

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Nanočástice ušlechtilých kovů v analýze fyziologicky aktivních
látek pomocí Ramanovy spektroskopie.**

Disertační práce

Mgr. Anna Balzerová

Studijní program: P1407 Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie

Školitel:

doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

OLOMOUC 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že veškerá literatura je řádně citována. Dále prohlašuji, že mám většinový autorský přínos v publikacích [i] a [v], uvedených v seznamu autorových publikací, jejichž obsah představuje část prezentované disertační práce.

.....
Mgr. Anna Balzerová

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost a podporu během celého průběhu mého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za ochotu diskutovat a řešit danou problematiku. Velké poděkování patří všem pracovníkům Katedry fyzikální chemie a Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů za spolupráci a pomoc během celého studia.

Seznam publikací, na nichž se autor této disertační práce podílel jako hlavní autor nebo spoluautor, za období 2012–2018 (v chronologickém pořadí)

- (i) **Balzerova, A.**; Fargasova, A.; Markova, Z.; Ranc, V. and 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, *Analytical Chemistry* 86 (2014). doi: 10.1021/ac503347h (IF = 5,636)
- (ii) 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 (2017) 10.1021/acs.analchem.7b00759 (IF = 5,886)
- (iii) Chaloupková, Z.; **Balzerová, A.**; Medříková, Z.; Srovnal, J.; Hajdúch, M.; Čépe, K.; Ranc, V.; Zbořil, R.; Label-free determination and multiplex analysis of DNA and RNA in tumor tissues, *Applied Materials Today* 12 (2018). 10.1016/j.apmt.2017.12.012
- (iv) Chaloupková, Z.; **Balzerová, A.**; Bařinková, J.; Medříková, Z.; Šácha, P.; Beneš, P.; Ranc, V.; Konvalinka, J.; Zbořil, R.; Label-free determination of prostate specific membrane antigen in human whole blood at nanomolar levels by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy, *Analytica Chimica Acta* 997 (2018). 10.1016/j.aca.2017.10.008 (IF = 4,95)
- (v) **Balzerová, A.**; Opletalová, A.; Ranc, V. and Zbořil, R. Simple multiplex competitive analysis of HER2 and EpCAM cancer markers in whole human blood, *Applied Materials Today* (2018), odesláno do *Applied Materials Today*

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Anna Balzerová
Název práce:	Nanočástice ušlechtilých kovů v analýze fyziologicky aktivních látek pomocí Ramanovy spektroskopie.
Typ práce:	Disertační práce
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie, UP v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Rok obhajoby:	2018
Počet stran:	169 (včetně příloh)
Počet příloh:	5
Jazyk:	Čeština

ABSTRAKT

Hlavním cílem práce je studium využití nanočástic vzácných kovů jako substrátů pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS) při analýze biologicky aktivních látek. V práci jsou rovněž popsány metody přípravy použitých nanomateriálů včetně jejich charakterizace spektroskopickými a mikroskopickými technikami (TEM, HRTEM, XRD, IČ). Hlavní pozornost při přípravě spektroskopicky aktivních nanomateriálů byla věnována nanočásticím stříbra a zlata a jejich modifikaci pro magneticky asistovanou povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii (MA-SERS). Tato metoda je pak využita k detekci a stanovení lidského imunoglobulinu G a rovněž pro simultánní analýzu dvou rozdílných nádorových markerů v krvi - HER2 a EpCAM.

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author:	Mgr. Anna Balzerová
Title of thesis:	Noble metals nanoparticles in the analysis of physiologically active substances using Raman spectroscopy.
Type of thesis:	Dissertation thesis
Department:	Department of Physical Chemistry, UP in Olomouc
Supervisor:	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
The year of presentation:	2018
Number of pages:	169 (including appendices)
Number of appendices:	5
Language:	Czech

ABSTRACT

The thesis is focused on the application of noble metal nanoparticles in analysis of biologically active substances using surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). The thesis also describes methods of preparation of used nanomaterials, including their characterization by spectroscopic and microscopic techniques (TEM, HRTEM, XRD, IR). The main part of the thesis is devoted to the gold and silver nanoparticles and their modification for magnetically assisted surface Raman spectroscopy (MA-SERS). Such method is then used for the detection of human immunoglobulin G as well as for simultaneous detection of two different tumor markers in blood - HER2 and EpCAM.

OBSAH

ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 Nanomateriály a nanočástice	13
1.1 Nanočástice ušlechtilých kovů	14
1.1.1 Syntéza.....	14
1.1.2 Vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů.....	17
Optické vlastnosti.....	17
1.1.3 Bioaplikace nanočástic ušlechtilých kovů	19
1.2 Magnetické nanočástice.....	21
1.2.1 Syntéza.....	21
1.2.2 Bioaplikace magnetických nanočástic.....	23
2 Ramanova spektroskopie	26
2.1 Historie	26
2.2 Princip.....	27
3 SERS	30
3.1 Substráty pro SERS	31
3.2 Aplikace SERS	32
3.2.1 SERS fyziologicky aktivních látek.....	32
3.3 Magnetický SERS	35
3.3.1 Aplikace magnetických nanočástic pro SERS	36
4 Cíle disertační práce	40
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
5 Příprava nanočástic, nanokompozitů a jejich funkcionalizace	42
5.1 Nanočástice stříbra.....	42
5.2 Magnetický nanokompozit pro analýzu IgG.....	42
5.3 Příprava biosensoru pro multiplexní analýzu nádorových markerů.....	43
5.4 Postup analýzy nádorových markerů HER2 a EpCAM	44
6 Výsledky a diskuze	45
6.1 Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS) pro stanovení lidského imunoglobulinu G v krvi.....	45
6.2 Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie k multiplexní analýze nádorových markerů HER2 a EpCAM v lidské krvi.....	53
6.3 Publikace zahrnující využití SERS k detekci dalších biologicky aktivních látek	63
6.3.1 Využití magneticky asistované Ramanovy spektroskopie k detekci infekce protetických kloubů	63
6.3.2 Multiplexní analýza RNA a DNA v rakovinných tkáních	64
6.3.3 Využití magneticky asistované Ramanovy spektroskopie k detekci prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v lidské krvi	65

ZÁVĚR	66
SUMMARY	68
LITERATURA	70
SEZNAM ZKRATEK.....	79
PŘÍLOHY.....	81

ÚVOD

Éru nanotechnologií odstartoval Richard Feynman v roce 1959 svojí přednáškou nazvanou „*There's Plenty of Room at the Bottom*“, ve které předpověděl, že v budoucnu bude možné cíleně manipulovat s atomy a sestavovat systémy a zařízení neobyčejných vlastností a funkcí. Většina z předních vědců té doby nevěnovala této přednášce moc pozornosti, nicméně výzkum v oblasti přípravy a studia vlastností částic menších než 100 nm ke konci osmdesátých a na začátku devadesátých let dvacátého století potvrdil platnost myšlenek vyslovených Feynmanem.¹ Na pomyslné startovní čáře vzniku nanotechnologií stály v té době uhlíkaté materiály typu fullerenu² či objev mikroskopických technik se skenující sondou.³ Od té doby dochází k novým a novým objevům, které umožňují další pokrok a zvyšují aplikační potenciál nanočástic jak v oblasti vědy, tak v běžném životě.⁴ Nicméně, nanočástice mají překvapivě dlouhou historii. Běžně se totiž vyskytují v přírodě jako produkty vulkanické činnosti, požárů či mikrobiologických procesů. Z tohoto důvodu lze první využití nanočástic člověkem datovat už do období antiky. Kovové nanočástice byly po dlouhá století využívány k barvení skla. Typickým příkladem jsou zlaté nanočástice, které zbarvují sklo do jasně červené barvy. Této vlastnosti využili ve čtvrtém století Římané při výrobě Lykurgových pohárů. Poháry se za denního světla jeví jako zelené, ale při ozáření z vnitřku se jeví jako červené. Technologie barvení skla nanočásticemi zlata byla poté zapomenuta a znovuobjevena až v 17. století.⁵ V roce 1857, opublikoval Faraday práci „*Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light*“, ve které popisuje přípravu koloidního roztoku zlata redukcí chlorozlatité soli fosforem v sirouhlíku. Na tento postup přišel čistě náhodou, nicméně se tyto roztoky (správněji disperze) nanočástic staly základem v té době nově vznikajícího oboru – koloidní chemie a později i oboru nanotechnologie.⁵⁻⁷ Přibližně o čtyřicet let později další z průkopníků koloidní chemie Richard Zsigmondy a Henry Siedentopf sestrojili ultramikroskop umožňující nepřímé sledování do té doby „neviditelných“ koloidních částic.⁸ Koloidní částice (obvykle se uvádí, že se jedná o částice hmoty o rozměrech v rozsahu přibližně 1 nm až 1 μm) pak poprvé spatřil konstruktér prvního elektronového mikroskopu Ernst Ruska v roce 1931.² A éru nanotechnologií, jednoduše definovaných jako obor zabývající se

hmotnými objekty o rozměrech v rozsahu 1-100 nm, spolu otevíral v roce 1981 objev skenovací tunelové mikroskopie, prvního zástupce široké řady technik označovaných jako mikroskopie se skenující sondou, které nejen že poskytují náhled do nanosvětla, ale zároveň umožňují i manipulaci s nanobjekty.⁹

Důležitou oblast výzkumu jak v koloidní chemii, tak i nanotechnologiích představuje interakce elektromagnetické záření s velmi malými objekty. Obzvláště u kovových nanočástic dochází ve viditelné oblasti spektra k zajímavým jevům, které způsobují barevnost jejich disperzí např. již zmíněné zabarvení skla, dochází k vybuzení tzv. povrchového plasmonu.¹⁰ Tato interakce má i další důsledky související s lokálním zesílením elektromagnetického pole v blízkosti povrchu nanočástice, které nese hlavní zodpovědnost za existenci vysoce citlivé spektroskopické metody - povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (Surface Enhanced Raman Spectroscopy – SERS). Přičemž zesílení Ramanova signálu je tak velké, že ve specifických případech umožňuje detekci i jednotlivých molekul.¹¹ Díky tomu tato metoda našla široké uplatnění například v potravinářství, kriminalistice, farmacii a biologii.^{12–16} Další zvýšení citlivosti přináší metoda magneticky asistované SERS (MA-SERS), umožňující detekci biologicky významných molekul, vyskytujících se v živých organismech ve velmi nízkých koncentracích. Tato metoda využívá nanokompozity s magnetickými vlastnostmi, které slouží jako substrát k navázání biologicky aktivních látek a které umožňují jednoduchou prekoncentraci analytu pomocí vnějšího magnetického pole. Kovové nanočástice, například zlata nebo stříbra, navázané na povrchu magnetických částic, pak slouží k zesílení Ramanova signálu.^{17–19}

V předkládané disertační práci byla tato metoda použita k detekci lidského imunoglobulinu G (IgG) ve vzorcích lidské krve. Přítomnost potenciální nespecifické interakce komponent vzorku s aktivním povrchem nanočástic byla minimalizována úplnou blokací tohoto povrchu pomocí vodného roztoku ethylaminu. Dále byla tato metoda použita k simultánnímu stanovení dvou odlišných rakovinných markerů (HER2 a EpCAM). Každý marker byl nejprve označen rozdílnými fluorescenčními značkami – HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5. Analýza pak byla založena na sledování poklesu relativních intenzit vybraných spektrálních pásů fluorescenčních značek v důsledku kompetice označených a neoznačených markerů o vazebná místa na povrchu magnetických


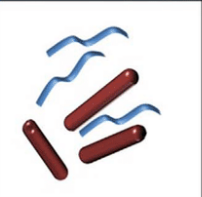
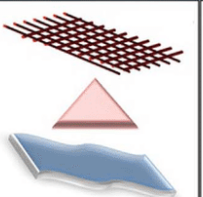

nanočástic. Závěr experimentální části této disertační práce je věnován stručným popisům spoluautorských publikací, ve kterých bylo rovněž využito nanočástic stříbra jakožto aktivních substrátů pro zesílení Ramanova signálu biologicky aktivních molekul.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Nanomateriály a nanočástice

Nanomateriály představují hmotné objekty, jejichž velikost je alespoň v jednom rozměru od 1 do 100 nm.²⁰ Na základě svých vlastností (velikost, struktura, morfologie) mohou být rozděleny do několika skupin. Nejzákladnější rozdělení nanostruktur je podle počtu rozměrů nad 100 nm a to na: 0D struktury (nanočástice, kvantové tečky), kdy všechny rozměry jsou v nanometrech, 1D struktury (nanodráty, nanotrubičky) dva rozměry pod 100 nm, 2D struktury (nanovrstvy, nanofilmy) jeden rozměr v nanometrech a 3D struktury, což jsou objemové materiály, které obsahují např. póry s velikostí v nanometrech (obrázek 1).^{20,21} Nanomateriály vykazují díky svým malým rozměrům a velkému povrchu unikátní fyzikální a chemické vlastnosti. Termín „nanotechnologie“ poprvé použil Eric Drexler roku 1986 a od té doby došlo k mnoha významným objevům v oblasti nanotechnologií.²² Mezi nejvýznamnější bezesporu patří již zmíněný vývoj skenovací tunelové mikroskopie, za kterou dostali Binnig a Rohrer v roce 1986 Nobelovu cenu, dále pak objev uhlíkových fullerenu C₆₀ (Smalley, Curl, Heath a Kroto, Nobelova cena udělena v roce 1986) či objev grafenu v roce 2004, za který byla Nobelova cena udělena v roce 2010 profesorům Geimovi a Novoselovi.¹

Díky malým rozměrům dochází ke změnám vlastností těchto materiálů. Změnu vlastností nanomateriálů oproti makroskopickým materiálům mají na svědomí dva faktory – zvýšená plocha povrchu a kvantová omezení. Díky těmto faktorům dochází ke změně magnetických, optických, elektrických vlastností a ke změně chemické reaktivity.²³

Isotropic nanomaterials		Anisotropic nanomaterials	
			
0D	1D	2D	3D
Spheres, Clusters	Nanorods, wires	Nanofilms, plates	Nanoparticles

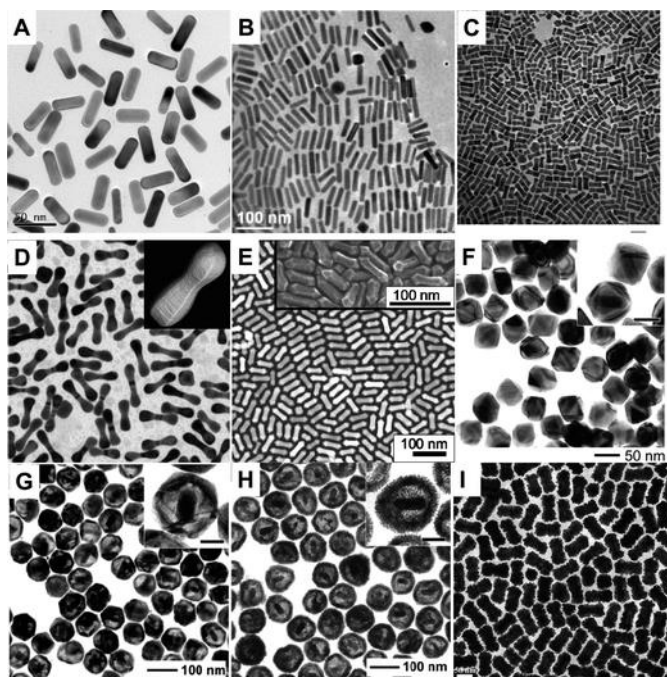
Obr. 1.: Schématické znázornění nanomateriálů podle počtu rozměrů pod 100 nm (0D, 1D, 2D a 3D).
Převzato z Sadhasivam a kol (2017).²¹

1.1 Nanočástice ušlechtilých kovů

Nanočástice ušlechtilých kovů, vykazují unikátní fyzikálně chemické vlastnosti, ale také biologické vlastnosti. Tyto vlastnosti výrazně závisí na velikosti a tvaru připravených nanočástic. Změnou tvaru a velikosti částic lze měnit jejich elektrické, optické a chemické vlastnosti a tím i způsob aplikace jako je katalýza, SERS, biologický sensing a mnoho dalších.²⁴ Velkým přínosem je uplatnění nanočástic ušlechtilých kovů v biomedicínálních aplikacích. Využívají se zejména v diagnostice, „imagingu“ či řízeném transportu léčiv.^{25–28} Protože zde jsou využívány zejména nanočástice kovů I. B skupiny periodického systému (Cu, Ag a Au), bude další text zaměřen hlavně na tyto kovy.

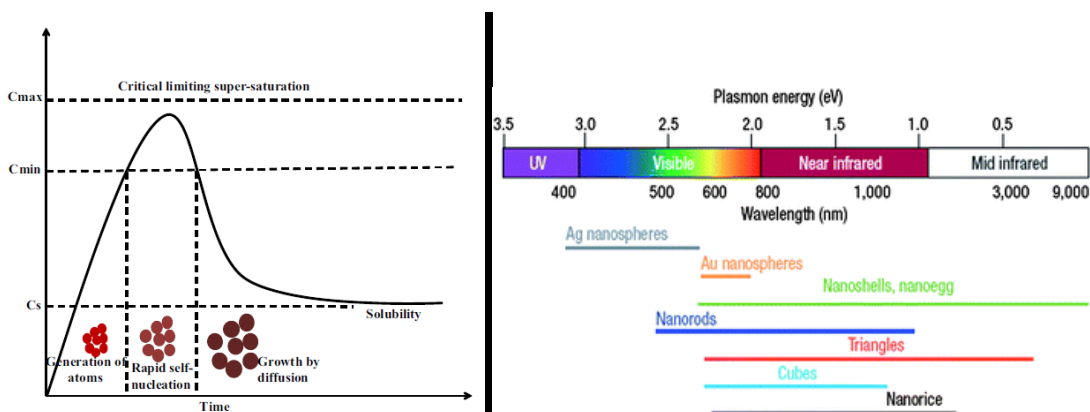
1.1.1 Syntéza

V současné době existuje několik způsobů syntézy nanočástic kovů. Jedná se zejména o metody chemické a fyzikální, ale i metody fotochemické či biologické. Každá z těchto metod má svoje pozitiva i negativa s ohledem na cenu, velikost částic a tvar částic. Obecně lze metody přípravy rozdělit do dvou hlavních skupin na „top-down“ metody (dispergační) a „bottom-up“ metody (kondenzační). U prvně zmíněných postupujeme od makroskopických materiálů směrem k menším útvarům až po nanočástice. Příkladem těchto metod je mletí, chemická depozice par či laserová ablace. Tímto způsobem lze připravit například nanočástice magnetitu z přírodní rudy, nanočástice uhlíku a jiné. Metody „bottom-up“ fungují obráceným způsobem, kdy jsou nanočástice „vystavěny“ z atomů, nejčastěji díky vhodné chemické reakci. Do této kategorie patří zejména srážecí a redukční (či oxidační) reakce.^{1,5} Mezi nejčastěji používané metody přípravy nanočástic ušlechtilých kovů patří zejména chemické metody, které umožňují syntézu kovových nanočástic v disperzi. Obecně, pro chemické syntézy je potřeba tří složek: 1) kovový prekurzor, 2) redukční činidlo a 3) stabilizátor. Vytvoření koloidních disperzí redukcí kovových solí zahrnuje dvě fáze – nukleaci, růst a zrání (obrázek 3). Všechny fáze výrazně ovlivňují výslednou velikost a tvar částic.²⁹ Pomocí vhodné metody lze připravit nanočástice různých velikostí i tvarů, například dráty, tyčinky, krychličky, hvězdčovitě částice, hranolovité částice a mnoho dalších.²⁴



Obr 2.: TEM snímky nanočástic zlata s různým tvarem, připravené „growth-seeding“ metodou. Převzato z Xu a kol. (2011).³⁰

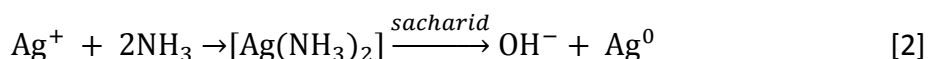
Se změnou tvaru a velikostí se mění i barva koloidních disperzí nanočástic kovů. Zlaté kulovité nanočástice o velikosti přibližně 10 – 20 nm mají červenou barvu, zatím co stříbrné kulovité částice o velikosti přibližně 30 nm mají barvu žlutou.³¹



Obr 3.: Schéma procesu nukleace a růstu nanokrytalů v roztoku: prekuzory jsou nejprve rozpuštěny v rozpouštědlech za vzniku monomerů, následované tvorbou jader a růstem nanokrytalů agregací jader. Převzato z Airo a kol (2014).³² /rozsah plasmonových rezonancí nanočástic s různým tvarem. Převzato z Xu a kol. (2011).³⁰

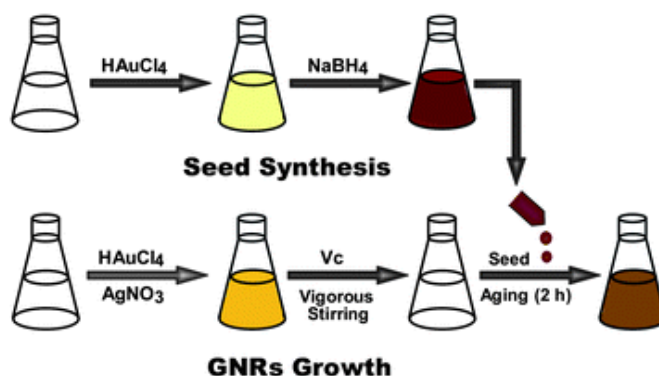
K přípravě nanočástic stříbra a zlata se nejčastěji používá chemická redukce. Redukčním činidlem může být například tetrahydridoboritan sodný. Jako první touto

metodou připravili Creighton, Blatchford a Albrecht nanočástice stříbra s velikostí v rozmezí 5 - 20 nm, které jsou stabilní po dobu několika měsíců.³³ Dalším redukčním činidlem může být citrát sodný. Lee a Meisel s jeho pomocí připravili stříbrné nanočástice tak, že k vroucímu vodnému roztoku AgNO₃, přidali 1% (w/w) roztok citrátu sodného a směs vařili po dobu 1 hodiny. Tímto postupem vznikají částice s velikostí od 30 nm do 120 nm, absorpčním maximem okolo 420 nm a s vyšší polydisperzitou než při redukci tetrahydridoboritanem sodným. Podle autorů publikace se tato metoda také označuje jako Lee – Meiselova metoda.³⁴ Mezi nejnámější syntézu nanočástic zlata patří Turkevitchova metoda . Zlatitá sůl a citrát sodný jsou smíchány ve vodném prostředí a změnou teploty, poměru jednotlivých látek a pořadím v jakém jsou do reakčního systému přidávány lze měnit velikost výsledných nanočástic.³¹ Kromě již zmíněných redukčních činidel se k syntézám používají také kyselina askorbová, hydrazin či sacharidy.^{35–37} Právě při redukci sacharidy lze řízeně připravit částice s určitou velikostí. Jedná se o modifikovaný Tollensův proces, což je jednostupňová syntéza, kdy se k redukci diaminstříbrného komplexu používá sacharid (schéma 2). Velikost částic připravených touto metodou se pohybuje v rozmezí od 25 nm do 450 nm a závisí na použitém sacharidu a také na koncentraci amoniaku v reakčním systému. Experimentálně bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací amoniaku v systému roste velikost částic.³⁸



Další oblíbenou metodou přípravy nanočástic různých tvarů a velikostí je „growth-seeding“ metoda. Při této metodě se nejdříve pomocí silného redukčního činidla připraví disperze velmi malých částic, které poté slouží jako zárodečná centra pro další růst částic po přidavku dalšího kovového prekurzoru a využití slabého redukčního činidla například kyseliny askorbové (obrázek 4). Při dalším růstu je velice důležitá přítomnost kationického surfaktantu, jako například CTAB (cetyltrimethylammonium bromid).³¹ Jana a kol. použili „growth-seeding“ metodu k přípravě nanočástic zlata s velikostí 5 – 40 nm. Velikost vznikajících částic lze velmi jednoduše ovlivnit poměrem zárodečných center v kovovém solu. Jako zárodečná centra použili nanočástice redukováné tetrahydridoboritanem sodným stabilizované citrátovým aniontem

s velikostí 3,5 nm. Vodný roztok CTAB byl použit jako růstové medium, které bránilo agregaci částic během růstu a zároveň sloužilo jako stabilizátor částic po jejich vytvoření.³⁹



Obr 4.: Postup přípravy nanočástic zlata pomocí „growth-seeding“ metody. Převzato z Xu a kol. (2011).³⁰

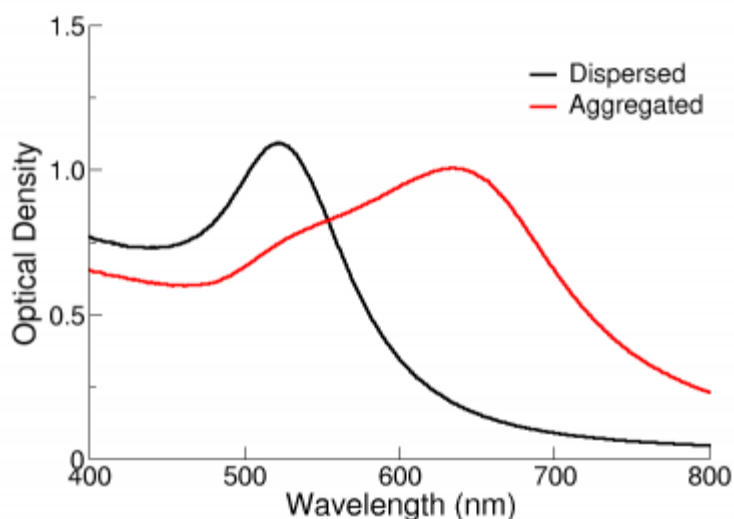
Nanočástice lze připravit také biologickými metodami, kdy se k redukcí využívají rostlinné extrakty či bakteriální kmeny a houby.⁴⁰ Amarendra Dhar Dwivedi a Krishna Gopal připravili stříbrné nanočástice redukcí dusičnanu stříbrného extraktem z listů rostliny *Chenopodium album*. Velikost takto připravených částic se pohybovala v rozmezí od 10 nm do 30 nm.⁴¹ Kromě již zmíněné *Chenopodium album* byly k přípravě nanočástic použity i extrakty z dalších rostlin jako například *Moringa oleifera*, *Garcinia mangostana*, *Magnolia kobus* a *Diopyros kaki*, *Acalypha indica* a mnoho dalších.^{42–44} K biosyntézám nanočástic lze také použít houby nebo bakterie. Například bakterie *Rhodococcus sp.* nebo *Bacillus subtilis* a houby *Aspergillus fumigatus* či *Fusarium oxysporum*.^{45–47}

1.1.2 Vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů

Optické vlastnosti

Již dlouho je známo, že přidáním zlata lze vytvořit sklo zabarvené do vínově červených nebo purpurových odstínů. S měnící se velikostí a tvarem nanočástic dochází i ke změně zbarvení koloidů. Koloidy zlatých kulovitých částic s velikostí okolo 20 nm mají charakteristickou červenou barvu, zatímco koloidy stříbrných kulovitých částic s velikostí okolo 25 nm jsou žluté. Zjistilo se, že zbarvení je způsobeno kolektivními oscilacemi elektronů ve vodivostním pásu, známé jako povrchový plasmon.³¹

Povrchového plasmonu je využíváno k charakterizaci nanočástic a také hraje významnou roli ve spektroskopických technikách jako je povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) a povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS). V UV/Vis spektroskopii poloha, intenzita a šířka pásu absorpce způsobené existencí povrchového plasmonu napovídá o velikosti a tvaru nanočástic. Například u nanočástic stříbra připravených redukcí maltosou roste s přidavkem amoniaku velikost částic a zároveň dochází k posunu absorpčního maxima povrchového plasmonu směrem k delším vlnovým délkám. Vznik agregátů nanočástic v systému lze v UV/Vis spektrech rozpoznat podle výskytu druhého absorpčního maxima, které má nižší intenzitu, je širší a posunuté k vyšším vlnovým délkám než původní pás. (obrázek 5).^{37,48}



Obr. 5.: Typická absorpční spektra stabilních nanočástic zlata a agregovaných nanočástic zlata. Převzato z www.nanocomposix.com.⁴⁹

Katalytické vlastnosti

Nanočástic ušlechtilých kovů se velice často využívá při katalýze díky jejich velkému povrchu a vysoké povrchové energii. Katalýza využívající nanočástic byla zkoumána jak pro „homogenní“ (katalyzátory a reaktanty jsou oba v roztoku), tak pro heterogenní systémy (katalyzátory na substrátu). Bylo ukázáno, že v homogenní katalýze mají tvary s více rohy a okrajovými atomy vyšší reaktivitu než podobné nanočástice s menším počtem rohů a okrajů. Katalytická aktivita nanočástic se vyskytuje i u materiálů, které

vykazují v objemovém stavu velmi malou reaktivitu. Právě například makroskopické zlato je ušlechtilý kov, který je velmi nereaktivní. Nicméně, nanočástice a malé klastry zlata jsou vysoce katalyticky aktivní. Bylo navrženo mnoho možných vysvětlení pro rozdílnost reaktivity mezi nanočásticemi a makroskopickým zlatem. Ty zahrnují elektronické a chemické vlastnosti nanočástic, tvar, velikost, oxidační stav nanočástic a plochu povrchu.⁵⁰

Antimikrobiální vlastnosti

Významnou vlastností některých nanočástic, zejména koloidního stříbra, je jeho biologická aktivita. Antimikrobiální účinky stříbrných iontů nebo solí jsou velmi dobře známé, ale účinky a mechanismus působení stříbrných nanočástic na mikroorganismy jsou stále předmětem výzkumu.^{51–53} Vzhledem k tomu, že v posledních letech je stále více bakterií resistantních vůči běžným antibiotikům, se výzkum zaměřuje na alternativní nebo dříve využívané formy léčiv nebo metod léčení. Stříbrné nanočástice vykazují baktericidní aktivitu už při nízkých koncentracích, kdy ještě nejsou toxické pro lidské buňky. Také se ukázalo, že zesilují účinky běžně používaných antibiotik.⁵⁴

1.1.3 Bioaplikace nanočástic ušlechtilých kovů

Existuje mnoho zmínek o použití ušlechtilých kovů, zejména stříbra, zlata a platiny pro léčebné účely. V Ayurvédě se běžně používají velmi jemné prášky těchto kovů, známé pod názvem "bhasma" pro léčbu různých onemocnění.⁵⁵ Nanočástice ušlechtilých kovů mají potenciál k využití v oblasti medicíny díky jejich unikátním vlastnostem. Lze jich využít k molekulárnímu zobrazování, diagnostice či cílenému transportu léčiv. V řadě studií bylo potvrzeno, že nanočástice jsou výborné nosiče chemoterapeutik, nicméně musí být splněno několik podmínek, jako je dobrá afinita léčiva k nanočásticím, stabilita nanočástic a specificita vytvořeného komplexu a jeho schopnost uvolnit léčivo.⁵⁶ Patra a kol. testovali zlaté nanočástice (AuNPs) jako nosiče léčiv. Na nanočástice s velikostí okolo 5 nm kovalentně navázali léčivo a poté sledovali akumulaci nanočástic v místě nádoru.^{57,58} Také bylo zjištěno, že AuNPs zvyšují účinek protinádorových léčiv. Nanočástice s navázanými protilátkami Anti-trastuzumab byly použity k zacílení lidského epidermálního růstového faktoru (HER2) v lidských buňkách rakoviny prsu (SK-BR-3). Bylo zjištěno, že nanočástice Au-HER s receptorem HER-2 byly

buňkou přijaty, což vedlo k dvojnásobnému zvýšení cytotoxicity trastuzumabu.⁵⁹ Kromě nádorových onemocnění mají AuNPs velký potenciál také proti infekčním onemocněním, jako je HIV, tuberkulóza, Parkinsonova nemoc a další.^{60–63} Například *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) je obtížné identifikovat díky jejich pomalému růstu. Liu a kol. vyvinuli biosenzor k vysoce citlivé detekci specifické DNA sekvence MT61 IS6110 složený z redukovaného grafenoxidu s AuNPs (rGO-AuNPs) a AuNPs s polyanilinem (Au-PANI), které sloužily jako značka. Vzhledem k vysoké elektroaktivitě konjugátů Au-PANI vykazoval sensor vysokou citlivost, specifitu a stabilitu.⁶⁴

Nejen AuNPs, ale i nanočástice stříbra (AgNPs) mají obrovské uplatnění v oblasti medicíny, především jako potenciální antimikrobiální látky, ale i při léčbě rakoviny. AgNPs byly použity k detekci a zobrazování nádorů, k transferu léčiv i k hypertermii. Kromě toho samotné AgNPs mají protinádorovou aktivitu, inhibují růst nádorů a také zabraňují angiogenezi v okolí nádorových tkání. Vědci využívají chemicky i biologicky syntetizované AgNPs k *in vitro* i *in vivo* testování protinádorových aktivit proti různým rakovinným buňkám, jako je buněčná linie lidského karcinomu prsu MCF-7, melanomová buňka B10F17, buňka epitelálního adenokarcinomu plic A549, cervikálního karcinomu SiHa a buňky HeLa.⁵⁶ Guo a kol. studovali účinek AgNPs pokrytých PVP s třemi různými velikostmi: 3, 11 a 30 nm, proti leukemii (lidská buněčná linie AML). Zjistili, že AgNPs s velikostí 11 nm byly více cytotoxické než 30 nm AgNPs, zatímco u částic s velikostí 3 a 11 nm nebyl žádný významný rozdíl v cytotoxicitě, což bylo způsobeno malým rozdílem v hydrodynamickém poloměru částic. Zjistili také, že AgNPs při nižších koncentracích vykazují silnější cytotoxický účinek než vyšší koncentrace nanočástic.⁶⁵ Stříbro v různých formách (kovové stříbro, stříbrné soli a koloidní stříbro) se používá jako účinné antibakteriální činidlo po mnoho staletí. Stříbrné NP nebyly běžně používány v lékařské praxi, s výjimkou krátkého období na počátku dvacátého století, kdy se koloidní stříbro používalo k léčbě některých infekčních stavů. Proto není jasné, zda se bakterie mohou stát rezistentními vůči AgNPs. Jediný výzkum, který studoval bakteriální chování v reakci na opakovanou dlouhodobou expozici AgNPs, zjistil, že mezi mnoha bakteriálními kmeny má pouze *Bacillus subtilis* přirozenou schopnost přizpůsobit se buněčnému oxidativnímu stresu vyvolanému stříbrnými nanočásticemi.⁶⁶ Vzhledem k nedostatku experimentálních

údajů stále probíhá diskuse o tom, zda si bakterie mohou vyvinout odolnost proti antibakteriálním účinkům AgNPs při dlouhodobé expozici subinhibičních koncentrací. Panáček a kol. zjistili, že bakterie opakovaně vystavené subinhibičním koncentracím AgNPs si mohou rychle vyvinout rezistenci vůči antibiotické aktivitě NPs. Tato odolnost je způsobena produkcí flagellinu, adhezního proteinu bakteriálního bičíku (flagellum), který způsobuje agregaci AgNPs a tím eliminuje jejich antibakteriální účinek vůči gramnegativním bakteriím. Vyvinutá bakteriální rezistence může být potlačena inhibitory, které zabraňují produkci flagellinu, jako je extrakt z kůry granátového jablka (PGRE).⁵⁴

1.2 Magnetické nanočástice

Během posledních let velmi vzrostl zájem vědecké komunity o magnetické nanomateriály z důvodu jejich uplatnění v mnoha aplikacích souvisejících s vývojem vysoce citlivých analytických metod či nových typů katalytických systémů.

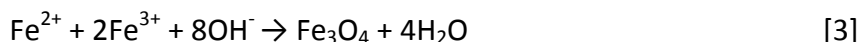
Mezi nejvíce zkoumané magnetické materiály patří nanočástice oxidů železa. Tři nejčastěji v přírodě vyskytující se formy oxidů železa jsou magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Využitelné magnetické vlastnosti jsou ale spojeny hlavně s nanočásticemi magnetitu. Feromagnetické částice s velikostí $<10 - 20$ nm vykazují unikátní vlastnosti jako například superparamagnetismus.⁶⁷

1.2.1 Syntéza

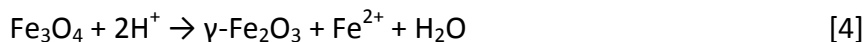
Nanočástice oxidů železa (FeNPs) mohou být připraveny 3 různými způsoby:

- 1) Fyzikální metody – hlavně metody typu *top-down*, mezi které patří mletí, depozice plynu či litografie. Nevýhodou těchto metod je obtížné řízení velikosti částic.^{67,68}
- 2) Chemické metody – v provedení odpovídající metodám *bottom-up*. Mezi nejčastěji používané metody patří koprecipitace, termický rozklad, hydrotermální syntéza, sol-gel metoda či sonochemická syntéza.^{67,69}
 - o Principem koprecipitační metody přípravy nanočástic magnetitu je reakce železitých a železnatých iontů v poměru 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$), která probíhá v silně zásaditém prostředí (pH 8 - 14) bez přístupu vzduchu, popřípadě i za zvýšené

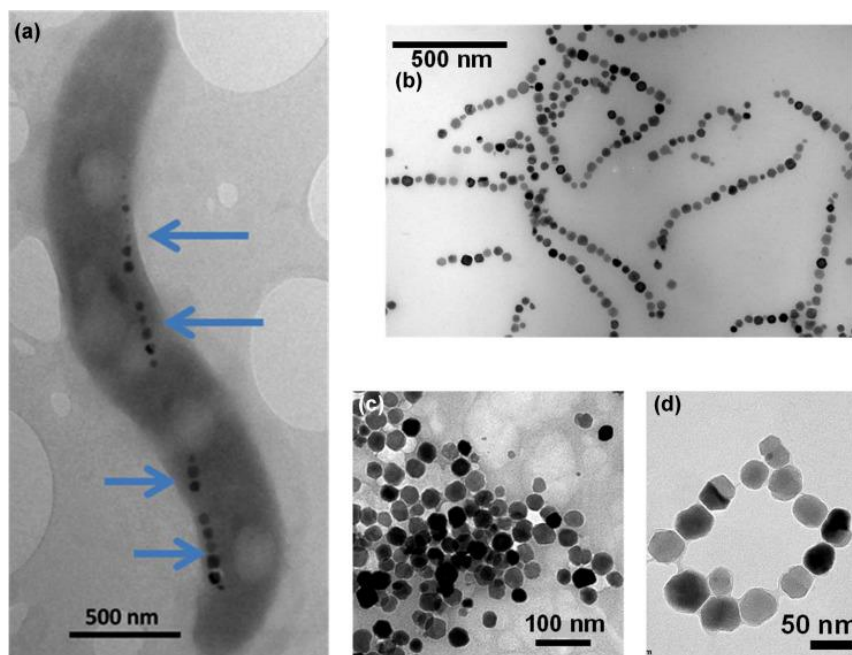
teploty. Jedná se pravděpodobně o nejjednodušší a nejefektivnější chemickou metodu syntézy nanočástic magnetitu.^{69,70}



Vzniklý magnetit (Fe_3O_4) je nestabilní a na vzduchu oxiduje na maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) podle rovnice:



- U metody termické dochází k rozkladu organokovové sloučeniny, například pentakarbonylu železa nebo tris(acetylacetonáto)železitého komplexu, v organickém rozpouštědle za vysokých teplot.⁶⁹
 - Hydrotermální metoda umožňuje přípravu vysoce krystalických FeNPs. Probíhá ve vodném prostředí v uzavřené nádobě (autoklávu) za vysokých teplot a tlaku. Syntéza může probíhat za přítomnosti surfaktantu i bez něj.⁷⁰
 - Sol-gel metoda je založena na hydroxylaci a kondenzaci molekul prekursoru v roztoku. Nejdříve vznikne roztok nanočástic („sol“) z kterého následnou kondenzací a polymerizací vzniká 3D síť oxidu železa označovaná jako gel. Celý proces probíhá za pokojové teploty, nicméně na závěr je k dosažení krystalických NPs potřeba vysoké teploty (400 °C).⁷⁰
 - Při sonochemické syntéze se využívá akustické kavitace, při které dochází ke vzniku bublin (kavit), které se po dosažení kritického poloměru rozpadají a tím dochází velkému nárůstu teploty a tlaku. Rozbití molekul prekursoru probíhá v malém objemu bublinky, čímž dochází ke vzniku nanočástic.⁶⁷
- 3) Biologické metody – krystalky Fe_3O_4 získané z magnetotaktických bakterií. Tyto bakterie obsahují řetízky speciálních organel nazývaných jako magnetozomy, díky kterým dochází k orientaci a pohybu bakterií podle linií magnetického pole Země, tudíž fungují podobně jako magnetická střelka kompasu (obrázek 6).^{71,72}



Obr 6.: (A) TEM snímek celé magnetotaktické bakterie. Magnetosomy jsou označeny modrými šípkami. (B) TEM snímek suspenze řetězců magnetosomů, izolovaných z magnetotaktických bakterií. (C) TEM snímky jednotlivých magnetosomů oddělených z řetězců tvořící agregáty. (D) TEM snímky jednotlivých magnetosomů oddělených z řetězců tvořící smyčku. Převzato z Alhandéry a kol. (2012).⁷¹

U magnetických nanočástic oxidů železa dochází velmi rychle k agregaci díky silným magnetickým vlastnostem částic, van der Waalsovým silám a díky vysoké povrchové energii. Z tohoto důvodu je výhodné magnetické částice stabilizovat modifikací jejich povrchu ať už stericky (pomocí polymerů) nebo elektrostaticky (pomocí funkčních skupin).⁷³ Existuje mnoho materiálů a polymerů, které se ke stabilizaci používají. Mezi nejpoužívanější patří polyethylenglykol (PEG), želatina, dextran, chitosan, polyvinylpyrrolidon (PVP), polyvinyl alkohol (PVA) nebo třeba polyakrylová kyselina či silany.^{67,69}

1.2.2 Bioaplikace magnetických nanočástic

V oblasti diagnostiky a léčby lze rozdělit magnetické nanočástice (MNPs) do čtyř skupin podle jejich využití. 1) nanočástice pro magnetickou separaci, 2) nanočástice pro přenos léčiv („drug delivery“), 3) nanočástice pro magnetickou rezonanci (MRI - Magnetic Resonance Imaging) a 4) hypertermie.⁷⁴

Ad 1) Magnetické separace – magnetické nanočástice lze v rámci diagnostických metod použít k *in vitro* separacím například proteinů nebo buněk. Magnetické separace mají

oproti konvenčním separačním metodám několik výhod. Celý proces je rychlý a jednoduchý. Pomocí externího magnetického pole přiloženého ke vzorku lze odseparovat požadovanou látku nebo vzorek jednoduše přečistit.⁷⁰

Ad 2) Přenos léčiv – další možnou aplikací magnetických nanočástic je „drug delivery“, kde nanočástice slouží jako nosič léčiva. V ideálním případě je nanočástice s léčivem na svém povrchu transportována na cílové místo (orgán) a zde následně dochází k uvolnění léčiva. Velikost, náboj a povrchová energie magnetické částice výrazně ovlivňují celý průběh procesu. Nanočástice s poloměrem od 10 nm do 100 nm jsou pro tuto aplikaci nejlepší, protože zůstávají v krevním oběhu optimální dobu a jsou dostatečně malé, aby byly efektivně distribuovány v cílových tkáních. Modifikaci „drug delivery“ je možné použít přímo k léčbě rakoviny. Výhodou této metody je, že oproti běžné chemoterapii jsou minimalizovány vedlejší účinky, jak bylo prokázáno při použití nanočástic oxidu železitého s navázaným cytostatikem mitoxantron.^{70,75}

Ad 3) MRI – metoda magnetické rezonance byla vyvinuta v roce 1973 a velmi rychle se stala oblíbenou a velmi používanou diagnostickou metodou klinické medicíny. Jedná se o neinvazivní metodu, která umožňuje zobrazení vnitřních orgánů a funkcí lidského těla. Magnetická rezonance využívá silné magnetické pole a elektromagnetické vlnění s vysokou frekvencí. V silném magnetickém poli dochází k uspořádání magnetických spinů atomových jader (protonů) podle vnějšího magnetického pole. Radiofrekvenční puls rozruší rovnovážné uspořádání spinů. Po skončení elektromagnetického impulsu již není protonům dodávána energie, a proto se vrací do původního, energeticky výhodnějšího postavení. V MRI můžeme pozorovat dva nezávislé relaxační procesy - T1 (podélná relaxace) a T2 (příčná relaxace). Nanočástice oxidů železa se využívají zejména ke zlepšení kontrastu v MRI.⁷⁶ Je důležité, aby se nanočástice hromadily okolo cílové tkáně. Toho je dosaženo funkcionalizací povrchu nanočástic molekulami, které pak interagují s receptory a tím dochází k potřebné akumulaci. MNPs mohou být funkcionalizovány různými látkami, například epidermálním růstovým faktorem (EGF), herceptinem nebo karcinoembryonální antigenem (CEA).⁶⁹

Ad 4) Hypertermie – použití nanočástic k hypertermii bylo poprvé popsáno v práci Jordana a jeho kolegů v roce 1993.⁷⁷ Tato práce experimentálně potvrdila vysokou

efektivitu superparamagnetických částic absorbovat energii střídavého magnetického pole a poté ji přeměnit na teplo. Obecně je známo, že nádorové buňky jsou více citlivé na teplo než buňky zdravé. Právě těchto vlastností se využívá při hypertermii, kdy se *in vivo* pomocí magnetických nanočástic zvýší teplota v místě nádoru (41 - 45 °C) a tím dojde ke zničení rakovinné buňky.⁷⁰

2 Ramanova spektroskopie

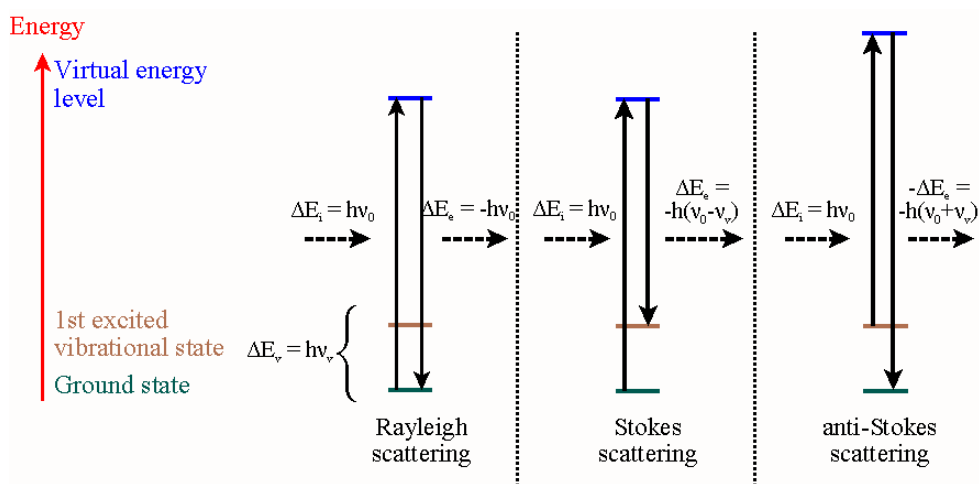
2.1 Historie

Ramanova spektroskopie je technika využívající k identifikaci látek rotační a vibrační stavy jejich molekul. Přestože byl neelastický rozptyl světla teoreticky předpovězen v roce 1923 rakouským fyzikem Adolfem Smekalem, experimentálně byl potvrzen až v roce 1928 Sirem Chandrasekhara Venkata Ramanem a jeho kolegou Sirem Kariamanickam Srinivasa Krishnanem. Jejich experiment využíval slunečního světla fokusovaného teleskopem na vzorek. K zachycení rozptýleného záření byly za vzorek umístěny další čočky. Tímto systémem optických filtrů dokázali existenci rozptýleného záření s odlišnou frekvencí, než mělo původní záření. Navíc to, co Raman pozoroval, byl anti-Stokesův rozptyl, který je normálně velmi slabý. Téměř současně pozorovali Ramanův rozptyl ruští vědci Landesberg a Mandelstan. Nicméně, v roce 1930 získal Sir Raman za tento objev Nobelovu cenu za fyziku. Následně v roce 1934 vypracoval George Placzek teorii Ramanova rozptylu.^{78,79}

Bezprostředně po objevu začal být Ramanův efekt využíván fyziky a chemiky k řešení mnoha problémů a během následujících pěti let přispěl k mnoha významným poznatkům v oblasti fyziky i chemie. Během prvního desetiletí po objevení Ramanova jevu bylo více než 2500 chemických sloučenin studováno tímto způsobem. Z počátku se jako zdroj záření využívalo rtuťových obloukových lamp. Tento zdroj záření byl v šedesátých letech nahrazen lasery, což bylo významným milníkem pro Ramanovu spektroskopii.⁸⁰ V dnešní době se k Ramanově rozptylu využívá laserů s širokou škálou frekvencí od blízké ultrafialové až po blízkou infračervenou a tím je umožněn výběr optimálních excitačních podmínek pro každý vzorek. Dále k vývoji citlivých Ramanových spektrometrů přispělo používání nových vysoce účinných multikanálových detektorů s nízkou hladinou šumu a vysokou kvantitativní účinností (charge- coupled device – CCD).^{81,82}

2.2 Princip

Když paprsek světla interaguje s molekulou, většina energie je rozptýlena elasticky (bez změny energie) se stejnou frekvencí jako mělo dopadající světlo, což označujeme jako Rayleighův rozptyl (obrázek 7). Některé fotony ale interagují a vyměňují s molekulami energii, což vede k neelastickému rozptylu světla, známého také jako Ramanův rozptyl. Molekula absorpcí fotonu vystoupá na virtuální hladinu excitovaného stavu a téměř okamžitě emituje foton s lehce odlišnou vlnovou délkou. Pokud původní foton interaguje s molekulami tak, že jim část energie předá, dojde k rozptýlení fotonů s nižší frekvencí (energií) a toto záření označujeme jako Stokesův rozptyl. Naopak pokud dopadající fotony přijímají energii od molekul, vzniká záření o vyšší frekvenci označované jako anti-Stokesův rozptyl. Rozdíl mezi frekvencí původních a rozptýlených fotonů odpovídá hladině vibrační energie molekuly a nazývá se Ramanův posun. Energie absorbovaného nebo emitovaného fotonu je dána Bohrovou frekvenční podmínkou $h\nu = \Delta E$ (obrázek 7). V případě Ramanovy spektroskopie je rozdíl mezi frekvencí rozptýleného a dopadajícího záření určen energetickými přechody v molekule, a proto se tato technika využívá k identifikaci funkčních skupin na základě změn rotačních a vibračních stavů molekul.^{83,84}



Obr. 7.: Různé možnosti rozptýlení světla: Rayleighův rozptyl (žádná výměna energie: původní a rozptýlené fotony mají stejnou energii), Stokesův Ramanův rozptyl (atom nebo molekula pohlcuje energii: rozptýlený foton má méně energie než původní foton) a anti-Stokesův Ramanův rozptyl (atom nebo molekula ztrácí energii: rozptýlený foton má více energie než původní foton). Převzato z Saleh (2017).⁸⁵

Díky rozdílům ve výběrových pravidlech je Ramanova spektroskopie doplňkovou metodou k infračervené spektroskopii a naopak. Při Ramanově rozptylu platí podmínka změny polarizovatelnosti molekuly během vibrace, jinak řečeno, polarizovatelnost molekuly je v průběhu rozptylu nenulová (kdežto u IČ musí docházet ke změně dipólového momentu molekuly). Vnější elektrické pole \bar{E}_e excitačního zdroje indukuje v molekule dipólový moment \bar{P} :

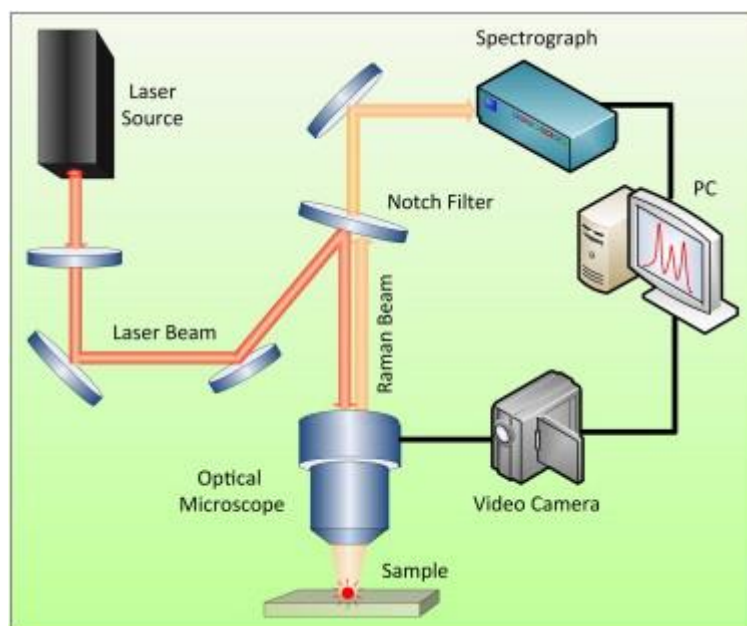
$$\bar{P} = \alpha \bar{E}_e, \quad [5]$$

kde α je polarizovatelnost molekuly. Tento koeficient vyjadřuje míru schopnosti elektrických nábojů v molekule posouvat se vlivem působení elektrického pole. Jednotkou polarizovatelnosti je $\text{Cm}^2 \text{V}^{-1}$.⁸⁴

Ramanova spektroskopie (RS) má také oproti IČ několik výhod: 1) absorpční pás vody je v IČ velmi intenzivní, kdežto v Ramanově spektroskopii velmi slabý a je tudíž možné bez problémů měřit vzorky ve vodném prostředí; 2) požadavky na úpravu vzorků před měřením pomocí RS jsou téměř nulové a množství vzorku potřebné pro analýzu je minimální a 3) oblast měření v RS je 4000 cm^{-1} až 10 cm^{-1} ; 4) metoda je neinvazivní a nedestruktivní a měření lze provádět za normálních podmínek. Hlavní nevýhodou Ramanovy spektroskopie je, že Ramanův jev je velmi slabý. Například v biomedicínálních aplikacích je potřeba k naměření kvalitních spekter poměrně vysoká koncentrace vzorku (0,1 – 0,01 M), což značně přesahuje fyziologické hodnoty.^{81,86} Navíc při vysokých koncentracích dochází k agregaci vzorků a tím ke změně struktury. Jednou z metod jak zvýšit citlivost detekce je rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS). K rezonančnímu Ramanově jevu dochází, když má vstupní záření frekvenci blízkou elektronovému přechodu chromoforu, což má za následek výrazné zvýšení intenzit pásů (3 – 5 krát) oproti normálnímu Ramanovu spektru. Resonanční Ramanova spektra mohou poskytnout informace například o sekundární struktuře proteinů a polypeptidů. Dalším problémem při měření Ramanových spekter je fluorescence. Ta může zastínit slabý Ramanův signál a tím znemožnit měření. K fluorescenci dochází vlivem nečistot, charakterem vzorku anebo kombinací obojího.⁸⁶

Intenzita Ramanova rozptylu závisí na vlnové délce použitého laseru, je přímo úměrná čtvrté odmocnině vlnové délky použitého záření ($\sqrt[4]{\lambda}$) a proto je laser s vlnovou délkou

532 nm 4,7 krát účinnější než laser s vlnovou délkou 785 nm a 16 krát účinnější než laser s excitací při 1064 nm. Z toho vyplývá, že použitím laseru s nižší vlnovou délkou získáme intenzivnější méně zašuměné spektrum. Pokud u měřeného vzorku dochází k fluorescenci, je nutné zvolit vyšší vlnovou délku laseru např. 785 nm nebo 1064 nm, a tím eliminovat interference způsobené fluorescencí vzorku.⁸⁷ Typické laboratorní uspořádání Ramanova spektrometru je znázorněno na obrázku 8. Paprsek laseru ozařuje vzorek pomocí optického mikroskopu, rozptýlené fotony po odfiltrování Rayleighova záření pronikají do spektrometru.⁸⁸ Výsledkem měření je pak Ramanovo spektrum vyjádřeno jako závislost intenzity rozptýleného záření na Ramanově posunu. Spektra lze zaznamenávat v rozmezí $4000 - 10 \text{ cm}^{-1}$, nicméně z hlediska kvalitativní analýzy je zajímavá oblast od 1500 cm^{-1} do 500 cm^{-1} (v případě biologických vzorků často $1800 \text{ cm}^{-1} - 500 \text{ cm}^{-1}$) označovaná jako „oblast otisku palce“, která poskytuje velmi cenné informace o zkoumaných látkách.^{80,89}



Obr. 8.: Typické laboratorní uspořádání Ramanova spektrometru. Převzato z Tu, Chang (2012).⁸⁸

3 SERS

V posledních desetiletích bylo vyvinuto několik technik využívajících Ramanův jev, jako například rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS), koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie (CARS), inverzní Ramanova spektroskopie, hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS) či povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). Poslední zmíněná technika se během poměrně krátké doby stala mocným nástrojem jak základního, tak aplikačního výzkumu. Povrchem zesílený Ramanův rozptyl byl poprvé pozorován na povrchu stříbrné elektrody v roce 1974 britským chemikem Martinem Fleischmanem a jeho kolegy.⁸⁶ Poté, v roce 1977, provedly dvě výzkumné skupiny, Jeanmaire s Van Duynem a Albrecht s Creightonem, kvantitativní studie potvrzující zesílení Ramanova jevu molekul adsorbovaných na povrchu stříbrné elektrody. Obecně je známo, že fenomén SERS je způsoben primárně dvěma mechanismy – elektromagnetickým a chemickým.^{78,79,87}

- Elektromagnetický mechanismus (EM) – je hlavním příspěvkem k celkovému zesílení Ramanova signálu. Tento mechanismus využívá silného elektrického pole, které vzniká v důsledku excitací povrchových plasmonů na povrchu kovových substrátů. Aby k excitaci došlo, musí být molekula v těsné blízkosti povrchu (maximální vzdálenost přibližně 10 nm). Ve většině případů jsou molekuly přímo na povrchu adsorbovány, ať už chemicky nebo fyzikálně.⁷⁹
- Chemický mechanismus (ChM) – jeho existence a samotná definice je neustále předmětem sporů, nicméně jeho příspěvek je mnohonásobně menší než elektromagnetický. Chemický mechanismus se často popisuje jako „charge-transfer“ mechanismus (mechanismus přenosu náboje) k čemuž je nutné mít molekulu adsorbovanou na kovovém povrchu.⁷⁹

Zesílení Ramanova signálu ovlivňuje mnoho faktorů, mezi něž patří například vlastnosti excitačního laseru (vlnová délka, polarizace či úhel dopadu) či samotné nastavení přístroje (počet skenů, doba jednoho skenu). Dále je pak zesílení ovlivněno typem použitého substrátu, kdy závisí na materiálu ze kterého je substrát vyroben (většinou se jedná o stříbro nebo zlato), na geometrii a úhlu vstupujícího záření a na prostorovém uspořádání (2D nebo 3D substrát). Zesílení je také ovlivněno adsorpcí

analytu – jeho koncentrací, mírou pokrytí substrátu, vzdáleností od povrchu a zejména změnou polarizovatelnosti vyvolanou adsorpcí.⁷⁹

3.1 Substráty pro SERS

Úspěch techniky SERS závisí na interakci adsorbované molekuly s vhodným substrátem. Většinou se jedná o substráty stříbrné, zlaté nebo měděné. Ideální kovové substráty pro SERS musí mít rozměr v nanometrech, nejlépe v rozmezí od 5 nm do 100 nm. Poslední desetiletí přineslo celou řadu nových typů substrátů s vyšší stabilitou a opakovatelností, které navíc poskytují větší zesílení signálu, typicky se jedná o nanostrukturní vrstvy.^{90–92} Ty mohou být připraveny primárně dvěma způsoby, fyzikálně a chemicky. Fyzikální metody tvorby vrstev zahrnují zejména litografii, depozici z plynné fáze, napařování či napařování a Langmuir-Blodgett metoda. Chemické metody zahrnují chemickou depozici par či metodu samovolné organizace vrstev, popřípadě její modifikaci layer-by-layer (LbL) využívající samovolnou organizaci.⁹³ Poslední zmíněná metoda je založena na elektrostatické interakci mezi kladně a záporně nabitými složkami. Tato metoda je velmi jednoduchá a levná, ale časově náročná.⁹⁴ V případě depozice vrstev nanočástic stříbra připravených modifikovanou Tollensovou metodou na skleněný substrát, byl nejdříve povrch substrátu aktivován ponořením do roztoku HCl/HNO₃ v poměru 3:1 (piranha solution), čímž získal substrát záporný náboj. Poté byl substrát ponořen do roztoku polymeru s kladným nábojem (polydiallyldimethylammonium chlorid - PDDA nebo 3-aminopropyltriethoxysilan - APTES), tzv. mezivrstvy a v posledním kroku byl ponořen do roztoku nanočástic stříbra se záporným nábojem. Důležité je po každém kroku substrát důkladně opláchnout, aby nedocházelo k agregaci nanočástic. Opakováním tohoto postupu lze připravit i vícenásobné vrstvy.⁹⁵ Sara Abalde-Cela a kol. připravili metodou LbL vrstvy nanočástic stříbra, které dále testovali jako substráty k detekci dioxinu pomocí SERS. Jako mezivrstvy použili polymery PDDA a polyakrylovou kyselinu (PAA).⁹⁶ Alternativou k výše uvedeným chemickým metodám může být metoda sonochemická. Vrstvy připravené tímto způsobem poskytují zesílení $5 \cdot 10^5$ (v případě adeninu jako modelového analytu), jsou více homogenní než v případě layer-by-layer metody a celý proces je mnohonásobně rychlejší.⁹⁷

3.2 Aplikace SERS

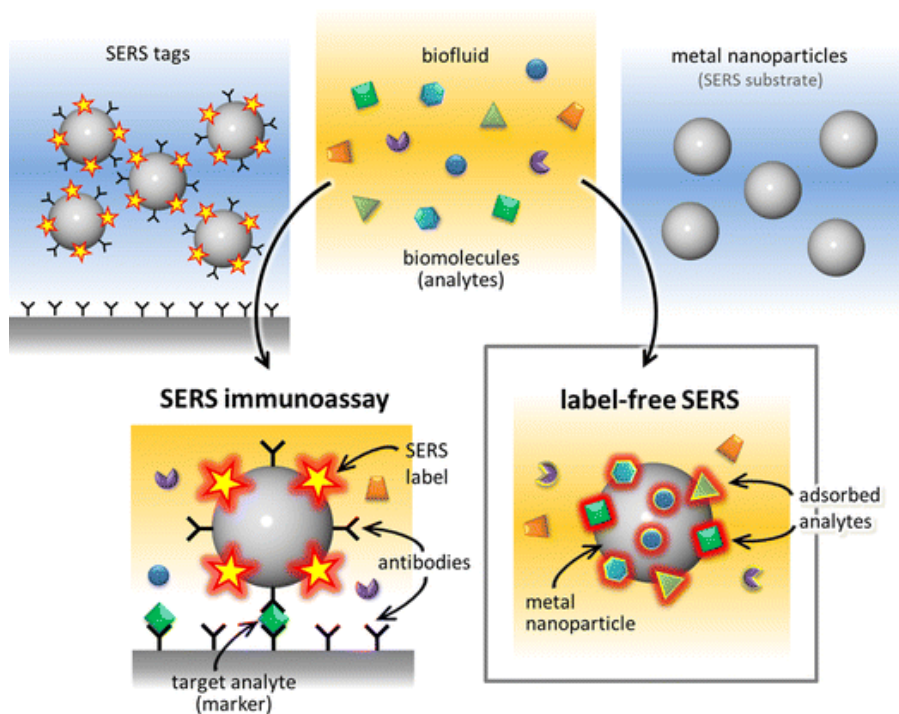
Velkou výhodou SERS je schopnost identifikovat široké spektrum látek a získat tak informace o jejich struktuře. Toho lze využít v materiálové chemii, biochemii, katalýze i elektrochemii. Přestože byl fenomén SERS pozorován a objasněn už v roce 1977, jeho aplikace mimo vědecké laboratoře trvala poměrně dlouho. Až s příchodem řízené přípravy nanostrukturních substrátů se SERS začal hojně využívat. Jednou z oblastí využití SERS může být restaurátorství či umění. SERS umožňuje měření velmi nízkých koncentrací z malého množství vzorku. Díky tomu je tato technika vhodná k analýze barev a pigmentů uměleckých děl, textilií nebo dřevěných soch.⁹¹ Velmi důležitou skupinou aplikací SERS je biosensing. Právě díky vysoké citlivosti a selektivitě této techniky je SERS vhodný zejména k detekci biologicky aktivních látek, jako například proteinů, bakterií, virů, neurohormonů a buněk.⁹¹ Kromě již zmíněných aplikací lze SERS využít i ve farmakologii, forenzních vědách nebo toxikologii.

Existuje několik způsobů jak využít SERS k biosensingu. Obecně lze tyto způsoby rozdělit do dvou skupin a to na „label-free“ a „label-based“. Label-free způsob zahrnuje sledování přímo zkoumaného analytu, kdežto label-based způsob využívá takzvaných Ramanovských značek, což jsou převážně aromatické sloučeniny obsahujících dusík nebo síru. Tyto molekulární značky jsou velmi často navázány na povrch nanočástic díky vysoké afinitě dusíku a síry ke kovovému prvku. Detekci pomocí SERS lze provádět v roztoku, kdy analyt reaguje s volnými nanočásticemi nebo v pevné fázi použitím SERS-aktivního substrátu.⁹⁸

3.2.1 SERS fyziologicky aktivních látek

Častým využitím techniky SERS je detekce proteinů. Proteiny jsou základní složkou organismu a podílí se na každém procesu v buňce. Nejdůležitějším rysem proteinů je jejich schopnost vázat se velmi pevně a specificky pouze na určité molekuly. Klasické metody a způsoby měření proteinů zahrnují zejména imunologické metody (ELISA) založené na spektroskopické nebo fluorimetrické detekci či metody separační, zejména elektroforéza a kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Přítomnost fluoroforu v případě prvně zmíněných imunologických metod může vést ke zlepšení limitu detekce, avšak může také docházet k autofluorescenci

či k vyhasínání.^{99,100} Separační metody jsou vysoce citlivé a selektivní, nicméně je nutné před měřením vzorek vhodně připravit, což může být obtížné zejména při měření v komplexní matici jako je například krev.¹⁰¹ Vývoj biochemických SERS sensorů v posledních letech vedl k posunu SERS techniky od jednoduché chemické analýzy k charakterizaci nanostruktur a biomedicinálním aplikacím. Proteiny lze studovat jak metodou „label free“ tak metodou „label-based“ (obrázek 9). Label-free metody detekují přímo proteiny adsorbované na SERS aktivním substrátu. Informace o analyzovaném proteinu je tak získána přímo z vibračních spekter daného proteinu.^{102–104} Tímto způsobem byly například analyzovány hemoproteiny jako myoglobin a hemoglobin, ale rovněž lze analyzovat i cytochromy.¹⁰³ Label-based metody stanovují proteiny nepřímo pomocí Ramanovských značek. K tomuto účelu se často používají nanočástice zlata nebo stříbra, popřípadě vrstvy těchto nanočástic s různými Ramanovskými značkami (Cy3, Cy5, MBA, Rh6G a další).^{105–107}



Obr. 9.: Schématické znázornění rozdílů mezi „label free“ SERS metodou a „label-based“ SERS metodou. U „label free“ metody je spektroskopický signál výsledkem všech naadsorbovaných analytů, zatímco u „label-based“ SERS metody pochází spektroskopický signál od Ramanovské značky. Převzato z Bonifacio a kol. (2015).¹⁰⁸

SERS je také vhodnou metodou k detekci či mapování buněk. Ty poskytují několik typických vibračních módů, zejména DNA/RNA, proteinů, lipidů a uhlovodíků.

