

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Využití bimetalických nanočástic při detekci fosforylace

Matyáš Straka
Jihomoravský kraj

Brno, 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Využití bimetalických nanočástic při detekci fosforylace

The Usage of Bimetallic Nanoparticles in Detection of Phosphorylation

Autoři: Matyáš Straka

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 980/55, 61600, Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. Vladimír Jonas

Brno, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 22. 2. 2023

Matyáš Straka

Poděkování

Rád bych poděkoval svému konzultantovi Mgr. Vladimíru Jonasovi za jeho odbornou pomoc, rady a čas.

Dále mé poděkování patří Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., v jehož laboratořích byla prováděna výzkumná činnost spojená s touto prací.

Poděkovat bych chtěl dále i Ústavu fyziky materiálů AV ČR, v. v. i., který provedl prvkovou analýzu připravených nanočástic a pořídil snímky Skenovací elektronovou mikroskopií.

Anotace

Tato práce se zabývá problematikou detekce fosforylovaných látek v laboratorní diagnostice. Přidáním určitých látek do zkoumaného roztoku je možné zesílit Ramanův rozptyl, což by zjednodušilo a upřesnilo diagnózu některých onemocnění. Konkrétně je tato práce zaměřena na přípravu bimetalických nanočástic s ideálními vlastnostmi, jako jsou nízké náklady na výrobu a nízký detekční limit. V průběhu bylo připraveno osm různých suspenzí s různými bimetalickými částicemi. Výsledky výzkumu ukázaly, že vliv užitých bimetalických částic na Ramanův rozptyl fosforylovaných proteinů je zatím příliš nízký.

Klíčová slova

Fosforylace; Ramanův rozptyl; bimetalické nanočástice; laboratorní diagnóza

Annotation

This thesis deals with the issue of detecting phosphorylated compounds in laboratory diagnosis. It may be possible to enhance a solution's Raman scattering by adding certain compounds into it. That would simplify the diagnosis of certain diseases. This work focuses on preparing bimetallic nanoparticles with ideal features such as low production cost and low detection limit. Eight different suspensions were prepared with multiple types of bimetallic particles. The results have shown that used bimetallic particles have too little influence on the solution's Raman scattering.

Keywords

Phosphorylation; Raman Scattering; bimetallic nanoparticle; laboratory diagnosis

Seznam zkratek

Ag@Fe	bimetalické částice stříbra a železa
Ag@TiO ₂	bimetalické částice stříbra a oxidu titaničitého
B2	riboflavin
B2P	riboflavin-5'-fosfát
DLS	dynamický rozptyl světla
HA-HCl	hydroxylamin hydrochlorid
P-Tyr	fosfotyrosin
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
TFA	kyselina trifluoroctová
Tyr	tyrosin
UV-Vis	ultrafialovo-viditelné

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Obecné principy mezi nanočásticí a vzorkem	8
2.2	Využití zlatých nanočástic při elektrochemické detekci.....	8
2.3	Nanočástice oxidu titaničitého	8
2.4	Příprava nanočástic železa	10
2.4.1	Mletí železného prášku v kulovém mlýnu	10
2.4.2	Redukce kationtů železa tetrahydridoboritanem sodným	10
2.4.3	Vysokoteplotní proces	11
2.4.4	Naprašování pomocí vzácných plynů	11
2.4.5	Laserová ablace.....	11
3	Experimentální část.....	13
3.1	Chemikálie	13
3.2	Přístroje.....	14
3.3	Kontrola afinity oxidu titaničitého k fosfotyrosinu	14
3.4	Příprava nanočástic stříbra a oxidu titaničitého	14
3.5	Příprava nanočástic oxidů železa se stříbrem	15
4	Výsledky a diskuze	17
4.1	Afinita oxidu titaničitého k fosfotyrosinu.....	17
4.2	Nanočástice železa se stříbrem	18
5	Závěr	24
6	Zdroje a použitá literatura	25
7	Seznam obrázků a tabulek	27
8	Příloha 1: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie	28

1 ÚVOD

Reverzibilní fosforylace proteinů je základem pro mezibuněčnou signální transdukcí a podílí se na procesech jako je buněčný cyklus, metabolismus, transkripce anebo transdukce. Má také neuronální a imunologickou funkci. Fosforylace proteinů je proto nedílnou součástí správné funkce každého organismu, avšak abnormální fosforylace bývá spojována s multifaktoriálními (komplexními) onemocněními, rakovinou, infekčními onemocněními [1] nebo špatnou činností srdce [2]. Proto je proces fosforylace a defosforylace přísně kontrolován enzymy kinázou a fosfatázou.

Fosforylace byla v poslední době intenzivně studována. Fosfátová skupina představuje jeden z nejdůležitějších kofaktorů enzymů. Fosforylovaný protein tedy může mít úplně rozdílnou reaktivitu, enzymovou specifitu a subcelulární lokalizaci než jeho nefosforylovaná obdoba. [1] Reakce na stimulaci adrenalinem vede k aktivaci fosforylázové kinázy a fosforylaci glykogenfosforylázy, dochází k bezprostřední aktivaci proteinu potřebné k principu „útok, nebo útěk.“ [3]

Také využití nanočástic ke zvětšení Ramanova rozptylu bylo již dlouho zkoumáno, [4] přesto dosud používané nanočástice nejsou vhodné pro užívání ve velkém měřítku buď kvůli vysokým nákladům na výrobu, nebo jejich omezeným možnostem, co se selektivity týče. Žádoucí je detekovat ve směsi všech fosforylovaných látek pouze peptidy a proteiny. Z těchto důvodů bylo kladeno za cíl najít cenově dostupnou alternativu s větším zesílením Ramanova rozptylu fosforylovaných proteinů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část práce se zabývá obecnými metodami detekce fosforylovaných látek a využitím nanočástic pro zmíněné účely.

2.1 Obecné principy mezi nanočásticí a vzorkem

Je obecně známo, že nanočástice, na jejichž povrchu je navázaný protein, zesilují Ramanův rozptyl onoho proteinu. Navázání na její povrch je zajištěno úpravou nanočástice tak, aby její část vykazovala afinitu k proteinu. Toho lze docílit dvěma způsoby, a sice adsorpcí vhodné látky nebo vytvořením bimetalické nanočástice s kovem, který má afinitu vůči fosforylovanému proteinu.

2.2 Využití zlatých nanočástic při elektrochemické detekci

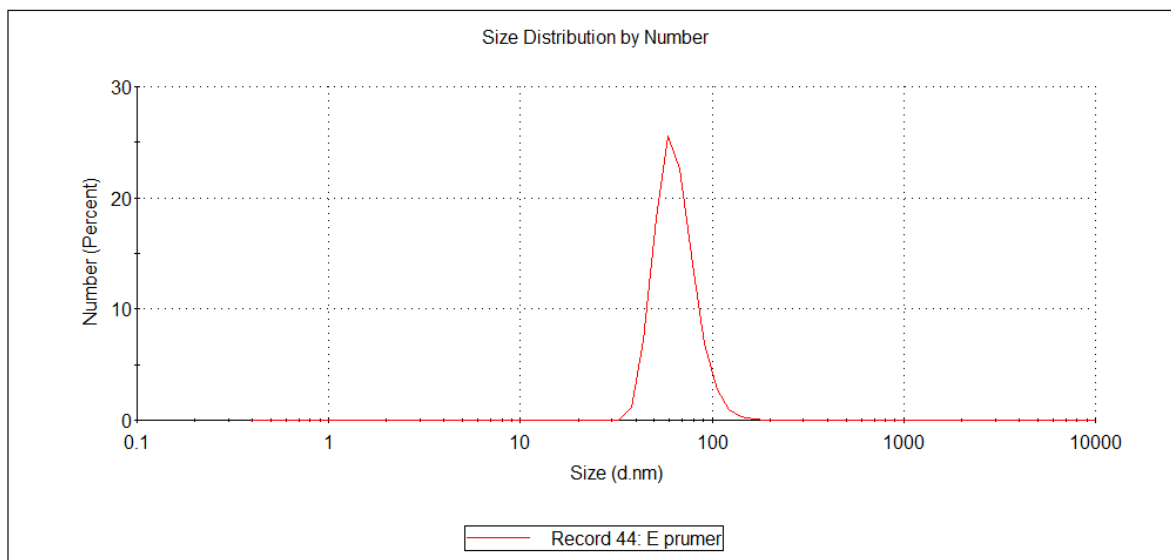
Elektrochemická detekce fosforylace spočívá v navázání nanočástic zlata na povrch fosforylovaných proteinů a následné detekci. Fosforylovaný, biotinylovaný protein se smíchá s nanočásticemi zlata pokrytými streptavidinem a díky vysoké afinitě mezi streptavidinem a biotinem dojde k navázání zlata na povrch proteinu. Při tom proběhne v blízkosti zlata elektrochemická reakce, díky níž je možné sledovat jak aktivitu kinázy a jejího substrátu, tak inhibice malých molekulárních inhibitorů na fosforylaci proteinů. Jako detekční limit pro aktivitu kinázy byla stanovena koncentrace 5 U/ml. [5]

