

Arany nanoprizmák előállítása és alkalmazása bioérzékelőkben

Tarpataki Nóra

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Elektronikai Technológia Tanszék, Villamosmérnöki és Informatikai Kar,
1111 Budapest, Egrý József utca 18.
tarpatakin@edu.bme.hu

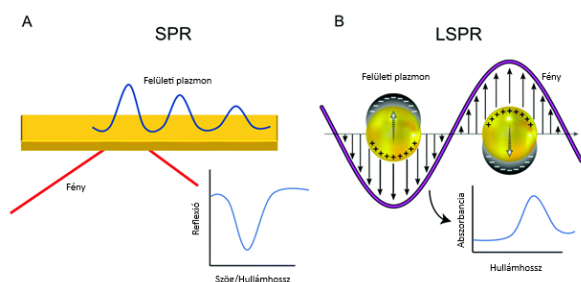
Tartalmi kivonat. A nanorészecskék - legalább egyik dimenziójukban 100 nm alá eső részecskék - számos kutatás tárgyát képezik és különböző felhasználási területekkel rendelkeznek, melyekre néhány példa: katalizátorok, membránok, orvosi biológiai felhasználás pl. gyógyszerhatóanyag leadó rendszerek, antibakteriális bevonatok és utóbbi kategóriába tartoznak a biológiai érzékelők is. A szenzoros alkalmazás alapját a plazmonrezonancia elnevezésű jelenség adja, ennek hatására a fémes nanorészecskék abszorpciós spektrumában jelentkező csúcs a közeg törésmutató-változásának megfelelően eltolódik. A szenzitivitás a nanorészecskék fizikai- és kémiai tulajdonságainak függvénye, ez utóbbiak pedig a szintézis során szabályozhatók. Szilárd hordozóra való rögzítéssel a nanorészecskékből funkcionális szenzorelem alakítható ki, mely például DNS vagy egyéb kismolekulák detektálására alkalmas. Jelen cikk a nanoprizmák létrehozásának és érzékelős alkalmazásának alapvető technológiai lépéseit mutatja be, saját példákon keresztül.

Kulcsszavak: arany nanorészecske, szintézis, lokalizált felületi plazmonrezonancia, pásztázó elektronmikroszkópia (SEM), immobilizálás, biológiai érzékelő, Raman-spektroszkópia

1. BEVEZETÉS

1.1 A plazmonrezonancia

A jelenség a nevét a plazmaoszcillációból nyerte, mivel itt is egy hasonló jellegű mozgás keletkezik. Ennek mechanizmusa azonban eltérő, plazmonrezonancia során a nemesfém atom elektronfelhőjével elektromágneses sugárzás lép kölcsönhatásba és megfelelő frekvencia esetén ez eredményezi a rezonanciát, az elektronfelhő oszcillációját. Attól függően, hogy a plazmon a fém felületén található, vagy pedig mérete nem haladja meg a gerjesztő fény hullámhosszát, felületi plazmonrezonanciáról (surface plasmon resonance - SPR), illetve lokalizált felületi plazmonrezonanciáról (localized surface plasmon resonance – LSPR) beszélünk. A különbséget az 1. ábra szemlélteti. [1]



1. ábra SPR (A) és LSPR (B) összehasonlítása [2]

1.2 Szenzoros alkalmazás

A plazmonrezonancia hullámhossza több paramétértől függ, ezek közé tartozik a nanorészecskék anyaga, mérete és alakja, valamint a közeg törésmutatója. Utóbbi használható ki érzékelési célra: amennyiben a kimutatandó molekula koncentrációja megnő a szenzor környezetében, megnő a törésmutató (n) is, a spektrális csúcs (λ_p) pedig eltolódik. [1]

Ezen eltolódás (shift) és törésmutató-változás ismeretében számítható a tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott érzékenység, vagy más néven szenzitivitás (refractive index sensitivity, RIS):

$$RIS = \frac{d\lambda_p}{dn} \quad (1)$$

A több csúccsal, illetve anizotróp alakokkal rendelkező nanorészecskéknek nagyobb az érzékenysége, ezért előnnyel járhat prizmák (háromszög alapú részecskék hegyes csúccsal) előállítása. [3]

