

Primena SERS i SERRS ramanskih tehnika, biosenzori na principu rezonancije površinskog plazmona

**Dr Jasmina Dimitrić Marković, redovni profesor
Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu
markovich@ffh.bg.ac.rs**

- NR efekat
- RR efekat
- SERS i SERRS efekat

- ramanski spektri – spektri kombinacionog rasejanja (KR spektri)

- rasejanje
 - elastično
 - neelastično

- ramanski spektri nastaju promenom unutrašnje energije molekula pod dejstvom upadnog neapsorbujućeg monohromatskog zračenja iz ULJ ili VID oblasti (ili bliske IC)

Ramanski spektri mogu biti:

- rotacioni**
- rotaciono-vibracioni**
- elektronski (ređe)**

- **1871. god. lord Rejli** (1903. dobio Nobelovu nagradu za fiziku) je pokazao da je intenzitet rasutog zračenja u vezi sa talasnom dužinom zračenja preko relacije:

$$I_{rasuto} \approx \frac{1}{\lambda^4} \approx V^4$$

pet puta efikasniji
proces za
 $\lambda = 400 \text{ nm}$ nego za
 $\lambda = 600 \text{ nm}$

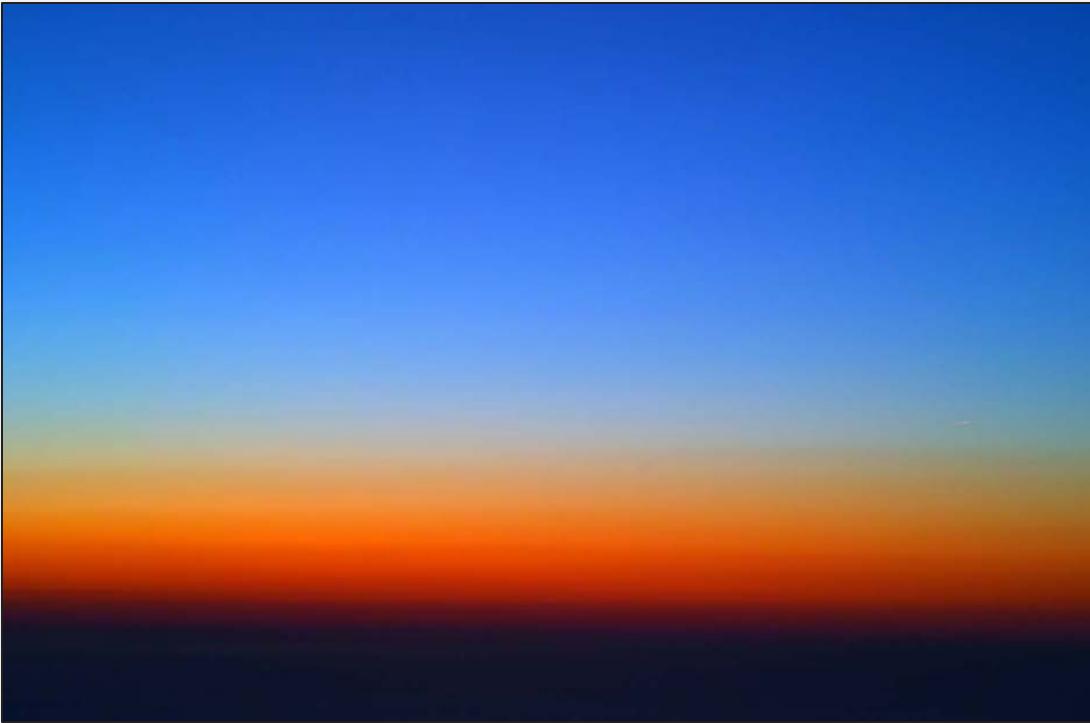
poprečni presek za Rejljevo
rasejanje

$$\sigma_s = \frac{2\pi^5}{3} \frac{d^6}{\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2$$



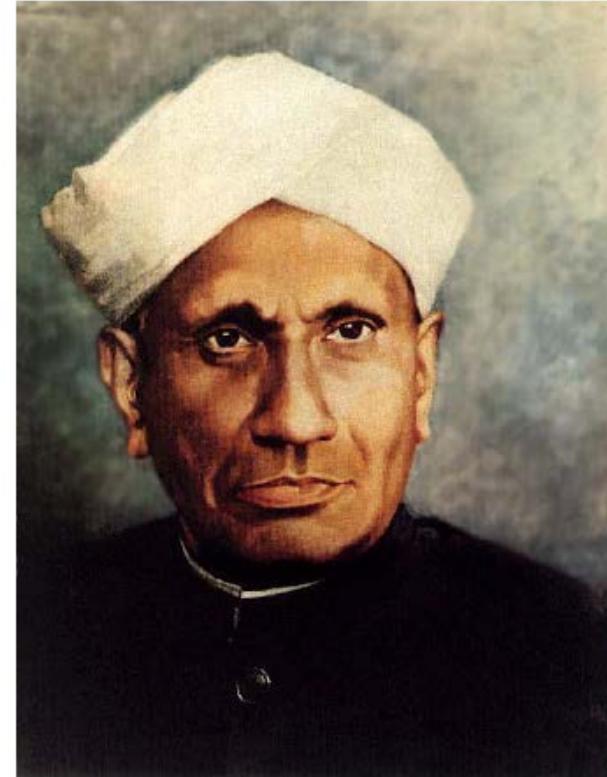
Lord Rayleigh
(1842-1919)

- ova relacija upravo pokazuje da je plava komponenta sunčevog zračenja najviše podložna rasejanju što je i razlog postojanja plave boje neba
- Rejljevo rasejanje u atmosferi je posledica **rasejanja na molekulima vazduha** (čija je dimenzija mnogo manja od talasne dužine upadnog zračenja) koji se haotično kreću odnosno. posledica je fluktuacija u gustini vazduha (dovodi do različitih vrednosti indeksa prelamanja u oblastima različitih gustina)



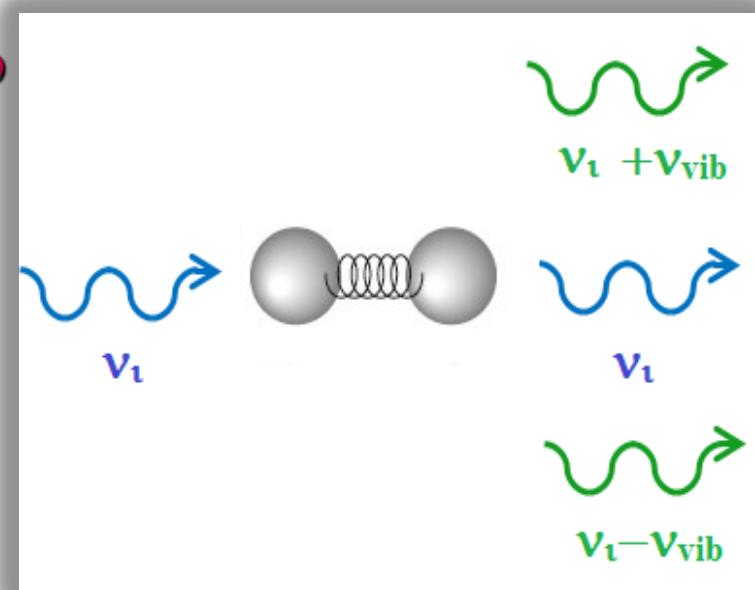
- **crvenkasto Sunčeve svetlo koje se vidi pri zalasku Sunca je posledica toga što se njegovim zalaskom odn. njegovim spuštanjem ka horizontu povećava gustina atmosfere kroz koju svetlost prolazi a to pojačava Rejlijevo rasejanje tako da se kraći talasi potpuno rasejavaju i uklanjuju plavu komponentu zračenja**
- **preostalo nerasejano zračenje se sastoji od dužih talasa što daje crveno-narandžastu boju neba**

- Ramanov efekat zapažen je **1928.** god. od strane **Ramana i Krišnana** pri propuštanju monohromatskog zračenja iz ULJ i VID dela spektra na neapsorbujući sloj rastvora (isto važi i za gasove i čvrste supstanca), transparentan za upadno zračenje određene energije



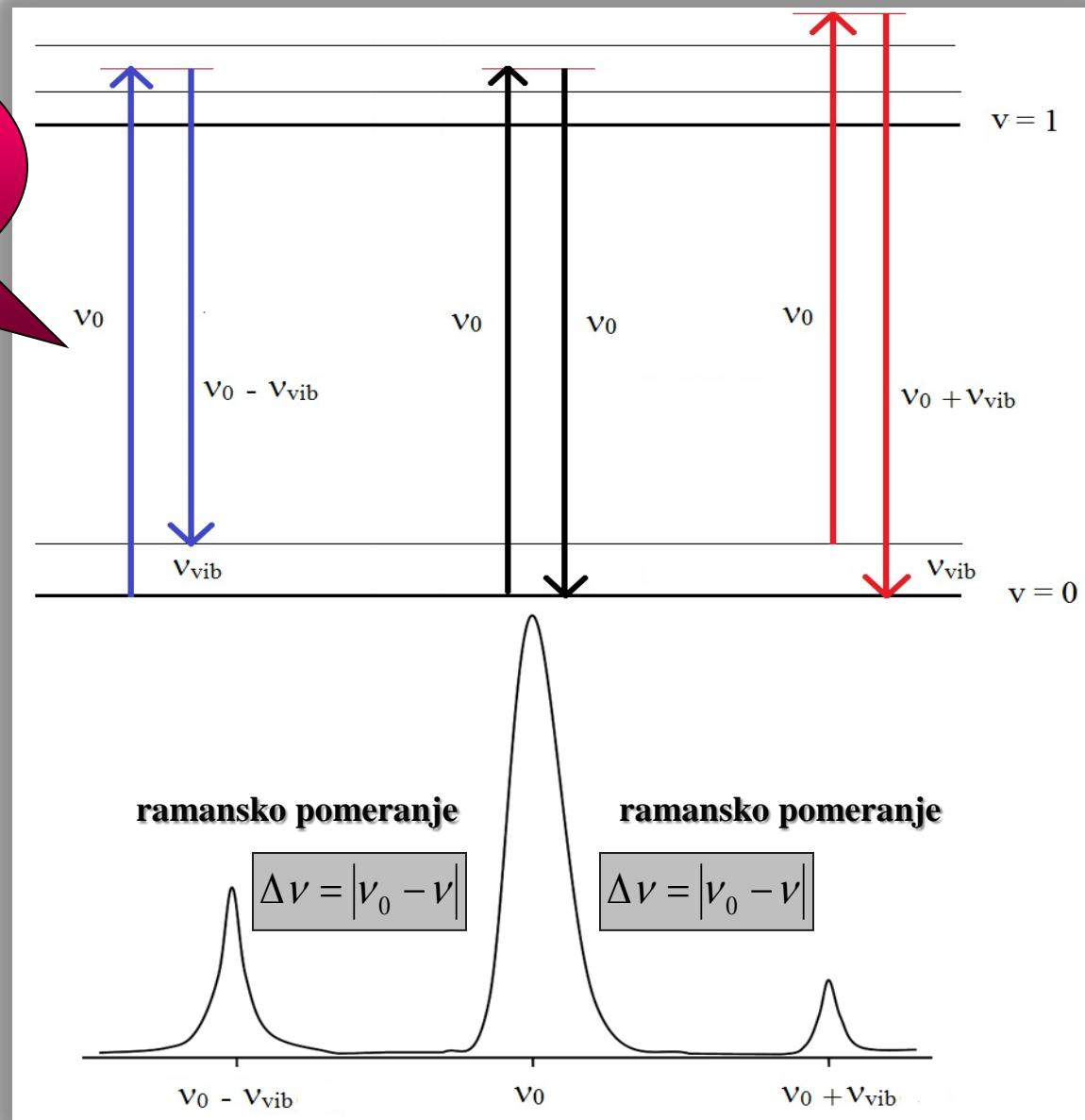
**Chandrasekhara
Venkata Raman
1888-1970**

- ukoliko upadno zračenje ima diskretan spektar tada se u spektru rasutog zračenja javljaju tri komponente:
- zračenje iste frekvencije kao i upadno zračenje (**REJLIJEVO RASEJANJE**)
- zračenje više frekvencije od upadnog zračenja
(ANTI STOKSOVO ZRAČENJE) i
- zračenje niže frekvenciji od upadnog zračenja (**STOKSOVO ZRAČENJE**)



Zračenje koje menja frekvenciju naziva se **RAMANSKO ZRAČENJE**

$$\frac{I_{ANTISTOKS}}{I_{STOKS}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu}{\nu_0 - \nu} \right)^4 e^{-\frac{h\nu}{kT}}$$



Mogući prelazi izazvani interakcijama foton-molekul

Objašnjenje Ramanskog efekta:

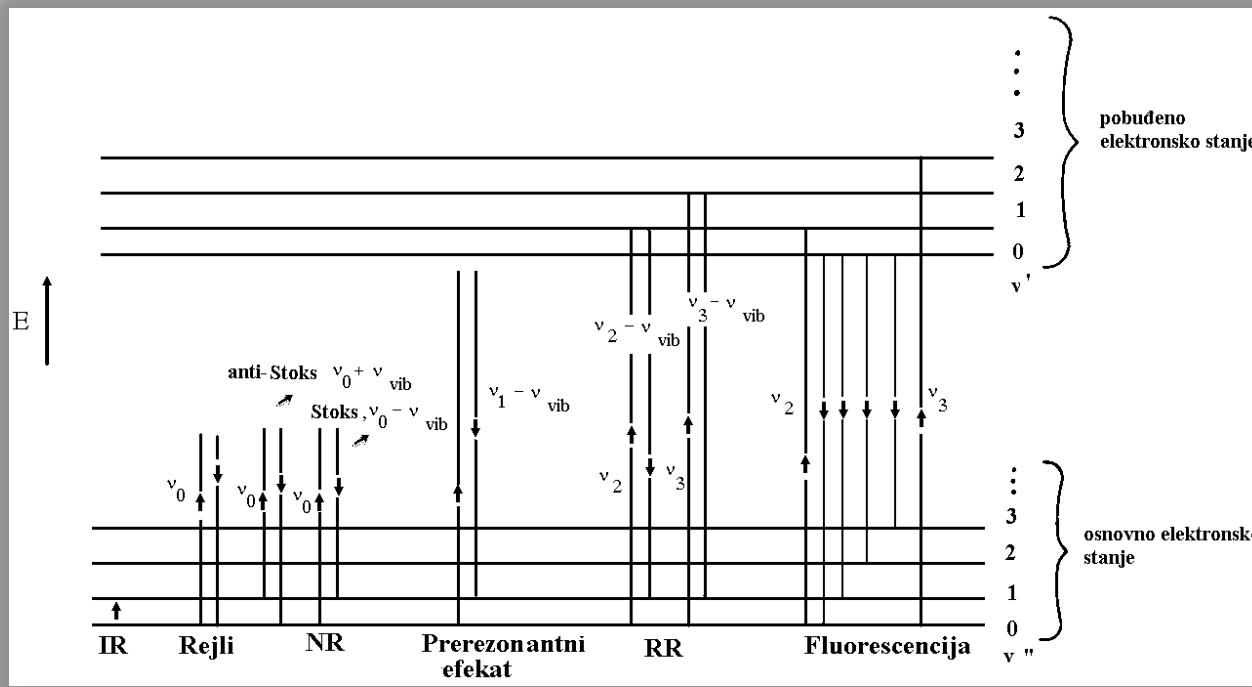
- **klasična teorija**
- **kvantna teorija**

- **opšte izborne pravilo za pojavu Ramanskih spektara:**

**MOLEKUL MORA BITI ANIZOTROPNO
POLARIZABILAN**

Rezonantna ramanska spektroskopija

Mogući prelazi izazvani foton-molekul interakcijama



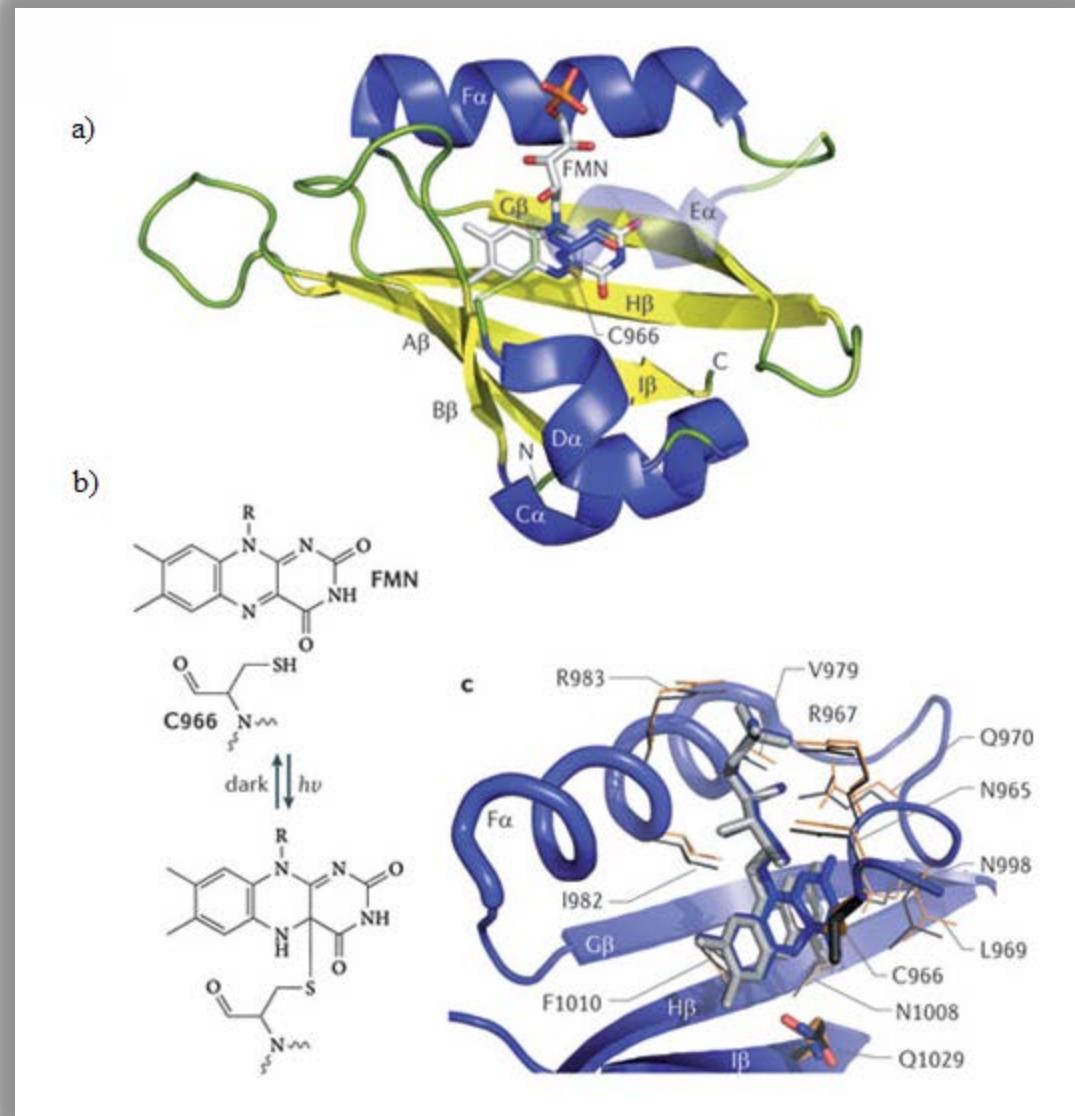
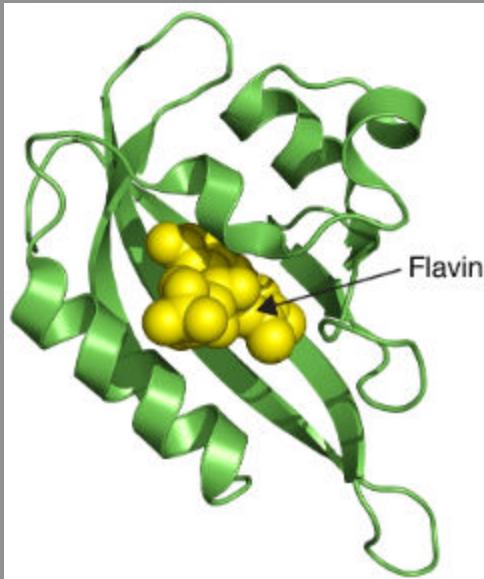
- ukoliko energija upadnog zračenja odgovara energiji elektronskog pobuđivanja molekula (u rezonanciji su) datim procesom nastaju **REZONANTNI RAMANSKI SPEKTRI (RR spektri)**

- trake u RR spektrima su znatno intenzivnije i to **10^2 - 10^6 puta**, u odnosu na trake u normalnim ramanskim spektrima
- u RR efektu dolazi do selektivnog pojačanja intenziteta nekih ramanskih traka
- pojačanje intenziteta nekih traka, koje je posledica fenomena rezonancije i sprezanja elektronske i vibracione energije, dovodi do selektivnosti u dobijanju vibracionog spektra jedne jedine hromofore, kao izolovane, u slučajevima kada je ona sastavni deo obično veoma složenih bioloških sistema

- ovaj aspekt Ramanske spektroskopije postaje od izuzetne važnosti u analizi velikih bioloških molekula sa hromoforama koje su deo njihove strukture
- u ovakvim strukturama CT (ET) prelazi metalnih kompleksa obično pojačavaju intenzitet metal-ligand istežućih (a i savijajućih) vibracija kao i nekih vibracija koje su karakteristične za same ligandne molekule
- kod molekula kao što je hemoglobin podešavanje upadne radijacije lasera na energiju ET prelaza koji uključuje prelaz sa atoma gvožđa daje spektar koji oslikava samo istežuće i savijajuće vibracije koje potiču od tetrapirolegvožđe grupe

**Stepen pojačanja intenziteta zavisi od energije
upadnog zračenja i dostiže maksimum kada je
E pobuđivačkog zračenja približno jednaka E
maksimuma apsorpcione trake**

Flavin hromofora i njeno vezivanje u strukturi proteina



**Površinski pojačana ramanska
spektroskopija**

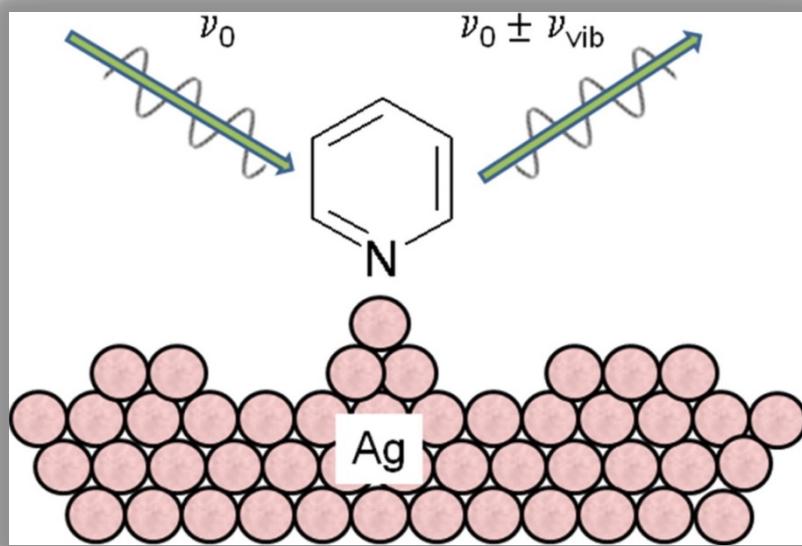
i

**Površinski pojačana rezonantna
ramanska spektroskopija**

SERS - Surface Enhanced Raman Spectroscopy

SERRS - Surface Enhanced Resonant Raman Spectroscopy

- ime “**površinski pojačana ramanska spektroskopija**” ukazuje na to da se ovom metodom dobijaju iste informacije kao i primenom ramanske spektroskopije ali uz znatno pojačanje intenziteta signala
- efekat je slučajno otkriven 1974. od strane Flaishman-a, Hendr-a i Macquillan-a sa Univerziteta Southampton -Velika Britanija kada su pokušali da dobiju ramanski spektar piridina na srebrenoj elektrodi grube i velike površine

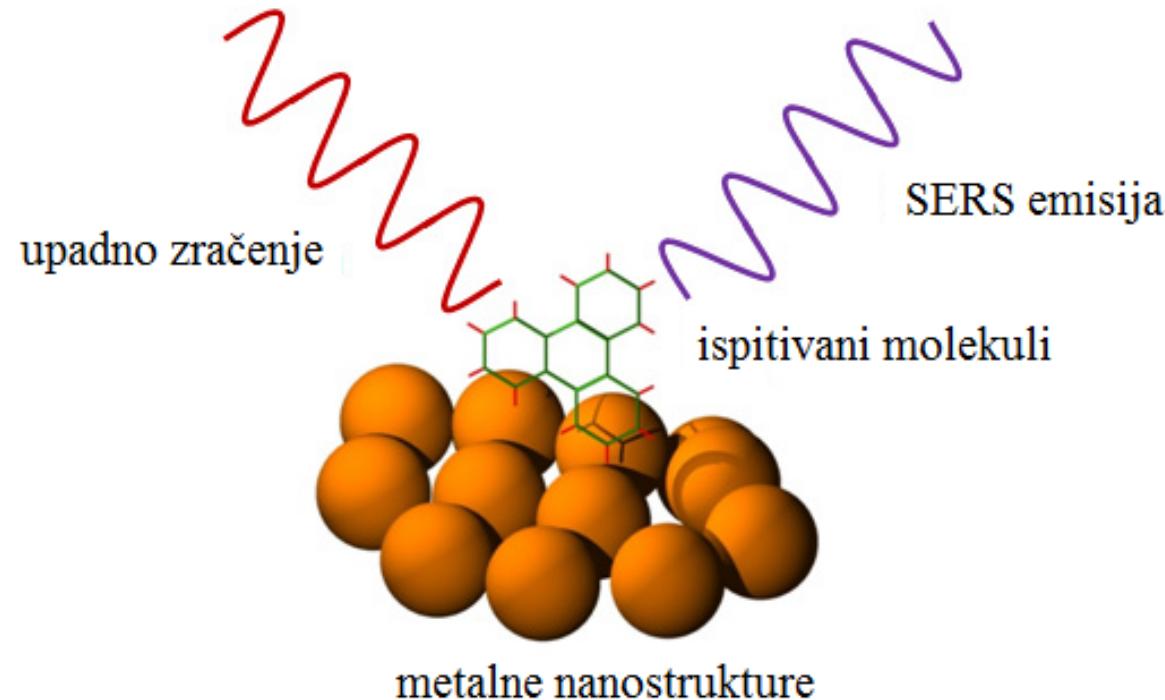


- spektar koji je dobijen bio je izuzetnog kvaliteta što su autori povezali sa povećanom površinom Ag elektrode
- kasnije, 1977. god, van Duyne shvata da, pored uticaja površine, pojačanje intenziteta rasejanja mora biti generisano **realnim pojačanjem efikasnosti ramanskog rasejanja** koje je veće za faktor i do **10^5 - 10^6** u odnosu na signal u NR spektrima

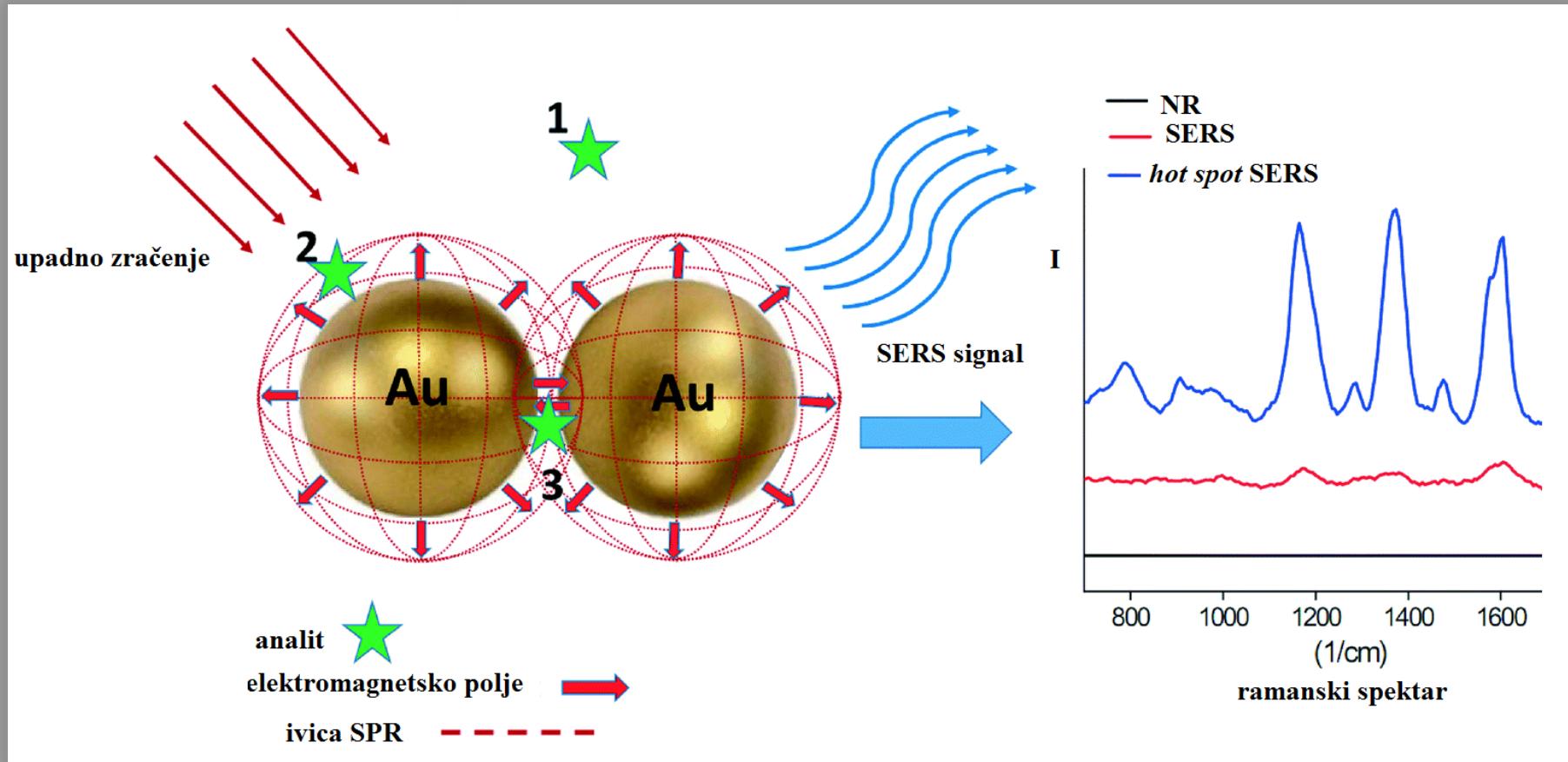
Glavne karakteristike SERS metode su:

- izuzetno osetljiva, nedestruktivna, ***in situ* vibraciona tehnika**
- SERS efekat se javlja kada se molekul nanese na površinu **SERS aktivnog supstrata različitih morfologija**
- SERS aktivnost **zavisi** od vrste i morfologije supstrata
- najčešće se kao supstrati koriste metalni koloidi **Au, Ag i Cu** koji se dobijaju redukcijom
- ekscitacioni profil, **$I_{rasejanja}/v_0$, odstupa od četvrtog stepena** kao što je slučaj kod NR efekta

$$I_{rasuto} \approx \frac{1}{\lambda^4} \approx v^4$$

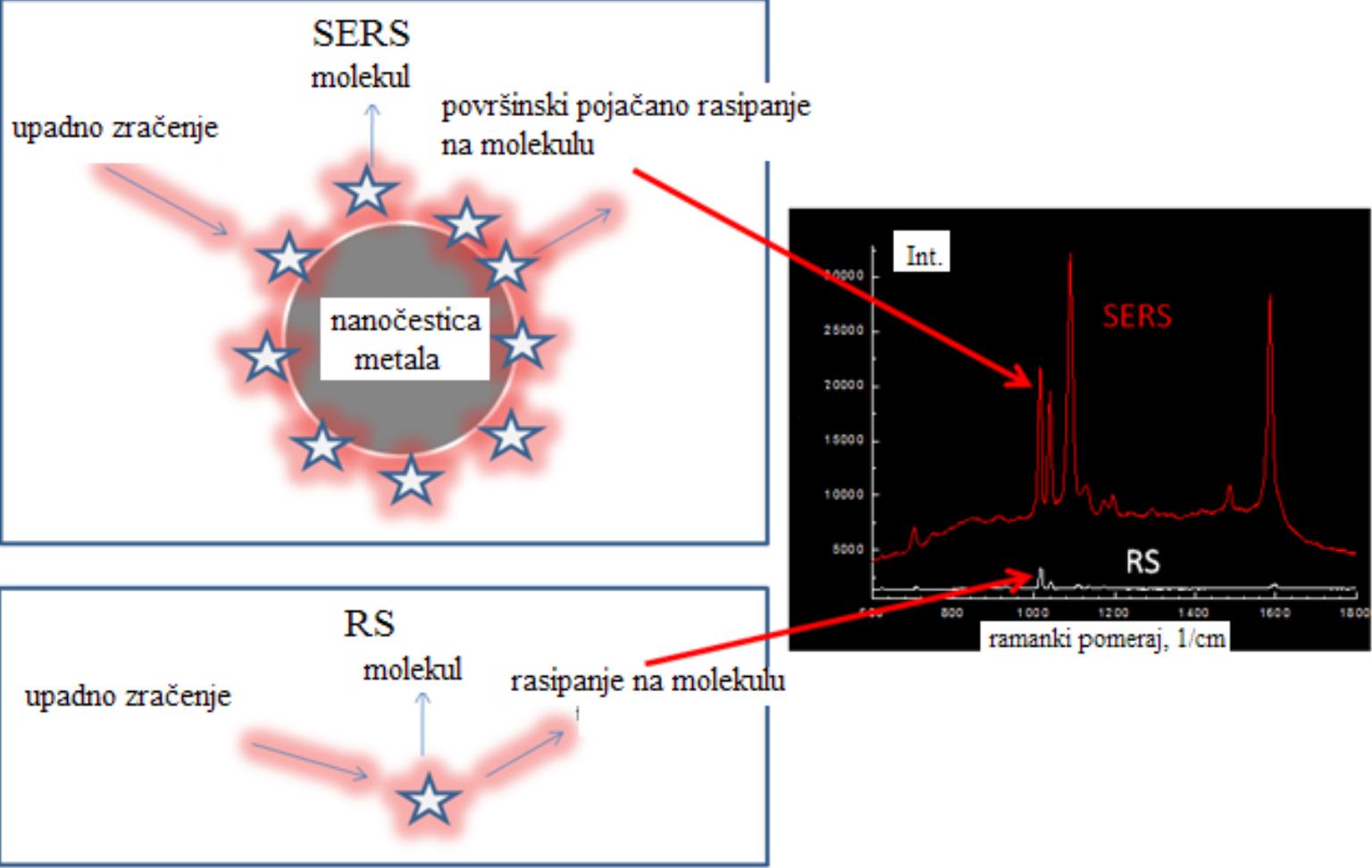


Shematski prikaz SERS-a



Shematski prikaz SERS-a

Uporedni prikaz SERS i NR spektra



Prednosti SERS tehnike:

- izuzetno velika osetljivost koja omogućava tzv. „*single molecule*“ detekciju
- posebna prednost SERS metode je u **biofizičkim ispitivanjima** koja se obično izvode u kombinaciji sa RR spektroskopijom (SERRS)*
- **SERRS efekat se javlja ukoliko su ispunjeni uslovi dvostrukе rezonancije, kada je pobuđivačka talasna dužina lasera u rezonanciji sa površinskim plazmonom i odeđenim elektronskim prelazom molekula čiji se vibracioni spektar selektivno pobuduje*
- *u uslovima dvostrukе rezonancije pojačanje intenziteta ide i do 10^{10} u odnosu na NR efekat*

- stvarni mehanizam pojačanja intenziteta rasutog zračenja nije do kraja poznat ali se predlažu dva mehanizma:
 - elektromagnetski mehanizam (EM) (van Dyne) i**
 - hemijski mehanizam (ET) (Albrecht, Crayton)**
- eksperimentalno ova dva mehanizma je veoma teško razdvojiti

- elektromagnetski mehanizam je zasnovan na ekscitaciji lokalizovanog površinskog plazmona
- za dobijanje SERS efekta, po EM mehanizmu, neophodno je postići uslove rezonancije površinskog plazmona – SPR (*surface plasmon resonance*)

EM mehanizam, teorija rezonancije površinskog plazmona

(SPR Theory - Surface Plasmon Resonance Theory)

- koncept površinskog plazmona potiče od Maksvelove teorije elektromagnetizma
- po Maksvelovoj teoriji slobodni elektroni metala (tzv. elektronski gas) se tretiraju kao tečnost velike gustine (plazma) i promene u gustini nanelektrisanja koje se javljaju na površini ovakve tečnosti nazivaju se plazmoni, površinski plazmoni ili površinski plazmon polaritoni (polaritoni jer se površinski plazmon kupluje sa fotonima upadnog zračenja)
- posebno su važna ispitivanje uslova rezonancije površinskih plazmona koji se postižu optičkim pobuđivanjem kao i ispitivanja različitih tipova površinskih rezonancija

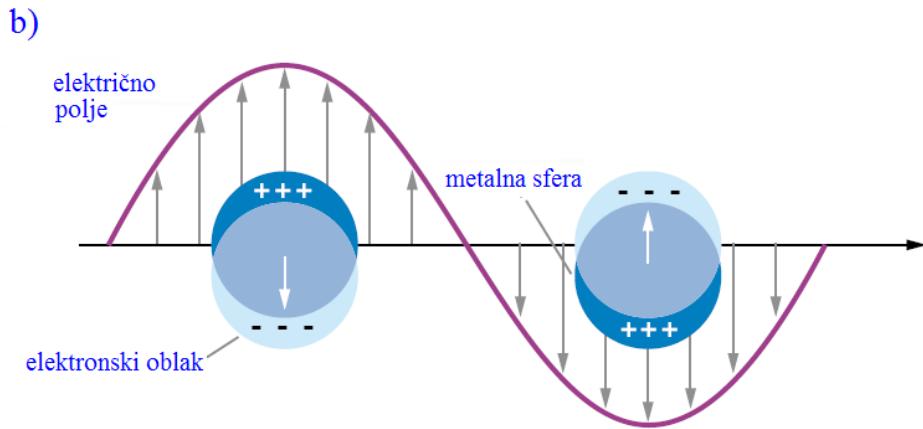
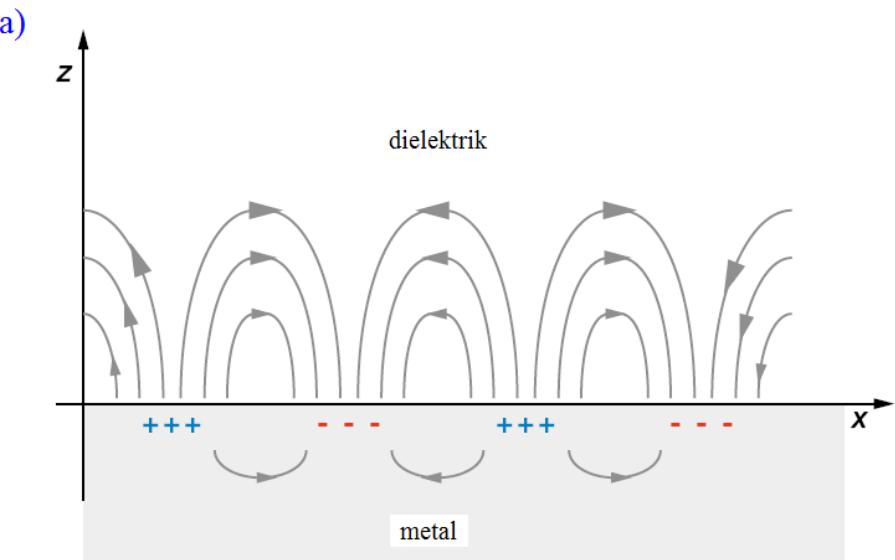
➤ plazmoni – površinska ekscitacija parova elektron-šupljina

- to su zajedničke oscilacije površinskog naelektrisanja (provodnih elektrona) koje se stvara pod delovanjem spoljašnjeg električnog polja
- plazmoni mogu biti: **površinski** – u vidu tankog filma na površini (surface plasmons, SPs), **lokализовани** - u nanočeticama (particle plasmons , PPs)
- površinski plazmoni na ravnim površinama su neradijacioni elektromagnetski oblici (jer interakcija svetlosti i SP-a ne zadovoljava zakon o održanju energije i momenta)
- površinski plazmoni na neravnim površinama su radijacioni elektromagnetski oblici (jer interakcija svetlosti i SP-a zadovoljava zakon o održanju energije i momenta)

- površinski plazmoni se posmatraju kao elektromagnetski talasi koji se prostiru duž površine tankog sloja metala

➤ rezonancija površinskog plazmona (SPR) je zajedničko oscilovanje valentnih elektrona u čvrstom materijalu, metalu, pod dejstvom upadnog zračenja određene energije

- rezonancija se uspostavlja kada se frekvencija upadnog zračenja izjednači sa frekvencijom oscilovanja elektrona koji osciluju nasuprot sili restitucije pozitivnih jezgara



a) propagirajući plazmon

b) lokalizovani površinski plazmon u rezonanciju

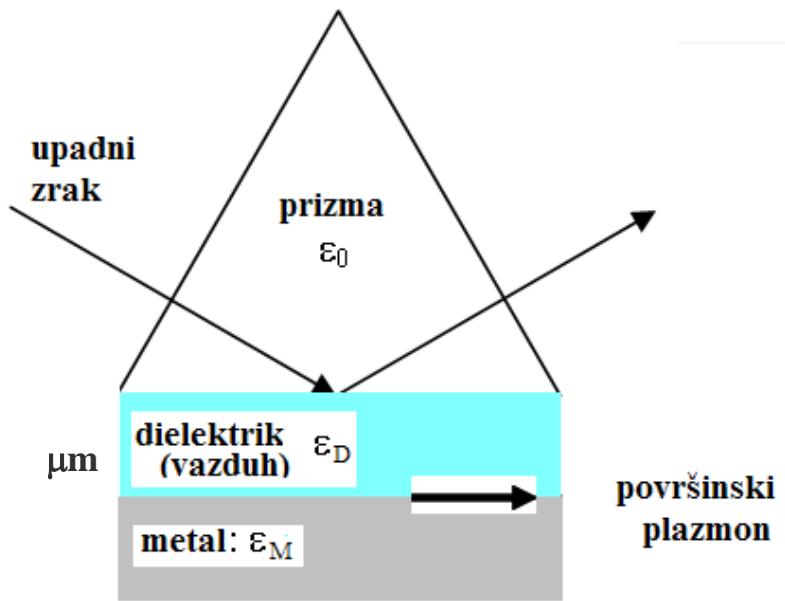
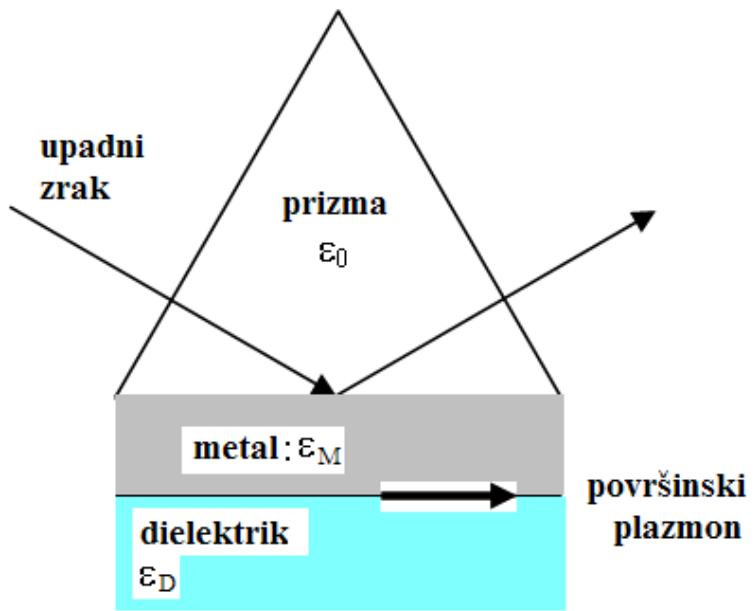
Rezonancija površinskog plazmona (SPR) je, između ostalog, osnova:

- metoda u ispitivanjima **osobina površina i tankih filmova**
- mnogih standardnih **metoda za merenje adsorpcije**
materijala na metalnim površinama
- rada bojenih **biosenzora i čip senzora**
- metoda u ispitivanjima **interakcija na graničnim površinama**

Za uvođenje površinskog plazmona u rezonanciju koriste se obično dve konfiguracije:

- **Otova (Otto) i Krečmanova (Kretchman)**
- kod Otove konfiguracije svetlost pada na staklenu prizmu i unutar nje trpi totalnu unutrašnju refleksiju
- efekat totalne unutrašnje refleksije javlja se samo kada se upadno zračenje prelama **iz optički gušće u optički redi sredinu** i kada pada na površinu **pod uglom koji je veći od kritičnogугла** (kritični ugao – minimalna vrednost ugla pri kojoj se refleksija javlja)
- između stakla i metala se postavlja veoma tanak sloj dielektrika (npr. vazduha) tako da tzv. nepostojeći zrak (“evanescent wave”) može da reaguje sa elektronskim talasom na površini metala i pobudi plazmon
- plazmon se pobuduje na unutrašnjoj strani metalnog filma

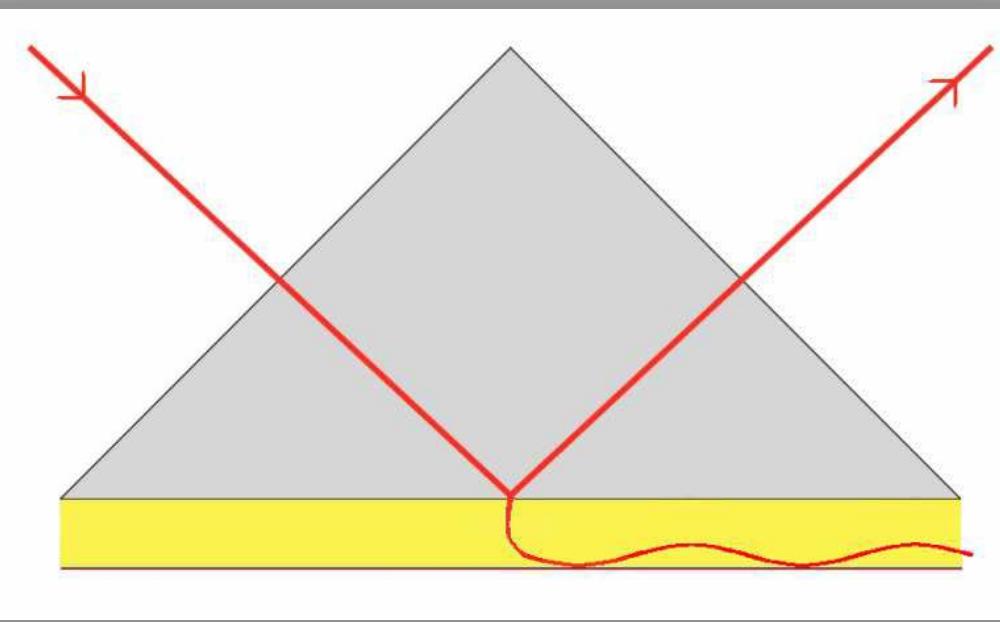
- u Krečmanovoj konfiguraciji metal se naparava na stakleni blok prizme
- pobuđivanje površinskog plazmona se postiže kada ravanski polarizovana upadna svetlost, koja podleže efektu totalne unutrašnje refleksije, pada na graničnu površinu koju čine:
 - a) provodni sloj prelaznog metala koji je nanet na stakleni nosač (sa visokim indeksom prelamanja) i
 - b) spoljašnja, dielektrična, sredina (gas ili tečnost) (malog indeksa prelamanja)
- plazmon se pobuđuje na spoljašnjoj strani metalnog filma
- ovo je konfiguracija koja se najčešće koristi u eksperimentima



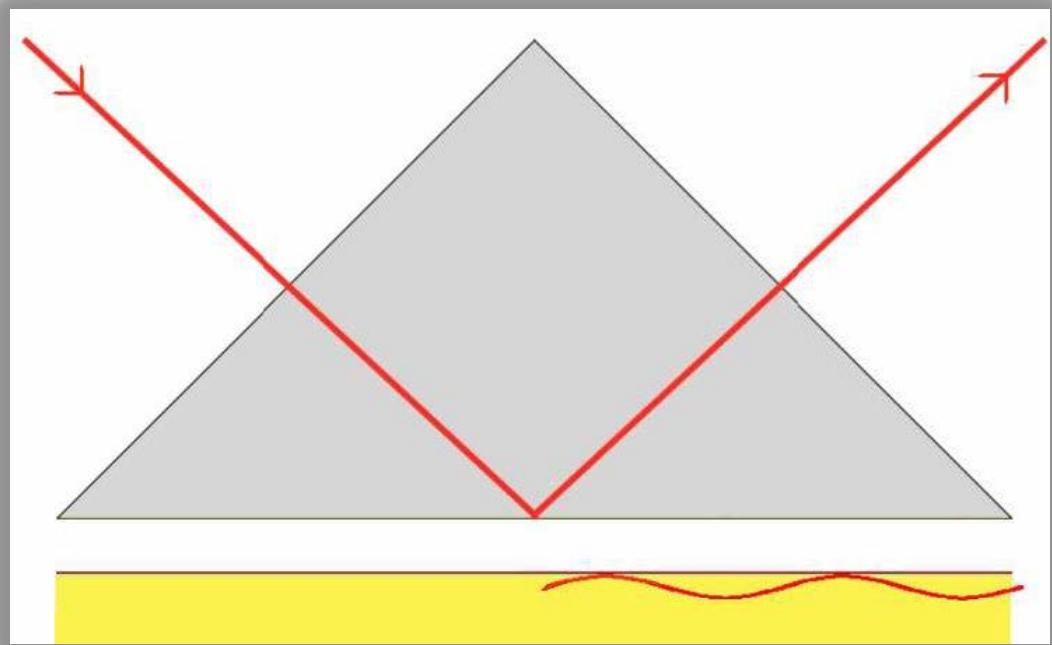
**Krečmanova konfiguracija
(najčešće se koristi u eksperimentima)**

(plazmon se pobuđuje na spoljašnjoj strani metalnog filma)

**Otova konfiguracija
(debljina dielektrika reda μm)
(plazmon se pobuđuje na unutrašnjoj strani metalnog filma)**



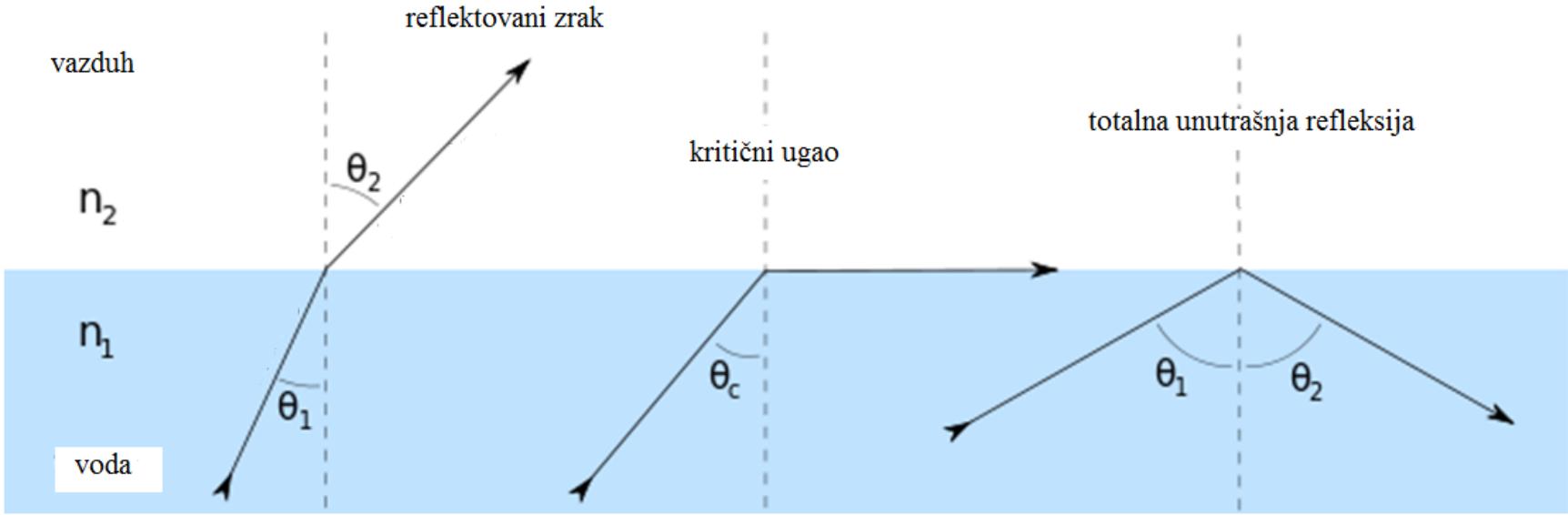
Krečmanova konfiguracije



Otova konfiguracije



Ilustracija različitih tipova refleksije

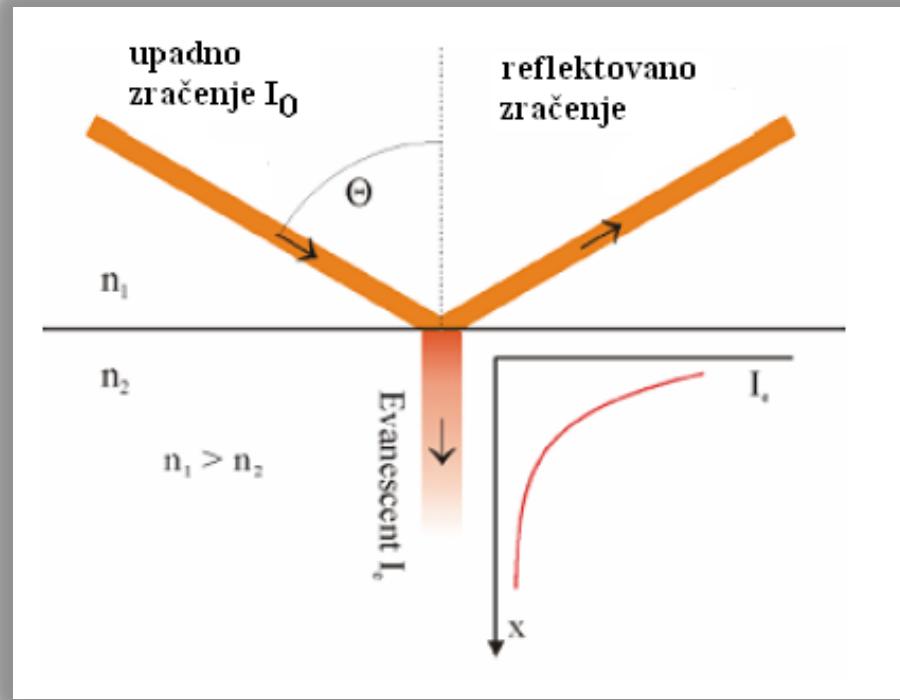


$$n_1 > n_2$$



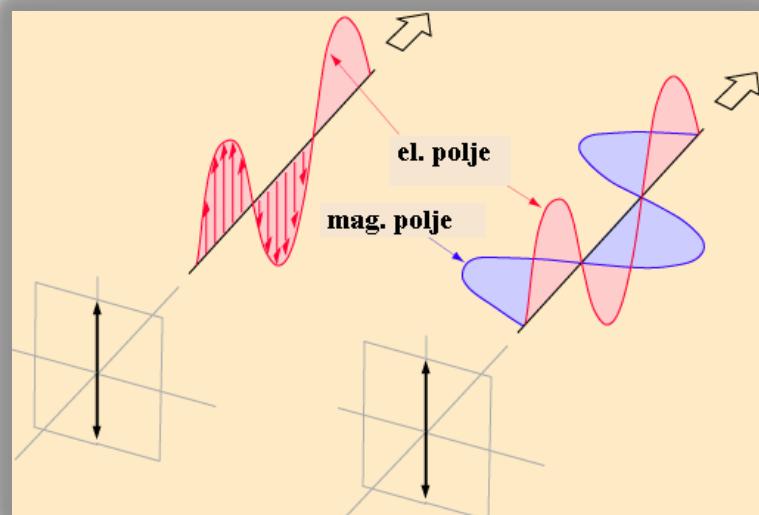
upadno zračenje se prelama iz optički
gušće u optički red ř sredinu i pada na
površinu pod ugлом koji je veći od
kritičnog ugla

- važna posledica totalne refleksije je prostiranje tzv. “**evanescent**“ (“**nepostojećeg**”) talasa kroz graničnu površinu dve faze
- naime, iako se u optički gušćoj sredini dešava totalna unutrašnja refleksija ipak postoji prolazak svetlosti i u drugi sloj što daje doprinos tzv. **Goos-Hanchen-ovom efektu**
- **Goos-Hanchen-ov efekat** je fenomen koji se tretira u klasičnoj optici i po kome zrak svetlosti koji se totalno reflektuje od površine **trpi frekventni pomak kao da je na kratko prodro u optički ređu sredinu PRE REFLEKSIJE**

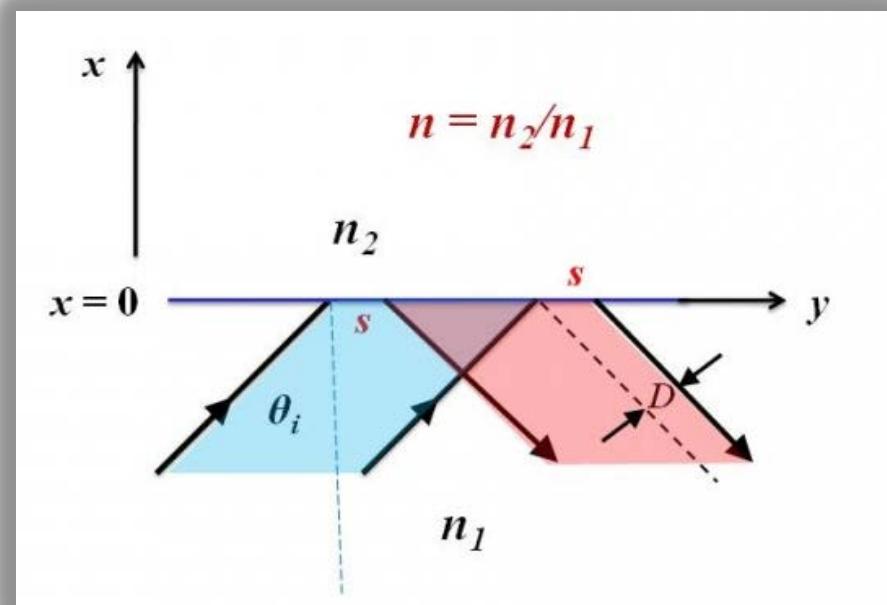


Intenzitet propuštenog zračenja, nepostojećeg talasa, naglo opada sa rastojanjem od granične površine

- **linearno polarizovana upadna svetlost trpi mali fazni pomak pri efektu totalne refleksije**
- **fazni pomak je normalan na pravac prostiranja upadnog talasa i nalazi se u ravni koju čine upadni i reflektovani talas**



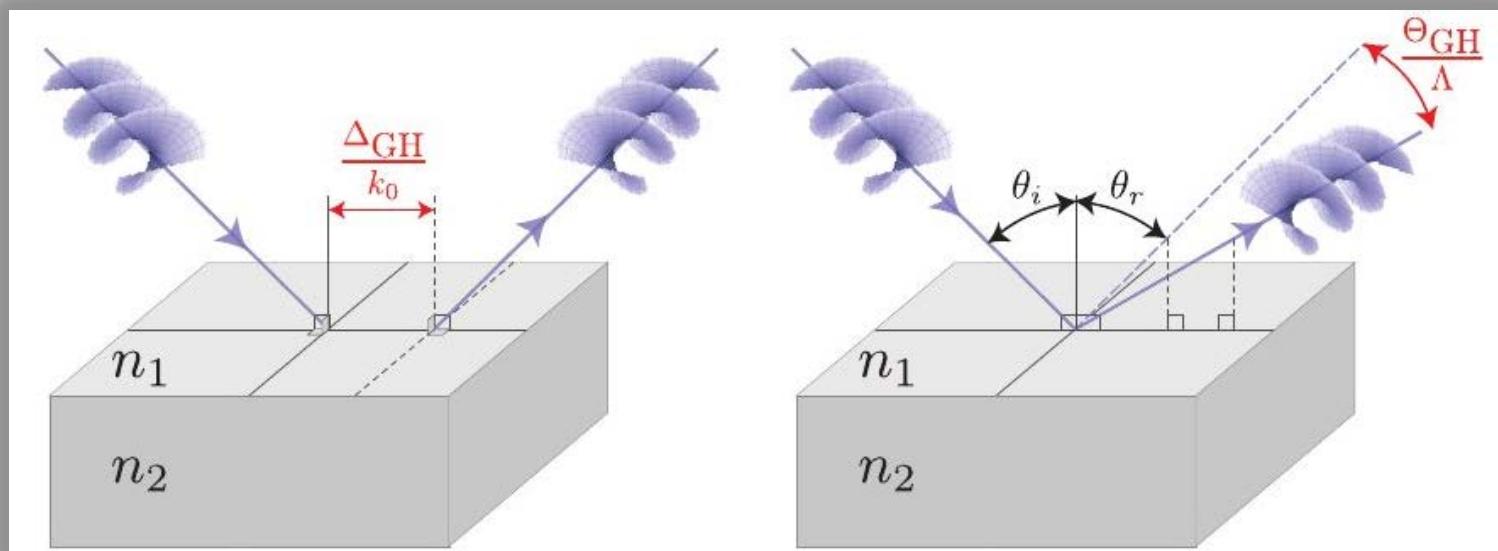
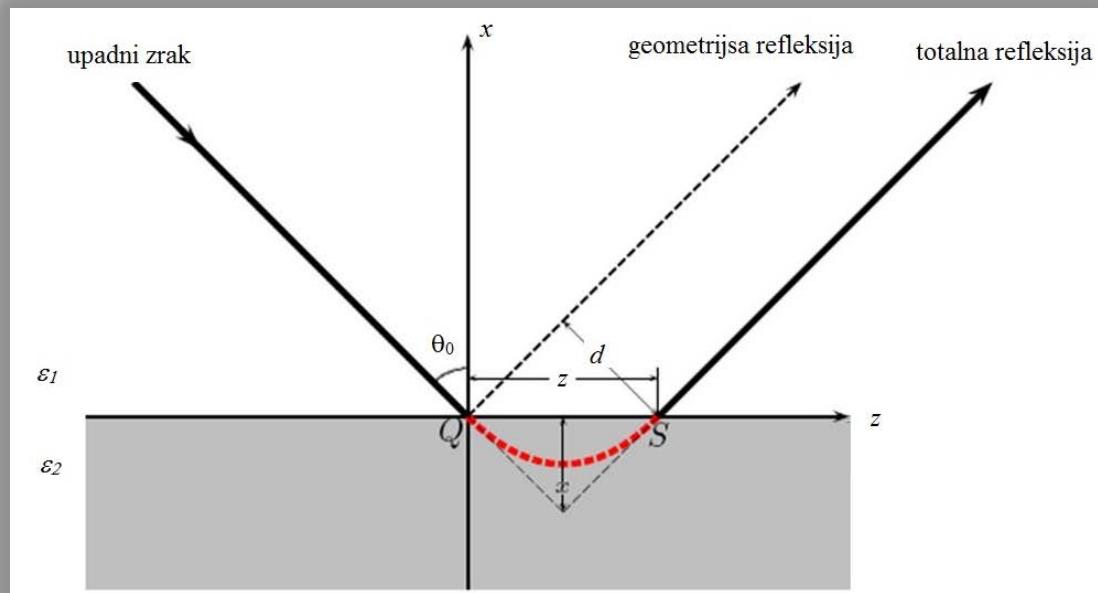
Shematski prikaz linearno polarizovane svetlosti



Shematski prikaz Goos–Hänchen-ovog efekta

Goos–Hänchen-ov pomeraj

zrak svetlosti koji se totalno reflektuje od površine trpi frekventni pomak kao da je na kratko prodro u optički red Š sredinu pre refleksije



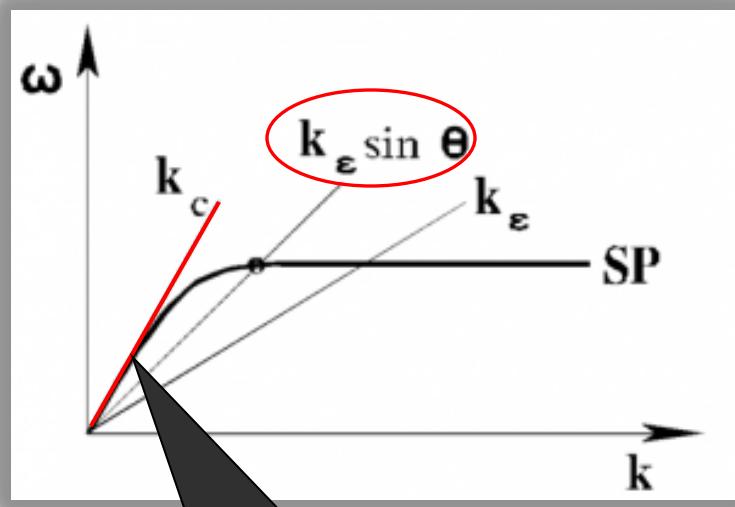
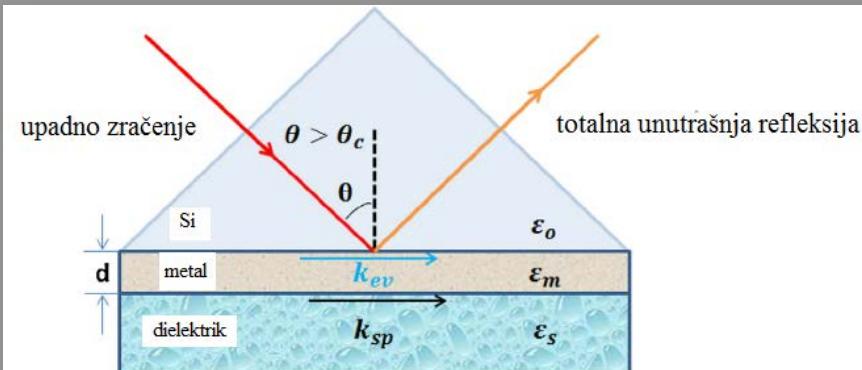
Zašto talas koji se prostire kroz vazduh ne može direktno da dovede do rezonancije površinskog plazmona već prvo mora proći kroz optičku prizmu???