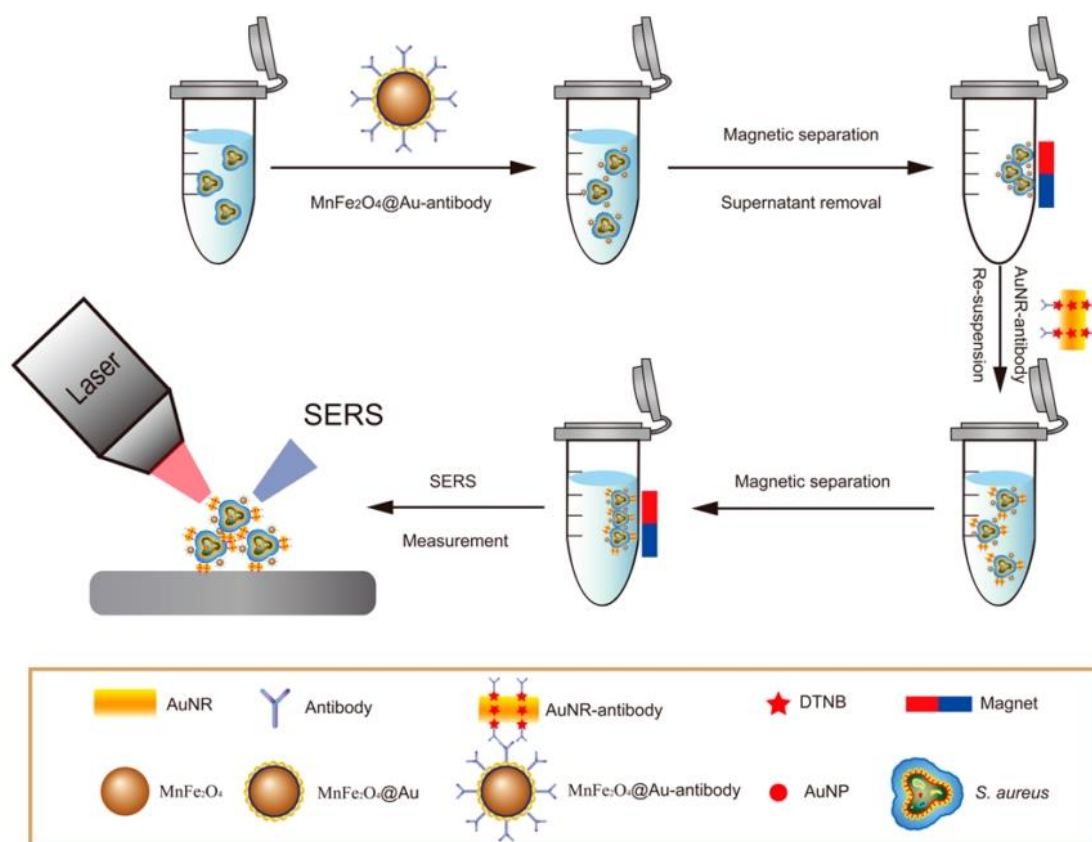
Nejvýraznějším pásem ve spektrech je valenční vibrace vazby C-H při 2930 cm^{-1} . Nejvýraznější pás značící přítomnost proteinů je Amid I při $1600 - 1690\text{ cm}^{-1}$ a dýchací mód tryptofanu a fenylalaninu při 1004 cm^{-1} . Dalšími pásy proteinů jsou Amid II při $1480 - 1580\text{ cm}^{-1}$ a Amid III při $1230 - 1300\text{ cm}^{-1}$.^{109,110} Další aplikací SERS je detekce cirkulujících nádorových buněk (CTC). Ty se dají považovat za charakteristický znak invazivních forem rakovinných buněk, které jsou zodpovědné za vývoj metastáz. Běžné metody jsou pro jejich měření nedostačující díky nízké citlivosti, specifitě a časové náročnosti měření. Wang a kol prováděli detekci nádorových buněk pomocí citrátových zlatých nanočástic s elektrostaticky navázanou QSY značkou. Poté byly Au-QSY nanočástice funkcionalizovány polymery, kdy 85 % povrchu bylo pokryto thiolovaným polyethylen glykolem, aby se předešlo nespecifickým interakcím s krevními buňkami. Zbýlých 15 % bylo pokryto polyethylen glykolem s dvěma funkčními skupinami - COOH a SH. Merkapto skupina umožnila navázání na povrch zlatých nanočástic, kdežto na karboxylovou skupinu byl přes N-konec navázán epidermální růstový faktor (EGF).¹¹¹ Podobný způsob byl využit k detekování a rozlišení buněk rakoviny prsou. K přípravě sensoru byly použity nanočástic stříbra s *p*-merkaptobenzoovou kyselinou (pMBA). pMBA obsahuje na jednom konci thiolové funkční skupiny a na druhém karboxylové. Pomocí thiolových funkčních skupin byla navázána na stříbrné nanočástice, zatímco karboxylové funkční skupiny sloužily k vytvoření peptidové vazby s protilátkami. Tento sensor byl poté použit k rozlišení mezi dvěma typy HER2 aktivních buněk: HER2-positivní SKBR3 buňky a HER2-negativní MCF7 buňky. Jako modelový vzorek byly nejprve použity jen SKBR3 buňky. Ty byly inkubovány s připraveným senzorem za různých podmínek: 4 hodiny při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 hodiny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a třetí způsob byla inkubace nejdříve s volnou protilátkou anti-HER2 po dobu 2 hodin a poté se senzorem po dobu 4 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejsilnější SERS signál vykazovaly buňky, které byly se senzorem inkubovány po dobu 4 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl sensor použit k rozlišení dvou typů buněk – SKBR3, které obsahují velké množství HER2 receptorů na jejich povrchu a MCF7, které obsahují HER2 receptory pouze v malém množství. Měření ukázalo, že intenzita SERS signálu SKBR3 buněk je 3 – 4krát vyšší než MCF7 buněk. Navíc bylo z Ramanovského mapování jednotlivých typů buněk zjištěno, že se připravený sensor váže lépe na HER2 pozitivní buňky (SKBR3).¹¹²

Technikou SERS lze rovněž detekovat bakterie a viry.¹¹³ Obecně existují tři různé způsoby jak získat SERS spektrum bakterií. Prvním způsobem je vytvoření SERS aktivních nanočástic (AgNPs nebo AuNPs) uvnitř nebo na povrchu bakterie. Druhý způsob spočívá v umístění bakterií přímo na SERS aktivní substrát a třetím způsobem je smíchání bakterií s koloidní disperzí.^{114,115} Zhou a kol. publikovali metodu syntézy stříbrných nanočástic přímo na buněčné stěně bakterií. Nejprve byly bakterie ponořeny do roztoku dusičnanu stříbrného a poté byl použit hydrochlorid hydroxylaminu jako redukční činidlo, tím došlo k vytvoření nanočástic stříbra na buněčné stěně. Tyto modifikované bakterie pak byly detekovány pomocí SERS. Zesílení signálu bylo až třicetinásobné oproti metodě, kdy se bakterie pouze smíchají s koloidem stříbra.¹¹⁶ Cui Fan a kol. použili techniku SERS k detekci několika kmenů virů (*norovirus*, *adenovirus*, *parvovirus*, *rotavirus*, *koronavirus*, *paramyxovirus*, and *herpesvirus*) vyskytujících se v jídle či ve vodě. K detekci použili komerční zlatý substrát. Díky SERS dokázali viry detekovat a pomocí statistických metod dokázali rozdělit viry do dvou skupin podle toho, zda obsahovaly lipidovou schránku či ne.¹¹⁷ Avci a kol získali SERS spektra patogenů infekce močových cest smícháním nanočástic stříbra redukovanými hydroxylaminem se suspenzí bakterií. Vzorek byl pak umístěn na substrát z fluoridu vápenatého.¹¹⁸ Prucek a kol. použili techniku SERS k rozlišení Gram pozitivních (*Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pyogenes*) a Gram negativních (*Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*) bakterií. V prvním kroku byly připraveny nanočástice stříbra redukcí D-maltosou. Poté byly k roztoku nanočástic přidány chloridové ionty, čímž došlo k rekrystalizaci nanočástic stříbra. V posledním kroku byl k rekrystalizovaným nanočásticím přidán lyzát bakterií. SERS spektra jednotlivých bakterií byla porovnána pomocí diskriminační analýzy a na základě těchto výsledků byly bakterie rozděleny na Gram pozitivní a Gram negativní.¹¹⁹

3.3 Magnetický SERS

Technika SERS je velmi užitečná k detekci fyziologicky aktivních látek, nicméně její modifikace využívající magnetických nanočástic jako substrátů ještě zvyšuje potenciál SERS techniky. Tato metoda bývá v literatuře nejčastěji nazývána jako magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS)). Její hlavní výhodou je jednoduchá

separace analytu ze vzorku a jeho zakoncentrování pomocí externího magnetického pole (obrázek 10).^{17,18,120}



Obr. 10.: Schématické znázornění aplikace metody magneticky asistovaného SERS (MA-SERS) k detekci bakterií *Staphylokoka aurea*. Převzato z Wang a kol. (2016).¹²⁰

3.3.1 Aplikace magnetických nanočástic pro SERS

Vzhledem ke schopnosti MA-SERS detekovat různé sloučeniny i ve velmi nízkých koncentracích, byla publikována řada studií zaměřených na využití této metody k detekci biomarkerů rakoviny a cirkulujících nádorových buněk (CTC). Takzvané sendvičové metody pro detekci markerů rakoviny nebo rakovinných buněk jsou velmi dobře známé.^{121–123} Obecně sandwichová metoda využívá magnetické částice s navázanými specifickými protilátkami a kovové nanočástice sloužící jako SERS aktivní značka (tzv. SERS reporter). Tato SERS aktivní značka obsahuje navázané specifické protilátky a velmi často i fluorescenční značku. Při analýze pak neměříme přímo signál analytu, ale signál SERS aktivní značky.¹²³ Tento postup byl například použit pro detekci rakovinných buněk s velmi nízkou četností výskytu. Magnetický nanokompozit

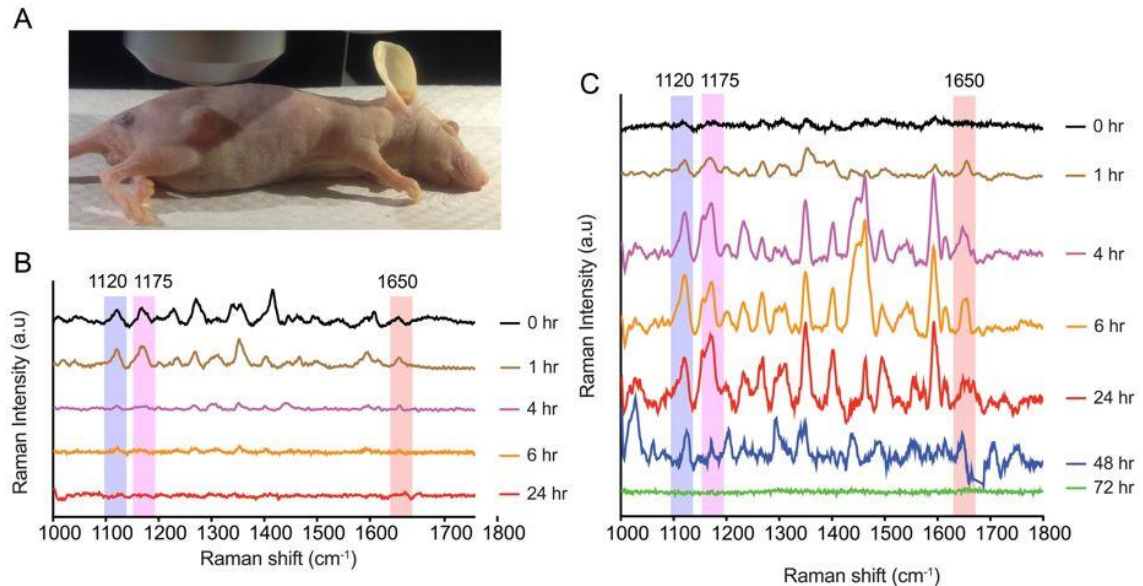
byl označen 4-aminothiofenolem (4-ATP) a protilátkou proti karcinoembryonálnímu antigenu (CEA). Jako aktivní substrát SERS byly použity zlaté nanočástice se stejnou protilátkou.¹²⁴ Další studie popisují pro detekci CEA použití zlatých nanočástic modifikovaných merkaptopbenzoovou kyselinou a protilátkou anti-CEA a nanokompozitu $\text{Fe}_2\text{O}_3@Au$ funkcionalizovaného také protilátkou anti-CEA.¹²⁵ Magnetická imunoanalýza byla použita i k detekci prostatického antigenu (PSA). Metoda využívá sensor a povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS). Sensor byl složen z magnetických nanočástic funkcionalizovaných specifickými protilátkami a ze zlatých nanočástic označených malachitovou zelení, které byly také funkcionalizovány stejnými protilátkami jako magnetické nanočástice.¹²⁶ Magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS) byla také využita k detekci buňky *Staphylokokka aurea* pomocí biosensoru s navázaným aptamerem. Biosenzor se skládal ze dvou částí - aktivního SERS substrátu (magnetické nanočástice pokryté stříbrem, AgMNPs) a SERS značek. Monodisperzní superparamagnetické AgMNP s dobrou SERS aktivitou a magnetickou odezvou byly syntetizovány za použití polymeru polyethyleniminu. Díky magnetickým vlastnostem AgMNPs bylo možné provést separaci a promytí, namísto opakovaného odstředování v centrifuze, čímž se zabránilo sedimentaci materiálu. Limit detekce (LOD) byl stanoven na úrovni 10 buněk *S. aurea* na mililitr.¹²⁷ Shin a kol. připravili biokompatibilní SERS-aktivní substrát založený na core-shell magnetickém nanomateriálu ($\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@Au$). Tento materiál byl použit k detekci a rozlišení proteinů lidského a myšího IgG. Tímto způsobem bylo dosaženo velmi nízkého limitu detekce a to 800 ag/ml u myšího IgG a 5 fg/ml u lidského IgG.¹²⁸

Stanovení jednoho biomarkeru není dostatečně specifické pro stanovení konkrétního typu rakoviny. Nutnost detekovat více než jeden biomarker současně vedl ke studiu a vývoji nových typů biosenzorů založených na systému protilátka-antigen. Velká pozornost je věnována multiplexní analýze a jejímu zlepšení, protože je nezbytná pro včasnou detekci a screening rakoviny v klinické praxi.¹²⁹

Současný způsob provedení multiplexní analýzy s využitím SERS většinou spočívá v označení analytů různými SERS aktivními značkami. Tang a kol. použili dvě různé značky (kyselinu merkaptopbenzoovou a 5,5'-dithiobis (sukcinimidyl-2-nitrobenzoát))

k označení stříbrného substrátu, který byl dále funkcionalizován protilátkami anti-Glypikan-3 a anti- α -fetoproteinem, které jsou specifické pro markery rakoviny jater - Glypikan-3 a α -fetoprotein (AFP). Metoda detekce rakovinných markerů byla v tomto případě založena na sledování posunu vybraných pásů SERS aktivních značek.¹³⁰ Další práce popisuje detekci rakoviny slinivky pomocí markerů CA 19-9 (carbohydrate antigen 19-9) a MMP-7 (matrix metalloproteinase-7). K detekci byla použita sklíčka pokrytá zlatem a funkcionalizovaná specifickými protilátkami. Výsledky SERS analýzy pak byly srovnány s imunologickou metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Výsledky obou analýz byly srovnatelné, nicméně množství vzorku potřebného pro SERS analýzu bylo mnohonásobně menší, což je velkou výhodou této techniky.¹³¹ Jako další imunosensor k multiplexní analýze rakovinných markerů CEA (carcinoembryonic antigen) a CK-19 (cytokeratin-19) byly použity pryskyřicové mikrokuličky s kyselinou aminosalicilovou pokryté zlatými nanočásticemi. Navržený sensor byl vysoce citlivý, selektivní, s nízkým limitem detekce a dlouhou stabilitou. Nejnižší naměřená koncentrace byla 0,01 ng.ml⁻¹ pro CEA a 0,04 ng.ml⁻¹ pro CK-19.¹³² V jiné studii byly využity zlaté hvězdicovité nanočástice pokryté slabou vrstvou oxidu křemičitého funkcionalizované třemi různými protilátkami. S jejich pomocí pak byly detekovány tři různé typy biomarkerů rakoviny prsu, konkrétně (CA) 15-3, CA 27-29 a CEA.¹³³ V další studii byly protilátky konjugovány na nanočástice zlata označené třemi různými značkami – Cyanine 5 (Cy5), isothiokyanát malachitové zeleně (MGITC) a rhodamin 6G (Rh6G). Díky značkám bylo možné rozlišit jednotlivé biomarkery jak *in vitro*, tak *in vivo* v xenoimplantátu (štěp z cizí tkáně převzaté při transplantaci z jiného živočišného druhu). Při *in vivo* testech byly funkcionalizované označené částice injektovány přímo do nádorů, kde došlo k navázání na nádorové markery. Maximální intenzita signálu byla pozorována po 6 hodinách, po 72 hodinách už nebyl signál vůbec pozorovatelný. Označené nanočástice bez specifických protilátek nevykazovaly po 6 hodinách žádný signál (obrázek 11).¹²⁹ Maiti a kol. připravili biokompatibilní SERS sensor s vysokou citlivostí a stabilitou. Pomocí kyseliny lipové, která sloužila jako linker, kovalentně navázali trifenylmethanovou značku na zlaté nanočástice funkcionalizované protilátkami anti-EGFR a anti-HER2. Připravený sensor byl pak použit pro SERS detekci rakovinných proteinů HER2 a EGFR. Navíc byla úspěšně provedena i *in vivo* detekce rakovinných buněk, které byly do myši injektovány.¹³⁴

Většina studií využívá k simultánní SERS detekci rakovinných markerů Ramanovské značky. Tento způsob je vysoce citlivý a selektivní v porovnání s běžně používanými imunologickými metodami jako je ELISA. Na druhou stranu, nespecifické interakce připravených materiálů s komplexní matricí jako je krev způsobují interference signálu a tím prozatím znemožňují použití těchto metod v klinické praxi.



Obr. 11.: In vivo multiplexní detekce modelového nádoru: (A): Obrázek myši s nádorem. (B): SERS spektra z oblasti nádoru znázorňující píky při 1120, 1175 a 1650 cm^{-1} odpovídající nekonjugovaným SERS značkám Cy5, MGITC a Rh6G. (C): - SERS spektra z místa nádoru znázorňující píky při 1120, 1175 a 1650 cm^{-1} odpovídající SERS značkám Cy5, MGITC a Rh6G navázaných na biomarkery TGF β RII, CD44 a EGFR. Převzato z Dinish a kol. (2014).¹²⁹

4 Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce byl výzkum zaměřený na přípravu a využití nanočástic ušlechtilých kovů, zejména nanočástic stříbra, v kombinaci s magnetickými nanočásticemi při povrchem zesílené Ramanově spektroskopii biologicky aktivních látek.

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

- optimalizovat podmínky přípravy a modifikace magnetických nanokompozitů s nanočásticemi stříbra pro magneticky asistovanou povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii
- vývoj a aplikace biosensoru pracujícího na principu magneticky asistované SERS detekce imunoglobulinu G ve vzorcích lidské krve
- vývoj a aplikace biosensoru pro multiplexní analýzu rakovinných markerů HER2 a EpCAM pomocí MA-SERS

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

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Příprava nanočástic, nanokompozitů a jejich funkcionalizace

5.1 Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra používané k zesílení Ramanova signálu byly připraveny redukcí diaminstříbrného kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ D-maltózou. Detailní postup je popsán v publikaci Panáčka a kol.¹³⁵ Pro přípravu nanočástic stříbra bylo složení reakčního systému následující: dusičnan stříbrný $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; maltóza $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; amoniak $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po smíchání dusičnanu stříbrného a amoniaku bylo pH reakčního systému upraveno přidáním hydroxidu sodného na $11,5 \pm 0,1$. Poté se, za intenzivního míchání, přidal do systému roztok maltózy. Reakce byla považována za dokončenou po 4 minutách, kdy již nedochází ke změně zbarvení vzniklé disperze AgNPs. Tímto postupem byla připravena prakticky monodisperzní suspenze nanočástic stříbra se střední velikostí částic okolo 28 nm.

5.2 Magnetický nanokompozit pro analýzu IgG

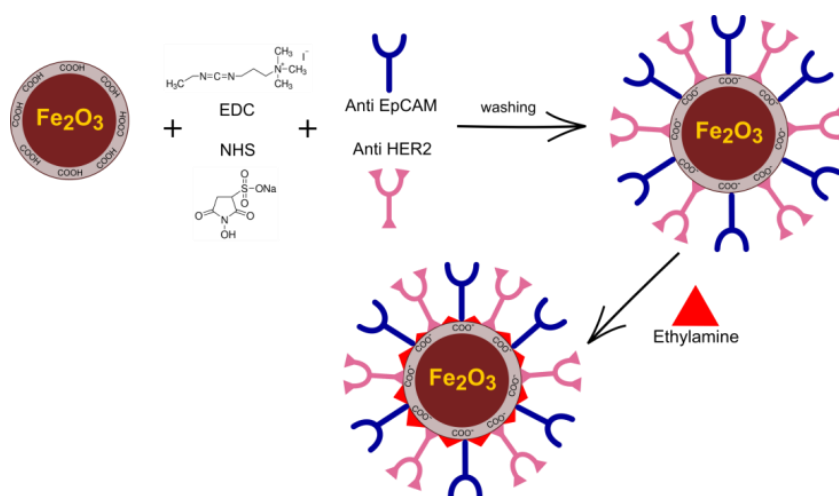
Magnetický nanokompozit byl připraven podle postupu popsaného dříve Markovou a kol.¹³⁶ Ve stručnosti, magnetické nanočástice byly připraveny Massartovou koprecipitační metodou z vodného roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ za použití hydroxidu sodného; pH směsi $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bylo upraveno 1,5 M NaOH na hodnotu 11. Syntéza byla provedena při pokojové teplotě za konstantního probublávání dusíkem, aby se zabránilo další oxidaci. Po hodině míchání byl produkt několikrát promyt vodou a magneticky odseparován. Získané magnetické nanočástice byly použity pro přípravu magnetit-O-karboxymethylchitosanu adsorpcí polymeru na povrch připravených nanočástic indukovanou postupným zvyšováním teploty na 80°C . V posledním kroku byl k magnetit-O-karboxymethylchitosanu přidán dusičnan stříbrný a na povrchu hybridu došlo k vyredukování iontů stříbra aminovými skupinami polymeru za alkalických podmínek a při teplotě 80°C .

Připravený nanokompozit byl dále funkcionalizován protilátkou anti-Ig. Nejprve byl nanokompozit smíchán s roztoky EDC/NHS (1:1, finální koncentrace 20 mM) a poté s ethylaminem (7% w/w). V dalším kroku byl přidán karboxy-PEG (finální koncentrace 1 mM), čímž došlo k vytvoření karboxylových skupin na povrchu AgNPs. Karboxylové skupiny byly aktivovány přidáním roztoku EDC/NHS (1:1, finální koncentrace 20 mM),

poté následovalo přidání streptavidinu (finální koncentrace $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Po navázání streptavidinu na aktivované karboxylové skupiny, byla přidána biotinylovaná protilátka anti-IgG (finální koncentrace $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), která vytvořila se streptavidinem pevnou vazbu. Na závěr byly zablokovány zbylé karboxylové skupiny ethylaminem (7% w/w), aby se zabránilo nespecifickým interakcím. Během funkcionalizace byl nanokompozit po každém kroku důkladně promyt a odseparován pomocí magnetického pole.

5.3 Příprava biosensoru pro multiplexní analýzu nádorových markerů

Uvedený biosensor byl složen z magnetických nanočástic a nanočástic stříbra potřebných k zesílení Ramanova signálu. Postup funkcionalizace magnetických nanočástic je zobrazen na obrázku 12. V prvním kroku přípravy biosensoru byly komerční magnetické částice s karboxylovými skupinami (Sigma Aldrich) aktivovány za použití směsi EDC/NHS v poměru 1:1 (finální koncentrace 10 mM); částice pak byly magneticky odseparovány a promyty PBS puforem. V následujícím kroku byly částice s aktivovanými karboxylovými skupinami smíchány s protilátkami AntiEpCAM a antiHER2 ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a ponechány přes noc na rotátoru čímž došlo ke vzniku kovalentní vazby mezi volnými amino skupinami ($-\text{NH}_2$) přítomnými ve struktuře protilátek a aktivovanými karboxylovými skupinami magnetických částic. Po imobilizaci protilátek byly magnetické částice odděleny pomocí magnetu a opět promyty PBS puforem. Na závěr byl přidán ethylamin (7% w/w), aby došlo k zablokování zbylých aktivních karboxylových skupin, čímž se zabránilo nespecifickým interakcím.

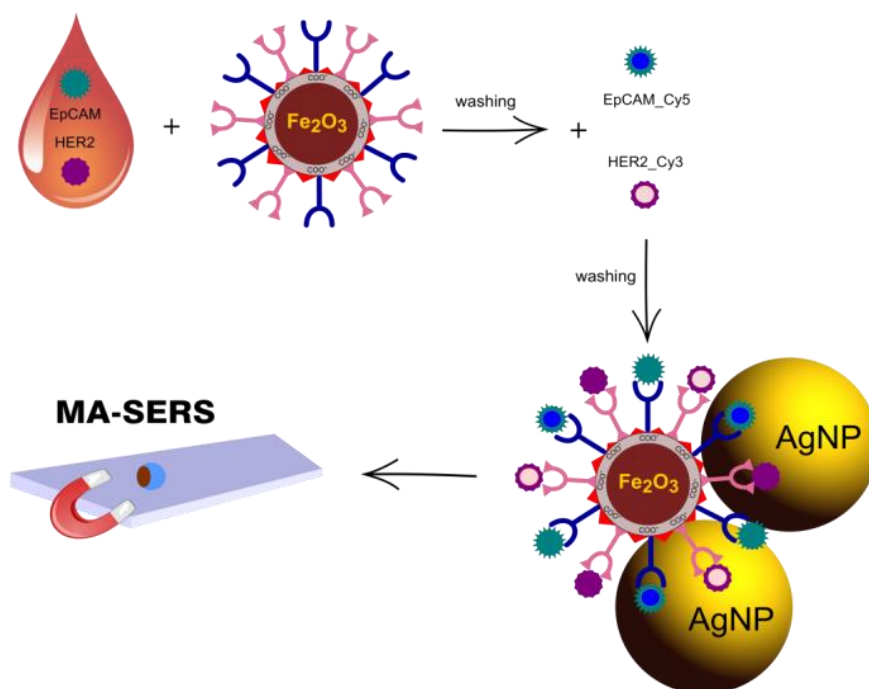


Obr. 12.: Schéma přípravy biosensoru (funkcionalizace MNPs protilátkami Anti-HER2 a Anti-EpCAM).
Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

5.4 Postup analýzy nádorových markerů HER2 a EpCAM

Slepý vzorek pro tuto analýzu obsahoval jen PBS pufr ($c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,5$). Modelový vzorek obsahoval biomarkery HER2 a EpCAM o koncentracích 5, 10 a 25 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěných v PBS pufru ($c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,5$). Vzorky lidské krve (20 vzorků od 2 dobrovolníků, $V = 1 \text{ ml}$) byly 100krát zředěny PBS a naspikovány biomarkery HER2 a EpCAM v konečné koncentraci 5 a 10 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

Postup analýzy vzorků je zobrazen na obrázku 13. Nejdříve byly 2 μl vzorku (slepý, modelový, lidská krev) smíchány s 10 μl připraveného senzoru anti-HER2@Anti-EpCAM@MNPs. Vzorek se senzorem byl míchán po dobu jedné hodiny, poté byl sensor magneticky odseparován, promyt PBS puftrem a znovu rozdispergován v 10 μl PBS. Poté byly k senzoru přidány 2 μl značeného HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5 (konečná koncentrace 10 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$) a směs byla pečlivě promíchána. Po 1 hodině byl sensor magneticky odseparován od přebytku označených markerů a dvakrát promyt deionizovanou vodou. V posledním kroku byly k senzoru přidány nanočástice stříbra aktivované chloridem sodným, výsledný nanokompozit byl zakonzentrován pomocí vnějšího magnetického pole a analyzován pomocí SERS.



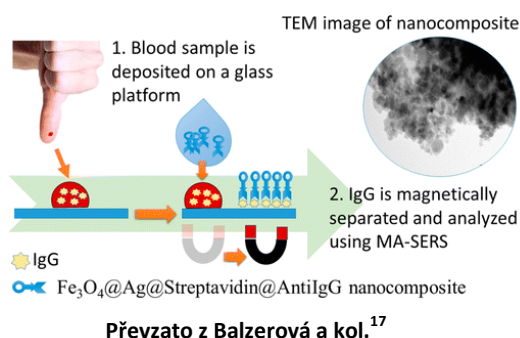
Obr. 13.: Schéma multiplexní kompetitivní analýzy dvou různých nádorových markerů v lidské plné krvi. Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

6 Výsledky a diskuze

Tato část disertační práce poskytuje přehled dosažených výsledků stanovení biologicky aktivních látek pomocí magneticky asistované a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Sekce je rozdělena do tří podkapitol. První podkapitola se zabývá využitím magnetického SERSu k detekci lidského imunoglobulinu G (IgG), zatímco druhá část se zabývá simultánní analýzou rakovinných markerů. Třetí podkapitola je věnována dalšímu využití techniky MA-SERS. Výsledky uvedené v této kapitole byly publikovány ve třech impaktovaných časopisech a dvou recenzovaných časopisech a jejich plné znění lze nalézt v příloze.

6.1 Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS) pro stanovení lidského imunoglobulinu G v krvi

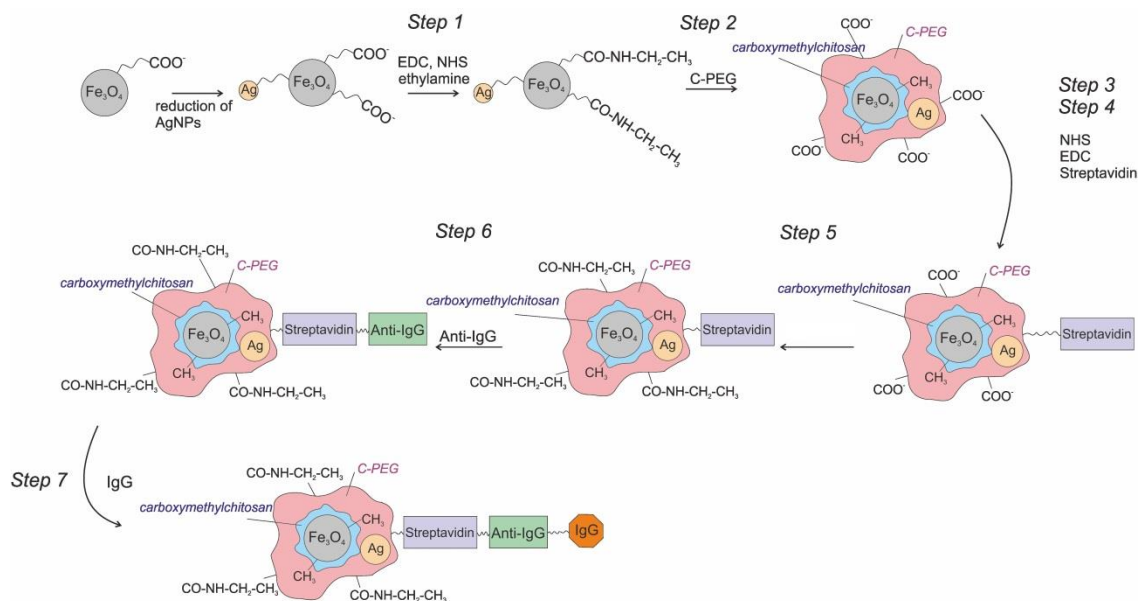
Tato práce popisuje vývoj metody ke stanovení lidského imunoglobulinu G (dále jen IgG) v krvi pomocí magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. K tomuto účelu byl připraven nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}$, který



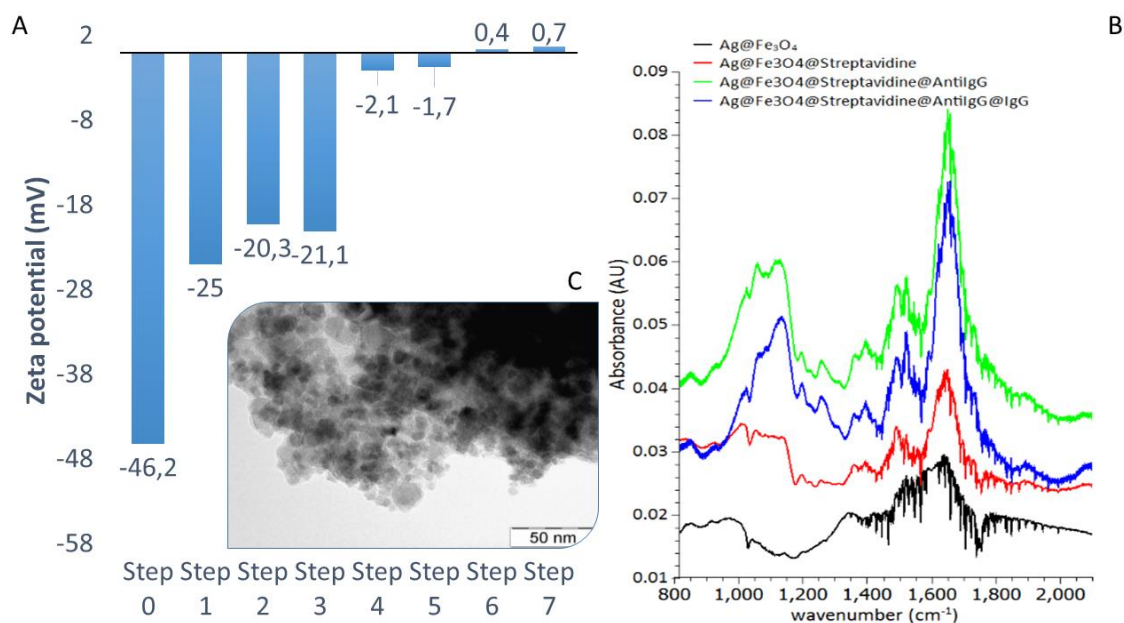
měl magnetické vlastnosti a zároveň poskytoval zesílení Ramanova signálu díky navázaným AgNPs. Charakterizace nanokompozitu byla provedena pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM), infračervené spektroskopie (IR), práškové difrakce (XRD) a měřením zeta potenciálu. Poté byl nanokompozit použit pro SERS analýzu vzorků lidské krve.

Nanokompozit k detekci IgG byl připraven podle schématu (Obr. 14). Nanokompozit byl složen z nanočástic Fe_3O_4 a stříbrných nanočástic kovalentně vázaných O-karboxymethylchitosanem. Tento linker byl zvolen z důvodu přítomnosti volných karboxylových skupin, které zajistily dlouhodobou stabilitu takto připraveného nanokompozitu ve vodném prostředí. Karboxylové skupiny však způsobují relativně vysoký negativní povrchový náboj. Proto byla jejich přítomnost během následných kroků modifikace povrchu minimalizována, aby se zajistilo vysoce selektivní navázání streptavidinu pouze na volnou plochu nanočástic stříbra. Z tohoto důvodu byly

v prvním kroku volné karboxylové skupiny odstraněny (deaktivovány) reakcí s vodnou směsí EDC/NHS v poměru 1:1 a následně vodným roztokem ethylaminu. Deaktivace a blokování karboxylových skupin (Obr. 14, Step 1) vedly k významné změně zeta potenciálu na -20,3 mV (z původního -46,2 mV). Z tohoto poklesu negativního náboje bylo patrné, že karboxylové skupiny byly úspěšně blokovány. V dalším kroku (Obr. 14, Step 2) byly na povrchu nanočástic stříbra vytvořeny nové volné karboxylové skupiny přidáním karboxypolyethylenglykolu. Tento krok byl nezbytný pro další selektivní imobilizaci streptavidinu. Adsorpce karboxy-PEGu na povrchu AgNPs vedla k mírnému zvýšení povrchového náboje na -21,1 mV. Rozdíl mezi poslední jmenovanou hodnotou a počátečním záporným nábojem (-46,2 mV) byl způsoben různým množstvím imobilizovaných funkčních skupin. Aktivace nově vytvořených karboxylových skupin vodnou směsí EDC a NHS (Obr. 14, Step 3) byla doprovázena velkým poklesem záporného náboje na hodnotu -2,1 mV. Ve čtvrtém kroku byl imobilizován streptavidin na povrch stříbrných nanočástic (Obr. 14, Step 4). Mezi aktivovanými karboxylovými skupinami a -NH₂ skupinami streptavidinu byly vytvořeny kovalentní vazby. Imobilizací streptavidinu na povrch nanokompozitu byl povrchový náboj změněn pouze mírně a to na -1,7 mV. Úspěšná imobilizace streptavidinu byla potvrzena měřením IR spekter (Obr. 15: B), která vykazovala nárůst pásů interpretovaných jako součást proteinové struktury (1450 a 1650 cm⁻¹). Streptavidin hrál klíčovou roli při vazbě biotinylované části anti-IgG, který byl přidán k nanokompozitu v dalším kroku (Obr. 14, Step 6). Tvorba vazby mezi streptavidinem a biotinylovanou částí anti-IgG byla doprovázena změnami povrchového náboje na 0,4 mV a změnami výše uvedených IR pásů. Ke konečnému zablokování zbývajících karboxylových skupin byl opět použit ethylamin. Zablkování bylo potvrzeno dodatečným zvýšením zeta-potenciálu na 0,7 mV (Obr. 15A, Step 7).



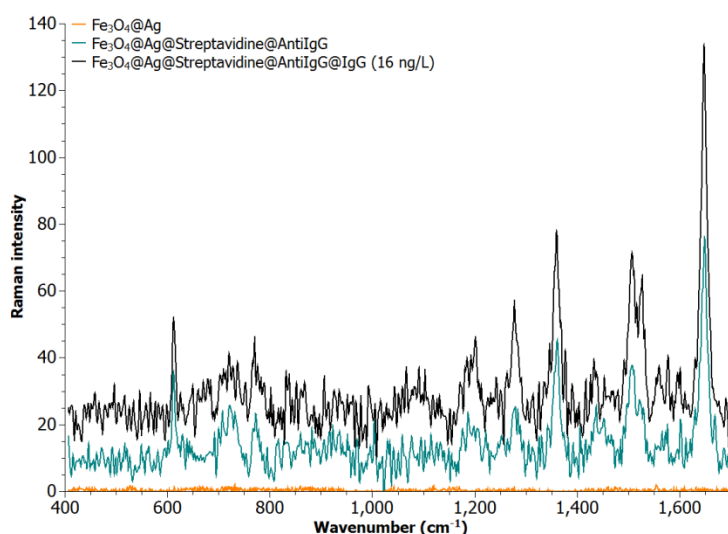
Obr. 14.: Schéma znázorňující jednotlivé kroky modifikace nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ pro stanovení lidského IgG pomocí MA-SERS. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷



Obr 15.: (A) Naměřené zeta-potenciály připraveného nanokompozitu a nanokompozitu po každém kroku modifikace. (B) IR spektra čistého nanokompozitu a modifikovaného nanokompozitu. (C) TEM snímek $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Připravený nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@anti-IgG$ byl použit pro stanovení koncentrace IgG ve vzorcích lidské plné krve. Na základě teorie bylo předpokládáno, že specifická interakce IgG s protilátkou na IgG imobilizovanou na povrchu nanokompozitu by vedla ke spektrálnímu posunu o několik vlnových jednotek nebo ke změně intenzity

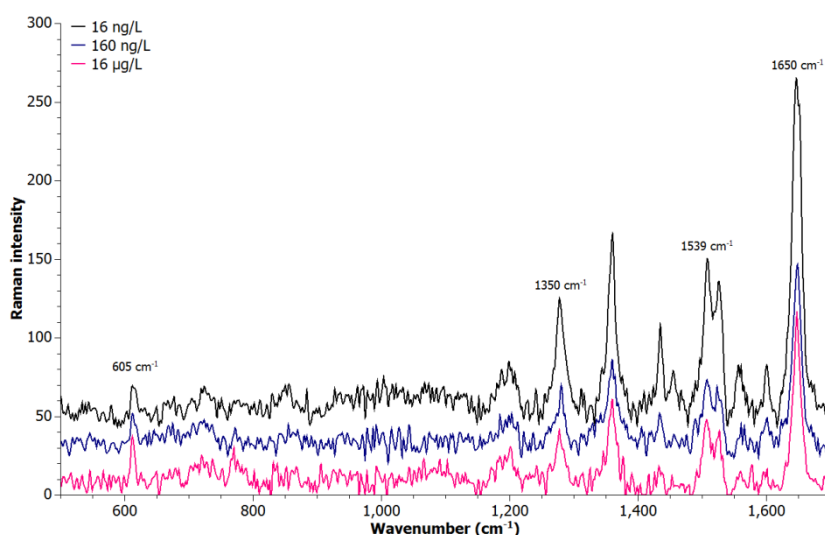
Ramanových pásů odpovídajících vazebným místům protilátky. Pro testování této hypotézy byly analyzovány standardní vzorky obsahující vodnou disperzi $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG$ s $16 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ lidského IgG, slepé a kontrolní vzorky. Slepý vzorek obsahoval pouze čistý nemodifikovaný nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ dispergovaný ve vodě, zatímco kontrolní vzorek sestával z vodné disperze nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG$ bez přidání IgG. Získaná spektra jsou prezentována na obrázku 16.



Obr. 16.: Ramanovo spektrum čistého nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$, modifikovaného nanokompozitu získaného imobilizací streptavidinu a anti-IgG ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG$) a modelového vzorku s koncentrací IgG $16 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (značené jako $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG@IgG$). Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Ramanův signál kontrolního vzorku obsahoval několik důležitých spektrálních pásů, které byly přiřazeny částem proteinů funkcionalizovaného nanokompozitu. Spektrální pásy při 1650 , 1539 a 1350 cm^{-1} byly interpretovány jako amidy I, II a III. Navíc poměrně ostrý pás s vlnočtem 1650 cm^{-1} značil sekundární strukturu typu α helix. Pás při 605 cm^{-1} byl interpretován jako vibrace Ag-N vazby pocházející z přidavku ethylaminu v prvních krocích modifikace nanokompozitu $\text{Fe}_2\text{O}_3@Ag$. Předpokládalo se, že jeho poloha a intenzita nebude citlivá na vznik kovalentní vazby mezi senzorem a IgG ve vzorku. Dále se předpokládalo, že úspěšná tvorba vazby mezi anti-IgG a IgG způsobí změny absolutních intenzit a hlavně poměr spektrálních pásů Amidu I, II a III, vzhledem k rozdílným strukturám těchto dvou proteinů. Podrobné porovnání spekter

kontrolních a modelových vzorků ukázalo, že jak pozice, tak intenzita pásu při 605 cm^{-1} zůstaly nezměněny, jak bylo předpokládáno, zatímco intenzity a poměry spektrálních pásů proteinů se lišily. Velmi důležité bylo studium selektivity navržené metody. Selektivita metody byla testována s použitím myšího IgG a BSA; přítomnost těchto proteinů nevedla k významným změnám pozorovaného analytického signálu, a vypočtené hodnoty RS se významně nelišily od hodnot získaných pro slepý roztok. Za účelem posouzení, zda lze metodu použít ke kvantitativní analýze bylo připraveno pět kalibračních vzorků. Všechny kalibrační vzorky byly měřeny za stejných podmínek. Rozsah koncentrací použitých pro sestavení kalibrační křivky byl zvolen tak, aby odpovídal požadavkům na provádění stopové analýzy a byl nastaven od $100\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ po $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Spektra modelových vzorků obsahujících $16\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $160\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a $16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG jsou uvedena na obrázku 17.



Obr. 17.: Ramanova spektra modelových vzorků obsahujících $16\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $160\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a $16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Normalizovaná a základní spektra byla vyhodnocena a použita pro kalibraci. Fluktuace ve spektrech, způsobené nestabilitou spektrálního pásu při 605 cm^{-1} , neumožňují přímé kvantitativní stanovení IgG z absolutních intenzit, což je patrné z obr. 17. Nicméně vědecké publikace naznačují, že interakce proteinů vedou ke značné změně poměrů vybraných spektrálních pásů.^{138–141} Kvantifikace IgG byla tedy založena na jednoduché rovnici (rovnice 6), která umožňuje výpočet poměru intenzity pásů proteinu s vlnočty 1539 a 1650 cm^{-1} , kde absolutní intenzity I_{1650} a I_{1539} byly předtím

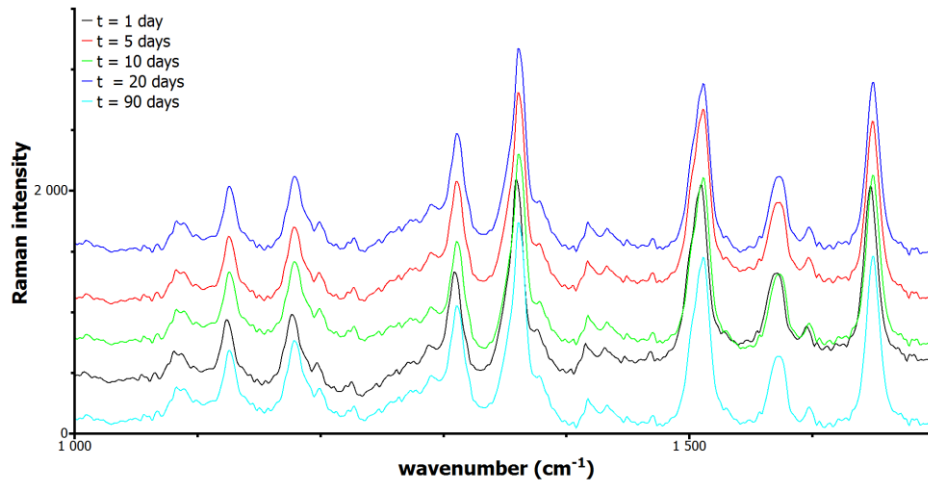
normalizovány na intenzitu referenčního pásu při 605 cm⁻¹, aby se minimalizovaly nežádoucí fluktuace analytického signálu.

$$R = \frac{I_{1539}/I_{605}}{I_{1650}/I_{605}}, \quad [6]$$

kde I₁₅₃₉, I₁₆₅₀ a I₆₀₅ představují intenzity spektrálních pásů při 1539, 1650 a 605 cm⁻¹. I₆₀₅ byl použit jako reference pro normalizaci spekter, aby se minimalizovaly systémové chyby způsobené změnami složení kompozitu, struktury a nestabilitou Ramanova signálu. Navíc, aby byla metoda robustnější, bylo použito Ramanovo spektrum kontrolního vzorku obsahujícího jen kompozit Fe₃O₄@streptavidin@anti-IgG, jak je uvedeno v rovnici 7:

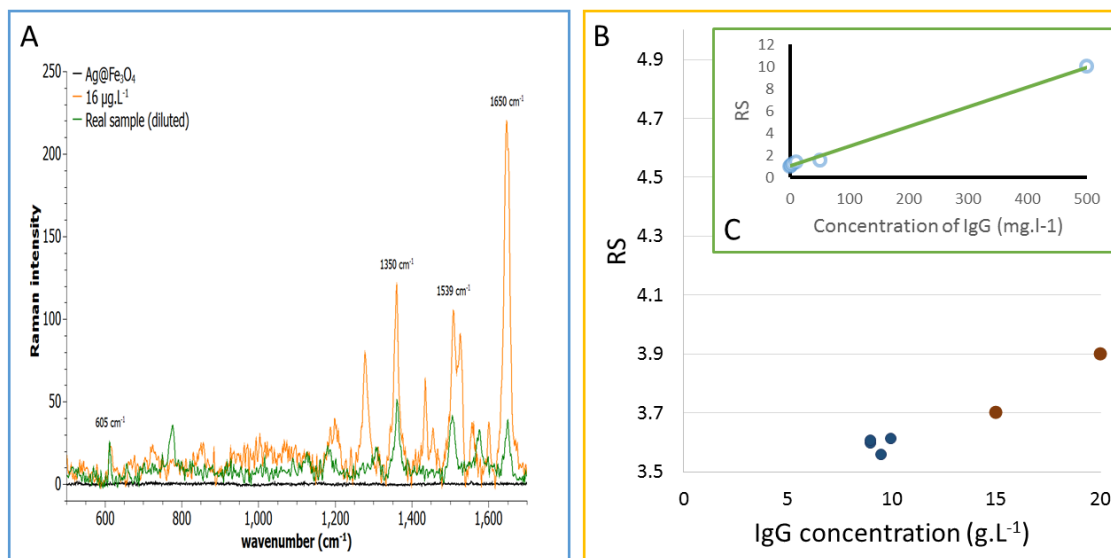
$$RS = \frac{I_{Std_{1539}}/I_{Std_{605}}}{I_{Std_{1650}}/I_{Std_{605}}} / \frac{I_{Ref_{1539}}/I_{Ref_{605}}}{I_{Ref_{1650}}/I_{Ref_{605}}}, \quad [7]$$

kde I_{Std} značí intenzity spektrálních pásů vzorků a I_{Ref} značí intenzity spektrálních pásů kontrolních vzorků. RS tudíž znázorňuje míru změny poměru proteinových pásů mezi kontrolním a analyzovaným vzorkem. Čím vyšší číslo než jedna, tím vyšším množstvím IgG ve vzorku (kontrolní vzorek RS = 1). Bylo zjištěno, že vypočítané poměry mají lineární charakter v celém měřeném rozsahu. Limit detekce byl spočítán na 0,6 ng.l⁻¹. Pro ověření stability signálu bylo provedeno 10 měření během 10 dnů. Bylo zjištěno, že relativní chyba RS mezi stejnými vzorky byla nižší než 8%. Dále byla provedena měření dvou modelových vzorků pro testování spolehlivosti a robustnosti metody. Vzorek A obsahoval 10 ng.l⁻¹ IgG a vzorek B 100 ng.l⁻¹. Rozdíly mezi skutečnou a experimentálně získanou hodnotou byly kolem 20% a relativní směrodatná odchylka RSD = 5%. Pro sledování dlouhodobé stability byla měřena Ramanova spektra Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG po dobu 90 dnů. Naměřená spektra jsou uvedena na obrázku 18. Každé spektrum je posunuto o 100 jednotek na ose intenzity, aby byla spektra více přehledná.



Obr. 18.: Ramanova spektra Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntilgG získaná v různých časových intervalech, která demonstrují stabilitu biosenzoru. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Navržená metoda byla dále použita pro analýzu vzorků lidské plné krve získaných odběrem kapky krve z prstu. Touto metodou lze získat pouze malé množství vzorku, v řádech mikrolitrů. Přestože metoda byla vyvíjena tak, aby nespecifické interakce připraveného nanokompozitu se složkami komplexní matrice krve byly minimální, část Ramanova signálu může přesto pocházet od nespecifických interakcí. Z tohoto důvodu bylo nutné spektra pečlivě vyhodnotit porovnáním reálných vzorků a vzorků modelových. Experimentální analýza byla provedena podle postupů použitých dříve v kalibračních experimentech. Bylo analyzováno 10 vzorků (dva pacienti, každý 5 vzorků), SERS spektrum reálného vzorku je uvedeno na obr. 19 (A).



Obr. 19.: (A) Ramanovo spektrum vzorku plné lidské krve. Pro srovnání jsou prezentovány také Ramanova spektra modelového vzorku obsahujícího 16 µg.l⁻¹ IgG a čistého nanokompozitu. (B) Stanovení koncentrace analyzovaných vzorků. Modré body patří reálným vzorkům krve a hnědé body prezentují data získaná metodou standardního přídavku k těmto vzorkům. (C) Kalibrační křivka pro stanovení IgG v modelových vzorcích. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

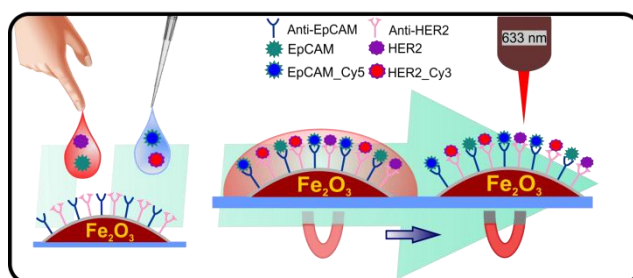
Ve spektru je vidět, že obsahuje všechny pásy dříve přiřazené sensoru; nicméně spektrální pás interpretovaný jako Amid II je mírně posunut vzhledem k odlišné struktuře IgG ve srovnání s anti-IgG a Streptavidinem. Spektrum reálného vzorku bylo porovnáno s příslušným Ramanovým spektrem standardního roztoku lidského IgG (počáteční koncentrace = 5 g.l⁻¹), aby se potvrdil původ analytického signálu. Koncentrace lidského IgG v reálných vzorcích byla stanovena metodou standardního přídavku, aby se minimalizovaly možné spektrální interference. Do každého vzorku krve bylo přidáno definované množství IgG a poloha a intenzita všech pásů byla vyhodnocena a porovnána s Ramanovými spektry původních vzorků krve. Získané hodnoty jsou ukázány na obrázku 19 (B), kde jsou reálné vzorky označeny jako modré body a dva standardní přídavky jsou označeny jako hnědé body. Výsledky analýzy ukázaly, že vzorky od pacienta A obsahovaly 9 g.l⁻¹ IgG a analogicky, vzorky získané od pacienta B obsahovaly 10 g.l⁻¹ IgG. Za zmínku stojí, že stanovená množství IgG jsou v souladu s hodnotami uváděnými pro zdravou populaci.⁷⁷

Výsledky této práce byly v roce 2014 publikovány v časopise *Analytical Chemistry* a v plném znění jsou dostupné v příloze.

6.2 Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie k multiplexní analýze nádorových markerů HER2 a EpCAM v lidské krvi

Tato práce popisuje využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie ke kompetitivní simultánní detekci dvou rakovinných markerů HER2 a EpCAM.

Jako biosensor byl použit magnetický



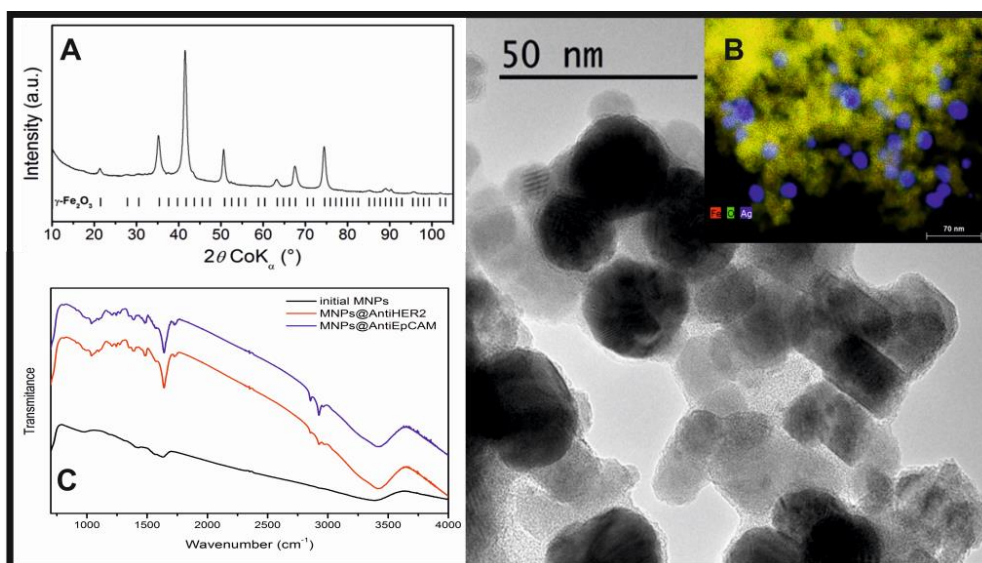
Převzato z Balzerová (2018)¹³⁷

nanokompozit $Fe_2O_3@Ag$ funkcionalizovaný protilátkami (Anti-HER2, Anti-EpCAM). Navržená metoda byla založena na kompetici mezi chemicky značenými referenčními markery (Her2_Cy3 a EpCAM_Cy5) a neoznačenými markery a byla použita pro detekci vybraných markerů v lidské plné krvi. Analýza vzorků krve byla statisticky vyhodnocena za použití Studentova t-testu a diskriminační analýzy. Díky magnetickým nanočásticím, které umožňují rychlou prekoncentraci analytu pomocí vnějšího magnetického pole a jednoduchou separaci cílených látek od komplexní matrice, představuje aplikace MA-SERS alternativu k ostatním metodám (elektrochemické metody nebo SERS) používaných při multiplexní detekci.

Chemická struktura výchozích magnetických nanočástic (MNPs) byla zkoumána rentgenovou práškovou difrakcí (XRD). Jako jediná krystalická fáze byl identifikován maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) (obr. 20 (A)) s velikostí krystalitů 13 nm. HRTEM snímky materiálu s prvkovým rozložením stříbra a magnetických nanočástic jsou zobrazeny na obrázku 20 (B). Světlejší, menší objekty byly identifikovány jako částice Fe_2O_3 mající velikost v rozmezí 10-15 nm, což odpovídá datům z XRD. Větší objekty na obrázku patří nanočásticím stříbra s průměrnou velikostí asi 30 nm. Tato interpretace je dále potvrzena elementární mapou (inset obrázku 20 B), kde menší žluté části mapy představují částice oxidu železitého, zatímco modré skvrny odpovídají nanočásticím stříbra.

Infračervená spektroskopie a měření ζ -potenciálu byly použity ke sledování změn povrchových charakteristik funkcionalizovaných MNPs během procesu funkcionalizace povrchu. Naměřený ζ -potenciál nemoifikovaných výchozích magnetických nanočástic

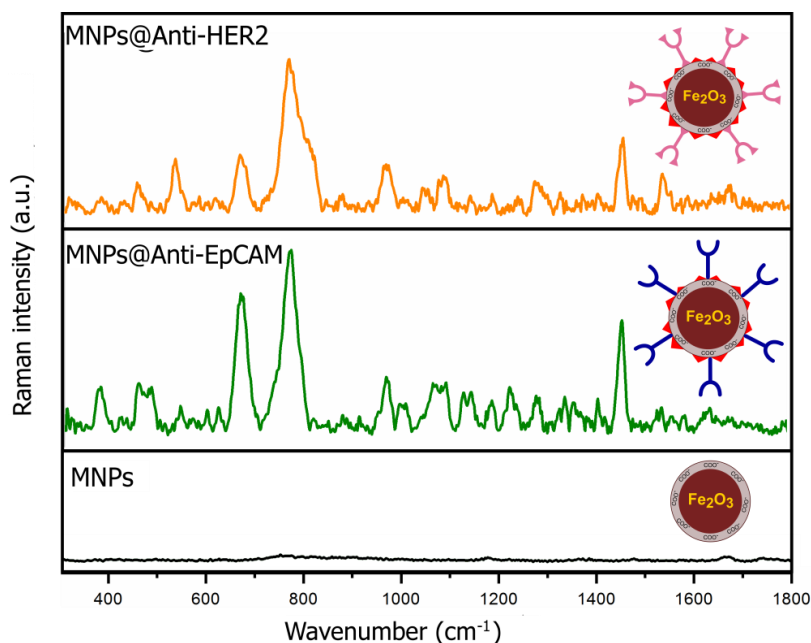
byl -22,3 mV. Silný záporný náboj MNPs byl způsoben karboxylovými skupinami přítomnými na povrchu magnetických nanočástic. Aktivace karboxylových skupin vodným roztokem EDC a NHS byla doprovázena velkou změnou záporného náboje na kladný, s hodnotami +7 mV ($\Delta \zeta$ potenciál = 29,3 mV). Poslední krok souvisel s imobilizací protilátek AntiHER2 a AntiEpCAM na povrch MNPs. Postupné navázání proteinů způsobilo změnu náboje na hodnoty +9 mV pro AntiHER2 a +8 mV v případě AntiEpCAM. Úspěšná imobilizace obou protilátek byla dále potvrzena naměřenými IR spektry, která jsou uvedena na obrázku 20 (C). Spektrum obsahuje významné pásy při 3430 cm^{-1} interpretované jako valenční vibrace O-H a pás při 1726 cm^{-1} , interpretovaný jako C=O vibrace karboxylových skupin přítomných na povrchu magnetických částic. Přítomnost navázaných proteinů značí proteinové pásy amidu I (-CO-NH) a amidu II (-CO-NH-) lokalizovaných při 1570 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} , spektrální pás 1385 cm^{-1} představuje vibraci COOH skupiny a je způsoben přítomností zbývajících nemodifikovaných karboxylových skupin na povrchu Fe_2O_3 .



Obr. 20.: (A) XRD spektrum čistých MNPs, (B) HRTEM snímek hybridního systému MNPs@Ag včetně elementárního mapování HAADF / EDS ve výřezu, (C) IR spektra čistých MNPs a funkcionalizovaných MNPs. Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

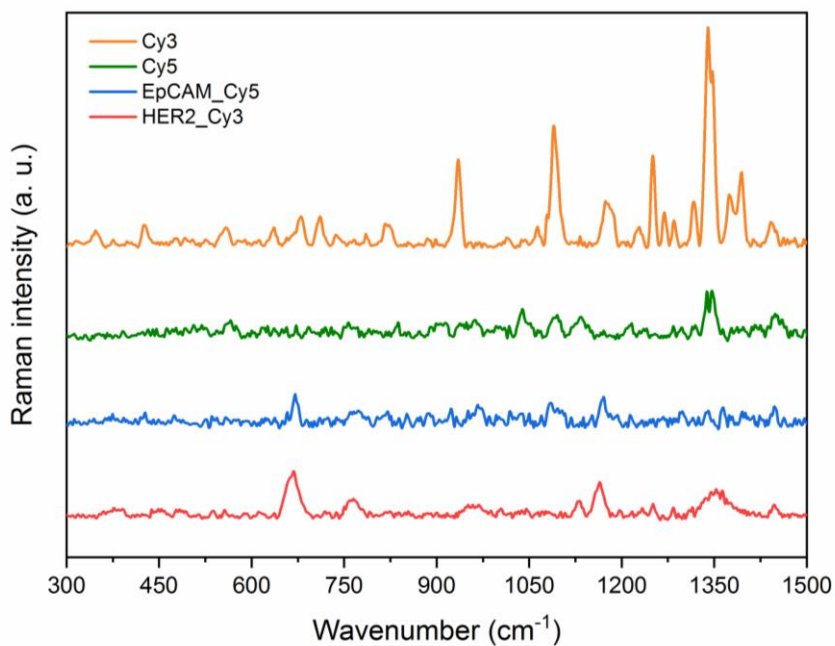
Sensor MNPs@AntiHER2@AntiEpCAM byl navržen pro kompetitivní multiplexní analýzu dvou různých nádorových markerů HER2 a EpCAM a jejich protějšků označených fluorescenčními značkami (HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5) v plné lidské krvi.

Nejdříve byla získána Ramanova spektra funkcionalizovaných MNPs pro potvrzení úspěšné imobilizace protilátek HER2 (oranžová linka) a EpCAM (zelená linka) na povrchu MNPs, což je ukázáno na obrázku 21. Spektra obsahují charakteristické proteinové pásy Amid III (1240 cm^{-1}) a Amid II (1554 cm^{-1}), které potvrzují úspěšné navázání proteinů na povrch nanočástic.



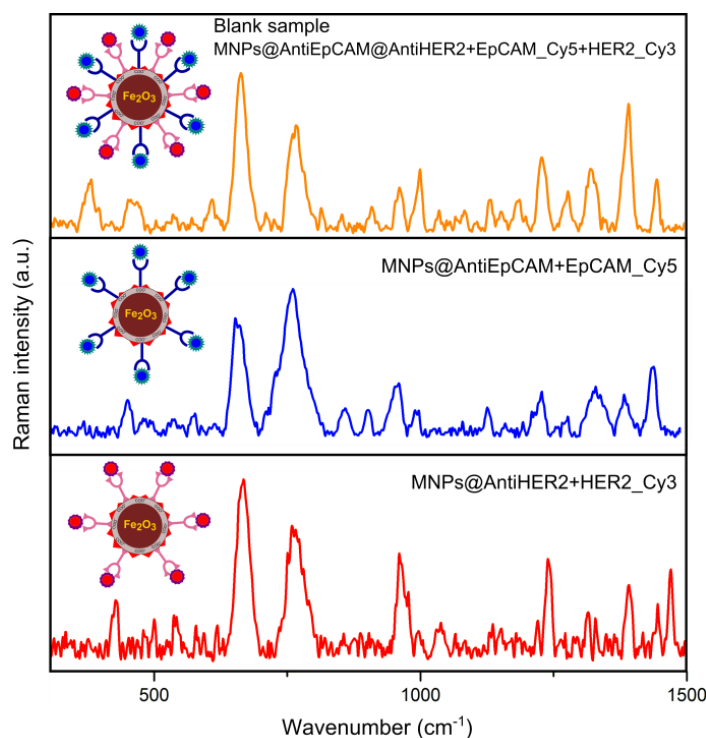
Obr. 21.: Ramanova spektra nefunkcionalizovaných magnetických nanočástic Fe_2O_3 , magnetické nanočástice funkcionalizované protilátkami Anti-HER2 (oranžová linka) a Anti-EpCAM (zelená linka), (MNPs@Anti-HER2, MNPs@Anti-EpCAM). Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

Poté byla měřena SERS spektra standardních roztoků značek (Cy3, Cy5) a označených markerů, která jsou uvedena na obrázku 22. Ramanova spektra sensoru a čistých sloučenin Cy3, Cy5, HER2 a EpCAM byla vzájemně porovnána. Přítomnost spektrálních pásů při 373 cm^{-1} (Cy3) a 475 cm^{-1} (Cy5) potvrdila úspěšné označení obou markerů.



Obr. 22.: Ramanova spektra čistých cyaninových značek Cyanin 3 (Cy3, oranžová linka) a Cyanin 5 (Cy5, zelená linka), nádorové markery HER2 a EpCAM značené cyaninovými značkami Cyanin 3 nebo Cyanin 5 (HER2_Cy3, červená linka; EpCAM_Cy5, modrá linka). Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

Pro zvýšení spolehlivosti metody, byl vybrán referenční pás při 660 cm^{-1} , charakteristický pro tyrosin. Ramanova spektra získaná analýzou označených nádorových markerů HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5 jsou uvedena na obrázku 23. Červená linka představuje Ramanovo spektrum získané analýzou označeného HER2 za použití MNPs@AntiHER2 senzoru. Spektrum obsahuje spektrální pásy charakteristické pro Cy3 a referenční pás ležící na 660 cm^{-1} . Modrá linka představuje Ramanovo spektrum získané analýzou označeného EpCAM markeru pomocí MNPs@AntiEpCAM senzoru a obsahuje spektrální pásy charakteristické pro Cy5 a referenční pás při 660 cm^{-1} . Oranžová linka znázorňuje Ramanovo spektrum získané multiplexní analýzou obou proteinů s použitím MNPs@AntiHER2@AntiEpCAM senzoru. Spektrum obsahuje spektrální pásy obou značek, konkrétně Cy3 při 373 cm^{-1} a Cy5 při 475 cm^{-1} .



