

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyzikální chemie



**Studium interakcí vybraných nanomateriálů na bázi
uhlíku s biopolymery**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Filip Urbánek
Studijní program:	N1407 – Chemie
Studijní obor:	Materiálová chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Olomouc 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem sepsal samostatně. K vypracování byly využity experimentální výsledky získané v laboratoři a literární zdroje, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, cenné rady a poskytnuté konzultace. Také děkuji Jensi Peteru Froningovi, MSc za odbornou pomoc.

Velký dík patří také mým rodičům, bez jejich podpory bych nemohl studovat.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Filip Urbánek
Název práce:	Studium interakcí vybraných nanomateriálů na bázi uhlíku s biopolymery
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	<p>V této práci byly studovány hybridní systémy složené z grafitu a oligonukleotidů. Ke studiu byly využity mikroskopie atomárních sil, kapacitní skenovací mikroskopie a Ramanova spektrometrie. Princip uvedených technik a možnosti jejich uplatnění v oblasti studovaných materiálů jsou shrnuty v teoretické části. V praktické části jsou obsaženy výsledky provedených experimentů, které ukazují, že oligonukleotidy tvoří na povrchu grafitu sférické agregáty, jejichž velikost není ovlivněna délkou řetězce.</p>
Klíčová slova:	SPM, SCM, AFM, Mikroskopie atomárních sil, Ramanova spektrometrie, DNA, RNA, grafit
Počet stran:	56
Jazyk:	Český

Bibliographic Identification

Author's first name and surname: Filip Urbánek

Title: Study of interactions of selected carbon based nanomaterials with biopolymers

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Year of Presentation: 2017

Abstract: In this work we studied hybrid systems composed of graphite and oligonucleotides. The techniques of atomic force microscopy, scanning capacitance microscopy and Raman spectroscopy were used. The principle of the techniques and their application potential in the field of studied materials are summarized in theoretical part. The practical part provides the results of experiments which reveal that the oligonucleotides form spherical units on graphite surface. The size of units is not affected by chain length.

Keywords: SPM, SCM, AFM, Atomic Force Microscopy, Raman spectroscopy, DNA, RNA, graphite

Number of Pages: 56

Language: Czech

Vysoká škola: Univerzita Palackého v Olomouci Fakulta: přírodovědecká
Katedra: Katedra fyzikální chemie Školní rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno: **FILIP URBÁNEK**

Studijní obor: Materiálová chemie (MCH)

Název práce:

česky: Studium interakcí vybraných nanomateriálů na bázi uhlíku s biopolymery

anglicky: Study of interactions of selected carbon based nanomaterials with biopolymers

Cíl práce: Zvládnutí základní obsluhy a základních měřících modů na přístroji AFM-Raman
Studium vlivu experimentálních parametrů (například koncentrace biopolymeru, jeho sekvence atd.) na výsledné interakci tohoto biopolymeru s nanomateriálem na bázi uhlíku (například HOPG)
Vyhodnocení naměřených dat a jejich interpretace pomocí metod zpracování signálu a procesování obrazu.

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše
2. Prostudování uvedené odborné literatury
3. Experimentální měření
4. Vyhodnocení experimentálních výsledků
5. Interpretace a diskuze výsledků
6. Vypracování diplomové práce
7. Příprava a prezentace multimediální prezentace diplomové práce

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah původní zprávy: 40-70 stran

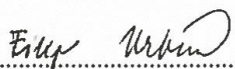
Seznam odborné literatury:


- Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, Springer, 2006
- Peter Atkins and Paula de Julio, Fyzikální chemie, VŠCHT Praha 2013
- Ewen Smith: Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach, Wiley, 2005
- Sebastian Shlucker: Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications, Wiley, 2011.
- původní časopisecká sdělení dle vlastní literární rešerše

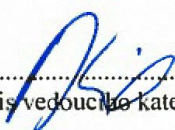
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: 23.10.2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2017


.....
podpis studenta


.....
podpis školitele


.....
podpis vedoucího katedry

OBSAH

Seznam zkratk	9
1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.1 DNA	11
2.1.1 Struktura DNA	11
2.2 Uhlíkové nanomateriály	13
2.2.1 Grafen	14
2.2.2 Kombinace grafenu a DNA	15
2.3 Mikroskopie skenující sondou	16
2.3.1 Mikroskopie atomárních sil	17
2.3.2 Pracovní režimy AFM	18
2.3.3 Rozlišení AFM.....	20
2.3.4 Vybrané variace AFM	21
2.3.5 Studium DNA pomocí AFM.....	23
2.3.6 Současné trendy ve vývoji AFM pro studium biomolekul	24
2.4 Ramanova spektrometrie.....	25
2.4.1 Charakterizace grafenu pomocí Ramanovy spektrometrie	27
3. Experimentální část	29
3.5 Materiál a metody	29
3.5.1 Použité chemikálie	29
3.5.2 Přístrojové vybavení a software.....	29
3.5.3 Příprava roztoků.....	32
3.5.4 Příprava vzorku k měření.....	32
3.5.5 Nastavení mikroskopu atomárních sil.....	33
3.6 Výsledky a diskuze	35
3.6.1 Čištění povrchu substrátu.....	35
3.6.2 AFM snímky grafitu	36
3.6.3 AFM a SCM snímky systému grafit – RNA.....	37
3.6.4 AFM a SCM snímky systému grafit – DNA (vzorek A).....	45
3.6.5 AFM a SCM snímky systému grafit – DNA (vzorek B)	48
3.6.6 Vliv depozice RNA na Ramanova spektra grafitu.....	50
4. Závěr.....	52
5. Summary.....	53
Seznam použité literatury	54

SEZNAM ZKRATEK

DNA	deoxyribonukleová kyselina
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
RNA.....	ribonukleová kyselina
A	adenin
T.....	thymin
C	cytosin
G	guanin
SPM.....	mikroskopie skenující sondou
AFM	mikroskopie atomárních sil
STM.....	skenovací tunelová mikroskopie
MFM.....	mikroskopie magnetických sil
KPFM	Kelvinova silová mikroskopie
CAFM.....	vodivostní mikroskopie
SCM.....	skenovací kapacitní mikroskopie
HS-AFM.....	vysokorychlostní mikroskopie atomárních sil
HOPG	vysoce orientovaný pyrolytický grafit
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. ÚVOD

Nanotechnologie v dnešní době už nepředstavují nic exotického. Nanomateriály jsou využívány například v elektronice, chemickém a automobilovém průmyslu či při řešení znečištění životního prostředí. V posledních letech se také vkládá velké úsilí do výzkumu nanomateriálů pro účely medicíny a farmacie. Objevily se nové obory nanomedicína a nanobiotechnologie, které se zabývají uplatněním nanotechnologií v diagnostice a terapii různých onemocnění, při vývoji nových léčiv či pro ochranu a zlepšení lidského zdraví.

Jednou ze zobrazovacích metod, které nanotechnologie nabízí, je i mikroskopie atomárních sil, která se obecně řadí mezi mikroskopie skenující sondou, kam kromě AFM patří i skenovací tunelová mikroskopie. Objev metod mikroskopie skenující sondou v 80. letech minulého století znamenal obrovský vědecký pokrok, protože techniky později umožnily vytvoření trojrozměrného obrazu s atomárním rozlišením. Dnes je možné díky těmto metodám zobrazit povrchy různých typu s různými vlastnostmi. V praxi můžeme častěji narazit na AFM, která umožňuje na rozdíl od STM měření v kapalně fázi a zobrazení jak vodivých, tak nevodivých povrchů. Obraz je vytvářen na základě mapování atomárních sil na povrchu zkoumaného vzorku [1].

AFM byla v rámci této diplomové práce využita ke studiu hybridního materiálu, který byl vytvořen adsorpcí molekul DNA na grafen. Zmíněný systém stojí z hlediska nanomedicíny za pozornost, protože díky svým vlastnostem může najít v budoucnu uplatnění při transportu genů nebo jako velmi citlivý a selektivní biosenzor [2].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 DNA

Deoxyribonukleová kyselina společně s ribonukleovou kyselinou patří do skupiny nukleových kyselin, které objevil v roce 1869 švýcarský biolog Friedrich Miescher v jádrech leukocytů z použitých chirurgických obvazů. Nukleové kyseliny se řadí mezi nejvýznamnější biomolekuly, protože jejich prostřednictvím je ukládána a přenášena genetická informace, která zajišťuje správnou funkci živých soustav. DNA je nositelem genetické informace u všech organismů s výjimkou RNA virů. Její molekula je tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci, které vznikají spojováním nukleotidových podjednotek [3, 4].

Každý nukleotid obsahuje tři složky: dusíkatou bázi, sacharid a zbytek kyseliny fosforečné. V nukleových kyselinách je možné nalézt pět typů dusíkatých bází. Tři z nich (adenin, cytosin a guanin) se objevují jak v DNA, tak v RNA, kdežto thymin se vyskytuje pouze v DNA a uracil pouze v RNA. Základem dusíkatých bází je heterocyklický kruh obsahující dusík. Cytosin, thymin a uracil jsou založeny na pyrimidinovém kruhu, ale adenin a guanin na kruhu purinovém.

Další složkou nukleotidu je sacharid. DNA obsahuje deoxyribosu, kdežto v RNA je přítomna ribosa. V obou případech se jedná o pětiuhlíkatý sacharid. Jak však název napovídá, ve struktuře deoxyribosy chybí atom kyslíku, který je v ribose vázán na uhlíkový atom číslo 2. Spojením dusíkaté báze a sacharidu, které je uskutečněno prostřednictvím glykosidické vazby, vzniká struktura označovaná jako nukleosid. Pomocí fosfátové vazby je k nukleosidu připojen zbytek kyseliny fosforečné a vzniká nukleotid [4].

Jednotlivé nukleotidy představují monomerní jednotky propojené prostřednictvím fosfodiesterové vazby, která vzniká mezi 3' uhlíkem jednoho nukleotidu a 5' uhlíkem nukleotidu druhého. Prodloužení řetězce se děje kondenzační reakcí, která je z energetického hlediska umožněna skutečností, že nukleotidy vstupují do reakce jako energeticky bohaté nukleosidtrifosfáty. Výsledný řetězec má pak 3' konec tvořený hydroxylovou skupinou a 5' konec, kterým je fosfátová skupina [5].

2.1.1 Struktura DNA

V případě nukleových kyseliny obecně je rozlišována struktura primární, sekundární a terciární. Pořadí nukleotidů v polynukleotidovém řetězci charakterizuje

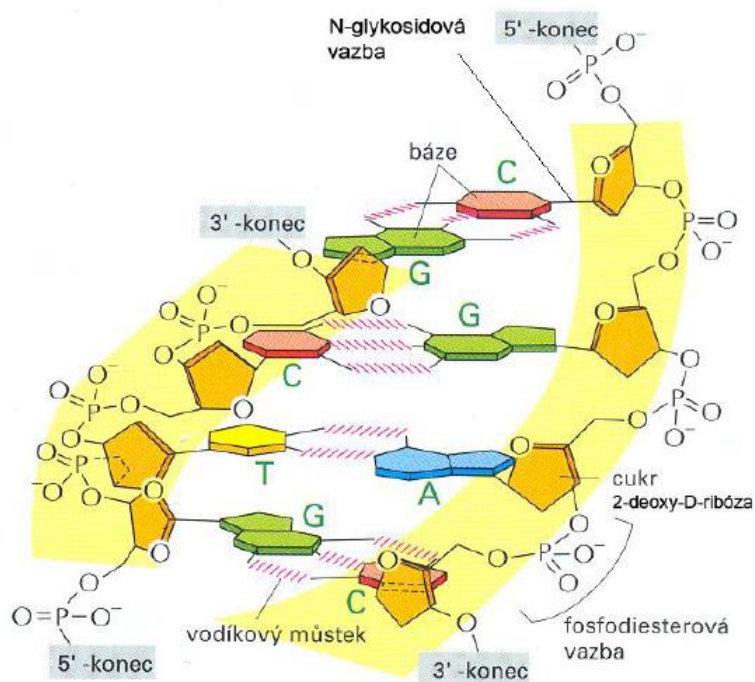
primární struktura. Sekundární struktura je určena polohou nukleotidů v prostoru a k jejímu vzniku dochází po spojení dvou řetězců prostřednictvím vodíkových vazeb. Řetězce jsou tzv. antiparalelní. Jeden řetězec je orientován ve směru od 3' konce k 5' konci, druhý naopak od 5' konce k 3' konci. Vodíkové vazby propojující řetězce se tvoří mezi komplementárními bázemi. Adenin se páruje s thyminem. Mezi nimi je možné nalézt dvě vodíkové vazby. A cytosin tvoří pár s guaninem. Oba jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami. Z poznatku o komplementaritě bází vyplývá vztah, který je dnes známý jako Chargaffova pravidla. V DNA je obsažen shodný počet molekul adeninu a thyminu a také stejné množství molekul cytosinu a guaninu.

Sekundární struktury jsou reprezentovány různými formami dvojité šroubovice, také označované jako helix, která vzniká obtáčením polynukleotidových řetězců kolem sebe navzájem. Vzhled dvoušroubovice není hladký, ale vyznačuje tzv. menším a větším žlábkem, které jsou místy, kde se na DNA může vázat například polypeptid nebo léčivá látka. V závislosti na podmínkách je možné DNA pozorovat ve formě A, B nebo Z [6].

Strukturu B-DNA správně předpověděli vědci James Watson a Francis Crick. Práce Watsona a Cricka v sobě spojila předešlé poznatky různých studií a opírala se o matematické modely, výsledky chemické analýzy a snímky z rentgenové krystalografie, které tehdy pořídila Rosalind Franklinová. B-DNA, která je považována za fyziologickou formu DNA, má podobu pravotočivé šroubovice, její průměr je asi 2 nm. Jeden závit zahrnuje 10 párů bází a stoupání na závit je přibližně 3,4 nm. Jestliže je snížen relativní obsah vody v prostředí na 75%, B-DNA přechází vratně do uspořádání A-DNA. Ta také představuje pravotočivou šroubovici, která však ve srovnání s B-DNA má širší a více plochou podobu. Její průměr je 2,6 nm. Na jeden závit zde připadá 11 párů bází a stoupání na závit je 2,8 nm. V současnosti se předpokládá, že konformační změna B-DNA → A-DNA je odpovědná za vyšší odolnost DNA bakteriálních spor vůči poškození ultrafialovým zářením. Další forma, Z-DNA, je levotočivá. Vyznačuje se hlubokým menším žlábkem a prakticky nerozeznatelným větším žlábkem. Díky tomu připomíná levotočivý vrták. Její průměr je asi 1,8 nm, Stoupání na jeden závit, který zahrnuje 12 párů bází, činí 4,5 nm. Biologická funkce Z-DNA zatím není bohužel známa [3].

Helikální struktura ale nepředstavuje finální podobu DNA, kterou lze nalézt v jádrech buněk. Prokaryotní DNA může vytvářet pozitivní nebo negativní nadšroubovicové vinutí, které reprezentuje terciární strukturu DNA. Pozitivní se vyznačuje stáčením nadšroubovice po směru hodinových ručiček, negativní pak ve směru opačném. Nadšroubovicové vinutí hraje roli při procesu replikace DNA a enzymy, které

jej ovlivňují, se označují jako topoizomerázy. Terciární struktura eukaryotní DNA, tedy i podoba nadšroubovice, je odlišná. Záporně nabitě fosfátové skupiny DNA interagují s kladně nabitými funkčními skupinami proteinů, které jsou označovány jako histony. Vzniká tak materiál zvaný chromatin [6].



Obr. 1. Úsek molekuly DNA. [7]

2.2 Uhlíkové nanomateriály

Nanomateriály je možné definovat jako objekty, které mají alespoň jeden rozměr menší než 100 nm. Jejich vlastnosti se mohou výrazně odlišovat od vlastností makroskopického materiálu stejného druhu. Velikost například určuje antimikrobiální aktivitu stříbra nebo elektrickou vodivost některých kovů [8].

Uhlík se řadí mezi nekovové prvky a lze jej najít v různých formách v každém živém organismu. Již od druhé poloviny 20. století přitahují nanomateriály uhlíku velkou pozornost a jsou intenzivně studovány. Děje se tak proto, že mnohé z nich se vyznačují neobyčejnými mechanickými, elektrickými, optickými a také chemickými vlastnostmi. Uhlíkové nanomateriály lze rozřadit do skupin na základě jejich rozměrů. První skupinou jsou bezrozměrné nanomateriály (0-D), jejichž velikost se ve všech třech rozměrech pohybuje v měřítku nanometrů. Řadí se sem například fullereny, nanočástice a nanodiamanty. Druhou skupinu představují nanomateriály jednorozměrné (1-D)

se dvěma rozměry ve škále nanometrů. Zástupce reprezentují uhlíková nanovlákna a nanotrubičky. Grafen je pak příkladem dvourozměrných nanomateriálů (2-D), které se vyznačují jediným rozměrem v měřítku nanometrů [9].

2.2.1 Grafen

Zatímco grafit je znám jako přirozeně se vyskytující materiál už téměř pět set let, tak jinou alotropickou modifikaci uhlíku, grafen, se podařilo poprvé připravit až v roce 2004. Na univerzitě v britském Manchesteru Andre Geim a jeho spolupracovníci k získání grafenu z grafitu uplatnili techniku mechanické exfoliace, při které se používá obyčejná lepicí páska. Získaný produkt měl podobu jednovrstvých a vícevrstvých vloček.

Grafen představuje dvourozměrný nanomateriál tvořený atomy uhlíku v hybridním stavu sp^2 . Ty jsou uspořádány tak, že v rovině vytváří šestičlenné kruhy připomínající včelí plástev. Hybridní stav sp^2 atomů uhlíku v grafenu vzniká energetickým sjednocením atomových orbitalů s , p_x a p_y . Elektrony těchto orbitalů se podílejí na vytvoření vazby typu σ se třemi sousedními atomy. Zbývající p_z orbital každého atomu uhlíku se překrývá se třemi okolními p_z orbitaly a dohromady dávají vzniknout pásu π orbitalů, které jsou obsazeny elektrony původních orbitalů p_z . Tento delokalizovaný elektronový systém je znám jako valenční pás. Pás tvořený volnými π^* orbitaly se pak označuje jako vodivostní pás. Popsané uspořádání stojí za výjimečnými vlastnostmi, které se s materiály založenými na grafenu spojují [10].

Grafen lze označit jako polokov s nulovou šířkou zakázaného pásu. Je výborným vodičem elektrického proudu, protože vykazuje tzv. balistický transport, při kterém se elektrony materiálem pohybují, jakoby neměly žádnou efektivní hmotnost. Rychlost elektronů se blíží rychlosti světla a hodnota jejich pohyblivosti dosahuje až $200\,000\text{ cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$. Mechanické vlastnosti grafenu byly zkoumány pomocí matematických simulací a AFM. Hodnota Youngova modulu pružnosti byla stanovena přibližně na 1 TPa a hodnota pevnosti v lomu činí asi 130 GPa. Pro srovnání, Youngův modul pružnosti oceli je přibližně pouze 200 GPa a pevnost v lomu oceli pak zhruba jen 400 MPa. Grafen má také neobyčejné optické vlastnosti. Propouští až 97,7 % záření z viditelné oblasti elektromagnetického spektra. Průhlednost se však lineárně snižuje se rostoucím počtem vrstev [11].