- **veličina talasnog vektora izražava se talasnim brojem:**

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{2\pi\nu}{c}$$

- **talasni vektor (konstanta propagacije) svetlosnog talasa frekvencije ω koja se prostire kroz medijum dielektrične konstante ϵ_0 je (talas putuje kroz vakum bez smetnje odn. kada nema disperzije) je:**

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_0} \rightarrow \text{relacija disperzije}$$



prava za vakum
(i vazduh)

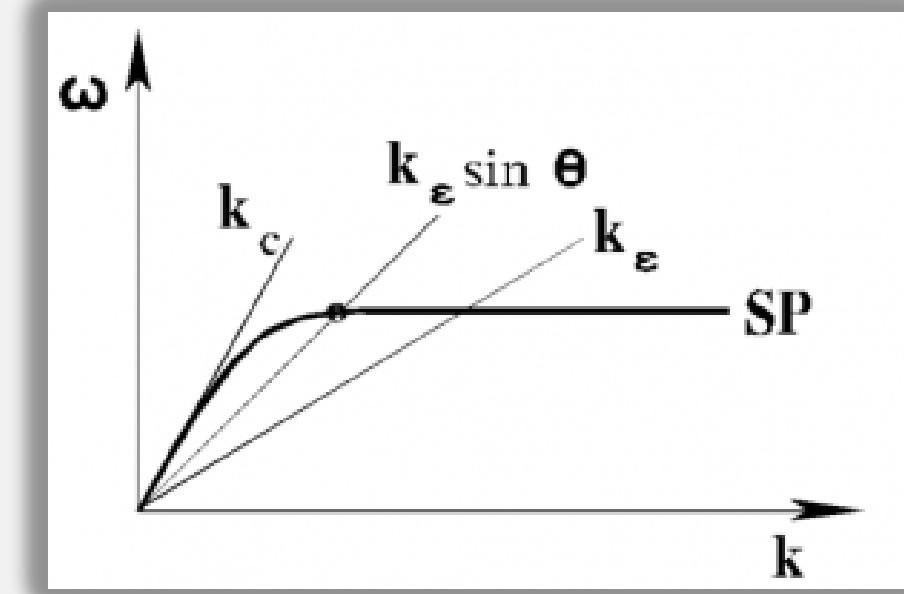
- talasni vektor površinskog plazmona koji se prostire na granici dve površine pokorava se relaciji disperzije oblika:

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}}$$

ϵ_M - dielektrična konstanta metala

ϵ_D - dielektrična konstanta površine u kontaktu sa metalom (dielektrik)

c - brzina svetlosti u vakuumu



- kako jednačina disperzije SP-a (kriva SP na slici) nikada ne preseca krivu disperzije za vazduh (i vakum) SP se ne može direktno pobuditi slobodno propagirajućom svetlošću nad metalnom površinom

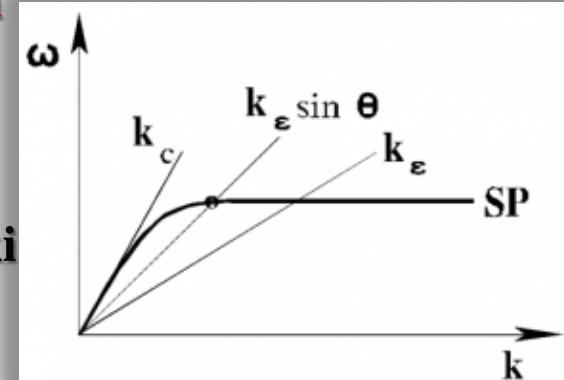
$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_0}$$

relacija disperzije za vazduh i vakum

- upadna svetlost koja se prostire kroz vazduh ne zadovoljava jednačinu disperzije plazmona i ne može da izazove njegovu rezonanciju

- to se postiže “smanjenjem” nagiba disperzije prave za faktor $\sqrt{\epsilon_0}$ odn. propuštanjem svetlosti kroz neku optički gušću sredinu (staklo, dielektrične konstante ϵ_0)

- rezonancija površinskog plazmona se postiže frekvencijom nepostojećeg talasa odn. sprezanjem nepostojećeg talasa (evanescent wave) i površinskog plazmona



$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}}$$

relacija disperzije za SP

- površinski plazmon se pobuđuje ravanski polarizovanom svetlošću koja trpi efekat totalne unutrašnje refleksije na granici staklo-metal

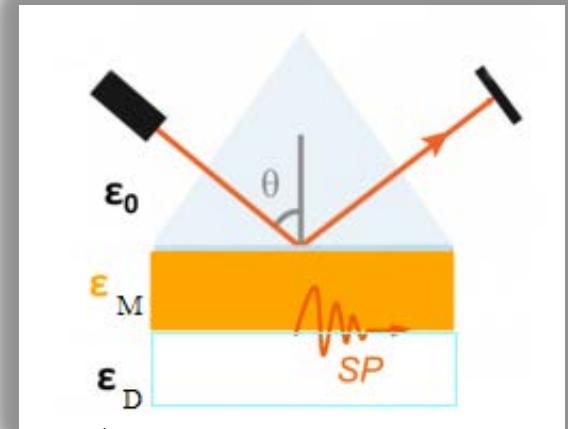
Uslov rezonancije površinskog plazmona:

$$\frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_0} \sin \theta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}}$$

ϵ_0 - dielektrična konstanta stakla

ϵ_M - dielektrična konstanta metala

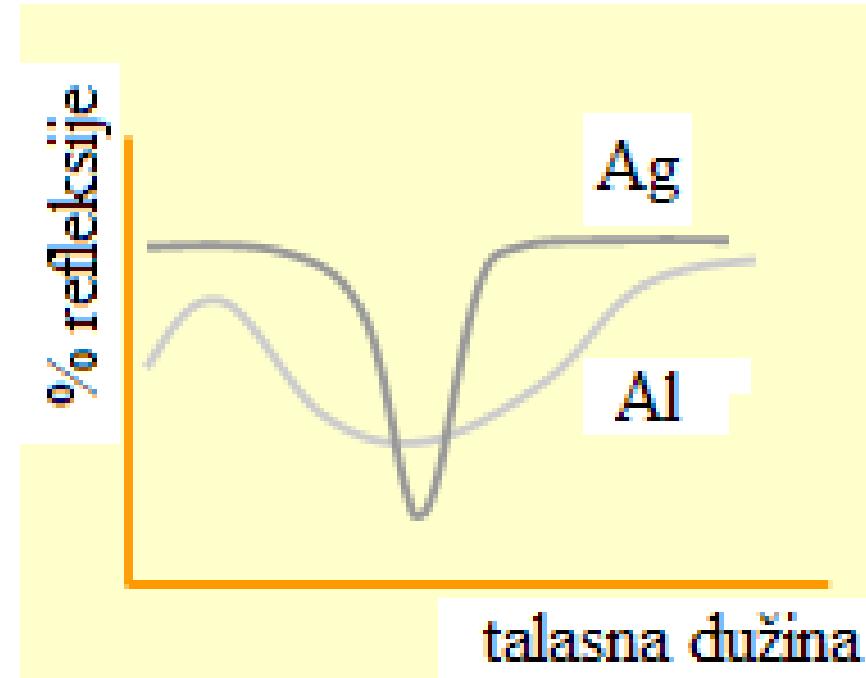
ϵ_D - dielektrična konstanta površine u kontaktu sa metalom



električno polje upadnog fotona, koji se totalno reflektuje, se prostire izvan reflektujuće površine do dubine koja je $\approx \lambda_0/4$ (dubina prostiranja “evanescent” talasa)

Osnovne karakteristike SP na granici metal-dielektrik ($n = 1,32$)

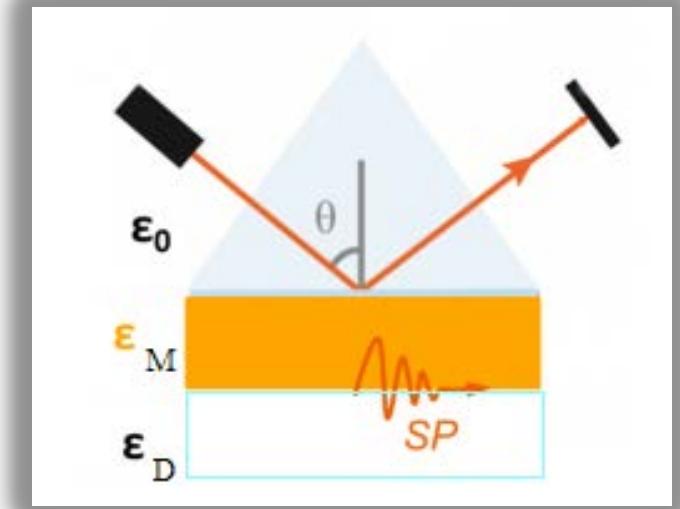
metal	Ag		Au	
talasna dužina svetlosti, nm	630	850	630	850
dubina prodiranja u metal, nm	24	23	29	25
dubina prodiranja u dielektrik, nm	219	443	162	400
dužina propagacije plazmona, μm	19	57	2	24



**EKSCITACIJA PLAZMONA JE VIDLJIVA U MOMENTU PADA
INTENZITETA REFLEKTOVANE SVETLOSTI PRI ODREĐENOM
UPADNOM UGLU i TALASNOJ DUŽINI UPADNOG ZRAČENJA**

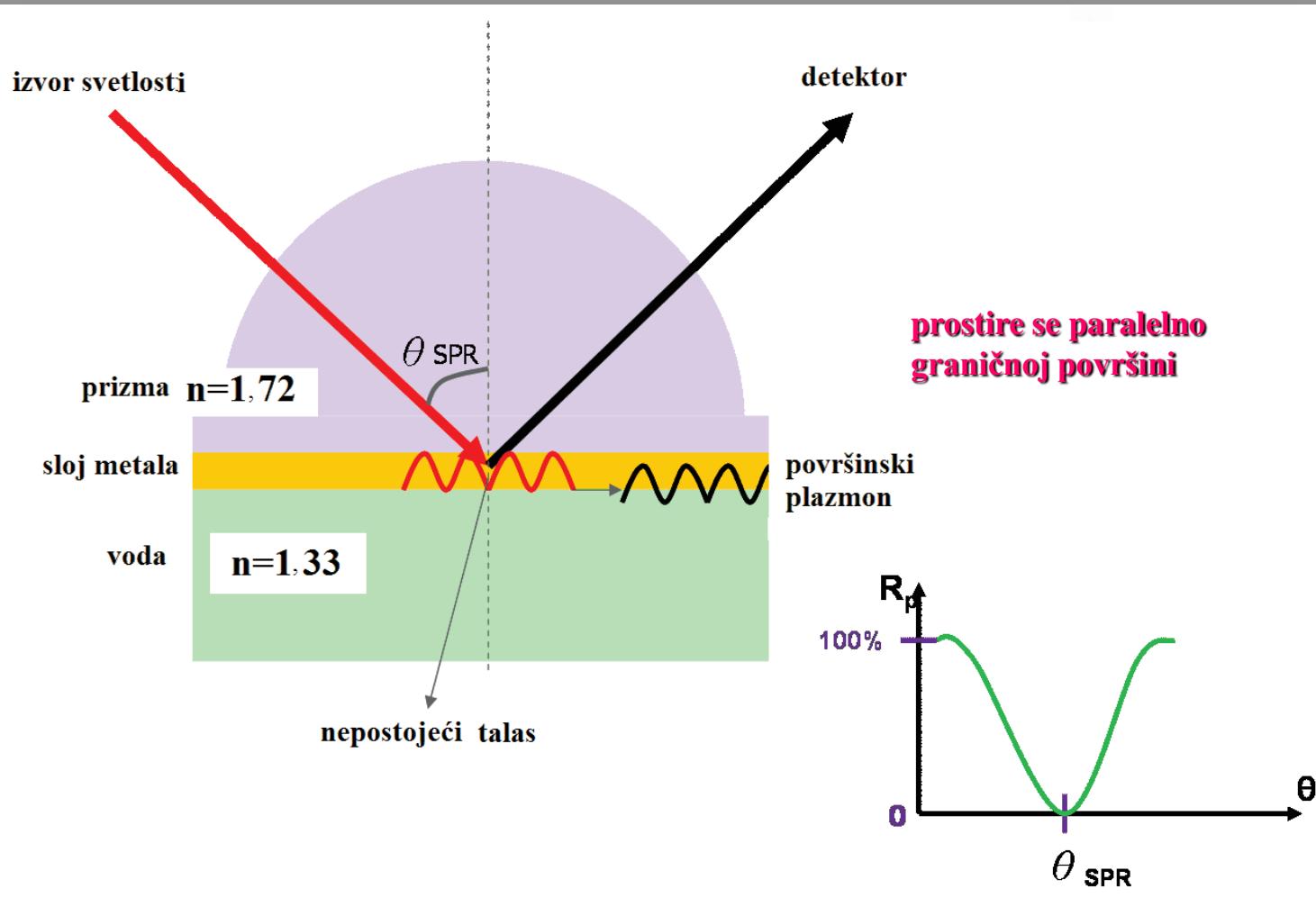
- u NR efektu molekul interaguje direktno sa električnom komponentom upadnog zračenja
- kod SERS efekta upadno polje (polje upadnog fotona) trpi promenu usled rezonancije površinskog plazmona tako da na molekul "dolazi", modifikovano, pojačano polje

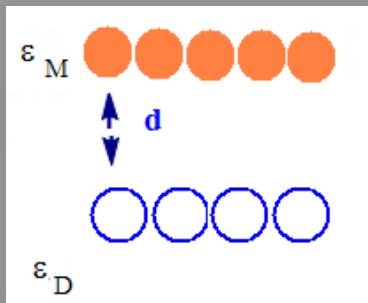
- površinski plazmon (SP) se prostire **paralelno** granici metal-dielektrik



- kako se talas prostire po granici dve površine tako su njegove oscilacije jako osetljive na bilo koju promenu karakteristika površine (npr.usled adsorpcije molekula na površini metala)

Indukovanje rezonancije površinskog plazmona





- upadno zračenje se u blizini granične površine metal - dielektrik pojačava usled rezonancije površinskog plazmona za iznos E_{sp}

- molekul oseća polje:

$$E = E_0 + E_{SP}$$

jačina polja se može analitički rešiti samo za metalne čestice sfernog ili sferoidnog oblika

E_0 – upadno polje

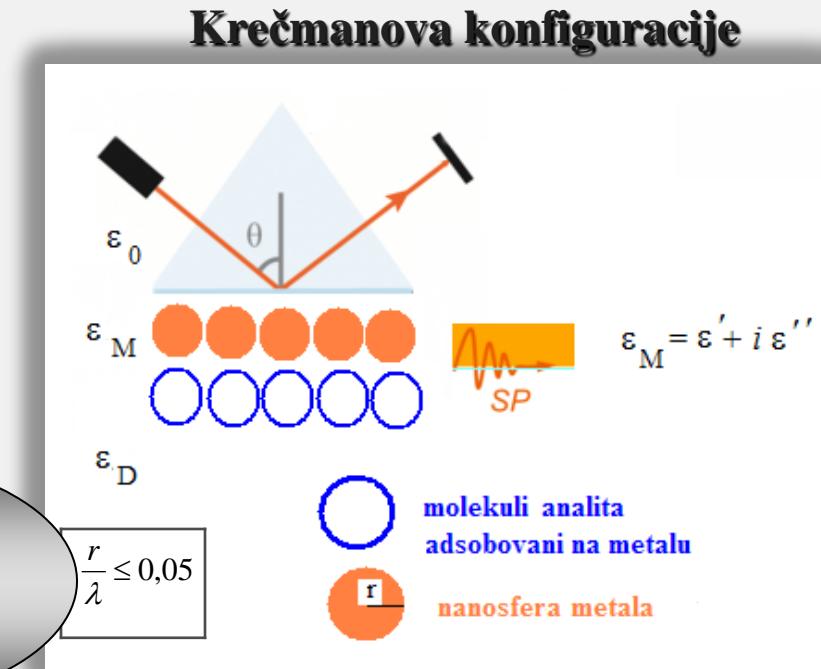
E_{SP} – polje usled SPR

$$E_{SP} = r^3 \frac{\epsilon_M - \epsilon_D}{\epsilon_M + 2\epsilon_D} E_0 \frac{1}{(r + d)^3}$$

ϵ_M – diel. konstanta metala

ϵ_D – diel. konstanta dielektrika u kome se molekul nalazi

- ovako pojačano upadno zračenje se rasejava na molekulima sredine



- u molekulu pojačano upadno polje ($E_0 + Esp$) indukuje dipolni momenat, μ_{ind} , koji osciluje sa tri različite frekvencije:
 - ω_0 (Rejlijevo rasejanje)
 - $(\omega_0 - \omega_{vib})$ (Stoksov)
 - $(\omega_0 + \omega_{vib})$ (anti-Stoksov prelaz)
- ω_0 - frekvencija upadnog zračenja
- ω_{vib} - fekvencija odgovarajućeg vibracionog oblika molekula

- **elektromagnetsko zračenje** ($E_{in} = E_0 + E_{SP}$) koje se rasejava na molekulima menja energiju u zavisnosti da li se radi o Stoksovoj ili anti-Stoksovoj komponenti
- **ramanski rasejano zračenje** ($\omega_0 \pm \omega_{vib}$) koje napušta molekul biva takođe pojačano za komponentu E_{SP}

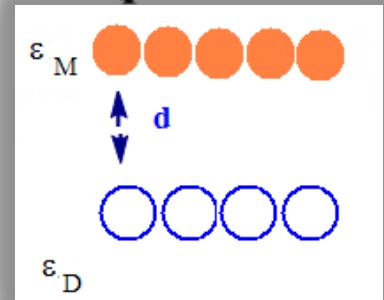
$$E_{out} = E_{rasejano} + E_{SP}$$

I ulazno i izlazno polje se pojačavaju za komponentu E_{sp} koja potiče od rezonancije površinskog plazmona

➤ pojačanje je posebno veliko ako je ramanski rasuta komponenta u rezonanciji sa površinskim plazmonom

- faktor pojačanja polja koje “oseća” molekul adsorbovan na površini metala je:

$$A(\nu) = \frac{E(\nu)}{E_0(\nu)} \approx \frac{\epsilon_M - \epsilon_D}{\epsilon_M + 2\epsilon_D} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3$$



- maksimalno pojačanje javlje se pod uslovim kada imenoc → 0:

- $\epsilon_M = -2\epsilon_D$ (relacija važi za Ag i Au kao metale koji se ozračuju nekim talasnim dužinama iz VID i NIR oblasti)

- kada je imaginarni* deo dielektrične konstante metala mali

- * za razliku od odgovora vakuma odgovor materijala (polarizacija, P) na primjeno električno polje zavisi od frekvencije polja. Ova zavisnost od frekvencije ukazuje da polarizacija metrijala ne “odgovara” na primjeno polje odmah već postoji neki fazni pomak u odgovoru. Zato se dielektrična konstanta predstavlja kao kompleksna funkcija odn. zbir realnog i imaginarnog dela: $\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) + i\epsilon''(\omega)$

$$A(\nu) = \frac{E(\nu)}{E_0(\nu)} \approx \frac{\epsilon_M - \epsilon_D}{\epsilon_M + 2\epsilon_D} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3$$

- faktor pojačanja polja, $A(\nu)$, **ZAVISI OD TALASNE DUŽINE UPADNOG ZRAČENJA**
- to je posledica zavisnosti realnog dela dielektrične konstante metala od talasne dužine zračenja, $\epsilon_M(\omega)$

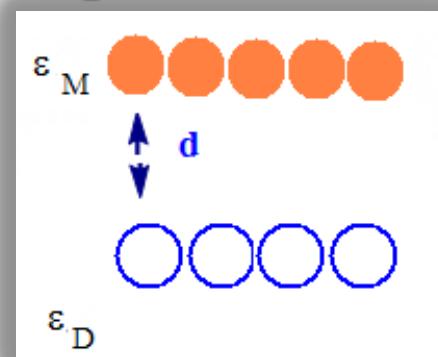
- intenzitet rasejanog zračenja po EM mehanizmu SERS efekta je proporcionalan:

$$I_{\text{rasejano}} = I_{\text{in}} I_{\text{out}} \approx E^4$$

- jer je I (detektovani intenzitet) proporcionalan $I=|E|^2$
- intenzitet rasejanog zračenja po EM mehanizmu brzo opada sa rastojanjem molekula od metalne površine:

$$E \approx \frac{1}{r^3} \approx \frac{1}{(r/d)^3}$$

$$I \approx E^4 \approx \left(\frac{r}{r+d}\right)^{-12}$$



- zavisnost ukazuje da samo molekuli u blizini metalne površine osećaju veliko pojačanje intenziteta polja

- dodatno, **orientacija molekula** igra veoma važnu ulogu pa je adsorpcija molekula na metalnim nanostrukturama ključni faktor u izvođenju SERS eksperimenata
- da bi se rasejanje javilo **oscilacije plazmona moraju biti normalne na površinu**, ukoliko se oscilacije nalaze u ravni do rasejanja ne dolazi

- pojačanje intenziteta zavisi od frekvencije upadnog zračenja
- ukoliko su upadno i ramanski rasuto zračenje blizu uslova rezonancije površinskog plazmona dolazi do E^4 pojačanja
- ukoliko ove dve komponente nisu bliskih frekvencija faktor pojačanja je manji

$$A(\nu) = \frac{E(\nu)}{E_0(\nu)} \approx \frac{\varepsilon_M - \varepsilon_D}{\varepsilon_M + 2\varepsilon_D} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3$$

faktor pojačanja

$$\varepsilon_M = -2\varepsilon_D$$

- izbor površine metala zavisi od uslova rezonancije njihovih površinskih plazmona
- VID i NIR zračenje pobuduju Ramanski aktivne oblike vibracije molekula (sve češće se koristi i ULj zračenje u ispitivanjima biomolekula)
- frekvencije oscilovanja plazmona **Ag** i **Au** se nalaze u istom intervalu EMSZ
- u ovaj opseg ulaze i frekvencije plazmona **Cu**, **Pt** i **Pd**

- SERS efekat tumačen po EM mehanizmu ne zahteva da adsorbovani molekul bude u direktnom kontaktu sa površinom ali mora da bude u određenoj zapremini
- zapremina je od praktičnog značaja jer u nekim eksperimentima, naročito kada se ispituju biološki molekuli, nije uvek moguć direktni kontakt molekula i metalne površine

Sažetak EM mehanizma

- rezonancija površinskog plazmona je kolektivno oscilovanje elektrona u metalu pod dejstvom upadnog zračenja
- pojačanje polja je najveće kada je frekvencija plazmona **u rezonanciji sa frekvencijom upadnog zračenja i frekvencijom ramanski rasutog zračenja**
- da bi se efikasno rasejanje javilo oscilacije plazmona moraju biti **normalne na površinu**, ukoliko se oscilacije javljaju u ravni do rasejanja ne dolazi
- **veličina čestica mora biti mnogo manje od talasne dužine upadne svetlosti ($r \ll \lambda$)**

- pojačanje intenziteta rasutog zračenja posledica je dvostrukog pojačanja polja:
 - pojačanja intenziteta upadnog polja (usled javljanja rezonancije površinskog plazmona) koje dalje pobuđuje ramanski aktivne oblike vibracija molekula
 - pojačanje intenziteta polja ramanski rasutog zračenje
- pri svakom koraku se intenzitet zračenja pojačava srazmerno E^2 , što ukupno dovodi do pojačanja koje je proporcionalno $\sim E^4$
- maksimalno pojačanje se postiže kad su obe komponente, upadno i rasuto zračenje, u rezonanciji sa površinskim plazmonom

Hemijski mehanizam pojačanja intenziteta rasutog zračenja (ET mehanizam)

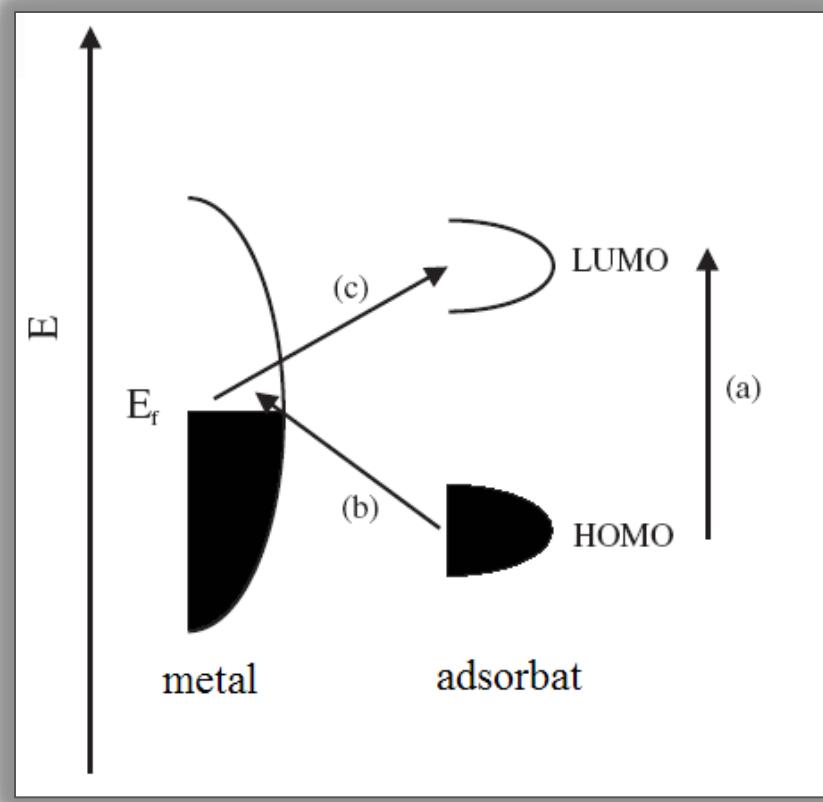
- zove se i **efekat “prvog sloja”** (*first-layer effect*) jer zahteva direktni kontakt supstrata (metala) i molekula
- EM teorija SERS efekta ne može objasniti pojačanje intenziteta u svim sistemima
- u slučaju kada molekuli imaju nesparene elektronske parove postoji mogućnost hemijskog vezivanja za površinu
- u tom slučaju se pojačanje intenziteta objašnjava delovanjem tzv. hemijskog mehanizma
- hemijski mehanizam **ne podrazumeva površinski plazmon** već **prenos naelektrisanja** između hemisorbovanih molekula i površine metala

➤ prelaz između HOMO i LUMO orbitala mnogih molekula zahteva više energije od energije iz VID i NIR oblasti zračenja koje se koriste u ramanskim eksperimentima

➤ kada se Fermijev nivo metala nalazi između HOMO i LUMO orbitala molekula koji se ispituje tada je moguć prelaz sa HOMO adsorbovanog molekula na nivo metala pa dalje na LUMO molekula što smanjuje energiju prelaza molekula

➤ u tom slučaju metal služi kao "intermedijerni" sloj koji omogućava prenos nanelektrisanja (ET prelaz)

➤ tako se prelaz koji bi se normalno javio u oblasti većih energija (ULJ) pobuduje u oblasti manjih energija (VID)



Izborna pravila

- vibracioni oblici koji se mogu javiti u spektrima uslovljeni su njihovom simetrijom
- kada se molekuli adsorbuju na površini metala simetrija molekula može da se menja uslovjavajući promenu izbornih pravila
- izborna pravila se modifikuju i kada usled adsorbcije na površini dolazi do gubljenja centra simetrije time se eliminišu zahtevi za tzv. *pravilo sključenja* koje diktira koji će vibracioni oblici biti IC a koji ramanski aktivni
- u tim slučajevima moguće je da se u spektrima jave i oni vibracioni oblici koji se normalnojavljaju samo u IC spektrima
- simetrija molekula može da se menja i u zavisnosti od orijentacije molekula na površini metala

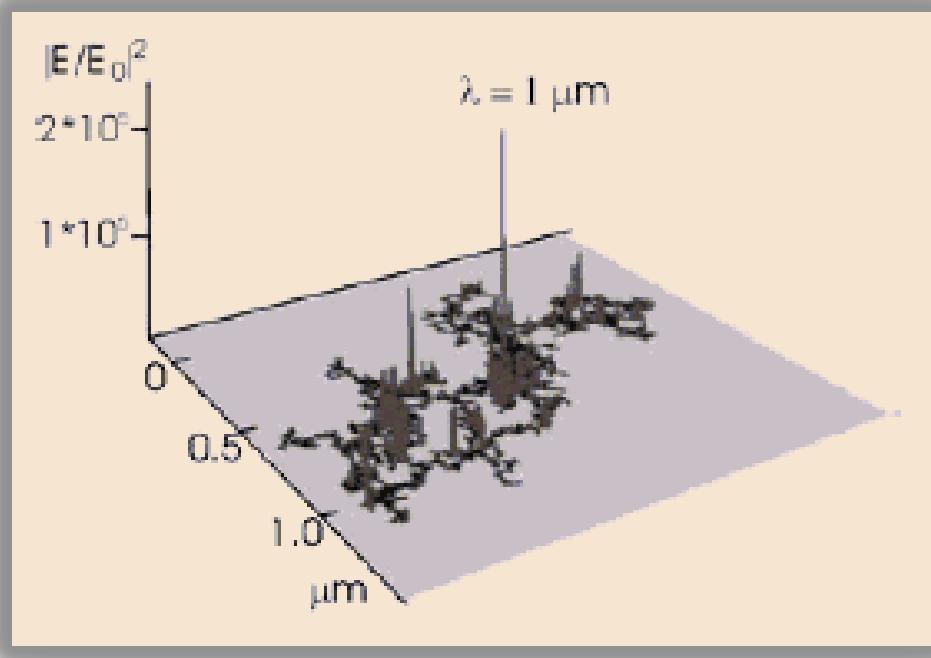
Površine u SERS eksperimentima

- SERS efekat je jako osetljiv na osobine površine
- prvi eksperimenti su izvođeni na elektrodi od srebra koja je bila elektrohemski obrađena do određene morfologije
- priprema površina uključuje više mogućnosti:
 - a) **višestruko izvođenje oksido-redukcionih ciklusa** na elektrodama; tokom procesa oksidacije sloj soli metala (najčešće halidi) se formira na površini elektrode; u ciklusu redukcije oslobođeni metal se ne raspoređuje ravnomođno po površini elektrode već neravnomerno praveći klastere
 - b) **nanošenje čestica metala** (prečnika 50 - 200 Å) na površine od stakla ili kvarca **metodom naparavanja na toplu površinu nosača** u debljini sloja od 50 -150 Å; povećana temperatura nosača omogućava veću pokretljivost čestica metala uslovjavajući grupisanje u mala “ostrva”
 - c) nanošenje čestica metala tzv. **“hladnom” depozicijom, na hladan nosač** temperature ispod 120 K; pokretljivost atoma metala je smanjena i takođe prouzrokuje formiranje grubog filma na površini nosača

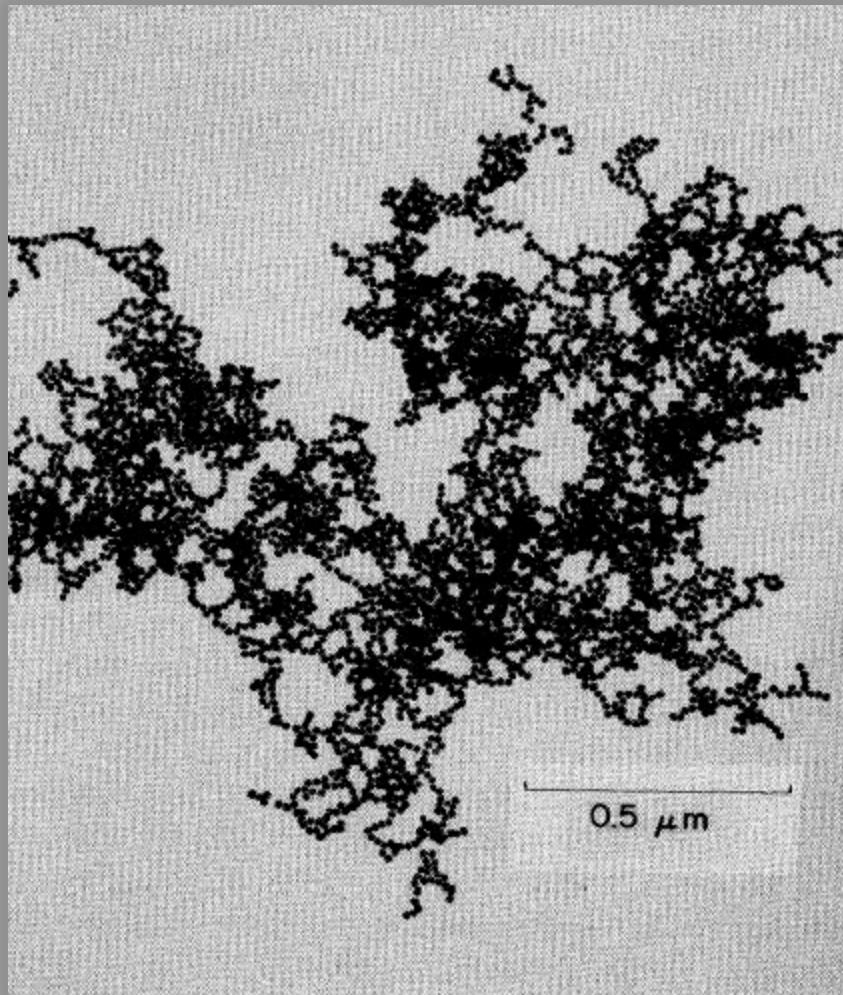
- SERS zahteva površine metala koje imaju veličinu čestica znatno manju od talasne dužine upadne svetlosti ($r \ll \lambda$)
- oblik i veličina čestica jako utiče na efekat i veličinu pojačanja intenziteta rasutog zračenja jer uslovjavaju odnos procesa apsorpcije i rasejanja
- samo za optimalnu veličinu i oblik čestica efekat pojačanja je maksimalan

- ukoliko su čestice velike dolazi do **ekscitacije**
mutipola koji ne emituju zračenje dovoljnog
intenziteta (samo dipolni prelazi dovode do
ramanskog rasejanja dovoljnog intenziteta)
- prelazi viših redova dovode do smanjenja faktora
pojačanja intenziteta
- čestice koje su premale **gube električnu**
provodljivost i ne mogu da pojačaju upadno polje

- pojačanje intenziteta rasutog zračenja raste sa gradijentom električnog polja
- iz tog razloga je potrebno da površina metala bude gruba da bi se omogućio tzv. “antena” efekat
- SERS supstrati takođe moraju da:
 - budu hemijski i biološki kompatibilni sa analitom
 - hemijski i vremenski stabilni
 - reproduktivni i ekonomični u pripremi



Tipičan SERS aktivni klaster srebra i raspodele polja na klasteru

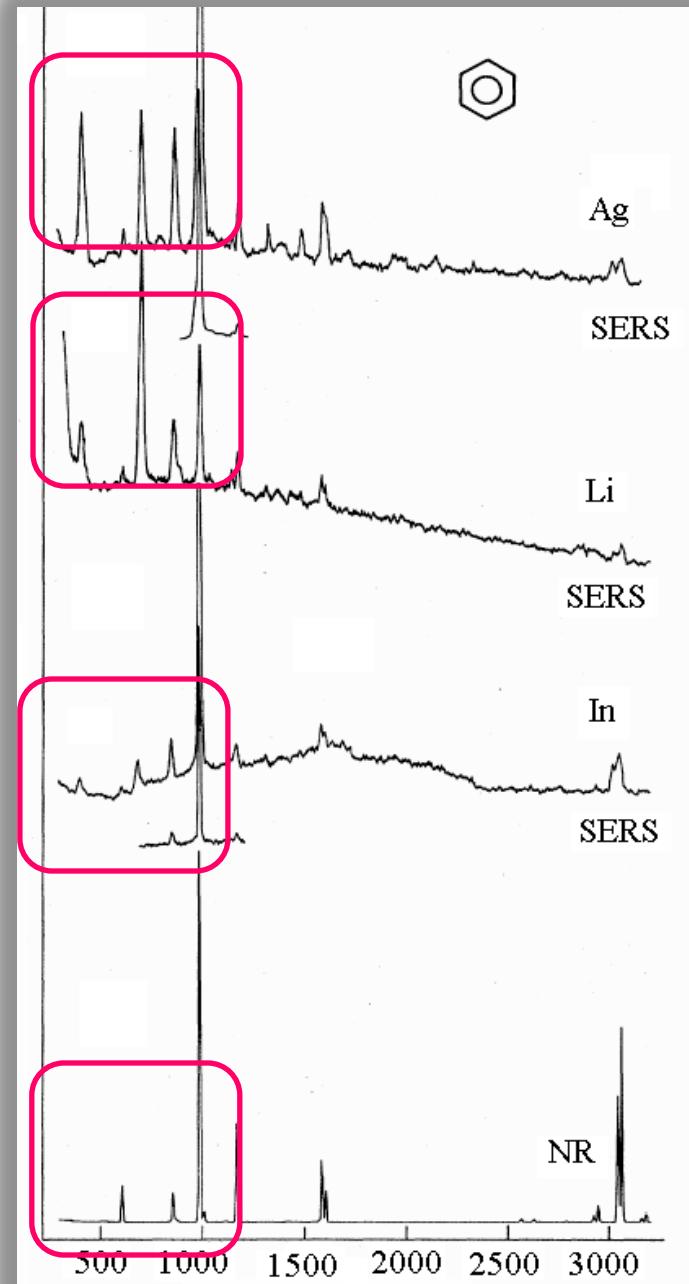


TEM slika agregata kolida zlata

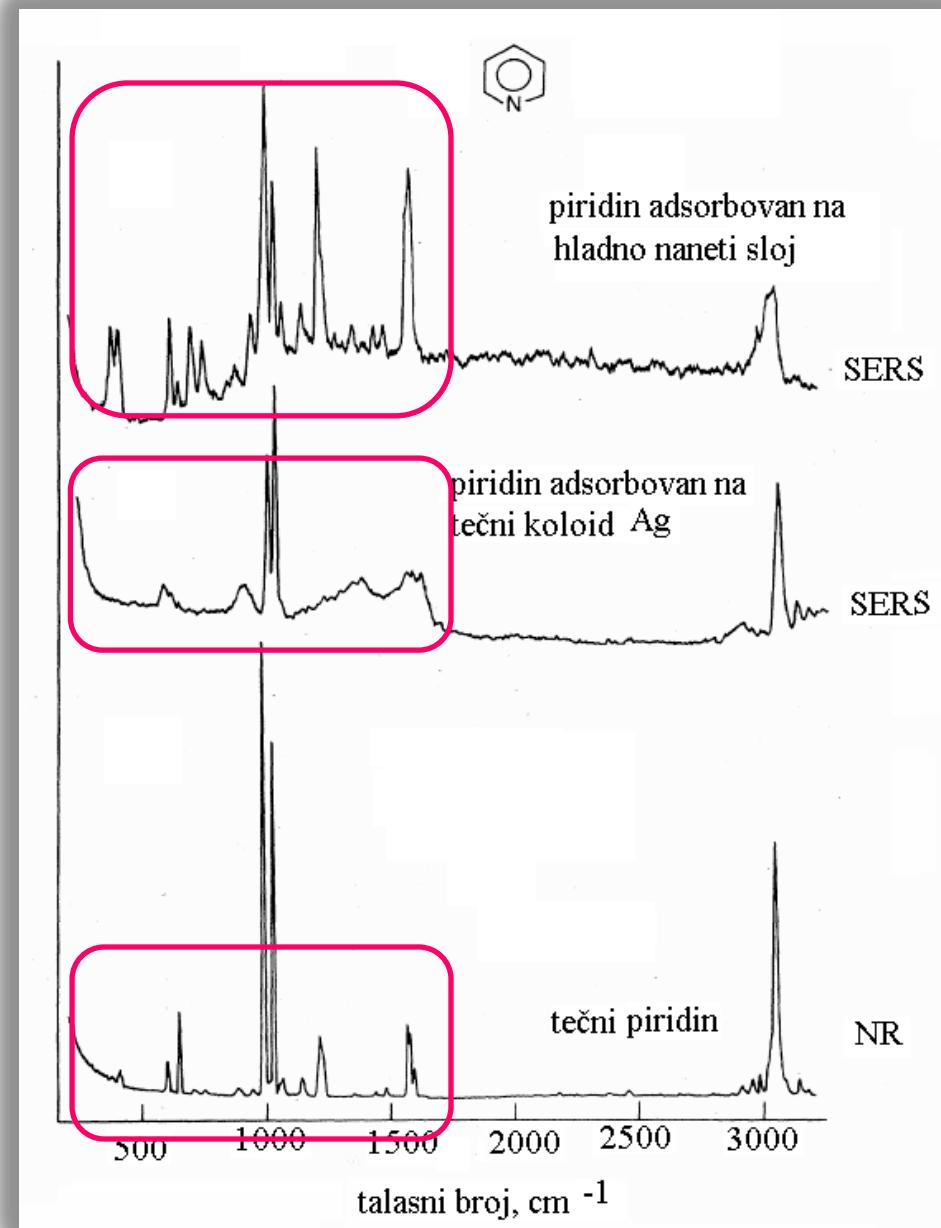
Izbor metala

- najveći broj eksperimenata koristi **Cu, Ag ili Au** kao metalne površine iz razloga što je uslov rezonancije njihovih površinskih plazmona u **VID oblasti**
- **Cu, Ag ili Au imaju dobru otpornost na koroziju**
- međutim, ovi metali ne odgovaraju eksperimentima u kojima se prate **heterogeni katalitički procesi**
- zato se počelo sa nanošenjem jako tankih filmova različitih, katalitički aktivnih, **prelaznih metala** na površine plazmonskega metala
- ovim postupkom se zadržavaju površinski plazmoni metala ali im se menja **reaktivnost**
- tanak sloj katalitički aktivnih metala ovim putem uspeva da “pozajmi“ EM efekat pojačanja intenziteta od plazmonskog metala

