



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA FOTON-UPKONVERZNÍCH NANOČÁSTIC A  
JEJICH VYUŽITÍ V IMUNOCHEMICKÝCH METODÁCH**

PREPARATION OF PHOTON-UPCONVERTING NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATION IN  
IMMUNOCHEMICAL METHODS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Julie Weisová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Mgr. Antonín Hlaváček, Ph.D.**

**BRNO 2023**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1829/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Julie Weisová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biochemická technologie  
Vedoucí práce: **Mgr. Antonín Hlaváček, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Příprava foton–upkonverzních nanočástic a jejich využití v imunochemických metodách

### Zadání bakalářské práce:

- popište jev fotonové upkonverze, syntézu foton–upkonverzních nanočástic, jejich povrchovou modifikací a využití těchto částic v imunochemických metodách.
- enkapsulujte připravené nanočástice v prostředí mikroemulze do polymerního obalu
- otestujte použití připravených nanočástic v imunochemickém stanovení aflatoxinu B1 ve vybraných vzorcích cereálií.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Julie Weisová  
studentka

-----  
Mgr. Antonín Hlaváček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá popisem mechanismů fotonové upkonverze a imunochemických metod, dále syntézou foton-upkonverzních nanočástic s obsahem thulia v nevodných rozpouštědlech a úpravou jejich povrchu pro biologické aplikace – zavádí nový postup enkapsulace do polyakrylového nanogelu v prostředí mikroemulze. Modifikované nanočástice jsou následně konjugovány s proteiny a aplikovány v imunochemickém stanovení aflatoxinu B1 ve vzorcích ovesných vloček.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis describes photon-upconversion luminescence, immunochemical methods, the synthesis of thulium-doped photon-upconversion nanoparticles in hydrophobic solvents, and their surface modification for biological applications. A new method for encapsulating nanoparticles in a polyacrylic nanogel by using a microemulsion synthesis is introduced. Nanogel-encapsulated nanoparticles are conjugated with proteins and applied in the immunochemical assay of aflatoxin B1 in oatmeal samples.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

fotonová upkonverze, foton-upkonverzní nanočástice, nanogely, imunochemické metody, aflatoxin B1

## **KEY WORDS**

photon-upconversion, photon-upconversion nanoparticles, nanogels, immunochemical methods, aflatoxin B1

WEISOVÁ, Julie. *Příprava foton-upkonverzních nanočástic a jejich využití v imunochemických metodách* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-21]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/150120>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Mgr. Antonín Hlaváček, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Julie Weisová

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří panu Mgr. Antonínu Hlaváčkovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za vloženou důvěru, předané zkušenosti, trpělivost a čas, který mi nejen v průběhu psaní této práce věnoval.

## OBSAH

|          |                                               |    |
|----------|-----------------------------------------------|----|
| 1        | ÚVOD                                          |    |
| 2        | TEORETICKÁ ČÁST                               | 8  |
| 2.1.     | Fotonová upkonverze                           | 8  |
| 2.2.     | Struktura foton-upkonverzních nanočástic      | 9  |
| 2.3.     | Syntéza foton-upkonverzních nanočástic        | 9  |
| 2.4.     | Povrchové modifikace a enkapsulace UCNP       | 10 |
| 2.5.     | Biologické zobrazování pomocí UCNP            | 11 |
| 2.6.     | Imunochemické metody                          | 11 |
| 2.6.1.   | Protilátky                                    | 11 |
| 2.6.2.   | Antigeny                                      | 11 |
| 2.7.     | Imunoanalytické metody se značenými reaktanty | 12 |
| 2.7.1.   | Luminiscenční značky                          | 12 |
| 2.7.2.   | Enzymová imunoanalýza                         | 12 |
| 2.7.2.1. | Princip metody ELISA                          | 13 |
| 2.7.2.2. | Přímá ELISA                                   | 13 |
| 2.7.2.3. | Nepřímá ELISA                                 | 13 |
| 2.7.2.4. | Sendvičová ELISA                              | 13 |
| 2.7.2.5. | Kompetitivní ELISA                            | 13 |
| 2.7.2.6. | Lateral flow (immuno)assay (LFIA)             | 14 |
| 2.7.2.7. | Princip LFIA                                  | 14 |
| 2.8.     | První spojení UCNP a imunochemických metod    | 15 |
| 2.9.     | Upconversion-Linked Immunosorbent Assay       | 15 |
| 2.10.    | LFA se značením UCNP                          | 16 |
| 2.11.    | Značení UCNP v potravinářských aplikacích     | 16 |
| 3        | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST                           | 17 |
| 3.1.     | Chemikálie                                    | 17 |
| 3.2.     | Přístrojové vybavení                          | 18 |
| 3.3.     | Metody                                        | 19 |
| 3.3.1.   | Syntéza UCNP                                  | 19 |
| 3.3.2.   | Syntéza core UCNP                             | 19 |
| 3.3.3.   | Příprava prekurzorů pro core-shell UCNP       | 19 |
| 3.3.4.   | Syntéza core-shell UCNP                       | 20 |
| 3.3.5.   | Purifikace UCNP                               | 20 |
| 3.3.6.   | Charakterizace UCNP                           | 20 |

|         |                                                                          |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.7.  | Syntéza polymerního obalu .....                                          | 20 |
| 3.3.8.  | Stanovení počtu karboxylátových skupin na povrchu UCNP-nanogelů .....    | 21 |
| 3.3.9.  | Stanovení velikosti pomocí TEM .....                                     | 22 |
| 3.3.10. | Stanovení molární koncentrace.....                                       | 22 |
| 3.3.11. | Horizontální gelová elektroforéza .....                                  | 22 |
| 3.3.12. | Emisní spektra .....                                                     | 22 |
| 3.3.13. | Syntéza biokonjugátů.....                                                | 22 |
| 3.3.14. | Test bioafinity připravených konjugátů.....                              | 23 |
| 3.3.15. | Příprava vzorků ovesných vloček pro stanovení aflatoxinu B1 .....        | 23 |
| 3.3.16. | Nepřímá kompetitivní ULISA pro stanovení aflatoxinu B1.....              | 24 |
| 4       | VÝSLEDKY A DISKUZE.....                                                  | 27 |
| 4.1.    | Syntéza a charakterizace UCNP-nanogelů pro imunochemická stanovení ..... | 27 |
| 4.2.    | Nepřímá kompetitivní ULISA pro stanovení aflatoxinu B1 .....             | 31 |
| 5       | ZÁVĚR.....                                                               | 36 |
| 6       | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....                                             | 37 |
| 7       | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....                                           | 40 |

# 1 ÚVOD

Fotonová upkonverze byla poprvé popsána r. 1966 francouzským vědcem François Auzelem a první metody pro syntézu nanočástic, které tento jev vykazovaly, se objevily již v 70. letech. Dříve se takové materiály označovaly pojmem „foton-upkonverzní luminofory“ (*photon-upconversion phosphors*). Dnes se můžeme setkat s celou řadou postupů pro syntézu tzv. foton-upkonverzních nanočástic (*angl.* UCNP), které nacházejí široké uplatnění především jako luminiscenční značky. Jsou využívány v oblastech výzkumu jako je theranostika a cílený transport léčiv, radioterapie, imunoanalytické metody, histologie apod. Přestože kvantové výtěžky UCNP jsou v řádu jednotek procent, představují pro epifluorescenční mikroskopii kvalitní luminiscenční značky ve smyslu vysoké fotostability a variability barevné emise. Mezi významné vlastnosti foton-upkonverzních nanočástic patří úzké emisní pásy a nízké pozadí autofluorescence většiny vzorků. Mimo jiné nabízejí možnost stanovení více analytů současně, tzv. multiplexingu.

Tato bakalářská práce zkoumá využití foton up-konverzních nanočástic v imunochemických metodách. V teoretické části popisuje princip jevu fotonové-upkonverze, syntézu foton-upkonverzních nanočástic a možnosti jejich povrchové modifikace pro biologické aplikace. Dále se zabývá základním principem a rozdělením imunochemických metod. Spojení mezi oběma tématy nalézá v imunoanalytických metodách, kde jako luminiscenčních značky vystupují UCNP. Přestože imunoanalytické metody se značením UCNP již byly využity ke stanovení patogenů, antibiotik, pesticidů, potravinářsky významných látek a kontaminantů, nejsou zatím součástí běžné laboratorní praxe. Velká výhoda imunoanalytických komerčních kitů (zejména metody ELISA a rychlých diagnostických testů) spočívá v jejich optimalizaci pro konkrétní stanovení a dobré dostupnosti. Nicméně, použitím značení UCNP je možné dosáhnout nižších limitů detekce a rychlejších stanovení než u výše zmíněných metod.

Cílem praktické části práce je připravit a popsat syntézu kvalitního hydrofilního obalu UCNP na bázi polyakrylátových gelů v prostředí mikroemulze. Tento obal poskytuje flexibilní systém pro biokonjugaci UCNP s proteiny i malými molekulami. Vhodnost využití takového detekčního systému je nejprve otestována v experimentu s přímým stanovením počtu vzniklých bioafinitních komplexů na mikrotitrační destičce a poté je využíván v nepřímém kompetitivním imunostanovení aflatoxinu B1 v reálných vzorcích.

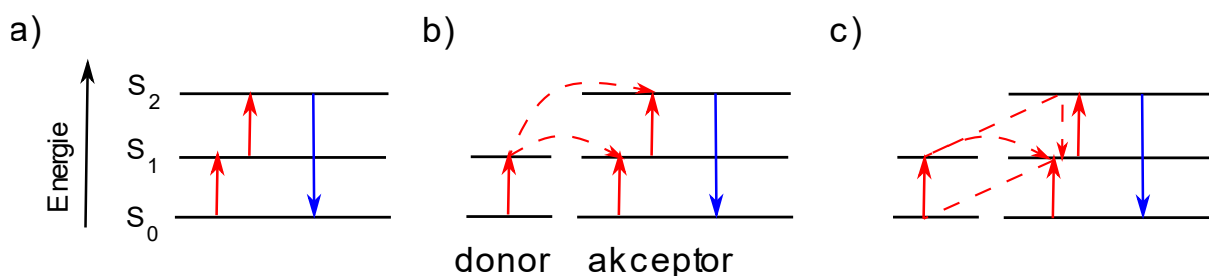
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Fotonová upkonverze

Fotonová-upkonverze je typ fotoluminiscence, při kterém vede absorpce dvou nebo více fotonů k emisi při kratších vlnových délkách. Tento typ emise, kdy mají absorbované fotony nižší energii než fotony emitované, se označuje jako anti-Stokesova (neboť nerespektuje Stokesův zákon). Nejúčinnější fotonová upkonverze se projevuje v pevných materiálech dopovaných prvky vzácných zemin. Ionty lanthanoidů se vyznačují schopností setrvat ve svém excitovaném stavu v rozsahu od mikrosekund po milisekundy [1-3]. Podle mechanismu fotonové upkonverze jsou rozlišovány 3 základní druhy (Obr. 1): absorpce v excitovaném stavu (**excited-state absorption, ESA**) upkonverze s přenosem energie (**energy-transfer upconversion, ETU**) a fotonová lavina (**photon avalanche, PA**).<sup>a</sup>

V případě ESA jsou k excitaci elektronů na energetickou hladinu, ze které může být emitováno záření kratší vlnové délky, absorbovány alespoň 2 fotony. Dochází ke konverzi jejich energie a následkem je emise záření o vyšší energii (resp. s kratší vlnovou délkou). Některé ionty kovů vzácných zemin, např.  $\text{Pr}^{3+}$ , mají schopnost generovat modrou, zelenou i červenou emisi ze stejné energetické hladiny [4]. V mechanismu ETU je iontem akceptoru (aktivátoru) absorbován pouze 1 foton, příčinou jeho vysoko-excitovaného stavu je přenos energie z okolních iontů (donorů nebo senzitizerů) na tento již excitovaný iont [5]. Nejúčinnější upkonverzi projevují  $\text{NaYF}_4$  krystaly dopované  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  a  $\text{Tm}^{3+}$ , které byly představeny již v sedmdesátých letech minulého století [2-3]. V Experimentální části je popsána příprava foton-upkonverzních nanočástic (UCNP) tohoto typu o složení  $\text{NaY}_{0,80}\text{Yb}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4$ . V těchto UCNP se uplatňuje především mechanismus ETU, kde ionty  $\text{Yb}^{3+}$  jsou donorem a ionty  $\text{Tm}^{3+}$  akceptorem energie.

Fenomén laviny se objevuje, jestliže absorpce fotonů vede k řetězové reakci mechanismu ESA a zároveň cross-relaxaci mezi ionty (tzn. excitační energie z jednoho iontu je částečně přenesena na sousední ion). Proces vede k emisi mnoha upkonvertovaných fotonů [6]. Na tomto principu staví především foton-upkonverzní lasery, v největší míře se princip PA uplatňuje v krystalech dopovaných  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$  [4].



Obr. 1: Schéma fotonové upkonverze. Mechanismus a) ESA b) ETU a c) PA.

<sup>a</sup> Někdy je pojem fotonová upkonverze používán pro vyjádření důsledku těchto mechanismů, tedy konverze dlouhovlnného záření na krátkovlnné. Někdy je použit pro mechanismus samotný.

