



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ NANOMATERIÁLŮ KE ZLEPŠENÍ OPTICKÉ DETEKCE BIOMOLEKUL

USE OF NANOMATERIALS TO IMPROVE OPTICAL DETECTION OF BIOMOLECULES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Simona Špačková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaroslava Bezděková

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1409/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Simona Špačková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jaroslava Bezděková**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Využití nanomateriálů ke zlepšení optické detekce biomolekul

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na přehled nanomateriálů využívaných pro optickou detekci biomolekul
2. Příprava kvantových teček
3. Konjugace kvantových teček se zvoleným proteinem/peptidem
4. Vyhodnocení vlastností připravených materiálů

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

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

.....
Simona Špačková
student(ka)

.....
Ing. Jaroslava Bezděková
vedoucí práce

.....
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústav

V Brně dne 31.1.2019

.....
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá moderními metodami značení biomolekul. Pozornost je věnována především luminiscenčnímu značení polovodičovými kvantovými tečkami, optimalizaci přípravy a charakterizaci kvantových teček (QDs) a jejich biokonjugátů s peptidem Ala4, který má antibakteriální vlastnosti. První způsob přípravy QDs využíval působení UV-záření a konjugace se studovaným peptidem byla provedena přes tiolovou skupinu peptidu. Druhý typ QDs byl připraven termicky a konjugace s peptidem byla provedena pomocí linkerů EDC/sulfo-NHS, které umožnily tvorbu peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou QDs a amino skupinou peptidu. Další část práce je zaměřena na studium vlivu konjugace na antimikrobiální aktivitu peptidu. Pro ověření antimikrobiálních vlastností peptidu byla pozorována interakce mezi konjugátem QDs-Ala4 a bakterií *Staphylococcus aureus*. Takto připravené konjugáty byly charakterizovány fluorescenční spektroskopií a kapilární elektroforézou s absorpční detekcí (λ -214 nm).

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with modern methods of biomolecule labeling. Attention is paid especially to luminescent labeling with semiconductor quantum dots, optimization of preparation and characterization of quantum dots (QDs) and their bioconjugates with Ala4 peptide, which has antibacterial properties. The first method of preparing QDs used UV-radiation and conjugation with the peptide of interest was carried out through the thiol group of the peptide. A second type of QDs was prepared thermally and conjugation with the peptide was performed by linkers EDC/sulfo-NHS, which allowed peptide bond formation between the carboxyl group of QDs and the amino group of the peptide. The next part of the thesis is focused on the influence of conjugation the antimicrobial activity of the peptide. To verify the antimicrobial properties of the peptide, an interaction between the QDs-Ala4 conjugate and *Staphylococcus aureus* was observed. Conjugates thus prepared were characterized by fluorescence spectroscopy and capillary electrophoresis with absorption detection (λ -214 nm).

KLÍČOVÁ SLOVA

Nanočástice, kvantové tečky, luminiscence, fluorescence, elektroforetické metody

KEYWORDS

Quantum dots, luminescence, electrophoretic methods

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.

.....

podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Jaroslavě Bezděkové, za její odborné vedení, ochotu a trpělivost při měření bakalářské práce a následném zpracování. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Lukášovi Nejdlovi, Ph.D. a paní doc. Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D za jejich ochotu a cenné rady.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Luminiscence	9
2.2	Mechanismus fluorescence	10
2.2.1	Absorpce	10
2.2.2	Fluorescence	10
2.2.3	Fosforescence	11
2.2.4	Zpožděná fluorescence	12
2.3	Kvantové tečky (QDs)	12
2.3.1	Struktura QDs	13
a)	Nekovalentní konjugace QDs	14
b)	Kovalentní konjugace QDs	14
	Náhradou thiolové skupiny stabilizátoru QDs	14
	Spojení QDs a biomolekuly přes linker	14
2.3.2	Ala4	14
2.3.3	QDs versus organická barviva	15
2.3.4	Biologická aplikace QDs	16
2.4	Elektroforetické metody a jejich využití ke studiu interakcí látek	16
2.4.1	Instrumentace	17
2.4.2	Princip metody	17
2.4.3	Detekce	18
	UV/Vis absorpční detekce	18
	Fluorescenční detekce	19
	Elektrochemická detekce	19
	Hmotnostní spektrometrie (MS)	19
2.4.4	Aplikace	19
3	Experimentální část	21
3.1	Materiály	21
3.2	Přístrojové vybavení	21
3.3	Metody	21
3.3.1	Příprava CdS QDs pomocí UV záření	21
3.3.2	Charakterizace QDs připravených pomocí UV záření	21

3.3.3	Příprava bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	22
3.3.4	Termická příprava CdTe QDs	22
3.3.5	Příprava konjugátu CdTe QDs-Ala4	22
3.3.6	Charakterizace termicky připravených QDs.....	22
4	Výsledky a diskuze	24
4.1	CdS QDs připravené pomocí UV záření.....	24
4.1.1	Optimalizace přípravy CdS QDs	24
4.1.2	Charakterizace QDs připravených pomocí UV záření	26
4.2	CdTe QDs připravené termicky	29
4.2.1	Optimalizace přípravy CdTe QDs	29
4.2.2	Charakterizace CdTe QDs	32
4.3	Interakce konjugátu s bakterií	34
5	Závěr	35
6	Seznam použitých zdrojů.....	36

CÍL PRÁCE

1. Rešerše zaměřená na přehled nanomateriálů využívaných pro optickou detekci biomolekul
2. Příprava kvantových teček
3. Konjugace kvantových teček se zvoleným proteinem/peptidem
4. Vyhodnocení vlastností připravených materiálů

1 ÚVOD

V současné době se rozšířil zájem o nanobiotechnologie zejména v biologii a medicíně. Díky malému rozměru v řádu několika nm získávají tyto objekty atraktivní optické nebo elektrochemické vlastnosti. Řada nanočástic se využívá ke značení biomolekul při pozorování biologických procesů.

Nanomateriály vytváří širokou škálu materiálů. Mezi ně patří anorganické nekovové nanomateriály (např. oxid hlinitý), uhlíkové nanomateriály (např. uhlíkové nanotrubičky), kovové nanočástice (např. nanostříbro) a organické materiály (např. dendrimery). Materiály existují v různých formách, na základě kterých může být docíleno požadovaných vlastností.

Na základě rozměrů rozčleňujeme nanomateriály na nanočástice a nanovlákná.

Existuje také široká škála fluorescenčních značek, které udělují fluorescenční vlastnosti sloučeninám, které nejsou inherentně fluorescenční. Jako fluorescenční značky se nejčastěji využívají fluorescenční barviva nebo kvantové tečky (QDs). QDs ve srovnání s fluorescenčními barvivy nabízí vysoký kvantový výtěžek, široké spektrum absorpce, fotostabilitu a laditelné úzké emisní spektrum. Velkou výhodou fluorescenční detekce je vysoká citlivost.

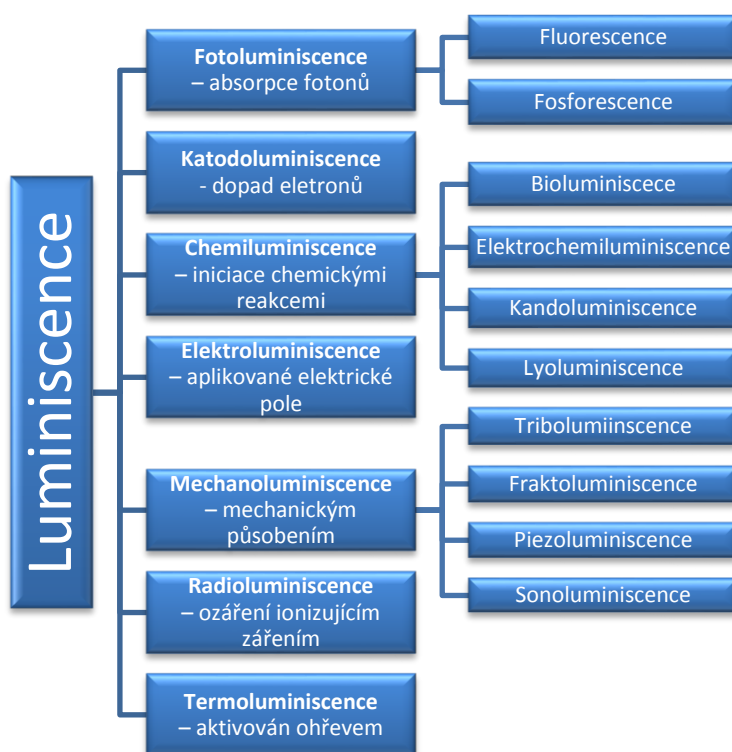
QDs byly vybrány, protože mají vynikající fyzikální a optické vlastnosti a jejich povrch se může modifikovat tak, aby se zvýšila jejich afinita vybraným analytům.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Luminiscence

Luminiscence je termín popisující proces, během kterého elektrony v atomu absorbují energii z vnějšího zdroje a excitují se do energeticky vyšších vrstev. Následně se elektrony vrátí na základní energetickou hladinu za uvolnění energie, která se emituje ve formě světla [1]. Podle doby trvání se luminiscence rozděluje na fluorescenci, která se zastaví téměř ihned po odstranění zdroje energie a fosforescenci, která pokračuje i po více než 10 nanosekundách po odstranění zdroje energie [2].

Na základě zdroje energie, který umožňuje excitaci elektronů do vyšší energetické hladiny může být luminiscence rozdělena na do několika kategorií, které jsou přehledně znázorněny na obrázku 1 [2].



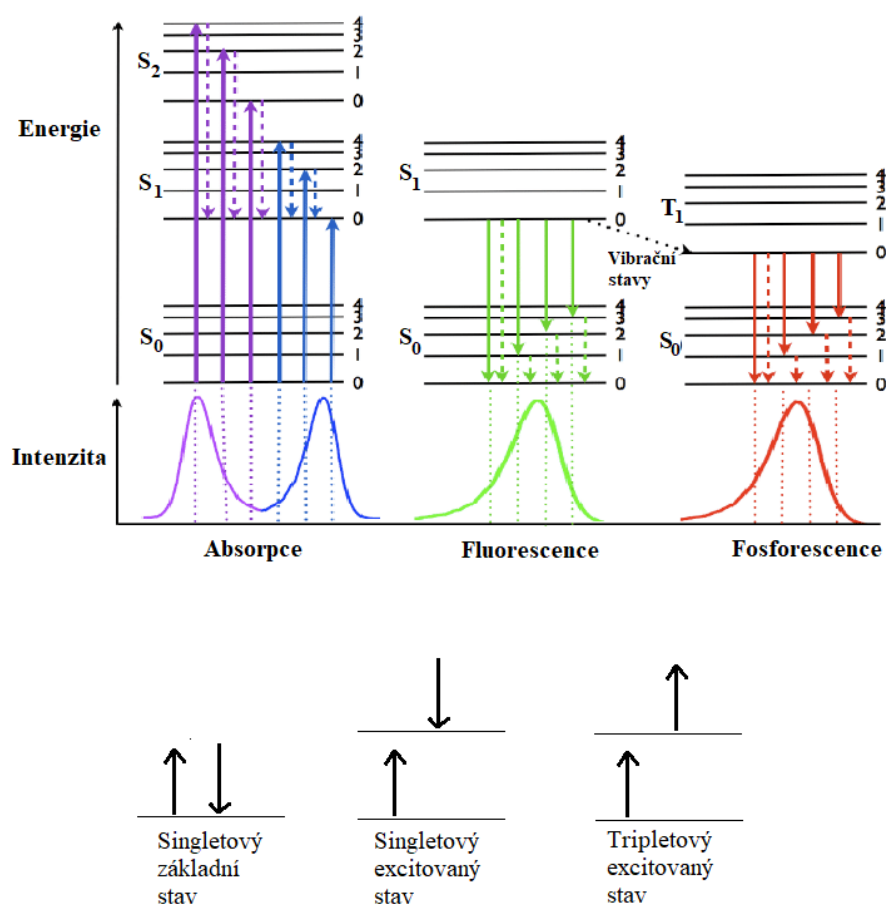
Obrázek 1 Rozdělení luminiscence [4]

Luminiscenční sloučeniny mohou být různého druhu:

- organické sloučeniny: aromatické uhlovodíky (naftalen, antracen, fenanthren, pyren, perylen atd.), deriváty fluoresceinu, rhodaminu, kumarinu, oxaziny, polyeny, difenylpolyeny, aminokyseliny (tryptofan, tyrosin, fenylalanin) atd.
- anorganické sloučeniny: uranylový iont (UO^{+2}), lanthanoidové ionty (např. Eu^{3+} , Tb^{3+}), dopovaná skla (např. s Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), krystaly (ZnS , CdS , ZnSe , CdSe , GaS , GaP , $\text{Al}_2\text{O}_3 / \text{Cr}^{3+}$ (ruby)) atd.
- organokovové sloučeniny: komplexy ruthenia (např. $\text{Ru}(\text{biPy})_3$), komplexy s ionty lanthanoidů, komplexy s fluorogenními chelatačními činidly (např. 8-hydroxychinolinem, také nazývaným oxin) atd. [4]

2.2 Mechanismus fluorescence

Fluorescenční aktivita může být schematicky ilustrována pomocí Jablonského diagramu (viz. obrázek 2, který poprvé navrhl polský fyzik profesor Alexander Jablonski v roce 1935, aby popsal absorpci a emisi světla. Princip spočívá v tom, že molekula absorbuje energii ve formě elektromagnetického záření a excituje se do vyššího energetického stavu [5]. Emise fotonů doprovázející deexcitaci se nazývá fotoluminiscence. Fotoluminiscence se dělí na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci [6,7].



Obrázek 2 Jablonského diagram

2.2.1 Absorpce

Absorpce je fyzikální proces, při kterém dochází k pohlcení energie fotonu molekulou. Elektrony dané molekuly jsou excitovány do vyššího energetického stavu. Důležité je, že mohou být absorbovány pouze takové vlnové délky, které mají energii odpovídající energetickému rozdílu mezi dvěma hladinami excitované molekuly. Absorbance je velmi rychlý přechod, který probíhá v řádu 10^{-15} sekundy. Pohlcená energie bývá následně uvolněna buď ve formě fotonu (zářivý přechod) nebo může být přeměněna na tepelnou energii (nezářivý přechod) [6].

