



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

SYNTÉZA KVANTOVÝCH TEČEK PRO DETEKCI PROTEINŮ

SYNTHESIS OF QUANTUM DOTS FOR PROTEINS DETECTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ANNA ŠIBÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JANA PEKÁRKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Studentka: Bc. Anna Šibíková

ID: 137262

Ročník: 2

Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

Syntéza kvantových teček pro detekci proteinů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proved'te literární rešerši na téma syntéza kvantových teček core/shell struktury a jejich modifikaci pro detekci proteinů. 2) Optimalizujte syntézu kvantových teček core/shell struktury. 3) Navrhněte optimální metodu navazování kvantových teček na vybranou biomolekulu, která společně vytvoří systém vhodný pro diagnostiku zajímavých látek (protein, protilátka). 4) Experimentálně ověřte navázání této biomolekuly na povrch kvantových teček sledováním změny jejich optických vlastností. 5) Pomocí kapilární elektroforézy zhodno'te navázání biomolekuly na kvantové tečky. 6) Proved'te diskusi a zhodnocení získaných výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] 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.
- [2] VACULOVIČOVÁ, M.; ŠMERKOVÁ, K.; CHOMOUCÁ, J.; HUBÁLEK, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. Glutathione modified CdTe quantum dots as a label for studying DNA interactions with platinum based cytostatics. Electrophoresis, 2013, roč. 34, č. 6, s. 801-808. ISSN: 0173- 0835.

Termín zadání: 9.2.2015

Termín odevzdání: 22.5.2015

Vedoucí práce: Ing. Jana Pekárková, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové 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

Táto diplomová práca sa zaoberá syntézou kvantových bodiek (QDs) pre detekciu proteínov. Je rozdelená na tri hlavné časti. V prvej je písané o teórii samotných QDs, ich syntézach, funkcionalizácií, interakciách, aplikáciách v medicíne. V experimentálnej časti boli syntetizované CdTe/ZnS QDs s jadrami modifikovanými glutathionom (GSH), na ktoré sa v ďalšom kroku naviazali biomolekuly BSA a IgG pomocou crosslinkerov EDC, NHS a CDI. Výsledné látky boli v poslednej časti charakterizované fluorescenčnou spektroskopiou a kapilárnou elektroforézou. Výsledky ukazujú závislosť intenzity fluorescence QDs na pH prostredí, koncentrácií BSA a koncentrácií IgG pri použití rôznych crosslinkerov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Kvantové bodky, syntéza, glutathion, funkcionalizácia, bioaplikácie, hovädzí sérový albumín, protilátky, Imunoglobulín G

ABSTRACT

This thesis is focused on synthesis of quantum dots (QDs) for protein detection. It comprises three parts. The first part summaries the theory of QDs, their synthesis, functionalization, interactions and applications in medicine. In the second part synthesis of CdTe/ZnS core/shell QDs modified by glutathione (GSH) is described, followed by the conjugation with biomolecules BSA and IgG. Several coupling agents such as EDC with NHS and CDI were used. In the last part, the final products were characterized by fluorescence spectroscopy and capillary electrophoresis. The results show the dependence of the fluorescence intensity of the QDs on pH range, concentration of BSA and IgG concentrations using different crosslinkers.

KEYWORDS

Quantum dots, synthesis, glutathione, functionalization, bioapplications, bovine serum albumin, antibodies, Immunoglobulin G

Bibliografická citácia diela

Šibíková, A. *Syntéza kvantových teček pro detekci proteinů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 97 s.
Vedoucí práce: Ing Jana Pekárková, PhD.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu na tému Syntéza kvantových tečiek pro detekci proteinů som vypracovala samostatne pod vedením vedúcej diplomovej práce a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto diplomovej práce som neporušila autorské práva tretích osôb, hlavne som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobností a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúceho zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich s ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníku č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcej svojej diplomovej práce Ing. Jane Pekárkové, PhD. Za odborné a skvelé vedenie, vecné pripomienky, cenné rady a trpezlivosť pri spracovaní projektu. Ďalej by som chcela poďakovať všetkým, ktorí ma akýmkoľvek spôsobom podporili pri písaní tejto práce.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

Výzkum popsáný v této diplomové práci byl realizovaný v laboratořích podpořených projektem Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů (SIX); registrační číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0072, operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

Obsah

Zoznam obrázkov	8
Úvod	11
1 Kvantové bodky	12
1.1 Charakteristika	12
1.2 Optické vlastnosti	12
1.3 Syntéza QDs	14
1.3.1 Syntéza hydrofóbných QDs	14
1.3.1.1 Metódy solubilizácie.....	14
1.3.2 Syntéza hydrofilných QDs.....	15
1.3.2.1 Syntéza koloidných QDs vo vodnom roztoku.....	15
1.3.3 Syntéza core/shell štruktúry.....	17
1.4 Toxicita	18
1.4.1 Metódy zisťovania toxicity	19
1.4.2 MTT test	20
2 Biokonjugácia QDs	21
3 Proteíny	28
3.1 Detekcia protilátok.....	28
3.2 Detekcia hovädzieho sérového albumínu	30
4 Detekcia DNA	33
5 Aplikácie QDs	35
5.1 <i>In vivo</i> zobrazovacie aplikácie	35
5.2 <i>In vitro</i> aplikácie	38
5.3 Imunosenzory.....	40
6 Charakteristika QDs	43
6.1 Luminiscencia	43
6.1.1 Fluorescencia	44
6.1.2 Fosforescencia	44
6.1.3 Oneskorená fluorescencia	44
6.2 UV-VIS	45

6.3	Kapilárna elektroforéza.....	45
7	Experimentálna časť	47
7.1	Použité chemikálie.....	47
7.2	Použité zariadenia a laboratórne vybavenie.....	47
7.3	Syntéza QDs	48
7.3.1	Syntéza QDs CdTe ovrstvených glutationom.....	48
7.3.2	Syntéza CdTe/ZnS QDs ovrstvených glutationom.....	48
7.3.3	Prečistenie a vysušenie CdTe QDs	48
7.3.4	Príprava fosfátového pufru	49
7.4	Naväzovanie biomolekuly na QDs	49
7.4.1	Naväzovanie biomolekuly na povrch QDs pomocou EDC a NHS	49
7.4.2	Naväzovanie biomolekuly na povrch QDs pomocou CDI	49
7.4.3	Zhášanie fluorescencie.....	49
7.5	Analýza QDs biokonjugovaných biomolekulou.....	50
7.5.1	Analýza pomocou Infinite M200.....	50
7.5.2	Analýza pomocou kapilárnej elektroforézy	50
8	Výsledky a diskusia	51
8.1	Syntéza CdTe QDs.....	51
8.1.1	CdTe-GSH QDs.....	51
8.2	Syntéza core/shell QDs.....	55
8.2.1	Syntéza CdTe-GSH/ZnS.....	55
8.2.2	Vplyv pH na CdTe-GSH/ZnS QDs	58
8.3	Naväzovanie vybraných biomolekúl na syntetizované QDs	59
8.3.1	Naviazanie BSA a IgG na CdTe-GSH/ZnS pomocou crosslinkerov EDC a NHS.....	59
8.3.1.1	Naviazanie BSA na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 6,5.....	60
8.3.1.2	Naviazanie BSA na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 7,5.....	62
8.3.1.3	Naviazanie BSA na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri	

pH = 8,5.....	63
8.3.1.4 Naviazanie IgG na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 8.....	65
8.3.2 Naviazanie BSA a IgG na CdTe-GSH/ZnS pomocou crosslinkera CDI	66
8.3.2.1 Naviazanie BSA na QDs pomocou 10 mM CDI crosslinkera.....	66
8.3.2.2 Naviazanie BSA na QDs pomocou 20 mM CDI crosslinkera.....	68
8.3.2.3 Naviazanie BSA na QDs pomocou 30 mM CDI crosslinkera.....	70
8.3.2.4 Naviazanie BSA na QDs pomocou 40 mM CDI crosslinkera.....	72
8.3.2.5 Naviazanie BSA na QDs pomocou 10–40 mM CDI crosslinkerov.....	74
8.3.2.6 Naviazanie IgG na QDs pomocou CDI crosslinkera.....	75
8.3.2.7 Naviazanie IgG na QDs pomocou 10 mM CDI crosslinkera	75
8.3.2.8 Naviazanie IgG na QDs pomocou 20 mM CDI crosslinkera	77
8.3.2.9 Naviazanie IgG na QDs pomocou 30 mM CDI crosslinkera	79
8.3.2.10 Naviazanie IgG na QDs pomocou 40 mM CDI crosslinkera	81
8.3.2.11 Naviazanie IgG na QDs pomocou 10–40 mM CDI crosslinkerov.....	84
8.4 Charakterizácia komplexu QDs-biomolekula pomocou kapilárnej elektroforézy	85
Záver	87
Literatura	89
Zoznam skratiek	96

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Spektra kvantových bodiek určene veľkosťou QDs, prevzaté a upravené z [6] .	13
Obr. 2 Príklady jednotlivých QDs, prevzaté a upravené z [7]	14
Obr. 3 Ukážka väzieb medzi CdTe a rôznymi thiolovými kyselinami, a - TGA, b - MPA a c,d - MSA, prevzaté a upravené z [14]	16
Obr. 4 Štruktúra core, core/shell a core/shell/shell, prevzaté a upravené z [18]	18
Obr. 5 Závislosť intenzity fluorescence QDs na vlnovej dĺžke pri hodnotách pH 5–9 označené a–e, prevzaté a upravené z [31]	21
Obr. 6 Závislosť intenzity fluorescence QDs v závislosti na koncentrácií Glyp-u, prevzaté a upravené z[33]	22
Obr. 7 Chemické vzorce crosslinkerov EDC a NHS, p r e v z a t é a upravené z[34]	23
Obr. 8 Schéma reakcie vzniku väzby medzi QDs a biomolekulou pomocou EDC, prevzaté a upravené z [34]	24
Obr. 9 Vytvorenie komplexu QDs-IgG pomocou crosslinkeru EDC, prevzaté a upravené z [37]	24
Obr. 10 Schéma reakcie vzniku väzby medzi QDs a biomolekulou pomocou EDC a sulfo-NHS, prevzaté a upravené z [34]	25
Obr. 11 (A) interakcia medzi QDs a thiolovými koncami biomolekúl, (B) amidová väzba s thiolaktylovými ligandmi, (C) elektrostatické interakcie medzi kladne nabitou bielkovinou a negatívnym povrchom QDs, (D) Polyhistidínové pripojenie bielkovín, (E) amidová väzba medzi karboxylovým zakončením biomolekuly a amidovým povrchom QDs, (F) väzba medzi amidovým zakončením biomolekuly a thiolovým koncom QDs za prítomnosti cross-linkeru, prevzaté a upravené z [35]	27
Obr. 12 Zobrazenie tvaru a štruktúry protilátky, prevzaté a upravené z [46]	29
Obr. 13 Molekula BSA, prevzaté a upravené z [54]	31
Obr. 14 Vytváranie väzieb medzi QDs a BSA pomocou crosslinkerov EDC a NHS, prevzaté a upravené z [56]	32
Obr. 15 Dvojzávitnicová špirála DNA, prevzaté a upravené z[58]	33
Obr. 16 Priebeh vytvárania QDs-DNA komplexu a následný rozpad komplexu za súčasného vylúčenia cysteamínu, prevzaté a upravené z [61]	34
Obr. 17 Zobrazenie cesty liečiva pomocou QDs v tele myši, prevzaté a upravené z [64]	36
Obr. 18 Postup výroby sondy a naviazania na bunky, prevzaté a upravené z [68]	37
Obr. 19 Príklady širokej škály farieb QDs, prevzaté a upravené z [62]	38
Obr. 20 Princíp metódy FRET	40
Obr. 21 Značenie S.aureus s IgG-QDs komplexom prevzane a upravené z [77]	42

Obr. 22 Jablonskéhoho diagram, prevzaté a upravené z [79]	43
Obr. 23 Elektroforeogram zobrazujúci separáciu roztoku QDs pomocou kapólarnej elektroforézy, prevzaté a upravené z [84]	46
Obr. 24 CdTe-GSH syntetizované 1,2,3,4 hodiny pod UV lampou	51
Obr. 25 CdTe-GSH syntetizované 1,2,3,4 hodiny na dennom svetle	52
Obr. 26 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH	53
Obr. 27 QDs pripravené dvomi metódami vľavo s využitím spätného chladiča vpravo hydrotermálna metóda v autokláve pod UV lampou	54
Obr. 28 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH QDs o koncentrácií 2 mg/ml pripravené pomocou refluxu a v autokláve	55
Obr. 29 CdTe-GSH/ZnS syntetizované 1, 2, 3 hodiny pod UV lampou	56
Obr. 30 CdTe-GSH syntetizované 1, 2, 3 hodiny na dennom svetle	56
Obr. 31 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH/ZnS	57
Obr. 32 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH a CdTe-GSH/ZnS s koncentráciami $c = 1\text{mg/ml}$	58
Obr. 33 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH/ZnS QDs o koncentráciách $c = 2\text{mg/ml}$ uskladnených v PBS pufroch s rôznym pH	59
Obr. 34 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH/ZnS QDs biokonjugovaných s BSA s rôznymi koncentráciami pri pH 6,5	60
Obr. 35 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA	61
Obr. 36 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA	62
Obr. 37 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA	64
Obr. 38 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG	65
Obr. 39 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 10mM CDI	67
Obr. 40 Stern-Volmerová závislosť zhašania intenzity fluorescencie QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 10 mM CDI	68
Obr. 41 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 20mM CDI	69
Obr. 42 Stern-Volmerová závislosť zhašania intenzity fluorescencie QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 20 mM CDI	70
Obr. 43 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 30mM CDI	71
Obr. 44 Stern-Volmerová závislosť zhašania intenzity fluorescencie QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 30 mM CDI	72
Obr. 45 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 40mM CDI	73

Obr. 46 Stern-Volmerová závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 40 mM CDI.....	74
Obr. 47 Stern-Volmerové závislosti zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 10–40 mM CDI.....	75
Obr. 48 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 10mM CDI.....	76
Obr. 49 Stern-Volmerová závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 10 mM CDI	77
Obr. 50 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 20mM CDI.....	78
Obr. 51 Stern-Volmerová závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 20 mM CDI	79
Obr. 52 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 30mM CDI.....	80
Obr. 53 Stern-Volmerová závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 30 mM CDI	81
Obr. 54 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 40mM CDI.....	82
Obr. 55 Stern-Volmerová závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 40 mM CDI	83
Obr. 56 Stern-Volmerové závislosti zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 10–40 mM CDI	84
Obr. 57 Elektroferogram komplexu QDs-BSA	85
Obr. 58 Elektroferogram komplexu QDs- IgG	86

ÚVOD

V súčasnej dobe je veľký záujem o nanotechnológie a diagnostické prístroje. Vďaka tomu sú dôležité aj aplikácie *in vivo*, *in vitro* a imunosenzory, pri ktorých zohrávajú dôležitú úlohu kvantové bodky (QDs). Pomocou nich prebieha rýchlejšia detekcia patologických procesov, biodistribúcia liečiv, zobrazenie krvného riečišťa alebo sledovanie pohybu QDs v tele. Výskum karcinogénov predstavuje ešte dlhú cestu skúmania ale už boli preukázané aj vhodné výsledky. Tento výskum má obrovský význam v medicíne, biológii, zobrazovaní a diagnostike chorôb.

Toxicita je hlavnou príčinou zdržovania rozvoja biomedicínskych aplikácií QDs, ktoré sú veľmi široko uplatniteľné. Toxicitu QDs zapríčiňuje jadro syntetizované z veľmi jedovatého kadmia. Modifikácie QDs zabezpečujú znižovanie tejto nepriaznivej vlastnosti. Najčastejšie dochádza k vytváraniu core/shell štruktúry, pri ktorej sa na povrch jadra QDs naväzuje obal napr. ZnS. Štruktúra core/shell zabezpečuje vynikajúce fyzikálne a optické vlastnosti a tým otvárajú nové možnosti využitia QDs v bioaplikáciách či už pri detekciách rôznych chorôb alebo preprave liečiv.

Úlohou tejto práce bolo skúmanie syntézy kvantových bodiek pre detekciu proteínov vyhodnocovaním fluorescenčných spektier QDs. Zaoberala som sa ako syntézou štruktúr core/shell kvantových bodiek tak aj naväzovaním biomolekúl Imunoglobulínu G a hovädzieho sérového albumínu na povrch QDs. Syntéza QDs prebiehala pomocou použitia glutathionu ako stabilizátora a teluričitanu sodného ako príkladu prekursora. Pri biokonjugácii QDs boli použité crosslinkeri ako EDC, NHS a CDI. Na konci boli jednotlivé QDs charakterizované pomocou fluorescenčnej spektroskopie a kapilárnej elektroforézy.

1 KVANTOVÉ BODKY

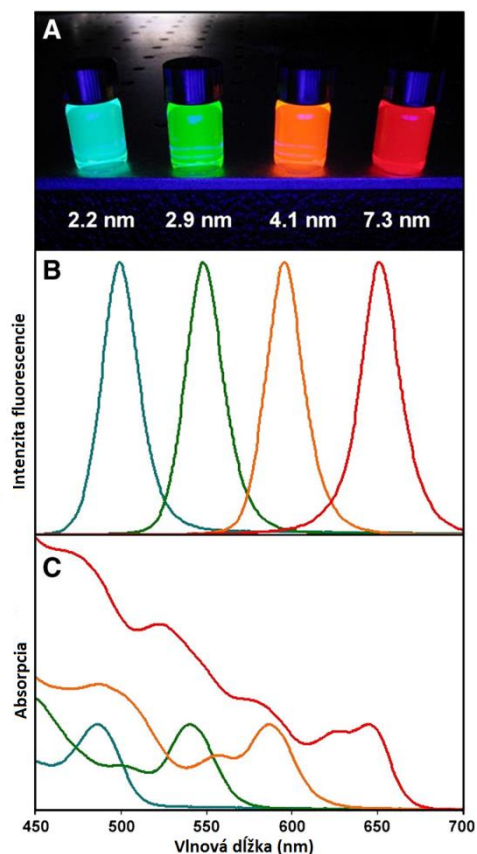
1.1 Charakteristika

Kvantové bodky, skrátene QDs (z anglického výrazu „Quantum Dots“), sú nanokryštály alebo atómové zhluky takmer guľovitého tvaru zložené z niekoľko 100 až miliónov atómov, ktoré však majú malý počet voľných elektrónov. Väčšinou sú syntetizované z polovodičov (II-IV skupina periodickej tabuľky prvkov) alebo z kovových materiálov (napr. Co, Ni, Pt). Veľkosť QDs sa pohybuje od 2 do 20 nm, záleží od použitých materiálov pri syntéze jednotlivých QDs. Polovodičový charakter a veľkosť QDs zabezpečujú ich atraktivitu pri biologických detekciách a využívaní optoelektronických zariadeniach a taktiež aj ako základný prototyp pre štúdium koloidov a ich vlastností [1,2]. Samotné QDs sú také nanočastice, ktoré vykazujú tzv. efekt kvantového obmedzenia a ich polomer je na viac menší ako jedna z nasledujúcich veličín : Bohrov polomer elektrónu a_e , diery a_h a excitónu a_{exc} [3].

1.2 Optické vlastnosti

V súčasnej dobe sú QDs považované za sľubných kandidátov pri optoelektronických zariadeniach vďaka ich optickým vlastnostiam a vysokej stabilite [4]. QDs majú jednu dôležitú vlastnosť, a to schopnosť fotoluminiscencie. Pri ožiarení QDs elektromagnetickým žiarením elektróny kvantových bodiek začnú excitovať. Po prijatí energie žiarenia prechádzajú do vyšších energetických hladín, z ktorých sa po určitej dobe vracajú späť do svojho pôvodného stavu. Pri tomto návrate kvantové bodky vyžiaria fotóny. Luminiscenčná vlnová dĺžka je závislá na veľkosti QDs. Vďaka rôznym syntézam je možné pripraviť množstvo QDs s rôznymi excitačnými vlnovými dĺžkami a šírkami píkovo v týchto spektrách [5].

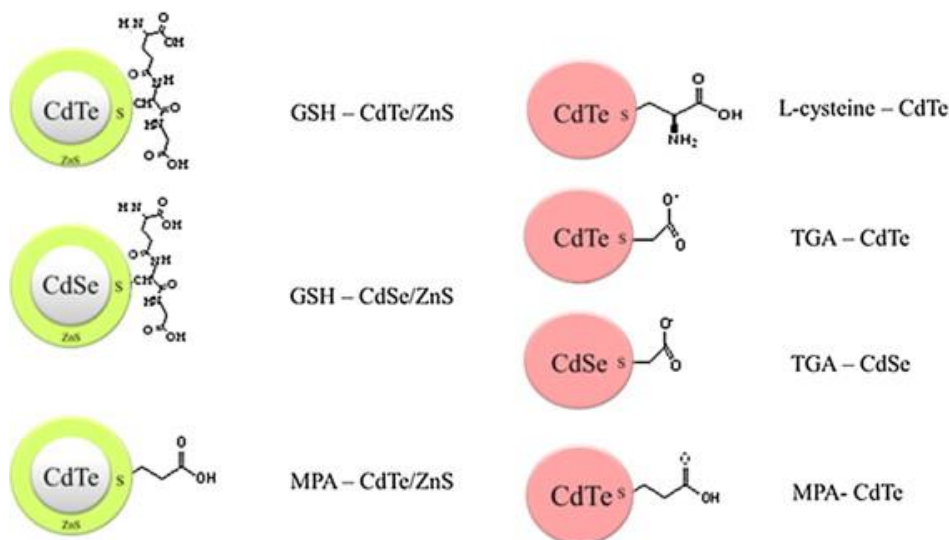
Chemické zloženie, veľkosť jadra a tvar QDs určuje čistotu fotoluminiscencie a polohu maxima emisnej krivky pri fluorescencií. QDs majú široký rozsah emisie (z UV do infračervenej oblasti spektra) [2]. Zmenšovaním veľkosti QDs sa poloha maxima emisie posúva z červenej oblasti spektra (780 nm) do modrej (400 nm) (Obr. 1). Dlhá životnosť zvyšuje pravdepodobnosť absorpcie pri kratších vlnových dĺžkach a jej výsledkom je široké absorpčné spektrum [6].



Obr. 1 Spektra kvantových bodiek určené veľkosťou QDs, prevzaté a upravené z [6]

QDs majú jednu dôležitú vlastnosť a to odolnosť voči fotobieleniu, tzv. „photobleaching“. V porovnaní s organickými farbivami a fluorescenčnými proteínmi sú QDs približne 10 až 100-krát jasnejšie a 100 až 1000-krát stabilnejšie proti fotobieleniu. Ich makromolekulárna štruktúra umožňuje aby povrch a biologické funkcie QDs boli upravené nezávisle na optických vlastnostiach [6]. Pre ešte lepšiu ochranu proti fotobieleniu sa môžu QDs obaľovať na povrchu vrstvou polovodičov ako už bolo spomínané. Príklady obaľovania sú znázornené na

Obr. 2. Vďaka tomu vykazujú QDs lepšiu fotostabilitu a teda aj možnosť podstupovania opakovaných cyklov excitácie a fluorescencie aj na niekoľko hodín [7,8].



Obr. 2 Príklady jednotlivých QDs, prevzaté a upravené z [7]

1.3 Syntéza QDs

Pri syntéze QDs je potrebné aby vytvorené kvantové bodky splňovali určité podmienky pre využitie v biologických aplikáciách. Je dôležité aby jadro tvorené z polovodičových kryštálov bolo odolné voči oxidácii a čo najmenej toxické. Tieto problémy rieši obalovanie jadier obalom alebo vytváranie štruktúry jadro/obal/obal. Taktiež za účelom zlepšenia fotostability a fotoluminiscencie boli vytvorené modifikácie povrchu jadier QDs [1].

1.3.1 Syntéza hydrofóbných QDs

Pri syntéze koloidných hydrofóbných QDs sa používajú metódy kontrolovaného rastu a tvorby častíc. Syntéza prebieha v roztokoch organokovových (napr. dimetylkadmium, chlorid kademnatý) a chalkogénových (napr. Se, Te, teluritan sodný a ďalšie ich zlúčeniny) prekursorov a spočíva v strieknutí reaktantov do ohrievaného a intenzívne miešaného koordinačného organického rozpúšťadla. Ako koordinačné rozpúšťadlá sa používajú TOP (trioctylphosphin), TOPO (trioctylphosphin oxid) a HDA (hexadecylamin). QDs obalené TOPO alebo TOP sú nerozpustné vo vode nakoľko ich obaly sú hydrofilné. Pre biologické aplikácie je potrebná povrchová úprava (metóda solubilizácie) na zabezpečenie rozpustnosti QDs vo vode [5,9].

1.3.1.1 Metódy solubilizácie

V biologických aplikáciách sa využívajú QDs vo vodných roztokoch. Z tohto dôvodu je nutné previesť hydrofóbné QDs na hydrofilné solubilizáciou. Existuje niekoľko rôznych modifikácií QDs za týmto účelom [5].

Prvá technika spočíva vo výmene ligandov (obalová výmena), pri ktorej sa na hydrofóbne ligandy naviažu hydrofilné bifunkčné ligandy. Jedna ich časť zaistuje donor-akceptorovú väzbu s povrchom nanokryštálov a druhá nesie vhodnú reaktívnu skupinu, ktorá je rozpustená vo vode. Nevýhodou techniky je cena a stabilita [5].

Druhá technika využíva vrstvu oxidu kremičitého, ktorý je navrstvený na povrch QDs. Vytvorená vrstva chráni QDs proti oxidácií a zvyšuje ich stabilitu [10].

Posledná technika je založená na naviazaní ligandov a polymérov pomocou hydrofóbných interakcií na kvantové bodky. Podstata je v zavedení molekuly, ktorá sa jednou časťou viaže hydrofóbnymi silami na povrch QDs (napr. polyméry) a druhá časť podporuje reaktivitu [11].

1.3.2 Syntéza hydrofilných QDs

Syntéza hydrofilných QDs so sebou prináša množstvo výhod. V porovnaní s hydrofóbnymi QDs sú stabilnejšie, biologicky kompatibilnejšie a hlavne vykazujú nižšiu toxicitu a ich syntéza je menej náročná a lacnejšia [5].

1.3.2.1 Syntéza koloidných QDs vo vodnom roztoku

Je množstvo príprav rozličných hydrofilných QDs. Pri syntézach je dôležité sledovať inertné podmienky, teplotu, dobu reakcie a aj pH prostredia. Každý uvedený príklad ovplyvňuje celkový priebeh syntézy a aj výsledný získaný produkt. Teplotou a dobou reakcie sa dá ovplyvniť emisné spektrum produktu. Úprava pH je potrebná zvýšenie aktivity syntetizovaných látok a tak zabezpečenie vyšších interakcií medzi molekulami, z ktorých sú syntetizované výsledné QDs [12].

Syntéza koloidných QDs prebieha najčastejšie v banke spojenej so spätným chladičom. V banke prebieha reakcia prekursorov ťažkých kovov (napr. dusičnany, chloridy) a chalkogénov. Prekursorové chalkogény môžu byť pripravené viacerými spôsobmi, ako napríklad v prášku (teluričitan sodný (Na_2TeO_3)) alebo pripravené tesne pred použitím (hydrogentelurid sodný (NaHTe), telurid sodný (Na_2Te)) z dôvodu ich nestability. Syntéza QDs pripravených z NaHTe a Na_2Te musí prebiehať v inertnom prostredí [10].

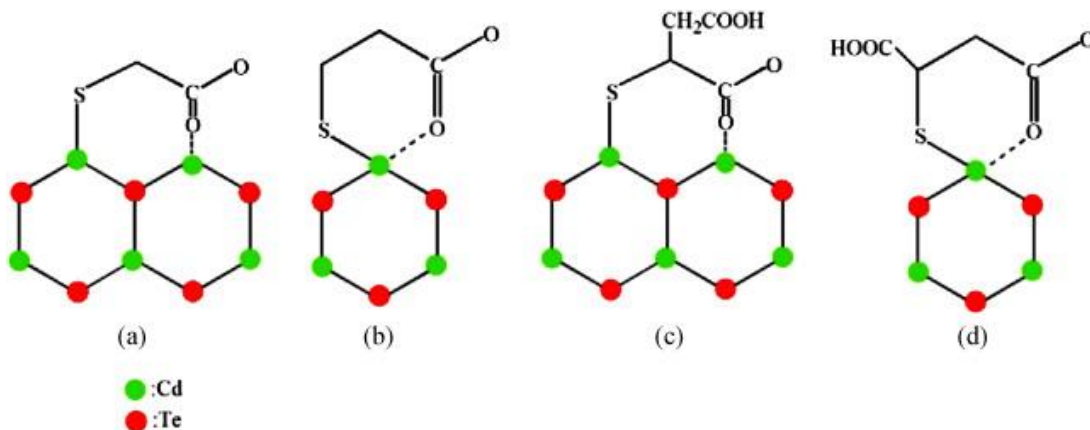
Ako príklad možno uviesť syntézu CdTe kvantových bodiek stabilizovaných kyselinou mekraptopropionovou (MPA) pripravovaných Jhonsiom s kolektívom. Syntéza prebiehala v trojhrdlej banke spojenej so spätným chladičom za prítomnosti N_2 . Do 50 ml vody boli za stáleho miešania pridávané reaktanty: CdCl_2 , MPA následne bolo upravené pH na hodnotu 9 pomocou NaOH . Ďalej bol do roztoku vstriednutý čerstvo pripravený NaHTe roztok, ktorý bol syntetizovaný z borohydridu sodného

(NaBH₄) slúžiacého ako redukčné činidlo a Te prášku. Výsledný roztok bol za stáleho miešania varený 8 hodín na teplote 100°C. Vzniknuté QDs mali veľkosť 3,36 nm [12].