## 2.2. Struktura foton-upkonverzních nanočástic

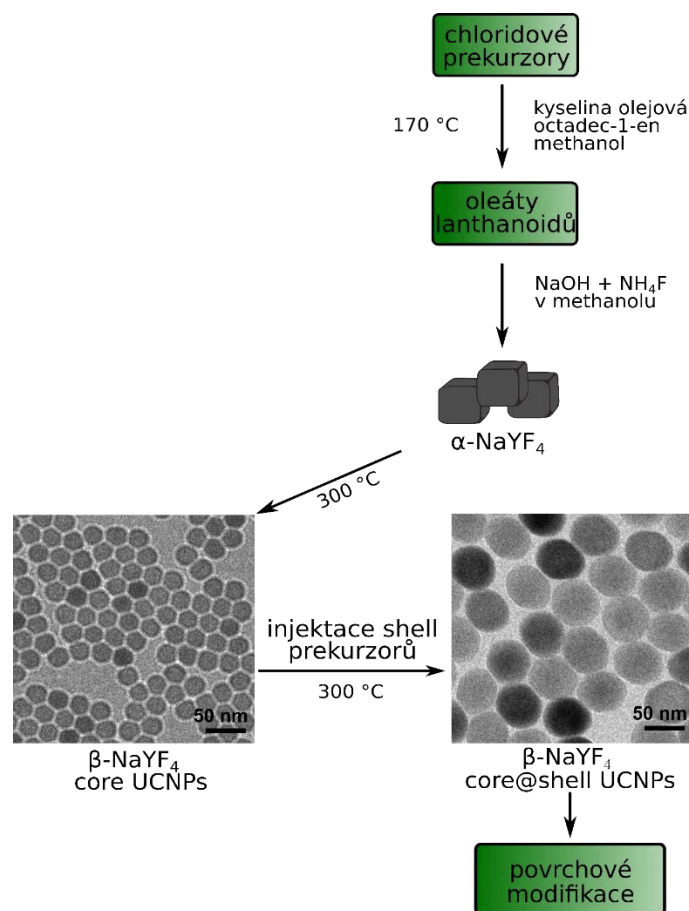
Nanočástice obecně reprezentují různé druhy materiálů do velikosti pod 100 nm. Foton-upkonverzní nanočástice jsou krystalické struktury tvořené maticí  $\text{NaReF}_4$  (Re = kovy vzácných zemin), kde kovy vzácných zemin nejčastěji zastupují např.  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  a  $\text{Tm}^{3+}$ . Krystalová soustava UCNP je dána průběhem syntézy; z tvarů nanokrystalů jsou zastoupeny krychle, tyčinky, hexagonální krystaly aj. Struktura UCNP se označuje termínem core-shell. Základ nanočástice tvoří jádro  $\text{NaReF}_4$  (*angl.* core) a na něm je následně vytvořena jedna nebo více obalových vrstev neboli slupek (*angl.* shell) z vhodného materiálu. Idea pro vytvoření právě core-shell struktury foton-upkonverzních nanočástic byla inspirována studiem kvantových teček (QDs). Obsah lanthanoidů v těchto nanokrystalech je nutnou podmínkou pro proces fotonové upkonverze. Chemie materiálů již vytvořila širokou škálu tzv. core-shell nanočástic z ušlechtilých kovů, polovodičů, ferromagnetických látek, polymerů a kombinací různých materiálů. Ovšem velká část těchto struktur nemůže poskytovat fotonovou upkonverzi, protože jsou s lanthanoidy chemicky nekompatibilní. Konkrétně fluoridy jsou používány, neboť mohou pojmout vysoké koncentrace lanthanoidů, jimiž jsou dopovány, a navíc disponují vysokou chemickou a tepelnou stabilitou [1]. Jednou z výhod UCNP je kontrola nad jejich barevnou emisí. Vlnovou délku emise (resp. barvu) můžeme ovlivnit zvolenou kompozicí nanočástice. Vliv má jak druh, tak koncentrace zvolených lanthanoidů. Intenzitu emise lze zvýšit nárůstem velikosti jádra a/nebo přidávkem obalových vrstev o jiném vhodném složení [1].

## 2.3. Syntéza foton-upkonverzních nanočástic

Kvalitní upkonverzní nanočástice jsou syntetizovány v nevodných rozpouštědlech. Během syntézy se nejprve objevuje jejich  $\alpha$ -forma, jejíž krystaly se za vyšších teplot rozpustí a vznikne  $\beta$ -forma UCNP [1]. Jedna z nepoužívanějších metod syntézy UCNP je tzv. termální dekompozice, která bude také uplatněna v Experimentální části (Obr. 2).

Tato metoda syntézy je založena na termolýze trifluoroacetátů nebo chloridů kovů vzácných zemin. Tyto prekurzory jsou připravovány reakcí komerčně dostupných oxidů lanthanoidů a příslušné kyseliny. Vzniklé soli se zahřejí ve směsi vysokovroucích rozpouštědel, jako je kyselina olejová a oktadec-1-en pod inertní atmosférou Ar nebo  $\text{N}_2$ . Syntéza samotných UCNP nastává při teplotách kolem 300 °C, přičemž tento proces trvá 1-2 hodiny. Po zchladnutí reakční směsi se jádra UCNP vysráží ze směsi isopropanolem a pelet se promyje methanolem pro odstranění zbytků reakční směsi. Purifikované nanočástice se uchovávají dispergované nejčastěji v cyklohexanu nebo chloroformu při laboratorní teplotě.

Pro syntézu obalových vrstev jsou buď přímo po syntéze jader injektovány do reakční směsi prekurzory s požadovaným složením solí  $\text{Re}^{3+}$ , nebo jsou UCNP nejprve purifikovány, znovu zahřáty ve směsi rozpouštědel a až poté jsou k nim přidávány prekurzory. Na jádru NP lze vytvořit i více obalových vrstev za vzniku tzv. multishelled NP. Syntéza umožňuje precizní kontrolu tloušťky vytvářených vrstev díky malým postupným přídávám prekurzorů o známé koncentraci [1]. Na obrázku níže je znázorněn příklad průběhu syntézy UCNP.



Obr. 2: Průběh syntézy UCNP z chloridových prekurzorů.

## 2.4. Povrchové modifikace a enkapsulace UCNP

Po syntéze je kyselina olejová silně vázána karboxylovými skupinami k iontům lanthanoidů, z toho důvodu jsou UCNP hydrofobní - ve vodě agregují a to je činí nevhodnými pro biologické aplikace. Ke spojení imunochemických metod a detekce pomocí UCNP je jejich dispergace ve vodném prostředí zásadní. Vhodné povrchové modifikace zahrnují zejména úplné odstranění ligandů, jejich oxidaci, záměnu (*ligand exchange*), pokrývání (*coating*) nebo také enkapsulaci celých nanočástic. Výhodou využití enkapsulace je zvýšení koloidní stability modifikovaných UCNP [7].

Typická metoda enkapsulace je tzv. silanizace, tj. syntéza hydrofilního polymerního obalu hydratovaného oxidu křemičitého. Nejpoužívanější postupy silanizace jsou Stöberova metoda a metoda s tvorbou reverzních micel. Zatímco Stöberova metoda se používá u již hydrofilních nanokrystalů, u hydrofobních UCNP pokrytých oleáty je potřeba použití mikroemulze. K nanočásticím dispergovaných v cyklohexanu jsou přidány surfaktanty (např. Igepal) a následně tetraethyl-orthosilikát (TEOS). Polymerní vrstva se vytvoří na povrchu UCNP díky amoniakem katalyzované hydrolyze TEOS a následné polymeraci. Podle molárního množství přidaného TEOS lze ovlivnit tloušťku vzniklé vrstvy. Zároveň funkční skupiny na takto modifikovaném povrchu umožňují biokonjugace s dalšími molekulami. NP se silikátovým obalem jsou chemicky stabilní a vykazují nižší cytotoxicitu než UCNP bez modifikace. Nicméně, silikátová vrstva může snižovat účinnost fotonové upkonverze a ve vodném prostředí podléhá disociaci [5, 8-9].

Mezi jiné polymery, které byly k enkapsulaci UCNP použity v posledních letech patří polystyren [10] a polyakrylová kyselina [11].

Nicméně při enkapsulaci UCNP do polystyrenu se do jednoho polystyrenového obalu uzavírá většinou více než jedna částice a (ani karboxylovaný) polystyren není optimálně hydrofilní materiál pro disperzi UCNP ve vodném prostředí. Kyselina polyakrylová nese limitace v podobě snížení flexibility systému, neboť omezuje reakční skupiny povrchu NP pouze na karboxyly. Vytvořením nového hydrofilního obalu bez výše zmíněných limitací se zabývá Experimentální část.

## **2.5. Biologické zobrazování pomocí UCNP**

UCNP mají nízké kvantové výtěžky v řádech jednotek procent, zatímco běžné fluorofory a kvantové tečky se blíží nebo dosahují i 100 %, např. kvantový výtěžek fluoresceinu je 95 %. Tuto nevýhodu ale překonávají řadou svých dalších vlastností. Mezi významné vlastnosti foton-upkonverzních nanočástic patří velký Stokesův posun (= velký rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou) a úzké emisní pásy, díky čemuž je omezen tzv. cross-talk efekt, který je typický pro kvantové tečky. UCNP mají větší fotostabilitu než organické fluorofory a jejich cytotoxicita může být nižší než u ostatních nanočásticových systémů [2]. K jejich excitaci postačí světlo z blízké infračervené oblasti (NIR), často je používán laser s vlnovou délkou 980 nm. NIR světlo má vysokou propustnost skrz biologické tkáně a jeho použití zaručuje, že se vyhneme autofluorescenci a fotochemickým reakcím, ke kterým může docházet při použití kratších vlnových délek [9]. Z těchto důvodů UCNP nacházejí široké uplatnění v biologickém zobrazování, např. v odvětvích biomedicíny jako je theranostika, cílený transport léčiv a radioterapie. Dále je lze efektivně využít v analytické chemii, histologii atd. [9].

## **2.6. Imunochemické metody**

Imunochemické metody jsou založeny na reakci antigenu a protilátky za vzniku tzv. imunokomplexu. Protilátka se váže k antigenu nekovalentními vazbami, tzn., že se uplatňují hydrofobní a elektrostatické interakce, vodíkové můstky a van der Waalsovy síly. Protilátka se na daný antigen váže specificky a reverzibilně. Imunochemicky lze stanovit jak antigen, tak protilátku [12]. Imunochemické metody můžeme rozdělit na 2 kategorie: imunoprecipitační a imunoanalytické. Imunoprecipitační metody jsou charakteristické tvorbou precipitujícího imunokomplexu, tzv. imunoprecipitátu. Předmětem této práce jsou druhé zmíněné – citlivější imunoanalytické metody. Jedním z jejich typů jsou tzv. metody se značenými reaktanty, kde se v současnosti zavádí značení pomocí UCNP.

### **2.6.1. Protilátky**

Protilátky jsou z chemického hlediska glykoproteiny, které jsou produkovány bílými krvinkami vyšších živočichů jako součást imunitní odpovědi. Tyto glykoproteiny nazýváme též imunoglobuliny [12]. Imunoglobuliny mají tvar písmene Y a skládají se ze dvou shodných lehkých řetězců a dvou shodných těžkých řetězců. Řetězce jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky. U savců se těžké řetězce protilátek rozdělují na 5 isotypů: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Lehké řetězce mají dvě domény – konstantní doménu a variabilní doménu. Imunoglobuliny A, D a G mají 3 konstantní a 1 variabilní doménu, imunoglobuliny E a M mají 4 konstantní domény a 1 variabilní. Schopnost tvorby dimerů a pentamerů mají IgA a IgM. Znalost struktury protilátek má význam pro jejich vývoj skrz biomedicínské inženýrství [13].

### **2.6.2. Antigeny**

Antigeny jsou látky většinou bílkovinné povahy (může se rovněž jednat o polysacharidy, nukleové kyseliny a jiné látky), které mohou být přírodního i syntetického původu. Imunitní systém tyto látky vyhodnocuje jako sobě cizí a reaguje na ně tvorbou výše

zmíněných protilátek. Protilátka se váže na antigen v místě tzv. antigenní determinanty neboli epitopu. Tento úsek molekuly má specifickou 3D strukturu a právě zde se nekovalentně váže protilátka. Antigeny, které mohou tvorbu protilátek navozovat přímo, se označují jako imunogeny. Hapteny jsou antigeny, které sami imunitní odpověď nevyvolávají, ale pro její uskutečnění se musí navázat na jinou makromolekulu – nosič. Hapteny se na nosič váží pomocí kovalentních vazeb a teprve tento komplex se stává imunogenním. Vyvolává imunitní odpověď organismu, popř. u citlivých jedinců alergickou reakci. Vazba haptenu na nosič je cíleně využívána v imunochemických metodách, kde jejím prostřednictvím vytváříme potřebné biokonjugáty, které mohou reagovat s protilátkou [14]. Příkladem běžného nosiče je hovězí sérový albumin (BSA).

## **2.7. Imunoanalytické metody se značenými reaktanty**

Jsou založené na značení analytu (antigenu nebo protilátky) pomocí látky, kterou můžeme stanovit snadněji a citlivěji než samotný imunokomplex. K tomuto značení se využívají radioizotopy (spíše zastaralé), enzymy, nebo látky vykazující některý typ fotoluminiscence, tzv. luminiscenční značky. Nejvyužívanější imunochemickou metodou patřící do této kategorie je v současnosti ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Jedná se o rychlou, jednoduchou techniku, a především jednu z nejcitlivějších metod enzymové imunochemické analýzy [15]. Enzymová imunoanalýza a princip ELISA jsou podrobněji popsány v podkapitole 2.7.2.

### **2.7.1. Luminiscenční značky**

Jako luminiscenční značky obecně lze použít materiály vykazující některý typ luminiscence. V praxi je využívána bioluminiscence (např. reakce luciferinů) a fotoluminiscence. Mezi nejběžnější fotoluminiscenční značky patří organické fluorofory vykazující fluorescenci jako jsou fluorescein a jeho deriváty, rhodaminy a BODIPY. Velikost těchto molekul je přibližně 0,5 nm. Jejich velikost je v některých aplikacích výhodou, ovšem molekuly těchto látek zpravidla podléhají světelné degradaci (*angl.* photobleaching). Jako jejich potenciální náhrada byly popsány kvantové tečky, jelikož se jedná o polovodičové nanomateriály s vysokými kvantovými výťažky i stabilitou.

Konjugáty QDs anebo UCNP s biomolekulami vzhledem k velikosti částic můžeme označit jako nanobiokonjugáty. Jejich spojení s biomolekulou je realizováno pomocí ligandů na jejich povrchu [16]. V současné době se zavádějí imunoanalytické metody se značením pomocí UCNP, neboť jejich spojení s luminiscenčními značkami umožňuje stanovení analytů s nízkými detekčními limity a bez potřeby zesilovat analytický signál, který jinak poskytuje reakce enzymu se substrátem [17]. Též nabízejí oproti QDs optické výhody, které byly zmíněny v kapitole 2.5.

### **2.7.2. Enzymová imunoanalýza**

Enzymová imunoanalýza se dělí na metody homogenní, mezi které patří např. technika EMIT<sup>®</sup> (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique) a metody heterogenní, do kterých řadíme mj. metodiku ELISA a LFIA podrobněji popsané v následujících podkapitolách.

V homogenní enzymové imunoanalýze využíváme faktu, že se enzymy stávají po navázání na protilátku inaktivní. Vzorek s analytem se smíchá s enzymovým konjugátem obsahujícím stanovovaný antigen a struktury mezi sebou soutěží o navázání na omezené množství protilátky. Enzymový konjugát navázaný na protilátku nevykazuje enzymovou aktivitu (nereaguje se substrátem) a neposkytuje žádný signál [12]. Homogenní enzymová

imunoanalýza se využívá méně často než heterogenní, jelikož je relativně drahá a méně citlivá. Hodí se ke stanovení malých množství látek, především u léčiv.

#### **2.7.2.1. Princip metody ELISA**

Obecně spočívá v zakotvení antigenu na pevný povrch materiálu (PS, PV nebo PP) mikrotitrační destičky, na který se následně naváže konjugovaná protilátka. Jako substráty pro konjugaci s protilátkou se používají enzymy, které v případě pozitivní reakce poskytují typické zabarvení. Například při použití alkalické fosfatasy a *p*-nitro-fenyl fosfátu, se pozitivní reakce barví žlutě. Při použití peroxidasy a 5-aminosalicylové kyseliny nebo *o*-fenylendiamin mají v pozitivním případě hnědou barvu [18]. Nicméně, tento krok může být časově náročný a spotřeba enzymů přináší nevýhody v podobě vysoké ceny a nároků na podmínky skladování. Výsledky jsou po reakci získány spektrofotometrickým měřením, popř. u fluoreskujících produktů fluorimetricky. Obsah analytu je určen pomocí kalibrační křivky. Níže jsou popsány 4 možná uspořádání ELISA (Obr. 3).

