

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Selektivní analýza nukleových kyselin pomocí
povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Daniela Balonková
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie

2016

Prohlášení:

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

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

V Olomouci dne.....

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. a Mgr. Anně Balzerové za odborné vedení mé bakalářské práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Dále bych chtěla poděkovat katedře fyzikální chemie za umožnění vypracování této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Autor: Daniela Balonková

Název práce: Selektivní analýza nukleových kyselin pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého, Olomouc

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

Rok obhajoby: 2016

Abstrakt: Předmětem této práce je selektivní analýza nukleových kyselin pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Pro zesílení Ramanova signálu byl syntetizován roztok nanočástic stříbra a následně charakterizovány jeho vlastnosti pomocí IR spektroskopie. Bylo provedeno ladění experimentálních parametrů analýzy DNA pomocí selektoru (chlorambucil) a linkeru (cysteamin) pro zajištění selektivní reakce nanočástic stříbra s DNA. Studovanými parametry byly poměry selektoru a linkeru, expoziční doba a pořadí přídavku DNA a NaCl. Podle Ramanových spekter byla vyhodnocena závislost intenzity signálu na koncentraci DNA. Sestavením kalibrační přímky bylo možné vypočítat neznámé koncentrace vzorků DNA.

Klíčová slova: DNA, nanočástice stříbra, povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Počet stran: 50

Jazyk: Čeština

Bibliographic identification:

Author: Daniela Balonková

Title: Selective analysis of nucleic acids using surface-enhanced Raman spectroscopy

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of physical chemistry, Palacky University, Olomouc

Supervisor: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Presentation year: 2016

Abstract: The subject of this work is the selective analysis of nucleic acids using surface-enhanced Raman spectroscopy. For the enhancement of Raman signal solution of silver nanoparticles was synthesized and subsequently its properties characterized by IR spectroscopy. It was carried out a tuning of experimental parameters affecting the analysis of DNA using selector (chlorambucil) and linker (cysteamine) for providing selective reaction of silver nanoparticles with DNA. Studied parameters were concentrations of selector and linker, exposure time and order of added DNA and NaCl. According to the Raman spectra the effect of the parameters was evaluated. Unknown concentration of DNA samples was calculated by constructing of a calibration curve.

Keywords: DNA, silver nanoparticles, surface-enhanced Raman spectroscopy

Number of Pages: 50

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD.....	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Nukleové kyseliny	9
1.1 Stavba nukleových kyselin	9
1.2 Vlastnosti nukleových kyselin	12
1.3 Poškození DNA	12
1.4 Metody analýzy DNA	14
2. Spektrální metody analýzy DNA.....	15
2.1 UV/VIS spektroskopie	15
2.1.1 Princip UV/VIS spektroskopie	16
2.1.2 Technické vybavení UV/VIS spektroskopu.....	17
2.1.3 Využití UV/VIS spektroskopu.....	18
2.2 Teorie vibrace a rotace.....	18
2.3 IR a Ramanova spektroskopie	20
2.3.1 Princip IR spektroskopie	20
2.3.2 Technické vybavení IR spektroskopu.....	21
2.3.3 Využití IR spektroskopie	23
2.4 Princip Ramanovy spektroskopie	23
2.4.1 Technické vybavení Ramanova spektroskopu.....	24
2.4.2 Využití Ramanova spektroskopu	25
2.5 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie	25
2.5.1 Nanočástice kovů	26
2.5.2 Nanočástice stříbra	27
2.5.3 Využití SERS	27
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3. Chemikálie, přístroje a pracovní postup	29
3.1 Chemikálie	29
3.2 Přístroje	29
3.3 Pracovní postupy	30
3.3.1 Příprava zásobních roztoků.....	30
3.3.2 Příprava nanočástic stříbra	31
3.3.3 Funkcionalizace nanočástic stříbra	31

3.3.4	Příprava vzorků pro analýzu	33
4.	Výsledky a diskuze	34
4.1	Postupy a výpočty	34
	ZÁVĚR	44
	SUMMARY	45
	REFERENCE	46

ÚVOD

Nanotechnologie jsou v dnešní době nejrychleji se rozvíjejícím odvětvím výzkumu. Nanočástice kovů mají díky svým malým rozměrům v rozmezí od 1 do 100 nm unikátní optické, katalytické, elektrochemické, magnetické nebo biologické vlastnosti. Tyto vlastnosti vycházejí z celkového povrchu nanočástic. Využívají se nejen v chemii, fyzice, elektronice, strojírenství, ale mají velký potenciál například v medicíně, kdy mohou být díky malým rozměrům částic zakomponovány do živých systému. Snadné proniknutí vyvinutých nanosenzorů buněčnými stěnami umožňuje studium těchto systémů. Toxicita nanočástic je velice diskutovaným tématem, nicméně je již od starého Říma známo, že například nanočástice stříbra mají antibakteriální účinky, což je v medicíně neocenitelná vlastnost.

DNA je nejen nositelkou genetické informace, ale je to složitý systém (biopolymer), který kódováním řídí procesy v organismu a určuje jeho vlastnosti. Navíc je DNA velice úzce spjata s diagnostikou některých onemocnění, což je jedním z důvodů, proč se její výzkum těší takové pozornosti.

V souvislosti s tímto tématem je bakalářská práce zaměřena na analýzu DNA pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Je zde popsána příprava povrchově modifikovaných nanočástic stříbra a následně studována jejich interakce s DNA. Bylo provedeno ladění experimentálních parametrů pomocí selektoru a linkeru. Jako selektor byl použit chlorambucil a jeho funkcí je selektivně vázat DNA na povrchu nanočástic. Imobilizace chlorambucilu na povrch stříbrné nanočástice byla realizována pomocí cysteaminu. U obou látek byl zkoumán poměr, ve kterém poskytují největší zesílení sledovaného analytického signálu. Vzhledem k velké citlivosti povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byla umožněna detekce DNA o koncentraci $2 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

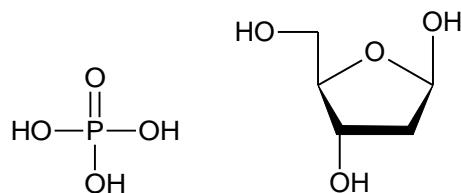
TEORETICKÁ ČÁST

1. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny se nacházejí ve všech živých buňkách a virech. Rozlišují se dva základní typy nukleových kyselin, DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina). Jejich primární funkcí je uchování a přenos dědičné informace z generace na generaci. Objev, který ukázal, že jsou nukleové kyseliny nositelkami genetické informace, dal impuls k důkladnějšímu prozkoumání jejich struktury ve snaze odhalit mechanismus přenosu informací. Jejich stavba je popsána v knize Biologie autora V. Zicháčka [1].

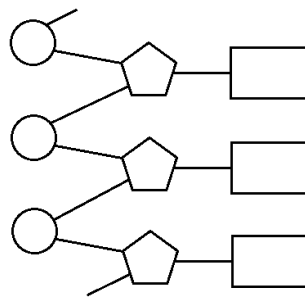
1.1 Stavba nukleových kyselin

DNA je polymerní molekula nacházející se především v jádře nebo v mitochondriích. Základním stavebním prvkem DNA je nukleotid, který je tvořen bází, fosfátem a sacharidem, přesněji 2-deoxy-D-ribosou (pentóza). Pokud struktura postrádá fosfát, je označována jako nukleosid.

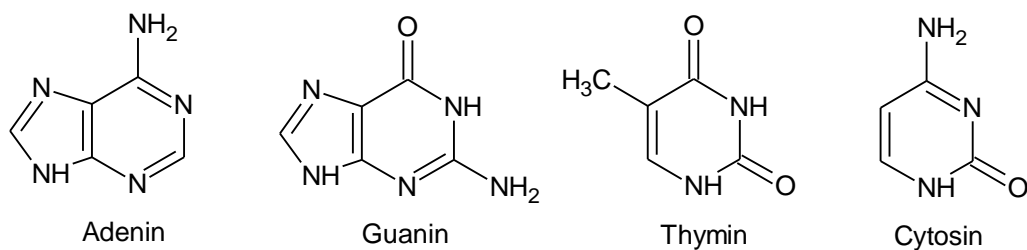


Obr. 1. Chemická struktura fosfátu a 2-deoxy-D-ribosy.

Váže se na sebe vždy pentóza-fosfát-pentóza-fosfát, a to diesterickými vazbami. Na pentózu jsou pak navázány uhlíkaté báze N-glykosidickou vazbou. Mezi báze molekuly DNA řadíme tyto čtyři: adenin, guanin, thymin a cytosin. Adenin a guanin jsou purinové báze a cytosin s thyminem jsou pyrimidinové báze.



Obr. 2. Obecné schéma nukleotidů v polynukleotidovém řetězci. Fosfát je reprezentován kruhem, 2-deoxy-D-ribose pětiúhelníkem a báze obdélníkem.



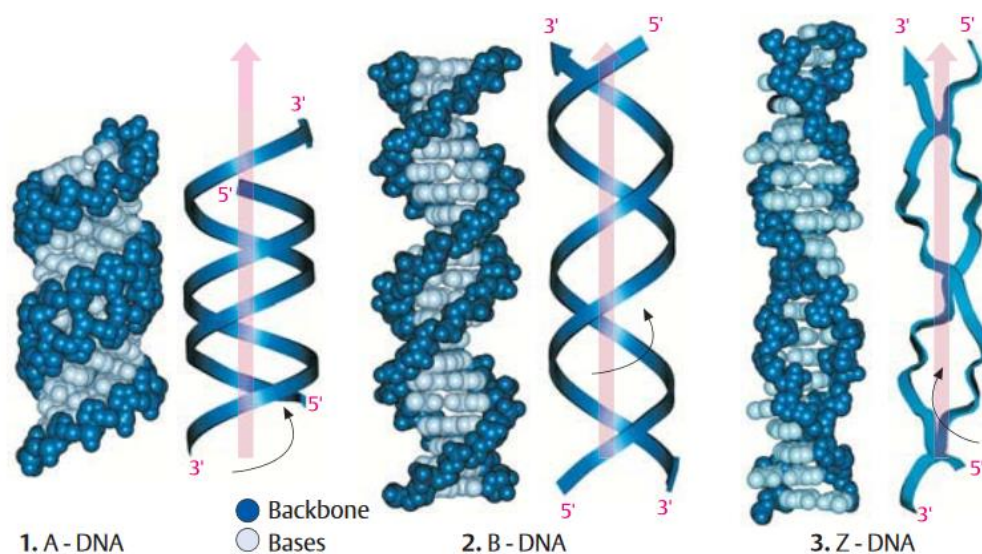
Obr. 3. Uhlíkaté báze.

Spojením jednotlivých nukleotidů se vytvoří polynukleotidový řetězec, k němuž se váže druhý polynukleotidový řetězec přes vodíkové vazby bází. Dva polynukleotidové řetězce se otáčejí kolem společné osy a jsou vůči sobě antiparalelní. Váže se vždy adenin s thyminem a cytosin s guaninem, a to proto, že mezi adeninem a thyminem se tvoří dvě vodíkové vazby a mezi cytosinem a guaninem tři vodíkové vazby. Tento jev se nazývá komplementarita bází. Pořadí bází v polynukleotidovém řetězci představuje genetický kód pro syntézu bílkovin.

V eukaryotických buňkách je DNA stabilizována pomocí proteinů, avšak během aktivní účasti v buněčných procesech může nabývat různých konformací. Existují tři hlavní dvouřetězcové formy DNA, jedná se o A-DNA, B-DNA a Z-DNA. Struktury DNA mohou být popsány různými parametry, jako je smysl otáčení, stoupání na pár bází, průměr helixu, vzdálenost sousedních bází, výška jednoho závitu nebo počet párů bází potřebných k realizaci jednoho závitu [2].

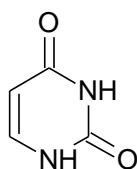
	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Smysl otáčení	Pravotočivá	Pravotočivá	Levotočivá
Počet párů bází na jeden závit	11	10,5	12
Stoupání na pár bází [Å]	2,55	3,4	3,7
Průměr helixu [Å]	23	20	18
Výška jednoho závitu helix [Å]	28	34	45

Tab. 1. Parametry jednotlivých strukturních forem DNA [2].



Obr. 4. Struktury DNA [3].

Ribonukleová kyselina (RNA) je nositelkou genetické informace u RNA-virů. Podobně jako DNA se i RNA skládá z nukleotidů. Ty jsou tvořeny fosfátem, cukrem ribózou a čtyřmi bázemi: adenin, guanin, cytosin a tymin je nahrazen uracilem.



Uracil

Obr. 5. Uhlíkatá báze.

V porovnání s molekulou DNA je RNA daleko menší. Tvoří ji pouze desítky či stovky nukleotidů a jsou to molekuly jednovláknové. Existují tři základní typy molekul RNA: ribosomální (rRNA), mediátorová (mRNA) a transferová (tRNA). Každá z nich hraje významnou roli při syntéze bílkovin: rRNA je součástí ribozomů, mRNA přenáší informace z genů do ribozomů a tRNA přenáší informace z mediátorové RNA do sekvence aminokyselin.

1.2 Vlastnosti nukleových kyselin

Nukleové kyseliny disponují několika významnými vlastnostmi, jako jsou replikace, transkripce a translace. Replikací rozumíme rozdělení mateřské molekuly, a to v místech zvaných replikony nebo také replikační vidlice. DNA polymeráza rozštěpí vodíkové vazby mezi bázemi a oddělí tak dva polynukleotidové řetězce, které slouží jako vzory. K nim jsou pak komplementárně přiřazovány volné báze a vytvoří se dvě dceřiné molekuly.

Pomocí transkripce se přepisuje genetická informace, což se provádí přepisem části nukleotidového řetězce DNA do molekuly RNA. Buňka tak dá signál k syntéze specifické bílkoviny, kterou zrovna potřebuje ke své funkci. Proces transkripce se podobá replikaci. Dochází k oddělení dvou vláken mateřské DNA díky RNA polymeráze. Jedno vlákno slouží jako matrice pro replikaci mRNA. K vláknu se opět komplementárně přiřazují volné báze. Po dokončení replikace se mRNA uvolní z DNA a cestuje z jádra do ribozomu.

