



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

BIOSENZORY NA BÁZI MODIFIKOVANÝCH NANOČÁSTIC

BIOSENSORS BASED ON MODIFIED NANOPARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ANA MIHAJLOVIĆ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JAROMÍR HUBÁLEK, Ph.D.

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Ana Mihajlović

ID: 125055

Ročník: 3

Akademický rok: 2011/2012

NÁZEV TÉMATU:

Biosenzory na bázi modifikovaných nanočástic

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši využití nanočástic v analytických technikách využitelných pro diagnostiku zajímavých látek. Zaměřte se na využití kvantových teček na bázi polovodičů AIBVI využívaných pro značkování v detekci nukleových kyselin nebo proteinů. 2) Zvolte vhodné nanočástice a látky a navrhnete metodiku jejich přípravy. 3) Ověřte postup v laboratoři tím, že modifikujete povrch nanočástic požadovanými látkami tak, aby se zvýšila specifická afinita hledaných nukleových kyselin nebo proteinů. 4) Analyticky ověřte vhodnou detekční metodou správnou funkci metodiky. 5) Proveďte diskusi výsledků a zhodnoťte praktickou využitelnost.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] MERKOCI, A. Biosensing Using Nanomaterials, Wiley series in Nanoscience and Nanotechnology, 2009

[2] DRBOHLAVOVÁ, J., ADAM, V., KIZEK, R., HUBÁLEK, J. Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. International Journal of Molecular Sciences. 2009 (10)(2). p. 656 - 673

Termín zadání: 6.2.2012

Termín odevzdání: 25.5.2012

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Ing. Jana Chomoucká, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá bio senzory na bázi modifikovaných polovodičových kvantových teček (AIIBIII). Tato práce je rozdělena do tří hlavních částí. V první se pojednává o teorii nutné k použití QDs v bioaplikacích, jsou popsány metody syntézy, biokonjugace a aplikace QDs. V praktické části, byly připraveny CdTe-GSH, CdTe-MPA a CdTe-TGA kvantové tečky přímou syntézou koloidních QDs. Tyto kvantové tečky byly pak modifikovány pomocí EDC s cílem zvýšení afinity vůči BSA (hovězí sérum albumin). Pro analýzu vzorků byly použity přístroje Infinite M200 Pro, Tecan a FluoroLog HORIBA Jobin Yvon s detektorem Quanta ϕ . Třetí část je závěr kde jsou shrnutí výsledky práce a dosažené cíle.

Abstract:

This thesis deals with biosensors based on modified semiconductor quantum dots(AIIBIII). This work is divided into three main parts. The first deals with the theory necessary for the use of QDs in bioapplications, there are described methods of synthesis, application and bioconjugation of QDs . In the practical part, GSH-CdTe, CdTe-MPA and TGA-CdTe quantum dots were prepared by direct colloidal synthesis. These quantum dots were then modified by EDC in order to increase affinity to BSA (bovine serumalbumin). For the analysis of samples were used Infinite M200, Tecan and HORIBA Jobin Yvon FluoroLog detector Quanta ϕ . The third part is the summary of results and work achievements.

Klíčová slova:

Kvantové tečky, QDs, syntéza, modifikace, Kadmium, vodorozpustné kvantové tečky, polovodičové kvantové tečky, BSA, EDC, GSH, MPA, TGA.

Keywords:

Quantum dots, QDs, synthesis, modification, Cadmium, colloidal quantum dots, semiconductor quantum dots, BSA, GSH, MPA, TGA.

Bibliografická citace díla:

MIHAJLOVIĆ, A. *Biosenzory na bázi modifikovaných nanočástic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. XY s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Prohlášení autora o původnosti díla:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Biosenzory na bázi modifikovaných nanočástic jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce projektu a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 24. 5. 2012

.....

Poděkování:

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Doc. Ing. Jaromíru Hubálkovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Janě Chomoucké, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování práce. Také bych ráda poděkovala všem, kteří mě jakkoli podpořili při psaní této bakalářské práce.

V Brně dne 24. 5. 2012

.....

OBSAH

ÚVOD	- 6 -
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY	- 7 -
1.1 DEFINICE A APLIKACE NANOTECHNOLOGIÍ.....	- 7 -
1.2 KVANTOVÉ TEČKY.....	- 8 -
1.3 SYNTÉZA QDS.....	- 10 -
1.3.1 <i>Syntéza hydrofobních QDs</i>	- 10 -
1.3.2 <i>Metody solubilizace</i>	- 10 -
1.3.3 <i>Přímá syntéza koloidních QDs</i>	- 12 -
1.4 BÍOKONJUGACE QDS.....	- 14 -
1.5 APLIKACE QDS.....	- 18 -
1.5.1 <i>Měření koncentrace maltózy</i>	- 18 -
1.5.2 <i>Imunologické testy</i>	- 18 -
1.5.3 <i>Detekce BSA</i>	- 19 -
1.6 DETEKTORY SIGNÁLU U TECHNOLOGIÍ ZALOŽENÝCH NA QDS.....	- 21 -
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 22 -
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	- 22 -
2.2 ZAŘÍZENÍ A LABORATORNÍ VYBAVENÍ:.....	- 22 -
2.3 SYNTÉZA QDS.....	- 23 -
2.3.1 <i>Syntéza glutathionem ovrstvených QDs CdTe-GSH</i>	- 23 -
2.3.2 <i>Syntéza merkaptoproinovou kyselinou ovrstvené QDs</i>	- 23 -
2.3.3 <i>Syntéza thyoglykolovou kyselinou ovrstvené QDs</i>	- 23 -
2.4 PŘÍPRAVA FOSFÁTOVÉHO PUFRU.....	- 23 -
2.5 NAVAZOVÁNÍ BSA NA KVANTOVOU TEČKU.....	- 24 -
2.5.1 <i>Navazování BSA na QDs bez modifikace povrchu</i>	- 24 -
2.5.2 <i>Navazování BSA na QDs s modifikací povrchu</i>	- 24 -
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	- 25 -
3.1 CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH QDS FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIÍ.....	- 25 -
3.2 VLIV KONCENTRACE QDS NA INTENZITU FLUORESCENCE.....	- 28 -
3.3 KONJUGACE QDS S BSA BEZ MODIFIKACE POVRCHU.....	- 31 -
3.4 KONJUGACE QDS S BSA MODIFIKACÍ POVRCHU.....	- 35 -
4 ZÁVĚR	- 38 -
5 POUŽITÁ LITERATURA	- 39 -

Úvod

V současnosti je problematika *biosenzorů* a jejich modifikací jednou z nejintenzivněji zkoumaných oblastí biotechniky. Biosenzory hrají klíčovou roli na poli moderních diagnostických metod, jelikož umožňují rychlejší detekci patologických procesů a tím pomáhají v boji proti mnohým závažným chorobám. Touto problematikou se zabývá celá řada různých specializovaných pracovišť (v oblasti chemie, biologie, elektronika aj.), které spolupracují při výzkumu a vývoji stále novějších a dokonalejších biosenzorů.

V této práci jsem se zabývala biosenzory na bázi modifikovaných nanočástic, přesněji na bázi modifikovaných kvantových teček. Kvantové tečky byly vybrány, protože mají vynikající fyzikální a optické vlastnosti a jejich povrch se může modifikovat tak, aby se zvýšila jejich afinita ke specifickým látkám, které chceme podrobněji zkoumat. Cílem je zkoumat význam koloidních kvantových teček na bázi kadmia (Cd), sumarizovat různé postupy jejich přípravy a konečně najít vhodné látky k jejich modifikaci, tj. aby byla zvýšena afinita kvantové tečky vůči BSA („bovine serum albumin“, hovězí sérový albumin), který je významný zejména kvůli jejímu strukturálnímu podobání s HSA („human serum albumin“, lidský sérový albumin) i funkci kterou plní v oběhovém systému.

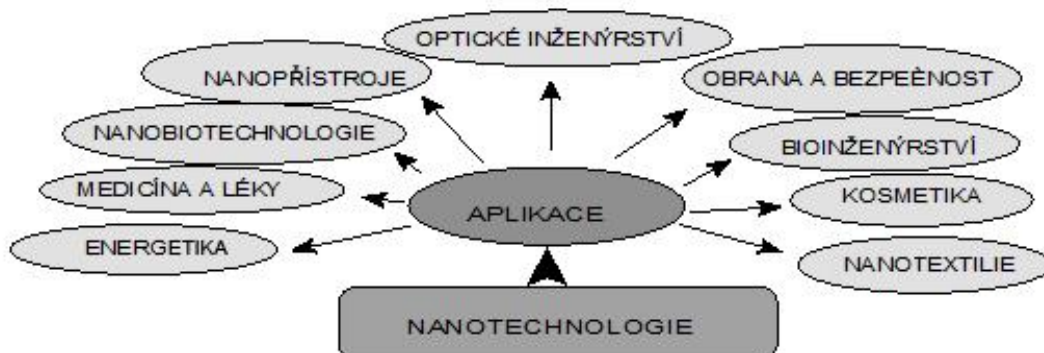
1 Současný stav řešení problematiky

1.1 Definice a aplikace nanotechnologií

*Nanotechnologie*¹ představují vědecko-technický obor, jenž se zabývá zkoumáním, syntézou a aplikací materiálů a přístrojů s funkční organizací na úrovni jedné miliardtiny metru (tj. nanometru). Částice o velikosti v rozmezí (1–100) nm pak nazýváme *nanočástice*.

Základy nanotechnologie položil Richard Feynman² v roce 1959 ve své přednášce „*Tam dole je spousta místa*“. Feynman se zde zabýval možností manipulace s materiály na úrovni atomů a molekul, přitom využil představy, v níž je celá *Encyclopædia Britannica*³ napsané na špičce jehly. Samotný termín „nanotechnologie“ se objevil až později, a sice v roce 1974, kdy jej poprvé použil Norio Taniguchi⁴, který se zabýval možnostmi inženýrství materiálů na úrovni nanometru [1].

Široké spektrum uplatnění nanotechnologií v současnosti přehledně shrnuje **Chyba! Ne-nalezen zdroj odkazů.**



Obr. 1 Aplikace nanotechnologií

¹ Slovo „nanotechnologie“ vzniklo spojením starořeckých slov „*νανος*“ (čti „nanos“), jehož původní význam je trpaslík a „*τεχνολογια*“ (čti „technologia“) ve významu nauky o dovednostech.

² **Richard Phillips Feynman** (1918–1988) – americký fyzik, držitel Nobelovy ceny za fyziku z roku 1965, který podle mnohých patřil k největším fyzikům 20. století.

³ **Encyclopædia Britannica** poprvé vydaná mezi lety 1768 a 1771 v Edinburghu je v současnosti největší tištěnou encyklopedií na světě.

⁴ **Norio Taniguchi** (1912–1999) – japonský fyzik.

1.2 Kvantové tečky

Kvantové tečky (mn. č. QDs z anglického „Quantum Dots“, j. č. QD) jsou nanokrystaly vytvořené obvykle z polovodičových materiálů. Skládají se přitom jen z několika stovek až několika milionů atomů a malého počtu volných elektronů (méně než 100) [2]. Velikost QDs se obvykle pohybuje od 2 do 20 nm, což se odvíjí od materiálů použitých pro jejich přípravu. Samotná velikost nanočástice však není nejpodstatnější vlastností určující pojem kvantová tečka, za kvantovou tečku totiž považujeme až takovou nanočástici, jež vykazuje tzv. *efekt kvantového omezení* a její poloměr je navíc menší než některá z následujících veličin: Bohrov⁵ poloměr elektronu (a_e), díry (a_h) a excitonu (a_{exc}). Díky efektu kvantového omezení leží vlastnosti QDs na pomezí nanokrystalů a jednotlivých atomů [3].

Dodejme ještě, že v některých publikacích významy slov nanočástice, nanokrystal a kvantová tečka splývají, avšak v naší práci budeme tyto pojmy striktně rozlišovat.

Jednou z nejdůležitějších vlastností QDs je jejich schopnost fotoluminiscence, kdy při ozáření QDs ultrafialovým nebo viditelným zářením dochází k excitaci elektronů, tj. kvantovou tečkou zachycené elektrony přijímají energii kvant záření a přecházejí na vyšší energetické hladiny, kde určitou dobu setrvávají. Po návratu do původního stavu pak dochází ke zpětnému vyzařování fotonů kvantovými tečkami, přičemž tento jev je označován jako fotoluminiscence [3] [4].

