

# Istraživanje vezanja bisbenzimidida Hoechst 33258 s DNA/RNA spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja

---

Zavidić, Virna

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:970257>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Virna Zaviđić

**ISTRAŽIVANJE VEZANJA BISBENZIMIDA  
HOECHST 33258 S DNA/RNA  
SPEKTROSKOPIJOM POVRŠINSKI  
POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc.  
Snežane Miljanić i neposrednim voditeljstvom doc. dr. sc. Adriane Kendel.



## Zahvale

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Snežani Miljanić na odabiru teme, pristupačnosti, strpljenju te velikom interesu i entuzijazmu za moj rad. Bila mi je čast raditi pod Vašim vodstvom.*

*Veliko hvala neposrednoj voditeljici, doc. dr. sc. Adriani Kendel na pomoći i susretljivosti te na svim smjernicama i savjetima koje ste mi uputili tijekom izrade ovoga rada. Zaista sam uživala raditi u laboratoriju s Vama.*

*Željela bih se zahvaliti svojoj obitelji, prvenstveno roditeljima Ingrid i Nenadu. Bez vas, ovo moje putovanje ne bi bilo moguće. Hvala vam na neizmjerne podršci koju mi pružate. Hvala i mojoj sestri Loreni koja me uvijek uveseljava i kod koje uvijek mogu potražiti iskren i realan savjet.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama, koji su bili uvijek tu za mene i unosili radost u moje studentske dane. Zahvaljujući vama, ovo razdoblje će mi ostati u jako lijepom sjećanju.*

*I za kraj, hvala jednoj meni posebnoj osobi koja mi je promijenila život nabolje. Puno si mi pomogao i od tebe učim svakodnevno.*

*Virna Zavidčić*



# Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>IX</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>XI</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1. Ramanova spektroskopija.....</b>                                      | <b>3</b>  |
| 2.1.1. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje.....                           | 11        |
| 2.1.1.1. Metalni supstrati.....   | 15        |
| 2.1.1.2. Mehanizmi pojačanja.....   | 19        |
| <b>2.2. DNA/RNA polinukleotidi .....</b>                                      | <b>22</b> |
| 2.2.1.1. Mehanizmi interakcije sa SERS supstratima.....                       | 29        |
| 2.2.1.2. Interakcije s malim organskim molekulama.....                        | 30        |
| <b>2.3. Hoechst 33258.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>3.1. Kemikalije.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>3.2. Mjerni uređaji.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>3.3. Priprava koloidnih suspenzija srebra .....</b>                        | <b>41</b> |
| 3.3.1. Priprava nanočestica srebra negativnog naboja AgNP <sub>Cl</sub> ..... | 41        |
| 3.3.2. Priprava nanočestica srebra pozitivnog naboja AgNP <sub>sp</sub> ..... | 42        |
| <b>3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka.....</b>                           | <b>43</b> |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>4.1. Ramanovi spektri spoja Hoechst 33258 .....</b>                        | <b>46</b> |
| <b>4.2. Ramanovi spektri koloidnih suspenzija srebra .....</b>                | <b>50</b> |
| <b>4.3. SERS spektri spoja Hoechst 33258.....</b>                             | <b>52</b> |
| <b>4.4. SERS spektri DNA/RNA polinukleotida.....</b>                          | <b>58</b> |
| 4.4.1. Utjecaj metalnog susprata i pobudnog zračenja.....                     | 58        |
| 4.4.1.1. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP <sub>Cl</sub> .....        | 58        |
| 4.4.1.2. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP <sub>sp</sub> .....        | 63        |
| <b>4.5. SERS spektri kompleksa Hoechst 33258 s DNA/RNA.....</b>               | <b>67</b> |
| 4.5.1. Utjecaj priprave uzorka.....   | 67        |
| 4.5.2. Utjecaj metalnog supstrata.....  | 69        |
| 4.5.2.1. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP <sub>Cl</sub> .....        | 69        |
| 4.5.2.2. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP <sub>sp</sub> .....        | 74        |



---

|   |      |
|---|------|
| § 5. ZAKLJUČAK .....                      | 77   |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 79   |
| § 7. LITERATURNI IZVORI.....              | 81   |
| § 8. DODATAK.....                         | XV   |
| § 9. ŽIVOTOPIS .....                      | XVII |



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISTRAŽIVANJE VEZANJA BISBENZIMIDA HOECHST 33258 S DNA/RNA SPEKTROSKOPIJOM POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA

Virna Zavidić

Spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) istražene su interakcije molekula Hoechst 33258 (H33258) s dvolančanim sintetskim DNA/RNA polinukleotidima (poli dA-poli dT, poli dG-poli dC, poli rA-poli rU) te prirodnom ct-DNA. Kompleksi su pripremljeni u molarnim omjerima  $[H33258]/[polinukleotid] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$  u koloidnim suspenzijama srebrnih nanočestica stabiliziranih površinskim slojem negativno nabijenih kloridnih iona (AgNP\_Cl) i pozitivno nabijenih molekula spermina (AgNP\_sp). Prije analize načina vezanja s polinukleotidima, istražena je agregacija H33258 u rasponu koncentracija  $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$  mol/L, pri čemu su opaženi SERS spektri karakteristični za agregirane i monomerne vrste. SERS spektri H33258 s DNA analogima ukazali su na vezanje molekula u mali utor AT polinukleotida te djelomično interkaliranje između parova baza gvanina i citozina pristupom kroz veliki utor GC polinukleotida. Promjene u SERS spektrima kompleksa s RNA analogom, upućuju na interakcije male molekule s adeninom. Spektralne karakteristike H33258 dominiraju u spektrima kompleksa s ct-DNA, najvjerojatnije zbog nasumičnih sljedova AT i GC prirodnog polinukleotida.

(97 stranica, 47 slika, 3 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: Hoechst 33258, nanočestice srebra, polinukleotidi, Ramanova spektroskopija, površinski pojačano Ramanovo raspršenje

Mentor: prof. dr. sc. Snežana Miljanić

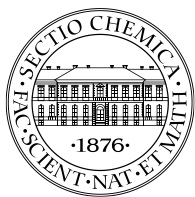
Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 24. rujna 2021.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### BINDING STUDY OF BISBENZIMIDE HOECHST 33258 WITH DNA/RNA USING SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING SPECTROSCOPY

Virna Zavidić

Interactions of Hoechst 33258 (H33258) molecules with double-stranded synthetic DNA/RNA polynucleotides (poly dA-poly dT, poly dG-poly dC, poly rA-poly rU) and natural ct-DNA were studied by surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy. Complexes were prepared in molar ratios  $[H33258]/[polynucleotide] = 1/1, 1/5$  and  $1/10$  in colloidal suspensions of silver nanoparticles stabilized by a surface layer of negatively charged chloride ions (AgNP<sub>Cl</sub>) and positively charged spermine molecules (AgNP<sub>sp</sub>). Prior to the polynucleotide binding assay, aggregation of H33258 in the concentration range  $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$  mol/L was investigated, whereby SERS spectra characteristic of aggregated and monomeric species were observed. The SERS spectra of H33258 with DNA analogs indicated binding of molecules into the minor groove of AT polynucleotide and partial intercalation between guanine and cytosine base pairs by access through the major groove of GC polynucleotide. Changes in the SERS spectra of the complex with the RNA analog implied interactions of small molecules with adenine. The spectral characteristics of H33258 dominated in the spectra of complexes with ct-DNA, most likely due to random AT and GC sequences of the natural polynucleotide.

(97 pages, 47 figures, 3 tables, 30 references, original in Croatian language)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: Hoechst 33258, polinucleotides, Raman spectroscopy, silver nanoparticles, surface-enhanced Raman scattering

Mentor: Dr. Snežana Miljanić, Professor

Assistant mentor: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 24 September 2021



## § 1. UVOD

Hoechst 33258 (H33258) je derivat bisbenzimidazola koji se koristi kao fluorescentna boja za kvantifikaciju DNA i mikroskopsko oslikavanje kromosoma.<sup>1</sup> Poznato je da se veže u mali utor dvostruke uzvojnice, većinom na adeninske i timinske parove baza, dok se djelomično interkalira i smješta u veliki utor gvaninskih i citozinskih parova baza. Zahvaljujući sklonosti agregiranju pri visokim koncentracijama i ionskoj jakosti medija,<sup>2</sup> molekule H33258, osim kao monomeri, mogu ostvarivati interakcije s nukleinskim kiselinama u obliku dimera i viših agregata.<sup>1</sup> U svrhu otkrivanja načina i mjesta vezanja bisbenzimidazola H33258 s DNA provode se brojna spektroskopska istraživanja.

Svrha ovog diplomskog rada je istražiti vezanje bisbenzimidazola H33258 s dvolančanim DNA/RNA polinukleotidima spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS). SERS spektroskopija je tehnika vibracijske spektroskopije kojom se signal neelastičnog raspršenja fotona, za molekule adsorbirane na metalnu površinu, pojačava do  $10^6$  puta u odnosu na normalno Ramanovo raspršenje. Kao SERS aktivni metalni supstrati u ovom radu koristit će se koloidne suspenzije nanočestica srebra različitog naboja, s kojima su već opisana SERS istraživanja DNA oligonukleotida.<sup>3,4</sup> Nanočestice srebra pripravljene redukcijom srebrova(I) nitrata s hidroksilamin-hidrokloridom nosit će negativan naboj kloridnih iona na površini,<sup>3</sup> dok će nanočestice srebra pripravljene redukcijom srebrova(I) nitrata s natrijevim borhidridom uz spermin-tetrahidroklorid, nositi pozitivan naboj protoniranih amino skupina spermina na površini.<sup>4</sup> Snimit će se Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine H33258 te, u svrhu izučavanja agregacije bisbenzimidazola, koncentracijski ovisni SERS spektri H33258 s oba metalna supstrata uz pobudu zračenjem valnih duljina 532 i 785 nm. Otopine polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) pripremit će se u kakodilatnom puferu, a njihovi SERS spektri snimit će se neposredno nakon pripreme mjernog uzorka u oba koloida te poticanjem adsorpcije na površinu metalnih supstrata dodatkom magnezijeva sulfata u koloid negativno nabijenih nanočestica srebra, odnosno inkubacijom pri sobnoj temperaturi tijekom dva sata u koloidu pozitivno nabijenih nanočestica srebra. Pripraviti će se kompleksi H33258 i DNA/RNA

polinukleotida u koncentracijskim omjerima  $[H33258]/[fosfati] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$  te snimiti pripadajući SERS spektri. Opažene spektralne promjene detaljno će se analizirati i interpretirati.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ramanova spektroskopija

Spektroskopija je metoda koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i tvari. Kao rezultat interakcije s tvari, upadni foton može biti transmitiran, apsorbiran, reflektiran i/ili raspršen.

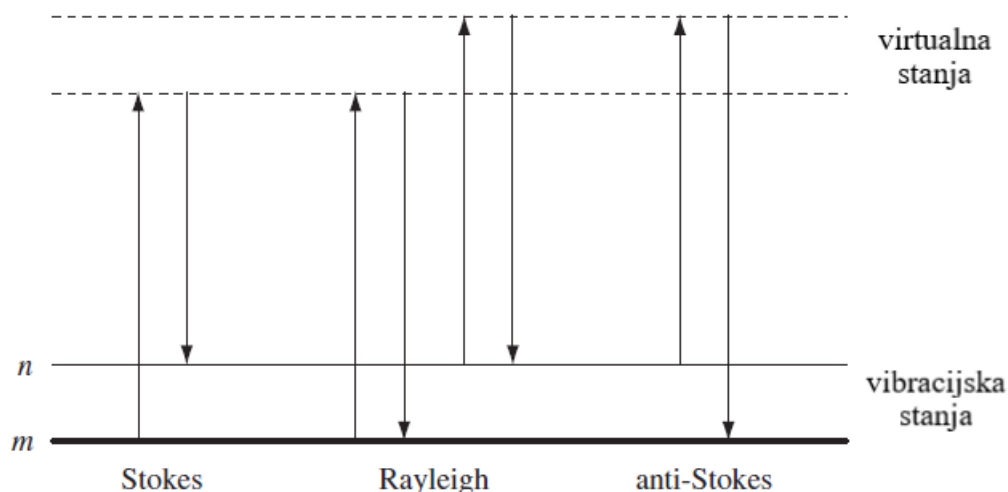
Vibracijska spektroskopija je vrsta spektroskopije u kojoj izloženost molekule zračenju određene valne duljine uzrokuje vibracije nekih funkcionalnih skupina, a kao posljedica toga opažaju se vibracijski spektri. Njezina je velika prednost mogućnost analize uzoraka u čvrstom, tekućem i plinovitom stanju. Zahvaljujući tome, nalazi široku primjenu pri detekciji, identifikaciji i karakterizaciji molekula.<sup>5</sup> Dijeli se na infracrvenu (engl. *infrared*, IR) i Ramanovu spektroskopiju.

Ramanova spektroskopija temelji se na fenomenu neelastičnog raspršenja zračenja. Taj je fenomen postavio A. Smekal davne 1923. godine, a prvi koji su ga eksperimentalno opazili bili su C. V. Raman i K. S. Krishnan pet godina kasnije. Zbog izuzetnog doprinosa razvoju spektroskopije i otkriću efekta koji je nazvan po njegovom imenu, C. V. Raman je 1930. godine osvojio Nobelovu nagradu za područje fizike, stoga je takva metoda ostala u znanosti poznata kao Ramanova spektroskopija. U izvornom eksperimentu, sunčeva je svjetlost bila usmjerena teleskopom na uzorak koji je po sastavu bio tekućina. Druga je leća bila postavljena blizu uzorka kako bi se sakupljalo raspršeno zračenje. Pomoću sustava optičkih filtera dokazano je da se frekvencija raspršenog zračenja razlikovala u odnosu na frekvenciju upadnog zračenja.<sup>6</sup> Ovaj eksperiment označava početak Ramanove spektroskopije.

Ramanovo raspršenje posljedica je interakcije zračenja i molekule pri kojoj dolazi do narušavanja, odnosno polarizacije oblaka elektrona oko jezgre. Na taj način nastaje kratkoživuće, tzv. „virtualno“ stanje koje nije realno energijsko stanje i kao takvo ne postoji u samoj molekuli, a energija tog stanja određena je energijom lasera. Takvo je energijsko stanje vrlo nestabilno pa se molekula u njemu kratko zadržava, nakon čega se vraća u osnovno energijsko stanje i pritom otpušta foton.



Ovisno o energiji raspršenog fotona, postoje dvije vrste raspršenja: Rayleighovo raspršenje i Ramanovo raspršenje. Rayleighovo raspršenje nastaje uslijed interakcije zračenja i elektronskog oblaka, pri čemu se fotoni raspršuju bez ikakve promjene ili s vrlo malom promjenom energije. Ova vrsta raspršenja, u kojoj raspršeno zračenje ima istu energiju kao upadno zračenje, naziva se elastično raspršenje. To je dominantan proces, odnosno većina upadnih fotona raspršuje se elastično. Pritom se molekula iz osnovnog ili pobuđenog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja ozračivanjem pobuđuje u virtualno stanje gdje se kratko zadržava, nakon čega slijedi povratak u isto energijsko stanje iz kojeg je bila pobuđena. Kod Ramanovog raspršenja dolazi do kretanja jezgara te se energija s upadnog fotona može prenijeti na molekulu ili pak s molekule na raspršeni foton. U oba slučaja, energija raspršenog fotona razlikuje se od energije upadnog fotona i taj se proces naziva neelastično raspršenje. Samo se jedan od  $10^6$  ili  $10^8$  fotona raspršuje neelastično i upravo je to razlog slabe osjetljivosti Ramanove spektroskopije.<sup>6</sup> Ramanovo raspršenje dijeli se na Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Do Stokesovog raspršenja dolazi kada se molekula iz osnovnog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja pobuđuje u virtualno stanje, a nakon toga se vraća u pobuđeno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja. U tom je slučaju upadni foton predao energiju molekuli pa raspršeni foton ima manju energiju od upadnog fotona. Anti-Stokesovo raspršenje je proces koji nastaje kada se molekula iz pobuđenog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja pobuđuje u virtualno stanje, nakon čega se vraća u osnovno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja. U tom slučaju energija se prenosi s molekule na raspršeni foton, koji ima veću energiju nego što je imao upadni foton. Na slici 1 prikazan je dijagram Rayleighovog i Ramanovog raspršenja.



Slika 1. Dijagram Rayleighovog i Ramanovog raspršenja. Slovom  $m$  označeno je osnovno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja, dok slovo  $n$  označava pobuđeno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>6</sup>

Stokesovo raspršenje je znatno većeg intenziteta od anti-Stokesovog raspršenja, što je posljedica potpunosti vibracijskih stanja u molekulama. Preraspodjela molekula u pojedinim vibracijskim stanjima definirana je Boltzmannovom jednadžbom, koja glasi:

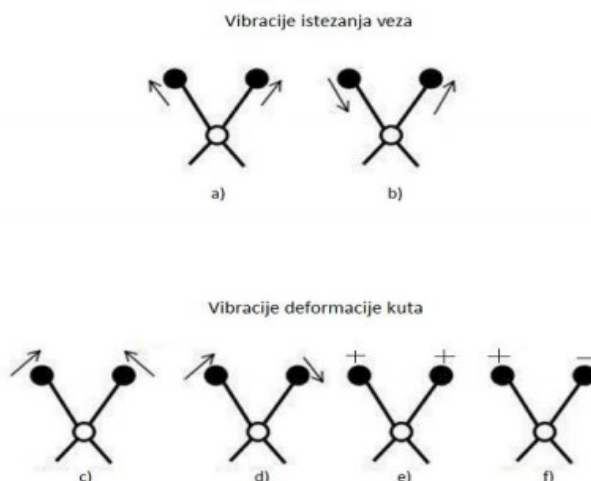
$$\frac{N_n}{N_m} = \frac{g_n}{g_m} \exp \left[ \frac{-(E_n - E_m)}{kT} \right]$$

gdje  $N_n$  označava broj molekula u pobuđenom vibracijskom stanju,  $N_m$  broj molekula u osnovnom vibracijskom stanju,  $g_n$  degeneraciju stanja  $n$ ,  $g_m$  degeneraciju stanja  $m$ ,  $E_n - E_m$  razliku energije između dva vibracijska stanja,  $k$  Boltzmannovu konstantu koja iznosi  $1,3807 \times 10^{-23}$  J/K, a  $T$  termodinamičku temperaturu. Iz ove jednadžbe proizlazi da se pri sobnoj temperaturi većina molekula nalazi u stanju najniže energije, tj. u osnovnom vibracijskom stanju pa je to razlog zašto je Stokesovo raspršenje puno većeg intenziteta od anti-Stokesovog. Intenzitet anti-Stokesovog raspršenja može se povećati dovođenjem topline u sustav, što će omogućiti prelazak molekula iz osnovnog u pobuđeno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja. Unatoč razlici u intenzitetu, spektri Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja jednaki su prema položaju vibracijskih vrpca i međusobno se odnose zrcalno. Analognost ovih spektara vrlo je korisna u slučaju kada postoji interferencija u vidu

fluorescencije koja prekriva Stokesov dio spektra pa se tada za analizu koristi anti-Stokesov dio Ramanovog spektra.<sup>6</sup>

Broj mogućih vibracija neke molekule jednak je broju vibracijskih stupnjeva slobode te molekule. Polazi se od broja mogućih načina gibanja neke višeatomne molekule u prostoru: atomi u molekuli mogu se gibati u tri prostorna smjera ( $3N$  prostornih koordinata, pri čemu je  $N$  broj atoma u molekuli) pa iz toga proizlazi da višeatomna molekula ima  $3N$  stupnjeva slobode. Poznato je da se gibanje molekule u trodimenzionalnom prostoru može opisati pomoću translacije, rotacije i vibracije. Na translaciju u sva tri smjera u prostoru otpadaju tri stupnja slobode. Rotacija se kod nelinearnih molekula može izvoditi oko sve tri osi u prostoru pa stoga na rotaciju kod nelinearnih molekula otpada još tri stupnja slobode. Iz toga slijedi da je broj vibracijskih stupnjeva slobode za nelinearne molekule  $3N-6$ . Međutim, kod linearnih molekula slučaj je nešto drugačiji utoliko što se kod njih rotacija oko osi linearne molekule ne smatra rotacijom pa linearne molekule stoga imaju  $3N-5$  vibracijskih stupnjeva slobode.

Vibracije se općenito dijele na istezne vibracije (engl. *stretching*,  $\nu$ ) koje podrazumijevaju promjenu duljine veze između atoma te na svijanje ili deformacijske vibracije (engl. *bending*,  $\delta$ ) koje se odnose na promjenu kuta između veza. Istezne se vibracije mogu podijeliti na simetrične (engl. *symmetrical stretching*,  $\nu_s$ ), kod kojih se atomi sa svake strane veze istovremeno približavaju i udaljavaju od centralnog atoma te na antisimetrične vibracije (engl. *asymmetrical stretching*,  $\nu_{as}$ ), koje podrazumijevaju naizmjenično približavanje i udaljavanje atoma sa svake strane veze u odnosu na središnji atom. Za nelinearne troatomne funkcionalne skupine, koje se sastoje od dva atoma jedne vrste vezana na središnji atom druge vrste (npr.  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}_2$ ), deformacije se dijele na striženje (engl. *scissoring*,  $\delta_{sc}$ ), zibanje (engl. *rocking*,  $\delta_{rc}$ ), uvijanje (engl. *twisting*,  $\delta_{tw}$ ) i klaćenje (engl. *wagging*,  $\delta_{wg}$ ), ovisno o tome kreću li se atomi u istom ili suprotnom smjeru istovremeno ili naizmjenice u ravnini ili izvan ravnine. Za složenije funkcionalne skupine deformacije se dijele na svijanja u ravnini (engl. *in plane bending*,  $\delta_{ip}$ ) i izvan ravnine (engl. *out of plane bending*,  $\delta_{oop}$ ).<sup>7</sup> Slika 2 prikazuje osnovne načine vibracija molekula.



Slika 2. Prikaz osnovnih vibracijskih modova: a) simetrična vibracija, b) antisimetrična vibracija, c) striženje, d) zibanje, e) klaćenje i f) uvijanje.<sup>8</sup>

Za razliku od procesa apsorpcije na kojem se zasniva IR spektroskopija, prilikom raspršenja foton ne mora imati energiju koja odgovara razlici energije između dva energijska stanja u molekuli. Dok se u IR spektroskopiji molekule pobuđuju IR zračenjem koje obuhvaća niz frekvencija, Ramanovo raspršenje pobuđuje se monokromatskim zračenjem (odnosno zračenjem jedne frekvencije) koje može biti u ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV), vidljivom (engl. *visible*, Vis) ili bliskom IR području (engl. *near-infrared*, NIR). Ramanovom spektroskopijom detektira se energija vibracije, koja odgovara razlici energije upadnog fotona i raspršenog fotona. Raspršeno se zračenje sakuplja pod kutom od 90° ili 180° u odnosu na upadno zračenje, ovisno o izvedbi instrumenta.

Ramanov intenzitet je veličina koja opisuje količinu raspršenog zračenja, a definiira se prema sljedećem izrazu:

$$I = Kl\alpha^2\nu^2$$

gdje redom  $I$  predstavlja Ramanov intenzitet,  $K$  konstantu,  $l$  snagu lasera,  $\nu$  frekvenciju upadnog zračenja te  $\alpha$  polarizabilnost elektrona u molekuli.

Dok je izborno pravilo za IR spektroskopiju promjena dipolnog momenta tijekom vibracije, u Ramanovoj je spektroskopiji izborno pravilo promjena polarizabilnosti elektronskog oblaka, tj. raspodjele elektrona oko molekule tijekom vibracije. Za razliku od IR spektroskopije, gdje se najveće promjene dipolnog momenta (a time i najintenzivnija

apsorpcija) događaju uslijed antisimetričnih vibracija, kod Ramanove spektroskopije najveće promjene polarizabilnosti i s tim u svezi najveće raspršenje karakteristično je za simetrične vibracije. Upravo zbog različitih izbornih pravila, IR i Ramanova spektroskopija su komplementarne metode čijom se kombinacijom dobiva kompletnija slika vibracijske strukture molekula. Molekule koje imaju centar simetrije imaju dodatno izborno pravilo, tzv. pravilo međusobnog isključenja, koje nalaže da nijedna vibracija ne može biti istovremeno i IR i Raman aktivna.<sup>6</sup>

Ramanova spektroskopija ima svojih prednosti i nedostataka u odnosu na IR spektroskopiju. Glavna prednost leži u tome što je moguće ispitivati vodene otopine organskih molekula, s obzirom da voda slabo raspršuje zračenje (što nije moguće IR spektroskopijom jer voda jako apsorbira zračenje pa spektar vode prekrije spektar spoja). To je posebno pogodno kod snimanja uzoraka s kojima se modeliraju uvjeti slični biološkim sustavima, budući da se stanice i većina biomolekula većinom istražuju u vodi. Prednost je i što se uzorke može analizirati u staklenom posuđu, a priprema uzoraka je jednostavna i minimalna – spektre nekih spojeva moguće je snimiti čak i bez prethodne pripreme. Nedostaci se uglavnom odnose na slabu osjetljivost, razgradnju uzoraka uslijed izlaganja laserskom zračenju velikog intenziteta te na pojavu fluorescentnog zračenja koje prekriva Ramanov spektar, zbog čega se znatno rjeđe koristi u odnosu na IR spektroskopiju.

Vrpce u Ramanovom spektru karakteriziraju tri parametra: intenzitet, položaj i širina. Kao što je spomenuto, Ramanov intenzitet ovisi o polarizabilnosti analizirane molekule te o snazi i frekvenciji lasera koji se koristi za pobudu. Položaj vrpce definiran je sljedećim izrazom:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

pri čemu  $\tilde{\nu}$  označava valni broj,  $c$  označava brzinu svjetlosti u vakuumu koja iznosi  $2,997925 \times 10^8$  m/s,  $k$  označava konstantu veze između dva atoma A i B sa svake strane veze izraženu u N/m ili kg/s<sup>2</sup>, a  $\mu$  označava reduciranu masu, koja se računa prema izrazu:

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

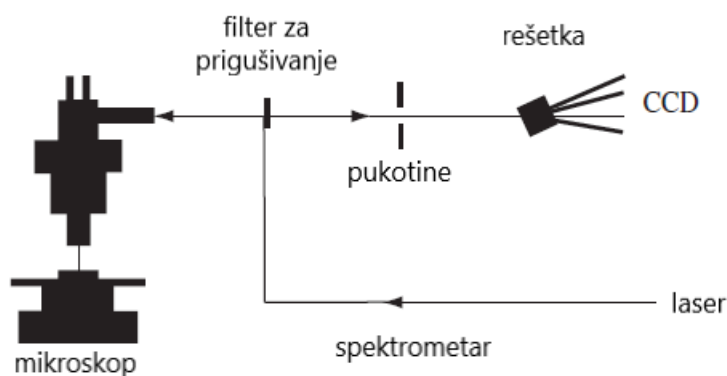
pri čemu  $m_A$  označava masu atoma A s jedne strane veze, dok  $m_B$  označava masu atoma B s druge strane veze. Dakle, valni broj (tj. frekvenciju) vibracije, odnosno položaj vrpce u spektru određuju jačina veze i mase atoma sa svake strane veze. Valni broj vrpce vibracije funkcionalne skupine u kojoj je konstanta veze veća, bit će veći: vrpca istezanja trostruke  $C\equiv C$  veze nalazit će se pri većim valnim brojevima od vrpce istezanja dvostruke  $C=C$  veze, koja će pak biti pri većim valnim brojevima od vrpce istezanja jednostruke  $C-C$  veze. S druge strane, što je reducirana masa veća, to će valni broj vrpce vibracije funkcionalne skupine biti manji pa će se tako npr. vrpca istezanja  $C-O$  veze nalaziti pri manjem valnom broju u odnosu na vrpca istezanja  $C-H$  veze.

Ramanovi su spektri jednostavniji od IR spektara s obzirom na broj i širinu vrpce, međutim njihova je interpretacija teža. U Ramanovom će spektru najintenzivnije vrpce potjecati od simetričnih vibracija funkcionalnih skupina čiji atomi imaju višak elektrona u vanjskim ljuskama, poput nezasićenih veza ( $C=C$ ) pri valnom broju od otprilike  $1640\text{ cm}^{-1}$  i disulfidnih mostova ( $S-S$ ) pri otprilike  $500\text{ cm}^{-1}$ . Spektri se u svrhu lakše analize i interpretacije mogu podvrgnuti glačanju, dekonvoluciji, deriviranju ili se može načiniti korekcija osnovne linije.

Instrumenti kojima se mjeri Ramanovo raspršenje zovu se Ramanovi spektrometri, a dijele se na disperzivne spektrometre i spektrometre s Fourierovim transformacijama. Disperzivni Ramanovi spektrometri koriste izvore zračenja u vidljivom području (argon-ionski laser s pobudom pri  $514,5\text{ nm}$ , plinski helij-neonski laser pri  $633\text{ nm}$  i diodni laser pri  $785\text{ nm}$ ), spektralno razlaganje vrši se na difrakcijskoj rešetki, a raspršeno zračenje detektira se fotomultiplikatorima ili višekanalnim detektorima poput CCD detektora (engl. *charge-coupled device*). Kod Ramanovih spektrometara s Fourierovim transformacijama izvor zračenja je laser od itrij-aluminijevog granata dopiran neodimijem (engl. *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*,  $Nd^{3+}:YAG$ ) koji emitira zračenje pri  $1064\text{ nm}$ , spektralno razlaganje odvija se u interferometru, a raspršeno zračenje detektira se pomoću fotodetektora od indij galij arsenida ( $InGaAs$ ) ili germanija ( $Ge$ ) hlađenog tekućim dušikom.