Ďalším príkladom je príprava CdTe QDs stabilizovaných glutathionom (GSH), ktorá prebieha v jednohrdlej banke spojennej so spätným chladičom. Do 25 mL vody sa pridali reaktanty: CdCl₂, citrát sodný dihydrát, Na₂TeO₃ a NaBH₄. Výsledná zmes bola zahrievaná na 90°C po dobu 4 hodiny. QDs pripravené týmto postupom boli veľké 2,5 nm [13].

Príprava CdTe QDs s merkaptojantarovou kyselinou (MSA) prebiehala v trojhrdlej banke, v ktorej boli do 100 ml deionizovanej vody pridané reaktanty CdCl₂, MSA a pod stálym prísunom dusíka bol vstrieknutý čerstvo pripravený roztok NaH₂Te. Výsledná zmes bola zahrievaná na 95 °C po dobu 2-5 hodín pri stálej kontrole veľkosti QDs [14].

Na základe rovnakého postupu Yu a kolektív pripravili aj CdTe QDs stabilizované thioglykolovou kyselinou (TGA). Na Obr. 3 je možné vidieť porovnanie väzieb medzi CdTe QDs funkcionalizovanými spomínanými thiolovými kyselinami a to MPA, MSA a TGA. TGA je spojená s dvoma susednými Cd molekulami QDs jednou thiolovou väzbou vďaka síre a jednou karbonylovou väzbou vďaka kyslíku. Takáto väzba je silnejšia ako thiolová väzba medzi sírou a Cd a karbonylová väzba medzi kyslíkom a rovnakým Cd ako thiolová väzba. Spomínanú väzbu majú QDs v spojení s MPA. MSA sa môže spájať s QDs oboma opísanými väzbami [14].



Obr. 3 Ukážka väzieb medzi CdTe a rôznymi thiolovými kyselinami, a - TGA, b - MPA a c,d - MSA, prevzaté a upravené z [14]

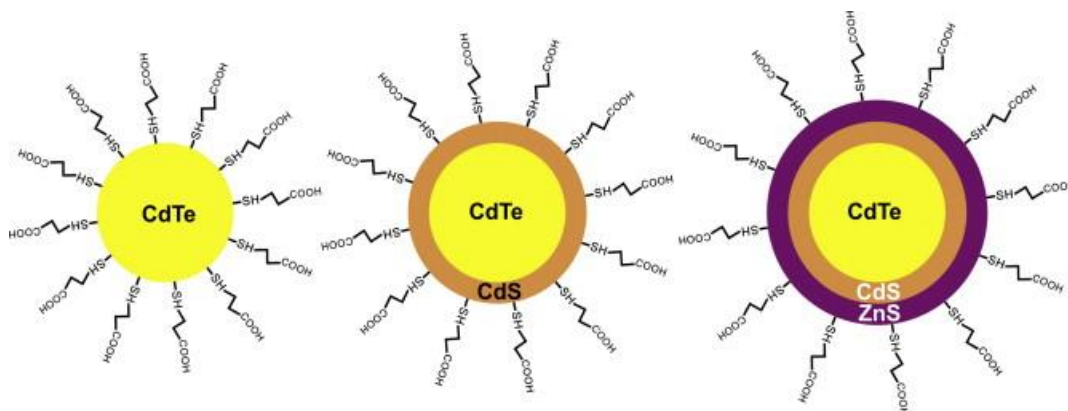
CdTe obalené L-cysteínom boli pripravené vo vodnom roztoku relatívne jednoduchým spôsobom. Ich prípravou bolo dosiahnuté široké fluorescenčné spektrum vlnových dĺžok. L-cysteín bol konjugovaný s CdTe jadrami QDs pomocou kovalentnej väzby. Príprava takýchto QDs bola pomocou teluridového prášku za prítomnosti

borohydridu sodného ako redukčného činidla, L-cysteínu a CdCl_2 v pomeroch Cd:Te:L-cystein 2:1:4. Výsledné excitačné vlnové dĺžky QDs boli v rozmedzí 480–650 nm (modrá-červená). L-cystein slúži ako stabilizátor QDs a prispieva k fluorescenčným vlastnostiam QDs [15].

Najväčšou nevýhodou pri syntézach QDs pomocou refluxu je ich časová náročnosť. Množstvo QDs sa pripravujú niekoľko hodín až dní. To má za následok znížené množstvo kvantového výťažku (QY) pripravených QDs. Možným riešením je príprava pomocou hydrotermálnej metódy (v autokláve). Tato metóda je jednoduchšia, časovo rýchlejšia a efektívnejšia. Najčastejšie sú takto pripravované CdTe QDs ale aj CdSe, ZnSe CdS a iné, ktoré sú ďalej funkcionalizované rôznymi thiolovými ligandami (napr. MPA, GSH, MSA, TGA a ďalšie). Vďaka funkcionalizácií thiolovými ligandami sú QDs rozpustné vo vode a ich stabilita vo vodnom prostredí sa zvyšuje [16,17]. Ako príklad je možné uviesť Khateiho a kolektív, ktorí pripravovali CdTe-MPA QDs. Syntéza prebiehala pomocou autoklávu 15–60 minút pri teplote 180°C a už po 35 minútach kvantové bodky dosiahli QY 15 %. Kvantové výťažky boli stanovené vo vzťahu k rodamínu 6G v etanole. Pri dlhotrvajúcej syntéze bol QY zvyšovaný až na výsledný QY, ktorý bol 95 %. Štruktúra, morfológia a veľkosť QDs bol stanovený pomocou práškovej röntgenovej difrakcie a transmisného elektrónového mikroskopu (TEM) [17].

1.3.3 Syntéza core/shell štruktúry

QDs sa delia z mnoho hľadísk. Pri koloidných QDs sa stretávame so sférickými nanočasticami. Podľa štruktúry sa delia na QDs zložené len z jadra („core“) a zložené z jadra a obalu („core/shell“) prípadne z štruktúry jadro/obal/obal („core/shell/shell“). Uvedené príklady je možné vidieť na Obr. 4, pričom jadro môže byť zložené z jedného polovodiča napr. CdTe, CdSe, CdS a je následne obklopené polovodičovým obalom, ktorý má priaznivý vplyv na stabilitu jadra a fluorescenciu QDs. Príkladom core/shell QDs sú CdTe/ZnS, CdTe/CdS, na ktoré môže byť pridaný ešte ďalší obal ZnS, ktorý zabezpečuje zníženie toxicity QDs. Hlavnou výhodou core/shell/shell QDs je ich využitie aj pri vysokej koncentrácii QDs [18].



Obr. 4 Štruktúra core, core/shell a core/shell/shell, prevzaté a upravené z [18]

QDs priťahujú značnú pozornosť pre ich vysokú chemickú stabilitu a odolnosť voči fotodegradácii avšak nakoľko je potrebná pri ich príprave vysoká teplota, zužujú sa ich biologické aplikácie. Vďaka tomu boli vyvinuté rôzne povrchové funkcionalizácie. Zvyčajne medzi jadrom a obalom (core/shell) sú kovalentné interakcie. Ako napríklad vytvorenie CdTe/CdS core/shell štruktúry Pengom s kolektívom. Syntéza prebiehala nasledovne: pripravené QDs boli primiešané do 100 ml vody a následne bol pridaný thioacetamid ako zdroj síry. Roztok bol za stáleho prísunu N_2 zahriaty na 70–80°C po dobu 30 minút. Výsledný QY takto pripravených QDs bol 58% [19].

Ďalšou možnosťou prípravy core/shell QDs je príprava CdTe/ZnS kvantových bodiek, pri ktorých bol GSH použitý ako uzatvárací reaktant a zdroj pre rast ZnS plášťa. Liu a Yu pripravili spomínané QDs syntézou CdTe QDs rozpustených v 50 ml vody a následne zmiešaných s $ZnCl_2$ a GSH. Roztok bol následne preliaty do banky spojenej so spätným chladičom a zahriaty na 100°C po dobu 10 minút až 2 hodiny pri stálom kontrolovaní veľkosti QDs [20].

Pre ľahkú funkcionalizáciu s protilátkami sa vytvárajú aj QDs s štruktúrou core/shell/shell. Wang s kolektívom pripravili takto štruktúrované QDs. Ich postup spočíval v tom, že core CdTe/MPA QDs boli zmiešané s vodným roztokom obsahujúcim $CdCl_2$, sulfid sodný (Na_2S) a MPA. Výslednému roztoku bolo upravené pH na 8,4. Následne bola vytvorená shell štruktúra sulfidu zinočnatého z $ZnCl_2$, Na_2S a MPA, ktorej bolo tiež upravené pH. Výsledný roztok reagentov bol zahriaty na 120°C po dobu 10 minút. Konečným produktom boli CdTe(MPA)/CdS/ZnS QDs [21].

1.4 Toxicita

QDs sú nanokryštály s unikátnym zložením a vlastnosťami, ktoré priťahujú pozornosť pri využívaní v biomedicínskych aplikáciách ako napríklad keď slúžia ako neinvazívne prostriedky pri lekárskej zobrazovaní, označovaní buniek pre mobilné

sledovanie a ako biosenzory intracelulárnych biologických signálov. Pri rade vynikajúcich vlastností QDs a širokým aplikáciám, je potrebné skúmať a riešiť aj nevýhody, ktoré tieto makromolekuly majú [22].

Azda najväčšou nevýhodou, ktorá sa v súčasnosti rieši a prináša najviac otázok je toxicita QDs. Ako už bolo spomínané QDs sú syntetizované z polovodičových prvkov a ich jadro je väčšinou tvorené kadmiumom. Kadmium je mäkký kovový prvok, ktorý je veľmi toxický viažuci sa s thiolovými skupinami. Tento prvok môže spôsobiť až smrť bunky. Preto sa vedci snažia vytvoriť vhodnú povrchovú štruktúru QDs, ktorá na jednej strane zníži toxicitu jadra a na strane druhej neovplyvňuje povahu QDs natoľko aby zabránila ďalšiemu vývoju a využitiu [22,23].

Toxicita QDs sa stala horúcou témou výskumu. Zisťovali sa nežiaduce účinky toxicity QDs na živé bunky. QDs prechádzajú do bunky najčastejšie mediátorovou endocytózou. V bunke začnú vyplavovať toxické ťažké kovy v koloidnej forme. Zhang a kolektív skúmali toxické účinky CdTe QDs na sladkovodné mušle. Zistili, že toxicita má následok poškodenie DNA a môže vyvolať oxidačný stres [22].

Štúdie Lin a kolektívu sa zaoberali vplyvom CdSe QDs na embryá a larvy ryby Dania pruhoaná. Ryba bola pod neustálym pôsobením nízkej úrovne QDs obalených MPA kyselinou. Výsledky ukázali abnormálne krvné riečište, rozdvojenie a kríženie lariev, zvýšenie plávania schopnosti lariev a taktiež apoptózu v oblasti hlavy a chvosta u embryí. Z týchto dôvodov sa vedci snažili znížiť toxicitu QDs [24].

Pri CdTe QDs Yang a Murase ako prvý predstavili hybridnú vrstvu oxidu kremičitého (SiO_2), ktorou potiahli QDs pomocou tetraetylortosilikátu namiesto organických amínov. Stabilita takto upravených QDs bola skúmaná meraním fluorescenčnej intenzity proti fosfátovému pufru. Vrstva na povrchu QDs potlačuje fotodegradáciu, bráni uvoľňovaniu kovových iónov v chemickom prostredí a zvyšuje biokompatibilitu QDs. Zhu a kolektív na povrch spomínanej SiO_2 vrstve pridali sulfid zinočnatý (ZnS vrstvu), ktorá mala za úlohu zníženie toxicity a zvýšenie efektivity fluorescencie a stability QDs [23].

1.4.1 Metódy zisťovania toxicity

QDs vďaka ich jedinečným vlastnostiam majú využitie v mnoho aplikáciách a preto je otázka ich toxicity stále horúcou témou výskumu [25]. Kolorimetrické metódy sa používajú ako hlavný nástroj pri hodnotení cytotoxicity nanomateriálov. Rozdeľujú sa na testy merajúce integritu plazmatickej membrány a mitochondriálnu aktivitu. Princíp je založený na ničení bunkovej membrány pomocou určitých cytotoxických činidiel. Pri takýchto metódach sa používa červené kationové farbivo, ktoré môže

prechádzať difúziou cez plazmatickú membránu a má tendenciu hromadiť sa v lyzozómoch. V prípade poškodenia membrány farbivo uniká, čo nám umožňuje určiť živé a mŕtve bunky [26].

1.4.2 MTT test

MTT test je kolorimetrická metóda vhodná pre zisťovanie cytotoxicity a zisťujúca mitochondriálnu aktivitu živých buniek. Je jedným z najviac univerzálnych a používaných testov pri *in vitro* toxikológii. Metóda je založená na štiepení žltého 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl) -2,5-difenylnitrotetrazoliumbromid (skrátene MTT) na nerozpustný formazánový purpurový kryštálový produkt [27]. K redukcii MTT dochádza v membráne živých buniek, pričom kryštálový produkt je ukladaný v cytoplazme buniek a následne pomocou silného detergentu (dodecylsírany sodného) premenený na rozpustnú formu. Na konci celého testu sa zmeria absorpcia rozpusteného formazánového kryštálu v oblasti viditeľného svetla pomocou spektrofotometrie. Táto technika má mnoho výhod v porovnaní s ostatnými technikami, pretože vyžaduje minimálnu manipuláciu s bunkami a reprodukovateľné výsledky [26].

QDs dávajú veľký prísľub pri liečení a diagnostike nádorových ochorení. V štúdiách Katsumitih a jeho spoločníkov boli použité CdS QDs naviazané na žiabrové bunky rýb (*Mytilus galloprovincialis*), na ktorých bola testovaná toxicita pomocou neutrálnej červene a MTT testu. Mechanizmy hodnotenia boli založené na zisťovaní reaktívnych kyslíkových radikálov, katalytickej činnosti a poškodenie DNA. Expozícia trvala 24 hodín a bolo zistené, že Cd v QDs je veľmi toxický pre tieto bunky nakoľko spôsobili zvýšenie katalytickej činnosti a došlo ku poškodeniu DNA [28].

Ďalšími metódami založenými na testovaní cytotoxicity sú MTS (3-(4,5-dimethylthiazil-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium), XTT alebo WST (4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) test. Počet živých buniek je stanovený obdobne a teda kvantifikáciou výroby formazánového produktu. Testy ako MTS alebo XTT sú výhodnejšie oproti MTT testu vďaka produkciám rozpustných farbív a nie kryštalického produktu [26].

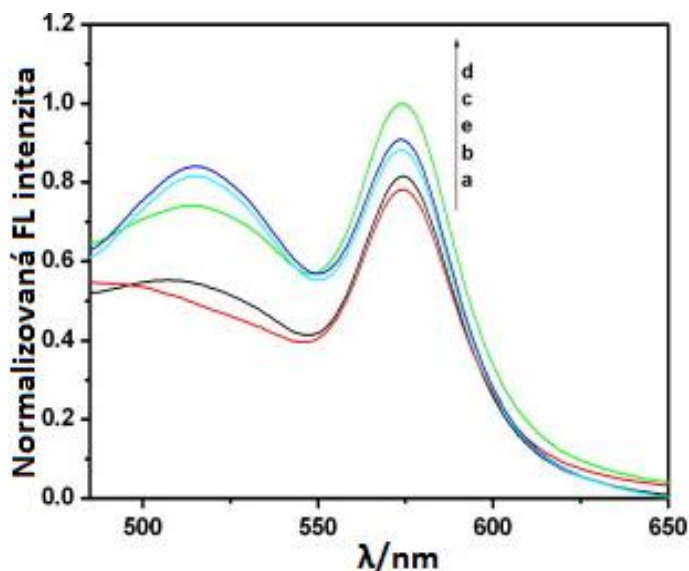
Test XTT patrí k citlivým kolorimetrickým metódam merania toxicity. Je založený na redukcii tetrazoliové soli, 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenyl) -5-[(phenylamino) karbonyl] -2H-tetrazolium hydroxidu (XTT) na formazánový produkt. Táto metóda bola nedávno zavedená k meraniu rastu a metabolizmu húb pomocou vhodnej koncentrácie XTT. Intenzita zmeny farby priamo koreluje s počtom metabolicky aktívnych (živých) buniek [29].

2 BIOKONJUGÁCIA QDS

Využitie QDs v biologických aplikáciách je závislé na ich schopnosti biokonjugácie s proteínmi, peptidmi, DNA a inými biomolekulami. Je dôležité skúmať vlastnosti a aktivitu komplexu QDs-biomolekula [30]. Pri konjugácii by mal produkt spĺňať určité požiadavky, a to:

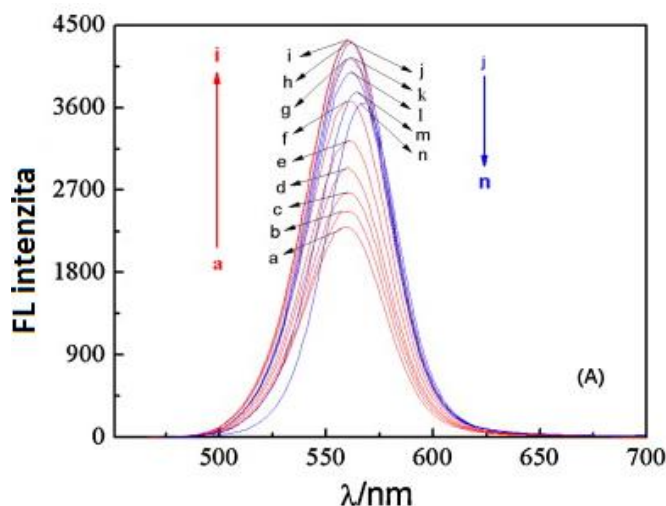
- súdržnosť medzi QDs a biomolekulou,
- výsledný produkt s nízkou toxicitou,
- vysoká špecificita a stabilita komplexu QDs-biomolekula,
- zachovaná aktivita biomolekuly,
- tenkosť vytvoreného obalu QDs.

Pri biokonjugáciách sú dôležité faktory ako hodnota pH prostredia QDs a biomolekuly, koncentrácia QDs ako aj koncentrácia biomolekuly naväzujúcej sa na QDs. Pri skúmaní vplyvu pH na intenzitu fluorescence QDs boli použité pufrы, ktoré mali hodnotu pH 5–9 označené a–e. Bolo zistené, že najvhodnejšie pH pre prácu s QDs je v rozmedzí od 6–8 čo je vidieť na Obr. 5. Ak je hodnota pH nižšia ako 6 CdTe QDs sú v kyslom prostredí čo môže viesť ku zničeniu štruktúry povrchu QDs, ku nestabilite QDs a teda ku znižovaniu intenzity fluorescence CdTe QDs. Pri príliš vysokej hodnote pH dochádza taktiež ku znižovaniu intenzity fluorescence. Najoptimálnejšia hodnota pH pri biokonjugácii QDs a biomolekúl je teda rovná 6–8 [31].



Obr. 5 Závislosť intenzity fluorescence QDs na vlnovej dĺžke pri hodnotách pH 5–9 označené a–e, prevzaté a upravené z [31]

Zo zvyšujúcou sa koncentráciou vybranej biomolekuly, ktorá je naviazaná na povrch QDs sa intenzita fluorescence QDs môže zvyšovať ale aj znižovať. Závisí to na pomeroch koncentrácií QDs a biomolekuly. Liang s kolektívom skúmali spomínanú závislosť na CdTe-TGA QDs biokonjugovaných s glyfosátom (skrátene Glyp je to derivát glycínu fungujúci ako širokospektrálny herbicid). Dokázali, že najvyhovujúcejší pomer Glyp:QDs je 1:1. Pred dosiahnutím tohto pomeru koncentrácií skúmaných látok sa intenzita fluorescence QDs po naviazaní Glyp zvyšovala. Bolo to spôsobené defektnými miestami na povrchu QDs, ktoré sa zaplňali Glyp a teda intenzita fluorescence sa zvyšovala. Po zaplnení všetkých defektov na povrchu QDs (dosiahnutie pomerov koncentrácií QDs:Glyp 1:1) naviazanie Glyp-u spôsobuje zhasanie intenzity emisie skúmaných QDs. Popísaná závislosť intenzity fluorescence na koncentrácií Glyp a pomeroch medzi Glyp a QDs je zobrazená na Obr. 6. Pomer koncentrácií QDs:Glyp s maximálnou intenzitou emisie je 1:1 [32,33].



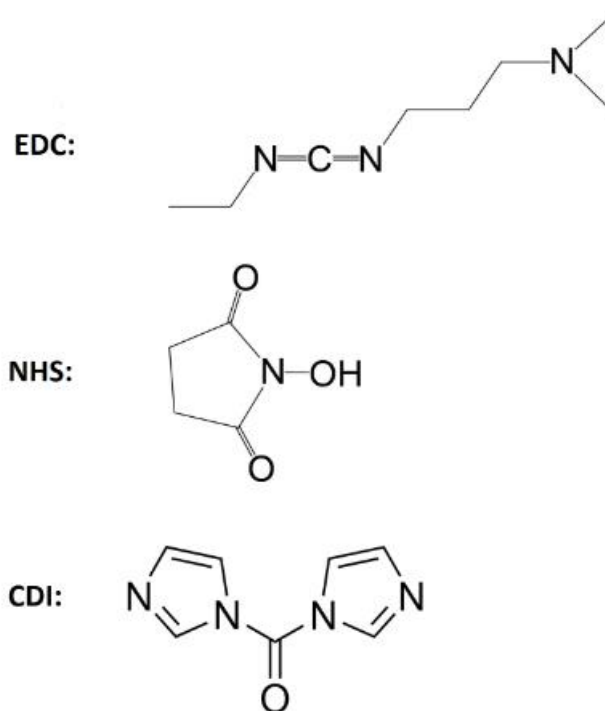
Obr. 6 Závislosť intenzity fluorescence QDs v závislosti na koncentrácií Glyp-u, prevzaté a upravené z[33]

Ako už bolo spomínané QDs majú relatívne malú veľkosť v rozsahu 2-20 nm. Aj napriek tejto skutočnosti majú dostatočne veľký povrch pre vytvorenie väzieb s biomolekulami. Biokonjugácia medzi QDs a určitou biomolekulou môže nastať niekoľkými spôsobmi. Medzi QDs a biomolekulou môže byť kovalentná, nekovalentná väzba alebo spojenie môže byť vytvorené pomocou spojok („crosslinkerov“) [10].

Kovalentná väzba nastáva vďaka thiolovým kyselinám na povrchu QDs, ktoré sú nahradené thiolovými biomolekulami. Na QDs môžu byť takýmto spôsobom naviazané napríklad BSA, DNA alebo oligonukleotidy [5,34].

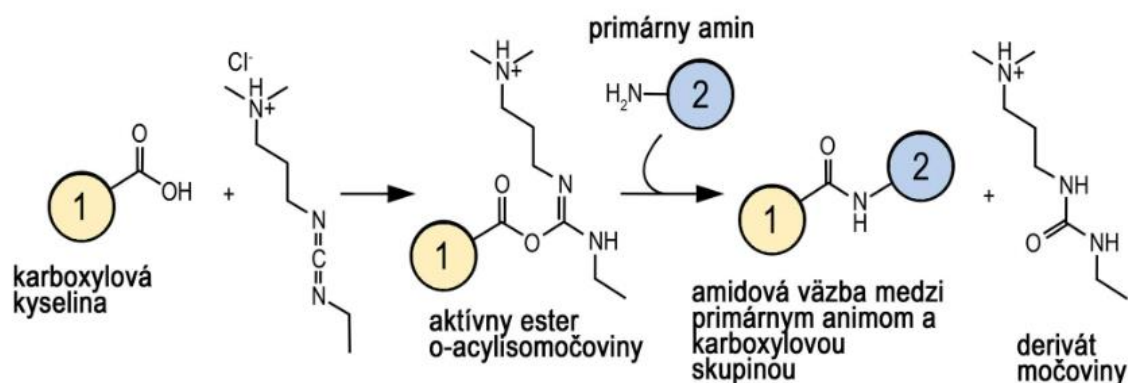
Pri kovalentných väzbách medzi QDs a biomolekulami sú často potrebné špeciálne typy chemických skupín, ktoré interagujú s karboxylovými skupinami vyskytujúcimi sa

vo väčšine biomolekúl. Medzi reagenty obsahujúce špeciálne skupiny patria tzv. spojky (crosslinkery). Vďaka crosslinkerom dochádza ku veľmi špecifickým väzbám medzi QDs a biomolekulami. Existujú dva typy crosslinkerov a to heterobifunkčné a homobifunkčné. Heterobifunkčné majú obe skupiny spájajúce QDs a biomolekulu voľne prístupné. Homobifunkčné majú jednu reaktívnu skupinu blokovanú. Túto blokáciu treba odstrániť pred využitím crosslinkera ako spojky medzi QDs a biomolekulou. Najväčšou skupinou cross-linkerov interagujúcich s karboxylovými kyselinami sú karbodiimidové zlúčeniny. Medzi karbodiimidové cross-linkery patrí hydrofílny EDC (1-Etyl-3-[3-dimetylaminopropyl]carbodiimid hydrochlorid), NHS (N-hydroxysukcinimid), CDI (karbonyldiimidazol) (Obr. 7) a iné [34].



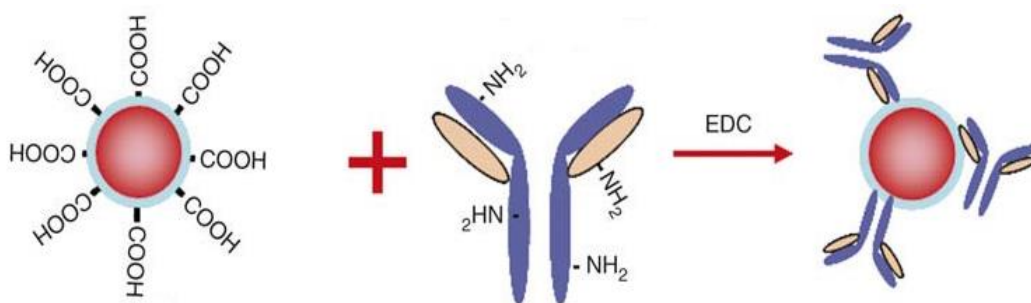
Obr. 7 Chemické vzorce crosslinkerov EDC, NHS a CDI, prevzaté a upravené z[34]

EDC interaguje s karboxylovými skupinami za vzniku aktívneho O-acylisomočovínového medziproduktu, ktorý je vo vodných roztokoch nestabilný a ľahko sa spája s aminoskupinami. Výsledok tohto spojenia sú amidové interakcie s karboxylovými skupinami. Ako vedľajší produkt pri spomínanej reakcii je derivát močoviny. Celý postup naviazania QDs a biomolekuly pomocou EDC je vyobrazený na Obr. 8. V súčasnosti patrí EDC medzi najviac využívaný crosslinker [34,35].



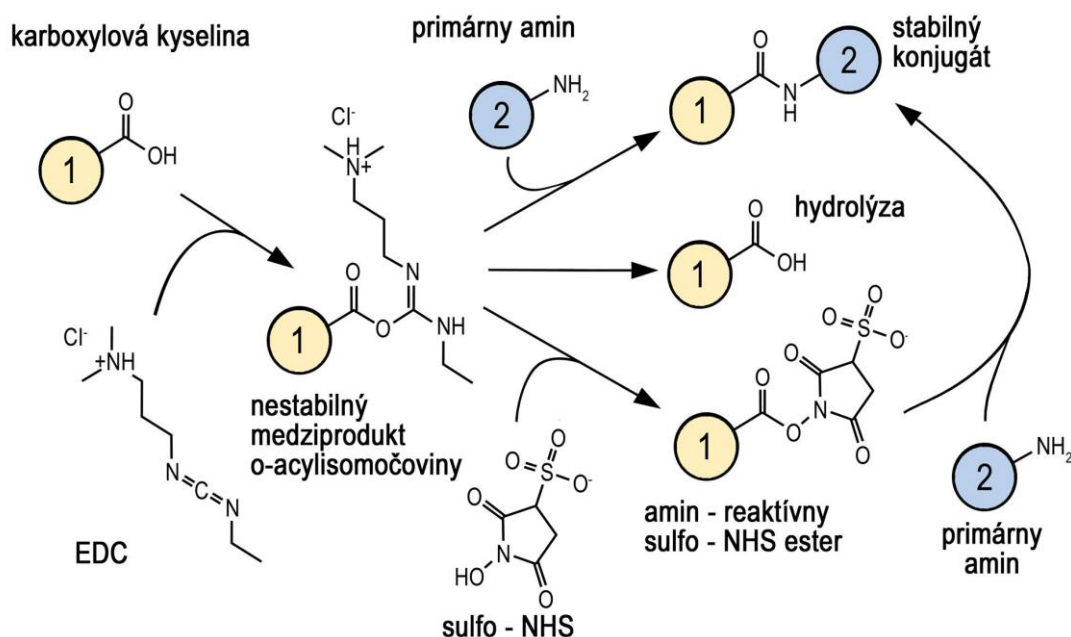
Obr. 8 Schéma reakcie vzniku väzby medzi QDs a biomolekulou pomocou EDC, prevzaté a upravené z [34]

Príkladom kovalentnej väzby môže byť väzba medzi karboxylovou skupinou QDs a amino skupinou imunoglobulínu G (IgG) [36] ako je vidieť na Obr. 9, ktorá vznikla vďaka EDC pridanému do tejto reakcie. EDC sa naviaže na karboxylovú skupinu na povrchu QDs a vytvorí komplex, na ktorý sa naviaže následne biomolekula (v tomto prípade IgG) pomocou amidovej väzby [37].