2.2.2 Fluorescence

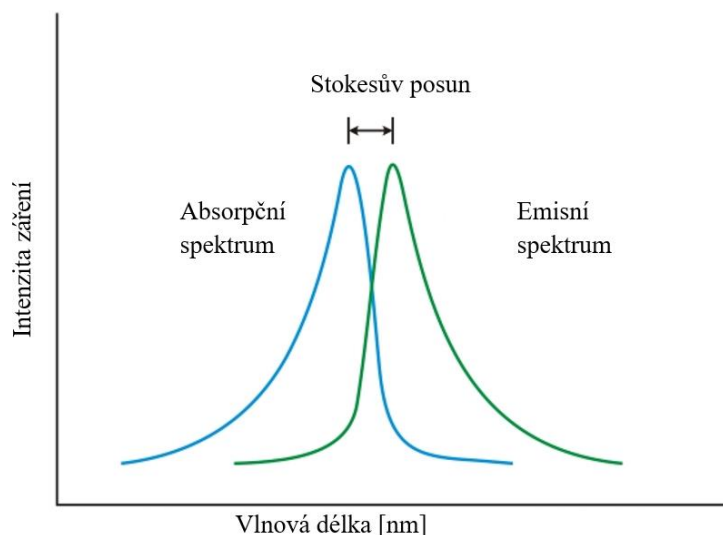
Při fluorescenci dochází k přechodu elektronu ze základního energetického stavu (S₀) do excitovaného singletového stavu (S₁, S₂, ...). Důležité je, si uvědomit, že jednotlivé

energetické hladiny se skládají z několika vibračních hladin. Před návratem do základní energetické hladiny dochází ke ztrátě části přijaté energie v důsledku nezářivých přechodů [3]. Nezářivé přechody mohou být rozděleny na:

- a) Vnitřní konverzi - přechod elektronu na základní vibrační hladinu v rámci jedné energetické hladiny (např. S_1)
- b) Vibrační relaxaci - přechod na nižší energetickou hladinu (např. z S_2 na S_1)

Energie uvolněná nezářivými přechody může zůstat uvnitř molekuly, nebo může být přenesena na okolní molekuly [7].

Při návratu na základní energetickou hladinu (S_0) pak dochází k emisi fotonu o větší vlnové délce (menší energii) v porovnání s přijatým fotonem. Rozdíl vlnových délek maxima absorpčního a emisního spektra se nazývá **Stokesův posun** (obrázek 3). Tento jev je pojmenován po irském fyzikovi Georgi Gabrielovi Stokesovi. Obecně také platí, že rozdíly mezi vibračními hladinami v základním a v excitovaných stavech jsou podobné, takže i absorpční a emisní spektra jsou si často podobná, ale jsou zrcadlově symetrická [5].



Obrázek 3 Stokesův posun [31]

Co se týče vztahu mezi intenzitou fluorescence a koncentrací látky, tak do jisté míry platí lineární závislost. Po překročení určité koncentrace začne docházet ke koncentračnímu zhášení, kdy dochází ke kolizi mezi excitovanými a neexcitovanými molekulami, která je spojená s nezářivou ztrátou energie. Ke snížení kvantového výtěžku fluorescence může také docházet působením zhášedel, kdy mezi excitovanou molekulou a zhášedlem může dojít ke kolizi, což způsobí přechod zhášedla do excitovaného stavu. Následně dojde k jeho nezářivé deexcitaci [3].

2.2.3 Fosforescence

Při fosforescenci dochází k excitaci elektronu ze základního energetického stavu do singletového excitovaného stavu stejně jako u fluorescence. Po excitaci do singletového stavu však nedochází k návratu do základní energetické hladiny jako je tomu u fluorescence, ale dochází k zakázanému přechodu do tripletového stavu. Rozdíl mezi singletovým a tripletovým stavem je v orientaci spinu elektronu. Zatímco v singletovém stavu jsou spiny elektronů antiparalelní,

v tripletovém stavu jsou paralelní (viz obrázek 2). Následně dochází k návratu elektronu z tripletového stavu na základní energetickou hladinu. Intenzita fosforescence je v důsledku zakázaného přechodu slabší než v případě fluorescence, a dosvit je delší (desetiny milisekund až minuty). Jedná se o méně častý jev [3].

2.2.4 Zpožděná fluorescence

Vyznačuje se tím, že dobu dosvitu má srovnatelnou s fosforescencí a vlnovou délku emitovaného záření srovnatelnou s fluorescencí. Nejčastěji se jedná o terminální (zpětnou) excitaci molekuly. Molekula je excitovaná do singletového stavu, následně přechází pomocí mezisystémového přechodu do tripletového stavu. V důsledku působení některých jevů (např. tepelných) může přecházet zpět do singletového stavu a odtud se potom navracet do základního energetického stavu. Jedná se tedy o přechod singlet-triplet-singlet [3].

2.3 Kvantové tečky (QDs)

Fluorescence se uplatňuje v celé řadě biologických výzkumů. Za posledních dvacet let došlo v této oblasti k výraznému pokroku. Mezi nové fluorescenční materiály, které se čím dál častěji uplatňují v biomedicíně, se řadí QDs, které díky svým unikátním vlastnostem konkurují konvenčním fluoroforům [9,10].

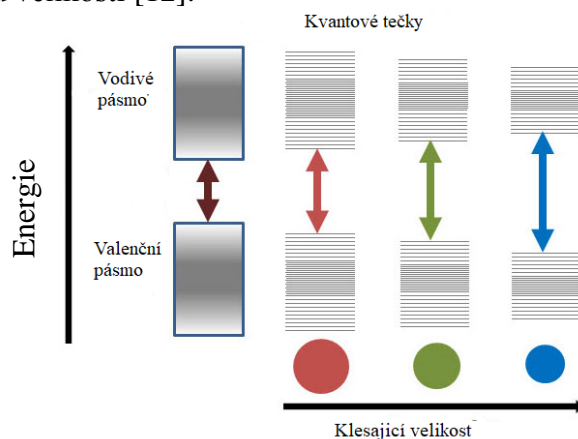
QDs jsou malé částice nebo krystaly o velikosti 2-10 nm, které jsou tvořeny z polovodičového materiálu, po stimulaci externím zdrojem ultrafialového (UV) záření fluoreskují. Barva a vlnová délka emitovaného záření závisí na velikosti krystalu. Menší QDs (~ 2 nm) vykazují modrou fluorescenční emisi (380 až 440 nm), zatímco větší částice (průměr ~ 6 nm) vykazují červenou fluorescenční emisi (605 až 630 nm). Toto barevné rozlišení můžeme vidět na obrázku 4 [9].



Obrázek 4 A) Kvantové tečky fluoreskující pod UV zářením různými barvami v závislosti na své velikosti B) S rostoucí velikostí kvantové tečky se posouvá její emise do červené oblasti spektra [11]

Elektrony v QDs jsou uzavřeny v poměrně malém prostoru. Jestliže poloměry polovodičového nanokrystalu jsou menší než Bohrov poloměr (nejpravděpodobnější vzdálenost elektronu od protonu v atomu vodíku), dochází ke kvantování energetických hladin podle Pauliho vylučovacího principu, které je zobrazeno na obrázku 5 [[12]]. Obecně platí, že čím je menší krystal, tím větší je rozdíl mezi nejvyšším valenčním pásmem a nejnižším

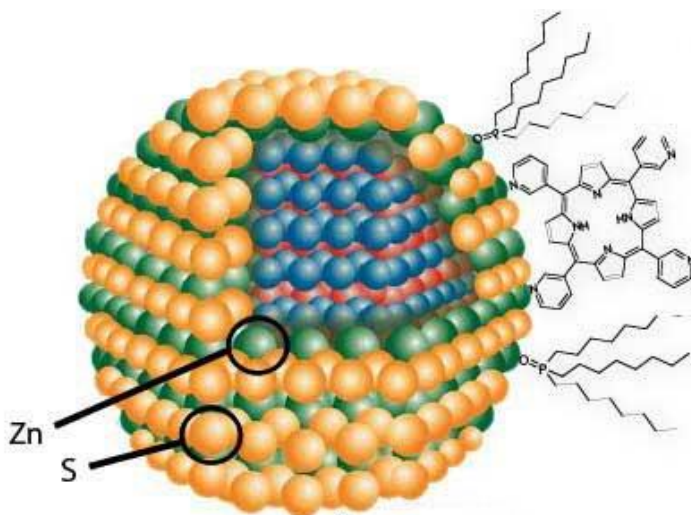
vodivým pásmem. K excitaci menších QDs je tedy potřeba dodat více energie než v případě větších QDs. Při následném návratu do základního stavu dochází k emisi fotonu o větší energii (kratší vlnové délce) než v případě větších QDs, které mají rozdíl mezi valenčním a vodivostním pásmem menší. To má za následek barevný posun z červené na modrou ve vyzařovaném záření. Proto mohou QDs ze stejného materiálu vyzařovat libovolnou barvu záření, a to pouze změnou velikosti [12].



Obrázek 5 Rozdělení energetických hladin v QDs v závislosti na klesající velikosti [12]

2.3.1 Struktura QDs

QDs se skládají z krystalického anorganického jádra metaloidu (typický polovodič např. CdSe, core), které je zodpovědné za jejich fluorescenční vlastnosti. Toto jádro může být obklopeno pláštěm (např. ZnS, core-shell), které jej chrání a činí QDs biokompatibilní. Pro zachování stability nanokrystalu v rozpouštědle je třeba přítomnost stabilizátoru obsahujícího thiolovou (–SH) skupinu. Tato struktura je zobrazena na obrázku 6 [13].

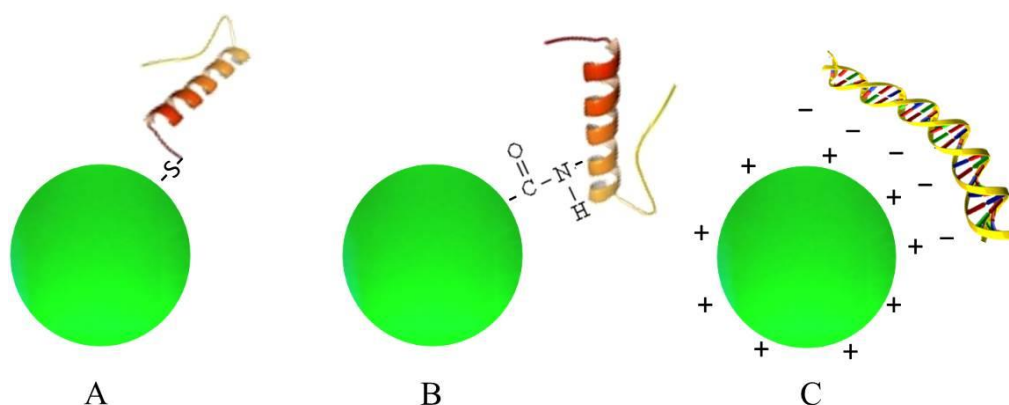


Obrázek 6 Struktura jádra a pláště QDs [13]

Povrch QDs může být funkcionalizován funkčními skupinami (např. amino nebo karboxylovou skupinou) pro dobrou rozpustnost ve vodných roztocích [10].

Na povrch QDs je možné konjugovat celou řadu různých biomolekul. Biomolekuly mohou být navázány na povrch QDs buď přímo (kovalentně/nekovalentně) nebo přes stabilizační vrstvu, která vzniká mezi ligandem a reaktivním povrchem nanočástic [10]. Jednotlivé typy

vazeb QDs jsou zobrazeny na obrázku 7.



Obrázek 7 A) QDs stabilizovaná thiolovou skupinou proteinu B) QDs stabilizovaná karbonylovou skupinou proteinu C) Elektrostatické interakce mezi proteinem a QDs

a) Nekovalentní konjugace QDs

Jedná se o jednoduchý, reprodukovatelný a snadný přístup. V tomto přístupu se uplatňují nekovalentní vazebné interakce např. elektrostatické interakce mezi povrchem QDs a navazovaným ligandem. Příkladem využití nekovalentního přístupu může být vázání CdTe QDs stabilizovaných cysteaminem s jednovláknovou DNA, kdy se elektrostaticky přitahují pozitivní amino skupiny na povrchu QDs s negativně nabitou molekulou DNA (obrázek 7 C) [15].

b) Kovalentní konjugace QDs

Náhradou thiolové skupiny stabilizátoru QDs

Malé molekuly s volnými thiolovými skupinami vykazují vždy vysokou vazebnou afinitu k QDs a toho je využíváno při kovalentní konjugaci. Tato konjugace je založená na nahrazování thiolových skupin (-SH), které jsou přítomné na povrchu QDs thiolovanými biomolekulami (obrázek 7 A). Tento způsob byl použit například na navázání vybrané monoklonální protilátky k CdSe/ZnS QDs [15].

Spojení QDs a biomolekuly přes linker

Nejčastějším příkladem kovalentního spojování je využití ve vodě rozpustného linkeru N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu a N-hydroxysulfosukcinimidu za vzniku kovalentních konjugátů QDs a navazované molekuly (obrázek 7 B) [15].

2.3.2 Ala4

Peptid Ala 4, je organická chemická sloučenina složená z 12 aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Jedná se o synteticky připravený homeomerní lineární polypeptid vykazující antibakteriální vlastnosti. V této práci byla antibakteriální aktivita peptidu studována na bakterii *Staphylococcus aureus*. Obecná struktura peptidu je zobrazena na obrázku 8. Základní vlastnosti tohoto peptidu jsou přehledně zaznamenány v tabulce 1.

Sekvence	FASTA formát: YKWFRHLIKKLC
	Tyr-Lys-Trp-Phe-Arg-His-Leu-Ile-Lys-Lys-Leu-Cys
Délka	12
Molární hmotnost (Mr)	1635,06 g/mol
Izoelektrický bod (pI)	10,5
Náboj (při pH 7)	4
Hydrofobnost	+12,29 Kcal/mol
Excitační koeficient¹	6990 M ⁻¹ .cm ⁻¹
Excitační koeficient²	6990 M ⁻¹ .cm ⁻¹

Tabulka 1 Vlastnosti peptidu Ala 4. Data byla vygenerována prostřednictvím peptide calculatoru dostupného na webových stránkách <http://www.bachem.com>



Obrázek 8 Struktura peptidu Ala 4 byla vygenerována prostřednictvím programu PEP-FOLD [13]

Tento peptid byl v předložené bakalářské práci navazován na povrch QDs dvěma různými způsoby. Následně byla zkoumána interakce takto připraveného konjugátu s gram pozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*.

