

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Příprava modifikovaných vrstev stříbra pro účely selektivní
detekce fyziologicky aktivních látek pomocí povrchem
zesílené Ramanovy spektroskopie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Zuzana Foltisová
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....
Vlastnoruční podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce RNDr. Václavu Rancovi, PhD. za odborné rady, věnovaný čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat celé Katedře fyzikální chemie za umožnění vypracování této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu po celou dobu mého studia

Bibliografická identifikace:

Autor: Zuzana Foltisová

Název práce: Příprava modifikovaných vrstev stříbra pro účely selektivní detekce fyziologicky aktivních látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra fyzikální chemie, UP Olomouc

Vedoucí práce: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt: Předmětem této bakalářské práce je příprava modifikovaných vrstev stříbra pro účely selektivní detekce fyziologicky aktivních látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Tenká vrstva nanočástic stříbra byla deponována na skleněném substrátu. Na získanou vrstvu byl pomocí linkerů na bázi krátkých alkylových řetězců imobilizován avidin. Byly vybrány parametry s nezanedbatelným vlivem na proces imobilizace čítaje: koncentrace a podíl linkerů a dokrývajícího činidla, koncentrace a podíl činidel sloužících k aktivaci volných karboxylových skupin a v neposlední řadě koncentrace proteinu (avidinu). Vliv těchto parametrů, jež jsou důležité pro takto provedenou povrchovou úpravu, byl následně evaluován pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Na základě Ramanových spekter byla stanovena míra vlivu parametrů na imobilizaci proteinu. Připravená vrstva byla následně využita ke studiu exprese proteinů cirkulujících nádorových buněk.

Klíčová slova: stříbrná vrstva, nanočástice, avidin, imobilizace, SERS, CTC

Počet stran: 48

Jazyk: čeština

Bibliographic identification:

Author: Zuzana Foltisová

Title: The preparation of modified layers of silver nanoparticles for purposes of selective detection of physiological important markers by surface enhance Raman spectroscopy

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of physical chemistry, UP Olomouc

Supervisor: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

The Year of presentation: 2014

Abstract: The subject of this bachelor thesis is preparation of modified layers of silver nanoparticles for purposes of selective detection of physiological important compounds by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). The thin film of silver nanoparticles were deposited on a glass substrate. On resulting layer was immobilized avidin by using linkers based on short alkyl chains. Parametres such as: concentration and ratio of linkers, concentration of activating agents and concentration of protein, which had an influence on process of immobilization were studied by SERS and scanning electron microscopy (SEM). On basis of Raman spectra was determined influence of parametrs on immobilization of protein. Prepared layer was used to study expression of proteins of circulating tumor cells.

Keywords: silver layer, nanoparticles, avidin, immobilization, SERS, CTC

Number of Pages: 48

Language: Czech

ÚVOD.....	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Disperzní soustava	9
1.1. Definice disperzní soustavy	9
1.2. Klasifikace disperzních soustav	9
2. Koloidní soustava	11
2.1. Definice koloidní soustavy.....	11
2.1.1. Klasifikace koloidních soustav.....	11
2.2. Vlastnosti koloidních soustav	13
2.2.1. Kinetické vlastnosti	13
2.2.2. Optické vlastnosti	13
2.2.2.1. Absorpce záření	14
2.2.2.2. Rozptyl záření	14
2.3. Příprava koloidů	14
2.3.1. Kondenzační metody	15
2.3.2. Dispergační metody.....	15
2.4. Metody studia koloidních soustav.....	15
2.4.1. Charakterizace velikosti částic pomocí UV/VIS spektrometrie.....	16
2.4.2. Charakterizace velikosti částic pomocí metody DLS.....	16
2.4.3. Charakterizace velikosti a tvaru částic elektronovými mikroskopy.....	18
3. Vrstvy koloidního stříbra	19
3.1. Příprava vrstev	20
3.1.1. Fyzikální metody.....	21
3.1.2. Chemické metody	22
3.2. Vlastnosti vrstev	24
4. Modifikace a aplikace vrstev	24
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
5. Materiál, přístroje a pracovní postupy	30
5.1. Chemikálie	30
5.2. Použité přístroje	30
5.3. Pracovní postupy.....	30
5.3.1. Příprava zásobních roztoků	30
5.3.2. Použité poměry a koncentrace.....	31

6. Výsledky a diskuze	32
6.1. Imobilizace avidinu	32
6.2. Aplikace modifikované vrstvy na CTC.....	38
ZÁVĚR	43
SUMMARY	44
LITERATURA	45

ÚVOD

Stále častěji se dostává pojem nanočástice do podvědomí mnoha lidí. Kvůli svým malým rozměrům v rozmezí od 1 do 100 nanometrů, vykazují nanočástice unikátní vlastnosti, díky kterým jsou využívány nejenom v chemii, ale setkáváme se s nimi i v běžném každodenním životě. Fyzikálně – chemické vlastnosti těchto částic se značně liší od vlastností látek makroskopických. Nanotechnologie se uplatňují zejména ve strojírenství, elektronice, automobilovém, ale i např. v textilním průmyslu.

V posledních letech zaznamenaly nanotechnologie značný nárůst aplikačního potenciálu v medicíně. Nanočástice se stávají novou perspektivní součástí léků proti nádorovým onemocněním. Ačkoli lze mluvit teprve o prvopočátcích laboratorního výzkumu a testování léčiv v oblasti onkologie, představují nanočástice a nanomateriály obrovský příslib pro cílenou léčbu budoucí generace. Souboj s časem je důležitým kritériem pro léčbu onkologických onemocnění, kdy včasná detekce rakovinných buněk hraje jednu z nejdůležitějších rolí pro následnou diagnózu a účinnou léčbu.

Navzdory složité problematice tohoto tématu je předložená bakalářská práce zaměřena na selektivní detekci fyziologicky aktivních látek pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie. Metoda SERS využívá nanočástice (zlato, stříbro) k zesílení Ramanova signálu. V představené bakalářské práci je studován postup imobilizace avidinu na stříbrný povrch a dále pak možnost využití takto imobilizovaného avidinu pro studium interakcí této molekuly s proteiny lokalizovanými na povrchu cirkulujících nádorových buněk pomocí SERS. Cirkulující nádorové buňky jsou obsaženy v krevním řečišti. Vzhledem ke své pohyblivosti v periferní krvi tyto buňky způsobují nárůst metastáz při rakovinném bujení nebo dokonce případnou recidivu. Díky této specifické interakci avidin-biotin lze aplikační rozsah rozšířit právě i na selektivní detekci CTC.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Disperzní soustava

1.1. Definice disperzní soustavy

Disperzní soustava neboli disperze je soustava tvořená spojitým disperzním prostředím, ve kterém je rovnoměrně rozptýlen disperzní podíl ve formě částic.

Chemické vlastnosti disperzního podílu se nemusí nutně lišit od disperzního prostředí a nemusí, ale v mnoha případech mohou představovat samostatnou fázi. Na základě toho lze rozlišit disperzní složku nebo disperzní fázi.

Převážná většina disperzních soustav patří k vícesložkovým systémům. Vícesložkové systémy můžeme rozdělit na heterogenní vícesložkové systémy, ve kterých se disperzní podíl liší svým složením od disperzního prostředí a tvoří samostatnou fázi, a na všechny druhy roztoků, které představují homogenní vícesložkové systémy. Zcela výjimečně mohou vznikat i heterogenní jednosložkové systémy, které jsou však velmi nestabilní.¹

1.2. Klasifikace disperzních soustav

Disperzní soustavy lze klasifikovat podle mnoha kritérií, z nichž nejčastěji využívaným je velikost či tvar dispergovaných částic nebo skupenství disperzní fáze a disperzního prostředí. Velikost dispergovaných částic soustavy je různá a lze ji vyjádřit tzv. stupněm disperzity, který představuje převrácenou hodnotu lineárního rozměru částice (průměr, délka hrany apod.). Platí, že čím jemněji je disperzní fáze rozptýlena, tím vyšší je stupeň disperzity.

Vyskytují-li se v soustavě všechny částice disperzní fáze se stejnou velikostí, nazýváme tuto soustavu monodisperzní, naopak mají-li částice disperzní fáze různou velikost, mluvíme o soustavě polydisperzní. Podle tvaru částic lze soustavy rozlišit na homodisperzní a heterodisperzní. Dále lze klasifikovat disperze na laminárně, korpuskulárně a fibrilárně disperzní.

Podle stupně disperzity lze disperzní soustavy rozdělit do 3 skupin, mezi nimiž existuje plynulý přechod, nemají tedy ostře vymezené hranice, a to na disperze analytické, koloidní a hrubé, které se dále dělí na mikrodisperzní a makrodisperzní.²

Analytická disperze je homogenní soustava, jejíž částice dosahují velikosti do 1nm. Jsou to termodynamicky stálé nefiltrovatelné roztoky, které rychle difundují a vykazují vysoký osmotický tlak. Koloidní disperze patří mezi mikroheterogenní soustavy s velikostí částic od 10^{-9} do 10^{-6} m. Projevuje se u nich slabá difúze a osmóza. Hrubě disperzní soustavu řadíme mezi makroheterogenní soustavy, kdy částice dosahují velikosti větší než 10^{-6} m. Tyto soustavy jsou termodynamicky nestálé, nedifundují a nevyvolávají žádný osmotický tlak.³

2. Koloidní soustava

2.1. Definice koloidní soustavy

Koloidní disperze je heterogenní systém vyznačující se vysokým stupněm disperzity, tj. vysokým stupněm rozptýlení částic disperzního podílu v disperzním prostředí.³

2.1.1. Klasifikace koloidních soustav

Ve světle rozmanitých vlastností koloidních systémů neexistuje jednotný způsob jejich klasifikace. Jedním z mnoha kritérií je například skupenský stav disperzní fáze a disperzního prostředí a rovněž velký význam pro klasifikaci koloidů představují vzájemné interakce částic mezi disperzní fází a disperzním prostředím. Na základě skupenství lze koloidní systémy rozdělit do osmi skupin (pro soustavu plyn-plyn neexistuje koloidní systém).^{2,3}

disperzní prostředí	disperzní fáze	označení koloidní disperze
plynné	plynný	netvoří koloid
	kapalný	aerosoly
	pevný	aerosoly
kapalné	plynný	pěny
	kapalný	emulze
	pevný	lyosoly
pevné	plynný	tuhé pěny
	pevný	tuhé emulze
	pevný	tuhé soly

Tab. 1. Klasifikace koloidů dle skupenského stavu.²

Obecně lze koloidní systémy označit názvem soly, kde lze na základě použité předpony rozlišit, ve kterém disperzním prostředí se částice podílu nachází. Koloidní systémy s plynným disperzním prostředím se označují jako aerosoly (aero = vzduch),

naopak koloidní systémy s kapalným disperzním prostředím lyosoly (lyos = rozpouštědlo).

Lyosoly lze dále klasifikovat podle vzájemné interakce disperzní fáze a disperzního prostředí, tedy dle vlastností fázového rozhraní na tři skupiny, a to na soustavy lyofilní, lyofóbní a asociativní.^{2,4}

Lyofilní koloidy jsou označovány také jako koloidní roztoky. Fázové rozhraní je zde rozprostřeno do větších šířek. Jsou tvořeny jedinou fází složenou z disperzní fáze a disperzního prostředí, můžeme tedy mluvit o soustavě homogenní. U hydrofilní soustavy je disperzní prostředí voda. Vznikají samovolně rozpuštěním vysokomolekulárních látek a jsou termodynamicky stabilní.

Lyofóbní koloidy neboli koloidní disperze mají ostře ohraničené fázové rozhraní. Považujeme je za soustavy heterogenní, kde disperzní fáze a disperzní prostředí představují dvě různé fáze tvořené anorganickými látkami. Tyto soustavy jsou termodynamicky nestálé a nevznikají samovolně. Můžeme je dále dělit na hydrofóbní, disperzní prostředí je tvořené vodou a organosoly, je-li disperzní prostředí organická kapalina.

Asociativní koloidy nemají pevně dané fázové rozhraní. Vznikají samovolnou vratnou asociací nízkomolekulárních látek v pravém roztoku za ustálení rovnováhy. Vzniklé částice nazýváme micely.²

Další možnou variantou je klasifikace podle vzájemného působení částic na volné a vázané koloidní systémy. Jak už nám název napovídá, k volně dispergovaným soustavám se řadí systémy bez struktury, nedochází ke vzájemnému spojení částic disperzní fáze. Částice mají schopnost se neustále pohybovat v rámci disperzního prostředí vlivem gravitačních sil a Brownova pohybu. Patří sem lyosoly, emulze, rozptýlené suspenze a aerosoly.

