

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Pavel Souček

Studium nukleových kyselin a jejich interakcí pomocí Ramanovy mikrospektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2011

Děkuji Dr. Vladimíru Kopeckému Jr. za trpělivost, ochotu a pomoc při vedení mé bakalářské práce, prof. Josefu Štěpánkovi za obstarání vzorků a konzultace k tématu bakalářské práce, a též Mgr. Janu Palackému za pomoc při zpracování dat. Dále pak děkuji své rodině za podporu při studiu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 15. 8. 2011

Pavel Souček

Název práce: *Studium nukleových kyselin a jejich interakcí pomocí Ramanovy mikrospektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)*

Autor: *Pavel Souček*

Katedra / Ústav: *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí bakalářské práce: *RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.*

Abstrakt: Práce je zaměřena na možnosti využití nové techniky nerezonanční Ramanovy spektroskopie – Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků (drop coating deposition Raman – DCDR) při studiu nukleových kyselin. DCDR spektroskopie je založena na depozici malé kapky roztoku studované látky na hydrofobní povrch, kde po odpaření rozpouštědla, vznikne kroužek látky ve skelné fázi. Tak dojde k zakoncentrování látky a při měření pomocí Ramanova mikrospektrometru i k několika řádovému zvýšení signálu oproti standardní technice měření vzorků v kapalně fázi. V práci jsme studovali chování 12-merů DNA a DNA o délce 3000 párů bází. Náš výzkum ukázal, že DCDR spektra DNA rozpuštěné v deionizované vodě lze měřit až do koncentrace 30 μM na bázi. DCDR Spektra jsou blízka spektrům měřeným z kapalně fáze, avšak deponovaný vzorek nikdy nevytváří kroužek. Ukázalo se, že dominantní roli při vzniku kroužku u nukleových kyselin hraje nikoli velikost molekul, ale jejich náboj, který vede k vzájemnému odpuzování molekul. Po přidání iontů sodíku a následně též iontů hořčíku byl pozorován vznik prstence. Faktorová analýza spektrálních map ale ukázala, že vzniklé prstence DNA nejsou spektrálně zcela homogenní a při jejich vzniku může hrát roli např. kondenzace DNA.

Klíčová slova: *DCDR, Ramanova spektroskopie, nukleové kyseliny*

Title: *Study of nucleic acids by means of drop coating deposition Raman microspectroscopy (DCDR)*

Author: *Pavel Souček*

Department: *Institute of Physics of Charles University in Prague*

Supervisor: *RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.*

Abstract: *The work was focused on possibilities of the new technique of nonresonance Raman spectroscopy – drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy upon study of nucleic acids. DCDR spectroscopy is based on deposition of a small droplet of the studied sample on a hydrophobic surface, where after evaporation of the solvent, ring of the studied material in glass phase is formed. That way the material is concentrated and upon measurements by means of Raman microspectrometry the increase of signal of several orders of magnitude is observed with respect to the standard technique of sample measurements in solvent. In this work we studied behavior of DNA 12-mer and DNA with 3000 base pairs. Our research showed that DCDR spectra of DNA dissolved in deionized water can be measured up to concentration of 30 μM per base. The DCDR spectra are similar to those measured from solvents. Nevertheless, the deposited sample never forms a ring. It was shown that the size of nucleic acids didn't play dominant role upon ring formation but their charge which lead to repulsion of the molecules. After adding of sodium ions and subsequently also magnesium ions the ring formation was observed. Factor analysis of spectral maps demonstrated that formed rings are not fully homogenous and that upon their origin condensation of DNA could play a role.*

Keywords: *DCDR, Raman spectroscopy, nucleic acids*

Obsah

1. Ramanova spektroskopie	1
2. Studium nukleových kyselin pomocí Ramanovy spektroskopie	4
2.1. Základní struktura nukleových kyselin	4
2.2. Ramanova spektroskopie nukleových kyselin	6
3. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)	9
3.1. Teoretický popis jevu	9
3.2. Užití DCDR	12
4. Materiály a metody	18
4.1. Vzorky	18
4.2. Konfokální mikroskop	18
4.3. Integrovaný Ramanův systém HR800	19
4.3.1. Základní komponenty experimentální sestavy HR800	19
4.3.2. Zjednodušený popis optické dráhy laserového svazku	19
4.4. Podložky SpectRIM TM	20
4.5. Systém pro makroskopické měření Ramanova rozptylu	21
4.6. Faktorová analýza	21
4.7. Zpracování dat	22
5. Měření nukleových kyselin	24
6. Diskuze výsledků a závěr	63
7. Literatura	65

1. Ramanova spektroskopie

Tento jev teoreticky předpověděl Adolf Smekal v roce 1923 [Smekal, 1923]. Experimentálně se jev poprvé podařilo pozorovat v roce 1928 Ramanovi a Krishnanovi v kapalinách [Raman & Krishnan, 1928] a Landsbergovi a Mandelstamovi v krystalech [Landsberg & Maldelstam, 1928].

Ramanova spektroskopie je spektroskopie využívající ke zkoumání vibračních stavů molekul Ramanova rozptylu. Principem tohoto jevu je neelastický rozptyl světla. Jestliže svítíme monochromatickým světlem na vzorek, můžeme pozorovat kromě elasticky rozptýleného světla s nezměněnou frekvencí ν_0 (*Rayleighův rozptyl*) i pásy spektrálních čar s frekvencemi $\nu' = \nu_0 \pm \nu_M$ (Obr. 1.1). Spektrální čáry s frekvencemi $\nu' = \nu_0 - \nu_M$ tvoří *Stokesovu větev* a větev s frekvencemi $\nu' = \nu_0 + \nu_M$ se nazývá *anti-Stokesova větev*. Frekvence ν_M nezávisí na frekvenci původního záření a souvisí s přechodem mezi rotačně-vibračními stavy molekuly.

Intenzity Rayleighova rozptylu jsou v porovnání s původním světlem o tři až čtyři řády nižší a Ramanův rozptyl je pak ještě o tři až pět řádů menší oproti Rayleighovu rozptylu. Vidíme tedy, že Ramanův rozptyl je jen velmi slabý jev a pro dobré pozorování je nutné kvalitní odfiltrování původního záření a vzorky s relativně co nejvyšší koncentrací studované látky.

Ramanův a Rayleighův rozptyl je dvoufotonový proces. Na rozdíl od infračervené absorpce/emise, kde se jedná o proces jednofotonový. Při tomto rozptylu dochází téměř současně k pohlcení fotonu molekulou, čímž se molekula excituje na virtuální stav, a k vyzáření fotonu s frekvencí stejnou/menší/větší podle toho, jestli se jedná o Ramanův či Rayleighův rozptyl. Schématické znázornění můžeme vidět na obrázku 1.2.

Fotony z anti-Stokesovy větve mají vyšší energii než elasticky rozptýlené, jelikož si přivlastnily část vibrační energie molekul vzorku. Pro intenzitu anti-Stokesovy větve je tedy určující počet molekul s energií vyšší, než mají molekuly účastníci se Stokesovy větve Ramanova rozptylu, kdy naopak fotony excitují molekuly vzorku. Molekuly podléhají Boltzmanovu rozdělení a platí tedy

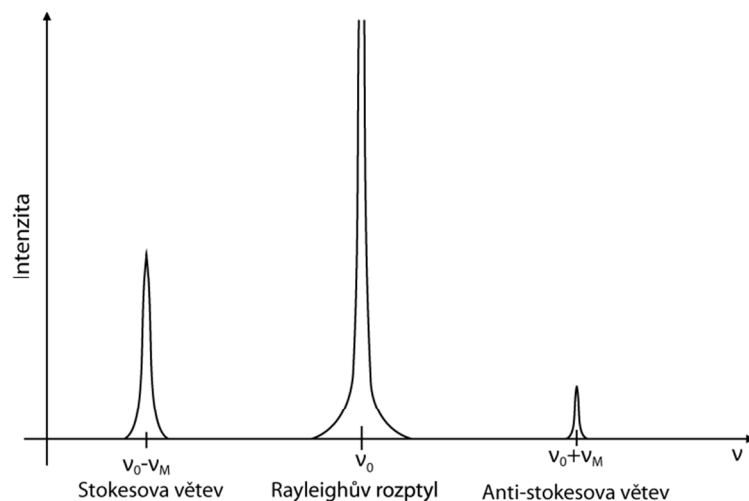
$$N \sim e^{-E/k_B T} \quad (1.1)$$

kde N je počet molekul nesoucí energii E , k_B je Boltzmanova konstanta a T absolutní teplota. Ze vztahu je zřejmé, že počet molekul s vyšší energií je vždy menší než počet molekul s energií nižší. Tudíž anti-Stokesova větev má menší intenzitu větve Stokesova (Obr. 1.1).

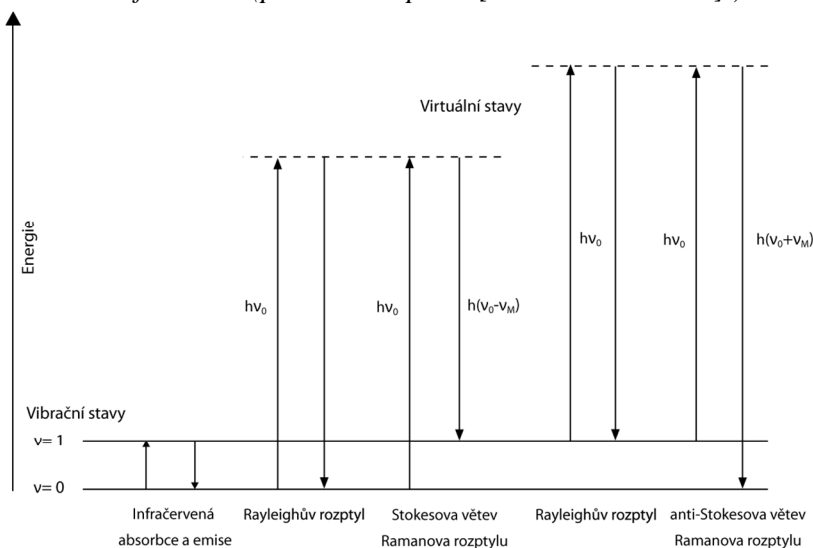
V klasickém popisu Ramanova rozptylu budeme postupovat podle práce [Keresztury, 2002]. Vycházíme z toho, že rozptýlené světlo pochází z oscilujícího elektrického dipólu indukovaného vnějším elektrickým polem původního záření. Vztah mezi vektorem dipólu μ a indukující intenzitou elektrického pole \mathbf{E} můžeme vyjádřit jako

$$\mu = \alpha \mathbf{E} + \frac{1}{2} \beta \mathbf{E} \mathbf{E} + \frac{1}{2} \gamma \mathbf{E} \mathbf{E} \mathbf{E} + \dots \quad (1.2)$$

kde α je tenzor polarizovatelnosti, β hyperpolarizovatelnosti atd. Polarizovatelnost vyjadřuje jakousi míru přizpůsobivosti elektronového obalu molekuly, míru s jakou se obal deformuje působením vnějšího elektrického pole.



Obr. 1.1: Schématické znázornění závislosti intenzit Ramanova a Rayleighova rozptylu na frekvenci (překresleno podle [Prosser et al. 1989].)



Obr. 1.2: Přechody mezi stavy vibračních energií (Překresleno podle [Keresztury, 2002].)

Většinou jsou nelineární členy v (1.2) malé a můžeme je zanedbat, čímž se vztah zjednoduší na

$$\mu(t) = \alpha \mathbf{E}(t) \quad (1.3)$$

Tensor polarizovatelnosti můžeme popsat symetrickou, reálnou maticí, pokud neuvažujeme rezonanční Ramanův rozptyl.

Molekula s N atomy má obecně $3N - 6$ vibračních stupňů volnosti podle vnitřních souřadnic Q_k . Vibrace můžeme popsat vztahem

$$Q_k = Q_{k0} \cos 2\pi\nu_k t \quad (1.4)$$

kde ν_k je frekvence k vibrace a Q_{k0} je její amplituda.

Závislost tenzoru polarizovatelnosti na těchto vnitřních souřadnicích můžeme vyjádřit Taylorovým rozvojem kolem rovnovážné polohy

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots \quad (1.5)$$

kde α_{ij} je komponenta tenzoru polarizovatelnosti a $(\alpha_{ij})_0$ je její hodnota v rovnovážné poloze. Pro další zjednodušení zanedbáme mechanickou a elektrickou anharmonicitu a dostaneme vztah

$$\alpha_{\mathbf{k}} = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_{\mathbf{k}}} \right)_0 Q_{\mathbf{k}} \quad (1.6)$$

Dále budeme uvažovat budící záření s frekvencí ν_0 (obvyčejně mnohem vyšší než ν_k vibrace molekuly). Jeho intenzitu vyjádříme jako

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad (1.7)$$

Spojením rovnic (1.3) a (1.4) s (1.6) a (1.7) dostaneme

$$\mu' = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_{\mathbf{k}}} \right)_0 Q_{\mathbf{k}0} \mathbf{E}_0 \cos 2\pi \nu_0 t \cdot \cos 2\pi \nu_k t \quad (1.8)$$

A užitím vztahů pro úpravu kosinů dostaneme vztah

$$\mu' = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos 2\pi \nu_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_{\mathbf{k}}} \right)_0 Q_{\mathbf{k}0} \mathbf{E}_0 [\cos 2\pi(\nu_0 - \nu_k)t + \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_k)t] \quad (1.9)$$

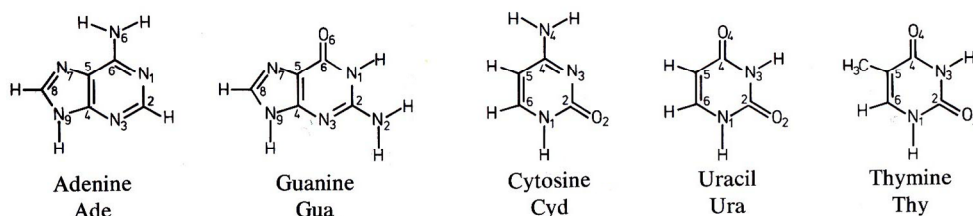
Tento výraz obsahuje tři frekvence, s nimiž dipól osciluje. Frekvence ν_0 patří Rayleighovu rozptylu, frekvence $\nu_0 + \nu_k$ anti-Stokesově a $\nu_0 - \nu_k$ Stokesově rozptylu. Dále vidíme, že pro Ramanův rozptyl je nutná nenulová derivace tenzoru polarizovatelnosti v rovnovážné poloze podle vnitřních souřadnic. Vibrace, u nichž se tento tenzor nemění, označujeme za Ramanovsky neaktivní (například asymetrické vibrace CO_2). Takovéto vibrace nemůžeme pozorovat v Ramanově spektru a jejich měření musíme použít jiné metody vibrační spektroskopie.

2. Studium nukleových kyselin pomocí Ramanovy spektroskopie

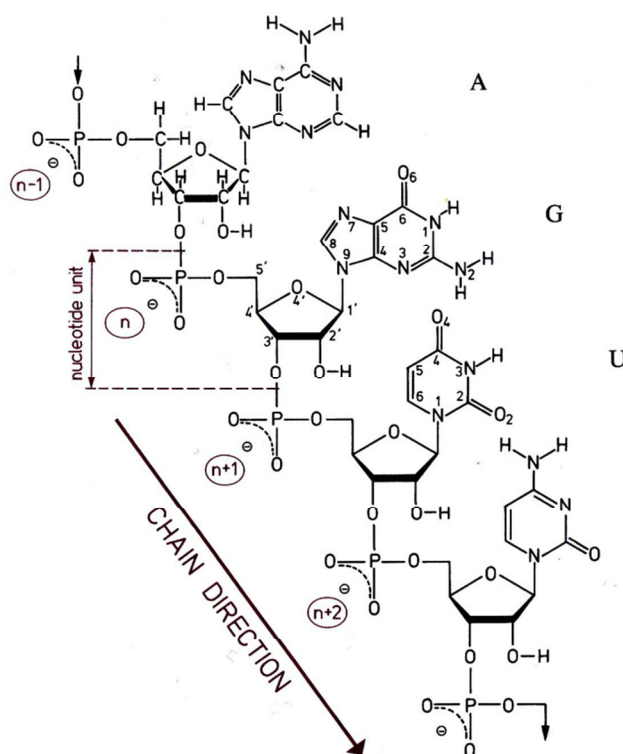
2.1. Základní struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou lineární polymery vystavěné z nukleotidů. Nukleotidy jsou celky skládající se ze tří částí: cukru, nukleové báze a fosfátu [Saenger, 1984]. Nejběžnějšími nukleovými kyselinami jsou kyselina deoxyribonukleová (DNA) a kyselina ribonukleová (RNA). Nukleové báze nacházející se v těchto kyselinách můžeme vidět na obrázku (Obr. 2.1.1). Báze jsou buď purinové – adenin a guanin nebo pyrimidinové – cytosin, thymin a uracil. Cukr a báze dohromady tvoří celek, který se nazývá nukleosid (Obr. 2.1.2). Nukleosidy vyskytující se v DNA jsou adenosin, guanosin, cytidin, thymidin a v RNA je thymidin nahrazen uridinem.

Nukleotidy jsou navzájem propojeny 3',5'-fosfodiesterovou vazbou (Obr. 2.1.2). Oligonukleotidy s 2',5'-fosfodiesterovou vazbou nebyly v přírodě pozorovány, ale lze je vyrobit synteticky [Saenger, 1984].



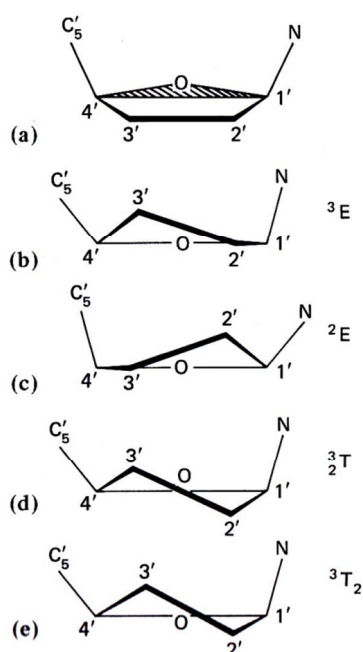
Obr. 2.1.1: Chemická struktura bází a nukleosidů (převzato z [Saenger, 1984]).



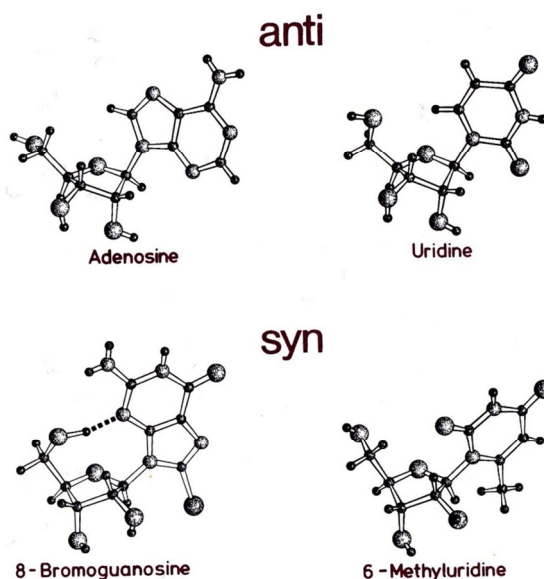
Obr. 2.1.2: Část řetězce RNA se sekvencí adenosin (A), guanosin (G), uridin (U) a cytidin (C). Nukleotidy jsou propojeny 3',5'-fosfodiesterovou vazbou (převzato z [Saenger, 1984]).

Pětičlenný kruh cukru není obecně rovinný. Možné typy konformací vidíme na (Obr. 2.1.3). Pokud jsou atomy vychýlené z kruhu stejným směrem jako atom uhlíku C5', nazýváme tuto konformaci *endo*, pokud směrem opačným, pak se nazývá *exo*. Vibrační módy jsou definovány stejně. Symetrické vychýlení z roviny (d) je jen málo časté. Proto asymetrické vychýlení dvou atomů z roviny (e) dělíme na velké (angl. major) a malé (angl. minor) vychýlení.

Další volnost má molekula v orientaci báze vůči cukru podél vazby C1'–N. Rozlišujeme dvě hlavní orientace *syn* a *anti* (Obr. 2.1.4). Preferovaný stav závisí mimo jiné na konformaci cukru. C3'–*endo* preferuje orientaci *anti* a při konformaci cukerné složky C2'–*endo* dochází k preferenci *syn* konformace.

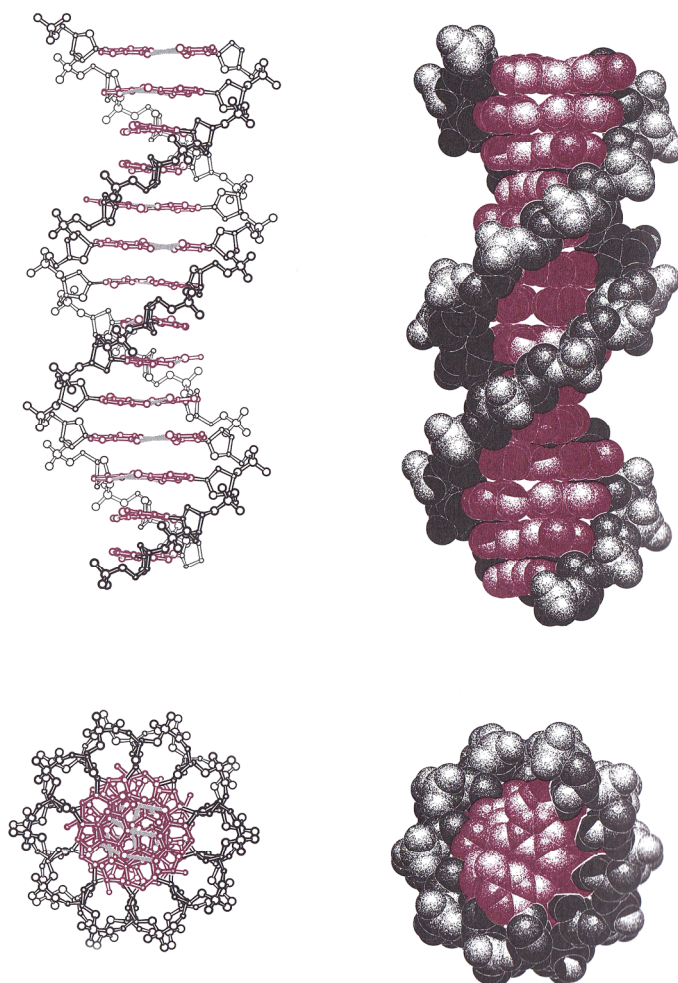


Obr. 2.1.3: Schématické znázornění konformací cukru. (a) Atomy jsou v rovině, takováto situace nebyla nikdy pozorována, (b) C3'–*endo*, (c) C2'–*endo*, (d) symetrické vychýlení C2'–*exo*–C3'–*endo*, (e) velké C3'–*endo* a malé C2'–*exo* (převzato z [Saenger, 1984]).



Obr. 2.1.4: Schéma ukazující nukleotidy adenosin a uridin v *anti* orientaci a 8-Bromoguanosin a 6-Methyluridin v *syn* orientaci (převzato z [Saenger, 1984]).

Řetězec vytvořený z nukleotidů může existovat sám jako jednovláknová molekula. DNA se však většinou vyskytuje v přírodě ve vícevláknové podobě. Nejčastěji pak v podobě dvoušroubovice, kde jednotlivá vlákna jsou propojena vodíkovými můstky (Obr. 2.1.5). (Může se však vyskytovat i ve formě trojšroubovice nebo kvadruplexu.) Nejčastějšími typy párování bází nukleových kyselin jsou Watson–Crickovo a Hoogsteenovo párování. Párování splňuje podmínku komplementarity, která říká, že jediná možná propojení bází jsou C–G a A–T, popř. A–U u RNA. Dvoušroubovice DNA pak dělíme podle typu sekundární struktury na A a B, které jsou pravotočivé a Z, která je levotočivá. Rozdíl mezi A-DNA a B-DNA je ve tvaru a počtu bází připadajícím na jedno otočení šroubovice. V přírodě můžeme nejčastěji pozorovat B-DNA, ostatní konformace jsou spíše vzácné.



Obr. 2.1.5: Schéma struktury B-DNA (převzato z [Saenger, 1984]).

2.2. Ramanova spektroskopie nukleových kyselin

Vibrační spektroskopie, jak infračervená (IR), tak Ramanova, se začala používat ke zkoumání nukleových kyselin od šedesátých let dvacátého století [Benevides et al., 2005]. Mezi jejich největší výhody patří možnost zkoumání vzorků v roztoku, tenkých filmech, vláknech, polykrystalickém, či krystalickém stavu. Dále pak není kladeno omezení na velikost zkoumaného vzorku, metoda není destruktivní a požaduje jen relativně malé množství vzorku. Vliv parametrů okolí, jako je pH, teplota, hydratace a ionizace prostředí, jde navíc dobře sledovat. Rovněž můžeme snadno porovnat výsledky Ramanovy, či IR spektroskopie s rentgenostrukturní analýzou krystalického vzorku a nukleární magnetickou rezonancí (NMR) roztoku. Kombinací všech těchto metod spolu s modelováním můžeme nakonec dostat velmi dobré informace o struktuře nukleových kyselin [Taillandier a Liquier, 2002].

Molekula nukleové kyseliny o N atomech má $3N - 6$ stupňů volnosti, ale většina těchto módů je silně lokalizována a představuje vibrace malé skupiny atomů. Pokud jsou skupiny atomů dostatečně malé a identifikovatelné, můžeme mluvit o vibraci skupiny. Skupiny atomů se však nemusí chovat vždy nezávisle. Vibrační módy jsou vzájemně mechanicky propojené například u nukleových bází a cukr-fosfátové páteře. V Ramanově spektru se pak objeví pásy delokalizovaných

vibračních módů s relativně vysokou intenzitou typickou pro lokalizované vibrační módy, ale s konformační závislostí. Takovéto pásy byly pozorovány jak u DNA, tak u RNA a umožňují nám určit jejich sekundární strukturu [Benevides et al., 2005].

Kombinace různých měřících metod a výpočtů nám dovolila přiřadit specifickým vlnočtům (*markerům*) pro IR a Ramanovu spektroskopii charakteristické geometrie, v nichž se vzorek nachází. Byly popsány dva typy těchto markerů. První typ nese informaci o konformaci cukr-fosfátové páteře. Je citlivý hlavně na změny v torzních úhlech fosfodiesterových vazeb páteře a v menší míře na typ báze. Tento typ markerů nám umožňuje určit sekundární strukturu nukleových kyselin. Hlavní markery tohoto typu jsou uvedeny v tabulce 2.2.1 pro A, B a Z konformace DNA. Druhý typ markerů nese informaci o konformaci nukleosidů. Pásy odpovídají hlavně valenční vibraci nukleové báze, která je propojena glykosilickou vazbou s cukrem. Tento typ markerů je citlivý na typ bází. Hlavní markery druhého typu jsou uvedeny v tabulce 2.2.2 [Benevides et al., 2005].

Mezi nejvyužívanější typy Ramanovy spektroskopie patří konvenční Ramanova spektroskopie, ultrafialová rezonanční Ramanova rezonanční spektroskopie (UVRR) a polarizovaná Ramanova spektroskopie. Konvenční Ramanova spektroskopie pracuje s roztoky s koncentracemi 1–10 mg/ml v objemu vzorku ~5 μ l a s viditelnými vlnovými délkami [Benevides et al., 2005]. Polarizovaná Ramanova mikrospektroskopie se zaměřuje na krystaly, vlákna a tenké filmy. Pro tuto metodu je důležitá stálá, předem známá orientace vzorku. Využívá konfokálního mikroskopu a Ramanova rozptylu laserového paprsku nejčastěji ve 180°. Měřením vzorku získáme lokální Ramanův tenzor. Aplikace této metody byla poprvé popsána v [Benevides et al., 1993] na levotočivé Z-DNA sekvence d(CGCGCG) v jediném orientovaném krystalu. Pro ultrafialovou rezonanční Ramanovu spektroskopii se většinou volí vlnová délka laseru tak, aby odpovídala maximu UV absorpce chromoforu vzorku (pro DNA a RNA báze ~260 nm). Největší přednost je tedy možnost volby excitace buď nukleových, nebo proteinových chromoforů pomocí vybrané vlnové délky laseru. Často se využívají lasery s více vlnovými délkami, čímž získáme další doplňující se informace o vzorku. Aby se zabránilo destrukci vzorku UV zářením, nechá se vzorek proudit. Proto musíme při měření použít většího objemu roztoku. Objem je řádově stokrát větší a minimální množství vzorku zůstává stejné jako u konvenční metody [Benevides et al., 2005].

Velká část experimentů byla provedena na syntetizovaných krátkých částech DNA. Zkoumání DNA ve své přirozené podobě je však stejně důležité. Při zkoumání přírodní, nesyntetizované B-DNA bylo zjištěno, že Ramanovo spektrum je ovlivněno pořadím bází a celkovou kompozicí bází. Ramanovy pásy přiřazené vibrační módům fosfátové páteře DNA jsou mezi nejcitlivějšími k pořadí bází. Geometrie fosfátové páteře se změní podle toho, jestli převládají páry AT nebo CG. Takže v principu bychom mohli být schopni rozlišit B-DNA s rozdílnou sekvencí podle jejího Ramanova spektra [Benevides et al., 2005].

Ramanova spektroskopie si našla široké uplatnění při zkoumání nukleových kyselin. Byla použita například k prozkoumání interakce nukleotidů s různými ionty a spojené konformační změně, zkoumání vodíkových vazeb mezi bázemi a procesu tání dvoušroubovice (tj. rozpojení řetězců vyvolané zvýšením teploty).

Tab. 2.2.1: Hlavní markery konformací dvoušroubovice DNA v Ramanově spektru ^a

A	B	Z	přiřazení
1416	1421	1426	C2'H ₂ deformační vibrace
	1375		dA anti
	1363		dG anti
		1362	dA syn
		1354	dG syn
1335			dA, dG
		1328	dA
1320		1315	dG
	1304	1312	dA
1254	1254	1264	dC
1099 ± 1	1092 ± 1	1095 ± 2	PO ₂ ⁻ ^b
	832		d, O-P-O
808		810	d, O-P-O
785	788	748	d, O-P-O
	727		dA anti
665	682		dG anti
		665	dG syn
		662	dA syn

^a Polohy pásů jsou uvedeny v cm⁻¹. dA, dT, dC, dG a d označují vibrace aromatického kruhu bází, O-P-O označuje vibrace fosfodiesterové vazby. Markery jsou získané ve vodném roztoku [Taillandier a Liquier, 2002],

^b vibrace fosfátové skupiny PO₂⁻ získány z DNA krystalů a vláken známé struktury [Benevides et al., 2005].

Tab. 2.2.2: Hlavní markery konformací nukleosidů v Ramanově spektru ^a

báze	C3'-endo/anti	C2'-endo/anti	C3'-endo/syn	C2'-endo/syn
G	664 ± 2 ^b	682 ± 2	625 ± 3	671 ± 2
	1318 ± 2	1333 ± 3 ^c	1316 ± 2	1324 ± 2
A	644 ± 4	663 ± 2	624 ± 3	
	1335 ± 2	1339 ± 2	1310 ± 5	
C	780 ± 2	782 ± 2	784 ± 2	
	1252 ± 2	1255 ± 5	1265 ± 2	
T	642 ± 2	665 ± 2		
	745 ± 2	748 ± 2		
	777 ± 2	790 ± 3		
	1239 ± 2	1208 ± 2		

^a Polohy pásů jsou uvedeny v cm⁻¹. Data získána z DNA krystalů a vláken známé struktury [Benevides et al., 2005].

^b Tento pás je pozorován na 688 ± 1 cm⁻¹ ve strukturách s rG.

^c V B-DNA se u tohoto pásu nalézá další slabý na 1316 cm⁻¹

3. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)

3.1. Teoretický popis jevu

Metoda Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků (drop coating deposition Raman – DCDR) je technika, při které nanese zkoumaný roztok na vhodnou podložku, necháme vyschnout a studujeme Ramanovou mikrospektroskopií [Rosová, 2008]. Takovýto postup přípravy vzorku nám umožní získat kvalitní Ramanova spektra i z roztoků o malých koncentracích a objemech v porovnání s klasickou Ramanovou spektroskopií [Zhang et al., 2003].

Proces odpařování probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází ke zmenšování kontaktního úhlu při konstantní styčné ploše kapky. Ve druhé fázi, kdy kontaktní úhel překročí kritickou hodnotu, začne docházet ke zmenšování styčné plochy [Hu & Larson, 2002]. Právě konstantnost styčné plochy zde hraje významnou roli. Aby byla styčná plocha opravdu zachována, musí existovat vnitřní toky v kapce, díky kterým bude kapalina proudit z vnitřní části kapky do vnější. A právě toto proudění přináší částice rozpuštěné v kapalině na okraj kapky, kde se následně usadí [Deegan et al., 1997]. Tomuto efektu říkáme *efekt kávového kroužku (coffee-ring effect)* a který je podstatou metody DCDR.

Na obrázku (Obr. 3.1.1) b) vidíme znázornění proudění v kapce zabraňující zmenšování styčné plochy, c) znázornění toku vypařování J na kapce. Proudění v kapce při vysychání můžeme popsat pomocí nasycenosti okolního prostředí vodní párou [Deegan et al., 1997]. Nasycenost okolního prostředí vodní párou označíme $\varphi(r)$. V nekonečnu budeme uvažovat, že nabývá konstantní hodnoty φ_∞ a na povrchu kapky hodnoty φ_s . Zároveň se řídí rovnicí stacionární difúze

$$\nabla^2 \varphi(r) = 0 \quad (3.1.1)$$

Tok vypařování kapky je úměrný gradientu nasycenosti vodních par na povrchu kapky a zapíšeme jej ve tvaru

$$J(r) = -D\nabla\varphi \quad (3.1.2)$$

Kde D je difuzivita vodní páry ve vzduchu. Úloha je ekvivalentní elektrostatické úloze, kde φ je elektrostatický potenciál a kapka představuje vodič s potenciálem na povrchu φ_s . Pokud kontaktní úhel kapky θ_c považujeme za malý, dostáváme řešení divergující pro r jdoucí k R . Kde r je vzdálenost od středu kapky a R je její poloměr. Řešení má tvar

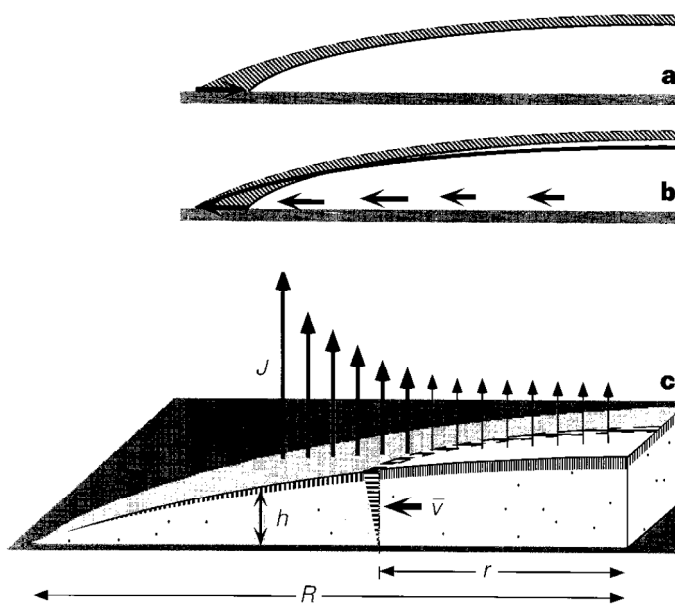
$$J(r) \approx (R - r)^{-\frac{\pi - 2\theta_c}{2\pi - 2\theta_c}} \quad (3.1.3)$$

Jak se kontaktní úhel θ_c blíží k nule, velikost exponentu se přibližuje k $\frac{1}{2}$ a velikost toku je úměrná

$$J(r) \approx \frac{1}{\sqrt{R-r}} \quad (3.1.4)$$

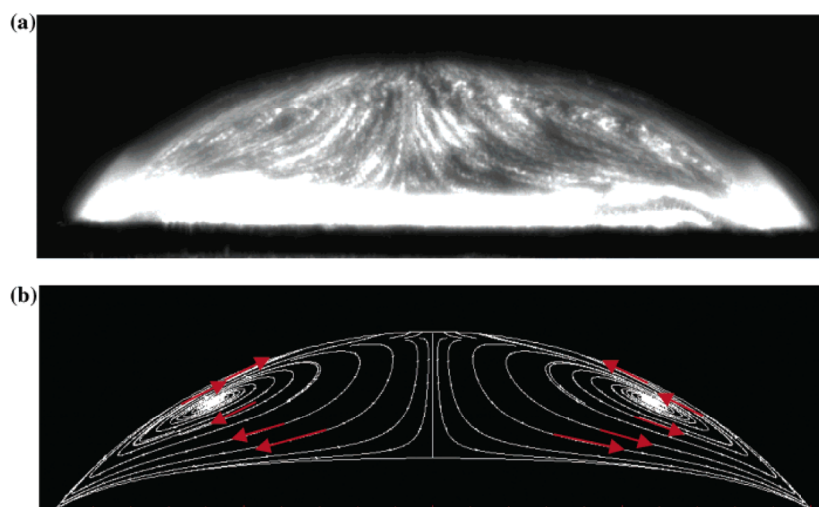
Aby se neměnila styčná plocha, musí být kapalina na okrajích kapky nahrazována rychlostí $v \approx J$ a tedy dochází i k přemísťování a hromadění částicek rozpuštěných v kapalině na obvodu kapky a tedy k vytváření kroužku. Tímto

způsobem můžeme dostat i značně koncentrovaný vzorek z roztoku velmi zředěného. Ramanova spektra lze měřit z roztoků o koncentracích až $1 \mu\text{M}$ [Zhang et al., 2003].



Obr. 3.1.1: Proudění kapaliny během vypařování. a) výsledek odpařování bez vnitřního proudění kapaliny, došlo by ke zmenšení plochy. b) proudění kapaliny kompenzuje odpařování a styčná plocha se nemění. c) znázornění veličin sloužících k popisu procesu vypařování. (Převzato z [Deegan et al., 1997].)

Nicméně takovýto proud uvnitř kapky není jediný. Ochlazování způsobené odpařováním není rovnoměrné a vršek kapky se ochlazuje rychleji než okraje. To způsobí, že povrchové napětí na vrcholku kapky je vyšší a vzniká gradient povrchového napětí. Tento gradient vyvolává proudění částic kapaliny v blízkosti povrchu kapky směrem k vrcholku. Spolu s dříve popsaným prouděním kapaliny “zevnitř ven” vytváří tento proud cirkulační proudění znázorněné na obrázku (Obr. 3.1.2) [Hu & Larson, 2006]. Takovéto proudění se nazývá *Marangoniho*. Marangoniho efektem se obecně pojmenovává proudění kapaliny podél fázového rozhraní do míst s vyšším mezifázovým napětím.

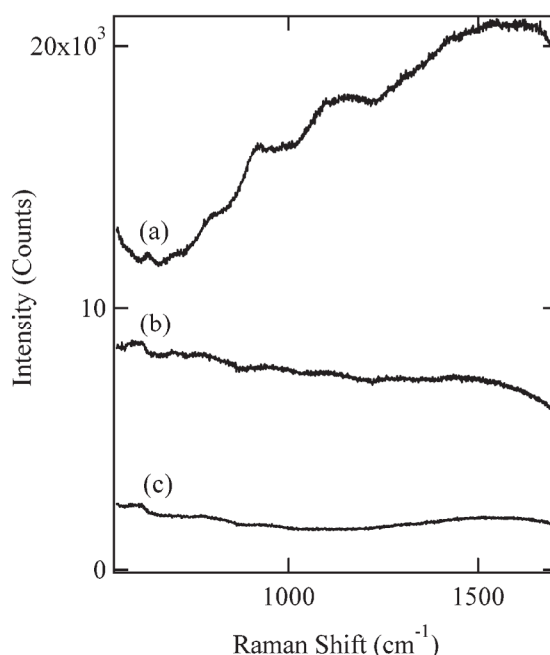


Obr. 3.1.2: Zobrazení Marangoniho efektu v kapce oktanu, a) experimentální obraz zobrazený pomocí fluorescence, b) výpočtené proudění. (Převzato z [Hu & Larson, 2006].)

Přesto Marangoniho proud většinou nepozorujeme pro vodné roztoky. Hu & Larson (2006) to vysvětlují tím, že kontaminace povrchově aktivními látkami silně oslabuje Marangoniho proud, přičemž voda je dobře známa svou vlastností přitahovat právě tyto látky. K tomu, abychom získali efekt kávového kroužku, potřebujeme tedy také potlačit Marangoniho proud, který naopak vyvolává usazování rozpuštěných látek okolo středu kapky.

Spektra získaná DCDR metodou jsou reprodukovatelná, nezávisí na intenzitě použitého laseru a jsou v dobré shodě se spektry získanými z koncentrovaného roztoku nebo případně krystalického vzorku [Zhang et al., 2003]. Jen spektrum získané z vnějšího okraje kroužku může být poškozeno kompletním vysušením vzorku v důsledku oscilace okraje kapky při vysychání [Kopecký & Baumruk, 2006]. Zároveň bylo pozorováno, že se některé složky roztoku neusazují homogenně na kroužku, nýbrž dochází k jejich segregaci. Složky s vysokou vzájemnou afinitou se však od sebe neseparují [Zhang et al., 2003].

Pro získání kvalitních spekter je velice důležité použití vhodných substrátů, na něž umístíme vzorky. Vhodný substrát pro měření metodou DCDR by měl být tepelně a chemicky odolný, mít nízkou optickou absorbanci, vysokou optickou odrazivost, malý nebo žádný signál v Ramanově spektru a být nesmáčivý [Zhang et al., 2003]. Nesmáčivost substrátu poslouží k vyšší koncentraci vzorku díky menší velikosti kapky. Požadavky na odolnost, absorbanci a odrazivost souvisí přímo s měřením pomocí Ramanovy spektroskopie. Zhang et al. (2003) testovali použití skla, skla potažené 20 nm vrstvou zlata a nerezové oceli s ~50 nm vrstvou teflonu. Nerezová ocel s vrstvou teflonu se ukázala jako nejlepší z testovaných. Na obrázku (Obr. 3.1.3) vidíme porovnání Ramanova spektra tří výše zmíněných substrátů.



Obr. 3.1.3: Ramanovo spektrum pro a) sklo, b) sklo potažené 20 nm vrstvou zlata, c) nerezovou ocel s ~50 nm vrstvou teflonu. (Převzato z [Zhang et al., 2003].)

Filik a Stone (2007) dále zkoušeli křemenné destičky a též CaF_2 . Křemen však projevoval výraznou luminiscenci. CaF_2 destička měla menší reflexi než teflonem potažená ocel (destičky SpectRIMTM) a tedy vyžadovala delší dobu pro měření. Dále pro ni byl charakteristický silný Ramanův signál na 320 cm^{-1} . Přesto destička dávala dobrý poměr signálu k šumu. Nakonec ji tedy použili pro její cenovou dostupnost a odolnost, díky níž se dala snadno znovu použít.

3.2. Užití DCDR

Poprvé publikovali použití metody kapkově nanášených povlaků Zhang et al. (2003). Autoři získali kvalitní Ramanova spektra roztoků proteinů pro koncentrace až do 1 μM , tím stanovili první odhad koncentračního limitu této metody. Zároveň provedli testování vhodných podložek pro měření. V experimentech použili roztoky cukrů – glukózy a fruktózy, a proteinů – lysozymu a inzulínu. Při porovnání zjistili, že ačkoli dostáváme proteiny v pevném stavu, zdají se dobře hydratované. Spektrum lysozymu je prakticky identické se spektrem získaným z roztoku. Rovněž inzulín dává spektrum stejné, jaké má v přirozeném stavu a nejeví známky denaturace. Spektrum glukózy je podobné jako má v roztoku a je rozdílné od spektra v krystalické formě. Na druhou stranu se spektrum fruktózy jeví podobné spíše její krystalické formě [Zhang et al., 2003]. Podobné srovnání spekter vodného roztoku a vysušené kapky provedli Ortiz et al. (2006). Změřená spektra inzulínu jsou stejná až na malé odchylky, které jsou podle autorů nejspíše důsledky různé hydratace vzorku, rozdílné míry obsahu nečistot a díky denuraci/agregaci při vysoušení.

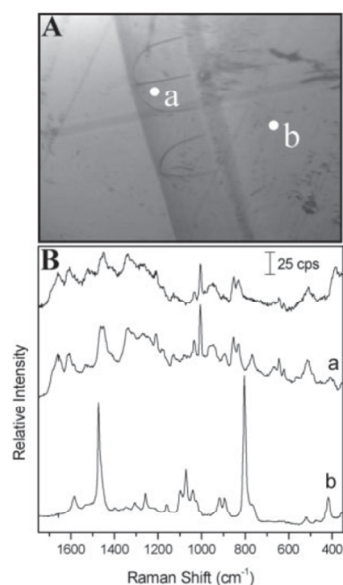
Na změny Ramanova spektra při vysoušení se zaměřili autoři článku [Kopecký & Baumruk, 2006]. Pozorovali, že spektrální pásy postranních řetězců proteinu albuminu se změnilly na okraji vytvořeného kroužku. Tyto postranní řetězce jsou citlivé na změny okolního prostředí. Autoři se domnívají, že změna spektrálních čar je způsobena vytvořením totálně vysušených vrstev na vnějším okraji kroužku. Proto nedoporučují měřit z vnější části kroužku, kde dochází k totálnímu vysoušení vzorku.

Na vliv vystavení vzorku laseru se zaměřili jak Zhang et al. (2003), tak Ortiz et al. (2006). V obou případech autoři nenašli změny v naměřených spektrech po vystavení vzorku laseru po delší dobu.

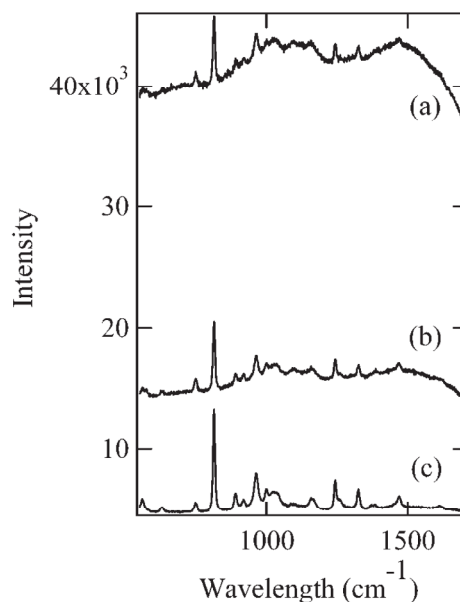
Záměnu vody za D_2O provedli Ortiz et al. (2006), jelikož se obraz vody překrývá s pásem vibrací skeletu bílkoviny v oblasti vibrací amidu I v Ramanově spektru. Ukázalo se, že přestože vzorek zůstává hydratován, vliv vody na výsledné spektrum je zanedbatelný a tedy záměna za D_2O nemá vliv na získané spektrum.

Různé koncentrace vzorků nám dávají prakticky shodná spektra. Avšak při koncentracích $< 10 \mu\text{M}$ je poměr signál k šumu menší [Ortiz et al, 2006]. Autoři tohoto článku navrhují vylepšení poměru signálu k šumu zvětšením objemu proteinu v kroužku vícenásobným nanášením kapky na jedno místo. Dále navrhují využití DCDR k detekci obsahu nečistot ve vzorku. Zhang et al. (2004) se dále zaměřili na problém fluorescenčních nečistot a pufrů. Zjistili, že DCDR může sloužit k separaci proteinů od fluorescenčních nečistot a pufru, a tím znatelně vylepšit získané spektrum. V práci autoři použili roztoky lysozymu a inzulínu ve vodném roztoku s pufrům. Pufr byl v poměru 1000:1 respektive 100:1. I přes tento značný nepoměr spektrum získané z kroužku se velice podobá čistému lysozymu/inzulínu a lišilo se od spektra získaného z vnitřní části kroužku, které se naopak podobá spektru pufru (Obr. 3.2.1). Tuto metodu porovnali s dalšími metodami odstranění nežádoucí fluorescence. Na (Obr. 3.2.2) vidíme srovnání s metodou vybělení v laserovém svazku.

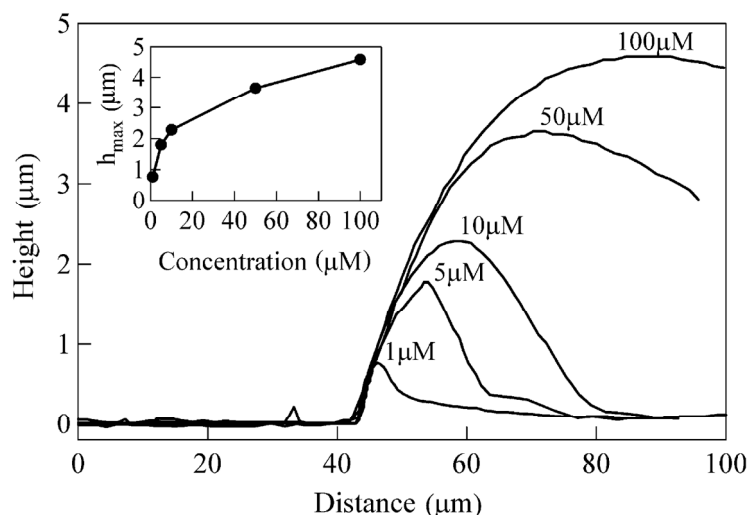
Výškovým profil vyschlého kroužku lysozymu změřili Ortiz et al. (2006) pomocí AFM (Atomic force microscopy) mikroskopu pro různé koncentrace lysozymu (Obr. 3.2.3). Kopecký a Baumruk (2006) změřili výškový profil nepřímo podle intenzit spektrálních čar albuminu. Výšku kroužku vytvořeného kapkou o objemu 2 μl o koncentraci 0,1 mg/ml odhadli pak podle interference na asi 600 nm.



Obr. 3.2.1: A) obraz kroužku po vysušeném roztoku inzulínu a pufru. B) a, b jsou naměřená spektra z vyznačených oblastí. Nahoře je zobrazeno spektrum inzulínu v pevném stavu pro porovnání. (Převzato z [Zhang et al., 2004].)



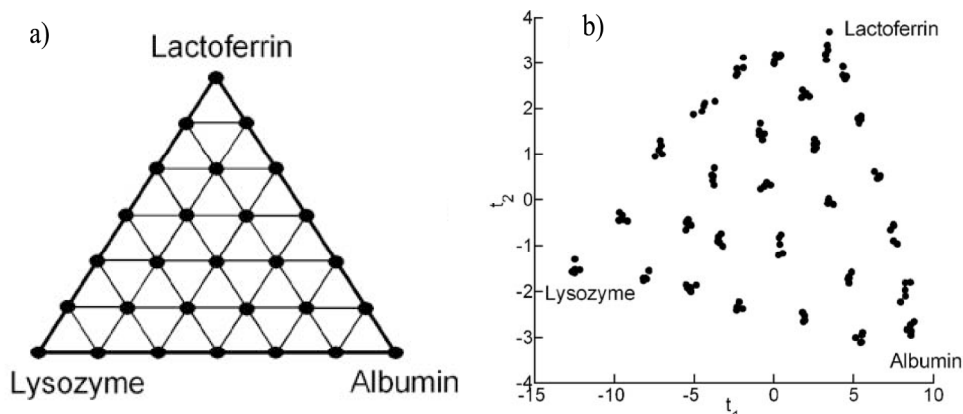
Obr. 3.2.2: Srovnání fluorescenčního pozadí z prášku *O*-fosfo-*L*-serinu. Spektra a) a b) byla získána metodou vybělování fluorescence v laserovém svazku po dobu a) 7 min, b) 65 min. c) Změřené DCDR spektrum. (Převzato z [Zhang et al., 2004].)



Obr. 3.2.3: Výškový profil kroužku pro různé koncentrace lysozymu. Výsek znázorňuje závislost maximální výšky kroužku na koncentraci. (Převzato z [Ortiz et al., 2006].)

Filik a Stone (2007) využili techniku DCDR pro analýzu relativních zastoupení proteinů ve vodném roztoku při celkové koncentraci podobné jako v lidských slzách (3 mg/ml). Měřili tři proteiny – lysozym, lactoferin a albumin. Pozorovali, že rozložení proteinů není na „kávovém kroužku“ rovnoměrné a tak použili průměrová spektra z pěti ekvidistantních měření přes šířku kroužku. Na (Obr. 3.2.4) vidíme a)

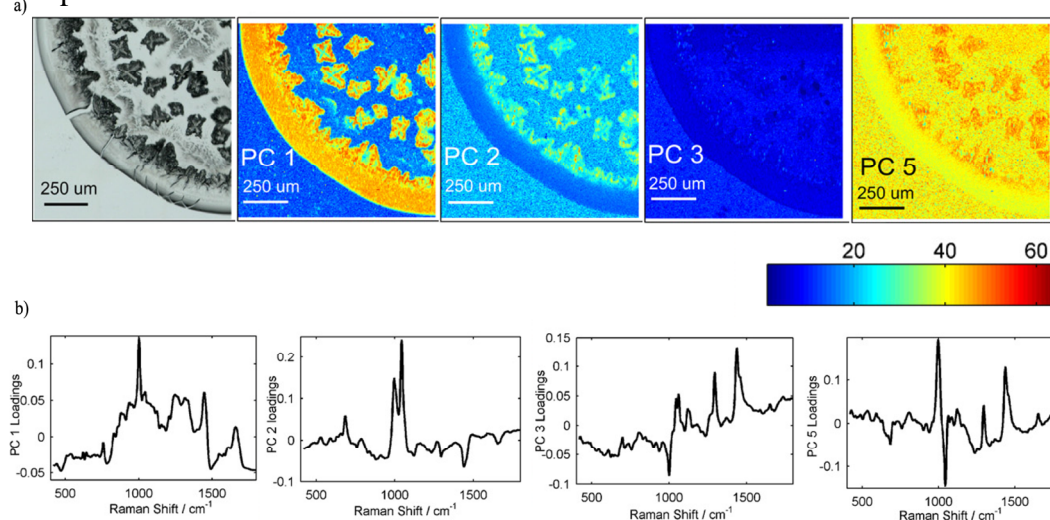
schéma přípravy směsi proteinů a b) hodnoty získané z měření. Vrcholy trojúhelníku odpovídají čistému roztoku daného proteinu, hrany pouze dvou proteinů a vnitřek kombinací všech tří.



Obr. 3.2.4: Rozdělení koncentrací tří proteinů a) připravené rozdělení b) detekované pomocí porovnání DCDR spekter. (Převzato z [Filik & Stone, 2007].)

Protože při oční infekci dochází ke změnám relativních koncentrací proteinů, bylo by možné použít DCDR spektroskopii k rychlé a jednoduché diagnóze oční infekce. Autoři se domnívají, že uvedená nehomogenita rozložení proteinů na kroužku mohla být zapříčiněna jejich rozdílnou hmotností. Lactoferin (ca. 90 kDa) a albumin (ca. 66 kDa) se jako podstatně těžší usadily více na vnější části kroužku, zatímco lehčí lysozym (14,7 kDa) byl deponován více u vnitřní strany a také tvořil dominantní složku zbytkového proteinu uprostřed kroužku.

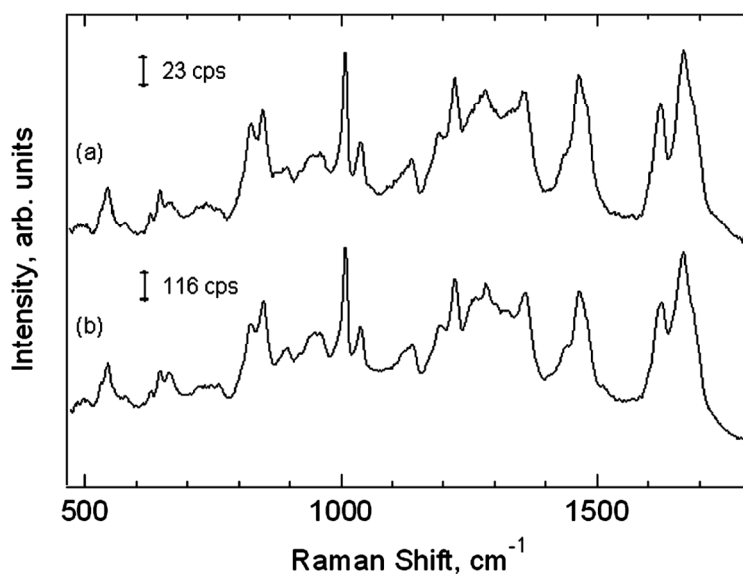
Ve své další práci Filik a Stone (2008) zkoumali složení slz zdravých lidí pomocí DCDR a výsledky zpracovali metodou analýzy hlavních komponent (Obr. 3.2.5). Hlavní složky slz určili proteiny, močovinu, hydrogenuhličitan sodný a lipidy. Ve svém článku autoři popsali proces vysušování kapky a pokusili se vysvětlit nehomogenitu usazování složek na základě jejich relativních rozpustností. Nejprve se začnou usazovat ty složky, které mají nejmenší rozpustnost, poté složky s rozpustností větší.



Obr. 3.2.5: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti ze vzorku lidských slz. (Převzato z [Filik & Stone, 2008].)

Poté se Filik a Stone (2009) pokusili odpovědět na otázku, zda DCDR spektra lidských slz obsahují signály od jednoho, či více proteinů a jestli jsou proteiny rozděleny na kroužku homogenně. Pomocí centrifug rozdělili proteiny získané z lidských slz podle hmotnosti. Z měření DCDR spekter došli k výsledku, že lidské slzy obsahují více proteinů, které jsou navíc rozloženy na kroužku nehomogenně. Dále pozorovali zesílení v oblasti pásu amidu III a pásech tryptofanu směrem k vnějšímu okraji, což může být připsáno na účet vysoušení proteinů na okrajích kapky [Kopecký & Baumruk, 2006].

Měření za účelem demonstrace využitelnosti Ramanovy spektroskopie k identifikaci velmi podobných proteinů provedli též Ortiz et al. (2004). Použili DCDR k získání kvalitních spekter z roztoků o nízkých koncentracích tří variant inzulínu – lidského, hovězího a prasečího. Zároveň porovnali spektra získaná DCDR metodou a z roztoku (Obr. 3.2.6).



Obr. 3.2.6: Porovnání Ramanova spektra hovězího inzulínu (a) z roztoku (4 mM), (b) DCDR spektra (z 10 μ M roztoku.) (Převzato z [Ortiz et al., 2004].)

Techniku DCDR lze užít i ke studiu malých molekul, tak jak to učinili Cipriani a Ben-Amotz (2005) při měření tří příslušníků rodiny taxanů (docetaxel, baccatin III a cephalotaxine), jež jsou potenciálně využitelné k výrobě léků a protinádorovému použití. Autoři pracovali s koncentracemi od 1 mM do 1 μ M a naměřené hodnoty porovnali s kvantově-mechanickými *ab initio* výpočty. Odchytky od naměřeného spektra vysvětlovali velikostí molekuly, kdy všechny normální módy jsou delokalizovány.

Jenkins et al. (2004) se zaměřili na výzkum jednotlivých aminokyselin pomocí DCDR za účelem lepšího pochopení interakcí proteinů s možnými léčivými a dalšími ligandy. Autoři se pokusili přiřadit a interpretovat jednotlivé vibrace ve spektrech aminokyselin vyskytujících se v proteinech, předpokládali přitom, že tato informace umožní rozpoznání spektrálních změn spojených s vazbou ligandů v blízkosti jednotlivých aminokyselin v řetězci bílkoviny. Získaná spektra jsou však bohužel velmi blízká spektrům získaným z práškových vzorků. Což poukazuje na jistá úskalí při užití DCDR spektroskopie, jak později ukázali na kyselině domoové (domoic acid) Djaoued et al. (2007). Jedná se o neurotoxin vyskytující se v mořském ekosystému a způsobující ztrátu krátkodobé paměti. Měření ukázala, že se DCDR spektrum roztoku mění podle koncentrace kyseliny a je odlišné od spektra získaného

z její krystalické práškové formy. Například ve spektru roztoku vymizely téměř všechny pásy karboxylové skupiny a rovněž bylo patrné klasické rozšíření pásů, v důsledku interakce s molekulami vodní obálky.

Další oblast uplatnění DCDR spektroskopie je v oblasti studia agregace molekul. Ortiz et al. (2007) zkoumali formování amyloidních vláken inzulinu. Využili k tomu DCDR diferenční spektroskopie a AFM pro přímé zobrazování formování vláken. Sekundární strukturu inzulinu tvoří z velké části α -helix, zatímco u vláken jsou to β -skládané listy. Očekávali tedy změnu sekundární struktury, která se projevila v Ramanově spektru. Největší zaznamenané změny našli v oblastech vibrace kostry bílkoviny, tj. v pásech amidu I a III. Možností využití DCDR jako rychlé metody pro měření stupně agregace lidského inzulinu se zabývali Gryniiewicz a Kauffman (2008). Agregace inzulinu způsobuje změnu jeho sekundární struktury a je tedy pozorovatelná v Ramanově spektru. Pro výpočet korelace mezi stupněm agregace a spektry byla použita metoda parciálních nejmenších čtverců. Metoda se ukázala jako schopná měřit stupeň agregace lidského inzulinu s chybou 5 % v rozsahu 5–30 %.

Citlivost DCDR spektroskopie lze však užít i ke sledování řady dějů v biomolekulách, např. stupně fosforylace tyrosinu v peptidech, tak jak to učinili Xie et al. (2004). Ve zkoumaných spektrech čtyř peptidů pozorovali při fosforylaci kolaps dubletu ve $820\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ a zeslabení pásu okolo 1205 cm^{-1} . Ve své další práci Xie et al. (2005) měřili spektrální změny DCDR spekter v závislosti na pH. Zkoumali fosforylované a nefosforylované aminokyseliny (serin a threonin). Při změnách pH v rozsahu 3–7 pozorovali změny v pásech 980 cm^{-1} a 1080 cm^{-1} u fosforylovaných aminokyselin. Tyto změny jsou důsledkem protonace fosfátových skupin. Demonstrovali tím možnost využití pH závislých DCDR měření pro určení míry fosforylace peptidů. Navíc pozorovali změny ve spektrech i některých nefosforylovaných peptidů, což připisují na účet změnám v jejich sekundární struktuře.

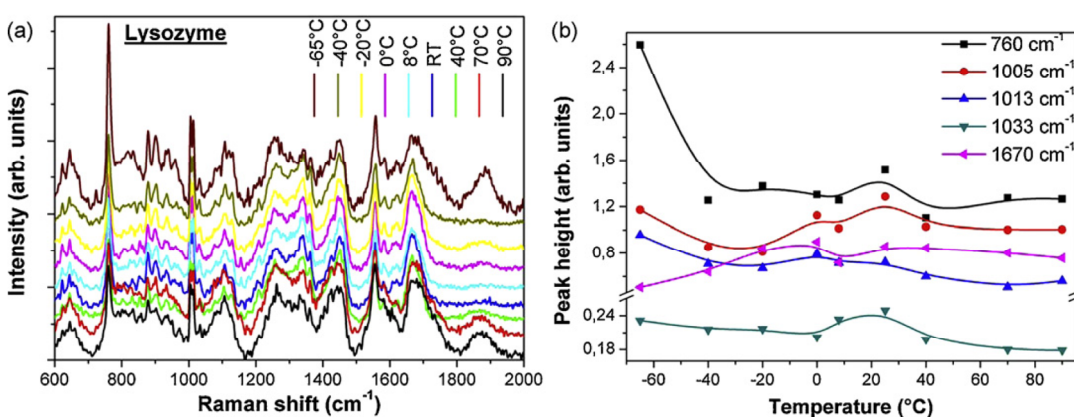
Zhang et al. (2009) demonstrovali použití nové radiometrické Ramanovy spektroskopie (RMRS), která by měla být schopná kvantitativně změřit oxidační poškození proteinu. Při experimentech byly použity oxidovaný hovězí sérový albumin (BSA) a oxidovaný lysozym. Na protein se nejprve navážeme dinitrofenyl hydrazin (DNPH), který označí oxidované místa. Následně naměříme DCDR spektra. Výsledek získáme výpočtem z poměru intenzit pásu DNPH (1340 cm^{-1}) a pásu fenyalaninu u proteinu (1033 cm^{-1} u BSA). Metoda nevyžaduje kalibraci a autoři uvádějí detekční limit $0,33\text{ pmol}$ karbonylu pro jedno měření.

Novou metodu pro zkoumání navázání ligandů na proteiny představili Xie et al. (2008). Touto metodou je ultrafiltrační Ramanova diference (ultra-filtration Raman difference, UFRD). Využívá jak DCDR, tak ultrafiltrace a diferenční spektroskopie. Ultrafiltrace slouží k odstranění volných ligandů, které se nenavázaly na protein. Diferenční spektroskopii pak porovnáme naměřené spektrum se spektrem proteinu bez navázaných ligandů. Při pokusech použili 2,4-dinitrophenol a transhyretin. Tato metoda se však ukázala použitelná jen pro silně se vázající ligandy.

Moger et al. (2007) použili DCDR spektra pro srovnání se spektry získanými pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Měřili změnu spekter při fosforylaci peptidů obsahujících serin a tyrosin s počáteční koncentrací $100\text{ }\mu\text{M}$. Pozorované změny při fosforylaci byly ponejvíce shodné u obou metod, ačkoli SERS spektra byla selektivně zesílena. Autoři pozorovali rozdíly například u posunu pásu amidu III. Ten vysvětlují tím, že oba peptidy jsou v rozdílných strukturních

konformacích na koloidním povrchu a DCDR substrátu. Dále pro protein s tyrosinem u SERS nepozorovali změnu v pásu amidu I při fosforylaci na rozdíl od DCDR. Uvádějí, že navázání peptidu na koloidní povrch může „uzamknout“ sekundární strukturu, která se jinak při fosforylaci mění. SERS tedy prezentují jako rychlou komplementární metodu ke klasické Ramanově spektroskopii.

Das et al. (2008) se pokusili použít DCDR na SERS destičce s povrchem ze zlatých nanočástic. Nanočástice tvořily na povrchu destičky vzor, čehož dosáhli pomocí elektronového svazku a elektro-pokovování. Uvádějí, že tímto způsobem bychom mohli získat spektra myoglobinu až o koncentracích řádu attomolů. Ve své další práci se Das et al. (2009) pokusili na této destičce změřit strukturální změny různých proteinů (lysozym, ribonukleáza-B, hovězí sérový albumin a myoglobin) při teplotních změnách v rozmezí -65 až 90 °C. Při zpracování výsledků využili diferenční a 2D Ramanovu korelační analýzu. Na obrázku (Obr. 3.2.7) vidíme naměřená spektra pro lysozym při různých teplotách (a) a změnu intenzit vybraných pásů (b). V jejich následujícím článku [Das et al., 2011] využili opět stejnou podložku a demonstrovali schopnost určení hlavních komponent směsi proteinů na základě jejich sekundární struktury. Chyba měření touto metodou se ukázala přibližně 14 %. Použité koncentrace proteinů ($7 \mu\text{M}$) však odpovídají spíše DCDR než SERS metodě. Je tedy otázkou zda autoři opravdu pozorovali SERS spektra. Při dalším výzkumu SERS aktivních povrchů, je třeba vzít v potaz i efekty pozorované při DCDR, které vedou k nahuštění vzorku, a tudíž ke vzrůstu signálu.



Obr. 3.2.7: Měření teplotní závislosti lysozymu (a) spektra pro různé teploty, (b) závislost intenzit vybraných pásů na teplotě (Převzato z [Das et al., 2009].)

Pro studium nukleových kyselin jako první použili DCDR Pagba et al. (2011). Ve své práci zkoumali konformační změny kvadruplexů DNA vyvolaných změnou teploty. Pozorovali, že se zvyšující se teplotou DNA ztrácí strukturu kvadruplexu a dojde k nahrazení novou strukturou s výraznou konformací guaninu $C3'$ -endo. Autoři zjistili, že přidáním iontů K^+ dochází ke stabilizaci struktury kvadruplexu a k její ztrátě dojde až při vyšších teplotách. Dále změřili DCDR spektra různých konformací kvadruplexů. Pozorovali rozdíly, díky kterým by bylo možné rozlišit jednotlivé konformace kvadruplexů a určit jejich stabilitu.

4. Materiály a metody

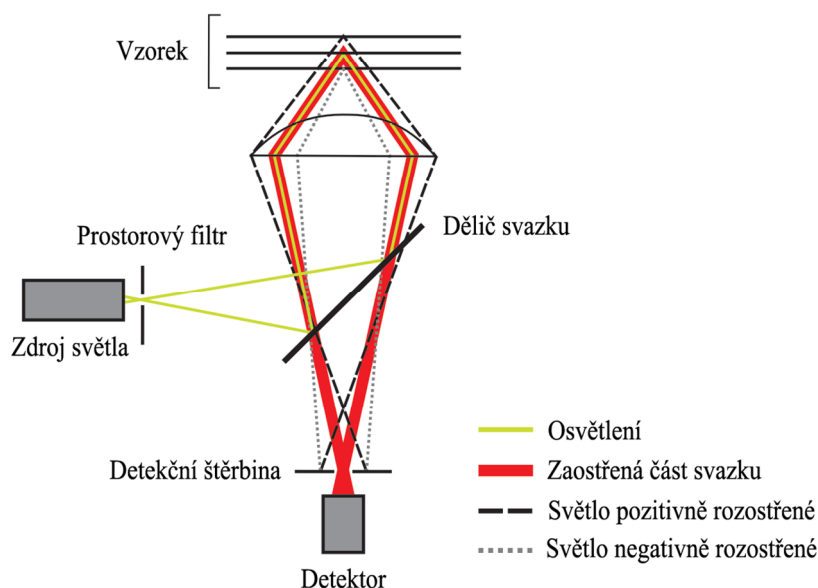
4.1. Vzorky

Pro měření byly použity synteticky připravené vzorky oligonukleotidů o délce dvanácti bází (VBC-Biotech, Vídeň), které byly přečištěné HPLC PAGE a následně dodané v lyofilizované formě. Vzorek označený jako *S1GGfos12* měl sekvenci 5'-TGGATATTAGGA-3' (m.w. 3724 g/mol, $T_m = 12,5$ °C) a komplementární vzorek označený *S2GGfos12* 5'-TCCTAATATCCA-3' (m.w. 3564 g/mol, $T_m = 12,5$ °C).

Dále byl pro porovnání použit komerčně dostupný vzorek DNA z lososích spermíí o délce 2000–3000 bází (*Pharmacia – Molecular Biology Division, No. 27–4561–01, Lot. OE614564*).

4.2. Konfokální mikroskop

U klasického mikroskopu pozorujeme světlo, které přichází z různých hloubek, respektive míst vzorku. Obraz se nám tedy jeví rozmazaný. Řešení tohoto problému představil M. Minsky v roce 1955 v podobě konfokálního mikroskopu [Minsky, 1988]. Principem konfokálního mikroskopu je vyloučení většiny světla ze vzorku, které nepřichází z ohniskové roviny mikroskopu. Vyloučením tohoto světla dostaneme obraz, který je ostřejší a má lepší kontrast [Semwogerere & Weeks, 2005]. Můžeme tedy také zkoumat trojrozměrnou strukturu vzorku. Nevýhodou konfokálního mikroskopu je však malé zorné pole. Schéma konfokálního mikroskopu je na (Obr. 4.2.1). Díky tzv. *konfokální štěrbině* dojde k propuštění světla pouze z části vzorku, na který je mikroskop zaostřen. Tato štěrбина je zaostřena na stejné místo a proto se tento mikroskop nazývá konfokální.



Obr. 4.2.1: Schéma konfokálního mikroskopu (Převzato z [Stefani, 2004].)

4.3. Integrovaný Ramanův systém HR800

Pro měření DCDR spekter byl použit LabRam HR800 (Horiba Jobin-Yvon). Jde o integrovaný Ramanův systém, který využívá uspořádání pro měření Ramanova signálu ve zpětném rozptylu.

4.3.1. Základní komponenty experimentální sestavy HR800

Systém umožňuje připojit prakticky jakýkoli externí laser s vlnovou délkou 440–800 nm. Vstup pro externí laser je v zadní části systému. Při měření byl použit helium-neonový laser s výkonem 20 mW a vlnovou délkou 632,8 nm. Pro odfiltrování elasticky rozptýleného záření je v přístroji Notch filtr. Jedná se o holografickou mřížku specifickou pro jednu vlnovou délku, kterou totálně odráží a ostatní vlnové délky propouští. Konfokální štěrbina mikroskopu je nastavitelná v rozsahu 0–1000 μm a v našem případě jsme užívali 400 μm .

V systému je použit mikroskop BX40 od firmy Olympus. Zaostřování je možné po 1 μm . Dostupné objektivy byly 5 \times (NA 0,1), 10 \times (NA 0,25), 50 \times (NA 0,7) a 100 \times (NA 0,9). Kde NA značí numerickou aperturu, pro kterou platí $NA = n \cdot \sin \alpha$, n je index lomu čočky (objektivu) a α sběrný prostorový úhel. Při měření DCDR spekter jsme použili 50 \times (NA 0,7) objektiv.

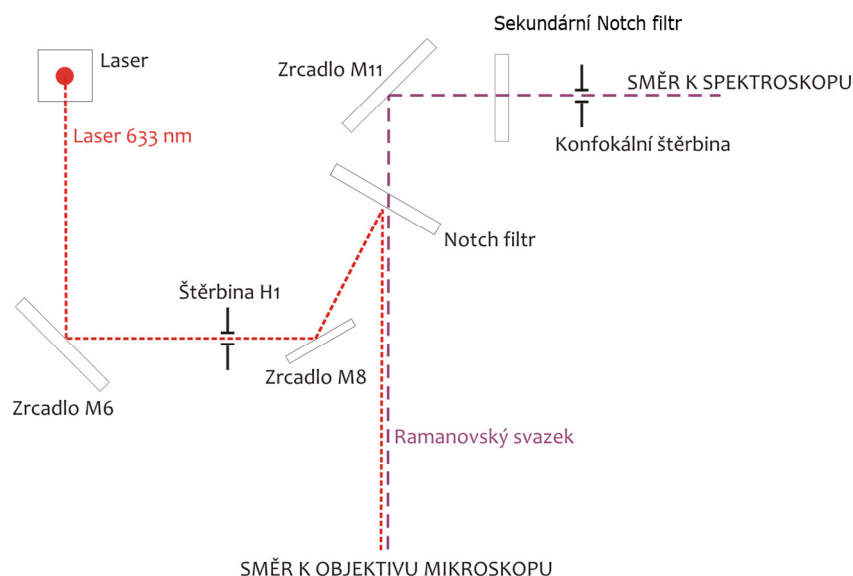
Jako spektrograf byl použit spektrograf s asymetrickou montáží Czerny Turner, která dává rovnoměrné rozložení intenzit na výstupu. Ohnisková vzdálenost je 800 mm. K dispozici jsou dvě mřížky. Standardní s 1800 vrypů/mm a druhá s 600 vrypů/mm, kterou jsme použili při měření. Spektrograf obsahuje vnitřní diodu, která nám spolu se standardní mřížkou umožňuje připravit vhodné nastavení konfokální štěrbinu a laserového svazku. Rozlišení spektrografu závisí na velikosti štěrbinu a jejího zobrazení na CCD detektor (v našem případě při nastavení štěrbinu na 100 μm činilo zhruba $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$). Přístroj byl před každým měřením kalibrován na spektrální čáru křemíku 520,7 cm^{-1} .

Měření jednotlivých spekter bylo prováděno s expoziční dobou 10 sekund a počtem akumulací 60. Vzorek byl před měřením během použitým laserem po dobu ~ 10 minut. Při měření map byla expoziční doba 10 sekund a počet akumulací 12 pro každé spektrum.

Pro pohyb se vzorkem a měření map byl použit mechanický stolek s mikroposuvem s přesností najetí 0,5 μm .

4.3.2. Zjednodušený popis optické dráhy laserového svazku

Laserový svazek je nejdříve zaostřen a štěrbinu H1, která určuje aperturu svazku před vstupem do mikroskopu (Obr. 4.3.2.1). Po průchodu štěrbinou je laserový svazek odražen systémem LIRS (laser injection rejection system). Ten se skládá ze zrcadla M8 a Notch filtru a umožňuje měnit úhel, pod kterým svazek dopadá na Notch filtr. Pokud je úhel nastaven vhodně, laserový paprsek se odráží od Notch filtru směrem k objektivu mikroskopu. Fluorescenční a odražené záření vzniklé Rayleighovým a Ramanovým rozptylem putují stejnou cestou k Notch filtru. Ten odráží záření rozptýlené Rayleighovým rozptylem a zbytek nechá projít.



Obr. 4.3.2.1: Zjednodušené schéma integrovaného Ramanova systému HR800 (Převzato z [Šípová 2006].)

Svazek putuje ke konfokální štěrbině, před kterou je další Notch filtr pro lepší odfiltrování Rayleighovsky rozptýleného světla. Obraz konfokální štěrbininy jde do spektrometru, který zde představuje mřížka a CCD (Charge-coupled device) detektor.

4.4. Podložky SpectRIM™

Při měření byly použity substráty SpectRIM™ vyrobené firmou Tienta Sciences. Podložka se skládá z plastové destičky velikosti $2,54 \times 7,62$ cm a na ní je jako substrát umístěna nerezová destička o velikosti $2,27 \times 2,27$ cm, pokrytá vrstvou teflonu tloušťky 50 nm.

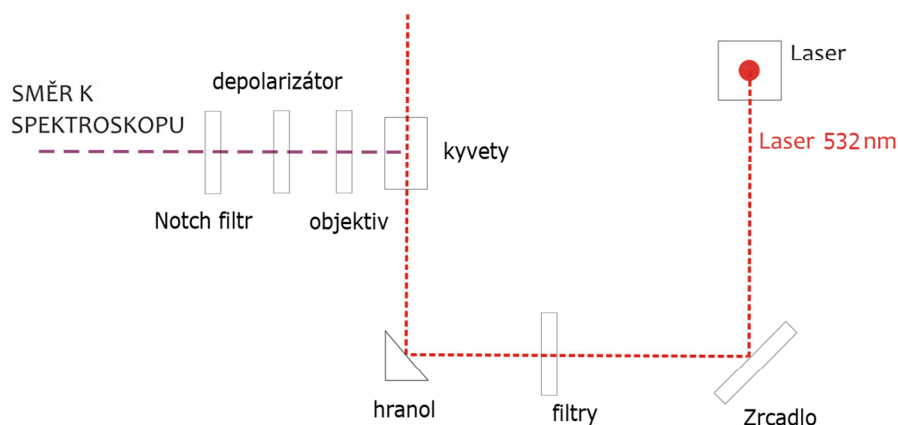
Podložka SpectRIM™ plně vyhovuje výše zmíněným podmínkám formulovaným v Zhang et al. (2003), viz kapitola 3.1. Je tepelně i chemicky odolná, má nízkou optickou absorpenci, vysokou odrazivost, slabý Ramanův signál a je nesmáčivá díky vrstvě teflonu.



Obr. 4.4.1: Podložka SpectRIM™

4.5. Systém pro makroskopické měření Ramanova rozptylu

Pro měření kapalných vzorků byl využit systém pro makroskopická měření, který byl sestaven na Fyzikálním ústavu MFF UK. Jako laser byl použit diodami čerpaný Nd:YAG Verdi (Coherent) s výstupní frekvencí 532 nm. Při měření byl nastaven výkon 0,8 W na výstupu laseru. Po průchodu optickým systémem poklesl výkon na vzorku na 0,5 W. Přičemž, svazek laseru byl nejdříve odražen zrcadlem (Obr. 4.5.1), za nímž mohou být umístěny filtry. Dále je svazek odražen hranolem vertikálně do držáku, v němž byla umístěna válcová mikrokvyeta se vzorkem o objemu 5 μ l. Část laserového svazku, která se rozptýlila kolmo k dopadajícímu záření, byla sebrána objektivem a putovala skrze depolarizátor a holografický Super Notch-PlusTM (Kaiser) filtr, který potlačí Rayleighův rozptyl, do spektrografu SPEX 270 (Jobin-Yvon). Pro každý vzorek byla změřena tři spektra s expoziční dobou 2 sekundy a počtem akumulací 300. Bělení vzorku bylo prováděno stejným laserem po dobu ~30 min.



Obr. 4.5.1: Zjednodušené schéma systému pro makroskopické měření Ramanova rozptylu.

4.6. Faktorová analýza

Pro zpracování naměřených spekter a map byla použita analýza hlavních komponent (PCA). Tato metoda nám umožňuje nalézt nové proměnné, které lépe popisují variabilitu systému a tím ve výsledku snížit dimenzi problému, pokud je to možné [Wall et al., 2003]. V našem případě jsou původními proměnnými naměřená spektra. Rozložení této báze spekter do báze nové, ortogonální, je možné pomocí metody singulárního rozkladu (singular value decomposition – SVD). Nová báze spektra nazýváme faktory.

Nechť máme naměřených n spekter o m bodech. Uspořádáme je do matice \mathbf{X} velikosti $m \times n$. Zřejmě $m > n$ pro náš případ a v matematické definici to můžeme bez újmy na obecnosti předpokládat. Rovnice pro SVD rozklad je následující

$$\mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T \quad (4.6.1)$$

kde \mathbf{U} je $m \times n$ matice, jejíž sloupce tvoří ortonormální bázi. \mathbf{V}^T je matice $n \times n$ a její řádky tvoří ortonormální bázi. Matice \mathbf{S} je diagonální matice $n \times n$ [Wall et al., 2003]. Hodnoty matice \mathbf{S} na diagonále se nazývají *singulární čísla* a jsou nezáporná. Počet nezáporných singulárních čísel je roven hodnotě matice \mathbf{X} . Takovýto rozklad avšak ještě není jednoznačný. Jednoznačnosti dosáhneme podmínkou $s_i > s_j$ pro všechny $i > j$, kde s_i jsou singulární čísla. Tedy seřazením singulárních čísel podle velikosti.

Matice \mathbf{U} se nazývá *maticí faktorů*, jelikož její sloupce tvoří nové báze vektory. \mathbf{S} nazýváme *maticí singulárních čísel* a \mathbf{V} *maticí koeficientů*, jelikož v jejích sloupcích jsou souřadnice původních spekter v nové bázi [Klener, 2011]. Zpětně můžeme vyjádřit původní spektra v nové bázi vztahem

$$\mathbf{x}_j = \sum_{i=1}^n v_{ij} s_i \mathbf{u}_i \quad (4.6.2)$$

kde \mathbf{x}_j je původní spektrum, v_{ij} prvky matice \mathbf{V} a \mathbf{u}_i faktory z matice \mathbf{U} . Jelikož jsou vektory \mathbf{v}_i a \mathbf{u}_i normovány na jedničku, podíl, jakým se faktory podílejí na vytváření původního spektra, určují singulární čísla. Ty jsou seřazena sestupně, a proto se můžeme omezit na částečnou sumu

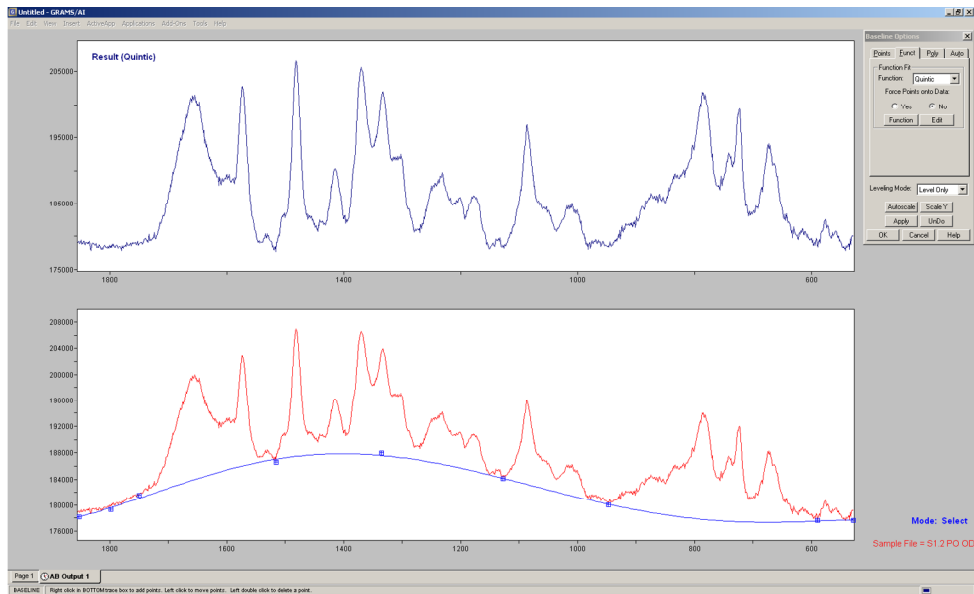
$$\mathbf{x}_j \approx \sum_{i=1}^r v_{ij} s_i \mathbf{u}_i \quad (4.6.3)$$

kde $r < n$. Číslo r určuje hranici, kdy příspěvky od dalších faktorů jsou zanedbatelné. Takováto hranice se obvykle určí podle průběhu singulárních čísel. Pokud při přidávání dalších faktorů klesají hodnoty singulárních čísel lineárně, odpovídá to přidávání informací stejné váhy a tedy nejspíše šumu [Klener, 2011].

4.7. Zpracování dat

Naměřené DCDR spektra byla nejprve upravena v programu GRAMS/AI (Galactic Industries), kde bylo od naměřených spekter odečteno pozadí (v podobě polynomu druhého až třetího stupně) a spektra byla posunuta na nulovou hodnotu. Následně byla spektra normalizována na pás vibrace fosfátové skupiny PO_4^{2-} na 1095 cm^{-1} . Intenzita tohoto pásu nemění s konformací DNA, a proto je často využíván k normalizaci jejích spekter [Thomas et al., 1995]. Pokud nebyl tento pás pozorován, byla normalizace provedena na stejnou velikost šumu. Takovéto případy nastaly, když naměřené spektrum odpovídalo hlavně příměsím ve vzorku a DNA nebyla pozorovatelná. Poté byla na spektrech provedena faktorová analýza (viz kapitola 4.6) pomocí programu napsaného doc. Jiřím Bokem (Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze).

Změřená Ramanova spektra z roztoku byla zpracována rovněž v programu GRAMS/AI (Galactic Industries). S ohledem na vyšší fluorescenční pozadí u měřených spekter, bylo třeba nejprve odečíst lineární závislost proloženou mezi prvním a posledním bodem spektra. Teprve poté bylo spektrum vody odečteno od spektra nukleové kyseliny. Následně bylo odečteno zbytkové fluorescenční pozadí ve tvaru polynomu pátého stupně, který byl definován arbitrárními body umístěnými ve spektru do oblastí, kde by měl být nulový signál od nukleové kyseliny (Obr. 4.7.1). Nakonec byl ještě odečten (marginální) příspěvek skla, jenž tvořilo mikrokvetu.



Obr. 4.7.1: Odečtení pozadí ve tvaru polynomu pátého stupně.

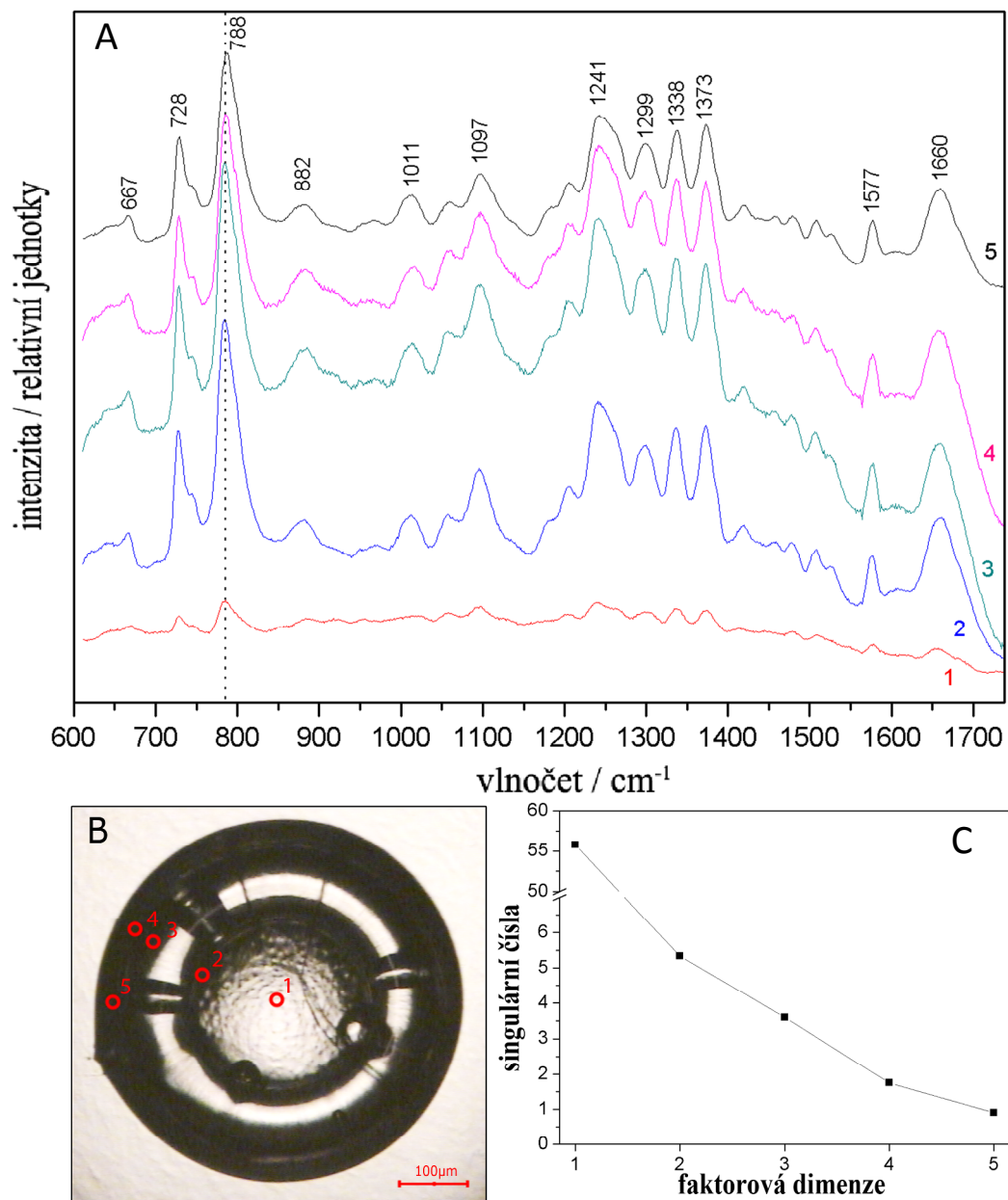
5. Měření nukleových kyselin

V první části měření jsme se zaměřili na proměření různých koncentrací DNA rozpuštěné v deionizované vodě metodou DCDR za účelem určení koncentračního limitu, kdy je tato metoda použitelná. Pozorovali jsme, jestli se vytvoří kroužek a celkovou homogenitu usazení DNA po vyschnutí kapky.

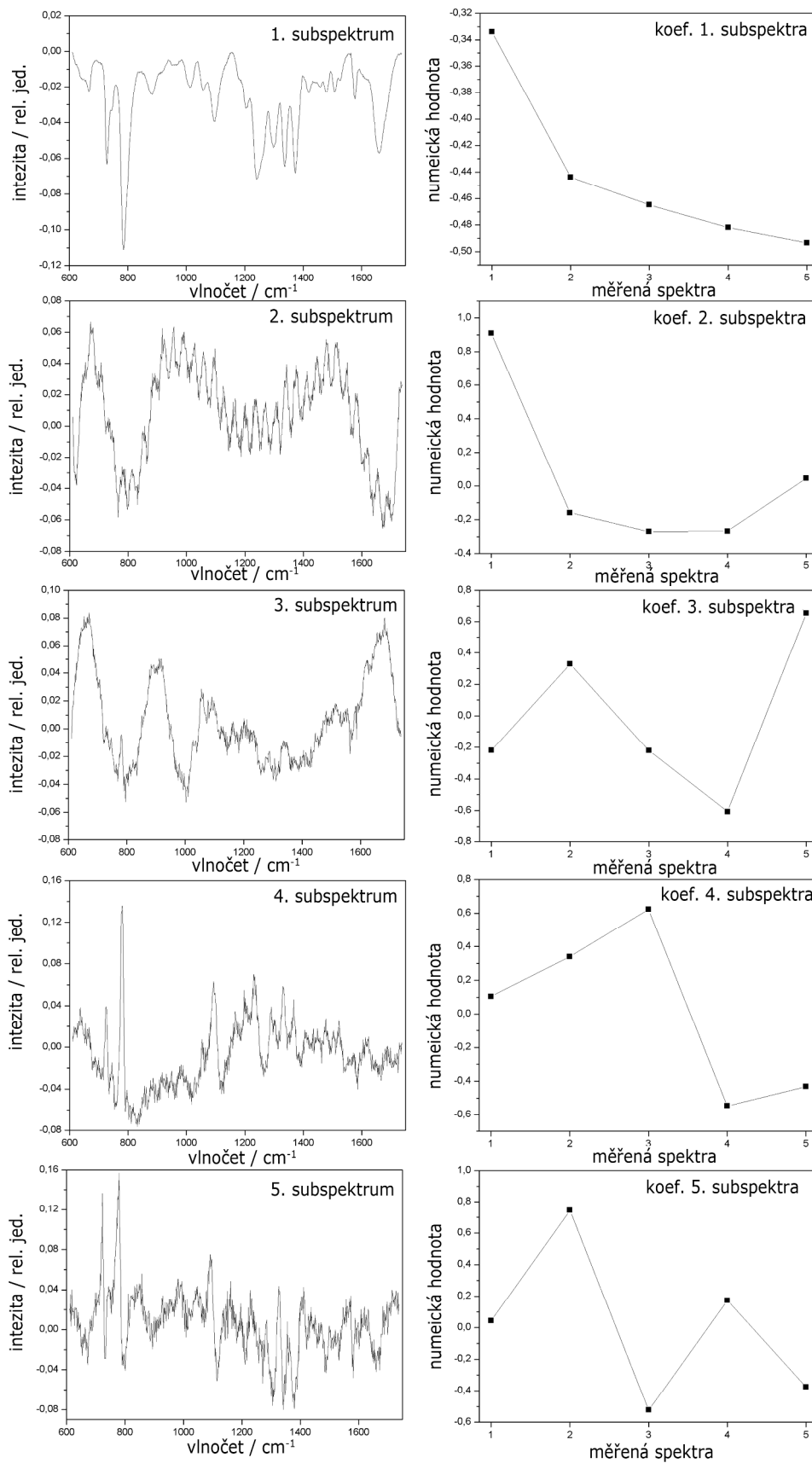
Pro tuto první část jsme použili synteticky připravený vzorek DNA S2GGfos12. Připravili jsme roztok této DNA s deionizovanou vodou v koncentracích: 5 mM, 0,5 mM, 50 μ M, 5 μ M, 0,5 μ M, 50 nM a 5 nM na oligonukleotid. Nanesli jsme 2 μ l roztoku na destičku SpectRIMTM a ponechali vyschnout za běžných podmínek. Kapka obvykle vyschla do jedné hodiny. Po vyschnutí jsme pořídili fotografie kapky Ramanovým mikroskopem (popsaným v kapitole 4.3) a naměřili několik spekter z různých míst kapky. Získaná spektra jsou na obrázcích 5.1–5.12. Barevně vyznačená DCDR spektra mají pouze posunutou nulovou hodnotu. Na fotografiích kapky jsou vyznačená místa, kde byla spektra snímána. Dále jsou uvedena singulární čísla, subspektra a jejich koeficienty faktorové analýzy (viz. kapitola 4.6), která byla užita za účelem odhalení nehomogenit v deponovaném DCDR vzorku, respektive změřených Ramanových spektrech.

I přes svůj tvar je rozložení DNA ve vyschlé kapce vzorku s koncentrací 5 mM (Obr. 5.1) celkem homogenní. Uprostřed kapky je koncentrace DNA nižší. Vzorek je na tmavém okraji (Obr. 5.1 B) poměrně vysoký a usadila se zde většina fluorescenčních nečistot, které však byly přítomny v celém vzorku. Hlavně ve druhém subspektru na obrázku 5.2 můžeme pozorovat periodicky se opakující obraz. Ten pravděpodobně pochází z interferencí z jiných měřících zařízení a bohužel se často prokládal do našich měření, lze jej tedy pozorovat i v ostatních měřeních.

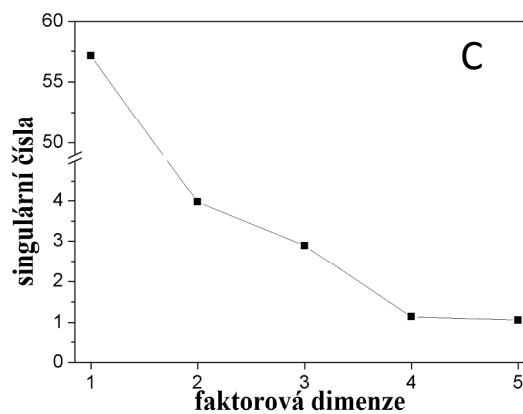
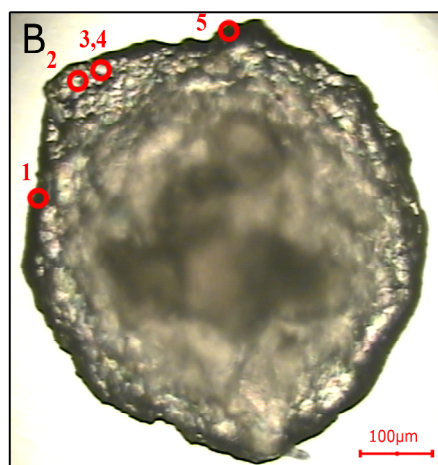
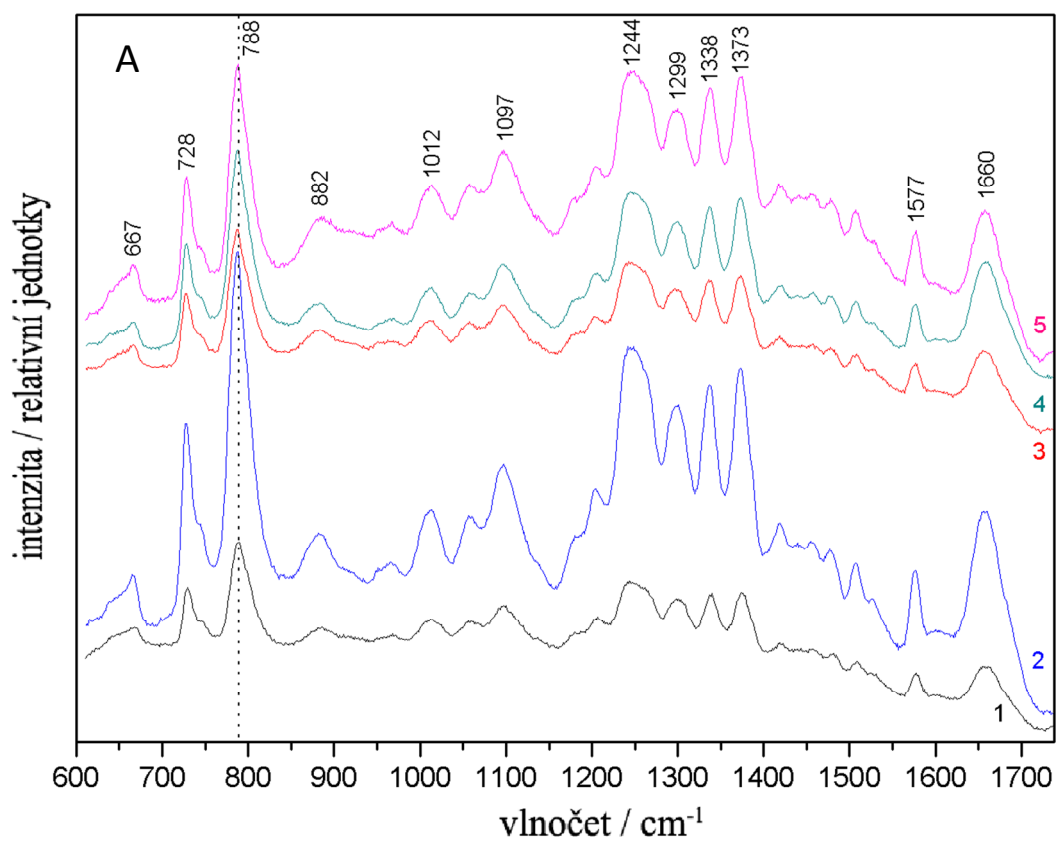
Při koncentraci 0,5 mM (Obr. 5.3) měl změřený vzorek opět výrazný výškový profil. Nejvyšší je pak vyschlá kapka uprostřed, kde bylo také koncentrováno nejvíce nečistot. I přes bělení ~20 minut se mi nepodařilo získat spektrum ničeho jiného, než nečistot a proto jsem naměřil spektra na okraji kapky. Tam byla fluorescence také, ale v menší míře. Při měření se zdálo, že usazená DNA sedí na povrchu kapky. Ale pro bližší prozkoumání by bylo potřeba provést více měření v různých vrstvách vzorku. Vzorek na obrázku 5.5 má koncentraci již stokrát nižší (50 μ M), než první měřená kapka. Zřejmě proto nemá tak výrazný výškový profil. Koncentrace DNA na kapce podle (Obr. 5.5 A) závisí na místě měření, ale usazeniny netvoří kroužek. Část nečistot vytvořila krystalky citlivé na laserový paprsek (docházelo k fotopoškození). Při koncentraci 5 μ M se kapka začala při vysychání rozpadat. Třetí spektrum (Obr. 5.7) bylo naměřeno na světlé části kapky a odpovídá téměř čisté destičce s přítomností malého množství nečistot. Na spektrech vzorku o koncentraci 0,5 μ M (Obr. 5.9) můžeme stále pozorovat typické spektrum nukleových kyselin. Páté spektrum bylo vyřazeno ze zpracování faktorovou analýzou, jelikož pásy 718 cm^{-1} a 1053 cm^{-1} jsou s největší pravděpodobností způsobeny průletem kosmického záření. Vzrůstající intenzitu pásů na 860 cm^{-1} a 994 cm^{-1} připisují nečistotám ve vzorku, protože jsou výrazné i při měření následující kapky s koncentrací 50 nM (Obr. 5.11), kde hlavní roli hrají již příměsi. Kapka s koncentrací 50 nM neudržela při vysychání poloměr a rozpadla se. Naměřil jsem tři spektra, ale ta jsou nepodobná spektrum nukleových kyselin. To platí i pro měření následující kapky na obrázku 5.13.



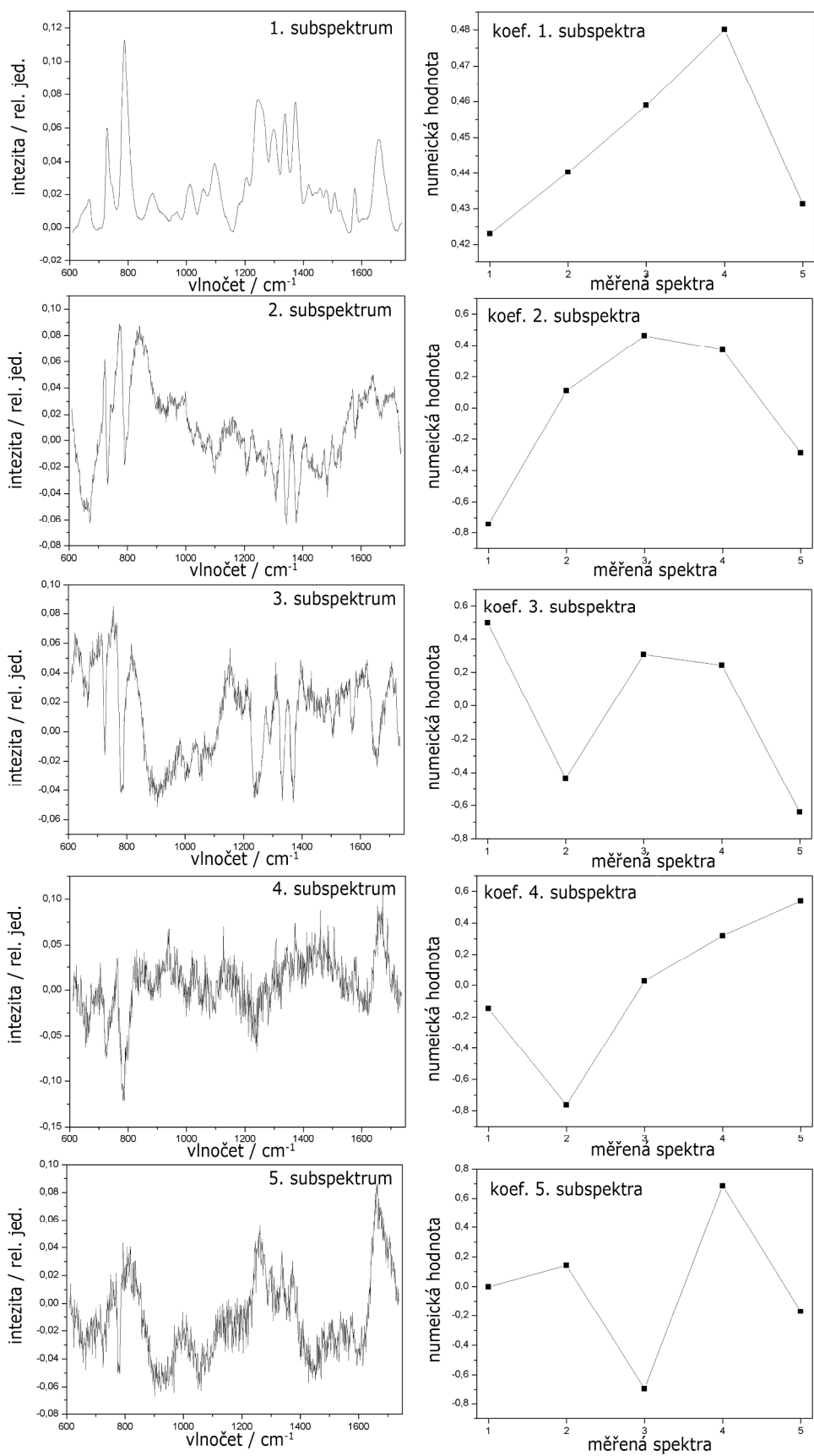
Obr. 5.1: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 5 mM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



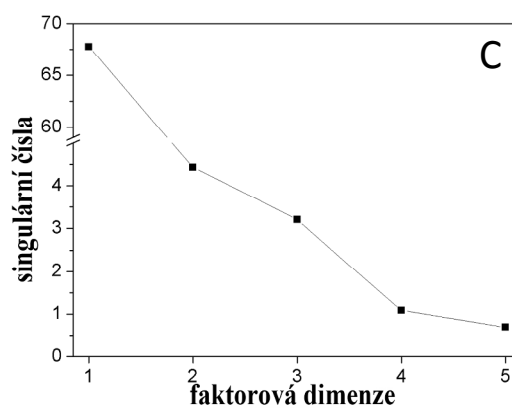
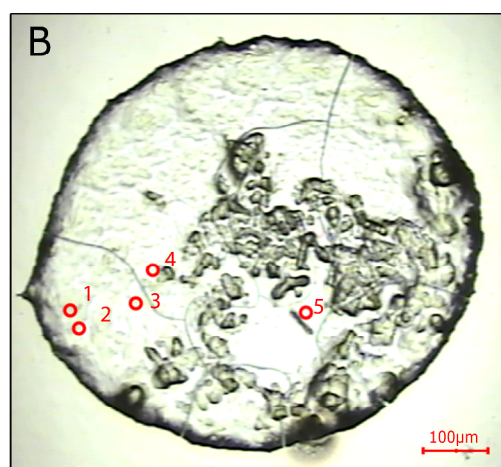
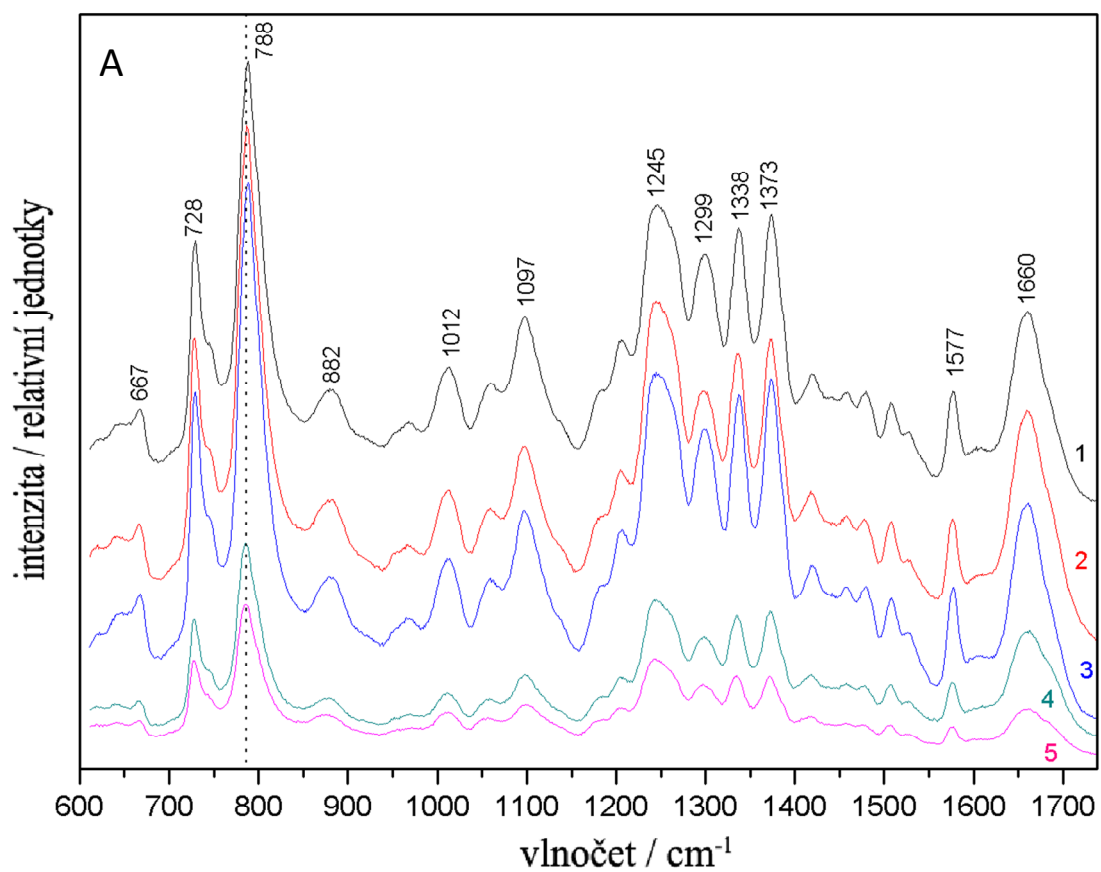
Obr. 5.2: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 5 mM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



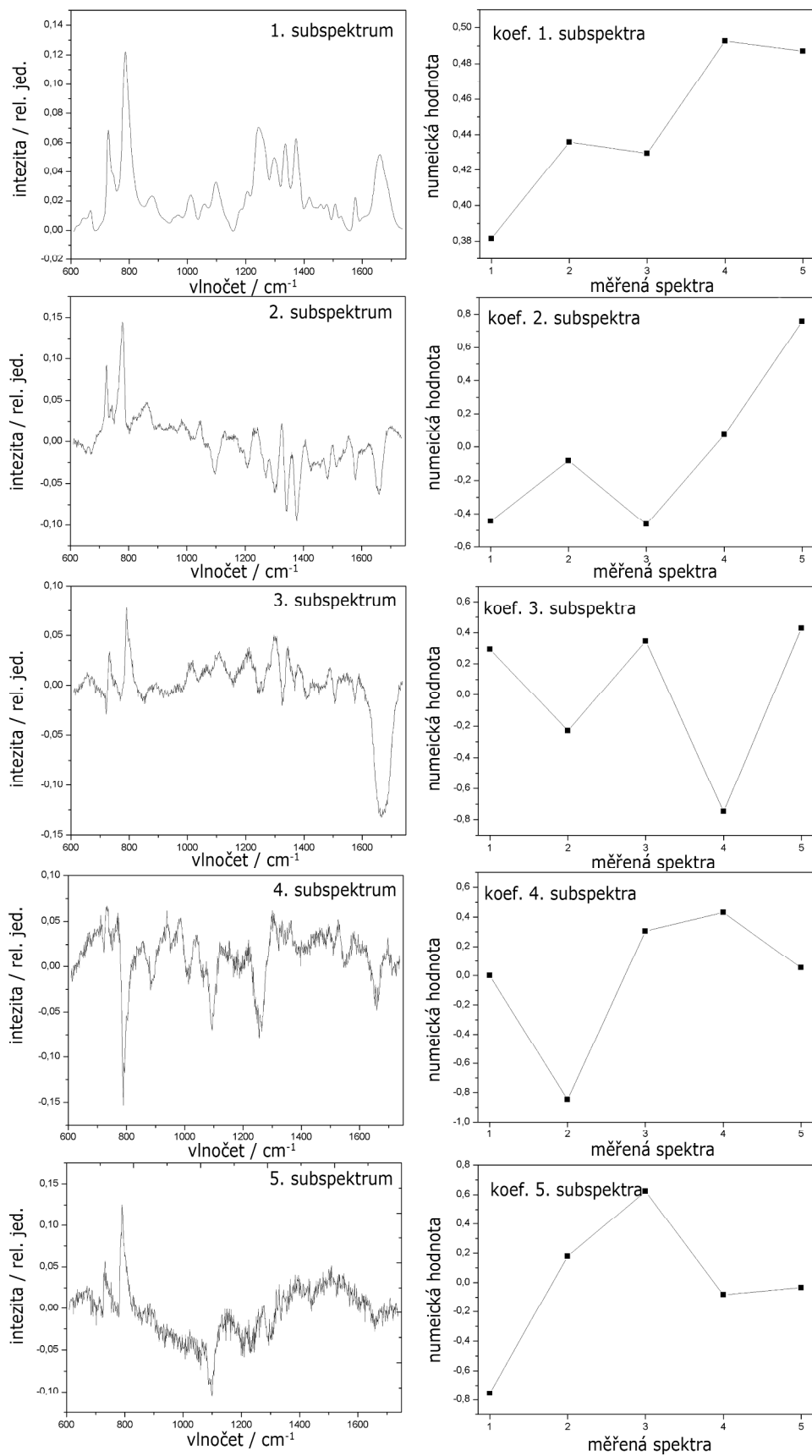
Obr. 5.3: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 0,5 mM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



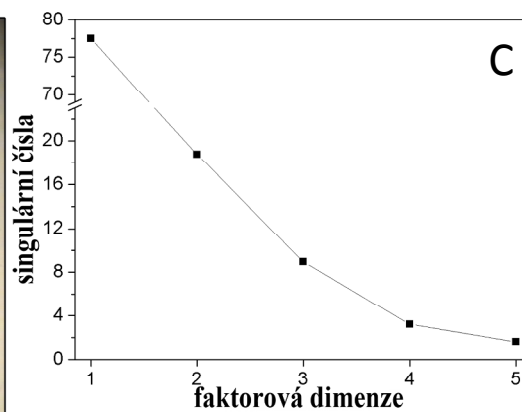
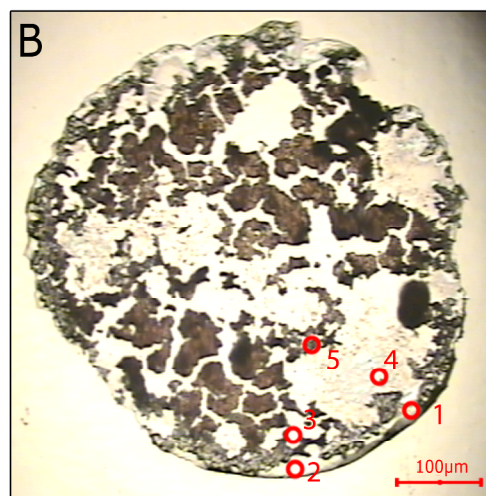
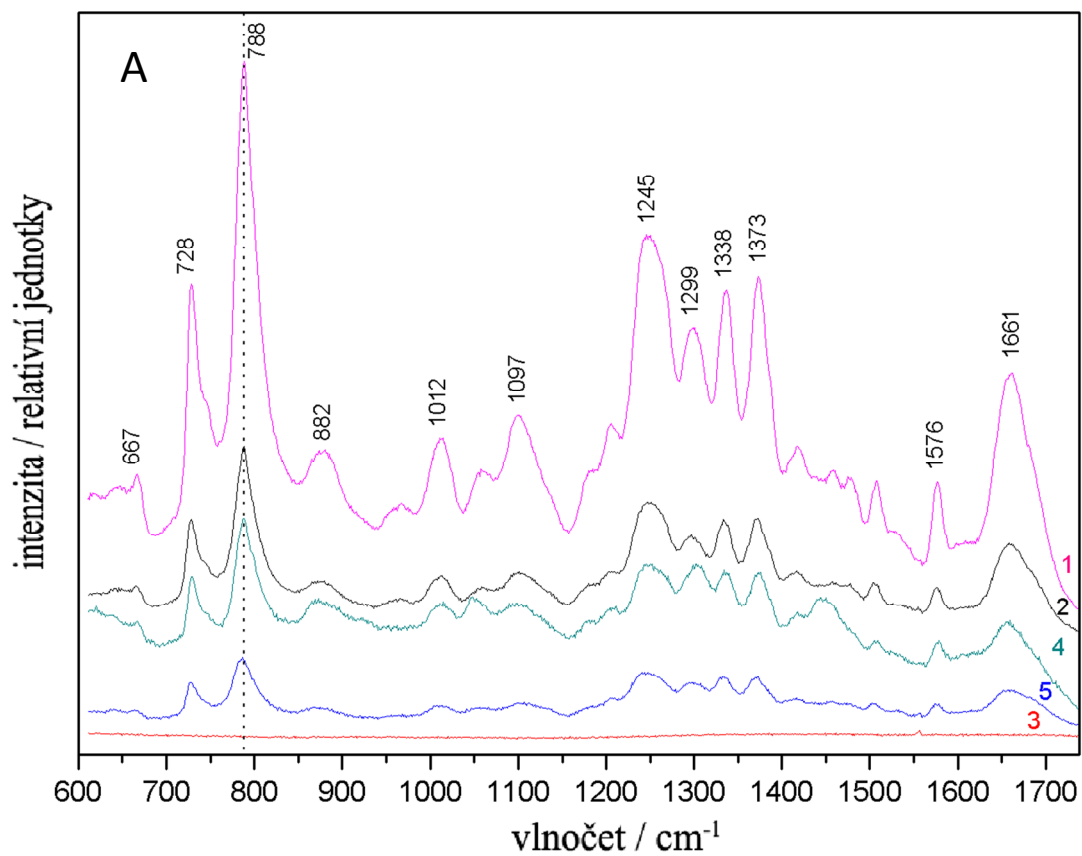
Obr. 5.4: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 0,5 mM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



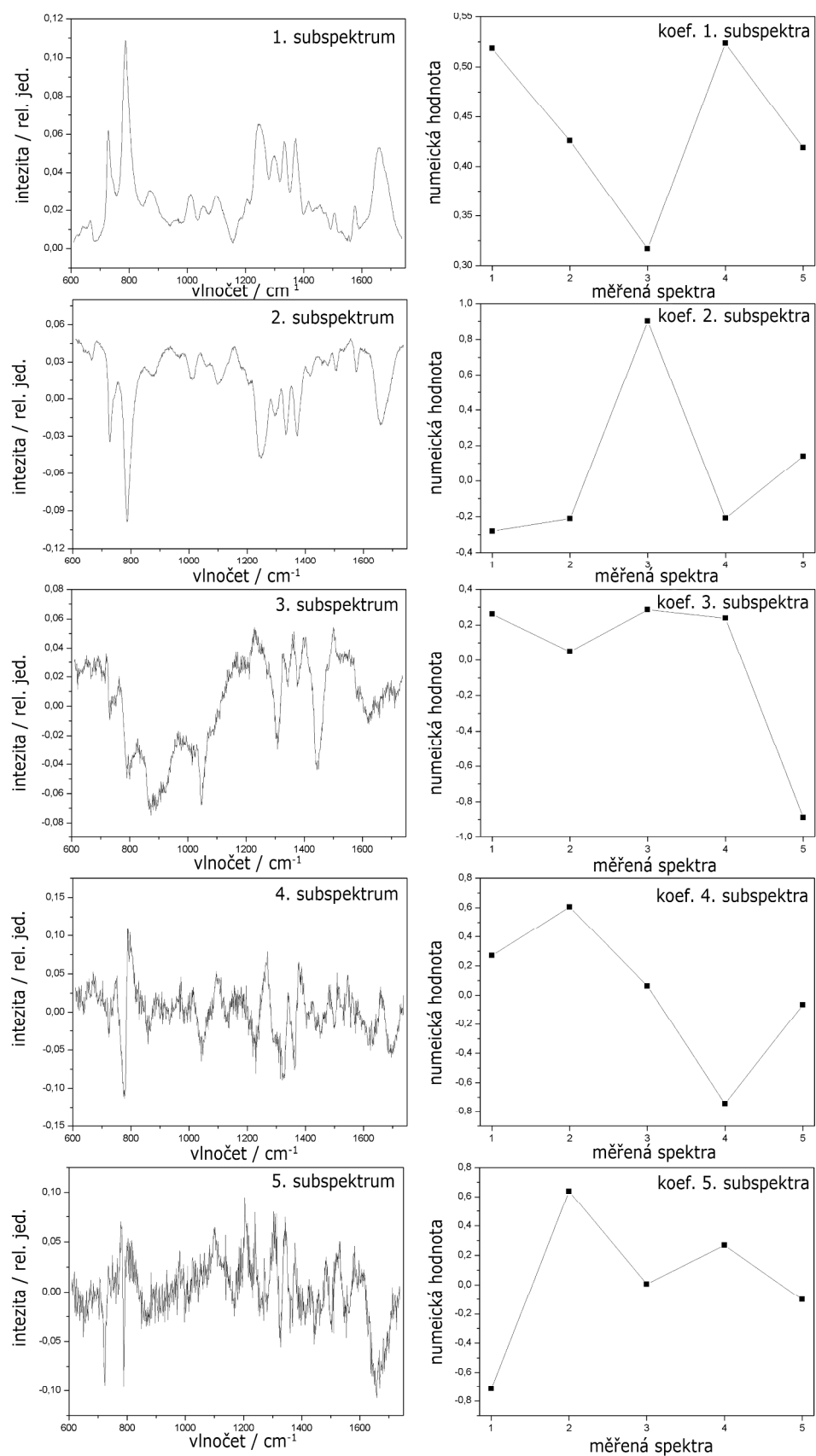
Obr. 5.5: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 50 μM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



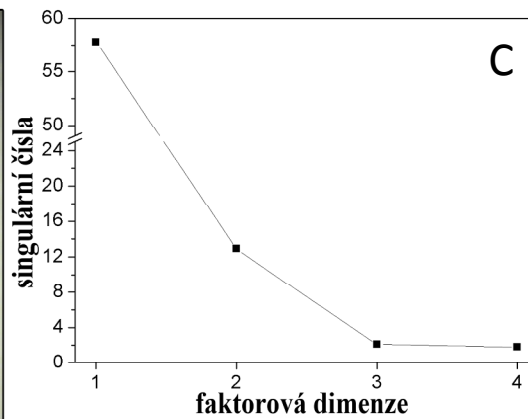
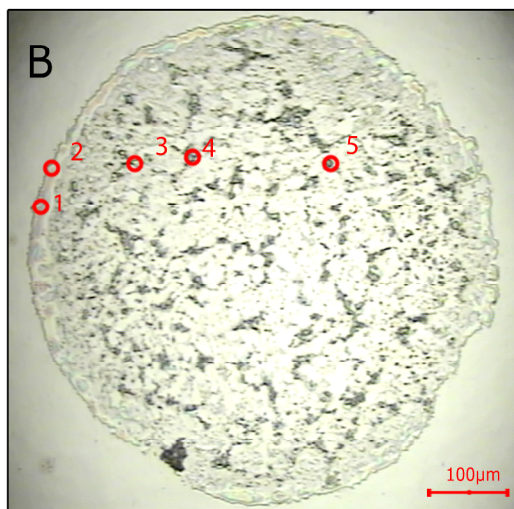
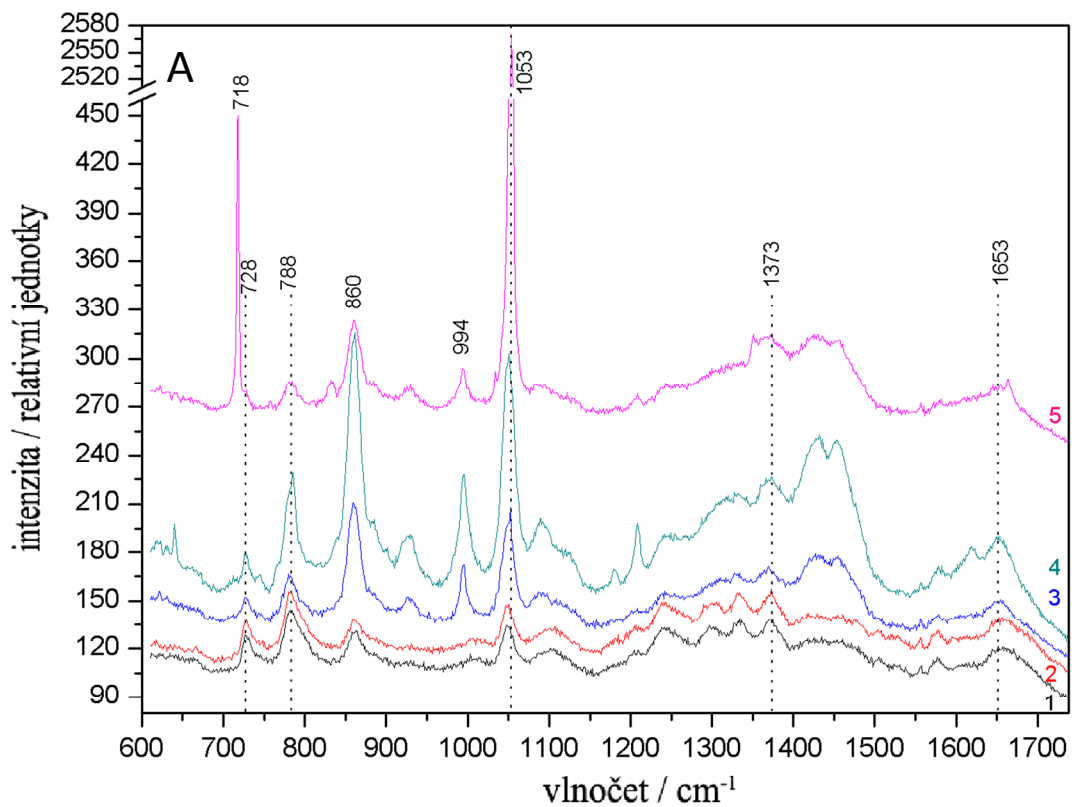
Obr. 5.6: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 50 μM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



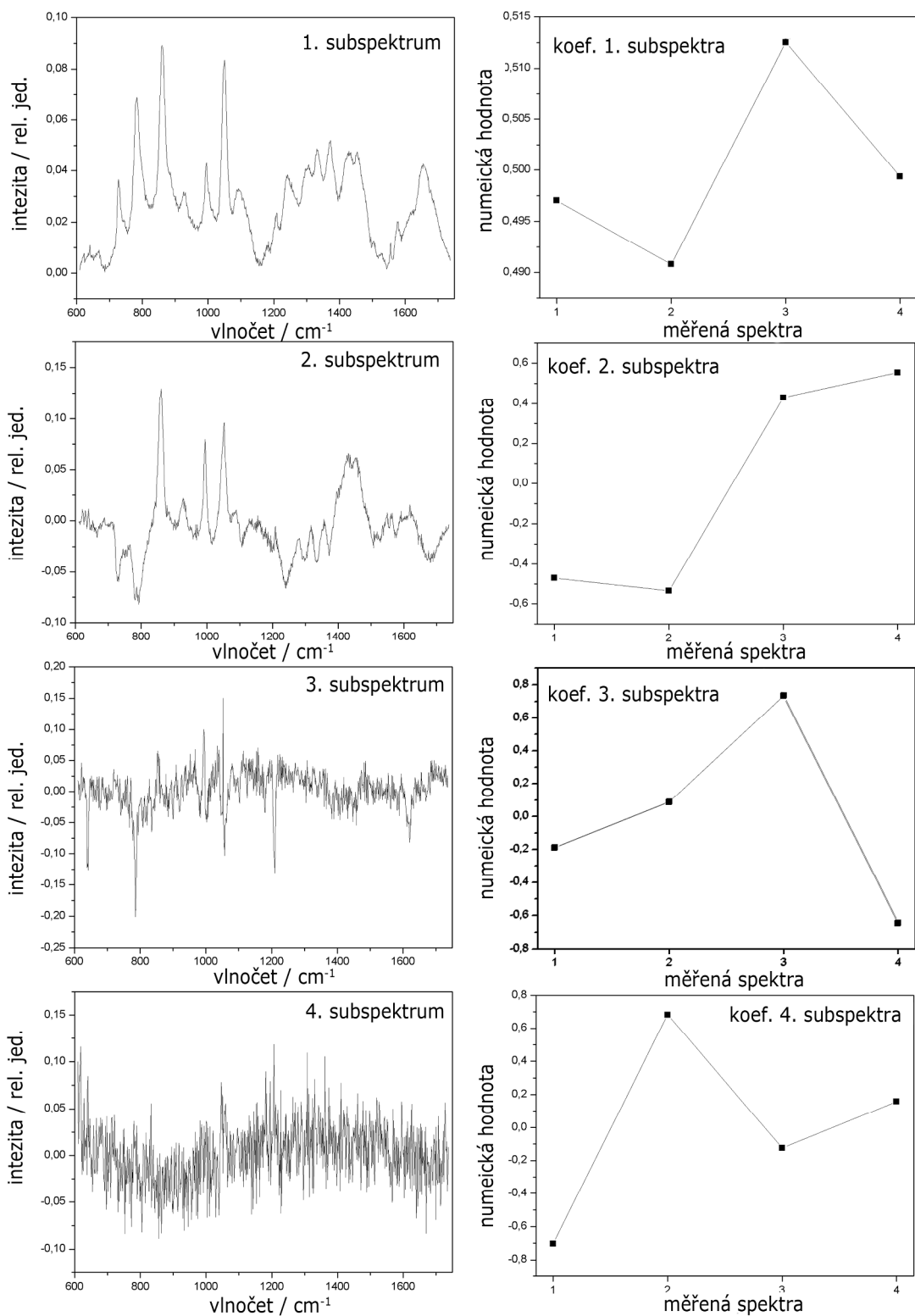
Obr. 5.7: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 5 μM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



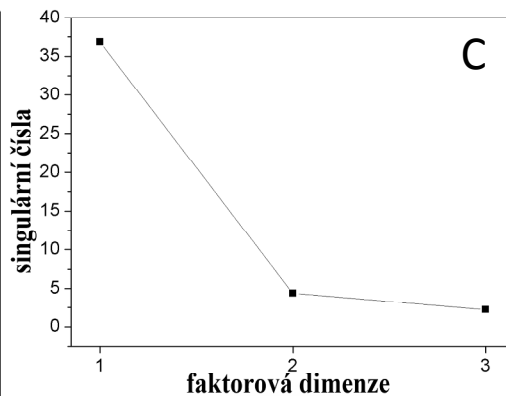
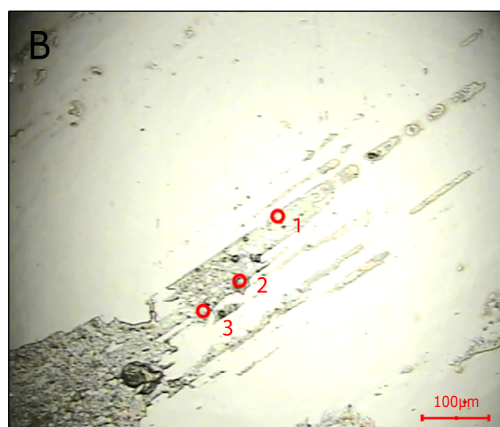
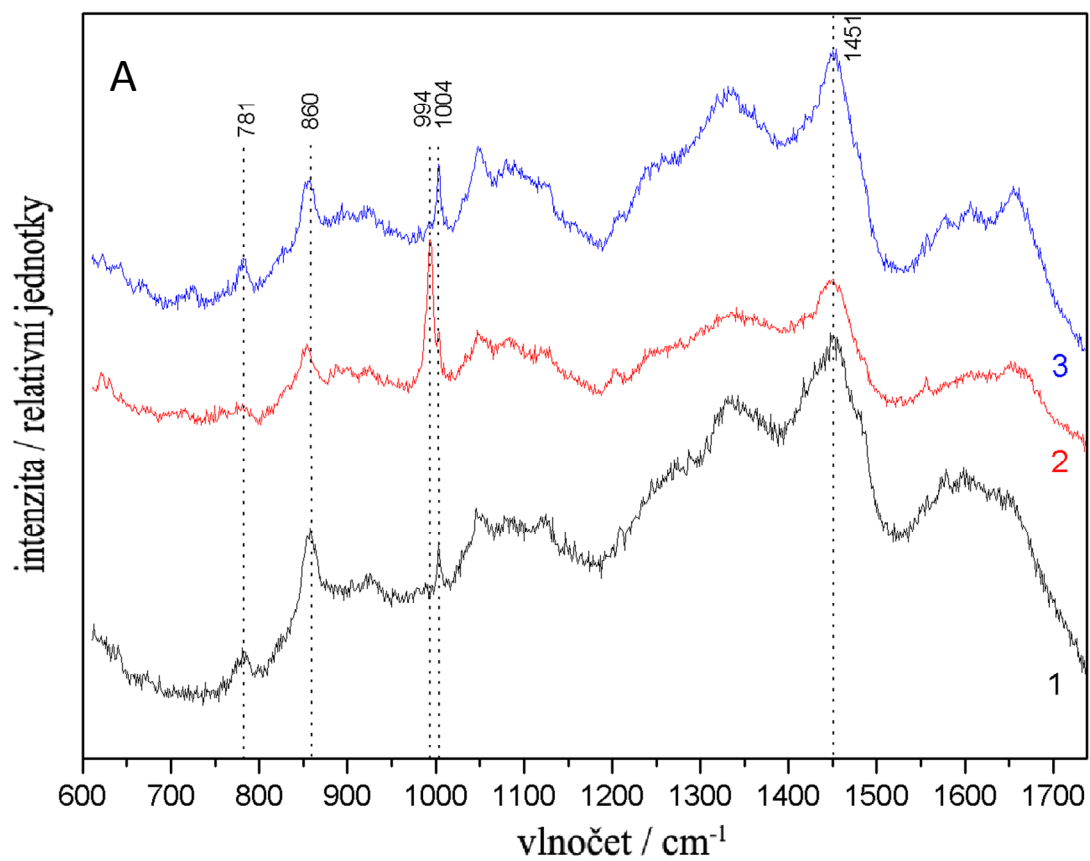
Obr. 5.8: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 5 μM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



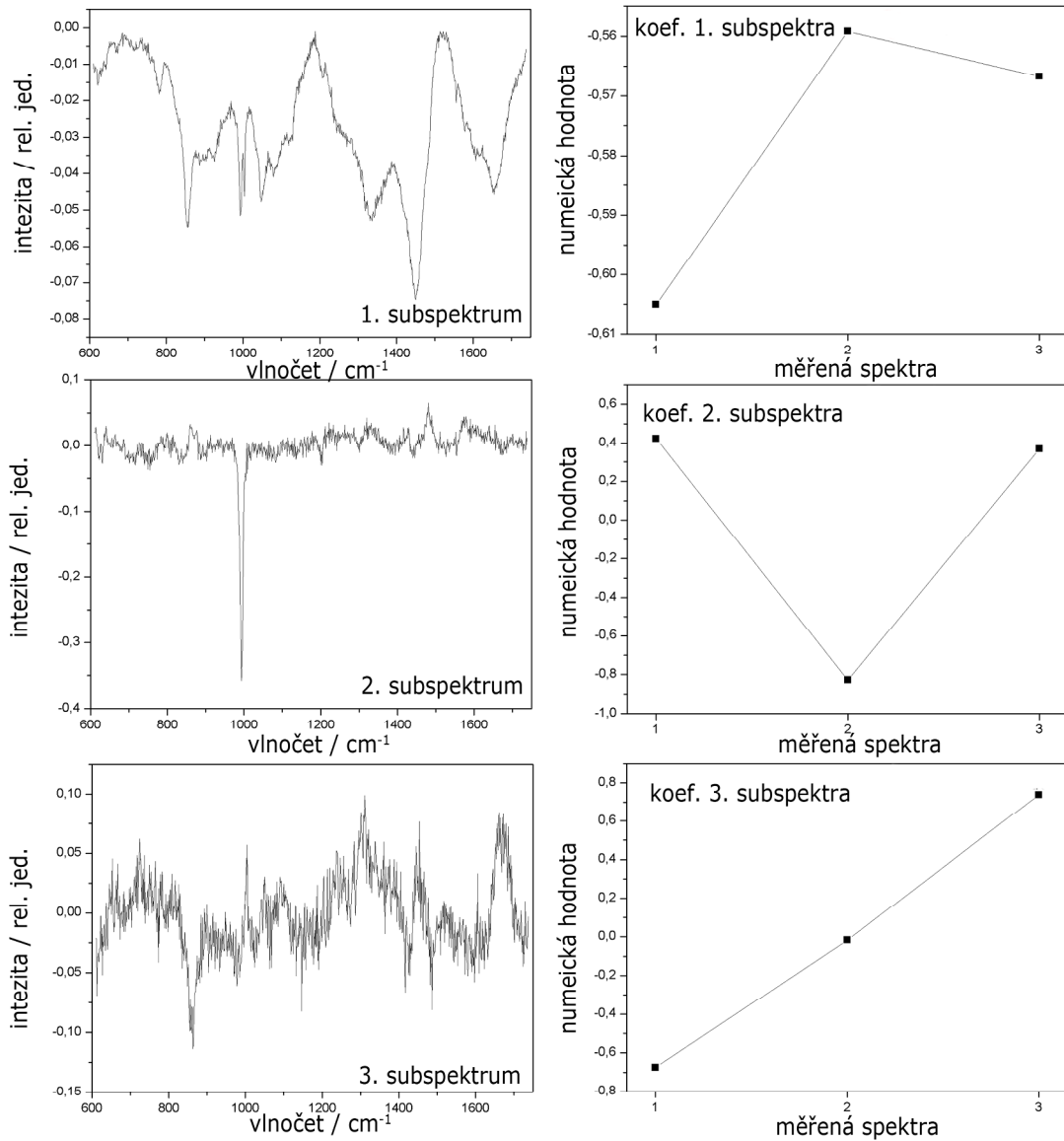
Obr. 5.9: DCDR vzorek *S2GGfos12* (koncentrace $0,5 \mu\text{M}$). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



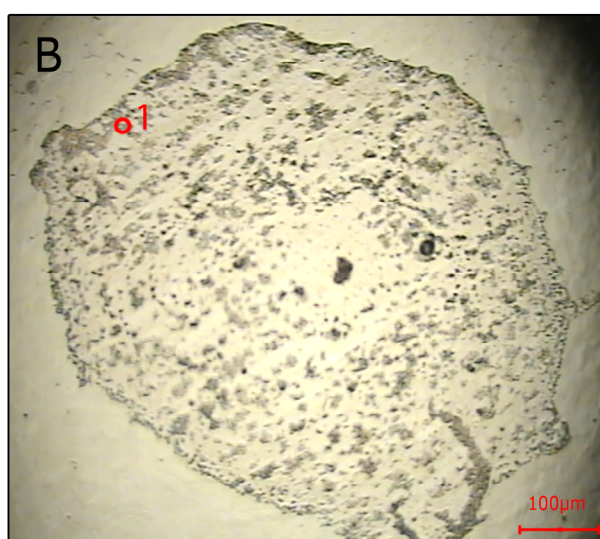
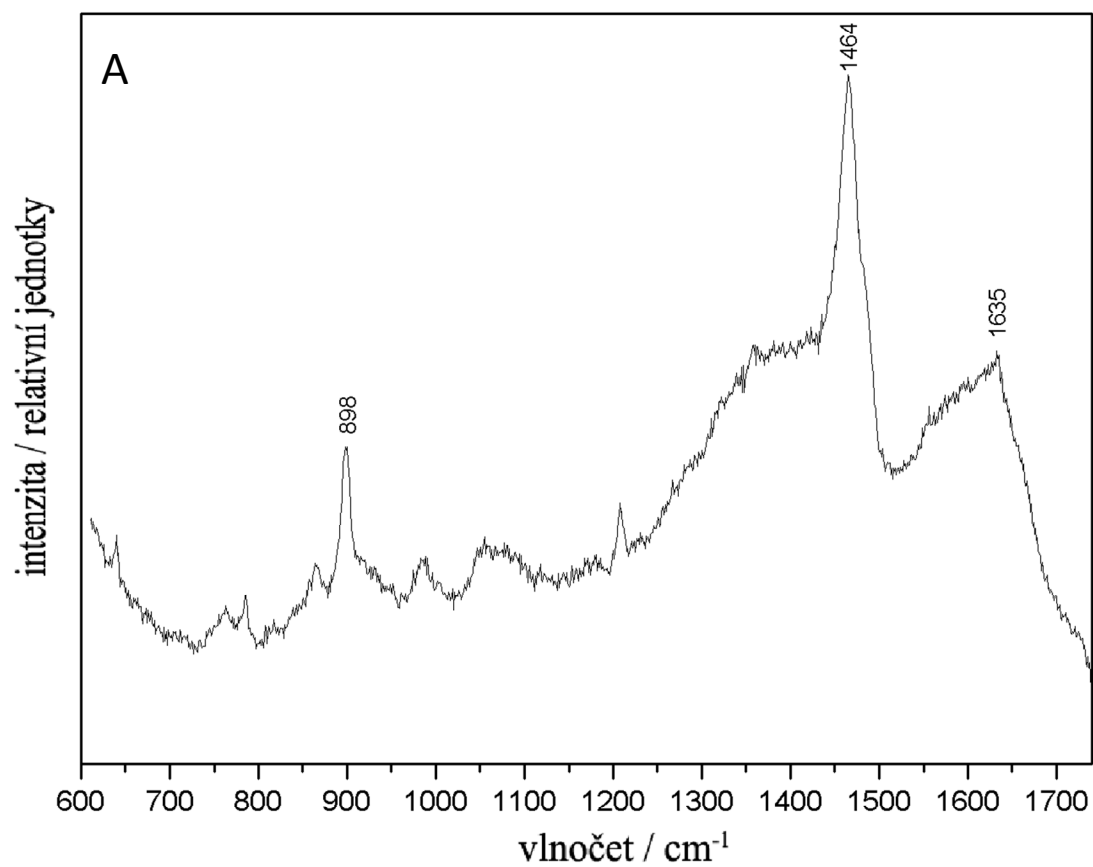
Obr. 5.10: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 0,5 μM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



Obr. 5.11: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 50 nM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



Obr. 5.12: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 50 nM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



Obr. 5.13: DCDR vzorek S2GGfos12 (koncentrace 5 nM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření.

Jelikož použité vzorky obsahovaly značné množství nečistot, provedli jsme mikrodialýzu dvou vzorků S2GGfos12 o původních koncentracích 0,5 mM a 50 μ M na oligonukleotid. K mikrodialýze byly použity membránové filtry o velikosti pórů 0,025 μ m vyrobené společností Millipore. Uvádím původní koncentraci, jelikož při mikrodialýze se může koncentrace vzorku s časem měnit. Zpracování získaných spekter proběhlo stejným způsobem a výsledky jsou na obrázcích 5.14–5.17.

Mikrodialýza se ukázala být schopná odstranit velké množství nečistot ze vzorku. Ve vzorku s původní koncentrací 0,5 mM (Obr. 5.14) vidíme, že koncentrace DNA je poměrně homogenní na celé kapce. Podobně je tomu tak, i když v menší míře, pro druhý vzorek o koncentraci 50 nM (Obr. 5.16). Kapka vzorku s koncentrací 0,5 mM neudržela poloměr a při vysušování se zmenšila. I přes homogenost koncentrace DNA na těchto kapičkách, je samotná DNA nehomogenně usazena, což vidíme z výsledků faktorové analýzy na obrázcích 5.14–5.17.

V dalším měření jsme se zaměřili na interakci DNA se svým komplementárním řetězcem. Pro měření jsme použili DCDR metodu i klasickou metodu měření Ramanova spektra z roztoků (viz. kapitola 4.5). Metodou DCDR jsme získali spektra vzorku s S2GGfos12 a S1GGfos12, které jsou navzájem komplementární. Připravený roztok s deionizovanou vodou obsahoval DNA v koncentraci 0,5 mM na bázi. Tuto koncentraci jsme vybrali, protože při měření vzorku S2GGfos12 s koncentrací 50 μ M, což odpovídá 0,6 mM na bázi (Obr. 5.5), byly nejmenší problémy s usazenými nečistotami. Obě DNA byly ve stejném poměru. Naměřená spektra a výsledky faktorové analýzy jsou na obrázcích 5.18–5.19. Jedno DCDR spektrum je spolu se spektry získanými z roztoku uvedeno na obrázku 5.20.

Při měření klasickou metodou Ramanových spekter z roztoku činila největší problém značná fluorescence vzorků. Pro získání lepších spekter bychom museli vzorek bělit po delší dobu, na což při našem měření nebyl prostor (více jak den). Vzorky S1GGfos12 a S2GGfos12 byly měřeny s koncentracemi 6 mM na bázi a společně v celkové koncentraci 5 mM na bázi (Obr. 5.20). Vidíme, že u vzorku S1GGfos12 jsou výrazné pásy 1485 cm^{-1} a 1576 cm^{-1} oproti S2GGfos12. Je to v důsledku rozdílného obsahu bází tvořících tyto řetězce. Pás 1485 cm^{-1} odpovídá převážně vibracím imidazolovaného kruhu guaninu a 1576 cm^{-1} odpovídá vibracím adeninu a guaninu [Mašek, 2007]. S1GGfos12 (5'-TGGATATTAGAA-3') obsahuje více bází guaninu a adeninu, než S2GGfos12 (3'-TCCTAATATCAA-5'). Proto je pás 1576 cm^{-1} intenzivnější a pás 1485 cm^{-1} se u S2GGfos12 nevyskytuje. Stejně je tomu tak u pásů 1242 cm^{-1} a 1303 cm^{-1} , které odpovídají vibracím thyminu a cytosinu, respektive adeninu a cytosinu. Podobné vysvětlení můžeme podat pro posunutí pásu 785 cm^{-1} u S2GGfos12 vůči 789 cm^{-1} u S1GGfos12. Tento pás je tvořen ze dvou třetin vibrací cytosinu (\sim 780 cm^{-1}) a thyminu (\sim 790 cm^{-1}) [Mašek, 2007]. S2GGfos12 obsahuje cytosin, a proto je tento pás posunut do nižších hodnot. Při porovnání naměřených spekter vzorků S1GGfos12, S2GGfos12 a jejich směsi získané DCDR a klasickou metodou, se ukázalo, že spektrum roztoku obou vzorků DNA se neliší od součtu spekter jednotlivých vláken. Z toho usuzuji, že jednotlivá vlákna tohoto vzorku spolu neinteragují a nedochází k vytvoření duplexu. Naměřená spektra DCDR a klasickou Ramanovou metodou jsou shodná.

Pro další měření jsme použily DNA od lososa Salmon Testes. Tuto DNA o délce 2000–3000 bází jsme vybrali, abychom mohli porovnat výsledky s velkou nukleovou kyselinou. Připravili jsme roztoky o koncentraci 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001 mg/ml. Všechny vzorky, kromě vzorku s koncentrací 1 mg/ml, byly zbaveny nečistot mikrodialýzou. Příprava a zpracování bylo stejné jako

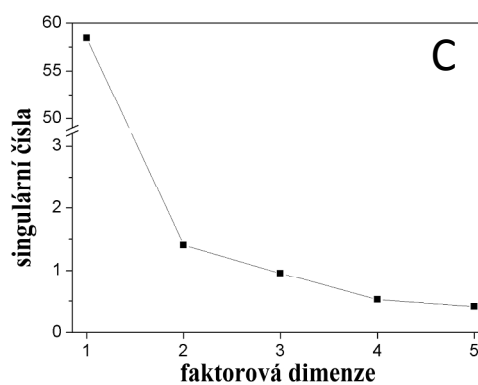
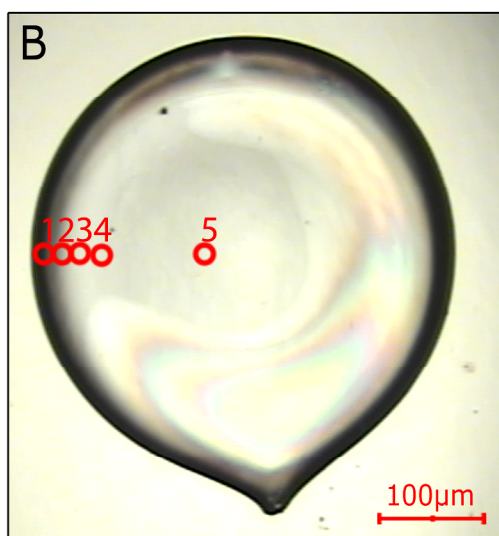
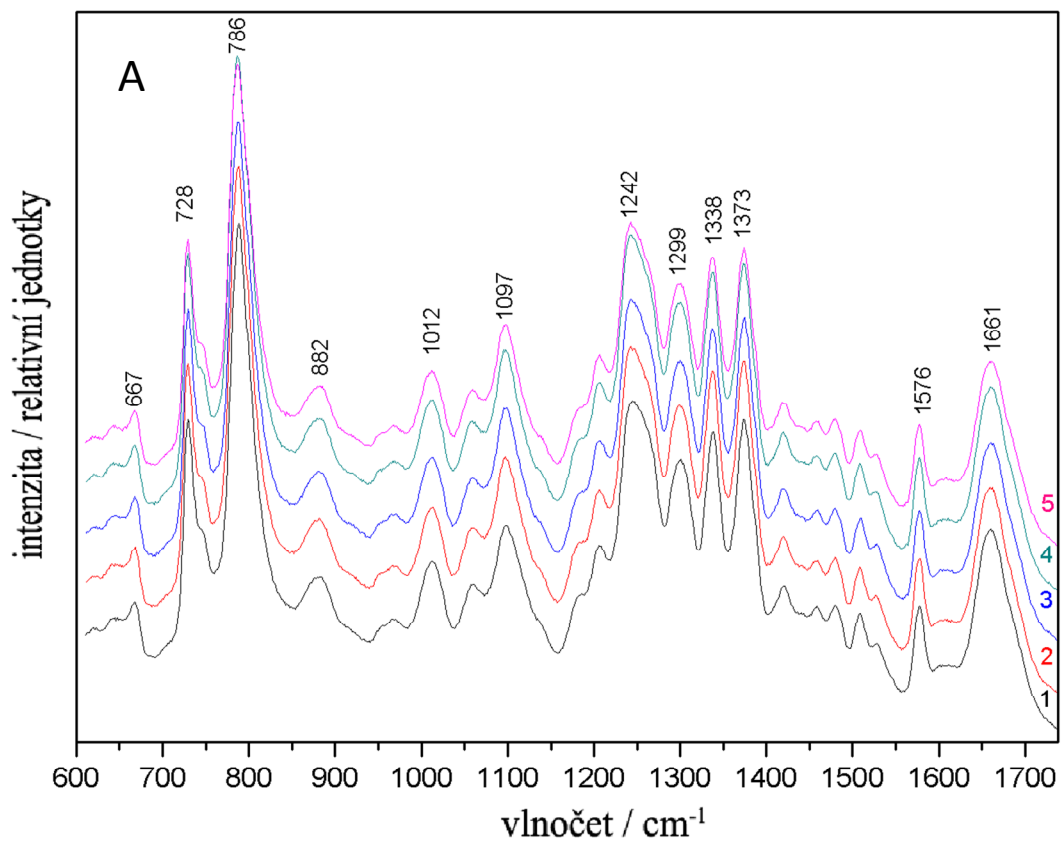
v předchozích případech při měření DCDR spekter. Výsledky jsou na obrázcích 5.23–5.29.

Při proměření různých koncentrací lososí DNA, jsme pozorovali stejnou situaci jako vzorku S2GGfos12. Koncentrace DNA je víceméně homogenní přes celou kapku až na lokální minima. Vzorek pak zdaleka netvoří kroužek. Faktorová analýza ukazuje, že DNA není uložena homogenně a dochází k posuvům, či změnám intenzit pásů v rámci kapky. Ještě slušná spektra jsme dostali při koncentraci 0,01 mg/ml (Obr. 5.25). To řádově odpovídá koncentraci 3 μM vzorku S2GGfos12, u kterého jsme slušná spektra dostali ještě při koncentraci 5 μM . U vzorku s koncentrací 0,001 mg/ml (Obr. 5.27) pozorujeme už pouze nečistoty.

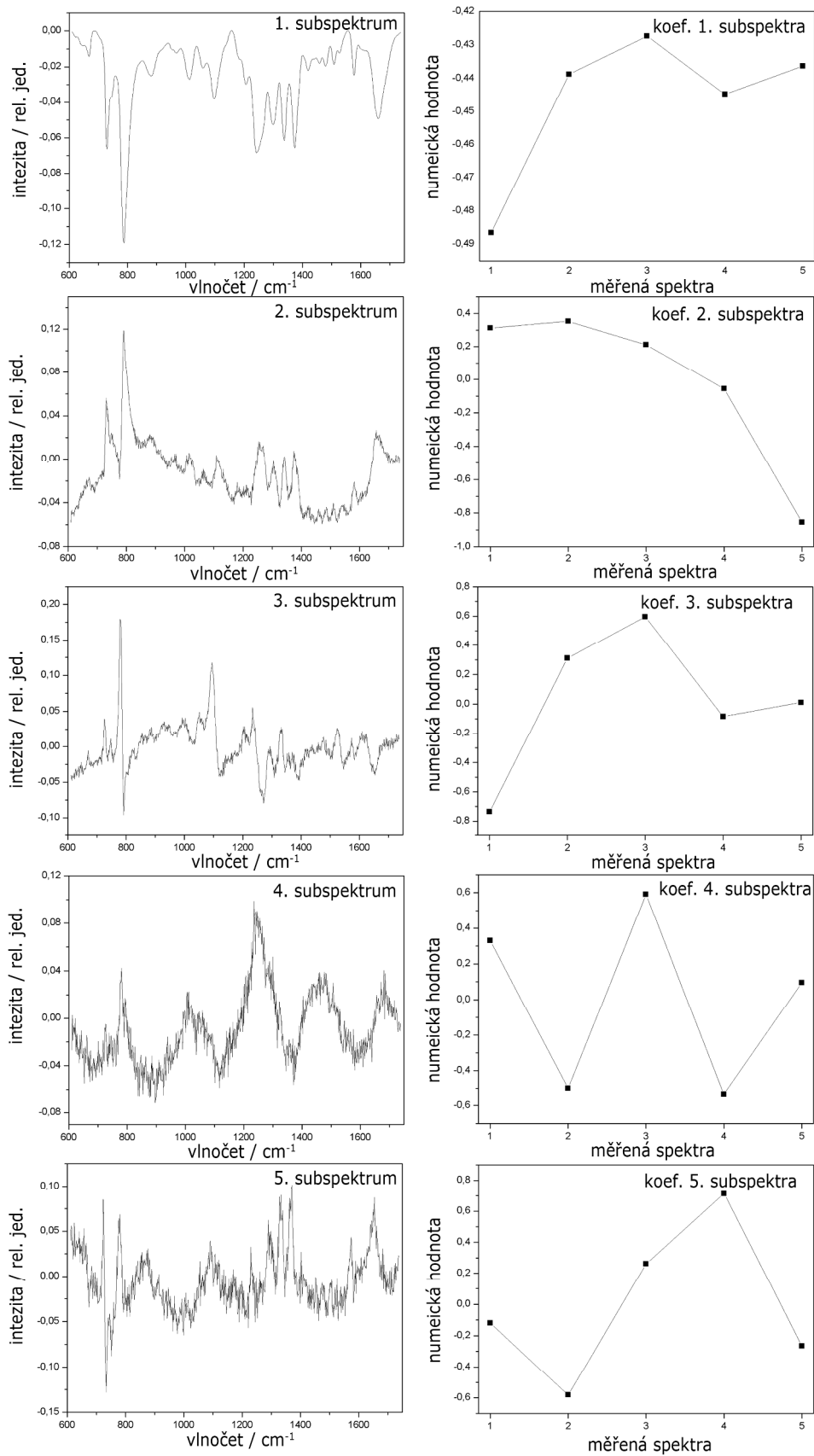
V poslední části měření jsme vyzkoušeli, jestli po přidání jednomocných iontů sodíku a dvojmocných iontů hořčíku dojde k oslabení coulombovských sil odpuzující záporně nabitě molekuly DNA a následnému vytvoření kroužku.

Připravili jsme dva vzorky lososí DNA o koncentraci 0,8 mg/ml s NaCl nebo MgCl_2 v koncentracích 200 mM v deionizované vodě. Soli byly připraveny společností Fluka s čistotou 99,5% pro NaCl a 99% pro MgCl_2 . Příprava a zpracování bylo opět stejné jako u ostatních DCDR měření. Navíc jsme však provedli mapová měření deponovaných vzorků. Přístroj proměří zadané množství spekter v dané oblasti (Obr. 5.30) a (Obr. 5.36) a následně provedeme faktorovou analýzu po odečtení pozadí. Software určí singulární čísla, subspektra a koeficienty, které software zakreslí do 2D obrázku (Obr. 5.32), (Obr. 5.33) a (Obr. 5.39). Při zpracování vzorku s roztokem NaCl byly odstraněny singularity, které jsou vidět v pravé části obrázku 5.33. Takové singularity jsou pravděpodobně způsobeny znečištěním nízkomolekulární látkou a uměle navyšují dimenzi problému ve faktorové analýze. Příslušná spektra byla nahrazena sousedními spektry v mapě, ačkoli nahrazení průměrem okolních spekter by bylo vhodnější.

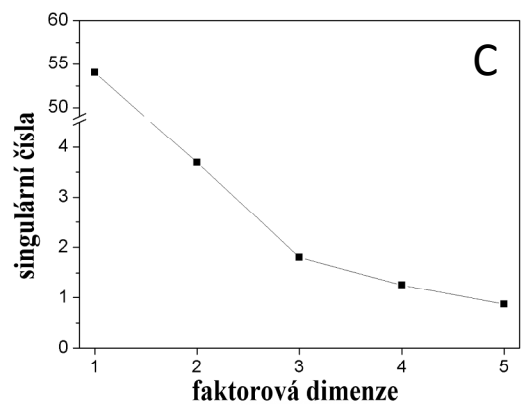
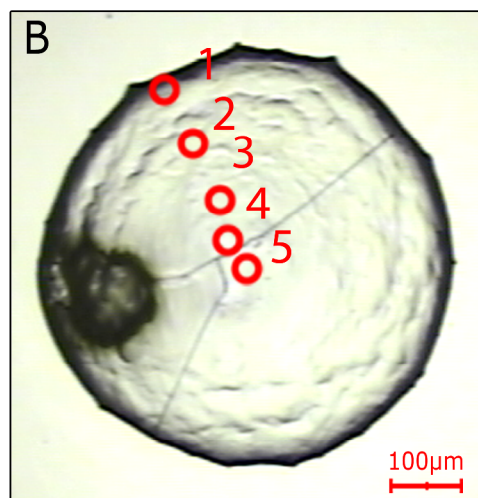
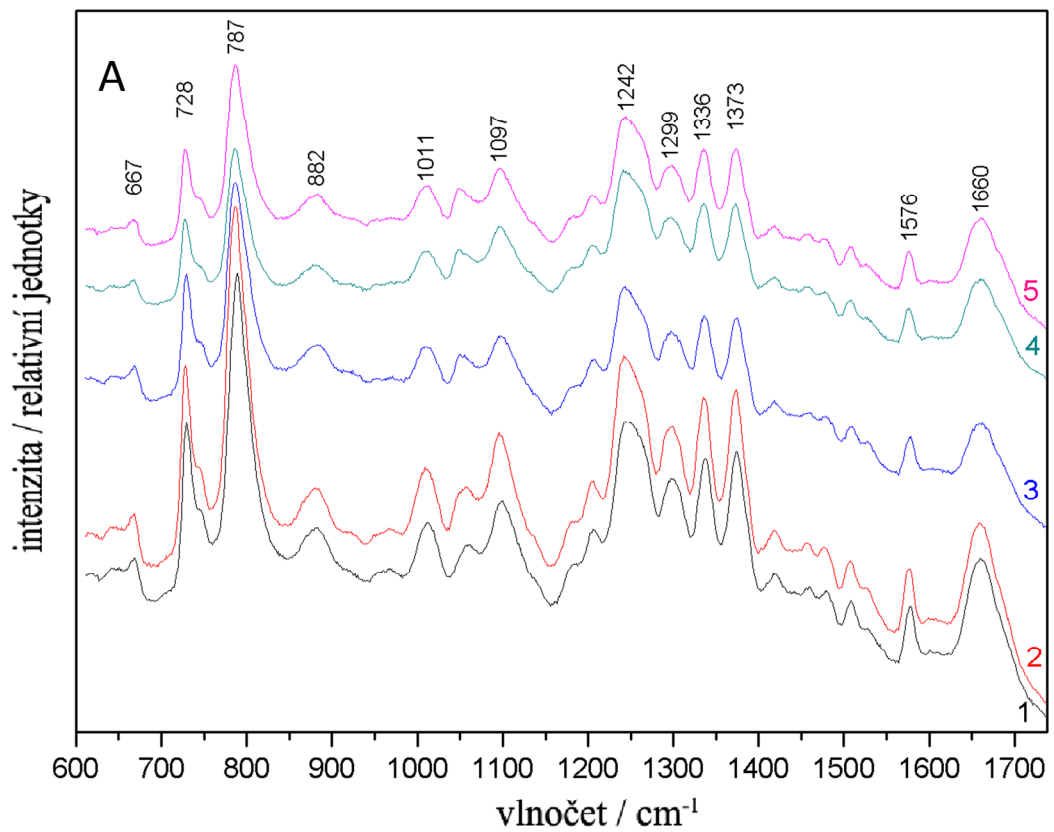
Už při měření kapky s roztokem NaCl (Obr. 5.28) se zdálo, že i přes velké krystaly soli je DNA usazena hlavně na okraji kapky. Měření map (Obr. 5.30–5.33) to pak potvrdilo. DNA však není na kroužku rozložena homogenně. Koeficienty prvního a druhého subspektra (Obr. 5.32) ukazují nehomogenní rozložení DNA na kroužku a posun pásů a intenzit. U vzorku s roztokem MgCl_2 došlo k vyvážení pásu vibrace PO_2^- na 1095 cm^{-1} . Mírné posuvy jsme pozorovali i u pásů 1250 cm^{-1} , 1339 cm^{-1} a 1372 cm^{-1} odpovídající dýchacím vibracím aromatického kruhu bází spřažených s pohyby atomů cukru. Při zpracování map vzorku nebylo nutné odstraňovat singularity (zdá se tedy, že nečistoty pochází převážně z použitých solí a MgCl_2 byl čistší vzorek). Z normálního měření i měření map vidíme, že DNA se usadila na kroužku. Avšak rozložení DNA podél kroužku opět není zcela homogenní. Navíc jsme během měření map pozorovali zvětšení jakýchsi hrudek (Obr. 5.39). Z koeficientů faktorové analýzy (Obr. 5.41) vidíme, že tyto hrudky obsahují také DNA. Otevírá se tedy otázka po stabilitě takto deponovaného vzorku DNA během měření.



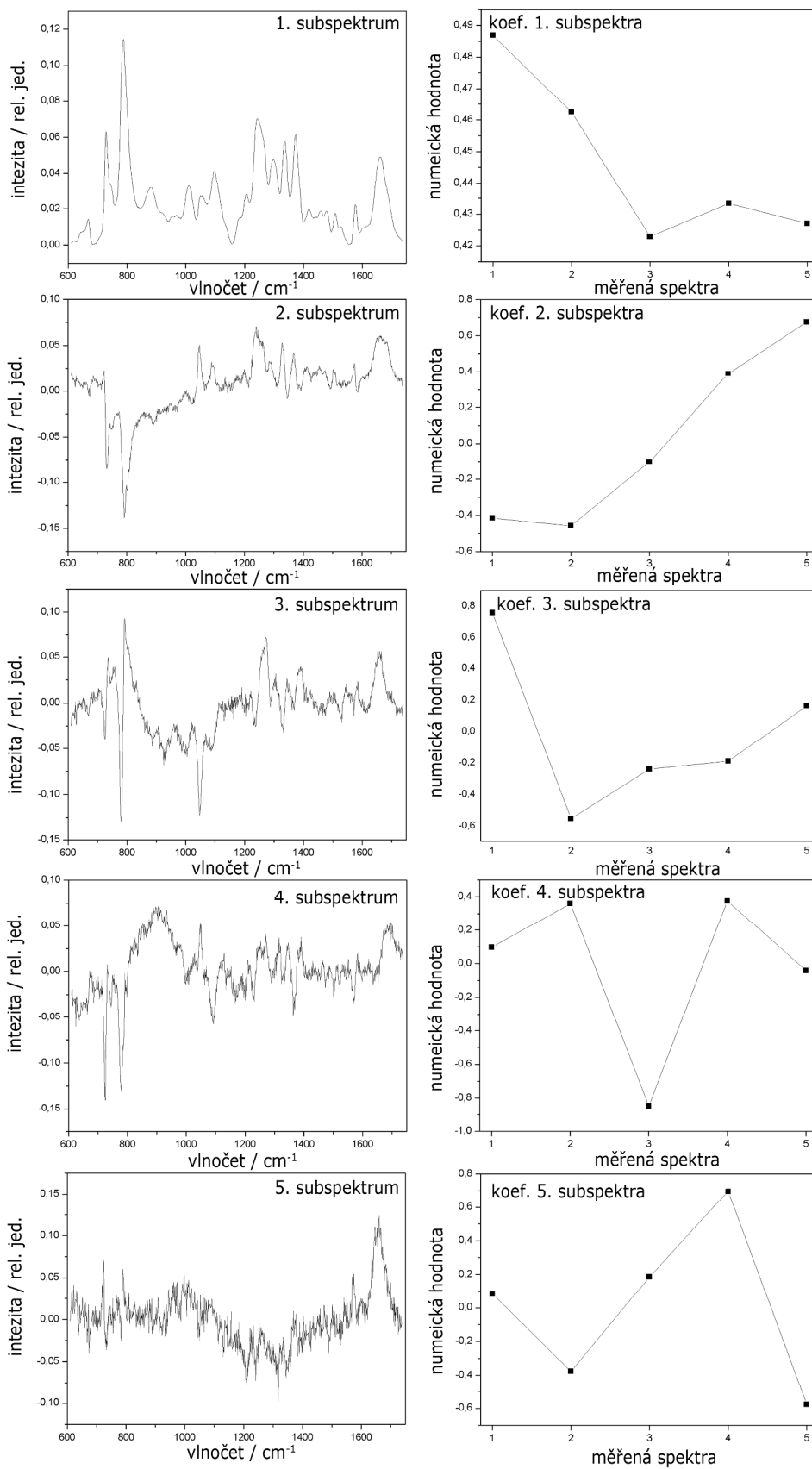
Obr. 5.14: DCDR dialyzovaný vzorek S2GGfos12 (koncentrace před dialýzou 0,5 mM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



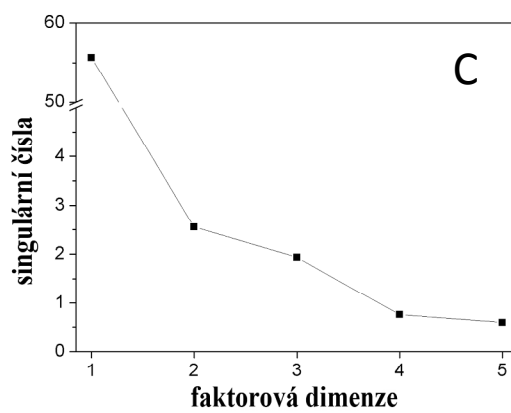
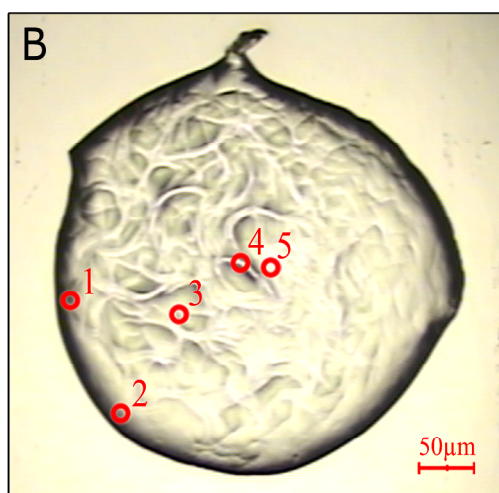
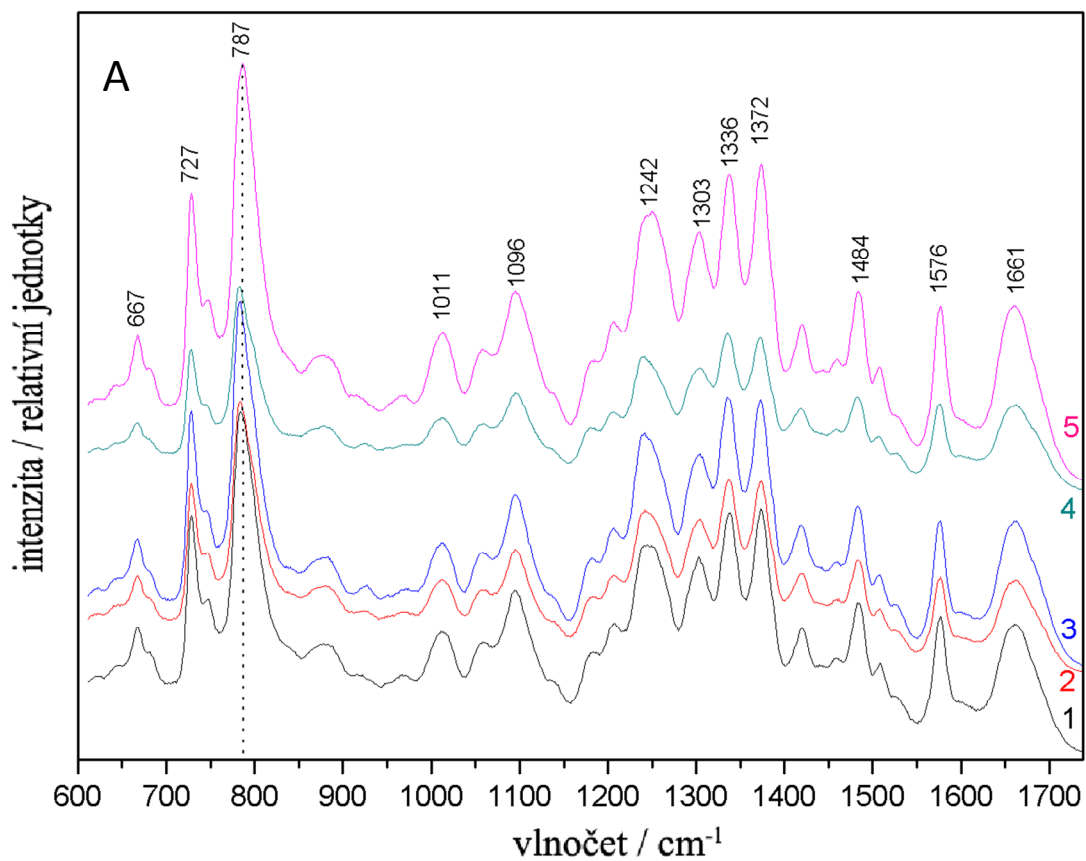
Obr. 5.15: DCDR dialyzovaný vzorek S2GGfos12 (koncentrace před dialýzou 0,5 mM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



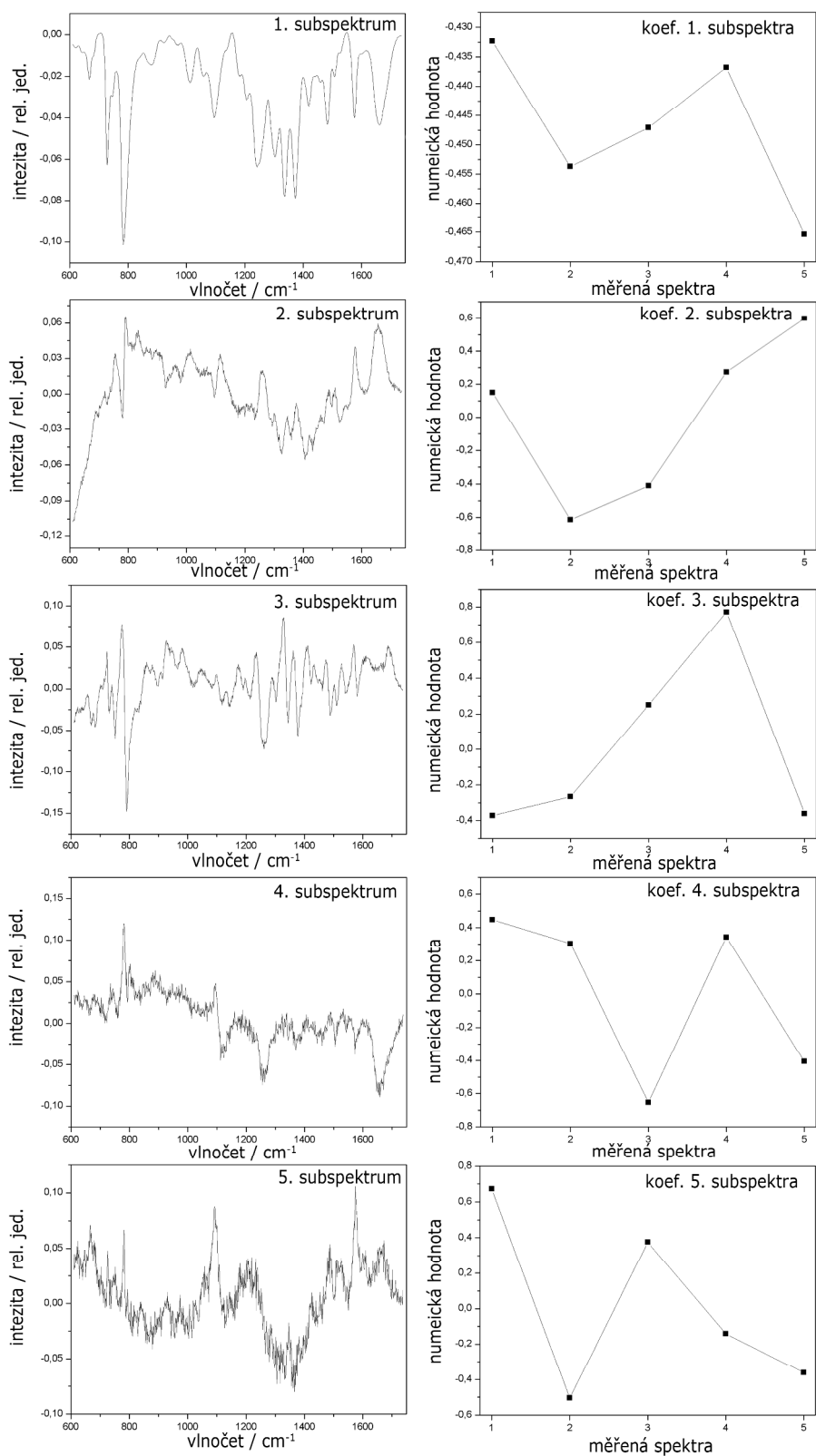
Obr. 5.16: DCDR dialyzovaný vzorek S2GGfos12 (koncentrace před dialýzou 50 μM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



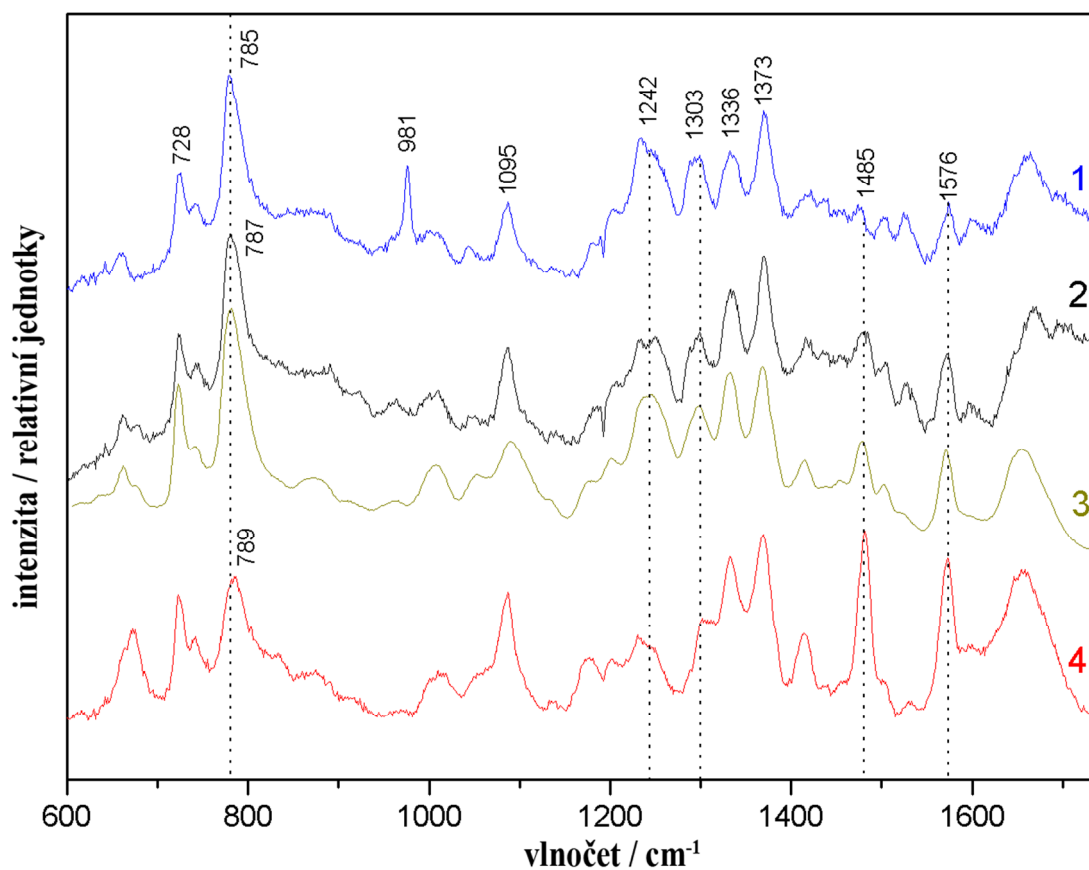
Obr. 5.17: DCDR dialyzovaný vzorek S2GGfos12 (koncentrace před dialýzou 50 μM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



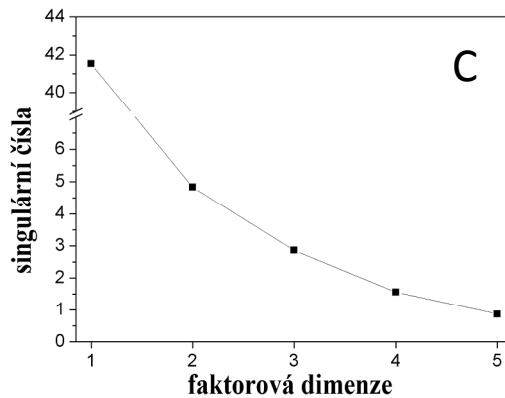
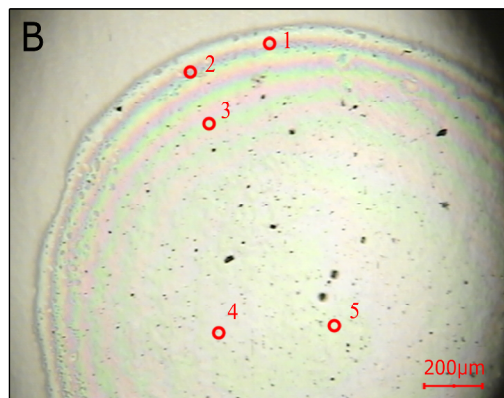
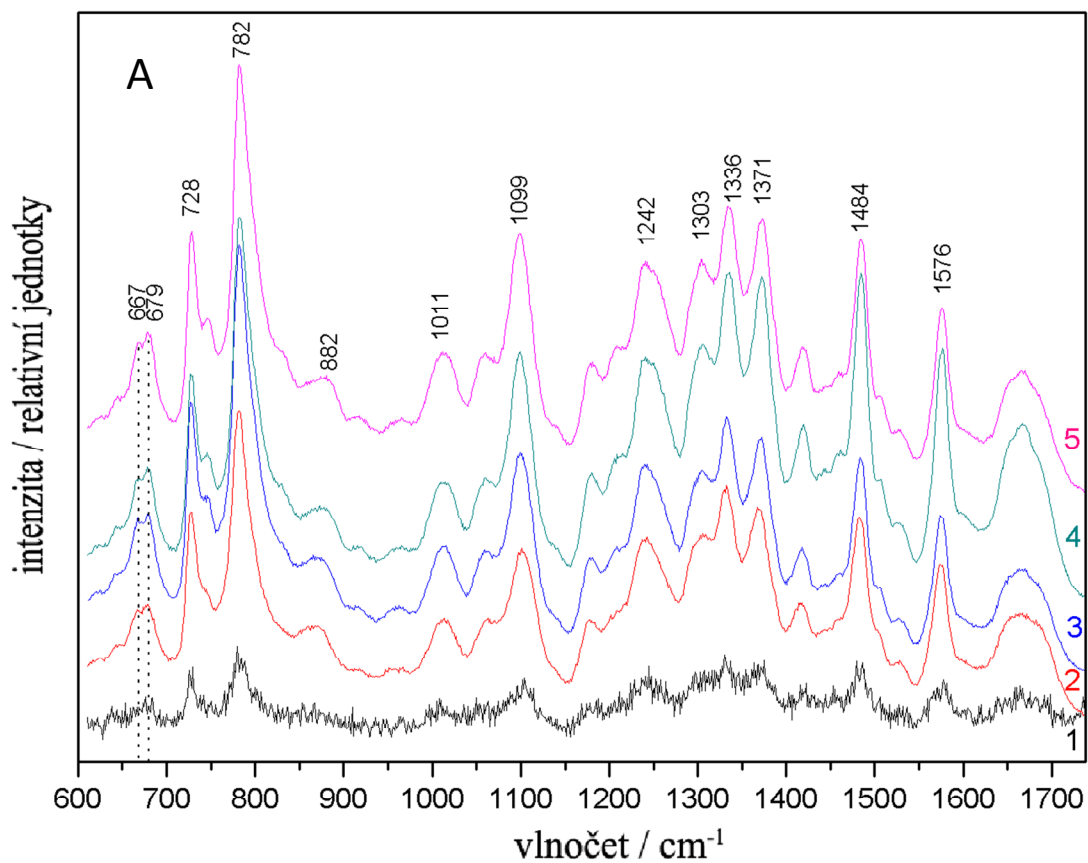
Obr. 5.18: DCDR vzorek *S1GGfos12* a *S2GGfos12* ve stejném poměru (koncentrace 0,5 mM na bázi). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



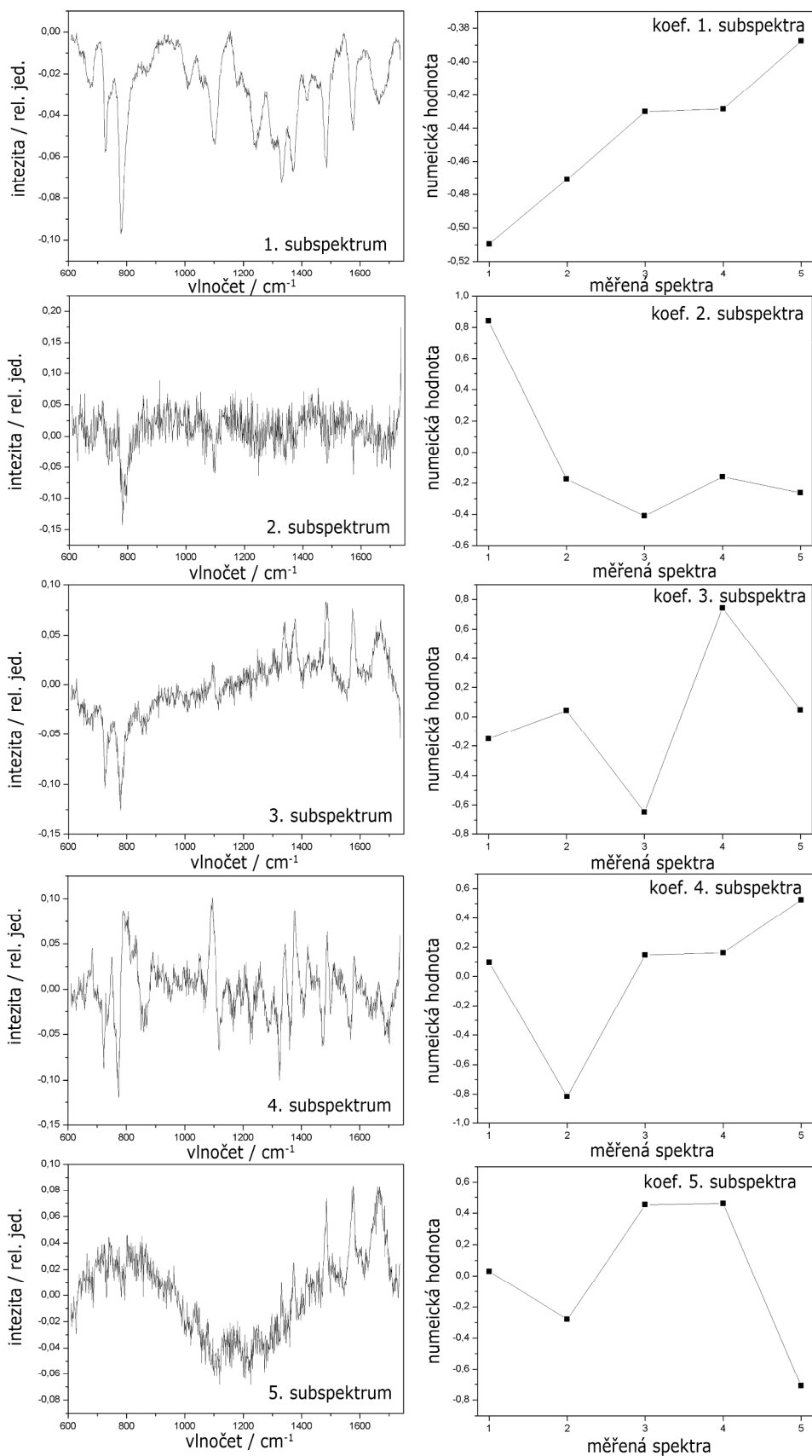
Obr. 5.19: DCDR vzorek *SIGGfos12* a *S2GGfos12* ve stejném poměru (koncentrace 0,5 mM na bázi). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



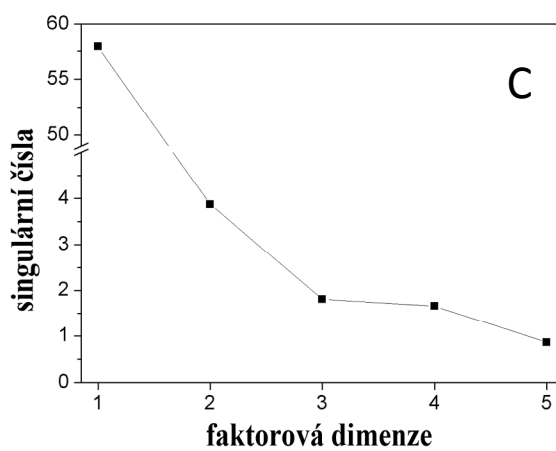
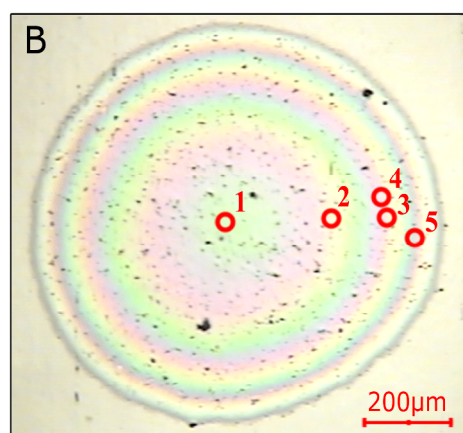
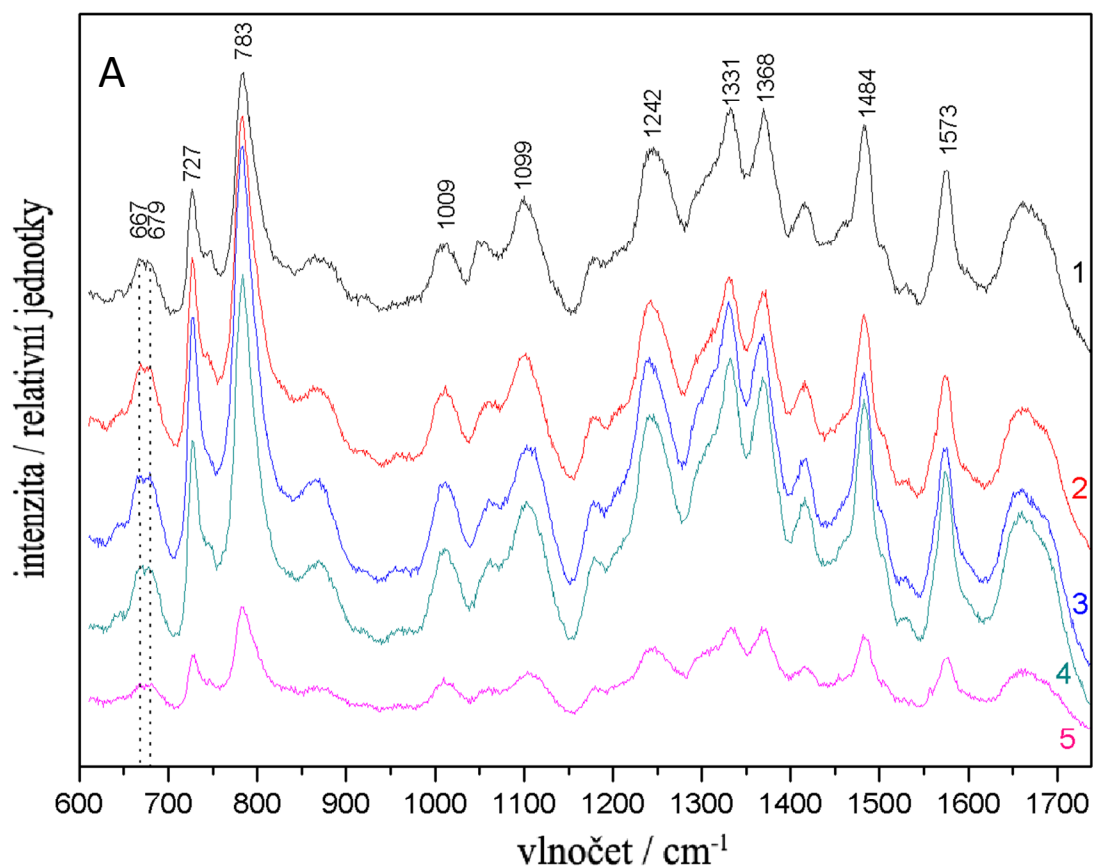
Obr. 5.20: Ramanovo spektrum nukleových kyselin měřené v roztoku. (1) vzorek S2GGfos12 6 mM na bázi, (2) S1GGfos12 a S2GGfos12 ve stejném poměru s celkovou koncentrací 5 mM na bázi. (3) pro srovnání DCDR spektrum téhož s koncentrací 0,5 mM na bázi z bodu 3 na (Obr. 5.18 B), (4) S1GGfos12 6 mM na bázi.



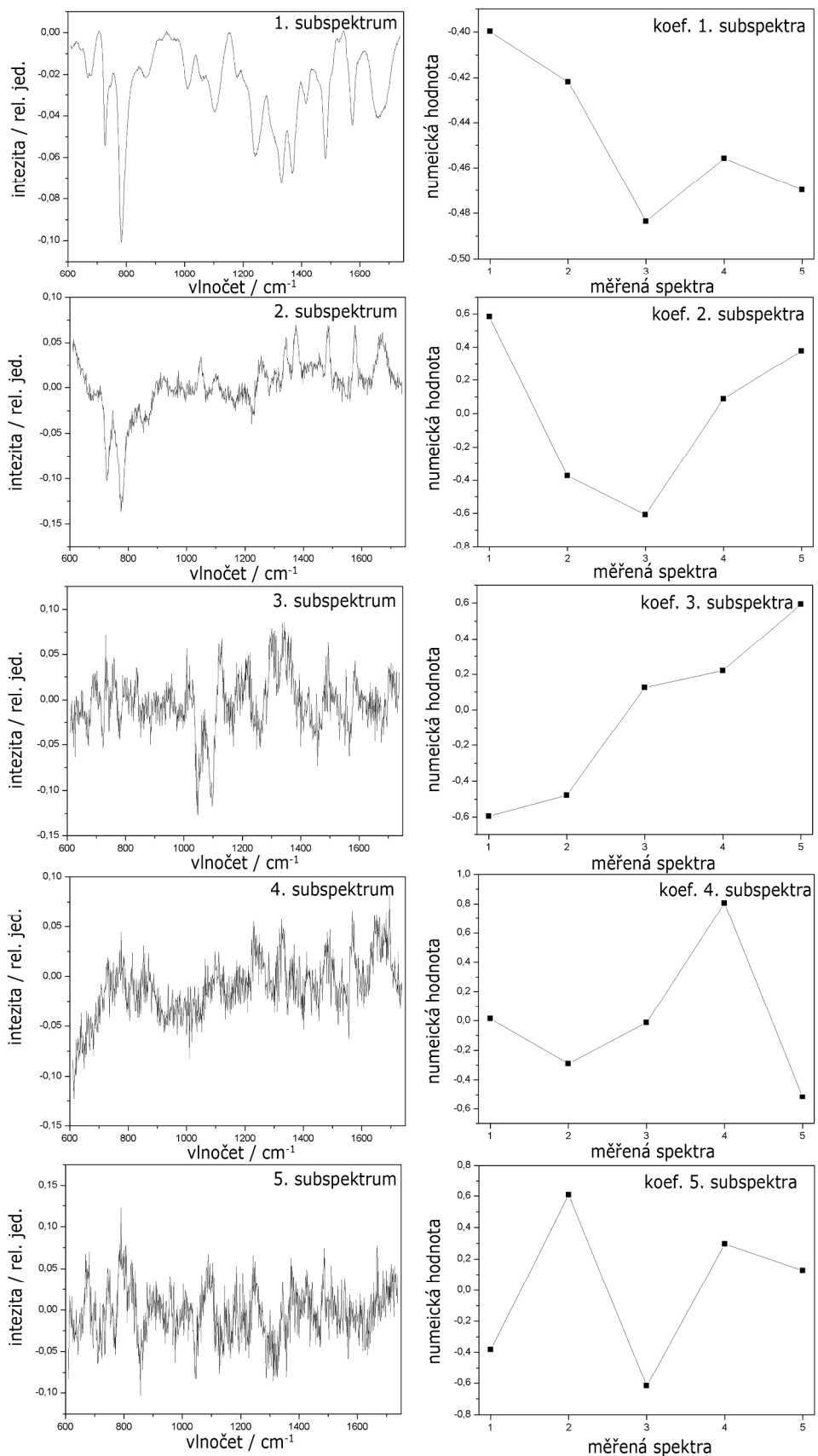
Obr. 5.21: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 1 mg/ml). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



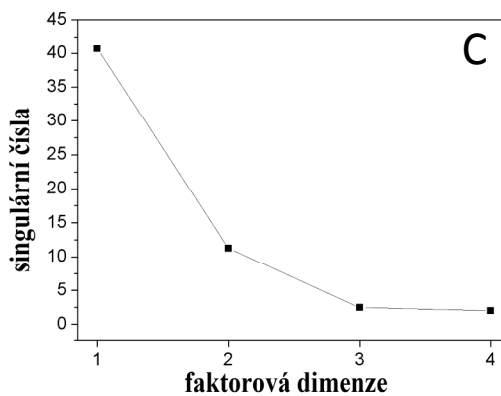
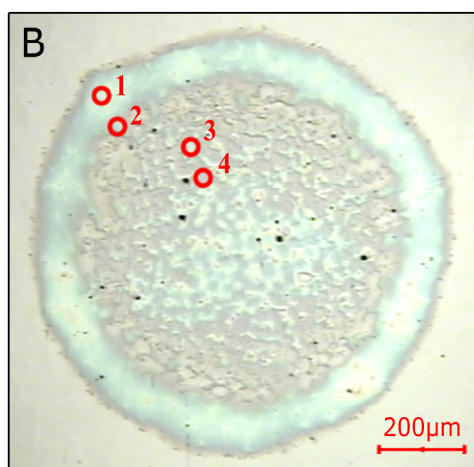
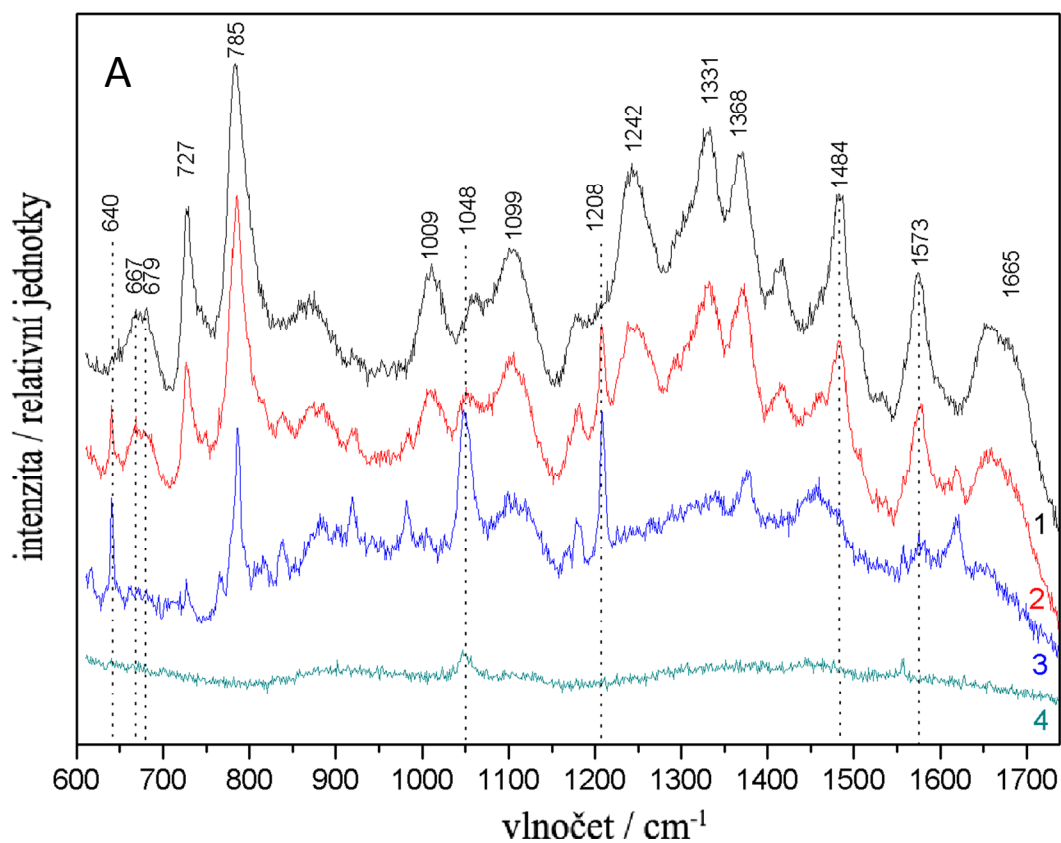
Obr. 5.22: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 1 mg/ml). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



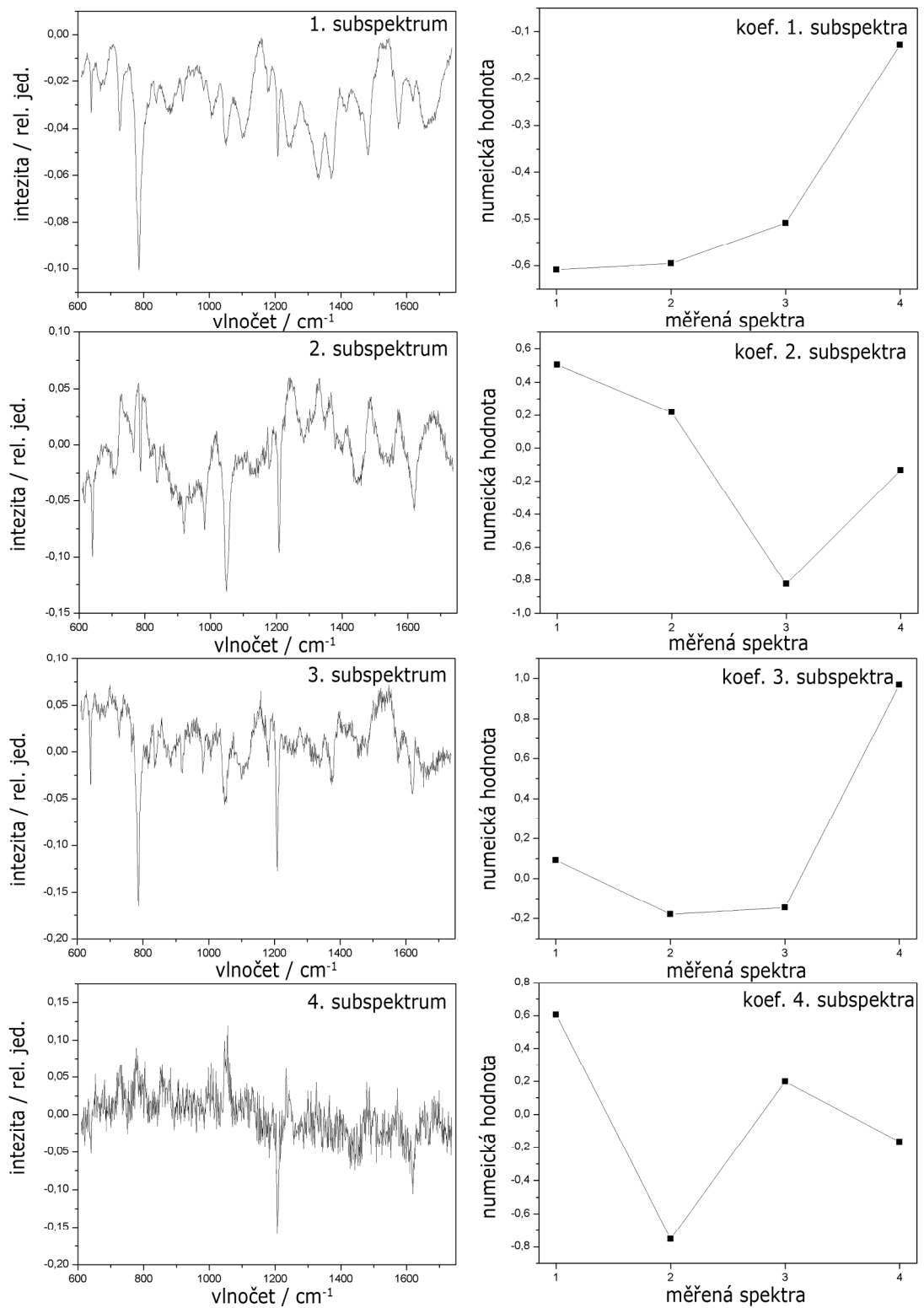
Obr. 5.23: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 0,1 mg/ml). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



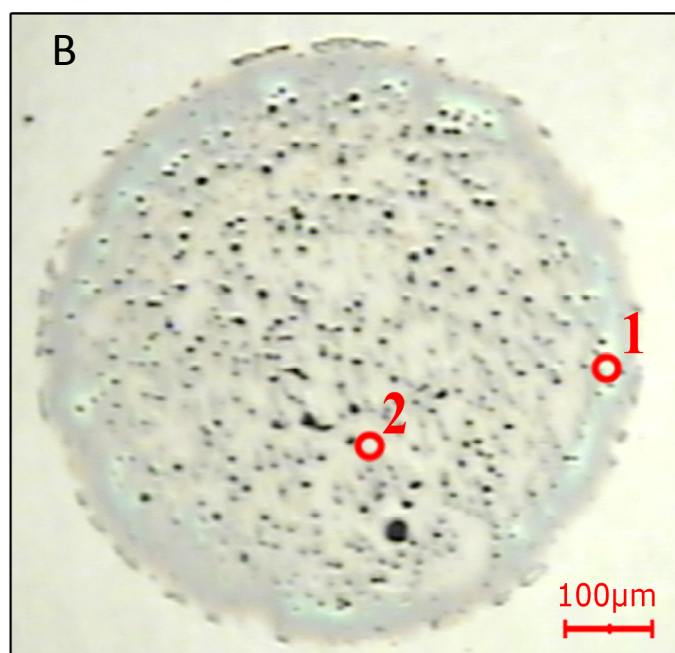
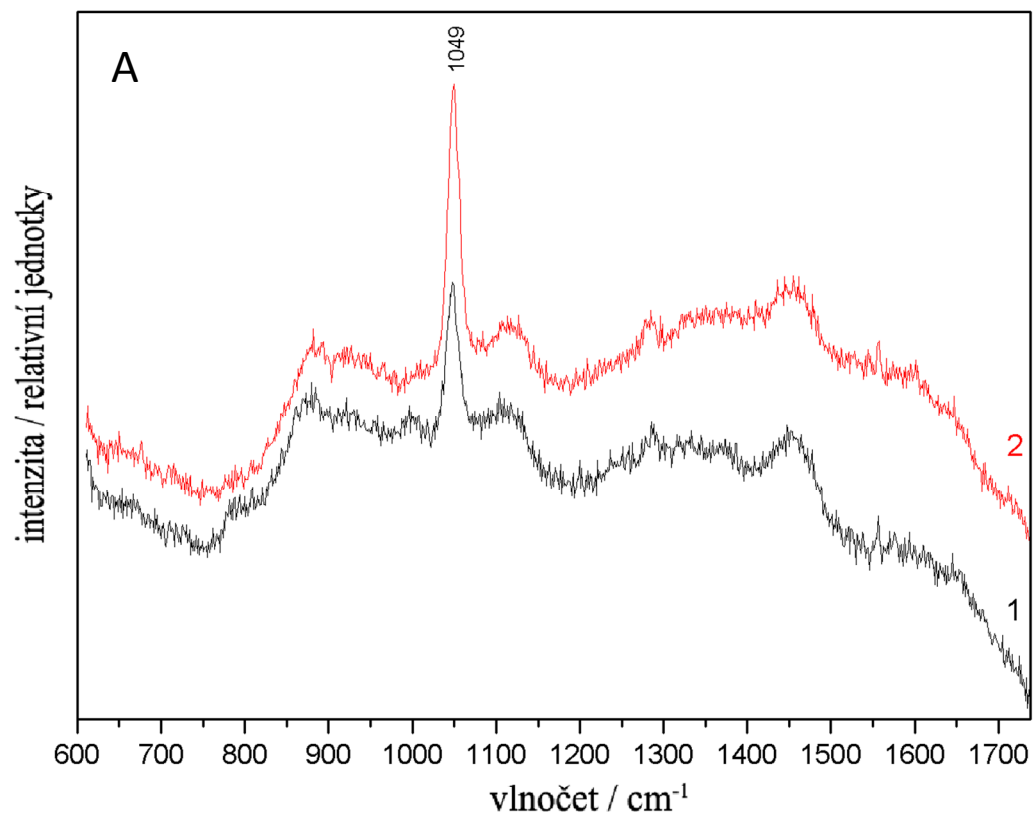
Obr. 5.24: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 0,1 mg/ml). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



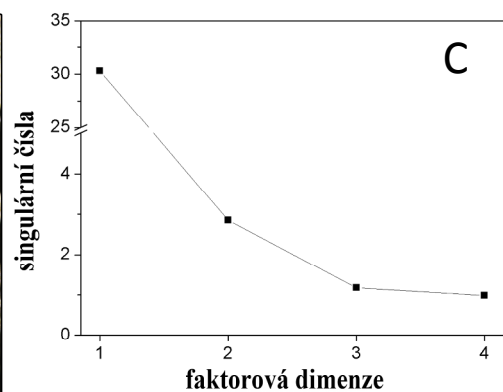
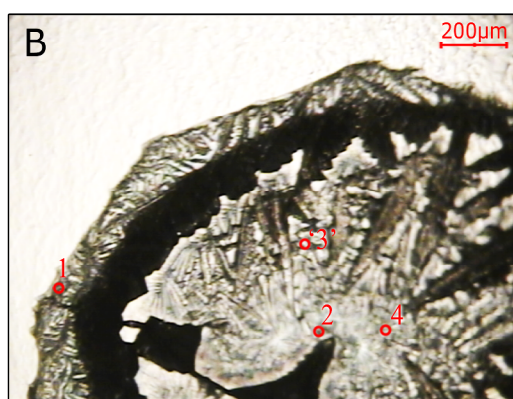
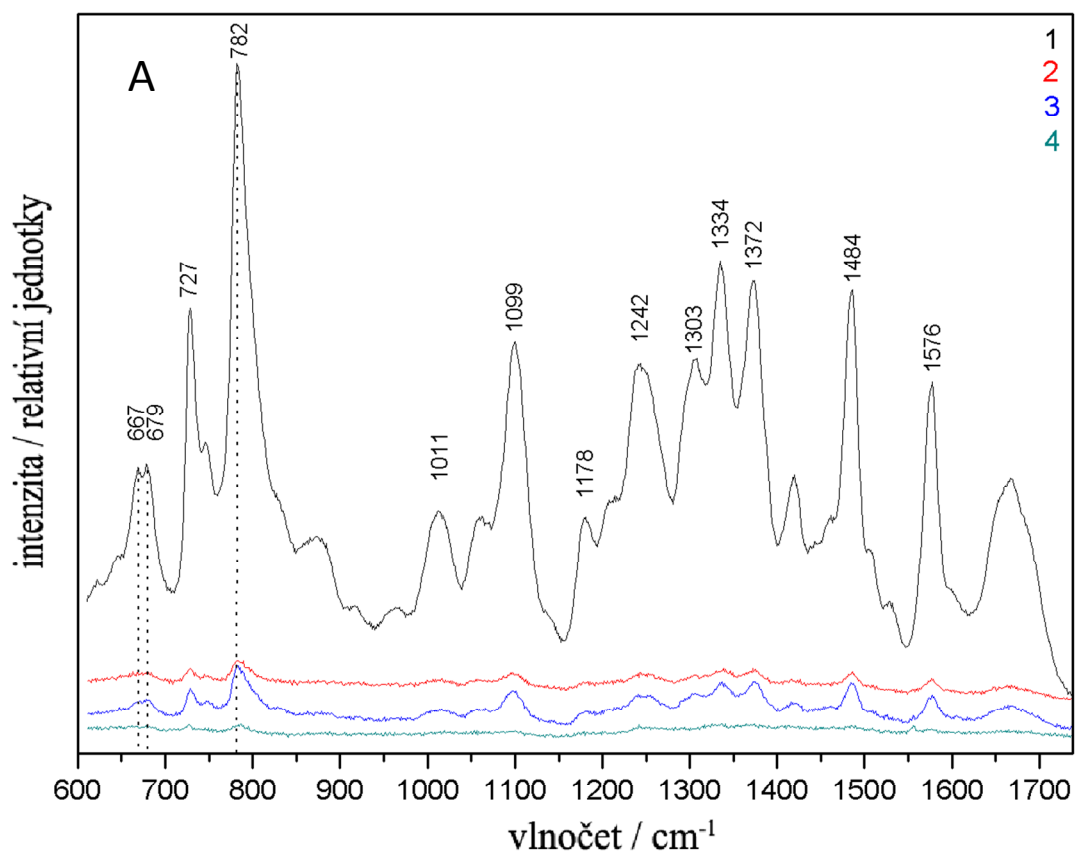
Obr. 5.25: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 0,01 mg/ml). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



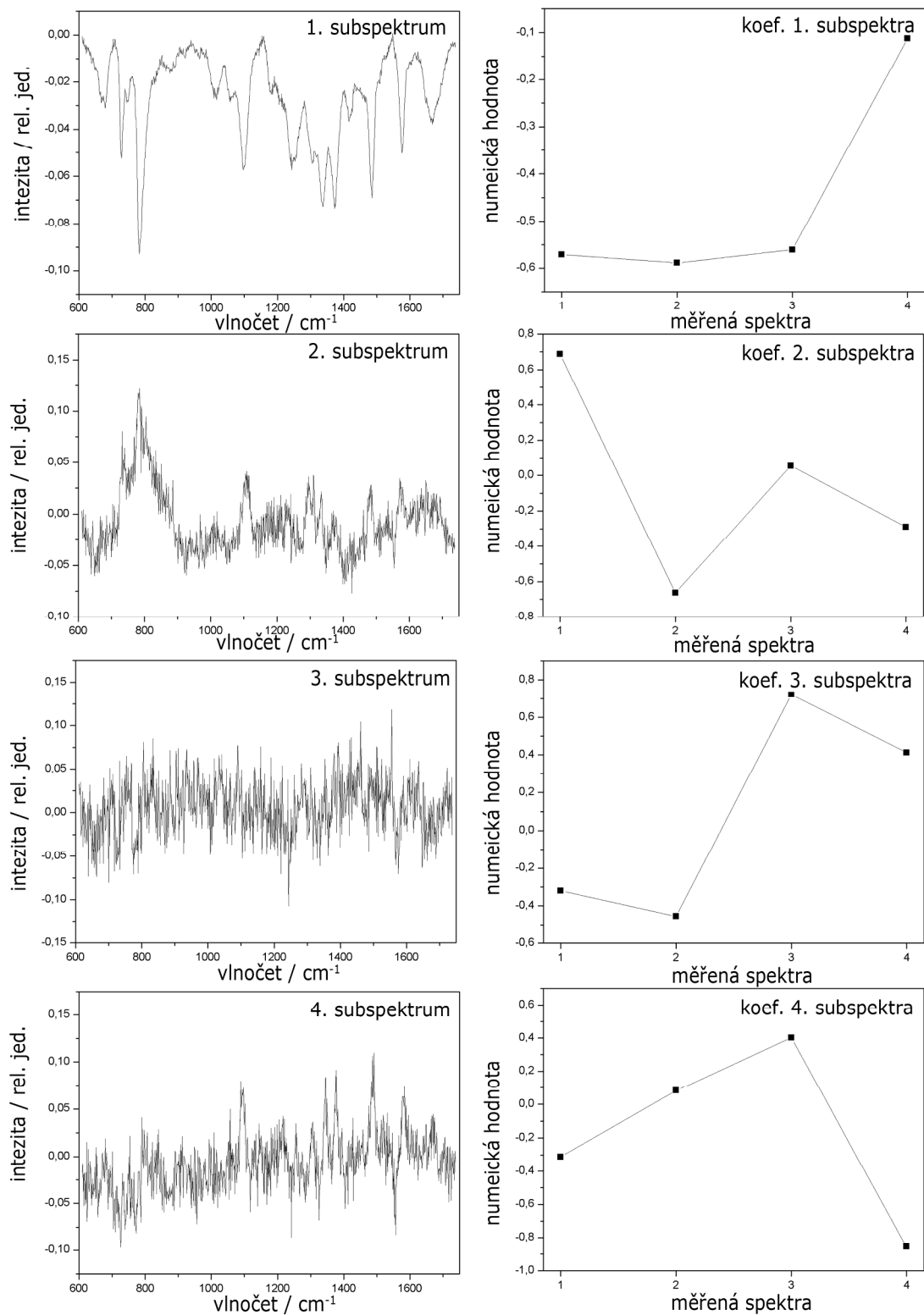
Obr. 5.26: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 0,01 mg/ml). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



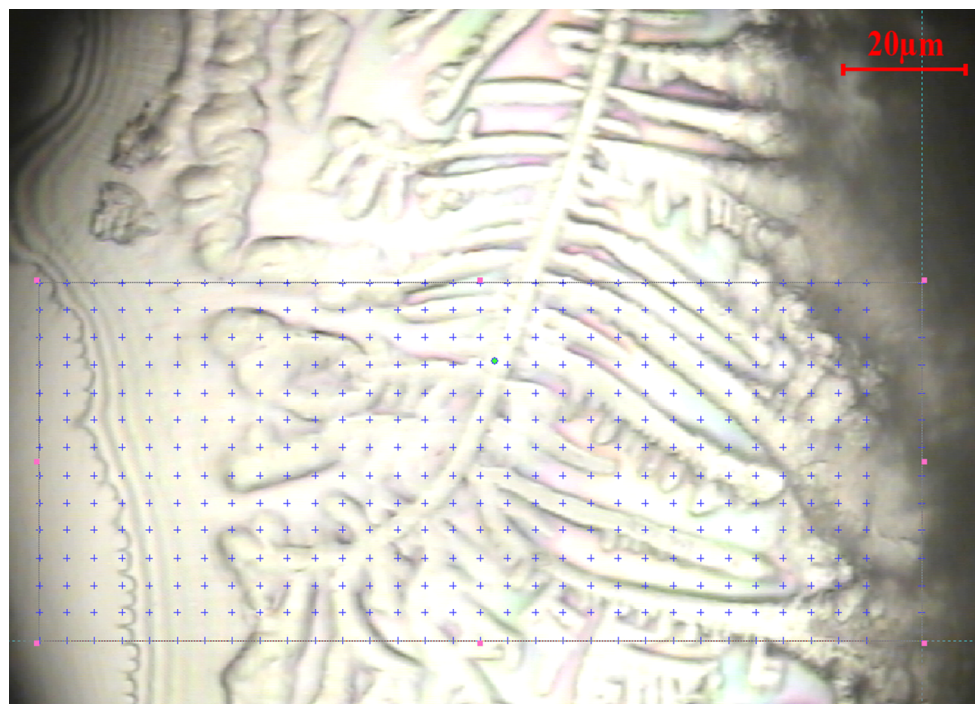
Obr. 5.27: DCDR vzorek lososí DNA (koncentrace 0,001 mg/ml). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření.



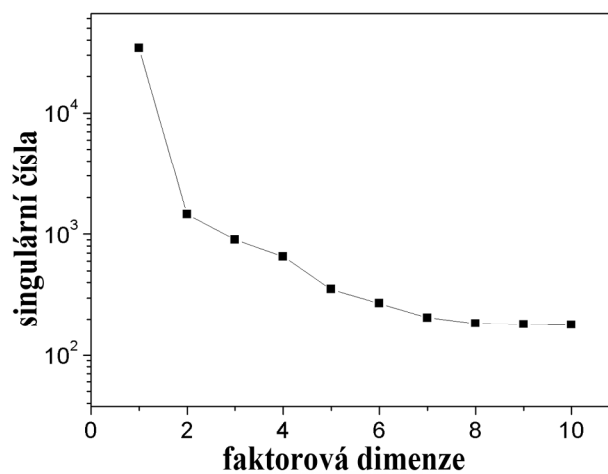
Obr. 5.28: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s NaCl (200 mM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření – bod 3 není na místě, kde je označen, ale nachází se na charakterově místě kapky, která není na fotografii. (C) singularní čísla faktorové analýzy.



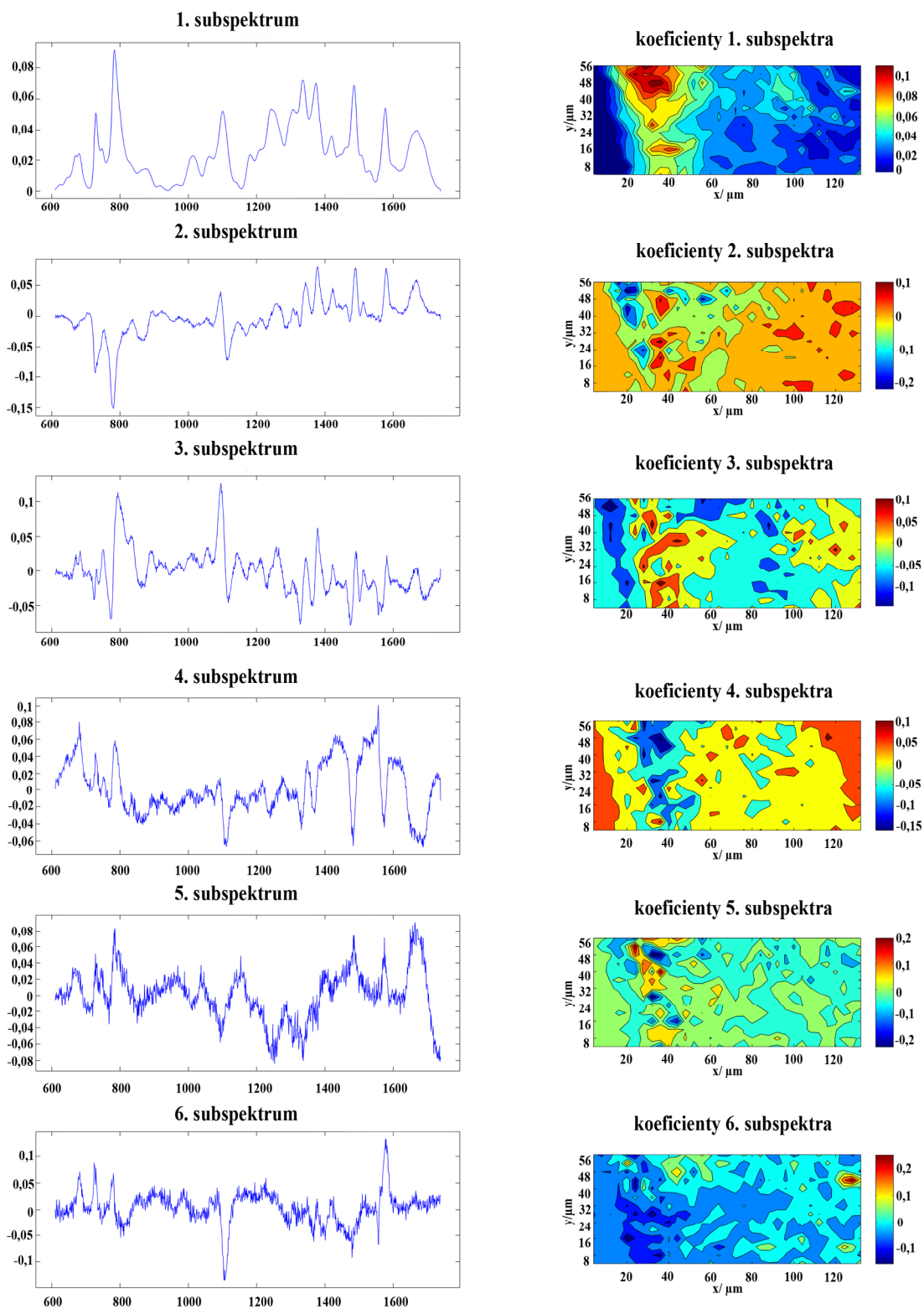
Obr. 5.29: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s NaCl (200 mM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



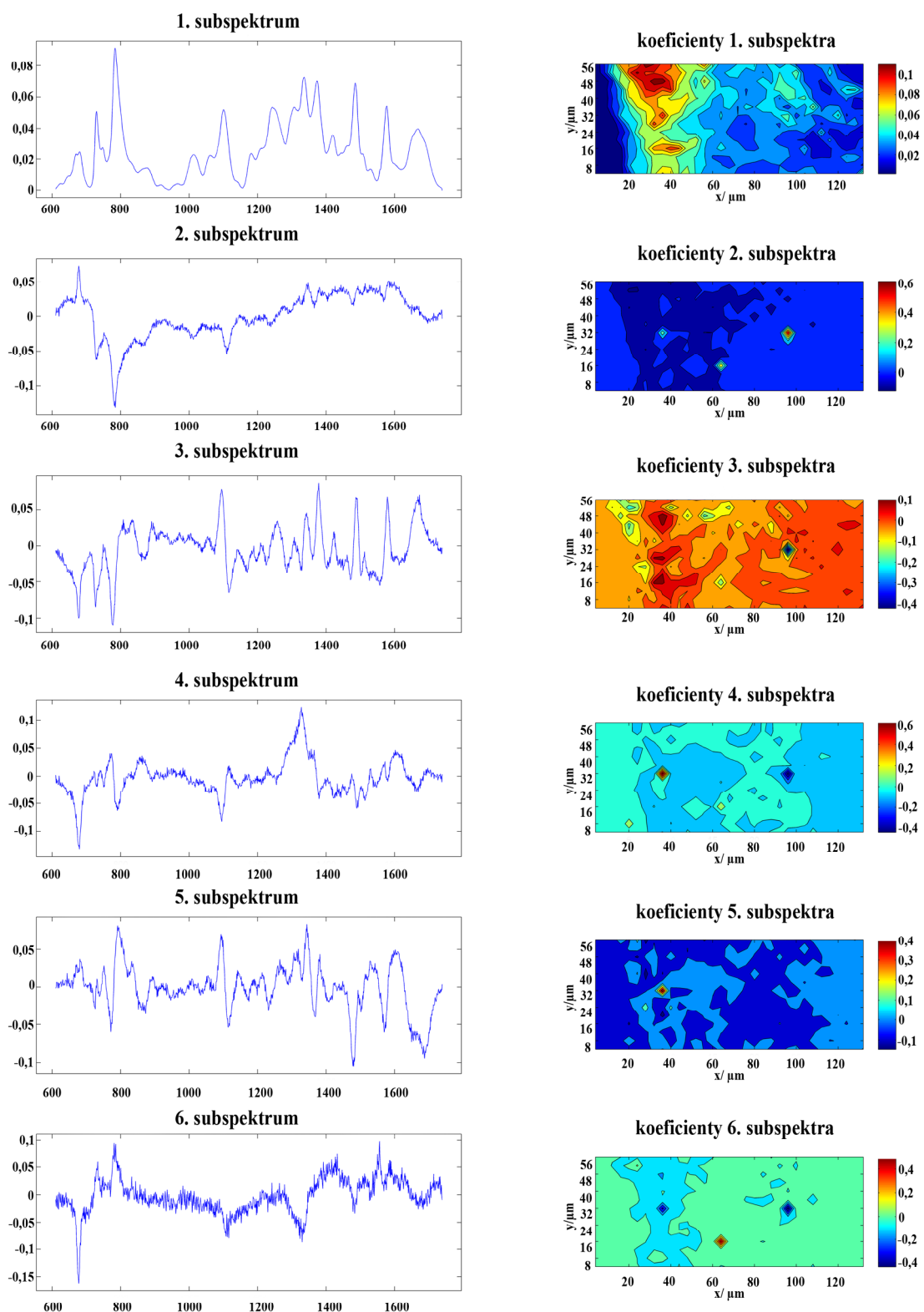
Obr. 5.30: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s NaCl (200 mM). Fotografie oblasti užitá k získání mapy.



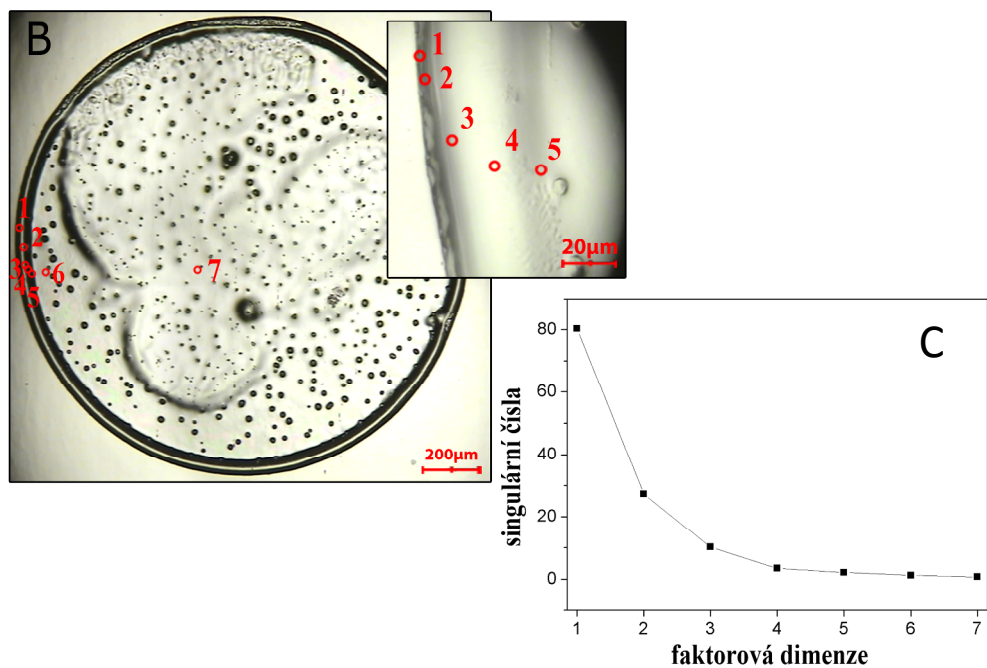
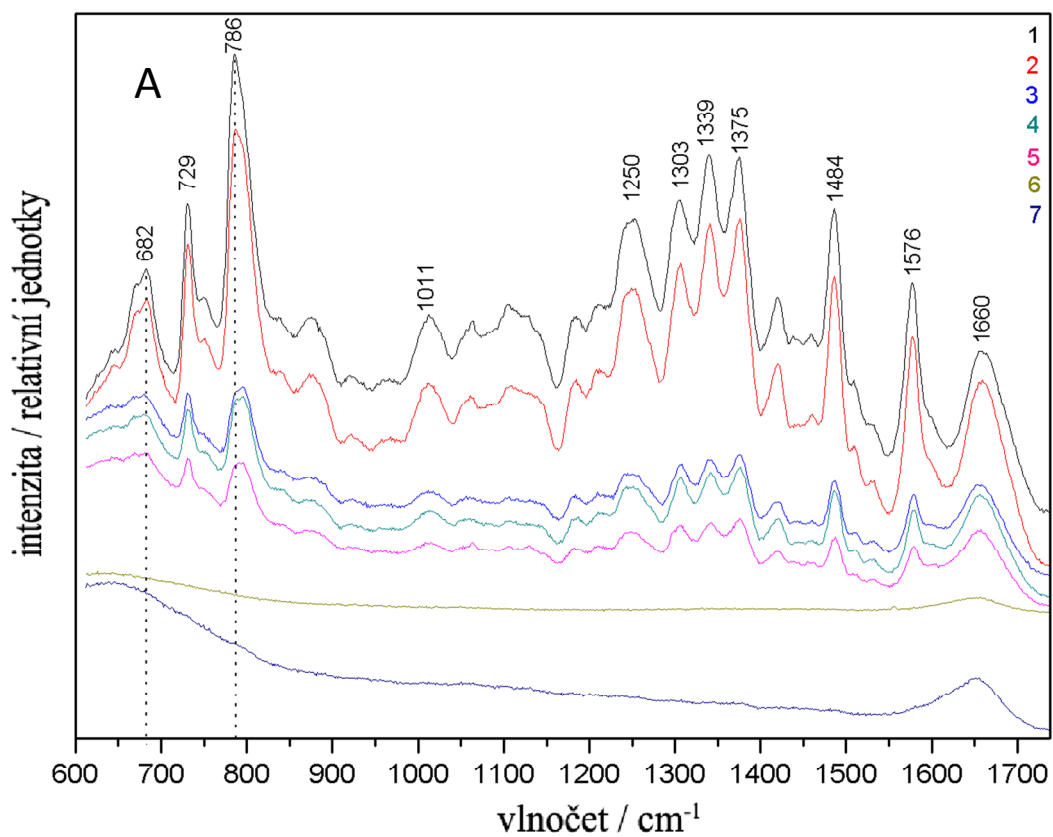
Obr. 5.31: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s NaCl (200 mM). Singulární čísla. Po úpravě, tj. odstranění odlehlých spekter odpovídajících nečistotám.



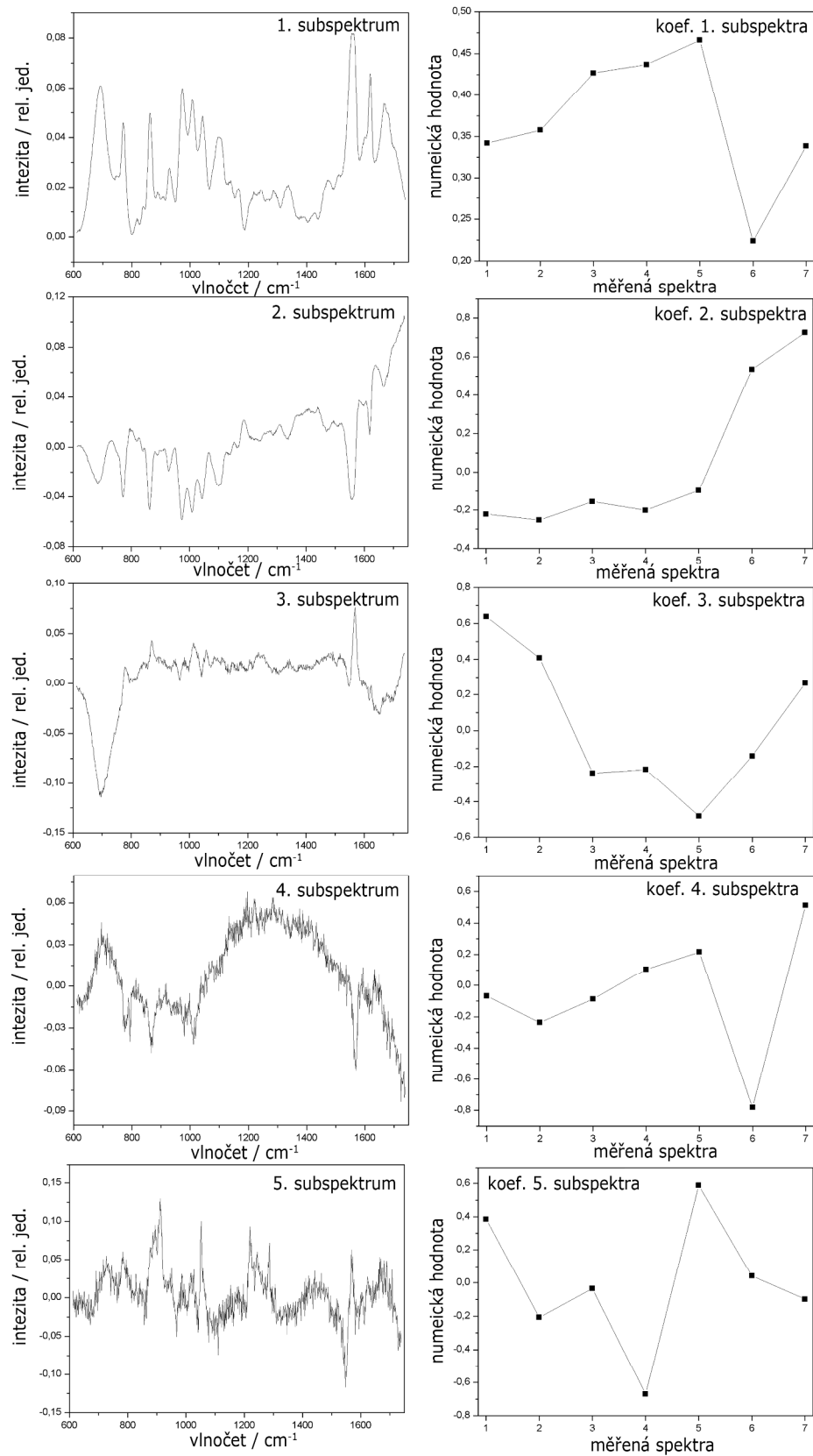
Obr. 5.32: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s NaCl (200 mM). Subspektra faktorové analýzy spektrální mapy a jejich koeficienty. Po odstranění odlehlých spekter.



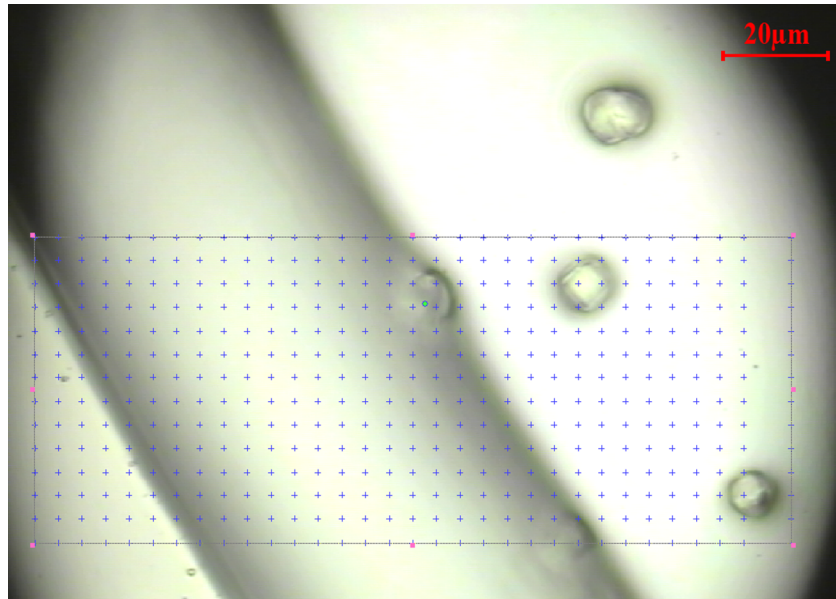
Obr. 5.33: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s NaCl (200 mM). Subspektra faktorové analýzy spektrální mapy a jejich koeficienty.



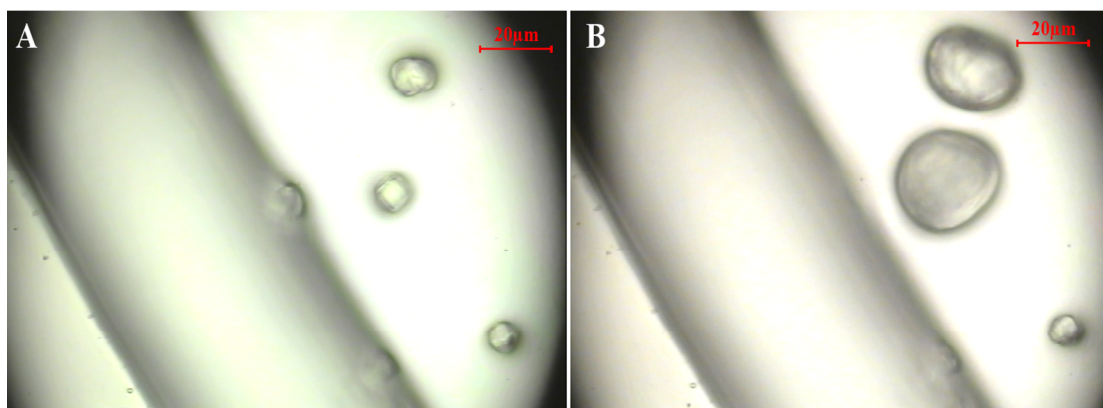
Obr. 5.34: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s $MgCl_2$ (200 mM). (A) DCDR spektrum, (B) fotografie kapky s vyznačenými body měření, (C) singulární čísla faktorové analýzy.



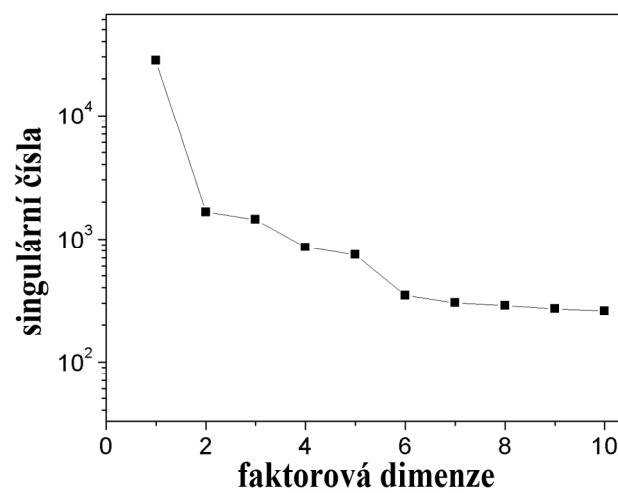
Obr. 5.35: DCDR vzorek lososí DNA (0,8mg/ml) s MgCl₂ (200mM). Subspektra faktorové analýzy a jejich koeficienty.



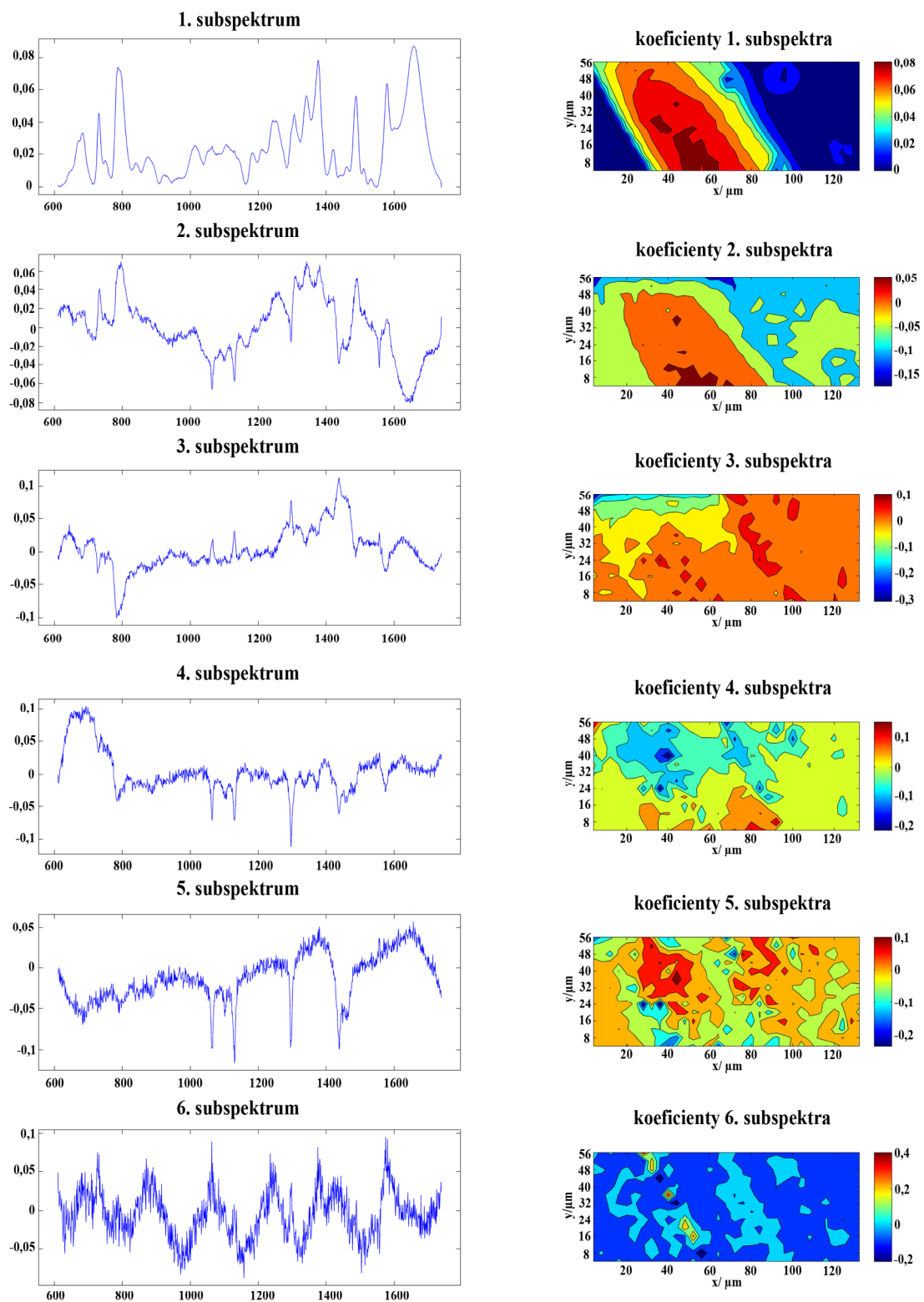
Obr. 5.36: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s $MgCl_2$ (200 mM). Fotografie oblasti k získání mapy.



Obr. 5.37: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s $MgCl_2$ (200 mM). Fotografie oblasti určené k měření mapy (A) před měřením, (B) po měření.



Obr. 5.38: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s $MgCl_2$ (200 mM). Singulární čísla.



Obr. 5.39: DCDR vzorek lososí DNA (0,8 mg/ml) s $MgCl_2$ (200 mM). Subspektra faktorové analýzy spektrální mapy a jejich koeficienty.

6. Diskuze výsledků a závěr

Při měření různých koncentrací roztoku S1GGfos12, S2GGfos12 a lososí DNA v deionizované vodě jsme nepozorovali vytvoření „kávového“ kroužku. DNA se usadila po celé ploše vyschlé kapky. U vzorků zbavených většiny nečistot mikrodialýzou bylo množství usazené DNA rovnoměrné po celé ploše vyschlé kapky. Výsledky faktorové analýzy však ukazují nehomogenní usazení DNA, kdy dochází k posunům a změnám intenzit pásů mezi jednotlivými částmi vyschlé kapky. Hlavně je pak viditelný častý posun pásu $\sim 788 \text{ cm}^{-1}$. Spektra použitelná pro Ramanovu spektroskopii jsme v tomto případě získali u vzorků při koncentraci $30 \mu\text{M}$ na bázi, řádově lze tedy hovořit o použitelné koncentraci v několika desítkách μM na bázi. Pro nižší koncentraci spektra odpovídala hlavně příměsím a nečistotám.

Rozdíly v naměřených spektrech komplementárních řetězců S1GGfos12 (5'-TGG ATA TTA GAA-3') a S2GGfos12 (3'-TCC TAA TAT CAA-5') jsou způsobeny rozdílným obsahem bází. Při měření roztoku obou těchto řetězců jsme nepozorovali vytvoření duplexu. Jeho spektrum je součtem spekter jednotlivých řetězců a neliší se od DCDR spektra.

S ohledem na to, že při výše zmíněných měřeních jsme nedosáhli zformování „kávového“ kroužku (viz kapitola 3.1) a tudíž nebylo možné použít výhodu DCDR metody (tedy výrazné zakoncentrování vzorku v kroužku), snažili jsme se najít příčinu rozvratu tohoto fyzikálního jevu. Ukázalo se, že jev je s největší pravděpodobností mimo jiné dán relativně nízkým nábojem studovaných molekul, tak jak je tomu u proteinů, kde se jev běžně pozoruje (viz např. [Zhang et al., 2003] či přehled dalších prací v kapitole 3.1). Proto se setkalo s úspěchem přidání jednomocného iontu sodíku nebo dvojmocného iontu hořčíku, které vytvořily podmínky pro vznik kroužku, na němž se DNA koncentruje. Ionty se navázaly na DNA a vyrušili elektrostatické odpuzování záporně nabitých molekul DNA. Při přidání iontů hořčíku došlo také k navázání iontu na skupinu PO^{2-} , a tedy vymizel pás vibrací na 1095 cm^{-1} . Měření spektrálních map ukázalo nehomogenní usazení DNA podél kroužku. Je otázkou k dalšímu výzkumu, zdali tato nehomogenita má původ ve fyzice vysychání kapek a formování „kávového“ kroužku, tak jak bylo popsáno při studiu proteinových vzorků [Kopecký & Baumruk, 2006]. Kompenzace náboje DNA se však každopádně ukázala klíčová pro použití metody DCDR spektroskopie, přičemž se jasně ukázalo, že užití dvojmocných iontů je efektivnější než užití jednomocných.

Dalším zajímavým efektem, který poukazuje na komplikovanost aplikace DCDR spektroskopie na nukleové kyseliny bylo „hrudek“ uvnitř kroužku s roztokem lososí DNA s přidáním MgCl_2 (viz Obr. 5.37.). Ty obsahují DNA a při vystavení laseru se během měření map zvětšily. Jedním z možných vysvětlení vzniku těchto hrudek může být kondenzace DNA vyvolaná vícevazebnými kationty popsaná v článku [Bloomfield, 1997]. Uvádí se, že ke kondenzaci dochází, když je okolo 90 % náboje DNA neutralizováno kationty, což bylo v našem případě splněno. Dalším možným důvodem by mohlo být usazení DNA kolem nečistoty obsažené ve vzorku.

V této souvislosti je třeba zmínit první práci užívající DCDR spektroskopii k měření nukleových kyselin [Pagba et al., 2011], která vyšla na sklonku bakalářské práce. V této práci autoři užívají vzorky rozpuštěné v deionizované vodě a též s přidáním 100 mM KCl , avšak nikde se nezmiňují o tom, že nemohli získat klasický

„kávový“ kroužek či že byl nezřetelný, jak tomu muselo být v případě 100 mM roztoku KCl. To tedy vznáší otázku nad věrohodností dat zmíněných v této práci.

Závěrem lze však říci, že Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků je perspektivní metoda pro studium DNA. Zároveň se však podařilo ukázat, že její aplikace na DNA má svá úskalí, dosud u biomolekul srovnatelné velikosti (např. proteinů) nepozorovaná (viz kapitola 3.1). Pro zvýšení koncentrace a tedy i získání lepších spekter je vhodné použít roztok s kationty (nejlépe pak s dvojmocnými kationty), které neutralizují odpudivé síly. Jedině kompenzace náboje totiž vede ke vzniku tolik žádaného „kávového“ kroužku. V tomto případě se zdá, že by mohla být bezproblémově měřitelná i koncentrace řádově několika μM na bázi. Případné nehomogenní usazování vzorku však bude vyžadovat další zkoumání s ohledem na použitelnost DCDR metody pro detailní studium konformace a interakcí nukleových kyselin.

7. Literatura

- Cipriani P., Ben-Amotz D. (2005): Characterization of select members of the taxane family using Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 1052–1058.
- Benevides J. M., Overman S. A., Thomas G. J., Jr. (2005): Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 279–299.
- Benevides J. M., Tsuboi M., Wang, A. H.-J. and Thomas, G. J., Jr. (1993): Local Raman tensors of double-helical DNA in the crystal: A basis for determining DNA residue orientations. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5351–5359.
- Bloomfield V. A. (1997): DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers: Nucleic Acid Sci.* **44**(3), 269–282.
- Das G., Mecarini F., De Angelis F., Prasciolu M., Liberale C., Patrini M., Di Fabrizio E. (2008): Attomole (amol) myoglobin Raman detection from plasmonic nanostructures. *Microelectronic Eng.* **85**, 1282–1285.
- Das G., Mecarini F., Gentile F., De Angelis F., Kumar M. H. G., Candeloro P., Liberale C., Cuda G., Di Fabrizio E. (2009): Nano-patterned SERS substrate: Application for protein analysis vs. temperature. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 1693–1699.
- Das G., Gentile F., Coluccio M. L., Perri A. M., Nicastrì A., Mecarini F., Cojoc G., Candeloro P., Liberale C., De Angelis F., Fabrizio E. (2011): Principal component analysis based methodology to distinguish protein SERS spectra. *J. Mol. Struct.* **993**, 500–505.
- Djaoued Y., Balaji S., Priya S. (2007): Non-resonance micro-Raman spectroscopic studies on crystalline domoic acid and its aqueous solutions. *Spectrochim. Acta A* **67** (5), 1362–1369.
- Deegan R. D., Bajakin O., Dupont T. F., Huber G., Nagel S. R., Witten T. A. (1997): Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827–829.
- Filik J., Stone N. (2007): Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures. *Analyst* **132**(6), 544–550.
- Filik J., Stone N. (2008): Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **616**, 177–184.
- Filik J., Stone N. (2009): Investigation into the protein composition of human tear fluid using centrifugal filters and drop coating deposition Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 218–224.
- Gryniewicz C. M., Kauffman J. F. (2008): Multivariate calibration of covalent aggregate fraction to the Raman spectrum of regular human insulin. *J. Pharma. Sci.* **97**, 9, 3727–3734.
- Hu H., Larson R. G. (2002): Evaporation of a sessile droplet on a substrate. *J. Phys. Chem. B* **106**, 1334–1344.
- Hu H., Larson R. G. (2006): Marangoni effect reverses coffee-ring depositions. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7090–7094.

- Jenkins A. L., Larsen R. A., Williams T. B. (2004): Characterization of amino acids using Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta A* **61**, 1585–1594.
- Keresztury G. (2002): Raman Spectroscopy: Theory. *Handbook of vibrational spectroscopy*, vol. 1, Chalmers J. M. a Griffiths P. R. (ed.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Klener J. (2011): Diagnostika neurodegenerativních chorob pomocí Ramanovy spektroskopie. *Diplomová práce. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.*
- Kopecký V., Jr., Baumruk V. (2006): Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules. *Vibr. Spectrosc.* **42**, 184–187.
- Landsberg G. a Mandelstam L. (1928): Eine neue erscheinung bei der lichtzertreuung. *Naturwissenschaften* **16**, 557, 77.
- Mašek V. (2007): Charakterizace aduktů platinových komplexů na DNA duplexech pomocí Ramanovy spektroskopie. *Disertační práce, Biofyzikální ústav AV ČR, Brno.*
- Minsky M. (1988): Memoir on inventing the confocal microscope. *Scanning* **10**, 128–138.
- Moger J., Gribbon P., Sewing A., Winlove C. P. (2007): Feasibility study using surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of tyrosine and serine phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 912–918.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2004): Identification of insulin variants using Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.* **332**, 245–252.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Ribbe A. E., Ben-Amotz D. (2006): Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis. *Anal. Biochem.* **353**, 157–166.
- Ortiz C., Zhang D., Ribbe A. E., Xie Y., Ben-Amotz D. (2007): Analysis of insulin amyloid fibrils by Raman spectroscopy. *Biophys Chem.* **128** (2–3), 150–155.
- Pagba C. V., Lane S. M., Wachsmann-Hogiu S. (2011): Conformational changes in quadruplex oligonucleotide structures probed by Raman spectroscopy. *Biomed. Optics Express* **2**(2), 207–217.
- Prosser V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha 1989.
- Raman C. V. a Krishnan K. S. (1928): A new type of secondary radiation, *Nature* **121**, 501.
- Rosová N. (2008): Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR) tělních tekutin. *Bakalářská práce. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.*
- Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer, New York 1984.
- Semwogerere D., Weeks E. R. (2005): Confocal microscopy. Wnek G. and Bowlin G. (ed.): *Encyklopedia of biomaterials and biomedical engineering*. Taylor & Francis.

- Stefani F. D. (2004): Confocal microscopy applied to the study of single entity fluorescence and light scattering. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz*.
- Smekal A. (1923): Zur quantentheorie der dispersion. *Naturwissenschaften* **11**, 873–875.
- Šípková H. (2006): Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanosubstrátech. *Bakalářská práce. Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze*.
- Taillandier E., Liquier J. (2002): Vibrational spectroscopy of nucleic acids. *Handbook of vibrational spectroscopy*, vol. 5, Chalmers J. M. a Griffiths P. R. (ed.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Thomas G. J., Jr., Benevides J. M., Overman S. A., Ueda T., Ushizawa K., Saitoh M., Tsuboi M. (1995): Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations. *Biophys J.* **68**(3), 1073–88.
- Wall M. E., Rechtsteiner A., Rocha, L. M. (2003) Singular value decomposition and principal component analysis. Berrar D. P., Dubitzky W., Martin G., (edt.), *A Practical approach to microarray data analysis*, s. 91–109. Kluwer, Norwell.
- Xie Y., Zhang D., Jarori G. K., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2004): The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation. *Anal. Biochem.* **332**, 116–121.
- Xie Y., Jiang Y., Ben-Amotz D. (2005): Detection of amino acid and peptide phosphate protonation using Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.* **343**, 223–230. {Tato citace byla na chy}
- Xie Y., Zhang D., Ben-Amotz D. (2008): Protein–ligand binding detected using ultrafiltration Raman difference spectroscopy. *Anal. Biochem.* **373**, 154–160.
- Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson J., Ben-Amotz D. (2003): Raman detection of proteomic analytes. *Anal. Chem.* **75**, 5703–5709.
- Zhang D., Mrozek M. F., Xie Y., Ben-Amotz D. (2004): Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition. *Appl. Spectrosc.* **58**, 929–933.
- Zhang D., Jiang D., Yanney M., Zou S., Sygula A. (2009): Ratiometric Raman spectroscopy for quantification of protein oxidative damage. *Anal. Biochem.* **391**, 121–126.