Obr. 9 Vytvorenie komplexu QDs-IgG pomocou crosslinkeru EDC, prevzaté a upravené z [37]

Ďalším špeciálnym cross-linkerom je sulfo-NHS, ktorý sa najčastejšie používa pri interakciách s spomínaným EDC. EDC a sulfo-NHS spoločne vytvárajú stabilnejšie medziprodukty. Za pomoci EDC sa viaže sulfo-NHS na karboxylové skupiny za vzniku stabilnejšieho medziproduktu NHS esteru a umožňujú biokonjugácie s amidovými skupinami biomolekúl. Celá reakčná schéma naviazania biomolekuly na QDs obsahujúce karboxylovú skupinu je zobrazená na Obr. 10 [34]



Obr. 10 Schéma reakcie vzniku väzby medzi QDs a biomolekulou pomocou EDC a sulfo-NHS, prevzaté a upravené z [34]

Dong a kolektív skúmali kovalentné väzby medzi GSH stabilizovanými CdTe QDs a špecifickými bunkami prostaty slúžiacimi pre priame značenie spojenými s IgG pre nepriame značenie nádorových buniek prostaty. Väzby boli vytvorené medzi QDs a crosslinkermi EDC-NHS vďaka karboxylovým skupinám a medzi EDC-NHS a IgG amidovými väzbami. Výsledky preukázali, že takéto značenie má vynikajúcu spektrálnu fotostabilitu. Pri nepriamom značení pomocou IgG bola preukázaná vyššia špecifita ako pri priamom značení [38].

CdTe QDs stabilizované MPA bolo možné konjugovať s peptidmi alebo proteínmi pomocou spojok EDC a NHS. Shang a kolektív týmto výskumom zistili, že konjugácia QDs a proteínov spomínaným spôsobom je výhodná v zachovaní biologickej aktivity QDs konjugátu a taktiež vykazuje vynikajúce výsledky v oblasti značenia buniek [39].

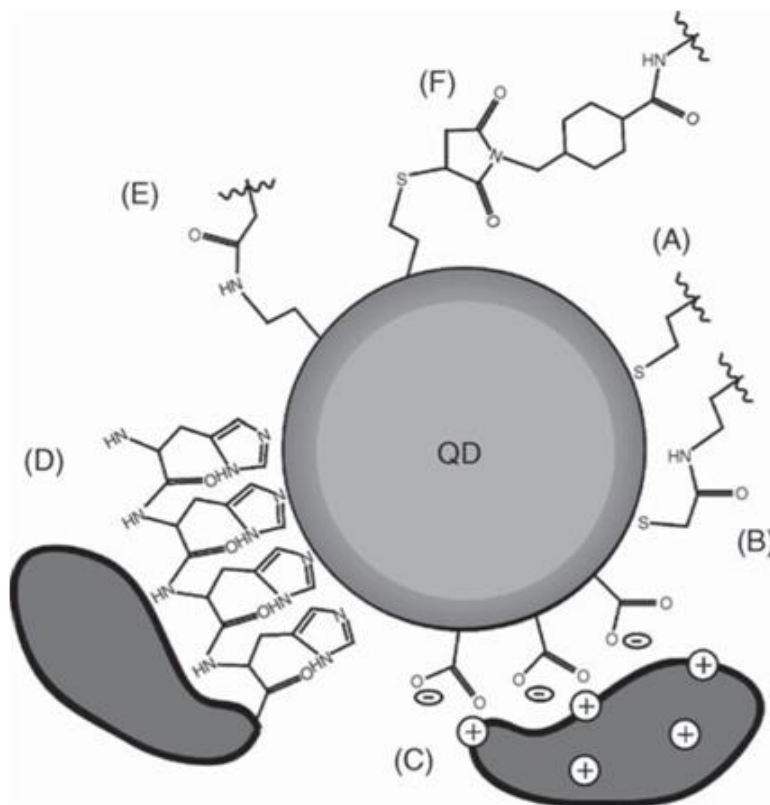
Cross-linker CDI patrí medzi vynikajúce karbonylačné činidlo, ktoré tvorí amidovú väzbu pri biokonjugáciách s peptidmi. CDI sa využíva pre aktiváciu hydroxylových aj karboxylových skupín za vzniku imidového medzi produktu predstavujúceho aktívnu skupinu. Pri konjugácii zlúčenín, ktoré obsahujú primárny amín, nukleofil sa viaže na karbonyl. Pri tomto deji dochádza ku odštiepeniu imidazolu [40].

Lišková s kolektívom sa zaoberali biokonjugáciou QDs v roztokoch pufrův o rôznych pH s anti-ovalbumínom, ktorá prebiehala pomocou cross-linkera CDI. Biokonjugácia prebiehala 1 hodinu pri izbovej teplote a išlo o väzby vytvorené medzi karboxylovou skupinou QDs a amino skupinou peptidov za prítomnosti CDI [40].

Nekovalentnými väzbami medzi komplexom QDs-biomolekula sú hlavne elektrostatické sily. Tieto interakcie sú v porovnaní s kovalentnými sú menej náročné. Elektrostatické sily nastávajú pri spojení záporne nabitých QDs a pozitívne nabitých enzýmov a proteínov. QDs, ktoré nemajú na povrchu naviazanú látku meniacu ich náboj sú záporne nabité. Takéto QDs sú schopné sa viazať s oligonukleotidmi alebo biomolekulami ako je BSA [41].

Elektrostatické väzby môžu vzniknúť dvoma spôsobmi. Buď sú QDs naviazané v negatívne nabitom komplexe alkyl-COOH-QD a vytvárajú biokonjugáciu s kladne nabitými biomolekulami alebo sú kladne nabité a viažu sa spoločne so záporne nabitou biomolekulou. Proteíny naväzujúce sa na povrch QDs zlepšujú optické vlastnosti samotných QDs. Kvantový výťažok QDs, ktoré majú na povrchu naviazané proteíny je podstatne vyšší o 50 až 300 %. Na druhej strane nevýhodou pri nekovalentných väzbách je oplyvnená aktivita biomolekúl a taktiež je veľmi náročné kontrola množstva biomolekúl naviazaných na QDs. QDs dosiahnu pozitívny náboj vďaka tomu, že sa na ich povrch naviaže pozitívne nabitá látka ako napr. cysteamín, rôzne typy kyselín a iné [42]. Gao s kolektívom skúmali CdTe QDs obalené cysteamínom a lyzozómovú väzbu DNA. Kladne nabitý cysteamín sa spájal so záporne nabitou DNA elektrostatickými väzbami. Vzhľadom k špecifickej väzbe DNA má toto spojenie vysokú selektivitu pre rozpoznávanie lyzozómu. Tento výskum bol prevedený v sére myší a vo vzorkách ranného ľudského moču [43].

Xiao s kolektívom skúmali spomínané nekovalentné interakcie QDs s rôznymi biomolekulami. CdSe/ZnS QDs s naviazanou merkaptooctovú kyselinu mali negatívne nabitý povrch, na rozdiel od rovnakých QDs s povrchom obaleným pozitívne nabitým cysteamínom. Vedci skúmali biokonjugáciu medzi spomínanými QDs a BSA. Zistili, že elektrostatické sily medzi oboma vznikajúcimi komplexmi sú veľmi stabilné, a že fluorescenčné spektrá oboch komplexov sú si podobné. Týmto výskumom dokázali, že interakcie medzi QDs a BSA závisia hlavne na koncentráciách naväzovanej biomolekuly [44]. Na Obr. 11 sú uvedené príklady jednotlivých interakcií pri vytváraní komplexu QDs-biomolekula [35].



Obr. 11 (A) interakcia medzi QDs a tiolovými koncami biomolekúl, (B) amidová väzba s tiolakyllovými ligandmi, (C) elektrostatické interakcie medzi kladne nabitou bielkovinou a negatívnym povrchom QDs, (D) Polyhistidínové pripojenie bielkovín, (E) amidová väzba medzi karboxylovým zakončením biomolekuly a amidovým povrchom QDs, (F) väzba medzi amidovým zakončením biomolekuly a tiolovým koncom QDs za prítomnosti cross-linkeru, prevzaté a upravené z [35]

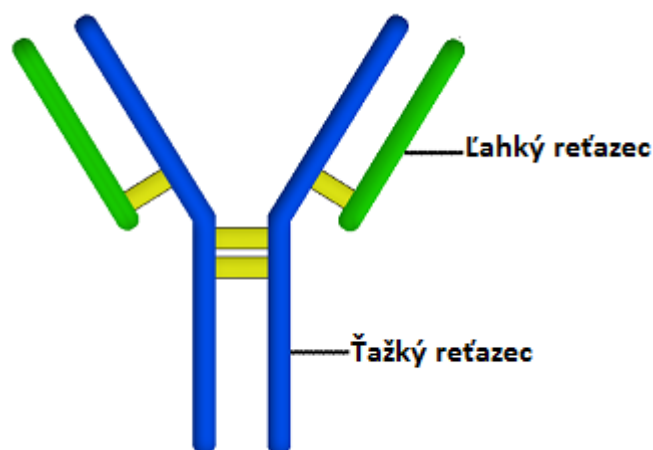
3 PROTEÍNY

Proteíny sú makromolekuly skladajúce sa z jedného alebo viacerých reťazcov aminokyselinových zvyškov tzv. polypeptidmi. Proteíny sa od seba líšia zložením polypeptidov. Sekvencie aminokyselinových zvyškov v proteínoch sú definované génom, ktorý je kódovaný v genetickom kóde. Jednotlivé aminokyselinové zvyšky sú spojené peptidovými väzbami. Genetický kód určuje 20 aminokyselín. Proteíny vykonávajú mnoho funkcií v živých organizmoch. Najdôležitejšie sú, že proteíny zabezpečujú replikáciu DNA, slúžia ako katalyzátory pri metabolických reakciách, zabezpečujú transport látok v živých organizmoch, majú mechanické a štrukturálne funkcie ako napr. aktín a myosín v svalu, dôležité sú v bunkovej signalizácii, imunitných odpovediach tela na vonkajšie podnety, pri zabezpečovaní bunkového cyklu.

Proteíny sú často spájané s látkami stabilnou väzbou za účelom dosiahnutia určitej funkcie. To bolo dôvodom, že sa vedci začali zaoberať biokonjugáciou proteínov s QDs. QDs v tomto spojení predstavujú novú budúcnosť v cielej preprave látok do živého organizmu, ku zobrazovaniu krvného riečišťa a karcinogénnych buniek. Pri biokonjugáciách QDs s biomolekulami vedci najčastejšie využívajú hovädzí sérový albumín (BSA), molekuly DNA alebo rôzne protilátky [45].

3.1 Detekcia protilátok

Protilátky, tiež nazývané ako imunoglobulíny (Ig), sú proteíny imunitného systému tvaru Y slúžiace ku identifikácii a neutralizácii patogénov (napr. baktérie a vírusy). Ig rozpoznávajú jedinečné molekuly patogénov tzv. antigény. Každá protilátka je špecifická a rozpoznáva špecifický antigén. Produkcia protilátok je hlavnou funkciou imunitného systému. Protilátky sú tvorené 2 ťažkými a dvoma ľahkými reťazcami spojenými disulfidickou väzbou (ako je vidieť na Obr. 12). Protilátky sa delia do 5 rôznych tried (izotopov) podľa typu ťažkého reťazca, ktorý obsahujú. Typy ťažkého reťazca sa označujú gréckymi písmenami α , γ , δ , ϵ a μ z čoho sú odvodené typy tried protilátok na IgA, IgG, IgD, IgE, IgM [46].



Obr. 12 Zobrazenie tvaru a štruktúry protilátky, prevzaté a upravené z [46]

Spojenie QDs s protilátkami otvára nové možnosti v lekárskej diagnostike. Vedci sa snažia týmto spojením získať nové luminiscenčné značky, ktoré môžu napomáhať k lepšiemu hodnoteniu liečby mnohých druhov závažných ochorení. Komplex QDs protilátka cirkulujúce v krvi môžu pomôcť pri včasnom odhalení rakoviny. Rozvoj krvných testov pomocou optických metód umožňuje včasnú diagnózu a prináša by mnoho výhod v riadení nádorových ochorení. Biokonjugáciu protilátok a QDs je možné dosiahnuť pomocou cross-linkerov, ktoré zabezpečia spojenie karboxylovej skupiny QDs a amino skupiny biomolekuly alebo elektrostatických síl medzi komplexom QDs-biomolekula. Konjugácia spomínaného komplexu bola sledovaná pomocou fluorescence a Ramanovho rozptylu. Espinola s kolektívom sa zaoberali štúdiom interakcií medzi CdSe/ZnS QDs a protilátky imunoglobulínu G (králičí IgG). Zistili, že fluorescenčné spektrá nekonjugovaných QDs majú Gaussovský tvar na rozdiel od spektier konjugovaných QDs s protilátkou, ktoré sa stávajú asymetrické [47].

Torchynska a kolektív skúmali biokonjugáciu (CdSeTe)/ZnS QDs s protilátkou vírusu besnoty (Pseudo rabies virus) z králičieho séra. Zistili, že táto biokonjugácia môže pomôcť k včasnej detekcii rady dôležitých ochorení vrátane rakoviny. Vývoj krvných testov pomocou optických metód fotoluminiscencie a Ramanovho rozptylu môžu byť veľkým pokrokom v kontrolovaní týchto chorôb [48].

QDs boli testované ako luminiscenčné sondy pre značenie buniek a tkanív. V minulosti sa skúmali biokonjugácie QDs-biomolekula pomocou povrchovej plazmovej rezonančnej analýzy, elektrochemickej analýzy alebo kalenia. V súčasnej dobe sa tieto interakcie skúmajú pomocou UV-VIS absorpcie, rezonancie Rayleighovho rozptylu alebo fluorescenčnej spektrometrie. Tieto analýzy využívali k skúmaniu interakcií medzi CdTe/TGA QDs a protilátky chylotrypsínu aj Peng s kolektívom. Chylotrypsín je tráviaci enzým v podžalúdkovej žľaze, ktorý pri interakcií s QDs môže

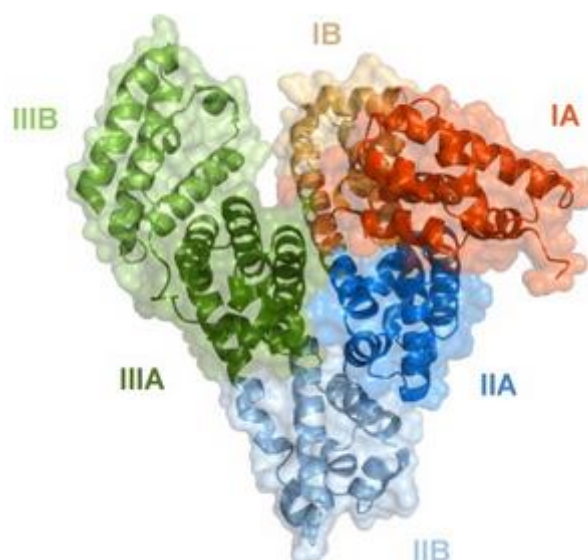
slúžiť k detekcii rakoviny pankreasu. QDs boli spojené s chylotrypsínom pomocou crosslinkera NHS. Výsledkom ich skúmania bolo, že molekuly chylotrypsínu majú relatívne vysokú afinitu s CdTe QDs [49].

Pri štúdiách interakcií CdSe/ZnS s protilátkou Osteopontin Torchynska skúmal spojenie pomocou fotoluminiscencie a Ramanovho rozptylu. Konjugácia bola dosiahnutá prostredníctvom kovalentných väzieb s použitím funkčných skupín na povrchu QDs alebo pomocou elektrostatickej sily medzi QDs a biomolekulou. Proteín Osteopontin (známy ako BSP-1 zabezpečujúci aktiváciu T-lymfocytov) v spojení s QDs môže slúžiť ako lepšie hodnotenie liečby mnoho druhov rakoviny. Nedávno bol tento proteín označený ako identifikačný marker rakoviny hrubého čreva [50].

Vazquez s kolektívom sa zaoberali výskumom biokonjugácie CdSe/ZnS s protilátkou interleukin 10 (anti-IL10). Všetky optické merania (Ramanov rozptyl, fotoluminiscencia) boli vykonané na vysušených kvapôčkach QDs umiestnených v Si substráte. Takáto biokonjugácia môže byť využívaná v génovej technológii k cielej distribúcii liekov do tkanív a k arteriálnemu a venóznemu zobrazeniu [51].

3.2 Detekcia hovädzieho sérového albumínu

Hovädzí sérový albumín (z anglického bovine serum albumin, skrátené BSA) je najhojnejší globulárny proteín v plazme s molekulovou hmotnosťou 66,5 kDa. Má mnoho využitia v biomedicínskych aplikáciách a enzymatických reakciách ale aj pri navrhovaní nových imunochemických testov. Jeho výhody spočívajú v jeho stabilite a nedostatku rušenia v biologických reakciách. Zvyčajne sa používa ako proteínové činidlo v proteínových testoch (napr. Bradfordov test), pri meraní koncentrácie proteínu v roztoku. Sérové albumíny hrajú dôležitú úlohu pri transporte endogénnych a exogénnych látok. Štrukturálne je BSA reťazec 582 aminokyselín a skladá sa z 3 domén (I, II, III), ktoré sú rozdelené do deviatich slučiek (L1-L9) 17-timi disulfidickými väzbami (Obr. 13). Má tri typy vnútorných fluoroforov a to tryptofán, tyrozín a fenylalanín. Jeho rovnaká štrukturálna homológia s HSA (ľudský sérový albumín) je dôležitým prvkom pri častých aplikáciách [52-54].



Obr. 13 Molekula BSA, prevzaté a upravené z [54]

Interakcie kvantových bodiek s biomolekulami priťahujú čoraz väčšiu pozornosť. Medzi povrchom QDs a biomolekulou vznikajú elektrostatické sily za vzniku komplexu QDs-biomolekula. QDs majú na svojom povrchu pozitívny náboj na rozdiel od BSA, ktorý má negatívny. Vďaka tomu dochádza ku elektrostatickým väzbám medzi QDs a BSA. Taktiež vytváranie komplexu môže nastať pomocou cross-linkerov, ktoré spájajú karboxylové skupiny na povrchu QDs a amino skupiny na biomolekule. Na povrch QDs sa vďaka karboxylovej skupine naviaže crosslinker, ktorý vytvorí medziprodukt. Na tento medziprodukt sa následne naviaže amidovou väzbou BSA. Ako príklad crosslinkerov možno uviesť EDC, EDC-NHS, CDI a iné [43].

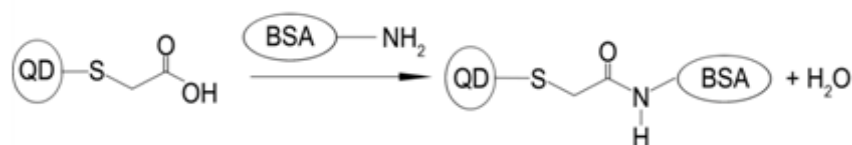
Zisťovanie biologickej toxicity QDs je súčasťou každého výskumu vedcov pri snahe využitia QDs pri analytických testoch. K týmto účelom sa využívajú biomolekuly HSA a BSA. Bai spoločne so svojím kolektívom skúmali vplyv veľkosti CdTe QDs na interakcie s HSA. Použili kompatibilné CdTe QDS s maximálnymi emisiami 535 nm (zeleno-emitujúce QDS, G-QDS) a 654 nm (červeno-emitujúce QDS, R-QDS). Výsledky ukázali, že na zhasenie fluorescence QDs s HSA má vplyv na veľkosť QDs. Väzbové konštanty a počet väzobných miest medzi R-QDS a HSA boli vyššie ako medzi komplexom G-QDS-HSA. Taktiež bola preukázaná zvyšujúca sa afinita QDs k HSA s rastúcou veľkosťou kvantových bodiek [55].

Vedci ako Wang a spol. sa vo svojich štúdiách zaoberali interakciami QDs a BSA. Skúmali vplyv veľkosti QDs na toxické interakcie s BSA pomocou fluorescence, cirkulárneho dichroizmu (CD nastáva pri rôznej absorpcii ľavotočivej alebo pravotočivej zložky cirkulárne polarizovaného žiarenia prechodom cez analyt) a UV-

VIS absorpčných spektier. Využívali tri veľkosti QDs s maximálnou emisiou 535 nm (zeleno-emitujúce QDs, G-QDs), 579 nm (žlto-emitujúce QDs, Y-QDs) a 654 nm (červeno-emitujúce QDs, R-QDs). Výsledky ukázali, že elektrostatické sily vytvárajú statickú väzbu v komplexe QDs-BSA a fluorescencia QDs účinne uhasí fluorescenciu BSA [42].

Väzbami medzi CdSe/ZnS a BSA sa zaoberali Xiao a kolektív. Pri syntéze CdSe/ZnS boli použité negatívna kyselina merkaptooctová (MAA) a pozitívny cysteamín (CA). Interakcie komplexu QDs-BSA skúmané pomocou UV-VIS a fluorescencie. Výsledky štúdií ukázali, že nábojovo limitované QDs rozložia intenzitu fluorescencie BSA s rôznou účinnosťou. Pri vyhodnocovaní pomocou cirkulárnej dichroizmovej spektroskopie výsledky ukázali konformačné zmeny BSA indukovaných pomocou QDs a ovplyvnenú biologickú aktivitu BSA rôznymi nábojmi QDs [44].

Interakcie medzi CdTe QDs a BSA skúmali Idowu s kolektívom. Karboxylové skupiny na povrchu QDs boli aktivované EDC, na ktoré bolo následne naviazané BSA aminovými skupinami ako je vidieť na Obr. 14. Zisťovali zmenu intenzity fluorescencie pred a po naviazaní BSA na QDs. Intenzita fluorescencie sa zvýšila po naviazaní biomolekuly na povrch QDs [56].



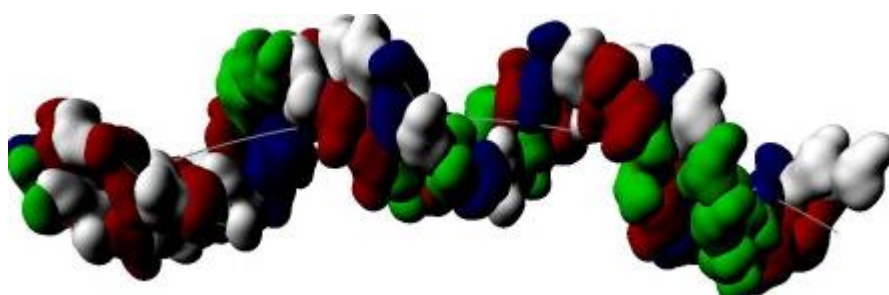
Obr. 14 Vytváranie väzieb medzi QDs a BSA pomocou crosslinkerov EDC a NHS, prevzaté a upravené z [56]

Pri skúmaní väzieb medzi QDs a BSA sa vedci zaoberali aj tepelným správaním BSA pri použití QDs ako sond. BSA je jedným z najviac skúmaným proteínom vďaka štrukturálnej homológii s ľudským albumínom. Pri porovnaní konjugovaných a nekonjugovaných QDs biomolekulou, nekonjugované QDs vykazujú lineárnu závislosť intenzity fluorescencie vzhľadom ku zvyšujúcej sa teplote. Biokonjugované QDs vykazujú viac komplexné správanie vysoko citlivé na štrukturálne zmeny proteínov. Pri teplote 51 °C intenzita fluorescencie biokonjugovaných QDs vykazuje pokles. Pri zahriatí na 69 °C dochádza ku zvýšeniu intenzity emisie QDs vďaka tomu, že pri tejto teplote dochádza ku denaturácii BSA naviazaného na povrch QDs [57].

4 DETEKCIA DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je nositeľkou genetickej informácie jednotlivých buniek. Zabezpečuje rast, delenie a obnovu buniek. DNA je stočená do dvojzávitnicovej špirály (Obr. 15). Prokaryotické organizmy majú DNA umiestnené voľne v cytoplazme, eukaryota majú hlavnú časť DNA v jadre a menšie molekuly DNA v bunkových organelách. Základné zložky DNA (tzv nukleotidy) sa skladajú z troch zložiek:

- Deoxyribózy
- Dusíkatej bázy (adenín, guanín, cytozín, tymín)
- Zvyšku kyseliny fosforečnej (PO_4^{3-})



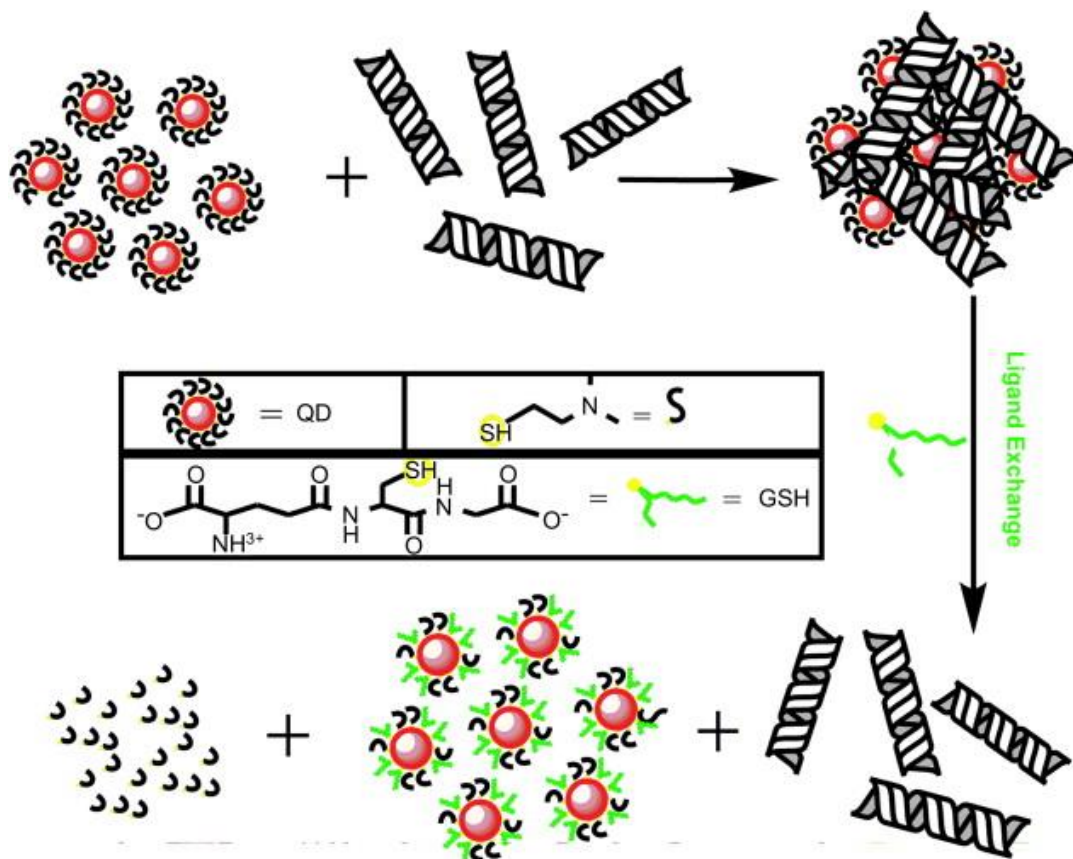
Obr. 15 Dvojzávitnicová špirála DNA, prevzaté a upravené z[58]

DNA v spojení s QDs vytvárajú veľký potenciál vo vývoji optických materiálov pre využívanie v biologickom zobrazovaní. Vytváranie biokonjugátu DNA-QDs je vďaka elektrostatickým väzbám medzi kladne nabitým povrchom QDs a záporne nabitou časticou DNA [58,59].

Paramanik s kolektívom sa vo svojej práci zamerali na interakcie medzi CdTe-TGA QDs v spojení z DNA. Nakoľko QDs modifikované TGA nevytvárajú väzby s DNA musel byť povrch QDs upravený kationovým polymérom. Etidium bromid bol použitý ako sonda na dvojreťazcovú DNA. Takto upravené kladne nabité QDs interagujú so záporne nabitou DNA vďaka elektrostatickým silám. Štúdium interakcií komplexu QDs-DNA v tejto práci bolo prevedené pomocou spektroskopie. Vytvorený komplex sa využíva v chemických snímaníach a biologických zobrazovaniach buniek [60].