SERS i NR spektri benzena na različitim supstratima



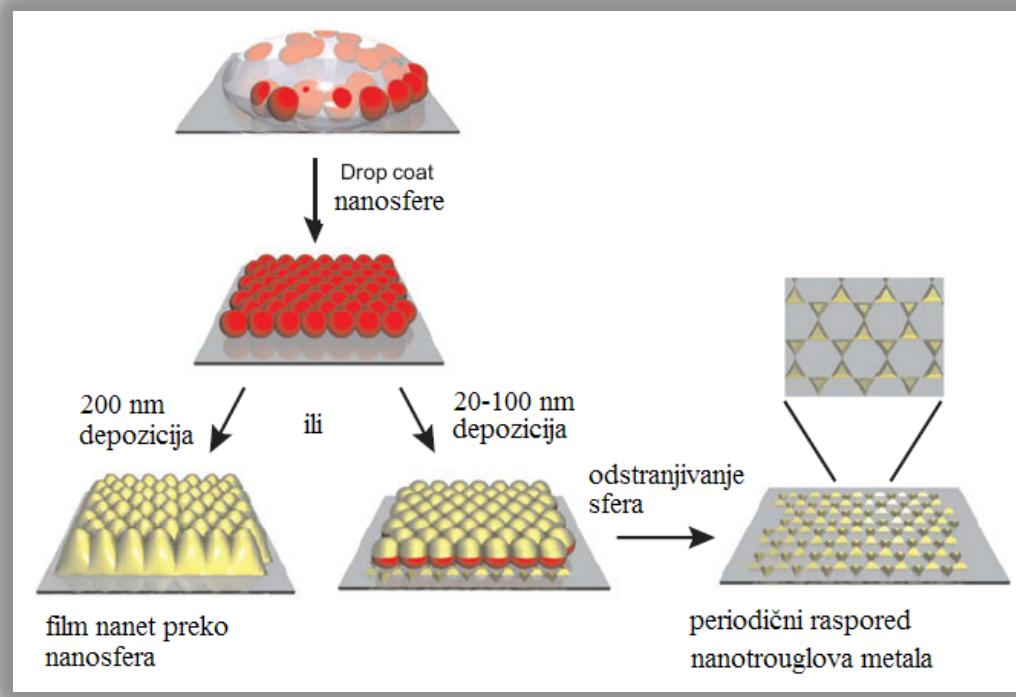
SERS i NR spektri piridina na različito pripremljenim supstratima



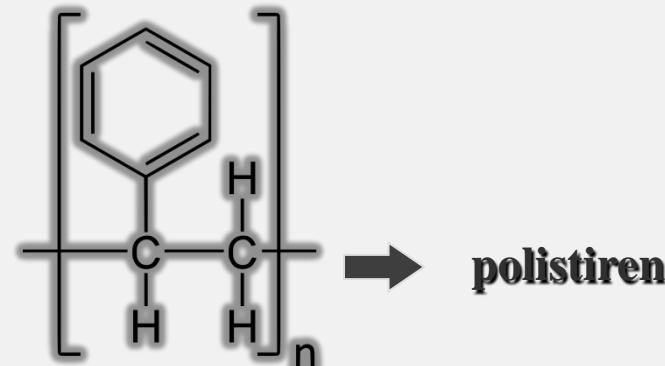
- razvitak na polju nanotehnologija omogućio je dobijanje površina koje su u mnogome poboljšale izvođenje SERS eksperimenata
- metoda koja se naziva **litografija nanosfera** je od posebne važnosti (*NSL- nanosphere lithography*)

Litografija nanosfera i filmovi naneti na nanosfere

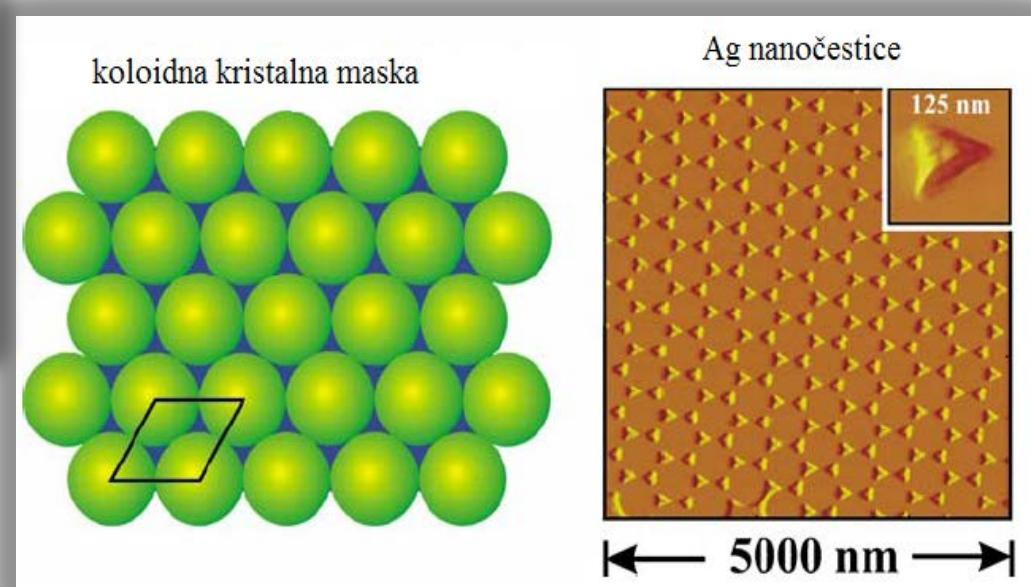
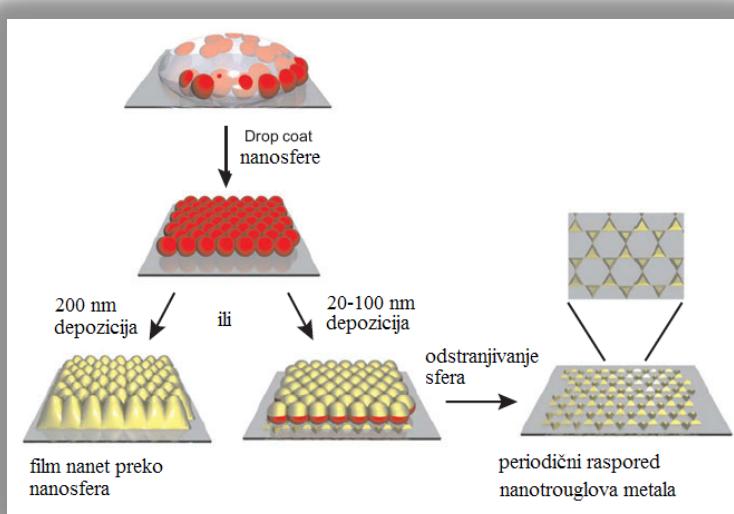
- metodu su originalno prvi predložili Fischer i Zingsheim
- polimer (polistiren ili lateks) koji sadrži nanosfere uniformnog poluprečnika se nanosi u gustom monosloju na podlogu i ostavlja da se osuši i rasporedi u gusto pakovani heksagonalni raspored
- na tu podlogu se potom nanosi sloj metala u debljini od **20–100 nm**



Shematski prikaz procesa litografije nanosfera



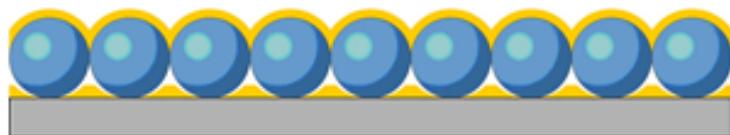
- zatim se vrši poravnavanje površine tako da na nosaču ostaje metal u periodičnom rasporedu
- na sloj polimera se može nanositi i deblji sloj metala (oko 200 nm) koji se pokazao kao veoma dobar i izdržljiv sloj koji može da izdrži perturbacije izazvane okolinom



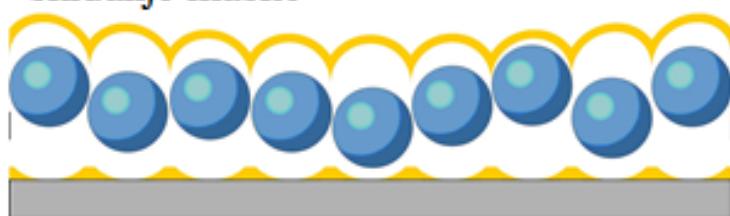
samoorganizacija nanosfera



naparavanje metala



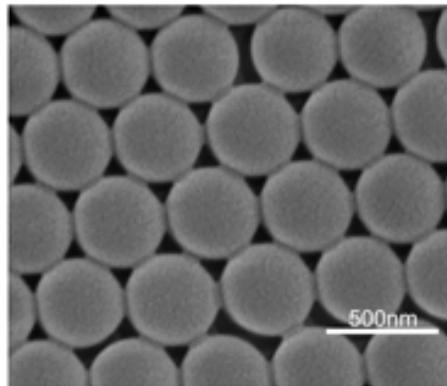
skidanje maske



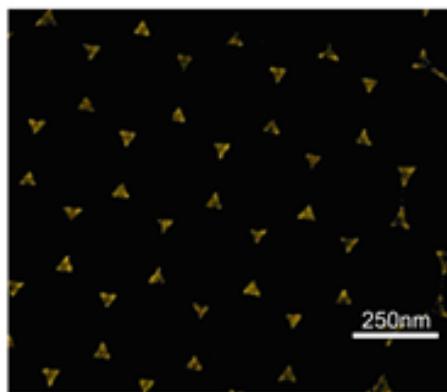
periodičan raspored metala



nanosfere polistirena



Au sloj koji ostaje

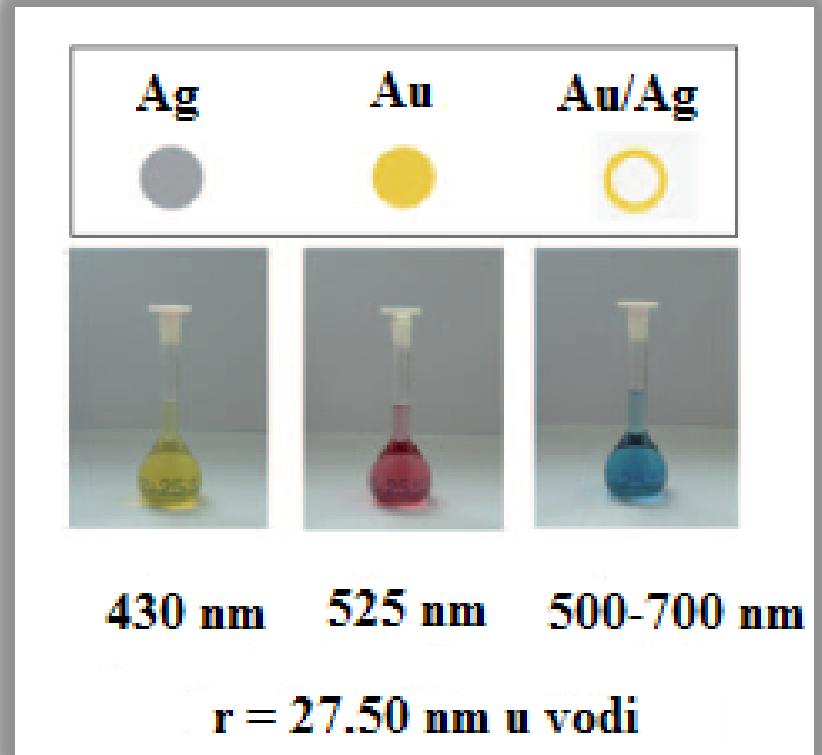


- 1995. Hulteen i van Duyne su dobili periodični raspored čestica koristeći jedno- i dvo-slojne sferne maske
- time su dobili idealan raspored Ag nanočestica površine od $4\text{--}25 \mu\text{m}^2$ i za metodu predložili naziv **litografija nanosfera** (*NSL- nanosphere lithography*)
- faktor pojačanja je bio $\sim 10^7$ pri analizi benzentiola na Ag česticama dobijenim postupkom NSL
- takođe se može koristiti i metoda **nanošenja metalnog filma preko nanosfera** (*FON - films over nanospheres*) (faktor pojačanja $\sim 10^6$)

Sinteza nanočestica metala

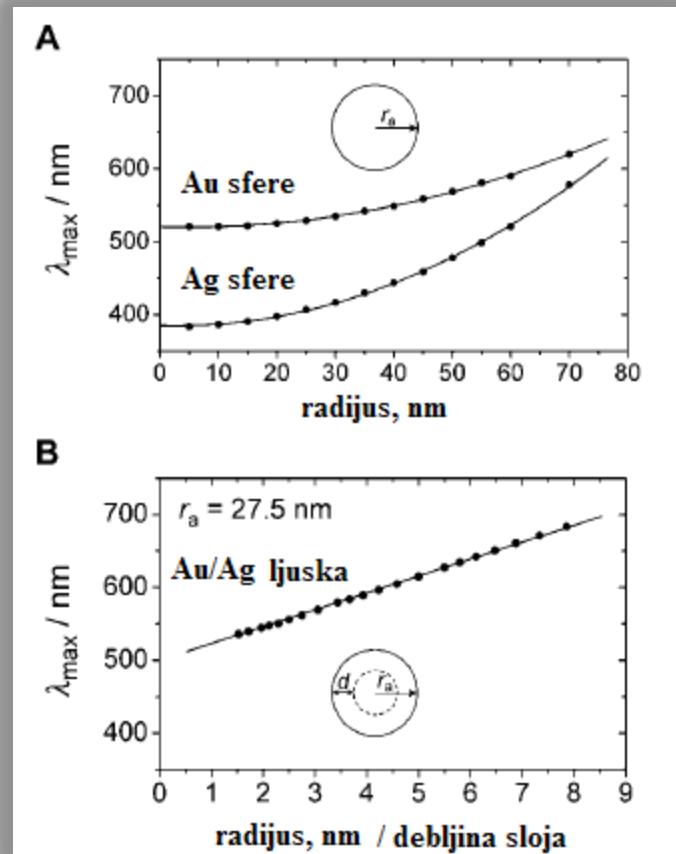
- soli metala (Ag ili Au najčešće) se redukuju u prisustvu nekog stabilizatora
- mogu da se prave i Ag/Au nanoljuske (po proceduri Xia i saradnika) jer se kod takvih površina SPR postiže u određenom opsegu talasnih dužina upadnog zračenja (od IC do NIR oblasti) sa jako velikim efikasnostima rasejanja (tzv. *tunable plasmon resonances*)
- Ag nanočetice se prave u tzv. poliol postupku, gde se koristi srebro nitrat koji se rastvara u etilenglikolu sa dodatkom polivinilpirolidina (PVP)
- koriste se i šuplje Au/Ag sfere

- parametri kao veličina, oblik i hemijski sastav određuju optičke osobine metalnih nanočestica
- za kvantitativnu SERS analizu potrebno je raditi sa monoslojevima čestica
- ekstinkcioni maksimumi (apsorpcija/rasejanje) plazmona Ag i Au nanosfera se javljaju u plavoj i zelenoj oblasti spektra a Au/Ag nanoljuski se mogu pomeriti i do NIR oblasti
- položaj λ_{\max} plazmona zavisi od veličine nanosfere kao i dielektričnih konstanti metala i sredine koja se graniči sa metalom (na slici su podaci za vodu)



Različite nanočetice metala i talasne dužine rezonancije njihovih plazmona u vodi za radijus čestica od $r_a=27,5 \text{ nm}$

- sa slike se vidi da je za Au čestice λ_{max} plazmona veća nego za Ag čestice a za Au/Ag nanoljuske još veća
- pokazano je da kada se laser od 632,8 nm usmeri na Au/Ag sloj debljine 60 nm dolazi do povećanja intenziteta rasutog zračenja i do 8 puta u odnosu na intenzitet rasutog zračenja koji se dobija sa Au česticama iste veličine
- plazmonske nanostrukture kao efikasni SERS supstrati u kombinaciji sa laserima iz NIR oblasti koriste u veoma često u biomedicinskim i biološkim ispitivanjima



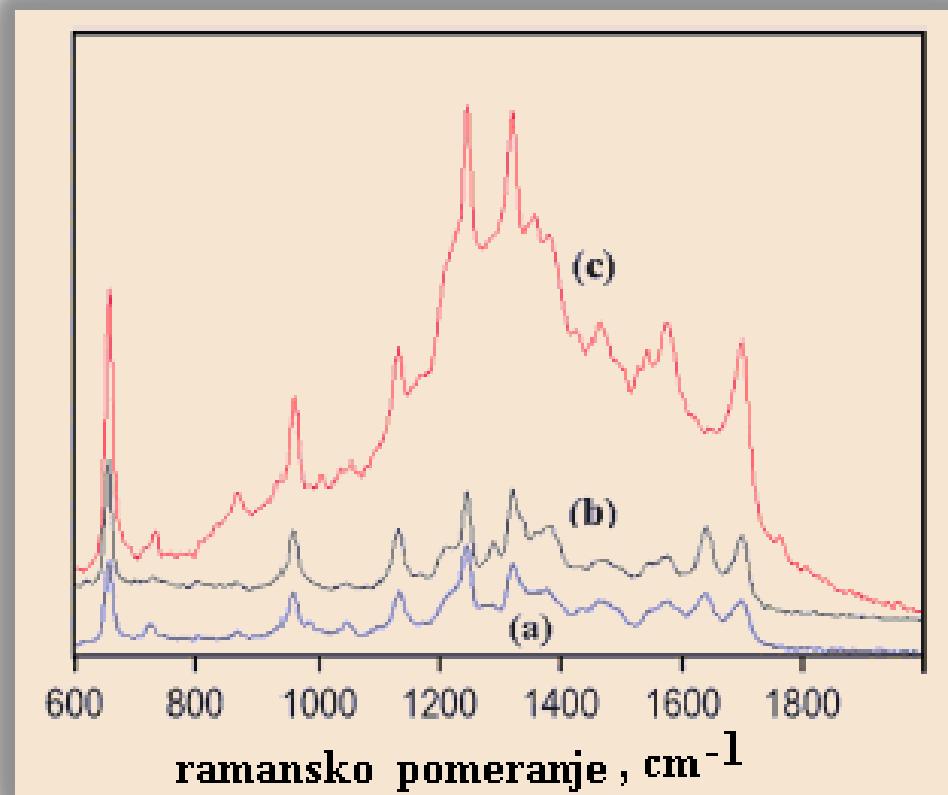
Položaj:

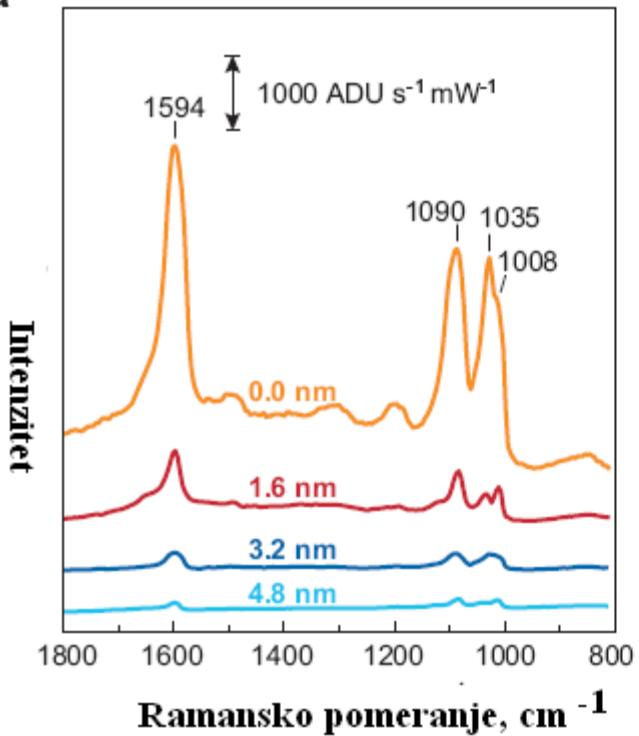
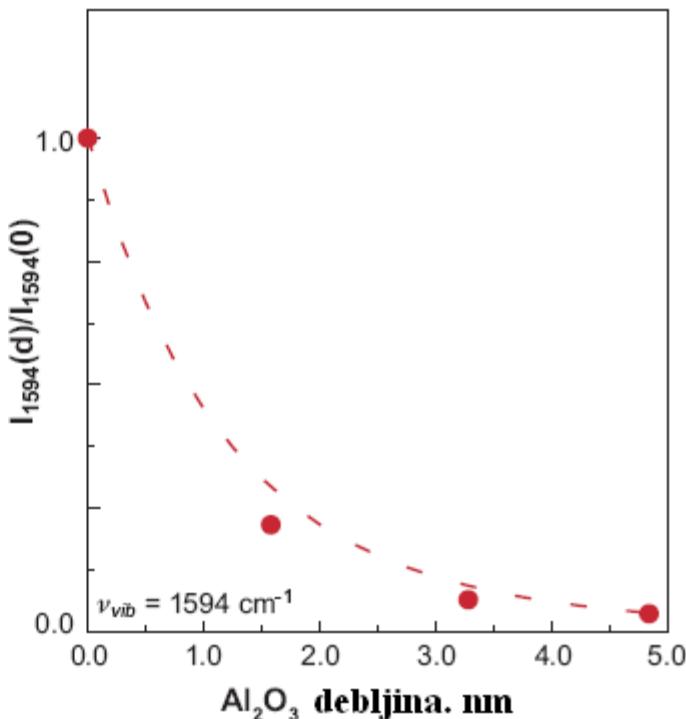
- A) traka plazmona Au i Ag nanosfera u vodi u f-ji poluprečnika nanosfera
- B) traka plazmona Au/Ag nanoljuski u vodi u f-ji odnosa poluprečnika nanosfera i debljine sloja za konstantan poluprečnik ($r=27,5 \text{ nm}$)

Uticaj oblika čestica srebra na izgled spektra

SERS spektri bakterije soja *Shewanella* na:

- a) Ag nano sferama
- b) Ag nano žicama
- c) u “sendviču” Ag-nanosfere-Ag nanožice

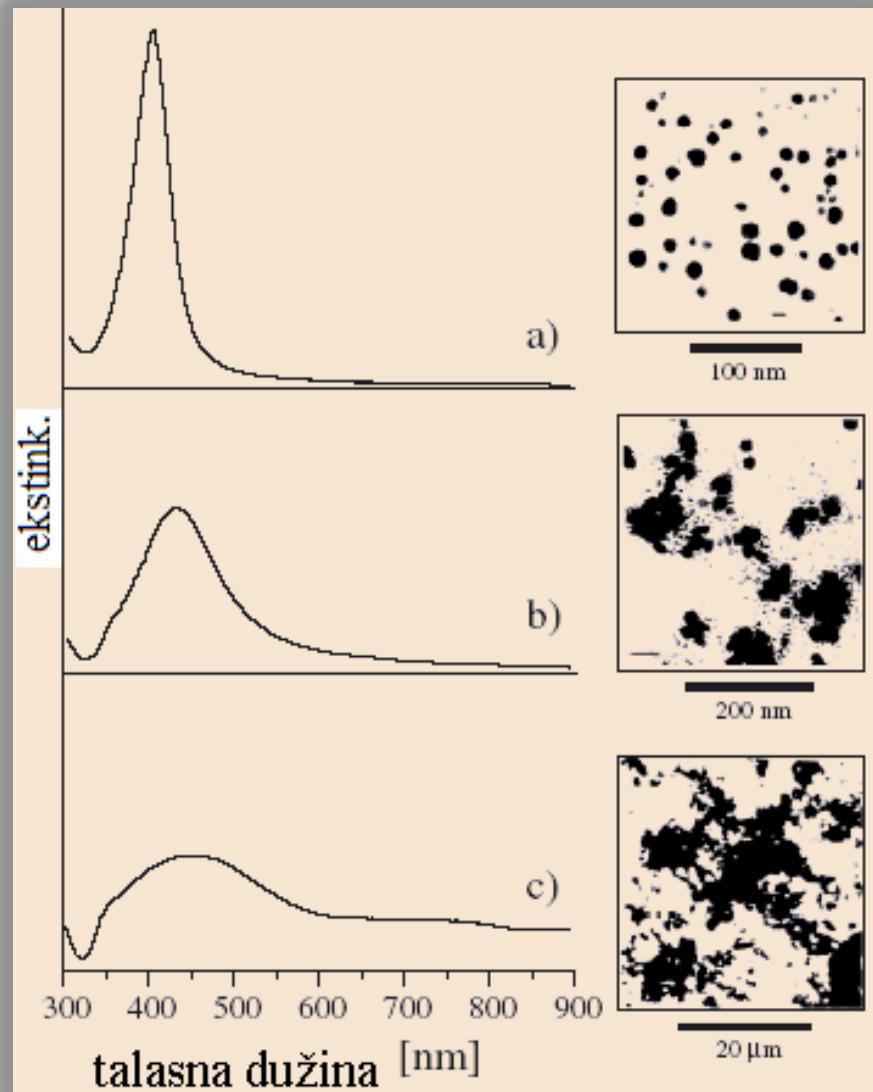


a**b**

SERS spektri piridina adsorbovanog na Ag filmu koji je tretiran različitim debljinama sloja Al₂O₃ (a) i zavisnost intenziteta rasejanja od debljine sloja Al₂O₃ (b)

Uticaj veličine čestica (agregacije Ag koloida)

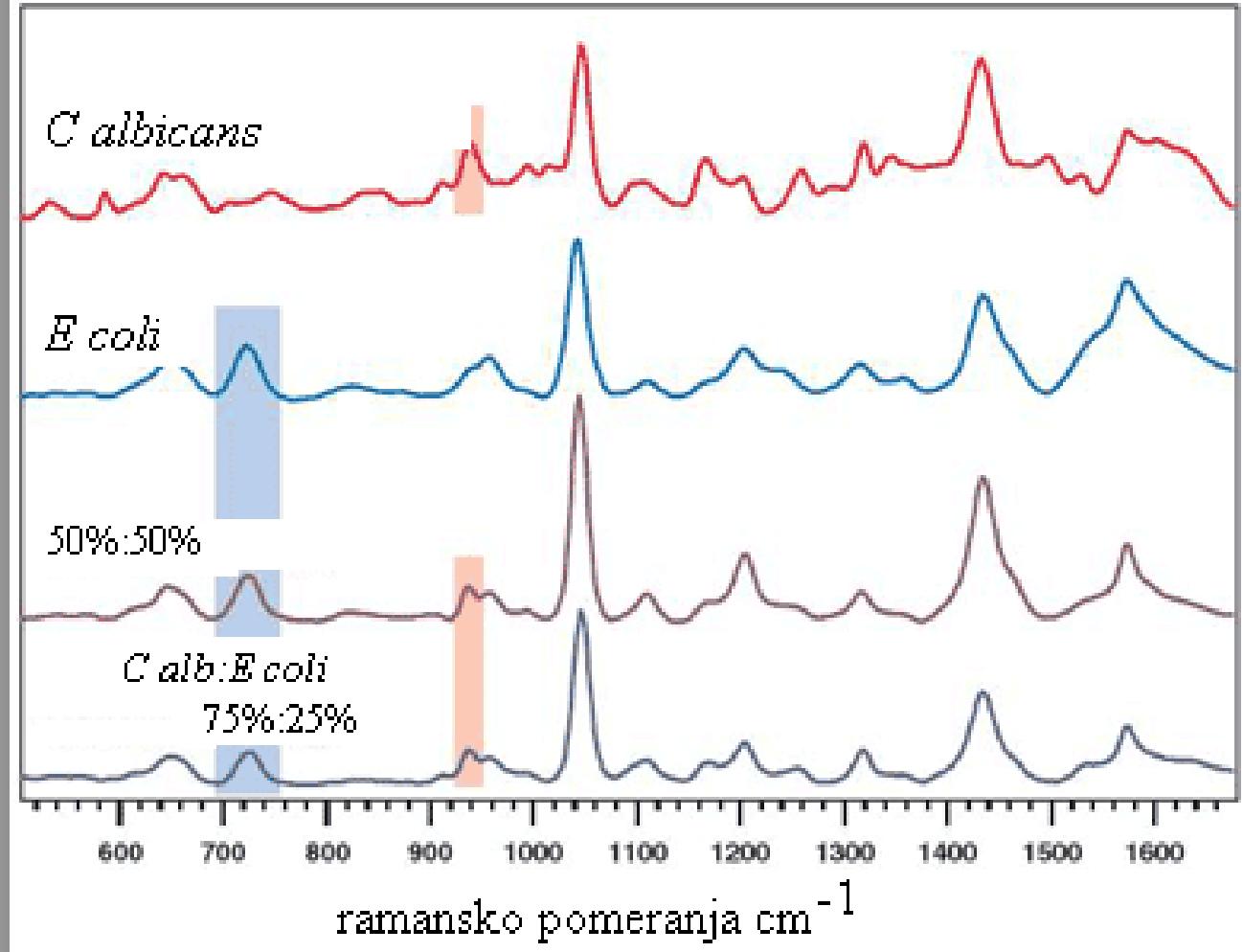
**Koloidne čestice srebra u
različitim stadijumima
agregacije i odgovarajuće
krive ekstinkcije**



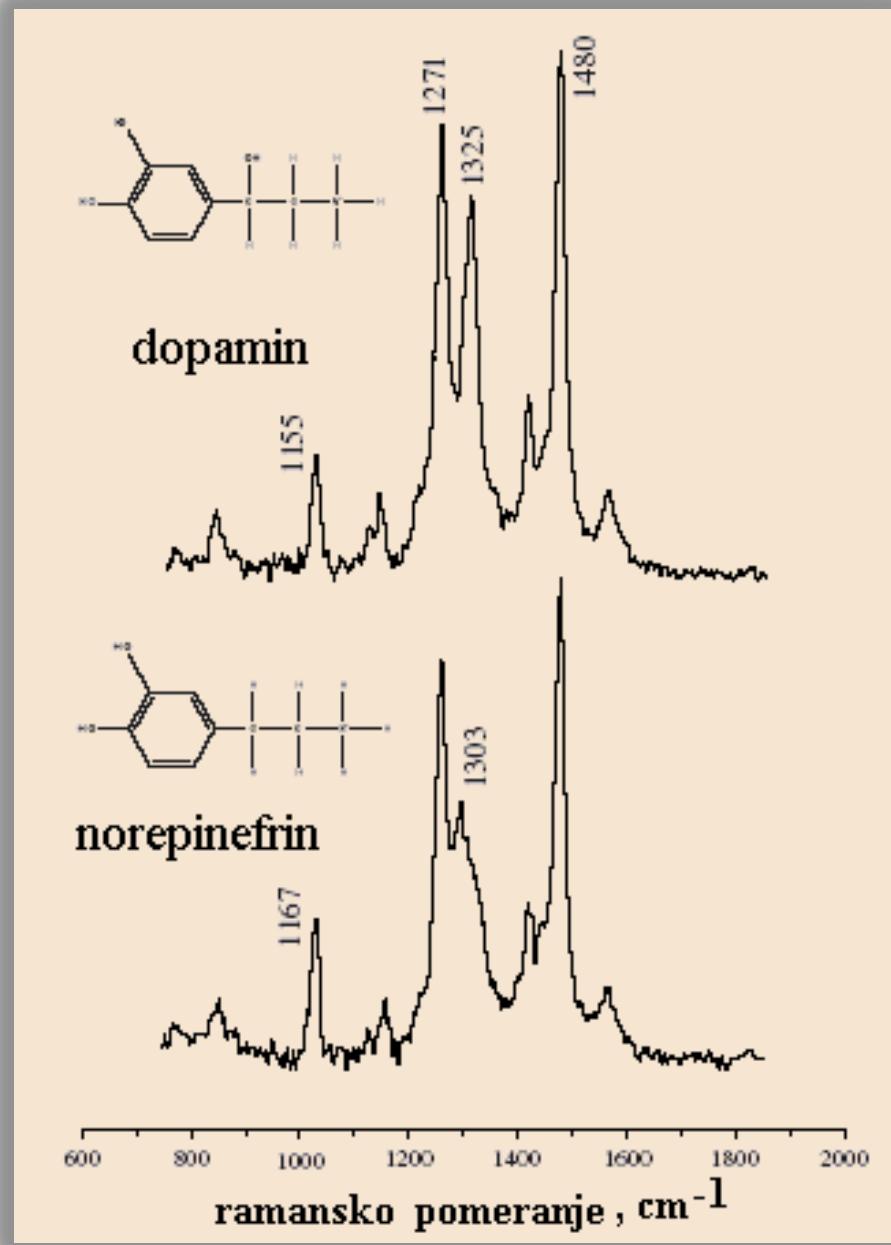
ULj-SERS

- proširenje ekscitacionog opsega sa NIR i VID na ULj oblast proširuje mogućnosti primene SERRS metode na veoma važne biološki aktivne molekule kao što su DNK i proteini
- kako se rezonancija plazmona Ag i Au, kao najčešće korišćenih metala, ne postiže u ULj oblasti spektra to se moraju koristiti drugi metali
- ULj-SERS eksperimenti se realizuju na supstratima od rodijima i rutenijuma (**Rh, Ru**) (pob. talasna dužina 325 nm)

