

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-288

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.04.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **09.11.2016**
(Věstník č. 45/2016)

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/36 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
RNDr. Robert Pucek, Ph.D., Olbramice, CZ
Bc. Klára Černá, Vrbátky, CZ
doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D., Uničov, CZ
doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc., Velký Týnec, CZ
prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob přípravy magnetického kompozitu
pro účely povrchem zesílené Ramanovy
spektroskopie, magnetický kompozit a jeho
použití**

(57) Anotace:
Řešení se týká způsobu přípravy magnetického kompozitu pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, kdy se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a/nebo částice stříbra a/nebo zlata a nakonec se případně přidá roztok redukčního činidla, přičemž magnetický kompozit případně dále obsahuje streptavidin. Předmětem řešení je rovněž magnetický kompozit pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie připravitelný způsobem podle předkládaného řešení, který obsahuje kompozit polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem a částic zlata a/nebo stříbra. Dále je předmětem řešení použití magnetického kompozitu pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii.

CZ 2015 - 288 A3

Způsob přípravy magnetického kompozitu pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, magnetický kompozit a jeho použití

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy magnetického kompozitu za účelem použití v oblasti povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, magnetického kompozitu a jeho použití.

Dosavadní stav techniky

Vývoj rychlých, citlivých a specifických metod identifikace různorodých látek, pokud možno vyžadujících minimální množství analyzovaného vzorku, je velmi žádoucí a potřebný. Tento požadavek se týká zcela jistě řady oblastí lidské činnosti. Například pro efektivní léčbu bakteriálních infekcí je nezbytné použití rychlých a specifických metod identifikace konkrétního patogenu. V praxi zavedené a využívané postupy či techniky jsou většinou náročné jak z hlediska ekonomického, časového a také z hlediska nutnosti dostatečného proškolení odborného personálu. Konvenční imuno- či histochemické metody zahrnují časově náročné kultivace patogenů ve vhodném růstovém médiu, tak aby bylo možné specifikovat konkrétní bakteriální kmen.

Spektroskopické metody jako například infračervená, fluorescenční či luminiscenční spektroskopie představují slibný nástroj pro tyto účely. Ve srovnání s fluorescenčními či luminiscenčními metodami umožňuje infračervená spektroskopie poskytnout detailnější a specifitější informace o analyzované látce. Problematické je však použití této techniky ve vodných roztocích a to kvůli značné absorpci infračerveného záření molekulami vody, což je možné překonat za využití Ramanovy spektroskopie, která umožňuje měření ve vodném (tedy fyziologickém) prostředí. Použití klasické Ramanovy spektroskopie je bohužel limitováno značně nízkou účinností Ramanova rozptylu, kdy pro analýzu je nutné použití excitačního laseru o značném výkonu, dlouhé doby záznamu spekter a to navíc jen pro analýzu vzorků s poměrně velkou koncentrací sledovaného analytu. Zmíněný nedostatek lze překonat využitím povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Fleischmannův objev povrchově zesíleného Ramanova rozptylu (SERS) v roce 1974 na stříbrné elektrodě a zejména jeho znovuzobjevení na koloidních částicích stříbra v roce 1977 Creightonem znamenal vznik nové velmi citlivé analytické metody, umožňující detekci molekul v oblasti piko až femtomolů (Doering W. E.

and Nie S. M., J Phys Chem B, 106, 2002). Vysoké zesílení, dosahujících hodnot až 10^{15} umožnilo dokonce detekci jediné molekuly adsorbované na jediné stříbrné nanočástici (Michaels M. et al., J Am Chem Soc, 121, 1999; Nie S. and Emory S. R., Science, 275, 1997). Nejpoužívanějšími materiály pro použití v oblasti povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie jsou substráty na bázi stříbra a zlata. Částice stříbra pro aplikaci v oblasti SERS jsou nejčastěji připravovány redukcí stříbrné soli tetrahydridoboritanem (Creighton J. A. et al., J Chem Soc Faraday Trans 2, 75, 1979), citrátem sodným (Lee P. C. and Meisel D., J Phys Chem 86, 1982) či hydroxylaminem (Leopold N. and Lendl B., J Phys Chem B 107, 2003). Jako redukční činidlo pro redukci stříbrných iontů a vznik částic stříbra lze použít redukujících cukrů (Kvítek L. et al., J Mater Chem, 2005). Výše zmíněná redukční činidla jsou často také využívána pro přípravu zlatých koloidních částic aplikovatelných v oblasti SERS (Creighton J. A. et al., J Chem Soc Faraday Trans 2, 75, 1979; Lee P. C. and Meisel D., J Phys Chem 86, 1982; Yuan H., J Phys Chem C, 115, 2011). Tyto koloidní částice připravené výše uvedenými postupy však samy o sobě, zejména v případě nanočástic stříbra, neposkytují výrazné zesílení Ramanova signálu a za tímto účelem musejí být upraveny, k čemuž se hojně využívá přidavku roztoku anorganických iontů, zejména chloridů (Leopold, N. and Lendl, B. J Phys Chem B 107, 2003; Michaels A. et al., J Am Chem Soc 121, 1999; Leng W. N. et al., J Raman Spectrosc 37, 2006; Zhang P. X. et al., J Raman Spectrosc 21, 1990; Campbell M. et al., J Raman Spectrosc 30, 1999; Doering W. E. and Nie S. M., J Phys Chem B 106, 2002). Mechanismus působení těchto iontů na aktivaci nanočástic stříbra nebyl zcela vysvětlen, jedno z pravděpodobných vysvětlení tohoto efektu spočívá v částečné agregaci nanočástic stříbra způsobené uvedenými ionty. Nedávno bylo prokázáno, že v oblasti kontaktu dvou či více částic dochází k velmi výraznému povrchovému zesílení Ramanova signálu (Dadosh T. et al., ACS Nano 3, 2009; Li. W. Y. et al., Nano Lett 9, 2009; Brus L., Acc Chem Res 41, 2008). Velmi výrazná hodnota zesílení Ramanova signálu je také dosahována na nepravidelných částicích obsahujících množství nerovností a zakřivení na svém povrchu, například částic hvězdovitého tvaru či částic obsahujících na svém povrchu velké množství trnovitých výstupků (Yuan H. et al, Chem Mater 19, 2007; Yuan H. et al., J Phys Chem C 115, 2011; Li S. et al., ACS Appl Mater Interfaces 5, 2013; Chen K. et al., Analyst 137, 2012).

Substráty na bázi stříbra či zlata byly využity pro studium a detekci či stanovení řady významných či nebezpečných látek, jako například persistentních organických polutantů (Guerrnni L., et al., Anal Chim Acta 624, 2008), bisfenolu A (Xue J., et al., Anal Chim Acta 777, 2013), polychlorovaných bifenyľů (Bantz K. C., et al, Vib Spectrosc 50, 2009), antibiotik

(He L., et al., J Raman Spectrosc 41, 2010), polycyklických aromatických uhlovodíků (Guerrini L., et al., Anal Chem 81, 2009; Jones C. L., et al. Anal Bioanal Chem 394, 2009), trinitrotoluenu (Dasary S. S. R., et al, J Am Chem Soc 131, 2009; Mahmoud K. H. and Zourob M., Analyst 138, 2013), ricinu (He L., et al., J Food Sci 76, 2011), bakterií či kvasinek (Walter A, et al., Lab Chip 11, 2011; Culha M., et al., Surf Interface Anal 42, 2010; Fan C., et al., Appl Microbiol Biotechnol 92, 2011;), markerů bakterií (Cheng H-W., et al, Anal Chem 81, 2009; Cowcher D. P., et al., Anal Chem 85, 2013).

Značná řada publikovaných prací však využívá nespecifické a neselektivní interakce s částicemi stříbra či zlata, které slouží jakožto zesilovače Ramanova signálu. Zajímavou a slibnou metodu pro selektivní interakci či separaci látek (zejména organických, např. různých markerů) nabízí systém avidin-biotin. Avidin byl objeven již ve 40-tých letech minulého století, jedná se o protein o molekulové hmotnosti 67 kDa sestávající ze 4 stejných podjednotek. Tento glykoprotein je značně stabilní a odolává řadě extrémních podmínek (teplota, denaturační činidla, pH). Význačná je pro avidin velmi silná interakce s biotinem (vitamín B7 či vitamín H). Tato interakce s asociační konstantou 10^{15} M^{-1} představuje jednu z nejsilnějších nekovalentních interakcí. Avidin kromě interakce s biotinem je však schopen i řady nespecifických interakcí s jinými látkami. Tento fakt byl překonán prostřednictvím snížení obsahu karbohydrátů ve struktuře proteinu bez ovlivnění jeho interakce s biotinem. Tato látka je na trhu k dispozici od řady výrobců pod názvy NeutrAvidin (Thermo Scientific Pierce), NeutraLite (Belovo) či ExtrAvidin (Sigma-Aldrich). Další alternativu představuje protein streptavidin izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*. Jedná se o homolog avidinu, také se 4 podjednotkami, vykazující podobnou afinitu k biotinu, tak jako avidin. Jelikož je na trhu k dispozici velká řada biotinylovaných protilátek (případně lze provést biotinylací protilátky za použití známých postupů), tak lze tohoto systému biotinylovaná protilátka–streptavidin využít pro řadu aplikací zabývajících se studiem či detekcí rozmanitých látek (Dundas Ch. M. et al., Appl Microbiol Biotechnol 97, 2013; Sapsford K. E. et al., Chem Rev 113, 2013).

Výhodným krokem je nanesení žádané protilátky na magnetický nosič, umožňující selektivní zachycení žádaného antigenu a následně pak i jeho separaci, přečištění a případné zakoncentrování pro následnou analýzu. Tímto přístupem byla např. provedena detekce a separace patogenů (Wang Y. et al., Anal Bioanal Chem 399, 2011) či imunoglobulinu IgG (Chen S. et al., Chem Comm 47, 2011). V těchto případech však byla separace provedena na magnetických částicích pokrytých vhodnou protilátkou a poté byly teprve přidány modifikované

koloidní částice zlata, jež slouží jako zesilovače Ramanova signálu daného analytu. Tyto postupy jsou však experimentálně náročné a zdlouhavé z hlediska měření povrchem zesílených Ramanových spekter.

