG interaction with the α HL pore. These factors permit single molecule identification and involve a salting-out effect, Coulombic interactions, and, probably, a change in the chain flexibility of the polymer.

Findings such as those of this study can help in understanding the physics of molecular interactions in confined spaces. It is hoped that our results will advance the devel-

opment of devices with sensor elements based on single nanopores, including those made in polymer matrices or carbon nanotubes, and will stimulate experimental and theoretical studies.

The authors thank Dr. Steven D. Aird (Center for Biotechnology and Biomedical Studies, Norfolk State University, Norfolk, VA, USA) for editing that improved the clarity of the manuscript.

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Rede de Nanotecnologia Molecular e de Interfaces and Instituto do Milênio de Materiais Complexos (Brazil).

REFERENCES

- Bezrukov, S. M., and J. J. Kasianowicz. 1993. Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. *Phys. Rev. Lett.* 70:2352–2355.
- Kasianowicz, J. J., and S. M. Bezrukov. 1995. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion-channel from spectral-analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophys. J.* 69:94–105.
- Braha, O., B. Walker, S. Cheley, J. J. Kasianowicz, L. Z. Song, J. E. Gouaux, and H. Bayley. 1997. Designed protein pores as components for biosensors. *Chem. Biol.* 4:497–505.
- Kasianowicz, J. J., D. L. Burden, L. C. Han, S. Cheley, and H. Bayley. 1999. Genetically engineered metal ion binding sites on the outside of a channel's transmembrane beta-barrel. *Biophys. J.* 76:837–845.
- Bezrukov, S. M., O. V. Krasilnikov, L. N. Yuldasheva, A. M. Berezhkovskii, and C. G. Rodrigues. 2004. Field-dependent effect of crown ether (18-crown-6) on ionic conductance of a-hemolysin channels. *Biophys. J.* 87:3162–3171.
- Cheley, S., L. Q. Gu, and H. Bayley. 2002. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. *Chem. Biol.* 9:829–838.
- Gu, L. Q., O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley. 1999. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature*. 398:686–690.
- Kasianowicz, J. J., E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:13770–13773.
- Branton, D., D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. H. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss. 2008. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1146–1153.
- Kasianowicz, J. J., S. E. Henrickson, M. Misakian, J. C. Lerman, R. G. Panchal, K. M. Halverson, S. M. Bavari, R. Gussio, T. Nguyen, D. K. Shenoy, and V. M. Stanford. 2007. The detection and characterization of ions, DNA and proteins using nanometer-scale pores. In *Handbook of Biosensors and Biochips*. R. S. Marks, D. C. Cullen, I. Karube, C. R. Lowe, and H. H. Weetall, editors. John Wiley & Sons. 1–20.
- Movileanu, L., J. P. Schmittschmitt, M. J. Scholtz, and H. Bayley. 2005. Interaction of peptides with a protein pore. *Biophys. J.* 89:1030–1045.
- Bezrukov, S. M., I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, and J. J. Kasianowicz. 1996. Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. *Macromolecules*. 29:8517–8522.
- Bezrukov, S. M., I. Vodyanoy, and V. A. Parsegian. 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature*. 370:279–281.
- Krasilnikov, O. V., C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov. 2006. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. *Phys. Rev. Lett.* 97:018301.
- Krasilnikov, O. V., R. Z. Sabirov, V. I. Temovsky, P. G. Merzlyak, and J. N. Muratkhodjaev. 1992. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol. Immunol.* 5:93–100.
- Movileanu, L., S. Cheley, and H. Bayley. 2003. Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore. *Biophys. J.* 85:897–910.
- Robertson, J. W., C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov, and J. J. Kasianowicz. 2007. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:8207–8211.
- Bayley, H., O. Braha, and L. Q. Gu. 2000. Stochastic sensing with protein pores. *Adv. Mater.* 12:139–142.
- Kang, X. F., S. Cheley, X. Guan, and H. Bayley. 2006. Stochastic detection of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* 128:10684–10685.
- Winters-Hilt, S. 2006. Nanopore detector based analysis of single-molecule conformational kinetics and binding interactions. *BMC. Bioinformatics. Suppl.* 7:21.
- Landry, M. and S. Winters-Hilt. 2007. Analysis of nanopore detector measurements using Machine-Learning methods, with application to single-molecule kinetic analysis. *BMC. Bioinformatics. Suppl.* 8:12.
- Bezrukov, S. M. 2000. Ion channels as molecular coulter counters to probe metabolite transport. *J. Membr. Biol.* 174:1–13.
- Kasianowicz, J. J., S. E. Henrickson, H. H. Weetall, and B. Robertson. 2001. Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore. *Anal. Chem.* 73:2268–2272.
- Ashkenasy, N., J. Sanchez-Quesada, H. Bayley, and M. R. Ghadiri. 2005. Recognizing a single base in an individual DNA strand: a step toward DNA sequencing in nanopores. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44:1401–1404.
- Berezhkovskii, A. M., and I. V. Gopich. 2003. Translocation of rodlike polymers through membrane channels. *Biophys. J.* 84:787–793.
- Luo, K., T. Ala-Nissila, S. C. Ying, and A. Bhattacharya. 2007. Influence of polymer-pore interactions on translocation. *Phys. Rev. Lett.* 99:148102.
- Muthukumar, M. 2003. Polymer escape through a nanopore. *J. Chem. Phys.* 118:5174–5184.
- Teraoka, I., and Y. M. Wang. 2004. Computer simulation studies on overlapping polymer chains confined in narrow channels. *Polymer (Guildf.)*. 45:3835–3843.
- Krasilnikov, O. V., P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva, and M. F. Capistrano. 2005. Protein electrostriction: a possibility of elastic deformation of the alpha-hemolysin channel by the applied field. *Eur. Biophys. J.* 34:997–1006.
- Zitserman, V. Y., A. M. Berezhkovskii, V. A. Parsegian, and S. M. Bezrukov. 2005. Nonideality of polymer solutions in the pore and concentration-dependent partitioning. *J. Chem. Phys.* 123:146101.
- Krasilnikov, O. V., and S. M. Bezrukov. 2004. Polymer partitioning from nonideal solutions into protein voids. *Macromolecules*. 37:2650–2657.
- Sahandzhieva, K., D. Tuma, S. Breyer, A. P. S. Kamps, and G. Maurer. 2006. Liquid-liquid equilibrium in mixtures of the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and an alkanol. *J. Chem. Eng. Data*. 51:1516–1525.
- Krasilnikov, O. V., P. G. Merzlyak, R. Z. Sabirov, V. I. Temovsky, and R. K. Zaripova. 1988. Influence of pH on the potential-dependence of staphylococcal toxin channels functioning in phosphatidylcholine bilayer. *Ukr. Biokhim. Zh.* 60:60–66.
- Merzlyak, P. G., L. N. Yuldasheva, C. G. Rodrigues, C. M. M. Cameiro, O. V. Krasilnikov, and S. M. Bezrukov. 1999. Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the alpha-toxin transmembrane channel. *Biophys. J.* 77:3023–3033.
- Harris, J. M. 1992. Introduction of biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). In *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. J. Milton Harris, editor. Springer, New York. 1–14.