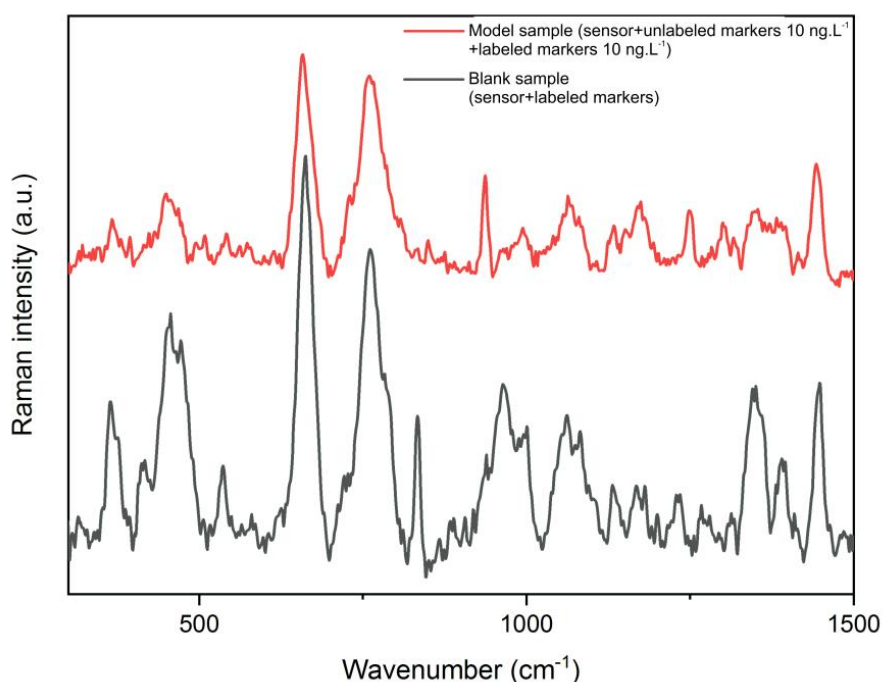
Obr. 23.: Ramanovo spektrum funkcionalizovaných MNPs s anti-HER2 po přidání značeného nádorového markeru HER2 (HER2_Cy3), Ramanovo spektrum funkcionalizovaných MNP s anti-EpCAM po přidání značeného nádorového markeru EpCAM (EpCAM_Cy5), multiplexní Ramanova analýza se senzorem (MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM) po přidání značených nádorových markerů HER2 (HER2_Cy3) a EpCAM (EpCAM_Cy5). Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

Pro testování funkčnosti senzorů byla vyhodnocena spektra slepých vzorků a modelových vzorků a ty pak byly použity pro další výpočty. Analýza byla provedena s 10 slepými vzorky a 10 modelovými vzorky. Každý vzorek byl měřen pětkrát. Průměrná intenzita Cy3, Cy5 a referenčních spektrálních pásů, získaná z pěti nezávislých měření, byla použita pro výpočet poměru celkové intenzity jako

$$R_{značka} = \frac{I_{značka}}{I_{ref}} \quad [8]$$

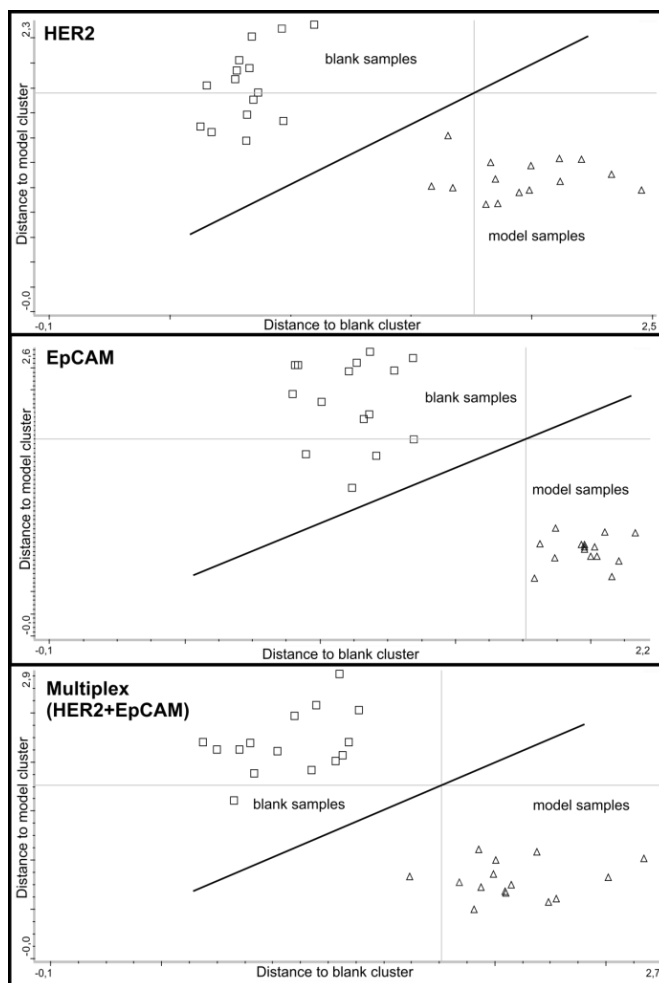
kde $I_{značka}$ představuje intenzitu příslušné Ramanovské značky (Cy3 nebo Cy5) a I_{ref} představuje intenzitu referenčního pásu přítomného při 660 cm^{-1} . Poměry byly vypočteny pro slepé vzorky (pufr PBS, $c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7$) a modelové vzorky obsahující markery HER2 a EpCAM v poměrech 1: 1 a 1: 2 (c/c, označené: neoznačené). Bylo předpokládáno, že konkurence mezi označenými a přirozenými markery se promítne ve snížené intenzitě spektrálních pásů charakteristických pro dané značky.

Tato hypotéza byla potvrzena v přítomných Ramanových spektrech slepého vzorku a modelového vzorku obsahujícího $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ HER2 a EpCAM (Obrázek 24). Pokles intenzity signálu byl určen pro každou značku zvlášť. Poměr intenzity ($I_{\text{značka}} / I_{\text{ref}}$) se ve vzorcích slepého vzorku, které obsahovaly pouze značené markery, změnil z 0,15 (Cy3) a 0,12 (Cy5) na 0,08 (Cy3) a 0,03 (Cy5) v modelových vzorcích, které obsahovaly také neznačené markery. Tyto změny se týkají úspěšné interakce mezi senzorem a markery HER2 a EpCAM a také přednostního obsazení vazebných míst neoznačenými markery před označenými.



Obr. 24.: Ramanovo spektrum slepého vzorku a modelového vzorku obsahujícího $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ HER2 a EpCAM. Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

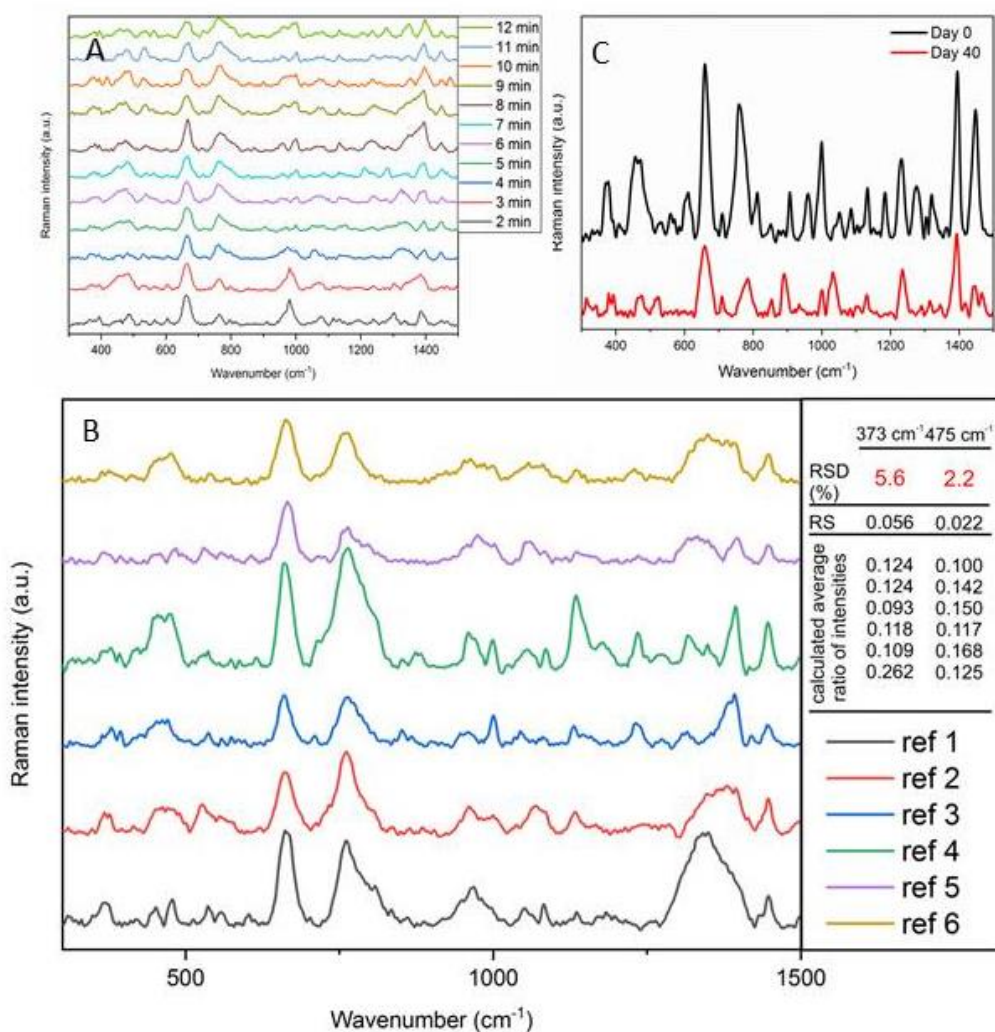
Metoda byla dále statisticky vyhodnocena pomocí diskriminační analýzy, kde byly zahrnuty spektrální pásy reference (tyrosin), Cy3 a Cy5 (660 cm^{-1} , 475 cm^{-1} a 373 cm^{-1}). Obrázek 25 ukazuje přítomnost významných rozdílů mezi Ramanovými spektry slepých vzorků (čtverec) a modelových vzorků (značka trojúhelníku). Rozdíly byly způsobeny snížením intenzity v důsledku soutěžení mezi neznačenými markery a označenými markery, jak bylo popsáno výše. Vypočtená průměrná Mahalanobisova vzdálenost mezi klastry byla následující: 1,9 pro HER2; 2,0 pro EpCAM a 2,1 pro multiplexní analýzu.



Obr. 25.: Diskriminační analýza MNPs s jednotlivými markery HER2, EpCAM a senzorem (MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM) pro multiplexní analýzu. Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

Stabilita signálu a také senzoru byla testována se slepým vzorkem za účelem ověření spolehlivosti metody. Během časového intervalu od 2 minut do 12 minut po přípravě byla zaznamenávána Ramanova spektra vzorků. Obrázek 26 (A) ukazuje, že všechna spektra obsahují stejné spektrální pásy, ačkoli jejich absolutní intenzity se s časem snižují. Rovněž byla testována reprodukovatelnost systému. Ramanova spektra šesti různých kapek připraveného senzoru s označenými markery jsou uvedena na obrázku 26 (B). V obou případech jsou spektra velmi podobná bez podstatných změn a lze tedy konstatovat, že metoda poskytuje opakovatelné výsledky, což bylo podpořeno výpočtem relativní směrodatné odchylky pro každou značku. Vypočtené hodnoty RSD činily 5,6% a 2,2%. Limit detekce byl stanoven z kalibrační křivky na hodnotu $LOD = 5 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ (vypočteno podle rovnice $3s/m$, kde 's' je směrodatná odchylka nejnižší koncentrace analytu a 'm' je směrnice přímky). Dlouhodobá stabilita byla hodnocena

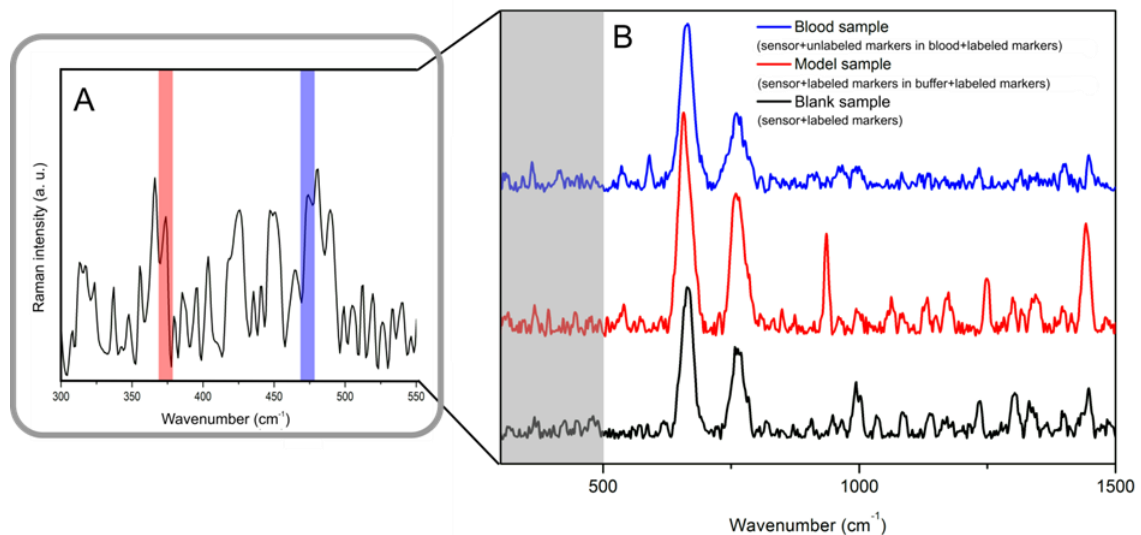
na slepém vzorku, kdy byla Ramanova spektra zaznamenána bezprostředně po přípravě vzorku (den 0) a po 40 dnech. Výsledná spektra jsou uvedena na obrázku 26 (C). Je zřejmé, že spektrum 40 dnů starého vzorku obsahuje stejné spektrální pásy jako vzorek měřený bezprostředně po přípravě. Přestože je intenzita pásu při 660 cm^{-1} o 57% nižší kvůli degradaci senzoru, systém je stále plně funkční.



Obr. 26.: (A) Ramanova spektra slepého vzorku (senzor + značené nádorové markery) získaná v časovém intervalu 2 – 12 minut po přípravě, která demonstrují stabilitu nanosystému. (B) Ramanova spektra šesti různých kapek slepého vzorku (senzor + značené nádorové markery), která ukazují opakovatelnost měření. (C) Měření dlouhodobé stability se slepým vzorkem (senzor + značené nádorové markery). Ramanova spektra byla měřena okamžitě po přípravě vzorku (den 0) a poté po 40 dnech od přípravy. Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

Aplikační potenciál navrhované metody byl dále testován s cílem použít ji pro kompetitivní multiplexní analýzu vzorků lidské krve. Bylo shromážděno deset vzorků od

dvou dobrovolníků a analyzováno pětkrát za účelem statistického vyhodnocení. Proces syntézy senzoru byl navržen tak, aby minimalizoval nespecifické interakce funkcionalizovaných MNPs s látkami přítomnými v komplexní matici lidské krve přidáním ethylaminu v posledním kroku přípravy senzoru a pečlivým několikanásobným promytím deionizovanou vodou. Nicméně nové spektrální pásy ve spektrech vzorku krve v oblasti 560 cm^{-1} a 1242 cm^{-1} naznačují nespecifické interakce, které ale nijak neovlivňují detekci. SERS spektrum plné krve je znázorněno na obr. 27. Všechny pásy předtím přiřazené modelovému vzorku a slepému vzorku demonstrují nepřítomnost interferujících nespecifických interakcí a vykazují změnu absolutních intenzit pozorovaných spektrálních pásů s ohledem na měnící se koncentraci HER2 a EpCAM.



Obr. 27.: (A) Detail spektrální oblasti od 300 do 550 cm^{-1} z označené oblasti v (B) se zvýrazněnými pásy jednotlivých značek, (B) Ramanovo spektrum multiplexní analýzy pomocí senzoru s pouze značenými nádorovými markery HER2 (HER2_Cy3) a EpCAM (EpCAM_Cy5) (slepý vzorek, černá linka), Ramanovo spektrum multiplexní analýzy pomocí senzoru s neznačenými nádorovými markery v roztoku pufru a značenými nádorovými markery (modelový vzorek, červená linka), Ramanovo spektrum kompetitivní multiplexní analýzy lidské plné krve obsahující nádorové markery pomocí senzoru a značených nádorových markerů (vzorek krve, modrá linka). Převzato z Balzerova a kol. (2018)¹³⁷

Další statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí studentova t-testu za účelem určení významného rozdílu průměrných poměrů intenzit pro Cy3 a Cy5 (jak bylo popsáno výše) mezi slepým vzorkem a vzorkem plné krve. Vypočtené p hodnoty byly 0,0093 pro HER2 a 0,0016 pro EpCAM. Takové výsledky ukazují na statisticky významný rozdíl.

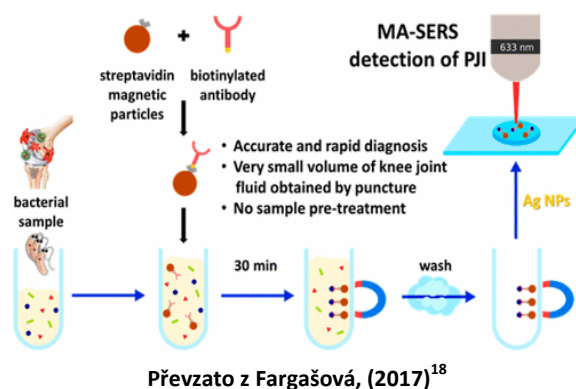
Výsledky této práce byly v roce 2018 zaslány do časopisu *Applied Materials Today* a v plném znění jsou dostupné v příloze.

6.3 Publikace zahrnující využití SERS k detekci dalších biologicky aktivních látek

Tato část disertační práce zahrnuje publikace, ve kterých bylo využito povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie k detekci dalších biologicky aktivních látek. Konkrétně se jedná o publikaci zabývající se multiplexní analýzou DNA a RNA v rakovinných tkáních; o publikaci popisující využití SERS k detekci bakteriální infekce kloubních náhrad a o publikaci, která popisuje využití magnetického biosensory k detekci rakoviny prostaty sledováním proteinu PSMA.

6.3.1 Využití magneticky asistované Ramanovy spektroskopie k detekci infekce protetických kloubů

Tato práce popisuje novou metodu diagnostiky infekce protetických kloubů (Prosthetic Joint Infection, PJI) založenou na magneticky asistované povrchové Ramanově spektroskopii (MA-SERS), která byla již dříve použita k rychlé, selektivní a vysoce citlivé detekci různých molekul včetně dopaminu a imunoglobulinů.^{17,142}



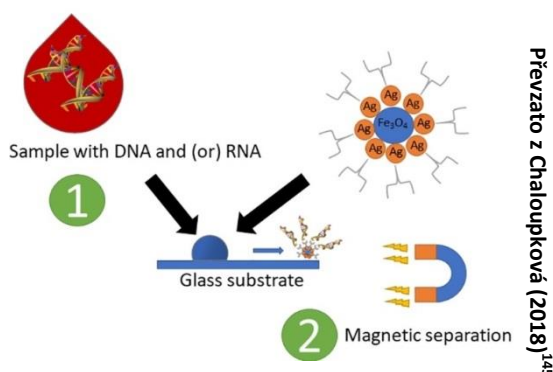
Stříbrné nanočástice se často používají pro svou synergickou antibakteriální aktivitu k potlačení růstu bakterií, nicméně při nízkých koncentracích používaných pro zvýšení Ramanova signálu nemají žádný inhibiční vliv na analyzované patogeny.^{143,144} Metoda využívá nový vysoce účinný biosenzor založený na streptavidinem modifikovaných karboxy-funkcionalizovaných magnetických nanočásticích (dále jen MNP@Strep) které zajišťují účinnou cílovou izolaci. Po izolaci je biosenzor pokryt nanočásticemi stříbra, které umožňují detekci PJI pomocí MA-SERS. Nanomateriál použitý pro detekci MA-SERS má dvě hlavní výhody. Za prvé, jeho magnetické vlastnosti umožňují efektivní a kvantitativní izolaci vybraných analytů z komplexní matrice. Za druhé, SERS účinek nanočástic stříbra naadsorbovaných na biosenzoru poskytuje velmi nízké limity detekce. Tato metoda byla použita k izolaci a identifikaci dvou bakteriálních kmenů, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Navíc byly touto metodou úspěšně diagnostikovány uvedené bakteriální

kmeny v reálném vzorku výpotku kolenního kloubu během několika minut bez nutnosti předběžné úpravy vzorku.

Výsledky této práce byly v roce 2017 publikovány v časopise *Analytical Chemistry* a v plném znění jsou dostupné v příloze.

6.3.2 Multiplexní analýza RNA a DNA v rakovinných tkáních

Práce popisuje využití nanosenzoru pro multiplexní stanovení DNA a RNA složeného z magnetického $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu funkcionalizovaného nízkomolekulárním selektorem ze skupiny alkylačních činidel - chlorambucilem. Alkylační antineoplastická činidla se často



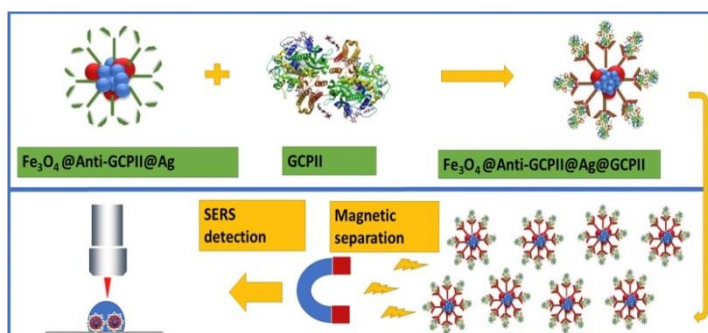
Převzato z Chaloupková (2018)¹⁴⁵

používají při léčení rakoviny selektivní alkyací guaninu. Tohoto mechanismu bylo využito k získání výrazně vyšší úrovně selektivity vůči nukleovým kyselinám. Sensor navíc umožňuje selektivní izolaci nukleových kyselin pomocí magnetických vlastností nanočástic Fe_3O_4 a následné stanovení pomocí magneticky asistované povrchové Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Dosažené limity detekce byly $3,0 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DNA a $3,8 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro RNA. Zvýšená selektivita vyvinutého sensoru, daná přítomností alkylačního činidla, umožňuje provádět multiplexní analýzu DNA a RNA s relativními odchylkami pod 10%. Stabilita použitého nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ byla sledována po dobu 21 dnů. Konečný pokles analytického signálu v čase byl 25 %.¹⁴⁵

Výsledky této práce byly v roce 2018 publikovány v časopise *Applied Materials Today* a v plném znění jsou dostupné v příloze.

6.3.3 Využití magneticky asistované Ramanovy spektroskopie k detekci prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v lidské krvi

Tato práce popisuje využití magnetického biosensoru k detekci rakoviny prostaty sledováním prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v lidské krvi.



Převzato z Chaloupková (2018)¹⁹

PSMA je také znám pod označením glutamát karboxypeptidáza II (GCPII). Metoda využívá magnetického nanokompozitu obsahujícího nanočástice oxidu železnato-železitého a nanočástice stříbra ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$) funkcionalizovaného protilátkou (syntetický GCPII inhibitor s nízkou molekulovou hmotností). Nanokompozit umožňuje jednoduchou izolaci analytu z matrice pomocí vnějšího magnetického pole a následné stanovení pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Limit detekce byl stanoven na 6 pmol. Navíc bylo zjištěno, že výsledný biosensor $\text{Fe}_3\text{O}_4@Anti-GCPII@Ag$ byl stabilní po dobu 21 dnů.

Výsledky této práce byly v roce 2018 publikovány v časopise *Analytica Chimica Acta* a v plném znění jsou dostupné v příloze.

ZÁVĚR

Cílem předkládané disertační práce bylo studium využití nanočástic ušlechtilých kovů v kombinaci s magnetickými nanočásticemi železa k detekci fyziologicky aktivních látek pomocí magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Připravené nanomateriály byly charakterizovány pomocí řady technik (XRD, UV/Vis, TEM, HRTEM, IČ, DLS), které vedle jejich základních fyzikálně chemických parametrů (velikost částic, prvkové složení) umožnily i sledování modifikace primárních nanočástic biologicky aktivními molekulami. Praktické uplatnění našly tyto připravené materiály při detekci proteinu IgG a rakovinných markerů HER2 a EpCAM pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Mimo tyto bioanalytické aplikace byly systémy založené na kombinaci magnetických nanočástic a nanočástic ušlechtilých kovů použity v dalších bioanalytických metodách (např. biosenzor pro stanovení PSMA, DNA a RNA rakovinných tkání, infekce kloubních náhrad).

První část experimentální práce se zabývala funkcionalizací magnetického nanokompozitu protilátkami a následnou detekcí lidského imunoglobulinu G v plné lidské krvi pomocí magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Navržená metoda využívala magnetický nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$, kde byly nanočástice stříbra kovalentně vázány použitím karboxymethylchitosanu. Povrch takto připraveného nanokompozitu byl modifikován pomocí streptavidinu a poté protilátkou anti-IgG. Nejdříve byl funkcionalizovaný nanokompozit testován s modelovými vzorky (vodný roztok IgG), poté byly provedena analýza vzorků lidské krve. Ke stanovení koncentrace IgG v krvi byla sestrojena kalibrační křivka, s jejíž pomocí byl stanoven limit detekce na hodnotu $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Velkým přínosem této metody je, že může být relativně snadno modifikována. To docílíme tak, že nanokompozit bude funkcionalizován jinou biotinylovanou protilátkou, což umožní stanovení odpovídajícího cílového analytu.

Druhá část experimentální práce se zabývala vývojem metody k simultánnímu stanovení nádorových markerů pomocí MA-SERS s biosenzorem kombinujícím magnetické nanočástice (oxid železitý) pro magnetickou separaci a nanočástice stříbra pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii v analytické koncepci. K analýze byly

vybrány dva nádorové markery – HER2 a EpCAM. Metoda využívá nanokompozitu $\text{Fe}_2\text{O}_3@Ag$ funkcionalizovaného specifickými protilátkami anti-HER2 a anti-EpCAM a je založena na kompetici mezi neoznačenými markery a markery označenými fluorescenčními značkami (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5). Limit detekce byl v tomto případě stanoven na velmi nízké úrovni 5 ng.l^{-1} , přičemž obě sloučeniny jsou statisticky odlišitelné od slepého vzorku s p -hodnotami 0,0093 (HER2) a 0,0016 (EpCAM).

SUMMARY

The aim of this dissertation was to study the application of noble metal nanoparticles for the detection of physiologically active substances using the surface of enhanced Raman spectroscopy. The prepared nanomaterials were characterized by variety of techniques (XRD, UV/Vis, TEM, HRTEM, IR, DLS). Prepared materials have found practical applications for the detection of IgG protein and cancer markers HER2 and EpCAM by surface enhanced Raman spectroscopy. In addition to these bioanalytical applications, systems based on the combination of magnetic nanoparticles and nanoparticles of noble metals were used in other bioanalytical methods (biosensor for determination of PSMA, DNA and RNA in tumor tissues, prosthetic joint infection).

The first part of the experimental section dealt with the functionalization of magnetic nanocomposite with antibodies and subsequent detection of human immunoglobulin G in whole human blood by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). The proposed method utilized the magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite where the silver nanoparticles were covalently bound using carboxymethylchitosan. The surface of the nanocomposite was modified with streptavidin and then with the anti-IgG antibody. First, the functionalized nanocomposite was tested with model samples (aqueous solution of IgG) and then human blood samples were analysed. A calibration curve was constructed to determine IgG concentration in blood. The detection limit was determined to $600 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. The benefit of such an approach is that it can be modified relatively easily in order to analyze other targets by selecting an appropriate biotinylated antibody.

The second part of the experimental work dealt with the development of a method for the simultaneous determination of cancer markers using MA-SERS. Two cancer markers - HER2 and EpCAM, were selected for analysis. The method employed $\text{Fe}_2\text{O}_3@Ag$ nanocomposite functionalized with specific antibodies anti-HER2 and anti-EpCAM and was based on competition between unlabeled markers and markers labeled with fluorescent labels (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5). The detection limit

was determined to 5 ng.L⁻¹ and both of model samples are statistically distinguishable from the blank sample with *p-values* of 0.0093 (HER2) and 0.0016 (EpCAM).

LITERATURA

1. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
2. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **318**, 162 (1985).
3. Bogner, A., Jouneau, P. H., Thollet, G., Basset, D. & Gauthier, C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards 'wet-STEM' imaging. *Micron* **38**, 390–401 (2007).
4. Olsman, N. & Goentoro, L. There's (still) plenty of room at the bottom. *Curr. Opin. Biotechnol.* **54**, 72–79 (2018).
5. Heiligtag, F. J. & Niederberger, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today* **16**, 262–271 (2013).
6. Yamamoto, Y. *et al.* Direct evidence for ferromagnetic spin polarization in gold nanoparticles. *Chem. Rev.* **104**, 293–346 (2004).
7. Faraday, M. LIX. Experimental relations of gold (and other metals) to light.—The bakerian lecture. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **14**, 512–539 (1857).
8. Babick, F. *Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates*. (Springer, 2016).
9. Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy—from Birth to Adolescence (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **26**, 606–614 (1987).
10. Noguez, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: The influence of shape and physical environment. *J. Phys. Chem. C* **111**, 3606–3619 (2007).
11. Le Ru, E. C., Meyer, M. & Etchegoin, P. G. Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique. *J. Phys. Chem. B* **110**, 1944–1948 (2006).
12. Stuart, D. A. *et al.* In Vivo Glucose Measurement by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **78**, 7211–7215 (2006).
13. El-Ansary, A. Nanoparticles as biochemical sensors. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **3**, 65 (2010).
14. Fikiet, M. A. *et al.* Surface enhanced Raman spectroscopy: A review of recent applications in forensic science. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **197**, 255–260 (2018).
15. Yang, J., Rorrer, G. L. & Wang, A. X. Bioenabled SERS substrates for food safety and drinking water monitoring. in *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering* (eds. Kim, M. S., Chao, K. & Chin, B. A.) **9488**, 948808 (2015).
16. Radu, A. I. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) in food analytics: Detection of vitamins B 2 and B 12 in cereals. *Talanta* **160**, 289–297 (2016).
17. 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.* **86**, 11107–11114 (2014).
18. Fargašová, A. *et al.* Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **89**, 6598–6607 (2017).
 19. Chaloupková, Z. *et al.* Label-free determination of prostate specific membrane antigen in human whole blood at nanomolar levels by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **997**, 44–51 (2018).
 20. Cao, G. & Wang, Y. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*. (World Scientific, 2011). at <<https://books.google.cz/books?id=HRvNTjo4tZQC>>
 21. Sadhasivam, T. *et al.* Dimensional effects of nanostructured Mg/MgH₂ for hydrogen storage applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **72**, 523–534 (2017).
 22. Drexler, K. E. Engines of creation 2.0." The Coming Era of Nanotechnology. *Anchor Books- Doubleday* **1986**, 576 (2006).
 23. Daniel, M. C. M. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **104**, 293–346 (2004).
 24. Stassi, S. *et al.* Shape-Controlled Synthesis of Silver Nature-Like Spiky Particles for Piezoresistive Sensor Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2711–2719 (2014).
 25. Baptista, P. *et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 943–950 (2008).
 26. Tanaka, R. *et al.* A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1414–1420 (2006).
 27. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115–2120 (2006).
 28. Han, G., Ghosh, P. & Rotello, V. M. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine* **2**, 113–123 (2007).
 29. Tran, Q. H., Nguyen, V. Q. & Le, A.-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **4**, 033001 (2013).
 30. Xu, L., Kuang, H., Wang, L. & Xu, C. Gold nanorod ensembles as artificial molecules for applications in sensors. *J. Mater. Chem.* **21**, 16759 (2011).
 31. Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 209–217 (2006).
 32. Airo, M. A. *et al.* Synthesis and characterization of indium monoselenide nanosheets: A proposed pseudo top-down mechanism. *J. Cryst. Growth* **406**, 1–7 (2014).
 33. Creighton, J. A., Blatchford, C. G. & Albrecht, M. G. 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. Trans. II* **75**, 790–798 (1979).
34. Lee, P. C. & Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **86**, 3391–3395 (1982).
 35. Kimling, J. *et al.* Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15700–15707 (2006).
 36. Nickel, U., Castell, A. Z., Pöppel, K. & Schneider, S. Silver colloid produced by reduction with hydrazine as support for highly sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy. *Langmuir* **16**, 9087–9091 (2000).
 37. Panáček, A. *et al.* Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **110**, 16248–16253 (2006).
 38. Kvi, L. & Vec, R. Silver Colloid Nanoparticles : Synthesis , Characterization , and Their Antibacterial Activity. 16248–16253 (2006).
 39. Jana, N. R., Gearheart, L. & Murphy, C. J. Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir* **17**, 6782–6786 (2001).
 40. Marambio-Jones, C. & Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* **12**, 1531–1551 (2010).
 41. Dwivedi, A. D. & Gopal, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **369**, 27–33 (2010).
 42. Veerasamy, R. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *J. Saudi Chem. Soc.* **15**, 113–120 (2011).
 43. Song, J. Y., Jang, H. K. & Kim, B. S. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochem.* **44**, 1133–1138 (2009).
 44. Krishnaraj, C. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **76**, 50–56 (2010).
 45. Ahmad, A. *et al.* Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. *Nanotechnology* **14**, 824–828 (2003).
 46. Bhainsa, K. C. & D'Souza, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **47**, 160–164 (2006).
 47. Ahmad, A. *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **28**, 313–318 (2003).
 48. Lu, X., Rycenga, M., Skrabalak, S. E., Wiley, B. & Xia, Y. Chemical Synthesis of Novel Plasmonic Nanoparticles. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 167–192 (2009).
 49. www.nanocomposix.com. at <<https://nanocomposix.com/pages/gold-nanoparticles-optical-properties>>

50. Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 209–217 (2006).
51. Kim, J. S. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 95–101 (2007).
52. Le Ouay, B. & Stellacci, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* **10**, 339–354 (2015).
53. Hsueh, Y.-H. *et al.* The Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles in *Bacillus subtilis* Are Mediated by Released Ag⁺ Ions. *PLoS One* **10**, e0144306 (2015).
54. Panáček, A. *et al.* Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* **13**, 65–71 (2018).
55. Pal, D., Sahu, C. & Haldar, A. Bhasma : The ancient Indian nanomedicine. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **5**, 4 (2014).
56. Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A. & Santos, C. A. Dos. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**, 1–24 (2015).
57. Patra, C. R. *et al.* Targeted Delivery of Gemcitabine to Pancreatic Adenocarcinoma Using Cetuximab as a Targeting Agent. *Cancer Res.* **68**, 1970–1978 (2008).
58. Patra, C. R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D. & Mukherjee, P. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 346–361 (2010).
59. Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 145–150 (2008).
60. Myers, S. M. and Collins, I. in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (ed. Intergovernmental Panel on Climate Change) **7**, 1–30 (Cambridge University Press, 2015).
61. Hussain, M. M., Samir, T. M. & Azzazy, H. M. E. Unmodified gold nanoparticles for direct and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clin. Biochem.* **46**, 633–637 (2013).
62. Tsai, T.-T. *et al.* Diagnosis of Tuberculosis Using Colorimetric Gold Nanoparticles on a Paper-Based Analytical Device. *ACS Sensors* **2**, 1345–1354 (2017).
63. Hu, K. *et al.* Neuroprotective effect of gold nanoparticles composites in Parkinson's disease model. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **14**, 1123–1136 (2018).
64. Liu, C. *et al.* An electrochemical DNA biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, based on signal amplification of graphene and a gold nanoparticle–polyaniline nanocomposite. *Analyst* **139**, 5460–5465 (2014).
65. Guo, D. *et al.* Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials* **34**, 7884–7894 (2013).
66. Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P. & Amal, R. Induced Adaptation of *Bacillus* sp. to Antimicrobial Nanosilver. *Small* **9**, 3554–3560 (2013).

67. Zia, M., Phull, A. R. & Ali, J. S. challenges of iron oxide nanoparticles. 49–67 (2016).
68. Majidi, S., Zeinali Sehrig, F., Farkhani, S. M., Soleymani Goloujeh, M. & Akbarzadeh, A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **44**, 722–734 (2016).
69. Hao, R. *et al.* Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater.* **22**, 2729–2742 (2010).
70. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Synthesis , Stabilization , Vectorization , Physicochemical Characterizations , and Biological Applications. 2064–2110 (2008).
71. Alphandéry, E., Guyot, F. & Chebbi, I. Preparation of chains of magnetosomes, isolated from *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 magnetotactic bacteria, yielding efficient treatment of tumors using magnetic hyperthermia. *Int. J. Pharm.* **434**, 444–452 (2012).
72. Oestreicher, Z. *et al.* Magnetosomes and magnetite crystals produced by magnetotactic bacteria as resolved by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *Micron* **43**, 1331–1335 (2012).
73. Challa S. S. R. Kumar. *Magnetic Nanomaterials*. (Wiley-VCH, 2009).
74. Kudr, J. *et al.* Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials* **7**, 243 (2017).
75. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
76. Boyer, C., Whittaker, M. R., Bulmus, V., Liu, J. & Davis, T. P. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater.* **2**, 23–30 (2010).
77. Gonzalez-Quintela, A. *et al.* Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 42–50 (2007).
78. Ewen Smith; Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
79. Eric Le Ru; Pablo Etchegoin. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*. (Elsevier B.V., 2009).
80. Bumbrah, G. S. & Sharma, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egypt. J. Forensic Sci.* **6**, 209–215 (2016).
81. Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R. & Feld, M. S. Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy. *Chem. Rev.* **99**, 2957–2976 (1999).
82. Krishnan, R. S. & Shankar, R. K. Raman effect: History of the discovery. *J. Raman Spectrosc.* **10**, 1–8 (1981).
83. Moura, C. C., Tare, R. S., Oreffo, R. O. C. & Mahajan, S. Raman spectroscopy and coherent anti- Stokes Raman scattering imaging : prospective tools for monitoring

- skeletal cells and skeletal regeneration. 9–11 (2016).
84. Peter Atkins; Julio de Paula. *Fyzikální chemie*. (Oxford University Press, 2010).
 85. Saleh, T. A. Pharmaceutical Characterization and Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Int. Arch. Clin. Pharmacol.* **3**, 1–7 (2017).
 86. Li, Y. & Church, J. S. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *J. Food Drug Anal.* **22**, 29–48 (2014).
 87. Peter Larkin. *Infrared and Raman Spectroscopy*. (Elsevier, 2011).
 88. Tu, Q. & Chang, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **8**, 545–558 (2012).
 89. Huang, W. *et al.* Study of both fingerprint and high wavenumber Raman spectroscopy of pathological nasopharyngeal tissues. *J. Raman Spectrosc.* **46**, 537–544 (2015).
 90. Kudelski, A. Analytical applications of Raman spectroscopy. *Talanta* **76**, 1–8 (2008).
 91. Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A.-I., Ringe, E. & Van Duyne, R. P. SERS: Materials, applications, and the future. *Mater. Today* **15**, 16–25 (2012).
 92. Gómez, M. & Lazzari, M. Reliable and cheap SERS active substrates. *Mater. Today* **17**, 358–359 (2014).
 93. 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. *Anal. Chim. Acta* **693**, 7–25 (2011).
 94. Dong, X., Gu, H., Kang, J., Yuan, X. & Wu, J. 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**, 142–147 (2010).
 95. Panáček, A. *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA-diatomite nanocomposite. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **110**, 191–198 (2013).
 96. Abalde-Cela, S. *et al.* Loading of Exponentially Grown LBL Films with Silver Nanoparticles and Their Application to Generalized SERS Detection. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 5326–5329 (2009).
 97. Suchomel, P. *et al.* Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes. *Ultrason. Sonochem.* **32**, 165–172 (2016).
 98. El-dessouky, R., Georges, M. & Azzazy, H. M. E. Silver Nanostructures : Properties , Synthesis , and Biosensor Applications. *Funct. Nanoparticles Bioanal. Nanomedicine Bioelectron. Devices* **1**, 359–404 (2012).
 99. van Eeden, P. E. *et al.* Using Time-Resolved Fluorescence to Measure Serum Venom-Specific IgE and IgG. *PLoS One* **6**, e16741 (2011).
 100. Bobek, V. *et al.* A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Res.* **30**, 4799–803 (2010).

101. Costa, D. De *et al.* Sequencing and quantification of IgG fragments and antigen binding regions by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2937–2945 (2010).
102. Kho, K. W., Dinish, U. S., Kumar, A. & Olivo, M. Frequency Shifts in SERS for Biosensing. *ACS Nano* **6**, 4892–4902 (2012).
103. Xu, L.-J. *et al.* Label-Free Detection of Native Proteins by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Iodide-Modified Nanoparticles. *Anal. Chem.* **86**, 2238–2245 (2014).
104. Han, X. X., Huang, G. G., Zhao, B. & Ozaki, Y. Label-Free Highly Sensitive Detection of Proteins in Aqueous Solutions Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **81**, 3329–3333 (2009).
105. Han, X. X., Zhao, B. & Ozaki, Y. Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1719–1727 (2009).
106. Yoon, J. *et al.* Highly sensitive detection of thrombin using SERS-based magnetic aptasensors. *Biosens. Bioelectron.* **47**, 62–67 (2013).
107. Hahn, C. D., Riener, C. K. & Gruber, H. J. Labeling of Antibodies with Cy3-, Cy3.5-, Cy5-, and Cy5.5-monofunctional Dyes at Defined Dye/Protein Ratios. *Single Mol.* **2**, 149–149 (2001).
108. Bonifacio, A., Cervo, S. & Sergio, V. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy of biofluids: fundamental aspects and diagnostic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8265–8277 (2015).
109. Lorenz, B., Wichmann, C., Stöckel, S., Rösch, P. & Popp, J. Cultivation-Free Raman Spectroscopic Investigations of Bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 413–424 (2017).
110. Rygula, A. *et al.* Raman spectroscopy of proteins: A review. *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1061–1076 (2013).
111. Wang, X. *et al.* Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced raman scattering nanoparticles. *Cancer Res.* **71**, 1526–1532 (2011).
112. Yang, J. *et al.* Distinguishing breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1093–1100 (2012).
113. Jarvis, R. M. & Goodacre, R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **76**, 40–47 (2004).
114. Mosier-Boss, P. Review on SERS of Bacteria. *Biosensors* **7**, 51 (2017).
115. Efrima, S. & Zeiri, L. Understanding SERS of bacteria. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 277–288 (2009).
116. Zhou, H. *et al.* SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles. *Anal. Chem.* **86**, 1525–1533 (2014).
117. Fan, C. *et al.* Detecting Food- and Waterborne Viruses by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Food Sci.* **75**, no-no (2010).
118. Avci, E., Kaya, N. S. eli., Ucankus, G. & Culha, M. Discrimination of urinary tract infection pathogens by means of their growth profiles using surface enhanced Raman scattering. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8233–8241 (2015).

119. Pucek, R. *et al.* Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation. *Analyst* **137**, 2866 (2012).
120. Wang, J. *et al.* Facile Synthesis of Au-Coated Magnetic Nanoparticles and Their Application in Bacteria Detection via a SERS Method. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 19958–19967 (2016).
121. Song, C., Yang, Y., Yang, B., Min, L. & Wang, L. Combination assay of lung cancer associated serum markers using surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Mater. Chem. B* **4**, 1811–1817 (2016).
122. Sun, C., Zhang, R., Gao, M. & Zhang, X. A rapid and simple method for efficient capture and accurate discrimination of circulating tumor cells using aptamer conjugated magnetic beads and surface-enhanced Raman scattering imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8883–8892 (2015).
123. Song, C. *et al.* Ultrasensitive detection of carcino-embryonic antigen by using novel flower-like gold nanoparticle SERS tags and SERS-active magnetic nanoparticles. *RSC Adv.* **4**, 41666–41669 (2014).
124. Qiu, Y. *et al.* Synthesis of magnetic Fe₃O₄–Au hybrids for sensitive SERS detection of cancer cells at low abundance. *J. Mater. Chem. B* **3**, 4487–4495 (2015).
125. Lin, Y. *et al.* Detection of CEA in human serum using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with antibody-modified Au and γ -Fe₂O₃@Au nanoparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **121**, 135–140 (2016).
126. Gao, R., Cheng, Z., DeMello, A. J. & Choo, J. Wash-free magnetic immunoassay of the PSA cancer marker using SERS and droplet microfluidics. *Lab Chip* **16**, 1022–1029 (2016).
127. Wang, J. *et al.* Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of Staphylococcus aureus Based on Aptamer Recognition. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 20919–20929 (2015).
128. Shin, M. H. *et al.* Multiple detection of proteins by SERS-based immunoassay with core shell magnetic gold nanoparticles. *Vib. Spectrosc.* **72**, 44–49 (2014).
129. Dinish, U. S., Balasundaram, G., Chang, Y.-T. & Olivo, M. Actively Targeted In Vivo Multiplex Detection of Intrinsic Cancer Biomarkers Using Biocompatible SERS Nanotags. *Sci. Rep.* **4**, 4075 (2014).
130. Tang, B. *et al.* Ultrasensitive, Multiplex Raman Frequency Shift Immunoassay of Liver Cancer Biomarkers in Physiological Media. *ACS Nano* **10**, 871–879 (2016).
131. Granger, J. H., Granger, M. C., Firpo, M. A., Mulvihill, S. J. & Porter, M. D. Toward development of a surface-enhanced Raman scattering (SERS)-based cancer diagnostic immunoassay panel. *Analyst* **138**, 410–416 (2013).
132. Lu, W. *et al.* Multiplexing determination of lung cancer biomarkers using electrochemical and surface-enhanced Raman spectroscopic techniques. *New J. Chem.* **39**, 5420–5430 (2015).
133. Li, M., Kang, J. W., Sukumar, S., Dasari, R. R. & Barman, I. Multiplexed detection of

- serological cancer markers with plasmon-enhanced Raman spectro-immunoassay. *Chem. Sci.* **6**, 3906–3914 (2015).
134. Maiti, K. K. *et al.* Multiplex cancer cell detection by SERS nanotags with cyanine and triphenylmethine Raman reporters. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**, 3514–3516 (2011).
 135. Panáček, A. *et al.* Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **110**, 16248–16253 (2006).
 136. Marková, Z. *et al.* Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity. *Green Chem.* **14**, 2550 (2012).
 137. Balzerová, A., Opletalová, A., Ranc, V. & Zbořil, R. Multiplex competitive analysis of HER2 and EpCAM cancer markers in whole human blood using Fe₂O₃@Ag nanocomposite. (2018).
 138. McNay, G., Eustace, D., Smith, W. E., Faulds, K. & Graham, D. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. *Appl. Spectrosc.* **65**, 825–837 (2011).
 139. Sjöberg, B., Foley, S., Cardey, B. & Enescu, M. An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **128**, 300–311 (2014).
 140. Guerrini, L. *et al.* Highly Sensitive SERS Quantification of the Oncogenic Protein c-Jun in Cellular Extracts. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10314–10317 (2013).
 141. Avci, E. & Culha, M. Influence of Protein Size on Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectra in Binary Protein Mixtures. *Appl. Spectrosc.* **68**, 890–899 (2014).
 142. Ranc, V. *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.* **86**, 2939–2946 (2014).
 143. Gallo, J. *et al.* Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection. *Materials (Basel)*. **9**, 337 (2016).
 144. Habiba, K. *et al.* Synergistic antibacterial activity of PEGylated silver–graphene quantum dots nanocomposites. *Appl. Mater. Today* **1**, 80–87 (2015).
 145. Chaloupková, Z. *et al.* Label-free determination and multiplex analysis of DNA and RNA in tumor tissues. *Appl. Mater. Today* **12**, 85–91 (2018).

SEZNAM ZKRATEK

SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i> , povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
MA-SERS	<i>Magnetically-assisted surface enhanced raman spectroscopy</i> , magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
AuNPs	<i>gold nanoparticles</i> ; nanočástice zlata
AgNPs	<i>silver nanoparticles</i> ; nanočástice stříbra
IgG	imunoglobulin G
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , lidský epidermální růstový faktor
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
Cy3	cyanin 3
Cy5	cyanin 5
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
RS	Ramanova spektroskopie
RRS	rezonanční Ramanova spektroskopie
CARS	<i>Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy</i> , koherentní anti-Stokes Ramanova spektroskopie
TERS	<i>Tip-enhanced Raman spectroscopy</i> , hrotem zesílená Ramanova spektroskopie
LbL	Layer-by-Layer, metoda samovolné organizace vrstev
PDDA	Poly(diallyldimethylammonium chlorid)
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
PAA	<i>Polyacrylic acid</i> , kyselina polyakrylová
Rh6G	Rhodamin 6G
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , ribonukleová kyselina
CTC	<i>Circulating tumor cell</i> , cirkulující nádorové buňky
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermální růstový faktor
pMBA	p-merkaptobenzoová kyselina
4-ATP	4-Aminothiophenol

CEA	karcinoembryonální antigen
PSA	prostatický specifický antigen
AFP	alfa-fetoprotein
MNPs	<i>magnetic nanoparticles</i> , magnetické nanočástice
MMP-7	matrix metaloproteináza 7
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i> ; enzymatická imunosorpční analýza
MGITC	<i>Malachite green isothiocyanate</i> , malachitová zeleň
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i> , perorální spinocelulární karcinom
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , epidermální růstový faktor
XRD	<i>X-ray powder diffraction</i> ; rentgenová prášková difrakce
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie
HRTEM	<i>high-resolution transmission electron microscopy</i> ; transmisní elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , mikroskopie atomárních sil
SEM	<i>scanning electron microscope</i> , rastrovací elektronový mikroskop
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
PEG	Polyethylenglykol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVA	Polyvinylalkohol
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> , magnetická rezonance
IR	<i>infrared spectroscopy</i> , infračervená spektroskopie
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
NHS	N-hydroxysulfosukcinimid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , fosfátový pufr
PJI	<i>Prosthetic Joint Infection</i> , infekce kloubní náhrady
PSMA	<i>Prostate-Specific Membrane Antigen</i> , prostatický specifický membránový antigen
GCPII	<i>Glutamate carboxypeptidase II</i> , glutamát karboxyperoxidáza II

PŘÍLOHY

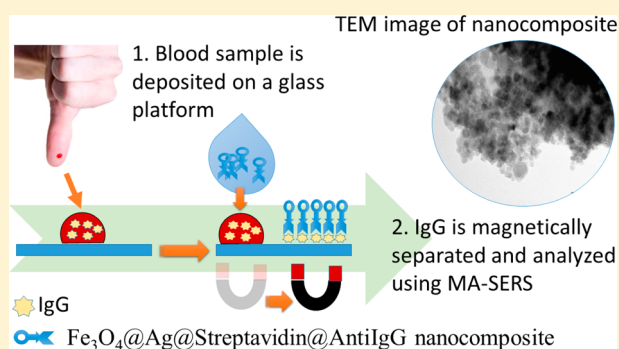
Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe₃O₄@Ag Nanocomposite

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

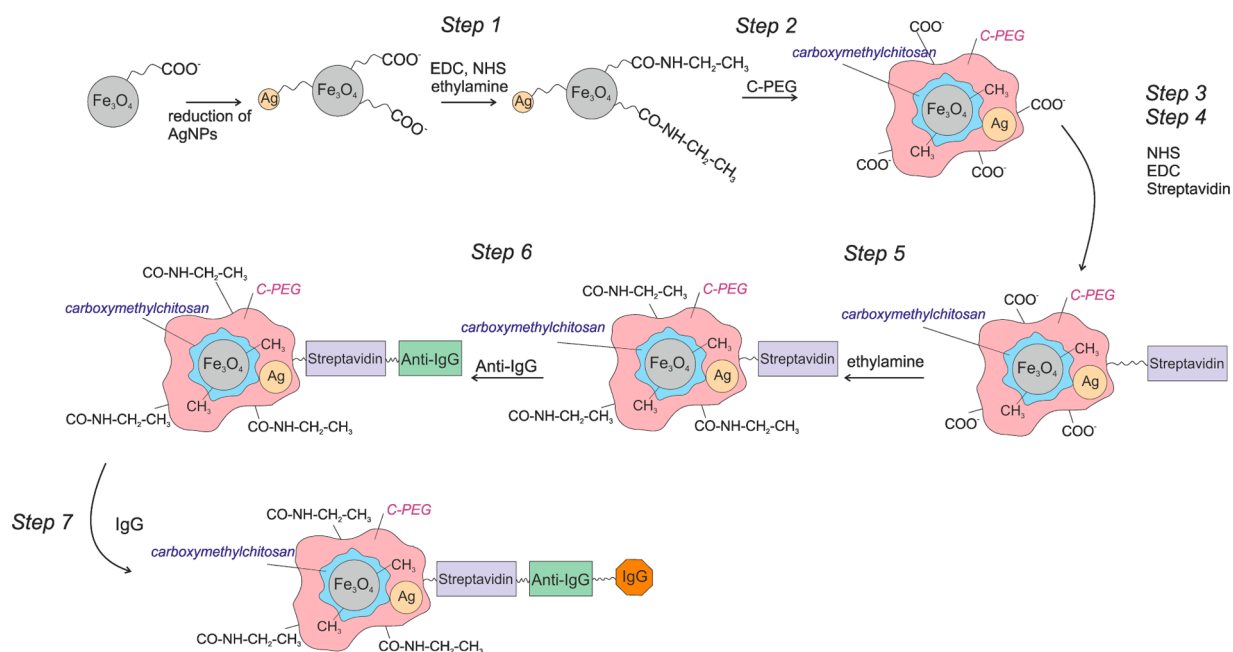


Figure 1. Scheme showing the individual steps in the modification of nanocomposite Fe₃O₄@Ag.

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-

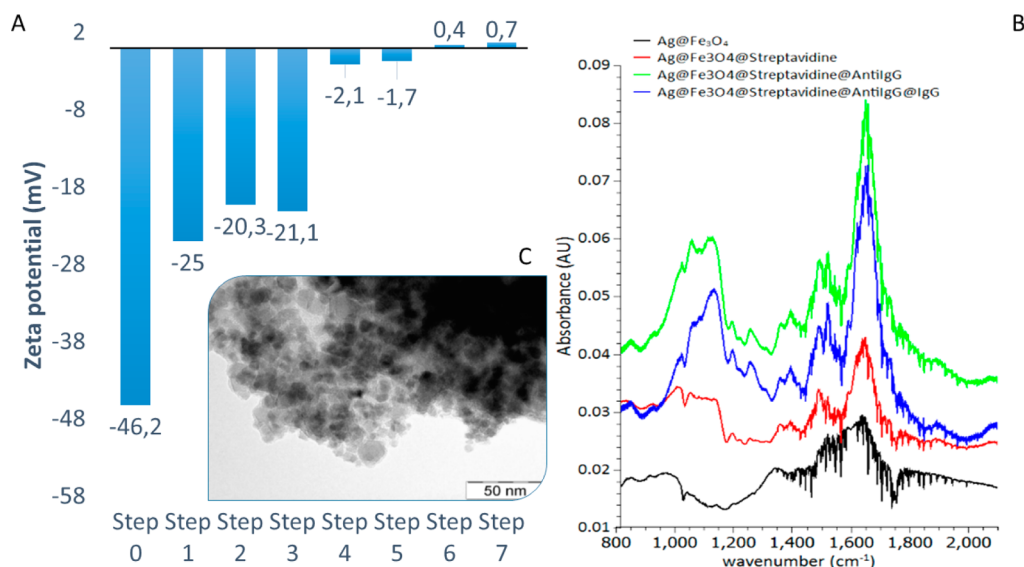


Figure 2. (A) Measured ζ -potentials of the prepared nanocomposite and of the nanocomposites after each step of modification. (B) IR spectra of the bare nanocomposite and modified nanocomposites. (C) TEM image of Fe₃O₄@Ag nanocomposite.

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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@$ streptavidin@anti-IgG without addition of IgG. The spectra obtained are shown in Figure 3. The Raman signal of the

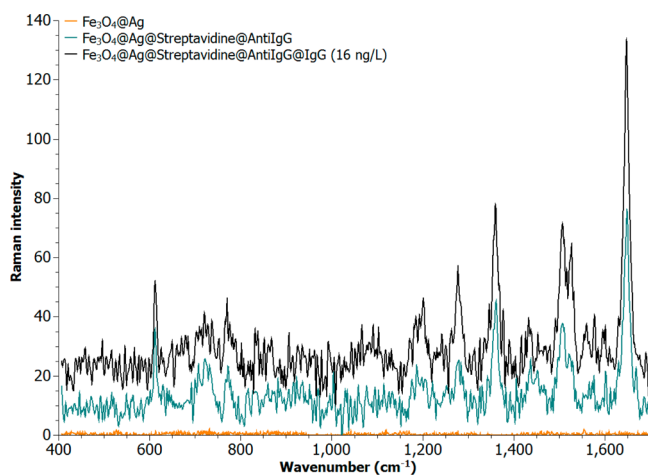


Figure 3. Raman spectra of bare nanocomposite $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, modified nanocomposite obtained by immobilization of streptavidin and anti-IgG ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@$ streptavidin@anti-IgG), and model sample with a concentration of IgG $16\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (labeled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

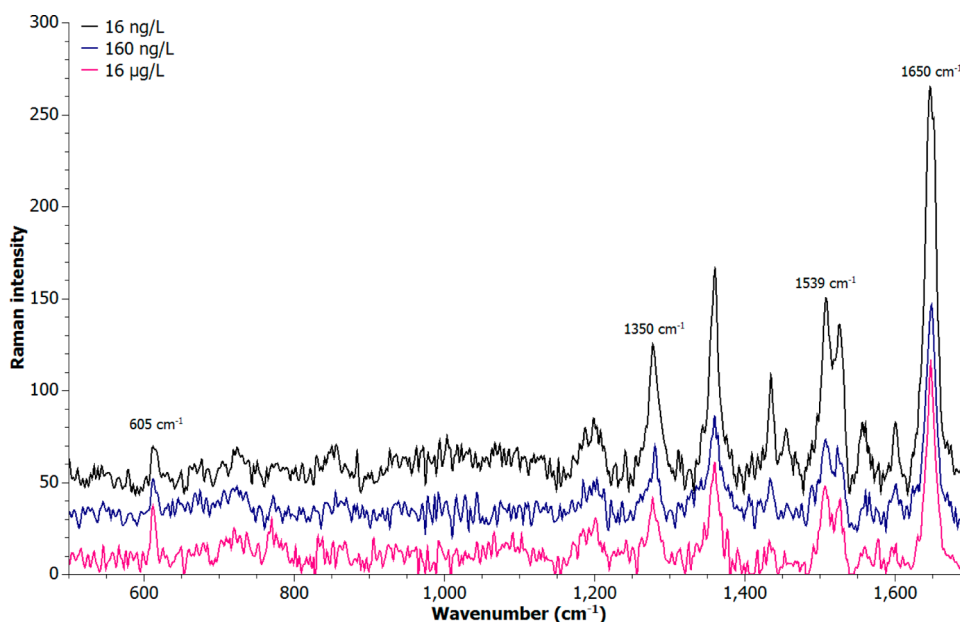


Figure 4. Raman spectra obtained in the presence of model samples containing $16\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $160\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, and $16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IgG.

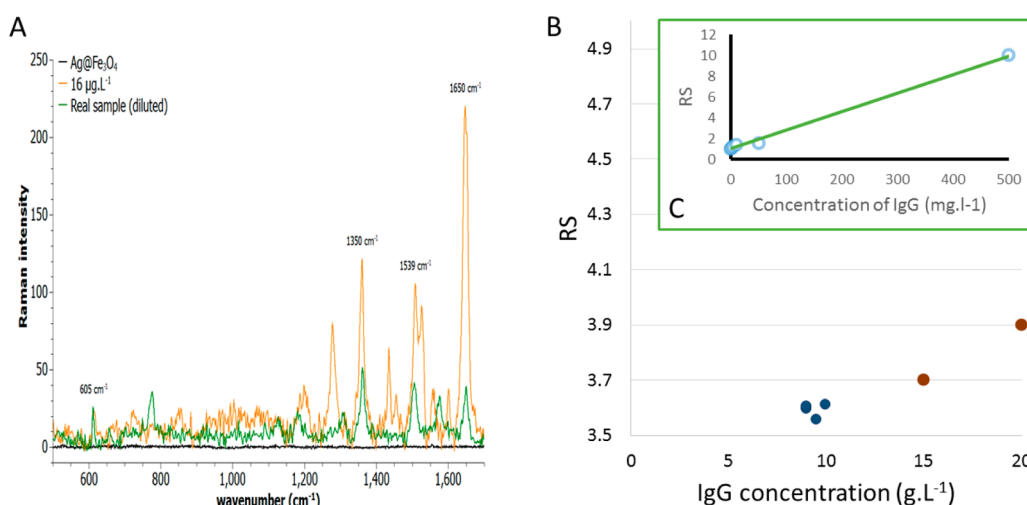


Figure 5. (A) Raman spectrum obtained in the presence of a real sample of whole human blood. For comparison, the Raman spectra of a model sample containing $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IgG and bare nanocomposite are also presented. (B) Concentration determination of analyzed samples. Blue points 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti\text{-IgG}$ composite was used as a reference, as shown in eq 2:

$$RS = \frac{I_{Std_{1539}}/I_{Std_{605}}}{I_{Std_{1650}}/I_{Std_{605}}} \bigg/ \frac{I_{Ref_{1539}}/I_{Ref_{605}}}{I_{Ref_{1650}}/I_{Ref_{605}}} \quad (2)$$

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; $RS = 1$). 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, $RSD = 5\%$. 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

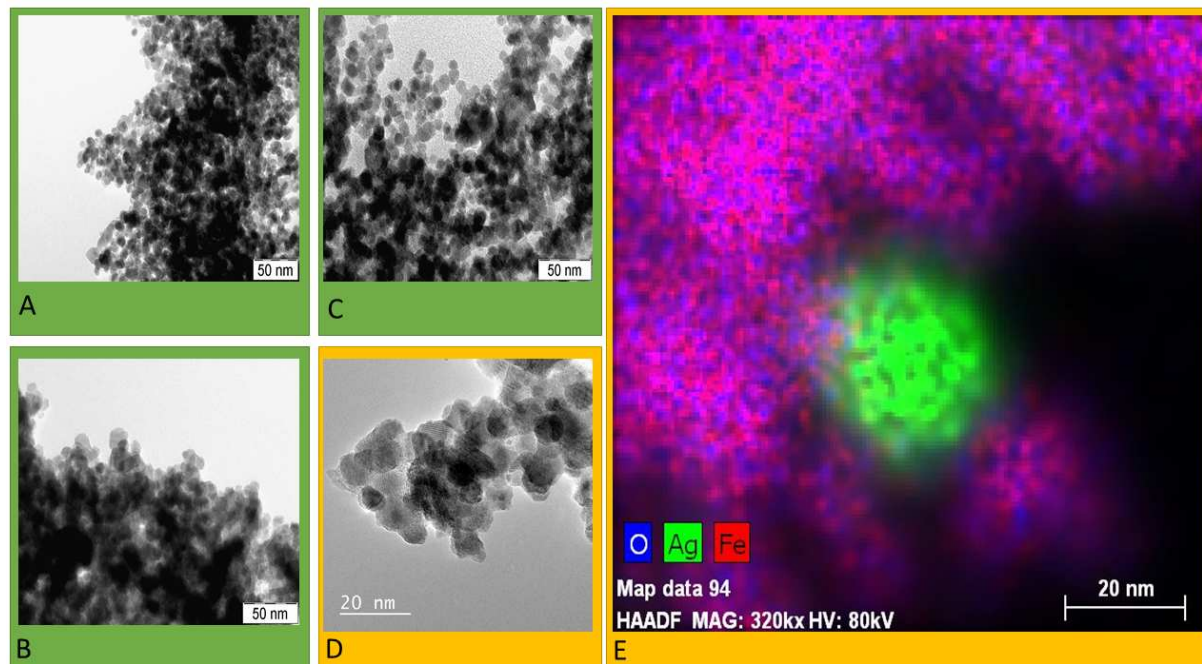


Figure S1. TEM images of as-prepared nanocomposites A) Fe₃O₄@Ag, B) Fe₃O₄@Ag@Streptavidin and C) Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG. D) HRTEM image of the as-prepared nanocomposite labeled as Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG. The present map displayed in frame E covers the distribution of Ag and Fe₃O₄ nanoparticles. 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.

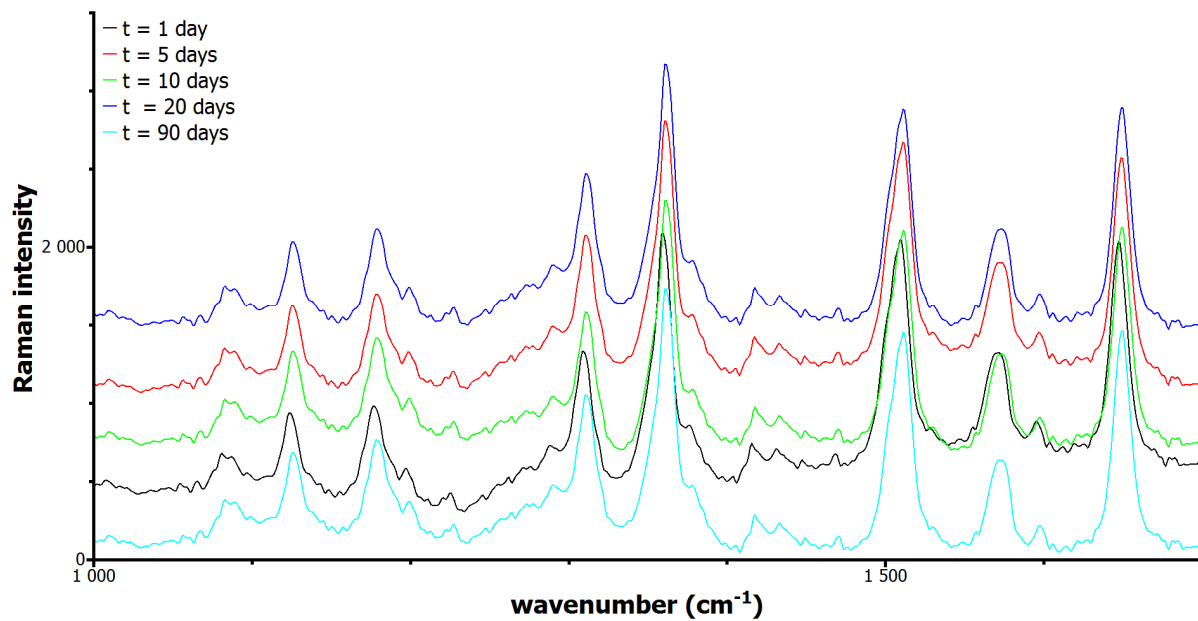


Figure S2. Raman spectra of Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG obtained in various periods of time after the preparation demonstrating the stability of the nanosystem. Each spectrum is shifted by 100 units of Raman intensity in order to increase the transparency of the spectra.

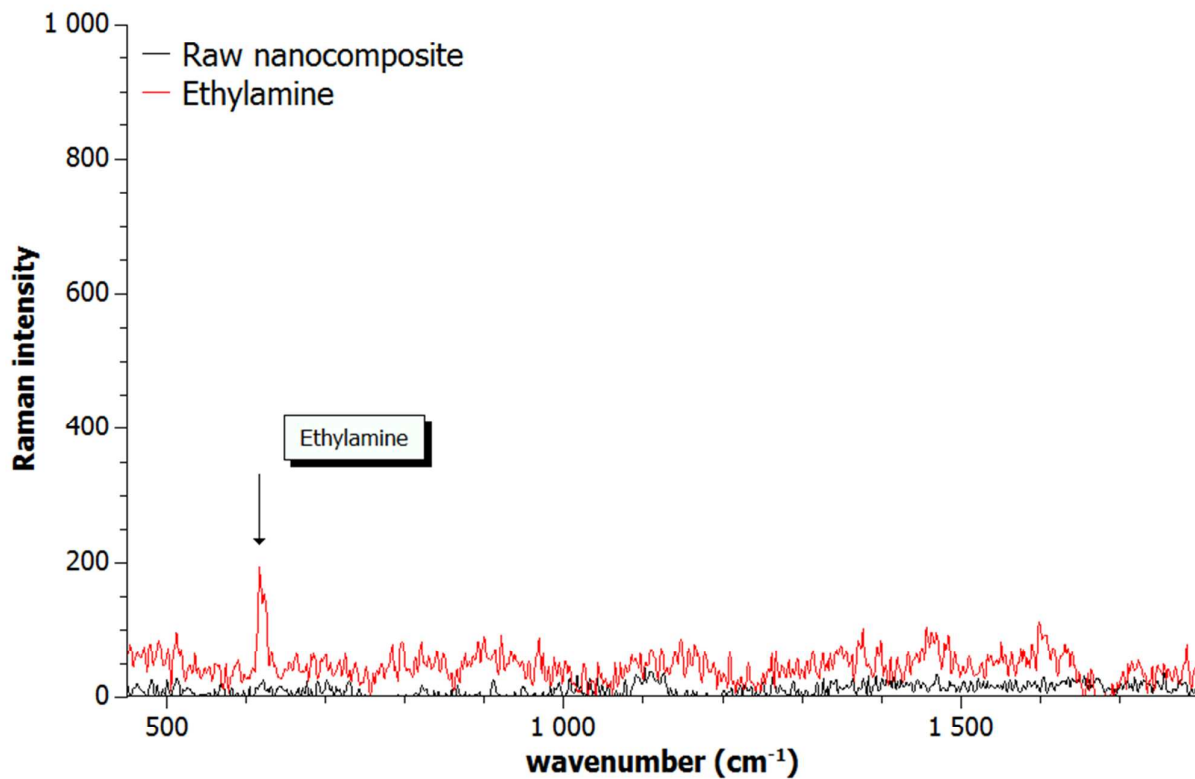


Figure S3. Raman spectra for raw Fe₃O₄@Ag nanocomposite (black spectrum) and Fe₃O₄@Ag nanocomposite with ethylamine ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, red spectrum). Both spectra demonstrate that the spectral band at 605 cm⁻¹ originates from the presence of ethylamine.