Relace je překlad genetické informace z mRNA do proteinů. Pořadí nukleotidů v mRNA se přeloží do pořadí aminokyselin v polypeptidickém řetězci, které udává předpis pro syntézu určité bílkoviny. Ke kodonům mRNA se pomocí antikodonů připojují molekuly tRNA, které nesou na svém konci aminokyseliny. Vytvoří se vazby mezi aminokyselinami a zaniknou vazby mezi kodony a antikodony. Díky tomu se tRNA uvolní a putuje do cytoplazmy. Aminokyseliny se na ribozomech vážou do polypeptidického řetězce, jehož primární struktura je určena mRNA.

1.3 Poškození DNA

Výzkumem struktury molekuly DNA se zabývá mnoho vědeckých odvětví. V roce 1953 Crick a Watson publikovali článek, ve kterém zveřejnili objev nukleové kyseliny ve formě třídimensionální dvojité šroubovice [4]. Byl to důležitý mezník ve výzkumu DNA, ovšem nebyl

první. Dříve v roce 1869 švýcarský fyziologický chemik Friedrich Miescher identifikoval v jádrech lidských bílých krvinek něco, co pojmenoval jako nuklein. Dalo by se tedy říct, že byl objevitelem DNA. Miescher se dokonce domníval, že nuklein může hrát roli při přenosu dědičných informací. Tuto myšlenku ale později zavrhl [5]. Ruský biochemik Phoebus Levene objevil tři základní složky nukleotidu a jejich pořadí (fosfát-cukr-báze). Jako první identifikoval cukr jako deoxyribózu [6]. Erwin Chargaff sice neodhalil, že se adenin váže s thyminem a cytosin s guaninem, ale zjistil, že množství purinových a pyrimidinových bází je stejné. Dnes to nazýváme Chargaffovým pravidlem [7].

V začátcích výzkumu DNA se zdálo, že nalezené molekuly jsou relativně stabilní. Později se zjistilo, že v molekulách DNA dochází k poškození struktury (lézím). Překvapením ovšem bylo, že se molekuly z tohoto stavu poškození dokáží zotavit. Termín oprava DNA je biochemický termín definující biologické procesy, během kterých se odstraní poškození molekuly, obnovuje se integrita genomu a zachová se genetický kód [6]. Každý den se v DNA může vytvořit kolem 10 000 lézí, které ovšem nevznikají bez příčiny [8]. Faktory, které způsobují tyto léze, mohou být chemické nebo fyzikální, vnitřní nebo vnější. Fyzikálními faktory jsou například pH, teplota nebo různé druhy záření. Chemickými faktory jsou například interakce DNA s různými toxiny, xenobiotiky, léčivy, apod. Léze vznikají ve většině případů vlivem vnějších faktorů. Nejčastěji vzniká poškození vlivem reaktivních forem kyslíku (ROS). Oxidace ovlivňuje vlastnosti bází. Reaktivní formy kyslíku jsou většinou v podobě volných radikálů ($O_2\cdot$, $OH\cdot$). V buňkách vzniká oxidační stres, což je vlastně nerovnováha antioxidantů a převládajících oxidantů. Působením ROS vznikají modifikace bází, jako jsou například 7,8-dihydro-8-oxo-guanin (8-oxo-G) a 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (faPy-G). Produkty oxidace adeninu jsou 7,8-dihydro-8-oxo-adenin (8-oxo-A), 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (faPy-A) nebo ethenoadenin (ϵ A). Oxidací pyrimidinů vznikají glykoly thyminu, 5-hydroxycytosin a dihydrouracil. Některé výzkumy ukazují, že oxidační stres je spojený s životním stylem. Kouření, nadměrná konzumace alkoholu nebo třeba každodenní stres může vést k nadměrné tvorbě lézí. Například cigaretový kouř obsahuje vysokou hladinu oxidantů a může produkovat až 60 mutagenů, které způsobují poškození DNA [9]. Tyto mutace jsou spojeny s rakovinou plic, prsu, vaječníků, žaludku, tlustého střeva, konečníku nebo neurodegenerativních nemocí jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba.

Existuje mnoho způsobů poškození DNA, proto také musí existovat mnoho mechanismů opravy. Při tak vysokém počtu tvorby lézí za jeden jediný den nemůže existovat jeden mechanismus opravy, který by se vypořádal se všemi druhy poškození. Dráha odpovědná za opravu lézí vzniklých působením ROS se nazývá BER (base excision repair) [10]. Mezi další mechanismy opravy poškození DNA patří například fotoreaktivace, NER (nucleotide excision repair), SSBs (single strand breaks) a DSBs (double strand breaks) [11].

1.4 Metody analýzy DNA

Vznikající specifické modifikované sloučeniny mohou sloužit jako biomarkery, jejichž detekce a následná analýza slouží k diagnostice zdravotního stavu pacienta. Tyto sloučeniny se vyskytují i v těle zdravého člověka, jelikož jsou výsledným produktem procesu stárnutí. Parametrem, který odlišuje zdravého člověka od nemocného je jejich koncentrace [9].

8OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) je jedna z převládajících forem lézí vznikající působením ROS. Tato modifikovaná guaninová báze se stala důležitým biomarkerem, jelikož je spojena s rakovinou. GC-MS je metoda plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která byla použita při detekci 8OHdG v moči. Při analýze plasmy se modifikované báze před analýzou musí uvolnit z molekuly DNA kyselou hydrolyzou [12][13]. Účinnost GC-MS se porovnávala s metodou CE (kapilární elektroforéza). Byla analyzována moč zdravých jedinců, jedinců s diagnostikovanou rakovinou a jedinců, kteří podstoupili léčbu v podobě chemoterapie nebo radioterapie. Hladina 8OHdG u zdravých jedinců byla daleko nižší než u jedinců nemocných. Navíc se zjistilo, že u jedinců, kteří podstoupili léčbu se hladina 8OHdG snížila. Metoda by mohla sloužit ke sledování účinnosti léčby [12]. Podobně jako plynová chromatografie byla použita metoda kapalinové chromatografie (LC-MS) v tandemu s hmotnostní spektrometrií k analýze nukleových kyselin. Obě metody sice přinesly výsledky, ale vyžadují pořízení drahého vybavení a kvalifikovaných pracovníků. Využívá se spojení více než dvou metod ke stanovení oxidačních produktů [14]. Při kometové analýze (gelová elektroforéza jednotlivých buněk - SCGE) se zjišťují poškození DNA v jednotlivých buňkách. Tato metoda může být alkalická nebo neutrální. Alkalická metoda má za následek oddělení řetězců DNA a je schopna detekovat jednořetězcové zlomy (SSBs). Neutrální metoda naopak detekuje dvouřetězcové zlomy (DSBs) [15].

V biochemii se využívá mnoho metod pro analýzu DNA, mezi které patří například polymerázová řetězová reakce (PCR), sekventování DNA, identifikace specifických sekvencí pomocí hybridizace se značenými sondami, klonování DNA [16], atd. Metoda PCR je jedna z nejvýznamnějších a nejvyžívanějších v biochemii. Je to velmi citlivá metoda pro detekci a množení specifické sekvence DNA ze stopového množství matrice. Princip metody je velice podobný replikaci DNA. V jednom cyklu amplifikace se vytvoří jen jeden klon. Opakováním cyklů se množí sekvence DNA geometrickou řadou. Dochází většinou k 20-30 opakování a jeden cyklus trvá 2 až 5 minut. Z jedné molekuly vzniká kolem 10^6 až 10^9 klonů. Každý cyklus má tři části. První částí je denaturace za vysoké teploty (95°C), kdy se oddělí dvouřetězcová DNA za vzniku templátu (vzoru). Poté se sníží teplota na takovou hodnotu, aby bylo primeru umožněno nasednout na cílovou sekvenci. Ve třetí části se optimalizuje teplota pro DNA polymerázu, která katalyzuje komplementární přiřazování nukleotidů k templátu DNA. Této metody se využívá při určování otcovství nebo v kriminalistice [16].

2. Spektrální metody analýzy DNA

Nejčastěji využívané metody fyzikální chemie pro analýzu vzorků jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s hmotou. Metody jsou spektrální nebo nespektrální. Při vyhodnocení výsledků jsou měřeny jevy, ke kterým dochází při této interakci. U spektrálních metod dochází k výměně energie a mezi jevy patří absorpce, emise a luminiscence. Naopak u nespektrálních metod nedochází k výměně energie a měřenými jevy jsou rozptyl, lom nebo polarizace záření.

2.1 UV/VIS spektroskopie

Fotony nesou informace o barvách, které jsou určovány frekvencí, hybností nebo třeba energií. Nejzákladnější metodou, která se zabývá studiem fotonů je UV/VIS spektroskopie. Princip této metody je popsán v učebním materiálu Spektrální metody studia chemických látek Univerzity Palackého [17].

2.1.1 Princip UV/VIS spektroskopie

UV/VIS spektroskopie, někdy nazývaná elektronová spektroskopie, je jednou z nejrozšířenějších metod, při které dochází k absorpci nebo emisi elektromagnetického záření o různých vlnových délkách v oblasti přibližně od 190 nm do 780 nm. Elektromagnetické záření se skládá ze dvou složek, elektrické a magnetické. Tyto dvě složky jsou na sebe kolmé a kmitají se stejnou fází. Elektromagnetické záření můžeme klasifikovat podle několika vlastností: svítivost, polarizace a frekvence. Frekvence (ν , počet cyklů za jednotku času) stejně jako absorpce je spojená s barevností látek. Průhledná látka má takovou barvu, jakou vlnovou délku elektromagnetického záření neabsorbuje. Například pokud má roztok červenou barvu, tak absorbuje doplňkovou modrozelenou barvu, ale neabsorbuje červenou.

Kromě frekvence jsou dalšími důležitými parametry také vlnová délka (λ , délka jedné vlny), a vlnčet ($\tilde{\nu}$, počet vln na jednotku délky). Tyto tři veličiny se navzájem ovlivňují následujícím vztahem:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda},$$

kde c je rychlost světla a n index lomu prostředí, kterým paprsek prochází.

Podle kvantové teorie jsou ze zdroje záření emitovány fotony, které mají určitou frekvenci a energii. Každý foton nese energii, která je úměrná frekvenci podle vztahu:

$$E = h \cdot \nu,$$

kde h je Planckova konstanta, jejíž hodnota je $6,6256 \cdot 10^{-34}$, a ν je frekvence.

Při absorpční spektroskopii přijme elektron energii od fotonu elektromagnetického záření, vybudí se do vyšší energetické hladiny a molekula tím přechází do excitovaného stavu. Excitací se poruší párování elektronů v orbitalech. Pro přechod elektronů platí Frank-Condonův princip, při kterém se nemění geometrie (vertikální přechod) ani spin elektronů. Podmínkou absorpce záření je, že zkoumaná látka musí obsahovat vazebné elektrony ve vazebných molekulových orbitalech a nepárové elektrony v nevazebných molekulových orbitalech. Další podmínkou je nenulový dipólový moment (rozložení náboje) a v látce musí být alespoň dvě

energetické hladiny, jedna základní a druhá hladina excitovaného stavu. Excitovaný elektron je nestálý a přijatá energie se mění na teplo.

Při vyhodnocení analýzy látky je měřena závislost absorbance nebo transmitance na vlnové délce. Transmitancí rozumíme množství záření, které prošlo vzorkem a platí pro ni vztah:

$$T = \frac{I}{I_0},$$

kde I je intenzita záření, které prošlo vzorkem a I_0 je množství světla, které do vzorku vstoupilo. Absorbance je množství záření, které bylo pohlceno vzorkem, kde platí vztah:

$$A = -\log T.$$

Pro UV/VIS spektroskopii také platí Lambert-Beerův zákon, který říká, že absorpce monochromatického světla procházejícího roztokem je úměrná koncentraci a dráze, kterou světlo roztokem prochází:

$$A = l \cdot \varepsilon \cdot c,$$

kde A je absorbance, l je délka kyvety, c je koncentrace a ε je hodnota pro absorpční molární koeficient stanovované látky. Každá látka má charakteristické spektrum s odpovídajícími pásy (píky). Podle polohy pásů provádíme kvalitativní analýzu a podle intenzity pásů kvantitativní analýzu. Graf je tedy odrazem strukturního vzorce analyzované látky.

2.1.2 Technické vybavení UV/VIS spektroskopu

Spektrofotometr se skládá z několika částí, a to zdroj záření, monochromátor, nosič vzorku a detektor. Zdrojem záření je deuterová lampa pro UV oblast a lampy halogenové nebo kryptonové pro viditelnou oblast. Monochromátorem, jako je například optická mřížka, prochází polychromatické záření a mění se na monochromatické, které dále putuje vzorkem. Nosičem vzorku jsou kyvety vyrobené z různého materiálu, nejčastěji se používá křemenné sklo pro UV oblast a plast nebo sklo pro viditelnou oblast. Další částí je optická mřížka, která je pokryta velkým množstvím vrypů. Podle úhlu otočení mřížky se mění vlnová délka, pro

kteřou je měřena absorbance vzorku. Poslední částí je diodové pole, které zachycuje záření a třídí ho podle vlnové délky. Výsledkem měření je graf, který přibližuje strukturu studované látky.

2.1.3 Využití UV/VIS spektroskopu

Spektroskop patří mezi základní vybavení každé laboratoře díky rychlosti, jednoduchosti a citlivosti metody. UV/VIS spektroskop měří vzorky ve formě roztoků. Metoda se používá ke spektrální charakterizaci neznámé látky, tedy ke stanovení látek absorbujících v UV a viditelné oblasti. Nejčastěji se pomocí spektroskopu měří neznámá koncentrace dané látky. Měření se provádí pomocí standardu o známé koncentraci a kalibrační přímky.

UV/VIS spektroskopie má široké využití při analýze DNA. Pomocí UV/VIS spektroskopie byla studována například interakce nanočástic TiO_2 s genomickou DNA [18] nebo interakce různých léčiv s DNA [19], jako jsou protinádorové léčiva (emodin [20]), antibiotika (tetracykliny [21]), antipsychotika (chlorpromazin hydrochlorid [22]).

2.2 Teorie vibrace a rotace

Podle kvantové mechaniky se elektrony v elektronovém obalu nachází na určité energetické hladině, která je určena kvantovým číslem n , a má určitou energii. Elektrony molekul v základním stavu obsazují molekulové orbitály s nejnižší energií. Dodáním energie nebo srážkou se elektron skokem přesune do vyšší energetické hladiny. Naopak při ztrátě energie se přesouvá do nižší energetické hladiny.

Vibrační molekuly rozumíme deformaci vazebné vzdálenosti mezi jádry atomů po srážce s fotonem elektromagnetického záření. Foton s sebou nese energii, která způsobí změnu vibračního stavu. Tato energie je kvantována a musí odpovídat rozdílu energií dvou energetických hladin, aby došlo k přechodu elektronu mezi nimi.