Ramanov spektrometar može se spregnuti s optičkim mikroskopom (slika 3). Ramanova mikroskopija omogućava analizu i detekciju uzoraka dostupnih u vrlo malim količinama, a prednost leži u tome što je optičkim mikroskopom moguće prvo pregledati uzorak te zatim željeni dio uzorka snimiti i analizirati. Riječ je o neinvazivnoj metodi pa je uzorke moguće snimati *in situ*. Kao pobudno zračenje koriste se laseri u Vis i NIR području, a raspršeno zračenje može se fokusirati staklenim lećama. Kao rezultat analize ovim spregnutim sustavom

nastaje kemijska slika, koja prikazuje prostornu raspodjelu kemijskih sastojaka heterogenog uzorka. Na taj način optička slika dobiva treću, spektroskopsku dimenziju te je moguće odrediti kemijski sastav svakog pojedinog sastojka. S obzirom na izvedbu, mikroskop može biti klasičan ili konfokalan. Klasičan mikroskop podrazumijeva takvu izvedbu pri kojoj se čitav uzorak na postolju ozračuje zračenjem iz izvora te se svo raspršeno zračenje s tog uzorka detektira. Kod konfokalne izvedbe upadno se zračenje usmjerava na uzorak, a pukotina ispred detektora eliminira zračenje raspršeno s ostalih dijelova uzorka, osim onog koje je bilo u žarišnoj ravnini objektiva. Takva izvedba omogućava puno preciznije i detaljnije snimanje spektara na površini uzorka. Osim toga, Ramanovom mikroskopijom moguće je i dubinski profilirati uzorak, odnosno snimiti Ramanov spektar pri različitim dubinama uzorka mijenjanjem fokusa pobudne zrake u smjeru osi z (osim standardnog pomicanja uzorka na postolju u x-y ravnini). Interferencija koja se pri tome može pojaviti je lom zračenja prilikom ulaska pobudne zrake iz zraka u uzorak, međutim ta se pojava eliminira uranjanjem objektiva u imerzijsko ulje ili vodu što dovodi do smanjenja razlike u indeksu loma uzorka i okoline. Oslikavanje i mapiranje predstavljaju dvije najčešće korištene tehnike Ramanove mikroskopije. Kod oslikavanja zračenje pada na veću površinu uzorka te se detektira raspršeno zračenje odgovarajuće vibracije karakteristične za pojedini sastojak u uzorku. Na taj se način odmah može prikazati kemijska slika. Mapiranje se provodi tako da se postolje mikroskopa pomiče u fokus zrake te se snima čitav spektar pojedinog piksela pri svakom pomaku uzorka. Odabire se karakteristična vrpca za pojedini sastojak i tek obradom kemijskih spektara nastaju mape koje prikazuju promjenu intenziteta vibracijske vrpce pri određenom valnom broju.



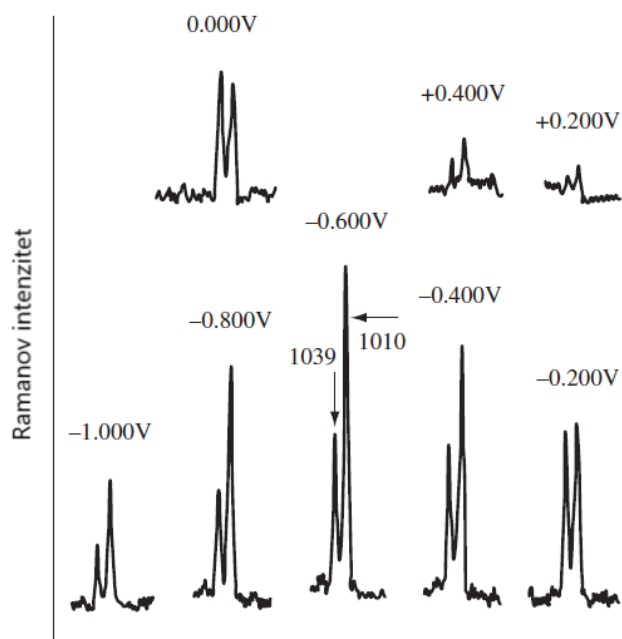
Slika 3. Shematski prikaz spregnutog sustava Ramanovog spektrometra i optičkog mikroskopa. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>6</sup>

Ramanova spektroskopija nalazi široku primjenu u prirodnim znanostima, tehničkim znanostima te umjetnosti. Prikladna je za identifikaciju i karakterizaciju elemenata i molekula te određivanje čistoće anorganskih tvari, te za analizu minerala u svrhu njihove karakterizacije te identifikacije nečistoća i inkluzija. Posebno je važna primjena u umjetnosti i arheologiji za određivanje starosti slika i arheoloških iskopina te razlikovanje originalnog dijela od krivotvorenog. Također, koristi se za identifikaciju i analizu strukture, sastava i stupnja umreženosti polimera, za analizu boja te za kontrolu tvorničkih postrojenja i praćenje reakcija. Od velikog je značaja mogućnost istraživanja bioloških uzoraka *in situ* u vodenom mediju pa se tako koristi u genomici, proteomici, medicini, pri analizi hrane, za istraživanje međumolekulskih interakcija bioloških molekula s malim organskim molekulama te interakcija proteina, a moguće je i praćenje strukturnih promjena molekulske okosnice. U širokoj je uporabi u farmaceutskog industriji za kontrolu kvalitete proizvoda *in situ* u polimernom pakiranju, za identifikaciju aktivne tvari i nečistoća te za istraživanje polimorfije. Primjenjuje se i u forenzici za identifikaciju droga, vlakana, boja i eksploziva te u elektronicima za detekciju boje ili produciranje slike u elektroničkim uređajima.

### 2.1.1. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje

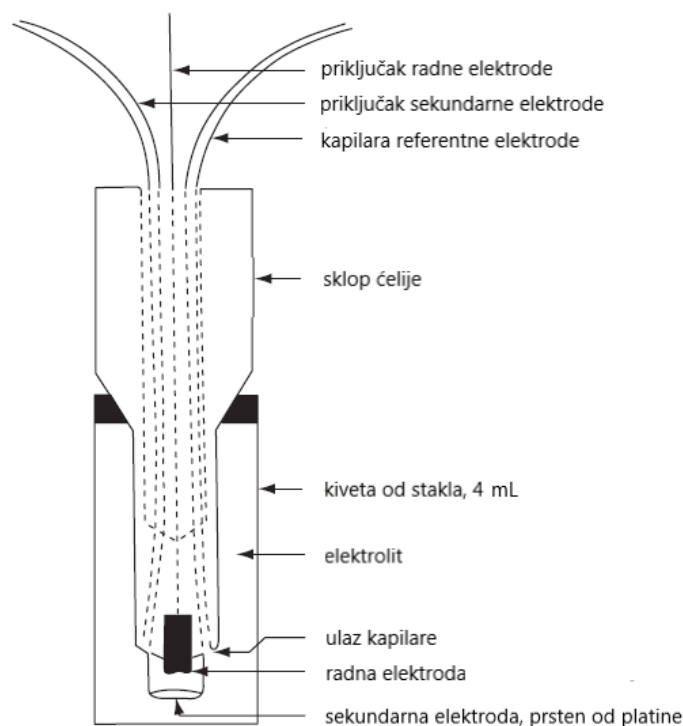
Budući da je tzv. normalna Ramanova spektroskopija vrlo slabe osjetljivosti, razvijene su različite tehnike kojima je taj nedostatak prevladan. Jedna od njih je površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS), tehnika koju je sasvim slučajno otkrio M. Fleischman sa suradnicima 1974. godine prilikom istraživanja utjecaja promjene napona na Ramanove spektre piridina (slika 4).





Slika 4. Ramanovi spektri piridina pri različitim potencijalima. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>6</sup>

Usporedbom Ramanovog spektra piridina snimljenog prije uranjanja srebrove elektrode u kivetu i Ramanovog spektra piridina snimljenog nakon uranjanja elektrode u kivetu, uočio je pojačanje intenziteta Ramanovog raspršenja piridina adsorbiranog iz vodene otopine na srebrovu elektrodu hrapave površine. Eksperimentalna postava za taj eksperiment prikazana je na slici 5. Budući da nije znao objasniti taj efekt, pripisao ga je povećanju površine elektrode zbog veće hrapavosti, odnosno adsorpciji većeg broja molekula piridina na metalnu površinu. Međutim, tri godine kasnije dvije su istraživačke skupine neovisne jedna o drugoj, koje su sačinjavali D. L. Jeanmarie i R. P. Van Duyne te M. G. Albrecht i J. A. Creighton, zaključile da razlog pojačanja Ramanovog raspršenja nije samo povećanje površine uslijed hrapavosti elektrode kojim bi se intenzitet pojačao za faktor manji od 10, s obzirom da je zapaženi intenzitet  $10^6$  puta veći u odnosu na normalno Ramanovo raspršenje. Treba naglasiti kako teorijska pozadina ove tehnike do danas još nije u potpunosti razjašnjena<sup>9</sup> te se u tu svrhu i dalje provode brojna istraživanja.



Slika 5. Shematski prikaz elektrokemijske ćelije za SERS. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>6</sup>

Teorija SERS spektroskopije temelji se na ozračivanju molekule koja je adsorbirana ili kemijski vezana na nanostrukturiranu metalnu površinu, nakon čega nastaje raspršeno Ramanovo zračenje puno jačeg intenziteta od normalnog Ramanovog raspršenja (do  $10^6$  puta). Kao posledica toga, opaža se SERS spektar koji prikazuje ovisnost Ramanovog intenziteta o valnom broju izraženom u recipročnim centimetrima.

Interpretacija SERS spektara nije jednostavna.<sup>6</sup> SERS spektri razlikuju se od normalnih Ramanovih spektara za istu molekulu pa se tako u SERS spektrima može uočiti pojava novih vrpce, pojačanje intenziteta postojećih vrpce, slabljenje intenziteta ili nestanak postojećih vrpce te nelinearna promjena intenziteta u koncentracijski ovisnim spektrima. Do tih promjena dolazi zbog različitih izbornih pravila koja vrijede za ove dvije tehnike. Najčešći razlog pojave novih vrpce u SERS spektru je činjenica da centrosimetrične molekule adsorpcijom na metalnu površinu gube centar simetrije pa u tom slučaju više ne vrijedi tzv. pravilo međusobnog isključenja te se u SERS spektru mogu zamijetiti IR aktivne vrpce. Osim toga, nove vrpce mogu se javiti i kao posledica puno veće osjetljivosti SERS tehnike u odnosu na normalnu Ramanovu spektroskopiju, zbog čega su u SERS spektrima vidljive vrpce nečistoća koje su adsorbirane ili vezane na metalni supstrat. Pojačanje ili smanjenje intenziteta neke vrpce u SERS spektru u

odnosu na intenzitet vrpce iste vibracije u normalnom Ramanovom spektru događa se ovisno o orijentaciji molekule analita na metalnoj površini, što je određeno tzv. izbornim pravilima na površini. Takva izborna pravila nalažu da se promjena polarizabilnosti funkcionalnih skupina mora događati okomito na metalnu površinu kako bi došlo do raspršenja zračenja te da će vrpce takvih vibracija biti najintenzivnije. U suprotnome, ako se promjena polarizabilnosti događa paralelno s metalnom površinom, raspršenje se neće opaziti. Nelinearna promjena intenziteta SERS signala u ovisnosti o koncentraciji analita može se objasniti pomoću navedenih izbornih pravila na primjeru molekule piridina adsorbirane na površinu metalnog supstrata. Pri vrlo visokim koncentracijama, zbog steričkih se smetnji molekule piridina na površini metala smještaju pod određenim kutovima u odnosu na metalnu površinu. Takav položaj molekula nije idealan, stoga je i intenzitet Ramanovog raspršenja nešto slabiji. Smanjenjem koncentracije, broj molekula piridina na površini je manji i sukladno tome, one imaju više prostora za smjestiti se optimalno, tj. s ravninom piridinskog prstena okomitom na metalnu površinu. U tom slučaju opaža se najintenzivniji SERS signal. Pri vrlo niskim koncentracijama, molekule piridina imaju veliku površinu metala na raspolaganju te se smještaju vodoravno na način da je ravnina aromatskog prstena paralelna s ravninom metalne površine, što daje slab intenzitet.

SERS tehnika većinom se koristi za detekciju molekula *in situ* u vodenim otopinama i za istraživanje mehanizama adsorpcije različitih molekula na površinu metala. Osim toga, metoda je od izbora pri istraživanju polimera te za detekciju analita pri kromatografskom postupku. Svoju primjenu, osim za kvalitativnu analizu, nalazi i u kvantitativnoj analizi.

Mogućnost dobivanja detaljne informacije o strukturi, visoka osjetljivost i gašenje emisije fluorescentnih molekula adsorbiranih na metalnu površinu čine je posebno pogodnom za istraživanje biomolekula. Prednosti SERS spektroskopije u istraživanju DNA su brojne: mogućnost snimanja uzoraka u mikromolarnom koncentracijskom području, istraživanje molekula različitih duljina – od oligonukleotida do polinukleotida, visoka osjetljivost, prihvatljiva cijena i jednostavna priprava uzoraka miješanjem otopina male molekule i DNA s koloidom. Posebno treba istaknuti kako uporaba koloidnih suspenzija kao SERS aktivnih supstrata omogućava mjerenja u vodenim otopinama pri fiziološkoj pH-vrijednosti, čime se oponašaju stanični uvjeti i omogućava fleksibilnost DNA molekule.<sup>10</sup>

### 2.1.1.1. Metalni supstrati

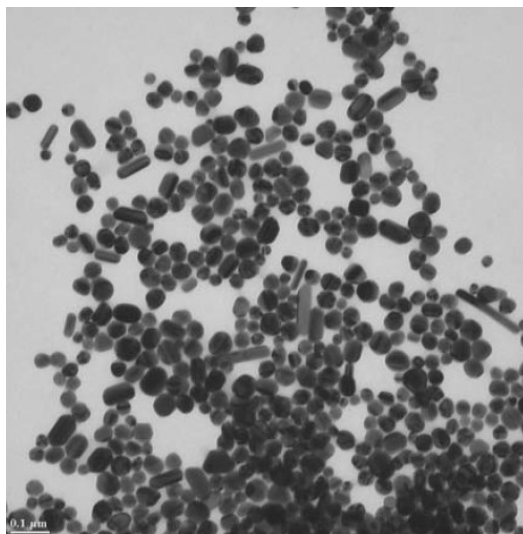
Osnovni uvjet da bi neka površina bila SERS aktivna je da se analit adsorbira na istu, kako bi se SERS spektri mogli opaziti. S obzirom da je postojanje hrapave metalne površine nužno za pojačanje SERS signala, važno je razumjeti njezinu prirodu. Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koji se mogu slobodno kretati po površini. Kada se metalnu površinu ozrači zračenjem odgovarajuće energije, elektroni počinju oscilirati i na taj način nastaju površinski plazmoni (oscilacije elektrona na površini metala). Zbog oscilacija elektrona, metalne nanočestice se polariziraju, a kao posljedica toga nastaju vrlo jaka električna polja. Površinski plazmoni osciliraju odgovarajućom frekvencijom koja odgovara apsorpciji i raspršenju zračenja. Ta takozvana rezonantna frekvencija ovisi o vrsti metala i o hrapavosti površine.

Dakle, osnova SERS spektroskopije je postojanje odgovarajuće nanostrukturirane metalne površine. Metali koji se najčešće koriste u tu svrhu, zbog svoje kemijske inertnosti i SERS učinkovitosti, su srebro i zlato. Velika je prednost tih dvaju metala to što se njihova karakteristična rezonantna frekvencija nalazi u Vis području – pri 410 nm za plazmone srebra, odnosno pri 510 nm za plazmone zlata. Budući da većina lasera u Ramanovoj spektroskopiji emitira u Vis području, može se postići rezonancija između valne duljine (tj. frekvencije) lasera i plazmonske frekvencije SERS supstrata. Svaki metal ima karakterističan omjer apsorpcije i raspršenja zračenja pa je tako za plazmone srebra favoriziran proces raspršenja i upravo je zbog toga SERS učinkovitost supstrata srebra puno bolja od one koju pokazuju supstrati zlata. Istraživanja su provedena i s bakrom i željezom kao metalnim supstratima, međutim nedostatak oba metala je taj što tvore slojeve oksida u prisutnosti kisika, pri čemu se mijenja priroda površine i gubi hrapavost, a nastali oksid djeluje i kao prostorna barijera između analita i metalne površine.<sup>6</sup> Iz navedenih razloga ta dva metala nisu toliko efikasna za pripremu SERS supstrata. Provedena su istraživanja i s litijem i natrijem, međutim zbog svoje reaktivnosti, ovi se metali ne koriste za pripremu SERS supstrata.

Osim što SERS aktivna površina mora biti metalna, ona mora biti i hrapava. Tome je tako iz razloga što se na glatkoj površini oscilacije elektrona događaju u ravnini metalne površine i u tom slučaju događa se samo apsorpcija zračenja. U slučaju hrapave površine, oscilacije elektrona se događaju i u ravnini i okomito na metalnu površinu, uslijed čega se zračenje i apsorpira i raspršuje. Kao supstrati hrapavih površina u SERS spektroskopiji koriste

se agregirane koloidne suspenzije, elektrode hrapavih površina i metalni filmovi. Područje rezonantnih valnih duljina ovisi o hrapavosti, odnosno o obliku SERS supstrata pa je stoga značajno šire u slučaju elektroda hrapavih površina, agregiranih koloidnih suspenzija i metalnih filmova nego za dispergirane nanočestice u koloidnim suspenzijama.

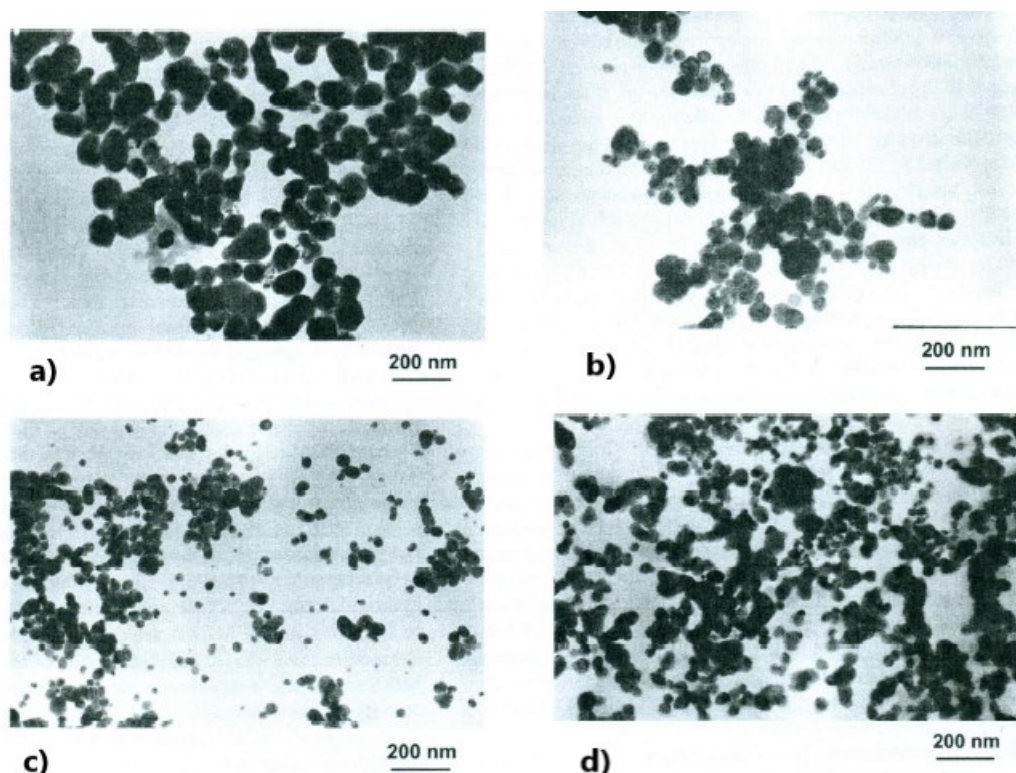
Metalni koloidi mogu se sintetizirati na različite načine, od kojih su najčešći kemijska redukcija, laserska ablacija i fotoredukcija.<sup>5</sup> Ipak, za sintezu koloidnih suspenzija metalnih nanočestica u SERS tehnici najviše se koristi postupak kemijske redukcije<sup>11</sup> u kojem se otopina soli odgovarajućeg metala reducira pomoću kemijskog reagensa. Takve je suspenzije jednostavno pripremiti, a mogu agregirati kontrolirano – dodatkom agregirajućih reagenasa, ili pak spontano. Oblik i veličina nanočestica može se regulirati izborom prikladne metode za sintezu, a parametri koji na to utječu su priroda metala, reducirajući reagens, temperatura, stabilizirajući reagens i koncentracija metalnih iona. Nanočestice oblikom mogu biti sferne, u obliku prizme, štapičaste ili zvjezdaste, a njihova veličina varira u rasponu između 10 i 80 nm. Na slici 6 prikazana je fotografija tipičnog koloida koji se koristi za SERS istraživanja snimljena transmisijskim elektronskim mikroskopom (engl. *transmission electron microscopy*, TEM). Elektrode hrapave površine moguće je sintetizirati različitim elektrokemijskim postupcima, a u tu svrhu koriste se metali poput platine, nikla, kobalta, željeza, paladija, iridija, rodija i rubidija. Također, u uporabi su i čisti halogenidi, sulfati i različite srebrove(I) soli. Tanki metalni filmovi najčešće se pripremaju raspadom u vakuumu, a prednosti ove tehnike su primjenjivost na sve tvari, visoka čistoća, u nekim slučajevima predodređena struktura, promjenjiva temperatura supstrata i pristup podlozi tijekom raspada.<sup>5</sup>



Slika 6. TEM fotografija tipičnog koloida koji se koristi za SERS istraživanja. Koloid je pripremljen Lee-Meislovom metodom redukcije srebrova(I) nitrata s citratom, a čestice su sfernog i igličastog oblika.<sup>6</sup>

SERS supstrati mogu biti smješteni u različitim okolinama, primjerice u vakuumskim komorama s malom količinom čistog analita u kontroliranoj atmosferi ili u otvorenim kivetama ispunjenim biološkim medijem koji sadrži analit.

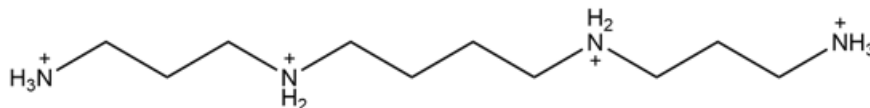
U ovom su radu za detekciju DNA molekule kao SERS aktivni metalni supstrati korištene koloidne suspenzije srebrovih nanočestica negativnog i pozitivnog naboja. Koloidna suspenzija srebrovih nanočestica negativnog naboja (AgNP<sub>-Cl</sub>) pripravljena je Leopold-Lendlovim postupkom redukcije srebrova(I) nitrata s hidroksilamin-hidrokloridom<sup>12</sup> (NH<sub>2</sub>OH×HCl), koji je brži i jednostavniji od Lee-Meislovog u kojem se kao reducirajući agens rabi natrijev citrat. Na temelju apsorpcijskog maksimuma u UV/Vis spektru koloidne suspenzije može se dobiti informacija o prosječnoj veličini čestica, dok širina na polovici visine maksimuma (engl. *full width at half-maximum*, fwhm) može poslužiti za procjenu disperzije čestica. Na veličinu i disperziju čestica može se utjecati promjenom redosljeda miješanja reagenasa te mijenjanjem brzine miješanja. Nanočestice srebra u ovom koloidu uglavnom su sfernog oblika (slika 7). Boja koloida može varirati od zelenkasto-sive, ukoliko je veličina čestica monodisperzna, do svijetlosive, ako se radi o polidisperznom sustavu. Provedeno istraživanje pokazalo je da je ovako pripravljena koloidna suspenzija bila stabilna i nakon tri mjeseca.<sup>12</sup>



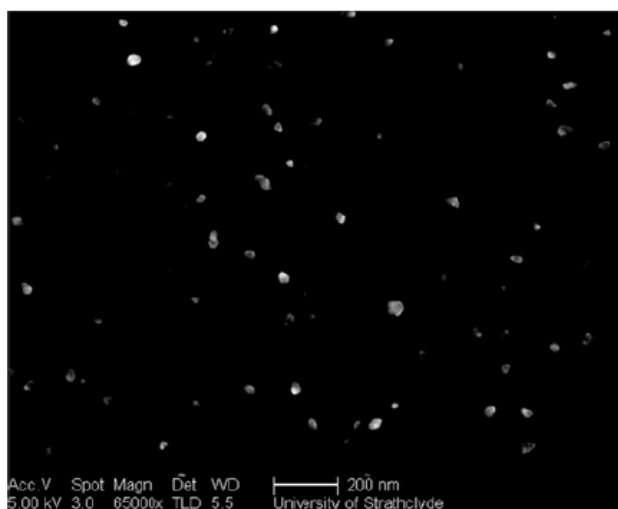
Slika 7. TEM fotografije koloidne suspenzije srebrovih nanočestica negativnog naboja (AgNP<sub>-Cl</sub>) pripravljene Leopold-Lendlovim postupkom redukcije srebrova(I) nitrata s hidroksilamin-hidrokloridom. Pod a) je prikazan polidisperzni sustav s prosječnom veličinom čestica 67 nm, dok ostale fotografije prikazuju monodisperzne sustave s prosječnom veličinom čestica: b) 34 nm te c) i d) 23 nm.<sup>12</sup>

Koloidna suspenzija srebrovih nanočestica pozitivnog naboja (AgNP<sub>-sp</sub>) pripravljena je redukcijom srebrova(I) nitrata s natrijevim borhidridom uz spermin-tetrahidroklorid. Spermin (4,9-diazadodekan-1,12-diamin,  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ) je četverovalentni alifatski poliamin (slika 8). U ovom slučaju spermin vezan na površinu srebrovih nanočestica djeluje kao stabilizator te pospješuje agregaciju nanočestica u stabilne klastere, što je velika prednost jer nije potreban dodatak agregirajućeg agensa. Prosječna veličina takvih nanočestica određena je pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) na temelju uzorka od 225 čestica te je iznosila  $(26,8 \pm 6)$  nm.<sup>13</sup> SEM fotografija AgNP<sub>-sp</sub> prikazana je na slici 9. Unutarnje stijenke kemijskog posuđa su prije sinteze obložene polietileniminom (PEI), kako bi se spriječila adhezija pozitivno nabijenih nanočestica na negativno nabijenu staklenu površinu. Provedeno istraživanje pokazalo je da je ovako

pripravljena koloidna suspenzija, skladištena u tamnoj prostoriji na 10-20°C, bila stabilna i nakon par mjeseci.<sup>13</sup>



Slika 8. Strukturna formula potpuno protoniranog oblika spermina.



Slika 9. SEM fotografija koloidne suspenzije srebravih nanočestica pozitivnog naboja (AgNP\_sp) pripravljene redukcijom srebrova(I) nitrata s natrijevim borhidridom uz dodatak spermin-tetrahidroklorida.<sup>13</sup>

### 2.1.1.2. Mehanizmi pojačanja

Kako nije moguće teorijski opisati vezanje ili adsorpciju organske molekule na hrapavu metalnu površinu u vodi, za objašnjenje SERS spektroskopije koriste se dvije jednako valjane teorije: elektromagnetsko pojačanje tj. elektromagnetski mehanizam, i kemijsko pojačanje tj. pojačanje uslijed prijenosa naboja, odnosno kemijski mehanizam.

U slučaju elektromagnetskog mehanizma, metalni supstrat aproksimiran je modelom metalne sfere. Ukupno električno polje na površini metalne sfere izložene laserskom zračenju opisano je sljedećim izrazom:



$$E_r = E_0 \cos \theta + g \left( \frac{a^3}{r^3} \right) E_0 \cos \theta$$

gdje je  $E_r$  ukupno električno polje na udaljenosti  $r$  od metalne sfere,  $E_0$  električno polje lasera,  $r$  udaljenost od površine sfere,  $a$  promjer sfere,  $\theta$  kut u odnosu na smjer električnog polja, a  $g$  konstanta koja se definira na sljedeći način:

$$g = \left( \frac{\varepsilon_1(\nu_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon_1(\nu_L) + 2\varepsilon_0} \right)$$

pri čemu je  $\varepsilon_1$  dielektrična konstanta metalne sfere,  $\varepsilon_0$  dielektrična konstanta medija oko sfere, a  $\nu_L$  frekvencija upadnog zračenja.<sup>6</sup> Iz ovih izraza može se zaključiti da udaljavanjem analita od površine električno polje slabi, zbog čega se pojačanje signala smanjuje. Električno polje okomito na površinu metalne sfere veće je od električnog polja paralelnog s površinom iste pa je to razlog što se najveće pojačanje opaža za one vibracije čija se promjena polarizabilnosti događa okomito na površinu metalne sfere.