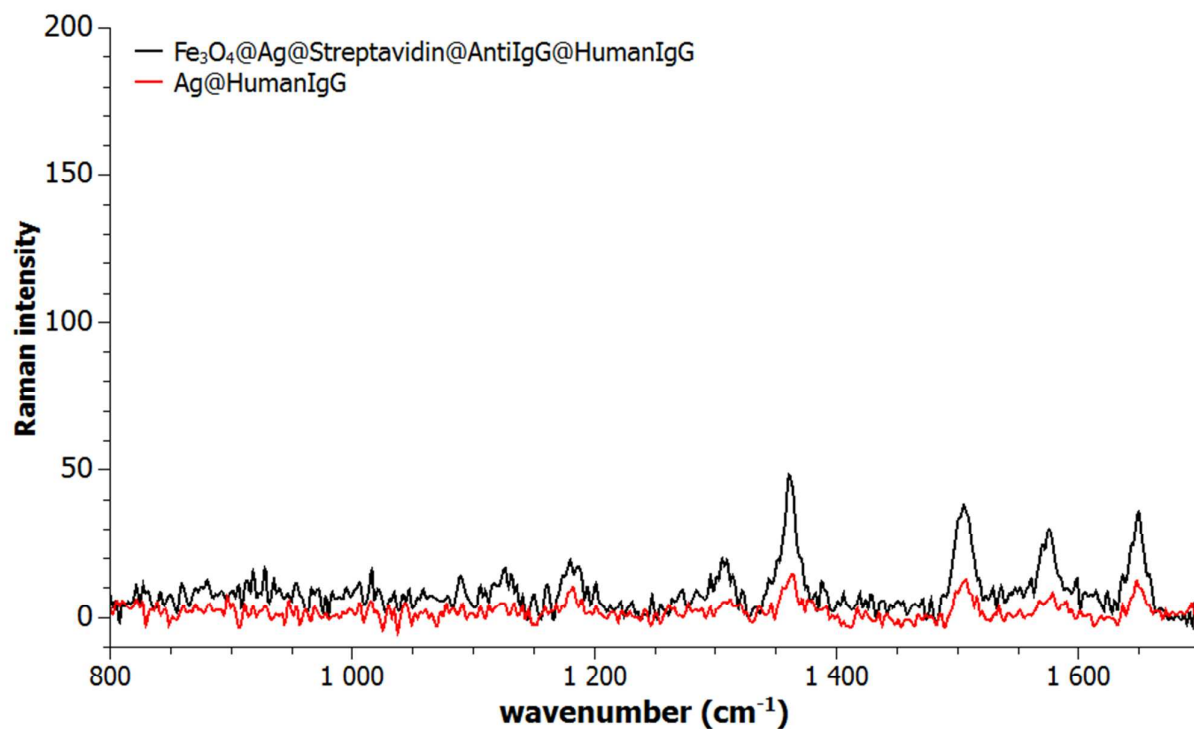


Figure S4. Raman spectra of human IgG measured using unmodified raw Fe₃O₄@Ag nanocomposite (red line), and the Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite (black line). Both spectra indicate that spectral signal of human IgG is the same for Raman analysis using raw material and modified Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG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

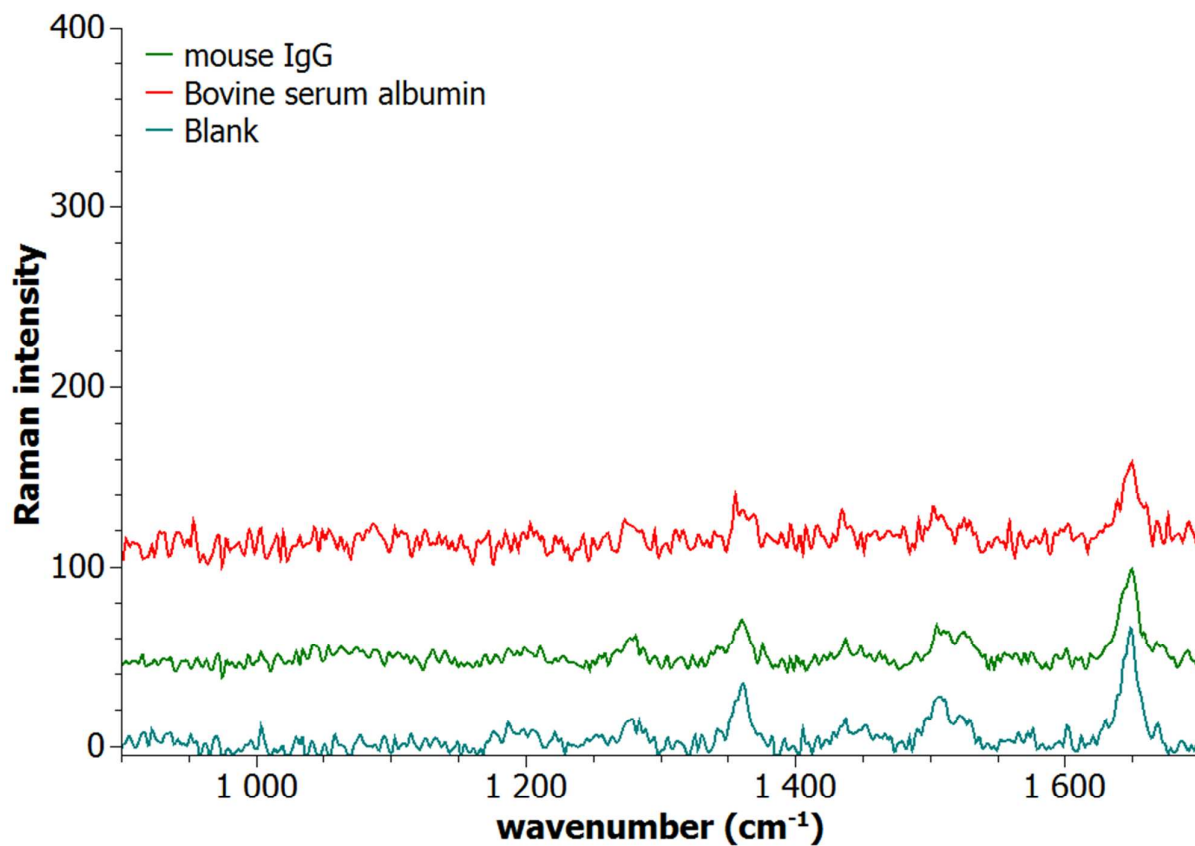


Figure S5. Raman spectra obtained by analysis of blank solution (without addition of human IgG, blue spectrum), mouse IgG (green spectrum) and bovine serum albumin (BSA, red spectrum) using the modified Fe₃O₄@Ag@Streptavidin@AntiIgG nanocomposite. It can be seen that analytical signal is not influenced 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.

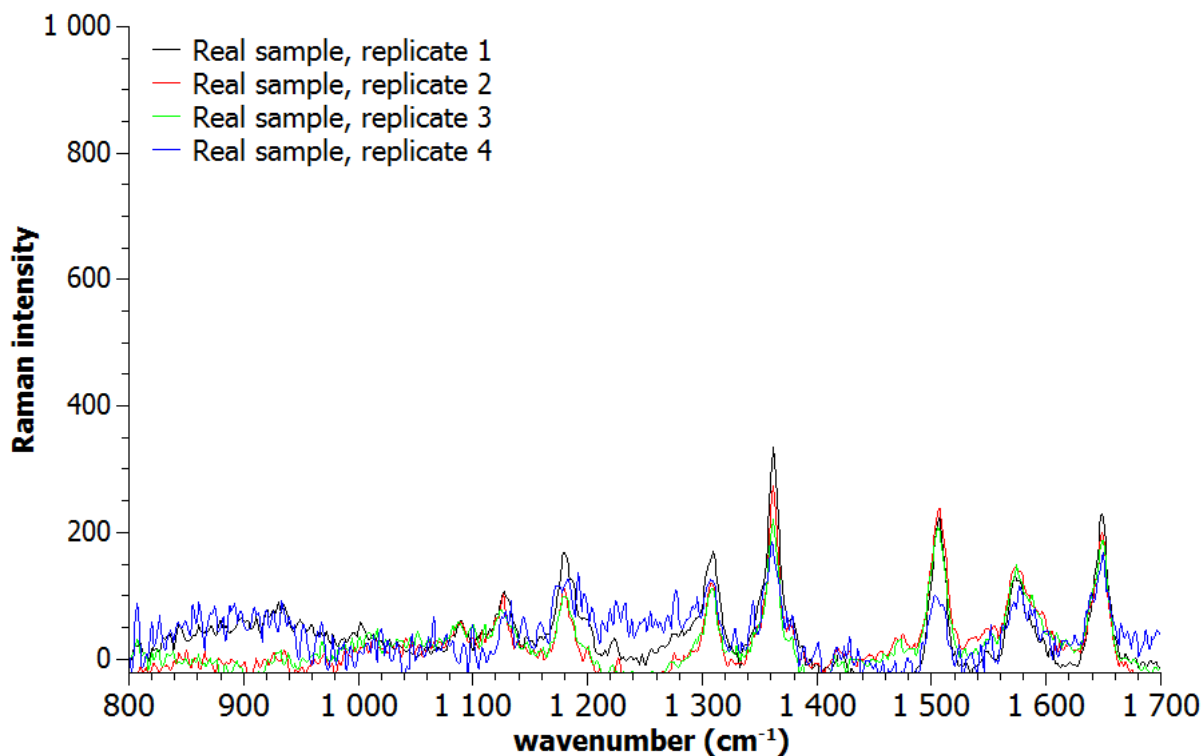


Figure S6. Raman spectra obtained by analysis of real blood samples (four replicates) obtained from the Patient A. The spectra were obtained by the utilization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Streptavidin}@\text{AntiIgG}$ nanocomposite and are labeled Real sample, replicate 1 - 4. Spectral 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 %.

Multiplex competitive analysis of HER2 and EpCAM cancer markers in whole human blood using Fe₂O₃@Ag nanocomposite.

Anna Balzerová, Ariana Opletalová, Václav Ranc*, Radek Zbořil*

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

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

Abstract

Sensitive, reliable, and selective detection of biochemical markers represents a challenging approach towards early diagnosis of cancer diseases. However, the complexity of the targeted physiological environments challenges currently available protocols. Therefore, new, reliable methodologies for detection of cancer markers are highly demanded. Here we describe a new method for parallel analysis of two essential cancer markers, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) and EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). The method is based on a combination of Fe₂O₃@Ag magnetic nanocomposite covalently functionalized with Anti-EpCAM and Anti-HER2, and surface enhanced Raman spectroscopy. The detection of target molecules employs a competitive approach between reference compounds, labeled with Raman active tags, and their naturally accruing counterparts. The limit of detection was determined to 5 ng L⁻¹, where both compounds are statistically distinguishable from a blank sample with $p = 0.0093$ (HER2) and 0.0016 (EpCAM). The developed methodology presents an exciting alternative to more common methods including immunological methods or PCR.

Keywords: multiplex, competitive analysis, cancer markers, SERS, magnetic

1. Introduction

Cancer, a disease caused by an uncontrolled division of abnormal cells, is one of the leading causes of death worldwide. In 2012, an estimated 14.1 million new cases were diagnosed, and 8.2 million people died [1]. Breast cancer, with an occurrence of 1.7 million cases, and with estimated 521,900 deaths, is the most frequent type of cancer among women [1]. These numbers strongly emphasize an urgent demand for novel

methodologies that will be able to provide a reliable screening of tumor markers involved in its early diagnosis [2]. The available screening methods usually target tumor markers found in blood, urine, or saliva [3–5], and include nucleic acids, metabolites, isoenzymes, or hormones. Nonetheless, the most important part of the recognized markers represents proteins overexpressed by cancer cells [6]. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), also known as receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 or HER2/neu, is a member of the human epidermal growth factor receptor family and it is associated with breast, lung, and ovarian cancer [7]. HER2 is overexpressed in 10–25% of cases [8], and it is usually related to extremely aggressive forms [9]. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) belongs to the family of the first discovered tumor-linked biomarkers [10]. It is often linked to a variety of human adenocarcinomas and squamous cell carcinomas or also breast, ovarian, and colon carcinomas [10]. Cancer screening techniques include cytology, histopathology, and immunochemistry [11–14] as well as tissue microarray techniques [15–19] or chips and paper-based electrochemical sensors [20–24]. Among potential candidates, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) has proven to be an interesting alternative. Its potential has been demonstrated in a detection of many physiologically active compounds covering both large proteins and low molecular compounds [25–27], bacteria [28–30], viruses [31,32], neuro-hormones [33], and whole cells [34,35]. Moreover, a newly developed SERS approach, referred to as magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS), further increases the potential of SERS by employing magnetic nanocomposites for highly efficient separation and pre-concentration of target compounds by an external magnetic field [25]. The improved analytical performance of MA-SERS has been shown in cases covering a detection of cancer biomarkers and circulating tumor cells (CTCs) using sandwich-based

approaches [36–38], detection of non-small lung cancer cells with a detection limit (LOD) approximately ten cells per mL [34], detection of CEA with a resulting LOD = 0.1 ng mL⁻¹ [39], or detection of a prostate-specific antigen (PSA) by magnetic immunoassay technique utilizing surface enhanced Raman scattering based micro-droplet sensor with LOD = 0.1 ng mL⁻¹ [40].

Nevertheless, a decision based on the detection of a single cancer-related biomarker does not often deliver suitable true positive or true negative rates. The demand for methods providing a multiplex detection of several biomarkers gives an opportunity to various types of highly advanced biosensors [41].

SERS-based methods for multiplex analyses usually introduce several Raman tags to distinguish the signals from targeted analytes [42]. Granger et al. [43] described a multiplex detection of pancreatic adenocarcinoma markers – serum carbohydrate antigen 19-9 and matrix metalloproteinase-7. The obtained results were subsequently compared to ELISA and eventually a good correlation was found [43]. Raman tags or reporters were also used for a simultaneous multiplex SERS detection of cancer markers, such as cancer antigen (CA) 15-3, CA 27-29, Glypican-3, α -fetoprotein, or cancer embryonic antigen (CEA) [5,44,45]. Maiti et al. [46] developed a biocompatible SERS nanotag with high stability by using sensitive triphenylmethine Raman reporters covalently attached to gold nanoparticles using lipoic acid (LA) as a linker. The prepared SERS nanotags were conjugated to selective antibodies recognizing HER2 and EGFR cancer proteins [46]. The above-mentioned experimental methods and approaches exhibit high selectivity and sensitivity in comparison with commonly used immunological methods like ELISA.

On the other hand, nonspecific interactions of the prepared materials with as complicated matrix as whole human blood cause interferences of signal and

considerably limit such methods in clinical practice. Herein we present a novel magnetic sensor for a competitive multiplexed detection of HER2 and EpCAM biomarkers using SERS approach. The developed sensor employs Fe₂O₃@Ag nanocomposite functionalized by Anti-HER2 and Anti-EpCAM antibodies. The detection is based on a competition between naturally present biomarkers and their tagged (reference) counterparts. This approach allows a simple magnetic separation of the sensor from human whole blood, it minimizes the influence of nonspecific interactions through a competition-based approach and active surface functionalization of the nanocomposite, and it increases the method reliability through a developed statistical evaluation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Silver nitrate (p.a.), D-(+)-Maltose monohydrate (BioXtra, $\geq 99\%$), Ammonium hydroxide solution (ACS reagent, 28.0–30.0% NH₃ basis), carboxy functionalized magnetic particles (18–22 mg mL⁻¹), 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC), N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt ($\geq 98\%$ (HPLC); NHS), Sodium chloride (BioXtra, $\geq 99.5\%$ (AT)), Anti-HER2 antibody produced in rabbit, Anti-EPCAM antibody produced in rabbit, ethylamine (purum, 70% in H₂O), Cy[®]3 mAb Kit, Cy[®]5 mAb Kit were purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used without further purification. Human HER2 / ErbB2 Protein (Fc Tag) was purchased from Sino Biological Inc. (China), recombinant Human EpCAM protein was purchased from Abcam (United Kingdom), H₃PO₄ (p.a., 85% w/w) and NaOH (p.a.) was bought from Lach-Ner (Czech Republic).

2.2. Functionalization of magnetic particles with antibodies (Fig. 1)

Magnetic particles with carboxylic groups were activated using EDC/NHS mixture (1:1, final concentration 10 mM) and the reaction was stirred for 30 minutes; the particles were then magnetically separated and washed with 5 mL of PBS buffer. In the next step, the particles with the previously activated carboxylic groups were mixed with antibodies ($c = 10 \text{ mg L}^{-1}$) and stirred overnight to form a covalent bond between free amino ($-\text{NH}_2$) groups present in the structure of the antibodies and the activated carboxylic groups of the magnetic particles. After the immobilization of antibodies, the magnetic particles were separated by a magnet and washed with 10 mM PBS buffer. After washing with PBS buffer, the ethylamine with final concentration 3.5% wt. was added to block the rest of the active carboxylic groups to prevent any nonspecific interactions. In a final step, the functionalized nanoparticles were washed three times with PBS buffer.

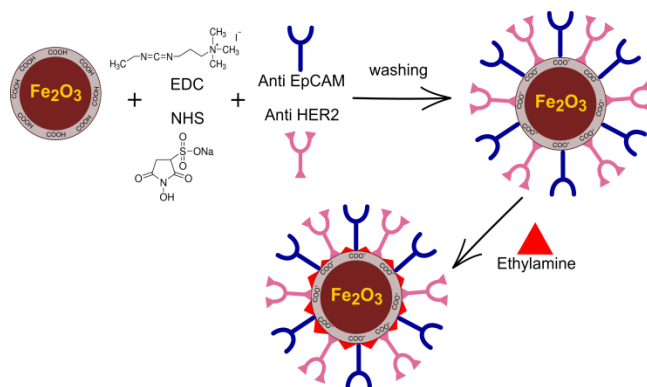


Fig. 1. Schema of sensor preparation (functionalization of MNPs with antibodies Anti-HER2 and Anti-EpCAM).

2.3. Labeling of proteins

Proteins (HER2, EpCAM) were labeled using a labeling kit containing reactive fluorescent dye Cy3 or Cy5 tags, coupling buffer (1 M sodium carbonate buffer, pH

9.3), and PBS buffer. HER2 protein was labeled with Cy3 tag (HER2_Cy3) in ratio 1:10 and EpCAM protein with Cy5 tag (EpCAM_Cy5) in the same ratio as HER2 according to the recommended procedure. The labeled proteins were purified using centrifugal filter units (Amicon Ultra 0.5 mL, MWCO 3 kDa) at 10000 rpm for 10 minutes to separate excessive free compound. The concentration of the proteins after labeling with Cy3 and Cy5 was measured using a colorimetric method with Coomassie Brilliant Blue G-250 agent (Bradford assay) at 595 nm. According to the measured data, the concentration of the markers after labeling was the following: HER 0.009 mg mL⁻¹ and EpCAM 0.01 mg mL⁻¹. The labeled marker HER2 (HER2_Cy3) was analyzed using HPLC-UV system to find out the yield of the labeling process. From the chromatogram, it was found that 70% of markers were successfully labeled (Fig. S1) and the sample did not contain a free Cy3 tag. The same yield of the labeling process was expected for EpCAM_Cy5. The optimal concentration for competitive analysis was set up experimentally as a breakpoint in a graph of the intensity–concentration dependence of the 1450 cm⁻¹ spectral band of the labeled markers (Fig. S2). Two linear fits were used for the calculation and the breakpoint was determined at the concentration 10 ng L⁻¹.

2.4. Apparatus

The ζ potential was measured using a Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). High-resolution transmission electron microscope (HR-TEM FEI Titan G2 60–300) with an X-FEG type emission gun, operating at 80 kV, was used to obtain the images of the final products. This microscope is equipped with Cs image corrector and a STEM high-angle annular dark field detector (HAADF). The point resolution is 0.08 nm in the TEM mode. The elemental mapping was obtained by STEM-energy dispersive X-ray

spectroscopy (EDS; Bruker SuperX) with acquisition time 20 min. X-ray powder diffraction pattern was recorded on PANalytical X'Pert PRO diffractometer in Bragg–Brentano geometry, equipped with an iron-filtered CoK α radiation source, X'Celerator detector, programmable divergence, and diffracted beam anti-scatter slits. 200 μ L of liquid sample was dropped on a zero-background Si slide, dried under vacuum at RT, and scanned in the two θ range from 10° to 105° under ambient conditions. Samples of protein standard and Cy3-labeled protein were analyzed using HPLC-UV system (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific, U.S.A.). The samples were separated on a C18 column (Nucleodur C18 Gravity, 150 \times 2 mm, 1.8 μ m particles). The separation was performed under isocratic conditions with composition of mobile phase: water : acetonitrile : TFA (0.95 : 0.049 : 0.001; v/v/v). The separated peaks were detected using UV detector operating at 274 nm. Raman spectra were collected using a DXR Raman spectroscopy (Thermo Scientific, U.S.A.) equipped with a laser operating at a wavelength of 633 nm. The laser power on the sample was set to 5 mW. Each measured Raman spectrum was an average of 4 experimental micro scans. The acquisition time was set to 3 s. SERS experiments employing silver nanoparticles were performed according to the procedure previously described by Fargašová et al. [47]. Briefly, 1 μ L of the sample was mixed with 7 μ L of the prepared silver nanoparticles (108 mg L⁻¹, 30 nm) and then 2 μ L of sodium chloride (c = 4 mol L⁻¹) was added to the mixture, mixed thoroughly and analyzed using SERS. 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, U.S.A.), highs of the target spectral bands were statistically assessed using LibreOffice (version 4.3.0, The Document Foundation, Berlin,

Germany). Discriminant analysis was performed using TQ Analyst. It revealed significant differences between blank samples and model samples according to the intensity ratios of the selected spectral bands (660 cm^{-1} , 475 cm^{-1} , and 373 cm^{-1}).

2.5. Sample preparation

The blank sample composed of the phosphate-buffered saline ($c = 10\text{ mM}$, $\text{pH} = 7.5$). The model samples contained a HER2 and EpCAM biomarkers at concentration levels 5, 10, and 25 ng L^{-1} dissolved in the phosphate-buffered saline ($c = 10\text{ mM}$, $\text{pH} = 7.5$). The human whole blood samples (20 samples from 2 volunteers, $V = 1\text{ mL}$) were collected with the volunteer's permission for blood collection and subsequent experiments. Whole human blood was diluted 100 times with phosphate-buffered saline ($c = 10\text{ mM}$, $\text{pH} = 7.5$), and spiked with HER2 and EpCAM biomarkers at final concentrations 5 and 10 ng L^{-1} .

2.6. Sample analysis

The samples were analyzed using a procedure described in Fig. 2. First, $2\text{ }\mu\text{L}$ of the sample (blank, model, human whole blood) was mixed with $10\text{ }\mu\text{L}$ of the prepared MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM sensor. After the sample was shaken for one hour, the sensor was magnetically separated, washed with phosphate-buffered saline (10 mM , $\text{pH} 7.5$), and dispensed in $10\text{ }\mu\text{L}$ PBS. Consecutively, $2\text{ }\mu\text{L}$ of tagged HER2_Cy3 and EpCAM_Cy5 (final concentration 10 ng L^{-1}) was added and the mixture was vortexed. After 1 hour, the sample was magnetically separated from an excess of the tagged markers and washed with deionized water ($20\text{ }\mu\text{L}$) two times. Finally, the sample was analyzed using SERS according to a previously described procedure.

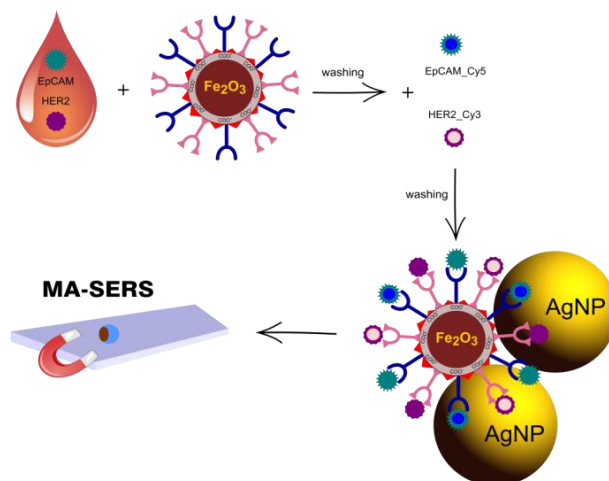


Fig. 2. Schema of competitive multiplex analysis of two different tumor markers in human whole blood.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of magnetic nanoparticles and MNPs@Ag hybrid system

The chemical structure of the initial magnetic nanoparticles (Fig. 3A) and Fe_2O_3 @Ag nanocomposite (Fig. S3.) was investigated using X-ray powder diffraction (XRD). Maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) was identified as the only crystalline phase in the sample (Fig. 3A). Crystallite size derived from Rietveld refinement is 13 nm. HRTEM images accompanied by an elemental map with the distribution of Ag and MNPs are depicted in Fig. 3B. The brighter, smaller objects were identified as Fe_2O_3 particles having a size in the range of 10–15 nm, in a good correspondence with XRD data. Larger objects on the image belong to the activated silver nanoparticles exhibiting an average size about 30 nm. This interpretation is further supported by an elemental map as depicted in the right corner of Fig. 3B. The smaller yellow parts of the image represent iron oxide particles, whereas the blue spots correspond to silver nanoparticles. Infrared spectroscopy and ζ -potential measurements were used to monitor changes in the surface characteristics of the functionalized MNPs during the surface functionalization

process. The measured ζ -potential of unmodified initial magnetic nanoparticles was -22.3 mV. The strong negative charge of MNPs was caused by carboxylic groups present on the surface of the magnetic nanoparticles. The activation of the carboxylic groups with an aqueous solution of EDC and NHS was accompanied by a considerable change of firstly negative charge to positive values of $+7$ mV ($\Delta\zeta$ -potential = 29.3 mV). The final step related to immobilization of Anti-HER2 and Anti-EpCAM antibodies onto the MNPs surface. Consecutive anchoring of proteins changed the charge to more positive values of $+9$ mV for Anti-HER2 and $+8$ mV in the case of Anti-EpCAM. The successful immobilization of both antibodies was further confirmed by measured IR spectra, shown in Fig. 3C. The spectrum contains bands located at 3430 cm^{-1} interpreted as a stretching vibration of O–H, and band at 1726 cm^{-1} , interpreted as a C=O vibration of the carboxyl groups presented on the surface of magnetic particles [48,49]. The presence of the anchored proteins is supported by the presence of two strong protein bands of Amide I ($-\text{CO}-\text{NH}$) and Amide II ($-\text{CO}-\text{NH}-$) localized at 1570 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} [50,51]. The spectral band at 1385 cm^{-1} represents COO stretching, and it is caused by the presence of the remaining unmodified carboxylic groups on the Fe_2O_3 surface [52].

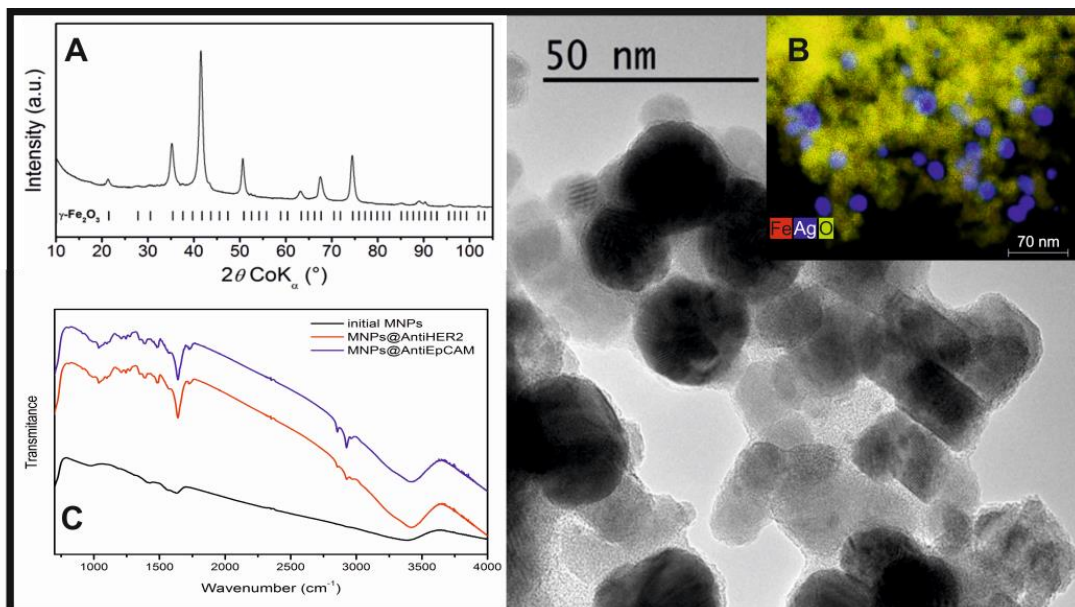


Fig. 3. (A) XRD spectrum of pristine MNPs, (B) HRTEM image of MNPs@Ag hybrid system including HAADF/EDS elemental mapping in the inset (scale bar 70 nm), (C) IR spectra of the initial MNPs and functionalized MNPs.

3.2. Raman characterization of the sensor

The sensor MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM was designed for the competitive multiplex analysis of two different tumor markers, HER2 and EpCAM, in whole human blood by a competitive approach with tagged standards of HER2, HER2_Cy3 and EpCAM, EpCAM_Cy5. Firstly, Raman spectra of functionalized MNPs were obtained to confirm the successful immobilization of antibodies HER2 (orange trace) and EpCAM (green trace) onto the MNPs surface, as shown in Fig. S4. The spectra contain characteristic protein bands Amid III (1240 cm^{-1}) and Amide II (1554 cm^{-1}) representing successful anchoring of the proteins [50,51,53–55]. Secondly, labeling of reference compounds was evaluated. SERS spectra of the stock solutions of tags (Cy3, Cy5) and labeled markers were measured and are shown in Fig. S5. Raman spectra of the sensor and pure compounds, including Cy3, Cy5, HER2, and EpCAM were compared to confirm successful labeling of the proteins HER2 and EpCAM using respective Raman tags in the presence of spectral bands located at 373 cm^{-1} (Cy3) and 475 cm^{-1} (Cy5). Furthermore, to considerably improve the method reliability, a reference band located at 660 cm^{-1} , characteristic for tyrosine, was selected and used in the consecutive analytical steps. Raman spectra obtained by the analysis of tagged tumor markers HER2_Cy3 and EpCAM_Cy5 are shown in Fig. 4. The red trace represents a Raman spectrum obtained by the analysis of HER2 using MNPs@Anti-HER2 sensor. The spectrum contains abundant spectral bands characteristic for Cy3 and reference band located at 660 cm^{-1} . The blue trace represents a Raman spectrum

obtained by the analysis of EpCAM antigen using MNPs@Anti-EpCAM sensor, and contains strong spectral characteristic for Cy5 and reference band at 660 cm^{-1} . The orange trace shows a Raman spectrum obtained by the multiplex analysis of both proteins using MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM sensor. The spectrum contains spectral bands of both tags, namely Cy3 at 373 cm^{-1} and Cy5 at 475 cm^{-1} .

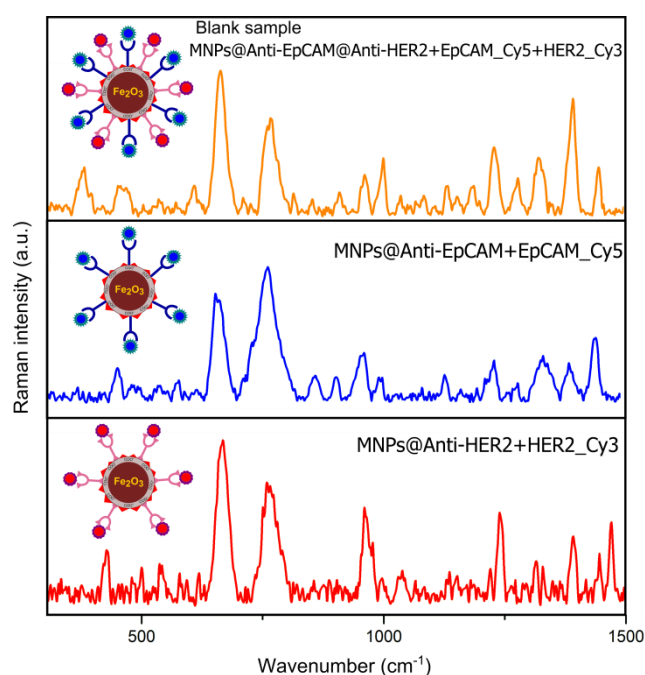


Fig. 4. Raman spectra of functionalized MNPs with Anti-HER2 after addition of labeled tumor marker HER2 (HER2_Cy3), Raman spectra of functionalized MNPs with Anti-EpCAM after addition of labeled tumor marker EpCAM (EpCAM_Cy5), multiplex Raman analysis with the sensor (MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM) after addition of labeled tumor markers HER2 (HER2_Cy3) and EpCAM (EpCAM_Cy5).

3.3. Multiplex analysis with model samples

The multiplex analysis was based on a competition between unlabeled tumor markers HER2 and EpCAM; and labeled tumor markers HER2_Cy3 and EpCAM_Cy5. To test the sensor functionality, the spectra of the blank samples and the model samples were

evaluated and used for further calculation. The analysis was done using 10 blank samples and 10 model samples. Each sample was measured five times. The average intensity of Cy3, Cy5, and reference spectral bands, obtained for five independent measurements, was used for the calculation of the overall intensity ratio as

$$R_{Tag} = \frac{I_{Tag}}{I_{ref}}, \quad (1)$$

where I_{Tag} represents a spectral intensity of the respective Raman tag (Cy3 or Cy5), and I_{ref} represents a spectral intensity of the reference band present at 660 cm^{-1} . The ratios were calculated for blank samples (PBS buffer, $c = 10 \text{ nM}$, $\text{pH} = 7$), and model samples containing natural HER2 and EpCAM compounds in ratios 1:1 and 1:2 (c/c, tagged:natural). The competition between the tagged and the natural antigens will be projected in the lowered intensity of spectral bands characteristic for the tags. This hypothesis was confirmed in the present Raman spectra of the blank sample and the model sample containing 10 ng L^{-1} HER2 and EpCAM (Fig. S6). The decrease in signal intensities was determined for each tag separately. The intensity ratio (I_{Tag}/I_{ref}) changed from 0.15 (Cy3) and 0.12 (Cy5) in the blank samples that contained only labeled markers to 0.08 (Cy3) and 0.03 (Cy5) in the model samples that contained also unlabeled markers. Such changes refer to a successful interaction between sensor and natural HER2 and EpCAM compounds and occupation of binding sites by natural markers prior to labeled markers.

3.4. Statistical evaluation of method

The method potential was further evaluated by a discriminant analysis, where spectral bands of the reference (tyrosine), Cy3 and Cy5 (660 cm^{-1} , 475 cm^{-1} , and 373 cm^{-1}) were included. Fig. 5 demonstrates the presence of significant differences between

Raman spectra of blank samples (square mark) and model sample (triangle mark). The differences were caused by a decrease in intensity due to the competition between the unlabeled markers and the labeled markers as described above. The calculated average Mahalanobis distance between clusters was the following: 1.9 for HER2, 2.0 for EpCAM, and 2.1 for the multiplex sample.

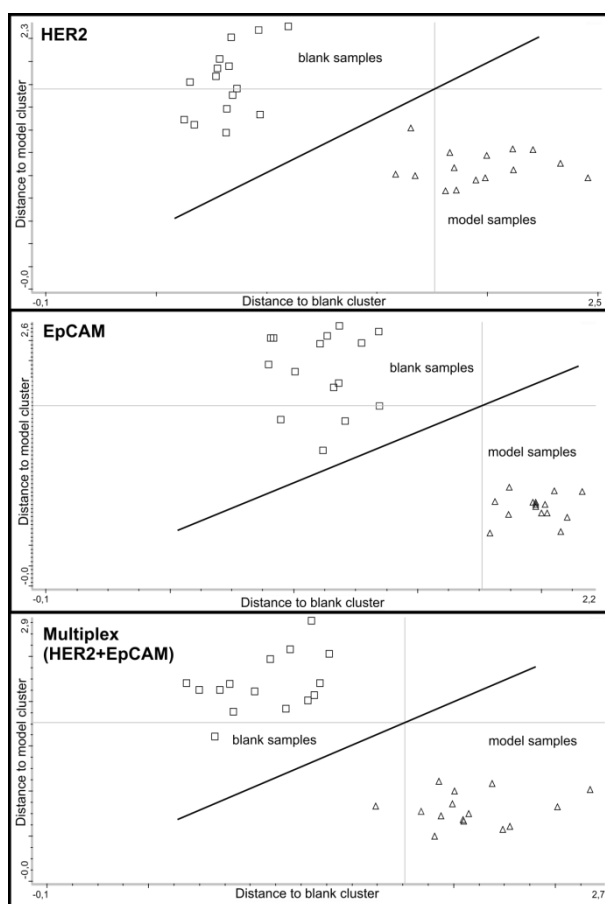


Fig. 5. Discriminant analysis of MNPs with single markers HER2, EpCAM, and sensor (MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM) for multiplex analysis.

3.5. Stability and reproducibility

Signal and sensor stability was evaluated to test the method's reliability. The signal stability was tested with a blank sample to obtain Raman spectra during the time interval from 2 minutes to 12 minutes after the preparation. Fig. S7 shows that all the

spectra contain the same spectral bands, although their absolute intensities decrease inappreciably over time. Also, the reproducibility of the system was tested. Raman spectra of six different drops of the sensor with the labeled markers are presented in Fig. S8. In both cases, the spectra are very similar without any considerable changes and it can be thus stated that the method produces repeatable results. The spectra were supported by calculating the relative standard deviation separately for each tag. The calculated RSD values, defined as an I373/I660 ratio or I475/I660 ratio were 5.6% and 2.2%, respectively. The limit of detection was determined according the $3s/m$ criteria where 's' is the standard deviation of the low concentration of the analyte and 'm' is the slope of the calibration graph (Fig.S9). Calculated value of LOD was 4.9 ng L. Long-term stability was evaluated on the blank sample. Resulting spectra are presented in Fig. S10. Ten days after preparation, the activity of system was 81%. After 40 days, intensity of the band at 660 cm^{-1} was 57% lower due to sensor degradation however it can be clearly seen that the spectrum of the 40-day-old sample contains the same spectral bands as the sample measured immediately after the preparation so the system is still fully operational.

3.6. Multiplex analysis of human whole blood samples

The application potential of the proposed method was further tested with the aim of using it for the competitive multiplex analysis of human whole blood samples (details are given in Materials and methods section). Ten samples from two volunteers were collected and analyzed five times to perform a statistical evaluation. The process of the sensor synthesis was tuned to minimize nonspecific interactions of the functionalized MNPs with non-targeted compounds present in the complex matrix of human blood by addition of ethylamine in the last step of sensor preparation and careful multiple washing with deionized water. However, new spectral bands located at 560 cm^{-1} and

1242 cm^{-1} in the spectrum of the blood sample indicate minor nonspecific interactions, nonetheless, their interference is minimized by a described post-processing procedure and they do not influence the detection. A SERS spectrum for the whole blood is presented in Fig. 6, showing that all the bands previously attributed to the model and blank samples a) demonstrate an absence of interfering nonspecific interactions and b) show a change in absolute intensities of the evaluated spectral bands with respect to a changing concentration of target compounds HER2 and EpCAM. The additional statistical evaluation was performed by a Student's *t*-test for paired group. Student's *t*-tests were performed to determine the significance of differences of average intensity ratios for Cy3 and Cy5 (as described earlier) between blank and whole blood samples. Calculated *p* values were 0.0093 for HER2 and 0.0016 for EpCAM. Such results show a statistically significant difference between the samples. The results of the *t*-test for competitive multiplex analysis are in Table S1.

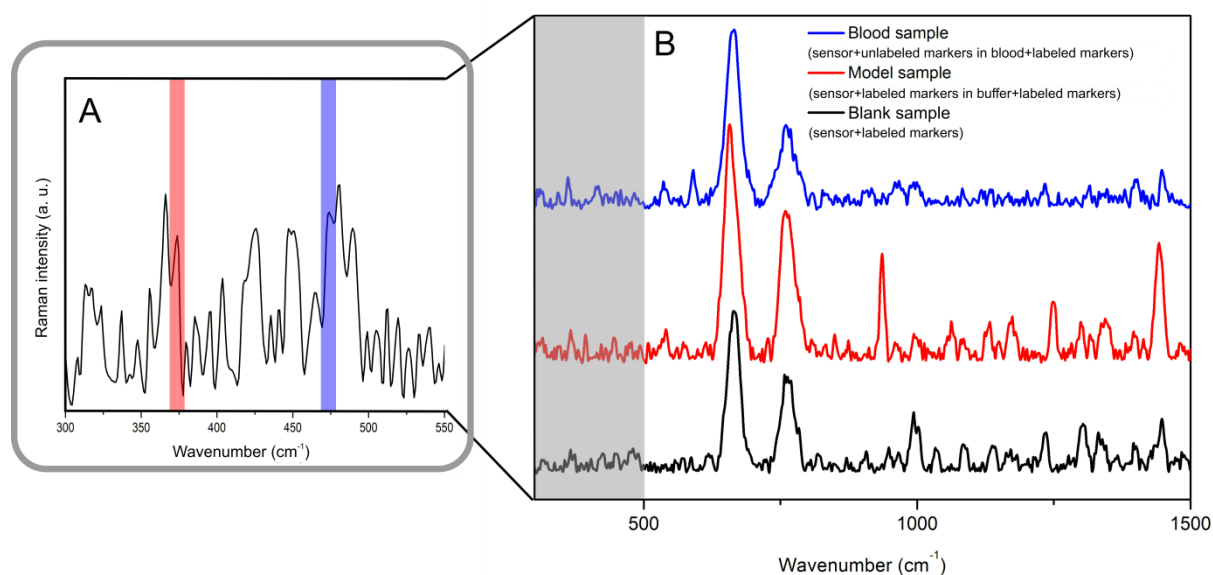


Fig. 6. (A) Detail of spectral region from 300 to 550 cm^{-1} originated from the marked area in (B), (B) Raman spectra of multiplex analysis using sensor with only labeled tumor markers HER2 (HER2_Cy3) and EpCAM (EpCAM_Cy5) (black line), Raman

spectra of multiplex analysis using sensor with unlabeled tumor markers in a buffer solution and labeled tumor markers (model sample; red line), Raman spectra of competitive multiplex analysis of human whole blood containing tumor markers using sensor and labeled tumor markers (blue line). The shift between spectra is 200 units of Raman intensity to make the figure more transparent.

4. Conclusions

Current screening methods for the detection of cancer markers in clinical samples are mostly based on the fluorescence analysis. Such methods can detect targets at low concentration levels but the high risk of auto-fluorescence and photobleaching makes these methods difficult to apply to all samples. Here we report a magnetic biosensor for the multiplex detection of tumor markers in the whole human blood. The designed sensor enables simultaneous detection of two different tumor markers in one step using surface enhanced Raman spectroscopy. Moreover, the magnetic properties allow a simple manipulation. The analysis is based on the competition between unlabeled (HER2, EpCAM) and tagged biomarkers (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5) to minimize the influence of nonspecific interactions. Both biomarkers compete for the active sites on respective antibodies, anchored on a surface of the prepared sensor. The benefit of such an approach lies mainly in the possible substitution of Anti-HER2 and Anti-EpCAM for other antibodies as well as for other small molecular targets using specific compounds that can be employed in the analysis. An interesting alternative would be the application of the designed sensor for the screening of circulating tumor cells (CTCs) in blood, which is essential for early detection of cancer and tracing metastasis in real time.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ondřej Tomanec and Klára Čépe for providing HRTEM and EDX and also Josef Kašlík for XRD data. The authors gratefully acknowledge support from project NPU LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

References

- [1] L.A. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward, A. Jemal, Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update, *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 25 (2016) 16–27.
- [2] S. Feng, S. Huang, D. Lin, G. Chen, Y. Xu, Y. Li, Z. Huang, J. Pan, R. Chen, H. Zeng, Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 537–547.
- [3] R. Nagler, G. Bahar, T. Shpitzer, R. Feinmesser, Concomitant analysis of salivary tumor markers—a new diagnostic tool for oral cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 3979–3984.
- [4] N. Kosaka, H. Iguchi, T. Ochiya, Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Sci.* 101 (2010) 2087–2092.
- [5] M. Li, J.W. Kang, S. Sukumar, R.R. Dasari, I. Barman, Multiplexed detection of serological cancer markers with plasmon-enhanced Raman spectro-immunoassay, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3906–3914.
- [6] S. Sharma, Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines, *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* 30 (2009) 1–8.
- [7] J. Yang, Z. Wang, S. Zong, C. Song, R. Zhang, Y. Cui, Distinguishing breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1093–1100.

- [8] P. Chandra, P. Suman, M. Mukherjee, P. Kumar, HER2 protein biomarker based sensor systems for breast cancer diagnosis, *J. Mol. Biomarkers Diagn.* 5 (2013) 1000e119.
- [9] J.T. Gohring, P.S. Dale, X. Fan, Detection of HER2 breast cancer biomarker using the opto-fluidic ring resonator biosensor, *Sens. Actuators, B*, 146 (2010) 226–230.
- [10] P.A. Baeuerle, O. Gires, EpCAM (CD326) finding its role in cancer, *Br. J. Cancer* 96 (2007) 417–423.
- [11] V.S.P.K.S.A. Jayanthi, A.B. Das, U. Saxena, Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 15–23.
- [12] D. Sidransky, Nucleic acid-based methods for the detection of cancer, *Science* 278 (1997) 1054–1058.
- [13] E. Heyderman, Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls, *J. Clin. Pathol.* 32 (1979) 971–978.
- [14] H. Yaziji, L.C. Goldstein, T.S. Barry, R. Werling, H. Hwang, G.K. Ellis, J.R. Gralow, R.B. Livingston, A.M. Gown, HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods, *JAMA* 291 (2004) 1972–1977.
- [15] G. Mor, I. Visintin, Y. Lai, H. Zhao, P. Schwartz, T. Rutherford, L. Yue, P. Bray-Ward, D.C. Ward, Serum protein markers for early detection of ovarian cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 7677–7682.
- [16] R.L. Camp, L.A. Charette, D.L. Rimm, Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma, *Lab. Invest.* 80 (2000) 1943–1949.
- [17] L. Bubendorf, A. Nocito, H. Moch, G. Sauter, Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies, *J. Pathol.* 195 (2001) 72–79.

- [18] M.J. Lodes, M. Caraballo, D. Suci, S. Munro, A. Kumar, B. Anderson, Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray, *PLoS One* 4 (2009) e6229.
- [19] S. Sassen, E.A. Miska, C. Caldas, MicroRNA—implications for cancer, *Virchows Arch.* 452 (2008) 1–10.
- [20] B. Mostert, S. Sleijfer, J.A. Foekens, J.W. Gratama, Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 463–474.
- [21] J. Zhou, Y. Zheng, J. Liu, X. Bing, J. Hua, H. Zhang, A paper-based detection method of cancer cells using the photo-thermal effect of nanocomposite, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117 (2016) 333–337.
- [22] C. Gao, M. Su, Y. Wang, S. Ge, J. Yu, A disposable paper-based electrochemiluminescence device for ultrasensitive monitoring of CEA based on $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ @Au nanocages, *RSC Adv.* 5 (2015) 28324–28331.
- [23] N. Radha Shanmugam, S. Muthukumar, S. Chaudhry, J. Anguiano, S. Prasad, Ultrasensitive nanostructure sensor arrays on flexible substrates for multiplexed and simultaneous electrochemical detection of a panel of cardiac biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 764–772.
- [24] J.S. Ross, E.A. Slodkowska, W.F. Symmans, L. Pusztai, P.M. Ravdin, G.N. Hortobagyi, The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted Anti-HER-2 therapy and personalized medicine, *Oncologist* 14 (2009) 320–368.
- [25] 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 Fe_3O_4 @Ag nanocomposite, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11107–11114.

- [26] B.-H. Jun, M.S. Noh, G. Kim, H. Kang, J.-H. Kim, W.-J. Chung, M.-S. Kim, Y.-K. Kim, M.-H. Cho, D.H. Jeong, Y.-S. Lee, Protein separation and identification using magnetic beads encoded with surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Biochem.* 391 (2009) 24–30.
- [27] L. Chen, W. Hong, Z. Guo, Y. Sa, X. Wang, Y.M. Jung, B. Zhao, Magnetic assistance highly sensitive protein assay based on surface-enhanced resonance Raman scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 368 (2012) 282–286.
- [28] C. Wang, J. Wang, M. Li, X. Qu, K. Zhang, Z. Rong, R. Xiao, S. Wang, A rapid SERS method for label-free bacteria detection using polyethylenimine-modified Au-coated magnetic microspheres and Au@Ag nanoparticles, *Analyst* 141 (2016) 6226–6238.
- [29] J. Wang, X. Wu, C. Wang, Z. Rong, H. Ding, H. Li, S. Li, N. Shao, P. Dong, R. Xiao, S. Wang, Facile synthesis of Au-coated magnetic nanoparticles and their application in bacteria detection via a SERS method, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 19958–19967.
- [30] 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.
- [31] J. Baniukevic, I. Hakki Boyaci, A. Goktug Bozkurt, U. Tamer, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 281–288.

- [32] Y. Sun, L. Xu, F. Zhang, Z. Song, Y. Hu, Y. Ji, J. Shen, B. Li, H. Lu, H. Yang, A promising magnetic SERS immunosensor for sensitive detection of avian influenza virus, *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 906–912.
- [33] 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.
- [34] Y. Qiu, D. Deng, Q. Deng, P. Wu, H. Zhang, C. Cai, Synthesis of magnetic Fe₃O₄-Au hybrids for sensitive SERS detection of cancer cells at low abundance, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 4487–4495.
- [35] M.S. Noh, B.-H. Jun, S. Kim, H. Kang, M.-A. Woo, A. Minai-Tehrani, J.-E. Kim, J. Kim, J. Park, H.-T. Lim, S.-C. Park, T. Hyeon, Y.-K. Kim, D.H. Jeong, Y.-S. Lee, M.-H. Cho, Magnetic surface-enhanced Raman spectroscopic (M-SERS) dots for the identification of bronchioalveolar stem cells in normal and lung cancer mice, *Biomaterials* 30 (2009) 3915–3925.
- [36] C. Song, Y. Yang, B. Yang, L. Min, L. Wang, Combination assay of lung cancer associated serum markers using surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 1811–1817.
- [37] C. Sun, R. Zhang, M. Gao, X. Zhang, A rapid and simple method for efficient capture and accurate discrimination of circulating tumor cells using aptamer conjugated magnetic beads and surface-enhanced Raman scattering imaging, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8883–8892.
- [38] C. Song, L. Min, N. Zhou, Y. Yang, B. Yang, L. Zhang, S. Su, L. Wang, Ultrasensitive detection of carcino-embryonic antigen by using novel flower-like gold

- nanoparticle SERS tags and SERS-active magnetic nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 41666–41669.
- [39] Y. Lin, G. Xu, F. Wei, A. Zhang, J. Yang, Q. Hu, Detection of CEA in human serum using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with antibody-modified Au and γ -Fe₂O₃@Au nanoparticles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 121 (2016) 135–140.
- [40] R. Gao, Z. Cheng, A. J. deMello, J. Choo, Wash-free magnetic immunoassay of the PSA cancer marker using SERS and droplet microfluidics, *Lab Chip* 16 (2016) 1022–1029.
- [41] U.S. Dinish, G. Balasundaram, Y.-T. Chang, M. Olivo, Actively targeted in vivo multiplex detection of intrinsic cancer biomarkers using biocompatible SERS nanotags, *Sci. Rep.* 4 (2014) 4075.
- [42] J. Li, S. Dong, J. Tong, P. Zhu, G. Diao, Z. Yang, 3D ordered silver nanoshells silica photonic crystal beads for multiplex encoded SERS bioassay, *Chem. Commun.* 52 (2016) 284–287.
- [43] J.H. Granger, M.C. Granger, M.A. Firpo, S.J. Mulvihill, M.D. Porter, Toward development of a surface-enhanced Raman scattering (SERS)-based cancer diagnostic immunoassay panel, *Analyst* 138 (2013) 410–416.
- [44] W. Lu, Y. Wang, X. Cao, L. Li, J. Dong, W. Qian, Multiplexing determination of lung cancer biomarkers using electrochemical and surface-enhanced Raman spectroscopic techniques, *New J. Chem.* 39 (2015) 5420–5430.
- [45] B. Tang, J. Wang, J.A. Hutchison, L. Ma, N. Zhang, H. Guo, Z. Hu, M. Li, Y. Zhao, Ultrasensitive, multiplex Raman frequency shift immunoassay of liver cancer biomarkers in physiological media, *ACS Nano* 10 (2016) 871–879.
- [46] K.K. Maiti, U.S. Dinish, C.Y. Fu, J.-J. Lee, K.-S. Soh, S.-W. Yun, R. Bhuvaneshwari, M. Olivo, Y.-T. Chang, Development of biocompatible SERS nanotag with increased

- stability by chemisorption of reporter molecule for *in vivo* cancer detection, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 398–403.
- [47] 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.
- [48] R. Li, R. Wu, L. Zhao, M. Wu, L. Yang, H. Zou, P-glycoprotein antibody functionalized carbon nanotube overcomes the multidrug resistance of human leukemia cells, *ACS Nano* 4 (2010) 1399–1408.
- [49] K. Jiang, L.S. Schadler, R.W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, M. Terrones, Protein immobilization on carbon nanotubes *via* a two-step process of diimide-activated amidation, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 37–39.
- [50] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1767 (2007) 1073–1101.
- [51] L.K. Tamm, S.A. Tatulian, Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Q. Rev. Biophys.* 30 (1997) 365–429.
- [52] V. Kumar, G. Nath, R.K. Kotnala, P.S. Saxena, A. Srivastava, Biofunctional magnetic nanotube probe for recognition and separation of specific bacteria from a mixed culture, *RSC Adv.* 3 (2013) 14634–14641.
- [53] A. Kasprzak, M. Poplawska, M. Bystrzejewski, I.P. Grudzinski, Sulfhydrylated graphene-encapsulated iron nanoparticles directly aminated with polyethylenimine: a novel magnetic nanoplatform for bioconjugation of gamma globulins and polyclonal antibodies, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 5593–5607.
- [54] R. Tuma, Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies, *J. Raman Spectrosc.* 36 (2005) 307–319.

[55] S. Feng, R. Chen, J. Lin, J. Pan, G. Chen, Y. Li, M. Cheng, Z. Huang, J. Chen, H. Zeng, Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2414–2419.

Supplementary material

Multiplex competitive analysis of HER2 and EpCAM cancer markers in whole human blood using Fe₂O₃@Ag nanocomposite.

Anna Balzerová, Ariana Opletalová, Václav Ranc*, Radek Zbořil*

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

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

The SI contents:

The SI file contains process of preparation of standard solutions and buffers and preparation of silver nanoparticles, chromatogram of HER2 marker (standard) and HER2 marker labeled with cyanine dye Cy3 (HER2_Cy3); intensity–concentration dependence graph of the 1450 cm⁻¹ spectral band of labeled markers for calculation of optimal concentration for competitive analysis; Raman spectra of initial magnetic nanoparticles Fe₂O₃, magnetic nanoparticles functionalized with antibodies Anti-HER2 and Anti-EpCAM (MNPs@Anti-HER2, MNPs@Anti-EpCAM); cyanine dyes Cyanine3 and Cyanine5, tumor markers HER2 and EpCAM labeled with cyanine dyes Cyanine3 or Cyanine5 (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5); calculated average ratio of intensities of blank samples and blood samples and calculated *t*-test; Raman spectra of blank sample and model sample containing 10 ng L⁻¹ HER2 and EpCAM; Raman spectra of blank sample (sensor + labeled tumor markers) obtained in various periods of time after the preparation demonstrating the stability of the nanosystem; Raman spectra of six different drops of blank sample (sensor + labeled tumor markers) to show repeatability of measurement and calculation of the relative standard deviation; Raman spectra of long-term stability measurements; XRD spectrum of Fe₂O₃@Ag nanocomposite with percentage of individual components; calibration curve for determination of limit of detection.

Preparation of Standard Solutions and Buffers. The phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM, pH 7.5) was prepared from 100 mM stock solution of H₃PO₄ by fine-tuning of its pH value using a highly concentrated solution of NaOH (50%, w/v) under a constant stirring. Afterward the final concentration was adjusted by adding a defined volume of water solvent. Stock solutions of 0.1 mol L⁻¹ NHS and EDC were prepared in a volume of 10 mL by careful weighing of the calculated amount of each. The solutions were used immediately after the preparation. The stock solutions of all the proteins being used, namely HER2, EpCAM, Anti-HER2, and Anti-EpCAM were prepared by dissolving 0.1 mg of each in 1 mL of water in an Eppendorf tube. The solutions of the proteins were kept in a dark environment at –20 °C for a maximum of five days.

Preparation of Silver Nanoparticles. Silver nanoparticles with concentration 108 mg L⁻¹ and average diameter 30 nm were prepared by a modified Tollens method.¹ Complex cation [Ag(NH₃)₂]⁺ was reduced using D-(+)-Maltose monohydrate under alkaline conditions. The initial concentrations of the reagents in the reaction system were as follows: silver nitrate 1 × 10⁻³ mol L⁻¹, ammonia 5 × 10⁻³ mol L⁻¹, sodium hydroxide 9.6 × 10⁻³ mol L⁻¹ and D-(+)-maltose 1 × 10⁻² mol L⁻¹. The synthesis was carried out at room temperature under constant stirring.

Number of pages: 7

Number of figures: 10

Number of tables: 1

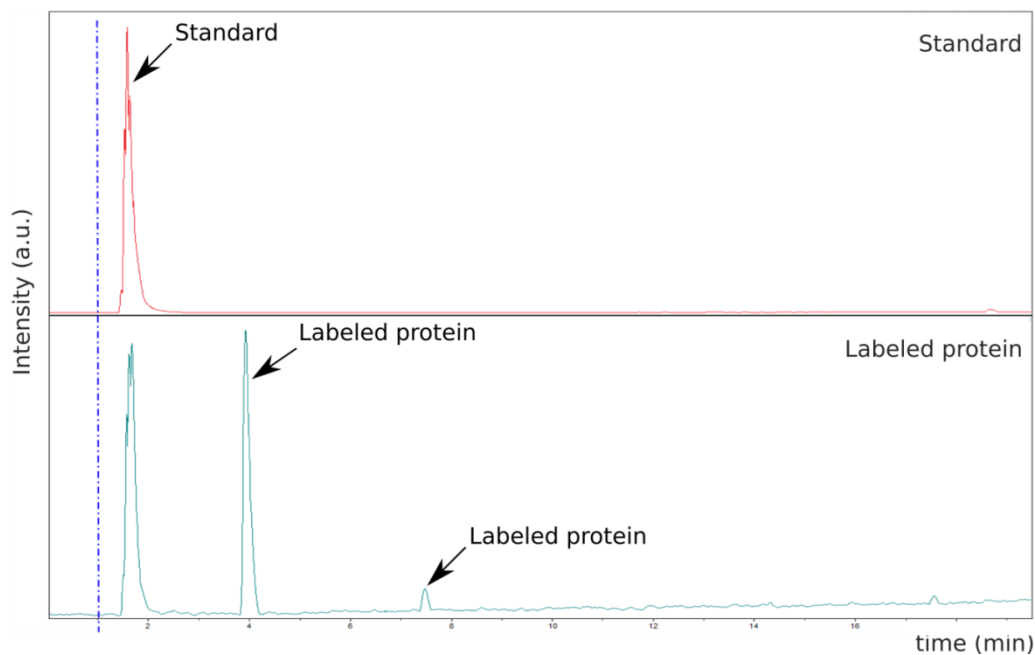


Fig. S1. Chromatogram of HER2 marker (standard) and HER2 marker labeled with cyanine dye Cy3 (HER2_Cy3). From the chromatogram, it was found that 70% of markers were successfully labeled and that the sample does not contain free Cy3 dye.

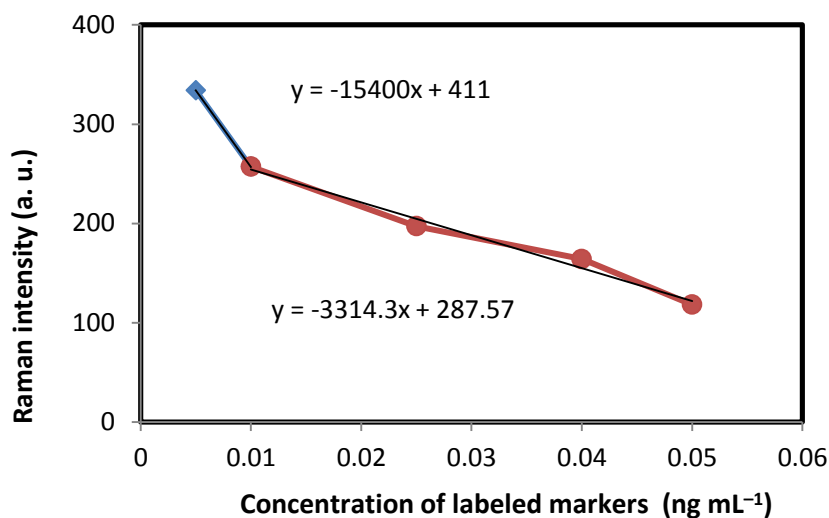


Fig. S2. Intensity–concentration dependence graph of the 1450 cm⁻¹ spectral band of labeled markers for calculation of optimal concentration for competitive analysis. Two linear fits were used for calculation of optimal concentration for competitive analysis, $y = -15400x + 411$ and $y = -3314.3x + 287.57$. Calculated concentration was 0.01 ng mL⁻¹.

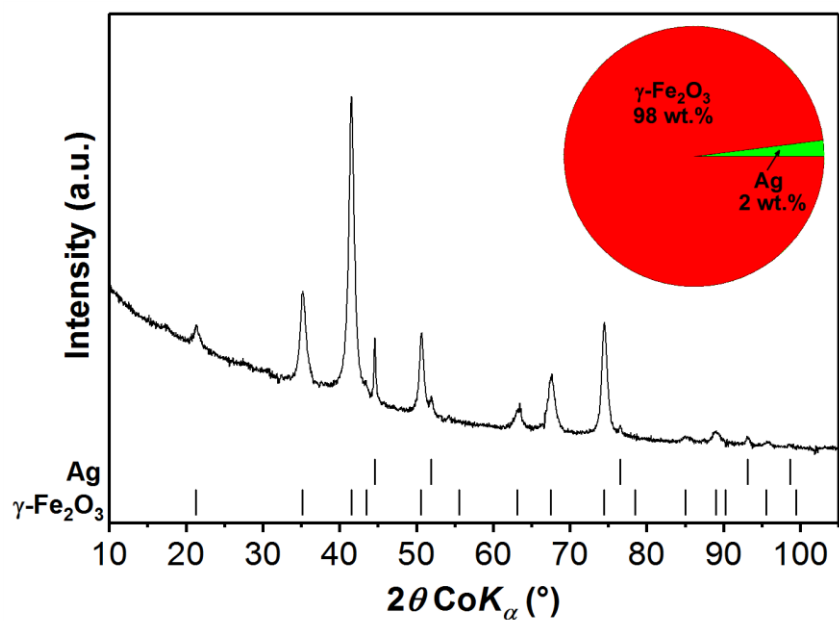


Fig. S3. XRD spectrum of Fe_2O_3 @Ag nanocomposite with percentage of individual components.

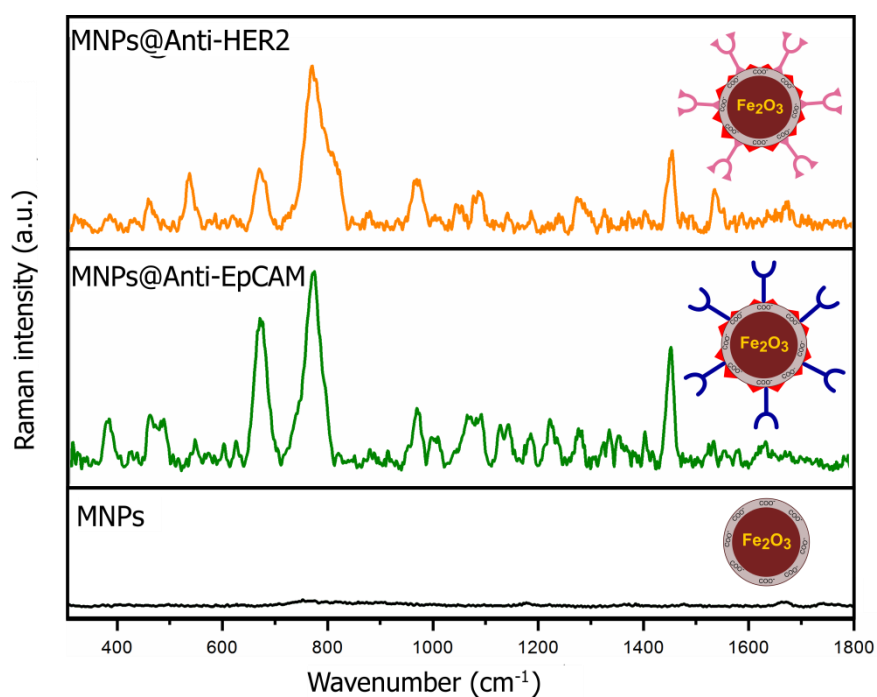


Fig. S4. Raman spectra of initial magnetic nanoparticles Fe_2O_3 , magnetic nanoparticles functionalized with antibodies Anti-HER2 and Anti-EpCAM (MNPs@Anti-HER2, MNPs@Anti-EpCAM). Raman spectra of functionalized MNPs were obtained to confirm the successful immobilization of antibodies HER2 (orange trace) and EpCAM (green trace) onto the MNPs surface.

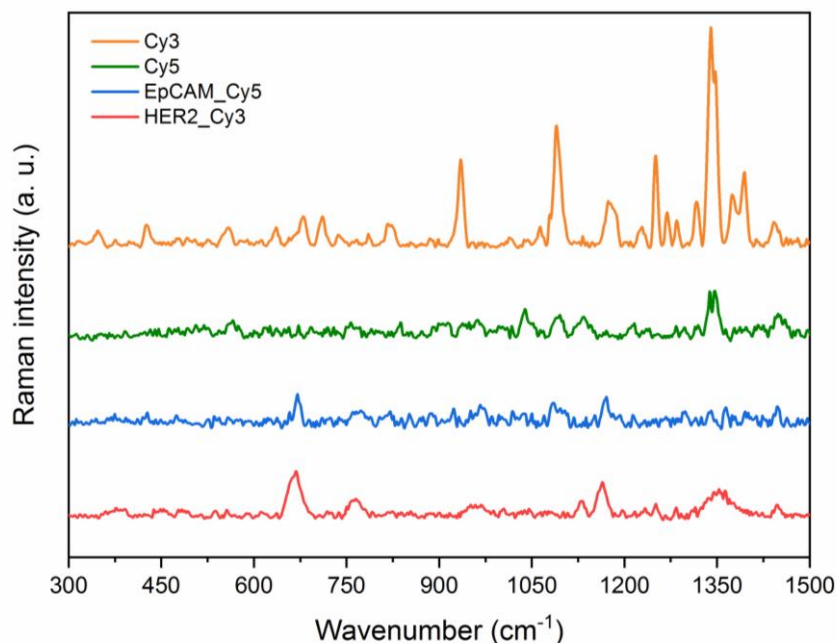


Fig. S5. Raman spectra of bare cyanine dyes Cyanine 3 (Cy3) and Cyanine 5 (Cy5), tumor markers HER2 and EpCAM labeled with cyanine dyes Cyanine 3 or Cyanine 5 (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5). Water solutions of fluorescent tags Cyanine 3 (red trace) and Cyanine 5 (blue trace) were measured to find specific spectral bands for each tag. Concerning the measured Raman spectra of these tags, one spectral band for each tag was chosen; the spectral band at 373 cm^{-1} for Cyanine 3 and 475 cm^{-1} for Cyanine 5. Labeling of the proteins was done according to the standard operational procedure provided by the manufacturer and followed by SERS analysis using activated AgNPs. The resulted SERS spectra were compared with the previously measured SERS spectra of simple labels to confirm the presence of selected spectral bands 373 cm^{-1} and 475 cm^{-1} . The shift between the spectra is 250 units of Raman intensity in order to make the figure more transparent.

