

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



*Magnetické nanokompozity využitelné jako vysoce účinné sensory
fyziologických procesů s možným diagnostickým nebo terapeutickým
dopadem.*

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Zuzana Chaloupková

Školitel: prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.

Olomouc 2018

Prohlášení

Základem předložené disertační práce jsou realizované výzkumné studie, jejichž výsledky byly publikovány v impaktované odborné literatuře (A-C).

Prohlašuji, že jsem disertační práci s názvem Magnetické nanokompozity jako vysoce účinné sensory fyziologických procesů s možným diagnostickým nebo terapeutickým dopadem sepsala samostatně pod vedením vedoucího práce prof. RNDr. Radka Zbořila, Ph.D. a konzultanta RNDr. Václava Rance, Ph.D. s využitím literárních zdrojů, které jsou citovány.

Prohlašuji, že mám autorský přínos v následujících publikacích, které tvoří základ této disertační práce:

- A) Chaloupková; Z., Balzerová; A., Medříková; Z., Srovnal; J., Hajdúch; M., Čépě; K., Ranc; V., Zbořil; R.: Label-free determination and multiplex analysis of DNA and RNA in tumor tissues, *Applied Materials Today* **2018**, 12, 85-91.
- B) Chaloupková; Z., Balzerová; A., Bařínková; 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.
- C) Ranc; V., Žiřka; R., Chaloupková; Z., Ševčík; J.: Imaging of growth factors on a human tooth root canal by surface Enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, v rešeržním řízení

V Olomouci dne 23.8.2018

.....
Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Radku Zbořilovi, Ph.D. za podporu během doktorského studia. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost a cenné rady během celého průběhu mého doktorského studia. Mé díky patří také Mariánu Hajdúchovi, M.D., Ph.D. za poskytnutí vzorků obsahujících DNA a RNA rakovinných tkání. Současně bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za spolupráci na publikaci zabývající se stanovením GCPII. Mgr. Kláře Čépe, Ph.D., Mgr. Janě Stráské a Mgr. Ondřeji Tomancovi děkuji za pořízení obrazových záznamů pomocí elektronových mikroskopů. Velké díky patří současným i bývalým spolupracovníkům z Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů a Katedry fyzikální chemie za pomoc a rady během mého doktorského studia. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mému příteli za podporu, kterou mi po celou dobu studia poskytoval.

Anotace

**Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého v Olomouci**

Student: **Mgr. Zuzana Chaloupková**

Titul: **Magnetické nanokompozity využitelné jako vysoce účinné sensory fyziologických procesů s možným diagnostickým nebo terapeutickým dopadem**

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.**

Spoluřešitel: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Počet stran: 121

Počet příloh: 3

Rok: 2018

Teoretická část disertační práce je zaměřena na popis Ramanovy spektroskopie, zejména SERS (povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii). Popisuje praktické využití metody SERS, především metodu SERS jako nástroj pro analýzu biopolymerů. Experimentální část se věnuje studiu biologických systémů pomocí nanokompozitu obsahujícího nanočástice stříbra s následnou detekcí metodou MA-SERS (magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie).

Klíčová slova: SERS, MA-SERS, nanočástice, biopolymery

Annotation

**Department of Physical Chemistry, Faculty of Science,
Palacký University Olomouc**

Student: Mgr. Zuzana Chaloupková

Title: **Magnetic nanocomposites applicable as highly effective sensors of physiological processes with possible diagnostic or therapeutic impact**

Supervisor: **prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.**

Co-supervisor: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Number of pages: 121

Number of attachments: 3

Year: 2018

The theoretical part of the dissertation is focused on the description of Raman spectroscopy, especially SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy). It describes the practical use of the SERS method, especially the SERS method as a tool for analyzing biopolymers. The experimental part deals with the study of biological systems using a nanocomposite containing silver nanoparticles, followed by detection by MA-SERS (magnetically assisted surface-enhanced Raman spectroscopy).

Key words: SERS, MA-SERS, nanoparticles, biopolymers

Obsah

Úvod	8
Teoretická část	9
1. Ramanova spektroskopie.....	10
1.1. Historie	10
1.2. Princip Ramanovy spektroskopie.....	11
1.3. Instrumentace Ramanova spektrometru.....	13
1.4. Interpretace spekter v Ramanově spektroskopii.....	15
1.5. Významné typy Ramanovy spektroskopie – RRS, SERS, SERRS	17
1.6. Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie.....	19
1.7. Aplikace Ramanovy spektroskopie.....	20
2. SERS - Surface Enhanced Raman Spectroscopy.....	21
2.1. Mechanismus SERS.....	21
2.2. SERS substráty.....	22
2.3. Praktické využití metody SERS.....	25
3. SERS jako nástroj analýzy biopolymerů.....	27
3.1. Detekce nukleových kyselin (DNA, RNA).....	28
3.2. Přímé metody detekce proteinů	29
3.3. Detekce proteinů ve vodných roztocích	30
3.4. Nepřímé metody detekce proteinů.....	31
Cíle disertační práce	33
Experimentální část	34
4.1. Chemikálie.....	35
4.2. Příprava nanočástic stříbra.....	35
4.3. Syntéza nanokompozitů	36
4.3.1. Syntéza Fe ₃ O ₄ @Ag nanokompozitu pro analýzu DNA/RNA.....	36
4.3.2. Syntéza Fe ₃ O ₄ @Anti-GCPII@Ag nanokompozitu ke stanovení GCPII.....	36
4.3.3. Syntéza Fe ₃ O ₄ @ Ag nanokompozitu pro analýzu růstových faktorů	37
4.4. Příprava inhibitoru a funkcionalizace nanomateriálu.....	38
4.4.1. Syntéza nízkomolekulárního GCP II inhibitoru k analýze GCPII	38

4.4.2. Funkcionalizace Fe ₃ O ₄ @Ag nanokompozitu pro analýzu DNA/RNA	39
4.4.3. Funkcionalizace nanomateriálu pro stanovení růstových faktorů	40
4.5. Příprava vzorků	41
4.5.1. Příprava vzorků RNA a DNA z rakovinných tkání	41
4.5.2. Příprava standardního roztoku GCPII	42
4.5.3. Příprava vzorků z plné krve k analýze GCPII	42
4.5.4. Příprava vzorků obsahujících GCPII	42
4.5.5. Příprava vzorků k analýze růstových faktorů	43
4.5.6. Ošetření vzorků zubní tkáně za použití EDTA	43
4.5.7. Úprava vzorků pro analýzu růstových faktorů za použití nanomateriálu	44
4.5.8. Značení vzorků zubní tkáně protilátkami pro Ramanovu spektroskopii	44
4.6. Analýza vzorků	44
4.6.1. Multiplexní analýza standardních a reálných vzorků obsahujících DNA/RNA	44
4.6.2. Analýza standardních a reálných vzorků obsahujících GCPII	45
4.6.3. Analýza růstových faktorů na povrchu dentinu	46
4.7. Přístrojové vybavení	46
Výsledky a diskuze	47
5.1. „Label-free“ determinace a multiplexní stanovení DNA a RNA v rakovinných tkáních	48
5.2. „Label-free“ stanovení PSMA v krvi v nanomolárním množství za použití MA-SERS	55
5.3. Povrchová analýza růstových faktorů lidského zubního kořenového kanálu pomocí MA-SERS	62
Závěr	69
Summary	71
Seznam zkratk	73
Použitá literatura	75
Přílohy	84
A. Applied Materials Today	85
B. Analytica Chimica Acta	93
C. Analytical and Bioanalytical Chemistry	102

Úvod

Ramanova spektroskopie je vibrační metodou, která je využívána k identifikaci látek, při určování jejich struktury a složení. Své uplatnění si našla zejména pro jednoduchost při přípravě vzorku, přesnost a rychlost měření. Mezi hlavní výhody této metody patří skutečnost, že se jedná o metodu nedestruktivní. Ramanova spektroskopie se používá k analýze plyných látek, kapalin i pevných látek, a lze pomocí ní analyzovat také povrchy (různé sorbenty či senzory) či biologické systémy (biomolekuly až organismy). Citlivost Ramanovy spektroskopie je poměrně omezená, avšak pomocí SERS – povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie jen možné snížit mez detekce až o několik řádů a získat tak informace o analyzovaném vzorku.

Předložená experimentální část disertační práce se zabývá studiem biologických systémů (DNA, RNA, proteinů a růstových faktorů) pomocí nanokompozitu na bázi nanočástic stříbra. Tento nanokompozit je následně funkcionalizovaný, čímž je zajištěna potřebná imobilizace cílových biopolymerů. Nanokompozit stříbra je využit pro jeho schopnost výrazně přispět k zesílení Ramanova signálu. V experimentální části této disertační práce byl použit magnetický nanokompozit obsahující nanočástice stříbra, jedná se tedy o MA-SERS – magneticky asistovanou povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii. Díky aplikaci magnetického nanokompozitu je možné ze složité biologické matrice specificky selektovat požadovaný analyt a podrobit ho následné analýze pomocí Ramanovy spektroskopie.

Závěr této disertační práce je věnován diskuzi týkající se dvou prvoautorských publikací a jedné spoluautorské, zaměřených na multiplexní stanovení DNA/RNA, „label-free“ stanovení GCPII pomocí MA-SERS a využití metody MA-SERS k analýze růstových faktorů na povrchu dentinu.

Teoretická část

1. Ramanova spektroskopie

1.1. Historie

Ramanova spektroskopie je metoda molekulové vibrační spektroskopie založená na neelastickém rozptylu monochromatického záření. Poprvé byl neelastický rozptyl zdokumentován C. V. Ramanem a jeho spolupracovníkem K. S. Krishnanem v roce 1928 (1), kteří provedli analýzu nejjednodušší biologické molekuly – H₂O a pozorovali jev neelastického optického rozptylu (2). C. V. Raman měl k dispozici pouze hrubou instrumentaci. Ve svém experimentu použil jako zdroj záření světlo, sběr paprsků umožnil dalekohled a musel spoléhat pouze na své oči, které využil jako detektor. Dva roky po tomto objevu obdržel C. V. Raman (Obr.1) za svoji práci Nobelovu cenu a spektroskopie začala nést jeho jméno. Dnes je Ramanova spektroskopie důležitým nástrojem používaným při analýze látek v mnoha oborech zahrnující chemii, biologii, lékařství, farmacii a mnoho dalších.



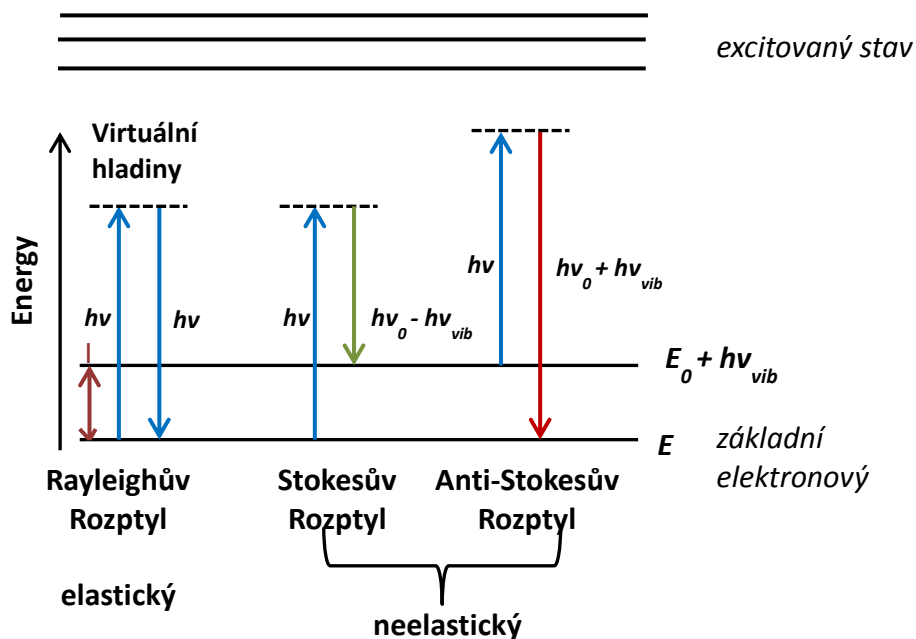
Obr. 1: Sir Chandrasekhara Venkata Raman (3) (*7.11.1888 - †21.11.1970)

1.2. *Princip Ramanovy spektroskopie*

Základním principem Ramanovy spektroskopie je měření rozptýleného záření vznikajícího interakcí monochromatického záření v UV-VIS a NIR oblasti s molekulami vzorku, při níž dochází ke změně jejich rotačních a vibračních stavů (4). Zdrojem záření je laser sloužící jako excitační zdroj, který ozařuje molekuly vzorku. Fotony reagující se vzorkem mohou vzorkem projít, být absorbovány nebo rozptýleny. Nejčastěji laser excituje elektron v základním stavu do virtuálního stavu. Při návratu elektronu do základního stavu dochází k vyzáření fotonu se stejnou vlnovou délkou jako původní foton a molekulám vzorku není předána žádná energie. Vzniká tak Rayleighův rozptyl (Obr.2). Rayleighův rozptyl patří mezi elastický rozptyl světla a týká se $1:10^4$ fotonů. V běžné praxi je odfiltrován pomocí tzv. Rayleighových filtrů (5).

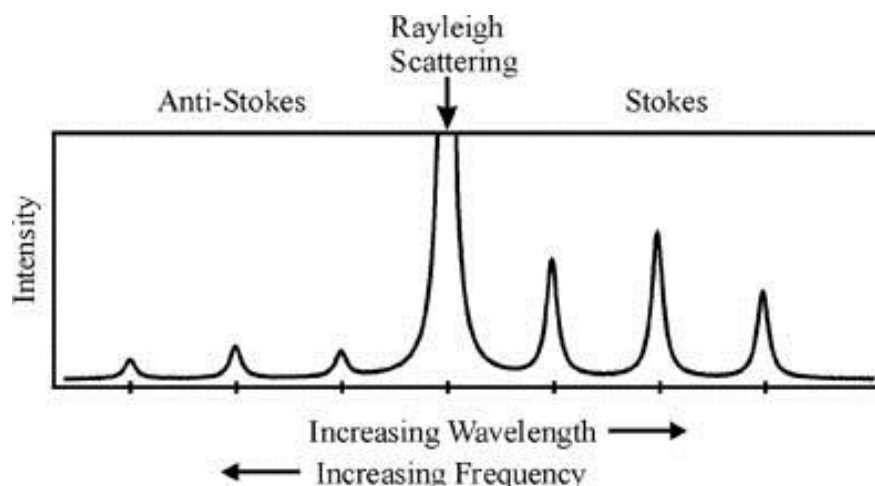
Fotony mohou být rozptýleny také neelasticky ($1:10^8$ fotonů). Na tomto jevu je založena Ramanova spektroskopie (6), tedy na neelastických srážkách molekul vzorku s fotony excitujícího záření (Stokesův a Anti-Stokesův rozptyl). Pokud se elektron po excitaci do virtuálního stavu vrátí do vyšší kvantové hladiny, než ze které byl elektron vyražen, vyzáří se foton s větší vlnovou délkou a vzniká tzv. Stokesův rozptyl (Obr.2). Pokud se elektron původně nenacházel v základním stavu, ale po návratu z vyšší hladiny na základní hladinu dochází k vyzáření fotonu o menší vlnové délce a pozorujeme tzv. Anti-Stokesův rozptyl (7).

Důležitou podmínkou vzniku Ramanova rozptylu je změna polarizovatelnosti studované molekuly (8). Jedná se o schopnost, kdy vlivem působení elektrického pole dochází k posunutí náboje v molekule a vzniká tak indukovaný dipól. Změna polarizovatelnosti tedy vede k deformaci orbitalů v důsledku interakce fotonů s elektronovými oblaky vazeb v molekule (9). Polarizovatelnost vykazují zejména nepolární části molekuly, zatímco polární jsou zřídka polarizovatelné. V Ramanově spektru jsou tedy vidět velice intenzivní pásy nepolárních vazeb, v důsledku výrazné změny polarizovatelnosti při vibraci.



Obr. 2: Schéma energetických přechodů v Ramanově spektroskopii.

Anti-Stokesův rozptyl vzniká s menší pravděpodobností než Stokesův a je nutnost odfiltrovat Rayleighovy linie, jelikož intenzita těchto linií je až 10^{12} vyšší. Proto se v praxi téměř výhradně měří spektra Stokesova rozptylu (Obr.3). Anti-Stokesova spektra lze využít v případě, kdy vlivem záření pozorujeme vysokou fluorescenci vzorku, která Stokesovu oblast zakryje (10).



Obr.3 : Stokesovy a anti-Stokesovy linie (11).

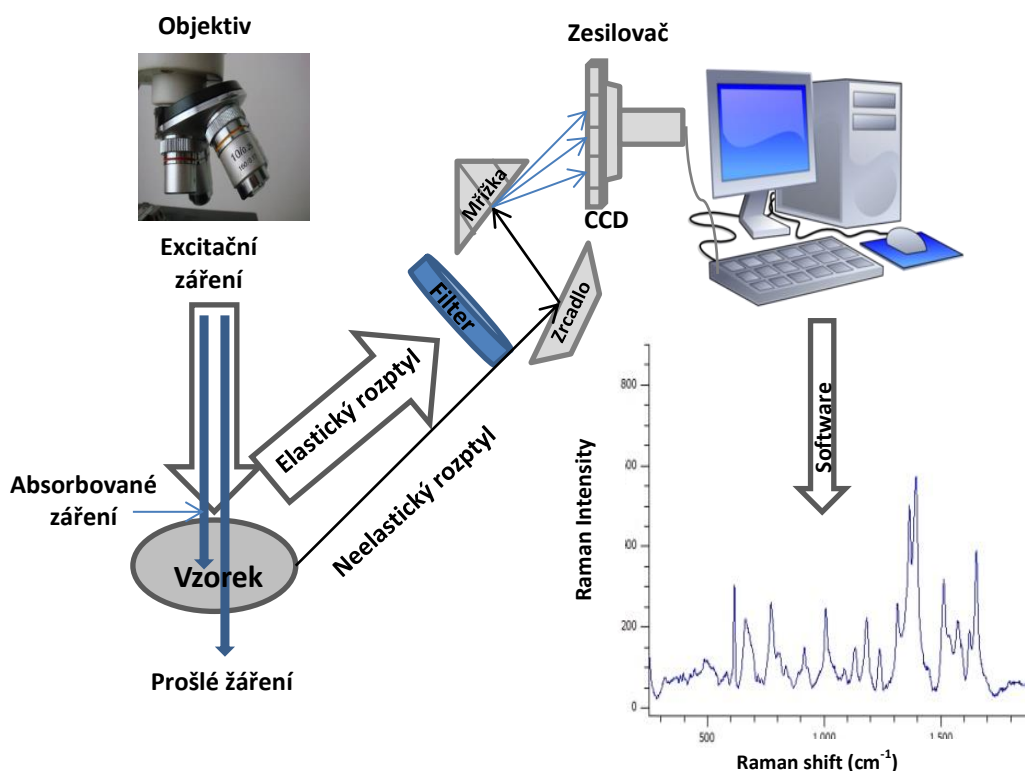
1.3. Instrumentace Ramanova spektrometru

Ramanovy spektrofotometry můžeme obecně rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří disperzní spektrofotometry založené na rozkladu světla pomocí hranolu či disperzní mřížky. Druhou skupinu tvoří spektrofotometry s interferometry, kde pro získání klasického spektrálního záznamu musíme použít Fourierovu transformaci, proto se tyto spektrofotometry označují také jako FT-spektrometry (12). V případě FT-spektrometrů je jako zdroj záření použit laser s excitačním zářením v blízké IČ oblasti. Hlavními součástmi Ramanova spektrofotometru jsou obecně zdroj monochromatického záření, monochromátor a detektor (Obr.4). Výstupem měření je získané Ramanovo spektrum, kde na ose y je vynesena intenzita záření a na ose x Ramanský posun.

Dříve se jako zdroj záření používaly rtuťové výbojky, ty byly později nahrazeny lasery poskytujícími intenzivní a stabilní paprsek záření. Existuje celá řada využitelných laserů, například argonový laser (457 - 488 nm), He-Ne laser (633 nm) nebo Nd-YAG laser pro NIR oblast (1064) (11). Další součástí Ramanova

spektrometru jsou monochromátory. Z rozptýleného záření je nutné nejprve odfiltrvat Reylichův rozptyl, který nesmí převýšit intenzitu Ramanova signálu. K tomu se běžně používají interferenční filtry, avšak v důsledku použití těchto filtrů dochází k odstranění spektrálního rozsahu $\pm 100 \text{ cm}^{-1}$ od frekvence laseru (13). Nežádoucí Reylichovo záření lze také eliminovat použitím monochromátorů s dvojitou nebo trojitou monochromací. Kvalitnější přístroje obvykle umožňují měřit spektra blíže k excitační linii a to až k hodnotě pouhých 10 cm^{-1} pomocí holografické optiky nebo zlepšených dielektrických filtrů (12).

Používané termoelektricky chlazené fotonásobiče, které sloužily jako detektory, byly nahrazeny tzv. CCD detektory pro disperzní spektrofotometry (14). Ramanova spektroskopie umožňuje měřit vzorky v pevném, kapalném i plynném skupenství. Důležitou vlastností je možnost přesného polohování vůči paprsku a sběrné optice rozptýleného záření a přístroje obsahující mikroskop (tzv. microRaman) jsou vybaveny x-y-z polohovacím zařízením (15). Tyto spektrometry jsou využívány zejména pro analýzu povrchů a jejich mapování (16). Základním předpokladem pro přesnou analýzu je vzdálenost vzorku od sběrné optiky. Rozptýlené záření musí být optimálně soustředěno na vstupní aperturu Ramanova spektrometru v případě Ramanova spektrometru s Fourierovou transformací či na vstupní šterbinu disperzního Ramanova spektrometru (13). Velkou výhodou Ramanovy spektroskopie je minimální zacházení se vzorkem a jeho příprava pro analýzu. Typické příslušenství zahrnuje držáky kyvet, držáky pevných látek či svorky pro nepravidelné pevné předměty (17).



Obr.4: Obecné schéma uspořádání Ramanova spektrofotometru

1.4. Interpretace spekter v Ramanově spektroskopii

Ramanova spektra umožňují získat informace o rotačně-vibračních pohybech polyatomických částic, přičemž frekvence normálních vibračních módů závisí na hmotnostech zúčastněných atomů, geometrickém uspořádání a na síle vazeb mezi nimi. Intenzita naměřených pásů odpovídá druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračních pohybů molekuly. Komplementární metodou k Ramanově spektroskopii je infračervená spektroskopie, např. symetrická vibrace bude silná v Ramanově spektru, zatímco v IR spektru bude slabá, naproti tomu karboxylové a karbonylové skupiny vykazují intenzivní absorpce jak v Ramanově tak v IR spektroskopii (12). V případě Ramanovy spektroskopie hrají významnou roli při určování pásů dostupná literatura a

praxe pracovníka obsluhujícího přístroj. Pokud tato dvě kritéria splníme, získáme podstatné informace o struktuře analyzované látky.

Jak už bylo uvedeno výše, intenzita pásů v Ramanových spektrech souvisí se změnou polarizovatelnosti. Intenzivnější jsou pásy pro symetrické vibrace, než pro vibrace antisymetrické. Obzvlášť intenzivní jsou pásy vícenásobných symetrických vazeb, například $-C=C-$, $-N=N-$) (18). Pro interpretaci spekter a objasnění molekulární struktury se využívají dva způsoby. Prvním je použití teorie skupin, která je založená na matematických výpočtech forem a frekvencí molekulárních vibrací. Druhá teorie se opírá o použití empirických charakteristických frekvencí pro funkční skupiny. Mnoho empirických skupin frekvencí bylo vysvětleno a zdokonalováno pomocí matematického teoretického přístupu, což přispělo ke zvýšení spolehlivosti interpretace spekter (19).

V Ramanově spektroskopii jsou aktivní valenční vibrace většiny anorganických molekul, deformační vibrace organických molekul (δHCH , δCCH , δCOH) a některé valenční vibrace organických molekul ($\nu C-C$, $\nu C-O$). Velký význam hrají charakteristické vibrace, kdy poloha spektrálních pásů funkčních skupin je relativně málo závislá na zbytku molekuly, a proto je možné jejich vlnočty tabelovat (20). Spektrální pásy, které se nacházejí v oblasti $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. $-OH$, $C=O$, $N-H$, CH aj.). Pásy nacházející se v oblasti $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ se nazývají oblastmi „otisku palce“ (z ang. fingerprint region) (21).

Nejčastějším rozpouštědlem využívaným v Ramanově spektroskopii je voda, jejíž typické vibrace lze nalézt v rozmezí $3760-1605 \text{ cm}^{-1}$, jmenovitě $3760-3580 \text{ cm}^{-1}$ pro asymetrickou vibraci O-H skupiny, $3640-3500 \text{ cm}^{-1}$ symetrická valenční vibrace O-H skupiny a $1640-1605 \text{ cm}^{-1}$ deformační vibrace O-H skupiny. Primární aminy poskytují v Ramanově spektru následující pásy: $3550-3280 \text{ cm}^{-1}$ asymetrická valenční vibrace $-NH_2$ skupiny, $3450-3160 \text{ cm}^{-1}$ pro symetrickou valenční vibraci $-NH_2$, $1650-1580 \text{ cm}^{-1}$ deformační vibrace NH_2 , $1360-1240 \text{ cm}^{-1}$ valenční vibrace $-CN$ a $1190-1170 \text{ cm}^{-1}$ kolébavá vibrace $-NH_2$. Sekundární aminy můžeme nalézt při vlnových délkách $3500-1180 \text{ cm}^{-1}$, kde pásy umístěné v rozmezí $3500-3300 \text{ cm}^{-1}$ vznikají v důsledku valenční

vibrace -NH skupiny, $1580\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ deformační vibrace -NH , $1360\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ valenční vibrace -CN a $1280\text{-}1180$ patří valenční vibraci $\text{-C}_R\text{N}$.

Při Ramanově spektroskopii, používané ke stanovení proteinů, je důležitá přítomnost spektrálních pásů značící amidy (Amid I, II, III v primární i sekundární struktuře proteinů). Jedná se o pásy umístěné při $1690\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ v případě primárních amidů ($1690\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ valenční vibrace C=O značící přítomnost amidu I, $1640\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ deformační vibrace -NH_2 pro amid II a $1420\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ valenční vibrace vazby -CN pro amid III) a $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ pro sekundární amidy ($1700\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ zobrazuje valenční vibraci C=O náležící amidu I, $1570\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$ deformační vibraci -NH amidu II, $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ valenční vibrace -CN amidu III).

1.5. Významné typy Ramanovy spektroskopie – RRS, SERS, SERRS

Citlivost Ramanovy spektroskopie je relativně omezená, zejména pokud jde o studium biologicky aktivních látek. I přes moderní instrumentace, umožňující měření velmi malých objemů vzorků, je nutné při analýze disponovat relativně vysokými koncentracemi vzorku (22). Existuje několik typů Ramanovy spektroskopie, které nám umožňují snížit mez detekce až o několik řádů a získat tak specifické informace o analyzovaném vzorku. V následujících kapitolách bude představena rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS) (23), povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) (12), povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (SERRS) (24) a hrotem zesílený Ramanův rozptyl (TERS) (25). Metodě SERS bude věnována pozornost v kapitole 2, jakožto hlavnímu nástroji používanému v detekci proteinů a nukleových kyselin v experimentální části této disertační práce.

RRS je založena na rezonančním Ramanově rozptylu. Ten nastává, jestliže frekvence použitého excitačního laseru odpovídá frekvenci záření potřebného na přechod elektronu ve zkoumané molekule do excitovaného stavu a dochází k rezonanci. Nejvyšší intenzita rezonančního Ramanova signálu nastane tehdy, pokud se frekvence

dopadajícího záření rovná frekvenci záření potřebného na přechod do prvního nebo druhého excitovaného stavu (26). Intenzita pásů pocházejících z části molekuly, kde došlo k přechodu, zesílí 3 až 6x. Největší zesílení je možné pozorovat na chromoforech, které absorbují dopadající záření běžně používaných laserů (532 nm a 633nm). Toho lze využít zejména v biologii, jelikož chromofory se často vyskytují v aktivních místech aromatických aminokyselin, biomolekul a bází nukleových kyselin (27). Ramanova rezonanční spektroskopie skýtá také nevýhodu, kterou je vysoká fluorescence a možná fotodegradace vzorku v důsledku působení vyšší energie excitačního laserového záření (28).

Principem povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie je zvýšení intenzity Ramanova rozptylu způsobené silnou interakcí analyzovaného vzorku absorbovaného na kovový povrch. Signál molekuly se může pomocí SERS zvýšit řádově až o 10^{14} - 10^{15} a je možné studovat vzorky s velmi malou koncentrací. Intenzita rozptýleného i dopadajícího záření se zesiluje v důsledku rezonanční excitaci povrchových plazmonů v kovu (29). Nejčastěji jsou využívány zlaté, stříbrné a měděné nanočástice. Použití SERS je velmi široké od mikrobiologie, toxikologie, chemie až po lékařství a forenzní vědy (30).

Povrchově zesílení rezonanční Ramanova spektroskopie pomáhá při interpretaci spekter, kde může docházet k zastínění pásů v důsledku chemické interakce s povrchem kovu při SERS. Oproti konvenční Ramanově spektroskopii dochází při SERS k zvýšení intenzity signálů až o 10^{14} - 10^{15} (30).

Hrotem zesílený Ramanův rozptyl je metodou vycházející ze SERS a je spojená se skenovací tunelovací mikroskopií (STM) nebo s mikroskopií atomových sil (AFM) (31). TERS tak umožňuje, jako jedna z mála metod, získání významného prostorového rozlišení a zároveň velmi lokalizované informace v podobě vibračního spektra (32). Principem metody je fokusace laserového paprsku na kovový hrot, na jehož konci dochází k plazmonové rezonanci. Hrot se nachází v bezprostřední blízkosti vzorku a v malé oblasti pod ním se selektivně budí Ramanův signál (31).