2.3 Nanočástice oxidu titaničitého

Karolína Blatná ve své bakalářské práci popisuje, jak byly připraveny suspenze oxidu titaničitého s přídavkem citrátu sodného jako stabilizátoru o šesti různých poměrech TiO_2 a citrátu. Testovali dva způsoby rozptýlení, a sice ultrazvukový sonikátor a dispergátor. U dispergátoru byly naměřené hodnoty z-average přibližně dvojnásobné oproti sonikaci, bylo větší zastoupení částic o vyšší velikosti, tudíž nebylo této metody dále využíváno. Největší zastoupení měly částice o průměrné velikosti 60 nm, v menších počtech se však vyskytovaly i částice podstatně větší, jež nebylo možné odstranit ani filtrací. Velikostní rozložení shrnuje obrázek 1.

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 273,6	Peak 1: 65,47	99,7	16,56
Pdl: 0,573	Peak 2: 361,5	0,3	154,2
Intercept: 0,835	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Refer to quality report**



Obrázek 1: Velikostní distribuce nanočástic TiO_2 puls:pauza $\approx 2:2$, amplituda 40 %, koncentrace citrátu 0,751 mM

Dále zkoumali vliv poměru TiO_2 a citrátu. Byl měřen zeta potenciál, s cílem mít dostatečně vysokou absolutní hodnotu, značící dlouhodobou stabilitu. Zároveň bylo žádoucí nemít v disperzi citrátu příliš mnoho, aby nedocházelo k tvorbě samotných nanočástic stříbra místo nanočástic stříbra s oxidem titaničitým při následujícím procesu. Bez přídavku citrátu byla hodnota zeta potenciálu blízka nule, nicméně již při přídavku malého množství citrátu byla dostatečně vysoká. Při dalším přídavku citrátu již hodnota zeta potenciálu výrazně nerostla. Pro přípravu nanočástic byl tedy používán poměr 0:0,12.

Připravené bimetalické nanočástice všech poměrů $\text{Ag}:\text{TiO}_2$ byly dále zkoumány. Ukázalo se, že s rostoucí koncentrací stříbra se zmenšuje velikost částic a že koncentrace stříbra nemá výrazný vliv na hodnotu zeta potenciálu. Dále bylo zjištěno, že citrát sodný zabráňuje v kontaktu fosforylované látky s nanočásticemi. Na UV-Vis spektrofotometru byla u oxidu titaničitého pozorována slabá afinita k adenosinu. Pozorování bylo opakováno s tyrosinem ve fluorimetru, avšak afinita zdaleka nedosahovala požadovaných hodnot.

Výsledky pozorování na elektronovém mikroskopu ukázaly, že nanočástice $\text{Ag}@\text{TiO}_2$ neměly požadovaný kulatý tvar, proto nebylo možné přesné určení jejich velikosti metodou DLS. [6]

2.4 Příprava nanočástic železa

Existuje řada způsobů, jak připravit částice ze železa nebo oxidů železa o velikosti nanometrů.

2.4.1 Mletí železného prášku v kulovém mlýnu

Nejčastěji používaným způsobem výroby železných nanočástic ve velkém množství je mletí. Na začátku stojí vsázka mikrometrových až milimetrových částic železa v podobě prášku¹ do kulového mlýnu², kde jsou rozemlety na velikost nanometrů. Jednou z výhod této metody je jednoduchost ovlivnit velikost částic úpravou procesu mletí. Další výhodou je, že tato metoda nevyužívá žádné drahé ani toxické chemikálie (narozdíl od redukce tetrahydridoboritanem sodným).

Proces mletí má vliv na výslednou velikost a tvar nanočástic, přičemž obě ze zmíněných vlastností mají dopad na jejich reaktivitu. Mletím v inertní atmosféře vznikají velmi reaktivní, pyroforní nanočástice, které při kontaktu se vzduchem spontánně vzplanou. Samovolnému vznícení lze předejít utvořením krycí vrstvy oxidu v mlecím médiu. Pokud médium obsahuje vodu, utvoří se na nanočásticích vrstvička oxidu, nicméně jako vedlejší produkt se vyvíjí vodík. [7]

Li et al. vyvinuli způsob přípravy nanočástic bez použití média. Železný mikroprášek byl společně s koulemi z nerezové oceli vložen do vysokorychlostní rotační komory. Po osmi hodinách mletí vznikly částice nepravidelného lupínkového tvaru o velikostech od 10 do 50 nm, na jejichž povrchu se nacházela vrstva Fe_2O_3 a Fe_3O_4 . [8]

Ribas et al. navrhli dvoufázový mokrá proces mletí s Al_2O_3 jako abrazivem. V prvním kroku byly v konvenčním kulovém mlýnu, za použití monoethylenglykolu jako rozpouštědla, připraveny tenké lupínky $Fe(CO)_5$. Následně byl do mlýnu přidán Al_2O_3 a železné lupínky byly rozmělněny na menší částice. [9]

2.4.2 Redukce kationtů železa tetrahydridoboritanem sodným

Díky své jednoduchosti se jedná o nejběžnější způsob přípravy nanočástic železa v malém měřítku. Soli železa, nejčastěji chloridy, jsou redukovány ve vodném prostředí v inertní atmosféře. Zároveň s redukcí probíhá i hydrolýza tetrahydridoboritanu, kvůli níž je nutné dodávat excesivní množství drahého, toxického činidla. Velikost částic typicky nepřesahuje 100 nm. Reaktivita nanočástic závisí na kyselosti reakční směsi, koncentraci prekursoru a koncentraci tetrahydridoboritanu. [7]

¹ Například pentakarbonyl železa, houbovitě železo, litina.

² Je možno použít i vibrační mlýn.

Kamali et al. zkoumali vliv různých poměrů $\text{NaBH}_4\text{:FeCl}_3$ a ultrazvukového sonikování na krystalinitu a velikost částic. Zjistili, že poměr reaktantů ovlivňuje stupeň krystalinity. Ultrazvuková sonikace během syntézy zapříčinila vznik menších nanočástic. [10]

Existují také ekologické alternativy k redukci tetrahydridoboritanem sodným. Extrakty z listů různých rostlin³ jsou nejen ekologické, ale také na železe přirozeně vytváří krycí vrstvu oxidu. S některými přírodními činidly byly získány částice o velikosti 5 až 10 nm. [11] Byla také snaha o zpracování odpadu vzniklého při lisování citrusové šťávy. Výsledky ukázaly, že extrakty z dužiny a slupky citrusů je možné použít při výrobě nanočástic železa. Připravené nanočástice měly různé velikosti od 3 do 300 nm a významně se u nich lišila reaktivita. [12]

2.4.3 Vysokoteplotní proces

Když je doprovodný materiál žáruvzdorný nebo se u něj po zahřátí vyskytují pouze malé změny ve struktuře, je vysokoteplotní proces založen na napouštění doprovodného materiálu solemi železa, vysoušení a následné redukci na povrchu doprovodného materiálu při teplotě vyšší než 500°C a za použití redukčních činidel.⁴

Jedna z metod spočívá v redukci solí a oxidů železa přichycených na povrchu uhlíkatých materiálů. Druhá je přímou pyrolýzou předpřipravené směsi organického materiálu a sloučenin železa. Zvýšená teplota způsobí karbonizaci organických sloučenin, při čemž jsou sloučeniny železa přeměněny na nanočástice železa účinkem karbotermické redukce. [7]

