

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

APLIKACE NANOTECHNOLOGIÍ PRO DETEKCI BIOMOLEKUL

APPLICATIONS OF NANOTECHNOLOGY IN DETECTION OF BIOMOLECULES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
Bc. ROSTISLAV MĚCH

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR
Ing. MIROSLAV KOLÍBAL, Ph.D.

BRNO 2014

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství
Akademický rok: 2013/14

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

student(ka): Bc. Rostislav Měch

který/která studuje v **magisterském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901T043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Aplikace nanotechnologií pro detekci biomolekul

v anglickém jazyce:

Applications of nanotechnology in detection of biomolecules

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Od nanotechnologií si slibujeme snížení detekčního limitu pro detekci biomolekul (DNA, proteiny atd.). Cílem práce bude použít kovové nanočástice pro optickou detekci DNA jak v roztoku, tak i na vhodně připravených souborech nanočástic na polovodičovém substrátu.

Cíle diplomové práce:

1. Nalezněte vhodnou metodu pro stabilizaci roztoku koloidních zlatých nanočástic v přítomnosti DNA.

2. Proveďte optická měření koloidních roztoků s přidanou DNA.

3. Zvolte vhodnou geometrii a připravte kovové plazmonické antény na substrátu. Ověřte vhodnou optickou metodou možnosti detekce DNA na připravených strukturách.

Seznam odborné literatury:

[1] Saha K et al., Gold nanoparticles in chemical and biological sensing, Chemical Reviews 112 (2012) 2739-2779.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2013/14.

V Brně, dne 28.11.2013

L.S.

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ DĚKANÁT

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
Ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h. c.
Děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá použitím kovových nanostruktur k detekci biomolekul. Byl vytvořen postup pro stabilizaci roztoků zlatých nanočástic pro lepší použitelnost v biologických vzorcích a biochemických procesech, kde mohou být použity různé koncentrace solí nebo různé pH. Byl vytvořen model optických vlastností těchto nanočástic, který byl podpořen spektroskopickými měřeními. V práci jsou také na experimentech demonstrovány možnosti využití plazmonických nanostruktur na površích v oblasti detekce biomolekul.

KLÍČOVÁ SLOVA

zlaté nanočástice, stabilizace, optické vlastnosti, plazmonické nanostruktury, spektroskopie, biodetekce

ABSTRACT

This thesis deals with metal nanostructures and their use in detection of biomolecules. A protocol for stabilizing solutions of gold nanoparticles was developed for better usage in biological samples or biochemical processes, where different pH or salt concentrations can be used. A model of optical properties of the nanoparticles was presented and supported by spectroscopic experiments. A possible utilization of plasmonic nanostructures on surfaces for detection of biomolecules was also demonstrated.

KEYWORDS

gold nanoparticles, stabilization, optical properties, plasmonic nanostructures, silicon, spectroscopy, biodetection

MĚCH, R.: *Aplikace nanotechnologií pro detekci biomolekul.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. 61 s. Vedoucí práce Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze za odborného vedení Ing. Miroslava Kolíbala, Ph.D., a že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Bc. Rostislav Měch

Děkuji Miroslavu Kolíbalovi za vedení této diplomové práce, užitečné nápady a připomínky. Děkuji také dr. Loredaně Casalis a jejímu týmu z Nanoinnovation Laboratory za možnost realizace studijního pobytu ERASMUS. Dále patří poděkování T. Neumanovi, P. Dvořákovi, F. Ligmajerovi, L. Břínkovi a M. Hrtoňovi za podnětné diskuze v rámci plazmonických schůzek i mimo ně. Děkuji také O. Metelkovi za spolupráci při vytváření vzorků, M. Šimšíkové za spolupráci při přípravě roztoků, J. Spoustovi za důkladné pročtení textu, mým spolužákům a všem ostatním kolegům za neustálé povzbuzování a vytváření perfektního místa pro studium i zábavu.

Speciální poděkování patří mým rodičům za podporu během celého studia, a zvláště mé přítelkyni za motivaci, trpělivost a lásku.

OBSAH

1 Úvod **3**

2 Stabilizace koloidních roztoků **5**

2.1 Vytváření samouspořádaných vrstev na zlatých površích 6

2.2 Stabilizace nanočástic 6

2.3 Materiály a příprava vzorků 8

2.4 Charakterizace nanočástic 8

2.5 Příprava funkcionalizovaných zlatých nanočástic 9

2.6 Testování stability a specificity připravených nanočástic 11

2.6.1 Stabilita v různých koncentracích soli 11

2.6.2 Stabilita v různém pH 15

2.6.3 Test nespecifických interakcí 17

2.6.4 Ověření přítomnosti DNA na povrchu nanočástic 23

2.6.5 Test specificity 24

3 Optické vlastnosti funkcionalizovaných nanočástic **29**

3.1 Vliv velikosti obalu na extinkci 32

3.2 Měření optických vlastností funkcionalizovaných nanočástic 34

3.2.1 Experimenty 35

4 Plazmonické struktury pro detekci biomolekul **39**

4.1 Srovnání povrchů a antén 40

4.2 Plazmonické struktury v infračervené oblasti 40

4.2.1 Měření infračervené spektroskopie 41

4.3 Plazmonické struktury v optické oblasti 44

4.3.1 Měření antén v optické oblasti 46

5 Metody použité v praktické části **49**

5.1 Dynamický rozptyl světla 49

5.2 Spektrofotometrie 50

5.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací 51

5.4 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie 51

5.5 Rozptyl RTG paprsků pod malými úhly 52

5.6 Rastrovací elektronová mikroskopie 52

5.7 Gelová elektroforéza 53

6 Závěr **55**

Literatura 57

Seznam použitých zkratek 61

1 ÚVOD

Použití nanotechnologií v detekci biomolekul si získává stále větší pozornost. Napomáhá tomu stále větší citlivost optických a infračervených senzorů založených na plazmonických nanostrukturách. Pomocí nanostruktur tak postupně vznikají detektory pro odhalování markerů různých chorob, bakteriálních toxinů, antigenů, protilátek, DNA či jiných biomolekul. Výhodou detekce pomocí nanotechnologií je to, že se zkoumané biomolekuly již nemusí ničím značit (např. fluorescenčními barvivy) - jedná se o tzv. „label-free“ metody detekce. Je možné použít senzory tam, kde se značené molekuly nevyskytují. Díky nanotechnologiím a zvláště plazmonickým nanostrukturám se již objevují komplexní miniaturizované systémy, které jsou schopny rychle a s velkou přesností stanovit přítomnost analyzované látky ve vzorku.

V této diplomové práci se zabývám plazmonickými strukturami ve formě koloidních roztoků kovových nanočástic a také plazmonickými nanostrukturami na površích - kovovými anténami. V první části se věnuji nanočásticím, zejména jejich stabilizaci pro zvýšení stability a omezení nespecifických interakcí, což je potřebné při používání v biologických vzorcích, ale i při studování biochemických procesů.

Ve druhé části se zaobírám optickými vlastnostmi funkcionalizovaných nanočástic. Srovnávám zde teoretický model s experimentálními výsledky a demonstruji možnosti detekce biomolekul pomocí koloidních kovových nanočástic.

Ve třetí části se věnuji nanostrukturám na povrchu pevné látky. Zde prezentuji možnosti detekce pomocí infračervené a viditelné oblasti spektra elektromagnetického záření.

V poslední části jsou krátce popsány experimentální techniky, které byly v této práci použity.

2 STABILIZACE KOLOIDNÍCH ROZTOKŮ

V posledních deseti letech se vědecké týmy snaží vytvořit roztoky stabilních nanočástic, které mají na povrchu funkční skupiny. Nejčastěji jsou používány zlaté nanočástice (AuNPs) funkcionalizované jednovláknovou deoxyribonukleovou kyselinou (ssDNA). DNA je výjimečně vhodná v tom, že její struktura a chemické reakce jsou velice dobře prozkoumány. Enzymy, které se těchto reakcí zúčastňují, nejlépe pracují v koncentracích okolo 1M NaCl, kdežto koloidní nanočástice funkcionalizované jednovláknovou DNA byly doposud stabilní pouze do koncentrace 300 mM NaCl. Aby byly tedy koloidní nanočástice použitelné v přirozených podmínkách enzymů, *in vivo* experimentech a genovém inženýrství v „gene delivery systems“[1], musí být stabilní i v přirozených podmínkách.

Existuje mnoho přístupů, jak docílit co největší stability ssDNA-AuNPs. Stabilita nanočástic souvisí s tím, jak kompaktní je vrstva biomolekul, která je stabilizuje. Jednovláknová DNA se dá navázat na povrch zlatých či stříbrných nanočástic využitím thiolové chemie nebo také využitím poly-adeninového (poly-A) konce DNA, který se na zlatý povrch také velice dobře váže [1]. Monovrstva na povrchu nanočástic ale obvykle není kompaktní, protože dochází k nespecifické interakci bází jednovláknové DNA se zlatým povrchem. Díky tomuto efektu si DNA „lehá“ na povrch [2]. Molekuly na povrchu jsou tudíž orientovány různě a monovrstva je neuspořádaná. Nekompaktnost a neuspořádanost monovrstvy znásobuje nespecifické interakce při vyšších koncentracích iontů (např. NaCl) v roztocích. Díky nim dochází ke stínění odpudivé elektrostatické interakce nanočástic vlivem nábojů v monovrstvě.[2] Z tohoto důvodu je potřeba stabilizovat nanočástice i jiným způsobem, například stericky [3]. V následující kapitole se budu zabývat vytvořením stabilních nanočástic, které jsou obaleny mixovanou monovrstvou tvořenou jednak DNA a jednak molekulami zajišťujícími sterickou stabilizaci.

Většina experimentální práce v této kapitole byla provedena pod vedením dr. Loredany Casalis ve spolupráci s Pietrem Parisse a Jashmini Deka v rámci studijního programu ERASMUS v italském Trieste v Nanoinnovation Laboratory, který je součástí komplexu synchrotronu Elettra.

[1] Doručovací systém pro geny do cílené oblasti, povětšinou dovnitř konkrétních typů buněk. V tomto případě by nanočástice sloužily jako nosné částice, na které by byla navázána genová informace v podobě DNA.

[2] Jednovláknová DNA je poly-aniont díky fosfátům v řetězci.

2.1 Vytváření samouspořádaných vrstev na zlatých površích

Zlaté a stříbrné povrchy jsou jedny z nejpoužívanějších v aplikacích pro biosenzory. V této práci jsem si vybral zlaté nanostruktury, protože jsou více chemicky inertní než stříbrné, které navíc mohou uvolňovat stříbrné ionty do okolí, čehož se využívá jako desinfekčních účinků, ale pro účely této práce je to nevhodné.

Na vytváření vrstev na zlatých površích se může využít více postupů. Jeden z nich je založen na adsorpci molekul díky hydrofilním vlastnostem zlata. Další využívá chemisorpci. Tento postup se může rozčlenit do dvou skupin - použitím thiolovaných a nethiolovaných molekul. Toto členění je zavedeno, protože se většinou při přípravě vrstev na zlatých površích využívá afinita síry ke zlatým atomům na povrchu. Z thiolu se odštěpí vodíkový iont a utvoří H_2 nebo se sloučí s kyslíkem a vytvoří H_2O. Pokud se monovrstva formuje z dithiolů, dochází ke štěpení disulfidické vazby -S-S-. Síla vazby mezi sírou a zlatým povrchem byla experimentálně stanovena na $40 - 50$ kcal/mol. Nethiolovaných molekul se většinou využívá ke stabilizaci koloidních nanočástic při přípravě redukcí z roztoku $HAuCl_4$ (např. citrát). Výhodou této metody je možnost následně takto připravené nanočástice funkcionalizovat molekulami s thiolovými skupinami, aniž by docházelo ke strukturální nebo funkční změně samotného zlatého jádra. Tato výměna molekul na povrchu se nazývá „výměna ligandů“. Ligandem je označována molekula, která se navazuje na zlaté atomy na povrchu.

Povrch objemového zlata se od povrchu nanočástice odlišuje v několika detailech. Nanočástice do průměru cca 4,4 nm vykazuje ještě strukturu komolého osmistěnu. To způsobí defekty monovrstvy na hranách, protože se molekuly budou orientovat podle jednotlivých ploch [4]. Od této velikosti se hrany postupně ztrácejí, ale stále může k těmto defektům lokálně dojít. Defekty v monovrstvě mohou znamenat částečnou ztrátu ochranné funkce a může docházet k nespecifickým interakcím. Dalším problémem je radiální uspořádání molekul na povrchu nanočástice, protože vrstva je blízko povrchu nanočástic mnohem kompaktnější než ve větší vzdálenosti, kde rozestupy mezi molekulami jsou větší [5]. Tento „radiální efekt“ opět může způsobovat nespecifické interakce, ale na druhou stranu může zajišťovat funkci některých molekul, o čemž se ještě zmíním.

2.2 Stabilizace nanočástic

Vytvořením vrstvy na povrchu nanočástice se dosahuje větší stability vůči různým vlivům (např. pH, koncentrace soli, atd.). Ukazuje se, že pokud se nanočástice

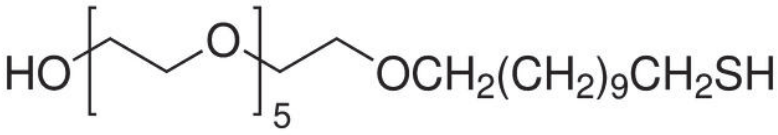
stabilizují pouze elektrostaticky, tak při určitém pH nebo koncentraci solí v roztoku přestane tato odpudivá elektrostatická interakce fungovat díky ztrátě nábojů molekul či stínění. Proto jsem se pokusil nanočástice stabilizovat i stericky, a to vytvořením mixované monovrstvy, kde jeden typ molekuly bude zajišťovat elektrostatickou a druhý sterickou stabilizaci. Elektrostatickou stabilizaci bude zajišťovat funkční molekula, v mém případě jednovláknová DNA, a jako sterický stabilizátor se nabízí jednoduché uhlíkaté řetězce zakončené sírou pro navázání na povrch. Například alkanthioly sice vytvářejí velice kompaktní monovrstvu na povrchu nanočástic, ale způsobují nespecifické hydrofobní reakce, takže se na stabilizaci nanočástic nehodí.

Další volbou molekul pro sterickou stabilizaci mohou být oligo- nebo poly-(ethylen glykoly) – OEG / PEG. Obě tyto molekuly jsou elektricky neutrální, a proto dokáží na površích vytvářet velice kompaktní obaly, podobně jako alkanthioly. Na rozdíl od nich ale nezpůsobují hydrofobní nespecifické interakce. PEG nebo OEG se využívají jako pasivační molekuly na površích, protože dobře odpuzují jiné biomolekuly (DNA, proteiny, atd.) [6]. Ethylen glykoly brání navazování i thiolované ssDNA na povrch [7], a proto je nutné, aby při procesu sterické stabilizace nanočástic byla již jednovláknová DNA na povrchu přítomna. PEG ale může zcela odstínit náboj DNA [8], a proto je nasnadě využití OEG, aby k tomuto efektu nedocházelo. Takto by tedy byly nanočástice stabilizovány jak stericky, tak elektrostaticky.

Oligo(ethylen glykol) má stejnou strukturu jako PEG, tudíž velice podobné vlastnosti co se odpuzování biomolekul týče [9]. Krátké řetězce OEG jsou ale ve vodě nerozpustné, což je nevhodné pro aplikaci v buňkách a v jejich přirozených prostředích. Rozpustnost OEG se zvyšuje s délkou řetězce, a proto je potřeba vybírat minimálně hexa(ethylen glykol), který už je ve vodě dobře rozpustný. OEG by ale sám o sobě na nanočásticích nedržel, proto jsem v experimentech používal hexa(ethylen glykol) na jednom konci zakončen alkanthiolovým řetězcem. Síra je využita k navázání na povrch a alkanový řetězec je vhodné použít k vytvoření kompaktnější vrstvy a tak snížit nespecifické interakce [10]. Navíc je tato molekula objemnější v té části, která je vzdálená od povrchu nanočástice, a tak se částečně snižuje radiální efekt monovrstvy. To ale ne natolik, aby zabránila DNA v hybridizaci s komplementární bází.

Vybraná molekula vhodná pro sterickou stabilizaci je (11-Merkaptoundecyl)-hexa(ethylen glykol), zkráceně přejmenován jako TOEG-6[3], jehož vzorec je zobrazen na Obr. 2.1.

[3]T v názvu značí, že je na jedné straně zakončen („terminated“) jinou molekulou, v tomto případě 11-merkaptoundecylem. Číslice šest značí, že jde o hexa(ethylen glykol).



Obr. 2.1: Konstituční vzorec molekuly TOEG-6.

2.3 Materiály a příprava vzorků

Thiolovaná DNA byla pořízena z biomers.net, TOEG-6 a ostatní chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich. Zlaté nanočástice byly připraveny pomocí citrátové syntézy (citrate seeded growth) podle [11]. Vzorky se zlatým filmem byly připraveny tak, že byl nalámán křemíkový wafer na kusy velké $0{,}5 \times 0{,}5$ cm^2. Ty byly lepidlem přilepeny na 5' wafer pokrytý zlatou vrstvou tloušťky 30 nm (připravena iontovým naprašováním). Kousky pak byly ořezány skalpelem a odloupnuty. Vznikl tak povrch, který má velmi malou drsnost. Navíc tím, že se obnaží těsně před experimentem, je i velice čistý. Připravené vzorky se zlatým povrchem byly ponechány přes noc v roztocích pro funkcionalizaci. Ty byly připraveny tři: 1μM ssDNA, 50μM TOEG-6 (rozpuštěn v ethanolu) a 1mM 6-merkaptohexanová kyselina. Pasivace vzorků s jednovláknovou DNA byla provedena ponecháním vzorku 30 minut v 50μM roztoku TOEG-6.

Pro funkcionalizaci a experimenty byly využity tyto DNA:

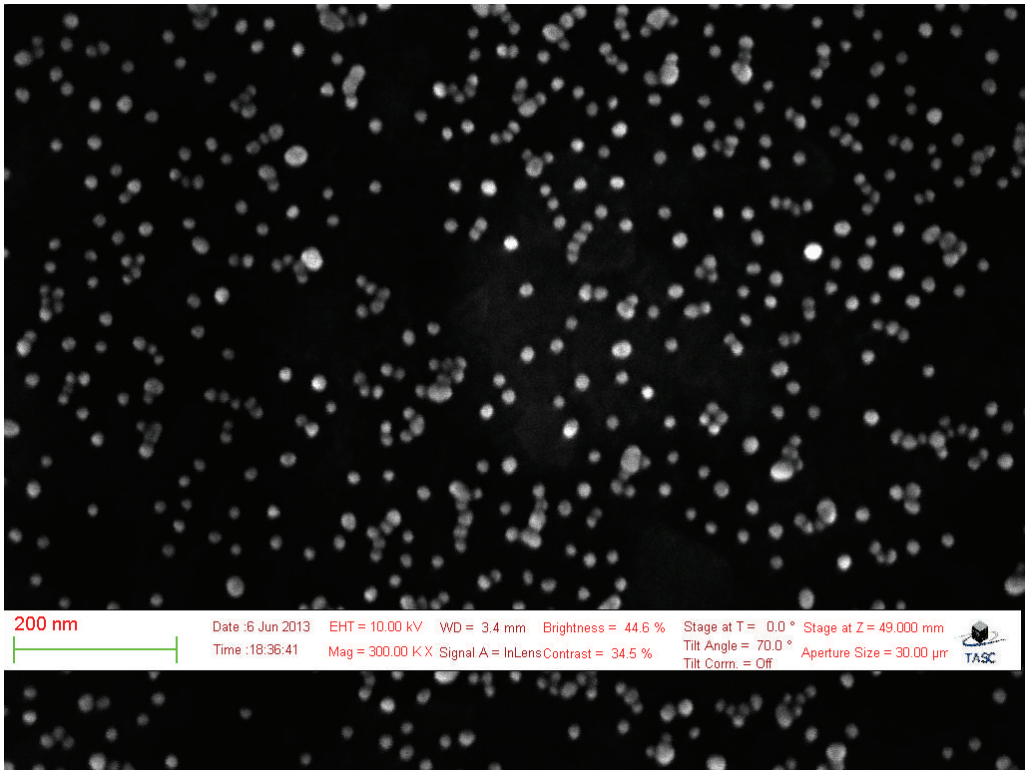
1. DNA-1 5'-AGTCGTTTAAAA-$(CH_2)_3$-SH
2. DNA-2 5'-GTTGCCATAAAA-$(CH_2)_3$-SH
3. duplex - 8 bází komplementárních ke každému z řetězců a 12 párů bazí uprostřed
4. DNA-3 5'-AAGAGGCATGTCTAGGCATGTCTCTTGATATCGAATTC–SH

2.4 Charakterizace nanočástic

Pro charakterizaci nanočástic, zejména velikosti, bylo použito rozptylu RTG paprsků pod malými úhly (SAXS), rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) a dynamického rozptylu světla (DLS).

Průměr nanočástic byl metodou SAXS z nafitovaných hodnot pomocí softwaru IGOR stanoven na (17,6 ± 0,2) nm, což by mělo odpovídat kovovému jádru nanočástice. Ze snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu LEO EVO 50HV, pořízených při 10 keV (Obr. 2.2) a po ručním zpracování byl průměr nanočástic (20,3 ± 2) nm. Podobnou hodnotu ukázala i metoda DLS a to 19,91 nm. Obě tyto metody

jsou ovlivněny stabilizačním obalem nanočástic. Jednotlivé výsledky tedy odpovídají předpokladu.



Obr. 2.2: Snímek z elektronového mikroskopu ukazující zlaté nanočástice používané v experimentech naadsorbované na zlatou vrstvu.