#### **2.7.2.2. Přímá ELISA**

Přímá ELISA spočívá v navázání protilátky (nebo antigenu) na dno jamky mikrotitrační destičky. Před každým dalším krokem se jamky promývají (washing). Volná místa na dně se zablokuje (většinou BSA). Další krok je navázání konjugátu enzymu s antigenem (nebo protilátkou). Proces inkubace vede k tvorbě komplexu antigen-protilátka. Nenavázaný konjugát se odstraní promýváním a po přidavku substrátu, resp. indikátoru se vytvoří barevný produkt [15,18].

#### **2.7.2.3. Nepřímá ELISA**

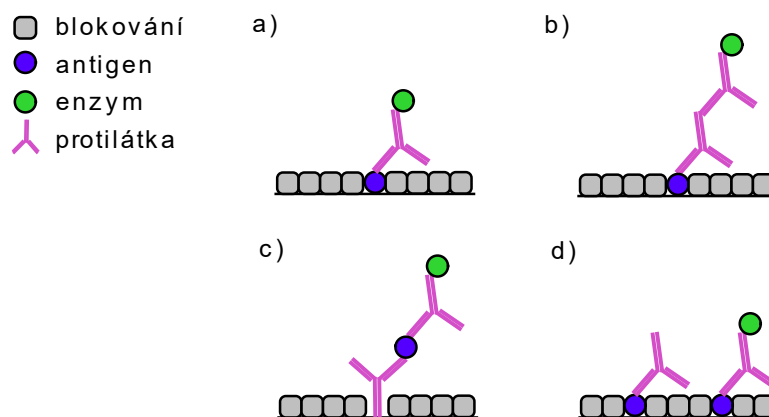
V nepřímém uspořádání se dno jamky pokryje antigenem, přidá se první protilátka a nechá se inkubovat. Přebytek protilátky se odstraní promýváním. Na první (primární) protilátku se naváže druhá (sekundární) protilátka značená enzymem. Analogicky k prvnímu případu se jamky na destičce promyjí a přidá se substrát, což vede k tvorbě barevného produktu. Nepřímá ELISA má větší citlivost než přímá z důvodu možnosti vazby více než jedné sekundární značené protilátky na primární protilátku [15].

#### **2.7.2.4. Sendvičová ELISA**

Prvním krokem sendvičového stanovení je vazba protilátky na dno jamky v mikrotitrační destičce a tvorba komplexu antigen-protilátka. Nenavázaný antigen se odstraní promýváním a volná místa se zablokuje. Do jamek se napipetuje enzymový konjugát další protilátky. Musíme proto vybrat dvě protilátky, které váží stejný antigen, ne však stejný epitop. Nadbytečný konjugát se opět odstraní promýváním a poté se dává indikátor. Nakonec probíhá enzymem katalyzovaná přeměna na barevný produkt. Sendvičová ELISA se ukázala být účinnější než její ostatní varianty [18].

#### **2.7.2.5. Kompetitivní ELISA**

Dno jamky se pokryje antigenem specifickým pro protilátku (antibody-specific antigen) nebo protilátkou specifickou pro antigen (antigen-specific antibody). Poté se společně dává analyt a enzymový konjugát (s antigenem nebo s protilátkou). Označený a neoznačený antigen (nebo protilátka) pak „soutěží“ o navázání na strukturu, která pokrývá dno. Jamka se promyje a přidá se substrát [18]. Všechny předchozí varianty mohou být provedeny stejným způsobem jako kompetitivní ELISA [15]. Rozdíl v kompetitivní ELISA je v korelaci koncentrace analytu a intenzity signálu. Intenzivnější zabarvení značí méně analytu ve vzorku.



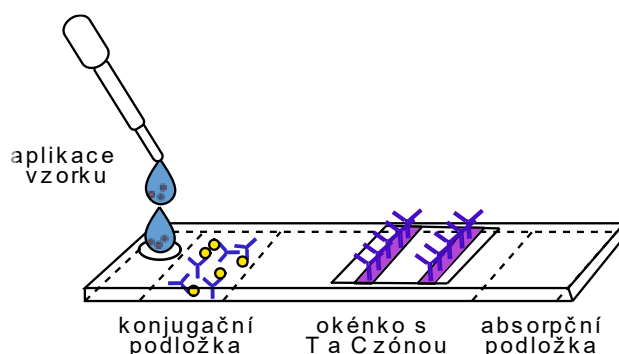
Obr. 3: Možná uspořádání ELISA: a) přímá, b) nepřímá, c) sendvičová a d) kompetitivní.

#### 2.7.2.6. Lateral flow (immuno)assay (LFIA)

Výraz můžeme přeložit jako imunostanovení v laterálním toku. V souvislosti s touto metodou se setkáváme také s termíny imunochromatografie a RDT (= rychlé diagnostické testy). LFA se využívá ke kvalitativním, semikvantitativním a někdy kvantitativním stanovením. Analytem bývají různé patogeny, léčiva, hormony a metabolity. Tyto metodiky jsou určeny jak k laboratornímu (potvrzení infekce nebo nemoci pacienta, kontaminace potravin apod.), tak k domácímu použití (těhotenské testy nebo samotestovací sady na Covid-19). Testy jsou citlivé, selektivní a jednoduché na použití. Výsledek poskytují nejpozději do 20 minut [19]. Formát eseje je srovnatelný s výše zmiňovanou enzymovou imunoanalýzou. Ke stanovení se používají proužky materiálu obsahující vysušené reagenty, které se aktivují nanesením kapalného vzorku. Vzorek nebo jeho extrakt se kape na začátek podložky, po které je následně vzorek unášen k zóně s reagenty a nakonec k absorpční podložce na konci. Hnací silou postupu po podložce je kapilární tok. Zóny s reagenty jsou označeny T (test line) a C (control line). Podložky jsou na bázi polymeru chráněného membránou např. z nitrocelulózy. Celý systém chrání plastové pouzdro pro snadnější manipulaci, uživatel vidí místo k aplikaci vzorku a oblast T a C zóny [19]. K vizualizaci T a C zón se využívají barevné nebo fluorescenční nanočástice. Nejčastěji se využívá koloidní zlato nebo latex [19]. Značení pomocí UCNP v LFA je blíže popsáno v kapitole 2.10.

#### 2.7.2.7. Princip LFIA

Těsně za místem pro aplikaci vzorku se nachází podložka s konjugáty protilátek a částic. V sendvičovém uspořádání (Obr. 4) je na T-zónu nanesena primární protilátka. Na konjugační podložce těsně za místem aplikace vzorku vzniká komplex značené sekundární protilátky a analytu, který se pak váže na T-zónu. Vzhledem k vysoké koncentraci barevných částic se zóna vizualizuje jako barevný proužek. V kompetitivním uspořádání vzniká na konjugační podložce směs značeného analytu a samostatných značených protilátek. Tyto struktury budou soutěžit o navázání na analyt imobilizovaný v T-zóně. Stejně jako u ELISA platí, že čím menší (barevný) signál získáme, tím je koncentrace analytu vyšší [19].



Obr. 4: Schéma sendvičové LFIA.

## 2.8. První spojení UCNP a imunochemických metod

První publikace, kde se se značením pomocí upkonverzních částic na běžné 96-jamkové mikrotitrační destičce setkáváme, pochází z roku 2005. Tým vědců z finské Univerzity v Turku tvořili K. Kuningas, T. Soukka, T. Rantanen, T. Lövgren a další. Upkonverzní částice byly komerčně dostupné pod označením „up-converting phosphors“ („UCP-phosphors“ nebo „anti-Stokes phosphors“). Nevýhodou UCP-luminoforů byla jejich velikost (v rámci mikrometrů) a od UCNP se lišily také svým složením. Tyto částice bylo nutné upravit mletím a připravit jejich konjugáty s biomolekulami. Tento postup byl popsán již předtím. Účelem práce Kuningase a kolektivu bylo „poprvé prezentovat simultánní měření anti-Stokesovy fotoluminiscence (...) ze samostatné mikrotitrační jamky bez vzájemného rušení těchto technologií značení“. Danou imunochemickou metodou označují jako bioafinitní stanovení (bioaffinity assay) [20-23].

## 2.9. Upconversion-Linked Immunosorbent Assay

Pojem Upconversion-Linked Immunosorbent Assay (ULISA) byl zaveden r. 2016 v publikaci A. Hlaváčka a kolektivu. Zmíněná práce představuje metodiku ULISA pro stanovení farmaceutických mikropolutantů ve vodě v kompetitivním uspořádání [17]. Jako antigen zde vystupuje léčivá látka diclofenac (DCF), protilátky jsou myší IgG. Dno mikrotitrační jamky bylo pokryto biokonjugátem BSA a analytu, resp. diclofenacu. Do jamek byla vložena sada ředění DCF a poté přidány anti-DCF protilátky. Nasednutí protilátky na antigen bylo detekováno konjugátem UCNP a proti-myší IgG sekundární protilátky. K excitaci UCNP byl použit laser s vlnovou délkou 980 nm. Obdobné uspořádání imunostanovení bude použito v Experimentální části. Použité UCNP měly v průměru ~46 nm a jejich povrch tvořila silikátová slupka, která vznikla dvojitým přidavkem tetraethyorthosilikátu (TEOS). Tato vrstva zajistila dobrou dispersibilitu ve vodě [17]. Stanovení bylo srovnáno s metodou ELISA a LC-MS. Všechny tři metody poskytly srovnatelné výsledky limitů detekce, hodnoty odchylek u ULISA byly mírně vyšší oproti referenčním metodám. Oproti tomu, její výhodou se prokázalo jednodušší a rychlejší získání analytického signálu. Podobně jako ELISA je vysoce citlivá a detekci analytu umožňuje bez signálu pozadí (matrice vzorku) [17]. V následujících pracích se již jeví ULISA jako citlivější metoda se širokým pracovním rozsahem [24, 27, 29]. Zavedené označení ULISA se také objevilo v práci Zhou a kolektivu (2021) [24] zabývající se detekcí karbohydrátového antigenu 19-9. Tento antigen je uvolňován pankreatickými rakovinnými buňkami a jeho stanovení slouží k monitoringu léčby karcinomu. V klinické praxi se pro stanovení antigenu 19-9 používá ELISA, kterou by mohla v budoucnu ULISA nahradit.

Značení pomocí UCNP se ve stanoveních objevuje často, ale název metody se liší autor od autora. Nejpočetněji se můžeme setkat s variacemi pojmu „heterogenní imunostanovení“.

## 2.10. LFA se značením UCNP

Pomocí LFA se značením UCNP (UCNP-LFA) byly již stanoveny různé chemické sloučeniny (nukleové kyseliny, proteiny, toxiny, ionty těžkých kovů) se stejnou specifitou a rychlostí jako komerční LFA se zlatými částicemi, ale s lepší citlivostí. Analytický signál UCNP lze vyhodnotit v jednoduché aplikaci smartphonu, s čímž se setkáváme u spousty publikací [25]. Značením UCNP se můžeme také vyhnout subjektivitě stanovení při čtení barevných signálů. V publikaci Martiskainen a kolektivu proto byly UCNP-LFA použity k vývoji RDT na protilátky HIV-1 a HIV-2. Autoři navíc umožnili výsledky (získané mobilní aplikací) na místě uložit do elektronické databáze. Tento postup by mohl vést ke snadnému monitorování postupů nemocí a jejich prevenci [26]. Velmi dobrou odpověď UCNP-LFA poskytla při analýzách reálných vzorků potravin s komplexní maticí, např. sušenky, párky a mléko [27].

## 2.11. Značení UCNP v potravinářských aplikacích

Značení pomocí UCNP lze použít také v monitorování kvality a bezpečnosti potravin. Při analýzách se uplatňují jak homogenní, tak heterogenní stanovení. Rizika v potravinách představují aditiva, léčiva, pesticidy, hnojiva a jiné kontaminanty jako polychlorované bifenylly (PCBs), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), těžké kovy a biotoxiny. Pro kvalitu potravin je nutné analyzovat složky jako cukry, aminokyseliny, mastné kyseliny, alkoholy, organické kyseliny apod. K tomu je potřeba analytických metod, které budou schopny detekovat nízké koncentrace rozlišných analytů – patogenů a chemikálií [27].

Stanovení nejběžnějších patogenních bakterií jako je *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes* se uskutečňuje pomocí kultivačních metod. Mají dobrou citlivost, ale analýza může být zdlouhavá. Identifikace patogenů zabere několik dní až týden [27]. Této limitaci se můžeme vyhnout použitím rychlejších imunochemických metod.

Významnou třídu kontaminantů potravin tvoří mykotoxiny. Jedná se o toxické sekundární metabolity vláknitých mikroskopických hub (plísní). V České republice jsou nařízením 1881/2006/ES stanoveny jejich nejvyšší přípustné limity v potravinách, neboť některé mykotoxiny mají za následek alimentární onemocnění, poškození jater nebo mají karcinogenní efekt. Mezi významné mykotoxiny řadíme aflatoxiny, ochratoxiny, patulin, námelové alkaloidy, fumosiny, atd. [28]. Mykotoxiny mohou být se srovnatelnými výsledky stanoveny imunochemickými a instrumentálními metodami. Nepřímá kompetitivní ELISA v porovnání s HPLC umožňuje rychlou a jednoduchou analýzu bez potřeby organických rozpouštědel. Korelační koeficient zmíněných metod je vysoký (0,97-0,98) [29]. Imunostanovení s foton-upkonverzní detekcí mohou být alternativou bez použití enzymů se srovnatelnými nebo nižšími limity detekce a možností multiplexování. Principem je příprava biokonjugátů UCNP s různě barevnou emisí a provedení stanovení. Signály všech UCNP jsou zachyceny současně pomocí kamery. Stanovení obsahu mykotoxinů v případě autorů Yanga a kolektivu probíhá vyhodnocením obrazu ve vlastní aplikaci smartphonu. Výsledek byl získán za méně než 1 minutu, přičemž LOD činil 1 ng [30]. Testy se značením UCNP byly rovněž využity ke kvantitativnímu stanovení antibiotik, pesticidů, iontů kovů ( $\text{Ag}^I$ ,  $\text{Pb}^{II}$ ,  $\text{Zn}^{II}$ ,  $\text{Hg}^{II}$  a  $\text{F}^-$ ) a dalších sloučenin [27].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Chemikálie

Tabulka 1: Chemikálie pro přípravu core-shell UCNP.

| Název                        | Čistota/složení, výrobce                                     |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Chlorid thulitý hexahydrát   | 99,99% báze stopových prvků, Sigma-Aldrich                   |
| Chlorid yttritý hexahydrát   | 99,9% báze stopových prvků, Sigma-Aldrich                    |
| Chlorid ytterbitý hexahydrát | 99,99% báze stopových prvků, Sigma-Aldrich                   |
| Oxid ytterbitý               | 99,99% báze stopových prvků, Sigma-Aldrich                   |
| Oxid yttritý                 | 99,99% báze stopových prvků, Sigma-Aldrich                   |
| Oxid thulitý                 | 99,99% báze stopových prvků, Sigma-Aldrich                   |
| Kyselina trifluorooctová     | ≥99,7%, Sigma-Aldrich                                        |
| Oktadec-1-en                 | 90%, Sigma-Aldrich                                           |
| Uhličitan sodný bezvodý      | ≥99,9%, Roth                                                 |
| Kyselina olejová             | 90%, Sigma-Aldrich                                           |
| Oleát sodný                  | >82% mastných kyselin (jako kyselina olejová); Sigma-Aldrich |
| Fluorid amonný               | >98%, Sigma-Aldrich                                          |
| Hydroxid sodný               | 98%, Penta                                                   |
| Methylalkohol                | 99,8%, Penta                                                 |
| Isopropylalkohol             | 99,5%, Penta                                                 |
| Cyklohexan                   | 99,5%, Penta                                                 |