SERS spektri različitih bakterijskih vrsta



ULJ-SERS spektri neurotransmitera dopamina i norepinefrina u rastvoru Ag kolida



CCD – detektor (Charge Coupled Device)

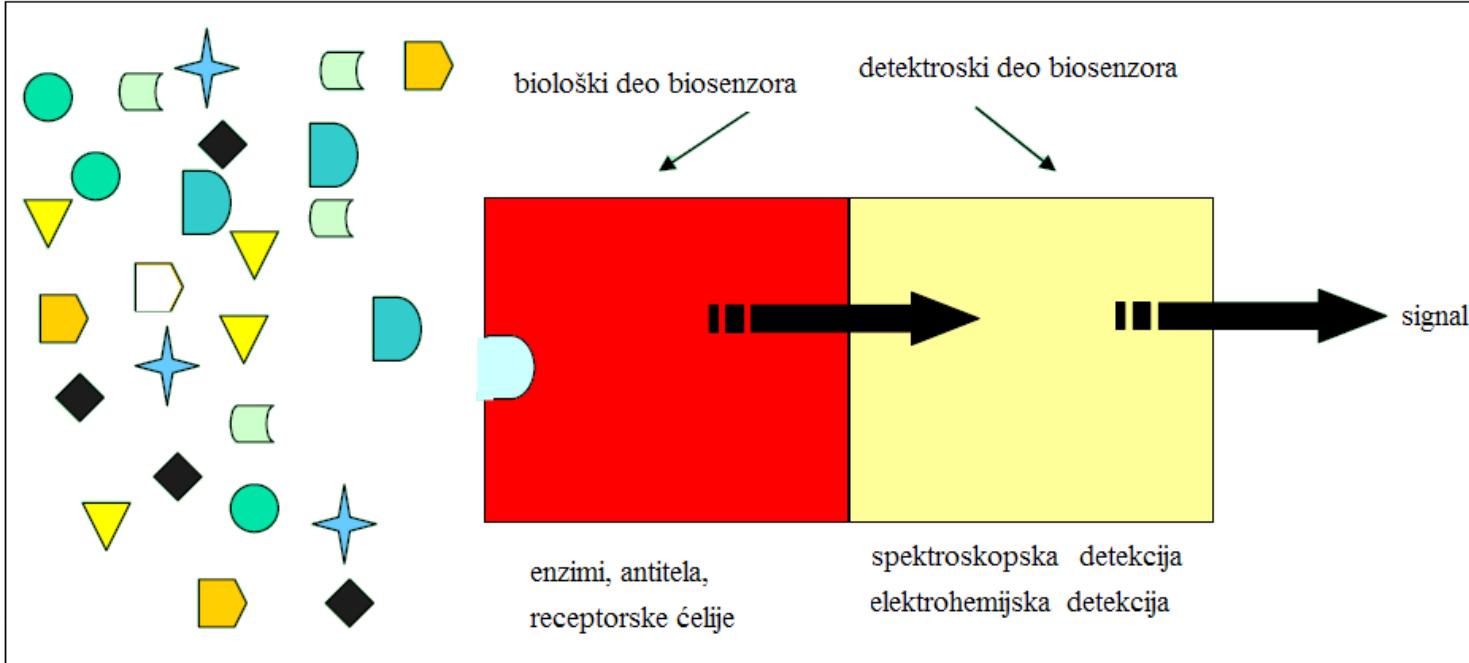
- **kompleksan elektronski uređaj koji omogućava istovremeno merenje intenziteta svetlosti, u velikom broju tačaka u ravni**
- **dobijena slika je ekvivalentna slici koja bi se dobila korišćenjem filma kao detektora**
- **ne koristi se izlazni razrez što omogućava istovremeno snimanje u širem spektralnom intervalu**
- **tačke u kojima CCD uređaj meri intenzitet svetla nazivaju se pikseli (veći broj piksela po jedinici dužine senzora spektar je bolji)**
- **prednost CCD čipova u odnosu na linijske detektore je u tome što čipovi imaju oblik matrice. Svaki red matrice snima po jedan spektar, a kao izlazna informacija dobija se usrednjena vrednost spektara sa svih redova CCD čipa**
- **kamera sa CCD senzorom prilagođenim za snimanje optičkih spektara (ICCD) (povezuje se sa računаром помоћу контролне kartice)**

- kamera može da radi u kontinualnom i u impulsnom režimu
- rad u impulsnom režimu snimanja zahteva sinhronizaciju kamere i impulsnog izvora pobuđivanja
- softver kamere omogućava različite načine snimanja (akumulaciju više snimaka radi dobijanja povoljnijeg odnosa signal-šum)
- kamera ima mogućnost i hlađenje CCD senzora Peltijeovim elementom (termoelektričnim elementom) na -20°C što doprinosi smanjenju struje mraka kamere odnosno smanjenju odnosa signal-šum
- nedostatak CCD senzora je tzv. efekat „preslušavanja“ - (efekat koji ima za posledicu da veliki intenzitet svetla, kojem je izložen jedan piksel, dovodi do lažnog povećanja intenziteta signala izmerenih u susednim pikselima, a koji su izloženi relativno malim intenzitetima svetla)

Optički biosenzori na bazi SPR-a

- biosenzori su tankolsojni refraktometri koji mere promenu u indeksu prelamnja koja se javlja na površini metalnog filma po kome se vrši prostiranje površinskog plazmona
- biosenzori su kombinovani biološki i fizičkoheminski sistemi koji se koriste za detekciju molekula analita

➤ osetljivi biološki molekuli (**tkiva, mikroorganizmi, ćelijske organele, ćelijski receptori, enzimi, antitela, nukleinske kiseline**) se kombinuju sa tzv. detektorskim elementima koji transformišu signale, koji su nastali kao posledica interakcije molekula analita i biološkog elementa biosenzora, u oblik signala koji se lako meri i kvantificuje

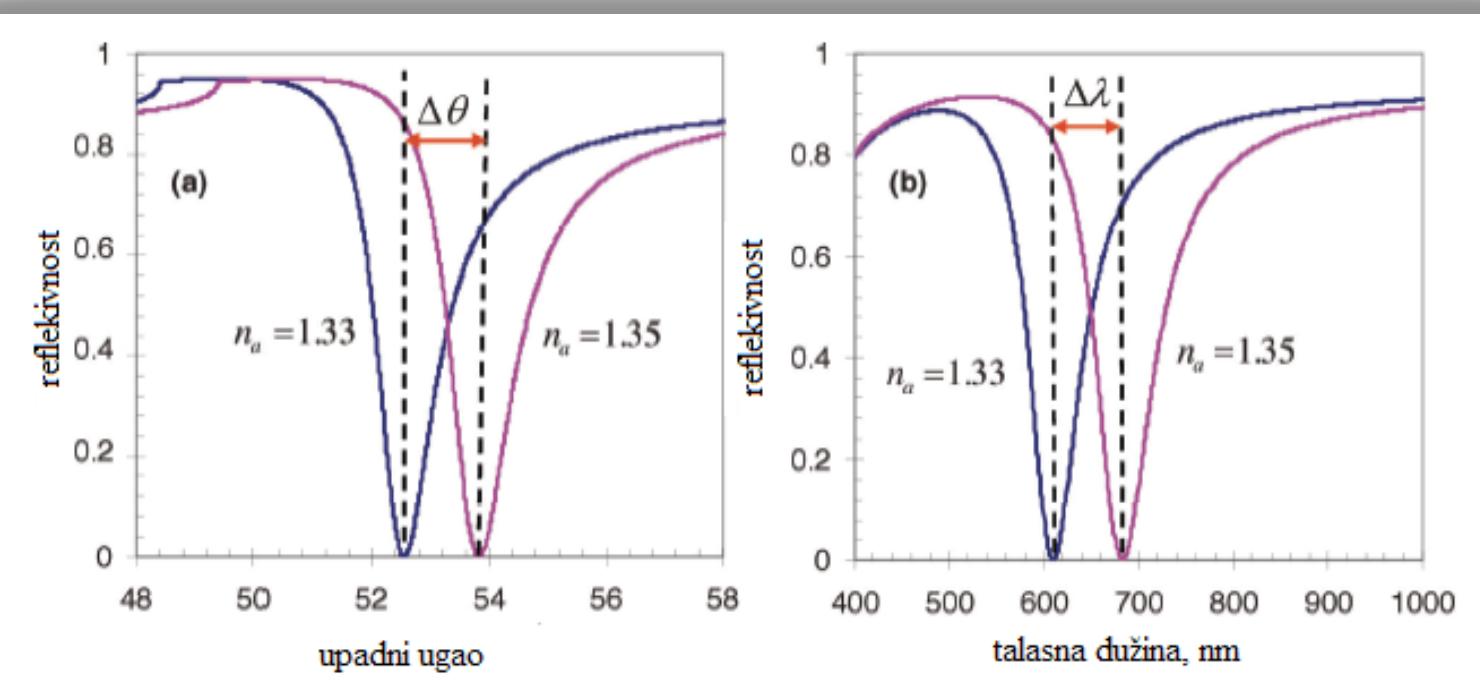


Shema biološkog senzora

- brza identifikacija veoma malih i velikih molekula (**DNK, lipidi, proteini, nukleinske kiseline**) u *in vivo* i *in vitro* uslovima ispitivanja čini SERS veoma primenljivom metodom u savremenim istraživanjima
- primena hemijskih i bioloških senzora zahteva veliku selektivnost i osetljivost
- biosenzori na bazi SPR su nezamenljivi u **karakterizaciji biomolekulskih interakcija**
- primena SPR senzora u analizi biloških uzoraka je od izuzetne važnosti i iz razloga veoma malog efikasnog preseka za ramansko rasejanje na molekulima vode što olakšava analizu uzoraka sa njenim visokim sadržajem

- SPR biosenzori se dele na senzore sa:
 - ugaonom modulacijom
 - modulacijom talasne dužine
 - modulacijom intenziteta ili faze
- (na osnovu toga na koji način se postiže rezonancija površinskog plazmona)
- kod modulacije talasne dužine površinski plazmon se pobuduje kolimirajućim polihromatskim zračenjem
- pobuđivanje plazmona se registruje u momentu pada intenziteta reflektovane svetlosti na skali talasnih dužina
- talasna dužina na kojoj je sprezanje najjače se koristi kao izlazni signal biosenzora
- kod ugaone modulacije površinski plazmon se pobuduje monohromatskim zračenjem koje pada na uzorak pod različitim uglovima
- pobuđivanje plazmona se registruje u momentu pada intenziteta reflektovane svetlosti na određenom uglu upadnog zračenja

Pomak rezonancije površinskog plazmona usled promene indeksa prelamanja (ugaona i modulacija talasne dužine)



- SPR biosenzori imaju:
 - tzv. “biološki element za raspoznavanje” (*biorecognition element*)
 - “provodni” element (*transducer*) koji “prevodi” vezivanje molekula analita i površine u izlazni signal koji se meri
- elementi za raspoznavanje se vezuju za (ili se nalaze u blizini) površinu metala na kojoj se javlja površinski plazmon
- molekul analita (**u tečnom stanju**) dolazi u kontakt sa SPR biosenzorom i menja uslove rezonancije površinskog plazmona
- u tom kontaktu dolazi do promene indeksa prelamanja na površini senzora
- promena indeksa prelamanja koja se javlja vezivanjem molekula analita zavisi od koncentracije analita i njegovih osobina:

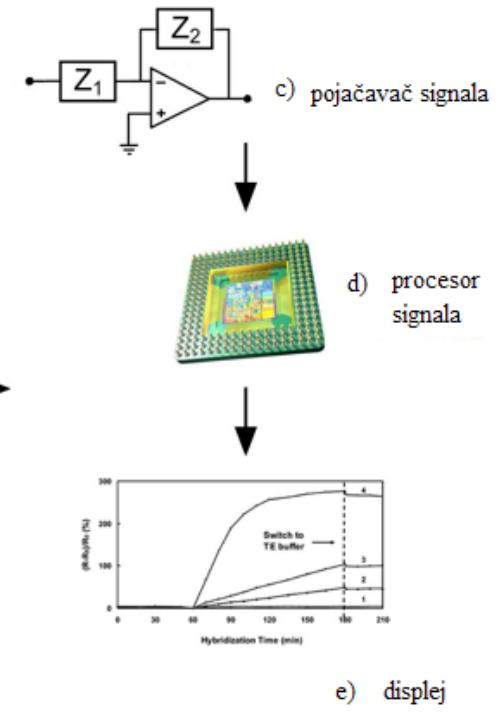
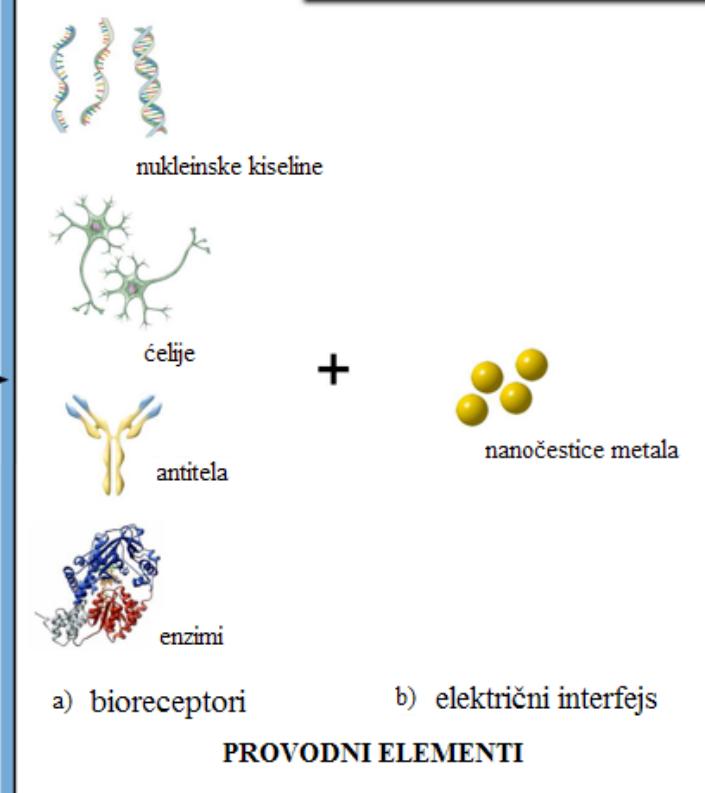
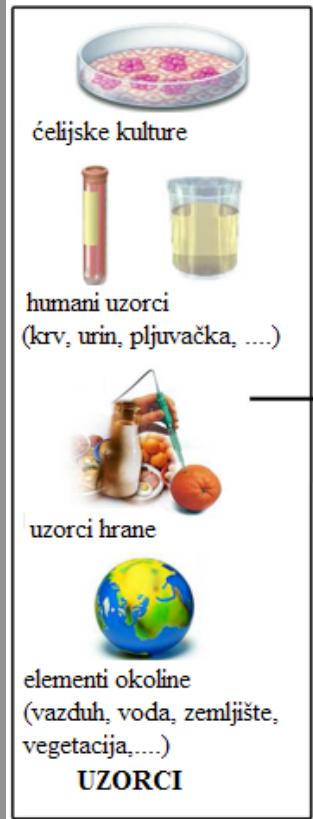
(dn/dc) - priraštaj indeksa prelamanja

Γ - površinska koncentracija vezanog analita (masa/površina)

h – debljina senzora za koju se vezuje molekul analita

$$\Delta n = \left(\frac{dn}{dc} \right) \frac{\Gamma}{h}$$

Elementi SPR biosenzora



Glavne karakteristike SPR biosenzora

- **osetljivost**
- **linearnost**
- **rezolucija**
- **tačnost**
- **reproduktivnost**
- **granica detekcije (LOD)**

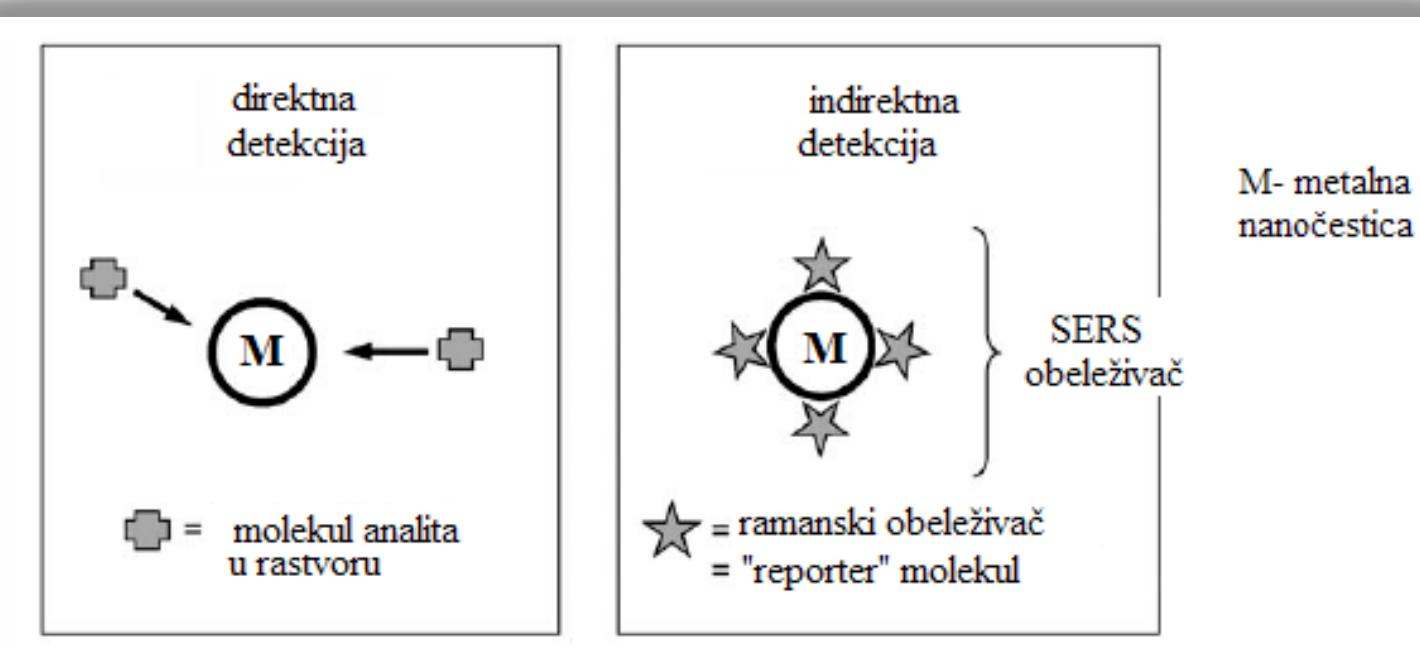
Detekcija u SERS eksperimentima

- postoji **neophodnost blizine analita i nanostrukturiranog supstrata u opsegu od nekoliko nm**
- metoda analize bioloških molekula može biti:
 - **direktna**
 - **indirektna (posredna)**

Direktna detekcija:

- podrazumeva nanošenje analita direktno na nanostrukturirani supstrat (najčešće Ag ili Au)
- metalne površine često nisu dovoljno stabilne (oksidacija metala) a i dosta važnih analita (npr. glukoza) ima veoma mali afinitet vezivanja za površinu Ag ili Au
- u direktnom kontaktu metala i analita takođe nije moguća zaštita i izolacija analita od interferirajućih efekata

Direktna i indirektna metoda detekcije



Indirektna (posredna) detekcija, funkcionizacija

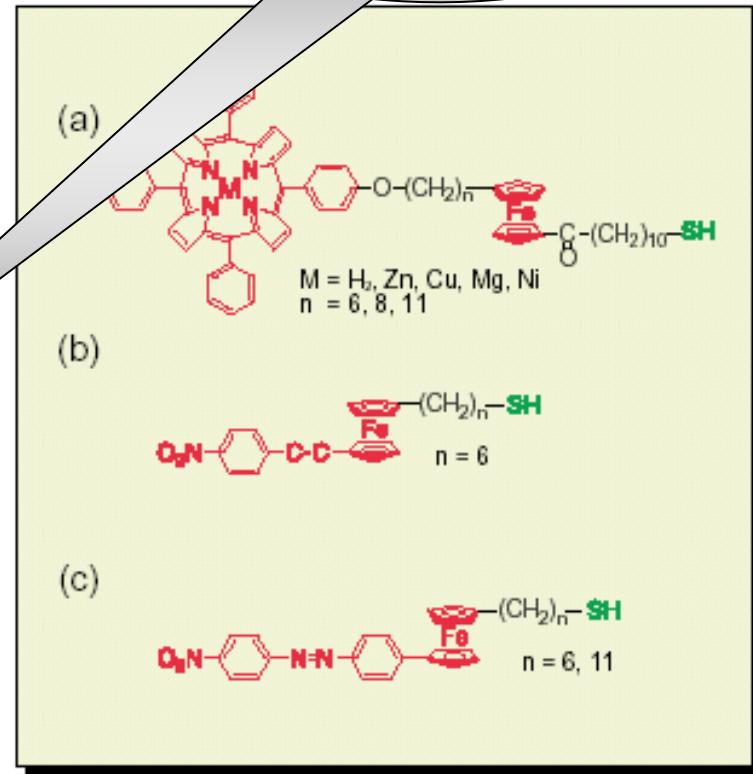
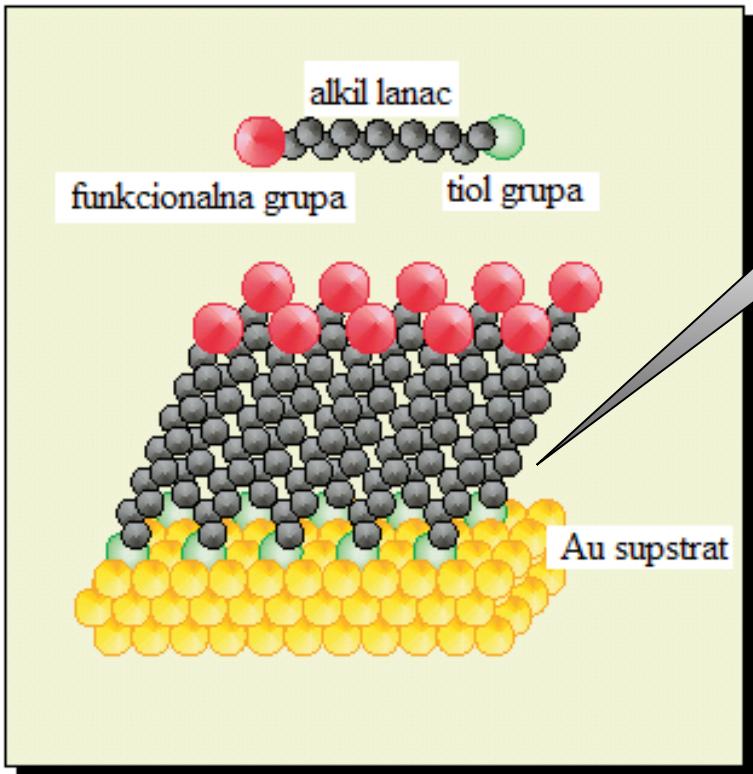
SERS površine

- u posrednoj metodi površina nanostrukturiranog supstrata se „funkcionalizuje“ određenim molekulima (obeleživačima, engl. *tag*) (kao što su alkantioli ili čak složeni makromolekuli) koji u isto vreme omogućavaju:
 - zaštitu analita od oksidujuće metalne površine i
 - dovoljnu blizinu analita na istoj toj površini
- molekuli koji su se do sad veoma često koristili kao obeleživači su:
 - enzimi
 - boje
 - molekulske fluorofore
 - kvantne tačke* i dr.

kvantne tačke* - su nanokristali napravljeni od poluprovodničkih materijala koji zbog malih dimenzija (2-10 nm, 10-50 atoma) ispoljavaju kvantno-mehaničke osobine. Elektronske osobine kvantnih tačaka su između osobina poluprovodnika i molekula sa diskretnim energetskim nivoima što se tumači izuzetno velikim odnosom površina/zapremina ovih struktura. U osnovne optičke osobine kvantnih tačaka spada fluorescencija koja se javlja posle ozračivanja uzorka svetlošći određenih talasnih dužina. Energija emitovanog fluorescentnog zračenja zavisi od veličine energetske barijere između provodne i valentne zone nanokristala. Energetska barijera raste kako opada veličina kvantnih tačaka tako da je za pobuđivanje kvantnih tačaka manjih dimenzija potrebna veće energija.

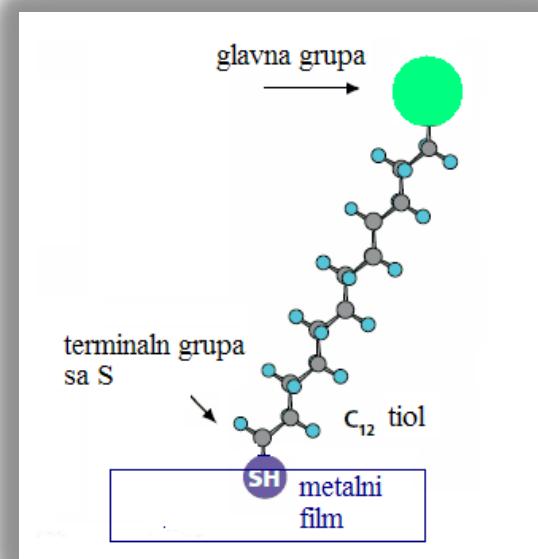
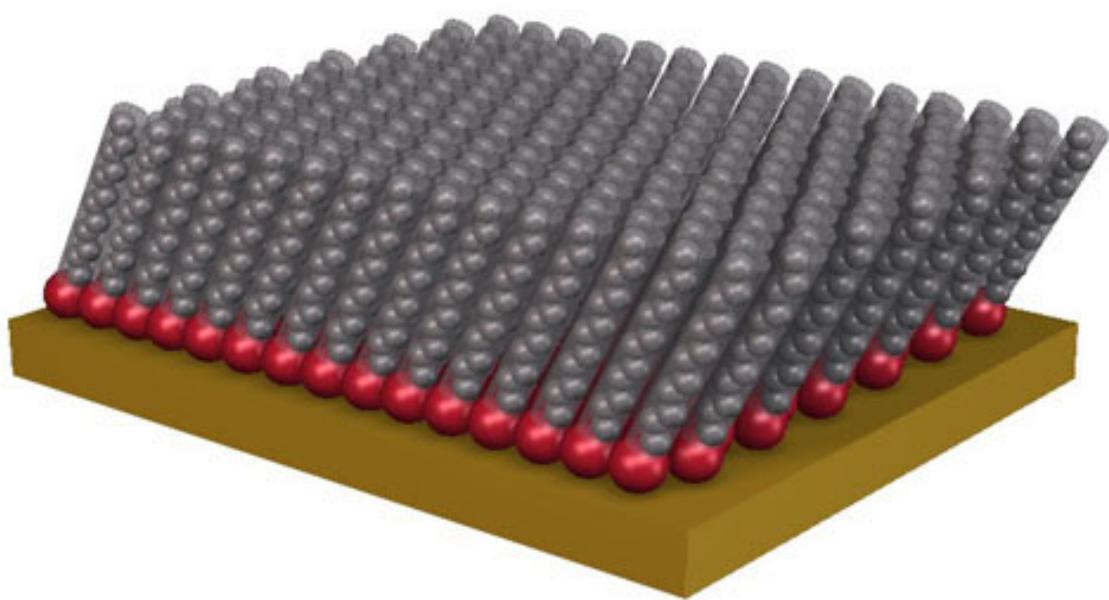
- ovi molekuli, koji obično imaju tiolne grupe (R-S-H), se vezuju za metalnu površinu i na njoj formiraju tzv. samoorganizujući monosloj (*SAMs-self-assembled monolayers*)
- SAM slojevi su analogni stacionarnoj fazi koja se koristi u metodi tečne hromatografije visokih performansi (HPLC)
- nedostatak SAM slojeva je mogućnost termičke razgradnje i fotoksidacije kojima se mogu stvoriti defekti na površini metala

Uvek jedna grupa
ima poseban afinitet
ka metalu (R-SH)



samoorganizujući monosloj

derivati alkantiola sa različitim
funkcionalnim grupama



samoorganizujući monosloj na Au podlozi

Funkcionalizacija metalnih nanočestica

- vrši se za specifična, ciljana, ispitivanja (tzv. „targeted research“)
- sastoji se iz odabira:

SERS
obeleživač

(i + ii) →

SERS proba
(20-100 nm)
(i + ii + iii) →

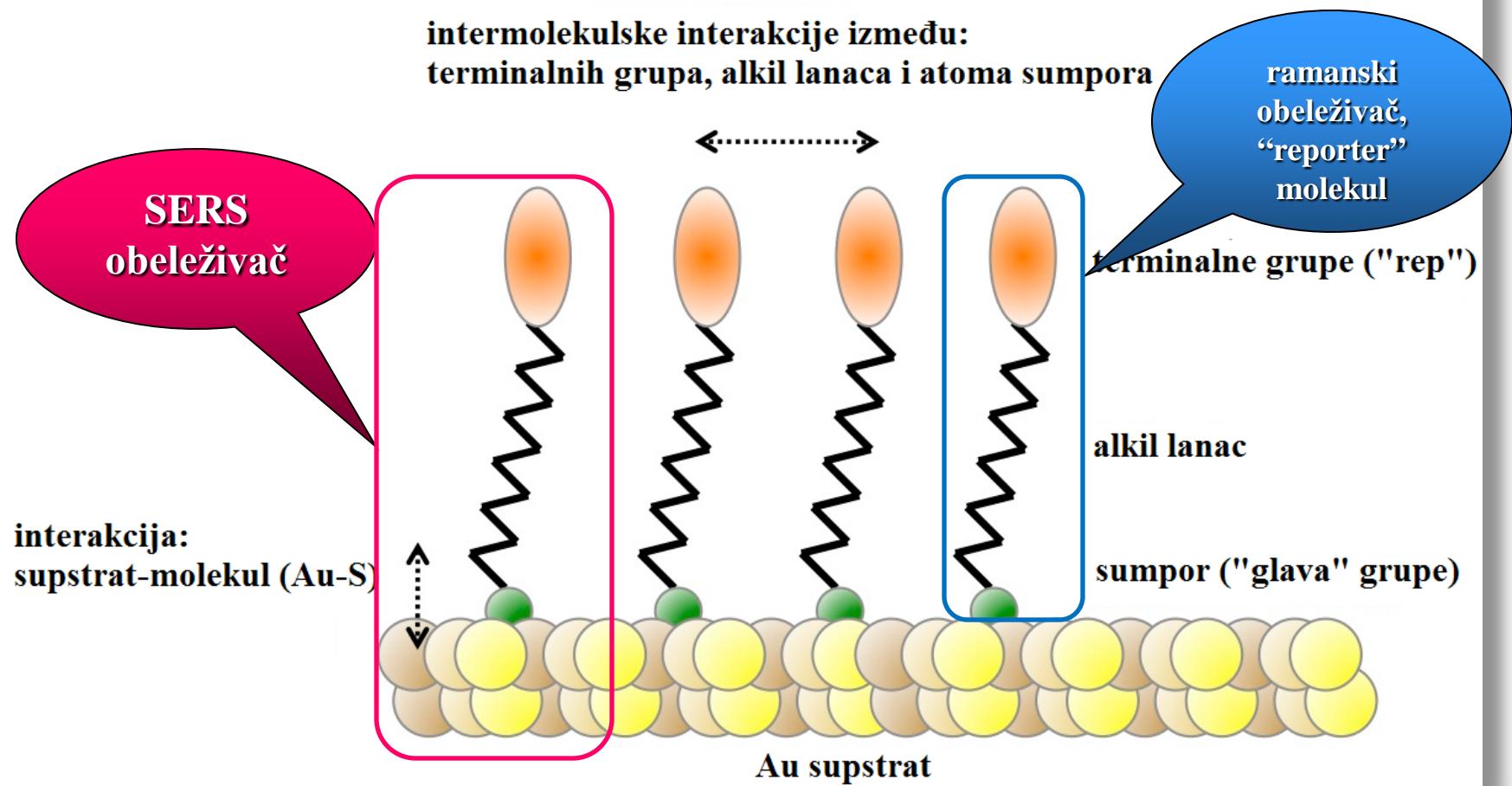
i) **SERS supstrata** (Ag, Au, Au/Ag...)

ii) **ramanskog obeleživača** (tzv. *ramanski “reporter“ molekul*)

koji se adsorbuje na nanočesticama metala
(npr. merkaptobenzojeva kiselina, rodamin 6G, ...) i
koji ima poznat i asigniran ramanski spektar, ramanski
obeleživači obično u sebi sadrže atome **azota ili sumpora** iz
razloga velikog afiniteta ka atomima srebra i zlata

iii) **biomolekula** (bioreceptora, *biorecognition* elementi): antitela,
aptameri i dr.) koji se vezuju za ramanski obeleživač

**intermolekulske interakcije između:
terminalnih grupa, alkil lanaca i atoma sumpora**

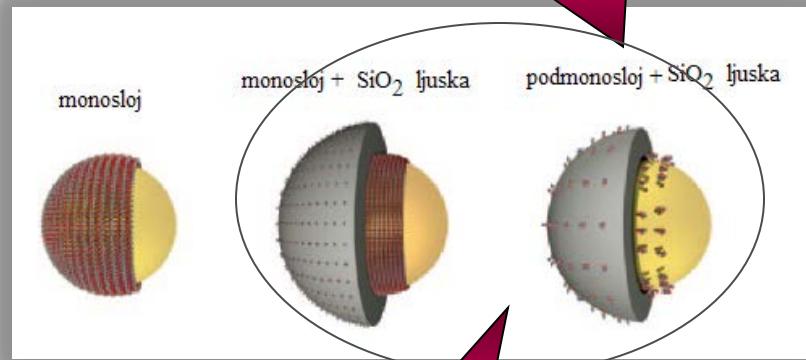


SERS obeleživači (metal + “reporter” molekul)

- sa jednom metalnom nanočesticom
- sa više metalnih nanočestica

a) SERS obeleživači sa jednom metalnom nanočesticom:

- postoje tri načina oblikovanja SERS obeleživača sa jednom nanočesticom
- arildisulfidi daju dobre monoslojeve na površini metala i vezuju se preko Au-S veza
- imaju veliku osetljivost jer omogućavaju dobro prekrivanje površine metalne nanočestice reporter molekulima
- SAM sloj takođe ima zaštitnu ulogu jer minimalizuje adsorpciju drugih molekula na supstratu



Enkapsulacija reporter molekula sa: proteinima, biopolimerima, organским polimerima i silicijumom