Az élhossz növelésével nő az abszorpciós csúcs és szenzitivitás, azonban a csúcsok félértékszélessége is, ami csökkenti az érzékelés hatékonyságát. Ezt befolyásolja még az anyagi minőség, ezüst esetén keskenyebbek a csúcsok, azonban az arany kémiaiilag stabilabb és kevésbé hajlamos az oxidációra, emiatt elterjedtebb. [1]

1.3 Nanorészecskék szintézise

A nanorészecskék előállítási módszerei két fő csoportra bonthatók: top-down és bottom-up eljárások. Előbbi esetben makroszkópikus anyagból indulnak ki és annak méretét csökkentik a nanotartomány eléréséig; míg utóbbinál molekuláris szintről indulva építik fel az anyagot. A bottom-up módszerek legfontosabb előnye, hogy a részecskék tulajdonságai (pl. méret, alak) pontosabban szabályozhatók. [4]

Ezen csoporton belül is megkülönböztethetjük az oldat alapú eljárásokat, mint amilyen koprecipitáció vagy a szol-gél szintézis; a gázfázisú módszereket, ilyen például a kémiai- illetve fizikai gőzfázisú leválasztás (chemical vapour deposition – CVD, physical vapour deposition – PVD); valamint a zöldkémiai alapokon nyugvó bioasszisztált szintéziseket. [4]

Az arany nanorészecskék bottom-up előállítása további két csoportra bontható: az ún. „one-pot”, illetve a „seed-mediated” szintézisek, mely beoltásos technika néven is ismeretes. Az első kategóriába sorolható eljárások, mint például a Turkevich-szintézis, gyorsabbak és kevésbé munkaigényesek, azonban a beoltásos technika különválasztja a nukleációs- és növekedési folyamatot, ezáltal pontosabb méretszabályozást tesz lehetővé. Ezen előnyök miatt az utóbbi eljárást alkalmaztam a saját szintéziseim során. [5]

2. KÍSÉRLETI ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Nanorészecskék szintézise

A szintézist E. Podlesnaia és munkatársai cikke [5] alapján végeztem.

Az első lépés a magok előkészítése volt. 4,7 mL 100 mM hexadeciltrimetil-ammónium-kloridot (CTAC, Sigma Aldrich) 25 μ L 50 mM arany(III)-klorid (HAuCl_4 , Sigma Aldrich) oldathoz adtam és 2-3 percig kevertettem. Intenzív keverés mellett 300 μ L 10 mM frissen készített nátrium-borohidrid (NaBH_4 , Sigma Aldrich) oldatot adtam hozzá, majd 2 órán keresztül kevésbé erőteljesen kevertettem. Ezután előállítottam az intermediér magokat: 16,6 μ L 50 mM HAuCl_4 -et és 20 μ L 100 mM aszkorbinsavat (AA, Sigma Aldrich) adtam 10 mL 25 mM CTAC-hez, végül 100 μ L-t öntöttem hozzá a fent említett magvakból erőteljes keverés mellett. Ezután az üvegsét félretettem, és 40 percig állni hagytam.

Ez idő alatt egy előkeveréket készítettem, amely 390 μ L vízből, 130 μ L 50 mM HAuCl_4 -ből és 40 μ L 10 mM nátrium-jodidból (NaI, Sigma Aldrich) állt. Ezután különböző mennyiségű intermediér magokat (a nanoprizmák méretétől függően) adtam hozzá egy 10,2 mL 50 mM CTAC-ot, 104 μ L 100 mM AA-t és 40 μ L 10 mM NaI-t tartalmazó oldathoz. Ezt a reakcióelegyet 45 másodpercig kevertettem, majd hozzáadtam az előkeveréket, még néhány másodpercig kevertettem, és 2 órán át állni hagytam.

Az utolsó lépés a tisztítás volt: a nanorészecskék méretétől függően különböző mennyiségű CTAC-ot adtam a nyers reakcióelegyhez, és 24 órán át állni hagytam, majd a csapadékot összegyűjtöttem és vízben rediszpergáltam.