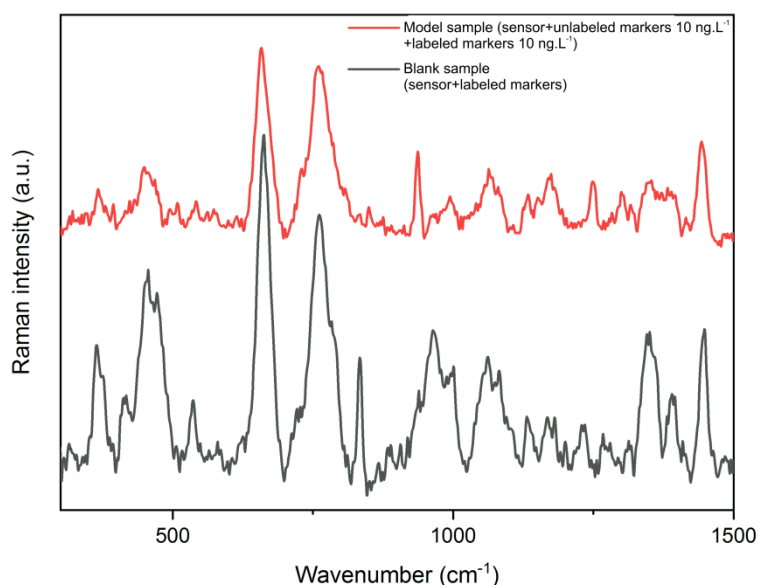


Fig. S6. Raman spectra of blank sample and model sample containing 10 ng L^{-1} HER2 and EpCAM. Raman spectra of the blank and model samples were obtained to confirm the interaction between sensor and natural HER2 and EpCAM compounds and the occupation of the binding sites by natural markers prior to the labeled markers. The shift between the spectra is 500 units of Raman intensity in order to make the figure more transparent.

Table S1. Calculated average ratio of intensities of blank samples and blood samples for both wavenumbers and calculated *t*-test.

wavenumber 373 cm ⁻¹	calculated average ratio of intensities		wavenumber 475 cm ⁻¹	calculated average ratio of intensities	
	blank	blood		blank	blood
sample	blank	blood	sample	blank	blood
1	0.1243	0.0586	1	0.1000	0.0460
2	0.1238	0.0445	2	0.1423	0.0582
3	0.6636	0.0657	3	0.1500	0.0700
4	0.0927	0.0233	4	0.1173	0.0644
5	0.3097	0.0780	5	0.1679	0.0543
6	0.1177	0.0789	6	0.1246	0.0711
7	0.2617	0.0744	7	0.4117	0.0567
8	0.1091	0.0422	8	0.1727	0.0511
9	0.1789	0.0720	9	0.1222	0.0800
10	0.2030	0.0563	10	0.1600	0.0663
<i>t</i> -test result	0.0093		<i>t</i> -test result	0.0016	

Student's *t*-tests were performed to determine the significance of differences in average intensities of blank samples without unlabeled tumor markers and blood samples with unlabeled markers. Calculated values of *t*-test of competitive multiplex analysis are shown in Table S1.

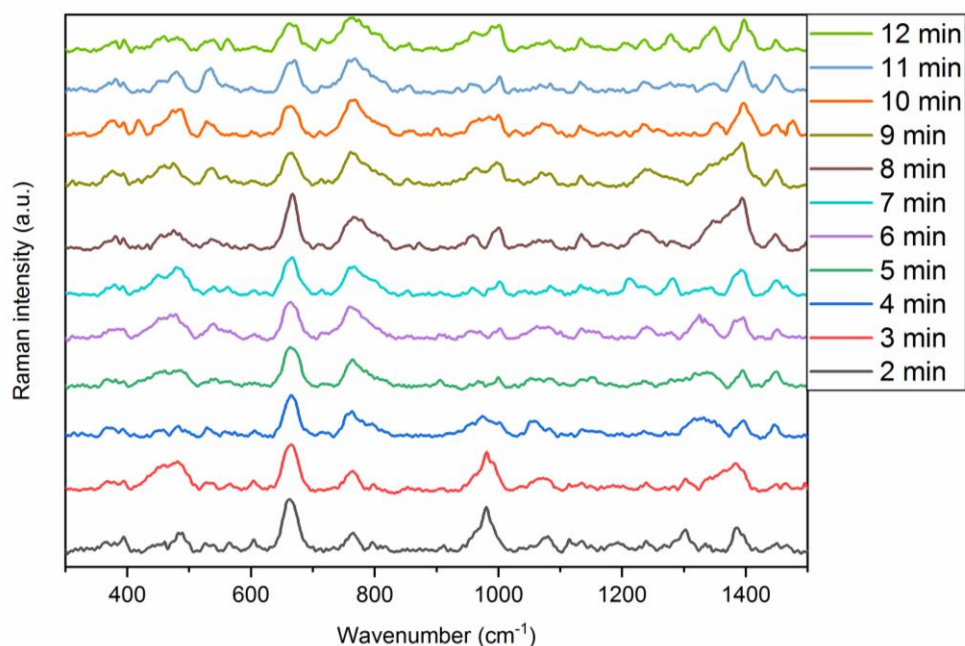


Fig. S7. Raman spectra of blank sample (sensor + labeled tumor markers) obtained in various periods of time after the preparation demonstrating the stability of the nanosystem. The shift between spectra is 250 units of Raman intensity in order to make the figure more transparent.

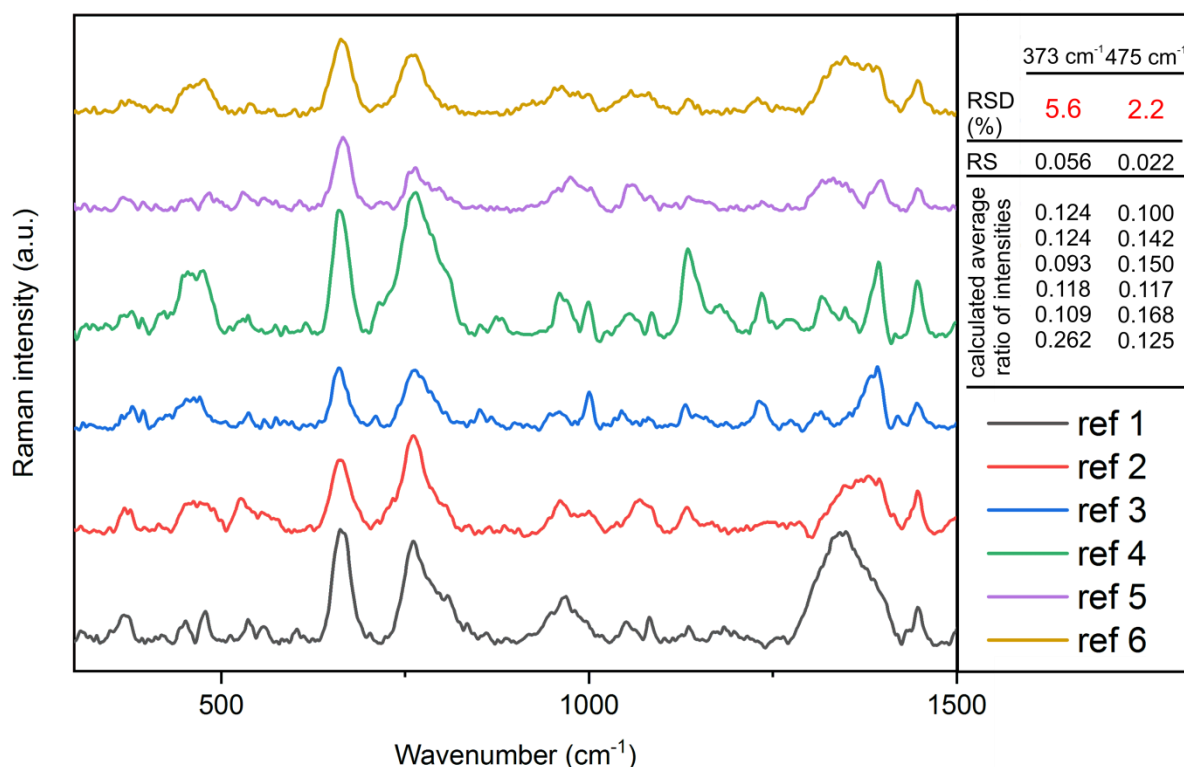


Fig. S8. Raman spectra of six different drops of blank sample (sensor + labeled tumor markers) to show repeatability of measurement. It can be seen in both cases that the spectra are very similar without any considerable changes and it can be thus stated that the method produces repeatable results. The spectra were supported by calculating the relative standard deviation, separately for each label. The calculated RSD values, defined as I₃₇₃/I₆₆₀ ratio or I₄₇₅/I₆₆₀ ratio were 5.6% and 2.2%, respectively. The shift between the spectra is 250 units of Raman intensity in order to make the figure more transparent.

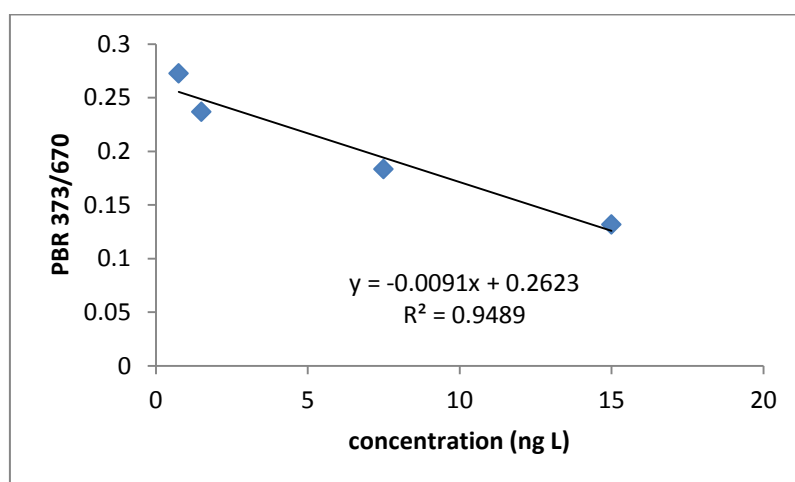


Fig. S9. Calibration curve for determination of limit of detection. LOD was calculated according the 3s/m criteria where 's' is the standard deviation of the low concentration of the analyte and 'm' is the slope of the calibration graph. Calculated value of LOD was 4.9 ng L.

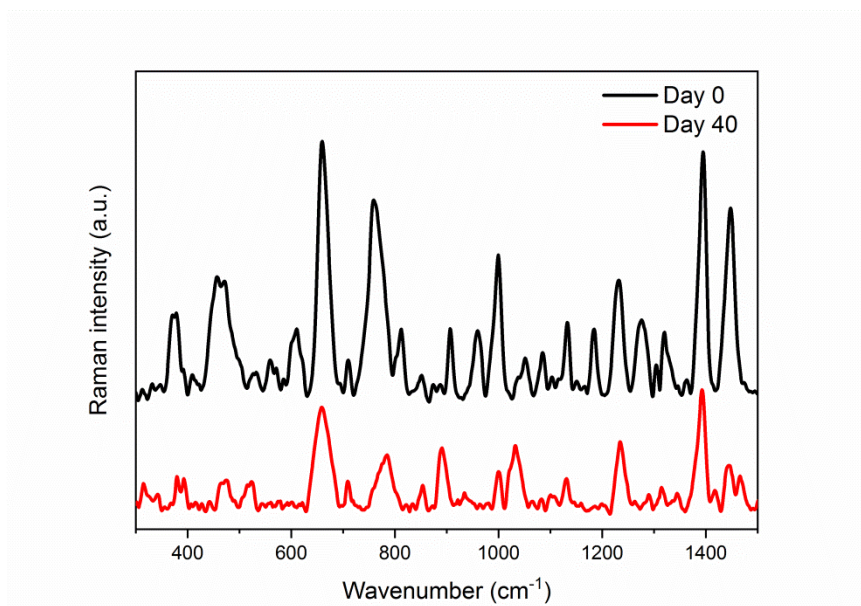


Fig. S10. Raman spectra of long-term stability measurements with blank sample (sensor + labeled tumor markers). Raman spectra were acquired immediately after the sample preparation (day 0) and then after 40 days. The spectrum of the 40-day-old sample contains the same spectral bands as the sample measured immediately after the preparation, but the intensity of the band at 660 cm^{-1} wavenumbers is 57% lower due to the sensor degradation.

References

- [1] 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.

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

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

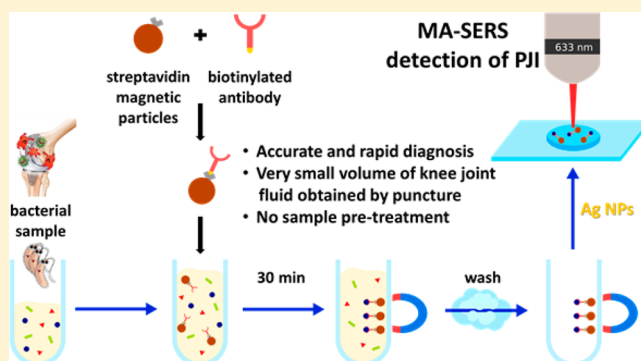
[†]Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

[‡]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

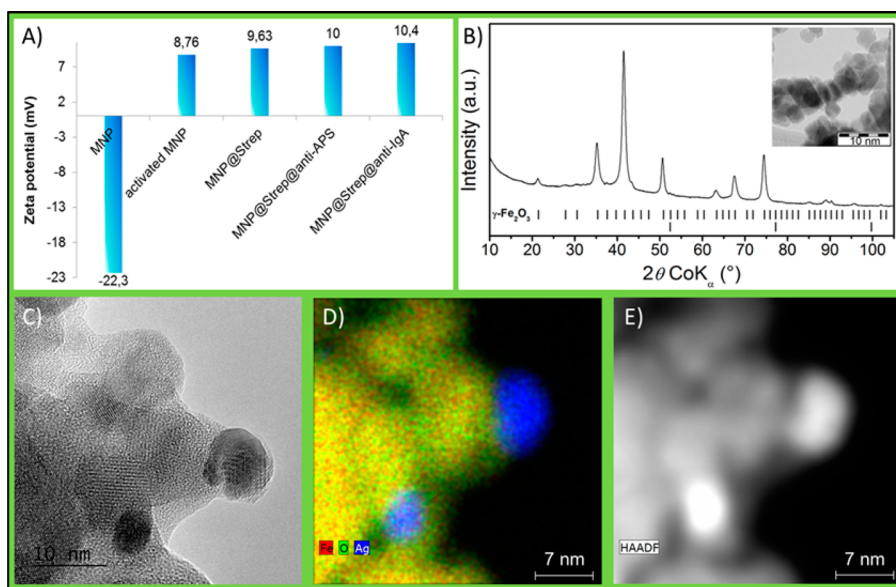


Figure 1. Material characterization of the MA-SERS biosensor: (A) Measured ζ potentials of the prepared biosensor after each modification step. (B) XRD pattern of MNP (inset: TEM image of the MNP). The theoretical position of the maghemite diffraction line is also shown. (C) Representative HRTEM image 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 $a = 0.8360\text{ nm}$) 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 $10\text{--}20\text{ nm}$. 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,

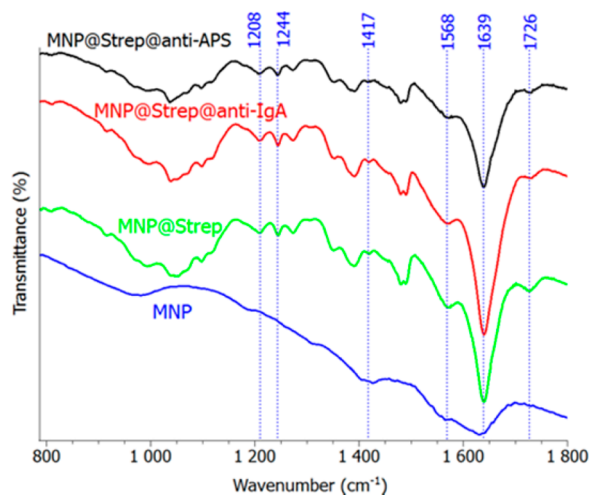


Figure 2. IR spectra of pure MNP, modified MNP@Strep, and MNP@Strep functionalized with biotinylated antibody to protein A (labeled as MNP@Strep@anti-IgA) and with biotinylated antibody to group-A streptococci polysaccharide (labeled as MNP@Strep@anti-APS).

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

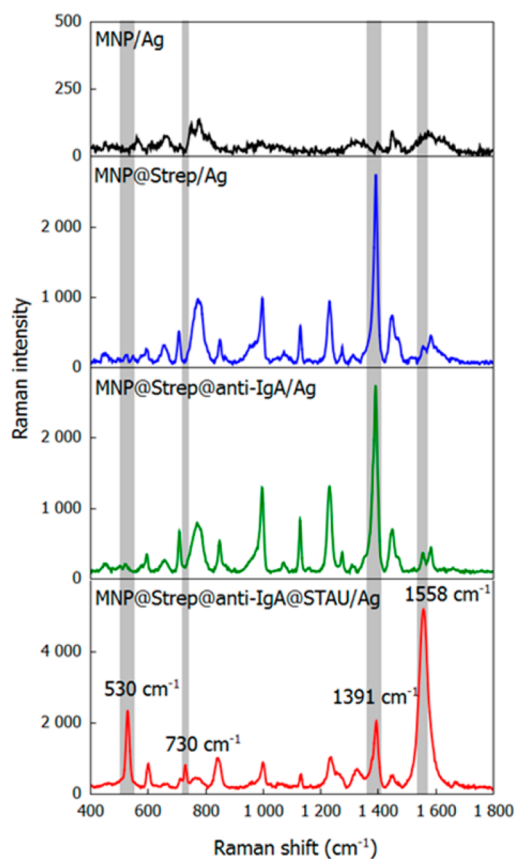


Figure 3. SERS spectra of the pure MNP/Ag, modified MNP@Strep/Ag, MNP@Strep modified with biotinylated antibody to protein A (labeled as MNP@Strep@anti-IgA/Ag), and bacterial lysate of *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag).

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

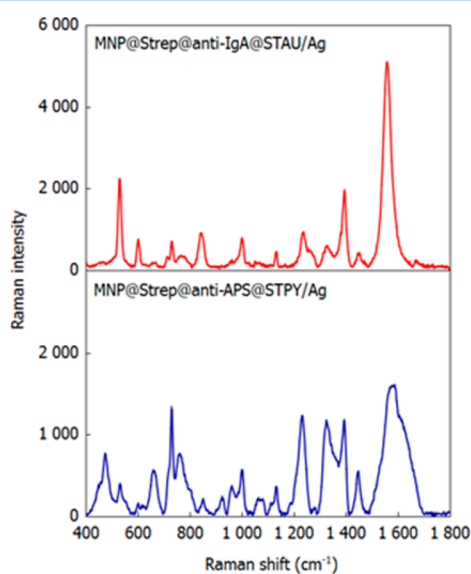


Figure 4. SERS spectra of model samples of bacterial lysates of *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag) and *Streptococcus pyogenes* (labeled as MNP@Strep@anti-APS@STPY/Ag).

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

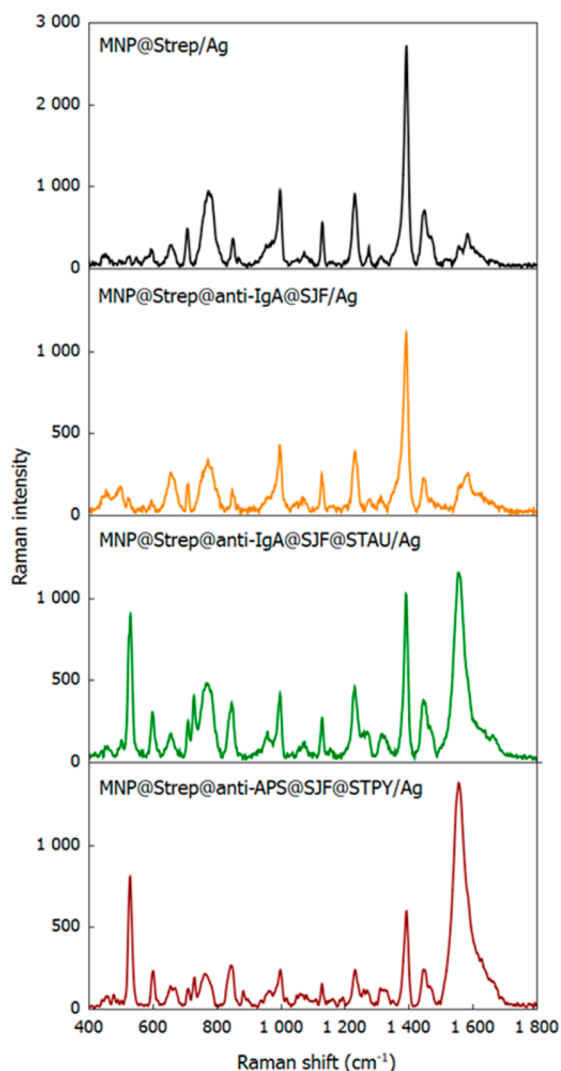


Figure 5. SERS spectra of the modified MNP@Strep/Ag nanoparticles, sterile joint fluid (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@SJF/Ag), joint fluid with *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (labeled as MNP@Strep@anti-IgA@SJF@STAU/Ag), and joint fluid with *Streptococcus pyogenes* (labeled as MNP@Strep@anti-APS@SJF@STPY/Ag).

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

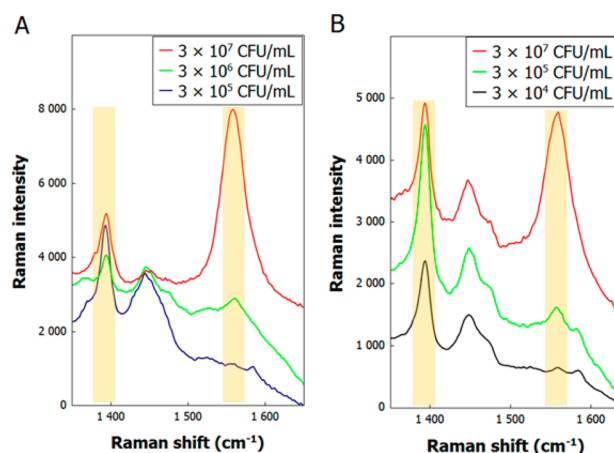


Figure 6. Close up of the 1391 and 1558 cm^{-1} peaks of real matrix sample with different concentrations of (A) *S. aureus* and (B) *S. pyogenes*. The spectra were shifted by a hundred units of Raman intensity in order to increase the transparency.

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

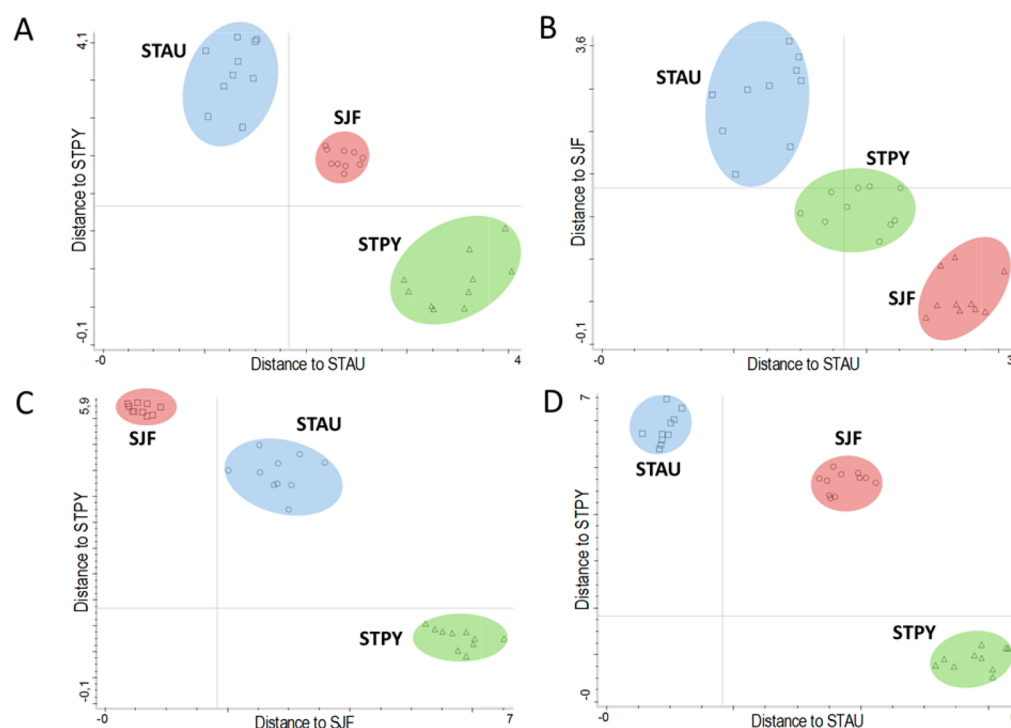


Figure 7. Discriminant analysis of knee joint fluid samples from four real patients (A, B, C, and D). Clusters defined training sets: sterile joint fluid (SJF; red), joint fluid with *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (STAU; blue), and joint fluid with *Streptococcus pyogenes* (STPY; green).

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.

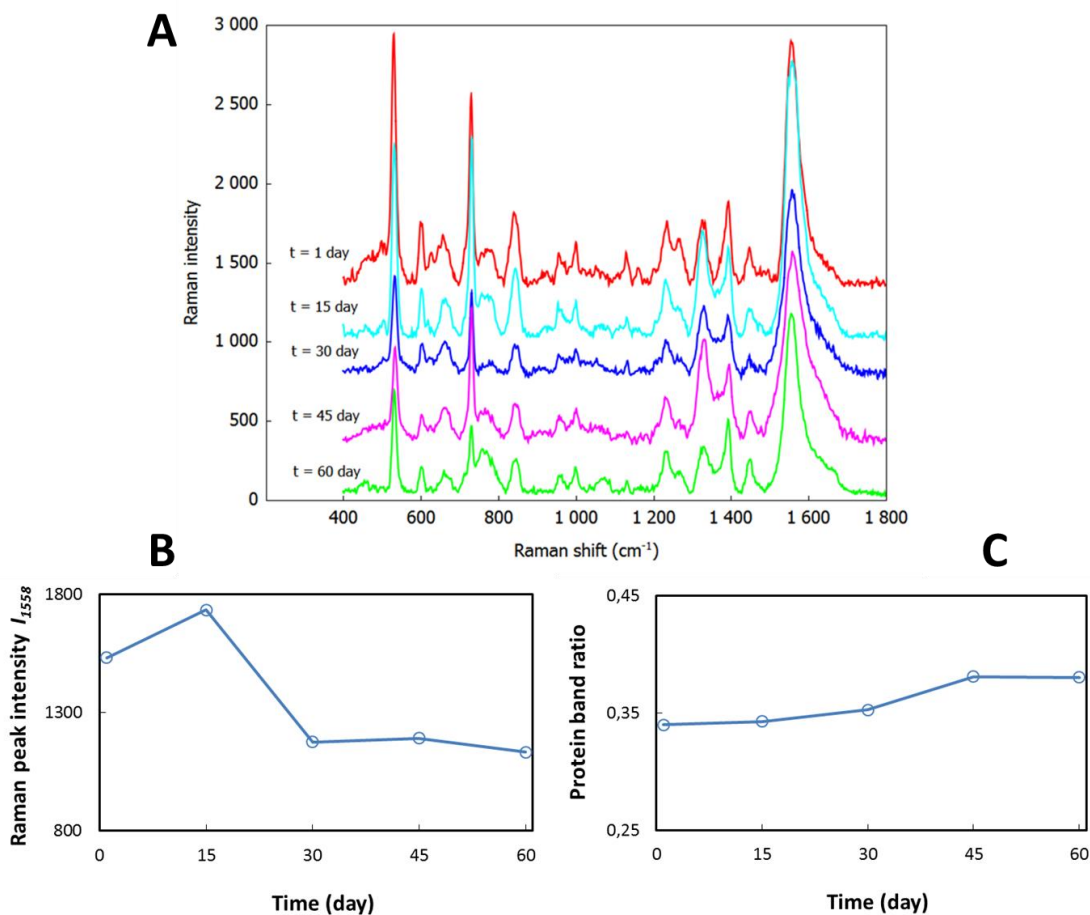


Figure S1. (A) SERS spectra of MNP@Strep@anti-IgA@STAU/Ag obtained with samples of different batches in a 2-month period after the preparation demonstrating the stability of the biosensor. Each spectrum is shifted by 300 units of Raman intensity in order to increase the transparency of the spectra. (B) 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.

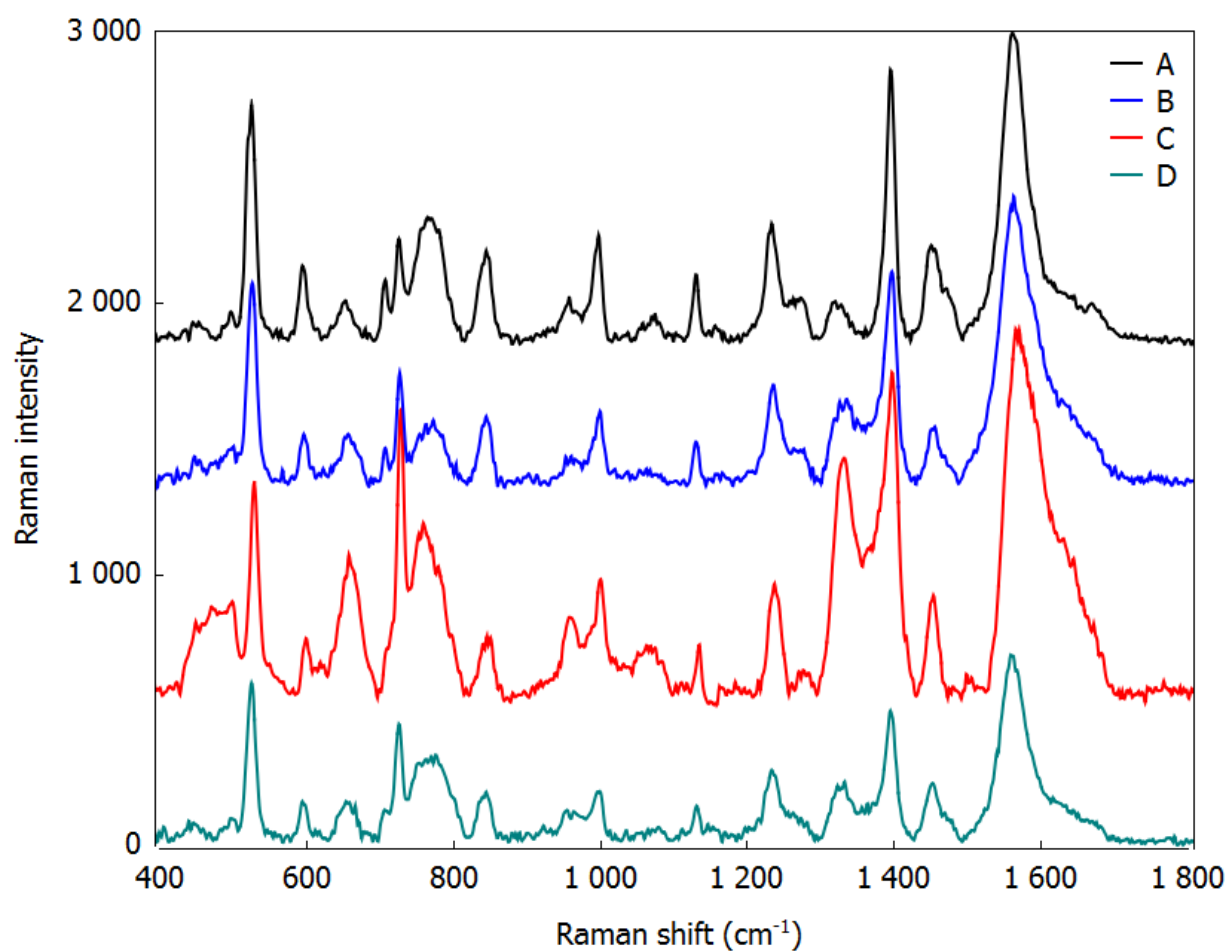


Figure S2. SERS spectra obtained by analysis of real-matrix samples of knee joint fluid collected from four different patients (labeled as A–D) spiked by live bacteria cells of STAU. The replicative spectra were acquired by the utilization of MNP@Strep@anti-IgA biosensor. Spectral pattern of obtained 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).

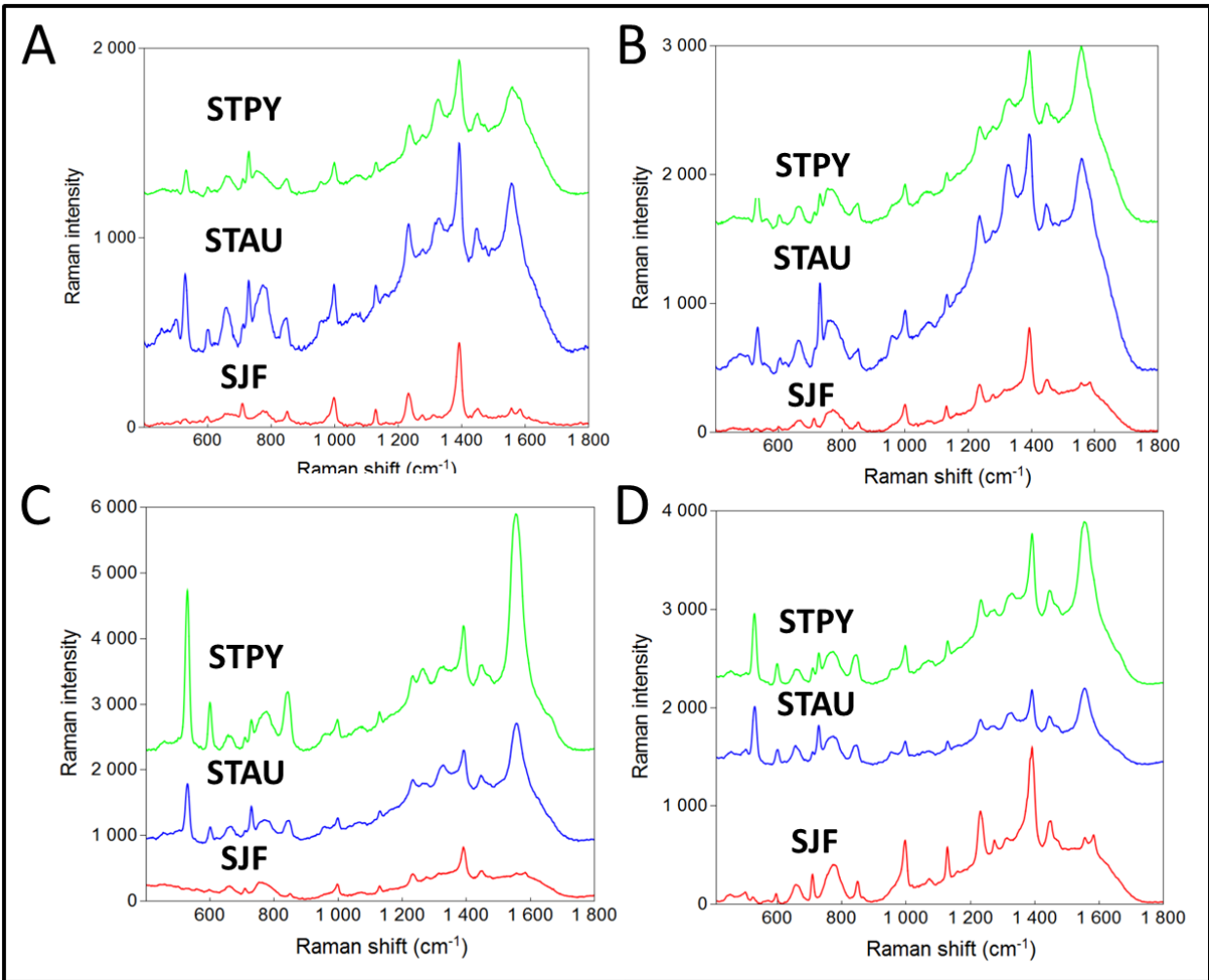


Figure S3. The corresponding mean spectra for each class of discriminant analysis of knee joint fluid samples from four real patients (A, B, C, and D). Spectra are shifted in order to increase the transparency of the spectra.

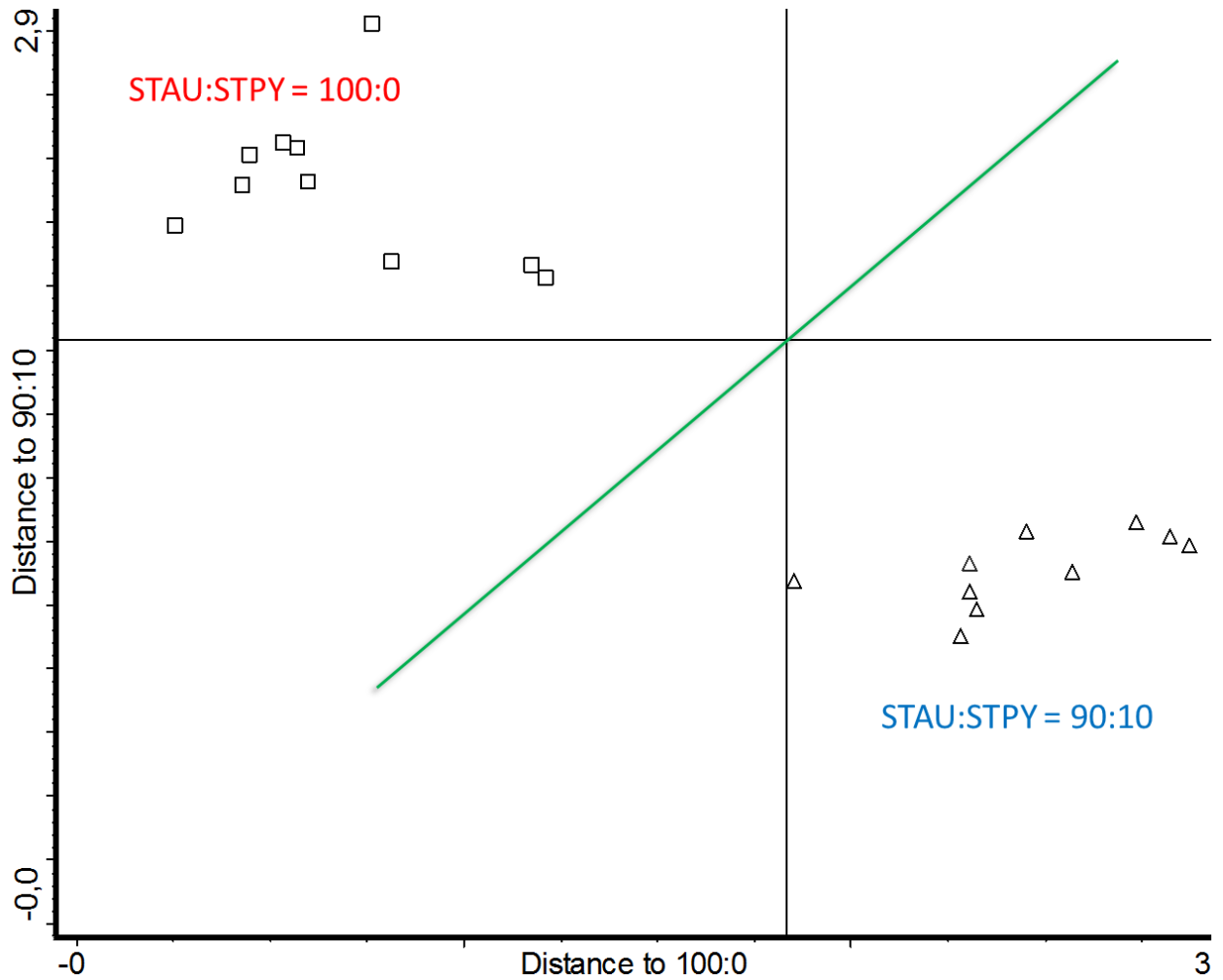


Figure S4. Graphical representation of the discriminant analysis of data obtained by evaluation of the 1:1 mixture of biosensors (MNP@Strep@anti-IgA & MNP@Strep@anti-APS) treated with pure *Staphylococcus aureus* as well as with the mixture of bacterial lysates (*Staphylococcus aureus* & *Streptococcus 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).

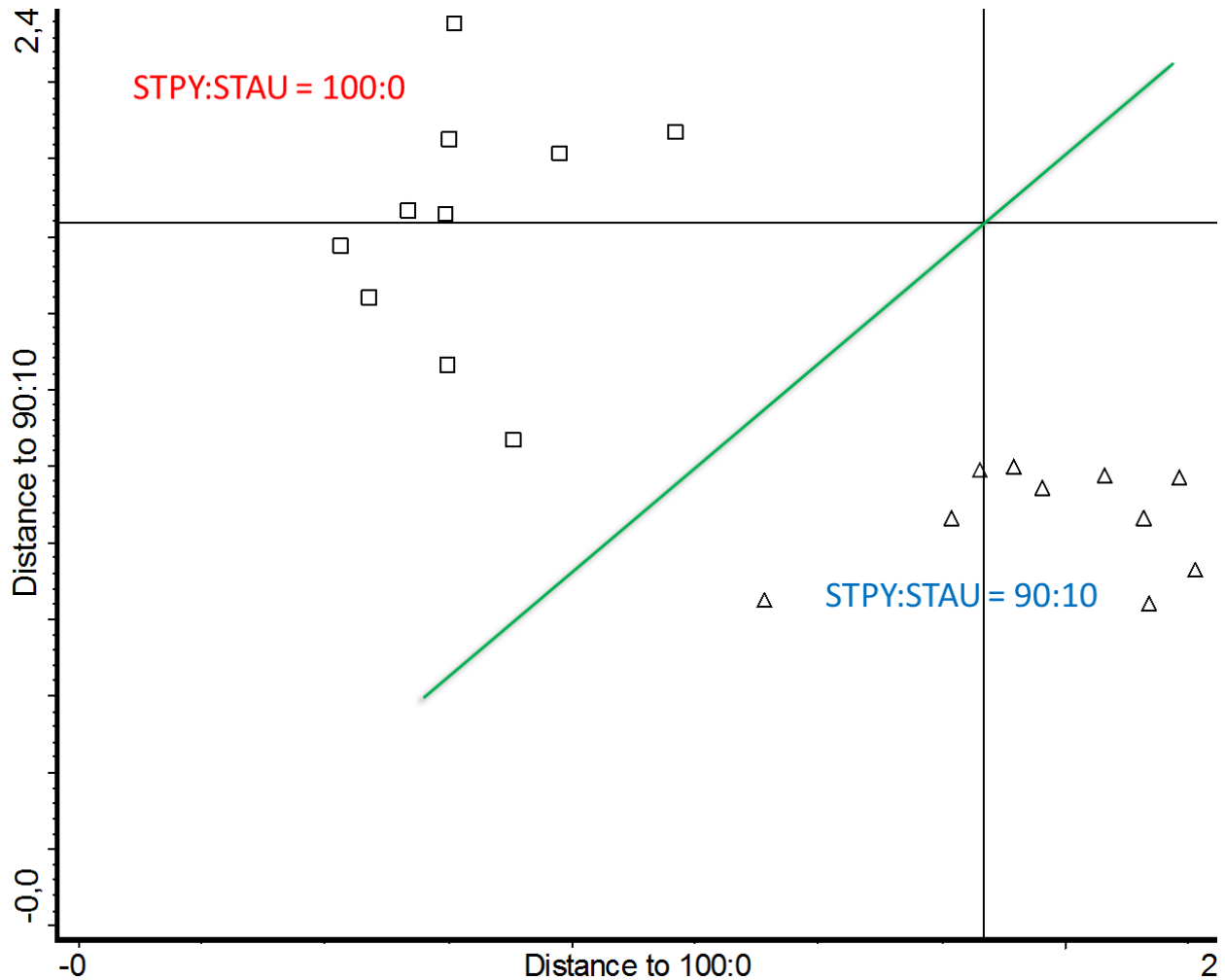


Figure S5. Graphical representation of the discriminant analysis of data obtained by evaluation of the 1:1 mixture of biosensors (MNP@Strep@anti-IgA & MNP@Strep@anti-APS) treated with pure *Streptococcus pyogenes* as well as with the mixture of bacterial lysates (*Streptococcus pyogenes* & *Staphylococcus 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).



Label-free determination and multiplex analysis of DNA and RNA in tumor tissues

Zuzana Chaloupková^a, Anna Balzerová^a, Zdenka Medříková^a, Josef Srovnal^b, Marián Hajdúch^b, Klára Čépe^a, Václav Ranc^{a,*}, Radek Zbořil^{a,*}

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

^b Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 5, CZ-77900 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2017

Received in revised form

18 December 2017

Accepted 18 December 2017

Keywords:

SERS

Nanocomposite

Nucleic acids

DNA

RNA

Alkylating agent

Chlorambucil

ABSTRACT

Determination of the total content of nucleic acids constitutes an important part of medicinal diagnosis. This determination is typically performed using a combination of spectrophotometry and polymerase chain reaction, where multi-step and complex sample pretreatment is generally required. To simplify the analysis, we present a nanosensor for the multiplex determination of DNA and RNA. This nanosensor consists of a magnetic Fe₃O₄@Ag nanocomposite functionalized by a low molecular selector from the family of alkylating agents, chlorambucil. The sensor allows selective isolation of nucleic acids based on the magnetic properties of integrated Fe₃O₄ nanoparticles and consecutive determination of their content via magnetically assisted surface-enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). Limits of detection of 3.0 ng L⁻¹ and 3.8 ng L⁻¹ are achieved for DNA and RNA, respectively. The enhanced selectivity of the developed sensor, owing to the presence of the alkylating agent, allows multiplexed analysis of DNA and RNA with low relative errors (<10%) of determination.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

An increasing number of diagnostic examinations require accurate and selective determination of nucleic acids and their structural properties. Illustrative examples include the determination of mitochondrial DNA in the diagnosis of diseases linked to a prenatal phase of development [1], neurodegenerative diseases [2], or diagnosis of atrial fibrillation [3]. The analyzed samples are usually complex and contain several highly abundant interferences including lipids and proteins; selectivity of the applied method toward respective molecular targets must therefore be assured. Analysis of the total DNA content commonly employs spectrophotometric approaches and, less frequently, separation techniques that are typically combined with UV/Vis spectroscopy, mass spectrometry [4] or immunoassays [5]. Analytical procedures that are sufficiently fast, cost efficient, and yield reliable determination of the total content of nucleic acids still pose a major scientific challenge. Newly developed methods must fulfill requirements, such as low limits of detection (LODs), selectivity, reliability, total costs per analysis, and accessibility of the procedure at the point of care

[6]. Currently applied technologies can achieve specificity toward a single sequence. However, from the viewpoint of the achieved limits of detection, portability of the procedure, and its cost efficiency, challenges persist. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) represents a promising technique in this regard. Recently, Wang described the use of hairpin DNA and SERS for the analysis of deafness mutations [7]. The analytical signal of this approach is obtained from the selective interaction of the DNA probe, immobilized on the SERS substrate, and the DNA present in the sample, as also previously described by Zhang [8]. The achieved limits of detection are quoted in units of femtomole per liter. A similar approach has been recently used for the diagnosis of respiratory infections [9], HPAI virus [10], detection of specific DNA mutations [11], and detection of the K-ras gene [12]. The aforementioned approaches exhibit ultra-high specificity. However, procedures based on the use of Raman spectroscopy for selective and reliable determination of the total content of nucleic acids remain challenging. Ou et al. used undecorated silver nanoparticles and SERS to determine the total DNA content of nasopharyngeal carcinoma cells [13]. In addition, Folch et al. demonstrated the feasibility of direct SERS combined with chemometrics and microfluidics for the identification and relative quantification of four different cytosine modifications in both single- and double-stranded DNA [14]. Yuan-feng has developed mi-RNA biosensors using Fe₃O₄@Ag magnetic microspheres as SERS. This low-cost Raman instrument renders

* Corresponding authors.

E-mail addresses: vaclav.ranc@upol.cz (V. Ranc), radek.zboril@upol.cz (R. Zbořil).

the method a potential tool for mi-RNA diagnosis [15]. A recent study also suggests that selective analysis of nucleic acids by SERS can be performed via a variation in pH [16]. Small-molecule-based chemosensing represents an interesting alternative to selective nucleic acid detection. Shirinfar et al. designed a novel imidazolium naphthalene derivative for a fluorescent chemosensor, which senses RNA selectively through fluorescence enhancement over other biologically relevant biomolecules [17]. Yousuf et al. proposed an effective strategy for the sensing of nucleic acids based on novel naphthalene-, anthracene-, and pyrene probes [18]. Similarly, Ahmed et al. developed a novel tetra-cationic probe for the selective detection of RNA in neuroblastoma cells and green algae cells [19].

Considerable improvement has been achieved through the utilization of magnetic nanocomposites [20]. The introduction of magnetic properties yielded a substantial increase in sensitivity, although a template of the target nucleic acid was still required to achieve a suitable level of selectivity.

In this work, we sought to develop an analytical platform aimed at determining the total content of nucleic acids, namely DNA and RNA. The detection platform is based on the utilization of a $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ nanocomposite and magnetically assisted surface-enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). This approach allows magnetic isolation of selected molecular targets and their consecutive detection via SERS with a single nanosensor [21]. Here, we present the first case demonstrating the utilization of an alkylation antineoplastic agent, employed as a molecular selector in SERS. Alkylation antineoplastic agents are frequently used in the treatment of cancer through selective alkylation of guanine. We have applied this mechanism as a working tool to achieve considerably higher levels of selectivity (than those of conventional methods) toward nucleic acids. Integration of the alkylation agent resulted in the development of a template-free analytical platform capable of high-sensitivity determination, with nanomolar-level limits of detection, of DNA and RNA levels.

2. Material and methods

2.1. 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), and Chlorambucil 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).

2.2. Sample preparations

Total RNA was purified from 10 different tumor tissues fixed in RNA Later solution (Qiagen, Valencia, CA, USA) immediately after biopsy and stored at -20°C until RNA isolation. Briefly, a small piece of tumor tissue (30–50 mg) was homogenized in 1 mL of TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) using three glass balls, each 3 mm in diameter. Homogenization was performed for 2 min at 30 Hz in a MixerMill 301 homogenizer (Retsch, Haan, Germany) prior to RNA purification. Total RNA was extracted from the tumor tissue homogenates in accordance with the manufacturer's instructions. For this extraction, 0.2 mL of chloroform was added to a TRI Reagent lysate. After centrifugation and phase separation, the upper aqueous RNA-containing phase was transferred to the novel tube. RNA was then precipitated by adding 0.5 mL of

isopropanol to the tube. The RNA pellet was then washed twice with ethanol and resolved in DEPC-treated water.

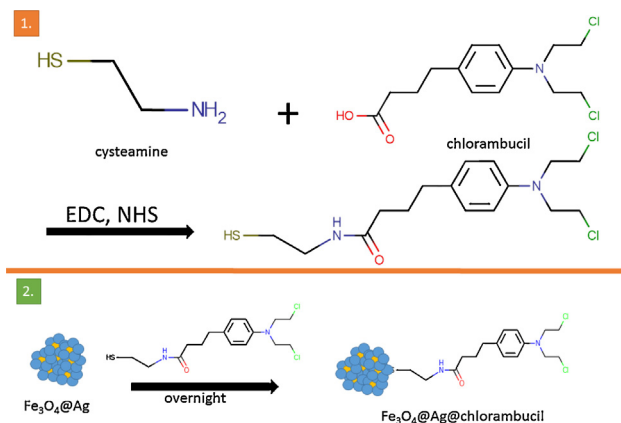
Genomic DNA was purified from 14 fresh-frozen brain tumor biopsies using a Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) in accordance with the manufacturer's instructions. The tumor specimens were lysed with protease K. Subsequently, isopropanol was added, and DNA was then bonded to the glass fiber filter during centrifugation. The concentration and purity of the nuclei acids were determined by a Nanodrop ND 1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA).

2.3. Synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite

Magnetic nanoparticles were prepared using the Massart co-precipitation method described previously by Markova et al. [22]. The co-precipitation was performed in an aqueous solution containing $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ using sodium hydroxide ($c = 1.5 \text{ mol L}^{-1}$). Sodium hydroxide was added dropwise to achieve a pH of 11. The reaction was performed at room temperature in an inert atmosphere achieved by constant bubbling of nitrogen to prevent further oxidation of the ferrous ions. After 1 h of stirring, the product was washed repeatedly with water and separated via simple magnetic decantation. The resulting nanoparticles were used for the preparation of the magnetite-O-carboxymethyl chitosan nanocomposite. Firstly, to introduce $-\text{COOH}$ groups, the chitosan LMW was carboxymethylated using the method described by Shi [11]. Polymer adsorption onto the surface of the as-prepared nanoparticles was induced by a gradual increase of temperature to 80°C . In the last step, silver nitrate was added to the magnetite-O-carboxymethyl chitosan nanocomposite through the reduction of silver ions on the surface of the composite. This reduction was induced, at a temperature of 80°C under alkaline conditions, by amine groups of the adsorbed polymer. The product was washed repeatedly with deionized water and separated via magnetic decantation. The resulting dispersion was diluted ten times prior to further processing.

2.4. Synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ nanocomposite

Immobilization of chlorambucil on the surface of silver nanoparticles was performed using cysteamine as a bridging molecule, as shown in Scheme 1. This immobilization was achieved through the following procedure: (i) 1 mg of chlorambucil was completely dissolved in 1 mL aqueous solution containing 2.4% NH_4OH , (ii) 100 μL of aqueous solution containing EDC ($c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$) and NHS ($c = 50 \text{ mmol L}^{-1}$) was added; the mixture was vigorously stirred for



Scheme 1. General scheme showing the preparation and follow-up functionalization of the nanomaterial. Functionalization is performed using cysteamine as a linking molecule.

60 min at room temperature, (iii) 100 μL of cysteamine (final concentration: 100 mmol L^{-1}) was added and the mixture was stirred for an additional 20 min, (iv) 20 μL of the resulting product was mixed with 20 μL of the dispersion of the previously prepared nanocomposite and allowed to interact for 60 min at room temperature. The as-prepared sample ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite) was stirred for 3 min prior to use.

2.5. Apparatus

Raman spectra were acquired using a DXR Raman spectrometer (Thermo Scientific, USA) equipped with a red excitation laser operating at a wavelength of 633 nm. Stokes Raman spectra were collected at wavenumbers of 400–1800 cm^{-1} with a spectral resolution of 1.0 cm^{-1} . The Raman spectrometer was operated with the following experimental parameters: exposure time 32 s and laser power on sample 8 mW. An averaged Raman spectrum was obtained from 32 micro scans. The acquired spectral data were evaluated using instrument control software (Omnic, version 8, Thermo Scientific, USA) and maxima of the target spectral bands were statistically evaluated with LibreOffice (version 4.3.0, The Document Foundation, Berlin, Germany). In addition, nucleic acids were quantified using software package TQ-Analyst (Omnic version 8, Thermo Scientific, USA). Spectral processing was performed in QTI plot (version 0.9.9.1, Romania). Through this processing, the spectral background was corrected using an algorithm based on a polynomial fitting. Afterward, the spectra were normalized to the intensity of the spectral band at 1350 cm^{-1} , interpreted as a structural part of chlorambucil. The measured spectra are presented in terms of Raman scattered photon counts. A high-resolution transmission electron microscope (HRTEM; FEI Titan) was used to obtain images and perform a chemical mapping of the functionalized nanocomposites.

3. Results and discussion

The developed analytical procedure is based on the utilization of an alkylating agent, selective toward guanine present in the structure of nucleic acids. Chlorambucil is preferred particularly due to its chemical structure, which facilitates its immobilization on a surface of silver nanoparticles of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite. The process of immobilization of chlorambucil on the surface of this nanocomposite is monitored via time-resolved infrared spectroscopy (IR) and follow-up measurements of ζ -potential (see Fig. 1A for the acquired infrared spectra). Firstly, IR spectra of the raw $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite are acquired for further comparison (trace label $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$). The anchoring of cysteamine on the surface of the silver nanoparticles is then evaluated. Spectral data (trace label $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Cysteamine$) show that addition of the bridging agent leads to a considerable increase in the abundance of spectral bands associated with aliphatic and amino functional groups occurring at wavenumbers of 1550 and 1150 cm^{-1} , respectively. The successful formation of the amino bond between the alkylating agent and cysteamine should lead to a detectable increase in the abundance of C–Cl. This hypothesis is validated by a consecutively measured infrared spectrum of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ nanocomposite, where increased intensities of analytical signals corresponding to C–Cl bonds at 730 cm^{-1} is observed (trace label $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$). The successful immobilization of the alkylation agent on the surface of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite is further supported by the results of ζ -potential measurements. The data obtained from $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ nanocomposites reveal a significant change (i.e., from -20 mV to -9 mV). Subsequently, the as-prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ nanocomposite is characterized via electron microscopy, where

clusters of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ are revealed (see Fig. 1B and C). Moreover, EDS analysis (Fig. 1B) reveals the presence of silver nanoparticles (shown in red, size: <40 nm), and magnetite nanoparticles (shown in blue, size: <5 nm). The synthesized nanomaterial is subsequently utilized in the analysis of DNA and RNA.

First, the developed analytical sensor is tested using a standard aqueous solution of DNA ($c = 100$ ng L^{-1}). Interfering spectral bands are absent from the Raman spectra of the raw nanomaterial and the as-prepared functionalized nanocomposites, namely $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ (see Fig. 2A). The band at 1350 cm^{-1} , originating from an aromatic structure of chlorambucil, is used for normalization of the acquired spectral data, as described in the Materials and methods section. Raman spectra obtained from the analysis of a DNA-containing solution exhibit characteristic spectral profiles. These include: dominant bands located at 729 cm^{-1} and 1576 cm^{-1} (ring stretching modes of Adenine), 773 cm^{-1} (breathing ring of Thymine), 1010 cm^{-1} (amino group vibration of Cytosine), 1440 cm^{-1} (vibration of the Guanine ring), 1100 cm^{-1} (asymmetric deformation of NH_2 in C), and a spectral band at 1390 cm^{-1} (aromatic ring vibration of DNA/RNA), previously interpreted by Kneipp [23] or Moskovits [24] (see Table S1 for a more detailed interpretation of the acquired spectral data). Second, the role of the functionalization is evaluated by analyzing RNA in an actual sample of tumor tissue. RNA in the sample is first identified using UV/Vis methodology, as previously described in the Materials and methods section.

Subsequently, the repeatability of the obtained results is evaluated on a set of five independent measurements of actual DNA-containing samples ($c = 100$ ng L^{-1}); results are shown in Fig. S2. The spectra are all similar, as indicated by the relative standard deviation (RSD: $<5\%$) between the intensities of the five most intense spectral bands. Furthermore, the long-term stability of the nanocomposite is evaluated through a set of five consecutive measurements performed over 21 days. The results are shown in Fig. S3. Partial aggregation of the nanocomposite results in a decrease in the total intensity of the acquired spectral data. Nonetheless, spectral data acquired 21 days after the synthesis of the final nanomaterial still yields a strong analytical signal, and the nanocomposite can be further utilized for the analysis of nucleic acids. The intensity of the strongest band (1390 cm^{-1} , aromatic ring vibration), measured after 21 days of material storage at room temperature, decreases by 25%.

The ability of the developed analytical method to distinguish between DNA and RNA is then verified. Standard samples containing both acids at the same concentration level ($c = 100$ ng L^{-1}) are prepared to minimize the influence of the concentration effect. Acquired Raman data of DNA and RNA are shown in Fig. 2C, and the spectrum of both nucleic acids in a mixture is shown in Fig. 2D. Spectral data suggest that differentiation of the spectra associated with RNA and DNA is possible. In general, spectral differences occur mainly at wavenumbers ranging from 500 to 1000 cm^{-1} , where deformation vibrations are attributable to particular bases. Two spectral bands are consequently selected for further differentiation of the nucleic acids. First, the RNA breathing mode (spectral band located at 850 cm^{-1}) is selected as a marker band for the analysis of RNA. Subsequently, the deformation mode of Thymine (spectral band located at 764 cm^{-1}) is employed for the analysis of DNA.

The ability of the procedure to perform quantitative analysis is subsequently assessed. First, Raman spectra for calibration samples containing standards of both nucleic acids (concentrations: 5–500 ng L^{-1}) are obtained; six calibration points with five technical replicates are measured (see Fig. 3C and D for the constructed calibration curves showing the results for DNA and RNA, respectively). The sample spectral data used for the calculation of both calibrations are shown in Fig. 3A and B, where three

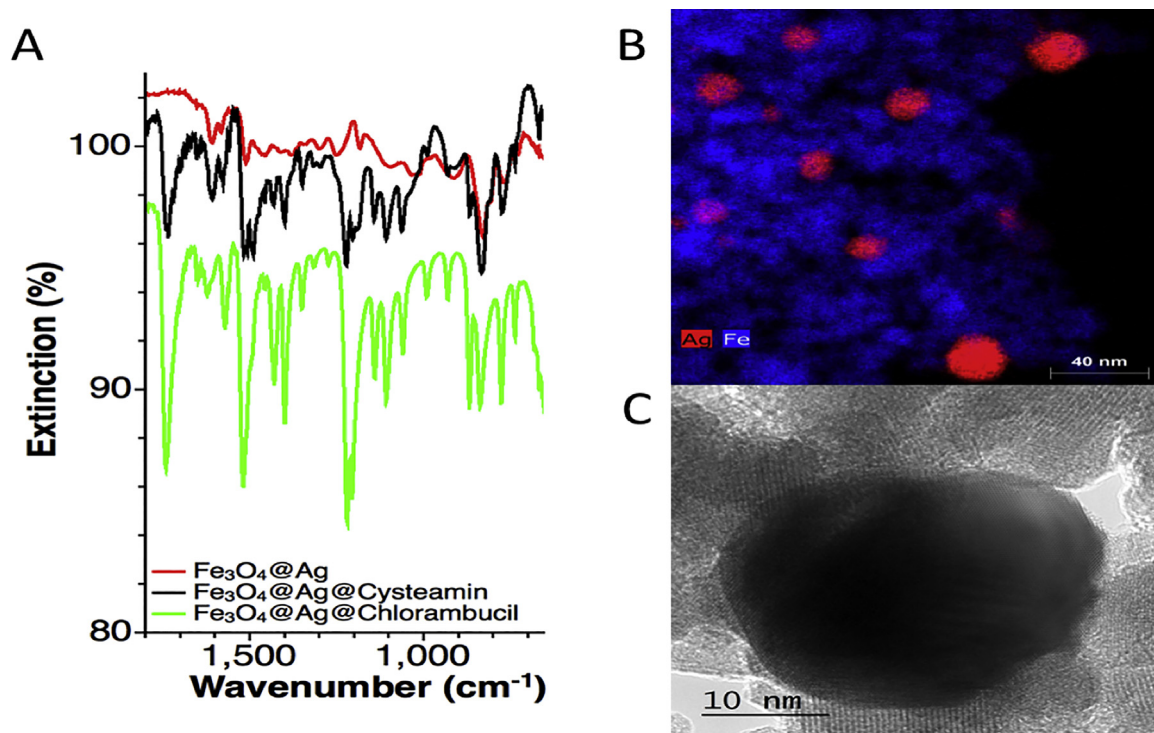


Fig. 1. (A) Infrared spectra obtained at three steps of the synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite. Trace 1: raw $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite, Trace 2: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposites functionalized by cysteamine, and Trace 3: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite. The as-prepared nanocomposite has been successfully functionalized. (B) Elemental analysis (color labels; blue: iron, red: silver) of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite reveals the presence of silver and magnetic nanoparticles. (C) HRTEM image of the as-prepared functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite showing a magnetic nanoparticle. Fe_3O_4 nanoparticles and silver nanoparticles have sizes of ~ 5 nm and < 40 nm, respectively.

concentration levels are selected. The absolute intensity of the spectral bands located at wavenumbers characteristic of DNA and RNA molecules changes accordingly. The final parameters of the calculated calibration curves are summarized in Table S2. Briefly, the coefficient of determination is 0.995 for DNA and 0.982 for RNA. The limits of detections for both targets (3.0 ng L^{-1} for DNA and 3.8 ng L^{-1} for RNA) are calculated from the slope and an integer of the respective calibration curves. The detection limits for the methods aimed at determining the total amount of DNA, based on a combination of spectrophotometry and labeling dyes [4], are frequently quoted in units of tens of ng L^{-1} . Existing alternatives, such as approaches based on quantum dots [25], small molecule-based fluorescent chemosensors [17–19], or mass spectrometry [26], have comparable limits of detection. However, approaches based on quantum dots and mass spectrometry typically require complex sample pre-treatment and application of protocols encompassing a time-dependent isolation of the targeted nucleic acids. Fluorescent imaging probes based on imidazole derivatives and other novel small organic molecules constitute interesting alternatives. However, research on their selectivity toward DNA and RNA, and development of synthesis protocols are lacking. These factors indicate that the developed approach represents a fully competitive solution to the already established approaches. Attributes including short analysis or method availability at a point of care render this approach an attractive alternative to the conventional methods.

The potential of the developed approach for quantifying the total amounts of nucleic acids is assessed using nine samples of tumor tissues. Resulting data are compared with parallel results obtained from a spectrophotometric analysis, consecutively performed on the same set of samples. The obtained results are shown in Fig. 3E and F, and the statistical data are summarized in Table S3. Briefly, the concentration levels of nucleic acids are determined with a relative error of determination of $< 5\%$; relative differences between

experimental data from both techniques are lower than 15% (correlation higher than 0.99). Furthermore, samples containing both targets are analyzed to determine if the developed approach can perform multiplexed analysis. In this case, three actual samples containing defined concentrations of both nucleic acids, namely RNA and DNA, are evaluated using the above-described procedures. The corresponding relative errors of determinations are all lower than 10%. Therefore, the obtained results indicate that the developed approach can perform multiplexed analysis. This may further enable the determination of the total DNA content of samples contaminated with other nucleic acids including RNA.