Li a spol. sa zaoberali konjugáciou CdTe QDs chránených cysteaminom, ktoré boli pozitívne nabité v elektrostatickom spojení s záporne nabitou plazmidovou DNA. Tvorba QDs-DNA komplexu takmer inhibuje transkripčnú aktivitu DNA. Preto bol komplex prerušený a DNA bola v spojení s glutathionom transferovaný do HEK 293 buniek, v ktorých bola meraná účinnosť transfekcie pomocou prietokovej cytometrie.

Na Obr. 16 je vidieť celý priebeh výskumu. Na začiatku ide o vytvorenie komplexu QDs-DNA, následne sa komplex rozrušuje po pridaní glutathionu, ktorý sa viaže na povrch QDs a z povrchu QDs sa v bunkách uvoľňuje cysteamín nachádzajúci sa na povrchu QDs. Z týchto faktov vyplynulo, že kladne nabité QDs majú potenciál ako nový prostriedok pri podávaní liekov v budúcnosti [61].



Obr. 16 Priebeh vytvárania QDs-DNA komplexu a následný rozpad komplexu za súčasného vylúčenia cysteamínu, prevzaté a upravené z [61]

5 APLIKÁCIE QDS

QDs v porovnaní s organickými farbivami a fluorescenčnými proteínmi majú jedinečné optické vlastnosti ako napríklad úprava emisných spektier, lepší jas, vynikajúcu fotostabilitu. Dnešné úspešné syntézy a biofunkcionalizácie QDs prispievajú k bohatému využívaniu týchto nanočastíc v biologických aplikáciách. Môžeme ich rozdeliť do troch skupín, *in vivo*, *in vitro* a aplikácie v imunosenzoroch [62].

5.1 *In vivo* zobrazovacie aplikácie

In vivo aplikácie sú vykonávané v zložitom systéme experimentálnych živočíchov. Tieto aplikácie môžu splňovať štyri hlavné úlohy, a to zobrazenie cievneho riečišťa, biodistribúcia QDs, pozorovanie pohybu QDs a karcinogénne zobrazovanie *in vivo*. Toxikogenomické štúdie boli zamerané na identifikáciu hepatokarcinogénnej aktivity. Pri týchto štúdiách bývajú splnené konkrétne podmienky:

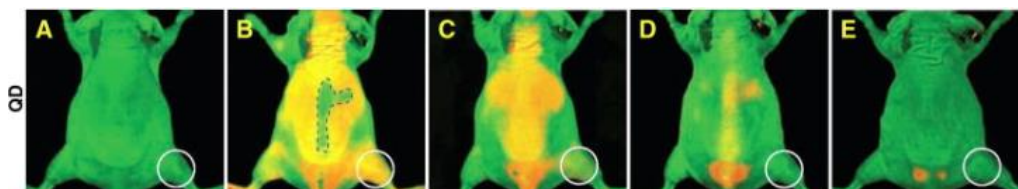
- značenia genomických karcinogénov sú pomerne súdržné,
- dlhá doba expozície (týždne), ktorá má za následok robustnejšie modely a väčšiu presnosť klasifikácie,
- potreba formalizovaného prístupu k tvorbe modelov pre spoľahlivú aplikáciu toxikogenomiky pri identifikácii a klasifikácii karcinogénnych buniek,
- možnosť kvantitatívne ho aj kvalitatívneho spôsobu hodnotenia rizík.

QDs pôsobia ako stabilné a odolné prírodné fluorescenčné značky používané v *in vivo* značení najmä pre dlhodobé zobrazovania a detekciu. Novo vyvinuté techniky označovania QDs prispeli k uľahčeniu štúdií podávania liekov na úrovni živých buniek.

Do buniek sa môžu QDs dostať štyrmi spôsobmi. Endocytóza ako jeden zo spôsobov prepravy QDs do buniek prebieha tak, že molekula QDs sa vnorí do plazmatickej membrány, ktorá ju obalí a dopraví do bunky. Ďalší mechanizmus preniku QDs do bunky je pomocou nešpecifickej pinocytózy. QDs vo forme tekutiny sú vpravené vchlípením cytoplazmatickej membrány pričom bunka zachytí extracelulárnu tekutinu v drobných váčkoch. QDs sa môžu dostať do vnútra bunky aj vďaka peptidom tzv. transportom indukovaným peptidom. Látka, tomto prípade peptid slúži ako prenášač QDs cez membránu bunky dovnútra. QDs sa môžu dostať do bunky aj mikroinjekčne teda vstriknutím do vnútra bunky [24,63].

Wang a kolektív sa zaoberali štúdiami modifikácie povrchu QDs pre podávanie liekov a QDs ako nositelia liečiv. QDs boli najskôr stabilizované merkaptoetylaminom a polyetylén glykolom, na ktoré sa ľahko viaže liečivo kovalentnými väzbami alebo

elektrostatickými silami. Takto modifikované QDs sú endocytózou vpravené do buniek. Tam slúžia pri sledovaní efektivity, rýchlosti uvoľňovania molekúl liečiva a ciest doručovania liečiva v živých bunkách organizmov. Na Obr. 17 je ukážka cesty liečiva pomocou QDs v tele myši [64].



Obr. 17 Zobrazenie cesty liečiva pomocou QDs v tele myši, prevzaté a upravené z [64]

Výkonný nástroj v zachytávaní prietoku krvi je technika nazývaná *in vivo* cryotechnika (hladiaca technika využívajúca veľmi nízkych teplôt). K tejto technike Terada s kolektívom využívali QDs obalené glutathionom, ktoré boli vstriednuté do myši. QDs boli lokalizované vo vnútri ciev v kôre obličiek 30 s po vstriednutí. Takýmto spôsobom je možné zobrazovať krvné riečište zvieračích orgánov v závislosti na čase vstriedkovania QDs [65].

V štúdiách Anantha a spol. boli skúmané antimikrobiálny potenciál TGA-CdTe QDs a fenolových látok (rutín, kofeín) s *E.coli*. Komplex QDs-rutín vykazoval vynikajúce kaliace účinky vďaka OH skupinám v štruktúre rutínu, ktoré chýbajú v kofeíne. Základné mechanizmy interakcií nanočastíc s bunkovou stenou baktérie sú:

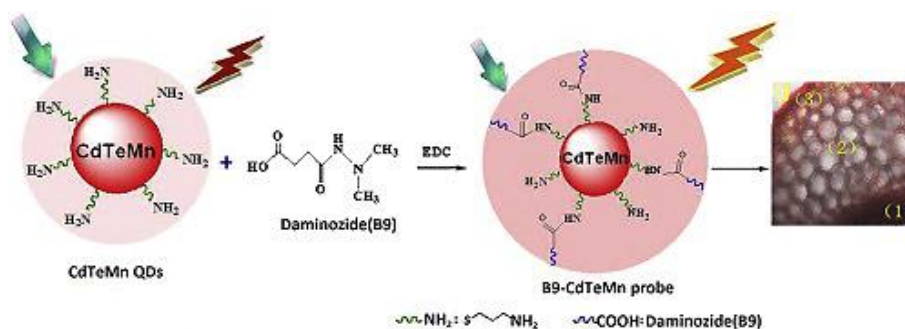
- absorpcia na bunkovej stene,
- nešpecifická pinocytóza

V prípade, že je veľkosť nanočastíc väčšia ako 10 nm dochádza k absorpcií na bunkovej stene. Pri dlhodobej akumulácii môže dôjsť až k smrti baktérií. Na druhej strane pokiaľ je veľkosť QDs nižšia ako 10 nm prechádzajú tieto nanočastice cez bunkovú membránu. Sú schopné produkovať reaktívne formy kyslíka, ktoré významne zvyšujú permeabilitu plazmatickej membrány a môže nastať bunková smrť v dôsledku nesprávnych transportných mechanizmov buniek. Značenie *E.coli* s QDs-rutín a QDs-kofeín bolo analyzované fluorescenčnou mikroskopickou metódou. Výsledky preukázali zvýšenú antimikrobiálnu aktivitu komplexu QDs-rutín a teda aj častejšie používanie tohto komplexu v spojení s *E.coli* [66].

QDs vďaka vynikajúcej fotostabilite a vysokej fotoluminiscencii v spojení s špecifickými baktériami slúžia k transportu do nádorov živých organizmov. V štúdiách Zhou-a a spol. boli skúmané QDs v spojení s baktériami *Bifidobacterium*

bifidum, ktoré boli transportované do tkanív nádorov. Pre zlepšenie účinnosti a špecificity zacielenia nádoru sa QDs nesúce baktérie boli konjugované s kyselinou listovou. Tento prístup otvára cestu k poskytovaniu rôznych typov funkčných látok ako napr. liečiv do nádoru živých zvierat pre zobrazenie, diagnózu a terapiu [67].

V ďalších štúdiách boli využívané červeno fluoreskujúce CdTe dopované mangánom. Ich syntéza prebiehala pomocou hydrotermálnych procesov z vysokou teplotou. CdTe-Mn QDs majú maximálny vrchol emisie fluorescence pri 610 nm a ich fluorescenčné vlastnosti sú vhodnejšie pri rôznych bioaplikáciách než CdTe QDs bez mangánu. Takéto QDs sa využívajú pri sondách B9-CdTeMn syntetizovaných kopuláciou B9 (4-(2,2-Dimethylhydrazinyl)-4-oxo-butánová kyselina – biela kryštalická látka slúžiaca ku ochrane rastlín) s CdTeMn QDS. Intenzita fluorescence sondy je dvakrát vyššia než v CdTeMn QDS, stabilita je lepšia pri rôznych podmienkach okolitého prostredia. Sonda zachováva biologickú aktivitu B9 ovplyvnenú zeleným farbivom v rastlinách. Z tohto dôvodu Liu s kolektívom túto sondu na značenie B9-viažúcich proteínov selektívne s koreňovými tkanivami semienok fazule. Tieto proteíny boli pozorované prevažne na povrchu bunkových membrán v kortexovom a epidermálnom parenchýmom. Celý postup syntézy a výsledkov je vidieť na Obr. 18. Červená fluorescencia sondy B9-CdMnTe môže zabrániť samovoľnej interferencii na pozadí obrázku rastliny [68].



Obr. 18 Postup výroby sondy a naviazania na bunky, prevzaté a upravené z [68]

V súčasnej dobe je veľké množstvo chemosenzorov a snímacích systémov založené na foto-indukovanom elektrónovom prenose QDs pri skúmaní interakcií medzi protinádorovými liečivami, DNA a QDs. Novo vyvinuté techniky značenia s QDs uľahčili podávanie liekov na úrovni živých buniek. Wang a kol. hlásili, že pomocou techniky na úpravu povrchu QDs, ktoré vo vode stabilizujú merkaptoethylamin a polyetylén glykol. Tieto látky sa ľahko konjugujú v liečivami pomocou kovalentých väzieb alebo elektrostatických síl za účelom vytvorenia komplexu s QDs. Vďaka tomu

niektoré malé molekuly alebo makromolekuly (peptidy, DNA) boli úspešne študované pomocou QDs fluorescenčnými zobrazovacími spôsobmi. Ako príklad možno uviesť CdTe/CdS QDS funkcionizovaných Glyp (glyfosát), ktorých emisia fluorescence bola zvýšená. Tieto funkcionizované QDs boli spojené s CT-DNA (DNA teľacieho týmusu) za vzniku jednoduchého citlivého a selektívneho biosenzoru [33].

Toxicita v *in vivo* zobrazeniach je kľúčovým faktorom pri schválení takýchto zobrazovacích sond regulačnými úradmi pre humánne klinické použitie. Pri rôznych štúdiách bola preukázaná potreba neustáleho kontrolovania a skúmania mechanizmov využívajúcich QDs pri mnohých syntézach a interakciách [6].

5.2 *In vitro* aplikácie

Úspešný výskum zaoberajúci sa syntézami a biokonjugáciami QDs umožňuje využitie QDs v biologických aplikáciách. Vďaka skvelým vlastnostiam QDs ako je fluorescencia a stabilita začali sa QDs využívať v oblasti *in vitro* aplikáciách a v biosenzoroch. V *in vitro* diagnostike sú využívané QDs vďaka ich vlastnostiam ako je tvar a veľkosť, jas, farba QDs (široká škála farieb QDs je uvedená na Obr. 19), úzke emisné pásy a najdôležitejšia fotostabilita.



Obr. 19 Príklady širokej škály farieb QDs, prevzaté a upravené z [62]

QDs predstavujú sľubné využitie pri sledovaní a dodávke liečiv v klinickej medicíne. Li s kolektívom vo svojich štúdiách skúmali toxicitu CdTe QDs nachádzajúcich sa v nanogéli (NGS). QDs-NGS udržiavali citlivosť pri vhodnom pH PBS pufru. Zistili, že komplex QDs-NGS chráni QDs pred rozkladom v cytoplazme a zachovávajú natívnu intenzitu fluorescence. MTT test ukázal, že QDs-NGS výrazne znižuje cytotoxicitu QDs [69].

Nanočastice môžu byť používané aj ako fluorescenčné sondy pre určenie rakovinotvorných buniek a tkanív. Schopnosť študovať molekulárne a biologické udalosti pomocou fluorescenčných sond ovplyvnila mnoho oblastí v biomedicínskom výskume, pri testovaní liečiv a molekulárnej diagnostike. Vďaka vysokej kvalite QDs sú vhodné pre multiplexné značenie alebo kódovaniu génov, proteínov a molekúl.

Nové stratégie prinášajú rozšírené využitie QDs v zobrazovacej oblasti. QDs slúžia ku cielenému a trvalému zobrazovaniu pri diagnostike rakoviny. Organické QDs boli konjugované s kyselinou listovou. Na kyselinu listovú sa pripojil vitamín E cez amidovú väzbu medzi NH_2 skupinou, ktorú obsahuje kyselina listová a COOH skupinou vitamínu E. QDs spojené so spomínaným komplexom slúžia ku diagnostike rakoviny v rannej fáze. Najčastejšie sa tieto QDs viažu na bunky rakoviny prsníka pričom zabezpečujú cielené zobrazenie a vysokú špecifickosť a citlivosť QDs na karcinogénne bunky [63].

CdTe-TGA QDs obalené želatínou boli rovnako využívané v oblasti zobrazovania. TGA-CdTe QDs s vrstvou želatíny boli vstriednuté do buniek THP-1 z dôvodu zisťovania toxicity. Želatína na povrchu QDs zabezpečuje nižšiu úroveň toxicity QDs pri konjugáciách s bunkami. THP-1 bunky sú bunky ľudského tela slúžiace ku testovaniu leukémie pri imunochemických analýzach. Bolo preukázané, že QDs sú schopné aktivovať ľudské krvné doštičky, čo prináša veľký pokrok ku využitiu nanočastíc v medicínskej a biochemickej oblasti [70].

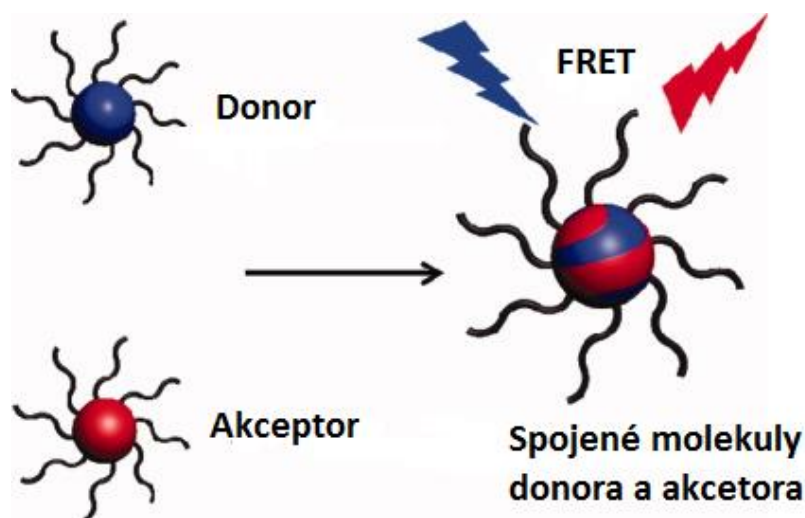
Wu a kol. boli medzi prvými, ktorý preukázali, že QDs môžu špecificky a účinne označovať molekulárne ciele na subcelulárnej úrovni. QDs boli obalené polymérom a funkcionizované biomolekulami (streptavidínom a imunoglobulínom) a aplikované na cieľové bunky (aktín a mikrotubuly). Použité kvantové bodky boli 2 rôznych farieb (630 nm a 535 nm) a porovnané s inými farbivami. Výsledky ukázali, že QDs sú oveľa fotostabilnejšie a od tej doby sa využívajú v nespočetne veľa aplikáciách vrátane in situ tkanivových diagnostikách [62].

In vitro aplikácie QDs majú však aj nevýhody. Medzi najväčšie patrí náročnosť aplikácie v dôsledku zložitej morfológie, prostredia a funkcie buniek ako aj vlastností QDs, ktoré môžu byť vážnou prekážkou pre citlivé pozorovanie jednotlivých interakcií a subcelulárnej funkcie. Taktiež aj už spomínaná cytotoxicita QDs je nevítaná pri aplikáciách a vyšetrovaní biologických systémov. Táto problematika je v súčasnosti často skloňovanou témou v diskusiách vedcov [71].

5.3 Imunosenzory

Vďaka vynikajúcim fluorescenčným vlastnostiam QDs je ich využitie v oblasti biosenzorov veľmi zaujímavé. V poslednej dobe, elektrochemická imunoanalýza priťahuje značný záujem vysoko citlivej detekcie proteínových biomarkerov vďaka jednoduchosti, nízkej cene, vysokej citlivosti, a miniaturizácii. Väčší počet značiek, ako sú enzýmy alebo elektroaktívne molekuly, bývajú použité pre uľahčenie elektrochemických meraní. S rozvojom nanotechnológií začínajú byť používané rôzne nanočastice zlata, oxidu kremičitého, polovodičových kryštálov (napr. CdS, ZnS) ako štítky zvyšujúce citlivosť elektrochemických imunologických techník. Ide najmä o elektrochemické biologické testy. Najčastejšie používaný QD systém pri spomínaných testoch je systém polovodičového jadra CdSe potiahnutého vonkajším plášťom ZnS [72].

Försterov rezonančný prenos energie (FRET) je fotofyzikálny proces, prostredníctvom ktorého fluorescenčná molekula (tzv. darca) prenáša svoju excitačnú energiu na molekulu (tzv. akceptor) prostredníctvom dipól-dipól interakcií pokiaľ je vzdialenosť medzi spomínanými molekulami menšia ako kritický polomer nazývaný ako Fosterov polomer (Obr. 20). Sila väzieb medzi akceptorom a donorom je závislá od vzdialenosti medzi nimi [73]. Vďaka tomu môže byť spektrum emisie „akceptoru“ nenáročne odlíšené od spektra „darca“ a teda signál pozadia je značne minimalizovaný. V posledných desaťročiach, polovodičové QDs boli použité ako vynikajúci darca energie namiesto tradičných organických farbív v FRET. Pri tejto metóde sú dôležité nutné kroky pri kovalentnej biokonjugácii medzi akceptorom a QDs, aby nedochádzalo k zníženiu intenzity spektier emisie a aj koloidnej stability QDs [74].

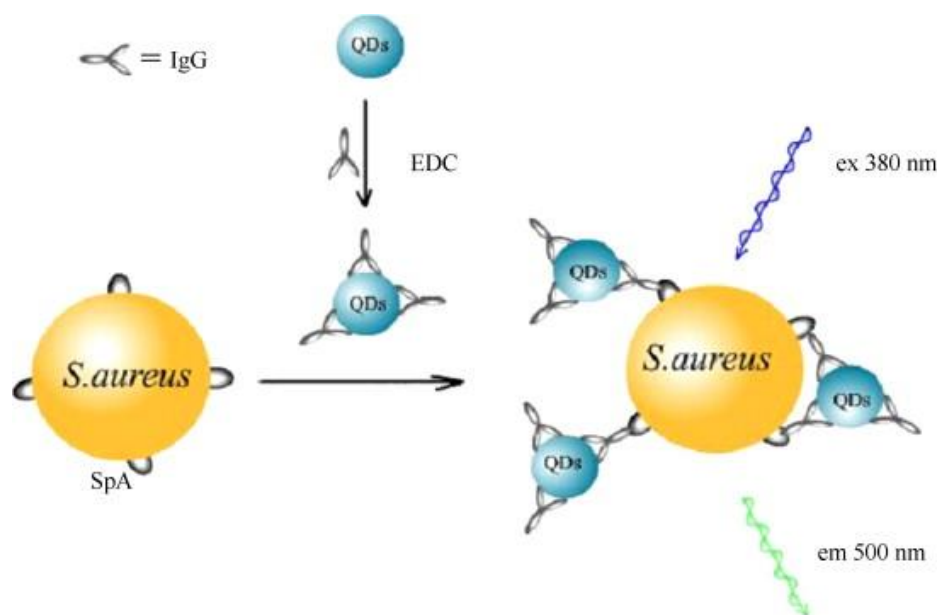


Obr. 20 Princíp metódy FRET

Adarsh s kolektívom skúmali CdSe/ZnS QDs v spojení s rodamínom B. Ukázalo sa, že QDs obalené ZnS vrstvou sú citlivé na vonkajšie faktory ako je pH a chránia jadro CdSe pred oxidáciou a zvyšujú kvantový výťažok. Medzi ZnS vrstvou a rodamínom B vznikajú elektrostatické vrstvy. QDs v spojení s rodamínom B sa využívajú vo vývoji biosenzorov [75].

Štúdie absorpcie proteínov má veľký význam v oblasti biotechnológií, lekárskom výskume a diagnostike. V bio-analytickej oblasti absorpcia proteínov zohráva dôležitú rolu vo vývoji biosenzorov, ďalej v oblasti biomateriálov ako napr. v systémoch pre podávanie liekov, umelých tkanív a orgánových systémov. Aj keď boli absorpcie proteínov študované niekoľko posledných desaťročí tieto mechanizmy sú veľmi náročné a ťažko objasniteľné z dôvodu štruktúry proteínov, ktoré obsahujú hydrofóbne aj hydrofilné aminokyselinové zvyšky a prenášajú buď negatívny alebo pozitívny náboj (interagujú pomocou elektrostatických síl) [76].

V biosenzoroch patria medzi jedny z najpoužívanejších proteínov protilátky imunoglobulíny. Imunoglobulíny sú teda protilátky, ktoré majú za úlohu identifikovať a zneškodniť cudzie látky (víruses a baktérie) v imunitnom systéme. Molekula imunoglobulínu sa skladá z dvoch ľahkých (označovaných L-light) a dvoch ťažkých (H-heavy) reťazcov, ktoré sú spojené disulfidovými mostíkmi a vytvárajú tvar písmena Y. Imunoglobulíny sa delia podľa ťažkého reťazca na 5 izotopov a to IgA, IgD, IgE, IgG, a IgM. V mnohých štúdiách sa zaoberali interakciami medzi QDs a imunoglobulínom a následnými aplikáciami v biosenzoroch. Ako príklad možno uviesť štúdie Liu-ho s kolektívom, ktorý skúmali interakcie medzi biofunkcionalizovanými QDs a IgG za vzniku biosenzoru využívané k optickej detekcii patogénov pomocou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Imobilizácia imunoglobulínu IgG na povrch TGA-CdS QDs bol pomocou kovalentnej väzby za vzniku rozpoznávacej sondy pre *S. aureus*, ktorý má schopnosť ľahko identifikovať a spoľahlivo detekovať patogény s pevným nosičom. Na Obr. 21 je možné vidieť imobilizáciu IgG s QDs a následné značenie *S. aureus* s IgG-QDs komplexom [77].



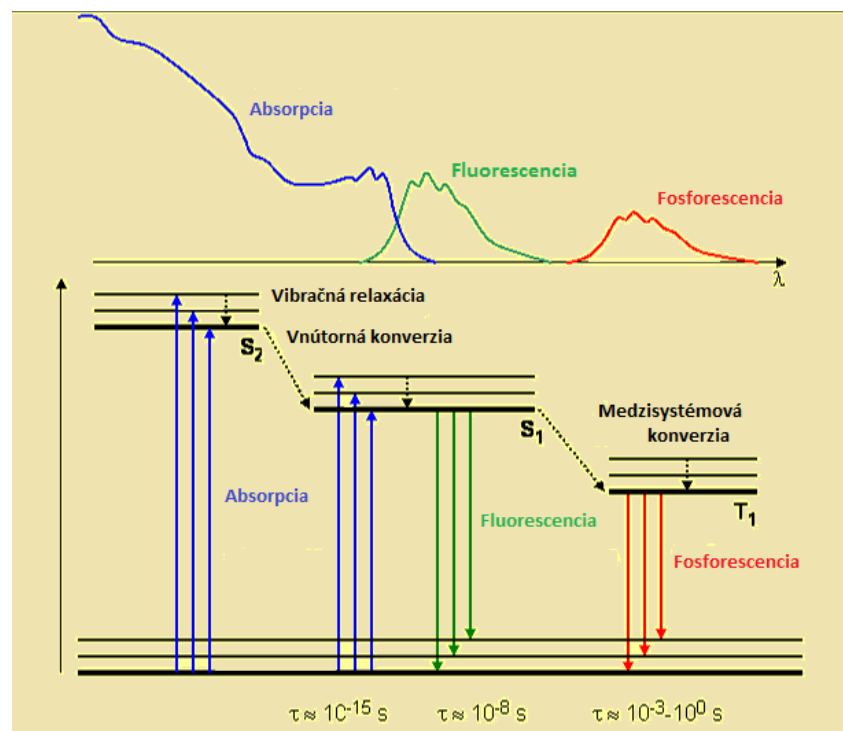
Obr. 21 Značenie *S.aureus* s IgG-QDs komplexom prevzane a upravené z [77]

6 CHARAKTERISTIKA QDS

6.1 Luminiscencia

Luminiscencia je definovaná ako jav, pri ktorom dochádza k absorbovaniu žiarenia o danej vlnovej dĺžke látky, ktorá prechádza do excitovaného stavu. Vyžiarená energia takejto látky sa nazýva luminiscencia.

Celý princíp vyžiarovania fotónov má niekoľko častí. Na začiatku po absorpcii svetelného žiarenia elektróny častíc prechádzajú zo singletného stavu S_0 do excitovaných singletných stavov S_1 , $S_2, \dots$ a tripletných stavov T_1 , T_2 . Molekula prejde z rovnovážnej vibračnej hladiny stavu S_0 do vibračnej hladiny excitovaných stavov. Pri návrate molekúl do základného stavu dochádza buď ku vyžiarovaniu fotónov (luminiscencia) alebo k nežiarivým prechodom (vibračná relácia, vnútorná konverzia a medzi systémová konverzia). Doba trvania absorpcie rádovo 10^{-15} s, fluorescence – 10^{-8} s, fosforescence – 10^{-3} až 10^0 s, vibračnej relácie – 10^{-12} až 10^{-13} s, vnútornej konverzie – 10^{-6} až 10^{-12} s a medzi systémovej konverzie – 10^{-4} až 10^{-12} s. Vyššie popísaný princíp je znázornený na Jablonského diagrame (Obr. 22) [78,79].



Obr. 22 Jablonského diagram, prevzaté a upravené z [79]

Luminiscencia sa delí na :

- fluorescenciu,
- fosforescenciu.
- oneskorenú fluorescenciu.

6.1.1 Fluorescencia

Fluorescencia je prechod z rovnovážnej vibračnej hladiny excitovaného stavu do vibračnej hladiny základného stavu za prítomnosti žiarenia. Pri používaní fluorescencie sa stanovuje QY. QY fluorescencie predstavuje pomer počtu svetelných kvánt emitovaných a absorbovaných látkou za sekundu. Dôležité podmienky pri fluorescencií sú:

- Stokesov zákon (vlnová dĺžka emisie je väčšia alebo rovná vlnovej dĺžke excitácie svetla),
- Kashovo pravidlo (pred emisiou fluorescenčného kvanta dochádza k relaxácii vibračnej energie a vnútornej konverzie),
- Vavilové pravidlo (doba excitovaného stavu a QY nezávisí na vlnovej dĺžke).

Fluorescencia sa využíva pri metódach ako je fluorescenčná spektrometria. Pri tejto metóde sa zisťujú optické vlastnosti nanoštruktúr napr. aké sú ich emisné spektrá. Základný prístroj sa skladá zo zdroja svetla (xenónová výbojka), excitačného monochromátoru alebo emisného monochromátoru. Výstupom pri fluorescenčnej spektrometrii je buď excitačné alebo emisné spektrum v závislosti od zapojeného typu monochromátoru pri analýze.

6.1.2 Fosforescencia

Hlavným rozdielom medzi fluorescenciou a fosforescenciou je doba dohasínania. U fosforescencie dochádza k pomalému návratu z excitovaného stavu z dôvodu, že elektróny s energiou absorbovaného fotónu prechádzajú vnútornými prechodmi a prichádzajú do takej energetickej hladiny, z ktorej sa nemôžu priamo vrátiť do základného stavu. Výsledkom je uväznenie energie zakázanými prechodmi. Táto energia je uvoľnená po niekoľkých minútach až hodinách.

6.1.3 Oneskorená fluorescencia

Oneskorená fluorescencia je žiarivý prechod z rovnakej energetickej hladiny ako pri fluorescencií ale doba dohasínania trvá dlhšie. Doba dohasínania oneskorenej

fluorescencie trvá približne rovnako ako doba dohasínania fosforescencie za rovnakých podmienok. Emisné spektrum je však totožné s emisným spektrom okamžitej fluorescencie [79,80].