Na rozdíl od organických fluoroforů, QDs vykazují poměrně široká absorpční spektra, úzká a symetrická emisní spektra (šířka pásu v polovině maxima se udává cca. 25 až 40 nm), dobrou chemickou stabilitu a delší životnost fotoluminiscence (v řádu desítek nanosekund). Poloha maxima emisní křivky při fotoluminiscenci přitom závisí na velikosti QDs, kdy se s jejich zmenšující velikostí posouvá z červené (750 nm) do modré oblasti (400 nm) spektra. QDs jsou excitovány všemi nižšími vlnovými délkami než je jejich emisní vlnová délka, proto je možné současně excitovat QDs s různou vlnovou délkou emise jedním zdrojem [5].

Jednou z důležitých vlastností QDs je jejich vynikající odolnost vůči fotooxidaci označované také jako tzv. „photobleaching“ (fotobělení). Pro ještě lepší ochranu povrchu QDs před photobleachingem může být navíc pasivován, čehož se dosahuje obalením jádra nanokrystalu vnější slupkou z polovodičů s vyšším pásmem energie nebo organickou vrstvou. Úspěšně pasivované QDs vykazují lepší fotostabilitu, což umožňuje jejich dlouhodobé pozorování během optických experimentů [5].

⁵ **Niels Henrik David Bohr** (1885–1962) – dánský fyzik, držitel Nobelovy ceny za fyziku z roku 1922, jenž významně přispěl k pochopení struktury atomu a základních principů kvantové mechaniky.

Jak již bylo řečeno výše, QDs bývají zpravidla založeny na polovodičových materiálech (Cd, Te, Pb, Se, Zn, Sn, In, As, Si, Ge), avšak existují i QDs na bázi vodičů, resp. kovů (Ni, Co, Pt, Au.). V této práci, jak jsem již avizovala dříve, se budu věnovat kvantovým tečkám na bázi kadmia. Dnes jsou nejvíce používané QDs na bázi kadmia (Cd) protože jejich oblast kvantového omezení zahrnuje celé optické spektrum [2][5].

QDs můžeme rozdělit z hlediska jejich struktury na dva typy: QDs složené pouze z jádra („core“) a QDs se strukturou jádro-slupka („core/shell“), viz Obr. 2. Přitom první typ tvořený materiálem jednoho polovodiče (CdS, CdSe, CdTe, CdPb) bývá v praxi využíván méně často. V případě druhého typu je jádro QDs obklopeno slupkou tvořenou dalším polovodičem (příklady struktury jádro-slupka: CdS/ZnS, CdSe/ZnS, CdSe/ZnSe, CdSe/CdS, CdTe/ZnS, CdTe/CdS), což má mj. příznivý vliv na fotoluminiscenci a stabilitu jádra. Velikost a složení jádra přitom určuje emisní vlnovou délku QD. Jádra z různých polovodičů umožňují fotoluminiscenci v různých oblastech spektra [5].



Obr. 2 Jádro (vlevo) a jádro-slupka (vpravo) QDs, převzato a upraveno z [5]

Je nutné dodat, že QDs mají i určité své nevýhody, zejména jsou kvůli své anorganické povaze nerozpustné ve vodném prostředí, což představuje jistou bariéru pro biologické aplikace. QDs založené na polovodičových materiálech sloučenin II-VI skupiny mají navíc jádro zhotovené obvykle z kadmia, které je značně toxické. Ionty kadmia jsou schopné navázat se na thiolové skupiny v mitochondriích a způsobit tak poškození nebo smrt buněk. Uvolnění těchto iontů může být redukováno přidáním vrstvy (slupky) nebo modifikací povrchu QDs [5]. Ochranná vrstva má za funkci bránit vzniku reaktivních forem kyslíku (hydroxylový radikál: $\cdot\text{OH}$ a superoxid: $\text{O}_2^{\cdot-}$) a singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Reaktivní formy kyslíku jsou pro lidský organismus rovněž toxické a mohou způsobit poškození nukleových kyselin, enzymů a buněčných složek. Z těchto příčin je v současnosti vynakládáno značné úsilí na syntézu QDs rozpustných ve vodě a na modifikaci jejich povrchu tak, aby se zmenšila jejich toxicita a tím rozšířila možnost jejich aplikace v biologii [2].

1.3 Syntéza QDs

Jedním z cílů v oblasti syntézy QDs je najít vysoce svítící polovodičové nanokrystaly, které mohou být jednoduše připraveny a přitom splňují všechny podmínky pro použití v biologických aplikacích (biokompatibilita, stabilita, rozpustnost ve vodném prostředí atd.). Podstatné je rovněž to, aby polovodičový materiál tvořící jádro QDs byl chráněn před degradací a oxidací. Další potenciální obtíží bývá vysoká reaktivita jader QDs, jež mohou nespecificky interagovat s makromolekulami, což vede k agregaci částic v biologickém prostředí. Tento problém může být snížen nebo dokonce odstraněn přidáním slupky na QDs. Také za účelem zlepšení stability a zvýšení fotoluminiscence jádra QDs byly vyvinuty postupy modifikace jejich povrchu [2].

Existuje několik metod syntézy QDs, které mají zásadní vliv i na jejich výsledné vlastnosti, tudíž způsob výroby QDs může ovlivnit rozsah jejich následné aplikace. Metody tzv. shora dolů („top-down“) jsou využívány pro přípravu QDs z velkého objemu materiálu. Jedna z takových možných příprav je syntéza založená na litografii. Tyto metody však mají jistou nevýhodu v tom, že jimi připravené QDs vykazují zhoršené optické vlastnosti. Metody tzv. zesponu nahoru („bottom-up“) jsou založeny na chemickém principu, přitom je možné jimi připravit koloidní QDs s konzistentními vlastnostmi [6].

1.3.1 Syntéza hydrofobních QDs

Koloidní hydrofobní QDs jsou nejčastěji syntetizovány metodou kontrolované nukleace a růstu částic. Syntéza probíhá v roztoku organokovových/chalkogenových prekurzorů a její podstatou je vstříknutí roztoku reagentů do koordinačního roztoku, který je ohříván při vysoké teplotě za intenzivního míchání. Jako koordinační roztoky jsou přitom používány TOPO (trioctylphosphin oxid), TOP (trioctylphosphin) a HDA (hexadecylamin). Ligandy v koordinačním roztoku zabraňují agregaci prostřednictvím Ostwaldova⁶ procesu zrání, jehož podstata tkví v tom, že malé krystaly jsou rozpustnější než velké, rozpustí se tedy dříve a následně se usadí na povrch velkých částic [2].

1.3.2 Metody solubilizace

Jelikož většina metod snímání za pomoci QDs se v biologických systémech uplatňuje v roztoku, pro použití koloidních hydrofobních QDs v bioaplikacích musí po jejich syntéze následovat procedura umožňující jejich solubilizaci. Existuje několik způsobů takových modifikací QDs. Na povrchu nanokrystalu se vytvoří vnější obal, který zajistí solvataci jinak hydrofobních nanokrystalů ve vodném prostředí. Ten současně nese funkční skupiny vhodné

⁶ **Wilhelm Ostwald** (1853–1932) – německý filosof a fyzikální chemik, nositel Nobelovy ceny za rok 1909.

pro konjugační reakce. Podle struktury a chemické povahy existují tři následující možnosti solubilizace (viz Obr. 3):

- Výměna ligandů

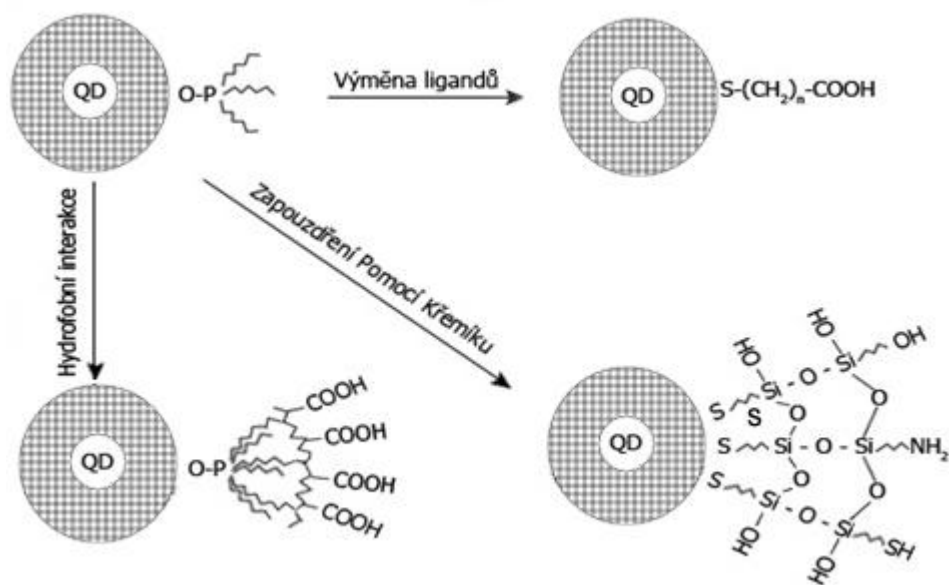
Tato metoda zavádí na povrch QDs bifunkční ligandy, jejichž jedna část je tvořena funkční skupinou, která zajišťuje donor-akceptorovou vazbu s povrchovými atomy nanokrystalu (nejčastěji thiolová skupina) a druhá část nese vhodnou reaktivní skupinu (karboxylová nebo aminoskupina) umožňující solvataci.

- Hydrofobní interakce

Touto metodou modifikace je možné na povrchu QDs vázat ligandy a polymery prostřednictvím hydrofobních interakcí. Tato technika se používá převážně pro převedení hydrofobních QDs do vodného prostředí. Její podstatou je zavedení amfifilních molekul na povrch QDs. Jedna část těchto molekul přitom zajišťuje hydrofobní interakci s povrchem QDs a TOP anebo TOPO ligandy, druhá část pak podporuje rozpustnost a chemickou reaktivitu. Pro tento typ úpravy povrchu QDs byly úspěšně použity triblokové kopolymery, fosfolipidy a amfifilní sacharidové deriváty [5].

- Zachycení polymerů

Další metodou stabilizace je zachycení jedné nebo několika QDs v polymerním obalu. Robustní a biokompatibilní obal lze vytvořit pomocí silanizace spočívající v nanosení několika jednotek až desítek nanometrů silné vrstvy oxidu křemičitého na povrch QD. Tato vrstva jim dodává stabilitu, snižuje jejich cytotoxicitu a umožňuje zavedení vhodných reaktivních skupin, pomocí nichž je možné křemíkový obal dále modifikovat. Silanizaci je takto možné provést za pomoci křemíkového prekurzoru TEOS (Tetraethyl Orthosilikát) [2] [3].



Obr. 3 Schematické znázornění možností solubilizace QDs, převzato a upraveno z [2]

1.3.3 Přímá syntéza koloidních QDs

Přímou syntézou můžeme vytvořit koloidní QDs určité velikosti, s lepšími luminiscenčními vlastnostmi a s vynikající biologickou kompatibilitou a stabilitou. Na rozdíl od hydrofobních QDs s následným krokem umožňující jejich rozpouštění ve vodě vykazují lepší reprodukovatelnost, nižší toxicitu a navíc je celý proces výroby levnější.

Syntéza ve vodě rozpustných QDs se nejčastěji provádí v tříhrdlé baňce spojené se zpětným chladičem. Spočívá přitom v reakci prekursoru těžkého kovu (Cd, Zn, Pb, Sn,...) s prekurzorem chalkogenu. Chalkogen potřebný pro syntézu QDs může být použit ve formě komerčně dostupných prášků, příp. je připraven v laboratoři před použitím v procesu syntézy [2] [6].

Pro syntézu ve vodě rozpustných CdTe QDs může být jako prekurzor chalkogenu použit teluricitan sodný (Na₂TeO₃) v komerční práškové formě nebo čerstvě připravený hydrogen telurid sodný (NaHTe), jenž je však, na rozdíl od Na₂TeO₃, za normálních podmínek nestabilní, a proto je nutné syntézu QDs s jeho pomocí provádět v inertním prostředí. NaHTe může být připraven ve dvouhrdlé baňce při teplotě 35 °C, za intenzivního míchání teluridového prášku s roztokem borohydridu sodného (NaBH₄). Během prvních 15 min ohřívání suspenze změni svou barvu z fialové do bezbarvé [7].