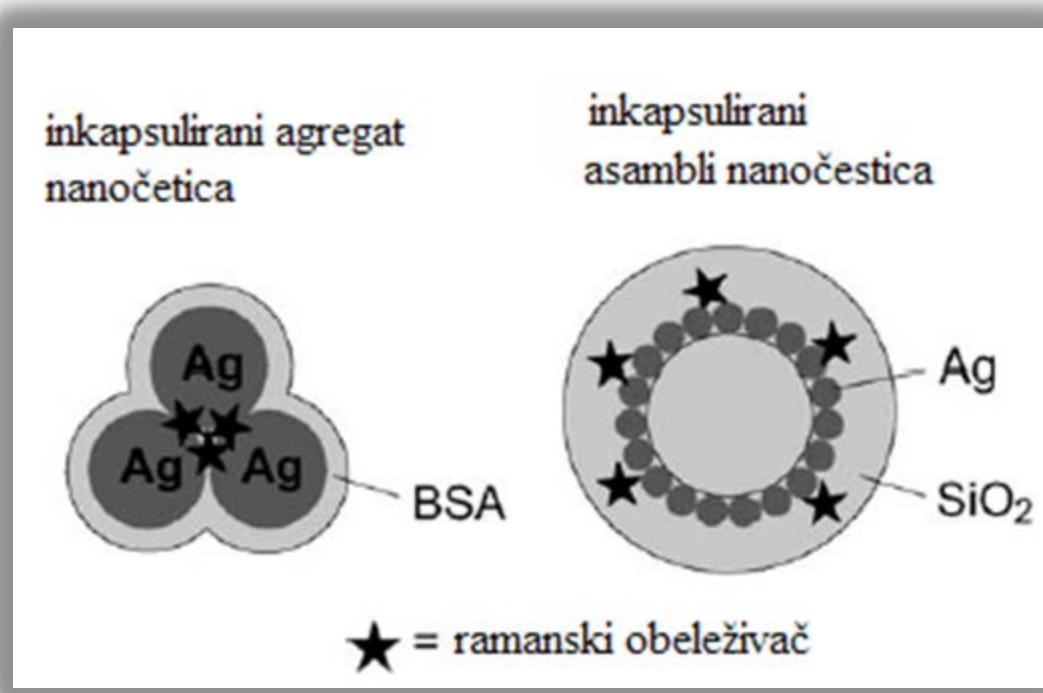
smanjuje se mogućnost desorpcije reporter molekula

- ako se uvede **inkapsulacija** - zaštita reporter molekula slojem silicijumoksida smanjuje se mogućnost desorpcije molekula reportera
- inkapsulacija može da se vrši molekulima kao što su: **proteini, biopolimeri, organski polimeri i silicijum**
- Si ima veliku stabilnost (hemijušku i vremensku)
- zaštita može da se vrši i stakлом

b) SERS obeleživači sa više metalnih nanočestica:

➤ postoje dva modaliteta:

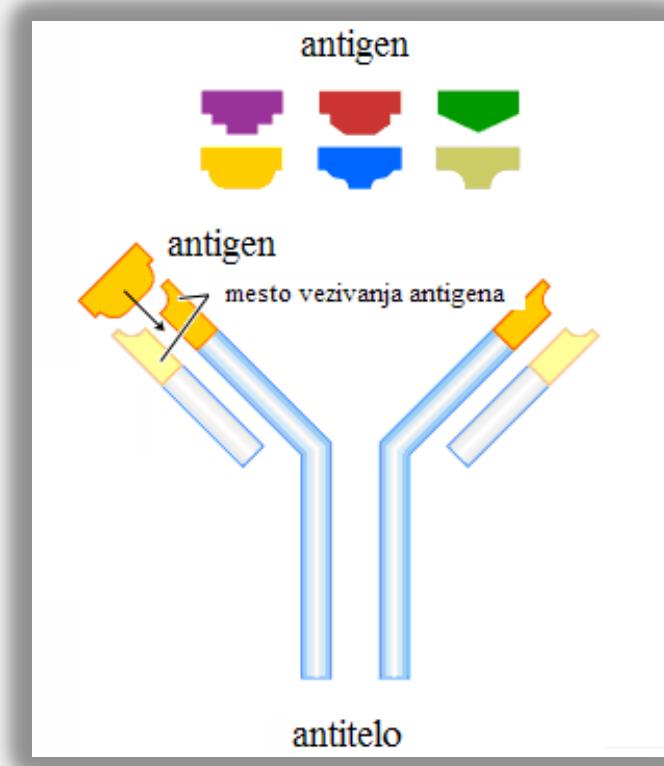
- **enkapsulirani agregati nanočestica**
- **asambli nanočestica** (čestice Si, dimenzija 180-210 nm, su matrica na kojoj se vrši depozicija mnogo malih Ag nanočestica na koju se dalje adsorbuju ramanski obeleživači-reporter molekuli)



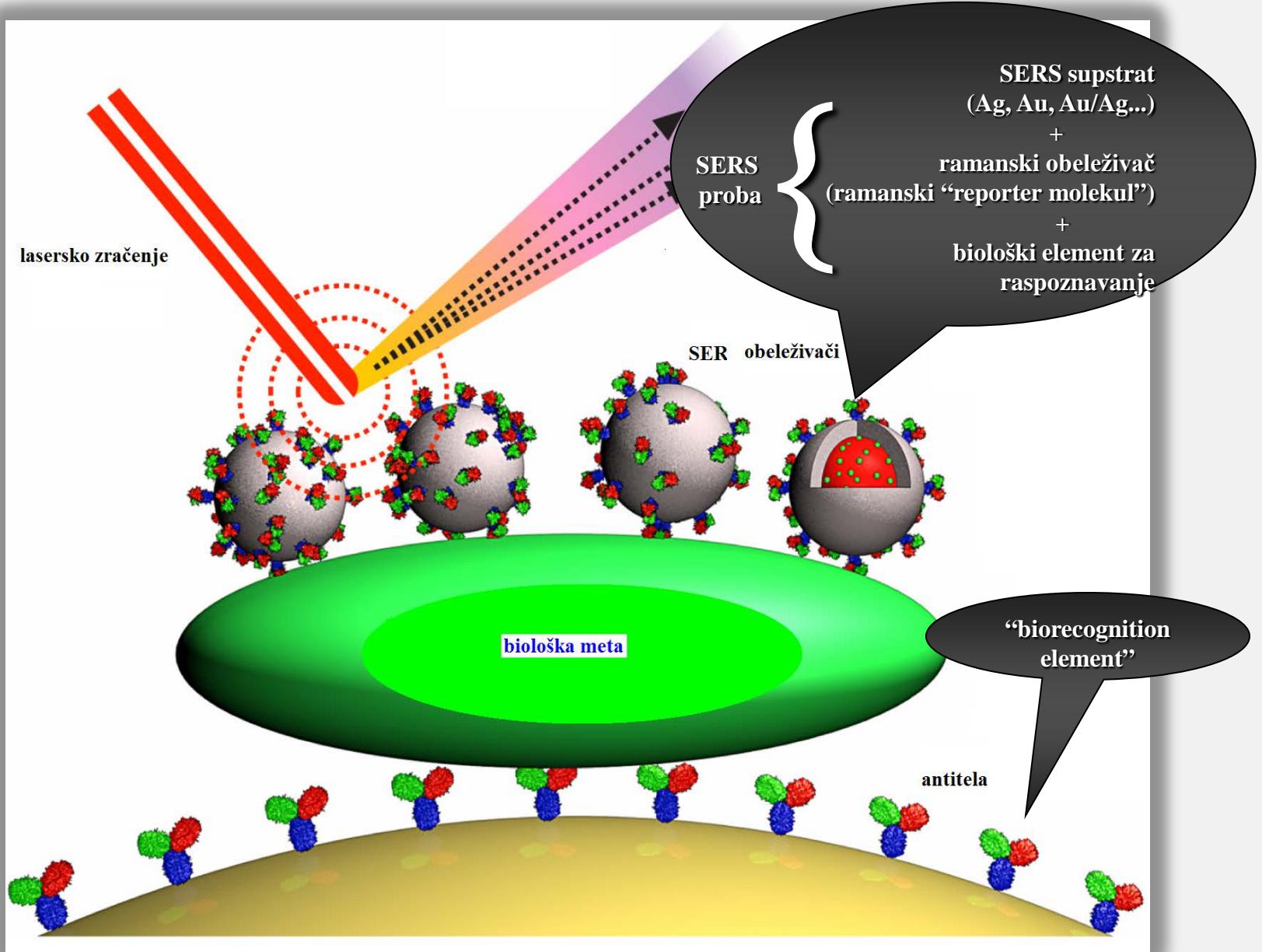
Biološki elementi za “prepoznavanje” analita (biorecognition element)

- vezuju se za ramanske obeleživače (metalna nanočestica + reporter molekul)
- koji se biološki molekul immobilizuje na površini zavisi od načina detekcije:
 - direktna
 - „sendvič“ detekcija ili
 - tzv. „konkurenčni“ format detekcije
- najzastupljenija su **antitela**, imaju veliki afinitet i specifičnost
- **peptidi** su takođe molekuli koji se koriste kao molekuli za prepoznavanje (u odnosu na antitela jeftiniji su i stabilniji ali manje specifični)

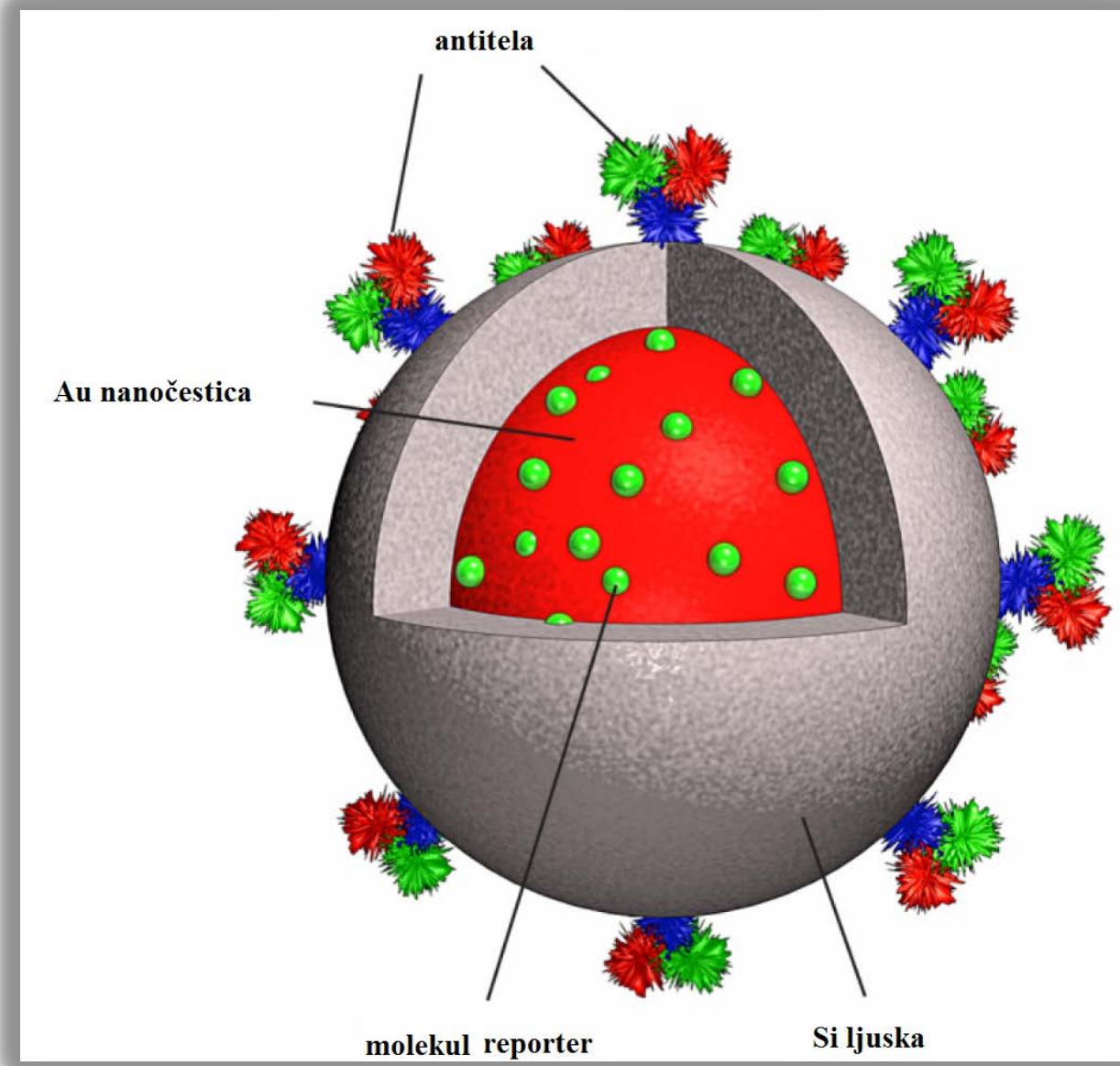
***antitelo** - je obično proteinски molekul koji stvara imunološki sistem organizma kao odgovor na strano telo
- **antigen**



- peptidi se obično koriste u detekciji antitela protiv:
 - virusa hepatitsa
 - herpes simpleks virusa (tip 1 i tip 2)
 - Epstajn-Bar virusa
 - u detekciji teških metala itd.
- kao molekuli za prepoznavanje mogu da se koriste i aptameri DNK ili RNK (aptameri su jednolančane sekvencije oligonukleotida)
- aptameri DNK ili RNK mogu da vezuju:
 - male molekule
 - proteine
 - nukleinske kiseline
 - ćelije
 - tkiva
 - čak i neke organizme

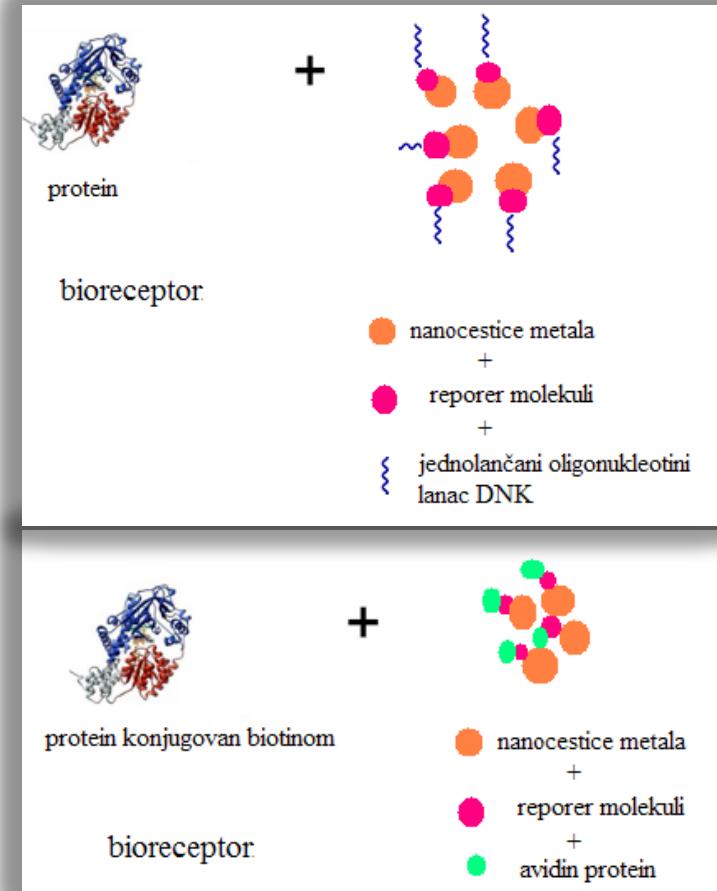


**SERS
proba**



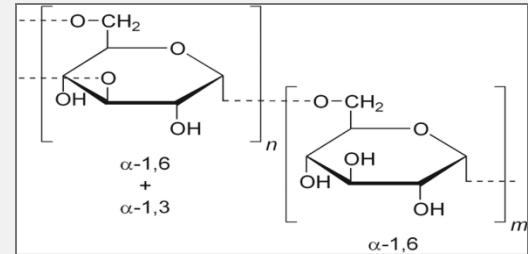
Imobilizacija bioloških elemenata za “prepoznavanje” na površini biosenzora (načini vezivanja za reporter molekule)

- uopšteno se immobilizacija zasniva na:
 - fizičkoj adsorpciji
 - hidrofobnim
 - elektrostatičkim i
 - kovalentnim interakcijama
- ukoliko su biološki elementi za prepoznavanje proteini (antitela) njihova immobilizacija se zasniva na:
 - ako je bioreceptor (elementi za prepoznanje) protein vezivanje se odvija preko jednolančanih sekvencija molekula DNK
 - vezivanjem reporter molekula sa parom histidin-metalni jon
 - ako je bioreceptor (elementi za prepoznanje) biotin (vitamin B) konjugovani proteini onda se prvo za reporter molekul ne-kovalentnim vezama vezuje avidin protein direktno (stvara se avidin-biotin par)



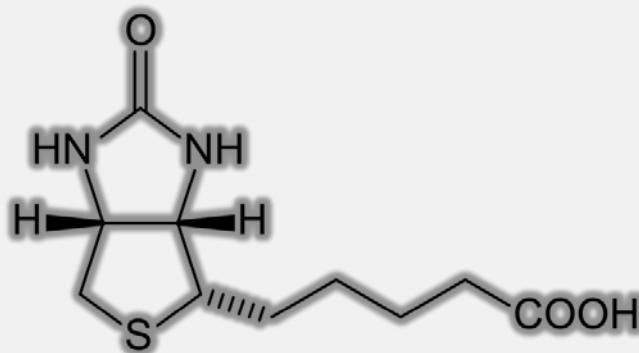
Imobilizacija proteina

dekstran

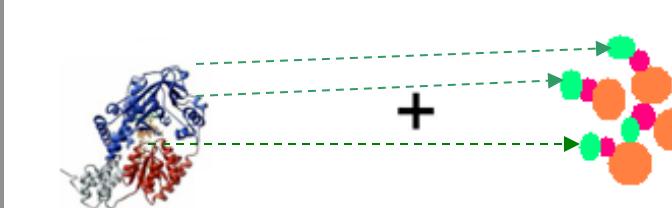
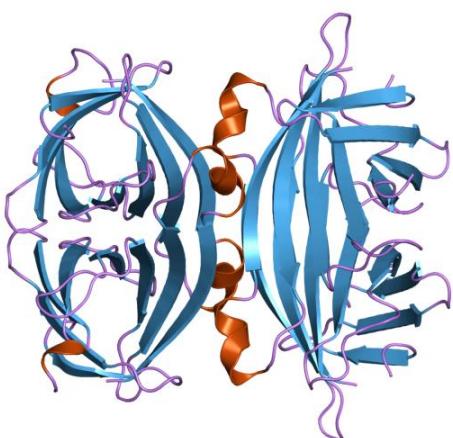


- proteini su najvažniji biološki elementi “prepoznavanja”
- imobilizacija se zasniva na **građenju kovalentne veze između nukleofilnih funkcionalnih grupa proteina (amino grupa, lizina, tiol grupa, cisteina)** i elektrofilnih grupa na površini senzora (aktivirane karboksilne grupe na SAM površinama **alkantiola ili matrici dekstrana** - složeni polisaharid koji sadrži više molekula glukoze)
- ovakva imobilizacija proteina često uslovjava slučajnu orijentaciju imobilizovanih proteina što može da ograniči konformacionu fleksibilnost proteina i uslovi njihovu funkciju
- drugi način imobilizacije proteina je **putem reakcija afiniteta**, najpoznatije su reakcije para **avidin (ili strepavidin)-biotin**
- protein avidin se imobilizuje na površini senzora (kovalentno ili indirektno preko biotina se veže za reporter molekul) i time omogućava **vezivanje biotin-konjugovanih proteina**
- “biotinizacija” proteina može da se izvede na više načina, preko različitih grupa proteina

struktura biotina - vitamina B



struktura avidina (proteina koji vezuje biotin)

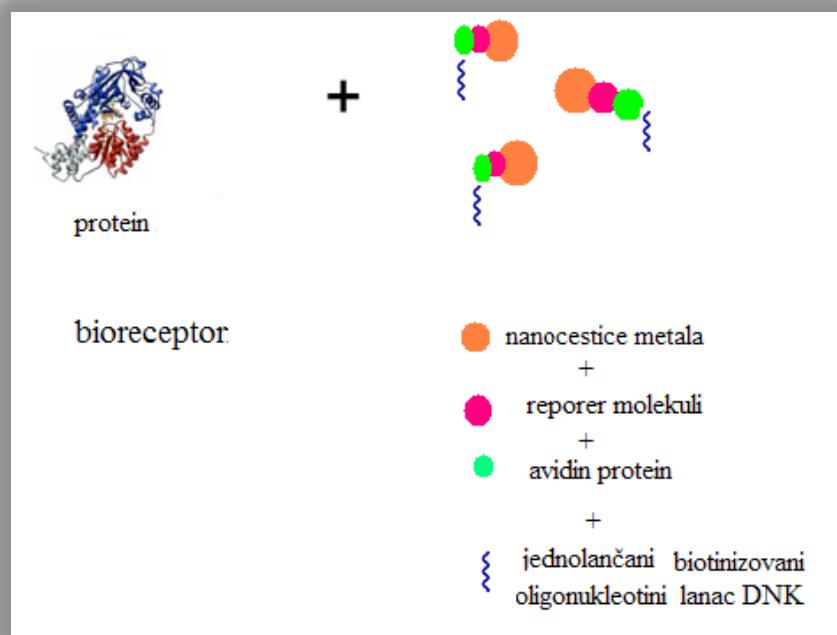


protein konjugovan biotinom

biorecepto

- nanocestice metala +
- reporer molekuli +
- avidin protein

- u novije vreme se sve više koristi imobilizacija antitela pomoću molekula DNK (tzv. *DNA-directed immobilization*)
- koriste se jednostruki lanac molekula DNK (*single-stranded DNA – ssDNA*)
- imobilizacija proteina se vrši njihovim vezivanjem sa komplementarnim ssDNK sekvencama (**hibridizacija***)



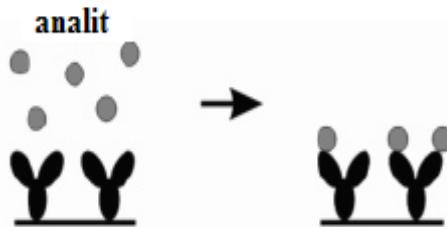
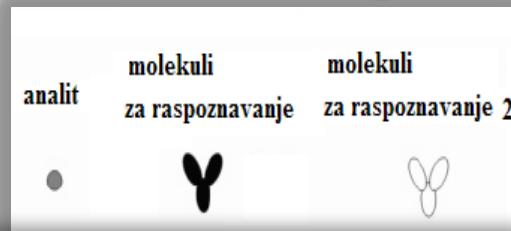
* **hibridizacija** – molekularno-biološka tehnika koja meri genetsku sličnost između DNK sekvenciјa

- imobilizacija oligonukleotida se vrši i preko interakcije avidina (ili strepavidina) (koji je imobilizovan na površini senzora) i biotinizovanog oligonukleotida
- mali molekuli se konjuguju sa većim proteinima (BSA- bovin serum albumin) koji se kovalentno vezuje za površinu senzora

Načini detekcije analita

- molekuli analita se mogu detektovati na nekoliko načina
- način detekcije se bira na osnovu:
 - veličine molekula analita
 - karakteristika vezivanja bioreceptora (biorecognition elementa)
 - opsega koncentracije analita koji se meri
 - same matrice uzorka
- formati detekcije su:
 - direktna detekcija
 - detekcija tzv. “sendvič tipa”
 - konkurentska detekcija
 - inhibitorska detekcija

- kod **direktne metode detekcije** element za raspoznavanje, antitelo, se imobiliše na SPR površini a molekuli analita u rastvoru se direktno vezuju za molekule antitela dajući promenu u indeksu prelamanja koju SPR senzor registruje



površina senzora sa molekulima za raspoznavanje

direktna metoda detekcije

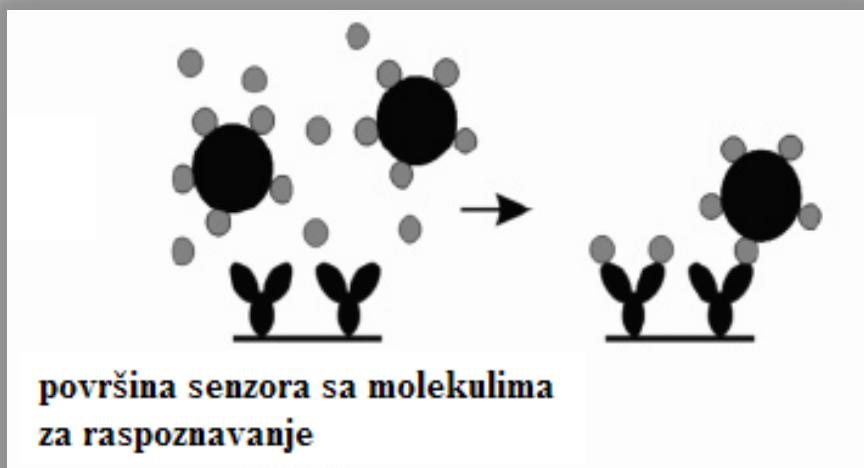


površina senzora sa molekulima za raspoznavanje

“sendvič” tip detekcije

- “sendvič” tip detekcije se koristi kada se želi povećati LOD vrednost merenja
- u dатој конфигурацији површина сензора на којој се налази заробљени molekuli analita se dodatno inkubира са другим antitelom

- kada se analiziraju mali molekuli (mol. mase < 5000 ajm) oni obično ne proizvode dovoljno veliku promenu indeksa prelamanja pa se mere ili konkurentskom ili metodom inhibicije
- kod **konkurentske metode** površina senzora je pokrivena molekulima antitela koji reaguju sa molekulima analita
- u sistem se dodaje i analit koji je konjugovan sa nekim velikim molekulom tako da se oba analita "takmiče" za ograničeni broj mesta na površini senzora za koji mogu da se vežu
- mogućnost vezivanja je obrnuto proporcionalna koncentraciji analita



konkurentska metoda detekcije

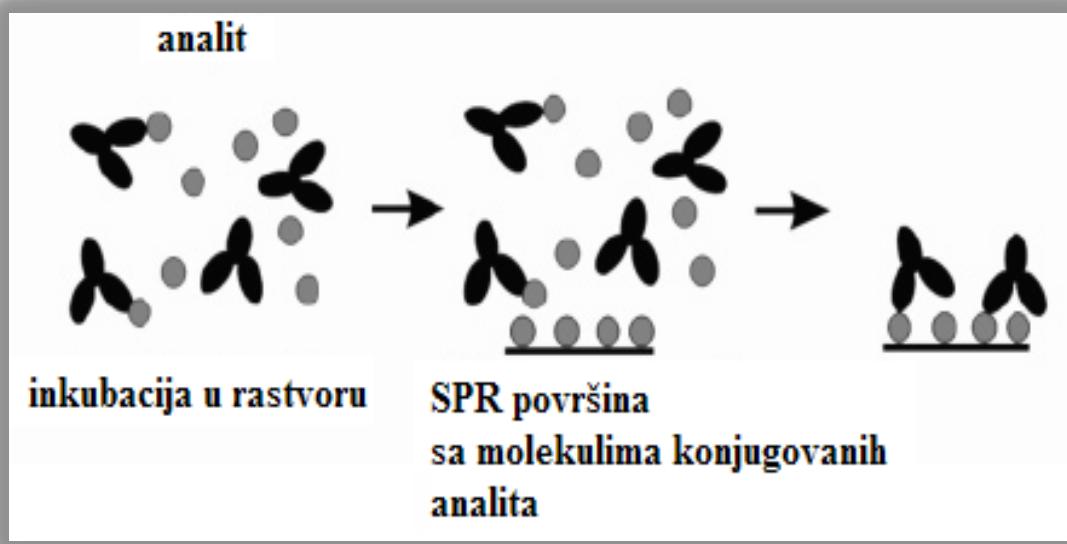
molekuli za raspoznavanje



molekul analita konjugovan sa velikim molekulom



- kod **metode inhibicije** stalna koncentracija antitela se meša sa uzorkom koji sadrži nepoznatu koncentraciju analita (tako da nisu sva antitela vezana za analit odn. određeni broj molekula analita je slobodan)
- potom se smeša ubaci u protočnu čeliju SPR senzora i pušta peko površine senzora za koju se vezuju molekuli analita i konjugovanog analita
- prati se kako se slobodni molekuli antitela, koji nisu kompleksirani, vezuju za molekule analita imobilizovane na povšini
- mogućnost vezivanja je obrnuto proporcionalna koncentraciji analita



metoda inhibicije

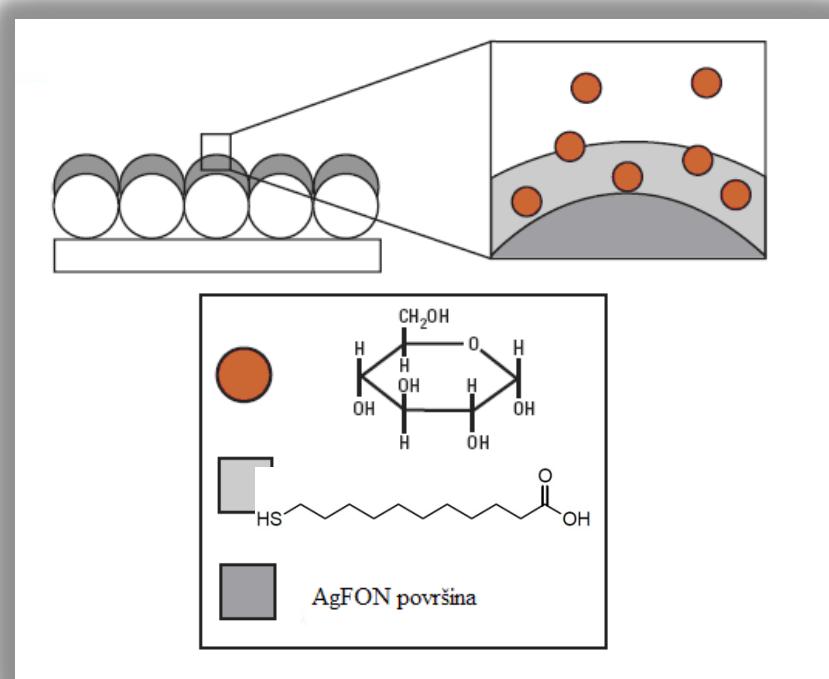
Određivanje važnih biomolekula

Određivanje glukoze

- među biološkim molekulima koji su detektabilni SERS metodom, glukoza se ističe po važnosti, kao indikator veoma čestog oboljenja, dijabetesa
- u odnosu na tradicionalnu elektrohemijušku metodu određivanja koncentracije glukoze SERS tehnikom je minimalno invazivno i omogućava dobijanje rezultata koji su tačni i pouzdani u granicama koje su postavljene u kliničkim ispitivanjima

- problem primene SERS tehnike je slaba adsorpcija glukoze na SERS aktivnim supstratima kao što su srebro ili zlato
- ovaj problem je prevazđen modifikovanjem (funkcionalizovanjem) grube površine srebra (tzv. AgFON* supstrat) (*FON - film over nanosphere*) hidrofilnim particionim slojem dekantiola koji ima sposobnost povećanje koncentracije glukoze (ili drugih malih molekula) u oblasti elektromagnetskog pojačanja polja na površini metala
- u prisustvu particionog sloja glukoza je mogla da bude detektovana i pri koncentracijama nižim od **5 mM**
- prisustvo glukoze praćeno je preko vibracionih traka na **1123 cm^{-1} i 1064 cm^{-1}**

Shematski prikaz prototipa senzora glukoze



**SERS sloja dekantiola
na srebru**



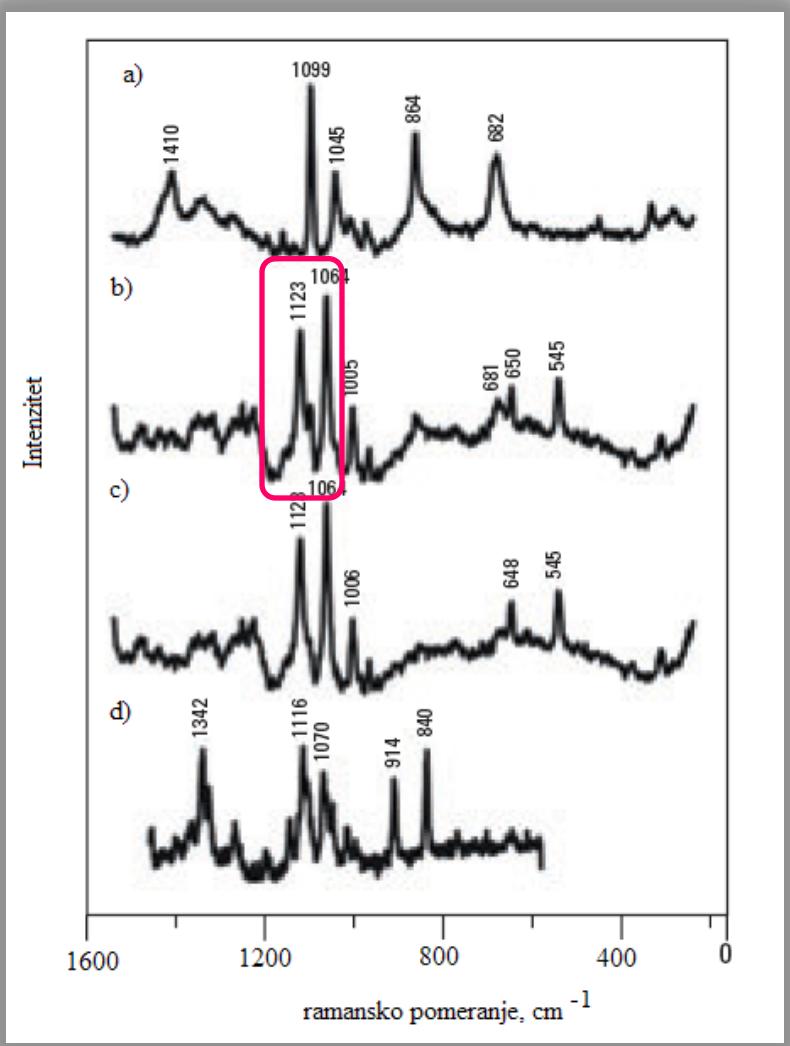
**SERS substrata tretiranog
sa 100 mM glukozom**



**razlike spektara dekantiola
i glukoze**

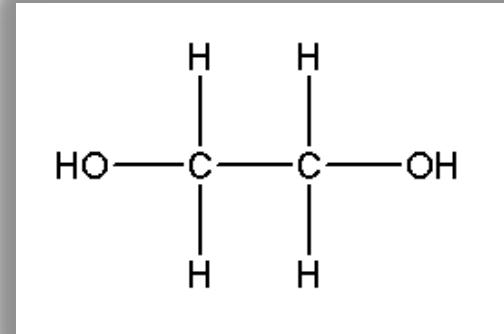


SERS čiste glukoze

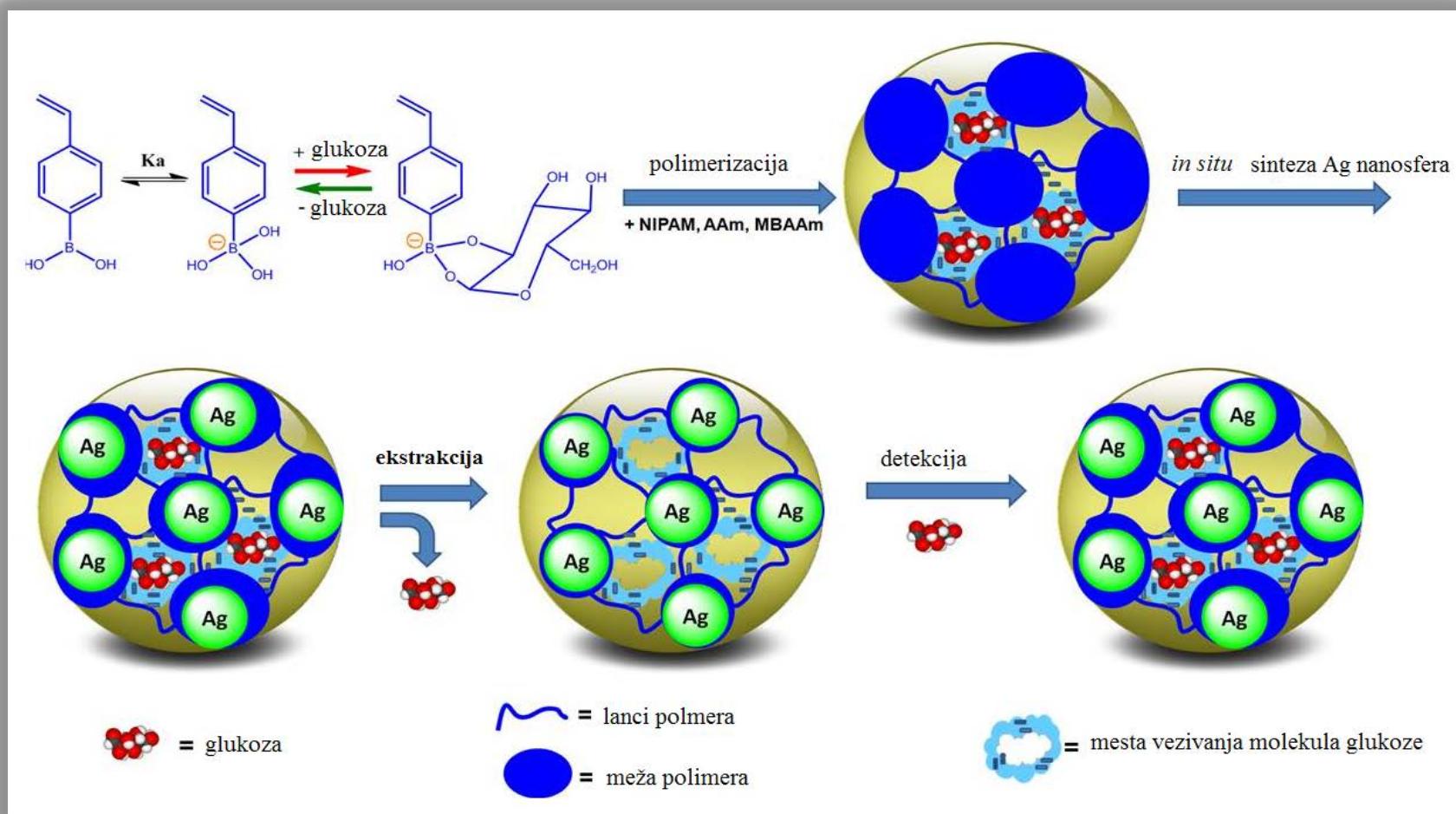


- istraživačka grupa (Vun Duyne et al.) je koristila i **etilen-glikol (EG)** kao particioni sloj (EG) koji je takođe nanošen na sloj srebro a korišćen je za određivanje nivoa glukoze u rastvoru bovin serum albumina (BSA)
- stabilnost partacionog sloja u ovakvoj sredini trajala je 3 dana, a kvantitativno određivanje glukoze je uspešno izvedeno u sledećim koncentracionim opsezima **0-250 mM**
- radi poboljšanja performansi partacionog sloja glukoznih senzora, formiran je i mešoviti monosloj **dekanetiol-merkaptoheksanol (DT/MH)** na AgFON-u i upotrebjen za praćenje koncentracije glukoze u realnom vremenu
- monosloj DT/MH se pokazao stabilnim u trajanju od 10 dana, a greška kvantitativne analize je bila manja nego kod EG particionih slojeva

Struktura
etilen-glikola (EG) →



- metoda je konstantno unapredjivana u cilju postizanja niže granice detekcije i smanjenja cene aparature što se postiglo korišćenjem zlata kao supstrata (Au FON supstrata) čija se rezonancija povšinskog plazmona javlja u IC oblasti, što snižava cenu aparature
- stabilnost particionog sloja u ovakvoj sredini trajala je 11 dana



Weitai Wu*, Jing Shen, Yaxin Li, Hongbo Zhu, Probal Banerjee, Shuiqin Zhou*. Specific glucose-to-SPR signal transduction at physiological pH by molecularly imprinted responsive **hybrid microgels**. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7115-7125.