36. Tasaki, K. 1996. Poly(oxyethylene)-water interactions: a molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.* 118:8459–8469.
37. Tasaki, K. 1999. Poly(oxyethylene)-cation interactions in aqueous solution: a molecular dynamics study. *Comput. Theor. Polym. Sci.* 9:271–284.
38. Douglas, J. F., and E. J. Garboczi. 1995. Intrinsic viscosity and the polarizability of particles having a wide range of shapes. *Adv. Chem. Phys.* 91:85–152.
39. Movileanu, L., and H. Bayley. 2001. Partitioning of a polymer into a nanoscopic protein pore obeys a simple scaling law. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:10137–10141.
40. Krasilnikov, O. V. 2002. Sizing channels with neutral polymers. In *Structure and Dynamics of Confined Polymers*. J. J. Kasianowicz, M. S. Z. Kellermayer, and D. W. Deamer, editors. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 97–115.
41. Krasilnikov, O. V., R. Z. Sabirov, V. I. Temovsky, P. G. Merzliak, and B. A. Tashmukhamedov. 1988. The structure of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced ionic channel. *Gen. Physiol. Biophys.* 7:467–473.
42. Läuger, P. 1976. Diffusion-limited ion flow through pores. *Biochim. Biophys. Acta*. 455:493–509.
43. Laver, D. R. 1994. The barrel-stave model as applied to alamethicin and its analogs reevaluated. *Biophys. J.* 66:355–359.
44. Laver, D. R., and K. A. Fairley-Grenot. 1994. Surface potentials near the mouth of the large-conductance K⁺ channel from *Chara australis*: a new method of testing for diffusion-limited ion flow. *J. Membr. Biol.* 139:149–165.
45. Okada, T. 1991. Characterization of poly(oxyethylene) complex-formation with alkali-metal cations in a cation-exchange resin phase. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 87:3027–3032.
46. Okada, T. 1991. Thermodynamic origin of selectivity in polyoxyethylene complexes with alkali cations. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 17:1209–1210.
47. Henrickson, S. E., M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz. 2000. Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Phys. Rev. Lett.* 85:3057–3060.
48. Li, S. C., M. Hoyle, S. Kuyucak, and S. H. Chung. 1998. Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels. *Biophys. J.* 74:37–47.
49. Xie, X. L., Y. W. Mai, and X. P. Zhou. 2005. Dispersion and alignment of carbon nanotubes in polymer matrix: A review. *Mater. Sci. Eng. Rep.* 49:89–112.
50. Zhou, H. X. 2005. Interactions of macromolecules with salt ions: an electrostatic theory for the Hofmeister effect. *Proteins*. 61:69–78.
51. Merzlyak, P. G., M. F. Capistrano, A. Valeva, J. J. Kasianowicz, and O. V. Krasilnikov. 2005. Conductance and ion selectivity of a mesoscopic protein nanopore probed with cysteine scanning mutagenesis. *Biophys. J.* 89:3059–3070.
52. Zhao, Q., D. A. Jayawardhana, and X. Guan. 2008. Stochastic study of the effect of ionic strength on noncovalent interactions in protein pores. *Biophys. J.* 94:1267–1275.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho desenvolvido nesta dissertação permitem concluir:

- 1- A energia de interação entre o nanoporo protéico formado pela α -HL incorporado em uma bicamada lipídica plana e o polietilenoglicol aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração de cloreto de potássio (KCl) presente na solução aquosa banhante da membrana;
- 2- Aumentando a concentração de KCl de 1M para 4M há um aumento na frequência dos bloqueios induzidos pelo molécula do analito não iônico (polietilenoglicol, PEG) na corrente iônica do nanoporo e também no tempo de residência dela no interior do poro melhorando a sensibilidade do sensor e a identificação das moléculas;
- 3- As moléculas do PEG em solução eletrolítica comportam-se como moléculas com carga elétrica livre;
- 4- Uma forte correlação entre as mudanças nas constantes de formação e dissociação do complexo nanoporo/PEG e a solubilidade do PEG nas diferentes concentrações de KCl indica que o efeito salting-out pode ser o responsável pelas estabelecidas mudanças nos parâmetros cinéticos da interação das moléculas com o sensor protéico estocástico.
- 5- A composição iônica da solução banhante influencia fortemente na interação do PEG com o nanoporo e consequentemente na sensibilidade do sensor. Ânions estão atuando em acordo com a sua influência na água (a típica Série de Hofmeister), enquanto que, a influência dos cátions não segue a sequência típica.

9. PERSPECTIVAS

Ampliar área do estudo, incluindo:

- Estudo da influência de soluções banhantes compostas por íons divalentes e trivalentes na interação de moléculas orgânicas com o nanoporo;
- Estudo da influência de substâncias desnaturantes como, uréia e guanidina, e estruturantes como a betaína no complexo nanoporo/PEG;
- Investigação da influência de íons cosmotrópicos e caotrópicos na detecção de ácidos nucleicos com o nanoporo unitário visando estabelecer as condições ótimas para um sequenciador molecular.