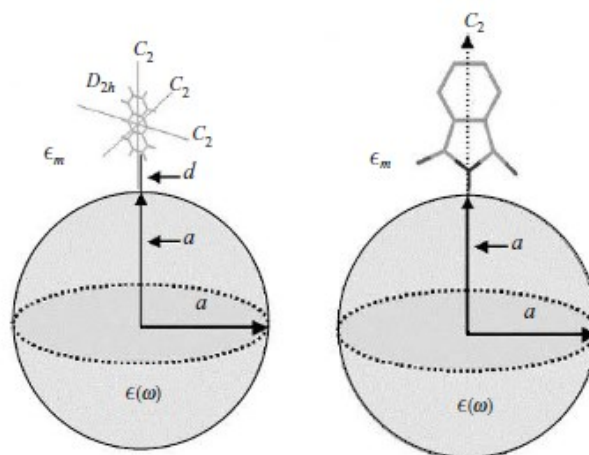
S obzirom da metalna sfera predstavlja jednu koloidnu česticu, a poznato je da agregirane suspenzije ovih čestica omogućavaju puno veće pojačanje, takva aproksimacija nije najadekvatnija. Usprkos tome, ona nudi objašnjenje većine osnovnih procesa koji se pritom odvijaju pa se stoga široko koristi. Elektromagnetsko pojačanje pretpostavlja da je molekula adsorbirana ili se nalazi vrlo blizu metalne površine. Pritom ne nastaje kemijska veza, već se radi ili o slabim elektrostatskim interakcijama s ionima na površini metala ili o  $\pi$ - $\pi$  interakcijama. Jako električno polje koje nastaje zbog polarizacije metalne sfere utječe na molekulu koja se nalazi u blizini, što uzrokuje interakciju između elektrona analita i plazmona. Kao posljedica te interakcije pojačava se Ramanovo raspršenje. Pritom se SERS spektar može opaziti ne samo za prvi sloj molekula koje su najbliže metalu, već i za drugi i za svaki sljedeći sloj analita uz površinu. Faktor pojačanja (engl. *enhancement factor*, EF) za elektromagnetski mehanizam iznosi otprilike  $10^8$ , što znači da se intenzitet vrpce može povećati  $10^8$  puta u odnosu na vrpce u normalnom Ramanovom spektru.

Međutim, kao što je već spomenuto, dokazano je da se najveće pojačanje raspršenog zračenja ne događa na izoliranoj čestici. Naime, električna polja su izuzetno jaka na mjestima gdje se čestice dodiruju, a takva mjesta se zovu „vruće točke“ (engl. „*hot spots*“). Pritom se

mijenja rezonantna frekvencija plazmona, koja sada obuhvaća više čestica. Egzaktnije, porastom veličine čestica smanjuje se plazmonska frekvencija. Dakle, na pojačanje SERS signala utječu frekvencija, veličina i oblik metalnih čestica te način na koji čestice agregiraju.

Kemijski mehanizam pretpostavlja da je molekula kemijski vezana na metalnu površinu, a veza s metalom uglavnom se ostvaruje preko heteroatoma, kao što su dušik, kisik ili sumpor. Pri tome može doći do prijenosa elektrona s metala na molekulu ili s molekule na metal. Pretpostavlja se da se nastajanjem kemijske veze između analita i metalne površine formiraju nove kemijske vrste na površini te da nastaju nova elektronska stanja. Povećanje polarizabilnosti molekule uslijed interakcije s elektronima metala dovodi do pojačanja Ramanovog raspršenja. SERS spektar koji se opaža posljedica je pojačanja raspršenja analita samo iz prvog sloja vezanog na površinu, odnosno samo onih molekula koje su kemijski vezane na metalnu površinu. Faktor pojačanja za kemijski mehanizam je približno  $10^2$ , dakle intenzitet vrpce može se povećati do  $10^2$  puta u odnosu na vrpce u normalnom Ramanovom spektru.

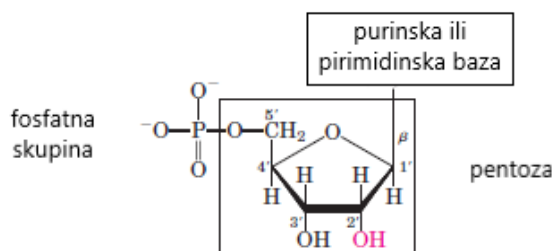
Treba naglasiti kako se u slučaju SERS spektara ova dva mehanizma ne opažaju neovisno jedan o drugome. Najčešće se (ovisno o strukturi molekule) opaža elektromagnetski mehanizam ili kombinacija elektromagnetskog i kemijskog mehanizma.<sup>10</sup> Shematski prikaz oba mehanizma nalazi se na slici 10.



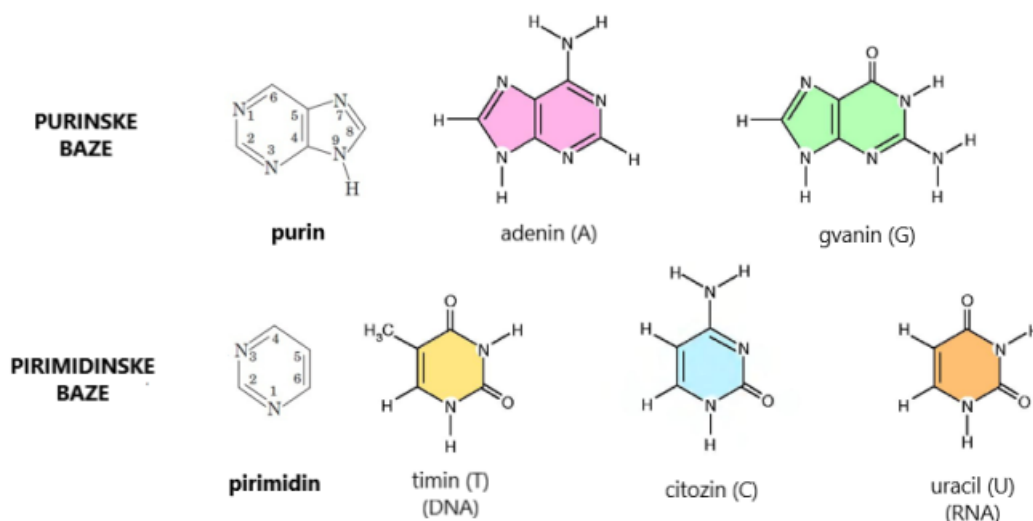
Slika 10. Shematski prikaz molekule na udaljenosti  $d$  od metalne nanosfere – elektromagnetsko pojačanje (lijevo) i molekule kemijski vezane na metalnu nanosferu – kemijsko pojačanje (desno).<sup>5</sup>

## 2.2. DNA/RNA polinukleotidi

Nukleinske kiseline predstavljaju molekulska spremišta genetičke informacije, a dijele se na deoksiribonukleinsku (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i ribonukleinsku kiselinu (engl. *ribonucleic acid*, RNA). DNA je dvolančana molekula koja se sastoji od dva međusobno komplementarna polinukleotidna lanca, dok je RNA jednolančana molekula sačinjena od jednog polinukleotidnog lanca. Polinukleotidni lanci nastaju uzastopnim povezivanjem monomernih jedinica, nukleotida. Nukleotidi imaju važnu ulogu u staničnom metabolizmu: prenose kemijsku energiju za metaboličke procese, posreduju u nastajanju staničnog odgovora na hormone i druge izvanstanične podražaje te izgrađuju niz enzimskih kofaktora i metaboličkih međuprodukata. Nukleotidi su građeni od tri strukturna dijela: dušične baze, šećera pentoze i jedne ili više fosfatnih skupina (slika 11).<sup>14</sup> Dušične baze su heterociklički spojevi koji sadrže dušik, a derivati su purina ili pirimidina. Purinske dušične baze su adenin (A) i gvanin (G) i svojstvene su objema nukleinskim kiselinama. Pirimidinske baze se razlikuju ovisno je li riječ o DNA ili RNA pa se tako u molekuli DNA nalazi timin (T), dok je u molekuli RNA prisutan uracil (U), a citozin (C) je zajednički objema. Strukturni prikaz dušičnih baza dan je na slici 12. Ribonukleinska kiselina sastavljena je od ribonukleotida kod kojih peteročlani prsten čini D-riboza, dok je deoksiribonukleinska kiselina sastavljena od deoksiribonukleotida kod kojih peteročlani prsten čini 2'-deoksi-D-riboza. Prema tome, nukleotidi prisutni u RNA nazivaju se adenzin, uridin, gvanozin i citidin, dok se nukleotidi prisutni u DNA nazivaju deoksiadenozin, deoksitimidin, deoksigvanozin i deoksicitidin. Dušična je baza kovalentno vezana na C1' atom šećera pentoze N-β-glikozidnom vezom. Ugljikovi atomi riboze i deoksiriboze dogovorno se označavaju brojevima s crticom, kako bi se razlikovali od ugljikovih atoma dušičnih baza. Kemijska struktura koja se sastoji samo od šećera pentoze i dušične baze naziva se nukleozid.<sup>15</sup>

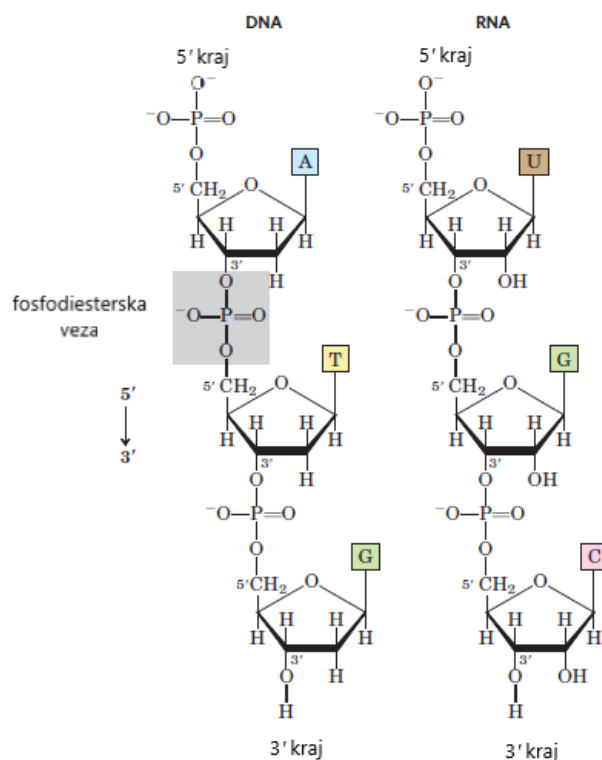


Slika 11. Strukturni prikaz sastavnih dijelova ribonukleotida. U slučaju deoksiribonukleotida,  $-OH$  skupina koja se nalazi na  $C2'$  atomu riboze (ružičasto) zamijenjena je vodikovim atomom. Struktura je numerirana prema uvriježenoj konvenciji. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>14</sup>



Slika 12. Strukturni prikaz dušičnih baza. Strukture su numerirane prema uvriježenoj konvenciji. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>16</sup>

Nukleotidi se međusobno povezuju kovalentnim vezama preko fosfatnih skupina na način da je  $5'$ -fosfatna skupina jednog nukleotida vezana na  $3'$ -hidroksilnu skupinu sljedećeg nukleotida, tvoreći tako fosfodieterske veze (slika 13).<sup>14</sup> Prema dogovoru,  $5'$ -kraj polinukleotidnog lanca je onaj čija je fosfatna skupina na  $5'$  položaju terminalna, odnosno na nju nije vezan sljedeći nukleotid, a  $3'$ -kraj je onaj čija je fosfatna skupina na  $3'$  položaju slobodna. Polinukleotidni lanci posjeduju polarnost tj. usmjerenje, a dogovorno je uzet smjer  $5' \rightarrow 3'$ .

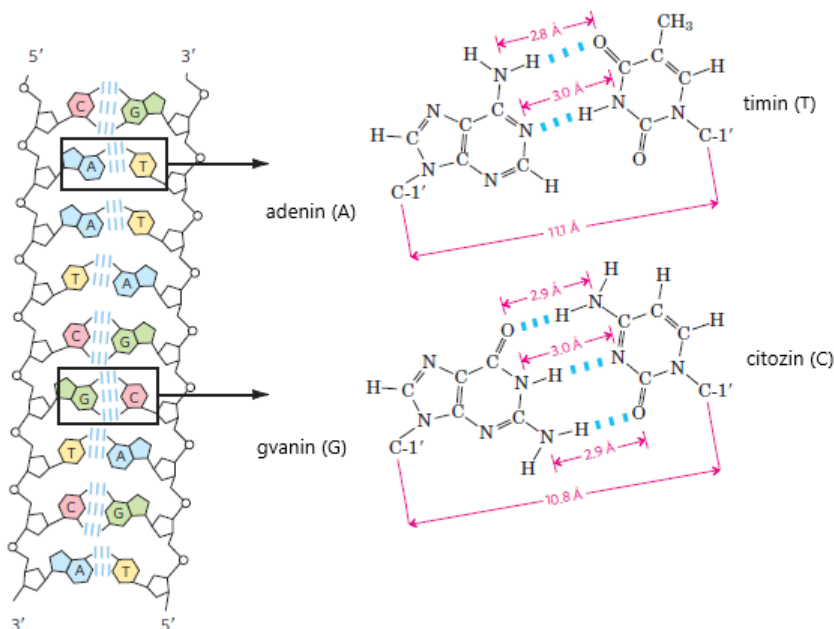


Slika 13. Prikaz međusobnog povezivanja nukleotida preko fosfodieterskih mostova.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>14</sup>

Okosnicu nukleinskih kiselina čine fosfatne skupine i šećer pentoza. Budući da je okosnica hidrofилna, šećer pentoza može preko svojih –OH skupina tvoriti vodikove veze s molekulama vode. Fosfatne skupine, čiji je  $pK_a$  približno jednak nuli, pri neutralnoj su pH-vrijednosti u potpunosti ionizirane, a njihov se negativni naboj općenito neutralizira ionskim interakcijama s pozitivnim nabojima proteina, metalnih iona ili poliamina.<sup>14</sup> Za razliku od okosnice, purinske i pirimidinske baze su hidrofobne te su između njih moguće dvije vrste interakcija: tzv.  $\pi$ -interakcije slaganja (engl. „*stacking*“) i vodikove veze.  $\pi$ -Interakcije slaganja opisuju se kao kombinacija van der Waalsovih interakcija i dipol-dipol interakcija između dušičnih baza (točnije, elektrona aromatskih prstenova), a nastaju kada su dvije ili više baza orijentirane na način da su im ravnine aromatskih prstenova međusobno paralelne. Ove su interakcije vrlo značajne jer stabiliziraju trodimenzionalnu strukturu nukleinskih kiselina. Vodikove veze nastaju između amino i karbonilnih skupina dušičnih baza te predstavljaju najvažniju vrstu interakcija između dvaju komplementarnih lanaca nukleinskih kiselina. Obrasce sparivanja dušičnih baza predložili su J. D. Watson i F. Crick 1953. godine,<sup>14</sup> a njima je određeno da se A specifično veže s T (u slučaju DNA) ili U (u slučaju RNA) dvjema vodikovim vezama, dok se

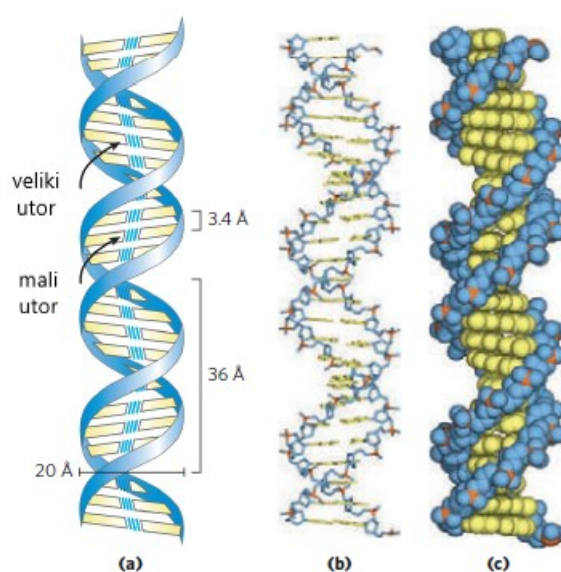
G povezuje s C trima vodikovim vezama (slika 14). Iz je tog razloga vodikova veza između parova baza GC jača i posljedično kraća od vodikove veze između parova baza AT.



Slika 14. Obrasci sparivanja dušičnih baza prema J. D. Watsonu i F. Cricku. Plave isprekidane linije predstavljaju vodikove veze. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>14</sup>

Trodimenzionalnu strukturu DNA molekule predložili su J. D. Watson i F. Crick 1953. godine na temelju proučavanja fotografija difrakcije rendgenskog zračenja na vertikalno orijentiranim nitima DNA, koje su snimili R. Franklin i M. Wilkins. Prema njihovom modelu, DNA se sastoji od dva helikoidna lanca koji se obavijaju u smjeru „obrnuto od kazaljke na satu“ oko zajedničke osi usmjerene prema gore (prema tzv. *pravilu desne ruke*), tvoreći tako desnu zavojnicu. Hidrofilna fosfodieterska okosnica nalazi se na vanjskoj strani zavojnice gdje može tvoriti interakcije s molekulama vode, dok su parovi baza smješteni u unutrašnjosti dvostruke zavojnice s ravninama hidrofobnih, gotovo planarnih aromatskih prstenova okomitima na os zavojnice. Pomak u sparivanju dva polinukleotidna lanca tvori veliki i mali utor na površini dvostruke zavojnice (slika 15).<sup>14</sup> Potvrđena je istinitost tzv. „Chargaffovih pravila“, koja nalažu da je u svakoj staničnoj DNA molarni udio adenozina jednak onome od timidina te da je molarni udio gvanozina jednak onome od citidina, iz čega proizlazi da je udio pirimidinskih baza jednak udjelu purinskih baza:  $A + G = T + C$ . Komplementarnost polinukleotidnih lanaca u molekuli

DNA odnosi se na razlike u redoslijedu dušičnih baza među lancima, s obzirom na njihovo sparivanje. Lanci su međusobno antiparalelni, odnosno jedan je u smjeru  $5' \rightarrow 3'$ , dok je drugi okrenut u smjeru  $3' \rightarrow 5'$ . Struktura dvostruke uzvojnice je periodična s parovima baza međusobno razmaknutim za  $3,4 \text{ \AA}$  i duljinom jednog punog zavoja (koji se sastoji od 10 parova baza) od  $34 \text{ \AA}$ , dok promjer zavojnice iznosi  $20 \text{ \AA}$ . Konformacija furanoznog prstena utječe na konformaciju fosfodiesterske okosnice te određuje udaljenost i međusobni položaj fosfatnih skupina. Takav prsten nije planaran, a najčešće je riječ o  $C2'$ -endo i  $C3'$ -endo konformaciji.



Slika 15. a) Shematski prikaz dvostruke DNA zavojnice, njenih dimenzija te velikog i malog utora, b) štapićasti prikaz okosnice i sparivanja baza te c) prostorni model dvostruke zavojnice. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>14</sup>

Dvostruka DNA zavojnica zbog svoje fleksibilnosti može poprimiti različite trodimenzionalne konformacije, od kojih su najčešće A, B i Z konformacija. B-DNA zove se još i tipična ili kanonska konformacija te je najzastupljenija u biološkim sustavima pri fiziološkim uvjetima. Watson-Crickov model odnosi se upravo na B konformaciju. A-DNA javlja se kod kraćih molekula u uvjetima niske vlažnosti, većeg je promjera te ima više parova baza po zavoju i kraći razmak između parova baza u odnosu na kanonsku konformaciju. Z-DNA se značajnije razlikuje od kanonske konformacije pa je tako riječ o lijevoj zavojnici, gdje je ponavljajuća jedinica dinukleotid. Stabilna je pri uvjetima visoke ionske jakosti, manjeg je promjera, ima više parova baza po zavoju i dulji razmak između parova baza u odnosu na tipičnu

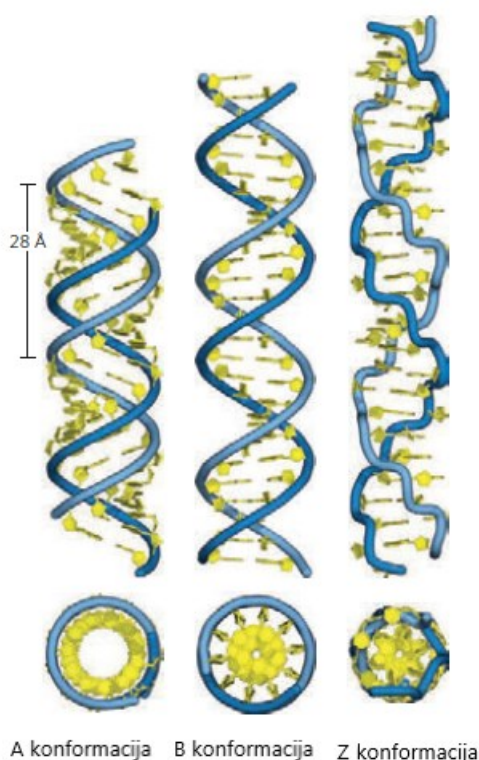
konformaciju. Usporedba A, B i Z konformacije molekule DNA dana je tablicom 1 i slikom 16.

Tablica 1. Strukturne razlike između A, B i Z konformacije molekule DNA.<sup>14,15</sup>

| <b>konformacija</b>                       | <b>A</b>        | <b>B</b>        | <b>Z</b>                                     |
|---|-----------------|-----------------|--|
| dvostruka zavojnica                       | desna           | desna           | lijeva                                       |
| promjer / Å                               | ~26             | ~20             | ~18  |
| ponavljajuća jedinica                     | 1 par baza      | 1 par baza      | 2 para baza                                  |
| broj parova baza po zavoju                | 11              | 10,5            | 12   |
| duljina razmaka između parova baza / Å    | 2,6             | 3,4             | 3,7  |
| nagib baze s obzirom na helikoidnu os / ° | 20              | 6               | 7  |
| konformacija šećera pentoze               | <i>C3' endo</i> | <i>C2' endo</i> | pir: <i>C2'-endo</i><br>pur: <i>C3'-endo</i> |
| konformacija glikozidne veze              | <i>anti</i>     | <i>anti</i>     | pir: <i>anti</i><br>pur: <i>syn</i>          |
| mali utor                                 | širok i plitak  | uzak i dubok    | uzak i dubok                                 |
| veliki utor                               | uzak i dubok    | širok i dubok   | plitak                                       |

Kratice: pir – pirimidinske baze, pur – purinske baze.





Slika 16. Usporedba A, B i Z konformacije molekule DNA. Svaka struktura ima 36 parova baza. Polinukleotidni lanci prikazani su plavom bojom, dok su pentoza i dušične baze prikazane žutom bojom. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>14</sup>

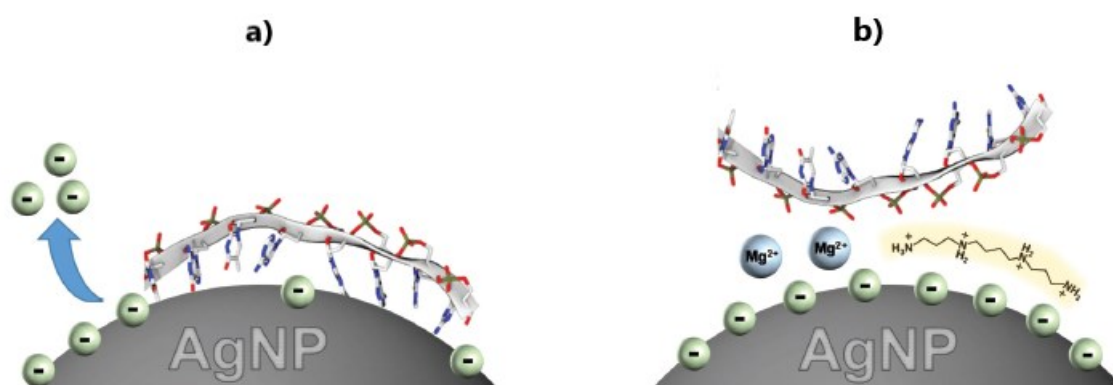
S obzirom da se kod eukariota DNA molekula nalazi u jezgri, dok se sinteza proteina odvija na ribosomima u citoplazmi, postalo je jasno da mora postojati neka druga molekula koja će prenositi genetičku informaciju iz jezgre u citoplazmu.<sup>14</sup> Ta je uloga pripisana molekuli RNA, budući da je pronađena i u jezgri i u citoplazmi. Dok je jedina poznata zadaća molekule DNA pohrana i prijenos genetičke informacije, RNA posjeduje širok spektar bioloških funkcija. Poznate su različite vrste RNA u stanici, a osnovna je podjela na ribosomsku RNA (engl. *ribosomal RNA*, rRNA) koja izgrađuje ribosome, glasničku RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) koja prenosi genetičku informaciju od gena do ribosoma te prijenosnu RNA (engl. *transport RNA*, tRNA) koja pomaže u prevođenju informacija s mRNA u specifični slijed aminokiselina. Molekula RNA uglavnom se sastoji od jednog polinukleotidnog lanca koji čini desnu zavojnicu. U takvoj jednolančanoj strukturi dominiraju izrazito jake interakcije  $\pi$ -slaganja između dušičnih baza dva pirimidina ili između purina i pirimidina. Međutim, može doći i do sparivanja komplementarnih baza između dva lanca RNA ili pak između RNA i DNA,

pri čemu nastaju antiparalelne RNA ili RNA-DNA dvostruke zavojnice. Sparivanjem dviju kraćih, jednolančanih RNA molekula pretežito nastaje desna zavojnica A konformacije.

### 2.2.1.1. Mehanizmi interakcije sa SERS supstratima

Direktna SERS detekcija dvolančane DNA molekule na negativno nabijenim nanočesticama kao SERS supstratima nije reproducibilna i slabo je osjetljiva zbog elektrostatskog odbijanja negativno nabijene fosfatne okosnice DNA i negativnog naboja samih nanočestica.<sup>4</sup> Kako bi se otklonio taj nedostatak, u koloidnu suspenziju negativno nabijenih nanočestica dodaju se pozitivno nabijeni ioni ili molekule.

Dva su mehanizma adsorpcije molekule DNA na nanočestice srebra: direktnom interakcijom dušične baze i metala, pri čemu dolazi do zamjene iona ili molekula koje su prethodno bile vezane na metalnu površinu, te elektrostatskom interakcijom između negativno nabijenih fosfatnih skupina DNA i metalne površine na kojoj se nalaze pozitivno nabijeni ioni, poput  $Mg^{2+}$ , ili pozitivno nabijene molekule, poput spermina (slika 17). Dvije su varijante elektrostatskog mehanizma: prethodnim kompleksiranjem DNA s tvarima koje neutraliziraju negativni naboj fosfatne okosnice, nakon čega slijedi adsorpcija nastalog kompleksa na negativno nabijenu metalnu površinu ili pak direktnom koordinacijom fosfatne okosnice DNA na pozitivno nabijene nanočestice.<sup>3,17</sup>



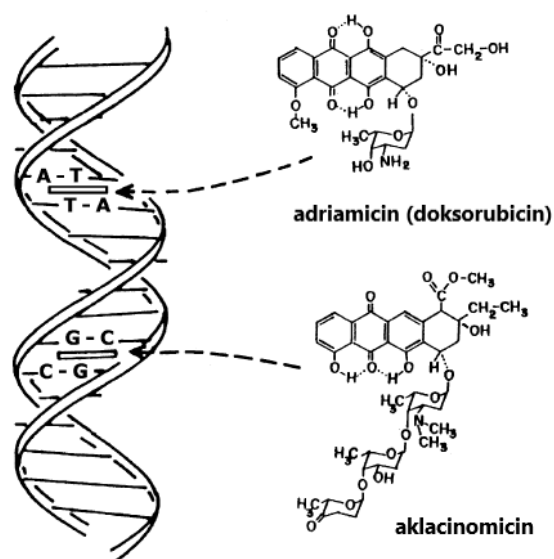
Dok pozitivno nabijene nanočestice spontano agregiraju dodatkom DNA, to nije slučaj kod onih negativno nabijenih pa je kod takvih često potreban dodatak agregirajućeg agensa.<sup>3</sup> Najčešće se u tu svrhu koristi magnezijev(II) sulfat. Riječ je o tzv. „pasivnom“ elektrolitu koji inducira agregaciju nanočestica povećavajući ionsku jakost bez čvrstog vezanja na površinu srebrovih nanočestica, što omogućava direktno vezanje DNA na metalnu površinu preko dušičnih baza.<sup>18</sup> Stoga se u slučaju agregacije posredovane  $Mg^{2+}$  ionima interakcija preferirano odvija prvim mehanizmom. Međutim, spermin znatno efikasnije neutralizira negativni naboj fosfatne okosnice od dvovalentnog iona kao što je  $Mg^{2+}$ . Spermin u kombinaciji s negativno nabijenim česticama djeluje kao tzv. „sandwich“ molekula – privlači molekule DNA površini metalnih nanočestica te potiče njihovu daljnju agregaciju, što omogućava visoku osjetljivost SERS metode.<sup>13</sup> Interakcija DNA i metalnih nanočestica posredovana sperminom preferirano se odvija drugim mehanizmom.