Pro přípravu koloidních QDs se používají octany, dusičnany a chloridy jako prekurzory těžkého kovu. Syntéza ve vodě rozpustných QDs spočívá v jednom kroku a provádí se v tříhrdlé baňce spojené se zpětným chladičem, v němž reagují prekurzory těžkého kovu

s prekurzorem chalkogenu. Pro stabilizaci se využívají různé thioly (např. glutathion, merkaptopropionová kyselina, thioglykolová kyselina). Tyto stabilizátory zajišťují chemickou a fyzikální stabilitu a možnost modifikace povrchu QDs navázáním funkčních skupin (aminoskupina a karboxylová skupina). Nanokrystaly pak vznikají smísením vhodných prekurzorů a následným zahříváním (v rozsahu teplot (90–100) °C po dobu několik hodin). Velikost výsledných QDs i vlnová délka jejich emise závisí na použitých prekurzorech a délce zahřívání. Takto připravené QDs však mohou obsahovat četné defekty a vykazovat slabší fotoluminiscenci, proto se využívá mikrovlnné syntézy založené na homogenním zahřívání, kdy vzniklé částice jsou uniformnější a mají vyšší kvantový výtěžek.

QDs jsou připravované různými způsoby. Dle Wei Zhanga a kolektivu mohou CdTe-MPA QDs být připraveny ve tříhrdlé baňce spojené se zpětným chladičem za intenzivního míchání pomocí $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, NaHTe, přičemž je jako stabilizátor použita merkaptopropionová kyselina [8].

Příprava koloidních CdSe-TGA QDs dle Yilin Wang a kolektivu může být vyrobena ve tříhrdlé baňce spojené se zpětným chladičem pomocí $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 a oxidu siřičitého (SO_2) při teplotě 100 °C. Jako stabilizátor je přitom využita thioglykolová kyselina (TGA) [9].

Kromě MPA a TGA mohou být QDs stabilizovány pomocí glutathionu (GSH). Tuto syntézu probíhající pod refluxem popisuje např. Mei Xue a kolektiv [7].

Syntéza ozářením mikrovlnami je velmi efektivní, jelikož jí lze za výrazně kratší dobu produkovat relativně kvalitní QDs. Tento proces syntézy je založen na ohřevu reaktantů průnikem mikrovln, jehož výsledkem jsou QDs bez povrchových defektů, které vykazují lepší fotoluminiscenci. Velikost QDs připravených tímto způsobem regulujeme změnou doby ohřevu, přitom růst QDs zastavujeme vypnutím zdroje mikrovlnného záření a ochlazením výsledného produktu [2].

1.4 Biokonjugace QDs

Pro použití QDs v bioaplikacích je nutné je nejprve biofunkcionalizovat, tj. různými metodami vytvořit spojení QDs s biomolekulou (tzv. biokonjugace). Při biokonjugaci je zásadní, aby celý proces, resp. jeho výsledný produkt, splňoval několik požadavků, kterými jsou:

- aktivita biomolekuly jím nesmí být kompromitovaná,
- signál QD by neměl být omezen,
- umožnění kontroly počtu spojení na povrchu QDs, ke kterým se mohou biomolekuly navázat,
- kombinace QD-biomolekula musí být stabilní,
- tloušťka slupky QD má být co nejmenší ve srovnání s velikostí QD.

Úspěšná a vhodná biofunkcionalizace QDs musí navíc splnit požadavky na koloidní stabilitu, bioinertnost, nízkou toxicitu a vysokou specifitu k zájmovým biomolekulám.

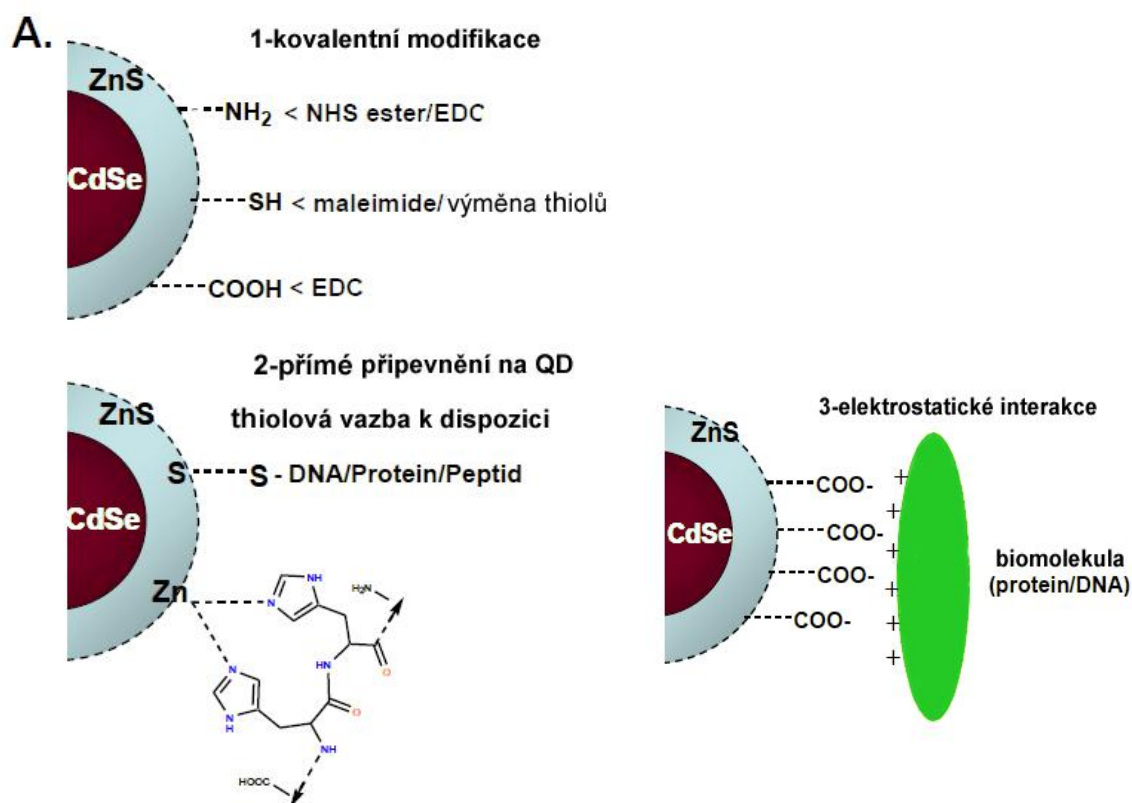
Přestože QDs mají relativně malou velikost, disponují dostatečně velkým povrchem pro vytvoření velkého množství spojení s biomolekulami. Tato spojení je možné připravit několika způsoby (ilustrované na Obr. 4), přičemž jedním z nich je přímá vazba mezi QD a biomolekulou. Tento typ vazby může být kovalentní nebo nekovalentní. Další možností je vytvoření vazby prostřednictvím jiné molekuly (tzv. „crosslinker“) [10].

Přímá nekovalentní vazba mezi QD a biomolekulou je založena na navázání biomolekul na povrch QD pomocí elektrostatických nebo hydrofobních sil, přičemž tato procedura je nejméně náročná. Elektrostatické síly můžeme využít ke spojení záporně nabitých QDs CdTe a pozitivně nabitých enzymů nebo spojení pozitivně nabitých částí proteinu s negativně nabitým komplexem alkyl-COOH-QD. Proteiny navázané na QDs mohou zvýšit stabilitu jejich povrchu a zlepšit tak i jejich optické vlastnosti. Tento efekt je možné pozorovat při navázání deseti až patnácti pozitivně nabitých částic (pentahistidinový segment) maltózového proteinu na povrch QD. Nevýhodou nekovalentního způsobu spojení je, že aktivita biomolekul může být ovlivněna reaktivním povrchem QD a je obtížné kontrolovat počet navázaných biomolekul na jednu QD [10].

Kovalentní způsob biokonjugace QDs je nejčastěji uskutečňován pomocí thiolových vazeb. Thiolové kyseliny přítomné na povrchu QDs jsou přitom nahrazeny thiolovými biomolekulami. Takto můžeme na povrch QDs navázat například oligonukleotidy, DNA či hovězí sérový albumin (BSA). Biokonjugace QDs může být založena i na reakci karboxylové skupiny nacházející se na povrchu QDs a amino skupiny proteinu. Tento způsob biokonjugace je používán pro navázání imunoglobulinu G (IgG) na povrch QD, přičemž tento komplex se

užívá jako ukazatel přítomnosti rakoviny. Stejným způsobem lze na povrch QDs navázat i streptavidin, kdy výsledný komplex je možno použít ke značkování aktinu, mikrotubul a buňčného jádra [10].

Jak již bylo uvedeno výše, biomolekuly se na povrch kvantové tečky mohou navázat prostřednictvím jiné molekuly, jež mezi nimi působí jako spojka (tzv. mediátor). Tento způsob biofunkcionalizace je založen na navázání mediátoru na povrch kvantové tečky (kovalentní nebo nekovalentní vazbou) z jedné strany a reakcí mediátoru s reaktivními skupinami biomolekuly (thiolová nebo amino skupina) na druhé straně mediátoru. Mediátor přitom zajišťuje velmi specifické spojení s biomolekulou. Existují dva typy mediátorů, a sice heterobifunkcionalizační a homobifunkcionalizační mediátor. U prvního typu jsou obě reaktivní skupiny neblokované a u druhého typu je jedna reaktivní skupina blokována, přičemž je nutné tuto blokaci před použitím mediátoru odstranit. Nevýhodou tohoto přístupu je, že homobifunkcionalizační mediátory s neblokovanými reaktivními skupinami mohou způsobit shlukování QDs. Další nevýhodou biokonjugace pomocí mediátoru je, že lze jen velmi těžko kontrolovat počet biomolekul, které se mají navázat na jednu kvantovou tečku, a proto je nutné je separovat. Separaci je možné provést za pomoci gelové elektroforézy [10].



Obr. 4 Metody biokonjugace QDs, převzato a upraveno z [11]

Biofunkcionalizace QDs se provádí za účelem snadného navázání zájmových látek (proteiny, nukleové kyseliny), např. pro detekci biotinylovaných biomolekul lze využít proteiny streptavidin nebo avidin, či k detekci fibroblastů pak QDs mohou být funkcionalizovány za pomoci esteru (biotinamidocaprioc kyselina 3-sulfo-N-hydroxysuccini-midu ester), který se následně váže s fibroblasty, jež se předtím inkubují s faloidin-biotinem a streptavidinem [10].

V současnosti se kvantové tečky pro detekci proteinů a nukleových kyselin nejčastěji modifikují pomocí následujících mediátorů:

- streptavidin - detekce biotinylovaných proteinů);
- EDC (1-Etyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid hydrochlorid) - pro značení DNA přes 5' fosfátové skupiny, jako mediátor mezi povrchem QDs, který je pokryt četnými volnými karboxylovými skupinami a proteiny;
- sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) - mediátor mezi povrchem QDs, jež pokrývají četné karboxylové skupiny a proteiny, zlepšuje účinnost reakcí, kde EDC hraje roli mediátoru [12].

Tian a kolektiv se zabývali zobrazením buněk obsahujících insulin, k čemuž použili modifikované CdTe QDs stabilizované TGA nebo glutationem. Tyto QDs následně funkcionalyzovali pomocí EDC a NHS, které sloužily jako mediátory pro specifickou konjugaci insulinu k povrchu QDs [13].

Shan a kolektiv se zabývali detekcí proteinů a peptidů pomocí modifikovaných koloidních CdTe QDs. Syntetizovali CdTe-MPA QDs a poté je pomocí NHS upravili a použili k detekci proteinů a peptidů [14].

1.5 Aplikace QDs

Rostoucí schopnost úspěšné syntézy a biofunkcionalizace QDs dnes umožňuje jejich bohaté využití v různých biologických aplikacích. Jak již bylo zmíněno výše, QDs disponují vynikajícími fluorescenčními vlastnostmi, proto je jejich využití v oblasti biosenzorů velmi atraktivní, neboť technologie založené na fluorescenci jsou vysoce citlivé. Navíc QDs vykazují značnou fotostabilitu, což umožňuje dlouhodobé pozorování zkoumané látky. Dále v této práci budou představeny aplikace QDs v oblasti biosenzorů a využití QDs při značení pro biologické snímání.

1.5.1 Měření koncentrace maltózy

V tomto případě je povrch QDs funkcionalizován pomocí MBP (maltose-binding proteinu). MBP na vazebném místě obsahuje β -cyclodextrin-QSY-9, jenž potlačuje emisi QDs. Pokud však maltóza β -cyclodextrin-QSY-9 nahradí, vyvolá tím emisi QDs [5].