2.3.3 QDs versus organická barviva

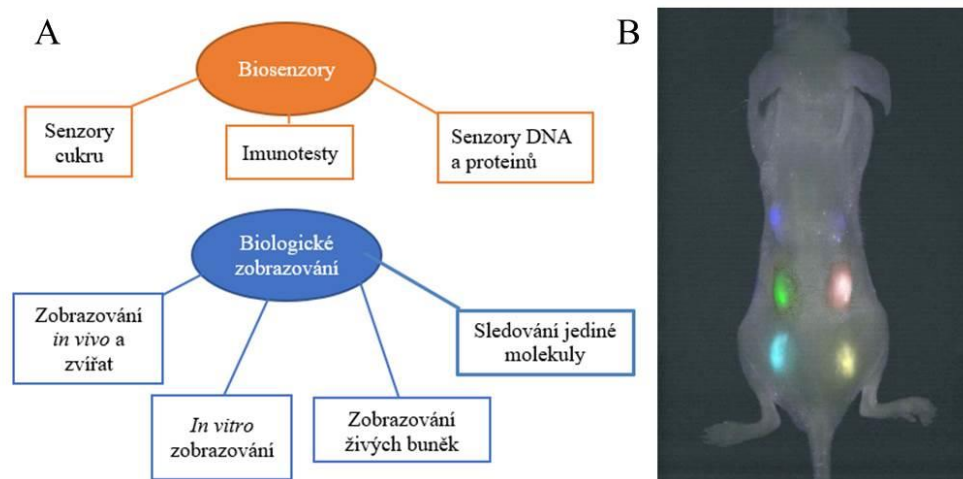
Během posledních několika desetiletí získaly kvantové tečky nesmírný význam díky své fotostabilitě, dobrému kvantovému výtěžku, širokému spektru absorpce a laditelnému úzkému emisnímu spektru [17,18]. Velkou výhodou také je, že vzhledem k širokému absorpčnímu spektru může být vizualizováno najednou více QDs o různých emisních vlnových délkách. V případě QDs dochází také k velkým Stokesovským posunům, což snižuje signál pozadí [19]. Dalšími výhodnými vlastnostmi QDs jsou odolnost vůči fotochemické a chemické degradaci ve srovnání s organofluorofory, což umožňuje jejich vizualizaci po dobu od několika hodin až po týden [20,21]. Srovnání vlastností QDs a organických barviv je zobrazeno v tabulce 2.

Tabulka 2 Srovnání vlastností QDs a organických barviv [22]

Vlastnosti	QDs	Fluorescenční barviva
Velikost	~ 0,5 nm (molekuly)	6–60 nm (částice)
Absorpční spektra	Úzká	Široká
Emisní spektra	Asymetrická	Symetrická (laditelná velikostí částice)
Fotochemická stabilita	Dostatečná pro mnoho aplikací	Vysoká
Vazba biomolekul	K dispozici několik protokolů. Několik biomolekul se váže na jednu QD.	Pomocí funkčních skupin podle zavedených protokolů. Často se na jednu biomolekulu váže několik barviv.

2.3.4 Biologická aplikace QDs

QDs se uplatňují v celé řadě bioanalytických aplikací. Nejčastěji se využívají jako biosenzory. Dalším příkladem aplikace QDs je vyšetření a diagnostika genetických onemocnění. Infračervené QDs mohou být využity jako fluorescenční sondy pro *in vivo* detekci u malých zvířat, kde mohou nahradit organické fluorofory, které emitují infračervené záření a jsou málo stabilní. Bylo prokázáno, že zobrazování myších buněk embryonálních kmenů (ES) na bázi peptidů s QDs neovlivňuje životaschopnost, proliferaci ani diferenciaci ES buněk. Zobrazení ES buněk pomocí šesti různých QDs můžeme pozorovat na Obrázek 9 B. Na obrázku 9 A je vybraných několik nejčastěji využívaných aplikací QDs [16].



Obrázek 9 A) Příklady biologické aplikace QDs B) Embryonální kmenové buňky označené QDs [16]

2.4 Elektroforetické metody a jejich využití ke studiu interakcí látek

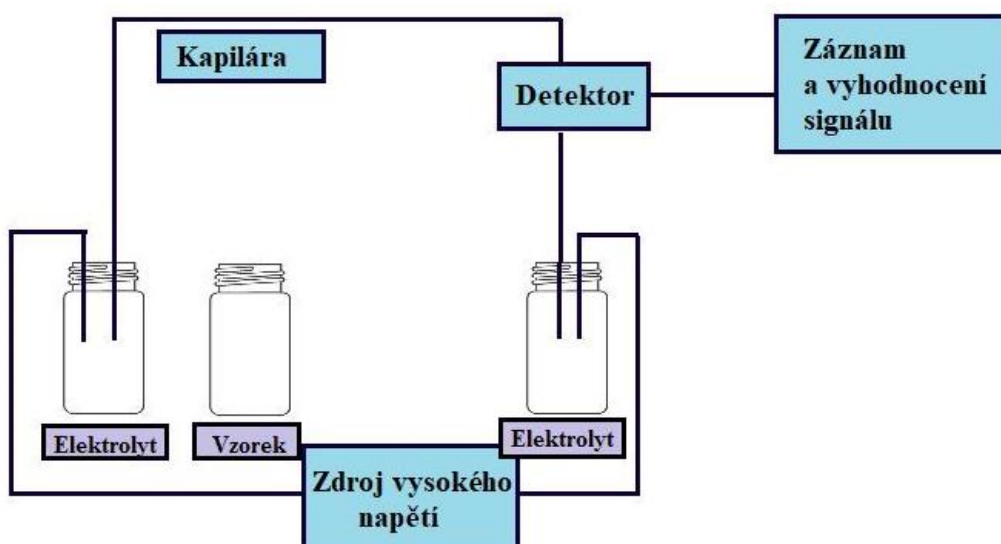
Pro charakterizaci QDs se využívá metoda kapilární elektroforézy (CE). CE je separační technika jejíž velkou výhodou je rychlost separace, jednoduchost, potřeba malého množství vzorku a vysoké rozlišení separace. CE zaznamenala využití v separaci a charakterizaci anorganických nanočástic (Ag, Au, TiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃), biomolekul (proteinů, peptidů) nebo konjugátů nanočástic s biomolekulami jako například QD-konjugáty s hovězím sérovým

albuminem nebo křenovou peroxidázou. Bývá také používána pro imunoanalýzy (např. stanovení prionového proteinu, alfa-fetoproteinu atd.). Právě kvůli těmto vlastnostem a možnostem aplikace byla vybrána jako vhodná metoda pro charakterizaci konjugátu QD-Ala4 a pro vizualizaci interakce mezi QDs-Ala4 a bakterií *Staphylococcus aureus* [25].

V současnosti je rozlišováno několik elektroforetických metod, které se liší průběhem separačního procesu. V této práci je využívána zónová kapilární elektroforéza [23,24].

2.4.1 Instrumentace

Typický systém kapilární elektroforézy se skládá z nádobek (vialek) s elektrolytem a vialky se vzorkem, zdroje vysokého napětí s výstupem na platinové elektrody, křemenné kapiláry, detektoru, který bývá umístěn většinou přímo na kapiláře a výstupního zařízení, které zaznamenává signál detektoru v čase. Některé přístroje obsahují také zařízení pro regulaci teploty, které zajišťuje opakovatelnost a reprodukovatelnost analýz. Kompletní instrumentaci je schematicky znázorněna na obrázku 10 [26,27]. Kapiláry z oxidu křemičitého jsou velmi křehké, proto jsou potaženy vrstvou polyimidu. Touto vrstvou neprochází UV záření, proto je nutné polymerní vrstvu v místě optické detekce odstranit [26].



Obrázek 10 Schéma kapilární zónové elektroforézy

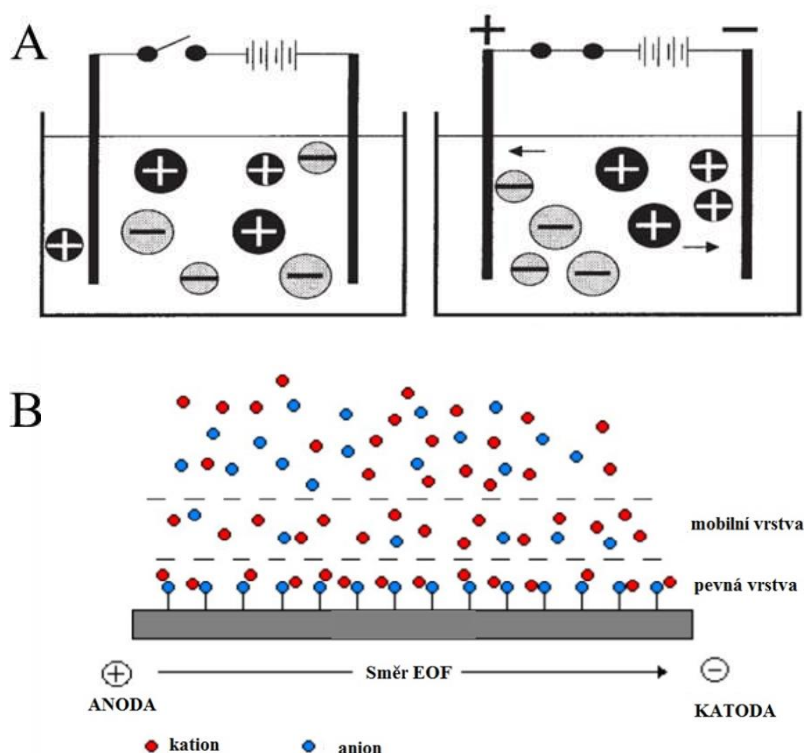
2.4.2 Princip metody

Působí-li na nabité částice elektrické pole, dochází k migraci těchto částic k opačně nabitě elektrodě. Rychlost elektroforetického pohybu částic závisí na jejich náboji, velikosti a také na intenzitě použitého elektrického pole. K porovnání hodnot naměřených v různých podmínkách, je využíváno pojmu elektroforetická mobilita (elektroforetická pohyblivost). Jedná o rychlost částic při jednotkové intenzitě pole [27].

Efektivní mobilitu je možné ovlivnit výběrem vnějších podmínek (především složením elektrolytu). Klíčovým faktorem je také pH prostředí [28].

Obrázek 11 A znázorňuje jednoduchý příklad elektroforézy. V případě nepřítomnosti elektrického pole je pohyb iontů náhodný (vlevo). Při vložení napětí se ionty začnou pohybovat

a dochází k separaci (vpravo) [27].



Obrázek 11 A) Princip elektroforézy, B) Separace v CE [27,28].

V případě kapilární elektroforézy je celý proces převeden do vnitřního prostoru kapiláry. V důsledku bazického prostředí základního elektrolytu, kterým je kapilára naplněna, dochází k odštěpení protonů ze silanových skupin (-Si-OH) vnitřní stěny kapiláry. Důsledkem deprotonace silanových skupin je záporně nabitý vnitřní povrch kapiláry. Kationty přítomné v daném elektrolytu vykompenzují záporný náboj vnitřního povrchu kapiláry a vznikne elektrická dvojitá vrstva. Tato dvojitá vrstva se po aplikaci elektrického napětí pohybuje ke katodě a strhává sebou celý vnitřní objem kapiláry. Tento jev se nazývá elektroosmotický tok (EOF). EOF lze ovlivnit změnou hodnoty vkládaného napětí, pH, iontové síly a viskozity základního elektrolytu [30]. Velkou výhodou CE je, že existence EOF umožňuje stanovení kationtů i aniontů v jedné analýze. Anionty jsou sice přitahovány k anodě, ale ve většině případů je jejich elektroforetická mobilita menší než mobilita EOF, které je unáší směrem k záporně nabitě katodě (obrázek 11 B) [27].

2.4.3 Detekce

Detekce analytických zón v CE může být provedena buď v průběhu jejich migrace kapilárou (UV-Vis absorpční detekce, fluorescenční detekce, vodivostní detekce, detekce na základě indexu lomu atd.) nebo po eluci z kapiláry (elektrochemická detekce, hmotnostní spektrometrie). Níže jsou zmíněny nejčastěji využívané detekční metody [31].

UV/Vis absorpční detekce

UV/Vis absorpce je nejběžnější detekční metoda v CE. Tato metoda je univerzální, používaná k detekci absorpce UV nebo viditelného záření molekulami ve vzorku. S použitím UV absorpčního detektoru je možné detekovat široké spektrum sloučenin. Předpokládá se,

že více než 90% sloučenin absorbuje v rozsahu vlnových délek UV. U sloučenin, které nevykazují UV nebo Vis absorpci, lze použít nepřímou detekci [32]. Při nepřímé detekci je použit pufr obsahující chromofor a detektor pak zaznamená snížení odezvy, což se na elektroferogramu projeví jako záporný pík. Citlivost UV/Vis detekce závisí na průměru kapiláry. Typické meze detekce se pohybují od přibližně 10^{-13} do 10^{-15} molů [33].

Fluorescenční detekce

Druhým nejpoužívanějším typem detekce v CE je detekce fluorescenční (nejčastěji laserem indukovaná fluorescenční detekce, LIF). Jako budící zdroj bývá používána buď oblouková lampa, nebo laser, případně světelná dioda, která se stala alternativou pro lasery díky malým rozměrům, stabilnímu výstupu a nízkým nákladům [36].

Tento vysoce citlivý a selektivní detektor je zvláště důležitý v biologických aplikacích, zejména u analytů obsahujících primární aminy (např. aminokyseliny, peptidy a proteiny), důležitý je i při sekvenování DNA [34]. Jednou z nevýhod této metody může být to, že jen velmi málo molekul vykazuje fluorescenční vlastnosti, a proto je nutné takovéto molekuly derivatizovat. V současné době však již je vyvinuta široká škála fluorescenčních značek, které udělují fluorescenční vlastnosti sloučeninám, které nejsou inherentně fluorescenční [35].