10. ANEXOS

10.1 RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

XXIV Reunião Anual da FeSBE 2009

ResumoID:1326-1

Área: Canais iônicos e Transporte

CANAL IÔNICO FORMADO PELA HEMOLISINA E MUTANTE, N286C, DE *ESCHERICHIA COLI* EM BICAMADA LIPÍDICA PLANA.

Dijanah Cota Machado (UFPE); **Sarah Brandão Palácio** (UFPE); **Angela Valeva** (University of Mainz); **Iwan Walev** (University of Mainz); **Oleg Vladimirovich Krasilnikov** (UFPE)

Resumo

OBJETIVOS:

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa normalmente encontrada na flora do trato gastro-intestinal. Algumas cepas desse bacilo são patogênicas produzindo toxinas formadoras de poros. Uma dessas toxinas é a hemolisina E (HlyE) que é um importante fator de virulência da bactéria, pois exibe atividade citotóxica em células de mamíferos (BBA 1788:538, 2009) ligada à formação dos poros transmembrana. Todavia as propriedades desses poros são pouco conhecidas. A mutagênese sítio dirigida é um método conhecido para o estudo dos canais iônicos. Nosso trabalho visou a elucidação primária do tamanho e seletividade do canal formado pela HlyE mutante em bicamadas lipídicas planas.

MÉTODO:

A confecção da bicamada foi feita pela técnica de Montal e Muller e a solução banhante era composta de 10mM KCl, 30mM HEPES, 1mM DTT, pH 7.0 ajustado com Tris. O lipídeo utilizado foi azolecitina e a toxina em estudo foi a HlyE mutante N286C. A seletividade do canal foi avaliada medindo-se o potencial de reversão. Determinou-se o tamanho da abertura do canal através do método de exclusão de não-eletrólitos (FEMS Microbiol. Immunol. 105:93, 1992) utilizando solução a 20% (p/v) de não-eletrólitos (polietilenoglicóis) com pesos moleculares de 200, 400, 600, 1000, 2000, 6000, 8000 como sondas moleculares. Nós medimos a condutância do canal quando os polímeros estavam em contato com as aberturas do canal.

RESULTADOS:

O canal iônico formado pela HlyE N286C apresentou condutância média de 0.24 ± 0.03 nS ($n=57$), ressalta-se a presença de um pré-poro antes da inserção completa do canal na membrana. O potencial de reversão (10.7 ± 1 mV; no lado de menor concentração) indicou um canal iônico seletivo a cátions semelhante ao canal formado pela toxina nativa (Mol. Microbiol. 32:1226, 1999). Observamos que PEGs com raio hidrodinâmico menor que 1.22 nm preencheram o interior do canal inversamente do peso molecular. Entretanto, moléculas com raio hidrodinâmico igual ou maior que 1.22 nm não entraram no canal, ou seja, ocorreu a completa exclusão do polímero de dentro do poro.

CONCLUSÃO:

O canal formado pela HlyE N286C possui a seletividade catiônica similar ao canal de HlyE nativa. O diâmetro da maior abertura do canal é ~ 2.5 nm.

XXIV Reunião Anual da FeSBE 2009

ResumoID:362-1

Área: Canais iônicos e Transporte**A INFLUÊNCIA DE SAIS HALOGÊNIOS NA RESOLUÇÃO E SENSIBILIDADE DO BIOSENSOR PARA MOLÉCULAS UNITÁRIAS DE POLÍMERO NEUTRO****Dijanah Cota Machado (UFPE); Annielle Mendes Brito Silva (UFPE); Janilson José da Silva Junior (UFPE); Cláudio Gabriel Rodrigues (UFPE); Oleg Vladimirovich Krasilnikov (UFPE)****Resumo****OBJETIVOS:**