1.6. *Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie*

Technika Ramanovy spektroskopie má mnoho výhod. Jde o techniku vibrační spektroskopie a spektrum poskytuje komplementární informace o molekulární struktuře k běžně používané metodě IR. Při měření vzorku pomocí Ramanovy spektroskopie není potřeba starost o tloušťku vzorku ani o příspěvek okolní atmosféry, tudíž není nutné měření ve vakuu, atmosféře suchého vzduchu nebo dusíku (33). Ramanova spektroskopie umožňuje měření vzorku v širokém rozsahu vlnočtů dovolující v jednom měření obsáhnout střední i vzdálenou infračervenou oblast vlnočtů příslušných vibračních módů (34).

Velkou výhodou Ramanovy spektroskopie oproti jiným metodám je časově nenáročná a nedestruktivní možnost analýzy vzorku. U vybraných přístrojů je možné testovat vzorky přímo v obalu, ve kterém se nachází (sklo, plast atd.). Při raných stádiích vývoje různých materiálů je obvykle k dispozici jen velmi malé množství vzorku v řádu několika mg. Ramanova spektroskopie umožňuje analyzovat velmi malé množství vzorku a připouští tak detekci vzorků o velmi malé koncentraci (35). Při měření vodných roztoků nedochází k ovlivnění spektra analyzované látky přítomností molekul vody, vzhledem k malému až zanedbatelnému Ramanovu rozptylu této molekuly. Pomocí Ramanovy spektroskopie lze pozorovat i malé změny v orientaci analyzovaného materiálu. Jak už bylo výše zmíněno, časová nenáročnost patří mezi hlavní výhody této metody a umožňuje i studium kinetiky reakcí. Flexibilita optického uspořádání umožňuje použití Ramanovy spektroskopie v různých instrumentálních konfiguracích.

Mezi hlavní nevýhody využití Ramanovy spektroskopie patří pořizovací náklady na vybavení, které jsou překážkou pro širší přijetí této spektroskopie při rutinních analýzách vzorku. Nevýhodou je také vysoká přítomnost fluorescence pozorována při analýze některých vzorků (způsobená například nečistotami ve vzorku). Tento problém se ve většině případů vyřeší použitím laseru o vlnové délce blízké se NIR. Pokud je použita vysoká excitace, můžeme vzorek tepelně rozložit (4).

1.7. Aplikace Ramanovy spektroskopie

Ramanovu spektroskopii lze využít například v potravinářství jako nástroj kontroly kvality potravin (36). Dalším možným uplatněním je ověřování pravosti uměleckých předmětů v archeologii (37). V poslední době se Ramanova spektroskopie dostává do popředí zejména v oblasti nanotechnologií – analýza uhlíkových nanotrubic, biologií a lékařství – stanovení markerů rakoviny pomocí SERS nebo farmacii – detekce padělků léčiv (38).

Bell *et al.* použil Ramanovu spektroskopii k profilování tablet extáze vedoucí k rozlišení tablet připravených různými výrobci a možnosti označit nezákonně syntetizované tablety (39). Vei *et al.* využil Ramanovu spektroskopii jako slibnou metodu pro rychlou detekci a identifikaci některých padělaných léčiv (40). Ramanova spektroskopie je využívána i jako nástroj pro kriminalistickou analýzu. Za zmínku stojí rychlá identifikace kokainu, heroinu, výše zmíněné extáze a dalších analogů těchto užívaných drog (41).

Jelikož je Ramanova spektroskopie metodou nedestruktivní a nevyžaduje předúpravu vzorku, stala se důležitým nástrojem při povrchové analýze uměleckých děl, zejména při identifikaci použitých pigmentů. Charakterizace pigmentů na uměleckých objektech poskytuje informace o použité technice při konstrukci, autentizaci a může pomoci k určení vhodných postupů pro budoucí restaurování (42). Tato možnost byla využita například při analýze pigmentů ve starých rukopisech (43), starověkého skla (44) či keramiky (45).

Důležitou biologickou aplikací Ramanovy spektroskopie je rozlišení nádorových buněk od normální zdravé tkáně a detekce prekancerózních buněk. Kast *et al.* ukázala na možnost diferenciaci maligních nádorů z prsní tkáně detekce časných neoplastických změn u myši za použití Ramanovy spektroskopie (46). Jess *et al.* poukázala na možnost Ramanovy spektroskopie stát se užitečným nástrojem pro včasnou detekci buněk vystavených lidskému papilomaviru (HPV). Infekce HPV může přispět k rozvoji neoplazie děložního čípku, a proto je včasná detekce velice důležitá (47).

V posledních letech hraje Ramanova spektroskopie důležitou roli při studiu a charakterizaci grafenových materiálů, jmenovitě pyrolytického grafitu (48), uhlíkových vláken, skelného uhlíku, fullerenů (49), uhlíkových nanotrubiček (50) a grafenu (51). Ramanova spektroskopie nám u těchto materiálů podává informace o velikosti krystalů, hybridizaci a přítomnosti nečistot, hustotě, defektech a o počtu grafenových vrstev.

2. SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Jak už bylo zmíněno výše, nejdůležitějším předpokladem metody SERS je přítomnost molekul na nebo blízko povrchu kovového substrátu. Přenos molekul z objemu na povrch je opakující se téma a také problém v praktickém využití techniky SERS (52). Zesílení signálu je zajištěno rezonancí plazmonu v kovovém substrátu, nejčastěji se jedná o nanočástice v roztoku, substráty vyrobené litografií a v neposlední řadě běžně dostupné komerční substráty, díky nimž se aplikace SERS dostává i mimo výzkumné laboratoře zásluhou dosažitelnosti technologie (29).

Během necelých 40 let od objevu SERS pokročila technika od modelových studií pyridinu na zdrsňené stříbrné elektrodě až po nejmodernější nanosenzory. Široký zájem o techniku SERS vzrostl zejména v uplynulém desetiletí díky rozvoji spektroskopické instrumentace, nanotechnologií a novým detekčním schémátům a SERS získal možnost stát se výkonným analytickým nástrojem (53).

2.1. Mechanismus SERS

Práce popisující účinek SERS zastávaly názor, že SERS vzniká především v důsledku elektromagnetického zesílení, které je spojeno s excitací intenzivního a ostře lokalizovaného povrchového plazmonu, interakcí elektromagnetického záření s nanočásticemi kovu. Avšak SERS je primárně chemický (v poslední době i biochemický) nástroj, jehož původ vyžaduje hlubokou znalost fyziky, především

optické odezvy materiálů (54). Neelastické záření dopadající na nanočástice kovu je zesíleno v důsledku Mieova rozptylu a velikost faktoru zesílení, který je dán nárůstem Ramanova signálu oproti signálu měřeného za standardních podmínek, je základem techniky SERS.

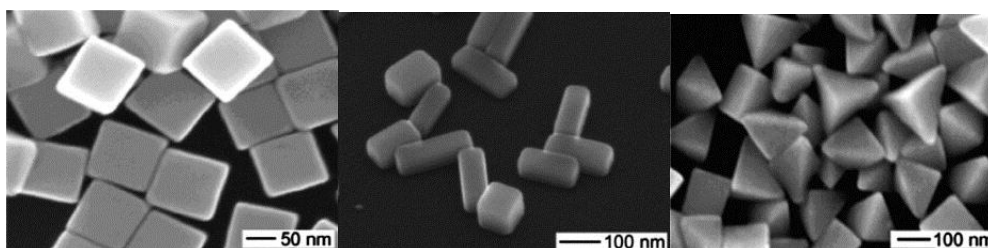
Elektromagnetický mechanismus je zodpovědný za největší příspěvek k celkovému faktoru zesílení. Optickým buzením povrchových plazmonů lokalizovaných na nanočásticích kovů vzniká silné elektromagnetické pole. Po absorpci záření vhodné vlnové délky dochází k rozkmitání vodivostních elektronů částici za vzniku oscilujícího dipólu, který emituje záření o intenzitě úměrné druhé mocnině velikosti tohoto dipólu. Intenzita záření je závislá na vzdálenosti molekuly a povrchu nanočástice (55). Zesílení Ramanova signálu můžeme ovlivnit vhodnou vlnovou délkou excitačního záření, velikostí a morfologií SERS substrátu nebo fyzikálními vlastnostmi.

2.2. SERS substráty

Jak už bylo zmíněno, nejdůležitějším aspektem provedení experimentu technikou SERS je volba vhodného substrátu (syntéza substrátu ušlechtilých kovů). Vzhledem k tomu, že intenzita SERS je závislá na LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance - lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance) je důležité zachovat všechny faktory pro maximalizaci síly signálu a zajištění reprodukovatelnosti. Mezi tyto faktory patří velikost, tvar, mezičásticové rozestupy nebo dielektrické prostředí. Tradiční substráty pro SERS poskytují požadované optické vlastnosti (56). Dnes jsou nejběžnější používané aktivní substráty SERS zařazeny do čtyř obecných kategorií: kovové nanočástice v suspenzi, kovové nanočástice imobilizované na pevných substrátech, nanostruktury vyrobené přímo na pevných substrátech nanolitografií a v neposlední řadě komerčně dostupné substráty, připravené jedním z výše uvedených postupů (57).

Kovové nanočástice v suspenzi mohou být připraveny chemickými nebo fyzikálními metodami. Jednou z běžně užívaných fyzikálních metod je pulzní laserová

ablace ušlechtilých kovů v kapalném médiu (58). Vznikají vysoce stabilních nanočástic Ag, Au nebo Cu, které neobsahují žádné organické nečistoty. Velikost těchto nanočástic je závislá na čase ozařování laserem a pH kapalného média. Obrázky z transmisní elektronové mikroskopie ukázaly, že takto připravené nanočástice jsou téměř sférické (59). Chemická syntéza aktivních nanočástic pro SERS je založena na redukci stříbrných nebo zlatých iontů v roztoku, za použití redukčních činidel jako je hydrazin, citrát sodný či hydroxylamin (60). Velikost nanočástic je v případě chemické metody řízena koncentrací redukčního činidla (Obr. 5). Silnější redukční činidla, například borohydrid, vytváří menší nanočástice, zatímco slabší redukční činidla, mezi které patří citrát sodný, dávají vzniknout větším nanočásticím (61).



Obr. 5: SEM snímky nanočástic stříbra různých tvarů a velikostí, v závislosti na způsobu přípravy (62, 63).

Důležitým faktorem, přispívající ke zvýšení intenzity signálu SERS, je tvar syntetizovaných nanočástic. Tvar kovových nanočástic v suspenzi lze regulovat přidáním povrchově aktivních látek během syntézy. Tyto látky mají za následek změnu povrchové energie a umožňují kontrolu agregace nanočástic. V závislosti na vybraném surfaktantu a materiálu, ze kterého jsou nanočástice syntetizovány, lze získat širokou škálu tvarů nanočástic (64, 65).

Další kategorií aktivních SERS substrátů jsou kovové nanočástice imobilizované na pevných substrátech. Základním požadavkem sférických kovových nanočástic je agregace pro zvýšení velikosti SERS efektu. Toho je dosaženo za pomoci imobilizace

nanočástic na pevné substráty. Jednou z možných metod je chemické ukotvení Ag nebo Au nanočástic na křemenném povrchu, kdy velikost takto připravených nanočástic je v rozmezí 40-100 nm (66). Substráty pro SERS mohou být také připraveny na papírových (67) nebo na hliníkových filtrech (68). Jeden ze způsobů přípravy SERS substrátů na papírovém filtru je založen na zlatém koloidu rozptýleném v isopropylalkoholu a následném vytisknutí koloidu pomocí inkoustové tiskárny (67). Hliníkové filtry jsou založeny na keramických membránách obsahujících oxid hlinitý. Tyto membrány mají jednotnou kapilární strukturu pór, jsou tuhé a Ramanovo spektrum nevykazuje žádné nespecifické interakce (69). Jedním z přístupů při výrobě hliníkových filtrů je vakuované potahování těchto filtrů stříbrem. Oxid hlinitý si i po potažení stříbrem zachoval své filtrační schopnosti a mohl tak být použit pro předkoncentraci zředěných analytů na povrch substrátu pro měření pomocí SERS (68).

Jako substráty SERS byly využity i tzv. sol-gelové fólie dopované zlatem či stříbrem (70, 71). Částice zlata či stříbra zachycené v sol-gelové matici jsou mnohem stabilnější než zlaté a stříbrné koloidní suspenze. Další výhodou při používání pórovité sol-gelové matrice na bázi oxidu křemičitého, je afinita této matrice k mnoha organickým i anorganickým molekulám.

Vysoce uspořádané kovové nanostrukturní soustavy pro SERS mohou být vyrobeny pomocí nanolitografie jak bylo zmíněno výše. Takto vyrobené SERS substráty disponují velkou plochou, homogenním signálem i chemickou stabilitou (72). Metoda nanosférové litografie (NLS) je nenákladná a vysoce výkonná. Může být použita pro syntézu dobře uspořádaných 2D částic pro SERS (73). Pro výrobu substrátu byly použity také techniky elektronové paprskové litografie (74). Primární výhodou této techniky oproti jiným technikám používaných k syntéze substrátů pro SERS, je možnost tvorby vlastních vzorů s rozlišením pod 10 nm. Tato schopnost je při výrobě SERS substrátu velice důležitá vzhledem k tomu, že lokalizované povrchové plazmony zodpovědné za SERS efekt, jsou závislé zejména na velikosti, tvaru a uspořádání nanostruktur (75).

Posledním typem výše zmíněných substrátů jsou komerčně dostupné substráty. Za účelem použití většiny těchto komerčních substrátů je na aktivní povrch SERS napipetován malý objem vzorku (typicky 10-15 μl). Real-time analyzátoři patří mezi první firmy nabízející SERS-aktivní substráty (53). Jedním z jejich prvních výrobků byly 2 ml skleněné lahvičky, jejichž vnitřek byl potažen SERS-aktivním sol-gelem. Pro použití byl do injekční lahvičky vstříknut roztok obsahující požadovanou chemickou látku, který byla umístěna analyzována Ramanovým spektrometrem pro získání spektra. Analyzátoři v reálném čase také nabízejí Ag nebo Au sol-gelové substráty v kapilárních zkumavkách a na 96 jamkových mikroděstičkách. Kapilární zkumavky Ag/Au byly použity například na zjištění kokainu v slinách (76).

Sigma-Aldrich nabízí komerční zlaté nanočástice pokryté vrstvou oxidu křemičitého o průměru 5, 10 a 20 nm. Křemičitý obal nanočástic zlata se provádí za použití tetraethylorthokřemičitanu (TEOS) za vzniku vysoce rozvětveného a mezoporézního polymeru na povrchu zlata. Výsledný siloxanový polymer nebo oxid křemičitý na povrchu má hydroxylové skupiny, které mohou být použity jako chemické kotvy pro další funkcionalizaci (53). V dnešní době existuje celá řada připravených komerčních substrátů a záleží jen na uživateli, jaký substrát zvolí s ohledem na cílovou aplikaci.

2.3. *Praktické využití metody SERS*

Weaver *et. al.* vyvinuly jedinečný přístup pro studium heterogenní katalýzy na jiných, než běžně používaných kovech. Technika je založena na pokrývání povrchů nekovových substrátů běžně používanými kovy pro SERS (77). Tyto substráty poskytují katalytickou aktivitu podkladové vrstvy při zachování SERS aktivity krycí vrstvy. Systémy zkoumané s těmito substráty zahrnují oxidaci metanolu na rhodiu a paladiu a elektrooxidaci kyseliny mravenčí na kovy platinové skupiny. Podobné substráty zkoumali také Fokas a Deckert. Jejich výsledky ukazují schopnost sledovat jednotlivé katalyticky aktivní nanočástice za reaktivních podmínek (78). SERS poskytuje kromě

vysoké citlivosti také informační vibrační spektrum jakožto ideální nástroj pro charakterizaci reaktivních meziproductů, které se účastní heterogenních reakcí.

SERS poskytuje velký potenciál pro citlivou a selektivní identifikaci biologických či chemických látek. Úzké a dobře rozpoznatelné pásy umožňují simultánní detekci více analytů a díky nízkému signálu molekul vody, lze jednoduše zkoumat i biologické vzorky. Nedávno byla metoda SERS aplikována jako signál-transdukční mechanismus v prototypu snímače glukózy. Van Duyne *et al.* upravili zdrsňený stříbrný povrch hydrofilní dělicí vrstvou a usnadnili tak předkoncentraci glukózy a malých molekulových analytů v zóně zvýšení elektromagnetického pole SERS. Glukóza tak byla detekována a kvantifikována s přesností blížíící se požadavkům biomedicínských přístrojů (79).

SERS byl také použit při detekci stopového množství chemických bojových látek. Jako substrát byla použita stříbrná nanovlákná (Langmuir-Blodgett), která byla následně použita pro detekci 2,4-dinitrotoulenu, nejčastějšího chemického indikátoru vykopaných nášlapných min a výbušnin s citlivostí 0,7 pg (80). V obou výše uvedených postupech detekce glukózy a 2,4-dinitrotoulenu bylo detekováno spektrum SERS cílové molekuly přímo. V nedávné době se začaly používat Ramanovy značky pro následné stanovení zkoumaných látek.

Vo-Dinh *et al.* použili Ramanovy značky k identifikaci rakovinných genů, čímž se zabránilo zavádění nežádoucích radioaktivních DNA sond. V této práci byla představena metoda založená na SERS-aktivním substrátu připojeném k jednovlákné (ss) DNA sondě nesoucí sekvenci z genu pro BRCA1 nebo genu BAX kódující protein, který je zodpovědná za regulaci apoptózy (81). DNA sondy nesoucí SERS-aktivní barviva byly inkubovány se substrátem modifikovaným zachycovacími sondami. Pokud značená sonda obsahovala sekvenci komplementární k zachycovací sondě, byla hybridizace úspěšná a výsledkem byl intenzivní SERS signál. Mirkin *et al.* ve svém experimentu použili ssDNA spolu se zlatými nanočásticemi a značkou SERS za účelem

detekce hybridizace v DNA. Vyvinutý substrát byl následně použit pro multiplexní detekci k odlišení hepatitidy A, hepatitidy B, HIV, Eboly, neštovic a Antraxu s detekčním limitem 20 fM (82).

SERS slouží také jako nástroj pro detekci léků. Suspenze nanočástic stříbra, připravené za použití chemických metod, byly použity například při detekci tramadolu. Alhabri *et al.* detekovali tramadol v umělé moči pomocí SERS a výše zmíněných nanočástic stříbra a dosáhli limitu detekce, který byl srovnatelný k hladinám zjištěných u jedinců používajících tramadol k úlevě od bolesti (83). Mabbott *et al.* za pomoci SERS a stříbrných nanočástic stanovili lék MDAI (syntetický derivát amfetaminu), který je považován za zakázanou látku. Pomocí SERS bylo dosaženo limitu detekce až 8 ppm (84).

3. SERS jako nástroj analýzy biopolymerů

Detekce proteinů pomocí SERS je významná zejména v lékařství. Proteiny jsou základní složkou organismů a podílejí se na důležitých procesech probíhajících v buňkách. S vývojem proteomiky je stále důležitější objevovat vysoce efektivní metody detekce proteinů. Ramanova spektra proteinů a nukleových kyselin se skládají z četných diskrétních pásem, které slouží jako citlivý a selektivní otisk prstu trojrozměrné struktury, intermolekulárních interakcí a dynamiky. Ramanova spektroskopie nese význam zejména při studiu detailních strukturálních parametrů virů, stanovení selektivní DNA a bílkovinných zbytků v nukleoproteinových komplexech či metod pro pochopení mechanismu proteinů (85).

Většina biologických metod s sebou nese nevýhody, mezi které patří časová náročnost, spotřeba velkého množství materiálu spojeného s malým výtěžkem produktu (86). Detekce proteinů pomocí SERS mají výhodu zejména oproti metodám založených na fluorescenci v oblasti citlivosti a možnosti multiplexní analýzy (87). Studie

biomolekul pomocí SERS prokázaly velký potenciál metody při identifikaci proteinů a detekce interakcí protein-ligand (88).

Současně používané metody založené na SERS lze na základě cíle detekce proteinů rozdělit na dva typy – SERS pomocí Ramanovského značení (nepřímá metoda) a SERS bez použití značek (přímá metoda). Pokud se zaměříme na metodu detekce proteinů bez použití značek, jedná se o přímou adsorpci proteinů na substrátech aktivních v SERS a jejich následnou analýzu pomocí Ramanovy spektroskopie. Například hemoproteiny (Cytochrom c, myoglobin a hemoglobin) byly velmi dobře charakterizovány pomocí SERS (89). Při nepřímé detekci jsou proteiny stanovovány pomocí SERS značek, které jsou spojeny se sondou. Obvykle jsou používány kovové (zlaté, stříbrné) nanočástice s různými značkami (Cy3, Cy5, MBA, RhB atd.) (90).

Vzhledem k rozsáhlému využívání SERS zejména v přírodních vědách nelze stručně popsat všechny možnosti, které SERS skýtá. V následujících podkapitolách se zaměřím na nejvýznamnější aplikace této metody kladoucích důraz na jejich výhody, zajímavé aplikace a vyvrácení mylných představ, které s touto metodou souvisí (91).

3.1. Detekce nukleových kyselin (DNA, RNA)

Přesná a selektivní analýza nukleových kyselin a jejich strukturních vlastností je předmětem zájmu v souvislosti s rostoucím počtem diagnostických vyšetření. Analyzované vzorky jsou složité a obvykle poskytují celou řadu interferencí včetně lipidů a bílkovin a je tedy důležité zajistit selektivitu metody vůči molekulárním cílům (92). Analýza celkového obsahu DNA je založena na spektrofotometrických přístupech a méně často využívá separační techniky kombinované s UV/VIS spektroskopií, hmotnostní spektroskopií (93) nebo imunotesty (94).

Problém s dosažitelnými limity detekce, náklady a přesností analýzy může vyřešit právě metoda SERS, která se stává slibným nástrojem detekce nukleových kyselin. Wang *et al.* popisoval využití metody SERS k detekci vlásenkové DNA

způsobující mutace, vedoucí k hluchotě (95). Metoda je založena na selektivní interakci sondy DNA imobilizované na substrátu SERS a DNA, která je obsažena ve vzorku. Tato metoda byla již dříve popsána Zhangem *et al.* a dosažené limity detekce se pohybovaly v rozsahu femtomolů na litr (96). V nedávné době byl SERS použit při detekci viru HPAI (97), specifických DNA mutací (98), respiračních infekcí či detekci K-ras genu (99). Ou *et al.* detekoval celkový obsah DNA v nosohltanových karcinogenních buňkách za pomoci stříbrných nanočástic (100). SERS byl také využit pro identifikaci a kvantifikaci čtyř různých cytosinových modifikací v jedno i dvouřetězové DNA (101). Yuanfeng *et al.* vyvinul mi-RNA biosenzor s použitím $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ magnetického nanokompozitu sloužícího jako SERS substrát (102). I přes vysokou specifickou výše zmíněných metod zůstávají postupy založené na povrchu zesílené Ramanově spektroskopii celkového obsahu nukleových kyselin stále náročné.

3.2. Přímé metody detekce proteinů

Jak už bylo řečeno dříve, přímé stanovení proteinů je založeno na detekci proteinů bez použití značek adsorpcí proteinů na aktivní SERS substráty. Proteiny, které obsahují pouze aminokyseliny, jsou označovány jako jednoduché proteiny. Konjugované proteiny jsou tvořeny bílkovinou a protetickou složkou připojenou kovalentně nebo slabými interakcemi s apoproteinem (103). Při studování jednoduchých proteinů metodou SERS jsou prvotní studie zaměřeny na zkoumání způsobů adsorpce aminokyselinových zbytků nebo preferovaných adsorpčních skupin (karboxylových nebo aminoskupin) na kovový povrch (104). SERS spektra jednoduchých proteinů měřená různými výzkumnými skupinami se značně liší v důsledku přítomnosti aminokyselin v blízkosti kovového povrchu a denaturace proteinů, která je způsobena právě interakcí mezi proteiny a kovovými nanočásticemi (105).

Mezi nejčastěji detekované konjugované proteiny patří hemoproteiny a na rozdíl od jednoduchých proteinů je jednodušší získaná SERS spektra analyzovat. Orientace

molekuly na nanočástici, mechanismus přenosu elektronů či detekce jednotlivých molekul jsou významně zkoumány na cytochromu c (106, 107). Nedávná studie publikována Feng *et al.* popsala charakterizaci přirozené struktury myoglobinu pomocí SERS za použití flow-cytometru (108) Směs proteinů nebo tkání je obvykle oddělena elektroforézou a poté je pomocí elektroblottingu přenesena na imobilizující membrány (Western blot) pro následnou identifikaci jednotlivých nebo specifických tříd proteinů pomocí imunochemických detekčních metod (109). Xiao *et al.* vyvinul nový analytický postup pro detekci bílkovin pomocí přímé metody označený jako West-Sern SERS (110). Tato metoda je složena z proteinové elektroforézy, Western blotu, použití koloidního stříbra a následné detekce pomocí SERS. Výhodou metody je možnost detekce více proteinů na jedné membráně.

3.3. Detekce proteinů ve vodných roztocích

Již bylo zmíněno, že je velice obtížné získat reprodukovatelná SERS spektra zvláště u proteinů bez chromoforů, vzhledem k nereprodukovatelným substrátům SERS a odlišné orientaci analytů na kovovém povrchu. Žádná předchozí studie proteinů založená na SERS neumožnila rutinní detekci proteinů bez značení s vysokou citlivostí za použití vodného roztoku. Halogenidové ionty, které se běžně využívají jako agregační činidla, mohou tvořit silně vázanou povrchovou vrstvu, která působí proti adsorpci proteinů (111). Xiao *et al.* se zaměřil na použití okyseleného sulfátu jako agregačního činidla, které se využívá k zředění cílových proteinů před SERS měřením (88). Slabé navázání SO_4^{2-} dává vzniknout mnohem silnějšímu signálu SERS v důsledku vysokého rozpustného produktu síranu stříbrného (112). Nadbytečné kationty H^+ hrají také významnou roli při podmínkách s nízkým pH (nižším než u většiny proteinů) nesou všechny cílové proteiny čistě pozitivní náboje a díky přítomnosti H^+ kationtů dochází k snadné adsorpci na stříbrný povrch nanočástice se zápornými elektrostatickými interakcemi (110).

Vložením cílových proteinů s pozitivním nábojem mezi stříbrné nanočástice umožňuje získat také vibrační informace celých proteinů zobrazené v SERS

s významnou reprodukovatelností. Detekce proteinů bez značení tedy kombinuje jednoduchost, rychlost, citlivost a reprodukovatelnost s velkým potenciálem při praktické detekci těchto proteinů.

3.4. Nepřímé metody detekce proteinů

Nepřímé stanovení proteinů se opírá o použití značek viditelných v Ramanově spektru. Ramanovo značení je velice užitečné pro detekci biosenzorů s vysokou citlivostí (113). Kovové nanočástice jsou přímo spojeny s nepřímým stanovením proteinů a staly se oblíbenými zejména v imuno-assays metodách založených na SERS (30). SERS signál bývá v některých imunometodách zvýšen pomocí stříbrných kationtů redukovaných na zlatých sondách (114). Ačkoliv tyto kovové sondy mají velké výhody, mezi které patří citlivost a vysoká selektivita, složitý postup pro syntézu může omezit jejich použití při detekci vysokovýkonných proteinů. Navíc vazebná místa cílových analytů na jejich ligandy (nejčastěji ty, které obsahují sulfhydrylové skupiny) mohou být zničeny kovovými nanočásticemi (115).

Jak je známo, v enzymovém imunoabsorpčním testu (ELISA test) působí enzym jako zesilovač a cílové proteiny jsou nepřímo detekovány za použití chemiluminiscence z produktů enzymaticky katalyzované reakce (116). Tato metoda nepatří mezi jednoduché a dochází k výrazné spotřebě reagensů. Xiao *et al.* spojil výhody pevných nosičů ELISA a vysoké citlivosti SERS. Je možné stanovit cílové antigeny pomocí fingerprintů SERS molekul a FITC (fluorescein-isothiokyanát), které jsou přímo připojeny k protilátkám a nedochází k nadbytečnému plýtvání reagensy (110).

Proteinové čipy s všestrannými aplikacemi hrají důležitou roli v proteomických studiích. Účelem je rychle snížit aktivitu daného proteinu proti mnoha cílům současně (117). Postupy založené na SERS pro detekci interakcí protein-ligand, kde se těží z výhod fluorescence, jsou popsány v mnoha studiích. Pravděpodobně některé fluorescenční značky, které jsou velmi blízké nanočásticím stříbra, jsou rozloženy

fluorescenčně, zatímco jiné, relativně vzdálené od stříbrných povrchů vzhledem k trojrozměrné struktuře bílkovin, jsou posíleny různě (118). Avšak značnou nevýhodou je nízká fotostabilita fluorescenčních značek používaných k detekci interakcí ligand-protein.

Jak už bylo zmíněno výše, SERS spektra analytu z Ag substrátů jsou náchylné ke změnám z důvodu odlišné orientace na kovových površích nebo konformačních změn z důvodu intermolekulárních interakcí. Pro reprodukovatelnost analýzy proteinů byly vytvořeny kovové sendvičové substráty přemostěné proteiny. Sandwichová struktura vzniká na základě techniky vrstva-vrstva (LbL) (119). Ve studii Carney *et al.* byla první zlatá monovrstva připravena samo-sestavováním nanočástic zlata na skleněném sklíčku pokrytém PDDA. Sandwichová struktura poté vznikla interakcí mezi proteiny ve střední vrstvě a kovovými nanočásticemi ve dvou kovových vrstvách (120).

Mnoho SERS studií prokázalo, že spektrum ze zlatých substrátů je mnohem stabilnější než u stříbrných substrátů, zatímco průměrná schopnost zesílení nanočástic zlata je mnohem slabší než u stříbrných substrátů (121). Nejvýznamnějším znakem této metody ve srovnání s jinými metodami založenými na SERS pro detekci proteinů je skutečnost, že monovrstvá nanočástice zlata se používá pro zachytávání bílkovin a výrobu substrátu SERS s druhou stříbrnou vrstvou, čímž se navrhovaný sendvičový substrát přístupnější a citlivější než jiné metody SERS založené na zlatě a více reprodukovatelné než jiné měření SERS na bázi stříbra (110).

Cíle práce

Cílem předložené disertační práce je využití magnetických nanokompozitů jako účinných sensorů s možným diagnostickým nebo terapeutickým dopadem.