2.4.4 Naprašování pomocí vzácných plynů

Tato metoda se používá spíše ve specializovaných laboratořích. Pokud je jako cíl naprašování používáno železo, během procesu se tvoří jeho nasycená pára, kterou je možné desublimovat zchlazením. Kuhn et al. připravili nanočástice železa s ochranou vrstvou oxidů. Ve vysokotlaké komoře použili dutý železný válec jako katodu a argon jako naprašovací plyn. Následným vystavením vzniklých nanočástic železa kyslíku pod vysokým tlakem vytvořili na povrchu částic ochrannou vrstvu Fe_2O_3 a Fe_3O_4 . Vzniklé nanočástice byly odolné vůči další oxidaci. [13]

2.4.5 Laserová ablace

Laserová ablace se využívá při přípravě železných nanočástic v malé míře. Ozařování železa laserovým pulsem na některých místech způsobí tavení a odpařování materiálu. Horká pára je chlazená médiem, v němž vznikají nanočástice železa. Pokud je součástí média kyslík nebo voda, nanočástice jednoduše oxidují. Okazoe et al. připravili nanočástice o velikosti okolo 7 nm v atmosférických podmínkách za použití kapalných iontových rozpouštědel obsahujících

³ jabloně, meruňky, hruškovce, třešně, blahovičnicku, aktinidie, citronovníku, mandarinkovníku, mišpule, olivovníku, morušovníku, dubu, pomerančovníku, marakuji, broskvoně, hrušně, borovice, marhaníku, slivoně, kdouloně, ostružiníku, jahodníku, čajovníku, vinné révy a ořešáku

⁴ vodík, vodíkové plazma, argonové plazma

mravenčany, zejména *tetraoktylfosfonium mravenčan* a *tetraoktylfosfonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imid*. [14]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

K ředění roztoků byla používána dvakrát destilovaná, deionizovaná, filtrovaná voda (filtrační hladina 0,5 μm). Použité chemikálie jsou sepsány v tabulce 1.

Název	Číslo CAS	Výrobce
Citrát sodný	6132-04-3	Sigma-Aldrich
Dusičnan stříbrný	7761-88-8	Sigma-Aldrich
Fosfotyrosin	21820-51-9	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný	1310-73-2	Penta Chemicals
Hydroxylamin hydrochlorid	5470-11-1	Sigma-Aldrich
Chlorid železitý hexahydrát	10025-77-1	Carl Roth
Kyselina trifluoroctová	76-05-1	Sigma-Aldrich
Oxid titaničitý	1317-70-0	Sigma-Aldrich
Riboflavin	201-507-1	Carl Roth
Riboflavin-5'-fosfát	130-40-5	Sigma Aldrich
Síran železnatý heptahydrát	7782-63-0	Lachema
L-Tyrosin	60-18-4	Sigma-Aldrich

Tabulka 1: Použité chemikálie

3.2 Přístroje

Typ přístroje	Výrobce	Model
Ramanův spektrometr	Vlastní konstrukce, Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.	-
Tyčový ultrazvukový sonikátor	Bandelin, Německo	UW 3200, sonda MS 72
UV osvitová jednotka	Idonus, Švýcarsko	UV-EXP130R-DEMO
UV-Vis spektrofotometr	Shimadzu, Japonsko	UV-1800

Tabulka 2: Použité přístroje

3.3 Kontrola afinity oxidu titaničitého k fosfotyrosinu

Přímo do mikrozkušavek bylo naváženo přibližně po 4 mg TiO_2 . Následně byla do mikrozkušavek přidána voda tak, aby koncentrace TiO_2 byla všude stejná. Dále byl do disperze přidán tyrosin nebo fosfotyrosin (do finální koncentrace 20 μM). Roztok byl sonikován v ultrazvukovém sonikátoru po dobu jedné minuty. Následně byla přidána TFA (do finální koncentrace 115 μM) a vzniklá směs byla centrifugována při 13000 RPM (18500 g) po dobu 20 minut bez brždění.

3.4 Příprava nanočástic stříbra a oxidu titaničitého

Rozmícháním prášku TiO_2 o deklarované velikosti <25 nm ve vodě byl připraven jeho vodný roztok (31,3 mM). Do šesti kádinek bylo napipetováno po 0,1 ml. Následně byl do kádinek přidán citrát sodný a voda dle tabulky.

Vzorek	Poměr TiO_2 :citrát	Množství citrátu	Koncentrace citrátu	H ₂ O
č. 1	1:0	0 μl	10 mM	900 μl
č. 2	1:0,12	37,6 μl	10 mM	862 μl

Vzorek	Poměr TiO ₂ :citrát	Množství citrátu	Koncentrace citrátu	H ₂ O
č. 3	1:0,24	75,1 ul	10 mM	825 ul
č. 4	1:0,63	19,7 ul	100 mM	880 ul
č. 5	1:0,73	22,9 ul	100 mM	877 ul
č. 6	1:3	93,9 ul	100 mM	806 ul

Tabulka 3: Přídavek citrátu sodného a H₂O

Připravené vzorky byly dále upraveny dvěma způsoby, a sice ultrazvukovým sonikátorem a dispergátorem. Vzorky byly vloženy do chladicích bloků a ponechány několik minut zchladnout. Dále byl do vzorků na 180 sekund vložen ultrazvukový sonikátor a vzorky byly zpracovávány při poměru pulsu a pauzy 2:2 a amplitudě 40 % přímo v chladicích blocích. Následně byly vzorky zahřáté při sonikaci opět ponechány vychladnout. Nakonec byla reakční směs vložena do UV osvitové jednotky, jejíž svit byl čočkou zaostřen na směs, jež byla dvakrát deset minut osvětlována při výkonu 50 %.

3.5 Příprava nanočástic oxidů železa se stříbrem

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,695 g; 4,575 mmol) byl rozpuštěn v H_2O (5 ml) a za stálého míchání smíchán s $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1,185 g; 4,386 mmol) rozpuštěným v H_2O (8,75 ml). Dále byl přidán roztok $NaOH$ (15 ml; 1,5 M). Disperze byla míchána po dobu 15 minut. Směsi byly ponechány sedimentovat, většina supernatantu byla odebrána a nahrazena stejným množstvím vody. Takto byly připraveny čtyři kádinky. Do každé kádinky byl následně přidán roztok hydroxylamin hydrochlorid ($HA-HCl$) (0,62 M), popřípadě i voda, podle tabulky 3.

vzorek	poměr Ag:Fe	HA-HCl	H ₂ O
č. 1	0,38:1	5,4 ml	15,6 ml
č. 2	0,77:1	10,7 ml	10,3 ml
č. 3	1:1	14 ml	7 ml
č. 4	1,54:1	21 ml	0 ml

Tabulka 4: Přídavek HA-HCl a H₂O

Následně byl přidán roztok $NaOH$ (10 ml; 1,5 M). Z připravených kádinek bylo vždy odebráno po 10 ml směsi do vialek o objemu 50 ml. Vialky byly následně ponořeny do