Fluorescence umožňuje extrémně nízké detekční limity, které se pohybují v rozmezí přibližně 10^{-15} až 10^{-20} molů, v závislosti na zdroji excitace, postupu derivatizace a fluorescenční značce [33].

Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce je založena na oxidaci nebo redukci analytu na elektrodě. Tato metoda vykazuje nižší limity detekce v porovnání s UV absorpční (od 10^{-17} do 10^{-19} molů) a nevyžaduje žádnou derivatizaci vzorku jako je tomu u fluorescenční detekce. Navzdory tomu je v CE využívána méně než UV/Vis nebo LIF detekce. Důvodem může být to, že vysoké napětí aplikované při separaci a výsledný proud v kapiláře jsou vnímány jako nekompatibilní s elektrochemickou detekcí [36].

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Propojení MS-CE je velmi atraktivní, protože umožňuje propojení účinné separační techniky s citlivou a selektivní detekcí jak malých tak velkých molekul. Analyty jsou detekovány na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. Získané informace jsou zvláště užitečné pro identifikaci struktury sloučenin [37]. Typické detekční limity se pohybují od přibližně 10^{-12} do 10^{-15} molů [38].

2.4.4 Aplikace

Možnosti aplikace CE jsou velmi rozsáhlé. CE je využíváno především k rozlišení malých molekul, k chirální separaci, pro stanovení čistoty řady farmaceutických přípravků, k separaci peptidů, k analýze sacharidů a oligosacharidů, k analýze nukleosidů, nukleotidů a nukleových kyselin, k farmaceutickým a klinickým účelům (např. pro analýzu různých farmak a sloučenin – př. aspirinu, paracetamolu, cimetidinu, hypoglykemických léků, antiepileptik, morfinu nebo kokainu v moči či v krevní plazmě). CE umožňuje analyzovat i větší molekuly, organely, buňky i nanočástice. [39].

CE může být také využita pro studium interakcí biomolekul. Ačkoliv existují i jiné metody, které umožňují studium interakcí biomolekul, jako je například chromatografie, vznikla i řada publikací potvrzující vhodnost použití CE k těmto účelům. Například Americký vědec Wang uvedl, že kapilární elektroforéza s fluorescenční detekcí (CE-FL) je účinná metoda k detekci interakcí mezi nanočásticemi a proteiny, jelikož umožňuje detekovat nepatrné změny ve struktuře a složení povrchově vázaných ligandů na kvantové tečky. Také bylo zjištěno, že kombinací technologií CE a fluorescenční rezonanční přenos energie lze studovat interakci proteinů a nanočástic nebo interakci peptidů. Proto byla tato metoda využita pro studium interakce mezi peptidem Ala4 a QDs i v této předkládané práci [40,41].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

Sodium borohydride	Sigma Aldrich (USA)	99,9%
Kadmium acetát	Sigma Aldrich (USA)	99,9%
Mercaptosuccinic acid	Sigma Aldrich (USA)	99,0%
Sodium tellurite	Sigma Aldrich (USA)	99,0%
Glutathione oxidized	Sigma Aldrich (USA)	98,0%
Sodium dodecylsulfate	Sigma Aldrich (USA)	99,0%
Trizma base (TRIS)	Sigma Aldrich (USA)	99,8%
Sodium tetraborate dexamhydrate	Sigma Aldrich (USA)	99,5%
Citric acid anhydride	Sigma Aldrich (USA)	
Dihydrogen dosdorečnan sodný	Sigma Aldrich (USA)	
Hydrogen fosforečnan sodný	Sigma Aldrich (USA)	
N-Hydroxioulfosuccimide sodium (Sulfo-NHS)	Sigma Aldrich	98%
Sodium hydroxide	Sigma Aldrich (USA)	
HCl	Sigma Aldrich (USA)	
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (USA)	
DMF	Sigma Aldrich (USA)	
EDC	Sigma Aldrich (USA)	
Trizma base	Penta (CZ)	
Sodium tetraborate decahydrate	Lachema (CZ)	
NH ₃	Lach-Ner, s.r.o (CZ)	25%
Ala ₄	Syntetizováno na Mendelově univerzitě v Brně	

3.2 Přístrojové vybavení

7100 Capillary Electrophoresis (Agilent Technologies)

PACE 5500 Capillary Electrophoresis (Beckman Coulter)

Fluorescence, absorbance, luminescence plate reader Infinite 200 PRO (Tecan)

3.3 Metody

3.3.1 Příprava CdS QDs pomocí UV záření

QDs byly připravovány v mikrotitrační UV transparentní destičce. V každé jamce bylo smícháno 50 μ l 3mM octanu kademnatého, 25 μ l 0,1mM fosfátového pufru o pH 7, 8,4 μ l kyseliny merkaptosukcinové (MSA) o koncentraci 2,44 mg/ml a 16,6 μ l peptidu Ala₄ o koncentraci 2,5 mg/ml. Vzorky byly posléze ozářeny v transluminátoru ($\lambda = 254$ nm) po dobu 15 min.

3.3.2 Charakterizace QDs připravených pomocí UV záření

Na kapilární elektroforéze Beckman PACE/5500 s UV fluorescenční detekcí byla ověřena konjugace peptidu Ala₄ s QDs. Signál byl detekován při vlnové délce 214 nm. Pro experiment

byla použita kapilára z taveného oxidu křemičitého o vnitřním průměru 75 μm , vnějším průměru 375 μm , celkové délce 47 cm a efektivní délce 40 cm. Jako základní elektrolyt byl použit 20 mM borátový pufr, pH 11,5. Vložené napětí činilo 20 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky po dobu 5 s, při tlaku 5 psi. Před každým měřením byla kapilára promývána po dobu 1 min, při tlaku 5 psi roztokem základního elektrolytu.

Jelikož mají peptidy tendenci adsorbovat na stěny kapiláry, bylo nezbytné do vzorku přidat detergent dodecylsulfát sodný (SDS) - 1 μl SDS na každých 20 μl vzorku. SDS snižuje mezifázovou energii peptidu a elektrostatickým odpuzováním dopomáhá ke snižování adsorpčních jevů.

3.3.3 Příprava bakterie *Staphylococcus aureus* (SA)

Bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika) byly kultivovány v Muller-Hintonovém bujónu (MHB) (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) přes noc při 37 °C a 150 ot./min. Koncentrace bakteriálních roztoků byla stanovena optickou hustotou při 600 nm a pomocí MHB byly kultury upraveny na koncentraci $\sim 10^6$ CFU $\cdot\text{ml}^{-1}$. Poté byly buňky centrifugovány při 8000 ot/min po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Supernatant byl odtraněn a pelet sedimentovaných buněk byl resuspendován ve stejném objemu směsi 20 mM TRIS o pH 8,5.

3.3.4 Termická příprava CdTe QDs

CdTe QDs byly připraveny následujícím způsobem:

Roztok 1: 10 mg octanu kademnatého a 60 mg MSA bylo rozpuštěno v malém objemu destilované vody, následně bylo přido 1,8 ml 1M amoniaku a roztok byl doplněn na výsledný objem 50 ml

Roztok 2: 4,43 mg telluridu sodného bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody

Roztok 3: NaBH₄ o koncentraci 0,1 mg/ml sloužil jako redukční činidlo

Roztoky byly smíchány v poměru 1 : 1 : 1, zahřívány po dobu 5 min na 90°C a po vychladnutí ozařovány v transluminátoru ($\lambda = 254$ nm) po dobu 1 min.

Vzniklé QDs byly následně přečištěny. Pro přečištění bylo nutné přesrážet QDs v isopropanolu. QDs byly smíchány s dvojnásobným množstvím isopropanolu. Následně byla tato směs třepána na termobloku (10 min, 500 rpm, 22°C) a zcentrifugována (10 min, 9000 rpm, 22°C). Supernatant byl odsát a vytvořený pelet QDs byl rozpuštěn v roztoku fosfátového pufru (PBS) o pH 7,2.

3.3.5 Příprava konjugátu CdTe QDs-Ala4

Navázání peptidu Ala4 na termicky připravené CdTe QDs bylo zprostředkováno přes EDC a sulfo-NHS linkery. Byl připraven roztok 0,6 mM EDC a 1,2 mM Sulfo-NHS ve vodě. Tyto roztoky bylo nutné připravit čerstvé těsně před použitím. K 300 μl CdTe QDs bylo přidáno 5 μl roztoku EDC a 5 μl roztoku sulfo-NHS. Tato směs byla jemně třepána na termobloku (300 rpm) při laboratorní teplotě po dobu 20 min. Poté bylo ke směsi přidáno 150 μl peptidu Ala4 (1 mg/ml) a směs byla jemně třepána dalších 60 min.

3.3.6 Charakterizace termicky připravených QDs

Na kapilární elektroforéze 7100 (Agilent Technologies, Německo) s UV/Vis absorpční detekcí

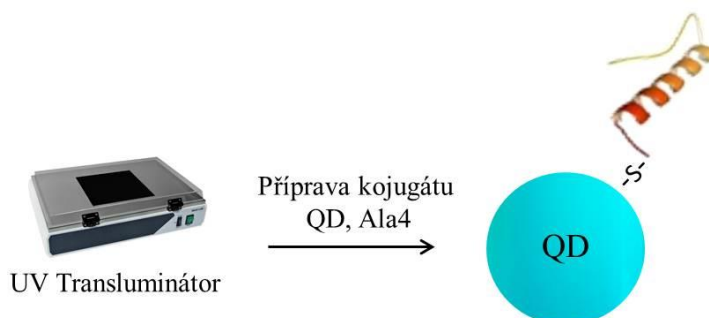
byl ověřen vznik konjugátu peptidu Ala4 a termicky připravených CdTe QDs. Signál byl detekován při vlnové délce 214 nm. Pro experiment byla použita kapilára z taveného oxidu křemičitého o vnitřním průměru 75 μm , vnějším průměru 375 μm , celkovou délkou 64,5 cm a účinnou délkou 56 cm. Jako základní elektrolyt byl použit 20 mM borátový pufr, pH 9. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 4 s. Vložené napětí bylo 20 kV. Před každou analýzou byla kapilára promyta po dobu 120 sekund roztokem základního elektrolytu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Velkou nevýhodou QDs je, že většina z nich je toxická, a tím pádem nevhodná pro lékařské aplikace. Mezi nejvíce používané a studované patří kadmiové QDs, protože je možné je připravit v celém optickém spektru [42]. Ionty kadmia jsou však schopny interagovat s thiolovými skupinami molekul, což může způsobovat poškození a následnou smrt buněk [43]. Uvolňování kademnatých iontů může být omezeno, případně úplně odstraněno povrchovou modifikací nanočástic. Velmi často se používá např. potahování QDs vrstvičkou teluru nebo zinku [44]. Jako stabilizátor mohou být použity i peptidy např. tripeptid glutathion, který se přirozeně existuje ve většině organismů, může být použit ke snížení toxicity nanočástic díky jeho chelatační schopnosti způsobené obsahem thiolové skupiny v jeho struktuře [45]. V předložené bakalářské práci byly připraveny dva typy kadmiových QDs. První byly QDs připravené UV zářením, které byly stabilizované kyselinou mercaptosucinovou a peptidem Ala4. Druhé byly QDs připravené termicky, stabilizované telluridem a peptidem Ala4. Optimalizace a charakterizace výše zmíněných QDs bude blíže popsána v kapitole (3.1 a 3.2).

4.1 CdS QDs připravené pomocí UV záření

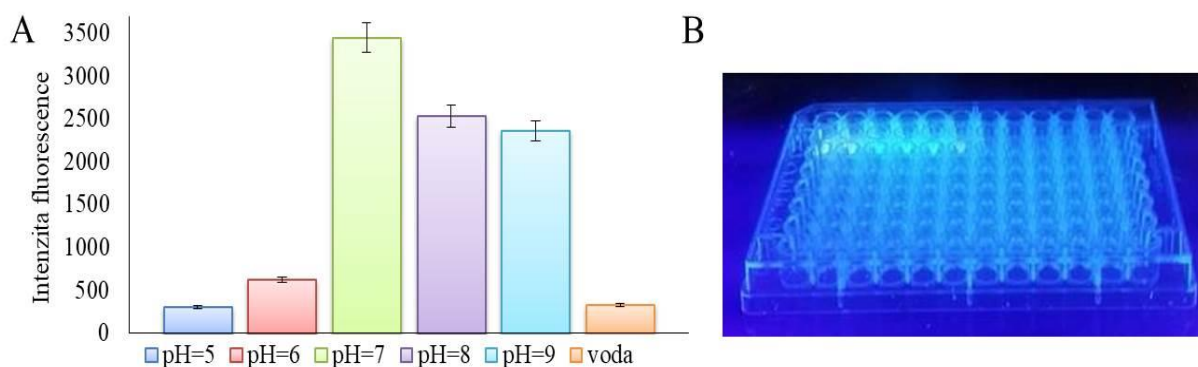
Konjugát CdS QDs–Ala4 byl připraven náhradou thiolové skupiny stabilizátoru MSA za thiolovou skupinu peptidu Ala4. Vzniklá vazba mezi QDs a peptidem je kovalentní. Konjugát byl připraven ozářením směsi octanu kademnatého, peptidu a MSA v jednom kroku. Schéma přípravy je zobrazeno na obrázku 12.



Obrázek 22: Schéma přípravy konjugátu CdS QDs a peptidu Ala4 pomocí UV záření

4.1.1 Optimalizace přípravy CdS QDs

Jelikož intenzita fluorescence většiny látek bývá silně ovlivňována kyselostí prostředí, bylo v prvním kroku optimalizováno pH prostředí, ve kterém budou QDs připravovány. Vzorky byly připravovány v prostředí 0,1 mM fosfátového pufru o pH 5–9. Sledované QDs byly stabilizovány pouze 25 μ l MSA (2,44 mg/ml) bez přítomnosti peptidu Ala4. U všech vzorků bylo proměřeno emisní spektrum pomocí fluorescenčního spektrometru pro analýzu v mikrotitračních destičkách.