2.2 Nanorészecskék immobilizálása

A nanoprizmák immobilizálására, vagyis szilárd felületre történő rögzítésére végül eredményes módszer Addison és társainak munkáján alapszik [6], ezen végeztem kisebb módosításokat.

Az üveglapkákat, melyekre a nanoprizmákat rögzítettem, acetonnal, izopropanollal, etanollal mostam, majd 10 percre ultrahang kádba helyeztem. Ezt követte az oxigén plazmás kezelés (240 W, 25 perc, 0,2 mbar, oxigén plazma 99,99% gázból) egy Diener Atto típusú kisnyomású plazmakamrában, ennek hatására hidroxil csoportok alakultak ki a felületen.

Az immobilizáláshoz használt anyag 3-merkaptó-propil-trimetoxi-szilán, ezt oldottam metanolban (5 V/V%) és ebbe helyeztem az üveglapokat. 12 óra elteltével metanollal, majd ultratiszta desztillált vízzel mostam őket. Végül 24 órán keresztül a kolloidot, valamint nátrium-hidroxidot tartalmazó oldatban áztattam az üveglapokat.

2.3 Optikai spektroszkópia

A spektrumokat egy Avantes Avalight DHS halogén fényforrással felszerelt Avantes Avaspec 2048-4DT típusú spektrométerrel vettem fel, 584 nm és 1096 nm között. A kiértékeléshez Matlab programot használtam.

2.4 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A mérésekhez használt készülék egy TESCAN MIRA3 típusú pásztázó elektronmikroszkóp (SEM).

2.5 DNS-detektálás

Az üveglapon immobilizált arany nanorészecskéket enyhe oxigénplazmás kezelésnek vettem alá, hogy az esetleges szennyeződésektől megtisztítsam őket (2 perc, 10% intenzitás). Ezt követően próba DNS-t cseppentettem rájuk, másnap pedig levegő fújatással szárítottam őket és rögzítettem az optikai spektrumukat. A Raman spektrumok felvétele Renishaw inVia típusú berendezéssel történt. Ezután hozzáadtam a target DNS-t, és a bekötődést követően (2 óra) optikai spektroszkópiával vizsgáltam a mintákat.

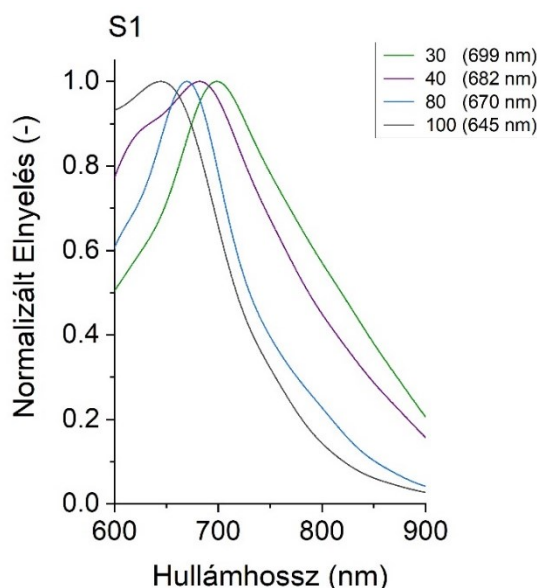
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

3.1 Nanorészecskék szintézise

A prizmak élhossza a szintézis során az intermedier gócok mennyiségével szabályozható. Minél kevesebb a góc, annál nagyobbak lesznek a nanorészecskék, mivel kevesebb növekedési centrumon oszlik szét ugyanaz az arany mennyiség. A nagyobb méretek pedig nagyobb hullámhosszokhoz tartozó abszorpciós csúcsokkal járnak.