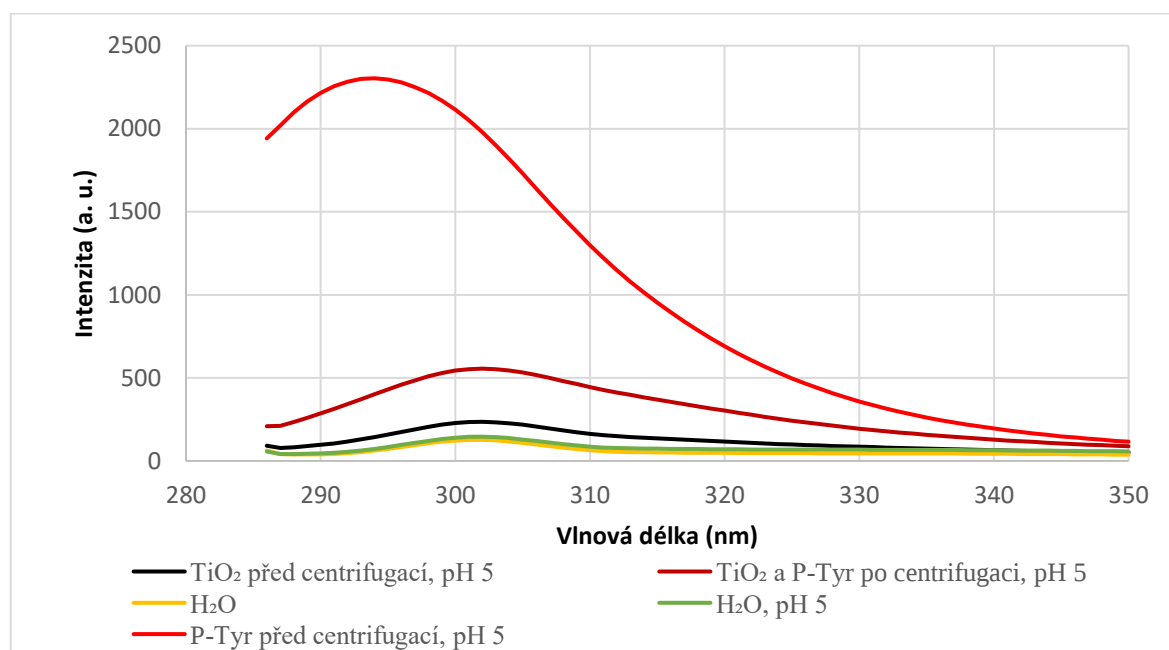
ultrazvukové lázně. Po třech minutách byl přímo v lázni přidán do vialek jistý objem $AgNO_3$ (88 mM) podle tabulky 3. Směs byla nechána v ultrazvukové lázni další tři minuty. Nakonec byla do vialek přidána deionizovaná voda tak, aby se sjednotil objem, a tím i koncentrace částic železa, podle tabulky 3.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato část práce vyhodnocuje proces přípravy a definuje nejefektivnější postupy. Dále zkoumá a analyzuje výsledky měření provedeného na připravených vzorcích.

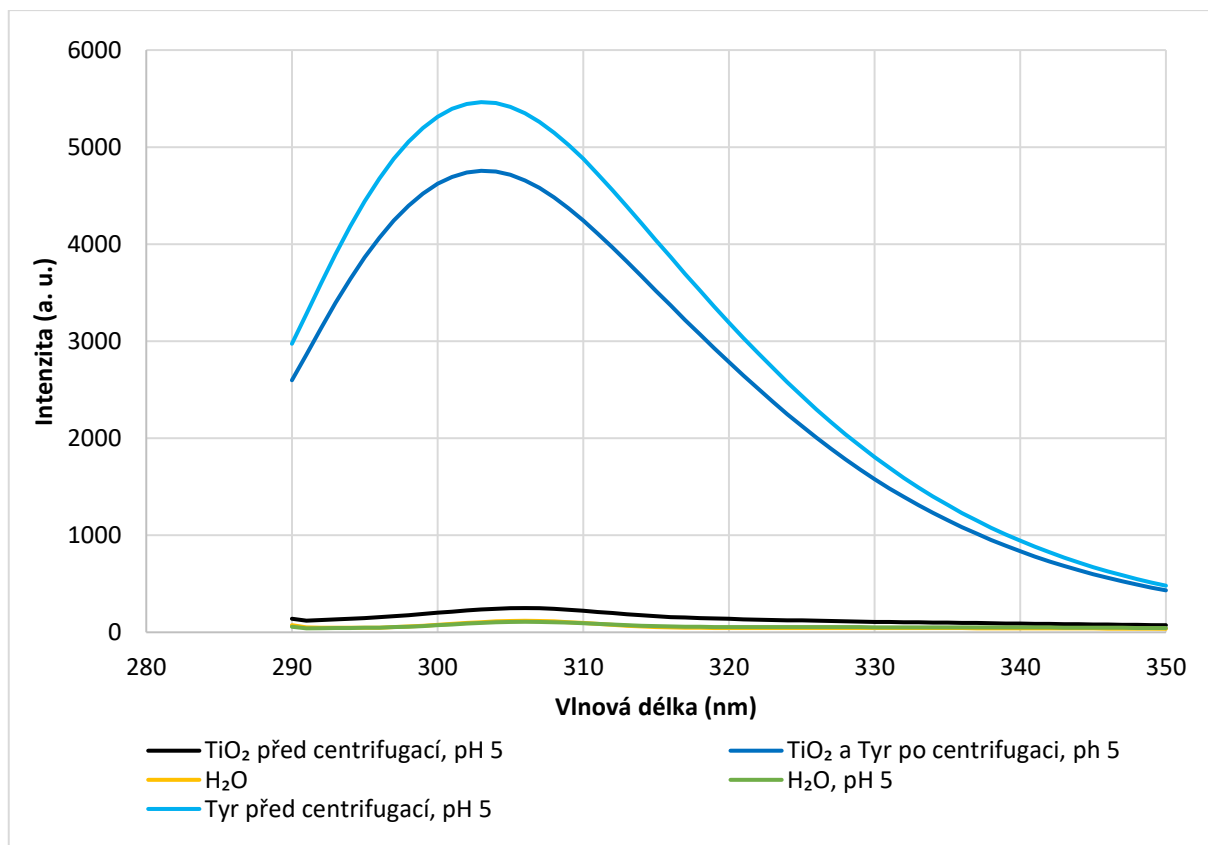
4.1 Afinita oxidu titaničitého k fosfotyrosinu

Supernatant byl zkoumán na fluorimetru. Látka byla osvětlena UV světlem (276 nm) a sledována emise v rozmezí 290-350 nm. V případě afinity nanočástic k fosfátové skupině by měl analyt při centrifugování klesnout společně s nanočásticemi na dno v podobě sedimentu. Pro přesnost byl na fluorimetru měřen také tyrosin, fosfotyrosin, TFA a voda samostatně, aby se vyloučil jejich vliv na sedimentaci analytu nebo přesnost měření.



Obrázek 2: Graf úbytku fosfotyrosinu

Jak je patrné z obrázku 2, po centrifugaci došlo k výraznému úbytku fosfotyrosinu v supernatantu.