6.2 UV-VIS

Ultrafialovo-viditeľná spektroskopia (skrátene UV-VIS) patrí medzi analytické metódy. Jej princíp spočíva v absorbcii elektromagnetického žiarenia, ktoré je v intervale 200-800 nm molekulami skúmaných vzoriek. Interval elektromagnetického žiarenia je daný viditeľnou a UV oblasťou spektra. Po absorpcii žiarenia molekulami dochádza ku excitácii elektrónov jednotlivých molekúl. Táto technika dopĺňa fluorescenčnú spektroskopiou v tom, že fluorescencia sa zaoberá prechodom molekúl z excitovaného stavu do základného zatiaľ čo UV-VIS rieši prechod molekúl zo základného stavu do excitovaného. UV-VIS metóda slúži ku stanoveniu koncentrácie jednotlivých látok a v spojení s ostatnými spektroskopickými metódami pre rozpoznávanie neznámej látky. Medzi výhody tejto metódy patrí rýchlosť, efektivita, citlivosť [81].

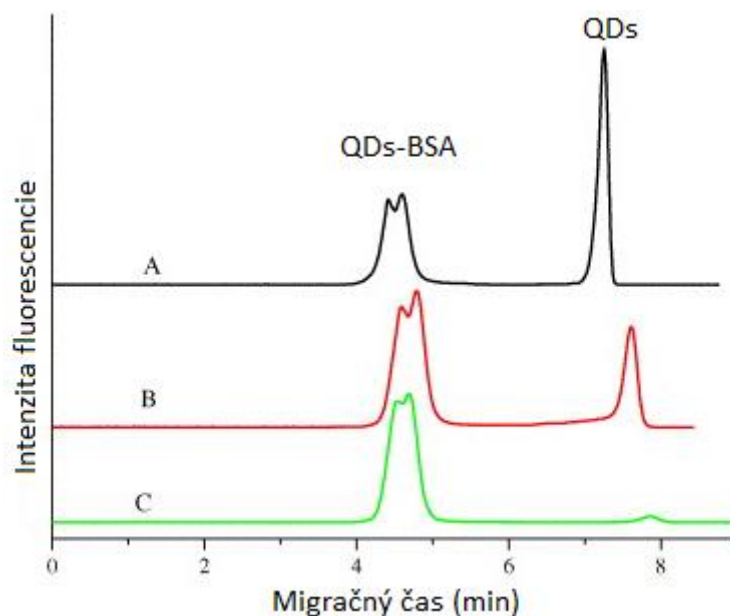
6.3 Kapilárna elektroforéza

Elektroforéza je metóda, ktorá využíva aktivitu nabitých častíc v elektrickom poli. Elektrické pole je vytvárané vložení jednosmerného konštantného napätia medzi elektródy. Rýchlosť pohybu nabitých častíc je závislá na veľkosti náboja a rozmerov molekuly. Odlišne veľké a rôzne nabité častice sa budú separované na základe rozdielnych rýchlostí pohybu. Elektroforéza sa využíva k separácii látok ale môže byť využitá aj pre preparatívne účely.

Kapilárna elektroforéza je podskupinou elektroforézy prevádzaná ako voľná elektroforéza v tenkej kapiláre s vysokým napätím (10-30 kV). K separácii dochádza pod vplyvmi elektroforetickej migrácie a elektroosmotického toku. Pod elektroforetickou migráciou rozumieme pohyb nabitých častíc v elektrickom poli. Elektroosmotický tok je spôsobený nábojom vnútorných stien kapilár. Keď príde ku kontaktu elektrolytu a silánových skupín, ktoré sa pozdĺž vnútorných stien kapiláry vytvára sa tak elektrická dvojvrstva medzi kapilárou a elektrolytom. Do takéhoto systému sa zavedie jednosmerný prúd kióny sa začnú pohybovať smerom k katóde a strhávajú zo sebou aj elektrolyt, vďaka čomu sa vytvára elektroosmotický tok ku katóde. Rôzne nabité molekuly sa pohybujú rôznymi rýchlosťami podľa náboja ale všetky sú nesené ku katóde. Pokiaľ sa separujú anionty elektroosmotický tok a migrácia

majú opačný smer. Neutrálne molekuly sa pri voľnej kapilárnej elektroforéze neseeparujú ale pohybujú sa ako jeden pás [82,83].

Kapilárna elektroforéza je citlivá metóda pre charakterizáciu kvantových bodiek. QD biokonjugát je pomocou tejto metódy účinne separovaný. V štúdiách Huang-a a kol. boli preukázateľné, že vďaka tejto metóde sú efektívne separované QDs biokonjugované s BSA a QDs nekonjugované. Využívali 30 cm dlhé kapiláry s napätím 12 kV pri teplote 25 °C. Na Obr. 23 je možné vidieť výsledky separácie QDs-BSA pomocou kapilárnej elektroforézy. Graf poskytuje náhľad na účinné oddelené QDs-BSA od samotných QDs. QDs sú rovnaké akurát spektrum A ukazuje elektroforeogram pôvodného roztoku, B vyjadruje elektroforeogram rovnakej vzorky po jednej ultra-filtrácii a posledný elektroforeogram C zobrazuje vzorku po 2 ultra-filtráciách [84].



Obr. 23 Elektroforeogram zobrazujúci separáciu roztoku QDs pomocou kapilárnej elektroforézy, prevzaté a upravené z [84]

7 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

7.1 Použité chemikálie

- Borohydrid sodný, Sigma-Aldrich
- Carbonyldiimidazol (CDI), Sigma-Aldrich
- Citrát sodný dihydrát, Sigma-Aldrich
- Dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát, Sigma-Aldrich
- Dihydrogénfosforečnan draselný, Merck spol. s.r.o
- 1-Etyl-3-[3-dimetylaminopropyl]carbodiimid hydrochlorid (EDC), Sigma-Aldrich
- Hovädzí sérový albumín (BSA), Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný, Penta
- Chlorid draselný, Sigma-Aldrich
- Chlorid kademnatý, Sigma-Aldrich
- Chlorid sodný, sigma-Aldrich
- Chlorid zinočnatý, Sigma-Aldrich
- Isopropylalkohol, Lach-Ner, s.r.o
- Imunoglobulín G, Sigma-Aldrich
- L-Glutathion redukovaný (GSH), Merck spol. s.r.o
- Merkaptojantárová kyselina (MSA), Merck Schuchardt OHG
- N-hydroxysukcinimid (NHS), Sigma-Aldrich
- Teluričitan sodný, Sigma-Aldrich
- Voda MiliQ, Milipore

7.2 Použité zariadenia a laboratórne vybavenie

- Centrifúga, EBA 20, Hettich
- Chladič, Petite Fleur, Huber
- Laboratórna sušička, Memmert
- Magnetická miešačka, MR Hei-end, Heiddph
- Mikropipeta, Eppendorf
- Multimodálna mikrodosťková čítačka, Infinite M200 Pro, Tecan
- pH meter, Cybescan PC 6500, Eutech Instruments
- Prístroj na kapilárnu elektroforézu, Agilent 7100
- Rotačná vakuová odparovačka, Hei-VAP Advantage, Heidolph

- Trepačka, MSC – 100, Thermo-shaker
- Ultracentrifúga, Minispin plus, Eppendorf
- Ultrazvuková čistička, 10P Sonorex digital, Bandelin
- UV lampa Kruss, A. Kruss optronic
- Vakuová odparovačka, Hei-Vap advantage, Heidolph
- Vakuová pec, VAKUUM PRAHA

7.3 Syntéza QDs

7.3.1 Syntéza QDs CdTe ovrstvených glutationom

Syntéza CdTe-GSH QDs prebiehala nasledovným spôsobom. Do roztoku deionizovanej vody (42 ml) a chloridu kademnatého (4 ml, $c = 0,04 \text{ mol/l}$) boli za stáleho miešania pridávané reaktanty: citrát sodný dihydrát (100 mg), teluričitan sodný (4 ml, $c = 0,01 \text{ mol/l}$), GSH (300 mg), borohydrid sodný (50 mg). Vzniknutý roztok bol preliaty do banky spojenej so spätným chladičom a následne bol zohrievaný za stáleho miešania (500 ot/min) na 95°C po dobu 4 hodiny. Roztok po ukončení syntézy bol žltej farby, uskladnený v chlade a temne. Pri hydrotermálnej metóde boli QDs syntetizované pri teplote 120°C počas 2 hodín [85].

7.3.2 Syntéza CdTe/ZnS QDs ovrstvených glutationom

Syntéza CdTe/ZnS QDs, ktoré sú ovrstvené glutationom prebiehala nasledovným spôsobom. Do roztoku deionizovanej vody (50 ml) a CdTe QDs (40 mg CdTe/GSH) boli za stáleho miešania pridávané reaktanty: ZnCl_2 (6,8 mg), GSH (61,3mg), hydroxid sodný (úprava pH na 8). Vzniknutý roztok bol preliaty do trojhrdlej banky spojenej so spätným chladičom a následne bol zohrievaný za stáleho miešania (500 ot/min) na 95°C po dobu 3 hodín [86].

7.3.3 Prečistenie a vysušenie CdTe QDs

Po dokončení syntézy boli všetky core QDs prečistené pomocou isopropanolu. Kvantové bodky boli zriedené s isopropanolom v pomere 1:2 a následne odstredené v centrifúge (6000 ot/min) po dobu 35 minút. Pri core/shell štruktúre boli QDs prečistené vo vakuovej odparke. Následne boli QDs sušené vo vakuovej peci pri teplote 50°C po dobu 4 hodiny.

7.3.4 Príprava fosfátového pufru

Príprava fosfátového pufru (PBS) prebiehala nasledovne. Do 200 ml vody boli za stáleho miešania pridávané nasledujúce látky: 1600 mg chloridu sodného, 40 mg chloridu draselného, 288 mg dihydrogénfosforečnanu sodného, 48 mg dihydrogénfosforečnanu draselného. Výsledná hodnota pH PBS pufru bola 7,4.

7.4 Naväzovanie biomolekuly na QDs

7.4.1 Naväzovanie biomolekuly na povrch QDs pomocou EDC a NHS

Interakcie biomolekuly a QDs boli zabezpečené spôsobom, že do roztoku QDs (200 μ l, $c = 1$ mg/ml) bol pridaný EDC (100 μ l, $c = 50$ mM) a NHS (100 μ l, $c = 5$ mM). Zmes bola ponechaná v trepačke 30 minút pri teplote 32 °C pre aktiváciu karboxylových skupín. Potom bol do zmesi pridaný BSA (200 μ l) o rôznych koncentráciách ($c = 0,33, 0,66, 1, 2, 4, 6, 8$ mg/ml). Výsledný roztok bol trepaný v trepačke 2 hodiny a následné uchovávaný v temne a chlade (4 °C) [87].

Ďalší postup naväzovania biomolekuly na QDs pomocou NHS a EDC bol nasledovný. Do 1 ml milipore boli pridané QDs ($m = 0,5$ mg/ml) ďalej BSA (o rôznych koncentráciách), NHS ($m = 1$ mg) a EDC (11 μ l). Výslednej zmesi sa upravilo pH na 7 pomocou NaOH a následne bola celá zmes ponechaná pri pokojovej teplote v trepačke 2–4 hodiny a po naviazaní biomolekuly uskladnená v temne a chlade (4°C) [88].

7.4.2 Naväzovanie biomolekuly na povrch QDs pomocou CDI

Interakcie biomolekuly a QDs boli zabezpečené spôsobom, že do roztoku QDs (1ml, $c = 0,1$ mg/ml) bol pridaný CDI (10 μ l, $c = 10$ mM), ktorý obsahuje 100 mM fosfátový pufr (pH = 7,4). Výsledný roztok bol ponechaný 30 minút pri pokojovej teplote aby bola zabezpečená aktivácia karboxylových skupín. Do zmesi bol potom pridaný BSA alebo IgG ($V = 336$ μ l) o rôznych koncentráciách. Biokonjugácia prebiehala pri pokojovej teplote 2 hodiny a následne bol roztok uchovávaný v temne a chlade (4°C) [40].

7.4.3 Zhášanie fluorescencie

Po naviazaní biomolekuly na povrch QDs často dochádza ku zhášaniu fluorescencie. Zhášanie fluorescencie QDs môže byť popísaný vďaka Stern-Volmerovej rovnici. Stern-Volmerová rovnica má tvar:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} * [Q] \quad (1)$$

Pričom I_0 predstavuje intenzitu v neprítomnosti zhášača (čo je látka znižujúca intenzitu emisie skúmaných QDs), I v rovnici je intenzita fluorescence v prítomnosti zhášača, K_{sv} je Stern-Volmerová konštanta zhášača a $[Q]$ je koncentrácia zhášača. Do grafov je vhodné vynášať $I_0/I=f([Q])$. I_0/I je lineárne závislé na koncentracii zhášača a smernica danej priamky sa rovná Stern-Volmerovej konštante K_{sv} .

7.5 Analýza QDs biokonjugovaných biomolekulou

7.5.1 Analýza pomocou Infinite M200

Analýza vzoriek QDs prebiehala pomocou prístroja Infinite M200 Pro, Tecan. Spomínaný prístroj sa využíva pri mnohých detekciách. Na začiatku boli jednotlivé vzorky ($V = 200 \mu\text{l}$) napipetované na mikrotitačné doštičky NUN 96 a tie boli následne vložené do prístroja. Pri analýze pripravených biokonjugovaných QDs bola použitá excitačná vlnová dĺžka 390 nm. Emitované žiarenie bolo detekované v rozsahu 410-800 nm s krokom 2 nm. Hodnota uzavriery (GAIN) bola nastavená na hodnoty 60 pri QDs a 70 pri vytvorení komplexu QDs-biomolekula.

7.5.2 Analýza pomocou kapilárnej elektroforézy

Ďalšia analýza vzoriek pripravených QDs prebiehala pomocou prístroja 7100 Agilent Technologies s dĺžkou kapiláry 63 cm, efektívnou dĺžkou 43 cm s priemerom kapiláry 75 μm . Dávkovanie prebehlo pod tlakom (100 mbar) počas doby 15 s za použitia separačného napätia 20 kV. Ako elektrolyt zabezpečujúci separáciu bol použitý 20 mM borát sodný ($\text{pH} = 9,2$). Analyzovaný signál bol detekovaný pomocou fluorescence s využitím excitačnej vlnovej dĺžky 488 nm.

8 VÝSLEDKY A DISKUSIA

8.1 Syntéza CdTe QDs

V praktickej časti boli syntetizované CdTe QDs stabilizované glutathionom (GSH). Pri syntéze jadra CdTe bol využitý teluricitan sodný, vďaka ktorému nemusela príprava QDs prebiehať v inertnom prostredí. Príprava QDs prebiehala dvoma metódami pomocou spätného chladiča (refluxu) a hydrotermálnou metódou v autokláve. QDs využívané v ďalšom výskume boli pripravené pomocou refluxu. Pripravené QDs boli následne obalené vrstvou ZnS podľa postupu uvedeného vyššie v kapitole 7.3.2. Ovrstvené QDs sa využívali ku biokonjugácii s vybranými biomolekulami (v tomto prípade BSA a IgG).

8.1.1 CdTe-GSH QDs

CdTe-GSH QDs boli syntetizované 1, 2, 3, 4 hodiny podľa postupu popísaného v kapitole 7.3.1. Na Obr. 24 a Obr. 25 je vidieť tieto QDs pod UV lampou a na dennom svetle. Pod UV lampou je vidieť zmenu spektra QDs z bledej do žiarivo zelenej farby. Na dennom svetle sú QDs žltej farby



Obr. 24 CdTe-GSH syntetizované 1,2,3,4 hodiny pod UV lampou

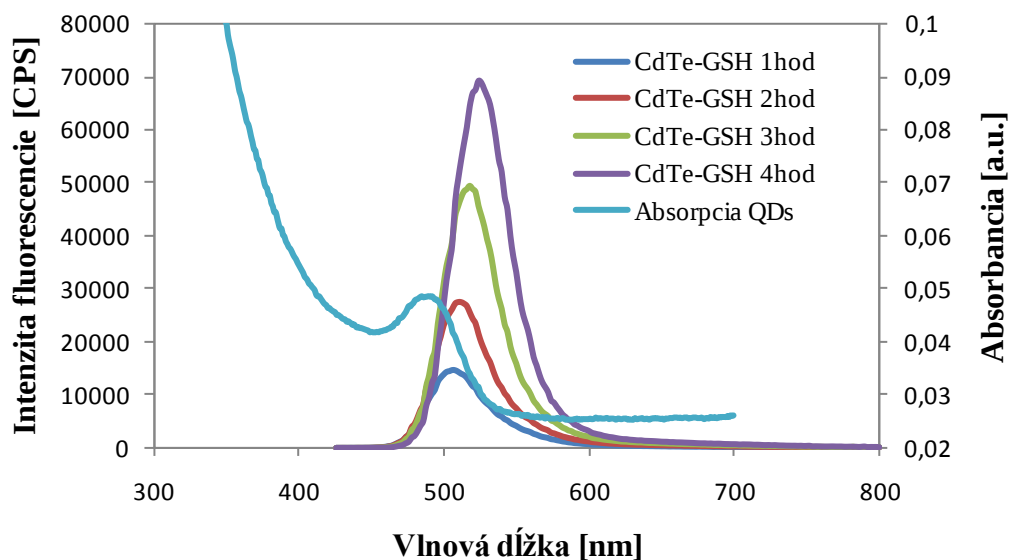


Obr. 25 CdTe-GSH syntetizované 1,2,3,4 hodiny na dennom svetle

Analýza všetkých vzoriek prebiehala pomocou prístroja Infinite M200 Pro, Tecan. Emitované žiarenie bolo detekované v rozsahu 410–800 nm po krokoch 2 nm. Veľkosť závierky bola nastavená na hodnotu 60. V diplomovej práci sú vyhodnocované fluorescenčné spektrá jednotlivých QDs, maximálne intenzity emisii ako aj šírka píku v polovici jeho maxima označovaná FWHM (z anglického „Full width at half maximum“).

Ako prvá bola skúmaná syntéza CdTe-GSH QDs. Pri syntéze QDs boli odoberané vzorky vždy po hodine od doby kedy dosiahli QDs teplotu 95 °C. Na Obr. 26 je vidieť závislosť intenzity emisie na vlnovej dĺžke CdTe-GSH QDs ako aj absorpčné spektrum QDs ($c = 1 \text{ mg/ml}$) získané metódou UV-VIS. CdTe-GSH QDs majú absorpčné maximum 0,0486 pri vlnovej dĺžke 485nm. Táto skutočnosť sa zhoduje z vedeckými predpokladmi pri skúmaní absorpčných vlastností QDs. Vedci zistili, že pri syntéze QDs o teplote 95 °C (čo bolo aj v tomto prípade) QDs vykazovali absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 500 nm [89]. Vzorky skúmané fluorescenčnou spektroskopiou boli odobrané postupne po hodine a následne im bola meraná intenzita emisie pri vlnovej dĺžke excitácie 390 nm. Hodnoty maximálnych emisií vlnových dĺžok boli v rozmedzí od 506 až 524 nm. Maximálne intenzity emisie rástli zo zvyšujúcim sa časom trvania syntézy, čo bolo aj predpokladom. **V Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** sú vypísané parametre maximálnych intenzít fluorescencie QDs, pri akých vlnových dĺžkach emisie boli dosiahnuté a taktiež aj hodnoty FWHM. Je vidieť, že dochádzalo ku posunu spektra QDs ku vyšším vlnovým dĺžkám smerujúcim ku červenej oblasti svetla.. Z hodnôt FWHM a tvaru spektra môžeme tiež určiť, že syntetizované QDs majú úzke symetrické emisné spektrá čo je výhoda pri ďalšej práci s týmito QDs. Najvyššiu intenzitu emisie dosiahla vzorka QDs po štyroch hodinách a to 69094 CPS pri vlnovej dĺžke 524 nm, ktorá sa následne využívala pri

syntéze core/shell QDs.



Obr. 26 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH a absorpčné spektrum pripravených QDs

Tab. 1 Parametre CdTe-GSH QDs

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH 1 hod.	506	14623	48
CdTe-GSH 2 hod.	510	27529	44
CdTe-GSH 3 hod.	518	49234	46
CdTe-GSH 4 hod.	524	69094	46
CdTe-GSH (reflux) $c_{\text{QDs}} = 1 \text{ mg/ml}$	522	48646	46
CdTe-GSH (autokláv) $c_{\text{QDs}} = 1 \text{ mg/ml}$	506	8106	46

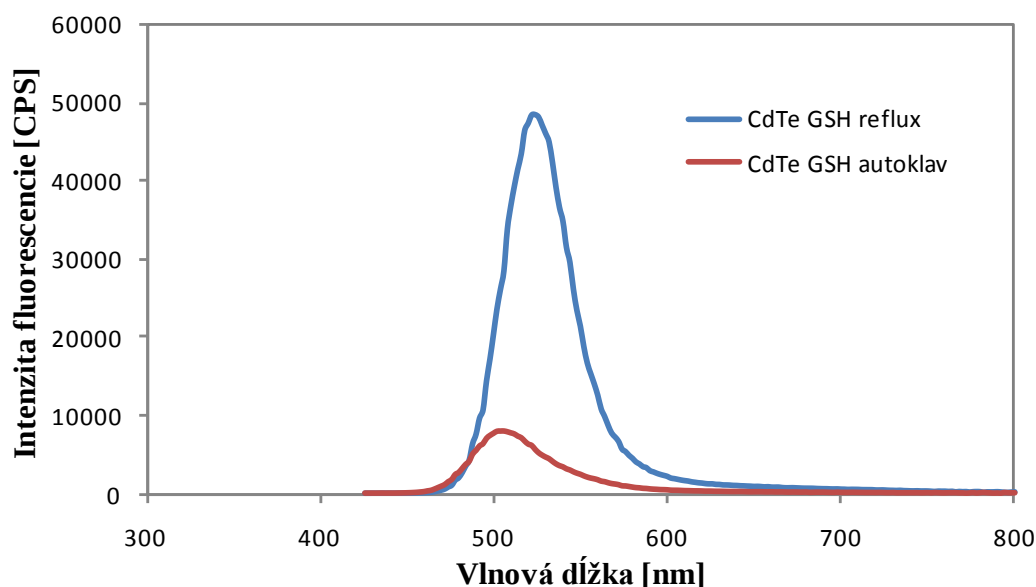
Ako už bolo spomínané vyššie syntéza QDs prebieha dvoma spôsobmi a to zahrievaním s využitím refluxu alebo hydrotermálnou metódou v autokláve. Pri syntéze QDs pomocou refluxu boli QDs syntetizované pri 95 C po dobu 4 hodín.

Pri hydrotermálnej metóde boli QDs syntetizované pri teplote 120°C počas doby 2 hodiny.



Obr. 27 QDs pripravené dvomi metódami vľavo s využitím spätného chladiča vpravo hydrotermálna metóda v autokláve pod UV lampou

Pri pohľade na Obr. 27 a Obr. 28 je vidieť rozdiely výsledných QDs pripravených z rovnakých chemikálií dvoma rôznymi metódami. Skúmané QDs mali koncentráciu 2 mg/ml. Je patrné, že QDs pripravené za pomoci spätného chladiča (refluxu) majú vyššiu intenzitu emisie ako QDs pripravené hydrotermálnou metódou (autoklávom). Maximálna hodnota intenzity emisie pri QDs pripravených pomocou refluxu bola 48646 CPS pri vlnovej dĺžke 522 nm. QDs pripravené hydrotermálnou metódou mali maximálnu intenzitu fluorescence 8106 CPS pri vlnovej dĺžke 506 nm. QDs syntetizované pomocou refluxu mali oveľa vyššiu maximálnu intenzitu emisie a emisné spektrum viac v zelenej oblasti čo je vidieť aj na Obr. 27. Hodnoty FWHM mali QDs rovnaké, z čoho vyplýva, že ich emisné spektrá boli rovnako úzke. Pri porovnaní výsledkov z predpokladmi z vedeckých článkov [90] je patrné, že QDs pripravené v autokláve by mali mať intenzitu fluorescence vyššiu alebo aspoň približne rovnakú ako je intenzita fluorescence QDs syntetizovaných pomocou refluxu. V tomto prípade boli výsledky odlišne takže aj napriek väčšej časovej náročnosti pri príprave QDs pomocou refluxu (4 hodiny) v porovnaní s hydrotermálnou metódou (čas trvania 2 hodiny) sa ukázala táto metóda výhodnejšia a všetky syntetizované QDs, ktoré boli následne obalené a biokonjugované proteínmi boli pripravené touto syntézou.



Obr. 28 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH QDs o koncentrácii 2 mg/ml pripravené pomocou refluxu a v autokláve

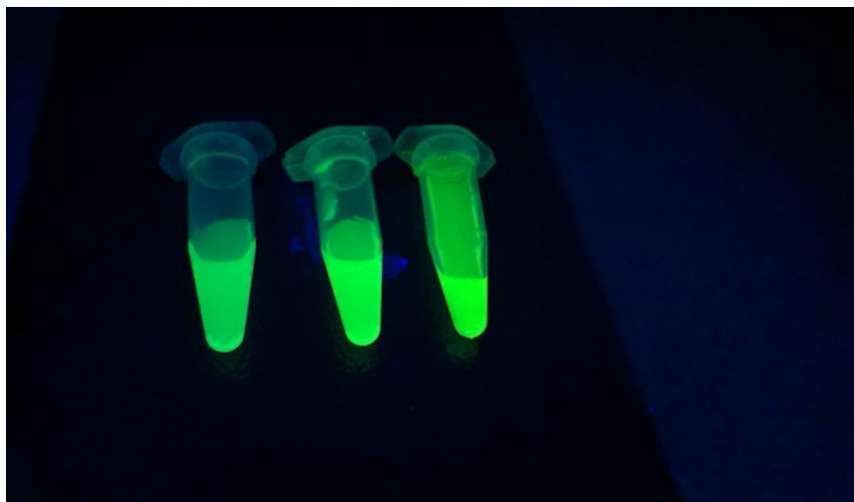
8.2 Syntéza core/shell QDs

V ďalšom kroku boli CdTe-GSH QDs obalené vrstvou ZnS. Pri vytvorení core/shell QDs sa zisťovala rovnako intenzita fluorescence a boli vyhodnotené emisné spektrá QDs. Takto pripravené core/shell QDs boli využité pri biokojugácii s BSA a IgG. Postupy syntézy core/shell QDs sú popísané vyššie v kapitole 7.3.2.

Analýza vzoriek prebiehala ako v predchádzajúcom prípade na prístroji Infinite M200 Pro, Tecan. Použitá excitačná vlnová dĺžka pri získavaní výsledkov bola 390 nm a emitované žiarenie sa detekovalo v rozmedzí 430–800 nm. Veľkosť závierky mala hodnotu 60.

8.2.1 Syntéza CdTe-GSH/ZnS

Na Obr. 29 a Obr. 30 sú zobrazené CdTe-GSH/ZnS pod UV lampou a na dennom svetle. CdTe-GSH/ZnS boli syntetizované 1, 2 a 3 hodiny. Na dennom svetle sú QDs žltej farby. Pod UV lampou je vidieť zmenu spektra QDs zo zelenej do zeleno-žltej farby.



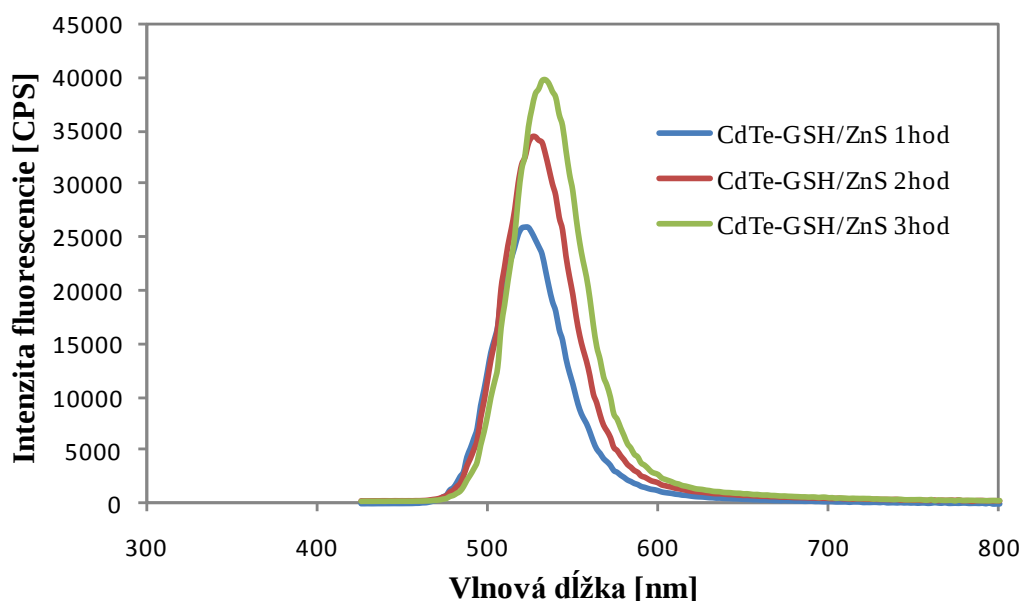
Obr. 29 CdTe-GSH/ZnS syntetizované 1, 2, 3 hodiny pod UV lampou



Obr. 30 CdTe-GSH syntetizované 1, 2, 3 hodiny na dennom svetle

Obr. 31 zobrazuje závislosti intenzity emisie na vlnových dĺžkach u CdTe-GSH QDs obalených vrstvou ZnS. Vzorky boli odoberané vždy po hodine pričom prvá vzorka bola zbraná hodinu od zahriatia roztoku na 95 °C. V Tab. 2 sú priblížené parametre vzoriek. QDs boli excitované svetlom o vlnovej dĺžke 390 nm , pri ktorom maximum intenzity emisie QDs dosiahli pri vlnových dĺžkach v rozmedzí 522–534 nm. Najvhodnejšie QDs na biokonjugáciu boli CdTe-GSH/ZnS po 3 hodinovej syntéze. Tieto QDs dosiahli maximálnu intenzitu fluorescence (39864 CPS) pri vlnovej dĺžke emisie 534 nm. Hodnota FWHM pri skumaných vzorkách bola od 46 do 48 nm. Z výsledných fluorescenčných spektier je vidieť, že core/shell QDs majú úzke a symetrické emisné spektrá. Zo zvyšujúcim sa časom syntézy sa emisné spektrá QDs posúvali smerom ku žltej oblasti. QDs s najvyššou intenzitou emisie (syntetizované 3

hodiny) boli následne využité pri biokonjugácií s vybranými biomolekulami.