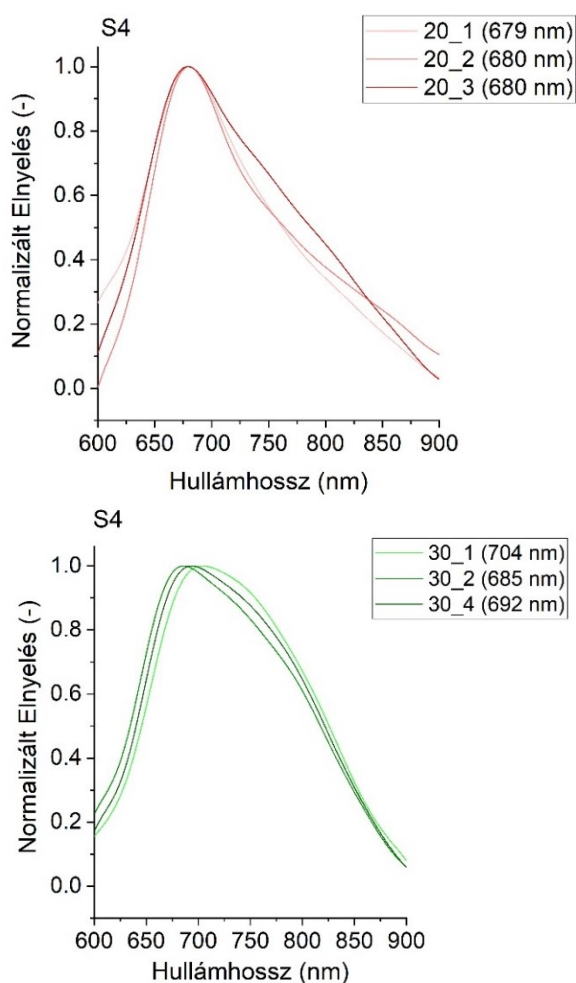
Az első szintézis során különböző térfogatú intermedier oldatokkal kísérleteztem (30, 40, 80, illetve 100 μ l), a mintákat ezeknek megfelelően

neveztem el. A spektrumokat a 2. ábra mutatja. Megfigyelhető, hogy a várakozásnak megfelelően a kevesebb intermedier gócot tartalmazó (nagyobb élhosszú) minták csúcsai a nagyobb hullámhosszok felé tolódnak.



2. ábra Első szintézis-sorozat optikai elnyelési spektrumai

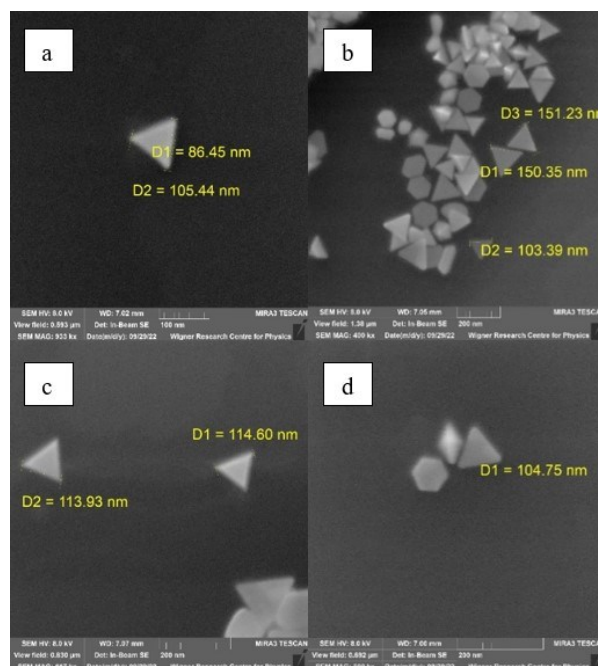
A folytatásban megkísérleltem tovább növelni a prizmak méretét, a 30-as mellett 20-as mintákat is készítettem, azonban a csúcsok félértékszélessége jelentősen megnőtt (3. ábra).