Pro splnění záměru disertační práce lze cíle práce rozdělit do následujících bodů:

- vývoj nanokompozitu pro MA-SERS
- vývoj metod pro analýzu fyziologicky zajímavých látek
- vývoj metod pro Ramanské zobrazování rozložení proteinů pomocí MA-SERS
- testování vybraných metod na reálných vzorcích

Experimentální část

4.1. Chemikálie

Dusičnan stříbrný (p.a.- LMW), chitosan (75-85% deacetylovaný), chlorid železnatý tetrahydrát (p.a.), chlorid železitý hexahydrát (p.a.), N-hydroxysulfosuccimide sodná sůl (> 98%), chlorambucil, sodná sůl karoxylmethyl celulózy (nízká viskozita), heptahydrát síranu železnatého (>=99%), hydroxid amonný (28.0-30.0 %), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylkarbodiimid methiodid (>=99%), Cy3 mAb Kit, Cy5, Cy7 mAb Kit, D-(+)-maltóza monohydrát, amoniak (25%) (p.a.), sulfát železnatý heptahydrát (>=99%), N,N'-dimethylformamid (>=99%), TBTU, methyl alkohol (> 99,8%), hydroxid paladnatý (20% w/t), trichloroctová kyselina (>=99%) byly zakoupeny ze Sigma Aldrich a použity bez dalšího čištění. H₃PO₄ (p.a., 85% w/w) a NaOH (p.a.) byly zakoupeny z Lach-Ner. Kyselina octová (99,8 %) a methanol (p.a.) byly zakoupeny v P-LAB (Česká republika). RNA Later solution (Qiagen, Valencia, CA, USA). TRI činidlo (Molecular Research Center, Cincinnati, Oh, USA). Z-PEG₁₂-COOH byl zakoupen z IRIS Biotech. Protilátky, jmenovitě anti-TGF-B1, anti-BMP-2 a anti-bFGF, byly zakoupeny od společnosti Abcam (Spojené království).

4.2. Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připraveny redukcí [Ag (NH₃)₂]⁺ komplexu D-maltosou podle protokolu Panáček *et.al* (122). Dusičnan stříbrný a maltóza byly rozpuštěny v destilované vodě o počáteční koncentraci 1 mmol a 10 mmol, koncentrace amoniaku byla 5 mmol. Po smíchání všech komponent bylo pH reakčního systému upraveno na 11,5 ± 0,1 přidáním hydroxidu sodného, který zahájil redukční proces. Reakce byla ukončena po 4 minutách a byla získána téměř monodisperzní suspenze nanočástic stříbra s maltózou o průměrné velikosti částic cca 28 nm.

4.3. Syntéza nanokompozitů

V následujících kapitolách jsou shrnuty postupy syntézy jednotlivých nanokompozitů, které jsou použity v publikacích.

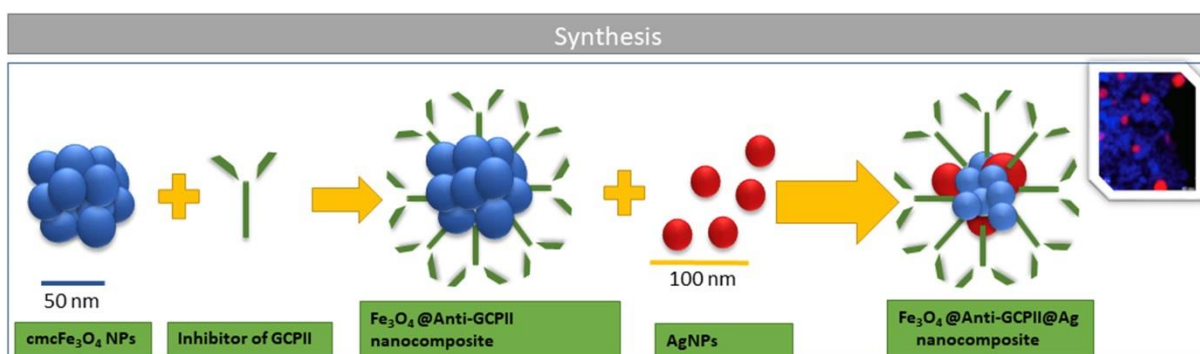
4.3.1. Syntéza $Fe_3O_4@Ag$ nanokompozitu pro analýzu DNA/RNA

Magnetické nanočástice byly syntetizovány za použití Massartovi koprecipitační metody popsané již dříve Markovou *et. al* (123). Koprecipitace byla provedena ve vodném roztoku obsahujícím $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ a $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$ s použitím hydroxidu sodného ($c = 1,5 \text{ mol} \cdot L^{-1}$), který byl přidán po kapkách pro dosažení pH 11. Reakce probíhala při pokojové teplotě a inertní atmosféře dosažené konstantním přebubláváním dusíku, zabraňujícím další oxidaci železitých iontů. Produkt byl po jedné hodině míchání promyt vodou a oddělen magnetickou dekantací. Výsledné nanočástice byly použity pro přípravu nanokompozitu magnetit-O-karboxylmethylchitosanu. Nanokompozit byl nejprve funkcionalizován -COOH skupinou pomocí chitosanu za použití metody popsané Shi *et al.* (124). Absorpce polymeru na povrch takto připravených nanočástic byla indukována postupným zvyšováním teploty na 80°C. V posledním kroku byl do nanokompozitu přidán dusičnan stříbrný pro redukci iontů stříbra na povrch nanokompozitu. Redukce probíhala za teploty 80°C a alkalických podmínek. Výsledný produkt byl opakovaně promyt deionizovanou vodou a separován magnetickou dekantací. Výsledná disperze byla před dalším zpracováním desetkrát zředěna.

4.3.2. Syntéza $Fe_3O_4@Anti-GCPII@Ag$ nanokompozitu ke stanovení GCPII

Nanočástice magnetitu byly nejprve stabilizovány za použití karboxylmethylcelulózy ($cmcFe_3O_4$) podle protokolu, který popsal Bakandritsos *et.al* (125). Smícháním CMC a $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ byl vytvořen vodný komplex. Poté byl ke směsi přidán NH_4OH (28%) a suspenze byla zahřáta na 50°C do vzniku magnetického

koloidu. Vzorek byl následně centrifugován a supernatant obsahující zbytky chemických látek byl z reakce odstraněn a nahrazen vodou, poté byl vzorek sonikován. Funkcionalizace nanomateriálu je schématicky popsána na Obr. 4.3.2.1., kde 75 μl cmcFe_3O_4 (obsahující 250 μg nanomateriálu) bylo aktivováno 5 μl EDC (aktivace karboxylových skupin). Po 15 minutách bylo přidáno 10 μg inhibitoru GCPII a celkový objem byl upraven na 250 μl . Imobilizace inhibitoru byla provedena přes noc. Vzniklý komplex byl poté centrifugován (20000 rpm) pro odstranění volného inhibitoru. V posledním kroku bylo do směsi přidáno 10 μl nanočástic stříbra pro imobilizaci stříbra na povrch připraveného nanokompozitu a roztok byl míchán 15 minut za pokojové teploty.



Obr. 4.3.2.1: Obecné schéma popisující přípravu a následnou funkcionalizaci nanomateriálu (126).

4.3.3. Syntéza $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ag}$ nanokompozitu pro analýzu růstových faktorů

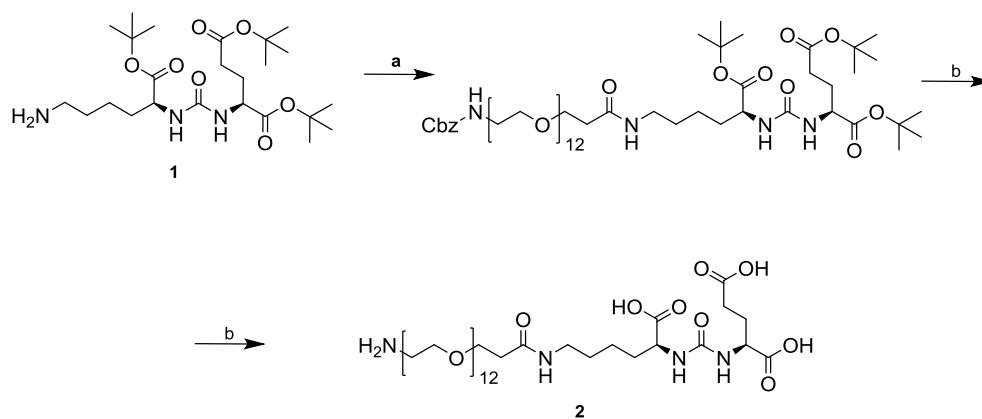
Na přípravu $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ag}$ magnetického nanokompozitu byl použit protokol popsany Bakandritsosem *et.al* (125). Postup je podrobně rozepsán v kapitole 4.3.2.

4.4. Příprava inhibitoru a funkcionalizace nanomateriálu

V níže uvedených kapitolách jsou popsány jednotlivé postupy využité k přípravě inhibitoru pro stanovení PSMA a funkcionalizaci nanomateriálu použitých v části Výsledky a diskuze.

4.4.1. Syntéza nízkomolekulárního GCP II inhibitoru k analýze GCPII

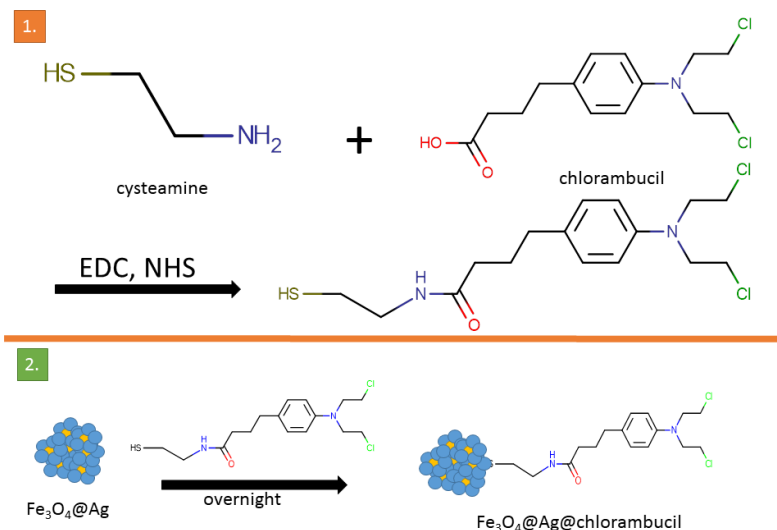
První složka inibitoru byla připravena pomocí protokolu Murelli *et al.* (127). Druhá složka byla syntetizována podle Obr. 4.4.1.1. a skládá se z 1-amino-39,47-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxa-40,46,48-triazafenpentakontan-45,49,51 trikarboxylové kyseliny - 511 mg (0,68 mmol, 1,1 ekvivalentu) Z-PEG12-COOH (IRIS Biotech), který byl rozpuštěn v 1,5 ml DMF a bylo přidáno 297 mg (0,775 mmol, 1,25 ekv.) TBTU spolu se 150 μ l DIEA (0,87 mmol, 1,4 ekv.). Reakce probíhala přes noc a směs byla následně odpařena do sucha. Surový produkt byl rozpuštěn v MeOH a ochranná skupina Cbz byla odstraněna hydrogenací (1,1 atm) spolu s Pd(OH)₂, který působil jako katalyzátor. Získaný produkt byl dále filtrován a rozpouštědlo bylo odstraněno na rotační odparce. Dále byl k jedné třetině produktu přidán 1 ml TFA a reakční směs byla střídavě sonikována a míchána po dobu 15 min. Nadbytek TFA byl odstraněn proudem dusíku a produkt byl pomocí HPLC (gradient 2-30% ACN, 60 min.) přičemž bylo získáno 131 mg produktu (izolovaný výtěžek 60%). Zásobní roztok druhé složky byl připraven rozpuštěním 40 μ g inhibitoru v 1 ml deionizované vody.



Obr. 4.4.1.1: Syntéza Anti-GCPII (druhá složka). a) Z-PEG12-COOH, TBTU, DIEA, DMF; b) 1) H₂, Pd(OH)₂, MeOH; 2) TFA (126).

4.4.2. Funkcionalizace Fe₃O₄@Ag nanokompozitu pro analýzu DNA/RNA

Imobilizace chlorambucilu na povrch Fe₃O₄@Ag nanokompozitu byla provedena za použití cysteaminu, který plnil funkci spojovací molekuly (Obr. 4.4.2.1.). Imobilizace byla dosažena následujícím způsobem: I) 1 mg chlorambucilu byl zcela rozpuštěn v 1 ml vodného roztoku obsahujícího 2,4% NH₄OH. II) poté bylo přidáno 100 μl vodného roztoku EDC (c = 50 mmol · L⁻¹) a NHS (c = 50 mmol · L⁻¹), směs byla intenzivně míchána 60 minut při pokojové teplotě. III) Dále bylo přidáno 100 μl cysteaminu (konečná koncentrace 100 mmol · L⁻¹) a směs byla míchána dalších 20 minut. IV) 20 μl výsledného produktu bylo smícháno s 20 μl disperze předem připraveného nanokompozitu. Reakce probíhala po dobu 60 minut za pokojové teploty. Připravený vzorek byl před použitím míchán 3 minuty.



Obr. 4.4.2.1.: Schéma přípravy a následné funkcionalizace magnetického nanokompozitu za použití cysteaminu jako „spojovací“ molekuly (128).

4.4.3. Funkcionalizace nanomateriálu pro stanovení růstových faktorů v dentinu

Připravený nanomateriál byl funkcionalizován protilátkami, označenými pomocí Ramanových značek za použití EDC a NHS. 75 μl magnetického nanokompozitu bylo aktivováno s použitím 15 μl EDC (1mM) po dobu 60 minut. Dále bylo ke směsi přidáno 15 μl NHS (1mM) a příslušné Raman-značené protilátky (50 mM) a reakce probíhala přes noc. Výsledný produkt byl magneticky separován a třikrát promyt destilovanou vodou.

4.5. Příprava vzorků

4.5.1. Příprava vzorků RNA a DNA z rakovinných tkání

Celková RNA byla získána z 10 různých rakovinných tkání (fixovaných v roztoku RNA Later - Qiagen, Valencia, CA, USA) bezprostředně po biopsii a uchovávána při -20°C do následné izolace RNA. Stručně, malý kus nádorové tkáně (30-50 mg) byl homogenizován v 1 ml činidla TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) za použití tří skleněných kuliček o průměru 3 mm. Homogenizace byla prováděna po dobu 2 min. při 30 Hz v homogenizátoru MixerMill 301 (Retsch, Haan, Německo) před purifikací RNA. Celková RNA byla extrahována z homogenátů nádorových tkání v souladu s pokyny výrobce. Pro extrakci bylo použito 0,2 ml chloroformu a k lyzátu bylo přidáno TRI. Po centrifugaci a fázové separaci byla horní vodná fáze obsahující RNA přenesena do nové zkumavky a RNA byla vysrážena přidáním 0,5 ml isopropanolu do zkumavky. RNA byla poté promyta dvakrát etanolem a rozpuštěna ve vodě ošetřené DEPT.

DNA byla purifikována ze 14 biopsií čerstvě zmraženého mozkového nádoru za použití soupravy na přípravu vzorků DNA Cobas (Roche, Basel, Švýcarsko) podle pokynů výrobce. Vzorky nádorové tkáně byly lyzovány proteázou K. Následně byl přidán isopropanol a DNA byla odstředěna pomocí filtru ze skleněných vláken. Koncentrace a čistota nukleových kyselin byla určena pomocí Nanodrop ND 1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA).

4.5.2. Příprava standardního roztoku GCPII

Extracelulární část GCPII (aminokyseliny 44-750 s AviTag na N-konci) byly produkovány v S2 buňkách hmyzu; purifikovány na matrici streptavidinového muteinu. Následně proběhla dialýza oproti 20 mM MOPS, 20 mM NaCl, pH 7,4 a produkt byl uchován při -80°C. Čistota byla stanovena na > 95% za použití dodecylsulfátu sodného a polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDSPAGE). Výsledná koncentrace purifikovaného proteinu byla 0,24 mg/ml (vypočtena ze stanovení aminokyselin po hydrolýze). Roztok obsahující 10 ng/ml izolovaného proteinu byl připraven zředěním zásobního roztoku fosfátovým pufrém (pH=7,2) a poté byl rozdělen na deset alikvótních dílů, které byly uchovány při -20°C.

4.5.3. Příprava vzorků z plné krve k analýze GCPII

Studie se zúčastnilo 5 zdravých dobrovolníků ve věku od 50-71 let (5 mužů, 0 žen). Vzorky plné krve byly odebrány do 2 ml eppendorfových zkumavek s přidaným citrátem působícím jako antikoagulační činidlo a byly uchovány při -80°C. Pro experiment byly vzorky plné krve zředěny v poměru 200 μ l krve a 800 μ l vody (celkový objem vzorku 1 ml). Vzorek nebyl podroben žádné další úpravě. Zředění vzorku je důležité zejména pro snížení celkové hustoty vzorku a viskozity nezbytné pro následnou magnetickou izolaci GCPII ze vzorku.

4.5.4. Příprava vzorků obsahujících GCPII

Pro analýzu GCPII za použití Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanokompozitu byl použit následující postup: nejprve bylo smícháno 10 μ l Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanokompozitu s 10 μ l standardního roztoku GCPII ($c = 10$ ng/ml) a vzniklá směs byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě. Produkt byl následně magneticky oddělen,

třikrát promyt deionizovanou vodou a analyzován pomocí MA-SERS. Spektra byla získána na 9 místech a byla zprůměrována.

4.5.5. Příprava vzorků k analýze růstových faktorů

Bylo získáno pět nezkažených a nezralých premolárů od pacientů, u kterých byla z ortodontických důvodů provedena extrakce. Rodiče poskytly písemný souhlas s dalším používání extrahovaných premolárů. Dále bylo získáno schválení Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity palackého (NV-1808-00328). Zuby byly po extrakci promyty fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl, B. Braun Medical, Melsungen, Německo), a poté byly uloženy v roztoku anorganických solí (1,5 mmol/L CaCl₂, 1,0 mmol/L KH₂PO₄ a 50,0 mmol/L NaCl) a okamžitě přepravy k následné analýze.

4.5.6. Ošetření vzorků zubní tkáně za použití EDTA

Po radiologickém vyšetření potvrzujícím přítomnost pouze jednoho kořenového kanálu byly zuby segmentovány čepelí s vodorovným ostřím za chlazení vodou. Tímto způsobem byly získány 4 vzorky z jednoho extrahovaného zubu s intaktním povrchem kořenového kanálu. Vzorky byly náhodně rozděleny do čtyř skupin – negativní kontrolní skupina, pozitivní kontrolní skupina a dvě experimentální skupiny s různou časovou expozicí 17% EDTA. Povrch kořenového kanálu v negativní kontrolní skupině byl vyhlazen za pomoci diamantového ostří (FGSL H. 1. 316. 010, Komet USA, Rock Hill, USA). V pozitivní kontrolní skupině byl vzorek promyt fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl, B. Braun Medical, Melsungen, Německo). V experimentálních skupinách byl povrch kořenového kanálu propláchnut 17% EDTA po dobu 5 a 20 minut a následně opláchnut fyziologickým roztokem.

4.5.7. Úprava vzorků pro analýzu růstových faktorů za použití nanomateriálu

Každý vzorek byl ponořen do 1 ml roztoku obsahujícího 100 μ l funkcionalizovaného materiálu, jmenovitě Ag@Anti-TGF- β 1@Cy3, Ag@Anti-BMP-2@Cy5 a Ag@Anti-bFGF@Cy7 a byl ponechán v tomto roztoku po dobu 20 minut. Po ukončení reakce byl vzorek promyt vodou pro odstranění nenavázaného nanomateriálu.

4.5.8. Značení vzorků zubní tkáně protilátkami pro Ramanovu spektroskopii

Protilátky, jmenovitě anti-TGF- β 1, anti-BMP-2 a anti-bFGF, byly značeny za použití sady značení obsahující reaktivní fluorescenční barviva Cy3, Cy5 a Cy7, vazebný pufr (1M pufr uhličitanu sodného, pH 9,3). Anti-TGF- β 1 protein byl značen značkou Cy3, anti-BMP-2 pomocí Cy5 značky a anti-bFGF Cy7 značkou. Označené proteiny byly purifikovány za použití odstředivých filtračních jednotek (Amicon Ultra 0,5 ml, MWCO 3 kDa) při 10 000 rpm po dobu 10 minut, pro oddělení nadbytku volné značky

4.6. Analýza vzorků

V následujících podkapitolách jsou uvedeny postupy použité při analýze vzorků. Výsledky jsou více diskutovány v kapitole 5.

4.6.1. Multiplexní analýza standardních a reálných vzorků obsahujících DNA/RNA

Syntetizovaný Fe₃O₄@Ag@chlorambucil nanokompozit byl použit k multiplexní analýze DNA/RNA v standardních a reálných vzorcích za využití Ramanovy spektroskopie. Reálné vzorky DNA a RNA byly připraveny podle postupu popsáném v kapitole 4.5.1. Připravený Fe₃O₄@Ag@chlorambucil nanokompozit byl nejprve použit k analýze standardního vodného roztoku DNA ($c=100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$). V dalším

kroku bylo stanoveno množství RNA v reálném vzorku nádorové tkáně pomocí $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}$ nanokompozitu. Pro vyloučení vlivu alkylačního činidla na analytickou informaci byla srovnána výsledná spektra RNA s dříve získanými daty standardních vzorků RNA.

Pro rozlišení DNA a RNA ve vzorcích byly připraveny standardní roztoky obsahující obě zmíněné kyseliny o koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ pro minimalizaci vlivu koncentračního účinku. Spektrální data naznačují schopnost spektrální diferenciace nukleových kyselin dané rozdílem spekter zejména v spektrálním rozmezí $500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ a pro následnou diferenciaci DNA a RNA byly vybrány dva spektrální pásy (850 cm^{-1} pro analýzu RNA a 764 cm^{-1} pro analýzu DNA).

4.6.2. *Analýza standardních a reálných vzorků obsahujících GCPII*

Připravený $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Anti-GCPII}@\text{Ag}$ nanokompozit slouží k magnetické separaci GCPII od komplexního biologického vzorku a k následné detekci pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie. Vzorky obsahující $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Anti-GCPII}@\text{Ag}@\text{GCPII}$ (standardní roztok) byly magneticky izolovány a zředěny deionizovanou vodou ($V=0,02 \text{ ml}$). Kapka byla nanесena na skleněný substrát a analyzována Ramanovou spektroskopií na devíti různých místech.

Koncentrace GCPII v reálných vzorcích byla stanovena následovně: nejprve byla vypočítaná přibližná koncentrace GCPII ve vzorku z externí kalibrace zkonstruované za použití standardních roztoků v rozsahu koncentrací $5 \text{ až } 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Následně byla stanovena koncentrace GCPII metodou standardního přídatku založené na třech po sobě následujících přídatcích standardního roztoku GCPII. Koncentrace standardních přídatků se odvíjela z přibližné koncentrace GCPII z prvního kroku a koncentrace přídatků 1-3 byly nastaveny na 30-50 % přírůstku. Metoda standardního přídatku byla použita za účelem zlepšení přesnosti metody a minimalizace možných efektů použité matrice. Pro kvantitativní analýzu byl vybrán spektrální pás lokalizovaný při 1335 cm^{-1} .

4.6.3. Analýza růstových faktorů na povrchu dentinu

Syntetizovaný $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanokompozit byl použit k analýze růstových faktorů na povrchu dentinu. Příprava vzorků je podrobně posána v kapitole 4.5.5. Dále byl nanomateriál kovalentně funkcionalizován příslušnými značenými protilátkami, jmenovitě $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-TGF-}\beta 1@\text{Cy}3$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-BMP-2}@\text{Cy}5$ a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-bFGF}@\text{Cy}7$ (kapitola 4.5.8.). V posledním kroku byly vzorky zubů ošetřeny po dobu 5 a 20 minut roztokem EDTA, sloužícího jako chelatační činidlo k odstranění skloviny, umožňující následnou analýzu růstových faktorů pomocí Ramanovy spektroskopie.

4.7. Přístrojové vybavení

Ramanova spektra byla získána za použití spektrometru DXR Raman (Thermo Scientific, USA). K excitaci byl využit He-Ne laser s excitační vlnovou délkou 633 nm. Ramanův spektrometr byl provozován s následujícími experimentálními parametry: pro multiplexní stanovení celkového obsahu DNA/RNA byla použita doba expozice 32 s a výkon laseru 8 mW. Stejně parametry byly použity i při stanovení PSMA. Pro analýzu růstových faktorů byla použita doba expozice 3 s a výkon laseru 2 mW. Získané spektrální data byla vyhodnocena pomocí softwaru dodaného výrobcem přístroje (Omnic, verze 8, Thermo Scientific, USA) a maxima cílových spektrálních pásem byla statisticky vyhodnocena pomocí LibreOffice (verze 4.3.0, The Document Foundation, Berlín, Německo). Ke kvantifikaci byl použit softwerový balíček TQ-Analyst (Omnic verze 8, Thermo Scientific, USA).

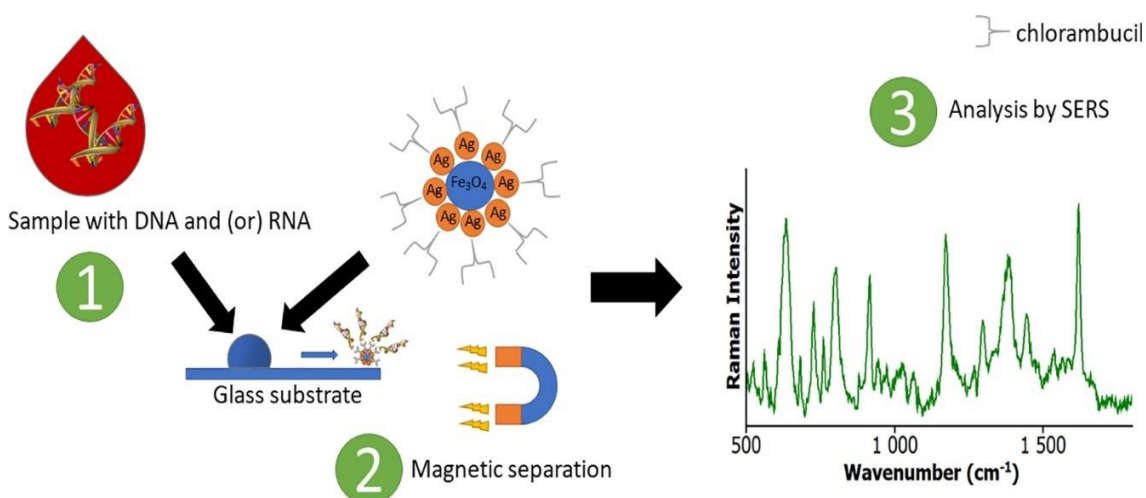
Zeta potenciál připraveného $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanokompozitu byla měřena pomocí Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). Prvková analýza připraveného nanokompozitu byla měřena energiově disperzním X-ray spektroskopem (EDS, Bruker, SuperX). Infračervená spektra byla získána za pomoci FT-IR spektrometru Nicolet iS5 (Thermo Scientific, U.S.A.). Velikost a morfologie částic byla charakterizována pomocí transmisního elektronového mikroskopu s vysokým rozlišením HR-TEM (FEI Titan).

Výsledky a diskuze

Tato část disertační práce je zaměřena na souhrn dosažených výsledků v rámci Ph.D studia, které byly publikovány. Výsledky lze rozdělit do dvou částí – prvoautorské články zaměřené na MA-SERS (Magnetically Assisted- Surface Enhanced Raman Spectroscopy) biologických aktivních látek a spoluautorskou publikaci, která rovněž využívá SERS pro stanovení růstových faktorů v zubní tkáni. Metody MA-SERS jsou založené na multiplex-analýze stanovovaných biologických látek na základě povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie a nanosenzoru složeného z magnetického $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu funkcionalizovaného příslušnou protilátkou s konjugovanými nanočásticemi stříbra. Představené výsledky v této kapitole byly publikovány v impaktovaných časopisech. Celé znění článků lze nalézt v přílohách A-C.

5.1. „Label-free“ determinace a multiplexní stanovení DNA a RNA v rakovinných tkáních

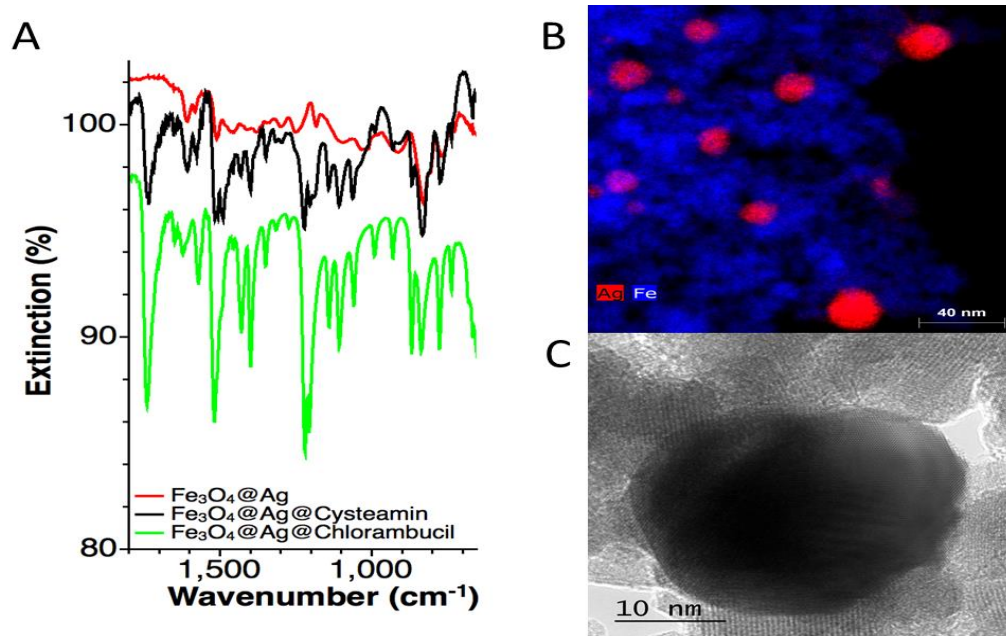
Cílem této publikace je stanovení celkového obsahu nukleových kyselin (DNA a RNA) v rakovinných tkáních pomocí nově vyvinuté analytické platformy, založené na $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@$ chlorambucil nanokompozitu. Syntetizovaný nanokompozit byl následně použit k multiplexní detekci DNA a RNA za pomoci MA-SERS (Obecné schéma zobrazující princip MA-SERS je zobrazeno na Obr. 5.1.1.). $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@$ chlorambucil nanokompozit vykazuje vyšší selektivitu vůči nukleovým kyselinám oproti běžně používaným metodám, a umožňuje tak detekovat DNA a RNA v řádech nanogramů.