Při vibraci dvouatomové molekuly popisujeme vibraci pomocí harmonického oscilátoru. Je možné si model představit jako dva hmotné body spojené pružinou, které kmitají kolem své rovnovážné osy. Tento model umožňuje přechod elektronu pouze mezi sousedními hladinami, které jsou ekvidistantní. Nejpravděpodobnější je přechod ze základní (fundamentální) hladiny

$n=0$ do hladiny $n=1$. Vibrace závisí na síle, kterou jsou atomy poutány, tedy na charakteru vazby a na hmotnosti jednotlivých kmitajících atomů.

V dvouatomovém systému kmitá každý hmotný bod kolem své rovnovážné polohy, a to se stejnou frekvencí, ale různou amplitudou. Nicméně oba hmotné body prochází přes své rovnovážné polohy současně. Amplitudy jsou nepřímo úměrné hmotnosti atomů, které zajišťují stacionární těžiště. Pro frekvenci harmonického oscilátoru platí vztah:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}},$$

kde k je silová konstanta a μ je redukovaná hmotnost, která je vyjádřena vztahem:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2},$$

kde hodnoty m_1 a m_2 jsou hmotnosti jednotlivých atomů dvouatomové molekuly. Naopak znalost hmotností a frekvence umožňuje vypočítat silovou konstantu.

S větším počtem atomů se vibrace molekuly poněkud komplikuje, charakter vibrace je složitější. Anharmonický oscilátor je daleko realističtější modelem, kde s rostoucím vibračním kvantovým číslem se zvětšuje odchylka od harmonického oscilátoru. U anharmonického oscilátoru jsou dovoleny přechody $\Delta n=2,3,4,\dots$. S rostoucím n se vzdálenost mezi hladinami snižuje. Tyto přechody o více než jednu hladinu se nazývají overtóny. Nejsou tak časté, protože k jejich realizaci je potřeba daleko více energie než u fundamentálních přechodů.

Vibrace jsou valenční a deformační. Při valenčních vibracích se mění délka vazby a rozdělují se na symetrické a asymetrické. Při deformačních vibracích dochází ke změně vazebného úhlu. Pohyb molekuly vyplývá z charakteristických vibrací molekul a je popsán pomocí vnitřních stupňů volnosti. Počet vibrací tedy závisí na počtu vnitřních stupňů volnosti a na tom, jestli je molekula lineární nebo nelineární. Pro výpočet množství vibrací se využívá pravidla $3N-6$ pro nelineární molekuly a $3N-5$ pro lineární molekuly. Veličina N charakterizuje počet atomů v molekule. Každý atom se pohybuje po osách x , y a z , což znamená, že každý atom má 3 stupně volnosti.

Nejen že atomy kmitají kolem své rovnovážné osy, ale zároveň konají rotační pohyb. Elektrony rotují kolem svých jader, molekuly rotují a celé se přesouvají. Podobně jako u vibrační i u rotací existují rotační hladiny. Liší se ovšem energií, jelikož ΔE rotačních hladin je poněkud menší než jak je tomu u vibračních hladin. Zavádí se zde kvantové rotační číslo ΔJ a jsou dovoleny jen přechody $\Delta J = \pm 1$. Rotace nemají až takový význam jako vibrace. Svou roli hrají spíše u analýzy plynů.

2.3 IR a Ramanova spektroskopie

Princip IR a Ramanovy spektroskopie popsal Peter J. Larkin ve své knize IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation [23]. Tyto metody mají obrovský potenciál při řešení mnoha komplexních problémů. Používají se k identifikaci a strukturní charakterizaci organických i anorganických látek.

2.3.1 Princip IR spektroskopie

Při analýze dochází k absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem. Infračervené záření je elektromagnetické záření o vlnové délce přibližně od 780 nm do 1 mm. Jelikož IR záření spadá do škály elektromagnetického záření, vlastnosti a vztahy, které platí pro UV záření, mají stejné základy jako IR záření. Fotony mohou být absorbovány nebo emitovány molekulou, což vede k přenosu energie. Při absorpci fotonu se zvyšuje energie molekuly, tedy ΔE je pozitivní a celková energie molekuly se skládá ze tří složek. Energie rotační, vibrační a elektronová se sčítají podle vztahu:

$$E = E_{vib} + E_{rot} + E_{el}.$$

Škálu infračerveného záření dělíme do tří oblastí: blízká IR oblast (780 nm – 5000 nm), střední IR oblast (5000 nm – 30000 nm) a vzdálená IR oblast (30000 nm – 1 mm). Nejvyužívanější jsou oblasti blízké a střední infračervené spektroskopie. Při průchodu infračerveného záření dochází ke změně vibračně rotačních stavů molekul v závislosti na změně dipólového momentu. Pro objasnění molekulární struktury se využívají charakteristické vibrace dané látky. IR spektroskopie měří přechody mezi molekulovými vibračními energetickými hladinami jako důsledek absorpce IR záření střední oblasti, při níž dochází ke zvýšení vibrační energie. Tato interakce záření a hmoty vyvolává rezonanční stav, který může nastat jen při

změně dipólového momentu (rozložení elektrického náboje) a který zprostředkovává přechod mezi vibračními energetickými hladinami.

Vibrační pásy jsou charakterizovány frekvencí, intenzitou a tvarem pásu. Vibrační energetické hladiny jsou specifické pro každou molekulu. Spektrum se může dělit na dvě části: a) oblast charakteristických vibrací, b) oblast otisku palce. Oblast charakteristických vibrací se pohybuje přibližně od 4000 do 1500 cm^{-1} , což je oblast poskytující informace o funkčních skupinách nacházejících se v analyzované molekule. Oblast otisku palce se nachází v rozmezí 1500 až 400 cm^{-1} a udává informace o zbytku molekuly. Frekvence molekulárních vibrací závisí na hmotnosti atomů, jejich geometrickém uspořádání a síle chemické vazby.

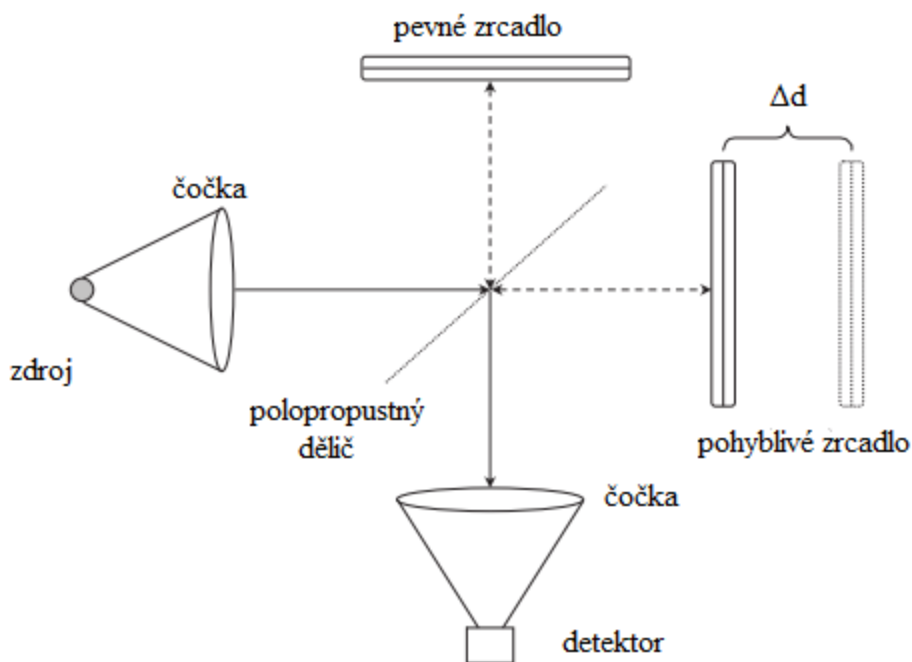
2.3.2 Technické vybavení IR spektroskopu

IR spektrum se měří dispersním nebo nedispersním spektroskopem. Rozdílem je, že nedispersní spektroskop neobsahuje monochromátor, jelikož zdrojem záření je monochromatický laser. Obecně IR spektroskopy obsahují zdroj infračerveného záření, monochromátor a detektor. Zdrojem disperzního IR spektroskopu jsou rozžhavené tyčinky a to, nichromový zdroj, Nernstova tyčinka nebo globar. Monochromátorem jsou odrazové mřížky, které slouží k rozkladu záření. Funkce detektoru je založena na tepelných a elektrických vlastnostech IR záření. Detektorem mohou být termočlánky, pyroelektrické detektory, polovodičové detektory nebo optoakustické detektory.

Analyzovanými vzorky mohou být bez omezení pevné, kapalné i plynné látky. Kapalné vzorky se měří v kyvetě s NaCl nebo KBr okénky nebo ve formě kapilární vrstvy. Pevné vzorky rozpustné v běžných rozpouštědlech se měří v kyvetách, nerozpustné vzorky je možné měřit ve formě tenkého filmu, tenké tablety, nujolové techniky, reflektanční techniky nebo difúzní reflektance. Tenké tablety se vyrábí mletím pevných vzorků ve vibračním mlýnku s KBr a následným lisováním. Nujolovou technikou se měří práškový vzorek smíchaný s parafinovým olejem v tenké vrstvě mezi dvěma okénky z NaCl nebo KBr. Tato technika je nevýhodná v tom, že je obtížné dosáhnout stejné tloušťky vrstvy v celém svém objemu.

Díky rozvoji výpočetní techniky se začaly hojně využívat FT-IR spektroskopy, které fungují na principu interference záření a vyžadují matematickou Fourierovu transformaci, aby bylo možné získat klasické IR spektrum. Interferenci záření zprostředkovává Michelsonův

interferometr skládající se z polopropustného děliče paprsků, pevného a pohyblivého zrcadla. Rovnoběžný svazek paprsků dopadá ze zdroje na polopropustný dělič pod úhlem 45° , přenáší 50 % záření na pevné zrcadlo a 50 % záření na pohyblivé zrcadlo. Oba svazky záření se přenášejí zpět na polopropustný dělič a dále do detektoru. Pokud jsou obě zrcadla ve stejné vzdálenosti od děliče, oba svazky urazí stejnou dráhu d . Posunem pohyblivého zrcadla vzniká dráhový rozdíl a podle jeho velikosti se tvoří interferenční minima a maxima.

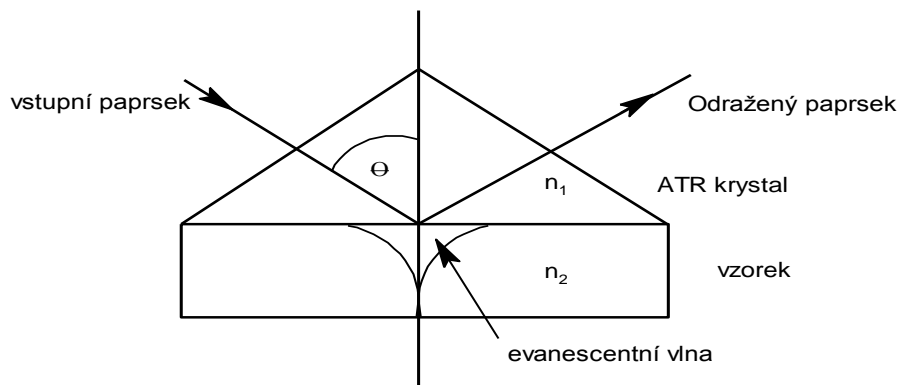


Obr. 6. Schéma Michelsonova interferometru [23].

Dvě z nejvíce používaných FT-IR technik odběru vzorků jsou ATR (zeslabený úplný odraz nebo vnitřní odraz) a DRIFT (difúzní reflektance). Pomocí ATR techniky se měří povrch materiálu, tenké filmy, fólie na lesklém kovovém povrchu zrcadlovou odrazností nebo silně absorbující látky. DRIFT je metoda adjustace vzorku na papírový kotouček s práškovým karbidem křemíku na povrchu.

Při ATR dochází k úplnému vnitřnímu odrazu infračerveného záření při průchodu krystalem, který je v těsném kontaktu se vzorkem. IR paprsek je směřován do opticky hustého krystalu s vysokým indexem lomu o určitém úhlu. Tento vnitřní odraz vytvoří evanescentní vlnu, která se rozprostírá na rozhraní hustého prostředí krystalu a řidšího prostředí vzorku a exponenciálně klesá se vzdáleností od rozhraní. Index lomu krystalu musí být výrazně vyšší

než index lomu ve vzorku, aby došlo k vnitřnímu odrazu. Nejvíce využívaný krystal je lichoběžníkový ZnSe, další používané krystaly jsou z AgCl, Si, Ge, safiru nebo KRS-5 (směs thalných halogenidů).



Obr. 7. Nákres systému ATR krystal-vzorek.

2.3.3 Využití IR spektroskopie

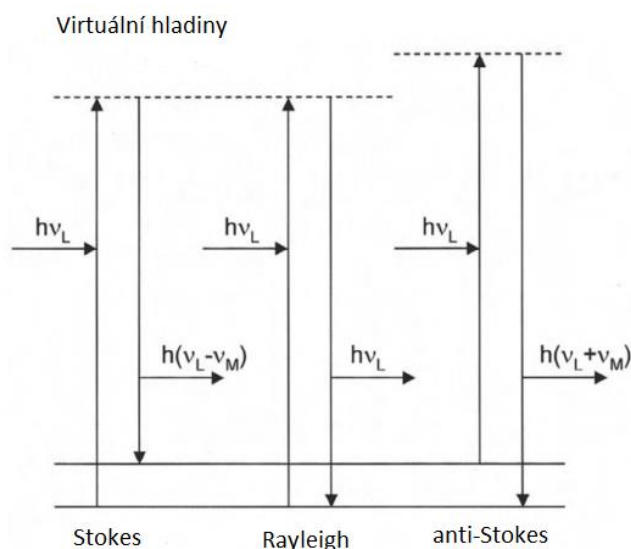
IR spektroskopie slouží se studiu struktury chemických látek, konkrétně při kontrole čistoty látek. V kriminalistice se používá například při analýze laku auta, v medicíně k diagnóze zhoubných nádorů, v potravinářství ke stanovení cukrů, atd. Pomocí IR spektroskopie lze studovat například interakce DNA a proteinů [24][25].