Tabulka 2: Chemikálie pro přípravu UCNP-nanogelů.

| Název                                    | Zkratka, čistota/složení, výrobce                 |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| UCNP                                     | Dispergované v <i>n</i> -hexanu, vlastní příprava |
| Akrylamid                                | AAM, ≥99%, Sigma                                  |
| Kyselina akrylová                        | AA, 99%, Sigma                                    |
| <i>N,N'</i> -methylen-bisakrylamid       | BisAAM, Fluka                                     |
| <i>n</i> -hexan                          | 99%, Penta                                        |
| Brij® 30                                 | Acros organics                                    |
| <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin | TEMED, Sigma                                      |
| Dokusát sodný                            | AOT, ≥96,0%, Sigma                                |
| Peroxodisíran amonný                     | APS, ≥ 98 %, Roth                                 |
| Voda                                     | miliQ                                             |

Tabulka 3: Chemikálie pro přípravu biokonjugátů UCNP-nanogelů s proteiny.

| Název                 | Zkratka, čistota/složení, výrobce                                                   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| UCNP-nanogely         | Pelet po centrifugaci, vlastní příprava                                             |
| Streptavidin          | SA, Afinitně purifikovaný, Thermo Fisher Scientific                                 |
| Albumin               | Albumin frakce V, bez biotinu, Roth                                                 |
| Biotinylovaný albumin | BSA: biotin 1:2, dispergovaný ve vodě (23,3 mg ml <sup>-1</sup> ), vlastní příprava |

Tabulka 3-pokračování: Chemikálie pro přípravu biokonjugátů UCNP-nanogelů s proteiny.

|                                                            |                                                                                |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl karbodiimid hydrochlorid | EDC, Alfa Aesar, 98%                                                           |
| N-hydroxysulfosukcinimid sodný                             | S-NHS, 98%, Sigma-Aldrich                                                      |
| Kyselina 4-morpholinethansulfonová monohydrát              | MES, >99%, Sigma                                                               |
| MES pufr                                                   | 100 mM MES, 30 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH = 6,0; vlastní příprava |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan                             | Tris, 99,8%, Sigma-Aldrich                                                     |
| Tris pufr                                                  | 50 mM Tris, 50 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , vlastní příprava            |
| Voda                                                       | miliQ                                                                          |

Tabulka 4: Chemikálie k realizaci imunostanovení a gelové elektroforézy.

| Název                                     | Zkratka, čistota/složení, výrobce                                                                                                                               |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biokonjugáty UCNP-nanogelů s proteiny     | Biokonjugát streptavidinu nebo biotinylovaného albuminu, vlastní příprava                                                                                       |
| Reálné vzorky pro stanovení aflatoxinu B1 | Ovesné vločky z běžného supermarketu                                                                                                                            |
| Aflatoxin B1                              | Z <i>Aspergillus flavus</i> , Sigma-Aldrich                                                                                                                     |
| Konjugát BSA-aflatoxin B1                 | Z <i>Aspergillus flavus</i> , Sigma-Aldrich                                                                                                                     |
| Anti-aflatoxin B1 (primární) protilátka   | Králičí IgG, polyklonální, Sigma-Aldrich                                                                                                                        |
| Biotinylovaná (sekundární) protilátka     | Koží proti-myši IgG, abcam                                                                                                                                      |
| Methylalkohol                             | 99,8%, Penta                                                                                                                                                    |
| Streptavidin                              | SA, Afinitně purifikovaný, Thermo Fisher Scientific                                                                                                             |
| Streptavidin rekombinant                  | SA-R, streptavidin 500 µg ml <sup>-1</sup> in 100 mM MOPS, 70 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,05% NaN <sub>3</sub> , pH = 7,5; vlastní příprava          |
| Albumin                                   | Albumin frakce V, Roth                                                                                                                                          |
| Fosfátový pufr                            | PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05% (w/v) NaN <sub>3</sub> , vlastní příprava |
| Promývací pufr                            | PBST; PBS + 0,05% (w/v) Tween 20, vlastní příprava                                                                                                              |
| Potahovací pufr                           | 100 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 45 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH = 9,0; vlastní příprava                                                      |
| MOPS (promývací) pufr                     | 20 mM MOPS, 27 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,05% Tween 20, pH = 7,5; vlastní příprava                                                                  |
| Assay pufr                                | 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05% NaN <sub>3</sub> , 0,01% Tween 20, 0,5% BSA, pH = 7,5; vlastní příprava                                                      |
| Voda                                      | miliQ                                                                                                                                                           |
| Agarosa                                   | NEEO, ultra-quality, Roth                                                                                                                                       |
| Glycerin                                  | Bezvodý, 99,5 %, Penta                                                                                                                                          |

### 3.2. Přístrojové vybavení

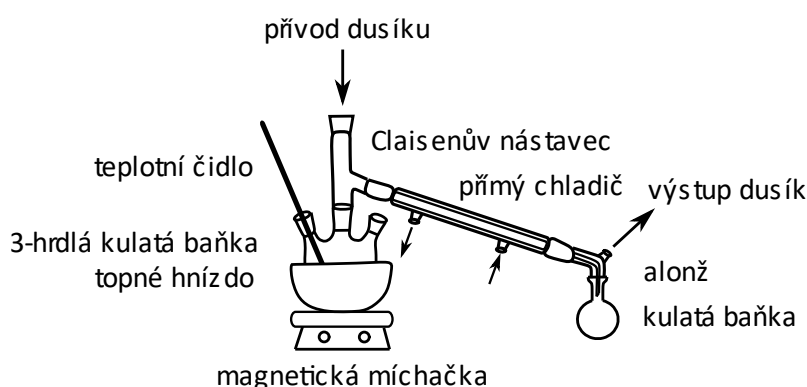
Vyhodnocení experimentálních dat probíhalo pomocí foton-upkonverzního mikroskopu a skeneru sestavených na Ústavu analytické chemie AV ČR, kde excitace UCNP byla uskutečněna 976 nm laserem. Pro charakterizaci foton-upkonverzních nanočástic byl použit spektrofotometr OceanOptics QE65 Pro, elektroforetická aparatura OWL C2-S a ZetaSizer ver.

7.01 (dynamický rozptyl světla, DLS). Mikrosnímky UCNP-nanogelů byly pořízeny transmisním skenovacím mikroskopem (dále jen TEM) Talos F200i, Thermo Fisher Scientific na Ústavu fyziky materiálů AV ČR.

### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Syntéza UCNP

Core UCNP byly připraveny metodou termální dekompozice. Jako výchozí látky byly použity chloridy lanthanoidů. Core-shell UCNP byly připraveny postupnými nástřiky zvyšujících se objemů prekurzorů (podle Tabulky 5) k horké reakční směsi. Syntéza UCNP probíhala v aparatuře napojené na inertní atmosféru  $N_2$  (viz Obr. 5), teplota reakční směsi byla snímána teplotním čidlem spojeným se softwarem, kterým byl řízen nárůst a udržování požadované teploty.



Obr. 5: Schéma aparatury pro syntézu UCNP.

#### 3.3.2. Syntéza core UCNP

Byly naváženy 4,0 mmol  $YCl_3 \cdot 6 H_2O$ , 0,9 mmol  $YbCl_3 \cdot 6 H_2O$  a 0,1 mmol  $TmCl_3 \cdot 6 H_2O$ . Chemikálie byly rozpuštěny v 30 ml methanolu a vzniklý roztok byl převeden do 250 ml tříhrdlé baňky obsahující směs kyseliny olejové a oktadec-1-enu v hmotnostním poměru 1:3 o celkovém objemu 112 ml.

Směs byla zahřívána na 170 °C pod inertní atmosférou  $N_2$  na dobu dostatečnou (~20 min) k odpaření nízkovroucích látek. Reakční směs byla ochlazená na 50 °C a do ní byly postupně přidány methanolvé roztoky o objemu 15 ml s 20,0 mmol  $NH_4F$  a 12,5 mmol  $NaOH$ . Teplota reakční směsi byla opět zvýšena nejprve ke 150 °C pro odpaření methanolu a vody, a nakonec bylo dosaženo teploty 300 °C. Teplota kolísala  $\pm 3$  °C a byla udržována 90 minut, během nichž vznikala stabilní  $\beta$ -forma UCNP. Obsah  $Tm^{3+}$  v připravených UCNP je 2 %<sub>mol</sub>.

#### 3.3.3. Příprava prekurzorů pro core-shell UCNP

Do tříhrdlé kulaté baňky bylo naváženo 8,0 mmol  $Y_2O_3$ , 1,8 mmol  $Yb_2O_3$  a 0,2 mmol  $Tm_2O_3$ . K oxidům lanthanoidů bylo přidáno 12 ml směsi koncentrované kyseliny trifluoroctové a vody 1:1. Reakční směs byla refluxována do vyčerení roztoku. V této fázi bylo přidáno 10 mmol  $Na_2CO_3$  za vzniku bublinek oxidu uhličitého. Kapalina byla vydestilována a vzniklý bílý prášek trifluoroacetátových solí lanthanoidů byl rozpuštěn v 20 ml methanolu. K roztoku bylo přidáno 45 ml směsi kyseliny olejové s oktadec-1-enem v objemovém poměru 1:1 a oleát sodný do koncentrace 67  $\mu mol\ ml^{-1}$ .

Reakční směs byla zahřívána pod N<sub>2</sub> atmosférou na 110 °C po dobu 20 minut za tvorby prekursorů pro shell strukturu UCNP. Koncentrace prekursorů v připravené směsi je 0,2 mmol/ml. Molární poměr lanthanoidů ve směsi prekursorů je stejný jako v již připravených core UCNP.

### 3.3.4. Syntéza core-shell UCNP

Pro syntézu core-shell struktur bylo do 100 ml tříhrdlé baňky odpipetováno 22,5 ml reakční směsi s core  $\beta$ -UCNP a 15 ml methanolu. Směs byla zahřívána pod inertní atmosférou na 150 °C (pro odstranění methanolu a vody). Teplota byla poté udržována na 300 °C a dle Tabulky 5 byly postupně přes pryžové septum injektovány do horké směsi příslušné objemy prekursorů. Časový odstup mezi jednotlivými přídávky byl 10 minut. Core-shell UCNP byly purifikovány podle postupu níže.

Tabulka 5: Objemy přídavek prekursorů Ln(CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>.

| Pořadí přídavku | Objem přídavku (ml) | Pořadí přídavku | Objem přídavku (ml) |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 1               | 2,7                 | 5               | 5,0                 |
| 2               | 3,2                 | 6               | 5,7                 |
| 3               | 3,7                 | 7               | 6,8                 |
| 4               | 4,4                 | -               | -                   |

### 3.3.5. Purifikace UCNP

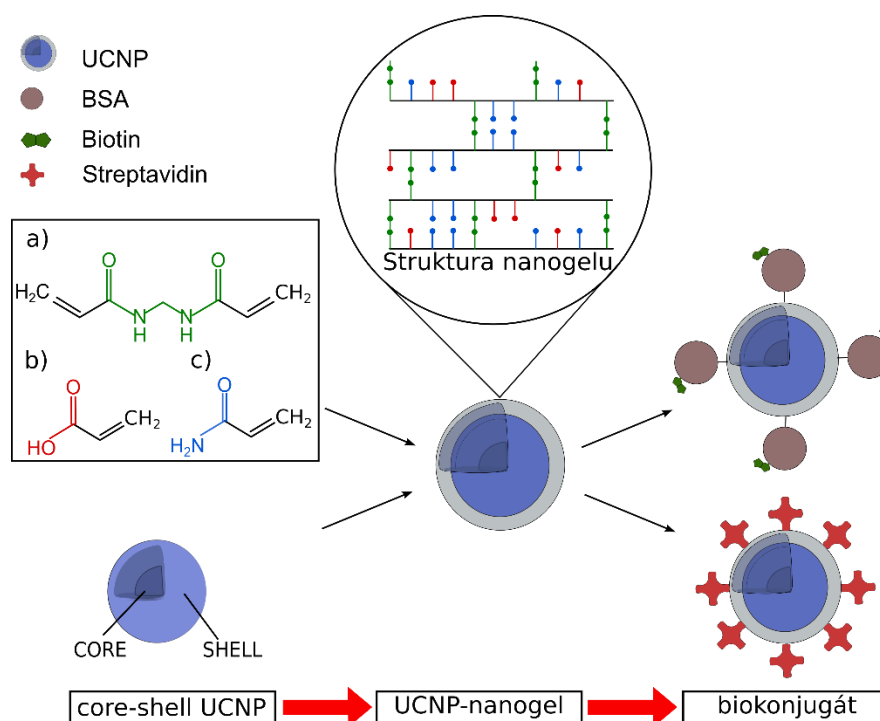
UCNP byly z reakční směsi vysráženy dvojnásobným objemem isopropylalkoholu a nechaly se samovolně usadit (přes noc). Kapalina byla dekantována a pelet UCNP byl kvantitativně převeden do 15 ml centrifugačních zkumavek. Před každou centrifugací se vzorky krátce homogenizovaly v ultrazvukové lázni. Suspenze byla odstředována 10 min při 6000 RPM. Supernatant byl odejmut a pelet byl promyt methanolem, následovala krátká centrifugace (cca 30 s) na 6000 RPM. Po promytí je odstraněn přebytek sodíku a zbytky rozpouštědel. Supernatant byl odejmut a pelet UCNP byl 3× vyextrahován cyklohexanem s centrifugací na 10 minut při 4000 RPM po každé extrakci. Během centrifugace po extrakci jsou odděleny nežádoucí agregáty UCNP. Hydrofobní nanočástice mohou být dlouhodobě skladovány v cyklohexanu, toluenu nebo chloroformu za laboratorní teploty.

### 3.3.6. Charakterizace UCNP

Koncentrace core-shell UCNP v cyklohexanu byla orientačně stanovena gravimetricky. Pro DLS (*angl.* dynamic light scattering) analýzu byl vzorek zředěn 20× cyklohexanem.

### 3.3.7. Syntéza polymerního obalu

Tato kapitola popisuje novou strategii enkapsulace UCNP do nanogelového obalu v prostředí mikroemulze. Schéma syntézy je znázorněno na Obrázku 6 níže.



Obr. 6: Schéma přípravy UCNP-nanogelů a následná biokonjugace s proteiny.