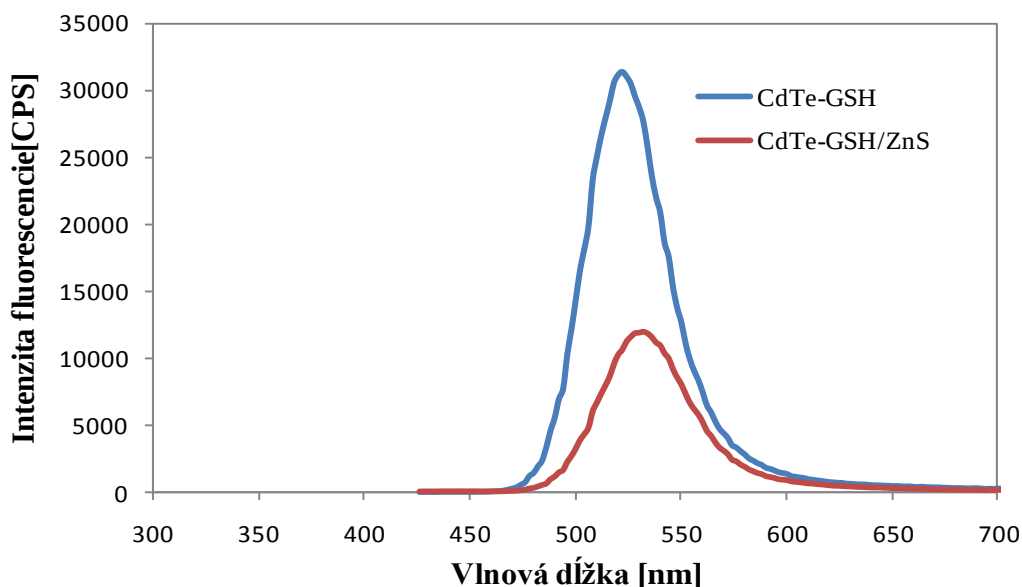
Obr. 31 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH/ZnS

Tab. 2 Parametre CdTe-GSH/ZnS QDs

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie[CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH/ZnS 1 hod.	522	26072	46
CdTe-GSH/ZnS 2 hod.	528	34321	46
CdTe-GSH/ZnS 3 hod.	534	39864	48
CdTe-GSH $c_{QDs} = 1 \text{ mg/ml}$	524	31854	46
CdTe-GSH/ZnS $c_{QDs} = 1 \text{ mg/ml}$	536	12075	48

Pre porovnanie fluorescenčných spektier CdTe-GSH QDs pred a po vytvorení vrstvy ZnS bol vykreslený Obr. 32. Porovnávané QDs mali obe koncentráciu $c = 1 \text{ mg/ml}$. Získané spektrá sú úzke a symetrické. Je vidieť, že QDs sa po obalení znižuje intenzita fluorescencie a dochádza k miernemu posunu spektra emisie do červenej oblasti. Vo väčšine prípadov tomu býva naopak. Zvyčajne obaľovanie QDs zabezpečuje ich lepšie optické vlastnosti a teda zvyšovanie intenzity fluorescencie QDs. Zníženie intenzity emisie u obalených QDs mohlo nastať z dôvodov ako sú nevhodné

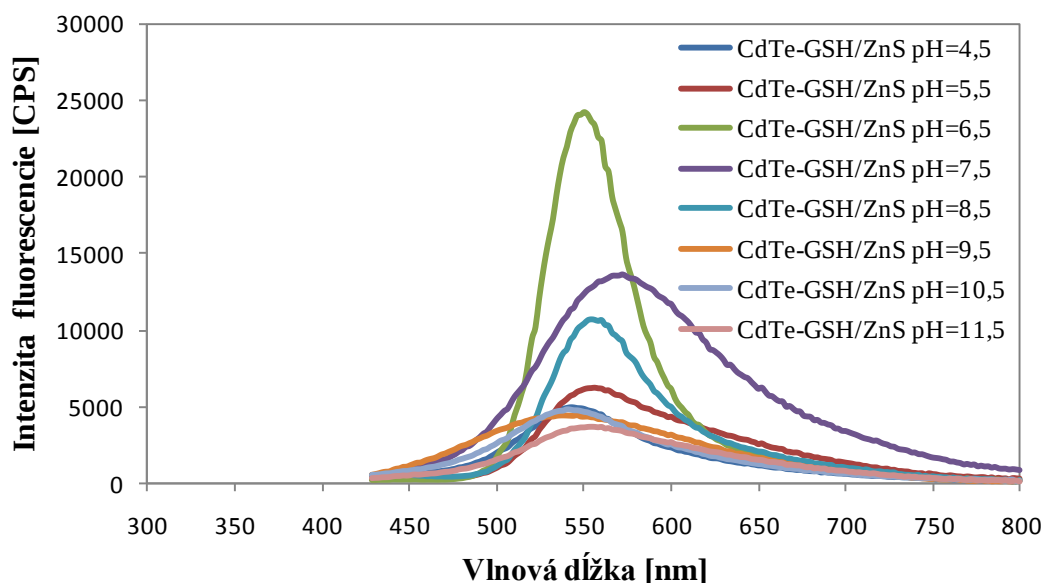
podmienky pri sušení QDs alebo mohlo dôjsť ku kontaminácii vzoriek pri meraní vzoriek. Aj napriek týmto faktom sú CdTe-GSH/ZnS vhodnými adeptami pri biokonjugácii nakoľko majú dostatočne vysokú intenzitu emisie (12075 CPS) a zníženú toxicitu vďaka vytvorenej vrstve ZnS čo je predpokladom z vedeckých článkov [91].



Obr. 32 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH a CdTe-GSH/ZnS s koncentraciami $c = 1 \text{ mg/ml}$

8.2.2 Vplyv pH na CdTe-GSH/ZnS QDs

Pred naväzovaním BSA a IgG na povrch QDs bolo najskôr skúmané najvhodnejšie pH PBS pufru (1 M), ktorý tvorí najvhodnejšie prostredie pre biokonjugácie QDs. pH bolo skúmané na CdTe-GSH/ZnS QDs s koncentraciou $c = 2 \text{ mg/ml}$. pH roztoku QDs je dôležité, nakoľko ovplyvňuje intenzitu emisie QDs. Zo získaného grafu (Obr. 33) je vidieť závislosť intenzity fluorescencie na hodnote pH jednotlivých vzoriek. QDs boli merané pri excitačnej vlnovej dĺžke 390 nm a emitované žiarenie sa detekovalo v rozmedzí 430–800 nm. Veľkosť závierky mala hodnotu 60. QDs dosahujú najvyššie intenzity emisie keď sa nachádzajú v PBS pufoch o hodnotách pH v rozmedzí 6,5–8,5. Tieto výsledky odpovedajú aj predpokladom z vedeckých článkov [31,92]. Z týchto dôvodov boli pri biokonjugáciách QDs s biomolekulou všetky QDs biokonjugované s biomolekulami v pufoch s pH od 6,5 do 8,5.



Obr. 33 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH/ZnS QDs o koncentráciách $c = 2\text{mg/ml}$ uskladnených v PBS pufoch s rôznym pH

8.3 Naväzovanie vybraných biomolekúl na syntetizované QDs

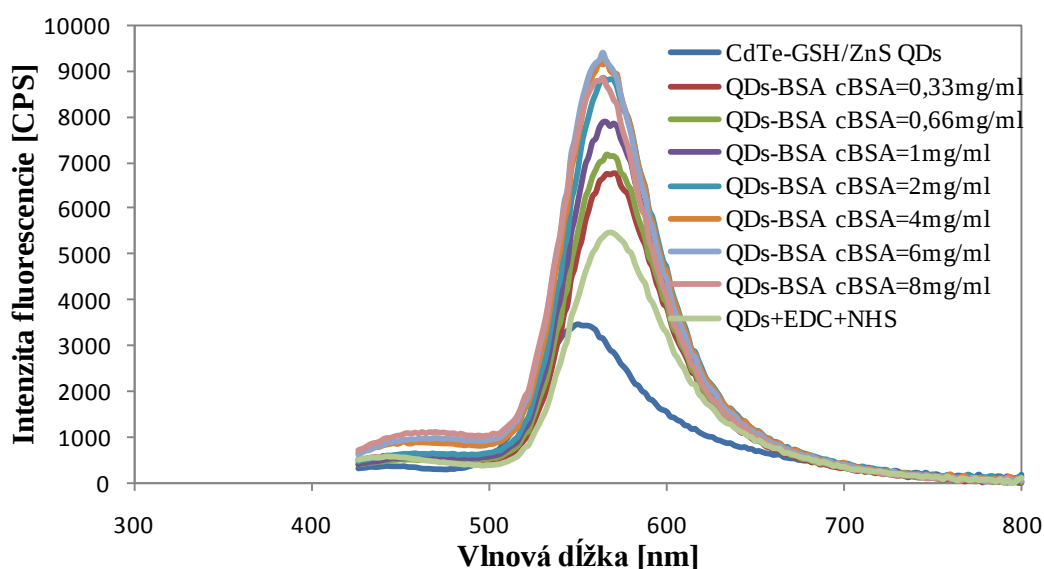
Všetky syntetizované QDs (CdTe-GSH) boli po obalení vrstvou ZnS biokonjugované hovädzím sérovým albumínom (BSA). Konjugácie prebiehali pomocou crosslinkerov EDC, NHS a CDI vďaka ktorým boli na povrch QDs naviazané biomolekuly BSA a IgG. Vytváranie komplexov CdTe/ZnS/BSA a CdTe/ZnS/IgG bolo pomocou troch postupov, ktoré sú popísané v kapitole 7.4.1. Rozdiel medzi nimi je hlavne v rôznych koncentračných pomeroch všetkých látok potrebných k vytvoreniu komplexu a taktiež vo využití rozdielneho crosslinkera.

8.3.1 Naviazanie BSA a IgG na CdTe-GSH/ZnS pomocou crosslinkerov EDC a NHS

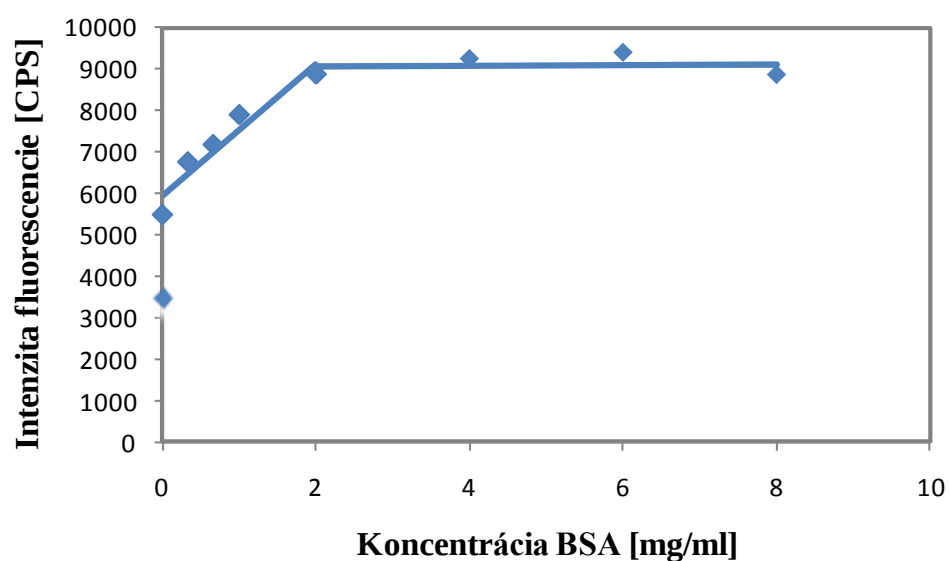
V tejto diplomovej práci boli sledované zmeny intenzity emisie QDs spôsobené biokonjugáciou QDs s rôznymi koncentráciami BSA. Pri interakciách CdTe-GSH/ZnS s BSA boli zaznamenávané fluorescenčné spektrá. Väzby medzi QDs a biomolekulou boli vytvorené vďaka crosslinkerom EDC a NHS, ktoré s karboxylovými skupinami na povrchu QDs vytvoria medziprodukty, na ktoré sa následne naväzujú amidové väzby z povrchu biomolekúl. Analýza všetkých vzorkov prebiehala na prístroji Infinite M200 Pro, Tecan. Excitačná vlnová dĺžka bola 390 nm hodnota závierky bola zvýšená na 70.

8.3.1.1 Naviazanie BSA na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 6,5

QDs biokonjugácia s rôznymi koncentráciami BSA prebiehala pri pH = 6,5. Koncentrácie BSA boli $c = 0,33, 0,66, 1, 2, 4, 6, 8$ mg/ml. Na Obr. 34 sú zobrazené spektrá CdTe-GSH/ZnS QDs ($c = 0,33$ mg/ml), ktoré majú modifikovaný povrch pomocou crosslinkerov EDC a NHS a následne je na ne vďaka tejto modifikácii naviazaná biomolekula BSA. Po naviazaní crosslinkerov sa intenzita fluorescence QDs zvýšila o 2004 CPS. Pri skúmaní vplyvu rôznych koncentrácií BSA na intenzitu emisie QDs (Tab. 3) je vidieť, že pri nižších koncentráciách BSA intenzita emisie QDs lineárne rastie až po koncentraciu BSA $c = 2$ mg/ml, potom dochádzalo ku stagnácii a pri vyšších koncentráciách nad 6 mg/ml dochádza ku miernemu poklesu intenzity emisie. Táto skutočnosť sa dá odôvodniť faktom, že pri syntéze QDs sa vytvárajú na povrchu jednotlivých QDs defektov, ktoré sa pri biokonjugácii s nižšou koncentráciou biomolekuly zacelia čím zvýšia intezitu emisie QDs a následne po naviazaní na zacelený povrch QDs biomolekuly dochádza ku znižovaniu intenzity emisie. Z výsledných spektier možno vidieť, že maximálnu intenzitu emisie (9388) dosiahli QDs interagujúce s BSA o koncentracii $c = 6$ mg/ml. Pri zvýšení koncentrácie BSA na $c = 8$ mg/ml QDs začali postupne znižovať intenzitu emisie o 538 CPS. Samotné QDs ($c=0,33$ mg/ml) vykazovali intenzitu emisie 3471 pri vlnovej dĺžke 550 nm. QDs sa po pridaní crosslinkerov EDC a NHS zvýšila maximálna intenzita emisie na hodnotu 5475 CPS. Hodnoty FWHM QDs boli v rozmedzí od 60 do 72 nm. Fluorescenčné spektrá sú širšie ako tomu bolo v prípade nekonjugovaných core a core/shell QDs.



Obr. 34 Fluorescenčné spektrá CdTe-GSH/ZnS QDs biokonjugovaných s BSA s rôznymi koncentráciami pri pH 6,5



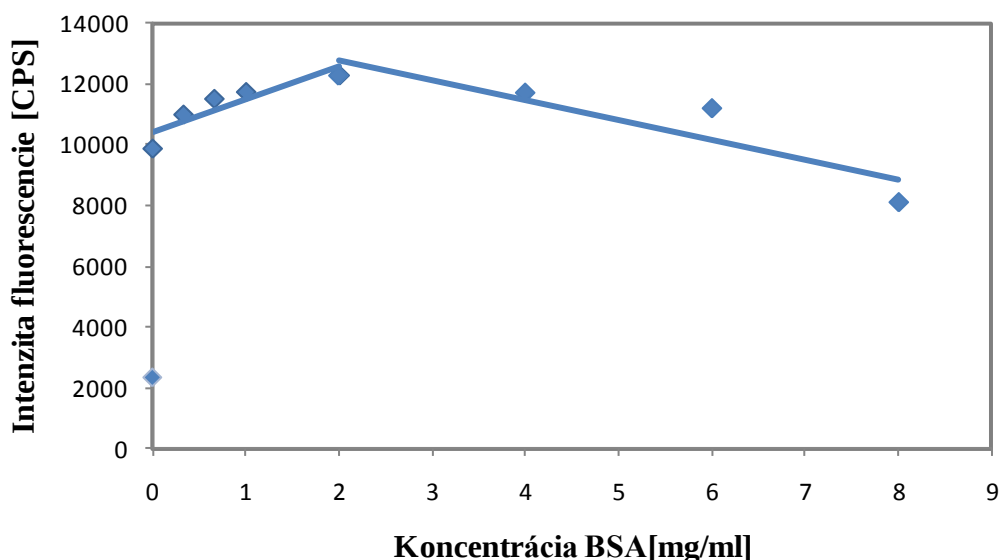
Obr. 35 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA

Tab. 3 Parametre CdTe-GSH/ZnS/BSA pri pH pufru 6,5

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH/ZnS QDs	550	3471	72
QDs+EDC+NHS	570	5475	54
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,33 \text{ mg/ml}$	570	6750	64
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,66 \text{ mg/ml}$	566	7168	62
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 1 \text{ mg/ml}$	566	7890	60
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 2 \text{ mg/ml}$	564	8868	62
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 4 \text{ mg/ml}$	566	9237	62
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 6 \text{ mg/ml}$	564	9388	60
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/ml}$	564	8850	60

8.3.1.2 Naviazanie BSA na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 7,5

Ďalej bola skúmaná rovnaká závislosť vzhľadom na zmenu pH PBS pufru. V tomto prípade mal pufr, v ktorom boli rozpustené skúmané QDs hodnotu pH= 7,5. Pri zvyšovaní pH PBS pufru, ktorý zabezpečuje prostredie pre biokonjugáciu dochádzalo ku znižovaniu intenzity emisie QDs už pri nižšej koncentrácii BSA. Ako je vidieť z grafu a tabuľky (Tab. 4 a Obr. 36) kvantové bodky, ktoré mali pôvodne nižšiu intenzitu fluorescencie (2324 CPS) ako to bolo u QDs s pH 6,5 pri vytváraní komplexu QDs-BSA zvyšovali svoju maximálnu intenzitu emisie (11735 CPS). Na povrch QDs sa najskôr naväzujú EDC a NHS, pri ktorých sa intenzita emisie QDs zvyšuje z 2324 CPS na 9850 CPS a dochádza ku zužovaniu fluorescenčného spektra QDs. Na začiatku pri naväzovaní biomolekuly (o nízkych koncentráciách) na povrch QDs dochádzalo ku zvyšovaniu maximálnej hodnoty emisie z 9850 CPS na 11735 CPS a následne po prekročení koncentrácie interagujúceho BSA o 2 mg/ml sa intenzita emisie znižovala a znížila sa až na hodnotu 8106 CPS pri koncentrácii BSA 8 mg/ml. Hodnoty FWHM získaných vzoriek boli v rozmedzí 56-98 nm. Hodnotu FWHM rovnú 98 nm mali samotné QDs. Z toho vyplýva, že sa ich emisné spektrum výrazne rozšírilo pri zvýšení pH pufru. Emisné spektrá konjugovaných QDs sú rovnako úzke ako tomu bolo pri konjugovaných QDs s pH 6,5.



Obr. 36 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA

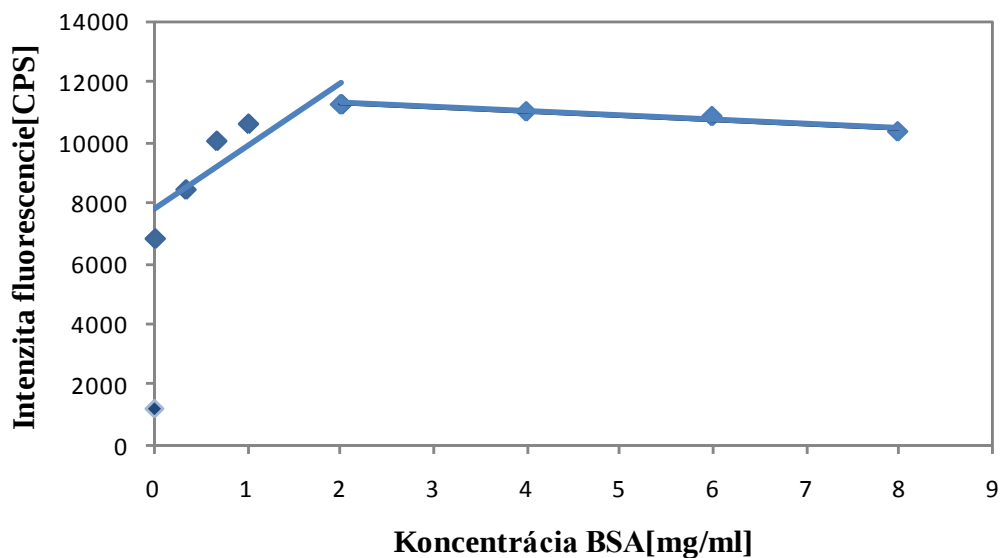
Tab. 4 Parametre CdTe-GSH/ZnS/BSA pri pH pufru 7,5

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	552	2324	98
QDs+EDC+NHS	566	9850	54
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,33 \text{ mg/ml}$	562	10991	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,66 \text{ mg/ml}$	562	11518	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 1 \text{ mg/ml}$	564	11748	58
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 2 \text{ mg/ml}$	560	12304	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 4 \text{ mg/ml}$	560	11735	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 6 \text{ mg/ml}$	558	11220	54
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 8 \text{ mg/ml}$	564	8106	56

8.3.1.3 Naviazanie BSA na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 8,5

Pri skúmaní závislosti vytvárania komplexu QDs-BSA a pH prostredia, kde prebieha biokonjugácia bolo ako posledné skúmané prostredie s pH = 8,5. Po zvýšení pH pufru na 8,5 sa hodnoty intenzity emisie opäť zmenili nakoľko došlo aj ku zmene prostredia biokonjugácie QDs a BSA. Pri pohľade na Obr. 37 a z neho získanej tabuľky parametrov (Tab. 5) je vidieť, že zo zvyšujúcim sa pH prostredia sa znižuje intenzita emisie nekonjugovaných QDs. Po naviazaní EDC a NHS na povrch QDs dochádza ku zvýšeniu intenzity emisie QDs. Priebeh pri biokonjugácii QDs a BSA je nasledovný, najskôr došlo ku zvýšeniu intenzity emisie QDs a to z 1184 CPS na hodnotu 11279 CPS po biokonjugácii s BSA o koncentráciách 0,33; 0,66; 1; 2 mg/ml. Následne pri vyšších koncentráciách BSA dochádzalo ku veľmi miernemu poklesu intenzity emisie na výslednú hodnotu 10 365 CPS nameranú pri vlnovej dĺžke 560 nm pri biokonjugácii QDs a BSA s koncentráciou 8 mg/ml. Z výsledkov sa dá vyvodiť záver, že pre biokonjugáciu QDs a BSA je najlepšie prostredie s hodnotou pH 6,5. FWHM hodnoty QDs boli v rozmedzí 58-62 nm až na samotné nekonjugované QDs, ktoré mali

hodnotu FWHM 132 nm. Z týchto hodnôt môžeme vyvodiť záver, že nekojugovaným QDs sa so zvyšujúcim pH ich emisné spektrum rapídne rozširuje. Po naviazaní na QDs biomolekuly sa emisné spektrum QDs zužuje späť do normálnych hodnôt.



Obr. 37 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA

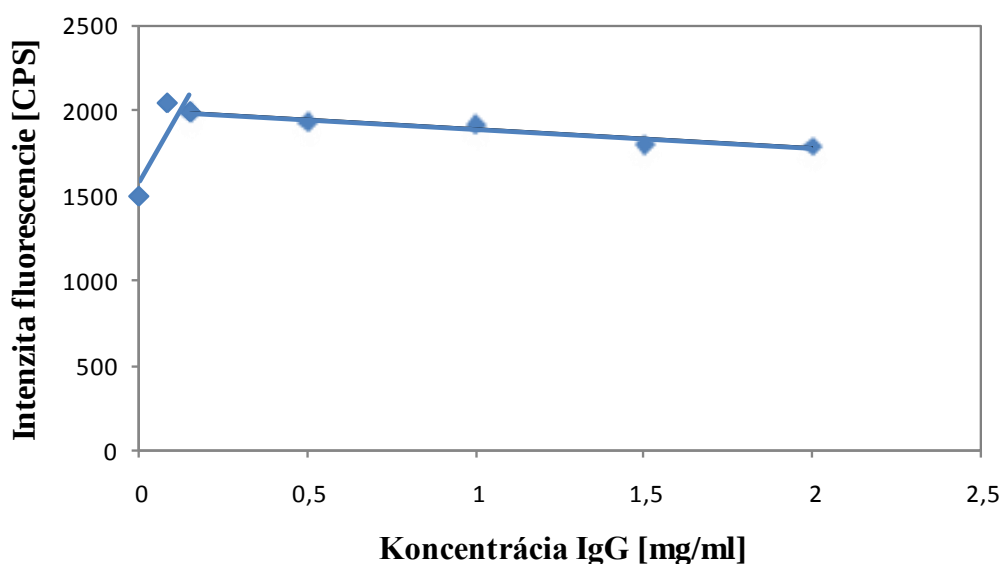
Tab. 5 Parametre CdTe-GSH/ZnS/BSA pri pH pufru 8,5

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	554	1184	132
QDs+EDC+NHS	570	6791	62
QDs-BSA $c_{BSA} = 0,33$ mg/ml	568	8430	60
QDs-BSA $c_{BSA} = 0,66$ mg/ml	566	10056	58
QDs-BSA $c_{BSA} = 1$ mg/ml	566	10629	60
QDs-BSA $c_{BSA} = 2$ mg/ml	566	11279	62
QDs-BSA $c_{BSA} = 4$ mg/ml	564	11041	60
QDs-BSA $c_{BSA} = 6$ mg/ml	562	10879	62

QDs-BSA $c_{BSA} = 8 \text{ mg/ml}$	560	10365	60
--	-----	-------	----

8.3.1.4 Naviazanie IgG na QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS pri pH = 8

V ďalšej časti práce bol skúmaný vplyv rôznych koncentrácií IgG na intenzitu emisie CdTe-GSH/ZnS QDs. Pri biokonjugácií QDs s IgG boli skúmané rovnaké závislosti ako v predošlých biokonjugáciách QDs s BSA s jedným rozdielom a to, že koncentrácie IgG sú nižšie (0,083; 0,15; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/ml) v porovnaní s koncentraciami BSA. Pri pohľade na parametre (Tab. 6) získané z fluorescenčných spektier zobrazených na Obr. 38 je vidieť, že QDs po biokonjugácií u malým množstvom IgG zvyšujú intenzitu emisie ale následne po prekročení koncentrácie $c = 0,15 \text{ mg/ml}$ dochádza ku veľmi miernemu lineárnemu znižovaniu intenzity emisie QDs. Pôvodné QDs, ktoré boli následne konjugované mali maximálnu intenzitu emisie 1502 CPS. Po vytvorení komplexu s IgG ($c = 0,083 \text{ mg/ml}$) dochádza ku zvýšeniu intenzity emisie na hodnotu 2046 CPS. Výsledná hodnota maximálnej intenzity emisie bola 1794 CPS pri vlnovej dĺžke 570 nm nameraná po vytvorení komplexu QDs-IgG pričom koncentrácia IgG bola $c=2 \text{ mg/ml}$. FWHM hodnoty boli v rozmedzí 74–88 nm až na pôvodné QDs ktoré mali hodnotu FWHM rovnú 110 nm. Emisné spektrá samotných QDs boli relatívne široké. Pri biokonjugácií dochádzalo k zúženiu emisných spektier QDs a taktiež ku posunu týchto spektier v žltej oblasti smerom ku červenej.