2.4 Princip Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie se používala méně než IR spektroskopie kvůli problémům s degradací vzorku a fluorescencí. Nicméně nedávné pokroky v technologii výrazně zjednodušily zařízení a redukovaly problémy. Tyto pokroky společně se schopností analyzovat vodné roztoky, roztoky uvnitř skleněné nádoby a vzorky bez předchozí úpravy vedly k rychlému nárůstu aplikace této techniky.

Ramanova spektroskopie měří rozptýlené spektrum elektromagnetického záření. Molekuly mají dvě základní vibrační energetické hladiny, základní (o energii $h\nu_L$) a excitovanou ($h\nu_M$), kde ν_L a ν_M jsou frekvence molekulových vibrací. Při interakci dochází nejen k absorpci záření ale také k rozptylu záření. Většina molekul se nachází běžně v základním energetickém stavu. Srážka fotonu s molekulou má za následek její přechod do virtuálního stavu a následnou emisí fotonu se molekula vrací zpět do původního základního

stavu. Emitovaný foton má stejnou energii, jako měl foton absorbovaný. Jedná se o elastický Rayleighův rozptyl neboli pružné srážky. Rozptýlené záření má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající na molekulu. Díky přítomnosti velkého počtu molekul v základním energetickém stavu je intenzita Rayleighova záření 10^5 - 10^{12} krát větší než u neelastických rozptylů, jako jsou Stokesův a anti-Stokesův rozptyl. Častěji dochází k rozptylu Stokesovu, kdy molekula přechází do virtuálního stavu po přijetí fotonu, ale nechává si část energie fotonu a vrací se na excitovanou energetickou hladinu. Emitovaný foton má nižší energii než přijatý foton a rozptýlené záření má vyšší vlnovou délku. Při anti-Stokesově rozptylu molekuly z excitovaného stavu přechází do virtuálního stavu a při emisi fotonu se vrací na základní energetickou hladinu. Energie emitovaného fotonu je větší než energie přijatého fotonu a rozptýlené záření má menší vlnovou délku. Tento rozptyl je nejméně pravděpodobný, jelikož jen malý podíl populace molekul se nachází ve stavu excitovaném. Ramanova spektroskopie měří jen neelastické rozptyly, Rayleighův rozptyl je nutné odfiltrovat [26].



Obr. 8. Schematické zobrazení Rayleighova, Stokesova a anti-Stokesova rozptylu [26].

2.4.1 Technické vybavení Ramanova spektroskopu

Ramanův spektroskop a IR spektroskop mají několik společných prvků. Zdrojem záření je laser lišící se vlnovou délkou, kterým může být helium-neonový (He-Ne), argonový (Ar^+), kryptonový (Kr^+), diodový, barviový nebo laser s označením Nd-YAG. Výkon laseru se dá

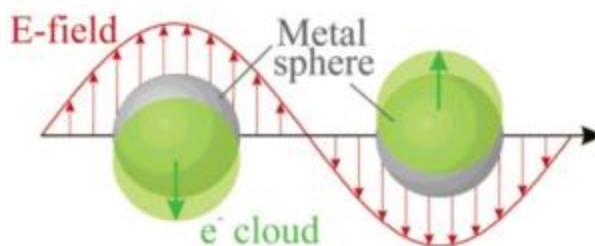
libovolně nastavit, avšak je nutné myslet na vlastnosti analyzovaného vzorku, aby nedošlo k jeho poškození laserem. Další součástí spektroskopu je vzorkovací komora, která je uzavřená a dovoluje analyzovat kapalně vzorky v kyvetách, pevné vzorky, tenké filmy, vzorky v kapkách měřených na sklíčku, atd. Vzorky jsou umístěny na polohovacím zařízení, které se pohybuje po osách x , y a z . Slouží hlavně k nastavení vzdálenosti vzorku od sběrné optiky a optimální soustředění záření do vstupní štěrbině disperzního nebo FT Ramanova spektroskopu. Pro filtrování Rayleighova rozptylu slouží holografické filtry. Do disperzních spektroskopů je zařazen důležitý prvek, kterým je disperzní mřížka a následná detekce je prováděna mnohokanálovým detektorem (CCD). FT spektroskop je vybaven interferometrem a jednokanálovým detektorem.

2.4.2 Využití Ramanova spektroskopu

Ramanovo spektrum podává informace o struktuře a prostorovém uspořádání molekul a podobně jako IR spektroskopie se Ramanova spektroskopie využívá při kontrole čistoty látek. Navíc se zjistilo, že Ramanova spektroskopie může být v některých ohledech daleko výhodnější při analýze. Například voda je zde ideálním rozpouštědlem, kdežto u IR spektroskopie silně absorbuje, tudíž se jako rozpouštědlo nevyužívá. Výhodou je také to, že léčiva mohou být analyzovány v originálních obalech bez nutnosti je otevřít. V souvislosti s DNA byla Ramanova spektroskopie také použita a to hlavně k analýze DNA s velice nízkou koncentrací, ale nahradila ji povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, která dosáhla v této oblasti daleko lepších výsledků.

2.5 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Princip povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) je postaven na zesílení Ramanova rozptylu díky adsorpci molekul vzorku na zdrsňený povrch ušlechtilého kovu. Tento děj je podmíněn existencí povrchových plasmonů. Kovová nanočástice se skládá z negativně nabitého mraku volných elektronů a pozitivně nabitého pozadí. Elektrické pole dopadajícího světla vyvíjí sílu na elektronový oblak, který se díky tomu snaží přemístit pryč, ale elektrostatická síla pozitivně nabitého prostředí ho táhne zpět. Elektronový mrak se chová jako lineární harmonický oscilátor a má tedy rezonanční frekvenci [27].



Obr. 9. Schematické znázornění plasmonové oscilace ukazující přemístění náboje elektronové oblaku vzhledem k jádru [28].

Existují dva typy povrchových plasmonů: povrchové plasmony šířící se po rozhraní kov-dielektrikum a povrchové plasmony lokalizované na nanočásticích. Plasmony jsou citlivé na změnu indexu lomu v blízkosti rozhraní kov-dielektrikum. Těto vlastnosti se využívá u chemických senzorů a biosenzorů [27].

Existují dva efekty, které jsou považovány za příčinu zvýšení intenzity Ramanova rozptylu, chemický a elektromagnetického pole. Chemický efekt uvádí, že povaha molekuly určuje zesilující faktor, jelikož byly pozorovány různé intenzity signálů na stejném substrátu s různými chemikáliemi. Efekt zesílení elektromagnetickým polem je připisován síle pole generovaného oscilací povrchového plasmonu [29].

2.5.1 Nanočástice kovů

Metoda SERS by neexistovala bez specifických vlastností některých mincovních kovů, jako jsou například zlato nebo stříbro. Mezi ně patří optické, elektrochemické, katalytické, magnetické nebo biologické vlastnosti. V posledních letech byl zaznamenán ohromný nárůst aplikací nanočástic, a to díky schopnosti kovů vytvářet částice o velikosti v řádech nanometrů. Příprava částic s rozměry od 1 do 100 nm a jejich vlastnosti jsou ovlivněny tvarem, velikostí, povrchem nebo charakterem okolí. Nanočástice mohou nabývat pravidelného kulovitého tvaru nebo nepravidelného tvaru trubiček, vláken a destiček. Jejich unikátní vlastnosti vycházejí především z celkového povrchu než z jejich hmotnosti nebo množství. Příprava koloidních roztoků je doprovázena barvou, která je závislá právě na tvaru a velikosti dispergovaných částic (fáze) v dispergovaném prostředí. V dispergované fázi se mezi částicemi uplatňují přitažlivé a odpuzivé mezimolekulární síly. Pokud jsou přitažlivé síly příliš silné, může docházet ke shlukování částic a vytváří se například klastry [30].

2.5.2 Nanočástice stříbra

Ve většině případů se nanočástice v chemii připravují kondenzačními metodami, u kovů to jsou především redukce iontových sloučenin. Redukčními činidly mohou být jak organické tak anorganické látky. Nejčastěji se využívá k redukci anorganické sloučeniny tetrahydroboritanu sodného. Metoda přípravy byla mnohokrát modifikována. Měnila se výsledná koncentrace všech látek v roztoku, jejich poměr nebo teplota, při které se nanočástice připravovaly. Prozatím je to nejúčinnější metoda řízené přípravy nanočástic. První redukcí se připraví „seed“ neboli zárodek, jehož další redukcí pak vznikají větší částice. Pro přípravu nanočástic stříbra lze také využít jako redukční činidlo hydrazin, peroxid vodíku nebo vodík, ovšem je nutná stabilizace polymery.

Mezi nejvýznamnější organická redukční činidla patří citrát sodný. Citrátový anion má navíc schopnost stabilizovat vzniklé nanočástice, které jsou v počátku reakce poměrně velké. Jejich zahříváním se částice zmenšují. Dále je možné připravit nanočástice pomocí dlouho známého Tollensova procesu. V neposlední řadě lze zařadit mezi organické redukční činidla například kyselinu askorbovou, jednoduché cukry, hydroxylamin nebo formaldehyd.

Kromě optických vlastností, které jsou důležité při použití nanočástic stříbra pomocí SERS, vykazuje stříbro důležité antibakteriální účinky. Tento fakt je znám od starého Říma, kdy se využívaly stříbrné nádoby pro zachování nezávadnosti tekutin. Díky rozvoji nanočástic se antibakteriální účinky nemusí týkat jen léčby popálenin. Této skutečnosti by se dalo využít při dnešní bakteriální resistenci vůči antibiotikům. I přesto existuje mnoho bakterií a virů, které nepodléhají tomuto antibakteriálnímu účinku. Nicméně se zjistilo, že ideální velikost nanočástic pro likvidaci bakterií je 1-10 nm [31][32].

2.5.3 Využití SERS

SERS je velice citlivá a selektivní metoda využitelná při detekci biologických vzorků. Mnoho proteinů má velikost desítek nanometrů, proto mohou být připraveny částice stejných rozměrů, které se zakomponují do biologických systémů. Tyto systémy jsou složité svými strukturami, syntézami a funkcí. Nanočástice o stejné velikosti umožňují jejich prozkoumání a pochopení.

Větším přínosem nanočástic v medicíně je ale studium cirkulujících nádorových buněk (CTCs) [34]. Tyto buňky jsou uvolňovány z hlavního nádoru nebo metastáz a cestují ve fyziologických tekutinách. Jejich kvantifikace je velkým přínosem při hodnocení šíření rakoviny a předvídání pacientovi prognózy. SERS dovoluje detekci biomarkerů v nižší koncentraci, což umožňuje dřívejší odhalení nemoci. Stejně tak je tomu u detekce dopaminu, což je neurotransmitter, který reguluje mnoho fyziologických aktivit v centrálním nervovém, hormonálním a kardiovaskulárním systému. Vysoká hladina dopaminu může vést k Parkinsonově chorobě nebo Alzheimerově chorobě [36]. Uplatnění má SERS i při analýze bojových chemických látek nebo v elektrochemii při odhalení chování molekul v různých oxidačních stavech [37].

Analýza DNA pomocí SERS se ve velké míře zaměřuje na interakci DNA a protinádorových léčiv. Byly provedeny rozsáhlé výzkumy na vývoj léků proti rakovině, která ročně zabíjí miliony lidí. Interakce léčiv s DNA hraje významnou roli v biologické aktivitě některých molekul protinádorových léčiv. Metoda SERS je schopna měřit redoxní potenciál těchto léčiv [38]. Stejně tak je prováděna analýza interakce DNA s různými antibiotiky [39]. Pomocí SERS s využitím nanočástic stříbra byla například detekována látka velice podobná guaninu, a to 6-thioguanin. Tato látka je využívána při léčbě leukémie [35].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. Chemikálie, přístroje a pracovní postup

3.1 Chemikálie

DNA s fluorescenční značkou (sekvence 5'-3', [DTPA]AGGCTATACACCACAGGTACCAACACCATAATAGCC[Cyanine3], HPLC čistota, Sigma-Aldrich), adenin (p.a., Sigma-Aldrich, MW 135,13), chlorid sodný (p.a., Sigma-Aldrich, MW 58,44), dusičnan stříbrný (p.a., Sigma-Aldrich, MW 169,87), amoniak 25-29 % vodný roztok (p.a., PENTA, MW 17,03), hydroxid sodný (p.a., Sigma-Aldrich, MW 40), maltóza (p.a., Sigma-Aldrich, MW 360,31), N-hydroxysuccinimide (p.a., Sigma-Aldrich, MW 115,09), chlorambucil (p.a., Sigma-Aldrich, MW 304,21), cysteamin (p.a., Sigma-Aldrich, MW 77,15), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (p.a., Sigma-Aldrich, MW 297,18), voda pro HPLC (vodivost 0,38 $\mu\text{S}/\text{m}$, Fisher Scientific, MW 18,02). Použité chemikálie nemusely být žádnými metodami přečišťovány, jelikož jejich čistota byla dostatečná.

3.2 Přístroje

Při měření Ramanových spekter byl využit Ramanův spektroskop Thermo Scientific DXR Raman microscope (Thermo Electron, USA). Spektrum bylo měřeno laserem o vlnové délce 633 nm a skládalo se z 8 skenů s expozičním časem 10 sekund na jedno spektrum. Rozsah měření byl 400-1800 cm^{-1} . Výkon laseru byl laděn na začátku každého laboratorního dne tak, aby výsledná intenzita měřených Ramanových spekter funkcionalizovaných nanočástic stříbra byla porovnatelná. Pro charakterizaci stříbrných nanočástic byl použit FT-IR spektroskop Nicolet iS5 (Thermo Electron, USA) využívající zeslabený úplný odraz (ATR) na krystalu ZnSe. Spektrum bylo složeno z 64 skenů. Vzorek se měřil ve formě kapky na ZnSe krystalu. Jelikož voda silně absorbuje, kapka byla aplikována na krystal a teprve až se odpařila voda, bylo změřeno spektrum.

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava zásobních roztoků

Jako rozpouštědlo byla použita voda pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC, popsáno v kapitole 3.1), protože při přípravě nanočástic docházelo k jejich rychlé agregaci, pokud byla využita destilovaná voda s nevyhovující čistotou. Byly připraveny zásobní roztoky dusičnanu stříbrného, amoniaku, hydroxidu sodného a maltózy pro pozdější přípravu koloidu stříbra do odměrných baněk o objemu 50 ml. Zásobní roztok dusičnanu stříbrného o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,0424 g ve vodě. Zásobní roztok amoniaku byl připraven napipetováním 400 μl 25-29 % amoniakálního roztoku do odměrné baňky a následným doplněním po rysku vodou. Jeho výsledná koncentrace byla $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Dále zásobní roztok $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydroxidu sodného byl připraven rozpuštěním 0,48 g ve vodě a zásobní roztok $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ maltózy rozpuštěním 0,9 g ve vodě.