Mikroemulze pro enkapsulaci UCNP do polyakrylamidového gelu tvořila vybraná směs akrylamidových monomerů ve vodě, disperze UCNP v *n*-hexanu a surfaktanty. Směs monomerů pro účely konjugace s proteiny byla připravena do 1,5 ml mikrozkušavky navážením 305 mg akrylamidu (AAM), 22 mg *N,N'*-metylen-bis-akrylamidu (BisAAM), 93 mg kyseliny akrylové (AA) a 580 mg miliQ vody. Směs s obsahem UCNP byla připravena do 25 ml 2-hrdlé kulaté baňky. Nejprve bylo odměřeno 17,3 ml *n*-hexanu a naváženo 986 mg Brij® 30 a 240 mg dokusátu sodného. Do směsi bylo přidáno 30 mg UCNP v 700  $\mu$ l *n*-hexanu. Nakonec bylo do směsi injektováno 18  $\mu$ l *N,N,N',N'*-tetramethyl-ethylendiaminu (TEMED). Celý objem vodního roztoku monomerů byl přidán do 2-hrdlé baňky za vzniku mikroemulze. Mikroemulze byla po 20 min odvzdušňována v prostředí inertního dusíku N<sub>2</sub>, poté byla polymerační reakce zahájena přidávkem 36  $\mu$ l 10% peroxodisíranu amonného (APS). Síranové radikály iniciovaly polymerační reakci trvající 90 minut za laboratorní teploty a konstantního míchání. Enkapsulované UCNP (dále UCNP-nanogely) byly centrifugovány 10 min při 10 000 RPM v 15 ml centrifugačních zkumavkách. Supernatant byl odebrán po každé centrifugaci. UCNP-nanogely byly nejprve 3× promyty 20 ml isopropanolu, zkumavka byla na několik sekund vložena do ultrazvukové lázně a směs znovu centrifugována (10 min, 10 000 RPM). Pelet byl následně promyt 20 ml směsí isopropanolu a vody (objemový poměr 1:1), směs byla sonikována a centrifugována 10 min na 6000 RPM. Nakonec byl pelet 2× promyt miliQ vodou (s následnou sonikací a centrifugací, viz předchozí krok). Poslední centrifugace probíhala 5 minut při 1000 RPM, čistý produkt zůstal v supernatantu, zatímco největší agregáty UCNP-nanogelů sedimentovali. UCNP-nanogely se dlouhodobě skladují ve skleněných vialkách v pufrch nebo miliQ vodě při teplotě 4 °C. Charakterizaci připravených UCNP-nanogelů popisují kapitoly níže.

### 3.3.8. Stanovení počtu karboxylátových skupin na povrchu UCNP-nanogelů

Počet karboxylátových skupin na povrchu UCNP-nanogelu byl stanoven alkalimetricky. Hydroxid sodný byl standardizován HCl na indikátor fenolftalein. Standardizace HCl byla

provedena na základní látku uhličitan sodný a indikátor methylořanž. Nejprve byly karboxylátové skupiny protonovány na karboxylové trojnásobným promytím 1 mM HCl. V každém promývacím cyklu byl UCNP-nanogel (200  $\mu$ L, 4,08 nM) centrifugován na 4 800  $g$  10 min, supernatant byl odebrán a pelet byl dispergován pomocí ultrazvukové lázně v nových 500  $\mu$ L 1 mM HCl. Po poslední centrifugaci byly nanogely dispergovány ve 100  $\mu$ L standardizované 1 mM HCl. Celý objem UCNP-nanogelu byl titrován 250  $\mu$ L skleněnou stříkačkou se standardizovaným 2,5 mM NaOH. Do roztoku byl přidán 1  $\mu$ L fenolftaleinového indikátoru. Bod ekvivalence byl indikován změnou jeho barvy na světle růžovou. Koncentrace karboxylových skupin ve vzorku byla vypočítána ze známé spotřeby NaOH po odečtení spotřeby NaOH na 100  $\mu$ L 1 mM HCl (zjištěna v separátním experimentu). Počet karboxylových skupin na jednu nanočástici byl vypočten vydělením počtu karboxylových skupin ve vzorku počtem nanočástic v tomto objemu.

### **3.3.9. Stanovení velikosti pomocí TEM**

Kapka zředěného vzorku UCNP-nanogelu byla přenesena na měděnou mřížku potaženou uhlíkem. Nadbytek kapaliny byl odsán buničitou vatou a vzorek se nechal při laboratorní teplotě vyschnout volně na vzduchu. Mikrosnímky byly pořízeny TEM Talos F200i, Thermo Fisher Scientific na Ústavu fyziky materiálů AV ČR.

### **3.3.10. Stanovení molární koncentrace**

Početní koncentrace UCNP-nanogelů byla určena metodou absolutní kvantifikace nanočástic ve zkolabovaném agarosovém gelu, podle dřívější publikace [31]. Vzorek UCNP-nanogelu byl 50 $\times$  zředěn vodou a byl smíchán se 2% (w/v) horkou agarosou v poměru 1:1. Vzorek byl napipetován na připravená podložní sklíčka s okénkem o známé hloubce (změřena z mikroskopového snímku za využití měřítka). Vzorek byl zakápnut imerzním olejem a přikryt krycím sklíčkem. Vzorky byly pozorovány pod imerzním objektivem (zvětšení 60 $\times$ , numerická apertura 1,40). Početní koncentrace a polydisperzita (vyjádřena jako obsah monomerů) byla určena z 9 snímků celkem ze 3 připravených podložních sklíček. Zaznamenali jsme početní koncentraci UCNP-nanogelů na jeden snímek a konvertovali tuto hodnotu na molární koncentraci. Obsah monomerů byl získán z intenzit emise UCNP. Pozadí bylo odečteno a histogram intenzit byl modelován jako lineární kombinace Gaussových křivek (Obr. 11). Polydisperzita vzorku byla vyjádřena jako obsah monomerů v procentech. Pro výpočet bylo použito >500 hodnot intenzit z každého snímku.

### **3.3.11. Horizontální gelová elektroforéza**

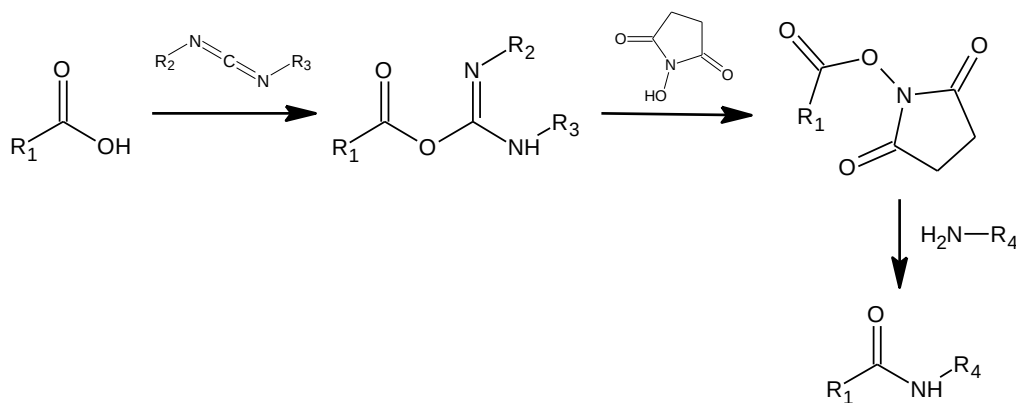
Do PCR zkumavek bylo pipetováno 35  $\mu$ L Tris pufru, 5  $\mu$ L glycerolu a 15  $\mu$ L vzorku UCNP-nanogelu nebo příslušného biokonjugátu. Z připravených roztoků bylo do jamek 0,2% agarosového gelu pipetováno 18  $\mu$ L po třech opakováních vedle sebe. Elektroforéza probíhala 30 minut při napětí 150 V (to odpovídá el. proudu  $\sim$ 70 mA).

### **3.3.12. Emisní spektra**

Emisní spektrum (Obr. 10B) bylo získáno spektrofotometrem Ocean Optics QE65 Pro s excitací při 976 nm s intenzitou 200 W cm<sup>-2</sup>.

### **3.3.13. Syntéza biokonjugátů**

Připravené UCNP-nanogely byly konjugovány se streptavidinem (SA) a biotinylovaným albuminem (BSA-biotin) za použití standardní karbodiimidové metody. Kovalentní vazby vznikají mezi aminovými skupinami molekul proteinu a karboxylovými skupinami povrchu nanogelu (viz Obr. 7).



Obr. 7: Mechanismus konjugace karboxylové skupiny s aminoskupinou proteinu po reakci s karbodiimidem a *N*-hydroxysukcinimidem.

UCNP-nanogely byly dispergovány v 650  $\mu$ l roztoku MES pufru s 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl karbodiimid hydrochloridem (EDC; 3,5 mg/ml) a *N*-hydroxysulfosukcinimidem sodným (S-NHS; 2,6 mg/ml). Aktivace probíhala 15 minut za občasného protřepání. Objem 650  $\mu$ l byl rozdělen na poloviny do 0,5 ml mikrozkušavek. Nanogely byly centrifugovány (1 min, 10 000 RPM) a pelety dispergovány v 200  $\mu$ l roztoku MES pufru s příslušným proteinem. Pro konjugaci UCNP-nanogelu se streptavidinem pufr obsahoval 2 mg/ml streptavidinu a 8 mg/ml BSA. Pro konjugaci UCNP-nanogelu s biotinylovaným BSA obsahoval pufr 5 mg/ml tohoto proteinu. Obě mikrozkušavky byly ponechány 120 minut na rotatoru za laboratorní teploty za vzniku příslušných biokonjugátů (UCNP-nanogel-BSA-biotin a UCNP-nanogel-SA). Nakonec byly biokonjugáty 3× promyty Tris puftrem. Biokonjugáty se dlouhodobě skladují ve skleněných vialkách v puftrech nebo miliQ vodě při teplotě 4 °C.

#### 3.3.14. Test bioafinity připravených konjugátů

Mikrotitrační (zkr. MT) destička s tenkým dnem (170  $\mu$ m) byla pokryta 100  $\mu$ l biotinylované protilátky v potahovacím pufru (5  $\mu$ g/ml). Destička přikrytá víkem se přes noc nechala v lednici při 4 °C. Z jamek bylo odpipetováno 50  $\mu$ l roztoku, jamky byly následně doplněny 150  $\mu$ l assay pufru. Destička byla inkubována v lednici a po 60 minutách byla pětikrát promyta promývacím puftrem. V případě konjugátu UCNP-nanogel-BSA-biotin bylo do jamek pipetováno 70  $\mu$ l rekombinovaného streptavidinu v assay pufru; do negativních kontrol a jamek, do kterých se později pipetoval konjugát UCNP-nanogel-SA, byl v tomto kroku napipetován pouze assay pufr. Destička byla inkubována v lednici 45 minut a pětikrát promyta. Oba vzorky připravených biokonjugátů byly 200× zředěny assay puftrem a 70  $\mu$ l disperze bylo napipetováno do příslušných jamek. Inkubace a promývání bylo provedeno stejně jako v předešlém kroku. Po vyschnutí na vzduchu byla mikrotitrační destička mikroskopována s imerzním objektivem (zvětšení 60×, numerická apertura 1,40). Početní koncentrace bioafinitních komplexů v jednotlivých jamkách (průměr 3 opakování pro každý vzorek) byly zjištěny pomocí foton-upkonverzního mikroskopu a konvoluční neuronové sítě rozpoznávající spoty emisí UCNP na jednotlivých mikrosnímcích.

#### 3.3.15. Příprava vzorků ovesných vloček pro stanovení aflatoxinu B1

Od každého vzorku ovesných vloček bylo odváženo 2,0 g. Vzorky byly následně rozmělněny v třecí misce a převedeny 10 ml směsi methanol:voda (7:3, v/v) do 15 ml plastové zkušavky. Zkušavky byly umístěny na 30 minut na rotator. Po extrakci byly suspenze centrifugovány

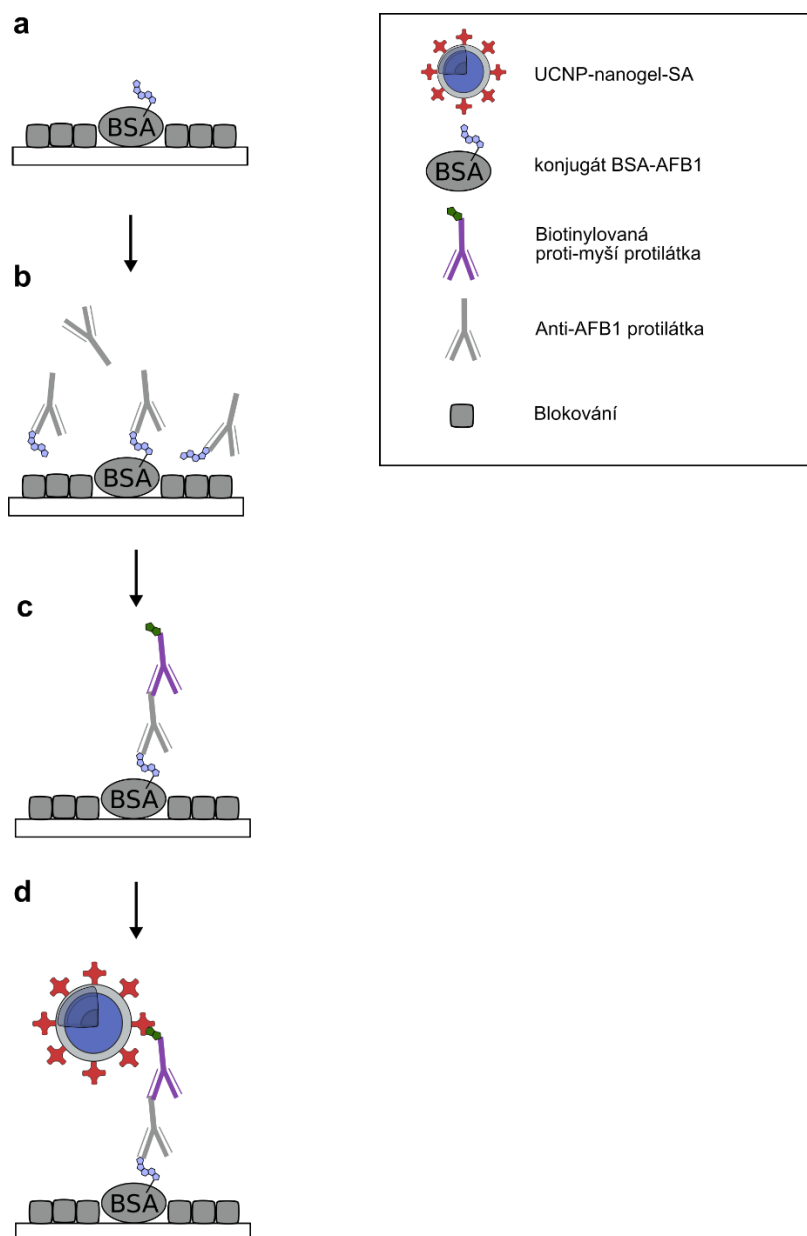
10 minut na 6000 RPM, supernatant byl odebrán k filtraci. Byly použity teflonové stříkačkové filtry s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . Vzorky byly ředěny 10% (aq) methanolem.