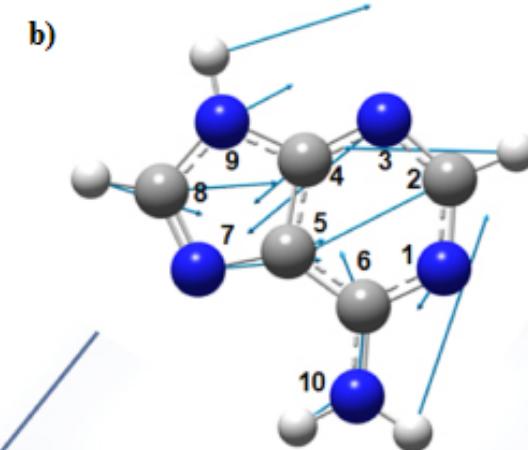
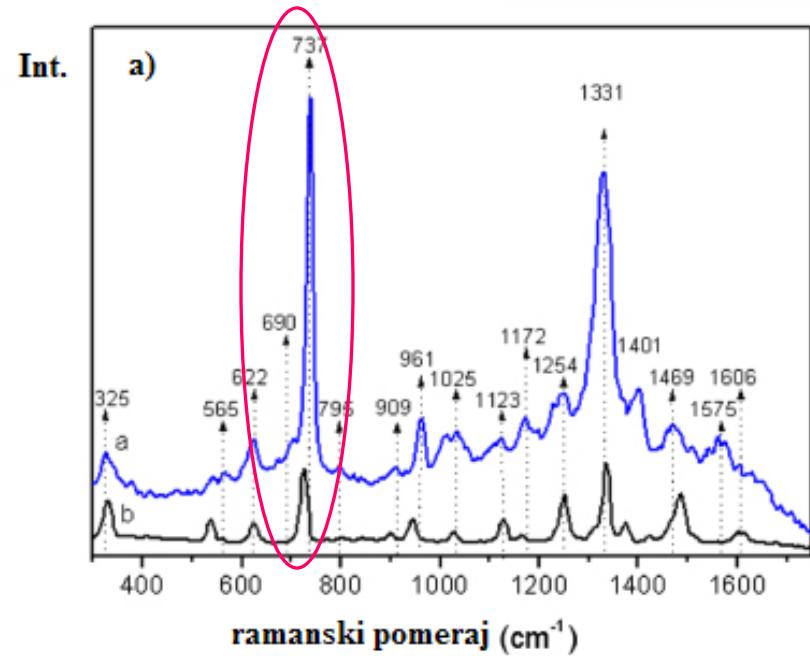
Analiza molekula DNK

- zahvaljujući velikoj osetljivosti, tehnikom SERS spektroskopije, je pored detekcije manjih bioloških molekula, moguće i direktno praćenje jednostrukih ili dvostrukih oligomernih lanaca DNK molekula
- analiza DNK dobija sve više na značaju iz razloga što se sve više sekvenci DNK molekula različitih organizama otkriva a što nas približava boljem definisanju rodova ili vrsta mikroorganizama, bolesti pa čak i samih individua
- brza i pouzdana detekcija molekula DNK ima veliku upotrebu i u oblastima forenzičke, zaštite kontrole kvaliteta hrane i poljoprivrede

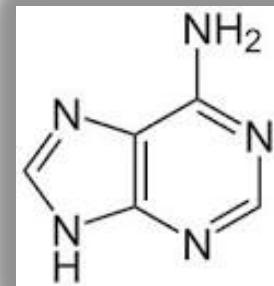
a) Direktna analiza DNK

- za dobijanje SERS spektara DNK koriste se **Au nanoljuske** nanesene na nosač od stakla
- u spektrima je dominirala vibraciona traka na **737 cm⁻¹** koja odgovara vibracijama **adenin nukleotida**

NR i SERS spektri adenin nukleotida



adenin nukleotid



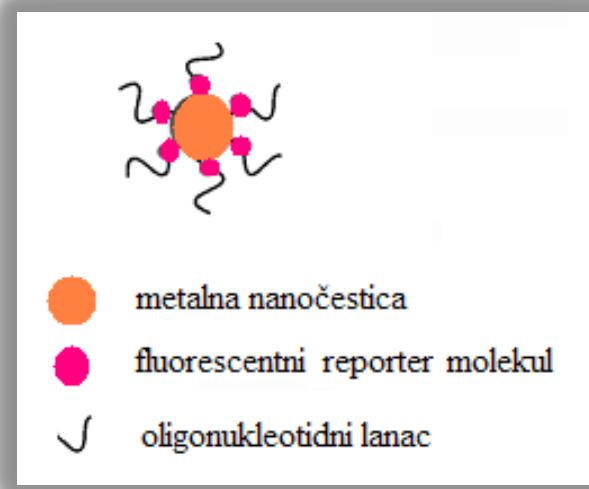
- adenin nukleotid je jedina baza DNK koja je do danas detektovana SERS metodom sa tačnošću od jednog molekula („*single-molecule detection*“), što ukazuje na veliki efikasni presek adenina za ramansko rasejanje
- takođe su ispitivane promene u spektrima dvolančane oligomerne sekvencije DNK prouzrokovane interakcijama sa *cis*- i *trans*-platinom, izomerima hemiterapijskog agensa, čime je pokazano da SERS tehnika može dati doprinos i u farmaceutskim istraživanjima
- mnoga istraživanja su vršena i na polju konformacionih promena:
 - samih molekula DNK i
 - promena prouzrokovanih interakcijom aptamer*-analit

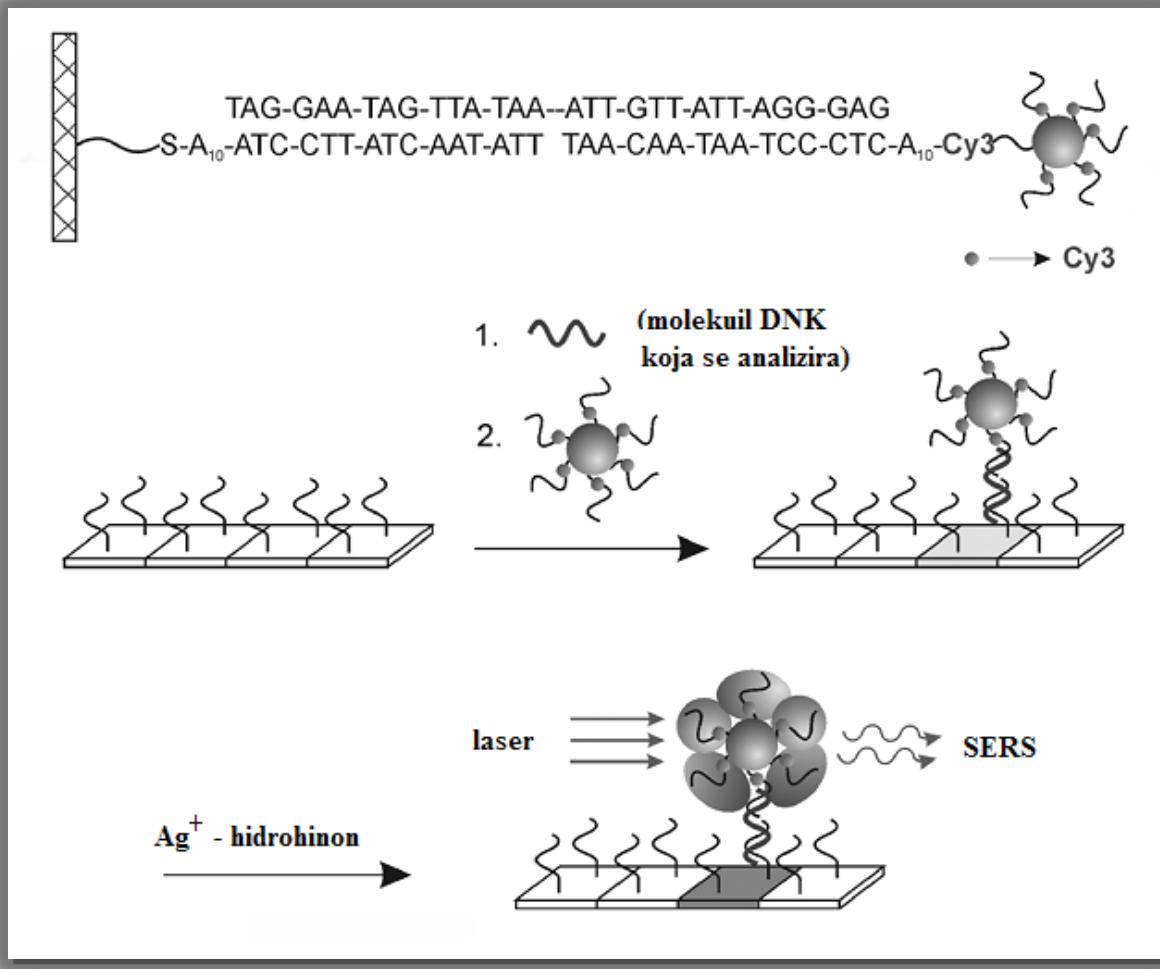
***aptameri** - su oligonukleinske kiseline ili peptidi koji se vezuju za specifične male ili velike molekule (proteine, nukleinske kiseline pa čak i ćelije, tkiva i organizme) omogućavajući time praćenje njihove koncentracije ili konformacionih promena

za aptamere se obično uzimaju delovi lanaca prirodnih molekula - DNK aptameri se obično sastoje od kraćih nizova oligonukleotida

b) Indirektna analiza DNK

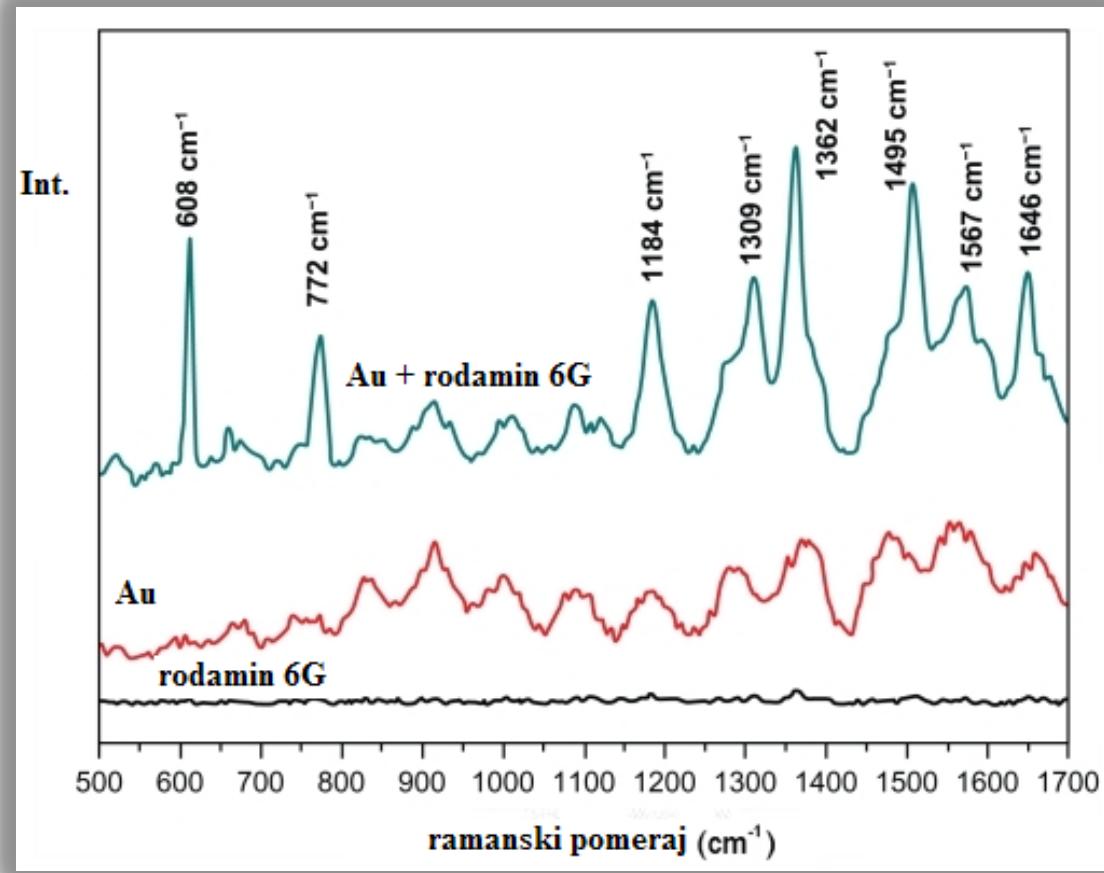
- indirektna analiza molekula DNK je mnogo šire rasprostranjena od direktne metode
- indirektna analiza DNK SERS metodom nije “*sequence specific*”
- da bi to bila koriste se fluorescentni reporter molekuli, obeleživači, (fluorescentne boje) čiji su SERS spektri poznati (*tzv. fluorescent labelling*)
- prilikom hibridizacije pomenutog obeleženog lanca molekula DNK sa drugim lancem, vezanim za drugi supstrat, postoji mogućnost dobijanja SERS ili SERRS spektra „reporter“ molekula što je potvrda hibridizacije DNK lanaca
- ovom metodologijom je uspešno detektovan gen tumora dojke (BRCA1)

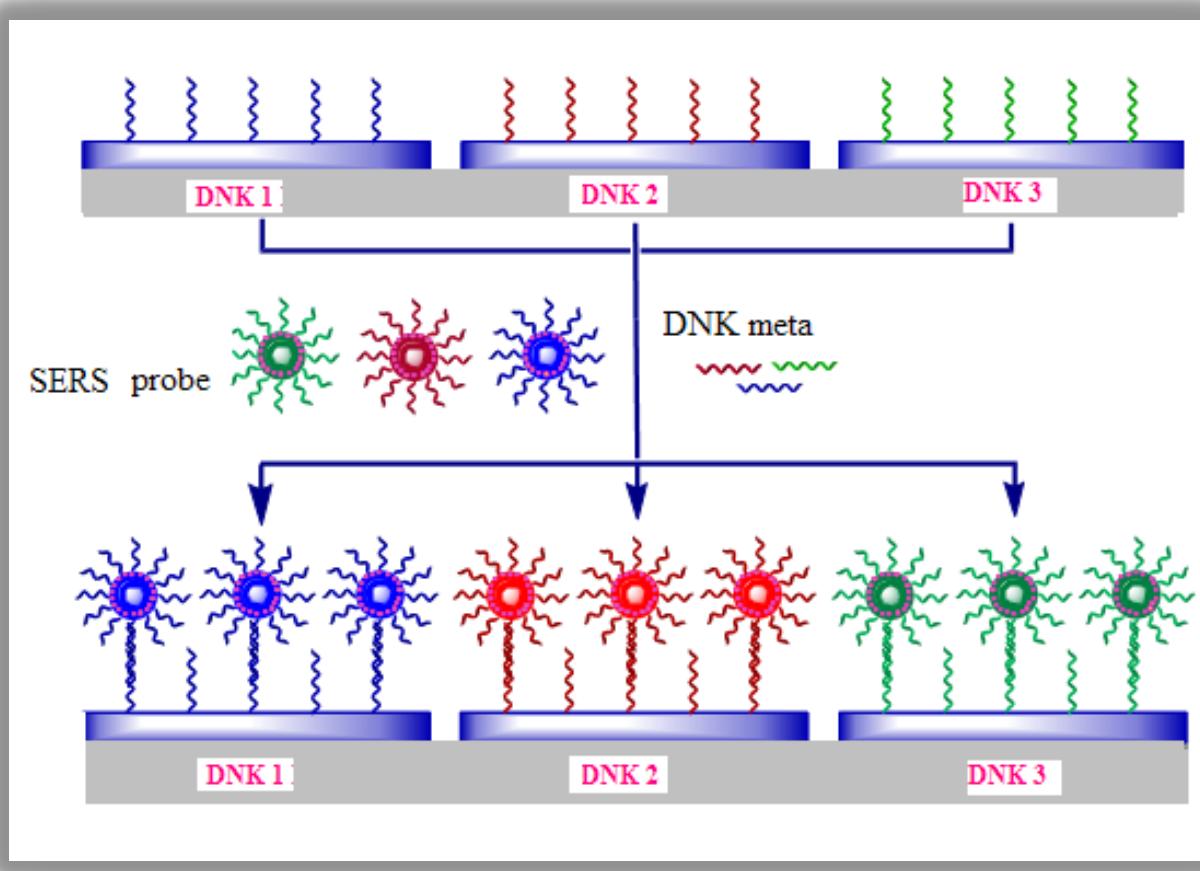




SERS sonda koja se sastoji od nanočestice zlata prečnika 13 nm, funkcionalizovana ramanski aktivnim obojenim oligonukleotidom

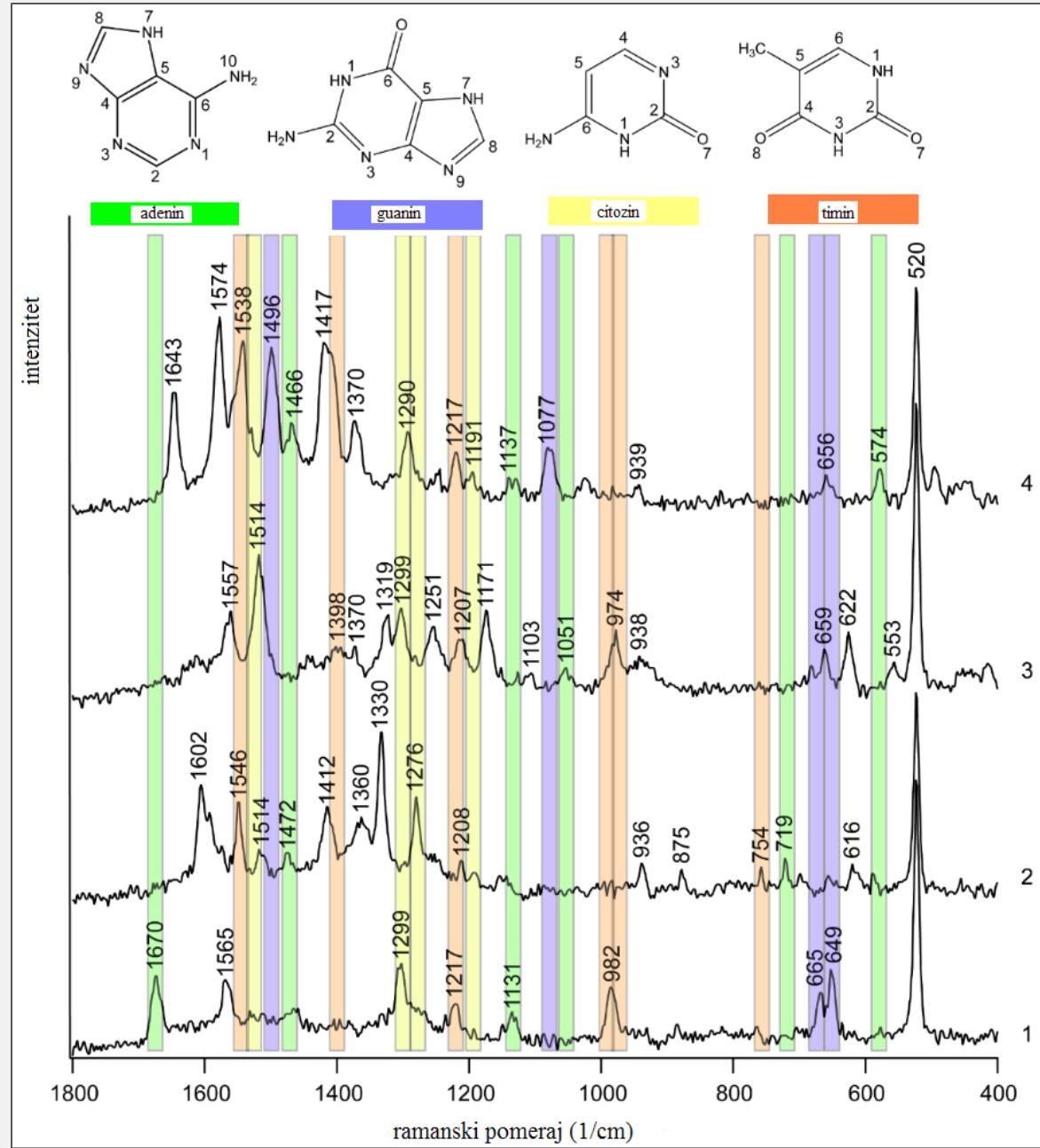
SERS spektri rodamina 6G, fluorescentnog obeleživača, na Au nanočesticama



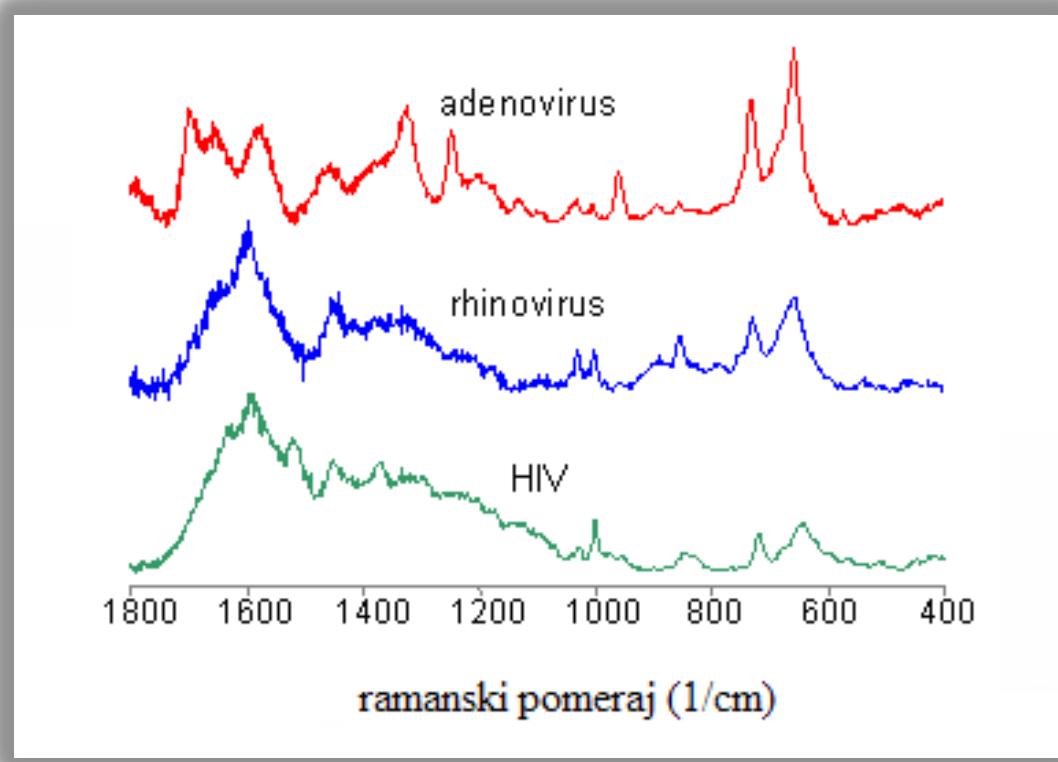


**hibridizacija komplementarnih
oligomernih lanaca molekula DNK**

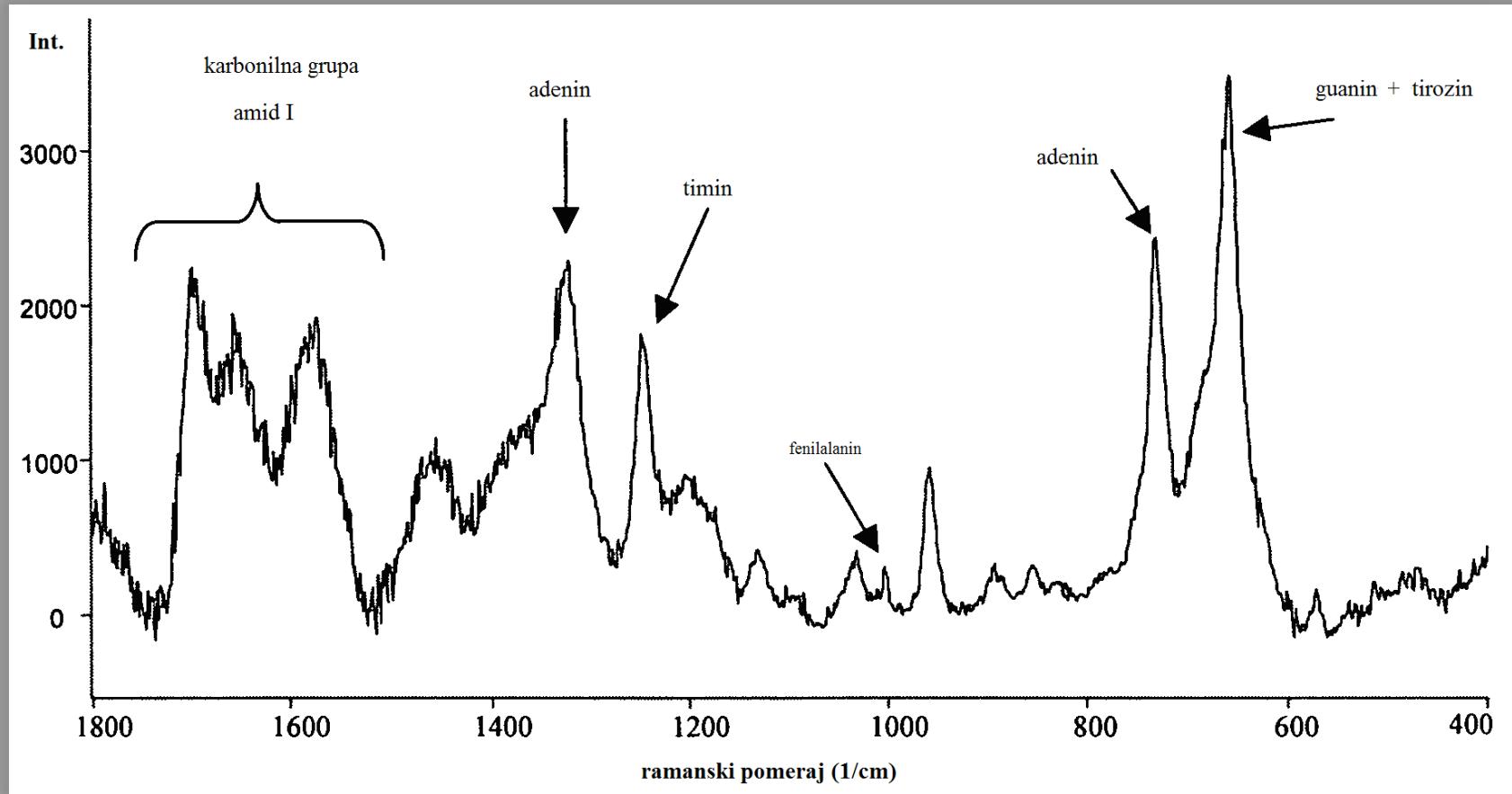
**SERS spektri ssDNK
molekula timusa govečeta
(1-4 uzorci uzeti iz različitih
delova timusa)**



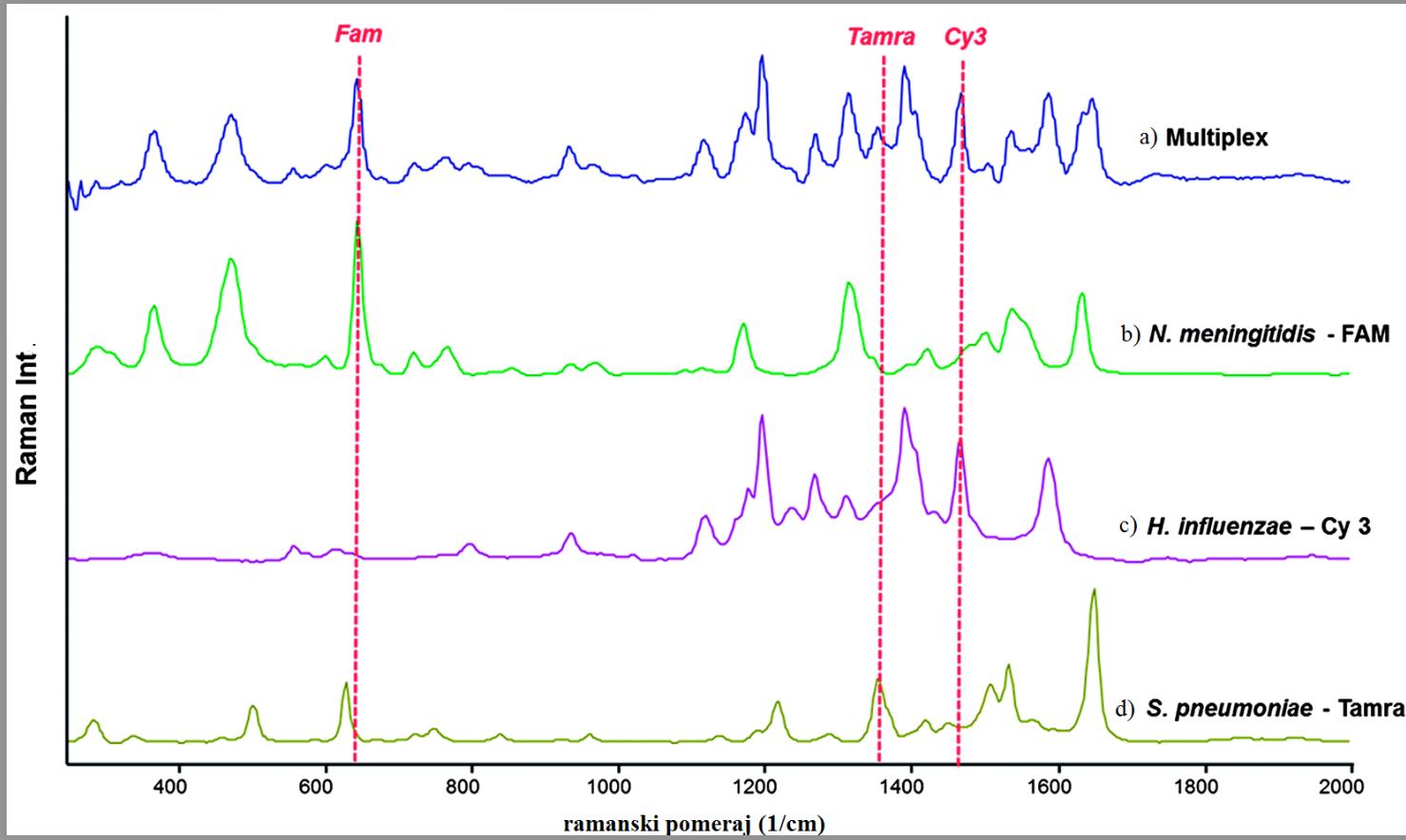
- Vo-Din je SERS tehnikom proučavao posebne sekvencije nukleinskih kiselina
- uz pomoć SERS aktivnih obeleživača on je pratio i hibridizaciju komplementarnih lanaca molekula DNK što se pokazalo kao izuzetno korisno u **detekciji DNK fragmenata virusa:**
 - *HIV*
 - *hepatitis A*
 - *hepatitis B*
 - *Ebola*
 - *Variola vera (smallpox)*
 - *Bacillus anthracis*
 - *Francisella tularensis*
 - *kolera*
- takođe je ispitivan i hemijski sastav slojeva koji bi bili najpovoljniji za vezivanje molekula DNK na površini SERS supstrata
- ispitivan je niz modifikacija amina koje su bile neophodne za postizanje pozitivnog nanelektrisanja lanca DNK koji bi se kao takav veoma lako vezao za nanočesticu srebra
- granica detekcije postignuta ovim merenjima bila je **$10^{-12} M$**