Byly připraveny dva zásobní roztoky chloridu sodného. První měl koncentraci $4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a byl připraven navážením 5,844 g do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn po rysku vodou. Tento roztok NaCl se přidával k nanočásticím stříbra pro jejich pomalou agregaci. Druhý roztok NaCl byl fyziologický roztok o koncentraci $9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a byl připraven navážením 0,09 g do plastové zkumavky a doplněním do 10 ml vodou. Tento roztok byl použit místo vody při analýze DNA o neznámé koncentraci pro zvýšení chloridových iontů v roztoku. Byla připravena kalibrační řada roztoků DNA o různých koncentracích. Původní roztok DNA měl koncentraci $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a postupným zředěním jsme připravili roztoky o koncentracích $2 \cdot 10^{-2}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-6}$ a $2 \cdot 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ adeninu byl připraven navážením 1,35 mg a doplněním do 100 ml vodou.

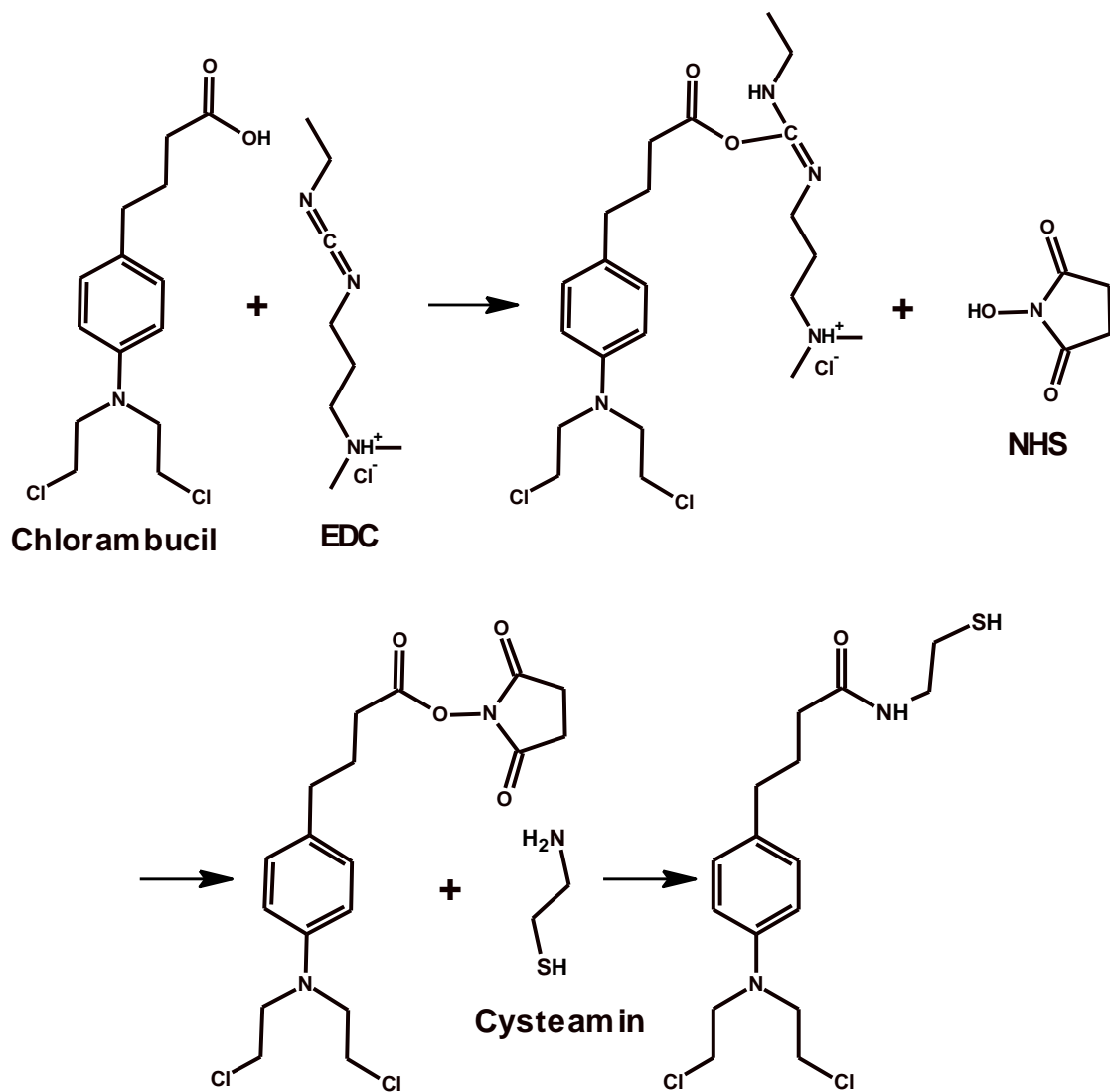
Posledními připravenými zásobními roztoky byly N-hydroxysuccinimide, chlorambucil, cysteamin a 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide. Všechny měly výslednou koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a byly připraveny do 5 ml zkumavek. Pro přípravu bylo naváženo a ve vodě rozpuštěno 0,575 mg N-hydroxysuccinimidu, 1,5 mg chlorambucilu, 0,386 mg cysteaminu a 1,48 mg 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodidu.

3.3.2 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny na magnetické míchačce, na kterou byla umístěna kádinka s magnetem. Do ní bylo napipetováno 5 ml $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku dusičnan stříbrného, 1,25 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku amoniaku, 12,75 ml vody, 1 ml $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku hydroxidu sodného a 5 ml $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku maltózy. Roztok se míchá na míchačce, dokud nedojde k medově žlutému zbarvení, což trvá 3 až 5 minut. Princip přípravy nanočástic je postaven na vzniku komplexu $\text{Ag}[(\text{NH}_3)_2]^+$ smícháním dusičnanu stříbrného s amoniakem. Přídavkem hydroxidu sodného a vody se upraví pH. Následuje redukce amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltózou.

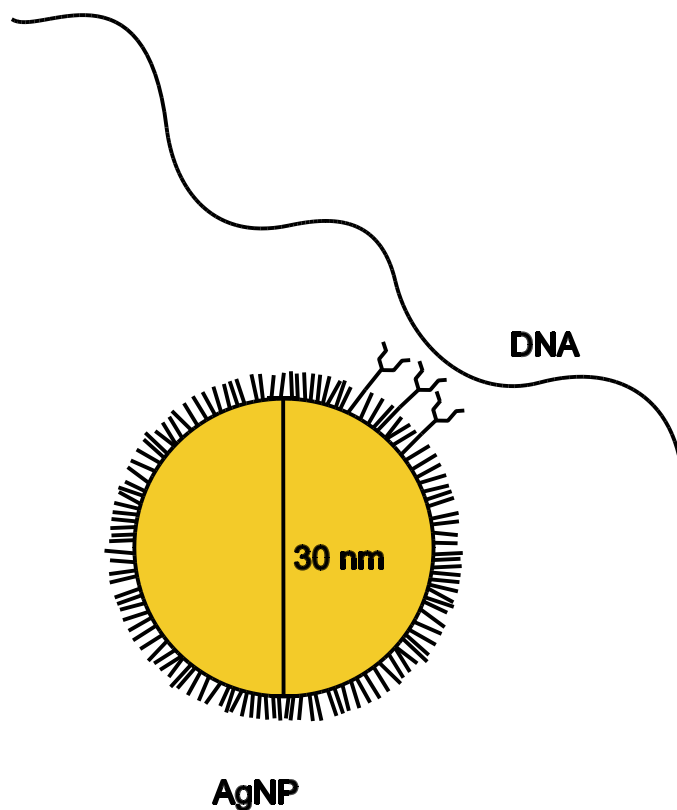
3.3.3 Funkcionalizace nanočástic stříbra

Předmětem bakalářské práce je analýza DNA pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Nejvyšší hodnoty zvýšení Ramanova signálu je dosaženo díky částicím stříbra o určité velikosti. Přesněji za zesílení signálu jsou zodpovědné styčné body mezi částicemi, které se nazývají „hot spots“. Ideální velikost částic je určena vlnovou délkou laseru použitého k excitaci a pohybuje se okolo 70 nm až 200 nm a to při vlnové délce laseru mezi 488 a 647 nm. Zesílení může být účinnější díky menším částicím po jejich reakci s některými anorganickými ionty. V tomto případě byly použity chloridové ionty a to v takovém množství, aby docházelo k jejich rekrystalizaci [40]. DNA může být vázána na povrchu částice pomocí funkčních skupin SH, OH, NH_2 nebo COOH. Do analyzovaných roztoků byl přidán selektor a linker. Jako selektor byl využit chlorambucil, ten by měl zajistit selektivní navázání DNA na stříbrné nanočástice. Jeho využitím bylo do určité míry zamezeno i navázání jiných látek na stříbrné nanočástice, což by se mohlo projevit v naměřeném spektru a znehodnotit výsledek. Imobilizace chlorambucilu na povrch stříbrné nanočástice byla realizována pomocí cysteaminu. Aminogrupina linkeru se naváže na karboxylovou skupinu selektoru. Aby vznikla tato vazba, je nutné využití látek NHS (N-hydroxysuccinimide) a EDC (1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide). EDC aktivuje karboxylovou skupinu chlorambucilu a vytvoří se nestabilní ester. EDC se odštěpí a na jeho místo se naváže NHS, kdy vznikne také ester, ale o něco stabilnější než ester předchozí. Jeho reakcí s linkerem vzniká vazba mezi karboxylovou skupinou selektoru a aminogrupinou linkeru.



Obr. 10. Princip mechanismu tvorby vazby mezi karboxylovou skupinou selektoru a aminoskupinou linkeru.

Následně se tato sloučenina váže přes síru na povrch nanočástic a pomocí chloru se na ni váže DNA.



Obr. 11. Znáornění interakce DNA a nanočástice stříbra pomocí selektoru a linkeru. Žlutá koule značí nanočástici stříbra, jejíž velikost se pohybuje okolo 30 nm. Celý povrch je pokryt sloučeninou, která vznikla po vytvoření vazby mezi selektorem a linkerem. Toto pokrytí je příčinou selektivity. Vidlice značí chlory, které vychytávají DNA.

3.3.4 Příprava vzorků pro analýzu

Zásobní roztoky N-hydroxysuccinimidu, chlorambucilu, cysteaminu a 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodidu (dále jen směs látek) byly smíchány v různých poměrech v rámci ladění experimentálních parametrů. Po vyhodnocení poměru s největším zesílením Ramanova signálu byly připraveny roztoky pro účel analýzy pomocí IR spektroskopie a Ramanovy spektroskopie. Nejdříve byl naměřen slepý vzorek pro následující porovnávání. Následně byla sestrojena kalibrační přímka po proměření vzorků s různými koncentracemi DNA. Byly připraveny dva vzorky o neznámé koncentraci a byla stanovena jejich koncentrace pomocí kalibrační přímky a metody standardního přidavku.

Vzorky pro analýzu pomocí IR spektroskopie byly připraveny smícháním 200 μl koloidu stříbra, 690 μl vody, 10 μl směsi látek a 100 μl chloridu sodného o koncentraci $4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jelikož byla metoda použita z důvodu charakterizace nanočástic stříbra, nebylo nutné do roztoku přidávat DNA. Byly proměřeny roztoky s různými poměry směsi látek.

Srovnávací vzorek byl připraven smícháním 200 μl koloidu stříbra, 750 μl vody a 50 μl chloridu sodného o koncentraci $4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrační přímka byla sestavena po proměření připravených zásobních roztoků značené DNA o koncentracích 0,2 až $2\cdot 10^{-7} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Analyzované roztoky byly připraveny smícháním 200 μl , 730 μl vody, 10 μl roztoku DNA, 10 μl směsi látek a 50 μl $4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu sodného. Výsledné koncentrace DNA v roztocích jsou od $2\cdot 10^{-3}$ do $2\cdot 10^{-9} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzorky o neznámé koncentraci se připravují stejně. Navíc jsou neznámé vzorky měřeny ještě jednou s jiným rozpouštědlem, kterým je fyziologický roztok chloridu sodného o koncentraci $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechny jsou měřeny v podobě kapky na kovovém povrchu, připevněném na sklíčku.

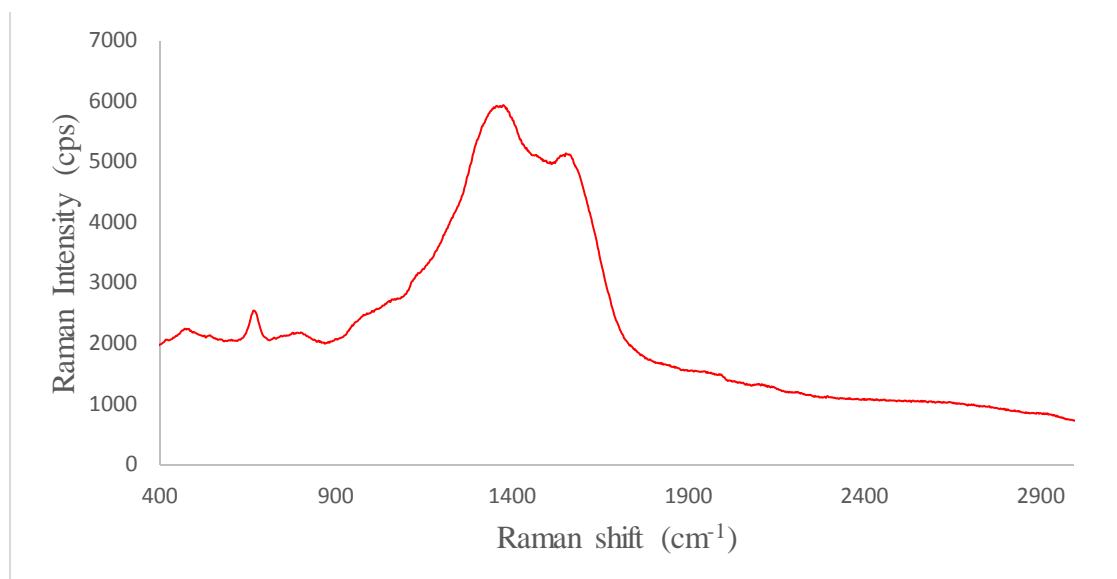
4. Výsledky a diskuze

4.1 Postupy a výpočty

První měření nebylo prováděno s DNA ale s adeninem. Cílem pokusu bylo dokázat, že roztok nanočástic stříbra zesiluje Ramanův signál a zjistit, jestli je výsledek ovlivněn pořadím, v jakém se do roztoku přidává NaCl a adenin. Bylo zjištěno, že pořadí přidavku DNA a adeninu není důležité. Výsledný pík adeninu o vlnočtu 734 cm^{-1} s dřívějším přidavkem adeninu měl intenzitu 302 a s dřívějším přidavkem NaCl intenzitu 306, což je zanedbatelný rozdíl. Pokud se jedná o množství přidavku $4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, bylo zjištěno, že pokud se přidá 100 μl NaCl je vhodné spektrum měřit bezprostředně po přidavku. Pokud je do roztoku přidáno 50 μl NaCl, je nutné vyčkat cca 2 minuty a poté spektrum změřit. Roztok obsahoval 200 μl AgNPs, 690 μl vody, 10 μl adeninu a 100 μl NaCl. Pokus není příliš vhodné provádět s DNA, jelikož bez přidání selektoru mohou být ve spektru vidět jiné látky než je DNA a výsledek by mohl být zkreslený.