### **3.3.16. Nepřímá kompetitivní ULISA pro stanovení aflatoxinu B1**

Pracovní postup nepřímé kompetitivní ULISA je znázorněn níže na Obr. 8. Jamky mikrotitrační destičky byly pokryty 100  $\mu\text{l}$  konjugátu BSA-aflatoxin B1 o koncentraci 0,33  $\mu\text{g/ml}$ . Mikrotitrační destička byla ponechána přes noc v lednici (4  $^{\circ}\text{C}$ ). Druhý den byla 4 $\times$  promyta promývacím pufrem a jamky byly blokovány 60 min 200  $\mu\text{l}$  BSA (0,1%, w/v) v assay pufru. Destička byla 4 $\times$  promyta promývacím pufrem.

Methanolvé extrakty vzorků byly rozředěny vodou a 10% methanolem (aq, v/v) na požadované zředění (dvě zkumavky extraktu na zředění 14 $\times$  a dvě na zředění 70 $\times$ ). Všechny připravené roztoky byly dále zředěny stejným množstvím fosfátového pufru (PBS). Výsledné zředění vzorků je tedy 28 $\times$  a 140 $\times$ . Z obou těchto ředění byla vždy jedna zkumavka spikována aflatoxinem B1 (AFB1) na koncentraci 0,5 ng/ml. Dále byla připravena sada standardních roztoků AFB1 pro sestavení kalibrační křivky s rozsahem koncentrací 100 – 0,0064 ng/ml. Standardy byly připraveny v 10% methanolu (aq, v/v) o 2 $\times$  větší koncentraci než byla požadovaná, tj. v rozsahu 200-0,0128 ng/ml. Poté byly všechny standardy zředěny stejným objemem PBS k získání požadované koncentrace 100 – 0,0064 ng/ml. Roztok primární protilátky o koncentraci 20 ng/ml byl připraven v PBS. V non-binding mikrotitrační destičce bylo smícháno 50  $\mu\text{l}$  této primární protilátky a 50  $\mu\text{l}$  připraveného standardu aflatoxinu B1 nebo naředěného extraktu ovesných vloček. Po 15 minutách aktivace bylo 100  $\mu\text{l}$  směsi přeneseno na zablokovanou mikrotitrační destičku. Inkubace probíhala 45 minut při laboratorní teplotě, poté byla destička 4 $\times$  promyta promývacím pufrem.

Do jamek bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  biotinylované sekundární protilátky o koncentraci 0,5  $\mu\text{g/ml}$  v assay pufru. Následovala inkubace 45 minut a promývání jako v předchozím kroku. Nakonec byl pipetován připravený konjugát UCNP-nanogel-SA 200 $\times$  zředěný assay pufrům. Destička byla inkubována 45 minut, 4 $\times$  promyta promývacím pufrem a 1 $\times$  promyta vodou. Přebytečná voda byla odstraněna pipetou. Po vysušení byla destička skenována foton-upkonverzním skenerem ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 976 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 800 nm).



Obr. 8: Schéma provedení ic-ULISA pro stanovení aflatoxinu B1. a) potahování dna MT destičky konjugátem BSA-aflatoxin B1 (BSA-AFB1, 0,33  $\mu\text{g/ml}$ ) b) kompetice primární protilátky (Anti-AFB1, 20 ng/ml) a aflatoxinu B1 c) nasednutí sekundární (biotinylované) protilátky (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) a d) označení imunokomplexu biokonjugátem UCNP-nanogel-SA (zř. 400 $\times$ ).

Snímek byl upraven odečtením pozadí laseru a byly získány signály z jednotlivých jamek. Kalibrační křivka byla fitována do logistické funkce (1),

$$y = \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + \left(\frac{[\text{AFB1}]}{IC_{50}}\right)^s} + Y_{\min} \quad (1)$$

kde  $Y_{\max}$  a  $Y_{\min}$  jsou maximální a minimální hodnoty signálů kalibrační křivky,  $[\text{AFB1}]$  je molární koncentrace aflatoxinu B1,  $IC_{50}$  koncentrace aflatoxinu B1, která redukuje signál o 50% rozdílu  $Y_{\max} - Y_{\min}$  a s sklon v inflexním bodě.

Koncentraci aflatoxinu B1 (2) a limit detekce (3) vyjádříme z rovnice (1):

$$[AFB1] = \sqrt{\frac{Y_{max} - Y_{min}}{y - Y_{min}}} - 1 \cdot IC_{50} \quad (2)$$

$$LOD = \sqrt{\frac{Y_{max} - Y_{min}}{Y(LOD) - Y_{min}}} - 1 \cdot IC_{50} \quad (3)$$

Za parametr  $Y(LOD)$  dosazujeme hodnotu získanou podle rovnice (4)

$$Y(LOD) = 0,85 (Y_{max} - Y_{min}) + Y_{min} \quad (4)$$

Signály byly stejným způsobem zpracovány u vzorků ovesných vloček.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Syntéza a charakterizace UCNP-nanogelů pro imunochemická stanovení

Připravené core UCNP byly charakterizovány pomocí DLS hydrodynamickým průměrem 31 nm. Z nich připravené core-shell UCNP měly hydrodynamický průměr 69 nm. Koncentrace core-shell UCNP byla gravimetricky stanovena 48 mg/ml.

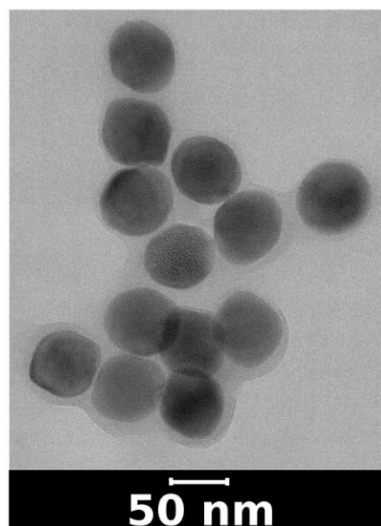
Pro následující aplikace bylo nutné zajistit hydrofilicitu a možnosti povrchové modifikace připravených nanočástic. Pro tento účel byl použit nanogelový obal na bázi akrylamidu. Směs monomerů byla vybrána tak, aby připravený obal obsahoval na svém povrchu vhodné množství karboxylových skupin pro účely biokonjugace s proteiny. Směs tvořilo 76,0 mol. % AAM, 22,5 mol. % AA a 2,5 mol. % BisAAM, který sloužil jako tzv. cross-linker. Pro konjugaci např. s organickými fluorofory obsahujícími karboxylovou skupinu (karboxyfluorescein, rhodamin B apod.) lze ve složení nahradit 1 mol. % ACMD za N-(3-aminopropyl)methacrylamid. Na povrchu nanogelu se pak budou nacházet aminové skupiny vhodné pro konjugáční reakci.

Počet karboxylových skupin na povrchu jedné UCNP-nanogel částice byl stanoven na  $69\,500 \pm 3500$  (průměr výsledků a jejich směrodatná odchylka ze tří po sobě jdoucích titrací). Zmíněný počet odpovídá jedné reakční skupině na  $0,22\text{ nm}^2$  povrchu nanočástice (uvažuje se kulatý tvar).

Ke strukturní charakterizaci UCNP-nanogelu byla použita transmisní elektronová mikroskopie, DLS analýza a gelová elektroforéza. Přesná velikost UCNP-nanogelů byla zjištěna analýzou TEM snímků 30 nanočástic. UCNP-nanogely měly kulatý nebo citronovitý tvar (Obr. 9). Kratší rozměr UCNP-nanogelů činil  $62,1 \pm 2,6\text{ nm}$  a delší rozměr  $69,4 \pm 1,9\text{ nm}$ . Tloušťka nanogelové vrstvy činila  $3,8 \pm 2,5\text{ nm}$ . Tloušťku vytvořené nanogelové vrstvy je pravděpodobně možné ovlivnit přidávkem většího/menšího molárního množství monomerů na bázi akrylamidu do původní mikroemulze. Nicméně, s větším molárním množstvím monomerů narůstá polydisperzita připravených UCNP-nanogelů. Vysoká odchylka od průměrné tloušťky nanogelového obalu je možná způsobena úpravou (vysušením) vzorku UCNP-nanogelu před samotnou TEM analýzou. Velikost UCNP-nanogelu byla orientačně stanovena DLS 191 nm, velikost jeho biokonjugátu se streptavidinem 176 nm a biokonjugátu s biotinylovaným BSA 166 nm (Obr. 10B). Emisní maximum připraveného UCNP-nanogelu bylo 800 nm (Obr. 10C).

Molární koncentrace UCNP-nanogelu  $4,1 \pm 0,27\text{ nmol/l}$  byla určena metodou přímého počítání v agarosovém gelu (viz kapitola 3.3.14), polydisperzitu vzorku charakterizuje graf v Obr. 11, v němž jsou patrné píky intenzit monomerů až pentamerů nanočástic. Výpočetem byla polydisperzita vyjádřena jako 30,4% obsah monomerů. Koncentrace připraveného konjugátu se streptavidinem činila  $2,2 \pm 0,038\text{ nmol/l}$  (obsah monomerů 47,8 %) a konjugátu s biotinylovaným BSA  $4,0 \pm 0,32\text{ nmol/l}$  (obsah monomerů 65,1 %).

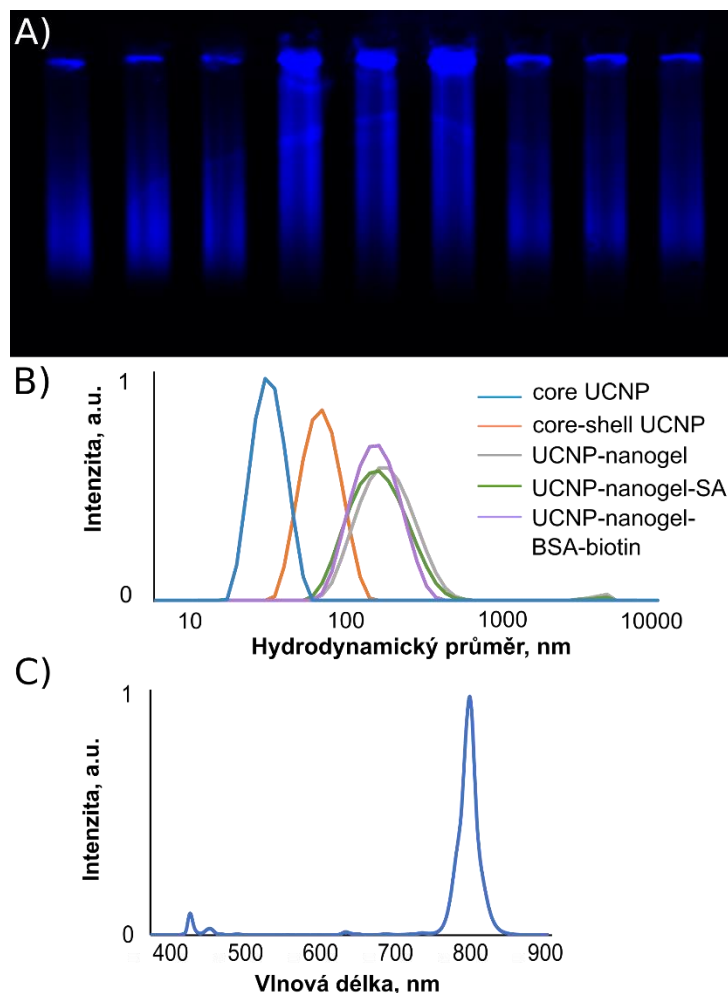
Přehled všech určených charakteristik připraveného UCNP-nanogelu shrnuje Tabulka 6.



Obr. 9: TEM snímek UCNP-nanogelu.

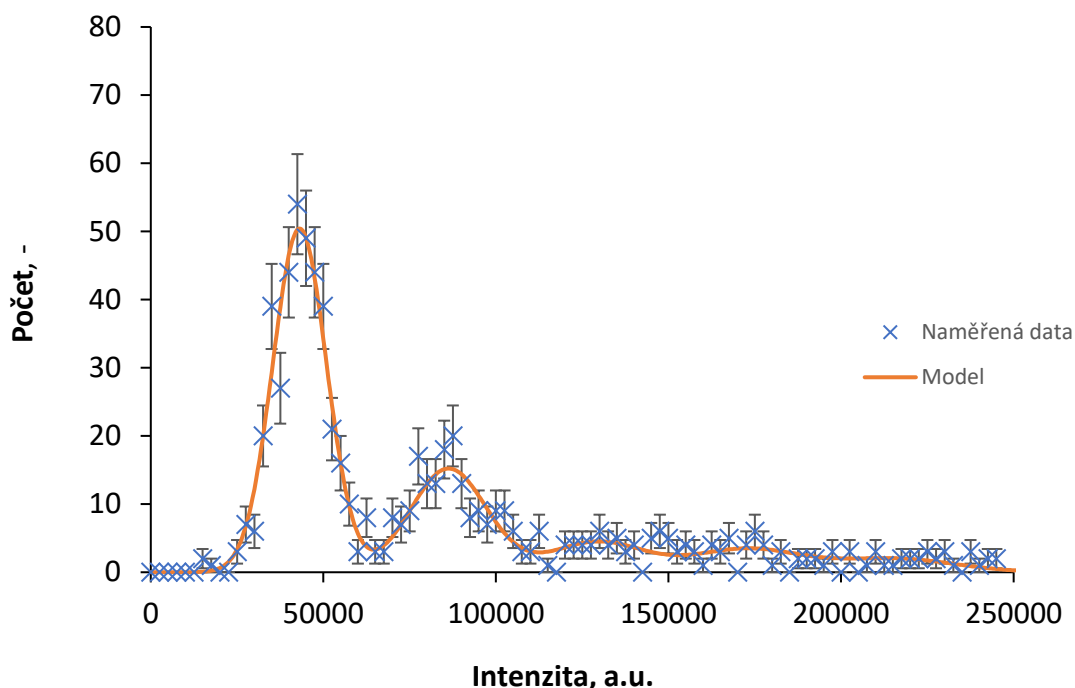
Tabulka 6: Charakterizace UCNP-nanogelu.

|                                                                          |                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kompozice upkonverzní nanočástice                                        | $\text{NaY}_{0,80}\text{Yb}_{0,18}\text{Tm}_{0,02}\text{F}_4$                                                     |
| Složení nanogelu                                                         | AAM 76,0 % <sub>mol</sub> ; AA 22,5 % <sub>mol</sub> ; BisAAM 2,5 % <sub>mol</sub>                                |
| Hydrodynamický průměr                                                    | 191,0 nm; PDI: 0,162                                                                                              |
| Rozměry určené transmisí elektronovou mikroskopií                        | Kratší rozměr: $62,1 \pm 2,6$ nm<br>Delší rozměr: $69,4 \pm 1,9$ nm<br>Tloušťka vrstvy nanogelu: $3,8 \pm 2,5$ nm |
| Molární koncentrace UCNP-nanogelu                                        | $4,1 \pm 0,27$ nmol/l                                                                                             |
| Obsah monomerů                                                           | 30,4 %                                                                                                            |
| Počet $\text{COO}^-$ skupin na jednu nanočástici                         | $69\,500 \pm 3\,500$                                                                                              |
| Emisní maximum ( $\lambda_{\text{ex}} = 976$ nm, 200 W/cm <sup>2</sup> ) | 800 nm                                                                                                            |