2.5 Příprava funkcionalizovaných zlatých nanočástic

Pro docílení mixované ssDNA/OEG monovrstvy na nanočásticích bylo potřeba optimalizovat postup, který se používá na rovných površích [12]. Pro navázání co nejvíce DNA na nanočástice se využívají různé strategie. Může to být buď postupné zvyšování koncentrace rozpuštěných iontů soli tak, aby docházelo ke stínícímu efektu mezi jednotlivými molekulami [13, 14] a nebo snížením pH [15, 16]. Metody s postupným přidáváním soli jsou velice časově náročné (2 dny přípravy) a postupy se snížením pH se nepodařilo na základě již publikovaných výsledků zopakovat. Nanočástice se totiž pod pH zhruba 4 srážejí, proto jsme využili snížení pH jen na hodnotu 4,3.

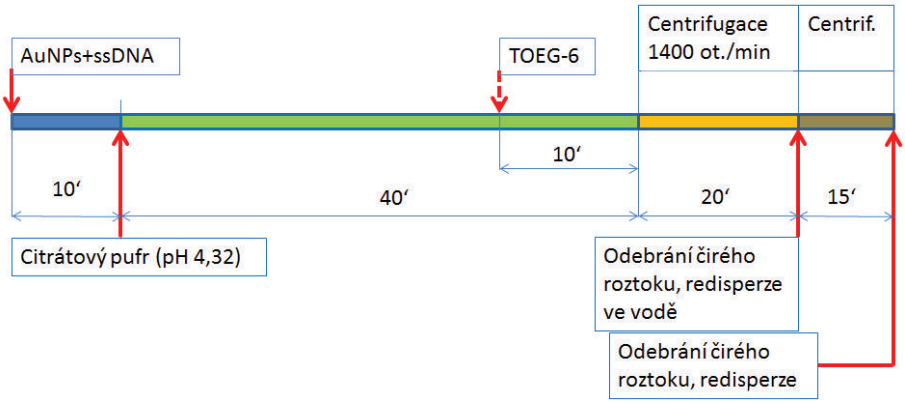
Na začátku byly smíchány roztoky citrátových zlatých nanočástic a jednovláknové DNA. Tato směs byla ponechána 10 minut reagovat, aby se ssDNA navázala na povrch zlatých nanočástic místo citrátových skupin. Po deseti minutách by se

již mělo na povrchu nanočástic nacházet mnoho molekul DNA [16]. Molekuly jednovláknové DNA by měly zajistit odolnost proti snížení pH roztoku, takže v dalším kroku se snížilo pH na hodnotu 4,3, kdy byly nanočástice ještě stabilní. Pokusy s nižší hodnotou pH roztoku měly za následek shlukování, což se projevovalo při první centrifugaci, kdy se tyto shluky naadsorbovaly na stěny mikrozkumavek. V pH 4,3 byly nanočástice ponechány dalších 30 minut. Poté byl do roztoku přidán sterický stabilizátor - molekuly TOEG-6. Tyto molekuly nahradily všechny molekuly jednovláknové DNA, které nebyly navázány přes thioly. Bohužel ale došlo také k nahrazení části molekul, které tak navázány byly, což bylo zjištěno při gelové elektroforéze. Aby byl tento efekt potlačen co nejvíce, po 10 minutách byl roztok zcentrifugován a pak již následovaly jen promývací kroky, aby v roztoku nezůstaly žádné volné molekuly DNA nebo TOEG-6. Tento postup zajišťuje vytvoření mixované DNA/OEG monovrstvy na povrchu nanočástic ve velice krátkém čase (1-2 h). Pro přehlednost tedy uvedu celý postup ještě v bodech a s koncentracemi jednotlivých roztoků a jednoduché schéma (Obr. 2.3):

1. 1,7 μl 100μM DNA bylo přidáno do 250 μl koloidního roztoku nanočástic.
2. Po 10 minutách se do roztoku přidá 50 μl citrátového pufru s pH 4,32.
3. Po 30 minutách se přidá 7,6 μl 50μM TOEG-6.
4. Po 10 minutách se vzorek po dobu 20 minut centrifuguje při 1400 ot/min.
5. Po centrifugaci se odebere čirý[4] roztok nad odstředěnými tmavě červenými nanočásticemi.
6. Zbylé nanočástice se znovu rozpustí v 500 μl vysoce čisté vody.
7. Kroky 4, 5 a 6 se jestě jednou zopakovaly - tento postup se označuje jako dvojí promývání („washing“).

Kromě těchto nanočástic s mixovanou monovrstvou jsem prováděl experimenty také s nanočásticemi funkcionalizovanými pouze ssDNA. V tomto případě byl vynechán krok 3. Dále byly připraveny nanočástice s monovrstvou tvořenou pouze molekulami TOEG-6. Tady se kromě vynechání 3. kroku vyměnil i úvodní roztok - místo 1,7 μl 100μM ssDNA se použilo 7,6 μl 50μM TOEG-6.

[4]Pokud je roztok zbarven do šeda či fialova, znamená to, že si na stěny nádobky sedly nestabilní nanočástice a celý proces nemusel proběhnout správně!



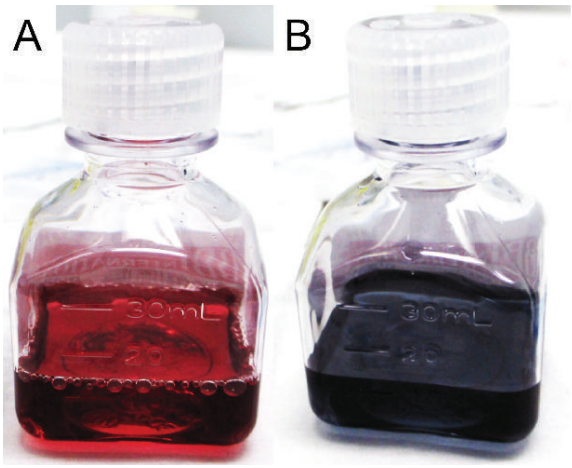
Obr. 2.3: Schéma popisující přípravu nanočástic funkcionalizovaných mixovanou ssDNA/TOEG-6 monovrstvou.

2.6 Testování stability a specificity připravených nanočástic

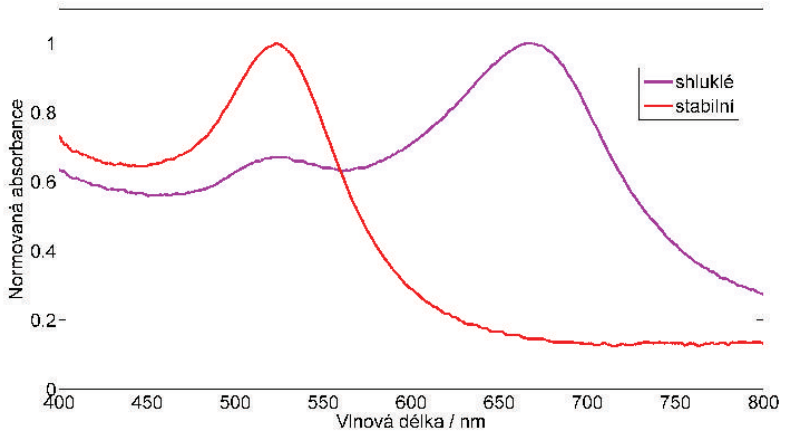
Pojmem stabilní nanočástice rozumíme částice, které se neshlukují (Obr. 2.4). Pokud se částice shlukují, pak jsou z nějakého důvodu nestabilní. Jedním ze základních testů pro ověření stability nanočástic je test stability v různých koncentracích soli. To proto, že přirozené prostředí ligandů, enzymů a jiných chemikálií není deionizovaná voda, ale jsou zde přítomny i rozpuštěné soli, případně může být různé pH. Proto i stabilita v různých pH je důležitá. Stabilita je úzce spojena s nespecifickými reakcemi, které způsobují shlukování. Pokud tedy chceme stabilní nanočástice, je vhodné je otestovat na tyto tři základní vlastnosti - stabilita v různých koncentracích soli, v různém pH a test nespecifických interakcí.

2.6.1 Stabilita v různých koncentracích soli

Na otestování stability nanočástic v různých koncentracích soli byly připraveny roztoky s různou koncentrací NaCl. Díky změně barvy roztoku z červeného (či růžového v malých koncentracích nanočástic) na fialový až šedý lze jednoduše zjistit, zda se nanočástice shlukují, což by znamenalo nestabilitu. Díky optickým vlastnostem nanočástic, zejména díky plazmonové rezonanci, se při agregaci posouvá extinkční (absorpce + rozptyl) maximum do vyšších vlnových délek (Obr. 2.5). Dochází totiž k takzvanému provázání modů jednotlivých nanočástic tak, že se pak shluk chová jako jedna větší nanočástice.

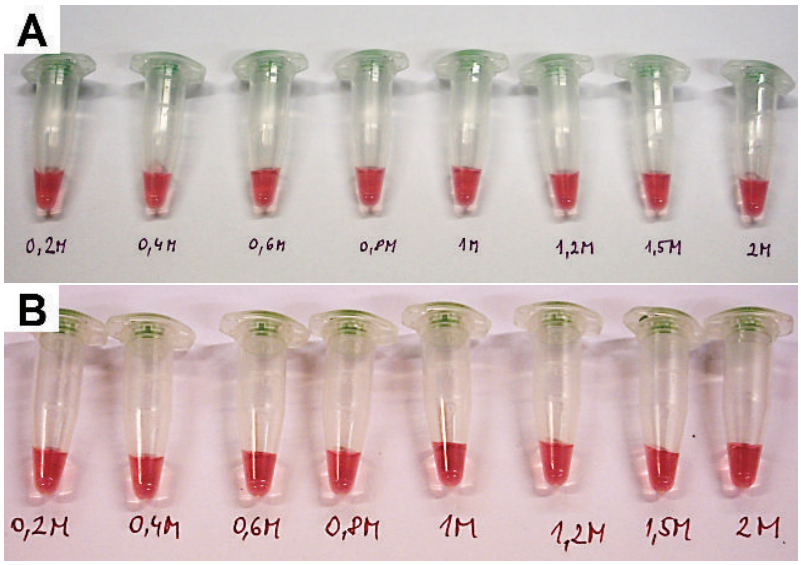


Obr. 2.4: Zobrazení koloidních roztoků zlatých nanočástic. (A) Stabilní roztok nanočástic. (B) Roztok shluklých nanočástic. Na obrázku je jasně patrná změna barvy z červené (stabilní) na fialovo-šedou (nestabilní - shluky).



Obr. 2.5: Absorbance stabilních (červená) a shluklých nanočástic (fialová). Ve spektru shluklých nanočástic lze vidět výrazný extinkční pík okolo 670 nm. Tato spektra byla získána spektrofotometricky (viz kap. 5)

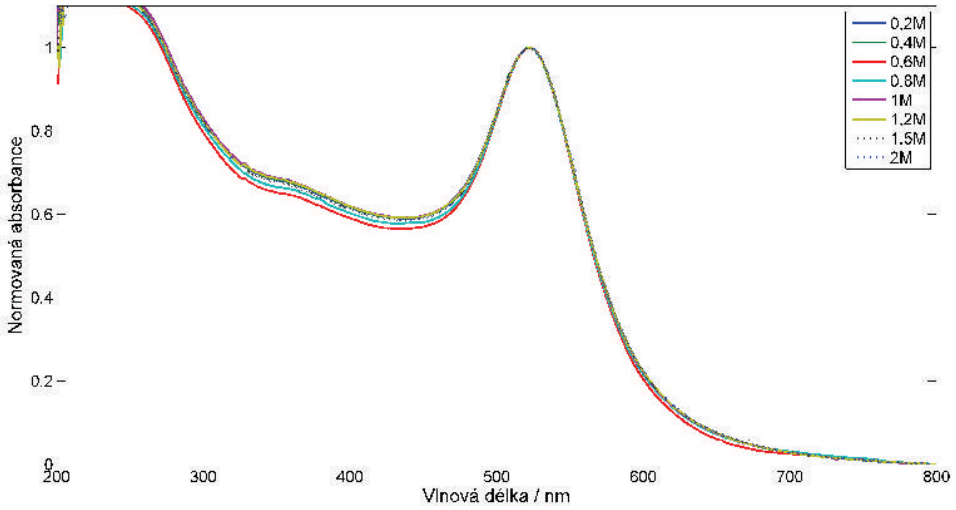
Na test jsem připravil roztoky s koncentracemi 0,2 – 2M NaCl, ve kterých jsem funkcionalizované nanočástice rozpustil. Tyto roztoky jsem srovnával kolorimetricky, spektroskopicky a také pomocí metody DLS. Kolorimetrický test (Obr. 2.6) neukázal žádnou změnu barvy roztoku, to znamená žádné shlukování. To napovídá, že by nanočástice měly být stabilní i ve 2M NaCl. Pro ověření jsem ale provedl také optická měření.



Obr. 2.6: Kolorimetrické stanovení stability připravených nanočástic. Fotografie jsou pořízeny ihned po přípravě (A) a po pěti dnech od přípravy (B). Nanočástice vypadají stabilně ve 2M NaCl, a to i po delší době.

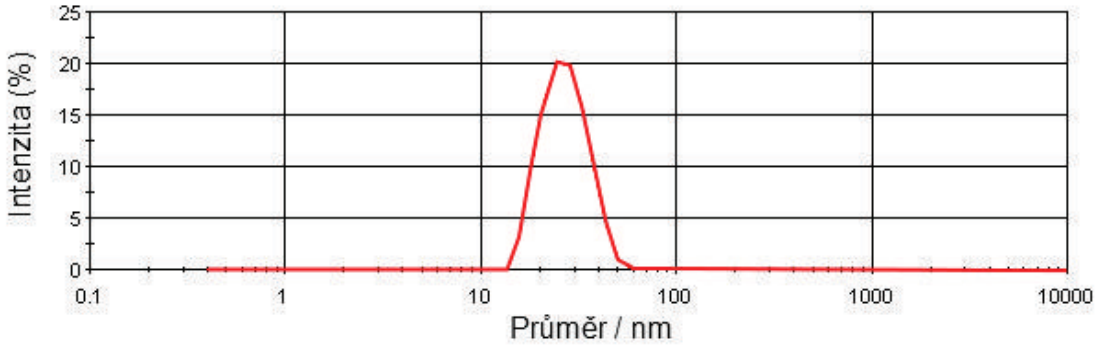
Větší citlivost na případné shluky mají optická měření jakými jsou optická spektrofotometrie a dynamický rozptyl světla. Pokud by vzorek obsahoval shluky nanočástic, ve spektru by se objevil pík ve větších vlnových délkách tak, jak je to na Obr. 2.5. Shluky mají vzhledem k jednotlivým nanočásticím větší průměr, a tak mnohonásobně více rozptylují světlo. To znamená, že pokud by se nanočástice začaly shlukovat, při optickém měření by se tyto shluky měly projevit téměř ihned. Na Obr. 2.7 je zobrazeno spektroskopické měření vzorků v různých koncentracích soli. Na grafu není ani v jednom případě patrný pík okolo 670 nm (který je indikátorem shluklých nanočástic s velikostí shluku obvykle okolo 1 μm), což potvrzuje výsledky z kolorimetrie - částice jsou ve 2M NaCl stabilní. Lepší je vždy absorbanční (extinkční) spektra normovat, abychom mohli lépe porovnat tvar jednotlivých spekter. Přitom na spektroskopickém měření posuzujeme tvar píku, kde rozšíření či jiná deformace může znamenat případnou nestabilitu. Posun maxima (v rámci jednotek nm) pak indikuje změnu v těsném okolí samotných nanočástic - např. změnu molekul na povrchu (více v kapitole 3).

Třetím experimentem provedeným na otestování stability v různých koncentracích soli je měření pomocí dynamického rozptylu světla. Metoda je popsána v kapitole 5. DLS je ve své podstatě tím citlivější, čím větší objekty chceme zkoumat. To znamená, že pokud by se ve vzorku objevily shluky, tak je velice snadno pomocí této metody objevíme. Na Obr. 2.8 jsem zobrazil výsledky z tohoto měření. Jedná se o výsledek roztoku jen s nejvyšší (tzn. 2M) koncentrací NaCl. Z rozdělení velikostí je vidět, že se žádné nanočástice větších rozměrů ve vzorku nenacházejí,



Obr. 2.7: Spektroskopické měření roztoků zlatých nanočástic funkcionalizovaných mixovanou monovrstvou v různých koncentracích NaCl. Na grafu jde vidět, že se pík nijak nedeformuje a nevzniká ani pík okolo 670 nm. Můžeme tedy říct, že částice jsou stabilní i ve 2M NaCl.

což opět znamená, že jsou nanočástice stabilní i ve 2M NaCl.



Obr. 2.8: Výstup z měření dynamického rozptylu světla (viz kap. 5) vzorku funkcionalizovaných zlatých nanočástic rozpuštěných ve 2M NaCl. Shluky nanočástic by se projevovaly vznikajícím píkem ve velikostech větších než 100 nm. Zde žádné takové velikosti zastoupení nemají, takže opět můžeme říci, že jsou připravené nanočástice stabilní i ve 2M NaCl.

Z hlediska stability jsem tedy na třech měřeních ukázal, že se nanočástice, připravené podle uvedeného protokolu, nemají snahu shlukovat ani při 2M koncentraci NaCl. To znamená, že takto připravené nanočástice jsou velice stabilní a měly by z tohoto hlediska být připraveny na použití i v biologických vzorcích nebo by jim neměla vadit změna okolního prostředí (např. přidání pufrů) pro přizpůsobení roztoku pro enzymy.

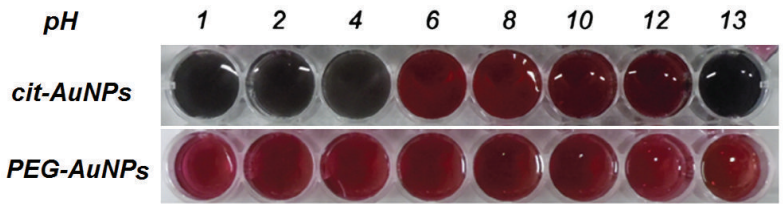
Jedna z kritických vlastností (stabilita v různých koncentracích soli, v různém pH a omezení nespecifických reakcí) je tedy experimentálně ověřena, další dvě zbývají. Pokračovat budu testem stability v různých pH, protože je to také „pouze“ míchání roztoků. Test na nespecifické interakce je poněkud složitější, a proto si jej ponechám na závěr této kapitoly.

2.6.2 Stabilita v různém pH

Pro tento pokus jsem použil DNA-3 v mixované obalové monovrstvě nanočástic, protože jsem již neměl k dispozici DNA-1 a DNA-2. DNA-3 má délku zhruba 11,5 nm, takže je výrazně delší než molekuly TOEG-6, které mají 3,6 nm [17].

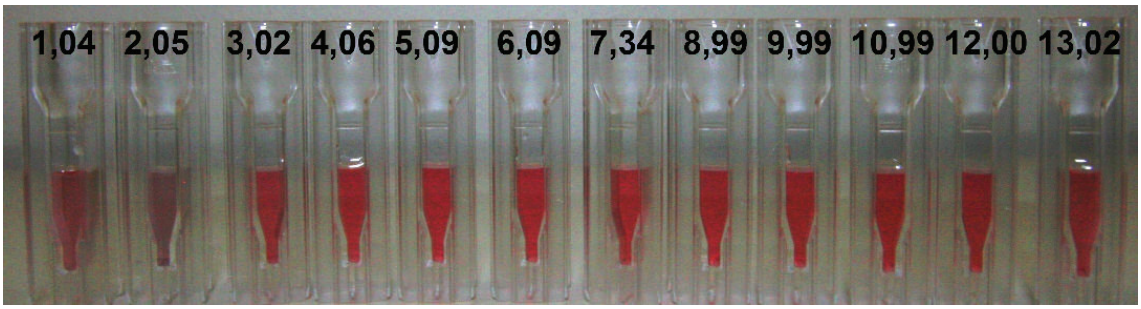
Pro tento pokus jsem si připravil dvanáct roztoků o pH: 1,04, 2,05, 3,02, 4,06, 5,09, 6,09, 7,34, 8,99, 9,99, 10,99, 12,00, 13,02. Použil jsem k tomu ultračistou vodu, pro nastavení kyselého pH jsem použil 1M HCl a pro vytvoření zásaditého prostředí jsem použil 1M NaCl. V těchto roztocích jsem rozpustil připravené nanočástice s mixovanou DNA-3/TOEG-6 monovrstvou. Stabilitu nanočástic v těchto prostředích jsem opět zkoumal kolorimetricky a spektrofotometricky.

U kolorimetrického měření sledujeme opět barvu roztoku. Při tomto měření jsem vycházel z toho, že poly(ehtylen glykol) stabilizuje nanočástice v celém rozsahu pH [8]. Oligo(ethylen glykol), který je navíc asi třetinové délky oproti ssDNA, se kterou se nachází v monovrstvě, nejpíše tak účinný nebude. Přesto jsem očekával, že připravené nanočástice budou stabilní v širokém rozsahu pH. Pro srovnání na Obr. 2.9 uvádím kolorimetrický test stability nanočástic pokrytých pouze citrátem (cit-AuNPs) a také nanočástice pokryté poly(ethylen glykol)em (PEG-AuNPs).



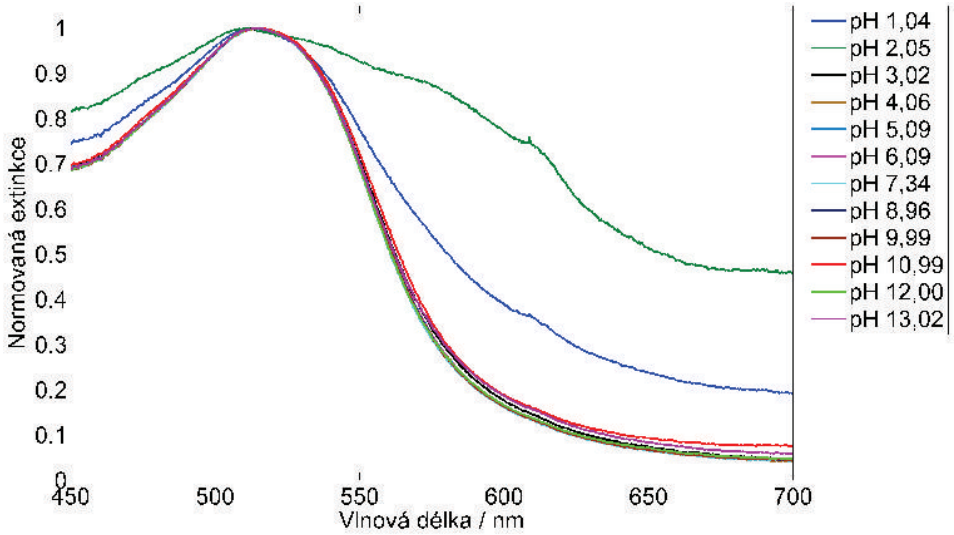
Obr. 2.9: Kolorimetrický test stability nanočástic v různých pH. Citrátem pokryté nanočástice (cit-AuNPs) jsou stabilní v rozsahu pH 6 - 10. V pH 12 se již začínají shlukovat. V ostatních pH jsou nanočástice shluklé (nestabilní). Poly(ethylen glykol)em pokryté nanočástice (PEG-AuNPs) jsou stabilní v celém rozsahu pH. Obrázek převzat z [8] a upraven.