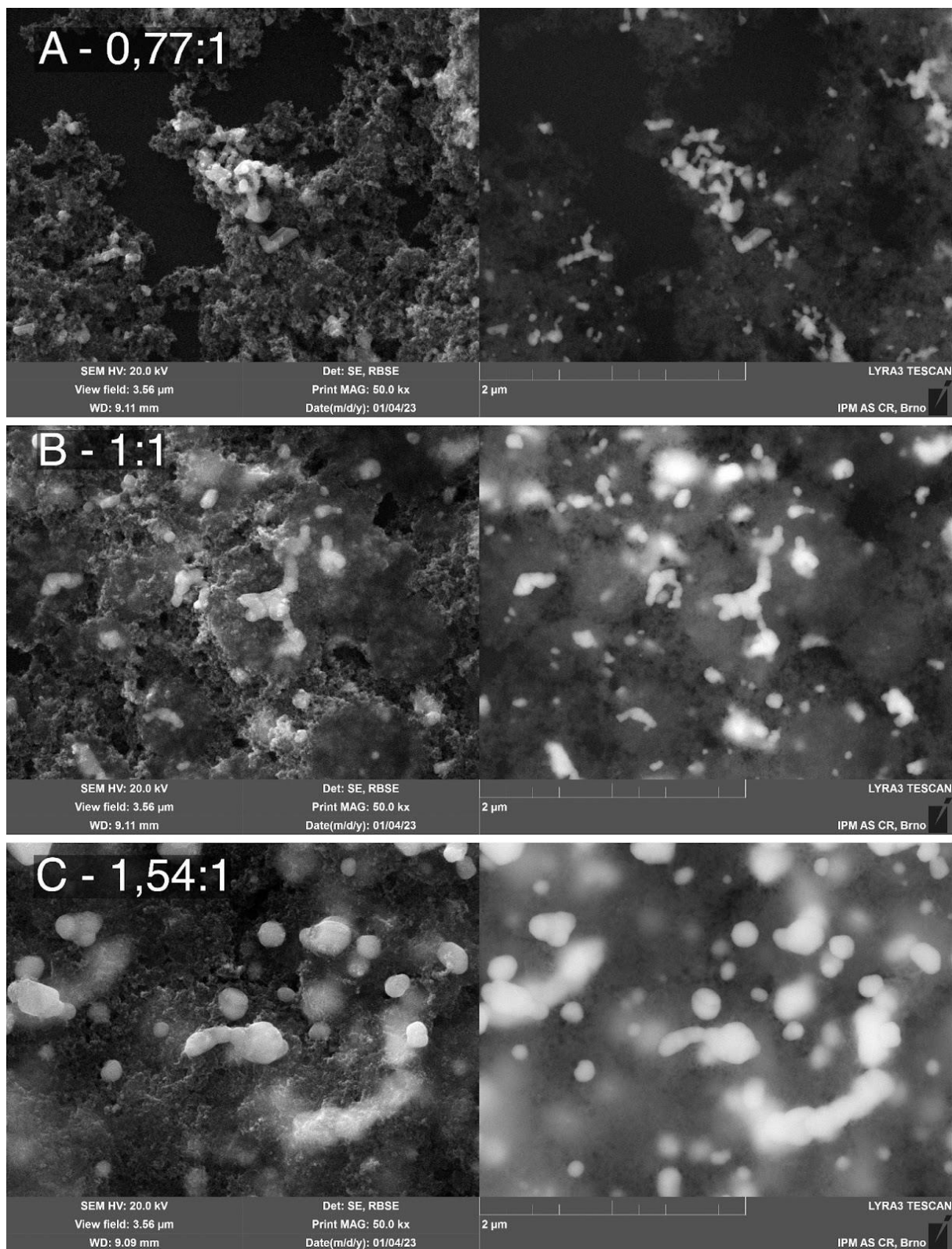
Obrázek 3: Graf úbytku tyrosinu

Dle obrázku 3 koncentrace nefosforylovaného tyrosinu klesla podstatně méně než koncentrace fosfotyrosinu (obrázek 2). Dá se tedy předpokládat, že existuje afinita mezi nanočásticemi oxidu titaničitého a fosfotyrosinem.

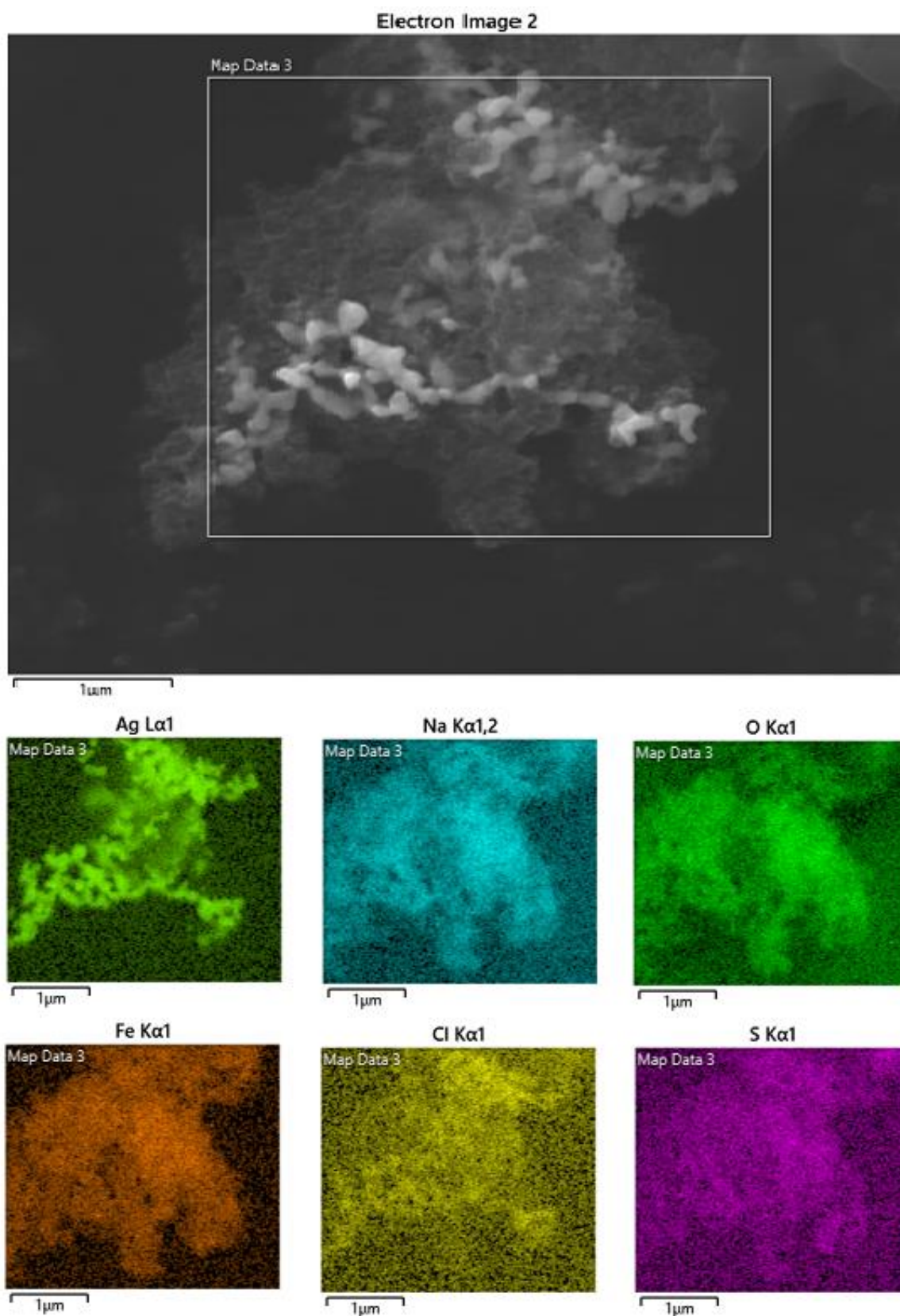
Bohužel ale selhaly všechny snahy týmu o zabránění rychlé agregace nanočástic, což značně komplikuje používání suspenze, ale hlavně zapříčiňuje obalování velkých agregátů TiO₂ stříbrem při snahách o vytvoření bimetalických nanočástic. Od TiO₂ bylo upuštěno a pokračovalo se s oxidy železa.

4.2 Nanočástice železa se stříbrem

Vzniklé nanočástice byly nafoceny metodou SEM (obrázek 4). Ze získaných snímků je patrné, že došlo ke shlukování železa do velkých agregátů, na jejichž povrchu jsou adsorbovány podstatně menší částice stříbra, o čemž svědčí i provedená prvková analýza (obrázek 5). Jelikož bimetalické částice nedosahovaly požadované malých velikostí, neměly pravidelný tvar a rychle sedimentovaly, nemohly být měřeny na zetasizeru. Připravené částice byly větší než v řádech nanometrů.



Obrázek 4: SEM snímky Ag@TiO₂ (měřeny na čistém křemíku, přilepeném oboustrannou uhlíkovou páskou na terčik; hodnoty označují hmotnostní poměr Ag:Fe, zvýšený kontrast; A Ag:Fe $\approx$ 0,77:1; B Ag:Fe $\approx$ 1:1; C Ag:Fe $\approx$ 1,54) $\approx$ 1