Rendgenskom strukturnom analizom kompleksa spermina i dodekamera DNA utvrđeno je da pozitivno nabijene terminalne amino skupine spermina tvore elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatnim skupinama DNA te da jedna od unutarnjih protoniranih imino skupina spermina tvori vodikovu vezu s karbonilnom skupinom gvanina.<sup>19</sup>

#### 2.2.1.2. Interakcije s malim organskim molekulama

Najzastupljeniji način interakcije između DNA i malih organskih molekula je interkalacija.<sup>15</sup> Interkalacija je proces umetanja planarne molekule između aromatskih prstenova dvije sukcesivne dušične baze dvostruke zavojnice DNA. Nastali je kompleks stabiliziran van der Waalsovima interakcijama između  $\pi$ -elektrona aromatskog sustava molekule interkalatora i heterocikličkih prstenova parova baza te ionskim interakcijama između pozitivno nabijenih skupina interkalatora i negativno nabijenih kisikovih atoma fosfodieterske okosnice. Smještanje velikog policikličkog aromatskog prstena interkalatora između parova baza molekule DNA u B konformaciji uzrokuje povećanje udaljenosti između istih za 1,8–4,5 Å po interkalaciji. Ovaj proces u konačnici uzrokuje produljenje polinukleotidnih lanaca te odmatanje dvostruke zavojnice za 11–48°. Kod duljih oligonukleotida i molekule DNA vrijedi pravilo isključenja susjedne interkalacije (engl. *neighbor exclusion rule*), koje nalaže da se interkalatori ne mogu vezati između dvaju uzastopnih parova baza. Interkalacijom nekog spoja dolazi do pomaka  $\pi$ - $\pi^*$  elektronskog prijelaza njegovog kromofora, a ta se promjena očituje u

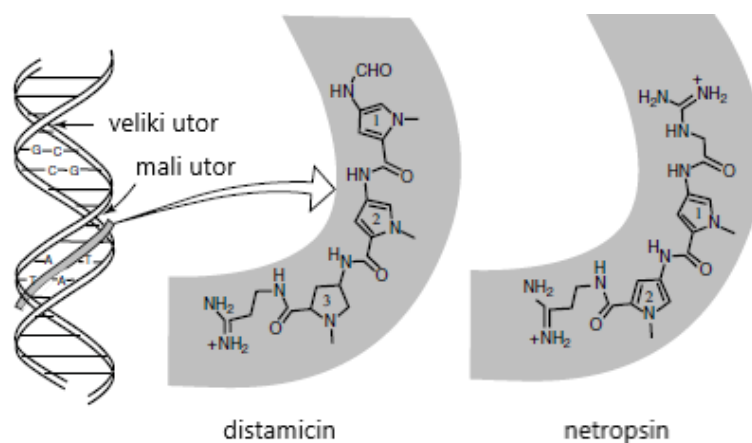
batokromnom pomaku apsorpcijske vrpce te u hipsokromnom pomaku vrpce u fluorescencijskom spektru. Gašenje fluorescencije pogodno je za određivanje mjesta interkalacije. Karakteristični primjeri interkalatora su etidijev bromid, akridin, aktinomycin i aklacinomicin. Neke molekule preferirano interkaliraju između točno određenih parova baza, poput aklacinomicina koji se veže između parova baza GC ili CG te adriamicina koji preferira parove baza AT ili TA (slika 18).



Slika 18. Preferirana interkalacija malih organskih molekula između parova baza u molekuli DNA. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>15</sup>

Drugi, vrlo čest način interakcije malih organskih molekula i DNA je vezanje u mali ili veliki utor dvostruke zavojnice. Zastupljenije je vezanje u mali utor, i to u područja bogata parovima baza AT. Molekule koje se preferencijalno vežu u mali utor bogat AT sljedovima najčešće imaju oblik polumjeseca te se sastoje od nekoliko aromatskih i/ili heterocikličkih prstenova, a nastali je adukt većinom stabiliziran vodikovim vezama, elektrostatskim interakcijama i van der Waalsovima interakcijama. Primjeri takvih molekula su Hoechst 33258 i SN6999 i njihovi derivati te antibiotici poput netropsina i distamicina (slika 19). Netropsin i distamicin svojim vezanjem u mali utor gotovo ne mijenjaju njegovu širinu. Ovi se antibiotici ne mogu vezati u mali utor područja bogatih GC sljedovima zbog  $-NH_2$  skupine gvanina koja predstavlja steričku smetnju. S druge strane, postoje molekule koje se preferirano vežu u mali utor područja bogatih GC sljedovima, poput spojeva s antitumorskim djelovanjem – kromomicina  $A_3$  i mitramicina. U ovom slučaju dolazi do konformacijske promjene dvostruke uzvojnice B-DNA koja sada više

nalikuje na A-DNA, što rezultira širim i plićim malim utorom. Ove se molekule preko svojih –OH skupina vežu vodikovim vezama sa spomenutom –NH<sub>2</sub> skupinom gvanina, koja zbog proširenja utora više sterički ne ometa njihov ulazak.



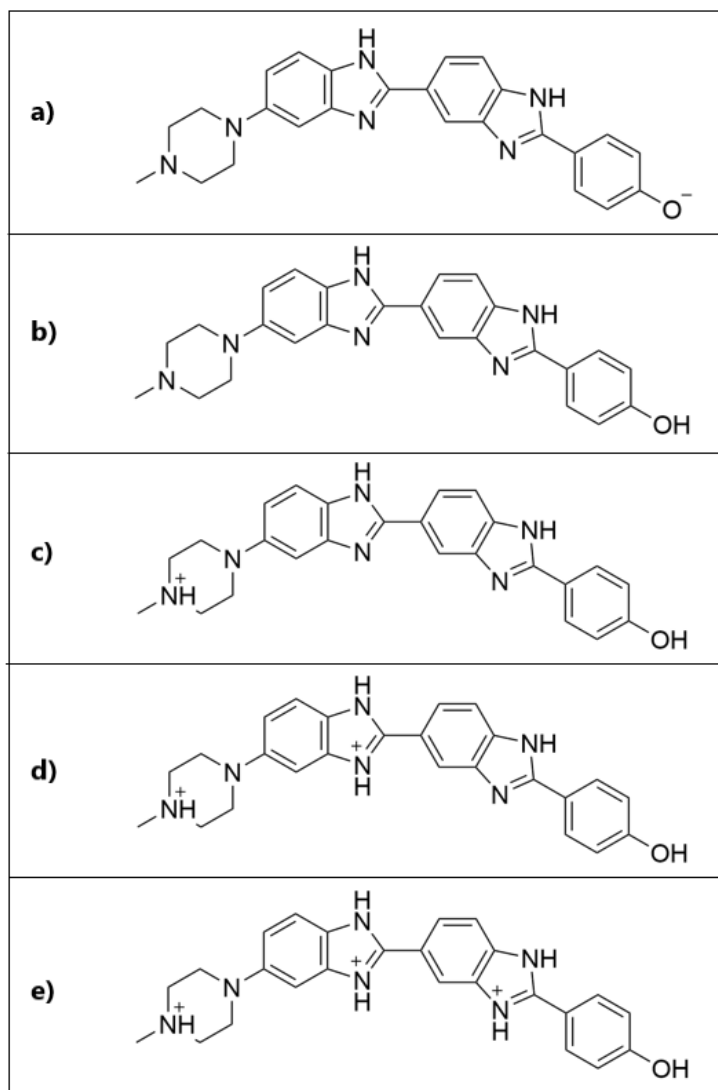
Slika 19. Strukture malih organskih molekula koje se vežu u mali utor molekule DNA.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>15</sup>

Ostali načini interakcije malih organskih molekula i DNA, poput kovalentnog vezanja s dušičnim bazama, elektrostatskih interakcija s fosfatnim skupinama na vanjskoj strani dvostruke uzvojnice te razaranja polinukleotidnog lanca, manje su zastupljeni.

### 2.3. Hoechst 33258

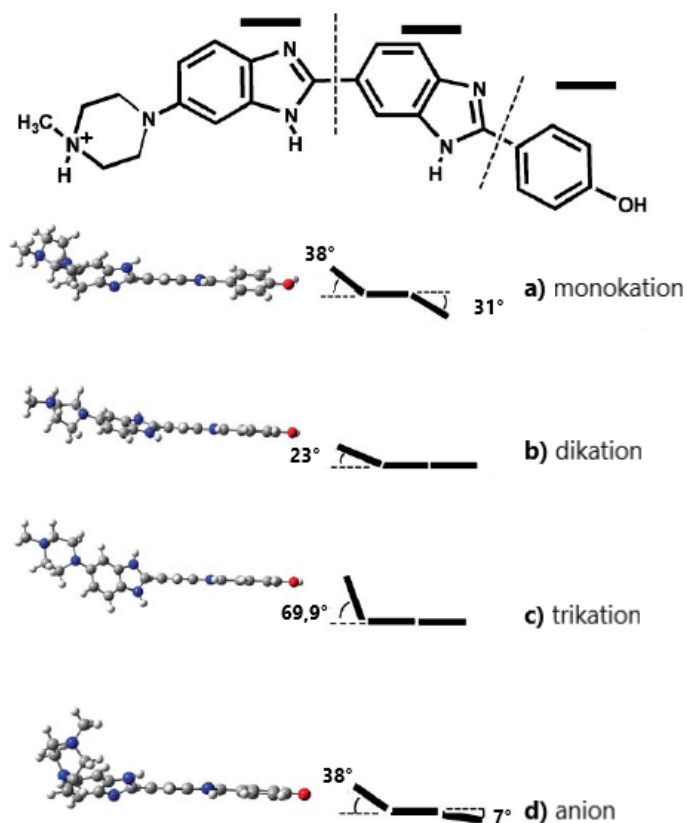
Hoechst 33258, punim nazivom: 2'-(4-hidroksifenil)-5-(4-metil-1-piperaziril)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol, (dalje u tekstu: H33258) je derivat bisbenzimidazola koji se široko koristi kao fluorescentna boja za kvantifikaciju nukleinskih kiselina, mikroskopsko oslikavanje kromosoma i istraživanje stanica. Osim toga, njegova biološka važnost očituje se i u tome što pokazuje antitumorska i antibiotska svojstva.<sup>1,20</sup> Struktura se sastoji se od četiriju rigidna, planarna prstena: piperazina, dva benzimidazola i fenola.<sup>21</sup> Takva je struktura tipična za spojeve koji se vežu u mali utor: molekula je u obliku polumjeseca te se sastoji od planarnih hidrofobnih aromatskih prstenova, koji čvrsto prijanjaju u hidrofobnu unutrašnjost malog utora.<sup>1</sup> Pri neutralnim pH-vrijednostima (7,0–7,5) postoji kao monokation – protoniran je samo dušikov atom piperazinskog prstena koji na sebi ima vezanu metilnu skupinu, uz nedisociranu fenolnu –OH skupinu.<sup>2,22</sup> Snižavanjem pH-vrijednosti na 4,5 protonira se imidazolni dušikov atom benzimidazolnog prstena susjednog piperazinu te nastaje dikationska vrsta. Daljnjim snižavanjem pH-vrijednosti do 1,5 protonira se i imidazolni dušikov atom drugog benzimidazolnog prstena susjednog fenilnom prstenu te nastaje trikationska vrsta.<sup>20</sup> U lužnatom su pak mediju pri pH-vrijednosti 11 deprotonirana sva tri spomenuta dušikova atoma, kao i hidroksilna skupina fenolnog prstena, što rezultira nastajanjem aniona. Protonacija H33258 odvija se kako je prikazano na slici 20.



Slika 20. Molekulska struktura bisbenzimidida Hoechst 33258 u obliku: a) aniona pri pH = 11, b) neutralne molekule, c) monokationa pri pH = 7,0–7,5, d) dikationa pri pH = 4,5 i e) trikationa pri pH = 1,5.

Opaženo je kako snižavanje pH-vrijednosti sa 7 na 4,5 dovodi do približno 20 puta jačeg intenziteta fluorescencije H33258, dok povećanje pH-vrijednosti od 1,5 do 4,5 dovodi do pojačanja intenziteta fluorescencije H33258 oko 80 puta. Stoga je ustanovljeno da je intenzitet fluorescencije H33258 ovisan o pH-vrijednosti,<sup>20,21</sup> a glavni razlog tome su strukturne promjene kojima ova boja podlaže tijekom protonacije (slika 21). Dikationska vrsta je gotovo planarna te ima parcijalni karakter dvostruke veze između dvaju benzimidazolinskih prstenova, zbog čega pokazuje najintenzivniju fluorescenciju. Pretpostavlja se kako se H33258 upravo u ovom obliku veže u mali utor molekule DNA zbog čega se zamjećuje značajno pojačanje fluorescencije, a

upravo ta pojava omogućava njegovu široku primjenu.<sup>20</sup> Međutim, slobodne molekule ove boje u vodenim otopinama ovisno o pH-vrijednosti pokazuju slično ponašanje s obzirom na pojačanje intenziteta fluorescencije kao i boja vezana na DNA, što otežava kvantitativna istraživanja.



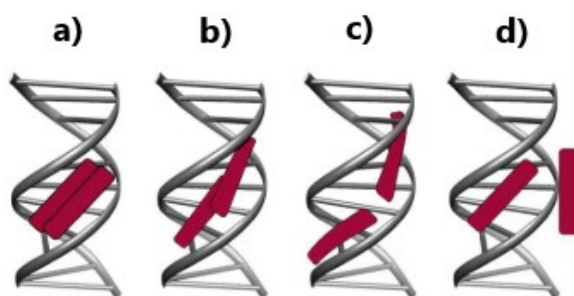
Slika 21. Prikaz optimizirane geometrije za različite forme H33258. Istaknuti kut predstavlja odklon triju označenih dijelova molekule od ravnine. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>20</sup>

H33258 je pri niskim ionskim jakostima monomer, dok pri višim ionskim jakostima pokazuje sklonost agregaciji te može tvoriti dimere ili pak više agregate.<sup>2</sup> Općenito, agregacija planarnih aromatskih molekula uzrokovana je interakcijama slaganja, koje uključuju hidrofobne interakcije, dipol-dipol interakcije,  $\pi$ - $\pi$  interakcije, disperzijske sile i brojne druge. Fluorescencijskim istraživanjima agregiranih vrsta boje H33258 utvrđeno je da dimeri pokazuju jaču fluorescenciju od monomera.<sup>2</sup>

H33258 tvori komplekse s dvostrukom zavojnicom molekule DNA, a vrsta interakcije ovisi o polinukleotidnom slijedu.<sup>2</sup> Kao pozitivno nabijena molekula, čvrsto se veže u manji utor



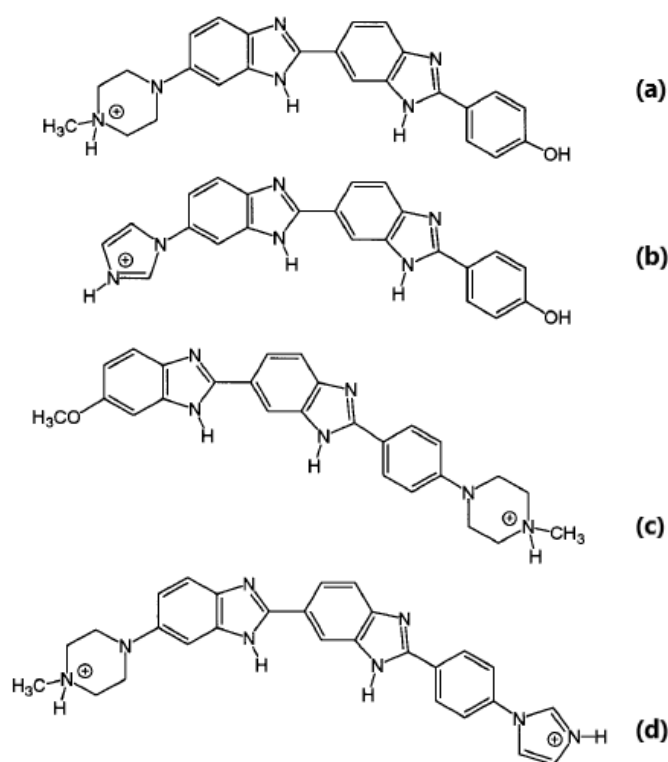
AT parova baza zbog izrazito elektronegativnog potencijala tog područja (u odnosu na regije bogate gvaninom i citozinom koje su elektropozitivnije). Taj je proces vrlo endoterman i entropijski povoljan, za razliku od interkaliranja kod kojeg uglavnom dominira entalpijski doprinos.<sup>1</sup> Uz to, posjeduje potencijalne donorne i akceptorske atome koji mogu tvoriti vodikove veze s povoljno pozicioniranim akceptorskim i donornim atomima adenina i timina u malom utoru.<sup>1</sup> Istraživanjem interakcije s AT sljedovima različitih duljina ( $A_2T_2$ ,  $A_3T_3$  i  $A_4T_4$ ), zaključeno je da se H33258 s najvećim afinitetom veže u sredinu AT sekvence  $A_4T_4$  oligonukleotida, tako da jedna molekula H33258 zauzima otprilike četiri uzastopna para baza u malom utoru. Na slici 22 prikazani su mogući načini vezanja dviju molekula H33258 s oligonukleotidom. Eksperimentalno je dokazano da se povećanjem omjera  $[H33258]/[oligonukleotid]$ , druga molekula veže isključivo u mali utor i to na način da se prva molekula pomakne kako bi omogućila prostor za drugu,<sup>1</sup> kako je prikazano pod c).



Slika 22. Shematski prikaz mjesta vezanja dvije molekule H33258 u dodekameru sa središnjim slijedom  $A_4T_4$ . Druga se molekula može vezati u mali utor: a) u tzv. „sandwich“ strukturu iznad prve molekule, b) paralelno, preklapajući se s prvom molekulom ili c) s malom udaljenošću u odnosu na prvu molekulu, a moguće je i vezanje pod d) s vanjske strane malog utora, na negativno nabijenu fosfatnu okosnicu.<sup>1</sup>

Preferencijalnom vezanju H33258 na AT sljedove u malom utoru DNA najviše doprinose jake hidrofobne interakcije, dok jake elektrostatske interakcije kao što su vodikove veze i dipol-dipol interakcije ovdje nemaju toliko značajnu ulogu. Čvrstom prijanjanju H33258 u mali utor s velikim udjelom AT sekvenci doprinosi i širina takvog utora (3–4 Å), koja je znatno manja nego u slučaju malog utora s miješanim parovima baza (6 Å), dok je mali utor bogat GC sekvencama još širi.<sup>1</sup>

Temeljem proučavanja H33258 i njegova tri analoga (prikazana na slici 23), istražena su četiri ključna strukturna faktora pri vezanju u mali utor: sterički faktor vezan uz *N*-metilpiperazinski prsten, hidrofobnost liganda, komplementarnost s manjim utorom (engl. *isohelicity*) i ukupni naboj liganda.<sup>23</sup> Pokazano je da *N*-metilpiperazinski prsten, usprkos svojoj veličini i zahtjevu za širim utorom te tome što se ne veže toliko duboko u mali utor, ostvaruje najpovoljniju interakciju s njim, vjerojatno zbog velikog doprinosa hidrofobnog efekta. Komplementarnost liganda i utora je u sva četiri slučaja bila jednaka, kao i broj ostvarenih vodikovih veza s malim utorom.



Slika 23. Kemijska struktura molekule H33258 (a) i istraživanih analoga (b), (c) i (d).<sup>23</sup>

Eksperimentalno je utvrđeno da se H33258 može djelomično interkalirati i vezati u veliki utor poli[d(G–C)<sub>2</sub>] kao dimer, te u poli(dG–dC)–poli(dG–dC) kao monomer, dimer i, pretpostavlja se, tetramer.<sup>2</sup>

Provedeno je fluorescencijsko i apsorpcijsko istraživanje ravnotežnog vezanja H33258 u širokom koncentracijskom rasponu s različitim DNA analogima: ct-DNA, poli[d(A–T)] i d(CCGGAATTCCGG) te je utvrđeno nastajanje većeg broja kompleksa različite stehiometrije,

a termodinamički parametri pokazali su da je vezanje najslabije u slučaju ct-DNA.<sup>22</sup> SERS spektroskopijom i konfokalnom mikroskopijom proučavano je vezanje H33258 na metaloorganske mreže nanočestica zlata (*ZIF-8*) u vodenom mediju i u živim stanicama, što je korisno za daljnja istraživanja molekule DNA.<sup>24</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije

Hoechst 33258, HPLC, *Sigma*

Spermin-tetrahidroklorid, p.a., *Aldrich*

Natrijev kakodilat trihidrat, p.a., *Sigma*

Srebrov nitrat, p.a., *Gram-mol*

Natrijev borhidrid, p.a., *Aldrich*

Polietilenimin, p.a. *Aldrich*

Natrijev hidroksid, p.a., *T.T.T. d.o.o.*

Hidroksilamin-hidroklorid, p.a., *Kemika*

Magnezijev sulfat, p.a., *Kemika*

ct-DNA, p.a., *Aldrich*

poli dA – poli dT, p.a., *Sigma*

poli dG – poli dC, p.a., *Sigma*

poli rA – poli rU, p.a., *Sigma*

Laboratorijsko posuđe za pripremu koloidnih suspenzija i uzoraka oprano je 5%-tnom otopinom dušične kiseline (p.a., *Kemika*) te isprano destiliranom i deioniziranom (Milli-Q) vodom. Posudice za snimanje spektara oprane su 5%-tnom otopinom dušične kiseline (p.a., *Kemika*) te isprane deioniziranom vodom i apsolutnim etanolom (p.a., *Kemika*).

### 3.2. Mjerni uređaji

Pomoću UV/Vis spektrofotometra SPECORD 200 tvrtke Analytik Jena snimljeni su apsorpcijski spektri uz korištenje kvarcnih kiveta duljine puta zračenja 0,2 cm. Spektri su snimljeni u području 190–1100 nm.

Mettler Toledo MP 220 pH metar s InLab®413 kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom korišten je za mjerenje pH-vrijednosti. Uređaj je prije mjerenja baždaren s otopinama pufera pH-vrijednosti 7,00 i 4,00.

Za snimanje Ramanovih i SERS spektara korišten je konfokalni Ramanov mikroskop/spektrometar *inVia* tvrtke *Renishaw* opremljen laserima koji emitiraju zračenje pri valnim duljinama 532 i 785 nm, maksimalne snage 100, odnosno 300 mW. Prilikom snimanja spektara snaga lasera podešavana je ovisno o uzorku. Za snimanje spektara korišten je objektiv povećanja  $\times 5$ . Spektri čvrstih uzoraka snimani su na aluminijskom nosaču za praškaste uzorke, dok su za snimanje tekućih uzoraka korištene aluminijske posudice za termogravimetrijsku analizu, volumena 40  $\mu\text{L}$ , ili mikrotitarske ploče od polistirena prevučene aluminijskom folijom. Spektri su snimani pri sobnoj temperaturi, u području  $3200\text{--}100\text{ cm}^{-1}$  uz vrijeme ekspozicije (izlaganja uzorka zračenju) od 10 s. Spektri su obrađeni u programu Wire 5.3.

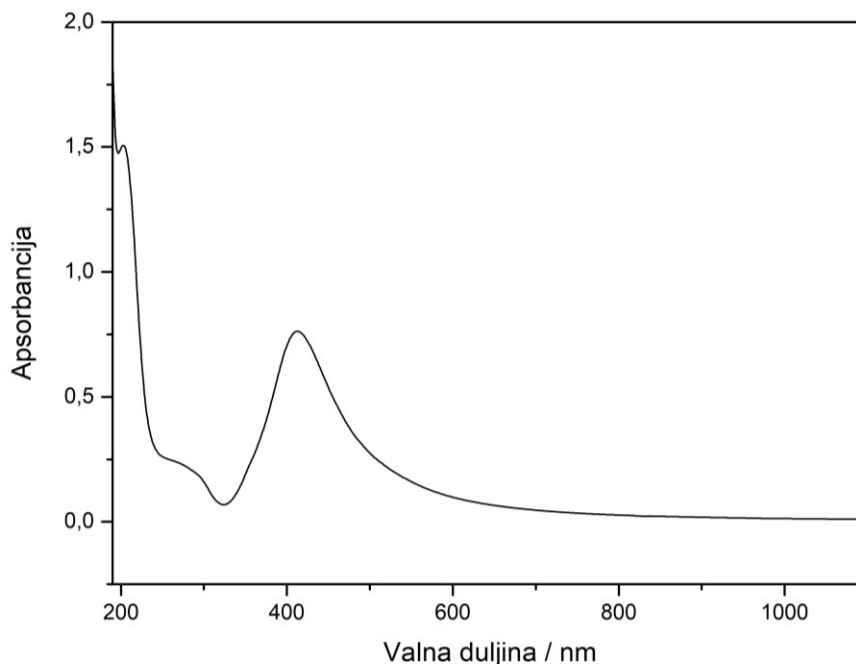
### 3.3. Priprava koloidnih suspenzija srebra

#### 3.3.1. Priprava nanočestica srebra negativnog naboja AgNP\_Cl

Koloidna suspenzija nanočestica srebra negativnog naboja pripravljena je modificiranom Leopold-Lendlovom metodom, redukcijom srebrova(I) nitrata s hidroksilamin-hidrokloridom.<sup>12,25</sup> Srebrov(I) nitrat mase 0,017 g otopljen je u 90 mL deionizirane vode. Zasebno, 0,017 g hidroksilamin-hidroklorida otopljeno je u 10 mL deionizirane vode, nakon čega je otopini dodano 0,220 mL otopine natrijeva hidroksida koncentracije 2 mol/L. Pripravljena otopina hidroksilamina i natrijeva hidroksida je zatim brzo dodana u otopinu srebrova nitrata uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon nekoliko trenutaka reakcijska smjesa poprimila je sivo-zelenu boju, a miješanje je nastavljeno još 10 minuta.

Apsorpcijski maksimum ove koloidne suspenzije srebra zabilježen je pri valnoj duljini od 413 nm (slika 24), a pH-vrijednost koloida iznosila je 8,54. Nanočestice srebra stabilizirane su slojem kloridnih iona na površini te stoga nose negativan naboj.

Budući da je koloidna suspenzija srebrovih nanočestica AgNP\_Cl nestabilna na svjetlu, posude je obloženo aluminijskom folijom te skladišteno u tamnom prostoru do uporabe.



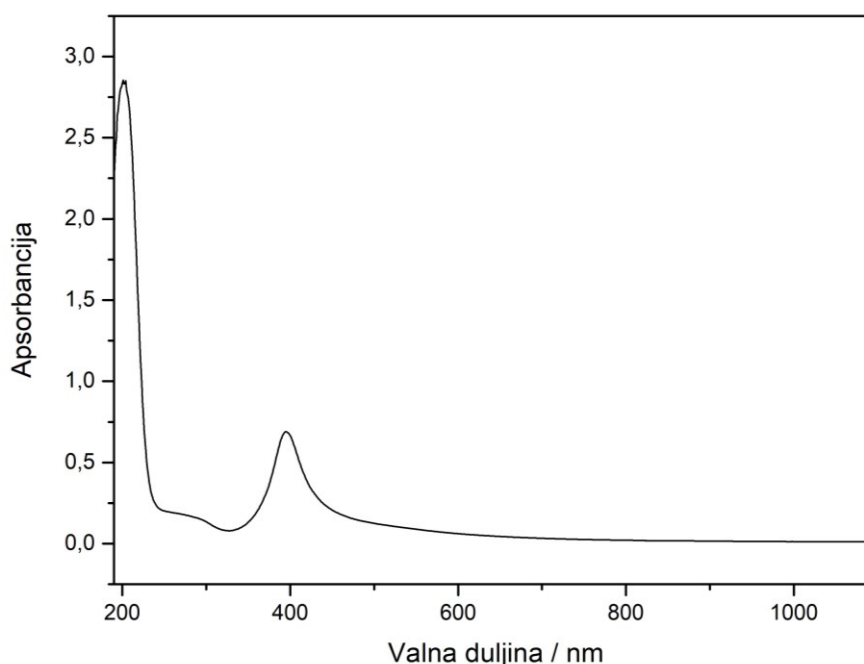
Slika 24. UV/Vis apsorpcijski spektar koloidne suspenzije nanočestica srebra AgNP\_Cl.

### 3.3.2. Priprava nanočestica srebra pozitivnog naboja AgNP\_sp

Kako bi se spriječilo prijanjanje nanočestica srebra na staklene stijenke, stakleno posuđe za pripravu ovog koloida prethodno je tretirano polietileniminom (PEI) na način da je tikvica napunjena 0,2% (v/v) vodenom otopinom polietilenimina i ostavljena stajati preko noći, nakon čega je pomno isprana deioniziranom vodom i osušena u sušioniku. Koloidna suspenzija nanočestica srebra pozitivnog naboja pripravljena je uz dodatak spermina prema literaturnom izvoru,<sup>4,13</sup> uz nekoliko preinaka. U 20 mL deionizirane vode dodano je 40  $\mu$ L srebrova(I) nitrata koncentracije 0,5 mol/L, te 14  $\mu$ L otopine spermin-tetrahidroklorida koncentracije 0,1 mol/L. U istu je otopinu, uz snažno miješanje na magnetskoj miješalici, dodano kap po kap 500  $\mu$ L svježe pripravljene vodene otopine natrijeva borhidrida (0,01 mol/L). Reakcijska smjesa miješana je umjerenom brzinom 20 minuta.

Ovako pripravljena koloidna suspenzija srebra je narančaste boje sa sivim odsjajem. Apsorpcijski maksimum ove koloidne suspenzije nalazi se pri valnoj duljini od 395 nm (slika 25), a pH-vrijednost koloida iznosila je 3,45. Nanočestice srebra stabilizirane su slojem protoniranih molekula spermina na površini te stoga nose pozitivan naboj.