Výsledky experimentu (Obr. 2.10) ukazují, že nanočástice se shlukují při pH 2,05 a nižší. V pH 3,02 a vyšším se již nanočástice jeví jako stabilní.



Obr. 2.10: Kolorimetrické měření stability nanočástic funkcionalizovaných DNA-3/TOEG-6 mixovanou monovrstvou v roztocích o různém pH. Změna barvy u roztoků s pH 1,04 a 2,05 indikuje shlukování nanočástic. To znamená, že v těchto prostředích nejsou tyto nanočástice stabilní.

Spektroskopická měření potvrdila výsledky z kolorimetrie. Ze spektroskopických dat (Obr. 2.11) můžeme vyčíst shlukování díky deformaci plazmonového rezonančního píku (rozšíření) a také se ve spektru objevují rezonanční píky od shluků, které jsou v delších vlnových délkách v oblasti $550 - 610$ nm.



Obr. 2.11: Extinkční spektra funkcionalizovaných nanočástic v roztocích o různém pH. Deformace rezonančního píku ve vlnových délkách okolo 515 nm a další rezonanční píky v oblasti 550 - 610 nm indikují shlukování nanočástic. Tyto efekty jsou vidět pouze u roztoků s pH 1,04 a 2,05. V pH 3,02 a vyšším se nanočástice jeví jako stabilní.

Výsledky ukazují, že molekula TOEG-6 není tak účinná jako PEG. Vzhledem k nutnosti zachování funkčnosti přítomné DNA však neúčinnost TOEG-6 v pH<2 nevadí. Nanočástice funkcionalizované mixovanou DNA-3/TOEG-6 monovrstvou

tedy splňují požadavky na použití v biologických vzorcích i z hlediska stability v různých pH.

2.6.3 Test nespecifických interakcí

Nespecifické reakce představují velký problém ve všech oblastech chemie, biochemie či biologie. Při nespecifických reakcích molekuly interagují jinak, než je jejich primární určení. Například molekuly jednovláknové DNA mohou svými bázemi interagovat s povrchy či jinými molekulami, zatímco jejich specifickou reakcí je hybridizace s komplementární bází. Abych potvrdil, že stabilita nanočástic je spojena s omezením nespecifických interakcí, otestoval jsem vyrobené nanočástice. Připravil jsem čtyři různé samouspořádané monovrstvy (SAM) na zlatém povrchu:

- povrch s DNA, která není komplementární s tou na nanočásticích,
- mixovanou monovrstvu DNA / TOEG-6,
- pouze TOEG-6 monovrstvu,
- monovrstvu, která je zakončená karboxylovou skupinou COO^-.

Tyto monovrstvy jsem měřil na XPS, zde uvedu výsledky jen z otestování monovrstvy tvořené pouze ssDNA a mixované monovrstvy, která obsahuje jak ssDNA tak TOEG-6 molekuly. Výsledky monovrstvy zakončené karboxylovou skupinou byly stejně průkazné.

Test mixované monovrstvy na zlatém povrchu

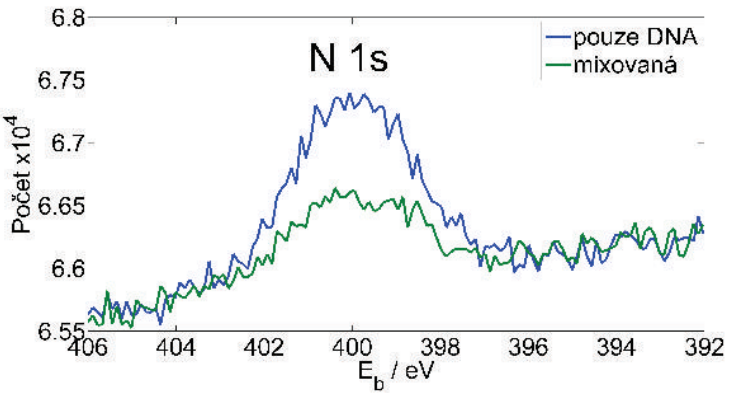
Pro otestování, zda se na vzorcích nachází skutečně daná monovrstva, byly vytvořeny dvě kopie vzorku od každého a byla provedena analýza pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS). XPS spektra na Obr. 2.12, 2.13 a 2.14 ukazují rozdíly mezi mixovanou monovrstvou a monovrstvou tvořenou pouze molekulami DNA. Ve spektrech můžeme pozorovat jednak změnu intenzity jednotlivých píků a také posuv díky jiné chemické vazbě prvků uvnitř molekuly DNA a TOEG-6.

Ve spektru dusíku (Obr. 2.12) vidíme změnu intenzity píku. Dusík je více přítomen ve vrstvě tvořené jen molekulami DNA. V mixované monovrstvě jsou nespecificky navázané molekuly DNA[5] nahrazeny molekulami TOEG-6, která dusík neobsahuje a snižuje tak výtěžek ze stejné plochy vzorku.

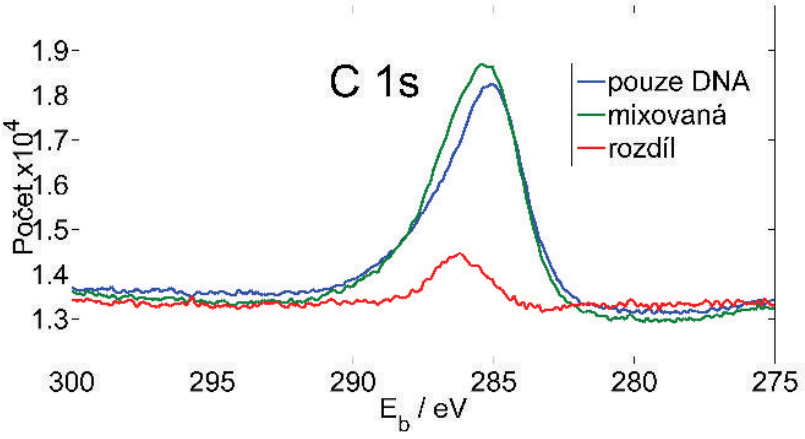
Ve spektru uhlíku (Obr. 2.13) je vidět posuv díky jiné chemické vazbě v molekule TOEG-6 a DNA. Spektrum uhlíku molekuly TOEG-6 obsahuje dva píky odpovídající dvěma různým chemickým vazbám, což je dobře vidět, když se obě spektra od sebe odečtou (Obr. 2.13 červená barva).

[5]Ty co nejsou vázány na povrch přes thiolovou skupinu.

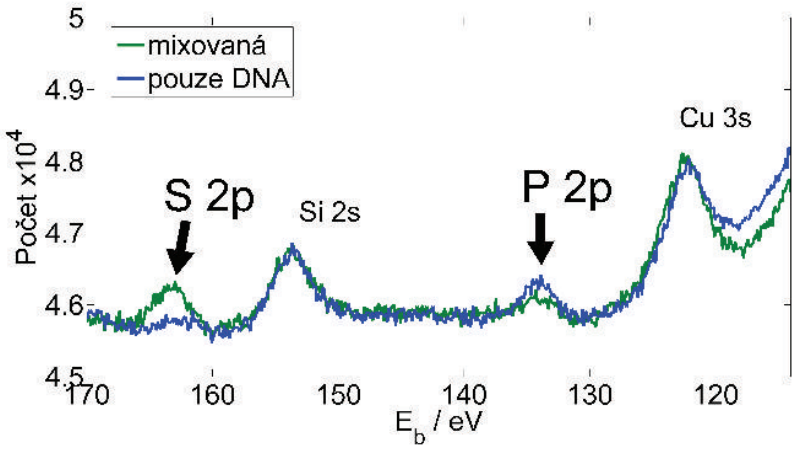
V dalším spektru (Obr. 2.14) se nacházejí píky jak od síry a fosforu. Fosfor je přítomen pouze v molekule DNA, proto je signál v mixované monovrstvě oslaben. Síra se nachází v obou molekulách, a proto je signál z 1s píku síry přítomen v obou případech. Zde naopak v mixované monovrstvě je signál zesílen. To je dáno tím, že molekuly TOEG-6 vrstvu lépe uspořádávají, proto je na stejné ploše více molekul než v případě vzorku pouze s DNA.



Obr. 2.12: Na grafu XPS můžeme vidět snížení zastoupení dusíku v mixované monovrstvě vzhledem k monovrstvě, kde je pouze ssDNA. Je to způsobeno tím, že molekuly TOEG-6 nahrazují nespecificky navázané molekuly DNA. V molekulách TOEG-6 se dusík nenachází, proto se signál v této oblasti energií snižuje.



Obr. 2.13: Ve spektru uhlíku můžeme vidět odlišně navázaný uhlík v molekulách TOEG-6 a v molekulách DNA.

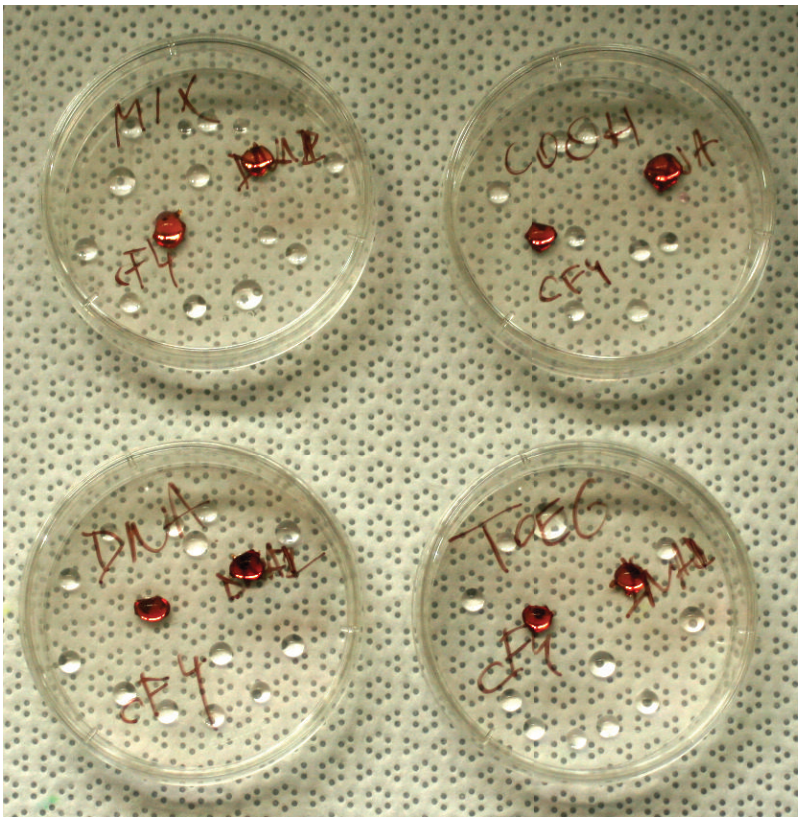


Obr. 2.14: V oblastech energií, kde se nachází síra a fosfor, jsou identifikovatelné píky od obou těchto atomů. Fosfor se nachází v páteřním řetězci molekuly DNA a v molekule TOEG-6 se nenachází, proto zeslabení signálu na vzorku s mixovanou DNA. Síra je přítomna v obou těchto molekulách, protože se přes ni vážou na zlatý povrch. Síra je zesílená na mixovaném povrchu, protože dochází k lepšímu uspořádání molekul na povrchu a většímu pokrytí, tudíž většímu množství thiolovaných molekul.

Srovnání nespecifických interakcí

Předchozí experiment prokázal přítomnost monovrstev na zlatém povrchu, který nyní využiji k otestování snížení nespecifických interakcí nanočástic díky začlenění sterického stabilizátoru TOEG-6 do jejich obalu. V následujícím textu budu používat zkratky SAM pro samouspořádanou monovrstvu na rovném zlatém povrchu, abych ji odlišil od monovrstvy na nanočásticích (obalu).

Aby bylo průkazné, že se vytvořením mixované monovrstvy na povrchu nanočástic skutečně snížily nespecifické interakce, provedl jsem následující experiment se dvěma roztoky nanočástic. Jeden roztok obsahoval nanočástice s mixovanou monovrstvou a druhý nanočástice funkcionalizované pouze jednovláknovou DNA. Oba roztoky jsem aplikoval na vytvořené SAM na zlatém povrchu (Obr. 2.15) a nechal přes noc v 5 °C. Ráno jsem vzorky několikrát opláchl deionizovanou vodou a vysušil dusíkem. Následně jsem vzorky pozoroval v rastrovacím elektronovém mikroskopu. SAM tvořená pouze ssDNA má hodně defektů, což zvyšuje podíl nespecifických interakcí. Naopak ostatní SAM by měly být velice dobře uspořádané, tudíž všechny nespecifické interakce, které se mohou projevit, pocházejí od nanočástic a jejich obalu. Proto uvedu výsledky jen ze SAM mixované (MIXOVANÁ), zakončené karboxylem (COOH) a monovrstvy pouze z molekul TOEG-6 (TOEG-6).

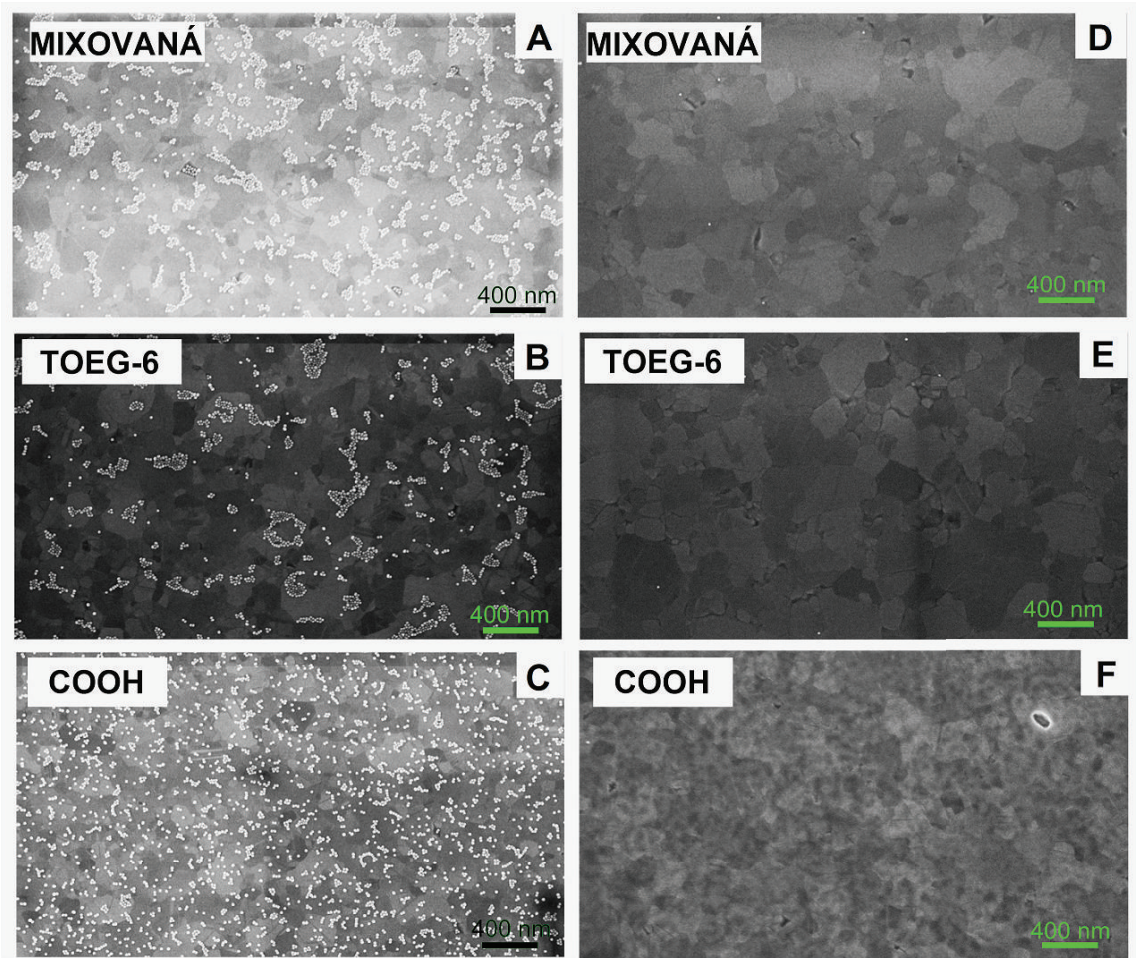


Obr. 2.15: Ilustrativní obrázek aplikace roztoků koloidních nanočástic na SAM na zlatých površích (červené objekty). Kolem dokola v Petriho miskách jsou kapky deionizované vody, aby se snížilo vysychání. Roztoky na vzorcích nesměly vyschnout, protože by se pak projevovaly kapilární efekty a výsledky by tím mohly být výrazně ovlivněné.

Snímky pořízené elektronovým mikroskopem jsou zobrazeny na Obr. 2.16. Ve srovnání můžeme vidět, že u nanočástic funkcionalizovaných pouze jednovláknovou DNA se vyskytují nespecifické interakce způsobené nekompaktní monovrstvou na povrchu nanočástic. Díky tomu mohou interagovat molekuly z rovného povrchu nespecificky s povrchem nanočástice, a také dochází k interakcím mezi samotnými nanočásticemi. Nespecifické interakce se projeví zachycením nanočástice na povrchu a následuje agregace nanočástic kolem. Agregace je především způsobena tím, že v okolí SAM je velká koncentrace nábojů, podobná vysokému množství soli v roztoku, a to způsobí shlukování v těsném okolí samouspořádané monovrstvy. Tento efekt by měl odstranit sterický stabilizátor - molekula TOEG-6. Ze snímků můžeme vidět velký rozdíl mezi nanočásticemi (AuNPs) funkcionalizovanými pouze ssDNA a nanočásticemi obalenými mixovanou ssDNA/TOEG-6 monovrstvou. Na Obr. 2.16A-C můžeme vidět přichycené a shluklé nanočástice (bílé ostrůvky) na různých samouspořádaných vrstvách na zlatém povrchu. Je zajímavé si také všimnout, že nanočástice mají tendenci se na různých SAM shlukovat do odlišných tvarů (os-

trůvky, řetízky). Co je ale pro závěry této práce důležité, je rozdíl mezi adsorpcí ssDNA-AuNPs (Obr. 2.16 snímky nalevo) a (ssDNA/TOEG-6)-AuNPs (Obr. 2.16 snímky napravo). Nanočástice připravené podle postupu v kapitole 2.5 se na SAM na povrchu prakticky nevyskytují (pár na několika μm^2). Pokud se někde objeví naadsorbovaná jednotlivá nanočástice je zřejmě způsobeno povrchovými nerovnostmi zlatého povrchu pod SAM, protože pokud byl na povrchu škábanec, bylo kolem něj naadsorbováno spoustu nanočástic ve všech případech.

Snímky ukazují výrazné omezení nespecifických interakcí při zahrnutí sterického stabilizátoru do obalové monovrstvy nanočástice. Omezení nespecifických interakcí má také za následek již zmiňovanou stabilitu ve vyšších koncentracích soli.



Obr. 2.16: Snímky z elektronového mikroskopu testu nespecifických interakcí. Na zlatém povrchu byly vytvořeny tři různé samouspořádané monovrstvy - ssDNA/TOEG-6 monovrstva (MIXOVANÁ) (A,D), TOEG-6 SAM (TOEG-6) (B,E) a SAM zakončená karboxylovými skupinami (COOH) (C,F). Na tyto vzorky byl naneseny dva různé roztoky zlatých nanočástic - obalené pouze ssDNA (A - C) a funkcionalizované mixovanou ssDNA/TOEG-6 monovrstvou (D - E). Ani v jednom případě nebyly řetězce jednovláknové DNA komplementární s těmi na zlatém povrchu. Na snímcích A - C můžeme vidět nespecificky adsorbované nanočástice na samouspořádané monovrstvě na vzorcích. Naopak na vzorcích D - F se nanočástice téměř nevyskytují. Zavedením sterického stabilizátoru, molekuly TOEG-6, na povrch nanočástic bylo dosaženo výrazné omezení nespecifických interakcí. Ty nanočástice, které zůstaly na vzorcích D - F se zřejmě uchytily v místech, kde měla vrstva na povrchu defekt.

2.6.4 Ověření přítomnosti DNA na povrchu nanočástic

Při pasivačním procesu na nanočásticích dochází k nahrazení jednovláknové DNA molekulou TOEG-6, i když je vázána přes thiol. Pokud by byl tento sterický stabilizátor ponechán v roztoku dlouhou dobu, nahradil by postupně všechny navázané oligonukleotidy a došlo by ke ztrátě funkce nanočástic [18]. K potvrzení toho, že nedochází ke kompletnímu nahrazení ssDNA, byly nanočástice podrobeny gelové elektroforéze (viz kap. 5).

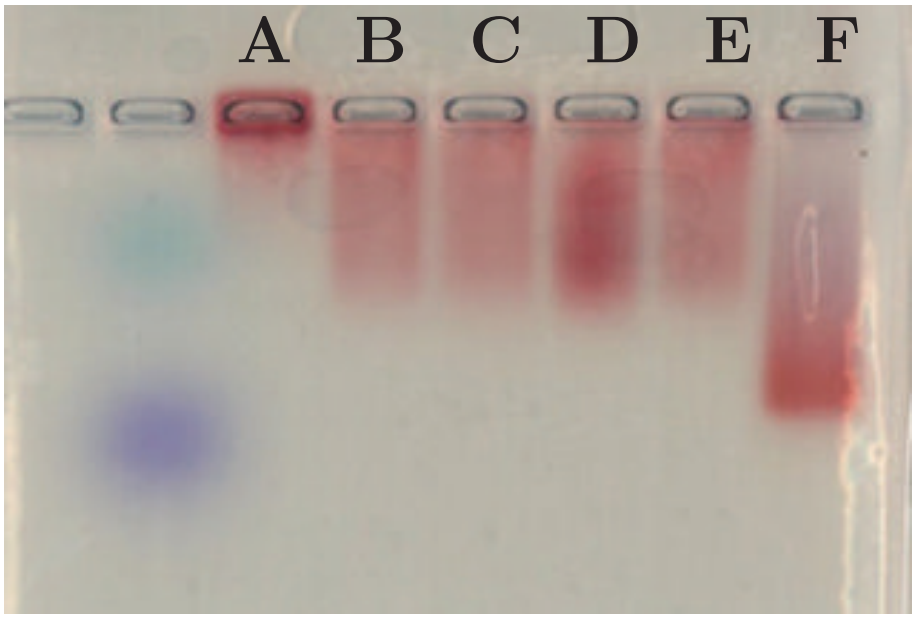
Pomocí této metody můžeme rozlišit, zda je v obalu nanočástic přítomný náboj, díky kterému by se v gelu pohybovaly. Molekula TOEG-6 je ve vodním prostředí neutrální, to znamená, že pokud by na povrchu nanočástic nahradila všechny molekuly DNA (ty mají záporný náboj), pak by se nanočástice v gelu nepohybovaly. Dalším faktorem, který ovlivňuje rychlost pohybu nanočástic v gelu, je její velikost. Čím větší částice, tím pomaleji se pohybuje. Na základě těchto vlastností jsme schopni rozlišit nanočástice s různou funkcionalizací povrchu [19, 20]. Rozdíl mezi nanočásticemi funkcionalizovanými pouze ssDNA a těmi, co mají na svém povrchu mixovanou monovrstvu, spočívá v tom, že v mixované monovrstvě jsou molekuly dobře uspořádány a vrstva je tak objemnější. Dalším rozdílem je velikost náboje na povrchu. Molekula TOEG-6 nahrazuje část molekul jednovláknové DNA na povrchu nanočástic a tím se snižuje celkový náboj vrstvy a na nanočástice nepůsobí tak velká síla po přiložení napětí. Oba tyto faktory tedy zpomalují chod nanočástic gelem.

Pro experiment byly 15nm zlaté nanočástice funkcionalizovány třemi různými způsoby:

- pouze molekulami TOEG-6,
- pouze jednovláknovou DNA
- oběma molekulami dohromady - mixovaná monovrstva (podle postupu uvedeného v kapitole 2.5).

Tyto nanočástice byly po poslední centrifugaci ponechány v koncentrovaném stavu a 5 μl bylo smícháno s glycerolem a naneseno do jamek připraveného gelu. Po 30 minutách po připojení napětí (viz kap. 5) byl výsledek gelové elektroforézy v souladu s teorií (Obr. 2.17). Nanočástice funkcionalizované pouze molekulami TOEG-6 zůstaly v jamce, protože na nanočásticích nebyl přítomen žádný náboj. Nanočástice funkcionalizované pouze molekulami ssDNA „doputovaly“ v gelu nejdále. Mixovaná monovrstva ssDNA/TOEG-6 je díky uspořádání objemnější a také ztratila část svého náboje díky částečnému nahrazení molekul ssDNA molekulami TOEG-6.

Gelová elektroforéza ukázala, že v mixované monovrstvě, připravené podle postupu v kap. 2.5, molekuly ssDNA zůstávají. Otázkou ale je, zda jsou funkční. Schopnost hybridizace s komplementárním řetězcem byla ověřena pomocí testu specificity.



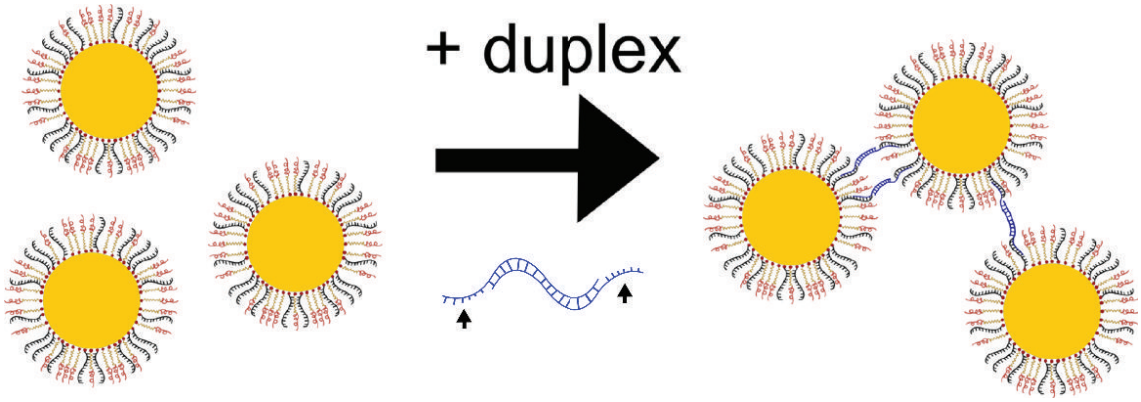
Obr. 2.17: Snímek gelu z gelové elektroforézy. Ve sloupcích A-F se nachází 15nm zlaté nanočástice s různou funkcionalizací povrchu - Nanočástice funkcionalizované pouze molekulou TOEG-6 (A), nanočástice obalené mixovanou ssDNA/TOEG-6 monovrstvou (B-E) a nanočástice funkcionalizované pouze jednovláknovou DNA (F). Nanočástice se v gelu pohybují podle velikosti a náboje. Molekula TOEG-6 nenese žádný náboj, proto nanočástice zůstaly ve sloupci A na místě, kde byly naneseny. Náboj nesou pouze molekuly ssDNA, které jsou přítomny jak v mixované monovrstvě (B-E), tak samostatně (F). V mixované monovrstvě ale molekula TOEG-6 nahradila část molekul ssDNA a monovrstvu lépe uspořádala (stala se objemnější). Tyto skutečnosti můžeme pozorovat jako sníženou pohyblivost nanočástic vlivem ztráty části celkového náboje a zvětšením velikosti obalu nanočástice. Důležité je také to, že v mixované monovrstvě jednovláknová DNA zůstává - nanočástice se ve sloupcích B-E pohybují.

2.6.5 Test specificity

Omezení nespecifických interakcí ještě nezbytně neznamená, že se nanočástice budou vázat specificky - tedy, že ssDNA vázaná v mixované monovrstvě na povrchu nanočástic bude stále dostupná k hybridizaci s komplementárním řetězcem. Může se totiž stát, že molekula TOEG-6, která je také přítomná v monovrstvě, bude stericky bránit nejen v agregaci, ale i v hybridizaci.

Pro ověření, zda je zachována funkcionalita jednovláknové DNA v mixované ssDNA/TOEG-6 monovrstvě na nanočásticích, byl proveden test specificity. V testu byly použity tři různé molekuly DNA: DNA-1, DNA-2 a duplex (viz kapitola 2.3). Byly připraveny dva roztoky nanočástic s různou funkcionalizací. Jeden roztok obsahoval nanočástice obalené mixovanou DNA-1/TOEG-6 monovrstvou a ve druhém

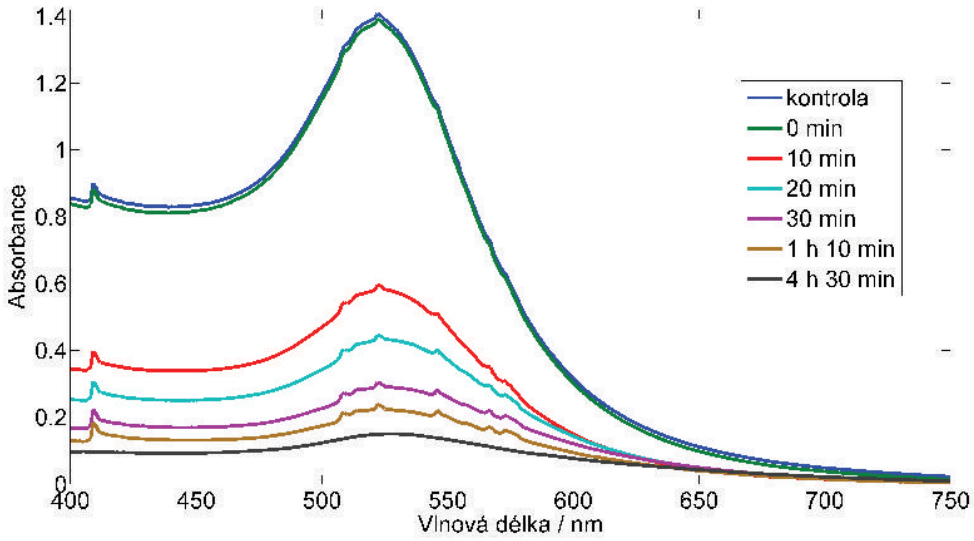
byl obal tvořen mixovanou DNA-2/TOEG-6 monovrstvou. DNA-1 a DNA-2 nejsou komplementární, proto by nanočástice neměly interagovat. Po přidání duplexu do roztoku by se jeho lepivé konce měly navázat na jedné straně na DNA-1 a na druhé straně na DNA-2, ke kterým jsou komplementární. Pokud je zachována funkcionalita DNA, tak by se měly nanočástice shlukovat. Celá reakce je schematicky zobrazena na Obr. 2.18.



Obr. 2.18: Schéma testování specifity na funkcionalizovaných zlatých nanočásticích. Nanočástice v roztoku jsou obaleny ssDNA/TOEG-6 monovrstvou, kde jednotlivé jednovláknové DNA nejsou navzájem komplementární. Do roztoku je následně přidán duplex, který má lepivé konce (malé šipky v obrázku) komplementární k ssDNA na obou typech nanočástich. Zachování funkčnosti DNA pak lze poznat z toho, že se částice shlukují.

Pro experimenty byly použity metody spektrofotometrie a dynamický rozptyl světla. Vykreslená spektroskopická data jsou na Obr. 2.19. Z grafu můžeme vyčíst, že se s přidáním duplexu snižuje absorbance (extinkce). Je to dáno tím, že v roztoku se vytvářejí shluky, které si sedají na dno. V kyvetě byla vidět na dně fialovo-šedá zrnka agregátů. Díky tomu, že absorbance je přímo úměrná koncentraci nanočástic (viz kapitola 5), můžeme z grafu vyčíst průběh reakce.

Snižující se a rozšiřující se extinkční pík okolo 520 nm ukazuje na agregaci nanočástic po přidání duplexu. Roztok obou typů nanočástic (DNA-1/TOEG-6 AuNPs, DNA-2/TOEG-6 AuNPs) dohromady byl testován po dobu 1 h, kdy se prakticky nic nestalo - na grafu jsou to hodnoty kontroly, které byly měřeny ihned po smíchání obou roztoků dohromady; a hodnoty s označením 0 min, které byly získány těsně před tím, než byl do roztoku přidán duplex. Celý tento experiment probíhal při 1M koncentraci NaCl v roztoku. V grafu na Obr. 2.19 můžeme vidět snižující se pík v absorbanci, který značí snižující se koncentraci samostatných nanočástic, které se díky duplexu shlukují a sedají na dno kyvety.

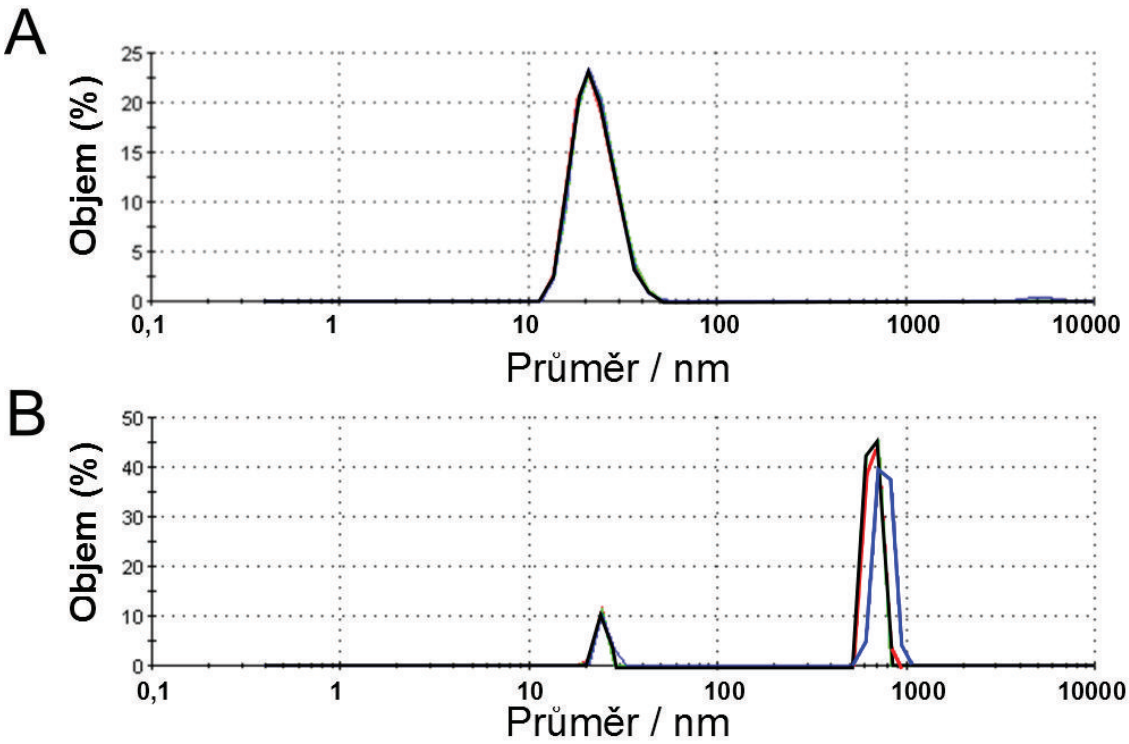


Obr. 2.19: Absorbance roztoku nanočástic s přidáním duplexu v 1M NaCl. Kontrola byla měřena 1 h před samotným měřením. Časový údaj odpovídá času po přidání duplexu do roztoku. Postupem času můžeme vidět snižující se absorbance. To je dáno shlukováním jednotlivých nanočástic. Již po 10 minutách byla koncentrace samostatných nanočástic poloviční oproti kontrole, tzn. 50 % částic již je navázáno jedna na druhou díky duplexu a tvoří shluky. Shlukování dokazuje zachování schopnosti hybridizace ssDNA, která je v mixované monovrstvě, s komplementárním řetězcem, v tomto případě lepivým koncem duplexu.

Měření DLS probíhalo stejně jako v přechozím případě, pouze po přidání duplexu byl roztok změřen jen jednou a to po pěti minutách od přidání. Výsledek můžeme vidět na Obr. 2.20. Na začátku byly nanočástice v roztoku samostatně a po přidání duplexu se začaly navazovat a tvořily větší shluky. Po pěti minutách (Obr. 2.20 B) pak v rozložení velikostí můžeme vidět nárůst okolo 1 μm.

Z obou měření tedy vyplývá, že nanočástice připravené podle výše uvedeného postupu mají stále dostupné jednovláknové DNA k tomu, aby se mohly specificky navázat na komplementární řetězce.

Zavedení molekuly TOEG-6 do obalové vrstvy nanočástic chrání nanočástice vůči okolním vlivům pH, koncentrace iontů solí, které mohou způsobovat nespecifické interakce a agregaci nanočástic. Zároveň ale ponechává molekule DNA její funkční vlastnosti - schopnost se specificky vázat na komplementární řetězce DNA, což značí velké shluky nanočástic.



Obr. 2.20: Výsledky z měření dynamického rozptylu světla. Smíchaný roztok nanočástic s mixovanými monovrstvami DNA-1/TOEG-6 a DNA-2/TOEG-6 (A). Roztok po 5 minutách od přidání duplexu do roztoku (B). Ve výsledcích jde vidět tvorba agregátů s průměrem okolo 1 μm po přidání duplexu. To potvrzuje, že jednovláknová DNA v mixované monovrstvě je stále schopná hybridizace s komplementárním řetězcem, v tomto případě s lepivým koncem duplexu.

3 OPTICKÉ VLASTNOSTI FUNKCIONALIZOVANÝCH NANOČÁSTIC

Pokud měříme optické vlastnosti koloidních nanočástic spektroskopicky, většinou měříme extinkci nebo absorbanci. Obě tyto veličiny se dají vypočítat z polarizovatelnosti α. Ta závisí na mnoha faktorech jako jsou například materiál jádra nanočástice, velikost, tvar a také na dielektrických vlastnostech okolí. Elektrické pole vybuzeného plazmonu totiž zasahuje jak dovnitř jádra nanočástice tak i do jejího okolí, kde je evanescentně tlumeno. Změna dielektrické funkce v okolí nanočástice tak může vyvolat posuv detekovaného extinkčního píku ve spektru [21].

Pro funkcionalizovanou nanočástici, tedy obalenou vrstvou o určité dielektrické funkci $\varepsilon^{(\mathrm{m})}$[1], existují odvozené vztahy pro její polarizovatelnost [22]. Ty byly odvozeny pro nanočástice nacházející se ve vakuu $\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})} = 1\right)$ a vycházejí z Mieho teorie. V experimentech, které jsou součástí této diplomové práce, se ale nanočástice vyskytují v roztocích a pro simulace jsou závěry z této a podobných pracích nevhodné. V [23] byl odvozen vztah i pro obalenou nanočástici v prostředí, ale pro větší názornost tento vztah odvodím i zde.

Nanočástice jsou cca 25× menší než vlnová délka záření, která se používá ke zkoumání jejich optických vlastností. Proto je pro simulace extinkce a absorbance koloidních nanočástic možno použít kvazistatické aproximace. Ta předpokládá, že pole má uvnitř nanočástice stejnou fázi. Pokud tedy necháme na kulovou nanočástici (Obr. 3.1) působit externí pole

$$\phi^{(\mathrm{ext})} = -E_0 \rho \cos\theta, \tag{3.1}$$

bude se v nanočástici budit dipólový moment p úměrný její polarizovatelnosti α_0

$$p = \alpha_0 E_0. \tag{3.2}$$

Pak můžeme předpokládat rozložení potenciálů v jednotlivých materiálech následovně:

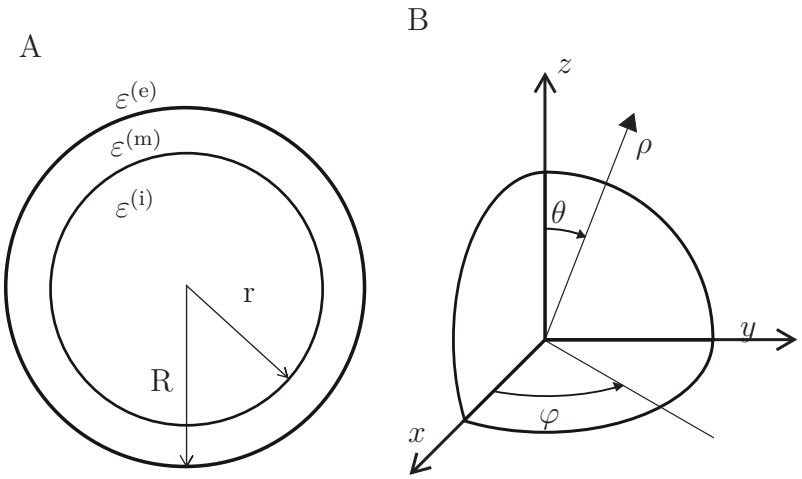
$$\phi^{(\mathrm{e})} = C^{(\mathrm{e})} \rho^{-2} - E_0 \rho, \tag{3.3}$$

$$\phi^{(\mathrm{m})} = A\rho + B\rho^{-2}, \tag{3.4}$$

$$\phi^{(\mathrm{i})} = C^{(\mathrm{i})} \rho \tag{3.5}$$

kde $\phi^{(\mathrm{e})}$ je potenciál vně obalené nanočástice, tzn. v prostředí s dielektrickou funkcí $\varepsilon^{(\mathrm{e})}$. $\phi^{(\mathrm{m})}$ je potenciál ve vrstvě s diel. funkcí $\varepsilon^{(\mathrm{m})}$ a $\phi^{(\mathrm{i})}$ je potenciál v kovovém jádře nanočástice $\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}\right)$ a $A, B, C^{(\mathrm{i})}$ a $C^{(\mathrm{e})}$ jsou konstanty.

[1] V této kapitole budu používat horní index (e) jako externí, pro médium v okolí nanočástice, (m) pro monovrstvu či obal nanočástice a (i) jako interní, tzn. index pro veličiny uvnitř samotného jádra nanočástice.



Obr. 3.1: Schema řešeného problému. A: Dielektrické funkce ε jednotlivých částí, poloměr jádra nanočástice r a poloměr celé nanočástice i s obalem R. B: Použité sférické souřadnice.

Po aplikaci podmínek spojitosti potenciálu a normálových složek elektrické indukce na rozhraních $\rho = r$ a $\rho = R$

$$\begin{aligned}
\phi^{(i)}\Big|_{\rho=r} &= \phi^{(m)}\Big|_{\rho=r}, \\
\phi^{(m)}\Big|_{\rho=R} &= \phi^{(e)}\Big|_{\rho=R}, \\
\varepsilon^{(i)}\frac{\partial\phi^{(i)}}{\partial\rho}\Big|_{\rho=r} &= \varepsilon^{(m)}\frac{\partial\phi^{(m)}}{\partial\rho}\Big|_{\rho=r}, \\
\varepsilon^{(m)}\frac{\partial\phi^{(m)}}{\partial\rho}\Big|_{\rho=R} &= \varepsilon^{(e)}\frac{\partial\phi^{(e)}}{\partial\rho}\Big|_{\rho=R},
\end{aligned}$$

a po dosazení ze vztahů 3.3–3.5 získáme soustavu rovnic

$$C^{(i)}r = Ar + Br^{-2}, \tag{3.6}$$

$$AR + BR^{-2} = C^{(e)}R^{-2} - E_0R, \tag{3.7}$$

$$\varepsilon^{(i)}C^{(i)} = \varepsilon^{(m)}\left[A - 2Br^{-3}\right], \tag{3.8}$$

$$\varepsilon^{(m)}\left[A + BR^{-3}\right] = \varepsilon^{(e)}\left[-2C^{(e)}R^{-3} - E_0\right]. \tag{3.9}$$

Vynásobením rovnice 3.6 výrazem $\varepsilon^{(i)}/r$ a odečtením rovnice 3.8 dostaneme

$$0 = A\left(\varepsilon^{(i)} - \varepsilon^{(m)}\right) + Br^{-3}\left(\varepsilon^{(i)} + 2\varepsilon^{(m)}\right). \tag{3.10}$$

Vynásobením rovnice 3.7 výrazem $2\varepsilon^{(e)}/R$ a přičtením rovnice 3.9 dostaneme

$$A\left(2\varepsilon^{(e)} + \varepsilon^{(m)}\right) + BR^{-3}\left(2\varepsilon^{(e)} - 2\varepsilon^{(m)}\right) = -3\varepsilon^{(e)}E_0. \tag{3.11}$$

Řešením rovnic 3.10 a 3.11 jsou koeficienty A a B:

$$A = \frac{3R^3\varepsilon^{(\mathrm{e})}E_0\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)}{2r^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)-R^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(2\varepsilon^{(\mathrm{e})}+\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)},$$

$$B = -\frac{3R^3r^3\varepsilon^{(\mathrm{e})}E_0\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)}{2r^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)-R^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(2\varepsilon^{(\mathrm{e})}+\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)}.$$

Z těchto koeficientů se již dají dosazením do rovnic 3.6 a 3.7 vyjádřit koeficienty $C^{(\mathrm{i})}$ a $C^{(\mathrm{e})}$.

$$C^{(\mathrm{i})} = \frac{-9R^3\varepsilon^{(\mathrm{e})}\varepsilon^{(\mathrm{m})}E_0}{2r^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{m})}-\varepsilon^{(\mathrm{i})}\right)\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)+R^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(2\varepsilon^{(\mathrm{e})}+\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)},$$

$$C^{(\mathrm{e})} = \frac{R^3E_0\left[r^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)-R^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\right]}{2r^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{m})}-\varepsilon^{(\mathrm{i})}\right)\left(\varepsilon^{(\mathrm{e})}-\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)+R^3\left(\varepsilon^{(\mathrm{i})}+2\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)\left(2\varepsilon^{(\mathrm{e})}+\varepsilon^{(\mathrm{m})}\right)}. \tag{3.12}$$

Pro pole v okolí dipólu platí:

$$\frac{p}{4\pi\varepsilon^{(\mathrm{e})}} = \frac{C^{(\mathrm{e})}}{E_0}E_0,$$

z čehož po úpravě dostáváme výraz

$$p = 4\pi\varepsilon^{(\mathrm{e})}\frac{C^{(\mathrm{e})}}{E_0}E_0,$$

který je již podobný rovnici 3.2 a již můžeme vyjádřit polarizovatelnost:

$$\alpha_0 = 4\pi\varepsilon^{(\mathrm{e})}\left(\frac{C^{(\mathrm{e})}}{E_0}\right).$$

Pro dosažení reálnějších výsledků použijeme radiační korekci platnou pro absorbující nanočástice s konstantním polem uvnitř [24]

$$\alpha = \frac{\alpha_0}{1-\frac{\mathrm{i}k^3}{6\pi\varepsilon^{(\mathrm{e})}}\alpha_0},$$

kde α je radiačně korigovaná polarizovatelnost a k je vlnový vektor. Z radiačně korigované polarizovatelnosti již dostaneme měřitelnou extinkci [25]

$$\sigma_{ext} = k\mathrm{Im}(\alpha).$$

3.1 Vliv velikosti obalu na extinkci

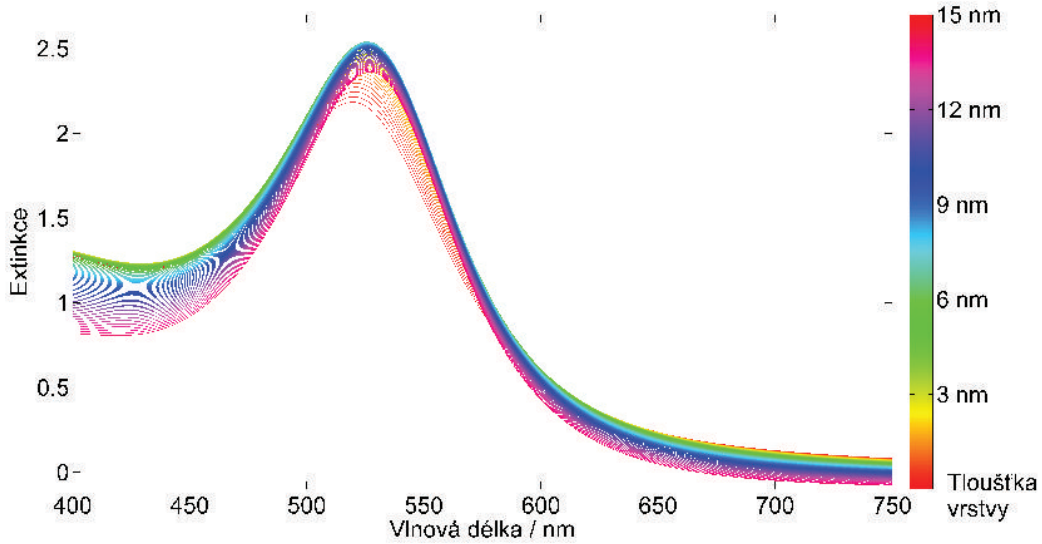
Citlivost nanočástic na změnu v okolí (obal, médium) je zajištěna evanescentní povahou elektrického pole od plazmonu, které zasahuje od povrchu částice směrem do okolí. Aby změna okolního prostředí měla měřitelný vliv a posouvala extinkční maximum ve spektru, musí se změna projevovat v oblastech s dostatečnou intenzitou elektrického pole.

Vhodnou aproximací tlumení pole od plazmonu je exponenciální pokles intenzity se vzdáleností od rozhraní jádro–obal. To znamená, že detekci změn v okolí nanočástice (vlivem obalení) můžeme efektivně měřit jen ve velmi malé oblasti okolo nanočástice (jednotky až desítky nm - záleží na velikosti nanočástice a na konfiguraci experimentu) [21]. Elektrické pole plazmonu totiž musí mít dostatečnou intenzitu v objemu, kde se váže analyt či dochází k jakékoliv změně. Na druhou stranu nemůže pole zasahovat daleko, protože by se změna uskutečňovala jen v malé části detekovatelného objemu a efektivní index lomu objemu, do kterého pole zasahuje, by pak byl velice podobný indexu lomu média. To znamená, že by se posuv extinkčního spektra nedal pozorovat. O tomto více pojednávám v kapitole 4.1.

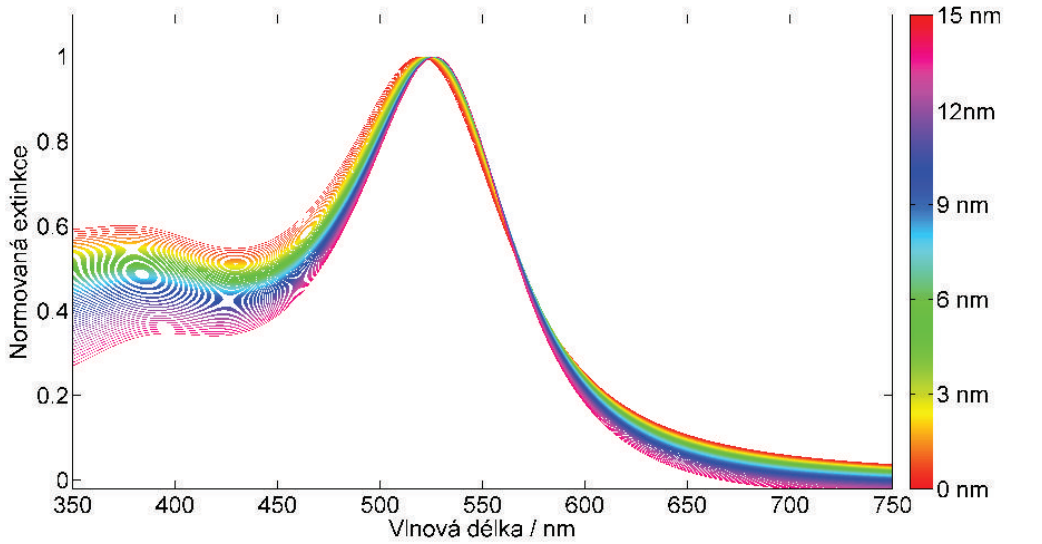
Vliv velikosti obalu na extinkci nanočástice jsem simuloval výpočtem v programu Matlab. Vykreslená spektra budou odpovídat velikosti zlatých nanočástic o průměru $d = 15$ nm. Jako dielektrickou funkci obalu jsem zvolil konstantní funkci $\varepsilon^{(\mathrm{m})} = 2$, která by mohla, alespoň přibližně, odpovídat neabsorbující vrstvě biomolekul [26]. Okolní prostředí $\varepsilon^{(\mathrm{e})}$ bylo simulováno jako voda a jádro nanočástice $\varepsilon^{(\mathrm{i})}$ jsem zvolil jako zlato [27].

Vypočítaný vliv změny velikosti obalu na extinkční spektrum zlaté nanočástice ve vodním prostředí je na Obr. 3.2. Ze spektra lze usuzovat, že extinkční maximum se nachází v jiných vlnových délkách pro různé velikosti obalu. Maximum extinkce ale i mění svou intenzitu, a proto je lepší spektra normovat. Z normovaných spekter pak můžeme mnohem lépe vidět posuv maxima ve spektru vlnových délek. Normovaná extinkční spektra jsem vykreslil na Obr. 3.3 a odečtenou závislost posunutí extinkčního maxima na velikosti obalu jsem zpracoval na Obr. 3.4.

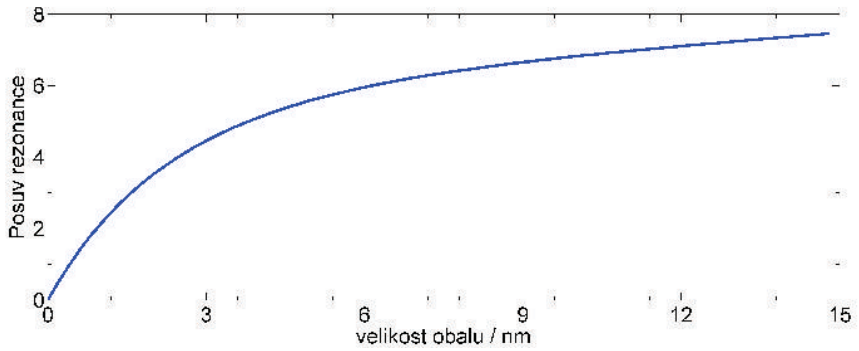
Na grafu na Obr. 3.4 můžeme vidět, že posuv rezonance ve spektru není moc velký, přesto není zanedbatelný. Musíme ale počítat také s tím, že při změně velikosti nanočástice nebo materiálu jádra bude posuv odlišný. Při zvětšení jádra nanočástice bude při zachování tloušťky vrstvy posun menší a naopak. Při změně materiálu můžeme dosáhnout zvětšení citlivosti. Pokud by bylo jádro nanočástice například ze stříbra, byla by rezonance obalem více ovlivněna (viz Obr. 3.5). Bohužel stříbrné nanočástice nejsou pro použití v buňkách vhodné, protože vykazují baktericidní vlastnosti.



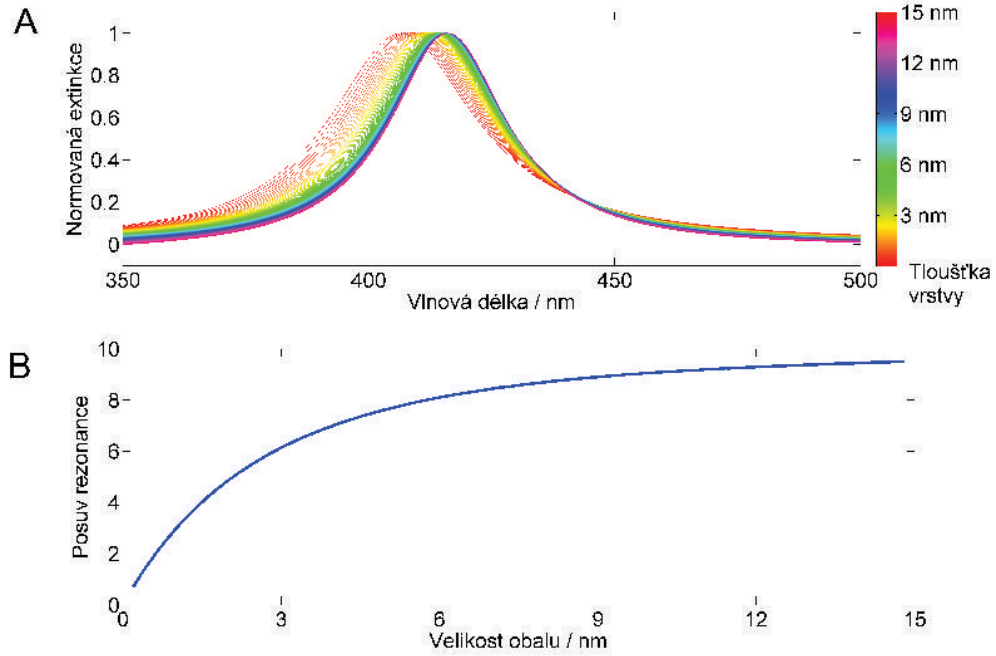
Obr. 3.2: Extinkční spektrum 15nm zlaté nanočástice obalené různě tlustou vrstvou o dielektrické funkci $\varepsilon^{(\mathrm{m})} = 2$ umístěné ve vodném prostředí. Extinkční maximum se posouvá a mění se intenzita.



Obr. 3.3: Simulované normované extinkční spektrum 15nm zlaté nanočástice obalené různě tlustou vrstvou o dielektrické funkci $\varepsilon^{(\mathrm{m})} = 2$ umístěné ve vodném prostředí. Z křivek je patrné, že maximum extinkce se posouvá s rostoucí tloušťkou monovrstvy do větších vlnových délek.



Obr. 3.4: Posuv rezonanční frekvence vlivem obalení nanočástice vrstvou o $\varepsilon^{(\mathrm{m})} = 2$ vypočítaný z modelu.



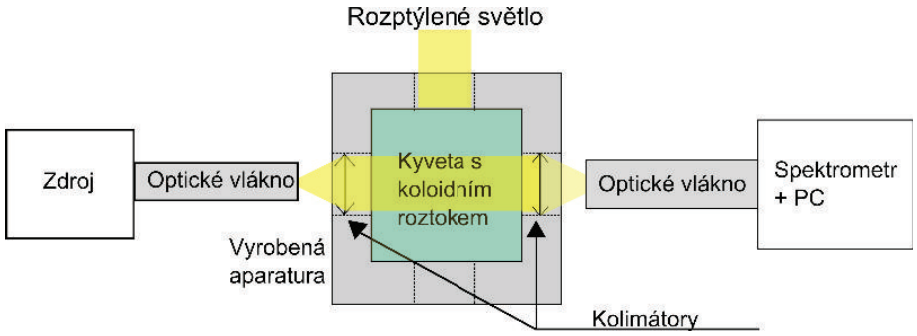
Obr. 3.5: Simulované normované extinkční spektrum 15nm stříbrné nanočástice obalené vrstvou o $\varepsilon^{(\mathrm{m})} = 2$ (A). Posuv rezonanční frekvence vlivem obalení vypočítaný z modelu(B).

3.2 Měření optických vlastností funkcionalizovaných nanočástic

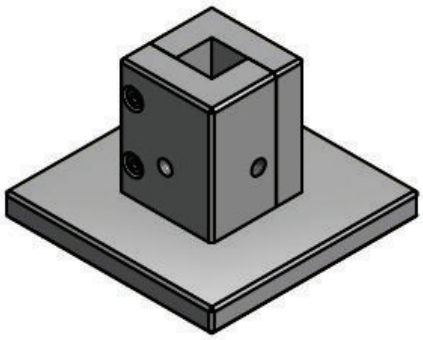
Extinkční spektra nanočástic jsou měřitelná spektrofotometrií, kde extinkce je přímo úměrná absorbanci (viz kap. 5).

Aparatura na měření

Pro experimenty jsem v rámci řešení projektu IMPI[2] navrhl a sestavil jednoduchý přípravek na měření spektrofotometrie koloidních roztoků, jehož schéma je na Obr. 3.6. Celou aparaturu lze použít nejen na měření prošlého světla, ale také i na měření intenzity rozptýlené na nanočásticích pod úhlem 90°. Nákres této aparatury je na Obr. 3.7. Tato aparatura je nyní využívána pro optická měření nejen koloidních roztoků kovových nanočástic, ale i jiných materiálů (např. uhlíkových nanotrubiček).



Obr. 3.6: Schema měření na vyrobené aparatuře.



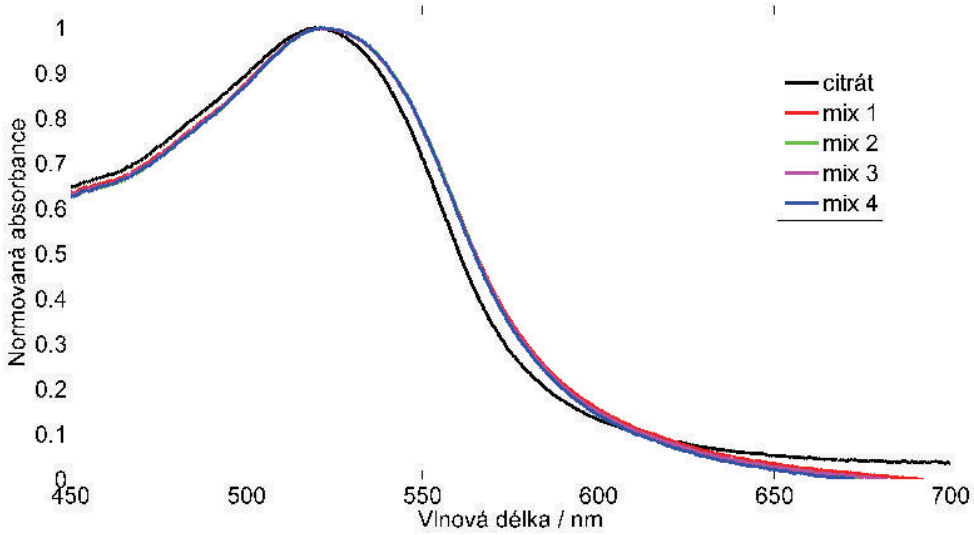
Obr. 3.7: Nákres vyrobeného přípravku. Uprostřed je místo pro kyvetu a z kyvetového prostoru vedou čtyři otvory se závitem pro kolimátory. Po vložení kyvety se aparatura ještě přiklopí krytem, který odstiňuje okolní světlo.

3.2.1 Experimenty

Na ověření modelu uvedeného v kapitole 3 jsem proměřil funkcionalizované zlaté 15nm nanočástice. Podle postupu popsaného v kapitole 2.5 jsem připravil 4 roztoky nanočástic funkcionalizovaných mixovanou DNA-3/TOEG-6 monovrstvou. Jako

[2]Inovace mezioborového studia přírodních věd a inženýrství - viz http://physics.fme.vutbr.cz/impi/ .

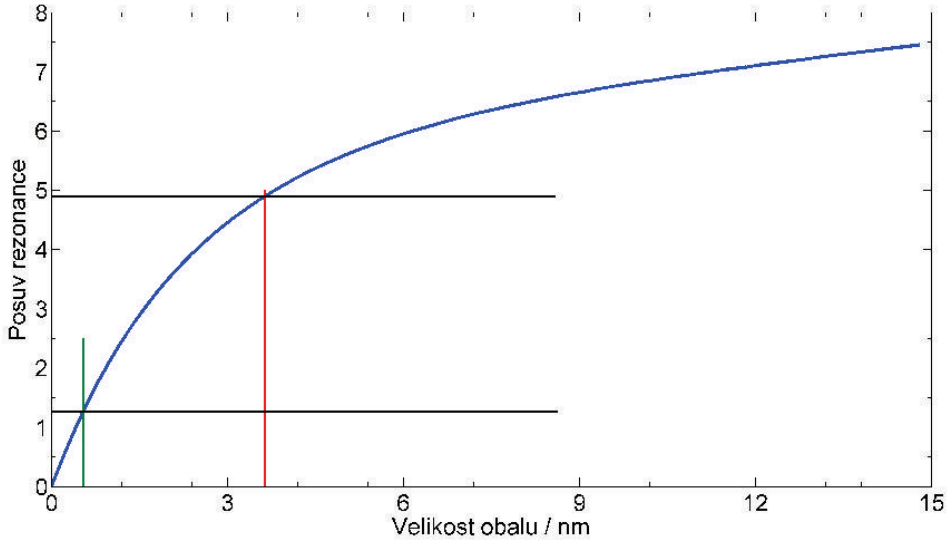
pátý, referenční, roztok jsem použil nanočástice pokryté citrátem (takto byly zakoupeny). Tyto roztoky jsem napipetoval do jednotlivých kyvet a proměřil na aparatuře. Výsledná spektra jsou vyobrazena na Obr. 3.8. Ve spektrech je patrný posuv extinkčního maxima nanočástic se zvětšením obalu. Všechny čtyři roztoky nanočástic s mixovanou monovrstvou mají téměř identický průběh absorbance a maximum tototo píku se nachází na (522,0 $\pm$ 0,3) nm. Nanočástice obalené citrátem mají maximum na kratší vlnové délce - (520,1 $\pm$ 0,3) nm. Posuv rezonančního maxima je tedy (1,9 $\pm$ 0,6) nm.



Obr. 3.8: Spektrofotometrické měření roztoků zlatých nanočástic obalených citrátem (citrát) a mixovanou DNA-3/TOEG-6 monovrstvou. V normovaných absorbančních spektrech lze vidět posuv maxima rezonance díky změně obalu nanočástice. Jde také vidět dobrou shodu všech čtyř roztoků s mixovanou monovrstvou na povrchu nanočástic.

Abych mohl porovnat model s experimentem, potřebuji znát velikosti molekul, které se v obalové monovrstvě nanočástice nacházejí. Citrátová molekula obsahuje 6 atomů uhlíku, z toho pět navázaných v hlavním řetězci a jeden v řetězci postranním. Podle [28] by měl tento řetězec mít délku cca 0,55 nm. Molekula TOEG-6 je mnohem větší - jedenáctiuhlíkový řetězec a hexa(ethylen glykol). Tato molekula by podle [17] měla dosahovat délky okolo 3,64 nm. Molekula použité jednovláknové DNA má délku 38 bází, tzn. při délce 0,3 nm na jednu bázi je délka této molekuly 11,4 nm. S touto délkou ale nebudu počítat, protože jednovláknová DNA je velice flexibilní a ve vzpřímeném stavu se nachází jen v dvoušroubovici.

Z modelu vychází pro změnu velikosti obalu z 0,55 nm na 3,64 posunutí maxima ve spektru o 3,6 nm, jak je zobrazeno na Obr. 3.9.



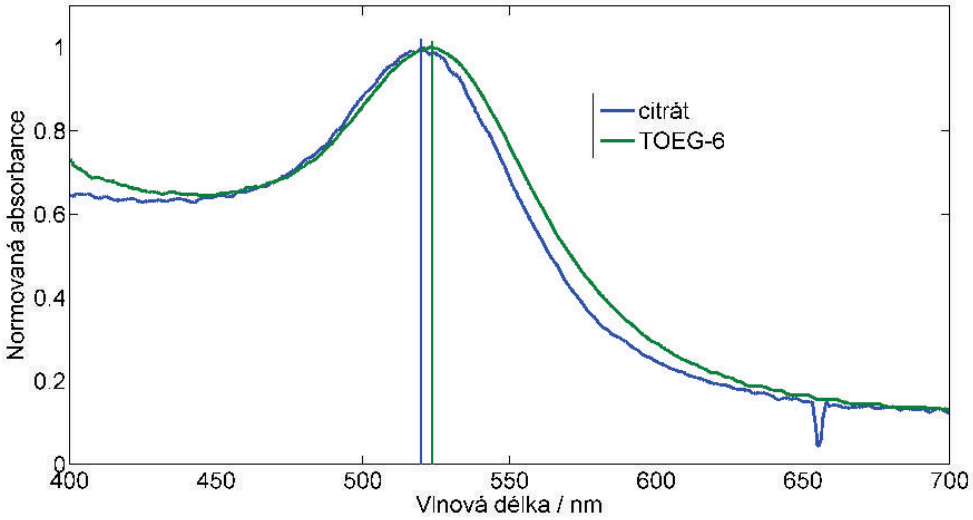
Obr. 3.9: Model posuvu extinkčního maxima v závislosti na velikosti obalu o $\varepsilon^{(m)} = 2$. Červeně je vykreslena velikost citrátového obalu (0,55 nm [28]) a zeleně velikost vrstvy z molekul TOEG-6 (3,64 nm [17]), které udávají velikost kompaktní monovrstvy.

Ve srovnání vychází v modelu posun extinkčního maxima o 3,6 nm a z experimentu (1,9 ± 0,6) nm. To může znamenat, že mixovaná monovrstva není kolem nanočástice tak kompaktní, a tudíž dielektrická funkce obalu je nižší než předpokládaná. Na nekompaktnost vrstvy může mít vliv délka jednovláknové DNA, která je přibližně 3x delší než molekula TOEG-6. Jelikož je molekula velice flexibilní, může docházet k tomu, že v monovrstvě nebude vhodně orientována a tudíž monovrstva nebude tak kompaktní. Dalším faktorem může být také orientace molekul na povrchu nanočástic. Na rovných površích se molekuly TOEG-6 mají tendenci orientovat pod úhlem, což snižuje tloušťku monovrstvy zhruba o třetinu. Kdyby se takto orientovaly i na povrchu nanočástic, pak by z modelu vycházel posuv extinkčního maxima o 2,66 nm. Dalším možným vysvětlením je nesprávně odhadnutá dielektrická funkce obalu v modelu.

Abych si ověřil, zda molekula DNA snižuje hodnotu dielektrické funkce obalu oproti molekule TOEG-6, tak jsem provedl experimenty s nanočásticemi obalenými pouze molekulami TOEG-6. Ze získaných spekter (Obr. 3.10) jsem odečetl pozice maxim. Pro citrátem pokryté nanočástice se absorbanční maximum nachází na (520,2 ± 0,3) nm a maximum nanočástic funkcionalizovaných molekulou TOEG-6 se nachází ve vlnové délce (523,6 ± 0,3) nm. Pozorovaný posuv byl tedy (3,4 ± 0,6) nm. Tato hodnota už odpovídá modelu.

Tyto výsledky naznačují, že molekula DNA v monovrstvě snižuje dielektrickou funkci monovrstvy. Zároveň tyto experimenty ukázaly, že kvazistatická aproximace

s radiační korekcí je velice dobrým přiblížením experimentálních výsledků.



Obr. 3.10: Spektrofotometrické měření nanočástic obalených citrátem ve srovnání s nanočásticemi funkcionalizovanými molekulami TOEG-6. Opět je zřetelný posuv extinkčního maxima po vytvoření objemnějšího obalu okolo nanočástic. Ve spektru citrátem obalených nanočástic je vidět okolo 655 nm artefakt a celé spektrum je trochu zašuměné, ale na tendenci a polohu maxima křivky to vliv nemá.

4 PLAZMONICKÉ STRUKTURY PRO DETEKCI BIOMOLEKUL

O možnosti použití plazmonických struktur pro detekci biomolekul jsem již psal ve své bakalářské práci [3]. V práci jsem zmínil možností použití LSPR[1] senzorů na detekci antigenů, protilátek nebo jiných biomolekul. Tyto senzory jsou řešeny pomocí plazmonického rezonátoru na povrchu. Většinou se využívá křemík nebo sklo, ale jsou také snahy o vyrobení těchto struktur na nanokrystalickém diamantu (NCD). Plazmonické struktury se nejčastěji vyskytují v podobě antén a dimérů antén. Nejjednodušším typem takové antény je obdélník případně dva obdélníky oddělené tenkou mezerou dosahující maximální délky několika desítek nanometrů. Čím je tento „gap“ menší, tím dochází k většímu zesílení elektromagnetického pole uvnitř mezery mezi oběma raménky rezonátoru. Při detekci biomolekul se největší citlivosti takovéhoto senzoru dosahuje tím, že se cílová molekula přivede do této mezery a nejvíce ovlivní vlastnosti rezonátoru. Bohužel navádění biomolekul do tohoto „gapu“ není jednoduché a tyto molekuly adsorbují i na jiná místa kovových nanostruktur. Proto jsem v rámci diplomové práce studoval optické vlastnosti pouze jednotlivých antén.

Zajímavou práci v oblasti, kterou i na Ústavu fyzikálního inženýrství v blízké budoucnosti budeme chtít minimálně zopakovat, publikoval vědecký tým z Barcelony [29]. Využívají plazmonické antény k detekci rakovinných markerů v séru. Detekce markerů chorob či mikrobiálních toxinů bez jakéhokoliv značení je podle mě správná cesta, kterou by se oblast detekce biomolekul měla ubírat.

V tomto článku ukazují změnu rezonanční vlnové délky v závislosti na pokrytí antény. O něco podobného jsem se pokoušel již ve své bakalářské práci za pomocí metody infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), ale experimentů bylo jen malé množství a byly spíše na otestování optických vlastností antén. V této práci se více zabývám detekcí biomolekul na plazmonických strukturách a rád bych srovnal dosažené výsledky s článkem [29] a vyvodil z toho výsledky, které by měly být základem pro další směřování detekce biomolekul na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně.

Experimentální část této kapitoly rozdělím do dvou částí - detekce pomocí FTIR a pomocí jiných optických měření.

[1] Z anglického Localized Surface Plasmon Resonance - Lokalizovaná plazmonová rezonance

4.1 Srovnání povrchů a antén

Existují dvě metody pro detekci biomolekul. Jedna je založená na propagaci povrchových plazmových polaritonech (SPP) a druhá na lokalizované plazmonové rezonanci (LSPR). Jelikož obě metody zkoumají změnu efektivního indexu lomu, můžeme se na jejich citlivost podívat z tohoto hlediska. Změna indexu lomu je dána hloubkou průniku (l_d) a tloušťkou vrstvy biomolekul (d_b) takto [30]:

$$\Delta n_\mathrm{ef} = \Delta n \left(1 - e^{-d_\mathrm{b}/l_\mathrm{d}}\right) \approx \frac{d_\mathrm{b}}{l_\mathrm{d}} \Delta n, \tag{4.1}$$

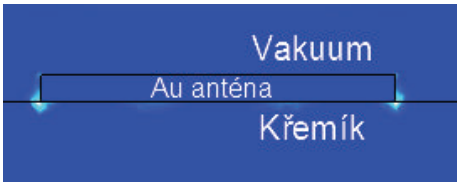
kde $\Delta n = n_\mathrm{a} - n_\mathrm{r}$ je kontrast mezi analytem (vrstvě biomolekul) a rozpouštědlem (např. vodou). Aproximace platí, pokud $d_\mathrm{b} \ll l_\mathrm{d}$. Tato podmínka je pro typické plazmonické senzory splněna, protože typická hloubka průniku je cca $20 - 40$ nm a tloušťka vrstvy biomolekul je typicky velká několik nanometrů. Z rovnice 4.1 je zřejmé, že čím menší bude l_d, tím bude větší změna efektivního indexu lomu. Díky tomu, že objemová senzitivita i hloubka průniku je pro SPP senzory o řád větší než u LSPR, můžeme očekávat podobné výsledky u obou senzorů. Toto bylo potvrzeno v [31]. Navíc zde bylo poukázáno na to, že pokud se vhodným způsobem upraví hloubka, mohou LSPR senzory být citlivější. Na druhou stranu jsou LSPR senzory obtížnější na přípravu a musí se řešit pasivace subrstrátu. Výhody LSPR senzorů jsou v tom, že mají menší citlivost na objemový index lomu, to znamená, že není potřeba taková tepelná stabilita, dále je to možnost konfigurace experimentů jak v trasmisním, tak reflexním uspořádání. Tohoto se využívá k vytvoření lab-on-chip[2] senzorů. Proto se v této práci zabývám užitím plazmonických antén jako LSPR senzorů.

4.2 Plazmonické struktury v infračervené oblasti

Infračervená (IR) oblast záření ($0{,}78 - 1000$ μm) se ve spektroskopii využívá na zjišťování chemického složení látek. Při průchodu látkou se infračervené světlo pohlcuje a budí různé rotačně-vibrační energetické stavy molekul. K tomu je zapotřebí, aby molekula měla minimálně jednu vazbu, která je alespoň slabě polární. To znamená, že látka obsahuje různé atomy ve své molekule. Při pohlcení energie elektromagnetického záření dochází ke změně dipólového momentu molekuly. Vibračně-rotační přechody se nacházejí ve střední infračervené oblasti (MIR $2{,}5 - 25$ μm) a vyšší harmonické frekvence těchto přechodů se nacházejí v blízké IR oblasti (NIR $0{,}78 - 2{,}5$ μm). V této oblasti plazmonické struktury mají rezonanci podle vztahu uvedeného v mé bakalářské práci [3]: $\lambda_\mathrm{rez} = 2\, l\, n_\mathrm{ef}$, kde l je délka antény a

[2] Anglický název pro laboratoř na čipu

n_{ef} je efektivní index lomu v okolí antény. Efektivní index lomu je v případě zlaté antény na křemíku velice podobný indexu lomu křemíku (3,4), protože nejvyšší intenzita pole v okolí antény je právě na rozhraní křemík - anténa - okolní prostředí (Obr. 4.1). Tento efektivní index lomu můžeme snížit podleptáním antény [32] nebo nárůstem nativního oxidu křemíku.



Obr. 4.1: Intenzita elektrického pole v okolí antény. Světlejší oblasti značí větší intenzitu el. pole. Převzato a upraveno z [33].

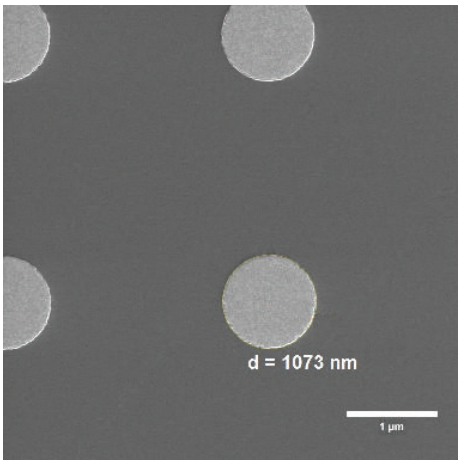
Plazmonické nanostruktury ale zesilují jen část spektra, a proto je potřeba nastavit rezonanci do oblasti, kde zkoumané molekuly mají povolené vibrační přechody. Tohoto efektu se využívá u povrchově zesílené infračervené spektroskopie (SEIRA - Surface Enhanced InfraRed Absorption).

Antény pro MIR oblast mají typicky mikrometrové rozměry, a proto je jejich hloubka průniku velká. To znamená, že změna efektivního lomu bude malá (viz rovnice 4.1). Díky tomu bude posuv rezonanční vlnové délky nezaznamenatelný. Jedinou vhodnou metodou detekce biomolekul je tedy již zmiňovaná SEIRA.

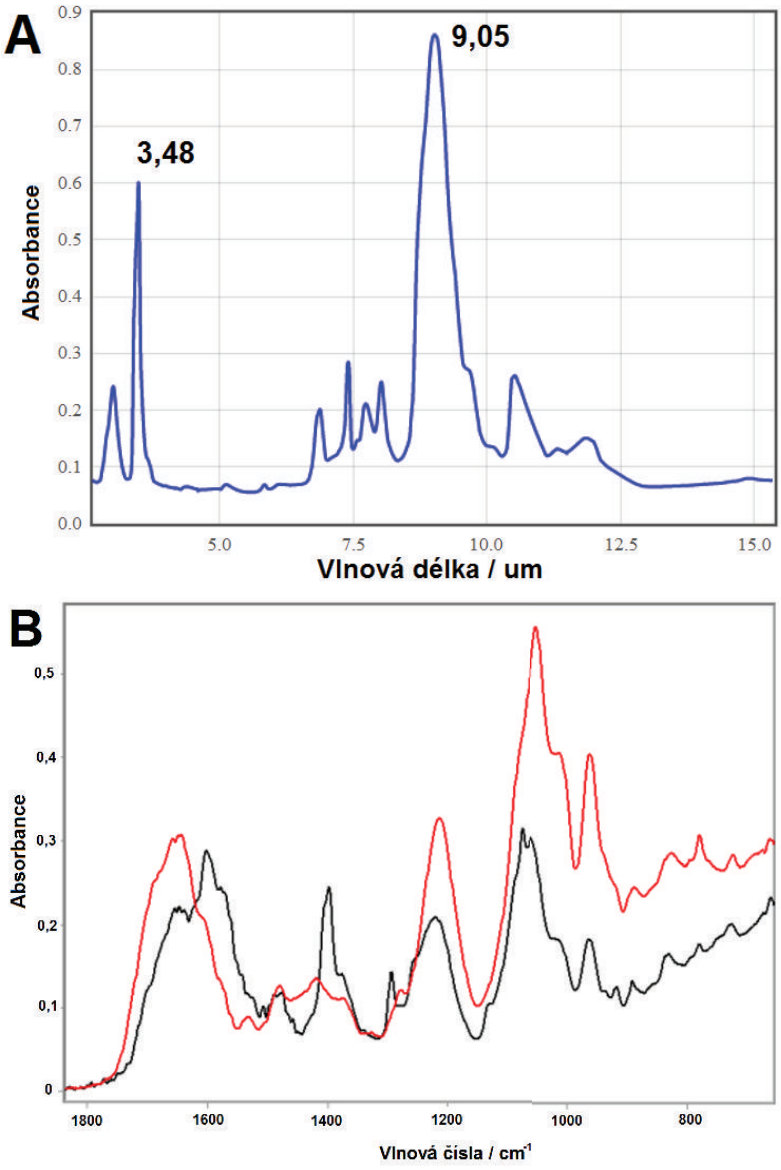
4.2.1 Měření infračervené spektroskopie

Pro experimenty byly využity antény vyrobené ve spolupráci s Bc. O. Metelkou. Pro experimenty byla připravena velká škála rozměrů antén i různé tvary (disky, obdélníky). Pro demonstraci výsledků jsem vybral zlaté disky o průměru 1 μm na křemíku (Obr. 4.2). Tato anténa má příhodnou délku pro pozorování vibračních stavů molekul DNA.

Tyto antény jsem funkcionalizoval mixovanou ssDNA/TOEG-6 monovrstvou podle stejného postupu jako v kapitole 2.3. Ve vibračním spektru jsem tak očekával jak vibrační stavy molekul DNA, tak molekul TOEG-6. Vibrační spektra obou molekul jsou vidět na Obr. 4.3.

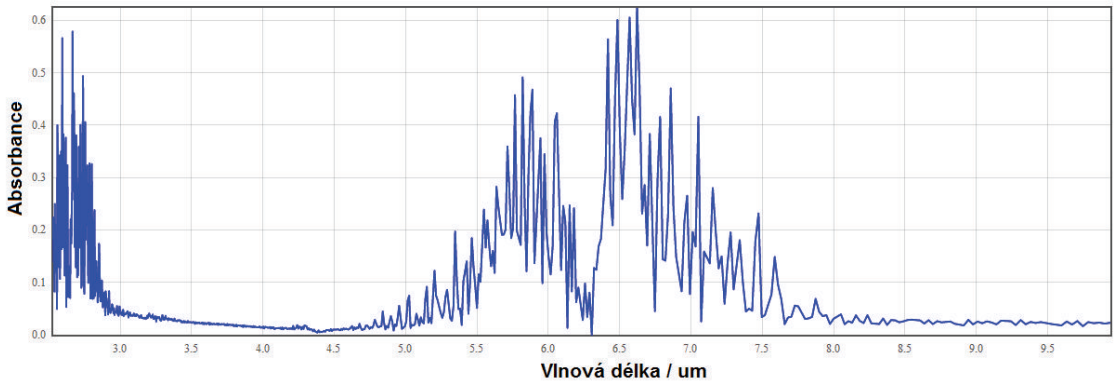


Obr. 4.2: Snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu jedné z antén použitých při experimentech. Snímek byl pořízen O. Metelkou.



Obr. 4.3: Absorpce molekul poly(etylen glykolu) (A), molekul jednovláknové DNA (B - červená) a dvouvláknové DNA (B - černá). Obrázky převzaty a upraveny z [34], respektive z [35].

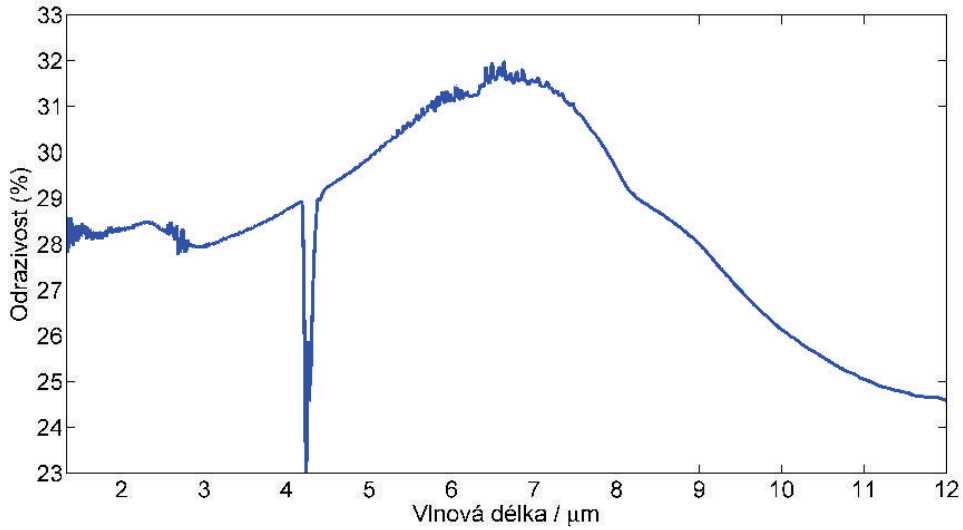
Bohužel můžeme vidět, že většina absorpce molekul DNA je zrovna v oblasti, kde má absorpci voda (Obr. 4.4) a v těchto místech je velice těžké něco identifikovat.



Obr. 4.4: Absorpční spektrum vodních par v infračervené oblasti. Převzato a upraveno z [34].

Píky, které tedy můžeme ve FTIR spektru identifikovat z molekuly DNA jsou píky nacházející se na 1050 $cm^{-1} \approx 9{,}534$ μm a 962 $cm^{-1} \approx 10{,}395$ μm a z molekuly TOEG-6 je nejvýraznější pík na 9,050 μm případně 3,478 μm.

V experimentu jsem bohužel žádné takovéto píky nenašel na žádném vzorku, ať už jsem měnil velikost antény, tvar či jsme zkoušeli antény podleptat. Pro ilustraci uvedu pouze spektrum nepodleptaných 1μm zlatých disků na křemíku. Ve spektru těchto antén (Obr. 4.5) můžeme vidět vibračně-rotační píky vodních par v oblasti $5 - 7{,}5$ μm. Dále se ve spektru nachází pík od CO_2 kolem 4,25 μm. Ve spektru se ještě v oblasti okolo 2,75 μm se nachází absorpční píky od Si-O-H vazby a na začátku spektra pod 2 μm podléhá spektrum rušivým vlivům díky optice. Žádné další píky se ve spektru nenachází, což vyvrací přítomnost jakékoliv monovrstvy na povrchu antén. Bohužel se mi nepodařilo zvládnout techniku povrchově zesílené infračervené spektroskopie, protože jsem v žádném v z naměřených spekter nenašel vibračně-rotační píky od molekul ssDNA nebo TOEG-6, které byly na povrch antén navázány. Tento neúspěch může být způsoben nedostatečně dlouho odebíranými spektry, což je ale velmi nepravděpodobné díky zesílení pole v oblastech absorpce. Dalším možným důvodem neúspěchu může být vystavení vzorku kyslíkovému plazmatu před samotnou funkcionalizací. I když byla použita různá nastavení složení plazmatu (25 % O_2 i 75 % O_2), byl výsledek stejný až na velikost píku okolo 2,75 μm, což je způsobeno nárůstem silnější vrstvy nativního oxidu. Expozice v plazmatu způsobí růst oxidu na povrchu mezi antenami. Oxid tak roste i v blizkosti anten, kde antény nejvíce zesilují elektriské pole (Obr. 4.1). Zesílení signálu od biomolekul je tak nevýrazné a ve spektru se vibračně-rotační absorpční píky téměř neprojeví. Nepřítomností molekul ssDNA a TOEG-6 to být nemůže, protože byla na vzorcích



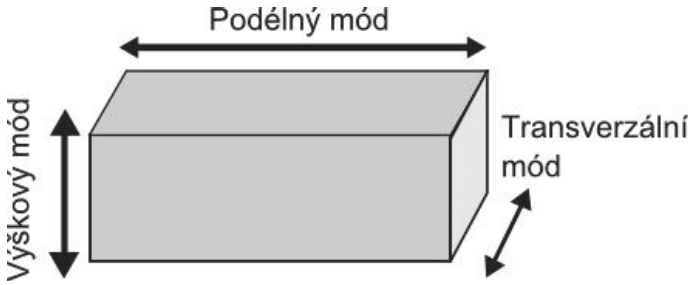
Obr. 4.5: Spektrum získané pomocí FTIR spektroskopie. V oblasti $5-7{,}5$ μm se nachází vibrační píky od vodních par, okolo 4,25 μm se nachází pík od molekuly CO_2. V okolí 2,75 μm se nachází absorpce Si-O-H vazby.

provedena analýza pomocí metody XPS (podobná jako v kap. 2.6.3), která přítomnost obou těchto molekul na vzorku potvrdila.

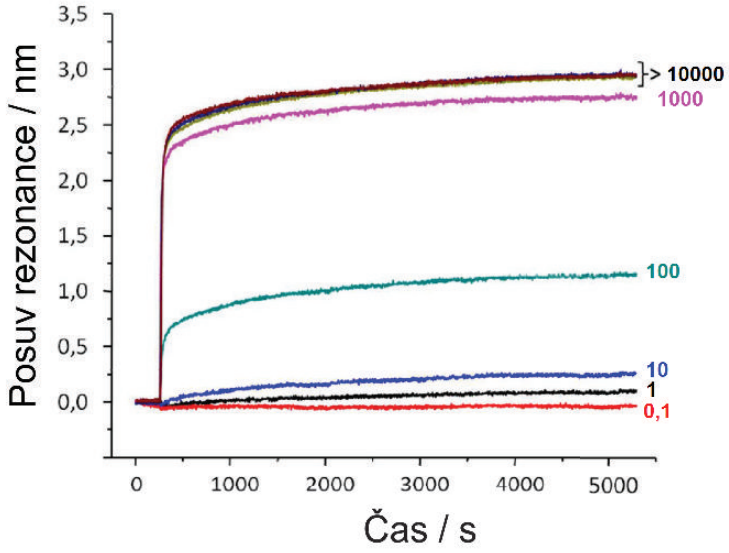
4.3 Plazmonické struktury v optické oblasti

Optická oblast ($400-780$ nm) je již z hlediska absorpcí molekul nevýznamná. Pokud se ale s rezonancí plazmonických struktur dostaneme do optické oblasti, ještě více se sníží hloubka průniku oproti IR oblasti. Pak z rovnice 4.1 vyplývá ještě větší změna efektivního indexu lomu. Větší změna efektivního indexu lomu již dává možnost sledovat posuvy rezonančních vlnových délek struktur.

V již zmiňovaném článku [29] byly sledovány změny efektivního indexu lomu v okolí antén s rezonancí na vlnové délce 800 nm v podélném a na 680 nm v transverzálním módu (viz Obr. 4.6). Tyto antény mají rozměr 200×105 nm a 50 nm na výšku a byly vyrobeny na skle. Pro experimenty byl vybrán podélný mód s rezonancí na vyšší vlnové délce. Pro první monovrstvu na anténách byly vybrány biotinylované molekuly TOEG-6 a detekován byl posuv rezonance díky navazování molekul streptavidinu na tuto monovrstvu. Pro různé koncentrace streptavidinu od 1 ng/ml do 10 μg/ml byl detekován posuv rezonanční vlnové délky antény v rozsahu od 0,1 do 3 nm podle koncentrace (viz Obr. 4.7).



Obr. 4.6: Na plasmonické anténě obdélníkového typu se dají vybudit 3 základní rezonanční módy. Podélný, transverzální a výškový. Při kruhových anténách podélný a transverzální módy splývají.

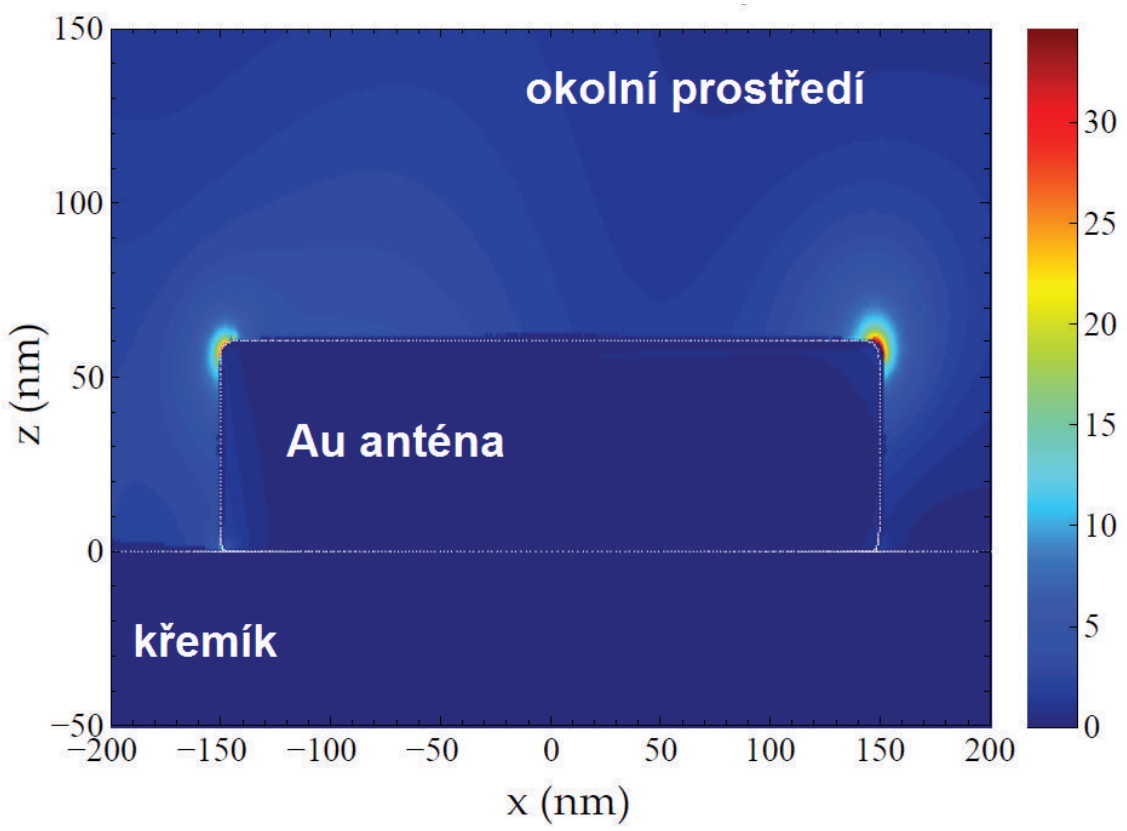


Obr. 4.7: Detekce posuvu rezonanční vlnové délky v reálném čase. Čísla napravo značí koncentraci streptavidinu v ng/ml. Převzato a upraveno z [29].

Podobné měření opakují ještě s jinými typy a velikostmi biomolekul. Podle mého názoru rezonance v podélném módu (větší hloubka průniku) byla zvolena proto, že experimenty byly primárně směřovány k detekci rakovinných markerů, kde po navázání na detekční monovrstvu na anténkách má celá tato struktura $10 - 15$ nm. Pro experiment s biotinylovanými molekulami TOEG-6 a streptavidinem by bylo kvuli zvýšení citlivosti vhodné zkusit v transverzálním nebo výškovém módu. Tuto citlivost předvedu na experimentu, který jsem provedl ve spolupráci s Ing. Petrem Dvořákem.

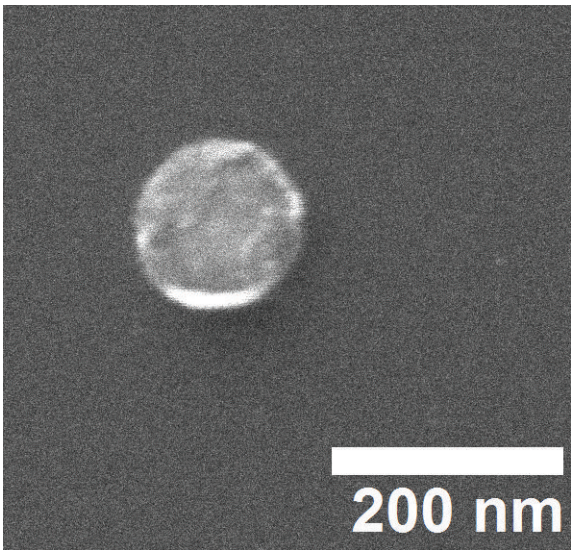
4.3.1 Měření antén v optické oblasti

Pro experimenty v rámci této části diplomové práce jsem použil zlaté antény na křemíkovém substrátu vyrobené ve spolupráci s O. Metelkou. Díky simulacím Ing. Martina Hrtoně bylo zřejmé, že by se tyto antény, byť by měly jakkoliv malé rozměry, podélným ani transverzálním módem do optické oblasti nedostaly díky vlastnostem křemíku. Bohužel pro experiment nebyly dostupné ani antény na skle, a tak jsem zvolil jiný přístup. Ten spočíval v měření výškových módů antény (Obr. 4.6), které jsou vybuditelné v uspořádání měření v temném poli. Tento mód je daleko méně ovlivněn substrátem, protože intenzita elektrického pole je největší na horních rozích antény (viz Obr. 4.8).



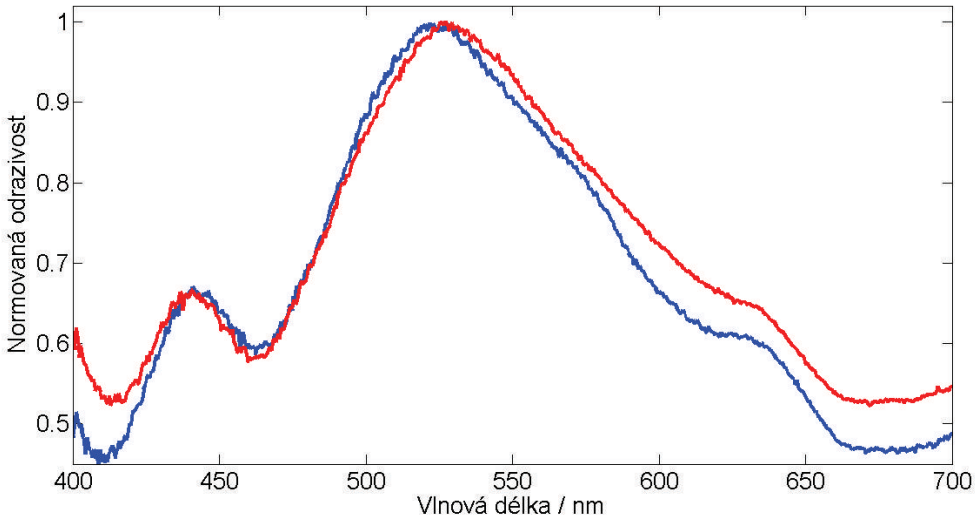
Obr. 4.8: Rozložení intenzity elektrického pole při vybuzeném výškovém módu plazmonické rezonance antény. Nejvyšší intenzita se nachází v horních rozích antény, a proto rezonance je daleko méně ovlivněna substrátem (křemíkem) ve srovnání s podélným či transverzálním módem zobrazeného na Obr. 4.1. Simulace byla provedena Ing. Martinem Hrtoněm.

Ve spolupráci s Ing. Petrem Dvořákem jsem proměřil jsem cca 10 různých velikostí a tvarů antén. Pro demonstraci výsledků jsem zvolil kruhové zlaté antény s poloměrem 167 nm a výškou cca 60 nm na křemíkovém substrátu (Obr. 4.9), ale výsledky všech ostatních vzorků byly velice podobné. Tyto antény jsem před



Obr. 4.9: Snímek kruhových antén použitých v experimentu pořízený na rastrovacím elektronovém mikroskopu LYRA3 O. Metelkou.

samotným měřením nechal v 25% kyslíkovém plazmatu a ofoukl dusíkem. Ihned po změření spektra čistých antén jsem celý vzorek ponořil do 300μM roztoku TOEG-6. Po 30 minutách jsem vzorek vytáhl, omyl, osušil dusíkem a změřil znovu. Spektra získaná pomocí spektroskopie v temném poli jsem zobrazil na Obr. 4.10.



Obr. 4.10: Naměřené spektrum pole kruhových antén s výškou 60 nm a poloměrem 167 nm. Spektrum bylo měřeno v konfiguraci temného pole, aby se vybudil výškový mód antén.

Spektru dominuje pík od výškového módu plazmonické rezonance antény okolo 523 nm. Ve vykreslených datech se ještě objevují další píky. Jeden okolo 440 nm a

druhý v oblasti okolo 635 nm. Ten první by mohl být některý z vyšších harmonických frekvencí podélného módu antény či jinak korespondovat s velikostí antény. Druhý pík, okolo 635 nm, by mohl souviset s nerovnostmi na povrchu antény. Někdy se totiž stane, že v průběhu procesu přípravy antén se vytvoří po obvodu antény „hradba“. Zde je ale intenzita tohoto píku tak malá, že můžu říci, že se hradba na těchto anténách téměř nevyskytovala.

Pro detekci biomolekul v optické oblasti je rozhodující posuv rezonanční vlnové délky plazmonické nanostruktury. V naměřených datech je tento posuv velice dobře viditelný. Rezonance se po funkcionalizaci molekulami TOEG-6 posouvá z vlnové délky $(522{,}9 \pm 0{,}3)$ nm na vlnovou délku $(527{,}8 \pm 0{,}3)$ nm. Jedná se tedy o posuv o $(4{,}9 \pm 0{,}6)$ nm.

Ve srovnání s [29] je posuv rezonanční vlnové délky větší. To ale může být způsobené tím, že v článku byly experimenty prováděny v průtočné komůrce, tudíž okolní médium nebyl vzduch, ale voda, která má index lomu bližší indexu lomu monovrstvy. Na druhou stranu byly v této publikaci na tuto vrstvu ještě pomocí biotinylovaného konce vázány molekuly streptavidinu. Bohužel jsem tento postup neměl možnost vyzkoušet, protože jsem biotinylované molekuly TOEG-6 neměl k dispozici. Nicméně jsou výsledky z měření velice povzbudivé a věřím, že výškové módy antén v oblasti senzoriky najdou své uplatnění už jen z toho důvodu, že se nachází v optické oblasti.

5 METODY POUŽITÉ V PRAKTICKÉ ČÁSTI

5.1 Dynamický rozptyl světla

Při rozptylu koherentního světla na částicích dochází k interferenci rozptýleného světla. Navíc, pokud se částice pohybují Brownovým pohybem, je tato interference časově závislá. Výsledkem interference je fluktuace intenzity rozptýleného záření okolo průměrné hodnoty intenzity. Vztah mezi průměrem intenzity v čase $(t + \tau)$ a v čase t se nazývá korelační funkce, která říká, jak moc jsou na sobě tyto veličiny závislé. Při velkém τ (zpoždění) jsou $I(t)$ a $I(t + \tau)$ na sobě nezávislé, zatímco při velmi krátkém zpoždění na sobě závislé jsou. V případě kulovitých částic stejných velikostí lze korelační funkci vyjádřit v jednoduchém exponenciálním tvaru:

$$g(\tau) = exp(-\tau/\tau_c),$$

kde parametr τ_c je přímo úměrný difúznímu koeficientu D částic podle:

$$\tau_c = \frac{1}{2} DQ^2,$$

kde Q je vlnový vektor.

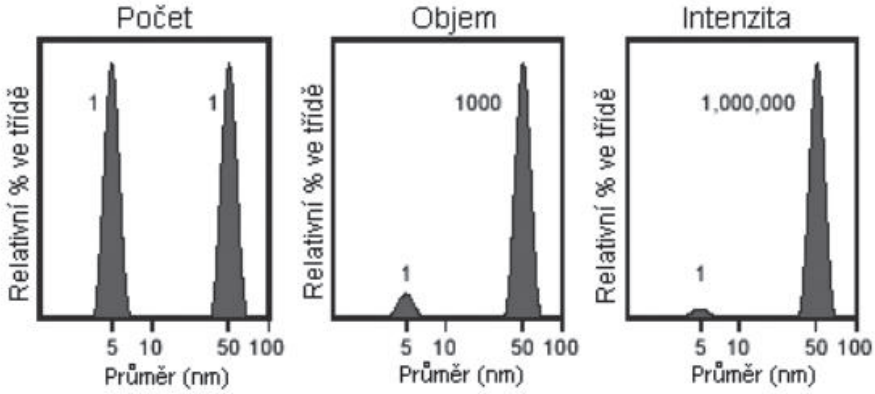
Hydrodynamický poloměr částic R_{H} je, za použití Stokesovy-Einsteinovy rovnice pro difúzní koeficient ($D = \frac{kT}{6\pi\eta a}$), dán vztahem:

$$R_{\mathrm{H}} = \frac{kT}{6\pi\eta} Q^2 \tau_c$$

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) je v současné době široce používána pro stanovení velikosti koloidních částic. Obvykle jsou výsledky v dobré shodě s výsledky elektronového mikroskopu, který ale při použití elektronů s velkou energií neregistruje naadsorbovanou vrstvu na povrchu částic nebo dochází ke změně solvatačního obalu díky vysoušení. V případě polydisperzních systémů má korelační funkce složitější formu a obtížně se vyhodnocuje. Průměrná velikost koloidních částic je vážena podle páté mocniny velikosti (tzv. Z-average), takže velké částice jsou v této hodnotě silně nadhodnoceny a dokonce se může u některých přístrojů stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích (Obr. 5.1). Rozsah metody je oproti sedimentačním metodám jiný - dolní mez se dnes pohybuje okolo 0,5 nm a maximální pak okolo 3 μm (pohyb větších nanočástic je již významně ovlivněn jinými fyzikálními vlivy) [36].

Přístroj Zetasizer NanoZS, který jsem využil ve své diplomové práci, využívá technologie neinvazivního zpětného rozptylu (NIBS - Non-Invasive Backscatter), který měří rozptyl pod úhlem 178°, používá HeNe laser (λ = 633 nm) a jako detektor využívá lavinovou fotodiodu (Q.E. > 50 % při 633 nm).

Tuto metodu jsem použil ke stanovení velikosti částic a také k testu stability a specifity v kapitole 2.



Obr. 5.1: Grafy znázorňující intenzity píků při různém vykreslení téhož rozdělení částic, tzn. jedna částice s průměrem 5 nm a jedna s průměrem 50 nm. Z grafů jde vidět, že při intenzitním vykreslení jdou nejvíce vidět velké částice a pokud chceme získat informaci o počtu nebo objemovém zastoupení částic, musíme použít jiný typ vykreslení výsledku. Pokud chceme poukázet na to, že v roztoku nejsou velké nebo shluklé nanočástice, nejlépe nám proto poslouží intenzitní či objemové vykreslení výsledku. Převzato z [37].

5.2 Spektrofotometrie

Spetrofotometrie se využívá na stanovení vlastnosti roztoků. Většinou se využívá ke stanovení koncentrace rozpuštěných látek v roztoku, které mají v určité oblasti spektra absorbci. V této práci jsem prováděl experimenty s roztoky zlatých nanočástic, které v optické oblasti jak absorbují, tak také rozptylují. V tomto případě se tedy měří změna intenzity světla díky extinkci:

$$\sigma_{\text{ext}} = \sigma_{\text{abs}} + \sigma_{\text{rozpt}}$$
$$\mathrm{d}I = -\sigma_{\text{ext}} c I_0 \mathrm{d}l,$$

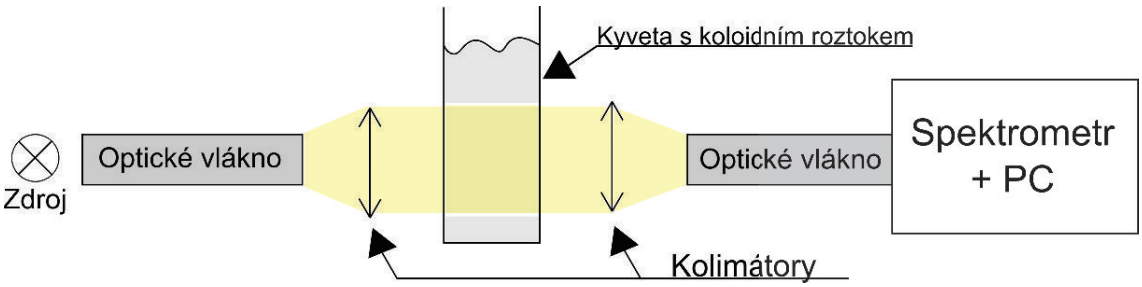
kde σ_{ext} je extinkční koeficient nanočástic, I_0 je intenzita zdroje záření, c je koncentrace částic a l je délka, kterou urazí světlo vzorkem. Po úpravě dostáváme vztah:

$$\frac{I_p}{I_0} = T = \exp(-\sigma_{\text{ext}}\, c\, l),$$

kde T je transmitance a I_p je intenzita prošlého světla. Většina přístrojů ale měří tzv. absorbanci (A), která je pouze záporným logaritmem transmitance. Pokud je délka kyvety konstantní, tak je absorbance přímo úměrná extinkčnímu koeficientu a koncentraci částic:

$$A = -\log T \sim \sigma_{\text{ext}} c$$

V biologii a biochemii jsou extinkční koeficienty měřených biomolekul tabelovány, takže se takto dá jednoduše zjistit koncentrace částic. V této práci jsem modeloval extinkční koeficient nanočástic v kapitole 3, kde uvádím i normovanou extinkci. Ta je přímo úměrná absorbanci, jejíž měření jsem prováděl v kapitole 2 a 3. Schéma měření je zobrazeno na Obr. 5.2



Obr. 5.2: Schéma uspořádání spektrofotometrického experimentu.

5.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie je jednou z nedestruktivních analytických metod. Zkoumaný vzorek není analýzou poškozen, a přesto poskytuje informaci o svém složení. Získané hodnoty vibračních a rotačních energií souvisí s pevností chemických vazeb a také s molekulovou geometrií a hmotnostmi jader, tedy s molekulovou strukturou. Proto je infračervenou spektroskopie vynikající experimentální technika, která hraje důležitou roli při výzkumu molekulové dynamiky, chemických vlastností molekul, vlivu prostředí na studované molekuly a mnoho jiných oblastí. Tato metoda je velice komplexní a více rozvedena je např. v [38]

5.4 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie

Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS) umožňuje získat informace o složení povrchu, a také o vazbách jednotlivých atomů [**?**]. Záření emitované ze zdroje (Mg nebo Al) dopadá na vzorek. Fotony tohoto charakteristického (K_α) záření pronikají do hloubky několika mikrometrů pod povrch vzorku a v celé povrchové oblasti vzorku mohou být absorbovány atomy, které se zde nacházejí. Energie fotonu je předána elektronu na některé z vnitřních hladin atomu. Tento elektron je následně z atomu emitován s kinetickou energií E_k, která je rovna rozdílu energie fotonu a vazebné energie elektronu v atomu. Tyto elektrony mohou vzorek opustit a být detekovány pouze v případě, že pocházejí z atomů blízkých k povrchu (několik nm).

Rozdělení jejich kinetických energií (tzv. fotoelektronové spektrum) se měří hemisférickým analyzátorem spojeným s detektorem. Vazebná energie fotoelektronů vzhledem k Fermiho hladině E_B^F (v případě elektricky vodivého vzorku) je dána vztahem:

$$E_B^F = h\nu - E_\mathrm{k} - \Phi_\mathrm{spec},$$

ve kterém Φ_spec je výstupní práce spektrometru.

Pomocí metody XPS se měří různá vazebná energie vnitřních elektronů. Stejné atomy vázány různě (např. v jiné hybridizaci) nebo v různých oxidačních stavech můžeme pozorovat pomocí posuvů píků. Tento jev označujeme jako chemický posuv. Chemický posuv nám umožňuje rozlišit jak různě vázané atomy téhož prvku, tak i poměrné zastoupení těchto atomů [39]. To je zachyceno například na Obr. 2.13 v kapitole 2.6.3, kde tuto metodu používám.

Při vyhodnocování spekter je potřeba vzít vždy některý z dominantních píků ve spektru (většinou se používá pík uhlíku C 1s, zde byl ale použit zlatý 4d pík) a porovnat ho s tabulkovými hodnotami. Podle tabulkových hodnot je potřeba celé spektrum posunout, abychom dostali správné hodnoty vazebné energie.

5.5 Rozptyl RTG paprsků pod malými úhly

SAXS - Rozptyl RTG paprsků pod malými úhly je nedestruktivní metoda pro vyšetřování velikosti nanostruktur v rozsahu 1 nm až 200 nm. RTG paprsky prochází vzorkem a jsou zde rozptylovány z čehož je možné usuzovat na strukturu zkoumaného vzorku. Výsledky měření SAXS jsou reprezentativní pro celý objem vzorku, SAXS je tedy ideální komplementární metodou k metodě přinášející jen lokální informaci, jakou je elektronová mikroskopie.

V této práci používám metodu SAXS pro charakterizaci nanočástic v kapitole 2.4.

5.6 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronová mikroskopie je založená na detekci částic a záření emitované z povrchů při kontaktu s primárním svazkem elektronů. V primárním svazku mají elektrony energie řádově jednotky až desítky keV a při dobré fokusaci má tento svazek průměr (stopu) o velikosti maximálně jednotek nanometru. Svazek elektronů rastruje po povrchu vzorku a dochází k emisi sekundárních elektronů a RTG záření.

V experimentech využívám detekce sekundárních elektronů v kapitole 2.4 a na sledování nespecifických interakcí v kap. 2.6.3.

5.7 Gelová elektroforéza

Principem metody je pohyb záporně nabitých molekul v gelu v elektrickém poli směrem k anodě. Pomocí gelové elektroforézy můžeme oddělovat molekuly na základě rozdílných rychlostí pohybu molekul v gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekul a přímo úměrné náboji. Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, nejčastěji v gelu tvořeném agarózou či polyakrylamidem. Gel je tvořen složitou sítí polymerních molekul s póry. Agarózový gel se připravuje v různé hustotě (udávané v % práškové agarózy). Agaróza se rozpouští v pufru, který je také obsažen v elektroforetické vaně jako elektrolyt (použit TBE pufr obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA). Vzorky se nanáší do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. hřebínku. Zatížení molekul (aby klesly do jamky v gelu) je zajištěno například přidáním tzv. nanášecího neboli vkládacího pufru, který je tmavě zbarvený a je tak umožněna kontrola vložení molekul do příslušné jamky a také migrace v gelu. Metodu používám v kapitole 2 pro ověření přítomnosti ssDNA v mixované monovrstvě na nanočásticích. V experimentech byl použit 1% agarózový gel s 10mM HEPES, pH 7,6. Do jamek byly napipetovány koncentrované nanočástice smíchané s 25% glycerolem. Gelová alektroforéza proběhla v 10mM HEPES pufru při napětí 70 V.

Po ukončení elektroforézy již není nutné s gelem nic dělat, protože nanočástice byly naneseny velice koncentrované a jeví se v gelu jako červené.

6 ZÁVĚR

V první části této práce jsem se zaměřil na stabilizaci koloidních roztoků funkcionalizovaných zlatých nanočástic. Nejčastěji jsou používány zlaté nanočástice funkcionalizované jednovláknovou DNA. V literatuře se ale nevyskytuje žádný jednoduchý a rychlý návod na přípravu těchto nanočástic, které by se neshlukovaly při koncentraci NaCl větší něž 300 mM. Postupy, které stabilitu nad tuto koncentraci zaručují, jsou zdlouhavé (řádově dny). Výsledkem první části této práce je postup vytvoření stabilních nanočástic funkcionalizovaných jednovláknovou DNA za méně než dvě hodiny. Stability nanočástic bylo dosaženo přidáním sterického stabilizátoru 11-merkaptoundecylhexa(ethylen glykolu) - pracovní název TOEG-6. Jednovláknová DNA a molekula TOEG-6 spolu vytváří na nanočásticích mixovanou monovrstvu, která si zachovává funkčnost díky molekule DNA a navíc molekula TOEG-6 tuto monovrstvu uspořádává, brání shlukování nanočástic a také omezuje nespecifické interakce jak s ostatními nanočásticemi, tak různými povrchy. Tyto vlastnosti byly demonstrovány na experimentech. Nanočástice připravené podle tohoto postupu jsou stabilní i při 1M NaCl nebo v pH<2. Tím byl splněn první cíl této diplomové práce.

Ve druhé části jsem vytvořil model extinkce kovových nanočástic o průměru 15 nm obalených dielektrickou vrstvou tloušťky $0-15$ nm. Tento model vychází z kvazi-statické aproximace a následně byl ještě více přiblížen reálným výsledkům díky korekci polarizovatelnosti. Z modelu je patrné, jak obalová vrstva s rostoucí tloušťkou posouvá maximum extinkce do vyšších vlnových délek (červený posuv). Experimenty na potvrzení modelu byly provedeny s nanočásticemi obalenými citrátem (tloušťka obalové vrstvy 0,5 nm) a již zmiňovanou mixovanou ssDNA/TOEG-6 monovrstvou (očekávaná tloušťka 3,6 nm). Pomocí modelu byl spočten posuv rezonanční vlnové délky o 3,6 nm. V experimentech jsem naměřil posuv $(1{,}9\pm0{,}6)$ nm při vytvoření mixované monovrstvy na povrchu nanočástic a posuv o $(3{,}4\pm0{,}6)$ nm při vytvoření monovrstvy pouze z molekul TOEG-6. Tyto výsledky naznačují, že model dobře odpovídá naměřeným výsledkům v případě funkcionalizace molekulami TOEG-6. Z menšího posuvu v případě mixované monovrstvy vyplývá, že molekuly jednovláknové DNA mají nižší index lomu než molekuly TOEG-6, což se projevilo snížením efektivního indexu lomu celé monovrstvy. Proměření optických vlastností funkcionalizovaných nanočástic bylo druhým cílem této diplomové práce a ten byl také úspěšně splněn.

Ve třetí části jsem se zabýval plazmonickými nanostrukturami na površích a jejich případným uplatněním pro detekci biomolekul. Tuto část jsem rozdělil na dvě oblasti - infračervenou spektroskopii a spektroskopii v optické oblasti. V infračervené oblasti jsem poukázal na to, že posuv rezonance díky funkcionalizace

nanostruktur je nedetekovatelný, pokud detekované molekuly nemají rozměry několik desítek až stovek nanometrů. V této oblasti elektromagnetického záření se ale vyskytují rotačně-vibrační energetické přechody molekul, čehož se dá k jejich detekci využít. Antény totiž lokálně zesilují pole a toho se může využít v metodě SEIRA (povrchově zesílená infračervená absorpce). V experimentech se mi ale nepodařilo odhalit molekuly navázané na povrch kovových antén. Ve vykreslených spektrech se podařilo detekovat zesílenou absorpci vazby Si-O, která odpovídá nativnímu oxidu křemíku, který se nachází v oblasti nejvyššího zesílení pole anténami. Byly odzoušeny antény obdélníkové, kruhové a také byly proměřeny antény podleptané, ale žádné vibrační píky od biomolekul jsem ve spektrech nenašel. Na druhou stranu velmi slibné výsledky přinesla měření antén v optické oblasti. Zde byly proměřeny připravené nanostruktury na výškové plazmonické módy, které spadají právě do této oblasti. Obalení těchto nanostruktur posouvá jejich rezonanční vlnovou délku, protože se mění efektivní index v okolí. Posuv rezonance je v tomto případě detekovatelný i pro molekuly o rozměrech jednotek až pár desítek nanometrů. V experimentu byl naměřen posuv rezonanční vlnové délky o $(4{,}9 \pm 0{,}6)$ nm po vytvoření monovrstvy z molekul TOEG-6, jejíž tloušťka je cca 2 nm. Na tomto experimentu bylo ukázáno, že senzory pracující v této oblasti mají velký potenciál k inovaci biosenzorů a k vytvoření tzv. lab-on-chip zařízení. Pro vytvoření takovéhoto zařízení ale potřebujeme integrovat plazmonické nanostruktury do systému s průtočnými komůrkami. Nanostruktury do optické oblasti mohou být využity také pro povrchově zesílenou Ramanovskou spektroskopii (SERS), ale touto metodou se v diplomové práci nezabývám. Důležitým faktem ale je, že zlaté nanostruktury (antény) na křemíku nemají rezonanci v optické oblasti, kromě výškového módu, který je ale vybuditelný pouze v konfiguraci temného pole. Proto je důležité zvládnout metodu výroby těchto struktur i na jiném substrátu (např. sklo nebo ITO - směs oxidů inditého a ciničitého).

LITERATURA

[1] Pei, H., Li, F., Wan, Y., Wei, M., Liu, H., Su, Y., Chen, N., Huang, Q., and Fan, C. Designed diblock oligonucleotide for the synthesis of spatially isolated and highly hybridizable functionalization of DNA–gold nanoparticle nanoconjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 134 (29), **2012**, s. 11876–11879. doi:10.1021/ja304118z.

[2] Sandström, P., Boncheva, M., and Åkerman, B. Nonspecific and thiol-specific binding of DNA to gold nanoparticles. *Langmuir*, 19 (18), **2003**, s. 7537–7543. doi:10.1021/la034348u.

[3] Měch, R. *Funkcionalizované nanostruktury*. Bakalářská práce, BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. Vedoucí bakalářské práce Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.

[4] Häkkinen, H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry*, 4 (6), **2012**, s. 443–455. doi:10.1038/NCHEM.1352.

[5] Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H., and Medintz, I. L. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews*, 113 (3), **2013**, s. 1904–2074. doi:10.1021/cr300143v.

[6] Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., Yu, Q., Homola, J., and Jiang, S. DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors. *Analytical Chemistry*, 76 (23), **2004**, s. 6967–6972. doi:10.1021/ac048908l.

[7] Zhang, X., Huang, P.-J. J., Servos, M. R., and Liu, J. Effects of polyethylene glycol on DNA adsorption and hybridization on gold nanoparticles and graphene oxide. *Langmuir*, 28 (40), **2012**, s. 14330–14337. doi:10.1021/la302799s.

[8] Wang, W., Wei, Q.-Q., Wang, J., Wang, B.-C., Zhang, S.-h., and Yuan, Z. Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): stabilizer or coagulant? *Journal of colloid and interface science*, 404, **2013**, s. 223–229. doi:10.1016/j.jcis.2013.04.020.

[9] Zheng, M., Davidson, F., and Huang, X. Ethylene glycol monolayer protected nanoparticles for eliminating nonspecific binding with biological molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (26), **2003**, s. 7790–7791. doi:10.1021/ja0350278.

[10] Maus, L., Dick, O., Bading, H., Spatz, J. P., and Fiammengo, R. Conjugation of peptides to the passivation shell of gold nanoparticles for targeting of cell-surface receptors. *ACS Nano*, 4 (11), **2010**, s. 6617–6628. doi:10.1021/nn101867w.

[11] Bastús, N. G., Comenge, J., and Puntes, V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir*, 27 (17), **2011**, s. 11098–11105. doi:10.1021/la201938u.

[12] Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., Yu, Q., Homola, J., and Jiang, S. DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors. *Analytical Chemistry*, 76 (23), **2004**, s. 6967–6972. doi:10.1021/ac048908l.

[13] Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society*, 120, **1998**, s. 1959–1964. doi:10.1021/ja972332i.

[14] Elghanian, R., Storhoff, J., Mucic, R., Letsinger, R., and Mirkin, C. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277 (5329), **1997**, s. 1078–1081. doi:10.1126/science.277.5329.1078.

[15] Zhang, X., Servos, M. R., and Liu, J. Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route. *Journal of the American Chemical Society*, 134 (17), **2012**, s. 7266–7269. doi:10.1021/ja3014055.

[16] Zhang, X., Servos, M., and Liu, J. Surface science of DNA adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles. *Langmuir*, 28, **2012**, s. 3896–3902. doi:10.1021/la205036p.

[17] Hayworth, D. *Polyethylene Glycol (PEG) and Pegylation of Proteins* [online]. Thermo Scientific, 2014. [cit. 2014-4-19]. Dostupné z WWW: http://www.piercenet.com/method/polyethylene-glycol-peg–pegylation.

[18] Steel, A., Levicky, R., Herne, T., and Tarlov, M. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophysical journal*, 79 (2), **2000**, s. 975–981. doi:10.1016/S0006-3495(00)76351-X.

[19] Parak, W. J., Pellegrino, T., Micheel, C. M., Gerion, D., Williams, S. C., and Alivisatos, A. P. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Letters*, 3 (1), **2003**, s. 33–36. doi:10.1021/nl025888z.

[20] Xu, X., Caswell, K. K., Tucker, E., Kabisatpathy, S., Brodhacker, K. L., and Scrivens, W. A. Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1167 (1), **2007**, s. 35–41. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.056.

[21] Kedem, O., Vaskevich, A., and Rubinstein, I. Critical Issues in Localized Plasmon Sensing. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118, **2014**, s. 8227–8244. doi:10.1021/jp409954s.

[22] Qiu, C.-W. and Gao, L. Resonant light scattering by small coated nonmagnetic spheres: magnetic resonances, negative refraction, and prediction. *JOSA B*, 25 (10), **2008**, s. 1728–1737. doi:10.1364/JOSAB.25.001728.

[23] Bohren, C. F. and Huffman, D. R. *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley & Sons, New York, 2008.

[24] Albaladejo, S., Gómez-Medina, R., Froufe-Pérez, L., Marinchio, H., Carminati, R., Torrado, J., Armelles, G., García-Martín, A., and Sáenz, J. Radiative corrections to the polarizability tensor of an electrically small anisotropic dielectric particle. *Optics Express*, 18 (4), **2010**, s. 3556–3567. doi:10.1364/OE.18.003556.

[25] Castanié, E., Vincent, R., Pierrat, R., and Carminati, R. Absorption by an optical dipole antenna in a structured environment. *International Journal of Optics*, 8 stran, **2012**. doi:10.1155/2012/452047.

[26] Sengwa, R. J., Kaur, K., and Chaudhary, R. Dielectric properties of low molecular weight poly (ethylene glycol) s. *Polymer international*, 49 (6), **2000**, s. 599–608. doi:10.1002/1097-0126(200006)49:6<599::AID-PI425>3.0.CO;2-K.

[27] Ung, B. and Sheng, Y. Interference of surface waves in a metallic nanoslit. *Optics Express*, 15 (3), **2007**, s. 1182–1190. doi:10.1364/OE.15.001182.

[28] Yaffe, O., Scheres, L., Puniredd, S. R., Stein, N., Biller, A., Lavan, R. H., Shpaisman, H., Zuilhof, H., Haick, H., Cahen, D., *et al.* Molecular electronics at metal/semiconductor junctions. Si inversion by sub-nanometer molecular films. *Nano Letters*, 9 (6), **2009**, s. 2390–2394. doi:10.1021/nl900953z.

[29] Aćimović, S., Ortega, M., Sanz, V., Berthelot, J., Garcia-Cordero, J., Renger, J., Maerkl, S., Kreuzer, M., and Quidant, R. LSPR Chip for Parallel, Rapid, and Sensitive Detection of Cancer Markers in Serum. *Nano Letters*, 14 (5), **2014**, s. 2636–2641. doi:10.1021/nl500574n.

[30] Agio, M. and Alù, A. *Optical antennas*. Cambridge University Press, New York, 2013.

[31] Svedendahl, M., Chen, S., Dmitriev, A., and Kall, M. Refractometric sensing using propagating versus localized surface plasmons: a direct comparison. *Nano Letters*, 9 (12), **2009**, s. 4428–4433. doi:10.1021/nl902721z.

[32] Metelka, O. *Charakterizace struktur připravených selektivním mokrým leptáním křemíku*. Diplomová práce, BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Tomáš Šamořil.

[33] Břínek, L. *Aplikace plazmonových polaritonøu v nanofotonice.* Pojednání k SDZ, BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. Vedoucí práce Prof. RNDr. Petr Dub, CSc.

[34] P.J. Linstrom and W.G. Mallard, Eds. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* [online]. National Institute of Standards and Technology, 2012. [cit. 2014-4-19]. Dostupné z WWW: http://webbook.nist.gov.

[35] Mello, M. L. S. and Vidal, B. Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. *PloS ONE*, 7 (8), **2012**, s. e43169. doi:10.1371/journal.pone.0043169.

[36] Kvítek, L. *Metody studia koloidních soustav* [online]. Prozatímní učební text, Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, 2006. [cit. 2014-4-19]. Dostupné z WWW: http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf.

[37] Daniš, S. *Dynamický rozptyl světla* [online]. Krystalografická společnost, 2012. [cit. 2014-4-19]. Dostupné z WWW: http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm.

[38] Babocký, J. *Optické vlastnosti asymetrických plasmonických struktur.* Diplomová práce, BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2014. Vedoucí diplomové práce Ing. Jan Čechal, Ph.D.

[39] Čechal, J. *Analýza povrchøu a tenkých vrstev využitím fotoelektronové spektroskopie.* Dizertační práce, BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2006. Školitel Prof. Petr Dub, CSc.

[40] Koňáková, K. *Selektivní růst kovových materiálů na čistých a oxidovaných substrátech.* Diplomová práce, BRNO: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. Vedoucí diplomové práce Ing. Jan Čechal, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam
AuNP	Zlatá nanočástice
DLS	Dynamický rozptyl světla
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
ssDNA	Jednovláknová kyselina deoxyribonukleová
EBL	Litografie elektronovým svazkem
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
LSPR	Lokalizovaná plazmonová rezonance
MIR	Střední infračervená oblast záření
NIR	Blízká infračervená oblast záření
OEG	Oligo(ethylen glykol)
PEG	Poly(ethylen glykol)
Q.E.	Kvantová účinnost
SAXS	Rozptyl rentgenového záření pod malými úhly
SEIRA	Povrchově zesílená infračervená absorpce
SAM	Samouspořádaná monovrstva
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
SPP	Povrchový plazmonový polariton
TOEG-6	(11-Merkaptoundecyl)hexa(ethylen glykol)