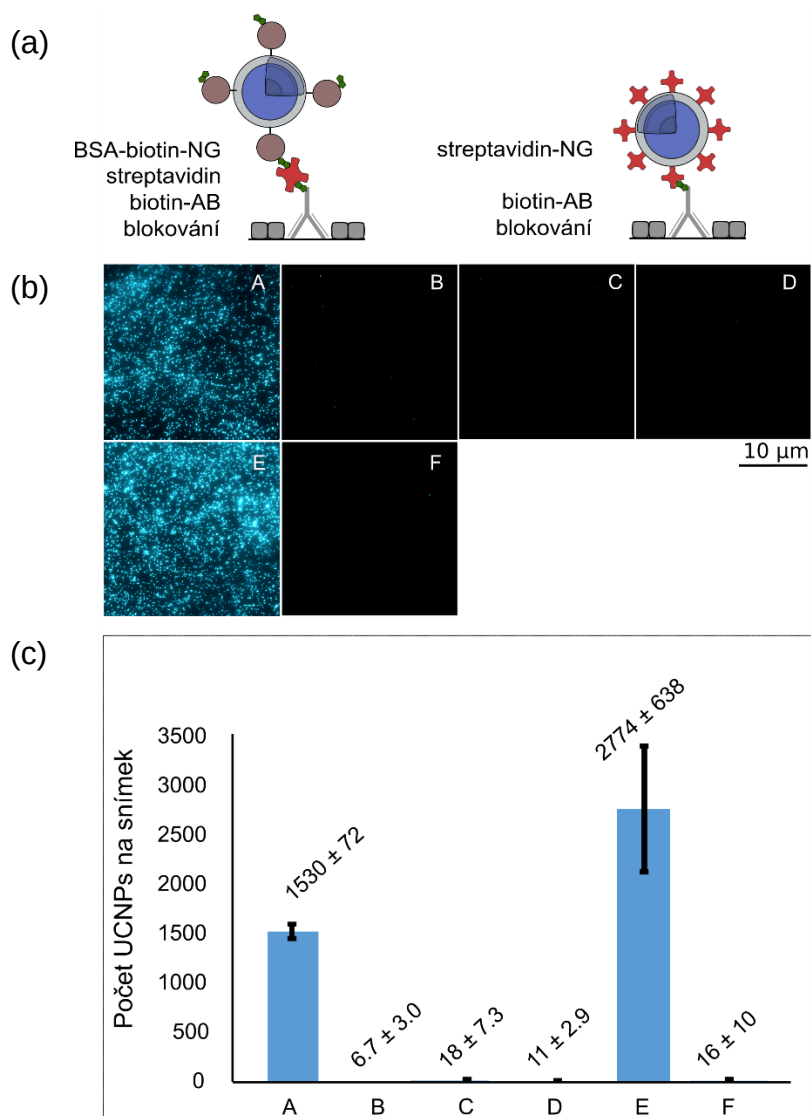
Obr. 10: Charakterizace UCNP-nanogelů. A) Horizontální gelová elektroforéza. Vzorky jsou pětkrát ředěné a nanášeny ve třech opakováních; zleva: konjugát UCNP-nanogel-SA, nekonjugovaný UCNP-nanogel a UCNP-nanogel-BSA-biotin. B) DLS analýza připravených nanočástic C) emisní spektrum částic UCNP-nanogelu (emisní maximum 800 nm, excitační vlnová délka 976 nm, intenzita excitačního záření 200 W/cm<sup>2</sup>).

V roztocích core-shell nanočástic je běžná přítomnost různě velkých klastrů. Pro charakterizaci agregace připraveného UCNP-nanogelu a jeho biokonjugátů, byly vzorky analyzovány gelovou elektroforézou. Výsledky měření hydrodynamického průměru nanočástic korelují s výsledky gelové elektroforézy: na elektroforeogramu (Obr. 10A) není zřetelné rozdělení frakcí podle velikosti. Menší hydrodynamický průměr biokonjugátů oproti UCNP-nanogelu vysvětlujeme „sbalením“ dlouhých polymerových řetězců, které možná vychází z povrchu nanogelu, po navázání proteinů.



Obr. 11: Graf vyjadřující počet nanoobjektů na mikrosnímku v daném rozsahu intenzit emise je znázorněním zastoupení monomerů a oligomerů částic ve vzorku UCNP-nanogelu. Naměřené intenzity nanoobjektů jsou zde nafitovány do matematického modelu, kterým je lineární kombinace Gaussových funkcí.

Před zahájením imunochemických stanovení s reálnými vzorky, byla ověřena bioafinita připravených konjugátů. Testovala se specifická vazba mezi konjugátem UCNP-nanogel-BSA-biotin a streptavidinem a specifická vazba mezi konjugátem UCNP-nanogel-SA a biotinylovanou protilátkou. Schéma bioafinitního testu znázorňuje Obr. 12(a). Vedle pozitivních kontrol, kde byl předpoklad vzniku bioafinitních komplexů, byly připraveny i negativní kontroly, které charakterizovaly nespecifické vazby biokonjugátů na mikrotitrační desky. Mikrosnímky pořízené z jednotlivých kontrol ukazuje Obr. 12(b) a vyhodnocení počtů bioafinitních komplexů na plochy snímků zobrazuje Obr. 12(c). Test bioafinity prokázal vysokou specifitu a tedy vhodnost biokonjugátů pro imunochemické stanovení s foton-upkonverzní detekcí.



Obr. 12: Test bioafinity připravených UCNP-nanogelů konjugovaných s proteiny. **(a)** Uspořádání bioafinitního testu: vlevo UCNP-nanogel-BSA-biotin na komplexu biotinylovaná protilátka-SA, vpravo UCNP-nanogel-SA na biotinylované protilátce. **(b)** foton-upkonverzní mikrosnímky z jamek MT destičky ( $\lambda_{\text{ex}} = 976 \text{ nm}$ ). A: pozitivní kontrola konjugátu UCNP-nanogel-BSA-biotin, B-D negativní kontroly konjugátu UCNP-nanogel-BSA-biotin (B: biotinylovaná protilátka + UCNP-nanogel-BSA-biotin; C: streptavidin + UCNP-nanogel-BSA-biotin; D: jen UCNP-nanogel-BSA-biotin). E: pozitivní kontrola konjugátu UCNP-nanogel-SA, F: negativní kontrola (chybí biotinylovaná protilátka). **(c)** Graf průměrného počtu bioafinitních komplexů na snímek v jednotlivých jamkách A-F.

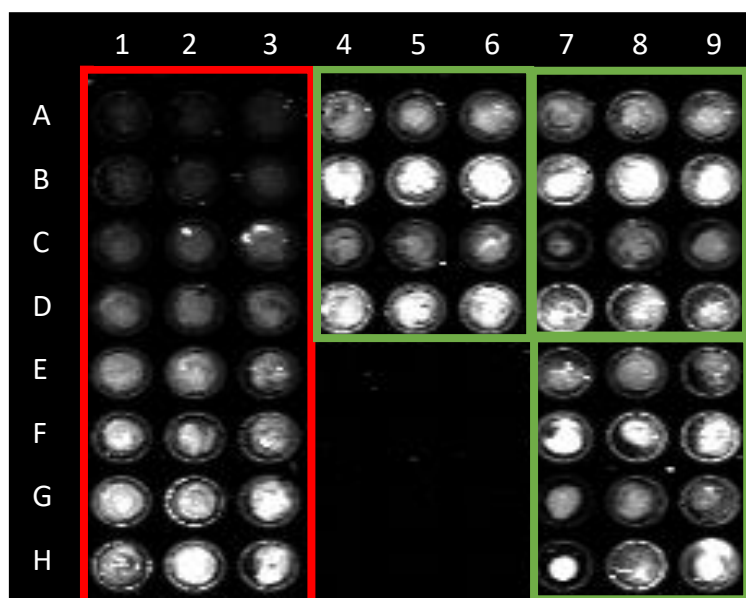
#### 4.2. Nepřímá kompetitivní ULISA pro stanovení aflatoxinu B1

Aflatoxin B1 (AFB1) je mykotoxin produkovaný mikroskopickými houbami *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, které jsou celosvětově rozšířeny. Je považován za typ aflatoxinu s nejvíce toxickými účinky, neboť byl prokázán jeho silný karcinogenní a mutagenní účinek. Aflatoxin B1 je významným kontaminantem rostlinných i živočišných potravin a krmiv a k jeho stanovení je třeba specifických a citlivých analytických metod. Velmi vhodné pro tento účel jsou nepřímé kompetitivní ELISA testy, které jsou dostupné ve formě komerčních kitů a mohou disponovat nižšími limity detekce než instrumentální metody jako je HPLC, plynová

chromatografie nebo hmotnostní spektrometrie [29]. Ale nevýhodou metody ELISA je právě potřeba enzym, které jsou nákladné, mají náročné skladovací podmínky a závěrečný krok stanovení (reakce enzymu se substrátem) je čas konzumující. Imunochemické stanovení AFB1 s upkonverzní detekcí (ULISA) výše zmíněné charakteristiky eliminuje.

Pro nepřímé kompetitivní ULISA (*ic*-ULISA) stanovení byly vybrány 3 různé značky ovesných vloček z jednoho obchodního řetězce: Bona Vita (běžné ovesné vločky), Arax (instantní ovesné vločky) a Nature's promise (bio ovesné vločky). Obsah aflatoxinů v potravinách upravuje Nařízení Komise (EU) č. 165/2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, a kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Maximální limit aflatoxinu ve všech druzích obilovin v současnosti činí 2 µg/kg aflatoxinu B1 a 4 µg/kg celkového aflatoxinu.

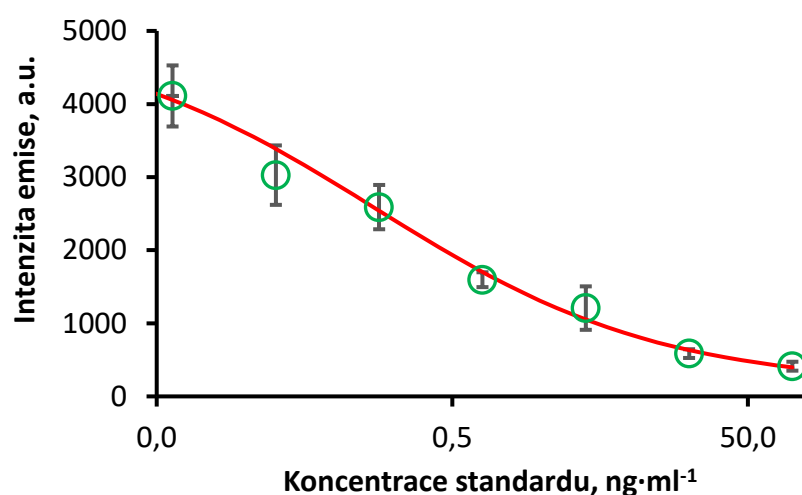
Kalibrační křivka byla sestavena z foton-upkonverzního skenu MT destičky (Obr. 13). Průměrná intenzita signálu emise jednotlivých standardů byla zanesena do Tabulky 7, průměr a směrodatná odchylka výsledků byly vypočteny ze tří po sobě jdoucích jamek tohoto standardu. Data z Tabulky 7 byla fitována do modelové funkce podle rovnice (1) v Obr. 14. Její parametry vyjadřuje Tabulka 8 s využitím rovnic (3) a (4). Koncentrace AFB1 ve vybraných vzorcích ovesných vloček byla vypočtena podle rovnice (2), naměřené signály a vypočtené hodnoty koncentrace AFB1 ukazuje Tabulka 9.



Obr. 13: Foton-upkonverzní sken MT destičky *ic*-ULISA pro stanovení AFB1. Sloupce v červeném poli představují kalibrační řadu AFB1 (blank s nulovou koncentrací AFB1 je v nejspodnějším řádku). V zelených polích jsou vždy čtyři řádky reprezentující daný vzorek ovesných vloček (sloupec 4-6 Bona Vita; sloupec 7-9, řádek A-D Nature's promise, řádek E-H Arax). Všechny roztoky standardů a vzorků byly pipetovány na MT destičku po třech opakováních. Vždy první a druhý řádek vzorku jsou před pipetováním ředěny 28×, třetí a čtvrtý řádek jsou zředěny 140×, spikované vzorky vykazují nižší luminiscenci pro každé (vždy horní řádek pro každé ředění) než vzorky nespikované (spodní řádek pro každé ředění).

Tabulka 7: Data pro kalibrační křivku ULISA stanovení aflatoxinu B1 (Obr. 14).  $\lambda_{ex} = 976 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 800 \text{ nm}$ .

| Koncentrace<br>aflatoxinu (ng/ml) | Průměrný signál<br>standardu (a. u.) | Směrodatná<br>odchylka |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 1,0E+02                           | 413,0                                | 60,83                  |
| 2,0E+01                           | 585,4                                | 59,73                  |
| 4,0E+00                           | 1208                                 | 297,4                  |
| 8,0E-01                           | 1596                                 | 101,7                  |
| 1,6E-01                           | 2590                                 | 303,1                  |
| 3,2E-02                           | 3027                                 | 406,7                  |
| 6,4E-03                           | 4110                                 | 418,0                  |
| 0,0E+00                           | 4066                                 | 1110                   |



Obr. 14: Kalibrační křivka ic-ULISA stanovení aflatoxinu B1 (data viz Tabulky 7), modelová funkce (rovnice 1) je znázorněna červeně.  $\lambda_{ex} = 976 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 800 \text{ nm}$ .

