

طیف سنجی رامان ارتقا یافته سطحی سرم خون با تکنیک انباشت قطره ای

هادی روحبخش منادی اول، سهراب احمدی، محمد جعفری، ناهید فرخاری، محمداسماعیل زاده اقدام

گروه فوتونیک، پژوهشکده فیزیک کاربردی و ستاره شناسی، دانشگاه تبریز

تهران، مرکز ملی علوم و فنون لیزر ایران

چکیده - در این مقاله، ارتقاء طیف رامان سرم خون بر مبنای تشدید پلاسمون های سطحی و با استفاده از نانوذرات کلونیدی به روش انباشت قطره ای گزارش شده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که علاوه بر کاهش قابل ملاحظه فلورسانس پس زمینه، شدت باندهای طیف رامان تا ۳۰ برابر نسبت به طیف رامان معمولی سرم خون تقویت شده است. قابلیت این تکنیک در آشکارسازی طیف رامان نمونه های بیولوژیکی، بویژه مایعات زیستی بدن، حتی با غلظت کم است. از این روش می توان برای مطالعه غلظت ترکیبات مختلف موجود در سرم خون استفاده کرد.

کلید واژه- انباشت قطره ای، طیف سنجی رامان، SERS، کلونید نقره، سرم خون

Surface enhanced Raman spectroscopy of blood serum by drop coating deposition technique

H.Roohbakhsh, S.Ahmadi, M.Jafari, N.Farkhari, M.Esmaeilzadeh aghdam

Department of photonics, Tabriz University, Tabriz

Iranian national laser center

Abstract- In this paper the surface- enhanced Raman spectroscopy (SERS) of blood serum is reported which was done with drop coating deposition technique. The results show that not only the fluorescence background is decreased significantly but (also) the intensity of Raman peaks is enhanced by the factor of 30 that shows the capability of this method in Raman spectroscopy of biological samples in particular the biofluids. This technique can be used in studying the concentration of blood serum different contents.

Keywords: raman spectroscopy, SERS, drop coating deposition, silver colloid, serum of blood

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

۱- مقدمه

طیف‌سنجی رامان روش مناسبی برای شناسایی ترکیبات و ساختار مواد است. از این روش در تشخیص و آشکارسازی ترکیبات در سطوح مولکولی استفاده می‌شود [1]. با استفاده از طیف‌سنجی رامان و به منظور کاربرد در تحقیقات پزشکی، می‌توان ساختار بافت‌های انسانی و سلولها را در سطوح مولکولی، مطالعه و شناسایی کرد و تغییرات مولفه‌هایی چون DNA، کربوهیدرات، پروتئین و چربی‌های موجود در بافت را مورد بررسی و پایش قرار داد. در سال‌های اخیر، پتانسیل بالای این روش برای تشخیص سرطان، توجه خاصی را به خود جلب کرده است [2,3]. بررسی ترکیبات شیمیایی و پیوندهای موجود در نمونه‌های سالم و سرطانی سرم خون با استفاده از طیف رامان و مقایسه آنها با هم، به عنوان روشی موثر در تشخیص و درمان به کار گرفته می‌شود [4]. به دلیل وجود فلورفورهای طبیعی در ساختار نمونه‌های بیولوژیکی، از جمله سرم خون، طیف رامان این نمونه‌ها اغلب همراه با پس زمینه‌ی فلورسانس شدید و گسترده‌ای است که آشکارسازی باندهای مخصوص طیف رامان را با مشکل مواجه می‌کند. لذا از روشهای مختلفی برای تضعیف فلورسانس و ارتقاء سیگنال رامان استفاده می‌شود [5]. یک روش قدرتمند برای این منظور، استفاده از خاصیت تشدید پلاسمون سطحی (SERS) است. در این تکنیک، مولکول مورد بررسی را به ذرات با ابعاد نانومتری و یا سطحی با زبری نانومتری نزدیک می‌کنند. در اثر این مجاورت، سیگنال رامان مولکول مورد نظر، به واسطه تشدید پلاسمون در سطح نانوساختار، از مرتبه 10^{-6} تا 10^{-10} برابر تقویت می‌شود [6]. زیرلایه‌های SERS می‌تواند شامل هر فلز یا نانو ساختار فلزی باشد که بتواند میدان را تقویت کند و معمولاً شامل موارد زیر است:

۱. نانو ذرات فلزی در محلول (کلوئید)