SERS spektri različitih virusa



SERS spektar adenovirusa



SERS spektri bakterija izazivača infektivnog meningitisa

- DNK SERS senzori mogu biti korišćeni i za određivanje drugih biomolekula, korišćenjem aptamera sintetisanih za detekciju drugih biomarkera*
- poznat je SERS proba na bazi zlato-trombinski aptamer uz korišćenje metilensko plavog kao molekula reportera

* biomarkeri su hemijski, fizički ili biološki (ćelije, biološki molekuli, geni, genski proizvodi, enzimi, hormoni,...) „parametri“ pomoću kojih se prati stanje nekog biološkog sistema

biomarker može biti bilo koji sistem koji je indikator promene fiziološkog stanja organizma

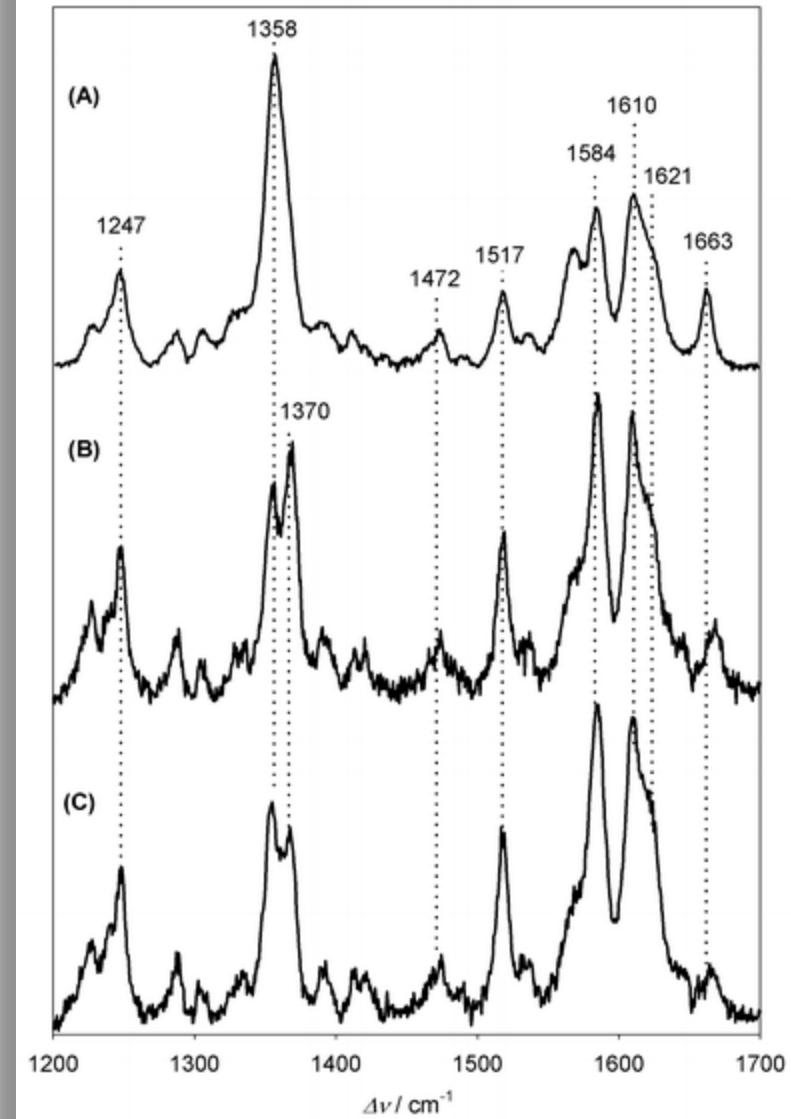
Analiza proteina

a) Direktna analiza proteina

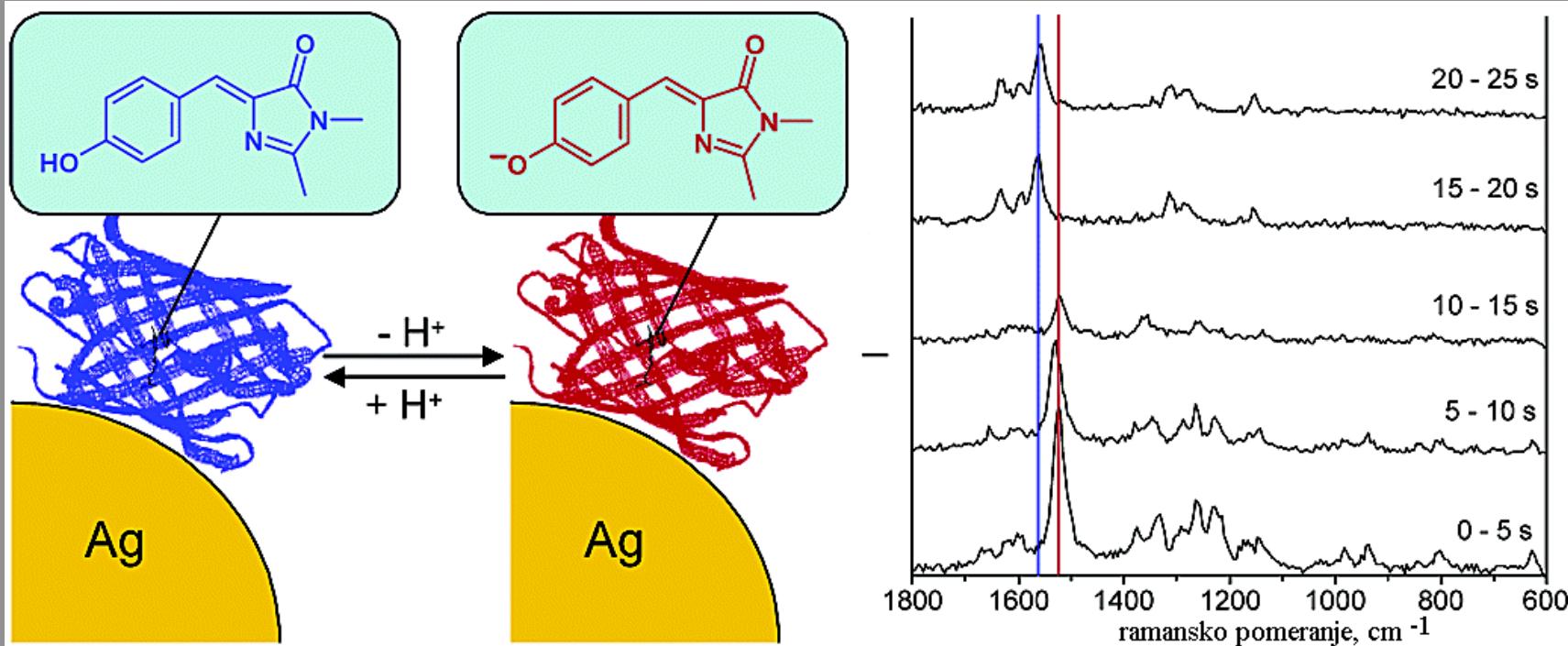
- **asignacija traka kod ovakvih molekula je više zasnovana na opštim strukturnim karakteristikama molekula, nego na lokalizovanim vibracionim oblicima**
- **najopštiji primer je karakteristična traka istežuće vibracije $\text{C}-\text{COO}^-$ grupe aromatičnih aminokiselina ($\sim 950 \text{ cm}^{-1}$) kao i traka karakteristična za simetričnu istežuću vibraciju COO^- grupe ($\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$)**

- za identifikaciju se takođe koriste:
 - amid-I traka ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) (C=O istežuća vibracija)
 - amid-II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) (kombinacija NH savijajućeg oblika u fazi i CN istežućeg oblika sa doprinosom C=O savijajućeg oblika u ravni, CC i NC istežućih oblika)
 - amid- III traka ($\sim 1400-1200 \text{ cm}^{-1}$) (kombinacija NH savijajućeg i CN istežućeg oblika u fazi sa malim doprinosom CO savijajućeg oblika u ravni i CC istežućeg oblika) i
 - skeletne istežuće vibracije ($\sim 1200-880 \text{ cm}^{-1}$)
- trake ovih oblika vibracija se koriste u direktnoj analizi peptida i proteina kao i za razlikovanje primarne i sekundarne strukture molekula

SERRS spektri citohroma c

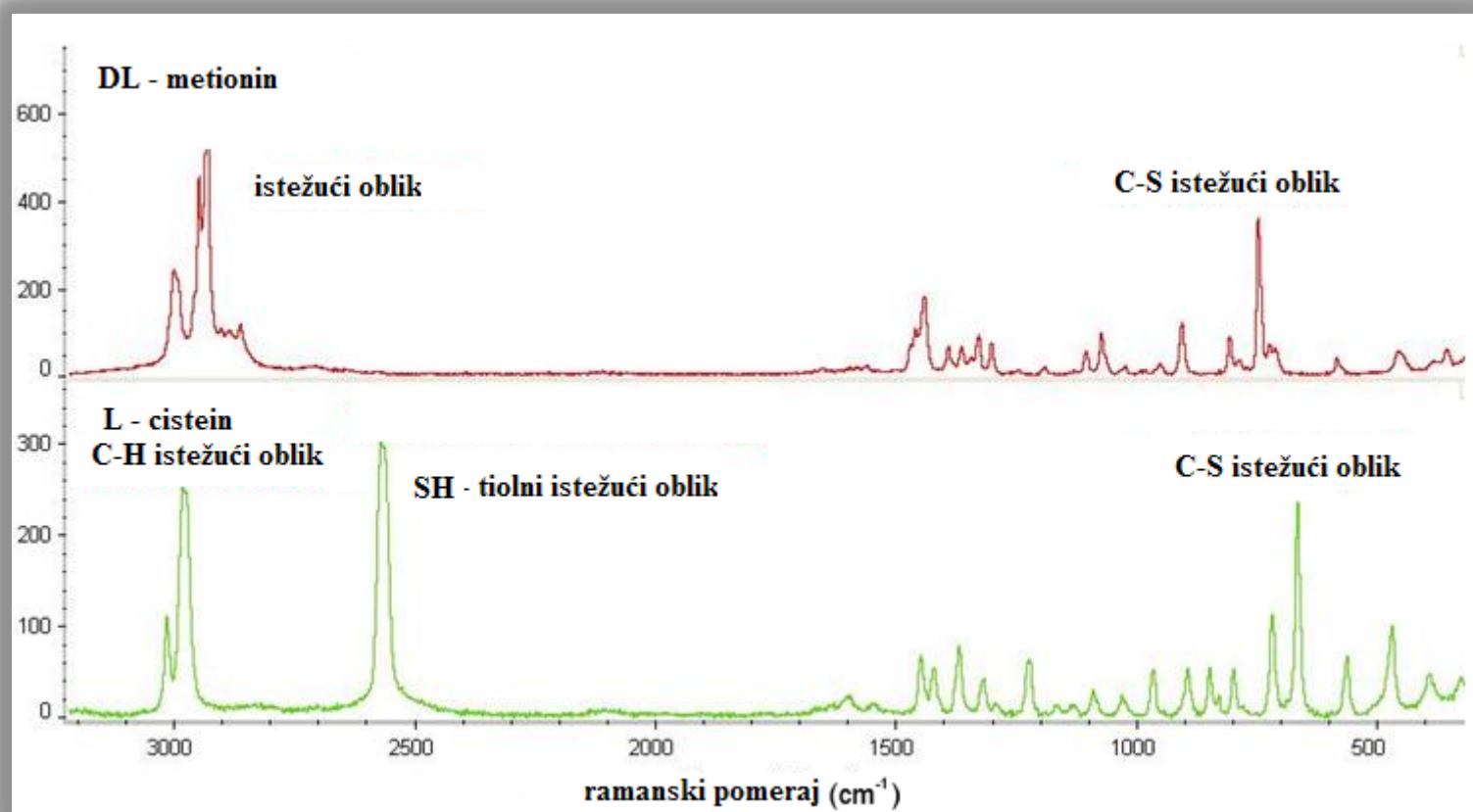


- podaci o apsorpciji bočnih lanaca amino kiselina daju važne podatke o mehanizmima reakcija u kojima proteini učestvuju
- obično je moguće istovremeno praćenje nekoliko pojedinačnih grupa koje učestvuju u određenim reakcijama
- iz spekatara se mogu dobiti podaci o:
 - stepenu protonacije
 - koordinaciji katjona
 - prisustvu vodonične veze i dr.
- u SERS spektrima proteina samo dva bočna lanaca imaju tzv. specifičnu apsorpciju koja daje trake koje se ne preklapaju sa trakama ostalih grupa
- to je traka SH grupe cisteina (**Cys**) (**2550–2600cm⁻¹**) i traka karbonilne grupe (C=O) u sastavu protonovane karboksilne grupe (**1710–1790 cm⁻¹**)



SERRS spektri EGFP fluorescirajućeg proteina (“single-molecule” detekcija i praćenje ravnoteže protonacije ↔ deprotonacija molekula)

SERS spektri metionina i cisteina



b) Indirektna analiza proteina

- **korišćenjem obeleživača**
- **molekuli obeleživača moraju da:**
 - održe stabilnost tokom vezivanja i detekcije i
 - daju jak i koherentan SERS (SERRS) spektar
- **za indirektnu detekciju proteina se obično koriste obeleživači:**
 - **5,5'-ditiobis (sukcinimidil-2-nitrobenzoat) (DSNB) (1336 cm^{-1})**
 - **4-merkaptobenzojeva kiselina (4-MBA) (1585 cm^{-1})**
 - **2-metoksibzenenetiol (2-MeOBT) (1037 cm^{-1})**
 - **4-nitrobenzenetiol (4-NBT) (1336 cm^{-1})**
 - **3-metoksibzenenetiol (3-MeOBT) (992 cm^{-1})**
 - **2-naftalenetiol (NT) (1384 cm^{-1})**

- kao ramanski obeleživači, koriste se takođe:
 - **4,4'-bipiridin (BiPy) (1609, 1227, i 1291 cm^{-1})**
 - **tiofenol (TP) (994 i 1570 cm^{-1})**
 - **p-aminotiofenol (PATP) (390, 1077, i 1578 cm^{-1})**
- fluorescentni obeleživači:
 - **fluorescein-izotiocijanat (FITC), 1630 cm^{-1}**
 - **malahitno-zeleno izotiocijanat, 1615 cm^{-1}**
- mnogi od pomenutih obeleživača su korišćeni za tzv. **imuno analize**, koje su zasnovane na specifičnosti interakcije između antitela i njemu korespondirajućeg antiga
- SERS imuno analize se do sada izvode na nekoliko poznatih supstrata kao što su: **filmovi srebra, koloidi u rastvoru, imobilisani ili modifikovani koloidi**
- koloidni supstrati su često korišćeni, s obzirom da se njihovim korišćenjem prevazilaze problemi reproduktivnosti merenja koji se obično javljaju kada se koristi srebro naneto metodom hladne ili tople depozicije

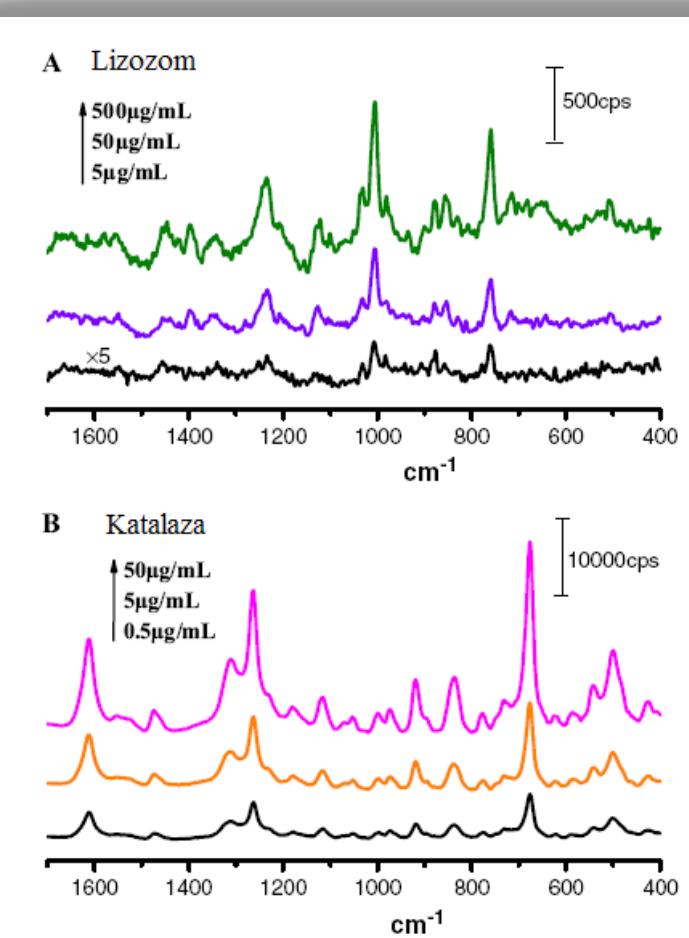
- prva imuno analiza, u kojoj je korišćena SERS tehnika, izvedena je još 1989 u analizi rada štitne žlezde
- analiza je izvedena u „sendvič“ konfiguraciji uz korišćenje filma srebra (dobijenog hladnom ili topлом depozicijom metala na podlozi, koja ima za rezultat formiranje tzv. „ostrva“- metala - „*island films*“) kao supstrata za koji je bilo vezano antitelo

Analiza peptida

- u analizi najprostijih struktura aminokiselina i peptida, primenjuju se dva pristupa
 - sa ciljem asignacije ramanskih traka pojedinačnih amino kiselina
 - prepoznavanje specifičnih biomarkera
- Proniewicz i saradnici su korišćenjem serije homopeptida, asignirali ramanske trake aminokiselina kao što su Cys, Gly, Leu, Met, Phe i Pro
- u istom istraživanju se došlo do saznanja o orijentaciji amino kiselina tokom adsorpcije
- da bi pokazali da je moguće razlikovanje različitih amino kiselina, Hartegrink i saradnici su koristili dipeptide, gde su različite aromatične amino kiseline bile vezane za cistein
- u ovom istraživanju Au nanoljuske su bile korišćene kao SERS supstrat dok je cistein korišćen kao pomoćno sredstvo za kovalentno vezivanje peptida za nanoljuske

Analiza enzima

- SERS tehnika je primenljiva i za praćenje podklase proteina, enzima
- Ozaki i sardnici su mešanjem enzima sa kiselim sulfatom a potom sa koloidnim srebrom dobili SERS spekture **lizozoma, ribonukleaze B, avidina, katalaze, hemoglobinu i citohrom c** sa detekcionim limitima u oblasti od $\mu\text{g/ml}$ do ng/ml
- imobilisani agregati nanočestica su korišćeni u analizi enzima za „single molecule“ detekciju peroksidaze rena (*HRP-horse raddish peroxidase*) u različitim tačkama enzimskog ciklusa
- pokazalo se da nanočestice srebra denaturišu protein ali i da mogu biti biokompatibilne što se postiže dodavanjem vodonik-peroksida, pre dodavanja enzima

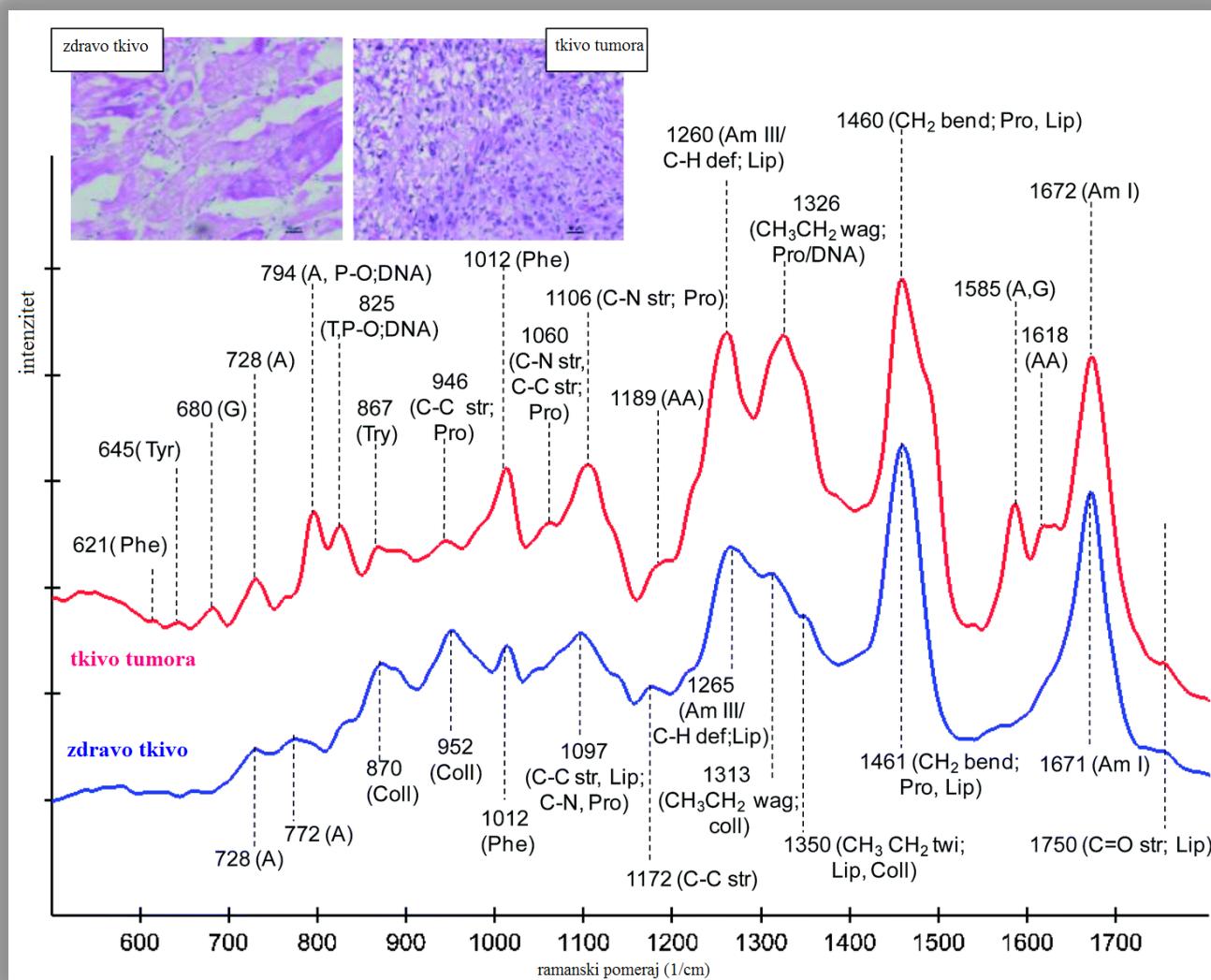


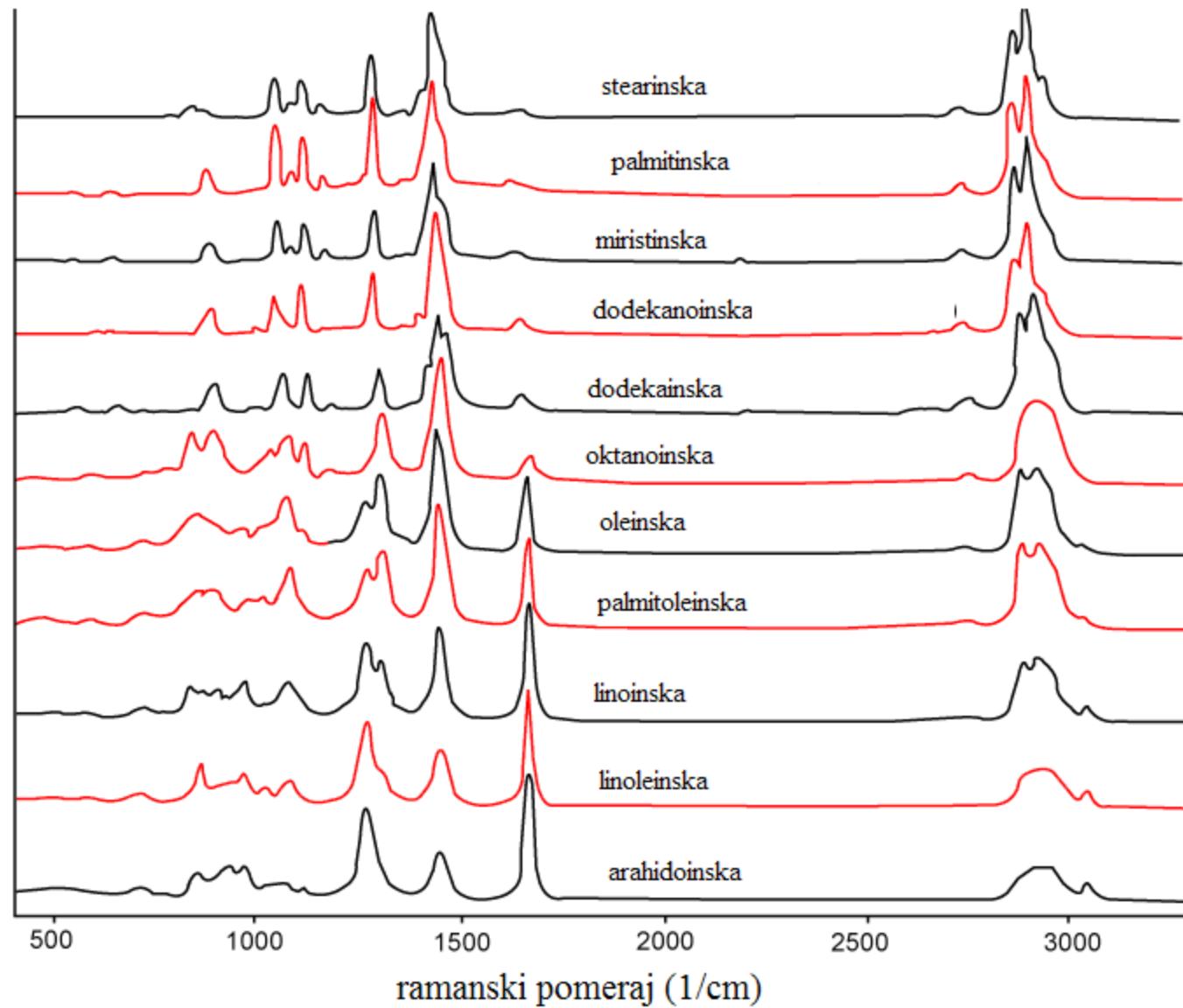
SERS spektri lizozoma i katalaze

Druge primene SPR biosenzora u analizi

- eksploziva
- zagadivača
- bakterija (ešerihija, listerija, salmonela, kolera, streptokoka areus,)
- virusa (Epstajn-Bar, hepatitis B, HIV, ...)
- tkiva
- toksina (afla toksin,...)
- alergena (histamin, polen, ...)
- hormona (progesteron, insulin,...)
- lekova (morphin, penicilin, heparin, ...),

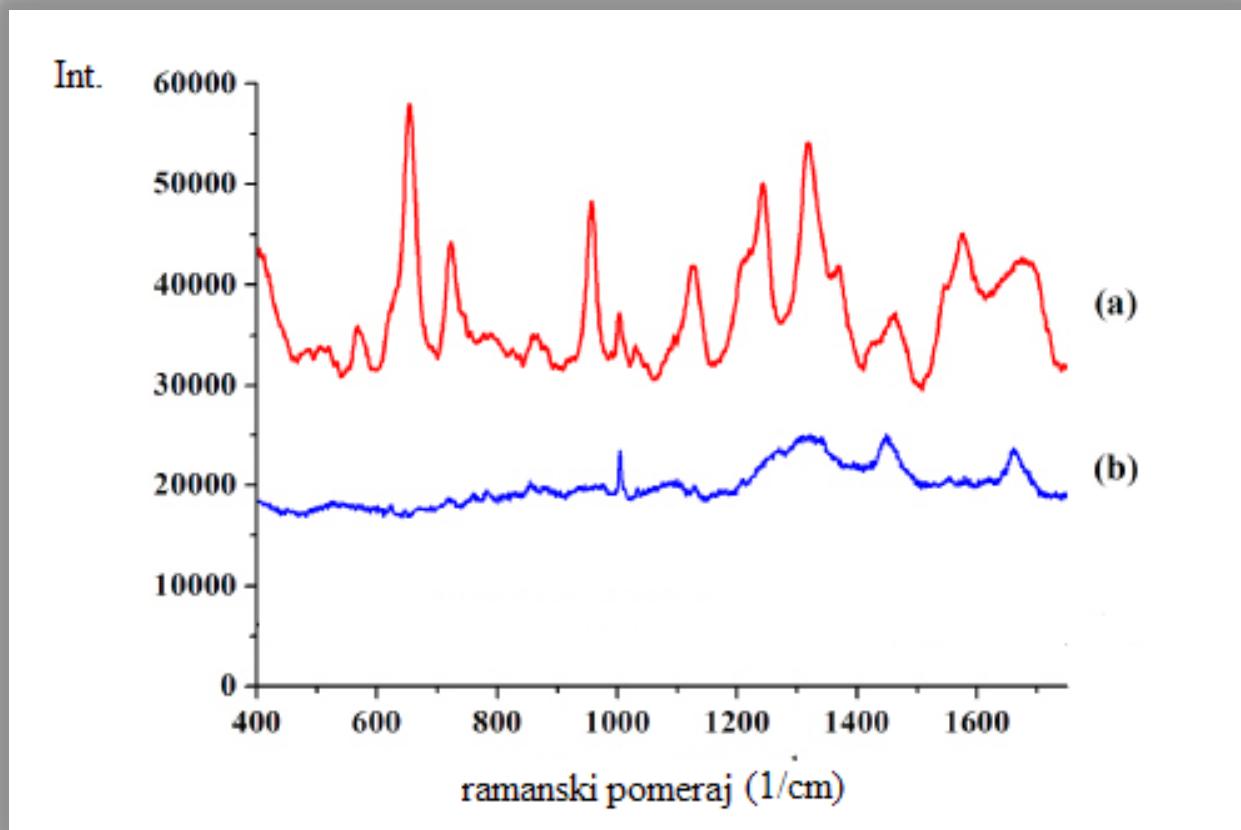
SERS spektri zdravog tkiva usta i tkiva zahvaćenog tumorom usne šupljine



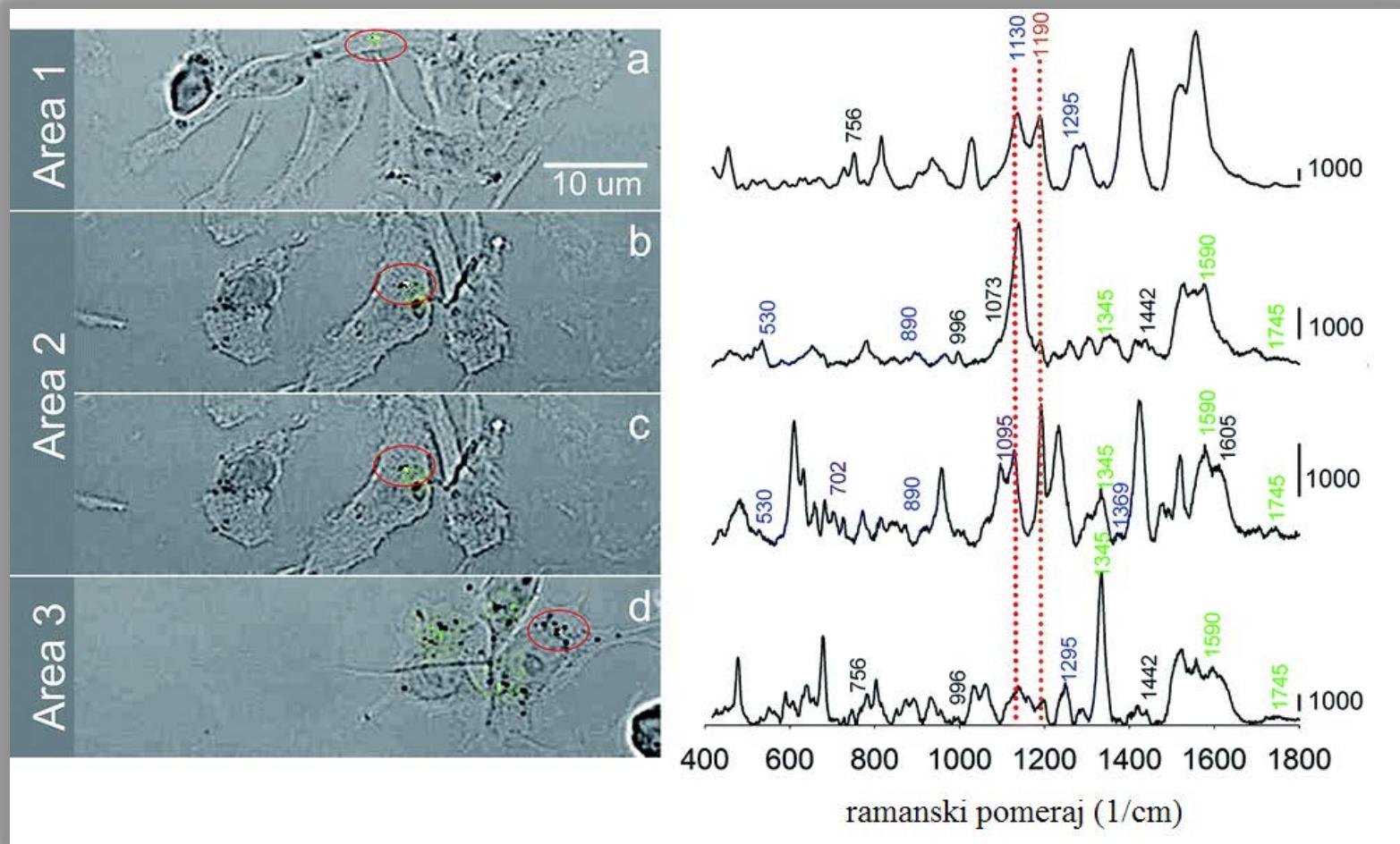


SERS spektri masnih kiselina

**NIR SERS spektar bolesnog tkiva pankreasa (a) i
NR spektar istog tkiva (b)**



SERS spektri makrofaga



Nedostatci biosenzora na principu SRP

- često prisutna **nereproduktivnost faktora pojačanja**
- brojni primeri pokazuju da isti supstrat pokazuje nešto drugčije performanse u različitim laboratorijama
- poznato je da veoma **male promene u nanostrukturisanim plemenitim metalima vode do znatnih promena uslova rezonancije lokalnih površinskih plazmona** što utiče na faktor pojačanja
- s obzirom da je efikasni presek fluorescencije znatno veći od efikasnog preseka ramanskog rasejanja, čak i vrlo slaba **fluorescencija može ometati, ili čak potpuno zakloniti SERS signal** (ovaj problem se prevaziđa korišćenjem lasera koji emituju u IC oblasti spektra ili metalnih površine koje „gase“ emisiju fluorofora)
- i slučaju da fluorofora nije u direktnom kontaktu sa SERS supstratom i dalje može doći do pozadinske fluorescencije

- još jedan od problema je i **efekat elastičnog rasejanja**, veoma često prisutan u analizama biloških fluida
- elastično rasejanje je takođe mnogo verovatniji proces od ramanskog rasejanja i može se javiti na raznim delovima ćelija (citoskelet, ćelijske organele...)
- dodatni problem mogu predstavljati i **razne interferujuće hemijske vrste** ili nespecifično vezivanje molekula koji mogu ometati i prekriti trake ispitivanog analita