Rozlišovány jsou tři typy grafenu: jednovrstvý, dvouvrstvý a vícevrstvý. Počet vrstev vícevrstvého grafenu však není vyšší než deset. Grafen tvoří základní stavební

jednotku některých dalších alotropických forem uhlíku, např. uhlíkových nanotrubic a fullerenu [12].

2.2.2 Kombinace grafenu a DNA

Existují rozdílné přístupy, jak vytvořit hybridní materiál spojující biomakromolekuly a nanomateriály. První cestu představuje spojení prostřednictvím kovalentní vazby. Nebo je možné jednu molekulu vložit do dutiny vytvořené druhou molekulou či molekulami. Třetí možnost spočívá ve využití adsorpce. Právě tento třetí způsob je nejvhodnější pro kombinaci grafenu a DNA [13].

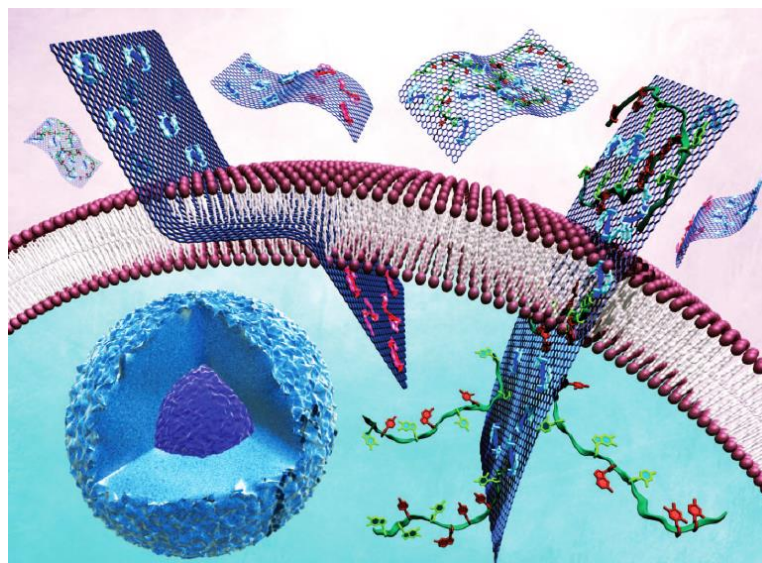
Na grafen se může adsorbovat jak ssDNA, tak dsDNA. Vazba probíhá prostřednictvím $\pi - \pi$ interakce mezi bázi nukleotidu a povrchem grafenu. Ve srovnání s dsDNA, která se váže až při vysokých hodnotách iontové síly roztoku, je vazba ssDNA pevnější. Sílu adsorpce ovlivňuje významným způsobem primární struktura DNA a zastoupení nukleobází v polynukleotidovém řetězci. Energie vazby mezi nukleobází a grafenem klesá v řadě $G > A > C > T$. Grafen po adsorpci chrání molekulu DNA před enzymatickým rozkladem a naopak DNA brání agregaci grafenových vrstev. Z tohoto důvodu je možné DNA použít při ultrazvukové dispergaci grafitu [14, 15].

Mezi výjimečné vlastnosti grafenu patří velký povrch, pružnost, elektrická vodivost, možnost chemické modifikace ovlivňující velikost zakázaného pásu. U molekuly DNA je zase možno chemickou syntézou určit její primární strukturu. Spojením grafenu a DNA vzniká nový nanomateriál, který by mohl najít využití v biomedicině při genové terapii a doručování léčivých látek nebo by mohl být použit jako velmi citlivý elektrochemický sensor [14, 16].

Příklad použití grafenu modifikovaného ssDNA jako citlivého senzoru předvedl Lu a jeho spolupracovníci. Zařízení, které vytvořili, umožňuje detekovat a rozlišit několik chemicky podobných plynných analytů. Děje se tak právě díky molekulám ssDNA, které zde působí jako senzibilizující prvek zásadně zvyšující citlivost a rozlišovací schopnost zařízení. Senzor vyniká také rychlostí své odezvy [17].

Tang a spolupracovníci pak ve své práci demonstrují vzhled a některé vlastnosti materiálu, kterého by bylo možné využít ke genové terapii. Ta představuje možnost léčby onemocnění, která jsou geneticky podmíněna, např. některá kardiovaskulární a nádorová onemocnění nebo AIDS. Metoda spočívá v procesu zavedení sekvence DNA do organismu, přičemž použitý úsek DNA kóduje chybějící nebo nefungující protein. Látky určené ke genové terapii se obecně skládají ze dvou prvků: nosiče (vektoru) a genetického

materiálu. Nosič chrání genetický materiál a zároveň umožňuje jeho transport do cílové části buňky. Rozlišovány jsou virové a nevirové nosiče. Mezi nevirové vektory se řadí lipidy, polymery a některé nanomateriály uhlíku jako oxid grafenu, nanotrubičky a nanočástice. Výhodou uhlíkových nanomateriálů je excelentní elektrická a tepelná vodivost a snadná funkcionalizace jejich povrchu. Naopak nevýhodou je nižší biokompatibilita. Samotný genetický materiál poté musí mít schopnost transformovat buňku do žádoucího stavu. Cílem výzkumu probíhajícího v této oblasti je získání vysoce účinné, netoxické a nekancerogenní léčivé látky [18, 2].



Obr. 2. Schéma průniku léčivé látky obsahující grafen a DNA přes biologickou membránu. [19]

2.3 Mikroskopie skenující sondou

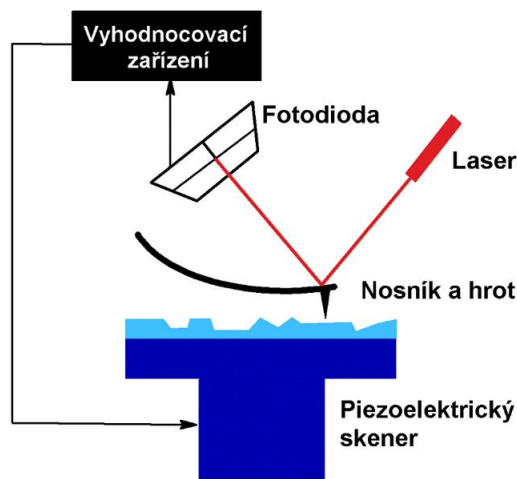
Jedná se o mikroskopické techniky, které jsou schopné rozlišit detaily studovaných povrchů až na atomární úrovni. První typem SPM byla skenovací tunelová mikroskopie, kterou představili Gerd Binnig a Heinrich Rohrer v roce 1982. O pouhé čtyři roky později obdrželi za svůj objev Nobelovu cenu za fyziku. STM společně s mikroskopií atomárních sil patří mezi nejrozšířenější techniky SPM. Obě jsou založeny na skenování povrchu vzorku, při kterém se velmi ostrý hrot pohybuje nejenom ve směru os x a y (rovina povrchu), ale také ve směru osy z a to podle toho, jak se mění topografie povrchu. Na rozdíl od optické a elektronové mikroskopie tak tyto techniky umožňují vytvořit trojrozměrný obraz vzorku [20].

Metody SPM obecně využívají pohybu sondy v oblasti tzv. blízkého pole, tj. ve vzdálenosti přibližně do 100 nm od vzorku. Díky tak malé vzdálenosti je možné dosáhnout lepšího rozlišení, než které by odpovídalo difrakční mezi představující limit rozlišení optické mikroskopie. Výhodou je také snížení energie potřebné k zobrazení a dochází k poklesu energetického zatížení vzorku. Existují ale i nevýhody spojené s uvedenou vzdáleností mezi sondou a vzorkem, mezi které patří vysoké nároky na mechanickou stabilitu a přesnost řízení pohybu sondy. Snadno může dojít k poškození sondy nebo samotného vzorku. Mechanická stabilita a také charakter interakce mezi sondou a vzorkem použitý k měření pak určují rozlišení ve směru osy z. To je jiné než rozlišení v rovině x a y, které závisí především na velikosti sondy a definici měřicích rozestupů. Naprostá většina technik SPM nepracuje v transmisním režimu, ale umožňují zkoumat pouze povrchovou vrstvu vzorku. Je rozlišováno mnoho různých druhů SPM, které se navzájem liší konstrukcí sondy a druhem fyzikální veličiny, která je k měření využita [21].

2.3.1 Mikroskopie atomárních sil

AFM byla vynalezena v roce 1986. Její hlavní výhodou oproti STM je možnost zobrazení i nevodivých vzorků. I tato metoda může v nejlepších případech dosáhnout až rozlišení jednotlivých atomů. K tomu využívá sil atomárního původu, nejčastěji Van der Waalsových sil nebo elektrostatické repulzní síly. Silové působení mezi sondou a povrchem vzorku způsobuje u sondy elastickou deformaci, která je detekována pomocí optického systému. Laserový paprsek se odráží od nosníku sondy a dopadá na fotodiodu, která registruje změnu jeho polohy. Pohyb sondy nebo vzorku pak obstarává piezoelektrický prvek. Síla mezi sondou a vzorkem je během skenování udržována na konstantní hodnotě díky posunu sondy ve směru osy z, což umožňuje získat informaci o topografii povrchu.

Sondy určené pro AFM se skládají z hrotu, nosníku a tzv. chipu. Nosník, který obstarává spojení mezi hrotem a chipem, je pružný a dovoluje elastickou deformaci. V dřívějších dobách byl nosník zhotoven z kovové folie a hrot byl velmi malý kousek rozdrceného diamantu. Dnes se k produkci sond používají polovodičové technologie založené na leptání křemíku, oxidu křemičitého nebo nitridu křemičitého [20].



Obr. 3. Schéma mikroskopu atomárních sil.

2.3.2 Pracovní režimy AFM

Vzdálenost mezi hrotem a povrchem vzorku určuje typ interakce, která je využita k samotnému měření. Na malé vzdálenosti, obvykle menší než 1 nm, působí elektrostatické repulzní síly. Naopak u relativně velkých vzdáleností v rozsahu 1 – 100 nm se uplatňují slabé přitažlivé interakce, kterými jsou nejčastěji Van der Waalsovy síly [22].

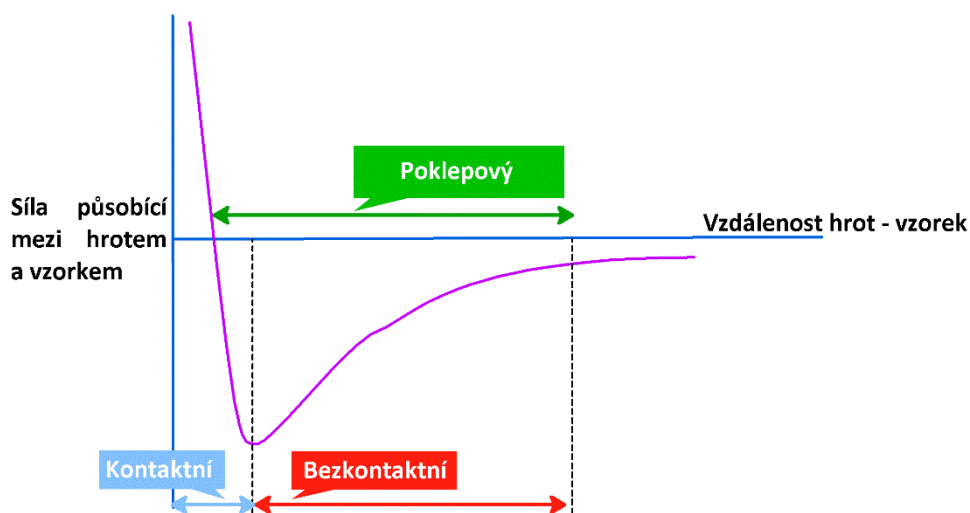
Jako první byl vyvinut kontaktní režim, při kterém se hrot neustále jemně dotýká povrchu vzorku. Působící síla je vždy repulzní. Měření v kontaktním režimu lze provádět ve třech modifikacích. Při měření s konstantní výškou je udržována stálá hodnota výšky základny (chipu) a podle topografie povrchu se mění ohnutí nosníku. Měření s konstantní silou se vyznačuje naopak stálým ohnutím nosníku, kterého je dosaženo pomocí pohybu sondy nebo vzorku ve směru osy z. Tento typ kontaktního režimu je v praxi aplikován nejčastěji, protože redukuje závislost prohnutí nosníku na kapilárních silách. Velmi zřídka lze narazit na kombinaci zmíněných typů, při které se pohyb ve směru osy z používá pouze k dorovnání náklonu vzorku, zbylé informace o topografii jsou sbírány díky ohybu nosníku. Kontaktní režim je obecně vhodný pro studium rovných a tvrdých vzorků v prostředí plynném i kapalném [21, 22].

Dotyk hrotu a nosníku je spojen se vznikem smykových sil, které způsobují torzi nosníku. Vzniklé zkroucení lze sledovat pomocí optického systému AFM vybaveného fotodiodou rozdělenou na čtyři kvadranty, která umožňuje současně detekovat ohyb i torzi. Záznam pak kvalitativně vypovídá o třecích a adhezních vlastnostech různých

částí povrchu, které odráží jeho chemickou, případně fyzikální podstatu. Jevu využívá tzv. režim laterálních sil. [22, 23].

Biologické vzorky jsou v celé řadě případů slabě vázány k substrátu a kontaktní režim může zapříčinit jejich poškození. K překonání tohoto problému byl vyvinut pokleповý režim. Nosník osciluje s frekvencí blízkou rezonanci a je v kontaktu se vzorkem jen po velmi krátký časový okamžik. V průběhu měření je monitorována amplituda oscilací, která se sníží po přiblížení hrotu ke vzorku. Záznamem zpětné vazby, která je potřeba k udržení konstantní amplitudy, je získána informace o topografii povrchu. Při periodicky se opakujícím přibližování hrotu k povrchu prochází sonda oblastí přitažlivých i repulzních sil. Oscilace nosníku mohou být vybudeny dvěma způsoby. Buď pomocí piezoelektrického prvku, který se dotýká chipu sondy, nebo s využitím měničícího se magnetického pole, které působí na tenký magnetický film na horní straně nosníku [22].

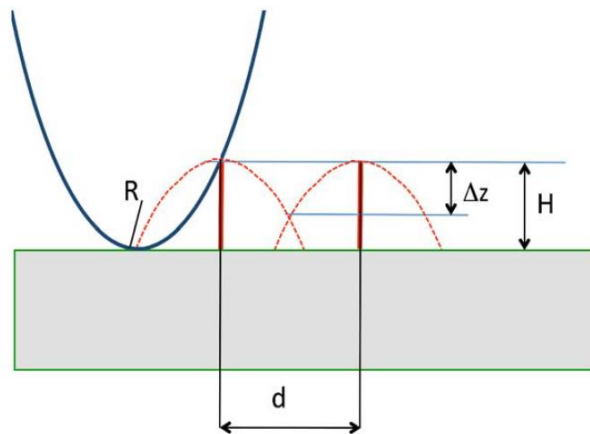
Při bezkontaktním režimu nosník osciluje v oblasti přitažlivých sil. Ty jsou ve srovnání s elektrostatickou repulzní silou velmi slabé. Pakliže je hrot od povrchu vzdálen více než 0,6 nm, síly nejsou větší než 1 pN. Výhoda tohoto nastavení spočívá ve velmi vysoké citlivosti a malé síle působící na vzorek. Citlivost je úzce spojena s tuhostí nosníku. Relativně tuhý nosník umožňuje eliminovat nestability odpovědné za šum při měření. Amplituda oscilací nosníku se obvykle pohybuje kolem 1 nm, což je méně ve srovnání s pokleповým režimem, u kterého amplituda dosahuje hodnot kolem 10 nm. Rozlišení bezkontaktního režimu klesá s rostoucí hodnotou vzdálenosti hrot – povrch [24].



Obr. 4. Schéma zobrazující možné režimy AFM.

2.3.3 Rozlišení AFM

Nejlepší mikroskopy atomárních sil se vyznačují rozlišením jednotlivých atomů, což je srovnatelné s nejpokročilejšími elektronovými mikroskopy. AFM však nabízí několik výhod, např. možnost pracovat v různých prostředích. V případě klasické optické i elektronové mikroskopie je rozlišení především limitováno délkou vlny, kterou lze spojit s pohybem částice využitě k vytvoření obrazu. U AFM závisí zejména na tvaru hrotu a možnostech piezoelektrického skeneru.



Obr. 5. Schéma popisující rozlišení SPM. [25]

Na obrázku 5 je schematicky znázorněn hrot sondy s poloměrem zakřivení R , který skenuje povrch vzorku obsahující velmi úzké výběžky, jejichž výška je označena H a vzdálenost mezi nimi činí d . Tečkovaná linie zobrazuje trajektorii hrotu, která je ve skutečnosti jeho obráceným profilem. Jestliže Δz popisuje vzdálenost mezi horní hranou objektů a průsečíkem trajektorií pohybu sondy, lze odvodit následující vztah:

$$d = 2(2R\Delta z)^{0,5} \quad (1)$$

Pro výpočet limitu rozlišení lze pak využít Rayleighova kritérium, dle kterého pro minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů d_{\min} platí, že $\Delta z = 0,2H$. Výsledek je následující:

$$d_{\min} = 2(0,4RH)^{0,5} \quad (2)$$

V případě, že parametry R a H jsou rovny $0,1$ nm, poté platí $d_{\min} \approx 0,12$ nm, což se přibližně shoduje s velikostí jednotlivých atomů. Mnohem častěji se ale lze setkat s hroty, jejichž poloměr zakřivení R je mnohem větší, nejčastěji kolem 10 nm. Hodnota d_{\min} pak vzroste na zhruba $5,7$ nm.

Rozlišení AFM ale ovlivňují i další faktory, ze kterých za zmínku stojí kapilární jevy. Často je možné se setkat se situací, že povrch vzorku je pokryt tenkou vodní vrstvou, která se vytvoří adsorpcí vzdušné vlhkosti. Toto chování je typické pro hydrofilní povrchy, jako je např. slída. Hroty AFM vyrobené z křemíku nebo nitridu křemíku se také vyznačují hydrofilitou, a proto se může při přibližování sondy k povrchu vytvořit mezi hrotem a povrchem můstek složený z molekul vody. Takový systém se vyznačuje vysokou hodnotou kapilární síly činící až desítky nN. Síla je natolik velká, že může dojít k tažení vzorku po povrchu substrátu a celý proces zobrazení se komplikuje. Vliv kapilární síly lze redukovat několika způsoby. Méně často se využívá měření při nízké relativní vlhkosti nebo ve vakuu, které není vhodné pro studium biologických vzorků. Obvyklejší a elegantnější řešení spočívá v aplikaci pokleповého režimu. Problém existence kapilární síly se samozřejmě nevztahuje pro měření v kapalně fázi [25].

2.3.4 Vybrané variace AFM

V současném výzkumu nacházejí stále větší uplatnění kromě klasických metod SPM také tzv. vícepřechodové techniky, které umožňují studovat i jiné vlastnosti povrchu než je topografie. Vlastní měření zahrnuje dva kroky. První přechod podél skenovací linie je proveden v kontaktním nebo pokleповém režimu a je při něm získána informace o topografii. Při druhém přechodu je předtím nabytá informace využita k potlačení vlivu prvků povrchu na měření vybraných vlastností. Sonda je umístěna ve vhodné výšce nad povrchem (přibližně 100 nm) a její pohyb při skenování kopíruje tvar povrchu. Zvolená výška však nesmí být příliš vysoká, jinak by mohla způsobit zeslabení měřicího signálu a zhoršení laterálního rozlišení.

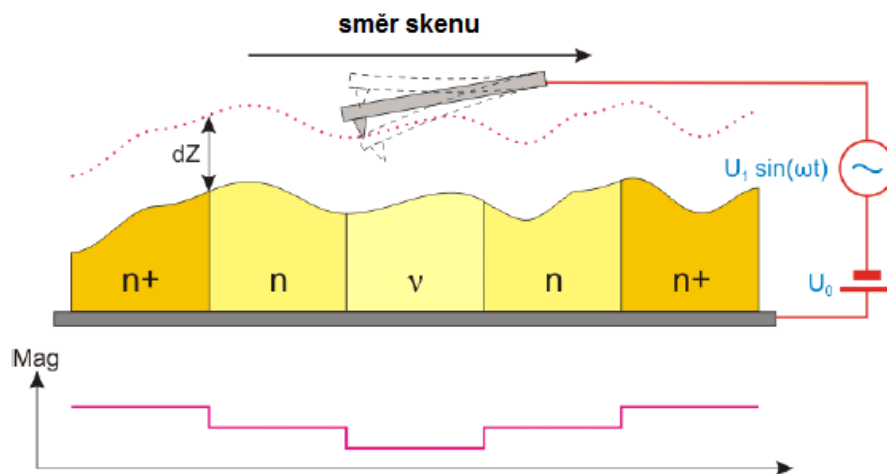
Mikroskopie magnetických sil umožňuje zobrazit rozložení magnetických polí. MFM je prováděna prostřednictvím magnetických sond, které mají podobu křemíkové sondy potažené velmi tenkým filmem magnetického materiálu. Mezi stinné stránky této techniky patří fakt, že při skenování vzorků s nízkou koerivitou může snadno dojít ke změně jejich magnetizace. Rozložení magnetických polí se bude lišit od jednoho měření ke druhému. MFM v praxi často nachází uplatnění při studiu vlastností magnetických úložných zařízení. Využívá se ale i při charakterizaci magnetických nanomateriálů, např. jednodoménových kovových teček. [26].

Pomocí Kelvinovy silové mikroskopie lze mapovat rozložení výstupní práce. Jedná se o veličinu, kterou lze v případě kovů považovat za energetický rozdíl mezi tzv. hladinou vakua a Fermiho energií. U jiných typů materiálu, jako jsou polovodiče

a izolanty, může být pak na výstupní práci nahlíženo jako na energetický rozdíl mezi hladinou vakua a nejslaběji vázaným elektronem uvnitř vzorku. Výstupní práce závisí nejen na vlastnostech samotného materiálu, ale také na adsorbovaných látkách, tloušťce vrstvy oxidů, koncentraci dopantu nebo teplotě. KPFM představuje techniku užitečnou pro zkoumání povrchů složených z různých materiálů, např. kompozitních materiálů nebo směsí polymerů.

Vodivostní mikroskopii mohou být měřeny lokální elektrické proudy mezi hrotem a povrchem vzorku. Při měření je nejdříve na hrot vloženo elektrické napětí a následně se provádí skenování v kontaktním režimu. CAFM se neřadí k vícepřechodovým technikám. Na rozdíl od STM, kde je zpětná vazba založena na udržování konstantní hodnoty elektrického proudu, je v případě CAFM zpětná vazba odpovědná za nastavení konstantní síly mezi hrotem a povrchem. Díky tomuto mechanismu mohou být zkoumány i heterogenní materiály představující kombinaci vodiče a izolantu bez hrozby zničení hrotu při skenování nevodivé části povrchu. Proud, který je zaznamenáván, závisí jednak na vodivosti vzorku, jednak na napětí vloženém na hrot. V typických případech jsou měřeny hodnoty elektrického proudu od 1 pA do 1 nA [27].

Skenovací kapacitní mikroskopie je technika vyvinutá k zobrazení rozložení kapacitance na povrchu vzorku a poskytuje tedy podobnou informaci jako CAFM. SCM se ale liší tím, že se jedná o vícepřechodovou techniku, při níž se uplatňuje pokleповý režim. Ve chvílích, kdy se sonda díky svým oscilacím dostává do kontaktu se vzorkem, vzniká systém chovající se jako elektrický kondenzátor. Po aplikaci napětí mohou poté být měřeny elektrické vlastnosti vytvořeného systému, např. jalový odpor (kapacitance). Využití SCM lze tak pro studium dielektrických vlastností povrchových vrstev nebo při zkoumání hustoty nosičů náboje v polovodičových součástkách [26].



Obr. 6. Schéma znázorňující druhý přechod při SCM. Barevně odlišené oblasti povrchu se vyznačují různou kapacitancí, což se promítá do hodnoty magnitudy oscilací sondy. [26]

2.3.5 Studium DNA pomocí AFM

DNA začala být pomocí AFM studována na začátku 90. let. Pionýrské práce v tomto specifickém odvětví provedli američtí vědci Stuart Lindsay a Yuri Lyubchenko, kterým se podařilo zobrazit jednotlivé molekuly DNA ve vodném prostředí i na vzduchu.

AFM je z velkého množství mikroskopických technik přitažlivá pro studium nukleových kyselin pro svou univerzálnost a schopnost zobrazovat dynamiku struktur tvořených DNA nebo RNA. Klíčovým krokem při procesu vytváření obrazu biologických makromolekul je jejich imobilizace, která zahrnuje výběr vhodného substrátu, jeho eventuální modifikaci a případně úpravu složení roztoku určeného k vlastní depozici. Naprostá většina technik imobilizace je založena na kompenzaci záporného náboje DNA a RNA. Povrch substrátu získává kladný náboj a molekula nukleové kyseliny je zadržena pomocí přitažlivé elektrostatické síly. Mezi nejběžnějšími substráty pro studium biologických vzorků se řadí slída, sklo, zlaté filmy a vysoce orientovaný pyrolytický grafit [28].

Slída je souhrnné označení pro množství odlišných křemičitanových minerálů. Pro potřeby AFM slouží zejména muskovitová slída se vzorcem $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$. Jedná se o nevodivý materiál složený z velkého množství vrstev, které jsou silné přibližně 1 nm. Charakteristický znak slídy představuje perfektní štěpitelnost vrstev, díky níž může být horní vrstva snadno odstraněna pomocí obyčejné lepicí pásky. Výsledkem je získání čistého, atomárně hladkého povrchu, který se vyznačuje hydrofilitou. To jej činí ideálním

podkladem pro hydrofilní molekuly, mezi které se řadí většina biomolekul. Povrch čerstvě očištěné slídy má záporný náboj, proto se jedná také o výborný substrát pro kladně nabitě molekuly. Adsorpce záporně nabitých molekul, jako jsou nukleové kyseliny, ale vyžaduje speciální úpravy povrchu nebo samotného vzorku. První možností je ošetření slídy roztokem obsahujícím ionty Mg^{2+} v koncentraci 5 – 10 mmol/L. Bylo též dokázáno, že předčasné ošetření substrátu pomocí roztoku není třeba, pakliže jsou ionty Mg^{2+} přítomny v roztoku nukleové kyseliny. Další studie pak rozšířily spektrum použitelných kovových iontů o kationty Ni^{2+} , Co^{2+} a Zn^{2+} . Pevnost vytvořené vazby závisí na koncentraci daných iontů, ale také na iontovém poloměru. S klesajícím iontovým poloměrem narůstá pevnost vazby. Alternativní přístup spočívá v chemické modifikaci slídy silany. V praxi se využívá ošetření povrchu slídy 3-aminopropyltriethoxysilanem (zkráceně APTES) za vzniku tzv. AP-slídy. Tato metoda byla vyvinuta přibližně současně s postupem používajícím ionty Mg^{2+} a byla úspěšně aplikována pro zobrazení samotné DNA nebo komplexu DNA a proteinů. Možností je též funkcionalizace povrchu slídy s 3-aminopropylsilanem za vzniku APS-slídy [28, 29].

Sklo reprezentuje vhodný materiál pro biologické vzorky. Povrch skla je dostatečně hladký pro zobrazení buněk a dalších velkých struktur, ale obvykle je příliš drsný pro zobrazení adsorbovaných molekul. Povrch skla je vždy kontaminován organickými látkami a částicemi, které by před použitím měly být odstraněny máčením v silné kyselině [30].

V některých případech mohou být preferovány hydrofóbní substráty, např. vysoce orientovaný pyrolytický grafit. Zajímavou vlastností HOPG je jeho vodivost, díky které jej lze použít pro vodivostní studie. Podobně jako slída se HOPG vyznačuje vrstevnatou strukturou a jeho povrch lze snadno očistit pomocí lepicí pásky. Snímky vzorků s HOPG je však třeba analyzovat velmi důkladně, protože povrchové defekty a jemná struktura hran čistého HOPG mohou vzhledově připomínat očekávané struktury DNA [28].

2.3.6 Současné trendy ve vývoji AFM pro studium biomolekul

Metoda AFM je v současnosti rozvíjena především ve dvou směrech. Úsilí je věnováno vývoji velmi ostrých, chemicky modifikovatelných hrotů a též jsou zkoumány možnosti zrychlení procesu vytváření snímku.

Představením hrotů s uhlíkovými nanotrubicemi byly znatelně posunuty hranice laterálního rozlišení AFM. Velkým přínosem tohoto typu hrotů je dobrá znalost struktury jejich povrchu a možnost chemické modifikace. Na samotný konec uhlíkové nanotrubice

lze dokonce navázat jednu jedinou molekulu, což umožňuje provádět chemické mapování s dříve nemyslitelným rozlišením. Chemicky modifikované hroty nacházejí uplatnění ve strukturní biochemii při rozbalování proteinů nebo rozplétání nukleových kyselin [22].

Konvenční AFM ve srovnání s konkurenčními technikami pracuje pomaleji. Vytvoření snímku s rozlišením 100×100 obrazových bodů zabere v typickém případě 30 – 60 s, často déle. Snímkem je zde přitom myšlen trojrozměrný obraz plochy studovaného povrchu v definovaném rozlišení. Několik pracovních skupin se v minulých letech zabývalo vývojem uspořádání, které umožňuje rychlejší sběr dat. První rychle skenující AFM sestrojil Quate se svými spolupracovníky. Jimi navržené AFM obsahovalo několik řad samostatných sond, jejichž tuhost však neumožňovala zobrazení biologických systémů. Tento problém byl vyřešen pracovní skupinou Hansmy, který ve svém zařízení použil krátkých nosníků s vysokou rezonanční frekvencí. Hansmovo HS-AFM dovolovalo sběr dat rychlostí zhruba stokrát vyšší ve srovnání s konvenční AFM, vytvoření snímku s rozlišením 100×100 obrazových bodů zabralo přibližně 2 s. Ando a spolupracovníci pak Hansmův systém dále rozvíjeli zdokonalením skeneru a návrhem elektroniky pro rychlý sběr dat. Ando se svým týmem dosáhl vygenerovat snímek o 100×100 obrazových bodech za 0,08 s. S těmito parametry dokázali pozorovat dynamiku myozinu. Dnešní systémy HS-AFM dosahují rychlosti 25 snímků za sekundu pro plochu 250×250 nm a rozlišení 100×100 obrazových bodů [28].

2.4 Ramanova spektrometrie

Příčinou existence spektrálních pásů v molekulárních spektrech jsou absorpce, emise nebo rozptyl fotonů molekulami. Interakce molekuly a fotonu, kvanta elektromagnetického záření, je doprovázena změnou energetického stavu částice. Může se jednat o stav elektronový, vibrační nebo rotační. Ramanova spektrometrie představuje techniku, která se studiem frekvencí přítomných v neelasticky rozptýleném záření zaměřuje na vibrační a rotační hladiny energie. Energii fotonu, který je absorbován, emitován či rozptýlen, lze vyjádřit pomocí Bohrovy podmínky:

$$h\nu = |E_1 - E_2| \quad (3)$$

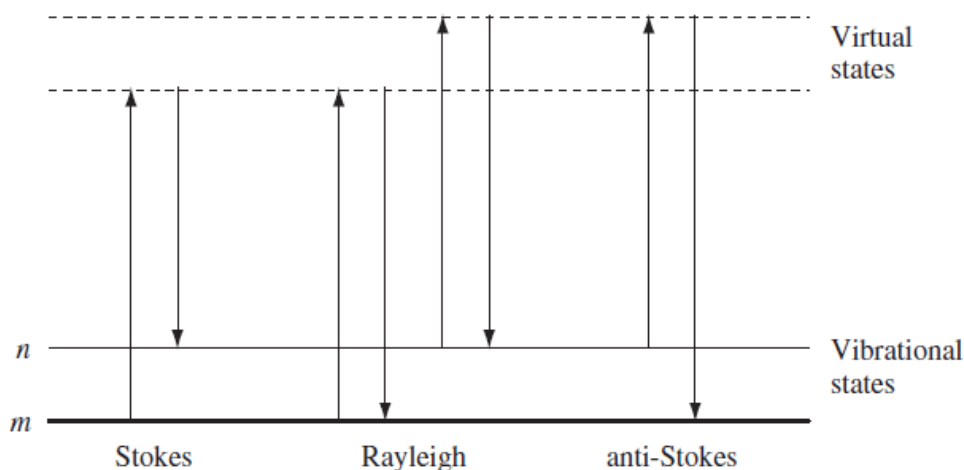
E_1 a E_2 reprezentují energie jednotlivých energetických stavů, h značí Planckovu konstantu a ν pak frekvenci fotonu [31].

Jev neelastického rozptylu světla byl poprvé pozorován indickými vědci Ramanem a Krishnanem v roce 1928. Od té doby se používá termín Ramanova spektrometrie. Zmínění vědci v původním experimentu zaměřili pomocí čočky sluneční světlo na

vzorek, který byl reprezentován buď přečištěnou kapalinou, nebo párami zbavených prachových částic. Druhá čočka byla umístěna za samotným vzorkem a sloužila ke sběru rozptýleného záření. Pomocí systému optických filtrů pak Raman s Krishnanem v rozptýleném záření pozorovali i jiné frekvence, než které byly obsaženy v použitém slunečním světle.

V dnešní době k ozáření vzorku používá monochromatické záření. Detekované rozptýlené záření pak obsahuje informaci o případné změně vibračního stavu molekuly. Na rozdíl od infračervené spektrometrie při studiu Ramanova rozptylu není nutné, aby se energie použitého záření shodovala s energetickým rozdílem mezi základním a excitovaným vibračním stavem. Záření interaguje s molekulou za vzniku krátce trvajících stavů, který je označován jako virtuální stav. Ten je velmi nestálý a molekula se stabilizuje opětovným vyzářením fotonu. Pakliže proces rozptylu záření zahrnuje pouze deformaci elektronového oblaku bez změny polohy atomových jader, jedná se o elastický rozptyl záření označovaný také jako Rayleighův rozptyl. Jestliže však při procesu rozptylu dochází ke změně pohybu atomových jader, lze mluvit o neelastickém Ramanově rozptylu. Energie dopadajícího a rozptýleného fotonu se pak liší o energetický rozdíl mezi jednotlivými vibračními stavy. Ramanův rozptyl se vyznačuje velice malou intenzitou. Přibližně pouze jeden foton z milionu je rozptýlen neelasticky, ostatní podléhají rozptylu elastickému. Až rychlé pokroky techniky v oblasti laserů a mikroskopie v posledních desetiletích umožnily zaměřit velké množství energie na malou plochu vzorku, zvýšit intenzitu elasticky rozptýleného záření a tím napomoci k rozšíření Ramanovy spektrometrie mimo vědecké laboratoře.

V Ramanových spektrech jsou rozlišovány Stokesovy a anti-Stokesovy pásy. Stokesovy pásy lze spojit s procesy, při nichž molekula přechází z energeticky nižšího vibračního stavu do vyššího. Ale některé molekuly se díky tepelné energii mohou již nacházet v excitovaném vibračním stavu a při procesu rozptylu mohou část své energie odevzdat fotonu a přejít naopak do základního vibračního stavu. Tímto specifickým rozptylem vznikají ve spektru anti-Stokesovy pásy, které se obvykle vyznačují nízkou intenzitou, protože při laboratorní teplotě se běžně nachází většina molekul v základním vibračním stavu a nikoli ve stavu excitovaném. V praxi jsou pro účely kvantitativní nebo kvalitativní analýzy využívány častěji pásy Stokesovy [32].



Obr. 7. Diagram znázorňující Rayleighův a Ramanův rozptyl. Základní vibrační stav je zde označen m , excitovaný vibrační stav pak n . [32]

Podle známého výběrového pravidla lze pomocí Ramanova rozptylu identifikovat vibrace, které způsobují změnu v polarizovatelnosti elektronového oblaku. To se týká především symetrických vibrací. Naopak v infračervené spektroskopii je nejvyšší absorpce spojena s vibracemi, které zapříčiňují změnu dipólového momentu molekuly [31].

2.4.1 Charakterizace grafenu pomocí Ramanovy spektrometrie

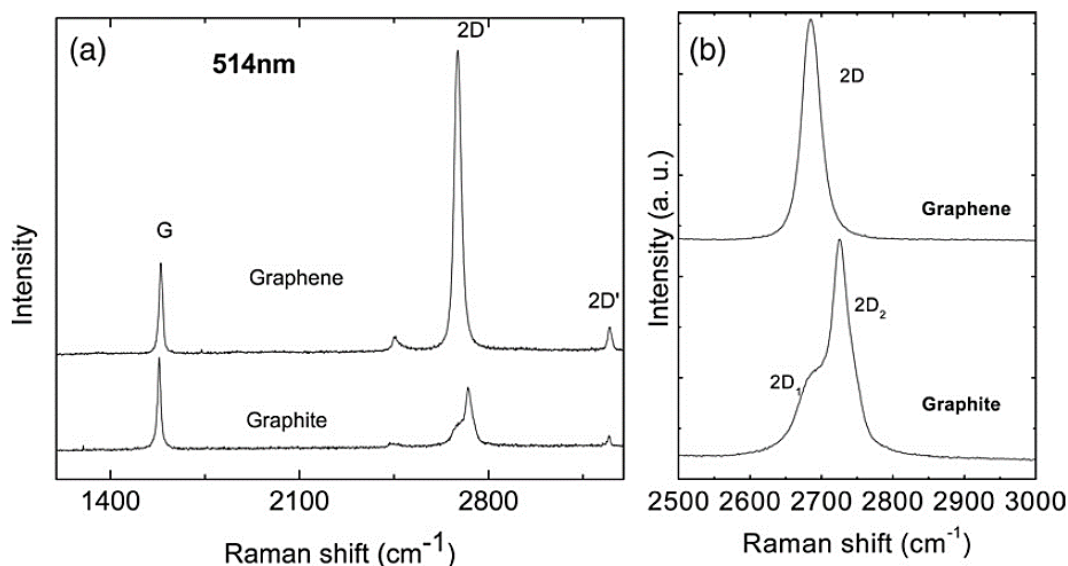
Všeobecně je známo, že uhlíkové nanomateriály hrají v dnešní době stále významnější roli na poli vědy, techniky i praktických aplikací. Grafit či uhlíkové nanotrubičky jsou např. součástí komerčně dostupných baterií. Klíčovým požadavkem pro rozvoj výzkumu a aplikací uhlíkových nanomateriálů je schopnost identifikovat a charakterizovat jednotlivé typy materiálů na laboratorní i průmyslové úrovni. Využití Ramanovy spektrometrie se jeví pro uvedené účely jako velmi vhodné. Jedná se o nedestruktivní techniku s vysokým rozlišením a schopností poskytnout velké množství strukturních informací.

Jednoduchost měření Ramanových spekter je vykoupena v mnoha případech obtížemi při jejich interpretaci. Nicméně spektra uhlíkových nanomateriálů lze označit za jednoduchá, obsahují několik velice intenzivních pásů v rozsahu $1000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$. Tvar, intenzita a přesná poloha jednotlivých pásů pak dovolují rozlišit jednotlivé druhy uhlíkových nanomateriálů. Společný znak při excitaci zářením z viditelné oblasti spektra představují tzv. G pás, který leží přibližně v oblasti 1560 cm^{-1} , a D pás, který je situován

do oblasti 1360 cm^{-1} a často jeví nízkou intenzitu. G pás vzniká díky valenční vibraci uhlíku v hybridním stavu sp^2 , ať už je atom umístěn v kruhu či v řetězci. D pás je spojen s tzv. dýchacím módem sp^2 atomů uhlíku v uzavřeném cyklu. Při použití ultrafialového záření pro excitaci lze pak u amorfního uhlíku pozorovat tzv. T pás v oblasti 1060 cm^{-1} .

Společným prvkem Ramanových spektrech grafenu a grafitu měřených při excitaci zářením o vlnové délce $514,5\text{ nm}$ je G pás v oblasti $1560 - 1580\text{ cm}^{-1}$ a 2D pás vyskytující se přibližně v oblasti 2700 cm^{-1} . Označení 2D je odvozeno od faktu, že pás odpovídá vyšší harmonické frekvenci vibrace, která se klasicky projevuje jako D pás. Změna ve tvaru a intenzitě 2D pásu umožňuje odlišit grafen od grafitu. 2D pás grafitu se zřetelně skládá ze dvou složek, které jsou označovány jako $2D_1$ a $2D_2$, a jeho výška dosahuje čtvrtiny až poloviny výšky G pásu. Naproti tomu grafen se vyznačuje ostrým, jednoduchým 2D pásem, který je přibližně čtyřikrát intenzivnější než G pás. Jestliže vícevrstvý grafen obsahuje více než pět vrstev, jeho spektrum se stane prakticky totožné se spektrem pro obyčejný grafit.

Modifikace povrchu grafenu ovlivní Fermiho hladinu energie a projeví se změnami v G pásu [33].



Obr. 8. (a) Srovnání Ramanových spekter grafenu a grafitu při excitaci zářením o vlnové délce 514 nm . (b) Srovnání 2D pásu grafenu a grafitu. [33]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výsledky uvedené v experimentální části diplomové práce byly získány v laboratořích Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů v Olomouci – Holici. Experimenty byly provedeny s materiální i intelektuální podporou vědecké skupiny Nanomateriály v biomedicíně.

3.5 Materiál a metody

3.5.1 Použité chemikálie

Tab. 1. Chemikálie použité při experimentech.

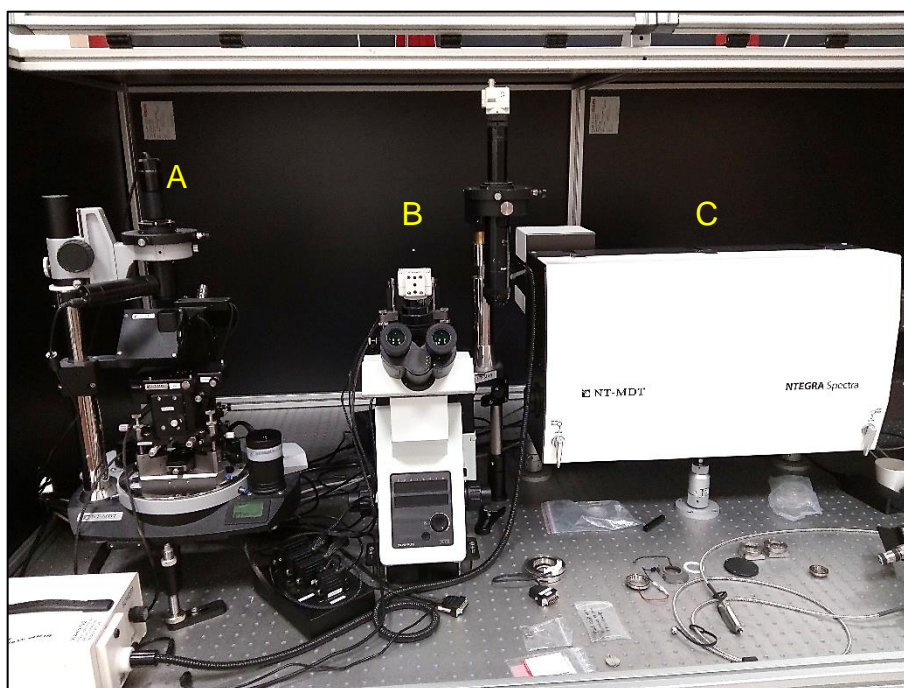
Chemikálie	Čistota	Výrobce
RNA (5' CGC GAG AGC G 3')	p.a.	DNA Technology A/S (Dánsko)
DNA (TAT GGT GTT GGT ACC TGT GGT GT(CY5))	p.a.	IBA GmbH (Německo)
DNA ((THIOL)AAA AAG GCT ATA CAC CAC AGG TAC CAA CAC CAT AAT AGC C(CY3))	p.a.	IBA GmbH (Německo)
HOPG	99,9 %	NT-MDT (Rusko)
EDTA	99 %	Sigma-Aldrich (USA)
TRIS	99,3 %	Carl Roth GmbH (Německo)
chlorid hořečnatý hexahydrát	p.a.	Lach-Ner (ČR)
kyselina octová	99 %	Penta (ČR)
hydroxid sodný	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (USA)
aceton	≥ 99 %	Honeywell (USA)
isopropylalkohol	≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich (USA)

3.5.2 Přístrojové vybavení a software

- analytické váhy Kern ABS-N/ABJ-NM
- pH metr inoLab 7110, WTW s kombinovanou skleněnou elektrodou
- zařízení NTEGRA Spectra

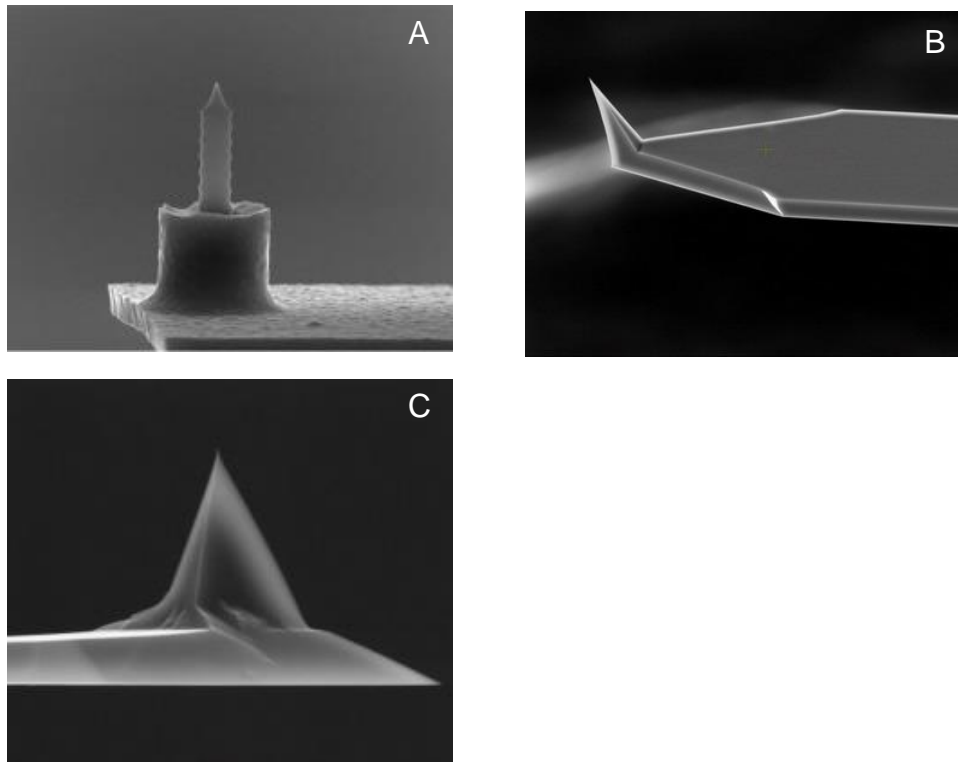
Jedná se o modulární přístroj, který kombinuje optický mikroskop, mikroskop atomárních sil a Ramanův spektrometr. Simultánní měření AFM a Ramanova rozptylu umožňuje současně získat informaci o vybraných fyzikálních vlastnostech

a chemickém složení vzorku. Měření je možno provádět na vzduchu nebo v kapalně fázi. Za optimálních podmínek lze dosáhnout laterálního rozlišení až 10 nm [34].



Obr. 9. Zařízení NTEGRA Spectra; (A) AFM pro měření za ambientních podmínek, (B) AFM pro měření v kapalně fázi, (C) Ramanův spektrometr.

- AFM sondy ETALON (HA-NC), NT-MDT, Zelenograd, Rusko
Sondy jsou vyrobeny z křemíku. Horní strana nosníku odrážející laserový paprsek je potažena zlatem. Výška hrotu je $\geq 10 \mu\text{m}$. Zakřivení konce hrotu činí méně než 10 nm. Rezonanční frekvence se pohybuje v rozmezí 160 – 250 kHz.
- AFM sondy VIT_P, NT-MDT, Zelenograd, Rusko
Sondy jsou vyrobeny z křemíku dopovaného antimonem. Výška hrotu je 14 – 16 μm . Zakřivení hrotu činí obvykle 6 nm, garantováno je 10 nm. Rezonanční frekvence se pohybuje v rozmezí 200 – 400 kHz.
- AFM sondy NSG01/Pt, NT-MDT, Zelenograd, Rusko
Sondy jsou vyrobeny z křemíku dopovaného antimonem a jsou pokryty slitinou platiny a iridia. Výška hrotu je 14 – 16 μm . Zakřivení hrotu činí 35 nm. Rezonanční frekvence spadá do intervalu 87 – 230 kHz.

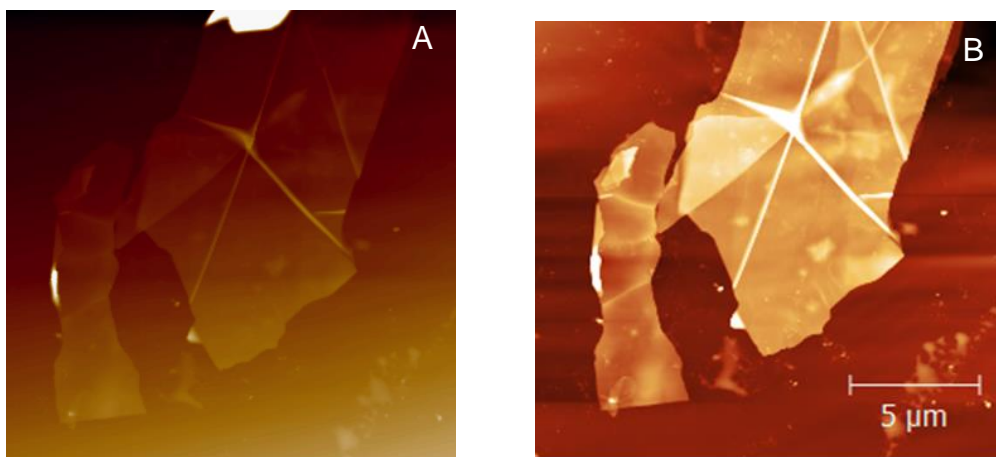


Obr. 10. Použité AFM sondy; (A) ETALON (HA-NC), (B) VIT_P, (C) NSG01/Pt. [35]

- aplikace Gwyddion

Jedná se o software sloužící k zobrazení a úpravě dat získaných technikami SPM. Primárně je program určen k analýze výškového profilu vzorku, ale uživatelům poskytuje i mnoho dalších funkcí. Velkou výhodou aplikace Gwyddion je její schopnost čtení a úpravy velkého množství formátů souborů SPM a také rozsáhlá podpora operačních systémů (Microsoft Windows, Mac OS X, GNU/Linux, FreeBSD). Gwyddion se řadí mezi svobodný a otevřený software, který lze zdarma získat na webových stránkách gwyddion.net [36].

Z funkcí, které Gwyddion nabízí, byly k úpravě snímků publikovaných v této práci nejčastěji využity vyrovnání náklonu vzorku, redukce laterálního šumu vznikajícího pohybem sondy a zvýšení barevného kontrastu.



Obr. 11. Topografické snímky vločky grafitu pořízené AFM; (A) před úpravou aplikací Gwyddion, (B) po úpravě aplikací Gwyddion.

3.5.3 Příprava roztoků

130,53 µg RNA bylo rozpuštěno v 1 mL destilované vody. Byl tak získán zásobní roztok o koncentraci 40,3 µmol/L. Nižší koncentrace měřených roztoků RNA byly získány zředěním zásobního roztoku destilovanou vodou.

Zásobní roztok DNA (vzorek A) o koncentraci 25 µmol/L byl připraven rozpuštěním 191,99 µg DNA v 1 mL destilované vody.

Zásobní roztok DNA (vzorek B) o koncentraci 25 µmol/L byl získán rozpuštěním 310,25 µg DNA v 1 mL destilované vody.

Při přípravě roztoku EDTA o koncentraci 0,5 mol/L bylo postupováno následovně. Navážka 14,6193 g EDTA byla za stálého míchání přidána k 80 mL destilované vody. Přídavkem pevného hydroxidu sodného bylo pH upraveno na hodnotu 8, při níž došlo k rozpuštění EDTA. Objem roztoku byl následně doplněn destilovanou vodou na 100 mL.

Pro výrobu pufru TAE 1× byla v 900 mL destilované vody rozpuštěna navážka 4,8482 g TRIS. K roztoku byly přidány 2 mL 0,5 mol/L EDTA. Za stálého míchání bylo přídavkem koncentrované kyseliny octové upraveno pH roztoku na výslednou hodnotu 8,5.

Rozpuštěním navážky 0,1080 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 40 mL pufru TAE 1× byl získán pufr TAE 1× s obsahem Mg^{2+} (12,5 mmol/L).

3.5.4 Příprava vzorku k měření

Nejdříve byla provedena exfoliace HOPG za pomoci lepicí pásky. Exfoliovaný grafit byl následně otisknut na substrát, kterým byl oxid křemičitý nebo sklo pokryté tenkou vrstvou oxidů india a cínu v případě měření SCM.

Vzorek byl následně prozkoumán pomocí optické mikroskopie, která umožňuje identifikaci grafitových vloček vyznačujících se nízkou výškou. Tenké grafitové vločky jsou na podkladu tvořeném oxidem křemičitým zbarveny fialově.

Dále byl vzorek očištěn pomocí organických rozpouštědel acetonu a isopropylalkoholu. Tento krok byl zařazen z toho důvodu, že při otisknutí exfoliovaného grafitu bylo společně s grafitovými vločkami přeneseno na substrát značné množství lepidla, které způsobovalo komplikace v identifikaci tenkých grafitových vloček a také v samotném procesu vytváření snímku.

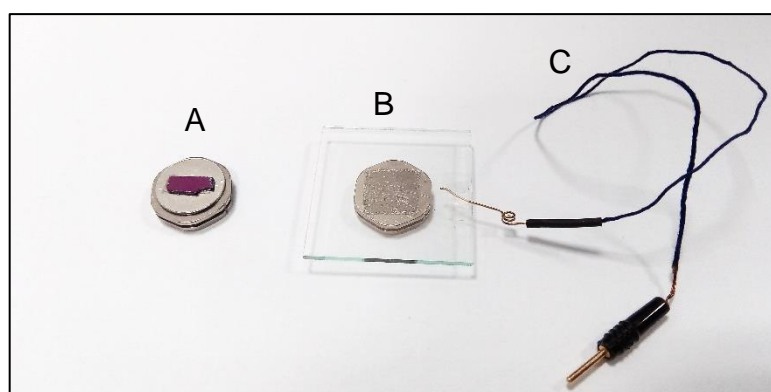
V dalším kroku bylo na připravený substrát nanášeno 5 μL roztoku nukleové kyseliny dané koncentrace a 5 μL pufru TAE 1 \times obsahujícího ionty Mg^{2+} v koncentraci 12,5 mmol/L. V případě RNA byly aplikovány roztoky o koncentraci 20 $\mu\text{mol/L}$, 200 nmol/L a 20 nmol/L. Roztoky DNA byly nanášeny v koncentraci 25 $\mu\text{mol/L}$.

Následovala inkubace vzorku trvající 10 minut, po které byl povrch vzorku vysušen proudem dusíku.

Nakonec bylo provedeno měření AFM, případně SCM či Ramanova rozptylu.

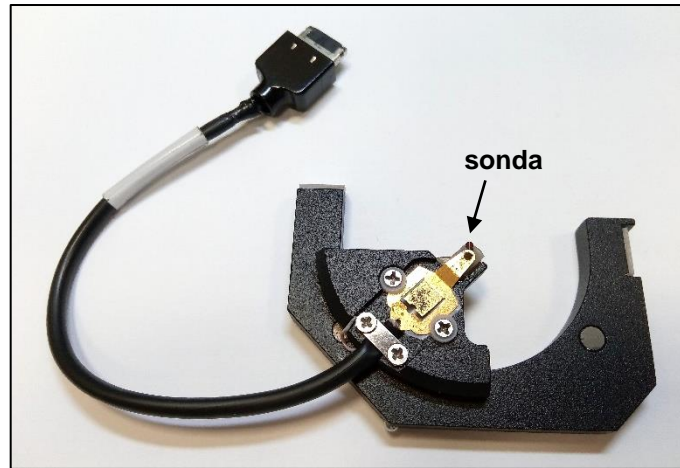
3.5.5 Nastavení mikroskopu atomárních sil

Substrát obsahující měřený vzorek byl připevněn pomocí oboustrannné lepicí pásky k magnetické podložce, která byla následně umístěna na základní jednotku mikroskopu atomárních sil. Při měření SCM bylo ještě provedeno uzemnění substrátu pomocí speciálního drátku.



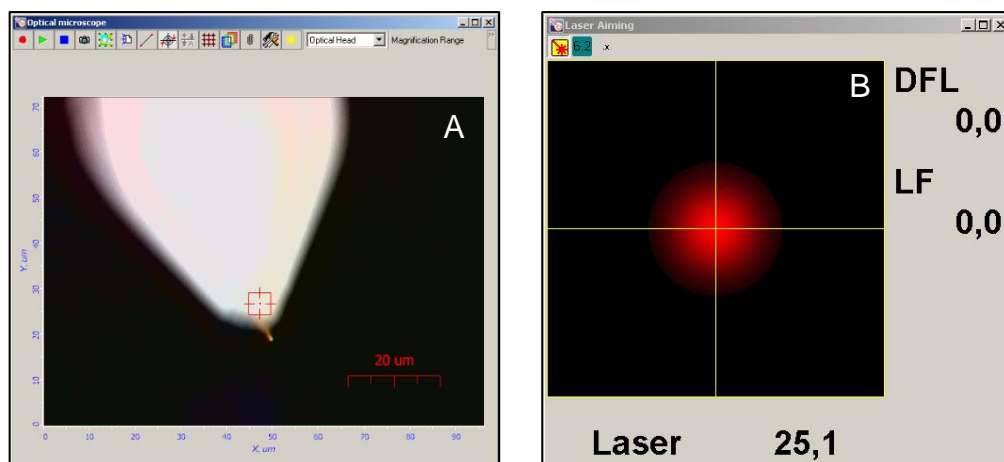
Obr. 12. (A) Substrát – SiO_2 , (B) substrát – sklo pokryté vodivou vrstvou oxidů india a cínu, (C) zemnicí drátek.

Pomocí pinzety byla do speciálního držáku vložena sonda VIT_P, ETALON (HA_NC) nebo NSG01/Pt. Držák byl dále připojen k měřicí hlavě a ta byla umístěna na základní jednotku AFM.



Obr. 13. Držák AFM sondy.

Byla spuštěna aplikace NOVA zajišťující obsluhu mikroskopu a nastavení detailních parametrů skenu. Pomocí optického mikroskopu byl prozkoumán povrch substrátu a také nalezen nosník sondy. Laserový paprsek, pomocí kterého je detekován ohyb a torze nosníku, byl zaměřen na střed fotodiody.



Obr. 14. (A) Obraz sondy vytvořený optickým mikroskopem, (B) ukazatel pozice laserového paprsku vzhledem k fotodiodě.

Po vycentrování laserového paprsku byl vzorek manuálně přiblížen k měřicí sondě na vzdálenost přibližně 2 mm.

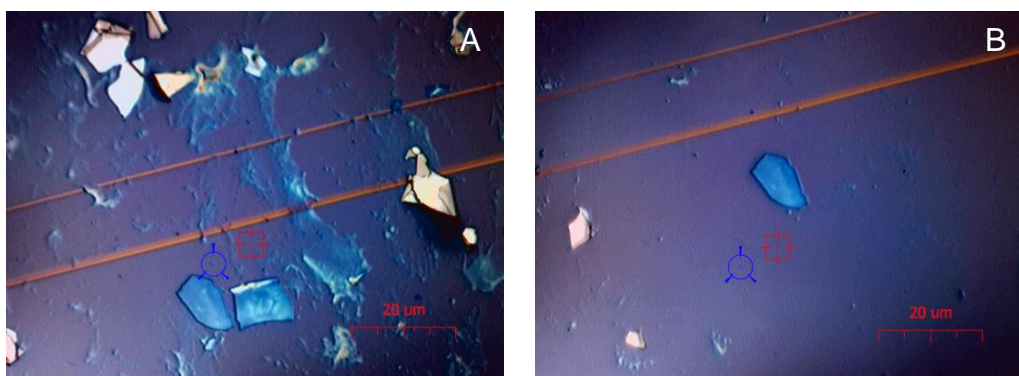
Skrze aplikaci NOVA bylo provedeno další nastavení. Byl zvolen **poklepový režim** (u všech provedených měření) a zkontrolován správný typ měřicí hlavy. Následně byla nastavena rezonanční frekvence nosníku, velikost amplitudy oscilací, jejíž relativní hodnota je v aplikaci NOVA monitorována prostřednictvím veličiny Mag, a bylo korigováno zkroucení nosníku. Bylo provedeno přiblížení nosníku se sondou k povrchu vzorku do výchozí vzdálenosti pro měření. Tu určuje hodnota veličiny **SetPoint**, která byla obvykle zvolena jako **polovina hodnoty amplitudy volné oscilace nosníku**. Úspěšné přiblížení pak bylo indikováno poklesem amplitudy oscilací. Před samotným skenováním byla ještě definována velikost skenované oblasti, rozlišení snímku a byly určeny měřené veličiny.

Získaná data byla uložena a posléze zpracována programem Gwyddion.

3.6 Výsledky a diskuze

3.6.1 Čištění povrchu substrátu

Po otisknutí exfoliovaného grafitu na substrát zůstával povrch znečištěn množstvím lepidla. Byl hledán způsob, jak množství lepidla eliminovat, ale zároveň zachovat přítomnost grafitových vloček. Husale a spolupracovníci doporučují aplikaci acetonu a isopropylalkoholu [37]. Jako velmi účinné se ukázalo využití ultrazvuku, které zásadně zkracuje dobu potřebnou pro působení rozpouštědla. Výsledná úprava vzorku měla následující podobu. Vzorek byl ponořen do acetonu a vystaven působení ultrazvuku po 3 s. Následovalo vysušení proudem dusíku. Vzorek byl dále ponořen do isopropylalkoholu a ponechán v ultrazvuku také po dobu přibližně 3 s. Nakonec byl vzorek dokonale vysušen dusíkem.

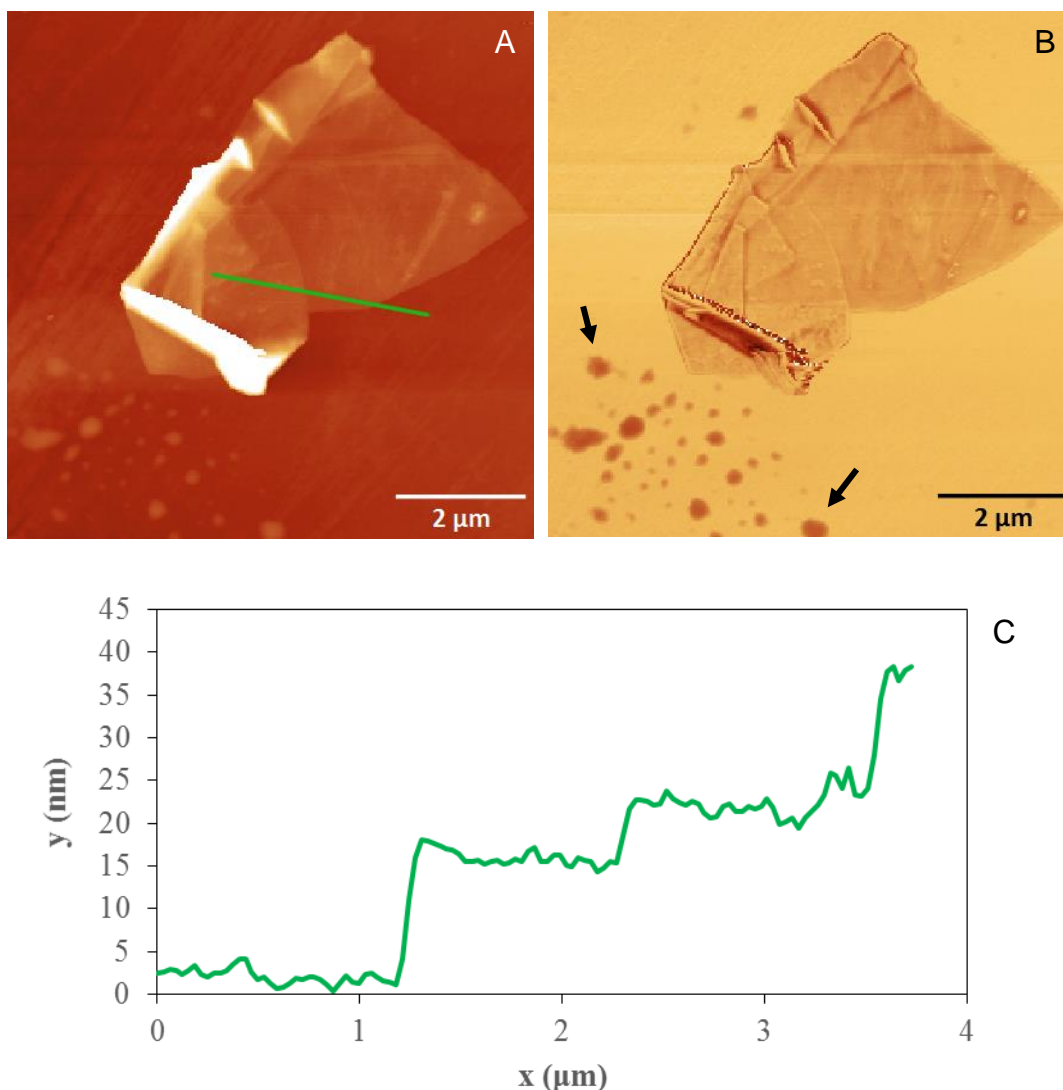


Obr. 15. Snímky exfoliovaného grafitu na substrátu (oxid křemičitý) pořízené optickým mikroskopem; (A) před očištěním povrchu organickými rozpouštědly, (B) po očištění povrchu organickými rozpouštědly.

3.6.2 AFM snímky grafitu

Základním krokem na začátku série experimentů bylo zobrazení samotných grafitových vloček na očištěném povrchu oxidu křemičitého. Kontrola vzhledu a topografie grafitových vloček byla nezbytná k zabránění pozdější špatné interpretace dat. Na obrázku 16 se nachází grafitová vločka získaná exfoliací HOPG po očištění povrchu acetonem a isopropylalkoholem. Zobrazení fáze potvrzuje, že povrch samotných grafitových vloček zůstává po ošetření organickými rozpouštědly čistý. Lepidlo však není odstraněno zcela dokonale. Na obraze topografie a zvláště pak na obraze fáze jsou patrné zbytky lepidla ve formě drobných kapiček, které zůstávají na substrátu. Jejich velikost a četnost ale již není rušivá. Na výškovém profilu je pak patrná vrstevnatá struktura grafitu.

Původním cílem byl zisk grafenu. Ten se ale identifikovat nepodařilo, ze dvou důvodů. Exfoliace, tedy mechanická separace vrstev, měla být dle dostupné literatury [38] pro přípravu grafenu dostatečně účinná. Praxe však ukázala velmi malou efektivitu exfoliace v tomto směru. Pro naprostou většinu pozorovaných grafitových vloček byla charakteristická výška několik desítek nanometrů. Druhou příčinou, proč nebyl identifikován grafen, bylo rozlišení AFM ve vertikálním směru. Při optimalizaci podmínek se podařilo dosáhnout rozlišení přibližně 2 – 3 nm ve směru osy z, což není dostatečné pro zobrazení jednovrstvého grafenu, u kterého výška vrstvy činí teoreticky 0,3 nm [39].

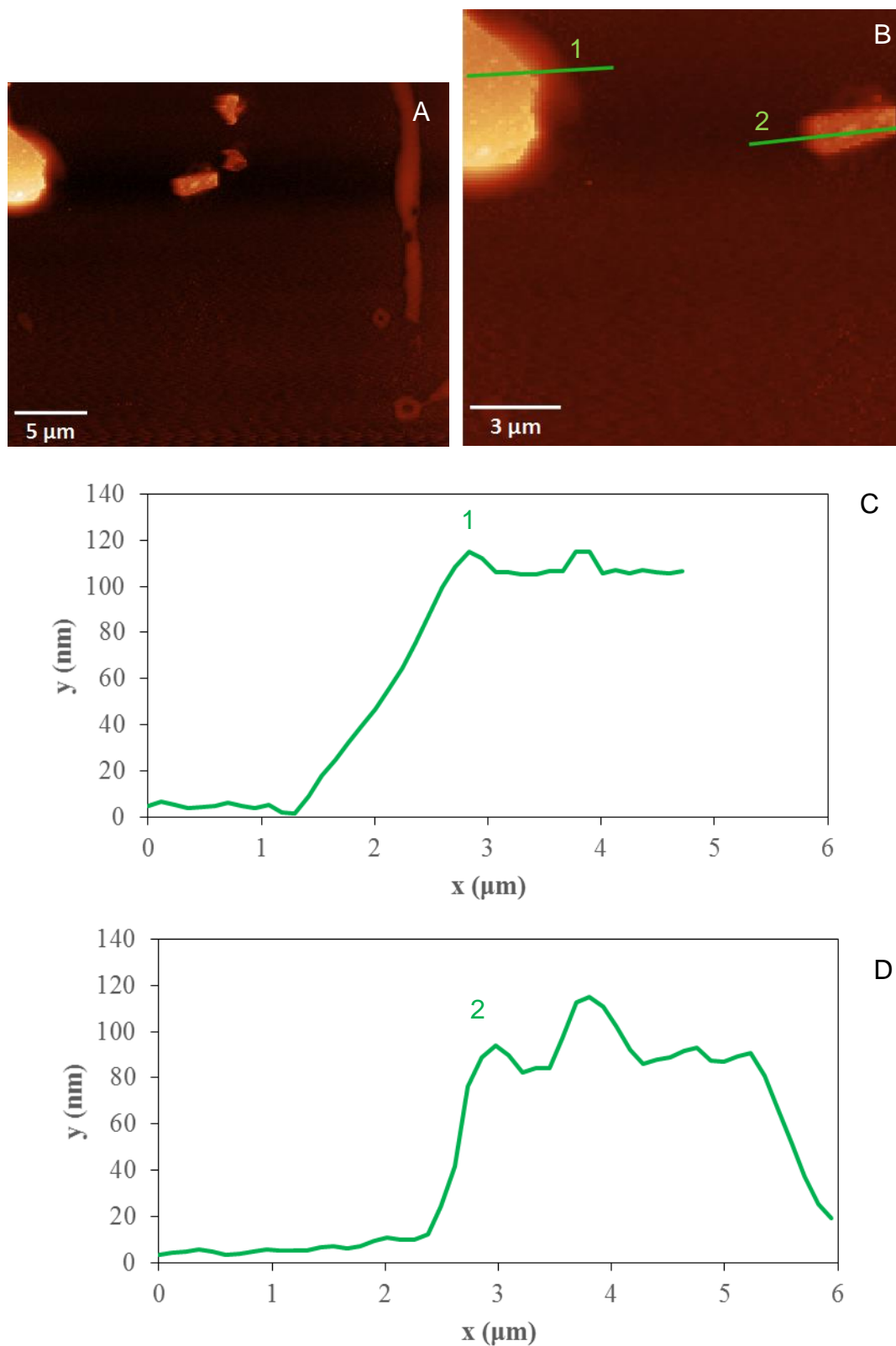


Obr. 16. Snímky grafitové vločky po očištění povrchu organickými rozpouštědly; (A) zobrazení topografie povrchu, (B) zobrazení fáze, šipky poukazují na zbytky lepidla, (C) výškový profil.

3.6.3 AFM a SCM snímky systému grafit – RNA

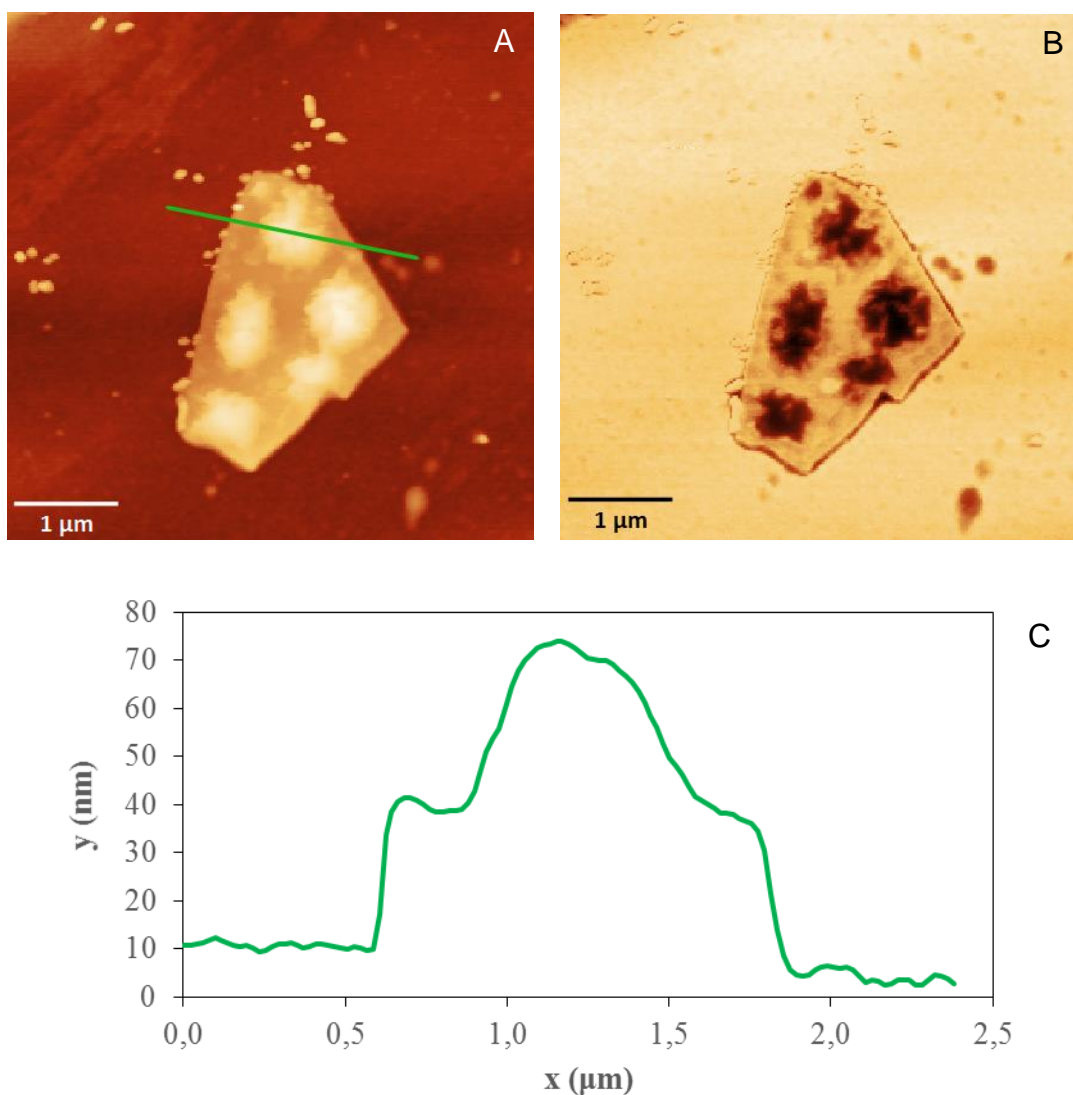
Na počátku bylo zamýšleno studium interakcí mezi grafitem a DNA v kapalně fázi. Důvodem je, že voda daleko přesněji simuluje prostředí živého organismu v porovnání s plynnou atmosférou. Z technických důvodů byl však získán v kapalně fázi pouze jediný snímek. Ten je možné vidět na obrázku 17. I přes nižší kvalitu snímku je patrné, že na povrchu grafitových vloček se nachází sférické útvary. Jejich výška se pohybuje v rozmezí od 9 nm po 34 nm. Výška útvarů byla vyhodnocena pomocí nástroje aplikace Gwyddion. Obraz fáze, který by mohl usnadnit další analýzu pozorovaných struktur, se nepodařilo vytvořit. Útvary mohou být tvořeny molekulami RNA, ale také se může jednat pouze o vzduchové bubliny vázané na povrch grafitu.

Kvůli zmíněným technickým obtížím byla další měření provedena za ambientních podmínek, tedy na vzduchu.



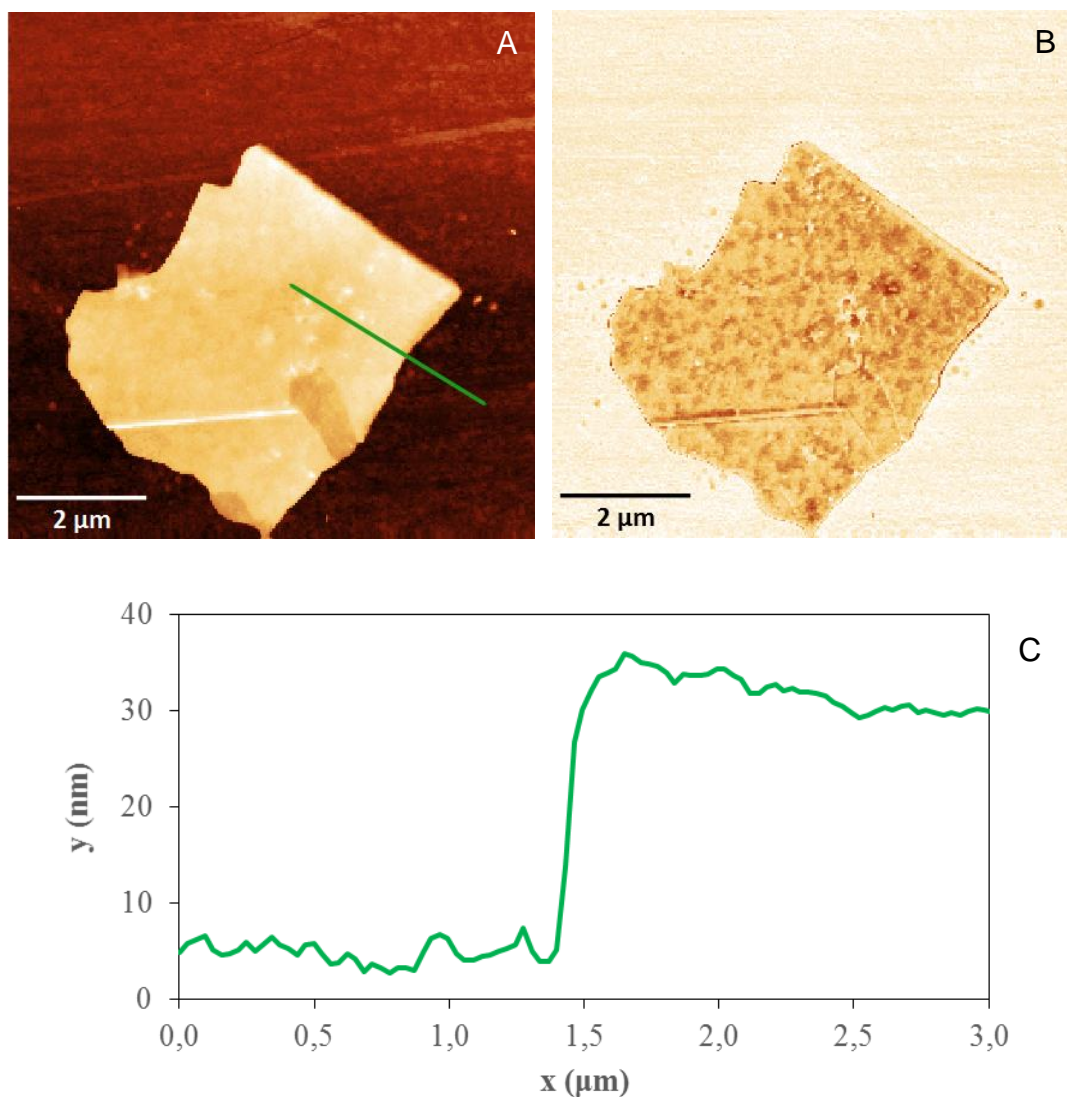
Obr. 17. Snímky systému grafit – RNA pořízené v kapalně fázi (H_2O); (A) zobrazení topografie povrchu, (B) zobrazení topografie povrchu – detail, (C) výškový profil 1, (D) výškový profil 2.

Výsledky depozice RNA na grafitové vločky a následného měření při ambientních podmínkách je možné vidět na obrázku 18. RNA byla nanesena jako vodný roztok bez přidání jiných látek. Stejně jako v případě měření v kapalně fázi, i při měření v ambientních podmínkách je možné po provedení depozice pozorovat na povrchu grafitu útvary, jejichž výška se pohybuje v řádu desítek nanometrů, v tomto případě od 27 nm do 40 nm (Gwyddion). U pozorovaných struktur lze vyloučit možnost, že by se jednalo o vzduchové bubliny, protože měření proběhlo v plynné atmosféře. Nemůže se jednat ani o zbytky lepidla, po ošetření organickými rozpouštědly zůstává povrch grafitových vloček čistý. A nerovnost povrchu vylučuje obraz fáze, který jasně potvrzuje, že útvary mají odlišnou fyzikálně-chemickou podstatu než povrch grafitové vločky. Struktury tak s nejvyšší pravděpodobností představují agregáty RNA.



Obr. 18. Snímky systému grafit – RNA měřené za ambientních podmínek ($C_{RNA} = 20 \mu\text{mol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení fáze, (C) výškový profil.

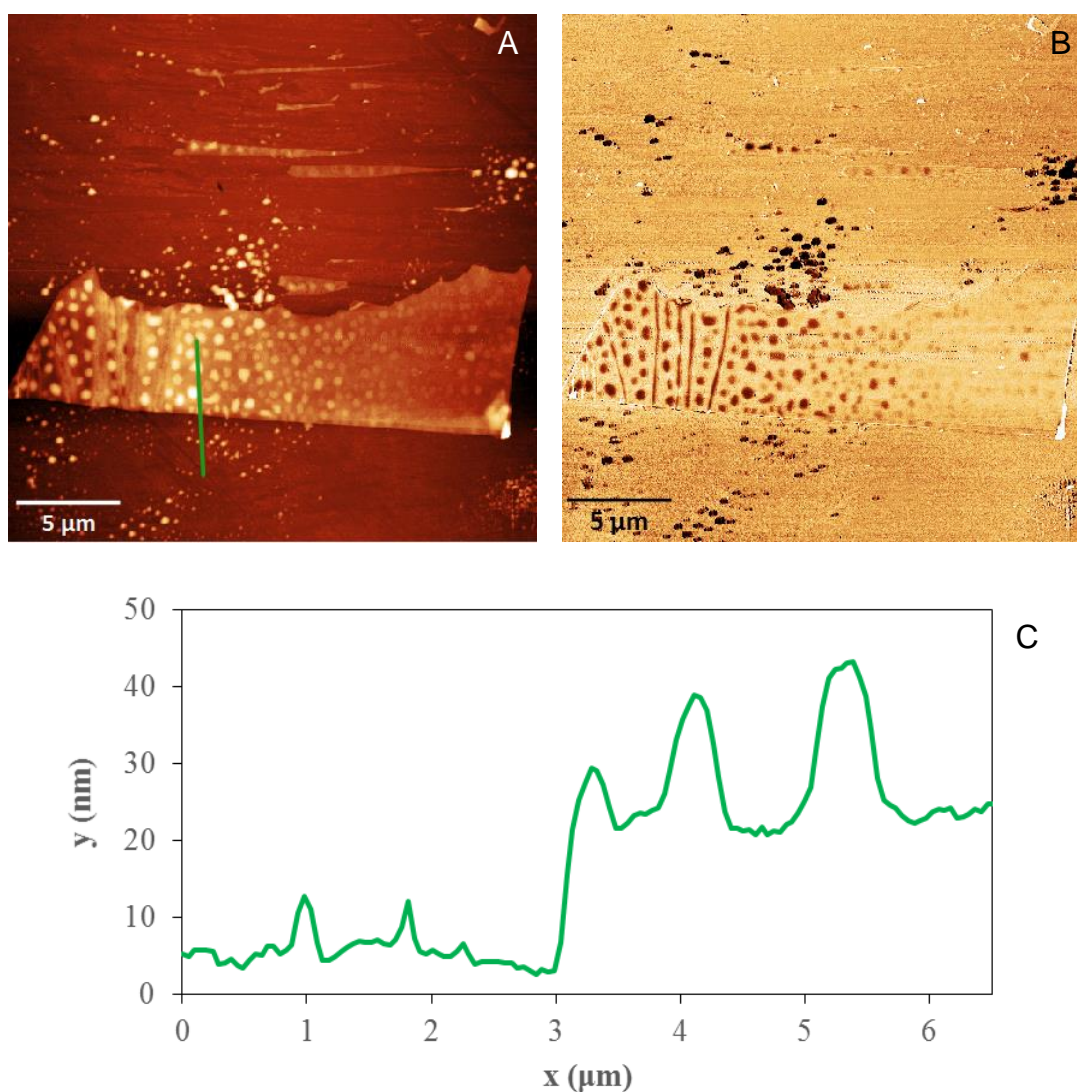
V případě, že RNA byla nanášena ve formě vodného roztoku bez přidavku dalších látek, byl u mnohých grafitových vloček pozorován jev, kdy RNA byla velmi nerovnoměrně distribuována po povrchu a tvořila velké, asymetrické útvary. Některé studie [40] doporučují provádět depozici v přítomnosti pufru obohaceného o dvojmocné ionty i v případě, že s jedná o depozici na elektricky nenabitý povrch, kdy pH a náboj nukleové kyseliny nehrají klíčovou roli. Jinak tomu je u elektricky nabitých substrátů, např. slídy, kdy je pH a náboj rozhodující. Při dalších provedených experimentech byla depozice provedena za účasti pufru TAE obsahujícího ionty Mg^{2+} . Aby bylo vyloučeno, že pozorované struktury budou tvořeny složkami pufru TAE, byl samozřejmě proveden kontrolní experiment, ve kterém byly na povrch grafitu nanesen pufr TAE s ionty Mg^{2+} .



Obr. 19. Snímky grafitové vločky po depozici pufru TAE 1× s Mg^{2+} (12,5 mmol/L); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení fáze, (C) výškový profil.

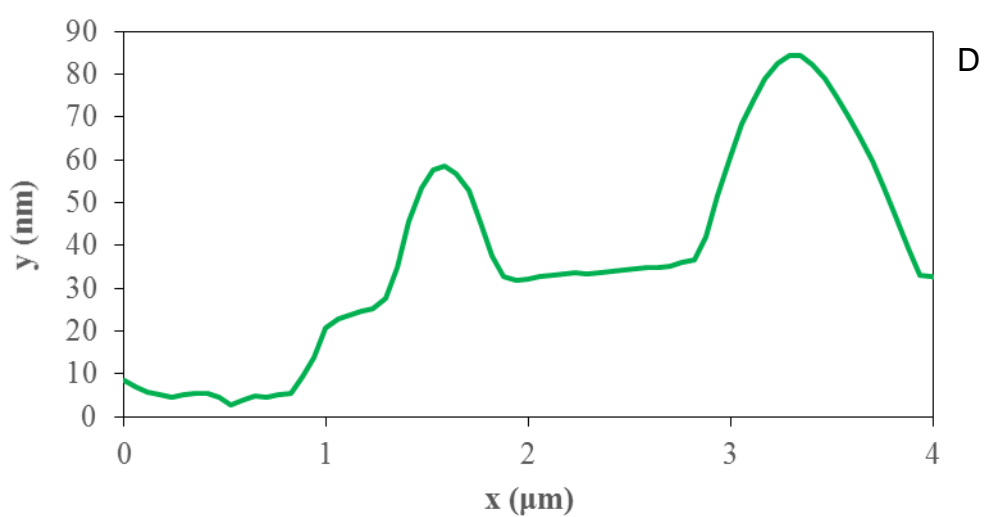
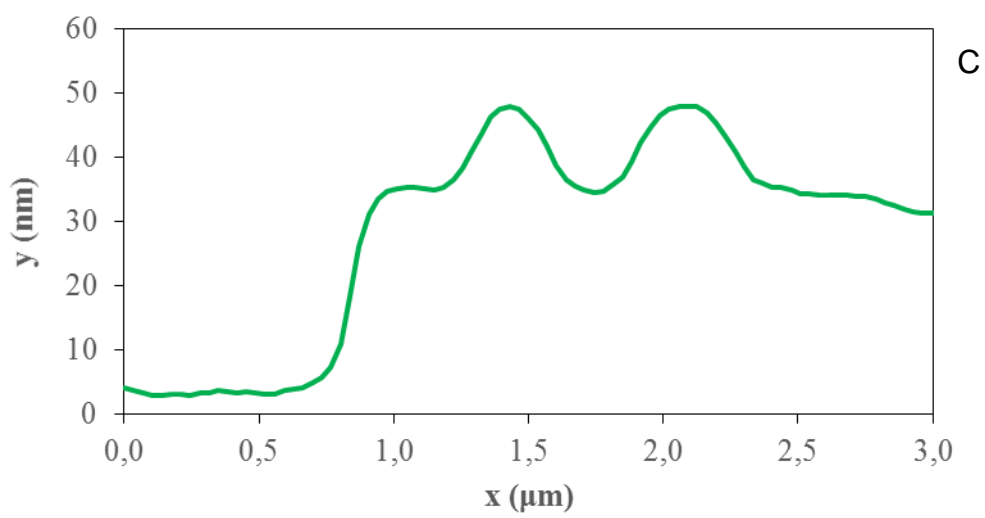
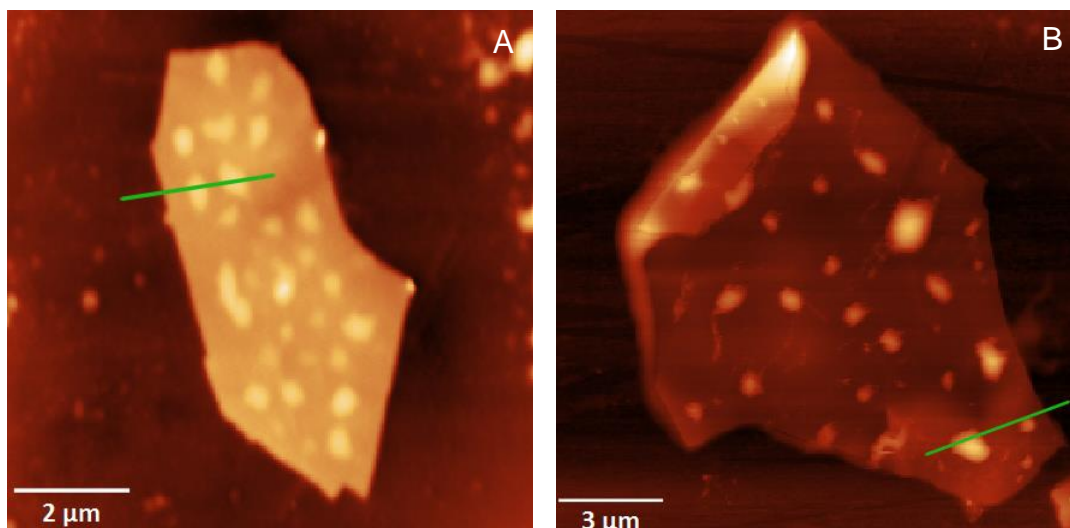
AFM snímky z obrázku 19 potvrzují, že složky pufru netvoří na povrchu grafitových vloček útvary, které by mohly být tvarově nebo velikostně zaměnitelné s agregáty RNA. Oproti čistému grafitu (viz obrázek 16) došlo k pozorovatelné změně obrazu fáze, což vypovídá o přítomnosti složek pufru na povrchu grafitu.

Při následujících experimentech byly oligonukleotidy deponovány v přítomnosti pufru TAE a iontů Mg^{2+} , jejichž použití přineslo pozitivní výsledek. Na žádné ze skenovaných grafitových vloček již nebyly identifikovány asymetrické agregáty. RNA byla na povrchu distribuována v podobě sférických útvarů, jejichž rozměry se řádově shodují. Výška útvarů, které je možné vidět na obrázku 20, se pohybuje v rozmezí 4 – 20 nm.



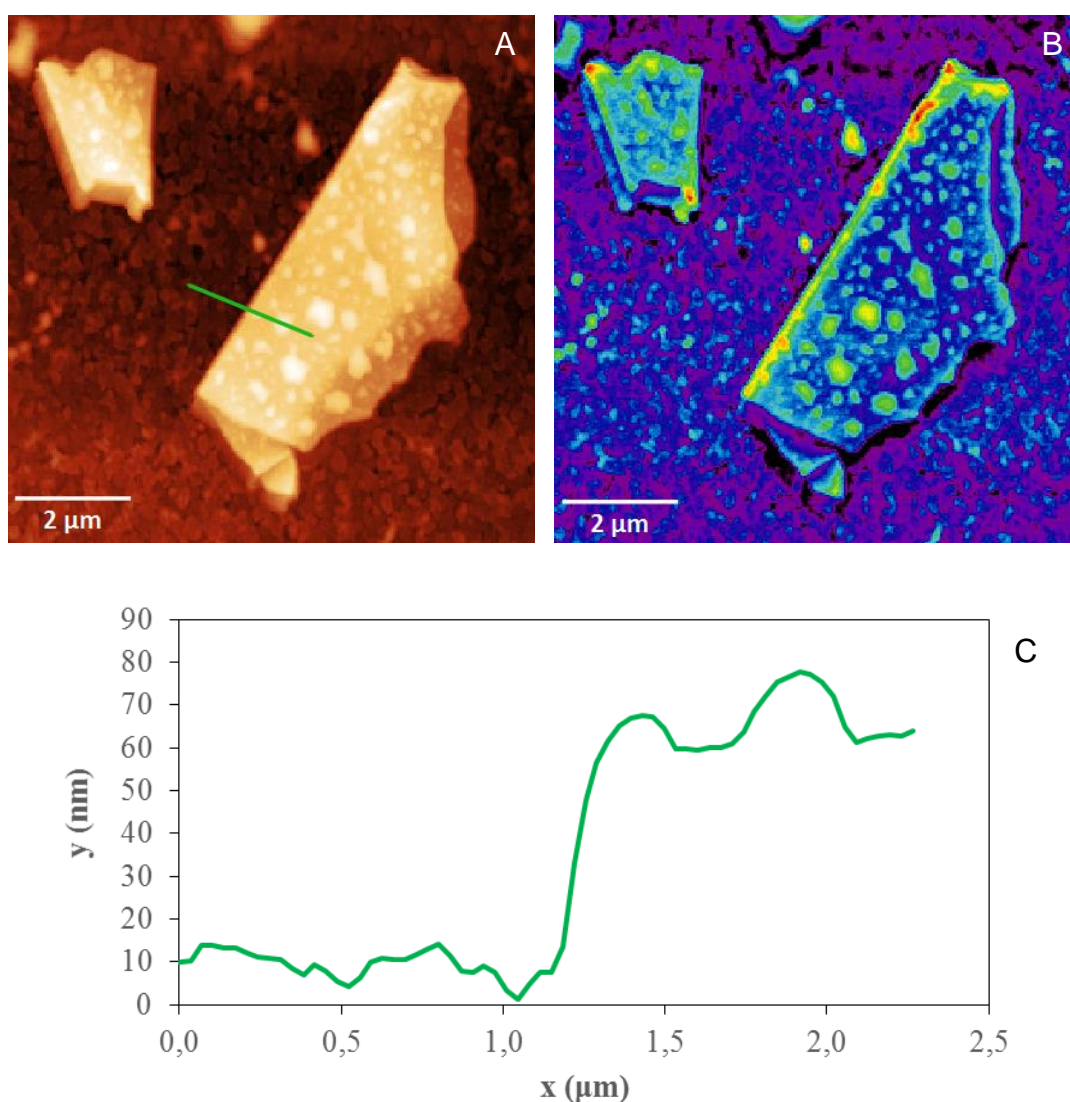
Obr. 20. Snímky systému grafit – RNA ($c_{RNA} = 20 \mu\text{mol/L}$, TAE 1 \times , $c_{Mg^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení fáze, (C) výškový profil.

Cílem dalších provedených experimentů bylo potvrzení hypotézy, že pozorované útvary jsou tvořeny RNA. Experiment byl navrhnout tak, že bude sledován dopad změny množství deponované RNA na vzhled pozorovaných útvarů. Snížení množství RNA by se mělo teoreticky projevit na podobě systému buď poklesem velikosti útvarů nebo snížením frekvence jejich výskytu. K depozici byly použity roztoky, jejichž koncentrace RNA byla 200 nmol/L a 20 nmol/L. Jednalo se tedy o vzorky, které byly oproti koncentraci původně nanášeného roztoku zředěny 100× a 1000×. Výraznější změny byly zaznamenány až u roztoku 1000× zředěného, kdy jasně poklesla frekvence výskytu a hustota zaplnění povrchu grafitových vloček pozorovanými útvary. Velikost struktur zůstala řádově zachována. Výška agregátů na obrázku 21 činí od 5 nm po 53 nm.



Obr. 21. Snímky systému grafit – RNA; (A) zobrazení topografie ($c_{\text{RNA}} = 200 \text{ nmol/L}$, TAE $1\times$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$), (B) zobrazení topografie ($c_{\text{RNA}} = 20 \text{ nmol/L}$, TAE $1\times$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$), (C) výškový profil pro snímek A, (D) výškový profil pro snímek B.

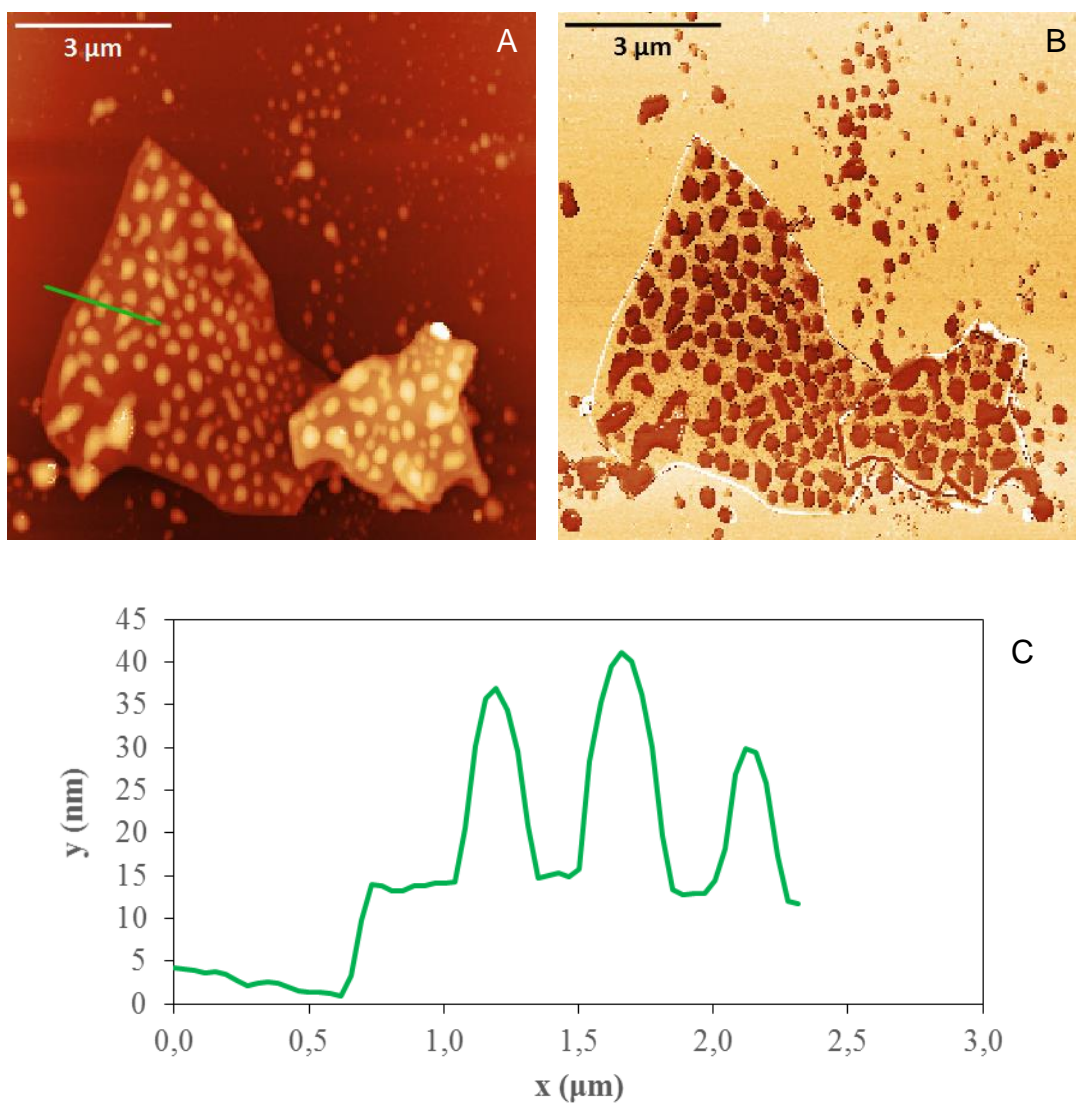
Odlišná chemická podstata pozorovaných struktur byla potvrzena i měřením kapacitní skenovací mikroskopií. Jak je vidět na obrázku 22, agregáty RNA se jasně odlišují hodnotou elektrické kapacitance od povrchu grafitu a samotného substrátu, kterým je v případě měření SCM skleněná destička pokrytá vodivou vrstvou oxidů kovů. Ze snímku SCM je jasně patrné, že zatímco substrát i grafit vykazují dobrou vodivost, agregáty vedou elektrický proud mnohem hůře. To potvrzuje předběžná očekávání, protože organické molekuly, mezi které se řadí i oligonukleotidy, by měly schopností vést střídavý elektrický proud jasně zaostávat za vodivými materiály. Výška pozorovaných útvarů se pohybovala v rozmezí 8 – 23 nm.



Obr. 22. Snímky systému grafit – RNA ($c_{\text{RNA}} = 20 \mu\text{mol/L}$, TAE $1\times$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení rozložení kapacitance, (C) výškový profil.

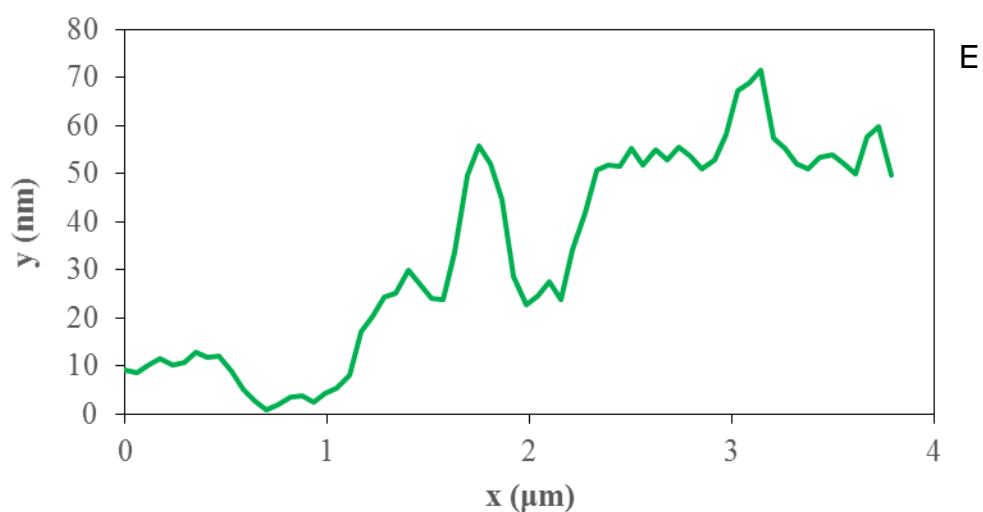
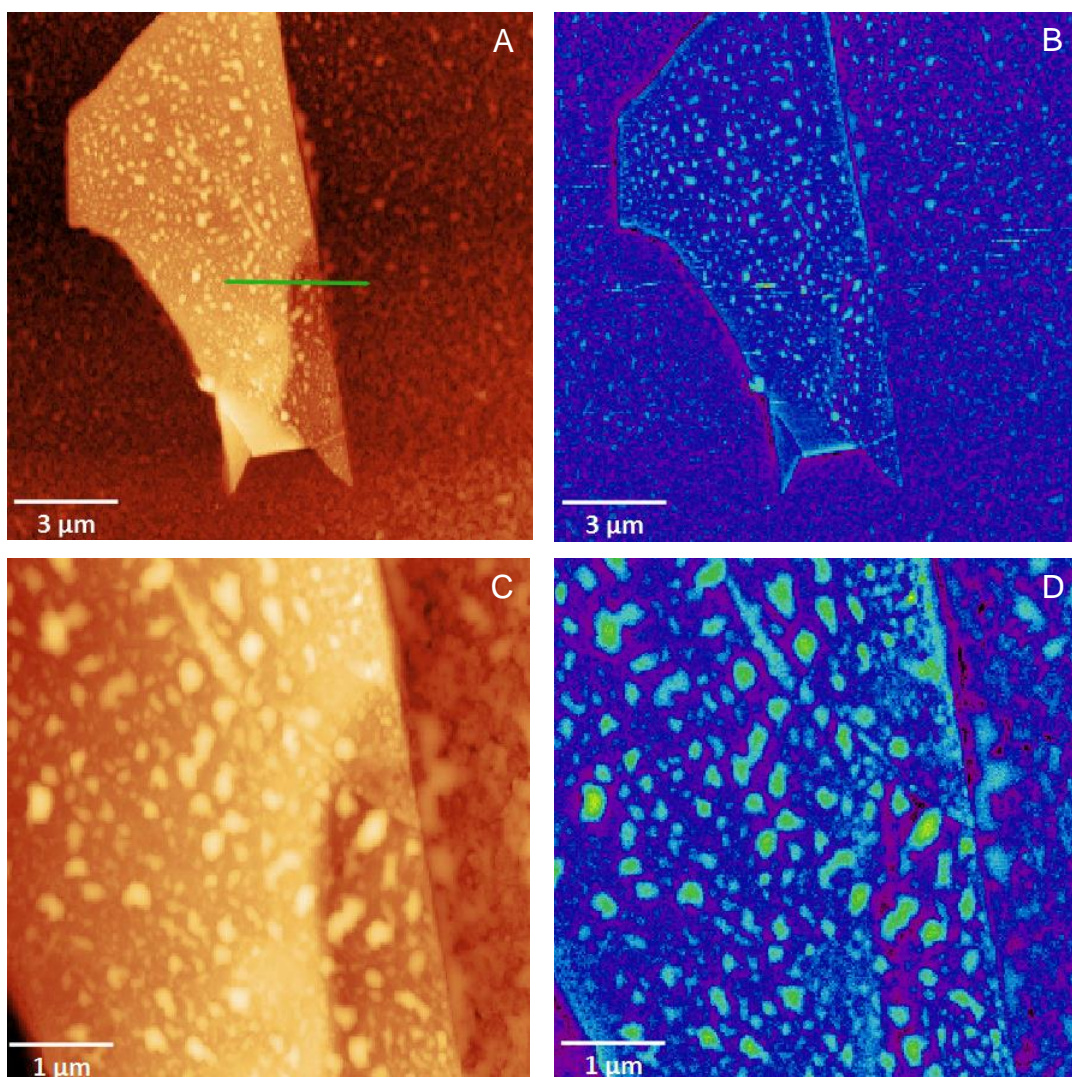
3.6.4 AFM a SCM snímky systému grafit – DNA (vzorek A)

Druhým oligonukleotidem, který byl deponován na povrch grafitových vloček, byl vzorek DNA, jehož délka činila 23 bází. Příprava a zobrazení vzorku probíhaly stejně jako v případě vzorku RNA. Na obrázku 23 jsou uvedeny výsledky depozice. Pozorované agregáty se vyznačovaly výškou od 7 nm do 50 nm. Jejich výška se tedy přibližně shoduje s agregáty tvořenými RNA. Tento fakt vypovídá o skutečnosti, že délka řetězce oligonukleotidu významným způsobem neovlivňuje velikost pozorovaných agregátů.



Obr. 23. Snímky systému grafit – DNA (vzorek A, $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{mol/L}$, TAE $1\times$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení fáze, (C) výškový profil.

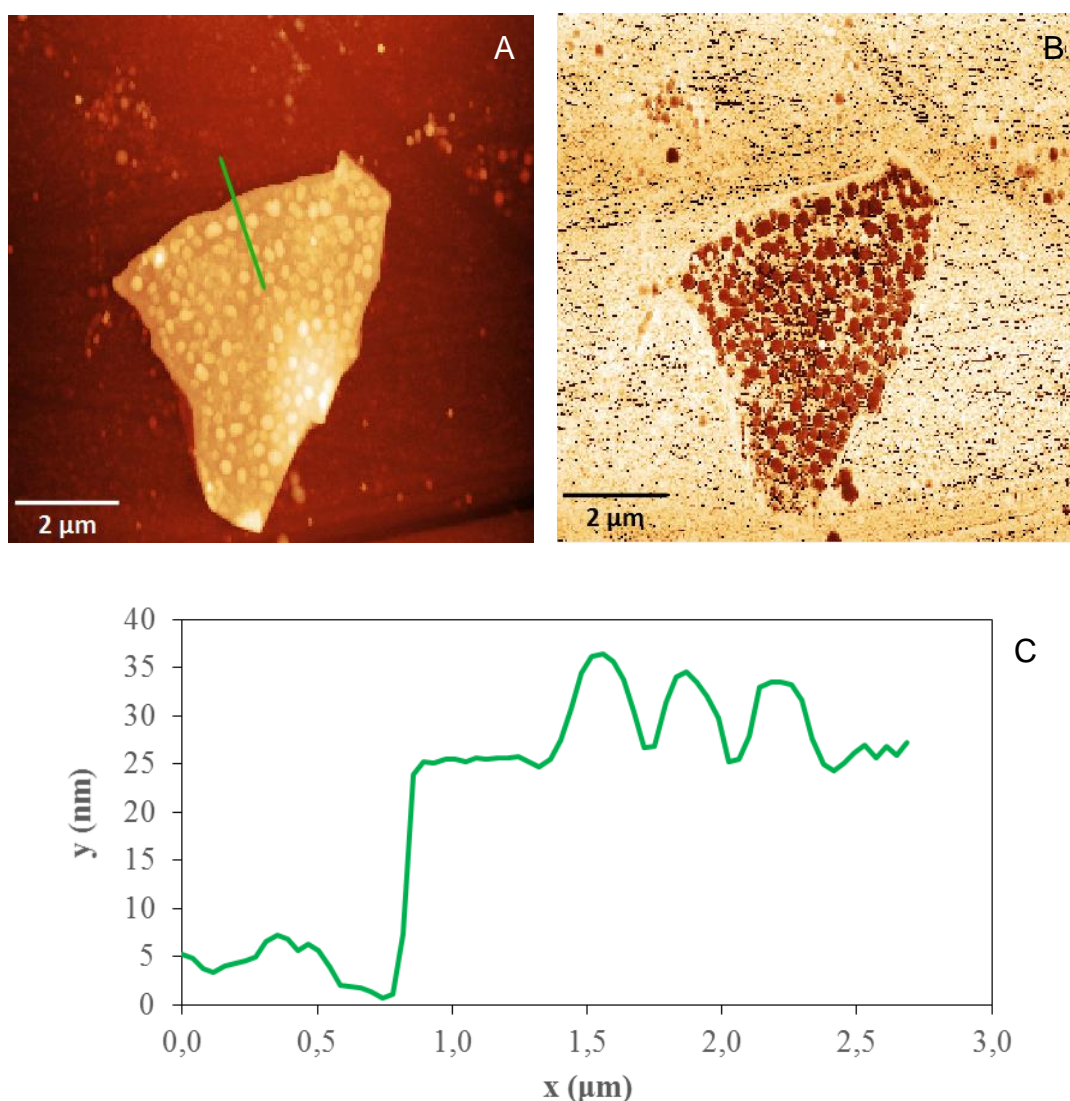
I v případě DNA (vzorek A) bylo provedeno měření SCM. Výsledky, které jsou shrnuty na obrázku 24, se podobají datům získaným pro vzorek RNA. Agregáty tvořené DNA se odlišují hodnotou elektrické kapacity od povrchu grafitové vločky a povrchu substrátu, což potvrzuje jejich chemickou odlišnost. Na výškovém profilu je dobře patrné, že šum ve vertikálním směru (ve směru osy z) je vysoký, což samozřejmě zhoršuje rozlišení mikroskopu. Měření SCM bylo prováděno za stejných laboratorních podmínek jako předešlá měření topografie a fáze, a tak příčina horšího rozlišení spočívala s nejvyšší pravděpodobností v typu použitého substrátu a použité sondy. Skleněný povrch nevykazuje bohužel takovou plochost jako oxid křemičitý a je méně vhodný pro sledování velmi malých struktur, jako jsou nanomateriály. Při měřeních SCM byla používána sonda NSG01/Pt, která se vyznačuje vyšším poloměrem zakřivení hrotu a nižším rozlišením ve srovnání se sondami VIT_P nebo ETALON (HA-NC).



Obr. 24. Snímky systému grafit – DNA (vzorek A, $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{mol/L}$, TAE $1\times$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení rozložení kapacity, (C) zobrazení topografie – detail, (D) zobrazení rozložení kapacity – detail, (E) výškový profil.

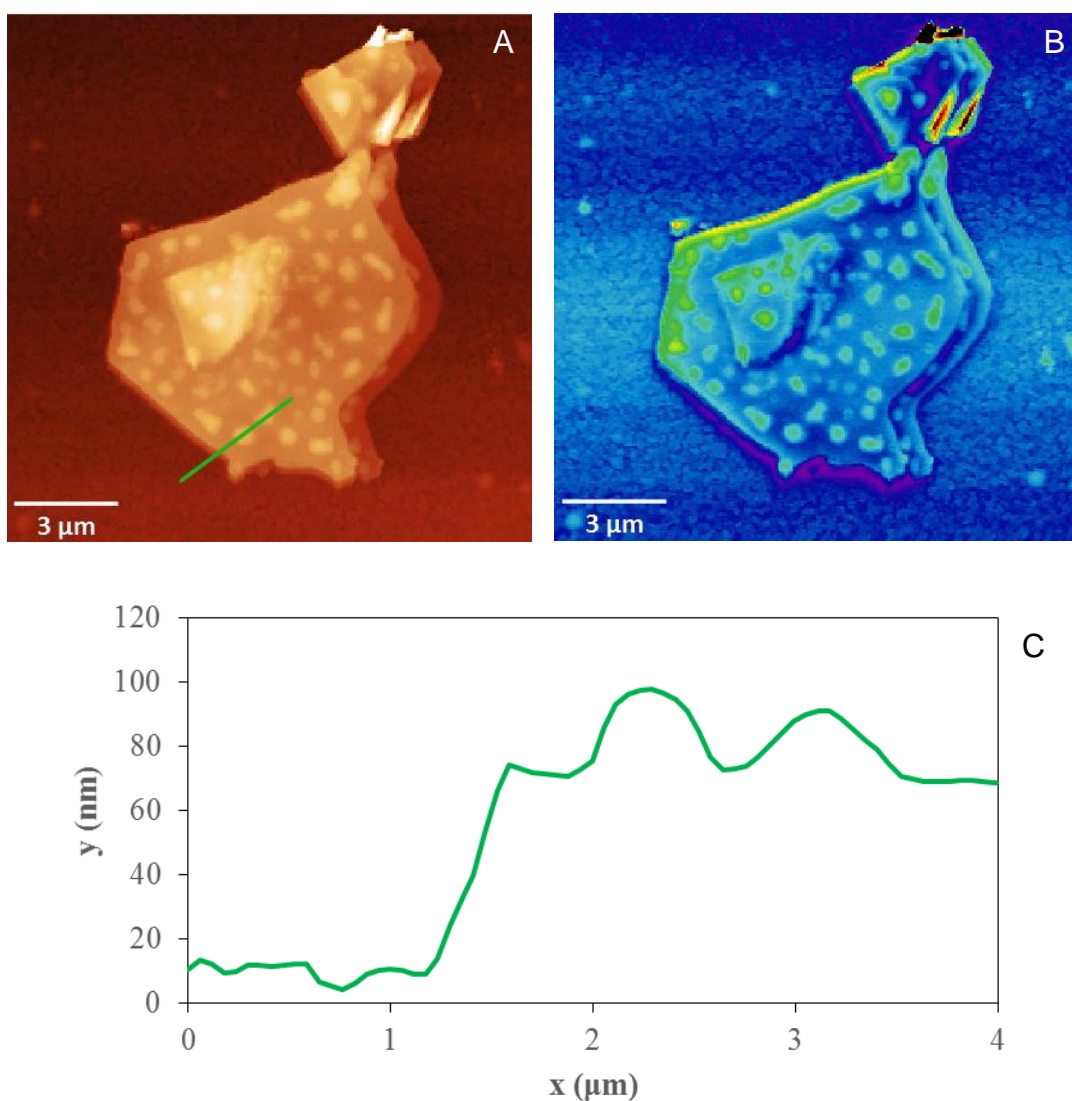
3.6.5 AFM a SCM snímky systému grafit – DNA (vzorek B)

Dále byla studována interakce mezi grafitovými vločkami a DNA (vzorek B). Délka oligonukleotidu v tomto případě činila 40 bází. I když se jedná o řetězec, který je téměř dvakrát delší ve srovnání s dříve zkoumaným vzorkem DNA (vzorek B) a čtyřikrát delší v porovnání se zkoumanou RNA, na výšku nebo tvar agregátů, které jsou vytvářeny na povrchu grafitu, to viditelný dopad nemělo. Pozorované útvary se velikostně i tvarově velmi podobají těm, které byly identifikovány v případě RNA a DNA (vzorek A). Snímky potvrzující předchozí výroky jsou obsaženy v obrázku 25. Výška agregátů se pohybovala v intervalu od 3 nm do 27 nm.



Obr. 25. AFM snímky systému grafit – DNA (vzorek B, $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{mol/L}$, TAE 1×, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení fáze, (C) výškový profil.

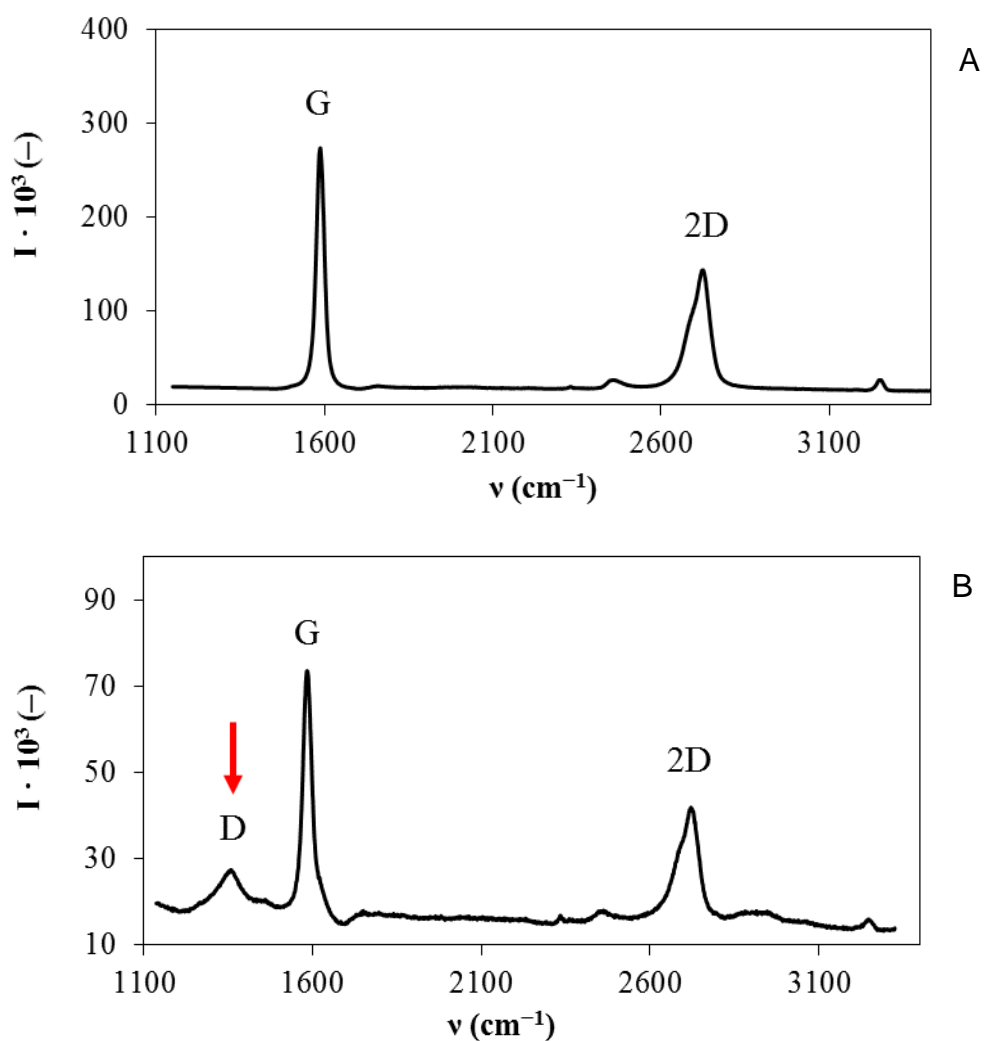
Zobrazení rozložení kapacitance, které je vidět na obrázku 26, je nepříznivě ovlivněno existencí artefaktu, který byl pravděpodobně zapříčiněn nižší kvalitou použitého hrotu související s velkým opotřebením. I přes existenci artefaktu v podobě zdvojení pravé hrany grafitové vločky, je na snímku dobře patrné, že agregáty oligonukleotidů se, stejně jako tomu bylo v předchozích případech, odlišují hodnotu kapacitance od grafitu a substrátu. Velikost agregátů pozorovaných na grafitové vločce na obrázku 26 se pohybuje od 6 nm po 48 nm.



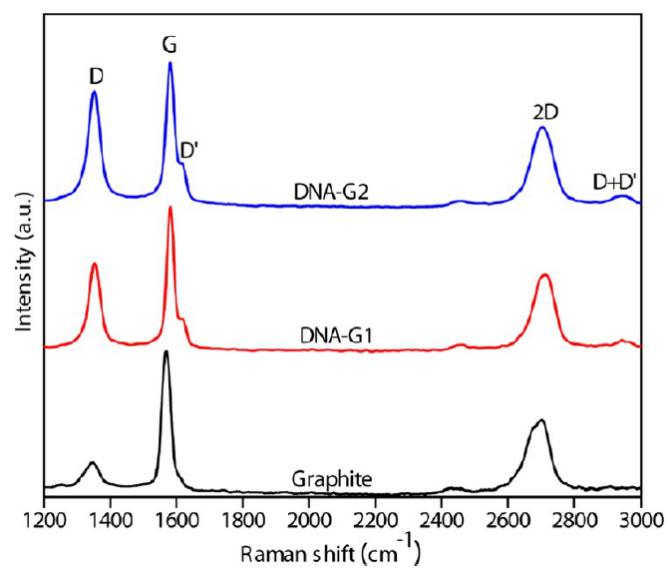
Obr. 26. Snímky systému grafit – DNA (vzorek B, $c_{\text{DNA}} = 25 \mu\text{mol/L}$, TAE $1\times$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,5 \text{ mmol/L}$); (A) zobrazení topografie, (B) zobrazení rozložení kapacitance, (C) výškový profil.

3.6.6 Vliv depozice RNA na Ramanova spektra grafitu

Obrázek 27 (A) zobrazuje Ramanovo spektrum grafitové vložky, které obsahuje G pás při 1586 cm^{-1} a 2D pás v oblasti 2729 cm^{-1} . Intenzita a tvar 2D pásu jasně vypovídají o faktu, že se jedná o spektrum grafitu, nikoli grafenu, jehož 2D pás se vyznačuje vyšší intenzitou oproti G pásu a dokonalou symetrií. Modifikace povrchu grafitu pomocí RNA se projevila v naměřených spektrech vystoupením D pásu při 1360 cm^{-1} . Existence D pásu indikuje porušení pravidelnosti v uspořádání atomů uhlíku v hybridním stavu sp^2 . Příčinou nepravidelnosti jsou obvykle defekty krystalové mřížky nebo modifikace povrchu grafenu chemisorpcí. Jak však ve své práci prokázali Joseph a spolupracovníci [41], vystoupení D pásu lze pozorovat i při fyzikální adsorpci DNA na grafen. Bylo pozorováno, že podobná změna spekter nastává i po adsorpci RNA.



Obr. 27. Ramanova spektra grafitové vložky; (A) před modifikací RNA, (B) po depozici RNA ($c_{\text{RNA}} = 20\ \mu\text{mol/L}$).



Obr. 28. Ramanova spektra grafitového prachu a grafenových vloček modifikovaných DNA.

4. ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na studium hybridního systému tvořeného nanografitem a oligonukleotidy, které byl reprezentovány RNA i DNA. Systém byl zkoumán s využitím technik mikroskopie atomárních sil, skenovací kapacitní mikroskopie a Ramanovy spektrometrie.

Nanografít byl připraven mechanickou exfoliací. Problém nežádoucích nečistot přítomných na substrátu obsahujícím vločky grafitu byl vyřešen očištěním povrchu pomocí organických rozpouštědel acetonu a isopropylalkoholu. Teprve po očištění povrchu bylo provedeno nanášení oligonukleotidů.

Měření mikroskopii atomárních sil ukázalo, že po depozici RNA vznikají na povrchu nanografitu sférické útvary, jejichž velikost se pohybuje přibližně od 5 nm do 50 nm. Domněnka, že pozorované agregáty jsou tvořeny molekulami RNA, byla potvrzena jednak měřením rozložení kapacitance, kdy se pozorované struktury jasně odlišovaly hodnotou kapacitance od grafitu a substrátu, a jednak snižováním množství deponované RNA, při kterém vizuálně poklesla hustota obsazení povrchu nanografitu pozorovanými agregáty.

V případě depozice vzorků DNA se ukázalo, že deoxyribonukleová kyselina vytváří na nanografitu agregáty, které se svou velikostí i tvarem velmi podobají těm tvořenými RNA. Délka řetězců, která byla u vzorků DNA vyšší ve srovnání s RNA, zde nemá vliv na rozměry agregátů.

Po modifikaci povrchu nanografitu RNA dochází v Ramanově spektru k vystoupení D pásu. Jedná se o jev podobný tomu, který byl pozorován při modifikaci povrchu grafenu DNA.

5. SUMMARY

The work was focused on the study of hybrid system consisting of nanographite and oligonucleotides. The oligos were represented by RNA and DNA. The system was studied using the techniques of atomic force microscopy, scanning capacitance microscopy and Raman spektrometry.

Nanographite was prepared by mechanical exfoliation. The problem of objectionable contaminants present on the substrate was solved by cleaning the surface with the organic solvents of acetone and isopropylacohol. Coating the surface with the oligos was made only after cleaning the surface.

The measurements of atomic force microscopy revealed that RNA forms spherical units on the nanographite and unit size ranges from approximately 5 nm to 50 nm. The assumption that the observed aggregates consist of RNA molecules was confirmed by measuring the distribution of capacitance and reducing the amount of deposited RNA. The observed structures differed in capacitance value from the nanographite and the substrate. The number of aggregates occupying the surface also decreased after reducing the amount of deposited RNA.

In the case of DNA samples it was showed that deoxyribonucleic acid forms structures which size and shape are very similar to those of RNA. Compared to RNA DNA was characterized by longer chain but it had no impact on the shape or the size of the observed aggregates.

The D band occurs in Raman spectra of graphite after modification of the graphite surface with RNA. This phenomenon is similar to that observed after modification of graphene with DNA.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] T. Prnka and K. Šperlink, *Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicína*, Ostrava: Repronis, 2006.
- [2] E. Keles, Y. Song, D. Du, W.-J. Dong and Y. Lin, "Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications," *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 1291-1309, 2016.
- [3] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemie*, 1. vyd. ed., Praha: Victoria Publishing, 1995.
- [4] J. Crowe and T. Bradshaw, *Chemistry for biosciences*, New York: Oxford University Press, 2010.
- [5] S. Rosypal, *Úvod do molekulární biologie*, Brno: Stanislav Rosypal, 2005.
- [6] M. K. Campbell and S. O. Farrell, *Biochemistry*, Pacific Grove, Calif: Brooks/Cole, 2011.
- [7] B. Alberts, *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998.
- [8] A. C. Grimsdale and K. Müllen, "The Chemistry of Organic Nanomaterials," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 35, pp. 5592-5629, 2005.
- [9] A. Mostofizadeh, Y. Li, B. Song and Y. Huang, "Synthesis, Properties, and Applications of Low-Dimensional Carbon-Related Nanomaterials," pp. 1-21, 2011.
- [10] M. J. Allen, V. C. Tung and R. B. Kaner, "Honeycomb Carbon: Honeycomb Carbon," *Chemical Reviews*, vol. 110, no. 1, pp. 132-145, 2010.
- [11] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. LI, J. V. Suk, J. R. Potts and R. S. Ruoff, "Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications," *Advanced Materials*, vol. 22, no. 35, pp. 3906-3924, 2010.
- [12] C. N. R. Rao, A. K. Sood, K. M. Subrahmanyam and A. Govindaraj, "Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 42, pp. 7752-7777, 2009.
- [13] T. Premkumar and K. E. Geckeler, "Graphene–DNA hybrid materials: Assembly, applications, and prospects," *Progress in Polymer Science*, vol. 37, no. 4, pp. 515-529, 2012.
- [14] H. Sun, J. Ren and X. Qu, "Carbon Nanomaterials and DNA: from Molecular Recognition to Applications," *Accounts of Chemical Research*, vol. 49, no. 3, pp. 461-470, 2016.

- [15] N. Varghese, U. Mogera, A. Govindaraj, A. Das, P. K. Maiti, A. K. Sood and C. N. R. Rao, "Binding of DNA Nucleobases and Nucleosides with Graphene," vol. 10, no. 1, pp. 206 - 210, 2009.
- [16] B. H. Nguyen and V. B. Nguyen, "Promising applications of graphene and graphene-based nanostructures," *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 7, no. 2, pp. 023002-, 2016.
- [17] Y. Lu, B. R. Goldsmith, N. J. Kybert and A. T. C. Johnson, "DNA-decoreted graphene chemical sensors," vol. 97, no. 8, pp. 083107-, 2010.
- [18] Z. Tang, H. Wu, J. R. Cort, G. W. Buchko, Y. Zhang, Y. Shao, A. I. Aksay, J. Liu and Y. Lin, "Constraint of DNA on Functionalized Graphene Improves its Biostability and Specificity," vol. 6, no. 11, pp. 1205-1209, 2010.
- [19] K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. L. Gellert, M. G. Schwab and K. Kim, "A roadmap for graphene," vol. 490, no. 7419, pp. 192-200, 2012.
- [20] D. A. Skoog, F. J. Holler and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [21] M. Vůjtek, R. Kubínek and M. Mašláň, *Nanoskopie*, Olomouc: Univerzita Palackého, 2012.
- [22] A. Alessandrini and P. Facci, "AFM: a versatile tool in biophysics," *Measurement Science and Technology*, vol. 16, no. 6, pp. R65-R92, 2005.
- [23] G. Friedbacher and H. Fuchs, "Classification of Scanning Probe Microscopies," *Pure Applied Chemistry*, vol. 71, no. 7, pp. 1337-1357, 1999.
- [24] K. Jandt, "Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces," *Surface Science*, vol. 491, no. 3, pp. 303-332, 2001.
- [25] Y. L. Lyubchenko, "Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging," *Micron*, vol. 42, no. 2, pp. 196-206, 2011.
- [26] "Many-Pass Techniques," in *NTEGRA Spectra PNL (Upright Configuration): Instruction Manual*, Moscow, NT-MDT, Co., 2011.
- [27] R. Berger, H.-J. Butt, J. Retschke and S. Weber, "Electrical Modes in Scanning Probe Microscopy," *Moacromolecular Rapid Communications*, vol. 30, no. 14, pp. 1167-1178, 2009.
- [28] Y. L. Lyubchenko, L. Shlyakhtenko and T. Ando, "Imaging of nuceic acids with atomic force microscopy," *Methods*, vol. 54, no. 2, pp. 274-283, 2011.
- [29] D. Billingsley, W. Bonass, N. Crampton, J. Kirkham and N. Thomson, "Single-molecule studies of DNA transcription usung atomic force microscopy," *Physical Biology*, no. 9, 2012.

- [30] K. Kirat, I. Burton, V. Dupres and Y. F. Dufrene, "Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy," *Journal of Microscopy*, no. 218, pp. 199-207, 2005.
- [31] P. Atkins and J. d. Paula, *Atkins' Physical chemistry*, New York: W.H. Feeman, 2006.
- [32] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy*, Hoboken, NJ: J. Wiley, 2005.
- [33] A. C. Ferrari, "Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects," *Solid State Communications*, vol. 143, no. 1-2, pp. 47-57, 2007.
- [34] "NTEGRA Spectra," NT-MDT, [Online]. Available: <https://www.ntmdt-si.com/afm-raman/ntegra-spectra>. [Accessed 22 03 2017].
- [35] "NT-MDT Tips," NT-MDT, [Online]. Available: <http://www.ntmdt-tips.com/products>. [Accessed 22 03 2017].
- [36] D. Nečas and P. Klapetek, "Gwyddion," [Online]. Available: <http://gwyddion.net/features.php>. [Accessed 22 03 2017].
- [37] B. S. Husale, S. Sahoo, A. Radenovic, F. Traversi, P. Annibale and A. Kis, "SsDNA Binding Reveals the Atomic Structure of Graphene," *Langmuir*, vol. 26, no. 23, pp. 18078-18082, 2010.
- [38] M. Yi and Z. Shen, "A review on mechanical exfoliation for the scalable production of graphene," *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 3, no. 22, pp. 11700-11715, 2015.
- [39] E. Wolf, *Graphene: A New Paradigm in Condensed Matter and Device Physics*, Oxford: Oxford University Press, 2013.
- [40] S. Akca, A. Foroughi, D. Wrochtzwajg, H. Postma and M. Antopolsky, "Competing Interactions in DNA Assembly on Graphene," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, pp. e18442-, 2011.
- [41] D. Joseph, S. Seo, D. Williams and K. Geckeler, "Double-Stranded DNA-Graphene Hybrid: Preparation and Anti-Proliferative Activity," *ACS Applied Materials*, vol. 6, no. 5, pp. 3347-3356, 2014.