3. ábra A második szintézis-sorozat nagyobb (20-as és 30-as) prizmainak optikai spektrumai

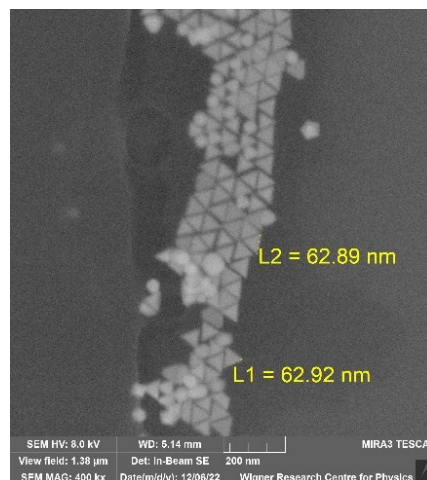
Ezeknek a megfigyeléseknek megfelelően maradtam a lehető legnagyobb méretű, ugyanakkor kis félértékszélességgel rendelkező prizmánál, ami a 40-es mintákat jelenti.

A spektrumok mellett a másik fontos információ forrást a SEM felvételek jelentették. A 4. ábra az első szintézis mintáit hasonlítja össze. Megfigyelhető, hogy a háromszögek mellett megjelennek egyéb alakzatok is, például gömbök, hatszögek; illetve, hogy egy adott mintán belül is nagy a polidiszperzitás.



4. ábra Az első szintézisről készült SEM felvételek, a) 80, b) 40, c) 30, d) 100

Ennek javítására a második szintézistől kezdve a folyamat során használt üvegszűrőket egy előzetes tisztításnak vettem alá, ami meghozta a kívánt eredményt (5. ábra).



5. ábra A második szintézis 80-as mintájáról készült SEM felvétel

Látható, hogy egyértelműen a háromszög (prizma) a domináns alakzat és az élhosszok szórása, azaz a polidiszperzitás is csökkent.

3.2 Nanorészecskék immobilizálása

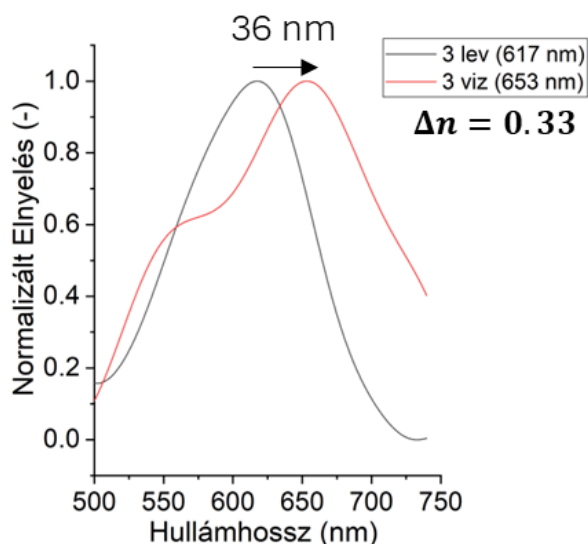
Az üveglapra történő immobilizálás folyamatában több módosítást végeztem annak érdekében, hogy eredményes legyen, ezek közül a legfontosabb a pH eltolása volt nátrium-hidroxid segítségével, ez jelentette az első sikeres rögzítést a hordozóra. Eredményes immobilizálást követően

az arany nanorészecskék jelenléte a felületen szabad szemmel is megfigyelhető, vizes mosást követően is szürke marad az üveglap, ezt mutatja a 6. ábra.



6. ábra Üveglapon immobilizált arany nanoprizmák

Ezek a minták már alkalmasak a szenzorfunkció demonstrálására, ezért felvettem a spektrumot levegőn, illetve vízben (7. ábra).



7. ábra Üveglapon immobilizált arany nanoprizmák spektruma levegőn (fekete) és vízben (piros)

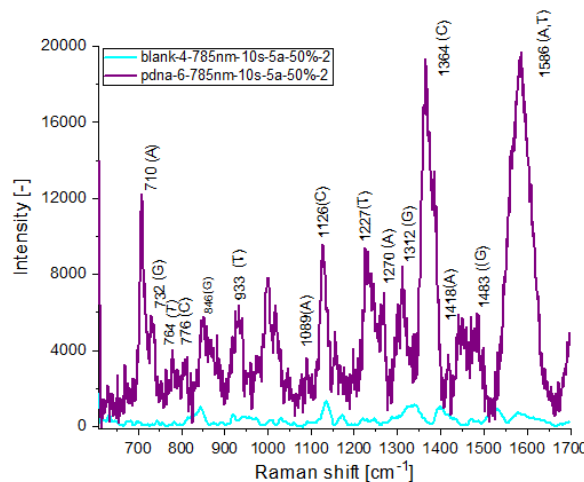
A két csúcs közti különbség 36 nm, a törésmutató változás pedig 0,33. Ezek alapján számítva, a szenzitivitás:

$$RIS = \frac{d\lambda_p}{dn} = \frac{36}{0,33} = 109,1 \text{ nm/RIU} \quad (2)$$