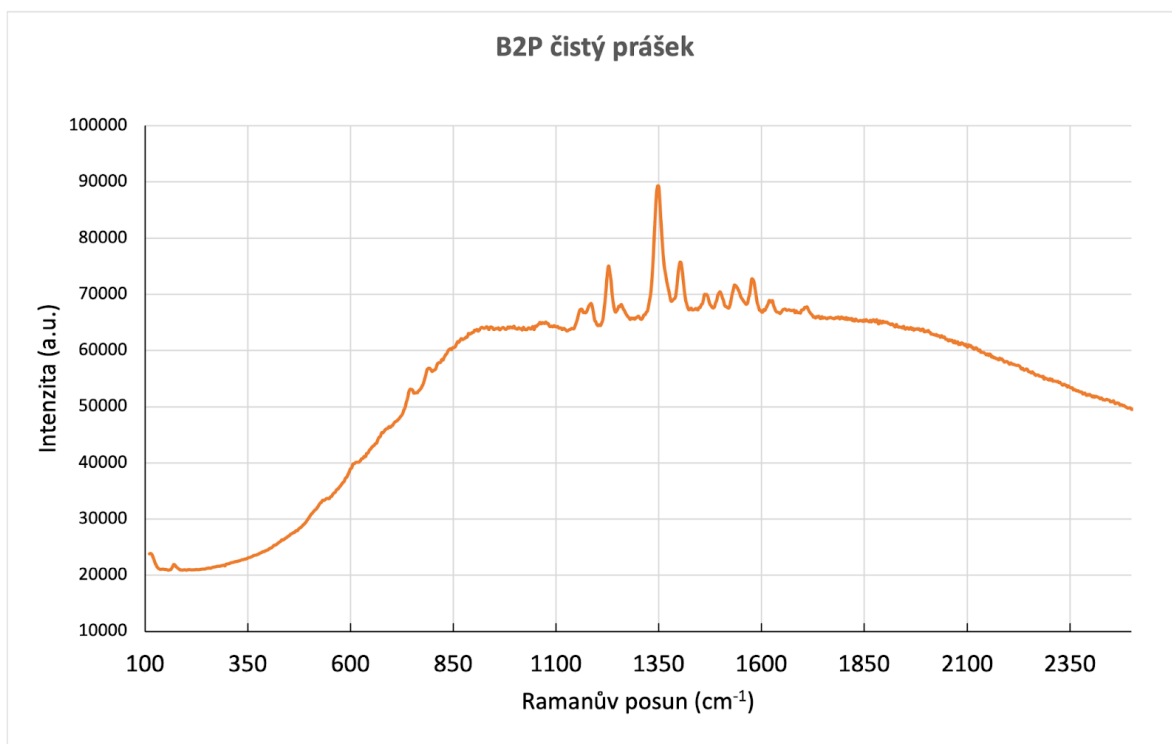


Obrázek 5: SEM snímky Ag@TiO₂ pro prvkovou analýzu

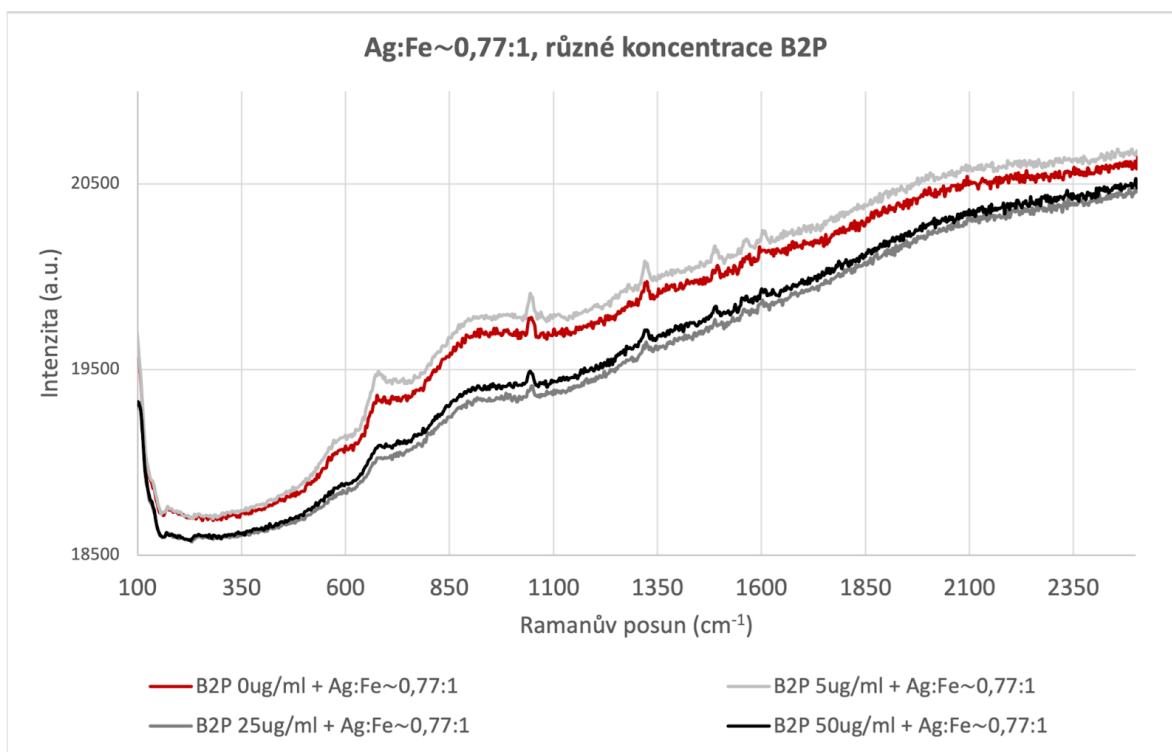
Dále bylo prováděno měření na Ramanově spektrometru při vlnové délce laseru 632,8 nm, výkonu 30 mW, s objektivem 10x a difrakční mřížkou 1200 l/mm. Expoziční čas byl nastaven na 3 sekundy a 5 akumulací. Měření každého vzorku bylo prováděno ze šesti 1,5 ul kapek či

malého krystalku a spektra pak byla zprůměrována. Směsi suspenzí a riboflavinu byly připraveny v objemovém poměru 1:1.

Pás 1350 cm^{-1} , nejvýraznější signál Ramanova rozptylu riboflavin fosfátu (obrázek 6), se neobjevil v žádné měřené koncentraci připravené koncentrační řady 0-50 ug/ml (obrázek 7). Nebyl pozorován ani trend, že by se nějaký pás měnil se zvyšující koncentrací B2P. Všechna spektra vypadají jako vzorkový blank, pásy tedy náleží látkám obsaženým v suspenzi, nikoli riboflavinu.



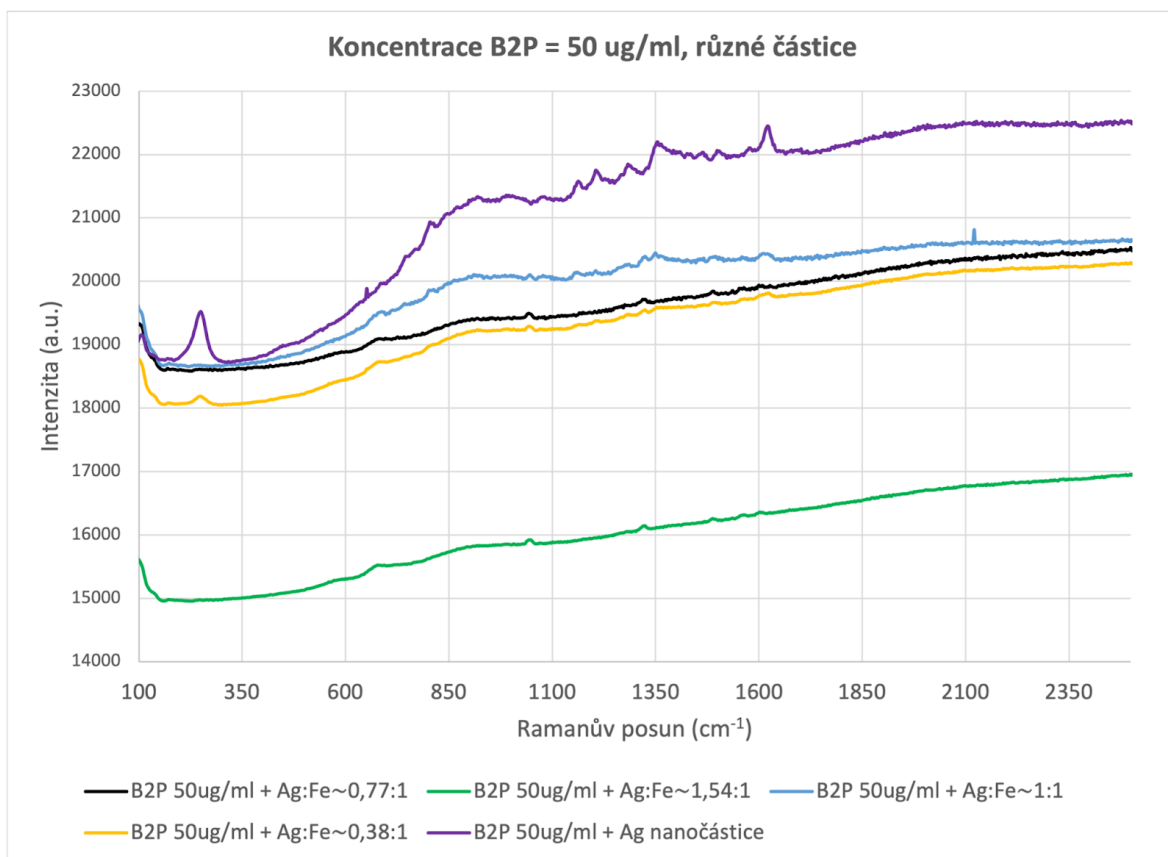
Obrázek 6: Spektrum Ramanova posunu práškového B2P



Obrázek 7: Spektrum Ramanova posunu B2P s Ag:Fe $\approx$ 0,77:1

Jiné poměry Ag:Fe mají velmi podobná spektra (obrázek 8). Výjimkou je suspenze 1:1, která slabý pás 1350 cm^{-1} poskytuje. Je možné, že jde o její dostatečně velkou plochu stříbra. Částice stříbra jsou stále malé, ale početnější než u nižších poměrů. Nejvyšší poměr Ag:Fe, 1,54:1, zesiluje Ramanův signál nejméně, pravděpodobně je to způsobeno příliš velkými částicemi stříbra. Částice musí být dostatečně malé, aby Ramanův signál zesilovaly. [15]

Pro srovnání byl B2P změřen i s čistě stříbrnými nanočásticemi (připravenými dle Leopold, Lendl [16]). Je patrné, že zesílení signálu je mnohem větší než u kterékoliv připravené bimetalické suspenze.