Obr.5.1.1.: Obecné schéma znázorňující princip stanovení DNA/RNA pomocí MA-SERS (128).

Poprvé byl použit chlorambucil, jakožto molekulární selektor vůči guaninu přítomného ve struktuře nukleových kyselin. Imobilizace chlorambucilu byla sledována za pomoci infračervené spektroskopie (IR) (Obr. 5.1.2A). Reakcí alkylačního činidla a cysteaminu dochází k detekovatelnému zvýšení množství C-Cl vazeb. Tato hypotéza byla následně potvrzena měřením infračerveným spektrem $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag@$ chlorambucil nanokompozitu, kde byla pozorována zvýšená intenzita analytického signálu odpovídajícímu vazbě C-Cl při 730 cm^{-1} . Úspěšná imobilizace alkylačního činidla na povrch nanokompozitu byla dále potvrzena výsledky měření ζ -potenciálu. Připravený

nanokompozit byl dále charakterizován pomocí HR-TEM mikroskopie (Obr. 5.1.2B) a energiově disperzní X-ray spektroskopie (Obr. 5.1.2C).



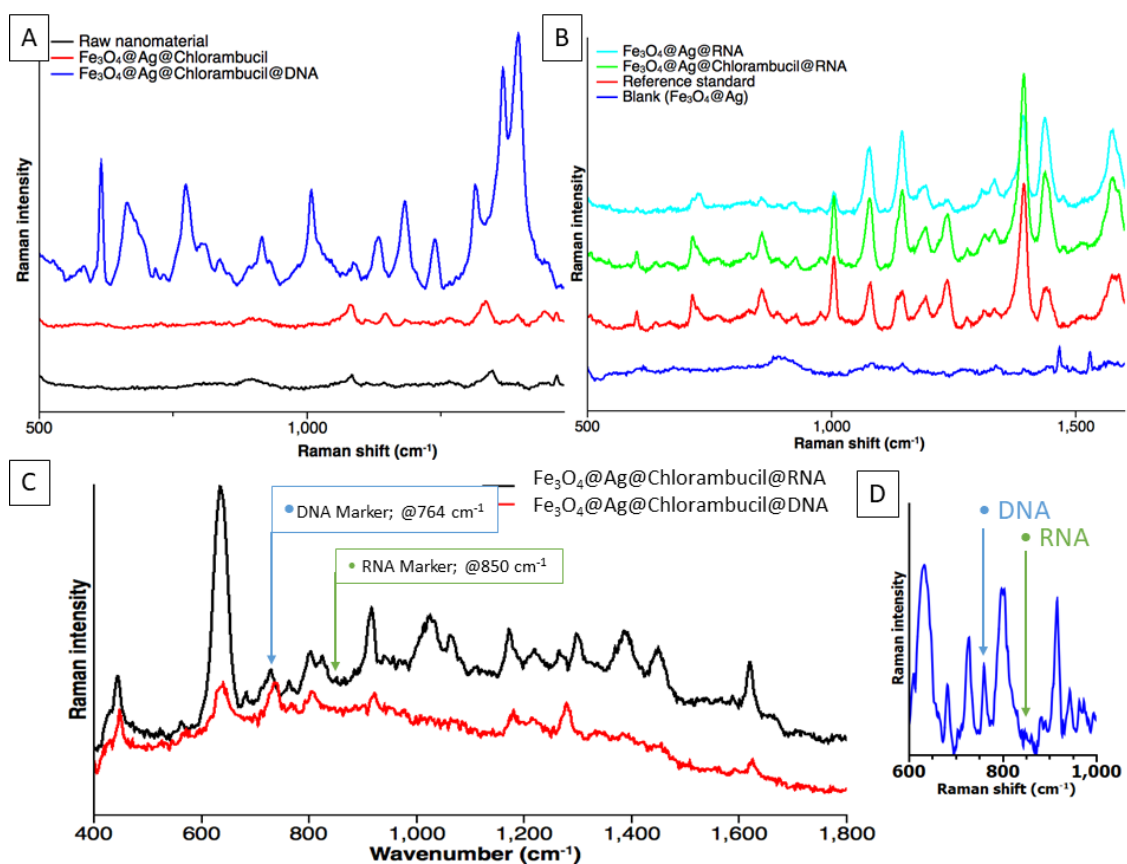
Obr.5.1.2.: A) IR spektrum získané syntézou Fe₃O₄@Ag@chlorambucil nanokompozitu. Červené spektrum zobrazuje čistý Fe₃O₄@Ag nanokompozit, černé Fe₃O₄@Ag nanokompozit funkcionizovaný cysteaminem a zelené spektrum znázorňuje Fe₃O₄@Ag@chlorambucil nanokompozit, ze kterého je patrné, že připravený nanokompozit byl úspěšně funkcionizován alkylačním činidlem. B) Analýza nanokompozitu vykazuje přítomnost nanočástic stříbra a magnetických nanočástic (modře značeno železo, červeně stříbro). C) HR-TEM snímek funkcionizovaného magnetického Fe₃O₄@Ag@chlorambucil nanokompozitu potvrzující přítomnost magnetických nanočástic o velikosti přibližně 5 nm a nanočástic stříbra < 40nm (128).

Syntetizovaný magnetický nanokompozit byl nejprve použit k analýze standardního vodného roztoku DNA ($c=100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$). Získaná data jsou znázorněna na Obr. 5.1.3A. Pro normalizaci získaných spektrálních dat byl použit spektrální pás 1350 cm⁻¹, který pochází z aromatické struktury chlorambucilu. Ramanova spektra standardního roztoku DNA naopak obsahují charakteristické spektrální profily

zahrnující dominantní pásy umístěné při 729 cm^{-1} a 1576 cm^{-1} (přítomnost Adeninu v molekule DNA), dále 773 cm^{-1} („dýchací“ vibrace aromatického kruhu Thyminu), 1010 cm^{-1} (vibrace Guaninového kruhu), 1100 cm^{-1} (asymetrická deformace NH_2 v Cytosinu) a spektrální pásmo 1390 cm^{-1} (vibrace aromatických kruhů DNA/RNA).

Dalším krokem bylo stanovení RNA v reálném vzorku nádorové tkáně pomocí $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}$ nanokompozitu. Ramanova spektra jsou zobrazena na Obr. 5.1.3B. Srovnáním výsledných spekter RNA s dříve získanými daty standardních vzorků RNA bylo potvrzeno, že alkylační činidlo neovlivňuje analytickou informaci. Spektra získaná analýzou reálných vzorků s vysokým obsahem interferujících složek za použití surového $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ a funkcionalizovaného $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}$ nanokompozitu ukázalo pozitivní výsledky námi syntetizované nové analytické platformy, kde spektrální data reálných komplexních vzorků RNA jsou méně intenzivní a neobsahují charakteristické bílkovinné pásy. Lze tak předpokládat, že funkcionalizace nanokompozitu výrazně snižuje působení interferencí.

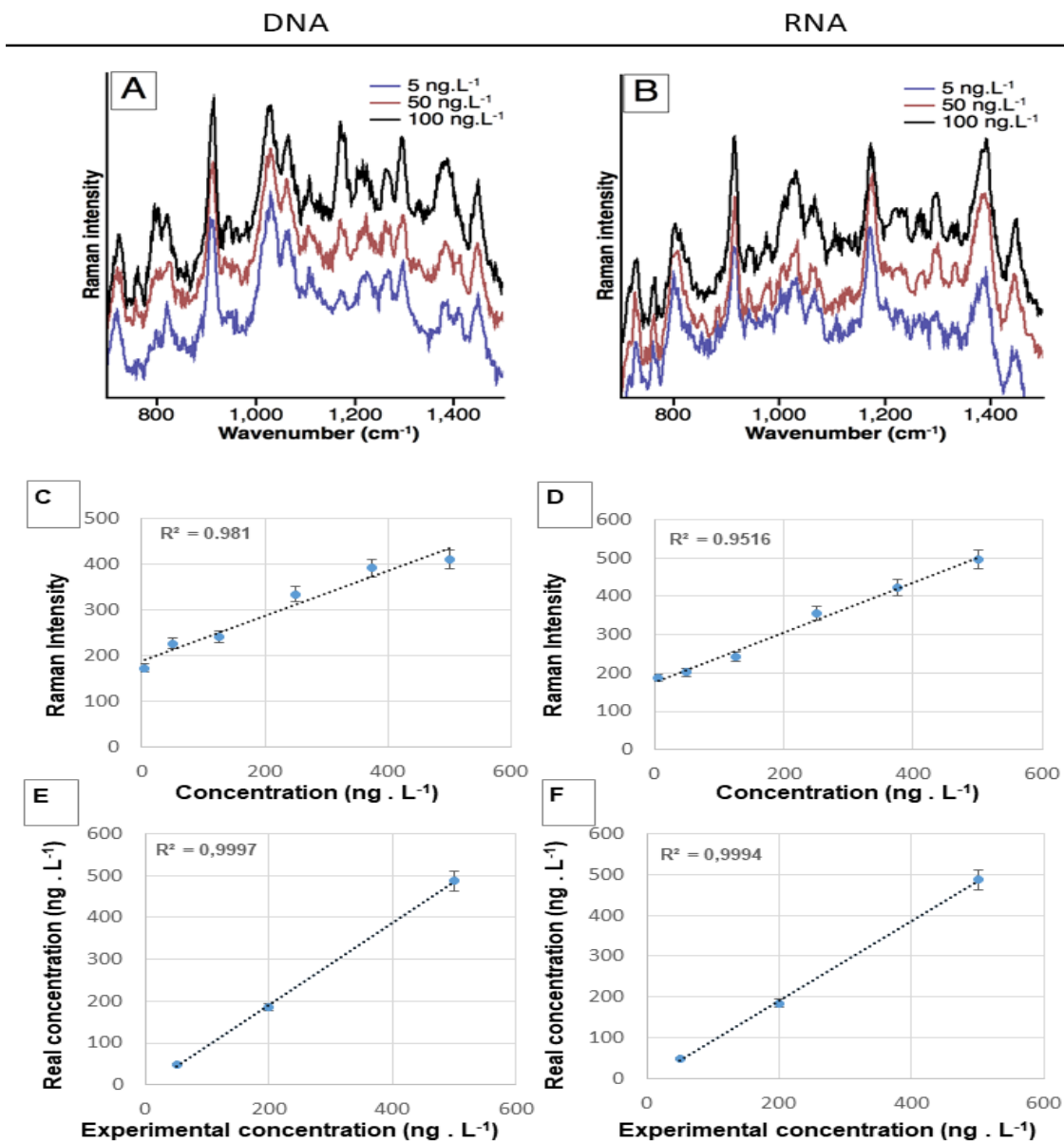
Důležitou podmínkou byla také možnost syntetizovaného nanokompozitu rozlišit DNA a RNA ve vzorcích. Pro tento účel byly připraveny standardní roztoky obsahující obě zmíněné kyseliny o koncentraci $100\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ pro minimalizaci vlivu koncentračního účinku. Získaná Ramanova spektra jsou zobrazena na Obr. 5.1.3C a Ramanovo spektrum obou nukleových kyselin ve směsi na Obr. 5.1.3D. Spektrální data naznačují schopnost spektrální diferenciaci nukleových kyselin dané rozdílem spekter zejména v spektrálním rozmezí $500 - 1000\text{ cm}^{-1}$ a pro následnou diferenciaci DNA a RNA byly vybrány dva spektrální pásy. Pro RNA spektrální pás zobrazující „dýchací“ vibrace nacházející se při 850 cm^{-1} a pro analýzu DNA deformační vibrace Thyminu při 764 cm^{-1} .



Obr. 5.1.3.: A) Ramanovo spektrum získané analýzou surového nanokompozitu (Raw nanomaterial), spektrum nanokompozitu funkcionalizovaného chlorambucilem ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}$) a Ramanovo spektrum standardního roztoku DNA ($c = 100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) měřené za pomoci $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}$ nanokompozitu ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}@\text{DNA}$). B) Ramanovo spektrum $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanokompozitu (blank), Ramanovo spektrum reálného vzorku RNA bez funkcionalizace nanokompozitu chlorambucilem ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{RNA}$), Ramanovo spektrum reálného vzorku RNA funkcionalizovaného nanokompozitu chlorambucilem ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}@\text{RNA}$) a standardní roztok RNA ($c = 100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) analyzovaný za použití $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanokompozitu (referenční standard). C) Ramanova spektra získaná analýzou vzorků obsahující DNA i RNA o koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, vzorky byly měřeny za pomoci $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{chlorambucil}$ nanokompozitu a MA-SERS D) Ramanova spektra DNA a RNA ($c = 100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$) ve směsi, v poměru 1:1 (128).

Pro kvantitativní analýzu bylo použito 6 kalibračních bodů, z nichž každý byl replikován pětkrát a následně byla zkonstruována kalibrační křivka (Obr. 5.1.4C pro

DNA a 5.1.4D pro RNA). Vzorová Ramanova spektra použité při výpočtu obou kalibrací jsou znázorněna na Obr. 4. 1. 1. 4A a 4. 1. 1. 4B, kde byly vybrány 3 koncentrace, které vykazovaly změny absolutních intenzit v Ramanových spektrech charakteristických pro DNA a RNA.



Obr. 5.1.4: (A) a RNA (B) o koncentracích 5, 50 a 100 ng . L⁻¹. Kalibrační křivky šesti kalibračních bodů DNA (C) a RNA (D) a kvantitativní výsledky získané analýzou reálných vzorků obsahujících DNA (E) a RNA (F) za použití výše popsané metodiky (experimentální koncentrace) a standardizovanou analýzou UV/Vis (skutečná kalibrace) (128).

Opakovatelnost získaných výsledků byla hodnocena na souboru pěti nezávislých měření reálných vzorků obsahujících DNA ($c=100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$). Relativní směrodatná odchylka (RSD) mezi intenzitami nejintenzivnějších pásů je nižší než 5%, z čehož vyplynulo, že všechna spektra jsou plně srovnatelná. Dlouhodobá stabilita byla vyhodnocena pomocí pěti po sobě následujících měření provedených v rozmezí 21 dnů. I přes pozorovanou agregaci nanokompozitu Ramanova spektra získané 21 dní po syntéze nanokompozitu obsahují silný analytický signál a nanokompozit může být nadále použit pro analýzu nukleových kyselin. Z kalibračních křivek byly stanoveny mezní hodnoty detekce $3,0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ příslušící DNA a $3,8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ pro RNA, které se stávají plně konkurenčními k již zavedeným přístupům a vykazují značné výhody, zejména analýzu vzorků v krátkém časovém intervalu.

Výše popsaný článek byl publikován v časopise Applied Materials Today 12 (2018), na stránkách 85-91. Celý článek je připojený k disertační práci jako Příloha A.

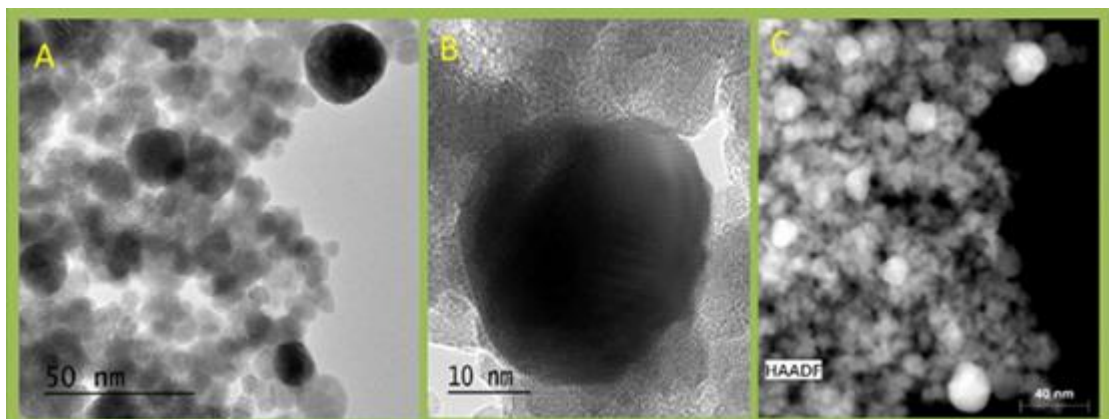
5.2. „Label-free“ stanovení prostatického specifického membránového antigenu v krvi v nanomolárním množství za použití magneticky asistované povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie

Rakovina prostaty patří mezi jednu z nejčastěji diagnostikovaných forem rakoviny a v současné době tvoří 12% všech případů rakoviny na celém světě. Výskyt této formy rakoviny se od roku 1970 zvýšil o 155% a v roce 2012 bylo diagnostikováno téměř 500 000 nových případů (129, 130). Nejběžnější screeningové testy pro včasnou diagnózu rakoviny jsou založeny na stanovení hladiny prostatického specifického antigenu (PSA) v krvi nebo na digitálním rektálním vyšetření spojeným s biopsií (DRE) (131). Výše zmíněná požadovaná biopsie je stále limitem v alternativním získávání informací z genomických dat pacienta (132). Jednou z možností v léčbě rakoviny prostaty je hledání vhodných markerů, umožňujících detekci rakoviny prostaty bez nutnosti DRE vyšetření. Jedním z potenciálně zajímavých markerů pro stanovení rakoviny prostaty je PSMA – prostatický membránový specifický antigen (známý jako folát-hydroláza I a glutamátcarboxypeptidáza II – GCPII). GCPII katalyzuje hydrolýzu N-acetylaspartylglutamátu (NAAG) na glutamát a N-acetylaspartát (NAA) a je nadměrně exprimován v buňkách rakoviny prostaty (133).

Běžně používané metody pro stanovení rakoviny prostaty založené například na využití inhibitorů malých molekul, které napodobují endogenní substrát NAAG nejsou velmi účinné při detekci malých metastatických ložisek (134). Inhibitory s fluorescenčními značkami využívané ke stanovení rakoviny prostaty prokázaly vyšší hladinu GCPII u pacientů s karcinomem prostaty ve srovnání se zdravými pacienty (135, 136). Tato publikace je zaměřena na využití MA-SERS a nízkomolekulárního inhibitoru GCPII pro analýzu GCPII z plné lidské krve za využití syntetizovaného $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu. Výhodou metody je magnetická izolace GCPII a jeho následná detekce v plné krvi ve velmi krátké době s limitem detekce nižším, než je tomu u obvykle používaných technik.

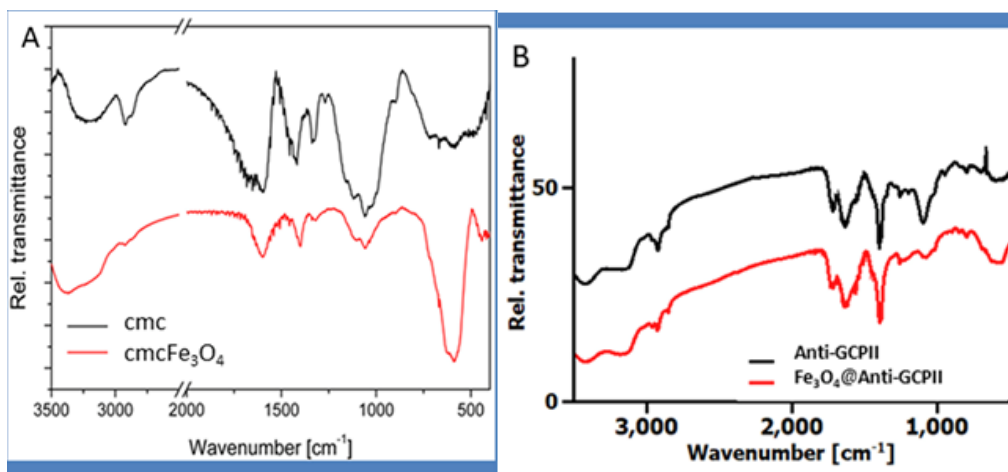
Prvním krokem byla charakterizace syntetizovaného nanokompozitu pomocí TEM, IR a stanovením ζ -potenciálu. Výsledky získané transmisí elektronovou

spektroskopií jsou zobrazeny na Obr. 5.2.1A–B. Stříbrné nanočástice o průměru 30 nm jsou obklopeny menšími magnetickými nanočásticemi s průměrem přibližně 10 nm a jsou organizovány do „superklastrů“. Toto pozorování bylo následně potvrzeno pomocí HAADF. Byl změřen ζ -potenciál syntetizovaného biosenzoru s výslednou hodnotou - 46mV, což naznačuje stabilitu systému (137).



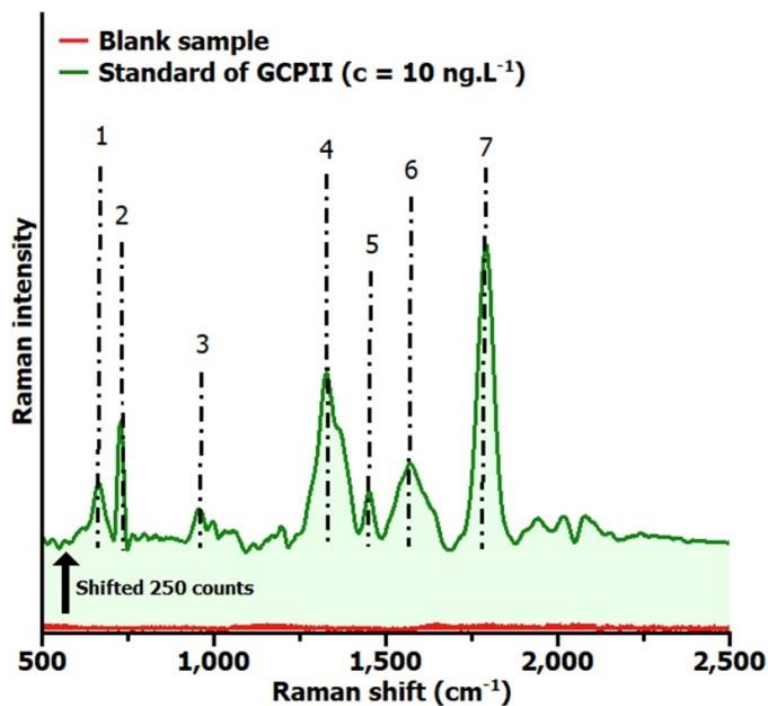
Obr. 5.2.1.: A-B) TEM snímky koloidního $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanokompozitu stabilizovaného CMC. A) obecný snímek vzorku; B) detailní pohled na nanočástice stříbra. C) HAADF obrázek vzorku (126).

Zaznamenaná FT-IR spektra volné karboxymethylcelulózy (CMC) a funkcionalizované cmcFe_3O_4 demonstrují úspěšnou imobilizaci CMC na povrch magnetických nanočástic (5.2.2A). Spektra byla interpretována v souladu s přístupy definovanými Barthem (138). Obě spektra obsahují charakteristické pásy čistého CMC při 3400-3000 (O-H valenční vibrace), 2917 (C-H valenční vibrace), 1594 (-COO asymetrická valenční vibrace), 1417 (-COO asymetrická valenční vibrace), 1338 (můstková-O- valenční vibrace), 1058 (C-O valenční vibrace), 910 cm^{-1} (pyranózový kruh). U cmcFe_3O_4 byl dále nalezen charakteristický pás pro magnetit při 590 cm^{-1} . Ukotvení anti-GCPII je zdokumentováno ve spektrálních datech uvedených na Obr. 5.2.2B. FT-IR spektra volných anti-GCPII a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{anti-GCPII}$ obsahují spektrální pásy 1626-1629 cm^{-1} (Lys, NH_3^+ asymetrická valenční vibrace), 1404 (Glu, -COO valenční vibrace), 1650 (Amide I C=O vibrace) a 1400 cm^{-1} (Amide III C-N vibrace).



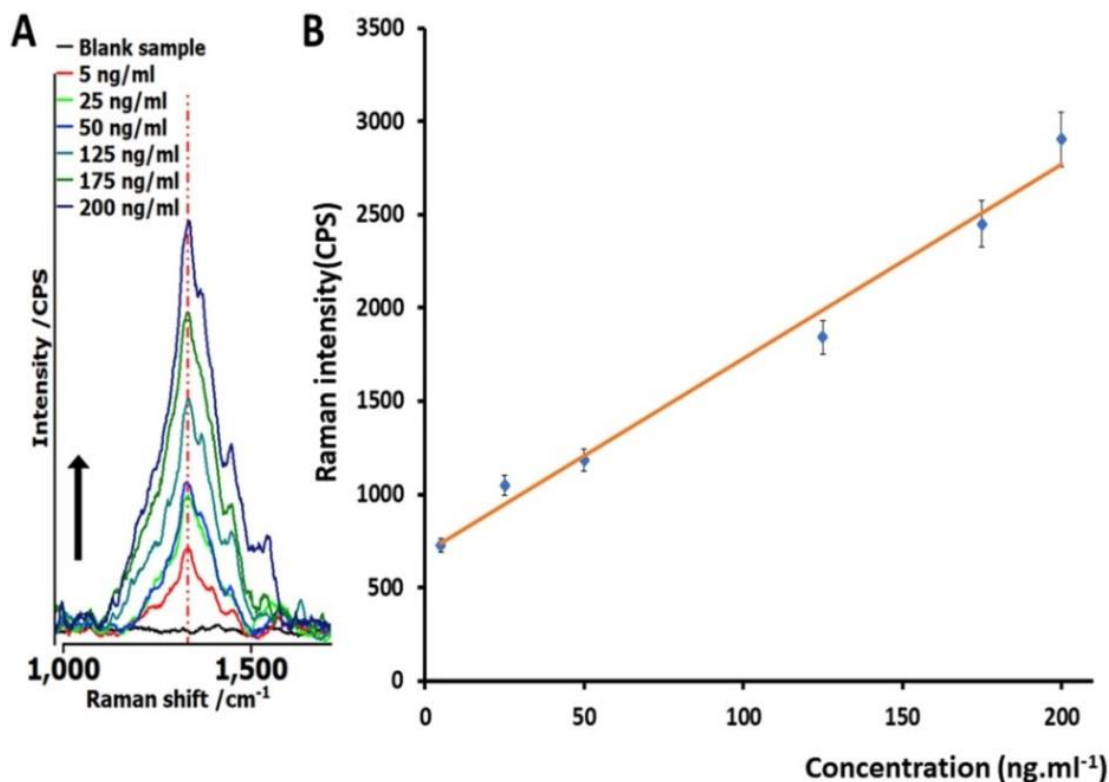
Obr. 5. 2. 2.: A) FT-IR spektroskopie cmcFe₃O₄. Černě je zobrazeno spektrum surového CMC, červeně nanomateriálu Fe₃O₄ funkcionalizovaného CMC. B) FT-IR spektroskopie funkcionalizovaného Fe₃O₄@Anti-GCPII. Černé spektrum náleží anti-GCPII, červené cmcFe₃O₄ funkcionalizovaného anti-GCPII tvořící Fe₃O₄@Anti-GCPII komplex (126).

Syntetizovaný nanomateriál byl nejprve testován za použití standardního roztoku purifikovaného rekombinantního GCPII (c=10 ng/ml). Výsledná data jsou zobrazena na Obr: 5.2.3. Ramanova spektra získaná z analýzy modelového vzorku GCPII (standard GCPII) obsahují ve srovnání s prázdným vzorkem (blank) spektrální pásy charakteristické pro proteiny. Výrazné vibrace proteinů zahrnují dominantní spektrální pásy, které se nacházejí v rozmezí 678 cm⁻¹, 728 cm⁻¹, 955 cm⁻¹, 1235 cm⁻¹ (Amid III), 1335 cm⁻¹ (C-H deformační proteinový pás), 1450 cm⁻¹, 1577 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹ (Amide I) a 1790 cm⁻¹.



5.2.3.: Ramanovo spektrum získané analýzou $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Anti-GCPII}@\text{Ag}$ nanokompozitu (blank) a Ramanovo spektrum purifikovaného rekombinantního vzorku GCPII ($c=10 \text{ ng/ml}$) za použití $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Anti-GCPII}@\text{Ag}$ nanokompozitu (standard GCPII) (126).

Dále bylo získáno kalibrační spektrum GCPII v koncentračním rozmezí 5-200 ng/mL (7 kalibračních bodů s pěti technickými replikami). Spektrální data všech sedmi kalibračních standardů jsou znázorněna na Obr: 5.2.4A a finální kalibrační křivka na Obr: 5.2.4B. Jako marker pro kvantifikační analýzu byl vybrán spektrální pás 1335 cm^{-1} (vibrace Amidu) vzhledem k jeho vysoké intenzitě a menší interferenci ve srovnání s jinými intenzivními spektrálními pásy. Z kalibrační křivky byl následně spočítán limit detekce $0,48 \text{ ng/ml}$.

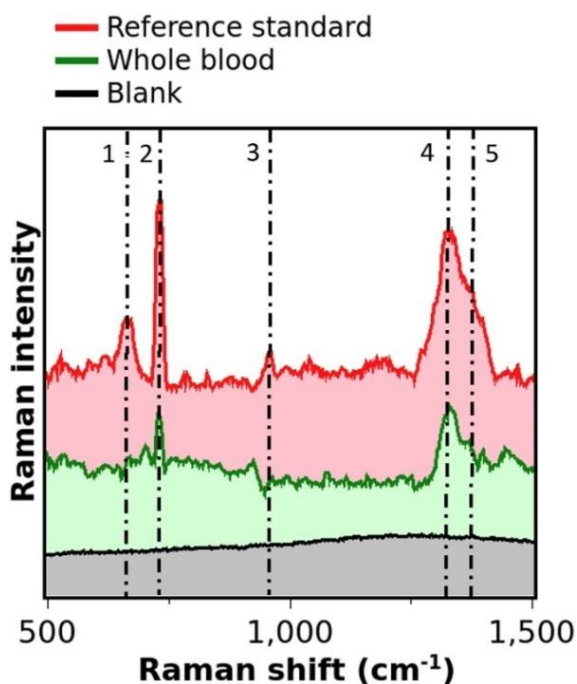


Obr. 5.2.4.: A) Ramanova spektra získaná analýzou GCPII o šesti různých koncentracích 5-200 ng/ml . B) Kalibrační křivka GCPII sestavená pomocí analýzy standardních vzorků (126).