U vázaných dispergovaných soustav dochází ke tvorbě struktur v disperzním prostředí díky působení mezimolekulárních sil mezi jednotlivými částicemi. Částice nemají schopnost samovolného pohybu, mohou pouze vibrovat. Mezi vázané systémy řadíme gely, koncentrované suspenze a emulze.⁴

2.2. Vlastnosti koloidních soustav

2.2.1. Kinetické vlastnosti

Molekuly a atomy se neustále chaoticky pohybují. Důsledkem tepelného pohybu jsou srážky molekul disperzního prostředí s koloidními částicemi a změna jejich rychlosti a směru. Tento jev se nazývá Brownův pohyb, jeho intenzita vzrůstá se zmenšující se velikostí částic a zvyšující se teplotou. Projevem Brownova pohybu jsou difúze, osmóza a sedimentace.^{2,3}

Difúze. Hnací silou je rozdíl koncentrací (koncentrační gradient) neboli rozdíl chemických potenciálů difundující látky v různých oblastech soustavy. Směr difúze je dán koncentračním gradientem, a to z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s koncentrací nižší. Výsledkem je dosažení rovnováhy vyrovnáním koncentrací ve všech částech soustavy. Rychlost difúze je nepřímo úměrná poloměru částic.^{2,5}

Osmóza. Vyrovnávání rozdílných koncentrací roztoků oddělených od sebe semipermeabilní (polopropustnou) membránou. Membránou prostupují pouze molekuly rozpouštědla, ostatní větší molekuly jsou zachyceny na pórech membrány. Hnací silou tohoto děje je osmotický tlak.

Sedimentace. Pohyb koloidních částic ve směru působení gravitační síly F_g je závislý na hmotnosti a tvaru částic, ale také na vlastnostech a hustotě prostředí, ve kterém se tyto částice pohybují. Mimo gravitační síly F_g působí na částice také vztlaková síla F_{vz} a viskózní odpor F_{vis} .²

2.2.2. Optické vlastnosti

Při dopadu elektromagnetického záření na koloidní soustavu dochází současně k několika jevům. Lze pozorovat lom a odraz paprsků od částic disperzní fáze, rozptyl neboli difrakci, absorpci světla a jeho následnou přeměnu energie na teplo nebo jen obyčejný průchod záření. Tyto jevy jsou nelineárně závislé na velikosti částic systému a vždy jeden z nich převládá v závislosti na vlastnostech systému.^{2,4}

2.2.2.1. Absorpce záření

Přechod elektronů z nižšího energetického stavu do stavů s vyšší energií vyvolaný pohlcením (absorpcí) elektromagnetického záření. Absorpci záření látkou A popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon cd$$

kde I je intenzita prošlého záření látkou, I_0 je intenzita dopadajícího světla na látku, ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace látky a d je tloušťka vrstvy, kterou paprsek prochází. U koloidních systémů je absorpce záření závislá na velikosti částic disperzní fáze. ²

2.2.2.2. Rozptyl záření

Jestliže vlnová délka záření je větší než poloměr částice disperzní fáze, nastane jev, který nazýváme rozptyl záření. Pokud není splněna tato podmínka, tedy vlnová délka je menší ve srovnání s poloměrem částice, dochází k odrazu světla, což se projeví jako vizuálně viditelný zákal. ⁴

Při rozptylu světla se nemění energetický stav valenčních či vazebných elektronů, nedochází tedy k pohlcení kvanta záření, jak tomu bylo u absorpce, ale k následnému vyzáření přijatého kvanta energie všemi směry s různou intenzitou, avšak beze změny vlnové délky. Rozptyl světla můžeme dále rozdělit na statický a dynamický, jež v dnešní době nabývá na významu zvláště při určování velikosti částic. ²

2.3. Příprava koloidů

Jak už bylo dříve řečeno, lyofilní roztoky jsou termodynamicky stabilní a vznikají samovolným rozpouštěním, což je výsledkem adhezních sil (přitažlivé síly molekul na rozhraní fází), které jsou významnější než síly kohezní (přitažlivé síly molekul určité fáze). Samovolné rozpouštění probíhá tedy bez dodání energie vlivem tepelného pohybu rozpouštědla. U lyofilních roztoků se setkáváme i s názvem reverzibilní neboli vratné koloidy a to proto, že po jejich destabilizaci je možný návrat

do koloidní formy. Oproti tomu lyofobní disperze jsou ireverzibilní (nevratné), termodynamicky nestálé a nevznikají samovolně. Jejich přípravu lze rozdělit na metody kondenzační a dispergační.

2.3.1. Kondenzační metody

U kondenzačních metod se využívá vhodných chemických reakcí k přeměně pravých roztoků (homogenních soustav) na soustavy koloidní. Jde tedy o zvětšování částic pomocí srážecích, oxidačních a redukčních reakcí. Méně využívaným, ale daleko jednodušším způsobem přípravy jsou fyzikální kondenzační metody založené na změně podmínek (teplota, tlak) nebo rozdílné rozpustnosti látek. Vhodnou změnou rozpouštědla, ve kterém je daná látka málo rozpustná, dochází ke kondenzaci za vzniku koloidů.

2.3.2. Dispergační metody

Dispergační metody jsou založeny na fyzikálních postupech s využitím mechanické práce a jejich využití je nejen v laboratoři, ale i v průmyslové praxi. U dispergačních metod dochází k přeměně hrubých disperzí na látky koloidních rozměrů zmenšováním částic. Vzhledem k vysoké nestabilitě vzniklých koloidů je nutno dodávat do soustavy různé ochranné stabilizátory, které jednak stabilizují nový koloid, ale také napomáhají jednoduššímu mechanickému rozmělnění. Nejčastěji se jako stabilizátory používají povrchově aktivní látky, ale i látky polymerního charakteru, např. želatina, která tvoří díky adsorpci ochrannou vrstvu na povrchu vzniklého koloidu, a tím jej chrání vůči zpětnému shlukování částic.³

K dispergačním metodám se řadí: mechanické rozmělnění (kulové mlýny) a rozmělnění pomocí ultrazvuku, peptizaci, elektrické rozprašování založené na přidavku elektrického proudu a laserovou ablaci.²

2.4. Metody studia koloidních soustav

Mnoho analytických metod je snadno aplikovatelných i na charakterizaci nanostruktur a nanomateriálů. V dnešní době se optická spektrometrie stává čím dál využívanější technikou k charakterizaci nanomateriálů. Techniky lze obecně rozdělit na

dvě hlavní podskupiny: absorpční elektronová spektrometrie (zejména UV/VIS) a vibrační spektrometrie (Infračervená a Ramanova spektrometrie).⁶

K charakterizaci koloidů se v praxi dále používá metoda dynamického rozptylu světla (DLS) nebo metody nepřímé – mikroskopické, kde řadíme transmisní elektronový mikroskop (TEM) a rastrovací elektronový mikroskop (SEM).

2.4.1. Charakterizace velikosti částic pomocí UV/VIS spektrometrie

UV/VIS spektrometrie je technika založená na absorpci ultrafialového a viditelného záření zředěnými roztoky v oblasti 200 až 800 nm. Dochází k excitaci valenčních elektronů, tedy jejich přechodu do vyšších energetických hladin, kdy výsledkem jsou elektronová absorpční spektra. Elektronové absorpční spektrum vyjadřuje závislost absorpce na vlnové délce.⁷

Vychází z Lambert-Beerova zákona, přičemž ze znalosti molárního absorpčního koeficientu můžeme stanovit koncentraci sledované látky.

2.4.2. Charakterizace velikosti částic pomocí metody DLS

Efektu dynamického rozptylu světla (DLS) využívá například fotonová korelační spektroskopie (PCS), která je založena na ozařování roztoku analytu monochromatickým laserem. Jsou měřeny fluktuace intenzity rozptýleného světla jako funkce času. Údaje o intenzitě slouží k určení distribuce velikosti částic.

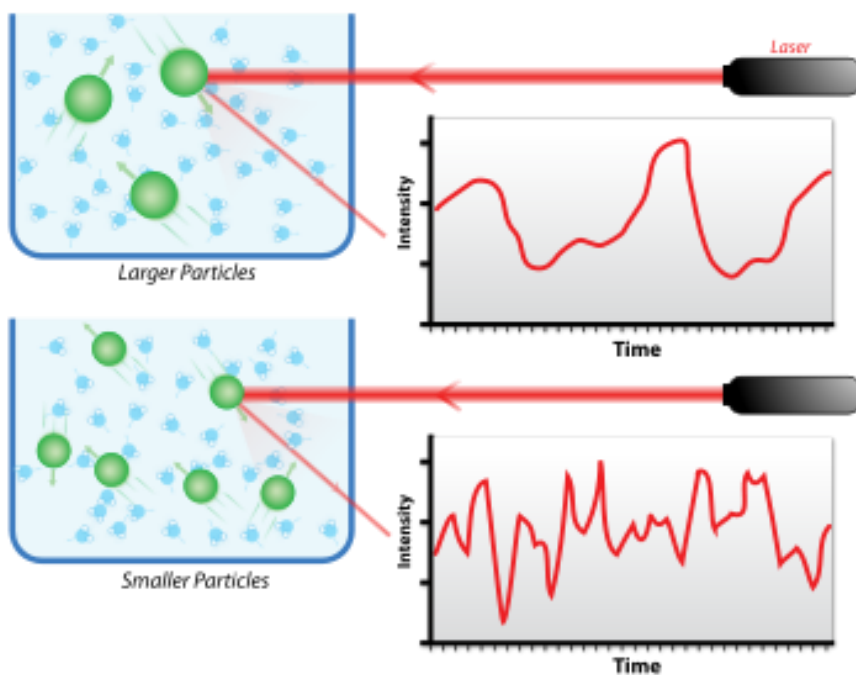
Obecně platí, jestliže je vzorek částic ozařován světlem s průměrem mnohem menším než je vlnová délka světla, pak bude každá částice ohýbat dopadající světlo všemi směry. Tento jev se nazývá Rayleighův rozptyl.

Jak už bylo řečeno, koloidní částice se pohybují náhodně při kolizích s molekulami rozpouštědla. Brownův pohyb je důležitý jev pro DLS analýzu, protože umožňuje využití Stokes-Einsteinovy rovnice vyjadřující vztah mezi rychlostí částice v roztoku k jeho hydrodynamickému poloměru.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a}$$

Ve Stokes-Einsteinově rovnici představuje D difúzní rychlost, k je Boltzmannova konstanta, T je teplota, η je viskozita, a je hydrodynamický poloměr částice.

Difúzní rychlost (D) ve Stokes-Einsteinově vztahu je nepřímo úměrná poloměru částice (a), a to v systému vykazující Brownův pohyb ukazuje, že malé částice jsou difundovány rychleji než velké. To je klíčový princip v DLS analýze.⁸



Obr. 1. Hypotetický dynamický rozptyl světla dvou vzorků: Pro větší částice v horní části obrázku a pro menší částice ve spodní části.⁹

2.4.3. Charakterizace velikosti a tvaru částic elektronovými mikroskopy

Elektronová mikroskopie je významnou experimentální metodou, která poskytuje informace o vnitřní mikrostruktuře materiálů v řádech několika mikrometrů až po rozměry atomů.