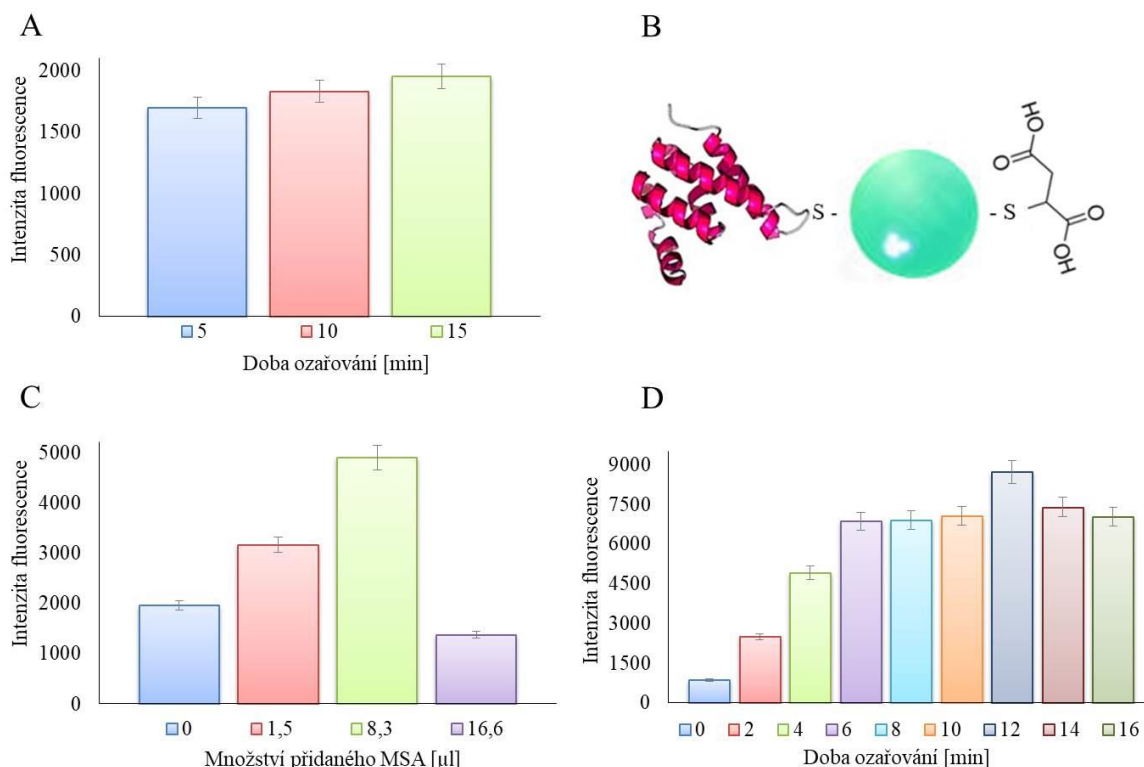
Obrázek 13 A) Intenzita fluorescence QDs připravených v prostředí o různých pH B) Vizualizace vzorků v transluminátoru

Výsledná data jsou zobrazena na obrázku 13. Z obrázku 13 A je patrné, že nejvyšší intenzitu fluorescence vykazovaly QDs v neutrálním prostředí. Proto bylo pH 7 použito pro přípravu QDs i v následujících experimentech. Na obrázku 13 B je vyfocena UV transparentní destička umístěná v transluminátoru. Z tohoto obrázku je zřejmé, že připravené QDs emitují modré záření.

V dalším kroku byly připravovány QDs stabilizované pouze peptidem Ala 4 (50 μ l, 2,5 mg/ml). Tyto QDs však vykazovaly nízkou intenzitu fluorescence, která byla nezávislá na době ozařování (obrázek 14 A). Tento jev mohl být způsoben tím, že molekula peptidu byla příliš objemná a stínila fluorescenci nebo mohlo docházet k elektronovým přesunům a k následnému zhášení fluorescence.

Za účelem zvýšení intenzity fluorescence byla vyzkoušena stabilizace QDs kombinací různých poměrů MSA a peptidu Ala4. Výsledné QDs by pak měly být stabilizovány thiolovou skupinou obou dvou složek MSA i peptidem Ala4 (obrázek 14 B). Pro stabilizaci QDs byly použity 3 různé poměry peptidu Ala4 a MSA (1:12, 1:2, 2:1). Naměřená data jsou znázorněna na obrázku 14 C. Z těchto dat je patrné, že nejvhodnější poměr Ala4 a MSA je 2:1. Za těchto podmínek vykazují připravené QDs nejvyšší intenzitu fluorescence.

Následně byla optimalizována doba ozařování QDs stabilizovaných poměrem Ala4 a MSA 2:1. Tato data jsou zaznamenána na obrázku 14 D, ze kterého lze vyvodit, že intenzita fluorescence takto připravovaných QDs je závislá na době ozařování. Nejvyšší intenzity fluorescence QDs dosahovaly po 12 minutách ozařování. Pokud byly QDs ozařovány po delší dobu, docházelo k pozvolnému poklesu intenzity fluorescence.

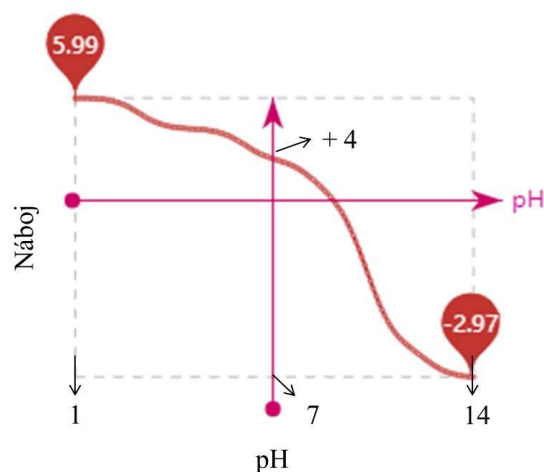


Obrázek 14 Optimalizace přípravy CdS QDs A) Závislost intenzity fluorescence na době ozařování; B) Struktura QDs stabilizovaných peptidem a MSA; C) Závislost intenzity fluorescence na množství přidaného MSA; D) Závislost intenzity fluorescence na době ozařování

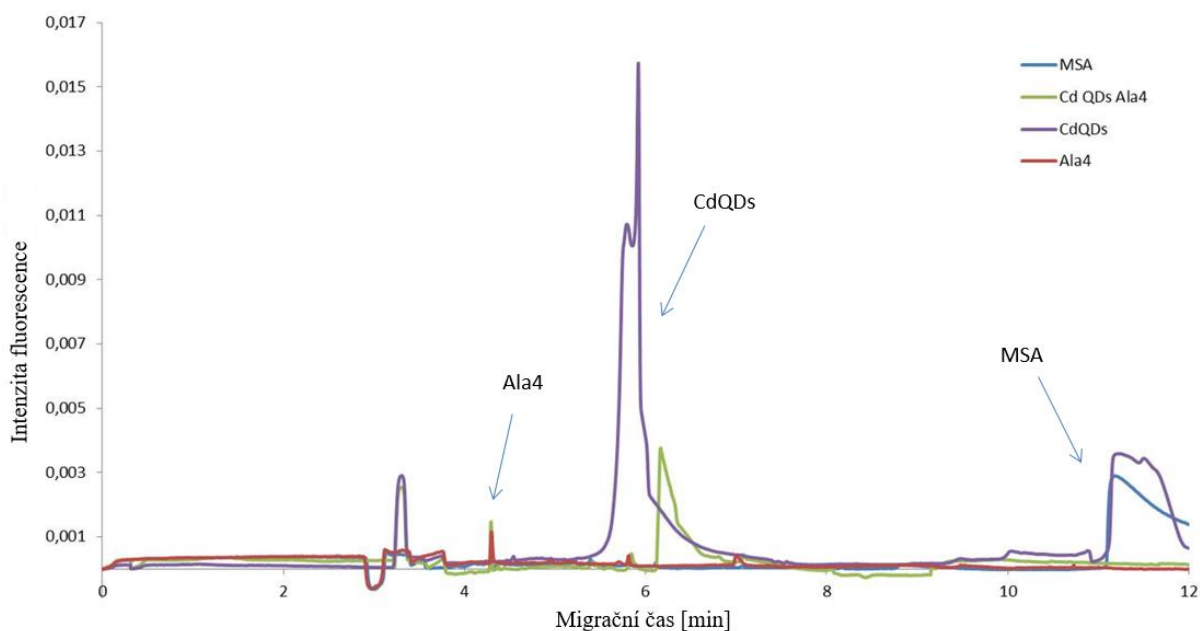
4.1.2 Charakterizace QDs připravených pomocí UV záření

Vazba mezi peptidem Ala4 a CdS QDs byla ověřena pomocí zónové kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí (ex. 350/em. 480 nm). Nejprve byly proměřeny jednotlivé prekurzory, ze kterých jsou QDs složeny, konkrétně MSA a peptid Ala4. Poté byly detekovány QDs připravené pouze stabilizací MSA (bez přítomnosti Ala4) a nakonec QDs stabilizované optimalizovaným poměrem peptidu Ala4 a MSA.

Výsledné signály připravených QDs se lišily intenzitou fluorescence i migračním časem. QDs obsahující ve své struktuře peptid byly detekovány v migračním čase 6,2 min, zatímco QDs v jejichž struktuře nebyl peptid zainkorporován měly migrační čas 5,7 minuty. Vzhledem k zápornému náboji peptidu Ala4 za zvolených separačních podmínek (při pH 11,5, které bylo použito při separaci byl náboj peptidu roven -2 , viz. obrázek 15) lze usuzovat, že došlo k jeho navázání na povrch QDs. Navázání peptidu může být i důvodem poklesu intenzity fluorescence QDs, jelikož značení peptidy/proteiny může vést ke zhášení fluorescence. Ačkoliv však byla intenzita fluorescence snížena v důsledku navázání peptidu, stále je její hodnota dostatečná pro zobrazení interakce mezi peptidem a bakterií. Výsledný elektroferogram je zobrazen na obrázku 16.



Obrázek 15 Graf závislosti náboje peptidu Ala4 na hodnotě pH. Data byla generována pomocí kalkulačky dostupné na webové stránce: www.novoprolabs.com



Obrázek 16 Charakterizace CdQDs stabilizovaných vhodným poměrem peptidu Ala 4 a MSA

Velikost QDs je důležitým parametrem, který ovlivňuje jak fyzikální, tak chemické vlastnosti těchto materiálů, a proto patří k základním parametrům, které by měly být při charakterizaci stanoveny. Ke stanovení velikosti byla použita metoda dynamického rozptylu světla, která je založena na měření fluktuace intenzity rozptýleného záření laserového paprsku, okolo jeho průměrné hodnoty. Naměřená data jsou zaznamenána v tabulce 3.

Povrchový náboj QD je dalším důležitým parametrem, který vypovídá o stabilitě a náchylnosti k agregaci. U QDs a konjugátu byl tedy stanoven zeta-potenciál. Obecně se za stabilní považují suspenze, které mají hodnotu zeta-potenciálu kladnější než +30 mV nebo zápornější než -30 mV. Naměřená data jsou zaznamenána v tabulce 3.

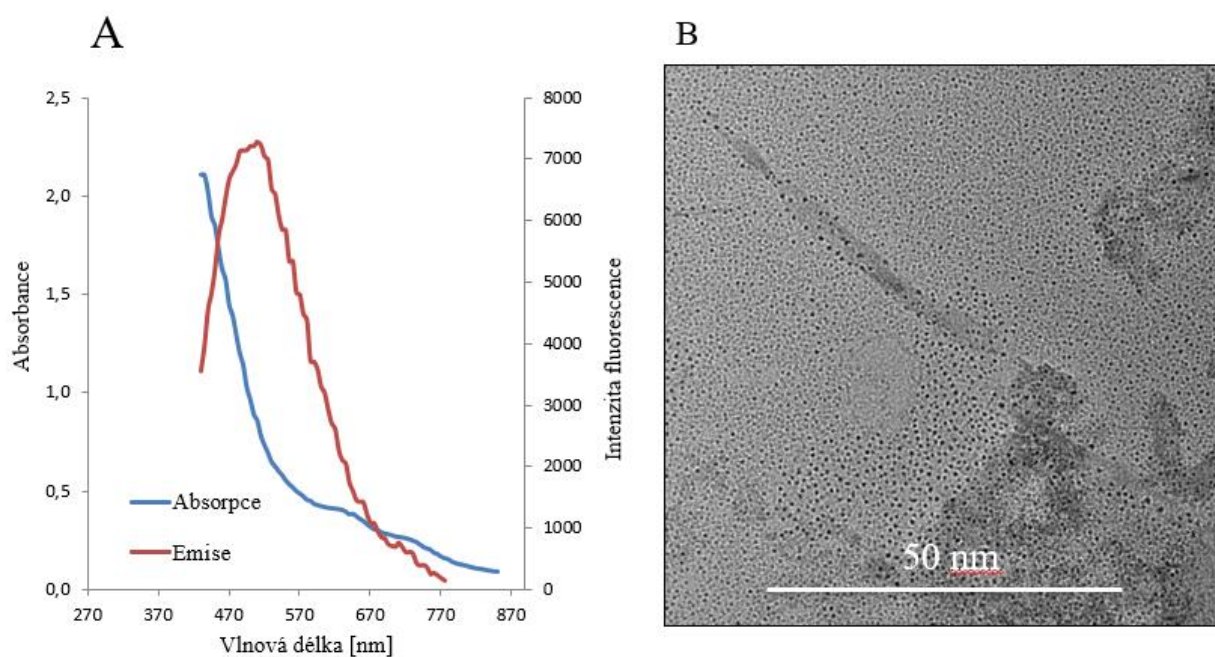
Tabulka 3: Velikosti a zetapotenciál připravených QDs a konjugátu QDs-Ala4

	Velikost [nm]	Zeta-potenciál [mV]
QDs	2,6	- 26
Konjugát QDs-Ala4	3	- 9

Z tabulky vyplývá, že velikost QDs je 2,6 nm, což odpovídá QDs emitujícím záření modré vlnové délky. Po navázání peptidu došlo k mírnému nárůstu velikosti QDs na velikost 3 nm. Zeta-potenciál QDs byl -26 mV, což je na pomezí hranice, která je považována za stabilní suspenzi. Po navázání peptidu došlo k změně zeta-potenciálu ke kladným hodnotám. Tento jev mohl být způsoben přítomností peptidu Ala4. QDs byly proměřovány ve fyziologickém roztoku (pH 7). Za těchto podmínek lze z obrázku 15 zjistit, že náboj peptidu je při dané hodnotě pH roven +4. Kladný náboj peptidu navázaného na povrchu QDs mohl být příčinou posunu hodnoty zeta-potenciálu QDs ke kladnějším hodnotám.

