

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Analytické využití nanočástic ušlechtilých kovů

Disertační práce

Autor: **Mgr. Ariana Opletalová (rozená Fargašová)**
Studijní program: P1407 Chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie
Forma studia: Prezenční
Školitel: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Olomouc 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že disertační práci s názvem *Analytické využití nanočástic ušlechtilých kovů* jsem vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a dalších zdrojů, ze kterých jsem čerpala informace, jež jsou řádně ocitovány a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tato práce je majetkem Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Ariana Opletalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost, podporu a zejména důvěru během celého průběhu mého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. a doc. RNDr. Robertu Pruckovi, Ph.D. za ochotu diskutovat a řešit danou problematiku. Současně bych chtěla poděkovat přednostovi Ortopedické kliniky prof. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D., za poskytnutí kloubních punktátů určených pro mé experimenty. Dále bych chtěla poděkovat přednostovi Ústavu mikrobiologie prof. MUDr. Milanu Kolářovi, Ph.D. a jeho kolegyním MUDr. Miroslavě Htoutou Sedlákové, Ph.D. a MUDr. Kateřině Bogdanové, Ph.D. za poskytnutí bakteriálních lyzátů a pomoc s jejich kultivací, a stejně tak doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D., Mgr. Kláře Čépe, Ph.D., Mgr. Janě Stráské a Mgr. Ondřeji Tomancovi za pořízení obrazových záznamů pomocí elektronových mikroskopů. Velké poděkování patří všem, ať už bývalým či současným, pracovníkům Katedry fyzikální chemie a Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů za pomoc, kterou mi v průběhu studia poskytovali a vytvořili tak skvělé pracovní prostředí, ve kterém mám nejen výborné kolegy, ale i spoustu dobrých přátel.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Úvod..... | 6 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 1. Ramanova spektroskopie | 9 |
| 1.1 Historie | 9 |
| 1.2 Princip metody | 10 |
| 1.3 Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie | 13 |
| 1.4 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie..... | 14 |
| 1.4.1 Historický vývoj techniky SERS | 15 |
| 1.4.2 Mechanismus povrchem zesíleného Ramanova signálu..... | 16 |
| 1.4.3 SERS aktivní povrchy..... | 18 |
| 2. Nanočástice ušlechtilých kovů..... | 18 |
| 2.1 Úvod do problematiky koloidně disperzních soustav | 18 |
| 2.2 Rozptyl světla elektricky vodivými částicemi..... | 20 |
| 2.3 Stabilita koloidně disperzních soustav | 22 |
| 2.4 Chemická syntéza nanočástic ušlechtilých kovů..... | 25 |
| 2.4.1 Redukce anorganickými látkami | 27 |
| 2.4.2 Redukce organickými látkami | 29 |
| 3. Aplikace nanočástic ušlechtilých kovů..... | 31 |
| 3.1 Analytické využití nanočástic ušlechtilých kovů v SERS..... | 32 |
| 3.2 Aplikace nanočástic ušlechtilých kovů v biologické SERS analýze..... | 36 |
| 3.3 Další oblasti analytického využití nanočástic ušlechtilých kovů | 44 |
| 4. Cíle disertační práce | 46 |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 47 |
| 5.1 Chemikálie..... | 48 |
| 5.2 Přístrojové vybavení..... | 48 |
| 5.3 Příprava vodné disperze nanočástic stříbra | 49 |
| 5.4 Aktivace nanočástic stříbra a jejich charakterizace..... | 50 |
| 5.5 Příprava magnetického SERS biosenzoru pro diagnostiku infekce kloubních náhrad | 51 |
| 5.5.1 Imobilizace streptavidinu na magnetické nanočástice..... | 51 |

| | |
|---|------------|
| 5.5.2 Funkcionalizace povrchu magnetických nanočástic protilátkou | 52 |
| 5.6 Příprava bakteriálních vzorků | 52 |
| 5.6.1 Příprava modelových vzorků | 52 |
| 5.6.2 Příprava biologických vzorků | 53 |
| 5.7 Příprava vzorků pro experimenty povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie.. | 53 |
| 5.7.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách | 53 |
| 5.7.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS | 54 |
| 6. Výsledky a diskuze | 56 |
| 6.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách | 56 |
| 6.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS | 65 |
| 6.3 Publikace zahrnující alternativní SERS substráty | 82 |
| 6.3.1 Magneticky-asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS) pro „label-free“ stanovení lidského imunoglobulinu G (IgG) v krvi s využitím nanokompozitního materiálu na bázi Fe ₃ O ₄ @Ag | 82 |
| 6.3.2 Sonochemická příprava skleněných destiček s vrstvou nanočástic stříbra pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie | 83 |
| 7. Závěr..... | 84 |
| 8. Summary | 86 |
| Seznam použitých zkratk..... | 88 |
| Seznam použité literatury..... | 89 |
| Přílohy | 105 |

Úvod

Nanočástice ušlechtilých kovů se staly běžnou součástí moderní civilizace, a to nejen na poli vědeckého výzkumu, ale i mezi širokou veřejností. Praktické využití nanomateriálů v různých oborech lidské činnosti, jako je medicína, katalýza, elektronika či široké spektrum bioanalytických aplikací, představují jen zlomek oblastí, kde jsou nanomateriály buď testovány, nebo přímo využívány. Tyto materiály o rozměrech pouhých pár jednotek až desítek nanometrů vykazují zcela odlišné chování v porovnání se svými makroskopickými protějšky. Díky těmto změnám v chování se mohou v nanosvětě objevovat zcela nové fenomény nepozorovatelné v makrosvětě.

Nanočástice stříbra, díky svým vlastnostem a aplikačnímu potenciálu, řadíme k nejstudovanějším ušlechtilým kovům v oblasti nanotechnologií. Mimo biologickou (antibakteriální) aktivitu, prakticky využívanou v materiálech pro humánní i veterinární medicínu [1], je další ohromný aplikační potenciál nanočástic stříbra spojován s jejich optickými vlastnostmi. Existence lokalizovaného povrchového plasmonu s maximem absorpce ve viditelné části spektra poskytuje nástroj pro nové vysoce citlivé analytické metody, mezi nimiž vyniká povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). Ramanova spektroskopie obdobně jako infračervená spektroskopie poskytuje řadu informací o studovaných systémech, ale její nízká citlivost ji předurčuje k využití pouze ve výzkumných laboratořích. Tento nedostatek byl vyřešen právě povrchovým zesílením Ramanova rozptylu na kovových nanomateriálech, kde hraje velmi důležitou roli velikost, morfologie a podoba těchto nanočástic, ne méně pak jejich tzv. „hot spots“ vytvořená během agregace [2]. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie se tak stává v současnosti velmi mocným analytickým nástrojem, který umožňuje selektivní a vysoce specifickou detekci biologicky významných molekul, jež se v živých systémech vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Mimo detekce velmi nízkých koncentrací (až pikomoly) biologicky významných molekul nabízí SERS do klinické praxe i specifickou detekci celých živých systémů – patogenních bakterií. Rychlá a jednoznačná detekce patogenů hraje v oblasti medicíny zásadní roli, typicky v oblasti ortopedie při sledování pooperačního stavu pacienta, kdy prodleva v rychlosti stanovení přítomnosti bakteriálního patogenu v kloubních punktátech může mít až fatální následky v podobě amputace končetin. Klasické testy přítomnosti bakterií v biologických

vzorcích jsou založeny na tradičních kultivačních technikách, ale i moderních technik jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) či enzymatická metoda (ELISA), které ovšem mohou zabrat i několik hodin až dní díky vysokým detekčním limitám. Nové možnosti detekce a identifikace patogenních mikroorganismů nabízí v takovýchto případech biofunkcionalizované magnetické nanočástice a jejich spojení s povrchem zesílenou Ramanovou spektroskopií. Hlavní výhodou magnetické separace oproti ostatním klasickým kultivačním technikám je jednoznačně její rychlost, snadnost provedení a vysoká specifita. Snižuje se tak doba komplexního mikrobiologického vyšetření, což je v dnešní době jeden z klíčových aspektů nejen v klinické mikrobiologii.

V souvislosti s těmito tématy je předložená disertační práce zaměřena na přípravu a testování substrátu na bázi nanočástic stříbra, jakožto efektivního substrátu pro zesílení Ramanova signálu. První část experimentální práce se zabývá sledováním míry zesílení Ramanova signálu modelové biomolekuly adeninu v závislosti na snoubení průměrné velikosti částic stříbra s vlnovou délkou budícího laserového záření (532, 633 a 780 nm). Dále pak na základě získaných výsledků byl výzkum SERS aplikace směřován do oblasti detekce a identifikace mikrobiálních patogenů. Druhá část experimentální sekce je proto věnována uplatnění diagnostického nástroje pracujícího na principu magneticky asistované SERS (MA-SERS) selektivní detekce a identifikace patogenních bakterií. K MA-SERS detekci byl využit biosenzor na bázi magnetických nanočástic oxidu železa funkcionalizovaných příslušnými protilátkami na jednotlivé bakterie, které byly následně konjugovány s nanočásticemi stříbra. Pomocí aplikace takových částic přímo do vzorku lze ze složité biologické matrice specificky selektovat požadovaný analyt a následně identifikovat. MA-SERS detekce a identifikace mikrobiálních patogenů byla nejprve vyvíjena na bakteriálních lyzátech *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Jelikož bylo dosaženo povzbudivých výsledků, následovalo testování tohoto biosenzoru s infikovanými vzorky kloubních punktátů získaných od pacientů trpících osteoartrózou. Závěr experimentální části této disertační práce je pak věnován stručným komentářům spoluautorských publikací, ve kterých byl rovněž využit aplikační potenciál nanočástic stříbra, ať už v podobě vrstev či jako součást kompozitního materiálu, jakožto aktivních substrátů pro zesílení Ramanova signálu biologicky významných molekul.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Ramanova spektroskopie

1.1 Historie

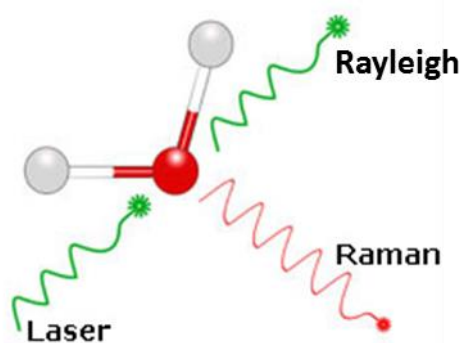
Historie Ramanovy spektroskopie pramení v letech 1923, kdy byl rakouským fyzikem A. Smekalem teoreticky předpovězen jev modulace monochromatického záření vnitřními frekvencemi molekuly [3]. V roce 1928 jev neelastického optického rozptylu kapalinou byl pozorován v Kalkatě dvojicí fyziků Ch. V. Ramanem s K. S. Krishnanem, kde jako zdroj záření použili sluneční záření, dalekohled jako soustavu optického prostředí a pouhé oči jako detektor [4]. Současně, ač nezávisle na sobě, byla také změna ve vlnové délce světla rozptýleného tentokrát pevnou látkou pozorována v Moskvě sovětskými vědci G. S. Landsbergem a L. I. Mandelstamem [5]. Dva roky poté profesor Raman, podle kterého nese tento obor spektroskopie název, obdržel za svoji práci Nobelovu cenu.

Rostoucí požadavky na zvýšení aplikačního potenciálu Ramanových spektrometrů postupně vedly k vylepšení jednotlivých komponent. Zpočátku byl výzkum soustředěn na vývoj zdrojů excitačního záření. Nejprve byly pro potřeby Ramanovy spektroskopie využívány heliové či olověné lampy, které se však díky nízké intenzitě neosvědčily. Následně roku 1930 přišla na svět vhodně upravená rtuťová výbojka sloužící jako zdroj monochromatického záření pro Ramanovu spektroskopii. V roce 1962 byl zásadním krokem ve vývoji instrumentace objev plynových laserů pracujících ve viditelné oblasti spektra (Ar^+ , Kr^+ , He-Ne), které se později osvědčily jako spolehlivý zdroj monochromatického záření pro Ramanovu spektroskopii [6].

Po druhé světové válce se začali vědci zabývat problematikou detekčních systémů, kde původní fotografické desky byly nahrazeny modernějšími detektory pracujícími na principu fotoelektrického jevu. Nástupem 70. let 20. století byl tehdejší trojitý monochromátor vyměněn za holografickou mřížku. Dále v průběhu vývoje Ramanovy spektroskopie, kdy byly zavedeny spektrometry s Fourierovou transformací (FT-Raman), byly vyvinuty velmi citlivé CCD (charge coupled device) detektory, které značně přispěly k rozvoji a komercionalizaci Ramanovy spektroskopie [6].

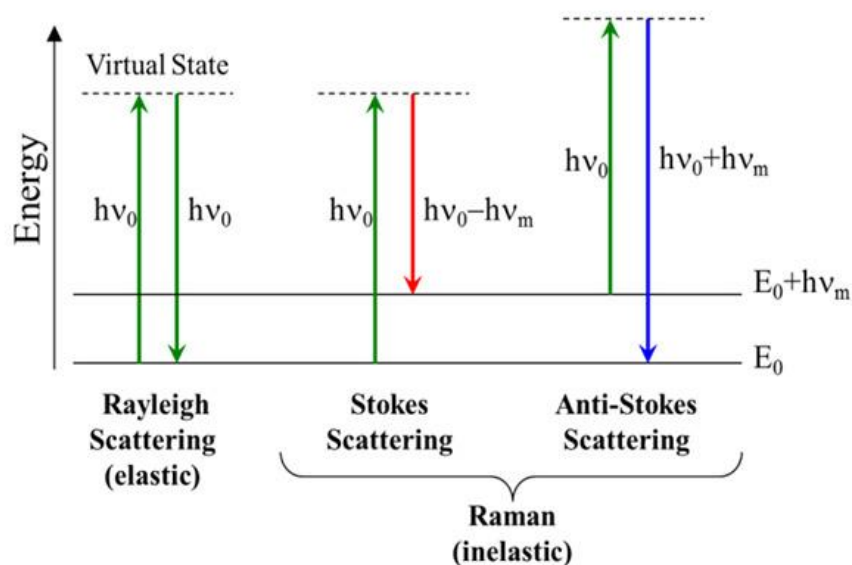
1.2 Princip metody

Pro jednotlivé složky monochromatického záření dopadajícího na analyzovaný vzorek ze zdroje platí, že je částečně tímto vzorkem absorbováno, částečně tímto vzorkem prochází a částečně je rozptylováno. Podstatou Ramanovy spektroskopie je tedy měření rozptýleného záření, jehož fyzikální původ stojí za neelastickými srážkami molekul vzorku s fotony excitujícího monochromatického záření za současné změny vibračně-rotačních stavů molekuly (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma vzniku Ramanova rozptylu. Převzato a upraveno z [7].

Interakce tohoto záření s molekulou je doprovázena absorpcí primárního fotonu a téměř okamžitou emisí sekundárního fotonu z krátkodobě existujícího virtuálního stavu ($<10^{-11}$ sekundy) do nižší energetické vibrační hladiny. Při této interakci dochází k výměně energie mezi fotony monochromatického záření s molekulami vzorku, jejímž výsledkem je změna energie sekundárního fotonu, a tím tedy i jeho vlnové délky. Poněvadž celková energie zůstává při tomto ději zachována, odpovídá změna energie fotonu snížení nebo zvýšení energie molekuly vzorku. Bohužel procesů probíhá současně více, proto můžeme rozlišit několik variant možných rozptylových jevů. Má-li rozptýlené záření frekvenci shodnou s frekvencí budícího záření vycházejícího ze zdroje, hovoříme o Rayleighově rozptylu (Obr. 2). Ten však řadíme mezi elastické rozptyly. Molekula je při rozptylu vybudena ze základní vibrační hladiny na vyšší virtuální hladinu, ze které v následném kroku putuje zpět a obsadí původní vibrační hladinu. Nedochází tedy ke změně energie fotonu a vyzářený foton má stejnou vlnovou délku jako budící záření.



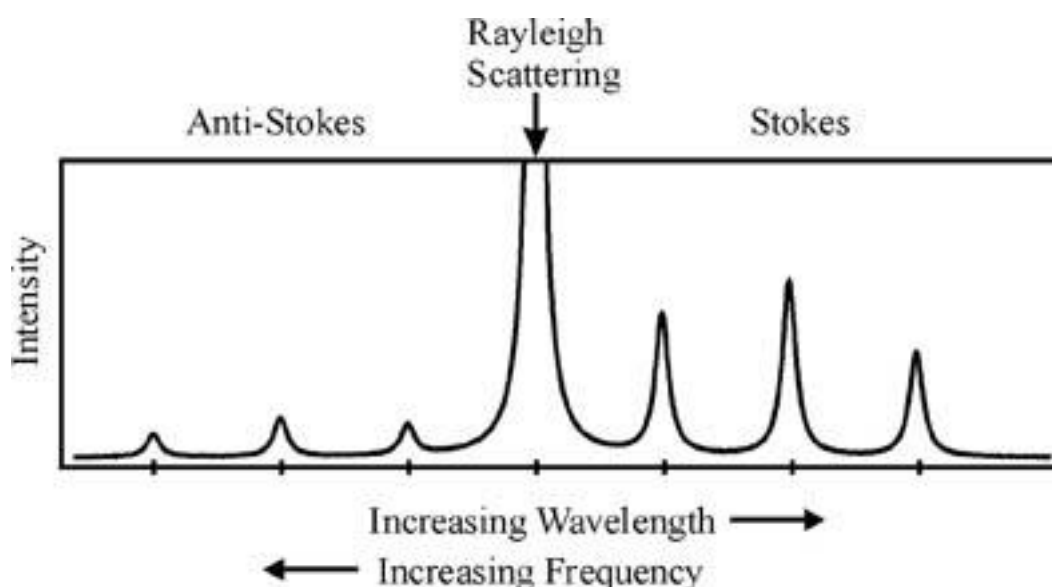
Obr. 2: Schematické znázornění Rayleighova a Ramanova rozptylu. Převzato z [8].

Naopak, je-li rozptýlené záření rozdílné frekvence než frekvence budícího záření, hovoříme o Ramanově rozptylu, který v Ramanově spektru rozlišujeme na Stokesovy a anti-Stokesovy linie (Obr. 2). Při Stokesově rozptylu se molekula po excitaci nevrací zpět do základní energetické hladiny, ale klesne na vhodnou excitovanou hladinu. Dojde tak k vyzáření fotonu s nižší energií (větší vlnovou délkou) než excitační záření. Naproti tomu anti-Stokesovy linie odpovídají přechodu molekuly na virtuální hladinu, z níž následně klesne až na základní vibrační hladinu. Podmínkou vzniku anti-Stokesových linií je, aby se molekula již na počátku celého děje nacházela v některém z vyšších vibračních energetických stavů v rámci základního elektronického stavu. Dojde tak k vyzáření fotonu s vyšší energií (nižší vlnovou délkou) než excitační záření. Jelikož populace těchto vyšších vibračních energetických hladin se řídí tzv. Boltzmanovým rozdělením (rovnice 1), je pravděpodobnost výskytu molekul v takovéto hladině velmi malá:

$$\frac{N_1}{N_0} = \exp\left(-\frac{h\nu_{vib}}{kT}\right), \quad (1)$$

kde N_0 , N_1 jsou populace molekul v základním, respektive vyšším vibračním energetickém stavu, h je Planckova konstanta, ν_{vib} je vibrační frekvence, k je Boltzmanova konstanta a T je teplota.

Tímto lze tedy poukázat na fakt, že anti-Stokesovy linie, ve srovnání se Stokesovými liniemi, mají mnohem nižší intenzitu (Obr. 3). Pokud je tedy daný vibrační mód aktivní v Ramanově spektru, bude pro něj možné pozorovat dvě linie, a to symetricky rozložené kolem linie Rayleighova rozptylu, tj. ve Stokesově a anti-Stokesově oblasti. Proto se v běžné praxi setkáváme výhradně se studiem spekter v oblasti Stokesova rozptylu, a to se zřetelem na nutnost odfiltrovat Rayleighovy linie, jejichž intenzita je přibližně 10^5 – 10^{12} krát vyšší, než intenzita běžného Ramanova rozptylu. Využití anti-Stokesovy linie lze uplatnit v případě, kdy se ve zkoumaném vzorku působícím zářením vybudí fluorescence, která způsobí překryv Stokesovy oblasti.



Obr. 3: Symetrické rozložení Stokesovy a anti-Stokesovy linie kolem linie Rayleighova rozptylu. Převzato z [9].

Základním výběrovým pravidlem pro vznik Ramanovy linie je podmínka, aby v průběhu vibrace docházelo ke změně polarizovatelnosti molekuly (tj. míra schopnosti elektrických nábojů v molekule se posouvat vlivem působení elektrického pole). Tuto schopnost vykazují především nepolární části molekul, zatímco polární jsou zřídka polarizovatelné.

Analytickým výstupem této metody je Ramanovo spektrum, vyjádřené závislostí intenzity rozptýleného záření na Ramanově posunu (cm^{-1}), které poskytuje informace o změně vibračních pohybů molekul. Z hlediska kvalitativní informace, smysl Ramanovy spektroskopie spočívá zejména v tom, že vibrační spektrum slouží jako tzv. „otisk palce“ chemických vlastností molekuly. Tato část spektra je pro každou látku naprosto charakteristická, neboť odráží uspořádání chemických vazeb a atomových jader v molekule, a stejně tak interakce mezi molekulou a jejím blízkým okolím. Na základě toho tak poskytuje detailní informace o chemickém složení zkoumaných látek.

1.3 Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní a nekontaktní analytická technika, která se využívá pro rychlé a relativně levné metody kvalitativní analýzy. Díky svým nesporným výhodám se Ramanova spektroskopie stále více dostává do popředí zájmu a upevňuje tak svou pozici na poli analýzy materiálů. V následujícím odstavci je pro názornost uvedeno několik výhod, ke kterým patří zejména:

- Snadnost měření vzorků různého skupenství a povahy, jako jsou roztoky, tenké povrchové filmy, pevné látky, plyny, gely, krystaly, vlákna, buňky i celé tkáně.
- Možnost měření vodných roztoků analytů. Intenzita Ramanova signálu je pro vodu velmi nízká a optické materiály používané v Ramanově spektroskopii nejsou citlivé na vlhkost.
- Potřeba jen minimálního množství vzorku k měření, dané pouze dobrou fokusací laserového paprsku na vzorek. V případě roztoků se jedná o práci s objemy v řádech jednotek mikrolitrů.
- Při analýze pevných látek lze měřit daný materiál bez jakékoliv nebo minimální úpravy. Nemusí být brán zřetel na tloušťku materiálu ani příspěvek okolní atmosféry.
- Metoda je nedestruktivní vůči vzorku, proto je ve většině případů vzorek nadále k dispozici pro použití při dalších experimentech.

- Podstatnou výhodou je časová nenáročnost, jelikož Ramanův rozptyl probíhá ve velmi krátké časové škále (v řádech femtosekund). Proto je tato metoda vhodná i ke studiu kinetiky biologických procesů.
- Pomocí optických vláken lze provádět měření na větších vzdálenostech.
- Metoda je bezkontaktní, proto lze provádět měření vzorků přes transparentní polymerní obaly či sklo.
- V současnosti naměřené informace tvoří rozsáhlé knihovny spekter s jednoznačně přiřazenými pásy, popisem vibrací a nalezenou korelací mezi strukturou a spektrálními rysy.

Jak už tomu tak bývá, tak i Ramanova spektroskopie má své záporné stránky.

V následujícím odstavci je pro názornost uvedeno pár nevýhod:

- Z hlediska poměrně slabého Ramanova jevu je zapotřebí použít citlivou a vysoce optimalizovanou sestavu měřicí techniky. Proto také měření vyžaduje poměrně vysokou koncentraci analytu, což může být, v případě některých biologických materiálů či málo rozpustných vzorků, potíží.
- Značným problémem může být fluorescence, ať už způsobená stopovými nečistotami ve vzorku, či samotným vzorkem. Může tak dojít k překrytí Ramanových linií a tím ke ztrátě informace. Proto jsou kladeny značné nároky na optickou homogenitu a čistotu vzorku.
- V důsledku velké intenzity dopadajícího excitačního záření může docházet až k nežádoucímu tepelnému poškození citlivějších vzorků.
- Ačkoliv je Ramanova spektroskopie relativně časově nenáročná, v některých případech může doba expozice a počet opakovaných akumulací spekter pojmout více času díky malé citlivosti této techniky.

1.4 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Ve srovnání s jinými spektroskopickými jevy v molekule je Ramanův rozptyl při standardním experimentálním uspořádání mnohonásobně slabším jevem (pouze jeden z 10^6 – 10^8 dopadajících fotonů je rozptýlen neelasticky, což značně omezuje rozvoj

v biologických vědách), a proto byla snaha vyvinout techniky zesilující jeho signál. Mezi pokročilejší techniky zesilující Ramanův rozptyl řadíme rezonanční Ramanovu spektroskopii (RRS z angl. resonance Raman scattering) a povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS z angl. surface enhanced Raman scattering), která bude podrobně diskutována v dalších podkapitolách. Základem RRS je využití rezonančního Ramanova efektu, který nastává tehdy, když excitační vlnová délka použitého laserového záření spadá do absorpčního pásu analyzovaného vzorku. Zde pak můžeme dosáhnout zesílení intenzity Ramanova rozptylu až s tisíci násobným zvýšením. Nicméně velkým nedostatkem je již výše zmíněná fluorescence a fotodegradace analyzovaného vzorku.

Naproti tomu, objev povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie má, díky extrémně vysoké citlivosti této metody, velký význam pro vědní disciplíny, které svou pozornost směřují ke studiu částic pohybujících se svým rozměrem v řádu několika nanometrů. Tato metoda je často využívána ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v zemědělství či lékařství. Právě tento potenciál využití SERS techniky je jedním z důvodů, proč je studium této metody věnována ze strany vědecké komunity tak značná pozornost.

V závislosti na zvolené metodě můžeme získat faktor zesílení Ramanova signálu více jak 10^4 (lokálně i více než 10^{15}). Obrovskou výhodou této aplikace je potřeba pouze malého množství vzorku, což nahrává na další přínos a tím je přímá analýza a široké pole uplatnění.

1.4.1 Historický vývoj techniky SERS

Začátkem sedmdesátých let minulého století se několik skupin vědců zabývalo možnými způsoby, jak získat Ramanovo spektrum monovrstvy molekul adsorbované na kovové elektrodě. Analýza takových systémů se však ve stejné době dala úspěšně provést pomocí infračervené spektroskopie a Ramanova spektroskopie tak nebyla považována, díky slabému signálu, za vhodnou volbu [10].

První souvislejší zmínky o SERS efektu spadají do roku 1974, kdy trojice vědců Fleischmann, Hendra a McQuillan [11] provedli pokus, při kterém pozorovali zesílení Ramanova signálu pyridinu adsorbovaného na předem elektrochemicky zdrsňeném povrchu stříbrné elektrody. Zesílený Ramanův signál pyridinu autoři připisovali zvětšené ploše povrchu elektrody způsobené zdrsňením. Nicméně i přes to, že se nabízelo jednoduché racionální vysvětlení zesílení Ramanova signálu, frekvence nevyřešených otázek, které nezapadaly do této teorie, se postupně zvyšovala. Mezi nimi se objevovala i teorie, že za určitých okolností může dojít, v důsledku většího zdrsňení plochy elektrody, právě naopak ke snížení Ramanova signálu. Krátce na to, roku 1977, byla původní myšlenka téměř současně vyvrácena dvěma skupinami vědců nezávisle na sobě. Dvojice Jeanmarie a Van Duyne [12], Albrecht a Creighton [13] predikovali myšlenku, kterou následně experimentálně podložili, že původ zesílení Ramanova signálu není zdaleka tak zapříčiněn velkou plochou povrchu na elektrodě, ale nýbrž se jedná o zcela jiný typ zesílení. Zásadním stimulem pro rozvoj v oblasti SERS techniky byla roku 1997 detekce jednotlivých molekul rhodaminu 6G naadsorbovaných na částicích koloidního stříbra, kdy je uváděn faktor zesílení až 10^{14} - 10^{15} [14].

Nicméně otázka mechanismu a původu takového výrazného zesílení Ramanova signálu stále není zcela zodpovězena a přitahuje tak svou pozornost mezi vědci bádajícími po základních podstatách této techniky. Výše zmíněné předpoklady byly však dlouhou dobu předmětem diskuze a zabralo zhruba desetiletí, než se dospělo k dnešním obecně přijímaným teoriím týkajících se mechanismu povrchového zesílení Ramanova signálu.

1.4.2 Mechanismus povrchem zesíleného Ramanova signálu

Princip SERS efektu má původ v současné interakci elektromagnetického záření s nanočásticemi kovů (např. Ag, Au, Cu, Pt) či nerovným (zdrsňeným) povrchem těchto kovů, a s molekulami lokalizovanými na jejich površích či v jejich blízkém okolí. Neelasticky rozptýlené záření těmito molekulami je pak zesíleno prostřednictvím tzv. rezonančního Mieova rozptylu výše zmíněnou nanočásticí kovu. Velikost faktoru zesílení (tj., k jak velkému došlo nárůstu Ramanova signálu oproti signálu měřeného za

standardních podmínek) je jedním z klíčových aspektů SERS techniky. V tomto systému se uplatňují dva typy fyzikálních mechanismů:

- Elektromagnetický – dlouhého dosahu. Tento mechanismus dodává největší příspěvek k celkovému faktoru zesílení Ramanova signálu. Elektromagnetický mechanismus využívá silného elektromagnetického pole, vznikajícího optickým buzením povrchových plasmonů, které jsou lokalizovány na nanočásticích kovů či jejich interagujících souborech. Absorbuje-li nanočástice plasmonického kovu záření vhodné vlnové délky, tak dojde k rozkmitání vodivostních elektronů v částici a vytvoří se tak oscilující dipól, který následně emituje záření, jehož intenzita je úměrná druhé mocnině velikosti tohoto dipólu. Abychom získali co nejvyšší hodnotu faktoru zesílení, musí se analyzovaná molekula nacházet v co nejtěsnější blízkosti povrchu nanočástice (<10 nm). S rostoucí vzdáleností mezi molekulou a povrchem nanočástice kovu klesá intenzita Ramanova rozptylu [15].
- Chemický mechanismus – krátkého dosahu, resp. nutnost velkého přiblížení analytu a kovu, neboli také mechanismus přenosu náboje, má o mnoho menší vliv na celkový faktor zesílení Ramanova signálu, a je založen na interakci mezi naadsorbovanými molekulami analytu na povrchu kovových nanočástic a následným přenosem náboje mezi analytem a kovovým povrchem příslušného adsorbentu. Mezi adsorbátem a adsorbentem vzniká chemická vazba a celý proces označujeme jako chemisorpci [16].

Při vhodně zvolených podmínkách můžeme dosáhnout vyšší hodnoty faktoru zesílení Ramanova signálu nejen správnou volbou vlnové délky excitačního záření (resonanční Ramanův rozptyl), ale také fyzikální vlastnosti, jako je velikost a morfologie SERS substrátu, hrají významnou roli. Stejně tak typ analytu a jeho fyzikálně–chemické vlastnosti nám výrazně mohou ovlivnit výslednou hodnotu faktoru zesílení. Vrátime-li se zpět do historie, tak již v roce 1982 Moskovits [17] shrnul základní požadavky na vhodný substrát pro SERS techniku. Ideální substrát musí poskytovat reprodukovatelné výsledky, musí být dostatečně dlouho stabilní a také jeho příprava by měla být nenáročná na čas a práci. Za posledních 30 let byly připraveny

různé typy SERS aktivních materiálů z kovů či jejich sloučenin, které budou probrány v následující podkapitole.

1.4.3 SERS aktivní povrchy

Těmi nejstaršími SERS-aktivními substráty jsou již zmíněné elektrochemicky zdrsňené elektrody, od kterých se odvíjela celá historie objevu SERS. Krátce po objevení SERS efektu se staly nejdiskutovanějším tématem v oblasti aktivních substrátů nanočástice mincovních kovů, především zlata, stříbra a mědi. Důvod, proč jsou koloidní disperze kovů tak populární, vysvětluje, díky jejich vynikajícím optickým vlastnostem v oblasti viditelného světla a v blízké infračervené oblasti, jejich silný vliv na zesílení Ramanova signálu (typicky 10^4 - 10^6), jejich levná, snadná a technicky méně náročná příprava související s požadavkem na úzkou distribuci velikosti a tvaru částic. Změnou parametrů během syntézy kovových nanočástic můžeme měnit jejich tvar (koule, trojúhelníky, tyčinky) a rozměry podle potřeb aplikace, s čímž se zároveň mění i jejich frekvence povrchového plasmonu. Na druhou stranu koloidní disperze kovů mají tendenci podléhat agregaci, která stojí za hlavní příčinou nereprodukovatelnosti měření. Proto výše zmíněné problémy lze obejít imobilizací nanočástic kovů na pevné substráty, např. skleněné, kde jsou spojeny a umocněny výhody obou těchto materiálů. Vzhledem k velkému významu aplikace nanočástic stříbra či zlata v SERS spektroskopii, budou rozebrány jejich vlastnosti, metody přípravy a využití v SERS v dalších kapitolách.

2. Nanočástice ušlechtilých kovů

2.1 Úvod do problematiky koloidně disperzních soustav

Pro uvedení do problematiky zabývající se disperzemi nanočástic ušlechtilých kovů lze využít metody používané pro charakterizaci koloidně disperzních soustav. Disperzní systém neboli disperzní soustava je termodynamický vícesložkový systém,

tvořený disperzní fází (podílem), která je různě jemně rozptýlena v homogenním kontinuu tvořícím disperzní prostředí. [18,19].

Základním kritériem pro klasifikaci disperzních soustav je velikost částic disperzního podílu. Měřítkem velikosti disperzních částic nám slouží tzv. stupeň disperzity, což je převrácená hodnota průměrné velikosti kulové částice, a vypovídá nám o tom, s jakou jemností je disperzní podíl rozptýlen v disperzním prostředí. Koloidně disperzní (mikroheterogenní) soustavy jsou tvořeny částicemi, jejichž rozměry se pohybují přibližně v intervalu od 10^{-9} m do 10^{-6} m. Pro úplnost, soustavy obsahující částice, jejichž rozměry se pohybují pod dolní hranicí velikosti, kterou je přibližně 10^{-9} m (molekulární či atomární rozptýlení), označujeme jako analyticky disperzní (homogenní) soustavy a řadíme sem pravé roztoky nízkomolekulárních látek [20]. Tyto disperze jsou stálé, nepodléhají sedimentaci ani za využití ultracentrifugy a jednoduše procházejí filtračním papírem i membránami [19]. Naopak soustavy s částicemi nabývajících rozměrů převyšujících jeden mikrometr nazýváme jako hrubě disperzní (makroheterogenní) soustavy. Tyto částice jsou viditelné pouhým okem či optickým mikroskopem a velice rychle podléhají gravitační síle a sedimentují.

Velikost částic lze použít jako vhodné kritérium pro klasifikaci koloidně disperzních soustav. Jsou-li všechny částice disperzního podílu stejně velké, označujeme tuto soustavu jako monodisperzní; naopak polydisperzní, jestliže jsou v soustavě přítomny částice rozdílných velikostí. Ve výjimečných případech, kdy jsou nastaveny optimální podmínky a po celou dobu přísně hlídány, lze připravit poměrně monodisperzní soustavy.

Druhé kritérium, podle kterého rozlišujeme koloidně disperzní soustavy, je založeno na tvaru dispergovaných částic. Mají-li částice stejný tvar, soustavu označujeme jako homodisperzní. Liší-li se tvar jednotlivých částic mezi sebou, soustavu pak označujeme jako heterodisperzní. V případě monodisperzních soustav se současně předpokládá, že jsou stejně tak i homodisperzní.[21]

Podle tvaru dispergovaných částic lze dále soustavy rozdělit na korpuskulární, laminární a fibrilární. Korpuskulární, neboli také globulární, soustavy obsahují částice, které jsou ve všech třech rozměrech přibližně identické (šířka, výška, délka), a proto

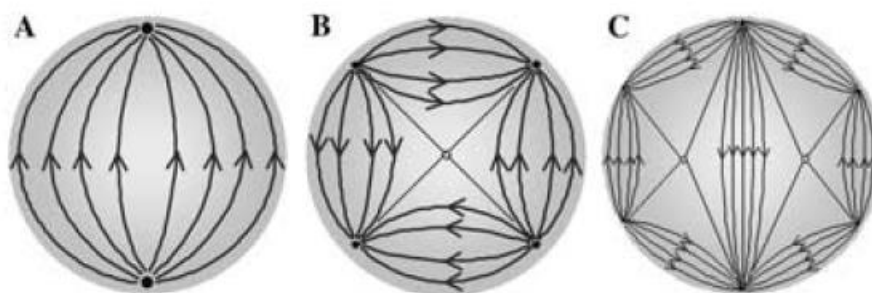
jsou označovány jako izometrické. Laminární soustavy představují částice mající tvar destiček nebo, jak také vyplývá z názvu, tvar lamel, jejichž dva rozměry převládají nad třetím. Proto se také můžeme setkat s označením jako anizometrické, mezi něž řadíme i zbývající třetí typ – fibrilární soustavy, jejichž částice jsou protaženy do tvaru tyčinek či vláken, kde převládá jeden rozměr nad zbývajícími dvěma [18,19].

Další významnou vlastností pro bližší klasifikaci koloidních soustav, které jsou tvořeny kapalným disperzním prostředím a pevným disperzním podílem (lyosoly), představují vzájemné interakce působící na fázovém rozhraní mezi disperzním prostředím a částicemi disperzního podílu. Za vratné nebo též lyofilní koloidy označujeme takové soustavy, jejichž fázové rozhraní je rozprostřeno do větších šířek. Systém je za daných podmínek (teplota, tlak, koncentrace) stálý, a jeho stabilitu není třeba udržovat přidávkem dalších látek. Naopak soustavy s ostře vymezeným fázovým rozhraním označujeme jako lyofobní. Daný systém je bez dodatečné stabilizace termodynamicky nestálý a velmi citlivý na změnu podmínek.

2.2 Rozptyl světla elektricky vodivými částicemi

Charakteristickou vlastností koloidních soustav je to, že rozptylují světlo, což je velmi důležitý (a komplikovaný) jev právě u disperzí nanočástic ušlechtilých kovů. Jedinečné optické vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů jsou jedny z významných charakteristik, díky nimž lze určit velikost přítomných částic, usuzovat na jejich koncentraci a dokonce i určit analyzovanou strukturu. Při interakci elektromagnetického záření (světla) s koloidní disperzí dochází ke snížení intenzity světelných paprsků po průchodu daným prostředím díky absorpci a rozptylu dopadajícího záření. V případě kovových částic se jedná o tzv. specifickou absorpci, při které absorpce záření a intenzita rozptýleného záření prochází s klesající vlnovou délkou elektromagnetického záření maximem. Velikost obou těchto optických jevů závisí jak na typu kovu, stupni disperzity, morfologii, tak i míře agregace částic disperzního podílu. U větších částic mohou nastat i další optické jevy, jako je lom a odraz světla na částicích disperzního podílu, u nanočástic se však nejvíce uplatňuje již zmíněná specifická absorpce a rozptyl záření [19,21,22]. Původem specifické absorpce elektromagnetického záření

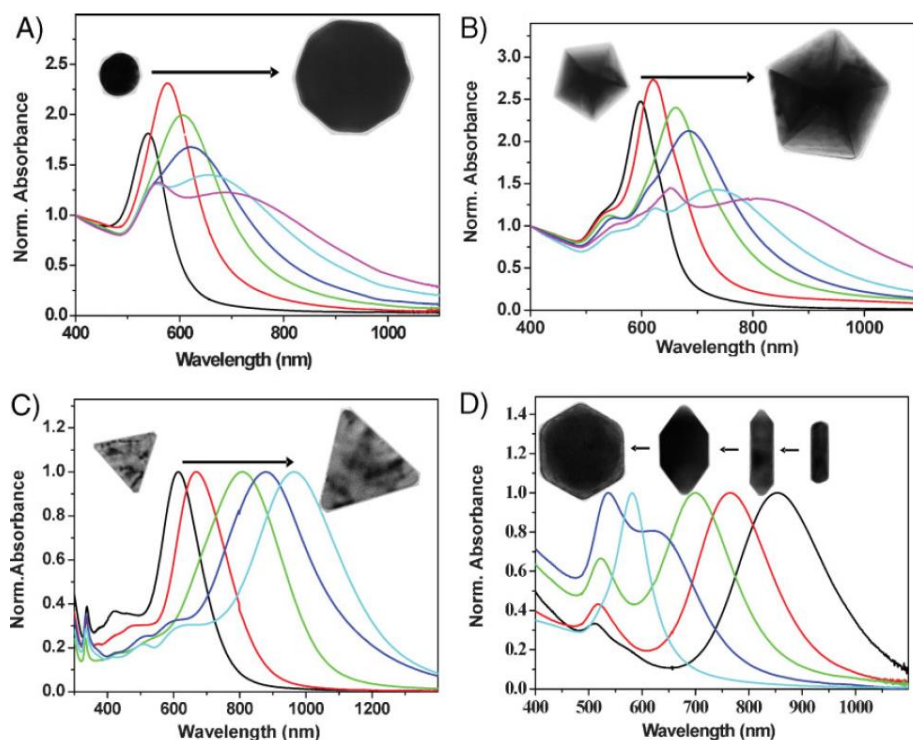
nanočásticemi kovu je souhra frekvence hromadné oscilace vodivostních elektronů s frekvencí dopadajícího záření. Tato rezonance je pak známá pod pojmem povrchová plasmonová rezonance (SPR z angl. surface plasmon resonance). Dopadající elektromagnetické záření na částici vyvolá kolektivní kmitání elektronů ve vodivostním pásu, což se následně projeví v extinkčním spektru (tj. spektru, kde je zahrnuta absorpce i rozptyl záření). Tvar spektra povrchové plasmonové rezonance závisí na dimenzionalitě přítomných částic. Se zvětšujícím se rozměrem částic se zvyšuje počet dipólů (Obr. 4), což se následně projeví v extinkčním spektru několika pásy navíc [23].



Obr. 4: Diagramy zobrazující siločáry elektrického A) dipólu, B) kvadrupólu, a C) oktopólu. Převzato z [23].

Pro nanočástice ušlechtilých kovů se typický pás specifické absorpce nachází ve viditelné oblasti spektra, zatímco neušlechtilé kovy mají svůj povrchový plasmon v UV oblasti [24,25]. Je zde nutno podotknout, že u nanočástic stříbra, v závislosti na jejich velikosti a tvaru, pozorujeme výraznější změny frekvencí plasmonové rezonance oproti částicím ostatních vzácných kovů [26]. Přesná poloha extinkčního maxima, tvar či pološířka daného pásu úzce souvisí nejen s velikostí, morfologií, povrchovými modifikacemi a stupněm agregace částic, které jsou v příslušném disperzním prostředí obsaženy, ale také s permitivitou disperzního média [27]. Experimentální studie dokazují, že s rostoucím rozměrem částic nejprve specifická absorpce strmě narůstá, následně po dosažení maxima klesá. Příkladem mohou být spektra pro různé morfologie nanočástic zlata a stříbra (Obr. 5). Změna morfologie částic ze sférických (Obr. 5 A) na tyčinkovité (Obr. 5 D) se promítá ve spektru, kde vznikají dvě extinkční maxima [28,29]. Také je evidentní, že s rostoucí velikostí nanočástic příslušného tvaru se posouvá extinkční maximum k dlouhovlnné oblasti spektra [28]. Změnou velikosti

částic, jejich morfologie a agregátního stavu lze tak efektivně ovlivňovat faktor zesílení Ramanova signálu navíc i v souvislosti s vlnovou délkou použitého excitujícího záření.



Obr. 5: UV/Vis spektra nanočástic kovů o různých velikostech a tvarech: A) sférické nanočástice Au, B) nanočástice Au ve tvaru desetistěnu, C) nanočástice Ag ve tvaru trojúhelníku, D) přeměna nanočástic Au z tyčinek na oktaedr. Převzato z [28].

2.3 Stabilita koloidně disperzních soustav

Doba existence soustavy v koloidním stavu se pohybuje od prakticky úplné nestability až po úplnou stálost. Důkazem je například doposud uchovávaný sol zlata v Královském londýnském institutu, který byl připraven Faradayem. Tak jako my, lidé, bohužel stárneme, tak i koloidní soustavy podléhají pochodům, které se nazývají stárnutí [19]. Problém stability disperzí nanočástic ušlechtilých kovů lze opět zjednodušeně nastínit obecnými přístupy, které jsou odvozeny pro klasickou koloidní chemii. V důsledku velké plochy povrchu částic disperzního podílu, koloidní soustava

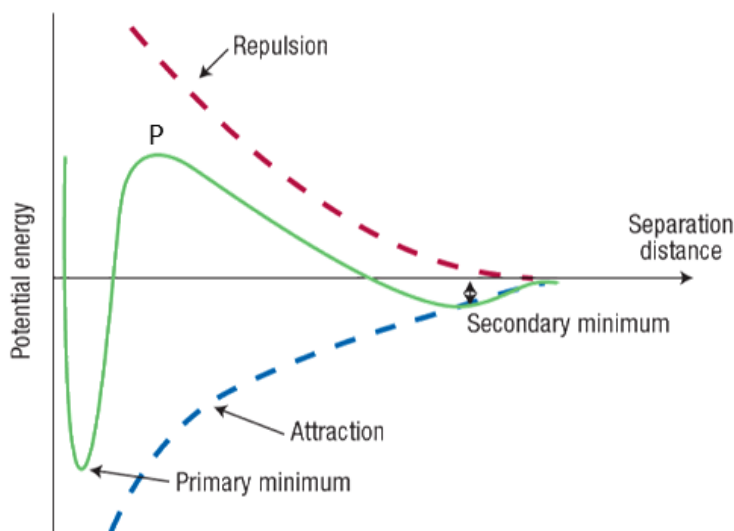
oplývá přebytkem povrchové energie, zejména jsou-li interakce mezi molekulami disperzního prostředí a disperzního podílu slabé. Pod výrazem stabilita termodynamicky nerovnovážných koloidních soustav si lze představit jejich schopnost se bránit vůči procesům, které mají negativní vliv na změnu jejich struktury, dále mají za následek snížení stupně disperzity a také vedou ke změně charakteru rozdělení částic podle rozměrů, což má fatální vliv na existenci koloidní soustavy [19,30].

Z pohledu stability je pro koloidní soustavu typický tzv. *metastabilní stav*, ve kterém soustava oplývá přebytkem povrchové energie, a to díky velkému povrchu částic disperzního podílu. Může však nastat i situace, kdy se koloidní soustava dostane do stavu s nižší povrchovou energií, k čemuž je potřeba překročení určité energetické bariéry. K překonání této energetické bariéry slouží tzv. aktivační energie, která je nutná ke spojování částic. Z toho je tedy evidentní, aby koloidní soustava vykazovala známky stability, musí existovat dostatečná energetická bariéra, která by zabraňovala spojování částic a tím i poklesu povrchové energie [21].

Základní myšlenku, týkající se problému agregátní a kinetické (sedimentační) stability nastínil v letech 1922 ruský fyzik N. P. Peskov, podle které rozlišujeme kinetickou a agregátní stálost koloidních soustav [30]. Pojem kinetická stabilita zvažuje schopnost soustavy, s jakou bude odolávat procesům působícím proti zachování rovnoměrného rozdělení koncentrace částic - typicky sedimentace v gravitačním poli [19,30]. Sedimentační stálost je významně ovlivňována poměrem rychlosti difúze a sedimentace, které nastávají uvnitř soustavy. Mezi sedimentačně stálé částice řadíme ty, jejichž rozměry se pohybují pod 100 nm a mají vlivem difúze, která působí proti sedimentaci, tendenci se udržet rovnoměrně v celém objemu disperzní soustavy [21]. Naopak agregátní stabilita vyjadřuje schopnost soustavy zachovat svůj stupeň disperzity [19]. Agregátní stálost koloidních soustav závisí jednak na složení disperzního prostředí, které lze jednoduše ovlivnit i velmi nepatrným přídavkem elektrolytů, a také na teplotě či intenzitě míchání dané soustavy [31].

Vzájemné soupeření mezi přitažlivými a odpuzivými silami dvou přibližujících se koloidních částic názorně popisuje tzv. křivka interakční energie (Obr. 6). Z ní je patrné, že se nejprve koloidní částice během jejich vzájemného přibližování dostanou do stavu tzv. sekundárního minima energie, ve kterém na částice působí slabé přitažlivé síly,

kteře jsou o něco větší než síly odpudivé. Tento děj označujeme jako flokulaci a vzniklé útvary pak jako flokuláty. Díky působícím slabým silám lze takovéto částice zpětně od sebe oddělit a převést do jejich původní koloidní formy.



Obr. 6: Blokové schéma znázorňující interakční energii dvou koloidních částic v závislosti na jejich vzájemné vzdálenosti. Převzato a upraveno z [32].

Proti dalšímu přibližování částic a vytvoření tzv. koagulátu se silně vázanými částicemi v rámci primárního energetického minima stojí v cestě energetická bariéra. V oblasti, kde interakční křivka dosahuje maxima P, dominují odpudivé síly nad přitažlivými a koloidní disperze se jeví jako kineticky stabilní.

Stabilizace koloidně disperzních soustav proti nežádoucí agregaci je realizovatelná dvěma základními způsoby souvisejícími s výše uvedeným popisem interakce mezi částicemi. Příčinou odpudivých sil, které zabezpečují dostatečnou energetickou bariéru proti spojování částic, je určitě elektrický náboj na povrchu částice, který tvoří iontovou obálku okolo kovového jádra. Proto jednou z možností stabilizace je využití elektrostatického odpuzování dvou částic nesoucích stejný elektrický náboj. Sílu elektrostatického odpuzování dvou nabitých částic q_1, q_2 popisuje Coulombův zákon:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2}, \quad (2)$$

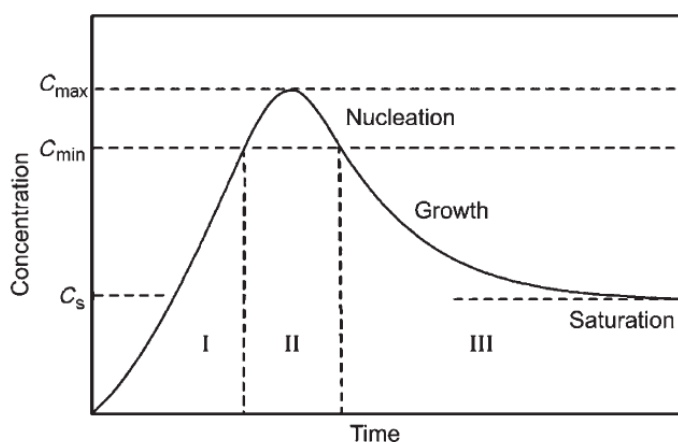
z něhož je evidentní, že odpudivá síla dvou sférických částic klesá s druhou mocninou jejich vzdálenosti r . Konstantu ϵ_0 označujeme jako permitivita vakua a ϵ_r jako permitivita prostředí [21]. Na povrchu kovové nanočástice se vlivem přídavku roztoku elektrolytu vytvoří elektrická dvojvrstva, která, pokud má dostatečně velký elektrický potenciál, vede ke vzniku elektrostatické repulze mezi částicemi, jež se od sebe dostanou na bezpečnou vzdálenost [19]. Tento mechanismus elektrostatické stabilizace popisuje kvantitativně teorie DLVO, kde jednou ze základních veličin, popisujících stabilitu koloidně disperzní soustavy je kritická koagulační koncentrace. Tato veličina představuje koncentraci elektrolytu o určitém náboji protiiontu (iont s opačným nábojem než je náboj elektrické dvojvrstvy na povrchu částice), která právě vyvolá rychlou agregaci koloidních částic.

Druhý základní stabilizační mechanismus koloidních soustav představuje tzv. sterická stabilizace. Principem zabránění agregace koloidních částic je vytvoření povrchové vrstvy vhodnými látkami (polymery přírodního i syntetického původu, např. želatina) přidanými do systému, které se specificky adsorbují na povrchu částice, aniž by ovlivňovaly povrchový náboj samotné částice. Výhodou stericky stabilizovaných nanočástic kovů, ve srovnání s elektrostatickou stabilizací, která se uplatňuje především ve vodném prostředí, je její využití jak v organické, tak vodné fázi [21].

2.4 Chemická syntéza nanočástic ušlechtilých kovů

Vlastnosti materiálů se se zmenšujícími se rozměry nečekaně mění a přinášejí zcela nové fenomény, nepozorované u částic většího rozměru. Tyto nové vlastnosti se objevují výrazně při poklesu rozměru částic pod 100 nm, tedy u nanočástic. Hitem posledních let v materiálovém výzkumu je snaha o řízenou přípravu nanočástic ušlechtilých kovů s velmi dobře definovanými tvary a velikostmi, jelikož jsou tyto parametry klíčovými pro jejich následnou aplikaci. Mechanismus růstu nanočástic kovů postupně od jednotlivých atomů je v základních principech popsitelný obecnými

přístupy odvozenými v klasickém modelu homogenní nukleace (Obr. 7), který byl publikován již v roce 1950 badateli LaMer a Dinegar [33]. Tento model představuje časový průběh změny koncentrace monomerů během chemické reakce. V první časové zóně průběhu reakce dochází ke vzniku monomerů prostřednictvím vzájemného přibližování jednotlivých molekul. Překročením jisté saturační koncentrace dojde k nukleaci (zóna II). Rychlý proces nukleace je následně doprovázen zmenšováním koncentrace monomeru, čímž je proces nukleace brzděn, a začíná růstové období již existujících jader v zóně III.



Obr. 7: Diagram mechanismu růstu krystalů v roztoku podle LaMer-Dinegara. Převzato z [34].

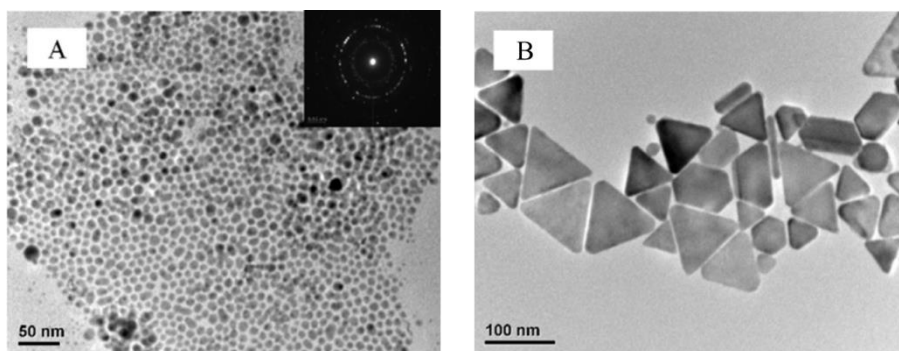
Aby disperze nanočástic ušlechtilých kovů splňovaly očekávané požadavky, je nutné zvolit tu nejvhodnější syntetickou cestu. Na základě vhodně zvoleného prekurzoru iontů stříbra či zlata, redukčního činidla, případně stabilizátorů a dále pak na základě změny experimentálních podmínek, jako je pH a teplota, lze řídit velikost, tvar a morfologii vznikajících částic. Základní postup přípravy nanočástic ušlechtilých kovů, tzn. stříbra a zlata, vychází ze stříbrné soli (převážně ve formě dusičnanu – AgNO_3), respektive zlatité soli (ve formě tetrahydrátu kyseliny tetrachlorozlatité – $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Výhodou těchto solí je jejich snadná rozpustnost ve vodě, což hraje důležitou roli pro nastavení optimálních podmínek. V následujících dvou podkapitolách bude podrobněji probrána chemická syntéza nanočástic ušlechtilých kovů tzv. „wet“ (roztokovou; chemickou) cestou, zejména nanočástic stříbra, kde jako hlavní kritérium při rozdělení těchto syntéz do podkapitol bude uvažován typ redukčních látek.

2.4.1 Redukce anorganickými látkami

Mezi nejrozšířenější metody přípravy nanočástic ušlechtilých kovů, využívajících k redukci anorganické látky, patří redukce tetrahydridoboritanem sodným (NaBH_4). Jako první publikovali tento postup přípravy nanočástic stříbra za využití výše zmíněného silného redukčního činidla v roce 1979 Creighton, Blatchford a Albrecht [35]. V této metodě se pracuje za poměrně nízkých teplot ($2\text{ }^\circ\text{C}$) a za intenzivního míchání, neboť při vyšších teplotách tetrahydridoboritan sodný podléhá hydrolyze za vzniku borátů různého složení. Za intenzivního míchání lze tímto postupem reprodukovatelně připravit velmi malé částice (jednotky nm) stabilní v disperzi několik měsíců. Tento postup od doby jeho publikování byl mnohokrát modifikován, od změny vstupní koncentrace borohydridu, přes změnu hodnoty pH, po změnu poměru reakčních složek, které vedou k cílené tvorbě nanočástic požadovaných rozměrů a tvarů [36]. Nicméně, jak bylo nastíněno autorem Rospendowski a kol. [37] už v roce 1991, povrch nanočástic stříbra redukovaných tetrahydridoboritanem sodným není biokompatibilní pro imobilizaci enzymů a dalších biologicky důležitých látek a jejich následnou SERS detekci. Zajímavé poznatky přinesly práce autora Polte a kol. [38,39], na jejichž základě lze usuzovat jak na rozdílnou agregátní stabilitu borohydridových nanočástic stříbra a zlata, tak i na jejich mechanismus růstu. Zatímco proces vzniku nanočástic zlata představuje pouze jednu fázi koalescence, která nastává ihned po smíchání reaktantů, tak vznik nanočástic stříbra je realizován ve dvou rozdílných fázích. První fáze je ztotožnitelná s fází u nanočástic zlata, zatímco v druhé fázi koalescence hrají roli borohydridové anionty podléhající hydrolyze, které také ovlivňují stabilitu příslušných nanočástic stříbra.

Zajímavé výsledky byly dosaženy skupinou autorů Yang a kol. [40] při přípravě stříbrných nanodestiček ve tvaru trojúhelníků. Navržený postup chemické syntézy je založen na třech krocích: (1) nejprve byly připraveny sférické nanočástice stříbra redukcí tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti citrátu sodného plnícího funkci stabilizačního činidla; (2) pak následovala několikahodinová konverze těchto citrátem stabilizovaných sférických částic na SDS (dodecylsíránem sodným z angl. sodium dodecyl sulphate) stabilizované nanočástice stříbra, který zároveň poskytuje vhodné prostředí pro rekrystalizaci nanočástic do požadovaných tvarů; (3) posledním krokem

bylo dvoudenní zrání těchto SDS stabilizovaných sférických částic za přítomnosti 0,01 mol/l roztoku chloridu sodného do trojúhelníkových tvarů, které bylo doprovázeno změnou zabarvení roztoku ze žlutohnědé na světle zelenou. Tyto částice v průběhu první fáze zrání dosahovaly průměrné velikosti 9,6 nm s UV/Vis absorpčním maximem při vlnové délce 397 nm. Následně v druhé fázi zrání, tj. po uplynutí 3 týdnů, došlo ke kompletní rekrytalizaci sférických částic stříbra na trojúhelníkové destičky (Obr. 8). Tato konverze byla doprovázena změnou zabarvení roztoku nanočástic stříbra na modrou. Na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu byly pozorovány trojúhelníkové destičky s průměrnou délkou stran 65 nm a v UV/Vis absorpčním spektru sejevily tři charakteristické pásy s absorpčními maximy při 330 nm, 450 nm a 660 nm.



Obr. 8: TEM snímky (A) SDS-stabilizovaných nanočástic stříbra před přidavkem NaCl; (B) nanočástice stříbra po třech týdnech zrání od přidavku 0,01 mol/l roztoku NaCl. Převzato a upraveno z [40].

Leopold a kol. [41] představili velmi rychlou a jednoduchou metodu přípravy stabilních a vysoce SERS-aktivních nanočástic stříbra, která spočívá v redukcí dusičnanu stříbrného hydroxylamin hydrochloridem v bazickém prostředí za pokojové teploty. Na základě změny pořadí reakčních komponent a změny jejich koncentračního poměru přidávaných do systému a současně v závislosti na způsobu míchání reakční směsi, byly připraveny částice o průměrných velikostech 23 nm, 34 nm a 67 nm.

Nanočástice stříbra lze rovněž připravit redukcí dusičnanu stříbrného hydrazin dihydrochloridem ve slabě alkalickém prostředí. Takto vzniklé nanočástice, o

velikostech od 40 nm do 70 nm, nejen že vykazovaly několikaměsíční agregátní stabilitu bez přítomnosti stabilizačních činidel, ale také se osvědčily jako SERS-aktivní substráty při detekci barviva nilské modři [42].

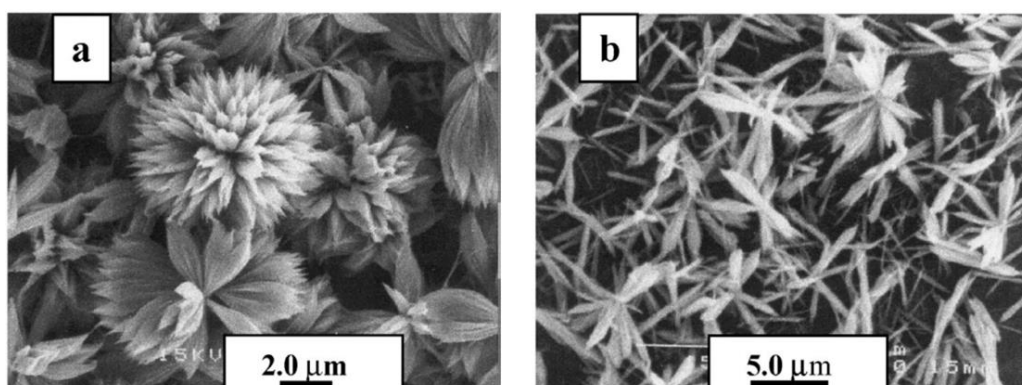
Dalšími, avšak méně často využívanými metodami přípravy nanočástic stříbra je redukce použitím peroxidu vodíku. Po kapkách přidávaný vodný roztok dusičnanu stříbrného k peroxidu vodíku za současného probublávání v bazickém prostředí, vede ke vzniku nanočástic stříbra o průměrné velikosti 22 nm. Z pohledu problematiky čistoty koloidních disperzí, je zde hlavní výhodou tvorba vedlejších produktů ve formě kyslíku, který se snadno uvolňuje ze směsi do vzduchu, a ve formě vody, která je součástí rozpouštědla [43].

Mezi dalšími, vcelku zřídka využívanými redukčními anorganickými látkami pro přípravu nanočástic stříbra nachází uplatnění např. vodík [44] či sodík [45]; cínaté ionty v případě nanočástic zlata [46].

2.4.2 Redukce organickými látkami

V případě metod přípravy nanočástic ušlechtilých kovů, využívajících redukcí organickými látkami, se můžeme nejčastěji setkat s tzv. citrátovou metodou podle Lee a Meisela [47], kteří se však nechali inspirovat prací profesora Turkeviche již z 80. let 20. století [48,49], zabývající se nukleací, růstem a koagulací nanočástic zlata. Základ postupu syntézy nanočástic ušlechtilých kovů v tomto případě spočívá ve smíšení vroucího vodného roztoku stříbrné, respektive zlatité soli s citrátem sodným, který zde zároveň plní i funkci stabilizátoru, a ovlivňuje jak velikost, tak morfologii vznikajících částic [50]. Na základě spektroskopického studia skupiny kolem profesora Munra [51] bylo zjištěno, že k redukcí stříbrného ionu Ag^+ na Ag^0 dochází již během prvních dvou minut po přidavku citrátu sodného, a vzniklé nanočástice jsou značně polydisperzní o velikostech 60 – 80 nm. Nicméně po 90 minutách následného zahřívání reakční směsi došlo ke vzniku relativně monodisperzních nanočástic stříbra o průměrné velikosti 27 nm, které byly následně využity v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii.

Koloidní částice ušlechtilých kovů lze dále připravit pomocí kyseliny askorbové ($C_6H_8O_6$) ve vodném roztoku za přítomnosti polymerních stabilizátorů např. polyvinyl alkoholu (PVA) [52] či Daxad-19 (sodná sůl polynaftalen sulfonátu s formaldehydem) [53]. Při nastavení vhodných reakčních podmínek, jako je teplota, rychlost přidavku redukčního činidla a doba zrání, lze snadno získat jak izometrické částice (částice jsou ve všech třech rozměrech přibližně stejně vyvinuty), tak i částice např. hexagonálních či složitějších tvarů, jak bylo popsáno v publikaci autora Suber a kol. [53]. Obrázek 9 představuje reprezentativní SEM snímky vybraných nanočástic stříbra složitějších struktur lišících se variací poměru teplota/doba zrání/ $AgNO_3$.



Obr. 9: SEM snímek nanočástic stříbra redukováných kyselinou askorbovou za přítomnosti stabilizátoru Daxad-19 připravených a) 20 hodinovým zráním při teplotě 50 °C a koncentraci $AgNO_3$ 0,18 mol/l, b) 24 hodinovým zráním při teplotě 65 °C a koncentraci $AgNO_3$ 0,065 mol/l. Převzato z [53].

Další velmi často používanou a pověstně známou metodou, ze které vychází mimo jiné i jedna z příložených prací, je tzv. Tollensův proces, který spočívá v redukci amoniakálního komplexního kationtu $[Ag(NH_3)_2]^+$ redukujícími sacharidy, jako je např. glukóza či maltóza [54], sorbitol [55], atd., coby mírná redukční činidla. Tento postup byl původně používán pro neelektrolytické nanášení stříbrného zrcátka ve formě tenkého filmu vyredukováného roztokem formaldehydu se sorbitolem na pevném povrchu. Snížením koncentrace reakčních složek a použitím ultrazvukové lázně, lze

získat nanočástice stříbra o velikostech v rozmezí 20 – 50 nm [55]. V důsledku silné afinity amoniaku vůči Ag^+ lze velmi snadno, během jediného syntetického kroku, řídit variací koncentrace amoniaku výslednou velikost nanočástic stříbra [54]. Kvítek a kol. [56] se ve své práci zabývali vlivem změny koncentrace amoniaku na velikost vznikajících nanočástic stříbra v modifikovaném Tollensově procesu, kde jako redukující cukr byla použita xylóza, glukóza, fruktóza a maltóza. Na základě svých studií zjistili, že s klesající koncentrací amoniaku (v rozsahu od 0,2 mol/l po 0,005 mol/l) klesá i průměrná velikost částic, přesněji redukcí xylózou z 372 nm – 54 nm, v případě glukózy z 336 nm – 57 nm, za použití fruktózy z 380 nm – 161 nm a v případě maltózy z 352 nm – 47 nm. Následně Panáček a kol. [57] se taktéž zabývali sledováním vlivu redukujících látek prostřednictvím modifikovaného Tollensova procesu na velikost vznikajících nanočástic stříbra. K redukci $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ použili dva monosacharidy, glukózu a galaktózu, a dva disacharidy, laktózu a maltózu. Experimenty byly prováděny při různých koncentracích amoniaku (0.005 – 0.20 mol/l) a při různých hodnotách pH (11.5 – 13.0), přičemž výsledná velikost nanočástic stříbra se pohybovala v rozsahu od 25 do 450 nm. Jak už autoři tušili z předešlých studií, se vzrůstající koncentrací amoniaku rostla průměrná velikost částic, která dosahovala maxima při koncentraci amoniaku 0.035 mol/l pro disacharidy a 0.20 mol/l pro monosacharidy.

3. Aplikace nanočástic ušlechtilých kovů

Využití nanočástic stříbra a zlata se odráží zejména od jejich unikátních vlastností, které nepozorujeme ve světě mikro a makroskopických rozměrů těchto kovů. S klesajícím rozměrem částic se výrazně mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, které vedou ke vzniku zcela nových fyzikálních jevů na fázovém rozhraní mezi nanočásticí a disperzním prostředím. Poněvadž s klesajícím rozměrem částic kovů roste poměr atomů na jejich povrchu vůči atomům v objemu, prosazují se zde povrchové jevy. Z velké plochy povrchu nanočástic vychází jejich široké využití při heterogenní katalýze, adsorpci či při zkoumání antibakteriální a antimykotické aktivity těchto částic. Na základě změněné vnitřní struktury materiálu mají navíc i unikátní elektrické a optické vlastnosti, čehož lze využít v analytických technikách jako je např. již zmíněná

povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, nebo při konstrukci biosenzorů či optických paměťových čipů. Objev povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie měl obrovský vliv jak na základní tak aplikovaný výzkum, zejména při objasnění strukturálních nebo konformačních změn molekul při adsorpci. Nebyl to jen prvotní impuls pro studium zesílení optického rozptylu na fázovém rozhraní, ale také nám ukázal cestu k dalším alternativním SERS technikám, jako je povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS) či hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS).

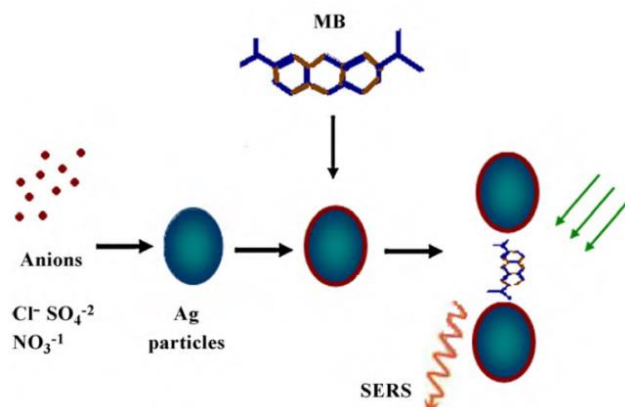
3.1 Analytické využití nanočástic ušlechtilých kovů v SERS

Nanočástice ušlechtilých kovů, připravené postupy diskutovanými v předchozích kapitolách, mají díky výhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem uplatnění v mnoha vědecko-výzkumných oblastech v rámci velice citlivé spektroskopické techniky – povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS), jejíž princip byl diskutován v úvodní kapitole. Díky extrémnímu povrchovému zesílení je největší předností této metody schopnost pracovat za koncentrací, které otevírají řadu analytických aplikací dříve pro Ramanovu spektroskopii nedostupných. V rámci hledání spolehlivých analýz pro detekci jednotlivých molekul v analytech, jejichž koncentrace nepřesahuje řád nanomolů, je SERS technika nezbytná v mnoha klíčových oblastech (nano)medicíny, (nano)biotechnologie, chemie, farmacie a jinde [58–61].

První důkazy o možnosti detekce jediné molekuly adsorbované na nanočástici stříbra metodou SERS podal Nie a kol. [14], kteří provedli detekci na úrovni jedné molekuly rhodaminu 6G naadsorbované na částicích koloidního stříbra, a stejně tak obdobných výsledků bylo dosaženo autorem Kneipp a kol. [62], kde detekovali jednotlivé molekuly krystalové violeti na těchto nanočásticích v kombinaci se SERS technikou. Schwartzberg a kol. [63] rovněž vyvinuli systém detekce rhodaminu 6G v přítomnosti vodné disperze agregátů nanočástic zlata, které poskytovaly faktor zesílení 10^7 - 10^9 . V návaznosti na tyto výsledky zároveň Kneipp a kol. [62] uvedli, za účelem získání vyšších intenzit signálů, tzv. aktivaci povrchu nanočástic stříbra účinkem chloridu sodného. Mezi prvními průkopníky aktivace povrchu nanočástic

stříbra se objevuje i práce autora Hildebrandt a kol. [64], kteří sledovali závislost zesílení SERS signálu rhodaminu 6G na přidavku halogenidových a sulfátových iontů k nanočásticím stříbra. Co stojí za příčinou působení těchto „aktivačních“ činidel v rámci nárůstu intenzity Ramanova signálu není doposud přesně známo. Nicméně existují tři hypotézy o možném mechanismu, kterými lze přiblížit ucelený pohled na tuto problematiku. První hypotéza, týkající se vysvětlení mechanismu aktivace, plyne ze zesíleného elektromagnetického pole působícího kolem vzniklých agregátů nanočástic kovů. Futamata a kol. [65] potvrdili, že přidavkem chloridových iontů je možné docílit detekce rhodaminu 6G na úrovni jedné molekuly, což je způsobeno ohromným elektromagnetickým polem v těsném okolí agregátů nanočástic stříbra v důsledku přidavku chloridových iontů. Další hypotéza na tuto problematiku vychází z představy přenosu náboje mezi příslušným kovem nanočástice a naadsorbovanými molekulami analytu [66–68]. Třetí hypotézu navrhl Grochala a kol. [69], kteří uvažují reorientaci molekul barviva vyvolanou aniontem a současně molekulární resonanci způsobenou silným vlivem koadsorbovaných chloridových ionů na elektronovou hladinu barviva.

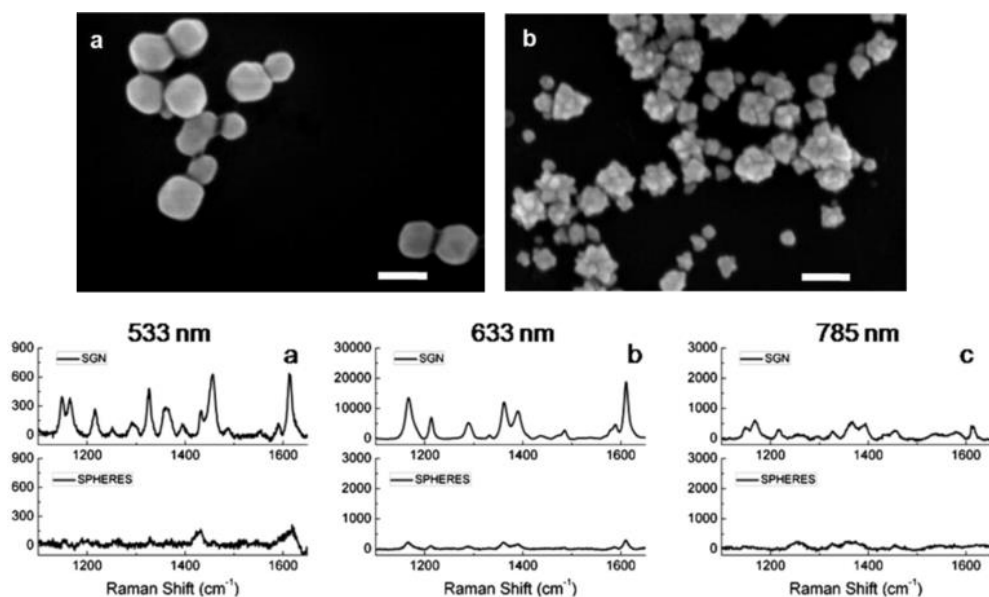
Dong a kol. [70] se zabývali vlivem různých redukčních činidel (hydroxylamin hydrochlorid, tetrahydridoboritan sodný, citrát sodný) a různých „aktivačních“ činidel (chlorid sodný, síran sodný, dusičnan sodný) na výslednou velikost nanočástic stříbra a současně sledovali účinek takto připravených částic na zesílení Ramanova signálu methylenové modře (MB). Mechanismus zmíněného postupu SERS aktivace popisuje Obr. 10, ze kterého plyne, že nejprve byl „aktivován“ povrch nanočástic stříbra a následně k těmto částicím byl přidán analyt MB. Přídavek aktivačních iontů a MB k primárním částicím stříbra je doprovázen změnou náboje na jejich površích a usnadňuje tak jejich následnou agregaci. Agregáty pak poskytují na styčných bodech mezi jednotlivými částicemi tzv. „hot spots“, kde je pozorována nejvyšší hodnota zesílení Ramanova signálu. Z uvedených výsledků jasně plyne, že nejvyššího zesílení bylo dosaženo při aktivaci hydroxylaminových nanočástic stříbra chloridovými ionty. Závěrem tedy nutno podotknout, že pod pojmem aktivace si lze s určitou pravděpodobností představit částečnou agregaci těchto částic, která je klíčová pro dosažení výrazného zesílení Ramanova signálu.



Obr. 10: Modelové schéma mechanismu aktivace povrchu nanočástic stříbra. Převzato z [70].

Vedle samotných nanočástic je studován i vliv dalších parametrů metody, jako je výkon laseru a hlavně vlnová délka excitačního zdroje záření. V jedné z publikovaných prací byla diskutována závislost Ramanova signálu na souhře velikosti nanočástic stříbra a vlnové délky excitačního záření. Při pozorování, které částice poskytují maximální efekt na zesílení Ramanova signálu ve spojení s vhodnou excitační vlnovou délkou použitého laseru pohybující se od ultrafialové až do blízké infračervené oblasti, se dospělo k závěru, že s rostoucí vlnovou délkou lineárně roste i potřebná velikost SERS-aktivních částic. Tyto nanočástice jsou známy pod pojmem jako tzv. „hot particles“. Zajímavých výsledků tak bylo dosaženo s nanočásticemi stříbra o velikostech 70 ± 6 nm v kombinaci s excitační vlnovou délkou 488 nm použitého laserového záření. Dále pak pro částice o průměrné velikosti 190-200 nm se jevila být nejpřívětivější excitační vlnová délka laseru 647 nm [71]. Nevhodné snoubení vlnové délky zdroje laserového záření a velikosti nanočástic může být značně zavádějící zejména pak při interpretaci a porovnávání získaných spekter [72,73]. I přes to, že se každoročně publikují stovky prací, kde se autoři odkazují na relevantnost této techniky pro detekci v praxi významných molekul, vývoj komerčních SERS substrátů stále zaostává. Proto v souvislosti s těmito poznatky jsme se před nedávnem v jedné z našich studií zabývali jednoduchým a reprodukovatelným vývojem SERS aktivního substrátu na bázi rekrytalizovaných nanočástic stříbra. Tyto rekrytalizované nanočástice stříbra poskytovaly zesílení Ramanova signálu jak při excitaci ve viditelné oblasti spektra

(488 nm), tak v blízké infračervené oblasti spektra (1084 nm) [74]. Morasso a kol. [75] se zabývali vlivem sférických a hvězdicovitých nanočástic zlata na zesílení SERS signálu malachitové zeleně s použitím třech různých vlnových délek (532 nm, 633 nm, 785 nm) excitačního zdroje záření. Obrázek 11 představuje SEM snímky zlatých sférických (spheres; 70 nm) a zlatých hvězdicovitých (SGN; 70 nm) nanočástic a SERS spektra malachitové zeleně (1 $\mu\text{mol/l}$) s oběma typy částic excitovanými třemi různými vlnovými délkami laserového záření. Srovnáním spekter je zřejmé, že nanohvězdy vykazují mnohem vyšší SERS signál, což lze přisuzovat zejména členitému povrchu nanočástic s ostrými konci. V této studii takto dosáhli na hvězdicovitých nanočásticích zlata až 50x vyššího faktoru zesílení než na sférických zlatých nanočásticích stejných rozměrů.



Obr. 11: SEM snímky (a) sférických nanočástic zlata (SPHERES) a (b) hvězdicovitých nanočástic zlata (SGN). SERS spektra malachitové zeleně (1 $\mu\text{mol/l}$) s oběma typy nanočástic a excitační vlnovou délkou 532 nm (a), 633 nm (b) a 785 nm (c). Převzato a upraveno z [75].

V posledních letech je značná pozornost ve vědecké komunitě taktéž věnována nanočásticím ušlechtilých kovů, které jsou imobilizovány na pevných površích, čímž se spojuje výhoda zajištění stability systému díky pevným substrátům s reprodukovatelnými SERS výsledky a taktéž výhoda užší distribuce velikosti částic, které lze v dnešní době připravit. Freeman a kol. [76] účinně imobilizovali samoorganizující se monovrstvu zlatých a stříbrných nanočástic na skleněných nosičích předem funkcionalizovaných polymery. Imobilizace nanočástic spočívala ve vzniku kovalentních interakcí mezi funkčními skupinami (kyano, amino či thiolové) na konci řetězců polymeru a nanočástic kovu. Tento systém byl následně využit k SERS detekci modelového analytu trans-1,2-bis(4-pyridyl) ethylenu (BPE) o koncentraci 1 mmol/l, kde bylo dosaženo velmi povzbudivých výsledků pro následné aplikace zmíněných SERS substrátů.

3.2 Aplikace nanočástic ušlechtilých kovů v biologické SERS analýze

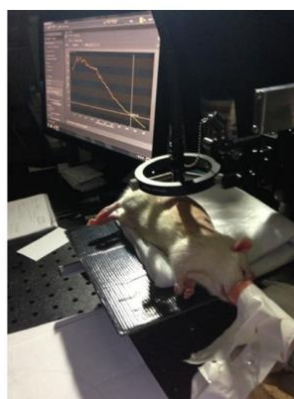
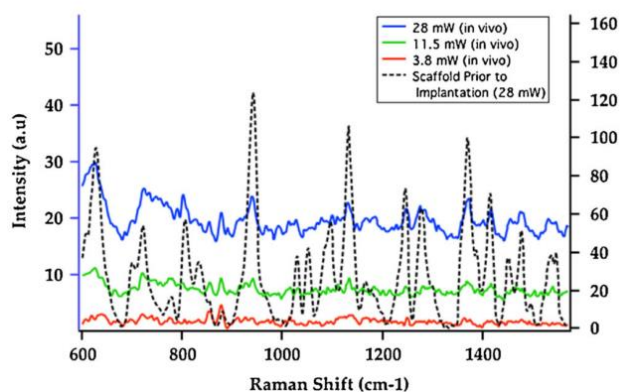
Jak již bylo uvedeno výše, SERS spektroskopie je takřka ideální metodou s využitím v oblasti forenzní analýzy (kriminalistiky), diagnostiky chorob či kontroly potravin, nebo analýzy životního prostředí. Jednou z dalších mnoha oblastí využití nanočástic ušlechtilých kovů ve spojení se SERS technikou představují tzv. biodetekce. I při velmi nepatrných změnách ve složení a koncentraci molekul analytu můžeme získat otisk těchto změn ve vibračních stavech příslušného SERS spektra. Navíc i přes potíže s reprodukovatelností signálu v souvislosti s přípravou SERS aktivních substrátů, lze tuto techniku uplatnit mimo jiné v medicínském výzkumu a směřuje i do lékařské praxe. Příkladem může být technologie SERS genomové sondy, která má velký potenciál pro širokou škálu aplikací v oblastech, kde je nutná identifikace nukleových kyselin. Ke stanovení specifických sekvencí DNA a dále objasnění úlohy některých genů pomocí SERS detekce významně přispěla práce autora Vo-Dinh a kol. [77]. Za tímto účelem vyvinuli DNA-SERS sondu na bázi 23 nm nanočástic stříbra značených molekulami fluorescenčních barviv (rhodamin B, rhodamin 123, rhodamine 6G, kresylová violet) citlivě detekovatelnými metodou SERS. Fluorescenční značka „ušíťá“ na míru k oligonukleotidu představuje vynikající detekční prvek, s jehož pomocí se

nabízí detailnější průzkum chování modifikovaných oligonukleotidů v „obarveném“ vnitrobuněčném prostředí. Takto vyvinutou metodu pak úspěšně testovali na buňkách z vaječníků čínského křečka. K tomuto výzkumu rovněž přispěli svou prací Cinta a kol. [78], kteří prováděli *in-vivo* SERS testy u myši postižených nádorovým onemocněním kůže s využitím nanočástic stříbra označených kresylovou violetí. Výše uvedené postupy značně rozšířily pohled na současnou problematiku značení biologických tkání za účelem sledovat rakovinu kůže SERS technikami. Nádorová onemocnění v současné době představují velký globální problémem, jelikož si stojí na druhém místě žebříčku nejčastějších příčin úmrtí. Proto je velká pozornost věnována využití SERS techniky v oblasti výzkumu rakoviny, konkrétně rakoviny děložního čípku [79], prsu [80,81], prostaty [82,83], plic [84], žaludku [85], jícnu [86], a dalších. Současná literatura tak představuje SERS techniku, díky její specifičnosti, vysoké citlivosti a materiálové i časové nenáročnosti, jako potenciální diagnostickou metodu k odlišení zdravé tkáně od karcinogenní.