Ještě výhodnější oproti předešlým postupům je nanesení částic stříbra přímo na magnetický nosič modifikovaný protilátkou případně modifikovaný streptavidinem. Předmětem publikace Balzerová A. et al., Anal Chem 86, 2014 je nanesení částic stříbra na částice magnetitu. Tento kompozit je následně modifikován polyetylenglykolem a karboxymetylcelulosou s následným navázáním streptavidinu. Nedostatkem tohoto postupu je, že probíhá v 5 reakčních krocích, což značně zvyšuje riziko nereprodukovatelnosti přípravy uvedeného substrátu a vyžaduje pečlivé promývání vzorku mezi jednotlivými reakčními kroky. Celý proces navíc vyžaduje několik hodin. Taktéž vlivem magnetických sil dochází k agregaci částic uvedeného kompozitu. Podobný vícekrokový postup přípravy byl použit v publikaci Hongrong J. et al., J Biomed Nanotechnol 9, 2013 pro přípravu streptavidinem modifikovaného třívrstvého core-shell kompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález řeší nevýhody stavu techniky přípravou magnetického kompozitu pro účely selektivní a specifické detekce či studia látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS), jejíž podstata spočívá v tom, že se k polystyrenovým částicím obsahujícím magnetické jádro přidávají stříbrné, zlatité či zlatné ionty a provede se jejich redukce, nebo se přidají částice stříbra a/nebo zlata, přičemž polystyrenové částice a/nebo částice stříbra a/nebo zlata mohou s výhodou obsahovat streptavidin. Částice zlata či stříbra (přidané ve formě částic nebo vzniklé in situ redukcí) se naváží na polystyrenové částice s magnetickým jádrem a fungují jako zesilovač Ramanova signálu daného analytu.

Polystyrenové částice mohou být modifikovány streptavidinem (tj. obsahovat streptavidin), například mohou být pokryty streptavidinem. Polystyrenové částice pokryté streptavidinem jsou výhodné pro selektivní a specifickou separaci a přečištění žádaného biotinylovaného analytu od ostatních balastních látek přítomných v analyzovaném vzorku.

Předkládaný vynález připraví magnetický kompozit efektivně zesilující Ramanův signál v jednom kroku, což výrazně snižuje problémy stavu techniky se zdlouhavostí, náročností a

nereprodukovatelností přípravy. Pomocí předkládaného vynálezu lze reprodukovatelně připravit magnetický kompozit efektivně zesilující Ramanův signál biotinylovaného analytu, či případně daného antigenu po jeho specifické reakci s biotinylovanou protilátkou, kterou je možné navázat skrze biotin na streptavidin, jenž je případně ukotvený na povrchu polystyrenových částic s magnetickým jádrem. Předkládaný vynález tak umožňuje rychlou, selektivní a specifickou metodu detekce pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie.

Oproti substrátům využívajícím magnetické oxidy železa ze stavu techniky má magnetický kompozit podle předkládaného vynálezu nižší specifickou hustotu (např. přibližně čtyřnásobně nižší v případě komerčně dostupných polystyrenových částic s magnetickým jádrem Sigma-Aldrich, katalogové číslo 49532, velikost částic $1\ \mu\text{m} \pm 0,1\ \mu\text{m}$; Sigma-Aldrich, katalogové číslo 08014, velikost částic $10\ \mu\text{m} \pm 0,5\ \mu\text{m}$), což výrazně snižuje náchylnost polystyrenových částic s magnetickým jádrem k jejich sedimentaci a tedy výrazně zvyšuje reprodukovatelnost a stabilitu měření povrchem zesílených Ramanových spekter. Oproti magnetickým částicím na bázi oxidů železa mají polystyrenové částice s magnetickým jádrem podle vynálezu také výrazně menší náchylnost k vlastní agregaci vlivem magnetických přitažlivých sil.

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy způsob přípravy magnetického kompozitu pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, kdy se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem, s výhodou o velikosti $1\ \mu\text{m}$ až $10\ \mu\text{m}$, výhodněji o velikosti $1\ \mu\text{m}$, přidá stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a/nebo částice stříbra a/nebo zlata, s výhodou o velikosti v rozmezí od $10\ \text{nm}$ do $500\ \text{nm}$, a nakonec se případně přidá roztok redukčního činidla, přičemž polystyrenové částice a/nebo částice stříbra a/nebo zlata s výhodou obsahují streptavidin. V jednom provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od $100\ \text{nm}$ do $500\ \text{nm}$. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od $20\ \text{nm}$ do $500\ \text{nm}$. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od $20\ \text{nm}$ do $40\ \text{nm}$. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od $200\ \text{nm}$ do $400\ \text{nm}$. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od $10\ \text{nm}$ do $100\ \text{nm}$. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od $300\ \text{nm}$ do $500\ \text{nm}$.

Ve vodě rozpustná stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl je solí anorganické nebo organické kyseliny, s výhodou vybrané ze skupiny zahrnující etylendiamintetraoctovou kyselinu, HCl , HF , HI , HBr , HCN , H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 a soli obsahující zlato v aniontu, například zlatitany

alkalických kovů. Nejvýhodněji je stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl solí HCl, HNO₃ a HClO₄.

V jednom provedení se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá spojovací molekula, stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a nakonec se popřípadě přidá roztok redukčního činidla.

Některé spojovací molekuly mohou zároveň zastat funkci redukčního činidla, pak není potřeba nakonec přidávat další redukční činidlo. Spojovací molekula je s výhodou vybrána ze skupiny zahrnující látky obsahující C6-C8 aromatické jádro nebo C5-C8 heteroarylové jádro obsahující alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N, přičemž aromatické nebo heteroarylové jádro může být substituované, s výhodou alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující OH, NH₂, F, Cl, Br, CH₃, NO₂ a C1-C20 (s výhodou C1-C6) alkylový řetězec nebo jejich kombinací, nejvýhodněji je aromatické nebo heteroarylové jádro substituováno alespoň jednou OH skupinou, přičemž aromatické nebo heteroarylové jádro a/nebo C1-C20 (s výhodou C1-C6) alkylový řetězec jsou substituovány alespoň jednou amino či thiolovou skupinou. S výhodou je C1-C20 (výhodněji C1-C6) alkylový řetězec substituován terminálně. C1-C20 (s výhodou C1-C6) alkylový řetězec může být dále substituován, s výhodou karboxylovou skupinou. Výhodněji je spojovací molekulou benzenthionol, histidin, aminofenol, aminothiofenol, fenylbutylamin, fenylethylamin, fenylalanin či dopamin, nejvýhodněji je spojovací molekulou dopamin. Dopamin, který obsahuje ve své struktuře aromatické jádro schopné interakce s polystyrenovými částicemi a také obsahuje amino skupinu, která má velmi velkou afinitu vůči iontům, atomům nebo částicím zlata a/nebo stříbra, také ovlivňuje morfologii generovaných částic stříbra a/nebo zlata, které následně umožňují velmi výrazné zesílení Ramanova signálu daného analytu.

V jiném provedení se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá spojovací molekula, stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a nakonec se popřípadě přidá roztok redukčního činidla, přičemž polystyrenové částice s magnetickým jádrem jsou pokryté streptavidinem.

V jiném provedení se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá spojovací molekula, a následně částice stříbra a/nebo zlata pokryté streptavidinem.

V jiném provedení se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a nakonec se přidá roztok redukčního činidla. Polystyrenové částice s magnetickým jádrem mohou nebo nemusí být pokryté streptavidinem.

Redukční činidlo je s výhodou vybráno ze skupiny zahrnující kyselinu askorbovou, hydrochinon, pyrokatechol, pyrogallol, aminofenol, obecné kovy, hydridy, hydridoboritany, hydroxylamin, hydrazin, dopamin a redukující cukry (xylosu, maltosu, laktosu, glukosu, galaktosu). V případě iontů zlata jsou výhodnými redukčními činidly dopamin, hydrochinon, pyrokatechol a jejich deriváty, které ovlivňují morfologii generovaných částic zlata, což následně umožňuje intenzivnější zesílení Ramanova signálu.

pH reakční směsi je s výhodou v rozmezí od 2,5 do 12.

V jiném provedení vynálezu se k reakční směsi před přidavkem redukčního činidla přidá amoniak.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž magnetický kompozit pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie připravitelný způsobem podle předkládaného vynálezu, který obsahuje kompozit polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem a koloidních částic zlata a/nebo stříbra o velikosti v rozmezí od 10 nm do 500 nm, přičemž výsledný magnetický kompozit případně dále obsahuje streptavidin. V jednom provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od 100 nm do 500 nm. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od 20 nm do 500 nm. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od 20 nm do 40 nm. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od 200 nm do 400 nm. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od 10 nm do 100 nm. V jiném provedení mají částice stříbra a/nebo zlata velikost v rozmezí od 300 nm do 500 nm.

Ve výhodném provedení obsahuje magnetický kompozit polystyrenové mikročástice s magnetickým jádrem pokryté streptavidinem.

V jiném výhodném provedení obsahuje magnetický kompozit částice zlata a/nebo stříbra, které jsou pokryty streptavidinem.

Předmětem vynálezu je dále použití magnetického kompozitu podle vynálezu pro selektivní a specifické detekce a/nebo studia látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. S výhodou je excitační vlnová délka použitého laseru v rozmezí 488 nm až 1064 nm, výhodněji 514 nm až 830 nm, nejvýhodněji 532 nm nebo 785 nm.

Seznam vyobrazení

- Obr. 1 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic pokrytých streptavidinem připravených dle Příkladu 1.
- Obr. 2 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic pokrytých streptavidinem připravených dle Příkladu 2.
- Obr. 3 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic pokrytých streptavidinem připravených dle Příkladu 3.
- Obr. 4 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic pokrytých streptavidinem připravených dle Příkladu 4.
- Obr. 5 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic pokrytých streptavidinem připravených dle Příkladu 5.
- Obr. 6 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic připravených dle Příkladu 6.
- Obr. 7 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic připravených dle Příkladu 7.
- Obr. 8 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic připravených dle Příkladu 8.
- Obr. 9 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic připravených dle Příkladu 9.
- Obr. 10 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic připravených dle Příkladu 10.
- Obr. 11 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic pokrytých streptavidinem připravených dle Příkladu 11.
- Obr. 12 zobrazuje transmisní elektronové snímky kompozitu částic zlata pokrytých streptavidinem a polystyrenových mikročástic připravených dle Příkladu 11.
- Obr. 13 zobrazuje povrchem zesílená Ramanova spektra za použití kompozitu připraveného dle Příkladu 2 a za použití excitačního laseru s vlnovou délkou 532 nm. (A) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem

připraveného dle Příkladu 2. (B) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu A (marker bakterie *Staphylococcus aureus*). (C) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu A a přidavku bakterie *Staphylococcus aureus*. (D) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu A a přidavku klinického materiálu (kloubní punktát) následně mimotělně infikovaného bakterií *Staphylococcus aureus*.

Obr. 14 zobrazuje povrchem zesílená Ramanova spektra za použití kompozitu připraveného dle Příkladu 1 a za použití excitačního laseru s vlnovou délkou 785 nm. (A) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2. (B) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 1 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu Tau (marker pro Alzheimerovu nemoc). (C) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 1 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu Tau a po přidavku Tau proteinu.

Příklady provedení vynálezu

Jako prekurzor pro přípravu kompozitu s magnetickým jádrem pro účely studia a detekce látek za využití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, byly použity komerčně dostupné polystyrenové mikročástice s magnetickým jádrem a se streptavidinem navázaným na povrchu částic (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 49532, velikost částic $1\ \mu\text{m} \pm 0,1\ \mu\text{m}$, vazebná aktivita vůči biotinu $> 600\ \text{pmol/mg}$, obsah oxidu železa $\geq 20\ \%$, teplota skladování $2\ \text{až}\ 8\ ^\circ\text{C}$), Sigma-Aldrich, katalogové číslo 08014, velikost částic $10\ \mu\text{m} \pm 0,5\ \mu\text{m}$, vazebná aktivita vůči biotinu $> 1000\ \text{pmol/mg}$, obsah oxidu železa $\geq 20\ \%$, teplota skladování $2\ \text{až}\ 8\ ^\circ\text{C}$). Kompozity uvedených polystyrenových částic s nanočásticemi stříbra a/nebo zlata byly připravovány redukcí zlatitých a/nebo zlatných iontů či případně redukcí amoniakálního komplexu stříbrných iontů redukčním činidlem kyselinou askorbovou, dopaminem anebo redukujícími cukry (např. maltosou, glukosou, atd.). Uvedené látky byly získány od firmy Sigma-Aldrich.

Velikost a morfologie částic zlata a stříbra byly pozorovány pomocí metody transmisní elektronové mikroskopie (TEM) na přístroji JEM 2010 (Jeol, Japonsko) za využití urychlovacího napětí 160 kV.

Povrchem zesílená Ramanova spektra byla měřena pomocí DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA) vybaveného termoelektricky chlazeným (-50 °C) CCD detektorem a za využití laseru s vlnovou délkou 532 nebo 785 nm. Doba záznamu spekter činila 10 s, počet akumulací byl 10, výkon laseru 10 mW. Měření povrchem zesílených Ramanových spekter bylo prováděno po nanesení 20 µl výše zmíněného vzorku kompozitu na podložní materiál na vrstvy oxidu hlinitého případně na sklo či křemen.

Příklad 1

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití dopaminu jako redukčního činidla při hodnotě pH 2,83

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,2 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 µm s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 9,1 ml deionizované vody a poté 0,2 ml 1% (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku hydrátu chloridu zlatitého o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a reakční směs byla následně promíchávána 5 minuty. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 1.

Příklad 2

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla při hodnotě pH 10,57 a za přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,2 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 µm s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,1 ml deionizované vody a poté 0,2 ml 1% (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku hydrátu chloridu zlatitého (molární hmotnost 339,79 g/mol) o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 1 ml roztoku NaOH o

koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 10,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Následně byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 2.

Příklad 3

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla při hodnotě pH 2,53 a bez přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,2 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti $1 \mu\text{m}$ s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 8,3 ml deionizované vody. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku chloridu zlatného o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs byla následně promíchána 3 minuty. Poté byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 3.

Příklad 4

Způsob přípravy kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla při hodnotě pH 10,54 a za přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,2 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti $1 \mu\text{m}$ s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,75 ml deionizované vody a poté 0,2 ml 1% (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s následným přidavkem 0,15 ml roztoku amoniaku o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 0,2 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 10,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Poté byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 4.

Příklad 5

Způsob přípravy kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití kyseliny askorbové při hodnotě pH 10,46 a bez přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,2 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 μm s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,95 ml deionizované vody. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, s následným přidavkem 0,15 ml roztoku amoniaku o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 0,2 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 10,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Poté byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 5.

Příklad 6

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem provedený za použití glukosy jako redukčního činidla při hodnotě pH 11,52 a za přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,04 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 μm s magnetickým jádrem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 5 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,26 ml deionizované vody a poté 0,2 ml 1% (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku chloridu zlatitého (molární hmotnost 303,33 g/mol) o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 1 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 11,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Následně byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku glukosy o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 6.

Příklad 7

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem provedený za použití glukosy jako redukčního činidla při hodnotě pH 11,96 a bez přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,04 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 μm s magnetickým jádrem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace části 5 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,46 ml deionizované vody. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku draselné soli kyseliny zlatité o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 1 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 11,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Následně byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku glukosy o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 7.

Příklad 8

Způsob přípravy kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem provedený za použití glukosy jako redukčního činidla při hodnotě pH 11,58 a za přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,04 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 μm s magnetickým jádrem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 5 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,90 ml deionizované vody a poté 0,2 ml 1 % (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku chloristanu stříbrného o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s následným přidavkem 0,15 ml roztoku amoniaku o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 0,2 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 11,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Poté byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku glukosy o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 8.

Příklad 9

Způsob přípravy kompozitu částic stříbra a polystyrenových mikročástic provedený za použití glukosy jako redukčního činidla při hodnotě pH 11,52 a bez přítomnosti dopaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,04 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 μm s magnetickým jádrem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 5 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,95 ml deionizované vody. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s následným přidavkem 0,15 ml roztoku amoniaku o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 0,2 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 11,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Poté byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku glukosy o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 9.

Příklad 10

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla při hodnotě pH 2,92 a za přítomnosti fenylbutylaminu

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 0,2 ml ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 1 μm s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace části 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 7,1 ml deionizované vody a poté 0,2 ml 1% (w/w) roztoku fenylbutylaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku hydrátu chloridu zlatitého o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota pH reakční směsi byla upravena pomocí cca 1 ml roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby pH činilo cca 10,5 a směs byla poté ještě promíchána 3 minuty. Následně byl do reakčního systému vpraven 1 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakční směs se poté nechala promíchávat 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 10.

Příklad 11

Způsob přípravy kompozitu částic zlata a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem provedený za použití dopaminu jako redukčního činidla při hodnotě pH 2,87

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 200 μl ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic o velikosti 10 μm s magnetickým jádrem pokrytých streptavidinem (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 9,1 ml deionizované vody a poté 200 μl 1% (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku hydrátu chloridu zlatitého o koncentraci zásobního roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a reakční směs byla následně promíchávána 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 11.

Příklad 12

Způsob přípravy kompozitu částic zlata pokrytých streptavidinem a polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem provedený za použití dopaminu jako redukčního činidla při hodnotě pH 2,87

Do kádinky o objemu 25 ml bylo vpraveno 200 μl ze zásobní disperze polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem o velikosti 1 μm (Sigma-Aldrich, hmotnostní koncentrace částic 1 % v disperzi). Poté bylo přidáno 9,3 ml deionizované vody a poté 200 μl 1% (w/w) roztoku dopaminu. Reakční směs byla promíchána 5 minut na elektromagnetické míchačce při otáčkách cca 500 rpm. Poté bylo přidáno 0,2 ml roztoku disperze nanočástic zlata o velikosti 20 nm pokrytých streptavidinem a směs byla následně promíchávána 5 minut. TEM snímky připraveného kompozitu jsou uvedeny v Obr. 12.

Příklad 13

Detekce přítomnosti bakterie Staphylococcus aureus v klinickém materiálu

Byla provedena detekce přítomnosti bakterie *Staphylococcus aureus* v klinickém materiálu (kloubním punktátu) za využití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie a magnetického kompozitu umožňujícího selektivní separaci, přečištění a detekci markeru (Protein A) typického pro bakterii *Staphylococcus aureus*.

V experimentech byl používán sterilní punktát z kolene od neznámého pacienta. Sterilita punktátu byla ověřena naočkováním na krevní agar a do Mueller-Hintonova bujónu. Z punktátu byly připraveny čtyři typy vzorků: punktát, do kterého byl přimíchán bakteriální lyzát (ad A),

punktát homogenizovaný s živou bakteriální kulturou (ad B), dále punktát s bakteriální suspenzí v Mueller-Hintonově bujónu (ad C) a punktát s bakteriální suspenzí ve fyziologickém roztoku (ad D).

A) K přípravě bakteriálního lyzátu byla použita dvacetičtyřhodinová kultura *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Dobře izolované kolonie byly přeneseny do 5 ml Mueller-Hintonova bujónu, aby výsledný zákal odpovídal zákalovému standardu 1 podle McFarlanda. Bakteriální suspenze byla kultivována při 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byl bujón centrifugován (2000 otáček/10 minut), supernatant slit a k sedimentu přidán 1 ml destilované vody. Promíchaná suspenze byla střídavě zmrazována při teplotě -72 °C po dobu 10 minut a rozmrazována ve vodní lázni při teplotě 37 °C, celkem desetkrát. Takto připravený lyzát byl smíchán s punktátem v poměru 1:1.

B) Do 1 ml punktátu byla přidána 1 středně velká kolonie dvacetičtyřhodinové kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a vzorek byl následně homogenizován v minitřepačce.

C) Dobře izolované kolonie dvacetičtyřhodinové kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 byly přeneseny do 2 ml Mueller-Hintonova bujónu, aby výsledný zákal odpovídal zákalovému standardu 0,5 podle McFarlanda. Bakteriální suspenze byla homogenizována v minitřepačce a následně smíchána s punktátem v poměru 1:1.

D) Dobře izolované kolonie dvacetičtyřhodinové kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 byly přeneseny do 2 ml fyziologického roztoku, aby výsledný zákal odpovídal zákalovému standardu 0,5 podle McFarlanda. Bakteriální suspenze byla homogenizována v třepačce a následně smíchána s punktátem v poměru 1:1.

Výsledná detekce přítomnosti bakterie *Staphylococcus aureus* v kloubním punktátu byla provedena za použití excitačního laseru s vlnovou délkou 532 nm:

Na obrázku 13 jsou znázorněna povrchem zesílená Ramanova spektra za použití kompozitu připraveného dle Příkladu 2 a za použití excitačního laseru s vlnovou délkou 532 nm.

(A) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2.

(B) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu A (marker bakterie *Staphylococcus aureus*).

(C) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu A a přidavku bakterie *Staphylococcus aureus*.

(D) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu A a přidavku klinického materiálu (kloubní punktát) následně mimotělně infikovaného bakterií *Staphylococcus aureus*.

Rozdílné spektrální pásy ve výše uvedených spektrech je možné využít k detekci infekce bakterií *Staphylococcus aureus* v biologickém materiálu.

Příklad 14

Detekce přítomnosti Tau proteinu

Tau protein (τ -protein) je bílkovinná komponenta, která se vyskytuje v neuronech mozkové tkáně. Za normálních okolností stabilizuje mikrotubulární struktury axonů. U Alzheimerovy choroby dochází k abnormální fosforylaci tohoto proteinu a ke zvýšenému vylučování do mozkomíšního moku. Fyziologická, normální hodnota, tau proteinu se v případě populace pod 60 let pohybuje v rozsahu $17,3 \pm 4,4 \text{ } \mu\text{g/l}$ a v případě populace nad 60 let $24,8 \pm 15,2 \text{ } \mu\text{g/l}$. Patologická hodnota tau proteinu v mozkomíšním moku, tedy příznak Alzheimerovy choroby, se v případě populace pod 60 let pohybuje v rozsahu $33,3 \pm 12,3 \text{ } \mu\text{g/l}$ a v případě populace nad 60 let $61,7 \pm 35,4 \text{ } \mu\text{g/l}$.

Byla provedena detekce Tau proteinu (Sigma-Aldrich, T7951) za využití kompozitu připraveného dle Příkladu 1 a za použití anti Tau protilátky (Sigma-Aldrich, SAB 4501821).

Anti Tau protilátka byla biotinylována za použití Biotin N-hydroxysuccinimidu (sigma-Aldrich, H1759). Pro experimenty bylo vždy použito 10 μl od disperze kompozitu, 10 μl od roztoku anti Tau protilátky a 10 μl roztoku Tau proteinu. Ve všech případech byly reakční směsi doplněny fyziologickým roztokem, tak aby výsledné objemy činily 30 μl . Výsledná koncentrace Tau proteinu činila ve vzorku (spektrum C, obr. 14) činila 100 $\mu\text{g/l}$.

Obr. 14 zobrazuje povrchem zesílená Ramanova spektra za použití kompozitu připraveného dle Příkladu 1 a za použití excitačního laseru s vlnovou délkou 785 nm. (A) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 2. (B) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 1 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu Tau. (C) Povrchem zesílené Ramanovo spektrum kompozitu částic zlata a polystyrenových částic pokrytých streptavidinem připraveného dle Příkladu 1 a po přidavku biotinylované protilátky vůči proteinu Tau a po přidavku Tau proteinu. Rozdílné spektrální pásy ve výše uvedených spektrech je možné využít k detekci Tau proteinu.

PATENTOVÉ NÁROKY

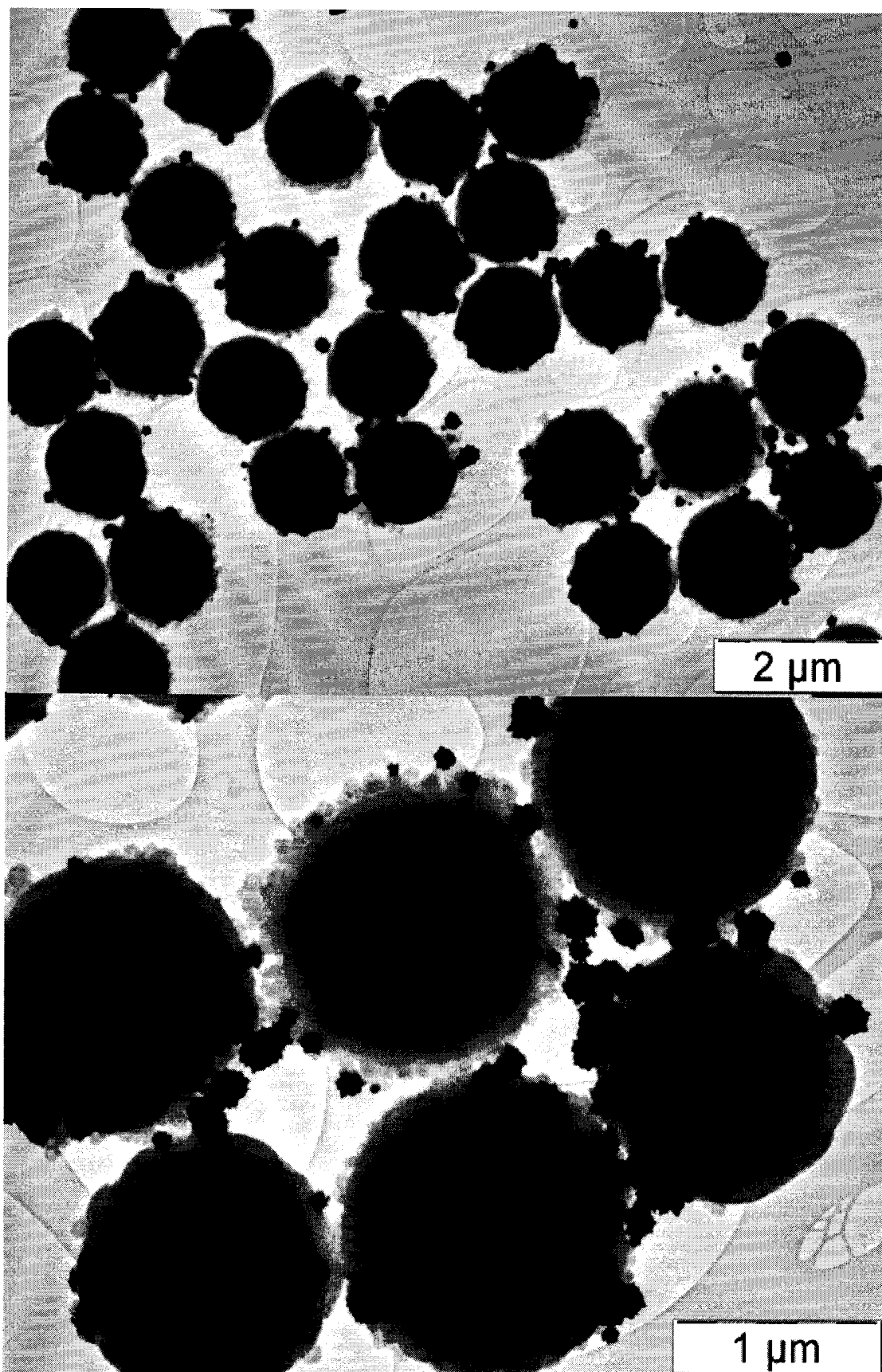
1. Způsob přípravy magnetického kompozitu pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, **vyznačený tím, že** se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a/nebo částice stříbra a/nebo zlata a nakonec se případně přidá roztok redukčního činidla, přičemž polystyrenové částice a/nebo částice stříbra a/nebo zlata s výhodou obsahují streptavidin.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím, že** se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá spojovací molekula, stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a nakonec se popřípadě přidá roztok redukčního činidla.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím, že** se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá spojovací molekula, stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a nakonec se popřípadě přidá roztok redukčního činidla, přičemž polystyrenové částice s magnetickým jádrem jsou pokryté streptavidinem.
4. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím, že** se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá spojovací molekula, a následně částice stříbra a/nebo zlata pokryté streptavidinem.
5. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím, že** se k vodné disperzi polystyrenových částic s magnetickým jádrem přidá stříbrná a/nebo zlatitá a/nebo zlatná sůl a nakonec se přidá roztok redukčního činidla, přičemž polystyrenové částice s magnetickým jádrem mohou nebo nemusí být pokryté streptavidinem.
6. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a 5, **vyznačený tím, že** redukční činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující kyselinu askorbovou, hydrochinon, pyrokatechol, pyrogallol, aminofenol, obecné kovy, hydridy, hydridoboritany, hydroxylamin, hydrazin, dopamin a redukující cukry.
7. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím, že** pH reakční směsi je v rozmezí od 2,5 do 12.

8. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím, že** se k reakční směsi před přidavkem redukčního činidla přidá amoniak.
9. Magnetický kompozit pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie připravitelný způsobem podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, který obsahuje kompozit polystyrenových mikročástic s magnetickým jádrem a částic zlata a/nebo stříbra.
10. Magnetický kompozit podle nároku 9, **vyznačený tím, že** polystyrenové mikročástice s magnetickým jádrem a/nebo částice zlata a/nebo stříbra jsou pokryty streptavidinem.
11. Použití magnetického kompozitu podle nároků 8 až 10 pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii.

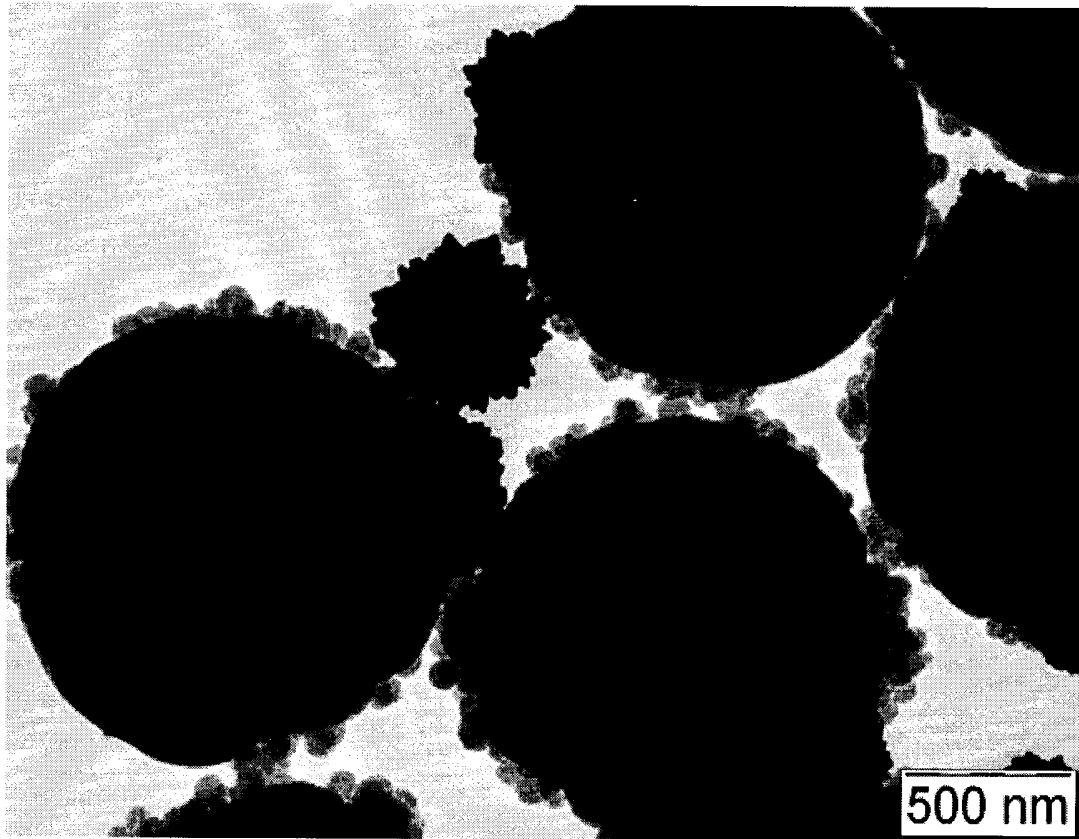
У 15037-149
29.04.15

1/14

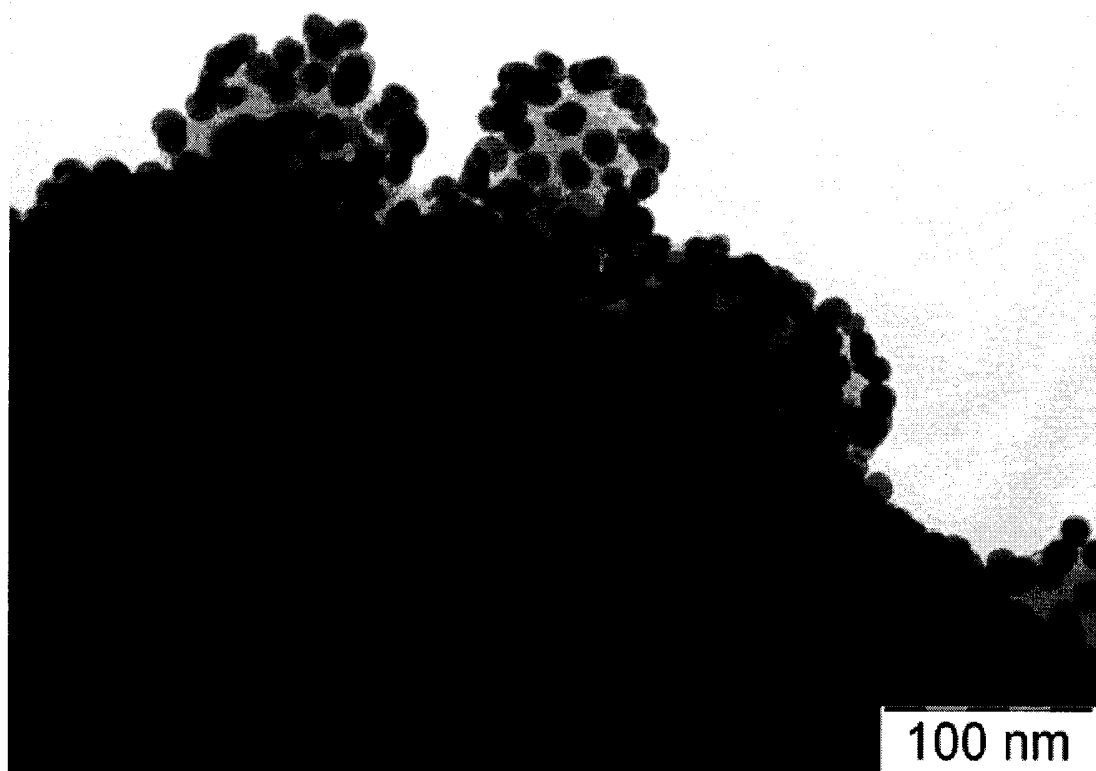
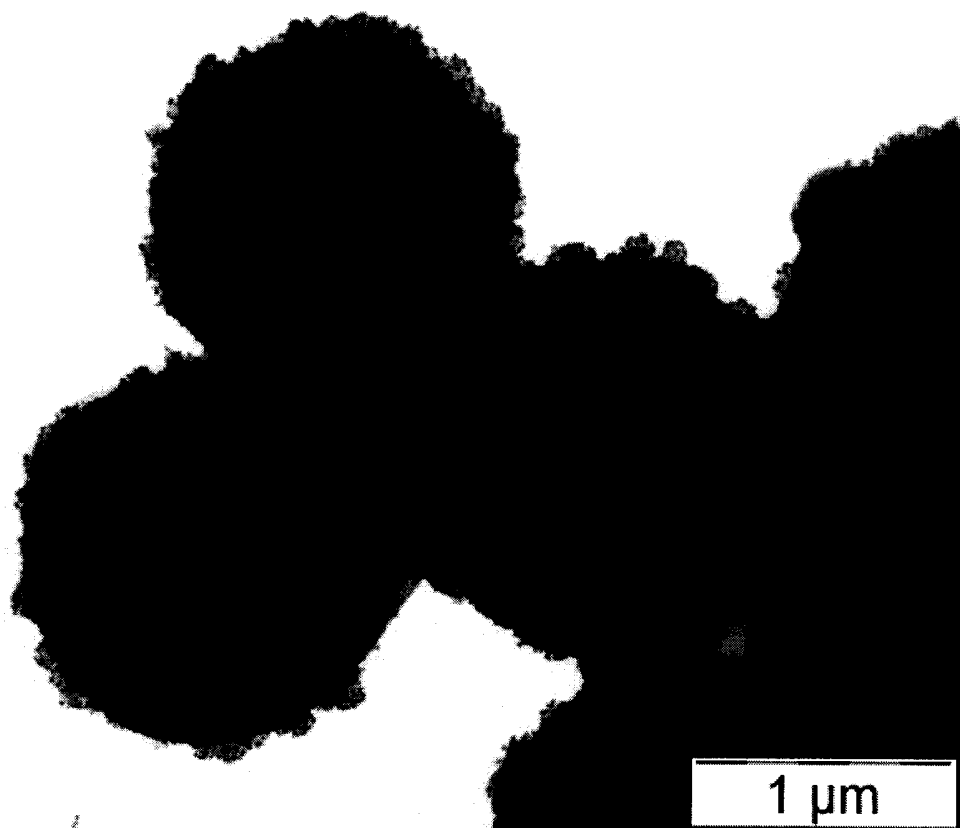
7V2015-288



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

J 150 27 149

29.04.15

7V 2015-288

4/14



Obr. 4

7 150 37 149

29.04.15

7V 2015-288

5/14



1 μm

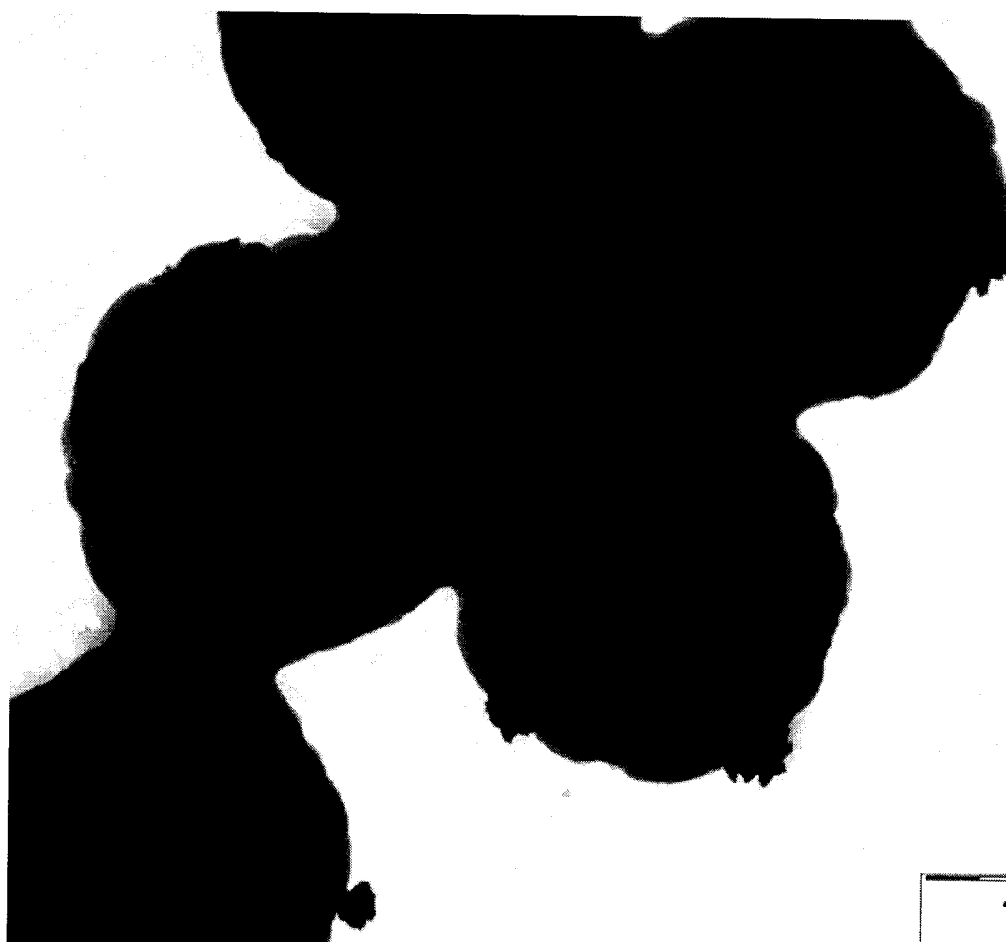
Obr. 5

J 150 J7 149

29.04.15

7V2015-208

6/14



1 μ m

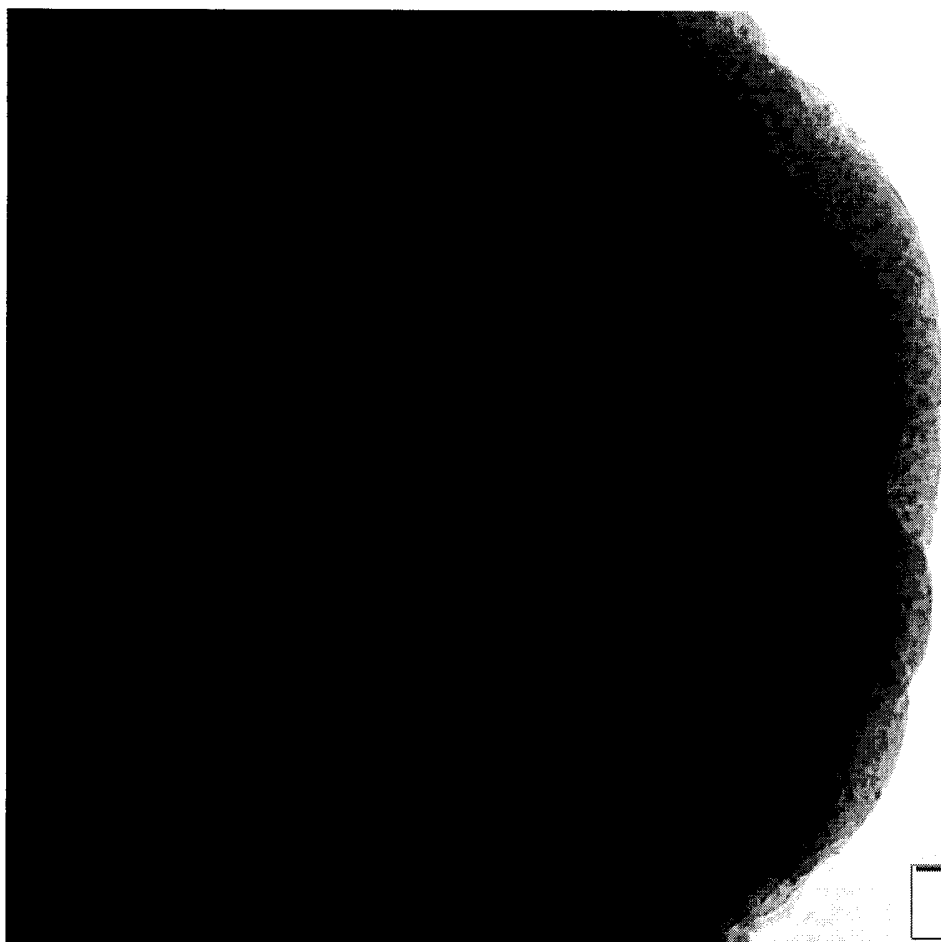
Obr. 6

8150 17149

29.04.15

7/14

фв 2015-288

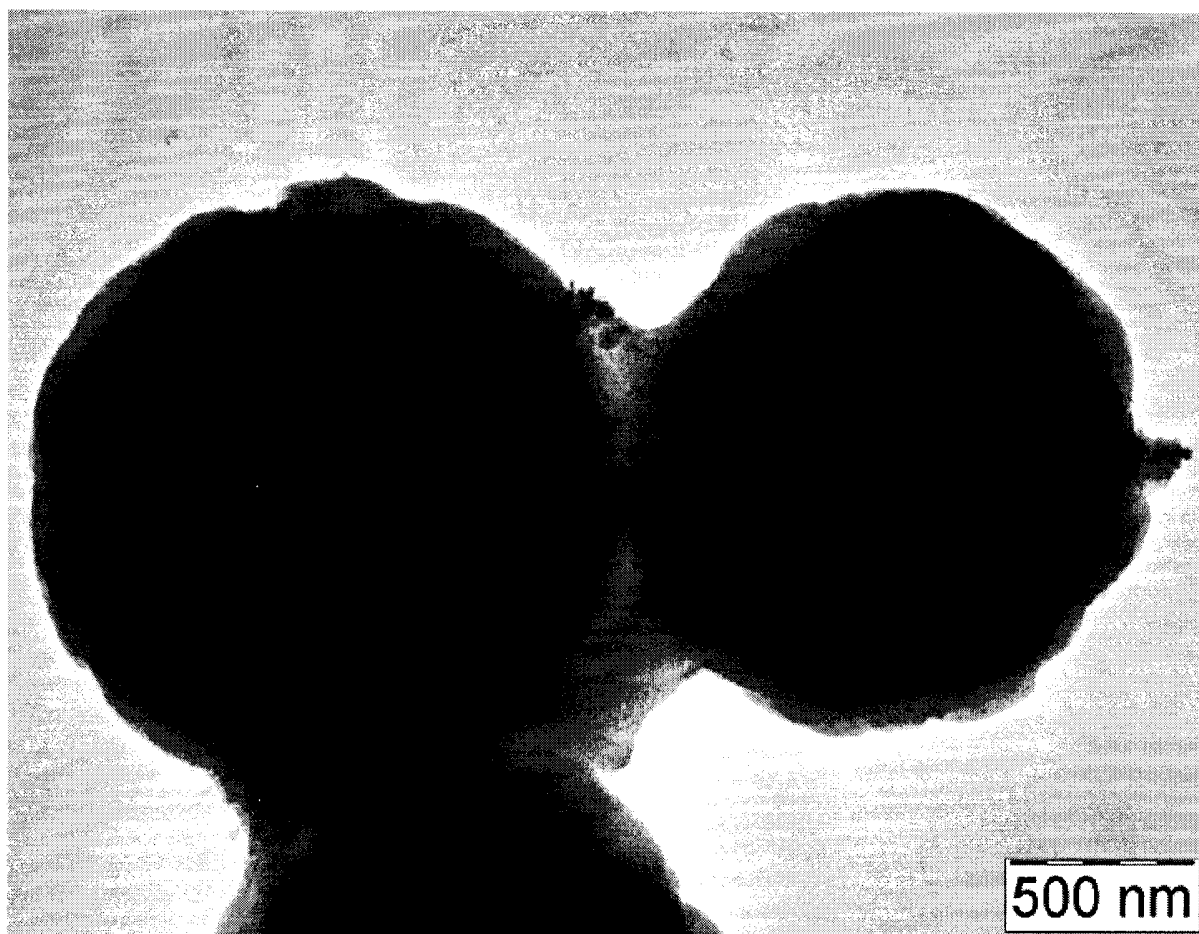


200 nm

Obr. 7

8/14

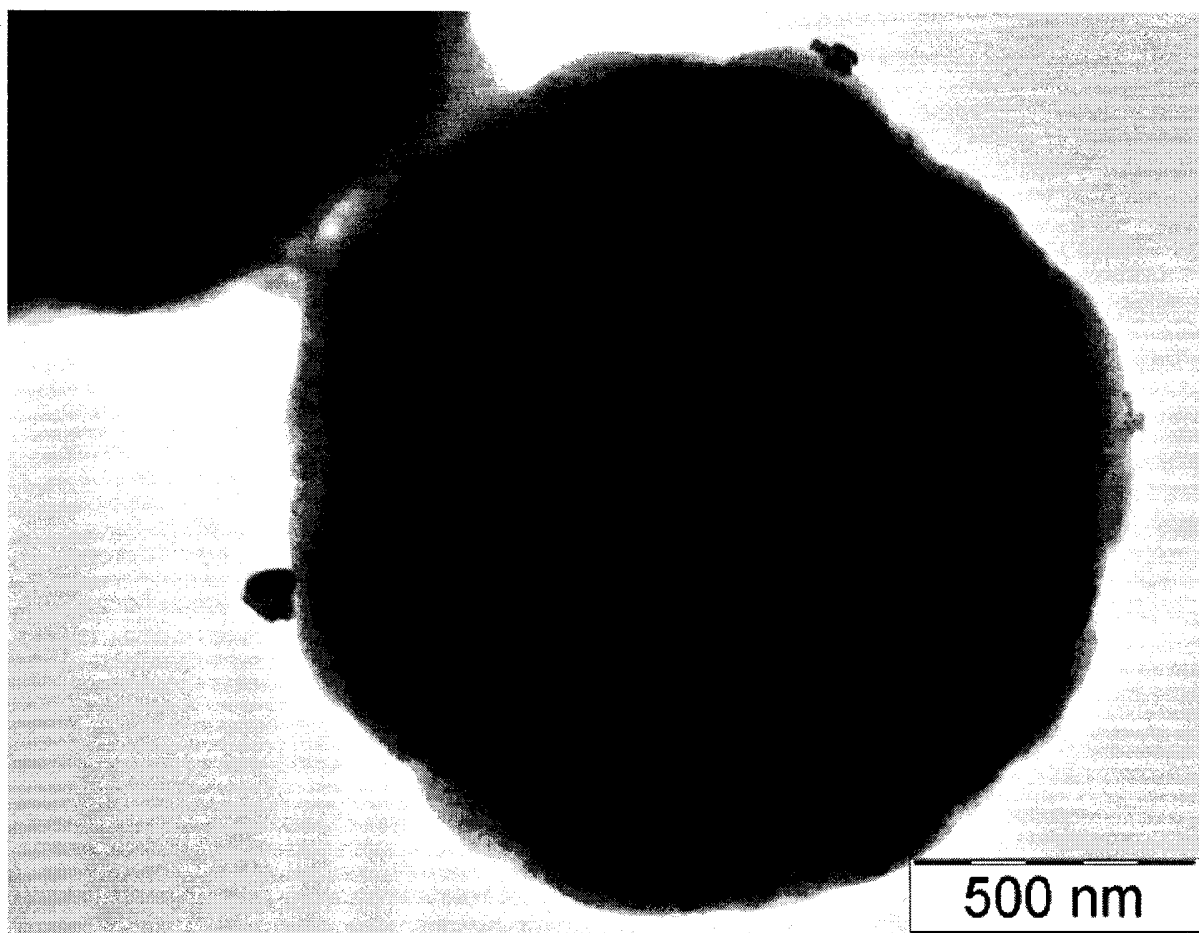
8 150 37 149
29.04.15
7V 2015-288



Obr. 8

9/14

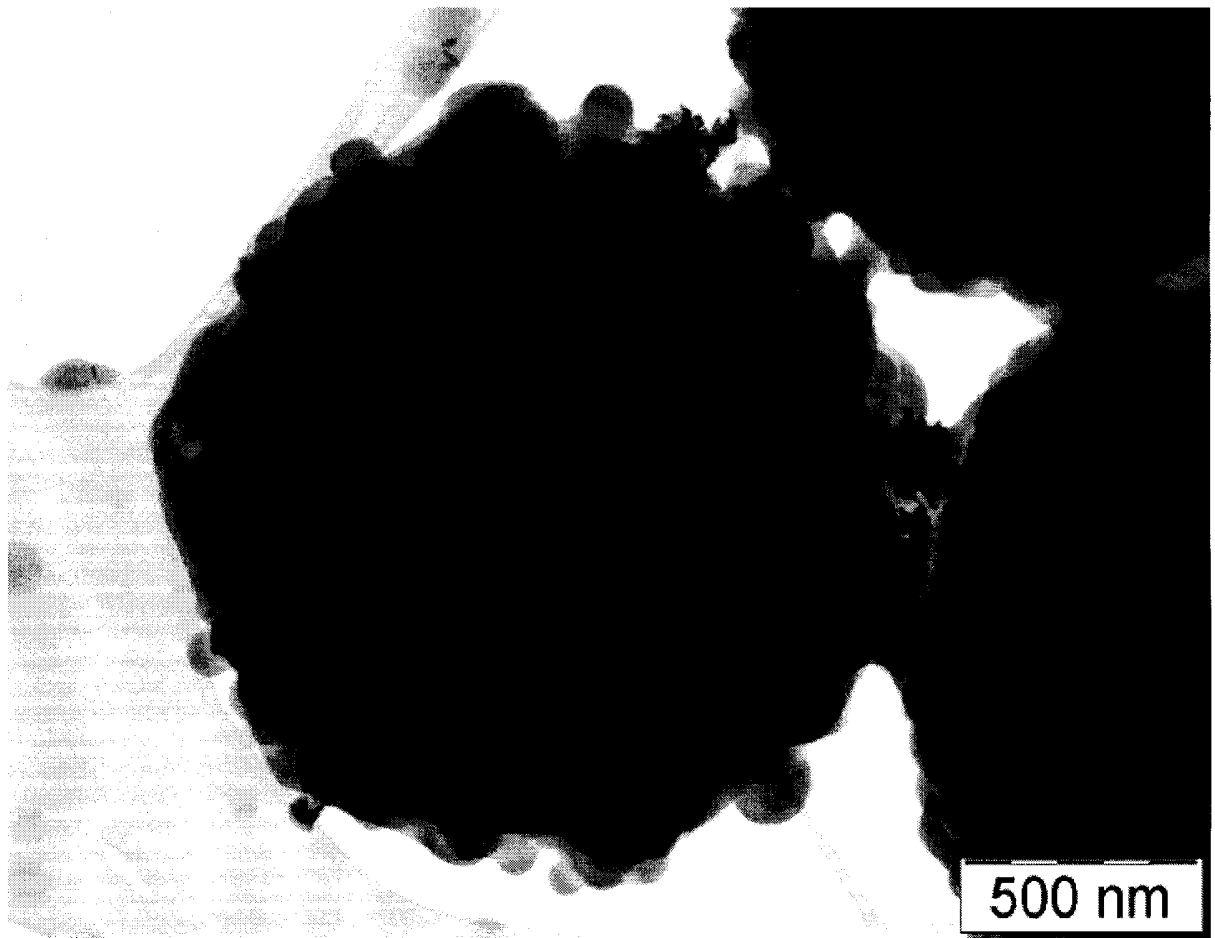
§ 150 § 7 149
29.04.15
§ 12015-288



Obr. 9

10/14

315037179
29.04.15
7V 2015-288



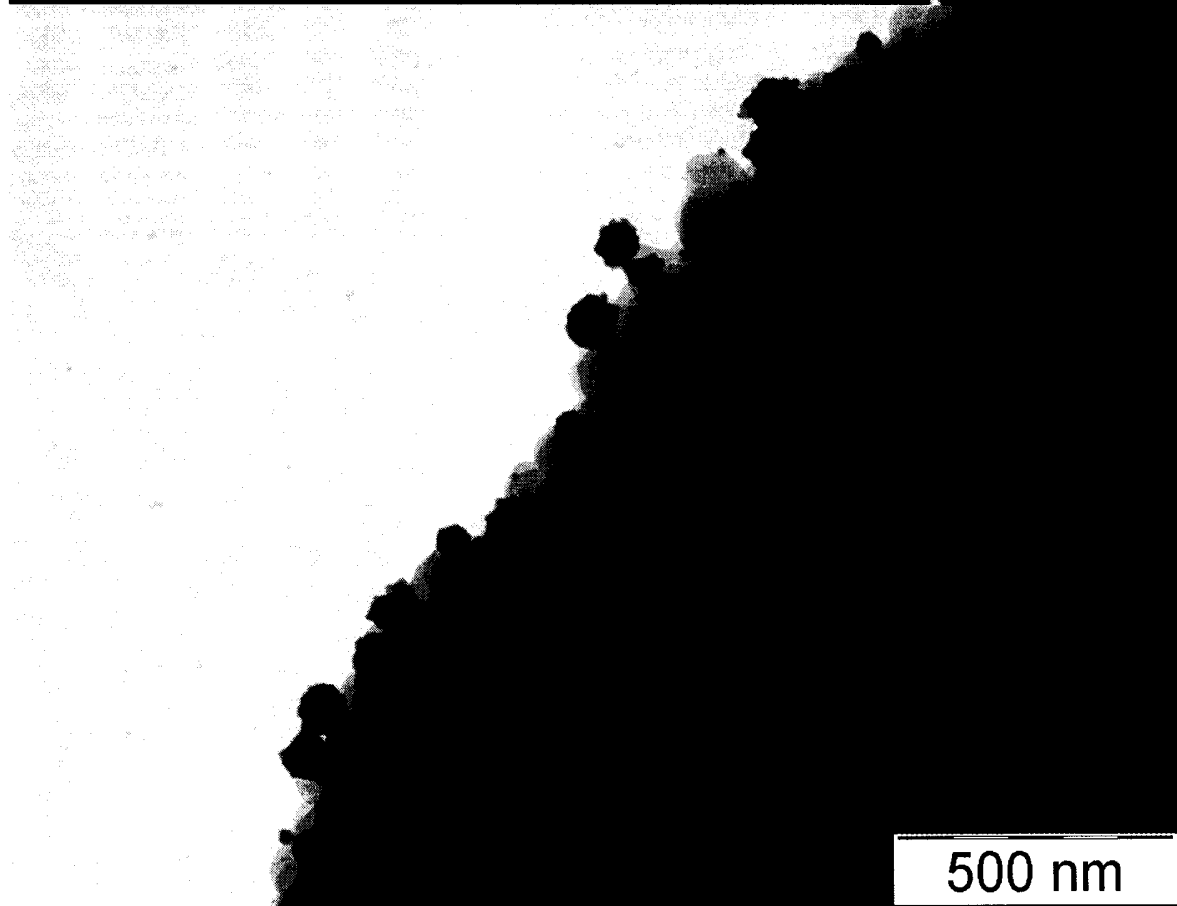
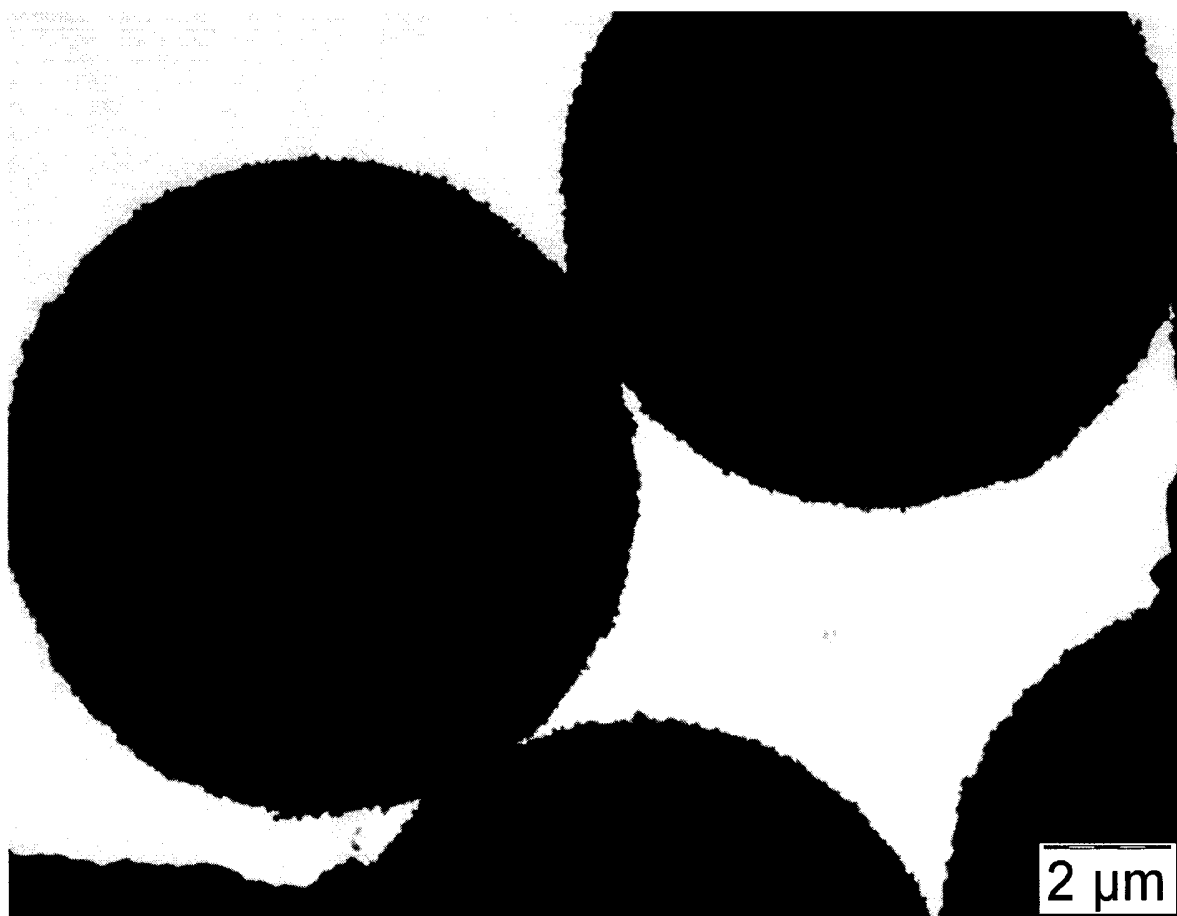
Obr. 10

S150 J7149

29.04.15

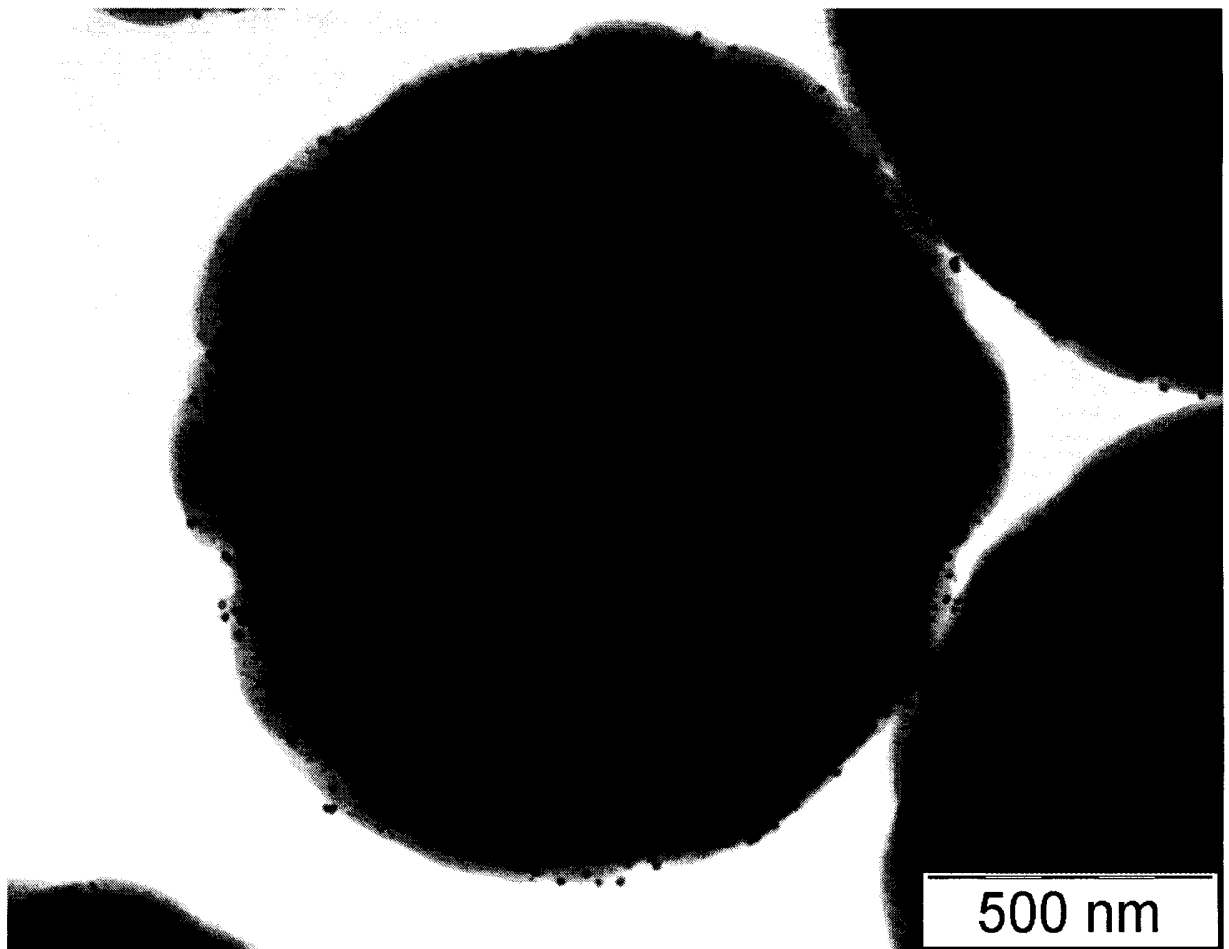
11/14

PV 2015-288

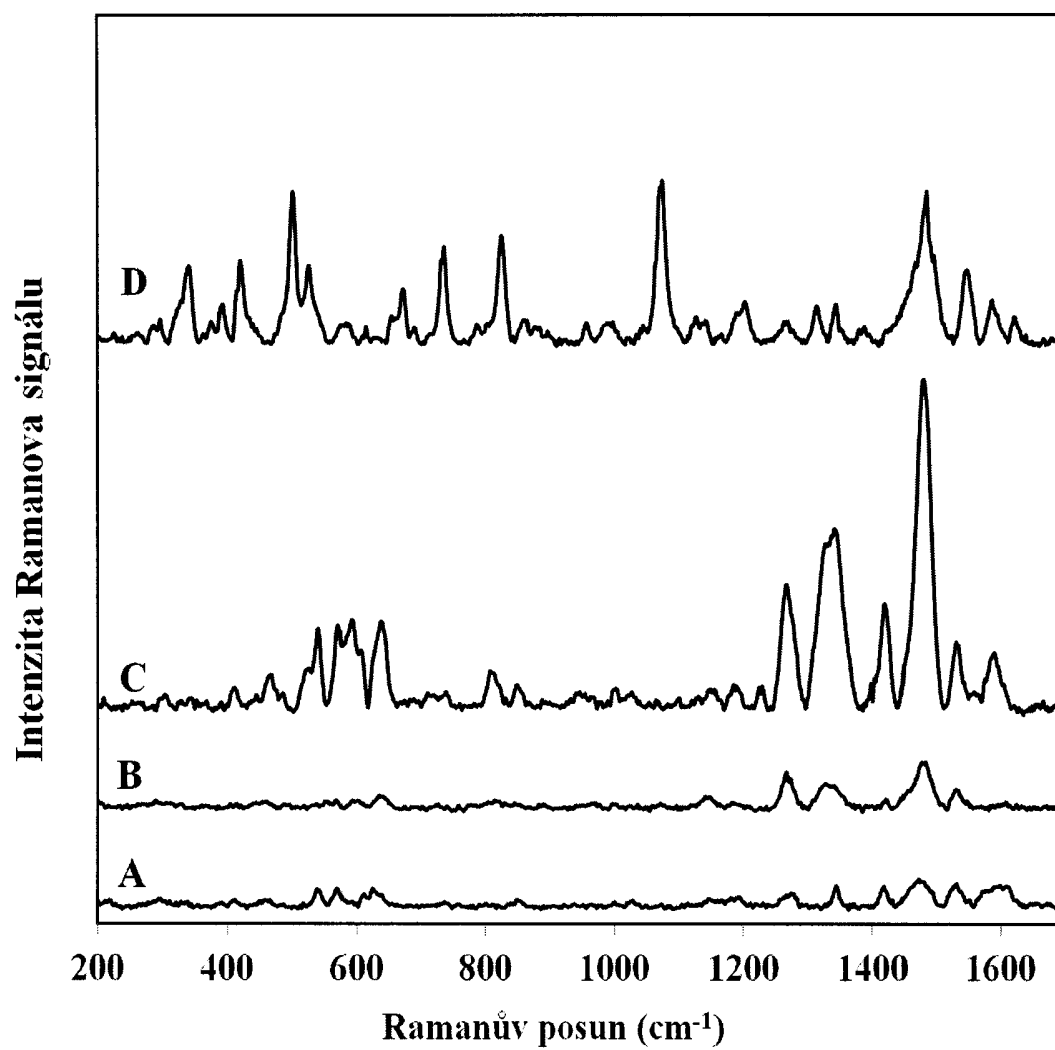


12/14

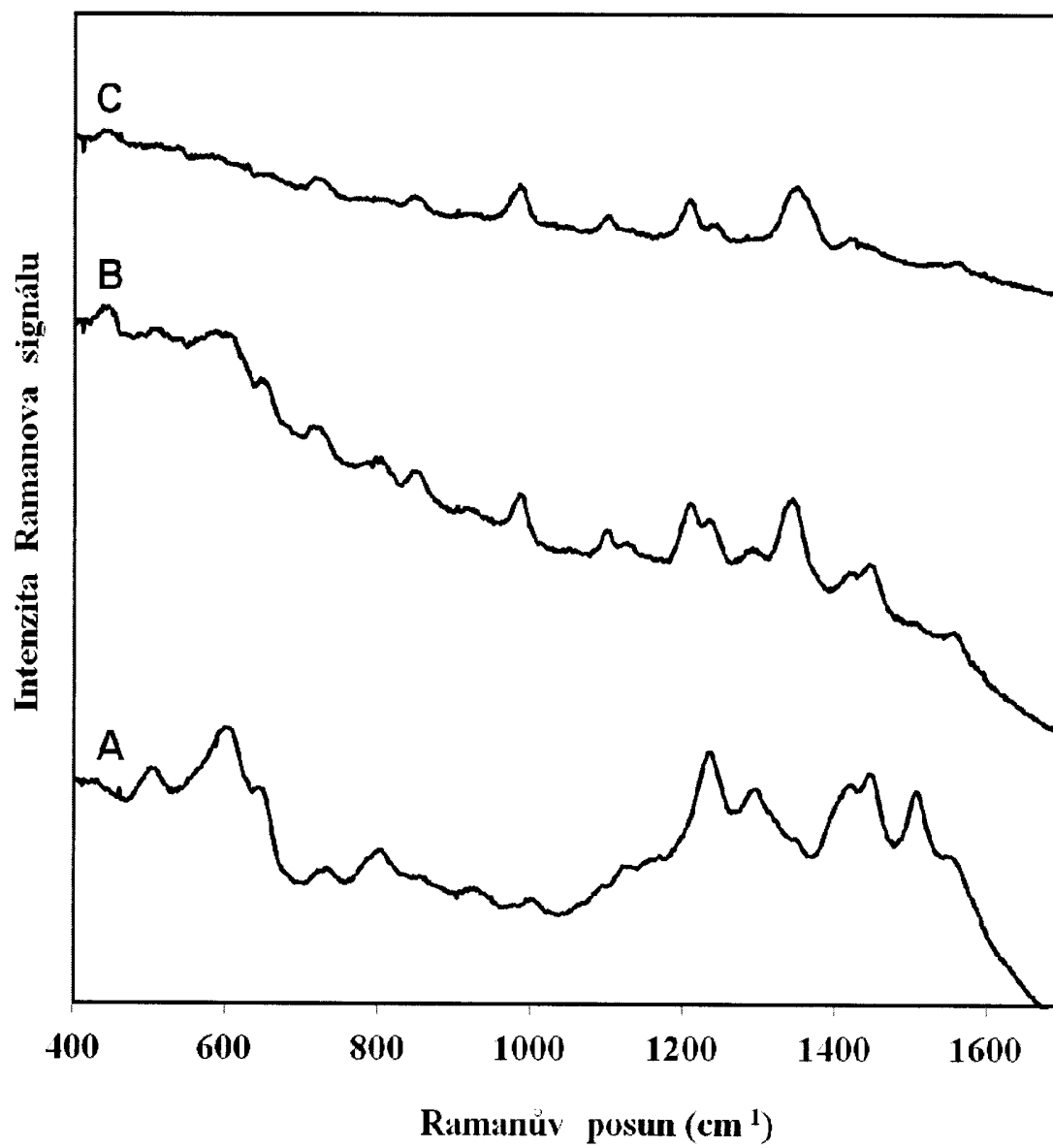
0180 37 149
20.04.15
p/2015-288



Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14