Dalším krokem byla spektrální charakterizace připravených nanočástic a konjugátů. Pro excitaci byla použita vlnová délka 350 nm. Emise byla měřena v rozsahu od 400 do 800 nm s krokem 2 nm. Absorpční spektra byla zaznamenána za stejných podmínek v rozmezí od 250 do 800 nm. Naměřená data jsou zaznamenána na obrázku 17 A.

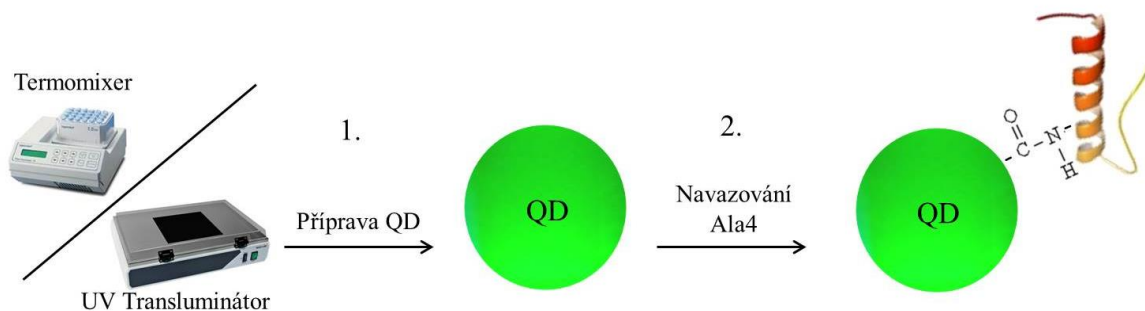
Pro vizualizaci vzorků byla použita transmisní elektronová mikroskopie. Vzorky (4 μ l) byly nanášeny na měděnou mřížku potaženou souvislou uhlíkovou vrstvou. Mřížky byly zobrazeny pomocí mikroskopu Tecnai F20 (FEI, USA). Snímek z mikroskopu je vidět na obrázku 17 B.



Obrázek 17 Charakterizace CdS QDs A. Spektrofotometrické stanovení absorpčního a emisního spektra, excitace při 350 nm B. Mikroskopické zobrazení CdS QDs

4.2 CdTe QDs připravené termicky

V případě termicky připravených QDs byl peptid navázán až na vytvořené QDs. Jednalo se tedy o dvou krokovou přípravu. V prvním kroku byly vytvořeny CdTe QDs pomocí zahřívání a působení UV záření. Ve druhém kroku byl na takto připravené QDs navázán peptid Ala4 pomocí linkerů EDC a sulfo-NHS, které umožnily vytvoření kovalentní peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou QDs a aminovou skupinou peptidu. Schéma procesu je zobrazeno na obrázku 18.



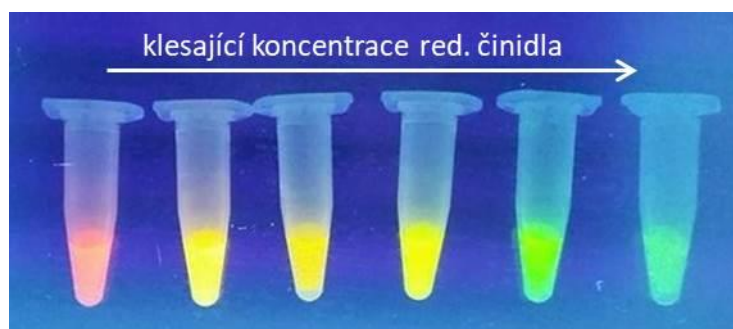
Obrázek 18 Proces přípravy CdTe QDs připravených termicky

4.2.1 Optimalizace přípravy CdTe QDs

Na přípravu CdTe QDs má vliv několik faktorů. Prvním z nich je koncentrace kadmia, dále koncentrace redukčního činidla a doba zahřívání i ozařování. Všechny tyto parametry byly optimalizovány tak, aby byly vytvořeny zeleně fluoreskující QDs.

a) Optimalizace koncentrace redukčního činidla

Bylo zjištěno, že při použití různé koncentrace redukčního činidla (RČ) dochází k tvorbě různě velkých QDs. Pro optimalizaci byla použita konstantní koncentrace kadmia (5 mg/ml) a různá koncentrace RČ v rozmezí 0,2 mg/ml až 0,01 mg/ml (získána ředěním 1:1). Vliv RČ na připravované QDs je demonstrován na obrázku 19. Z obrázku je patrné, že s klesající koncentrací RČ dochází i k poklesu velikosti QDs a tím i k pozvolné změně fluorescence od červené k zelené.

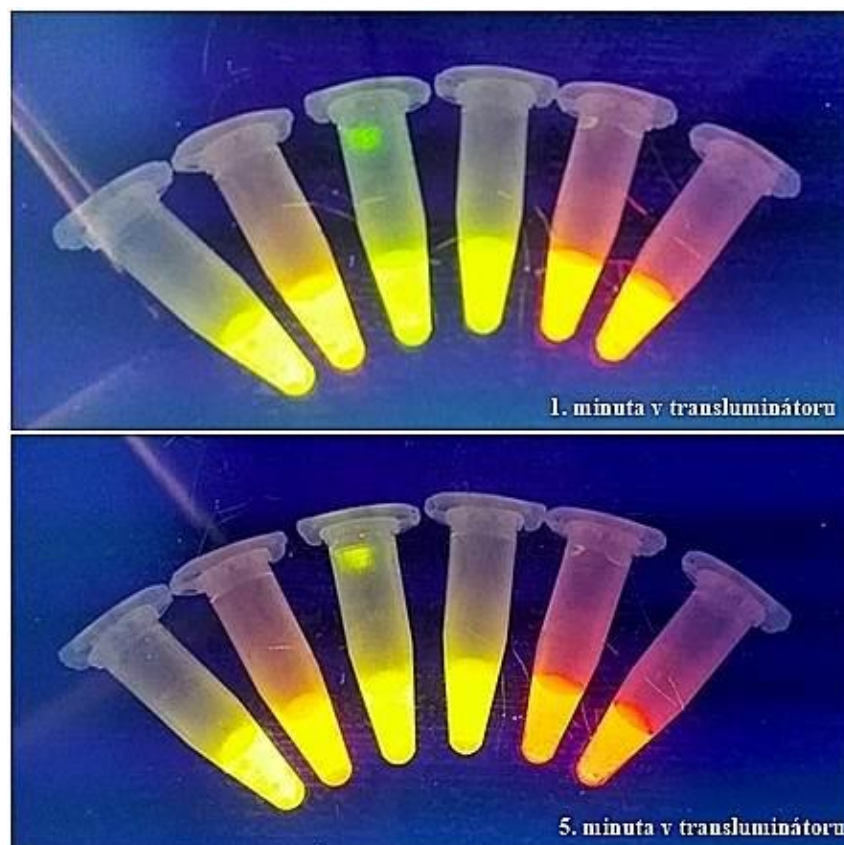


Obrázek 19 Optimalizace koncentrace redukčního činidla na základě intenzity fluorescence v transluminátoru

b) Optimalizace doby zahřívání a ozařování

Následně bylo zjištěno, že na přípravu QDs má vliv i doba zahřívání. QDs byly zahřívány na teplotu 90 °C po dobu 1-20 min. Bylo pozorováno, že s rostoucí dobou zahřívání, dochází k snižování intenzity fluorescence připravovaných QDs. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při

5 minutách ohřívání. QDs zahříváné po dobu 5 min nevykazovaly emisi fluorescence okamžitě po vložení do transluminátoru, ale docházelo u nich k postupnému nárůstu fluorescence působením UV záření. Pokud však byly QDs vystavené UV záření po dobu delší než 1 minuta docházelo u nich k posunu fluorescence směrem k červené barvě, což je patrné i z obrázku 20. Z obrázku je vidět, že zeleně fluoreskující QDs se postupně měnily na žlutou až oranžovou a oranžové přecházely na červenou. Jako ideální doba ozařování byla stanovena 1 min.



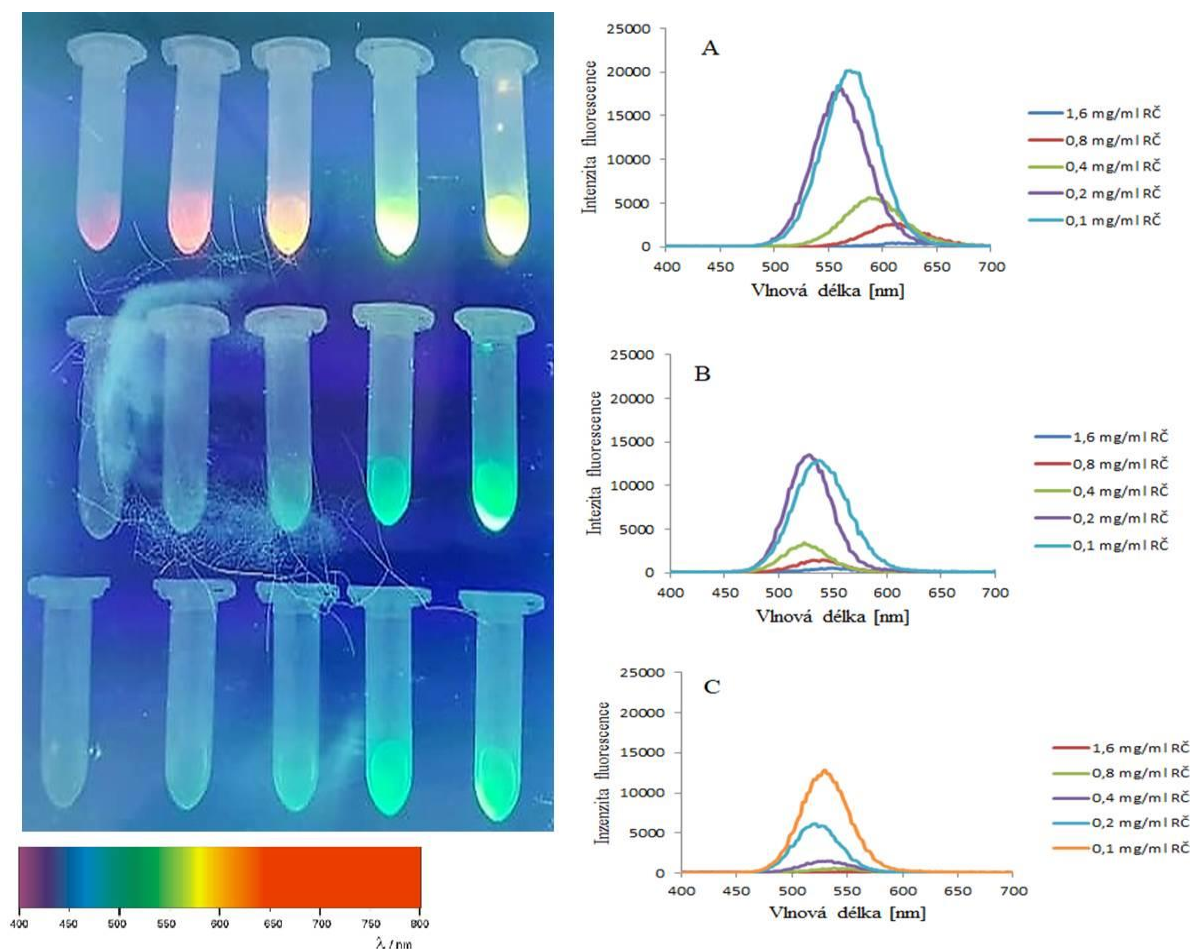
Obrázek 20 Optimalizace doby zahřívání a ozařování na základě intenzity fluorescence v transluminátoru

c) Optimalizace koncentrace octanu kademnatého

Pro optimalizaci koncentrace octanu kademnatého a ověření vlivu koncentrace RČ na QDs s různými koncentracemi kadmia byl proveden experiment, ve kterém byly připraveny a proměřeny QDs o různých poměrech koncentrace octanu kademnatého (0,1-0,3 mg/ml) a RČ (1,6-0,1 mg/ml). Konkrétní poměry jsou zaznamenány v tabulce 4 (hodnoty jsou uvedeny v jednotkách mg/ml). Připravené vzorky a jejich emisní spektra jsou zaznamenány na obrázku 21.

Tabulka 4: Koncentrace redukčního činidla a Cd^{2+} pro přípravu následujících vzorků

	1. sloupec		2. sloupec		3. sloupec		4. sloupec		5. sloupec	
	RČ	Cd	RČ	Cd	RČ	Cd	RČ	Cd	RČ	Cd
1. řádek	1,6	0,1	0,8	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
2. řádek	1,6	0,2	0,8	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
3. řádek	1,6	0,3	0,8	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,1	0,3



Obrázek 21 Optimalizace přípravy Cd Te QDs A) Závislost intenzity fluorescence CdTe QDs o koncentraci Cd²⁺ 0,1 mg/ml B) Závislost intenzity fluorescence CdTe QDs o koncentraci Cd²⁺ 0,2 mg/ml C) Závislost intenzity fluorescence CdTe QDs o koncentraci Cd²⁺ 0,3 mg/ml

Z obrázku 21 A je patrné, že při přípravě CdTe QDs o koncentraci 0,1 mg/ml mají nejvyšší intenzitu fluorescence QDs připraveny s nejnižší koncentrací redukčního činidla (tj. 0,1 mg/ml). Tyto QDs vykazují v transluminátoru žluté zbarvení. Nejnižší intenzitu fluorescence CdTe QDs o koncentraci 0,1 mg/ml je za použití redukčního činidla o nejvyšší koncentraci, tedy 1,6 mg/ml. Tyto QDs vykazují v transluminátoru červené zbarvení.