Jedním z průkopníků, kteří významně přispěli SERS technikou k detekci jednotlivých živých buněk byli Kneipp a kol. [87–90]. Potenciál SERS techniky jakožto citlivé metody pro „label-free“ (tj. bez použití výše uvedených fluorescenčních značek) analýzu uvnitř jednotlivých živých buněk ilustruje například publikace autorů Kneipp a kol. [90], kteří ve své práci využili nanočástice zlata o rozměrech 30 nm až 50 nm. Tyto nanočástice pak byly prostřednictvím endocytózy zavedeny do myších mikrořágů a buněk krysích ledvinných tubulů a sledován vliv agregace nanočástic zlata po inkubaci (30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 24 hod) s tímto biologickým materiálem na zesílení Ramanova signálu. Aby byl minimalizován účinek nežádoucí fluorescence, jako budící zdroj záření byl použit laser s excitační vlnovou délkou 786 nm v blízké infračervené oblasti elektromagnetického záření. SERS spektra zaznamenaná dvě hodiny po internalizaci nanočástic zlata do epitelálních buněk byla nejintenzivnější a nesla tak nejhojnější informaci o vibračních stavech molekul.

Další z oblastí aplikace SERS spektroskopie směřující do lékařské praxe je výzkum tkání. Zde se většinou využívá vlnových délek laseru v blízké infračervené oblasti spektra (650 – 900 nm), ve které je průnik světla tkáněmi a krví maximální. Skutečnost, že takové záření proniká do hloubky až několika milimetrů, nachází

obrovskou výhodou pro výzkum pokožky. Register a kol. [91] tak prováděli *ex-vivo* SERS testy na lidských kožních štěpech a *in-vivo* na živých zvířecích modelech. Zmíněná studie je výsledkem výzkumu zlatých 45 nm hvězdicovitých nanočástic, které byly aplikovány injekční stříkačkou do hrubé struktury kůže těsně pod povrch. Kromě nalezení optimálních podmínek, jak získat maximální SERS signál pro *in-vivo* testování, se jim také podařilo identifikovat rozdíly lidské a zvířecí (potkaní a prasečí) kůže. Pro *in-vivo* SERS testování byly Au nanohvězdy označené HITC barvivem (z angl. 1,1',3,3',3'-hexamethylindotricarbocyanine iodide) vloženy do porézních hydrogelových platform a implantovány do hřbetu živého potkana tak, aby se minimalizoval pohyb při dýchání. Obrázek 10 (vlevo) ukazuje SERS spektra HITC značených Au nanohvězd zakotvených v porézní platformě. Všechna SERS spektra jsou průměrem třech 10s expozic s využitím excitačního laseru o vlnové délce 785 nm. Černé SERS spektrum odpovídá porézní platformě před implantací do potkaního hřbetu. Modré, zelené a červené SERS spektrum odpovídá tentýž platformě, nýbrž ihned po implantaci, zaznamenané s lišícím se výkonem laseru 28 mW, 11,5 mW a 3,8 mW. Obrázek 10 (vpravo) ilustruje *in-vivo* SERS uspořádání na anestezizovaném potkanovi. Publikované výsledky testů *in-vivo* a *ex-vivo* naznačují, že díky zlatým hvězdicovitým nanočásticím lze SERS techniku využít jako diagnostickou metodu a udělují ji tak velký potenciál v biomedicině nejen pro *in-vivo* testování, ale i pro klinické aplikace.



Obr. 12: SERS spektra HITC značených Au nanohvězd zakotvených v porézní platformě, které byly nitrokožně implantovány do hřbetu potkana (10s expozice; excitační vlnová délka 785 nm). Převzato z [91].

Dále se *ex-vivo* výzkumu kůže pomocí SERS techniky, konkrétně studiem dynamiky penetrace a akumulace 20 nm částic zlata v kůži potkanů do hloubky až 75 μm , zabývali ve své práci Xiong a kol. [92]. Kromě určení hloubky, kam až jsou nanočástice zlata schopny proniknout, se jim také podařilo rozlišit různé vrstvy pokožky od nejsvrchnější až po škáru.

Obrovský přínos pro medicínu je *in-vivo* detekce glukózy v krvi. Stanovení glukózy v krvi je důležité, a to nejen z důvodu sledování hladiny její koncentrace u pacientů trpících cukrovkou, ale i z důvodu určení jejího vztahu k neurální aktivitě mozku. Nicméně SERS spektrum glukózy je obvykle poměrně nízkých intenzit. K překonání tohoto problému v oblasti biomedicínského využití SERS techniky přispěli průkopníci Shafer-Peltier a kol. [93]. Zmíněná práce je výsledkem pilotního výzkumu systematické studie přímé detekce glukózy v krvi pomocí biosenzoru na bázi vrstvy nanočástic stříbra a SERS techniky. Modifikace povrchu tenkého filmu nanočástic stříbra alkanthioly byla navržena za účelem co nejefektivnější adsorpce glukózy na substrát, který byl vytvořen nanosením stříbra na vrstvu polystyrenových částic a jejich následnou samoorganizací do stříbrných trojúhelníkových útvarů. Zmíněná studie tak demonstruje funkční model pro kvantitativní detekci glukózy jak ve vysokých (0-250 mmol/l), tak klinicky významných (0-25 mmol/l) koncentracích, což nahrává k jeho komerčnímu využití v medicíně. Plány a ambice do budoucna mezi vědci jsou tak zřejmě jasné. V dlouhodobém časovém horizontu se bude usilovat o vývoj mikro-SERS či nano-SERS zařízení, které bude možno podkožně implantovat, nebo dokonce začlenit jako součást protetické kontaktní čočky v oku diabetických jedinců.

Klíčovou otázkou, ve které zatím stále není úplně vše jasně zodpovězeno, zůstává rychlý screening a možnost detekce a typizace bakteriálních patogenů v oblasti bezpečnosti potravin, ochrany veřejného zdraví, a stejně tak v diagnóze původce infekčního onemocnění [94]. Zavedené molekulárně biochemické techniky pro rutinní analýzy bakteriálních patogenů typicky představují časově velmi náročné kultivační postupy bakterií odebraných z kontaminovaných zdrojů [95]. Zcela odlišný přístup k identifikaci bakterií poskytuje Ramanova [96,97] a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie [98]. Na rozdíl od klasických kultivačních metod, zde nejsou třeba pro tuto techniku kroky jako extrakce či amplifikace (zmnožení) bakteriální DNA.

Ramanova spektroskopie je založena na vibračních spektrech, která odrážejí proteinový profil analyzované bakteriální buňky. Mnoho prací se již zabývalo SERS technikou za účelem detekce vybraných mikroorganismů, jako jsou například *Pseudomonas aeruginosa* [99–101], *Staphylococcus epidermidis* [102,103], *Helicobacter pylori* [104], *Listeria innocua* [105], *Shewanella oneidensis* [106,107], *Escherichia coli* [108–112], *Salmonella typhimurium* [113–116] *Listeria monocytogenes* [117] *Staphylococcus aureus* [113,118–120] a *Legionella pneumophila* [121]. Detekce a identifikace výše zmíněných testovaných bakterií byla prováděna s rozdílnými excitačními zdroji záření, zejména v UV/Vis oblasti, a s využitím různých SERS substrátů (převážně nanočástice stříbra a zlata). Přitom je třeba podotknout, že pro SERS uspořádání s excitačním zářením vlnových délek v blízké infračervené oblasti spektra (785 nm, 830 nm) jsou nejčastěji využívány substráty na bázi nanočástic stříbra či jejich agregátů [122–128]. Pro testování biologických materiálů je šťastnější volba zdroje excitačního záření právě v blízké infračervené oblasti spektra za účelem vyhnout se utopení Ramanova signálu ve fluorescenčním pozadí. Na toto poukazují i další práce, kde byly využity jako SERS substráty zlaté 80 nm částice [72,129,130]. Je tedy namístě, aby byly vyvíjeny různé substráty pro typické vlnové délky excitačního záření z uvedené oblasti. Praktické využití SERS metody při detekci vybraných patogenních mikroorganismů představuje rovněž práce autorů Pucek a kol. [131], kteří vyvinuli robustní metodu pro diskriminaci mezi Gram-pozitivními (*Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pyogenes*) a Gram-negativními bakteriemi (*Acinetobacter baumannii* a *Klebsiella pneumoniae*). Tato metoda detekce využívá 400 nm částice stříbra, vzniklé rekrystalizací nanočástic přidavkem vysoce koncentrovaných chloridových iontů.

Pokroky ve výzkumu SERS biosenzorů nabízejí nové možnosti pro rychlou detekci a identifikaci bakteriálních patogenů. Při aplikaci disperze nanočástic ušlechtilých kovů v lékařské praxi lze předpokládat nežádoucí působení nepříznivých vlivů biologické matrice na stabilitu nanočástic. Z tohoto důvodu je nutné zajistit jejich lepší agregátní stabilitu vhodnou modifikací povrchu a zároveň musí chemická modifikace umožnit následné zesílení SERS signálu. První pilotní studie, které se řadí na počátek zkoumání modifikace povrchu Au NPs ochrannou vrstvou oxidu křemičitého, byly publikovány skupinami Mine [132], Mulvaney [133], Doering [134], a Brown [135]. V těchto experimentech sice modifikace nanočástic zlepšila agregátní

stabilitu systému, nicméně takto navržený postup měl za následek relativně nízké intenzity SERS signálu. Na základě obecně uznávané teorie mechanismu zesílení Ramanova signálu se toto dalo očekávat, jelikož nejlepší SERS aktivity je dosaženo na nanočásticích ve stavu, kdy jsou mírně zagregovány, avšak těsně před jejich shluknutím do velkých SERS neaktivních útvarů. Systém zlatých nanočástic s ochrannou vrstvou oxidu křemičitého se podařilo výrazně vylepšit využitím velkých nanočástic zlata (cca 150 nm) a hlavně další modifikací povrchu specifickou protilátkou na protein A. Za pomoci takto modifikovaných nanočástic se podařila detekce i jednotlivých bakteriálních buněk *Staphylococcus aureus* [95].

V další studii se Khan a kol. [116] zaměřili na detekci bakterie *Salmonella Typhimurium* ve vodě, která je považována za celosvětově nejzákeřnější patogen způsobující infekci z potravin, a zároveň se tento typ bakterie nachází mimo spektrum působení mnoha antibiotik. V těchto experimentech byly využity hvězdicovité nanočástice zlata, které byly připraveny dvoustupňovým redukčním procesem [136]. První krok syntézy spočíval v přípravě 4,3 nm zárodečných částic redukcí roztoku trojmocného zlata tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti citrátu sodného plnicího funkci stabilizačního činidla. Druhý krok syntézy představoval následnou redukci dalších zlatitých iontů slabším redukčním činidlem (kyselinou askorbovou) za přítomnosti cetyltrimethylamonium bromidu, který plnil funkci modifikátoru růstu a podporoval tak tvorbu hvězdicovitých nanočástic zlata o velikosti 30 nm. Pro kovalentní imobilizaci monoklonální protilátky na O-antigen (antigen polysacharidové povahy ve stěně bakterií *Salmonella Typhimurium*) na výše zmíněné Au NPs bylo využito molekulární raménko glutaraldehydu. V těchto studiích bylo dosaženo limitu detekce 10 CFU/ml. Výše zmíněný typ nanostrukturovaných částic zlata, funkcionalizovaných anti-PSMA monoklonální protilátkou, je dle autorů rovněž možno využít při detekci prostatického specifického membránového antigenu (PSMA), který je využitelný pro časnou detekci karcinomu prostaty [136].

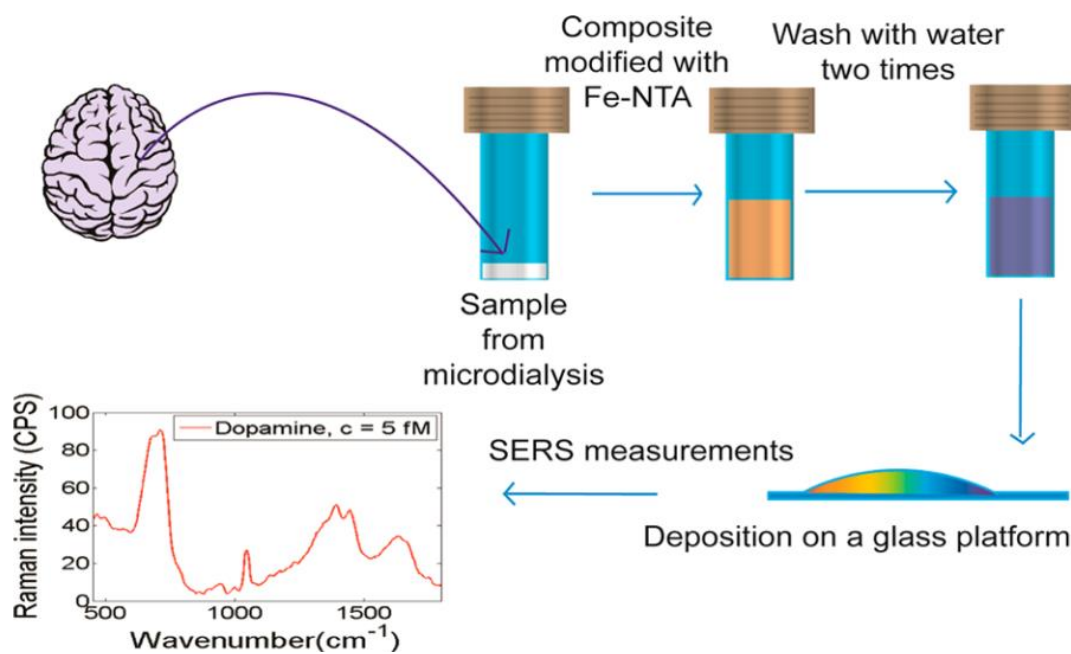
SERS technika byla dále využita při detekci bakterií ve vzorcích lidské krve. Sivanesan a kol. [137] se zabývali vývojem selektivní identifikace grampozitivních (*S. epidermidis*, *B. megaterium*) a gramnegativních (*E. coli*, *S. enterica*) bakteriálních patogenů v koncentracích 10^2 CFU/ml. V této studii byla využita elektrochemicky

zdrsněná stříbrná elektroda s deponovanou tenkou vrstvou nanočástic zlata a následně funkcionalizovanou antibiotikem (vankomycin či ceftazidim) za účelem zvýšit selektivitu a zachycení bakterií. Na základě svých studií zjistili, že intenzita SERS signálu s použitím biosenzoru s vankomycinem oproti nemodifikované Ag/Au bimetalické elektrodě je 8x vyšší pro *S. epidermidis* a *B. megaterium*, 4x vyšší pro *S. enterica* a 5x vyšší pro *E. coli*. Důvod vyšší intenzity SERS signálu pro *S. epidermidis* a *B. megaterium* autoři připisují tomu, že vankomycin se užívá k léčbě infekcí vyvolaných právě výše uvedenými grampozitivními bakteriemi.

Aplikační potenciál nanočástic kovů v klasické SERS technice při analýze biologických vzorků lze jednoznačně zvýšit využitím magnetických nanomateriálů za účelem cílené separace a zakoncentrování analytu působením vnějšího magnetického pole. Separaci a purifikaci cílených molekul pomocí magnetických částic ze složitých biologických vzorků lze realizovat prostřednictvím afinitních interakcí. Kovalentní imobilizace afinitního ligandu (streptavidin; monoklonální protilátka) na povrch magnetických částic je perspektivní možností, jak rychle a snadno izolovat proteiny (nebo jiné molekuly, které jsou předmětem zájmu) z komplexní matrice. Dále pak na základě nekovalentní interakce dvojice chemických komponent tzv. zámku (protilátky) a klíče (antigenu, resp. proteinu z určité bakterie) dochází k rozpoznávání cílových molekul s vysokou specificitou. Při použití magnetického separačního zařízení je takto navázaná molekula lehce izolována z analyzovaného vzorku (krev, kloubní punkáty, mozkomíšní mok, sliny, potraviny), čímž lze snížit nebezpečí jak falešně pozitivních výsledků, tak i snížení citlivosti detekční metody. V porovnání s klasickými biochemickými kultivačními metodami je práce s magnetickými částicemi bezpečná, rychlá, levná a jednoduchá.

Jak už tedy bylo napovězeno, novým výzkumným směrem posledních let, především v oblasti sensoriky, se stala tzv. magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS). Tento selektivní a vysoce specifický inovativní systém, založený na magnetickém kompozitu s nanočásticemi ušlechtilých kovů, byl úspěšně aplikován pro stanovení dopaminu ve vzorku mozkomíšního moku získaného z oblasti myšího mozku zvané corpus striatum (Obr. 13). Tento MA-SERS detekční systém využívá nanokompozit na bázi nanočástic Fe_3O_4 a stříbra, následně

modifikovaný kyselinou železo-nitrilotrioctovou (Fe-NTA), která je selektivní vůči dopaminu. Takto navržený detekční systém byl spolehlivě využit pro analýzu modelových vzorků s obsahem dopaminu v rozsahu koncentrací 10 - 5000 fmol/l [138].



Obr. 13: Schematické znázornění SERS analýzy dopaminu. Převzato z [138].

Obdobného principu magneticky asistované SERS selektivní detekce bylo využito i pro stanovení lidského imunoglobulinu G ze vzorku krve získaného z prstu ruky [139]. Pro izolaci cílené molekuly imunoglobulinu G byl využit opět nanokompozitní materiál obsahující nanočástice Fe₃O₄ a stříbra. Následně byl tento systém modifikován anti-imunoglobulinem G přes nekovalentní interakci s kovalentně navázaným streptavidinem na povrchu kompozitu a tímto byla zajištěna vysoká selektivita stanovení. V této práci bylo ukázáno, že lze detekovat koncentrace imunoglobulinu G od 600 fg/ml v kapce krve, což lze srovnat např. s hojně využívanou fluorescenční metodou [140]. Další možností je využití kompozitního systému magnetických částic s nanočásticemi zlata, na což se zaměřili Drake a kol. [141] v jejich studii zabývající se detekcí bakterie *Staphylococcus aureus*. Magnetické nanočástice oxidu železa byly použity k separaci a izolaci bakterie a SERS aktivní 50 nm nanočástice zlata modifikované kyselinou

4-merkaptobenzoovou byly využity pro následnou detekci a kvantifikaci bakteriálního patogenu. Oba typy nanočástic byly funkcionalizovány protilátkou, která se selektivně váže na protein A přítomný v buněčné stěně bakterie *Staphylococcus aureus*. Takto navrženým SERS biosenzorem dosáhli autoři detekčního limitu 1 buňky bakterie *S. aureus* v 1 ml vzorku.

Příkladem jiné aplikace SERS techniky může být tzv. sandwichová imunomagnetická separace bakteriálních patogenů. Cho a kol. [142] se zabývali detekcí bakterie *E. coli* vyskytující se ve výrobcích z mletého hovězího masa. Systém využívá sandwichového komplexu, který sestává z 30 nm magnetických nanočástic (Fe_3O_4) modifikovaných monoklonální protilátkou a 30 nm nanočástic zlata modifikovaných polyklonální protilátkou, jež jsou obě specifické na bakterii *E. coli*. Následnou membránovou filtrací a autometalografií, za účelem pokrýt povrch bakterií SERS aktivními nanočásticemi stříbra, bylo dosaženo detekčního limitu 10 CFU/ml v homogenátu mletého masa. Stejně tak na obdobném principu sandwichové imunomagnetické SERS detekce byl využit kompozitní systém magnetických nanočástic se sférickými nanočásticemi zlata a SERS aktivními tyčinkovitými nanočásticemi zlata pro detekci bakterie *E. coli* ve vodě. Tento kompozitní systém i tyčinkovité Au NPs byly modifikovány avidinem a následně funkcionalizovány biotinylovanou protilátkou selektivní na bakterii *E. coli*. S takto navrženým kompozitním sandwichovým systémem bylo dosaženo detekčního limitu 8 CFU/ml a hodnota meze stanovitelnosti byla 24 CFU/ml [108].

3.3 Další oblasti analytického využití nanočástic ušlechtilých kovů

Jak už bylo výše uvedeno, při interakci elektromagnetického záření s nanočásticemi kovů můžeme v důsledku kolektivních oscilací vodivostních elektronů pozorovat charakteristické absorpční maximum ve viditelné oblasti spektra, nazývané jako povrchová plasmonová resonance. Poloha a tvar tohoto maxima závisí na velikosti a tvaru nanočástic, na jejich stupni agregace, na dielektrických vlastnostech příslušného kovu a stejně tak i na okolí kovové částice [26,36]. Jako konkrétní příklad využití tohoto jevu v analýze lze uvést detekci lithných iontů ve vodném prostředí za pomoci

nanočástic zlata modifikovaných 1,10-fenantrolinem. Princip této detekce spočívá v navázání Li^+ na ligand za vzniku komplexu, který následně způsobí agregaci nanočástic zlata, což se projeví typickým posunem extinkčního maxima do dlouhovlnné oblasti spektra. Tento detekční systém byl spolehlivě využit v rozsahu koncentrací 10 – 100 mmol/l Li^+ [143]. Na stejném principu byly nanočástice zlata a stříbra modifikované manosou využity ke kolorimetrickému stanovení Concavalinu A. V této práci bylo dosaženo detekčního limitu 0.04 $\mu\text{mol/l}$ pro nanočástice zlata a 0,1 $\mu\text{mol/l}$ pro nanočástice stříbra [144]. Naproti tomu, Haes a kol. [145] možnost využití nanočástic jakožto biosenzorů ilustrovali na systému trojbokých nanočástic stříbra (100 nm širokých, 50 nm vysokých) funkcionalizovaných biotinem pro stanovení 100 nmol/l streptavidinu. Na základě pozorování extinkčních spekter došlo po úspěšné interakci mezi biotinem a streptavidinem k posunu povrchového plasmonu o 27 nm do červené oblasti spektra. Těchto principů bylo taktéž využito při konstrukci imunosensoru pro stanovení antibiotinu [146] či biomarkeru pro určení Alzheimerovy choroby [147].

Další možností analytického využití nanočástic ve formě luminiscenčních biosenzorů představují 2,5 nm nanočástice zlata modifikované oligonukleotidovým řetězcem zakončeným fluoroforem navržené pro cílenou detekci specifických DNA sekvencí. V důsledku interakce mezi DNA a značeným oligonukleotidovým řetězcem došlo ke změně konformace tohoto řetězce, což se následně projevilo změnou průběhu fluorescenčního signálu typického pro analyzovanou sekvenci DNA [148].

V oblasti elektrochemických metod nacházejí nanočástice zlata a stříbra aplikační potenciál v podobě vrstev nanosených na klasických elektrodách či mikroelektrodách. Shi a kol. [149] se zabývali vývojem citlivého, selektivního, ekonomicky výhodného senzorického pole na bázi nanočástic zlata, které umožňovalo detekci těkavých organických sloučenin. Kolektivem kolem španělského vědce Arbena Merkoçih byl vyvinut elektrochemický imunosensor na základě nanočástic zlata modifikovaných ferrocenem a následně funkcionalizovaných polyklonální protilátkou. Tento sensor byl využit ke stanovení lidského imunoglobulinu G v modelových vzorcích pomocí diferenční pulzní voltametrie s limitem detekce 0,87 ng/ml a mezí stanovitelnosti 2,9 ng/ml [150]. Tento imunosensor se navíc ukázal jako využitelný i pro přímé stanovení IgG v reálných vzorcích lidského krevního séra.

4. Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce byl výzkum zaměřený na přípravu, modifikaci a transformaci koloidních částic stříbra (včetně nanočástic) a jejich organizovaných souborů (vrstev na vhodných pevných substrátech) s ohledem na jejich využití v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii při analýze biologicky významných (signálních) molekul.

Při realizaci tohoto záměru byly naplánovány tyto cíle, které lze shrnout do následujících bodů:

- optimalizovat podmínky vývoje efektivního substrátu a vlastního měření povrchem zesílených Ramanových spekter na sestavě disperzní Ramanův mikroskop DXR Nicolet pro aplikace v bioanalytické oblasti
- studium závislosti velikosti povrchového zesílení Ramanova signálu na změně excitačních vlnových délek budícího záření a změně morfologie nanočástic stříbra
- vývoj a aplikace diagnostického nástroje pracujícího na principu magneticky asistované SERS detekce patogenních mikroorganismů (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) při rychlém stanovení bakteriální infekce kloubních náhrad
- využití aplikačního potenciálu alternativních SERS substrátů při detekci biologicky významných molekul

Kromě předložené disertační práce jsou výsledky obsahem čtyř publikací v mezinárodních impaktovaných časopisech. Všechny publikace jsou uvedeny v přehledu publikací v kapitole Přílohy na konci disertační práce.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemikálie

Na přípravu disperzí nanočástic stříbra i nanočásticových vrstev stříbra, které sloužily jako SERS-aktivní substrát, byly použity následující chemikálie: dusičnan stříbrný (AgNO_3 , p.a., Fagron), amoniak (NH_3 , vodný roztok 28% (v/v), p.a., Sigma), hydroxid sodný (NaOH , p.a., Lachema), D(+)-maltóza monohydrát ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, p.a., Sigma). Chlorid sodný (NaCl , p.a., Sigma-Aldrich) sloužil jako tzv. aktivační činidlo primárních nanočástic stříbra. Jako modelová látka pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byl použit adenin (Sigma-Aldrich, minimum 99%).

Na přípravu magnetického SERS biosenzoru pro včasnou detekci infekce kloubní náhrady byly použity následující chemikálie: magnetické mikročástice funkcionalizované karboxylovými skupinami (18-22 mg/ml, Sigma-Aldrich, katalogové číslo produktu 00239), N-hydroxysulfosukcinimid sodná sůl ($\geq 98\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (Sigma-Aldrich), streptavidin izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii* (lyofilizovaný prášek, ≥ 13 units/mg protein, Sigma-Aldrich), biotinylovaná myší monoklonální protilátka na protein A (Sigma-Aldrich), biotinylovaná králičí polyklonální protilátka na stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A (Abcam plc., Cambridge, UK), ethylamin (vodný roztok 70%, Sigma-Aldrich), fosfátový pufr pH 7,5 (Sigma-Aldrich).

Veškeré zde výše uvedené chemikálie byly použity bez dalšího čištění.

5.2 Přístrojové vybavení

Velikost a distribuce připravených částic stříbra ve vodné disperzi byly charakterizovány technikou pracující na principu dynamického rozptylu světla (DLS) – 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Zeta potenciál připravených magnetických částic byl měřen metodou elektroforetické mobility na přístroji Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). UV/Vis absorpční spektra nanočástic stříbra byla zaznamenávána spektrofotometrem Specord S 600 (Analytik Jena AG, Německo). Velikost a morfologie částic byla charakterizována pomocí elektronových mikroskopů jako je transmisní (TEM) na přístroji JEM 2010 (Jeol, Japonsko) s urychlovacím napětím 160 kV, skenovací (SEM) na přístroji Hitachi

SU6600 (Hitachi, Japonsko), a stejně tak pomocí transmisního elektronového mikroskopu s vysokým rozlišením (HRTEM) na přístroji FEI Titan G2 60 – 300 při urychlovacím napětí 80 kV s X-FEG zdrojem elektronů a s bodovým rozlišením v TEM režimu 0,08 nm. Současně je tento mikroskop vybaven Cs korektorem a detektorem STEM-HAADF. Pro prvkovou analýzu studovaného materiálu bylo využito STEM-energieově disperzní X-ray spektroskopie (EDS; Bruker SuperX) s dobou akvizice 20 min. Infračervená spektra byla naměřena na FT-IR spektrometru Nicolet iS5 (Thermo Scientific, U.S.A.) technikou zeslabeného úplného (vnitřního) odrazu (ATR) se ZnSe krystalem.

Vlastní záznam Ramanových a povrchem zesílených Ramanových spekter proběhl při laboratorní teplotě na disperzním Ramanově mikroskopu DXR Nicolet (Thermo Scientific, U.S.A.) vybaveným integrovaným optickým mikroskopem se sadou objektivů se zvětšením 4x, 10x a 50x a termoelektricky chlazeným CCD detektorem (-50 °C). K excitaci byly využity pevné látkové diodové lasery s vlnovou délkou 532 nm a 780 nm a He-Ne laser s excitační vlnovou délkou 633 nm. Strukturní analýza studovaného materiálu byla zajištěna pomocí rentgenové práškové difraktometrie (XRD, PANalytical X'Pert PRO) s kobaltovou rentgenkou $\text{CoK}\alpha$ (provozní režim 40 kV a 30 mA), vertikálním goniometrem a lineárně pozičním citlivým detektorem X'Celerator.

5.3 Příprava vodné disperze nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou, která spočívá v redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou. Postup přípravy byl následující: v litrové kádince byly smíchány předem připravené zásobní roztoky reakčních komponent o definovaných objemech a daných koncentracích v následujícím pořadí: 160 ml $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l AgNO_3 , 40 ml 0,1 mol/l NH_3 , 408 ml destilované vody. Zásadité prostředí reakčního systému pak bylo nastaveno na hodnotu pH $11,5 \pm 0,1$ přidávkem 32 ml 0,24 mol/l NaOH. K intenzivně míchané takto připravené směsi bylo přidáno 160 ml vodného roztoku maltózy o koncentraci 0,05 mol/l. Reakce byla přibližně po 4 minutách ukončena a takto vzniklá žlutohnědá koloidní disperze byla uchovávána v tmavé zásobní láhvi pro použití v následujících

experimentech bez jakýchkoliv dalších úprav. Reakce byla provedena v netemperovaném prostředí při laboratorní teplotě (20 °C). Tyto maltózou redukováné nanočástice stříbra jsou téměř monodisperzní s průměrnou velikostí částic okolo 28 nm. Takto připravené nanočástice stříbra byly charakterizovány UV/Vis absorpční spektroskopii s maximem absorpčního pásu při vlnové délce 410 nm. Připravená vodná disperze nanočástic stříbra vykazuje dlouhou stabilitu po dobu několika měsíců až let bez jakýchkoliv známek agregace a to i bez přidání stabilizujících činidel [74].

5.4 Aktivace nanočástic stříbra a jejich charakterizace

Pro vlastní použití nanočástic stříbra v SERS experimentech byla jejich vodná disperze aktivována přidáním roztoku chloridu sodného o různých výsledných koncentracích. Průběh změny parametrů aktivovaných stříbrných nanočástic chloridovými ionty byl sledován na základě měření průměrné velikosti částic metodou DLS a zaznamenáváním UV/Vis absorpčních spekter. V obou případech byl postup následující: 0,4 ml zásobního roztoku nanočástic stříbra bylo naředěno 1,20 ml – 1,55 ml destilované vody a následně přidáno 0,050 ml – 0,400 ml 1 mol/l nebo 4 mol/l vodného roztoku chloridu sodného tak, aby výsledný objem činil 2 ml. Okamžitě, po přidání chloridových iontů k vodné disperzi nanočástic stříbra, byla reakční směs řádně promíchána a během pár vteřin spuštěno měření. V případě měření průměrné velikosti aktivovaných částic metodou DLS byla po dobu 30 minut každou minutu změřena hodnota velikosti částic a zaznamenána. Při sledování kinetiky aktivace nanočástic stříbra pomocí UV/Vis spektroskopie probíhala analýza také po dobu 30 minut, kde každou 20. sekundu bylo zaznamenáno spektrum proti čisté destilované vodě v rozsahu vlnových délek 350 nm – 800 nm.

Jako přímá metoda pozorování průběhu změny velikosti a tvaru nanočástic stříbra po přidání chloridových iontů byla zvolena transmisní elektronová mikroskopie. V tomto případě byl ale vzorek odebrán pouze v čase 15 minut od přidání aktivčního činidla k disperzi nanočástic stříbra. Odebraný vzorek byl naředěn desetinásobným množstvím destilované vody za účelem pozastavení probíhající reakce a teprve pak nanesen na měděnou podložní síťku s napařenou uhlíkovou vrstvou.

5.5 Příprava magnetického SERS biosenzoru pro diagnostiku infekce kloubních náhrad

Na základě získaných výsledků, jež budou diskutovány v kapitole 6.1, byla k této studii použita disperze nanočástic připravených redukcí amoniakálního komplexu stříbra maltózou aktivovaná 1M NaCl (výsledná koncentrace 200 mmol/l), která byla přikápnuta k biofunkcionalizovaným magnetickým částicím těsně před samotnou SERS analýzou bakteriálních vzorků.

5.5.1 Imobilizace streptavidinu na magnetické nanočástice

K navázání biologicky aktivních molekul na povrch magnetických nanočástic s využitím specifických interakcí je nezbytná funkcionalizace jejich povrchu prostřednictvím vhodných funkčních skupin (např. COOH, NH₂, SH). Jelikož byly využity komerčně dostupné vhodně povrchově modifikované magnetické nanočástice s karboxylovými skupinami, odpadla při přípravě magnetického SERS biosenzoru nutnost tohoto prvního kroku funkcionalizace. Imobilizace streptavidinu (Strep) na povrch magnetických nanočástic s funkčními karboxylovými skupinami (MNP) probíhala následovně: bylo odebráno 0,5 ml ze zásobní disperze MNP (18-22 mg/ml) a pomocí vnějšího magnetu separovány z disperze a třikrát promyty destilovanou vodou. Funkční karboxylové skupiny na těchto magnetických nanočásticích byly nejprve aktivovány přidávkem 1 ml směsi 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) a N-hydroxysulfosukcinimid (NHS) (1:1, výsledná koncentrace obou reakčních složek byla 0,010 mmol·l⁻¹) k pevnému promytému podílu MNP a míchány na magnetické míchače po dobu 45 min. Poté byly MNP třikrát promyty fosfátovým pufrem o pH 7,5. V dalším kroku bylo k pevnému podílu MNP, který byl odseparován přiložením vnějšího magnetického pole, přidáno 5 ml roztoku streptavidinu o koncentraci 1 mg/l a necháno po dobu 2 hodin míchat za účelem vytvoření kovalentní vazby mezi volnými amino skupinami (-NH₂) přítomnými ve struktuře streptavidinu a aktivovanými karboxylovými skupinami na povrchu MNP. Poté byly opět magnetické nanočástice s navázaným streptavidinem (MNP@Strep) třikrát promyty fosfátovým pufrem, přičemž byly vymyty nenavázané molekuly streptavidinu.

5.5.2 Funkcionalizace povrchu magnetických nanočástic protilátkou

Imobilizace biotinylované myší monoklonální protilátky na protein A (anti-IgA), který je přítomný v buněčné stěně bakterie *Staphylococcus aureus*, či imobilizace biotinylované králičí polyklonální protilátky na stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A (anti-APS), která je přítomna u bakterie *Streptococcus pyogenes*, na povrch magnetických nanočástic se streptavidinem, byla prováděna následujícím postupem: k pevnému podílu magnetických nanočástic (18-22 mg/ml) modifikovaných streptavidinem byl přidán 1 ml buď protilátky anti-IgA, a nebo 1 ml protilátky anti-APS (výsledná koncentrace obou protilátek byla 10 mg/l) a následovala hodinová inkubace za účelem vytvoření nekovalentní interakce mezi streptavidinem a biotinylovanou částí protilátky. Po dostatečném promytí fosfátovým pufrům bylo nutné zablokovat zbytek volných aktivních karboxylových skupin přidáním 3,5% vodného roztoku ethylaminu. Takto připravený magnetický biosenzor (MNP@Strep@anti-IgA či MNP@Strep@anti-APS) byl stabilní po dobu zhruba dvou měsíců.

5.6 Příprava bakteriálních vzorků

5.6.1 Příprava modelových vzorků

Vývoj magnetického SERS biosenzoru pro včasnou detekci infekce kloubní náhrady byl prováděn na modelových vzorcích bakteriálních lyzátů *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* ve fyziologickém roztoku. K přípravě bakteriálního lyzátu byla použita dvacetičtyřhodinová kultura *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Streptococcus pyogenes* (vlastní bakteriální kmen č. SP12 z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého). Dobře izolované kolonie byly převedeny do 5 ml Mueller-Hintonova (HiMedia) bujónu, aby výsledný zákal odpovídal zákalovému standardu 1 podle McFarlanda (hustota buněk přibližně 3×10^8 CFU/ml). Bakteriální suspenze byla kultivována při 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byl bujón centrifugován (2000 otáček/10 minut), supernatant slit a k sedimentu bylo přidáno 10 ml destilované vody. Promíchaná suspenze byla střídavě zmrazována při teplotě -72 °C po dobu 10 minut a rozmrazována ve vodní lázni při teplotě 37 °C celkem desetkrát.

Tímto způsobem byly připraveny bakteriální lyzáty, které byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

5.6.2 Příprava biologických vzorků

Testování magnetického SERS biosenzoru pro včasnou detekci infekce kloubní náhrady bylo prováděno se sterilními kloubními výpotky získanými punkcí z kolene od pacientů trpících osteoartrózou. Sterilita punktátu byla vždy dopředu ověřena naočkováním na krevní agar (Trios, Ltd) a do Mueller-Hintonova (HiMedia) bujónu, což bylo prováděno na specializovaném pracovišti Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého pod vedením prof. MUDr. Milana Koláře, Ph.D. Z punktátu od každého pacienta byly dodány tři typy vzorků: punktát homogenizovaný 1:1 s živou bakteriální kulturou *Staphylococcus aureus*, dále punktát homogenizovaný 1:1 s živou bakteriální kulturou *Streptococcus pyogenes* a sterilní kloubní punktát (dále pak označováno jako SJF z angl. *sterile joint fluid*), který sloužil jako negativní kontrola pro SERS experimenty.

Odběr a zpracování kloubního punktátu bylo prováděno s povolením etické komise Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci v souladu s českou legislativou. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před zařazením do studie.

5.7 Příprava vzorků pro experimenty povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie

5.7.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách

V rámci první fáze této disertační práce byl proveden výzkum zaměřený na studium vlivu aktivace vodné disperze nanočástic stříbra chloridovými ionty a nalezení optimálního postupu, kterým lze dosáhnout největšího zesílení Ramanova signálu. Pro

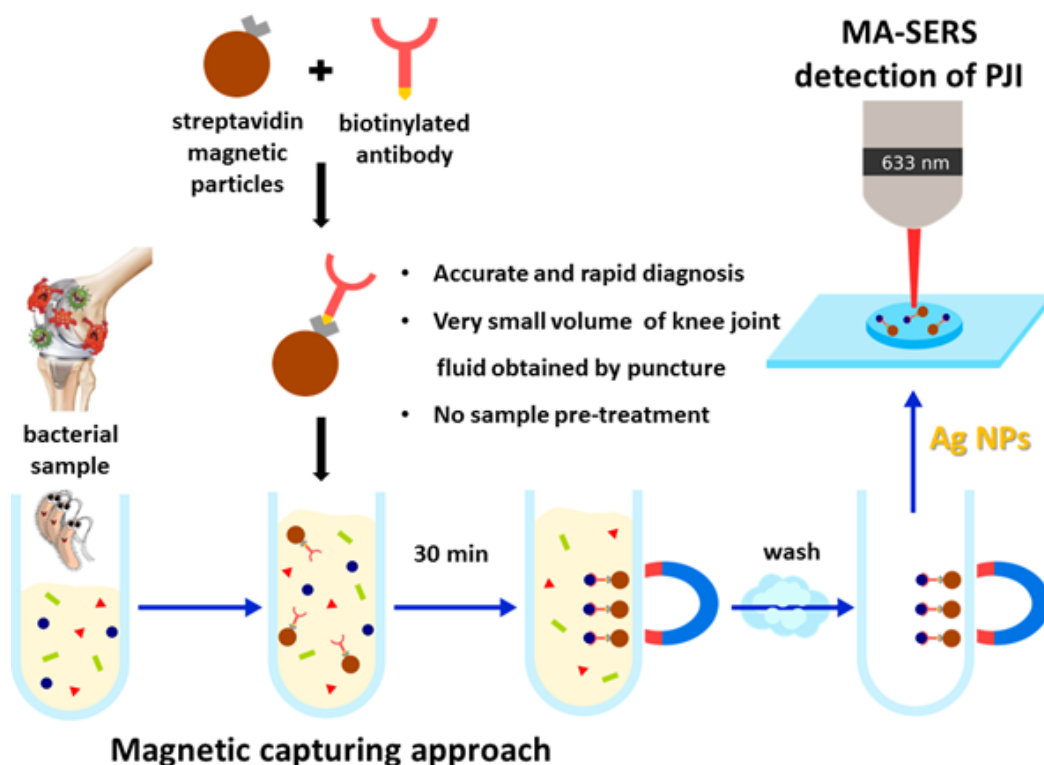
tyto SERS experimenty byla připravena řada disperzí nanočástic stříbra s lišící se výslednou koncentrací chloridu sodného, jakožto aktivačního činidla, které byly připraveny následovně: 0,4 ml zásobního roztoku nanočástic stříbra bylo naředěno 1,18 ml – 1,53 ml destilované vody a následně přidáno 0,050 ml – 0,400 ml 1 mol/l nebo 4 mol/l vodného roztoku chloridu sodného. Nakonec bylo k takto upraveným nanočásticím stříbra přidáno 20 μ l 0,001 mol/l adeninu (výsledná koncentrace adeninu pak byla $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tak, aby výsledný objem činil 2 ml, a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Pro měření závislosti SERS zesílení na vlnové délce excitačního zdroje pro různé morfologie nanočástic byla jako modelová látka zvolen adenin a to z jednoho prostého důvodu. Adenin, jakožto purinová báze, má velmi efektivní Ramanův rozptyl a zároveň se dobře adsorbuje na povrch stříbrných nanočástic. Tento výše uvedený pracovní postup byl stejný pro všechny tři použité excitační vlnové délky. Určení faktorů zesílení signálu Ramanova rozptylu pro jednotlivé systémy pak bylo vypočteno z poměru intenzit SERS signálu $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l adeninu k standardnímu Ramanovu signálu 0,1 mol/l adeninu pro intenzivní pás při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$.

5.7.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS

Bakteriální lyzáty a živé bakteriální kultury (*Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*) byly připraveny výše popsaným postupem (5.6). MA-SERS analýza reálné matrice kloubního punktátu inokulovaného živými bakteriálními buňkami probíhala po jejím desetinásobném naředění deionizovanou vodou z důvodu změny viskozity vzorku. Vzorky, ať už bakteriálních lyzátů či kloubních punktátů s živými bakteriálními kulturami, byly připraveny pro MA-SERS analýzu následujícím postupem: v mikrozkuhavce typu eppendorf bylo smícháno 10 μ l MNP@Strep nanočástic konjugovaných biotinylovanou protilátkou buď na protein A nebo na streptokokovou stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A s 10 μ l analyzovaného bakteriálního vzorku a ponecháno inkubovat po dobu 30 minut. Tato reakční směs pak byla převedena na podložní sklíčko, kde působením vnějšího magnetického pole došlo k odseparování alikvótního množství magnetického komplexu od zbytků matrice vzorku. Dále pak bylo k tomuto oddělenému množství pevného magnetického podílu přikápnuto 8 μ l vodné disperze Ag NPs ($\sim 28 \text{ nm}$), která byla následně aktivována

přídavkem 2 μl 1 mol/l vodného roztoku NaCl. Po promíchání ve špičce automatické pipety byla, po přiložení vnějšího magnetického pole k podložnímu sklíčku, vytvořena na okraji kapky sraženina magnetického biosensory, která byla analyzována SERS technikou bezprostředně před vysušením. Schematické přiblížení výše popsaného postupu SERS detekce je na Obr. 14.

Měření a zpracování vibračních spekter bylo provedeno pomocí softwaru OMNIC 8.2.0.403 (Thermo Fisher Scientific Inc.). K vyhodnocení experimentálních dat a vibračních spekter byly použity následující programy: QtiPlot 0.9.8.3 a Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení experimentálních dat a jejich grafické znázornění v podobě diskriminační analýzy pak bylo provedeno pomocí softwaru TQ Analyst 8.4.257 (Thermo Fisher Scientific).



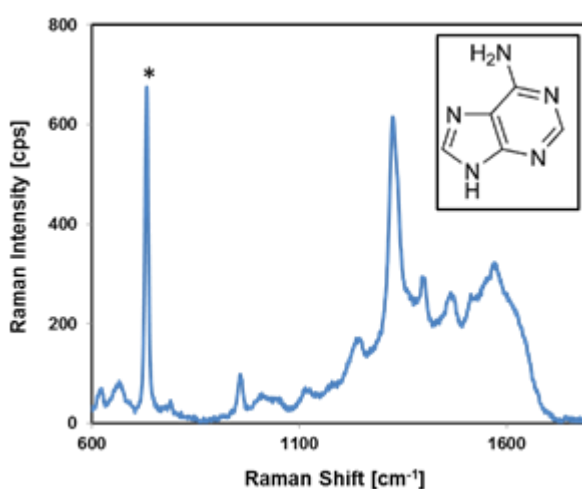
Obr. 14: Schematické znázornění MA-SERS detekce bakteriálních patogenů. Ilustrace autora [151].

6. Výsledky a diskuze

6.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách

V naší předešlé studii [74] bylo dokázáno, že vysoká koncentrace vodného roztoku NaCl (výsledná koncentrace 400 mmol/l) je velmi účinná pro SERS aktivaci maltózových nanočástic stříbra (~28 nm). Tato vysoká koncentrace chloridových iontů vedla k rychlé rekrystalizaci primárních nanočástic stříbra na částice s průměrnou velikostí okolo 400 nm, které byly velmi efektivní pro zesílení Ramanova signálu adeninu při použití excitačních laserů s vlnovými délkami jak ve viditelné (488 nm), tak blízké infračervené (1064 nm) oblasti spektra. Tato základní studie byla prohloubena dalším originálním výzkumem zaměřeným na hlubší pochopení role Ag NPs při zesílení Ramanova signálu po aktivaci chloridovými ionty. Nová studie se tak zabývá účinkem různě koncentrovaných chloridových iontů jak na fyzikální parametry částic stříbra, tak i na zesílení Ramanova signálu těmito částicemi. K těmto experimentům posloužily nanočástice stříbra (~28 nm) připravené redukcí Ag^+ v amoniakálním prostředí maltózou o koncentraci 0,05 mol/l. Pro vlastní použití v SERS experimentech byla jejich vodná disperze, před přidáním roztoku adeninu o výsledné koncentraci 10^{-5} mol/l, aktivována (agregována) přidavkem roztoku chloridu sodného. Experimenty byly prováděny s řadou šesti různých výsledných koncentrací chloridových iontů (25, 50, 100, 200, 400, 800 mmol/l) ve vodné disperzi nanočástic stříbra a se třemi rozdílnými excitačními lasery (532 nm, 633 nm, 780 nm). Proces aktivace nanočástic stříbra vodným roztokem chloridu sodného byl sledován na základě měření průměrné velikosti částic metodou DLS a zaznamenávání absorpčních UV/Vis spekter. Změna průměrné velikosti částic stříbra měřená pomocí DLS, a stejně tak UV/Vis spektra, byla zaznamenávána v minutových intervalech po dobu 30 minut za účelem sledovat probíhající proces transformace primárních nanočástic stříbra. Dále pak částice stříbra byly blíže charakterizovány transmisí elektronovou mikroskopií, kdy se v čase 15 minut od přidavku roztoku NaCl odebraly vzorky pro TEM. V případě SERS měření

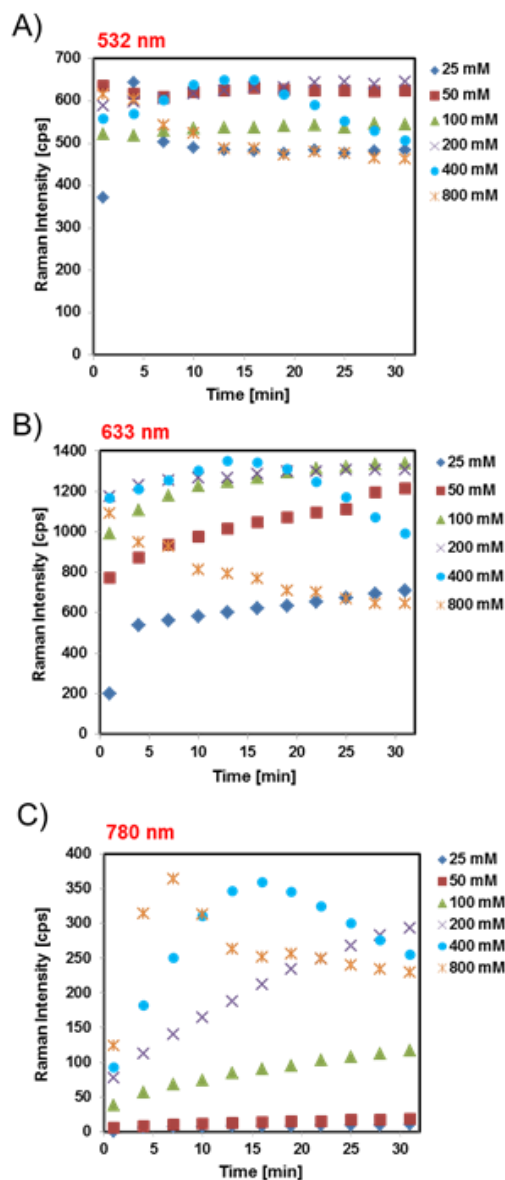
byla spektra zaznamenávána v třiminutovém intervalu po dobu 30 minut od přidavku roztoku NaCl. Spektrem adeninu dominuje vibrace dýchacího kruhu, proto se v dalších odstavcích pro zjednodušení porovnání a zhodnocení intenzity SERS signálu zaměříme pouze na tento typický pás ležící při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$. Intenzity dalších molekulových vibrací adeninu se měnily úměrně k intenzitě tohoto hlavního pásu $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$. Na obrázku 15 si můžeme všimnout, že tento pás (označený hvězdičkou) je nejintenzivnější z celého SERS spektra a pochází od vibrace dýchacího řetězce ve struktuře adeninu (vložený obrázek v Obr. 15).



Obr. 15: SERS spektrum adeninu a strukturní vzorec jeho molekuly. Převzato z [152].

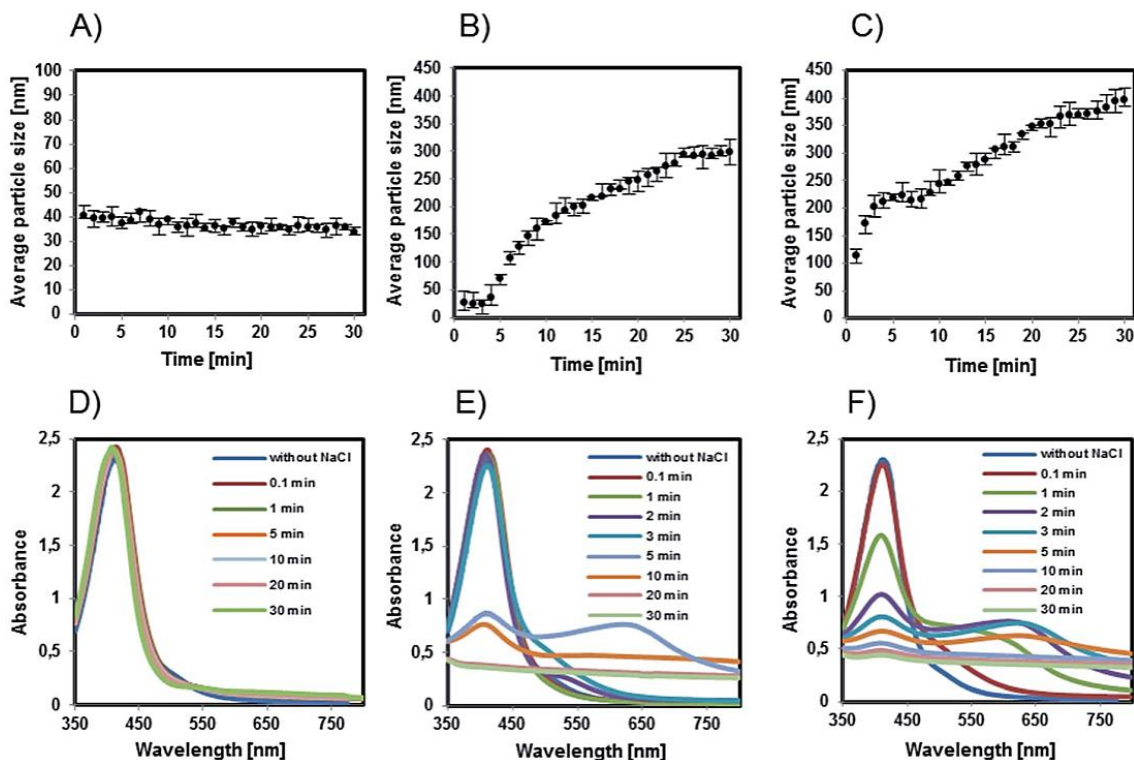
SERS měření byla prováděna s excitačními vlnovými délkami 532 nm, 633 nm a 780 nm. Profil časových závislostí intenzit SERS signálu vibrace dýchacího kruhu adeninu při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$ po přidavku chloridových iontů je znázorněna na obrázku 16. Pro excitační vlnovou délku 532 nm byly pozorovány pouze malé změny v intenzitách SERS signálu mezi jednotlivými systémy s lišícími se koncentracemi chloridových iontů (Obr. 16A). Srovnáme-li účinek všech použitých výsledných koncentrací NaCl, lze pozorovat zhruba 20% rozdíly v intenzitách pásu adeninu při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$. V případě excitace při 633 nm, zde můžeme pozorovat značné rozdíly v intenzitách SERS signálu adeninu mezi jednotlivými koncentracemi NaCl (Obr. 16B). Nejvyššího zesílení Ramanova signálu bylo dosaženo s disperzí nanočástic stříbra aktivovaných roztokem

NaCl o výsledné koncentraci 400 mmol/l. Naopak, hodnoty intenzit SERS signálu získané pro laser 780 nm byly značně nižší oproti excitaci s vlnovou délkou 532 nm a 633 nm (Obr. 16C). Porovnáním intenzit SERS signálu z těchto měření a standardního Ramanova signálu roztoku adeninu o koncentraci 0,1 mol/l pak vychází celkové faktory zesílení Ramanova signálu přibližně $7,2 \times 10^4$ pro laser 532 nm, $2,0 \times 10^5$ pro laser 633 nm, a $2,4 \times 10^5$ pro laser 780 nm.



Obr. 16: Profil časových závislostí intenzit SERS signálu vibrace dýchacího kruhu adeninu při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$ po přidavku chloridových iontů při excitačních vlnových délkách 532 nm (A), 633 nm (B) a 780 nm (C). Legenda popisuje výsledné koncentrace roztoku NaCl ve vodné disperzi částic stříbra. Převzato z [152].

Z vynesných závislostí na obrázku 16 je evidentní, že intenzity SERS signálu, v případě použití excitačního laseru 532 nm, téměř nezávisí na koncentraci chloridových iontů použitých k aktivaci. U excitačního laseru s vlnovou délkou 633 nm jsou již zřetelné odlišnosti, které jsou pak nejvýraznější u laseru 780 nm, kde nejnižší koncentrace NaCl použité k aktivaci poskytují jen velmi malé zesílení Ramanova signálu adeninu. Možné vysvětlení poměrně vysokých intenzit SERS signálu pro lasery 532 nm a 633 nm dosažených s využitím aktivace pomocí roztoku NaCl o nejnižší výsledné koncentraci 25 mmol/l leží v existenci tzv. „hot spot“ míst [153]. Taková koncentrace chloridových iontů může vyvolat dočasné přiblížení částic stříbra v roztoku na určitou velmi malou vzdálenost, která je zcela klíčovou záležitostí pro vytvoření aktivních míst podstatných pro zesílení Ramanova signálu. Naopak, při excitaci s vlnovou délkou 780 nm jsme u takto nízké koncentrace chloridových iontů nepozorovali žádný nárůst intenzity SERS signálu. Tento přírůstek chloridových iontů nevyvolal dostatečný vliv na transformaci Ag NPs, čímž pádem povrchový plasmon těchto nanočástic byl mimo rezonanci s excitační vlnovou délkou při 780 nm. Jak už bylo výše zmíněno, v těchto experimentech se vycházelo z nanočástic o průměrné velikosti 28 nm. Z obrázku 17A je patrné, že ihned po přidavku roztoku NaCl o výsledné koncentraci 25 mmol/l došlo ke změně průměrné velikosti částic z počáteční hodnoty 28 nm na 40 nm. S dalším narůstajícím časem pak průměrná velikost částic postupně klesala. Toto pozorování lze vysvětlit tak, že došlo k dočasnému přiblížení dvou či více Ag NPs, které mělo vliv na mírný nárůst průměrné velikosti částic zaznamenávané v minutových intervalech metodou DLS. Nicméně na základě pozorování UV/Vis spekter a TEM snímků lze usuzovat, že takto nízká koncentrace NaCl neměla vliv na parametry nanočástic. Z UV/Vis spekter (Obr. 17D) zaznamenaných po přidavku NaCl o koncentraci 25 mmol/l lze usuzovat, že nedochází ke změně pozice absorpčního maxima během celého procesu měření, jelikož změna průměrné velikosti částic byla jen velmi nepatrná. Nicméně slabý nárůst absorpce při vyšších vlnových délkách byl přeci jen pozorován. Tyto výsledky byly následně podpořeny TEM analýzou téhož systému, ze kterého byl odebrán vzorek v 15. minutě od přidavku NaCl k disperzi Ag NPs (Obr. 19A).

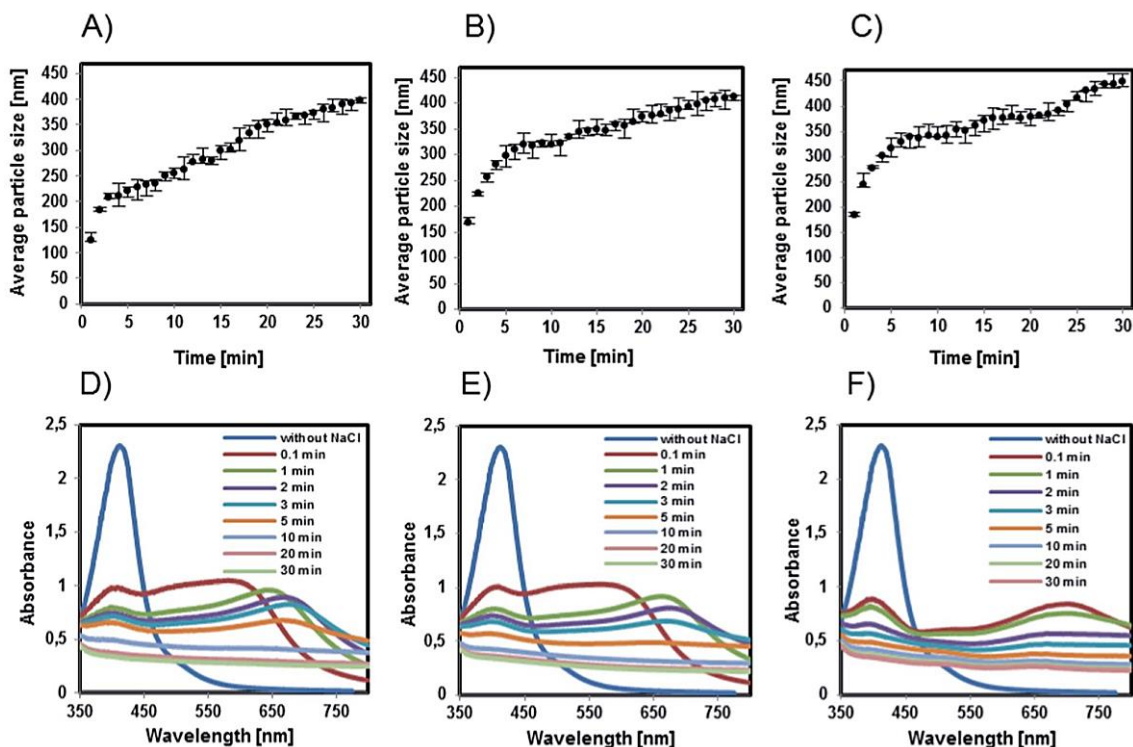


Obr. 17: Graf závislosti velikosti částic stříbra A) – C) a jejich příslušných UV/Vis spekter D) – F) na čase od přidavku chloridových iontů do systému o výsledné koncentraci 25 mmol/l, 50 mmol/l a 100 mmol/l. Chybové úsečky představují rozmezí hodnot (nejmenší a nejvyšší), které byly získány během třech nezávislých měření. Legenda popisuje uplynulý čas od přidavku chloridových iontů. Převzato z [152].

Poněkud odlišná závislost byla získána při aktivaci vodné disperze Ag NPs chloridovými ionty o výsledné koncentraci 50 mmol/l, kde byly pozorovány od samého začátku vyšší hodnoty intenzit SERS signálu při excitační vlnové délce 532 nm, které byly stabilní během celého třicetiminutového experimentu (Obr. 16A). V případě excitačního laseru 633 nm došlo ke značnému nárůstu intenzit SERS zesílení během prvních pár minut po přidavku NaCl k disperzi nanočástic stříbra (Obr. 16B). S dalším narůstajícím časem, respektive narůstající průměrnou velikostí částic, se pak úměrně měnila i intenzita SERS signálu. To však neplatí pro systém s excitační vlnovou délkou při 780 nm, u něhož byl zaznamenán pouze nepatrný nárůst intenzit SERS signálu (Obr. 16C). Tento jev může být vysvětlen na základě značných změn velikosti částic

zapříčiněných přidávkem 50 mmol/l chloridových iontů k Ag NPs (Obr. 17B). Po třetí minutě od přidavku NaCl byl pozorován obrovský nárůst velikosti částic. Tento nárůst byl patrný až do 25. minuty aktivačního procesu, kde průměrná velikost částic vzrostla až k 300 nm. Tyto změny byly současně potvrzeny i pořízeným TEM snímkem (Obr. 19B), který odhalil přítomnost větších částic. Navíc, celý tento proces aktivace primárních částic stříbra byl doprovázen výraznou změnou zabarvení reakčního systému z hnědé na šedou. Tyto změny indikující vznik větších částic byly následně potvrzeny UV/Vis spektry, jak je vidět na obrázku 17E. Povrchový plasmon původních Ag NPs s maximem absorbance při 410 nm je typický pro primární částice o velikostech okolo 28 nm bez přidaného roztoku NaCl. Po třetí minutě od přidavku chloridových iontů k vodné disperzi nanočástic stříbra byl zaznamenán pokles tohoto maxima a zároveň v ten samý okamžik se objevil druhý pík s plasmonovým maximem v oblasti 640 nm. Tyto poznatky potvrdily, že takto upravené Ag NPs jsou při excitaci 532 nm a 633 nm v rezonanci s povrchovým plasmonem. Naopak při excitaci 780 nm je efekt povrchového zesílení téměř nulový, z důvodu slabého účinku této koncentrace NaCl na změnu vlastností (změnu ve tvaru nanočástic či agregační stav) původních Ag NPs.

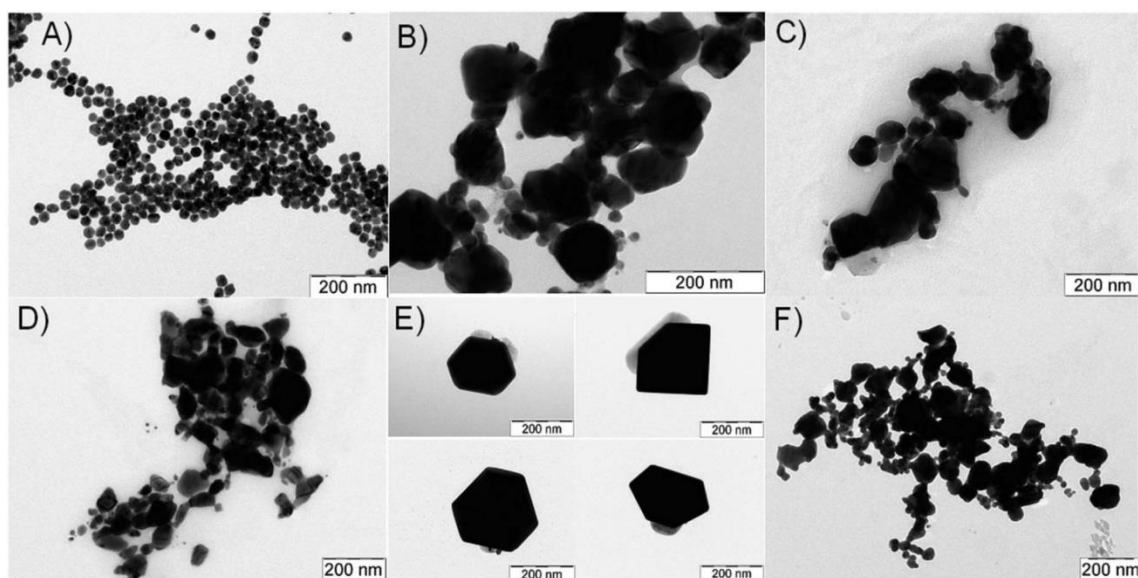
Při excitaci s vlnovou délkou 780 nm není tento typ laseru v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii příliš rozšířen, jelikož se k tomuto účelu používají především SERS substráty na bázi koloidního stříbra mající maximum absorbance povrchového plasmonu nižší, než výše zmíněná excitační vlnová délka 780 nm. Je všeobecně známo, že vlnová délka povrchového plasmonu se posouvá do dlouhovlnné oblasti spektra s rostoucí velikostí kovových částic. Dá se tedy očekávat, že poloha tohoto maxima bude v rezonanci s vlnovou délkou budícího laserového záření a bude tak dosaženo nejlepšího zesílení Ramanova signálu. Běžně používané nízké koncentrace chloridových iontů (v jednotkách mmol/l) nejsou zdaleka tak účinné ke změnám parametrů Ag NPs, aby došlo k zesílení Ramanova signálu s použitím budícího záření delších vlnových délek. Nicméně jak jsme pozorovali v předešlé naší studii, přidávek vysoce koncentrovaného roztoku NaCl (stovky mmol/l) k maltóзовé disperzi nanočástic stříbra zajistil reprodukovatelný SERS-aktivní povrch s efektivním zesílením Ramanova signálu adeninu jak ve viditelné (488 nm), tak blízké infračervené (1064 nm) oblasti spektra [74].



Obr. 18: Graf závislosti velikosti částic stříbra A) – C) a jejich příslušných UV/Vis spekter D) – F) na čase od přidavku chloridových iontů do systému o výsledné koncentraci 200 mmol/l, 400 mmol/l a 800 mmol/l. Chybové úsečky představují rozmezí hodnot (nejmenší a nejvyšší), které byly získány během třech nezávislých měření. Legenda popisuje uplynulý čas od přidavku chloridových iontů. Převzato z [152].

Při zvýšení výsledné koncentrace roztoku NaCl na 100 mmol/l a 200 mmol/l jsme pozorovali pro obě koncentrace podobnou závislost změn vlastností Ag NPs na přidavku NaCl do systému, s výjimkou vyšších intenzit Ramanova signálu pro 200 mmol/l NaCl. Co se týče budícího záření s excitační vlnovou délkou při 532 nm, zde byly hodnoty intenzit SERS signálu pro obě koncentrace po celou dobu analýzy stabilní (Obr. 16A). U obou koncentrací NaCl nebyly pozorovány žádné významné změny v intenzitách SERS signálu po dobu měření s excitační vlnovou délkou 633 nm (Obr. 16B); při aktivaci 200 mmol/l NaCl bylo dosaženo stabilních hodnot zesíleného Ramanova signálu během celé sledované doby, v případě 100 mmol/l NaCl intenzita signálu mírně narůstala. Naopak pro laser 780 nm, v případě 100 mmol/l NaCl hodnota intenzit SERS signálu vzrostla dvojnásobně, v případě 200 mmol/l NaCl čtyřnásobně

(Obr. 16C). Sledováním korelace mezi DLS hodnotami, UV/Vis spektry a změnou morfologie Ag NPs pozorovanou v TEM snímcích (Obr. 19C a D) lze usuzovat, že tyto chloridové koncentrace vyvolaly změny v rozměrech částic za současného vzniku jak malých, tak větších částic stříbra v důsledku rozpouštění původních Ag NPs a jejich následnou rekrystalizaci v přítomnosti obou takto koncentrovaných chloridových iontů. Průměrná velikost těchto částic u obou systémů vzrostla z desítek nanometrů na stovky nanometrů (Obr. 17C a 18A). Většina změn se projevila během prvních pár minut od přidavku chloridových iontů. U obou systémů došlo během 30 minut k potlačení extinkčního maxima při 410 nm a zároveň byla patrná zvýšená absorpance v oblasti 650 nm odpovídající právě buď agregátům, či zvětšeným rozměrům částic (Obr. 17F a 18D). Na základě těchto poznatků lze usuzovat, že docházelo k postupným změnám v průměrné velikosti Ag NPs [74] či jejich morfologie [154]. Jakmile vzrostla průměrná velikost částic, jejich povrchový plasmon byl v rezonanci s použitými excitačními vlnovými délkami, a tím pádem se dalo očekávat vyšších intenzit zesíleného Ramanova signálu. Všechny tyto charakteristické změny byly doprovázeny i výraznou změnou zabarvení reakčního systému z hnědé na šedou.



Obr. 19: TEM snímky částic stříbra po 15 minutách od přidavku chloridových iontů do systému o výsledné koncentraci 25 mmol/l (A), 50 mmol/l (B), 100 mmol/l (C), 200 mmol/l (D), 400 mmol/l (E) a 800 mmol/l (F). Převzato z [152].

Povrch nanočástic byl dále aktivován účinkem 400 mmol/l NaCl, které měly vliv na největší zesílení Ramanova signálu pro všechny tři použité excitační vlnové délky napříč všemi koncentracemi aktivačního činidla. Po 3 minutách od přidavku NaCl k Ag NPs vzrostla průměrná velikost částic až k 400 nm. Během 15 minut od přidavku 400 mmol/l NaCl k disperzi Ag NPs došlo k postupnému navýšení intenzit SERS signálu (Obr. 16A – C). Toto lze přisuzovat k nárůstu velikosti částic Ag způsobené přítomností vysoce koncentrovaných chloridových iontů, kde jsme pozorovali Ag částice o velmi dobře definovaných tvarech, odebraných ze systému pro TEM analýzu v 15. minutě od přidavku NaCl (Obr. 19E). Po výše zmíněném čase došlo k poklesu SERS signálu modelového analytu, což je pravděpodobně spojeno se snížením dostupného povrchu Ag částic nezbytného pro naadsorbování molekul adeninu, z důvodu agregace Ag NPs, jak je dokumentováno na Obr. 18B [155]. Nárůst průměrné velikosti částic s časem, a stejně tak značný posun UV/Vis extinkčního maxima do červené oblasti spektra (Obr. 18E), umožňuje sledovat kinetiku přeměny částic, která byla taktéž doprovázena výraznou změnou zabarvení reakčního systému z hnědé na šedou.

Na závěr si všimněme, co se děje se SERS signálem adeninu při aktivaci povrchu nanočástic stříbra 800 mmol/l NaCl. Poněkud odlišná závislost byla získána pro excitační vlnové délky 532 nm a 633 nm, kde byly pozorovány klesající intenzity SERS signálu adeninu ihned po přidavku NaCl k vodné disperzi Ag NPs (Obr. 16A a B). Jedno z možných vysvětlení, proč došlo ke snížení intenzit pozorovaného SERS signálu tkví především v konkurenčním boji mezi chloridovými ionty a molekulami adeninu o povrch Ag NPs [156]. Na základě výsledků je vidět, že již v 7. minutě od přidavku roztoku NaCl k Ag NPs pozorujeme maximální intenzitu SERS signálu adeninu v případě excitační vlnové délky při 780 nm. Jeho signál však následně významně klesal (Obr. 16C). I v tomto případě byla prováděna DLS měření, která odhalila značný růst průměrné velikosti částic až na 450 nm (Obr. 18C), což bylo v souladu s příslušnými UV/Vis spektry, kde v první minutě experimentu došlo k poklesu a rozšíření maxima při 410 nm a zároveň k nárůstu absorpance při 700 nm (Obr. 18F). Následná agregace částic vedla k destabilizaci vodné disperze, což se projevilo úplným potlačením obou UV/Vis maxim. Současný pokles a posun UV/Vis maxim do červené oblasti spektra

bylo výraznější, než u předešlých nižších koncentrací NaCl, což nám potvrdil i TEM snímek těchto modifikovaných částic (Obr. 19F). Z důvodu přerůstání Ag NPs a agregačního mechanismu aktivačního procesu takového rozsahu, jsme se dostali mimo rezonanci excitačních vlnových délek, a v důsledku toho jsme opět pozorovali změnu zbarvení reakčního systému z hnědé na šedou. Z důvodu velmi silné agregátní a sedimentační nestability pokleslo množství SERS-aktivních Ag NPs ve vodné disperzi, kde podle předpokladu docházelo s rostoucím časem ke snížení intenzit Ramanských signálů.

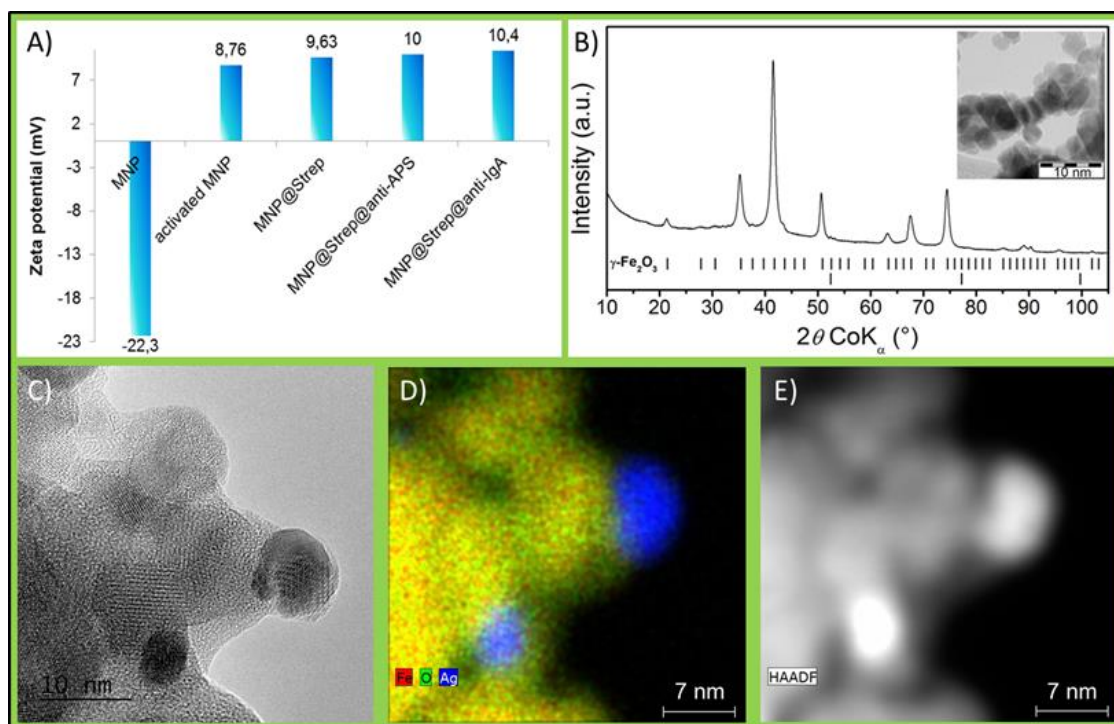
Výsledky z této kapitoly byly v roce 2015 publikovány v časopise *RSC Advances* a autorka disertační práce je první ze šesti autorů tohoto původního článku, který lze nalézt v příloze této práce.

6.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS

Předmětem studia v této práci byla včasná detekce a identifikace bakteriálních patogenů *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* přítomných ve vzorcích kloubního výpotku získaných punkcí kolene. Přítomnost kovalentně navázaného streptavidinu na povrchu magnetických částic, který vykazuje vysokou afinitu pro biotin, umožňuje jejich následnou selektivitu prostřednictvím jednoduché funkcionalizace povrchu pomocí biotinylované protilátky. K těmto experimentům byly využity dvě protilátky: protilátka na protein A [157] se používá k dosažení selektivity pro bakterii *Staphylococcus aureus*, a protilátka na streptokokovou stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A [158], které se využívá k selektivní detekci bakterie *Streptococcus pyogenes*.

Charakterizace materiálu po jednotlivých krocích chemické modifikace povrchu magnetických částic, tj. po aktivaci funkčních skupin a vzniku nových vazeb, byla provedena na základě měření jejich elektrokinetického (zeta; ζ) potenciálu. ζ -potenciály naměřené po každé povrchové úpravě jsou uvedeny v grafu na obrázku 20A. Naměřená hodnota ζ -potenciálu primárních magnetických nanočástic s volnými karboxylovými skupinami (MNP) odpovídala hodnotě -22,3 mV. Tento relativně vysoký záporný povrchový náboj je přičítán přítomnosti početných volných karboxylových skupin.

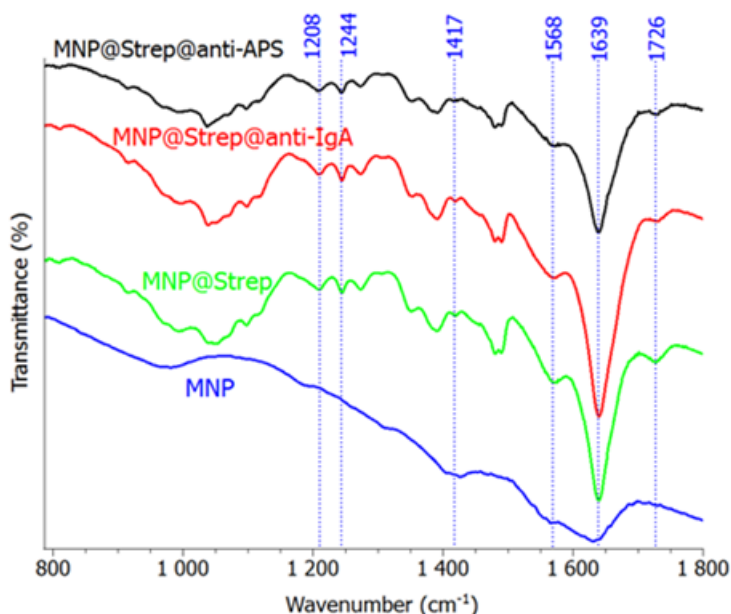
Výchozí MNP byly charakterizovány metodou RTG práškové difrakce (Obr. 20B) na rentgenovém práškovém difraktometru. Pořízený XRD záznam spektra studovaného výchozího materiálu MNP dokazuje přítomnost pouze krystalické fáze bez dalších difrakcí nebo významného podílu amorfni fáze. Analýzou difrakčního záznamu jsme zjistili hodnotu mřížkové konstanty a rovnou 0,8360 nm, kde pozorujeme mírně nestechiometrickou fázi maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), která vykazuje kubickou strukturu s částečně uspořádanými vakancemi s prostorovou grupou P4332. Rietveldova analýza difrakčních podílů naznačila, že částice maghemitu dosahují velikosti 13 nm. Závěry učiněné na základě difrakčních dat byly podpořeny i TEM snímkem výchozích MNP (vložený obrázek do Obr. 20B). Tyto výchozí magnetické nanočástice byly vybrány z důvodu přítomnosti volných karboxylových skupin na povrchu, které brání aglomeraci nanočástic a zvyšují tak jejich disperzibilitu ve vodném prostředí. Následná aktivace volných karboxylových skupin za použití vodné směsi činidel EDC a NHS byla doprovázena výrazným zvýšením ζ -potenciálu materiálu až na hodnotu 8,8 mV, což odráží úspěšnou aktivaci karboxylových funkčních skupin na povrchu MNP na reaktivní estery N-hydroxysukcinimidu. Dalším krokem byla kovalentní imobilizace streptavidinu na povrch magnetických nanočástic prostřednictvím reakce jeho koncové aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) s aktivovanými karboxylovými skupinami na povrchu MNP. Vznik kovalentní vazby se projevil zvýšením ζ -potenciálu až na hodnotu 9,6 mV. Další krok syntézy spočíval v navázání biotinylované protilátky na streptavidin. Vznik nekovalentní vazby v komplexu streptavidin-biotin a konečné zablokování zbylých aktivovaných karboxylových skupin způsobilo malé navýšení povrchového náboje na hodnotu 10 mV, která je typická pro nanočástice nesoucí protilátku anti-APS, a stejně tak na hodnotu 10,4 mV, která byla zaznamenána v případě funkcionalizace povrchu MNP anti-IgA protilátkou. Morfologie biosenzoru byla charakterizována pomocí HRTEM, STEM-EDS a STEM-HAADF zobrazovacích technik. Při použití HRTEM analýzy MNP@Strep/Ag částic (Obr. 20C) je zřejmé, že celkový průměr, jak magnetických, tak stříbrných nanočástic se pohybuje v rozmezí 10-20 nm. Kromě toho, chemické mapování STEM-EDS (Obr. 20D) biosenzoru jasně poukazuje na přítomnost prvků jak Fe, tak Ag. Jak je znázorněno na obrázku 20E, nanočástice stříbra jsou distribuovány na povrchu maghemitu; toto je dále potvrzeno přítomností částic s různým kontrastem ve snímku STEM-HAADF (Obr. 20E).



Obr. 20: Komplexní materiálová charakterizace MA-SERS nanočástic: (A) Naměřené ζ -potenciály zaznamenané po každém kroku modifikace připraveného biosenzoru. (B) XRD spektrum výchozích magnetických nanočástic MNP (vložený obrázek vpravo nahoře představuje TEM snímek týchž MNP) se zobrazením teoreticky nejvýznamnějších difrakčních rovin maghemitu. (C) Reprezentativní HRTEM snímek modifikovaných MNP@Strep/Ag částic. (D) STEM-EDS chemické mapování (Fe, O, a Ag) modifikovaných MNP@Strep/Ag částic. (E) HAADF snímek modifikovaných MNP@Strep/Ag částic. Převzato z [151].