۲. ساختار فلزی تخت یا آرایه ای از نانوذرات

فلزی لایه‌نشانی شده بر روی سطح تخت از

جنس شیشه یا سیلیکون

۳. الکترودهای فلزی در الکتروشیمی (زبر و

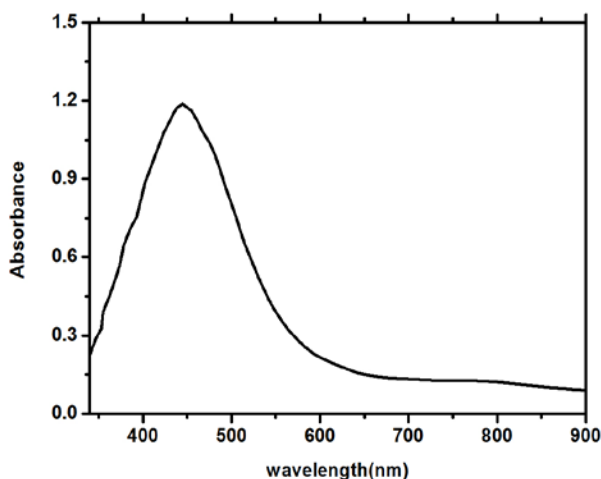
ناهموار)

ذرات فلزی طلا، نقره و مس با ابعاد ۱۰ تا ۸۰ نانومتر برای این کار مناسب هستند. تکنیک SERS علاوه بر

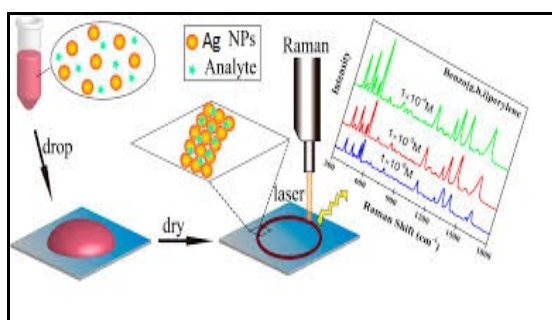
افزایش سیگنال رامان، فلورسانس پس زمینه را نیز کاهش می‌دهد. در این مقاله به بررسی تقویت سیگنال رامان سرم خون با روش انباشت قطره ای با استفاده از کلوئید نقره می‌پردازیم. نتایج نشان می‌دهد که سیگنال رامان نمونه تا ۳۰ برابر تقویت می‌شود. از این روش کم‌هزینه و ساده می‌توان برای بررسی طیف رامان مایعات زیستی بدن، حتی با غلظتهای بسیار پایین، استفاده کرد.

۲- آماده سازی نمونه و پردازش داده ها

برای ساخت نانو ذرات نقره از روش لی و میسل استفاده شد [7]. در این روش کاهش نیترات نقره در حضور سدیم سیترات رخ می‌دهد. کلوئید حاصل به مدت چند هفته پایدار است. شکل ۱ طیف جذبی کلوئید نقره تولید شده را نشان می‌دهد که دارای بیشینه‌ای در ۴۴۵ نانومتر است.



شکل ۱: طیف جذبی کلوئید نقره با بیشینه‌ی جذب در ۴۴۵ نانومتر



شکل ۲: نمایی شماتیک از طیف‌سنجی رامان اتقا یافته به وسیله انباشت قطره ای

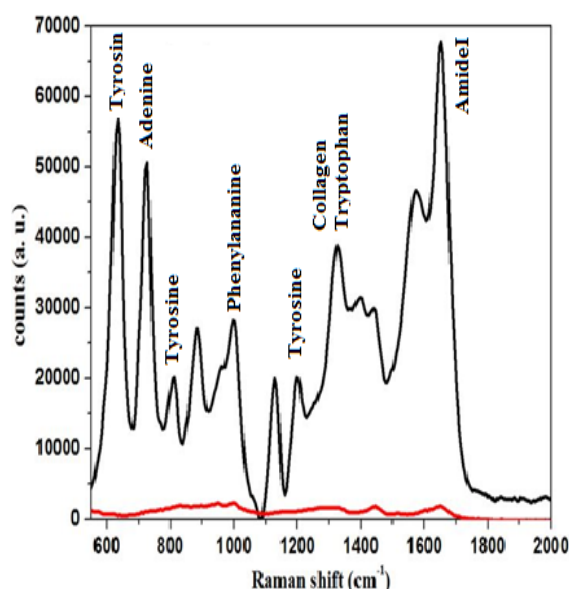
وجود تنها یک قله در طیف جذبی کلوئید، نشان می‌دهد که نانوذرات کروی یا شبه کروی هستند. برای ساخت زیر لایه، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از کلوئید نقره بر روی فویل آلومینیوم با ابعاد ۵×۵ میلی‌متر انباشته شد. کلوئید نقره در دمای اتاق و بدون هیچ ارتعاشی به مدت یک ساعت

مجموعه‌ی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بر عهده آن است. سرم خون شامل پروتئین، آنتی ژن، آنتی بادی، آنزیم و الکترولیت‌های مختلفی است که میزان و تغییرات هر کدام از آنها می‌تواند معیار مناسبی برای تشخیص بیماری و یا ناهنجاری باشد. جدول ۱ حاوی اطلاعات طیف رامان سرم خون و مد ارتعاشی مربوط به آن است. تفاوت شدت و ویژگی‌های طیف سرم خون سالم و سرطانی در کارهای متعددی گزارش شده است. برای مثال شدت مد ارتعاشی 1655 cm^{-1} سرم خون سرطانی نسبت به غیرسرطانی، که مربوط به باند رامان Amide I در پروتئین α -Helix و آلبومین سرم است، کاهش پیدا می‌کند. [8]. همچنین می‌توان به راحتی غلظت سایر مولکول‌های موجود در سرم خون را با هم مقایسه کرده و از تغییرات در سطح مولکولی آگاه شد. از مزیت‌های دیگر این روش طیف‌سنجی در غلظت‌های بسیار پایین و آشکارسازی در حد تغییرات مولکولی و سهولت آن است.