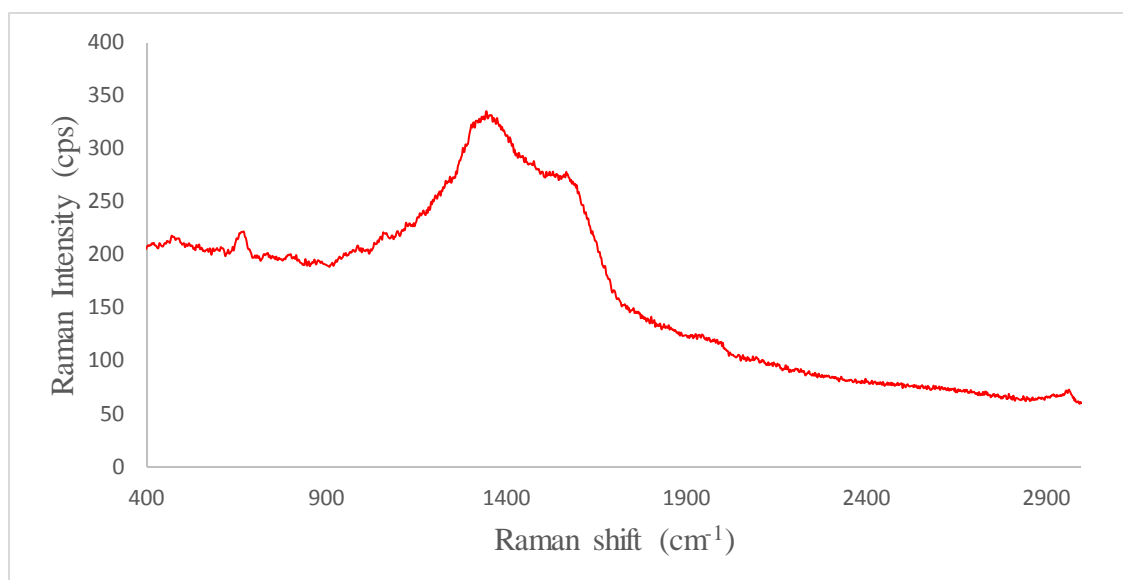
Další studovanou záležitostí je vliv selektoru a linkeru na intenzitu Ramanova signálu. V rámci ladění experimentálních parametrů byly smíchány chlorambucil a cysteamin v různých poměrech. Látky NHS a EDC byly ponechány v poměru 1:1. Poměry se měnily jen u selektoru

a linkeru. Nejdříve byl změřen slepý vzorek nanočástic stříbra, který obsahoval jen koloid stříbra. Toto měření se využívalo při stanovení, které píky patří DNA a které selektoru.



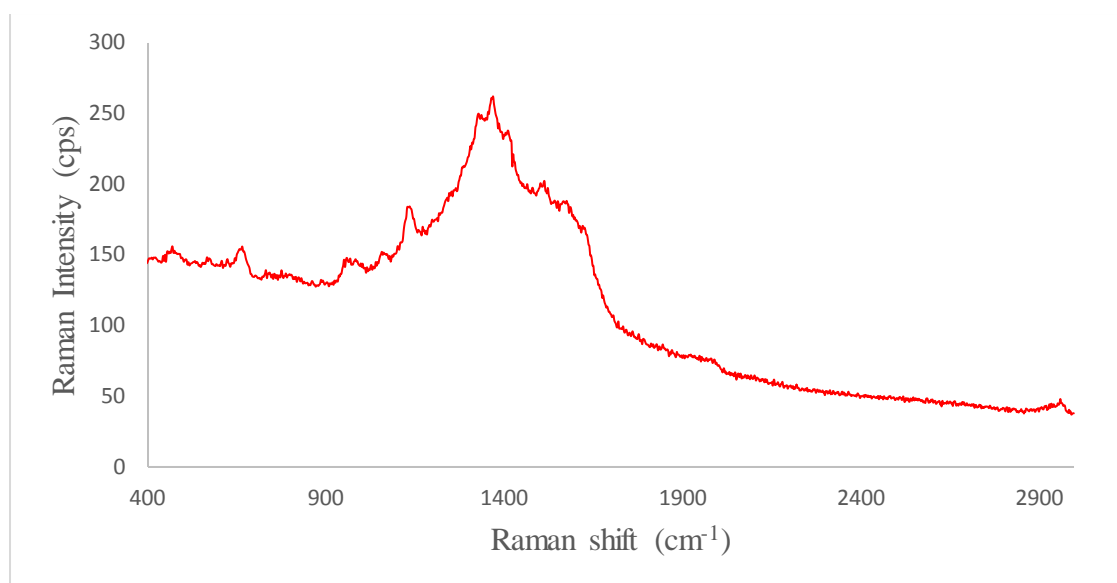
Graf 1. Blank AgNPs.

Poté bylo změřeno spektrum funkcionalizované AgNPs bez DNA, selektoru a linkeru. Roztok byl připraven smícháním 200 μl AgNPs, 700 μl vody a 100 μl NaCl.



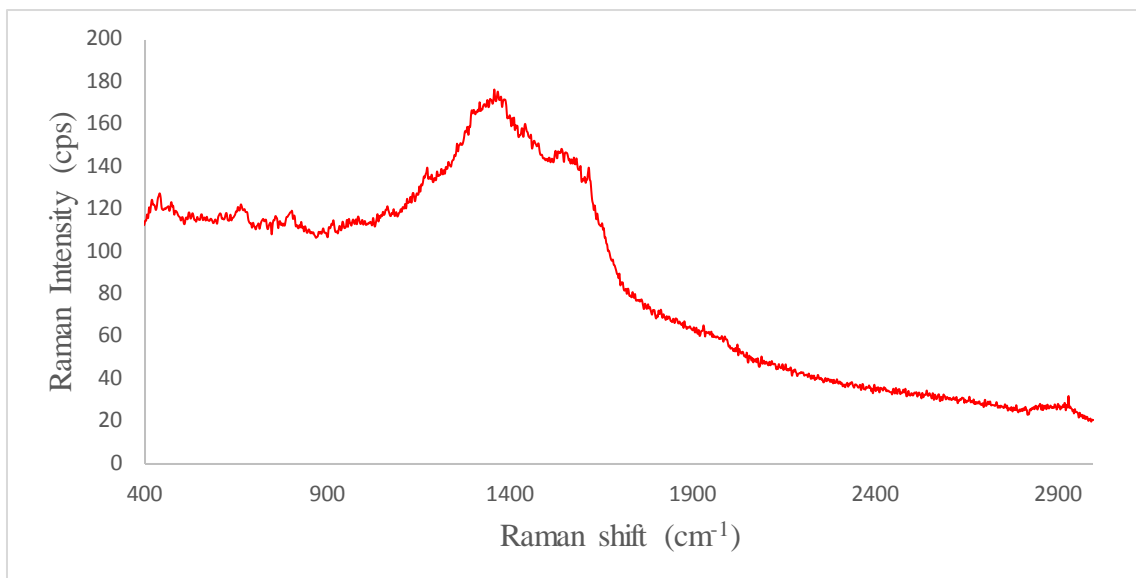
Graf 2. Funkcionalizované AgNPs.

Přidáním DNA do tohoto roztoku bylo při měření zjištěno, že DNA musí při použité koncentraci obsahovat fluorescenční značku, jinak se její píky nezobrazí ve spektru. Tyto značky výrobci přidávají k DNA a proteinům a vážou se kovalentně na aminové, sulfhydrylové, thiolové skupiny a histidinové postranní řetězce. Vzorek obsahoval 200 μl AgNPs, 690 μl vody, 10 μl DNA o koncentraci 0,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 100 μl NaCl. Stejně jako u adeninu bylo při tomto měření zjišťováno, jestli je výsledné spektrum ovlivněno pořadím přidavku DNA a NaCl. Také v tomto případě bylo zjištěno, že pořadí přidavku je nepodstatné.



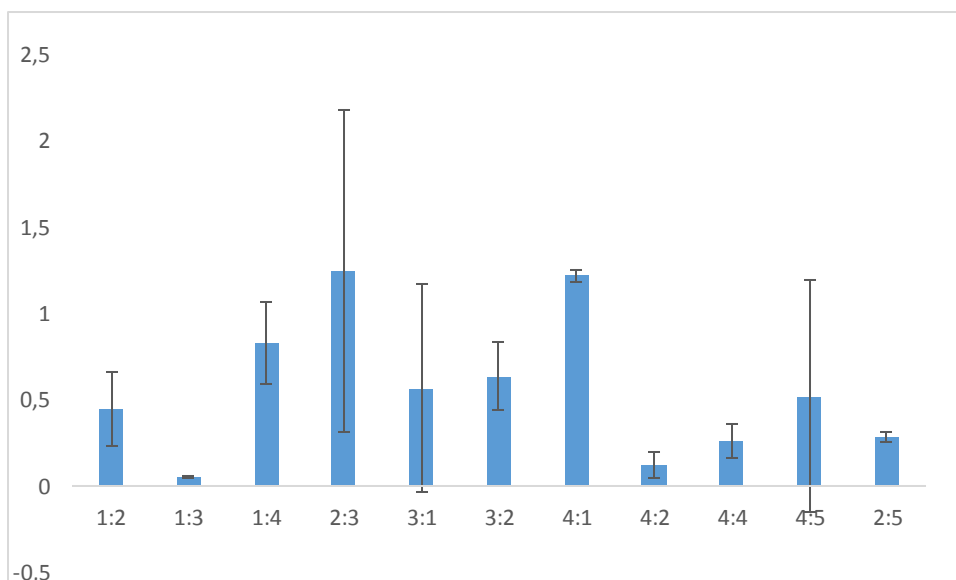
Graf 3. Spektrum DNA bez selektoru.

Další měření bylo prováděno se selektorem. Roztok vznikl smícháním 200 μl AgNPs, 730 μl vody, 10 μl DNA o koncentraci 0,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 μl směsi látek a 50 μl NaCl. Poměr selektoru, linkeru, EDC a NHS byl 1:1:1:1. V této části experimentu bylo studováno, po jak dlouhé době spolu látky reagují. Nejdříve se smíchaly látky chlorambucil, cysteamin, EDC a NHS. Poté se směs látek smíchala s AgNPs a roztok se nechal 20 minut odstát. Dále se přidala DNA a zase se roztok nechal 20 minut odstát. Při druhém měření byly všechny látky smíchány a měřeny bez jakéhokoliv časové prodlevy. Výsledkem tohoto pokusu bylo, že látky nepotřebují zvláštní čas na společnou interakci a také nezáleží, jestli se roztok chloridu sodného přidá před přidavkem DNA a směsi látek nebo až po něm. Při přidavku 50 μl NaCl je opět nutné měřit spektrum cca po dvou minutách.



Graf 4. Spektrum DNA se selektorem.

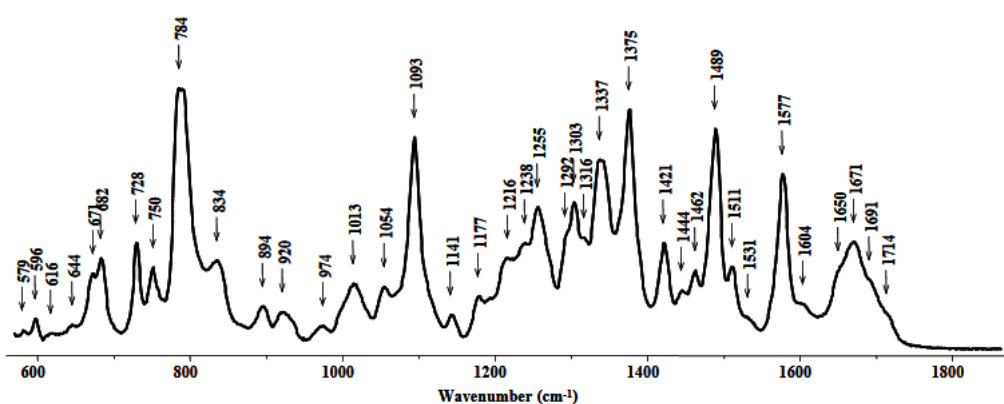
Ladění experimentálních parametrů se provádělo analýzou jak pomocí IR spektroskopie, tak pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Obě metody měřily vliv poměrů selektoru a linkeru na intenzitu zesíleného signálu. Poměry látek EDC a NHS zůstaly 1:1. Spektra byla vyhodnocena pomocí vybraných píků DNA, selektoru a linkeru. Pro IR analýzu byl zvolen pík chlorambucilu o vlnové délce 870 nm, který připadá vazbě C–C–N. Pík cysteaminu o vlnové délce 1076 nm odpovídá valenční vibraci vazby C–S. Analyzovaný vzorek obsahoval 200 μl AgNPs, 690 μl vody, 10 μl směsi látek v různém poměru a 100 μl NaCl. Pro charakterizaci nanočástic není nutné do roztoku přidávat DNA. Bylo zjišťováno, jestli zvýšení obsahu AgNPs a NaCl ovlivní výsledné spektrum, to se ovšem nepotvrdilo. Byly změřeny podíly intenzit dvou píků 870/1076 nm v roztocích o různých poměrech směsi látek. Jejich porovnáním bylo vyhodnoceno největší zesílení Ramanova signálu.



Graf 5. Podíly intenzit dvou píkù chlorambucil/cysteamin s odchylkami v měření.