Budući da je koloidna suspenzija srebrovih nanočestica AgNP\_sp nestabilna na svjetlu, posuđe je obloženo aluminijskom folijom te skladišteno u tamnom prostoru do uporabe.



Slika 25. UV/Vis apsorpcijski spektar koloidne suspenzije nanočestica srebra AgNP\_sp.

### 3.4. Priprava otopina i mjernih uzoraka

Ishodna otopina spoja H33258 koncentracije  $1 \times 10^{-2}$  mol/L pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase čvrste tvari u deioniziranoj vodi. Spoj je dobro topljiv u vodi, a nastala otopina je intenzivno žute boje. Ramanov spektar ishodne otopine spoja H33258 snimljen je pipetiranjem 40  $\mu$ L otopine u aluminijsku posudicu za mjerenje.

Otopina spermina koncentracije  $1 \times 10^{-1}$  mol/L pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase spermin-tetrahidroklorida u deioniziranoj vodi te je u svrhu snimanja Ramanovog spektra uzet alikvot od 40  $\mu$ L. Otopina magnezijeva(II) sulfata (0,1 mol/L) pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase čvrste tvari u deioniziranoj vodi te je korištena kao reagens za agregaciju koloida.

Ramanovi spektri čvrstih uzoraka spojeva H33258 i spermina snimljeni su bez prethodne pripreme, na aluminijskom nosaču.

Ishodne otopine dvolančanih polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) pripravljene su u puferu natrijeva kakodilata pH-vrijednosti 7,0 i ionske jakosti 0,05 mol/L. Koncentracije ishodnih otopina polinukleotida određene su spektrofometrijski pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta dostupnog od proizvođača, te su izražene kao koncentracije fosfata:  $c(\text{ct-DNA}) = 1,88 \times 10^{-3}$  mol/L,  $c(\text{poli dA – poli dT}) = 3,53 \times 10^{-3}$  mol/L,  $c(\text{poli dG – poli dC}) = 2,57 \times 10^{-3}$  mol/L i  $c(\text{poli rA – poli rU}) = 2,41 \times 10^{-3}$  mol/L.

Mjerni uzorci za snimanje koncentracijski ovisnih SERS spektara spoja H33258 pripremljeni su miješanjem 35  $\mu$ L koloidne suspenzije nanočestica srebra negativnog (AgNP<sub>Cl</sub>) ili pozitivnog (AgNP<sub>sp</sub>) naboja i 5  $\mu$ L otopine spoja H33258 odgovarajuće koncentracije ( $8 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$  i  $8 \times 10^{-6}$  mol/L) pripravljene razrjeđivanjem ishodne otopine spoja H33258 ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L). Ukupni volumen mjernih uzoraka iznosio je 40  $\mu$ L. Koncentracije spoja H33258 u mjernim uzorcima iznosile su  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  i  $1 \times 10^{-6}$  mol/L. Svi mjerni uzorci sadržavali su jednaki volumen koloidne suspenzije srebra,  $\varphi = 87,5\%$ .

U svrhu snimanja SERS spektara dvolančanih polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU), pripremljeni su mjerni uzorci polinukleotida koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  mol/L miješanjem 12,5  $\mu$ L otopine polinukleotida odgovarajuće



koncentracije i 87,5  $\mu\text{L}$  koloidne suspenzije srebrovih nanočestica negativnog (AgNP\_C1) ili pozitivnog (AgNP\_sp) naboja. Ukupni volumen mjernog uzorka polinukleotida u koloidnoj suspenziji bio je 100  $\mu\text{L}$  ( $\varphi(\text{suspenzija srebra}) = 87,5\%$ ). SERS spektar polinukleotida u koloidnoj suspenziji srebra negativnog naboja (AgNP\_C1) snimljen je neposredno nakon pripreme mjernog uzorka uzimanjem alikvota od 40  $\mu\text{L}$ , dok je u preostalih 60  $\mu\text{L}$  uzorka dodano 6  $\mu\text{L}$  otopine agregirajućeg reagensa  $\text{MgSO}_4$  (0,1 mol/L). Po dodatku agregirajuće soli u mjerni uzorak, uzet je alikvot od 40  $\mu\text{L}$  za snimanje spektra polinukleotida nakon agregacije nanočestica. SERS spektar polinukleotida u koloidnoj suspenziji srebra pozitivnog naboja (AgNP\_sp) snimljen je neposredno nakon pripreme mjernog uzorka uzimanjem alikvota od 40  $\mu\text{L}$  te nakon inkubacije dva sata pri sobnoj temperaturi, uzimanjem novih 40  $\mu\text{L}$  mjernog uzorka.

Kako bi se istražio utjecaj pripreme uzoraka kompleksa male molekule i polinukleotida na mjereni SERS spektar, uzorci smjesa spoja H33258 i dvolančanog polinukleotida poli dA – poli dT pripremljeni su na dva načina. Na prvi su način uzorci pripremljeni tako da je prvo pomiješano 5  $\mu\text{L}$  otopine spoja H33258 ( $2,4 \times 10^{-4}$  mol/L) i 10  $\mu\text{L}$  otopine polinukleotida kako bi nastao kompleks, nakon čega je dodano 105  $\mu\text{L}$  koloidne suspenzije nanočestica srebra negativnog naboja (AgNP\_C1). Na drugi su način uzorci pripremljeni tako da je 5  $\mu\text{L}$  otopine spoja H33258 ( $2,4 \times 10^{-4}$  mol/L) prvo pomiješano sa 105  $\mu\text{L}$  koloidne suspenzije nanočestica srebra negativnog naboja (AgNP\_C1), a zatim je dodano 10  $\mu\text{L}$  otopine polinukleotida. Za snimanje SERS spektara uzimani su alikvoti od 40  $\mu\text{L}$  pripremljenih mjernih uzoraka. Koncentracija spoja H33258 u svim mjernim uzorcima iznosila je  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, a volumni udio koloida srebra 87,5%. Kompleksi H33258 i polinukleotida pripremljeni su u molarnim omjerima  $[\text{H33258}]/[\text{polinukleotid}] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$ . Koncentracija otopine polinukleotida poli dA – poli dT za pripravu smjese omjera 1/1 iznosila je  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, za pripravu smjese omjera 1/5 bila je  $5 \times 10^{-5}$  mol/L, dok je za smjesu omjera 1/10 iznosila  $1 \times 10^{-4}$  mol/L.

Mjerni uzorci za snimanje SERS spektara kompleksa H33258 i dvolančanih polinukleotida u omjerima  $[\text{H33258}]/[\text{polinukleotid}]$  1/1, 1/5, i 1/10 pripremljeni su na gore opisani prvi način, odnosno dodatkom koloidne suspenzije nanočestica srebra negativnog (AgNP\_C1) ili pozitivnog (AgNP\_sp) naboja na već pripremljeni kompleks spoja H33258 i polinukleotida. Koncentracija otopina polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) za pripravu smjese omjera 1/1 i iznosila je  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, za smjesu

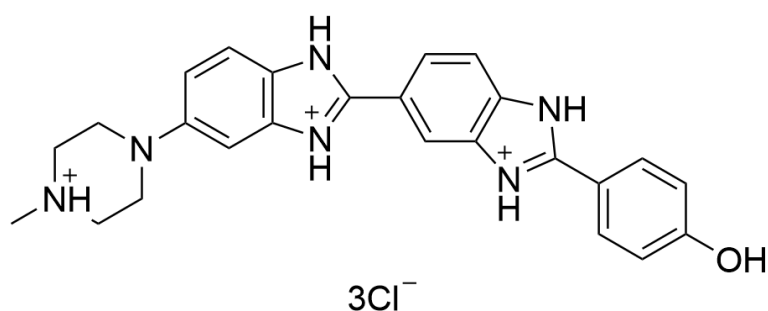
omjera 1/5 iznosila je  $5 \times 10^{-5}$  mol/L, dok je za smjesu omjera 1/10 iznosila  $1 \times 10^{-4}$  mol/L. Koncentracija spoja H33258 u svim uzorcima iznosila je  $1 \times 10^{-5}$  mol/L.

Sve pripravljene otopine čuvane su pri temperaturi od 4 °C do uporabe.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ramanovi spektri spoja Hoechst 33258

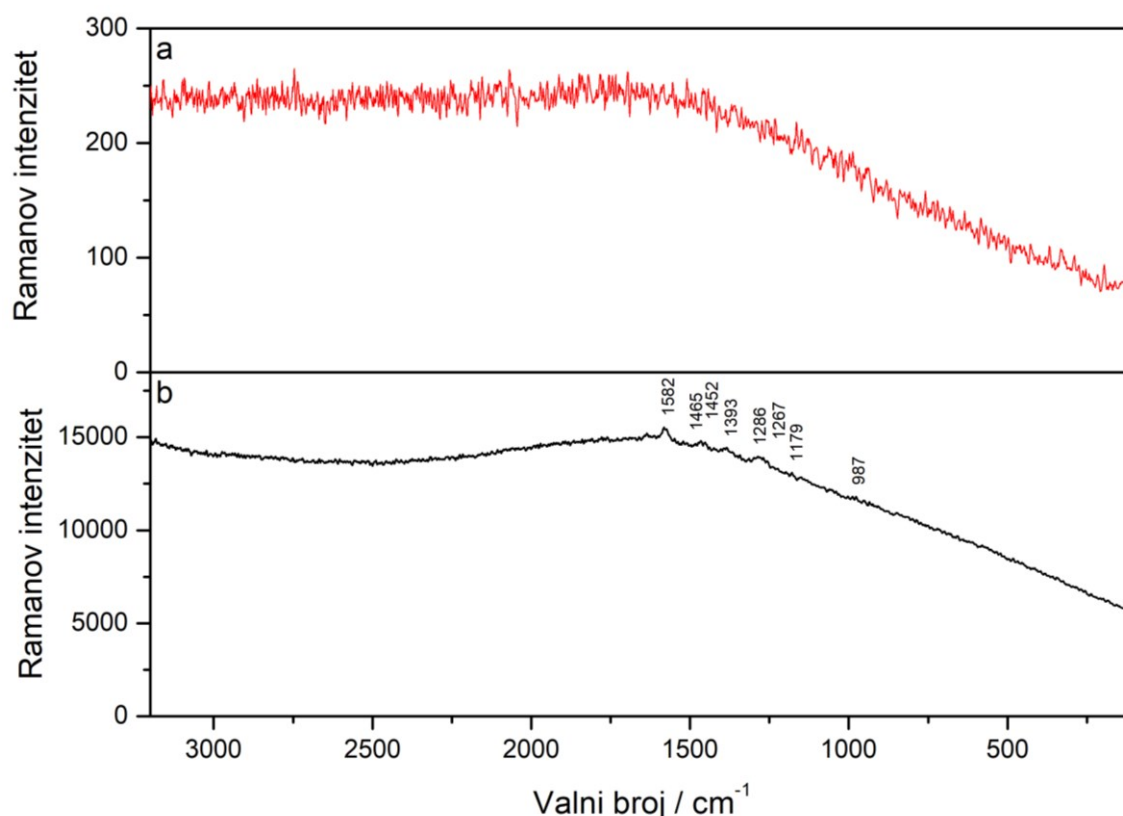
Molekulska struktura spoja Hoechst 33258 (H33258) prikazana je na slici 26.



Slika 26. Molekulska struktura potpuno protoniranog oblika bisbenzimidida Hoechst 33258 (H33258, komercijalno dostupan kao trihidroklorid,  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O} \times 3\text{HCl}$ ).

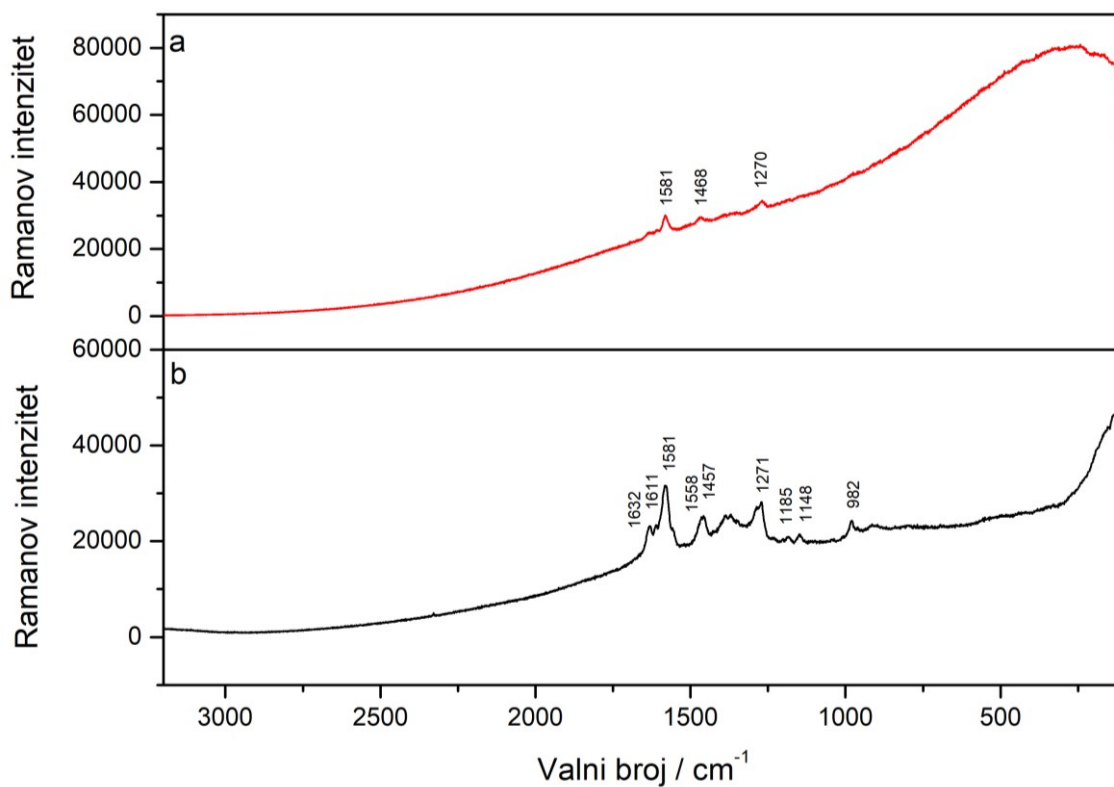
Snimljeni su Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine H33258 ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) nakon pobude zračenjem pri 532 nm (slika 27) i 785 nm (slika 28) te su asignirane vibracijske vrpce u spektrima (tablica 2). Pobudom pri 785 nm čvrsti uzorak H33258 slabo je raspršio zračenje, dok nakon pobude zračenjem pri 532 nm nije opažen Ramanov spektar krutine. Slično, pobuda vodene otopine H33258 ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) NIR zračenjem (785 nm) dala je nešto intenzivniji spektar od pobude Vis zračenjem (532 nm).

U spektru vodene otopine H33258 snimljenom nakon pobude zračenjem pri 532 nm uočavaju se vrpce vrlo slabog intenziteta, među kojima se ističe vrpca pri  $1582\text{ cm}^{-1}$ , koja odgovara istezanju CC veza benzenskih prstenova. Vrpca pri  $1465\text{ cm}^{-1}$  pripisana je svijanju CH skupina benzimidazola i striženju  $\text{CH}_2$  skupina piperazina, a vrpca pri  $1452\text{ cm}^{-1}$  istezanju CC i CN veza benzimidazola. Vrlo slaba vrpca pri  $1179\text{ cm}^{-1}$  potječe od deformacije kuta između CNC veza piperazina, dok vrpca pri  $987\text{ cm}^{-1}$  odgovara tzv. vibraciji „disanja“ benzenskog prstena.<sup>26</sup>



Slika 27. Ramanovi spektri a) čvrstog uzorka H33258 (crveno) i b) vodene otopine H33258 ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) (crno) nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera: 0,0001 mW (a) i 1 mW (b).

U spektru čvrstog uzorka H33258 snimljenom nakon pobude laserom pri 785 nm ističe se vrpca istezanja benzenskih CC veza pri 1581  $\text{cm}^{-1}$  te vrpce svijanja aromatskih CH i alifatskih  $\text{CH}_2$  skupina pri 1468 i 1270  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>26-28</sup> U spektru vodene otopine H33258 snimljenom pri valnoj duljini 785 nm opaženo je najviše vrpce. Uz vrpce pri 1581  $\text{cm}^{-1}$  koja dominira u spektru, opažaju se i vrpce pri 1632 i 1611  $\text{cm}^{-1}$ , koje također potječu od istezanja CC veza aromatskih okosnica. Intenzivna vrpca pri 1558  $\text{cm}^{-1}$  pripisana je istezanju CC i CN veza benzimidazolnog sustava, dok je vrpca pri 1271  $\text{cm}^{-1}$  pridružena deformacijama benzimidazolnih CH skupina i  $\text{CH}_2$  skupina piperazina.<sup>26</sup>



Slika 28. Ramanovi spektri a) čvrstog uzorka H33258 (crveno) i b) vodene otopine H33258 ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) (crno) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera: 0,15 mW (a) i 300 mW (b).

Tablica 2. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u Ramanovim spektrima čvrstog uzorka i otopine H33258 ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) nakon pobude zračenjem pri 532 i 785 nm.

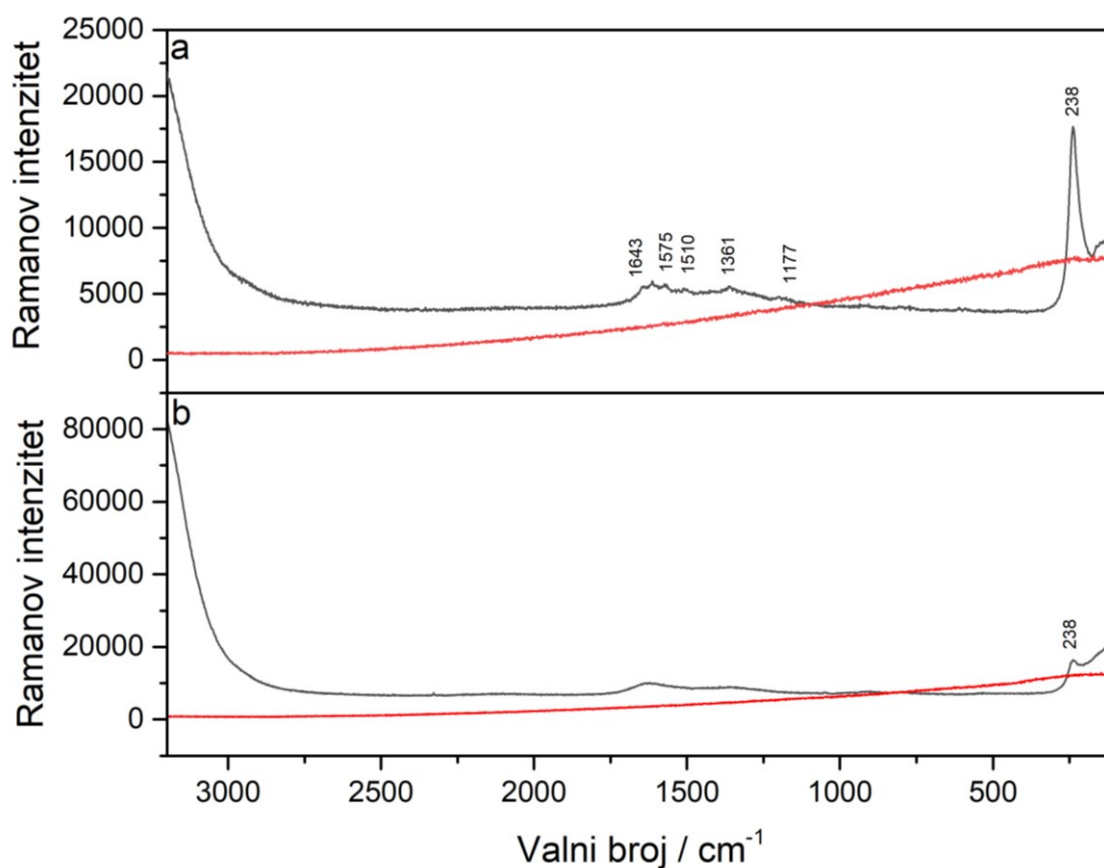
| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |               |         | Asignacija   |
|-------------------------------|---------------|---------|--|
| 532 nm                        | 785 nm        |         |  |
| otopina                       | čvrsti uzorak | otopina |  |
|                               |               | 1632    | v CC (Bz, Im)  |
|                               |               | 1611    | v CC (BzOH)  |
| 1582                          | 1581          | 1581    | v CC (Bz)  |
|                               |               | 1558    | v CC / v CN (Bz, Im)   |
| 1465                          | 1468          |         | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CH <sub>2</sub> (Pip)                   |
| 1452                          |               | 1457    | v CC / v CN (Bz, Im)   |
| 1393                          |               |         | $\delta$ CH  |
| 1286                          |               |         | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CH <sub>2</sub> (Pip), $\delta$ NH (Im) |
| 1267                          | 1270          | 1271    | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CH <sub>2</sub> (Pip), $\delta$ NH (Im) |
| 1179                          |               | 1185    | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CNC (Pip)                               |
|                               |               | 1148    | $\delta$ CH (Bz, Im)   |
| 987                           |               | 982     | $\delta$ prsten („disanje“) (Bz, BzOH)                                 |

Kratice: Bz – benzen, Im – imidazol, BzOH – benzenski prsten s OH skupinom, Pip – piperazin.

## 4.2. Ramanovi spektri koloidnih suspenzija srebra

Snimljeni su Ramanovi spektri koloidne suspenzije nanočestica srebra negativnog (AgNP\_Cl) i pozitivnog (AgNP\_sp) naboja. Spektri su prikazani na slici 29.

Nakon pobude zračenjem valne duljine 785 nm nisu opaženi Ramanovi spektri niti jednog od pripremljenih koloida. Za zaključiti je da kemijske vrste na površini nanočestica srebra, kloridni ioni (AgNP\_Cl), odnosno spermin (AgNP\_sp), ne raspršuju zračenje koje bi interferiralo s Ramanovim raspršenjem istraživanih molekula.



Slika 29. Ramanovi spektri a) AgNP\_Cl nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 10 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 30 mW (crveno) te b) AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 50 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 150 mW (crveno).

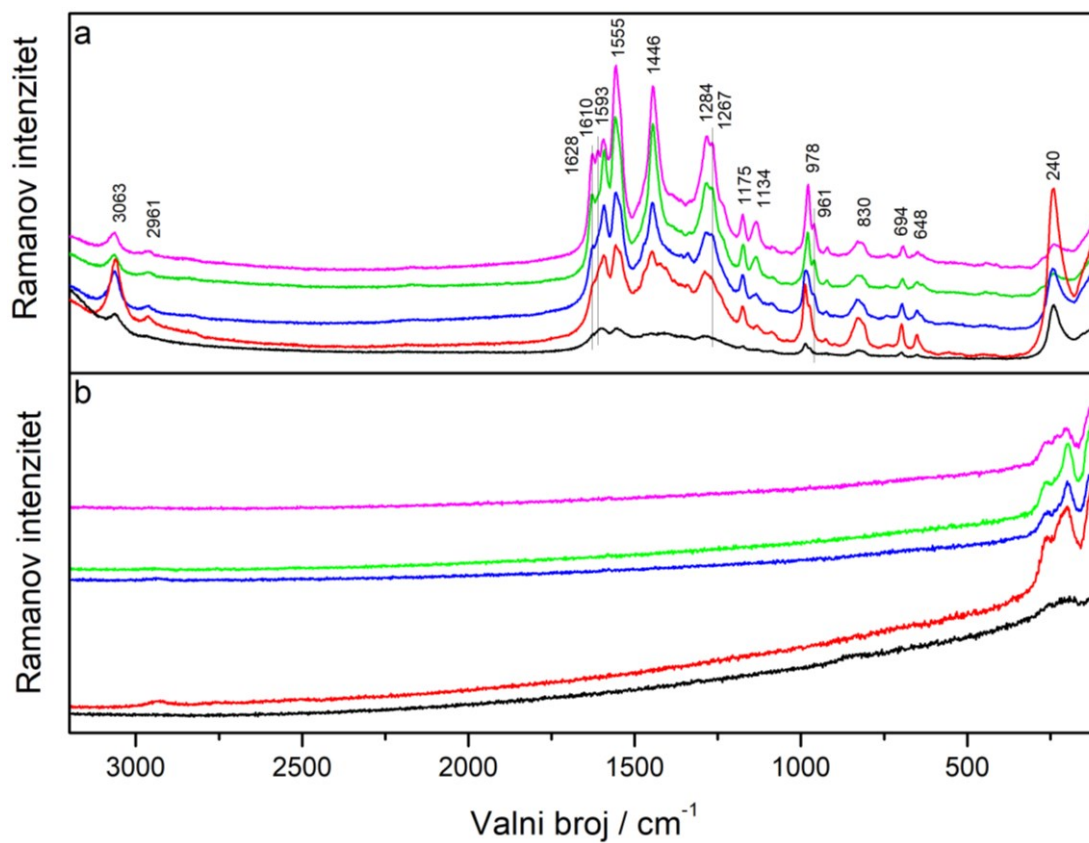
Za razliku od pobude NIR zračenjem, u spektrima oba koloida snimljenim nakon pobude Vis zračenjem opaža se vrpca pri  $238\text{ cm}^{-1}$ , intenzivnija u spektru AgNP\_Cl nego u spektru AgNP\_sp, koja odgovara istezanju veze Ag-Cl nastale vezanjem kloridnih iona s nanočesticama srebra.<sup>3</sup> Nadalje, u spektru AgNP\_Cl snimljenom nakon pobude pri 532 nm opažaju se i dodatne, tzv. „anomalne“ vrpce ( $1643$ ,  $1575$ ,  $1510$ ,  $1361$  i  $1177\text{ cm}^{-1}$ ), čije podrijetlo nije u potpunosti razjašnjeno, a potječu od kemijskih vrsta prisutnih u uzorku koje se mogu adsorbirati na površinu srebra.<sup>9,11</sup> To mogu biti produkti razgradnih ili redukcijско-oksidacijskih procesa koji su zaostali u suspenziji nakon priprave koloida ili neidentificirane kemijske vrste, strukturno slične rodaminima, prisutne u vodi, čije su vrpce mogu javiti u SERS spektrima koloidnih suspenzija te su u literaturi poznate kao „rodaminu slične vrpce“ (engl. *rhodamine-like bands*).<sup>11</sup>



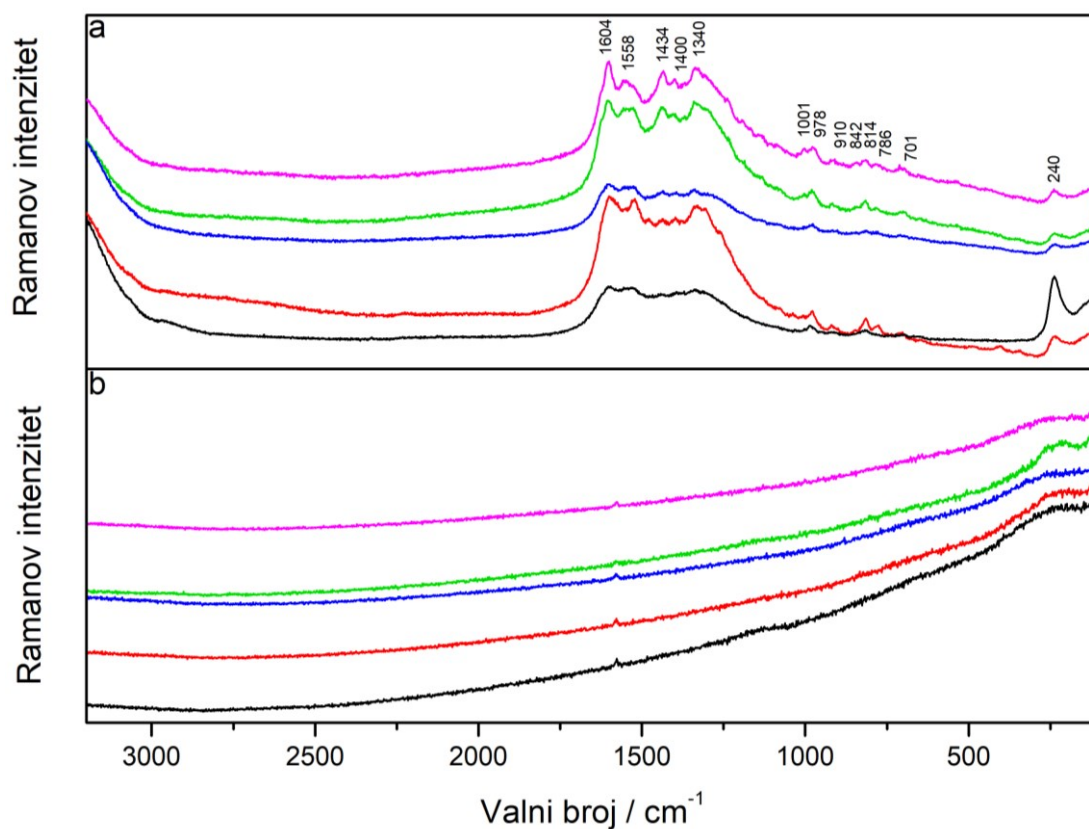
### 4.3. SERS spektri spoja Hoechst 33258

U svrhu istraživanja agregacije malih molekula, snimljeni su SERS spektri otopina H33258 različitih koncentracija ( $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol/L) u koloidnim suspenzijama srebrovih nanočestica negativnog naboja, AgNP\_Cl (slika 30) te pozitivnog naboja, AgNP\_sp (slika 31) nakon pobude zračenjem pri 532 i 785 nm. Asignacija pripadajućih vibracijskih vrpca dana je u tablici 3.

SERS spektri H33258 u koloidnim suspenzijama srebra AgNP\_Cl i AgNP\_sp razlikuju se od Ramanovih spektara otopine ovog spoja. SERS spektri snimljeni nakon pobude Vis zračenjem intenzivniji su od onih snimljenih NIR zračenjem, za razliku od odgovarajućih Ramanovih spektara, što se pripisuje bližem podudaranju valne duljine vidljivog pobudnog zračenja (532 nm) i plazmonske rezonancije metalnih supstrata (~400 nm). SERS spektri H33258 u oba koloida srebra snimljeni nakon pobude zračenjem pri 785 nm vrlo su slabi ili nisu opaženi, što je također posljedica i manje energije NIR zračenja u odnosu na Vis zračenje.



Slika 30. SERS spektri H33258 koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L (ružičasto),  $5 \times 10^{-5}$  mol/L (zeleno),  $1 \times 10^{-5}$  mol/L (plavo),  $5 \times 10^{-6}$  mol/L (crveno) i  $1 \times 10^{-6}$  mol/L (crno) u koloidnoj suspenziji AgNP-Cl nakon pobude zračenjem pri: a) 532 nm i b) 785 nm.



Slika 31. SERS spektri H33258 koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  mol/L (ružičasto),  $5 \times 10^{-5}$  mol/L (zeleno),  $1 \times 10^{-5}$  mol/L (plavo),  $5 \times 10^{-6}$  mol/L (crveno),  $1 \times 10^{-6}$  mol/L (crno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri: a) 532 nm, snaga lasera 10 mW i b) 785 nm, snaga lasera 150 mW.

Tablica 3. Asignacija osnovnih vibracijskih vrpca u SERS spektrima spoja H33258 ( $1 \times 10^{-4}$  i  $5 \times 10^{-6}$  mol/L) u koloidnim suspenzijama AgNP\_Cl i AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri 532 nm.

| Valni broj / $\text{cm}^{-1}$ |                             |                             |                             | Asignacija   |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| AgNP_Cl                       |                             | AgNP_sp                     |                             |  |
| $1 \times 10^{-4}$<br>mol/L   | $5 \times 10^{-6}$<br>mol/L | $1 \times 10^{-4}$<br>mol/L | $5 \times 10^{-6}$<br>mol/L |  |
| 3063                          | 3062                        |                             |                             | v C–H ar   |
| 2961                          | 2963                        |                             |                             | v C–H al   |
| 1628                          |                             |                             |                             | v CC (Bz, Im)  |
| 1610                          |                             |                             |                             | v CC (BzOH)  |
| 1593                          | 1593                        | 1604                        | 1601                        | v CC (Bz)  |
| 1555                          | 1557                        | 1558                        |                             | v CC / v CN (Bz, Im)   |
| 1446                          | 1447                        | 1434                        | 1437                        | v CC / v CN (Bz, Im)   |
|                               |                             | 1400                        | 1400                        | v CC (Im), $\delta$ NH, $\delta$ CH (Im)                               |
|                               |                             | 1340                        | 1340                        | v CN (Im), $\delta$ NH, $\delta$ CH (Im)                               |
| 1284                          | 1289                        |                             |                             | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CH <sub>2</sub> (Pip), $\delta$ NH (Im) |
| 1267                          |                             |                             |                             | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CH <sub>2</sub> (Pip), $\delta$ NH (Im) |
| 1175                          | 1175                        |                             |                             | $\delta$ CH (Bz, Im), $\delta$ CNC (Pip)                               |
| 1134                          | 1131                        |                             |                             | $\delta$ CH (Bz, Im)   |
|                               |                             | 1001                        |                             | $\delta$ CH (Bz)   |
| 978                           | 987                         | 978                         | 978                         | $\delta$ prsten („disanje“) (Bz)                                       |
| 961                           | 975                         |                             |                             | $\delta$ prsten („disanje“) (Bz–OH)                                    |
|                               |                             | 910                         | 912                         | $\delta$ CH (Bz, Im)   |
| 830                           | 829                         | 842                         | 846                         | $\delta$ prsten („disanje“) (Pip)                                      |
|                               |                             | 814                         | 814                         | $\delta$ prsten (Pip)  |
|                               |                             | 786                         | 786                         | $\delta$ CH (Bz, Im)   |
| 694                           | 697                         | 701                         | 703                         | $\delta$ prsten (Pip)  |
| 648                           | 650                         |                             |                             | $\delta$ prsten (Pip)  |
| 240                           | 240                         | 240                         | 238                         | v Ag–Cl  |

Kratice: Bz – benzen, Im – imidazol, BzOH – benzenski prsten s OH skupinom, Pip – piperazin.

U koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl, pH-vrijednosti 8,54, molekule H33258 prisutne su kao monokationi s pozitivno nabijenim metilom supstituiranim dušikovim atomom piperazinskog prstena. Pozitivno nabijene molekule H33258 najvjerojatnije se adsorbiraju na nanočestice srebra uslijed elektrostatskog privlačenja sa stabilizirajućim, negativno nabijenim slojem kloridnih iona na površini nanočestica. Površinski pojačano raspršenje molekula H33258 u ovom koloidu rezultira spektrima s jasno razlučenim vibracijskim vrpčama.

U koloidnoj suspenziji AgNP\_sp, čija je pH-vrijednost 3,45, molekule H33258 nose dva pozitivna naboja – osim supstituiranog dušikovitog atoma piperazinskog prstena, protoniran je i dušikov atom benzimidazolne skupine susjedne piperazinu. Zbog elektrostatskog odbijanja između dvostruko pozitivno nabijenih molekula H33258 i pozitivno nabijenih molekula spermina na površini srebrovih nanočestica u ovom koloidu, adsorpcija molekula je otežana te se u SERS spektrima javljaju vrpce slabog intenziteta i široki motiv vrpce koje se prekrivaju. Za pretpostaviti je da opažanju spektra doprinose kloridni ioni prisutni u uzorku, koji dijelom neutraliziraju pozitivan naboj spermina na površini te molekulama H33258 omogućavaju smještanje blizu površine nanočestica.

U SERS spektrima H33258 u oba koloida, snimljenim nakon pobude Vis zračenjem, najintenzivnije vrpce opažaju se u spektralnom području 1600–1250  $\text{cm}^{-1}$ , a potječu od vibracija benzimidazolnih sustava koji sadrže nezasićene veze i delokalizirane elektrone koji najjače raspršuju zračenje.

Usporedbom spektara H33258 u koncentracijskom području  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol/L, snimljenih u koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl pri 532 nm, vidljivo je kako se sa smanjenjem koncentracije intenzitet nekih vrpce povećava, dok se intenzitet drugih vrpce smanjuje. Intenzitet vrpce ovisan je o orijentaciji molekule (tzv. izborna pravila na površini) i udaljenosti molekule s obzirom na metalnu površinu. Intenzitet Ramanovog raspršenja veći je za one funkcionalne skupine orijentirane okomito na metalni supstrat te za one koje se nalaze bliže metalnom supstratu. Može se primijetiti kako se sa smanjenjem koncentracije H33258 smanjuje intenzitet vrpce istezanja CC/CN okosnice i svijanja CH skupina benzimidazolnih sustava u području 1600–1250  $\text{cm}^{-1}$ . Također, vrpca istezanja CC veza fenolnog prstena pri 1610  $\text{cm}^{-1}$  potpuno nestaje, dok vrpca deformacije fenolnog prstena pri 961  $\text{cm}^{-1}$  prelazi u rame pri 975  $\text{cm}^{-1}$ . S druge strane, smanjenjem koncentracije H33258 povećava se intenzitet vrpce pri 1175, 830, 694 i 648  $\text{cm}^{-1}$  koje potječu od svijanja piperazinskog prstena. Iz navedenog se može zaključiti da je smanjenje koncentracije praćeno promjenom položaja molekula H33258 na

površini nanočestica srebra, pri čemu se molekule orijentiraju piperazinskim prstenom bliže površini nanočestica, dok se fenolni prsten smješta dalje od površine.

Opaženi koncentracijski ovisni SERS spektri H33258 upućuju na različite oblike molekula u otopini. Spektri koncentracija  $5 \times 10^{-5}$  i  $1 \times 10^{-4}$  mol/L odgovaraju agregatima nastalim uslijed  $\pi$ -interakcija slaganja (engl. „*stacking*“) aromatskih sustava molekula H33258 koje se smještaju jedna na drugu. Molekule u agregatima orijentirane su na tzv. „*head to tail*“ način, pri čemu se fenilni prsten jedne molekule nalazi iznad piperazinskog prstena druge molekule. S obzirom da se u takvim agregatima pozitivan naboj nalazi s obje strane agregata, agregati se na nanočestice srebra najvjerojatnije smještaju aromatskim sustavima okomito na površinu pa stoga u spektru dominiraju vrpce benzimidazolnih sustava. Smanjenje koncentracije uzrokuje disocijaciju agregata na monomere, pri čemu se SERS spektar H33258 koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  mol/L pripisuje većinom monomernim molekulama, uz vjerojatno prisutne dimerne vrste, u skladu s istraživanjima fluorescencije.<sup>2</sup> Na same monomerne molekule upućuje SERS spektar koncentracije  $5 \times 10^{-6}$  mol/L, u kojem su vrpce piperazinskog dijela molekula najintenzivnije, a posljedica su smještanja pojedinačnih molekula s pozitivno nabijenim dijelom molekule blizu površine nanočestica srebra. Pri nižoj koncentraciji,  $1 \times 10^{-6}$  mol/L, molekule H33258 imaju veći prostor na raspolaganju pa se vjerojatno smještaju paralelno s površinom metalnog supstrata, zbog čega je općenito intenzitet vrpce u tom spektru znatno slabiji.

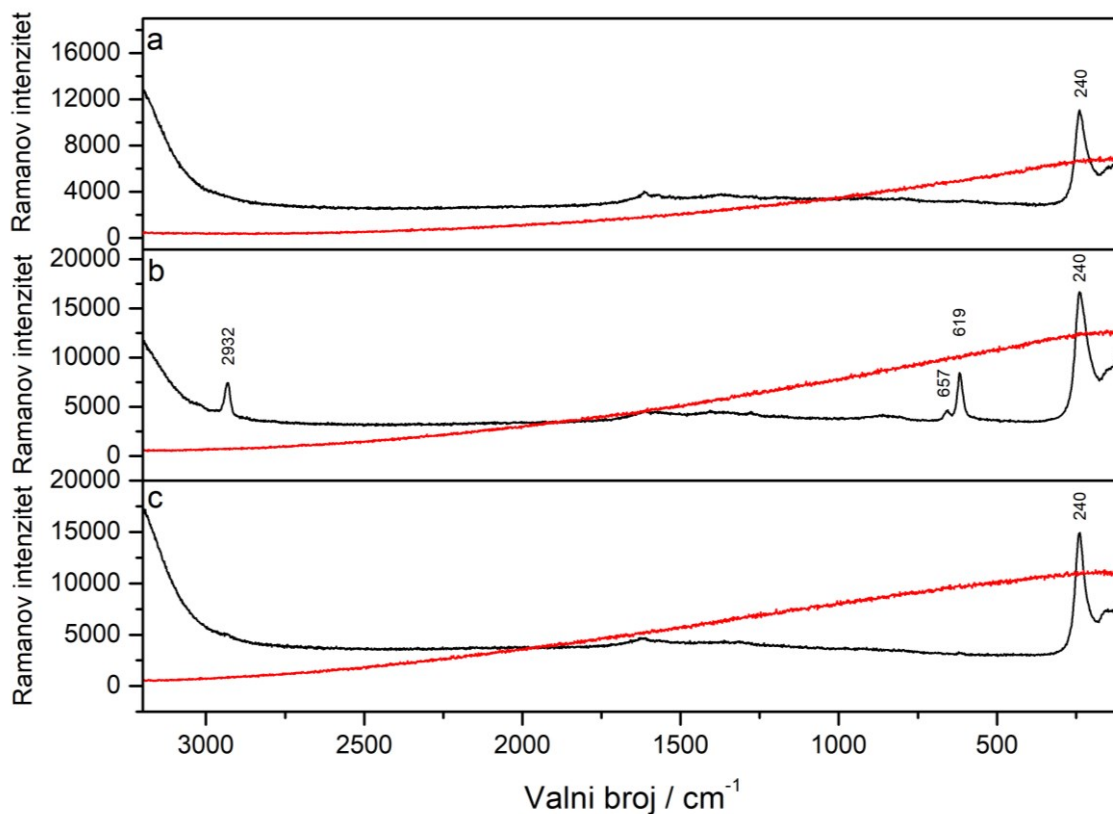
## 4.4. SERS spektri DNA/RNA polinukleotida

### 4.4.1. Utjecaj metalnog susprata i pobudnog zračenja

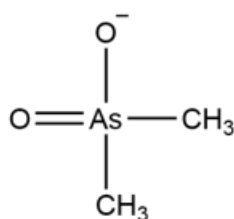
#### 4.4.1.1. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP\_Cl

S obzirom da su otopine polinukleotida pripravljene u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ), istražen je utjecaj kakodilatnog pufera na spektar. Snimljeni su Ramanovi spektri koloidne suspenzije AgNP\_Cl koja je sadržavala kakodilatni pufer ( $\varphi = 12,5\%$ ) bez dodatka i nakon dodatka agregirajućeg agensa  $\text{MgSO}_4$  ( $0,1 \text{ mol/L}$ ). Svi spektri snimljeni su nakon pobude zračenjem pri 532 i 785 nm i uspoređeni sa spektrima netretiranog koloida srebra AgNP\_Cl (slika 32).

Nakon pobude zračenjem pri 785 nm nisu opaženi SERS spektri koloidnih uzoraka AgNP\_Cl. Međutim, pojačano Ramanovo raspršenje istih uzoraka opaženo je nakon pobude vidljivim zračenjem, a posljedica je veće energije pobudnog zračenja u odnosu na NIR zračenje te manje razlike između valne duljine pobudnog zračenja (532 nm) i plazmonske rezonancije koloida (413 nm). Nakon pobude Vis zračenjem u svim spektrima opaža se vrpca pri  $240 \text{ cm}^{-1}$  koja potječe od istezanja veze Ag–Cl. U spektru koloidne suspenzije AgNP\_Cl koja sadrži kakodilatni pufer uočavaju se vrpce koje su pripisane kakodilatnom ionu prisutnom u uzorku blago lužnate pH-vrijednosti ( $\text{pH}(\text{AgNP\_Cl}) = 8,54$ ;  $\text{p}K_a(\text{kakodilna kiselina}) = 6$ ) (slika 33). Vrpca pri  $2932 \text{ cm}^{-1}$  potječe od istezanja veza C–H metilnih skupina, dok su vrpce pri 657 i  $619 \text{ cm}^{-1}$  pripisane istezanju veza između arsena i kisika. Dodatkom agregirajućeg agensa  $\text{MgSO}_4$  u koloid AgNP\_Cl s kakodilatnim puferom, izostaju vrpce kakodilata, što ukazuje na izmjenu kemijskih vrsta u blizini površine srebra.



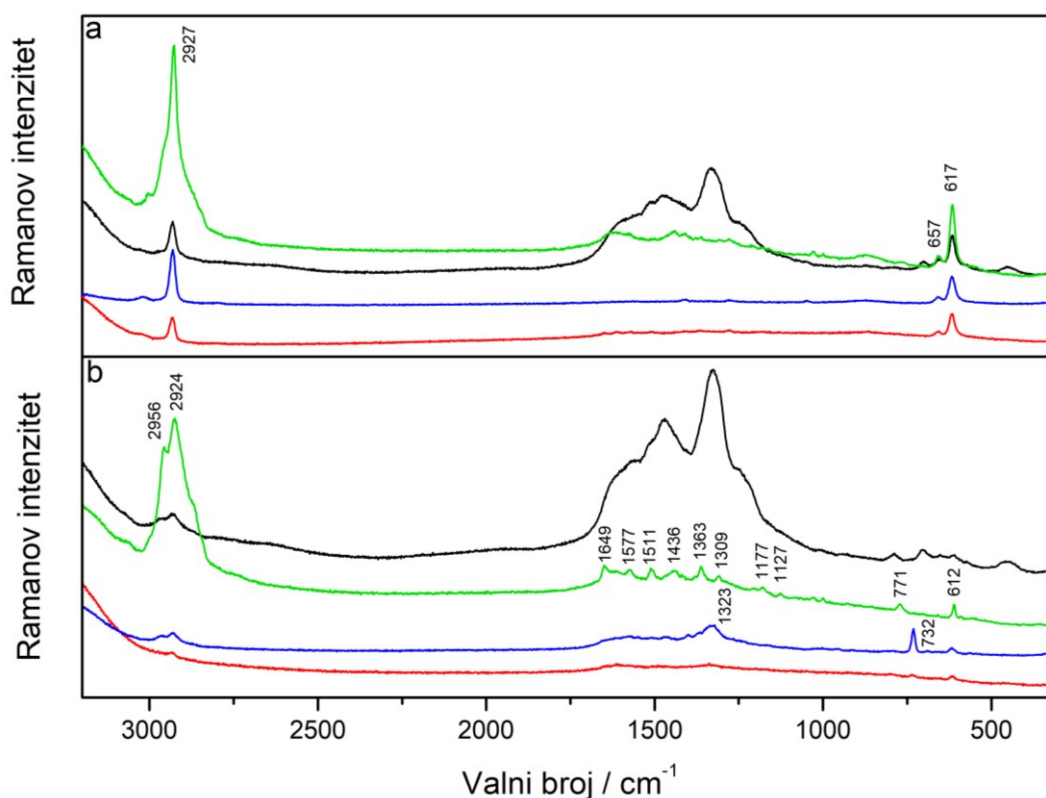
Slika 32. Ramanovi spektri: a) AgNP\_Cl nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 10 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 30 mW (crveno), b) AgNP\_Cl u prisutnosti kakodilatnog pufera nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 10 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 30 mW (crveno) te c) AgNP\_Cl u prisutnosti kakodilatnog pufera i agregirajućeg agensa MgSO<sub>4</sub> (0,1 mol/L) nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 10 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 15 mW (crveno).



Slika 33. Strukturni prikaz kakodilatnog aniona.



Zatim su snimljeni SERS spektri polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  mol/L u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1 bez i u prisutnosti agregirajućeg agensa MgSO<sub>4</sub> (0,1 mol/L) nakon pobude zračenjem pri 532 nm (slika 34) te 785 nm (slika 35). Spektri su snimani u području  $3200\text{--}300\text{ cm}^{-1}$  zbog intenzivne vrpce istezanja veze Ag–Cl ( $240\text{ cm}^{-1}$ ), čiji je intenzitet raspršenog zračenja uzrokovao zasićenje detektora.

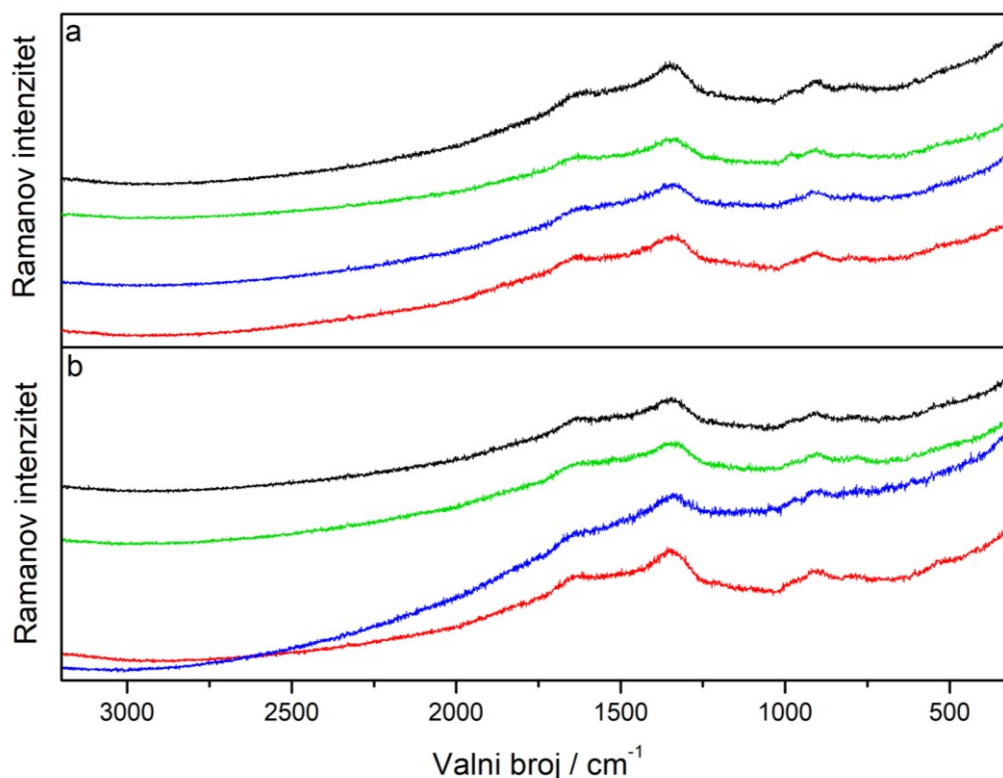


Slika 34. SERS spektri polinukleotida ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) ct-DNA (crno), poli rA – poli rU (zeleno), poli dG – poli dC (plavo) i poli dA – poli dT (crveno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1 nakon pobude zračenjem pri 532 nm: a) bez agregirajućeg agensa i b) u prisutnosti agregirajućeg agensa MgSO<sub>4</sub> (0,1 mol/L).

U spektrima svih polinukleotida u koloidu AgNP\_C1 snimljenim nakon pobude pri 532 nm uočavaju se vrpce pri  $2927$ ,  $657$  i  $617\text{ cm}^{-1}$ , koje potječu od kakodilatnog pufera. Spektri polinukleotida poli dA – poli dT i poli dG – poli dC nisu opaženi. U spektru poli rA – poli rU naziru se vrpce vrlo slabog intenziteta u području oko  $1620\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ , dok se u spektru ct-

DNA u tom području javlja široki spektralni motiv koji je posljedica preklapanja vrpce pripisanih većinom vibracijama dušičnih baza.<sup>17</sup>

Dodatkom agregirajućeg agensa slabi intenzitet vrpce koje potječu od pufera. Magnezijev(II) sulfat djeluje kao tzv. „pasivni“ elektrolit koji povećanjem ionske jakosti potiče agregaciju nanočestica,<sup>3</sup> bez vezanja na površinu srebra. Agregiranjem nanočestica povećava se broj SERS aktivnih mjesta na kojima su električna polja izuzetno jaka. Također, pozitivan naboj magnezijevih iona djelomično neutralizira negativan naboj kloridnih iona na površini srebra, što negativno nabijenim DNA strukturama olakšava približavanje površini metala i vezanje preko dušičnih baza.<sup>18</sup> Nakon dodatka agregirajuće soli u spektru ct-DNA povećao se intenzitet široke vrpce vibracija prstenova dušičnih baza u području  $1620\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ . Spektar poli rA – poli rU je specifičan utoliko što su u njemu opažene tzv. anomalne vrpce slične rodaminu ( $1649, 1577, 1511, 1436, 1363, 1309, 1177, 1127, 771$  i  $612\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>11</sup> Za razliku od spektra poli dA – poli dT koji nije opažen niti nakon dodatka  $\text{MgSO}_4$  u uzorak, nakon agregacije nanočestica u spektru poli dG – poli dC uočene su nove vrpce pri  $1323$  i  $732\text{ cm}^{-1}$ , pripisane vibracijama citozinskog i gvaninskog prstena.



Slika 35. SERS spektri polinukleotida ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) ct-DNA (crno), poli rA – poli rU (zeleno), poli dG – poli dC (plavo) i poli dA – poli dT (crveno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1 nakon pobude zračenjem pri 785 nm: a) bez agregirajućeg agensa i b) u prisutnosti agregirajućeg agensa MgSO<sub>4</sub> (0,1 mol/L).

Spektri polinukleotida u koloidu AgNP\_C1 snimljeni nakon pobude pri 785 nm nisu opaženi, čak ni nakon dodatka agregirajućeg agensa. I u ovom slučaju pobuda uzorka zračenjem valne duljine 785 nm pokazala se manje efikasnom od pobude zračenjem pri 532 nm.

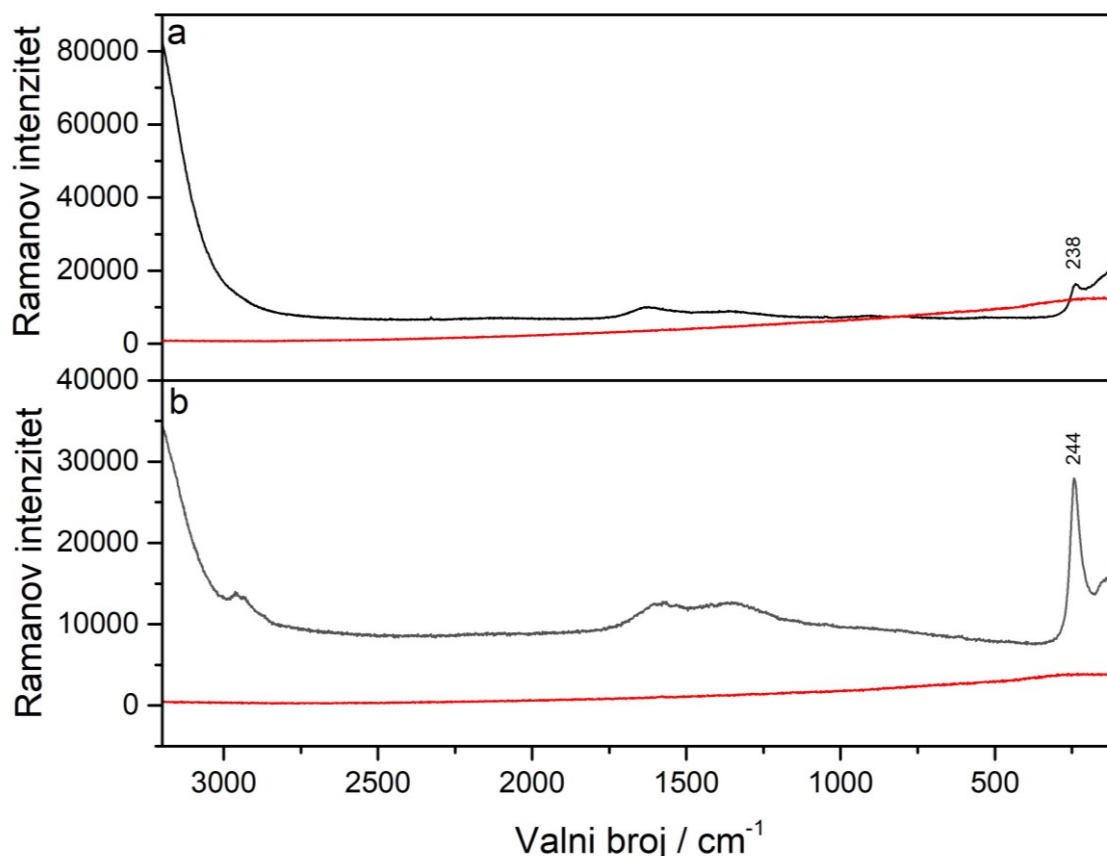
Može se zaključiti da se DNA/RNA polinukleotidi zbog višestruko negativno nabijene fosfatne okosnice elektrostatski odbijaju od srebrnih nanočestica s kloridnim ionima na površini (AgNP\_C1), uslijed čega je pojačanje Ramanovog raspršenja vrlo slabo ili u potpunosti izostaje. Ni dodatak agregirajućeg agensa nije pospješio adsorpciju dugih polinukleotida na nanočestice srebra negativnog naboja.

#### 4.4.1.2. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP\_sp

Snimljeni su Ramanovi spektri koloidne suspenzije AgNP\_sp bez i u prisutnosti kakodilatnog pufera nakon pobude zračenjem pri 532 i 785 nm (slika 36).

Nakon pobude zračenjem pri 785 nm nisu opaženi spektri koloidne suspenzije AgNP\_sp neovisno o prisutnosti kakodilatnog pufera.

Vrpca istezanja veze Ag–Cl pri  $238\text{ cm}^{-1}$  u spektru koloidne suspenzije AgNP\_sp snimljenom nakon pobude zračenjem pri 532 nm, postaje intenzivnija i pomiče se prema  $244\text{ cm}^{-1}$  u spektru koloidne suspenzije AgNP\_sp koja sadrži kakodilatni pufer, što se može pripisati većoj koncentraciji kloridnih iona u uzorku koji potječu od klorovodične kiseline korištene za podešavanje pH-vrijednosti pri pripravi pufera. Karakteristične vrpce kakodilatnog iona nisu uočene jer je u kiselom mediju koloida ( $\text{pH}(\text{AgNP\_sp}) = 3,45$ ) prisutan u protoniranom obliku, čime se smanjuje njegov afinitet i sposobnost adsorpcije na nanočestice srebra stabilizirane molekulama spermina pozitivnog naboja.

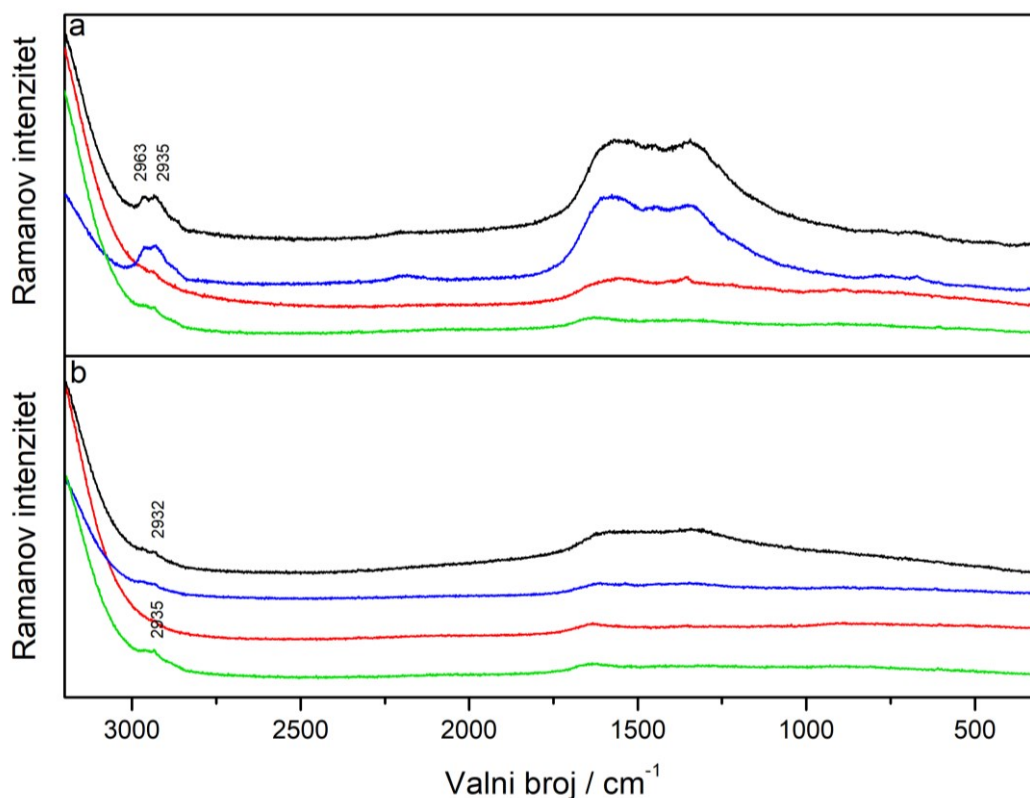


Slika 36. Ramanovi spektri: a) AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 50 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 150 mW (crveno) te b) AgNP\_sp u prisutnosti kakodilatnog pufera nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 10 mW (crno) i nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 30 mW (crveno).

Snimljeni su SERS spektri polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  mol/L u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp neposredno nakon pripreme uzoraka te dva sata nakon pripreme uzoraka uz pobudu zračenjem pri 532 nm (slika 37) te 785 nm (slika 38). Spektri su snimani u području  $3200\text{--}300\text{ cm}^{-1}$  jer je zračenje raspršeno pri  $240\text{ cm}^{-1}$  uzrokovalo zasićenje detektora.

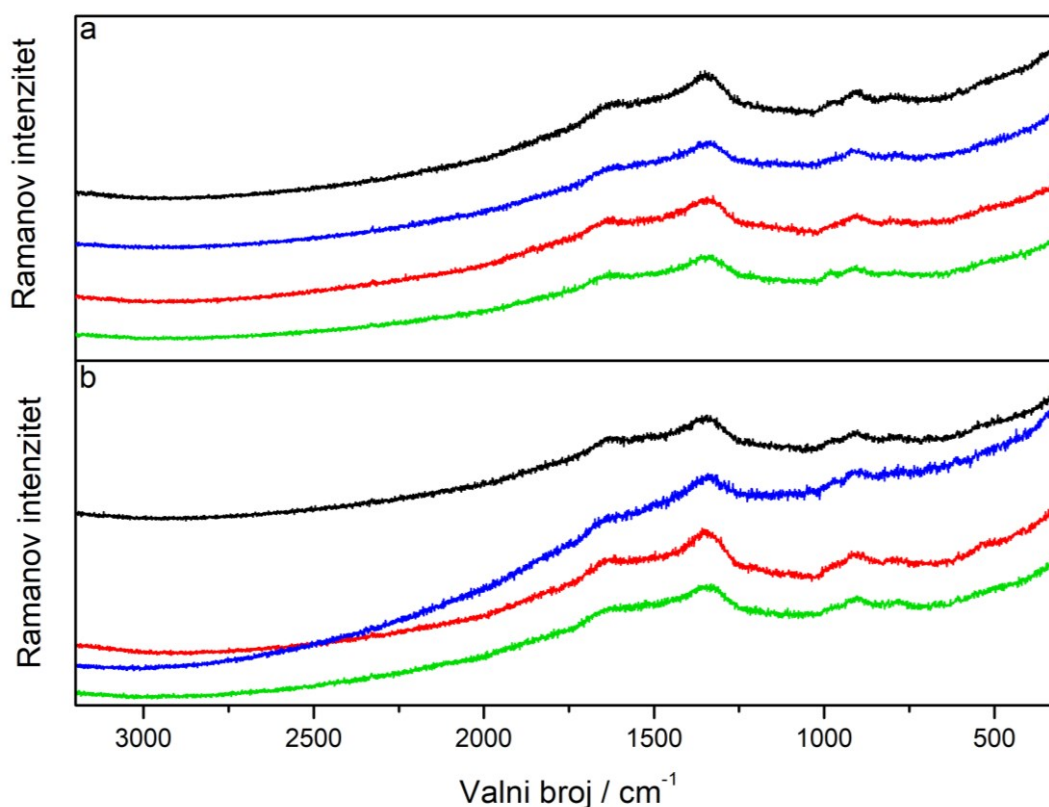
Nakon pobude pri 532 nm, široke i slabe vrpce polinukleotida u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp bile su izraženije u spektrima snimljenim neposredno nakon pripreme uzoraka u odnosu na spektre snimljene dva sata nakon pripreme. U spektrima DNA analoga (ct-DNA, poli dG – poli dC i poli dA – poli dT) uočavaju se slabe vrpce pri  $2963$  i  $2935\text{ cm}^{-1}$  te široki motiv vrpce koje se preklapaju u spektralnom području  $1650\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ , a potječu od vibracija prstenova dušičnih baza. Suprotno očekivanome, inkubacija uzorka tijekom dva sata nije

pospješila adsorpciju polinukleotida na nanočestice srebra pozitivnog naboja te spektri nisu opaženi.



Slika 37. SERS spektri polinukleotida ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) ct-DNA (crno), poli dG – poli dC (plavo), poli dA – poli dT (crveno) i poli rA – poli rU (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri 532 nm: a) neposredno nakon priprave uzorka te b) 2 sata nakon priprave uzorka.

SERS spektri polinukleotida u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp snimljeni nakon pobude pri 785 nm neposredno nakon priprave uzorka i dva sata kasnije nalikuju jedan drugome, a odgovaraju spektru same koloidne suspenzije AgNP\_sp.



Slika 38. SERS spektri polinukleotida ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) ct-DNA (crno), poli dG – poli dC (plavo), poli dA – poli dT (crveno) i poli rA – poli rU (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri 785 nm: a) neposredno nakon pripreve uzorka te b) 2 sata nakon pripreve uzorka.

Za očekivati je bilo se da će se polinukleotidi elektrostatskim interakcijama između negativno nabijene fosfatne okosnice i pozitivno nabijenih molekula spermina na površini srebra adsorbirati na srebrove nanočestice (AgNP\_sp). Međutim, izostanak karakterističnih vrpci polinukleotida nakon pobude pri obje valne duljine (532 i 785 nm) ukazuje da to nije slučaj. Problem vjerojatno leži u složenoj strukturi istraživanih polinukleotida, koji su građeni od velikog broja nukleotida (500–1000), odnosno parova dušičnih baza smještenih unutar dvostruke uzvojnice, što otežava adsorpciju i vezanje na površinu metalnih supstrata. Ranija SERS istraživanja, većinom jednolančanih DNA struktura koje su sadržavale 10–30 nukleotida, uspješno su provedena vjerojatno zbog značajno manje kompleksnosti takvih biomolekula.

## 4.5. SERS spektri kompleksa Hoechst 33258 s DNA/RNA

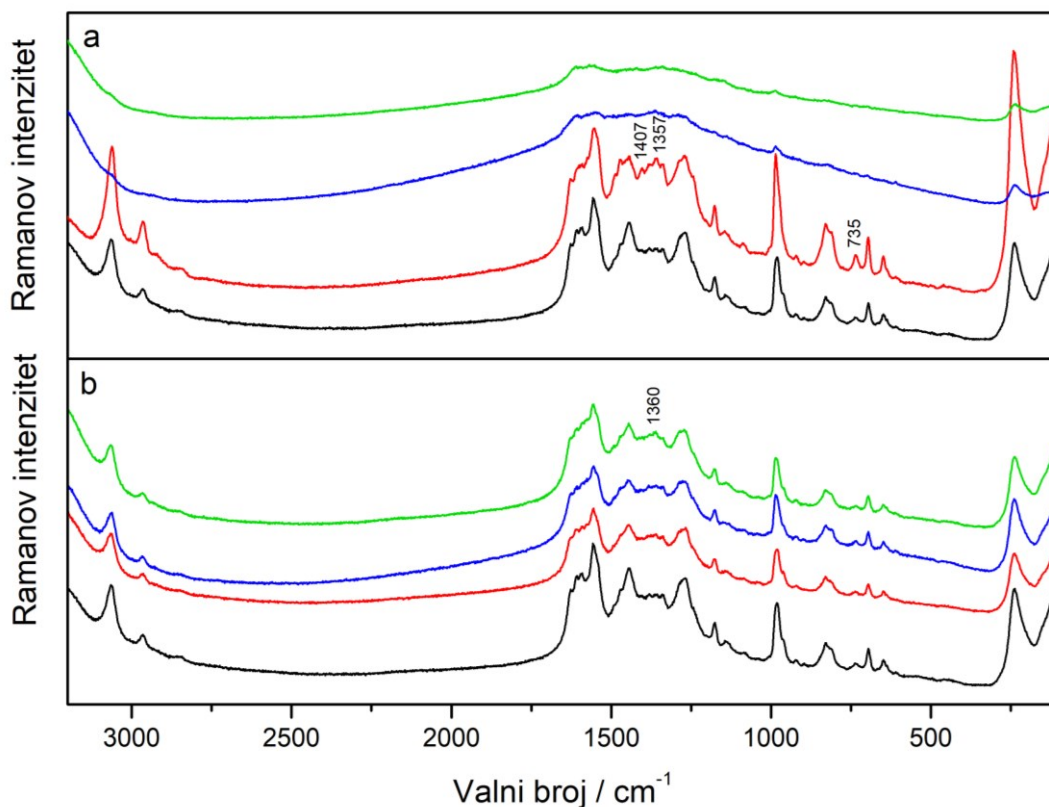
SERS spektroskopijom moguće je istraživati interakcije malih molekula s DNA/RNA na temelju spektralnih razlika koje podrazumijevaju pomak ili promjenu intenziteta karakterističnih vrpca male molekule, a upućuju na funkcionalne skupine molekule koje sudjeluju u vezanju pri nastajanju kompleksa. Analizom SERS spektara također je moguće utvrditi način i mjesto vezanja male molekule s DNA/RNA, na koje ukazuje pojava novih vrpca u spektru, koje se pripisuju dijelovima polinukleotida koji ostvaruju interakcije s malom molekulom, uslijed čega se smještaju bliže površini metalnog supstrata s koje se Ramanovo raspršenje pojačava.

### 4.5.1. Utjecaj priprave uzorka

U svrhu istraživanja utjecaja priprave mjernog uzorka na interakcije spoja H33258 i DNA/RNA analoga, uzorci kompleksa H33258 i dvolančanog polinukleotida poli dA – poli dT pripremljeni su u koloidnoj suspenziji srebra (AgNP\_Cl) na dva načina. Na prvi način uzorci su pripremljeni tako da su prvo pomiješane otopine spoja H33258 i polinukleotida, nakon čega je nastali kompleks dodana koloidna suspenzija AgNP\_Cl. Na drugi način uzorci su pripremljeni tako da je otopina H33258 prvo pomiješana s koloidnom suspenzijom AgNP\_Cl, a zatim je koloidnoj smjesi dodana otopina polinukleotida. Koncentracija H33258 u svim mjernim uzorcima iznosila je  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, a volumni udio koloidne suspenzije srebra 87,5%. Kompleksi H33258 i polinukleotida pripremljeni su u omjerima  $[H33258]/[polinukleotid] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$ . Budući da se pobuda laserom pri valnoj duljini od 532 nm pokazala uspješnijom od pobude pri 785 nm, svi spektri kompleksa H33258 i polinukleotida snimljeni su nakon pobude Vis zračenjem.

SERS spektri kompleksa H33258 s poli dA – poli dT različitih omjera, pripremljenih na oba načina, kao i spektar H33258 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) u koloidu srebra AgNP\_Cl, prikazani su na slici 39.





Slika 39. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa [H33258]/[poli dA – poli dT] 1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl, kada je mjerni uzorak pripremljen: a) dodatkom koloida srebra u otopinu kompleksa H33258 i polinukleotida (prvi način) i b) dodatkom polinukleotida u koloid srebra koji sadrži H33258 (drugi način);

$$c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}, \lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}.$$

Usporedbom spektra H33258 sa spektrima kompleksa H33258/poli dA – poli dT može se uočiti da se spektri razlikuju ovisno o molarnom omjeru male molekule i polinukleotida kada su uzorci pripremljeni na prvi način, dodatkom koloida srebra u pripremljeni kompleks. Spektri uzoraka pripremljenih na drugi način, kada je u koloid srebra dodan najprije H33258, a zatim poli dA – poli dT, nalikuju jedan drugome, odnosno spektru H33258, što ukazuje da je afinitet vezanja H33258 na nanočestice srebra veći od afiniteta vezanja H33258 s polinukleotidima. Asignaciju i interpretaciju spektara otežava i strukturna sličnost H33258 (benzimidazolni sustavi) i dušičnih baza, koja rezultira preklapanjem karakterističnih vibracijskih vrpca.

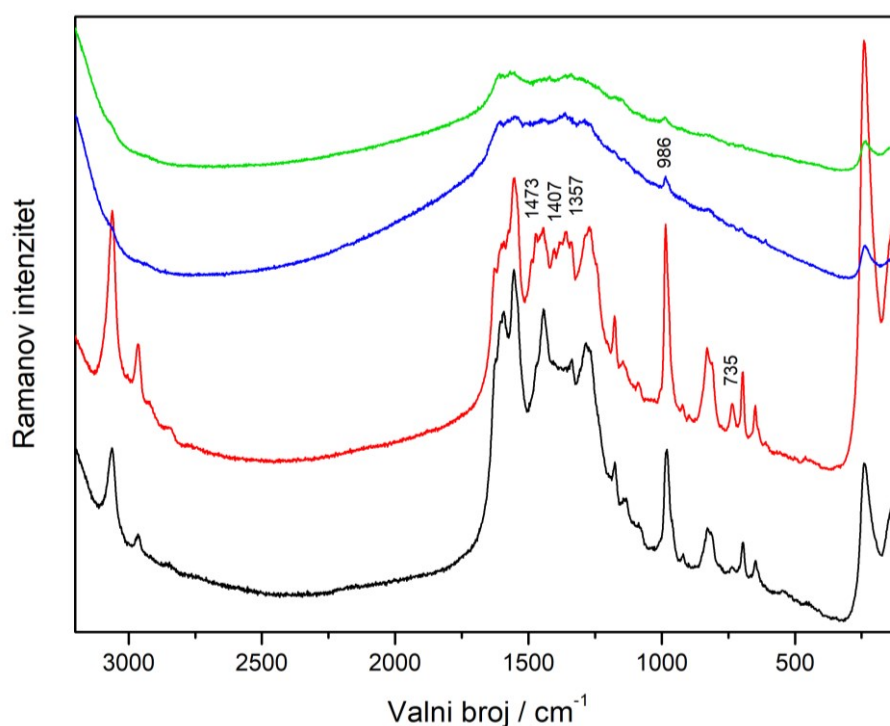
S obzirom da se prvi način pripreme uzoraka kompleksa H33258 i polinukleotida pokazao boljim, svi naredni uzorci pripremljeni su na taj način.

#### 4.5.2. Utjecaj metalnog supstrata

Kako bi se ispitaio utjecaj metalnog supstrata na SERS spektre kompleksa H33258 i dvolančanih DNA/RNA polinukleotida, uzorci su snimljeni u koloidnoj suspenziji nanočestica srebra stabiliziranih negativno nabijenim slojem kloridnih iona na površini nanočestica (AgNP\_Cl) i koloidnoj suspenziji nanočestica srebra stabiliziranih pozitivno nabijenim slojem molekula spermina na površini nanočestica (AgNP\_sp).

##### 4.5.2.1. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP\_Cl

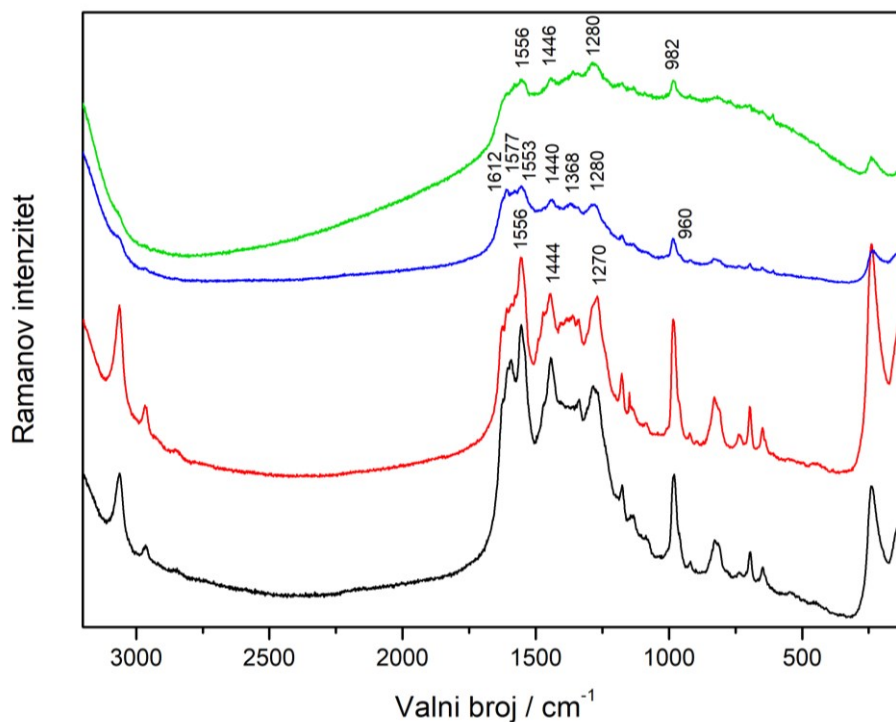
Snimljeni su SERS spektri uzoraka kompleksa H33258 i DNA/RNA analoga u omjerima  $[H33258]/[polinukleotid] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$  u koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl nakon pobude zračenjem pri 532 nm. Spektar H33258 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), kao i spektri kompleksa H33258 i poli dA – poli dT različitih omjera, prikazani su na slici 40.



Slika 40. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa  $[H33258]/[poli\ dA - poli\ dT]$  1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl;  $c(H33258) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{ex} = 532$  nm.

SERS spektar kompleksa H33258 s AT polinukleotidom u omjeru  $[H33258]/[poli\ dA - poli\ dT] = 1/1$  nalikuje spektru H33258. Za pretpostaviti je da spektru doprinose slobodne molekule H33258 adsorbirane na nanočestice srebra, ali i nastali kompleks s polinukleotidom. Na to ukazuju nove vrpce u spektru kompleksa uočene pri 1473, 1407, 1357 i 735  $cm^{-1}$ , koje nisu opažene u spektru H33258. Vrpce pri 1473 i 735  $cm^{-1}$  pripisane su vibracijama istežanja i „disanja“ šesteročlanog prstena adenina, dok su vrpce pri 1407 i 1357  $cm^{-1}$  pripisane svijanju u ravnini C6–H skupine, odnosno N3–H skupine timina.<sup>29,30</sup> Opažene vrpce polinukleotida upućuju na interakcije između H33258 i dvolančanog AT polinukleotida, pri čemu vrpca „disanja“ heteroaromatskog prstena adenina (735  $cm^{-1}$ ), koji u malom utoru sadrži N3 atom slobodan za vodikovo vezanje, sugerira smještanje molekula H33258 u mali utor dvostruke uzvojnice, u skladu s provedenim istraživanjima.<sup>1</sup> Povećanjem udjela polinukleotida povećava se udio slobodnih veznih mjesta, te se intenzitet SERS vrpce molekula H33258 smanjuje. Vrlo slaba vrpca pri 986  $cm^{-1}$  u spektru kompleksa pripremljenog u omjeru  $[H33258]/[poli\ dA - poli\ dT] = 1/5$  potječe od vibracije disanja benzenskog prstena na vanjskom rubu benzimidazolnih sustava H33258, koji strše iz malog utora poli dA – poli dT. Daljnjim povećanjem udjela polinukleotida ( $[H33258]/[poli\ dA - poli\ dT] = 1/10$ ), molekule H33258 se smještaju duboko u mali utor AT polinukleotida prikladne širine te se negativno nabijeni kompleks udaljava od površine srebrovih nanočestica negativnog naboja pri čemu Ramanovo raspršenje izostaje.

SERS spektar H33258 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), kao i spektri kompleksa  $[H33258]/[poli\ dG - poli\ dC] = 1/1$ ,  $1/5$  i  $1/10$  u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1, snimljeni nakon pobude Vis zračenjem (532 nm), prikazani su na slici 41.

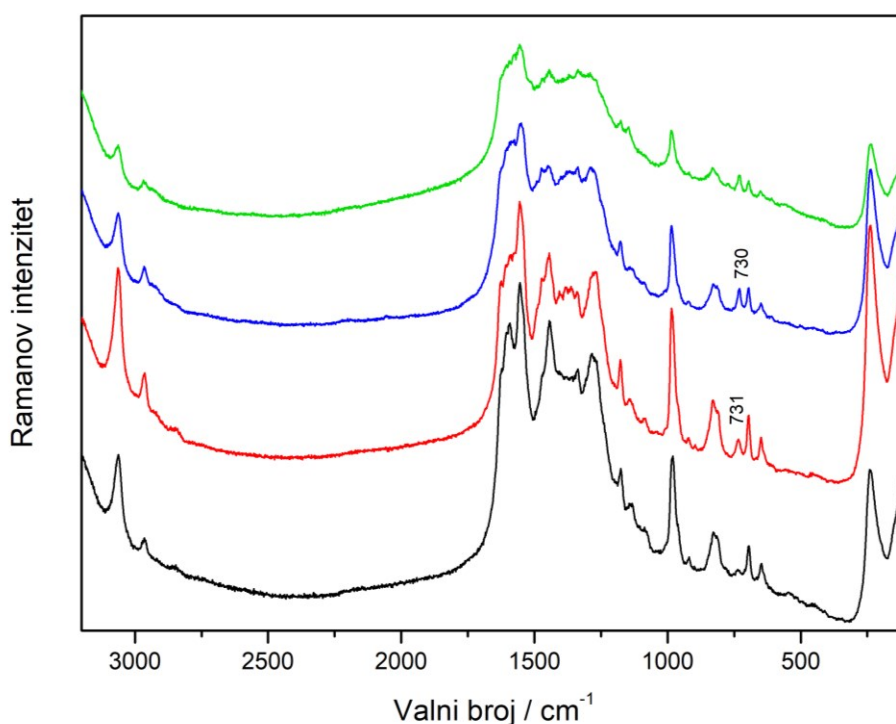


Slika 41. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa [H33258]/[poli dG – poli dC] 1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP<sub>Cl</sub>;  $c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm.

SERS spektar kompleksa H33258 i GC polinukleotida u omjeru [H33258]/[poli dG – poli dC] = 1/1 nalikuje spektru H33258 te je rezultat Ramanovog raspršenja slobodnih malih molekula na površini nanočestica srebra, što je u skladu s manjim afinitetom H33258 za sljedove gvanina i citozina, u odnosu na sljedove adenina i timina.<sup>1</sup> Značajnije spektralne razlike uočene su tek za komplekse s većim udjelom GC polinukleotida. U spektru kompleksa pripremljenog u omjeru [H33258]/[poli dG – poli dC] = 1/5 uočen je smanjeni intenzitet vrpce benzimidazolnih sustava praćen pomakom vrpce istezanja CC i CN veza prema manjim valnim brojevima (s 1444 na 1440  $\text{cm}^{-1}$  i 1556 na 1553  $\text{cm}^{-1}$ ) i vrpce svijanja CH i NH skupina prema većim valnim brojevima (s 1270  $\text{cm}^{-1}$  na 1280  $\text{cm}^{-1}$ ). Opažene promjene ukazuju na sudjelovanje aromatskih dijelova molekula u  $\pi$ -interakcijama slaganja s nukleobazama. Selektivno pojačana vrpca pri 1612  $\text{cm}^{-1}$  i rame pri 960  $\text{cm}^{-1}$ , oboje pripisano fenolnoj skupini H33258, sugeriraju položaj ovog kraja molekule izvan GC uzvojnice, u neposrednoj blizini površine srebra. Nove vrpce u spektru pri 1577 i 1368  $\text{cm}^{-1}$  potječu od polinukleotida, pri čemu je prva pripisana istezanju šesteročlanog prstena gvanina, dok je druga pripisana istezanju peteročlanog prstena gvanina,

kao i svijanju C5–H i C6–H skupina citozina. Opažene vrpce potječu od strukturnih dijelova parova baza GC u velikom utoru. Spektralne karakteristike ukazuju na vezanje molekula H33258 u veliki utor,<sup>29</sup> u skladu s činjenicom da egzociklička amino skupina gvanina u malom utoru poli dG – poli dC sterički ometa vezanje malih molekula. Povećanjem udjela polinukleotida ( $[H33258]/[poli\ dG - poli\ dC] = 1/10$ ), intenzitet SERS spektra se smanjuje, ali ne toliko kao u slučaju kompleksa s AT polinukleotidom. Slabe, široke vrpce pri 982, 1280, 1446 i 1556  $cm^{-1}$  ukazuju na djelomično umetanje molekula H33258 unutar GC polinukleotida, u skladu s predloženim djelomičnim interkaliranjem kroz veliki utor.<sup>1,2</sup>

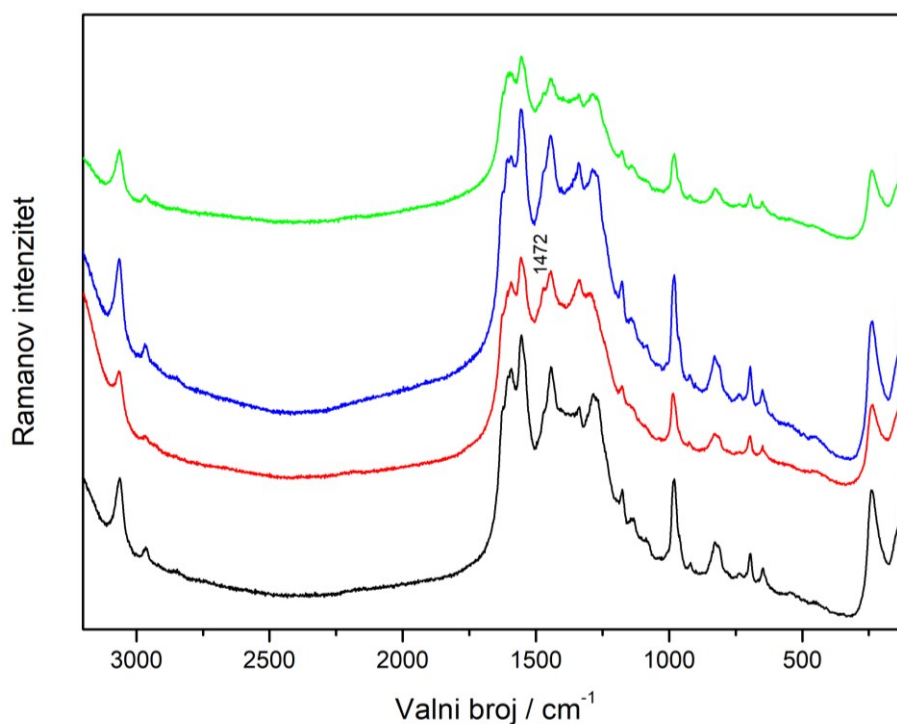
SERS spektrar H33258 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), kao i spektri kompleksa  $[H33258]/[poli\ rA - poli\ rU] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$  u koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl, snimljeni nakon pobude zračenjem pri 532 nm, prikazani su na slici 42.



Slika 42. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa  $[H33258]/[poli\ rA - poli\ rU]$  1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_Cl;  $c(H33258) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{ex} = 532$  nm.

U usporedbi sa SERS spektrima kompleksa H33258 sa sintetskim DNA analogima, promjene u SERS spektrima kompleksa H33258 i sintetskog dvolančanog RNA polinukleotida manje su izražene. Povećanjem udjela RNA polinukleotida u kompleksu smanjuje se intenzitet vrpce molekula H33258 u spektru, što ukazuje na interakcije H33258 i poli rA – poli rU, ali ne i na točno vezno mjesto jer su zbog opsežnog prekrivanja vrpce eventualne nove vrpce loše definirane i slabo razlučene. Jasno je, međutim, uočljiva pojava vrpce pri približno  $730\text{ cm}^{-1}$ , koja se pripisuje „disanju“ adeninskog prstena, a upućuje na važnost prisutnosti adenina u strukturi pri vezanju H33258 s nukleotidnim sljedovima.

SERS spektar H33258 ( $1 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ ), kao i spektri kompleksa  $[\text{H33258}]/[\text{ct-DNA}] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$  u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1, snimljeni nakon pobude zračenjem pri  $532\text{ nm}$ , prikazani su na slici 43.



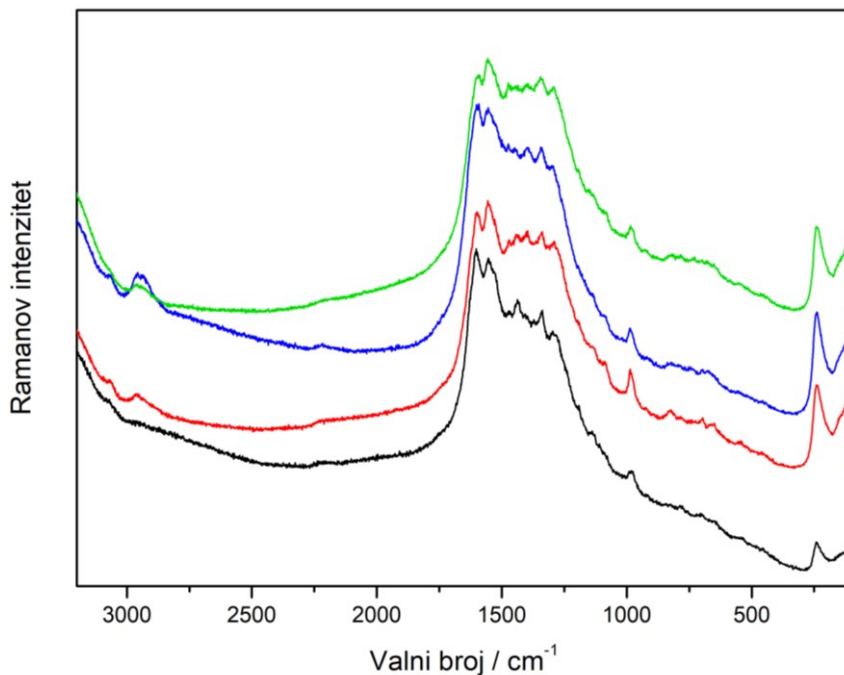
Slika 43. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa  $[\text{H33258}]/[\text{ct-DNA}]$  1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1;  $c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{ nm}$ .

Iako je najintenzivniji spektar kompleksa H33258 s ct-DNA opažen za kompleks pripremljen u omjeru  $[H33258]/[ct-DNA] = 1/5$ , SERS spektri kompleksa u svim omjerima vrlo su slični te nalikuju spektru H33258, što upućuje na postojanje slobodnih molekula H33258 koje se ne vežu s ct-DNA. S obzirom da prirodna ct-DNA sadrži 42% parova baza GC i 58% parova baza AT, moglo se očekivati da će u spektrima kompleksa s DNA dijelom biti opažene spektralne karakteristike kompleksa sa sintetskim GC i AT polinukleotidima. Međutim, strukturna svojstva malog utora, koja utječu na vezanje malih molekula, poput širine utora, razlikuju se ovisno o sastavu polinukleotida. Tako širina malog utora, prikladna za vezanje H33258, iznosi 3–4 Å za AT sljedove, za razliku od 6 Å za AT područja miješanih DNA sljedova. Odstupanje od očekivanih rezultata također se može objasniti činjenicom da su za specifično vezanje molekule H33258 potrebna najmanje četiri uzastopna para baza AT te da se jedno takvo mjesto, pogodno za vezanje H33258, nalazi na 100 parova baza ct-DNA.<sup>22</sup>

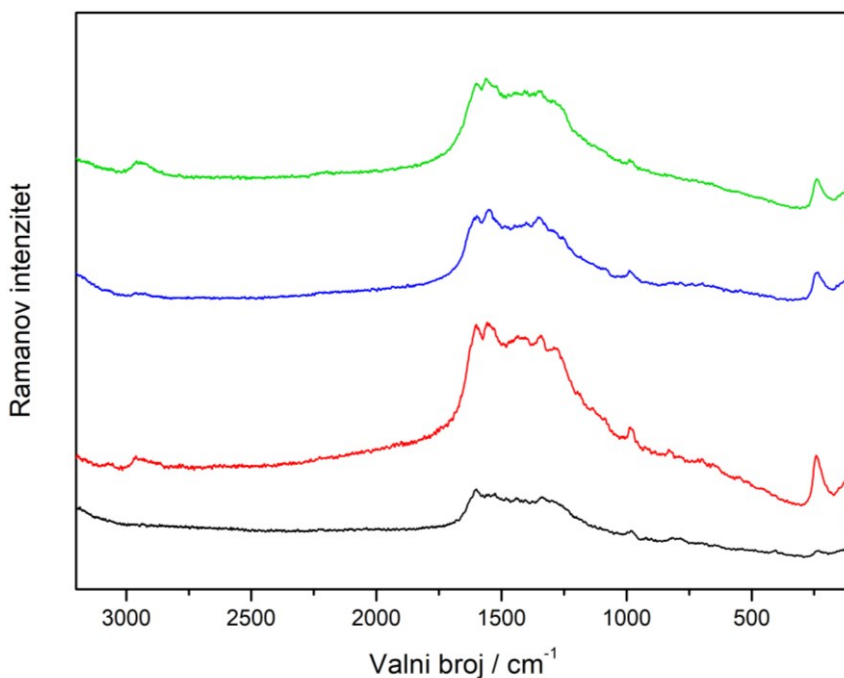
#### 4.5.2.2. SERS spektri na nanočesticama srebra AgNP\_sp

Snimljeni su SERS spektri uzoraka kompleksa H33258 i DNA/RNA analoga u omjerima  $[H33258]/[polinukleotid] = 1/1, 1/5$  i  $1/10$  u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp nakon pobude zračenjem pri 532 nm. Spektar H33258 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), kao i spektri kompleksa H33258 s poli dA – poli dT, poli dG – poli dC, poli rA – poli rU i ct-DNA prikazani su na slikama 44–47.

Široki spektralni motiv vrpce koje se preklapaju u području  $1600-1100 \text{ cm}^{-1}$  opažen je u spektrima kompleksa H33258 sa svim istraživanim polinukleotidima, a pripisan je molekulama H33258 adsorbiranim na nanočestice srebra pozitivnog naboja. Također, nisu uočene značajnije promjene intenziteta raspršenog zračenja s promjenom molarnog omjera kompleksa. Slabo definirani vrhovi opaženog spektralnog motiva onemogućili su pouzdanu asignaciju vrpce i interpretaciju spektara u svrhu istraživanja načina i mjesta vezanja H33258 s polinukleotidima.

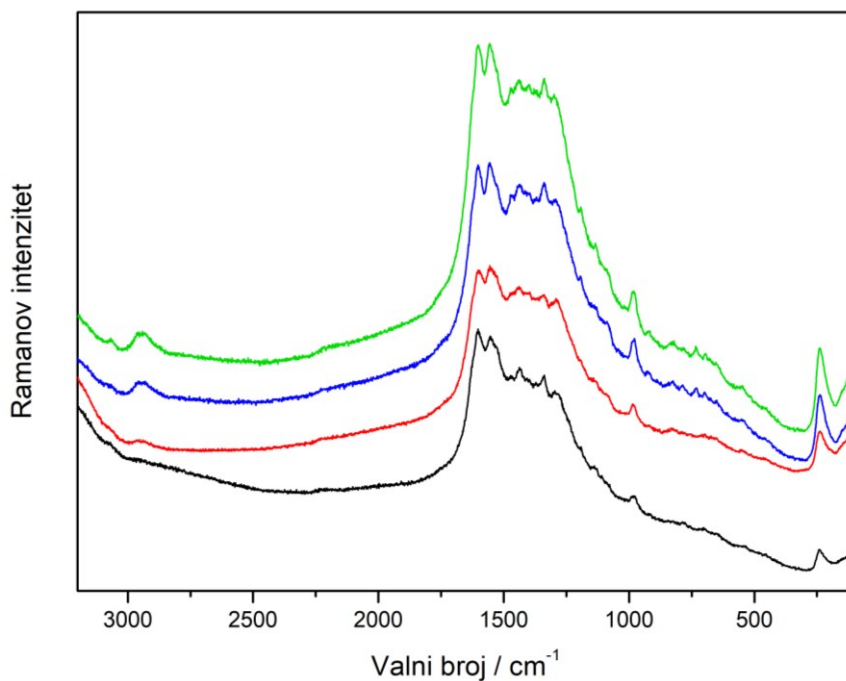


Slika 44. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa [H33258]/[poli dA – poli dT] 1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp;  $c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm.

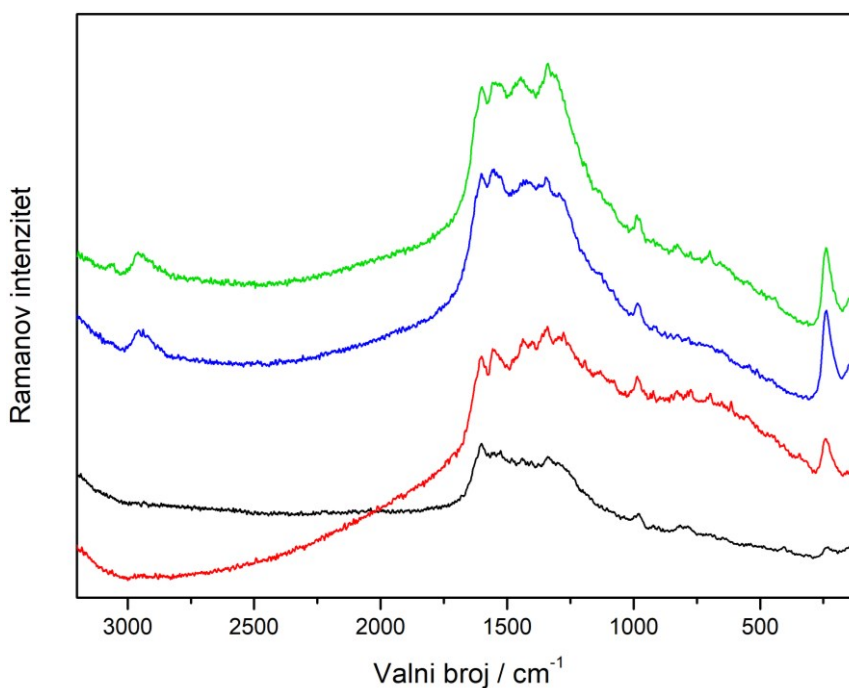


Slika 45. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa [H33258]/[poli dG – poli dC] 1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp;  $c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm. Svi su spektri obrađeni glačanjem.





Slika 46. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa [H33258]/[poli rA – poli rU] 1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP<sub>sp</sub>;  $c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm.



Slika 47. SERS spektri spoja H33258 (crno) te kompleksa [H33258]/[ct-DNA] 1/1 (crveno), 1/5 (plavo) i 1/10 (zeleno) u koloidnoj suspenziji AgNP<sub>sp</sub>;  $c(\text{H33258}) = 1 \times 10^{-5}$  mol/L,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm. Svi su spektri obrađeni glačanjem.

## § 5. ZAKLJUČAK

Snimljeni su i asignirani Ramanovi spektri čvrstog uzorka i vodene otopine bisbenzimidida Hoechst 33258 (H33258) nakon pobude zračenjem u vidljivom (532 nm) i bliskom infracrvenom (785 nm) području.

U svrhu istraživanja agregacije spoja H33258, snimljeni su koncentracijski ovisni SERS spektri u području koncentracija  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-4}$  mol/L u koloidnoj suspenziji srebrovih nanočestica negativnog (AgNP\_Cl) i pozitivnog (AgNP\_sp) naboja nakon pobude zračenjem valnih duljina 532 i 785 nm. Razlike u spektrima ukazale su na različite oblike i orijentaciju molekula na površini nanočestica srebra. Tako su spektri H33258 koncentracija  $1 \times 10^{-4}$  i  $5 \times 10^{-5}$  mol/L pripisani agregatima molekula koji nastaju interakcijama slaganja između aromatskih benzimidazolnih sustava. Smanjenjem koncentracije agregati disociraju pa su pri koncentraciji  $1 \times 10^{-5}$  mol/L vjerojatno još prisutne dimerne vrste, dok spektar H33258 koncentracije  $5 \times 10^{-6}$  mol/L odgovara samo monomernim molekulama. Za strukturnu analizu spoja H33258 uspješnijim se pokazao koloid AgNP\_Cl, na koji se pozitivno nabijene molekule H33258 adsorbiraju elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenim kloridnim ionima na površini srebrovih nanočestica.

SERS spektri dvolančanih polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  mol/L u koloidnim suspenzijama AgNP\_Cl i AgNP\_sp, snimljeni nakon pobude zračenjem pri 532 i 785 nm, nisu opaženi. Ramanovo raspršenje polinukleotida nije uočeno ni nakon dodatka agregirajućeg agensa ( $\text{MgSO}_4$ ) u koloidne uzorke negativno nabijenih nanočestica srebra, odnosno inkubacije pri sobnoj temperaturi tijekom dva sata u koloidnim uzorcima pozitivno nabijenih nanočestica srebra. Razlog tome može se potražiti u složenoj strukturi dugih dvolančanih polinukleotida.

S obzirom na pre-rezonantne uvjete s nanočesticama srebra i veću energiju pobudnog zračenja, SERS spektri kompleksa H33258 i polinukleotida snimani su samo nakon pobude zračenjem pri 532 nm. Uzorci kompleksa H33258 i DNA/RNA pripremljeni miješanjem spoja s odgovarajućim polinukleotidom te naknadnim dodatkom koloida, rezultirali su spektralnim promjenama koje su upućivale na interakcije malih molekula s polinukleotidima. Iako su u SERS spektrima kompleksa H33258 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) i polinukleotida (ct-DNA, poli dA – poli

dT, poli dG – poli dC i poli rA – poli rU) u omjerima [H33258]/[polinukleotid] = 1/1, 1/5 i 1/10 većinom dominirale vrpce H33258, spektri uzoraka u koloidnoj suspenziji AgNP\_C1 omogućili su istraživanje vezanja s DNA/RNA, dok široki spektralni motiv vrpce koje se preklapaju u spektrima uzoraka u koloidnoj suspenziji AgNP\_sp nije bilo moguće pouzdano analizirati i interpretirati.

Snimljeni SERS spektri ukazali su na to da je dominantan način interakcije spoja H33258 s DNA vezanje u mali utor polinukleotida adenina i timina te djelomična interkalacija i vezanje u veliki utor polinukleotida gvanina i citozina. Iako je afinitet vezanja spoja H33258 s DNA veći nego s RNA, spektar kompleksa H33258 sa sintetskim dvolančanim RNA analogom upućuje na interakcije malih molekula s polinukleotidom adenina i uracila. Zbog složene strukture prirodne ct-DNA, spektralne razlike slabije su izražene te su posljedica različitih interakcija i načina vezanja molekula H33258 koje uključuju vodikovo vezanje s dušičnim bazama u utorima,  $\pi$ -slaganje između parova baza i elektrostatske interakcije s fosfatnom okosnicom DNA.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – adenin

AgNP – koloidna suspenzija srebrovih nanočestica (engl. *silver nanoparticles*)

AgNP\_Cl – koloidna suspenzija srebrovih nanočestica stabiliziranih slojem negativno nabijenih kloridnih iona na površini

AgNP\_sp – koloidna suspenzija srebrovih nanočestica stabiliziranih pozitivno nabijenim molekulama spermina na površini

C – citozin

CCD – nabojno spregnuti uređaj (engl. *charge-coupled device*)

ct-DNA – DNA izolirana iz telećeg timusa tj. prsne žlijezde (engl. *calf thymus DNA*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EF – faktor pojačanja (engl. *enhancement factor*)

G – gvanin

H33258 – Hoechst 33258

IR – infracrveno zračenje (engl. *infrared light*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

Nd<sup>3+</sup>:YAG – itrij-aluminijev granat dopiran neodimijem (engl. *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*)

NIR – blisko infracrveno zračenje (engl. *near-infrared light*)

poli dA – poli dT – dvolančani polinukleotid sastavljen od polideoksiadenozinskog i polideoksitimidinskog lanca

poli dG – poli dC – dvolančani polinukleotid sastavljen od polideoksigvanozinskog i polideoksicitidinskog lanca

poli rA – poli rU – dvolančani polinukleotid sastavljen od poliadenozinskog i poliuridinskog lanca

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

rRNA – ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*)

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *scanning electron microscopy*)

SERS – površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *surface-enhanced Raman scattering*)

T – timin

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *transmission electron microscopy*)

tRNA – prijenosna RNA (engl. *transfer RNA*)

U – uracil

UV – ultraljubičasto zračenje (engl. *ultraviolet light*)

Vis – vidljivo zračenje (engl. *visible light*)

$\delta$  – svijanje ili deformacijska vibracija (engl. *bending*)

$\delta_{ip}$  – deformacija u ravnini (engl. *in plane bending*)

$\delta_{oop}$  – deformacija izvan ravnine (engl. *out of plane bending*)

$\delta_{rc}$  – zibanje (engl. *rocking*)

$\delta_{sc}$  – striženje (engl. *scissoring*)

$\delta_{tw}$  – uvijanje (engl. *twisting*)

$\delta_{wg}$  – klaćenje (engl. *wagging*)

$\nu$  – istežna vibracija (engl. *stretching*)

$\nu_{as}$  – antisimetrična vibracija (engl. *asymmetrical stretching*)

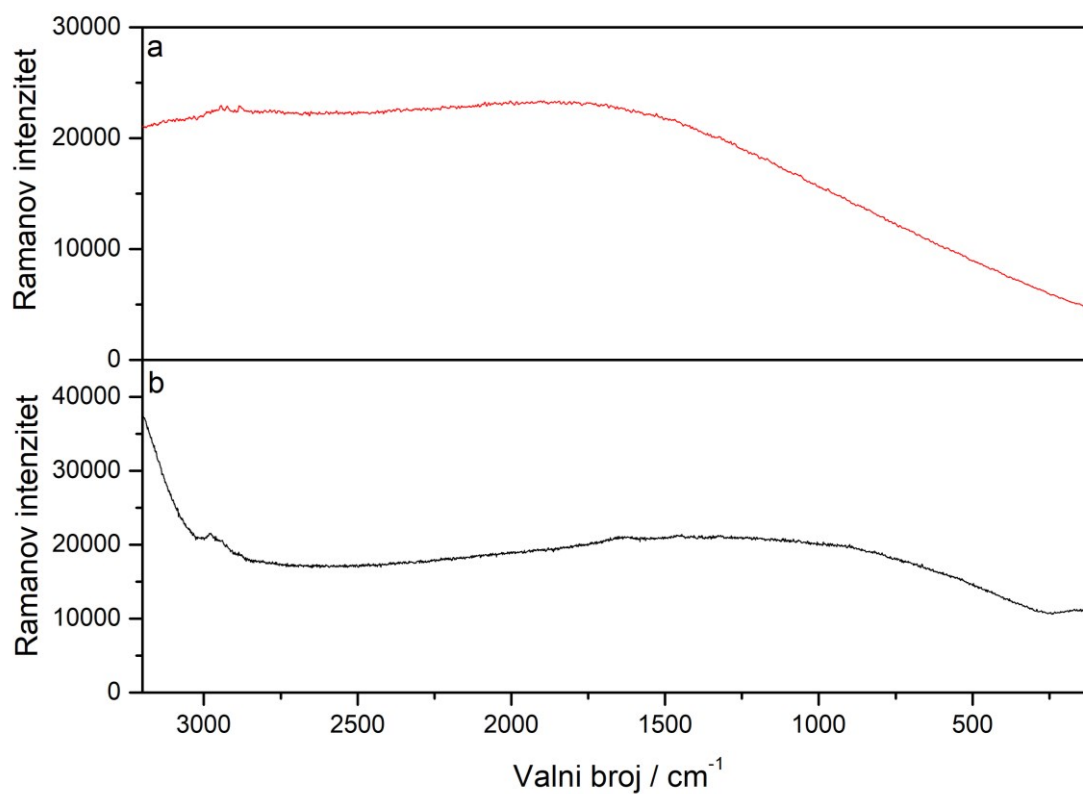
$\nu_s$  – simetrična vibracija (engl. *symmetrical stretching*)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. L. H. Fornander, L. Wu, M. Billeter, P. Lincoln, B. Nordén, *J. Phys. Chem. B* **117** (2013) 5820–5830.
2. N. Busto, B. Cano, R. Tejido, T. Biver, J. M. Leal, M. Venturini, F. Secco, B. García, *J. Phys. Chem. B* **119** (2015) 4575–4581.
3. A. Torres-Nuñez, K. Faulds, D. Graham, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Analyst* **141** (2016) 5170–5180.
4. L. Guerrini, Ž. Krpetić, D. Van Lierop, R. A. Alvarez-Puebla, D. Graham, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54** (2015) 1144–1148.
5. R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley & Sons, West Sussex, 2006.
6. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, Wiley & Sons, West Sussex, 2005.
7. T. Frey, *Istraživanje sekundarne strukture ubikvitina infracrvenom spektroskopijom*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 2–3.
8. G. Lihtar, *Infracrvena spektroskopija kolesterola*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 3.
9. N. R. Yaffe, E. W. Blanch, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 196–201.
10. S. Miljanić, A. Kendel, M. Novak, T. G. Deligeorgiev, I. Crnolatac, I. Piantanida, V. Chiş, *RSC Adv.* **6** (2016) 41927–41936.
11. S. Sánchez-Cortés, J. V. García-Ramos, *J. Raman Spectrosc.* **29** (1998) 365–371.
12. N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 5723–5727.
13. D. Van Lierop, Ž. Krpetić, L. Guerrini, I. A. Larmour, J. A. Dougan, K. Faulds, D. Graham, *Chem. Commun.* **48** (2012) 8192–8194.
14. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6. izd., W. H. Freeman and Company, New York, 2012.
15. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug - DNA interactions: Structures and Spectra*, Wiley & Sons, Hoboken, 2008.
16. T. McKee, J. R. McKee, *Biochemistry: The Molecular Basis of Life*, 3. izd., McGraw-

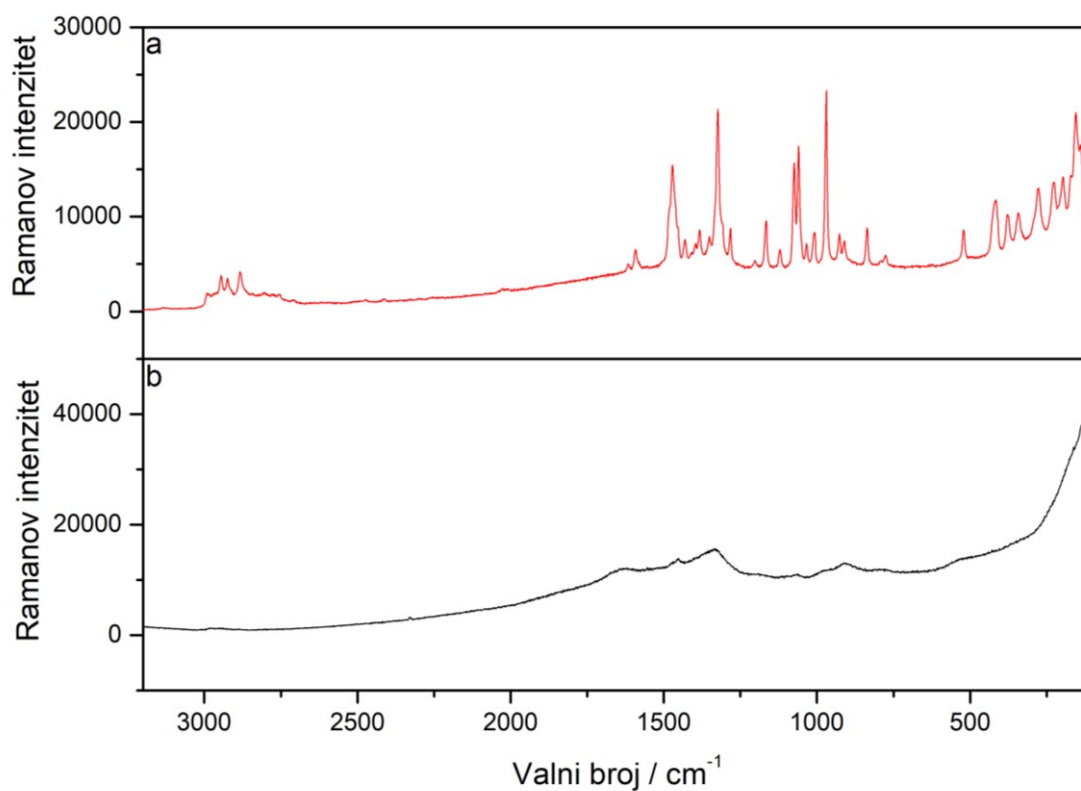
- Hill, New York, 2003.
17. E. Garcia-Rico, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Chem. Soc. Rev.* **47** (2018) 4909–4923.
  18. E. Papadopoulou, S. E. J. Bell, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50** (2011) 9058–9061.
  19. Y. Takeda, K. Samejima, K. Nagano, M. Watanabe, H. Sugeta, Y. Kyogoku, *Eur. J. Biochem.* **130** (1983) 383–389.
  20. N. Barooah, J. Mohanty, H. Pal, S. K. Sarkar, T. Mukherjee, A. C. Bhasikuttan, *Photochem. Photobiol. Sci.* **10** (2011) 35–41.
  21. H. Görner, *Photochem. Photobiol.* **73** (2001) 339–348.
  22. F. G. Loontjens, L. Dumortier, P. Regenfuss, A. Zechel, R. M. Clegg, *Biochemistry* **29** (1990) 9029–9039.
  23. C. E. Bostock-Smith, M. S. Searle, *Nucleic Acids Res.* **27** (1999) 1619–1624.
  24. C. Carrillo-Carrión, R. Martínez, M. F. Navarro Poupard, B. Pelaz, E. Polo, A. Arenas-Vivo, A. Olgiati, P. Taboada, M. G. Soliman, Ú. Catalán, S. Fernández-Castillejo, R. Solà, W. J. Parak, P. Horcajada, R. A. Alvarez-Puebla, P. del Pino, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58** (2019) 7078–7082.
  25. V. Chiş, M. M. Venter, N. Leopold, O. Cozar, *Vib. Spectrosc.* **48** (2008) 210–214.
  26. S. Sengupta, N. Maiti, R. Chadha, S. Kapoor, *Chem. Phys.* **436–437** (2014) 55–62.
  27. M. A. Morsy, M. A. Al-Khaldi, A. Suwaiyan, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) 9196–9203.
  28. N. Sundaraganesan, S. Ilakiamani, P. Subramani, B. D. Joshua, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **67** (2007) 628–635.
  29. S. Miljanić, A. Dijanošić, I. Piantanida, Z. Meić, M. T. Albelda, A. Sornosa-Ten, E. García-Espana, *Analyst* **136** (2011) 3185–3193.
  30. S. Miljanić, A. Dijanošić, M. Kalac, M. R. Stojković, I. Piantanida, D. Pawlica, J. Eilmes, *Croat. Chem. Acta* **85** (2012) 577–584.

## § 8. DODATAK



Slika D1. Ramanovi spektri: a) čvrstog uzorka spermin-tetrahidroklorida (crveno) i b) vodene otopine spermin-tetrahidroklorida ( $1 \times 10^{-1}$  mol/L) (crno) nakon pobude zračenjem pri 532 nm, snaga lasera 1 mW (a) i 10 mW (b).





Slika D2. Ramanovi spektri a) čvrstog uzorka spermin-tetrahidroklorida (crveno) i b) vodene otopine spermin-tetrahidroklorida ( $1 \times 10^{-1}$  mol/L) (crno) nakon pobude zračenjem pri 785 nm, snaga lasera 150 mW (a) i 300 mW (b).

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Virna Zavidić

Datum rođenja: 19. rujna 1996.

Mjesto rođenja: Rijeka

### Obrazovanje

|           |  |
|-----------|--|
| 2003–2011 | Osnovna škola „Milan Brozović“, Kastav   |
| 2011–2015 | „Prva riječka hrvatska gimnazija“, Rijeka  |
| 2015–2019 | Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb                    |
| 2021      | Stručna praksa na projektu za tvrtku Xellia d.o.o. (Xellia Pharmaceuticals), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |

### Nagrade i priznanja

|      |  |
|------|--|
| 2013 | Stipendija Grada Kastva u kategoriji nadarenih učenika |
| 2015 | Priznanje za status finalista projekta „Ideja godine“  |

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

|                 |  |
|-----------------|--|
| 2017–2019, 2021 | „Otvoreni dan kemije“, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb  |
| 2018–2019       | „Simpozij studenata kemičara“ (članica Organizacijskog odbora), Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |
| 2020–2021       | „Znanstvene čarolije“ Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb   |