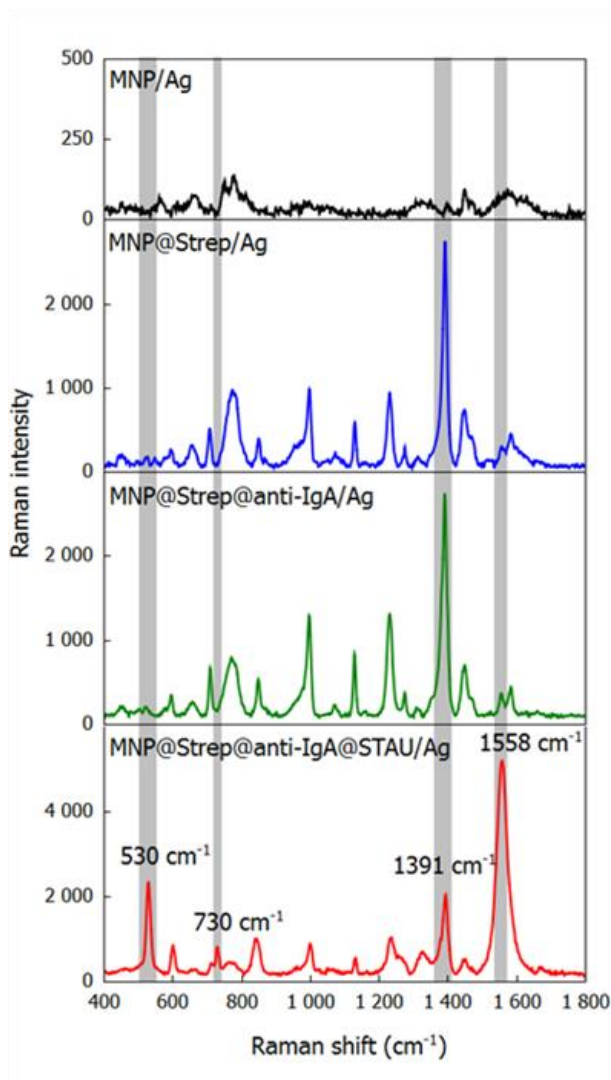
Úspěšnost syntézy MA-SERS biosenzoru byla ověřena s využitím metody infračervené spektroskopie (IR). IR absorpční spektra povrchu čistých MNP, modifikovaných streptavidinem a následně funkcionalizovaných biotinylovanými protilátkami jsou ukázána na Obr. 21. IR spektrum primárních MNP vykazuje charakteristické vibrační módy (např. 1726 cm^{-1}) typické pro karboxylové vibrace, prozatím bez přítomných vibrací proteinů, které budou následně diskutovány v IR spektrech po jednotlivých krocích modifikace povrchu MNP. IR spektrum nanočástic po imobilizaci streptavidinu (tj. MNP@Strep) vykazují dva amidové pásy: amid I při

1639 cm^{-1} , který je typický pro β -strukturu skládaného listu (C=O vibrace), a amid II při 1568 cm^{-1} (deformační N–H s valenční C–N vibrací). Tyto pásy mohou být připsány amidovým skupinám v postranním řetězci přítomným v peptidových skupinách streptavidinu, a proto na tomto základě lze usoudit přítomnost streptavidinu na povrchu MNP [96,159,160]. Pás odpovídající vibračnímu módu karboxylátu při 474 cm^{-1} (COO^- vibrace) je taktéž identifikovatelný ve spektru MNP@Strep [161]. Přítomnost streptavidinu na MNP byla taktéž potvrzena přítomností vibrace slabých až středních intenzit při 1208 cm^{-1} a 1247 cm^{-1} , vibrací z nichž obě odpovídají vibracím amidu III [96]. Srovnáme-li na Obr. 20 IR spektra biosenzorů (označené jako MNP@Strep@anti-IgA a MNP@Strep@anti-APS) a spektrum MNP@Strep, nepozorujeme zde žádné rozdílné vibrace až na slabý posun pásu 1726 cm^{-1} do červené oblasti spektra, který odpovídá signálu karbonylové skupiny, která může být zodpovědná za interakci klíč-zámek mezi nanočásticemi s navázaným streptavidinem a biotinylovaným koncem protilátek [162].



Obr. 21: IR spektra výchozích MNP, modifikovaných MNP@Strep, MNP@Strep funkcionalizovaných biotinylovanou protilátkou na protein A (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA) a biotinylovanou protilátkou na streptokokovou stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A (označeno jako MNP@Strep@anti-APS). Převzato z [151].

MA-SERS biosenzor byl nejprve testován na modelových vzorcích bakteriálního lyzátu *Staphylococcus aureus* (proto dále označení STAU). Výsledná SERS spektra jsou znázorněna na Obr. 22, společně se spektrem výchozích MNP, dále pak pro porovnání spektrum vzorku představující modifikované MNP@Strep částice a spektrum slepého vzorku sestávajícího z vodné disperze MNP@Strep@anti-IgA biosenzoru bez přidaného lyzátu.

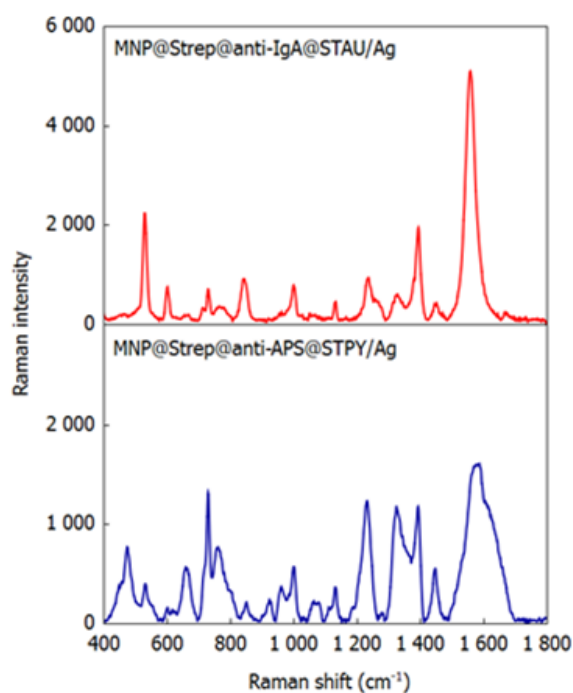


Obr. 22: SERS spektra výchozích MNP/Ag, modifikovaných MNP@Strep/Ag, MNP@Strep funkcionalizovaných biotinylovanou protilátkou na protein A (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA/Ag) a bakteriálního lyzátu *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag). Převzato z [151].

Spektrum čistých MNP nevykazuje žádné ze silných vibračních módů, které jsou následně pozorovány ve spektrech modifikovaných MNP@Strep částic, slepého či modelového vzorku. Naopak, SERS spektra modifikovaných MNP@Strep částic a částic MNP@Strep@anti-IgA biosenzoru (slepý vzorek) si jsou velice podobné. Oba vykazují charakteristické spektrální pásy odpovídající částem proteinové struktury, které zahrnují pásy označované v literatuře jako amid II a III. Charakteristické vibrace spektrálních pásů amidu II se nacházejí při 1558 cm^{-1} (NH vibrace) a 1450 cm^{-1} ($\delta\text{-CH}_2$ nůžková) [163]. Dále pak vibrační mód amidu III, který je spojován se strukturou α -helixu a zejména pak s $\nu(\text{CN})$ a NH in-plane vibracemi peptidové vazby, je reprezentován pásy při 1391 cm^{-1} a 1231 cm^{-1} [164,165]. Funkcionalizací MNP@Strep částic biotinylovanou protilátkou došlo k podstatnému navýšení intenzity SERS pásu amidu III při 1231 cm^{-1} , což lze vysvětlit nadbytkem přítomných α -helix konformací, a tím pádem to považovat za úspěšnou nekovalentní interakci mezi streptavidinem a biotinylovaným koncem protilátky. Reprezentativní SERS spektrum biosenzoru (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA/Ag) je zobrazeno na Obr. 22. Nakonec inkubace biosenzoru se vzorkem STAU lyzátu (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) byla doprovázena výraznými změnami relativních intenzit pásů při 1391 cm^{-1} a 1558 cm^{-1} ve srovnání s intenzitami těchto pásů ve slepém vzorku. Za citlivý indikátor úspěšné interakce biosenzoru s proteinem A typického pro STAU bakterii, lze považovat hodnotu poměru intenzit proteinových pásů (definovaný jako I_{1391} / I_{1558} , dále pak označováno jako PBR z angl. *protein band ratio*), která byla doprovázena změnou hodnot z 13,31 (slepý vzorek) na 0,36 (modelový vzorek) se statisticky významným rozdílem (p hodnota = $1,035 \times 10^{-5}$). SERS spektrum STAU lyzátu rovněž vykazuje nové vskutku dobře rozlišitelné pásy při 530 cm^{-1} , 602 cm^{-1} a 730 cm^{-1} , které nebyly pozorovatelné ve spektrech MNP@Strep či slepém vzorku. Ve spektru STAU bakterie dominuje silný vibrační mód při 530 cm^{-1} , který lze interpretovat jako S-S vibraci pocházející od významného bakteriálního polypeptidového toxinu (L-cystein) produkovaného STAU bakterií [96,166,167]. SERS spektrum taktéž vykazuje významný pás při 602 cm^{-1} , který může být přiřazen vibračnímu módu fenylalaninu, který je stejně tak produkován STAU bakteriemi [168,169]. Další významný pás ležící při 730 cm^{-1} byl interpretován jako mód glykosidické vazby stavebních kamenů v buněčných stěnách bakterie, přesněji poly-N-

acetylglukosamin (NAG) a kyselina N-acetylmuramová (NAM) [127,170–172]. Zároveň se můžeme setkat s interpretací podle literatury Ankamwar a kol. [120], kde je tento vibrační pás při 730 cm^{-1} spojován s „dýchacími“ vibracemi aromatického purinového kruhu C-N řetězce adeninu pocházejícího ze složek lipidové vrstvy buněčné stěny bakterie.

Vysoký stupeň všestrannosti, který tato metoda nabízí, spočívá ve volbě konkrétní protilátky, jenž se přidává v posledním kroku syntézy, a zajišťuje tak selektivitu MA-SERS biosenzoru. Univerzálnost této metody byla demonstrována na bakteriálním lyzátu *Streptococcus pyogenes* (dále jen STPY), který je rovněž spojován s infekcí kloubní náhrady (IKN). Srovnání SERS spekter modelových vzorků STPY bakteriálního lyzátu (dále označeno jako MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag) a STAU lyzátu (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) se nachází v Obr. 23.



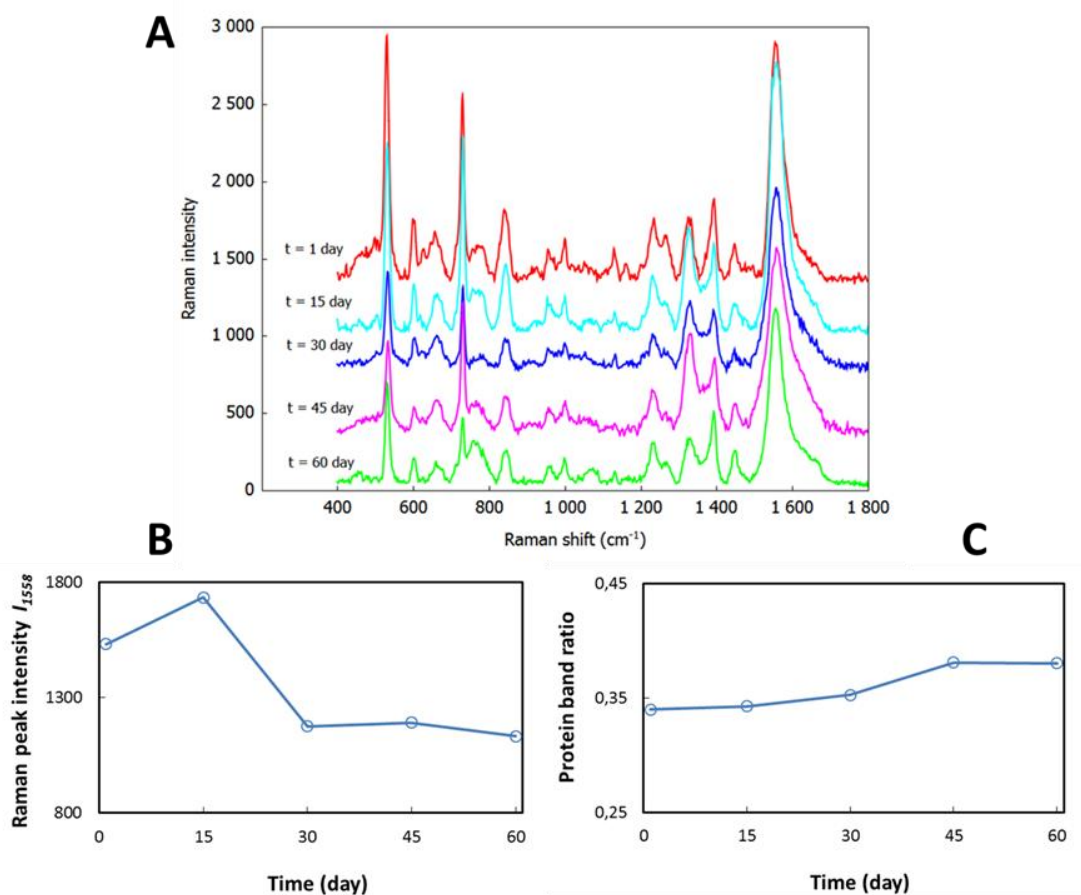
Obr. 23: SERS spektra modelových vzorků bakteriálních lyzátů *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (označené jako MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) a *Streptococcus pyogenes* (označené jako MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag). Převzato z [151].

Vzhledem k zařazení obou bakterií mezi fakultativně anaerobní Gram-pozitivní koky se dalo očekávat, že jejich spektra budou mít velmi podobný průběh, i přes některé významně rozdílné molekulové vibrace. Hodnota PBR se podstatně snížila po inkubaci příslušného biosenzoru se STPY lyzátem, tj. z hodnoty 19,71 na hodnotu 0,48 se statisticky významným rozdílem, jenž nám svědčí o úspěšné interakci mezi bakteriálním lyzátem a funkcionalizovaným biosenzorem. Největší rozdíly mezi SERS spektry STAU (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) a STPY (MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag) bakterií se vztahují k vibračním pásům ležícím při 475 cm^{-1} , 924 cm^{-1} a 962 cm^{-1} . Tyto pásy byly interpretovány jako vibrace D-manózy, která je hlavní cukernou složkou matrice STPY [173]. Ve spektru STPY bakterie můžeme také pozorovat intenzivní pík při 660 cm^{-1} , který nám jednoznačně potvrzuje přítomnost C-S vibrací pocházející z toxinu methioninu diskutované bakterie [170,174]. Kromě toho se ve spektrech nachází další ne méně důležitý pás při 530 cm^{-1} , který je původcem S-S vibrace cysteinu. Rovněž si můžeme všimnout, že intenzita vibrace tohoto pásu je nižší ve spektru STPY než v případě STAU, což může být dalším vodítkem pro diskriminaci mezi těmito dvěma patogeny. Navíc rozdíl mezi hodnotami PBR pro STAU a STPY se jednoznačně jevil jako staticky významný ($p = 0,021$). Toto přímé porovnání SERS spekter dvou různých bakteriálních lyzátů s na míru ušitým biosenzorem jasně poukazuje, že prostřednictvím zde popsaného MA-SERS přístupu můžeme jasně rozlišit mezi bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*.

Vzhledem k tomu, že vzorky kloubních tekutin jsou typicky bohaté na informace v důsledku širokého obsahu celé řady různých molekul, interpretace spekter bakteriálních patogenů v matrici biologických materiálů je obvykle velmi obtížná. Proto se často nevyhne použití náročných technik a zkušených specialistů pro analýzu získaných dat. I přes to se SERS spektroskopie jeví jako perspektivní analytická technika použitelná pro klinickou praxi při detekci patogenních mikroorganismů. Vzhledem ke komplexnosti biologických vzorků se dá očekávat, že spektra budou obsahovat koktejl SERS-aktivních vibračních módů pocházejících od složek buněčné stěny patogenů a nativních složek matrice. Zatímco zde uvedený systém spoléhá na apriorní znalosti o biochemii analyzovaného patogenu, tato technika rovněž poskytuje určitou flexibilitu při interpretaci SERS vibračních pásů a následnou detekci a diagnostiku IKN. Přestože je tato flexibilita atraktivní, ideální systém detekce bakterií

by vůbec neměl dovolit nejisté přiřazení pásů. Bohužel v současné době se váhavému přiřazení pásů pravděpodobně nevyhneme z důvodu nedostatku dostupných SERS spektrálních knihoven, které by mohly být využity k interpretaci vibračních pásů bakteriálních složek, což se může podepsat na finanční i časové náročnosti celého analytického procesu. Ačkoliv se databázové zdroje pro základní Ramanova spektra biologických materiálů postupně stávají dostupnější a komplexnější, není zde jistota, že vibrační pásy pozorované v Ramanově spektru budou totožné s pásy pozorovanými v SERS spektrech těch samých bakterií.

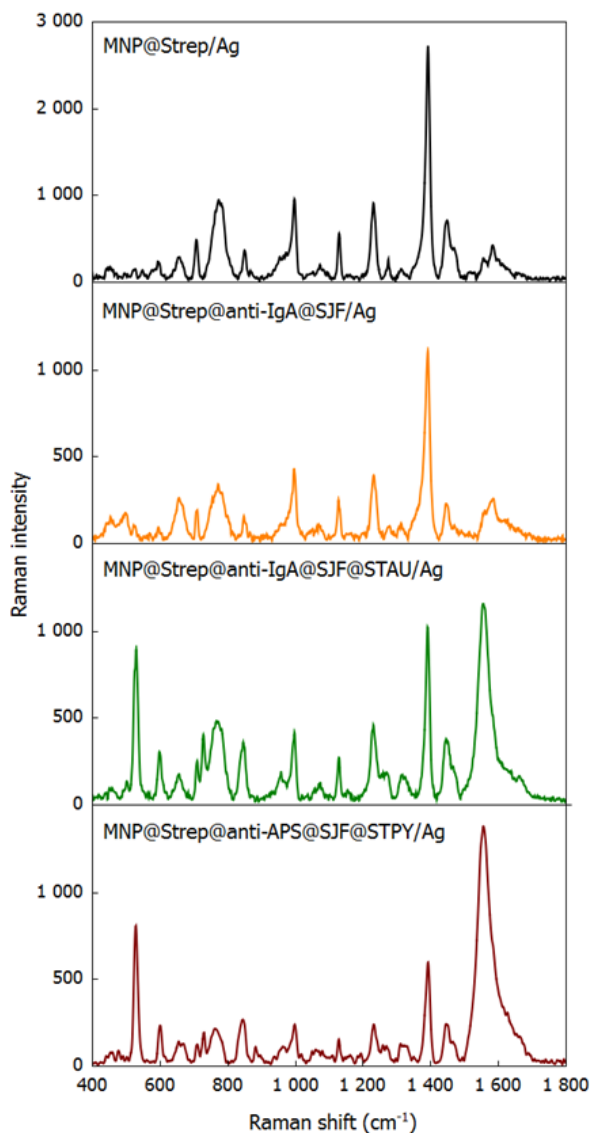
Z hlediska dalších aplikací a zejména pak při využití v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii je velmi klíčová časová stabilita magnetického biosenzoru. Vliv stárnutí senzoru na stabilitu SERS signálu jsme testovali pomocí STAU biosenzoru, jenž byl skladován za atmosférických podmínek po dobu několika týdnů. Stabilita SERS signálu byla hodnocena s využitím MNP@Strep@anti-IgA částic, které byly ihned po přípravě uloženy do chladničky. Z tohoto zásobního roztoku byly v den měření (1., 15., 30., 45. a 60. den od přípravy) odebrány alikvótní podíly vždy těsně před inkubací se STAU lyzátem a následně byla zaznamenána SERS spektra. I přes to, že se absolutní intenzity s časem znatelně snížily, polohy vibračních pásů pozorované ve spektrech na Obr. 24A zůstaly pro danou bakterii po celou dobu zachovány. Vypočtené PBR hodnoty jsou poměrně stabilní s průměrnou hodnotou okolo 0,36 a relativní směrodatnou odchylkou nižší než 5%. Následně byly vyneseny závislosti SERS intenzit pásu 1558 cm^{-1} , resp. PBR hodnot na čase od přípravy STAU biosenzoru. Jak je vidět na obrázcích 24B a 24C, obě hodnoty byly monitorovány po dobu 2 měsíců. Tento SERS biosenzor se tak jeví jako poměrně stabilní za běžných atmosférických podmínek, a to i po dvou měsících skladování.



Obr. 24: A) SERS spektra MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag získány pro vzorky různých dávek odebraných během 2 měsíců ode dne jejich přípravy při sledování časové stability biosenzoru. Pro lepší přehlednost bylo každé SERS spektrum posunuto o zhruba 300 jednotek Ramanovy intenzity. Sledování časové stability prostřednictvím závislosti B) SERS intenzity pásu 1558 cm^{-1} a C) PBR hodnot na čase v průběhu 2 měsíců. Převzato z [151].

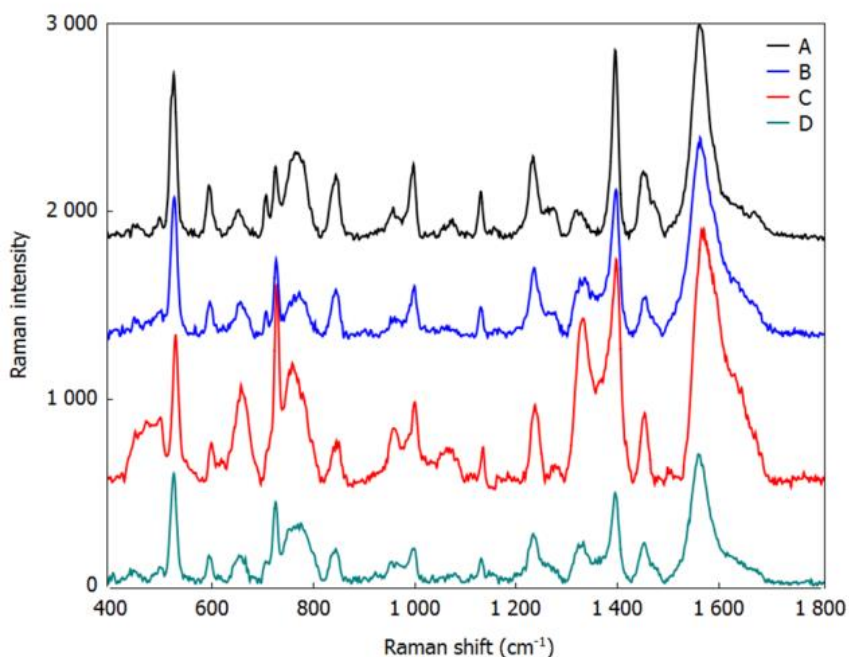
K testování a hodnocení použitelnosti navrhované bezkultivační detekce a identifikace patogenů *S. aureus* a *S. pyogenes* v reálné matrici byly zkoumány vzorky zprvu sterilních punktátů z kolenního kloubu, které byly inokulovány těmito živými bakteriálními buňkami. SERS spektra získaná během těchto experimentů jsou uvedena na obrázku 25. I přes to, že se absolutní intenzity SERS signálů oproti modelovým vzorkům znatelně snížily, polohy vibračních pásů pozorované ve spektrech na Obr. 25 (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@SJF@STAU/Ag a MNP@Strep@anti-APS@SJF@STPY/Ag) zůstaly pro obě bakterie zachovány a odpovídají spektrům

jejich modelových vzorků. Nicméně oba vzorky (modelové i s reálnou maticí) poskytovaly stejný trend změny hodnot PBR, která klesala z 13,31 na 0,08 ($p = 1.010 \times 10^{-5}$) v případě *S. aureus*, a z 19,71 na 0,65 ($p = 2.817 \times 10^{-5}$) v případě *S. pyogenes*.



Obr. 25: SERS spektrum modifikovaných MNP@Strep/Ag částic, MNP@Strep částic funkcionalizovaných biotinylovanou protilátkou na protein A (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA/Ag), sterilního kloubního punktátu (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@SJF/Ag), kloubního punktátu inokulovaného bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@SJF@STAU/Ag) a kloubního punktátu inokulovaného bakterií *Streptococcus pyogenes* (označeno jako MNP@Strep@anti-APS@SJF@STPY/Ag). Převzato z [151].

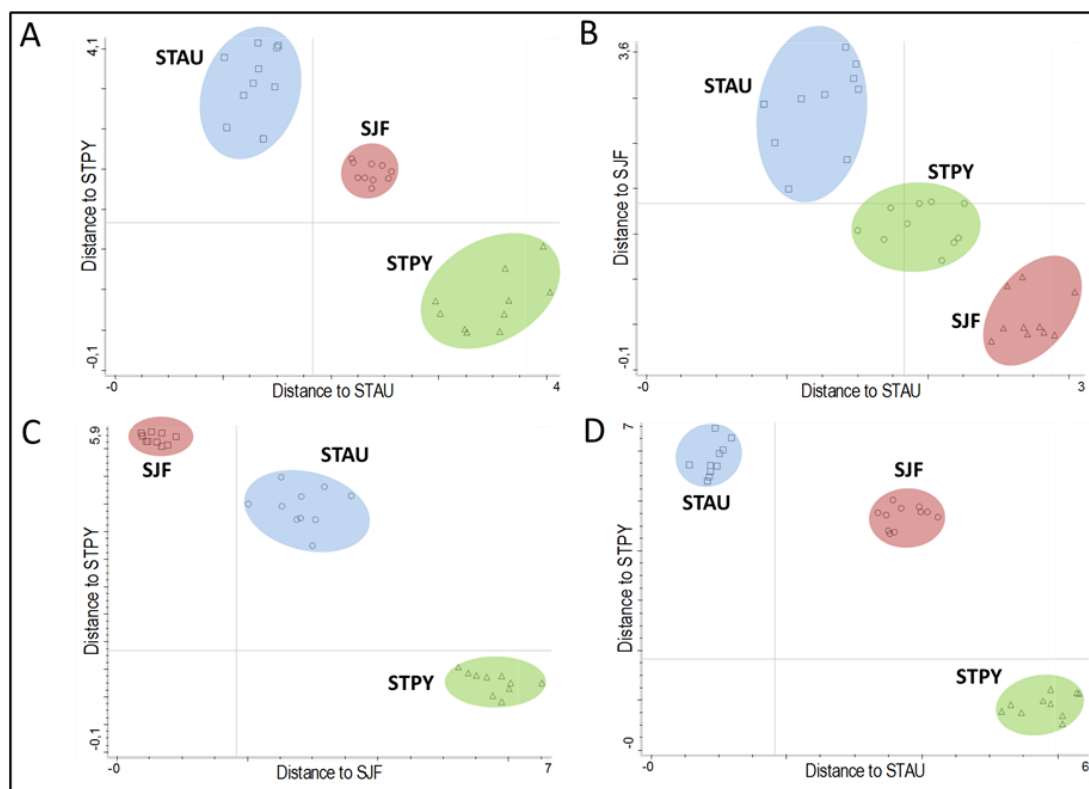
Dále pak byl sledován vliv koncentrace a nespecifických interakcí na úspěšnost bakteriální detekce. Vliv nespecifických interakcí byl studován s využitím MNP@Strep@anti-IgA biosenzoru inkubovaného se vzorky punktátu z kolenního kloubu získaných od čtyř pacientů (označení jako pacient A-D), které byly inokulovány živými bakteriemi STAU. Obrázek 26 reprezentuje získaná spektrální data pro tato měření. Všechna spektra obsahují výše interpretované a následně diskutované vibrační módy, ačkoliv se jejich absolutní intenzity mezi sebou patrně liší. Nicméně, vypočtené hodnoty PBR pro všechny 4 pacienty jsou stabilní (průměrně se pohybují okolo hodnoty 0,80) s 10% relativní směrodatnou odchylkou mezi PBR hodnotami jednotlivých pacientů. Můžeme si povšimnout, že spektra bakterií přítomných v reálné matici znázorněná na obrázcích 25 a 26 obsahují méně významné pásy pocházející z nespecifických biologických interakcí na rozhraní mezi volným povrchem nanočástic stříbra a malými organickými molekulami. Nicméně tyto interakce nemají zásadní vliv na vypočtené hodnoty PBR, o čemž svědčí nízká RSD a stabilním PBR.



Obr. 26: Reprezentativní SERS spektra živých bakteriálních buněk STAU inokulovaných v kloubních punktátech získaných od čtyř různých pacientů (A-D). Pro lepší přehlednost bylo každé SERS spektrum posunuto o řádově stovky jednotek Ramanovy intenzity. Převzato z [151].

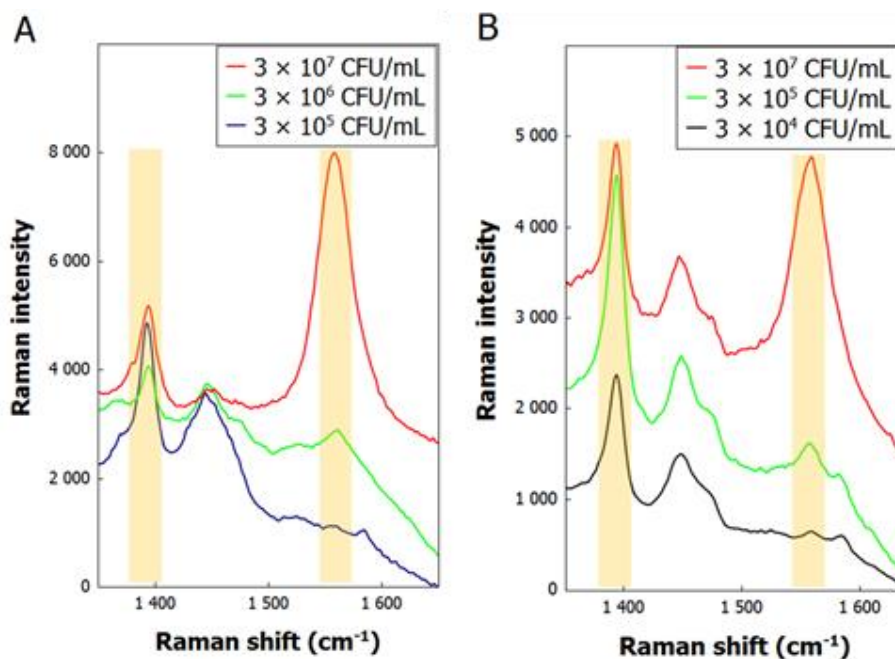
O definitivním postavení této nové analytické metody v diagnostickém algoritmu bylo nasnadě dále testovat použití biosenzoru ve vzorcích reálné matrice kloubního punktátu získaných od čtyř pacientů (A, B, C a D). Pro každý vzorek bylo provedeno deset opakovaných měření a výsledné spektrální údaje byly podrobeny statistické analýze pro následné zhodnocení schopnosti navrhované metody detekce a identifikace IKN. Pro klasifikaci dvou bakteriálních patogenů (STAU a STPY) v biologickém materiálu byl použit algoritmus diskriminační analýzy (DA), který je součástí chemometrického programu *TQ Analyst* dodávaného s přístrojem. Diskriminační analýza umožňuje interpretovat rozdíly mezi dvěma nebo více skupinami objektů, které mají velmi podobné charakteristické rysy (v našem případě spektrální průběh). Zařazování bakteriálních vzorků do tříd se odehrává na základě vzdálenosti mezi centry jednotlivých tříd vyjádřené v distančních Mahalanobisových jednotkách. Výstupem statistické diskriminační analýzy dat je následně grafické uspořádání objektů ve vícerozměrném prostoru pomocí již zmíněné Mahalanobisovy vzdálenosti. Jak bude dále patrné v této disertační práci, DA usnadňuje interpretaci spektrálních podobností a rozdílů, a stejně tak umožňuje zařazení neznámého objektu do jedné z již existujících tříd. SERS spektra biologických vzorků s největší reprodukovatelnou podobností by se měly seskupit do transformovaného prostoru s nejmenší Mahalanobisovou vzdáleností. Vzhledem k bohatým informacím ve spektrální oblasti 400 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} byla statistické diskriminační analýze podrobena tato oblast SERS spektra. Studie byla provedena na skupině 30 vzorků vždy pro každého pacienta, zahrnující reprodukovatelná SERS spektra naměřená se sterilními kloubními punktáty a punktáty inokulovanými živými bakteriálními buňkami (STAU či STPY). Získané výsledky jsou shrnuty na obrázku 27A-D, kde pozorujeme jednoznačné odlišení existujících tříd v datech, přičemž třída sterilního kloubního punktátu je znázorněna červeně, třída kloubního punktátu s inokulovanou bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 je zobrazena modře a třída kloubního punktátu inokulovaného bakterií *Streptococcus pyogenes* je označena zeleně. Z obrázku 27 je patrné, že jednotlivé vzorky kloubních punktátů tvoří oddělené shluky, které mají různé meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti. Vypočtené průměrné hodnoty vzdáleností uvnitř jednotlivých tříd pro pacienty A, B, C a D odpovídají hodnotám 0,37, 0,57, 0,59 a 0,94 pro sterilní kloubní punktát; 1,31, 1,24, 0,80 a 0,92 pro kloubní punktát inokulovaný bakterií *S. aureus*

CCM 3953; 0,84, 0,82, 1,27 a 0,91 pro kloubní punktát inokulovaný bakterií *S. pyogenes*. Vypočtené průměrné hodnoty mezi jednotlivými třídami navzájem odpovídají vzdálenostem 2,37, 2,90, 2,83 a 3,72 mezi sterilním kloubním punktátem a punktátem se *Staphylococcus aureus* CCM 3953; 2,46, 1,60, 5,69 a 4,69 mezi sterilním kloubním punktátem a punktátem se *Streptococcus pyogenes*. Dále pak meziklastrové vzdálenosti odpovídají hodnotám 3,62, 1,95, 4,45 a 5,83 pro třídy *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Streptococcus pyogenes*. Závěrem lze tedy konstatovat, že tyto výsledky poukazují na spolehlivost kombinace MA-SERS s DA k rozlišení třech analytů, které byly současně validovány na základě standardních kultivačních metod se stejným setem týchž vzorků.



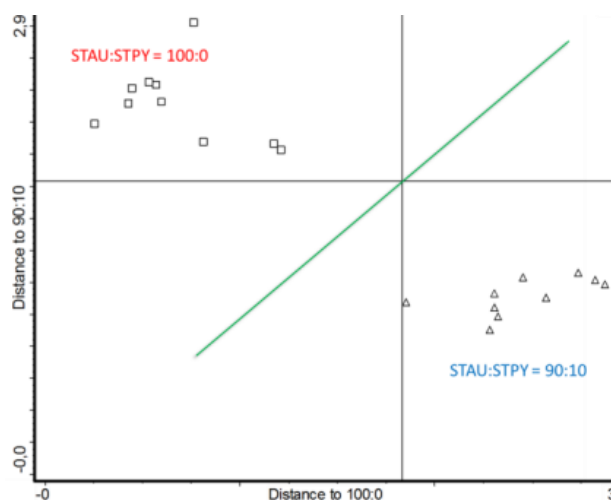
Obr. 27: Klasifikace kloubních punktátů od čtyř pacientů (A, B, C a D) podle diskriminační analýzy. Orientačně zvýrazněné oblasti v grafech představují: sterilní kloubní punktát (SJF; červená), kloubní punktát inokulovaný bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (STAU; modrá) a kloubní punktát inokulovaný bakterií *Streptococcus pyogenes* (STPY; zelená). Převzato z [151].

Citlivost metody byla následně testována s využitím stejného MA-SERS detekčního protokolu popsaného v Experimentální části. V následující části práce již byly zkoumány pouze bakteriální lyzáty v kloubním punktátu z důvodu snadnější manipulace s biologickým materiálem a dodržení ředících kroků. Koncentrace obou bakteriálních patogenů byla snižována až na hranici, kde lze stále pozorovat statisticky významný rozdíl mezi PBR hodnotami (I_{1391} / I_{1558}) slepého vzorku, resp. biosenzoru a bakteriálního vzorku. Na základě získaných výsledků tak bylo zjištěno, že navržený biosenzor poskytuje pozitivní odpověď na běžně se vyskytující koncentraci bakterií (3×10^8 CFU/mL) v reálných vzorcích během IKN, jak jsme pozorovali výše u modelových vzorků (Obr. 23). A navíc tato MA-SERS metoda poskytuje limity detekce o dva (STAU; Obr. 28A) či tři (STPY; Obr. 28B) řády nižší než je běžně se vyskytující koncentrace bakterií doprovázející IKN.

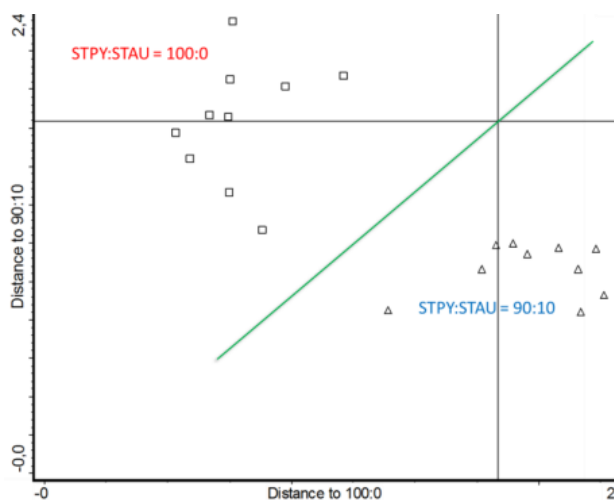


Obr. 28: Detailní pohled na pásy 1391 cm^{-1} a 1558 cm^{-1} v SERS spektru kloubních punktátů s rozdílnými koncentracemi bakteriálních patogenů A) *Staphylococcus aureus* a B) *Streptococcus pyogenes*. Pro lepší přehlednost bylo každé SERS spektrum posunuto o řádově stovky jednotek Ramanovy intenzity. Převzato z [151].

Posledním, rovněž velmi důležitým kritériem bylo testování schopnosti MA-SERS biosenzoru selektivně vázat bakterie ve vzorcích reálné matrice. Za tímto účelem byla připravena směs obou senzorů (MNP@Strep@anti-IgA & MNP@Strep@anti-APS) v poměru 1:1. Tento mix senzorů byl otestován jak s čistými lyzáty jednotlivých bakterií, tak s jejich bakteriální směsí v poměru 90:10 jak pro STAU, tak STPY a rovněž se postupovalo stejným MA-SERS detekčním protokolem popsáným v Experimentální části disertační práce. Při klasifikaci setů s čistým STAU (Obr. 29) nebo STPY (Obr. 30) proti jejich odpovídajícím bakteriálním směsím byly v obou případech získány dvě různé třídy vyjádřené pomocí hraniční přímky pozorované v grafech diskriminační analýzy. Vypočtené průměrné hodnoty vzdáleností uvnitř jednotlivých tříd pro STAU vzorky odpovídají hodnotám 0,37 pro směs 90:10 a 0,68 pro směs 100:0, resp. čistý STAU. Podobné výsledky byly získány pro klasifikaci STPY vzorků, které byly opět v poměru 90:10 a 100:0 (Obr. 30) s vnitřními vzdálenostmi 1,06 a 0,79. Na druhou stranu z výsledků vyplývá, že jednotlivé vzorky tvoří oddělené shluky s meziklastrovou vzdáleností 2,45 pro STAU vzorky a 1,97 pro STPY vzorky. Na základě získaných výsledků tak bylo zjištěno, že navržená metoda je selektivní pro oba přítomné patogeny i navzdory tomu, že je jedna bakterie ve velmi malém zastoupení vedle druhé.



Obr. 29: Grafické znázornění diskriminační analýzy dat získaných klasifikací čistého STAU lyzátu (STAU:STPY = 100:0; čtverec) a směsi bakteriálních lyzátů (STAU:STPY = 90:10; trojúhelník) s využitím směsi biosenzorů v poměru 1:1. Převzato z [151].



Obr. 30: Grafické znázornění diskriminační analýzy dat získaných klasifikací čistého STPY lyzátu (STAU:STPY = 100:0; čtverec) a směsi bakteriálních lyzátů (STPY:STAU = 90:10; trojúhelník) s využitím směsi biosenzorů v poměru 1:1. Převzato z [151].

Výsledky z této kapitoly byly v roce 2017 publikovány v časopise *Analytical chemistry* a autorka disertační práce je první z devíti autorů tohoto původního článku, který lze nalézt v příloze této práce.

6.3 Publikace zahrnující alternativní SERS substráty

Tato část předkládané disertační práce shrnuje spoluautorské publikace, ve kterých bylo rovněž využito optických vlastností Ag NPs a jejich aplikačního potenciálu v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii jako aktivních substrátů, oproti předchozím případům ale byly Ag NPs použity v podobě vrstev či jako součást kompozitního materiálu. Konkrétně se jedná o publikaci zabývající se přípravou nanokompozitního materiálu pro „label-free“ stanovení lidského imunoglobulinu G v krvi metodou MA-SERS a o publikaci, která ilustruje syntézu sonochemické depozice Ag NPs na skleněné destičky a jejich využití jako SERS aktivní substráty.

6.3.1 Magneticky-asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS) pro „label-free“ stanovení lidského imunoglobulinu G (IgG) v krvi s využitím nanokompozitního materiálu na bázi Fe₃O₄@Ag

Výsledky této práce popisují modifikaci nanokompozitního materiálu obsahujícího nanočástice stříbra a Fe₃O₄, konjugované spolu přes polymerní mezivrstvu vytvořenou karboxymethyl chitosanem, jakožto přírodním a biokompatibilním polymerem. Následně byl tento systém modifikován anti-imunoglobulinem G přes nekovalentní interakci s kovalentně navázaným streptavidinem na povrchu kompozitu, čímž byla zajištěna vysoká selektivita stanovení. S využitím mikroRamanovy spektroskopie našel takto připravený biosenzor uplatnění ve stanovení imunoglobulinu G ze vzorků krve. V této práci bylo ukázáno, že lze detekovat koncentrace imunoglobulinu G od 600 fg/ml v kapce krve. Tato robustní metoda poskytuje relativně snadnou modifikaci za účelem stanovení celé řady biologicky významných molekulů s vysokou selektivitou a citlivostí. Příslušná modifikace se realizuje tak, že se v posledním kroku vybere vhodná biotinylovaná protilátka.

Výsledky z této kapitoly byly v roce 2014 publikovány v časopise *Analytical Chemistry* a autorka disertační práce je druhá z pěti autorů tohoto původního článku, který lze nalézt v příloze této práce.

6.3.2 Sonochemická příprava skleněných destiček s vrstvou nanočástic stříbra pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie

V rámci další fáze studia aplikačního potenciálu povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byla provedena studie na zcela nově metodicky navržených sonochemicky deponovaných vrstvách částic stříbra na skleněném povrchu. Jelikož sonochemická příprava nebyla součástí této disertační práce, budou zde jednotlivé postupy popsány jen v krátkosti. Podrobný postup pak byl popsán v publikaci Suchomel a kol. [175]. Výsledky této publikace spočívají v komparativní studii možných postupů variujících použití rozdílných redukčních látek, s cílem nalézt experimentální uspořádání a podmínky pro časově nenáročnou a reprodukovatelnou přípravu Ag vrstev a jejich následný aplikační potenciál v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii. Navržené postupy přípravy Ag vrstev spočívaly ve variujícím použití různých redukujících látek (polyethylenglykol, glycerol, maltóza, glukóza, laktóza) a v různém experimentálním uspořádání (především snížení koncentrace stříbra) za účelem zvýšit reprodukovatelnost přípravy i SERS signálu. Testování SERS aplikačních možností takto připravených, vysoce stabilních a homogenních vrstev nanočástic stříbra prokázalo využitelnost všech typů deponovaných vrstev jako efektivních SERS substrátů. Odhlédneme-li od nepatrně negativního vedlejšího účinku procesu tvorby těchto povrchů spojeným s přítomností reziduí v SERS spektrech, pak lze konstatovat, že jako nejefektivnější se ukázaly vrstvy připravené redukcí maltózou za asistence ultrazvuku, kde bylo dosaženo faktoru zesílení Ramanova signálu v řádu statisíců.

Výsledky z této kapitoly byly v roce 2016 publikovány v časopise *Ultrasonics Sonochemistry* a autorka disertační práce je čtvrtá z osmi autorů tohoto původního článku, který lze nalézt v příloze této práce.

7. Závěr

Cílem předkládané disertační práce byla příprava a modifikace nanočástic stříbra pro aplikace v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS) se zaměřením na citlivou a specifickou analýzu biologicky významných molekul i jednobuněčných patogenních mikroorganismů - bakterií. Jednotlivé připravené materiály byly charakterizovány řadou technik (transmisní, skenovací či vysokorozlišovací elektronová mikroskopie, UV/Vis, Ramanova a infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce, dynamický rozptyl světla) a zejména pak byly testovány jejich aplikačně významné vlastnosti se zaměřením na zesílení Ramanova signálu a specifickosti vyvíjené analytické aplikace využívající tyto materiály.

První část experimentální práce se zabývala aktivací disperze nanočástic stříbra vlivem šesti rozdílných finálních koncentrací chloridových iontů (25, 50, 100, 200, 400, a 800 mmol/l) a jejich následné využití pro praktické aplikace v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii. V této části studie byl popsán přímý vztah mezi vybranými koncentracemi chloridových iontů a intenzitou SERS signálu modelové molekuly adeninu. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že klíčovou roli hraje nejen koncentrace chloridových iontů, ale stejně důležitý je i výběr vlnové délky excitačního záření pro konkrétní provedení aktivace. Ze získaných výsledků pozorování morfologických změn Ag NPs bylo patrné, že přídavek nižších koncentrací chloridových iontů (desítky mmol/l) nemá zásadní vliv na transformaci nanočástic stříbra oproti vlivu vyšších koncentrací chloridových iontů (stovky mmol/l). Srovnáme-li účinek všech použitých výsledných koncentrací NaCl napříč všemi třemi testovanými excitačními lasery (532, 633 a 780 nm), lze konstatovat, že nejvyšší zesílení Ramanova signálu bylo dosaženo se systémem, který obsahoval finální koncentraci 400 mmol/l NaCl. Nicméně nižší koncentrace chloridů jsou rovněž použitelné v případě excitace laserem 532 nm, avšak nedostatečné pro použití při excitaci vlnovými délkami 633 a 780 nm. Oproti tomu, vlivem účinku ještě vyšší koncentrace chloridových iontů na úrovni 800 mmol/l docházelo již k tvorbě nestabilních rozměrných částic, kdy se pak tato destabilizace Ag NPs odrazila ve velmi rychlé ztrátě Ramanova signálu a to pro všechny tři excitační lasery.

Druhá část experimentální práce se zabývala vývojem rychlé diagnostiky infekce kloubních náhrad metodou magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. MA-SERS detekce a identifikace bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) byla nejprve vyvíjena na bakteriálních lyzátech. K MA-SERS detekci byl využit biosenzor na bázi magnetických nanočástic oxidu železa funkcionalizovaných protilátkami na příslušné bakterie. Po prvotní úspěšné testovací fázi na umělých vzorcích následovalo testování tohoto biosenzoru s reálnými vzorky kloubních punktátů inokulovaných živými bakteriálními buňkami. Ramanova spektra jednotlivých vzorků (infikovaný a neinfikovaný biologický materiál) byla podrobena diskriminační analýze, kde bylo dosaženo rozdělení signálu systémů obsahujících jednotlivé bakterie do příslušných tříd na základě Mahalanobisových vzdáleností. Na základě získaných výsledků se tak podařilo nejen rozhodnout, zda je kloubní punktát infikovaný, ale především i určit, o jakou bakterii se jedná z důvodu včasného nasazení těch správných antibiotik. Spojení mikro-Ramanovy spektroskopie a diskriminační analýzy tak poskytuje rychlou detekci a identifikaci infekce kloubních náhrad bez nutnosti zdlouhavých kultivačních postupů, se kterými se můžeme setkat v klasické mikrobiologii.

Poslední část experimentální práce se věnovala výzkumům, ve kterých byl rovněž využit aplikační potenciál nanočástic stříbra v povrchu zesílené Ramanově spektroskopii, použitý tentokrát ve formě stříbrné vrstvy či jako součást magnetického kompozitu.

Vyvíjené typy senzorů naznačují cestu k ultracitlivé detekci využitelné v biologii i medicíně s velmi malými nároky na instrumentální vybavení. Vývoj vlastní metodiky přípravy SERS biosenzorů není zdaleka ukončen, výzkum pokračuje ve směrech multiplexní analýzy a snižování detekčních limitů vzhledem k požadavku jejich aplikovatelnosti v medicínské i běžné praxi. Výsledky získané v souvislosti s touto disertační prací, zejména pak na základě výsledků z detekce infekce kloubních náhrad, byly nadále zúročeny pro rychlou a včasnou detekci meningitidy, kde prozatímni výsledky naznačují, že jsme na správné cestě v boji proti této zákeřné infekci mozkových blan.

8. Summary

The aim of this dissertation was the preparation and modification of silver nanoparticles for application in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), focusing on sensitive and specific analysis of biologically important molecules as well as single-celled pathogenic microorganisms - bacteria. The individual synthesized materials were characterized by a variety of techniques (transmission, scanning or high resolution electron microscopy, UV/Vis, Raman and infrared spectroscopy, X-ray diffraction, dynamic light scattering) and especially their significant application characteristics with focus on enhancement of Raman signal and specificity of developed analytical application using these materials.

The first part of the Experimental Section of the thesis was focused on the influence of six different final concentrations of chloride ions (25, 50, 100, 200, 400, and 800 mmol/L) used as an agent for silver nanoparticles activation and their subsequent use for practical application in surface enhanced Raman spectroscopy. In this part of the study a direct relationship between the selected concentrations of chloride ions with the intensity of the SERS signal using of adenine as a model compound was described. It was found out that the concentration level of chloride ions plays a crucial role in this part and a careful tuning of experimental design has to be performed for each laser wavelength. From the results of the observation of the morphological changes of Ag NPs it was evident that lower final concentrations of chloride ions (tens of mmol/L) led to a transformation of silver nanoparticles in a different manner (mainly aggregation) compared to higher concentrations (hundreds of mmol/L). If we compare the effect of the all final NaCl concentrations across the three tested excitation lasers (532, 633 and 780 nm), it can be stated that the best results were achieved with a system containing a final concentration of 400 mmol/L NaCl. Nevertheless, lower concentrations of chlorides are also usable for 532 nm laser, but its action has smaller or no effect on the Raman signal enhancement for lasers 633 and 780 nm. On the other hand, treatment with 800 mmol/L chlorides led to a rapid loss of the Raman signal due to the formation of unstable large-sized particles and their subsequent destabilization for all three tested laser wavelengths.

The second part of the Experimental Section of the thesis dealt with the development of rapid detection of prosthetic joint infection (PJI) based on magnetically assisted surfaced enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). MA-SERS detection and bacterial identification (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) has been developed on model samples of bacterial lysates. The MA-SERS detection used a biosensor based on magnetic iron oxide nanoparticles functionalized with suitable antibodies to the respective bacteria. After the initial successful test phase with model samples, testing of this biosensor followed with real samples of the synovial fluid inoculated with live bacterial cells. The Raman spectra of the individual samples (infected and uninfected biological material) were subjected to discriminant analysis, which was used to determine the classes of known materials by calculating the distance between each class center in Mahalanobis distance units. The results showed that it was possible to decide whether the synovial fluid is infected and moreover to determine which bacteria is presented. The combination of microRaman spectroscopy and discriminant analysis can reliably be used to rapid detection and identification of prosthetic joint infection without the need for lengthy cultivation methods.

The last part of the Experimental Section of the thesis was devoted to research in which it was also exploited the application potential of silver nanoparticles in the surface enhanced Raman spectroscopy as a silver layer or as part of a magnetic composite.

Developed types of sensors indicate a way to ultrasensitive detection applicable in biology and medicine with very small requirements on instrumental equipment. The development of the SERS biosensor preparation is far from complete, the research continues in the direction of multiplex analysis and the reduction of detection limits due to the requirement of their applicability in medical and common practice. The results based on this dissertation, especially on the results of the detection of prosthetic joint infection, have been applied for rapid and early diagnosis of meningitis, where temporary results suggest that we are on the right way to fight for this insidious infection of the meninges.

Seznam použitých zkratek

| | |
|------------|--|
| Ag NPs | <i>silver nanoparticles</i> ; nanočástice stříbra |
| anti-IgA | protilátka na protein A |
| anti-APS | protilátka na stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A |
| DA | diskriminační analýza |
| ELISA | <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> ; enzymatická imunosorpční analýza |
| EDC | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid |
| HRTEM | <i>high-resolution transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením |
| IKN | infekce kloubní náhrady |
| MA-SERS | <i>magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy</i> ; magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie |
| NHS | N-hydroxysulfosukcinimid |
| PBR | <i>protein band ratio</i> ; poměr proteinových pásů |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> ; polymerázová řetězová reakce |
| SERS | <i>surface enhanced Raman spectroscopy</i> ; povrchem zesílená Ramanova spektroskopie |
| SJF | <i>sterile joint fluid</i> ; sterilní kloubní punktát |
| STAU | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| STEM-EDS | <i>scanning transmission electron microscopy/energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> ; skenovací transmisní elektronová mikroskopie s energiově disperzním systémem |
| STEM-HAADF | <i>scanning transmission electron microscopy/high-angle angular dark-field</i> ; skenovací transmisní elektronová mikroskopie s prstencovým detektorem elektronů difraktovaných pod velkými úhly |
| STPY | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| TEM | <i>transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie |
| XRD | <i>X-ray powder diffraction</i> ; Rentgenová prášková difrakce |

Seznam použité literatury

- [1] A. Panáček, M. Smékalová, R. Večeřová, K. Bogdanová, M. Röderová, M. Kolář, M. Kilianová, Š. Hradilová, J.P. Fröning, M. Havrdová, R. Pucek, R. Zbořil, L. Kvítek, Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 142 (2016) 392–399. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.007.
- [2] L. Bi, J. Dong, W. Xie, W. Lu, W. Tong, L. Tao, W. Qian, Bimetallic gold-silver nanoplate array as a highly active SERS substrate for detection of streptavidin/biotin assemblies, *Anal. Chim. Acta*. 805 (2013) 95–100. doi:10.1016/j.aca.2013.10.045.
- [3] A. Smekal, *Zuschriften und vorläufige Mitteilungen, Naturwissenschaften*. 11 (1923) 873–875. doi:10.1002/ange.200703237.
- [4] C. V. Raman, K.S. Krishnan, A New Type of Secondary Radiation, *Nature*. 121 (1928) 501–502. doi:10.1038/121501c0.
- [5] G. Landsberg, L. Mandelstam, Eine neue Erscheinung bei der Lichtzerstreuung in Krystallen, *Naturwissenschaften*. 16 (1928) 557–558. doi:10.1007/BF01506807.
- [6] J.R. Ferraro, K. Nakamoto, C.W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy (Second edition)*, 2003. <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1407>.
- [7] <http://www.horiba.com/es/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/raman-scattering/>, staženo 4. 3. 2016.
- [8] <http://bwtek.com/raman-theory-of-raman-scattering/>, staženo 5. 3. 2016.
- [9] <http://www.omegafilters.com/applications/raman-spectroscopy/>, staženo 4. 1. 2017.
- [10] C.L. Haynes, C.R. Yonzon, X. Zhang, R.P. Van Duyne, Surface-enhanced Raman sensors: Early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 471–484. doi:10.1002/jrs.1376.
- [11] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* 26 (1974) 163–166. doi:10.1016/0009-2614(74)85388-1.
- [12] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, Surface raman spectroelectrochemistry Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *J. Electroanal. Chem.* 84 (1977) 1–20. doi:10.1016/S0022-0728(77)80224-6.
- [13] M.G. Albrecht, J.A. Creighton, Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 5215–5217. doi:10.1021/ja00457a071.

- [14] S. Nie, Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science* (80-.). 275 (1997) 1102–1106. doi:10.1126/science.275.5303.1102.
- [15] B. Štrauch, B. Vlčková, I. Němec, Infrared and Raman Spectroscopy in Chemistry Departments of Faculty of Science at Charles University in Prague - from History to the Present, *Chem. List.* 104 (2010) 1210–1219.
- [16] J.R. Lombardi, R.L. Birke, T. Lu, J. Xu, Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg–Teller contributions, *J. Chem. Phys.* 84 (1986) 4174–4180. doi:10.1063/1.450037.
- [17] M. Moskovits, Surface selection rules, *J. Chem. Phys.* 77 (1982) 4408–4416. doi:10.1063/1.444442.
- [18] K. Komers, *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Univerzita Pardubice. Pardubice 1996. 64 stran. ISBN 80-7194-045-3, Univerzita Pardubice, Pardubice.
- [19] L. Bartovská, M. Šišková, *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. vyd. VŠCHT Praha 2005. 244 stran. ISBN 80-7080-579-X.
- [20] J. Pouchlý, *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 1. vyd. VŠCHT Praha 1998. 98 stran. ISBN 80-7080-331-2.
- [21] L. Kvítek, A. Panáček, *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc 2007. 70 stran. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [22] L. Šimek, J. Hrnčířik, *Fyzikální chemie II (Koloidní a makromolekulární systémy)*. 2. vyd. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Zlín 2004. 94 stran. ISBN 80-7318-169-X.
- [23] D.D. Evanoff, G. Chumanov, Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays, *ChemPhysChem*. 6 (2005) 1221–1231. doi:10.1002/cphc.200500113.
- [24] J.A. Creighton, D.G. Eadont, Ultraviolet-Visible Absorption Spectra of the Colloidal Metallic Elements, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (1991) 3881–3891. doi:10.1039/FT9918703881.
- [25] N. Felidj, J. Aubard, G. Levi, Discrete dipole approximation for ultraviolet-visible extinction spectra simulation of silver and gold colloids, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 1195–1208. doi:10.1063/1.479305.
- [26] T. Jensen, L. Kelly, A. Lazarides, G.C. Schatz, Electrodynamics of noble metal nanoparticles and nanoparticle clusters, *J. Clust. Sci.* 10 (1999) 295–317. doi:10.1023/A:1021977613319.
- [27] K. Šišková, J. Pflieger, M. Procházka, Stabilization of Au nanoparticles prepared by laser ablation in chloroform with free-base porphyrin molecules, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 2979–2987. doi:10.1016/j.apsusc.2009.11.061.
- [28] I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, N , N -Dimethylformamide as a reaction

- medium for metal nanoparticle synthesis, *Adv Funct Mater.* 19 (2009) 679–688. doi:10.1002/adfm.200801566.
- [29] S. Link, M.A. El-Sayed, Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 8410–8426. doi:10.1021/jp9917648.
- [30] E.D. Ščukin, A. V. Percov, E.A. Amelinová, *Koloidní chemie*. 1. vyd. Academia Praha 1990. 484 stran. ISBN 80-200-0259-6.
- [31] S.S. Vojuckij, *Kurs koloidní chemie*. 1. vyd. SNTL Praha 1984. 396 stran.
- [32] G. Malescio, Intermolecular potentials — past, present, future, *Nat. Mater.* 2 (2003) 501–503. doi:10.1038/nmat949.
- [33] V.K. LaMer, R.H. Dinegar, Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 4847–4854. doi:10.1021/ja01167a001.
- [34] L. Bahrig, S.G. Hickey, A. Eychmüller, Mesocrystalline materials and the involvement of oriented attachment – a review, *CrystEngComm.* 16 (2014) 9408–9424. doi:10.1039/C4CE00882K.
- [35] J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* 75 (1979) 790. doi:10.1039/f29797500790.
- [36] S. Schneider, P. Halbig, H. Grau, U. Nickel, REPRODUCIBLE PREPARATION OF SILVER SOLS WITH UNIFORM PARTICLE SIZE FOR APPLICATION IN SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY, *Photochem. Photobiol.* 60 (1994) 605–610. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05156.x.
- [37] B.N. Rospendowski, K. Kelly, C.R. Wolf, W.E. Smith, Surface-enhanced resonance Raman scattering from cytochromes P-450 adsorbed on citrate-reduced silver sols, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 1217–1225. doi:10.1021/ja00004a023.
- [38] J. Polte, X. Tuae, M. Wuithschick, A. Fischer, A.F. Thuenemann, K. Rademann, R. Kraehnert, F. Emmerling, Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles, *ACS Nano.* 6 (2012) 5791–5802. doi:10.1021/nn301724z.
- [39] J. Polte, R. Erler, A.F. Thünemann, S. Sokolov, T.T. Ahner, K. Rademann, F. Emmerling, R. Kraehnert, Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied via in situ Small Angle X-ray Scattering at Millisecond Time Resolution, *ACS Nano.* 4 (2010) 1076–1082. doi:10.1021/nn901499c.
- [40] J. Yang, Q. Zhang, J.Y. Lee, H.-P. Too, Dissolution–recrystallization mechanism for the conversion of silver nanospheres to triangular nanoplates, *J. Colloid Interface Sci.* 308 (2007) 157–161. doi:10.1016/j.jcis.2006.12.081.
- [41] N. Leopold, B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-

Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 5723–5727. doi:10.1021/jp027460u.

- [42] U. Nickel, A. zu Castell, K. Pöpl, S. Schneider, A Silver Colloid Produced by Reduction with Hydrazine as Support for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Langmuir.* 16 (2000) 9087–9091. doi:10.1021/la000536y.
- [43] Y.-S. Li, J. Cheng, L.B. Coons, A silver solution for surface-enhanced Raman scattering, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 55 (1999) 1197–1207. doi:10.1016/s1386-1425(98)00282-0.
- [44] K. Esumi, N. Ishizuki, K. Torigoe, H. Nakamura, K. Meguro, Preparation of colloidal silver using various reductants in the presence of copolymers of vinyl alcohol-n-vinyl pyrrolidone, *J. Appl. Polym. Sci.* 44 (1992) 1003–1007. doi:10.1002/app.1992.070440609.
- [45] L. Sun, Z. Zhang, H. Dang, A novel method for preparation of silver nanoparticles, *Mater. Lett.* 57 (2003) 3874–3879. doi:10.1016/S0167-577X(03)00232-5.
- [46] A. Vaškėlis, R. Tarozaitė, A. Jagminienė, L.T. Tamašiūnaitė, R. Juškėnas, M. Kurtinaitienė, Gold nanoparticles obtained by Au(III) reduction with Sn(II): Preparation and electrocatalytic properties in oxidation of reducing agents, *Electrochim. Acta.* 53 (2007) 407–416. doi:10.1016/j.electacta.2007.04.008.
- [47] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J.Phys.Chem.* 86 (1982) 3391–3395. doi:10.1021/j100214a025.
- [48] J. Turkevich, Colloidal gold. Part I, *Gold Bull.* 18 (1985) 125–131. doi:10.1007/BF03214694.
- [49] J. Turkevich, Colloidal gold. Part II, *Gold Bull.* 18 (1995) 125–131. doi:10.1007/BF03214694.
- [50] Z.S. Pillai, P. V Kamat, What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 945–951. doi:10.1021/jp037018r.
- [51] C.H. Munro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering, *Langmuir.* 11 (1995) 3712–3720. doi:10.1021/la00010a021.
- [52] H. Tyagi, A. Kushwaha, A. Kumar, M. Aslam, PVA stabilized gold nanoparticles using ascorbic acid as a reducing agent, *AIP Conf. Proc.* 1349 (2011) 419–420. doi:10.1063/1.3605913.
- [53] L. Suber, I. Sondi, E. Matijević, D. V. Goia, Preparation and the mechanisms of formation of silver particles of different morphologies in homogeneous solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 288 (2005) 489–495. doi:10.1016/j.jcis.2005.03.017.

- [54] V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Adv. Colloid Interface Sci.* 145 (2009) 83–96. doi:10.1016/j.cis.2008.09.002.
- [55] Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaran, Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process Electronic supplementary information (ESI) available: photographs of silver mirror, and of stable dispersions of silver nanoparticles from mixi, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 522–527. doi:10.1039/b107469e.
- [56] L. Kvitek, R. Prucek, A. Panacek, R. Novotny, J. Hrbac, R. Zboril, The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 1099. doi:10.1039/b417007e.
- [57] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V.K. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil, Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 16248–16253. doi:10.1021/jp063826h.
- [58] J. Liang, H. Liu, C. Huang, C. Yao, Q. Fu, X. Li, D. Cao, Z. Luo, Y. Tang, Aggregated Silver Nanoparticles Based Surface-Enhanced Raman Scattering Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultrasensitive Detection of Protein Biomarkers and Small Molecules, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5790–5796. doi:10.1021/acs.analchem.5b01011.
- [59] B. Saute, R. Narayanan, Solution-based direct readout surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of ultra-low levels of thiram with dogbone shaped gold nanoparticles., *Analyst.* 136 (2011) 527–532. doi:10.1039/c0an00594k.
- [60] Y. Shi, W. Liu, C. Chen, Two-Step Centrifugation Method for Subpicomolar Surface-Enhanced Raman Scattering Detection, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5009–5015. doi:10.1021/acs.analchem.6b01194.
- [61] A.M. Michaels, M. Nirmal, L.E. Brus, Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Individual Rhodamine 6G Molecules on Large Ag Nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9932–9939. doi:10.1021/ja992128q.
- [62] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1667–1670. doi:10.1103/PhysRevLett.78.1667.
- [63] A.M. Schwartzberg, C.D. Grant, A. Wolcott, C.E. Talley, T.R. Huser, R. Bogomolni, J.Z. Zhang, Unique Gold Nanoparticle Aggregates as a Highly Active Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 19191–19197. doi:10.1021/jp048430p.
- [64] P. Hildebrandt, M. Stockburger, Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of Rhodamine 6G adsorbed on colloidal silver, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 5935–5944. doi:10.1021/j150668a038.

- [65] M. Futamata, Y. Maruyama, Electromagnetic and chemical interaction between Ag nanoparticles and adsorbed rhodamine molecules in surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 89–102. doi:10.1007/s00216-007-1183-5.
- [66] T.J. Dines, H. Wu, Surface-Enhanced Resonance Raman-Spectroscopic Studies of the Pb-Ii Complex of 1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol Adsorbed on Ag Sol, *J. Chem. Soc. Trans.* 91 (1995) 463–468. doi:10.1039/ft9959100463.
- [67] E.J. Liang, W. Kiefert, Chemical Effect of SERS with Near-Infrared Excitation, *J. Raman Spectrosc.* 27 (1996) 879–885. doi:10.1002/(SICI)1097-4555(199612)27:12<879::AID-JRS45>3.3.CO;2-Y.
- [68] E.J. Liang, X.L. Ye, W. Kiefer, Interaction of halide and halate ions with colloidal silver and their influence on surface-enhanced Raman scattering of pyridine with near-infrared excitation, *Vib. Spectrosc.* 15 (1997) 69–78. doi:10.1016/S0924-2031(97)00028-3.
- [69] W. Grochala, a. Kudelski, J. Bukowska, Anion-induced charge-transfer enhancement in SERS and SERRS spectra of Rhodamine 6G on a silver electrode: how important is it?, *J. Raman Spectrosc.* 29 (1998) 681–685. doi:10.1002/(SICI)1097-4555(199808)29:8<681::AID-JRS287>3.0.CO;2-J.
- [70] X. Dong, H. Gu, J. Kang, X. Yuan, J. Wu, Comparative study of surface-enhanced Raman scattering activities of three kinds of silver colloids when adding anions as aggregating agents, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 368 (2010) 142–147. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.07.029.
- [71] S.R. Emory, E. Haskins, S. Nie, Direct Observation of sSize- Dependent Optical Enhancement in single Meta Nanoparticle, *Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8009–8010. doi:10.1021/ja9815677.
- [72] L. Zeiri, S. Efrima, Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: The effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 667–675. doi:10.1002/jrs.1349.
- [73] S. Efrima, L. Zeiri, Understanding SERS of bacteria, *J. Raman Spectrosc.* 40 (2009) 277–288. doi:10.1002/jrs.2121.
- [74] R. Prucek, A. Panáček, A. Fargašová, V. Ranc, V. Mašek, L. Kvítek, R. Zbořil, Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy, *CrystEngComm.* 13 (2011) 2242. doi:10.1039/c0ce00776e.
- [75] C. Morasso, D. Mehn, R. Vanna, M. Bedoni, E. Forvi, M. Colombo, D. Prospero, F. Gramatica, One-step synthesis of star-like gold nanoparticles for surface enhanced Raman spectroscopy, *Mater. Chem. Phys.* 143 (2014) 1215–1221. doi:10.1016/j.matchemphys.2013.11.024.
- [76] R.G. Freeman, K.C. Grabar, K.J. Allison, R.M. Bright, J.A. Davis, A.P. Guthrie, M.B. Hommer, M.A. Jackson, P.C. Smith, D.G. Walter, M.J. Natan, SERS

Substrates, 267 (1995).

- [77] T. Vo-Dinh, F. Yan, M.B. Wabuyele, Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 640–647. doi:10.1002/jrs.1348.
- [78] S. Cîntă Pînzaru, A. Falamaş, C. Dehelean, C. Morari, M. Venter, Double Amino Functionalized Ag Nanoparticles as SERS Tags in Raman Diagnostic, *Croat. Chem. Acta.* 86 (2013) 233–244. doi:10.5562/cca2067.
- [79] S. Feng, D. Lin, J. Lin, B. Li, Z. Huang, G. Chen, W. Zhang, L. Wang, J. Pan, R. Chen, H. Zeng, Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer, *Analyst.* 138 (2013) 3967. doi:10.1039/c3an36890d.
- [80] Y. Wang, S. Kang, A. Khan, G. Ruttner, S.Y. Leigh, M. Murray, S. Abeytunge, G. Peterson, M. Rajadhyaksha, S. Dintzis, S. Javid, J.T.C. Liu, Quantitative molecular phenotyping with topically applied SERS nanoparticles for intraoperative guidance of breast cancer lumpectomy, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21242. doi:10.1038/srep21242.
- [81] S. Cervo, E. Mansutti, G. Del Mistro, R. Spizzo, A. Colombatti, A. Steffan, V. Sergio, A. Bonifacio, SERS analysis of serum for detection of early and locally advanced breast cancer, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 7503–7509. doi:10.1007/s00216-015-8923-8.
- [82] S. Li, Y. Zhang, J. Xu, L. Li, Q. Zeng, L. Lin, Z. Guo, Z. Liu, H. Xiong, S. Liu, Noninvasive prostate cancer screening based on serum surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine, *Appl. Phys. Lett.* 105 (2014). doi:10.1063/1.4892667.
- [83] D.S. Grubisha, R.J. Lipert, H. Park, J. Driskell, M.D. Porter, Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen: An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogold Labels Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen: An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogol, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5936–5943. doi:10.1021/ac034356f.
- [84] Y. Zhang, X. Ye, G. Xu, X. Jin, M. Luan, J. Lou, L. Wang, C. Huang, J. Ye, Identification and distinction of non-small-cell lung cancer cells by intracellular SERS nanoprobes, *RSC Adv.* 6 (2016) 5401–5407. doi:10.1039/C5RA21758J.
- [85] Y. Chen, G. Chen, X. Zheng, C. He, S. Feng, Y. Chen, X. Lin, R. Chen, H. Zeng, Discrimination of gastric cancer from normal by serum RNA based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analysis., *Med. Phys.* 39 (2012) 5664–8. doi:10.1118/1.4747269.
- [86] S. Feng, J. Lin, Z. Huang, G. Chen, W. Chen, Y. Wang, R. Chen, H. Zeng, Esophageal cancer detection based on tissue surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis, *Appl. Phys. Lett.* 102 (2013) 0–4. doi:10.1063/1.4789996.

- [87] K. Kneipp, K. Kneipp, H. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, I. Itzkan, R.R. Dasari, R.R. Dasari, M.S. Feld, M.S. Feld, Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy., *Chem. Rev.* 99 (1999) 2957–76. doi:10.1021/cr980133r.
- [88] K. Kneipp, A.S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K.E. Shafer-Peltier, J.T. Motz, R.R. Dasari, M.S. Feld, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells Using Gold Nanoparticles, *Appl. Spectrosc.* 56 (2002) 150–154. <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?id=119376%5Cnhttp://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-56-2-150>.
- [89] J. Kneipp, H. Kneipp, W.L. Rice, K. Kneipp, Optical probes for biological applications based on surface-enhanced Raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles., *Anal. Chem.* 77 (2005) 2381–2385. doi:10.1021/ac050109v.
- [90] J. Kneipp, H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown, K. Kneipp, In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates, *Nano Lett.* 6 (2006) 2225–2231. doi:10.1021/nl061517x.
- [91] J.K. Register, A.M. Fales, H.-N. Wang, S.J. Norton, E.H. Cho, A. Boico, S. Pradhan, J. Kim, T. Schroeder, N.A. Wisniewski, B. Klitzman, T. Vo-Dinh, In vivo detection of SERS-encoded plasmonic nanostars in human skin grafts and live animal models, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8215–8224. doi:10.1007/s00216-015-8939-0.
- [92] H. Xiong, Z. Guo, H. Zhong, Y. Ji, Monitoring the penetration and accumulation of gold nanoparticles in rat skin *ex vivo* using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy, *J. Innov. Opt. Health Sci.* 9 (2016) 1650026. doi:10.1142/S1793545816500267.
- [93] K.E. Shafer-Peltier, C.L. Haynes, M.R. Glucksberg, R.P. Van Duyne, Toward a Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 588–593. doi:10.1021/ja028255v.
- [94] C. Kaittanis, S. Santra, J.M. Perez, Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 408–423. doi:10.1016/j.addr.2009.11.013.
- [95] P.-J. Huang, L.-L. Tay, J. Tanha, S. Ryan, L.-K. Chau, Single-Domain Antibody-Conjugated Nanoaggregate-Embedded Beads for Targeted Detection of Pathogenic Bacteria, *Chem. - A Eur. J.* 15 (2009) 9330–9334. doi:10.1002/chem.200901397.
- [96] K. Maquelin, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N. Van Den Braak, H.P. Endtz, D. Naumann, G.J. Puppels, Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy, *J. Microbiol. Methods.* 51 (2002) 255–271. doi:10.1016/S0167-7012(02)00127-6.
- [97] K. Maquelin, C. Kirschner, L.-P. Choo-Smith, N.A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stammeler, H.P. Endtz, H.A. Bruining, D. Naumann, G.J. Puppels, Prospective

Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 324–329. doi:10.1128/JCM.41.1.324-329.2003.

- [98] W.R. Premasiri, J.C. Lee, A. Sauer-Budge, R. Thøgers, C.E. Costello, L.D. Ziegler, The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS, *Anal. Bioanal. Chem.* (2016) 1–17. doi:10.1007/s00216-016-9540-x.
- [99] T. Smith-Palmer, C. Douglas, P. Fredericks, Rationalizing the SER spectra of bacteria, *Vib. Spectrosc.* 53 (2010) 103–106. doi:10.1016/j.vibspec.2010.02.012.
- [100] X. Wu, J. Chen, X. Li, Y. Zhao, S.M. Zughair, Culture-free diagnostics of *Pseudomonas aeruginosa* infection by silver nanorod array based SERS from clinical sputum samples, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 10 (2014) 1863–1870. doi:10.1016/j.nano.2014.04.010.
- [101] G. Bodelón, V. Montes-García, V. López-Puente, E.H. Hill, C. Hamon, M.N. Sanz-Ortiz, S. Rodal-Cedeira, C. Costas, S. Celiksoy, I. Pérez-Juste, L. Scarabelli, A. La Porta, J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering, *Nat. Mater.* 15 (2016) 1203–1211. doi:10.1038/nmat4720.
- [102] D. van Lierop, K. Faulds, D. Graham, Separation Free DNA Detection Using Surface Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5817–5821. doi:10.1021/AC200514e.
- [103] H. Zhou, D. Yang, N.P. Ivleva, N.E. Mircescu, R. Niessner, C. Haisch, SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1525–1533. doi:10.1021/ac402935p.
- [104] H. Kudo, T. Itoh, T. Kashiwagi, M. Ishikawa, H. Takeuchi, H. Ukeda, Surface enhanced Raman scattering spectroscopy of Ag nanoparticle aggregates directly photo-reduced on pathogenic bacterium (*Helicobacter pylori*), *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 221 (2011) 181–186. doi:10.1016/j.jphotochem.2011.03.009.
- [105] S. Uusitalo, M. Kögler, A.-L. Välimaa, A. Popov, Y. Ryabchikov, V. Kontturi, S. Siitonen, J. Petäjä, T. Virtanen, R. Laitinen, M. Kinnunen, I. Meglinski, A. Kabashin, A. Bunker, T. Viitala, J. Hiltunen, Detection of *Listeria innocua* on roll-to-roll produced SERS substrates with gold nanoparticles, *RSC Adv.* 6 (2016) 62981–62989. doi:10.1039/C6RA08313G.
- [106] X. Yang, C. Gu, F. Qian, Y. Li, J.Z. Zhang, Highly sensitive detection of proteins and bacteria in aqueous solution using surface-enhanced raman scattering and optical fibers, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5888–5894. doi:10.1021/ac200707t.
- [107] S. Preciado-Flores, D. a Wheeler, T.M. Tran, Z. Tanaka, C. Jiang, M. Barboza-Flores, F. Qian, Y. Li, B. Chen, J.Z. Zhang, SERS spectroscopy and SERS imaging of *Shewanella oneidensis* using silver nanoparticles and nanowires, *Chem. Commun.* 47 (2011) 4129. doi:10.1039/c0cc05517d.

- [108] B. Guven, N. Basaran-Akgul, E. Temur, U. Tamer, İ.H. Boyacı, SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for *Escherichia coli* enumeration, *Analyst*. 136 (2011) 740–748. doi:10.1039/C0AN00473A.
- [109] A.K. Boardman, W.S. Wong, W.R. Premasiri, L.D. Ziegler, J.C. Lee, M. Miljkovic, C.M. Klapperich, A. Sharon, A.F. Sauer-Budge, Rapid Detection of Bacteria from Blood with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 88 (2016) 8026–8035. doi:10.1021/acs.analchem.6b01273.
- [110] E. Kastanos, K. Hadjigeorgiou, A. Kyriakides, C. Pitris, Classification of bacterial samples as negative or positive for a UTI and antibiogram using surface enhanced Raman spectroscopy, in: T. Vo-Dinh, J.R. Lakowicz (Eds.), *Prog. Biomed. Opt. Imaging - Proc. SPIE*, 2011: p. 791107. doi:10.1117/12.874425.
- [111] A. Walter, A. März, W. Schumacher, P. Rösch, J. Popp, Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device., *Lab Chip*. 11 (2011) 1013–1021. doi:10.1039/c0lc00536c.
- [112] D. Yang, H. Zhou, C. Haisch, R. Niessner, Y. Ying, Reproducible *E. coli* detection based on label-free SERS and mapping, *Talanta*. 146 (2016) 457–463. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.006.
- [113] Y. Wang, K. Lee, J. Irudayaraj, Silver Nanosphere SERS Probes for Sensitive Identification of Pathogens, *J. Phys. Chem. C*. 114 (2010) 16122–16128. doi:10.1021/jp1015406.
- [114] X. Ma, Y. Liu, N. Zhou, N. Duan, S. Wu, Z. Wang, SERS aptasensor detection of *Salmonella typhimurium* using a magnetic gold nanoparticle and gold nanoparticle based sandwich structure, *Anal. Methods*. 8 (2016) 8099–8105. doi:10.1039/C6AY02623K.
- [115] H. Zhang, X. Ma, Y. Liu, N. Duan, S. Wu, Z. Wang, B. Xu, Gold nanoparticles enhanced SERS aptasensor for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 872–877. doi:10.1016/j.bios.2015.07.033.
- [116] S.A. Khan, A.K. Singh, D. Senapati, Z. Fan, P.C. Ray, Targeted highly sensitive detection of multi-drug resistant salmonella DT104 using gold nanoparticles, *Chem. Commun.* 47 (2011) 9444. doi:10.1039/c1cc13199k.
- [117] C. Fan, Z. Hu, A. Mustapha, M. Lin, Rapid detection of food- and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011) 1053–1061. doi:10.1007/s00253-011-3634-3.
- [118] M. Potara, E. Jakab, A. Damert, O. Popescu, V. Canpean, S. Astilean, Synergistic antibacterial activity of chitosan–silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*, *Nanotechnology*. 22 (2011) 135101. doi:10.1088/0957-4484/22/13/135101.

- [119] J. Wang, X. Wu, C. Wang, N. Shao, P. Dong, R. Xiao, S. Wang, Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of *Staphylococcus aureus* Based on Aptamer Recognition, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 20919–20929. doi:10.1021/acsami.5b06446.
- [120] B. Ankamwar, U.K. Sur, P. Das, SERS study of bacteria using biosynthesized silver nanoparticles as the SERS substrate, *Anal. Methods*. 8 (2016) 2335–2340. doi:10.1039/C5AY03014E.
- [121] J. Li, T. Qin, X.X. Jia, A.H. Deng, X. Zhang, W.H. Fan, S.D. Huo, T.Y. Wen, W.J. Liu, Rapid Identification of *Legionella* Pathogenicity by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy., *Biomed. Environ. Sci.* 28 (2015) 437–44. doi:10.3967/bes2015.061.
- [122] M. Kahraman, M.M. Yazici, F. Şahin, M. Çulha, Convective assembly of bacteria for surface-enhanced Raman scattering, *Langmuir*. 24 (2008) 894–901. doi:10.1021/la702240q.
- [123] M. Kahraman, A.I. Zamaleeva, R.F. Fakhrullin, M. Culha, Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2559–2567. doi:10.1007/s00216-009-3159-0.
- [124] M. Kahraman, K. Keseroğlu, M. Çulha, On Sample Preparation for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria and the Source of Spectral Features of the Spectra, *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 500–506. doi:10.1366/10-06184.
- [125] E. Efeoglu, M. Culha, In Situ-Monitoring of Biofilm Formation by Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 498–505. doi:10.1366/12-06896.
- [126] D. Cam, K. Keseroglu, M. Kahraman, F. Sahin, M. Culha, Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectrosc.* 41 (2009) 484–489. doi:10.1002/jrs.2475.
- [127] R.M. Jarvis, R. Goodacre, Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 76 (2004) 40–47. doi:10.1021/ac034689c.
- [128] X. Wu, C. Xu, R.A. Tripp, Y. Huang, Y. Zhao, Detection and differentiation of foodborne pathogenic bacteria in mung bean sprouts using field deployable label-free SERS devices, *Analyst*. 138 (2013) 3005. doi:10.1039/c3an00186e.
- [129] W.R. Premasiri, D.T. Moir, M.S. Klempner, N. Krieger, G. Jones, L.D. Ziegler, Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria, *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 312–320. doi:10.1021/jp040442n.
- [130] H.-W. Cheng, S.-Y. Huan, H.-L. Wu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Surface-enhanced Raman spectroscopic detection of a bacteria biomarker using gold nanoparticle immobilized substrates., *Anal. Chem.* 81 (2009) 9902–9912. doi:10.1021/ac9014275.

- [131] R. Prucek, V. Ranc, L. Kvítek, A. Panáček, R. Zbořil, M. Kolář, Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation, *Analyst*. 137 (2012) 2866. doi:10.1039/c2an16310a.
- [132] E. Mine, A. Yamada, Y. Kobayashi, M. Konno, L.M. Liz-Marzán, Direct coating of gold nanoparticles with silica by a seeded polymerization technique, *J. Colloid Interface Sci.* 264 (2003) 385–390. doi:10.1016/S0021-9797(03)00422-3.
- [133] S.P. Mulvaney, M.D. Musick, C.D. Keating, M.J. Natan, Glass-coated, analyte-tagged nanoparticles: A new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman scattering, *Langmuir*. 19 (2003) 4784–4790. doi:10.1021/la026706j.
- [134] W.E. Doering, S. Nie, Spectroscopic Tags Using Dye-Embedded Nanoparticles and Surface-Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6171–6176. doi:10.1021/ac034672u.
- [135] L.O. Brown, S.K. Doorn, Optimization of the Preparation of Glass-Coated, Dye-Tagged Metal Nanoparticles as SERS Substrates, *Langmuir*. 24 (2008) 2178–2185. doi:10.1021/la703218f.
- [136] W. Lu, A.K. Singh, S.A. Khan, D. Senapati, H. Yu, P.C. Ray, Gold nanopopcorn-based targeted diagnosis, nanotherapy treatment, and in situ monitoring of photothermal therapy response of prostate cancer cells using surface-enhanced raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 18103–18114. doi:10.1021/ja104924b.
- [137] A. Sivanesan, E. Witkowska, W. Adamkiewicz, Ł. Dziewit, A. Kamińska, J. Waluk, Nanostructured silver–gold bimetallic SERS substrates for selective identification of bacteria in human blood, *Analyst*. 139 (2014) 1037. doi:10.1039/c3an01924a.
- [138] V. Ranc, Z. Markova, M. Hajduch, R. Prucek, L. Kvitek, J. Kaslik, K. Safarova, R. Zboril, Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Scattering Selective Determination of Dopamine in an Artificial Cerebrospinal Fluid and a Mouse Striatum Using Fe₃O₄/Ag Nanocomposite, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2939–2946. doi:10.1021/ac500394g.
- [139] A. Balzerova, A. Fargasova, Z. Markova, V. Ranc, R. Zboril, Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11107–11114. doi:10.1021/ac503347h.
- [140] P.E. van Eeden, M.D. Wiese, S. Aulfrey, B.J. Hales, S.F. Stone, S.G.A. Brown, Using time-resolved fluorescence to measure serum venom-specific IgE and IgG, *PLoS One*. 6 (2011) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0016741.
- [141] P. Drake, P.-S. Jiang, H.-W. Chang, S.-C. Su, J. Tanha, L.-L. Tay, P. Chen, Y.-J. Lin, Raman based detection of *Staphylococcus aureus* utilizing single domain antibody coated nanoparticle labels and magnetic trapping, *Anal. Methods*. 5

(2013) 4152. doi:10.1039/c3ay40652k.