Další metodou, kterou lze využít k stanovení koncentrace maltózy, je tzv. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, příp. Förster⁷ Resonance Energy Transfer, Fluorescenční rezonanční energetický transfér) je proces přenosu energie z donoru na akceptor projevující se pouze v situaci, kdy vzdálenost mezi částicemi je menší než tzv. Försterův poloměr (vzdálenost, při které je účinnost přenosu energie 50%). FRET se projevuje zkrácením excitační doby donoru, sníženou emisí donoru a zvýšením intenzity emise akceptoru [8]. Na tomto principu fungují senzory založené na QDs funkcionalizovaných pomocí MBP, přičemž tyto senzory se chovají jako dvojitě FRET senzory. Podstata těchto senzorů je ta, že Cy3 (kyanové fluorescenční barvivo), které se nachází na povrchu MBP, je excitováno emisí QDs. Při přechodu zpět do původního stavu Cy3 emituje energii, která excituje β -cyclodextrin-Cy3.5, přičemž pozorujeme emisi. Maltóza po zavedení do senzoru nahrazuje β -cyclodextrin-Cy3.5 a emise Cy3 tak dále není omezena [10].

1.5.2 Imunologické testy

QDs nacházejí své využití i v imunologických testech („immunoassay“). Testy jsou pomocí QDs provedeny např. kovalentním navázáním protilátky na tzv. „glass chip“ a následným spojením tohoto systému s antigenem. Dále je antigen detegován přidáním protilátky značené kvantovými tečkami [10]. Konjugát QD-protilátka je rovněž možné připravit z biotilovaných protilátek a konjugátu QD-streptavidin, jelikož mezi biotinem a streptavidinem se tvoří silná specifická vazba, nebo přímým spojením QD a protilátky za přítomnosti EDC a NHS [5].

⁷ Theodor Förster (1910–1974) – německý fyzikální chemik.

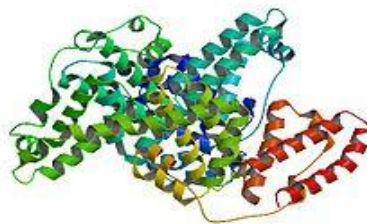
V některých případech je možné detegovat více látek současně. Souběžnou detekci patogenní *E. Coli* a salmonelly je možné provést pomocí imunomagnetické chemické analýzy založené na použití QDs, kdy je nejprve třeba konjugovat anti-*E. Coli* a anti-Salmonelly konjugátem kvantová tečka-streptavidin, přičemž je každé z protilátek přidána jiná barva. Kvantové tečky také mohou být použité při diagnostice hyperplazie prostaty a rakoviny prostaty. V tomto případě je konjugát streptavidin-quantová tečka konjugován s protilátkou proti PSA (prostatický specifický antigen) [5].

V současnosti se stále zvyšuje potřeba rozvíjet nové, modernější a přesnější metody diagnostiky nejrůznějších typů chorob. FISH (Fluorescence in situ Hybridization) je cytogenetická metoda umožňující detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromozomech. Jako příklad uvedme biotinylovanou DNA spojenou s konjugátem streptavidin-QDs, kdy výsledný konjugát lze použít ve FISH metodě pro detekci Her2 markeru v buňkách karcinomu prsu [5]. Pro značení Her2 markeru je rovněž možné použít vícebarevné kvantové tečky biofunkcionalizované streptavidinem nebo IgG (imunoglobulin G) [10].

Použití QDs má přednost před použitím organických barviv při sledování jednotlivých molekul. Např. Dahan a kolektiv úspěšně provedli sledování jednotlivých receptorů glycinu značených kvantovými tečkami pomocí elektronového mikroskopu, což jim umožnilo pozorovat vstup jednotlivých receptorů glycinu do synapsí buněk žijících na neuronové membráně [10].

1.5.3 Detekce BSA

V této bakalářské práci se budeme věnovat detekci BSA (Obr. 5) modifikovanými kvantovými tečkami, a proto tady trochu více popíšeme tento protein, který byl vybrán díky jeho medicínskému významu, nízké ceně, pohotové dostupnosti a neobvyklými vlastnostmi navázání na ligandy [15].



Obr. 5 BSA (hovězí sérum albumin) převzato z [16]

BSA je jedním z nejvíce studovaných proteinů, zejména kvůli jejímu strukturálnímu podobání s HSA (lidský sérový albumin). Mezi biologickými makromolekulami, BSA je hlavní rozpustnou složkou oběhového systému a má mnoho fyziologických funkcí (skladiště a transport proteinu atd.). Dnes je BSA často používán pro modifikaci povrchu nanočástic (např. QDs), protože vůči nim má silnou afinitu. Výsledky různých stádií interakcí BSA s QDs ukázaly, že se při jejich vzájemném navázání uplatňují nejrůznější vazby. Zhao a kolektiv ve své studii uvádějí, že hlavní typy vazeb uplatňující se při interakci BSA a QDs a stabilizující tento komplex jsou vodíkové vazby a Van der Waalovy síly [17]. Oproti tomu Liang a kolektiv tvrdí, že se při navázání BSA na QDs nejvíce uplatňují hydrofobní vazby a sulfhydrylové skupiny, naopak Shao a kolektiv ve své studii ukazují že se spíše jedná o elektrostatické interakce [18] [19].

BSA při ozařování emitují záření v UV oblasti. Při zkoumání interakcí mezi tímto proteinem a QDs je nejčastěji používán přístup zhašení fotoluminiscence BSA pomocí roztoků QDs o různých koncentracích.

Zhášení fotoluminiscence BSA pomocí roztoků QDs o různých koncentracích budu ve své práci využívat pro posouzení, jestli došlo k navázání BSA na QDs, či nikoliv.

1.6 Detektory signálu u technologií založených na QDs

Aplikace QDs jako fluoroforů by ztrácela svůj význam, pokud by neexistovala zařízení, resp. metody, umožňující detekci optických signálů emitovaných QDs. Dnes je však dostupná celá řada takovýchto přístrojů a postupů, mezi něž např. patří:

- konfokální mikroskop,
- TIRF (Total Internal Reflection Microscopy),
- epifluorescenční mikroskop,
- průtoková cytometrie,
- spektrofluorimetrie,
- kapilární elektroforéza (slouží k separaci látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli),
- skenovací elektronový mikroskop (SEM),
- transmisní elektronový mikroskop (TEM).

Použití laserového skenovacího konfokálního mikroskopu má své přednosti oproti tradičním přístrojům detekujícím luminiscenci. Tato přednost spočívá v možnosti vytvoření trojrozměrných obrázků, které dnes nachází své rozmanité využití ve výzkumné činnosti. Navíc při použití dvou-fotonového laserového skenovacího fluorescenčního mikroskopu je dosaženo lepšího trojrozměrného prostorového rozlišení [5].

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

- Borohydrid sodný 99%, Sigma-Aldrich
- Citrát sodný dihydrát, Sigma-Aldrich
- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a, Fluka
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a., Penta
- Etyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid hydrochlorid) (EDC), Sigma-Aldrich
- Glutation (GSH), Merck spol. s.r.o.
- Hovězí sérum albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný, p.a., Penta
- Chlorid draselný, p.a., Penta
- Chlorid kademnatý, p.a, Sigma-Aldrich
- Chlorid sodný, p.a., Penta
- Isopropanol, p.a., Lach-Ner, s.r.o.
- Merkaptopropionová kyselina (MPA), Merck Schuchardt OHG
- Teluričitan sodný, Sigma-Aldrich
- Thioglykolová kyselina (TGA), Merck Schuchardt OHG
- Voda (H₂O), Millipore

2.2 Zařízení a laboratorní vybavení:

- Centrifuga, Hettich EBA 20
- FluoroLog HORIBA Jobin Yvon s detektorem Quanta ϕ
- Chladič, Haake DC 30
- Infinite M200 Pro, Tecan
- Magnetická míchačka, Heidolph MR hei-end
- pH metr, Cyberscan PC6500

2.3 Syntéza QDs

2.3.1 Syntéza glutathionem ovrstvených QDs CdTe-GSH

CdTe-GSH QDs byly syntetizované následujícím způsobem: do roztoku deionizované vody (42 ml) a chloridu kademnatého (4 ml; 0,04 mol/l) byly za stálého míchání přidány zbývající reaktanty v následujícím pořadí: GSH (300 mg), citrát sodný dihydrát (100 mg), Na_2TeO_3 (4 ml; 0,01 mol/l), borohydrid sodný (50 mg). Výsledná směs pak byla přelita do tříhrdlé baňky spojené se zpětným chladičem a následně ohřívána na 95 °C za stálého míchání (500 ot/min) po dobu 4h [20]. Na konci ohřívání roztok měl žlutou barvu.

2.3.2 Syntéza merkaptoproinovou kyselinou ovrstvené QDs

CdTe-MPA QDs byly syntetizované následujícím způsobem: do roztoku deionizované vody (42 ml) a chloridu kademnatého (0,183 mg) za stálého míchání byli přidány zbývající reaktanty v tomto pořadí: MPA (130 μl), hydroxid sodný (několik kapek; pH=10,5), citrát sodný dihydrát (50 mg), Na_2TeO_3 (2 ml; 0,01 mol/l), borohydrid sodný (20 mg). Výsledná směs pak byla přelita do tříhrdlé baňky spojené s refluxem a následně ohřívána na 95 °C za stálého míchání (500 ot/min) po dobu 3h [10]. Na konci zahřívání roztok měl červenou barvu.

2.3.3 Syntéza thyglykolovou kyselinou ovrstvené QDs

CdTe-TGA QDs byly syntetizované následujícím způsobem: do roztoku deionizované vody (42 ml) a chloridu kademnatého (0,183 mg) za stálého míchání byli přidány zbývající reaktanty v tomto pořadí TGA (104 μl), hydroxid sodný (několik kapek; pH=10,5), citrát sodný dihydrát (50 mg), Na_2TeO_3 (2 ml; 0,01 mol/l), borohydrid sodný (20 mg), a to po jednom, do úplného rozpuštění každého jednoho z nich. Výsledná směs pak byla přelita do tříhrdlé baňky spojené s refluxem a následně ohřívána na 95 °C za stálého míchání (500 ot/min) po dobu 4h [10]. Na konci ohřívání roztok měl tmavě-oranžovou barvu.

Všechny QDs po ukončení procesu syntézy byly přečištěny v isopropanolu a odstředěny v odstředivce (6000 ot./min; 15 min). Poměr QDs:isopropanolu byl 1:2.

2.4 Příprava fosfátového pufru

Do deionizované vody (200 ml) byly postupně a za stálého míchání přidáván chlorid draselný (1600 mg), chlorid sodný (NaCl; 40 mg), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (288 mg) a dihydrogenfosforečnan draselný (48 mg). pH pufru bylo 7,4.

2.5 Navazování BSA na kvantovou tečku

2.5.1 Navazování BSA na QDs bez modifikace povrchu

V tomto případě pro detekci BSA využíváno elektrostatických interakcí mezi BSA a QDs. Biokonjugace QDs a BSA byla zajištěna takto: QDs (250 μ l) byly přidány do směsi BSA (137,5 μ l; 15 mg/ml) a PBS (92,5 μ l; pH=7,4) přičemž byly použity různé koncentrace QDs (0,5; 1; 1,5; 2; 5) mg/ml. Reakce probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě, roztok byl v chladu (4°C) a temnu [21].