4. Conclusions

Determination of the total content of nucleic acids in complex samples represents an important step in procedures associated with medical diagnosis or forensic science. For this purpose, a novel approach based on magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS) has been developed. The methodology is based on the utilization of a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite, where the surface of Ag nanoparticles is further functionalized using an alkylating agent, namely chlorambucil. The functionalization is performed via cysteamine, which serves as a linking molecule. As-prepared functionalized nanocomposite is subsequently applied as a biosensor for multiplexed determination of the total contents of DNA and RNA in actual samples of cancerous tissues. Calculated limits of detection are in units of ng L^{-1} and relative errors of determination, obtained from the analysis of actual samples, are lower than 10%. Comparison of the obtained results with parallel data acquired from spectral measurements reveals a relative difference of $< 15\%$. The method provides results with very good repeatability. The stability of the utilized $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite is evaluated over 21 days with a 25% degreasing of the analytical

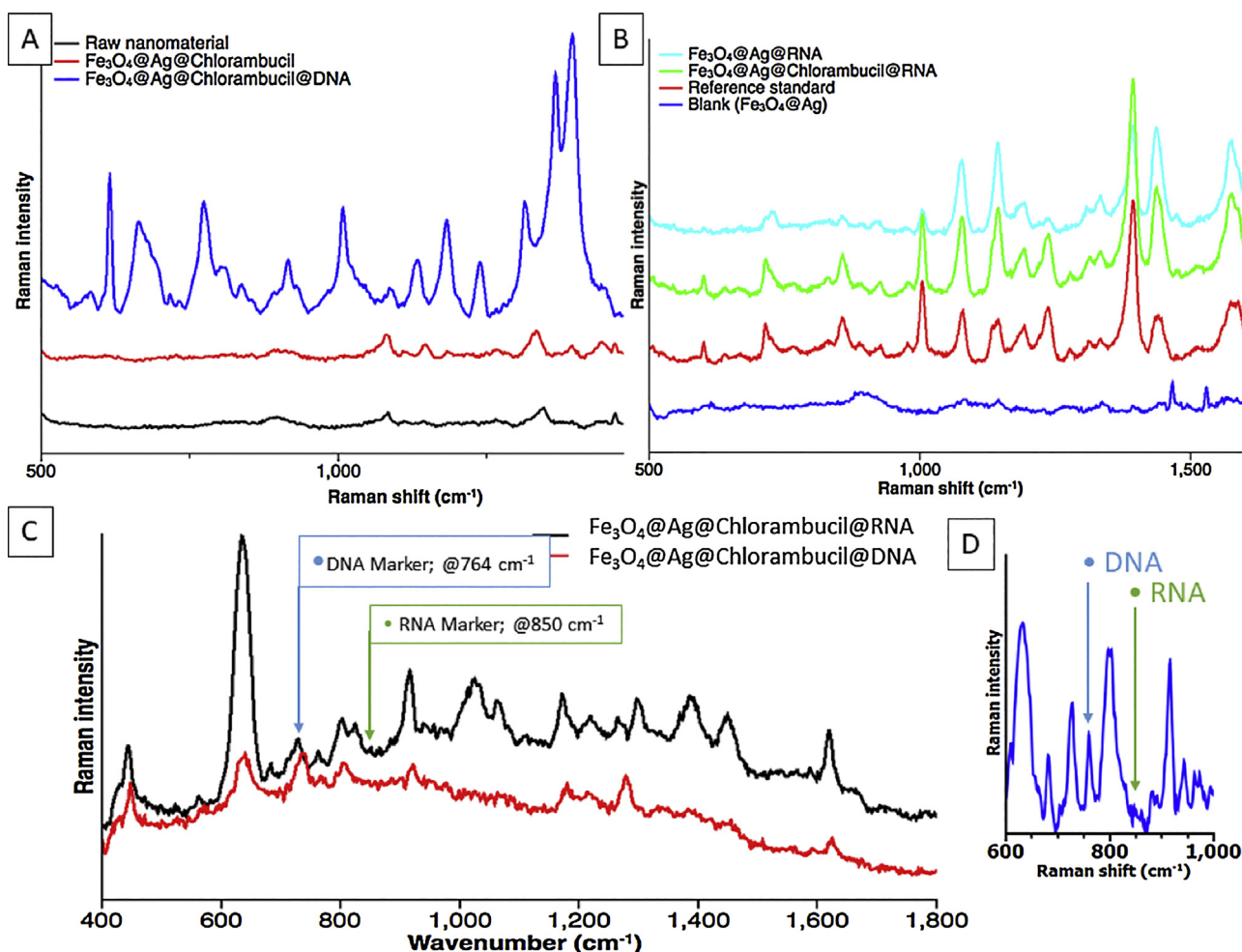


Fig. 2. (A) Raman spectra obtained from the bare $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$), and a standard sample of DNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$) associated with the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@DNA}$). (B) Raman spectra obtained from: the as-prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite (blank), an actual sample of non-functionalized RNA ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@RNA}$), an actual sample of RNA functionalized by chlorambucil using the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil@RNA}$), and a standard RNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$)-containing solution, analyzed using the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite (reference standard). (C) Raman spectra obtained from the samples containing DNA and RNA at the same concentration level (100 ng L^{-1}). Samples were analyzed using $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite and MA-SERS. Spectra contain regions with a considerable degree of differentiation. These regions are located between 800 cm^{-1} and 1200 cm^{-1} , where breathing modes of DNA and RNA, as well as spectral bands of Thymine and Uracil, are found. (D) Raman spectra obtained from the analysis of DNA and RNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$, ratio = 1:1). The sample is consecutively diluted to a RNA level of 100 ng L^{-1} . The resulting Raman spectra (Fig. 2B) are compared with data previously acquired from standard samples of RNA. This comparison shows that utilization of the alkylation agent has no effect on the gained analytical information, as indicated by the spectral trace denoted as "Reference standard". The spectra obtained from the analysis of actual samples with a high content of interfering components using both functionalized and bare nanocomposites (denoted as " $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ " and " $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ ") are also compared. This comparison reveals the significant potential of the above-described functionalization. Spectral data of RNA present in actual complex samples, acquired using $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite, are less dented than those of the bare nanocomposites and lack the characteristic protein bands. Therefore, the functionalization leads to a considerable decrease in the impact of the presented interferences. This hypothesis is further tested by analyzing samples containing bovine serum albumin (BSA) at five different concentration levels ($10\text{--}10,000 \text{ ng mL}^{-1}$). The corresponding results (see Fig. S1) reveal the positive impact of the functionalization. Spectra obtained from the bare $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite consist of spectral bands that are characteristic of proteins (for example, the bands at 1300 cm^{-1} and 1550 cm^{-1} correspond to Amid I and II, respectively). These bands are absent from the spectra obtained using functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag@Chlorambucil}$ nanocomposite, indicating that the functionalization inactivates the free surface of the nanocomposite and increases the sensitivity toward nucleic acids.

signal. The achieved limits of detection combined with minimal time requirements and simplicity render the method an interesting alternative to generally applied spectroscopy-based methods, such as UV/Vis and fluorimetry.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of the NPU LO1305 and NPU LO1304 projects of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, project IGA.UP.2016.021, CZ.1.07/2.3.00/30.0004 and Research Infrastructure NanoEnvicZ, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the

Czech Republic under Project No. LM2015073. ZC measured the Raman spectra, AB and ZM prepared the functionalized Fe_3O_4 nanomaterials, JS and MH designed the experiment regarding the samples and analytes. In addition, VR and RZ designed the nanomaterial and wrote the manuscript, and KC was responsible for HRTEM images and chemical mapping. All authors reviewed the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.apmt.2017.12.012](https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.12.012).

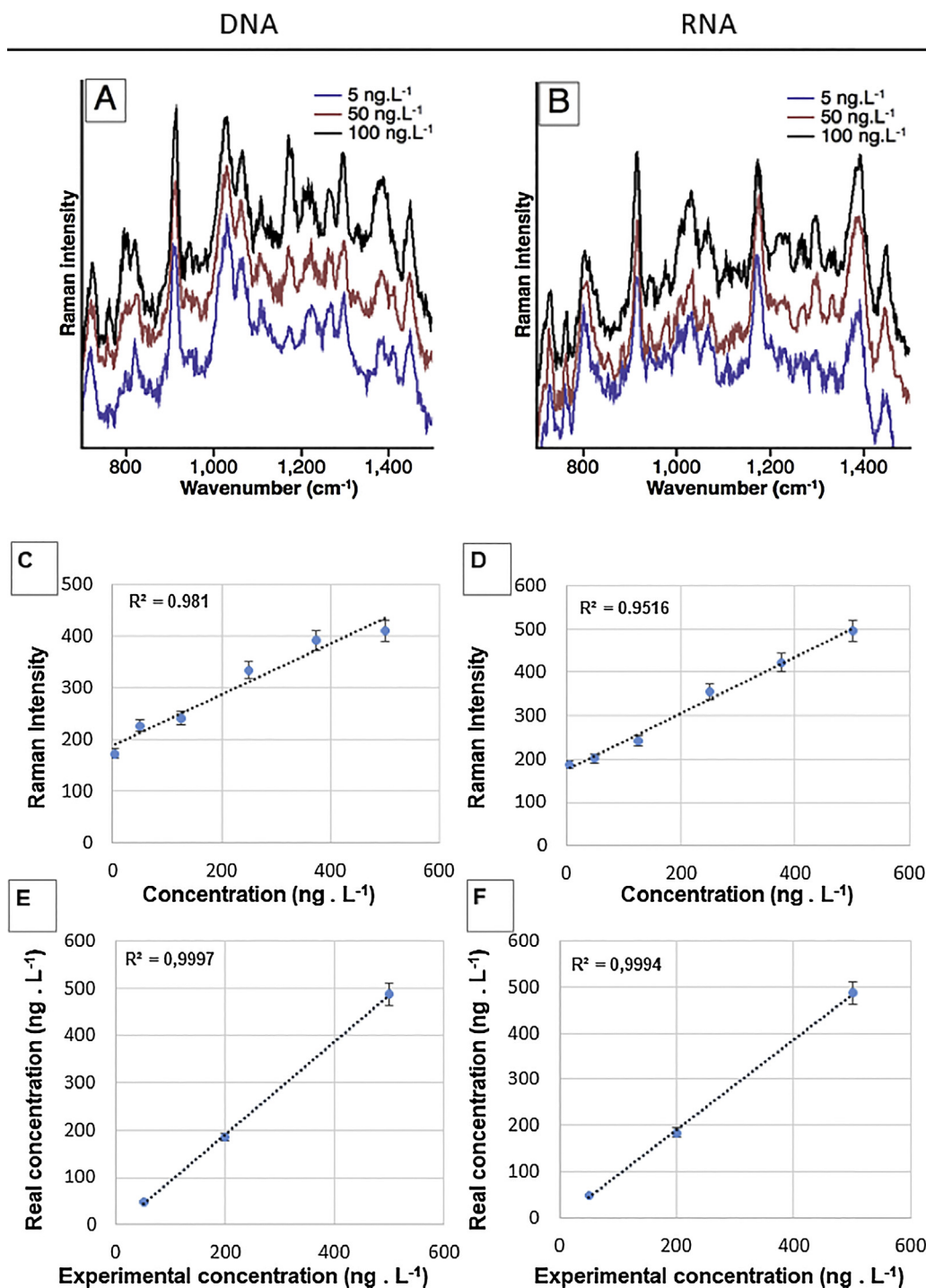


Fig. 3. Data obtained from the MA-SERS analysis of actual samples. Raman spectra obtained from analysis of (A) DNA and (B) RNA at concentrations of 5, 50, and 100 ng.L⁻¹. Calibration curves containing six calibration points obtained from the analysis of (C) DNA and (D) RNA. Quantitative results obtained from the analysis of actual samples containing (E) DNA and (F) RNA using the methodology described here (experimental concentration) and standardized UV/Vis analysis (actual concentration).

References

- [1] S. Stigliani, P. Anserini, P.L. Venturini, P. Scaruffi, Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation, *Hum. Reprod.* 28 (2013) 2652–2660.
- [2] P. Podlesniy, J. Figueiro-Silva, A. Llado, A. Antonell, R. Sanchez-Valle, D. Alcolea, A. Lleo, J.L. Molinuevo, N. Serra, R. Trullas, Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease, *Ann. Neurol.* 74 (2013) 655–668.
- [3] M. Tsuboi, I. Hisatome, T. Morisaki, M. Tanaka, Y. Tomikura, S. Takeda, M. Shimoyama, A. Ohtahara, K. Ogino, O. Igawa, C. Shigemasa, S. Ohgi, E. Nanba, Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation, *Eur. J. Clin. Invest.* 31 (2001) 489–496.
- [4] S.B. Lee, B. McCord, E. Buel, Advances in forensic DNA quantification: a review, *Electrophoresis* 35 (2014) 3044–3052.
- [5] E.P. Diamandis, Analytical methodology for immunoassays and DNA hybridization assays – current status and selected systems – critical review, *Clin. Chim. Acta* 194 (1990) 19–50.
- [6] P. Koivisto, K. Peltonen, Analytical methods in DNA and protein adduct analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2563–2572.
- [7] H. Wang, X. Jiang, X. Wang, X. Wei, Y. Zhu, B. Sun, Y. Su, S. He, Y. He, Hairpin DNA-assisted silicon/silver-based surface-enhanced Raman scattering sensing platform for ultrahighly sensitive and specific discrimination of deafness mutations in a real system, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7368–7376.

- [8] J. Zheng, A. Jiao, R. Yang, H. Li, J. Li, M. Shi, C. Ma, Y. Jiang, L. Deng, W. Tan, Fabricating a reversible and regenerable Raman-active substrate with a biomolecule-controlled DNA nanomachine, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 19957–19960.
- [9] H.-N. Wang, A.M. Fales, A.K. Zaas, C.W. Woods, T. Burke, G.S. Ginsburg, T. Vo-Dinh, Surface-enhanced Raman scattering molecular sentinel nanoprobe for viral infection diagnostics, *Anal. Chim. Acta* 786 (2013) 153–158.
- [10] Y. Pang, J. Wang, R. Xiao, S. Wang, SERS molecular sentinel for the RNA genetic marker of PB1-F2 protein in highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus, *Biosens. Bioelectron.* 61 (2014) 460–465.
- [11] Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, B. Shuter, S.-C. Wang, C. Poh, W. Wang, (Carboxymethyl)chitosan-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of stem cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1 (2009) 328–335.
- [12] S.-q. Huang, J. Hu, G. Zhu, C.-y. Zhang, Sensitive detection of point mutation using exponential strand displacement amplification-based surface enhanced Raman spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 191–197.
- [13] L. Ou, Y. Chen, Y. Su, Y. Huang, R. Chen, J. Lei, Application of silver nanoparticle-based SERS spectroscopy for DNA analysis in irradiated nasopharyngeal carcinoma cells, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 680–685.
- [14] J. Morla-Folch, H.-n. Xie, P. Gisbert-Quilis, S. Gómez-de Pedro, N. Pazos-Perez, R.A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, Ultrasensitive direct quantification of nucleobase modifications in DNA by surface-enhanced Raman scattering: the case of cytosine, *Angew. Chem., Int. Ed.* 54 (2015) 13650–13654.
- [15] Y. Pang, C. Wang, J. Wang, Z. Sun, R. Xiao, S. Wang, Fe₃O₄@Ag magnetic nanoparticles for microRNA capture and duplex-specific nuclease signal amplification based SERS detection in cancer cells, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 574–580.
- [16] P.C. Pinheiro, S. Fateixa, H.I.S. Nogueira, T. Trindade, SERS studies of DNA nucleobases using new silver poly(methyl methacrylate) nanocomposites as analytical platforms, *J. Raman Spectrosc.* 46 (2015) 47–53.
- [17] B. Shirinfar, N. Ahmed, Y.S. Park, G.S. Cho, Y.S. Youn, J.K. Han, H.G. Nam, K.S. Kim, Selective fluorescent detection of RNA in living cells by using imidazolium-based cyclophane, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 90–93.
- [18] M. Yousuf, Y.S. Youn, J. Yun, L. Rasheed, R. Valero, G. Shi, K.S. Kim, Violation of DNA neighbor exclusion principle in RNA recognition, *Chem. Sci.* 7 (2016) 3581–3588.
- [19] N. Ahmed, B. Shirinfar, V.M. Miriyala, S.-K. Choi, K.-M. Lee, W.B. Jeon, Y.S. Park, H.G. Nam, A new selective 'turn-on' small fluorescent cationic probe for recognition of RNA in cells, *Supramol. Chem.* 27 (2015) 478–483.
- [20] T. Donnelly, W.E. Smith, K. Faulds, D. Graham, Silver and magnetic nanoparticles for sensitive DNA detection by SERS, *Chem. Commun.* 50 (2014) 12907–12910.
- [21] 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.
- [22] Z. Marková, K. Šišková, J. Filip, K. Šafářová, R. Prucek, A. Panáček, M. Kolář, R. Zbořil, Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity, *Green Chem.* 14 (2012) 2550–2558.
- [23] K. Kneipp, J. Flemming, Surface enhanced Raman scattering (SERS) of nucleic acids adsorbed on colloidal silver particles, *J. Mol. Struct.* 145 (1986) 173–179.
- [24] J.S. Suh, M. Moskovits, Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids and nucleotide bases adsorbed on silver, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4711–4718.
- [25] Y.K. Tak, W.Y. Kim, M.J. Kim, E. Han, M.S. Han, J.J. Kim, W. Kim, J.E. Lee, J.M. Song, Highly sensitive polymerase chain reaction-free quantum dot-based quantification of forensic genomic DNA, *Anal. Chim. Acta* 721 (2012) 85–91.
- [26] S.-I. Fujii, K. Inagaki, S.-i. Miyashita, K. Nagasawa, K. Chiba, A. Takatsu, A coupling system of capillary gel electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of double stranded DNA fragments, *Metallomics* 5 (2013) 424–428.

Supporting Information

Label-free determination and multiplex analysis of DNA and RNA in tumor tissues

Zuzana Chaloupková ^a, Anna Balzerová ^a, Zdenka Medříková ^a, Josef Srovnal ^b, Marián Hajdúch ^b, Klára Čépe ^a, Václav Ranc ^{a,*}, Radek Zbořil ^{a,*}

^a *Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic*

^b *Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, Czech Republic*

Table S1. Interpretation of spectral data

Interpretation of spectral bands of presented in Raman spectra of DNA and RNA samples.

Spectral band (cm⁻¹)	Interpretation
505	S-S disulfide stretching in proteins

602	Phosphate band
725	Trp or A (symmetric breathing of bases)
729	Adenine
773	Thymine
850	RNA ring breathing mode
1140	C-O-C stretch
1336	Adenine
1390	Aromatic ring vibration of DNA/RNA
1440	Guanine
1576	Adenine
1610	Tyr aromatic ring vibration
1640	Carbonyl stretching mode

Table S2. Results obtained from a linear regression performed on calibration data
Parameters A and B represent coefficients of the equation of calculated calibration line. LOD stands for a limit of detection calculated from parameters of the calibration line.

Target	y = Ax+B		R ²	LOD ng L ⁻¹
	A	B		
DNA	20.9	-12.4	0.98	3.0
RNA	15.5	-7.59	0.95	3.8

Table S3. Results obtained by quantitative analysis of samples containing DNA and RNA
Results obtained by the analysis of real samples. Real samples were analyzed using here developed MA-SERS based approach, and using spectrophotometry for a comparison. It can be seen that the procedure can determine the content of nucleic acids with relative errors (RSD) lower than 15% for both, mixed samples and real samples.

Sample	PCR (ng L ⁻¹)	MA-SERS (ng L ⁻¹)	RSD (%)
DNA 1	224	227	1.3
DNA 2	224	226	1.0
DNA 3	224	235	4.5
DNA 4	224	257	12.8
DNA 5	224	202	10.9
DNA 6	224	238	5.9
RNA 1	582	606	4.0
RNA 2	582	575	1.3
RNA 3	582	593	1.8

Ratio DNA/RNA	DNA			RNA		
	Real	Experimental	RSD (%)	Real	Experimental	RSD (%)
Sample 1	50	45	10.0	500	487	2.6
Sample 2	200	185	7.5	200	185	7.5
Sample 3	500	487	2.6	50	48	4.0

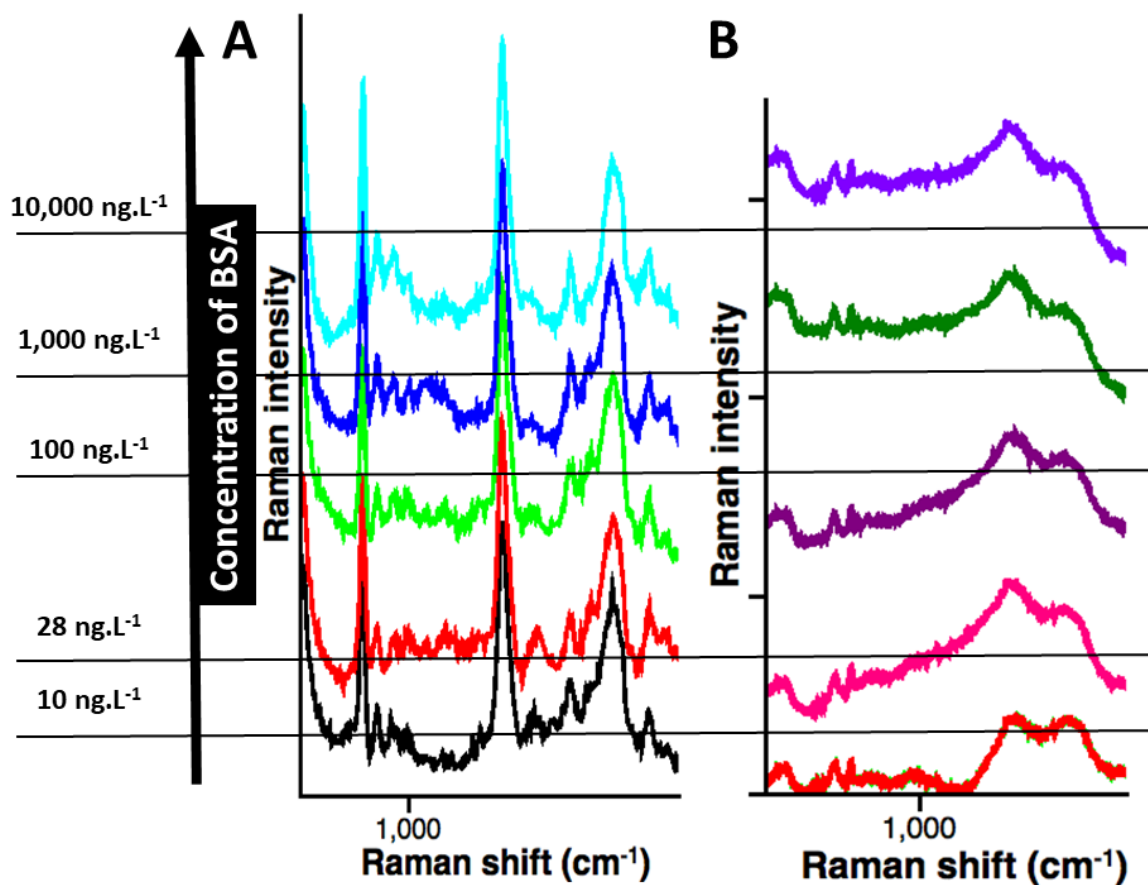


Fig. S1. Evaluation of the selectivity of the sensor

Raman spectra were obtained at five different concentrations of bovine serum albumin (BSA). Spectra at part A were obtained using functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Chlorambucil}$ nanocomposite. Spectra at part B were obtained without functionalization with a bare $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite.

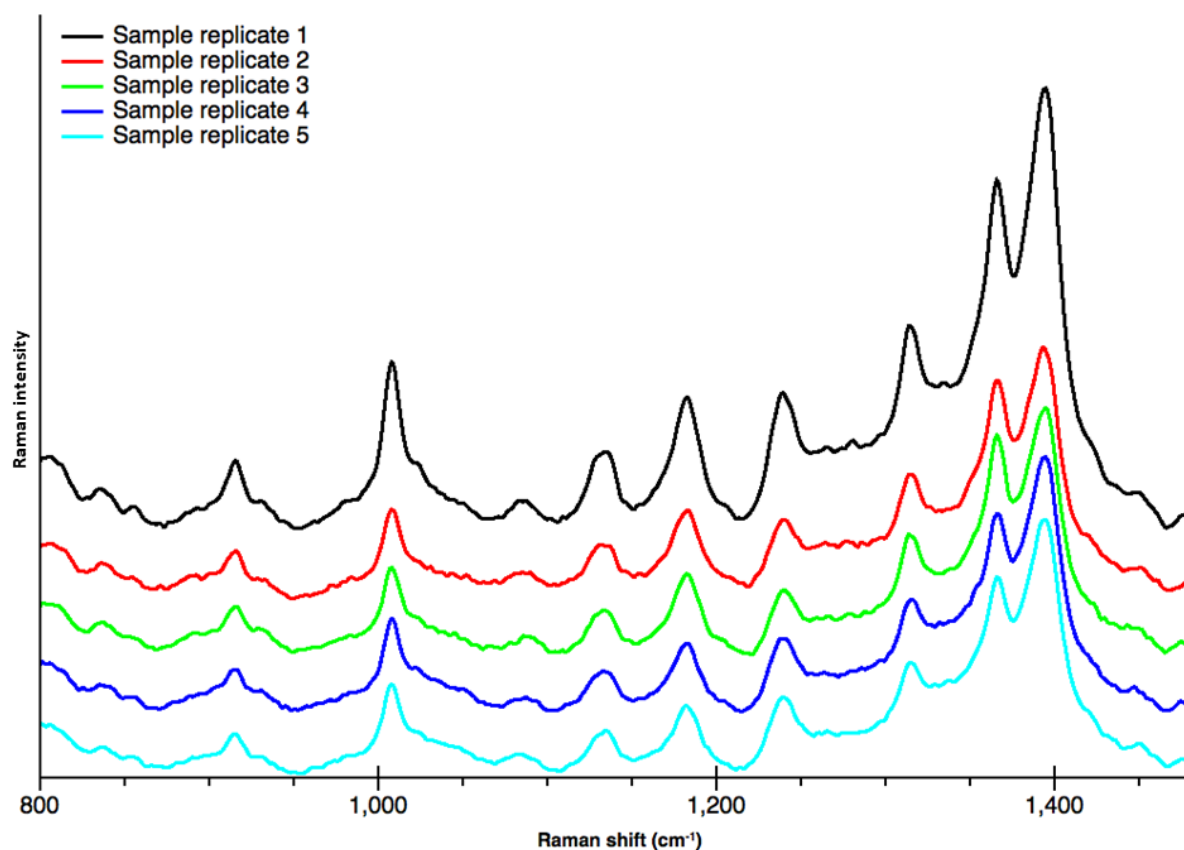


Fig. S2. Stability of DNA samples

Raman spectra of five consecutive samples of DNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$). Spectra were measured using $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Chlorambucil}$ nanocomposite and MA-SERS in one batch. It is shown that there is no considerable difference between obtained spectral data.

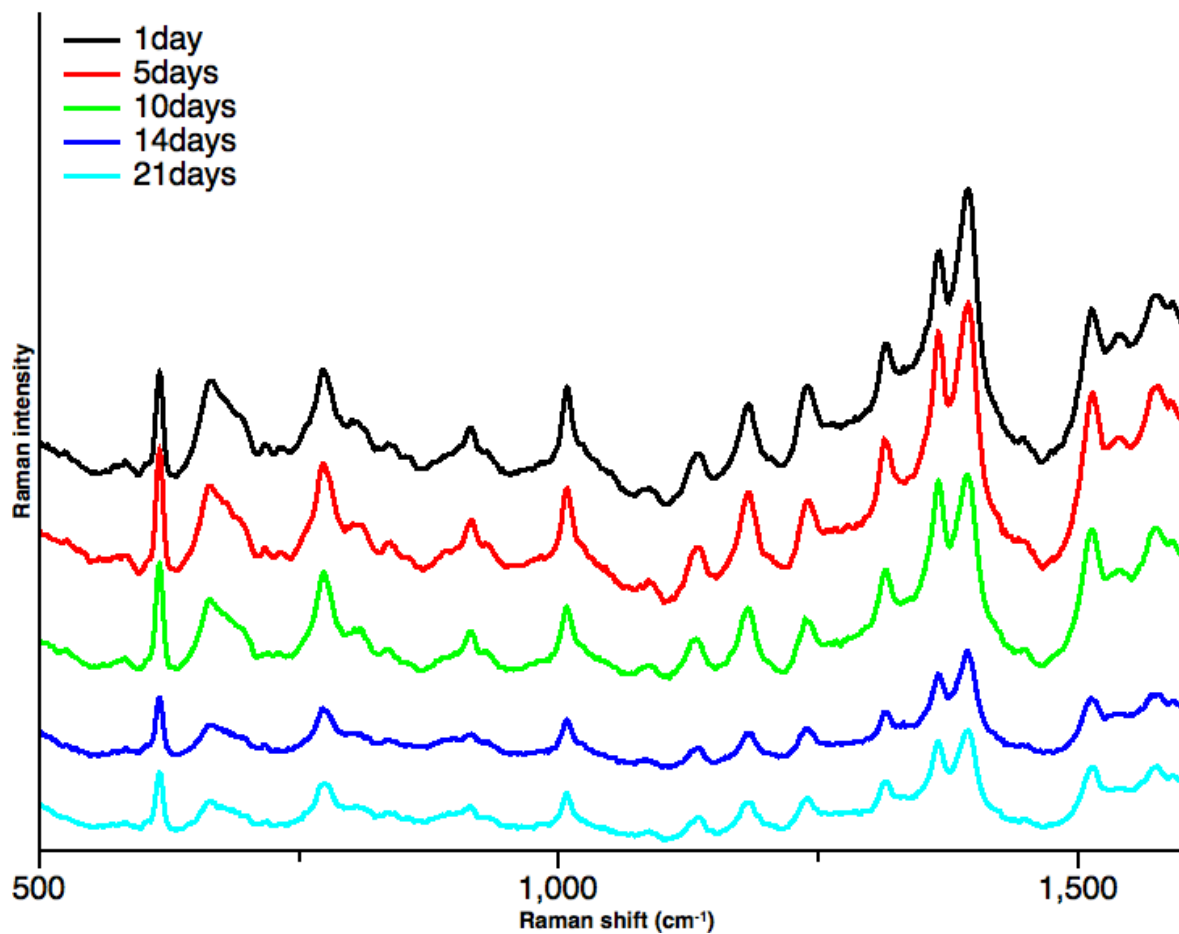


Fig. S3. Repeatability of measurements

Raman spectra of five consecutive samples of DNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$). Samples were measured using $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Chlorambucil}$ at the defined time intervals: 1, 5, 10, 14, and 21 days. It is shown that all spectra are fully comparable, albeit longer storage times lead to a moderate decrease of the total intensity. The calculated decrease of total intensity between day 1 and day 10 is lower than 5%.



Label-free determination of prostate specific membrane antigen in human whole blood at nanomolar levels by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy



Zuzana Chaloupková^a, Anna Balzerová^a, Jitka Bařínková^b, Zdenka Medříková^a, Pavel Šácha^d, Petr Beneš^c, Václav Ranc^{a,*}, Jan Konvalinka^b, Radek Zbořil^a

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

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha 2, Czech Republic

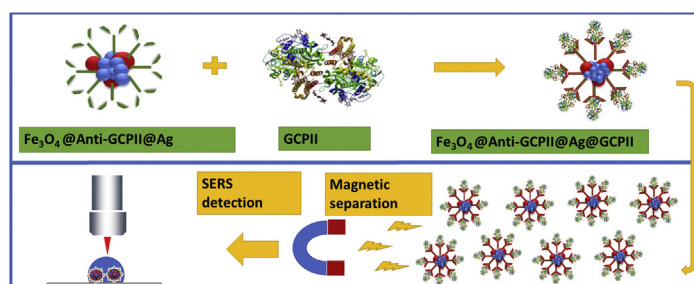
^c Oncology Clinic, University Hospital in Olomouc, I. P. Pavlova 6, Olomouc, Czech Republic

^d Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, The Czech Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, 16610, Prague 6, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- A new method for a determination of prostate specific membrane antigen is proposed.
- The method utilizes magnetic; surface functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanocomposite.
- A determination is based on magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy.
- Method application potential is demonstrated by analysis of human whole blood.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2017

Received in revised form

6 October 2017

Accepted 8 October 2017

Available online 17 October 2017

Keywords:

Raman spectroscopy

Nanocomposites

Prostate cancer

GCPII

MA-SERS

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most common cancers among men and can in its later stages cause serious medical problems. Due to the limited suitability of current diagnostic biochemical markers, new biomarkers for the detection of prostate cancer are highly sought after. An ideal biomarker should serve as a reliable prognostic marker, be applicable for early diagnosis, and be applicable for monitoring of therapeutic response. One potential candidate is glutamate carboxypeptidase II (GCPII), also known as prostate specific membrane antigen (PSMA), which has a promising role for direct imaging. GCPII is considerably over-expressed on cancerous prostatic epithelial cells; its analysis typically follows radiological or spectrophotometric principles. Its role as a biomarker present in blood has been recently investigated and potential correlation between a concentration of GCPII and prostate cancer has been proposed. The wider inclusion of GCPII detection in clinical praxis limits mainly the time and cost per analysis. Here, we present a novel analytical nanosensor applicable to quantification of GCPII in human whole blood consisted of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ magnetic nanocomposite surface-functionalized by an artificial antibody (low-molecular-weight GCPII synthetic inhibitor). The nanocomposite allows a simple magnetic isolation of GCPII using external magnetic force and its consecutive determination by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS) with a limit of detection $6 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$. This

* Corresponding author.

E-mail address: vaclav.ranc@upol.cz (V. Ranc).

method enables a rapid determination of picomolar concentrations of GCPII in whole human blood of healthy individuals using a standard addition method without a complicated sample pre-treatment.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer is among the most frequently diagnosed forms of cancer, and currently accounts for 12% of all cancer cases worldwide. The incidence rate in the global population has increased 155% since 1970, and nearly 500,000 new cases were diagnosed in 2012 [1,2]. The most common screening tests for early diagnosis of prostate cancer are based on determination of the blood level of prostate specific antigen (PSA) or a digital rectal exam (DRE) [3]. Elevated PSA levels indicate higher probability of prostate cancer; however, PSA elevations also can be caused by other health complications, including benign prostatic hyperplasia and nonspecific inflammation [4,5]. If PSA or DRE suggests prostate cancer, transrectal biopsy is typically used to confirm the diagnosis. Diagnostic information describing a tumor behavior can be alternatively obtained from a patient's genomic data, however, utilization of this procedure is still limited due a still required biopsy [6]. Therefore, new biomarkers and more reliable techniques for a prostate cancer diagnosis are being actively investigated. Prostate specific membrane antigen [PSMA, also known as folate hydrolase I and glutamate carboxypeptidase II (GCPII)], is one potential candidate. GCPII is a type II transmembrane zinc-metalloenzyme with glutamate carboxypeptidase activity [7]. It catalyzes the hydrolysis of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) to glutamate and N-acetylaspartate (NAA) and is considerably over-expressed on prostate cancer cells [7,8]. Some studies have also indicated a correlation of GCPII expression with tumor stage and grade [9]. Reports also indicate its potential applicability in all stages of diagnostics and monitoring of disease treatment [10]. Clinical trials utilizing labeled antibody against GCPII for prostate cancer detection have shown promising results [11]; however, their usability is considerably limited by a long biological half-life [12]. Strategies to overcome this limitation include use of antibodies labeled with long-lived PET radionuclides, including ^{89}Zr and ^{64}Cu , and utilization of antiGCPII mini-bodies [13]. An alternative approach is utilization of small-molecule inhibitors that mimic the endogenous substrate NAAG. Development of inhibitors for visualization of GCPII led to introduction of various radiolabels, including ^{68}Ga , ^{123}I , ^{18}F , and ^{111}In , of which ^{68}Ga seems to offer the best results [14–20]. However, radiolabeled molecules were not very effective at detecting small metastatic deposits, leading researchers to design inhibitors with fluorescent labels. Inhibitors labeled with fluorescent dyes have been applied intraoperatively to identify brain tumors using photo-diagnosis (PDD) [21,22]. This approach was further improved using quantum dots [23] and advanced fluorescent labels, including indocyanine green (ICG) [24]. Detection of GCP-II as a potential biomarker in blood serum has been investigated e.g. by Rochon et al., where higher levels in prostate cancer patients were demonstrated, compared to healthy patients [25]. Similar results were obtained by Murphy *et al.*, where GCP-II shown a better prognostic value than PSA [26]. GCP-II levels in blood has been further evaluated by Beckett et al. [27], and Knedlik et al. [28], where a further potential has been proposed. Methods based on molecular spectroscopy are an interesting alternative to these more common label-based approaches. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is considered a promising technique for analysis of molecular targets at ultra-low concentration levels. Since its

introduction in 1979 by Fleischmann, the technique has undergone dramatic developments [29]. Development of novel substrates allowed detection of record-low concentrations of various targets, and introduction of magnetic nanocomposites allowed isolation of the chemical target before follow-up spectral analysis [30–33]. Here, we demonstrate the utilization of low-molecular-weight GCPII inhibitors in magnetically assisted (MA)-SERS. The suitability of this type of low-molecular-weight inhibitor in the analysis of GCPII has been demonstrated in previous analyses of human blood [28] using a radio-immunoanalytical approach (RIA) and of brain tissue [34], as well as in GCPII detection using DNA-linked inhibitor [35]. Sacha et al. described a more complex strategy employing synthetic polymer conjugates [36]. The MA-SERS approach described here utilizes $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ magnetic nanocomposite functionalized with a low-molecular-weight inhibitor of GCPII. This novel approach enables magnetic isolation of GCPII and its follow up SERS detection in whole human blood in a very short time, with a limit of detections orders of magnitude lower than commonly used techniques.

2. Experimental section

2.1. Reagents and chemicals

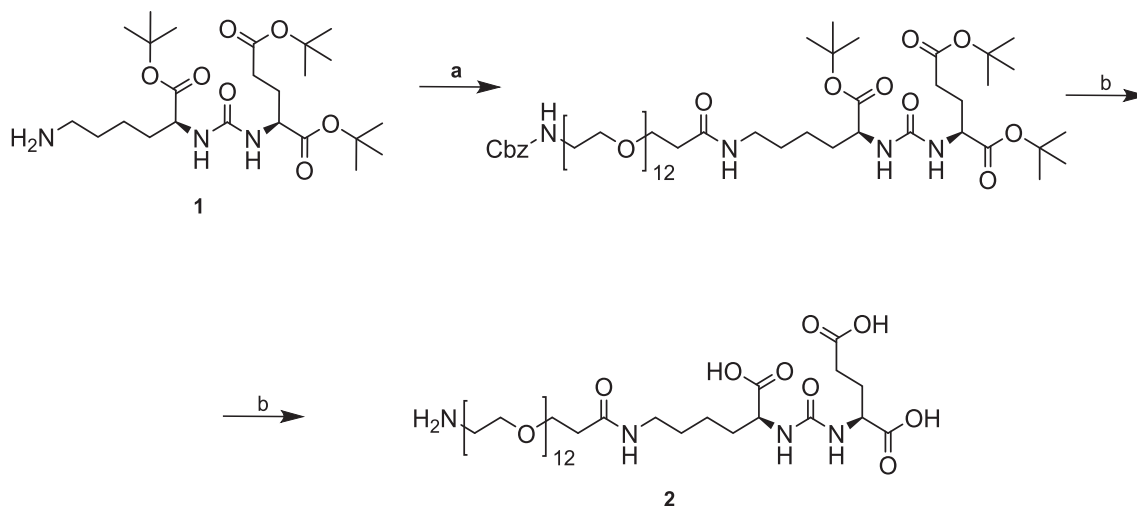
Silver nitrate (p.a.), D-(+)-maltose monohydrate (p.a.), ammonia (25%) (p.a.), carboxymethyl cellulose sodium salt (low viscosity), iron(II) sulfate heptahydrate ($\geq 99\%$), ammonium hydroxide solution, (28.0–30.0%), and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride ($\geq 99.0\%$) were purchased from Sigma Aldrich (San Chose, U.S.A.) and used without further purification. Sodium hydroxide (p.a.) was purchased from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic).

2.2. Synthesis of low-molecular-weight GCPII inhibitor

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless stated otherwise. The final compound was purified using a preparative scale Jasco PU-986 HPLC (flow rate 10 mL/s), equipped with a YMC C18 Prep Column, 5 μm , 250 \times 20 mm. Purity was tested on an analytical Jasco PU-1580 HPLC (flow rate 1 mL/s), equipped with a Watex C18 Analytical Column, 5 μm , 250 \times 5 mm. The final compound was of at least 99% purity. The structure was confirmed by HRMS at LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific).

Compound **1** was prepared as previously described [37]. Compound **2** was synthesized as shown in Scheme 1.

Compound **2**: 1-amino-39,47-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxa-40,46,48-triazahenpentacontane-45,49,51-tricarboxylic acid, 511 mg (0.68 mmol, 1.1 eq) Z-PEG₁₂-COOH (IRIS Biotech) was dissolved in 1.5 mL DMF, and 297 mg (0.775 mmol, 1.25 eq) TBTU along with 150 μL DIEA (0.87 mmol, 1.4 eq) were added. The reaction mixture was left stirring for 30 min, and 307 mg (0.62 mmol, 1.0 eq) compound **1** along with 118 μL DIEA (0.68 mmol, 1.1 eq) dissolved in 1.5 mL of DMF, were added into the reaction mixture in one portion. The reaction was left overnight, and the mixture was rotary evaporated to dryness. The crude product was dissolved in MeOH, and the Cbz protective group was removed by hydrogenation (1.1 atm) with $\text{Pd}(\text{OH})_2$ as catalyst (the



Scheme 1. Synthesis of Anti-GCPII (labeled as compound 2)

a) Z-PEG12-COOH, TBTU, DIEA, DMF; b) 1) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, MeOH; 2) TFA.

course of the reaction was monitored with TLC; it completed in 3 h). The product was filtered and solvent removed on a rotary evaporator. To one-third of this product, 1 mL TFA was added and the reaction mixture was alternately sonicated and stirred for 15 min. TFA was removed by flow of nitrogen, and the product was purified using preparative scale HPLC (gradient 2–30% ACN in 60 min, $t_R = 38.1$ min), 113 mg of product was obtained (isolated yield = 60%). Analytical HPLC (gradient 2–100% ACN in 30 min, $t_R = 14.8$ min). HRMS (ESI⁻): calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{20}$ [M]⁻ 917.48,236. Found 917.48,138. A stock solution of compound 2 was prepared by dissolving 40 μg of the inhibitor in 1 mL deionized water.

2.3. Preparation of a standard solution of GCPII

GCPII protein was prepared as previously described [38]. Briefly, the extracellular portion of GCPII (amino acids 44–750 with an AviTag at the N-terminus) was produced in insect S2 cells; purified on Streptavidin mutein matrix; dialyzed against 20 mM MOPS, 20 mM NaCl, pH 7.4; aliquoted; and stored at -80°C . The purity was estimated to be >95% using sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentration of purified protein was 0.24 mg/mL, as determined by amino acid analysis after hydrolysis.

A solution containing 10 ng/mL of the isolated protein was prepared by diluting the stock solution with phosphate buffer (pH = 7.2). The sample was divided into 10 aliquots, which were kept at -20°C . Aliquots were diluted to the concentration levels described in the Results section immediately before use.

2.4. Preparation of samples of whole human blood

Five healthy volunteers in ranging in age from 50 to 71 years (5 males, 0 females) agreed to participate in this study. Blood specimens were collected to 2 mL Eppendorf tubes with citrate as anticoagulating agent. Samples were kept at -80°C and analyzed within 24 h. Blood samples were prepared by dilution 200 μL whole blood with 800 μL water (total volume of blood samples was 1 mL). No additional sample pre-treatment was performed. This step is necessary to reduce a total sample density and viscosity to further increase efficiency of consecutive magnetic isolation of GCPII from the sample.

2.5. Preparation of silver nanoparticles

Silver nanoparticles were prepared by a reduction of silver ammonia complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ with D-maltose according to protocol previously described by Panacek et al. [39]. Briefly, silver nitrate and the maltose were dissolved in distilled water to initial concentrations of 1 mmol and 10 mmol, respectively. The concentration of ammonia was 5 mmol. 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, initiating the reduction process. The reaction was considered complete after four minutes, yielding a nearly monodispersed suspension of maltose-reduced silver nanoparticles with an average particle size of about 28 nm.

2.6. Synthesis of Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite

First, magnetite nanoparticles stabilized using carboxymethyl cellulose (cmcFe_3O_4) were prepared according to the protocol described by Bakandritsos et al. [40]. Briefly, CMC and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ form a complex in aqueous solution. When NH_4OH (28%) is added to the mixture and the suspension is heated to 50°C , a magnetic colloid form. The sample was centrifuged, and the supernatant containing residual chemicals from the reaction was removed and replaced with water, and the sample was sonicated. Subsequent functionalization of the nanomaterial is schematically described in Fig. 1. A 75- μL aliquot of carboxymethyl cmcFe_3O_4 (containing 250 μg of nanomaterial) was activated by 5 μL of EDC (activation of carboxyl groups). After 15 min, 10 μg of compound 2 was added, and the total volume was adjusted to 250 μL . Immobilization of the inhibitor was performed overnight. The cMNPs loaded with compound 2 was washed using centrifugation (20,000 rpm) to remove free inhibitor. Finally, 10 μL of silver nanoparticles was added to the mixture to add silver onto the surface of Fe_3O_4 @Anti-GCPII nanoparticles, and nanoparticles were stirred 10–15 min at room temperature.

2.7. Preparation of samples containing GCPII

Analysis of GCPII using Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanoparticles was performed according to the following protocol: first, 10 μL of Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite was mixed with 10 μL of a standard solution of GCPII ($c = 10$ ng/mL), and the mixture was left

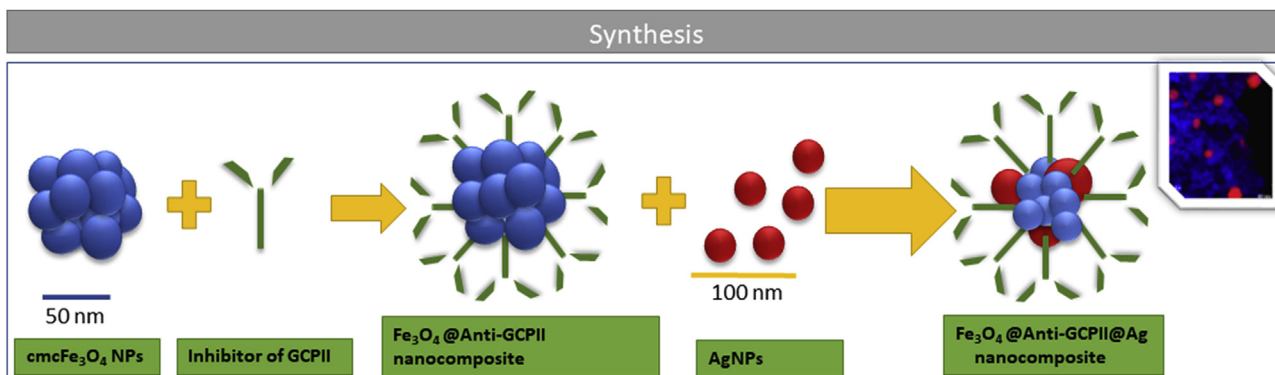


Fig. 1. General scheme describing the preparation and follow up functionalization of the nanomaterial.

for 30 min at room temperature. The dispersion was carefully mixed prior to use. Product was magnetically separated, washed three times with deionized water, and analyzed using our MA-SERS approach. The droplet containing sample and sensor was deposited on a glass platform, sensor was magnetically shifted closer to the droplet edge and measured immediately. Spectra were collected on nine representative spots and averaged.

2.8. Apparatus

The ζ potentials of the starting material and final products were measured using a Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). Raman spectra were measured on a DXR Raman spectroscope (Thermo Scientific, U.S.A) equipped with a red excitation laser operating at 633 nm. Stokes Raman spectra were collected in the 400–1800 cm^{-1} range with a spectral resolution of 1.0 cm^{-1} . The Raman spectrometer was operated with the following experimental parameters: exposure time 32 s, laser power on sample 8 mW, 32 microscans were averaged to obtain one experimental point. Spectral background was corrected using subtraction of polynomial functions ($n = 3$) to remove interference caused by fluorescence. The measured spectra are presented in terms of their Raman scattered photon count. Elemental mapping was conducted using a high-resolution transmission electron microscope (HR-TEM TITAN 60–300 kV) operating at 80 kV. Protein quantification was performed using the TQ-Analyst software package (Omnic version 8, Thermo Scientific, USA).

2.9. Analysis of samples

Our analytical method utilizes $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ magnetic nanocomposite functionalized with a low-molecular-weight GCPII inhibitor (compound **2**). The final ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Anti-GCPII@Ag$) nanocomposite serves as a biosensor with dual modality: magnetic separation of GCPII from a complex biological sample and follow-up detection using surface-enhanced Raman spectroscopy. Prepared samples containing $\text{Fe}_3\text{O}_4@Anti-GCPII@Ag@GCPII$ were magnetically isolated and diluted with deionized water ($V = 0.02$ mL). The resulting drop was deposited on a glass substrate and analyzed by Raman spectroscopy at 9 representative spots. Resulting spectral data were averaged and utilized in the follow-up steps.

2.10. Analysis of real samples

Real blood samples were analyzed analogically to a protocol described in the Experimental section, paragraph 2.9, and concentration of GCPII was determined using a following procedure. First, approximate concentration of the GCPII in the sample was

calculated from an external calibration constructed using standard solutions in a concentration range 5–200 ng mL^{-1} . Second, concentration of GCPII was determined using a standard addition method based on three consecutive additions of the standard solution of GCP II. Concentrations of the standard GCPII additions were based on an approximate concentration of GCPII from the first step, where concentrations of additions 1–3 were set to be 30–50% increments. Standard addition method was utilized to improve method accuracy and minimize possible matrix effects. Spectral band localized at 1335 cm^{-1} was employed in both steps for a quantification purposes.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the GCPII nanosensor

The GCPII nanosensor, prepared as described in the Experimental section, was characterized by transmission electron microscopy, Raman and infrared spectroscopy, and ζ -potential measurements. High-resolution TEM results are displayed in Fig. 2A–B. Silver nanoparticles with an average diameter of 30 nm are enclosed by considerably smaller magnetic nanoparticles with sizes around 10 nm, organized into dense superclusters. This observation is further supported by high-angle angular dark field image (HAADF, Fig. 2C) and energy dispersed spectroscopy (EDS, Fig. 2D–E). The ζ -potential of the final biosensor was -46 mV, indicating that the system is stable [41].

Acquired infrared spectral data are shown in Fig. 3A and B. The recorded FT-IR spectra of free carboxymethyl-cellulose (CMC) and functionalized cmcFe_3O_4 demonstrate successful immobilization of CMC on the surface of the magnetic nanoparticles (Fig. 3A). Spectra were interpreted in accordance with approaches defined by Barth [42]. Both spectra contain characteristic bands of pure CMC at 3400–3000 (O–H stretch), 2917 (C–H stretch), 1594 ($-\text{COO}^-$ asymmetric stretch), 1417 ($-\text{COO}^-$ symmetric stretch), 1338 (bridge–O–stretch), 1058 (C–O stretch), and 910 cm^{-1} (pyranose ring). Moreover, the characteristic band for magnetite at 590 cm^{-1} was found in cmcFe_3O_4 data. Anchoring of the Anti-GCPII is documented in the spectral data shown in Fig. 3B. The obtained FT-IR spectra of free Anti-GCPII and $\text{Fe}_3\text{O}_4@Anti-GCPII$ contain spectral bands at 1626–1629 (Lys, NH_3^+ asymmetric stretch), 1404 (Glu, COO^- vib. stretch), 1650 (amide I C=O stretch) and 1400 cm^{-1} (amide III C–N stretch).

3.2. Analysis of GCPII in model samples

To evaluate use of the synthesized nanomaterial in the analysis of GCPII, we first tested the analytical probe functionalized with

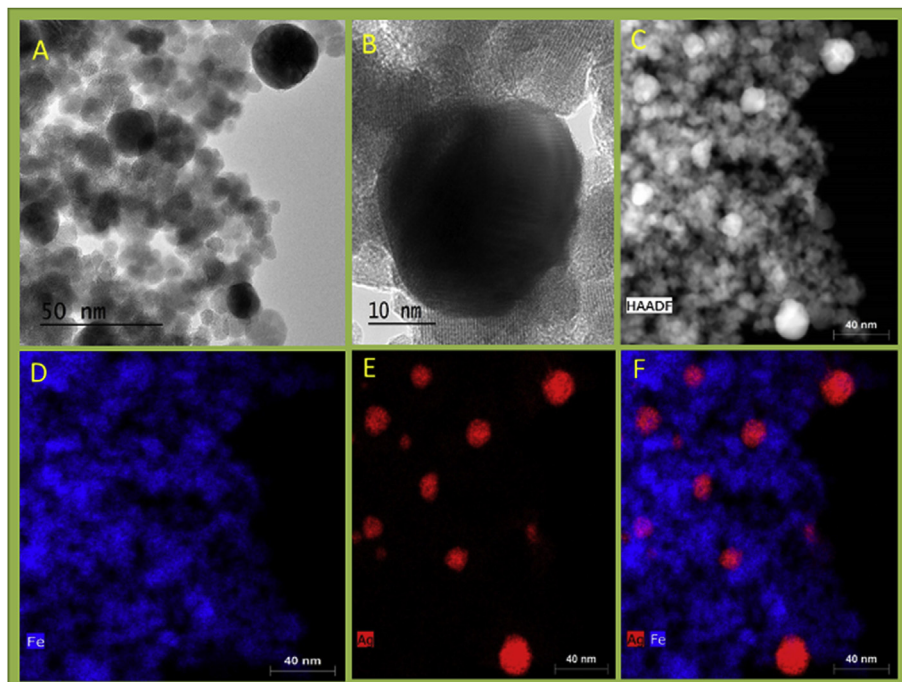


Fig. 2. High-resolution TEM images of colloidal $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ stabilized by CMC. A: general overview of the sample, B: detailed view of a silver nanoparticle, C: HAADF image of the sample, D–F: EDS characterization focused on the presence of Ag and Fe elements.

Anti-GCPII using a standard solution of purified recombinant GCPII ($c = 10 \text{ ng/mL}$). The resulting data are shown in Fig. 4. Raman spectra obtained from the analysis of the model sample of GCPII (label: Standard of GCPII) contain, compared to a blank sample (label: Blank sample) spectral bands characteristic of proteins. Distinctive vibrations of proteins include dominant spectral bands located at, 678 cm^{-1} , 728 cm^{-1} , 955 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} (amide III), 1335 cm^{-1} (C-H deformation bands of proteins), 1450 cm^{-1} , 1577 cm^{-1} , $1670 \text{ (Amide I) cm}^{-1}$, and 1790 cm^{-1} .

We next measured calibration spectra for GCPII in the concentration range from 5 to 200 ng/mL, where seven calibration points with five technical replicates were evaluated. Spectral data of all seven calibration standards are shown in Fig. 5A and final calibration curve in Fig. 5B. These data illustrate that the Raman intensity of spectral bands of proteins and amino acids, characteristic for GCPII, change as the concentration varies. We designated the amide vibration of amide located at 1335 cm^{-1} as a quantification marker due to its higher absolute intensity and lower amount of interference compared to other intense spectral bands (Fig. 4). The normalized intensity of the band was used for construction of a calibration curve. The coefficient of determination (R^2) of the linear regression was 0.985, and the limit of detection (LOD) was 0.48 ng/mL (calculated from the S/N ratio).

Next, the repeatability of the analytical procedure was evaluated on a set of five independent measurements (Fig. S1). All spectra are fully comparable; the statistical difference between the 3 most intensive bands in experimental data is lower than 7%. Furthermore, stability of the nanomaterial was evaluated using a set of periodic measurements performed over a 21-day interval. The results are shown in Fig. S2. A moderate decline in the total intensity of acquired spectral data due to a partial aggregation of the nanomaterial can be observed. Nevertheless, spectral data acquired 21 days after the synthesis of the nanomaterial contain a strong analytical signal of the measured chemical target.

3.3. Analysis of GCPII in samples of human whole blood

We next evaluated our functionalized nanocomposite for analysis of human whole blood samples containing various concentrations of GCPII. First, Raman spectrum obtained from the analysis of real sample and standard solution of GCPII ($c = 10 \text{ ng mL}^{-1}$) are shown in Fig. 6. In-detail spectral analysis uncovered new bands located at 1415 cm^{-1} , and 1450 cm^{-1} , present in the spectrum of the real sample, indicating minor nonspecific interactions. Peak area of the newly formed spectral bands is lower than 5% of total peak area and does not interfere with a spectral band at 1335 cm^{-1} which minimizes its influence on a quantification of GCPII. Furthermore, total concentration of GCPII in real samples was performed using standard addition method to minimize effects of nonspecific interactions between matrix constituents and analytical sensor. Total five real samples of healthy adult individuals were evaluated. Spectral data of real samples and standard additions, accompanied by calibration data and calculated coefficients of determination are summarized in the Figure S-3. The GCPII concentrations in these samples was found to be in the range from 1 to 7.3 ng/mL, which is in a good correlation to previously reported values for a healthy population [28]. The relative errors of determination (RSD) were less than 10%. All values obtained, including calculated RSD and confidence intervals are further summarized in Tables S-1 with respective statistical values.

4. Conclusions

Tools to analyze the total amount of GCPII in biological samples present the potential opportunity for development of prostate cancer diagnostics. Working toward this goal, we developed a novel approach based on utilization of a low-molecular-weight GCPII ligand in MA-SERS analysis. The functionalization of raw $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ nanocomposite was based on the anchoring of a GCPII inhibitor on its free surface. The resulting $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Anti-GCPII@Ag}$ functionalized

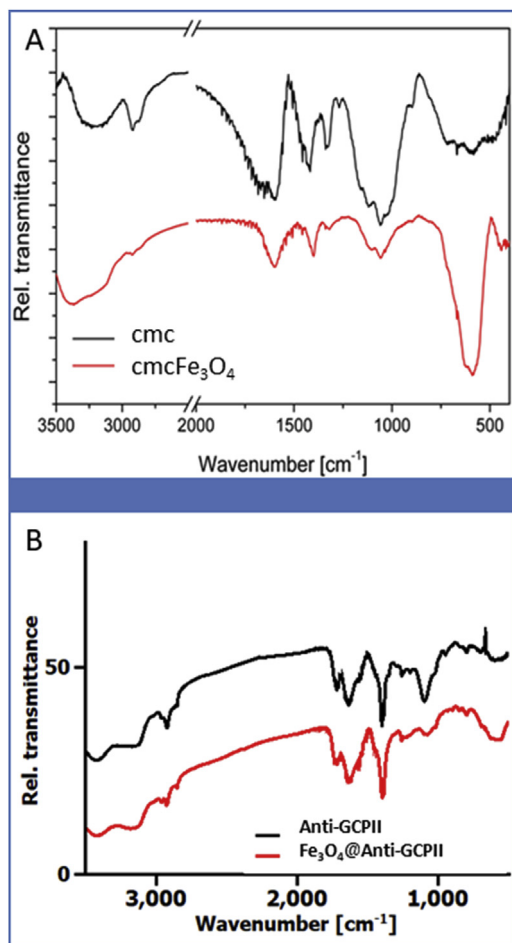


Fig. 3. A: FT-IR spectroscopy of cmcFe_3O_4 . Black, FT-IR of raw CMC; red, FT-IR of nano Fe_3O_4 functionalized by CMC. B: FT-IR spectroscopy of functionalized Fe_3O_4 @Anti-GCPII. Black trace, FT-IR of raw Anti-GCPII; red trace, FT-IR of cmcFe_3O_4 functionalized by Anti-GCPII forming Fe_3O_4 @Anti-GCPII. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

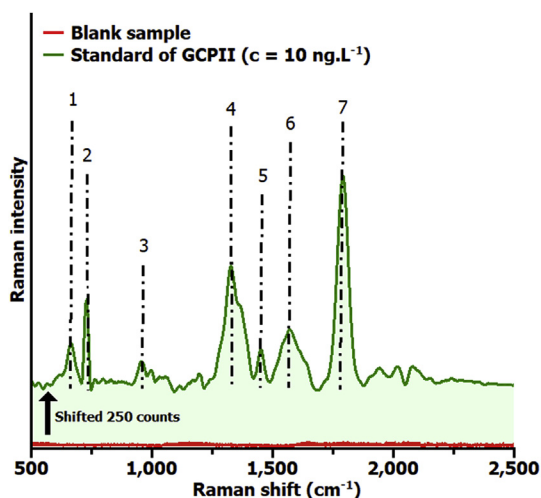


Fig. 4. Raman spectrum obtained by the analysis of Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite (label: Blank sample), and Raman spectrum obtained from the analysis of purified recombinant GCPII ($c = 10 \text{ ng mL}^{-1}$) using Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite (label: Standard of GCPII). An interpretation of spectral data is given in Table S1. Data of Standard sample are shifted for 250 counts to make the figure readable. Spectral bands are labeled in a following order: 1: 678 cm^{-1} ; 2: 728 cm^{-1} ; 3: 955 cm^{-1} ; 4: 1335 cm^{-1} ; 5: 1455 cm^{-1} ; 6: 1577 cm^{-1} and 7: 1790 cm^{-1} .

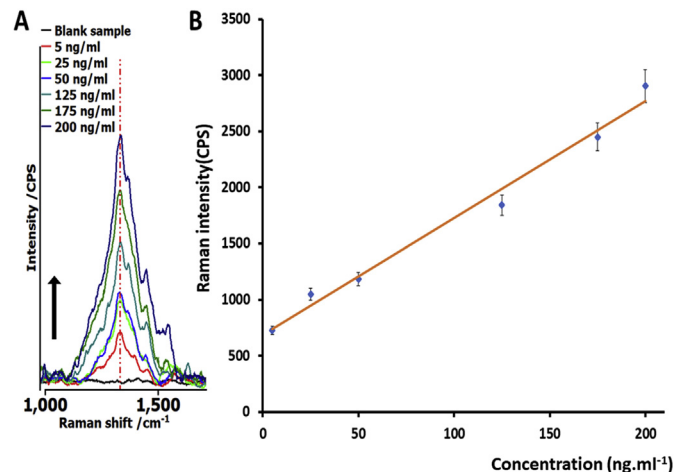


Fig. 5. A) Raman spectra obtained by analysis of GCPII at six different concentration levels: 5–200 ng/mL. B) Calibration curve for GCPII, obtained from the spectral analysis of standard samples.

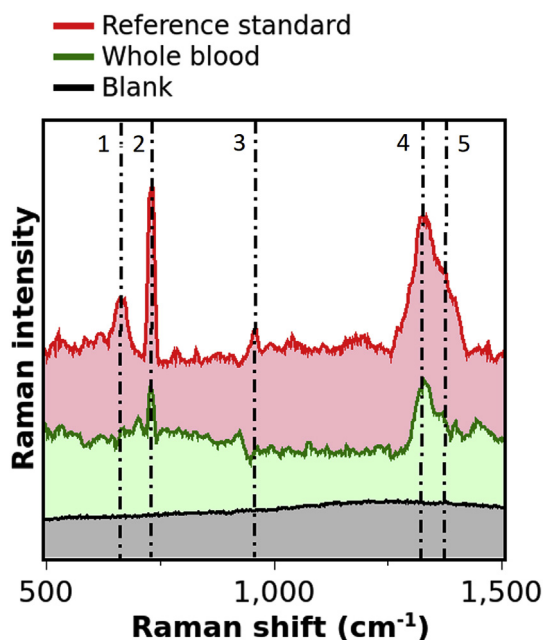


Fig. 6. Raman spectra obtained by analysis of a whole blood sample containing GCPII with nanocomposite functionalized by compound 2 (Whole blood) and reference spectrum of a standard solution of GCPII ($c = 10 \text{ ng mL}^{-1}$), analyzed using Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite (Reference standard). Blank Raman spectrum represents an analysis of human blood using raw nanomaterial (Fe_3O_4 @Ag). Spectral bands are labeled in a following order: Spectral bands are labeled in a following order: 1: 678 cm^{-1} ; 2: 728 cm^{-1} ; 3: 955 cm^{-1} ; 4: 1335 cm^{-1} ; 5: 1371 cm^{-1} .

nanocomposite was subsequently evaluated as a potential nanosensor for determination of the total amount of GCPII in whole human blood samples. The calculated limits of quantification are in the ng/mL range, and relative errors of determination, obtained from the analysis of blood samples, are lower than 7%. Furthermore, the method provides results with very good repeatability. The Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite remained stable for 21 days. The sensitivity of detection and simplicity of this method suggest its promise as a potential alternative to generally applied analytical procedures.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors.

Notes

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

The authors acknowledge Hillary Hoffman for language editing of the manuscript. The authors gratefully acknowledge support from projects NPU LO1305, NPU LO1302 and NPU LO1304 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic; project IGA_UP_2017_025, CZ.1.07/2.3.00/30.0004 and Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073; and project 16-02938S of the Grant Agency of the Czech Republic.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.008>.

References

- [1] S.H. Landis, T. Murray, S. Bolden, P.A. Wingo, *Cancer statistics, 1999*, *Ca-Cancer J. Clin.* 49 (1999) 8–31.
- [2] P.A. Wingo, C.I. Cardinez, S.H. Landis, R.T. Greenlee, L.A.G. Ries, R.N. Anderson, M.J. Thun, Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930–1998, *Cancer* 97 (2003) 3133–+.
- [3] A. Lorch, Systemic treatment of metastatic prostate cancer, *Onkologie* 23 (2017) 237–250.
- [4] A.E. Ross, S. Loeb, P. Landis, A.W. Partin, J.I. Epstein, A. Kettermann, Z.Y. Feng, P.C. Walsh, H.B. Ctr, Prostate-specific antigen kinetics during follow-up are an unreliable trigger for intervention in a prostate cancer surveillance program, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 2810–2816.
- [5] K. Lees, M. Durve, C. Parker, Active surveillance in prostate cancer: patient selection and triggers for intervention, *Curr. Opin. Urol.* 22 (2012) 210–215.
- [6] L. Klotz, Active surveillance: the Canadian experience, *Curr. Opin. Urol.* 22 (2012) 222–230.
- [7] S. Perner, M.D. Hofer, R. Kim, R.B. Shah, H.J. Li, P. Moller, R.E. Hautmann, J.E. Gschwend, R. Kuefer, M.A. Rubin, Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression, *Hum. Pathol.* 38 (2007) 696–701.
- [8] D.A. Silver, I. Pellicer, W.R. Fair, W.D.W. Heston, C. CordonCardo, Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 81–85.
- [9] J.C. Evans, M. Malhotra, J.F. Cryan, C.M. O'Driscoll, The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease, *Brit J. Pharmacol.* 173 (2016), 3145–U3108.
- [10] D.G. Bostwick, A. Pacelli, M. Blute, P. Roche, G.P. Murphy, Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma - a study of 184 cases, *Cancer* 82 (1998) 2256–2261.
- [11] M.J. Evans, P.M. Smith-Jones, J. Wongvipat, V. Navarro, S. Kim, N.H. Bander, S.M. Larson, C.L. Sawyers, Noninvasive measurement of androgen receptor signaling with a positron-emitting radiopharmaceutical that targets prostate-specific membrane antigen, *P Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 9578–9582.
- [12] M.J. Morris, C.R. Divgi, N. Pandit-Taskar, M. Batraki, N. Warren, A. Nacca, P. Smith-Jones, L. Schwartz, W.K. Kelly, S. Slovin, D. Solit, J. Halpern, A. Delacruz, T. Curley, R. Finn, J.A. O'Donoghue, P. Livingston, S. Larson, H.I. Scher, Pilot trial of unlabeled and indium-111-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody J591 for castrate metastatic prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 7454–7461.
- [13] J.P. Holland, V. Divilov, N.H. Bander, P.M. Smith-Jones, S.M. Larson, J.S. Lewis, Zr-89-DF0-J591 for ImmunopET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo, *J. Nucl. Med.* 51 (2010) 1293–1300.
- [14] K.P. Maresca, S.M. Hillier, F.J. Femia, D. Keith, C. Barone, J.L. Joyal, C.N. Zimmerman, A.P. Kozikowski, J.A. Barrett, W.C. Eckelman, J.W. Babich, A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 347–357.
- [15] I. Rauscher, T. Maurer, W.P. Fendler, W.H. Sommer, M. Schwaiger, M. Eiber, Ga-68-PSMA ligand PET/CT in patients with prostate cancer: how we review and report, *Cancer Imaging* 16 (2016).
- [16] S.M. Hillier, K.P. Maresca, F.J. Femia, J.C. Marquis, C.A. Foss, N. Nguyen, C.N. Zimmerman, J.A. Barrett, W.C. Eckelman, M.G. Pomper, J.L. Joyal, J.W. Babich, Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer, *Cancer Res.* 69 (2009) 6932–6940.
- [17] C.M. Zechmann, A. Afshar-Oromieh, T. Armor, J.B. Stubbs, W. Mier, B. Hadaschik, J. Joyal, K. Kopka, J. Debus, J.W. Babich, U. Haberkorn, Radiation dosimetry and first therapy results with a I-124/I-131-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I* 41 (2014) 1280–1292.
- [18] G.L. Lu, K.P. Maresca, S.M. Hillier, C.N. Zimmerman, W.C. Eckelman, J.L. Joyal, J.W. Babich, Synthesis and SAR of Tc-99m/Re-labeled small molecule prostate specific membrane antigen inhibitors with novel polar chelates, *Bioorg Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 1557–1563.
- [19] M. Eder, M. Schafer, U. Bauder-Wust, W.E. Hull, C. Wangler, W. Mier, U. Haberkorn, M. Eisenhut, Ga-68-Complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging, *Bioconjugate Chem.* 23 (2012) 688–697.
- [20] S.Y. Cho, K.L. Gage, R.C. Mease, S. Senthamizchelvan, D.P. Holt, A. Jeffrey-Kwanisai, C.J. Endres, R.F. Dannals, G. Sgouros, M. Lodge, M.A. Eisenberger, R. Rodriguez, M.A. Carducci, C. Rojas, B.S. Slusher, A.P. Kozikowski, M.G. Pomper, Biodistribution, tumor detection, and radiation dosimetry of F-18-DCFBC, a low-molecular-weight inhibitor of prostate-specific membrane antigen, in patients with metastatic prostate cancer, *J. Nucl. Med.* 53 (2012) 1883–1891.
- [21] Z. Hollo, L. Homolya, T. Hegedus, M. Muller, G. Szakacs, K. Jakab, F. Antal, B. Sarkadi, Parallel functional and immunological detection of human multi-drug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1, *Anticancer Res.* 18 (1998) 2981–2987.
- [22] T. Okuda, K. Kataoka, M. Taneda, Metastatic brain tumor surgery using fluoresein sodium: technical note, *Minim. Invas Neurosurg* 50 (2007) 382–384.
- [23] D.J. Arndt-Jovin, S.R. Kantelehardt, W. Caarls, A.H.B. de Vries, A. Giese, T.M. Jovin, Tumor-targeted quantum dots can help surgeons find tumor boundaries, *Lee T Nanobiosci* 8 (2009) 65–71.
- [24] K. Gotoh, T. Yamada, O. Ishikawa, H. Takahashi, H. Eguchi, M. Yano, H. Ohgashi, Y. Tomita, Y. Miyamoto, S. Imaoka, How i do it a novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation, *J. Surg. Oncol.* 100 (2009) 75–79.
- [25] Y.P. Rochon, J. Horeszewitz, A. Boynton, E. Holmes, R. Barren, S. Erickson, G. Kenny, G. Murphy, Western-blot assay for prostate specific membrane antigen in serum of prostate cancer patients, *Prostate* 25 (1994) 219–223.
- [26] G. Murphy, H. Ragde, G. Kenny, R. Barren, S. Erickson, B. Tjoa, A. Boynton, E. Holmes, J. Gilbaugh, T. Douglas, Comparison of prostate specific membrane antigen, and prostate specific antigen levels in prostate cancer patients, *Anticancer Res.* 15 (1995) 1473–1479.
- [27] M. Beckett, L. Cazares, A. Vlahou, P. Schellhammer, G. Wright, Prostate-specific membrane antigen levels in sera from healthy men and patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer, *Clic. Cancer. Res.* 5 (1999) 4034–4040.
- [28] T. Knedlik, V. Navratil, V. Vik, D. Pacik, P. Sacha, J. Konvalinka, Detection and quantitation of glutamate carboxypeptidase II in human blood, *Prostate* 74 (2014) 768–780.
- [29] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. Mcquillan, Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* 26 (1974) 163–166.
- [30] Y.W.C. Cao, R.C. Jin, C.A. Mirkin, Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection, *Science* 297 (2002) 1536–1540.
- [31] J.J. Laserna, A.D. Campiglia, J.D. Winefordner, Mixture analysis and quantitative-determination of nitrogen-containing organic-molecules by surface-enhanced raman spectrometry, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1697–1701.
- [32] 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.
- [33] V. Ranc, Z. Markova, M. Hajdich, R. Pucek, 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.
- [34] P. Sacha, J. Zamecnik, C. Barinka, K. Hlouchova, A. Vicha, P. Mlcochova, I. Hilgert, T. Eckschlager, J. Konvalinka, Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain, *Neuroscience* 144 (2007) 1361–1372.
- [35] V. Navratil, J. Schimer, J. Tykvart, T. Knedlik, V. Vik, P. Majer, J. Konvalinka, P. Sacha, DNA-linked Inhibitor Antibody Assay (DIANA) for sensitive and selective enzyme detection and inhibitor screening, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017).
- [36] P. Sacha, T. Knedlik, J. Schimer, J. Tykvart, J. Parolek, V. Navratil, P. Dvorakova, F. Sedlak, K. Ulbrich, J. Strohal, P. Majer, V. Subr, J. Konvalinka, iBodies: modular synthetic antibody mimetics based on hydrophilic polymers decorated with functional moieties, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 2356–2360.
- [37] R.P. Murelli, A.X. Zhang, J. Michel, W.L. Jorgensen, D.A. Spiegel, Chemical control over immune recognition: a class of antibody-recruiting small molecules that target prostate cancer, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009), 17090–+.
- [38] J. Tykvart, P. Sacha, C. Barinka, T. Knedlik, J. Starkova, J. Lubkowski, J. Konvalinka, Efficient and versatile one-step affinity purification of in vivo

- biotinylated proteins: expression, characterization and structure analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II, *Protein Expres Purif.* 82 (2012) 106–115.
- [39] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V.K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril, Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16248–16253.
- [40] A. Bakandritsos, G. Mattheolabakis, G. Chatzikyriakos, T. Szabo, V. Tzitzios, D. Kouzoudis, S. Couris, K. Avgoustakis, Doxorubicin nanocarriers based on magnetic colloids with a bio-polyelectrolyte corona and high non-linear optical response: synthesis, characterization, and properties, *Adv. Funct. Mater* 21 (2011) 1465–1475.
- [41] B.J. Kirby, E.F. Hasselbrink, Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis* 25 (2004) 187–202.
- [42] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Bba-Bioenergetics* 1767 (2007) 1073–1101.