Opakovatelnost analytického postupu byla vyhodnocena na souboru pěti nezávislých měření. Všechna spektra byla plně srovnatelná, kdy statistický rozdíl mezi třemi nejintenzivnějšími pásy v experimentálních datech nepřesáhl hodnotu 7%. Stabilita syntetizovaného nanomateriálu byla hodnocena za použití souboru periodických měření prováděných po dobu 21 dní. Byl pozorován pouze malý pokles celkové intenzity získaných spektrálních dat v důsledku částečné agregace nanomateriálu. Nicméně Ramanova spektra získaná 21 dní po syntéze nanomateriálu vykazovaly silný analytický signál měřeného GCPII.

Posledním krokem bylo stanovení různé koncentrace GCPII v plné krvi pomocí námi syntetizovaného funkcionalizovaného nanokompozitu. Na Obr. 5.2.5. jsou zobrazena Ramanova spektra získaná analýzou reálného vzorku a standardního roztoku GCPII ($c=10 \text{ ng/ml}$). Podrobná spektrální analýza odhalila nové pásy umístěné při 1415 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} přítomné v Ramanově spektru reálného vzorku, což naznačuje menší

nespecifické interakce. Tyto pásy však neinterferují se spektrální pásem 1335 cm^{-1} a neovlivňují tak kvantifikaci GCPII.



Obr. 5.2.5.: Ramanova spektra získané analýzou vzorku plné krve obsahující GCPII pomocí nanokompozitu funkcionalizovaného anti-GCPII a referenční spektrum standardního roztoku GCPII ($c = 10\text{ ng/ml}$) za použití $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{anti-GCPII}@\text{Ag}$ nanokompozitu (referenční standard). Blank představuje Ramanovo spektrum analýzy plné krve pomocí surového nanomateriálu ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$). Spektrální pásy jsou označeny v následujícím pořadí: 1: 678 cm^{-1} ; 2: 728 cm^{-1} ; 3: 955 cm^{-1} ; 4: 1335 a 5: 1371 cm^{-1} (126).

Celková koncentrace GCPII v reálných vzorcích byla stanovena za použití metody standardního přídatku za účelem minimalizace nespecifických interakcí mezi maticí a analytem. Ve studii bylo vyhodnoceno celkem pět reálných vzorků zdravých dospělých jedinců. Koncentrace GCPII v těchto vzorcích nabývala hodnot od 1 – 7,3 ng/ml, což je v dobré korelaci s dříve uvedenými hodnotami pro zdravou populaci (139). Výsledné koncentrace byly naměřeny s relativní chybou stanovení (RSD) menší než 10%.

Metoda byla publikována v časopise *Analytica Chimica Acta* 997 (2018), na stránkách 44-51. Celý článek je připojený k disertační práci jako Příloha B.

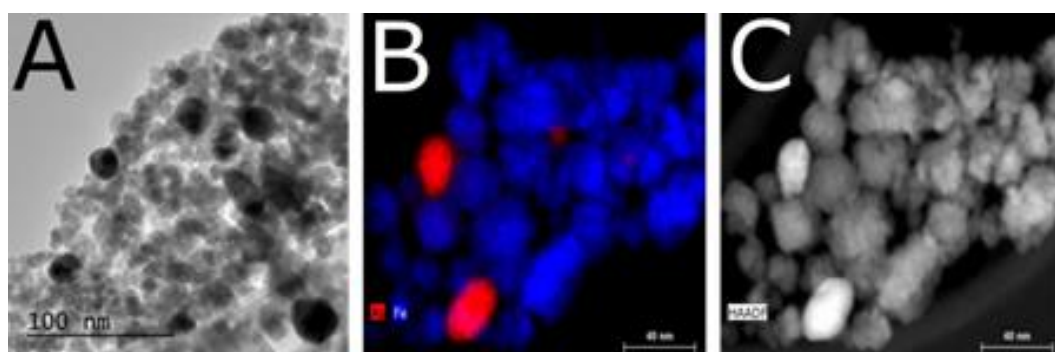
5.3. Povrchová analýza růstových faktorů lidského zubního kořenového kanálu pomocí MA-SERS

Častým problémem v endodoncii se stává léčba zubů obsahující nekrotickou tkáň. Ta je dnes standardně ošetřována pomocí léčby kořenových kanálků, bohužel je stále zatěžována několika klinickými problémy (140). Mezi nejběžněji používané přístupy regenerační léčby se řadí revaskularizace a revitalizace opírající se o schopnost dodání růstových faktorů spolu s kmenovými buňkami přímo do postiženého kanálku, což může mít vliv na buňky nacházející se v periapické oblasti (141). Důležité růstovými faktory hrající roli v regeneraci dentinu jsou růstový faktor beta 1 (TGF- β 1), zastávající důležitou roli při diferenciaci kmenových buněk dřeně na ontoblasty (142). Dále kostní morfogenetický protein 2 (BMP-2) vykazující silný osteoinduktivní a chondrogenní účinek a byl popsán také stimulační účinek na dentinogenezi v odontoblastech (143). A základní fibroblastový růstový faktor (bFGF) působící jako silný mitogen, který stimuluje proliferaci kmenových buněk dřeně a zvyšuje jejich diferenciační potenciál (144).

Většina metod studujících rozložení růstových faktorů na povrchu dentinu vyžaduje extrakci růstových faktorů mimo zub a informace o jejich distribuci na povrchu kořenového kanálu tak nejsou dostupné (145). Jednou z metod, používanou již dříve ke studiu dentinu, byla Ramanova spektroskopie. Byla však využita pouze v omezené míře například při studii fluorescence skloviny na zdravé a nekrotické zubní tkáni (146, 147). Další aplikace Ramanovy spektroskopie v zubním lékařství byly shrnuty v přehledu napsaném Ramakrishnaiahem (148). Tato publikace je zaměřena na studium růstových faktorů přímo na povrchu dentinových kanálků pomocí Ramanovy spektroskopie a syntetizovaného nanosenzoru složeného z $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$, který je dále funkcionalizovaný tak, aby poskytoval multiplexní analýzu růstových faktorů, jmenovitě TGF- β 1, BMP-2 a bFGF přímo na povrchu vzorku.

Funkcionalizovaný nanokompozit byl nejprve charakterizován elektronovou mikroskopií a pomocí EDX. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 5.3.1A-C, kde jsou zobrazeny TEM a EDX obrazy funkcionalizovaného nanokompozitu. Ze snímků

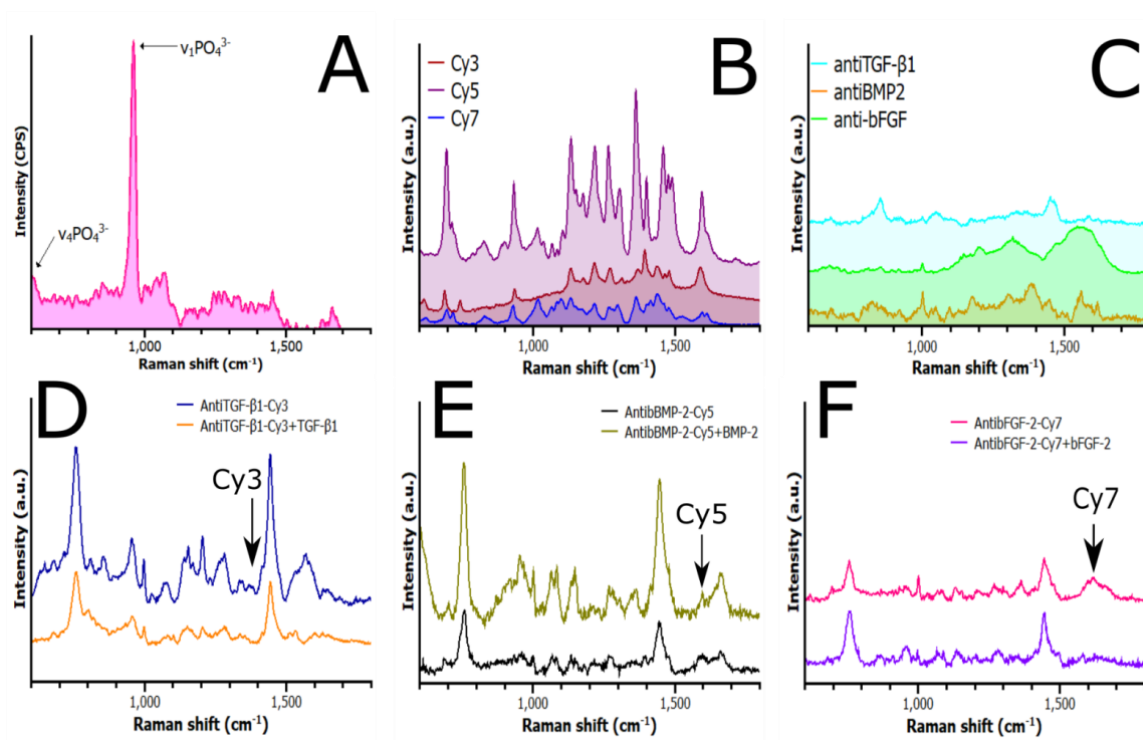
vyplývá, že magnetické nanočástice jsou lokalizovány v klastrech. Velikost magnetického kompozitu byla pomocí DLS stanovena na 140 nm. Analýza z_c-potenciálu odhalila výraznou změnu hodnot z -42 mV pro Fe₃O₄@Ag nanokompozit na +2mV pro materiál funkcionalizovaný za použití značených protilátek. Tato změna je způsobena zakotvením kladně nabitého proteinu na povrchu negativně nabitého nanokompozitu avšak systém je koloidně stabilní, i přes nízkou hodnotu z_c-potenciálu, vzhledem k elektrostatickým interakcím mezi ukotvenými proteiny.



Obr. 5.3.1.: A) TEM snímek funkcionalizovaného materiálu. B) EDX obrázek nanokompozitu s nanočásticemi stříbra (červené) a maghemitu (modrá). C) HAADF analýza nanokompozitu, kde stříbro je znázorněno jasně a železo v tmavších odstínech (149).

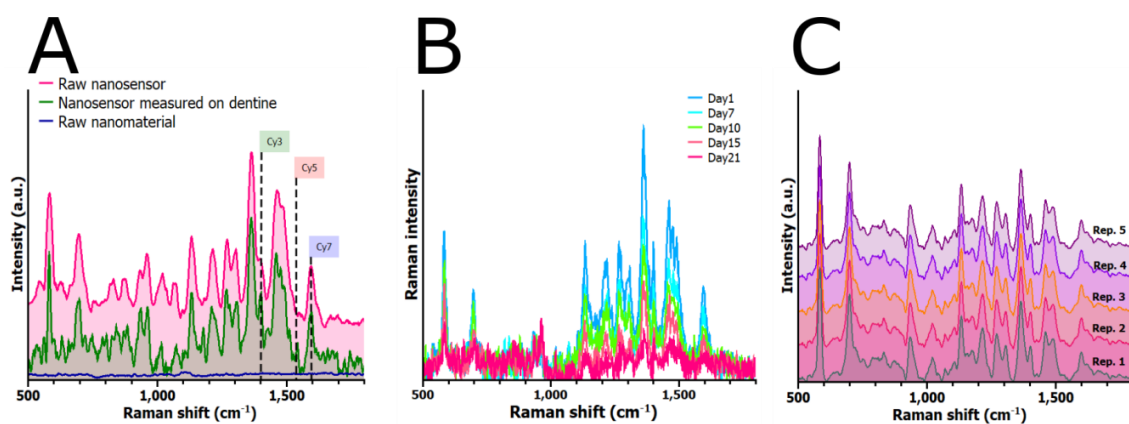
Získaná spektrální data získaná měřením pomocí Ramanovy spektroskopie jsou znázorněna na Obr. 5.3.2A. Ramanovo spektrum obsahuje charakteristické pásy $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (spektrální pás 960 cm^{-1}) a $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (spektrální pás 588 cm^{-1}). Je zřejmé, že spektrum neobsahuje žádné spektrální pásy charakteristické pro proteiny. Dále byly vyhodnoceny SERS spektra Cy3, Cy5 a Cy7. Výsledná Ramanova spektra jsou zobrazena na 5.3.2B a jsou plně v souladu s dříve publikovanými výsledky (150). Poté byly pomocí SERS měřeny protilátky, jmenovitě anti-TGF- β 1, anti-BMP-2 a anti-bFGF a získaná spektra jsou znázorněna na Obr. 5.3.2C. Spektra obsahují převážně pásy charakteristické pro proteiny, včetně Amidu I a III, které se nacházejí při 1652 cm^{-1} a 1304 cm^{-1} . Avšak Ramanovo spektrum dentinu obsahuje velké množství proteinů včetně cílených růstových faktorů a mnoho dalších.

Selektivní detekce interakce mezi zakotvenou protilátkou a konkrétním růstovým faktorem může být proto obtížná a není spolehlivá. Za tímto účelem byly protilátky značeny pomocí Raman aktivních spektrálních značek – Cy3, Cy5 a Cy7. Značky spolu s příslušnými protilátkami byly charakterizovány za použití SERS a výsledná Ramanova spektra jsou zobrazena na Obr. 5.3.2D-F. Spektrální analýza odhalila přítomnost spektrálních pásem charakteristických pro každou Ramanovu značku, jedná se o pásy 1395 cm^{-1} pro anti-TGF- β 1-Cy3, 1597 cm^{-1} pro anti-BMP-2-Cy5 a 1621 cm^{-1} pro anti-bFGF-Cy7.



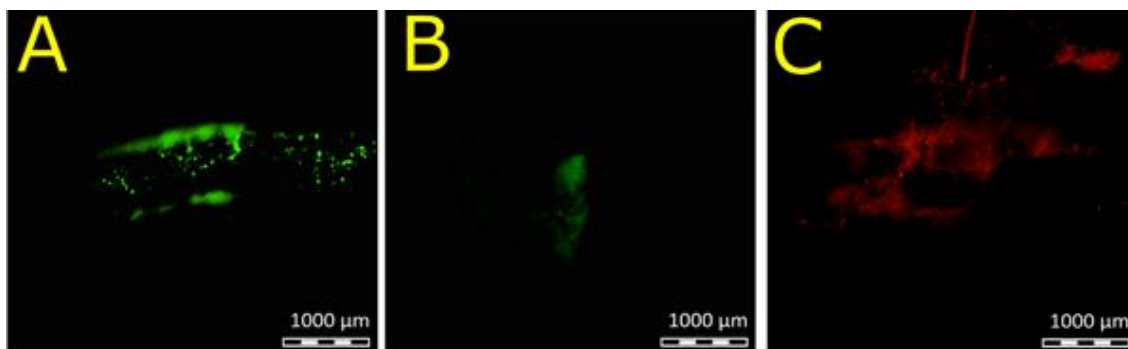
Obr. 5.3.2: A) Ramanovo spektrum kořenového kanálu. B) SERS spektra Cy3, Cy5 a Cy7 Ramanových značek. C) SERS spektra protilátek anti-TGF- β 1, anti-BMP-2 a anti-bFGF. D-F) SERS spektra specifických protilátek značených Ramanovými značkami a protilátky s vázanými antigeny, konkrétně anti-TGF- β 1-Cy3 (D), anti-BMP-2-Cy5 (E) a anti-bFGF-Cy7 (F) (149).

Analýza SERS vzorků obsahujícího připravený nanosenzor složený z nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ kovalentně funkcionizovaného příslušnými značenými protilátkami odhalil přítomnost pásů charakteristických pro Ramanovy značky, nanosenzor a protilátky. Výsledná spektra jsou znázorněna na Obr. 5.3.3A. Ramanovo spektrum obsahuje všechny dříve identifikované pásy, včetně pásem charakteristických pro použité Ramanovy značky, což naznačuje úspěšnou imobilizaci značených protilátek na povrch nanokompozitu. Stabilita signálu byla testována na šesti vzorcích obsahujících $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{anti-TGF-}\beta\text{1-Cy3}$ během časového období 21 dní. Vzorky byly uchovány v ledničce při 7°C a tmě. Signál značek se mírně snížil, jak je ukázáno na Obr. 5.3.3B avšak stále je nad hranicí detekce a je plně použitelný. Dále byla vyhodnocena opakovatelnost signálu na sérii pěti $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{anti-TGF-}\beta\text{1-Cy3}$ vzorků. Získaná Ramanova spektra jsou zobrazena na Obr. 5.3.3C. Ramanova spektra byla normalizována a byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD), která nepřesáhla 5% pro všechny tři značky.



Obr. 4.1.3.3. : A) Ramanovo spektrum surového $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanokompozitu (modré), Ramanovo spektrum nanosenzoru se zakotvenými protilátkami značenými Ramanovými značkami (růžové) a spektrum senzoru naměřené na povrchu dentinu (zelené). B) Studium stability signálu připraveného $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{anti-TGF-}\beta\text{1-Cy3}$ sensoru. C) Opakovatelnost analytického signálu připraveného $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{anti-TGF-}\beta\text{1-Cy3}$ sensoru (149).

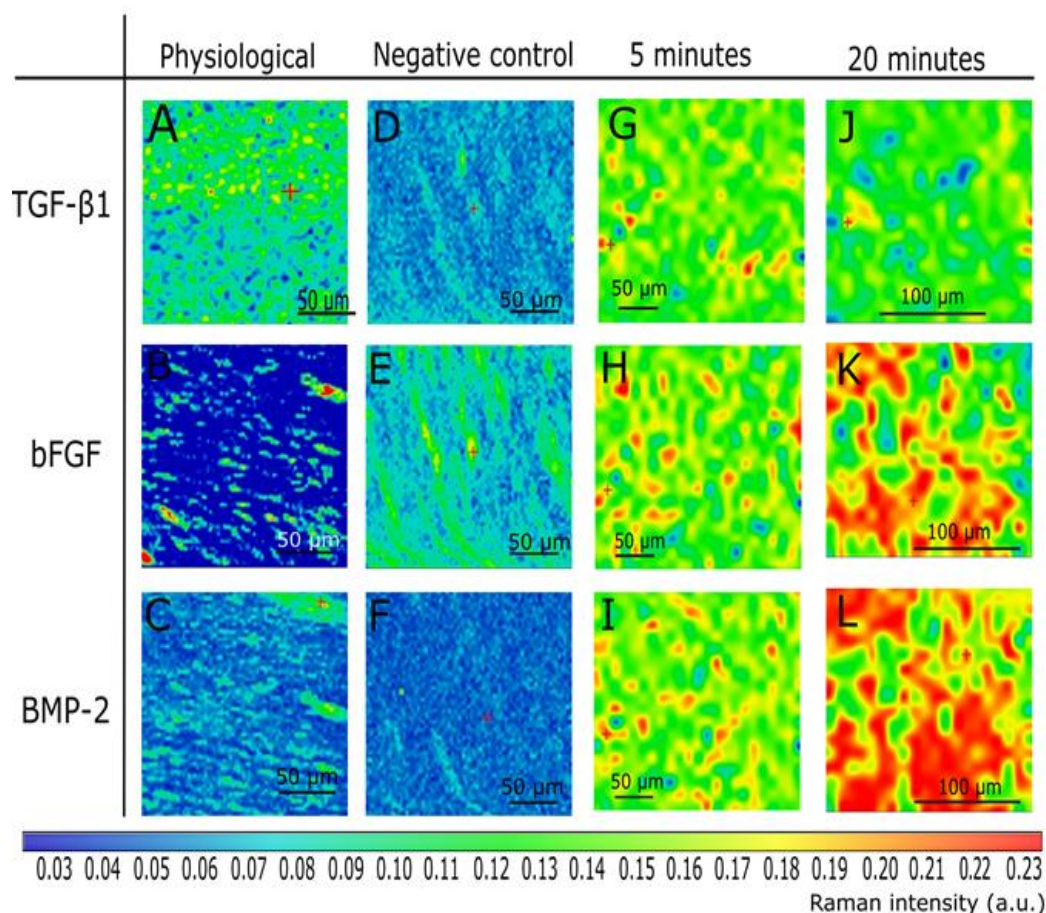
Dalším krokem bylo ošetření vzorků zubů po dobu 5 a 20 minut za použití EDTA jako chelatačního činidla k odstranění skloviny. Nejprve byla měřena plocha lidského zubního kořenového kanálu bez předúpravy pro testování potenciálu metody. Vzorky byly nejprve podrobeny analýze za použití fluorescenční mikroskopie pro ověření přítomnosti nanosenzorů na povrchu vzorku. Získané výsledky jsou zobrazeny na Obr. 5.3.4., kde je demonstrována přítomnost všech tří značek na povrchu vzorků.



Obr. 4.1.3.4.: mikroskopické snímky nanosenzorů na povrchu vzorku zubu. A) senzor TGF- β 1, B) BMP-2 a C) bFGF (149).

Ramanovy mapy fyziologického vzorku ukazují přítomnost každého růstového faktoru s různým výskytem. TGF- β 1 růstový faktor může být považován za nejhojnější, následovaly růstové faktory bFGF a BMP-2. Tyto výsledky jsou shodné s předchozími studiemi, u nichž bylo zjištěno, že růstový faktor TGF- β 1 je častější než jiné růstové faktory (151). Jako negativní kontrola byla vybrána vrstva obsahující sklovinu a tudíž je zabráněno interakcím se značkami (Obr. 5.3.5D-F), tudíž přítomnost všech tří cílených růstových faktorů na kořenovém povrchu byla výrazně snížena. Spektrální analýza vykazuje pokles o 70% pro TGF- β 1, o 50% pro bFGF a o 82% pro BMP-2. Dále byl studován vliv EDTA na přítomnost růstových faktorů na povrchu vzorku, přičemž byly zvoleny dva časové úseky 5 a 20 minut. Doba působení EDTA po dobu 5 minut je zobrazena na Obr. 5.3.5G-I, podobná Ramanova spektra byla získána u vzorků ošetřených EDTA po dobu 20 minut (Obr. 5.3.5J-L). Množství TGF- β 1 přítomného ve vzorku ošetřeného po dobu 20 minut se snížilo o 10% oproti vzorku ošetřeného po dobu

5 minut, ale vzrostlo o 80% v porovnání s fyziologickým vzorkem. Lepší výsledky byly dosaženy u bFGF a BMP-2, kde ošetření EDTA po dobu 20 minut vedla ke zvýšení výskytu růstových faktorů o více než 300% ve srovnání s fyziologickým vzorkem.



Obr. 4.1.3.5.: A-L) Ramanovy spektrální mapy získané analýzou vzorku zubů - řádky představují jednotlivé růstové faktory (TGF-β1, bFGF a BMP-2) a sloupce typy (fyziologický vzorek, negativní kontrola, ošetření EDTA 5 nebo 20 minut). Relativní Ramanova intenzita jednotlivých faktorů jsou značeny barevně, viz. barevná škála pod obrázkem. Pro Ramanovo zobrazení byly vybrány následující spektrální pásy – 1395 cm^{-1} pro anti-TGF-β1-Cy3, 1597 cm^{-1} pro anti-bFGF-Cy7 a 1621 cm^{-1} pro anti-BMP-2-Cy5 (149).

Výsledky této práce byly 6.8.2018 přijaty v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry* a v plném znění jsou dostupné v příloze C .

Závěr

Cílem předložené disertační práce byla specifická analýza biopolymerů metodou magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Syntetizované magnetické nanokompozity, funkcionalizované příslušnými látkami, byly charakterizovány řadou technik (dynamický rozptyl světla, vysokorozlišovací transmisní elektronová mikroskopie, Ramanova spektroskopie, infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce) a následně byly použity pro významné aplikace vedoucí ke stanovení cílových biopolymerů (DNA, RNA, GCP II, růstové faktory) pomocí MA-SERS.

První část experimentální práce je zaměřena na multiplexní stanovení celkového obsahu nukleových kyselin v reálných vzorcích rakovinných tkání, což představuje důležitý krok zejména v lékařské diagnostice. Stříbrné nanočástice na povrchu syntetizovaného magnetického $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu byly funkcionalizovány za použití alkylačního činidla, chlorambucilu. Takto připravený funkcionalizovaný nanokompozit byl následně použit jako biosenzor pro výše zmíněné multiplexní stanovení DNA a RNA v reálných vzorcích rakovinných tkání. Bylo dosaženo limitu detekce v $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 10%. Dosažené limity detekce spolu s minimálními časovými požadavky a jednoduchostí metody umožnily vyvinuté metodě stát se zajímavou alternativou k obecně používaným metodám založených na spektroskopii.

Druhá část experimentální práce se zabývá stanovením celkového množství GCPII v biologických vzorcích jakožto potencionálního markeru pro vývoj diagnostiky rakoviny prostaty. Metoda je založena na využití nízkomolekulárního GCPII ligandu a následné analýze pomocí MA-SERS. Funkcionalizace $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanomateriálu byla založena na ukotvení inhibitoru GCPII na jeho volném povrchu. Výsledný $\text{Fe}_3\text{O}_4@anti\text{-GCPII}@Ag$ nanokompozit byl následně použit ke stanovení celkového množství GCPII v plné lidské krvi. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, s relativní směrodatnou odchylkou stanovení 7%.

V poslední části disertační práce je popsána metoda založená na povrchové analýze růstových faktorů lidského zubního kořenového kanálu pomocí MA-SERS a $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ nanokompozitu funkcionalizovaného Ramanovskou značkou. Metoda byla testována na lidských zubních vzorcích, ve kterých byla analyzována distribuce všech tří růstových faktorů (TGF- β 1, bFGF a BMP-2) na povrchu dentinu. Dále byl v práci diskutován vliv působení EDTA, kde bylo prokázáno, že pětiminutové působení EDTA vedlo ke značnému zvýšení výskytu všech tří studovaných růstových faktorů. Bylo zjištěno, že delší působení EDTA by mohlo vést k vymytí některých růstových faktorů, proto je velice důležité pro používanou metodu optimálně nastavit čas. Výsledky značící rychlejší vymývání růstového faktoru TGF- β 1 ve srovnání s dalšími dvěma faktory odpovídaly výsledkům zveřejněných v předchozích studiích zabývajících se tímto problémem.

Výše zmíněné syntetizované nanosenzory nám otevírají nové možnosti vedoucí k ultracitlivé detekci zejména v lékařství s minimálními nároky na vybavení. Díky aplikaci magnetického nanokompozitu je možné ze složité biologické matrice specificky selektovat požadovaný analyt a následně ho analyzovat za použití Ramanovy spektroskopie.

Summary

The aim of this dissertation thesis was a specific analysis of biopolymers by magnetically assisted surface-enhanced Raman spectroscopy. The synthesized magnetic nanocomposites, functionalized by respective substances, were characterized by a number of techniques (dynamic light scattering, high resolution transmissive electron microscopy, Raman spectroscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction) and subsequently used for significant biopolymer targeting (DNA, RNA, GCP II, growth factors) by MA-SERS.

The first part of the experimental work is focused on the multiplex determination of total nucleic acid content in real samples of cancer tissues, which is an important step especially in medical diagnostics. The silver nanoparticles on the surface of the synthesized magnetic Fe₃O₄ @ Ag nanocomposite were functionalized using an alkylating agent, chlorambucil. Thus prepared functionalized nanocomposite was subsequently used as a biosensor for the above mentioned multiplex DNA and RNA assays in real cancer tissue samples. The limit of detection in ng.L⁻¹ was reached with a relative standard deviation of less than 10%. Achieved detection limits, along with minimal time requirements and simplicity of the method, allowed the developed method to become an interesting alternative to commonly used spectroscopic methods.

The second part of the experimental work deals with the determination of the total amount of GCPII in biological samples as a potential marker for the development of prostate cancer diagnosis. The method is based on the use of low-molecular GCPII ligand and subsequent MA-SERS analysis. The functionalization of Fe₃O₄ @ Ag nanomaterial was based on the anchoring of the GCPII inhibitor on its free surface. The resulting Fe₃O₄ @ anti-GCPII @ Ag nanocomposite was subsequently used to determine the total amount of GCP II in whole human blood. Detection limits ranged from ng. mL⁻¹, with a relative standard deviation of 7%.

In the last part of the dissertation the method based on surface analysis of growth factors of the human dental root canal using MA-SERS and Fe₃O₄ @ Ag nanocomposite functionalized by Raman marks is described. The method was tested on human dental samples, in which the distribution of all three growth factors (TGF- β 1, bFGF and BMP-2) on the dentin surface was analyzed. In addition, the effect of EDTA was discussed, where it was shown that the five-minute effect of EDTA led to a significant increase in the occurrence of all three studied growth factors. Longer EDTA effect has been found to lead to the removal of some growth factors, so it is very important for the method to optimize the time. Results indicating a faster elution of TGF- β 1 growth factor compared to the other two factors were consistent with the results reported in previous studies addressing this problem.

Synthesized nanosensors open up new possibilities for ultra-detection especially in medicine with minimal equipment requirements. Due to the application of magnetic nanocomposite it is possible to specifically select the desired analyte from a complex biological matrix and then analyze it using Raman spectroscopy.