2.5.2 Navazování BSA na QDs s modifikací povrchu

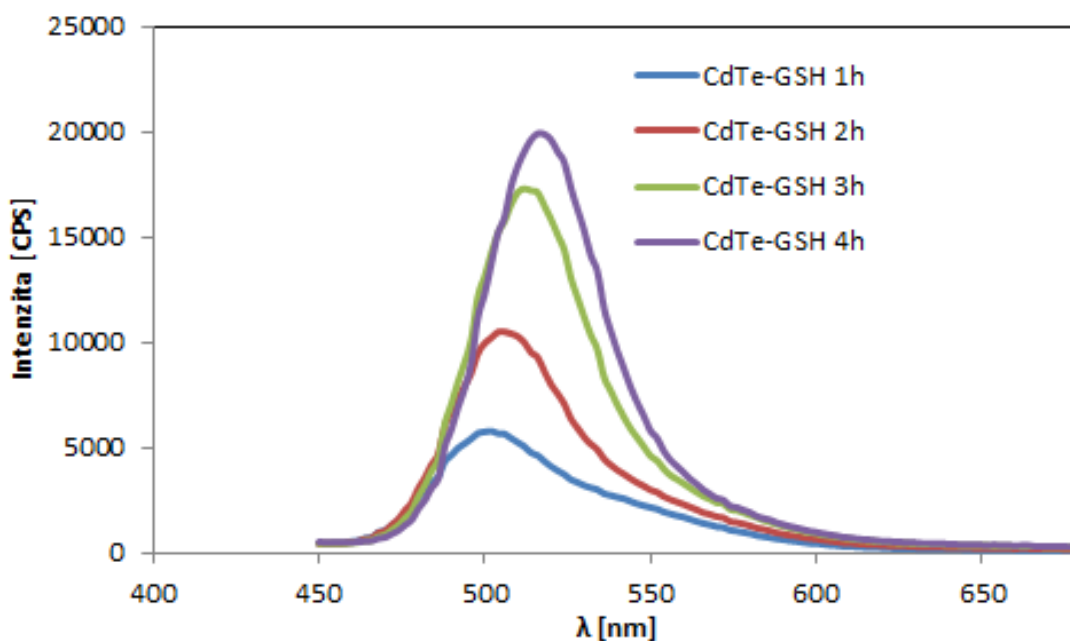
Tento případ biokonjugace QDs a BSA pomocí mediátoru EDC byl založen na uplatnění kovalentních vazeb mezi reaktanty. Biokonjugace byla zajištěna následujícím způsobem: do roztoku QDs (0,5 ml) o různých koncentracích (0,5; 1; 1,5; 2; 5) mg/ml byl přidán EDC (0,5 ml; obsahující PBS pH=7,4) a výsledný roztok byl nechán 5 min při pokojové teplotě pro aktivaci karboxylových skupin. Do směsi byl přidán BSA (0,5 ml; 15mg/ml) a výsledná směs byla nechána při pokojové teplotě 2 h a pak uchována v chladu (4°C) a temnu [21].

3 Výsledky a diskuze

3.1 Charakterizace připravených QDs fluorescenční spektroskopii

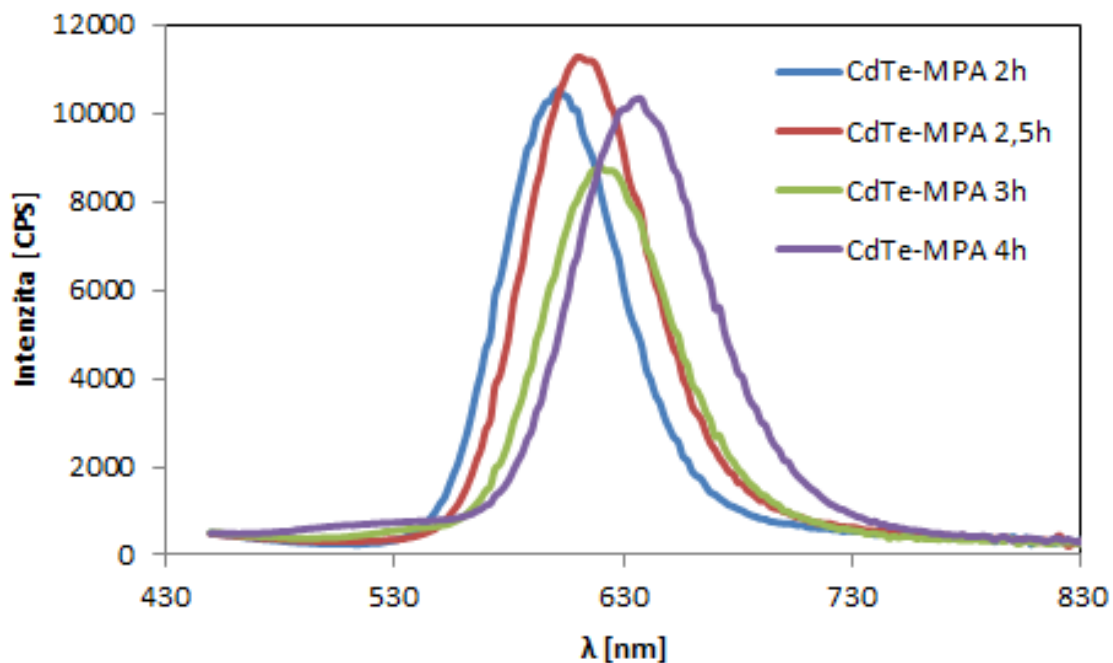
Pro praktickou část syntézy QDs byla vybrána syntéza koloidních CdTe stabilizovaných glutationem (GSH), merkaptopropionovou kyselinou (MPA) a thioglykolovou kyselinou (TGA). Vybrala jsem tři různé stabilizátory, aby bylo víc pozorovatelné, jak se různými látkami může dosáhnout QDs určitých vlastností (maximální intenzita emise, poloha fluorescenčních spekter čili, v jaké oblasti světla budou QDs emitovat, jakou barvou).

Analýza všech vzorků QDs proběhla na přístroji Infinite M200 Pro, Tecan, přičemž byla použita vlnová délka excitace 380 nm, při teplotě 21,8 °C.



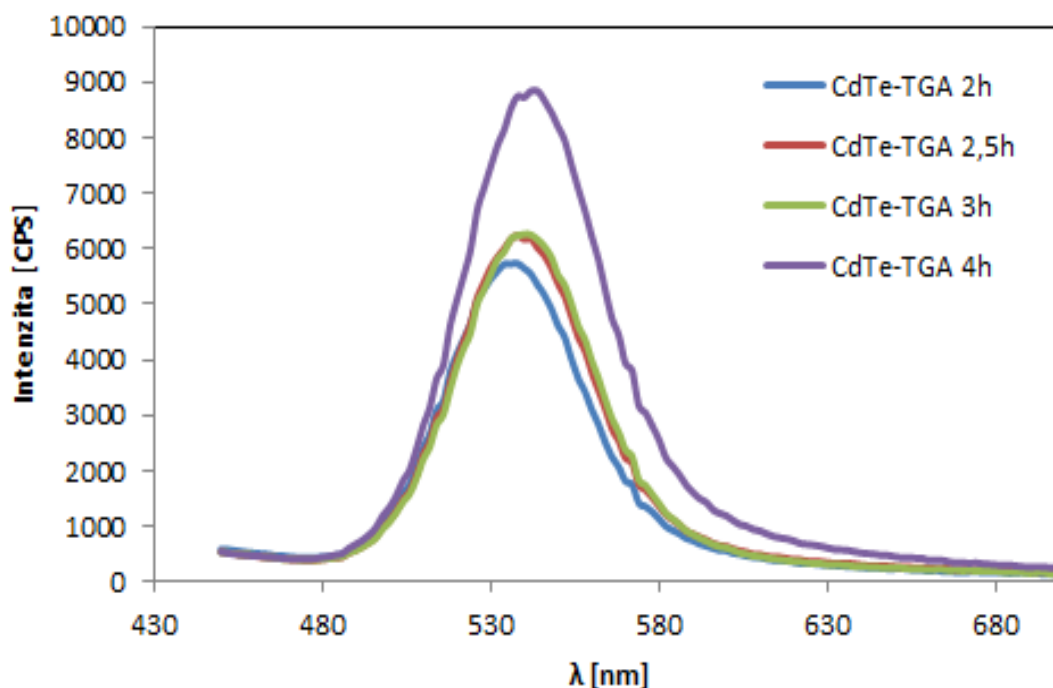
Obr. 6 Emisní spektrum CdTe-GSH QDs

Na Obr. 6 je znázorněna závislost intenzity emise na vlnové délce u CdTe-GSH QDs pro vzorky odebrané v časech 1h, 2h, 3h a 4h od okamžiku dosažení požadované teploty (95°C) při syntéze. Z grafu je patrné, že vzorky fluoreskovaly a výsledky měření fluorescenčních spekter QDs se jen nepatrně lišily od předpokládaných průběhů, neboť spektra těchto závislostí měla být úzká a ostrá. Odebrané vzorky vykazovaly emisi při vlnových délkách kolem 500 nm, přičemž maxima intenzit emise rostla s časem ohřívání. Nejvyšší intenzitu emise (19920 CPS, při vlnové délce 516 nm) měl vzorek zahříván 4h a právě proto byl tento vzorek vybrán pro biokonjugaci s BSA. Ostatní vzorky odebrány v časech 1h, 2h, 3h měly maxima intenzit 5799, 10512 a 17300 CPS při vlnových délkách 502 nm, 522 nm a 512 nm.



Obr. 7 Emisní spektrum CdTe-MPA QDs

Na Obr. 7 je znázorněna závislost intenzity emise na vlnové délce u CdTe-MPA QDs, kdy byly vzorky odebírány v časech 2 h; 2,5 h; 3 h a 4 h od okamžiku dosažení požadované teploty (95°C) při syntéze. Stejně jako v předešlém případě, spektra QDs byla symetrická a úzká. Odebrané vzorky vykazovaly maximum emise na vlnových délkách 602-636 nm, přičemž maxima intenzit emise nerostla s časem zahřívání. Nejvyšší intenzitu emise (11185 CPS) při vlnové délce 616 nm měl vzorek zahříván 2,5h. Vzorky odebrané v časech 2h, 3h a 4h měly maxima intenzit 10522, 8777 a 10319 CPS při vlnových délkách 602 nm, 620 nm a 636 nm. Pro biokonjugaci s BSA byl vybrán vzorek zahříván 3 h.

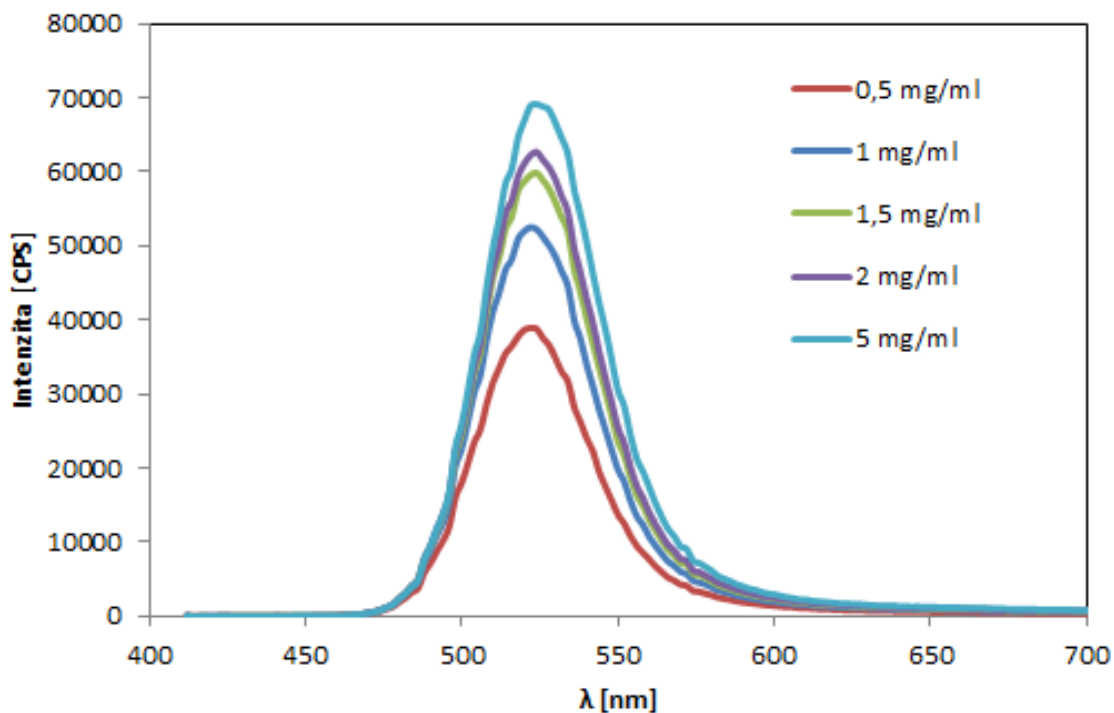


Obr. 8 Emisní spektrum CdTe-TGA QDs

Na Obr. 8 je znázorněna závislost intenzity emise na vlnové délce u CdTe-TGA QDs, kdy byly vzorky odebrány v časech 2 h; 2,5 h; 3 h a 4 h od okamžiku dosažení požadované teploty (95°C) při syntéze. Stejně jako v předešlých případech, spektra QDs byla symetrická a úzká. Odebrané vzorky vykazovaly maximum emise na vlnových délkách kolem 540 nm, přičemž maxima intenzit emise nerostla s časem zahřívání. Nejvyšší intenzitu emise (8839 CPS) při vlnové délce 542 nm měl vzorek zahříván 4h. Vzorky odebrané v časech 2h, 3h a 4h měly maxima intenzit 5731, 6240 a 6260 CPS při vlnových délkách 538 nm, 538 nm a 540 nm. Pro biokonjugaci s BSA byl vybrán vzorek zahříván 4 h.