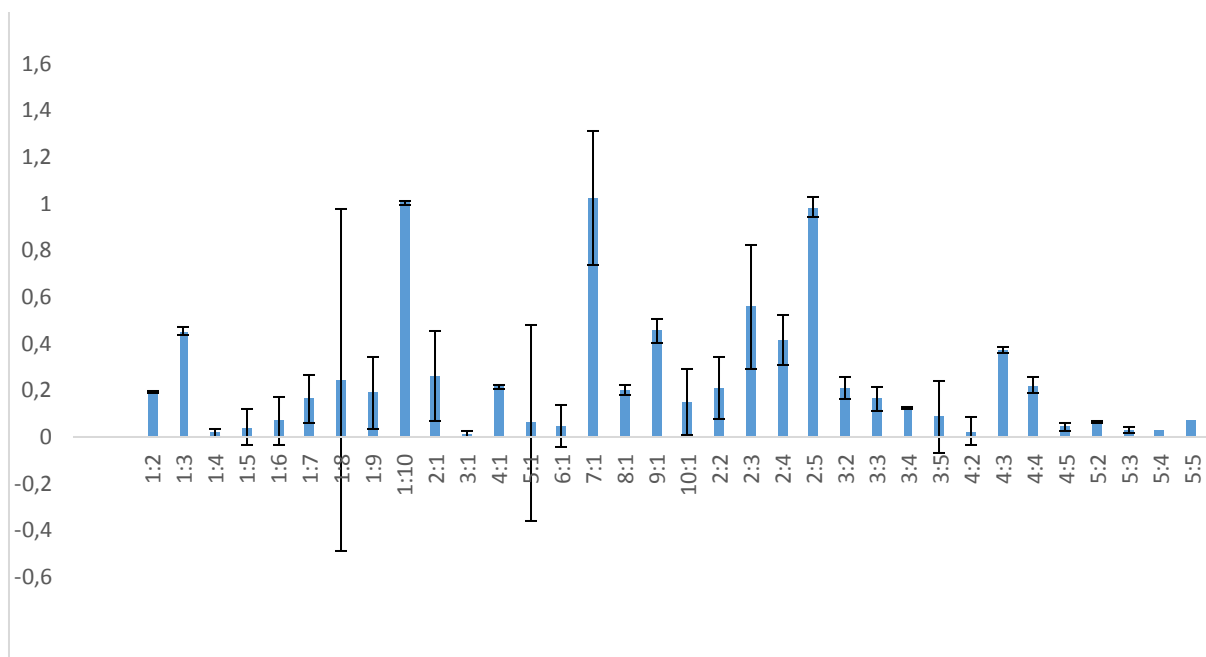
Podle IR spektroskopie je dosaženo největšího zesílení Ramanova signálu při použití poměrù cysteaminu a chlorambucilu 2:3 a 4:1. Poměr 2:3 je ovšem zatížen velkou chybou způsobenou pravděpodobně větším podílem nezreagované části chlorambucilu. Tudíž nejlepší vlastnosti má koloidní roztok se směsí látek s poměrem cysteaminu a chlorambucilu 4:1.

V následujícím obrázku jsou ukázány píky, které by měla obsahovat DNA. Pro analýzu SERS v této práci byl využit pík 1303 nm, který patří elektronové skruktuře bází, přesněji adeninu nebo guaninu. Druhý vybraný pík o vlnové délce 1618 nm patřil benzenovému jádru chlorambucilu.



Obr. 12. Ramanovo spektrum DNA z telecího brzlíku [41].

Měření bylo prováděno třikrát a průměr intenzit píků jednotlivých poměrů byl následně srovnáván v podobě podílů píků o vlnové délce 1303 nm a 1618 nm.



Graf 6. Podíly intenzit dvou píků DNA/chlorambucil při různých poměrech cysteaminu a chlorambucilu.

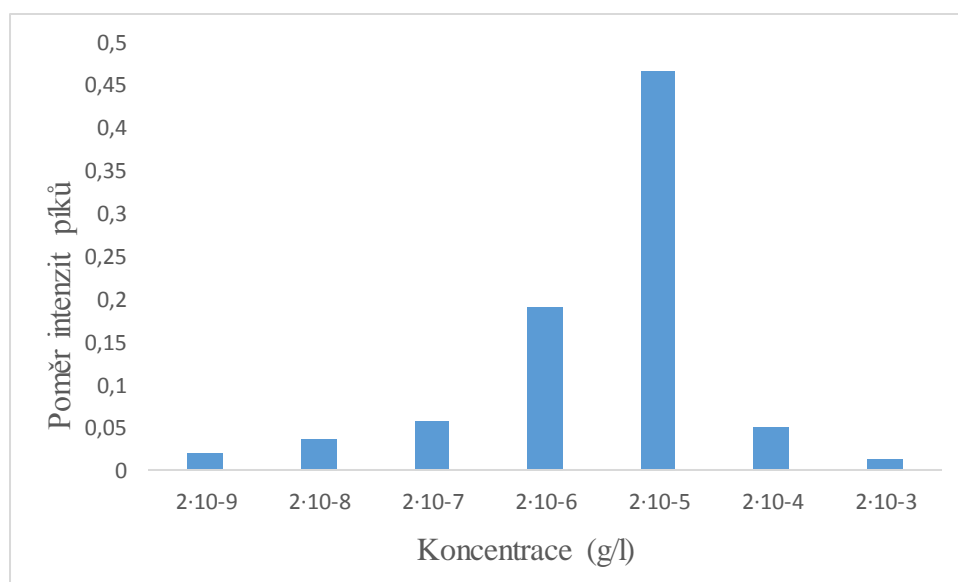
Podle výsledného grafu bylo zjištěno, že nejlepší poměry jsou 1:10, 7:1 a 2:5. Poměr 1:10 je ovšem nevěrohodný, jelikož intenzity chlorambucilu i DNA byly dosti nízké. Tudíž jejich poměr může být zkreslený. Poměr 7:1 je podle grafu zatížen velkou chybou. Byl tedy vybrán poměr cysteaminu a chlorambucilu 2:5 pro následující měření, vytvoření kalibrační přímky a výpočet koncentrace dvou neznámých vzorků. Vyhodnocený poměr cysteaminu a chlorambucilu 2:5 při analýze SERS se lišil od poměru 4:1 získaného při IR spektroskopii. Důvodem může být rozdílnost metod nebo nepřítomnost DNA v analyzovaném vzorku při měření IR spekter.

Byla naměřena spektra DNA o různých koncentracích. Roztoky se připravovaly smícháním 200 μl AgNPs, 730 μl vody, 10 μl DNA, 10 μl směsi látek o poměru cysteaminu a chlorambucilu 2:5 a 50 μl NaCl. Výsledné koncentrace DNA v roztocích byly $2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$,

$2 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-8}$ a $2 \cdot 10^{-9}$ g·l⁻¹. Byly měřeny podíly píků DNA (1303 nm) a chlorambucilu (1618 nm).

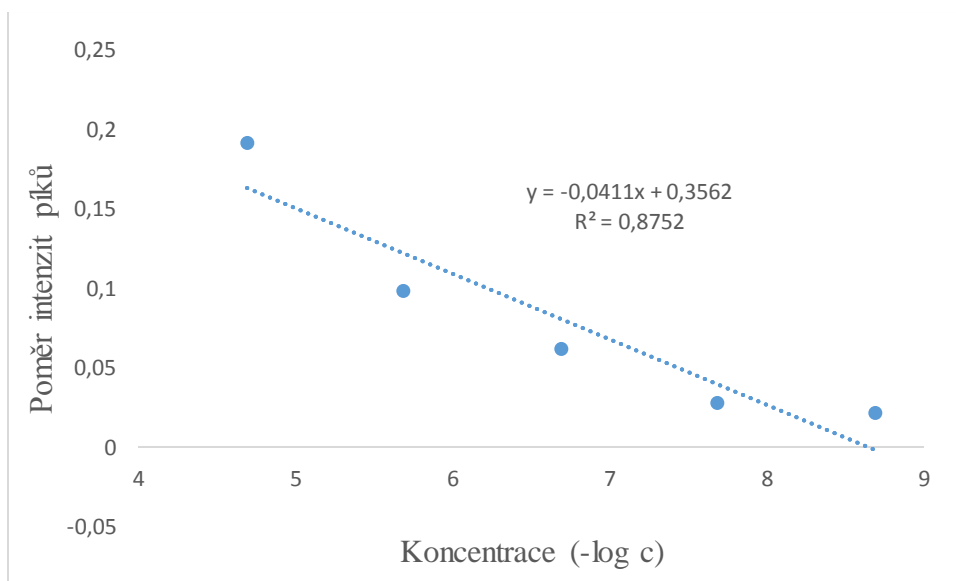
Koncentrace DNA [g·l ⁻¹]	Poměr 1	Poměr 2	Poměr 3	Průměr	Odchylka
$2 \cdot 10^{-9}$	0,026528	0,020752	0,019351	0,022211	0,003106
$2 \cdot 10^{-8}$	0,024754	0,035902	0,022668	0,027775	0,00581
$2 \cdot 10^{-7}$	0,014168	0,057161	0,115898	0,062409	0,041696
$2 \cdot 10^{-6}$	0,063918	0,190223	0,043037	0,099059	0,065024
$2 \cdot 10^{-5}$	0,070257	0,466702	0,039665	0,192208	0,194498
$2 \cdot 10^{-4}$	0,201025	0,051461	0,071663	0,10805	0,066259
$2 \cdot 10^{-3}$	0,030899	0,012559	0,03994	0,027799	0,011391
Vzorek 1	0,032683	0,008611	0,011601	0,017632	0,010712
Vzorek 2	0,018327	0,049663	0,018831	0,02894	0,014655
Vzorek 1 ve fyziologickém roztoku	0,04807	0,011122	0,00805	0,022414	0,018185
Vzorek 2 ve fyziologickém roztoku	0,039668	0,025085	0,077652	0,047468	0,022158

Tab. 2. Tabulka zobrazuje hodnoty poměrů píků DNA a chlorambucilu pro různé koncentrace DNA a neznámých vzorků.



Graf 7. Poměr intenzit píků pro jednotlivé koncentrace DNA.

Závislost koncentrace DNA na poměru píku DNA/chlorambucilu je evidentní u koncentrací od $2 \cdot 10^{-5}$ do $2 \cdot 10^{-9}$ $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. U vyšších koncentrací jako jsou $2 \cdot 10^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-4}$ $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ tato závislost neplatí. Důvodem je nejspíš to, že při vyšších koncentracích dochází k destabilizaci použitých nanočástic, což vede k horším faktorům zesílení. Pro sestavení kalibrační přímky se použily jen hodnoty koncentrace DNA mezi $2 \cdot 10^{-9}$ a $2 \cdot 10^{-5}$ $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrace se zlogaritmovaly.



Graf 8. Kalibrační závislost.

Koncentrace neznámého vzorku 1 se vypočítá z rovnice přímky $y = -0,0411x + 0,3562$. Po vyjádření x se dosadí hodnoty průměrných hodnot podílů intenzity píku. První hodnotou je zlogaritmovaná koncentrace neznámého vzorku 1 ve vodě a druhou hodnotou je zlogaritmovaná koncentrace neznámého vzorku 1 s fyziologickým roztokem jako rozpouštědlem. Hodnoty je nutné přepočítat.

$$y = -0,0411x + 0,3562$$

$$x = \frac{y - 0,3562}{-0,0411}$$

$$x = \frac{0,017632 - 0,3562}{-0,0411} = 8,237664 = 10^{-8,237664} = 5,78 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$x = \frac{0,022414 - 0,3562}{-0,0411} = 8,121314 = 10^{-8,121314} = 7,56 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Koncentrace neznámého vzorku 2 se vypočítá pomocí metody standardního přídávku. Metoda funguje na principu změny intenzity signálu v závislosti na přidaném množství. Pro výpočet byl použit následující vzorec, kde c_x je koncentrace neznámého vzorku, c_{sp} je koncentrace standardního přídávku, A_1 je plocha píku stanovované látky v původním vzorku, A_2 je plocha píku stanovované látky ve vzorku se standardním přídávkem, V_1 je objem původního vzorku (μl) a V_{sp} je objem standardního přídávku (μl). Za hodnotu plochy píku byla dosazena hodnota podílu dvou píků DNA/chlorambucil.

	Podíl ploch píků DNA/chlorambucil A_1	průměr
A_1 plocha píku neznámého vzorku 2	0,002404	0,003347
	0,00429	
A_2 plocha píku se standardním přídávkem	0,003396	0,005127
	0,006857	
A_1 plocha píku neznámého vzorku 2 (ve fyz. roztoku)	0,010385	0,007297
	0,00421	
A_2 plocha píku se standardním přídávkem (ve fyz. roztoku)	0,018331	0,018016
	0,017702	

Tab. 3. Hodnoty ploch píků stanovované látky a ploch píků se standardním přídávkem ve vzorku v neznámém vzorku 2 ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku.

$$c_x = c_{sp} \frac{A_1 \cdot V_{sp}}{A_2 \cdot (V_1 + V_{sp}) - A_1 \cdot V_1}$$

$$c_x = 0,002 \cdot \frac{0,007297 \cdot 10}{0,018016 \cdot (10 + 50) - 0,007297 \cdot 50} = 2,038 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$c_x = 0,002 \cdot \frac{0,003347 \cdot 10}{0,005127 \cdot (10 + 50) - 0,003347 \cdot 50} = 4,772 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Koncentrace neznámého vzorku 1 byla pomocí rovnice kalibrační přímky vypočítána jako $5,78 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a koncentrace neznámého vzorku 1 ve fyziologickém roztoku jako $7,56 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Skutečná hodnota koncentrace těchto dvou vzorků byla $1,2 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Absolutní chyba koncentrace neznámého vzorku 1 je $4,58 \cdot 10^{-9}$ a absolutní chyba koncentrace neznámého vzorku 1 ve fyziologickém roztoku je $6,36 \cdot 10^{-9}$.

Koncentrace neznámého vzorku 2 byla pomocí metody standardního přídatku vypočítána jako $2,038 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a koncentrace neznámého vzorku 2 ve fyziologickém roztoku jako $4,772 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Skutečná hodnota koncentrace těchto vzorků byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Absolutní chyba koncentrace neznámého vzorku 2 je $1,038 \cdot 10^{-4}$ a absolutní chyba koncentrace neznámého vzorku 2 ve fyziologickém roztoku je $3,772 \cdot 10^{-4}$.