- [142] I.-H. Cho, P. Bhandari, P. Patel, J. Irudayaraj, Membrane filter-assisted surface enhanced Raman spectroscopy for the rapid detection of *E. coli* O157:H7 in ground beef., *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 171–6. doi:10.1016/j.bios.2014.08.063.
- [143] S.O. Obare, R.E. Hollowell, C.J. Murphy, Sensing strategy for lithium ion based on gold nanoparticles, *Langmuir.* 18 (2002) 10407–10410. doi:10.1021/la0260335.
- [144] C.L. Schofield, A.H. Haines, R.A. Field, D.A. Russell, Silver and gold glyconanoparticles for colorimetric bioassays, *Langmuir.* 22 (2006) 6707–6711. doi:10.1021/la060288r.
- [145] A.J. Haes, R.P. Van Duyne, A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 10596–10604. doi:10.1021/ja020393x.
- [146] J.C. Riboh, A.J. Haes, A.D. McFarland, C.R. Yonzon, R.P. Van Duyne, A nanoscale optical biosensor: Real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 1772–1780. doi:10.1021/jp022130v.
- [147] A.J. Haes, L. Chang, W.L. Klein, R.P. Van Duyne, Detection of a Biomarker for Alzheimer’s Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2264–2271. doi:10.1021/ja044087q.
- [148] D.J. Maxwell, J.R. Taylor, S. Nie, Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 9606–9612. doi:10.1021/ja025814p.
- [149] X. Shi, L. Wang, N. Kariuki, J. Luo, C.J. Zhong, S. Lu, A multi-module artificial neural network approach to pattern recognition with optimized nanostructured sensor array, *Sensors Actuators, B Chem.* 117 (2006) 65–73. doi:10.1016/j.snb.2005.11.002.
- [150] A. Mars, C. Parolo, A. de la Escosura-Muñiz, N. Raouafi, A. Merkoçi, Control of Electron-transfer in Immunonanosensors by Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies, *Electroanalysis.* 28 (2016) 1795–1802. doi:10.1002/elan.201500646.
- [151] A. Fargašová, A. Balzerová, R. Pucek, M.H. Sedláková, K. Bogdanová, J. Gallo, M. Kolář, V. Ranc, R. Zbořil, Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6598–6607. doi:10.1021/acs.analchem.7b00759.
- [152] A. Fargašová, R. Pucek, V. Ranc, A. Panáček, L. Kvítek, R. Zbořil, Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation

wavelengths, *RSC Adv.* 5 (2015) 9737–9744. doi:10.1039/C4RA13881C.

- [153] W. Li, P.H.C. Camargo, X. Lu, Y. Xia, Dimers of Silver Nanospheres: Facile Synthesis and Their Use as Hot Spots for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Nano Lett.* 9 (2009) 485–490. doi:10.1021/nl803621x.
- [154] Y. Yang, S. Matsubara, L. Xiong, T. Hayakawa, M. Nogami, Solvothermal Synthesis of Multiple Shapes of Silver Nanoparticles and Their SERS Properties Solvothermal Synthesis of Multiple Shapes of Silver Nanoparticles and Their SERS Properties, *Society.* (2007) 9095–9104. doi:10.1021/jp068859b.
- [155] S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos, G. Morcillo, A. Tinti, Morphological Study of Silver Colloids Employed in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Activation when Exciting in Visible and Near-Infrared Regions, *J. Colloid Interface Sci.* 175 (1995) 358–368. doi:10.1006/jcis.1995.1467.
- [156] J. Aubard, E. Bagnasco, J. Pantigny, M.F. Ruasse, G. Levi, E. Wentrup-Byrne, An Ion-Exchange Reaction as Measured by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Silver Colloids, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 7075–7081. doi:10.1021/j100018a046.
- [157] S.D. Kobayashi, F.R. Deleo, Staphylococcus aureus Protein A promotes Immune Suppression, *Am. Soc. Microbiol.* 4 (2013) 4–6. doi:10.1128/mBio.00764-13.Updated.
- [158] F.M. Poulsen, J.T. Johansen, J.A. Pedersen, Structural properties of the combining site of anti Streptococcus group a antibodies: Spin label-hapten studies, *Carlsberg Res. Commun.* 42 (1977) 369–378. doi:10.1007/BF02906121.
- [159] C.-M. Pradier, M. Salmann, L. Zheng, G. Jaouen, Specific binding of avidin to biotin immobilised on modified gold surfaces, *Surf. Sci.* 502–503 (2002) 193–202. doi:10.1016/S0039-6028(01)01932-X.
- [160] Z. Liu, M.D. Amiridis, Quantitative FT-IRRAS Spectroscopic Studies of the Interaction of Avidin with Biotin on Functionalized Quartz Surfaces, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 16866–16872. doi:10.1021/jp0535240.
- [161] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (2007) 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [162] P.I. Haris, Can infrared spectroscopy provide information on protein-protein interactions?, *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2010) 940–6. doi:10.1042/BST0380940.
- [163] M. Harz, P. Rösch, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, J. Popp, Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions, *Analyst.* 130 (2005) 1543. doi:10.1039/b507715j.
- [164] M. Knauer, N.P. Ivleva, X. Liu, R. Niessner, C. Haisch, Surface-enhanced raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2766–2772. doi:10.1021/ac902696y.

- [165] J.H. Shao, Y.F. Zou, X.L. Xu, J.Q. Wu, G.H. Zhou, Evaluation of structural changes in raw and heated meat batters prepared with different lipids using Raman spectroscopy, *Food Res. Int.* 44 (2011) 2955–2961. doi:10.1016/j.foodres.2011.07.003.
- [166] H. Ton-That, S.K. Mazmanian, L. Alksne, O. Schneewind, Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 7447–7452. doi:10.1074/jbc.M109945200.
- [167] R.P. Chauhan, G. Singh, S. Singh, N. Bag, M. Patra, S.R. Vadera, A.K. Mishra, R. Mathur, Biotinylated magnetic nanoparticles for pretargeting: Synthesis and characterization study, *Cancer Nanotechnol.* 2 (2011) 111–120. doi:10.1007/s12645-011-0021-9.
- [168] G.J. Puppels, H.S. Garritsen, G.M. Segers-Nolten, F.F. de Mul, J. Greve, Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes., *Biophys. J.* 60 (1991) 1046–56. doi:10.1016/S0006-3495(91)82142-7.
- [169] R.A. Halvorson, W. Leng, P.J. Vikesland, Differentiation of microcystin, nodularin, and their component amino acids by drop-coating deposition Raman spectroscopy, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9273–9280. doi:10.1021/ac201617g.
- [170] J. Guicheteau, L. Argue, D. Emge, A. Hyre, M. Jacobson, S. Christesen, *Bacillus* spore classification via surface-enhanced Raman spectroscopy and principal component analysis, *Appl. Spectrosc.* 62 (2008) 267–272. doi:10.1366/000370208783759623.
- [171] T.T. Liu, Y.H. Lin, C.S. Hung, T.J. Liu, Y. Chen, Y.C. Huang, T.H. Tsai, H.H. Wang, D.W. Wang, J.K. Wang, Y.L. Wang, C.H. Lin, A high speed detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for monitoring antibiotic-induced chemical changes in bacteria cell wall, *PLoS One.* 4 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0005470.
- [172] A. Kropec, T. Maira-Litran, K.K. Jefferson, M. Grout, S.E. Cramton, F. Gotz, D. a Goldmann, G.B. Pier, Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* Is Essential for Virulence in Murine Models of Systemic Infection, *Infect. Immun.* 73 (2005) 6868–6876. doi:10.1128/IAI.73.10.6868-6876.2005.
- [173] R.M.B. Shafreen, S. Srinivasan, P. Manisankar, S.K. Pandian, Biofilm formation by *Streptococcus pyogenes*: Modulation of exopolysaccharide by fluoroquinolone derivatives, *J. Biosci. Bioeng.* 112 (2011) 345–350. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.06.013.
- [174] M. Liu, C. Prakash, A. Nauta, R.J. Siezen, C. Francke, Computational analysis of cysteine and methionine metabolism and its regulation in dairy starter and related bacteria, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 3522–3533. doi:10.1128/JB.06816-11.
- [175] P. Suchomel, R. Prucek, K. Černá, A. Fargašová, A. Panáček, A. Gedanken, R. Zbořil, L. Kvítek, Highly efficient silver particle layers on glass substrate

synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes, *Ultrason. Sonochem.* 32 (2016) 165–172. doi:10.1016/j.ulsonch.2016.03.006.

Přílohy

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 9737

Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation wavelengths†

Ariana Fargašová, Robert Prucek,* Václav Ranc, Aleš Panáček, Libor Kvítek and Radek Zbořil

The effect of six various chloride ion concentrations (25, 50, 100, 200, 400, and 800 mM) on time-dependence and surface enhanced Raman scattering (SERS) signal intensity was investigated for silver nanoparticles (~28 nm) with a high monodispersity and long time stability. The experiments were performed using three lasers with excitation wavelengths in the visible region (532 nm, 633 nm, 780 nm). Adenine was used as a model analyte. The treatment procedure, when the various sodium chloride solutions added to silver nanoparticles, led to an enhancement in the Raman signal at all studied concentration levels of sodium chloride. Nevertheless, low-concentration chloride ions differently influenced the time course of enhancement efficiency contrary to high-concentration chloride ions. The final concentration of chloride ions equal to 25 mM did not have any pronounced influence on the silver particle sizes and morphologies. The final concentration of chloride ions varying from 50 to 200 mM led to the etching and coalescence of silver nanoparticles. Higher concentrations of chlorides (400 mM) caused re-crystallization of primary silver nanoparticles to one order larger crystallites (400 nm). From the point of view of SERS, the time dependent profiles of Raman signal enhancement differ only slightly for all the used final concentrations of chloride ions when using excitation at 532 nm. On the contrary, for excitation wavelengths 633 nm and 780 nm, the time dependent profiles of Raman signal enhancement were very different when using above mentioned six various final concentrations of chloride ions.

Received 5th November 2014
Accepted 5th January 2015

DOI: 10.1039/c4ra13881c

www.rsc.org/advances

Introduction

Due to Fleischmann's observation of Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode,¹ and mainly Creighton's observations of intense Raman scattering of pyridine molecules adsorbed on silver colloid particles,² surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy has become a powerful analytical technique where metal particles or layers are exploited for detection of important molecules.^{3,4} SERS is a very sensitive technique which allows the acquisition of spectra at very low concentrations of analytes.⁵⁻⁷ This ability makes SERS a versatile tool for easy and rapid detection of the important compounds which may be a clue to, for example, criminal investigations or diagnostic purposes. Silver or gold nanoparticles which are the most frequently used SERS substrates⁸⁻¹² have been successfully

applied for measurements of addictive substances,¹³⁻¹⁵ unsafe food,¹⁶⁻¹⁸ or, especially in the last few years, bacteria.¹⁹⁻²⁷

Among the metals, silver based substrates are widely used for SERS purposes, because of the cost, relatively easy preparation, and very good enhancement effects of such materials. Studies revealed that the shape, size and distance between silver nanoparticles play an important role providing an enhancement of the Raman signal.^{28,29} Recently, it has been shown that the highest value of Raman signal enhancement was achieved on the so-called 'hot silver particles'. The optimal sizes of such particles are between 110 to 120 nm for the commonly used argon laser with a wavelength of 514.5 nm.^{7,30} On the other hand, silver nanoparticles with sizes of a few tens of nanometers can be utilized as effective SERS substrates too. Nevertheless, these small particles themselves usually do not provide significant enhancement of the Raman signal. For these purposes, they must be treated, usually by the addition of some inorganic ions, mainly chlorides. The presence of ions leads to the aggregation of particles where the junction sites among nanoparticles provide the very strong enhancement of the SERS signal. The most used silver colloids for SERS purposes (treated

Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Slechtitelu 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic. E-mail: robert.prucek@upol.cz

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4ra13881c

by the addition of ions) are prepared using of sodium citrate, sodium borohydride and hydroxylamine hydrochloride as reducing agents. Nevertheless, there are a few studies comparing influence of different concentrations of ions on characteristics of silver colloid and its activity in SERS.^{31–35} Liu *et al.* provided comprehensive studies of 66 mM halides (NaCl, NaBr, and NaI) activation of borohydride-reduced silver colloid for SERS of riboflavin.³³ Dong *et al.* reported a comparative study of the effects of various sodium salts (NaCl, NaNO₃, Na₂SO₄, and NaI) on the Raman signal of methylene blue (MB) adsorbed on hydroxylamine-reduced silver colloid with particle size of about 34 nm.³⁶ Among the four mentioned salts used for SERS effect, the addition of NaCl solution provides the greatest enhancement of Raman signal due to the synergy of the modification of silver particle surface and the particle aggregation caused by chlorides, while NaI gives the least enhancement of Raman signal. On the other side, Aubard *et al.* observed quenching of SERS-signal from benzoic acid after the addition of various anions (Br⁻, I⁻, and Cl⁻). This work brought interesting results about mechanism of ions exchange which proceed on silver particle surface. They have observed the decreasing SERS intensities with the increasing concentration of sodium salts up to 10 mM.³⁷

There are no studies that have investigated the influence of ions in a wide range of concentrations on changes of one type silver nanoparticles with respect to its efficiency to enhance of Raman signal. For such study, we choose maltose-reduced silver nanoparticles (NPs) with high monodispersity and great time stability.³⁸ For treating of the silver NPs with an average particle size equal to 28 nm, we applied six different final concentrations of chloride ions (25, 50, 100, 200, 400, and 800 mM). The changes in silver nanoparticle characteristics were monitored by measuring the average particle sizes and by recording the UV/Vis spectra. The kinetics of Raman signal enhancement after addition of chloride ions was investigated for three excitation wavelengths (532, 633, and 780 nm).

Experimental

Materials and chemicals

Silver nitrate (AgNO₃, p.a., Fagron), ammonia (NH₃, aqueous solution 28% w/w, p.a., Sigma), sodium hydroxide (NaOH, p.a., Lachema), D(+)-maltose monohydrate (C₁₂H₂₂O₁₁·H₂O, p.a., Sigma) were used for preparation of silver nanoparticles without any further purification. Sodium chloride (NaCl, p.a., Sigma-Aldrich) was used as a treatment agent of primarily prepared silver nanoparticles. The adenine with certified purity of 99% (Sigma-Aldrich) was used without any further purification too. Deionized water was used for all experiments with conductivity 0.05 μS cm⁻¹ obtained from instrument Aqual 29 (Merci).

Instrumentation

The size of synthesized silver nanoparticles as well as the course of changes of particle sizes formed after the addition of sodium chloride to the primarily prepared silver nanoparticles was characterized by a dynamic light scattering (DLS) using a Zeta

Plus analyzer (Brookhaven, USA). UV/Vis absorption spectra of the silver nanoparticles were obtained by using a Specord S600 (Analytic Jena AG, Germany). Transmission electron microscopy (TEM) images of silver nanoparticles were recorded on a Jeol JEM 2010 (Japan) electron microscope at 160 kV of the acceleration voltage. SERS and normal Raman spectra were recorded using a DXR Raman Microscope (Thermo Scientific) equipped with a thermoelectrically cooled (−50 °C) charge-coupled device (CCD) camera and a 4× objective. All spectra were measured at room temperature in a quartz cell. SERS spectra have been measured by three laser sources with wavelengths of 532 nm (diode-pumped, solid state laser), 633 nm (He–Ne gas laser) and 780 nm (frequency-stabilized single mode diode laser). In all three cases, the SERS spectra were acquired in the range from 40 to 1880 cm⁻¹ where the spectral acquisition was repeated 16 times with 5 seconds accumulation time. For all three different excitation wavelengths, the laser light power incident onto a sample was adjusted at to 8.0 mW and slit to 50 μm.

Preparation of silver nanoparticles

The maltose reduced silver nanoparticles, used as a SERS substrate, were prepared by a procedure described by Panacek *et al.*³⁹ This procedure lies in a reduction of the silver ammonia complex cation [Ag(NH₃)₂]⁺ with D-maltose. The concentrations of the reaction components were 10⁻³ mol L⁻¹ and 10⁻² mol L⁻¹ for AgNO₃ and the reducing sugar, respectively. The concentration of the used ammonia was 5 × 10⁻³ mol L⁻¹. The basic environment of the reaction system was adjusted to the value of pH at 11.5 ± 0.1 by adding of sodium hydroxide solution. A reaction time was achieved during 4 minutes. These maltose-reduced silver nanoparticles are nearly monodispersed with an average particle size of about 28 nm. The as-prepared silver nanoparticles were characterized by measuring the UV/Vis absorption spectra with narrow surface plasmon absorption peak at 410 nm wavelength. All the measurements were performed at the laboratory temperature (20 °C). The resulting brownish aqueous dispersion of the silver nanoparticles exhibits a long stability in time during a period of ~2 years.³⁸

Sample preparation for characterization and SERS measurements

For the purpose both of DLS and UV/Vis measurements, 0.4 mL of the stock aqueous solution of silver nanoparticles was diluted by deionized water ranged from 1.20 to 1.55 mL and then 0.050–0.400 mL of 1 M or 4 M NaCl solution was added. After adding solution of chloride ions, the mixture was quickly shaken and immediately the measurements began. For SERS measurements, six working mixtures with different final concentration of sodium chloride were prepared as follows: the amount of 0.4 mL of the stock aqueous solution of silver nanoparticles was added to deionized water ranged from 1.18 to 1.53 mL. Then, 0.050–0.400 mL of 1 M or 4 M NaCl solution was added in order to characterize the influence of chlorides. After adding chloride ions to the diluted dispersion of silver nanoparticles, the mixture was quickly vortexed and finally 20 μL of 10⁻³ M solution of adenine was added (the final concentration of adenine

was 10^{-5} M) thus, the total volume was 2 mL. The working mixture was shaken and the SERS measurements began immediately. This treatment procedure was the same for each laser source. The total volume of working solution was held constant for each measurement when the various chloride concentrations and different lasers were used. The experiments were repeated three times in order to verify the reproducibility. The SERS enhancement factors were calculated as a ratio of SERS signal of 10^{-5} M adenine to Raman signal of 0.1 M adenine for the strongest band in the spectrum at ~ 734 cm^{-1} .

Results and discussion

In our previous work, it has been shown that the high concentrated aqueous solution of NaCl (a final concentration of 400 mM) is very efficient for the SERS activation of maltose-reduced silver nanoparticles (~ 28 nm). Such very high concentration of chloride ions leads to rapid re-crystallization of the primarily prepared silver nanoparticles to particles with the size around 400 nm which very efficiently enhanced Raman signal of adenine both for visible (488 nm) and near infrared laser excitation (1064 nm).³⁸

In this study, we focus on effects of various concentrations of chloride ions on the characteristics of silver nanoparticles (particle size, UV/Vis absorption, SERS activity) because such complex study is missing and is important for the utilization and understanding of silver nanoparticles as enhancers of Raman signal after treatment by chloride ions. The experiments were performed for six different final concentrations of chlorides (25, 50, 100, 200, 400, and 800 mM) in aqueous dispersion of silver nanoparticles and for three excitation lines (532 nm, 633 nm, 780 nm). Silver nanoparticles obtained by the above mentioned procedure are nearly monodispersed with a long-time stability. After addition of NaCl solution to the diluted dispersion of silver nanoparticles, the changes in its properties were monitored by measuring of average particle size and by recording of UV/Vis spectra. Change of the average particle size measured by DLS as well as the UV/Vis absorption spectra were recorded each minute during 30 minutes in order to have information regarding the ongoing transformation processes of primary silver nanoparticles. In order to confirmation of particle size changes including their morphology, samples at the time of 15 minutes after the addition of NaCl solution were taken for TEM analysis. In the case of SERS measurements, the SERS spectra were collected each third minute during a period of 30 minutes after the addition of the NaCl solution. For the evaluation and comparison of Raman intensities, the observation of the whole spectrum is important. Nevertheless, for a simplification of calculation we have chosen only one peak at ~ 734 cm^{-1} . The intensities of the other adenine peaks varied in proportion to intensity of the main peak at ~ 734 cm^{-1} . The SERS spectrum in Fig. 1 shows that this peak (marked with star) is the strongest among all and comes from the ring-breathing mode in the adenine structure (inset picture in Fig. 1).

SERS measurements were performed with excitation wavelengths of 532 nm, 633 nm and 780 nm. Raman intensity dependences on time are shown in the Fig. 2. For the excitation

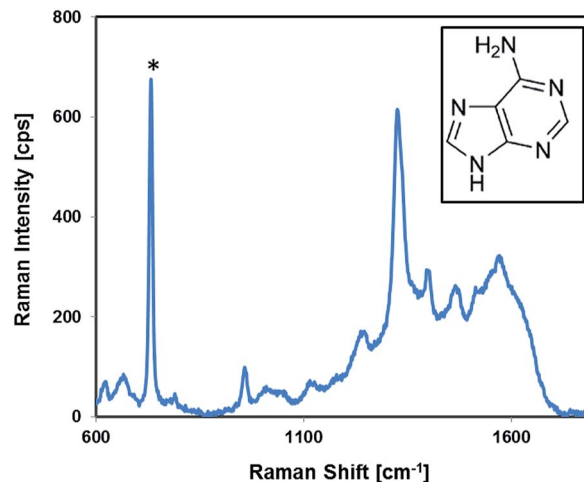


Fig. 1 SERS spectrum and chemical structure of adenine.

wavelength 532 nm, there were only slight differences among the varying concentration of chloride ions (see Fig. 2a).

For all used final NaCl concentrations, we have observed approximately twenty percent difference in intensities of the adenine band at ~ 734 cm^{-1} . In the case of excitation at 633 nm, there we have observed considerable differences among the SERS intensities of adenine for each concentration of NaCl (Fig. 2b). The highest enhancement of the Raman signal was obtained with the use of 400 mM final concentration of chloride ions. The SERS signal values achieved for the excitation wavelength of 780 nm were lower than in the case with excitation wavelengths of 532 nm and 633 nm, as seen in the Fig. 2c. There the highest enhancement of the Raman signal was observed when 400 mM final concentration of chlorides was used, although the absolute enhancement was considerably lower compared to 532 nm and 632 excitation lines. The SERS enhancement factors for the excitation lasers of 532 nm, 633 nm, and 780 nm were estimated to be 7.2×10^4 , 2.0×10^5 , and 2.4×10^5 , respectively.

As can be seen (Fig. 2a), the enhancement and time-dependent enhancement profiles for excitation at 532 nm are very similar for different final concentrations of chlorides on the contrary of using of 633 nm and mainly 780 nm excitation line. The possible explanations of considerably high Raman signal enhancement for 532 nm and 633 nm excitation wavelengths when using of 25 mM chlorides lies in the so-called hot spot regions.⁴⁰ Such concentration of chloride ions can cause temporarily approaching of certain fraction of particles in the solution, which are close to each other enough to form active sites for Raman signal enhancement. Nevertheless, for excitation wavelength 780 nm the using of 25 mM chlorides was ineffective. The increase in SERS intensities at 780 nm excitation wavelength using such low concentration of chloride ions was not observed due to the fact that the addition of chloride ions did not induce changes in silver nanoparticle characteristics sufficiently and the surface plasmon resonance of such treated Ag NPs is off the resonance with the use of the laser 780 nm. The original size of the primary silver nanoparticles has

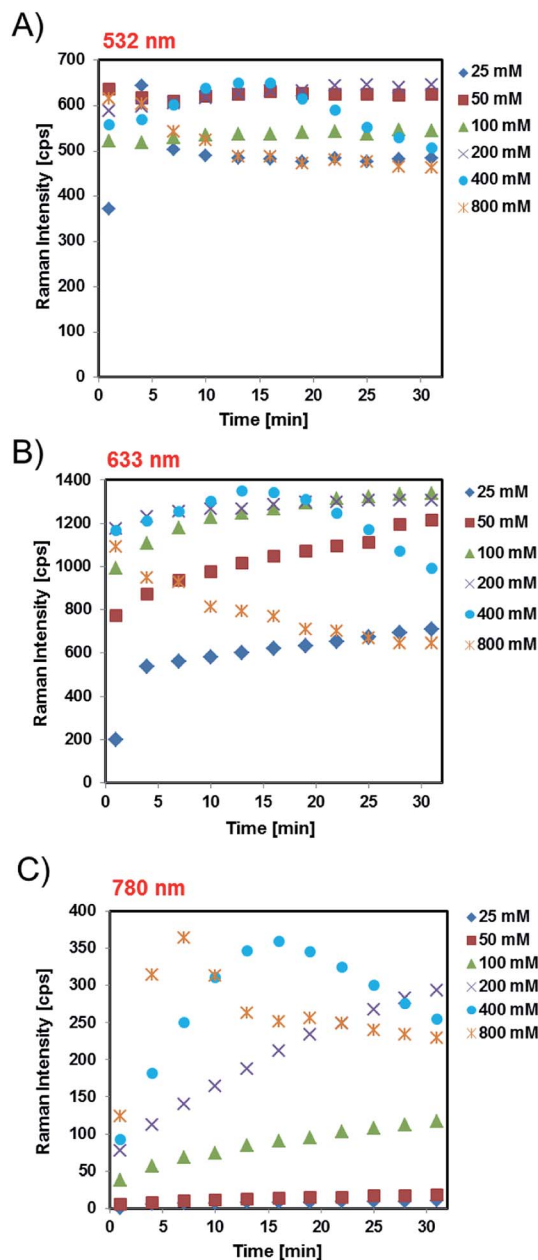


Fig. 2 Time-dependence profiles of SERS signal intensities of the 734 cm^{-1} band of adenine after the addition of six different concentrated solution of NaCl for the excitation wavelengths of 532 nm (A), 633 nm (B) and 780 nm (C).

been changed from 28 nm to 40 nm. Immediately, during the first minute after the adding of 25 mM solution of NaCl to the primary Ag NPs, there was change in the particle size from 28 nm to 40 nm, and after that the average particle size gradually decreased during a period of 30 minutes as is shown in the time-dependence of particle size measured by the DLS method (Fig. 3a). Because of the every minute averaging of particle size, temporary approaches of two or more Ag NPs have influence on slight growth of the average particle size to 40 nm. Nevertheless, on the basis of the observation of the UV/Vis absorption spectra and TEM image, there weren't observed considerable changes

in particle size. Fig. 3d shows the UV/Vis absorption spectra of Ag NPs mixed with the final concentration of chloride ions equal to 25 mM. It has been observed obviously that the addition of 25 mM chlorides doesn't change the position of the absorption peak during the whole measurement, because the change of the average particle size was very negligible. Nevertheless, the weak increase of absorption at 532 nm and 633 nm has been observed. This correlates with TEM image which was taken at the time of 15 minutes after the addition of chloride ions solution (Fig. 5a). TEM image of primarily prepared Ag NPs is presented in ESI (Fig. S1†).

For the final concentration of chlorides equal to 50 mM, there were observed higher SERS intensities for the laser 532 nm, which were stable during the whole experiment (Fig. 2a). In the case of excitation at 633 nm, a considerable growth of enhancement was achieved within few minutes after the addition of Cl^- (Fig. 2b). The enhancement slowly grew further up with the increasing particle size. As it can be seen in the Fig. 2c, there is nearly negligible growth of SERS intensities for laser excitation at 780 nm. This fact can be explained by a considerable change in the size of Ag NPs after the addition of Cl^- to Ag NPs (Fig. 3b). After the third minute following the addition of sodium chloride, there was an abrupt increase in the particle size. The size increased until the 25th minute, where it was about 300 nm. In addition, particle size changes were accompanied by a change in the color of the working mixture of Ag NPs (from brownish to grey). Fig. 3e exhibits the UV/Vis absorption spectra recorded immediately after the addition of 50 mM chlorides. After three minutes, the surface plasmon resonance peak of the original nanoparticles (410 nm) was suppressed and at the same time the secondary peak in the region 570 nm appeared. This indicates that the Ag NPs are still suitable for lasers 532 nm, 633 nm but not for 780 nm. These changes correlate with a respective TEM image (Fig. 5b), which revealed the presence of larger silver particles. On the basis of performed measurements, there it can be deduced that the addition of 50 mM chlorides causes transformations of original nanoparticles suitable for SERS measurements at 532 nm and 633 nm, but this low concentration level of chlorides has still poor effect for enhancement of the Raman signal using laser 780 nm.

The laser with excitation wavelength at 780 nm is generally not commonly used, because the most common SERS-active substrates exhibiting the largest enhancement effects are based on colloidal silver, which has the strongest plasmon field lower than mentioned excitation wavelength at 780 nm. It is known that the surface plasmon resonance wavelength is shifted with a size of the particles or with distance among them and it has to be in resonance with Raman laser to achieve the best signal enhancement. The mostly used lower final concentrations of sodium chloride (in orders of units of mM) are not sufficient to increase the size of the particles enough to enhance the Raman signal equipped with laser of longer wavelengths, but as we have observed in our previous study, the addition of highly concentrated sodium chloride solution (hundreds of mM) to maltose-reduced silver colloid increases the particle size enough to achieve an effectiveness of enhancement of the

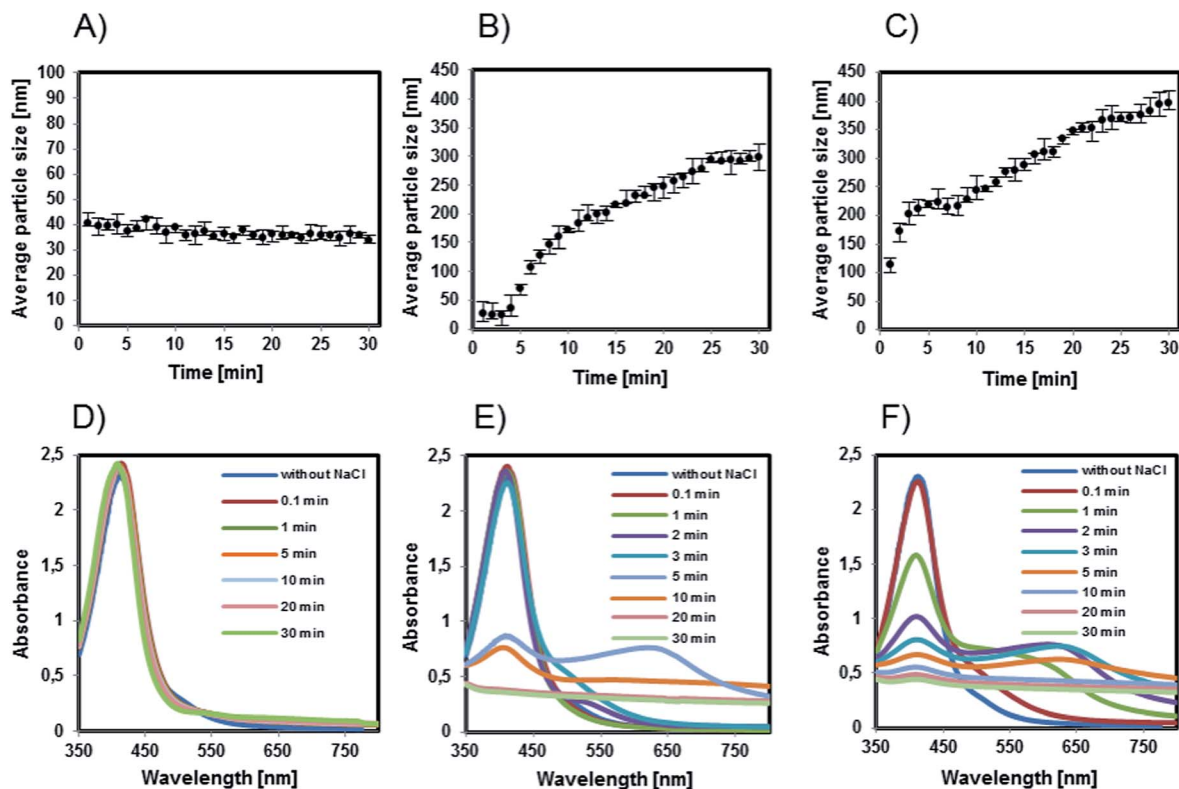


Fig. 3 Time dependences of the average size of Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the NaCl solution. The time dependences represented in plots (A)–(F) correspond to final concentration 25 mM, 50 mM and 100 mM of NaCl in mixture, respectively.

Raman signal even for near infrared laser excitation (1064 nm).³⁸

In terms of activation by 100 mM and 200 mM chloride ions, the very similar effect of these concentrations was observed, albeit the Raman intensities were higher with the use of 200 mM NaCl. Regarding the laser operating at 532 nm, there the Raman intensities for both concentration levels are stable during a whole measuring time (Fig. 2a). Addition of final concentration 100 or 200 mM NaCl didn't cause any significant changes in Raman intensities during the measurements when laser 633 nm was utilized (Fig. 2b and c); the enhancement was stable during the whole monitored time. For laser 780 nm, the signal intensities increased for 50% regarding 100 mM and 500% regarding the use of 200 mM (Fig. 2b and c). Correlation among the DLS method, UV/Vis absorption spectra and the morphologies observed in the TEM image indicates that these Cl^- concentrations induced changes in the particle size with the formation of both larger and smaller particles due to the re-growth and diffusion of the origin nanoparticles in the presence of the 100 mM Cl^- and 200 mM Cl^- . Considerable growth of the average particle size from 28 nm up to 400 nm was observed (Fig. 3c and 4a). Most of the changes occur within the first few minutes after the addition of chloride ions. During the thirty minute record, the surface plasmon band was shifted to ~ 650 nm and the plasmon band at 410 nm for origin nanoparticles was suppressed (Fig. 3f and 4d). The suppression of the original peak at 410 nm and at the same time the emerging

of the secondary peak clearly indicates the onset gradual changes in the average size³⁸ or morphologies⁴¹ of silver particles. As the size of the silver particles increases, the value of UV/Vis absorption maximum becomes closer to excitation wavelengths, and higher SERS-signal enhancement is achieved. All these characteristic changes were accompanied by a change in the color of the working mixture of Ag NPs (from brownish to grey).

Particles treated with 400 mM chlorides caused the most effective Raman enhancement for all the three mentioned excitation sources, compared to the other concentrations of chlorides. In the time region 1–16 minute after the addition of 400 mM chlorides to Ag NPs, there we observed a gradual rise in Raman intensities (Fig. 2a–c). It is attributed to an increase in the particle size caused by the presence of highly concentrated chloride ions. After the mentioned time, the SERS signal decreases because the colloid becomes over-aggregated. Due to the aggregation effect, large radii of new particles (up to 400 nm), reached after 3 minutes after the addition of NaCl solution, leads to a decrease of the available particle surface, and thus its total saturation can be achieved more easily,⁴² as is shown in the Fig. 4b. The particle growth was accompanied by both a change in the color of the working mixture of Ag NPs (from brownish to grey) and a distinct red shift of the maximum in the UV/Vis absorption (Fig. 4e).

For the highest concentration of chlorides, 800 mM, and laser excitations 532 nm and 633 nm, there were observed

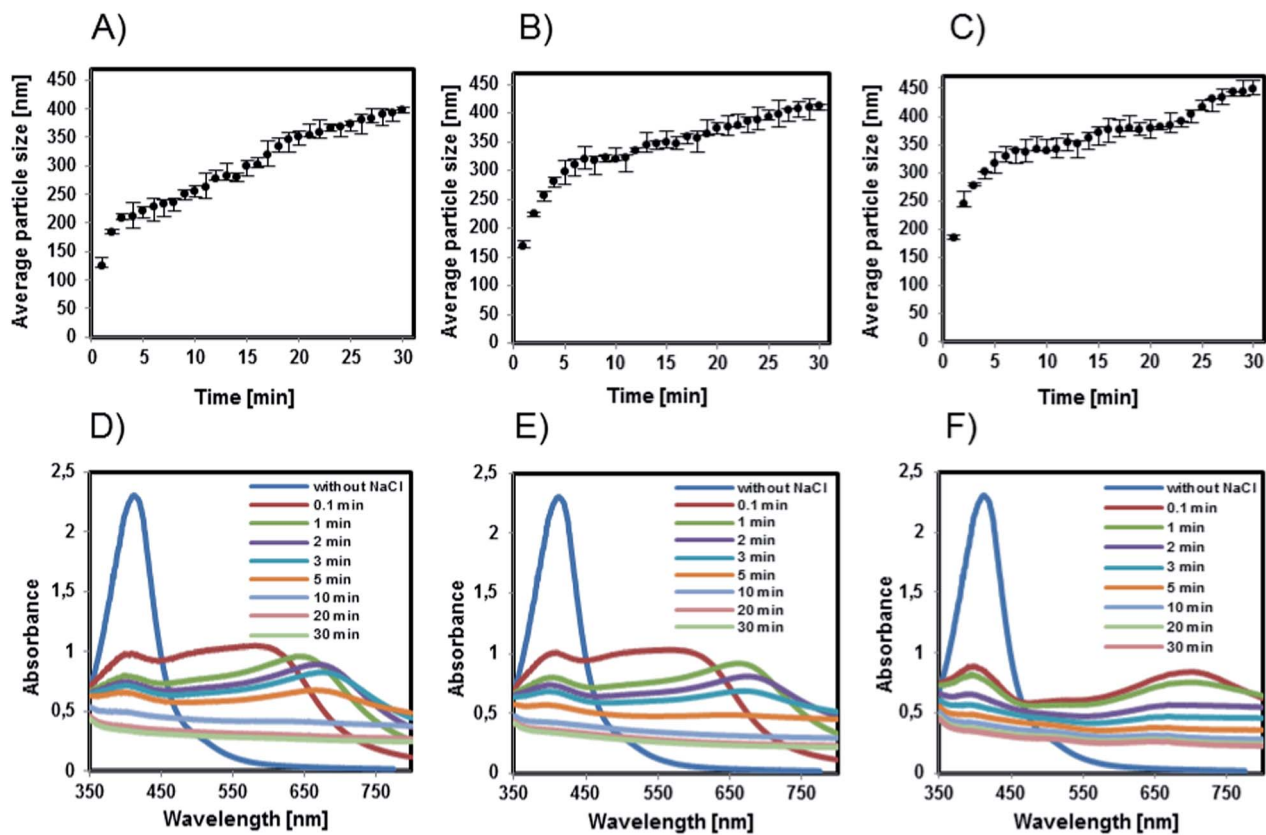


Fig. 4 Time dependences of the average size of Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the NaCl solution. The time dependences represented in plots (A)–(F) correspond to final concentration 200 mM, 400 mM and 800 mM of NaCl in mixture, respectively.

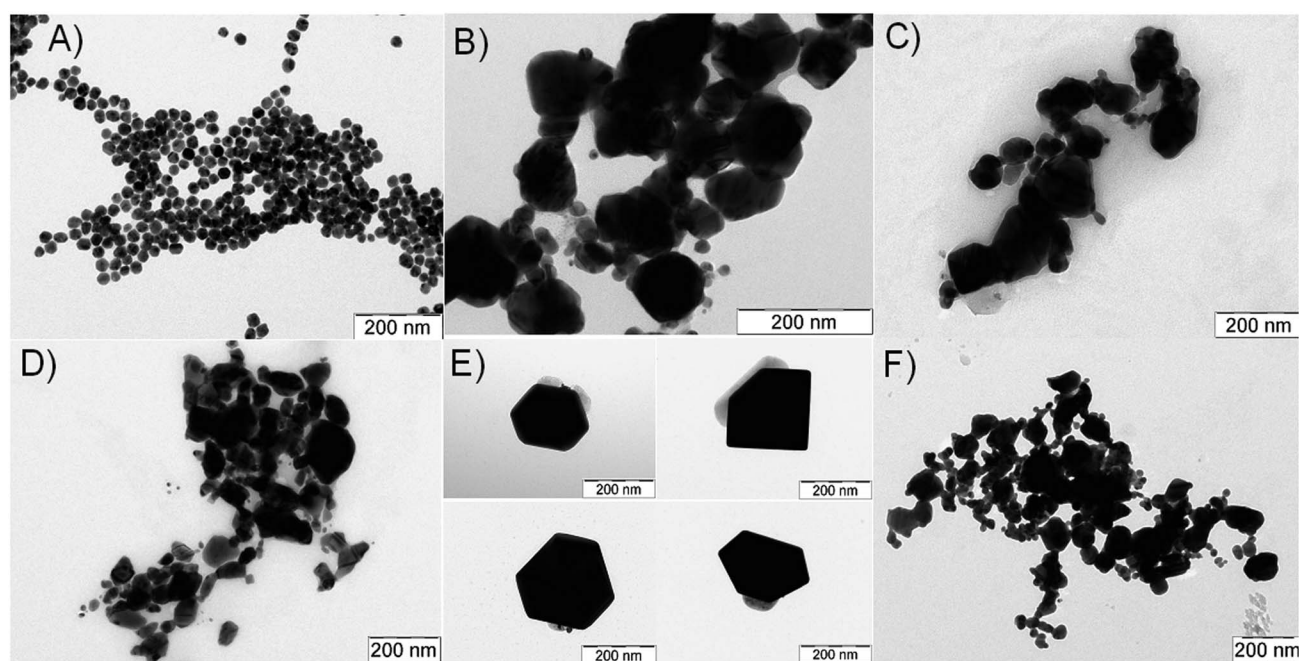


Fig. 5 Representative TEM images of the treated Ag NPs after 15 minutes from the addition of the NaCl solution with final concentration (A) 25 mM, (B) 50 mM, (C) 100 mM, (D) 200 mM, (E) 400 mM and (F) 800 mM.

decreasing Raman intensities with increasing incubation time (Fig. 2a and b). One of the possible explanations for the observed SERS-signal intensities decrease can be attributed to a surface-coverage limitation caused by a competition of the Cl^- ions and molecules of adenine for a surface on the present silver particles.³⁷ The measurement of SERS on silver surface with excitation source 780 nm, there it has been observed the maximum intensity sooner, compared to 400 mM chlorides, already in the 7th minute after the addition of chloride ions solution. However the signal immediately decreased (Fig. 2c). Following DLS measurements uncovered a significant growth of the average particle size to 450 nm (Fig. 4c), which is in a good accordance with the respective UV/Vis absorption spectra where, in the first minute of the experiment, the peak at 410 nm decreased and broadened and in parallel, peak at 700 nm raised (Fig. 4f). Further aggregation of the particles leads to their destabilization which causes a total loss of both absorption maxima. As it has been noticed, the simultaneous decrease of absorption and the long-wavelength shift is more dramatic than in the case of the previous lower chlorides concentrations, which is in a correlation with a TEM image of particles treated using 800 mM chlorides (Fig. 5f). Higher concentrations of NaCl added to original silver colloid led to a formation of large silver aggregates which was accompanied by a change in the color of the working mixture of Ag NPs (from brownish to grey). These aggregates sediment, and therefore the amount of SERS-active particles decrease.

For comparison, we also performed additional experiments regarding impact of three final chlorides concentrations (25 mM, 100 mM, and 400 mM) on the changes of Ag NPs with average particle size equal to approx. 50 nm and 120 nm (see ESI†).

Conclusions

The presented study was focused on the influence of six different final concentrations of chloride ions (25, 50, 100, 200, 400, and 800 mM) used as an agent for silver nanoparticles activation for purposes of surface enhanced Raman spectroscopy. The study correlates selected concentration levels of chloride ions with the intensity of the SERS signal using of adenine as a model compound. It was found out that the concentration level of chloride ions plays a crucial role and a careful tuning of experimental design has to be performed for each laser wavelength. Lower final concentrations of chloride ions (tens of mM) led to a transformation of silver nanoparticles in a different manner (mainly aggregation) compared to higher concentrations (hundreds of mM). Higher concentration of NaCl (in this case 400 mM) led to the best results for all three tested laser wavelengths (532, 633 and 780 nm). Lower concentrations of chlorides are also usable for 532 nm laser, but its action has less or no effect on the Raman signal enhancement for lasers 633 and 780 nm. On the other hand, treatment with 800 mM chlorides led to a rapid loss of the Raman signal due to the fast destabilization of silver particles for all three tested laser wavelengths.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support by the project LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. This work has been also supported by the Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0056), internal grant of Palacky University in Olomouc (PrF_2014_032) and by the Technology Agency of Czech Republic (Project no. TA03011368).

Notes and references

- 1 M. Fleischmann, P. J. Hendra and A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, **26**, 163–166.
- 2 J. A. Creighton, C. G. Blatchford and M. G. Albrecht, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1979, **75**, 790–798.
- 3 H. Huang, Ch. Shende, A. Sengupta, F. Inscore, C. Brouillette, W. Smith and S. Farquharson, *J. Raman Spectrosc.*, 2012, **43**, 701–705.
- 4 R. L. Garrell, *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 401A.
- 5 V. Ranc, J. Hruzikova, K. Maitner, R. Prucek, D. Milde and L. Kvitek, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, **43**, 971–976.
- 6 M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.*, 1985, **57**, 783–826.
- 7 K. Kneipp, Y. Wang, R. R. Dasari and M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.*, 1995, **49**, 780–784.
- 8 L. Kvitek, R. Prucek, A. Panacek, R. Novotny, J. Hrbac and R. Zboril, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 1099–1105.
- 9 P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391–3395.
- 10 N. Leopold and B. Lendl, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 5723–5727.
- 11 R. Prucek, A. Panacek, J. Soukupova, R. Novotny and L. Kvitek, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 6416–6420.
- 12 R. Prucek, V. Ranc, O. Balzerova, A. Panacek, R. Zboril and L. Kvitek, *Mater. Res. Bull.*, 2014, **50**, 63–67.
- 13 F. Inscore, Ch. Shende, A. Sengupta, H. Huang and S. Farquharson, *Appl. Spectrosc.*, 2011, **65**, 1004–1008.
- 14 R. Pérez, A. Rupérez and J. J. Laserna, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **376**, 255–263.
- 15 P. C. White, *Sci. Justice*, 2000, **40**, 113–119.
- 16 L. He, Z. Liu, M. Lin, J. Awika, D. R. Lidoux, H. Li and A. Mustapha, *Sensorry and Instrumentation for Food Quality*, 2008, **2**, 66–71.
- 17 N. N. Yazgan, I. H. Boyaci, A. Topcu and U. Tamer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 2009–2017.
- 18 B. Liu, P. Zhou, X. Liu, X. Sun, H. Li and M. Lin, *Food Bioprocess Technol.*, 2012, **6**, 710–718.
- 19 R. Prucek, V. Ranc, L. Kvitek, A. Panacek, R. Zboril and M. Kolar, *Analyst*, 2012, **137**, 2866–2870.
- 20 M. Kazanci, J. P. Schulte, C. Douglas, P. Fratzl, D. Pink and T. Smith-Palmer, *Appl. Spectrosc.*, 2009, **63**, 214–223.
- 21 Y. L. Liu, Y. R. Chen, X. W. Nou and K. L. Chao, *Appl. Spectrosc.*, 2007, **61**, 824–831.
- 22 S. Ramya, R. P. George, R. V. Subba Rao and R. K. Dayal, *Appl. Surf. Sci.*, 2010, **256**, 5108–5115.
- 23 N. P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner and C. Haisch, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 10184–10194.

- 24 N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner and C. Haisch, *J. Biophotonics*, 2010, **3**, 548–556.
- 25 J. Guicheteau, S. Christesen, D. Emge and A. Tripathi, *J. Raman Spectrosc.*, 2010, **41**, 1632–1637.
- 26 C. Fan, Z. Q. Hu, A. Mustapha and M. S. Lin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **92**, 1053–1061.
- 27 S. L. Hennigan, J. D. Driskell, N. Ferguson-Noel, R. A. Dluhy, Y. Zhao, R. A. Tripp and D. C. Krause, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 1930–1935.
- 28 L. Kvitek, R. Prucek, A. Panacek, J. Soukupova and M. Vanickova, *Nanocon 2009, Conference Proceedings*, 2009, pp. 74–82.
- 29 K. G. Stamplecoskie and J. C. Scaiano, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 1403–1409.
- 30 S. M. Nie and S. R. Emory, *Science*, 1997, **275**, 1102–1106.
- 31 N. R. Yaffe and E. W. Blanch, *Vib. Spectrosc.*, 2008, **48**, 196–201.
- 32 M. G. Espinoza, M. L. Hinks, A. M. Mendoza and D. P. Pullman, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 8305–8313.
- 33 F. Liu, H. Gu, Y. Lin, Y. Qi, X. Dong, J. Gao and T. Cai, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2012, **85**, 111–119.
- 34 X. Dong, H. Gu, J. Kang, X. Yuan and J. Wu, *Colloids Surf., A*, 2010, **368**, 142–147.
- 35 M.-S. Hsu, Y.-W. Cao, H.-W. Wang, Y.-S. Pan, B.-H. Lee and Ch.-L. Huang, *ChemPhysChem*, 2010, **11**, 1742–1748.
- 36 X. Dong, H. Gu and F. Liu, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2012, **88**, 97–101.
- 37 J. Aubard, E. Bagnasco, J. Pantigny, M. F. Ruasse and G. Lévi, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 7075–7081.
- 38 R. Prucek, A. Panacek, A. Fargasova, V. Ranc, V. Masek, L. Kvitek and R. Zboril, *CrystEngComm*, 2011, **13**, 2242–2248.
- 39 A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevecna and R. Zboril, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 16248–16253.
- 40 L. Weiyang, H. C. C. Pedro, L. Xianmao and X. Younan, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 485–490.
- 41 Y. Yang, S. Matsubara, L. Xiong, t. Hayakawa and M. Nogami, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 9095–9104.
- 42 S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo and A. Tinti, *J. Colloid Interface Sci.*, 1995, **175**, 358–368.

**Influence of Various Chloride Ion Concentrations on Silver Nanoparticle
Transformations and Effectiveness in Surface Enhanced Raman Scattering
for Different Excitation Wavelengths**

Ariana Fargašová, Robert Pucek*, Václav Ranc, Aleš Panáček,

Libor Kvítek and Radek Zbořil

*Regional Center of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical
Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Slechtitelu 11, 783 71 Olomouc,
Czech Republic*

Preparation of silver nanoparticles using glucose as reducing agent

The silver nanoparticles were prepared by a reduction of the silver ammonia complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by glucose. The concentrations of the reaction components were $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for AgNO_3 and glucose, respectively. The concentration of ammonia was $5\cdot 10^{-3} \text{ M}$. The pH of the reaction mixture was adjusted to the value 11.5 ± 0.1 by adding of sodium hydroxide solution. These silver nanoparticles had an average particle size of about 50 nm.

Preparation of silver nanoparticles using ascorbic acid as reducing agent

The silver particles were prepared by a reduction of the silver ammonia complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by ascorbic acid. The concentrations of the reaction components were $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for AgNO_3 and ascorbic acid, respectively. The concentration of ammonia was $5\cdot 10^{-3} \text{ M}$. The basic environment of the reaction system was adjusted to the value of pH at 11.5 ± 0.1 by adding of sodium hydroxide solution. These silver particles had an average particle size of about 120 nm.

DLS and UV-Vis measurements

For the purpose both of DLS and UV-Vis measurements, 0.4 mL of the stock aqueous solution of silver nanoparticles was diluted by deionized water (volumes ranged from 1.50 to 1.55 mL) and then 0.050 or 0.100 mL of 1 M and 0.100 mL of 4 M NaCl solution was added. The final concentrations of chloride ions were 25 mM, 100 mM, and 400 mM, respectively. After adding chloride ions, the solution was quickly mixed and immediately the measurements began. All the measurements were performed at the laboratory temperature (20 °C).

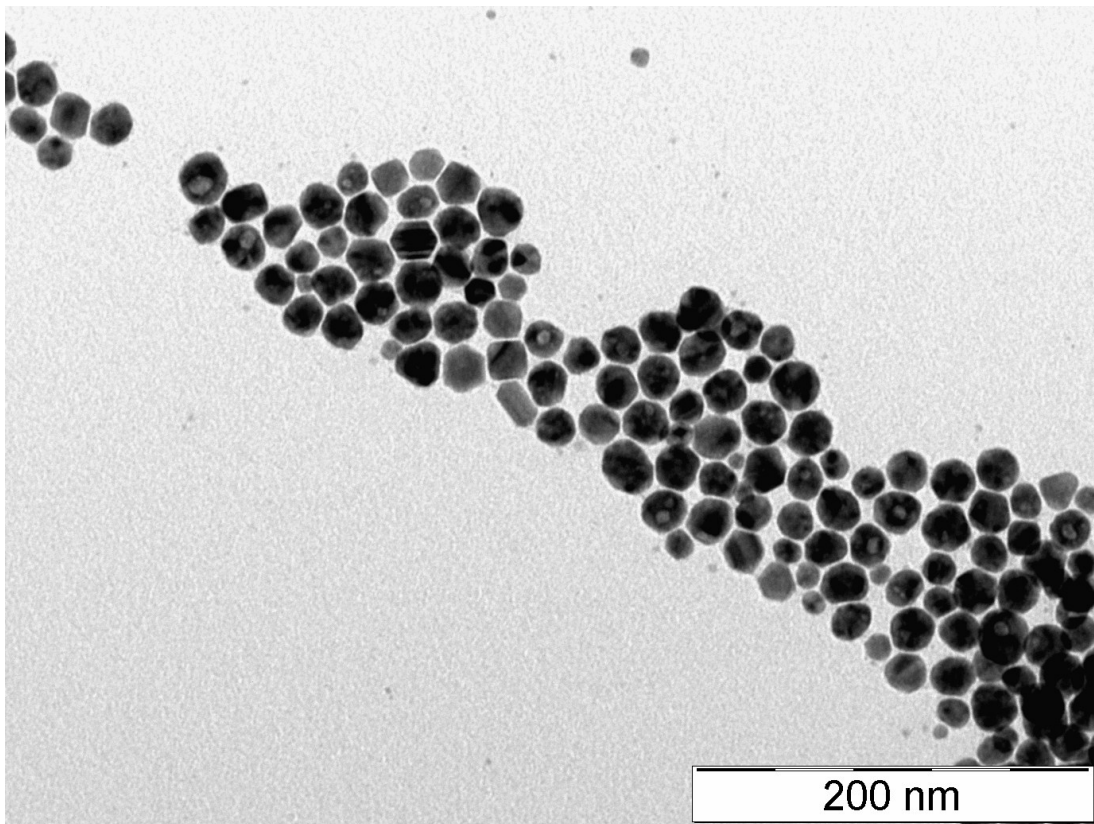


Figure S1. TEM images of primary silver particles reduced by D-maltose without the addition of NaCl.

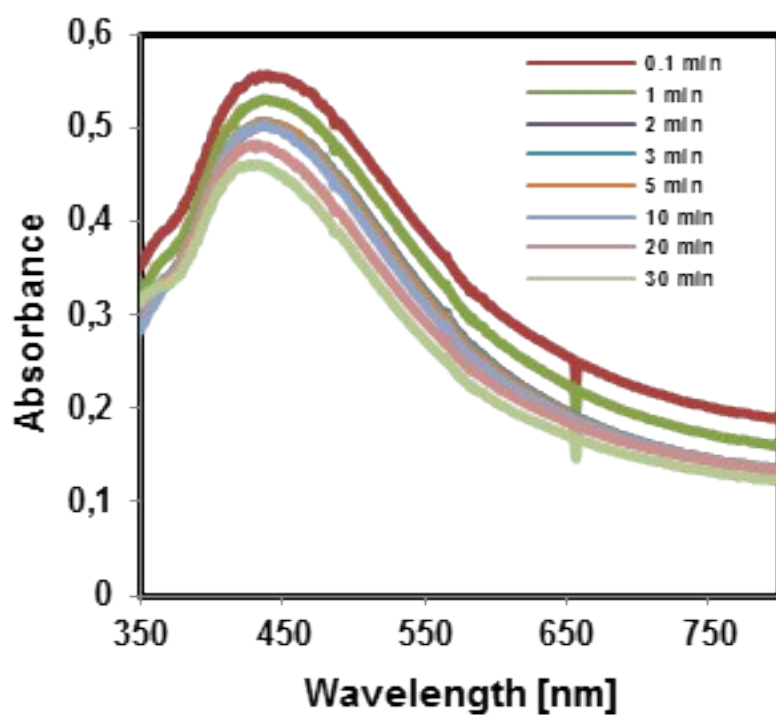
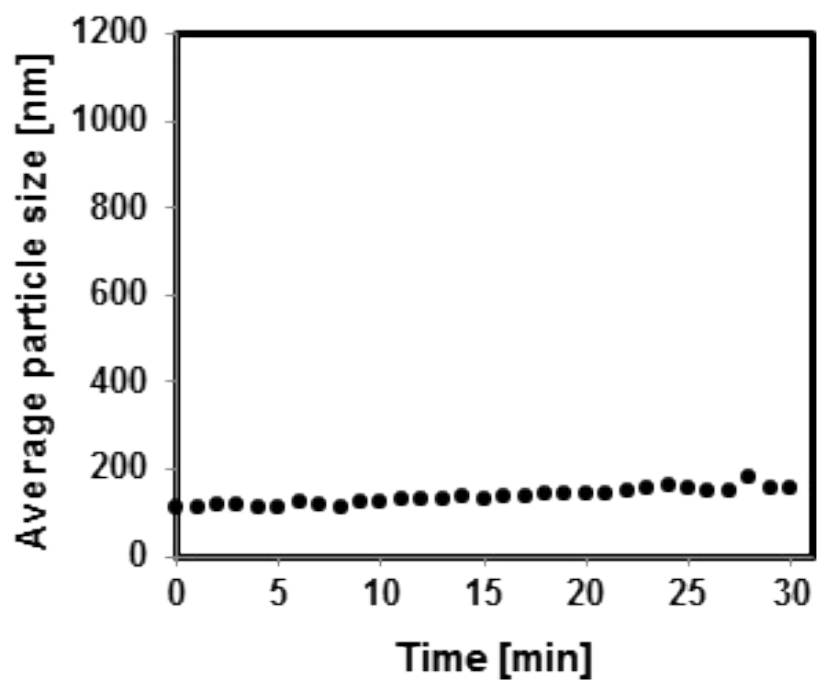


Figure S2: Time dependences of the average size of ascorbic acid Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the 25 mM NaCl solution.

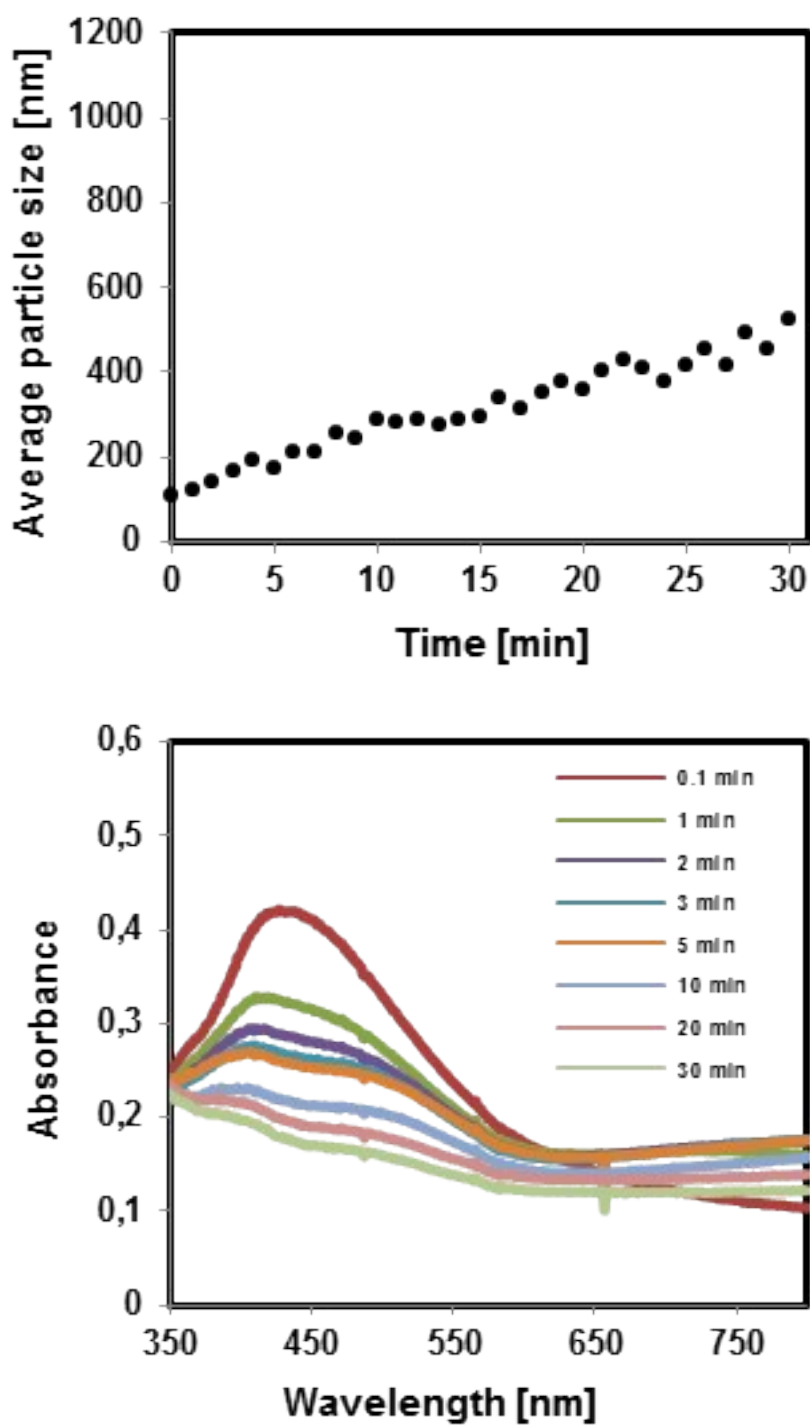


Figure S3: Time dependences of the average size of ascorbic acid Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the 100 mM NaCl solution.

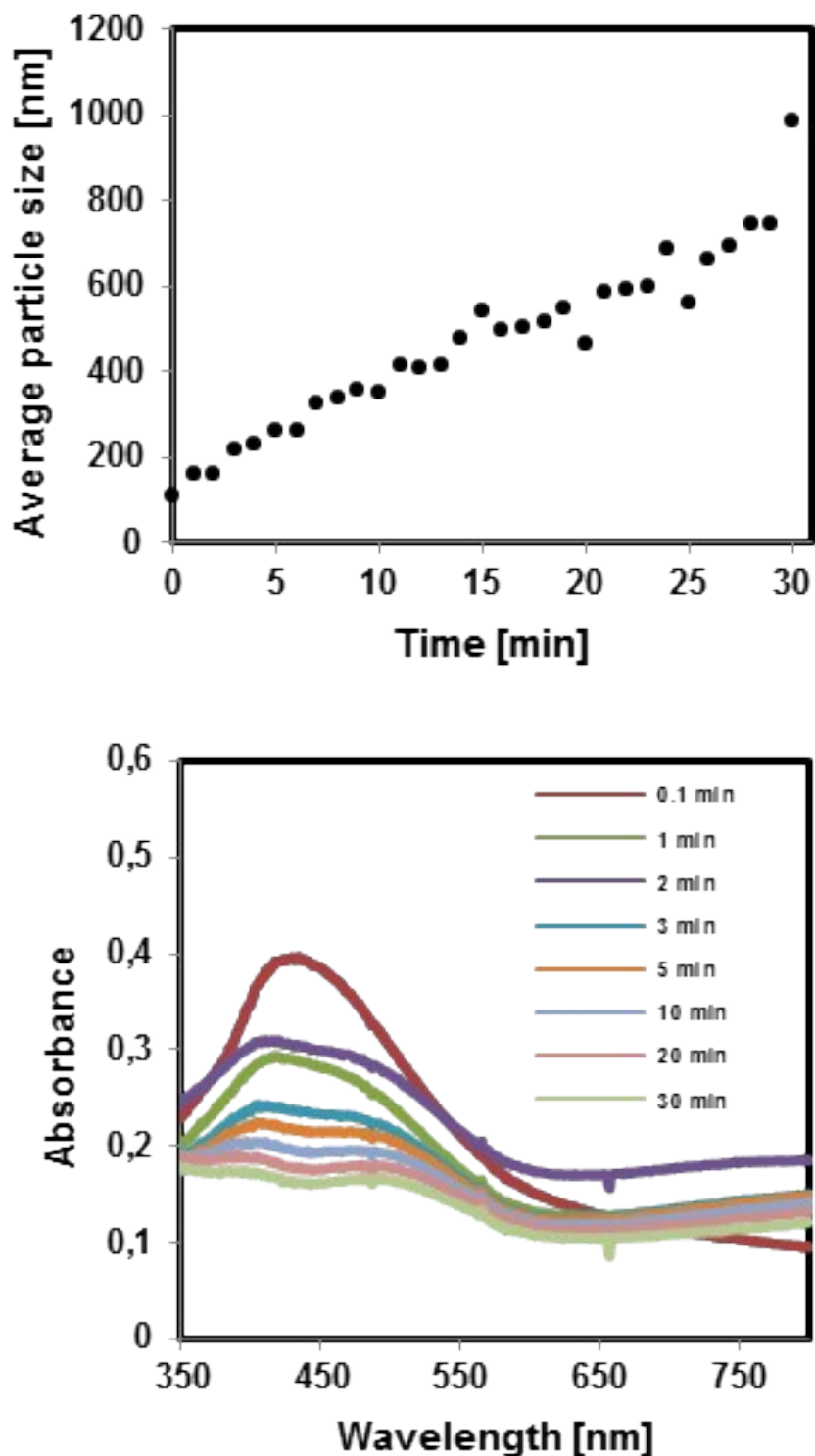


Figure S4: Time dependences of the average size of ascorbic acid Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the 400 mM NaCl solution.

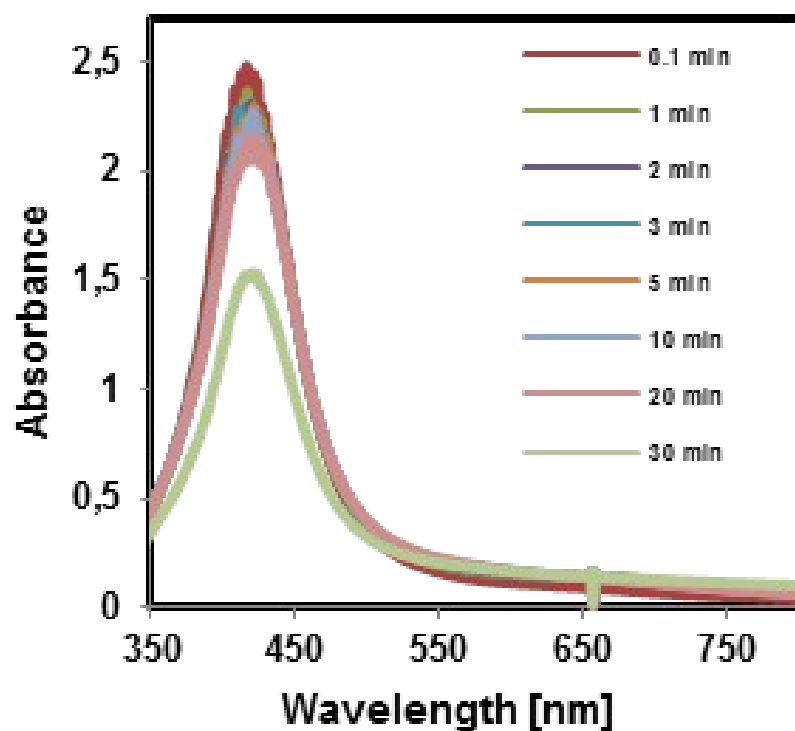
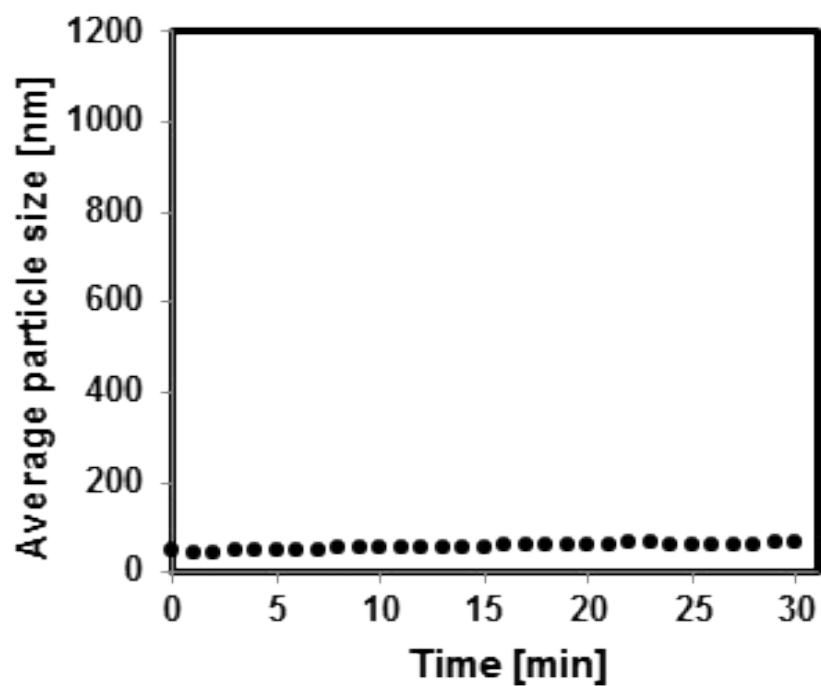


Figure S5. Time dependences of the average size of glucose Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the 25 mM NaCl solution.

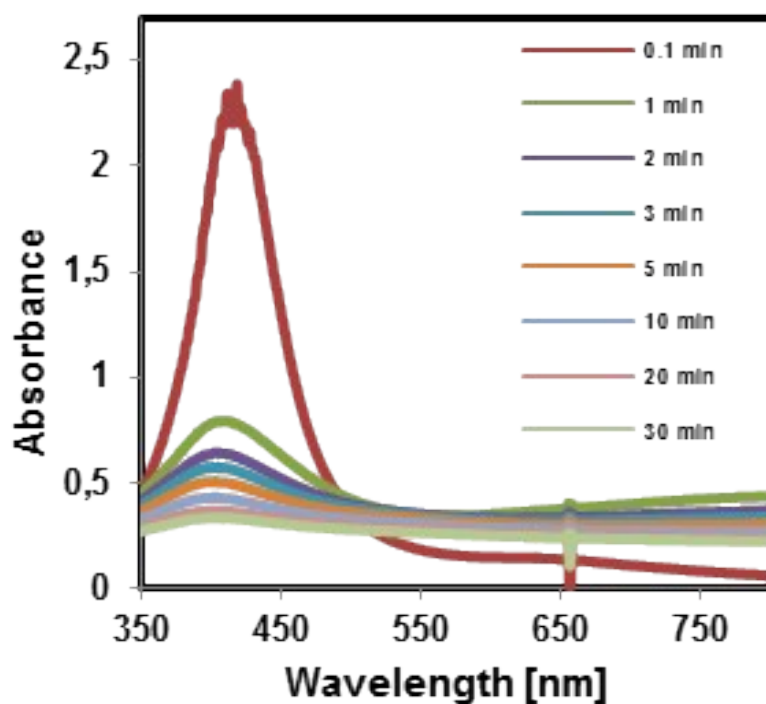
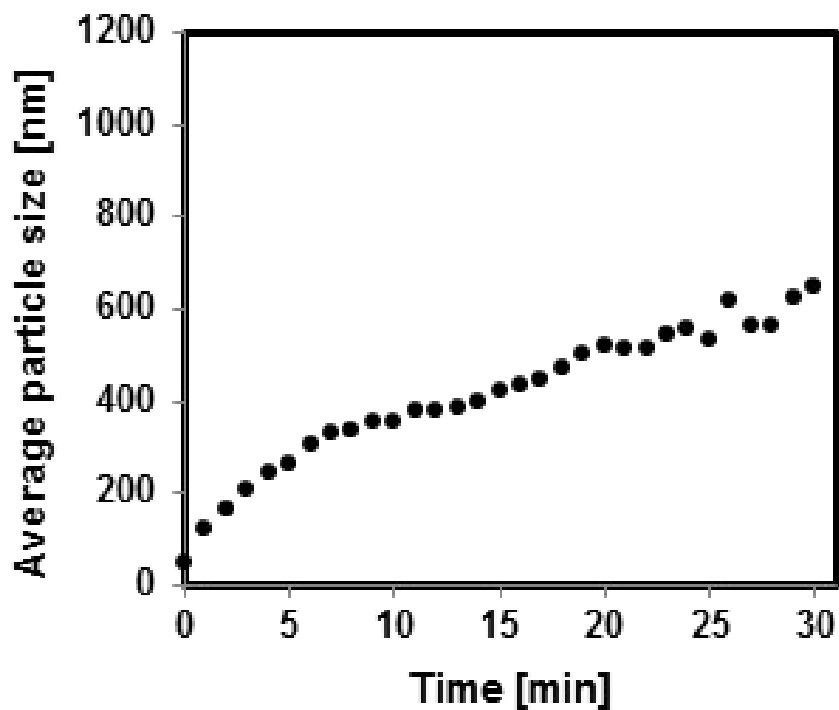


Figure S6. Time dependences of the average size of glucose Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the 100 mM NaCl solution.

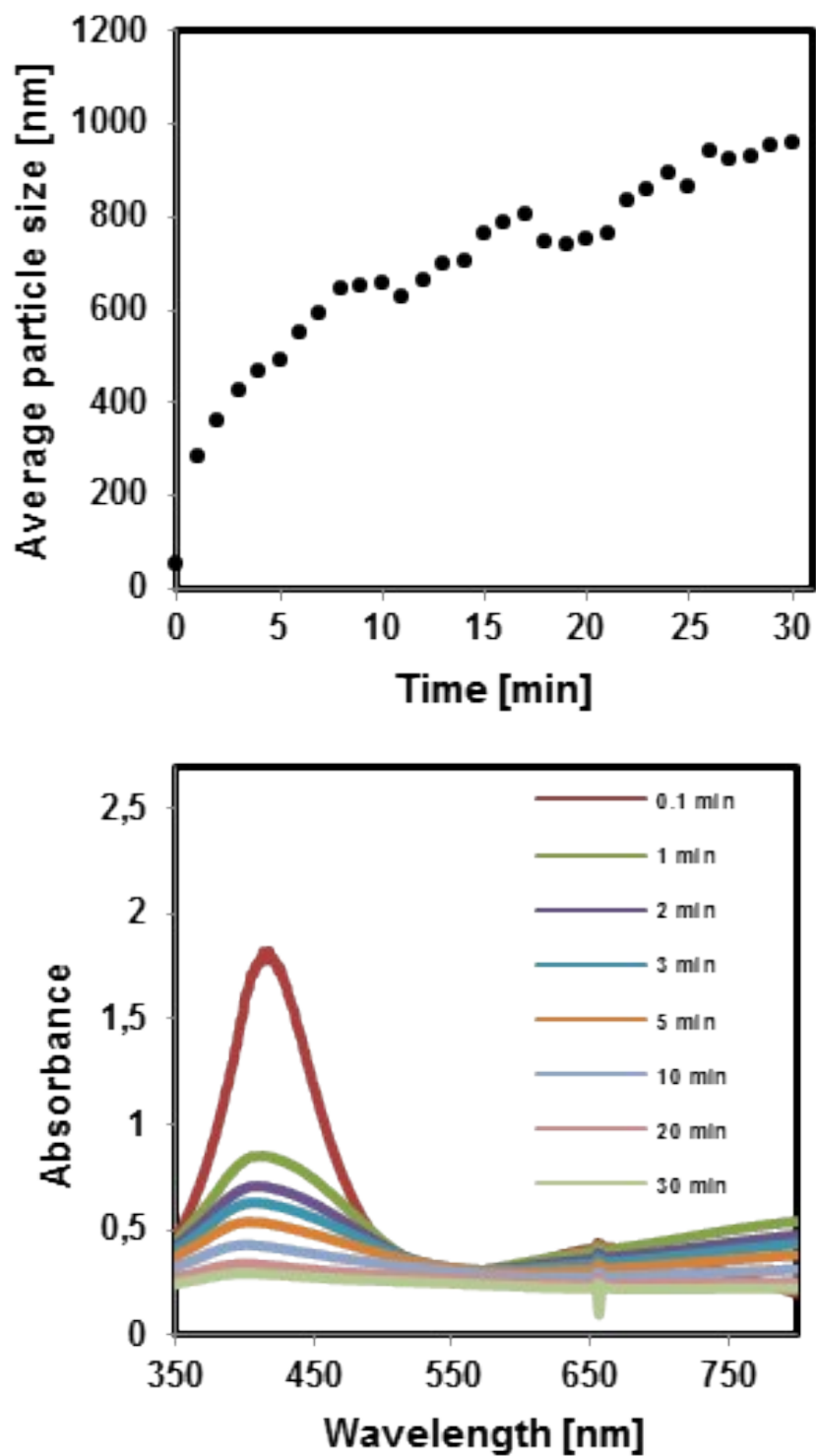


Figure S7. Time dependences of the average size of glucose Ag NPs and its UV/Vis absorption spectra recorded during 30 minutes after the addition of the 400 mM NaCl solution.

Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Ariana Fargašová,[†] Anna Balzerová,[†] Robert Prucek,[†] Miroslava Htoutou Sedláková,[‡] Kateřina Bogdanová,[‡] Jirí Gallo,[§] Milan Kolář,[‡] Václav Ranc,^{*,†} and Radek Zbořil^{*,†,‡,§}

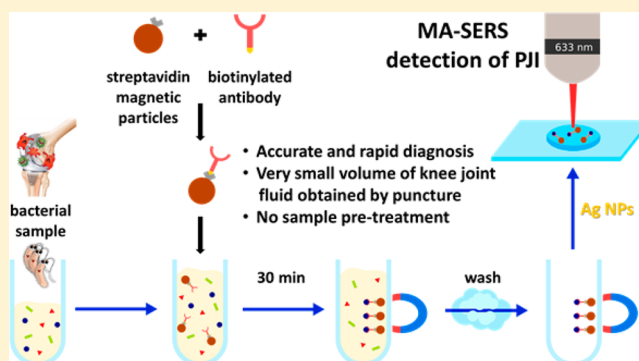
[†]Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

[‡]Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

[§]Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, I. P. Pavlova 6, 77520 Olomouc, Czech Republic

S Supporting Information

ABSTRACT: Accurate and rapid diagnosis of prosthetic joint infection (PJI) is vital for rational and effective therapeutic management of this condition. Several diagnostic strategies have been developed for discriminating between infected and noninfected cases. However, none of them can reliably diagnose the whole spectrum of clinical presentations of PJI. Here, we report a new method for PJI detection based on magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS) using streptavidin-modified magnetic nanoparticles (MNP@Strep) whose surface is functionalized with suitable biotinylated antibodies and then coated with silver nanoparticles by self-assembly. The high efficiency of this approach is demonstrated by the diagnosis of infections caused by two bacterial species commonly associated with PJI, namely, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. The method's performance was verified with model samples of bacterial lysates and with four real-matrix samples of knee joint fluid spiked with live pathogenic bacterial cells. This procedure is operationally simple, versatile, inexpensive, and quick to perform, making it a potentially attractive alternative to established diagnostic techniques based on Koch's culturing or colony counting methods.



Prosthetic joint infection (PJI) is a feared complication of total joint arthroplasty that substantially increases morbidity and mortality following total joint arthroplasty. Current estimates suggest that PJI complications occur in up to 3% of primary hip and knee arthroplasties and up to 15.4% and 25% of revision hip and knee arthroplasties, respectively.^{1,2} The pathogenesis of PJI is related to the presence of biofilm-forming microorganisms, most commonly *Staphylococci* and *Streptococci*.^{3,4}

Most current methods for diagnosing PJI are rather time-consuming, involving several pre- and intraoperative steps. This is especially true for low-grade infections that are difficult to distinguish from aseptic failure.⁵ The condition is typically diagnosed on the basis of four generally accepted criteria: (i) the presence of a cutaneous sinus tract communicating with the prosthesis, (ii) histopathological evidence of acute inflammation, (iii) increased counts or differentials of leukocytes or neutrophils in the synovial fluid, and (iv) the development of a positive culture from samples of synovial fluid, intraoperative periprosthetic tissue, or sonication fluid.^{3,5–8} In recent years, there has also been considerable interest in diagnosing PJI by detecting antibacterial molecules. These methods achieve

excellent sensitivity and specificity in around 95% of all enrolled cases.⁹ However, they provide no information about the causative bacteria in any given infection.

Most of the gold standard microbial methods for diagnosing PJI are based on Koch's culturing and colony counting methods¹⁰ and only deliver results after several days.¹¹ Additionally, culture-based methods are susceptible to contamination, which can lead to false positive diagnoses, and yield false negative diagnoses in up to 30% of all cases.¹² More advanced alternative techniques have been proposed to shorten the analysis time and increase the accuracy of the identification of PJI. One such alternative is based on the polymerase chain reaction (PCR), which can be used to detect and identify diverse pathogens.^{11,13–15} PCR is considerably less time-consuming and more sensitive than many other techniques, including the culturing and plating methods discussed above.^{11,16} However, highly trained professionals are needed

Received: March 1, 2017

Accepted: May 22, 2017

Published: May 22, 2017

to perform PCR analyses and interpret their results.^{16,17} Other techniques capable of bacterial identification are based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).^{18–20} Despite their sensitivity, methods based on PFGE are very time-consuming, which limits their practical utility. Thus, there is still a need for a rapid and highly sensitive typing tool that would enable the accurate diagnosis of PJI and the identification of the causative agent within a few minutes.

Procedures based on Raman spectroscopy represent interesting alternatives to culture- or PCR-based methods for PJI diagnosis. It was recently shown that surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) can be used to rapidly identify selected microorganisms.^{21,22} Additionally, Khan et al. showed that a SERS assay using antibody-conjugated popcorn-shaped gold nanoparticles can detect *Salmonella typhimurium* in water samples.²³ SERS was also used by Sivanesan et al. to selectively identify the pathogenic bacterium *S. epidermidis* in blood samples on a bare Ag–Au bimetallic surface.²⁴ More recently, a composite of nanoaggregates of gold particles was used with a high specificity single domain antibody to identify *Staphylococcus aureus* bacteria by SERS.²⁵ Another innovative approach based on immunomagnetic isolation, membrane filtration, and silver intensification was used to measure the SERS signals of pathogenic *Escherichia coli* bacteria in ground beef.^{26,27} Unfortunately, all these nanoparticle-based techniques require precultivation periods of several hours to generate sufficient biomass and a silver intensification step to permit SERS measurements. Here, we present a fast new method for diagnosing PJI based on magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS), which was previously used by our group for fast, selective, and highly sensitive detection of various molecules including dopamine²⁸ and immunoglobulins.²⁹ It is worth mentioning that, despite Ag NPs being frequently used for their synergistic antibacterial and antibiofilm activity to inhibit the growth of bacteria,^{30,31} Ag NPs at low concentrations effective for Raman signal enhancement do not have any inhibitory impact on the analyzed pathogens.

The method uses a new highly efficient biosensor based on streptavidin-modified carboxy-functionalized magnetic nanoparticles (henceforth referred to as MNP@Strep) for efficient target isolation. After isolation, the biosensor is coated with silver nanoparticles to enable MA-SERS detection of PJI. The nanomaterial used for MA-SERS detection has two beneficial effects. First, its magnetic properties enable effective and quantitative isolation of selected chemical targets from a complex matrix. Second, the SERS effect of the silver nanoparticles on adsorbed molecules gives the method ultralow limits of detection. We show that this method can be used to isolate and identify two bacterial strains, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Moreover, the method was successfully used to diagnose PJI in real-matrix samples of knee joint fluid in a few minutes, without any need for sample pretreatment. It could thus be an attractive alternative to established procedures for clinical diagnosis of PJI.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Chemicals. Carboxy-functionalized magnetic microparticles, *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt ($\geq 98\%$ (HPLC); NHS), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC), streptavidin from *Streptomyces avidinii* (essentially salt-free, lyophilized powder, ≥ 13 units/mg protein), biotin-conjugated mouse antiprotein A monoclonal antibody, ethylamine (purum, 70% in H₂O), and

phosphate-buffered saline solution (PBS) were purchased from Sigma-Aldrich. Biotin-conjugated rabbit anti-*Streptococcus* group A polyclonal antibody was obtained from Abcam plc. (Cambridge, UK). Silver nitrate (AgNO₃, p.a., Tamda), ammonia (NH₄, aqueous solution 28% w/w, p.a., Sigma-Aldrich), sodium hydroxide (NaOH, p.a., Lach-Ner), and D(+)-maltose monohydrate (C₁₂H₂₂O₁₁ × H₂O, p.a., Sigma-Aldrich) were used to prepare primary silver nanoparticles. Sodium chloride (NaCl, p.a., Sigma-Aldrich) was used to treat the primary silver nanoparticles. All chemicals were used as received without any additional purification steps.