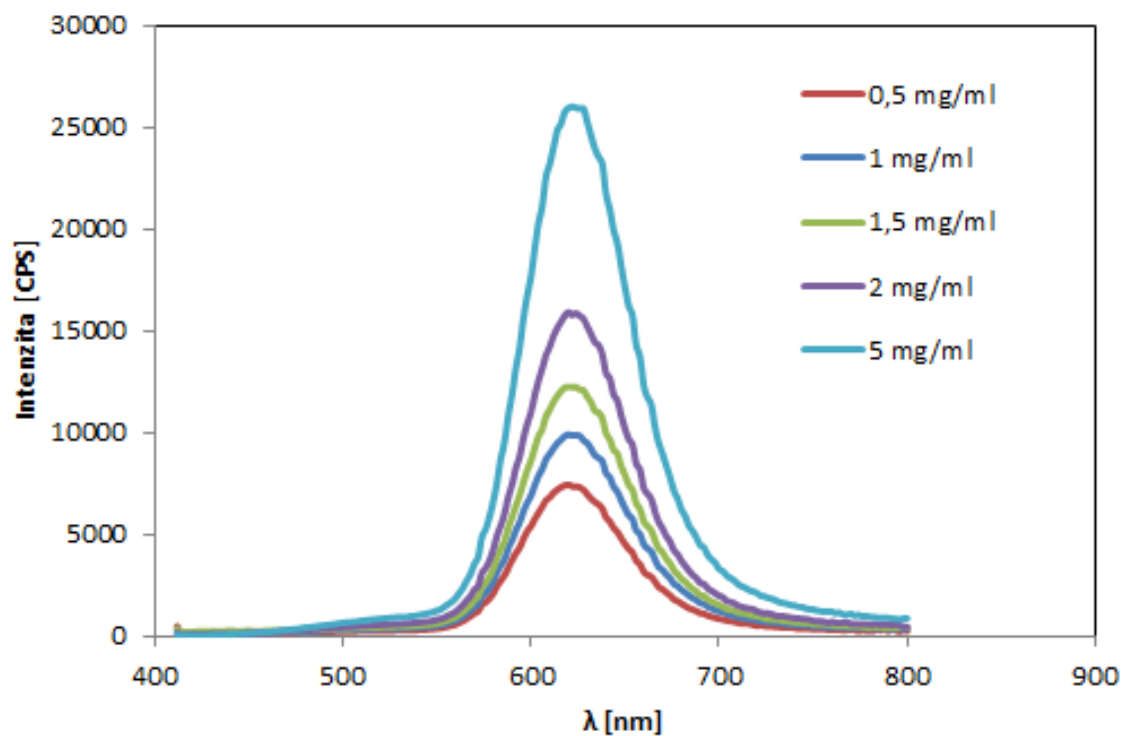
Vybrané vzorky QDs byly proměřeny na přístroji FluoroLog HORIBA Jobin Yvon s detektorem Quanta ϕ , přičemž byly změřené jejich kvantové výtěžky. CdTe-GSH měly kvantový výtěžek 16,8%, CdTe-MPA 11,5% a CdTe-TGA 6,88%.

3.2 Vliv koncentrace QDs na intenzitu fluorescence



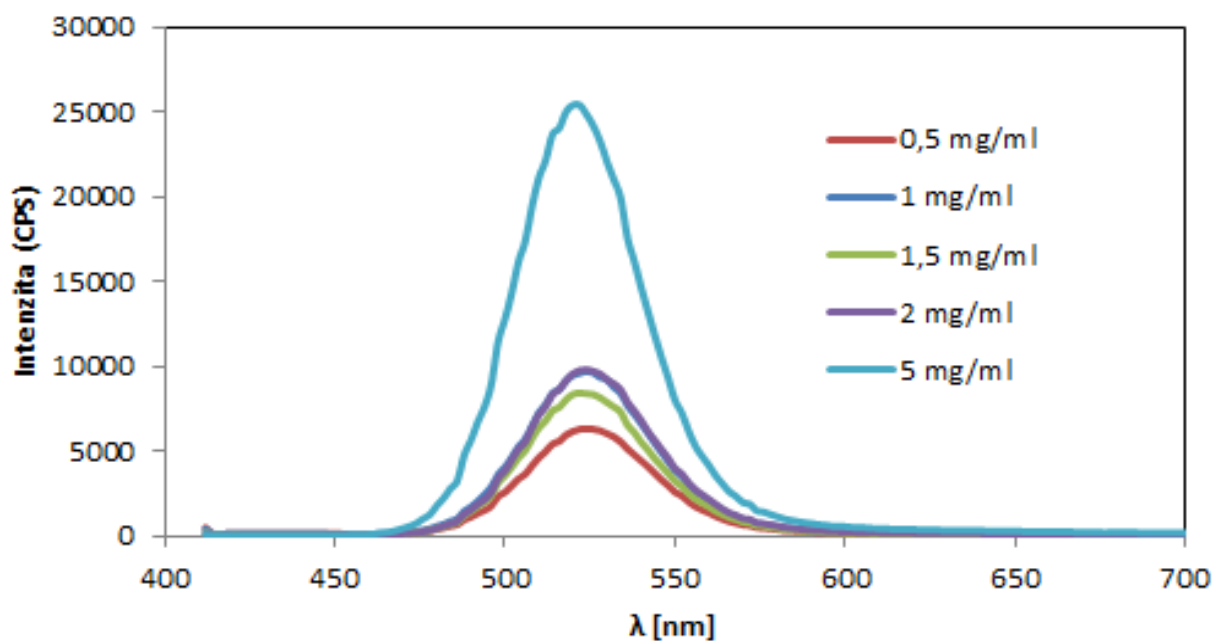
Obr. 9 Emisní spektrum CdTe-GSH QDs

Na Obr. 9 je znázorněná závislost intenzity emise na vlnové délce CdTe-GSH QDs o různých koncentracích (0,5; 1; 1,5; 2; 5) mg/ml. Je patrné, že s rostoucími koncentrací se zvyšuje maximum intenzity emise. Pro koncentrace (0,5; 1; 1,5; 2; 5) mg/ml dosáhla maximální intenzita emise následujících hodnot: 38932, 52523, 59537, 62672, 69120 CPS odpovídající vlnovým délkách 522, 522, 522, 524, 524 nm.



Obr. 10 Emisní spektrum CdTe-MPA QDs

V případě CdTe-MPA QDs (Obr. 10) je také patrné, že s rostoucími koncentrací QDs se zvyšuje maximum intenzity emise. Pro koncentrace 0,5; 1; 1,5; 2; 5 mg/ml dosáhlo maximum emise hodnot 7440, 9902, 12249, 15863, 26012 při 620, 620, 620,628, 622 nm. Z grafu je patrné, že pokles intenzi emise byl mnohem plynulejší a výraznější než je to mu v případě CdTe-GSH QDs, intenzita emise ale byla mnohem menší.

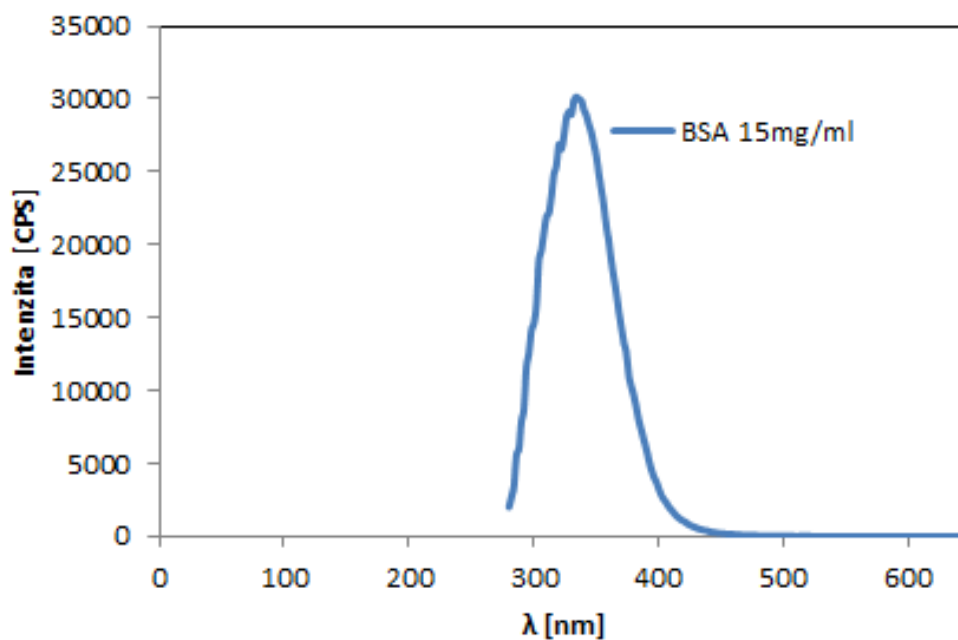


Obr. 11 Emisní spektrum CdTe-TGA QDs

Na Obr. 171 je patrné, že se zvyšující se koncentrací roztoku CdTe-TGA QDs se zvyšuje maximum intenzity emise jen pozvolně. Pro koncentrace roztoku 0,5; 1; 1,5; 2; 5 mg/ml dosáhlo maximum emise hodnot 6325, 9720, 8444, 9830, 25402 CPS při 524, 524, 534, 524, 520 nm.

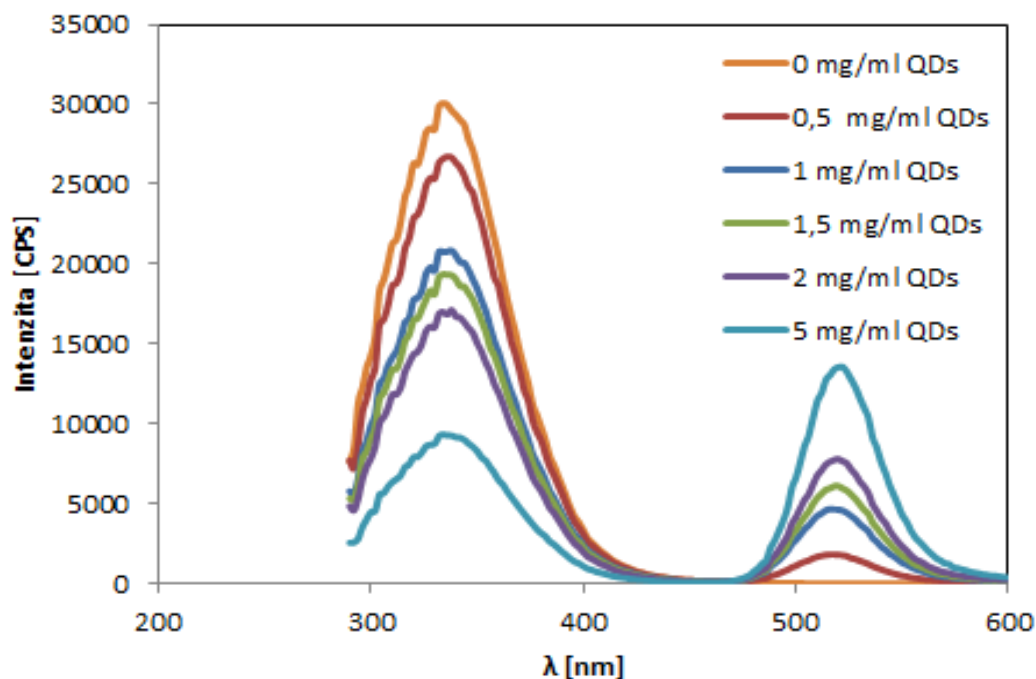
Z grafů je patrné, že CdTe-GSH QDs fluoreskovaly nejintenzivněji oproti CdTe-TGA QDs a CdTe-MPA QDs, které emitovali záření mnohem nižší intenzity.