A kísérletek kezdeti stádiumában ez egy jónak mondható érzékenység. A legrelevánsabb problémát a felület inhomogén borítása jelenti, ennek fejlesztése feltételezhetően a szenzitivitás javulását is eredményezné.

3.3 DNS detektálás

A Raman-spektrum alapján kijelenthető, hogy a próba DNS rögzítése az üveglapon immobilizált nanoprizmákhoz sikeresen megtörtént. Ezt a 8. ábra támasztja alá: a világoskék spektrum egy próba DNS nélküli mintához tartozik, a lila pedig egy olyan mintához, amire próba DNS-t rögzítettem.



8. ábra DNS-t tartalmazó minta (lila) és a referenciaként alkalmazott DNS nélküli (kék) Raman-spektruma, a csúcsoknál a zárójel jelöli, hogy a DNS-re karakterisztikus csúcs melyik bázishoz tartozik

A target DNS hozzáadását és kötődését követően ismételt felvettem az optikai spektrumokat is, ezek azonban kiértékelhetetlennek bizonyultak, így LSPR szenzorként egyelőre nem alkalmazhatók. Ennek oka feltehetőleg a minták inhomogenitása, ami a Raman-spektroszkópiás méréseket is megnehezítette.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásom során különböző élhosszúságú arany nanoprizmákat állítottam elő, optikai spektroszkópiás és pásztázó elektronmikroszkópiás módszerekkel karakterizáltam a mintákat, majd sikeresen immobilizáltam őket üvegfelületen. Az így létrehozott szenzorelemekhez próba DNS-t rögzítettem és kimutattam a jelenlétüket Raman-spektroszkópiával.

A szintézis során javítottam a minták polidiszperzitását és növeltem a prizma arányát, valamint meghatároztam a szenzoros alkalmazás

szempontjából optimális méretet (40-es minták). Ezek az élhossz – és ezáltal a szenzitivitás – maximalizálása mellett nem növelik a spektrális csúcsok félértékszélességét.

Az immobilizálást a pH eltolását követően sikeresen véghez vittem, azonban csak inhomogén felületet tudtam létrehozni, ez további fejlesztést igényel. Ebből adódóan a DNS detektálás LSPR-rel nem történt meg, azonban a próba DNS jelenlétét Raman-spektroszkópia segítségével kimutattam.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] K. M. Mayer and J. H. Hafner, “Localized surface plasmon resonance sensors,” *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 6, pp. 3828–3857, Jun. 08, 2011. doi: 10.1021/cr100313v.
- [2] J. F. Masson, “Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors,” *Analyst*, 2020, doi: 10.1039/D0AN00316F.
- [3] J. J. Mock, D. R. Smith, and S. Schultz, “Local refractive index dependence of plasmon resonance spectra from individual nanoparticles,” *Nano Lett*, vol. 3, no. 4, pp. 485–491, Apr. 2003, doi: 10.1021/nl0340475.
- [4] A. Selmani, D. Kovačević, and K. Bohinc, “Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond,” *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 303, p. 102640, May 2022, doi: 10.1016/j.cis.2022.102640.
- [5] E. Podlesnaia, A. Csáki, and W. Fritzsche, “Time optimization of seed-mediated gold nanotriangle synthesis based on kinetic studies,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 4, 2021, doi: 10.3390/nano11041049.
- [6] C. J. Addison and A. G. Brolo, “Nanoparticle-containing structures as a substrate for surface-enhanced raman scattering,” *Langmuir*, vol. 22, no. 21, pp. 8696–8702, Oct. 2006, doi: 10.1021/la061598c.