Obr. 38 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG

Tab. 6 Parametre CdTe-GSH/ZnS/IgG pri pH pufru 8

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	550	1502	110
QDs-IgG $c_{IgG} = 0,083$ mg/ml	564	2046	88
QDs-IgG $c_{IgG} = 0,15$ mg/ml	568	1995	80
QDs-IgG $c_{IgG} = 0,5$ mg/ml	570	1940	78
QDs-IgG $c_{IgG} = 1$ mg/ml	566	1921	78
QDs-IgG $c_{IgG} = 1,5$ mg/ml	566	1807	74
QDs-IgG $c_{IgG} = 2$ mg/ml	570	1794	78

8.3.2 Naviazanie BSA a IgG na CdTe-GSH/ZnS pomocou crosslinkera CDI

Pri vytváraní komplexu podľa postupu opísaného v kap. 7.4.2 boli na povrch QDs naviazané biomolekuly BSA a IgG. Doba prípravy komplexu bola 2,5 hodiny. Bol študovaný vplyv koncentrácie CDI pri vytváraní komplexu QDs-biomolekula. Práca je zameraná na skúmanie fluorescenčných spektier QDs, na ktoré boli naviazané biomolekuly BSA a IgG s rôznymi koncentráciami. Celá syntéza komplexu QDs-biomolekula prebiehala v prostredí s pH 8. Toto pH bolo zvolené z dôvodu, že pri skúmaní naväzovania biomolekuli na povrch QDs pomocou CDI sa zistilo, že pri pH = 8 dochádza ku najlepšej biokonjugácii QDs s vybranými biomolekulami. QDs mali vo všetkých syntézach koncentráciu $c = 1$ mg/ml.

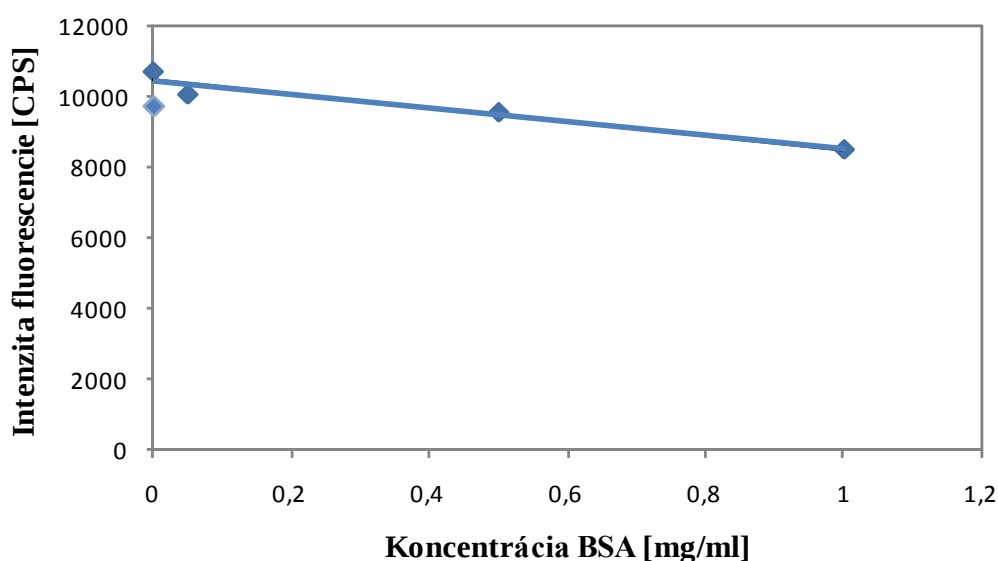
8.3.2.1 Naviazanie BSA na QDs pomocou 10 mM CDI crosslinkera

V tejto časti práce bol ku QDs o koncentracii 1 mg/ml pridaný 10 mM CDI crosslinker, na ktorý bolo naviazané BSA o koncentráciách 0,05; 0,5; 1 mg/ml. Fluorescenčné spektrá QDs zobrazené na

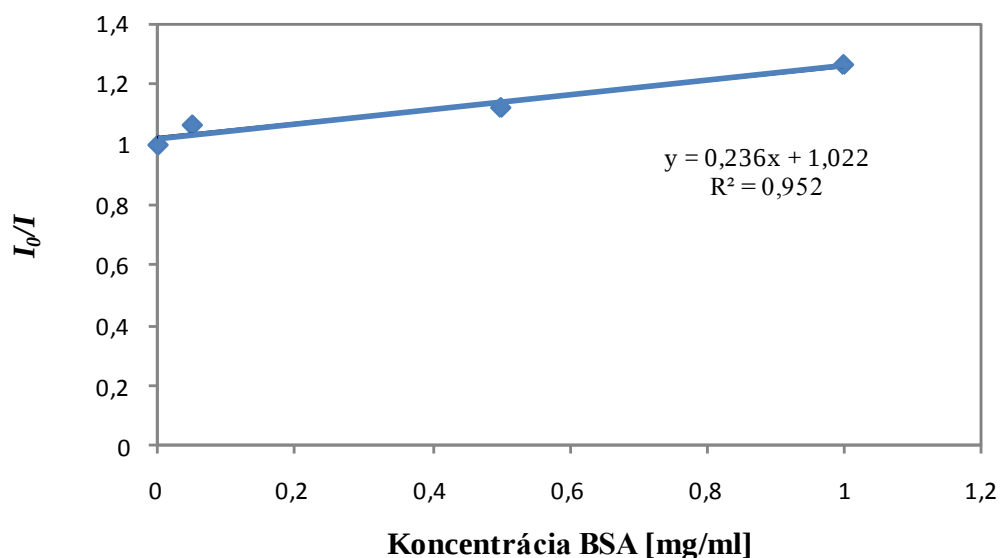
Obr. 39 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** ukazujú lineárnu závislosť intenzity fluorescencie QDs na koncentracii BSA. Pri spojení QDs s crosslinkerom CDI došlo ku

miernemu zníženiu intenzity fluorescence QDs o 1008 CPS. Po pridaní biomolekuly o koncentrácií 0,05 mg/ml došlo k zhášaniu intenzity emisie o 660 CPS. Po pridaní BSA o koncentrácii 0,5 mg/ml bola intenzita fluorescence znížená na hodnotu 9570 CPS a pri dvojnásobnej koncentrácii BSA pridaného do roztoku QDs s CDI došlo ku zníženiu skúmanej intenzity emisie na hodnotu 8497 CPS. Skúmané vzorky mali hodnotu FWHM v rozmedzí 52–56 nm až na samotné QDs, ktoré mali hodnotu FWHM rovnú 100 nm. Z tohto sa dá povedať, že samotné QDs pri pH 8 majú relatívne široké spektrum a pri naväzovaní biomolekuly ale taktiež už aj pri spojení QDs s crosslinkermi sa ich emisné spektrá zúžia. Všetky popísané skutočnosti sú zhrnuté v Tab. 7.

Na ďalšom obrázku (Obr. 40) je zobrazená Stern-Volmer závislosť zhášania fluorescence CdTe-GSH/ZnS QDs pri rôznych koncentráciách BSA pričom biokonjugácia vznikla pomocou crosslinkerak CDI o koncentrácií $c = 10$ mg/ml. Z grafu je vidieť, že ide o lineárnu závislosť pri BSA s koncentraciám 0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml. Rovnica regresie skúmanej závislosti je $y = 0,236x + 1,022$ a determinančný koeficient je $R^2 = 0,952$. Smernica danej priamky predstavuje zhášaciu konštantu K_{SV} . Lineárna krivka predstavuje statické zhášanie nakoľko zisťované hodnoty ležia na lineárnej priamke.



Obr. 39 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 10mM CDI



Obr. 40 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 10 mM CDI

Tab. 7 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/BSA vytvoreného pomocou 10 mM crosslinkera CDI

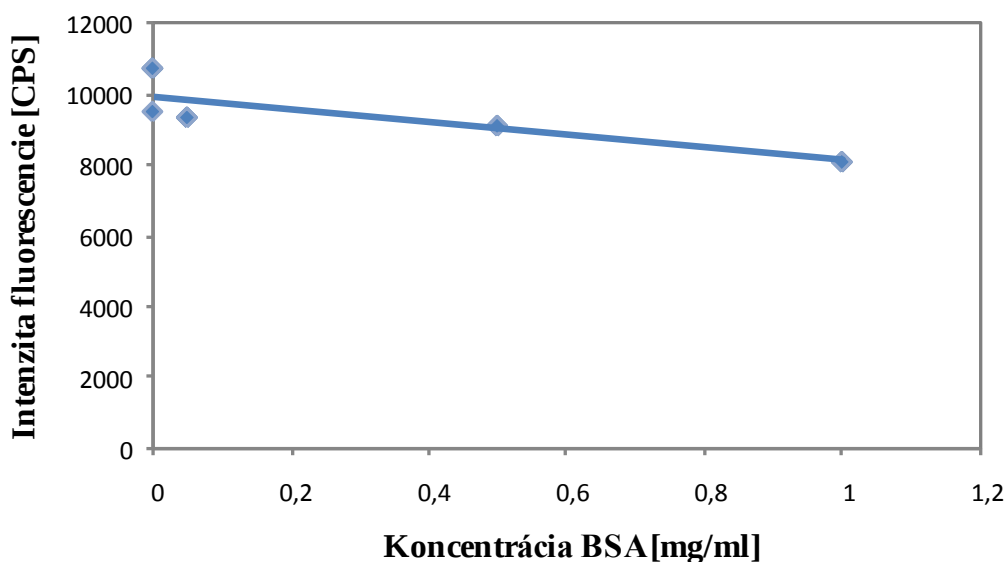
Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+10 mM CDI	546	9738	54
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,05$ mg/ml	544	10086	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,5$ mg/ml	544	9570	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 1$ mg/ml	546	8497	52

8.3.2.2 Naviazanie BSA na QDs pomocou 20 mM CDI crosslinkera

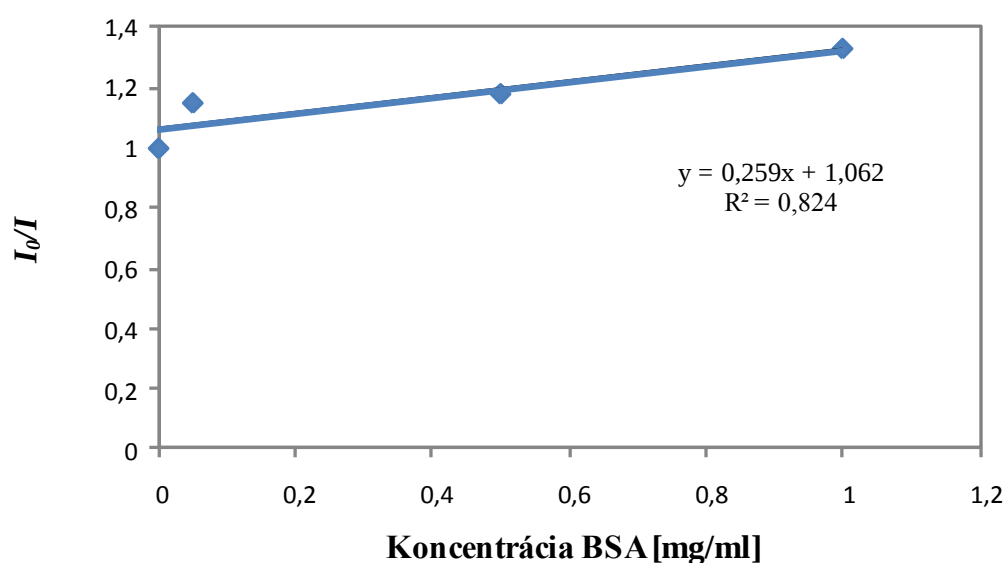
Vytváranie komplexu QDs-BSA bolo následne prevedené pomocou 20 mM CDI. Na grafe (Obr. 41) a taktiež aj z parametrov v tabuľke Tab. 8 je vidieť lineárnu závislosť intenzity fluorescence QDs na koncentrácií biomolekuly. QDs mali výslednú koncentráciu 1 mg/ml a intenzitu emisie 10746 CPS pri vlnovej dĺžke 546 nm po pridaní 20 mM CDI sa znížila intenzita fluorescence na hodnotu 9527 CPS. Po pridaní BSA o koncentrácií 0,05 mg/ml došlo ku zhášaniu intenzity fluorescence o 1416 CPS,

po pridaní BSA o koncentrácií 0,5 mg/ml bol úbytok intenzity fluorescence o 1619 CPS a výsledný komplex QDs-BSA pri koncentrácií BSA 1 mg/ml mal nižšiu intenzitu fluorescence oproti nekonjugovaným QDs o 2636 CPS. Hodnoty FWHM boli u všetkých vzoriek 56 nm okrem vzorky QDs biokonjugovaných spoločne s 1mg/ml BSA a taktiež pri pôvodných QDs. Tieto vzorky mali hodnotu FWHM 58 nm a 100 nm. Z hodnôt FWHM sa dá povedať, že biokonjugované QDs majú úzke emisné spektrá ale pôvodné nekonjugované QDs majú emisné spektrá široké.

Na Obr. 42 je vidieť Stern-Volmerova závislosť QDs pri biokonjugácii s rôznymi koncentraciám BSA za prítomnosti 20 mM CDI. Ide o lineárne stúpajúcu intenzitu fluorescence po pridaní BSA o koncentraciách 0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml. Rovnica regresie bola $y = 0,259x + 1,062$ a determinačný koeficient je rovný $R^2=0,824$.



Obr. 41 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 20mM CDI



Obr. 42 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 20 mM CDI

Tab. 8 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/BSA vytvoreného pomocou 20 mM crosslinkera CDI

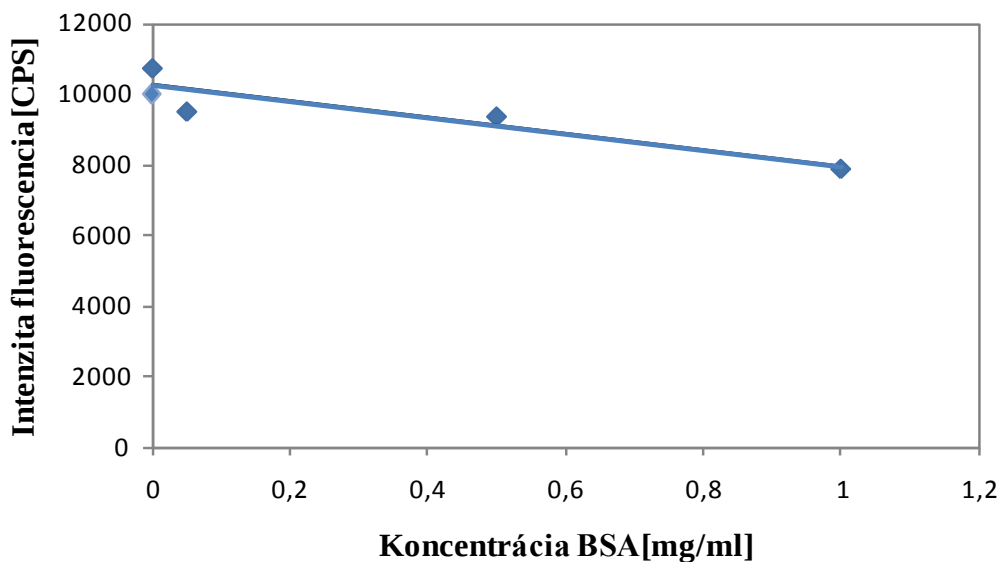
Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+20 mM CDI	544	9527	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,05$ mg/ml	546	9362	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,5$ mg/ml	546	9127	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 1$ mg/ml	544	8110	58

8.3.2.3 Naviazanie BSA na QDs pomocou 30 mM CDI crosslinkera

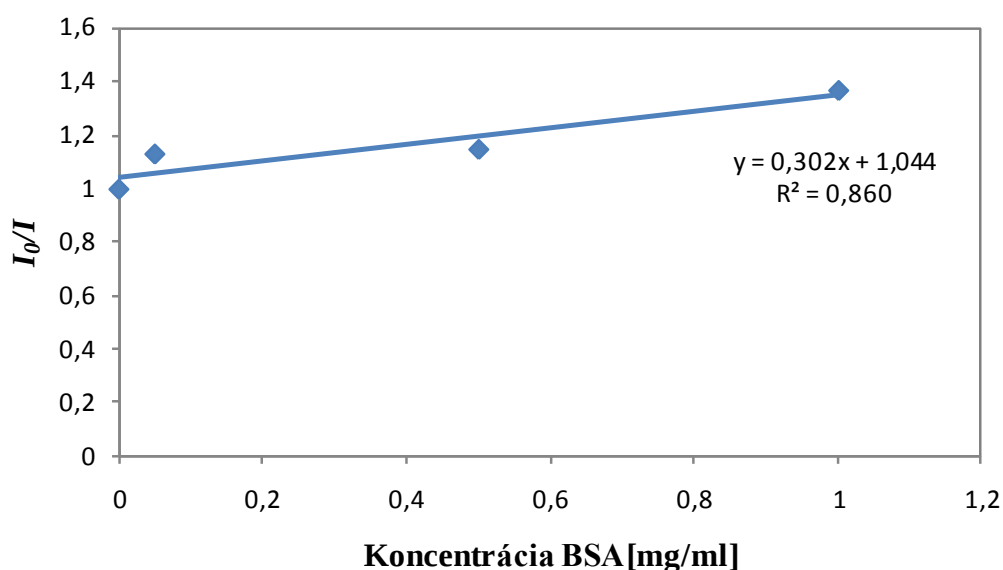
Pri skúmaní vytvárania komplexu QDs-BSA v závislosti na rôzne koncentrácie CDI boli vytvárané väzby aj vďaka 30 mM CDI. Intenzity fluorescence QDs s koncentráciou 1 mg/ml pri využití 30 mM CDI boli znova lineárne znižované vplyvom zvyšovania koncentrácie BSA (Obr. 43). Po pridaní 30 mM CDI do QDs bola intenzita fluorescence QDs znížená o 1088 CS. QDs po pridaní BSA o koncentrácií 0,05 mg/ml znížili svoju intenzitu fluorescence z 10746 CPS na 9506 CPS. BSA

o koncentrácií 0,5 mg/ml znížilo intenzitu emisie QDs o 382 CPS. Posledná skúmaná koncentrácia BSA vplývajúca na intenzitu fluorescence bola rovná 1 mg/ml. Takéto množstvo BSA znížilo intenzitu fluorescence o 2879 CPS. Hodnoty FWHM boli v rozmedzí 56–60 nm. Nekongugované QDs mali hodnotu FWHM 100 nm, čo znamená, že mali široké emisné spektrum, ktoré sa po naviazaní crosslinkerov a biomolekuly optimalizovalo na úzke emisné spektrum. Všetky popísané hodnoty sú uvedené v Tab. 9.

Stern-Volmerova závislosť QDs pri biokonjugácii s BSA o rôznych koncentráciách 0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml je zobrazená na Obr. 44. Biokonjugácia QDs a BSA prebiehala za prítomnosti 30 mM CDI. Je vidieť, že ide o lineárne stúpajúcu závislosť po pridaní jednotlivých koncentráciách QDs. Rovnica regresie v tomto prípade bola $y = 0,302x + 1,044$ a determinančný koeficient bol $R^2 = 0,860$.



Obr. 43 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 30mM CDI



Obr. 44 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 30 mM CDI

Tab. 9 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/BSA vytvoreného pomocou 30 mM crosslinkera CDI

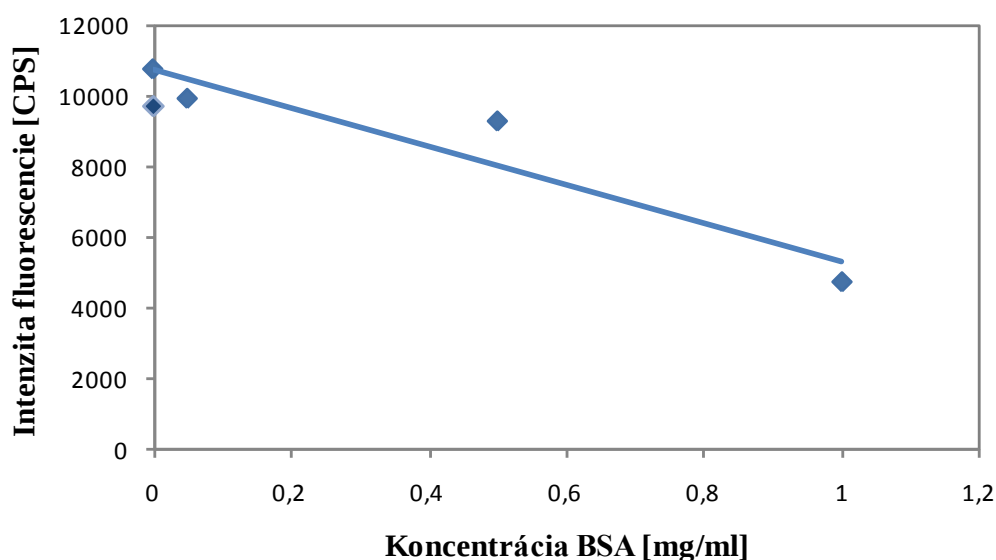
Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+30 mM CDI	546	9658	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,05$ mg/ml	546	9506	56
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 0,5$ mg/ml	542	9364	58
QDs-BSA $c_{\text{BSA}} = 1$ mg/ml	544	7867	60

8.3.2.4 Naviazanie BSA na QDs pomocou 40 mM CDI crosslinkera

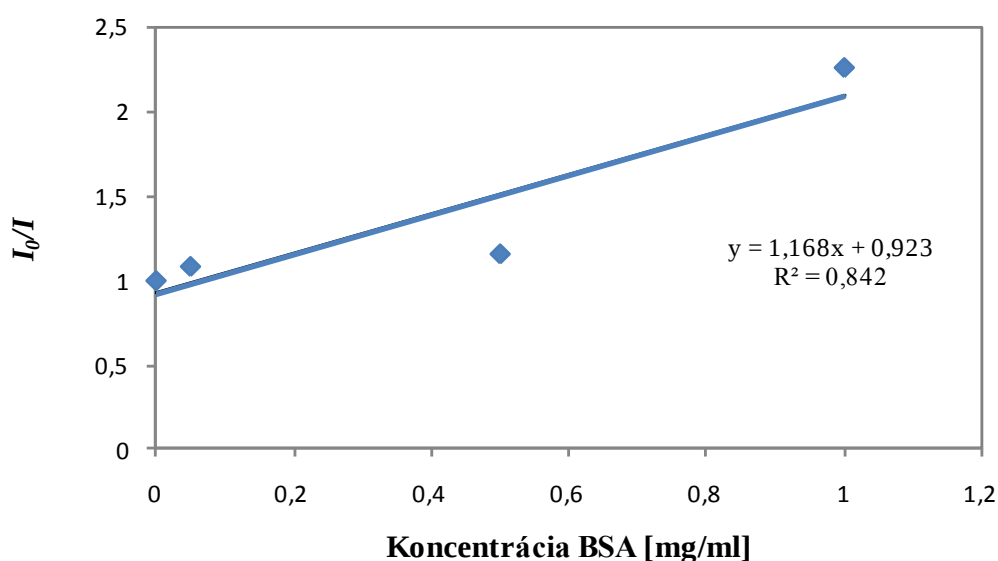
Posledná koncentrácia crosslinkera vytvárajúceho väzby medzi QDs a BSA bola 40 mg/ml CDI. Pri skúmaní komplexu QDs-BSA vytvoreného pomocou CDI bolo zistené, že zvyšujúca koncentrácia BSA naviazaného na povrch QDs spôsobovala lineárne zhášanie intenzity emisie CdTe-GSH/ZnS. Pri pohľade na Obr. 45 a Tab. 10 je vidieť zníženie intenzity emisie QDs z 10746 CPS pri vlnovej dĺžke 546 nm na intenzitu

emisie 4755 CPS pri rovnakej vlnovej dĺžke. Zníženie intenzity emisie na túto hodnotu spôsobuje BSA s koncentráciou $c = 1 \text{ mg/ml}$. QDs v spojení s 40 mM CDI znížili intenzitu fluorescence QDs na hodnotu 10018 CPS. Výsledné vzorky mali hodnoty FWHM v rozmedzí 54-62 nm až na nekonjugované QDs, ktoré mali túto hodnotu rovnú 100 nm. Všetky konjugované QDs mali úzke emisné spektrá. Nekonjugované QDs mali emisné spektrum široké. Spektrá skúmaných vzoriek sa posúval smerom ku červenej oblasti spektra čo znamená, že vlnové dĺžky emisných spektier QDs sa zvyšovali.

Stern-Volmerova závislosť QDs s rôznymi koncentraciám BSA (0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml) spojenými pomocou 40 mM CDI je zobrazené na Obr. 46. Zisťovaná závislosť bola lineárne stúpajúca. Rovnica regresie bola $y = 1,168x + 0,923$ a determinačný koeficient sa rovnal $R^2 = 0,842$.



Obr. 45 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie BSA pri využití 40mM CDI



Obr. 46 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 40 mM CDI

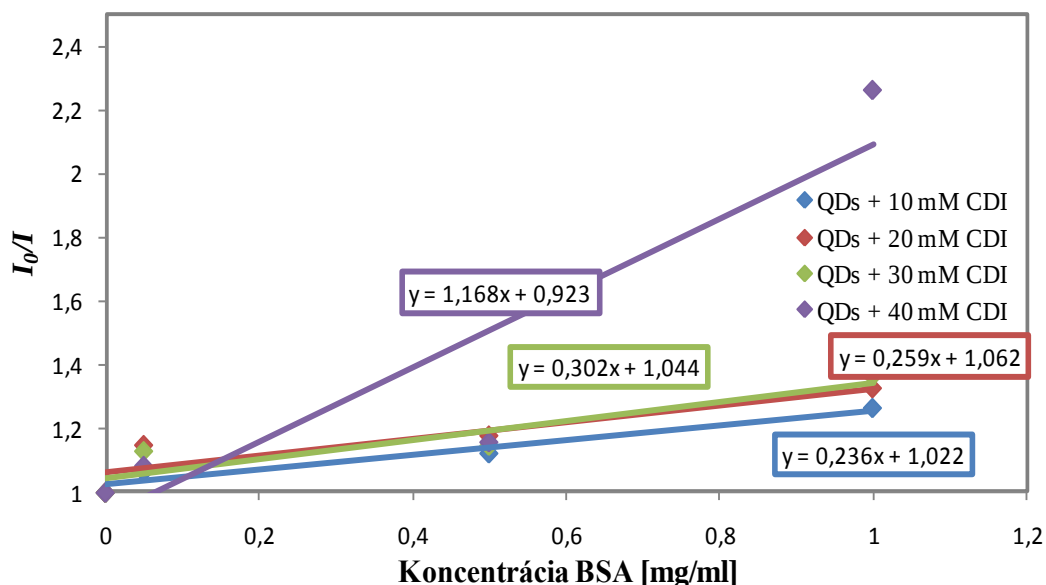
Tab. 10 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/BSA vytvoreného pomocou 40 mM crosslinkera CDI

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+40 mM CDI	544	10018	54
QDs-BSA $c_{BSA} = 0,05$ mg/ml	546	9916	56
QDs-BSA $c_{BSA} = 0,5$ mg/ml	544	9279	56
QDs-BSA $c_{BSA} = 1$ mg/ml	546	4755	62

8.3.2.5 Naviazanie BSA na QDs pomocou 10–40 mM CDI crosslinkerov

Pri biokonjugácii QDs s biomolekulou je veľmi dôležitou súčasťou crosslinker, ktorý zabezpečuje vytvorenie väzby. V tomto prípade to bol CDI s rôznymi koncentraciami. Pri pohľade na Obr. 47 je vidieť závislosti naviazania biomolekuly (BSA) na povrch QDs pri rôznych koncentráciách pridaného CDI. Z grafu vyplýva, že pri biokonjugácii s použitím crosslinkera 10–30 mM CDI dochádza len k veľmi miernemu lineárnemu zhášaniu QDs v závislosti na zvyšujúcej sa koncentrácii BSA. 40

mM CDI ako jediný zapríčinil viditeľné lineárne zhášanie intenzity fluorescence QDs a to pri použití BSA o koncentrácií 1 mg/ml. Z výsledkov vyplýva, že vytváranie komplexu QDs-BSA sa uskutočňuje pri 40 mM CDI pričom koncentrácie BSA aj QDs musí byť minimálne 1:1 čo vyplýva aj z predpokladov [33].