Při přípravě CdTe QDs o koncentraci 0,2 mg/ml mají nejvyšší intenzitu fluorescence QDs připraveny s koncentrací redukčního činidla 0,2 mg/ml. Tyto QDs vykazují v transluminátoru zelené zbarvení. Nejnižší intenzitu fluorescence CdTe QDs o koncentraci 0,2 mg/ml je za použití redukčního činidla o nejvyšší koncentraci, tedy 1,6 mg/ml. Tyto QDs nevykazují v transluminátoru zbarvení.

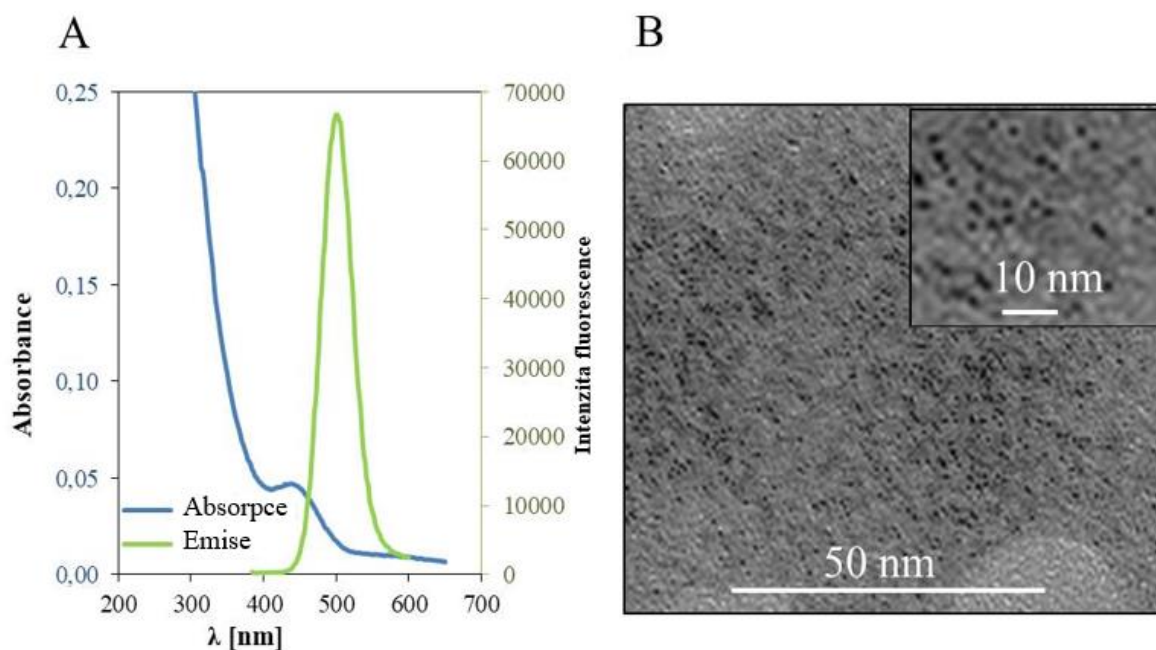
Při přípravě CdTe QDs o koncentraci 0,3 mg/ml mají nejvyšší intenzitu fluorescence QDs připraveny s koncentrací redukčního činidla 0,1 mg/ml. Tyto QDs vykazují v transluminátoru zelené zbarvení. Nejnižší intenzitu fluorescence CdTe QDs o koncentraci 0,3 mg/ml je za použití redukčního činidla o nejvyšší koncentraci, tedy 1,6 mg/ml. Tyto QDs nevykazují v transluminátoru zbarvení.

Na základě těchto informací je možné usoudit, že při nižší koncentraci Cd^{2+} a vyšší koncentraci redukčního činidla vznikají červené QDs, které vykazují nižší intenzitu fluorescence. Naším cílem bylo připravit zelené QDs, které vykazují co nejvyšší intenzitou fluorescence. Proto byly jako nejvhodnější QDs zvoleny s koncentrací redukčního činidla 0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml octanu kademnatého.

4.2.2 Charakterizace CdTe QDs

Fluorescenční spektra QDs byla získána za shodných podmínek jako při měření spekter QDs připravených UV zářením. Naměřená data jsou zaznamenána na obrázku 21 A.

Pro vizualizaci vzorků byla použita transmisní elektronová mikroskopie. Snímek z mikroskopu je na obrázku 22 B.



Obrázek 22 Charakterizace CdTe QDs A. Spektrofotometrické stanovení absorpčního a emisního spektra, excitace při 405 nm B. Mikroskopické zobrazení CdTe QDs [46]

U připravených QDs a konjugátu QD-Ala4 byla proměřena velikost a zeta-potenciál. Naměřená data jsou zaznamenána v tabulce 5.

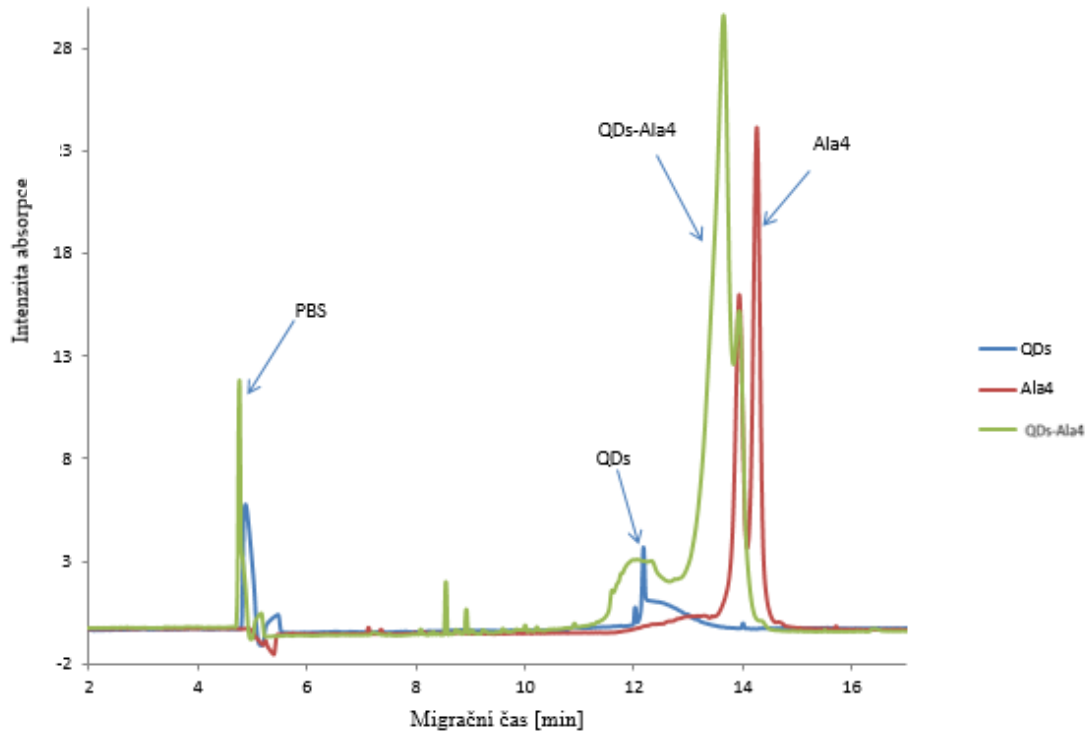
Tabulka 5: Velikosti a zeta-potenciál připravených QDs a konjugátu QDs-Ala4

	Velikost [nm]	Zeta-potenciál [mV]
QDs	3	- 31
Konjugát QDs-Ala4	3,3	8

Z tabulky je patrné, že velikost QDs je 3 nm, což odpovídá QDs emitujícím světlo zelené vlnové délky. Po navázání peptidu došlo k mírnému nárůstu velikosti QDs na velikost 3,3 nm. Zeta-potenciál QDs byl - 31 mV, což naznačuje, že by se mělo jednat o stabilní suspenzi. Po navázání peptidu došlo k posunu hodnoty zeta-potenciálu směrem ke kladným hodnotám. Tento jev byl pravděpodobně stejně jako v předchozím případě způsoben přítomností peptidu Ala4 (při daných podmínkách má náboj +4) na povrchu QDs. Rozdíl mezi zeta-potenciálem

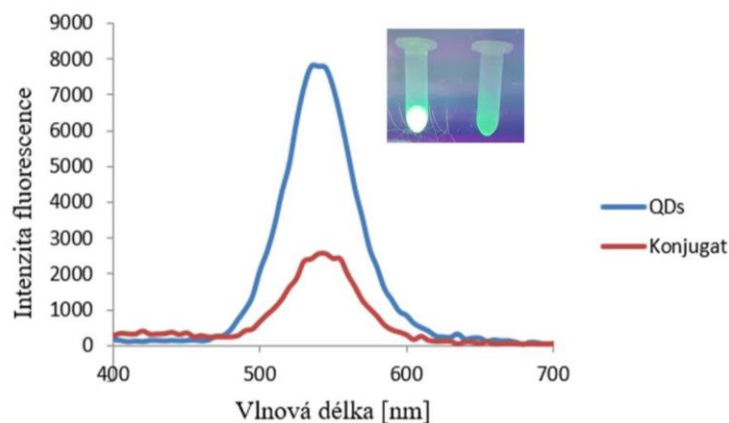
konjugátu QDs připraveného termicky a působením UV záření je ovlivněn množstvím navázaného peptidu. Z dat tedy vyplývá, že v případě termicky připravených QDs došlo k navázání většího množství peptidu Ala4.

Vazba mezi peptidem Ala4 a CdTe QDs byla ověřena pomocí zónové kapilární elektroforézy s UV/Vis absorpční detekcí ($\lambda = 214 \text{ nm}$). Naměřená data jsou zaznamenána na obrázku 23.



Obrázek 23 Charakterizace CdTe QDs pomocí CE

Nejdříve byly proměřeny samotné QDs ($t_m = 12,1 \text{ min}$), dále samotný peptid Ala4 ($t_m = 13,8 \text{ min}$). Při proměření elektroforegramu vytvořeného konjugátu QDs-Ala4 byl detekován nový signál v migračním čase 13,5 min. Naměřená data potvrzují vznik konjugátu.



Obrázek 24. Spektrofotometrické stanovení intenzity fluorescence QDs a konjugátu

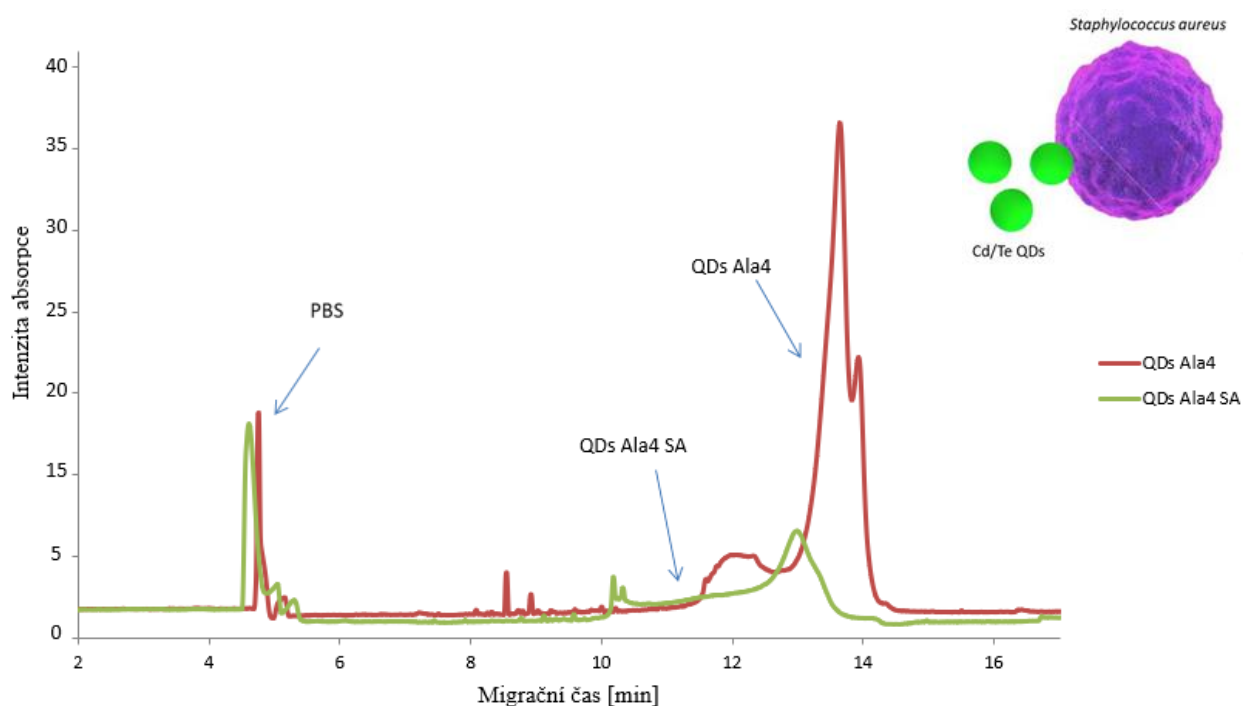
Konjugace mezi QDs a peptidem byla ověřena i spektrometricky. Na obrázku 24 jsou zaznamenána emisní spektra QDs a konjugátu. Z grafu lze vidět pokles intenzity fluorescence

po navázání peptidu. V pravém horním rohu je reálná fotka QDs a konjugátu pořízená při působení UV záření.

4.3 Interakce konjugátu s bakterií

Peptid Ala4 vykazuje antimikrobiální vlastnosti. Pro vizualizaci *in vitro* experimentů je však nezbytné tento peptid konjugovat s fluorescenční značkou. V předložené práci byl konjugován se dvěma typy QDs. U první z nich byl peptid s QDs spojen přes thiolovou skupinu, ve druhém případě došlo k tvorbě peptidové vazby mezi karboxilovou skupinou QDs a amino skupinou peptidu Ala4. Další část bakalářské práce byla tedy zaměřena na studium interakce připravených konjugátů QDs a peptidu Ala4 s bakterií *Staphylococcus aureus*. Tyto experimenty by také měly ověřit funkčnost peptidu po navázání na QDs.