Tabulka 8: Parametry modelu z Obr. 14 a limit detekce aflatoxinu B1 podle rovnice (4).

| Parametr        | Hodnota      |
|-----------------|--------------|
| $Y_{\max}$      | 5000,00      |
| $Y_{\min}$      | 150,00       |
| $IC_{50}$       | 0,15         |
| $s$             | 0,45         |
| $Y(\text{LOD})$ | 4275,59      |
| LOD             | 0,0031 ng/ml |

Tabulka 9: Signály vzorků ovesných vloček a koncentrace AFB1.

| Lokace v MT destičce | Vzorek ovesných vloček  | Zředění vzorku | Průměr signálů intenzit | Předpokládaná koncentrace AFB1, ng/ml | Stanovená koncentrace AFB1, ng/ml |
|----------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| H1-H3                | Blank                   | -              | 4066 ± 1110             | 0                                     | -                                 |
| A4-A6                | Bona Vita, spike        | 28×            | 2593 ± 275,3            | 0,50                                  | 0,44                              |
| B4-B6                | Bona Vita               | 28×            | 5543 ± 814,1            | -                                     | Obsah AFB1 je pod limitem         |
| C4-C6                | Bona Vita, spike        | 140×           | 1617 ± 650,8            | 0,50                                  | 38,48                             |
| D4-D6                | Bona Vita               | 140×           | 3402 ± 305,2            | -                                     | 0,49 ± 0,023                      |
| A7-A9                | Nature's promise, spike | 28×            | 2348 ± 240,6            | 0,50                                  | 0,68                              |
| B7-B9                | Nature's promise        | 28×            | 4268 ± 743,6            | -                                     | 0,029 ± 0,017                     |
| C7-C9                | Nature's promise, spike | 140×           | 2132 ± 217,4            | 0,50                                  | 5,10                              |
| D7-D9                | Nature's promise        | 140×           | 3505 ± 817,5            | -                                     | 0,6072 ± 0,037                    |
| E7-E9                | Arax, spike             | 28×            | 2574 ± 281,0            | 0,50                                  | 0,45                              |
| F7-F9                | Arax                    | 28×            | 5384 ± 451,3            | -                                     | Obsah AFB1 je pod limitem         |
| G7-G9                | Arax, spike             | 140×           | 1991 ± 448,9            | 0,50                                  | 7,8                               |
| H7-H9                | Arax                    | 140×           | 4276 ± 184,3            | -                                     | 0,049 ± 0,002                     |

Získané hodnoty signálů vybraných vzorků ovesných vloček naznačovaly žádný nebo velmi nízký obsah aflatoxinu B1, z toho důvodu byl u naměřených dat proveden Studentův jednovýběrový dvoustranný t-test k ověření hypotézy „průměrný signál vzorku se výrazně neliší od signálu blanku“. Dle T-testu se významně liší pouze hodnota u vzorku Arax, zředění 28× (jamky F7-F9). U nespikovaných vzorků ovesných vloček je odchylka koncentrace AFB1 vyjádřena jako směrodatná odchylka 3 výsledků koncentrací AFB1 ze tří po sobě jdoucích jamek. Všechny zkoumané vzorky se vyznačovaly vysokou intenzitou signálu, přičemž se tento signál příliš nelišil od signálu blanku, jak potvrdily výsledky t-testu. To dokazuje nepřítomnost aflatoxinu B1 ve vybraných vzorcích.

V souladu s formátem kompetitivní ULISA, méně jasné jamky na MT destičce představují vzorky spikované na koncentraci AFB1 0,5 ng/ml. Koncentrace AFB1 ve spikovaných vzorcích byla stanovena s přijatelnou odchylkou pouze při použití menšího zředění (28×). U vzorku Bona Vita činila odchylka 12 %, u vzorku Nature's promise 36 % a u vzorku Arax 10 %. Běžná odchylka nepřímé kompetitivní ELISA bývá 10-15 % [32]. Limit detekce AFB1 byl stanoven 0,0031 ng/ml, což je ~10× méně, než poskytla ic-ELISA v uvedené literatuře [29, 32]. Stanovení AFB1 nepřímou kompetitivní ULISA zatím vyžaduje další optimalizaci, zejména je

třeba zvýšit opakovatelnost. Tuto charakteristiku by zlepšila vyšší homogenita pokrytí dna jamky. Na to bude mít pravděpodobně vliv způsob inkubace (teplota, čas, míchání/třepání), způsob promývání destičky mezi jednotlivými kroky (vyklepávání pufry vs. promývání pipetou nebo promývačkou) a složení pufry.

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části práce byly shrnuty jednotlivé mechanismy fotonové upkonverze, popsána syntéza core-shell struktur a problematika povrchové modifikace pro biologické účely. Dále byly popsány výhody, které UCNP poskytují oproti běžným fluoroforům jako jsou kvantové tečky a organické molekuly. Poté byly popsány principy imunoanalytických stanovení, zejména rutinně používaná metoda ELISA.

V praktické části byly připraveny core-shell UCNP s obsahem 2 %<sub>mol</sub> thulia. Tyto UCNP vykazovaly emisní maximum při 800 nm. Následně byla představena nová metodika syntézy hydrofilního obalu na bázi akrylamidu v prostředí mikroemulze. Výsledkem syntézy byly ~70 nm UCNP enkapsulované do nanogelového obalu (UCNP-nanogely). Vrstva akrylového gelu je nanočásticím efektivním hydrofilním obalem, který je vhodný pro konjugace s proteiny, tak malými molekulami. UCNP-nanogely a jejich (bio)konjugáty lze uplatnit nejen v imunoanalytických metodách, jak bylo prokázáno, ale i v jednomolekulových stanoveních, přípravě nanosenzorů apod. Široké využití umožňuje právě velikost připravených konjugátů v řádu desítek nanometrů, variabilita složení nanogelu a samotné fluorescenční vlastnosti UCNP. Tento stabilní systém nabízí široké možnosti povrchové modifikace a aplikovatelnost běžných biokonjugačních metod. Pro nepřímé kompetitivní imunostanovení aflatoxinu B1 s upkonverzní detekcí (ULISA), byly UCNP-nanogely konjugovány se streptavidinem standardní karbodiimidovou metodou. Analýza reálných vzorků (ovesných vloček) metodou ULISA neprokázala přítomnost aflatoxinu B1. Stanovení bylo charakterizováno limitem detekce 0,0031 ng/ml, tj. asi 10× méně než poskytla ELISA v referenčních pracích. Nicméně, stanovení se nevyznačovalo dobrou opakovatelností. Pro další využití této metody je nutno provést optimalizaci použitých postupů.

Vývoj imunoanalytických metod s foton-upkonverzní detekcí by do budoucna mohl znamenat možnost kvantitativně stanovit více analytů současně, za krátký čas a s jednoduchým a přenosným vybavením, což současná imunostanovení ani instrumentální metody jako je HPLC nemohou v jednom kroku poskytnout.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Chen, X., Peng, D., Ju, Q., Wang, F. Photon upconversion in core-shell nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2015; **44**, 6, 1318-1330. Dostupné z: doi: 10.1039/C4CS00151F.
- [2] Park, Y.I., Lee, K.T., Suh, Y.D., Hyeon, T. Upconverting nanoparticles: A versatile platform for wide-field two-photon microscopy and multi-modal in vivo imaging. *Chemical Society Reviews*, 2015; **44**, 6, 1302-1317. Dostupné z: doi: 10.1039/c4cs00173g.
- [3] Auzel, F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. *Chemical Reviews*, 2004; **104**, 1, 139-173, ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi: 10.1021/cr020357g.
- [4] Marie-France Joubert. Photon avalanche upconversion in rare earth laser materials. *Optical Materials*, 1999; **11**, 2-3, 181-203, ISSN 0925-3467. Dostupné z: doi: 10.1016/S0925-3467(98)00043-3.
- [5] Haase, M., Schäfer, H. Upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2011; **50**, 26, 5808-5829. Dostupné z: doi: 10.1002/anie.201005159.
- [6] Lee, C., Xu, E.Z., Liu, Y. et al. Giant nonlinear optical responses from photon-avalanching nanoparticles. *Nature*, 2021; **589**, 7841, 230-235. Dostupné z: doi: 10.1038/s41586-020-03092-9.
- [7] Zhang, H.; Wang, X.; Jin, R.; Su, Q. Preparation and Applications of Polymer-Modified Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles. *Giant* 2022, **12**, 100, ISSN 2666-5425. Dostupné z: doi: 10.1016/j.giant.2022.100130.
- [8] Z. Li, Y. Zhang and S. Jiang. Multicolor Core/Shell-Structured Upconversion Fluorescent Nanoparticles. *Advanced Mater*, 2008, **20**, 24, 4765-4769, ISSN 09359648. Dostupné z: doi: 10.1002/adma.200801056.
- [9] Liu, J.-N., Bu, W.-B., Shi, J.-L. Silica Coated Upconversion Nanoparticles: A Versatile Platform for the Development of Efficient Theranostics. *Accounts of Chemical Research*, 2015; **48**, 7, 1797-1805. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.accounts.5b00078.
- [10] Potluri, P. R.; Rajendran, V. K.; Tran, C. T.; McKenzie, D. R.; Sunna, A. Linker-Protein G Mediated Functionalization of Polystyrene-Encapsulated Upconversion Nanoparticles for Rapid Gene Assay Using Convective PCR. *Microchimica Acta*, 2019, **186**, 6. Dostupné z: doi: 10.1007/s00604-019-3466-x.
- [11] Chen, R. et al. Facile fabrication of water-soluble polyacrylic acid encapsulated core@shell upconversion nanoparticles via metal-free light induced surface initiated atom transfer radical polymerization. *Materials Letters*, 2020, **273**, 127, ISSN 0167-577X. Dostupné z: doi: 10.1016/j.matlet.2020.127874.
- [12] BARTOŠ, Vladimír, Kristián ŠAFARČÍK, Marie KARLÍKOVÁ, Ondřej TOPOLČAN, Radek KUČERA a Jindra WINDRICHOVÁ. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu* [online]. Plzeň, 2013 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://oid.fnplzen.cz/sites/users/oid/skripta%20Principy%20imunoanalytick%C3%BDch%20metod%20%282%29.pdf>
- [13] Mark L. Chiu, Dennis R. Goulet, Alexey Teplyakov, and Gary L. Gilliland. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel)*, 2019; **8**, 4, 55. Dostupné z: doi: 10.3390/antib8040055.
- [14] López-Puertollano, D., Agulló, C., Mercader, J. V., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Click Chemistry-Assisted Bioconjugates for Hapten Immunodiagnostics. *Bioconjugate Chemistry*, 2020; **31**, 3, 956-964. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00099.

- [15] Metoda ELISA: aspekty jednotlivých uspořádání. *Baria* [online]. 10.5.2019 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>.
- [16] Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 2008; **5**, 9, 763-75. Dostupné z: doi: 10.1038/nmeth.1248.
- [17] Hlaváček, A., Farka, Z., Hübner, M., Horňáková, V., Němeček, D., Niessner, R., . . . Gorris, H. H. Competitive upconversion-linked immunosorbent assay for the sensitive detection of diclofenac. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**, 11, 6011-6017. Dostupné z doi: 10.1021/acs.analchem.6b01083.
- [18] Suleyman Aydin. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 2015; **72**, 4-15. Dostupné z: doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- [19] Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009; **393**, 2, 569-582. Dostupné z: doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.
- [20] Kuningas, K., Rantanen, T., Karhunen, U., Lövgren, T., & Soukka, T. Simultaneous use of time-resolved fluorescence and anti-stokes photoluminescence in a bioaffinity assay. *Analytical Chemistry*, 2005; **77**, 9, 2826-2834. Dostupné z: doi:10.1021/ac048186y.
- [21] Soukka, T., Kuningas, K., Rantanen, T., Haaslahti, V., & Lövgren, T. Photochemical characterization of up-converting inorganic lanthanide phosphors as potential labels. *Journal of Fluorescence*, 2005; **15**, 4, 513-528. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-005-2825-7.
- [22] Kuningas, K., Rantanen, T., Lövgren, T., & Soukka, T. Enhanced photoluminescence of up-converting phosphors in a solid phase bioaffinity assay. *Analytica Chimica Acta*, 2005; **543**, 1-2, 130-136. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aca.2005.04.034.
- [23] Kuningas, K., Rantanen, T., Ukonaho, T., Lövgren, T., & Soukka, T. Homogeneous assay technology based on upconverting phosphors. *Analytical Chemistry*, 2005; **77**, 22, 7348-7355. Dostupné z: doi:10.1021/ac0510944.
- [24] Zhou, C., Chu, Z., Hou, W., & Wang, X Lanthanide-doped upconversion-linked immunosorbent assay for the sensitive detection of carbohydrate antigen 19-9. *Frontiers in Chemistry*, 2021; **8**. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2020.592445.
- [25] Yan Gong, Yamin Zheng, Birui Jin, Minli You, Jiayu Wang, XiuJun Li, Min Lin, Feng Xu, Fei Li,. A portable and universal upconversion nanoparticle-based lateral flow assay platform for point-of-care testing. *Talanta*, 2019; **201**, 126-133, ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.105.
- [26] Martiskainen I, Juntunen E, Salminen T, Vuorenperä K, Bayoumy S, Vuorinen T, et al. Double-antigen lateral flow immunoassay for the detection of anti-hiv-1 and-2 antibodies using upconverting nanoparticle reporters. *Sensors*, 2021; **21**, 2, 1-17. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aca.2005.04.034.
- [27] Riikka Peltomaa, Elena Benito-Peña, Hans H. Gorris and María C. Moreno-Bondi. Biosensing based on upconversion nanoparticles for food quality and safety applications. *Analyst*, 2021, **146**, 13. Dostupné z: doi: 10.1039/d0an01883j.
- [28] Mykotoxiny. *Bezpečnost potravin* [online]. Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76672.aspx>.
- [29] Rossi, C. N.; Takabayashi, C. R.; Ono, M. A.; Saito, G. H.; Itano, E. N.; Kawamura, O.; Hirooka, E. Y.; Ono, E. Y. S. Immunoassay Based on Monoclonal Antibody for Aflatoxin

- Detection in Poultry Feed. *Food Chemistry*, 2012; **132**, 2211–2216, ISSN 18737072. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.067.
- [30] M. Yang, Y. Zhang, M. Cui, Y. Tian, S. Zhang, K. Peng, H. Xu, Z. Liao, H. Wang and J. Chang, A smartphone-based quantitative detection platform of mycotoxins based on multiple-color upconversion nanoparticles. *Nanoscale*, 2018, **10**, 15865–15874. Dostupné z: doi: 10.1039/c8nr04138e.
- [31] Hlaváček A, Křivánková J, Brožková H, Weisová J, Pizúrová N, Foret F. Absolute Counting Method with Multiplexing Capability for Estimating the Number Concentration of Nanoparticles Using Anisotropically Collapsed Gels. *Analytical Chemistry*, 2022; **94**, 41, 14340–8. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.analchem.2c02989.
- [32] Hayashi Y, Matsuda R, Maitani T, Imai K, Nishimura W, Ito K, et al. Precision, Limit of Detection and Range of Quantitation in Competitive ELISA. *Analytical Chemistry*, 2004; **76**, 5, 1295–301. Dostupné z: doi: 10.1021/ac0302859.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                |                                                            |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| AA             | kyselina akrylová                                          |
| AAM            | akrylamid                                                  |
| AFB1           | aflatoxin B1                                               |
| APS            | peroxodisíran amonný                                       |
| BisAAM         | bisakrylamid                                               |
| BSA            | hovězí sérový albumin                                      |
| DLS            | <i>angl.</i> dynamic light scattering                      |
| EDC            | 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl karbodiimid hydrochlorid |
| ELISA          | <i>angl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay             |
| LF(I)A         | <i>angl.</i> lateral flow (immuno)assay                    |
| $\lambda_{em}$ | emisní vlnová délka                                        |
| $\lambda_{ex}$ | excitační vlnová délka                                     |
| MT             | mikrotitrační (destička)                                   |
| SA             | streptavidin                                               |
| S-NHS          | <i>N</i> -hydroxysulfosukcinimid sodný                     |
| TEMED          | <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl-ethylendiamin             |
| TEOS           | tetraethyl-orthosilikát                                    |
| TEM            | transmisní elektronová mikroskopie                         |
| UCNP           | foton-upkonverzní nanočástice                              |
| ULISA          | <i>angl.</i> upconversion-linked immunosorbent assay       |
| QDs            | kvantové tečky                                             |