Preparation of Silver Nanoparticles. Maltose-reduced silver nanoparticles for use as SERS substrates were prepared by reducing the silver ammonia complex cation [Ag(NH₃)₂]⁺ with D-maltose as described by Panacek and co-workers.³² Briefly, silver nitrate and the reducing sugar (maltose) were dissolved in distilled water to initial concentrations of 10⁻³ and 10⁻² M, respectively. The initial concentration of ammonia was 5 × 10⁻³ M. After the silver, sugar, and ammonia had been added, the reaction system's pH was adjusted to 11.5 ± 0.1 by adding sodium hydroxide. The reaction was deemed complete after 4 min, yielding a nearly monodispersed suspension of maltose-reduced silver nanoparticles with an average particle size of about 28 nm.

Preparation of Bacterial Samples. Preparation of Model Samples. The method was initially tested using model bacterial lysate samples without knee joint fluid. Testing samples were prepared using the bacterial species *Staphylococcus aureus* CCM 3953 and *Streptococcus pyogenes* (Strain No. SP12, from the culture collection of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc). Lysates were prepared from 24 h cultures of *S. aureus* and *S. pyogenes*. Well-isolated colonies were transferred into 5 mL of Mueller-Hinton broth so that the resulting turbidity was equivalent to a McFarland standard of 1.0 (approximate cell density of 3 × 10⁸ CFU/mL). The inoculum density was determined by measuring the samples' optical density with a densitometer (Densi-La-Meter; LACHEMA, Czech Republic), and the bacterial suspensions were then cultured at 37 °C for 24 h. After incubation, the broth was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was then removed, and 10 mL of distilled water was added to the pellet. Finally, the mixed suspension was repeatedly (10 times) frozen at -72 °C for 10 min and then thawed in a 37 °C water bath. The repeated freeze–thaw cycles cause lysis of bacterial cells in suspension.

Preparation of Real-Matrix Samples. After being validated against model samples, the method was tested using real-matrix samples prepared from sterile knee joint fluid obtained by puncture from patients with osteoarthritis. To verify the sterility of the initial joint fluid, it was inoculated onto blood agar (Trios, Ltd.) and into Mueller-Hinton broth (HiMedia) and cultivated. Real-matrix samples for testing were then prepared by spiking samples of the joint fluid in a 1:1 ratio with live cells of one of the two bacterial lysates. In these experiments, the spiking samples of the joint fluid and the sterile joint fluid were used as positive and negative controls, respectively. All joint fluid samples were obtained under standard conditions with written informed patient consent, and the study was approved by the local Ethics Committee.

Immobilization of Streptavidin onto Carboxy-Functionalized Magnetic Nanoparticles (MNP@Strep). To immobilize streptavidin on the surface of the carboxy-functionalized magnetic nanoparticles (MNP), 0.5 mL of the

stock dispersion of MNP was separated from the mixture solution using a magnet and then washed with deionized water. The carboxylic groups of these MNP were then activated with a 1 mL solution of EDC and NHS (the final concentrations of both reagents were 10 mM) and stirred for 45 min. The MNP were collected using an external magnetic field and washed three times with 10 mM PBS buffer. The MNP with activated carboxylic groups were then mixed with streptavidin (1 mg/L) and stirred for 2 h to form covalent bonds between the free amino ($-\text{NH}_2$) groups of streptavidin and the activated carboxylic groups of the MNP. After the addition of streptavidin, the MNP were collected using a permanent magnet and subsequently washed three times with 10 mM PBS buffer to remove free streptavidin.

MNP@Strep Nanoparticles and Antibody Binding Procedure. Two different biotinylated antibodies were used to prepare antibody-labeled MNP: mouse monoclonal antibody to protein A (anti-IgA) (a surface protein from the *S. aureus* cell wall) or rabbit polyclonal antibody to group-A streptococci polysaccharide (anti-APS). To prepare MNP with antibodies immobilized on their surfaces, MNP@Strep nanoparticles were mixed with 1 mL of the appropriate antibody solution (at a final concentration of 10 mg/L) and stirred for 1 h to enable noncovalent bond formation between the streptavidin and the antibody's biotin tag. After rinsing three times with 10 mM PBS buffer to physically remove residual unbound antibody molecules, ethylamine at a final concentration of 3.5% wt. was added to block the remaining active carboxylic groups. The resulting MNP@Strep@anti-IgA or MNP@Strep@anti-APS nanoparticles were stable over a period of 2 months.

Material Characterization Methods. The ζ potentials of the starting material, intermediates, and final products were measured using a Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). A transmission electron microscope (TEM) (Jeol 2100) equipped with a LaB₆ cathode operated at an accelerating voltage of 200 kV with a point-to-point resolution of 0.194 nm was used to obtain an image of the commercial starting material, i.e., the carboxy-functionalized MNP. A drop of MNP dispersion was placed onto a holey carbon film supported on a copper-mesh TEM grid and left to air-dry at room temperature. Structural analysis of the starting MNP was performed with an X-ray powder diffractometer with programmable divergence (XRD, PANalytical X'Pert PRO) in the Bragg–Brentano geometry, equipped with an iron-filtered Co $K\alpha$ radiation source, an X'Celerator detector, and diffracted beam antiscatter slits. 200 μL of liquid sample was dropped on a zero-background Si slide, dried under vacuum at room temperature, and scanned across 2θ values ranging from 10° to 105° under ambient conditions. HRTEM images of the final product were obtained using a high resolution transmission electron microscope (HR-TEM FEI Titan G2 60–300) with an X-FEG type emission gun, operating at 80 kV. This microscope was equipped with a Cs image corrector and a STEM high-angle annular dark-field detector (HAADF). Its point resolution was 0.08 nm in TEM mode. Elemental mapping was performed by STEM-Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS; Bruker SuperX) with an acquisition time of 20 min. Fourier transform infrared (FT-IR) absorption spectra were collected using a Nicolet iS5 infrared spectrometer (Thermo Scientific, U.S.A.) to identify the functional groups of the treated MNP and the nature of their bonding. FT-IR spectra were acquired by attenuated total reflectance (ATR) in a ZnSe crystal. A drop of sample was placed onto a ZnSe crystal and left to air-dry at room

temperature. Then, a total of 64 scans with a resolution of 2 cm^{-1} were recorded and averaged for each sample. The FT-IR absorption spectra were processed using ATR correction.

Sample Preparation for SERS Detection. Bacterial lysates and live bacterial cells of *S. aureus* and *S. pyogenes* were prepared as described above. Prior to the analysis of real-matrix samples of joint fluid spiked with live bacterial cells, samples were diluted 10-fold with deionized water to modify their consistency. Both model bacterial lysate samples and real-matrix samples of knee joint fluid spiked with live bacterial cells were then analyzed using the following SERS protocol. A sample volume of 10 μL was mixed with a 10 μL solution of the MNP@Strep nanoparticles conjugated with a biotinylated antibody to either protein A or the group-A streptococci polysaccharide, and the resulting mixture was stirred for 30 min. A 20 μL aliquot of the stirred solution was then dropped onto a glass slide and magnetically separated from the excess sample matrix. Next, 8 μL of a silver nanoparticle (Ag NPs) suspension was pipetted onto the separated magnetic solid portion on the glass slide. Finally, 2 μL of a 1 M solution of NaCl was pipetted onto the magnetic biosensor and the resulting suspension was mixed in the pipet tip. A precipitate of the magnetic biosensor formed on the edge of the drop, from where it was captured with a magnet and analyzed immediately before it could dry.

SERS Instrumentation and Data Processing. SERS spectra were recorded using a DXR Raman Microscope (Thermo Scientific) equipped with a thermoelectrically cooled (-50°C) charge-coupled device (CCD) camera and a 10 \times objective. All spectra were measured at room temperature on a glass slide. SERS spectra were measured with an excitation line at 633 nm (He–Ne gas laser) and were acquired over a wavenumber range of 400 to 1800 cm^{-1} . Spectral acquisition was repeated 16 times per sample, with an accumulation time of 0.5 s per repetition. The laser light power incident on the samples was adjusted to 5.0 mW, and the slit length was set to 50 mm.

All spectra were baseline corrected and unit-vector normalized to enable visualization of spectral dissimilarities. Spectra of experimental samples were evaluated by comparing their protein band ratios to those in the spectra of blank samples. The results were expressed as the mean of the standard deviation of values obtained from five independent experiments with ten measurements in the case of biosensor stability and four independent experiments with ten measurements in the case of the influence of concentration effects on bacterial recognition. The differences between blank sample and bacteria treated biosensors were analyzed by a two-tailed Student's *t* test using Microsoft Excel and were considered statistically significant ($p < 0.05$). The Nicolet TQ Analyst chemometric software package was used to construct and perform discriminant analysis of the bacteria related to prosthetic joint infection. Additionally, the TQ Analyst software package was used to perform a clustering analysis based on average intra- and intercluster distances in order to evaluate the MA-SERS method's ability to discriminate between bacteria. The capacity of the MA-SERS biosensor to detect PJI was evaluated using both infected and noninfected real-matrix samples. A set of 30 samples including ten sterile joint fluid replicates and spectra of sterile joint fluid spiked with live bacterial cells were used for this purpose. The three principal components needed to describe the spectral variation in the standards using the discriminant analysis method were chosen

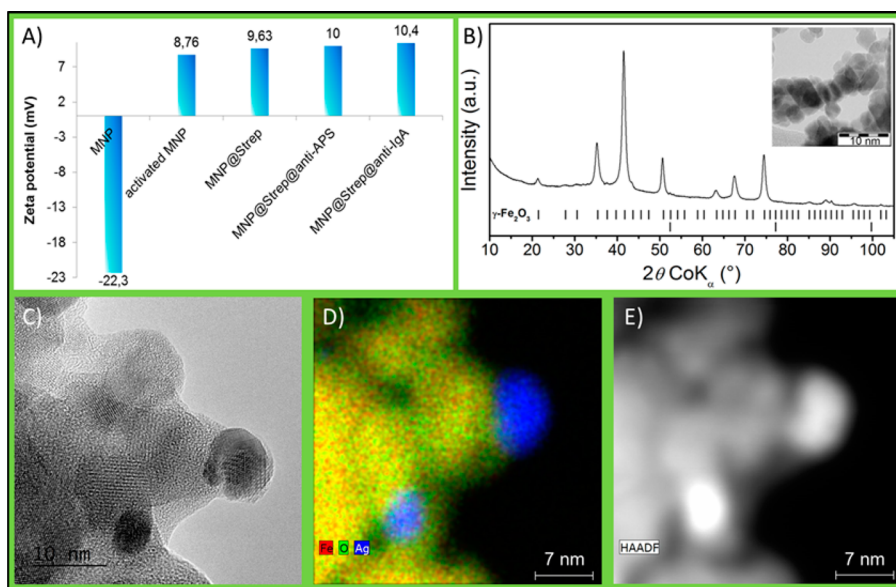


Figure 1. Material characterization of the MA-SERS biosensor: (A) Measured ζ potentials of the prepared biosensor after each modification step. (B) XRD pattern of MNP (inset: TEM image of the MNP). The theoretical position of the maghemite diffraction line is also shown. (C) Representative HRTEM image of MNP@Strep/Ag. (D) STEM-EDS chemical mapping (Fe, O, and Ag) of MNP@Strep/Ag. (E) HAADF image of MNP@Strep/Ag.

on the basis of an Eigenanalysis; the resulting decomposition converted the data into a principal component space with axes in the directions of maximal orthogonal variation inherent in the data. The chemometric models were constructed using data for the $400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ region of the Raman spectra, where the full spectrum contribution was above 99.5%.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, MNP@Strep biosensors were used as SERS platforms for the determination of two bacterial strains, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, in knee joint fluid samples. The presence of covalently bound streptavidin on the surface of these magnetic biosensors allows their selectivity to be tuned by simple functionalization using biotinylated antibodies. Two antibodies were employed in this work: an antibody to protein A³³ was used to achieve selectivity for *Staphylococcus aureus*, and an antibody to the group-A streptococci polysaccharide³⁴ was used to achieve selectivity for *Streptococcus pyogenes*.

The surface composition of the as-synthesized biosensors was monitored by measuring their ζ potential after each modification step, i.e., after the activation of functional groups and bond-forming steps. ζ potentials measured after each surface modification are shown in Figure 1A. The measured ζ potential of the pristine carboxy-functionalized magnetic nanoparticles (MNP) corresponded to a charge of -22.3 mV. This relatively high negative surface charge is attributed to the acidity of the free carboxyl groups. These pristine MNP were also characterized by XRD with Co $K\alpha$ radiation (Figure 1B). The only crystalline phase can be identified from the diffraction pattern: cubic slightly nonstoichiometric maghemite phase ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; cell parameter $a = 0.8360$ nm) with partially ordered vacancies (space group $P4332$). The crystallite size derived from Rietveld refinement analysis of the X-ray powder diffraction pattern is 13 nm. A TEM image of the starting MNP is shown in the inset of Figure 1B. These pristine magnetic nanoparticles were selected because of the presence

of free carboxylic groups, which increased the long-term stability of the as-prepared biosensor by enhancing its dispersibility in aqueous environments. The subsequent activation of the surface carboxyl groups using an aqueous mixture of EDC and NHS was accompanied by a substantial increase in the material's zeta potential (to 8.76 mV), reflecting the successful conversion of the carboxyl groups on the MNP surface into reactive *N*-hydroxysulfosuccinimide esters. In the next step, streptavidin was immobilized on the surface of the magnetic nanoparticles via the reaction of its terminal amino group ($-\text{NH}_2$) with the activated carboxyl groups on the MNP surfaces. This increased the particles' zeta potential further, to 9.63 mV. Streptavidin functionalization was required to enable binding of the biotinylated antibodies, which occurred in the next step of the synthesis. The formation of a noncovalent bond between streptavidin and the biotinylated antibodies and the final blockage of residual activated carboxylic groups caused a small further increase in the surface charge, to 10 mV for the nanoparticles bearing the anti-APS antibody and 10.4 mV for those bearing the anti-IgA antibody. The morphology of the final biosensors was characterized by HRTEM, STEM-EDS, and STEM-HAADF imaging. Figure 1C shows a HRTEM image of MNP@Strep/Ag which reveals that the overall diameter of the as-synthesized Fe_2O_3 (maghemite) and Ag nanoparticles is in the range of 10–20 nm. Moreover, the STEM-EDS chemical mapping (Figure 1D) of the biosensors clearly indicates the presence of both Fe and Ag species. As shown in Figure 1E, silver nanoparticles are distributed on the surface of maghemite; this is further confirmed by the presence of particles with different contrast in the STEM-HAADF image.

To better understand the surface composition of the functionalized MNP@Strep biosensors, they were analyzed by infrared spectroscopy (IR). IR absorption spectra collected after streptavidin decoration and the attachment of biotinylated antibodies to the MNP are shown in Figure 2. The IR spectrum of the pristine MNP features the characteristic vibrational modes (e.g., 1726 cm^{-1}), which are due to carbonyl stretching,

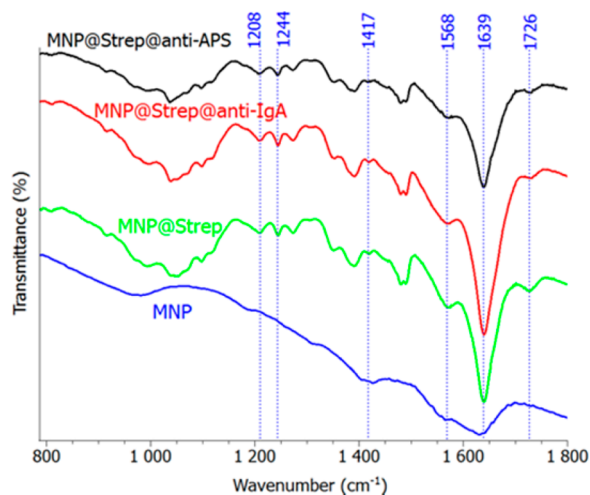


Figure 2. IR spectra of pure MNP, modified MNP@Strep, and MNP@Strep functionalized with biotinylated antibody to protein A (labeled as MNP@Strep@anti-IgA) and with biotinylated antibody to group-A streptococci polysaccharide (labeled as MNP@Strep@anti-APS).

yet contains no protein vibrations that will be featured in IR spectra after subsequent modification steps of MNP. The IR spectrum of the nanoparticles after streptavidin immobilization (i.e., MNP@Strep) features two amide bands: band I at 1639 cm^{-1} , corresponding to a β -pleated sheet structure (C=O stretch), and band II at 1568 cm^{-1} (N–H bend with C–N stretch). These bands can be attributed to the amide functionalities of streptavidin's peptide groups and thus indicate the presence of the streptavidin on MNP.^{21,35,36} A peak corresponding to the carboxylate vibrational mode at 1417 cm^{-1} (COO⁻ stretch) is also identifiable in the spectrum of MNP@Strep.³⁷ The presence of streptavidin on MNP was confirmed by the presence of bands of weak-to-medium intensity at 1208 and 1247 cm^{-1} , both of which were assigned to amide III vibrations.²¹ As can be seen in Figure 2, there are no new vibrational modes between the IR spectra of the biosensors prepared with antibodies (labeled MNP@Strep@anti-IgA and MNP@Strep@anti-APS, respectively) and that of the streptavidin-coated nanoparticles except for a slight red shift of a weak spectral band located at 1726 cm^{-1} arising from carbonyl stretching, which may be attributed to the formation of a lock-and-key type interaction between the nanoparticle-bound streptavidin and the biotin tag on the antibodies.³⁸

The biosensors were initially tested against model samples consisting of a *Staphylococcus aureus* (henceforth referred to as STAU) bacterial lysate. The resulting SERS spectra are shown in the Figure 3, together with spectra for a pure MNP sample, a modified sample consisting of the MNP@Strep nanoparticles in aqueous solution, and a blank sample consisting of the MNP@Strep@anti-IgA biosensor in aqueous solution with no added lysate. The spectrum of the pure MNP sample features none of the strong vibrational modes observed in the spectra of the modified MNP@Strep, blank, or model samples. Conversely, the SERS spectra of the MNP@Strep and MNP@Strep@anti-IgA (blank) samples are very similar. Both feature spectral bands characteristic of proteins, including the amide II and III bands. The spectral bands located at 1558 and 1450 cm^{-1} were assigned to the amide II mode, which arises mostly from NH bending, and to (δ -CH₂) scissoring vibrations modes, respectively.³⁹ The amide III mode, which is associated with

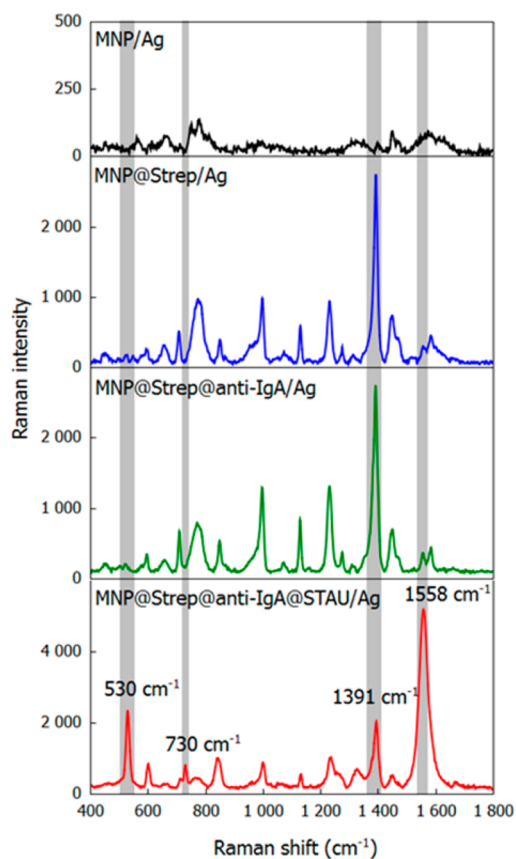


Figure 3. SERS spectra of the pure MNP/Ag, modified MNP@Strep/Ag, MNP@Strep modified with biotinylated antibody to protein A (labeled as MNP@Strep@anti-IgA/Ag), and bacterial lysate of *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag).

α -helices and is primarily due to ν (CN) stretching and NH in-plane bending vibrations of the peptide bond, is represented by the bands at 1391 and 1231 cm^{-1} .^{40,41} Functionalization of the MNP@Strep biosensor using either of the biotinylated antibodies increased the intensity of the amide III band at 1231 cm^{-1} , which is consistent with an increase in the prevalence of α -helical conformations and thus successful noncovalent binding between streptavidin and the biotinylated antibody. A representative SERS spectrum of an antibody-decorated MNP sample is shown in Figure 3 with the label MNP@Strep@anti-IgA/Ag. Finally, treatment of anti-IgA-decorated MNP with the STAU lysate yielded a sample referred to as MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag. SERS analysis of this material revealed pronounced changes in the relative intensities of the bands at 1391 and 1558 cm^{-1} when compared to the modified MNP@Strep and blank sample. The ratio of intensities (I_{1391}/I_{1558} , henceforth referred to as the protein band ratio, PBR) changed from 13.31 in the blank sample to 0.36 with the difference statistically significant (p value = 1.035×10^{-5}), which is consistent with a successful interaction between a functionalized composite and protein A, which is a characteristic protein of STAU.

The SERS spectrum of the lysate-treated MNP (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) also features new well-resolved bands at 530 , 602 , and 730 cm^{-1} that were not present in the spectra of the modified MNP@Strep and blank samples. The strong Raman mode at 530 cm^{-1} could be assigned to S–S

stretches of the L-cysteine-rich polypeptide toxin produced by STAU.^{21,42,43} The SERS spectrum also features a significant band at 602 cm^{-1} which might be due to a vibrational mode of phenylalanine, which is also produced by STAU.^{44,45} Another important peak at 730 cm^{-1} may correspond to a glycosidic ring mode of the bacterium's peptidoglycan cell wall building blocks, poly-*N*-acetylglucosamine (NAG) and *N*-acetylmuramic acid (NAM).^{46–49} On the other hand, Ankamwar et al.⁵⁰ attributed the 730 cm^{-1} peak to the purine ring breathing mode and the C–N stretching mode of the adenine part of the lipid layer components of the bacterial cell wall.

Our method offers a high degree of versatility because the selectivity of the nanoparticle biosensors can be altered simply by changing the antibody that is added in the final step of the synthesis. This was demonstrated by analyzing a lysate of *Streptococcus pyogenes* (henceforth, STPY), which is frequently associated with PJI. Figure 4 compares the SERS spectra of the

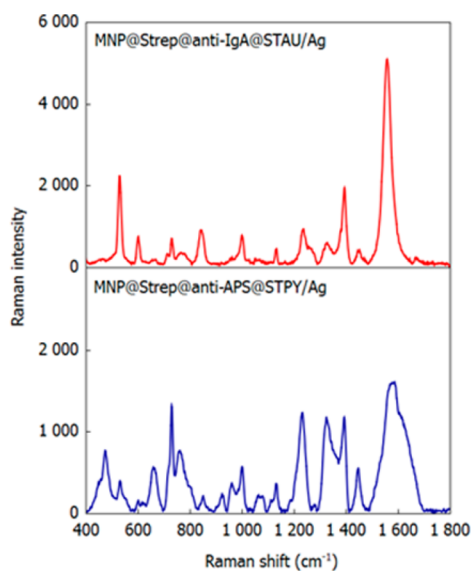


Figure 4. SERS spectra of model samples of bacterial lysates of *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) and *Streptococcus pyogenes* (labeled as MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag).

STPY biosensor after treatment with the corresponding bacterial lysate (labeled MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag) to that of the previously discussed STAU sensor (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) after treatment with the STAU lysate. As might be expected given that both of these bacteria are Gram-positive facultative anaerobic species, the two spectra are quite similar, although there are some noteworthy differences. The PBR for the peaks at 1391 and 1558 cm^{-1} in the SERS spectrum of the MNP@Strep@anti-APS nanoparticles changed substantially upon treatment with the STPY lysate, from 19.71 falling to 0.48 with a statistically significant difference (p value = 2.522×10^{-6}). This is clearly indicative of an interaction between the lysate and the functionalized biosensor. The largest differences between the SERS spectra of the lysate-treated STAU MNP (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) and STPY MNP (MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag) relate to the bands at 475, 924, and 962 cm^{-1} . All of these could be due to vibrations of D-mannose, which is the main sugar component in the matrix of STPY.⁵¹ The MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag spectrum also features a striking and

intense peak at 660 cm^{-1} , corresponding to the C–S stretch of the methionine-containing STPY toxin.^{47,52} Moreover, the important band at 530 cm^{-1} (corresponding to cysteine S–S stretches) is less intense in the spectrum of the STPY MNP than in the STAU MNP, which could be used to further differentiate these bacterial species. Moreover, the PBR values for the STAU and STPY lysates were statistically significantly different (0.36 vs 0.48, p value = 0.021). This direct comparison of the SERS spectra of two different bacterial lysates with tailored MA-SERS biosensors clearly shows that our new MA-SERS assay can distinguish between *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*.

Because knee joint fluid samples are typically information-rich and contain a wide range of different molecules, interpreting the spectra of bacterial pathogens in a knee joint fluid matrix is usually very difficult and often requires the use of complex data analysis techniques. Despite this, SERS microscopy is a promising clinical analytical technique for detecting pathogenic bacteria. Because of the samples' biochemical complexity, they are likely to contain a diverse mix of SERS-active vibrational modes arising from pathogen cell envelope components and native components of the matrix. While the system presented here relies on a priori knowledge of the biochemistry of the pathogen of interest and the host, the technique offers some flexibility in that the SERS spectrum of a lysate-treated biosensor is likely to contain multiple peaks that could be used for diagnosis and detection. Although this flexibility is attractive, an ideal system would not permit any band to be assigned tentatively. In practice, tentative assignment is likely to be unavoidable for the time being because of the lack of SERS spectral databases that could be used to identify peaks due to bacterial components; this makes the analytical process more time-consuming than it would be otherwise. Although database resources for basic Raman spectra of biological materials are gradually becoming more accessible and comprehensive, it is not certain that the vibrational bands seen in Raman spectra will also appear in the SERS spectra of the corresponding bacteria.

We tested the stability of our fabricated SERS biosensor by storing it for various periods of time under atmospheric conditions and then repeating the SERS analysis. The SERS signal stability was evaluated using a batch of the MNP@Strep@anti-IgA that was prepared (on day 0) and stored in a refrigerator for a period of 60 days. Aliquots of this stored material were removed and treated with an STAU lysate on days 1, 15, 30, 45, and 60, and the SERS spectra of the resulting MNP@Strep@anti-IgA@STAU nanoparticles were acquired. Figure S1A shows these spectra. All the spectra contain the same bands as those for the fresh material, although their absolute intensities decrease appreciably over time. However, the calculated PBR values are rather stable, with an average value of 0.36 and a relative standard deviation of less than 5% between PBR values. Consequently, we have plotted additional line charts of the main peak intensity at 1558 cm^{-1} /PBR value as y axis and time as x axis. Both values were monitored for a 2 month period as can be seen in Figure S1B,C. The SERS biosensor thus appears to be quite stable when stored under ambient atmospheric conditions even after two months.

To further evaluate the viability of the proposed cultivation-free approach for detecting and identifying STAU and STPY in a real matrix, samples of a sterile knee joint fluid spiked with live bacterial cells were examined. The Raman spectra obtained in these experiments are shown in Figure 5. The signals in both

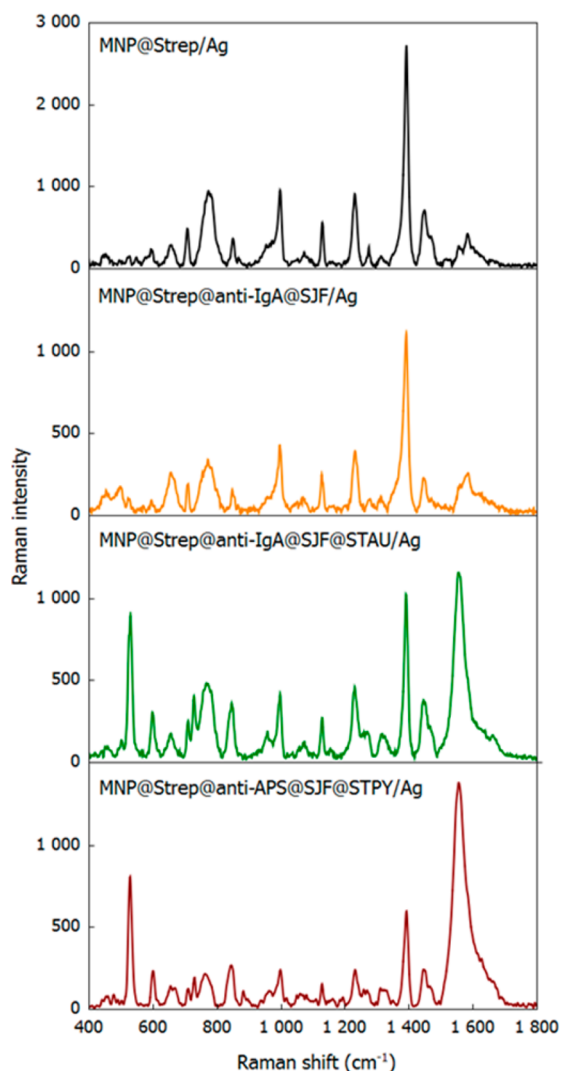


Figure 5. SERS spectra of the modified MNP@Strep/Ag nanoparticles, sterile joint fluid (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@SJF/Ag), joint fluid with *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@SJF@STAU/Ag), and joint fluid with *Streptococcus pyogenes* (labeled as MNP@Strep@anti-APS@SJF@STPY/Ag).

spectra agree well with those for the corresponding model samples; while the peaks' absolute intensities changed because of concentration effects, both the model samples and the real matrix samples yielded the same trend in the PBR, which decreased from 13.31 to 0.80 (p value = 1.010×10^{-5}) in the case of *S. aureus* and from 19.71 to 0.65 (p value = 2.817×10^{-5}) for STPY. We then investigated the influence of concentration effects and nonspecific interactions on bacterial recognition. The influence of nonspecific interactions was studied using the MNP@Strep@anti-IgA biosensor with real-matrix samples of knee joint fluid from four patients (labeled A–D) spiked with live STAU bacteria prepared at different times. Figure S2 shows the spectral data for these measurements. All the spectra contain the previously identified bands, although their absolute abundances vary appreciably. However, the calculated PBR values are stable (averaging around 0.80), and the relative standard deviation of the PBR between batches is only 10%. The spectra shown in Figures 5 and S2 contain minor bands originating from nonspecific interactions of the

remaining free surface of the silver nanoparticles with small organic molecules and salts. These interactions have no appreciable effect on the calculated PBR values, as demonstrated by the low RSD and steady PBR.

The performance of the new method was then tested using real-matrix samples from the same four patients (A, B, C, and D). Briefly, ten technical replicate analyses were performed for each sample, and the resulting spectral data were subjected to statistical analysis to further evaluate the method's ability to distinguish between the two studied bacterial strains. The chosen analytical technique was discriminant analysis (DA), which is used to determine the classes of known materials that have similar spectra by calculating the distance between each class center in Mahalanobis distance units. When working with data derived from multiple sources, DA can be used to map the observations into a coordinate space that maximizes source separation. As applied in this work, DA facilitates the detection of spectral similarities and differences and can also be used to screen incoming materials to determine how they should be classified. If the SERS spectra of the biological samples have obvious, repeatable similarities, data points from each species should group together within the transformed space, indicating successful discrimination of a species-specific SERS signature. After the material was successfully classified by DA, the Statistical Spectra software tool supplied with the spectrometer was used to compute a mean spectrum for each class. Due to the rich informational content of the spectra in the region between 400 and 1600 cm^{-1} , the DA was performed based on this region. The study was performed on a set of 30 samples from the four patients, including replicate spectra of the sterile joint fluid and sterile joint fluid spiked with live bacterial cells. The results obtained are summarized in Figure 7A–D, which

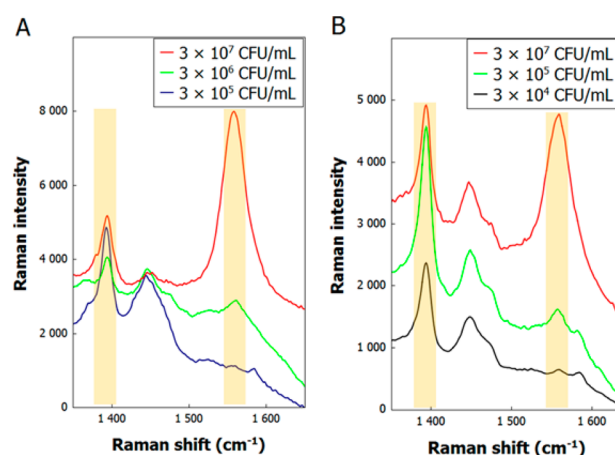


Figure 6. Close up of the 1391 and 1558 cm^{-1} peaks of real matrix sample with different concentrations of (A) *S. aureus* and (B) *S. pyogenes*. The spectra were shifted by a hundred units of Raman intensity in order to increase the transparency.

show the results of a DA and the associated mean SERS spectra (Figure S3A–D). The classes identified by the DA are clearly visible and distinct, with the sterile joint fluid cluster shown in red, the sterile joint fluid with added *Staphylococcus aureus* CCM 3953 cluster shown in blue, and the sterile joint fluid with added *Streptococcus pyogenes* cluster shown in green. DA data based on the SERS spectra obtained for each individual patient indicate that the method can differentiate between pathogenic samples and sterile sample (SJF, red cluster) as well as between

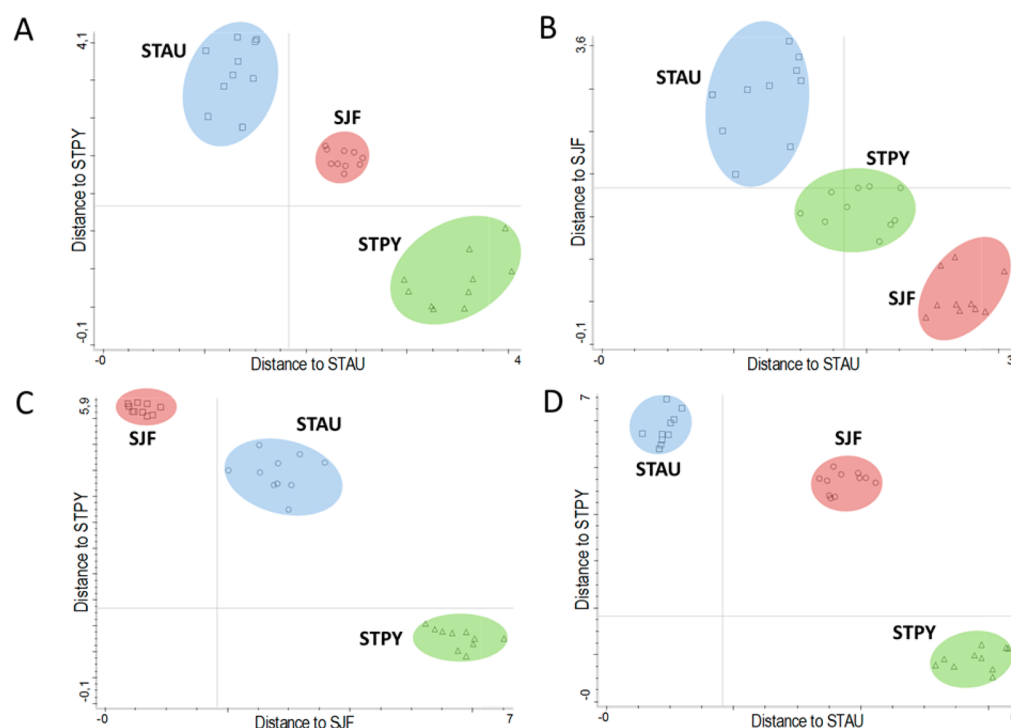


Figure 7. Discriminant analysis of knee joint fluid samples from four real patients (A, B, C, and D). Clusters defined training sets: sterile joint fluid (SJF; red), joint fluid with *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (STAU; blue), and joint fluid with *Streptococcus pyogenes* (STPY; green).

the *S. aureus* (blue cluster) and *S. pyogenes* (green cluster) samples because the experimental data points are centered in clusters that are separated by appreciable distances. The DA accurately classified all the tested samples as belonging to one of the sterile fluid, *S. aureus*, or *S. pyogenes* classes. For all patients (Figure 7A–D), the signals corresponding to *S. aureus* and *S. pyogenes* are located in two distinct clusters and can be clearly distinguished from the sterile knee joint fluid. The calculated average intracluster distances for patients A, B, C, and D are 0.37, 0.57, 0.59, and 0.94, respectively, for sterile joint fluid; 1.31, 1.24, 0.80, and 0.92, respectively, for sterile joint fluid with added *S. aureus* CCM 3953; 0.84, 0.82, 1.27, and 0.91, respectively, for sterile joint fluid with added *S. pyogenes*. The average intercluster distances between the sterile joint fluid cluster and the *Staphylococcus aureus* CCM 3953 or *Streptococcus pyogenes* clusters are 2.37, 2.90, 2.83, and 3.72 and 2.46, 1.60, 5.69, and 4.69, respectively. The average intercluster distance between sterile joint fluid with added *Staphylococcus aureus* CCM 3953 and sterile joint fluid with added *Streptococcus pyogenes* is 3.62, 1.95, 4.45, and 5.83. These results show that MA-SERS combined with DA can reliably be used to differentiate the three analytes, a conclusion that was subsequently validated using standard cultivation methods with the same set of samples.

The sensitivity of the method was tested using the same MA-SERS detection protocol described in the Experimental Section. We have decreased the concentration of both bacteria down to a limit, where a statistically significant change in PBR value can still be observed between the blank and bacteria containing real samples. On the basis of the results, this approach gives a positive response for the common concentration of bacteria present (3×10^8 CFU/mL) in real samples accompanying prosthetic joint infection. Moreover, the purposed approach showed that the limit of detection of the MA-SERS method is two (STAU) or three (STPY) orders below a common value

accompanying bacterial joint infections, which can be seen in Figure 6.

Finally, the ability of the purposed MA-SERS biosensor to selectively trap a target pathogen in real-matrix samples was briefly tested using the 1:1 mixture of biosensors (MNP@Strep@anti-IgA and MNP@Strep@anti-APS) treated with pure *S. aureus* or *S. pyogenes* as well as with the mixture of bacterial lysates in a 90:10 ratio for both bacteria. The mixed biosensors were treated with the above-mentioned bacterial samples with the same sampling protocol described in the Experimental Section. When differentiating between the sets with pure *S. aureus* or *S. pyogenes* against their respective bacterial mixtures, two different classes observed in DA were obtained (see Figures S4 and S5, respectively). The calculated average intracluster distances for STAU samples sets 90:10 and 100:0 are 1.11 and 0.68, respectively. On the other hand, these clusters are completely separated and the distance between the classes is 2.45. Then, the calculated average intracluster distances for STPY samples sets 90:10 and 100:0 are 1.06 and 0.79, respectively. On the other hand, these clusters are completely separated and the distance between the classes is 1.97. It has been estimated that the assay is selective for both pathogens despite the fact that one is present in a very small amount compared to the other one.

CONCLUSION

Aspiration of the knee joint is required before reoperation due to PJI and before the second stage of the two-stage surgery. Additionally, many orthopedic surgeons perform this simple examination routinely before any revision total joint arthroplasty. Joint fluid samples are regularly analyzed for the presence of cells and molecules associated with antibacterial host responses and for causative agents of PJI. However, cultures grown from joint fluid samples often yield false negative results even in cases with evident PJI. In addition, the

identification and characterization of bacteria using culture methods is time-consuming, laborious, and expensive. Our work demonstrates that characteristic proteins of pathogenic bacteria, protein A from *Staphylococcus aureus* and the group-A streptococci polysaccharide from *Streptococcus pyogenes*, can be detected in experimental settings and in clinical knee joint fluid samples using MA-SERS spectroscopy with antibody-functionalized magnetic nanoparticle biosensors. The analysis can be performed much more quickly than established methods for diagnosing PJI based on Koch's culturing protocols, colony counting, PCR, or PFGE and can be tailored to specific pathogens of interest by selecting an appropriate antibody when functionalizing the nanoparticles in the final step of their synthesis. As such, our new method could be clinically useful for rapidly diagnosing cases of PJI and identifying appropriate treatments. Additionally, the results presented herein clearly demonstrate the power of functionalized magnetic nanoparticles in biorecognition.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00759.

SERS spectra of MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag obtained with samples of different batches in a 2 month period after the preparation and SERS spectra obtained by analysis of real-matrix samples of knee joint fluid collected from four different patients spiked by live bacteria cells of STAU; mean SERS spectra for each class of discriminant analysis of knee joint fluid samples from four patients and graphical representation of the discriminant analysis of data obtained by evaluation of the mixture of biosensors treated with a mixture of bacterial lysates (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: vaclav.ranc@upol.cz (V.R.).

*E-mail: radek.zboril@upol.cz (R.Z.).

ORCID

Radek Zbořil: 0000-0002-3147-2196

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project LO1305), and Palacký University (Student Project IGA_PrF_2017_025). The authors also acknowledge the assistance provided by the Research Infrastructure Nano-EnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073. This work was further supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV VES 15-27726A) and Project IGA_LF_2017_009 of Palacký University. Mrs. Jana Stráská is thanked for TEM measurements, Mr. Josef Kašík for XRD measurements and analysis, and Dr. Klára Čépe and Mr.

Ondřej Tomanec for HRTEM measurements (all from the Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic).

■ REFERENCES

- (1) Voigt, J.; Mosier, M.; Darouiche, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6696–6707.
- (2) Kamath, A. F.; Ong, K. L.; Lau, E.; Chan, V.; Vail, T. P.; Rubash, H. E.; Berry, D. J.; Bozic, K. J. *J. Arthroplast.* **2015**, *30*, 1492–1497.
- (3) Corvec, S.; Portillo, M. E.; Pasticci, B. M.; Borens, O.; Trampuz, A. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35*, 923–934.
- (4) Zimmerli, W.; Trampuz, A.; Ochsner, P. E. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1645–1654.
- (5) Trampuz, A.; Zimmerli, W. *Swiss Med. Wkly.* **2005**, *135*, 243–251.
- (6) Portillo, M. E.; Salvadó, M.; Alier, A.; Martínez, S.; Sorli, L.; Horcajada, J. P.; Puig, L. *J. Infect.* **2014**, *69*, 35–41.
- (7) The Workgroup Convened by the Musculoskeletal Infection Society. *J. Arthroplast.* **2011**, *26*, 1136–1138.
- (8) Parvizi, J.; Zmistowski, B.; Berbari, E. F.; Bauer, T. W.; Springer, B. D.; Della Valle, C. J.; Garvin, K. L.; Mont, M. A.; Wongworawat, M. D.; Zalavras, C. G. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469*, 2992–2994.
- (9) Deirmengian, C.; Kardos, K.; Kilmartin, P.; Gulati, S.; Citrano, P.; Booth, R. E., Jr. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2015**, *473*, 2229–2235.
- (10) Saeed, K.; Ahmad-Saeed, N. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 957–964.
- (11) Lazcka, O.; Del Campo, F. J.; Muñoz, F. X. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1205–1217.
- (12) Berbari, E. F.; Marculescu, C.; Sia, I.; Lahr, B. D.; Hanssen, A. D.; Steckelberg, J. M.; Gullerud, R.; Osmon, D. R. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1113–1119.
- (13) Metso, L.; Mäki, M.; Tissari, P.; Remes, V.; Piiparinen, P.; Kirveskari, J.; Tarkka, E.; Anttila, V.-J.; Vaara, M.; Huotari, K. *Acta Orthop.* **2014**, *85*, 165–170.
- (14) Qu, X.; Zhai, Z.; Li, H.; Li, H.; Liu, X.; Zhu, Z.; Wang, Y.; Liu, G.; Dai, K. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2742–2746.
- (15) Panousis, K.; Grigoris, P.; Butcher, I.; Rana, B.; Reilly, J. H.; Hamblen, D. L. *Acta Orthop.* **2005**, *76*, 341–346.
- (16) Cazanave, C.; Greenwood-Quaintance, K. E.; Hanssen, A. D.; Karau, M. J.; Schmidt, S. M.; Gomez Urena, E. O.; Mandrekar, J. N.; Osmon, D. R.; Lough, L. E.; Pritt, B. S.; Steckelberg, J. M.; Patel, R. J. *Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2280–2287.
- (17) Hommelshaim, C. M.; Frantzeskakis, L.; Huang, M.; Ülker, B. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 5052.
- (18) Weller, T. M. A. *J. Hosp. Infect.* **2000**, *44*, 160–172.
- (19) Corvec, S.; Illiaquer, M.; Touchais, S.; Boutoille, D.; van der Mee-Marquet, N.; Quentin, R.; Reynaud, A.; Lepelletier, D.; Bémer, P. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 380–382.
- (20) Kourbatova, E. V.; Halvosa, J. S.; King, M. D.; Ray, S. M.; White, N.; Blumberg, H. M. *Am. J. Infect. Control* **2005**, *33*, 385–391.
- (21) Maquelin, K.; Kirschner, C.; Choo-Smith, L.-P.; van den Braak, N.; Endtz, H. P.; Naumann, D.; Puppels, G. J. *J. Microbiol. Methods* **2002**, *51*, 255–271.
- (22) Prucek, R.; Ranc, V.; Kvitek, L.; Panáček, A.; Zbořil, R.; Kolář, M. *Analyst* **2012**, *137*, 2866–2870.
- (23) Khan, S. A.; Singh, A. K.; Senapati, D.; Fan, Z.; Ray, P. C. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9444–9446.
- (24) Sivanesan, A.; Witkowska, E.; Adamkiewicz, W.; Dziewit, Ł.; Kamińska, A.; Waluk, J. *Analyst* **2014**, *139*, 1037–1043.
- (25) Huang, P.-J.; Tay, L.-L.; Tanha, J.; Ryan, S.; Chau, L.-K. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 9330–9334.
- (26) Cho, I.-H.; Bhandari, P.; Patel, P.; Irudayaraj, J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 171–176.
- (27) Guven, B.; Basaran-Akgul, N.; Temur, E.; Tamer, U.; Boyacı, İ.H.B. *Analyst* **2011**, *136*, 740–748.
- (28) Ranc, V.; Markova, Z.; Hajdich, M.; Prucek, R.; Kvitek, L.; Kaslik, J.; Safarova, K.; Zboril, R. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2939–2946.

- (29) Balzerova, A.; Fargasova, A.; Markova, Z.; Ranc, V.; Zboril, R. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11107–11114.
- (30) Gallo, J.; Panacek, A.; Pucek, R.; Kriegova, E.; Hradilova, S.; Hobza, M.; Holinka, M. *Materials* **2016**, *9*, 337.
- (31) Habiba, K.; Bracho-Rincon, D. P.; Gonzalez-Feliciano, J. A.; Villalobos-Santos, J. C.; Makarov, V. I.; Ortiz, D.; Avalos, J. A.; Gonzalez, C. I.; Weiner, B. R.; Morell, G. *Appl. Mater. Today* **2015**, *1*, 80–87.
- (32) Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolář, M.; Večeřová, R.; Pizúrová, N.; Sharma, V. K.; Nevěčná, T.; Zbořil, R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- (33) Kobayashi, S. D.; DeLeo, F. R. *mBio* **2013**, *4*, e00764-13.
- (34) Poulsen, F. M.; Johansen, J. T.; Pedersen, J. A. *Carlsberg Res. Commun.* **1977**, *42*, 369–378.
- (35) Pradier, C.-M.; Salmain, M.; Zheng, L.; Jaouen, G. *Surf. Sci.* **2002**, *502–503*, 193–202.
- (36) Liu, Z.; Amiridis, M. D. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16866–16872.
- (37) Barth, A. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073–1101.
- (38) Haris, P. I. *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 940–946.
- (39) Harz, M.; Rösch, P.; Peschke, K.-D.; Ronneberger, O.; Burkhardt, H.; Popp, J. *Analyst* **2005**, *130*, 1543–1550.
- (40) Knauer, M.; Ivleva, N. P.; Niessner, R.; Haisch, C. *Anal. Sci.* **2010**, *26*, 761–766.
- (41) Shao, J.-H.; Zou, Y.-F.; Xu, X.-L.; Wu, J.-Q.; Zhou, G.-H. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2955–2961.
- (42) Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Alksne, L.; Schneewind, O. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7447–7452.
- (43) Chauhan, R. P.; Singh, G.; Singh, S.; Bag, N.; Patra, M.; Vadera, S. R.; Mishra, A. K.; Mathur, R. *Cancer Nanotechnol.* **2011**, *2*, 111–120.
- (44) Puppels, G. J.; Garritsen, H. S.; Segers-Nolten, G. M.; de Mul, F. F.; Greve, J. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1046–1056.
- (45) Halvorson, R. A.; Leng, W.; Vikesland, P. J. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9273–9280.
- (46) Jarvis, R. M.; Goodacre, R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 40–47.
- (47) Guicheteau, J.; Argue, L.; Emge, D.; Hyre, A.; Jacobson, M.; Christesen, S. *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62*, 267–272.
- (48) Liu, T.-T.; Lin, Y.-H.; Hung, C.-S.; Liu, T.-J.; Chen, Y.; Huang, Y.-C.; Tsai, T.-H.; Wang, H.-H.; Wang, D.-W.; Wang, J.-K.; Wang, Y.-L.; Lin, C.-H. *PLoS One* **2009**, *4*, e5470.
- (49) Kropec, A.; Maira-Litran, T.; Jefferson, K. K.; Grout, M.; Cramton, S. E.; Götz, F.; Goldmann, D. A.; Pier, G. B. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 6868–6876.
- (50) Ankamwar, B.; Sur, U. K.; Das, P. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 2335–2340.
- (51) Shafreen, R. M. B.; Srinivasan, S.; Manisankar, P.; Pandian, S. K. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 345–350.
- (52) Liu, M.; Prakash, C.; Nauta, A.; Siezen, R. J.; Francke, C. J. *Bacteriol.* **2012**, *194*, 3522–3533.

Supporting Information

to

Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Ariana Fargašová,[†] Anna Balzerová,[†] Robert Prucek,[†] Miroslava Htoutou Sedláková,[‡] Kateřina Bogdanová,[‡] Jiří Gallo,[§] Milan Kolář,[‡] Václav Ranc,^{†} and Radek Zbořil^{*†}*

[†] *Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic*

[‡] *Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic*

[§] *Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, University Hospital, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic*

* Corresponding authors: Phone: +420 585634388, Fax: +420 585634761, E-mail address: vaclav.ranc@upol.cz (Václav Ranc); Phone: +420 585634337, Fax: +420 585634761, E-mail address: radek.zboril@upol.cz (Radek Zbořil)

The SI contents:

The SI file contains SERS spectra of MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag obtained with samples of different batches in 2-months period after the preparation and SERS spectra obtained by analysis of real-matrix samples of knee joint fluid collected from four different patients (labeled as A–D) spiked by live bacteria cells of STAU, the mean SERS spectra for each class of discriminant analysis of knee joint fluid samples from four patients, and graphical representation of the discriminant analysis of data obtained by evaluation of the mixture of biosensors treated with mixture of bacterial lysates.

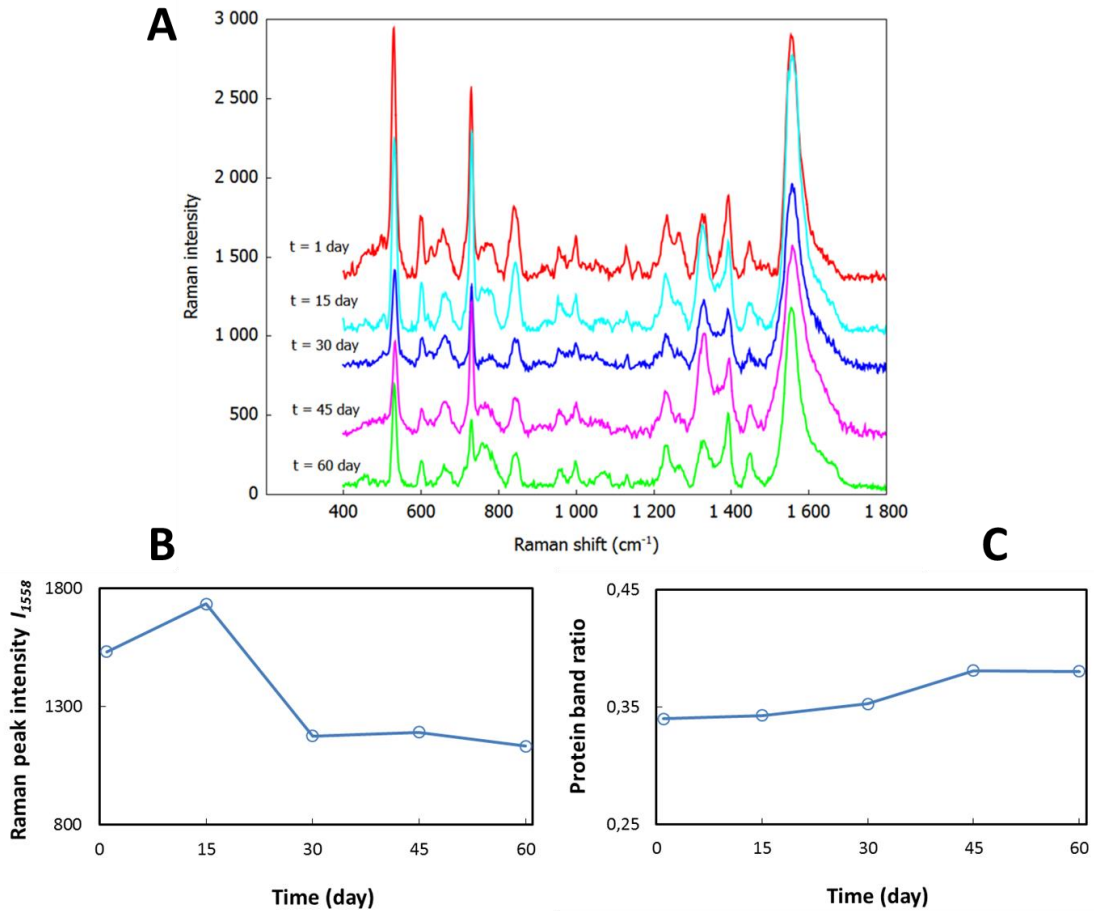


Figure S1. (A) SERS spectra of MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag obtained with samples of different batches in a 2-month period after the preparation demonstrating the stability of the biosensor. Each spectrum is shifted by 300 units of Raman intensity in order to increase the transparency of the spectra. (B) The line chart with main peak intensity at 1558 cm^{-1} of MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag obtained with samples of different batches plotted against a 2-month period after the preparation and found to have a decreasing trend. (C) The line chart of PBR values of MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag obtained with samples of different batches in a 2-month period after the preparation demonstrating the stability of the biosensor.

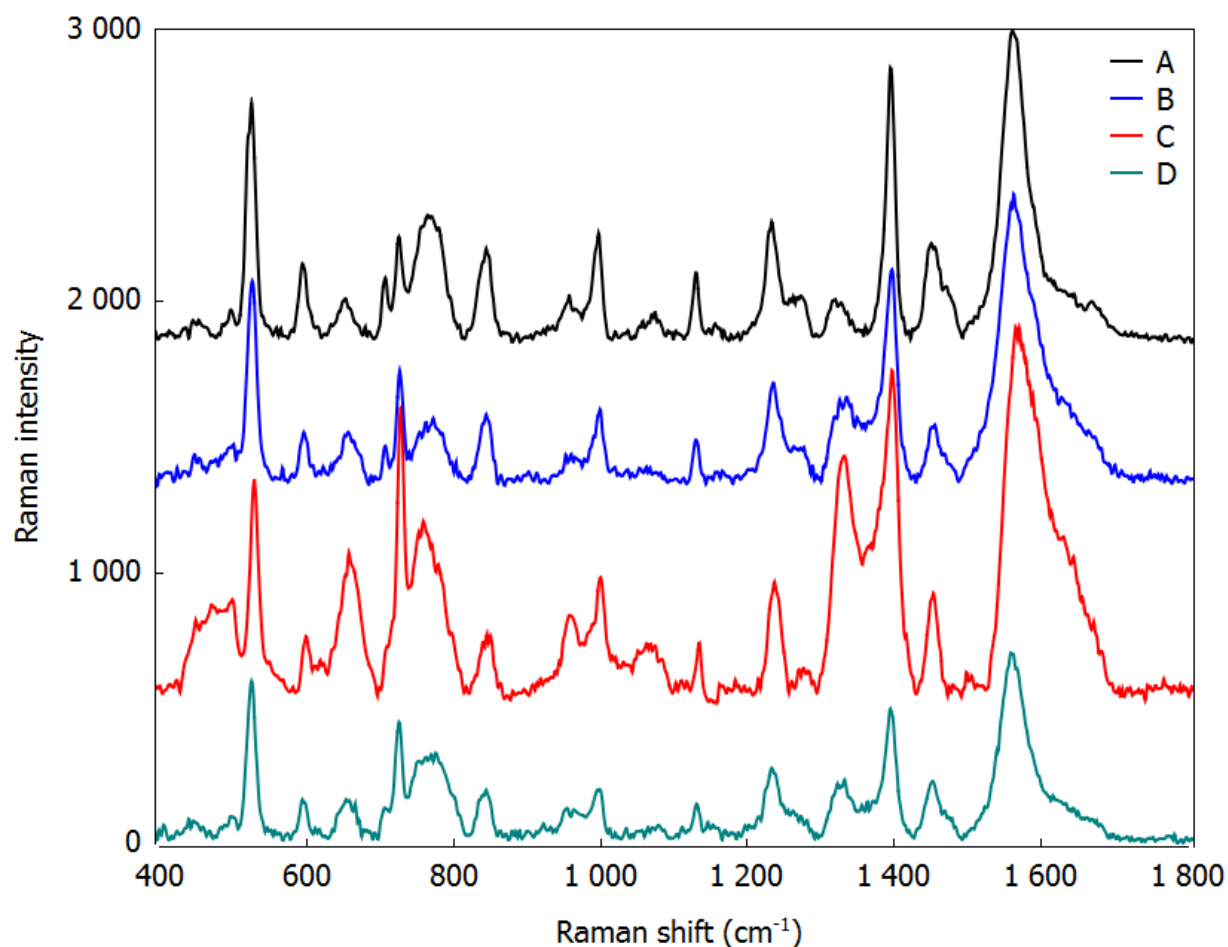


Figure S2. SERS spectra obtained by analysis of real-matrix samples of knee joint fluid collected from four different patients (labeled as A–D) spiked by live bacteria cells of STAU. The replicative spectra were acquired by the utilization of MNP@Strep@anti-IgA biosensor. Spectral pattern of obtained spectra is comparable, albeit the absolute intensities differ. However, the calculated spectral differences among PBR values, defined as I_{1391}/I_{1558} ratio, acquired from the different batches, are 10% (measured as relative standard deviation, RSD, between PBR).

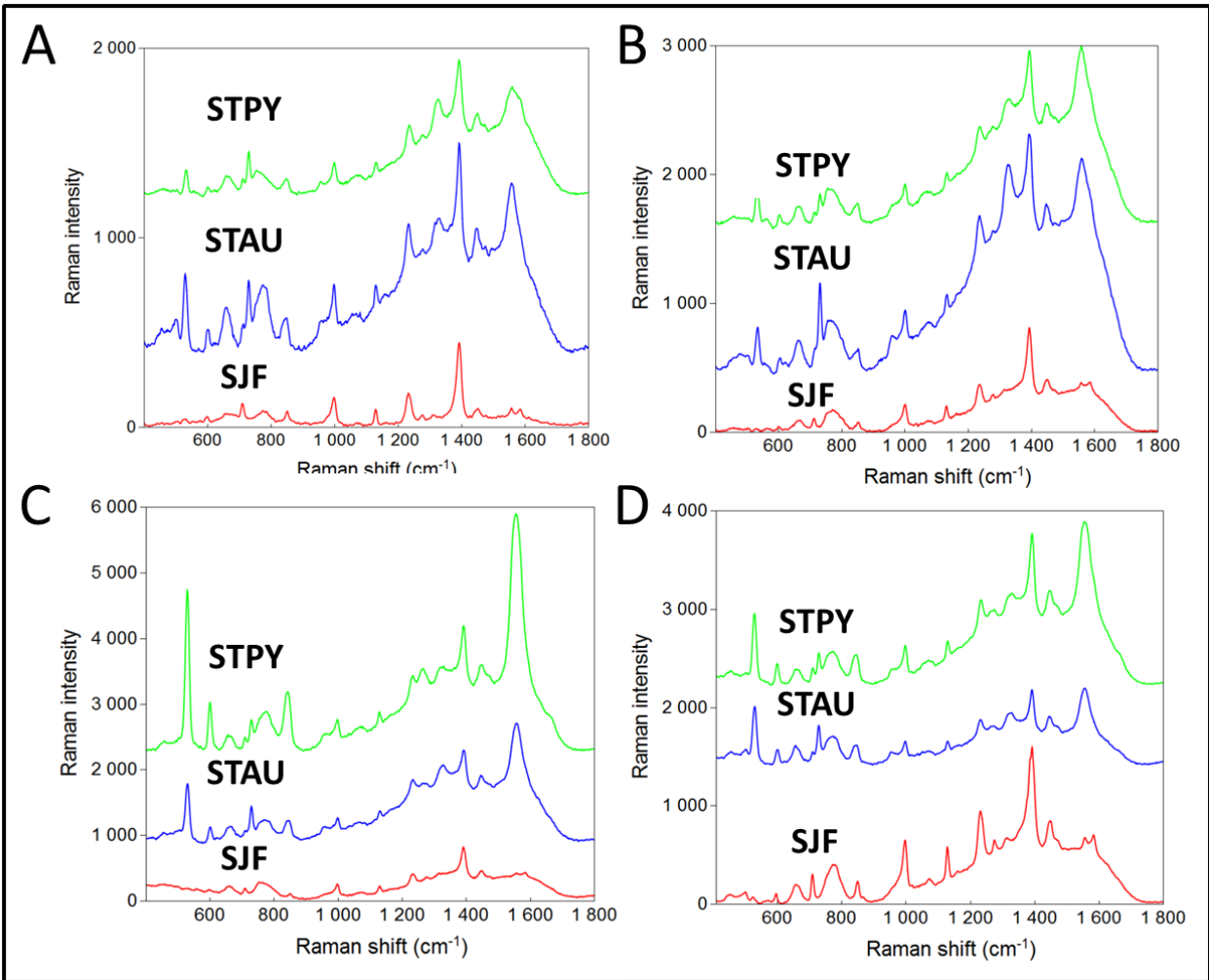


Figure S3. The corresponding mean spectra for each class of discriminant analysis of knee joint fluid samples from four real patients (A, B, C, and D). Spectra are shifted in order to increase the transparency of the spectra.

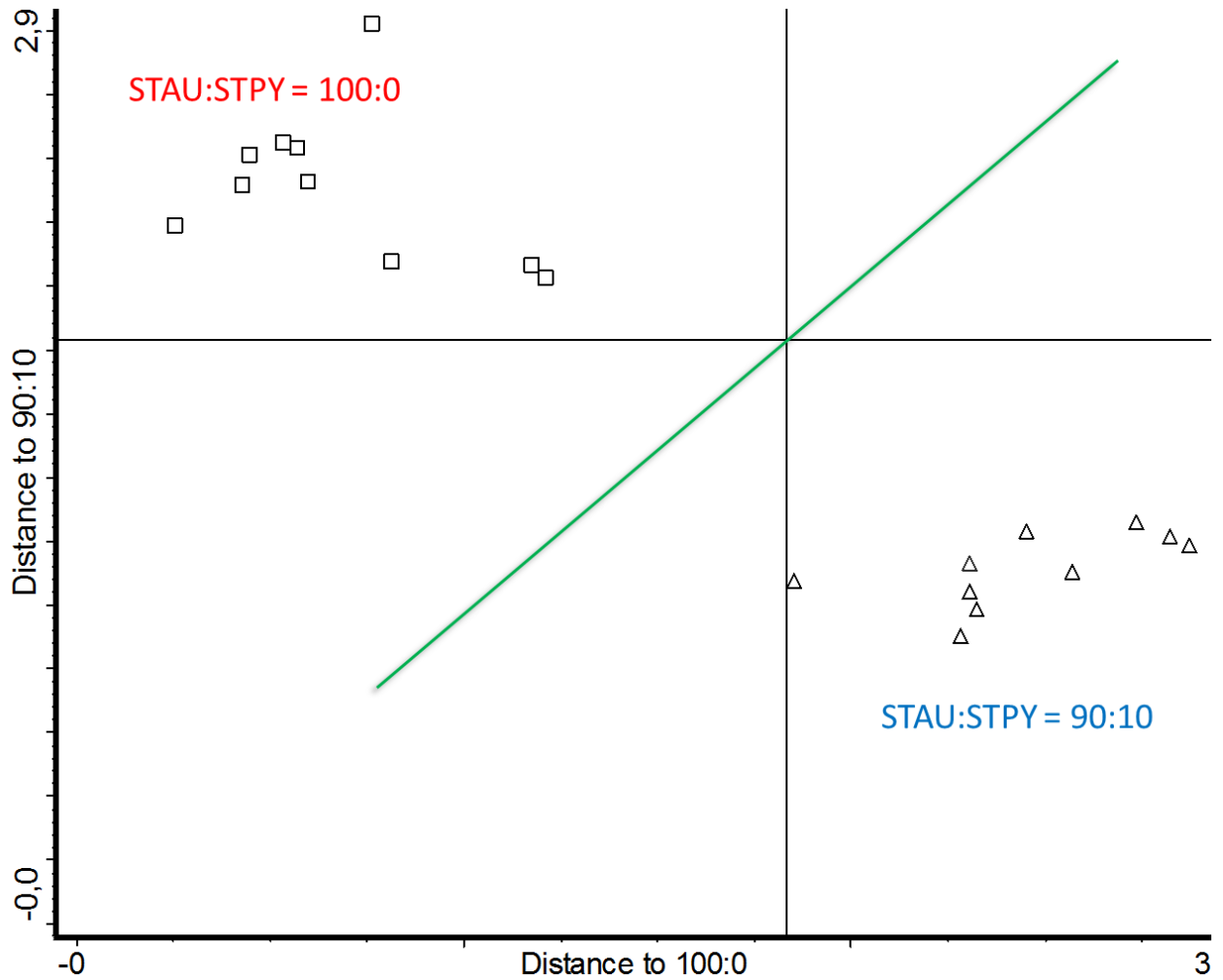


Figure S4. Graphical representation of the discriminant analysis of data obtained by evaluation of the 1:1 mixture of biosensors (MNP@Strep@anti-IgA & MNP@Strep@anti-APS) treated with pure *Staphylococcus aureus* as well as with the mixture of bacterial lysates (*Staphylococcus aureus* & *Streptococcus pyogenes*) in real-matrix sample. Clusters defined training sets: STAU:STPY = 100:0 (square), and STAU:STPY = 90:10 (triangle), where the distance between the clusters represents the level of discrimination (Mahalanobis distance).

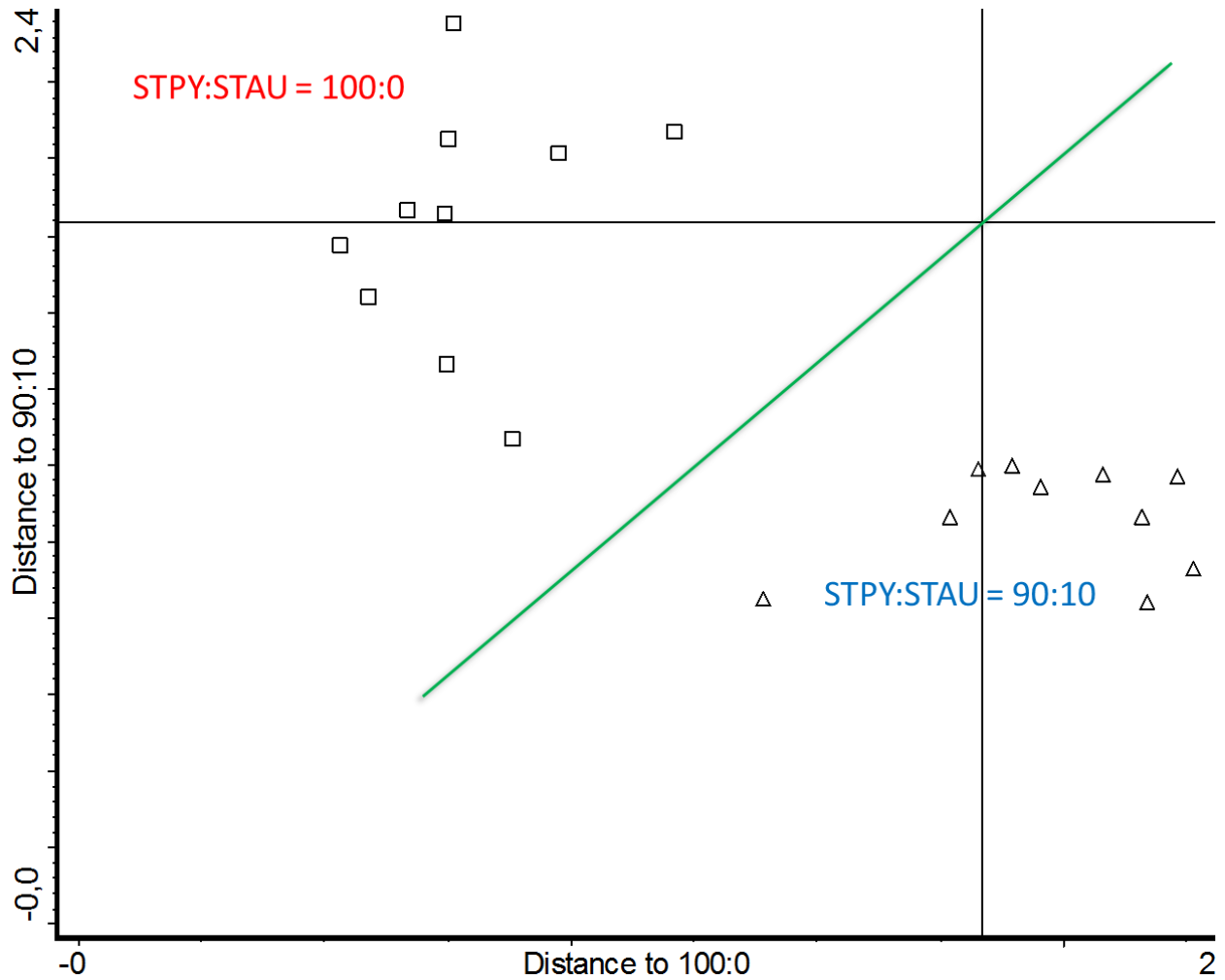


Figure S5. Graphical representation of the discriminant analysis of data obtained by evaluation of the 1:1 mixture of biosensors (MNP@Strep@anti-IgA & MNP@Strep@anti-APS) treated with pure *Streptococcus pyogenes* as well as with the mixture of bacterial lysates (*Streptococcus pyogenes* & *Staphylococcus aureus*) in real-matrix sample. Clusters defined training sets: STPY:STAU = 100:0 (square), and STPY:STAU = 90:10 (triangle), where the distance between the clusters represents the level of discrimination (Mahalanobis distance).

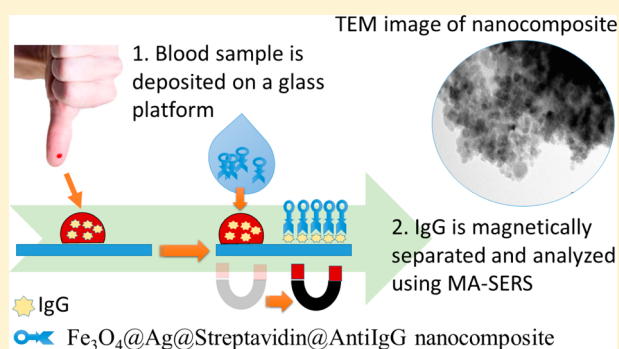
Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite

Anna Balzerova, Ariana Fargasova, Zdenka Markova, Vaclav Ranc,* and Radek Zboril*

Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 12, CZ-77146, Olomouc, Czech Republic

Supporting Information

ABSTRACT: Development of methods allowing determination of even ultralow levels of immunoglobulins in various clinical samples including whole human blood and plasma is a particular scientific challenge, especially due to many essential discoveries in the fields of immunology and medicine in the past few decades. The determination of IgG is usually performed using an enzymatic approach, followed by colorimetric or fluorimetric detection. However, limitations of these methods relate to their complicated setup and stringent requirements concerning the sample purity. Here, we present a novel approach based on magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA/SERS), which utilizes a Fe₃O₄@Ag@streptavidin@anti-IgG nanocomposite with strong magnetic properties and an efficient SERS enhancement factor conferred by the Fe₃O₄ particles and silver nanoparticles, respectively. Such a nanocomposite offers the possibility of separating a target efficiently from a complex matrix by simple application of an external magnetic force, followed by direct determination using SERS. High selectivity was achieved by the presence of anti-IgG on the surface of silver nanoparticles coupled with their further inactivation by ethylamine. Compared to many recently developed sandwich methods, application of single nanocomposites showed many advantages, including simplicity of use, direct control of the analytic process, and elimination of errors caused by possible nonspecific interactions. Moreover, incorporation of advanced spectral processing methods led to a considerable decrease in the relative error of determination to below 5%.



Immunoglobulins (Ig) play an essential role in many defensive mechanisms of organisms against various potentially damaging objects, such as viruses or bacteria. Five classes have been shown to be present in the human circulatory system, namely immunoglobulins A, G, M, E, and D.¹ It is noteworthy that IgG has a considerably smaller effective diameter compared to other immunoglobulins in the above-mentioned classes.² It is thus able to enter placenta and defend an unborn organism in its prenatal phase of development. IgG is present in the blood of healthy human adults at concentrations of approximately 10 g·L⁻¹, but these levels are usually changed during pathological processes induced by diseases.³ Therefore, advanced technologies and novel materials have been utilized to improve currently used methods to develop new procedures for determining levels of IgG with superior selectivity, even at ultralow concentrations, in order to decrease sample requirements, particularly the amount.

Classical methods and approaches for measuring IgG concentrations include immunomethods based on spectroscopic detection, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).⁴ Several alternatives to ELISA have been developed in order to increase the method accuracy and improve the limit of detection, e.g., fluorescence-based methods.⁵ The presence

of fluorophore defined by a design of the method can be advantageous for the above-mentioned reasons. However, such approaches may be limited by the modification steps required and by possible photobleaching or autofluorescence. Other well-established methods are based on separation techniques (electrophoresis, liquid chromatography), which are often coupled with mass spectrometry.⁶ These techniques possess several advantages, including high sensitivity and robustness. However, they also have some drawbacks regarding the requirements for sample purity and composition.

An alternative technique that can be used for the determination of human IgG is surface enhanced Raman spectroscopy (SERS),⁷ which allows detection of various organic, inorganic, and biological compounds at ultralow concentrations, even at the molecular level. Until now, SERS has been successfully applied in many fields, ranging from the enterprise sector, clinical praxis to environmental control, and forensic sciences.⁸ Moreover, the application potential of SERS can be further increased by employing magnetic nanomaterials

Received: May 20, 2014

Accepted: September 26, 2014

Published: September 26, 2014

for efficient sample separation and preconcentration,⁹ an approach referred here as magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). This innovative approach has already been successfully applied for the purification of recombinant biotinylated human sarco-/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase using a magnetic nanomaterial functionalized with avidin.¹⁰ Another important study showed that a magnetic nanocomposite containing silver nanoparticles could be utilized for the detection of a protein–small molecule complex (avidin–biotin) using SERS.¹¹ MA-SERS has also recently been applied for the determination of dopamine in an artificial cerebrospinal fluid and mouse striatum.¹² Another possibility is to use various magnetic nanomaterials with gold nanoparticles.¹³ Drake et al. exploited the magnetic properties of iron oxide nanoparticles to trap and isolate *Staphylococcus aureus* bacteria and then employed active gold nanoparticles (AuNPs) coated with 4-mercaptobenzoic acid for the detection and quantification of the bacteria by SERS.¹⁴ One of the key features of the nanocomposites presented here is the formation of a covalent bond between the magnetic and noble metal nanoparticles. Such a property is useful not only for the analysis of *ex-vivo* samples because of the increased stability of the nanocomposites but also for future applications in *in vivo* experiments, where a stable bond between the magnetic core and surface modified silver/gold nanoparticles is crucial.

To the best of our knowledge, the detection of proteins by SERS-based immunoassay has so far mostly been indirect and required a Raman label to provide a strong Raman signal.¹⁵ An example of such an approach can be seen in the work of Chen et al.¹⁶ They developed an analytical approach for detecting IgG at a very low limit of detection (LOD) of $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.¹⁶ Moreover, Song et al. prepared gold nanoparticles labeled with 4-mercaptobenzoic acid and used them as a Raman label for the detection of IgG at a level of $100 \text{ fm}\cdot\text{mL}^{-1}$.¹⁷ It is worth mentioning that this approach can be enhanced by employing sandwich systems.¹⁸ The magnetic properties of some nanoparticles can be employed to improve the separation of targets from a complex matrix. A common sandwich-type analytical system thus consists of a combination of magnetic and SERS-active substrates. The magnetic substrates are used to efficiently extract a target from a complex matrix by employing a selective bond between an analyte and immunorecognition molecule (previously immobilized on the surface) and applying an external magnetic force. The SERS-active silver or gold nanoparticles are added after purification and selectively attached to the target using the same set of immunorecognition molecules present on the metal surface. Indirect analysis is then performed by measuring the signal of a Raman label present as a linker between the antibody and metal surface of the SERS-active substrate.^{17,19} Chon et al. demonstrated the application potential of such an approach for the analysis of IgG.^{19b} They developed a method based on SERS and opto-fluidics for the detection. The LOD was between 1 and $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.^{19b}

The above-mentioned methods have many advantages, such as ultralow LODs and versatility. However, their simplicity of use is limited by several drawbacks, including the necessity to synthesize two sets of nanoparticles with limited stability, usually complicated experimental design, high risk of false results as a result of nonspecific interactions between particles and nontargeted compounds attracted from a matrix, and inability to monitor the direct bonding of target to a specific

antibody. These limitations may explain the relatively low uptake of such methods in other scientific fields.

Here we present a label-free SERS based method for the determination of human IgG using a single nanocomposite. The method utilized a novel magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}$ nanocomposite, which comprised a magnetic core modified by O-carboxymethylchitosan (CM) to covalently attach silver nanoparticles. The silver surface was subsequently modified by streptavidin and finally anti-immunoglobulin G (anti-IgG). The immobilization of anti-IgG via a bond with streptavidin did not influence its total activity, in contrast to the approaches mentioned above, which utilized unspecific direct immobilization on the metal surface. Application of the method is demonstrated for the determination of human IgG in blood samples obtained by the finger prick method. Despite being relatively straightforward, the proposed method showed high accuracy and reliability. Further, the relative standard errors of determination were reduced to below 5% by using a newly developed advanced spectral processing method, which involved background normalization and utilization of two reference spectral points.

■ MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Silver nitrate (p.a.), low molecular weight (LMW) chitosan (75–85% deacetylated), iron(II) chloride tetrahydrate (p.a.) and iron(III) chloride hexahydrate (p.a.), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt ($\geq 98\%$ (HPLC); NHS), IgG from human serum (reagent grade, $\geq 95\%$ (SDS-PAGE), essentially salt-free, lyophilized powder), antihuman IgG (Fc specific)-biotin antibody produced in rabbit (IgG fraction of antiserum, lyophilized powder), ethylamine (purum, 70% in H_2O), streptavidin from *Streptomyces avidinii* (essentially salt-free, lyophilized powder, ≥ 13 units/mg protein) and α,ω -bis{2-[(3-carboxy-1-oxopropyl)amino]ethyl}-polyethylene glycol (M_n 2000) (carboxy-PEG) were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. H_3PO_4 (p.a., 85% w/w) and NaOH (p.a.) were bought from Lach-Ner. Acetic acid (99,8%) and methanol (p.a.) were obtained from P-LAB (Czech Republic).

Preparation of standard solutions and buffers. A phosphate-buffered saline solution (PBS; 10 mM, pH 7.5) was prepared from 100 mM stock solution of H_3PO_4 by fine-tuning its pH value using a highly concentrated solution of NaOH (50%, w/v) under constant stirring. The final concentration was adjusted by addition of a defined volume of water. Stock solutions of $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NHS and EDC were prepared in a volume of 10 mL weighing exact amounts of each. Solutions were used immediately after preparation. Stock solutions of all used proteins, namely IgG, anti-IgG and streptavidin, were prepared by dissolving 1 mg of protein in 1 mL of water in an Eppendorf tube. Solutions of proteins were kept in the dark at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ for no longer than 5 days.

Preparation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite. Magnetic nanocomposites were prepared according to the process described earlier by Markova et al.²⁰ Briefly, magnetic nanoparticles were prepared by the Massart coprecipitation method of an aqueous solution of $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ using sodium hydroxide; 1.5 M NaOH was slowly added to a mixture of $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ to obtain a pH of 11. The synthesis was carried out at room temperature under constant bubbling of nitrogen to prevent further oxidation of the ferrous ions. After 1 h of stirring, the product was washed

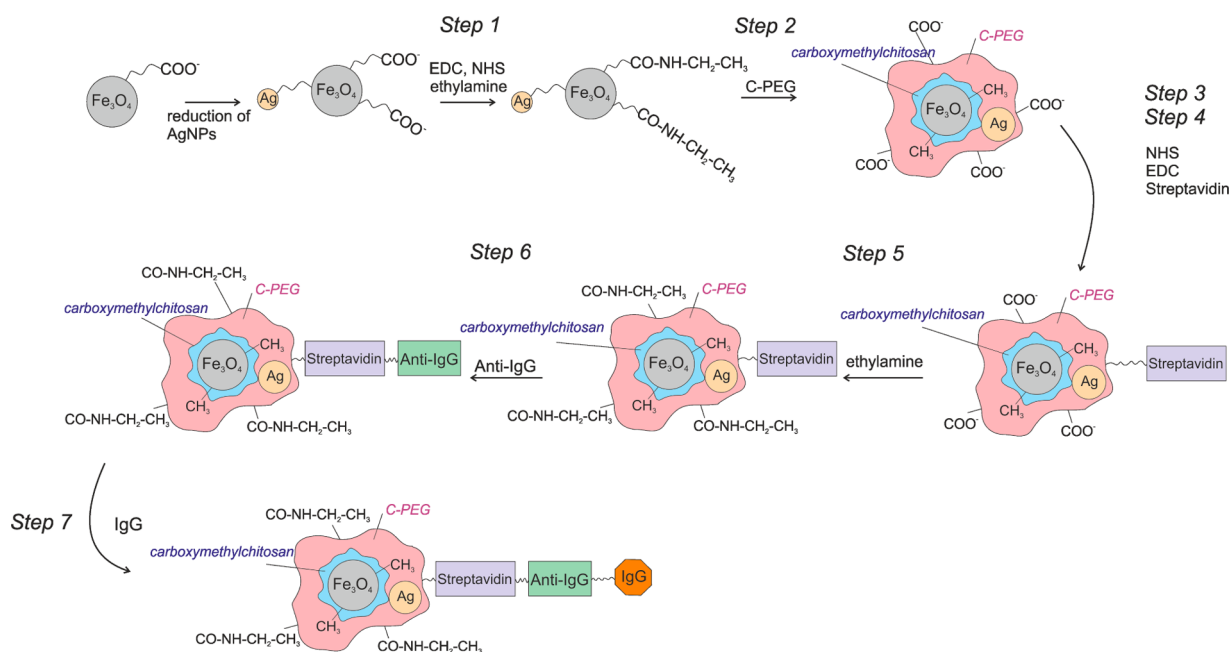


Figure 1. Scheme showing the individual steps in the modification of nanocomposite Fe₃O₄@Ag.

several times with water and separated using simple magnetic decantation. The magnetic nanoparticles generated were used for the preparation of magnetite-O-carboxymethylchitosan hybrids by adsorption of polymer onto the surface of the as-prepared nanoparticles induced by gradually increasing the temperature to 80 °C. Finally, silver nitrate was added to the magnetite-O-carboxymethylchitosan hybrids and silver ions were reduced on the surface of the hybrids by amine groups in the polymer under alkaline conditions and at a temperature of 80 °C. The products were finally washed several times with deionized water and separated using magnetic decantation.