Zkoumaná interakce CdTeQDs s bakterií *Staphylococcus aureus* je zobrazena na obrázku 25. Byly proměřeny elektroforegramy QDs-Ala4 a konjugátu s bakterií. První signál naměřený v migračním čase 4,3 min je odezvou rozpouštědla (PBS). Samostatná bakterie byla detekována v migračním čase 10 min. Konjugát vykazoval signál v migračním čase 13,5 min. Na obrázku 23 je možné pozorovat, že se u konjugátu s bakterií došlo k posunu k píku k nižšímu migračnímu času a poklesu intenzity signálu Ala4. Z těchto informací a z informací, které nám poskytly spektra těchto píků, lze usoudit, že došlo k interakci mezi konjugátem termicky připravených QDs s peptidem Ala4 a bakterií, nicméně pro dosažení lepších závěrů je třeba optimalizovat CE separaci, což nebylo předmětem této bakalářské práce.



Obrázek 25 Charakterizace interakce CdTe QDs s bakterií *Staphylococcus aureus* pomocí CE

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce je zaměřena na přípravu fluorescenčně značeného antimikrobiálního peptidu Ala4 a studium případné změny jeho antimikrobiálních vlastností, po navázání fluorescenční sondy, pomocí kapilární elektroforézy s absorpční detekcí ($\lambda - 214$ nm).

V teoretické části práce byla vypracována rešerše zaměřená na fluorescenční značení biomolekul. Byla popsána podstata luminiscence QDs na základě Jablonského diagramu. Byly diskutovány další možnosti značení organickými barvami, které však neposkytují takovou fotostabilitu, svit, široké spektrum absorpce a laditelné emisní spektrum jako QDs. Následně byly shrnuty aplikace QDs a možné detekce využitelné k charakterizaci vzniklých konjugátů.

Experimentální část práce byla soustředěna na optimalizaci přípravy a charakterizaci QDs a jejich konjugátů s peptidem Ala4. Byly provedeny dvě různé syntézy Cd QDs, které se od sebe lišily nejen přípravou, ale i výslednou strukturou a optickými vlastnostmi. První QDs byly připravené UV zářením, které byly stabilizované MSA a peptidem Ala4. Druhé byly QDs připravené termicky, stabilizované telluridem a peptidem Ala4.

U optimalizace přípravy CdS QDs připravených UV zářením byl studován i vliv pH prostředí na intenzitu emitovaného záření QDs. Výsledky charakterizace ukázaly, že nejvyšší intenzity emise dosahují CdS QDs při pH 7. Za účelem zvýšení intenzity fluorescence byla vyzkoušena stabilizace QDs kombinací různých poměrů MSA a peptidu Ala4. Výsledné QDs byly stabilizovány thiolovou skupinou obou dvou složek MSA i peptidu Ala4. Dále bylo zjištěno, že hlavní roli v přípravě QDs hrají i nepatrné úpravy koncentrací použitých prekurzorů a to zejména koncentrace octanu kademnatého a stabilizátorů (MSA). Byla optimalizována doba ozařování QDs na 12 minut. Vazba mezi peptidem Ala4 a CdS QDs byla ověřena pomocí zónové kapilární elektroforézy.

V případě optimalizace přípravy CdTe QDs připravených termicky byla studována koncentrace redukčního činidla, doba zahřívání a ozařování a koncentrace octanu kademnatého. Výsledky charakterizace ukázaly, že nejvyšší intenzity emise dosahují CdTe QDs za použití 0,1 mg/ml redukčního činidla a 0,2 mg/ml octanu kademnatého. Výsledné CdTe QDs byly vytvořeny pomocí linkerů EDC a sulfo-NHS, které umožnily vytvoření kovalentní peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou QDs a aminovou skupinou peptidu.

V další části práce byla studována interakce takto připravených konjugátů QDs a peptidu Ala4 s bakterií *Staphylococcus aureus*. V případě termicky připravených CdTe QDs došlo k interakci s bakterií, zatímco u připravených CdS QDs připravených UV zářením přes thiolovou skupinu ne.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Dodeigne, c. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* [online]. 51(3), 415-439 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1016/s0039-9140(99)00294-5. Issn 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/s0039914099002945>
- [2] Weeks, ian. *Chemiluminescence immunoassay*. New york, ny, usa: distributors for the u.s. and canada, elsevier science pub. Co., 1992. Isbn 9780444890351.
- [3] Klouda, pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: pavel klouda - nakladatelství pavko, 2016. Isbn 978-80-86369-22-8.
- [4] Valeur, bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications*. New york: wiley-vch, c2002. Isbn 352729919x.
- [5] Andrews, david l. *Encyclopedia of applied spectroscopy*. Weinheim, germany: wiley-vch, c2009. Isbn 978-3-527-40773-6.
- [6] *Molecular fluorescence: principles and applications, second edition*. *Journal of biomedical optics* [online]. 2013, 18(3) [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1117/1.jbo.18.3.039901. Issn 1083-3668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.jbo.18.3.039901>
- [7] Lakowicz, joseph r., ed. *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. Boston, ma: springer us, 2006 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1007/978-0-387-46312-4. Isbn 978-0-387-31278-1.
- [8] Lichtenberg, mads, erik christian løvbjerg trampe, thomas craig vogelmann a michael kühl. Light sheet microscopy imaging of light absorption and photosynthesis distribution in plant tissue. *Plant physiology*[online]. [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1104/pp.17.00820. Issn 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.17.00820>
- [9] Xing, yan, jinhua zhao, peter s. Conti a kai chen. Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging. *Theranostics* [online]. 2014, 4(3), 290-306 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.7150/thno.7341. Issn 1838-7640. Dostupné z: <http://www.thno.org/v04p0290.htm>
- [10] Pereira, m., capillary electrophoresis for the characterization of quantum dots after non-selective or selective bioconjugation with antibodies for immunoassay. *Journal of nanobiotechnology*, 2008. 6(10).
- [11] Avmania: 2. 2015 kvantové tečky přicházejí do tv více na: <https://avmania.e15.cz/kvantove-tecky-prichazeji-do-tv-co-muzeme-od-novinky-cekat> [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://avmania.e15.cz/kvantove-tecky-prichazeji-do-tv-co-muzeme-od-novinky-cekat>
- [12] Quantum dots. Sigma aldrich [online]. [cit. 2018-11-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/quantum-dots.html>

- [13] Nano assemblies & supramolecular structures: quantum dots [online]. [cit. 2018-11-15]. Dostupné z: https://www.tu-chemnitz.de/physik/osmp/_nass/_nass.php
- [14] Rpbs web portal [online]. [cit. 2018-11-15]. Dostupné z: <http://mobyte.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>
- [15] Zhao, p., et al., near infrared quantum dots in biomedical applications: current status and future perspective. Wiley interdisciplinary reviews-nanomedicine and nanobiotechnology, 2018. 10(3).
- [16] Drbohlavova, j., et al., quantum dots - characterization, preparation and usage in biological systems. International journal of molecular sciences, 2009. 10(2): p. 656-673.
- [17] Burgess, diane j. A mamta kapoor. Quantum dot labeling for assessment of intracellular trafficking of therapeutically active molecules. Weissig, volkmar a gerard g. M. D'souza, ed. Organelle-specific pharmaceutical nanotechnology[online]. Hoboken, nj, usa: john wiley & sons, 2010, 2010-08-25, s. 535-567 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1002/9780470875780.ch27. Isbn 9780470875780. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470875780.ch27>
- [18] Gerion, daniele, wolfgang j. Parak, shara c. Williams, daniela zanchet, christine m. Micheel a a. Paul alivisatos. Sorting fluorescent nanocrystals with dna. Journal of the american chemical society [online]. 2002, 124(24), 7070-7074 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1021/ja017822w. Issn 0002-7863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja017822w>
- [19] Chen, fanqing a daniele gerion. Fluorescent cdse/zns nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells. Nano letters [online]. 2004, 4(10), 1827-1832 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1021/nl049170q. Issn 1530-6984. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl049170q>
- [20] Resch-genger, ute, markus grabolle, sara cavaliere-jaricot, roland nitschke a thomas nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature methods [online]. 2008, 5(9), 763-775 [cit. 2019-03-28]. Doi: 10.1038/nmeth.1248. Issn 1548-7091. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nmeth.1248>
- [21] Haggie, peter m. A a. S. Verkman. Unimpaired lysosomal acidification in respiratory epithelial cells in cystic fibrosis. Journal of biological chemistry[online]. 2009, 284(12), 7681-7686 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1074/jbc.m809161200. Issn 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.m809161200>
- [22] Ozkan, mihrimah. Quantum dots and other nanoparticles: what can they offer to drug discovery?. Drug discovery today [online]. 2004, 9(24), 1065-1071 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1016/s1359-6446(04)03291-x. Issn 13596446. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135964460403291x>
- [23] Pouchlý, julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Praha: vydavatelství vřcht, 1998. 198 s. Isbn 80-7080-331-2.
- [24] Bartůňková, jiřina, paulík, milan a kolektiv. Vyšetřovací metody v imunologii. Praha:

grada publishing a. S., 2011. 172 s. Isbn 978-80-247-7089-5.

- [25] Sang, fuming, xiangyi huang a jicun ren. Characterization and separation of semiconductor quantum dots and their conjugates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 2014, 35(6), 793-803 [cit. 2019-04-16]. Doi: 10.1002/elps.201300528. Issn 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201300528>
- [26] Lauer, h. H.; rozing, g. P. High performance capillary electrophoresis. Germany : agilent technologies, 2010. 174 s. 5990-3777en
- [27] Whatley, harry. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. Petersen, john r. A amin a. Mohammad, ed. *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis* [online]. Totowa, nj: humana press, 2001, 2001, s. 21-58 [cit. 2019-03-28]. Doi: 10.1007/978-1-59259-120-6_2. Isbn 978-1-61737-113-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-120-6_2
- [28] Majer, jaroslav a kol. *Analytická chemia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. Martin: osveta, 1989. 363 s. Isbn neuvedeno.
- [29] harvey, david. *Modern analytical chemistry*. Boston: mcgraw-hill, c2000. Isbn 0-07-116953-9.
- [30] Kašička, václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. In *chemické listy*, 1997, roč. 91, č. 5, s. 321 – 325. Issn 0009-2770.
- [31] Tagliaro, f., et al., a brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic science international*, 1998. 92(2-3): p. 75-88.
- [32] De jong, gerhardus, ed. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry (ce-ms): principles and applications* [online]. Weinheim, germany: wiley-vch verlag gmbh & co., 2016 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1002/9783527693801. Isbn 9783527339242.
- [33] Bočekxs, petr. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. Paul d. Grossman and joel c. Colburn (eds.) Academic press, inc., san diego, california, usa, 1992, 352 pp., price us \$ 69.95, isbn 0-12-304250-x. *Electrophoresis*[online]. 1993, 14(1), 559-559 [cit. 2019-04-16]. Doi: 10.1002/elps.1150140185. Issn 0173-0835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150140185>
- [34] De kort, bregje j., gerhardus j. De jong a govert w. Somsen. Native fluorescence detection of biomolecular and pharmaceutical compounds in capillary electrophoresis: detector designs, performance and applications. *Analytica chimica acta* [online]. 2013, 766, 13-33 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1016/j.aca.2012.12.006. Issn 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267012017710>
- [35] Wuethrich, alain a joselito p. Quirino. Derivatisation for separation and detection in capillary electrophoresis (2012-2015). *Electrophoresis* [online]. 2016, 37(1), 45-55 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1002/elps.201500290. Issn 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201500290>
- [36] Xiao, dan, lei yan, hongyan yuan, shulin zhao, xiupei yang a martin m. F. Choi. Ce

- with led-based detection: an update. *Electrophoresis* [online]. 2009, 30(1), 189-202 [cit. 2019-04-11]. Doi: 10.1002/elps.200800415. Issn 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200800415>
- [37] Vandaveer, walter r., stephanie a. Padas-farmer, david j. Fischer, celeste n. Frankenfeld a susan m. Lunte. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 2004, 25(21-22), 3528-3549 [cit. 2019-04-16]. Doi: 10.1002/elps.200406115. Issn 0173-0835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200406115>
- [38] Smith, richard d., jose a. Olivares, nhung t. Nguyen a harold r. Udseth. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface. *Analytical chemistry* [online]. 2002, 60(5), 436-441 [cit. 2019-04-16]. Doi: 10.1021/ac00156a013. Issn 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00156a013>
- [39] Camilleri, patrick. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. Crc press, 1997. 576 p. Isbn 9780849391279.
- [40] Qiu, l., et al., protein a detection based on quantum dots-antibody bioprobe using fluorescence coupled capillary electrophoresis. *International journal of molecular sciences*, 2014. 15(2): p. 1804-1811.
- [41] Tagliaro, f., et al., a brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic science international*, 1998. 92(2-3): p. 75-88.
- [42] Kumar, challa s. S. R., ed. *Nanotechnologies for the life sciences* [online]. Weinheim, germany: wiley-vch verlag gmbh & co., 2007 [cit. 2019-05-10]. Doi: 10.1002/9783527610419. Isbn 9783527610419.
- [43] Walling, maureen, jennifer novak a jason r. E. Shepard. Quantum dots for live cell and in vivo imaging. *International journal of molecular sciences* [online]. 2009, 10(2), 441-491 [cit. 2019-05-10]. Doi: 10.3390/ijms10020441. Issn 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/2/441>
- [44] Byrne, stephen j., yvonne williams, anthony davies, et al: synthesis and cytotoxicity studies of cdte quantum dot–gelatin nanocomposites. *Small* [online]. 2007, 3(7), 1152-1156 [cit. 2019-05-10]. Doi: 10.1002/sml.200700090. Issn 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200700090>
- [45] Qian, huifeng, chaoqing dong, jifang weng a jicun ren. Facile one-pot synthesis of luminescent, water-soluble, and biocompatible glutathione-coated cdte nanocrystals. *Small* [online]. 2006, 2(6), 747-751 [cit. 2019-05-10]. Doi: 10.1002/sml.200500530. Issn 1613-6810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200500530>
- [46] LI, Shuang-ling, Jing YANG, Xiao-fei LEI, Jian-na ZHANG, Hong-li YANG, Kun LI a Chang-qing XU. Peptide-Conjugated Quantum Dots Act as the Target Marker for Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2016, 38(3), 1121-1128 [cit. 2019-05-14]. DOI: 10.1159/000443062. ISSN 1015-8987. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/fulltext/443062>