Supporting Information

Label-free determination of prostate specific membrane antigen in human whole blood at nanomolar levels by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy

Zuzana Chaloupková,[†] Anna Balzerová,[†] Jitka Bařínková,[‡] Zdenka Medříková,[†] Pavel Šácha,[#] Petr Beneš,[§] Václav Ranc,^{*,†} Jan Konvalinka,[‡] and Radek Zbořil^{*,†}

[†] Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

[‡] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha 2, Czech Republic

[§] Department of Oncology, University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic

[#] Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, The Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

* Corresponding authors: vaclav.ranc@upol.cz (Václav Ranc), radek.zboril@upol.cz (Radek Zboril)

Table of Contents:

Table S-1	S-2
Figure S-1	S-2
Figure S-2	S-3
Figure S-3	S-4

Table S-1. Results obtained by quantitative analysis of samples containing GCPII. Results obtained by the analysis of selected real samples. Samples were analyzed using here developed MA-SERS based approach. The procedure is able to determine content of GCPII with relative errors (RSD) lower than 10%. Confidence intervals (95%) were calculated for each sample from the respective calibration curves (shown in Figure S-3).

Sample	Experimental value (ng·mL ⁻¹)	Confidence intervals (95%)		RSD (%)
		Lower	Upper	
1	1.02	0.74	1.35	5.2
2	3.71	3.53	4.01	7.0
3	6.14	5.78	6.26	5.5
4	7.27	7.00	7.54	4.5
5	5.93	5.67	6.12	6.3

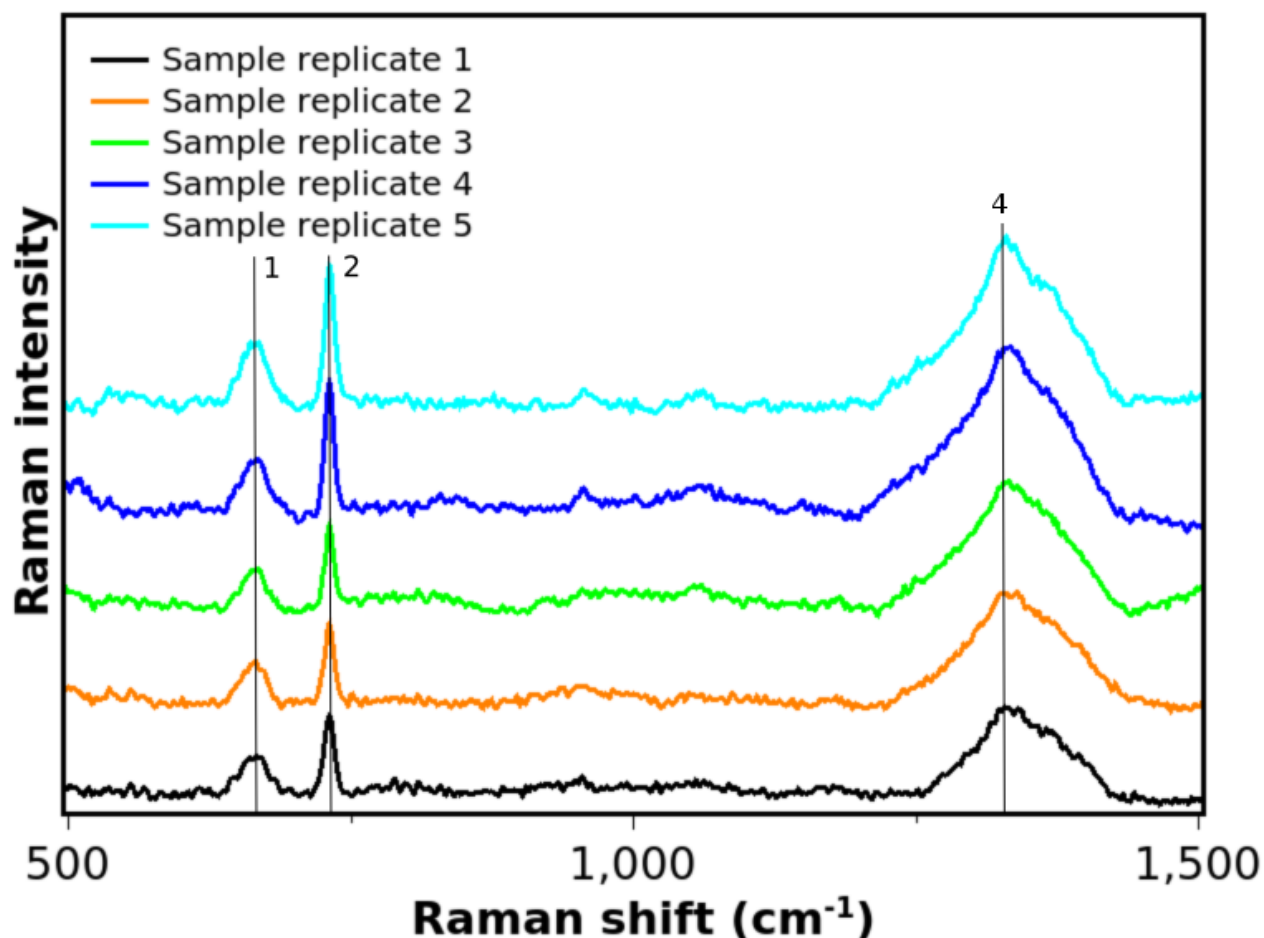


Figure S-1. Raman spectra of five consecutive samples of GCPII ($c = 10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Spectra were measured using $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AntiGCPII}@\text{Ag}$ nanocomposite and MA-SERS in one batch. It is shown

that there is no considerable difference between obtained spectral data. Positions of spectral bands are: 1: 678 cm^{-1} ; 2: 728 cm^{-1} ; 4: 1335 cm^{-1} .

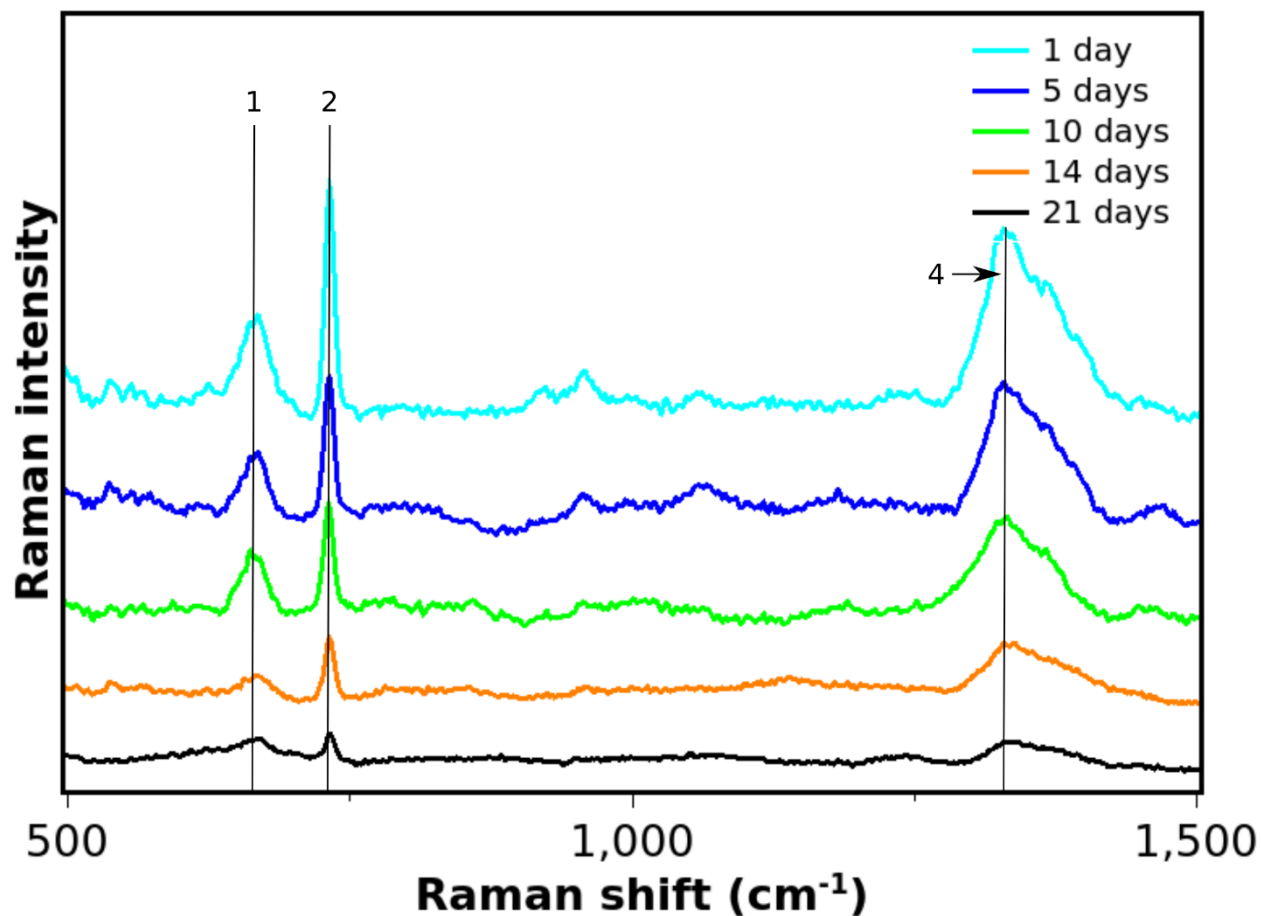


Figure S-2. Stability of measurements. Raman spectra of five consecutive samples of GCPII ($c = 10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Samples were measured using $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AntiGCPII}@\text{Ag}$ nanocomposite and MA-SERS at the defined interval: 1, 5, 10, 14, and 21 days. It is shown that all spectra are fully comparable. Positions of spectral bands are: 1: 678 cm^{-1} ; 2: 728 cm^{-1} ; 4: 1335 cm^{-1} .

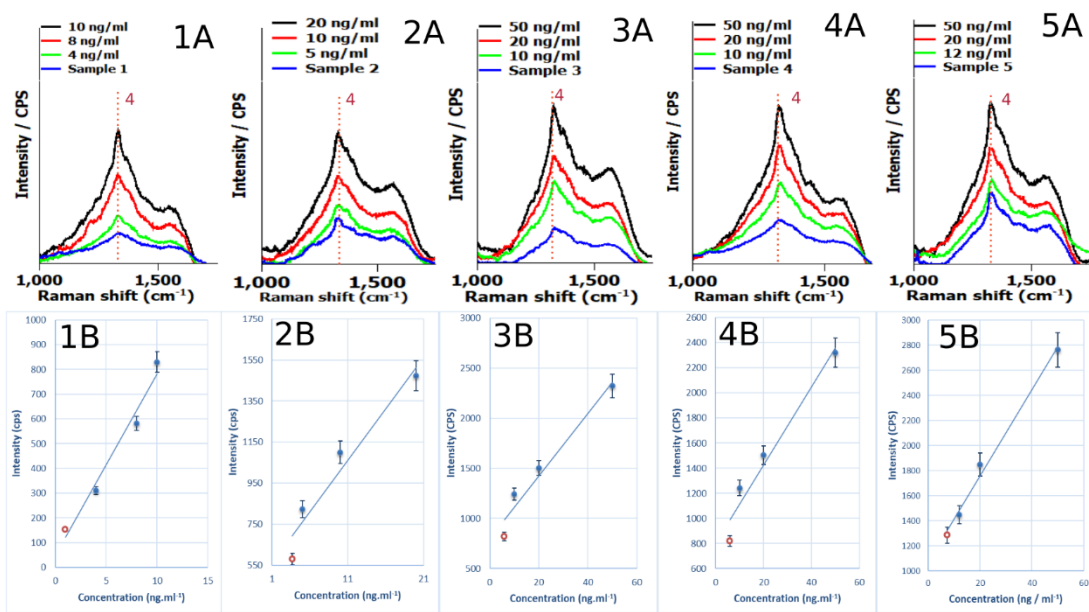


Figure S-3. Raman spectra obtained by the analysis of GCPII in human whole blood samples 1-5. Spectra were measured using method of standard additions and MA-SERS in one batch. Data of these measurement are shown in figure 1a, 2a, 3a, 4a and 5a and responding calibration curve in figure S-3 1b, 2b, 3b, 4b and 5b. The coefficient of determination (R^2) of the linear regression was 0.983 for 1b, 0.970 for 2b, 0.972 for 3b, 0.963 for 4b and 0.988 for 5b.

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Nanočástice ušlechtilých kovů v analýze fyziologicky aktivních látek
pomocí Ramanovy spektroskopie.**

Autoreferát k disertační práci

Mgr. Anna Balzerová

Studijní program: P1407 Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie

Školitel:

doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

OLOMOUC 2018

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

Uchazeč: **Mgr. Anna Balzerová**

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:

SEZNAM PUBLIKACÍ

Seznam publikací, na nichž se autor disertační práce podílel jako hlavní autor nebo spoluautor, za období 2012–2018 (v chronologickém pořadí)

- (i) **Balzerova, A.**; Fargasova, A.; Markova, Z.; Ranc, V. and 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, *Analytical Chemistry* 86 (2014). doi: 10.1021/ac503347h (IF = 5,636)
- (ii) 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 (2017) 10.1021/acs.analchem.7b00759 (IF = 5,886)
- (iii) Chaloupková, Z.; **Balzerová, A.**; Medříková, Z.; Srovnal, J.; Hajdúch, M.; Čépe, K.; Ranc, V.; Zbořil, R.; Label-free determination and multiplex analysis of DNA and RNA in tumor tissues, *Applied Materials Today* 12 (2018). 10.1016/j.apmt.2017.12.012
- (iv) Chaloupková, Z.; **Balzerová, A.**; Bařinková, J.; Medříková, Z.; Šácha, P.; Beneš, P.; Ranc, V.; Konvalinka, J.; Zbořil, R.; Label-free determination of prostate specific membrane antigen in human whole blood at nanomolar levels by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy, *Analytica Chimica Acta* 997 (2018). 10.1016/j.aca.2017.10.008 (IF = 4,95)
- (v) **Balzerová, A.**; Opletalová, A.; Ranc, V. and Zbořil, R. Simple multiplex competitive analysis of HER2 and EpCAM cancer markers in whole human blood, *Applied Materials Today* (2018), submitted

OBSAH

Seznam publikací	3
Úvod	5
Teoretická část	7
1. Nanomateriály a nanočástice	7
1.1. Bioaplikace nanočástic ušlechtilých kovů	7
2. SERS	9
2.1. Aplikace SERS	10
2.2. SERS fyziologicky aktivních látek	10
2.3. Magnetický SERS	11
3. Cíle disertační práce	13
Experimentální část	14
4. Příprava nanočástic, nanokompozitů a jejich funkcionalizace	14
4.1. Nanočástice stříbra	14
4.2. Magnetický nanokompozit pro analýzu IgG	14
4.3. Příprava biosensoru pro multiplexní analýzu nádorových markerů	15
4.4. Postup analýzy nádorových markerů HER2 a EpCAM	15
5. Výsledky a diskuze	17
5.1. Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS) pro stanovení lidského imunoglobulinu G v krvi	17
5.2. Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie k multiplexní analýze nádorových markerů HER2 a EpCAM v lidské krvi	23
5.3. Publikace zahrnující využití SERS k detekci dalších biologicky aktivních látek	31
Závěr	33
Summary	34
Seznam literatury	35

ÚVOD

Éru nanotechnologií odstartoval Richard Feynman v roce 1959 svojí přednáškou nazvanou „*There's Plenty of Room at the Bottom*“, ve které předpověděl, že v budoucnu bude možné cíleně manipulovat s atomy a sestavovat systémy a zařízení neobyčejných vlastností a funkcí. Většina z předních vědců té doby nevěnovala této přednášce moc pozornosti, nicméně výzkum v oblasti přípravy a studia vlastností částic menších než 100 nm ke konci osmdesátých a na začátku devadesátých let dvacátého století potvrdil platnost myšlenek vyslovených Feynmanem.¹ Na pomyslné startovní čáře vzniku nanotechnologií stály v té době uhlíkaté materiály typu fullerenu² či objev mikroskopických technik se skenující sondou.³ Od té doby dochází k novým a novým objevům, které umožňují další pokrok a zvyšují aplikační potenciál nanočástic jak v oblasti vědy, tak v běžném životě.⁴ Nicméně, nanočástice mají překvapivě dlouhou historii. Běžně se totiž vyskytují v přírodě jako produkty vulkanické činnosti, požárů či mikrobiologických procesů. Z tohoto důvodu lze první využití nanočástic člověkem datovat už do období antiky. Kovové nanočástice byly po dlouhá století využívány k barvení skla. Typickým příkladem jsou zlaté nanočástice, které zbarvují sklo do jasně červené barvy. Této vlastnosti využili ve čtvrtém století Římané při výrobě Lykurgových pohárů. Poháry se za denního světla jeví jako zelené, ale při ozáření z vnitřku se jeví jako červené. Technologie barvení skla nanočásticemi zlata byla poté zapomenuta a znovuobjevena až v 17. století.⁵ V roce 1857, opublikoval Faraday práci „*Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light*“, ve které popisuje přípravu koloidního roztoku zlata redukcí chlorozlatité soli fosforem v sirouhlíku. Na tento postup přišel čistě náhodou, nicméně se tyto roztoky (správněji disperze) nanočástic staly základem v té době nově vznikajícího oboru – koloidní chemie a později i oboru nanotechnologie.⁵⁻⁷ Přibližně o čtyřicet let později další z průkopníků koloidní chemie Richard Zsigmondy a Henry Siedentopf sestrojili ultramikroskop umožňující nepřímé sledování do té doby „neviditelných“ koloidních částic.⁸ Koloidní částice (obvykle se uvádí, že se jedná o částice hmoty o rozměrech v rozsahu přibližně 1 nm až 1 μ m) pak poprvé spatřil konstruktér prvního elektronového mikroskopu Ernst Ruska v roce 1931.² A éru nanotechnologií, jednoduše definovaných jako obor zabývající se hmotnými objekty o rozměrech v rozsahu 1-100 nm, spolu otevíral v roce 1981 objev skenovací tunelové mikroskopie, prvního zástupce široké řady technik označovaných jako mikroskopie se skenující sondou, které nejen že poskytují náhled do nanosvěta, ale zároveň umožňují i manipulaci s nanobjekty.⁹

Důležitou oblast výzkumu jak v koloidní chemii, tak i nanotechnologiích představuje interakce elektromagnetické záření s velmi malými objekty. Obzvláště u kovových nanočástic dochází ve viditelné oblasti spektra k zajímavým jevům, které způsobují barevnost jejich disperzí např. již zmíněné zbarvení skla, dochází k vybuzení tzv. povrchového plasmonu.¹⁰ Tato interakce má i další důsledky související s lokálním zesílením elektromagnetického pole

v blízkosti povrchu nanočástice, které nese hlavní zodpovědnost za existenci vysoce citlivé spektroskopické metody - povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (Surface Enhanced Raman Spectroscopy – SERS). Přičemž zesílení Ramanova signálu je tak velké, že ve specifických případech umožňuje detekci i jednotlivých molekul.¹¹ Díky tomu tato metoda našla široké uplatnění například v potravinářství, kriminalistice, farmacii a biologii.^{12–16} Další zvýšení citlivosti přináší metoda magneticky asistované SERS (MA-SERS), umožňující detekci biologicky významných molekul, vyskytujících se v živých organismech ve velmi nízkých koncentracích. Tato metoda využívá nanokompozity s magnetickými vlastnostmi, které slouží jako substrát k navázání biologicky aktivních látek a které umožňují jednoduchou prekoncentraci analytu pomocí vnějšího magnetického pole. Kovové nanočástice, například zlata nebo stříbra, navázané na povrchu magnetických částic, pak slouží k zesílení Ramanova signálu.^{17–19}

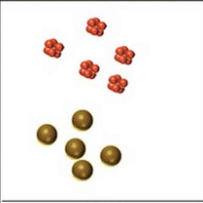
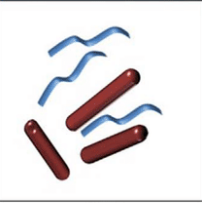
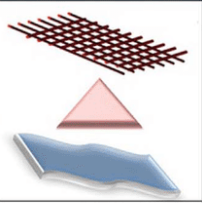

V předkládané disertační práci byla tato metoda použita k detekci lidského imunoglobulinu G (IgG) ve vzorcích lidské krve. Přítomnost potenciální nespecifické interakce komponent vzorku s aktivním povrchem nanočástic byla minimalizována úplnou blokadou tohoto povrchu pomocí vodného roztoku ethylaminu. Dále byla tato metoda použita k simultánnímu stanovení dvou odlišných rakovinných markerů (HER2 a EpCAM). Každý marker byl nejprve označen rozdílnými fluorescenčními značkami – HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5. Analýza pak byla založena na sledování poklesu relativních intenzit vybraných spektrálních pásů fluorescenčních značek v důsledku kompetice označených a neoznačených markerů o vazebná místa na povrchu magnetických nanočástic. Závěr experimentální části této disertační práce je věnován stručným popisům spoluautorských publikací, ve kterých bylo rovněž využito nanočástic stříbra jakožto aktivních substrátů pro zesílení Ramanova signálu biologicky aktivních molekul.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Nanomateriály a nanočástice

Nanomateriály jsou složeny z částic, jejichž velikost je alespoň v jednom rozměru od 1 do 100 nm.²⁰ Na základě svých vlastností (velikost, struktura, morfologie) mohou být rozděleny do několika skupin. Nejzákladnější rozdělení nanostruktur je podle počtu rozměrů pod 100 nm a to na: 0D struktury (nanočástice, kvantové tečky), kdy všechny rozměry jsou v nanometrech, 1D struktury (nanodráty, nanotrubičky) dva rozměry pod 100 nm, 2D struktury (nanovrstvy, nanofilmy) jeden rozměr v nanometrech a 3D struktury, což jsou objemové materiály, které obsahují např. póry s velikostí v nanometrech (obrázek 1).^{20,21} Nanomateriály vykazují díky svým malým rozměrům a velkému povrchu unikátní fyzikální a chemické vlastnosti. Termín „nanotechnologie“ je znám od roku 1959, kdy zazněl v přednášce *“There’s Plenty of Room at the Bottom”* („Tam dole je spousta místa“) laureáta Nobelovy ceny Richarda P. Feynmana a od té doby došlo k mnoha významným objevům v oblasti nanotechnologií.⁴ Mezi nejvýznamnější bezesporu patří vývoj skenovací tunelové mikroskopie, za kterou dostali Binnig a Rohrer v roce 1986 Nobelovu cenu, dále pak objev uhlíkových fullerenu C₆₀ (Smalley, Curl, Heath a Kroto, Nobelova cena udělena v roce 1986) či objev grafenu v roce 2004, za který byla Nobelova cena udělena v roce 2010 profesoru Geimovi a Novoselovi.¹

Díky malým rozměrům dochází ke změnám vlastností těchto materiálů. Změnu vlastností nanomateriálů oproti makroskopickým materiálům mají na svědomí dva faktory – zvýšená plocha povrchu a kvantová omezení. Díky těmto faktorům dochází ke změně magnetických, optických, elektrických vlastností a ke změně chemické reaktivity.

Isotropic nanomaterials		Anisotropic nanomaterials	
			
0D	1D	2D	3D
Spheres, Clusters	Nanorods, wires	Nanofilms, plates	Nanoparticles

Obr. 1.: Schématické znázornění nanomateriálů podle počtu rozměrů pod 100 nm (0D, 1D, 2D a 3D). Převzato z Sadhasivam a kol (2017).²¹

1.1. Bioaplikace nanočástic ušlechtilých kovů

Existuje mnoho zmínek o použití ušlechtilých kovů, zejména stříbra, zlata a platiny pro léčebné účely. V Ayurvédě se běžně používají velmi jemné prášky těchto kovů, známé pod názvem "bhasma" pro léčbu různých onemocnění.²² Nanočástice ušlechtilých kovů mají potenciál k využití v oblasti medicíny díky jejich unikátním vlastnostem. Lze jich využít

k molekulárnímu zobrazování, diagnostice či cílenému transportu léčiv. V řadě studií bylo potvrzeno, že nanočástice jsou výborné nosiče chemoterapeutik, nicméně musí být splněno několik podmínek, jako je dobrá afinita léčiva k nanočásticím, stabilita nanočástic a specifita vytvořeného komplexu a jeho schopnost uvolnit léčivo.²³ Patra a kol. testovali zlaté nanočástice (AuNPs) jako nosiče léčiv. Na nanočástice s velikostí okolo 5 nm kovalentně navázali léčivo a poté sledovali akumulaci nanočástic v místě nádoru.^{24,25} Také bylo zjištěno, že AuNPs zvyšují účinek protinádorových léčiv. Nanočástice s navázanými protilátkami Anti-trastuzumab byly použity k zacílení lidského epidermálního růstového faktoru (HER2) v lidských buňkách rakoviny prsu (SK-BR-3). Bylo zjištěno, že nanočástice Au-HER s receptorem HER-2 byly buňkou přijaty, což vedlo k dvojnásobnému zvýšení cytotoxicity trastuzumabu.²⁶ Kromě nádorových onemocnění mají AuNPs velký potenciál také proti infekčním onemocněním, jako je HIV, tuberkulóza, Parkinsonova nemoc a další.²⁷⁻³⁰ Například *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) je obtížné identifikovat díky jejich pomalému růstu. Liu a kol. vyvinuli biosenzor k vysoce citlivé detekci specifické DNA sekvence MT61 IS6110 složený z redukovaného grafenoxidu s AuNPs (rGO-AuNPs) a AuNPs s polyanilinem (Au-PANI), které sloužily jako značka. Vzhledem k vysoké elektroaktivitě konjugátů Au-PANI vykazoval sensor vysokou citlivost, specifitu a stabilitu.³¹

Nejen AuNPs, ale i nanočástice stříbra (AgNPs) mají obrovské uplatnění v oblasti medicíny, především jako potenciální antimikrobiální látky, ale i při léčbě rakoviny. AgNPs byly použity k detekci a zobrazování nádorů, k transferu léčiv i k hypertermii. Kromě toho samotné AgNPs mají protinádorovou aktivitu, inhibují růst nádorů a také zabraňují angiogenezi v okolí nádorových tkání. Vědci využívají chemicky i biologicky syntetizované AgNPs k *in vitro* i *in vivo* testování protinádorových aktivit proti různým rakovinným buňkám, jako je buněčná linie lidského karcinomu prsu MCF-7, melanomová buňka B10F17, buňka epitelálního adenokarcinomu plic A549, cervikálního karcinomu SiHa a buňky HeLa.²³ Guo a kol. studovali účinek AgNPs pokrytých PVP s třemi různými velikostmi: 3, 11 a 30 nm, proti leukemii (lidská buněčná linie AML). Zjistili, že AgNPs s velikostí 11 nm byly více cytotoxické než 30 nm AgNPs, zatímco u částic s velikostí 3 a 11 nm nebyl žádný významný rozdíl v cytotoxicitě, což bylo způsobeno malým rozdílem v hydrodynamickém poloměru částic. Zjistili také, že AgNPs při nižších koncentracích vykazují silnější cytotoxický účinek než vyšší koncentrace nanočástic.³² Stříbro v různých formách (kovové stříbro, stříbrné soli a koloidní stříbro) se používá jako účinné antibakteriální činidlo po mnoho staletí. Stříbrné NP nebyly běžně používány v lékařské praxi, s výjimkou krátkého období na počátku dvacátého století, kdy se koloidní stříbro používalo k léčbě některých infekčních stavů. Proto není jasné, zda se bakterie mohou stát rezistentními vůči AgNPs. Jediný výzkum, který studoval bakteriální chování v reakci na opakovanou dlouhodobou expozici AgNPs, zjistil, že mezi mnoha bakteriálními kmeny má pouze *Bacillus subtilis* přirozenou schopnost přizpůsobit se buněčnému oxidativnímu stresu vyvolanému stříbrnými nanočásticemi.³³ Vzhledem k nedostatku experimentálních údajů stále probíhá diskuse o tom, zda si bakterie mohou vyvinout odolnost proti antibakteriálním účinkům AgNPs při dlouhodobé expozici subinhibičních koncentrací. Panáček a kol. zjistili, že bakterie opakovaně vystavené

subinhibičním koncentracím AgNPs si mohou rychle vyvinout rezistenci vůči antibiotické aktivitě NPs. Tato odolnost je způsobena produkcí flagellinu, adhezního proteinu bakteriálního bičíku (flagellum), který způsobuje agregaci AgNPs a tím eliminuje jejich antibakteriální účinek vůči gramnegativním bakteriím. Vyvinutá bakteriální rezistence může být potlačena inhibitory, které zabraňují produkci flagellinu, jako je extrakt z kůry granátového jablka (PGRE).³⁴

2. SERS

V posledních desetiletích bylo vyvinuto několik technik využívajících Ramanův jev, jako například rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS), koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie (CARS), inverzní Ramanova spektroskopie, hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS) či povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). Poslední zmíněná technika se během poměrně krátké doby stala mocným nástrojem jak základního, tak aplikačního výzkumu. Povrchem zesílený Ramanův rozptyl byl poprvé pozorován na povrchu stříbrné elektrody v roce 1974 britským chemikem Martinem Fleischmanem a jeho kolegy.³⁵ Poté, v roce 1977 provedly dvě výzkumné skupiny, Jeanmaire s Van Duynem a Albrecht s Creightonem, kvantitativní studie potvrzující zesílení Ramanova jevu molekul adsorbovaných na povrchu stříbrné elektrody. Obecně je známo, že fenomén SERS je způsoben primárně dvěma mechanismy – elektromagnetickým a chemickým.^{36–38}

- Elektromagnetický mechanismus (EM) – je hlavním příspěvkem k celkovému zesílení Ramanova signálu. Tento mechanismus využívá silného elektrického pole, které vzniká v důsledku excitací povrchových plasmonů na povrchu kovových substrátů. Aby k excitaci došlo, musí být molekula v těsné blízkosti povrchu (maximální vzdálenost přibližně 10 nm). Ve většině případů jsou molekuly přímo na povrchu adsorbovány, ať už chemicky nebo fyzikálně.³⁶
- Chemický mechanismus (ChM) – jeho existence a samotná definice je neustále předmětem sporů, nicméně jeho příspěvek je mnohonásobně menší než elektromagnetický. Chemický mechanismus se často popisuje jako „charge-transfer“ mechanismus (mechanismus přenosu náboje) k čemuž je nutné mít molekulu adsorbovanou na kovovém povrchu.³⁶

Zesílení Ramanova signálu ovlivňuje mnoho faktorů, mezi něž patří například vlastnosti excitačního laseru (vlnová délka, polarizace či úhel dopadu) či samotné nastavení přístroje (počet skenů, doba jednoho skenu). Dále je pak zesílení ovlivněno typem použitého substrátu, kdy závisí na materiálu ze kterého je substrát vyroben (většinou se jedná o stříbro nebo zlato), na geometrii a úhlu vstupujícího záření a na prostorovém uspořádání (2D nebo 3D substrát). Zesílení je také ovlivněno adsorpcí analytu – jeho efektivitou, koncentrací, mírou pokrytí substrátu, vzdáleností od povrchu a zejména změnou polarizovatelnosti vyvolanou adsorpcí.³⁶

2.1. Aplikace SERS

Velkou výhodou SERS je schopnost identifikovat široké spektrum látek a získat tak informace o jejich struktuře. Toho lze využít v materiálové chemii, biochemii, katalýze i elektrochemii. Přestože byl fenomén SERS pozorován a objasněn už v roce 1977, jeho aplikace mimo vědecké laboratoře trvala poměrně dlouho. Až s příchodem řízené přípravy nanostrukturálních substrátů se SERS začal hojně využívat. Jednou z oblastí využití SERS může být restaurátorství či umění. SERS umožňuje měření velmi nízkých koncentrací z malého množství vzorku. Díky tomu je tato technika vhodná k analýze barev a pigmentů uměleckých děl, textilií nebo dřevěných soch.³⁹ Velmi důležitou skupinou aplikací SERS je biosensing. Právě díky vysoké citlivosti a selektivitě této techniky je SERS vhodný zejména k detekci biologicky aktivních látek, jako například proteinů, bakterií, virů, neurohormonů a buněk.³⁹ Kromě již zmíněných aplikací lze SERS využít i ve farmakologii, forenzních vědách nebo toxikologii.

Existuje několik způsobů jak využít SERS k biosensingu. Obecně lze tyto způsoby rozdělit do dvou skupin a to na „label-free“ a „label-based“. Label-free způsob zahrnuje sledování přímo zkoumaného analytu, kdežto label-based způsob využívá takzvaných Ramanovských značek, což jsou převážně aromatické sloučeniny obsahujících dusík nebo síru. Tyto molekulární značky jsou velmi často navázány na povrch nanočástic díky vysoké afinitě dusíku a síry ke kovovému prvku. Detekci pomocí SERS lze provádět v roztoku, kdy analyt reaguje s volnými nanočásticemi nebo v pevné fázi použitím SERS-aktivního substrátu.⁴⁰

2.2. SERS fyziologicky aktivních látek

Častým využitím techniky SERS je detekce proteinů. Proteiny jsou základní složkou organismu a podílí se na každém procesu v buňce. Nejdůležitějším rysem proteinů je jejich schopnost vázat se velmi pevně a specificky pouze na určité molekuly. Klasické metody a způsoby měření proteinů zahrnují zejména imunologické metody (ELISA) založené na spektroskopické nebo fluorimetrické detekci či metody separační, zejména elektroforéza a kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Přítomnost fluoroforu v případě prvně zmíněných imunologických metod může vést ke zlepšení limitu detekce, avšak může také docházet k autofluorescenci či k vyhasínání.^{41,42} Separační metody jsou vysoce citlivé a selektivní, nicméně je nutné před měřením vzorek vhodně připravit, což může být obtížné zejména při měření v komplexní matici jako je například krev.⁴³ Vývoj biochemických SERS sensorů v posledních letech vedl k posunu SERS techniky od jednoduché chemické analýzy k charakterizaci nanostruktur a biomedicínám aplikacím. SERS je také vhodnou metodou k detekci či mapování buněk. Ty poskytují několik typických vibračních módů, zejména DNA/RNA, proteinů, lipidů a uhlovodíků. Nejvýraznějším pásem ve spektrech je valenční vibrace vazby C-H při 2930 cm^{-1} . Nejvýraznější pás značící přítomnost proteinů je Amid I při $1600 - 1690\text{ cm}^{-1}$ a dýchací mód tryptofanu a fenylalaninu při 1004 cm^{-1} . Dalšími pásy proteinů jsou Amid II při $1480 - 1580\text{ cm}^{-1}$ a Amid III při $1230 - 1300\text{ cm}^{-1}$.^{44,45} Další aplikací SERS je detekce cirkulujících nádorových buněk (CTC). Ty se dají považovat za charakteristický znak invazivních forem rakovinných buněk, které jsou zodpovědné za vývoj

metastází. Běžné metody jsou pro jejich měření nedostačující díky nízké citlivosti, specifitě a časové náročnosti měření. Technikou SERS lze rovněž detekovat bakterie a viry.⁴⁶ Obecně existují tři různé způsoby jak získat SERS spektrum bakterií. Prvním způsobem je vytvoření SERS aktivních nanočástic (AgNPs nebo AuNPs) uvnitř nebo na povrchu bakterie. Druhý způsob spočívá v umístění bakterií přímo na SERS aktivní substrát a třetím způsobem je smíchání bakterií s koloidním roztokem.^{47,48}

2.3. Magnetický SERS

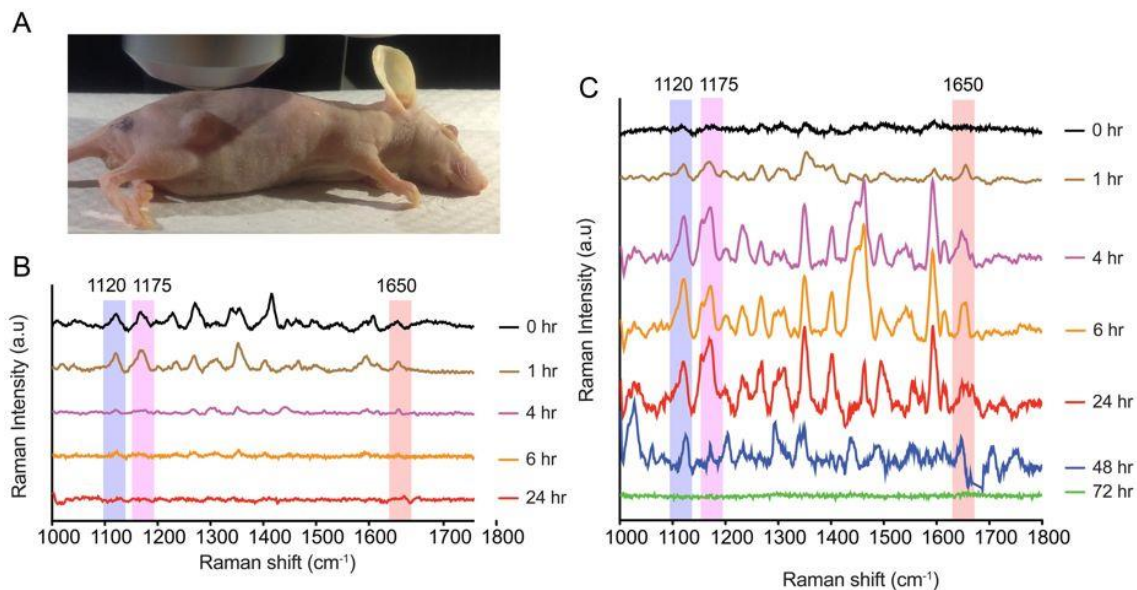
Technika SERS je velmi užitečná k detekci fyziologicky aktivních látek, nicméně její modifikace využívající magnetických nanočástic jako substrátů ještě zvyšuje potenciál SERS techniky. Tato metoda bývá v literatuře nejčastěji nazývána jako magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS)). Její hlavní výhodou je jednoduchá separace analytu ze vzorku a jeho zakoncentrování pomocí externího magnetického pole.^{17,18,49}

2.4. Aplikace magnetických nanočástic pro SERS

Vzhledem k schopnosti MA-SERS detekovat různé sloučeniny i ve velmi nízkých koncentracích, se tato metoda používá k detekci biomarkerů rakoviny a cirkulujících nádorových buněk (CTC). Takzvané sendvičové metody využívají magnetické částice a kovové nanočástice pro detekci markerů rakoviny nebo rakovinných buněk jsou velmi dobře známé.⁵⁰⁻⁵² Tento postup byl například použit pro detekci rakovinných buněk s velmi nízkou četností výskytu, detekci rakovinných markerů CEA a PSA či k detekci bakterií.⁵³⁻⁵⁶ Stanovení jednoho biomarkeru není dostatečně specifické pro stanovení konkrétního typu rakoviny. Nutnost detekovat více než jeden biomarker současně vedl ke studiu a vývoji nových typů biosenzorů založených na systému protilátka-antigen. Velká pozornost je věnována multiplexní analýze a jejímu zlepšení, protože je nezbytná pro včasnou detekci a screening rakoviny v klinické praxi.⁵⁷ Biosenzor schopný detekovat čtyři markery spojené s rakovinou plic (CEA, CA125, AFP a CA15-3) byl vyvinut skupinou Tanga a kol. V publikaci popisují přístup založený na elektrochemickém imunosenzoru s funkcionalizovanými magnetickými nanočásticemi, který měří změnu potenciálu elektrody při navázání antigenu na protilátku.⁵⁸ Elektrochemický sensor byl také použit v práci Wana a kol. Jejich metoda k identifikaci rakovinných buněk využívá kovových nanočástic (MNPs), které se specificky váží na cílové buňky. Rakovinové buňky byly nejprve zachyceny na elektrodě modifikované anti-EpCAM aptamerem, poté byl přidán roztok funkcionalizovaných nanočástic kovu a byla provedena elektrochemická detekce pomocí voltametrie.⁵⁹ V další studii byly protilátky konjugovány na nanočástice zlata označené třemi různými značkami – Cyanine 5 (Cy5), isothiokyanát malachitové zeleně (MGITC) a rhodamin 6G (Rh6G). Díky značkám bylo možné rozlišit jednotlivé biomarkery jak *in vitro*, tak *in vivo* v xenoimplantátu (štěp z cizí tkáně převzaté při transplantaci z jiného živočišného druhu). Při *in vivo* testech byly funkcionalizované označené částice injektovány přímo do nádorů, kde došlo k navázání na nádorové markery. Maximální intenzita signálu byla pozorována po 6 hodinách, po 72 hodinách už nebyl signál vůbec

pozorovatelný. Označené nanočástice bez specifických protilátek nevykazovaly po 6 hodinách žádný signál (obrázek 2).⁵⁷

Nynější způsob multiplexní analýzy pomocí SERS většinou spočívá v označení analytů různými značkami. Tento způsob je vysoce citlivý a selektivní v porovnání s běžně používanými imunologickými metodami jako je ELISA. Na druhou stranu, nespecifické interakce připravených materiálů s komplexní matricí jako je krev způsobují interference signálu a tím znemožňují použití těchto metod v klinické praxi.



Obr. 2: *In vivo* multiplexní detekce modelového nádoru: (A): Obrázek myši s nádorem. (B): SERS spektra z oblasti nádoru znázorňující píky při 1120, 1175 a 1650 cm^{-1} odpovídající nekonjugovaným SERS značkám Cy5, MGITC a Rh6G. (C): - SERS spektra z místa nádoru znázorňující píky při 1120, 1175 a 1650 cm^{-1} odpovídající SERS značkám Cy5, MGITC a Rh6G navázaných na biomarkery TGF β R II , CD44 a EGFR. Převzato z Dinish a kol. (2014).⁵⁷

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce byl výzkum zaměřený na přípravu a využití nanočástic ušlechtilých kovů, zejména nanočástic stříbra, v kombinaci s magnetickými nanočásticemi při povrchem zesílené Ramanově spektroskopii biologicky aktivních látek.

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

- optimalizovat podmínky přípravy a modifikace magnetických nanokompozitů s nanočásticemi stříbra pro magneticky asistovanou povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii
- vývoj a aplikace biosensoru pracujícího na principu magneticky asistované SERS detekce imunoglobulinu G ve vzorcích lidské krve
- vývoj a aplikace biosensoru pro multiplexní analýzu rakovinných markerů HER2 a EpCAM pomocí MA-SERS

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

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Příprava nanočástic, nanokompozitů a jejich funkcionalizace

4.1. Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra používané k zesílení Ramanova signálu byly připraveny redukcí diaminstříbrného kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ D-maltózou. Detailní postup je popsán v publikaci Panáčka a kol.⁶⁰ Pro přípravu nanočástic stříbra bylo složení reakčního systému následující: dusičnan stříbrný $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; maltóza $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; amoniak $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po smíchání dusičnanu stříbrného a amoniaku bylo pH reakčního systému upraveno přidáním hydroxidu sodného na $11,5 \pm 0,1$. Poté se, za intenzivního míchání, přidal do systému roztok maltózy. Reakce byla považována za dokončenou po 4 minutách, kdy již nedochází ke změně zabarvení vzniklé disperze AgNPs. Tímto postupem byla připravena prakticky monodisperzní suspenze nanočástic stříbra se střední velikostí částic okolo 28 nm.

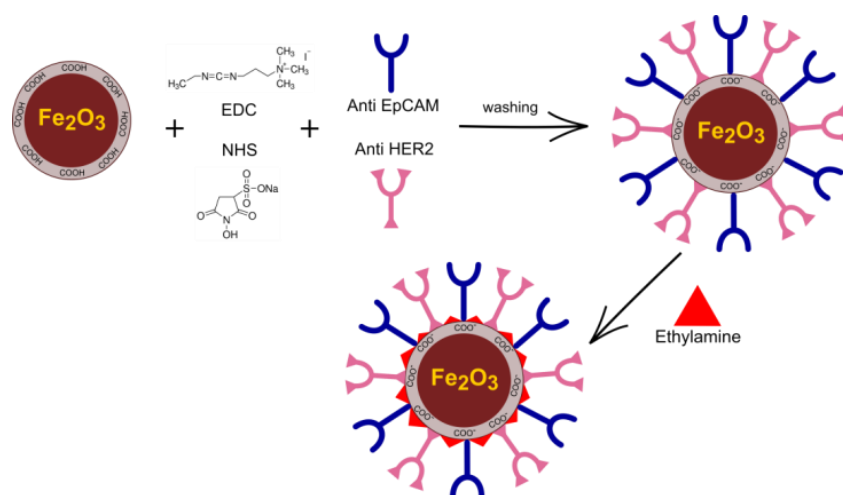
4.2. Magnetický nanokompozit pro analýzu IgG

Magnetický nanokompozit byl připraven podle postupu popsaného dříve Markovou a kol.⁶¹ Ve stručnosti, magnetické nanočástice byly připraveny Massartovou koprecipitační metodou z vodného roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ za použití hydroxidu sodného; pH směsi $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bylo upraveno 1,5 M NaOH na hodnotu 11. Syntéza byla provedena při pokojové teplotě za konstantního probublávání dusíkem, aby se zabránilo další oxidaci. Po hodině míchání byl produkt několikrát promyt vodou a magneticky odseparován. Získané magnetické nanočástice byly použity pro přípravu magnetit-O-karboxymethylchitosanu adsorpcí polymeru na povrch připravených nanočástic indukovanou postupným zvyšováním teploty na $80 \text{ }^\circ\text{C}$. V posledním kroku byl k magnetit-O-karboxymethylchitosanu přidán dusičnan stříbrný a na povrchu hybridu došlo k vyredukování iontů stříbra aminovými skupinami polymeru za alkalických podmínek a při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Připravený nanokompozit byl dále funkcionalizován protilátkou anti-IgG. Nejprve byl nanokompozit smíchán s roztoky EDC/NHS (1:1, finální koncentrace 20 mM) a poté s ethylaminem (7% w/w). V dalším kroku byl přidán karboxy-PEG (finální koncentrace 1 mM), čímž došlo k vytvoření karboxylových skupin na povrchu AgNPs. Karboxylové skupiny byly aktivovány přidáním roztoku EDC/NHS (1:1, finální koncentrace 20 mM), poté následovalo přidání streptavidinu (finální koncentrace $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Po navázání streptavidinu na aktivované karboxylové skupiny, byla přidána biotinylovaná protilátka anti-IgG (finální koncentrace $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), která vytvořila se streptavidinem pevnou vazbu. Na závěr byly zablokovány zbylé karboxylové skupiny ethylaminem (7% w/w), aby se zabránilo nespecifickým interakcím. Během funkcionalizace byl nanokompozit po každém kroku důkladně promyt a odseparován pomocí magnetického pole.

4.3. Příprava biosenzoru pro multiplexní analýzu nádorových markerů

Uvedený biosenzor byl složen z magnetických nanočástic a nanočástic stříbra potřebných k zesílení Ramanova signálu. Postup funkcionalizace magnetických nanočástic je zobrazen na obrázku 3. V prvním kroku přípravy biosenzoru byly komerční magnetické částice s karboxylovými skupinami (Sigma Aldrich) aktivovány za použití směsi EDC/NHS v poměru 1:1 (finální koncentrace 10 mM); částice pak byly magneticky odseparovány a promyty PBS pufrem. V následujícím kroku byly částice s aktivovanými karboxylovými skupinami smíchány s protilátkami AntiEpCAM a antiHER2 ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a ponechány přes noc na rotátoru čímž došlo ke vzniku kovalentní vazby mezi volnými amino skupinami ($-\text{NH}_2$) přítomnými ve struktuře protilátek a aktivovanými karboxylovými skupinami magnetických částic. Po imobilizaci protilátek byly magnetické částice odděleny pomocí magnetu a opět promyty PBS pufrem. Na závěr byl přidán ethylamin (7% w/w), aby došlo k zablokování zbylých aktivních karboxylových skupin, čímž se zabránilo nespecifickým interakcím.



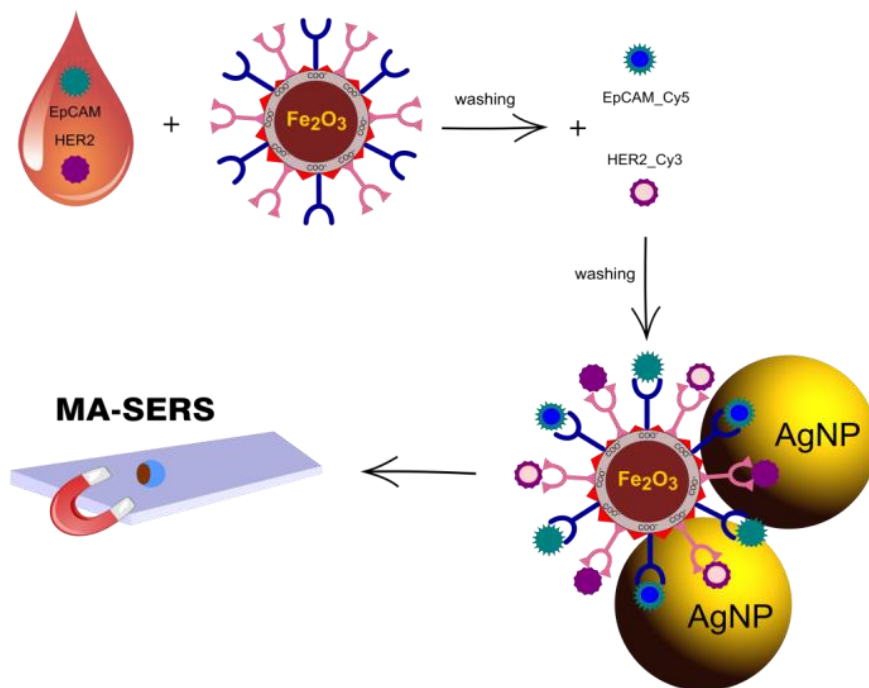
Obr. 3: Schéma přípravy biosenzoru (funkcionalizace MNPs protilátkami Anti-HER2 a Anti-EpCAM). Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

4.4. Postup analýzy nádorových markerů HER2 a EpCAM

Slepý vzorek pro tuto analýzu obsahoval jen PBS pufr ($c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,5$). Modelový vzorek obsahoval biomarkery HER2 a EpCAM o koncentracích 5, 10 a $25 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěných v PBS pufru ($c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,5$). Vzorky lidské krve (20 vzorků od 2 dobrovolníků, $V = 1 \text{ ml}$) byly 100krát zředěny PBS a naspikovány biomarkery HER2 a EpCAM v konečné koncentraci 5 a $10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

Postup analýzy vzorků je zobrazen na obrázku 4. Nejdříve byly $2 \mu\text{l}$ vzorku (slepý, modelový, lidská krev) smíchány s $10 \mu\text{l}$ připraveného sensoru anti-HER2@Anti-EpCAM@MNPs. Vzorek se senzorem byl míchán po dobu jedné hodiny, poté byl sensor magneticky odseparován, promyt PBS pufrem a znovu rozdispergován v $10 \mu\text{l}$ PBS. Poté byly k sensoru přidány $2 \mu\text{l}$ značeného HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5 (konečná koncentrace $10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) a směs byla pečlivě promíchána. Po 1 hodině byl sensor magneticky odseparován od přebytku označených

markerů a dvakrát promyt deionizovanou vodou. V posledním kroku byly k senzoru přidány nanočástice stříbra aktivované chloridem sodným, výsledný nanokompozit byl zakoncentrován pomocí vnějšího magnetického pole a analyzován pomocí SERS.



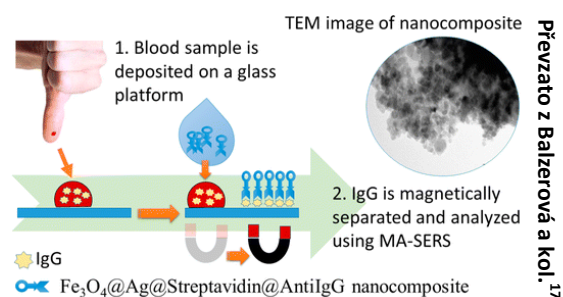
Obr. 4: Schéma multiplexní kompetitivní analýzy dvou různých nádorových markerů v lidské plné krvi. Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

5. Výsledky a diskuze

Tato část disertační práce poskytuje přehled dosažených výsledků stanovení biologicky aktivních látek pomocí magneticky asistované a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Sekce je rozdělena do tří podkapitol. První podkapitola se zabývá využitím magnetického SERSu k detekci lidského imunoglobulinu G (IgG), zatímco druhá část se zabývá simultánní analýzou rakovinných markerů. Třetí podkapitola je věnována dalšímu využití techniky MA-SERS. Výsledky uvedené v této kapitole byly publikovány ve třech impaktovaných časopisech a dvou recenzovaných časopisech a jejich plné znění lze nalézt v příloze.

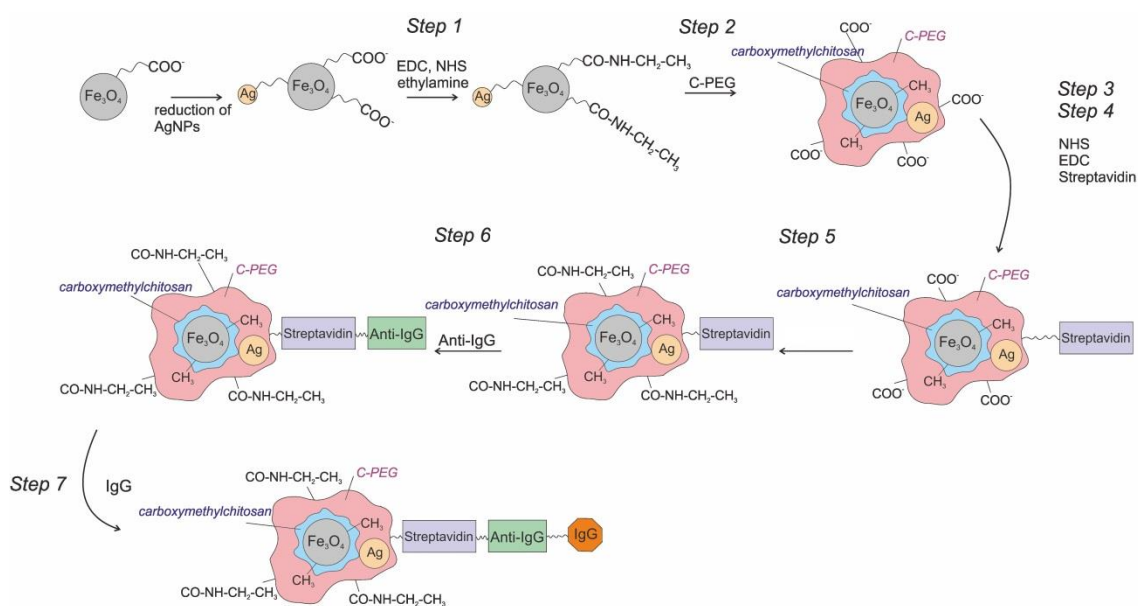
5.1. Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS) pro stanovení lidského imunoglobulinu G v krvi

Tato práce popisuje vývoj metody ke stanovení lidského imunoglobulinu G (dále jen IgG) v krvi pomocí magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. K tomuto účelu byl připraven nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{streptavidin}@\text{anti-IgG}$, který měl magnetické vlastnosti a zároveň poskytoval zesílení Ramanova signálu díky navázaným AgNPs. Charakterizace nanokompozitu byla provedena pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM), infračervené spektroskopie (IR), práškové difrakce (XRD) a měřením zeta potenciálu. Poté byl nanokompozit použit pro SERS analýzu vzorků lidské krve.

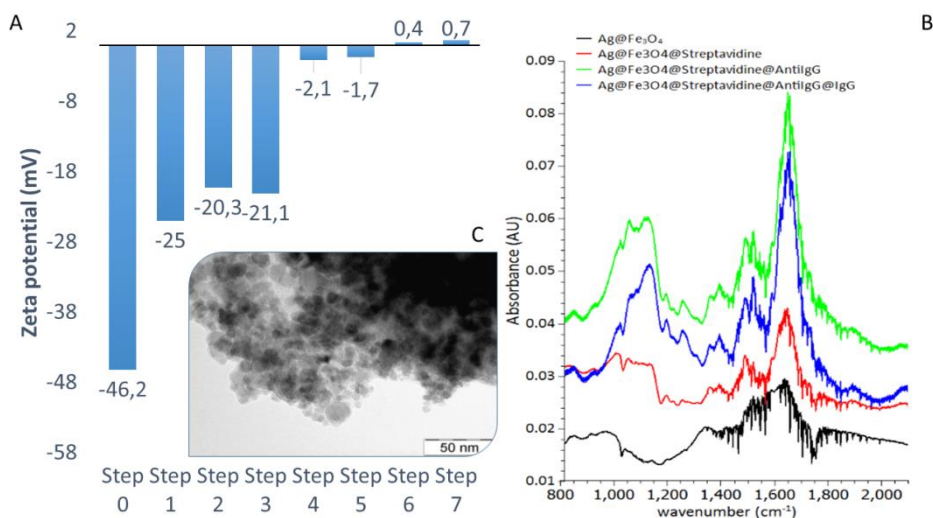


Nanokompozit k detekci IgG byl připraven podle schématu (Obr. 5). Nanokompozit byl složen z nanočástic Fe_3O_4 a stříbrných nanočástic kovalentně vázaných O-karboxymethylchitosanem. Tento linker byl zvolen z důvodu přítomnosti volných karboxylových skupin, které zajistily dlouhodobou stabilitu takto připraveného nanokompozitu ve vodném prostředí. Karboxylové skupiny však způsobují relativně vysoký negativní povrchový náboj. Proto byla jejich přítomnost během následných kroků modifikace povrchu minimalizována, aby se zajistilo vysoce selektivní navázání streptavidinu pouze na volnou plochu nanočástic stříbra. Z tohoto důvodu byly v prvním kroku volné karboxylové skupiny odstraněny (deaktivovány) reakcí s vodnou směsí EDC/NHS v poměru 1:1 a následně vodným roztokem ethylaminu. Deaktivace a blokování karboxylových skupin (Obr. 5, Step 1) vedly k významné změně zeta potenciálu na $-20,3$ mV (z původního $-46,2$ mV). Z tohoto poklesu negativního náboje bylo patrné, že karboxylové skupiny byly úspěšně blokovány. V dalším kroku (Obr. 5, Step 2) byly na povrchu nanočástic stříbra vytvořeny nové volné karboxylové skupiny přidávkou karboxypolyethylenglykolu. Tento krok byl nezbytný pro další selektivní imobilizaci streptavidinu. Adsorpce karboxy-PEGu na povrchu AgNPs vedla k mírnému zvýšení povrchového náboje na $-21,1$ mV. Rozdíl mezi poslední jmenovanou hodnotou a počátečním záporným nábojem ($-46,2$ mV) byl způsoben různým množstvím

imobilizovaných funkčních skupin. Aktivace nově vytvořených karboxylových skupin vodnou směsí EDC a NHS (Obr. 5, Step 3) byla doprovázena velkým poklesem záporného náboje na hodnotu -2,1 mV. Ve čtvrtém kroku byl imobilizován streptavidin na povrch stříbrných nanočástic (Obr. 5, Step 4). Mezi aktivovanými karboxylovými skupinami a -NH₂ skupinami streptavidinu byly vytvořeny kovalentní vazby. Imobilizací streptavidinu na povrch nanokompozitu byl povrchový náboj změněn pouze mírně a to na -1,7 mV. Úspěšná imobilizace streptavidinu byla potvrzena měřením IR spekter (Obr. 6B), která vykazovala nárůst pásů interpretovaných jako součást proteinové struktury (1450 a 1650 cm⁻¹). Streptavidin hrál klíčovou roli při vazbě biotinylované části anti-IgG, který byl přidán k nanokompozitu v dalším kroku (Obr. 5, Step 6). Tvorba vazby mezi streptavidinem a biotinylovanou částí anti-IgG byla doprovázena změnami povrchového náboje na 0,4 mV a změnami výše uvedených IR pásů. Ke konečnému zablokování zbývajících karboxylových skupin byl opět použit ethylamin. Zablokování bylo potvrzeno dodatečným zvýšením zeta-potenciálu na 0,7 mV (obrázek 6A).

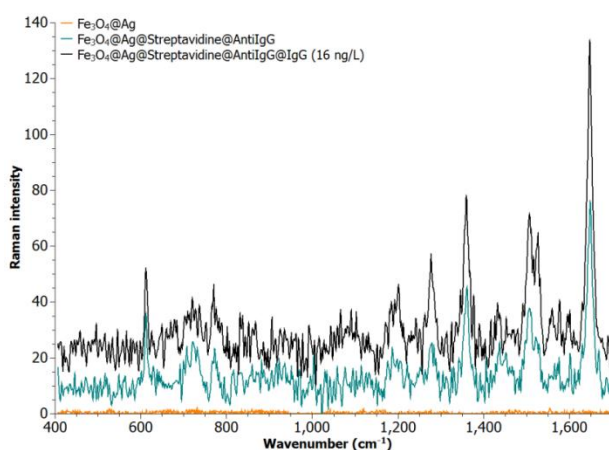


Obr. 5: Schéma znázorňující jednotlivé kroky modifikace nanokompozitu Fe₃O₄@Ag pro stanovení lidského IgG pomocí MA-SERS. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷



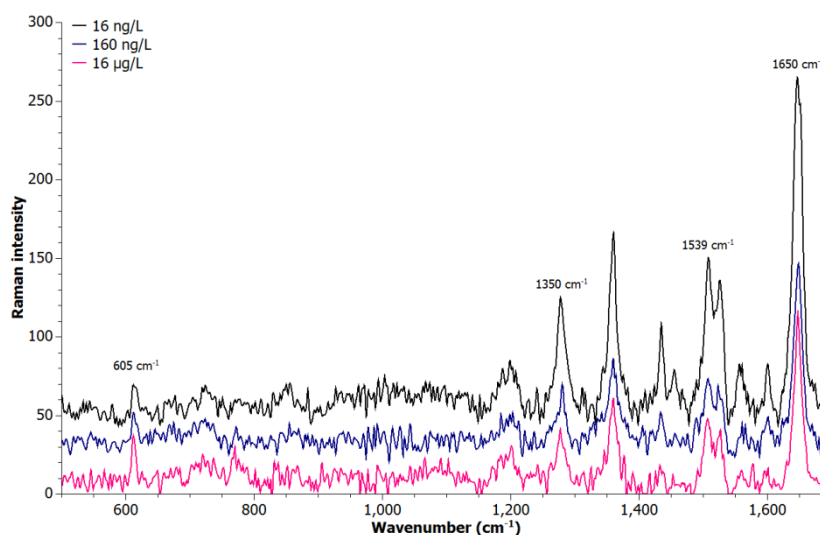
Obr 6: (A) Naměřené zeta-potenciály připraveného nanokompozitu a nanokompozitu po každém kroku modifikace. (B) IR spektra čistého nanokompozitu a modifikovaného nanokompozitu. (C) TEM snímek $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Připravený nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@anti-IgG$ byl použit pro stanovení koncentrace IgG ve vzorcích lidské plné krve. Na základě teorie bylo předpokládáno, že specifická interakce IgG s protilátkou na IgG imobilizovanou na povrchu nanokompozitu by vedla ke spektrálnímu posunu o několik vlnových jednotek nebo ke změně intenzity Ramanových pářů odpovídajících vazebným místům protilátky. Pro testování této hypotézy byly analyzovány standardní vzorky obsahující vodnou disperzi $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG$ s $16 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ lidského IgG, slepé a kontrolní vzorky. Slepý vzorek obsahoval pouze čistý nemodifikovaný nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ dispergovaný ve vodě, zatímco kontrolní vzorek sestával z vodné disperze nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG$ bez přidání IgG. Získaná spektra jsou prezentována na obrázku 7.