Seznam zkratek

bFGF	základní fibroblastový růstový faktor
BMP-2	kostní morfogenetický protein
CCD	charge-couple zařízení
CMC	carboxymethyl celulóza
Cy3	cystein 3
Cy5	cystein 5
Cy7	cystein7
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
DRE	digitální rektální vyšetření
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid
EDS	energieově disperzní rentgenová spektroskopie
EDTA	disodium ethylenediaminetetraacetát dihydrát
ELISA	enzyme-linked immunosorbentní analýza
FITC	fluorescein isothiokyanát
FT-IR	Fourier-transform infračervená spektroskopie
GCPII	glutamát carboxypeptidáza II
HAADF	vysoko-rozlišující kontrastní zobrazení
HPAI	virus ptačí chřipky
HR-TEM	vysoko-rozlišující transmisní elektronová mikroskopie
IR	infračervená spektroskopie
LbL	vrstva po vrstvě
LSPR	lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance

MA-SERS	magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
MBA	2-chloro-N-(2-chloroethyl)-N-methylethanamin
MeOH	methanol
NHS	N-hydroxysuccinimid
NLS	nanosférová litografie
NIR	blízká infračervená spektroskopie
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
ORC	kombinovaná redoxní elektroda
PDDA	poly(diallyldimethylammoniumchlorid)
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RhB	rhodamin B
RNA	ribonukleotidová kyselina
RRS	Ramanova rezonanční spektroskopie
RSD	relativní směrodatná odchylka
SERS	povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
SERRS	povrchem zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie
TGF- β 1	transformující růstový faktor beta 1
TEM	transmisní elektronová spektroskopie
UV-VIS	ultrafialová-viditelná spektroskopie
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

Použitá literatura:

- 1) Raman; C. V., Krishnan; K. S. *Nature* **1928**, 501, 3048.
- 2) Raman; C. V., Krishnan; K. S. *J. Phys.* **1928**, 2, 399–419.
- 3) Wikipedie; <http://www.omegafilters.com/applications/raman-spectroscopy/>.
- 4) Vankeirsbilck; T., Vercauteren; A., Baeyens; W., der Weken; G.V. **2002**.
- 5) Barhoumy; A., Zhang; D., Tam; F., Halas; N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5523-5529.
- 6) Smith; E., Dent; G. *Chichester: John Wiley & Sons* **2005**.
- 7) Schrader; B., Bougeard; D. *New York: VCH* **1995**, 787.
- 8) Bakárek; V., Fryšová; I. *Univerzita Palackého v Olomouci* **2007**, 61.
- 9) Klouda; P. *vyd. Ostrava* **2003**.
- 10) Lindon; J. C., Tranter; G. E., Holmes; J. L. *London: Academic Press* **2000**, 3.
- 11) Ferraro; J. R., Nakamoto; K., Brown; CH. W. *San Diego: Academic Press* **2003**, 434.
- 12) Bumbrah; G. S., Sharma; R. M. *Egyptian Journal Of Forensis Sciences* **2016**, 6, 209-215. Schmitt; M, Popp; J. *J. of Raman Spectros.* **2006**, 37, 20-28.
- 13) Schmitt; M, Popp; J. *J. of Raman Spectros.* **2006**, 37, 20-28. Chalmers; J. M., Edwards; H. G., Hargreaves; M. D. *Hoboken: Wiley* **2012**, 1.
- 14) Chalmers; J. M., Edwards; H. G., Hargreaves; M. D. *Hoboken: Wiley* **2012**, 1.
- 15) Salzer; R., Siesler; H. W. *Německo: Wile-VCH* **2009**.
- 16) Breitenbach; J., Schrof; W., Neumann; J. *Pharmaceutical Research* **1999**, 16, 1109-1113.
- 17) Pelletier; M. J. *Blackwell Science: London* **1999**.
- 18) Dendisová; M., Žvátora; P., Matějka; P. Ramanova spektrometrie [online].
- 19) Colthup; N. B. *J. Opt. Soc. Am.* **1950**, 40, 397-400.
- 20) Perez; L. R., Contreras; P. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6060 - 6062.
- 21) Otto; A. *J. of Raman Spectros.* **2005**, 36, 497 – 509.
- 22) Le-RU; E. C., Blackie; E., Meyer; M., Etchegoin; P. G. *J. Phys. Chem.* **2007**, 111, 13794-13803.
- 23) Pal; B., Kitagawa; T. *Elsevier* **2008**, 540-546.

- 24) McNay; G., Eustace; D., Smith; W. E., Faulds; K., Graham; D. *Appl. Spectroscop.* **2011**, 65, 825-837.
- 25) Kumar; N., Mignuzzi; S., Su; W., Roy; D. *Techniques and Instrumentation* **2015**, 2, 9.
- 26) Ferrari; A. C., Robertson; J., *Phys. Rev. B* **2001**, 64, 155-306.
- 27) Jordan; T., Eads; J. C., Spiro; T. G. *Protein Science* **1995**, 4, 716-728.
- 28) Lieber; Ch. A., Mahadevan-Jansen; A. *Appl. Spectroscopy* **2003**, 11,
- 29) Moskovits; M. *Journal of Raman spectroscopy* **2005**, 36, 485-496.
- 30) El-Said; W. A., Kim; T. H., Yea; C. H., Kim; H., Choi; J. W. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, 11, 768 .
- 31) Verma; P. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 6447-6466.
- 32) Culha; M., Stokes; D., Allain; L. R., Vo-Dinh; T. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6196–6201.
- 33) Mulvaney; S. P., Musick; M. D., Keating; Ch. D., Natan; M. J. *Langmuir* **2003**, 19, 4784–4790.
- 34) Bao; L., Mahurin; S. M., Haire; R. G., Dai; S. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6614–6620.
- 35) Manoharan; R., Wang; Y., Feld; M. S. *Spectrochimica Acta A* **1996**, 52, 215-249.
- 36) Ozaki; Y., Cho; R., Ikegaya; K. *App. Spetros.* **1992**, 46, 1503-1507.
- 37) Mulvaney; S. P., Keating; Ch. D. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 145-157.
- 38) Smith; E., Dent; G. *John Wiley* **2005**.
- 39) Bell; S. E. J., Barrett; L. J., Burns; D. T., Dennis; A. C., Speers; S. J. *Analyst* **2003**, 128, 1331-1335.
- 40) Veij; M., Vandenabeele; P., Hall; K. A., Fernandez; F. M., Green; M. D., White; N. J., Dondorp; A. M., Newton; P. N., Moens; L. J. *Raman Spectrosc.* **2007**, 38, 181-187.
- 41) Andrikopoulos; K. S., Daniilia; S. X., Roussel; B., Janssens; K. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 1026-1034.

- 42) Bersani; D., Lottici; P. P., Vignali; F., Zanichelli; G. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 1026-1032.
- 43) Sandalinas; C., Ruiz-Moreno; S., Lopez-Gil; A., Miralles; J. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 1146-1153.
- 44) Hernanz; A., Gavira-Vallejo; J. M., Ruiz-Lopez; J. F. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 1054-1062.
- 45) Welter; N., Schussler; U., Kiefer; W. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, 38, 113-122.
- 46) Kast; R. E., Serhatkulu; G. K., Cao; A., Pandya; A. K., Dai; H., Thakur; J. S., Naik; V. M., Naik; R., Klein; M. D., Auner; G. W., Rabah; R. *Biopolymers* **2008**, 89, 235-241.
- 47) Jess; P. R. T., Smith; D. D. W., Mazilu; M., Dholakia; K., Riches; A. C., Herrington; C. S. *Int. J. Cancer* **2007**, 121, 2723-2728.
- 48) Faugeras; C., Nerriere; A., Potemski; M. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 92, 011914-1-011914-3.
- 49) Kuzmany; H., Pfeiffer; R., Hulman; M., Kramberger; C. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2004**, 362, 2375-2406.
- 50) Dresselhaus; M. S., Dresselhaus; G., Saito; R., Jorio; A. *Physics Reports* **2005**, 409, 47-99.
- 51) Malard; L. M., Pimenta; M. A., Dresselhaus; G., Dresselhaus; M. S. *Physics Reports* **2009**, 473, 51-87.
- 52) Sur; U. K. *Resonance* **2010**, 15, 154-164.
- 53) Haynes; CH. L., McFarland; A. D., Van Duyne; R. P. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 338A-346A.
- 54) Moskovits; M. J. *Raman Spectroscopy* **2005**, 36, 485-796.
- 55) Štrauch; B., Vlčková; B., Němec; I. *Chem. List.* **2010**, 104, 1210-1219.
- 56) Haynes; C. L., Van Duyne; R. P. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 5599-5611.
- 57) Mosier-Boss; P. A. *Nanomaterials* **2017**, 7, 142.
- 58) Nedderson; J., Chumanov; G., Cotton; T. M. *Appl. Spectrosc.* **1993**, 47, 1959-1964.

- 59) Herrera; G. M., Padilla; A. C., Hernandez-Rivera; S. P. *Nanomaterials* **2013**, 3, 158-172.
- 60) Stiufluic; R., Iacovita; C., Lucaciu; C. M., Stiufluic; G. , Dutu; A. G., Braescu; C., Leopold; N. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8, 47.
- 61) Israelsen; N. D., Hanson; C., Vargis; E. *The Scientific World Journal* **2015**, 1-12.
- 62) Wiley; B. J., Im; S. H., Li; Z. I., McLellan; J., Siekkinen; A., Xia; Y. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 15666-17675.
- 63) Wiley; B. J., Chen; Y., McLellan; J. M., Xiong; Y., Li; Z. Y., Ginger; D., Xia; Y. *Nano Lett.* **2007**, 7, 1032-1036.
- 64) Wiley; B., Sun; Y., Mayers; B., Xia; Y. *Chemistry* **2005**, 11, 454-63.
- 65) Tian; F., Bonnier; F., Casey; A., Shanahan; A. E., Byrne; H. J. *Anal. Methods*. **2014**, 6, 9116–9123.
- 66) Péron; O., Rinnert; E., Lehaitre; M., Crassous; P., Compère; *Talanta* **2009**, 79, 199-204.
- 67) Fierro-Mercado; P. M., Hernández-Rivera; S. P. *Int. J. Spectrosc.* **2012**, 1-7.
- 68) Muniz-Miranda; M., Gellini; C., Giorgetti; E., Margheri; G., Marsili; P., Lascialfari; L., Becucci; L., Trigari; S., Giammanco; F. *Thin Solid Films* **2013**, 543, 118–121.
- 69) Mosier-Boss; P. A., Sorensen; K. C., George; R. D., Obratsova; A. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016** , 153, 591-598.
- 70) Ramanauskaite; L., Snitka; V. *Nanoscale Res Lett.* **2015**, 10, 133.
- 71) Rodríguez-Fernández; D., Langer; J., Henriksen-Lacey; M., Liz-Marzán; L. M. *Chem. Mater.* **2015**, 27, 2540–2545.
- 72) Lin; C. H., Jiang; L., Chai; Y. H., Xiao; H., Chen; S. J., Tsai; H. L. *Opt Express.* **2009**, 17, 21581-21589.
- 73) Mahajan; S., Abdelsalam; M., Suguwara; Y., Cintra; S., Russell; A., Baumberg; J., Bartlett; P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 104-109.
- 74) Hatab; N. A., Hsueh; C. H., Gaddis; A. L., Retterer; S. T., Li; J. H., Eres; G. , Zhang; Z., Gu; B. *Nano Lett.* **2010**, 10, 4952-4955.

- 75) Cinel; N. A., Cakmakyapan; S., Butun; S., Ertas; G., Ozbay; E. *Photonics Nanostruct. Fundam. Appl.* **2015**, 15, 109–115.
- 76) Xie; Ch., Dinno; M. A., Li; Y. *Optics Letters* **2002**, 4, 249-251.
- 77) Zou; S., Weaver; M. J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2387–2395.
- 78) Fokas; C., Deckert; V. *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 192–199.
- 79) Shafer-Peltier; K. E., Haynes; C. L., Glucksberg; M. R., Van Duyne; R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 588–593.
- 80) Tao; A., Kim; F., Hess; Ch.,Goldberger; J., He; R., Sun; Y., Xia; Y., Yang; P. *Nano Lett.* **2003**, 3, 1229–1233.
- 81) Shafer-Peltier; K. E., Haynes; C. L., Glucksberg; M. R., Van Duyne; R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 588–593.
- 82) Cao; Y. C., Jin; R., Mirkin; C. A. *Science* **2002**, 297, 1536–1540.
- 83) Alharbi; O., Xu; Y., Goodacre; R. *Analyst* **2015**, 140, 5965-5970.
- 84) Mabbott; S., Alharbi; O., Groves; K., Goodacre; R. *Analyst* **2015**, 13, 4399-4406.
- 85) George; J. T. Jr, *Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 1-27.
- 86) Westermeier; R., Naven; T. *Wiley-VCH* **2002**, Weinheim.
- 87) Graham; D., Goodacre; R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 5.
- 88) Kneipp; K., Moskovits; M., Kneipp; H. *Springer* **2006**, Berlin Heidelberg New York.
- 89) Bizzarri; A. R., Cannistraro; S. *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 1531–1537.
- 90) Cao; Y. C., Jin; R., Nam; J. M., Thaxton; C. S., Mirkin; C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 125, 14676–14677.
- 91) Weaver; M. J. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13,79–89.
- 92) Bensimon; A., Simon; A., Chiffaudel; A., Croquette; V., Heslot; F., Bensimon; D. *Science* **1994**, 30, 2096-2098.
- 93) Lee; S. B., McCord; B., Buel; E *Electrophoresis* **2014**, 35, 3044-3052.
- 94) Diamandis; E. P. *Clin. Chim. Acta* **1990**, 194, 19-50.
- 95) Wang; H., Jiang; X., Wang; X., Wei; X., Zhu; Y., Sun; B., Su; Y., He; S., He; Y. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 7368-7376.

- 96) Zheng; J., Jiao; A., Yang; R., Li; H., Li; L., Shi; M., Ma; C., Jiang; Y., Deng; L., Tan; W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 19957-19960.
- 97) Pang Y., Wang J., Xiao; R., Wang S. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 61, 460-465.
- 98) Shi; Z., Neoh; K. G., Kang; E. T., Shuter; B., Wang; S.-C., Poh; C., Wang; W. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, 1, 328-335.
- 99) Huang; S. Q., Hu; J., Zhu; G., Zhang; C.-Y. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 65, 191-197.
- 100) Ou; L., Chen; Y., Su; Y., Huang; Y., Chen; R., Lei; J. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, 44, 680-685.
- 101) Morla-Folch; J, Xie; H.-N., Gisbert-Quilis; P., Gómez-de Pedro; S., Pazos-Perez; N., Alvarez-Puebla; R. A., Guerrini; L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54, 13650-13654.
- 102) Yuanfeng; P., Wang; C., Wang; J., Sun; Z., Xiao; R., Wang; S. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 79, 574-580.
- 103) Wang; J. Y., Zhu; S. G., Xun; C. F. *Biochemistry* **2002**, High Education PressChina.
- 104) Stewart; S., Fredericks; P. M. *Spectrochim. Acta* **1999**, Part A 55, 1615–164.
- 105) Grabbe; E. S., Buck; R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8362–6366.
- 106) Macdonald; I. D. G., Smith; W. E. *Langmuir* **1996**, 12, 706–713.
- 107) Delfino; I., Bizzarri; A. R., Cannistraro; S. *Biophys. Chem.* **2005**, 113, 41–51.
- 108) Li; H., Sunh; J., cullum; B. M. *Nanobiotechnology* **2006**, 2, 17–28.
- 109) Feng; M., Tachikawa; H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7443–7448.
- 110) Towbin; H., Staehelin; T., Gordon; J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, 76, 4350–4354.
- 111) Xiao; X., Zhao; B., Ozaki; Y. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 1719–1727.
- 112) Bell; S. E. J., Sirimuthu; N. M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15580–15581.
- 113) Bell; S. E. J., Mackle; J. N., Sirimuthu; N. M. S. *Analyst* **2005**, 130,545–549.
- 114) Gong; J. L., Liang; Y., Huang; Y., Chen; J. W., Jiang; J. H., Shen; G. L., Yu; R. Q. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 1501–1507.

- 115) Wang; J. Y., Zhu; S. G., Xun; C. F. *Biochemistry* **2002**, High Education PressChina.
- 116) Kemeny; D. M. J. *Immunol. Meth.* **1992**, 150, 57–76.
- 117) Zhu; H., Snyder; M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 1, 55–63.
- 118) Geddes; C. D., Lakowicz; J. R. *J. Fluoresc.* **2002**, 12, 121–129.
- 119) Ruan; W. D., Wang; C. X., Ji; N., Lu; Z. C., Zhou; T. L., Zhao; B., Lombardi; J. R. *Langmuir* **2008**, 24, 8417–8420.
- 120) Carney; J., Braven; H., Seal; J., Whitworth; E. *IVD Technol* **2006**, 11, 41–51.
- 121) Zeman; E. J., Schatz; G. C. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 634–643.
- 122) Panacek; A., Kvitek; L., Pucek; R., Kolar; M., Vecerova; R., Pizurova; N., Sharma; V. K., Nevecna; T., Zboril; R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 16248–16253.
- 123) Marková; Z., Šišková; K., Filip; J., Šafářová; K., Pucek; R., Panáček; A., Kolář; M., Zbořil; R. *Green Chem.* **2012**, 14, 2550–2558.
- 124) Shi; Z., Neoh; K. G., Kang; E. T., Shuter; B., Wang; S-C., Poh; C., Wang; W. *Appl. Mater. Interfaces* **2009**, 1, 328–335.
- 125) Bakandritsos; A., Mattheolabakis; G., Chatzikyriakos; G., Szabo; T., Tzitzios; V., Kouzoudis; D., Couris; S., Avgoustakis; K. *Adv. Funct. Mater* **2011**, 21, 1465–1475.
- 126) Chaloupková; Z., Balzerová; A., Bařinková; J., Medřiková; Z., Šácha; P., Beneš; P., Ranc; V., Konvalinka; J., Zbořil; R. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 997, 44–51.
- 127) Murelli; R. P., Zhang; A. X., Michel; J., Jorgensen; W. L., Spiegel; D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17090–17092.
- 128) Chaloupková; Z., Balzerová; A., Medřiková; Z., Srovnal; J., Hajdúch; M., Čépé; K., Ranc; V., Zbořil; R. *Applied Materials Today* **2018**, 12, 85–91.
- 129) Landis; S. H., Murray; T., Bolden; S., Wingo; P. A. *Ca-Cancer J. Clin.* **1999**, 49, 8–31.
- 130) Wingo; P. A., Cardinez; C. I., Landis; S. H., Greenlee; R. T., Ries; L. A. R., Anderson; R. N., ThunLong; M. J. *Cancer* **2003**, 97, 3133–3275.

- 131) Lorch; A. *Onkologe* **2017**, 23 , 237-250.
- 132) Klotz; L. *Curr. Opin. Urol.* **2012**, 22 , 222-230.
- 133) Perner; S., Hofer; M. D., Kim; R., Shah; R. B., Li; H. J., Moller; P., Hautmann; R. E., Gschwend; J. E., Kuefer; R., Rubin; M. A. *Hum. Pathol.* **2007**, 38 , 696-701.
- 134) Maresca; K. P., Hillier; S. M., Femia; F. J., Keith; D., Barone; C., Joyal; J. L., Zimmerman; C. N., Kozikowski; A. P., Barrett; J. A., Eckelman W. C., Babich; J. W. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 , 347-357.
- 135) Hollo; Z., Homolya; L., Hegedus; T., Muller; M., Szakacs; G., Jakab; K., Antal; F., Sarkadi; B. *Anticancer Res.* **1998**, 18 , 2981-2987.
- 136) Gotoh; K., Yamada; T., Ishikawa; O., Takahashi; H., Eguchi; H., Yano; M., Ohigashi; H., Tomita; Y., Miyamoto; Y., Imaoka; S. *J. Surg. Oncol.* **2009**, 100 , 75-79.
- 137) Kirby; B J., Hasselbrink; E. F. *Electrophoresis* **2004**, 25 , 187-202.
- 138) Barth; A. *Bioenergetics* **2007**, 1767 , 1073-1101.
- 139) Knedlik; T., Navratil; V., Vik; V., Pacik; D., Sacha; P., Konvalinka; J. *Prostate* **2014**, 74 , 768-780.
- 140) Dhillon; H., Kaushik; M., Sharma; R. *Applied Biomaterials* **2016**, 104, 676–685.
- 141) Smith; A., Scheven; B., Takahashi; Y., Ferracane; J., Shelton; R., Cooper; P. *Archives of Oral Biology* **2012**, 57, 109–121.
- 142) He; H., Yu; J., Liu Y., Lu; S., Liu; H., Shi; J., Jin; Y. *Cell Biology International* **2008**, 32, 827–834.
- 143) Zhu; Q. , Gao; J., Tian; G., Tang; Z., Tan; Y. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2017**, 49, 609–616.
- 144) Morito; A., Kida; Y., Suzuki; K., Inoue; K., Kuroda; N., Gomi; K., Arai; T., Sato; T. *Archives of Histology and Cytology* **2009**, 72, 51–64.
- 145) Galler; K. M., Buchalla; W., Hiller; K-A., Federlin; M., Eidt; A., Schiefersteiner; M., Schmalz; G. *Journal of Endodontics* **2015**, 41, 363–368.

- 146) Zavala-Alonso; V., Loyola-Rodríguez; J. P., Terrones; H., Patiño-Marín; N., Martínez-Castañón; G. A., Anusavice; K. *Journal of oral science* **2012**, 54, 93–98.
- 147) Wang; Y., Yao; X. *Dental Materials* **2010**, 26, 433–442.
- 148) Ramakrishnaiah; G., Rehman; S, Basavarajappa; A. A., Al Khuraif; B. H., Durgesh; A. S., Khan *Applied Spectroscopy Reviews* **2015**, 50, 332–350.
- 149) Ranc; V., Žižka; R., Chaloupková; Z., Ševčík; J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**,
v rešeržním řízení
- 150) Wang; Y., Schlücker; S. *Analyst* 2013, 138, 2224–2238.
- 151) Galler; K.M., Buchalla; W., Hiller; K-A., Federlin; M., Eidt; A., Schiefersteiner; M., Schmalz; G. *J. Endod.* **2015**, 41, 363–368.

Přílohy

Příloha A

Z. Chaloupková, A. Balzerová, Z. Meříková, J. Srovnal, M. Hajdúch, K.
Čépé, V. Ranc, R. Zbořil

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

Applied Materials Today, 85-91, 2018



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.

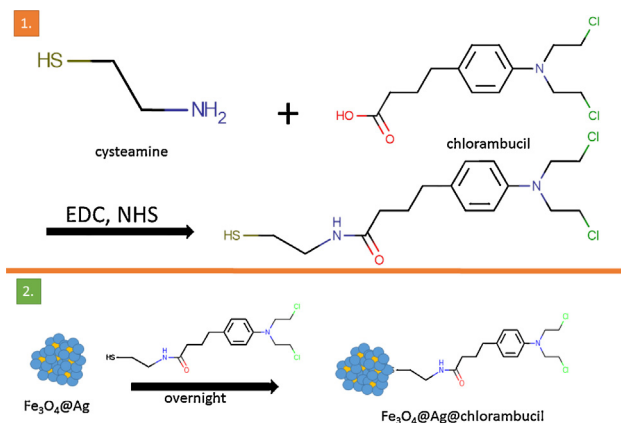
Genomic DNA was purified from 14 fresh-frozen brain tumor biopsies using a Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) in accordance with the manufacturer's instructions. The tumor specimens were lysed with protease K. Subsequently, isopropanol was added, and DNA was then bonded to the 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

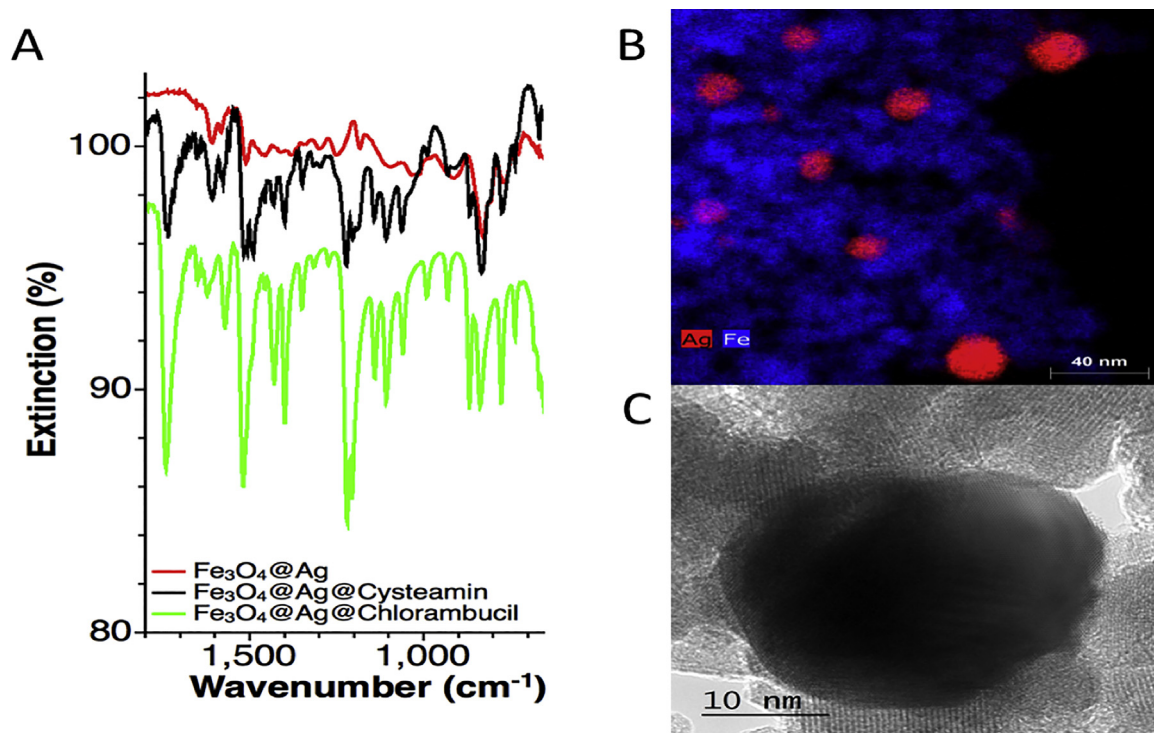


Fig. 1. (A) Infrared spectra obtained at three steps of the synthesis of Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite. Trace 1: raw Fe₃O₄@Ag nanocomposite, Trace 2: Fe₃O₄@Ag nanocomposites functionalized by cysteamine, and Trace 3: Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite. The as-prepared nanocomposite has been successfully functionalized. (B) Elemental analysis (color labels; blue: iron, red: silver) of Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite reveals the presence of silver and magnetic nanoparticles. (C) HRTEM image of the as-prepared functionalized Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite showing a magnetic nanoparticle. Fe₃O₄ 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 Fe₃O₄@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 Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite is evaluated over 21 days with a 25% degreasing of the analytical

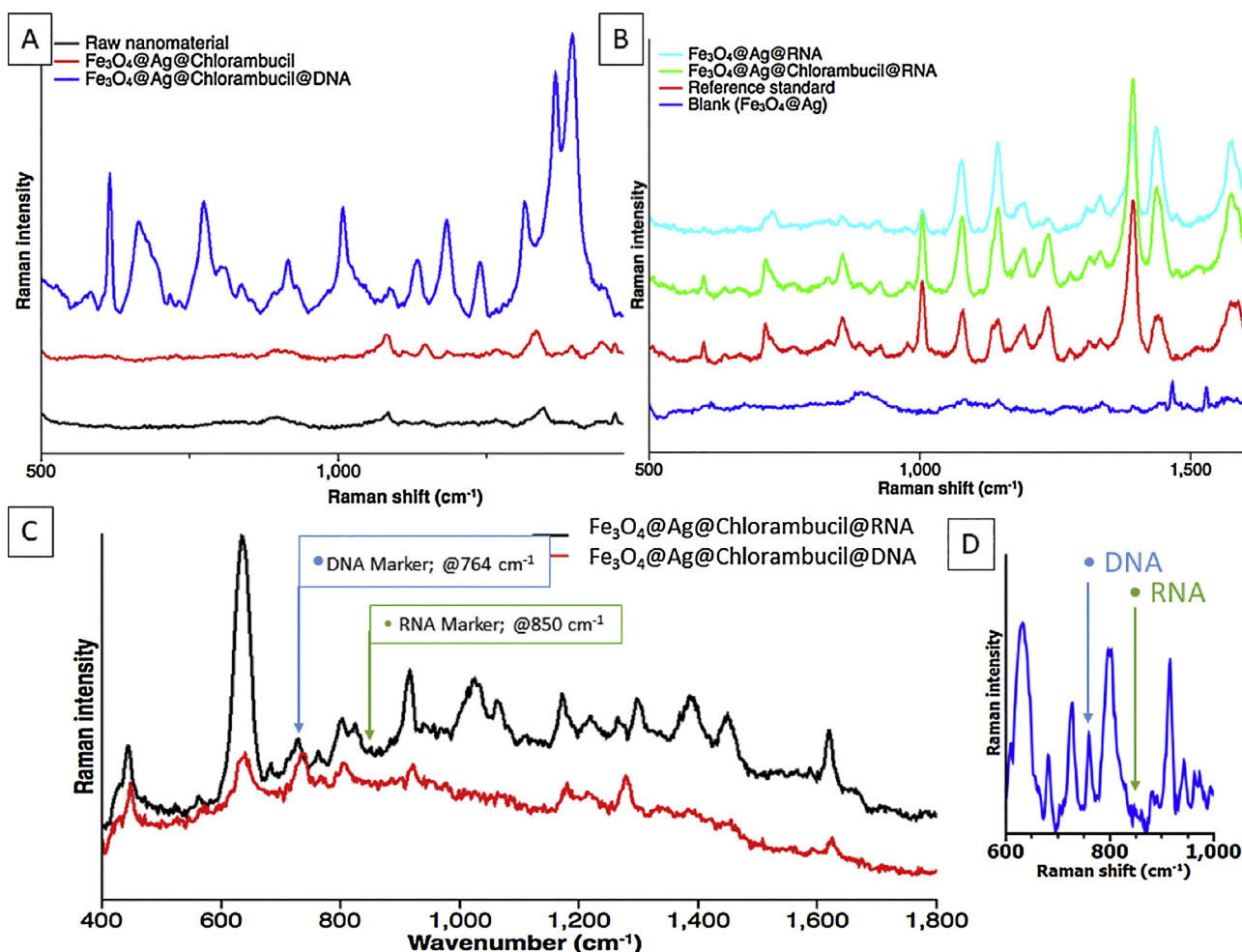


Fig. 2. (A) Raman spectra obtained from the bare Fe₃O₄@Ag nanocomposite, Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite (Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil), and a standard sample of DNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$) associated with the Fe₃O₄@Ag nanocomposite (Fe₃O₄@Ag@DNA). (B) Raman spectra obtained from: the as-prepared Fe₃O₄@Ag nanocomposite (blank), an actual sample of non-functionalized RNA (Fe₃O₄@Ag@RNA), an actual sample of RNA functionalized by chlorambucil using the Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil nanocomposite (Fe₃O₄@Ag@Chlorambucil@RNA), and a standard RNA ($c = 100 \text{ ng L}^{-1}$)-containing solution, analyzed using the Fe₃O₄@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 Fe₃O₄@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 "Fe₃O₄@Ag" and "Fe₃O₄@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 Fe₃O₄@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 Fe₃O₄@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 Fe₃O₄@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 Fe₃O₄ 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).