	Raman shift (cm^{-1})	Raman mode	Major Assignment
1	638	ϑ (C-S)	Tyrosine
2	725	δ (C-H)	Adenine
3	823	Ringbreathing	Tyrosine
4	881	δ (ring)	Tryptophan
5	1004	ϑ_s (C-C)	Phenylalanine
6	1074	ϑ (C-C)	phospholipids
7	1206	Ring vibration	Tyrosine
8	1322	CH_3CH_2 twisting	Collagen Tryptophan
9	1365	-----	Tryptophan
10	1655	ϑ (C-O)	AmideI

جدول ۱: مدهای رامان سرم خون [9]

خشک شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر سرم خون با شرایط مشابه به مدت نیم ساعت بر روی زیر لایه قرار گرفت. برای انجام آزمایش‌ها و ثبت طیف رامان از دستگاه طیف‌سنج رامان فیبری با توان تفکیک 8 cm^{-1} و لیزر ۷۸۵ نانومتر و پروب فیبری مخصوص این طول موج استفاده شد. مدت جمع‌آوری سیگنال ۲۰ ثانیه و توان لیزر ۳۲۰ میلی وات بود. همچنین به منظور مقایسه طیف رامان عادی سرم خون در شرایط نمونه‌گیری مشابه، از سلول کوارتز و نگهدارنده مخصوص استفاده شد. برای ثبت بهترین ارتقاء طیف رامان، آزمایش در نسبت غلظت‌های متفاوت تکرار شد و بهترین نتیجه به ازای نسبت ۱ به ۱ نقره و سرم حاصل شد. در شکل ۳ طیف رامان ارتقا یافته و عادی سرم خون، بعد از حذف پس زمینه فلورسانس با الگوریتم چندجمله‌ای رسم شده‌است.



شکل ۳: طیف‌های رامان عادی (منحنی قرمز) و طیف SERS (سیاه) سرم خون

۳- نتایج و بحث

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود طیف رامان در حالت ارتقا یافته و معمولی با هم مقایسه شده‌اند. از آنجا که در طیف رامان ارتقا یافته، مدهای ارتعاشی به طور چشمگیری تقویت می‌شوند، بنابراین این روش می‌تواند تغییرات مولکولی را با دقت بالایی تشخیص دهد و در امر تشخیص پزشکی مفید واقع شود. ترکیبات موجود در خون می‌تواند شاخصی از کارکرد متابولیسم بدن باشد که

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش طیف رامان ارتقایافته سرم خون بررسی شد. این روش گامی موثر در جهت بررسی ترکیبات خون و تشخیص بیماری به روشی غیرمخرب است. کلونید نقره به روش ساده انباشت قطره‌ای به عنوان عامل ارتقا دهنده سیگنال رامان معرفی شد. نتایج نشان می‌دهند که سیگنال رامان در حدود ۳۰ برابر تقویت شده است. این روش علاوه بر سادگی، طیف سنجی مایعات زیستی بدن را با غلظت بسیار پایین میسر می‌سازد.

۵- مراجع

- [1] L. A. K. Staveley, "The Characterization of Chemical Purity: Organic Compounds", the inorganic chemistry laboratory university of oxford, 1971
- [2] Kenny Kong, Catherine Kendall, Nicholas Stone, Ioan Nottingher "Raman spectroscopy for medical diagnostics From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection", Volume 89, 15 July 2015, Pages 121–134
- [3] Katherine A. Bakeev, Robert Thomas, Robert Chimenti, Michael Claybourn, "The Use of Raman Spectroscopy in Cancer Diagnostics" Spectroscopy Volume 28, Issue 9 Sep 01, 2013
- [4] Alois Bonifacio, Silvia Dalla Marta, Riccardo Spizzo, Silvia Cervo, Agostino Steffan, "Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study", Anal Bioanal Chem (2014) 406:2355–2365
- [5] Ewen Smith, Geoffrey Dent, "Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach", Wiley, 2005
- [6] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan. "Raman electrode." Chem. Phys. spectra of pyridine adsorbed at a silver Lett., 26, 1974, p.163–66
- [7] S. L. Smitha, K. M. Nissamudeen, D. Philip, K. G. Gopchandran, Spectrochimia Acta Part A, 71 (2008) 186-190.
- [8] R. Liu, X. Zi, Y. Kang, M. Si, and Y. Wu, "Surface-enhanced Raman scattering study of human serum on PVA Ag nanofilm prepared by using electrostatic self-assembly," J. Raman Spectrosc 42 (2), 137-144 (2011).