Obrázek 8: Ramanův posun B2P (50 ug/ml) s Ag:Fe o různých poměrech

Do budoucnosti je plánováno zmenšit velikost částic, neboť menší částice lépe zesilují Ramanův rozptyl, mají větší plochu a práce s koloidní disperzí je jednodušší než se suspenzí, která trpí rychlou sedimentací. Zmenšení až na úroveň nanočástic by umožnilo použití koloidu v kapilárách, které se používají v mnoha chemických analýzách.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo připravit bimetalické nanočástice, které by zesilovaly Ramanův rozptyl při detekci fosforylovaných proteinů. Byly připraveny nanočástice titanu se stříbrem o různých poměrech. Tyto nanočástice však nebyly dostatečně malé, neměly požadovaný tvar a nevykazovaly dostatečnou afinitu k fosforylovaným látkám, proto bylo od jejich zkoumání upuštěno. Dále byly připraveny nanočástice oxidů železa se stříbrem o čtyřech různých poměrech zastoupení složek. Výsledky měření však ukázaly, že vliv zkoumaných nanočástic na Ramanův rozptyl byl nepatrný a téměř se ztratil v šumu. V budoucnosti bude snaha zmenšit velikost částic, která představuje nejpravděpodobnější příčinu nezdaru. Neúspěch práce by neměl odrazovat od dalšího bádání v této oblasti, neboť včasná, přesná a pro všechny dostupná diagnóza je určitě jeden ze základních předpokladů pro všeobecné blaho.

6 ZDROJE A POUŽITÁ LITERATURA

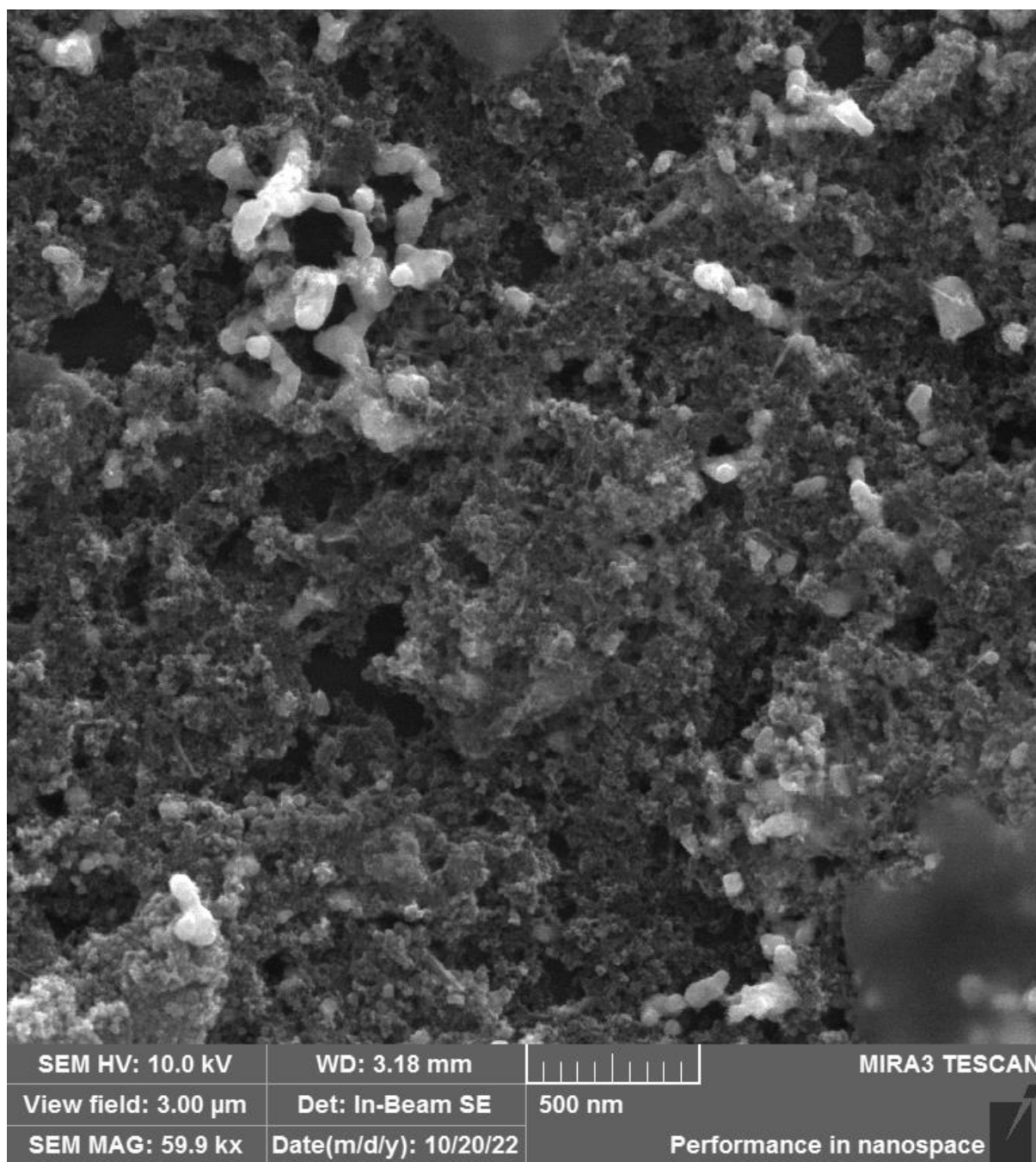
- [1] SMOLY, I, SHEMESH, N. ZIV-UKELSON, M. BEN-ZVI, A. a YEGER-LOTEM, E. An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. *PLOS Computational Biology* [online]. California, 2017, 30 January 2017, 2017 [cit. 2023-01-03]. ISSN 1553-7358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1005221
- [2] DOBREV, Dobromir a Xander H.T. WEHRENS. Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias. *Circulation Research* [online]. 2014, 114(8), 1311-1319 [cit. 2023-01-14]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300568
- [3] JOHNSON, Louise N. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2009, 2009(37), 627-641 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: doi:10.1042/BST0370627
- [4] GE, Xiaoxiao, Weiying ZHANG, Yuehe LIN a Dan DU. Magnetic Fe₃O₄@TiO₂ nanoparticles-based test strip immunosensing device for rapid detection of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2013, 50, 486-491 [cit. 2023-01-20]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2013.07.017
- [5] KERMAN, Kagan, Miyuki CHIKAE, Shohei YAMAMURA a Eiichi TAMIYA. Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation. *Analytica Chimica Acta* [online]. Japan, 2007, 4 April 2007, 2007(588), 26-33 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2007.02.001
- [6] BLATNÁ, Karolína. *Syntéza a charakterizace bimetalických nanočástic pro studium fosforylovaných biomolekul metodou povrchem zesílené Ramanovy spektrometrie* [online]. Brno, 2020 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/zqzvb/bakalarska_prace_Karolina_Blatna.pdf. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie. Vedoucí práce Anna Týčová.
- [7] PASINSZKI, Tibor a Melinda KREBSZ. *Synthesis and Application of Zero-Valent Iron Nanoparticles in Water Treatment, Environmental Remediation, Catalysis, and Their Biological Effects* [online]. Fiji, 2020 [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano10050917>. Department of Chemistry, School of Pure Sciences, College of Engineering, Science and Technology, Fiji National University, Suva P.O. Box 7222, Fiji.
- [8] LI, Shaolin, Weile YAN a Wei-xian ZHANG. Solvent-free production of nanoscale zero-valent iron (nZVI) with precision milling. *Green Chemistry* [online]. 2009, 11(10) [cit. 2023-01-29]. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/b913056j