Mikrostruktura je zkoumána v prostředí vakua za ozařování elektronovým svazkem, který vzniká emisí elektronů z katody, jež jsou dále akcelerovány k anodě. Svazek je soustředěn ve vhodném elektrostatickém, magnetickém nebo elektromagnetickém poli, což zajišťuje potřebné zvětšení. Obraz u elektronové mikroskopie je vytvářen interakcemi mezi preparátem a elektronovým svazkem a podle jeho tvorby můžeme elektronovou mikroskopii dělit na transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM).¹⁰

3. Vrstvy koloidního stříbra

Za tenké vrstvy lze považovat materiály, jejichž třetí rozměr (tloušťka) je zanedbatelný a jsou tak zdánlivě dvourozměrné. Rozměry tenkých vrstev se pohybují v oblasti 1 mikrometru až 1 nanometru.¹¹

Všechny fázové přeměny, včetně tvorby tenkých vrstev, zahrnují několik procesů vzniku. V prvotní fázi tvorby vrstvy známé jako nukleace, dochází ke kondenzaci par atomů či molekul, které se následně permanentně usadí na substrát. Po expozici substrátu a dopadajících par je možné pozorovat rovnoměrné rozložení malých, ale vysoce mobilních klastrů a ostrůvků. Původní jádra substrátu začlení dopadající atomy a následně i vznikající klastry, čímž roste jejich velikost.¹²

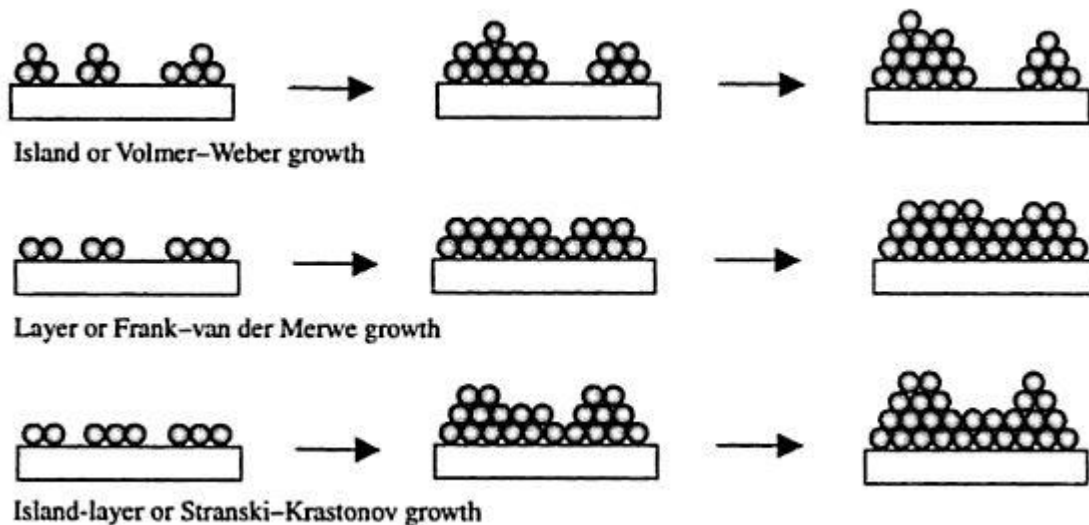
V další fázi dochází ke koalescenci. Splývání ostrůvků vede ke snižování jejich hustoty, což má za následek odkrývání substrátu a další nukleaci. V konečné fázi je celý substrát pokryt celistvou tenkou vrstvou.¹³

Prvotní vznik vrstev lze popsat třemi základními růstovými modely (obr. 2.):

Volmer-Weber. Deponované atomy jsou mnohem silněji vázány sami k sobě než k substrátu. Dochází k růstu klastrů v samostatné trojrozměrné ostrůvky, které se poté spojí.

Frank-van der Merve. Tento růstový model vzniká v důsledku silnější interakce deponovaných atomů k substrátu, než jsou jejich vzájemné interakce. Nejmenší stabilní klastry rostou a vytváří se rovinná monovrstva, na které můžou vznikat další slaběji vázané monovrstvy.

Stranski-Krastonov. Tento typ růstového módu představuje kombinaci předchozích dvou typů a představuje přechod od růstu dvojrozměrného k třírozměrnému. Jakmile vznikne jedna či více monovrstev a vznik další se stává energeticky nevýhodným, dochází ke vzniku ostrůvků.¹³



Obr. 2. Schémata tří základních módů počáteční nukleace při růstu vrstev. ⁶

Nukleace hraje důležitou roli při určování krystalické mikrostruktury při tvorbě tenkých vrstev, která se v konečném stadiu vyvíjí v daném depozičním procesu. Struktura vrstvy je silně ovlivněna tím, co se děje v průběhu nukleace a jejím následném růstu. ⁶

3.1. Příprava vrstev

Depozice tenkých vrstev je předmětem intenzivního studia už mnoho let, během kterých bylo vyvinuto mnoho metod. Mnohé z nich jsou široce využívány v průmyslu, což vede k dalšímu předpokládanému rozvoji těchto technik. Obecně lze metody růstu vrstev rozdělit na dvě skupiny, a to na depozici z plynné fáze a metody růstu vrstev z kapaliny. První metoda zahrnuje napařování, naprašování, epitaxi z molekulárních svazků (Molecular Beam Epitaxy, MBE), chemickou depozici z plynné fáze (Chemical Vapor Deposition, CVD) a atomovou depozici (Atomic Layer Deposition, ALD). Příkladem metod růstu vrstev z kapaliny jsou elektrochemické depozice, depozice z chemického roztoku (Chemical Solution Deposition, CSD), Langmuirovy-Blodgettové filmy a samovolně uspořádané monovrstvy (self-assembled monolayers, SAM). Tyto metody lze také zjednodušeně dělit na metody fyzikální a chemické. ⁶

3.1.1. Fyzikální metody

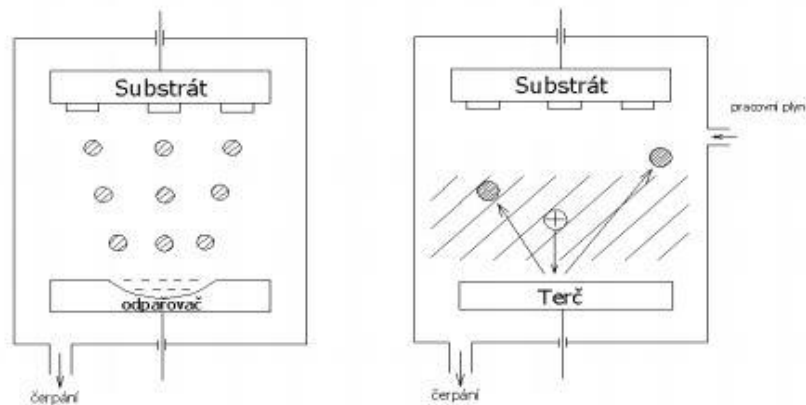
Fyzikální depozice z plynné fáze (PVD, Physical Vapour Deposition) je souhrnný název pro řadu depozičních metod pro nanášení tenké vrstvy doprovázenými fyzikálními procesy. Atomy jsou uvolňovány z kapaliny či pevné fáze převedené na páry, které kondenzují na substrátu za vakua. Metody PVD se slouží k nanášení vrstev s tloušťkou v rozmezí 10^{-3} až 10^{-6} m. ¹⁴

Tyto technologie lze dělit z hlediska způsobu převedení pevné fáze na plynnou na dvě základní metody, napařování a naprašování. ¹³

Napařování. Je jedna z nejjednodušších metod pro přípravu tenkých vrstev. Deponovaný materiál je uvolňován prostřednictvím tepelné energie ve formě par. Páry následně expandují do vakuové komory, kde na substrátu za nižší teploty kondenzují.

Naprašování. Působením iontů plynu, které naráží na materiál, dochází k vyrazení atomů z povrchu. Zdroj nanášeného materiálu je používán jako terč a společně se substrátem slouží jako elektrody umístěné v naprašovací komoře. Jako inertní plyn se využívá argon a po zavedení elektrického proudu slouží jako médium pro elektrický výboj a vede k reakci naprašovaných atomů a tvorbě sloučeniny na vrstvě. Rozprašené částice jsou převážně neutrální atomy v základním stavu, které po vyrazení putují směrem k substrátu. Tlak v plynové komoře je dalším důležitým faktorem, zda bude rozprašená částice vycházející z katody putovat na substrát. Depozice naprašováním může sloužit pouze jako podklad pro další tvorbu a růst filmů. Použitím více různých terčů můžeme postupně vytvořit vrstevnaté nátěry. Výhodou této metody je vysoká stabilita, rovnoměrné a hladké rozložení povrchu vrstvy, které je dáno vysokou mobilitou kondenzovaných atomů. Další výhodou je regulace tloušťky vzhledem k relativně velké ploše rozprašovacího zdroje a také mnohostranné využití této metody z hlediska deponovaného materiálu.

Dle volby podmínek, při kterých se naprašování tenkých vrstev provádí, můžeme tuto metodu dále dělit na rozprašování iontového svazku (Ion Beam Sputtering), stejnosměrné (DC) naprašování, vysokofrekvenční (RF) naprašování, magnetronové naprašování. ¹⁵



Obr. 3. Schéma ilustrující princip základních PVD metod: napařování (nalevo) a naprašování (napravo).¹³

3.1.2. Chemické metody

Chemická depozice z plynné fáze (CVD, Chemical Vapour Deposition). Metoda využívající chemických reakcí k nanesení vrstvy na substrát. Reakce více látek nebo rozklad pouze jedné látky za vzniku produktu, který následně pokrývá substrát tenkou vrstvou. Chemická depozice probíhá za zvýšené teploty dodáním energie a vznikající vedlejší produkty jsou odstraněny proudem plynu či vakua.

Je využíváno i dalších alternativních zdrojů energie jako je plazma či optického buzení s tou výhodou, že požadují nižší teplotu na substrátu. V dnešní době existuje obrovské množství modifikací této metody, např. CVD za sníženého tlaku (Low Pressure CVD, LPCVD), CVD za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure CVD, APCVD), CVD iniciované plasmou (Plasma Enhanced CVD, PECVD), epitaxe atomových vrstev (Atomic Layer CVD, ALCVD), CVD za přítomnosti aerosolu (Aerosol Assisted CVD, AACVD) atd.¹⁶

Metoda samovolného uspořádání částic (Self-Assembled, SA). Metoda založená na samovolném uspořádání částic chemisorpčním procesem na povrchu substrátu, který je ponořen do roztoku vhodného povrchově aktivního organického rozpouštědla.

Samotná amfifilní molekula (molekula složená z hydrofilní a hydrofobní složky) obsahuje z energetického hlediska tři části: aktivní hlavičku neboli čelní skupinu, alkylový řetězec a koncovou skupinu.¹⁷

Ačkoli se kombinace molekul a substrátu u SA můžou značně lišit, společným rysem pro systémy vytvořené touto metodou je povrchově aktivní hlavička, která se váže na příslušný substrát chemisorpcí. Výsledkem tohoto adsorpčního exoterického procesu je ultratenká monovrstva, jejíž tloušťka je dána délkou alkylového řetězce.¹⁸

Jako substrát k vytvoření vrstev se běžně používá sklo, k jehož čištění před samotným ponořením slouží Piranha solution, což je roztok kyseliny sírové a peroxidu vodíku v různém poměru. Čištění substrátu vede nejen k odstranění nežádoucích nečistot, ale i k aktivaci hydroxylových skupin na skle.

Ačkoli metoda samovolné organizace částic slouží k vytvoření ultratenkých vrstev, značný vývoj této metody přispěl k jejímu rozvoji i pro tvorbu multivrstev (metoda Layer-by-Layer, LBL). Hlavní výhodou LBL je malá, jak instrumentální, tak i časová náročnost oproti ostatním depozičním metodám.

Střídavé ponoření substrátu do roztoků způsobuje adsorpci kladně a záporně nabitých látek na povrch substrátu. Výsledkem je opačně nabitý povrch, což umožňuje depoziční další vrstvy.

V praxi se často využívá metoda LBL s poly (diallyldimethylammonium chloridem), označovaným také jako PDDA a metoda LBL s 3-aminopropyltriethoxysilanem neboli APTES.¹⁹

Depozice ultrazvukem - Sonochemická metoda. Metoda využívající k aktivaci chemických reakcí energie ultrazvuku. Působením mechanického vlnění dochází k lokálnímu zředění či zhoustnutí roztoku. Při poklesu tlaku se na částicích tvoří bubliny, které narůstají a poté se rozpadají s uvolněním energie, což vede k dočasnému nárůstu tlaku a teploty. Vzniklé podmínky vedou k destrukci prekurzorů při využití vhodného rozpouštědla (přenos energie) a tvorbě požadovaných vrstev.²⁰

Kolaps bubliny je velmi rychlý exotermický proces, který probíhá jen několik nanosekund. Rychlá kinetika zabraňuje růstu jader. V každé kolabující bublině jsou nukleační centra, jejichž růst je omezen krátkým kolapsem, což výrazně snižuje celkovou organizaci a krystalizaci vrstev. Získané vrstvy jsou homogenní a mohou se lišit ve svých vlastnostech, tvarech či struktuře, vždy však odpovídají nanorozměrům.

Nanočástice ukotvené na povrch substrátu vytvořením chemické vazby nelze odstranit promytím.²²

Sonochemické metody vytváří vrstvu po vrstvě, takže po kompletní depozici každé vrstvy dochází ke vzniku detailně homogenní vrstvy díky slinování (spojení) sousedních částic. Kvůli vysoké povrchové energii, která činí částice velmi reaktivními, dochází k agregaci systému bez dostatečné ochrany. K zabránění agregace se využívá různých stabilizačních činidel.²⁷

V poslední době byly modifikovány některé metody pro ukládání stříbra na vrstvy za snížené teploty. V pracích, zabývajících se metodou bezproudového pokovování²³ a metodou založené na redukčním srážení polyolu,²⁴ byly využity jako stabilizační činidla ve vodě rozpustné polymerní látky, a to konkrétně PVA (polyvinylalkohol) a PVD (polyvinylpyrrolidon). Tyto stabilizační činidla brání při depozici Ag na modifikované vrstvy jejich srůstání. V případě první metody, která probíhala za přísné kontroly teploty, bylo potřeba k dosažení požadované tloušťky depozici několikrát opakovat. V druhém případě nebyla vzniklá vrstva zcela homogenní.

Tyto práce dokazují, že homogenní potažení vrstvy může být problémem, avšak sonochemie je efektivní metodou pro ukládání nanočástic stříbra na různé keramické či skleněné nosiče.

Gedanken ve své práci využil jako stabilizátor PVP za působení ultrazvuku, čímž dosáhl homogenního uspořádání Ag vrstvy.^{26,27,28} Ultrazvuk vyvolává kavitaci, což znamená, že k tvorbě, růstu a následnému kolapsu bublin dochází v bezprostřední blízkosti pevného materiálu. Jádra nanočástic, vytvořených z roztoku prekursoru, jsou tryskou naneseny na substrát po rozpadu bublin. Vysoká rychlost trysky způsobuje přilnutí nanočástic na povrch.^{29,22}

4. Modifikace a aplikace vrstev

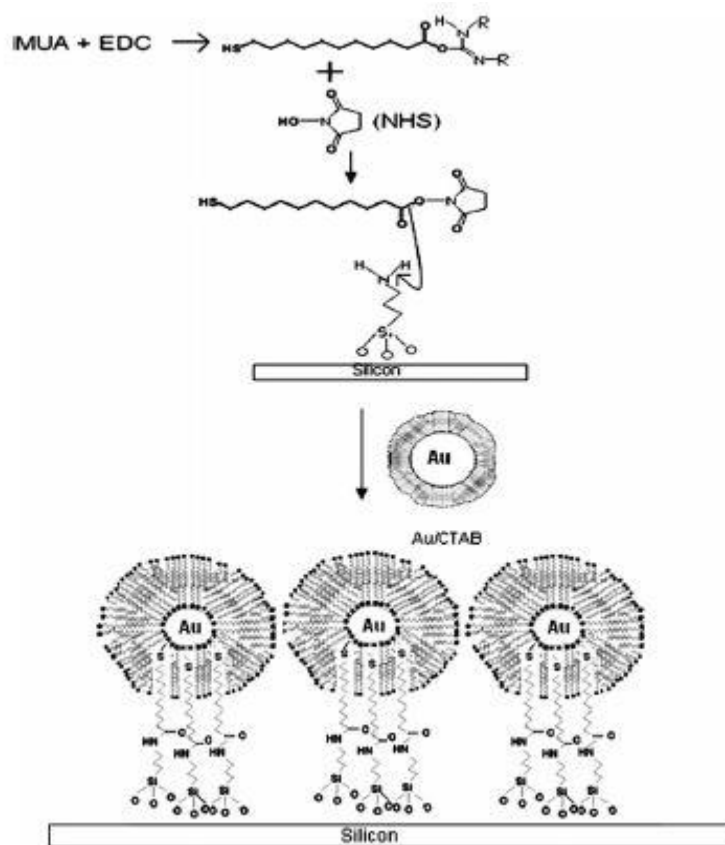
Za posledních 10 let došlo ke značnému rozvoji aplikací tenkých vrstev. Tyto vrstvy jsou nejčastěji imobilizované na různé druhy substrátů, které slouží především k detekci pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektrometrie (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS). Díky vysoké spolehlivosti a reprodukovatelnosti této

metody, představuje SERS citlivý nástroj pro analytickou chemii. Další výhodou této metody je malá časová náročnost a relativně malé náklady na přípravu substrátů. SERS spočívá v zesílení intenzity Ramanova signálu. Zvýšení intenzity silně závisí na velikosti a tvaru nanostruktur, které toto zesílení způsobují. Mezi základní typ substrátů patří kovové nanočástice, zejména zlato a stříbro, imobilizované na pevném podkladu.³²

Vývoj metody SERS s využitím nanostruktur s sebou přináší širokou škálu aplikací od různých oborů chemie, biologie, fyziky až po aplikace v lékařství nebo dokonce aplikace na analýzu životního prostředí.

Imobilizovaný systém kovových nanočástic může být použit na přímou detekci patogenů. Například Kahraman a kol.³³ použili SERS substrát připravený metodou Layer-by-layer SA a úspěšně identifikovali dva druhy bakterií, *Escherichia coli* a *Staphylococcus cohnii* s přesností na jediný organismus. Další velmi slibný přístup přinesl Yan a kol.³⁴, kteří využili klastry nanočástic na tenké vrstvě zlata jako substrát pro SERS k detekci různých druhů bakterií.

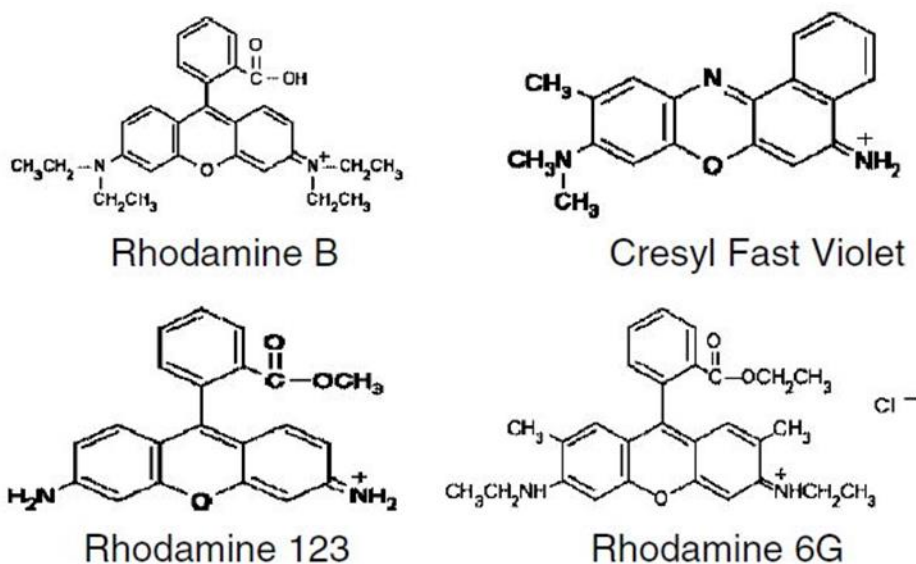
Kaminska a kol.³⁵ ve své práci modifikovali křemíkové destičky dlouhým řetězcem silanů zakončeným thiolem, který proniká do CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromid) dvojvrstvy a chemicky se váže na vrstvu nanočástic zlata. Po nanesení proteinu (inhibitor trypsinu, BPTI) a aminokyseliny fenylalaninu byly zkoumány vzájemné interakce s nanočásticemi zlata pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie. Srovnáním spekter proteinu a fenylalaninu v roztoku imobilizovaném na zlatou vrstvu bylo dokázáno, že orientace proteinu není náhodná. SERS spektrum fenylalaninu bylo zcela odlišné od dříve získaných spekter aminokyselinových zbytků na holém kovu. Odlišné spektra byly přisuzovány aromatickým zbytkům, které pronikají do dvojvrstvy, která indukuje konformační změny proteinu.



Obr. 4. Schématické znázornění syntetických kroků k vytvoření nanočásticového pole s MUA, CTAB a NHS. ³⁵

Imobilizované tenké vrstvy nanočástic jsou důležité také pro lékařské diagnózy, např. sledování glukosy v krvi. Samotná detekce glukosy je velmi složitým úkolem kvůli špatné adsorpci na samotném stříbrném povrchu. Schafer-Pertier a kol.³⁶ poprvé ve své práci popsali přímou detekci glukosy pomocí SERS. Klíčem k detekci glukosy pomocí metody SERS byla povrchová modifikace vrstvy pomocí alkanthiolu pro usnadnění adsorpce glukosy na povrchu kovu. Alkanthioly výrazně zlepšily adsorpci glukosy na tenké vrstvě stříbra, z nichž jako nejúčinnější byl vybrán dekanthiol. SERS se prokázala jako slibná specifická a citlivá metoda, která řeší nedostatky ostatních technik. Např. absorpce v IR oblasti je závislá na teplotě, pH a interferující absorpci vody nebo laserová polarografie, technika schopná detekovat i velmi nízké koncentrace, detekuje i další interferující složky s optickou aktivitou, které činí tuto metodu značně nevýhodnou. Budoucí aplikace se mohou tedy zaměřit i na detekci dalších fyziologických analytů nebo detekci glukosy v komplexní směsi biomolekul.

Jedním z průkopníků, kteří významně přispěli k detekci DNA pomocí SERS, byli Vo-Dinh a kolektiv.³⁷ Pro lékařské diagnózy využili barvivem označené DNA snímače a nanostrukturované kovové substráty. Rhodamin ve 3 typech a kresylová violet' byly použity jako barviva.



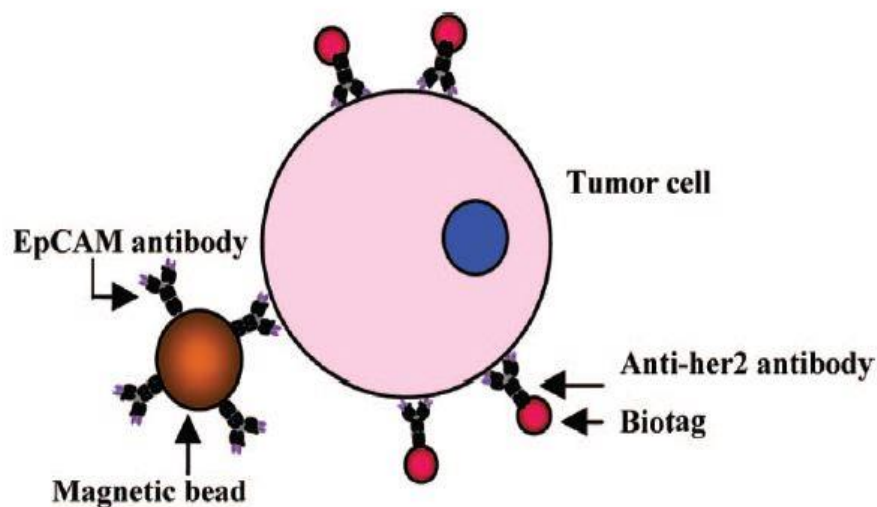
Obr. 5. Schéma ilustrující SERS aktivní struktury barviv. ³⁷

Genové snímače mohou být použity k cílené detekci DNA (např. genová sekvence, bakterie, DNA virů) pomocí hybridizace s využitím komplementarity sekvence DNA k těmto snímačům. Další jejich výhodou je obrovský potenciál v poskytování citlivosti a selektivity. Před samotným navázáním DNA sond byla modifikace samouspořádaných stříbrných vrstev depositovaných na skleněný substrát prováděna pomocí alkanthiolů. SERS v zakompilovaný v systému HSERI (Hyperspectral Surface-Enhanced Raman Imaging) představuje perspektivní metodu pro identifikaci buněčných komponentů s vysokým prostorovým rozlišením. Obdobný postup byl využit k detekci genu HIV a rakovinných buněk. ³⁸

Technologie využívající metodu SERS zaznamenaly výrazný nárůst počtu aplikací také v onkologické diagnostice. Jedná se především o multiplexní detekci a identifikaci nových biomarkerů, nukleotidových polymorfismů a cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells, CTC). Společně s imunoSERS mikroskopií představuje neinvazivní nástroj pro histologické analýzy biopsií (vyšetření vzorků

tkáně) a při detekci nádorů „in vivo“ Metoda SERS s využitím nanočástic vykazuje obrovský potenciál též i pro cílené zavedení léčiv.³⁹

Detekce CTC je důležitým diagnostickým milníkem. Lidská krev s buňkami SKBR-3 jako model využívající anti-EpCAM (anti-epiteliální buněčná adhézní molekula) na magnetické kuličce a SERS a anti-HER2 (lidský epidermální růstový receptor) byla využita k izolaci cirkulujících buněk rakoviny prsu a jejich následné detekci s 99,7% přesností.⁴⁰



Obr. 6. Ilustrace zobrazující navázání magnetické kuličky na modelovou nádorovou buňku.⁴⁰

SERS metoda je vysoce selektivní a představuje ideál pro rozvoj diagnostických testů. V rámci diagnostiky rakoviny vyžadují testy založené na metodě SERS malé objemy vzorků (několik mikrolitrů) a mají velmi nízké detekční limity (až do femtomolární úrovně). Významný pokrok také zaznamenal vývoj neoznačených substrátů pro SERS sloužící identifikaci nádorových vzorků a předpokládá se, že tato technika je velkým příslibem pro budoucí generace při detekci rakoviny a její léčby.³⁹

4.1. Vlastnosti vrstev

Vlastnosti výsledné vrstvy nezáleží pouze na povlakovaném materiálu, ale také na vhodně zvolené metodě přípravy. Zatímco u chemických metod není mnohdy potřeba speciálních tlaků, tak oproti fyzikálním metodám vedou k přípravě vrstev o větší tloušťce (10^{-5} až 10^{-7} m). Na druhou stranu, ačkoli je metoda založená na samouspořádání částic poměrně jednoduchá a ekonomicky nenáročná, nemusí poskytovat potřebnou homogenitu vrstvy jako je tomu například u sonochemických metod.

K charakterizaci vrstev je využíváno mnoho metod. Kromě již zmíněné optické UV-VIS spektrometrie a mikroskopických metod TEM a SEM, se dále využívá mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy, AFM), difrakce rentgenových paprsků (X-Ray Diffraction, XRD).

Mikroskopie atomárních sil snímá trojrozměrný povrch vzorku ostrým hrotem upevněném na nosníku, který je ohýbán v důsledku působení přitažlivých sil mezi hrotem a povrchem vzorku. Na základě velikosti ohybů hrotu, který skenuje zkoumaný povrch vzorku, je možné sestavit zvětšený obraz vrstvy.³⁰

Difrakce rentgenových paprsků se v případě charakterizace tenkých filmů využívá společně s práškovou metodou k určení struktury pevných látek. Detekce difraktovaného záření vychází z interakce rentgenového záření s elektrony. Vzhledem k uspořádání atomů dochází k rozptylu a následné interferenci záření, což vede ke vzniku difrakčních maxim, z jejichž polohy, tvaru a intenzity lze určit mikrostruktura vrstev.³¹

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Materiál, přístroje a pracovní postupy

5.1. Chemikálie

Kyselina 6-aminohexanová (p.a., Sigma-Aldrich), kyselina 8-aminooktanová (p.a., Sigma-Aldrich), butylamin (p.a., Sigma-Aldrich), hexylamin (p.a., Sigma-Aldrich), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide neboli EDC (p.a., Sigma-Aldrich), N-hydroxysulfosuccimide sodium neboli NHS (p.a., Sigma-Aldrich), avidin (p.a., Sigma-Aldrich). Díky velké čistotě byly uvedené chemikálie použity bez dalšího přečištění. Vrstva nanočástic stříbra imobilizovaná na skleněném substrátu připravená dle postupu publikovaném Gedankenem.²⁶

5.2. Použité přístroje

Vrstvy byly charakterizovány pomocí skenující elektronové mikroskopie (SEM, Hitachi SU6600, Německo). K měření Ramanových spekter byl využit Ramanův spektroskop DXR Raman (Thermo Scientific, U.S.A.), kde byla vrstva měřena při vlnové délce laseru 532 nm a výkonu laseru na vzorek 2mW. Každé spektrum bylo složeno s 32 mikroskenů a expoziční čas byl 1 s.

5.3. Pracovní postupy

5.3.1. Příprava zásobních roztoků

Zásobní vodné roztoky EDC, NHS, linkerů a odkrývacích činidel (kyseliny 8-aminooktanové, 6-aminohexanové, butylaminu a hexylaminu) byly připraveny do odměrných baněk v objemu 25 ml a koncentrací $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro přípravu zásobního roztoku 6-aminohexanové kyseliny bylo použito 0,328 g této látky s molekulovou hmotností 131,17. Roztok kyseliny 8-aminooktanové byl připraven rozpuštěním 0,398 g této látky s molekulovou hmotností 159,23 ve vodě. Na přípravu zásobního roztoku butylaminu bylo použito 0,24 ml této látky s molekulovou hmotností

73,14. K přípravě hexylaminu bylo odměřeno 0,33 ml této látky s molekulovou hmotností 101,19. Všechny uvedené látky byly doplněny v 25 ml odměrné baňce destilovanou vodou po rysku. K přípravě zásobního roztoku EDC a NHS o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo naváženo 0,743 g EDC s molekulovou hmotností 297,18 a 0,543 g NHS s molekulovou hmotností 217,13 a následně byly tyto látky rozpuštěny v 25 ml baňce a doplněny po rysku. Avidin o koncentraci 1 mg na ml byl připraven přesným navážením 1 mg standardu, který byl následně rozpuštěn v 1 ml destilované vody.

5.3.2. Použité poměry a koncentrace

Z připravených zásobních roztoků byly vytvořeny dvojice o složení aminokyselina - amin, a to kyselina 6-aminohexanová s butylaminem a kyselina 8-aminooktanová s hexylaminem. Uvedené dvojice byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v poměrech 1:1, 2:1, 1:2, 1:3. Roztoky v uvedených poměrech ve výsledku naředěny destilovanou vodou na celkovou koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

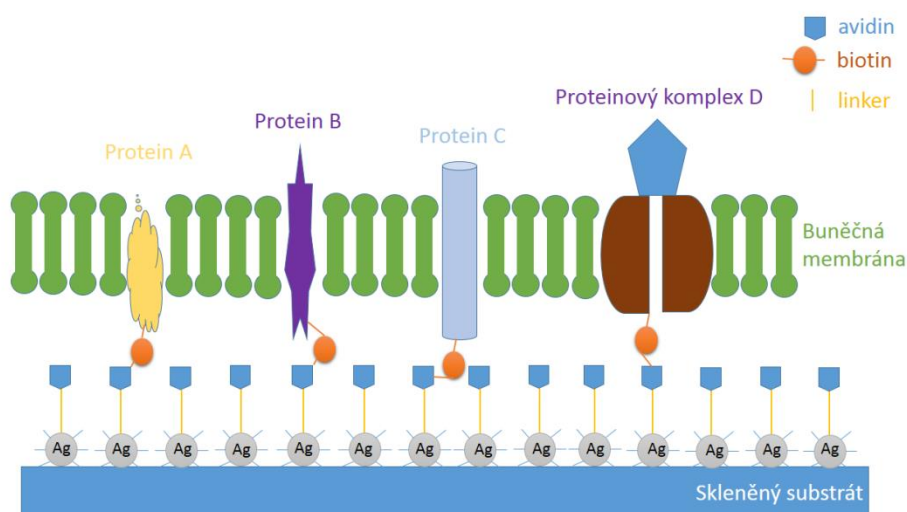
EDC a NHS bylo použito v poměru 1:1. Dvojice EDC – NHS byla v tomto poměru připravena o koncentracích $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Odpovídající poměry byly připraveny do mikrozkušavek, celkový objem roztoků činil 1 ml.

Koncentrace avidinu byla sledována v rozmezí $5 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kde jednotlivé koncentrační úrovně byly připraveny postupným ředěním předem připraveného zásobního roztoku.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Imobilizace avidinu

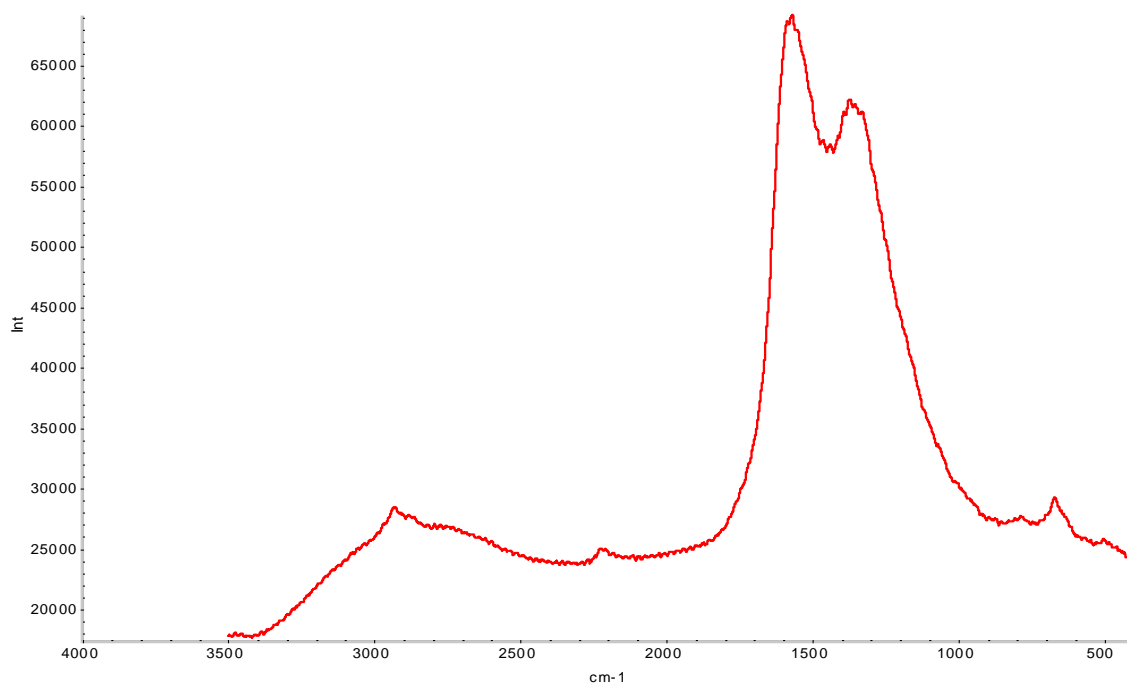
Cílem práce byla imobilizace avidinu na stříbrnou vrstvu s následným využitím při studiu cirkulujících nádorových buněk. Výsledný systém má charakter, jenž lze znázornit obrázkem 7.



Obr. 7. Schématické znázornění připravené vrstvy s imobilizovaným avidinem a cirkulující nádorovou buňkou.

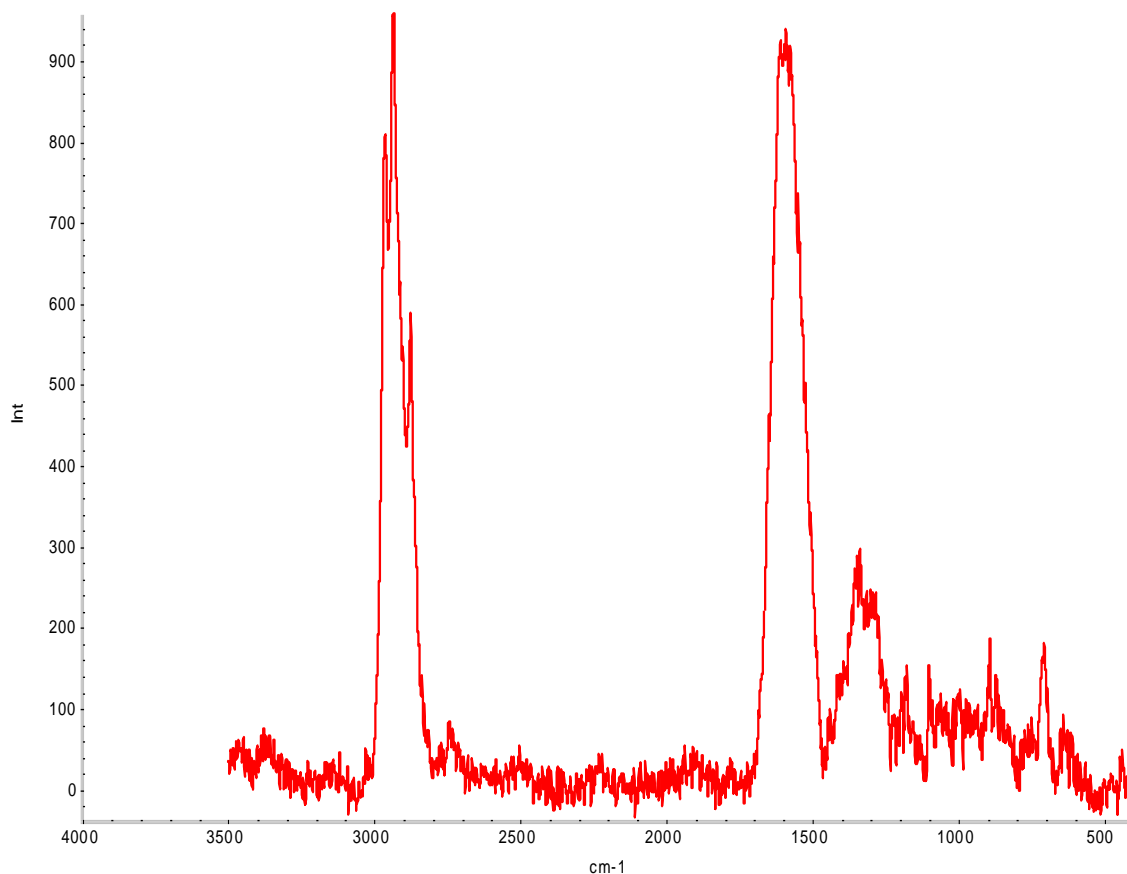
Z hlediska požadavku na přípravu modifikované vrstvy s co nejlepší charakteristikou, čítaje například celkovou homogenitu pokrytí a ekonomickou efektivitu, byly vybrány parametry, jejichž vliv byl v průběhu práce sledován. Zprvce byl studován vliv délky řetězce linkeru a poměru dvojice aminokyselina – amin a vliv koncentrace činidel EDC a NHS. K následné imobilizaci avidinu byly využity v předchozí kapitole popsané poměry dvojice aminokyselina – amin, EDC – NHS a koncentrace avidinu.

První experiment sloužil k určení vhodného poměru a délky řetězce kyselina – amin. Před každým experimentem byla stříbrná vrstva důkladně omyta v destilované vodě. Ramanovo spektrum získané měřením čisté vrstvy je zobrazeno na obrázku 8.



Obr. 8. Spektrum blanku – čistá stříbrná vrstva.

Po nanesení 1 μl směsi linkeru a odkrývacího činidla o poměru 1:1 a celkové koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla tato vrstva proměřena znovu, výsledkem čehož je spektrum vyobrazené na obrázku 9. Ramanovské spektrum získané na vrstvě po navázání aminů a aminokyselin obsahuje charakteristické pásy kolem 2850 cm^{-1} (CH_2 a CH_3) skupiny.

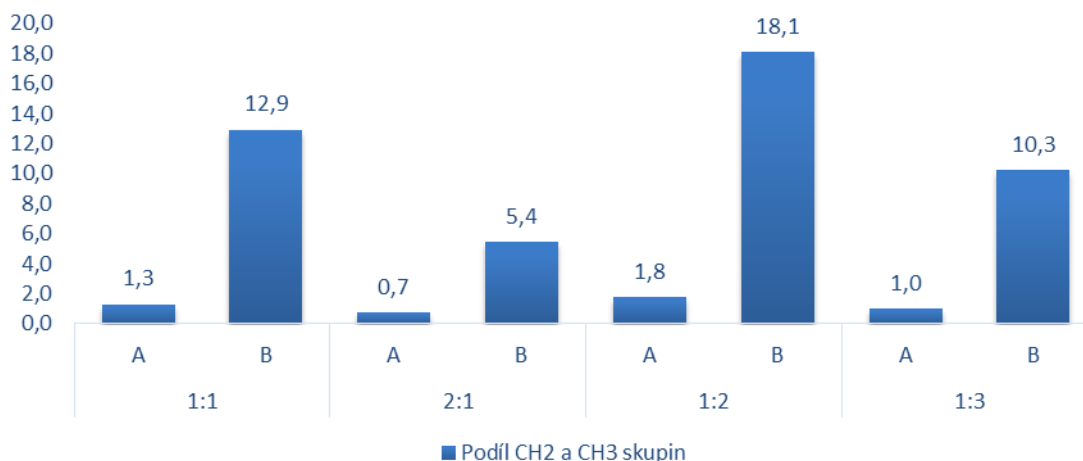


Obr. 9. Spektrum stříbrné vrstvy po navázání aminů.

Vliv délky uhlíkatého řetězce a poměru aminokyselina – amin pro imobilizaci avidinu byl jednou ze základních otázek této práce. První dvojice se skládala z kyseliny 6-aminohexanové a butylaminu, druhá dvojice byla kombinací 8-aminooktanové a hexylaminu. Připravené dvojice roztoků o zvolené koncentraci se lišily o dva uhlíky ve svém řetězci kvůli sférickým zábranám. Oba tyto páry byly nanášeny na stříbrnou vrstvu v odpovídajících poměrech. Tyto látky byly vybrány na základě dobré interakce stříbra s aminoskupinou, přes kterou došlo k navázání těchto látek na vrstvu. Výhodnější dvojicí z hlediska délky řetězce byl určen řetězec obsahující kyselinu 8-aminooktanovou a hexylamin. Při použití této aminokyseliny v kombinaci s aminem došlo k navázání dál od vrstvy kovu. Nejvhodnějším poměrem se ukázal poměr 1:3 této dvojice. Při tomto poměru došlo k vytvoření navázání aminokyseliny a aminu s největší hustotou, která byla potřebná pro největší možnou imobilizaci proteinu.

Po očištění vrstvy bylo nanášeno 8 kapek o objemu 1 μl obou dvojic kyselina – amin ve všech připravených poměrech. Po zaschnutí všech kapek byla vrstva

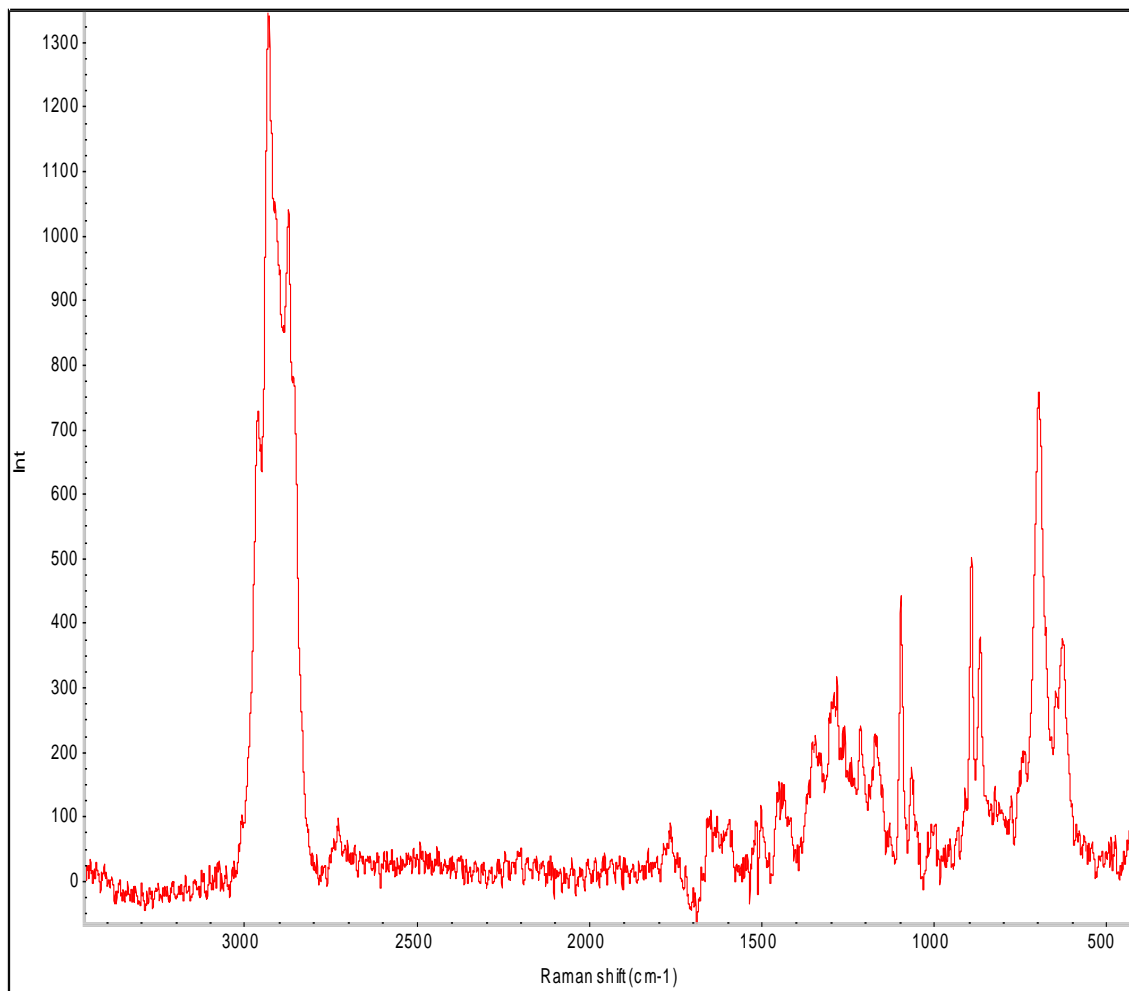
zkoumána pomocí SERS. Výsledek experimentu je znázorněn na obrázku 10. Z obrázku je patrné, že podíl nanášených sloučenin (linkeru a dokrývacího činidla) neodpovídá jejich výslednému zastoupení na připravené vrstvě. Podíl aminokyseliny a aminu bylo nutné vyladit tak, aby většina volných karboxylových skupin byla následně vyvázána Avidinem. Dále byl využíván jen poměr 1:3 kyseliny 8-aminooktanové a hexylaminu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 10. Graf znázorňující vliv podílů funkčního a dokrývacího linkeru (aminokyselina a amin) na reálném zastoupení výše uvedených linkerů na povrchu vrstvy.

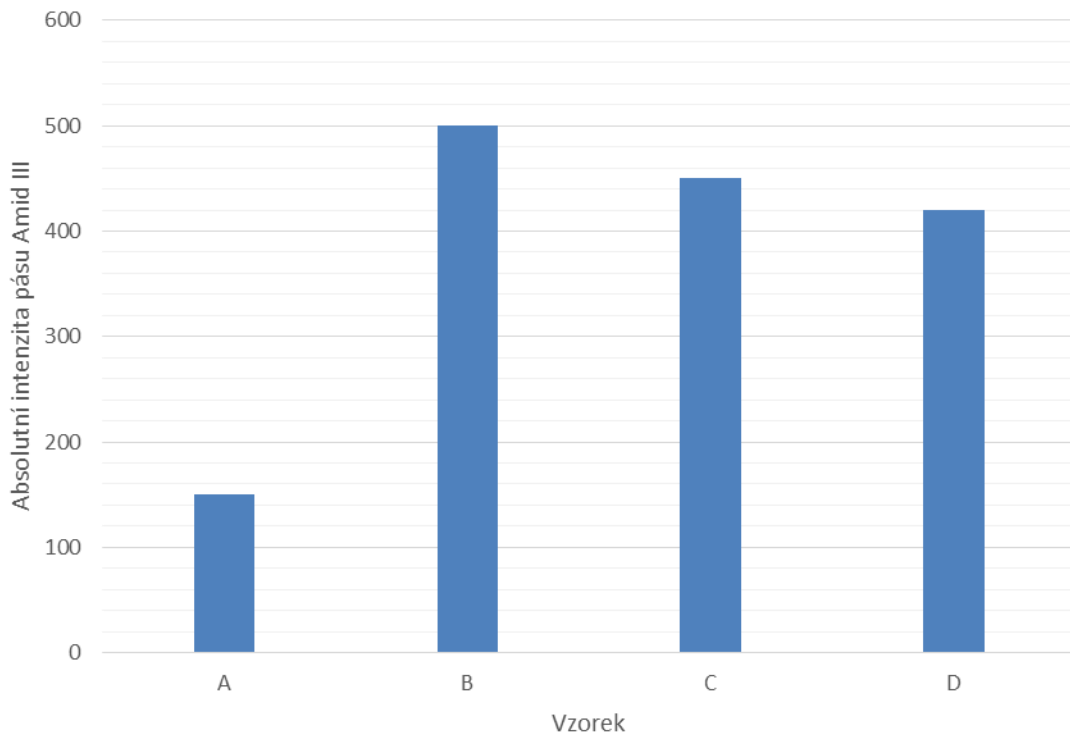
Pro stanovení nejvýhodnější koncentrace EDC a NHS byly na vrstvu nanášeny 4 kapky aminokyseliny a aminu. Po zaschnutí byly přidány na každou kapku roztoky EDC – NHS ve všech připravených koncentracích o objemu 1 μl . Tyto činidla byly použity pro aktivaci karboxylové skupiny na aminokyselině. Po přidání aktivačních činidel na karboxylovou skupinu došlo k vytvoření aktivované kyseliny, esteru, který je schopen dále reagovat s aminoskupinou v našem případě s proteinem za vzniku amidu. Vrstva byla následně sledována pomocí SERS. Byla určena nejvhodnější koncentrace EDC-NHS pro aktivaci karboxylových skupin. Nebyl sledován žádný vliv v rozmezí použitých koncentrací. Koncentrace $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla stanovena jako nevhodná z hlediska malého množství navázaného proteinu. Při koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ došlo k navázání daleko většího množství proteinu. Oproti této koncentraci, koncentrace $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ už nevykazovaly větší změny. Z tohoto důvodu byla koncentrace $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ určena jako nejvýhodnější, která byla dále používána.

Aktivované karboxylové kyseliny jsou vhodné pro další modifikace proteinu díky dobré interakci karboxylové skupiny s aminoskupinou. Na připravenou vrstvu aktivovaných karboxylových skupin byl nanesen avidin o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Na obr. 11. lze pozorovat Ramanovo spektrum po imobilizaci avidinu. Toto spektrum obsahuje proteinové pásy Amid I, II a III, které značí úspěšné navázání proteinu na povrch zesílený pomocí stříbrných nanočástic.



Obr. 11. Spektrum vrstvy po imobilizaci avidinu.

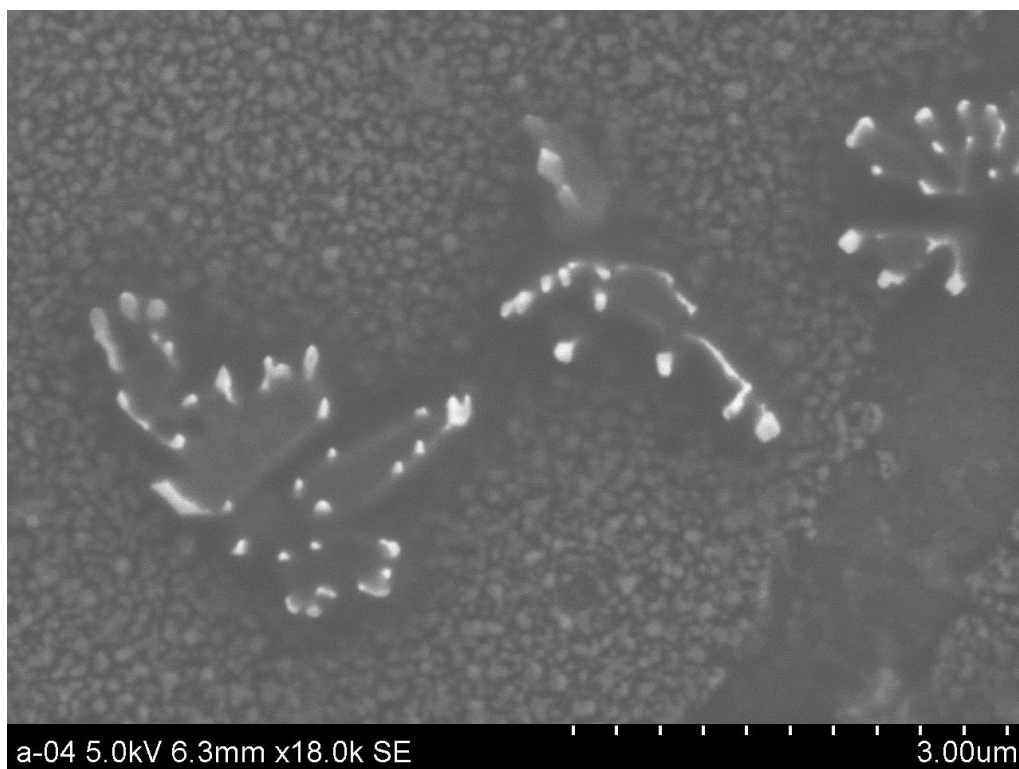
Připravená modifikovaná vrstva byla zkoumána z hlediska navázaného množství proteinu pomocí SERS. Množství navázaného proteinu bylo studováno v koncentracích popsaných úrovní v příslušném oddílu experimentální části. Výsledek studia je znázorněn jako závislost intenzity spektrálního pásu 1650 cm^{-1} , který charakterizuje strukturální část navázaného proteinu (Amid III) na obrázku 12.



Obr. 12. Graf závislosti intenzity pásu 1650 cm^{-1} (Amid III) na množství avidinu přidaného na vrstvu v průběhu syntézy.

Jak je vidět výše (obr. 12.), koncentrace avidinu ve vzorku A není dostatečná, neboť u vzorku B dochází k dalšímu nárůstu tohoto pásu. U vzorků B – D se intenzita víceméně nemění.

Připravená modifikovaná vrstva s navázaným avidinem byla také zkoumána pomocí skenovací elektronové mikroskopie (obr. 13.).

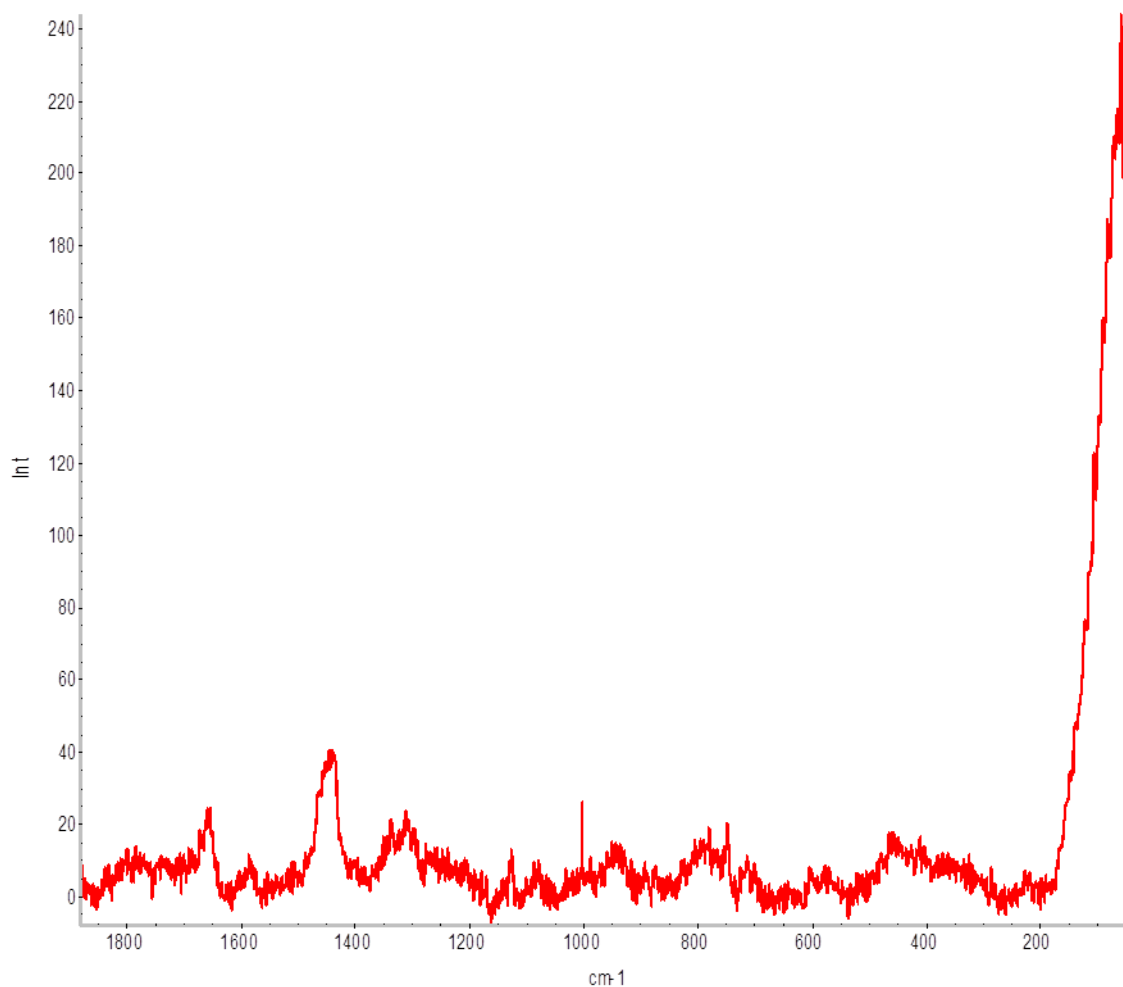


Obr. 13. SEM snímek výše uvedené připravené vrstvy.

6.2. Aplikace modifikované vrstvy na CTC

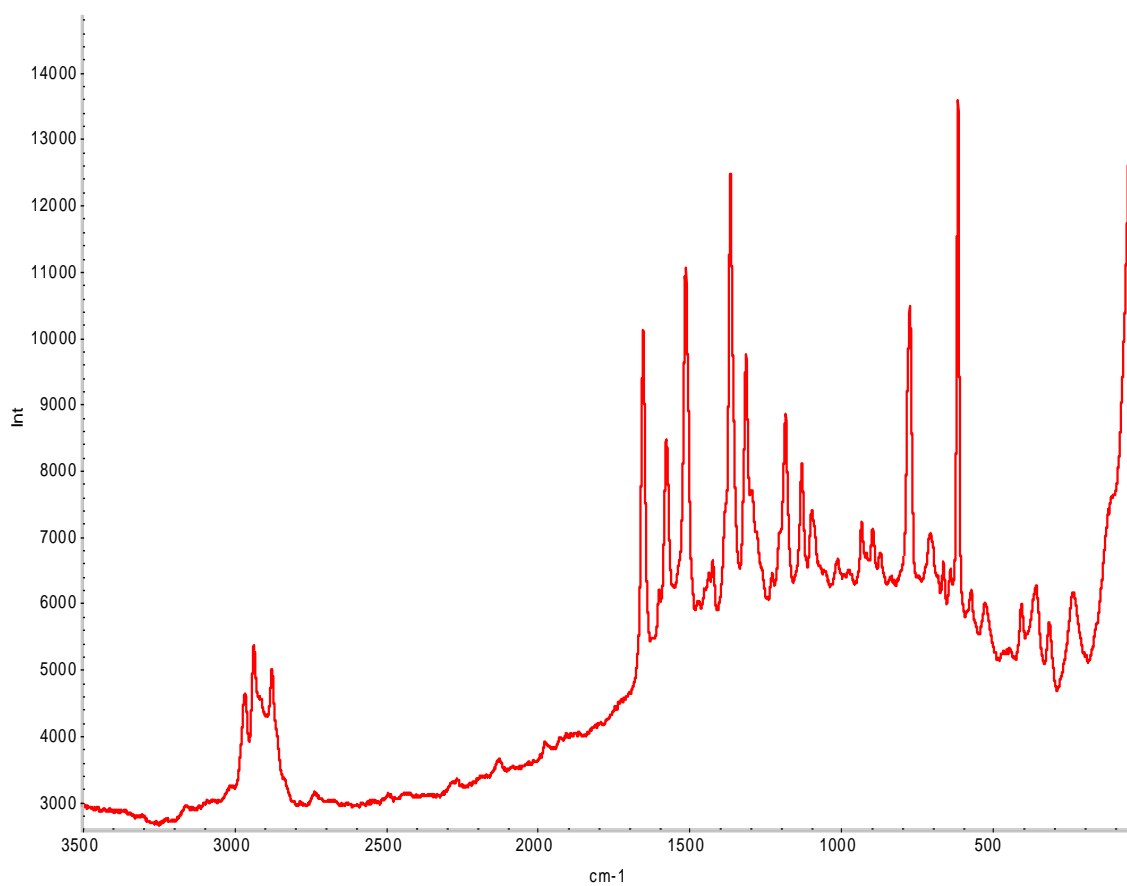
Připravená modifikovaná vrstva byla použita k detekci cirkulujících nádorových buněk. CTC byly navázány na modifikovanou vrstvu avidinu přes biotinylované proteiny na povrchu buňky. Jako biotinylační činidlo bylo využito NHS – biotin. Vysoká vzájemná afinita těchto proteinů vede k vytvoření komplexu avidin – biotin. Tento proces je velmi rychlý a vzniklý komplex je odolný vůči extrémnímu pH, změnám teploty a různým rozpouštědlům.

Obr. 14. znázorňuje Ramanovské spektrum cirkulující nádorové buňky imobilizované na skle. Toto spektrum bylo nejdříve změřeno bez použití zesilující stříbrné vrstvy.

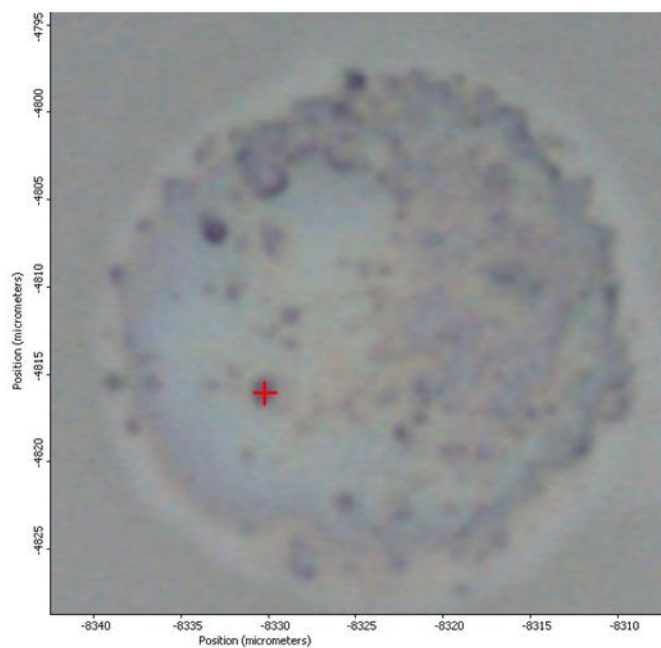


Obr. 14. Spektrum cirkulující nádorové buňky immobilizované na skle.

Ramanovské spektrum (obr. 15.) zobrazuje cirkulující nádorové buňky immobilizované na stříbrné vrstvě s avidinem. Imobilizace proběhla přes biotinylované proteiny na povrchu buňky a následnou vazbou s avidinem ukotveném na povrchu modifikované stříbrné vrstvy. Srovnáním těchto spekter (obr. 14. a 15.) lze usoudit, že cirkulující nádorové buňky immobilizované na stříbrné vrstvě s avidinem vykazují daleko lepší intenzitu signálu v Ramanové spektroskopii než cirkulující nádorové buňky immobilizované na skle.

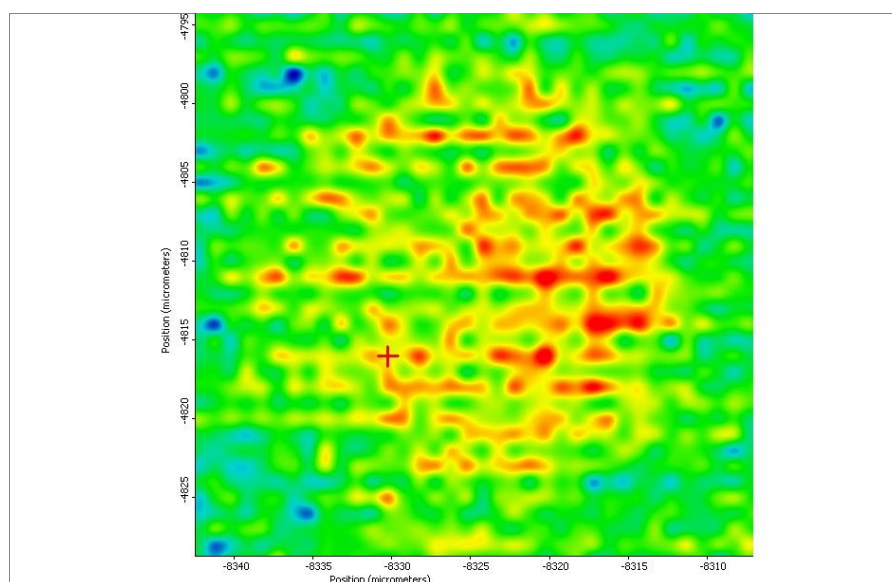


Obr. 15. Spektrum cirkulující nádorové buňky imobilizované na získané vrstvě s avidinem – navázáno přes NHS-Biotin.



Obr. 16. Obrázek buňky přes mikroskop Ramanova spektrometru, objektiv 50x.

Cirkulující nádorová buňka - rakoviny prsu zobrazena pomocí mikroskopu na Ramanově spektroskopu s objektivem 50x. (obr. 16.).



Obr. 17. Ramanovská mapa získaná skenováním výše uvedené buňky s prostorovým rozlišením 1 μm .

Ramanovská mapa výše uvedené buňky získaná imobilizací této buňky na modifikované vrstvě. Barevná škála odpovídá absolutní intenzitě pásu odpovídajícího Amidu III. Červená je nejintenzivnější a modrá nejméně intenzivní.

ZÁVĚR

Práce se zabývala přípravou modifikovaných vrstev stříbra pro selektivní detekci fyziologicky aktivních látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Cílem této práce bylo vyvinout metodu sloužící k efektivní detekci cirkulujících nádorových buněk pomocí imobilizace proteinu. Vliv jednotlivých parametrů byl studován pomocí SERS.

K experimentu byla využita vrstva nanočástic stříbra imobilizovaná na skleněném substrátu, která sloužila k zesílení Ramanova signálu. Samotná modifikace byla prováděna na stříbrnou vrstvu pomocí funkčního a odkrývacího linkeru, aktivačních činidel a avidinu. Pro funkci linkeru byly zvoleny dvě dvojice o složení aminokyselina – amin, a to konkrétně kyselina 6-aminohexanová s butylaminem a kyselina 8-aminooktanová s hexylaminem. U vytvořených párů byl studován vliv poměrů a délky uhlíkatého řetězce. Na základě spekter bylo určeno rozložení linkerů na povrchu stříbrné vrstvy, které hrálo důležitou roli pro imobilizaci proteinu. Dále byla zkoumána koncentrace směsi složek EDC – NHS, jejichž funkce spočívala v aktivaci karboxylových skupin pro následné navázání co největšího množství avidinu. Použitím nevhodné koncentrace by mohlo dojít k aktivaci jen určitého počtu volných karboxylových skupin, což znamená, že ostatní volné karboxylové skupiny by pro následnou imobilizaci proteinu zůstaly nevyužity. Posledním sledovaným parametrem byla koncentrace avidinu. Různé koncentrace proteinu způsobily rozdílné pokrytí stříbrné vrstvy, která byla dále využita pro selektivní detekci cirkulujících nádorových buněk.

SUMMARY

This bachelor thesis is aimed on a study of parameters influencing a modification of silver films for a selective detection of physiological important markers using surface enhanced Raman spectroscopy. The parameters covered ratio and concentration of linker and covering compound, concentration and ratio of substances used for activation of free surface located carboxyl groups and last but not least, amount of immobilized protein. The main goal of here subjected thesis was to develop a method for a fundamental study of protein composition of immobilized circulating cells. The influence of each of selected parameters was studied through SERS.

Experiment was based on utilization of a silver film, immobilized on a glass substrate, which served as an enhancement of the Raman signal. The modification itself was performed using set of linker and covering agent, where two pairs of amino acid – amine and specifically 6-aminohexanoic acid with butylamine and 8-aminooctanoic acid with hexylamine were used. The formed pairs were studied for the influence of ratio and length of carbonaceous chain. Based on the spectrum, the composition of linkers on the surface of the silver layer was determined, which played an important role in the immobilization of proteins. The carboxyl groups of immobilized linker were activated using a set of EDC and NHS. The concentration of a mixture of components was also examined and evaluated. Concentration of avidin was evaluated in order to achieve highest possible coverage of the as prepared layer. Finally prepared layer was afterwards utilized for a study of protein composition of immobilized circulating tumor cells.

LITERATURA

- [1] BARTOVSKÁ, L. a ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [2] KVÍTEK, L. a PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [3] KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav*. Prozatímní učební text. Katedra fyzikální chemie PŘF UP. Olomouc 2006.
- [4] VOJUCKIJ, S. S. *Kurs koloidní chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984, 396 s.
- [5] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [6] CAO, G. a WANG, Y. *Nanostructures: synthesis, properties, and applications*. 2nd ed. New Jersey: World Scientific, 2011, xiii, 581 p. ISBN 98-143-2250-4.
- [7] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [8] *Dynamic light scattering* [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Microscopy/Dynamic_Light_Scattering
- [9] *Dynamic light scattering* [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering
- [10] Elektronový mikroskop. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektronov%C3%BD_mikroskop
- [11] JELÍNEK, M. Tenké vrstvy pro nanomateriály. *Sborník přednášek Nanotechnologie*. 2007.
- [12] OHRING, M. *The Materials Science of Thin Films*. San Diego: Academic Press, 1991, 704 s. ISBN 01-252-4990-X.
- [13] ŠATAVA, V. *Reaktivní magnetronová depozice vybraných oxidových vrstev a jejich vlastnosti*. Plzeň, 2011. Dizertační práce. Západočeská univerzita v Plzni.

- [14] MACÁK, J. et al. *Korozní vlastnosti vakuově nanášených vrstev*. Praha: Chemické listy, 2007, roč. 101, č. 9.
- [15] SREE HARSHA, K. S. *Principles of physical vapor deposition of thin films*. Amsterdam: Elsevier, 2006, xi, 1160 s. ISBN 00-804-4699-X.
- [16] EKRT, O. Technologie a vlastnosti tenkých vrstev, tenkovrstvé senzory. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://fchi.vscht.cz/uploads/pedagogika/nano/predmety/senzory/05_TechnologieCVD_%20PVD_PECVD_MOVPE_MBE.pdf
- [17] BABÍK, A. *Samovolně seskupené vrstvy na bázi křemíku*. Brno, 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [18] MASSIMILIANO DI VENTRA, S. E. *Introduction to nanoscale science and technology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. ISBN 14-020-7757-2.
- [19] KOMÍNKOVÁ, Z. *Příprava organizovaných vrstev nanočástic stříbra*. Olomouc, 2010. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [20] REICHLOVÁ, V. *Sonochemická příprava oxidických materiálů*. Brno, 2006. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity.
- [21] GEDANKEN, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2004, 11.2: 47-55.
- [22] PERKAS, N., et al. Depositing silver nanoparticles on/in a glass slide by the sonochemical method. *Nanotechnology*, 2008, 19.43: 435604.
- [23] SCHAEFERS, S.; RAST, L.; STANISHEVSKY, A. Electroless silver plating on spin-coated silver nanoparticle seed layers. *Materials Letters*, 2006, 60.5: 706-709.
- [24] SINGH, N.; GUPTA, P. K.; SOOD, K. N. Application of Polyvinyl Pyrrolidone on Deposition of Silver Micro Sizes Particles on Glass Substrate. *Reviews in Analytical Chemistry*, 2006, 25.4: 307-316.
- [25] GAUTAM, A.; SINGH, G. P.; RAM, S. A simple polyol synthesis of silver metal nanopowder of uniform particles. *Synthetic metals*, 2007, 157.1: 5-10.
- [26] POL, V. G., et al. Sonochemical deposition of silver nanoparticles on silica spheres. *Langmuir*, 2002, 18.8: 3352-3357.

- [27] PERKAS, N., et al. Ultrasound-assisted coating of nylon 6, 6 with silver nanoparticles and its antibacterial activity. *Journal of applied polymer science*, 2007, 104.3: 1423-1430.
- [28] KOTLYAR, A., et al. Coating silver nanoparticles on poly (methyl methacrylate) chips and spheres via ultrasound irradiation. *Journal of applied polymer science*, 2007, 104.5: 2868-2876.
- [29] SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review of Materials Science*, 1999, 29.1: 295-326.
- [30] Mikroskopie atomárních sil. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroskopie_atom%C3%A1rn%C3%ADch_sil
- [31] Rentgenová difrakční analýza na práškových vzorcích. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/rentgenova-difracni-analyza-na-praskovych-vzorcich>
- [32] FAN, M.; ANDRADE, G. F.S.; BROLO, A. G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 693.1: 7-25.
- [33] KAHRAMAN, M., et al. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2009, 395.8: 2559-2567.
- [34] YAN, B., et al. Engineered SERS substrates with multiscale signal enhancement: nanoparticle cluster arrays. *Acs Nano*, 2009, 3.5: 1190-1202.
- [35] KAMINSKA, A., et al. Chemically bound gold nanoparticle arrays on silicon: assembly, properties and SERS study of protein interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008, 10.28: 4172-4180.
- [36] SHAFER-PELTIER, K. E., et al. Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125.2: 588-593.
- [37] VO-DINH, T.; YAN, F.; WABUYELE, M. B. Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging. *Journal of raman spectroscopy*, 2005, 36.6-7: 640-647.

[38] ISOLA, N. R.; STOKES, D. L.; VO-DINH, T. Surface-enhanced Raman gene probe for HIV detection. *Analytical chemistry*, 1998, 70.7: 1352-1356.

[39] VENDRELL, M., et al. Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends in biotechnology*, 2013, 31.4: 249-257.

[40] SHA, M. Y., et al. Surface-enhanced Raman scattering tags for rapid and homogeneous detection of circulating tumor cells in the presence of human whole blood. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130.51: 17214-17215.