3.3 Konjugace QDs s BSA bez modifikace povrchu



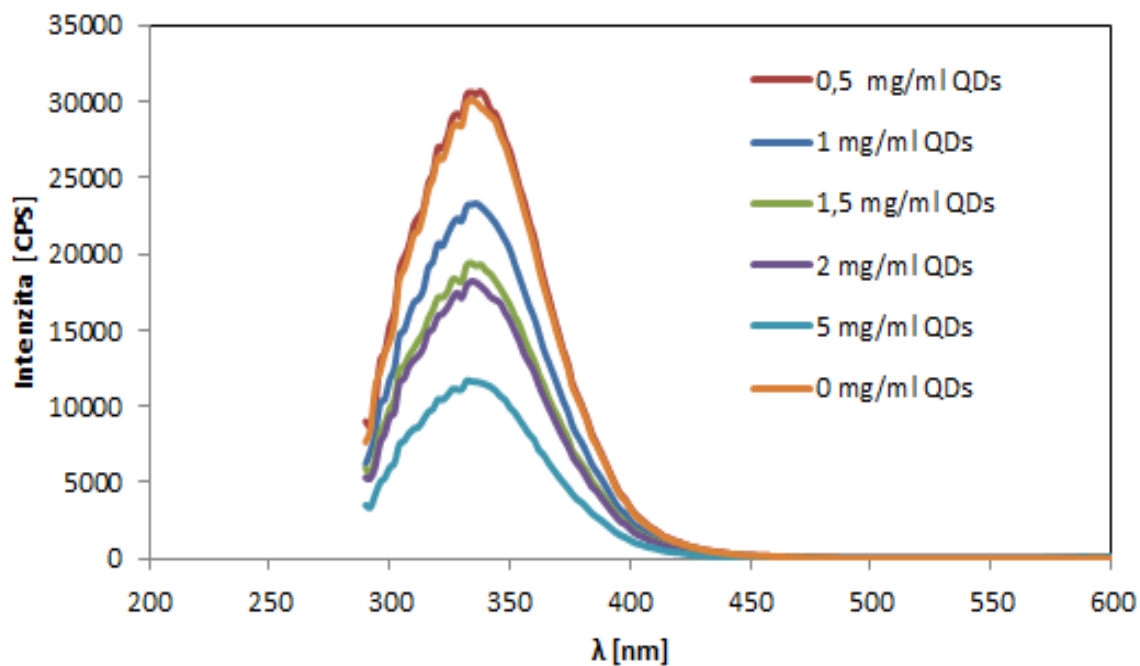
Obr. 12 Emisní spektrum BSA

Na Obr. 12 je pozorovatelná závislost intenzity emise na vlnové délce u roztoku BSA o koncentraci 15 mg/ml. Měření bylo provedeno na přístroji Infinite M200 PRO, TECAN, přičemž byla použita vlnová délka excitace 230 nm, při teplotě 21,4 °C. Roztok BSA emitoval světlo na vlnových délkách kolem 334 nm, přičemž maximum intenzity (30152 CPS) vykazoval při vlnové délce 334 nm. Tento roztok byl pozužit k biokonjugaci s QDs.



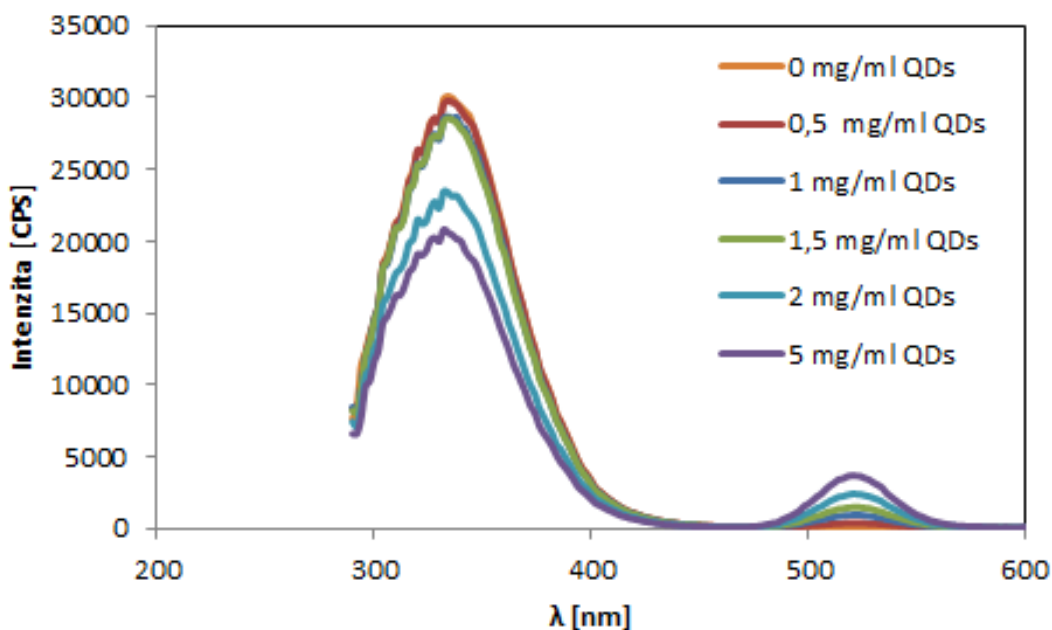
Obr. 13 Emisní spektrum BSA navázaného na CdTe-GSH QDs

Na Obr. 13 je znázorněné, jak roztoky CdTe-GSH QDs o různých koncentracích ovlivňují fotoluminiscenci BSA. Došlo ke zhášení fotoluminiscence, což se dá vysvětlit jako snížení maximálních intenzit emise BSA. Je patrné, že se zvyšující se koncentraci roztoku QDs docházelo ke většímu zhášení fotoluminiscence BSA. Z toho vyplývá, že opravdu došlo k navázání BSA na povrch CdTe-GSH QDs a že tento postup může být využíván k detekci BSA. Na obrázku je také pozorovatelný další pík, které představuje právě tu vlastnost QDs, že fluoreskují při excitaci záření jakékoliv vlnové délky menší, než je vlnová délka emise.



Obr. 14 Emisní spektrum BSA navázaného na CdTe-MPA QDs

Na Obr. 14 je znázorněno, jak roztoky CdTe-MPA QDs o různých koncentracích ovlivňují fotoluminiscenci BSA. Roztok o nejnižší koncentraci (0,5 mg/ml CdTe-MPA QDs) skoro vůbec nezhasel fotoluminiscenci BSA, ale se zvyšující se koncentrací roztoků bylo zhášení BSA pozorováno. Aby bylo zhášení BSA prokazatelné, je nutné v tomto případě použít koncentrovanější roztok CdTe_MPA QDs než je 0,5 mg/ml.

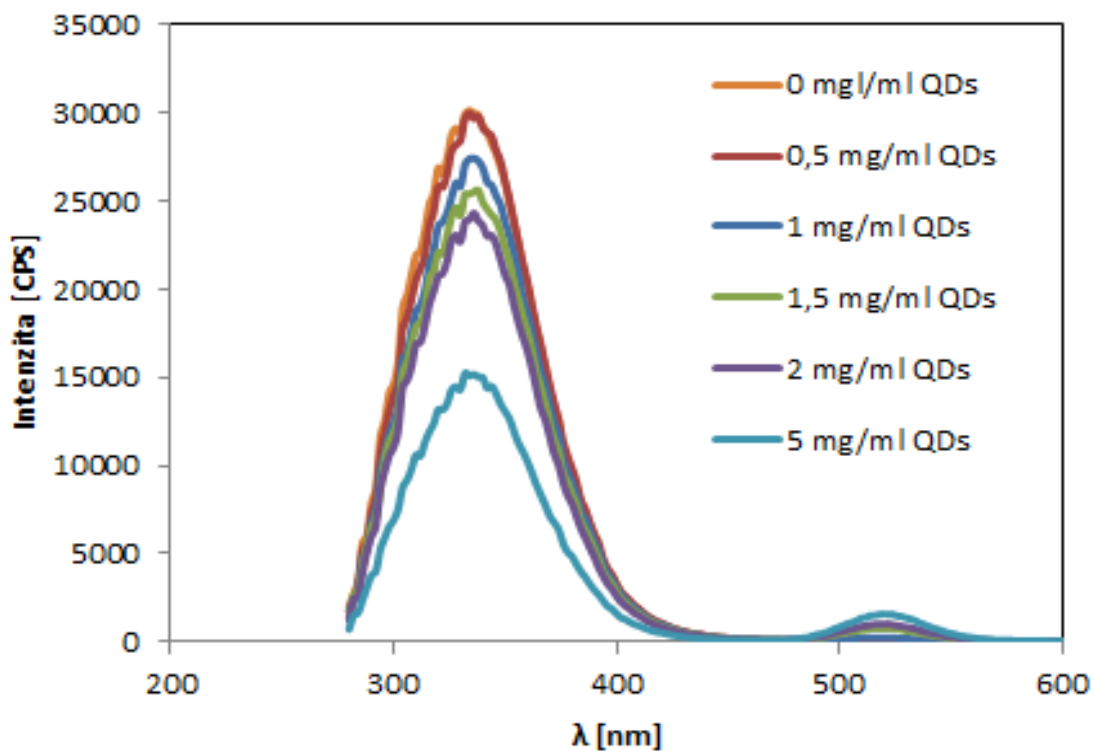


Obr. 15 Emisní spektrum BSA navázaného na CdTe-TGA QDs

Na Obr. 15 lze vidět, jak roztoky CdTe-TGA QDs o různých koncentracích ovlivňují fotoluminiscenci BSA. Je patné, že málo koncentrované roztoky QDs (0,5 mg/ml, 1 mg/ml a 1.5 mg/ml) vůbec neovlivňují fotoluminiscenci BSA, nedochází k zhášení, které je lépe pozorovatelné až při koncentraci 2 mg/ml roztoku CdTe-TGA QDs.

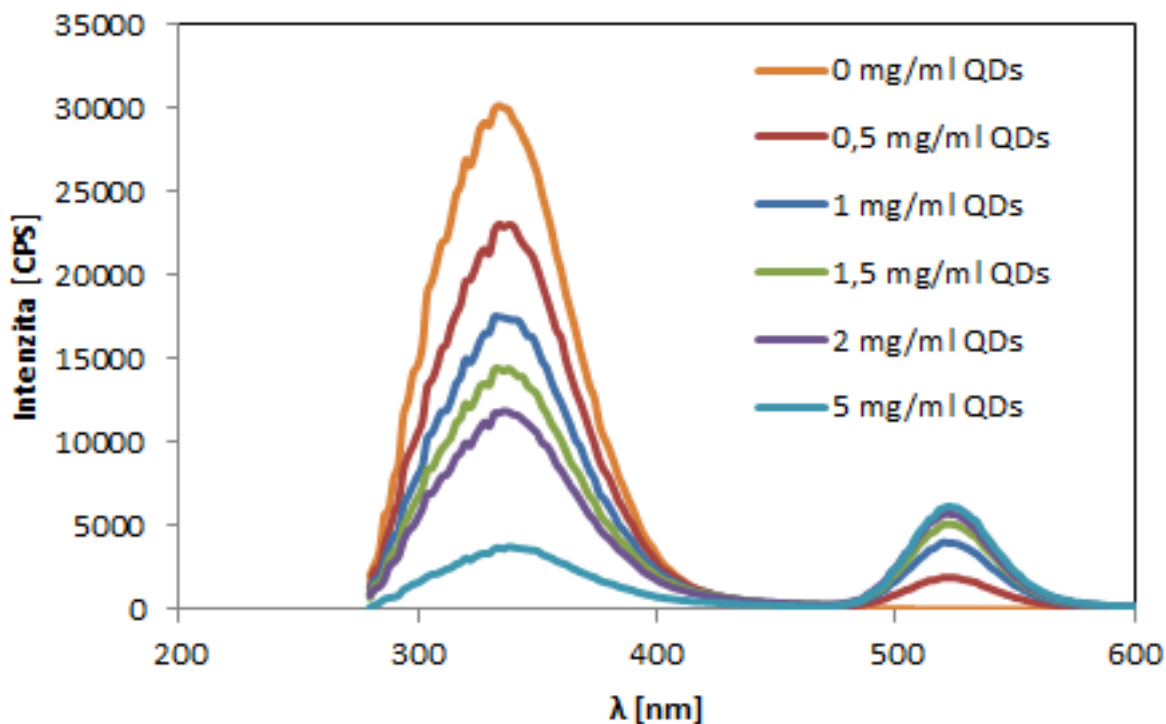
3.4 Konjugace QDs s BSA modifikací povrchu

Pro modifikaci povrchu QDs byl vybrán EDC kvůli tomu, že na povrchu QD aktivuje karboxylové skupiny a usnadňuje navazování proteinů a nukleových kyselin, v tomto případě usnadňuje navazování BSA.