- [9] RIBAS, D., K. PEŠKOVÁ, I. JUBANY, P. PARMA, M. ČERNÍK, J.A. BENITO a V. MARTÍ. High reactive nano zero-valent iron produced via wet milling through abrasion by alumina. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2019, 366, 235-245 [cit. 2023-01-29]. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2019.02.090
- [10] KAMALI, Mohammadreza, Maria Elisabete V. COSTA, Gonzalo OTERO-IRURUETA a Isabel CAPELA. Ultrasonic irradiation as a green production route for coupling crystallinity and high specific surface area in iron nanomaterials. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2019, 211, 185-197 [cit. 2023-02-04]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2018.11.127
- [11] MACHADO, J, J. G. PACHECO, H. P. A. NOUWS, J. T. ALBERGARIA a C. DELERUE-MATOS. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of The Total Environment* [online]. Portugal, 2015, 2015(533), 76-81 [cit. 2023-01-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.091
- [12] MACHADO, S, J. P. GROSSO, H. P. A. NOUWS, J. T. ALBERGARIA a C. DELERUE-MATOS. Utilization of food industry wastes for the production of zero-valent iron nanoparticles. *Science of The Total Environment* [online]. Portugal, 2014, 2014(496), 233-240 [cit. 2023-01-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.058
- [13] KUHN, L Theil, A BOJESSEN, L TIMMERMANN, M Meedom NIELSEN a S M RUP. Structural and magnetic properties of core shell iron iron oxide nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter* [online]. 2002, 14(49), 13551-13567 [cit. 2023-01-29]. ISSN 0953-8984. Dostupné z: doi:10.1088/0953-8984/14/49/311
- [14] OKAZOE, Shinya, Yoshiro YASAKA, Masaki KUDO, Hiroshi MAENO, Yasukazu MURAKAMI a Yoshifumi KIMURA. Synthesis of zero-valent iron nanoparticles via laser ablation in a formate ionic liquid under atmospheric conditions. *Chemical Communications* [online]. 2018, 54(56), 7834-7837 [cit. 2023-01-29]. ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi:10.1039/C8CC03350A
- [15] KELLY, K. Lance, Eduardo CORONADO, Lin Lin ZHAO a George C. SCHATZ. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2003, 107(3), 668-677 [cit. 2023-02-04]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp026731y
- [16] LEOPOLD, Nicolae a Bernhard LENDL. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2003, 107(24), 5723-5727 [cit. 2023-02-08]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp027460u

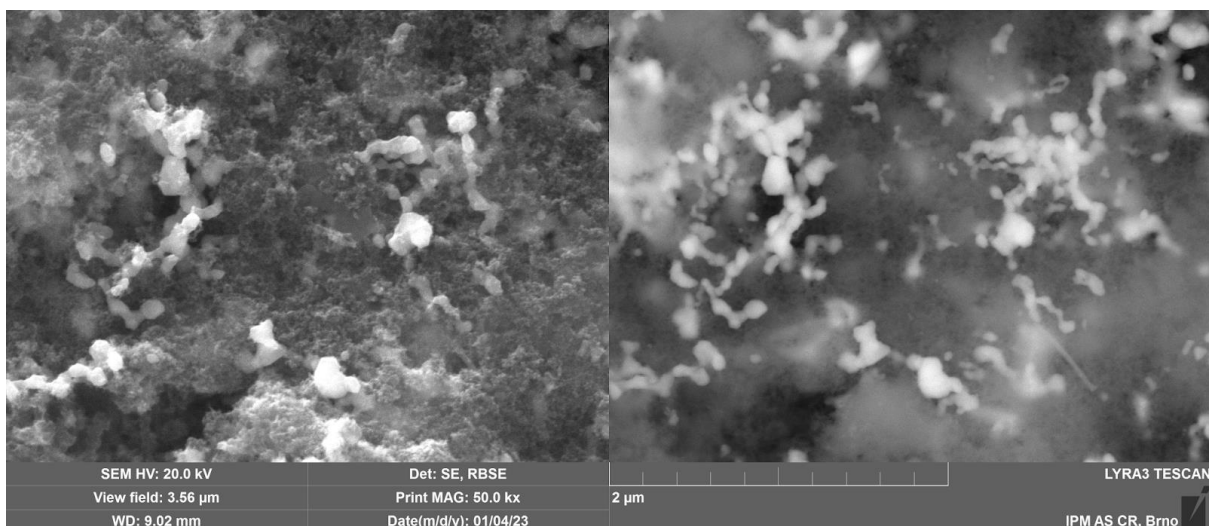
7 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Velikostní distribuce nanočástic TiO_2	9
Obrázek 2: Graf úbytku fosfotyrosinu	17
Obrázek 3: Graf úbytku tyrosinu	18
Obrázek 4: SEM snímky Ag@TiO_2	19
Obrázek 5: SEM snímky Ag@TiO_2 pro prvkovou analýzu	20
Obrázek 6: Spektrum Ramanova posunu práškového B2P	22
Obrázek 7: Spektrum Ramanova posunu B2P s $\text{Ag:Fe} \approx 0,77:1$	22
Obrázek 8: Ramanův posun B2P (50 ug/ml) s Ag:Fe o různých poměrech.....	23
Tabulka 1: Použité chemikálie.....	13
Tabulka 2: Použité přístroje	14
Tabulka 3: Přídavek citrátu sodného a H_2O	15
Tabulka 4: Přídavek HA-HCl a H_2O	15

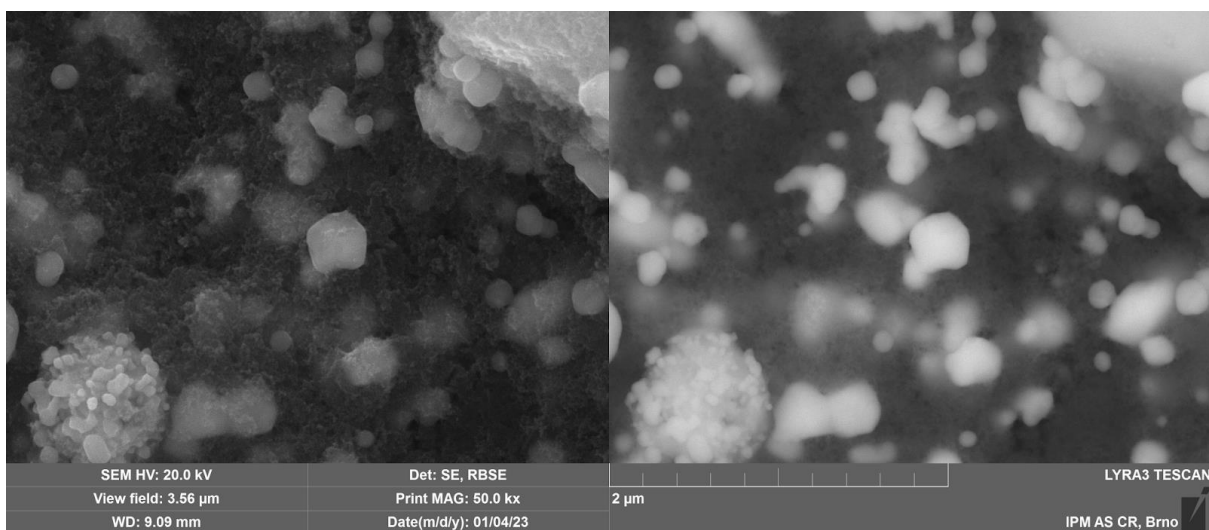
8 PŘÍLOHA 1: SNÍMKY ZE SKENOVACÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE



Snímek SEM Ag@Fe, Ag:Fe $\approx$ 0,77:1



Snímek SEM Ag@Fe, Ag:Fe $\approx$ 0,38:1



Snímek SEM Ag@Fe, Ag:Fe $\approx$ 1,54:1