Obr. 7: Ramanovo spektrum čistého nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$, modifikovaného nanokompozitu získaného imobilizací streptavidinu a anti-IgG ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG$) a modelového vzorku s koncentrací IgG $16 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (značené jako $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@streptavidin@anti-IgG@IgG$). Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Ramanův signál kontrolního vzorku obsahoval několik důležitých spektrálních pásů, které byly přiřazeny částem proteinů funkcionalizovaného nanokompozitu. Spektrální pásy při 1650, 1539 a 1350 cm^{-1} byly interpretovány jako amidy I, II a III. Navíc poměrně ostrý pás s vlnočtem 1650 cm^{-1} značil sekundární strukturu typu α helix. Pás při 605 cm^{-1} byl interpretován jako vibrace Ag-N vazby pocházející z přidavku ethylaminu v prvních krocích modifikace nanokompozitu $\text{Fe}_2\text{O}_3@Ag$. Předpokládalo se, že jeho poloha a intenzita nebude citlivá na vznik kovalentní vazby mezi senzorem a IgG ve vzorku. Dále se předpokládalo, že úspěšná tvorba vazby mezi anti-IgG a IgG způsobí změny absolutních intenzit a hlavně poměr spektrálních pásů Amidu I, II a III, vzhledem k rozdílným strukturám těchto dvou proteinů. Podrobné porovnání spekter kontrolních a modelových vzorků ukázalo, že jak pozice, tak intenzita pásu při 605 cm^{-1} zůstaly nezměněny, jak bylo předpokládáno, zatímco intenzity a poměry spektrálních pásů proteinů se lišily. Velmi důležité bylo studium selektivity navržené metody. Selektivita metody byla testována s použitím myšního IgG a BSA; přítomnost těchto proteinů nevedla k významným změnám pozorovaného analytického signálu, a vypočtené hodnoty RS se významně nelišily od hodnot získaných pro slepý roztok. Za účelem posouzení, zda lze metodu použít ke kvantitativní analýze bylo připraveno pět kalibračních vzorků. Všechny kalibrační vzorky byly měřeny za stejných podmínek. Rozsah koncentrací použitých pro sestavení kalibrační křivky byl zvolen tak, aby odpovídal požadavkům na provádění stopové analýzy a byl nastaven od 100 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ po 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Spektra modelových vzorků obsahujících 16 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, 160 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a 16 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG jsou uvedena na obrázku 8.



Obr. 8: Ramanova spektra modelových vzorků obsahujících 16 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, 160 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a 16 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Normalizovaná a základní spektra byla vyhodnocena a použita pro kalibraci. Fluktuace ve spektrech, způsobené nestabilitou spektrálního pásu při 605 cm^{-1} , neumožňují přímé kvantitativní stanovení IgG z absolutních intenzit, což je patrné z obr. 8. Nicméně vědecké publikace naznačují, že interakce proteinů vedou ke značné změně poměrů vybraných spektrálních pásů.^{63–66} Kvantifikace IgG byla tedy založena na jednoduché rovnici (rovnice 1),

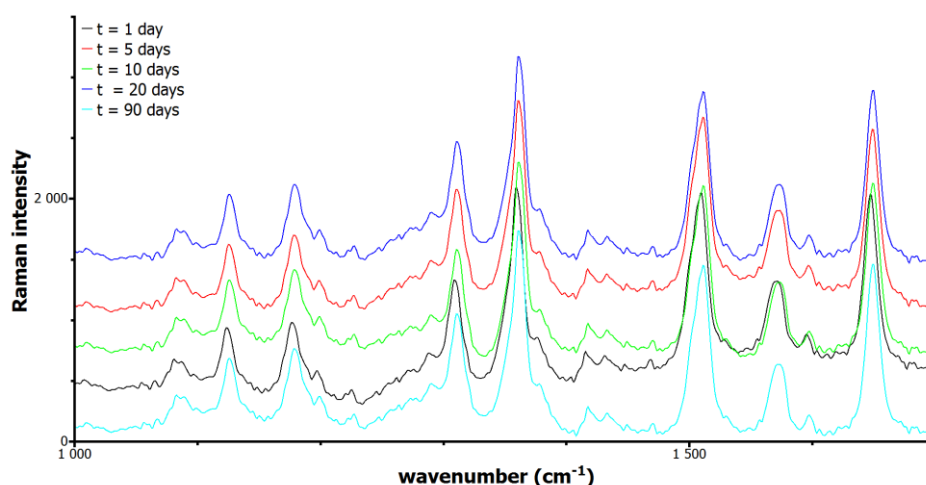
kteřá umožňuje výpočet poměru intenzity pásů proteinu s vlnočty 1539 a 1650 cm^{-1} , kde absolutní intenzity I_{1650} a I_{1539} byly předtím normalizovány na intenzitu referenčního pásu při 605 cm^{-1} , aby se minimalizovaly nežádoucí fluktuace analytického signálu.

$$R = \frac{I_{1539}/I_{605}}{I_{1650}/I_{605}}, \quad [1]$$

kde I_{1539} , I_{1650} a I_{605} představují intenzity spektrálních pásů při 1539, 1650 a 605 cm^{-1} . 605 byl použit jako reference pro normalizaci spekter, aby se minimalizovaly systémové chyby způsobené změnami složení kompozitu, struktury a nestabilitou Ramanova signálu. Navíc, aby byla metoda robustnější, bylo použito Ramanovo spektrum kontrolního vzorku obsahujícího jen kompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{streptavidin}@anti\text{-IgG}$, jak je uvedeno v rovnici 2:

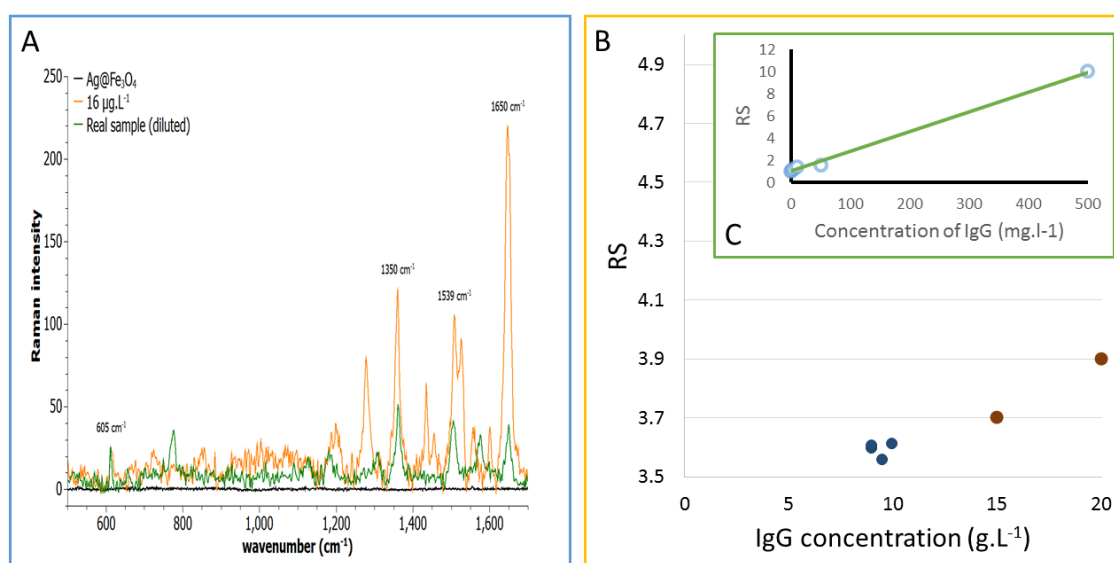
$$RS = \frac{I_{Std_{1539}}/I_{Std_{605}}}{I_{Std_{1650}}/I_{Std_{605}}} / \frac{I_{Ref_{1539}}/I_{Ref_{605}}}{I_{Ref_{1650}}/I_{Ref_{605}}}, \quad [2]$$

kde I_{Std} značí intenzity spektrálních pásů vzorků a I_{Ref} značí intenzity spektrálních pásů kontrolních vzorků. RS tudíž znázorňuje míru změny poměru proteinových pásů mezi kontrolním a analyzovaným vzorkem. Čím vyšší číslo než jedna, tím vyšším množstvím IgG ve vzorku (kontrolní vzorek $RS = 1$). Bylo zjištěno, že vypočítané poměry mají lineární charakter v celém měřeném rozsahu. Limit detekce byl spočítán na 0,6 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro ověření stability signálu bylo provedeno 10 měření během 10 dnů. Bylo zjištěno, že relativní chyba RS mezi stejnými vzorky byla nižší než 8%. Dále byla provedena měření dvou modelových vzorků pro testování spolehlivosti a robustnosti metody. Vzorek A obsahoval 10 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG a vzorek B 100 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozdíly mezi skutečnou a experimentálně získanou hodnotou byly kolem 20% a relativní směrodatná odchylka $RSD = 5\%$. Pro sledování dlouhodobé stability byla měřena Ramanova spektra $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@Streptavidin@AntiIgG$ po dobu 90 dnů. Naměřená spektra jsou uvedena na obrázku 9. Každé spektrum je posunuto o 100 jednotek na ose intenzity, aby byla spektra více přehledná.



Obr. 9: Ramanova spektra $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@Streptavidin@AntiIgG$ získaná v různých časových intervalech, která demonstrují stabilitu biosenzoru. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Navržená metoda byla dále použita pro analýzu vzorků lidské plné krve získaných odběrem kapky krve z prstu. Touto metodou lze získat pouze malé množství vzorku, v řádech mikrolitrů. Přestože metoda byla vyvíjena tak, aby nespecifické interakce připraveného nanokompozitu se složkami komplexní matrice krve byly minimální, část Ramanova signálu může přesto pocházet od nespecifických interakcí. Z tohoto důvodu bylo nutné spektra pečlivě vyhodnotit porovnáním reálných vzorků a vzorků modelových. Experimentální analýza byla provedena podle postupů použitých dříve v kalibračních experimentech. Bylo analyzováno 10 vzorků (dva pacienti, každý 5 vzorků), SERS spektrum reálného vzorku je uvedeno na obr. 10 (A).



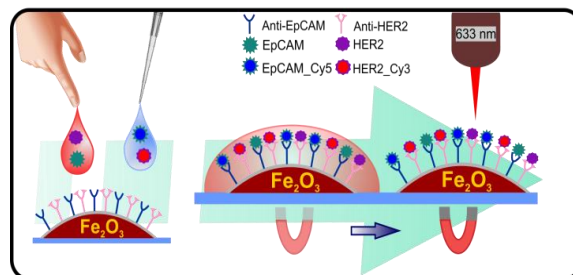
Obr. 10: (A) Ramanovo spektrum vzorku plné lidské krve. Pro srovnání jsou prezentovány také Ramanova spektra modelového vzorku obsahujícího $16 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG a čistého nanokompozitu. (B) Stanovení koncentrace analyzovaných vzorků. Modré body patří reálným vzorkům krve a hnědé body prezentují data získaná metodou standardního přídávku k těmto vzorkům. (C) Kalibrační křivka pro stanovení IgG v modelových vzorcích. Převzato z Balzerova a kol. (2014)¹⁷

Ve spektru je vidět, že obsahuje všechny pásy dříve přiřazené sensoru; nicméně spektrální pás interpretovaný jako Amid II je mírně posunut vzhledem k odlišné struktuře IgG ve srovnání s anti-IgG a Streptavidinem. Spektrum reálného vzorku bylo porovnáno s příslušným Ramanovým spektrem standardního roztoku lidského IgG (počáteční koncentrace = $5 \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), aby se potvrdil původ analytického signálu. Koncentrace lidského IgG v reálných vzorcích byla stanovena metodou standardního přídávku, aby se minimalizovaly možné spektrální interference. Do každého vzorku krve bylo přidáno definované množství IgG a poloha a intenzita všech pásů byla vyhodnocena a porovnána s Ramanovými spektry původních vzorků krve. Získané hodnoty jsou ukázány na obrázku 10 (B), kde jsou reálné vzorky označeny jako modré body a dva standardní přídávky jsou označeny jako hnědé body. Výsledky analýzy ukázaly, že vzorky od pacienta A obsahovaly $9 \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG a analogicky, vzorky získané od pacienta B obsahovaly $10 \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ IgG. Za zmínku stojí, že stanovená množství IgG jsou v souladu s hodnotami uváděnými pro zdravou populaci.⁶⁷

Výsledky této práce byly v roce 2014 publikovány v časopise *Analytical Chemistry* a v plném znění jsou dostupné v příloze disertační práce.

5.2. Využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie k multiplexní analýze nádorových markerů HER2 a EpCAM v lidské krvi

Tato práce popisuje využití magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie ke kompetitivní simultánní detekci dvou rakovinných markerů HER2 a EpCAM. Jako biosensor byl použit magnetický nanokompozit $\text{Fe}_2\text{O}_3@Ag$ funkcionalizovaný protilátkami (Anti-HER2,



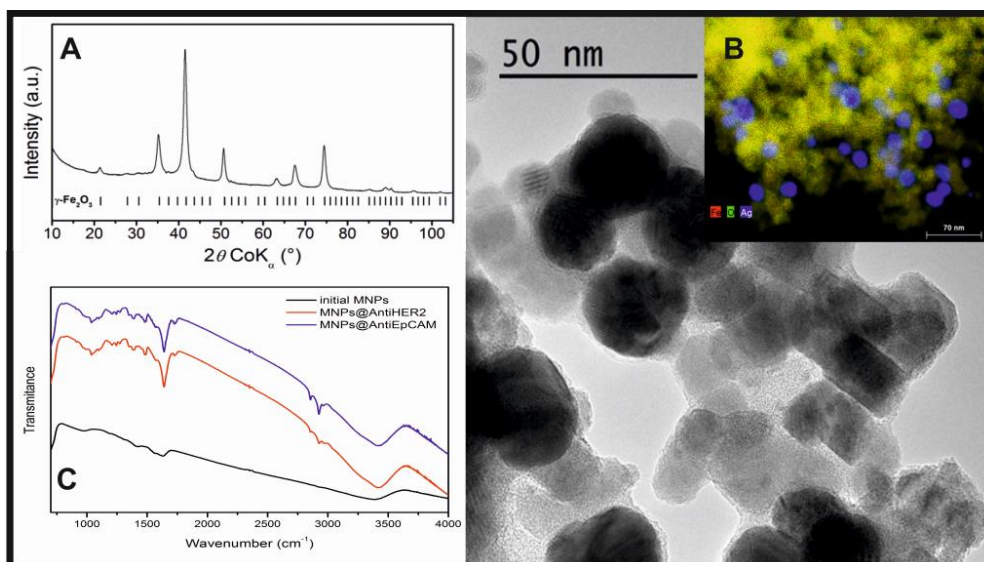
Převzato z Balzerová (2018)⁶²

Anti-EpCAM). Navržená metoda byla založena na kompetici mezi chemicky značenými referenčními markery (Her2_Cy3 a EpCAM_Cy5) a neoznačenými markery a byla použita pro detekci vybraných markerů v lidské plné krvi. Analýza vzorků krve byla statisticky vyhodnocena za použití Studentova t-testu a diskriminační analýzy. Díky magnetickým nanočásticím, které umožňují rychlou prekoncentraci analytu pomocí vnějšího magnetického pole a jednoduchou separaci cílených látek od komplexní matrice, představuje aplikace MA-SERS alternativu k ostatním metodám (elektrochemické metody nebo SERS) používaných při multiplexní detekci.

Chemická struktura výchozích magnetických nanočástic (MNPs) byla zkoumána rentgenovou práškovou difrakcí (XRD). Jako jediná krystalická fáze byl identifikován maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (obr. 11 (A)) s velikostí krystalitů 13 nm. HRTEM snímky materiálu s prvkovým rozložením stříbra a magnetických nanočástic jsou zobrazeny na obrázku 11 (B). Světlejší, menší objekty byly identifikovány jako částice Fe_2O_3 mající velikost v rozmezí 10-15 nm, což odpovídá datům z XRD. Větší objekty na obrázku patří nanočásticím stříbra s průměrnou velikostí asi 30 nm. Tato interpretace je dále potvrzena elementární mapou (inset obrázku 11 B), kde menší žluté části mapy představují částice oxidu železitého, zatímco modré skvrny odpovídají nanočásticím stříbra.

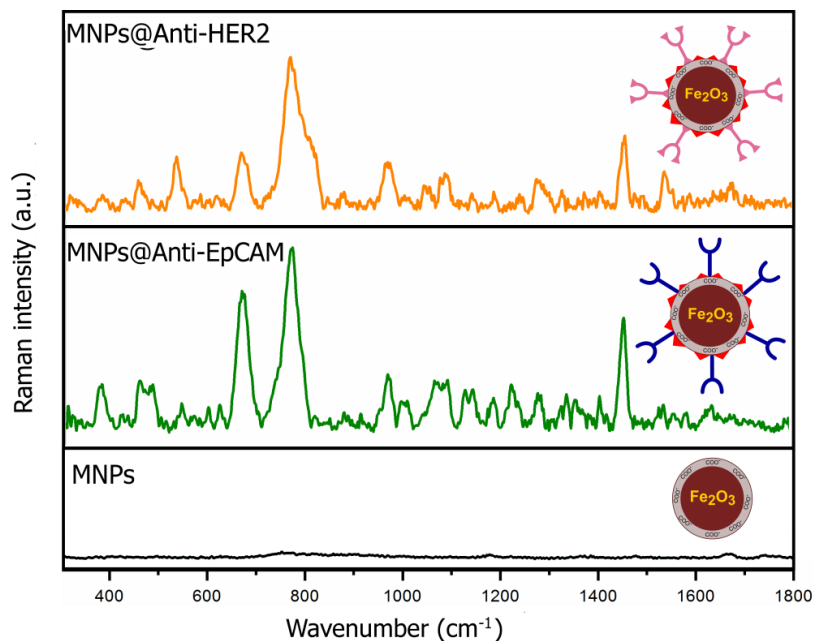
Infračervená spektroskopie a měření ζ -potenciálu byly použity ke sledování změn povrchových charakteristik funkcionalizovaných MNPs během procesu funkcionalizace povrchu. Naměřený ζ -potenciál nemoifikovaných výchozích magnetických nanočástic byl -22,3 mV. Silný záporný náboj MNPs byl způsoben karboxylovými skupinami přítomnými na povrchu magnetických nanočástic. Aktivace karboxylových skupin vodným roztokem EDC a NHS byla doprovázena velkou změnou záporného náboje na kladný, s hodnotami +7 mV ($\Delta \zeta$ potenciál = 29,3 mV). Poslední krok souvisel s imobilizací protilátek AntiHER2 a AntiEpCAM na povrch MNPs. Postupné navázání proteinů způsobilo změnu náboje na hodnoty +9 mV pro AntiHER2 a +8 mV v případě AntiEpCAM. Úspěšná imobilizace obou protilátek byla dále potvrzena naměřenými IR spektry, která jsou uvedena na obrázku 11 (C). Spektrum obsahuje

významné pásy při 3430 cm^{-1} interpretované jako valenční vibrace O-H a pás při 1726 cm^{-1} , interpretovaný jako C=O vibrace karboxylových skupin přítomných na povrchu magnetických částic. Přítomnost navázaných proteinů značí proteinové pásy amidu I (-CO-NH) a amidu II (-CO-NH-) lokalizovaných při 1570 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} , spektrální pás 1385 cm^{-1} představuje vibraci COOH skupiny a je způsoben přítomností zbývajících nemoifikovaných karboxylových skupin na povrchu Fe_2O_3 .



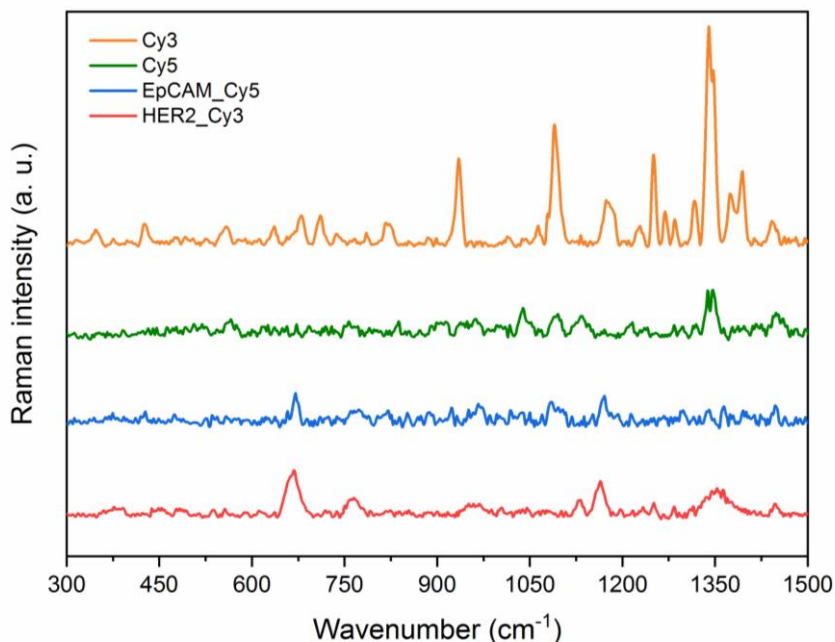
Obr. 11: (A) XRD spektrum čistých MNPs, (B) HRTEM snímek hybridního systému MNPs@Ag včetně elementárního mapování HAADF / EDS ve výřezu, (C) IR spektra čistých MNPs a funkcionalizovaných MNPs. Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Sensor MNPs@AntiHER2@AntiEpCAM byl navržen pro kompetitivní multiplexní analýzu dvou různých nádorových markerů HER2 a EpCAM a jejich protějšků označených fluorescenčními značkami (HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5) v plné lidské krvi. Nejdříve byla získána Ramanova spektra funkcionalizovaných MNPs pro potvrzení úspěšné imobilizace protilátek HER2 (oranžová linka) a EpCAM (zelená linka) na povrchu MNPs, což je ukázáno na obrázku 12. Spektra obsahují charakteristické proteinové pásy Amid III (1240 cm^{-1}) a Amid II (1554 cm^{-1}), které potvrzují úspěšné navázání proteinů na povrch nanočástic.



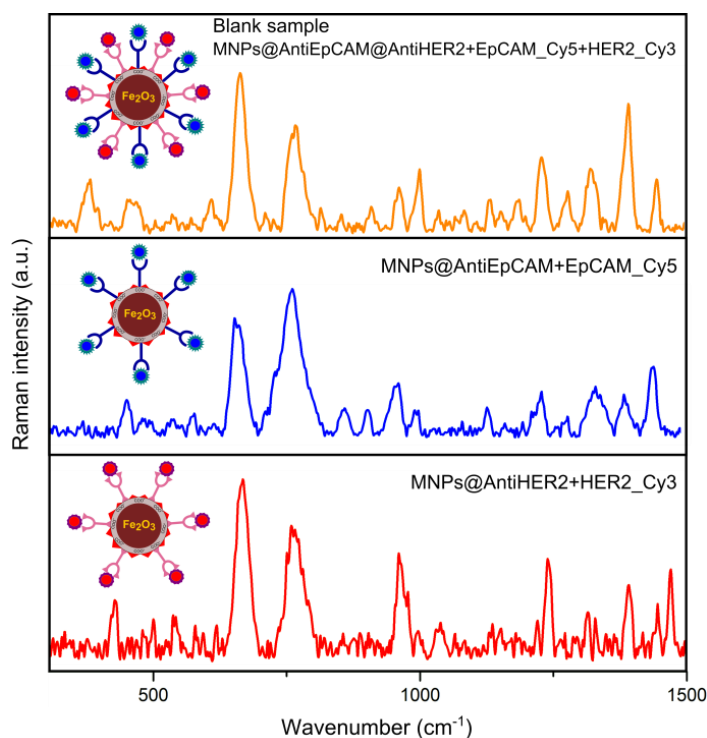
Obr. 12: Ramanova spektra nefunkcionalizovaných magnetických nanočástic Fe_2O_3 , magnetické nanočástice funkcionalizované protilátkami Anti-HER2 (oranžová linka) a Anti-EpCAM (zelená linka), (MNPs@Anti-HER2, MNPs@Anti-EpCAM). Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Poté byla měřena SERS spektra standardních roztoků značek (Cy3, Cy5) a označených markerů, která jsou uvedena na obrázku 13. Ramanova spektra sensoru a čistých sloučenin Cy3, Cy5, HER2 a EpCAM byla vzájemně porovnána. Přítomnost spektrálních pásů při 373 cm^{-1} (Cy3) a 475 cm^{-1} (Cy5) potvrdila úspěšné označení obou markerů.



Obr. 13: Ramanova spektra čistých cyaninových značek Cyanin 3 (Cy3, oranžová linka) a Cyanin 5 (Cy5, zelená linka), nádorové markery HER2 a EpCAM značené cyaninovými značkami Cyanin 3 nebo Cyanin 5 (HER2_Cy3, červená linka; EpCAM_Cy5, modrá linka). Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Pro zvýšení spolehlivosti metody, byl vybrán referenční pás při 660 cm^{-1} , charakteristický pro tyrosin. Ramanova spektra získaná analýzou označených nádorových markerů HER2_Cy3 a EpCAM_Cy5 jsou uvedena na obrázku 14. Červená linka představuje Ramanovo spektrum získané analýzou označeného HER2 za použití MNPs@AntiHER2 senzoru. Spektrum obsahuje spektrální pásy charakteristické pro Cy3 a referenční pás ležící na 660 cm^{-1} . Modrá linka představuje Ramanovo spektrum získané analýzou označeného EpCAM markeru pomocí MNPs@AntiEpCAM senzoru a obsahuje spektrální pásy charakteristické pro Cy5 a referenční pás při 660 cm^{-1} . Oranžová linka znázorňuje Ramanovo spektrum získané multiplexní analýzou obou proteinů s použitím MNPs@AntiHER2@AntiEpCAM senzoru. Spektrum obsahuje spektrální pásy obou značek, konkrétně Cy3 při 373 cm^{-1} a Cy5 při 475 cm^{-1}

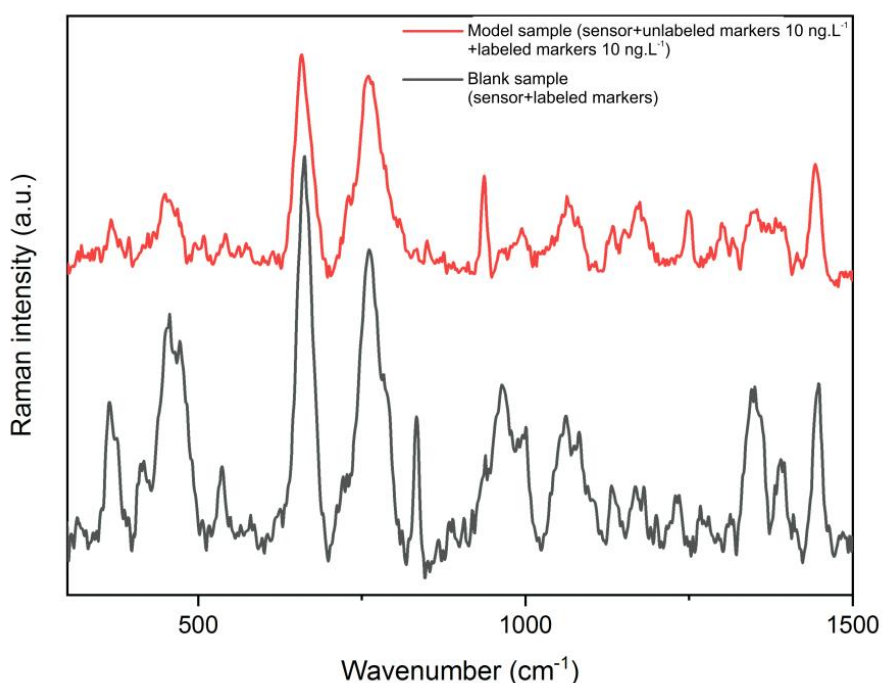


Obr. 14: Ramanovo spektrum funkcionalizovaných MNPs s anti-HER2 po přidání značeného nádorového markeru HER2 (HER2_Cy3), Ramanovo spektrum funkcionalizovaných MNP s anti-EpCAM po přidání značeného nádorového markeru EpCAM (EpCAM_Cy5), multiplexní Ramanova analýza se senzorem (MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM) po přidání značených nádorových markerů HER2 (HER2_Cy3) a EpCAM (EpCAM_Cy5). Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Pro testování funkčnosti senzorů byla vyhodnocena spektra slepých vzorků a modelových vzorků a ty pak byly použity pro další výpočty. Analýza byla provedena s 10 slepými vzorky a 10 modelovými vzorky. Každý vzorek byl měřen pětkrát. Průměrná intenzita Cy3, Cy5 a referenčních spektrálních pásů, získaná z pěti nezávislých měření, byla použita pro výpočet poměru celkové intenzity jako

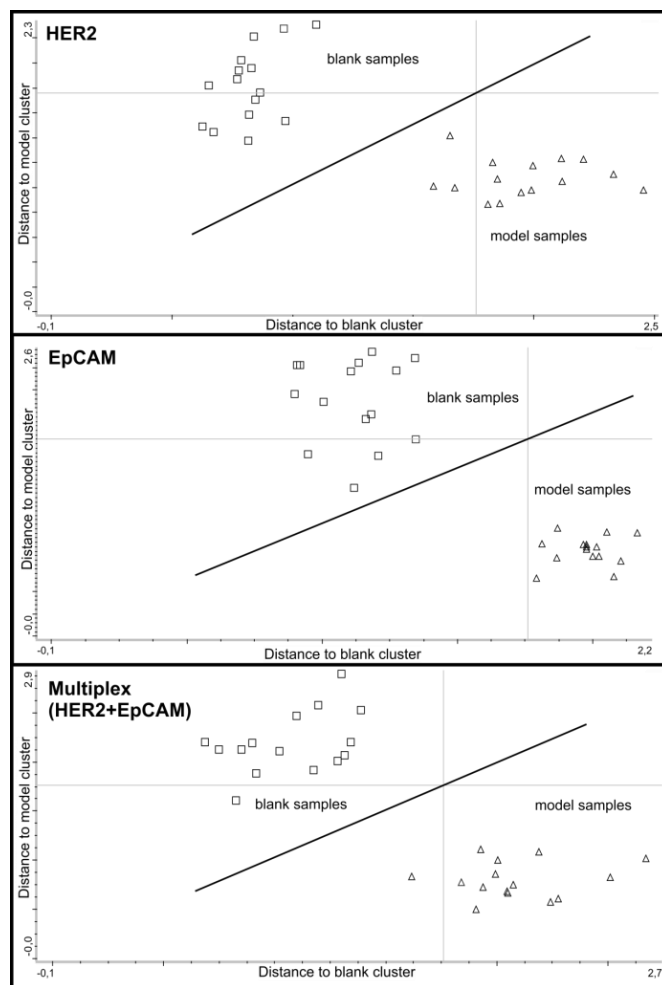
$$R_{značka} = \frac{I_{značka}}{I_{ref}} \quad [3]$$

kde $I_{\text{značka}}$ představuje intenzitu příslušné Ramanovské značky (Cy3 nebo Cy5) a I_{ref} představuje intenzitu referenčního pásu přítomného při 660 cm^{-1} . Poměry byly vypočteny pro slepé vzorky (pufr PBS, $c = 10\text{ mM}$, $\text{pH} = 7$) a modelové vzorky obsahující markery HER2 a EpCAM v poměrech 1: 1 a 1: 2 (c/c, označené: neoznačené). Bylo předpokládáno, že konkurence mezi označenými a přirozenými markery se promítne ve snížené intenzitě spektrálních pásů charakteristických pro dané značky. Tato hypotéza byla potvrzena v přítomných Ramanových spektrech slepého vzorku a modelového vzorku obsahujícího $10\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ HER2 a EpCAM (Obrázek 15). Pokles intenzity signálu byl určen pro každou značku zvlášť. Poměr intenzity ($I_{\text{značka}} / I_{\text{ref}}$) se ve vzorcích slepého vzorku, které obsahovaly pouze značené markery, změnil z 0,15 (Cy3) a 0,12 (Cy5) na 0,08 (Cy3) a 0,03 (Cy5) v modelových vzorcích, které obsahovaly také neoznačené markery. Tyto změny se týkají úspěšné interakce mezi senzorem a markery HER2 a EpCAM a také přednostního obsazení vazebných míst neoznačenými markery před označenými.



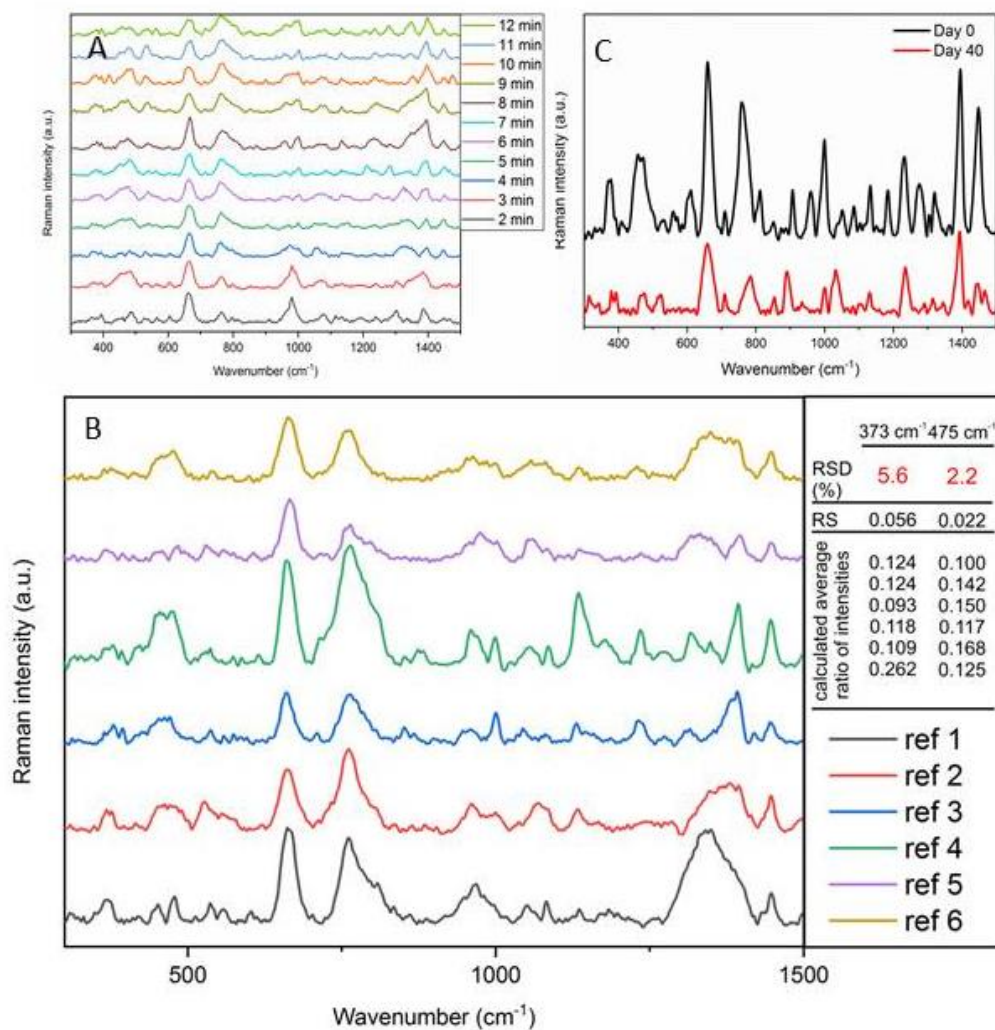
Obr. 15: Ramanovo spektrum slepého vzorku a modelového vzorku obsahujícího $10\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ HER2 a EpCAM. Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Metoda byla dále statisticky vyhodnocena pomocí diskriminační analýzy, kde byly zahrnuty spektrální pásy reference (tyrosin), Cy3 a Cy5 (660 cm^{-1} , 475 cm^{-1} a 373 cm^{-1}). Obrázek 16 ukazuje přítomnost významných rozdílů mezi Ramanovými spektry slepých vzorků (čtverec) a modelových vzorků (značka trojúhelníku). Rozdíly byly způsobeny snížením intenzity v důsledku soutěžení mezi neoznačenými markery a označenými markery, jak bylo popsáno výše. Vypočtená průměrná Mahalanobisova vzdálenost mezi klastry byla následující: 1,9 pro HER2; 2,0 pro EpCAM a 2,1 pro multiplexní analýzu.



Obr. 16: Diskriminační analýza MNPs s jednotlivými markery HER2, EpCAM a senzorem (MNPs@Anti-HER2@Anti-EpCAM) pro multiplexní analýzu. Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

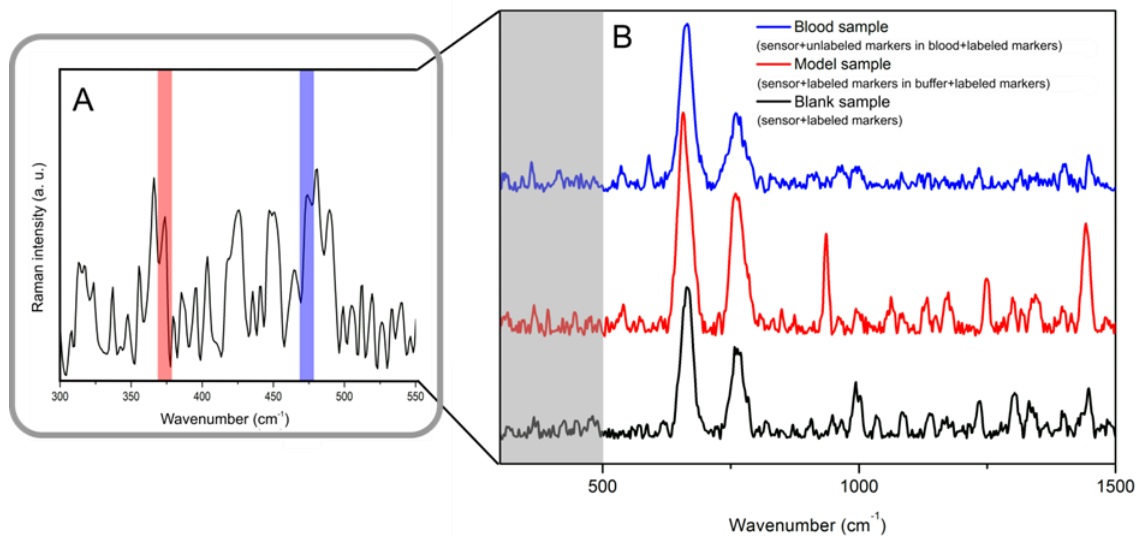
Stabilita signálu a také senzoru byla testována se slepým vzorkem za účelem ověření spolehlivosti metody. Během časového intervalu od 2 minut do 12 minut po přípravě byla zaznamenávána Ramanova spektra vzorků. Obrázek 17 (A) ukazuje, že všechna spektra obsahují stejné spektrální pásy, ačkoli jejich absolutní intenzity se s časem snižují. Rovněž byla testována reprodukovatelnost systému. Ramanova spektra šesti různých kapek připraveného senzoru s označenými markery jsou uvedena na obrázku 17 (B). V obou případech jsou spektra velmi podobná bez podstatných změn a lze tedy konstatovat, že metoda poskytuje opakovatelné výsledky, což bylo podpořeno výpočtem relativní směrodatné odchylky pro každou značku. Vypočtené hodnoty RSD činily 5,6% a 2,2%. Limit detekce byl stanoven z kalibrační křivky na hodnotu $LOD = 5 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ (vypočteno podle rovnice $3s/m$, kde 's' je směrodatná odchylka nejnižší koncentrace analytu a 'm' je směrnice přímky). Dlouhodobá stabilita byla hodnocena na slepém vzorku, kdy byla Ramanova spektra zaznamenána bezprostředně po přípravě vzorku (den 0) a po 40 dnech. Výsledná spektra jsou uvedena na obrázku 17 (C). Je zřejmé, že spektrum 40 dnů starého vzorku obsahuje stejné spektrální pásy jako vzorek měřený bezprostředně po přípravě. Přestože je intenzita pásu při 660 cm^{-1} o 57% nižší kvůli degradaci senzoru, systém je stále plně funkční.



Obr. 17: (A) Ramanova spektra slepého vzorku (senzor + značené nádorové markery) získaná v časovém intervalu 2 – 12 minut po přípravě, která demonstrují stabilitu nanosystému. (B) Ramanova spektra šesti různých kapek slepého vzorku (senzor + značené nádorové markery), která ukazují opakovatelnost měření. (C) Měření dlouhodobé stability se slepým vzorkem (senzor + značené nádorové markery). Ramanova spektra byla měřena okamžitě po přípravě vzorku (den 0) a poté po 40 dnech od přípravy. Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Aplikační potenciál navrhované metody byl dále testován s cílem použít ji pro kompetitivní multiplexní analýzu vzorků lidské krve. Bylo shromážděno deset vzorků od dvou dobrovolníků a analyzováno pětkrát za účelem statistického vyhodnocení. Proces syntézy senzoru byl navržen tak, aby minimalizoval nespecifické interakce funkcionalizovaných MNPs s látkami přítomnými v komplexní matici lidské krve přidáním ethylaminu v posledním kroku přípravy senzoru a pečlivým několikanásobným promytím deionizovanou vodou. Nicméně nové spektrální pásy ve spektrech vzorku krve v oblasti 560 cm⁻¹ a 1242 cm⁻¹ naznačují nespecifické interakce, které ale nijak neovlivňují detekci. SERS spektrum plné krve je znázorněno na obr. 18. Všechny pásy předtím přiřazené modelovému vzorku a slepému vzorku demonstrují nepřítomnost interferujících nespecifických interakcí a vykazují změnu

absolutních intenzit pozorovaných spektrálních pásů s ohledem na měnící se koncentraci HER2 a EpCAM.



Obr. 18: (A) Detail spektrální oblasti od 300 do 550 cm^{-1} z označené oblasti v (B) se zvýrazněnými pásy jednotlivých značek, (B) Ramanovo spektrum multiplexní analýzy pomocí senzoru s pouze značenými nádorovými markery HER2 (HER2_Cy3) a EpCAM (EpCAM_Cy5) (slepý vzorek, černá linka), Ramanovo spektrum multiplexní analýzy pomocí senzoru s neznačenými nádorovými markery v roztoku pufru a značenými nádorovými markery (modelový vzorek, červená linka), Ramanovo spektrum kompetitivní multiplexní analýzy lidské plné krve obsahující nádorové markery pomocí senzoru a značených nádorových markerů (vzorek krve, modrá linka). Převzato z Balzerova a kol. (2018)⁶²

Další statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí studentova t-testu za účelem určení významného rozdílu průměrných poměrů intenzit pro Cy3 a Cy5 (jak bylo popsáno výše) mezi slepým vzorkem a vzorkem plné krve. Vypočtené p hodnoty byly 0,0093 pro HER2 a 0,0016 pro EpCAM. Takové výsledky ukazují na statisticky významný rozdíl.

Výsledky této práce byly v roce 2018 zaslány do časopisu *Applied Materials Today* a v plném znění jsou dostupné v příloze disertační práce.

5.3. Publikace zahrnující využití SERS k detekci dalších biologicky aktivních látek

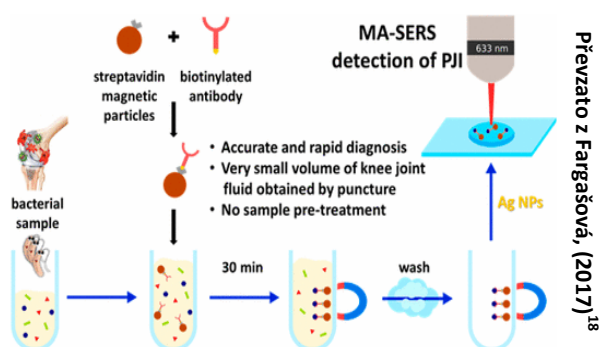
Tato část disertační práce zahrnuje publikace, ve kterých bylo využito povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie k detekci dalších biologicky aktivních látek. Konkrétně se jedná o publikaci zabývající se multiplexní analýzou DNA a RNA v rakovinných tkáních; o publikaci popisující využití SERS k detekci bakteriální infekce kloubních náhrad a o publikaci, která popisuje využití magnetického biosensory k detekci rakoviny prostaty sledováním proteinu PSMA.

5.3.1. Využití magneticky asistované Ramanovy spektroskopie k detekci infekce protetikých kloubů

Tato práce popisuje novou metodu diagnostiky infekce protetikých kloubů (Prosthetic Joint Infection, PJI) založenou na magneticky asistované povrchové Ramanově spektroskopii (MA-SERS), která byla již dříve použita k rychlé, selektivní a vysoce citlivé detekci různých molekul včetně dopaminu a imunoglobulinů.^{17,68} Stříbrné nanočástice se

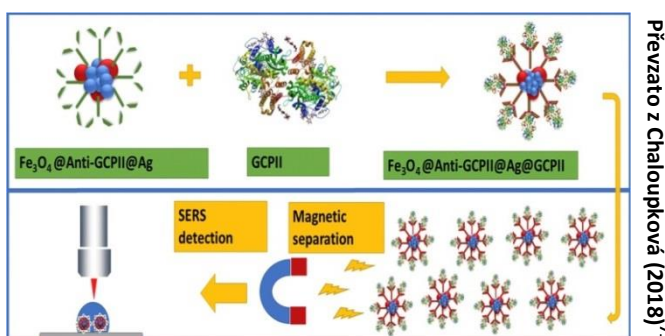
často používají pro svou synergickou antibakteriální aktivitu k potlačení růstu bakterií, nicméně při nízkých koncentracích používaných pro zvýšení Ramanova signálu nemají žádný inhibiční vliv na analyzované patogeny.^{69,70} Metoda využívá nový vysoce účinný biosenzor založený na streptavidinem modifikovaných karboxy-funkcionalizovaných magnetických nanočásticích (dále jen MNP@Strep) které zajišťují účinnou cílovou izolaci. Po izolaci je biosenzor pokryt nanočásticemi stříbra, které umožňují detekci PJI pomocí MA-SERS. Nanomateriál použitý pro detekci MA-SERS má dvě hlavní výhody. Za prvé, jeho magnetické vlastnosti umožňují efektivní a kvantitativní izolaci vybraných analytů z komplexní matrice. Za druhé, SERS účinek nanočástic stříbra naadsorbovaných na biosenzoru poskytuje velmi nízké limity detekce. Tato metoda byla použita k izolaci a identifikaci dvou bakteriálních kmenů, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Navíc byly touto metodou úspěšně diagnostikovány uvedené bakteriální kmeny v reálném vzorku výpotku kolenního kloubu během několika minut bez nutnosti předběžné úpravy vzorku.

Výsledky této práce byly v roce 2017 publikovány v časopise *Analytical Chemistry* a v plném znění jsou dostupné v příloze disertační práce.



5.3.2. Multiplexní analýza RNA a DNA v rakovinných tkáních

Práce popisuje využití nanosenzoru pro multiplexní stanovení DNA a RNA složeného z magnetického $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu funkcionalizovaného nízkomolekulárním selektorem ze skupiny alkylačních činidel - chlorambucilem. Alkylační antineoplastická činidla se často



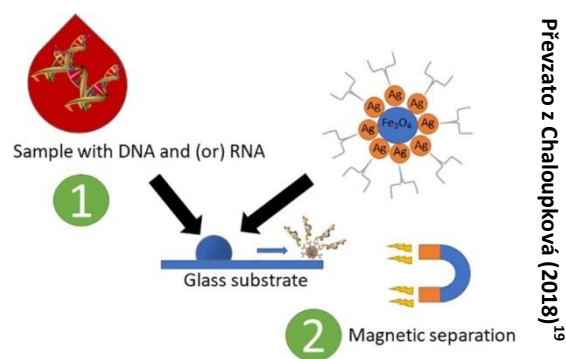
Převzato z Chaloupková (2018)⁷¹

používají při léčení rakoviny selektivní alkylací guaninu. Tohoto mechanismu bylo využito k získání výrazně vyšší úrovně selektivity vůči nukleovým kyselinám. Sensor navíc umožňuje selektivní izolaci nukleových kyselin pomocí magnetických vlastností nanočástic Fe_3O_4 a následné stanovení pomocí magneticky asistované povrchové Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Dosažené limity detekce byly $3,0 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro DNA a $3,8 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro RNA. Zvýšená selektivita vyvinutého senzoru, daná přítomností alkylačního činidla, umožňuje provádět multiplexní analýzu DNA a RNA s relativními odchylkami pod 10%. Stabilita použitého nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@Chlorambucil$ byla sledována po dobu 21 dnů. Konečný pokles analytického signálu v čase byl 25 %.⁷¹

Výsledky této práce byly v roce 2018 publikovány v časopise *Applied Materials Today* a v plném znění jsou dostupné v příloze disertační práce.

5.3.3. Využití magneticky asistované Ramanovy spektroskopie k detekci prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v lidské krvi

Tato práce popisuje využití magnetického biosenzoru k detekci rakoviny prostaty sledováním prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v lidské krvi. PSMA je také znám pod označením glutamát karboxypeptidáza II (GCPII). Metoda využívá magnetického nanokompozitu obsahujícího nanočástice oxidu železnato-železitého a nanočástice stříbra ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$) funkcionalizovaného protilátkou (syntetický GCPII inhibitor s nízkou molekulovou hmotností). Nanokompozit umožňuje jednoduchou izolaci analytu z matrice pomocí vnějšího magnetického pole a následné stanovení pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Limit detekce byl stanoven na 6 pmol. Navíc bylo zjištěno, že výsledný biosenzor $\text{Fe}_3\text{O}_4@Anti-GCPII@Ag$ byl stabilní po dobu 21 dnů.



Převzato z Chaloupková (2018)¹⁹

Výsledky této práce byly v roce 2018 publikovány v časopise *Analytica Chimica Acta* a v plném znění jsou dostupné v příloze disertační práce.

ZÁVĚR

Cílem předkládané disertační práce bylo studium využití nanočástic ušlechtilých kovů k detekci fyziologicky aktivních látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Připravené nanomateriály byly charakterizovány pomocí řady technik (XRD, UV/Vis, TEM, HRTEM, IČ, DLS). Praktické uplatnění našly tyto připravené materiály při detekci proteinu IgG a rakovinných markerů HER2 a EpCAM pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie.

První část experimentální práce se zabývala funkcionalizací magnetického nanokompozitu protilátkami a následnou detekcí lidského imunoglobulinu G v plné lidské krvi pomocí magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS). Navržená metoda využívala magnetický nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, kde byly nanočástice stříbra kovalentně vázány použitím karboxymethylchitosanu. Povrch takto připraveného nanokompozitu byl modifikován pomocí streptavidinu a poté protilátkou anti-IgG. Nejdříve byl funkcionalizovaný nanokompozit testován s modelovými vzorky (vodný roztok IgG) a poté byly provedena analýza vzorků lidské krve. Ke stanovení koncentrace IgG v krvi byla sestrojena kalibrační křivka. Limit detekce byl stanoven na $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Velkým přínosem této metody je, že může být relativně snadno modifikována, tím že nanokompozit bude funkcionalizován jinou biotinylovanou protilátkou, což umožní stanovení odpovídajícího cílového analytu.

Druhá část experimentální práce se zabývala vývojem metody k simultánnímu stanovení nádorových markerů pomocí MA-SERS. K analýze byly vybrány dva nádorové markery – HER2 a EpCAM. Metoda využívá nanokompozitu $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Ag}$ funkcionalizovaného specifickými protilátkami anti-HER2 a anti-EpCAM a byla založena na kompetici mezi neoznačenými markery a markery označenými fluorescenčními značkami (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5). Limit detekce byl stanoven na $5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž obě sloučeniny jsou statisticky odlišitelné od slepého vzorku s p hodnotami 0,0093 (HER2) a 0,0016 (EpCAM).

SUMMARY

The aim of this dissertation was to study the application of noble metal nanoparticles for the detection of physiologically active substances using the surface of enhanced Raman spectroscopy. The prepared nanomaterials were characterized by variety of techniques (XRD, UV/Vis, TEM, HRTEM, IR, DLS). Prepared materials have found practical applications for the detection of IgG protein and cancer markers HER2 and EpCAM by surface enhanced Raman spectroscopy. In addition to these bioanalytical applications, systems based on the combination of magnetic nanoparticles and nanoparticles of noble metals were used in other bioanalytical methods (biosensor for determination of PSMA, DNA and RNA in tumor tissues, prosthetic joint infection).

The first part of the experimental section dealt with the functionalization of magnetic nanocomposite with antibodies and subsequent detection of human immunoglobulin G in whole human blood by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS). The proposed method utilized the magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite where the silver nanoparticles were covalently bound using carboxymethylchitosan. The surface of the nanocomposite was modified with streptavidin and then with the anti-IgG antibody. First, the functionalized nanocomposite was tested with model samples (aqueous solution of IgG) and then human blood samples were analysed. A calibration curve was constructed to determine IgG concentration in blood. The detection limit was determined to $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The benefit of such an approach is that it can be modified relatively easily in order to analyze other targets by selecting an appropriate biotinylated antibody.

The second part of the experimental work dealt with the development of a method for the simultaneous determination of cancer markers using MA-SERS. Two cancer markers - HER2 and EpCAM, were selected for analysis. The method employed $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{Ag}$ nanocomposite functionalized with specific antibodies anti-HER2 and anti-EpCAM and was based on competition between unlabeled markers and markers labeled with fluorescent labels (HER2_Cy3, EpCAM_Cy5). The detection limit was determined to $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and both of model samples are statistically distinguishable from the blank sample with *p-values* of 0.0093 (HER2) and 0.0016 (EpCAM).

SEZNAM LITERATURY

- (1) Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arab. J. Chem.* **2017**.
- (2) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318*, 162.
- (3) Bogner, A.; Jouneau, P. H.; Thollet, G.; Basset, D.; Gauthier, C. A History of Scanning Electron Microscopy Developments: Towards "Wet-STEM" Imaging. *Micron* **2007**, *38* (4), 390–401.
- (4) Olsman, N.; Goentoro, L. There's (Still) Plenty of Room at the Bottom. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *54*, 72–79.
- (5) Heiligtag, F. J.; Niederberger, M. The Fascinating World of Nanoparticle Research. *Mater. Today* **2013**, *16* (7–8), 262–271.
- (6) Yamamoto, Y.; Miura, T.; Teranishi, T.; Miyake, M.; Hori, H.; Suzuki, M.; Kawamura, N.; Miyagawa, H.; Nakamura, T.; Kobayashi, K. Direct Evidence for Ferromagnetic Spin Polarization in Gold Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (7) Faraday, M. LIX. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light.—The Bakerian Lecture. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1857**, *14* (96), 512–539.
- (8) Babick, F. *Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates*; Springer, 2016.
- (9) Binnig, G.; Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy—from Birth to Adolescence (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1987**, *26* (7), 606–614.
- (10) Noguez, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (10), 3606–3619.
- (11) Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (4), 1944–1948.
- (12) Stuart, D. A.; Yuen, J. M.; Shah, N.; Lyandres, O.; Yonzon, C. R.; Glucksberg, M. R.; Walsh, J. T.; Van Duyne, R. P. In Vivo Glucose Measurement by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (20), 7211–7215.
- (13) El-Ansary, A. Nanoparticles as Biochemical Sensors. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2010**, *3* (1), 65.
- (14) Fikiet, M. A.; Khandasammy, S. R.; Mistek, E.; Ahmed, Y.; Halámková, L.; Bueno, J.; Lednev, I. K. Surface Enhanced Raman Spectroscopy: A Review of Recent Applications in Forensic Science. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *197*, 255–260.
- (15) Yang, J.; Rorrer, G. L.; Wang, A. X. Bioenabled SERS Substrates for Food Safety and Drinking Water Monitoring. In *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*; Kim, M. S., Chao, K., Chin, B. A., Eds.; 2015; Vol. 9488, p 948808.
- (16) Radu, A. I.; Kuellmer, M.; Giese, B.; Huebner, U.; Weber, K.; Cialla-May, D.; Popp, J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) in Food Analytics: Detection of Vitamins B 2 and B 12 in Cereals. *Talanta* **2016**, *160*, 289–297.

- (17) 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* (22), 11107–11114.
- (18) Fargašová, A.; Balzerová, A.; Pucek, R.; Sedláková, M. H.; Bogdanová, K.; Gallo, J.; Kolář, M.; Ranc, V.; Zbořil, R. Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (12), 6598–6607.
- (19) Chaloupková, Z.; Balzerová, A.; Bařinková, J.; Medříková, Z.; Šácha, P.; Beneš, P.; Ranc, V.; Konvalinka, J.; Zbořil, R. Label-Free Determination of Prostate Specific Membrane Antigen in Human Whole Blood at Nanomolar Levels by Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *997*, 44–51.
- (20) Cao, G.; Wang, Y. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*; World Scientific series in nanoscience and nanotechnology; World Scientific, 2011.
- (21) Sadhasivam, T.; Kim, H.-T.; Jung, S.; Roh, S.-H.; Park, J.-H.; Jung, H.-Y. Dimensional Effects of Nanostructured Mg/MgH₂ for Hydrogen Storage Applications: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *72* (November 2016), 523–534.
- (22) Pal, D.; Sahu, C.; Haldar, A. Bhasma : The Ancient Indian Nanomedicine. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2014**, *5* (1), 4.
- (23) Rai, M.; Ingle, A. P.; Birla, S.; Yadav, A.; Santos, C. A. Dos. Strategic Role of Selected Noble Metal Nanoparticles in Medicine. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *42* (5), 1–24.
- (24) Patra, C. R.; Bhattacharya, R.; Wang, E.; Katarya, A.; Lau, J. S.; Dutta, S.; Muders, M.; Wang, S.; Buhrow, S. A.; Safgren, S. L.; et al. Targeted Delivery of Gemcitabine to Pancreatic Adenocarcinoma Using Cetuximab as a Targeting Agent. *Cancer Res.* **2008**, *68* (6), 1970–1978.
- (25) Patra, C. R.; Bhattacharya, R.; Mukhopadhyay, D.; Mukherjee, P. Fabrication of Gold Nanoparticles for Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (3), 346–361.
- (26) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (3), 145–150.
- (27) Myers, S. M. and Collins, I. Summary for Policymakers. In *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*; Intergovernmental Panel on Climate Change, Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2015; Vol. 7, pp 1–30.
- (28) Hussain, M. M.; Samir, T. M.; Azzazy, H. M. E. Unmodified Gold Nanoparticles for Direct and Rapid Detection of Mycobacterium Tuberculosis Complex. *Clin. Biochem.* **2013**, *46* (7–8), 633–637.
- (29) Tsai, T.-T.; Huang, C.-Y.; Chen, C.-A.; Shen, S.-W.; Wang, M.-C.; Cheng, C.-M.; Chen, C.-F. Diagnosis of Tuberculosis Using Colorimetric Gold Nanoparticles on a Paper-Based Analytical Device. *ACS Sensors* **2017**, *2* (9), 1345–1354.
- (30) Hu, K.; Chen, X.; Chen, W.; Zhang, L.; Li, J.; Ye, J.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Li, C.-H.; Yin, L.; et al. Neuroprotective Effect of Gold Nanoparticles Composites in Parkinson's Disease Model. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2018**, *14* (4), 1123–1136.
- (31) Liu, C.; Jiang, D.; Xiang, G.; Liu, L.; Liu, F.; Pu, X. An Electrochemical DNA Biosensor for the

- Detection of Mycobacterium Tuberculosis, Based on Signal Amplification of Graphene and a Gold Nanoparticle–polyaniline Nanocomposite. *Analyst* **2014**, *139* (21), 5460–5465.
- (32) Guo, D.; Zhu, L.; Huang, Z.; Zhou, H.; Ge, Y.; Ma, W.; Wu, J.; Zhang, X.; Zhou, X.; Zhang, Y.; et al. Anti-Leukemia Activity of PVP-Coated Silver Nanoparticles via Generation of Reactive Oxygen Species and Release of Silver Ions. *Biomaterials* **2013**, *34* (32), 7884–7894.
- (33) Gunawan, C.; Teoh, W. Y.; Marquis, C. P.; Amal, R. Induced Adaptation of Bacillus Sp. to Antimicrobial Nanosilver. *Small* **2013**, *9* (21), 3554–3560.
- (34) Panáček, A.; Kvítek, L.; Smékalová, M.; Večeřová, R.; Kolář, M.; Röderová, M.; Dyčka, F.; Šebela, M.; Pucek, R.; Tomanec, O.; et al. Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and How to Overcome It. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13* (1), 65–71.
- (35) Li, Y.; Church, J. S. Raman Spectroscopy in the Analysis of Food and Pharmaceutical Nanomaterials. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22* (1), 29–48.
- (36) Eric Le Ru; Pablo Etchegoin. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*; Elsevier B.V., 2009.
- (37) Peter Larkin. *Infrared and Raman Spectroscopy*; Elsevier, 2011.
- (38) Ewen Smith; Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*; John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
- (39) Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; Van Duyne, R. P. SERS: Materials, Applications, and the Future. *Mater. Today* **2012**, *15* (1–2), 16–25.
- (40) El-dessouky, R.; Georges, M.; Azzazy, H. M. E. Silver Nanostructures : Properties , Synthesis , and Biosensor Applications. *Funct. Nanoparticles Bioanal. Nanomedicine Bioelectron. Devices* **2012**, *1*, 359–404.
- (41) van Eeden, P. E.; Wiese, M. D.; Aulfrey, S.; Hales, B. J.; Stone, S. F.; Brown, S. G. A. Using Time-Resolved Fluorescence to Measure Serum Venom-Specific IgE and IgG. *PLoS One* **2011**, *6* (1), e16741.
- (42) Bobek, V.; Kolostova, K.; Pinterova, D.; Kacprzak, G.; Adamiak, J.; Kolodziej, J.; Boubelik, M.; Kubecova, M.; Hoffman, R. M. A Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma. *Anticancer Res.* **2010**, *30* (12), 4799–4803.
- (43) Costa, D. De; Broodman, I.; Duijn, M. M. Van; Stingl, C.; Dekker, L. J. M.; Burgers, P. C.; Hoogsteden, H. C.; Smitt, P. a E. S.; Klaveren, R. J. Van; Luider, T. M. Sequencing and Quantification of IgG Fragments and Antigen Binding Regions by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2010**, No. 9, 2937–2945.
- (44) Lorenz, B.; Wichmann, C.; Stöckel, S.; Rösch, P.; Popp, J. Cultivation-Free Raman Spectroscopic Investigations of Bacteria. *Trends Microbiol.* **2017**, *25* (5), 413–424.
- (45) Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K. M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M. Raman Spectroscopy of Proteins: A Review. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44* (8), 1061–1076.
- (46) Jarvis, R. M.; Goodacre, R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (1), 40–47.
- (47) Mosier-Boss, P. Review on SERS of Bacteria. *Biosensors* **2017**, *7* (4), 51.

- (48) Efrima, S.; Zeiri, L. Understanding SERS of Bacteria. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (3), 277–288.
- (49) Wang, J.; Wu, X.; Wang, C.; Rong, Z.; Ding, H.; Li, H.; Li, S.; Shao, N.; Dong, P.; Xiao, R.; et al. Facile Synthesis of Au-Coated Magnetic Nanoparticles and Their Application in Bacteria Detection via a SERS Method. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (31), 19958–19967.
- (50) Song, C.; Yang, Y.; Yang, B.; Min, L.; Wang, L. Combination Assay of Lung Cancer Associated Serum Markers Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (10), 1811–1817.
- (51) Sun, C.; Zhang, R.; Gao, M.; Zhang, X. A Rapid and Simple Method for Efficient Capture and Accurate Discrimination of Circulating Tumor Cells Using Aptamer Conjugated Magnetic Beads and Surface-Enhanced Raman Scattering Imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (29), 8883–8892.
- (52) Song, C.; Min, L.; Zhou, N.; Yang, Y.; Yang, B.; Zhang, L.; Su, S.; Wang, L. Ultrasensitive Detection of Carcino-Embryonic Antigen by Using Novel Flower-like Gold Nanoparticle SERS Tags and SERS-Active Magnetic Nanoparticles. *RSC Adv.* **2014**, *4* (78), 41666–41669.
- (53) Qiu, Y.; Deng, D.; Deng, Q.; Wu, P.; Zhang, H.; Cai, C. Synthesis of Magnetic Fe₃O₄-Au Hybrids for Sensitive SERS Detection of Cancer Cells at Low Abundance. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (22), 4487–4495.
- (54) Lin, Y.; Xu, G.; Wei, F.; Zhang, A.; Yang, J.; Hu, Q. Detection of CEA in Human Serum Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Antibody-Modified Au and γ -Fe₂O₃@Au Nanoparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *121*, 135–140.
- (55) Gao, R.; Cheng, Z.; DeMello, A. J.; Choo, J. Wash-Free Magnetic Immunoassay of the PSA Cancer Marker Using SERS and Droplet Microfluidics. *Lab Chip* **2016**, *16* (6), 1022–1029.
- (56) Wang, J.; Wu, X.; Wang, C.; Shao, N.; Dong, P.; Xiao, R.; Wang, S. Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of Staphylococcus Aureus Based on Aptamer Recognition. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (37), 20919–20929.
- (57) Dinish, U. S.; Balasundaram, G.; Chang, Y.-T.; Olivo, M. Actively Targeted In Vivo Multiplex Detection of Intrinsic Cancer Biomarkers Using Biocompatible SERS Nanotags. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4075.
- (58) Tang, D.; Yuan, R.; Chai, Y. Magnetic Control of an Electrochemical Microfluidic Device with an Arrayed Immunosensor for Simultaneous Multiple Immunoassays. *Clin. Chem.* **2007**, *53* (7), 1323–1329.
- (59) Wan, Y.; Zhou, Y.; Poudineh, M.; Safaei, T. S.; Mohamadi, R. M.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O. Highly Specific Electrochemical Analysis of Cancer Cells Using Multi-Nanoparticle Labeling. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (48), 13145–13149.
- (60) Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolář, M.; Večeřová, R.; Pizúrová, N.; Sharma, V. K.; Nevěčná, T.; Zbořil, R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (33), 16248–16253.
- (61) Marková, Z.; Šišková, K.; Filip, J.; Šafářová, K.; Pucek, R.; Panáček, A.; Kolář, M.; Zbořil, R. Chitosan-Based Synthesis of Magnetically-Driven Nanocomposites with Biogenic Magnetite Core, Controlled Silver Size, and High Antimicrobial Activity. *Green Chem.* **2012**, *14* (9), 2550.
- (62) Balzerová, A.; Opletalová, A.; Ranc, V.; Zbořil, R. Multiplex Competitive Analysis of HER2 and

- EpCAM Cancer Markers in Whole Human Blood Using Fe₂O₃@Ag Nanocomposite. **2018**.
- (63) McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65* (8), 825–837.
- (64) Sjöberg, B.; Foley, S.; Cardey, B.; Enescu, M. An Experimental and Theoretical Study of the Amino Acid Side Chain Raman Bands in Proteins. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *128*, 300–311.
- (65) Guerrini, L.; Pazos, E.; Penas, C.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L.; Alvarez-Puebla, R. A. Highly Sensitive SERS Quantification of the Oncogenic Protein C-Jun in Cellular Extracts. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (28), 10314–10317.
- (66) Avci, E.; Culha, M. Influence of Protein Size on Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectra in Binary Protein Mixtures. *Appl. Spectrosc.* **2014**, *68* (8), 890–899.
- (67) Gonzalez-Quintela, A.; Alende, R.; Gude, F.; Campos, J.; Rey, J.; Meijide, L. M.; Fernandez-Merino, C.; Vidal, C. Serum Levels of Immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a General Adult Population and Their Relationship with Alcohol Consumption, Smoking and Common Metabolic Abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *151* (1), 42–50.
- (68) Ranc, V.; Markova, Z.; Hajdúch, M.; Pucek, R.; Kvitek, L.; Kaslik, J.; Safarova, K.; Zboril, R. 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* (6), 2939–2946.
- (69) Gallo, J.; Panacek, A.; Pucek, R.; Kriegova, E.; Hradilova, S.; Hobza, M.; Holinka, M. Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection. *Materials (Basel)*. **2016**, *9* (5), 337.
- (70) 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. Synergistic Antibacterial Activity of PEGylated Silver–graphene Quantum Dots Nanocomposites. *Appl. Mater. Today* **2015**, *1* (2), 80–87.
- (71) Chaloupková, Z.; Balzerová, A.; Medříková, Z.; Srovnal, J.; Hajdúch, M.; Čépe, K.; Ranc, V.; Zbořil, R. Label-Free Determination and Multiplex Analysis of DNA and RNA in Tumor Tissues. *Appl. Mater. Today* **2018**, *12*, 85–91.