A necessidade e importância de identificar e quantificar analitos em diferentes amostras vem despertando interesse e o desenvolvimento de novos sensores e biossensores. Nesta perspectiva, nanoporos protéicos unitários formados pela α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* (α HL) em bicamadas lipídicas planas destaca-se como modelo experimental do biossensor estocástico muito promissor. Recentemente estabelecemos que um aumento da concentração do KCl amplifica a resolução e sensibilidade do biossensor em aproximadamente 1000 vezes (Proc. Natl. Acad. Sci. 104:8207, 2007), maximizando a detecção de polietilenoglicol (PEG). Alguns fenômenos específicos induzido por íons são conhecidos como os efeitos de Hofmeister. Apesar de inúmeras publicações nesta área, não existe estudo deste fenômeno em espaços confinados, deste modo investigamos a influência de ânions da família dos halogênios na interação de moléculas do PEG com nanoporos unitários protéicos, visando entender seus mecanismos moleculares e estabelecer as condições ótimas do processo.

MÉTODO:

A confecção da bicamada lipídica plana e a inserção de α HL-poro unitário na membrana, bem como os registros de correntes iônicas através dos poros foram realizadas em condições de fixação de voltagem, empregando um amplificador de Patch Clamp (Axon Patch 200A, Axon Instruments) como descrito recentemente (Biophys. J. 95, 5186, 2008). A solução banhante da membrana foi composta por sais de potássio com ânions da série de Hofmeister: F⁻, Cl⁻, Br⁻ e I⁻ (4 M), tamponado com Tris (5mM) em pH 7,5. Em experimentos pilotos utilizamos como modelo de analito polimérico, o PEG (1294), uma vez que ele é monodisperso e de elevado grau de pureza.

RESULTADOS:

Estabelecemos que o tipo de ânion presente na solução banhante do biossensor formado pela α HL incorporada em bicamada lipídica, altera drasticamente a frequência dos eventos de interação das moléculas do PEG com o nanoporo protéico. A eficácia do ânion obedece a série de Hofmeister F⁻ > Cl⁻ > Br⁻ > I⁻. As menores concentrações detectáveis do PEG 1294 capazes de induzir a frequência de 1 Hz foram de 0,05 μ M, 0,5 μ M, 2 μ M e 7 μ M, para os ânions F⁻, Cl⁻, Br⁻ e I⁻, respectivamente.

CONCLUSÃO:

Os ânions presentes na solução banhante do nanoporo formado pela α -hemolisina influenciam na interação do PEG com o biossensor e essa influência obedece a série de Hofmeister.

XXIV Reunião Anual da FeSBE 2009

ResumoID:1912-1

Área: Canais iônicos e Transporte

HOW HIGH CONCENTRATION OF KCL IMPROVES DETECTION OF NONIONIC POLYMER BY NANOPORE SENSORS**Cláudio Gabriel Rodrigues (UFPE); Sérgio Fernandovitch Chevtchenko (UFPE); Dijanah Cota Machado (UFPE); Oleg Vladimirovitch Krasilnikov (UFPE)****Resumo****OBJETIVOS:**

Recent studies (Proc. Natl. Acad. Sci. 104:8207, 2007) have demonstrated that high KCl concentrations considerably improve single molecule detection by unitary α -hemolysin nanopore (a-HL). The goal this study was to discover the underlying mechanism(s) of the stochastic sensing enhancement observed at high KCl concentrations.

MÉTODO:

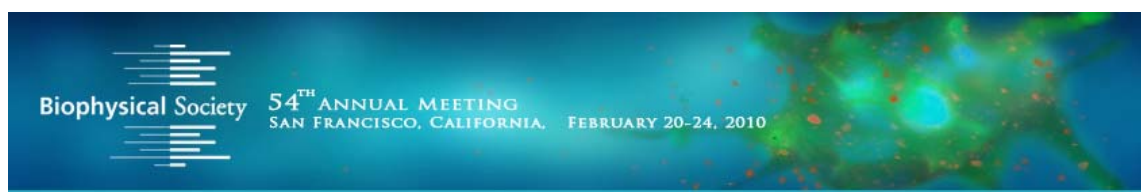
Bilayer lipid membranes were formed by the lipid monolayer apposition technique. The membrane-bathing aqueous solution contained 1 M to 4 M KCl in 5 mM Tris-citric acid buffer (pH 7.5). a-HL nanopore was inserted from the cis side. Nonionic polymers, poly(ethylene glycols) (PEG), were added from the trans side of the membrane. Experiments were carried out at 40 mV using Axopatch 200B amplifier at voltage clamp mode. The molecular signature of PEG-nanopore interaction (mean duration and amplitude of the blockage), and the kinetic parameters of the process were obtained essentially as described in our previous work (Phys. Rev. Lett. 97:018301, 2006). PEG solubility was estimated by the modified cloud-point method (J. Chem.Eng. Data. 51:1516, 2006).

RESULTADOS:

We showed that 1) polymer-nanopore interaction is a strong non-monotonic function of voltage; 2) the rate constants of the process and the solubility of PEG are a power function of KCl concentration. Specifically we have established that the larger the salt concentration the larger the on-rate constant and the smaller the off-rate and the solubility of PEG.

CONCLUSÃO:

The flexible, nonionic molecules of PEG are charged in high KCl solutions. The salting-out effect, Coulombic interactions, and, probably, a change in the chain flexibility of the polymer are factors responsible for the enhancement in stochastic sensing with KCl.



1732-Pos/B530 - ANIONS FROM THE HOFMEISTER SERIES: SINGLE MOLECULE DETECTION WITH A SOLITARY PROTEIN NANOPORE.

Presentation Time: Feb 22 2010 1:45PM - 3:45PM

Session Title: Biophysics of Ion Permeation

Location: Hall D

Dijana C. Machado, Claudio G. Rodrigues, Annielle M. B. da Silva, Janilson J. S. Júnior, **Oleg Krasilnikov**.

Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Nanopores have emerged in recent years as versatile single molecule detectors. The sensing principle is based on transient interruptions in the ion-current of an electrolyte, induced by the entry, transport, and exit of a particular analyte from the pore. The improving the detection capability of the nanopore is essential. Recently (Rodrigues et al., 2008) we have shown that the "salting out" are responsible for the KCl-induced enhancement in identification of individual molecules of poly(ethylene glycol) using solitary α -hemolysin nanoscale pores. The result suggested that specific ion effects may take place. Hofmeister effects are almost ubiquitous (Lo Nostro et al., 2006). Despite the huge number of studies devoted to this issue that date back more than a century, their origin is still debated. There are only isolated studies of the phenomenon at the confined spaces. For this reason, we focused on the effect of monovalent anions on a simple bimolecular complexation reaction between poly(ethylene glycol) and α -hemolysin nanoscale pore at the single-molecule level.

We find that the type of anions used here has dramatic influence on the "on-rate" constant of the reaction (the difference reaches several hundred times). As a consequence of this, the transition rate and the detection limit of the nanopore based sensor is correspondingly changed. The all probed anions follow the Hofmeister ranking according to their influence on the on-rate constant ($F^- > Cl^- > Br^- > I^-$) and the solubility of the analyte ($F^- < Cl^- < Br^- < I^-$). Therefore, salting-out phenomenon is responsible for the anion-induced effect on single molecule detection with a solitary protein nanopore. These results will advance the development of devices with sensor elements based on single nanopores.

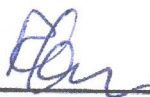
Supported by CNPq, RENAMI and InstINAMI, Brazil.

Estudo da influência de substâncias cosmotrópicas e caotrópicas na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos individuais protéicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração de Biotecnologia.

APROVADO EM: 05 de MARÇO de 2010

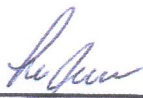
Orientador



Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov

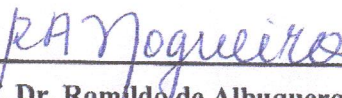
Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

Membros Titulares



Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica; LIKA - UFPE



Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE