

Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana biomolekuł usytuowanych na polimerowych podłożach

Katarzyna Filipecka

Instytut Fizyki, Wydział Inżynierii Procesowej, Materiałowej i Fizyki Stosowanej, Politechnika Częstochowska, Al. Armii Krajowej 19, 42-200 Częstochowa

kasia.filipecka@onet.eu

Streszczenie

Technika SERS została wykorzystana w celu wykrycia przeciwciał zaabsorbowanych na cząsteczkach białka A unieruchomionych na powierzchniach polimerowych, takich jak poliuretan i polietylen. Do wzmocnienia sygnału zostały użyte nanocząsteczki srebra. Celem pracy była bezpośrednia detekcja i szybka identyfikacja patogenów oraz stworzenie uniwersalnej metody wspierającej wykrywanie patogenów w układach biologicznych.

Wstęp

Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS) jest techniką badawczą wywodzącą się z klasycznej spektroskopii Ramana. Charakteryzuje się ona znacznym wzmocnieniem natężenia rozproszonego sygnału Ramana przez cząsteczki zaabsorbowane na powierzchni metalu. Wzmocnienie sygnału powodowane jest głównie przez oddziaływanie fal elektromagnetycznych z metalami w zjawisku rezonansu plazmonowego. Natężenie sygnału wyjściowego zależy od rodzaju metalu, stopnia jego chropowatości, rozmiaru i kształtu, jak również od natężenia padającego światła. W odpowiednich warunkach SERS może spowodować wzmocnienie nawet do 10^6 razy większe w porównaniu do klasycznej spektroskopii Ramana. Aby osiągnąć tak duże wzmocnienie, cząsteczki powinny być zaabsorbowane na powierzchni podłoża metalowego lub być bardzo blisko niego (zazwyczaj około 10 nm) [2, 5].

Po raz pierwszy zjawisko SERS zostało zaobserwowane w roku 1974 dla pirydyny zaadsorbowanej na powierzchni srebra. Okazało się, że wzmocnienie sygnału jest związane ze wzbudzeniem powierzchniowych plazmonów metalu. W kolejnych latach pojawiło się wiele wyjaśnień omawianego zjawiska, lecz żadne z nich nie opisywało go szczegółowo. W ostatnich latach zainteresowanie SERS ponownie wzrosło, co jest spowodowane rozwojem aparatury do detekcji widm Ramana. Ponadto, udoskonalenia wdrażane w dziedzinie nanotechnologii otworzyły nowe możliwości, szczególnie w zakresie projektowania i produkcji podłoża SERS. W rezultacie SERS

radykalnie rozszerzył swoją widoczność w wielu dyscyplinach. SERS odgrywa ważną rolę w poprawieniu czułości i selektywności techniki bio-analiz. Jest to jedna z najbardziej obiecujących i bezpiecznych technik do bezpośredniego wykrywania patogenów. Dostarcza informacji na temat struktury chemicznej i formy fizycznej, zarówno nieorganicznych jak i organicznych materiałów we wszystkich stanach skupienia dając widma charakteryzujące się wysoką rozdzielczością. SERS może być wykorzystana do szybkiej identyfikacji szkodliwych patogenów związanych z zatruciami pokarmowymi, zanieczyszczeniami wód i wojnami biologicznymi. Może być to obiecujące narzędzie do wczesnego wykrywania raka i kontroli leczenia chorób [6, 7].

Material badawczy

Do badań zostały wykorzystane następujące materiały:

- Powierzchnie polietylenowe (PE) $[-CH_2-CH_2]_n$
- Powierzchnie poliuretanowe (PU) $[-OCONH-R-NHCOO-R']_n$
- Srebro koloidalne – do otrzymania koloidów zostały wykorzystane nanocząsteczki srebra o średnicy około 100 nm (Aldrich, Milwaukee, WI). Nanocząsteczki srebra o średnicy od około 70 do 100 nm zostały opisane w literaturze, jako dające największe wzmocnienie elektromagnetyczne [1]. Koloidy srebra zostały przygotowane w stężeniach 10.8 mg/25 ml oraz 10.8 mg/50ml.
- Białko A – jest składnikiem błony komórkowej produkowanym przez kilka szczepów gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Jest to łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej 42 kDa. W swojej strukturze zawiera cztery miejsca o wysokim powinowactwie do regionu Fc przeciwciał kilku gatunków (fragment Fc – fragment przeciwciała odpowiadającego za różne zjawiska, które zapoczątkowuje związanie antygeny). Roztwory białka zostały przygotowane w stężeniach 50 mg/l oraz 10 mg/l [4].
- Przeciwciała, immunoglobuliny – są to białkowe cząsteczki o kształcie zbliżonym do litery "Y", o masach cząsteczkowych od 150 do 970 kDa, złożone z czterech glikozylowanych łańcuchów peptydowych. Dwa z tych łańcuchów, określane mianem łańcuchów ciężkich (*H*, od ang. *Heavy*) są dłuższe i związane ze sobą wiązaniami dwusiarczkowymi. Pozostałe dwa łańcuchy, nazywane lekkimi (*L*, od ang. *Light*) są związane z łańcuchami ciężkimi również za pomocą mostków dwusiarczkowych. Obydwa łańcuchy ciężkie w danej cząsteczce są identyczne, podobnie jest z łańcuchami lekkimi. W badaniach zostały użyte immunoglobuliny G (IgG) [4].

Aparatura

Eksperyment został przeprowadzony za pomocą trójśiatkowego spektroskopu ramanowskiego firmy Jobin-Yvon (model T64000) znajdującego się w Laboratorium Fizyki w Uniwersytecie du Maine w Le Mans (Francja). Spektrometr został wyposażony w spójną argonowo-kryptonową wiązkę światła laserowego oraz sprzężony

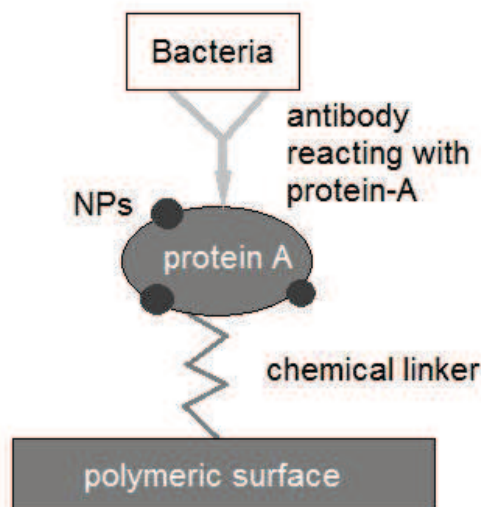
z mikroskopem konfokalnym Olympus BX40, wyposażonym w kilka standardowych obiektywów ($\times 10$, $\times 100$, w tym dalekozasięgowym $\times 50$).

W celu analizy otrzymanych widm zostały użyte programy takie jak OPUS IDENT (*Bruker Optics GmbH*, Ettlingen, Niemcy) oraz Labspec (Version 5.25.15, HORIBA Jobin-Yvon, Wielka Brytania). Są to wyspecjalizowane oprogramowania przeznaczone do identyfikacji substancji, obróbki danych spektroskopowych i obrazów. Ponadto programy te oferują szeroki zestaw procedur przetwarzania widm, takich jak na przykład korekcja linii bazowej widma i normalizacja sygnału.

Procedura analizy

Procedura analizy, schematycznie przedstawiona na rysunku 1, została prowadzona w następujących etapach:

- 1) "czyste" powierzchnie polimerowe jako widma odniesienia,
- 2) powierzchnie polimerowe z nanocząsteczkami srebra,
- 3) powierzchnie polimerowe z białkami A,
- 4) powierzchnie polimerowe z nanocząsteczkami srebra i białkami A,
- 5) powierzchnie polimerowe i immuno-reakcje pomiędzy przeciwciałem i białkiem A oraz nanocząsteczki srebra.



Rys. 1. Schematyczny diagram procedury analizy.

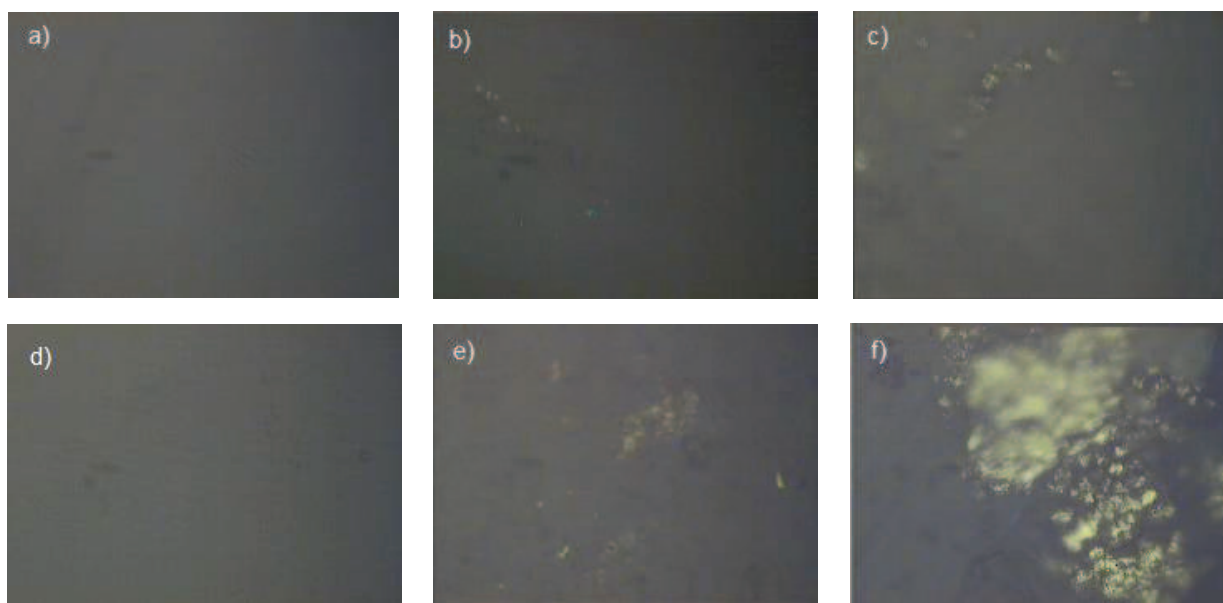
Zagregowane nanocząsteczki

Nanocząsteczki srebra były jaśniejsze i można było łatwo je zidentyfikować za pomocą mikroskopu konfokalnego skupiającego wiązkę światła podczas procesu analizy (Rys. 2).

Część nanocząsteczek formowała skupiska o różnej wielkości i kształtach. W przypadku roztworów zawierających dodatkowo białko i przeciwciała skupiska te były znacznie większe. Agregacja koloidów związana była prawdopodobnie z che-

micznymi właściwościami i różnicami w wielkości molekuł (białko składa się z polipeptydowego łańcucha o masie cząsteczkowej 42 kDa, podczas gdy rozmiar przeciwciała jest około cztery razy większy niż białka).

W zależności od stężenia białka i nanocząsteczek srebra można było dostrzec niewielkie różnice w ilości cząsteczek izolowanych i agregacji zlokalizowanych na powierzchni, ich wielkości oraz kształcie. Najwięcej molekuł i agregacji zawierały próbki, gdzie roztwory zostały najpierw odwirowane, a następnie unieruchomione na powierzchni.

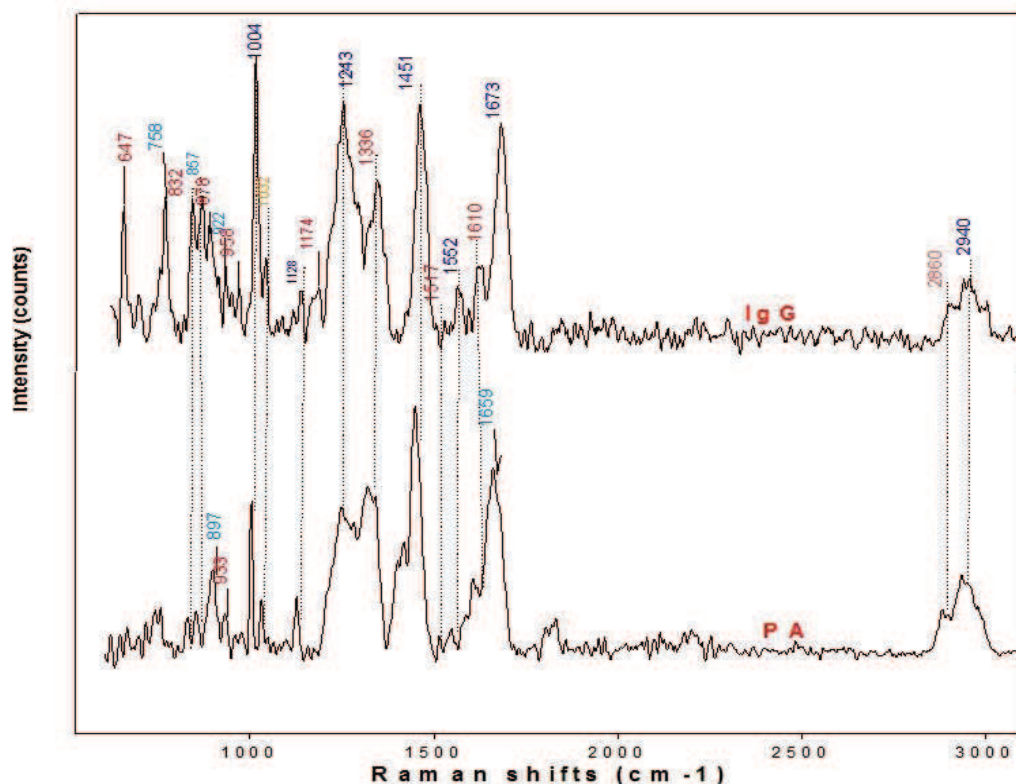


Rys. 2. Obraz powierzchni polimerowych z mikroskopu konfokalnego: a) PE, b) PE + nanocząsteczki srebra, c) PE + białko A i nanocząsteczki srebra, d) PU, e) PU + nanocząsteczki srebra, f) PU + białko A i nanocząsteczki srebra (obiektyw $\times 100$).

Spektra SERS

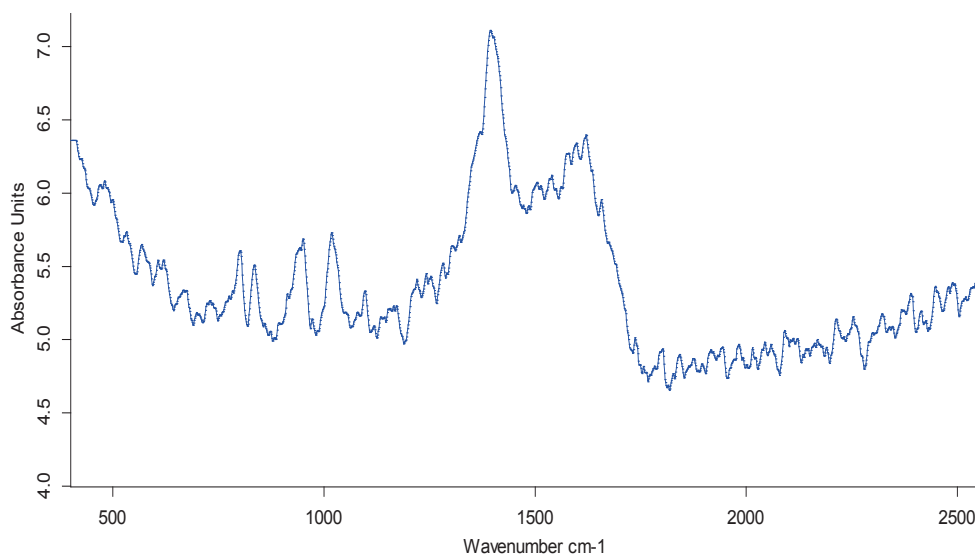
Widma SERS zostały wykonane na każdym etapie procedury analizy. Analiza widm oparta była na interpretacji podobnych widm opisanych w literaturze [3, 6].

Na rysunku 3 zostały przedstawione widma białka A i przeciwciała. Obok pasm charakterystycznych dla aminokwasów występują pasma amidowe I i III. W widmie białka A obserwujemy I drganie amidowe około 1657 cm^{-1} i III drganie amidowe około 1327 cm^{-1} związane z jego strukturą II-rzędową helikalną. Widmo białka A wykazuje również pasmo wibracyjne około 937 cm^{-1} związane z drganiami wahadłowymi (ρ_{CH_3}) grupy CH_3 struktury helikalnej. Dominująca struktura II-rzędowa (harmonijka beta) immunoglobuliny została zidentyfikowana przez I drganie amidowe około 1671 cm^{-1} i 1242 cm^{-1} dla III drgania amidowego. Pasma drgań rozciągających (ν_{CH}) alifatycznych łańcuchów bocznych jest obserwowane około 2860 do 2940 cm^{-1} . Pasma drgań zginających (δ_{CH_2}) jest obserwowane około 1445 cm^{-1} . Pasma pochodzące od tyrozyny są obserwowane około 644, 760, 830 i 853 cm^{-1} , fenyloalaniny około 1002 i 1610 cm^{-1} , natomiast pasma tryptofanu w 1421 i 1553 cm^{-1} [3, 4].



Rys. 3. Widma Ramana białka A (poniżej) i przeciwciał IgG (powyżej) (300 s, 785 nm, 10 mW, obiektyw $\times 100$) [3].

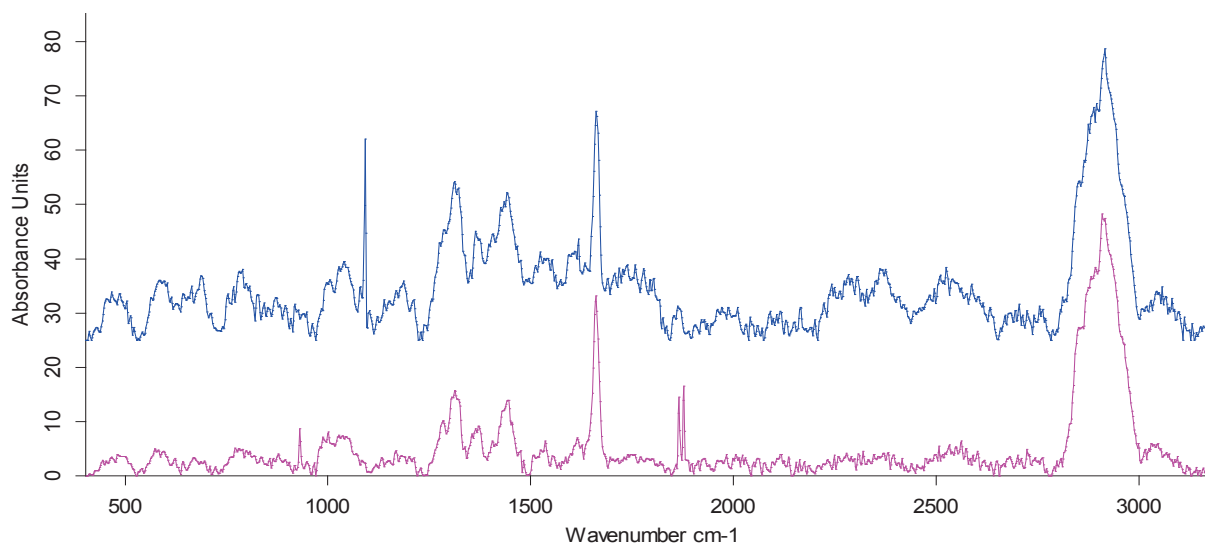
Widmo ramanowskie nanocząsteczek srebra zostało przedstawione na rysunku 4. Widmo przejawia grupę słabych pasm w regionie od $700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, natomiast główne pasma występują około $1621, 1394, 1018, 950, 836, 801\text{ cm}^{-1}$.



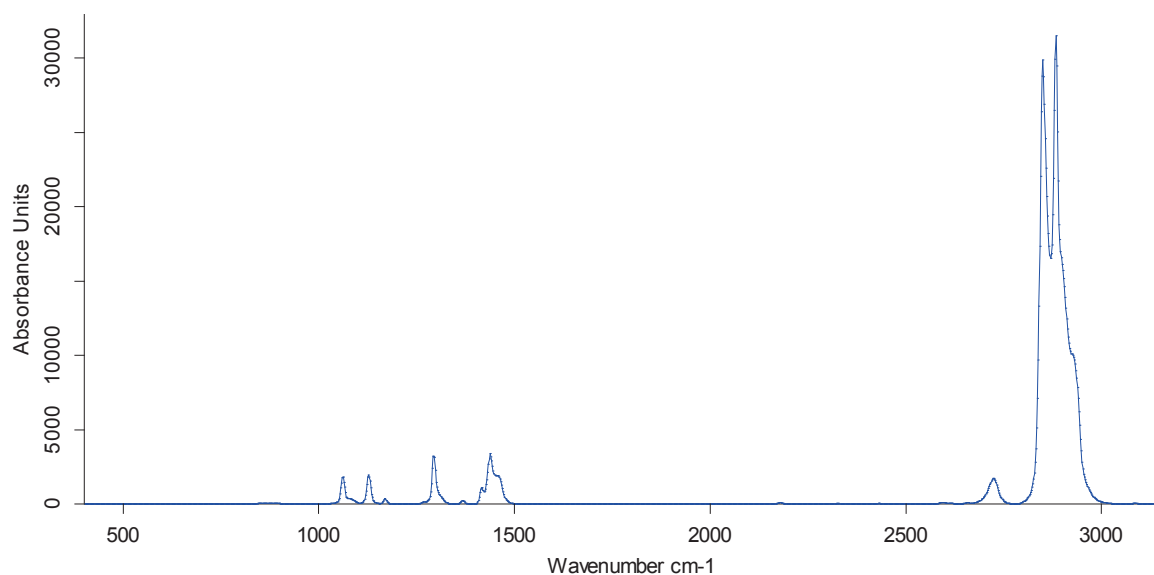
Rys. 4. Widma Ramana nanocząsteczek srebra w regionie $400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (100 s, 647.1 nm, 100 mW, obiektyw $\times 100$).

Wzbudzając niektóre próbki światłem zielonym, niebieskim bądź fioletowym możemy indukować przejścia elektronowe, które z kolei mogą wywołać świecenie

fluorescencyjne. Powstające w ten sposób tło fluorescencyjne przysłania linie ramanowskie. Rysunek 5 i 6 przedstawia widma powierzchni polimerowych. Ze względu na dużą fluorescencję powierzchni PU została dokonana korekcja linii bazowej widm.



Rys. 5. Widma Ramana z korektą linii bazowej powierzchni poliuretanowych w regionie $400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (50 s, 514.53 nm, 20 mW, obiektyw $\times 100$).

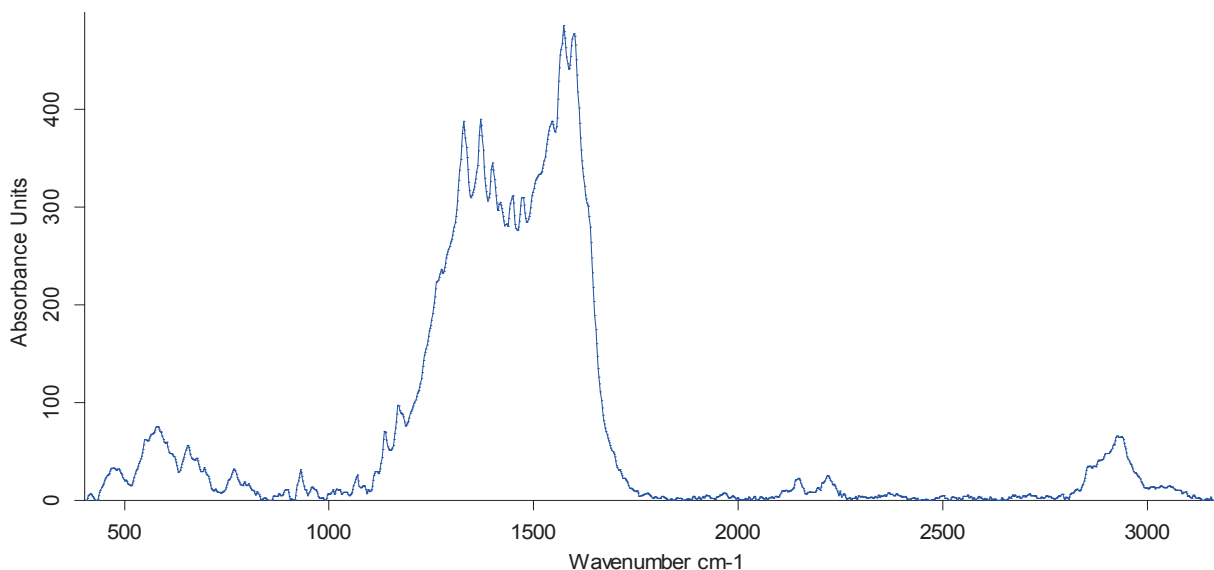


Rys. 6. Widmo Ramana powierzchni polietylenowej w regionie $400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (50 s, 514.53 nm, 50 mW, obiektyw $\times 100$).

Widma powierzchni polimerowych z nanocząsteczkami srebra lub tylko z cząsteczkami białka A były bardzo podobne do widm odniesienia. Również w tym przypadku powierzchnia poliuretanowa wykazywała wysoką fluorescencję.

W przypadku unieruchomienia cząsteczek białek A i nanocząsteczek srebra uzyskane widma były zdecydowanie inne i wykazywały charakterystyczne drgania amidowe. Dla powierzchni PU pasmo obserwowane około 1597 cm^{-1} odpowiada I drganiom amidowym, natomiast pik około 1370 cm^{-1} przypisany jest do III drgań amido-

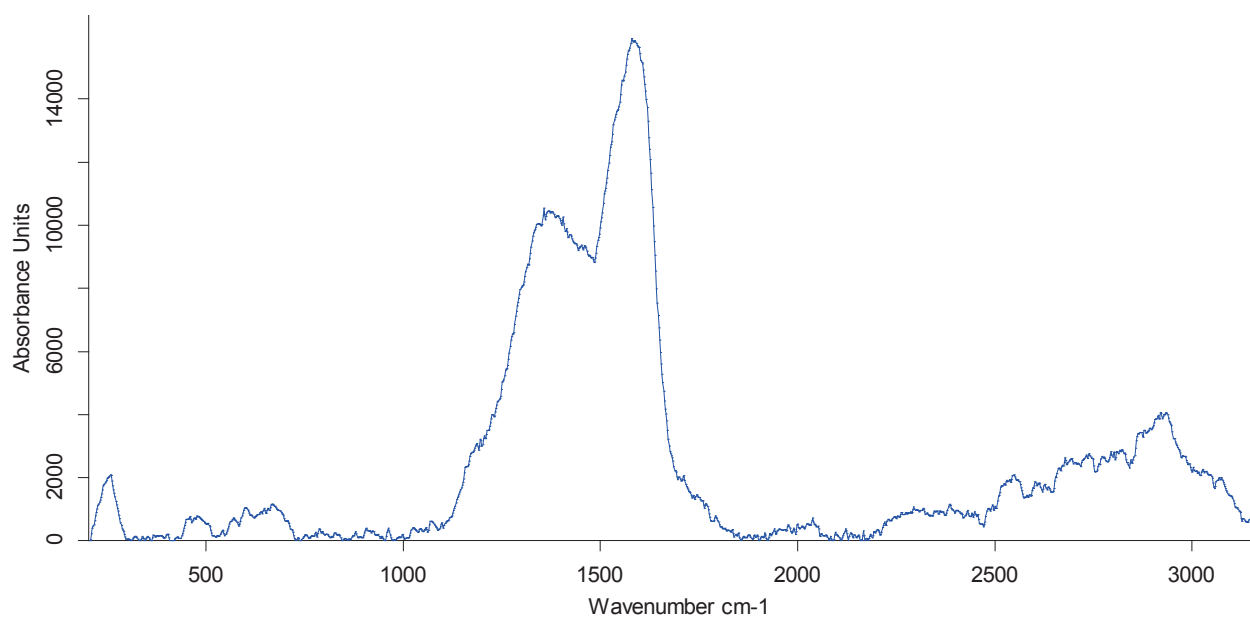
wych (Rys. 7). Dla powierzchni polietylenowej pasma amidowe miały podobną pozycję.



Rys. 7. Widma Ramana powierzchni PU z odwirowaną mieszaniną białka A i nanocząsteczkami srebra w regionie 400-3200 cm⁻¹ (50 s, 514.53 nm, 10 mW, obiektyw ×100).

Podobne widma SERS zostały uzyskane dla powierzchni, gdzie został dodatkowo dodany roztwór przeciwciał (Rys. 8).

Analizując różne stężenia roztworów białek A i nanocząsteczek srebra, można dojść do wniosku, że najczęściej i najłatwiej uzyskiwano widma SERS, gdy roztwór był najpierw odwirowany. Wzmocnienie sygnału zgadzało się z obrazem powierzchni z mikroskopu konfokalnego i potwierdziło powstanie większych agregacji cząstek.



Rys. 8. Widmo Raman PU z nanocząsteczkami srebra, białkiem A i przeciwciałami w obszarze 400-3200 cm⁻¹ (50 s, 514.53 nm, 20 mW i obiektyw ×100).

Wnioski

Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Raman została wykorzystana w celu wykrycia biomolekuł unieruchomionych na powierzchniach polimerowych.

Optyczne i spektroskopowe dane wykazały, że SERS jest zjawiskiem lokalnym, tylko część cząstek jest SERS-aktywnych. W przypadku agregacji nanocząsteczek uzyskano najsilniejsze wzmocnienie sygnału. Wzmocnienie sygnału zgadzało się z obrazem powierzchni z mikroskopu konfokalnego i potwierdziło powstanie większych agregacji.

Wyniki potwierdziły, że technika SERS jest dobrym narzędziem do identyfikacji cząsteczek biologicznych oraz że jest jedną z najbardziej obiecujących i bezpiecznych metod do bezpośredniego wykrywania takiego rodzaju materiałów.

Podziękowania

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy zostały uzyskane podczas pobytu w Uniwersytecie du Maine (Le Mans, Francja) we współpracy z prof. Philip Daniel i dr Fabienne Lagarde-Abribat.

Literatura:

- [1] M. Iosin, F. Toderas, P. L. Baldeck, S. Astilean, *Study of protein-gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering*, J. Mol. Struct. 924-926, 196-200 (2009).
- [2] C. L. Haynes, C. R. Yonzon, X. Zhang, R. P. Van Duyne, *Surface-enhanced Raman sensors: early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection*, J. Raman Spectrosc., 36, 471–484 (2005).
- [3] R. P. Kengne-Momo, Y. L. Jeyachandran, A. Assaf, C. Esnault, P. Daniel, J. F. Pilard, M. J. Durand, F. Lagarde, E. Dongo, G. Thouand, *A simple method of surface functionalization for immuno-specific immobilisation of proteins*, Anal. Bioanal. Chem., 398, 1249–1255 (2010).
- [4] R. P. Kengne Momo, *Mise en oeuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman*, PhD thesis, 2011
- [5] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, *Principles of Surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects*, Elsevier, Great Britain (2009).
- [6] G. Naja, P. Bouvrette, S. Hrapovic, J.H.T. Luong, *Raman-based detection of bacteria using silver nanoparticles conjugated with antibodies*, Royal Society of Chemistry, Analyst, 132, 679-686 (2007).
- [7] A. Sengupta, M. Mujacic, E. J. Davis, *Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy*, Anal. Bioanal. Chem., 386, 1379–1386 (2006).