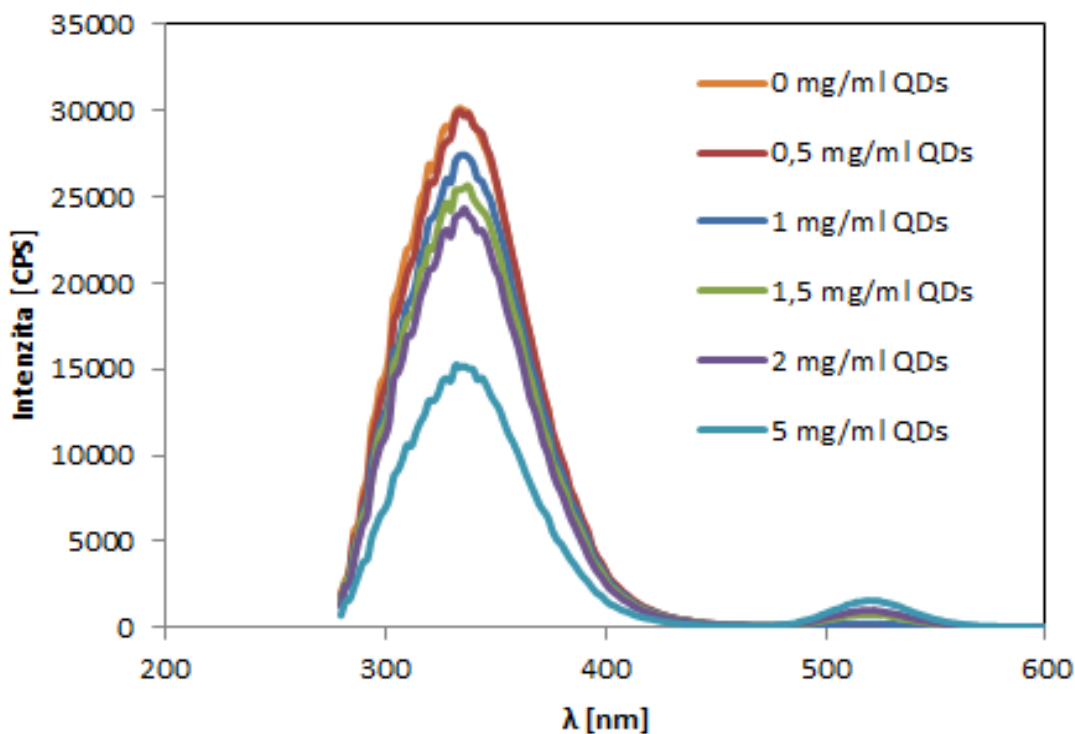
Obr. 16 Emisní spektrum BSA navázaného na modifikovaný povrch CdTe-MPA QDs

Na Obr. 16 je pozorovatelný vliv koncentrace roztoků CdTe-MPA QDs modifikovaných pomocí EDC na fotoluminiscenci BSA. Zhášení fotoluminiscence BSA při začalo od koncentrace 1 mg/ml CdTe-MPA QDs. Lepé je pozorovatelné zhášení při koncentraci roztoku 5 mg/ml CdTe-MPA QDs. Při porovnání vlivu QDs s modifikovaným a nemodifikovaným povrchem bylo zjištěno, že v případě QDs modifikovaných EDC došlo k menšímu poklesu zhášení BSA oproti QDs bez modifikace.



Obr. 17 Emisní spektrum BSA navázaného na modifikovaný povrch CdTe-GSH QDs

Na Obr. 17 je znázorněný vliv roztoků o různých koncentracích CdTe-GSH QDs, modifikovaných pomocí EDC na fotoluminiscenci BSA. Zhášení fotoluminiscence BSA začalo už od koncentrace 0,5 mg/ml CdTe-GSH QDs, pokles luminiscence je výrazný a lineární. Z grafu je patrné, že 5 mg/ml CdTe-GSH QDs téměř zháší BSA. Z porovnání vlivu QDs s modifikovaným a s nemodifikovaným povrchem (Obr. 13) na zhášení BSA je patrné, že v případě QDs s modifikovaným povrchem došlo k výraznějšímu poklesu fotoluminiscence.



Obr. 18 Emisní spektrum BSA navázaného na modifikovaný povrch CdTe-TGA QDs

Na Obr. 18 je znázorněn vliv roztoků o různých koncentracích CdTe-TGA QDs, modifikovaných pomocí EDC na fotoluminiscenci BSA. Zhášení fotoluminiscence BSA začalo od koncentrace 1 mg/ml CdTe-TGA QDs. Zhášení nebylo tak výrazné, jako v případě CdTe-GSH QDs, jeho průběh byl obdobný jako v případě CdTe-MPA QDs. Opět, z porovnání vlivu QDs s modifikovaným a s nemodifikovaným povrchem (Obr. 15) na zhášení BSA je patrné, že v případě QDs s modifikovaným povrchem došlo k výraznějšímu poklesu fotoluminiscence.

4 Závěr

Tato bakalářská práce si kladla za cíl zkoumat vlastnosti QDs na bázi polovodičů AIIBVI, metody jejich přípravy a aplikace modifikovaných QDs pro diagnostiku zajímavých látek.

V první části práce byl proveden popis důležitých vlastností těchto nanočástic, jejich rozdělení, výhody a nevýhody. V práci jsou také popsány typy syntéz QDs se zaměřením na přímou syntézu koloidních QDs. Byl také proveden popis různých metod modifikace QDs pro zvýšení afinity k různým látkám a aplikace QDs.

V experimentální části práce jsem se zaměřila na zkoumání, syntézu a modifikaci koloidních QDs na bázi kadmia využitých k detekci BSA. Byly syntetizovány koloidní CdTe QDs stabilizované glutationem (GSH), merkaptopropionovou kyselinou (MPA) a thioglykolovou kyselinou (TGA) a následně u některých vzorků byla provedena modifikace povrchu QDs pomocí EDC, s cílem zvýšení afinity QDs vůči BSA. Pro porovnatelnost výsledků rozhodla jsem se i o detekci BSA bez modifikace povrchu QDs. Výsledné vzorky jsou pak analyzované pomocí špičkových přístrojů Infinite M200 Pro, Tecan (analýza emisních spekter) a Fluoro-Log HORIBA Jobin Yvon s detektorem Quanta ϕ (určení kvantového výtěžku). Výsledky navazování BSA na QDs ukázaly, že zhášení BSA CdTe-GSH QDs s modifikovaným povrchem je intenzivnější oproti CdTe-GHS QDs bez modifikovaného povrchu. Oproti tomu, zhášení BSA CdTe-MPA a CdTe-TGA QDs je intenzivnější při použití QDs s nemodifikovaným povrchem.

5 Použitá literatura

- [1] SAHOO, S.K., PARVEN, S., PANDA, J. J., *The present and future of nanotechnology in human health care* [databáze online]. Volume 3. Issue 1. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 28.03.2007 [cit. 2011-11-6]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com./science/article/pii/S154996340600342X> >. Stránky 20-39.
- [2] CHOMOUCKÁ, J.; DRBOHLAVOVÁ, J.; BUŠINOVÁ, P.; RYVOLOVÁ, M.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HUBÁLEK, J. Synthesis of Glutathione Coated Quantum Dots. InTech. (18 p.).
- [3] DRBOHLAVOVÁ, J., ADAM, V., KIZEK, R., HUBÁLEK, J. Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. International Journal of Molecular Sciences. 2009 [cit. 2011-11-7] (10)(2). p. 656 – 673
- [4] *Luminiscence: Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online]. Stránka byla naposledy editována 1. 1. 2012 v 20:20 [cit. 2012-1-1]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Luminiscence>>
- [5] MERKOCI, A. Biosensing Using Nanomaterials. Wiley series in Nanoscience and Nanotechnology. 2009
- [6] PIERCE, D.T., ZHAO, J.X. Trace Analysis with Nanomaterials. Weinheim :WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2010. ISBN: 978-3-527-32350-0
- [7] XUE, M., WANG, X., WANG, H., TANG, B. *The preparation of glutathione-capped CdTe quantum dots and their use in imaging of cells* [databáze online]. Volume 83. Issue 5. Talanta. 15.02.2011 [cit. 2011-11-27].
- [8] ZHANG, W., HE, X., CHEN, Y., LI, W., ZHANG, Y. *Composite of CdTe quantum dots and molecularly imprinted polymer as a sensing material for cytochrome c* [databáze online]. Volume 26. Issue 5. Biosensors and Bioelectronics. 15.01.2011 [cit. 2011-11-30].
- [9] WANG, Y., MO, Y., ZHOU, L. *Synthesis of CdSe quantum dots using selenium dioxide as selenium source and its interaction with pepsin* [databáze online]. Volume 79. Issue 5. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. September 2011 [cit. 2011-11-30].
- [10] WANG, J., HAN, H. *Hydrothermal synthesis of high-quality type-II CdTe/CdSe quantum dots with near-infrared fluorescence* [databáze online]. Volume 351. Issue 1. Journal of Colloid and Interface Science. 01.11.2010 [cit. 2011-12-12].

- [11] KUMAR, C.S.S.R. *Biofunctionalization of Nanomaterials*. Volume 1. *Nanotechnologies for the Life Sciences*. Weinheim :WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2005. ISBN: 3-527-31381-8
- [12] Wang, Q., Liu, P., Zhou, X., Zhang, X., Fang, T., Liu, P., Min, P., Li, X. *Thermodynamic and conformational investigation of the influence of CdTe QDs size on the toxic interaction with BSA* [databáze online]. Volume 230. Issue 1. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 15.02.2012 [cit. 2012-5-12].
- [13] *Bovine serum albumin: Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online]. Stránka byla naposledy editována 24.4.2012 v 19:35 [cit. 2012-5-5]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin>
- [14] Xiao, J., Chen, T., Chen, L., Cao, H., Yang, F., Bai, Y. *CdTe quantum dots (QDs) improve the affinities of baicalein and genistein for human serum albumin in vitro*, *Journal of Inorganic Biochemistry* [databáze online]. Volume 104. Issue 11. November 2010 [cit. 2012-5-12].
- [15] Wu, D., Chen, Z., Liu, X. *Study of the interaction between bovine serum albumin and ZnS quantum dots with spectroscopic techniques*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [databáze online]. Volume 84. Issue 1. 15 December 2011 [cit. 2012-5-12].
- [16] TERMO-SCIENTifiC [online]. c2011 [cit. 2011-12-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02030312>>
- [17] SAPSFORD, K. E., PONS, T., MEDINTZ, I. L., MATTOUSSI, H. *Biosensing with Luminescent Semiconductor Quantum Dots* [databáze online]. *Sensors*. 24.08.2006 [cit. 2011-12-24]. 6(8):925-953.
- [18] TIAN, J., LIU, R., ZHAO, Y., XU, Q., ZHAO, S. *Controllable synthesis and cell-imaging studies on CdTe quantum dots together capped by glutathione and thioglycolic acid* [databáze online]. Volume 336. Issue 2. *Journal of Colloid and Interface Science*. 15.08.2009.
- [19] SHAN, Y., WANG, L., SHI, Y., ZHANG, H., LI, H., LIU, H., YANG, B., LI, T., FENG, X., LI, W. *NHS-mediated QDs-peptide/protein conjugation and its application for cell labeling* [databáze online]. Volume 75. Issue 4. *Talanta*. 30.05.2008 [cit. 2011-12-24].
- [20] DUAN, J., SONG, L., ZHAN, J. *One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties* [online]. Stránka byla naposledy editována 11.08.2009 v 16:31 [cit. 2012-5-5].

- [21] HUANG, X., WENG, J., SANG, F., SONG, X., CAO, C., REN, J. *Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection* [databáze online]. Volume 1113. Issue 1-2. Journal of Chromatography A. 28.04.2006 [cit. 2012-5-21].

6 Seznam zkratek

BSA, bovine serum albumin-hovězí sérum albumin

CPS, counts per second- počet za sekundu

EDC -1-Etyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid hydrochlorid

FISH Fluorescence in situ Hybridization

FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer- Fluorescenční rezonanční energetický
transfér

GSH-glutathion

HDA- hexadecylamin

MBP- maltose-binding protein

MPA-merkaptopropionová kyselina

PBS-fosfátový pufr

PSA -prostatický specifický antigen

QDs , quantum dots – kvantové tečky

SEM- skenovací elektronový mikroskop

sulfo-NHS -N-hydroxysulfosuccinimide

TEM -transmisní elektronový mikroskop TEM

TGA-thioglykolová kyselina

TIRF -Total Internal Reflection Microscopy

TOP- trioctylphosphin oxid

TOPO- trioctylphosphin oxid