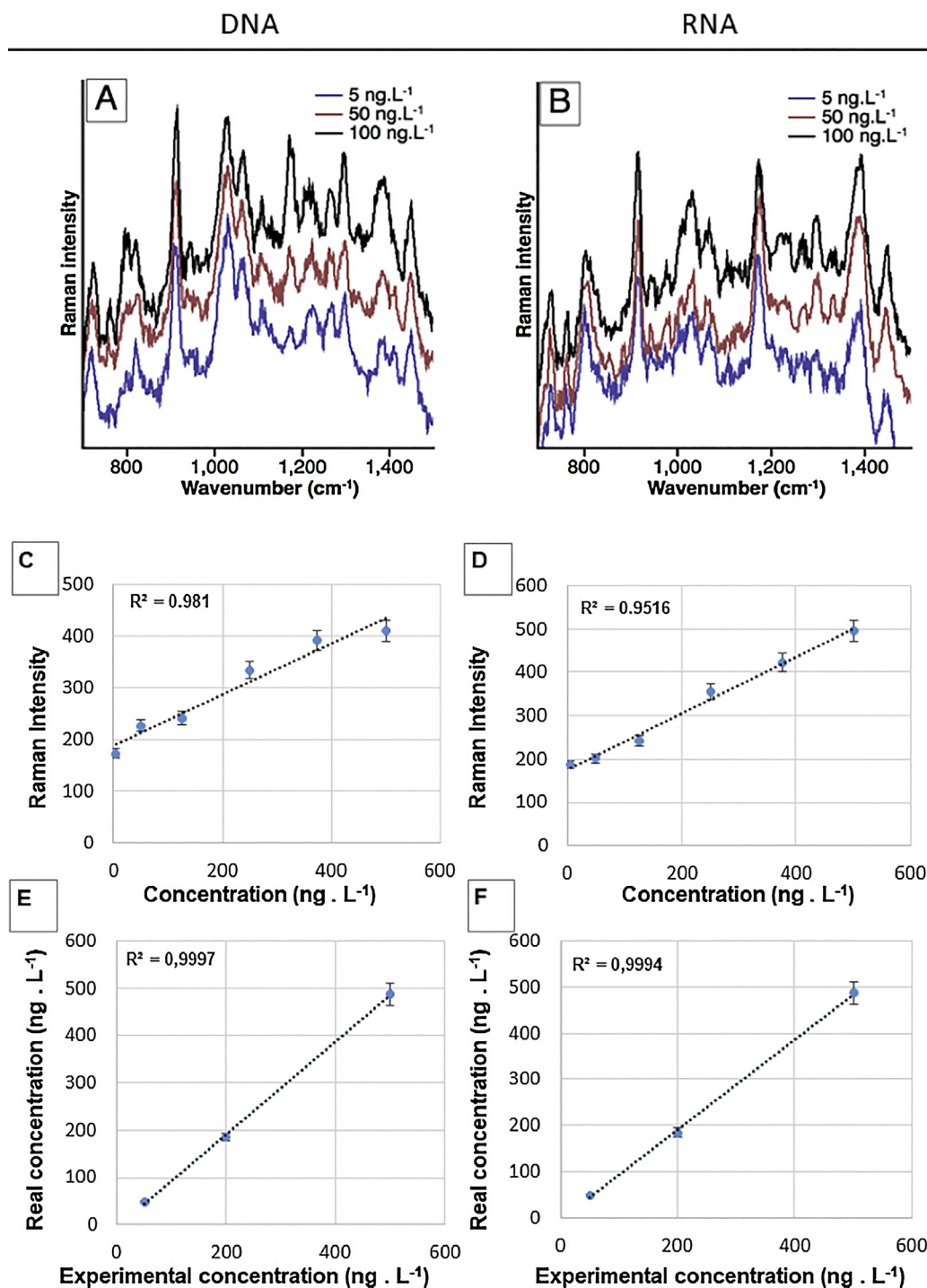


Fig. 3. Data obtained from the MA-SERS analysis of actual samples. Raman spectra obtained from analysis of (A) DNA and (B) RNA at concentrations of 5, 50, and 100 ng.L⁻¹. Calibration curves containing six calibration points obtained from the analysis of (C) DNA and (D) RNA. Quantitative results obtained 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. Marková, M. Hajdúch, R. Prucek, L. Kvitek, J. Kaslík, 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.

Příloha B

Z. Chaloupková, A. Balzerová, J. Bařinková, Z. Meříková, P. Šácha, P. Beneš,
K., V. Ranc, J. Konvalinka, R. Zbořil

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,44-51, 2018



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

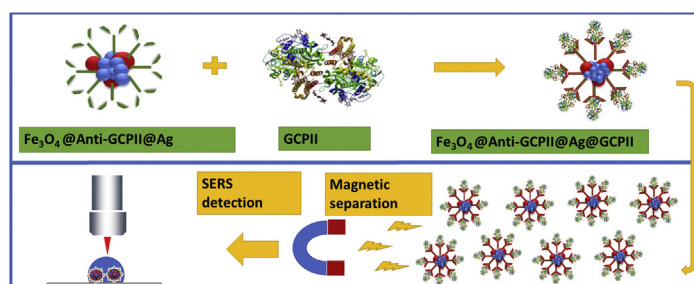
^c Oncology Clinic, University Hospital in Olomouc, I. P. Pavlova 6, Olomouc, Czech Republic

^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 pmol 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

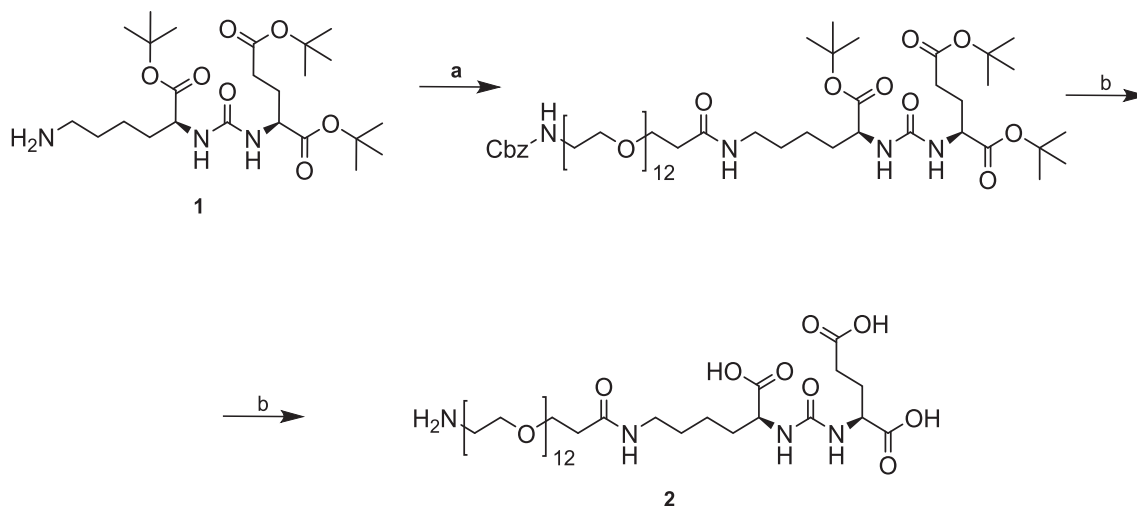
Silver nitrate (p.a.), D-(+)-maltose monohydrate (p.a.), ammonia (25%) (p.a.), carboxymethyl cellulose sodium salt (low viscosity), iron(II) sulfate heptahydrate ($\geq 99\%$), ammonium hydroxide solution, (28.0–30.0%), and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride ($\geq 99.0\%$) 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

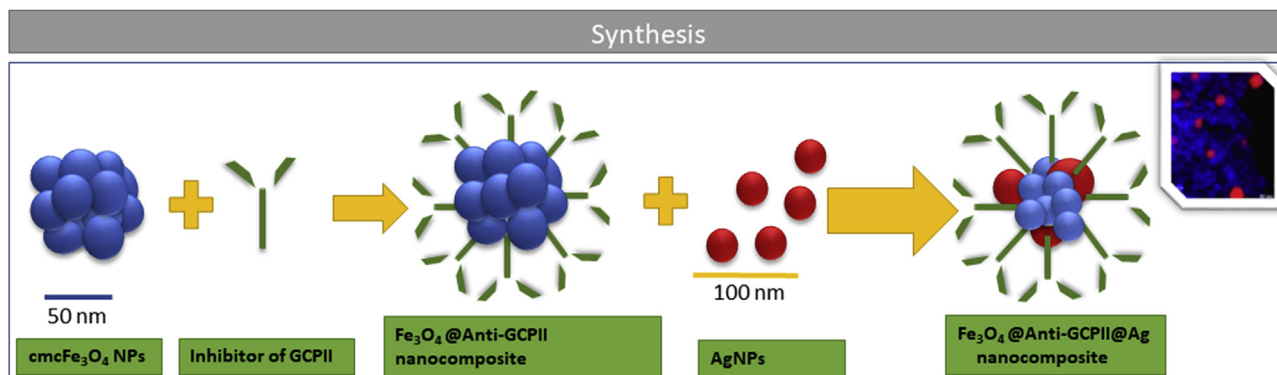


Fig. 1. General scheme describing the preparation and follow up functionalization of the nanomaterial.

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 (Omnicon version 8, Thermo Scientific, USA).

2.9. Analysis of samples

Our analytical method utilizes Fe_3O_4 @Ag magnetic nanocomposite functionalized with a low-molecular-weight GCPII inhibitor (compound **2**). The final (Fe_3O_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 Fe_3O_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 Fe_3O_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

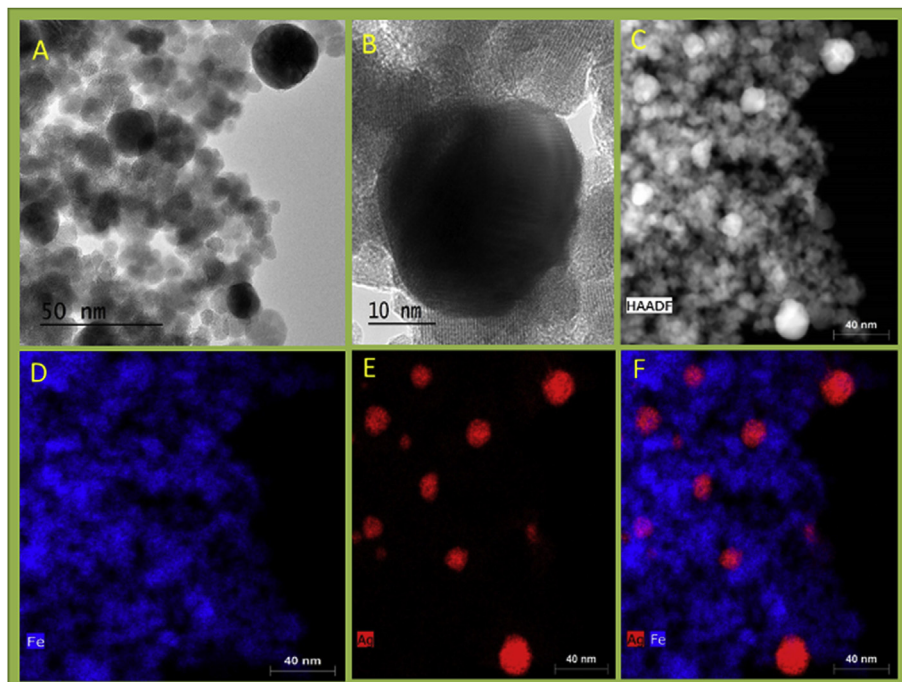


Fig. 2. High-resolution TEM images of colloidal $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ stabilized by CMC. A: general overview of the sample, B: detailed view of a silver nanoparticle, C: HAADF image of the sample, D–F: EDS characterization focused on the presence of Ag and Fe elements.

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

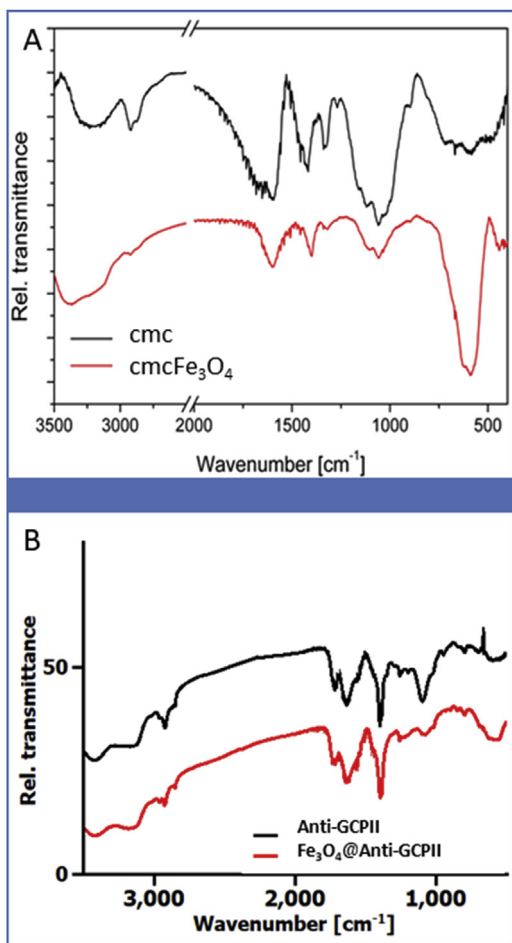


Fig. 3. A: FT-IR spectroscopy of cmcFe_3O_4 . Black, FT-IR of raw CMC; red, FT-IR of nano Fe_3O_4 functionalized by CMC. B: FT-IR spectroscopy of functionalized Fe_3O_4 @Anti-GCPII. Black trace, FT-IR of raw Anti-GCPII; red trace, FT-IR of cmcFe_3O_4 functionalized by Anti-GCPII forming Fe_3O_4 @Anti-GCPII.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

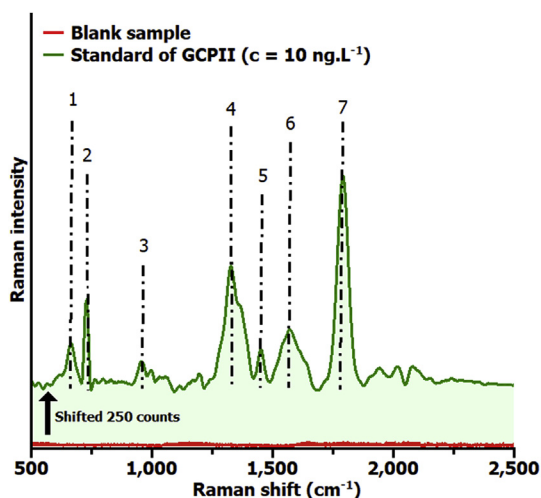


Fig. 4. Raman spectrum obtained by the analysis of Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite (label: Blank sample), and Raman spectrum obtained from the analysis of purified recombinant GCPII ($c = 10 \text{ ng ml}^{-1}$) using Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite (label: Standard of GCPII). An interpretation 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} .

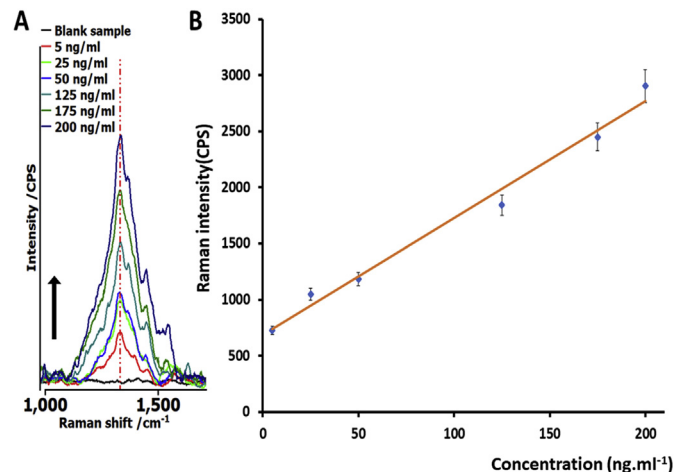


Fig. 5. A) Raman spectra obtained by analysis of GCPII at six different concentration levels: 5–200 ng/mL. B) Calibration curve for GCPII, obtained from the spectral analysis of standard samples.

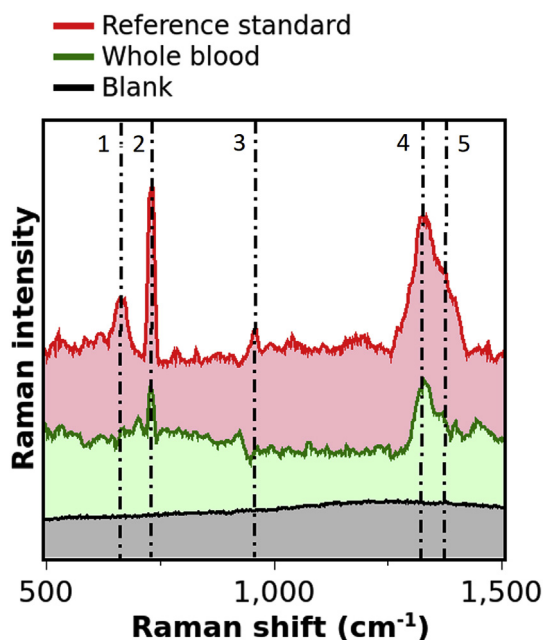


Fig. 6. Raman spectra obtained by analysis of a whole blood sample containing GCPII with nanocomposite functionalized by compound 2 (Whole blood) and reference spectrum of a standard solution of GCPII ($c = 10 \text{ ng ml}^{-1}$), analyzed using Fe_3O_4 @Anti-GCPII@Ag nanocomposite (Reference standard). 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. Senthambichelvan, 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.

Příloha C

V. Ranc, R. Žižka, Z. Chaloupková, J. Ševčík, R. Zbořil

Imaging of growth factors on a human tooth root canal by surface
enhanced Raman spectroscopy

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018

Imaging of growth factors on a human tooth root canal by surface enhanced Raman spectroscopy

Václav Ranc¹, Radovan Žižka², Zuzana Chaloupková¹, Juraj Ševčík³, Radek Zbořil¹

¹Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 77146 Olomouc, Czech Republic.

² Czech Educational and Dental Research Innovative Group, Brno, Czech Republic.

³ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic.

ABSTRACT

Endodontic treatment of immature permanent teeth with necrotic pulp poses several clinical challenges and is one of the most demanding interventions in endodontics. Recently, with new discoveries in the field of tissue engineering, novel treatment protocols have been established. The most-promising treatment modality is revascularization, which integral part is the exposure of collagen matrix and embedded growth factors. However, optimization of the treatment protocol requires a development of analytical procedures able to analyze growth factors directly on the sample surface.

In this work, method based on surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) was developed to investigate the influence of the time of the medical treatment using EDTA on exposure and accessibility of the growth factors, namely TGF- β 1, BMP-2, and bFGF on the dentine surface. The nanotags, which consist of magnetic Fe₃O₄@Ag nanocomposite covalently functionalized by tagged antibodies (anti-TGF- β 1-Cy3, anti-BMP-2-Cy5, and anti-bFGF-Cy7), were employed as a SERS substrate. Each antibody was coupled with a unique label allowing to perform a parallel analysis of all three growth factors within one analytical run. Developed methodology presents an interesting

alternative to a fluorescence microscopy and in contrary allows to evaluate a chemical composition and thus minimize possible false-positive results.

Keywords: SERS, nanocomposites, growth factors, imaging

1. Introduction

The endodontic treatment of immature permanent teeth with necrotic pulp remains one of the most challenging treatment options in endodontics. Root canal treatment is nowadays a standard modality for teeth with infected dental pulp[1]. However, this process is still a subject to several clinical challenges[2, 3]. Nowadays, the cell-free approach of regenerative treatment known as revascularization or revitalization belongs among the most applied approaches. It depends on the intracanal delivery of scaffold which is rich in growth factors and contains stem cells or can attract such cells residing in the periapical region[4, 5]. The growth factors of the extracellular dentinal matrix, with significant roles in pulp-dentin regeneration, are transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and basic fibroblast growth factor (bFGF). One of the most considerable challenges of the newly developed protocols is efficient removal of the present smear layer[6]. Smear layer is an amorphous layer of dentin, pulp and bacterial remnants which is produced during cavity preparation or root canal instrumentation. The content is composed of two distinct layers where a thin superficial layer 1-2 micrometres thick overlying a densely packed layer that penetrated into the dentinal tubules which are subsequently occluded. The organic part is mostly composed of collagen residues and glycosaminoglycans.[7] Its presence is efficiently lowering the availability of the growth factors by an effective blocking of the surface for further interactions. Based on its structure, it can't be removed by a water stream, and it is thus usually treated with acids[8] or chelators such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).[9–11] The efficiency of each treatment approach is given by the number of the exposed growth factors available for further interactions with the introduced stem cells, and development of analytical protocols allowing to study the distribution of the growth factors on the dentin surface is thus essential.

Majority of approaches is based on immunohistochemical localization of the growth factors, including recently published works by Hisamoto, et al. [12], where selected growth factors and receptors in the tooth germ of murine fetuses and neonates were studied, Shubo et al. [13], where an expression of growth factors such as connective tissue growth factor, and TGF- β 1 were studied during a mouse tooth development, and Niwa et al. demonstrated a localization of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin[14]. However, the results obtained by an immunohistochemical analysis could be influenced by a presence of nonspecific interactions and thus false positive results. Interestingly, only a limited number of works employs alternative approaches. One of few examples was demonstrated by Zhao et al., where a distribution of TGF- β isoforms on dentinal cut surfaces of mature teeth was studied using an electron microscopy and functionalized gold substrate [15].

To our best knowledge, parallel imaging of growth factors directly on the dentin surface using molecular spectroscopy has not been reported yet. Raman spectroscopy has been previously exploited in this area only superficially, despite its considerable potential. It was applied in the analysis of carious lesions in enamel [16], analysis of enamel fluorosis at healthy and affected samples [17], study of dentine [18] or analysis of microorganism present in oral cavity[19, 20]. The potential of Raman spectroscopy was considerably increased with a discovery of surface enhanced Raman scattering (SERS) by Fleischman[21]. Recent modification of SERS, The magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS), presents an interesting alternative to a selective detection of single molecules, such as PSMA, dopamine or IgG [22–24]. However, its application in surface imaging was limited. The aim of this present work is to enhance the original MA-SERS methodology and apply it in a parallel imaging of growth factors, namely TGF- β 1, BMP-2 and bFGF, on root dentin canals on four real samples. The developed methodology is based on magnetic Fe₃O₄@Ag nanosensors, functionalized using covalently anchored antibodies tagged with unique Raman tags.

2. Experimental section

2.1.Reagents and chemicals

Silver nitrate (p.a.), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (98% (HPLC); NHS), Cy3 mAb Kit, Cy5 and Cy7 mAb Kit were purchased from Sigma-Aldrich (San Jose, U.S.A.). H_3PO_4 (p.a., 85% w/w) and NaOH (p.a.) were purchased from Lach-Ner. Acetic acid (99.8%) and methanol (p.a.) were obtained from P-LAB (Czech Republic). Antibodies, namely Anti-TGF-B1, Anti-BMP-2, and Anti-bFGF, were purchased from Abcam (United Kingdom).

2.2.Sample extraction

Five non-carious immature single-rooted human-premolars were obtained from three patients in cases where extraction of these teeth had been indicated for orthodontic reasons and otherwise the teeth would have been disposed of. The parents were informed about further usage of the extracted premolars and a written informed consent was obtained. The approval of Ethic committee of Faculty Hospital Olomouc and Medical Faculty of Palacký University for the study was obtained (NV-18-08-00328). After extraction, the teeth were washed with saline (0.9% NaCl, B. Braun Medical, Melsungen, Germany), stored in a solution of inorganic salts (1.5 mmol/l $CaCl_2$, 1.0 mmol/l KH_2PO_4 , 50.0 mmol/l NaCl) and immediately transported for specimen preparation.

2.3.Sample treatment using EDTA

After radiological verification that only one root canal is present, the teeth were decoronated and the roots sectioned in the middle of the longitudinal and horizontal dimension plane with a segmented diamond-edged blade cooled by water. Under this procedure, four specimens from one tooth with the intact surface of the root canal have been obtained, and were randomly divided into four groups – negative control group,

positive control group and two experimental groups with different time exposure with 17 % EDTA; five samples from different specimen were present in each group. In the negative control, and experimental groups, the surface of the root canal was smoothed with a diamond burr (FGSL H.1.316.010, Komet USA, Rock Hill, USA) to obtain the smear layer. In the positive control group (labeled as physiological sample), the specimen was rinsed with saline (0.9 % NaCl, B. Braun Medical, Melsungen, Germany). In the experimental groups, the surface of the root canal was rinsed with 17 % EDTA (MD-Cleanser, Meta Biomed, Cheongju-Si, South Korea) for 5 and 20 minutes and subsequently rinsed with saline (0.9 % NaCl, B. Braun Medical, Melsungen, Germany).

2.4. Tagging of antibodies

Antibodies, namely anti-TGF- β 1, anti-BMP-2, and anti-bFGF, were labeled using a labeling kit containing reactive fluorescent dye Cy3, Cy5 and Cy7 tags, coupling buffer (1 M Sodium Carbonate buffer, pH 9.3) and PBS buffer. Anti-TGF- β 1 protein was labeled with a Cy3 tag, anti-BMP-2 with Cy5 tag, and anti-bFGF with a Cy7 tag according to the obtained standard protocol. Labeled proteins were purified by using centrifugal filter units (Amicon Ultra 0.5 mL, MWCO 3kDa) at 10000 rpm for 10 minutes to separate an excessive free compound.

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 the protocol previously described by Panacek et al.[25] Briefly, silver nitrate and maltose were dissolved in deionized water to achieve a concentration of 1 mmol and 10 mmol, respectively. The added concentration of ammonia was 5 mmol. After the silver, sugar, and ammonia were added, the reaction system's pH was adjusted to 11.5 by adding sodium hydroxide to initiate the reduction process. The reaction was complete after four minutes having yielded a suspension of silver nanoparticles with an average particle size of 30 nm, measured by a dynamic light scattering method.

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

The magnetite nanoparticles stabilized by using carboxymethyl chitosan (CMC) were prepared according to the protocol described by Markova et al.[26]. Briefly, carboxymethyl chitosan 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, magnetic nanoparticles are formed. The sample was centrifuged and the supernatant containing residual chemicals was removed and replaced with water. Finally, 10 μL of dispersion containing previously prepared silver nanoparticles (section 2.5) was mixed with 200 μL of dispersion containing prepared magnetic nanoparticles. The silver nanoparticles were immobilized on the present carboxymethylchitosan shell via a bond between present nitrogen atoms and silver. The formed nanocomposite was stirred for 10-15 min at room temperature.

2.7.Functionalization of nanomaterials

The prepared nanomaterial was functionalized using antibodies, tagged with Raman labels. First, 75 μL of CMC magnetic nanocomposite was activated by using 15 μL EDC (1 mM) for 60 minutes. Next, 15 μL of NHS (1 mM) and respective Raman-tagged antibody (50 μM) were added and let react overnight. The magnetic properties of the nanocomposite allowed to quantitatively isolate the product from the reaction medium by a simple application of external magnetic field wash it three times with a distilled water. This step minimized a presence of nonspecific adsorption of free Raman tags and free antibodies on a surface of the nanosensor.

2.8.Sample pretreatment

Each sample was immersed in a 1 mL solution containing 100 μL of each functionalized nanomaterial, namely $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-TGF-}\beta 1@\text{Cy}3$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Ag}@\text{Anti-BMP-2}@\text{Cy}5$, and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Ag}@\text{Anti-bFGF}@\text{Cy}7$. The sample was let to interact for 20 minutes. When finished, it was washed in water three times to remove any unbonded nanomaterial.

2.9.Apparatus

Sample Raman spectra were acquired using a DXR Raman spectrometer (Thermo Scientific, U.S.A.) equipped with a red excitation laser operating at the wavelength of 633 nm. Stokes Raman spectra were collected at wavenumbers of 400-1800 cm^{-1} and a spectral resolution 1.0 cm^{-1} . The spectrometer operated under the following conditions: exposure time: 32 s, laser power on sample: 2 mW. In each case, an averaged Raman spectrum was obtained from a total of 32 micro scans. SERS spectra were measured using procedure described earlier by Pucek et al.[27] Briefly, 200 μL of the prepared silver nanoparticles (described in the section 2.5) was mixed with 100 μL of aqueous solution NaCl ($c = 4 \text{ mol.l}^{-1}$), and 690 μL of water. Consequently, 10 μL of analyte ($c = 10 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$) was added and sample was shaken. Resulting dispersion was measured in a quartz cuvette three minutes after its preparation using instrumental parameters described above. The acquired spectral data were evaluated using instrument control software (Omnic, version 8, Thermo Scientific, USA). The ζ potentials of nanocomposites, and sizes of silver nanoparticles were measured using a Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). A transmission electron microscope (TEM) (JEM 2010, Jeol, Japan) was used to obtain images, and High-Angle, Annular Dark Field (HAADF) analysis of the final sensor. The TEM was operated at a voltage of 160 kV with a point-to-point resolution of 1.9 Å. Fluorescence microscopy was performed on Olympus IX70 microscope with fluorescent mode. Samples of dentine treated using respective prepared nanosensors (section 2.8) were deposited on a microscopy glass and measured.

2.10. Raman imaging

Raman imaging was performed using DXR micro-Raman spectrometer (Thermo Scientific, U.S.A.) with an excitation laser operating at 633 nm, spectral resolution 3 cm^{-1} , and spatial resolution 1 μm . The exposure time was set to 2 s, the spectra were averaged from 16 micro-scans, and the laser power on the sample was set to 3 mW. The microscope was equipped with a 50X objective, NA = 0.75, and estimated

diameter of the irradiated spot was 1.6 μm . Spectral maps contain 100 x 100 Raman spectra, with a spacing 2 μm , giving a total number of 10.000 points.

2.11. Data processing

During this processing, the spectral background was corrected using an algorithm based on polynomial fitting with an order of 3. The measured spectra were plotted regarding Raman-scattered photon counts. Signal processing was performed using the TQ-Analyst software package (Omniscan version 8, Thermo Scientific, USA) and QTI plot (version 0.9.9.1, Romania), respectively. Raman intensities of Cy3, Cy5, and Cy7 in the measured spectral maps were normalized to the intensity of the phosphate band at 960 cm^{-1} to minimize influences of the sample topography.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the nanosensor

Firstly, the functionalized nanocomposite was characterized by electron microscopy and EDX element mapping to evaluate its morphology, size distribution, and composition. Figure 1 shows TEM and EDX images of the functionalized nanocomposite with the average size of the spherical silver nanoparticles 30 nm and spherical maghemite nanocrystallite 10 nm (measured by TEM). It is worth mentioning that the magnetic nanoparticles are localized in clusters formed by the combination of the sample treatment required for a TEM imaging and magnetic forces among nanoparticles. Analysis of the bare Ag nanoparticles as well as $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposites using DLS are shown in figure 1D, where the size of Ag nanoparticles corresponds to previous findings based on TEM. Size of the magnetic nanocomposite was determined to 140 nm. The difference is caused by a formation of clusters due to a combination of electrostatic and magnetic interactions. The analysis of the Zeta-potential uncovered a considerable change from -42 mV for a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite to +2 mV for the material functionalized using the tagged

antibodies. This considerable change is caused by anchoring the positively charged Raman tagged protein on a surface of the negatively charged nanocomposite. The system is colloiddally stable despite a low deviation of the value from zero due to electrostatic interactions between the anchored proteins.

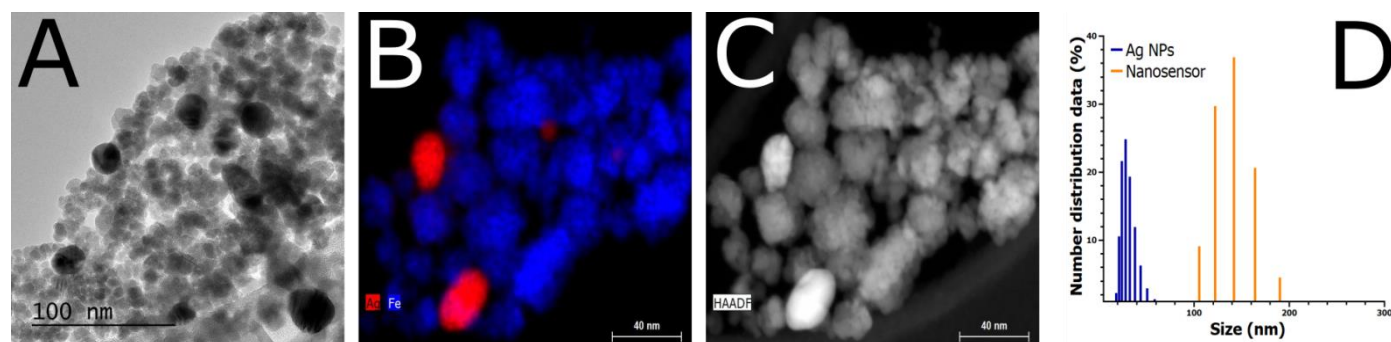


Figure 1: A: TEM image of the functionalized nanomaterial, B: EDX element mapping of the nanocomposite with silver in red color and iron in blue color. C: HAADF analysis of the nanocomposite, where silver is shown in bright and iron in darker shades, D: Distribution of sizes of silver nanoparticles, and nanosensor $Fe_3O_4@Ag$ measured by DLS.

To minimize possible interferences of the sample on the signal of nanosensor, the raw surface was first measured by Raman spectroscopy; obtained spectral data are shown in Figure 2A. Signal contain characteristic bands for $\nu_1PO_4^{3-}$ (spectral band at 960 cm^{-1}), and $\nu_4PO_4^{3-}$ (spectral band at 588 cm^{-1}). It is shown that the spectrum does not contain any spectral bands characteristic for proteins, which indicates that their concentration is below the limit of detection of Raman spectroscopy, and surface enhanced Raman scattering needs to be applied to visualize their distribution. Next, SERS spectra of Cy3, Cy5, and Cy7, were evaluated. Spectral data are shown in Figure 2B, and are in a full agreement with previously published results[28]. Next, antibodies, namely Anti-TGF- β 1, anti-BMP2, and anti-bFGF were measured using SERS, and resulting spectra are shown in Figure 2C. Spectral data contain dominantly bands characteristic for proteins, including amide I, and III, located at 1652 cm^{-1} , and 1304 cm^{-1} However, the measured dentine contains a large set of proteins, including targeted growth factors, and many others. Moreover, measured spectra are frequently burdened with fluorescence (as shown in the figure 2C, SERS

spectrum of anti-bFGF). Selective detection of interaction between the anchored antibody and particular growth factor can be thus difficult, and not reliable. Antibodies were thus labeled using Raman active spectral tags, namely Cy3, Cy5, and Cy7 to increase the selectivity of the analysis. Finally, functionalized antibodies together with respective antigens were characterized using SERS, and resulting data are shown in Figure 2D-F. SERS spectra contain bands characteristic for both, Raman labels and proteins, although present with different intensities, caused by a spatial position of the adsorbed antibody on the surface of the silver nanoparticle. Larger distance of the labels from the nanoparticle surface is indicated by a relatively lower intensity of respective Raman bands, compared to the signal of proteins. Spectral analysis uncovered a presence of spectral bands, characteristic for each Raman tag, namely Raman band at 1395 cm^{-1} for anti-TGF- β 1-Cy3, 1597 cm^{-1} for anti-BMP2-Cy5, and 1621 cm^{-1} for anti-bFGF-Cy7, which were consequently selected for univariate analysis. Successful binding of antigens on the respective antibodies is indicated by a change of spectral intensities of bands characteristic for amino acids. Finally, SERS analysis of a sample containing the prepared nanosensor composed of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite covalently functionalized by respective tagged antibodies uncovered a presence of bands characteristic for Raman tags, nanomaterial and anchored antibodies, as shown in Figure 3A. The spectrum contains all previously identified bands, including bands characteristic for used Raman tags, which indicates a successful immobilization of the tagged antibodies on a surface of the nanocomposite. Spectrum of the prepared nanosensor anchored on a surface of dentine is shown in Figure 3A (green spectrum). Spectral characteristics of the sensor are not considerably changed during the interaction and signal of particular Raman tags are measurable.

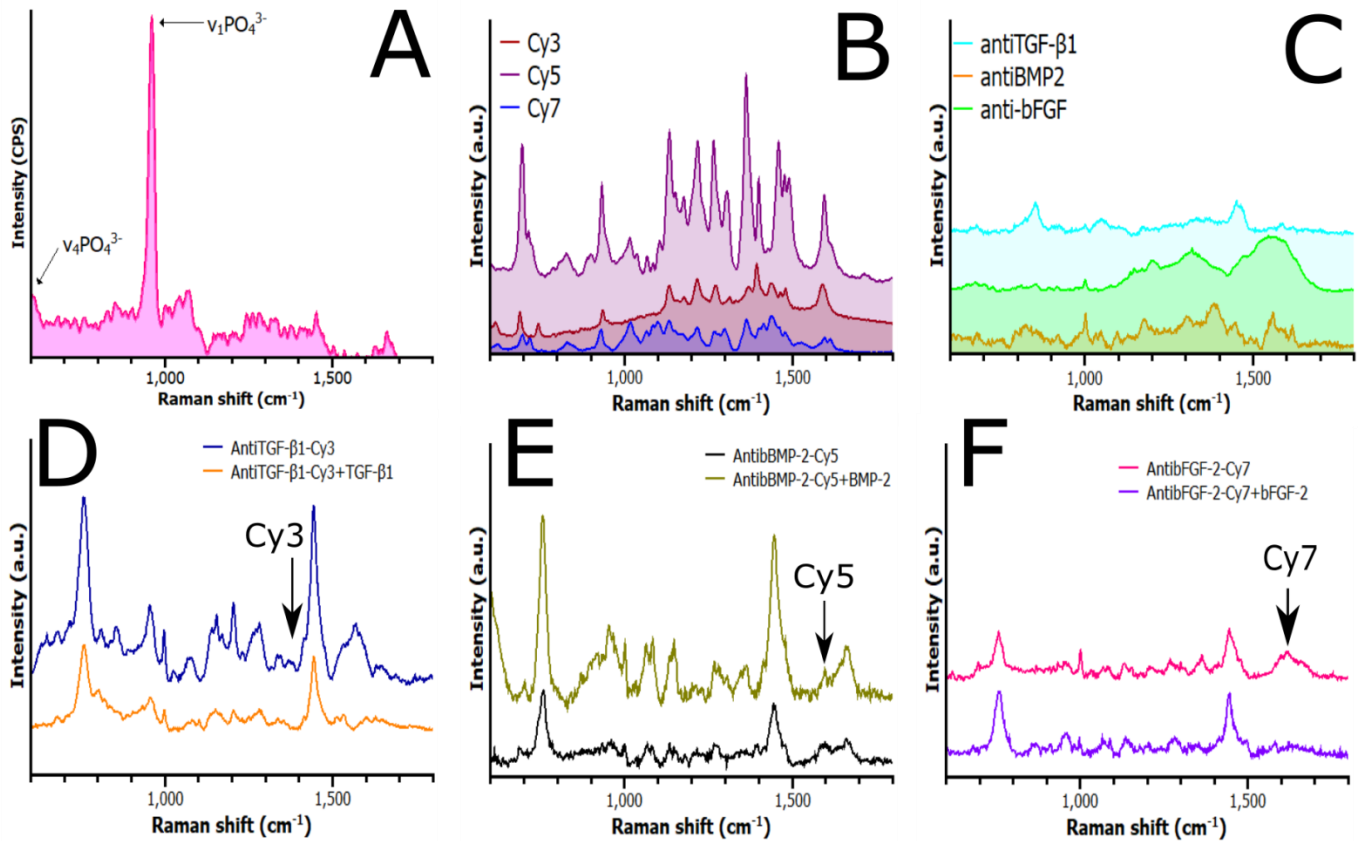


Figure 2: A: Raman spectrum of the root canal. B: SERS spectra of Cy3, Cy5, and Cy7 Raman tags, C: SERS spectra of antibodies anti-TGF- β 1, anti-BMP2, and anti-bFGF, D-F: SERS Spectra of particular Raman tagged antibodies and antibodies with bonded antigens, namely antiTGF- β 1-Cy3(D), anti-BMP-2-Cy5(E), and anti-bFGF-Cy7(F).

3.2. Repeatability and signal stability

The stability of the nanomaterial and the repeatability of the obtained results are considered as the essential factors for a consecutive analysis of real samples. First, the signal stability was analyzed. Six measurements of samples containing $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-TGF-}\beta$ 1-Cy3 sensor were performed in 21 days. The sensor was kept in the refrigerator at 7 °C in dark. The signal of the labels moderately decreased, as shown in the figure 3B, and it is still significantly above a limit of detection (determined as $S/N = 3$), and thus fully utilizable. However, we have applied the sensor no longer than 1 day after the preparation. Based on the sensor nature, similar behavior can be hypothesized for BMP-2, and bFGF sensors. Further, signal

repeatability was evaluated on a set of 5 samples containing $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-TGF-}\beta 1@\text{Cy}3$. The measured data are shown in Figure 3C. Raman spectra were first normalized according to the procedure described in the Experimental section and the intensities of the spectral bands characterizing particulate Raman tags, as described previously, were analyzed and subsequently relative standard deviations (RSDs) were calculated. RSD values for all three tags did not exceed 5 %.

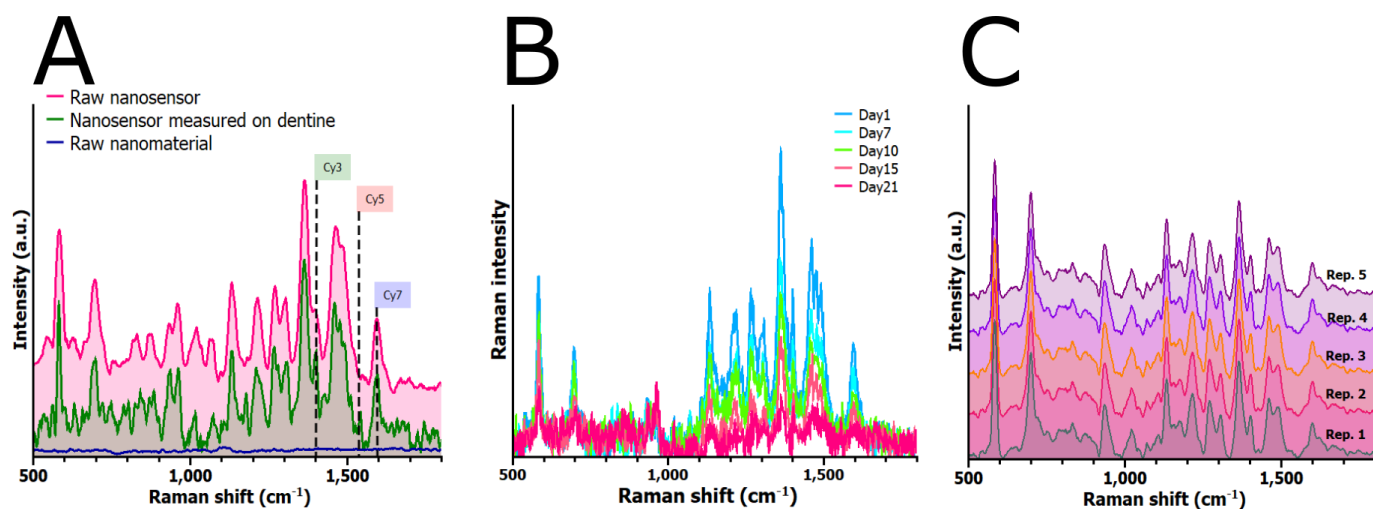


Figure 3: A: (blue) Raman spectrum of the pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposite, (pink) Raman spectrum of the nanosensor with anchored Raman-tagged antibodies, and (green) average spectrum of the sensor measured on a surface of dentine. B: Study of the signal stability and stability of the prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-TGF-}\beta 1-\text{Cy}3$ sensor. C: Repeatability of the analytical signal of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Anti-TGF-}\beta 1-\text{Cy}3$ sensor.

3.3. Sample imaging of growth factors

This study aimed to develop a method for an analysis of selected growth factors on the dentinal surface. The next step involved treating the tooth samples for 5 and 20 minutes using EDTA in the role of a chelating agent; applied to remove the existing smear layer. The newly developed methodology was consequently utilized to study this process, mainly to evaluate the influence of the treatment time on the

availability of growth factors on the sample surface. First, to test the method potential, the surface of a human tooth root canal without any pre-treatment was measured. The sample was labelled using a mixture of all three sensors according to the procedure described in the Experimental part. First, samples were subjected to analysis using fluorescence microscopy to verify the presence of nanosensors on the sample surface. Obtained results are shown in figure 4, where presence of all three sensors on the surface of the physiological sample is demonstrated.

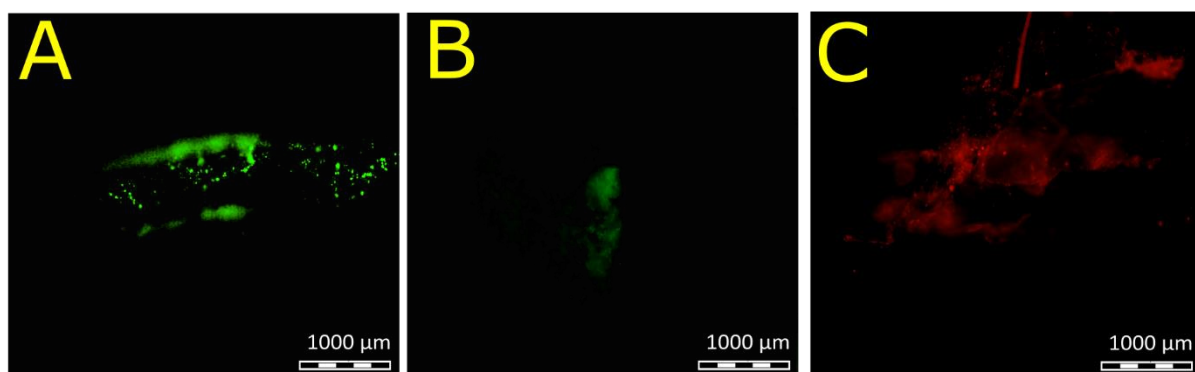


Figure 4: microscopy images of the nanosensors on a surface of the physiological tooth sample. A: TGF- β 1 sensor, B: BMP-2 sensor, and C: bFGF sensor.

Univariate analysis, utilizing characteristic spectral bands of each functionalized antibody, was applied in the analysis; particular spectral bands are described in the Results section 3.1. The results of the univariate analysis performed for each Raman tag are shown in Figure 5A-L. The Raman intensities in all the obtained maps (four samples per group) were first normalized to allow a meaningful comparison between various measurements. The Raman maps obtained by the univariate analysis of physiological sample show the presence of each growth factor in varying abundances. The growth factor TGF- β 1 can be considered the most abundant, followed by bFGF and BMP-2. This agrees with previous studies, where TGF-beta1 was found to be more frequent than other growth factors.[6, 10] Second, a sample containing the smear layer covering the surface and thus disabling its interaction with sensors was selected as a negative control. The corresponding maps are shown in figure 5D-F. The availability of all three targeted growth factors on the

root surface was considerably lowered. The spectral analysis shows a decrease of 70 % for TGF- β 1, 50 % for bFGF, and 82 % for BMP-2. The lowered number of active places indicate the absence of nonspecific interaction of the sensor with the sample surface and support the role of the smear layer as a blockage between the growth factors present in dentin microchannels and the surface.

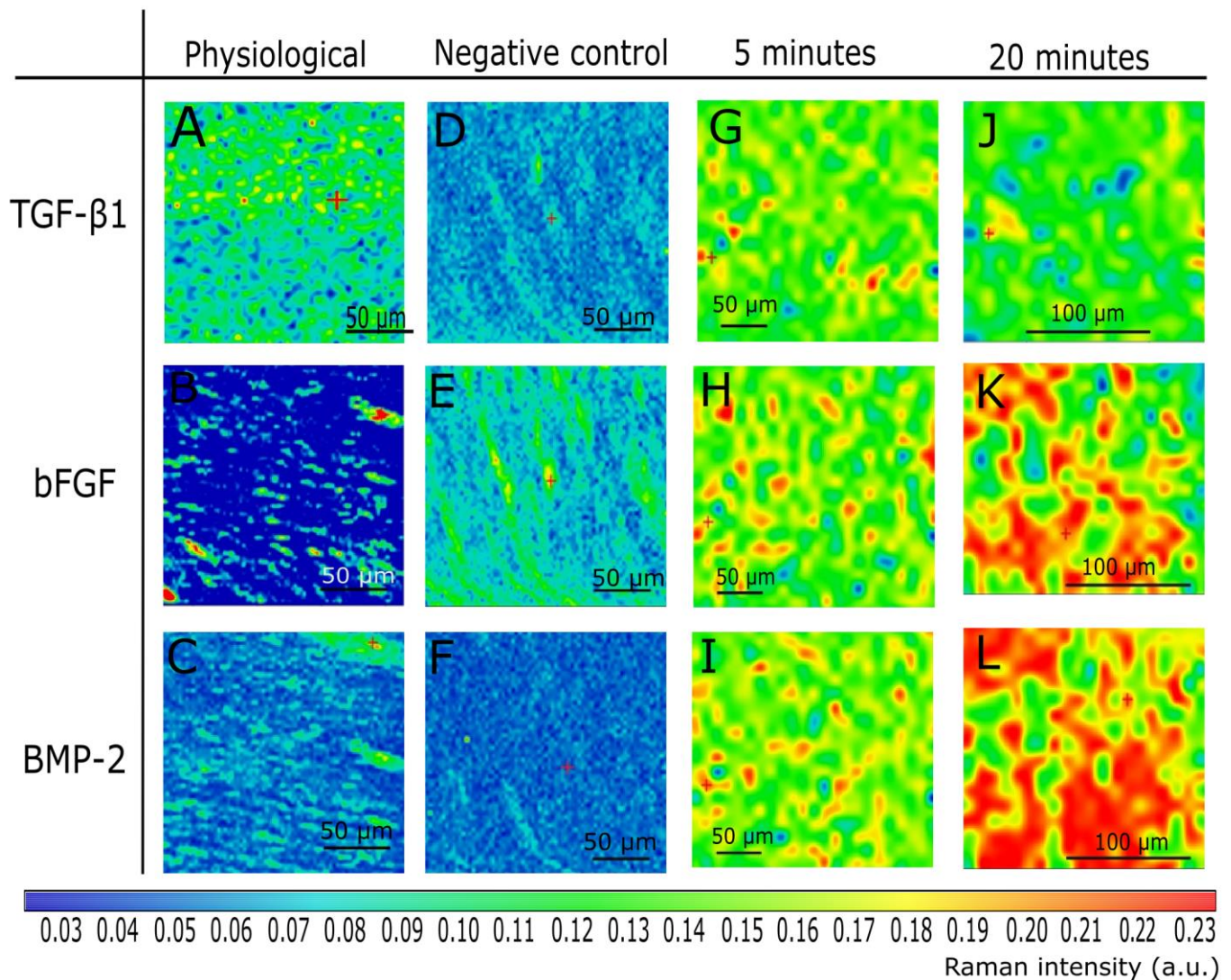


Figure 5: (A-L) Raman spectral maps obtained by analysis of tooth sample. The rows represent individual growth factors (TGF- β 1, BMP-2, and bFGF). Columns represent sample treatments, i.e.: without sample treatment (label physiological), negative control with a smear layer (label: negative control), treated by

EDTA for 5 minutes (label 5 minutes), and treated by EDTA for 20 minutes (labeled as 20 minutes). Relative Raman intensities of particular factors are shown as colors defined by the inserted color bar. For the Raman imaging, spectral bands localized at 1395 cm^{-1} for anti-TGF- β 1-Cy3, 1597 cm^{-1} for anti-BMP2-Cy5, and 1621 cm^{-1} for anti-bFGF-Cy7 were selected.

Next, the influence of the irrigation protocol on the availability of growth factors on the surface was evaluated. Namely, the duration of the treatment of the sample by EDTA was studied, while different periods of time 5 and 20 minutes were selected. Initially, the sample treated by EDTA for 5 minutes was measured. The results of the univariate analyses performed on the normalized and background corrected Raman data are shown in Figure 5G-I, where image G represents a distribution of TGF- β 1, H represents a distribution of bFGF and I stands for distribution of BMP-2. Similar images (Figure 5, labels J-L) were obtained from the samples treated for 20 minutes, albeit with intensities ranging at higher values. The abundance of the TGF- β 1 present in the sample treated for 20 minutes decreased by 10 %, compared to the sample treated for 5 minutes, but it increased by 80 % compared to the physiological sample, where a naturally according smear layer is present. Even better situation was observed in bFGF and BMP-2, where the treatment with EDTA for 20 minutes led to an increase in the growth factors abundances by more than 300 % compared to the physiological sample.

4. Conclusions

Here present methodology, providing a parallel analysis of growth factors, i.e., TGF- β 1, bFGF, and BMP-2 on the dentin surface is based on the combination of surface enhanced Raman spectroscopy and the new nanosensors based on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanocomposites functionalized by Raman tagged antibodies, namely anti-TGF- β 1@Cy3, anti-bFGF@Cy7, and anti-BMP-2@Cy5. The methodology was studied on a set of samples of human teeth in which the distribution of all three growth factors on the dentin surface was analyzed. Next, the influence of the time of treatment using EDTA was evaluated to study the possibility

for the methodology to provide a semiquantitative analysis. It is shown that a five-minute treatment led to a considerable increase of the abundances of all three studied proteins. It was also found out that longer periods of time could lead to washing some proteins out, therefore the optimal time needs to be set carefully. Growth factor TGF- β 1 started to wash out relatively fast compared to bFGF, and BMP-2, which is consistent with previous studies published by Galler[6]. The release of growth factors strongly depends on the applied solution. It is known that citric acids leads to a preferential release of bFGF and VEGF, compared to TGF- β 1, and TGF- β 1 is preferentially released by EDTA.[11]

ASSOCIATED CONTENT

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vaclav.ranc@upol.cz (Václav Ranc)

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors.

Notes

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge support from projects NPU LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic; project IGA_PrF_2018_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; and project 16-02938S of the Grant Agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Dhillon H, Kaushik M, Sharma R (2016) Regenerative endodontics-Creating new horizons: Regenerative Endodontics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104:676–685 . doi: 10.1002/jbm.b.33587
2. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD (2013) Revascularization: A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. *J Endod* 39:319–326 . doi: 10.1016/j.joen.2012.11.014
3. Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K (2012) Drawbacks and Unfavorable Outcomes of Regenerative Endodontic Treatments of Necrotic Immature Teeth: A Literature Review and Report of a Case. *J Endod* 38:1428–1434 . doi: 10.1016/j.joen.2012.06.025
4. Žižka R, Šedý J (2017) Paradigm Shift from Stem Cells to Cell-Free Regenerative Endodontic Procedures: A Critical Review. *Stem Cells Dev* 26:147–153 . doi: 10.1089/scd.2016.0264
5. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR (2012) Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol* 57:109–121 . doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.008
6. Galler KM, Buchalla W, Hiller K-A, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G (2015) Influence of Root Canal Disinfectants on Growth Factor Release from Dentin. *J Endod* 41:363–368 . doi: 10.1016/j.joen.2014.11.021
7. Kakaboura A (1989) [Smear layer on prepared dentin]. *Odontostomatol Proodos* 43:211–223
8. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ (2013) Dentin Matrix Component Solubilization by Solutions at pH Relevant to Self-etching Dental Adhesives. *J Adhes Dent* 15:407–412 . doi: 10.3290/j.jad.a29536
9. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller K-A, Hoffer PC, Schmalz G (2016) EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J* 49:581–590 . doi: 10.1111/iej.12492
10. Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebdeh D, Badi MA, Kim JR, Ling J, Yang M (2016) Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. *J Endod* 42:1760–1766 . doi: 10.1016/j.joen.2016.04.029
11. Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJP, Reid C, Smith G, Cooper PR (2017) Release of bio-active dentine extracellular matrix components by histone deacetylase inhibitors (HDACi). *Int Endod J* 50:24–38 . doi: 10.1111/iej.12588
12. Hisamoto M, Goto M, Muto M, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Yokoyama A (2015) A systematic analysis for localization of predominant growth factors and their receptors involved in murine tooth germ differentiation using in situ hybridization technique. *Biomed Res* 36:205–217 . doi: 10.2220/biomedres.36.205
13. Li S, Pan Y (2017) Differential expression of transforming growth factor-beta1, connective tissue growth factor, phosphorylated-SMAD2/3 and phosphorylated-ERK1/2 during mouse tooth development. *J Mol Histol* 48:347–355 . doi: 10.1007/s10735-017-9733-4

14. Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JC-C, Nagano T, Yamamoto R, Simmer JP, Margolis HC, Gomi K (2018) The dynamics of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Sci Rep* 8:4450 . doi: 10.1038/s41598-018-22823-7
15. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ (2000) Ultrastructural localisation of TGF- β exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J* 32:489–494
16. Ionita I (2009) Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy. *Rom Rep Phys* 61:567–574
17. Zavala-Alonso V, Loyola-Rodríguez JP, Terrones H, Patiño-Marín N, Martínez-Castañón GA, Anusavice K (2012) Analysis of the molecular structure of human enamel with fluorosis using micro-Raman spectroscopy. *J Oral Sci* 54:93–98
18. Wang Y, Yao X (2010) Morphological/chemical imaging of demineralized dentin layer in its natural, wet state. *Dent Mater* 26:433–442 . doi: 10.1016/j.dental.2010.01.002
19. Beier BD, Quivey RG, Berger AJ (2012) Raman microspectroscopy for species identification and mapping within bacterial biofilms. *AMB Express* 2:35
20. Cepeda-Pérez E, Moreno-Hernández C, López-Luke T, Monzón-Hernández D, de la Rosa E (2016) Evaluation of bacterial presence in the root canal by Raman spectroscopy: a preliminary study. *Biomed Phys Eng Express* 2:065006 . doi: 10.1088/2057-1976/2/6/065006
21. FLEISCHMANN M, HENDRA PJ, McQUILLAN AJ RAMAN SPECTRA OF PYRIDZNE ADSORBED AT A SILVER ELECTRODE. *Chem Phys Lett* 26:4
22. Balzerova A, Fargasova A, Markova Z, Ranc V, Zboril R (2014) 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 . doi: 10.1021/ac503347h
23. Ranc V, Markova Z, Hajduch M, Pucek R, Kvitek L, Kaslik J, Safarova K, Zboril R (2014) 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 . doi: 10.1021/ac500394g
24. Chaloupková Z, Balzerová A, Bařinková J, Medřříková Z, Šácha P, Beneš P, Ranc V, Konvalinka J, Zbořil R (2017) 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*. doi: 10.1016/j.aca.2017.10.008
25. Panacek A, Balzerova A, Pucek R, Ranc V, Vecerova R, Husickova V, Pechousek J, Filip J, Zboril R, Kvitek L (2013) Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA-diatomite nanocomposite. *COLLOIDS Surf B-BIOINTERFACES* 110:191–198 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.031
26. Marková Z, Šišková K, Filip J, Šafářová K, Pucek R, Panáček A, Kolář M, Zbořil R (2012) Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity. *Green Chem* 14:2550 . doi: 10.1039/c2gc35545k
27. Pucek R, Panacek A, Fargasova A, Ranc V, Masek V, Kvitek L, Zboril R (2011) Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment-a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CRYSTENGCOMM* 13:2242–2248 . doi: 10.1039/c0ce00776e
28. Wang Y, Schlücker S (2013) Rational design and synthesis of SERS labels. *Analyst* 138:2224–2238 . doi:

10.1039/C3AN36866A