Preparation of Fe₃O₄@Ag@streptavidin@anti-IgG nanocomposite. Immobilization of anti-IgG on the surface of the previously described nanocomposite Fe₃O₄@Ag was carried out according to the steps shown in Figure 1. First, 1 mL of magnetic nanoparticles prepared by the process described above was mixed with 100 μL of EDC and NHS (final concentration of both reagents was set to 20 mM) and stirred for 30 min. Next, ethylamine was added to a final concentration of wt.7%. The nanocomposite was collected by application of an external magnetic field and washed twice with 10 mM PBS buffer. Then, 5 mM carboxy-PEG was added (final concentration 1 mM) to the washed magnetic nanocomposite. After 1 h of stirring at 300 rpm, the magnetic nanocomposite was separated from the reaction mixture by simple application of an external magnetic field and washed with PBS buffer. Next, EDC and NHS (1:1, final concentration 20 mM) were added and the reaction stirred for a further 1 h. The resulting nanocomposite was again magnetically separated and washed with PBS buffer. In the next step, nanocomposite with previously activated carboxylic groups was mixed with streptavidin (0.2 mg·L⁻¹) and stirred for 1 h to form covalent bonds between the free amino (–NH₂) groups present in the structure of streptavidin and activated carboxylic groups of the nanocomposite. After the addition of streptavidin, the nanocomposite was magnetically separated and washed with 10 mM PBS buffer. Next, nanocomposite with streptavidin was mixed with biotinylated anti-IgG (final concentration 0.2 mg·L⁻¹) and

stirred for 1 h to allow covalent bonds to be formed between streptavidin and the biotinylated part of the anti-IgG. After washing with PBS buffer, ethylamine at a final concentration of 7% wt. was added to block the rest of the active carboxylic groups.

Analysis of real samples. Human whole blood samples (*n* = 2) were collected by finger prick method performed according to standard operation procedure UOG-REB, SOP011. A sample of volume *V* = 2 μL was placed on a glass platform, 10 μL of nanocomposite Fe₃O₄@Ag@streptavidin@anti-IgG was immediately added and the mixture carefully stirred. The nanocomposite was magnetically separated from the blood sample and washed twice with deionized water (20 μL). Finally, the nanocomposite was magnetically separated and analyzed using SERS.

Apparatus. The ζ potentials of the starting material, intermediate and final products were measured using a Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). A transmission electron microscope (TEM) (JEM 2010, Jeol, Japan) was used to obtain images of the unmodified magnetic nanocomposite and final nanocomposites. The TEM was operated at a voltage of 160 kV with a point-to-point resolution of 1.9 Å. Raman spectra were collected using a DXR Raman spectroscope (Thermo Scientific, U.S.A.) equipped with a laser operating at a wavelength of 532 nm. The laser power on the sample was set to 2 mW. Each measured Raman spectrum was an average of 32 experimental microscans. The acquisition time was set to 1s. Infrared spectra were acquired using a Nicolet iS5 infrared spectrometer (Thermo Scientific, U.S.A.). A total of 32 scans were measured and averaged for each material. Raman and IR spectra were evaluated using instrument control software (Omnic, version 8, Thermo Scientific, USA) and highs of target spectral bands were statistically evaluated using LibreOffice (version 4.3.0, The Document foundation, Berlin, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Infrared spectroscopy and ζ-potential measurements were used to monitor changes in the surface characteristics of the as-

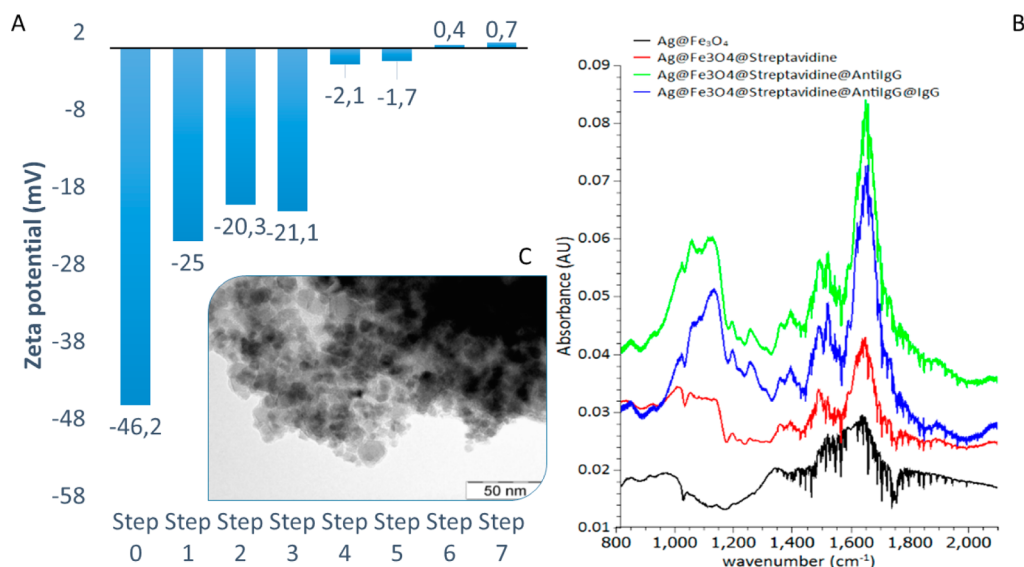


Figure 2. (A) Measured ζ -potentials of the prepared nanocomposite and of the nanocomposites after each step of modification. (B) IR spectra of the bare nanocomposite and modified nanocomposites. (C) TEM image of Fe₃O₄@Ag nanocomposite.

prepared nanocomposite during the surface modification process. Such modifications included adsorption of chemicals on the surface of the nanocomposite, activation of functional groups, and formation of new bonds. Infrared spectra and ζ -potentials measured during the surface modification process are shown in Figure 2. The measured ζ -potential of an unmodified initial nanocomposite (labeled as Step 0) corresponded to a charge -46.2 mV. The nanocomposite was composed of Fe₃O₄ and Ag nanoparticles covalently bonded by O-carboxymethyl-chitosan. This linker was selected because of the presence of free carboxylic groups, which increased the long-term stability of the as-prepared nanocomposite by enhancing its dispersibility in aqueous environments. However, such groups cause relatively high negative surface charge. Therefore, their presence during subsequent surface modification steps had to be minimized to ensure highly selective bonding of streptavidin only to a free surface of silver nanoparticles, while at the same time maximizing the sensitivity of the designed analytical system. The free carboxylic groups were thus removed in the first step by reaction with an aqueous mixture of EDC:NHS, followed by an aqueous solution of ethylamine. The deactivation (Step 1) and blockage (Step 2) of carboxylic groups led to a considerable change of ζ -potential to -20.3 mV. This decrease in negative charge confirmed that the carboxylic groups were successfully activated and efficiently blocked. The residual negative charge was attributed to the bare silver nanoparticles. In the next step (Step 3), free carboxyl groups were generated on the surface of the silver nanoparticles by addition of carboxy-PEG. This step was required for further selective immobilization of streptavidin. The adsorption of carboxy-PEG on the surface of Ag led to a moderate increase of surface charge to -21.1 mV. The difference between the latter value and the initial negative charge (-46.2 mV) was due to different numbers of immobilized functional groups. Activation of the newly created carboxylic groups with an aqueous mixture of EDC and NHS (Step 4) was accompanied by a large decrease in negative charge to a value of -2.1 mV. The following step was performed to immobilize streptavidin on the silver surface (Step 5). Covalent bonds were formed between $-\text{NH}_2$ groups of streptavidin and activated carboxyl groups by

stirring for 1 h at 100 rpm. Immobilization of streptavidin onto the nanocomposite surface changed the charge only slightly to -1.7 mV. Successful immobilization of streptavidin was confirmed by measuring IR spectra, which showed an increase of bands interpreted as part of the protein structure (1450 and 1650 cm⁻¹). Streptavidin played a key role for binding the biotinylated part of anti-IgG, which was added to the nanocomposite in the next step (Step 6). The formation of a bond between streptavidin and the biotinylated part of anti-IgG was accompanied by changes in the surface charge to 0.4 mV and by changes in the previously mentioned IR bands. Final blockage of the remaining carboxylic groups with ethylamine was confirmed by an additional increase of the ζ -potential to 0.7 mV (Step 7). Moreover, the ability of the analytical system to bind IgG was tested by IR measurements. It was expected that successful binding of IgG would lead to a further change of protein band intensities, as can be seen in Figure 2C. A TEM image of the as-prepared and surface-modified nanocomposite is shown in Figure 2C, where the bright fringes surrounding the silver nanoparticles (shown in gray) can be interpreted as attached protein layers. Additional TEM images acquired at three important stages of the modification are shown in Figure S1A – Figure S01C. It can be seen that the synthesis did not lead to any considerable structural changes. Moreover, the HRTEM images accompanied by a map with the distribution of Ag and Fe₃O₄ nanoparticles in the prepared Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite are included in Figure S1D–S1E. The signal stability of the modified nanocomposite is of the highest importance, and several experiments were conducted in order to evaluate its parameters. The as-prepared nanocomposite Fe₃O₄@Ag was prepared at day = 0 and stored for a period of 90 days. Its final modifications (labeled as Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG) were prepared at selected instances, namely on days 1, 5, 10, 20, and 90, and their respective Raman spectra were acquired. Average Raman spectra can be seen in Figure S2. The calculated variation of the intensity of the spectral band at 1650 cm⁻¹ between measured spectra is lower than 10%. It can be thus stated that the modification is repeatable and resulting Raman spectra comparable.

The as-prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{anti-IgG}$ nanocomposite was successively utilized for the determination of levels of one of the most important immunoglobulins, IgG, in human whole blood samples. Based on vibration theory, it was predicted that the specific interaction of IgG with anti-IgG antibody immobilized on the surface of the nanocomposite would lead to a spectral shift of the order of a few wavenumbers or change in intensity of Raman bands corresponding to parts of the binding site of the antibody. To test this hypothesis, standard samples containing $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of human IgG dissolved in water were analyzed, as well as blank and control samples. The blank sample contained only the pure unmodified nanocomposite Fe_3O_4 dispersed in water, whereas the control sample consisted of an aqueous dispersion of nanocomposite $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}$ without addition of IgG. The spectra obtained are shown in Figure 3. The Raman signal of the

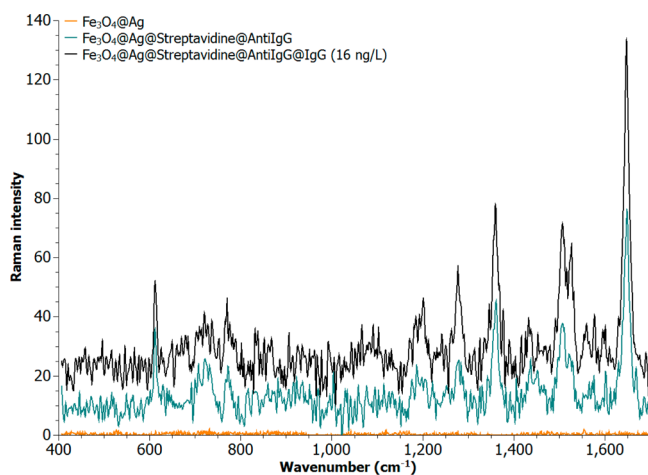


Figure 3. Raman spectra of bare nanocomposite $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, modified nanocomposite obtained by immobilization of streptavidin and anti-IgG ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}$), and model sample with a concentration of IgG $16 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (labeled as $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}@\text{IgG}$).

control sample contained several important spectral bands that were attributed to parts of the protein structure of the designed analytical probe. Spectral bands at 1650 , 1539 , and 1350 cm^{-1} were interpreted as Amide I, II, and III, respectively. Moreover, the relatively sharp band at 1650 cm^{-1} indicated an α helix type secondary structure. The band at 605 cm^{-1} was interpreted as an Ag–N bond vibration originating from the addition of ethylamine in the first steps of the modification of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite, as can be seen from the experiments summarized in Figure S3. Furthermore, its position and intensity were expected to be insensitive to further formation of a bond between anti-IgG covalently attached to the surface of the analytical probe, and IgG in a sample. On the other hand, successful formation of a bond between anti-IgG and IgG was anticipated to change the absolute intensities and, more importantly, the ratio of the spectral bands of Amide I, II, and III, owing to the different structures of these two proteins. Detailed comparison of spectra of the control and model samples revealed that both the position and intensity of the band at 605 cm^{-1} remained unchanged, as predicted, whereas the intensities and ratios of the protein spectral bands differed.

The selectivity of the here designed method is a very important issue. AntiIgG used in the role of selector has been previously utilized by many authors where a high selectivity of antiIgG toward IgG was successfully demonstrated.^{16–18} The overall selectivity of this approach was tested using mouse IgG and BSA; the presence of these proteins did not lead to any significant changes in the observed analytical signal, as can be seen in Figure S4; calculated values of RS were not significantly different from the values obtained for the blank solution. In order to evaluate the method's capabilities for obtaining quantitative information, five calibration samples were prepared. All the calibration samples were measured under the same conditions. The range of concentrations used to construct the calibration curve was selected to comply with demands for methods able to perform ultratrace analysis, and was set from $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ to $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Corresponding Raman spectra of the selected standards are shown in Figure 4.

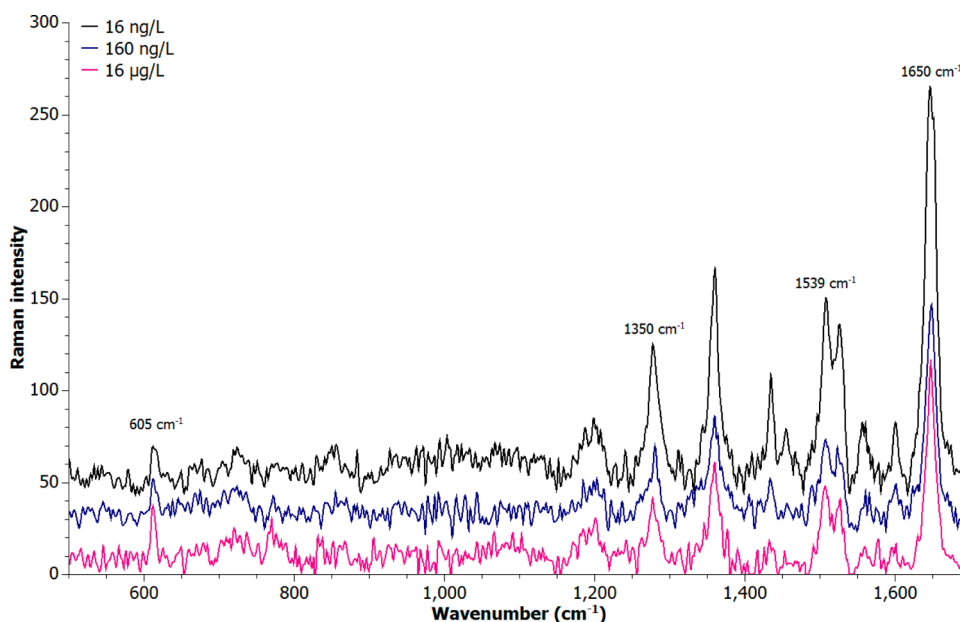


Figure 4. Raman spectra obtained in the presence of model samples containing $16 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $160 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, and $16 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IgG.

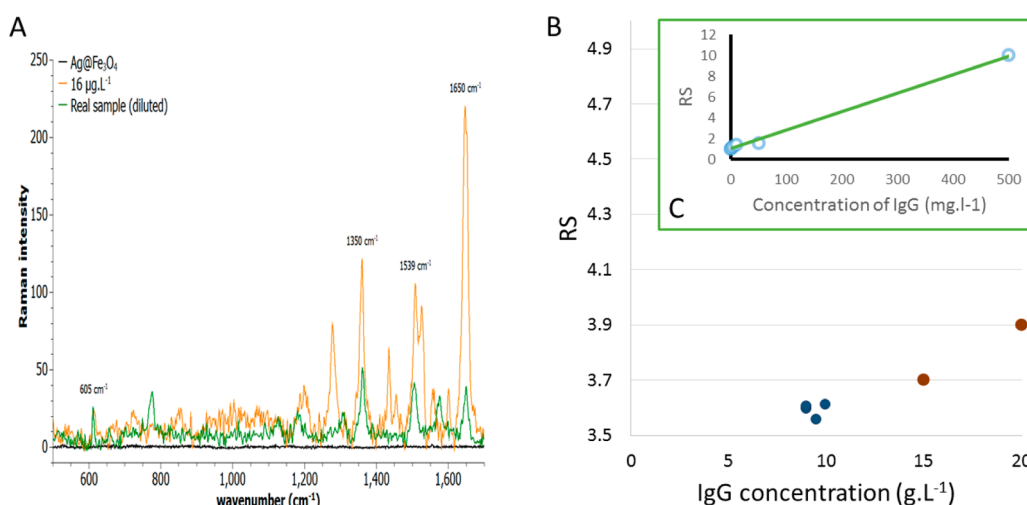


Figure 5. (A) Raman spectrum obtained in the presence of a real sample of whole human blood. For comparison, the Raman spectra of a model sample containing $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IgG and bare nanocomposite are also presented. (B) Concentration determination of analyzed samples. Blue points stand for real samples and brown points show data obtained by standard additions. (C) Calibration curve for a determination of IgG in model samples.

Normalized and baseline-corrected spectra were evaluated and used for a calibration. Presented fluctuations in the spectral data, observed from the instability of the spectral band at 605 cm^{-1} , do not allow a direct determination of the amount of IgG from absolute intensities, as can be seen in Figure 4. However, previous works suggest that protein interactions lead to considerable changes in ratios of selected spectral bands.⁸ Quantification of IgG is thus based on a simple equation (eq 1) that allows calculation of the ratio of the intensities of the protein 1539 and 1650 cm^{-1} bands, where the absolute intensities of I_{1650} and I_{1539} were previously normalized to the intensity of the reference band at 605 cm^{-1} in order to minimize the unwanted fluctuations in the analytical signal.

$$R = \frac{I_{1539}/I_{605}}{I_{1650}/I_{605}} \quad (1)$$

where I_{1539} , I_{1650} and I_{605} stand for the intensities of the spectral bands at 1539, 1650, and 605 cm^{-1} , respectively. I_{605} was used as a spectral reference to normalize the whole spectrum in order to minimize system errors originating from changes in the composite constitution, structure, and Raman signal instability. As the data come from separate spectral analyses, values of I_{605} in eq 1 could not be completely eliminated. Moreover, to make the method more robust, a Raman spectrum for a control sample containing only $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}$ composite was used as a reference, as shown in eq 2:

$$\text{RS} = \frac{\text{IStd}_{1539}/\text{IStd}_{605}}{\text{IStd}_{1650}/\text{IStd}_{605}} \bigg/ \frac{\text{IRef}_{1539}/\text{IRef}_{605}}{\text{IRef}_{1650}/\text{IRef}_{605}} \quad (2)$$

where IS denotes the intensities of the spectral bands obtained by analysis of the samples and, analogously, IRef stands for the spectral intensities of bands in the Raman spectra of the control samples. RS thus describes the degree of change of the protein band ratios between the control and each analyzed sample; the greater the value above one, the higher the amount of IgG present in the sample (control sample; $\text{RS} = 1$). It was found that the ratio showed a linear trend over the whole measured range with a coefficient of determination amounting to 0.98, as can be seen in Figure 5. The calculated limit of detection was $0.6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (calculated from the parameters of the calibrations

curve, $S/N = 3$). The limit of detection of most current assays for the analysis of IgG in human blood samples is of the order of tens of $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, with a relative standard error of determination of around 20%; this includes serum and whole blood samples. Although those assays are based on similar principles (interaction of the target with a particular antibody), the developed method is capable of detecting human IgG at $1000\times$ lower concentration level and at the same time uses much lower sample volumes. This is due to a superior signal amplification effect achieved by careful selection of the SERS conditions (described in the Materials and Methods). Moreover, 10 measurements were taken on 10 separate days to test the stability of the Raman signal. It was found out that the relative error of RS between replicates was lower than 8%. Next, measurements of two model samples were performed to test the method reliability and robustness. Sample A contained $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ IgG and Sample B $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, with differences between the real and experimentally obtained values of around 20% and relative standard deviation, $\text{RSD} = 5\%$. The same samples were measured at two different times of day (intraday values) and on three separate days (interday values). It was shown that the relative error was lower than 5% for the intraday experiments and lower than 15% for the interday experiments. This demonstrates the applicability of the described method for the analysis of IgG.

The application potential of the proposed method was further tested with the aim of using it for the analysis of human whole blood samples obtained using the finger prick method (details are given in the experimental part), where sample amount is strictly limited to a few microliters. It should be noted that a design of the described procedure was tuned to minimize nonspecific interactions of the synthesized nanocomposites with nontargeted compounds present in the complex matrix of human blood. However, part of the overall Raman signal may still have originated from nonspecific interactions, and thus the Raman signal had to be properly verified and normalized by careful comparison of the spectra obtained for real and model samples. The experimental analysis was performed according to the procedures previously used in the calibration experiments. Briefly, $2 \mu\text{L}$ of $100\times$ diluted whole

blood was collected and deposited on a glass platform. Then, 10 μL of a solution containing prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@$ streptavidin@anti-IgG nanocomposite was added and well mixed with the sample. The nanocomposite was washed twice with water using an external magnetic force for separation (in total 10 μL) and analyzed using SERS. To perform a full statistical evaluation, four samples from two patients were collected and analyzed 5 times. A SERS spectrum for the real sample is presented in Figure 5A, showing that all the bands previously attributed to the analytical probe were present; nevertheless, the spectral band interpreted as Amid II is moderately shifted due to a different structure of IgG, compared to antiIgG and Streptavidin. The Raman spectrum of the real sample was thus compared to a respective Raman spectrum of a standard solution of human IgG (initial concentration = 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in order to demonstrate the origin of the analytical signal. Results are shown in Figure S4, where the same pattern of both spectra is demonstrated.

Further demonstration of the method involved evaluation of the method selectivity. It can be stated that the immunochemical reaction can be considered as very selective, and the impact of such a statement has already been demonstrated. Moreover, the approach used in this analytical method further minimized possible interferences caused by the presence of nontargeted proteins by the applied synergy of magnetic separation and preconcentration with a high selectivity of AntiIgG. Albeit the number of already published papers dealing with the applications of antibodies in the role of selectors was mentioned previously,^{15–18} the selectivity of the here described method was further tested on a set of proteins, namely mouse IgG, human IgG, and bovine serum albumin. The results obtained from the performed experiment are shown in Figure S5, where it can be seen that the presence of BSA or mouse IgG did not lead to any considerable changes in the spectra; the calculated value of RS is equal to 1 for the blank solution (without human IgG), 1.05 for BSA ($c = 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and 1.08 for mouse IgG. Nonetheless, the concentration level of human IgG in real samples was quantified by a standard addition method in order to minimize possible spectral interferences originating from the matrix effects and to achieve a suitable level of accuracy and precision. A defined amount of IgG was thus added to each sample, and the spectral position and intensity of all bands were evaluated and compared to Raman spectra of real samples. The obtained values are shown in Figure 5B, where real samples are labeled as blue points, and two standard additions are labeled as brown points, respectively. Signal stability was evaluated using a set number of technical replicates ($N = 5$). Obtained Raman spectra of Sample 1 retrieved from patient A are shown in Figure S6. The obtained relative standard deviation between calculated values of RS is lower than 5%. The results of the analysis show that samples from patient A contained 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of IgG, and analogously, samples obtained from patient B contained 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of IgG. It is worth mentioning that the determined amounts of IgG are in good compliance with the levels recorded in a healthy population.²¹

CONCLUSIONS

Current methods for the determination of levels of IgG in humans are mostly based on interactions of antibodies with a target coupled with colorimetric or fluorimetric detection. These methods are usually robust and fast. However, their further development is limited and there is increasing demand

for methods able to determine IgG at ultralow concentrations. Here, we report a novel method for the determination of human IgG in whole blood samples. The method utilizes a magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite, where silver nanoparticles are covalently bonded using carboxymethylchitosan chosen as a physiologically compatible linker. The surface of the as-prepared nanocomposite was modified using streptavidin, followed by anti-IgG. The nanocomposite enabled the development of a robust method for the direct determination of IgG at concentrations from 600 $\text{fg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The benefit of such an approach is that it can be modified relatively easily in order to analyze many other targets by selecting an appropriate antibody modified by addition of biotin.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

TEM images and Raman spectra. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: +420 585634753. Fax: +420 585634761. E-mail address: vaclav.ranc@upol.cz (V.R.).

*Phone: +420 585634337. Fax: +420 585634761. E-mail address: radek.zboril@upol.cz (R.Z.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge support from the Operational Program Research and Development for Innovations—European Social Fund (Project No. CZ.1.05/2.1.00/03.0058), New Technologies UP in Chemistry and Biology (Project No. CZ.1.05/3.1.00/14.0302), and the Research Team of the Regional Centre of Advanced Technologies and Materials with a Focus on Unconventional Experimental Techniques in Materials and Optical Research (RCPTM_FRONT) (Project No. CZ.1.07/2.3.00/20.0155) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. This work has also been supported by the Operational Program Education for Competitiveness—European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0056), an internal grant of Palacky University in Olomouc (PrF_2014032), and the Technology Agency of the Czech Republic (Project No. TA03011368). The authors would like to thank Jana Straska and Klara Cepe for providing HRTEM and EDX data.

REFERENCES

- (1) Yap, P. L. *Clinical Applications of Intravenous Immunoglobulin Therapy*; Churchill Livingstone: Edinburgh, New York, 1992; p ix, pp 270.
- (2) Shakib, F. *The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis of Structure, Function, and Regulation*, 1st ed.; Pergamon Press: Oxford, New York, 1990; p xi, pp 316.
- (3) Virella, G. *Medical Immunology*, 6th ed.; Informa Healthcare: New York, 2007; p ix, pp 465.
- (4) Dobson, R.; Topping, J.; Giovannoni, G. *J. Med. Virol.* **2013**, *85*, 128–131.
- (5) van Eeden, P. E.; Wiese, M. D.; Aulfrey, S.; Hales, B. J.; Stone, S. F.; Brown, S. G. A. *PLoS One* **2011**, *6*, e16741.
- (6) de Costa, D.; Broodman, I.; VanDuijn, M. M.; Stingl, C.; Dekker, L. J. M.; Burgers, P. C.; Hoogsteden, H. C.; Smitt, P. A. E. S.; van Klaveren, R. J.; Luiders, T. M. J. *Proteome Res.* **2010**, *9*, 2937–2945.

- (7) Rodriguez-Lorenzo, L.; Fabris, L.; Alvarez-Puebla, R. A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *745*, 10–23.
- (8) (a) McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 825–837. (b) Mikhonin, A.; Ahmed, Z.; Ianoul, A. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19020–19028. (c) Sjöberg, B.; Foley, S.; Cardey, B.; Enescu, M. *Spectrochim. Acta, A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *128*, 300–311. (d) Guerrini, L.; Pazos, E.; Penas, C.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L.; Alvarez-Puebla, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10314–10317. (e) Avci, E.; Culha, M. *Appl. Spectrosc.* **2014**, *68*, 890–899.
- (9) Trang, N. T. T.; Thuy, T. T.; Higashimine, K.; Mott, D. M.; Maenosono, S. *Plasmonics* **2013**, *8*, 1177–1184.
- (10) Magro, M.; Faralli, A.; Baratella, D.; Bertipaglia, I.; Giannetti, S.; Salviulo, G.; Zboril, R.; Vianello, F. *Langmuir* **2012**, *28*, 15392–15401.
- (11) Chen, L.; Hong, W.; Guo, Z.; Sa, Y.; Wang, X.; Jung, Y. M.; Zhao, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *368*, 282–286.
- (12) Ranc, V.; Markova, Z.; Hajduch, M.; Prucek, R.; Kvitek, L.; Kaslik, J.; Safarova, K.; Zboril, R. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2939–2946.
- (13) (a) Quaresma, P.; Osorio, I.; Doria, G.; Carvalho, P. A.; Pereira, A.; Langer, J.; Araujo, J. P.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M.; Franco, R.; Baptista, P. V.; Pereira, E. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3659–3667. (b) Neng, J.; Harpster, M. H.; Wilson, W. C.; Johnson, P. A. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 316–321.
- (14) Drake, P.; Jiang, P. S.; Chang, H. W.; Su, S. C.; Tanha, J.; Tay, L. L.; Chen, P. L.; Lin, Y. J. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 4152–4158.
- (15) (a) Lin, C.-C.; Yang, Y.-M.; Chen, Y.-F.; Yang, T.-S.; Chang, H.-C. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 178–183. (b) Chen, J.; Luo, Y.; Liang, Y.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R. *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 347–352. (c) Li, T.; Guo, L.; Wang, Z. *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 907–910. (d) Penn, M. A.; Drake, D. M.; Driskell, J. D. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8609–8617. (e) Chen, J. W.; Lei, Y.; Liu, X. J.; Jiang, J. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 187–193. (f) Han, X. X.; Kitahama, Y.; Tanaka, Y.; Guo, J.; Xu, W. Q.; Zhao, B.; Ozaki, Y. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6567–6572. (g) Li, T.; Guo, L. P.; Wang, Z. X. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1125–1130. (h) Wei, L.; Jin, B.; Dai, S. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 17174–17181. (i) Zengin, A.; Tamer, U.; Caykara, T. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3001–3009.
- (16) Chen, J. W.; Lei, Y.; Liu, X. J.; Jiang, J. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 187–193.
- (17) Song, C.; Wang, Z.; Zhang, R.; Yang, J.; Tan, X.; Cui, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 826–831.
- (18) Narayanan, R.; Lipert, R. J.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2265–2271.
- (19) (a) Chen, Y.; Cheng, H.; Tram, K.; Zhang, S.; Zhao, Y.; Han, L.; Chen, Z.; Huan, S. *Analyst* **2013**, *138*, 2624–2631. (b) Chon, H.; Lim, C.; Ha, S.-M.; Ahn, Y.; Lee, E. K.; Chang, S.-I.; Seong, G. H.; Choo, J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5290–5295. (c) Zong, S.; Wang, Z.; Zhang, R.; Wang, C.; Xu, S.; Cui, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 745–751. (d) Yoon, J.; Choi, N.; Ko, J.; Kim, K.; Lee, S.; Choo, J. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *47*, 62–67. (e) Baniukevic, J.; Hakki Boyaci, I.; Goktug Bozkurt, A.; Tamer, U.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 281–288. (f) Guven, B.; Basaran-Akgul, N.; Temur, E.; Tamer, U.; Boyaci, I. H. *Analyst* **2011**, *136*, 740–748. (g) Kim, I.; Junejo, I.-R.; Lee, M.; Lee, S.; Lee, E. K.; Chang, S.-I.; Choo, J. *J. Mol. Struct.* **2012**, *1023*, 197–203. (h) Shin, M. H.; Hong, W.; Sa, Y.; Chen, L.; Jung, Y.-J.; Wang, X.; Zhao, B.; Jung, Y. M. *Vib. Spectrosc.* **2014**, *72*, 44–49.
- (20) Markova, Z.; Siskova, K.; Filip, J.; Safarova, K.; Prucek, R.; Panacek, A.; Kolar, M.; Zboril, R. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2550–2558.
- (21) Reen, D. J.; Murphy, M. B.; Oconnor, A.; Fitzgerald, M. X. *Irish J. Med. Sci.* **1981**, *150*, 265–269.

Supporting Information

to

Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite

Anna Balzerova, Ariana Fargasova, Zdenka Markova, Vaclav Ranc and Radek Zboril**

Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry,
Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17 listopadu 1192/12, CZ-77146 Olomouc,
Czech Republic.

* Corresponding authors: * Phone: +420 585634753, Fax: +420 585634761, E-mail address: vaclav.ranc@upol.cz (Vaclav Ranc); Phone: +420 585634337, Fax: +420 585634761, E-mail address: radek.zboril@upol.cz (Radek Zboril)

Number of pages: 7

Number of figures: 6

Supporting Figures

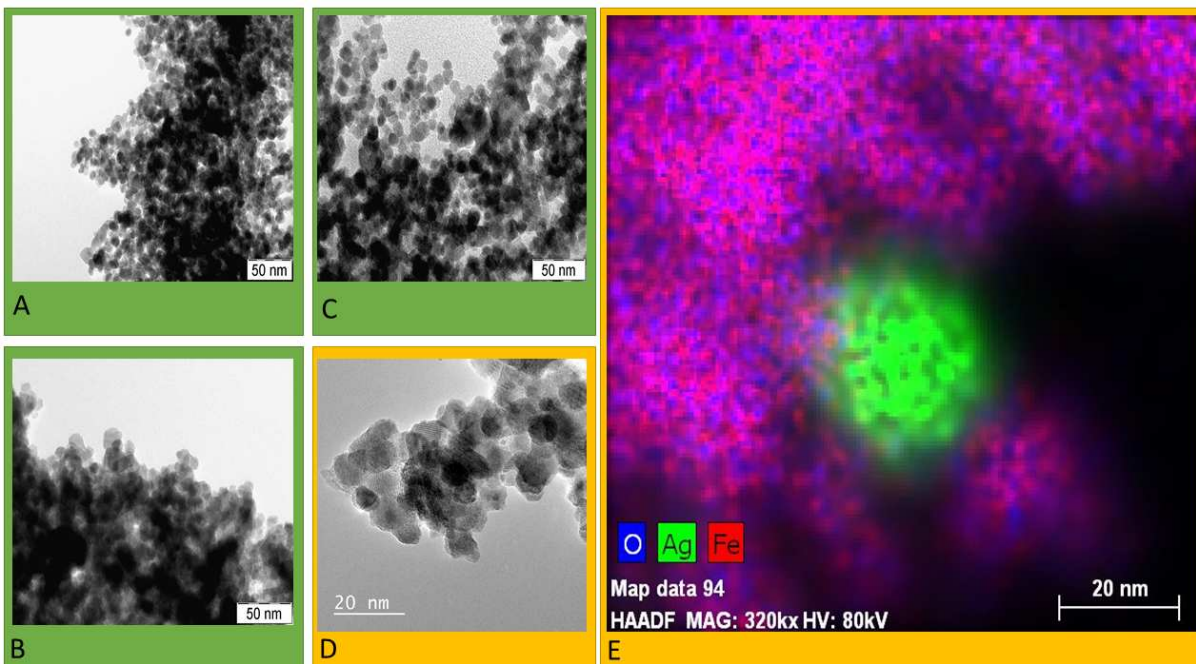


Figure S1. TEM images of as-prepared nanocomposites A) Fe₃O₄@Ag, B) Fe₃O₄@Ag@Streptavidin and C) Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG. D) HRTEM image of the as-prepared nanocomposite labeled as Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG. The present map displayed in frame E covers the distribution of Ag and Fe₃O₄ nanoparticles. Figures S01A – S01C show that the synthesis of tmodified Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite did not lead to any structural or morphological changes of the nanocomposite.

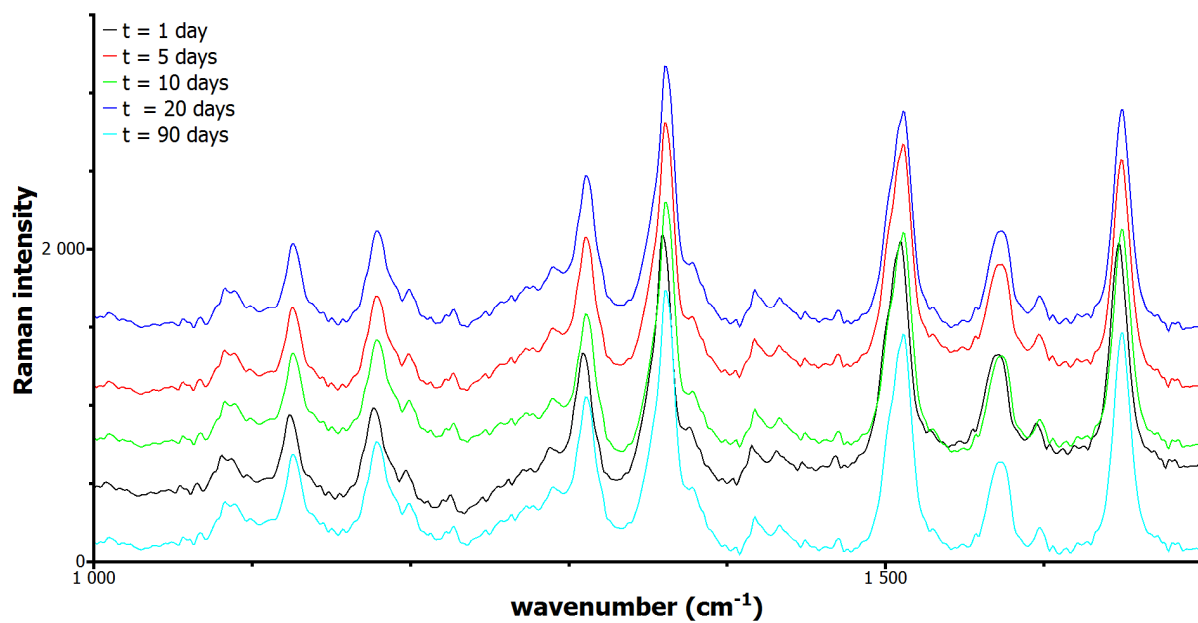


Figure S2. Raman spectra of Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG obtained in various periods of time after the preparation demonstrating the stability of the nanosystem. Each spectrum is shifted by 100 units of Raman intensity in order to increase the transparency of the spectra.

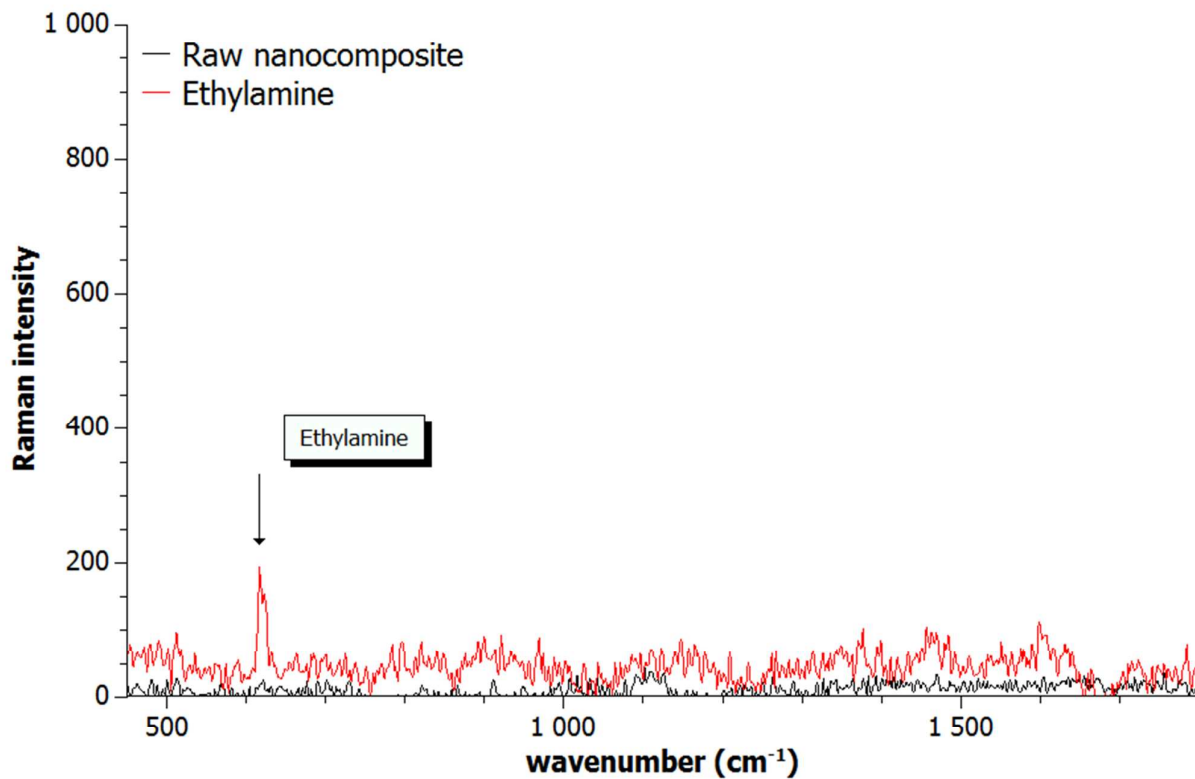


Figure S3. Raman spectra for raw Fe₃O₄@Ag nanocomposite (black spectrum) and Fe₃O₄@Ag nanocomposite with ethylamine ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, red spectrum). Both spectra demonstrate that the spectral band at 605 cm⁻¹ originates from the presence of ethylamine.

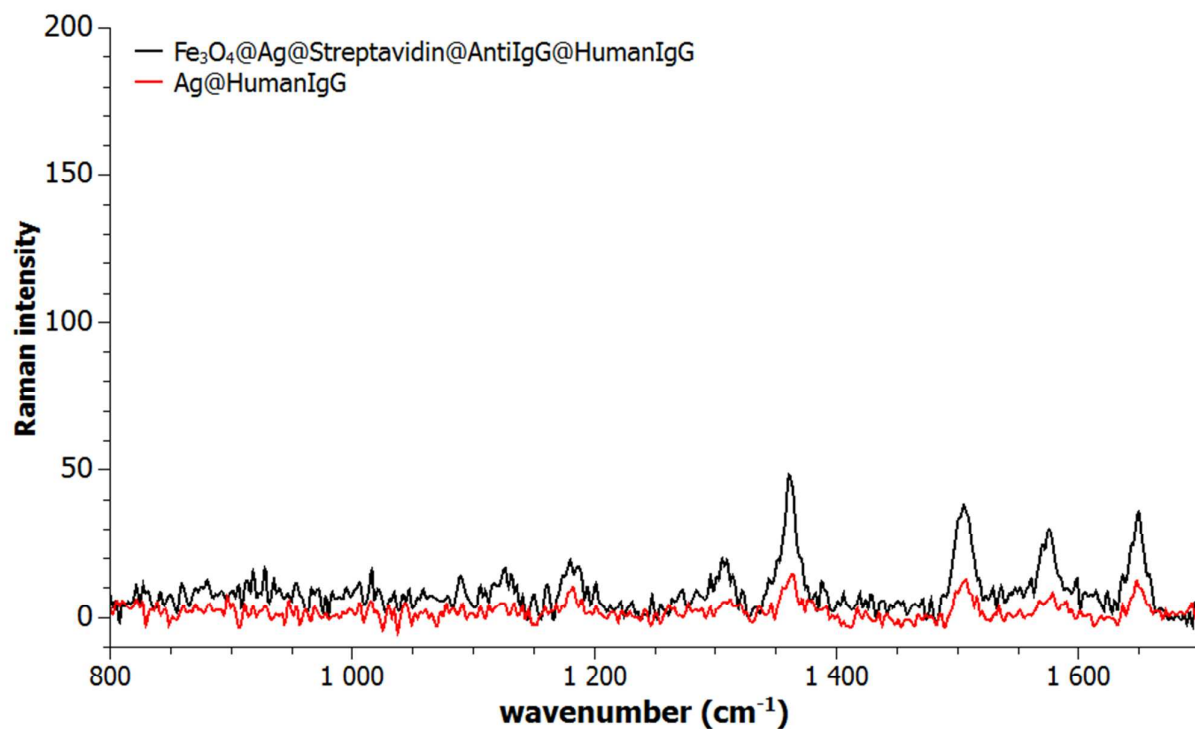


Figure S4. Raman spectra of human IgG measured using unmodified raw Fe₃O₄@Ag nanocomposite (red line), and the Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite (black line). Both spectra indicate that spectral signal of human IgG is the same for Raman analysis using raw material and modified Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite.

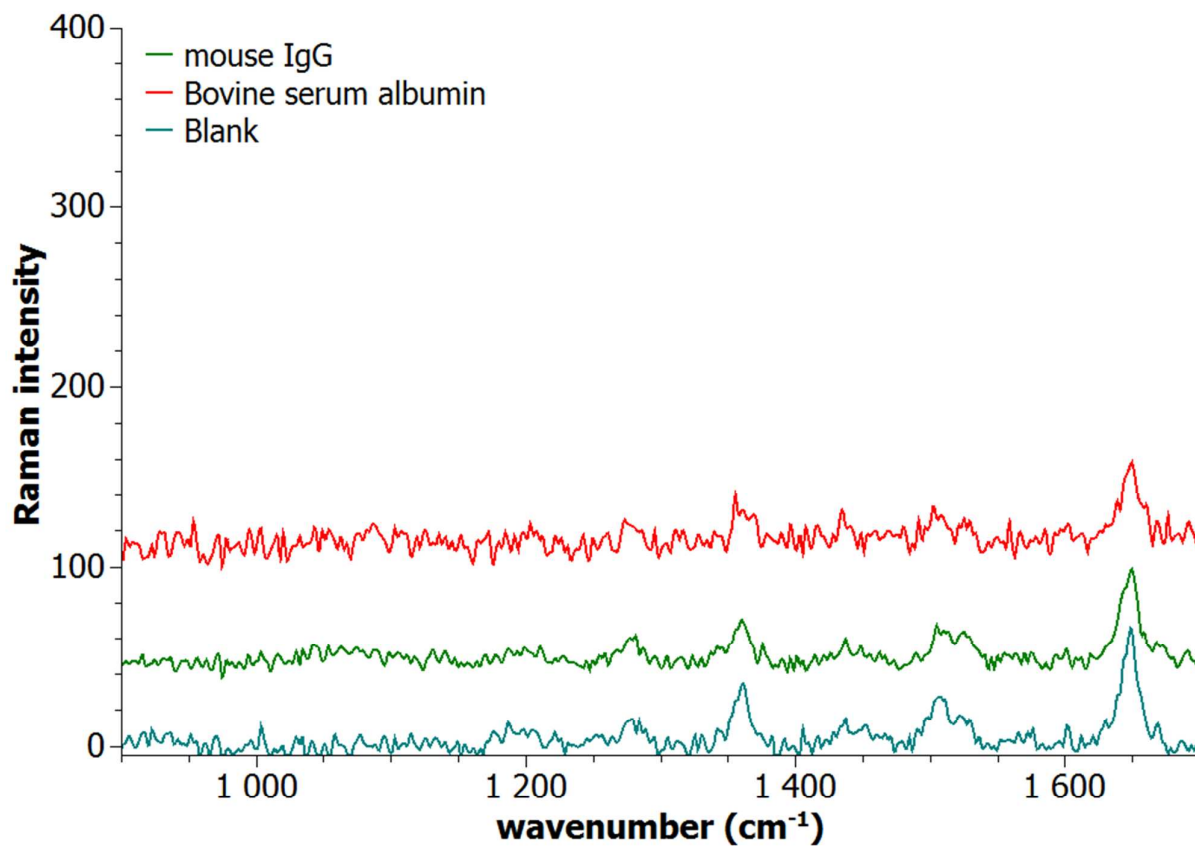


Figure S5. Raman spectra obtained by analysis of blank solution (without addition of human IgG, blue spectrum), mouse IgG (green spectrum) and bovine serum albumin (BSA, red spectrum) using the modified Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite. It can be seen that analytical signal is not influenced by the presence of BSA or mouse IgG. The shift between spectra is 50 units of Raman intensity in order to make the figure more transparent.

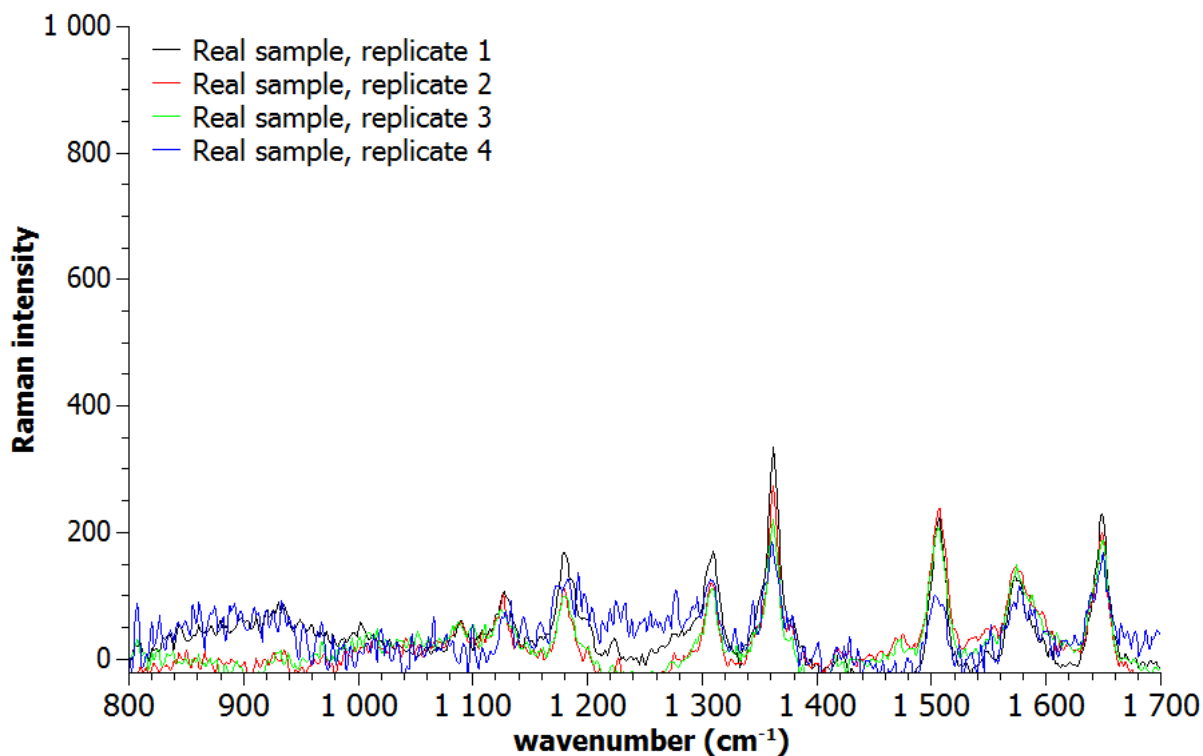


Figure S6. Raman spectra obtained by analysis of real blood samples (four replicates) obtained from the Patient A. The spectra were obtained by the utilization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Streptavidin}@\text{AntiIgG}$ nanocomposite and are labeled Real sample, replicate 1 - 4. Spectral pattern of obtained spectra is comparable, albeit the absolute intensities differ. However, the calculated differences between RS values, defined as I1539/I1650 ratio, normalized to the blank solution, are lower than 5 %.



Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes



Petr Suchomel^a, Robert Prucek^{a,*}, Klára Černá^a, Ariana Fargašová^a, Aleš Panáček^a, Aharon Gedanken^{b,*}, Radek Zbořil^a, Libor Kvítek^a

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic
^b Department of Chemistry, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2016
 Received in revised form 4 March 2016
 Accepted 5 March 2016
 Available online 7 March 2016

Keywords:

Silver particles layer
 Glass substrate
 Sonochemical
 Surface enhanced Raman spectroscopy

ABSTRACT

A fast method for preparing of silver particle layers on glass substrates with high application potential for using in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is introduced. Silver particle layers deposited on glass cover slips were generated in one-step process by reduction of silver nitrate using several reducing agents (ethylene glycol, glycerol, maltose, lactose and glucose) under ultrasonic irradiation. This technique allows the formation of homogeneous layers of silver particles with sizes from 80 nm up to several hundred nanometers depending on the nature of the used reducing agent. Additionally, the presented method is not susceptible to impurities on the substrate surface and it does not need any additives to capture or stabilize the silver particles on the glass surface. The characteristics of prepared silver layers on glass substrate by the above mentioned sonochemical approach was compared with chemically prepared ones. The prepared layers were tested as substrates for SERS using adenine as a model analyte. The factor of Raman signal enhancement reached up to $5 \cdot 10^5$. On the contrary, the chemically prepared silver layers does not exhibit almost any pronounced Raman signal enhancement. Presented sonochemical approach for preparation of silver particle layers is fast, simple, robust, and is better suited for reproducible fabrication functional SERS substrates than chemical one.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Discovery of surface enhanced Raman scattering (SERS) on a silver electrode by Fleischmann in 1974, and especially its rediscovery on colloidal silver particles by Creighton in 1977 [1] initiated the extensive development of a new and very sensitive analytical method that allows the detection of molecules in the concentration range from pico to femtomoles [2]. The most widely used materials for SERS include silver or gold. Silver is preferable due to its cheaper price and better optical properties for utilization in SERS [3].

A high enhancement of SERS, reaching the values of up to 10^{15} , even allowed the detection of a single molecule adsorbed on an individual silver nanoparticle [4,5]. Some studies have shown that such a high value of the enhancement can be achieved only on particles of certain sizes which are referred as “hot particles”.

The particles' optimum size depends on the wavelength of the laser used for the excitation and ranges approximately from 70 to 200 nm for the excitation wavelengths in the range from 488 to 647 nm [6]. Based on the dependence of the “hot particles” size for a given laser wavelength, it can be expected, when using lasers with wavelengths 785 nm and 1064 nm, the maximum enhancement of the Raman signal should be obtained on silver particles of the size of around 400 nm [7–9]. Unfortunately, particles of these dimensions are unstable and settle within a short time. Silver nanoparticles with sizes equal to a few tens of nanometers are generally stable for several months or years, however, these small particles do not provide sufficient surface enhancement of the Raman signal themselves. For this purpose, they must be treated by addition of some inorganic ions. The inorganic ions added into the dispersion of silver nanoparticles induces their slow and often uncontrollable aggregation resulting in the irreproducibility of the Raman signal [2,4,10–13].

The disadvantages connected with aggregation or sedimentation of silver nanoparticles can be overcome through the formation of metal particle layers [14] on suitable substrate such as quartz or

* Corresponding authors.

E-mail addresses: robert.prucek@upol.cz (R. Prucek), gedanken@mail.biu.ac.il (A. Gedanken).

glass [15]. The chemical techniques for the formation of metal particle layers can be divided into deposition from gas phase and formation by growing up of layers from solution, which is represented by electrochemical deposition, chemical deposition from solution, Langmuir–Blodgett film technique, and self-assembling [16]. Deposition of particles on the glass substrate can also be performed by lithographic method based on formation of self-assembled layers of polystyrene particles serving as a lithographic mask. After deposition of metal nanoparticles (silver or gold in most cases), the polystyrene particles are removed by organic solvent [17–21]. Another possible technique of metal layers formation involves deposition of one or more layers using polyelectrolytes such as polydiallyldimethylammonium chloride (PDDA) or polyethylenimine (PEI) [22,23]. In this approach, the layers of particles are captured between layers of polyelectrolyte through electrostatic interactions. Other way to obtain silver particle layers involves exploitation of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) [24], which is able to form covalent bond with the activated surface of glass or quartz substrate. When APTES is bonded on the surface, its amino groups can interact through free electron pair with silver nanoparticles [25].

Unfortunately, the described methods are usually time consuming, very sensitive to thorough cleaning of the surface, and also require activation of substrate surface prior to deposition of silver particles. Due to these disadvantages, it is desirable to find new techniques, which are more effective, time-saving and which do not require addition of other chemicals, which could affect the enhancement of Raman signal. One of the promising techniques is based on sonochemical preparation of silver layers. Through sonochemical approach, Perkas et al. prepared layers of silver particles stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP) on glass substrates [26] with substantial antibacterial activity. However, application of the reported method in preparation of the effective SERS substrate is questionable due to interfering of the Raman signal originated from the PVP polymer used as stabilizer with Raman signal of analyzed molecules adsorbed on this type of silver nanoparticle layer.

In the current study, we report the innovative preparation method of the silver particle layers usable as efficient SERS substrate based on the combination of sonochemistry and modified Tollens reaction. The influence of experimental parameters such as sonication parameters, concentration of silver salt, type of reducing substance, absence or presence of PVP, and choice of beaker type (glass or polypropylene), used for preparation, on the characteristics of silver particle layers was investigated. The prepared silver particle layers deposited on glass slips were tested and evaluated as highly effective substrates for surface enhanced Raman spectroscopy purposes.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and instruments

Silver nitrate (Sigma–Aldrich, p.a.) was used as a precursor of silver particle layers. Ethylene glycol (Sigma–Aldrich, p.a.), glycerol (Sigma–Aldrich, p.a.), maltose (Sigma–Aldrich, p.a.), glucose (Sigma–Aldrich, p.a.) and lactose (Sigma–Aldrich, p.a.) were used as reducing agents. Polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma–Aldrich, M. W. 40,000) was used as a stabilizer. Ammonium hydroxide (Sigma–Aldrich, 28–30% aqueous solution) was used as a complexing agent. Adenine (Sigma–Aldrich, 99%) was used for the SERS experiments as a model analyte. All chemicals were used without additional purification. Deionized water (18 M Ω cm, Millipore) was used for preparation of all solutions.

Silver layers on glass slips were prepared by ultrasonic processor Q700 with standard titanium probe 4220 (QSonica LLC, USA). Glass slips covered by silver nanoparticles were characterized by using of scanning electron microscope Hitachi SU6600 (Hitachi, Japan) and UV–vis spectrometer Specord S600 (Analytic Jena AG, Germany). Silver concentrations were determined by the AAS technique with flame ionization using a ContraAA 300 (Analytik Jena AG, Germany) equipped with a high-resolution Echelle double monochromator (spectral bandwidth of 2 pm at 200 nm) and with a continuum radiation source (xenon lamp). The absorption line used for these analyses was 328.0683 nm. Surface enhanced Raman spectra were recorded using iRaman Plus with the 785 nm excitation laser (BWTEK Inc., USA), scan time 10 s, 6 accumulations were made. The laser light power was 100 mW. For the SERS measurement, 10 μ l of 10^{-5} M adenine solution was used.

2.2. Preparation of silver particle layers deposited on glass substrate

The silver particle layers were deposited on glass microscope cover slips (Menzel–Gläser, 18 \times 18 mm) by using of sonochemical approach. Before deposition, cover slips were thoroughly cleaned by detergent and washed by deionized water. After cleaning, cover slips were carefully inserted vertically using wire holders into beaker and then solutions of reaction precursors were added. Several modifications of the silver particle layers preparation process based on the reduction of silver ammonia complex related to changes of concentrations of the reactants were performed. Two polyols: ethylene glycol and glycerol, and three reducing saccharides: maltose, glucose and lactose, were used as reducing agents. Typically, 5 ml or 1 ml of 0.25 M silver nitrate solution was diluted by an appropriate amount of deionized water and 5 ml or 1 ml of reducing substance (ethylene glycol, glycerol or 0.25 M solution of reducing saccharide) was added. The final volume of reaction mixture was 25 ml. After mixing, the sonication tip was immersed into the reaction mixture. Parameter of sonication was adjusted to the amplitude value equal to 30% and the sonication begun. Few seconds after the start, 1.5 ml or 0.3 ml of ammonia solution was rapidly injected into the beaker. Also, the effect of presence of stabilizing polymer PVP on formation of silver nanoparticle layers was tested. In this case, 0.5 ml of 15 g/L PVP solution was added into the reaction system with ethylene glycol before sonication. Synthesis of silver particle layers on glass cover slips was terminated after 5.5 min of sonication. Glass slips were then pulled out of the holders, washed by deionized water and dried by air flow. For comparison to sonochemical approach of deposition of silver particle layers on glass substrate, the silver layers were also prepared using chemical method. As an example of such method, the Tollens process was chosen because this method exploits almost the same chemicals. In this case, cleaned glass slip was activated by tin dichloride, immersed into beaker and then silver layer was formed by mixing of silver nitrate (0.1 M) and ammonia (0.1 M) solution with solution of sodium hydroxide (1 M) and glucose (1.1 M) in the ratio equal to 1:1.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of silver particle layers deposited on glass slips using ethylene glycol and glycerol

The main goal of the presented study was development of a simple and reproducible preparation of silver layers applicable as SERS substrates. The new synthetic route based on combination of two synthetic approaches, sonochemical method of silver nanoparticles deposition on glass [26] and modified Tollens process [27] was studied as an alternative methods. The procedure,

used as standard for comparison of the new developed procedure, consist of mixing of 5 ml silver nitrate solution (0.25 M), 1.5 ml of ammonia solution (2.5% V/V), 0.5 ml of PVP (15 g/L) and 15.5 ml of deionized water. The silver ions were reduced under ultrasonic

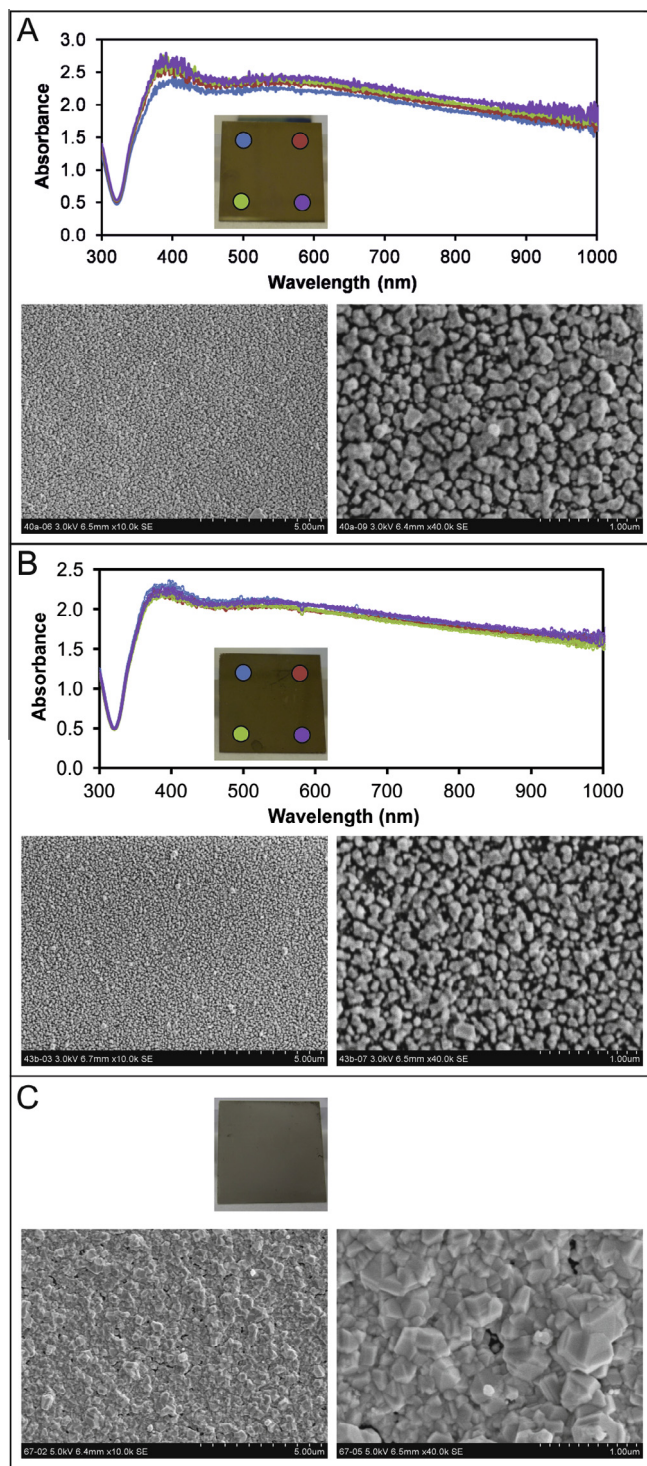


Fig. 1. UV–vis spectra, digital photos and SEM images of silver particle layers deposited on glass slips synthesized in glass beaker (final concentration of silver 0.05 M) reduced by (A) ethylene glycol in the presence of PVP, (B) ethylene glycol without the presence PVP, and (C) glycerol without the presence of PVP. Color dots in digital photos correspond to sites scanned by UV–vis absorption spectroscopy and correspond with color of absorption curves. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

irradiation by adding of 2.5 ml of ethylene glycol. UV–vis spectra of prepared slips (Fig. 1A) proved the presence of silver nanoparticles deposited on the glass substrate due to the presence of absorption maximum at approximately 400 nm. Moreover, the recorded UV–vis spectra at four different sites on the glass slip in combination with captured digital photography show good homogeneity of the generated silver particle layer. Color dots at photos of slips correspond to sites scanned by UV–vis absorption spectroscopy and correspond to color of absorption spectra. The structure of the generated layers was characterized by SEM images, which revealed the presence of silver nanoparticles deposited on the glass slips with a mean diameter of around 100 nm (Fig. 1A). However, the presence of PVP can negatively affect the layer applicability for SERS due to existence of influencing redundant Raman signal going from the presence of PVP polymer in the layer (Fig. 5A). Thus, we modified this method of preparation of silver particle layers to a polymer-free synthetic approach. The other reaction conditions were maintained identical as in the case when PVP was used. In this case, silver particle layer consists of particles with a mean diameter of around 80 nm as can be seen from SEM images (Fig. 1B). Homogeneity and nanoparticulate nature of layer can be demonstrated through recorded UV–vis spectra at four different positions at silver particle layers surface (Fig. 1B). The utilization of ethylene glycol as a reducing agent can be unfortunately problematic from the view-point of its chronic toxicity and teratogenicity [28,29]. Moreover, remains of glycerol adsorbed on silver layers are also detected by SERS and produce further redundant signals (Fig. 5A, B and D). Thus, in the next modification step, the above mentioned reducing agent was replaced by much environmental friendly substance – glycerol, which is commonly used in medicals and pharmaceuticals [30]. Exploitation of glycerol also enables generation of silver particle layers (Fig. 1C). In the case of using of glycerol as the reducing agent, considerably higher deposition of silver particles on the glass surface was observed (Fig. 1C) and therefore due to the high light absorption of this dense layer, UV–vis absorption spectra could not be recorded. The higher deposition of silver particles on glass surface was confirmed by AAS measurements (Table 1). While in the case of ethylene glycol, the amount of deposited silver reached values of 0.75 mg per glass cover slip in the presence of PVP and 0.86 mg per glass cover slip without PVP, in the case of glycerol, the amount increased to 12.0 mg per glass. SEM images proved that the prepared layer is much denser and revealed that layer consists of silver crystals with sizes from 100 to 400 nm (Fig. 1C).

Table 1

Amount of silver nanoparticles deposited on glass substrate using sonochemical technique determined by AAS.

| Reducing agent and conditions | Amount of silver on glass (mg) | Efficiency of deposition (%) |
|---|--------------------------------|------------------------------|
| Ethylene glycol in the presence of PVP in glass beaker | 0.75 | 0.56 |
| Ethylene glycol without the presence of PVP in glass beaker | 0.86 | 0.64 |
| Glycerol without the presence of PVP in glass beaker | 12.00 | 8.92 |
| Ethylene glycol without the presence of PVP in polypropylene beaker | 0.87 | 3.23 |
| Glycerol without the presence of PVP in polypropylene beaker | 5.61 | 20.86 |
| Maltose without the presence of PVP in polypropylene beaker | 1.01 | 3.75 |
| Lactose without the presence of PVP in polypropylene beaker | 1.29 | 4.81 |
| Glucose without the presence of PVP in polypropylene beaker | 3.67 | 13.66 |

The above mentioned procedures of silver layer preparation involve a high consumption of silver nitrate when only small part is exploited for desired silver layer formation due to deposition of large amount of metallic silver on walls of the glass beaker during the sonication process. With the aim to significantly increase efficiency of the sonochemical reduction process we have replaced glass beakers with the plastic ones. The change allows us to reduce five-times final concentration of silver nitrate solution from 0.05 M to 0.01 M. Moreover, the amounts of added ethylene glycol or glycerol were reduced to 1 ml and the amount of 2.5% ammonia solution was only 0.3 ml. The time of preparation was kept identical (5.5 min) as in the systems using glass beaker. This simple change in the reaction arrangement leads to improving of efficiency of the sonochemical deposition process as documented in Fig. 2. In the case of using ethylene glycol as a reducing substance, UV-vis spectra proved presence of silver nanoparticles on the glass surface with nearly the same density and size as in the case of experiment

with five times higher concentration of reaction components (Fig. 2A). In the case of using of glycerol as the reducing agent, the same trend like in the preparation in glass beaker was observed and higher deposition of silver particles on the glass surface made impossible to record UV-vis absorption spectra (Fig. 2B). More efficient deposition of silver nanoparticles was also confirmed by AAS measurement (Table 1). SEM images revealed that dense layer of silver is formed by two size classes of silver particles. There are both larger crystals with sizes of up to 1 μm and particles with size of around 100 nm.

In summary, the substantial advantage of such modified procedure lies in the fact that the deposition of silver nanoparticles is more effective and prepared silver particle layers are denser if plastic baker is used compared to sonochemical procedure realized in the glass beaker. Unfortunately, synthetic procedures described above require precise control of reaction conditions (concentration of reactants, temperature, quality of deionized water, etc.) to

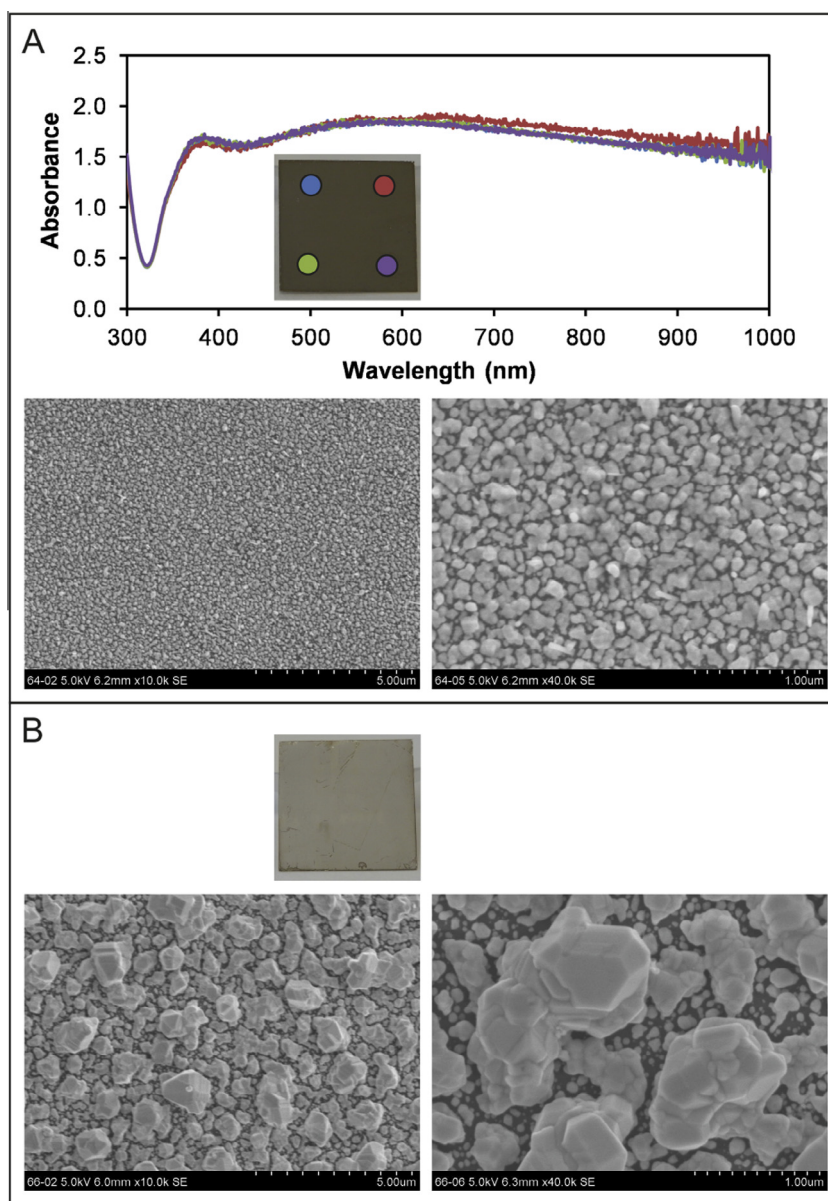


Fig. 2. UV-vis spectra, digital photos and SEM images of silver particles deposited on glass prepared in polypropylene beaker (final concentration of silver 0.01 M) reduced by (A) ethylene glycol and (B) glycerol. Color dots in digital photos correspond to sites scanned by UV-vis absorption spectroscopy and correspond with color of absorption curves. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

obtain a good reproducibility of the physico-chemical properties of the prepared silver layers.

3.2. Preparation of silver particle layers deposited on glass slips using reducing saccharides

Therefore, in order to gain the highest reproducibility and quality of silver layers preparation, the entirely new approach to sonochemical preparation method was introduced. This new method is based on the combination of sonochemical approach and the process based on the Tollens reaction where silver ammonia complexations are reduced by saccharides in alkaline environment [31]. In this procedure, three reducing saccharides (maltose, lactose, and glucose) which differ in their redox potentials were chosen and tested. Typically, 1 ml of 0.25 M silver nitrate solution was reduced by 1 ml of 0.25 M saccharide solution in the presence of 0.3 ml of ammonia (2.5%). Final concentrations of reaction compounds were therefore 0.01 M of silver nitrate, 0.01 M of reducing saccharide and 0.018 M of ammonia. As well as in the previously described case of silver layers formed using glycerol, also in the case of silver layers formed by reduction using saccharides, it was not possible to record UV-vis spectra because of very high light absorption by formed dense silver layers, which was again confirmed by AAS measurements (Table 1). Therefore, the characterization of generated silver layers and particle's size determination was performed only through SEM images. Depending on saccharide used, the silver layers consist of particles with a mean diameter ranging from 100 to 250 nm. The average size of deposited silver nanoparticles was approximately 100 nm for maltose (Fig. 3A), 150–180 nm for lactose (Fig. 3B) and 200–250 nm for glucose (Fig. 3C). It was found that exploitation of reducing saccharides for sonochemical reduction and deposition of silver nanoparticles on glass slips is much more preferable compared to polyol method. The synthesis is much less dependent on external influences and, moreover, use of reducing saccharides increases amount of deposited silver on glass surface.

Additionally, presented sonochemical approach provides great quality of the prepared silver layers on glass substrate in an extremely short time in comparison to other published methods based on application of auxiliary sublayer for capturing of silver nanoparticles on solid surface. One of the often used methods described in literature is based on capturing metal nanoparticles on primarily prepared layer of polyelectrolyte, such as poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA) or polyethyleneimine (PEI) through electrostatic interactions. Preparation of thin silver layers through PDDA was introduced by Chapman et al. or by Guo et al. [22,32], using of PEI was published by Michna et al. [23]. Common features occurring in this technique include requirement of perfect cleaning of substrate and activation by strongly interact solutions such as H_2O_2 with NH_4OH or H_2O_2 with H_2SO_4 (piranha solution). Glass substrate is then immersed into a solution of polyelectrolyte or polymer for several minutes or hours. After careful washing of the glass substrate to remove the excess of polyelectrolyte or polymer, the glass is inserted into a dispersion of silver nanoparticles prepared separately a priori. The whole process takes time on the order of units or tens of hours. Another well-known procedure used for silver nanoparticles deposition is the exploitation of APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) which is covalently bonded to the surface of the glass substrate after its activation which is followed by bonding of Ag NPs due to their interaction with amino groups of APTES and forming layer on glass substrate. This technique is also time-consuming as above mentioned procedures using polyelectrolytes [24,33,34]. Besides theoretical comparison of sonochemically prepared silver layers to the above mentioned results from literature, we have prepared silver particle layers on glass slips using chemical approach. For this purpose, the Tollens process

was exploited because this procedure involves almost the same chemical composition of the reaction components. It can be seen that thus prepared silver layers do not exhibit so high homogeneity and uniformity of silver particle distribution such as layers prepared by sonochemical technique. Moreover, silver nanoparticles are subject to recrystallization and therefore there are formed large straps which lose their nano/micro particulate nature Fig. 4.

Contrary to these procedures, our novel technique is not so susceptible to impurities on the substrate surface and requires washing just by detergent distilled water. There is no need of additives to capture the silver particles on the surface and, finally, silver particles are formed and deposited all at once during the sonication. The whole procedure for silver layers preparation takes therefore only several minutes. The advantage of sonochemical method arises from the physical nature of sonication, concretely from changes due to the acoustic cavitation [35]. By using of power ultrasound power, there are created cavitation bubbles whose implosive collapses results in an enormous concentration of energy. This energy, in combination with high local temperatures and pressures, lead to the formation of nanosized particles [36]. When the cavitation bubbles collapse near a solid surface (glass e.g.), they produce microjets and shock waves [37], which throw due to the asymmetric jet formation newly formed nanoparticles onto surface at a very velocities [38]. Moreover it was found, that in heterogeneous systems and in the presence of solid surface the nucleation rate increases several hundred times [39] and therefore, using of sonochemistry is much more efficient compared to non-sonicated methods for surface coating by nanoparticles.

3.3. Application of silver particle layers deposited on glass slips as SERS substrates

The prepared silver particle layers on glass slips were tested as substrates for surface enhanced Raman spectroscopy with excitation wavelength 785 nm. Utilization of 785 nm excitation wavelength can be advantageous for biological samples to avoid most of the back-ground fluorescence. Adenine was used as a model analyte. The SERS enhancement factors were calculated as a ratio of SERS signal of 10^{-5} M adenine solution dropped on silver particle layer to Raman signal of 0.1 M adenine dropped on pure glass slip without silver particle layer. Even if entire spectrum is important for the evaluation of Raman intensities, it is possible to simplify calculation by selecting of strongest peak of adenine at $\sim 738\text{ cm}^{-1}$. After dropping of $10\ \mu\text{l}$ of 10^{-5} M adenine solution on substrate, the measurement immediately began. This fact is advantageous from practical point of view because of time saving.

Differently prepared glass slips with deposited silver particles exhibited different level of Raman signal enhancement. The best results were observed for the substrate prepared using ethylene glycol (Fig. 5A) and maltose (Fig. 5F) as reducing substances. The enhancement factors were approximately $5 \cdot 10^5$. In both cases, the silver particle layers are formed by approximately 100 nm large particles. However, in the case of ethylene glycol, high concentration of silver nitrate in glass beaker (0.05 M) was applied. When the concentration of silver was reduced to 0.01 M, the efficiency of layer in SERS significantly decreased (Fig. 5D). Moreover, while in the case of maltose, as the best reducing agent, flat (clean) spectrum between 900 cm^{-1} and 1250 cm^{-1} can be observed, in the presence of ethylene glycol, residual peaks in the range about $1000\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ can be seen in the spectrum (Fig. 5B and D), which are in addition affected by PVP in the case of using PVP as modifier (Fig. 5A). The substrates prepared by other reducing sugars show lower values of signal enhancement. The efficiency decreased (Fig. 5G and H) with increasing particle size: 150–180 nm for lactose (Fig. 3B) and 200–250 nm for glucose (Fig. 3C). The layers formed using glycerol provide higher enhancement

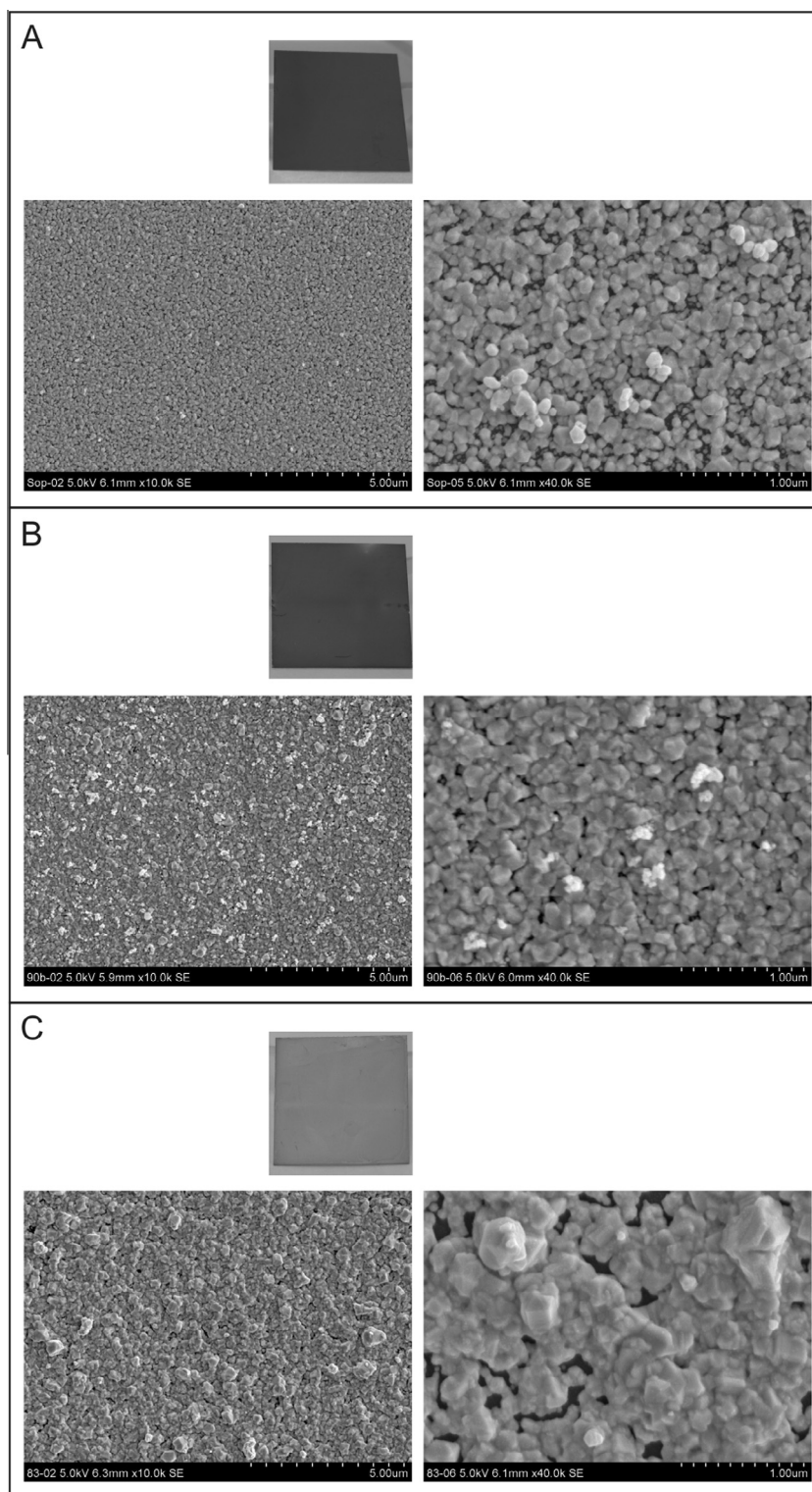


Fig. 3. Digital photos and SEM images of glass slips deposited by silver nanoparticles prepared in plastic beaker (final concentration of silver 0.01 M) reduced by (A) maltose and (B) lactose and (C) glucose.

although the layers were formed by large particles with size about 400 nm (0.05 M silver nitrate) or even 1000 nm (0.01 M silver nitrate) which can be connected with the used laser excitation wavelength. However, these layers also contain some fraction of particles with sizes of about 100 nm which are probably responsible for the high value of Raman signal enhancement. Since all of tested silver layers synthesized by presented sonochemical

technique showed Raman signal enhancement, it can be concluded that every silver based substrates can be used for SERS purposes. For comparison, the chemically (by Tollens process) prepared silver layers on glass substrate were also tested as SERS enhancers (Fig. 5I). The results showed, that non-sonochemically prepared silver layers does not exhibit almost any pronounced Raman signal enhancement. So, it can be concluded that sonochemical approach

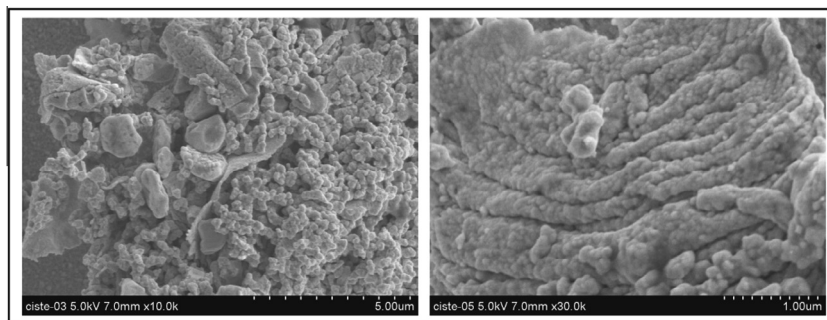


Fig. 4. SEM image of glass slip deposited by silver nanoparticles prepared non-sonochemically in glass beaker by modified Tollens process based on the reduction of silver ammonia complex by maltose.