Hodnoty koncentrací vzorků ve fyziologickém roztoku byly vyšší než u vzorků, ve kterých byla jako rozpouštědlo použita voda. Příčinou je pravděpodobně vyšší koncentrace chloridových iontů. U těchto roztoků byla ovšem zjištěna větší absolutní chyba. Zvýšením chloridových iontů se tedy nezajistí kvalitnější výsledek.

Absolutní chyby při stanovování koncentrací neznámých roztoků 2 byly menší. Metoda standardního přídatku je tedy vyhodnocena jako přesnější oproti metodě kalibrační přímky.

ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na analýzu nukleových kyselin pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Cílem práce bylo ladění experimentálních parametrů analýzy DNA s výsledkem získání zesíleného Ramanova signálu s využitím nanočástic stříbra.

Byl syntetizován roztok nanočástic stříbra a charakterizovány jeho vlastnosti jak pomocí IR spektroskopie, tak pomocí Ramanovy spektroskopie. Prvním zkoumaným parametrem byla závislost intenzity píků na koncentraci DNA. Následně byla studována interakce nanočástic stříbra a DNA v přítomnosti látek selektoru (chlorambucil), linkeru (cysteamin), NHS (N-hydroxysuccinimidu) a EDC (1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodid). Karboxylová skupina selektoru reakcí s EDC se aktivovala a vytvořil se nestabilní ester, ECD se odštěpí a na jeho místo se naváže NHS. Reakcí s linkerem vzniká vazba mezi karboxylovou skupinou selektoru a aminoskupinou linkeru. DNA se naváže přes chlor a AgNPs se naváže přes síru na vytvořenou sloučeninu. U těchto látek se měnil jejich poměr v analyzovaném roztoku. V rámci ladění experimentálních parametrů analýzy DNA se měnily poměry pouze cysteaminu a chlorambucilu, zatímco poměry zbylých dvou látek byly konstantní (1:1). Z naměřeného spektra se vybral jeden pík DNA o vlnové délce 1303 nm a jeden pík chlorambucilu o vlnové délce 1618 nm a byly vypočítány podíly jejich intenzit. Z roztoků s různými poměry chlorambucilu a cysteaminu byl vyhodnocen poměr, při kterém je zesílení Ramanova signálu největší, a to poměr 2:5. S tímto poměrem cysteaminu a chlorambucilu se dále pracovalo při sestavení kalibrační závislosti podílů intenzit DNA/chlorambucil na koncentraci DNA. Díky této závislosti se vypočítaly koncentrace neznámých vzorků DNA. Posledním zkoumaným parametrem byl vliv rozpouštědla na zesílení Ramanova signálu, kde místo vody byl použit fyziologický roztok NaCl o koncentraci $9 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace vzorků s fyziologickým roztokem byly vypočítány pomocí metody standardního přídavku. Pomocí kalibrační přímky byly vypočítány hodnoty koncentrace neznámého vzorku 1 jako $5,78\cdot 10^{-9} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentraci neznámého vzorku 1 ve fyziologickém roztoku jako $7,56\cdot 10^{-9} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pomocí metody standardního přídavku byly vypočítány hodnoty koncentrace neznámého vzorku 2 jako $2,038\cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentraci neznámého vzorku 2 ve fyziologickém roztoku jako $4,772\cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Podle hodnot absolutních chyb byla voda klasifikována jako vhodnější rozpouštědlo a metoda standardního přídavku hodnocena jako přesnější.

SUMMARY

This bachelor thesis is focused on the analysis of nucleic acids, namely DNA using surface-enhanced Raman spectroscopy. The aim of the work was to tune key experimental parameters including effects of concentrations and concentration ratios of the used selector (chlorambucil), and linker (cysteamine) on the analytical signal of analyzed nucleic acids.

Silver nanoparticles were synthesized and functionalized using various concentration ratios of chlorambucil and cysteamine. Nanomaterial was functionalized using EDC/NHS chemistry, where EDC stands for 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide, and NHS for N-hydroxysuccinimide. The reaction between EDC/NHS and carboxyl group of chlorambucil leads to its activation through a creation of unstable ester and a consequential amine coupling with cysteamine. As-prepared nanomaterials were first characterized by infrared spectroscopy. The signal of chlorambucil and cysteamine was evaluated and the best ratios were selected. Next, Raman spectroscopy was utilized in the study of the relation of a concentration ratio of the selector and the linker, and the obtained SERS signal of DNA. In this experiment, intensity of spectral bands of chlorambucil and DNA were evaluated. Careful study of the concentration ratios of a linker and of a selector led to a development of the analytical method able to detect a DNA at ultra-trace concentration levels. The parameters of the method were studied on a performed 5-point calibration curve and four model samples. The limits of a detection are in units of $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Model samples were aqueous solutions of DNA and DNA in saline. The saline was selected in order to test the potential of the method in the analysis of samples with higher salinity. Unknown concentrations of DNA samples 1 were calculated by constructing of a calibration curve. Unknown concentrations of DNA samples 2 were calculated by standard addition method. The concentration values of the unknown sample 1 was calculated as $5,78\cdot 10^{-9}\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ and the concentration of the unknown sample 1 in saline was calculated as $7,56\cdot 10^{-9}\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. The concentration values of the unknown sample 2 was calculated as $2,038\cdot 10^{-4}\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ and the concentration of the unknown sample 2 in saline was calculated as $4,772\cdot 10^{-4}\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. According to the values of absolute errors the water was classified as a suitable solvent and standard addition method was evaluated as more correct.

REFERENCE

- [1] ZICHÁČEK, V. a JELÍNEK, J. *Biologie*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2003. ISBN 80-7182-159-4.
- [2] SINDEN, R. R., PEARSON, CH. E., POTAMAN V. N. a USSERY, D. W. DNA: Structure and function. *Advances in Genome Biology*. 1998, roč. 5, s. 1–141. ISSN 10675701.
- [3] KOOLMAN, J. a ROEHM, K. H. *Koolman, Color Atlas of Biochemistry*. 2005. ISBN 3131003723.
- [4] WATSON, J. D., CRICK, F. H. C. *Molecular Structure of Nucleic Acids*. 1953. ISBN 0028-0836
- [5] DAHM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*. 2008, roč. 122, č. 6, s. 565–581.
- [6] FRIEDBERG, E. C. A brief history of the DNA repair field. *Cell research*. 2008, roč. 18, č. 1, s. 3–7.
- [7] MANCHESTER, K. L. Historical Opinion: Erwin Chargaff and his „rules" for the base composition of DNA: why did he fail to see the possibility of complementarity? *Trends in Biochemical Sciences*. 2008, roč. 33, č. 2, s. 65–70. ISSN 09680004.
- [8] HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA repair mechanisms. *Maturitas*. 2001, roč. 38, č. 1, s. 17–22. ISSN 03785122.
- [9] SOARES, J. P., SILVA, A. M., FONSECA, S., OLIVEIRA, M. M., PEIXOTO, F., GAIVÃO, I. a MOTA, M. P. How can age and lifestyle variables affect DNA damage, repair capacity and endogenous biomarkers of oxidative stress? *Experimental gerontology*. 2015, roč. 62, s. 45–52. ISSN 1873-6815.
- [10] VAN LOON, B., MARKKANEN, E. a HÜBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair*. 2010, roč. 9, č. 6, s. 604–616. ISSN 15687864.
- [11] RASTOGI, R. P., RICHA, KUMAR, A., TYAGI, M. B. a SINHA, R. P. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of*

Nucleic Acids. 2010, roč. 2010, s. 1–32. ISSN 2090-021X.

- [12] MEI, S., YAO, Q., WU, C. a XU, G. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches - Capillary electrophoresis and GC/MS: An assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2005, roč. 827, č. 1, s. 83–87. ISSN 15700232.
- [13] EVANS, M. D., COOKE, M. S., PODMORE, I. D., ZHENG, Q., HERBERT, K. E. a LUNEC, J. Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999, roč. 259, č. 2, s. 374–8. ISSN 0006-291X.
- [14] LAM, P. M. W., MISTRY, V., MARCZYLO, T. H., KONJE, J. C., EVANS, M. D. a COOKE, M. S. Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012, roč. 52, č. 10, s. 2057–2063.
- [15] DVOŘÁK, M. Sledování poškození DNA metodou kometové analýzy. 2013.
- [16] KOTRBA, P., KNEJZLÍK, Z. a CHODORA, Z. (VŠCHT, Praha). Izolace, klonování a analýza DNA. nedatováno, s. 12.
- [17] NOVOTNÁ, R., ŠILHA, T., TRÁVNÍČEK, Z. (UNIVERZITA PALACKÉHO, Olomouc). *Spektrální metody studia chemických látek*. 2011.
- [18] PATEL, S., PATEL, P., UNDRE, S. B., PANDYA, S. R., SINGH, M. a BAKSHI, S. DNA binding and dispersion activities of titanium dioxide nanoparticles with UV/vis spectrophotometry, fluorescence spectroscopy and physicochemical analysis at physiological temperature. *Journal of Molecular Liquids*. 2016, roč. 213, s. 304–311. ISSN 01677322.
- [19] PERVEEN, F., QURESHI, R., ANSARI, F. L., KALSOOM, S. a AHMED, S. Investigations of drug-DNA interactions using molecular docking, cyclic voltammetry and UV-Vis spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 2011, roč. 1004, č. 1-3, s. 67–73. ISSN 00222860.

- [20] SAITO, S. T., SILVA, G., PUNGARTNIK, C. a BRENDDEL, M. Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012, roč. 111, s. 59–63. ISSN 10111344.
- [21] NI, Y., LIN, D. a KOKOT, S. Synchronous fluorescence and UV-vis spectroscopic studies of interactions between the tetracycline antibiotic, aluminium ions and DNA with the aid of the Methylene Blue dye probe. *Analytica Chimica Acta*. 2008, roč. 606, č. 1, s. 19–25. ISSN 00032670.
- [22] NI, Y., LIN, D. a KOKOT, S. Synchronous fluorescence and UV-vis spectrometric study of the competitive interaction of chlorpromazine hydrochloride and Neutral Red with DNA using chemometrics approaches. *Talanta*. 2005, roč. 65, č. 5, s. 1295–1302. ISSN 00399140.
- [23] LARKIN, P. J. „*IR and Raman Spectroscopy - Principles and Spectral Interpretation*“. 2011. ISBN 9780123869845.
- [24] POLYANICHKO, A. a CHIKHIRZHINA, E. Interaction between DNA and chromosomal proteins HMGB1 and H1 studied by IR/VCD spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 2013, roč. 1044, s. 167–172. ISSN 00222860.
- [25] KUMAR, A., KUMAR, A., GUPTA, R. K., PAITANDI, R. P., SINGH, K. B., TRIGUN, S. K., HUNDAL, M. S. a PANDEY, D. S. Cationic Ru(II), Rh(III) and Ir(III) complexes containing cyclic π -perimeter and 2-aminophenyl benzimidazole ligands: Synthesis, molecular structure, DNA and protein binding, cytotoxicity and anticancer activity. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2016, roč. 801, s. 68–79. ISSN 0022328X.
- [26] REISENAUER, H. P. *IR and Raman Spectroscopy. (Series: Spectroscopic Techniques—An Interactive Course)*. By Siegfried Wartewig.. 2004. ISBN 352730245X.
- [27] PETERSON, D., SIMON, H., CHENG, P., WHITBY, B., GOLDSTEIN, L., POTTS, T. a THORNTON, C. Table of Contents: Introduction. 1997, roč. 19, č. 2, s. 1–25.
- [28] KELLY, K. L., CORONADO, E., ZHAO, L. L. a SCHATZ, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B*. 2003, roč. 107, s. 668–677. ISSN 1520-6106.

- [29] EUSTIS, S. a EL-SAYED, M. 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. *Chemical Society reviews*. 2006, roč. 35, č. 3, s. 209–217. ISSN 0306-0012.
- [30] KVÍTEK, L. a PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. 2007, s. 52.
- [31] PRUCEK, R., KILIANOVÁ, M. (Univerzita Palackého). *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie*. 2013, s. 75.
- [32] KVÍTEK, L. (Univerzita Palackého). *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*. 2008, s. 79.
- [33] KATO, H., SUZUKI, M., FUJITA, K., HORIE, M., ENDOH, S., YOSHIDA, Y., IWAHASHI, H., TAKAHASHI, K., NAKAMURA A. a KINUGASA, S. Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicology in Vitro*. 2009, roč. 23, č. 5, s. 927–934. ISSN 08872333.
- [34] LIANIDOU, E. S. a MARKOU, A. Circulating tumor cells in breast cancer: Detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clinical Chemistry*. 2011, roč. 57, č. 9, s. 1242–1255. ISSN 00099147.
- [35] LI, H., CHONG, X., CHEN, Y., YANG, L., LUO, L., ZHAO, B. a TIAN, Y. Detection of 6-Thioguanine by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy using silver nanoparticles-coated silicon wafer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2016, roč. 493, s. 52–58. ISSN 09277757.
- [36] ULUBAY, S. a DURSUN, Z. Cu nanoparticles incorporated polypyrrole modified GCE for sensitive simultaneous determination of dopamine and uric acid. *Talanta*. 2010, roč. 80, č. 3, s. 1461–1466. ISSN 00399140.
- [37] SHARMA, B., FRONTIERA, R. R., HENRY, A. I., RINGE, E. a VAN DUYNE, R. P. SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*. 2012, roč. 15, č. 1-2, s. 16–25. ISSN 13697021.
- [38] MENEGHELLO, M., PAPADOPOULOU, E., UGO, P. a BARTLETT, P. N. *Electrochimica Acta Using Electrochemical SERS to Measure the Redox Potential of*

Drug Molecules Bound to dsDNA — a Study of Mitoxantrone. *Electrochimica Acta*. 2016, roč. 187, s. 684–692. ISSN 0013-4686.

- [39] SHARMA, S. K., MORRISSEY, A. T., MILLER, G. G., GMEINER, W. H. a LOWN, J. W. Design, synthesis, and intracellular localization of a fluorescently labeled DNA binding polyamide related to the antibiotic distamycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2001, roč. 11, č. 6, s. 769–772. ISSN 0960894X.
- [40] PRUCEK, R., RANC, V., BALZEROVÁ, O., PANÁČEK, A., ZBOŘIL, R. a KVÍTEK, L. Preparation of silver particles and its application for surface enhanced Raman scattering with near-infrared excitation. *Materials Research Bulletin*. 2014, roč. 50, s. 63–67. ISSN 00255408.
- [41] MAŠEK, V. (Masarykova Univerzita v Brně). Charakterizace aduktů platinových komplexů na DNA duplexech pomocí Ramanovy spektroskopie. 2011, s. 1–32.