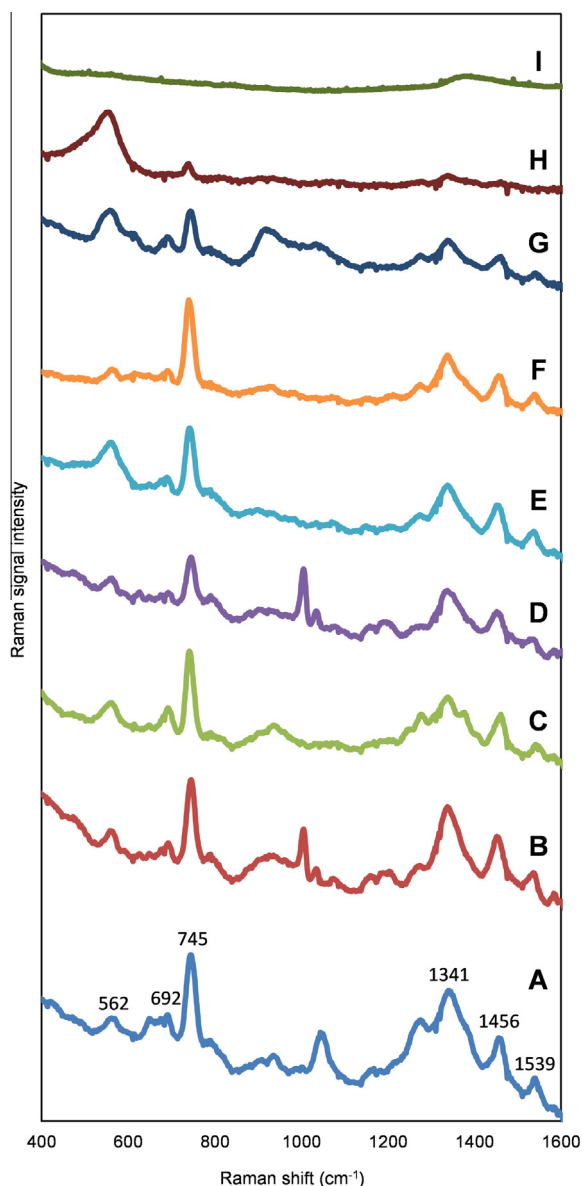


Fig. 5. Surface enhanced Raman spectra of adenine (10^{-5} M) on silver particle layers deposited on glass slips prepared in a glass beaker (final concentration of silver 0.05 M), reduced by (A) ethylene glycol with PVP, (B) ethylene glycol without PVP, (C) glycerol and prepared in a plastic beaker (final concentration of silver 0.01 M) reduced by (D) ethylene glycol, (E) glycerol, (F) maltose, (G) lactose and (H) glucose and particle layers deposited non-sonochemically (I). For the measurements, $10 \mu\text{l}$ of 10^{-5} M adenine solution was used.

is better suited for fabrication functional SERS substrates than chemical one.

In summary, the proposed novel method of silver particle layer preparation based on combination of modified Tollens reaction with sonochemical reduction process is the best method for preparation of effective SERS substrates due to its ability to gain high enhancement factor for Raman signal with outstanding reproducibility and also due to its environmentally friendly character avoiding toxic compounds such as ethylene glycol.

4. Conclusion

In this work, we described a novel simple technique for preparation of silver particle layers deposited on the glass slips. This procedure is based on ultrasonically assisted chemical reduction of silver ammonia complex cations and simultaneous deposition of formed silver particles on the glass substrate. By changing the reaction parameters, concentrations of reagents and by selecting a suitable reducing agent, it was possible to control the size of the deposited silver particles, whose diameter ranged from 80 nm up to several hundreds of nm. The deposition of particles on the glass substrate prevents their aggregation or other changes in size and shape during storage. Therefore, the formed silver layers exhibit long-term stability, which is important assumption for their practical utilization. Compared to other possible techniques of thin layers preparation, our developed method does not require careful cleaning and activation of substrate surface, which makes our technique time-saving and, therefore, economically advantageous. Changing of reaction beakers from glass to plastic ones enabled five-times decrease in the silver concentration, which brings another reduction in costs. The prepared silver particle layers were tested as substrates for surface enhanced Raman spectroscopy. The enhancement factor of the Raman signal reached approximately $5 \cdot 10^5$ for adenine serving as a model analyte. Thus, the prepared silver particle layers deposited on the cover slips significantly enhanced the Raman signal and, hence, can be preferably used for purposes of mentioned analytical technique.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by the National Programme for Sustainability I (2013–2020), project LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0056) and Internal Grants of Palacký University in Olomouc (PrF_2015_022). The authors thank Petra Bazgerová for SEM measurements and Jiří Tuček for language corrections (both from the Regional Centre of Advanced

Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic).

References

- [1] M.G. Albrecht, J.A. Creighton, Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 5215–5217.
- [2] W.E. Doering, S. Nie, Single-molecule and single-nanoparticle sers: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 311–317.
- [3] T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, H.M. Hiepa, D.-K. Kim, Y. Yonezawa, et al., Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance-based core-shell structured nanoparticle layer nanochip, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6465–6475.
- [4] A.M. Michaels, M. Nirmal, L.E. Brus, Surface enhanced Raman spectroscopy of individual Rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9932–9939.
- [5] S. Nie, Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *Science* 275 (1997) 1102–1106.
- [6] S.R. Emory, W.E. Haskins, S. Nie, Direct observation of size-dependent optical enhancement in single metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8009–8010.
- [7] R. Prucek, A. Panacek, A. Fargasova, V. Ranc, V. Masek, L. Kvitek, et al., Recrystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy, *CrystEngComm* 13 (2011) 2242.
- [8] R. Prucek, V. Ranc, L. Kvitek, A. Panacek, R. Zboril, M. Kolar, Reproducible discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation, *Analyst* 137 (2012) 2866–2870.
- [9] A. Fargasova, R. Prucek, V. Ranc, A. Panacek, L. Kvitek, R. Zboril, Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation wavelengths, *RSC Adv.* 5 (2015) 9737–9744.
- [10] N. Leopold, B. Lendl, A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5723–5727.
- [11] W. Leng, H.Y. Woo, D. Vak, G.C. Bazan, A. Myers Kelley, Surface-enhanced resonance Raman and hyper-Raman spectroscopy of water-soluble substituted stilbene and distyrylbenzene chromophores, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 132–141.
- [12] P.X. Zhang, Y. Fang, W.N. Wang, D.H. Ni, S.Y. Fu, Influence of addition of potassium chloride to silver colloids, *J. Raman Spectrosc.* 21 (1990) 127–131.
- [13] M. Campbell, S. Lecomte, W.E. Smith, Effect of different mechanisms of surface binding of dyes on the surface-enhanced resonance Raman scattering obtained from aggregated colloid, *J. Raman Spectrosc.* 30 (1999) 37–44.
- [14] R.P. Van Duyne, J.C. Hulst, D.A. Treichel, Atomic force microscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. I. Ag island films and Ag film over polymer nanosphere surfaces supported on glass, *J. Chem. Phys.* 99 (1993) 2101.
- [15] A.J. Haes, S. Zou, J. Zhao, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Localized surface plasmon resonance spectroscopy near molecular resonances, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 10905–10914.
- [16] G. Cao, Y. Wang, *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, World Scientific Publishing Company, Singapore, 2011.
- [17] E.M. Hicks, X. Zhang, S. Zou, O. Lyandres, K.G. Spears, G.C. Schatz, et al., Plasmonic properties of film over nanowell surfaces fabricated by nanosphere lithography, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 22351–22358.
- [18] M.-V. Meli, R.B. Lennox, Surface plasmon resonance of gold nanoparticle arrays partially embedded in quartz substrates, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 3658–3664.
- [19] O. Stranik, H.M. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications, *Sens. Actuat. B Chem.* 107 (2005) 148–153.
- [20] A.J. Haes, S. Zou, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Nanoscale optical biosensor: short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 6961–6968.
- [21] J. Sung, E.M. Hicks, R.P. VanDuyne, K.G. Spears, Nanoparticle spectroscopy: dipole coupling in two-dimensional arrays of L-shaped silver nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 10368–10376.
- [22] Y.-B. Guo, D.-G. Wang, S.-H. Liu, S.-W. Zhang, Fabrication and tribological properties of polyelectrolyte multilayers containing in situ gold and silver nanoparticles, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 417 (2013) 1–9.
- [23] A. Michna, Z. Adamczyk, B. Siwek, M. Oćwieja, Silver nanoparticle monolayers on poly(ethylene imine) covered mica produced by colloidal self-assembly, *J. Colloid Interface Sci.* 345 (2010) 187–193.
- [24] A. Taglietti, C.R. Arciola, A. D'Agostino, G. Dacarro, L. Montanaro, D. Campoccia, et al., Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface, *Biomaterials* 35 (2014) 1779–1788.
- [25] J. Kim, P. Seidler, C. Fill, L.S. Wan, Investigations of the effect of curing conditions on the structure and stability of amino-functionalized organic films on silicon substrates by Fourier transform infrared spectroscopy, ellipsometry, and fluorescence microscopy, *Surf. Sci.* 602 (2008) 3323–3330.
- [26] N. Perkas, G. Amirian, G. Applerot, E. Efendiev, Y. Kaganovskii, A.V. Ghule, et al., Depositing silver nanoparticles on/in a glass slide by the sonochemical method, *Nanotechnology* 19 (2008) 435604.
- [27] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, et al., Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16248–16253.
- [28] J. Devillers, A. Chezeau, V. Poulsen, E. Thybaud, Effects of ethylene glycol ethers on the reproduction of *Ceriodaphnia dubia*, *Chemosphere* 50 (2003) 373–376.
- [29] J. Zhu, Y.-L. Feng, B. Aikawa, A positive chemical ionization GC/MS method for the determination of airborne ethylene glycol and propylene glycols in non-occupational environments, *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 881–887.
- [30] A.H. Saberi, Y. Fang, D.J. McClements, Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification, *J. Colloid Interface Sci.* 411 (2013) 105–113.
- [31] Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaran, Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process Electronic supplementary information (ESI) available: photographs of silver mirror, and of stable dispersions of silver nanoparticles from mixi, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 522–527.
- [32] R. Chapman, P. Mulvaney, Electro-optical shifts in silver nanoparticle films, *Chem. Phys. Lett.* 349 (2001) 358–362.
- [33] S. Zhu, C. Fan, J. Wang, J. He, E. Liang, Self-assembled Ag nanoparticles for surface enhanced Raman scattering, *Opt. Rev.* 20 (2013) 361–366.
- [34] Y. Lv, H. Liu, Z. Wang, L. Hao, J. Liu, Y. Wang, et al., Antibiotic glass slide coated with silver nanoparticles and its antimicrobial capabilities, *Polym. Adv. Technol.* 19 (2008).
- [35] K.S. Suslick, Sonochemistry, *Science* 247 (1990) 1439–1445.
- [36] M. Soloviev, A. Gedanken, Coating a stainless steel plate with silver nanoparticles by the sonochemical method, *Ultrasonics Sonochem.* 18 (2011) 356–362.
- [37] S. Bhattacharyya, A. Gabashvili, N. Perkas, A. Gedanken, Sonochemical insertion of silver nanoparticles into two-dimensional mesoporous alumina, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 11161–11167.
- [38] A. Abramova, A. Gedanken, V. Popov, E.-H. Ooi, T.J. Mason, E.M. Joyce, et al., A sonochemical technology for coating of textiles with antibacterial nanoparticles and equipment for its implementation, *Mater. Lett.* 96 (2013) 121–124.
- [39] A. Aersmann, *Crystallization Technology Handbook*, second ed., CRC Press, New York, 2001.

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Analytické využití nanočástic ušlechtilých kovů

Autoreferát k disertační práci

Mgr. Ariana Opletalová

Školitel: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Doktorský studijní program Chemie – P1407

Olomouc 2017

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorského studijního programu na Katedře fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Uchazeč: **Mgr. Ariana Opletalová (rozená Fargašová)**

Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc

Školitel: **doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.**

Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc

Oponenti:

Místo a termín obhajoby:

Místo, kde bude možné se s disertační prací a posudky alespoň 14 dnů před vykonáním obhajoby seznámit:

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Úvod | 4 |
| 1. Teoretická část | 6 |
| 1.1 Aplikace nanočástic ušlechtilých kovů v biologické SERS analýze | 6 |
| 2. Cíle disertační práce | 12 |
| 3. Experimentální část | 13 |
| 3.1 Příprava vodné disperze nanočástic stříbra | 13 |
| 3.2 Aktivace nanočástic stříbra a jejich charakterizace | 13 |
| 3.3 Příprava magnetického SERS biosenzoru pro diagnostiku infekce kloubních náhrad | 14 |
| 3.3.1 Imobilizace streptavidinu na magnetické nanočástice | 14 |
| 3.3.2 Funkcionalizace povrchu magnetických nanočástic protilátkou | 15 |
| 3.4 Příprava bakteriálních vzorků | 16 |
| 3.4.1 Příprava modelových vzorků | 16 |
| 3.4.2 Příprava biologických vzorků | 16 |
| 3.5 Příprava vzorků pro experimenty povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie | 17 |
| 3.5.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách | 17 |
| 3.5.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS | 18 |
| 4. Výsledky a diskuze | 20 |
| 4.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách | 20 |
| 4.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS | 29 |
| 4.3 Publikace zahrnující alternativní SERS substráty | 46 |
| 4.3.1 Magneticky-asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS) pro „label-free“ stanovení lidského imunoglobulinu G (IgG) v krvi s využitím nanokompozitního materiálu na bázi Fe ₃ O ₄ @Ag | 46 |
| 4.3.2 Sonochemická příprava skleněných destiček s vrstvou nanočástic stříbra pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie | 47 |
| 5. Závěr | 48 |
| 6. Summary | 50 |
| Seznam použitých zkratk | 52 |
| Seznam použité literatury | 53 |
| Seznam autorských publikací | 61 |

Úvod

Nanočástice ušlechtilých kovů se staly běžnou součástí moderní civilizace, a to nejen na poli vědeckého výzkumu, ale i mezi širokou veřejností. Praktické využití nanomateriálů v různých oborech lidské činnosti, jako je medicína, katalýza, elektronika či široké spektrum bioanalytických aplikací, představují jen zlomek oblastí, kde jsou nanomateriály buď testovány, nebo přímo využívány. Tyto materiály o rozměrech pouhých pár jednotek až desítek nanometrů vykazují zcela odlišné chování v porovnání se svými makroskopickými protějšky. Díky těmto změnám v chování se mohou v nanosvětě objevovat zcela nové fenomény nepozorovatelné v makrosvětě.

Nanočástice stříbra, díky svým vlastnostem a aplikačnímu potenciálu, řadíme k nejstudovanějším ušlechtilým kovům v oblasti nanotechnologií. Mimo biologickou (antibakteriální) aktivitu, prakticky využívanou v materiálech pro humánní i veterinární medicínu [1], je další ohromný aplikační potenciál nanočástic stříbra spojován s jejich optickými vlastnostmi. Existence lokalizovaného povrchového plasmonu s maximem absorpce ve viditelné části spektra poskytuje nástroj pro nové vysoce citlivé analytické metody, mezi nimiž vyniká povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). Ramanova spektroskopie obdobně jako infračervená spektroskopie poskytuje řadu informací o studovaných systémech, ale její nízká citlivost ji předurčuje k využití pouze ve výzkumných laboratořích. Tento nedostatek byl vyřešen právě povrchovým zesílením Ramanova rozptylu na kovových nanomateriálech, kde hraje velmi důležitou roli velikost, morfologie a podoba těchto nanočástic, ne méně pak jejich tzv. „hot spots“ vytvořená během agregace [2]. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie se tak stává v současnosti velmi mocným analytickým nástrojem, který umožňuje selektivní a vysoce specifickou detekci biologicky významných molekul, jež se v živých systémech vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Mimo detekce velmi nízkých koncentrací (až pikomoly) biologicky významných molekul nabízí SERS do klinické praxe i specifickou detekci celých živých systémů – patogenních bakterií. Rychlá a jednoznačná detekce patogenů hraje v oblasti medicíny zásadní roli, typicky v oblasti ortopedie při sledování pooperačního stavu pacienta, kdy prodleva v rychlosti stanovení přítomnosti bakteriálního patogenu v kloubních punktátech může mít až fatální následky v podobě amputace končetin. Klasické testy přítomnosti bakterií v biologických

vzorcích jsou založeny na tradičních kultivačních technikách, ale i moderních technik jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) či enzymatická metoda (ELISA), které ovšem mohou zabrat i několik hodin až dní díky vysokým detekčním limitám. Nové možnosti detekce a identifikace patogenních mikroorganismů nabízí v takovýchto případech biofunkcionalizované magnetické nanočástice a jejich spojení s povrchem zesílenou Ramanovou spektroskopií. Hlavní výhodou magnetické separace oproti ostatním klasickým kultivačním technikám je jednoznačně její rychlost, snadnost provedení a vysoká specifita. Snižuje se tak doba komplexního mikrobiologického vyšetření, což je v dnešní době jeden z klíčových aspektů nejen v klinické mikrobiologii.

V souvislosti s těmito tématy je předložená disertační práce zaměřena na přípravu a testování substrátu na bázi nanočástic stříbra, jakožto efektivního substrátu pro zesílení Ramanova signálu. První část experimentální práce se zabývá sledováním míry zesílení Ramanova signálu modelové biomolekuly adeninu v závislosti na snoubení průměrné velikosti částic stříbra s vlnovou délkou budícího laserového záření (532, 633 a 780 nm). Dále pak na základě získaných výsledků byl výzkum SERS aplikace směřován do oblasti detekce a identifikace mikrobiálních patogenů. Druhá část experimentální sekce je proto věnována uplatnění diagnostického nástroje pracujícího na principu magneticky asistované SERS (MA-SERS) selektivní detekce a identifikace patogenních bakterií. K MA-SERS detekci byl využit biosenzor na bázi magnetických nanočástic oxidu železa funkcionalizovaných příslušnými protilátkami na jednotlivé bakterie, které byly následně konjugovány s nanočásticemi stříbra. Pomocí aplikace takových částic přímo do vzorku lze ze složité biologické matrice specificky selektovat požadovaný analyt a následně identifikovat. MA-SERS detekce a identifikace mikrobiálních patogenů byla nejprve vyvíjena na bakteriálních lyzátech *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Jelikož bylo dosaženo povzbudivých výsledků, následovalo testování tohoto biosenzoru s infikovanými vzorky kloubních punktátů získaných od pacientů trpících osteoartrózou. Závěr experimentální části této disertační práce je pak věnován stručným komentářům spoluautorských publikací, ve kterých byl rovněž využit aplikační potenciál nanočástic stříbra, ať už v podobě vrstev či jako součást kompozitního materiálu, jakožto aktivních substrátů pro zesílení Ramanova signálu biologicky významných molekul.

1. Teoretická část

1.1 Aplikace nanočástic ušlechtilých kovů v biologické SERS analýze

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) je takřka ideální metodou s využitím v oblasti forenzní analýzy (kriminalistiky), diagnostiky chorob či kontroly potravin, nebo analýzy životního prostředí. Jednou z dalších mnoha oblastí využití nanočástic ušlechtilých kovů ve spojení se SERS technikou představují tzv. biodetekce. I při velmi nepatrných změnách ve složení a koncentraci molekul analytu můžeme získat otisk těchto změn ve vibračních stavech příslušného SERS spektra. Navíc i přes potíže s reprodukovatelností signálu v souvislosti s přípravou SERS aktivních substrátů, lze tuto techniku uplatnit mimo jiné v medicínském výzkumu a směřuje i do lékařské praxe. Příkladem může být technologie SERS genomové sondy, která má velký potenciál pro širokou škálu aplikací v oblastech, kde je nutná identifikace nukleových kyselin. Ke stanovení specifických sekvencí DNA a dále objasnění úlohy některých genů pomocí SERS detekce významně přispěla práce autora Vo-Dinh a kol. [3]. Za tímto účelem vyvinuli DNA-SERS sondu na bázi 23 nm nanočástic stříbra značených molekulami fluorescenčních barviv (rhodamin B, rhodamin 123, rhodamine 6G, kresylová violeť) citlivě detekovatelnými metodou SERS. Fluorescenční značka „ušitá“ na míru k oligonukleotidu představuje vynikající detekční prvek, s jehož pomocí se nabízí detailnější průzkum chování modifikovaných oligonukleotidů v „obarveném“ vnitrobuněčném prostředí. Takto vyvinutou metodu pak úspěšně testovali na buňkách z vaječníků čínského křečka. K tomuto výzkumu rovněž přispěli svou prací Cinta a kol. [4], kteří prováděli *in-vivo* SERS testy u myši postižených nádorovým onemocněním kůže s využitím nanočástic stříbra označených kresylovou violetí. Výše uvedené postupy značně rozšířily pohled na současnou problematiku značení biologických tkání za účelem sledovat rakovinu kůže SERS technikami. Nádorová onemocnění v současné době představují velký globální problém, jelikož si stojí na druhém místě žebříčku nejčastějších příčin úmrtí. Proto je velká pozornost věnována využití SERS techniky v oblasti výzkumu rakoviny, konkrétně rakoviny děložního čípku [5], prsu [6,7], prostaty [8,9], plic [10], žaludku [11], jícnu [12], a dalších. Současná literatura tak představuje SERS techniku, díky její specifčnosti, vysoké citlivosti a materiálové i

časové nenáročnosti, jako potenciální diagnostickou metodu k odlišení zdravé tkáně od karcinogenní.

Obrovský přínos pro medicínu je *in-vivo* detekce glukózy v krvi. Stanovení glukózy v krvi je důležité, a to nejen z důvodu sledování hladiny její koncentrace u pacientů trpících cukrovkou, ale i z důvodu určení jejího vztahu k neurální aktivitě mozku. Nicméně SERS spektrum glukózy je obvykle poměrně nízkých intenzit. K překonání tohoto problému v oblasti biomedicínského využití SERS techniky přispěli průkopníci Shafer-Peltier a kol. [13]. Zmíněná práce je výsledkem pilotního výzkumu systematické studie přímé detekce glukózy v krvi pomocí biosenzoru na bázi vrstvy nanočástic stříbra a SERS techniky. Modifikace povrchu tenkého filmu nanočástic stříbra alkanthioly byla navržena za účelem co nejefektivnější adsorpce glukózy na substrát, který byl vytvořen nanosením stříbra na vrstvu polystyrenových částic a jejich následnou samoorganizací do stříbrných trojúhelníkových útvarů. Zmíněná studie tak demonstruje funkční model pro kvantitativní detekci glukózy jak ve vysokých (0-250 mmol/l), tak klinicky významných (0-25 mmol/l) koncentracích, což nahrává k jeho komerčnímu využití v medicíně. Plány a ambice do budoucna mezi vědci jsou tak zřejmě jasné. V dlouhodobém časovém horizontu se bude usilovat o vývoj mikro-SERS či nano-SERS zařízení, které bude možno podkožně implantovat, nebo dokonce začlenit jako součást protetické kontaktní čočky v oku diabetických jednotlivců.

Klíčovou otázkou, ve které zatím stále není úplně vše jasně zodpovězeno, zůstává rychlý screening a možnost detekce a typizace bakteriálních patogenů v oblasti bezpečnosti potravin, ochrany veřejného zdraví, a stejně tak v diagnóze původce infekčního onemocnění [14]. Zavedené molekulárně biochemické techniky pro rutinní analýzy bakteriálních patogenů typicky představují časově velmi náročné kultivační postupy bakterií odebraných z kontaminovaných zdrojů [15]. Zcela odlišný přístup k identifikaci bakterií poskytuje Ramanova [16,17] a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie [18]. Na rozdíl od klasických kultivačních metod, zde nejsou třeba pro tuto techniku kroky jako extrakce či amplifikace (zmnožení) bakteriální DNA. Ramanova spektroskopie je založena na vibračních spektrech, která odrážejí proteinový profil analyzované bakteriální buňky. Mnoho prací se již zabývalo SERS technikou za účelem detekce vybraných mikroorganismů, jako jsou například *Pseudomonas*

aeruginosa [19–21], *Staphylococcus epidermidis* [22,23], *Helicobacter pylori* [24], *Listeria innocua* [25], *Shewanella oneidensis* [26,27], *Escherichia coli* [28–32], *Salmonella typhimurium* [33–36] *Listeria monocytogenes* [37] *Staphylococcus aureus* [33,38–40] a *Legionella pneumophila* [41]. Detekce a identifikace výše zmíněných testovaných bakterií byla prováděna s rozdílnými excitačními zdroji záření, zejména v UV/Vis oblasti, a s využitím různých SERS substrátů (převážně nanočástice stříbra a zlata). Přitom je třeba podotknout, že pro SERS uspořádání s excitačním zářením vlnových délek v blízké infračervené oblasti spektra (785 nm, 830 nm) jsou nejčastěji využívány substráty na bázi nanočástic stříbra či jejich agregátů [42–48]. Pro testování biologických materiálů je šťastnější volba zdroje excitačního záření právě v blízké infračervené oblasti spektra za účelem vyhnout se utopení Ramanova signálu ve fluorescenčním pozadí. Na toto poukazují i další práce, kde byly využity jako SERS substráty zlaté 80 nm částice [49–51]. Je tedy namístě, aby byly vyvíjeny různé substráty pro typické vlnové délky excitačního záření z uvedené oblasti. Praktické využití SERS metody při detekci vybraných patogenních mikroorganismů představuje rovněž práce autorů Pucek a kol. [52], kteří vyvinuli robustní metodu pro diskriminaci mezi Gram-pozitivními (*Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pyogenes*) a Gram-negativními bakteriemi (*Acinetobacter baumannii* a *Klebsiella pneumoniae*). Tato metoda detekce využívá 400 nm částice stříbra, vzniklé rekrystalizací nanočástic přidavkem vysoce koncentrovaných chloridových iontů.

Pokroky ve výzkumu SERS biosenzorů nabízejí nové možnosti pro rychlou detekci a identifikaci bakteriálních patogenů. Při aplikaci disperze nanočástic ušlechtilých kovů v lékařské praxi lze předpokládat nežádoucí působení nepříznivých vlivů biologické matrice na stabilitu nanočástic. Z tohoto důvodu je nutné zajistit jejich lepší agregátní stabilitu vhodnou modifikací povrchu a zároveň musí chemická modifikace umožnit následné zesílení SERS signálu. První pilotní studie, které se řadí na počátek zkoumání modifikace povrchu Au NPs ochrannou vrstvou oxidu křemičitého, byly publikovány skupinami Mine [53], Mulvaney [54], Doering [55], a Brown [56]. V těchto experimentech sice modifikace nanočástic zlepšila agregátní stabilitu systému, nicméně takto navržený postup měl za následek relativně nízké intenzity SERS signálu. Na základě obecně uznávané teorie mechanismu zesílení Ramanova signálu se toto dalo očekávat, jelikož nejlepší SERS aktivity je dosaženo na

nanočásticích ve stavu, kdy jsou mírně zagregovány, avšak těsně před jejich shluknutím do velkých SERS neaktivních útvarů. Systém zlatých nanočástic s ochrannou vrstvou oxidu křemičitého se podařilo výrazně vylepšit využitím velkých nanočástic zlata (cca 150 nm) a hlavně další modifikací povrchu specifickou protilátkou na protein A. Za pomoci takto modifikovaných nanočástic se podařila detekce i jednotlivých bakteriálních buněk *Staphylococcus aureus* [15].

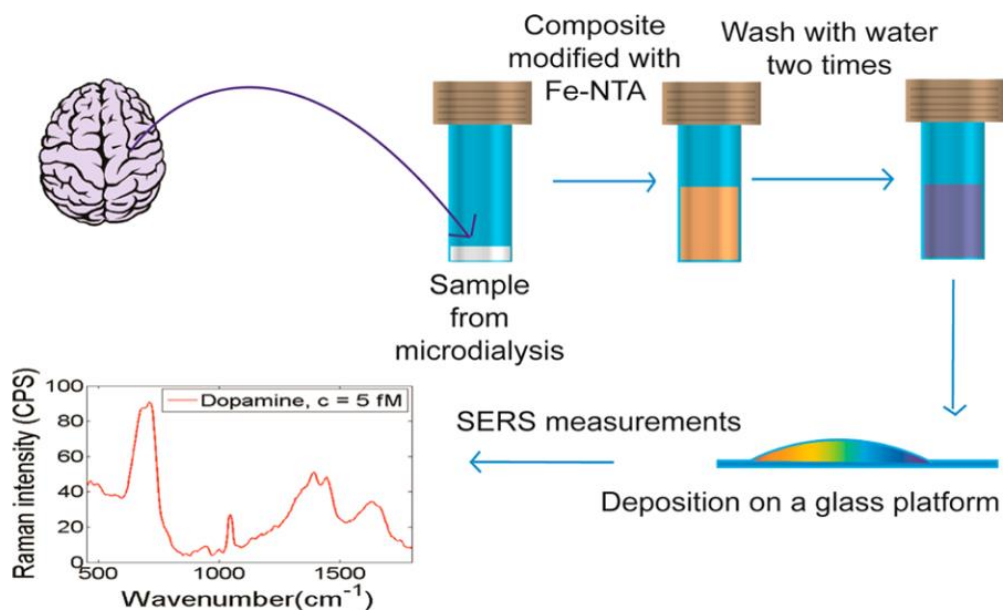
V další studii se Khan a kol. [36] zaměřili na detekci bakterie *Salmonella Typhimurium* ve vodě, která je považována za celosvětově nejzákeřnější patogen způsobující infekci z potravin, a zároveň se tento typ bakterie nachází mimo spektrum působení mnoha antibiotik. V těchto experimentech byly využity hvězdicovité nanočástice zlata, které byly připraveny dvoustupňovým redukčním procesem [57]. První krok syntézy spočíval v přípravě 4,3 nm zárodečných částic redukcí roztoku trojmocného zlata tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti citrátu sodného plnicího funkci stabilizačního činidla. Druhý krok syntézy představoval následnou redukcí dalších zlatitých iontů slabším redukčním činidlem (kyselinou askorbovou) za přítomnosti cetyltrimethylamonium bromidu, který plnil funkci modifikátoru růstu a podporoval tak tvorbu hvězdicovitých nanočástic zlata o velikosti 30 nm. Pro kovalentní imobilizaci monoklonální protilátky na O-antigen (antigen polysacharidové povahy ve stěně bakterií *Salmonella Typhimurium*) na výše zmíněné Au NPs bylo využito molekulární raménko glutaraldehydu. V těchto studiích bylo dosaženo limitu detekce 10 CFU/ml. Výše zmíněný typ nanostrukturovaných částic zlata, funkcionalizovaných anti-PSMA monoklonální protilátkou, je dle autorů rovněž možno využít při detekci prostatického specifického membránového antigenu (PSMA), který je využitelný pro časnou detekci karcinomu prostaty [57].

SERS technika byla dále využita při detekci bakterií ve vzorcích lidské krve. Sivanesan a kol. [58] se zabývali vývojem selektivní identifikace grampozitivních (*S. epidermidis*, *B. megaterium*) a gramnegativních (*E. coli*, *S. enterica*) bakteriálních patogenů v koncentracích 10^2 CFU/ml. V této studii byla využita elektrochemicky zdrsňená stříbrná elektroda s deponovanou tenkou vrstvou nanočástic zlata a následně funkcionalizovanou antibiotikem (vankomycin či ceftazidim) za účelem zvýšit selektivitu a zachycení bakterií. Na základě svých studií zjistili, že intenzita SERS

signálu s použitím biosenzoru s vankomycinem oproti nemodifikované Ag/Au bimetalické elektrodě je 8x vyšší pro *S. epidermidis* a *B. megaterium*, 4x vyšší pro *S. enterica* a 5x vyšší pro *E. coli*. Důvod vyšší intenzity SERS signálu pro *S. epidermidis* a *B. megaterium* autoři připisují tomu, že vankomycin se užívá k léčbě infekcí vyvolaných právě výše uvedenými grampozitivními bakteriemi.

Aplikační potenciál nanočástic kovů v klasické SERS technice při analýze biologických vzorků lze jednoznačně zvýšit využitím magnetických nanomateriálů za účelem cílené separace a zakoncentrování analytu působením vnějšího magnetického pole. Separaci a purifikaci cílených molekul pomocí magnetických částic ze složitých biologických vzorků lze realizovat prostřednictvím afinitních interakcí. Kovalentní imobilizace afinitního ligandu (streptavidin; monoklonální protilátka) na povrch magnetických částic je perspektivní možností, jak rychle a snadno izolovat proteiny (nebo jiné molekuly, které jsou předmětem zájmu) z komplexní matrice. Dále pak na základě nekovalentní interakce dvojice chemických komponent tzv. zámku (protilátky) a klíče (antigenu, resp. proteinu z určité bakterie) dochází k rozpoznávání cílových molekul s vysokou specificitou. Při použití magnetického separačního zařízení je takto navázaná molekula lehce izolována z analyzovaného vzorku (krev, kloubní punktáty, mozkomíšni mok, sliny, potraviny), čímž lze snížit nebezpečí jak falešně pozitivních výsledků, tak i snížení citlivosti detekční metody. V porovnání s klasickými biochemickými kultivačními metodami je práce s magnetickými částicemi bezpečná, rychlá, levná a jednoduchá.

Jak už tedy bylo napovězeno, novým výzkumným směrem posledních let, především v oblasti sensoriky, se stala tzv. magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS). Tento selektivní a vysoce specifický inovativní systém, založený na magnetickém kompozitu s nanočásticemi ušlechtilých kovů, byl úspěšně aplikován pro stanovení dopaminu ve vzorku mozkomíšního moku získaného z oblasti myšního mozku zvané corpus striatum (Obr. 1). Tento MA-SERS detekční systém využívá nanokompozit na bázi nanočástic Fe_3O_4 a stříbra, následně modifikovaný kyselinou železo-nitilotriocetovou (Fe-NTA), která je selektivní vůči dopaminu. Takto navržený detekční systém byl spolehlivě využit pro analýzu modelových vzorků s obsahem dopaminu v rozsahu koncentrací 10 - 5000 fmol/l [59].



Obr. 1: Schematické znázornění SERS analýzy dopaminu. Převzato z [59].

Obdobného principu magneticky asistované SERS selektivní detekce bylo využito i pro stanovení lidského imunoglobulinu G ze vzorku krve získaného z prstu ruky [60]. Pro izolaci cílené molekuly imunoglobulinu G byl využit opět nanokompozitní materiál obsahující nanočástice Fe_3O_4 a stříbra. Následně byl tento systém modifikován anti-imunoglobulinem G přes nekovalentní interakci s kovalentně navázaným streptavidinem na povrchu kompozitu a tímto byla zajištěna vysoká selektivita stanovení. V této práci bylo ukázáno, že lze detekovat koncentrace imunoglobulinu G od 600 fg/ml v kapce krve, což lze srovnat např. s hojně využívanou fluorescenční metodou [61]. Další možností je využití kompozitního systému magnetických částic s nanočásticemi zlata, na což se zaměřili Drake a kol. [62] v jejich studii zabývající se detekcí bakterie *Staphylococcus aureus*. Magnetické nanočástice oxidu železa byly použity k separaci a izolaci bakterie a SERS aktivní 50 nm nanočástice zlata modifikované kyselinou 4-merkaptobenzoovou byly využity pro následnou detekci a kvantifikaci bakteriálního patogenu. Oba typy nanočástic byly funkcionalizovány protilátkou, která se selektivně váže na protein A přítomný v buněčné stěně bakterie *Staphylococcus aureus*. Takto navrženým SERS biosenzorem dosáhli autoři detekčního limitu 1 buňky bakterie *S. aureus* v 1 ml vzorku.

2. Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce byl výzkum zaměřený na přípravu, modifikaci a transformaci koloidních částic stříbra (včetně nanočástic) a jejich organizovaných souborů (vrstev na vhodných pevných substrátech) s ohledem na jejich využití v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii při analýze biologicky významných (signálních) molekul.

Při realizaci tohoto záměru byly naplánovány tyto cíle, které lze shrnout do následujících bodů:

- optimalizovat podmínky vývoje efektivního substrátu a vlastního měření povrchem zesílených Ramanových spekter na sestavě disperzní Ramanův mikroskop DXR Nicolet pro aplikace v bioanalytické oblasti
- studium závislosti velikosti povrchového zesílení Ramanova signálu na změně excitačních vlnových délek budícího záření a změně morfologie nanočástic stříbra
- vývoj a aplikace diagnostického nástroje pracujícího na principu magneticky asistované SERS detekce patogenních mikroorganismů (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) při rychlém stanovení bakteriální infekce kloubních náhrad
- využití aplikačního potenciálu alternativních SERS substrátů při detekci biologicky významných molekul

Kromě předložené disertační práce jsou výsledky obsahem čtyř publikací v mezinárodních impaktovaných časopisech.

3. Experimentální část

3.1 Příprava vodné disperze nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny modifikovanou Tollensovou metodou, která spočívá v redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou. Postup přípravy byl následující: v litrové kádince byly smíchány předem připravené zásobní roztoky reakčních komponent o definovaných objemech a daných koncentracích v následujícím pořadí: 160 ml $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l AgNO_3 , 40 ml 0,1 mol/l NH_3 , 408 ml destilované vody. Zásadité prostředí reakčního systému pak bylo nastaveno na hodnotu $\text{pH } 11,5 \pm 0,1$ přidavkem 32 ml 0,24 mol/l NaOH . K intenzivně míchané takto připravené směsi bylo přidáno 160 ml vodného roztoku maltózy o koncentraci 0,05 mol/l. Reakce byla přibližně po 4 minutách ukončena a takto vzniklá žlutohnědá koloidní disperze byla uchovávána v tmavé zásobní láhvi pro použití v následujících experimentech bez jakýchkoliv dalších úprav. Reakce byla provedena v netemperovaném prostředí při laboratorní teplotě (20 °C). Tyto maltózou redukováné nanočástice stříbra jsou téměř monodisperzní s průměrnou velikostí částic okolo 28 nm. Takto připravené nanočástice stříbra byly charakterizovány UV/Vis absorpční spektroskopii s maximem absorpčního pásu při vlnové délce 410 nm. Připravená vodná disperze nanočástic stříbra vykazuje dlouhou stabilitu po dobu několika měsíců až let bez jakýchkoliv známek agregace a to i bez přidaných stabilizujících činidel [63].

3.2 Aktivace nanočástic stříbra a jejich charakterizace

Pro vlastní použití nanočástic stříbra v SERS experimentech byla jejich vodná disperze aktivována přidavkem roztoku chloridu sodného o různých výsledných koncentracích. Průběh změny parametrů aktivovaných stříbrných nanočástic chloridovými ionty byl sledován na základě měření průměrné velikosti částic metodou DLS a zaznamenáváním UV/Vis absorpčních spekter. V obou případech byl postup následující: 0,4 ml zásobního roztoku nanočástic stříbra bylo naředěno 1,20 ml – 1,55 ml destilované vody a následně přidáno 0,050 ml – 0,400 ml 1 mol/l nebo 4 mol/l vodného roztoku chloridu sodného tak, aby výsledný objem činil 2 ml. Okamžitě, po přidavku chloridových iontů k vodné disperzi nanočástic stříbra, byla

reakční směs řádně promíchána a během pár vteřin spuštěno měření. V případě měření průměrné velikosti aktivovaných částic metodou DLS byla po dobu 30 minut každou minutu změřena hodnota velikosti částic a zaznamenána. Při sledování kinetiky aktivace nanočástic stříbra pomocí UV/Vis spektroskopie probíhala analýza taktéž po dobu 30 minut, kde každou 20. sekundu bylo zaznamenáno spektrum proti čisté destilované vodě v rozsahu vlnových délek 350 nm – 800 nm.

Jako přímá metoda pozorování průběhu změny velikosti a tvaru nanočástic stříbra po přidavku chloridových iontů byla zvolena transmisní elektronová mikroskopie. V tomto případě byl ale vzorek odebrán pouze v čase 15 minut od přidavku aktivačního činidla k disperzi nanočástic stříbra. Odebraný vzorek byl naředěn desetinásobným množstvím destilované vody za účelem pozastavení probíhající reakce a teprve pak nanesen na měděnou podložní síťku s napařenou uhlíkovou vrstvou.

3.3 Příprava magnetického SERS biosenzoru pro diagnostiku infekce kloubních náhrad

Na základě získaných výsledků, jež budou diskutovány v kapitole 4.1, byla k této studii použita disperze nanočástic připravených redukcí amoniakálního komplexu stříbra maltózou aktivovaná 1M NaCl (výsledná koncentrace 200 mmol/l), která byla přikápnuta k biofunkcionalizovaným magnetickým částicím těsně před samotnou SERS analýzou bakteriálních vzorků.

3.3.1 Imobilizace streptavidinu na magnetické nanočástice

K navázání biologicky aktivních molekul na povrch magnetických nanočástic s využitím specifických interakcí je nezbytná funkcionalizace jejich povrchu prostřednictvím vhodných funkčních skupin (např. COOH, NH₂, SH). Jelikož byly využity komerčně dostupné vhodně povrchově modifikované magnetické nanočástice s karboxylovými skupinami, odpadla při přípravě magnetického SERS biosenzoru nutnost tohoto prvního kroku funkcionalizace. Imobilizace streptavidinu (Strep) na povrch magnetických nanočástic s funkčními karboxylovými skupinami (MNP)

probíhala následovně: bylo odebráno 0,5 ml ze zásobní disperze MNP (18-22 mg/ml) a pomocí vnějšího magnetu separovány z disperze a třikrát promyty destilovanou vodou. Funkční karboxylové skupiny na těchto magnetických nanočásticích byly nejprve aktivovány přidavkem 1 ml směsi 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) a N-hydroxysulfosukcinimid (NHS) (1:1, výsledná koncentrace obou reakčních složek byla $0,010 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) k pevnému promytému podílu MNP a míchány na magnetické míchače po dobu 45 min. Poté byly MNP třikrát promyty fosfátovým pufrem o pH 7,5. V dalším kroku bylo k pevnému podílu MNP, který byl odseparován přiložením vnějšího magnetického pole, přidáno 5 ml roztoku streptavidinu o koncentraci 1 mg/l a necháno po dobu 2 hodin míchat za účelem vytvoření kovalentní vazby mezi volnými amino skupinami ($-\text{NH}_2$) přítomnými ve struktuře streptavidinu a aktivovanými karboxylovými skupinami na povrchu MNP. Poté byly opět magnetické nanočástice s navázaným streptavidinem (MNP@Strep) třikrát promyty fosfátovým pufrem, přičemž byly vymyty nenavázané molekuly streptavidinu.

3.3.2 Funkcionalizace povrchu magnetických nanočástic protilátkou

Imobilizace biotinylované myší monoklonální protilátky na protein A (anti-IgA), který je přítomný v buněčné stěně bakterie *Staphylococcus aureus*, či imobilizace biotinylované králičí polyklonální protilátky na stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A (anti-APS), která je přítomna u bakterie *Streptococcus pyogenes*, na povrch magnetických nanočástic se streptavidinem, byla prováděna následujícím postupem: k pevnému podílu magnetických nanočástic (18-22 mg/ml) modifikovaných streptavidinem byl přidán 1 ml buď protilátky anti-IgA, a nebo 1 ml protilátky anti-APS (výsledná koncentrace obou protilátek byla 10 mg/l) a následovala hodinová inkubace za účelem vytvoření nekovalentní interakce mezi streptavidinem a biotinylovanou částí protilátky. Po dostatečném promytí fosfátovým pufrem bylo nutné zablockovat zbytek volných aktivních karboxylových skupin přidavkem 3,5% vodného roztoku ethylaminu. Takto připravený magnetický biosenzor (MNP@Strep@anti-IgA či MNP@Strep@anti-APS) byl stabilní po dobu zhruba dvou měsíců.

3.4 Příprava bakteriálních vzorků

3.4.1 Příprava modelových vzorků

Vývoj magnetického SERS biosenzoru pro včasnou detekci infekce kloubní náhrady byl prováděn na modelových vzorcích bakteriálních lyzátů *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* ve fyziologickém roztoku. K přípravě bakteriálního lyzátu byla použita dvacetičtyřhodinová kultura *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Streptococcus pyogenes* (vlastní bakteriální kmen č. SP12 z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého). Dobře izolované kolonie byly převedeny do 5 ml Mueller-Hintonova (HiMedia) bujónu, aby výsledný zákal odpovídal zákalovému standardu 1 podle McFarlanda (hustota buněk přibližně 3×10^8 CFU/ml). Bakteriální suspenze byla kultivována při 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byl bujón centrifugován (2000 otáček/10 minut), supernatant slit a k sedimentu bylo přidáno 10 ml destilované vody. Promíchaná suspenze byla střídavě zmrazována při teplotě -72 °C po dobu 10 minut a rozmrazována ve vodní lázni při teplotě 37 °C celkem desetkrát. Tímto způsobem byly připraveny bakteriální lyzáty, které byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

3.4.2 Příprava biologických vzorků

Testování magnetického SERS biosenzoru pro včasnou detekci infekce kloubní náhrady bylo prováděno se sterilními kloubními výpotky získanými punkcí z kolene od pacientů trpících osteoartrózou. Sterilita punktátu byla vždy dopředu ověřena naočkováním na krevní agar (Trios, Ltd) a do Mueller-Hintonova (HiMedia) bujónu, což bylo prováděno na specializovaném pracovišti Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého pod vedením prof. MUDr. Milana Koláře, Ph.D. Z punktátu od každého pacienta byly dodány tři typy vzorků: punktát homogenizovaný 1:1 s živou bakteriální kulturou *Staphylococcus aureus*, dále punktát homogenizovaný 1:1 s živou bakteriální kulturou *Streptococcus pyogenes* a sterilní kloubní punktát (dále pak označováno jako SJF z angl. *sterile joint fluid*), který sloužil jako negativní kontrola pro SERS experimenty.

Odběr a zpracování kloubního punktátu bylo prováděno s povolením etické komise Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci v souladu s českou legislativou. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před zařazením do studie.

3.5 Příprava vzorků pro experimenty povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie

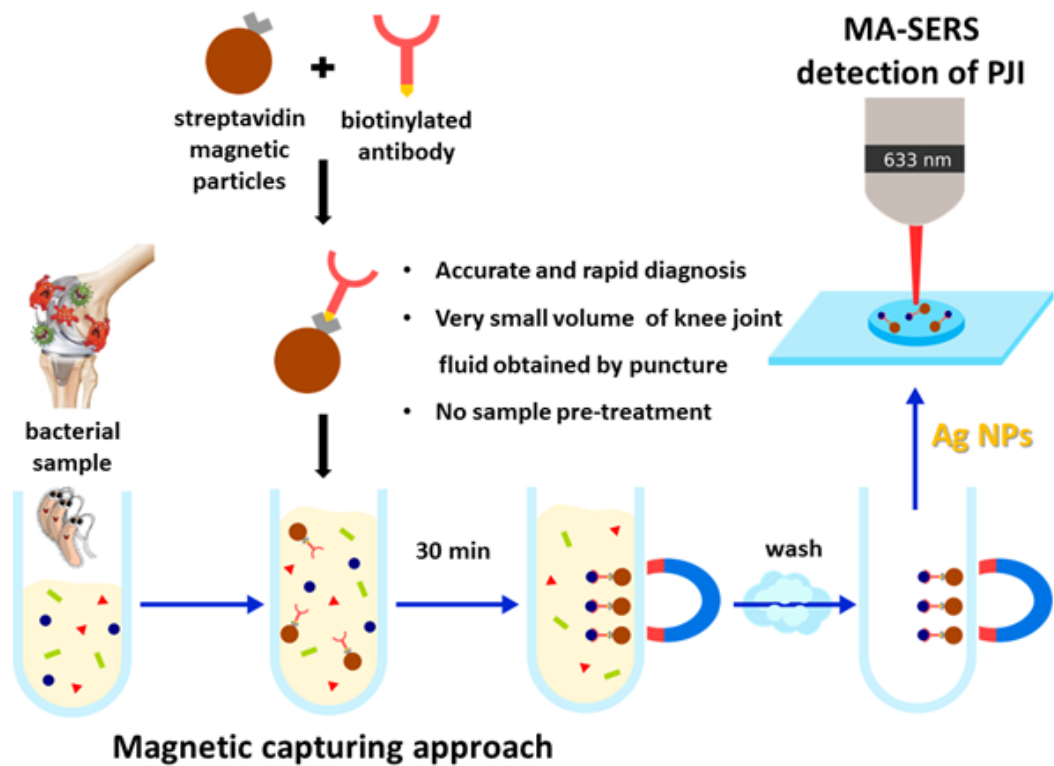
3.5.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách

V rámci první fáze této disertační práce byl proveden výzkum zaměřený na studium vlivu aktivace vodné disperze nanočástic stříbra chloridovými ionty a nalezení optimálního postupu, kterým lze dosáhnout největšího zesílení Ramanova signálu. Pro tyto SERS experimenty byla připravena řada disperzí nanočástic stříbra s lišící se výslednou koncentrací chloridu sodného, jakožto aktivačního činidla, které byly připraveny následovně: 0,4 ml zásobního roztoku nanočástic stříbra bylo naředěno 1,18 ml – 1,53 ml destilované vody a následně přidáno 0,050 ml – 0,400 ml 1 mol/l nebo 4 mol/l vodného roztoku chloridu sodného. Nakonec bylo k takto upraveným nanočásticím stříbra přidáno 20 μ l 0,001 mol/l adeninu (výsledná koncentrace adeninu pak byla $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tak, aby výsledný objem činil 2 ml, a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Pro měření závislosti SERS zesílení na vlnové délce excitačního zdroje pro různé morfologie nanočástic byla jako modelová látka zvolen adenin a to z jednoho prostého důvodu. Adenin, jakožto purinová báze, má velmi efektivní Ramanův rozptyl a zároveň se dobře adsorbuje na povrch stříbrných nanočástic. Tento výše uvedený pracovní postup byl stejný pro všechny tři použité excitační vlnové délky. Určení faktorů zesílení signálu Ramanova rozptylu pro jednotlivé systémy pak bylo vypočteno z poměru intenzit SERS signálu $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l adeninu k standardnímu Ramanovu signálu 0,1 mol/l adeninu pro intenzivní pás při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$.

3.5.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS

Bakteriální lyzáty a živé bakteriální kultury (*Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*) byly připraveny výše popsaným postupem (5.6). MA-SERS analýza reálné matrice kloubního punktátu inokulovaného živými bakteriálními buňkami probíhala po jejím desetinásobném naředění deionizovanou vodou z důvodu změny viskozity vzorku. Vzorky, ať už bakteriálních lyzátů či kloubních punktátů s živými bakteriálními kulturami, byly připraveny pro MA-SERS analýzu následujícím postupem: v mikrozkuhavce typu eppendorf bylo smícháno 10 μ l MNP@Strep nanočástic konjugovaných biotinylovanou protilátkou buď na protein A nebo na streptokokovou stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A s 10 μ l analyzovaného bakteriálního vzorku a ponecháno inkubovat po dobu 30 minut. Tato reakční směs pak byla převedena na podložní sklíčko, kde působením vnějšího magnetického pole došlo k odseparování alikvótního množství magnetického komplexu od zbytků matrice vzorku. Dále pak bylo k tomuto oddělenému množství pevného magnetického podílu přikápnuto 8 μ l vodné disperze Ag NPs (~28 nm), která byla následně aktivována přídatkem 2 μ l 1 mol/l vodného roztoku NaCl. Po promíchání ve špičce automatické pipety byla, po přiložení vnějšího magnetického pole k podložnímu sklíčku, vytvořena na okraji kapky sraženina magnetického biosensoru, která byla analyzována SERS technikou bezprostředně před vysušením. Schematické přiblížení výše popsaného postupu SERS detekce je na Obr. 2.

Měření a zpracování vibračních spekter bylo provedeno pomocí softwaru OMNIC 8.2.0.403 (Thermo Fisher Scientific Inc.). K vyhodnocení experimentálních dat a vibračních spekter byly použity následující programy: QtiPlot 0.9.8.3 a Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení experimentálních dat a jejich grafické znázornění v podobě diskriminační analýzy pak bylo provedeno pomocí softwaru TQ Analyst 8.4.257 (Thermo Fisher Scientific).



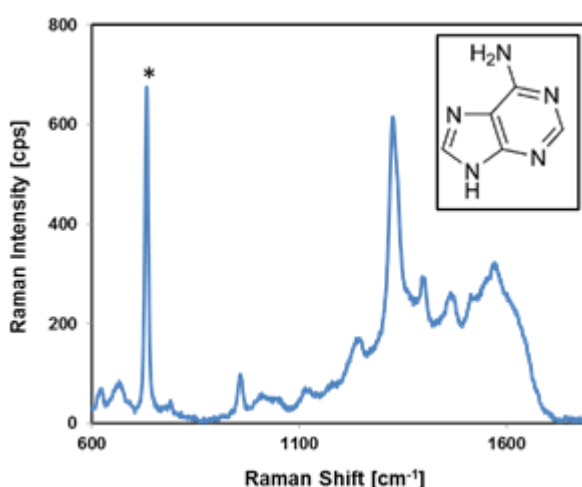
Obr. 2: Schematické znázornění MA-SERS detekce bakteriálních patogenů. Ilustrace autora [64].

4. Výsledky a diskuze

4.1 Vliv různé koncentrace chloridových iontů na transformaci nanočástic stříbra a jejich využití v SERS při rozdílných excitačních vlnových délkách

V naší předešlé studii [63] bylo dokázáno, že vysoká koncentrace vodného roztoku NaCl (výsledná koncentrace 400 mmol/l) je velmi účinná pro SERS aktivaci maltózových nanočástic stříbra (~28 nm). Tato vysoká koncentrace chloridových iontů vedla k rychlé rekrytalizaci primárních nanočástic stříbra na částice s průměrnou velikostí okolo 400 nm, které byly velmi efektivní pro zesílení Ramanova signálu adeninu při použití excitačních laserů s vlnovými délkami jak ve viditelné (488 nm), tak blízké infračervené (1064 nm) oblasti spektra. Tato základní studie byla prohloubena dalším originálním výzkumem zaměřeným na hlubší pochopení role Ag NPs při zesílení Ramanova signálu po aktivaci chloridovými ionty. Nová studie se tak zabývá účinkem různě koncentrovaných chloridových iontů jak na fyzikální parametry částic stříbra, tak i na zesílení Ramanova signálu těmito částicemi. K těmto experimentům posloužily nanočástice stříbra (~28 nm) připravené redukcí Ag^+ v amoniakálním prostředí maltózou o koncentraci 0,05 mol/l. Pro vlastní použití v SERS experimentech byla jejich vodná disperze, před přidáním roztoku adeninu o výsledné koncentraci 10^{-5} mol/l, aktivována (agregována) přidavkem roztoku chloridu sodného. Experimenty byly prováděny s řadou šesti různých výsledných koncentrací chloridových iontů (25, 50, 100, 200, 400, 800 mmol/l) ve vodné disperzi nanočástic stříbra a se třemi rozdílnými excitačními lasery (532 nm, 633 nm, 780 nm). Proces aktivace nanočástic stříbra vodným roztokem chloridu sodného byl sledován na základě měření průměrné velikosti částic metodou DLS a zaznamenávání absorpčních UV/Vis spekter. Změna průměrné velikosti částic stříbra měřená pomocí DLS, a stejně tak UV/Vis spektra, byla zaznamenávána v minutových intervalech po dobu 30 minut za účelem sledovat probíhající proces transformace primárních nanočástic stříbra. Dále pak částice stříbra byly blíže charakterizovány transmisí elektronovou mikroskopií, kdy se v čase 15 minut od přidavku roztoku NaCl odebraly vzorky pro TEM. V případě SERS měření

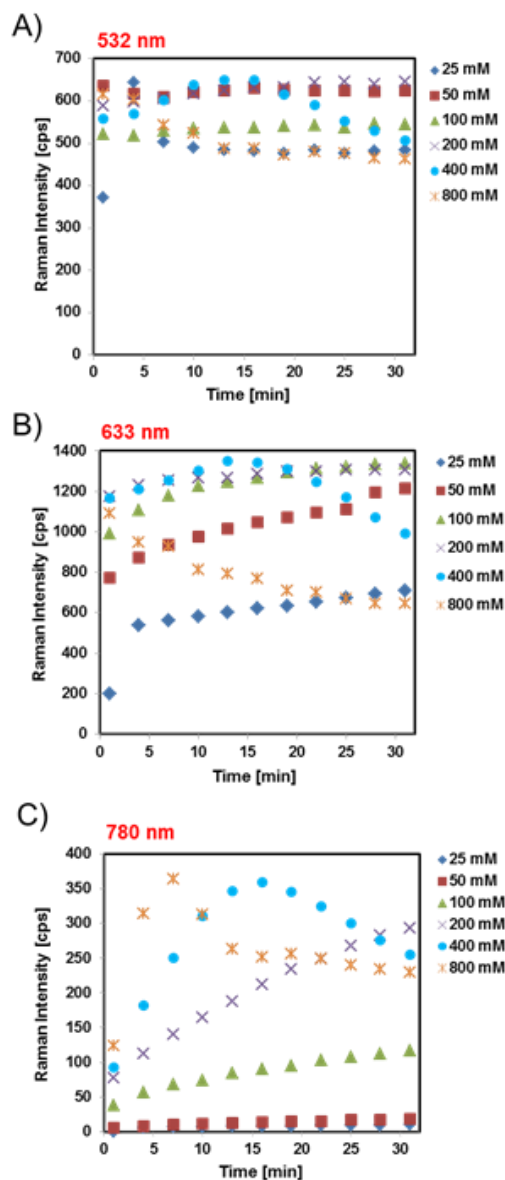
byla spektra zaznamenávána v třiminutovém intervalu po dobu 30 minut od přidavku roztoku NaCl. Spektru adeninu dominuje vibrace dýchacího kruhu, proto se v dalších odstavcích pro zjednodušení porovnání a zhodnocení intenzity SERS signálu zaměříme pouze na tento typický pás ležící při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$. Intenzity dalších molekulových vibrací adeninu se měnily úměrně k intenzitě tohoto hlavního pásu $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$. Na obrázku 3 si můžeme všimnout, že tento pás (označený hvězdičkou) je nejintenzivnější z celého SERS spektra a pochází od vibrace dýchacího řetězce ve struktuře adeninu (vložený obrázek v Obr. 3).



Obr. 3: SERS spektrum adeninu a strukturní vzorec jeho molekuly. Převzato z [65].

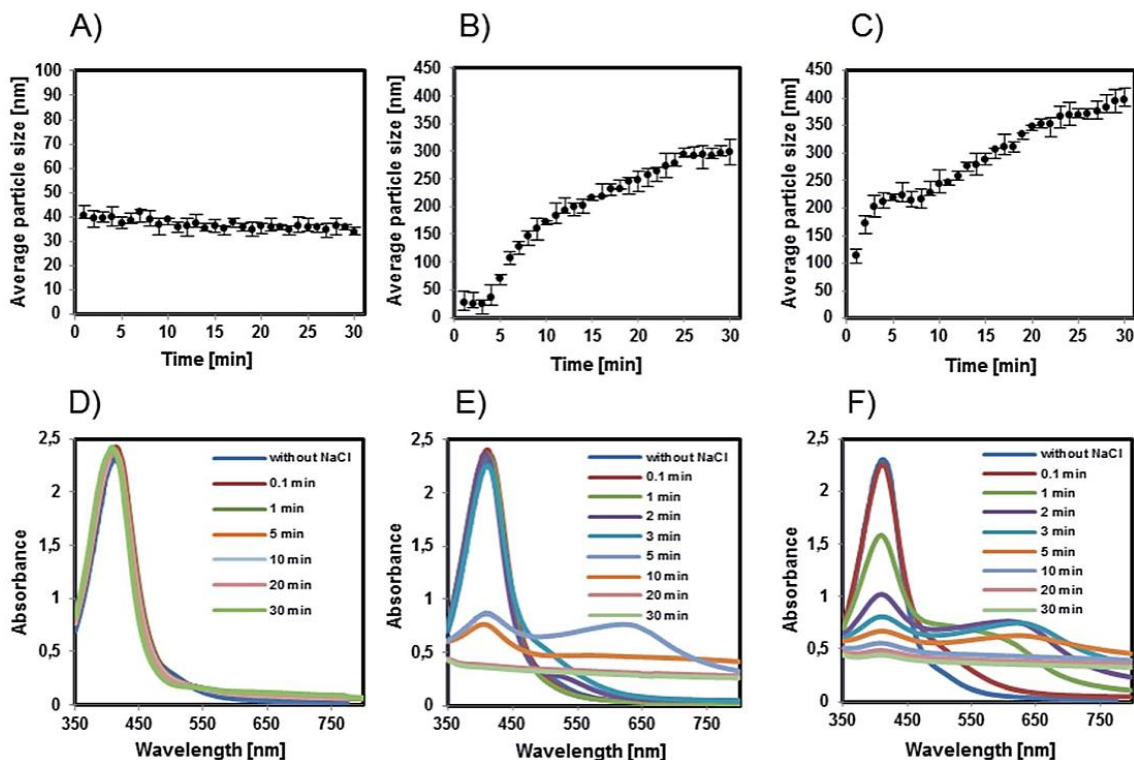
SERS měření byla prováděna s excitačními vlnovými délkami 532 nm, 633 nm a 780 nm. Profil časových závislostí intenzit SERS signálu vibrace dýchacího kruhu adeninu při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$ po přidavku chloridových iontů je znázorněna na obrázku 4. Pro excitační vlnovou délku 532 nm byly pozorovány pouze malé změny v intenzitách SERS signálu mezi jednotlivými systémy s lišícími se koncentracemi chloridových iontů (Obr. 4A). Srovnáme-li účinek všech použitých výsledných koncentrací NaCl, lze pozorovat zhruba 20% rozdíly v intenzitách pásu adeninu při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$. V případě excitace při 633 nm, zde můžeme pozorovat značné rozdíly v intenzitách SERS signálu adeninu mezi jednotlivými koncentracemi NaCl (Obr. 4B). Nejvyššího zesílení Ramanova signálu bylo dosaženo s disperzí nanočástic stříbra aktivovaných roztokem

NaCl o výsledné koncentraci 400 mmol/l. Naopak, hodnoty intenzit SERS signálu získané pro laser 780 nm byly značně nižší oproti excitaci s vlnovou délkou 532 nm a 633 nm (Obr. 4C). Porovnáním intenzit SERS signálu z těchto měření a standardního Ramanova signálu roztoku adeninu o koncentraci 0,1 mol/l pak vychází celkové faktory zesílení Ramanova signálu přibližně $7,2 \times 10^4$ pro laser 532 nm, $2,0 \times 10^5$ pro laser 633 nm, a $2,4 \times 10^5$ pro laser 780 nm.



Obr. 4: Profil časových závislostí intenzit SERS signálu vibrace dýchacího kruhu adeninu při $\sim 734 \text{ cm}^{-1}$ po přidavku chloridových iontů při excitačních vlnových délkách 532 nm (A), 633 nm (B) a 780 nm (C). Legenda popisuje výsledné koncentrace roztoku NaCl ve vodné disperzi částic stříbra. Převzato z [65].

Z vynesných závislostí na obrázku 4 je evidentní, že intenzity SERS signálu, v případě použití excitačního laseru 532 nm, téměř nezávisí na koncentraci chloridových iontů použitých k aktivaci. U excitačního laseru s vlnovou délkou 633 nm jsou již zřetelné odlišnosti, které jsou pak nejvýraznější u laseru 780 nm, kde nejnižší koncentrace NaCl použité k aktivaci poskytují jen velmi malé zesílení Ramanova signálu adeninu. Možné vysvětlení poměrně vysokých intenzit SERS signálu pro lasery 532 nm a 633 nm dosažených s využitím aktivace pomocí roztoku NaCl o nejnižší výsledné koncentraci 25 mmol/l leží v existenci tzv. „hot spot“ míst [66]. Taková koncentrace chloridových iontů může vyvolat dočasné přiblížení částic stříbra v roztoku na určitou velmi malou vzdálenost, která je zcela klíčovou záležitostí pro vytvoření aktivních míst podstatných pro zesílení Ramanova signálu. Naopak, při excitaci s vlnovou délkou 780 nm jsme u takto nízké koncentrace chloridových iontů nepozorovali žádný nárůst intenzity SERS signálu. Tento přírůstek chloridových iontů nevyvolal dostatečný vliv na transformaci Ag NPs, čímž pádem povrchový plasmon těchto nanočástic byl mimo rezonanci s excitační vlnovou délkou při 780 nm. Jak už bylo výše zmíněno, v těchto experimentech se vycházelo z nanočástic o průměrné velikosti 28 nm. Z obrázku 5A je patrné, že ihned po přidavku roztoku NaCl o výsledné koncentraci 25 mmol/l došlo ke změně průměrné velikosti částic z počáteční hodnoty 28 nm na 40 nm. S dalším narůstajícím časem pak průměrná velikost částic postupně klesala. Toto pozorování lze vysvětlit tak, že došlo k dočasnému přiblížení dvou či více Ag NPs, které mělo vliv na mírný nárůst průměrné velikosti částic zaznamenávané v minutových intervalech metodou DLS. Nicméně na základě pozorování UV/Vis spekter a TEM snímků lze usuzovat, že takto nízká koncentrace NaCl neměla vliv na parametry nanočástic. Z UV/Vis spekter (Obr. 5D) zaznamenaných po přidavku NaCl o koncentraci 25 mmol/l lze usuzovat, že nedochází ke změně pozice absorpčního maxima během celého procesu měření, jelikož změna průměrné velikosti částic byla jen velmi nepatrná. Nicméně slabý nárůst absorpce při vyšších vlnových délkách byl přeci jen pozorován. Tyto výsledky byly následně podpořeny TEM analýzou téhož systému, ze kterého byl odebrán vzorek v 15. minutě od přidavku NaCl k disperzi Ag NPs (Obr. 7A).

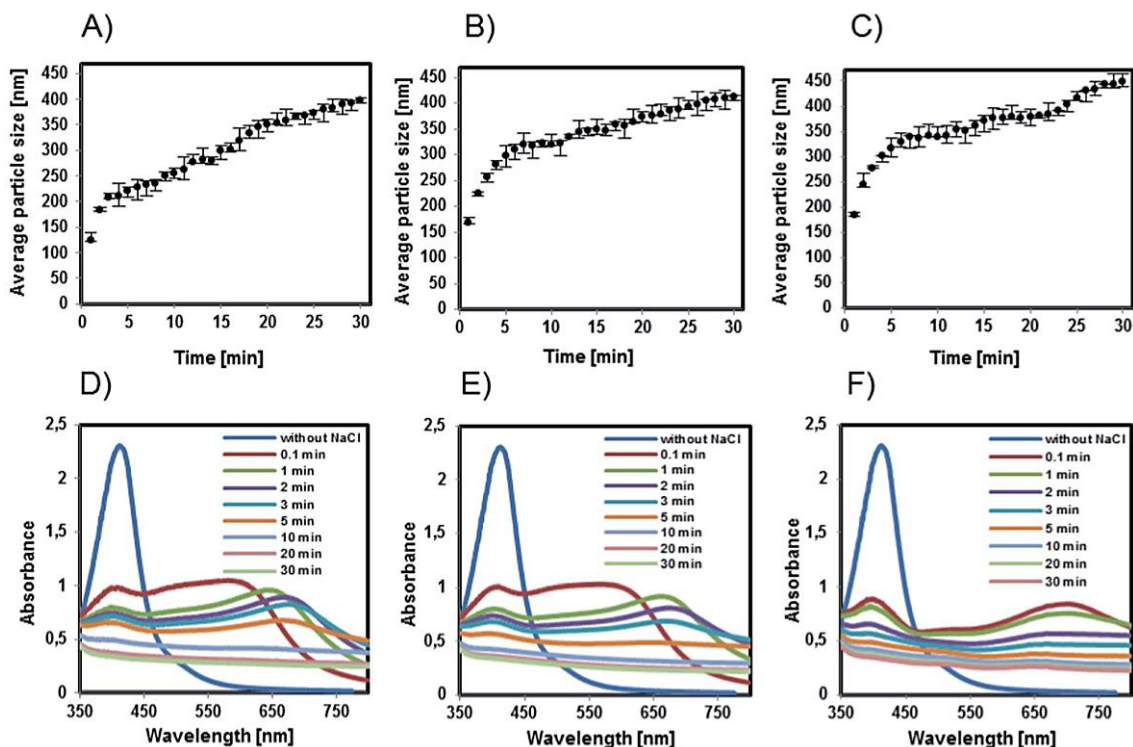


Obr. 5: Graf závislosti velikosti částic stříbra A) – C) a jejich příslušných UV/Vis spekter D) – F) na čase od přidavku chloridových iontů do systému o výsledné koncentraci 25 mmol/l, 50 mmol/l a 100 mmol/l. Chybové úsečky představují rozmezí hodnot (nejmenší a nejvyšší), které byly získány během třech nezávislých měření. Legenda popisuje uplynulý čas od přidavku chloridových iontů. Převzato z [65].

Poněkud odlišná závislost byla získána při aktivaci vodné disperze Ag NPs chloridovými ionty o výsledné koncentraci 50 mmol/l, kde byly pozorovány od samého začátku vyšší hodnoty intenzit SERS signálu při excitační vlnové délce 532 nm, které byly stabilní během celého třicetiminutového experimentu (Obr. 4A). V případě excitačního laseru 633 nm došlo ke značnému nárůstu intenzit SERS zesílení během prvních pár minut po přidavku NaCl k disperzi nanočástic stříbra (Obr. 4B). S dalším narůstajícím časem, respektive narůstající průměrnou velikostí částic, se pak úměrně měnila i intenzita SERS signálu. To však neplatí pro systém s excitační vlnovou délkou při 780 nm, u něhož byl zaznamenán pouze nepatrný nárůst intenzit SERS signálu (Obr. 4C). Tento jev může být vysvětlen na základě značných změn velikosti částic

zapříčiněných přidávkem 50 mmol/l chloridových iontů k Ag NPs (Obr. 5B). Po třetí minutě od přidavku NaCl byl pozorován obrovský nárůst velikosti částic. Tento nárůst byl patrný až do 25. minuty aktivačního procesu, kde průměrná velikost částic vzrostla až k 300 nm. Tyto změny byly současně potvrzeny i pořízeným TEM snímkem (Obr. 7B), který odhalil přítomnost větších částic. Navíc, celý tento proces aktivace primárních částic stříbra byl doprovázen výraznou změnou zabarvení reakčního systému z hnědé na šedou. Tyto změny indikující vznik větších částic byly následně potvrzeny UV/Vis spektry, jak je vidět na obrázku 5E. Povrchový plasmon původních Ag NPs s maximem absorbance při 410 nm je typický pro primární částice o velikostech okolo 28 nm bez přidaného roztoku NaCl. Po třetí minutě od přidavku chloridových iontů k vodné disperzi nanočástic stříbra byl zaznamenán pokles tohoto maxima a zároveň v ten samý okamžik se objevil druhý pík s plasmonovým maximem v oblasti 640 nm. Tyto poznatky potvrdily, že takto upravené Ag NPs jsou při excitaci 532 nm a 633 nm v rezonanci s povrchovým plasmonem. Naopak při excitaci 780 nm je efekt povrchového zesílení téměř nulový, z důvodu slabého účinku této koncentrace NaCl na změnu vlastností (změnu ve tvaru nanočástic či agregační stav) původních Ag NPs.

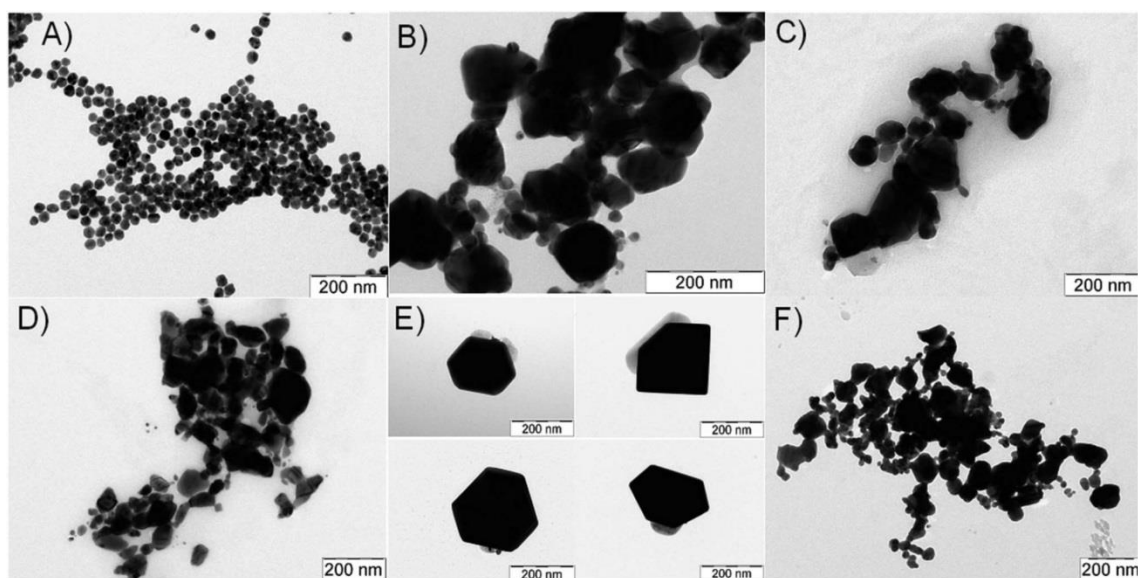
Při excitaci s vlnovou délkou 780 nm není tento typ laseru v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii příliš rozšířen, jelikož se k tomuto účelu používají především SERS substráty na bázi koloidního stříbra mající maximum absorbance povrchového plasmonu nižší, než výše zmíněná excitační vlnová délka 780 nm. Je všeobecně známo, že vlnová délka povrchového plasmonu se posouvá do dlouhovlnné oblasti spektra s rostoucí velikostí kovových částic. Dá se tedy očekávat, že poloha tohoto maxima bude v rezonanci s vlnovou délkou budícího laserového záření a bude tak dosaženo nejlepšího zesílení Ramanova signálu. Běžně používané nízké koncentrace chloridových iontů (v jednotkách mmol/l) nejsou zdaleka tak účinné ke změnám parametrů Ag NPs, aby došlo k zesílení Ramanova signálu s použitím budícího záření delších vlnových délek. Nicméně jak jsme pozorovali v předešlé naší studii, přidávek vysoce koncentrovaného roztoku NaCl (stovky mmol/l) k maltóзовé disperzi nanočástic stříbra zajistil reprodukovatelný SERS-aktivní povrch s efektivním zesílením Ramanova signálu adeninu jak ve viditelné (488 nm), tak blízké infračervené (1064 nm) oblasti spektra [63].



Obr. 6: Graf závislosti velikosti částic stříbra A) – C) a jejich příslušných UV/Vis spekter D) – F) na čase od přidavku chloridových iontů do systému o výsledné koncentraci 200 mmol/l, 400 mmol/l a 800 mmol/l. Chybové úsečky představují rozmezí hodnot (nejmenší a nejvyšší), které byly získány během třech nezávislých měření. Legenda popisuje uplynulý čas od přidavku chloridových iontů. Převzato z [65].

Při zvýšení výsledné koncentrace roztoku NaCl na 100 mmol/l a 200 mmol/l jsme pozorovali pro obě koncentrace podobnou závislost změn vlastností Ag NPs na přidavku NaCl do systému, s výjimkou vyšších intenzit Ramanova signálu pro 200 mmol/l NaCl. Co se týče budícího záření s excitační vlnovou délkou při 532 nm, zde byly hodnoty intenzit SERS signálu pro obě koncentrace po celou dobu analýzy stabilní (Obr. 4A). U obou koncentrací NaCl nebyly pozorovány žádné významné změny v intenzitách SERS signálu po dobu měření s excitační vlnovou délkou 633 nm (Obr. 4B); při aktivaci 200 mmol/l NaCl bylo dosaženo stabilních hodnot zesíleného Ramanova signálu během celé sledované doby, v případě 100 mmol/l NaCl intenzita signálu mírně narůstala. Naopak pro laser 780 nm, v případě 100 mmol/l NaCl hodnota intenzit SERS signálu vzrostla dvojnásobně, v případě 200 mmol/l NaCl čtyřnásobně (Obr. 4C). Sledováním korelace mezi DLS hodnotami, UV/Vis spektry a změnou

morfologie Ag NPs pozorovanou v TEM snímcích (Obr. 7C a D) lze usuzovat, že tyto chloridové koncentrace vyvolaly změny v rozměrech částic za současného vzniku jak malých, tak větších částic stříbra v důsledku rozpouštění původních Ag NPs a jejich následnou rekrystalizaci v přítomnosti obou takto koncentrovaných chloridových iontů. Průměrná velikost těchto částic u obou systémů vzrostla z desítek nanometrů na stovky nanometrů (Obr. 5C a 6A). Většina změn se projevila během prvních pár minut od přidavku chloridových iontů. U obou systémů došlo během 30 minut k potlačení extinkčního maxima při 410 nm a zároveň byla patrná zvýšená absorbance v oblasti 650 nm odpovídající právě buď agregátům, či zvětšeným rozměrům částic (Obr. 5F a 6D). Na základě těchto poznatků lze usuzovat, že docházelo k postupným změnám v průměrné velikosti Ag NPs [63] či jejich morfologie [67]. Jakmile vzrostla průměrná velikost částic, jejich povrchový plasmon byl v rezonanci s použitými excitačními vlnovými délkami, a tím pádem se dalo očekávat vyšších intenzit zesíleného Ramanova signálu. Všechny tyto charakteristické změny byly doprovázeny i výraznou změnou zabarvení reakčního systému z hnědé na šedou.



Obr. 7: TEM snímky částic stříbra po 15 minutách od přidavku chloridových iontů do systému o výsledné koncentraci 25 mmol/l (A), 50 mmol/l (B), 100 mmol/l (C), 200 mmol/l (D), 400 mmol/l (E) a 800 mmol/l (F). Převzato z [65].

Povrch nanočástic byl dále aktivován účinkem 400 mmol/l NaCl, které měly vliv na největší zesílení Ramanova signálu pro všechny tři použité excitační vlnové délky napříč všemi koncentracemi aktivačního činidla. Po 3 minutách od přidavku NaCl k Ag NPs vzrostla průměrná velikost částic až k 400 nm. Během 15 minut od přidavku 400 mmol/l NaCl k disperzi Ag NPs došlo k postupnému navýšení intenzit SERS signálu (Obr. 4A – C). Toto lze přisuzovat k nárůstu velikosti částic Ag způsobené přítomností vysoce koncentrovaných chloridových iontů, kde jsme pozorovali Ag částice o velmi dobře definovaných tvarech, odebraných ze systému pro TEM analýzu v 15. minutě od přidavku NaCl (Obr. 7E). Po výše zmíněném čase došlo k poklesu SERS signálu modelového analytu, což je pravděpodobně spojeno se snížením dostupného povrchu Ag částic nezbytného pro naadsorbování molekul adeninu, z důvodu agregace Ag NPs, jak je dokumentováno na Obr. 6B [68]. Nárůst průměrné velikosti částic s časem, a stejně tak značný posun UV/Vis extinkčního maxima do červené oblasti spektra (Obr. 6E), umožňuje sledovat kinetiku přeměny částic, která byla taktéž doprovázena výraznou změnou zabarvení reakčního systému z hnědé na šedou.

Na závěr si všimněme, co se děje se SERS signálem adeninu při aktivaci povrchu nanočástic stříbra 800 mmol/l NaCl. Poněkud odlišná závislost byla získána pro excitační vlnové délky 532 nm a 633 nm, kde byly pozorovány klesající intenzity SERS signálu adeninu ihned po přidavku NaCl k vodné disperzi Ag NPs (Obr. 4A a B). Jedno z možných vysvětlení, proč došlo ke snížení intenzit pozorovaného SERS signálu tkví především v konkurenčním boji mezi chloridovými ionty a molekulami adeninu o povrch Ag NPs [69]. Na základě výsledků je vidět, že již v 7. minutě od přidavku roztoku NaCl k Ag NPs pozorujeme maximální intenzitu SERS signálu adeninu v případě excitační vlnové délky při 780 nm. Jeho signál však následně významně klesal (Obr. 4C). I v tomto případě byla prováděna DLS měření, která odhalila značný růst průměrné velikosti částic až na 450 nm (Obr. 6C), což bylo v souladu s příslušnými UV/Vis spektry, kde v první minutě experimentu došlo k poklesu a rozšíření maxima při 410 nm a zároveň k nárůstu absorbance při 700 nm (Obr. 6F). Následná agregace částic vedla k destabilizaci vodné disperze, což se projevilo úplným potlačením obou UV/Vis maxim. Současný pokles a posun UV/Vis maxim do červené oblasti spektra bylo

výraznější, než u předešlých nižších koncentrací NaCl, což nám potvrdil i TEM snímek těchto modifikovaných částic (Obr. 7F). Z důvodu přerůstání Ag NPs a agregačního mechanismu aktivačního procesu takového rozsahu, jsme se dostali mimo rezonanci excitačních vlnových délek, a v důsledku toho jsme opět pozorovali změnu zbarvení reakčního systému z hnědé na šedou. Z důvodu velmi silné agregátní a sedimentační nestability pokleslo množství SERS-aktivních Ag NPs ve vodné disperzi, kde podle předpokladu docházelo s rostoucím časem ke snížení intenzit Ramanských signálů.

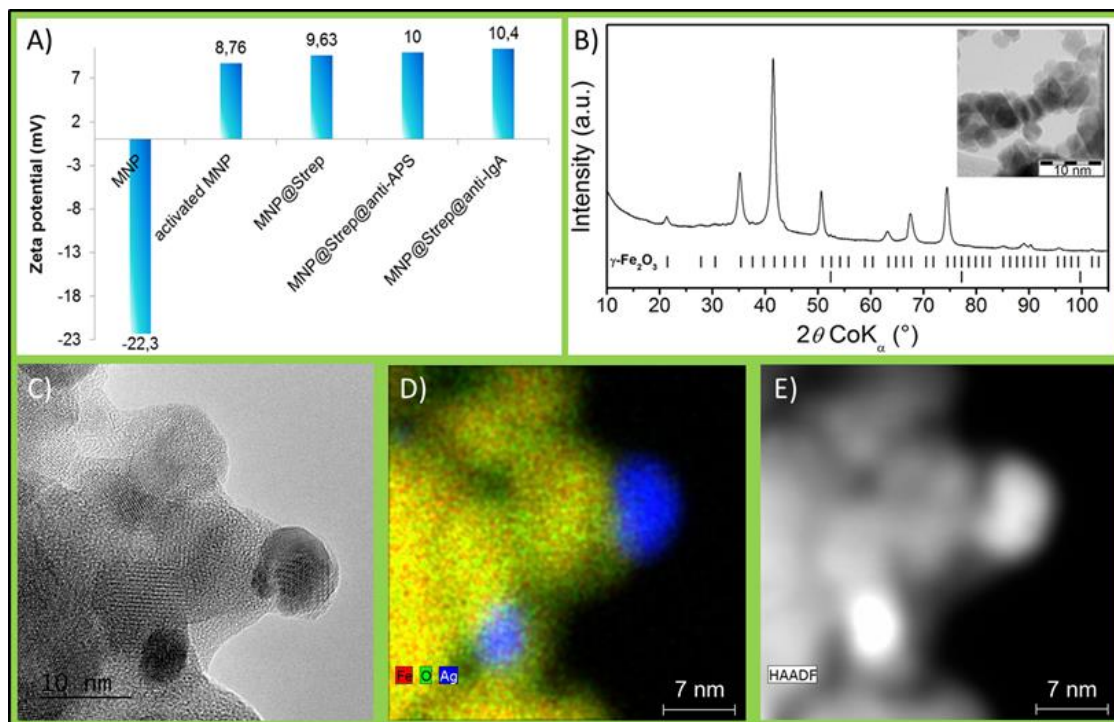
Výsledky z této kapitoly byly v roce 2015 publikovány v časopise *RSC Advances* a autorka disertační práce je první ze šesti autorů tohoto původního článku.

4.2 Diagnostika infekce kloubních náhrad metodou MA-SERS

Předmětem studia v této práci byla včasná detekce a identifikace bakteriálních patogenů *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* přítomných ve vzorcích kloubního výpotku získaných punkcí kolene. Přítomnost kovalentně navázaného streptavidinu na povrchu magnetických částic, který vykazuje vysokou afinitu pro biotin, umožňuje jejich následnou selektivitu prostřednictvím jednoduché funkcionalizace povrchu pomocí biotinylované protilátky. K těmto experimentům byly využity dvě protilátky: protilátka na protein A [70] se používá k dosažení selektivity pro bakterii *Staphylococcus aureus*, a protilátka na streptokokovou stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A [71], které se využívá k selektivní detekci bakterie *Streptococcus pyogenes*.

Charakterizace materiálu po jednotlivých krocích chemické modifikace povrchu magnetických částic, tj. po aktivaci funkčních skupin a vzniku nových vazeb, byla provedena na základě měření jejich elektrokinetického (zeta; ζ) potenciálu. ζ -potenciály naměřené po každé povrchové úpravě jsou uvedeny v grafu na obrázku 8A. Naměřená hodnota ζ -potenciálu primárních magnetických nanočástic s volnými karboxylovými skupinami (MNP) odpovídala hodnotě -22,3 mV. Tento relativně vysoký záporný povrchový náboj je přičítán přítomnosti početných volných karboxylových skupin.

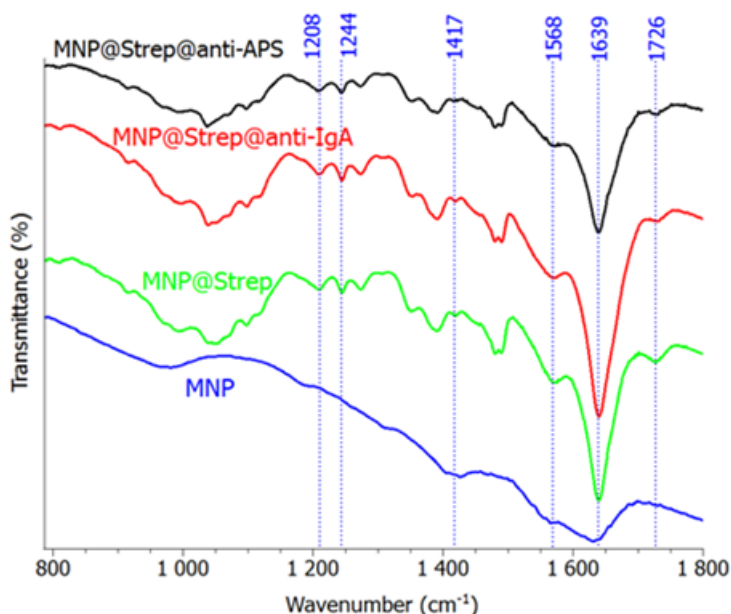
Výchozí MNP byly charakterizovány metodou RTG práškové difrakce (Obr. 8B) na rentgenovém práškovém difraktometru. Pořízený XRD záznam spektra studovaného výchozího materiálu MNP dokazuje přítomnost pouze krystalické fáze bez dalších difrakcí nebo významného podílu amorfni fáze. Analýzou difrakčního záznamu jsme zjistili hodnotu mřížkové konstanty a rovnou 0,8360 nm, kde pozorujeme mírně nestechiometrickou fázi maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), která vykazuje kubickou strukturu s částečně uspořádanými vakancemi s prostorovou grupou P4332. Rietveldova analýza difrakčních podílů naznačila, že částice maghemitu dosahují velikosti 13 nm. Závěry učiněné na základě difrakčních dat byly podpořeny i TEM snímkem výchozích MNP (vložený obrázek do Obr. 8B). Tyto výchozí magnetické nanočástice byly vybrány z důvodu přítomnosti volných karboxylových skupin na povrchu, které brání aglomeraci nanočástic a zvyšují tak jejich disperzibilitu ve vodném prostředí. Následná aktivace volných karboxylových skupin za použití vodné směsi činidel EDC a NHS byla doprovázena výrazným zvýšením ζ -potenciálu materiálu až na hodnotu 8,8 mV, což odráží úspěšnou aktivaci karboxylových funkčních skupin na povrchu MNP na reaktivní estery N-hydroxysukcinimidu. Dalším krokem byla kovalentní imobilizace streptavidinu na povrch magnetických nanočástic prostřednictvím reakce jeho koncové aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) s aktivovanými karboxylovými skupinami na povrchu MNP. Vznik kovalentní vazby se projevilo zvýšením ζ -potenciálu až na hodnotu 9,6 mV. Další krok syntézy spočíval v navázání biotinylované protilátky na streptavidin. Vznik nekovalentní vazby v komplexu streptavidin-biotin a konečné zablokování zbylých aktivovaných karboxylových skupin způsobilo malé navýšení povrchového náboje na hodnotu 10 mV, která je typická pro nanočástice nesoucí protilátku anti-APS, a stejně tak na hodnotu 10,4 mV, která byla zaznamenána v případě funkcionalizace povrchu MNP anti-IgA protilátkou. Morfologie biosenzoru byla charakterizována pomocí HRTEM, STEM-EDS a STEM-HAADF zobrazovacích technik. Při použití HRTEM analýzy MNP@Strep/Ag částic (Obr. 8C) je zřejmé, že celkový průměr, jak magnetických, tak stříbrných nanočástic se pohybuje v rozmezí 10-20 nm. Kromě toho, chemické mapování STEM-EDS (Obr. 8D) biosenzoru jasně poukazuje na přítomnost prvků jak Fe, tak Ag. Jak je znázorněno na obrázku 8E, nanočástice stříbra jsou distribuovány na povrchu maghemitu; toto je dále potvrzeno přítomností částic s různým kontrastem ve snímku STEM-HAADF (Obr. 8E).



Obr. 8: Komplexní materiálová charakterizace MA-SERS nanočástic: (A) Naměřené ζ -potenciály zaznamenané po každém kroku modifikace připraveného biosenzoru. (B) XRD spektrum výchozích magnetických nanočástic MNP (vložený obrázek vpravo nahoře představuje TEM snímek týchž MNP) se zobrazením teoreticky nejvýznamnějších difrakčních rovin maghemitu. (C) Reprezentativní HRTEM snímek modifikovaných MNP@Strep/Ag částic. (D) STEM-EDS chemické mapování (Fe, O, a Ag) modifikovaných MNP@Strep/Ag částic. (E) HAADF snímek modifikovaných MNP@Strep/Ag částic. Převzato z [64].

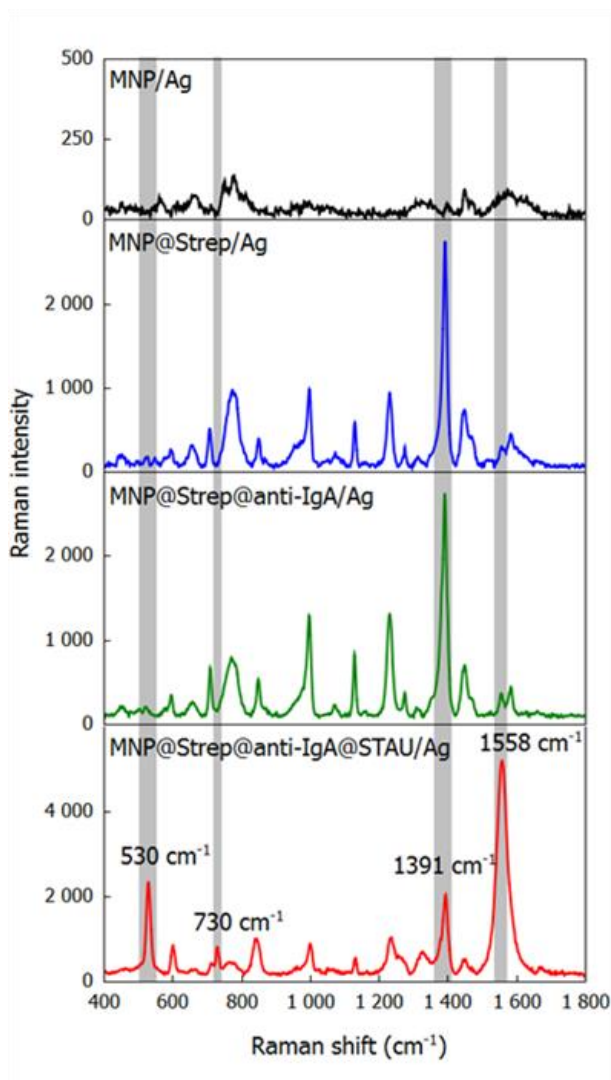
Úspěšnost syntézy MA-SERS biosenzoru byla ověřena s využitím metody infračervené spektroskopie (IR). IR absorpční spektra povrchu čistých MNP, modifikovaných streptavidinem a následně funkcionalizovaných biotinylovanými protilátkami jsou ukázána na Obr. 9. IR spektrum primárních MNP vykazuje charakteristické vibrační módy (např. 1726 cm^{-1}) typické pro karboxylové vibrace, prozatím bez přítomných vibrací proteinů, které budou následně diskutovány v IR spektrech po jednotlivých krocích modifikace povrchu MNP. IR spektrum nanočástic po imobilizaci streptavidinu (tj. MNP@Strep) vykazují dva amidové pásy: amid I při

1639 cm^{-1} , který je typický pro β -strukturu skládaného listu (C=O vibrace), a amid II při 1568 cm^{-1} (deformační N–H s valenční C–N vibrací). Tyto pásy mohou být připsány amidovým skupinám v postranním řetězci přítomným v peptidových skupinách streptavidinu, a proto na tomto základě lze usoudit přítomnost streptavidinu na povrchu MNP [16,72,73]. Pás odpovídající vibračnímu módu karboxylátu při 474 cm^{-1} (COO^- vibrace) je taktéž identifikovatelný ve spektru MNP@Strep [74]. Přítomnost streptavidinu na MNP byla taktéž potvrzena přítomností vibrace slabých až středních intenzit při 1208 cm^{-1} a 1247 cm^{-1} , vibrací z nichž obě odpovídají vibracím amidu III [16]. Srovnáme-li na Obr. 8 IR spektra biosenzorů (označené jako MNP@Strep@anti-IgA a MNP@Strep@anti-APS) a spektrum MNP@Strep, nepozorujeme zde žádné rozdílné vibrace až na slabý posun pásu 1726 cm^{-1} do červené oblasti spektra, který odpovídá signálu karbonylové skupiny, která může být zodpovědná za interakci klíč-zámek mezi nanočásticemi s navázaným streptavidinem a biotinylovaným koncem protilátek [75].



Obr. 9: IR spektra výchozích MNP, modifikovaných MNP@Strep, MNP@Strep funkcionalizovaných biotinylovanou protilátkou na protein A (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA) a biotinylovanou protilátkou na streptokokovou stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A (označeno jako MNP@Strep@anti-APS). Převzato z [64].

MA-SERS biosenzor byl nejprve testován na modelových vzorcích bakteriálního lyzátu *Staphylococcus aureus* (proto dále označení STAU). Výsledná SERS spektra jsou znázorněna na Obr. 10, společně se spektrem výchozích MNP, dále pak pro porovnání spektrum vzorku představující modifikované MNP@Strep částice a spektrum slepého vzorku sestávajícího z vodné disperze MNP@Strep@anti-IgA biosenzoru bez přidaného lyzátu.

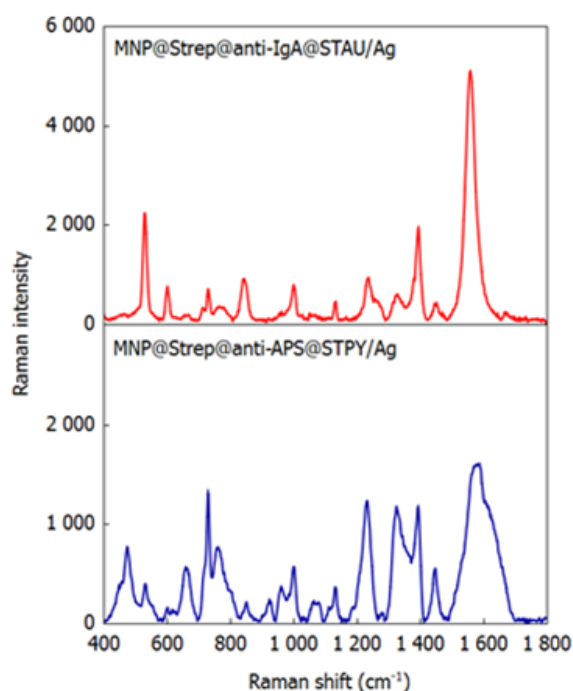


Obr. 10: SERS spektra výchozích MNP/Ag, modifikovaných MNP@Strep/Ag, MNP@Strep funkcionalizovaných biotinylovanou protilátkou na protein A (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA/Ag) a bakteriálního lyzátu *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag). Převzato z [64].

Spektrum čistých MNP nevykazuje žádné ze silných vibračních módů, které jsou následně pozorovány ve spektrech modifikovaných MNP@Strep částic, slepého či modelového vzorku. Naopak, SERS spektra modifikovaných MNP@Strep částic a částic MNP@Strep@anti-IgA biosenzoru (slepý vzorek) si jsou velice podobné. Oba vykazují charakteristické spektrální pásy odpovídající částem proteinové struktury, které zahrnují pásy označované v literatuře jako amid II a III. Charakteristické vibrace spektrálních pásů amidu II se nacházejí při 1558 cm^{-1} (NH vibrace) a 1450 cm^{-1} ($\delta\text{-CH}_2$ nůžková) [76]. Dále pak vibrační mód amidu III, který je spojován se strukturou α -helixu a zejména pak s $\nu(\text{CN})$ a NH in-plane vibracemi peptidové vazby, je reprezentován pásy při 1391 cm^{-1} a 1231 cm^{-1} [77,78]. Funkcionalizací MNP@Strep částic biotinylovanou protilátkou došlo k podstatnému navýšení intenzity SERS pásu amidu III při 1231 cm^{-1} , což lze vysvětlit nadbytkem přítomných α -helix konformací, a tím pádem to považovat za úspěšnou nekovalentní interakci mezi streptavidinem a biotinylovaným koncem protilátky. Reprezentativní SERS spektrum biosenzoru (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA/Ag) je zobrazeno na Obr. 10. Nakonec inkubace biosenzoru se vzorkem STAU lyzátu (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) byla doprovázena výraznými změnami relativních intenzit pásů při 1391 cm^{-1} a 1558 cm^{-1} ve srovnání s intenzitami těchto pásů ve slepém vzorku. Za citlivý indikátor úspěšné interakce biosenzoru s proteinem A typického pro STAU bakterii, lze považovat hodnotu poměru intenzit proteinových pásů (definovaný jako I_{1391} / I_{1558} , dále pak označováno jako PBR z angl. *protein band ratio*), která byla doprovázena změnou hodnot z 13,31 (slepý vzorek) na 0,36 (modelový vzorek) se statisticky významným rozdílem (p hodnota = $1,035 \times 10^{-5}$). SERS spektrum STAU lyzátu rovněž vykazuje nové vskutku dobře rozlišitelné pásy při 530 cm^{-1} , 602 cm^{-1} a 730 cm^{-1} , které nebyly pozorovatelné ve spektrech MNP@Strep či slepém vzorku. Ve spektru STAU bakterie dominuje silný vibrační mód při 530 cm^{-1} , který lze interpretovat jako S-S vibraci pocházející od významného bakteriálního polypeptidového toxinu (L-cystein) produkovaného STAU bakterií [16,79,80]. SERS spektrum taktéž vykazuje významný pás při 602 cm^{-1} , který může být přiřazen vibračnímu módu fenylalaninu, který je stejně tak produkován STAU bakteriemi [81,82]. Další významný pás ležící při 730 cm^{-1} byl interpretován jako mód glykosidické vazby stavebních kamenů v buněčných stěnách bakterie, přesněji poly-N-

acetylglukosamin (NAG) a kyselina N-acetylmuramová (NAM) [47,83–85]. Zároveň se můžeme setkat s interpretací podle literatury Ankamwar a kol. [40], kde je tento vibrační pás při 730 cm^{-1} spojován s „dýchacími“ vibracemi aromatického purinového kruhu C-N řetězce adeninu pocházejícího ze složek lipidové vrstvy buněčné stěny bakterie.

Vysoký stupeň všestrannosti, který tato metoda nabízí, spočívá ve volbě konkrétní protilátky, jež se přidává v posledním kroku syntézy, a zajišťuje tak selektivitu MA-SERS biosenzoru. Univerzálnost této metody byla demonstrována na bakteriálním lyzátu *Streptococcus pyogenes* (dále jen STPY), který je rovněž spojován s infekcí kloubní náhrady (IKN). Srovnání SERS spekter modelových vzorků STPY bakteriálního lyzátu (dále označeno jako MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag) a STAU lyzátu (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) se nachází v Obr. 11.



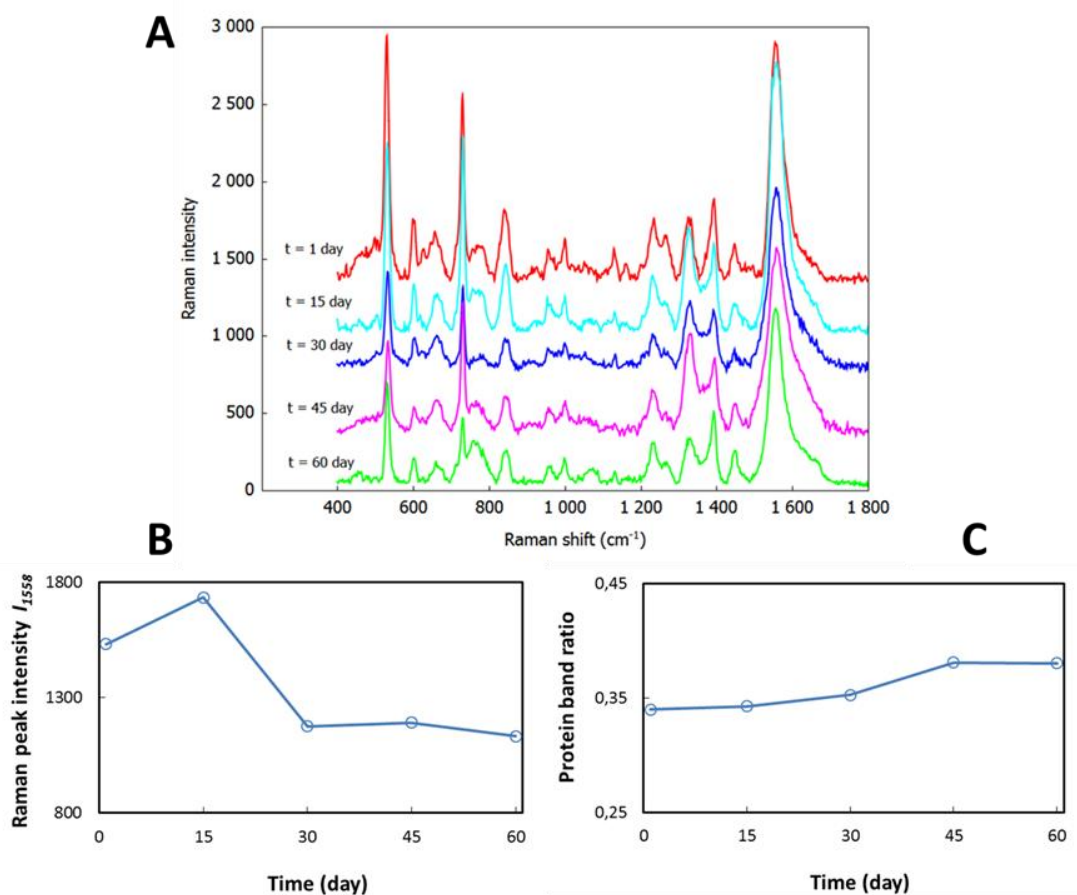
Obr. 11: SERS spektra modelových vzorků bakteriálních lyzátů *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (označené jako MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) a *Streptococcus pyogenes* (označené jako MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag). Převzato z [64].

Vzhledem k zařazení obou bakterií mezi fakultativně anaerobní Gram-pozitivní koky se dalo očekávat, že jejich spektra budou mít velmi podobný průběh, i přes některé významně rozdílné molekulové vibrace. Hodnota PBR se podstatně snížila po inkubaci příslušného biosenzoru se STPY lyzátem, tj. z hodnoty 19,71 na hodnotu 0,48 se statisticky významným rozdílem, jenž nám svědčí o úspěšné interakci mezi bakteriálním lyzátem a funkcionalizovaným biosenzorem. Největší rozdíly mezi SERS spektry STAU (MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) a STPY (MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag) bakterií se vztahují k vibračním pásům ležícím při 475 cm^{-1} , 924 cm^{-1} a 962 cm^{-1} . Tyto pásy byly interpretovány jako vibrace D-manózy, která je hlavní cukernou složkou matrice STPY [86]. Ve spektru STPY bakterie můžeme také pozorovat intenzivní pík při 660 cm^{-1} , který nám jednoznačně potvrzuje přítomnost C-S vibrací pocházející z toxinu methioninu diskutované bakterie [83,87]. Kromě toho se ve spektrech nachází další ne méně důležitý pás při 530 cm^{-1} , který je původcem S-S vibrace cysteinu. Rovněž si můžeme všimnout, že intenzita vibrace tohoto pásu je nižší ve spektru STPY než v případě STAU, což může být dalším vodítkem pro diskriminaci mezi těmito dvěma patogeny. Navíc rozdíl mezi hodnotami PBR pro STAU a STPY se jednoznačně jevil jako staticky významný ($p = 0,021$). Toto přímé porovnání SERS spekter dvou různých bakteriálních lyzátů s na míru ušitým biosenzorem jasně poukazuje, že prostřednictvím zde popsaného MA-SERS přístupu můžeme jasně rozlišit mezi bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*.

Vzhledem k tomu, že vzorky kloubních tekutin jsou typicky bohaté na informace v důsledku širokého obsahu celé řady různých molekul, interpretace spekter bakteriálních patogenů v matrici biologických materiálů je obvykle velmi obtížná. Proto se často nevyhne použití náročných technik a zkušených specialistů pro analýzu získaných dat. I přes to se SERS spektroskopie jeví jako perspektivní analytická technika použitelná pro klinickou praxi při detekci patogenních mikroorganismů. Vzhledem ke komplexnosti biologických vzorků se dá očekávat, že spektra budou obsahovat koktejl SERS-aktivních vibračních módů pocházejících od složek buněčné stěny patogenů a nativních složek matrice. Zatímco zde uvedený systém spoléhá na apriorní znalosti o biochemii analyzovaného patogenu, tato technika rovněž poskytuje určitou flexibilitu při interpretaci SERS vibračních pásů a následnou detekci a diagnostiku IKN. Přestože je tato flexibilita atraktivní, ideální systém detekce bakterií

by vůbec neměl dovolit nejisté přiřazení pásů. Bohužel v současné době se váhavému přiřazení pásů pravděpodobně nevyhneme z důvodu nedostatku dostupných SERS spektrálních knihoven, které by mohly být využity k interpretaci vibračních pásů bakteriálních složek, což se může podepsat na finanční i časové náročnosti celého analytického procesu. Ačkoliv se databázové zdroje pro základní Ramanova spektra biologických materiálů postupně stávají dostupnější a komplexnější, není zde jistota, že vibrační pásy pozorované v Ramanově spektru budou totožné s pásy pozorovanými v SERS spektrech těch samých bakterií.

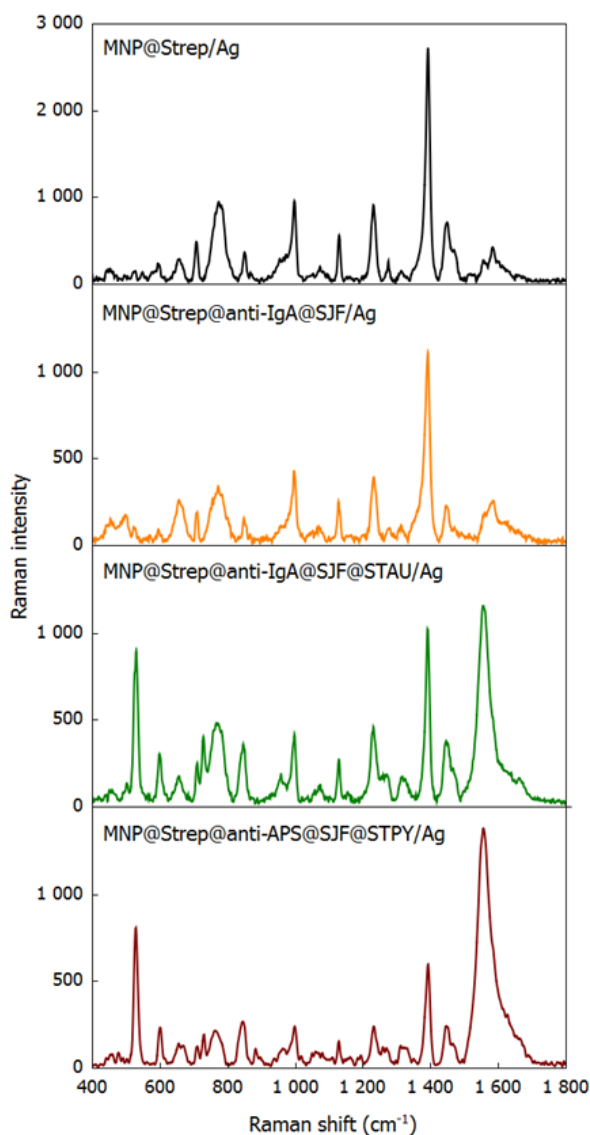
Z hlediska dalších aplikací a zejména pak při využití v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii je velmi klíčová časová stabilita magnetického biosenzoru. Vliv stárnutí senzoru na stabilitu SERS signálu jsme testovali pomocí STAU biosenzoru, jenž byl skladován za atmosférických podmínek po dobu několika týdnů. Stabilita SERS signálu byla hodnocena s využitím MNP@Strep@anti-IgA částic, které byly ihned po přípravě uloženy do chladničky. Z tohoto zásobního roztoku byly v den měření (1., 15., 30., 45. a 60. den od přípravy) odebrány alikvótní podíly vždy těsně před inkubací se STAU lyzátem a následně byla zaznamenána SERS spektra. I přes to, že se absolutní intenzity s časem znatelně snížily, polohy vibračních pásů pozorované ve spektrech na Obr. 12A zůstaly pro danou bakterii po celou dobu zachovány. Vypočtené PBR hodnoty jsou poměrně stabilní s průměrnou hodnotou okolo 0,36 a relativní směrodatnou odchylkou nižší než 5%. Následně byly vyneseny závislosti SERS intenzit pásu 1558 cm^{-1} , resp. PBR hodnot na čase od přípravy STAU biosenzoru. Jak je vidět na obrázcích 12B a 12C, obě hodnoty byly monitorovány po dobu 2 měsíců. Tento SERS biosenzor se tak jeví jako poměrně stabilní za běžných atmosférických podmínek, a to i po dvou měsících skladování.



Obr. 12: A) SERS spektra MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag získány pro vzorky různých dávek odebraných během 2 měsíců ode dne jejich přípravy při sledování časové stability biosenzoru. Pro lepší přehlednost bylo každé SERS spektrum posunuto o zhruba 300 jednotek Ramanovy intenzity. Sledování časové stability prostřednictvím závislosti B) SERS intenzity pásu 1558 cm^{-1} a C) PBR hodnot na čase v průběhu 2 měsíců. Převzato z [64].

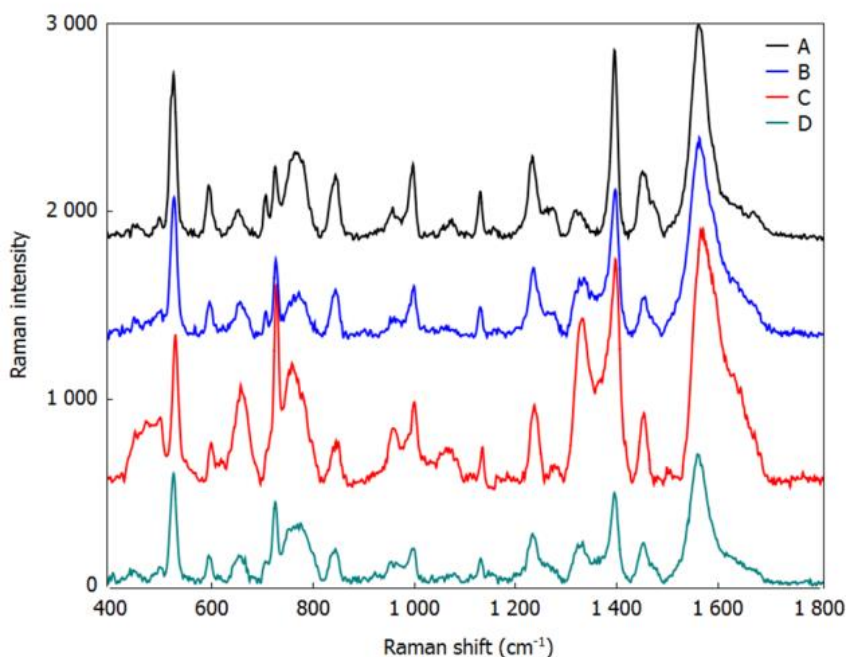
K testování a hodnocení použitelnosti navrhované bezkultivační detekce a identifikace patogenů *S. aureus* a *S. pyogenes* v reálné matrici byly zkoumány vzorky zprvu sterilních punktátů z kolenního kloubu, které byly inokulovány těmito živými bakteriálními buňkami. SERS spektra získaná během těchto experimentů jsou uvedena na obrázku 13. I přes to, že se absolutní intenzity SERS signálů oproti modelovým vzorkům znatelně snížily, polohy vibračních pásů pozorované ve spektrech na Obr. 13 (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@SJF@STAU/Ag a MNP@Strep@anti-APS@SJF@STPY/Ag) zůstaly pro obě bakterie zachovány a odpovídají spektrům

jejich modelových vzorků. Nicméně oba vzorky (modelové i s reálnou maticí) poskytovaly stejný trend změny hodnot PBR, která klesala z 13,31 na 0,08 ($p = 1.010 \times 10^{-5}$) v případě *S. aureus*, a z 19,71 na 0,65 ($p = 2.817 \times 10^{-5}$) v případě *S. pyogenes*.



Obr. 13: SERS spektrum modifikovaných MNP@Strep/Ag částic, MNP@Strep částic funkcionalizovaných biotinylovanou protilátkou na protein A (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA/Ag), sterilního kloubního punktátu (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@SJF/Ag), kloubního punktátu inokulovaného bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (označeno jako MNP@Strep@anti-IgA@SJF@STAU/Ag) a kloubního punktátu inokulovaného bakterií *Streptococcus pyogenes* (označeno jako MNP@Strep@anti-APS@SJF@STPY/Ag). Převzato z [64].

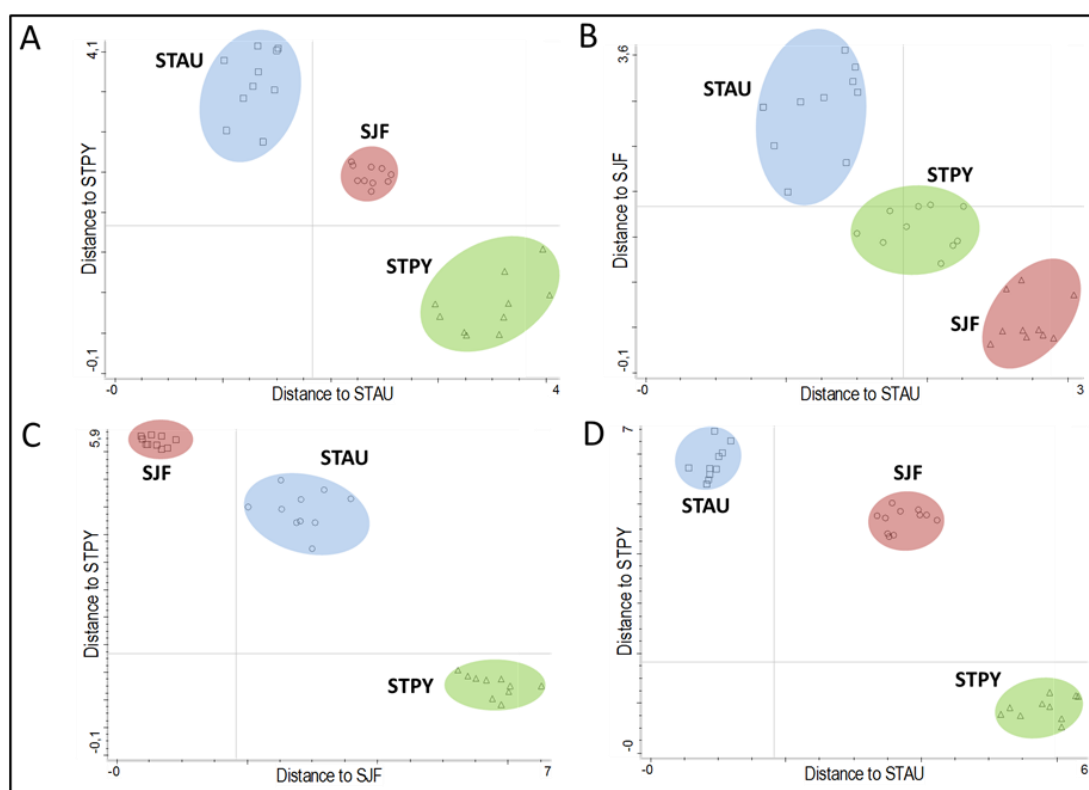
Dále pak byl sledován vliv koncentrace a nespecifických interakcí na úspěšnost bakteriální detekce. Vliv nespecifických interakcí byl studován s využitím MNP@Strep@anti-IgA biosenzoru inkubovaného se vzorky punktátu z kolenního kloubu získaných od čtyř pacientů (označení jako pacient A-D), které byly inokulovány živými bakteriemi STAU. Obrázek 14 reprezentuje získaná spektrální data pro tato měření. Všechna spektra obsahují výše interpretované a následně diskutované vibrační módy, ačkoliv se jejich absolutní intenzity mezi sebou patrně liší. Nicméně, vypočtené hodnoty PBR pro všechny 4 pacienty jsou stabilní (průměrně se pohybují okolo hodnoty 0,80) s 10% relativní směrodatnou odchylkou mezi PBR hodnotami jednotlivých pacientů. Můžeme si povšimnout, že spektra bakterií přítomných v reálné matici znázorněná na obrázcích 13 a 14 obsahují méně významné pásy pocházející z nespecifických biologických interakcí na rozhraní mezi volným povrchem nanočástic stříbra a malými organickými molekulami. Nicméně tyto interakce nemají zásadní vliv na vypočtené hodnoty PBR, o čemž svědčí nízká RSD a stabilním PBR.



Obr. 14: Reprezentativní SERS spektra živých bakteriálních buněk STAU inokulovaných v kloubních punktátech získaných od čtyř různých pacientů (A-D). Pro lepší přehlednost bylo každé SERS spektrum posunuto o řádově stovky jednotek Ramanovy intenzity. Převzato z [64].

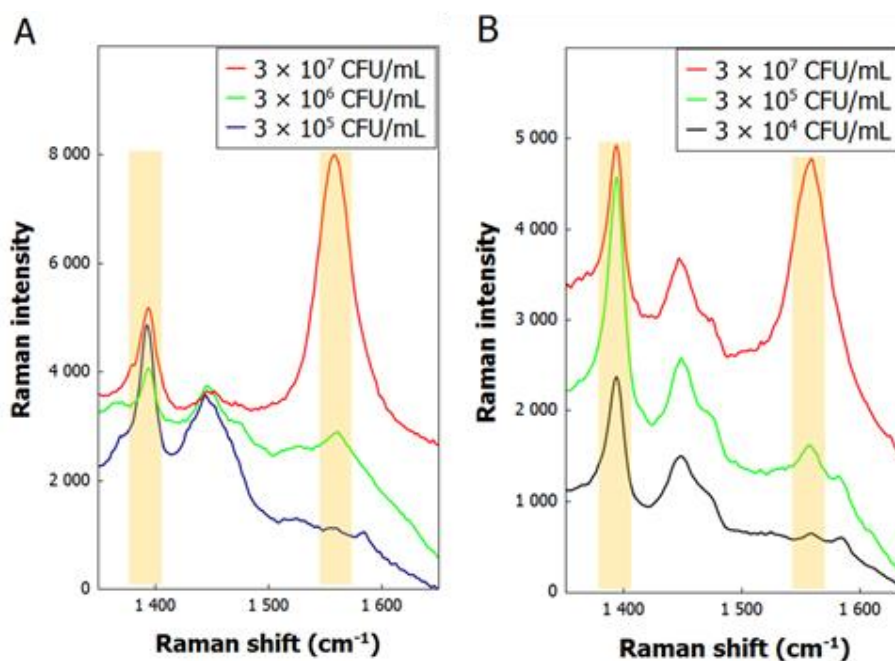
O definitivním postavení této nové analytické metody v diagnostickém algoritmu bylo nasnadě dále testovat použití biosenzoru ve vzorcích reálné matrice kloubního punktátu získaných od čtyř pacientů (A, B, C a D). Pro každý vzorek bylo provedeno deset opakovaných měření a výsledné spektrální údaje byly podrobeny statistické analýze pro následné zhodnocení schopnosti navrhované metody detekce a identifikace IKN. Pro klasifikaci dvou bakteriálních patogenů (STAU a STPY) v biologickém materiálu byl použit algoritmus diskriminační analýzy (DA), který je součástí chemometrického programu *TQ Analyst* dodávaného s přístrojem. Diskriminační analýza umožňuje interpretovat rozdíly mezi dvěma nebo více skupinami objektů, které mají velmi podobné charakteristické rysy (v našem případě spektrální průběh). Zařazování bakteriálních vzorků do tříd se odehrává na základě vzdálenosti mezi centry jednotlivých tříd vyjádřené v distančních Mahalanobisových jednotkách. Výstupem statistické diskriminační analýzy dat je následně grafické uspořádání objektů ve vícerozměrném prostoru pomocí již zmíněné Mahalanobisovy vzdálenosti. Jak bude dále patrné v této disertační práci, DA usnadňuje interpretaci spektrálních podobností a rozdílů, a stejně tak umožňuje zařazení neznámého objektu do jedné z již existujících tříd. SERS spektra biologických vzorků s největší reprodukovatelnou podobností by se měly seskupit do transformovaného prostoru s nejmenší Mahalanobisovou vzdáleností. Vzhledem k bohatým informacím ve spektrální oblasti 400 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} byla statistické diskriminační analýze podrobena tato oblast SERS spektra. Studie byla provedena na skupině 30 vzorků vždy pro každého pacienta, zahrnující reprodukovatelná SERS spektra naměřená se sterilními kloubními punktáty a punktáty inokulovanými živými bakteriálními buňkami (STAU či STPY). Získané výsledky jsou shrnuty na obrázku 15A-D, kde pozorujeme jednoznačné odlišení existujících tříd v datech, přičemž třída sterilního kloubního punktátu je znázorněna červeně, třída kloubního punktátu s inokulovanou bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 je zobrazena modře a třída kloubního punktátu inokulovaného bakterií *Streptococcus pyogenes* je označena zeleně. Z obrázku 15 je patrné, že jednotlivé vzorky kloubních punktátů tvoří oddělené shluky, které mají různé meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti. Vypočtené průměrné hodnoty vzdáleností uvnitř jednotlivých tříd pro pacienty A, B, C a D odpovídají hodnotám 0,37, 0,57, 0,59 a 0,94 pro sterilní kloubní punktát; 1,31, 1,24, 0,80 a 0,92 pro kloubní punktát inokulovaný bakterií *S. aureus*

CCM 3953; 0,84, 0,82, 1,27 a 0,91 pro kloubní punktát inokulovaný bakterií *S. pyogenes*. Vypočtené průměrné hodnoty mezi jednotlivými třídami navzájem odpovídají vzdálenostem 2,37, 2,90, 2,83 a 3,72 mezi sterilním kloubním punktátem a punktátem se *Staphylococcus aureus* CCM 3953; 2,46, 1,60, 5,69 a 4,69 mezi sterilním kloubním punktátem a punktátem se *Streptococcus pyogenes*. Dále pak meziklastrové vzdálenosti odpovídají hodnotám 3,62, 1,95, 4,45 a 5,83 pro třídy *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Streptococcus pyogenes*. Závěrem lze tedy konstatovat, že tyto výsledky poukazují na spolehlivost kombinace MA-SERS s DA k rozlišení třech analytů, které byly současně validovány na základě standardních kultivačních metod se stejným setem týchž vzorků.



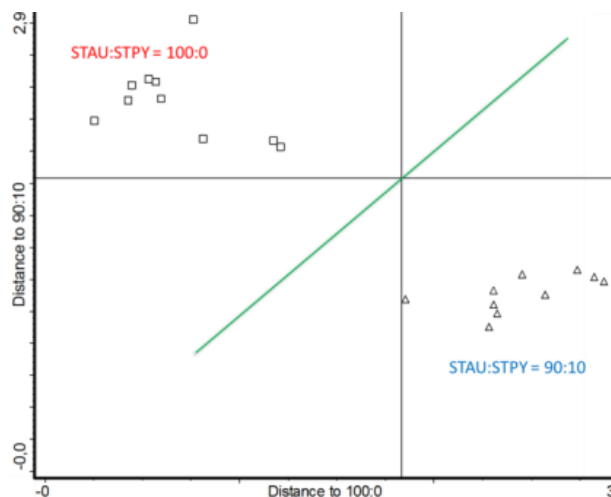
Obr. 15: Klasifikace kloubních punktátů od čtyř pacientů (A, B, C a D) podle diskriminační analýzy. Orientačně zvýrazněné oblasti v grafech představují: sterilní kloubní punktát (SJF; červená), kloubní punktát inokulovaný bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (STAU; modrá) a kloubní punktát inokulovaný bakterií *Streptococcus pyogenes* (STPY; zelená). Převzato z [64].

Citlivost metody byla následně testována s využitím stejného MA-SERS detekčního protokolu popsaného v Experimentální části. V následující části práce již byly zkoumány pouze bakteriální lyzáty v kloubním punktátu z důvodu snadnější manipulace s biologickým materiálem a dodržení ředících kroků. Koncentrace obou bakteriálních patogenů byla snižována až na hranici, kde lze stále pozorovat statisticky významný rozdíl mezi PBR hodnotami (I_{1391} / I_{1558}) slepého vzorku, resp. biosenzoru a bakteriálního vzorku. Na základě získaných výsledků tak bylo zjištěno, že navržený biosenzor poskytuje pozitivní odpověď na běžně se vyskytující koncentraci bakterií (3×10^8 CFU/mL) v reálných vzorcích během IKN, jak jsme pozorovali výše u modelových vzorků (Obr. 11). A navíc tato MA-SERS metoda poskytuje limity detekce o dva (STAU; Obr. 16A) či tři (STPY; Obr. 16B) řády nižší než je běžně se vyskytující koncentrace bakterií doprovázející IKN.

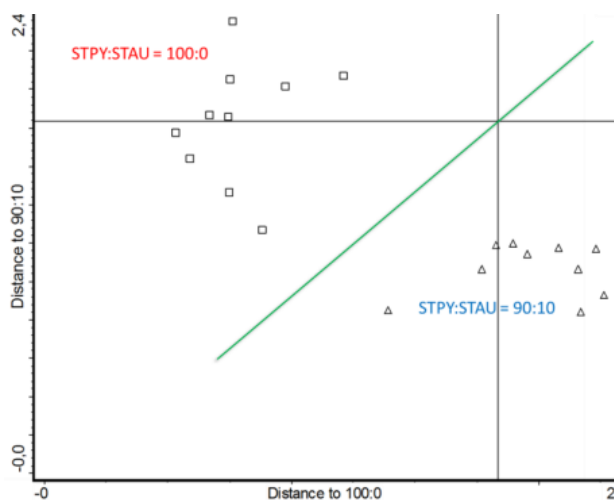


Obr. 16: Detailní pohled na pásy 1391 cm^{-1} a 1558 cm^{-1} v SERS spektru kloubních punktátů s rozdílnými koncentracemi bakteriálních patogenů A) *Staphylococcus aureus* a B) *Streptococcus pyogenes*. Pro lepší přehlednost bylo každé SERS spektrum posunuto o řádově stovky jednotek Ramanovy intenzity. Převzato z [64].

Posledním, rovněž velmi důležitým kritériem bylo testování schopnosti MA-SERS biosenzoru selektivně vázat bakterie ve vzorcích reálné matrice. Za tímto účelem byla připravena směs obou senzorů (MNP@Strep@anti-IgA & MNP@Strep@anti-APS) v poměru 1:1. Tento mix senzorů byl otestován jak s čistými lyzáty jednotlivých bakterií, tak s jejich bakteriální směsí v poměru 90:10 jak pro STAU, tak STPY a rovněž se postupovalo stejným MA-SERS detekčním protokolem popsáným v Experimentální části disertační práce. Při klasifikaci setů s čistým STAU (Obr. 17) nebo STPY (Obr. 18) proti jejich odpovídajícím bakteriálním směsím byly v obou případech získány dvě různé třídy vyjádřené pomocí hraniční přímky pozorované v grafech diskriminační analýzy. Vypočtené průměrné hodnoty vzdáleností uvnitř jednotlivých tříd pro STAU vzorky odpovídají hodnotám 0,37 pro směs 90:10 a 0,68 pro směs 100:0, resp. čistý STAU. Podobné výsledky byly získány pro klasifikaci STPY vzorků, které byly opět v poměru 90:10 a 100:0 (Obr. 18) s vnitřními vzdálenostmi 1,06 a 0,79. Na druhou stranu z výsledků vyplývá, že jednotlivé vzorky tvoří oddělené shluky s meziklastrovou vzdáleností 2,45 pro STAU vzorky a 1,97 pro STPY vzorky. Na základě získaných výsledků tak bylo zjištěno, že navržená metoda je selektivní pro oba přítomné patogeny i navzdory tomu, že je jedna bakterie ve velmi malém zastoupení vedle druhé.



Obr. 17: Grafické znázornění diskriminační analýzy dat získaných klasifikací čistého STAU lyzátu (STAU:STPY = 100:0; čtverec) a směsi bakteriálních lyzátů (STAU:STPY = 90:10; trojúhelník) s využitím směsi biosenzorů v poměru 1:1. Převzato z [64].



Obr. 18: Grafické znázornění diskriminační analýzy dat získaných klasifikací čistého STPY lyzátu (STAU:STPY = 100:0; čtverec) a směsi bakteriálních lyzátů (STPY:STAU = 90:10; trojúhelník) s využitím směsi biosenzorů v poměru 1:1. Převzato z [64].

Výsledky z této kapitoly byly v roce 2017 publikovány v časopise *Analytical chemistry* a autorka disertační práce je první z devíti autorů tohoto původního článku.

4.3 Publikace zahrnující alternativní SERS substráty

Tato část předkládané disertační práce shrnuje spoluautorské publikace, ve kterých bylo rovněž využito optických vlastností Ag NPs a jejich aplikačního potenciálu v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii jako aktivních substrátů, oproti předchozím případům ale byly Ag NPs použity v podobě vrstev či jako součást kompozitního materiálu. Konkrétně se jedná o publikaci zabývající se přípravou nanokompozitního materiálu pro „label-free“ stanovení lidského imunoglobulinu G v krvi metodou MA-SERS a o publikaci, která ilustruje syntézu sonochemické depozice Ag NPs na skleněné destičky a jejich využití jako SERS aktivní substráty.

4.3.1 Magneticky-asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS) pro „label-free“ stanovení lidského imunoglobulinu G (IgG) v krvi s využitím nanokompozitního materiálu na bázi Fe₃O₄@Ag

Výsledky této práce popisují modifikaci nanokompozitního materiálu obsahujícího nanočástice stříbra a Fe₃O₄, konjugované spolu přes polymerní mezivrstvu vytvořenou karboxymethyl chitosanem, jakožto přírodním a biokompatibilním polymerem. Následně byl tento systém modifikován anti-imunoglobulinem G přes nekovalentní interakci s kovalentně navázaným streptavidinem na povrchu kompozitu, čímž byla zajištěna vysoká selektivita stanovení. S využitím mikroRamanovy spektroskopie našel takto připravený biosenzor uplatnění ve stanovení imunoglobulinu G ze vzorků krve. V této práci bylo ukázáno, že lze detekovat koncentrace imunoglobulinu G od 600 fg/ml v kapce krve. Tato robustní metoda poskytuje relativně snadnou modifikaci za účelem stanovení celé řady biologicky významných molekulů s vysokou selektivitou a citlivostí. Příslušná modifikace se realizuje tak, že se v posledním kroku vybere vhodná biotinylovaná protilátka.

Výsledky z této kapitoly byly v roce 2014 publikovány v časopise *Analytical Chemistry* a autorka disertační práce je druhá z pěti autorů tohoto původního článku.

4.3.2 Sonochemická příprava skleněných destiček s vrstvou nanočástic stříbra pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie

V rámci další fáze studia aplikačního potenciálu povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byla provedena studie na zcela nově metodicky navržených sonochemicky deponovaných vrstvách částic stříbra na skleněném povrchu. Jelikož sonochemická příprava nebyla součástí této disertační práce, budou zde jednotlivé postupy popsány jen v krátkosti. Podrobný postup pak byl popsán v publikaci Suchomel a kol. [88]. Výsledky této publikace spočívají v komparativní studii možných postupů variujících použití rozdílných redukčních látek, s cílem nalézt experimentální uspořádání a podmínky pro časově nenáročnou a reprodukovatelnou přípravu Ag vrstev a jejich následný aplikační potenciál v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii. Navržené postupy přípravy Ag vrstev spočívaly ve variujícím použití různých redukujících látek (polyethylenglykol, glycerol, maltóza, glukóza, laktóza) a v různém experimentálním uspořádání (především snížení koncentrace stříbra) za účelem zvýšit reprodukovatelnost přípravy i SERS signálu. Testování SERS aplikačních možností takto připravených, vysoce stabilních a homogenních vrstev nanočástic stříbra prokázalo využitelnost všech typů deponovaných vrstev jako efektivních SERS substrátů. Odhlédneme-li od nepatrně negativního vedlejšího účinku procesu tvorby těchto povrchů spojeným s přítomností reziduí v SERS spektrech, pak lze konstatovat, že jako nejefektivnější se ukázaly vrstvy připravené redukcí maltózou za asistence ultrazvuku, kde bylo dosaženo faktoru zesílení Ramanova signálu v řádu statisíců.

Výsledky z této kapitoly byly v roce 2016 publikovány v časopise *Ultrasonics Sonochemistry* a autorka disertační práce je čtvrtá z osmi autorů tohoto původního článku.

5. Závěr

Cílem předkládané disertační práce byla příprava a modifikace nanočástic stříbra pro aplikace v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS) se zaměřením na citlivou a specifickou analýzu biologicky významných molekul i jednobuněčných patogenních mikroorganismů - bakterií. Jednotlivé připravené materiály byly charakterizovány řadou technik (transmisní, skenovací či vysokorozlišovací elektronová mikroskopie, UV/Vis, Ramanova a infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce, dynamický rozptyl světla) a zejména pak byly testovány jejich aplikačně významné vlastnosti se zaměřením na zesílení Ramanova signálu a specifitu vyvíjené analytické aplikace využívající tyto materiály.

První část experimentální práce se zabývala aktivací disperze nanočástic stříbra vlivem šesti rozdílných finálních koncentrací chloridových iontů (25, 50, 100, 200, 400, a 800 mmol/l) a jejich následné využití pro praktické aplikace v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii. V této části studie byl popsán přímý vztah mezi vybranými koncentracemi chloridových iontů a intenzitou SERS signálu modelové molekuly adeninu. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že klíčovou roli hraje nejen koncentrace chloridových iontů, ale stejně důležitý je i výběr vlnové délky excitačního záření pro konkrétní provedení aktivace. Ze získaných výsledků pozorování morfologických změn Ag NPs bylo patrné, že přídavek nižších koncentrací chloridových iontů (desítky mmol/l) nemá zásadní vliv na transformaci nanočástic stříbra oproti vlivu vyšších koncentrací chloridových iontů (stovky mmol/l). Srovnáme-li účinek všech použitých výsledných koncentrací NaCl napříč všemi třemi testovanými excitačními lasery (532, 633 a 780 nm), lze konstatovat, že nejvyšší zesílení Ramanova signálu bylo dosaženo se systémem, který obsahoval finální koncentraci 400 mmol/l NaCl. Nicméně nižší koncentrace chloridů jsou rovněž použitelné v případě excitace laserem 532 nm, avšak nedostatečné pro použití při excitaci vlnovými délkami 633 a 780 nm. Oproti tomu, vlivem účinku ještě vyšší koncentrace chloridových iontů na úrovni 800 mmol/l docházelo již k tvorbě nestabilních rozměrných částic, kdy se pak tato destabilizace Ag NPs odrazila ve velmi rychlé ztrátě Ramanova signálu a to pro všechny tři excitační lasery.

Druhá část experimentální práce se zabývala vývojem rychlé diagnostiky infekce kloubních náhrad metodou magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. MA-SERS detekce a identifikace bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) byla nejprve vyvíjena na bakteriálních lyzátech. K MA-SERS detekci byl využit biosenzor na bázi magnetických nanočástic oxidu železa funkcionalizovaných protilátkami na příslušné bakterie. Po prvotní úspěšné testovací fázi na umělých vzorcích následovalo testování tohoto biosenzoru s reálnými vzorky kloubních punktátů inokulovaných živými bakteriálními buňkami. Ramanova spektra jednotlivých vzorků (infikovaný a neinfikovaný biologický materiál) byla podrobena diskriminační analýze, kde bylo dosaženo rozdělení signálu systémů obsahujících jednotlivé bakterie do příslušných tříd na základě Mahalanobisových vzdáleností. Na základě získaných výsledků se tak podařilo nejen rozhodnout, zda je kloubní punktát infikovaný, ale především i určit, o jakou bakterii se jedná z důvodu včasného nasazení těch správných antibiotik. Spojení mikro-Ramanovy spektroskopie a diskriminační analýzy tak poskytuje rychlou detekci a identifikaci infekce kloubních náhrad bez nutnosti zdlouhavých kultivačních postupů, se kterými se můžeme setkat v klasické mikrobiologii.

Poslední část experimentální práce se věnovala výzkumům, ve kterých byl rovněž využit aplikační potenciál nanočástic stříbra v povrchu zesílené Ramanově spektroskopii, použitý tentokrát ve formě stříbrné vrstvy či jako součást magnetického kompozitu.

Vyvíjené typy senzorů naznačují cestu k ultracitlivé detekci využitelné v biologii i medicíně s velmi malými nároky na instrumentální vybavení. Vývoj vlastní metodiky přípravy SERS biosenzorů není zdaleka ukončen, výzkum pokračuje ve směrech multiplexní analýzy a snižování detekčních limitů vzhledem k požadavku jejich aplikovatelnosti v medicínské i běžné praxi. Výsledky získané v souvislosti s touto disertační prací, zejména pak na základě výsledků z detekce infekce kloubních náhrad, byly nadále zúročeny pro rychlou a včasnou detekci meningitidy, kde prozatímni výsledky naznačují, že jsme na správné cestě v boji proti této zákeřné infekci mozkových blan.

6. Summary

The aim of this dissertation was the preparation and modification of silver nanoparticles for application in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), focusing on sensitive and specific analysis of biologically important molecules as well as single-celled pathogenic microorganisms - bacteria. The individual synthesized materials were characterized by a variety of techniques (transmission, scanning or high resolution electron microscopy, UV/Vis, Raman and infrared spectroscopy, X-ray diffraction, dynamic light scattering) and especially their significant application characteristics with focus on enhancement of Raman signal and specificity of developed analytical application using these materials.

The first part of the Experimental Section of the thesis was focused on the influence of six different final concentrations of chloride ions (25, 50, 100, 200, 400, and 800 mmol/L) used as an agent for silver nanoparticles activation and their subsequent use for practical application in surface enhanced Raman spectroscopy. In this part of the study a direct relationship between the selected concentrations of chloride ions with the intensity of the SERS signal using of adenine as a model compound was described. It was found out that the concentration level of chloride ions plays a crucial role in this part and a careful tuning of experimental design has to be performed for each laser wavelength. From the results of the observation of the morphological changes of Ag NPs it was evident that lower final concentrations of chloride ions (tens of mmol/L) led to a transformation of silver nanoparticles in a different manner (mainly aggregation) compared to higher concentrations (hundreds of mmol/L). If we compare the effect of the all final NaCl concentrations across the three tested excitation lasers (532, 633 and 780 nm), it can be stated that the best results were achieved with a system containing a final concentration of 400 mmol/L NaCl. Nevertheless, lower concentrations of chlorides are also usable for 532 nm laser, but its action has smaller or no effect on the Raman signal enhancement for lasers 633 and 780 nm. On the other hand, treatment with 800 mmol/L chlorides led to a rapid loss of the Raman signal due to the formation of unstable large-sized particles and their subsequent destabilization for all three tested laser wavelengths.

The second part of the Experimental Section of the thesis dealt with the development of rapid detection of prosthetic joint infection (PJI) based on magnetically assisted surfaced enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). MA-SERS detection and bacterial identification (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) has been developed on model samples of bacterial lysates. The MA-SERS detection used a biosensor based on magnetic iron oxide nanoparticles functionalized with suitable antibodies to the respective bacteria. After the initial successful test phase with model samples, testing of this biosensor followed with real samples of the synovial fluid inoculated with live bacterial cells. The Raman spectra of the individual samples (infected and uninfected biological material) were subjected to discriminant analysis, which was used to determine the classes of known materials by calculating the distance between each class center in Mahalanobis distance units. The results showed that it was possible to decide whether the synovial fluid is infected and moreover to determine which bacteria is presented. The combination of microRaman spectroscopy and discriminant analysis can reliably be used to rapid detection and identification of prosthetic joint infection without the need for lengthy cultivation methods.

The last part of the Experimental Section of the thesis was devoted to research in which it was also exploited the application potential of silver nanoparticles in the surface enhanced Raman spectroscopy as a silver layer or as part of a magnetic composite.

Developed types of sensors indicate a way to ultrasensitive detection applicable in biology and medicine with very small requirements on instrumental equipment. The development of the SERS biosensor preparation is far from complete, the research continues in the direction of multiplex analysis and the reduction of detection limits due to the requirement of their applicability in medical and common practice. The results based on this dissertation, especially on the results of the detection of prosthetic joint infection, have been applied for rapid and early diagnosis of meningitis, where temporary results suggest that we are on the right way to fight for this insidious infection of the meninges.

Seznam použitých zkratk

| | |
|------------|--|
| Ag NPs | <i>silver nanoparticles</i> ; nanočástice stříbra |
| anti-IgA | protilátka na protein A |
| anti-APS | protilátka na stěnovou polysacharidovou substanci skupiny A |
| DA | diskriminační analýza |
| ELISA | <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> ; enzymatická imunosorpční analýza |
| EDC | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid |
| HRTEM | <i>high-resolution transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením |
| IKN | infekce kloubní náhrady |
| MA-SERS | <i>magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy</i> ; magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie |
| NHS | N-hydroxysulfosukcinimid |
| PBR | <i>protein band ratio</i> ; poměr proteinových pásů |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> ; polymerázová řetězová reakce |
| SERS | <i>surface enhanced Raman spectroscopy</i> ; povrchem zesílená Ramanova spektroskopie |
| SJF | <i>sterile joint fluid</i> ; sterilní kloubní punktát |
| STAU | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| STEM-EDS | <i>scanning transmission electron microscopy/energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> ; skenovací transmisní elektronová mikroskopie s energiově disperzním systémem |
| STEM-HAADF | <i>scanning transmission electron microscopy/high-angle angular dark-field</i> ; skenovací transmisní elektronová mikroskopie s prstencovým detektorem elektronů difraktovaných pod velkými úhly |
| STPY | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| TEM | <i>transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie |
| XRD | <i>X-ray powder diffraction</i> ; Rentgenová prášková difrakce |

Seznam použité literatury

- [1] Panáček A, Smékalová M, Večeřová R, Bogdanová K, Röderová M, Kolář M, et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016;142:392–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.007.
- [2] Bi L, Dong J, Xie W, Lu W, Tong W, Tao L, et al. Bimetallic gold-silver nanoplate array as a highly active SERS substrate for detection of streptavidin/biotin assemblies. *Anal Chim Acta* 2013;805:95–100. doi:10.1016/j.aca.2013.10.045.
- [3] Vo-Dinh T, Yan F, Wabuyele MB. Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging. *J Raman Spectrosc* 2005;36:640–7. doi:10.1002/jrs.1348.
- [4] Cîntă Pînzaru S, Falamaş A, Dehelean C, Morari C, Venter M. Double Amino Functionalized Ag Nanoparticles as SERS Tags in Raman Diagnostic. *Croat Chem Acta* 2013;86:233–44. doi:10.5562/cca2067.
- [5] Feng S, Lin D, Lin J, Li B, Huang Z, Chen G, et al. Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer. *Analyst* 2013;138:3967. doi:10.1039/c3an36890d.
- [6] Wang Y, Kang S, Khan A, Ruttner G, Leigh SY, Murray M, et al. Quantitative molecular phenotyping with topically applied SERS nanoparticles for intraoperative guidance of breast cancer lumpectomy. *Sci Rep* 2016;6:21242. doi:10.1038/srep21242.
- [7] Cervo S, Mansutti E, Mistro G Del, Spizzo R, Colombatti A, Steffan A, et al. SERS analysis of serum for detection of early and locally advanced breast cancer. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:7503–9. doi:10.1007/s00216-015-8923-8.
- [8] Li S, Zhang Y, Xu J, Li L, Zeng Q, Lin L, et al. Noninvasive prostate cancer screening based on serum surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine. *Appl Phys Lett* 2014;105. doi:10.1063/1.4892667.
- [9] Grubisha DS, Lipert RJ, Park H, Driskell J, Porter MD. Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen : An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogold Labels Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen : An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogol. *Anal Chem* 2003;75:5936–43. doi:10.1021/ac034356f.
- [10] Zhang Y, Ye X, Xu G, Jin X, Luan M, Lou J, et al. Identification and distinction of non-small-cell lung cancer cells by intracellular SERS nanoprobe. *RSC Adv* 2016;6:5401–7. doi:10.1039/C5RA21758J.
- [11] Chen Y, Chen G, Zheng X, He C, Feng S, Chen Y, et al. Discrimination of gastric cancer from normal by serum RNA based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analysis. *Med Phys* 2012;39:5664–8.

doi:10.1118/1.4747269.

- [12] Feng S, Lin J, Huang Z, Chen G, Chen W, Wang Y, et al. Esophageal cancer detection based on tissue surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Appl Phys Lett* 2013;102:0–4. doi:10.1063/1.4789996.
- [13] Shafer-Peltier KE, Haynes CL, Glucksberg MR, Van Duyne RP. Toward a Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *J Am Chem Soc* 2003;125:588–93. doi:10.1021/ja028255v.
- [14] Kaittanis C, Santra S, Perez JM. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:408–23. doi:10.1016/j.addr.2009.11.013.
- [15] Huang P-J, Tay L-L, Tanha J, Ryan S, Chau L-K. Single-Domain Antibody-Conjugated Nanoaggregate-Embedded Beads for Targeted Detection of Pathogenic Bacteria. *Chem - A Eur J* 2009;15:9330–4. doi:10.1002/chem.200901397.
- [16] Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Van Den Braak N, Endtz HP, Naumann D, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods* 2002;51:255–71. doi:10.1016/S0167-7012(02)00127-6.
- [17] Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, et al. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:324–9. doi:10.1128/JCM.41.1.324-329.2003.
- [18] Premasiri WR, Lee JC, Sauer-Budge A, Thøgers R, Costello CE, Ziegler LD. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS. *Anal Bioanal Chem* 2016:1–17. doi:10.1007/s00216-016-9540-x.
- [19] Smith-Palmer T, Douglas C, Fredericks P. Rationalizing the SER spectra of bacteria. *Vib Spectrosc* 2010;53:103–6. doi:10.1016/j.vibspec.2010.02.012.
- [20] Wu X, Chen J, Li X, Zhao Y, Zughaier SM. Culture-free diagnostics of *Pseudomonas aeruginosa* infection by silver nanorod array based SERS from clinical sputum samples. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2014;10:1863–70. doi:10.1016/j.nano.2014.04.010.
- [21] Bodelón G, Montes-García V, López-Puente V, Hill EH, Hamon C, Sanz-Ortiz MN, et al. Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nat Mater* 2016;15:1203–11. doi:10.1038/nmat4720.
- [22] van Lierop D, Faulds K, Graham D. Separation Free DNA Detection Using Surface Enhanced Raman Scattering. *Anal Chem* 2011;83:5817–21. doi:10.1021/Ac200514e.

- [23] Zhou H, Yang D, Ivleva NP, Mircescu NE, Niessner R, Haisch C. SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles. *Anal Chem* 2014;86:1525–33. doi:10.1021/ac402935p.
- [24] Kudo H, Itoh T, Kashiwagi T, Ishikawa M, Takeuchi H, Ukeda H. Surface enhanced Raman scattering spectroscopy of Ag nanoparticle aggregates directly photo-reduced on pathogenic bacterium (*Helicobacter pylori*). *J Photochem Photobiol A Chem* 2011;221:181–6. doi:10.1016/j.jphotochem.2011.03.009.
- [25] Uusitalo S, Kögler M, Välimaa A-L, Popov A, Ryabchikov Y, Kontturi V, et al. Detection of *Listeria innocua* on roll-to-roll produced SERS substrates with gold nanoparticles. *RSC Adv* 2016;6:62981–9. doi:10.1039/C6RA08313G.
- [26] Yang X, Gu C, Qian F, Li Y, Zhang JZ. Highly sensitive detection of proteins and bacteria in aqueous solution using surface-enhanced raman scattering and optical fibers. *Anal Chem* 2011;83:5888–94. doi:10.1021/ac200707t.
- [27] Preciado-Flores S, Wheeler D a, Tran TM, Tanaka Z, Jiang C, Barboza-Flores M, et al. SERS spectroscopy and SERS imaging of *Shewanella oneidensis* using silver nanoparticles and nanowires. *Chem Commun* 2011;47:4129. doi:10.1039/c0cc05517d.
- [28] Guven B, Basaran-Akgul N, Temur E, Tamer U, Boyacı İH. SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for *Escherichia coli* enumeration. *Analyst* 2011;136:740–8. doi:10.1039/C0AN00473A.
- [29] Boardman AK, Wong WS, Premasiri WR, Ziegler LD, Lee JC, Miljkovic M, et al. Rapid Detection of Bacteria from Blood with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2016;88:8026–35. doi:10.1021/acs.analchem.6b01273.
- [30] Kastanos E, Hadjigeorgiou K, Kyriakides A, Pitris C. Classification of bacterial samples as negative or positive for a UTI and antibiogram using surface enhanced Raman spectroscopy. In: Vo-Dinh T, Lakowicz JR, editors. *Prog. Biomed. Opt. Imaging - Proc. SPIE*, vol. 7911, 2011, p. 791107. doi:10.1117/12.874425.
- [31] Walter A, März A, Schumacher W, Rösch P, Popp J. Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device. *Lab Chip* 2011;11:1013–21. doi:10.1039/c0lc00536c.
- [32] Yang D, Zhou H, Haisch C, Niessner R, Ying Y. Reproducible *E. coli* detection based on label-free SERS and mapping. *Talanta* 2016;146:457–63. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.006.
- [33] Wang Y, Lee K, Irudayaraj J. Silver Nanosphere SERS Probes for Sensitive Identification of Pathogens. *J Phys Chem C* 2010;114:16122–8. doi:10.1021/jp1015406.
- [34] Ma X, Liu Y, Zhou N, Duan N, Wu S, Wang Z. SERS aptasensor detection of *Salmonella typhimurium* using a magnetic gold nanoparticle and gold

nanoparticle based sandwich structure. *Anal Methods* 2016;8:8099–105. doi:10.1039/C6AY02623K.

- [35] Zhang H, Ma X, Liu Y, Duan N, Wu S, Wang Z, et al. Gold nanoparticles enhanced SERS aptasensor for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron* 2015;74:872–7. doi:10.1016/j.bios.2015.07.033.
- [36] Khan SA, Singh AK, Senapati D, Fan Z, Ray PC. Targeted highly sensitive detection of multi-drug resistant salmonella DT104 using gold nanoparticles. *Chem Commun* 2011;47:9444. doi:10.1039/c1cc13199k.
- [37] Fan C, Hu Z, Mustapha A, Lin M. Rapid detection of food- and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;92:1053–61. doi:10.1007/s00253-011-3634-3.
- [38] Potara M, Jakab E, Damert A, Popescu O, Canpean V, Astilean S. Synergistic antibacterial activity of chitosan–silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* 2011;22:135101. doi:10.1088/0957-4484/22/13/135101.
- [39] Wang J, Wu X, Wang C, Shao N, Dong P, Xiao R, et al. Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of *Staphylococcus aureus* Based on Aptamer Recognition. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7:20919–29. doi:10.1021/acsami.5b06446.
- [40] Ankamwar B, Sur UK, Das P. SERS study of bacteria using biosynthesized silver nanoparticles as the SERS substrate. *Anal Methods* 2016;8:2335–40. doi:10.1039/C5AY03014E.
- [41] Li J, Qin T, Jia XX, Deng AH, Zhang X, Fan WH, et al. Rapid Identification of *Legionella* Pathogenicity by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Biomed Environ Sci* 2015;28:437–44. doi:10.3967/bes2015.061.
- [42] Kahraman M, Yazici MM, Şahin F, Çulha M. Convective assembly of bacteria for surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* 2008;24:894–901. doi:10.1021/la702240q.
- [43] Kahraman M, Zamaleeva AI, Fakhrullin RF, Culha M. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Anal Bioanal Chem* 2009;395:2559–67. doi:10.1007/s00216-009-3159-0.
- [44] Kahraman M, Keseroğlu K, Çulha M. On Sample Preparation for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria and the Source of Spectral Features of the Spectra. *Appl Spectrosc* 2011;65:500–6. doi:10.1366/10-06184.
- [45] Efeoglu E, Culha M. In Situ-Monitoring of Biofilm Formation by Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl Spectrosc* 2013;67:498–505. doi:10.1366/12-06896.
- [46] Cam D, Keseroglu K, Kahraman M, Sahin F, Culha M. Multiplex identification

- of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering. *J Raman Spectrosc* 2009;41:484–9. doi:10.1002/jrs.2475.
- [47] Jarvis RM, Goodacre R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2004;76:40–7. doi:10.1021/ac034689c.
- [48] Wu X, Xu C, Tripp RA, Huang Y, Zhao Y. Detection and differentiation of foodborne pathogenic bacteria in mung bean sprouts using field deployable label-free SERS devices. *Analyst* 2013;138:3005. doi:10.1039/c3an00186e.
- [49] Premasiri WR, Moir DT, Klempner MS, Krieger N, Jones G, Ziegler LD. Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. *J Phys Chem B* 2005;109:312–20. doi:10.1021/jp040442n.
- [50] Zeiri L, Efrima S. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: The effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu. *J Raman Spectrosc* 2005;36:667–75. doi:10.1002/jrs.1349.
- [51] Cheng H-W, Huan S-Y, Wu H-L, Shen G-L, Yu R-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopic detection of a bacteria biomarker using gold nanoparticle immobilized substrates. *Anal Chem* 2009;81:9902–12. doi:10.1021/ac9014275.
- [52] Pucek R, Ranc V, Kvítek L, Panáček A, Zbořil R, Kolář M. Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation. *Analyst* 2012;137:2866. doi:10.1039/c2an16310a.
- [53] Mine E, Yamada A, Kobayashi Y, Konno M, Liz-Marzán LM. Direct coating of gold nanoparticles with silica by a seeded polymerization technique. *J Colloid Interface Sci* 2003;264:385–90. doi:10.1016/S0021-9797(03)00422-3.
- [54] Mulvaney SP, Musick MD, Keating CD, Natan MJ. Glass-coated, analyte-tagged nanoparticles: A new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* 2003;19:4784–90. doi:10.1021/la026706j.
- [55] Doering WE, Nie S. Spectroscopic Tags Using Dye-Embedded Nanoparticles and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal Chem* 2003;75:6171–6. doi:10.1021/ac034672u.
- [56] Brown LO, Doorn SK. Optimization of the Preparation of Glass-Coated, Dye-Tagged Metal Nanoparticles as SERS Substrates. *Langmuir* 2008;24:2178–85. doi:10.1021/la703218f.
- [57] Lu W, Singh AK, Khan SA, Senapati D, Yu H, Ray PC. Gold nano-popcorn-based targeted diagnosis, nanotherapy treatment, and in situ monitoring of photothermal therapy response of prostate cancer cells using surface-enhanced raman spectroscopy. *J Am Chem Soc* 2010;132:18103–14. doi:10.1021/ja104924b.
- [58] Sivanesan A, Witkowska E, Adamkiewicz W, Dziewit Ł, Kamińska A, Waluk J. Nanostructured silver–gold bimetallic SERS substrates for selective identification

of bacteria in human blood. *Analyst* 2014;139:1037. doi:10.1039/c3an01924a.

- [59] Ranc V, Markova Z, Hajduch M, Prucek R, Kvitek L, Kaslik J, et al. Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Scattering Selective Determination of Dopamine in an Artificial Cerebrospinal Fluid and a Mouse Striatum Using Fe₃O₄/Ag Nanocomposite. *Anal Chem* 2014;86:2939–46. doi:10.1021/ac500394g.
- [60] Balzerova A, Fargasova A, Markova Z, Ranc V, Zboril R. Magnetically-assisted surface enhanced raman spectroscopy (MA-SERS) for label-free determination of human immunoglobulin G (IgG) in blood using Fe₃O₄@Ag nanocomposite. *Anal Chem* 2014;86:11107–14. doi:10.1021/ac503347h.
- [61] van Eeden PE, Wiese MD, Aulfrey S, Hales BJ, Stone SF, Brown SGA. Using time-resolved fluorescence to measure serum venom-specific IgE and IgG. *PLoS One* 2011;6:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0016741.
- [62] Drake P, Jiang P-S, Chang H-W, Su S-C, Tanha J, Tay L-L, et al. Raman based detection of *Staphylococcus aureus* utilizing single domain antibody coated nanoparticle labels and magnetic trapping. *Anal Methods* 2013;5:4152. doi:10.1039/c3ay40652k.
- [63] Prucek R, Panáček A, Fargašová A, Ranc V, Mašek V, Kvitek L, et al. Recrystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CrystEngComm* 2011;13:2242. doi:10.1039/c0ce00776e.
- [64] Fargašová A, Balzerová A, Prucek R, Sedláková MH, Bogdanová K, Gallo J, et al. Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2017;89:6598–607. doi:10.1021/acs.analchem.7b00759.
- [65] Fargašová A, Prucek R, Ranc V, Panáček A, Kvitek L, Zbořil R. Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation wavelengths. *RSC Adv* 2015;5:9737–44. doi:10.1039/C4RA13881C.
- [66] Li W, Camargo PHC, Lu X, Xia Y. Dimers of Silver Nanospheres: Facile Synthesis and Their Use as Hot Spots for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nano Lett* 2009;9:485–90. doi:10.1021/nl803621x.
- [67] Yang Y, Matsubara S, Xiong L, Hayakawa T, Nogami M. Solvothermal Synthesis of Multiple Shapes of Silver Nanoparticles and Their SERS Properties. *Society* 2007:9095–104. doi:10.1021/jp068859b.
- [68] Sánchez-Cortés S, García-Ramos JV, Morcillo G, Tinti A. Morphological Study of Silver Colloids Employed in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Activation when Exciting in Visible and Near-Infrared Regions. *J Colloid Interface Sci* 1995;175:358–68. doi:10.1006/jcis.1995.1467.

- [69] Aubard J, Bagnasco E, Pantigny J, Ruasse MF, Levi G, Wentrup-Byrne E. An Ion-Exchange Reaction as Measured by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Silver Colloids. *J Phys Chem* 1995;99:7075–81. doi:10.1021/j100018a046.
- [70] Kobayashi SD, Deleo FR. Staphylococcus aureus Protein A promotes Immune Suppression. *Am Soc Microbiol* 2013;4:4–6. doi:10.1128/mBio.00764-13.Updated.
- [71] Poulsen FM, Johansen JT, Pedersen JA. Structural properties of the combining site of anti Streptococcus group a antibodies: Spin label-hapten studies. *Carlsberg Res Commun* 1977;42:369–78. doi:10.1007/BF02906121.
- [72] Pradier C-M, Salmain M, Zheng L, Jaouen G. Specific binding of avidin to biotin immobilised on modified gold surfaces. *Surf Sci* 2002;502–503:193–202. doi:10.1016/S0039-6028(01)01932-X.
- [73] Liu Z, Amiridis MD. Quantitative FT-IRRAS Spectroscopic Studies of the Interaction of Avidin with Biotin on Functionalized Quartz Surfaces. *J Phys Chem B* 2005;109:16866–72. doi:10.1021/jp0535240.
- [74] Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2007;1767:1073–101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [75] Haris PI. Can infrared spectroscopy provide information on protein-protein interactions? *Biochem Soc Trans* 2010;38:940–6. doi:10.1042/BST0380940.
- [76] Harz M, Rösch P, Peschke K-D, Ronneberger O, Burkhardt H, Popp J. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions. *Analyst* 2005;130:1543. doi:10.1039/b507715j.
- [77] Knauer M, Ivleva NP, Liu X, Niessner R, Haisch C. Surface-enhanced raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms. *Anal Chem* 2010;82:2766–72. doi:10.1021/ac902696y.
- [78] Shao JH, Zou YF, Xu XL, Wu JQ, Zhou GH. Evaluation of structural changes in raw and heated meat batters prepared with different lipids using Raman spectroscopy. *Food Res Int* 2011;44:2955–61. doi:10.1016/j.foodres.2011.07.003.
- [79] Ton-That H, Mazmanian SK, Alksne L, Schneewind O. Anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J Biol Chem* 2002;277:7447–52. doi:10.1074/jbc.M109945200.
- [80] Chauhan RP, Singh G, Singh S, Bag N, Patra M, Vadera SR, et al. Biotinylated magnetic nanoparticles for pretargeting: Synthesis and characterization study. *Cancer Nanotechnol* 2011;2:111–20. doi:10.1007/s12645-011-0021-9.
- [81] Puppels GJ, Garritsen HS, Segers-Nolten GM, de Mul FF, Greve J. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes. *Biophys J*

1991;60:1046–56. doi:10.1016/S0006-3495(91)82142-7.

- [82] Halvorson RA, Leng W, Vikesland PJ. Differentiation of microcystin, nodularin, and their component amino acids by drop-coating deposition Raman spectroscopy. *Anal Chem* 2011;83:9273–80. doi:10.1021/ac201617g.
- [83] Guicheteau J, Argue L, Emge D, Hyre A, Jacobson M, Christesen S. Bacillus spore classification via surface-enhanced Raman spectroscopy and principal component analysis. *Appl Spectrosc* 2008;62:267–72. doi:10.1366/000370208783759623.
- [84] Liu TT, Lin YH, Hung CS, Liu TJ, Chen Y, Huang YC, et al. A high speed detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for monitoring antibiotic-induced chemical changes in bacteria cell wall. *PLoS One* 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0005470.
- [85] Kropec A, Maira-Litran T, Jefferson KK, Grout M, Cramton SE, Gotz F, et al. Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* Is Essential for Virulence in Murine Models of Systemic Infection. *Infect Immun* 2005;73:6868–76. doi:10.1128/IAI.73.10.6868-6876.2005.
- [86] Shafreen RMB, Srinivasan S, Manisankar P, Pandian SK. Biofilm formation by *Streptococcus pyogenes*: Modulation of exopolysaccharide by fluoroquinolone derivatives. *J Biosci Bioeng* 2011;112:345–50. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.06.013.
- [87] Liu M, Prakash C, Nauta A, Siezen RJ, Francke C. Computational analysis of cysteine and methionine metabolism and its regulation in dairy starter and related bacteria. *J Bacteriol* 2012;194:3522–33. doi:10.1128/JB.06816-11.
- [88] Suchomel P, Prucek R, Černá K, Fargašová A, Panáček A, Gedanken A, et al. Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes. *Ultrason Sonochem* 2016;32:165–72. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.03.006.

Seznam autorských publikací

- [i] **Fargašová, A.**; Balzerová, A.; Pucek, R.; Htoutou Sedláková, M.; Bogdanová, K.; Gallo, J.; Kolář, M.; Ranc, V. and Zbořil, R. Rapid Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS). *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 89, 6598–6607, 2017.
- [ii] **Fargašová, A.**; Pucek, R.; Ranc, V.; Panáček, A.; Kvítek, L. and Zbořil, R. Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation wavelengths, *RSC ADVANCES*, 5(13), 9737–9744, 2015.
- [iii] Balzerová, A.; **Fargašová, A.**; Marková, Z.; Ranc, V. and Zbořil, R. Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 86(22), 11107-11114, 2015.
- [iv] Suchomel, P.; Pucek, R.; Černá, K.; **Fargašová, A.**; Panáček, A.; Gedanken, A.; Zbořil, R. and Kvítek, L. *Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes*, *ULTRASONICS SONOCHEMISTRY*, 32, 165-172, 2016.
- [v] Pucek, R.; Panáček, A.; **Fargašová, A.**; Ranc, V.; Mašek, V.; Kvítek, L. and Zbořil, R. *Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment-a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy*, *CRYSTENGCOMM*, 13(7), 2242-2248, 2011.
- [vi] Cieslářová, P.; Šišková, K. M.; **Fargašová, A.** and Zbořil, R. *Anionic organic species detection using silver nanoparticles?* *NANOCON 2013, 5th NANOCON International Conference*, 203-208, 2014.
- [vii] Lazar, P.; Otyepková, E.; Banáš, P.; **Fargašová, A.**; Šafářová, K.; Lapčík, L.; Pechoušek, J.; Zbořil, R. and Otyepka, M. *The nature of high surface energy sites in graphene and graphite* *CARBON*, 73, 448-453.

Tato disertační práce je založena na výsledcích prací [i – iv].