Obr. 47 Stern-Volmerove závislosti zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách BSA za prítomnosti 10–40 mM CDI

8.3.2.6 Naviazanie IgG na QDs pomocou CDI crosslinkera

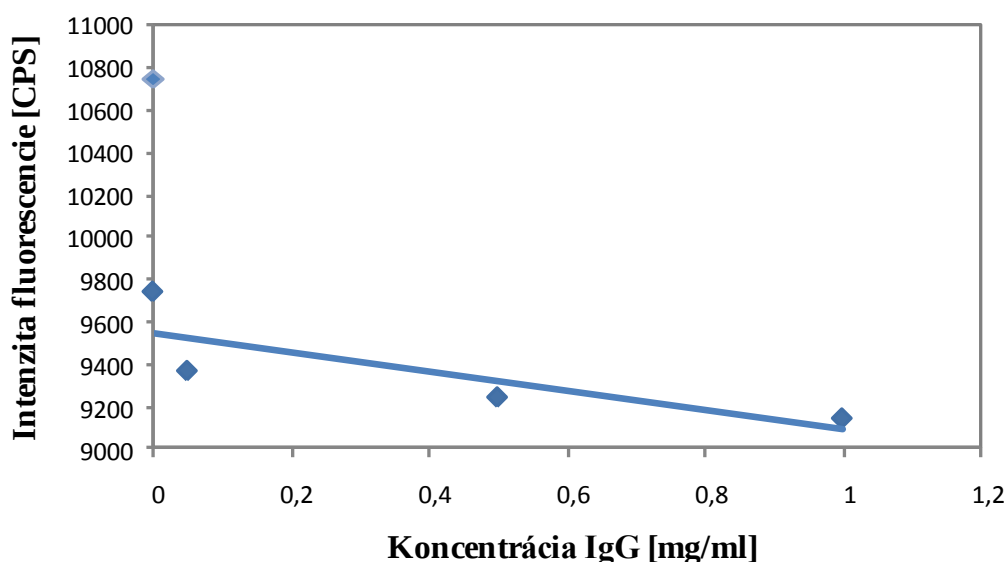
Pri QDs biokojugovaných biomolekulou IgG boli skúmané rovnaké parametre ako pri vytváraní komplexu QDs-BSA. Jednotlivé koncentrácie IgG $c=0,05$; $0,5$; 1 mg/ml boli naviazané na povrch QDs vďaka crosslinkeru 10, 20, 30, 40 mM CDI. QDs mali výslednú koncentráciu v roztoku rovnú 1 mg/ml.

8.3.2.7 Naviazanie IgG na QDs pomocou 10 mM CDI crosslinkera

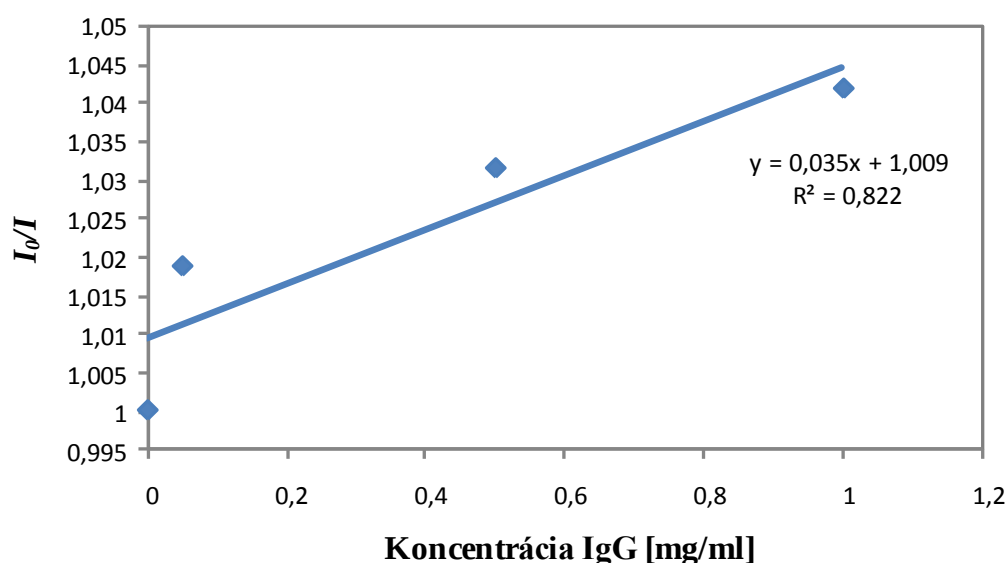
Ako prvé boli skúmané fluorescenčné spektrá vytvoreného komplexu QDs-IgG vďaka 10 mM CDI. Pri skúmaní QDs ($c = 1$ mg/ml) interagujúcich s IgG boli dôležité viaceré parametre ako koncentrácia crosslinkera a koncentrácia biomolekuly. Na výsledkoch QDs-IgG (Tab. 11 a Obr. 48) je vidieť, že pri zvyšovaní koncentrácie biomolekuly dochádza ku znižovaniu intenzity emisie lineárne. 10 mM CDI naviazané na povrch QDs znížil intenzitu fluorescence QDs o 1008 CPS. QDs pri vytvorení väzby s IgG o koncentrácií $0,05$ mg/ml znížili svoju intenzitu fluorescence z 10746 CPS na 9366 CPS. Pri pridaní IgG o koncentrácií $0,5$ mg/ml došlo ku zníženiu intenzity emisie z 10746 CPS na 9242 CPS. A pri poslednej skúmanej koncentrácií IgG a to 1 mg/ml

dochádzalo ku zhášaniu intenzity emisie z 10746 CPS až na hodnotu 9143 CPS. Všetky skúmané vzorky vytvorené pomocou 10 mM CDI mali FWHM rovné 56 nm až na samotné QDs, ktoré mali túto hodnotu 100 nm. Po pridaní crosslinkera a následne biomolekuly boli emisné spektrá QDs úzke.

Na ďalšom obrázku (Obr. 49) je zobrazená Stern-Volmerova závislosť zhášania fluorescence CdTe-GSH/ZnS QDs pri rôznych koncentráciách IgG pričom biokonjugácia vznikla pomocou crosslinkera CDI o koncentracii $c = 10 \text{ mg/ml}$. Z grafu je vidieť, že ide o lineárnu závislosť pri BSA s koncentraciami 0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml. Rovnica regresie skúmanej závislosti je $y = 0,035x + 1,009$ a determinálny koeficient je $R^2 = 0,822$. Smernica danej priamky predstavuje zhášaciu konštantu K_{SV} . Lineárna krivka predstavuje statické zhášanie.



Obr. 48 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 10mM CDI



Obr. 49 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 10 mM CDI

Tab. 11 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/IgG vytvoreného pomocou 10 mM crosslinkera CDI

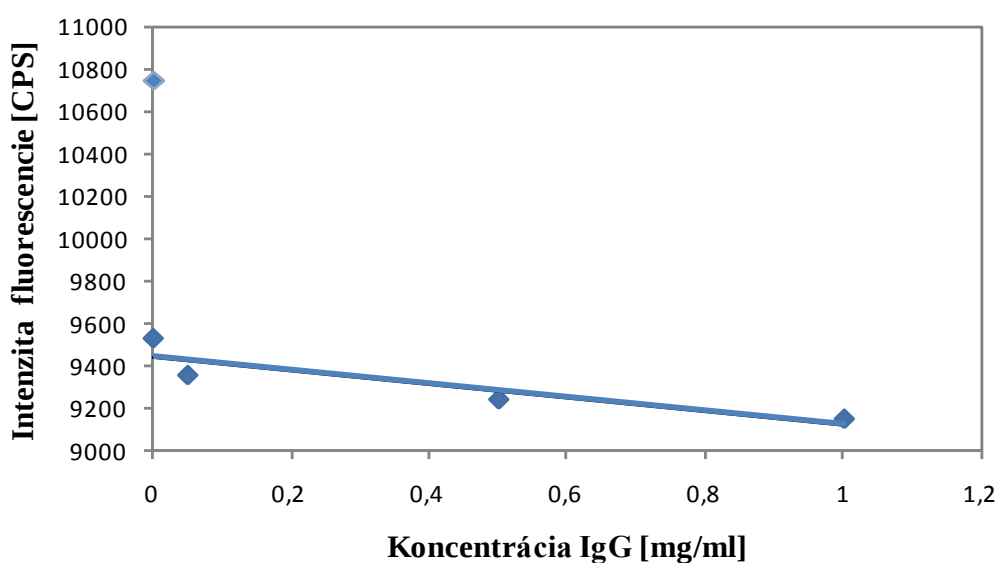
Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	544	10746	100
QDs+10 mM CDI	546	9738	54
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,05 \text{ mg/ml}$	546	9366	56
QDs- IgG $c_{\text{IgG}} = 0,5 \text{ mg/ml}$	544	9242	56
QDs- IgG $c_{\text{IgG}} = 1 \text{ mg/ml}$	546	9143	56

8.3.2.8 Naviazanie IgG na QDs pomocou 20 mM CDI crosslinkera

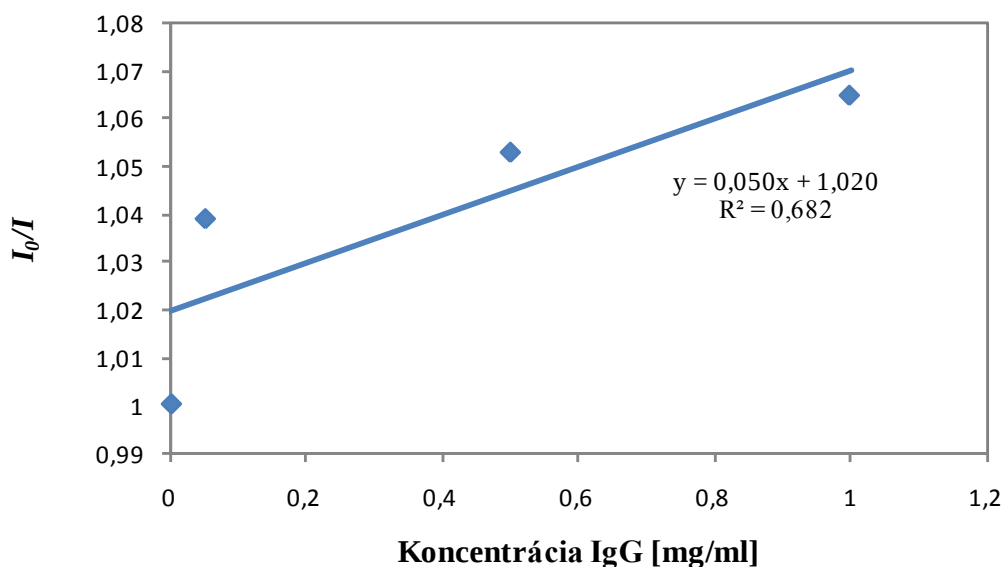
Pri vytváraní väzieb medzi QDs a IgG bol využitý aj 20 mM CDI crosslinker. Koncentrácia QDs bola $c = 1 \text{ mg/ml}$. Pri využití 20 mM CDI crosslinkera pre vytváranie komplexu QDs-IgG je vidieť na Obr. 50 a v Tab. 12 lineárne zhášanie ako to bolo aj v predchádzajúcom prípade. QDs znížili svoju intenzitu emisie po pridaní CDI o 1219 CPS, o 1395 CPS pri koncentrácií IgG rovnjej 0,05 mg/ml, ďalej o 1511 CPS pri koncentrácií IgG 0,5 mg/ml a nakoniec o 1604 CPS pri výslednej koncentrácií

biomolekuly 1 mg/ml. Maximálne intenzity fluorescence skúmaných QDs boli pri vlnových dĺžkach 544–546 nm. Hodnota FWHM bola pri všetkých vzorkách v tomto prípade rovná 56 nm až na samotné QDs. Tie mali hodnotu FWHM rovnú 100 nm a teda široké emisné spektrum. QDs v prítomnosti crosslinera a biomolekuly mali úzke emisné spektrá.

Stern-Volmerova závislosť QDs s rôznymi koncentraciami IgG (0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml) spojenými pomocou 20 mM CDI je zobrazené na Obr. 51. Zisťovaná závislosť bola lineárne stúpajúca. Rovnica regresie bola $y = 0,050x + 1,020$ a determinačný koeficient sa rovnal $R^2 = 0,682$.



Obr. 50 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 20mM CDI



Obr. 51 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 20 mM CDI

Tab. 12 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/IgG vytvoreného pomocou 20 mM crosslinkera CDI

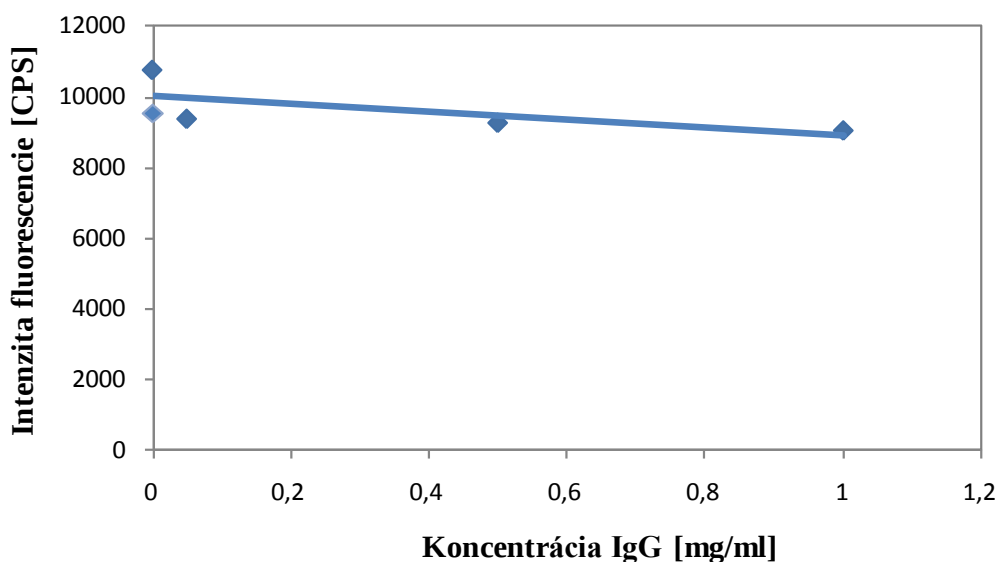
Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescencie [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+20 mM CDI	544	9527	56
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,05 \text{ mg/ml}$	544	9351	56
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,5 \text{ mg/ml}$	546	9235	56
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 1 \text{ mg/ml}$	546	9142	56

8.3.2.9 Naviazanie IgG na QDs pomocou 30 mM CDI crosslinkera

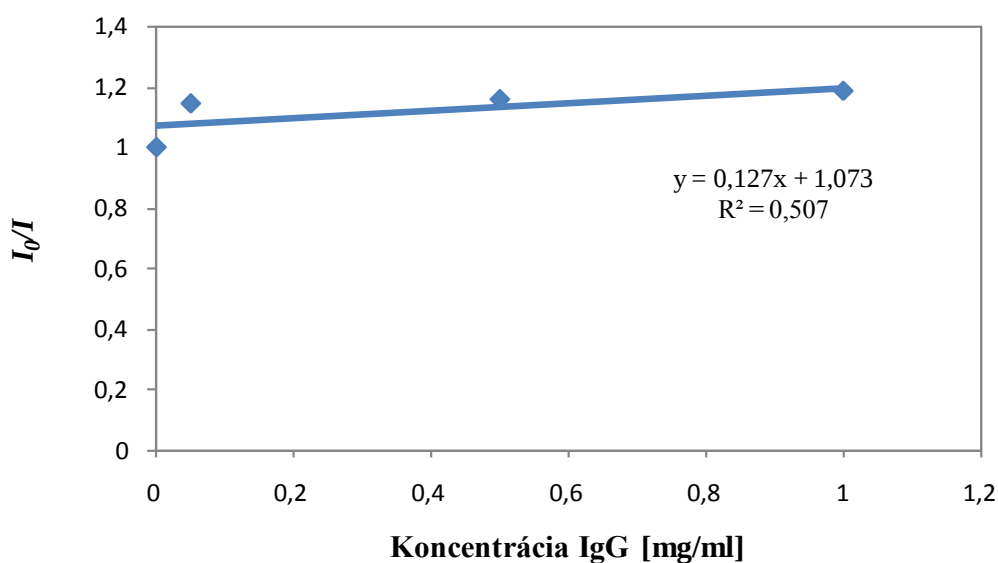
Ako ďalšie sa skúmali QDs ($c = 1 \text{ mg/ml}$) v spojení s biomolekulou IgG pri využití 30 mM CDI. Pri vytváraní komplexu QDs-IgG pomocou crosslinkera 30 mM CDI boli zaznamenané výsledky na Obr. 52 a v Tab. 13. Je vidieť lineárne znižovanie intenzity emisie so zvyšujúcou sa koncentráciou biomolekuly v tomto prípade IgG. QDs po

spojení s 30 mM CDI snížili intenzitu fluorescence na z 10746 CPS na hodnotu 9658 CPS. IgG o koncentracii 0,05 mg/ml zapříčinil snížení intenzity emise QDs o 1377 CPS. Při koncentracii 0,5 mg/ml IgG došlo ku snížení intenzity emise z 10746 CPS na hodnotu 9257 CPS. Posledná použitá koncentrácia IgG bola 1 mg/ml a pri tejto koncentrácii došlo ku zhasaniu intenzity emise QDs až o 1705 CPS. Namerané maximálne intenzity fluorescence boli pri vlnových dĺžkach v rozmedzí 544-546 nm. Hodnoty FWHM boli od 56 do 60 nm. Nekongugované QDs mali hodnotu FWHM 100 nm. Emisné spektrá QDs boli relatívne úzke symetrické, až na pôvodné QDs, ktoré mali emisné spektrum symetrické avšak široké.

Stern-Volmerova závislosť QDs pri biokonjugácii s IgG o rôznych koncentráciách 0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml je zobrazená na Obr. 53. Biokonjugácia QDs a BSA prebiehala za prítomnosti 30 mM CDI. Je vidieť, že ide o lineárne stúpajúcu závislosť po pridaní jednotlivých koncentráciách QDs. Rovnica regresie v tomto prípade bola $y = 0,127x + 1,073$ a determinančný koeficient bol $R^2 = 0,507$.



Obr. 52 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emise QDs a koncentrácie IgG pri využití 30mM CDI



Obr. 53 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 30 mM CDI

Tab. 13 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/IgG vytvoreného pomocou 30 mM crosslinkera CDI

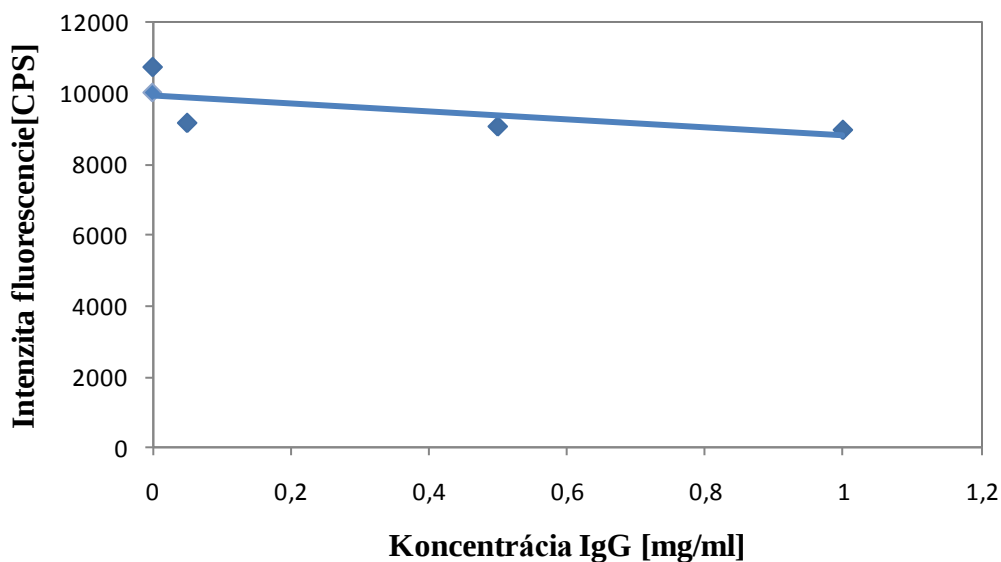
Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+30 mM CDI	546	9658	56
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,05 \text{ mg/ml}$	546	9369	60
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,5 \text{ mg/ml}$	544	9257	58
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 1 \text{ mg/ml}$	546	9041	58

8.3.2.10 Naviazanie IgG na QDs pomocou 40 mM CDI crosslinkera

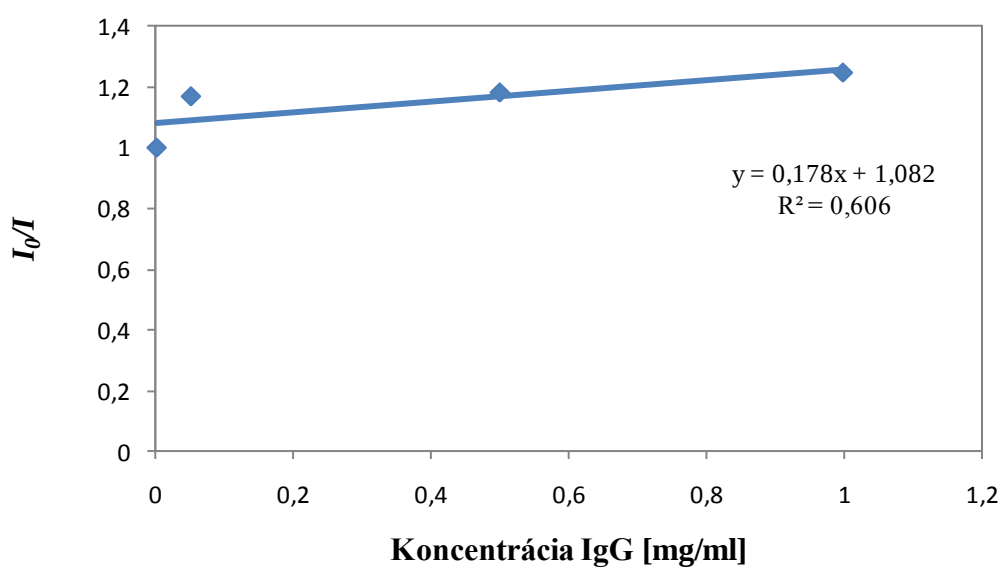
Posledným výskumom vytvárania komplexu CdTe-GSH/ZnS spoločne z IgG bolo vytvorenie komplexu pomocou 40 mM CDI. QDs mali pri tejto biokonjugácii koncentráciu $c = 1 \text{ mg/ml}$. Pri pohľade na výsledky skúmania (Tab. 14 a Obr. 54) QDs znižovali svoju intenzitu emisie lineárne v závislosti na zvyšujúcej sa intenzite IgG. QDs majúce intenzitu emisie 10746 CPS ju znížili na hodnotu 9176 CPS pri koncentrácii naväzujúceho IgG $c=0,05\text{mg/ml}$. Ku zníženiu intenzity emisie došlo aj

pri koncentrácií 0,5 mg/ml a to na hodnotu 9176 CPS a QDs vytvárajúce väzbu s IgG o koncentrácií 1 mg/ml znížil intenzitu fluorescence QDs na hodnotu 8980 CPS. QDs v spojení s 40 mM CDI znížili svoju intenzitu fluorescence na hodnotu 10018 CPS. Hodnoty FWHM získaných vzoriek boli v rozmedzí 56-58 nm. Pri hodnote FWHM u pôvodných nekonjugovaných QDs bola táto hodnota ako v predchádzajúcich prípadoch 100 nm. QDs mali po pridaní crosslinkera a biomolekuly úzke symetrické emisné spektrá v žltej oblasti svetla. Pôvodné QDs mali tiež emisné spektrum symetrické v žltej oblasti avšak bolo široké.

Stern-Volmerova závislosť QDs s rôznymi koncentraciámí IgG (0, 0,05, 0,5, 1 mg/ml) spojenými pomocou 40 mM CDI je zobrazené na Obr. 55. Zisťovaná závislosť bola lineárne stúpajúca. Rovnica regresie bola $y = 0,178x + 1,082$ a determinačný koeficient sa rovnal $R^2 = 0,606$.



Obr. 54 Závislosť hodnoty maximálnej intenzity emisie QDs a koncentrácie IgG pri využití 40mM CDI



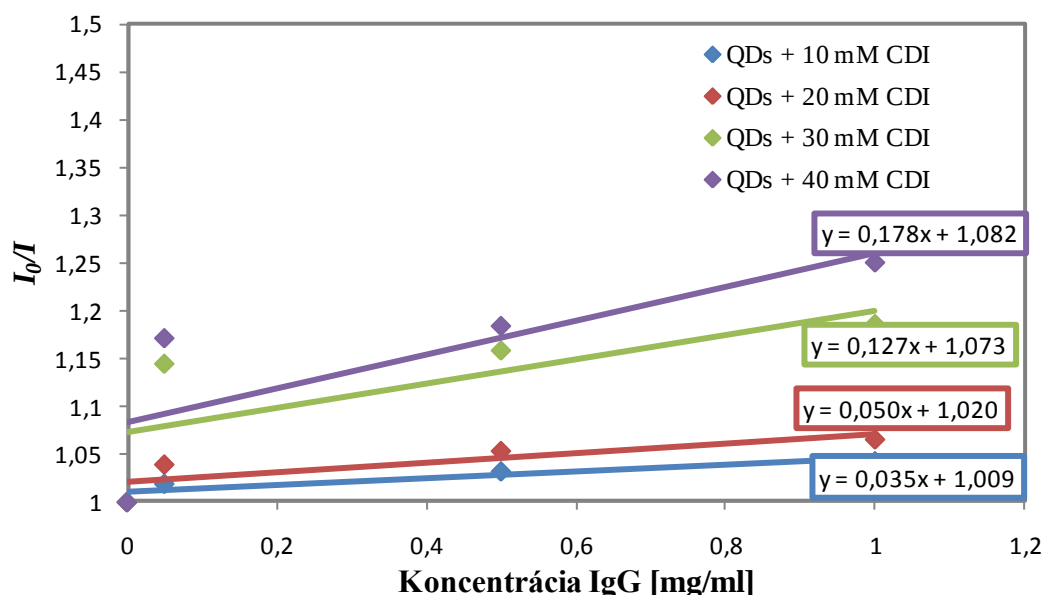
Obr. 55 Stern-Volmerova závislosť zhášania intenzity fluorescence QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 40 mM CDI

Tab. 14 Parametre komplexu CdTe-GSH/ZnS/IgG vytvoreného pomocou 40 mM crosslinkera CDI

Typ QDs	λ_{MAX} [nm]	Intenzita fluorescence [CPS]	FWHM [nm]
CdTe-GSH QDs	546	10746	100
QDs+40 mM CDI	544	10018	54
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,05 \text{ mg/ml}$	546	9176	56
QDs-IgG $c_{\text{IgG}} = 0,5 \text{ mg/ml}$	546	9077	58
QDs- IgG $c_{\text{IgG}} = 1 \text{ mg/ml}$	546	8980	58

8.3.2.11 Naviazanie IgG na QDs pomocou 10–40 mM CDI crosslinkerov

Všetky výsledky (Obr. 56) biokonjugácie CdTe-GSH/ZnS a IgG ukázali, že zo zvyšujúcou sa koncentráciou biomolekuly dochádza ku veľmi miernemu lineárnemu znižovaniu intenzity emisie QDs. Taktiež bolo preukázané, že zvýšená koncentrácia crosslinkera CDI zabezpečuje naviazanie väčšieho množstva IgG aj keď vo veľmi malej miere. Z grafu je patrné, že pri zvyšovaní použitého crosslinkera CDI sa lineárne zvyšuje aj zhášanie QDs, ku ktorému dochádza vďaka naväzovaniu biomolekuly IgG. Pri 40 mM CDI dochádzalo ku najväčšiemu zhášaniu QDs. Opäť sa potvrdili predpoklady, že najvhodnejší pomer koncentrácií QDs:biomolekula je 1:1 [33]. Emisné spektrá sa po pridaní crosslinkerov a biomolekuly optimalizovali a zúžili. Všetky skúmané QDs mali koncentráciu 1mg/ml.



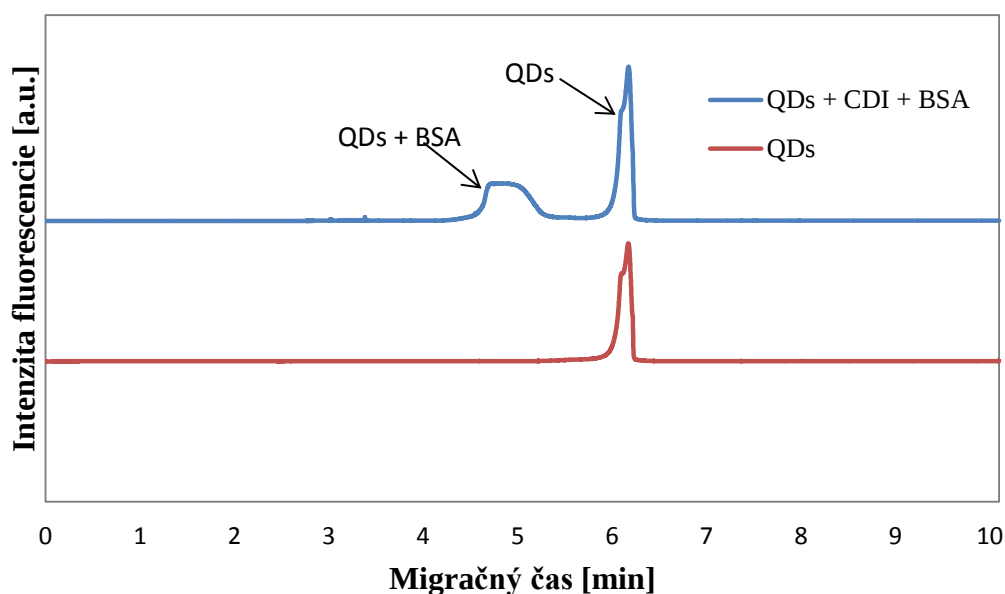
Obr. 56 Stern-Volmerove závislosti zhášania intenzity fluorescencie QDs pri rôznych koncentráciách IgG za prítomnosti 10–40 mM CDI

8.4 Charakterizácia komplexu QDs-biomolekula pomocou kapilárnej elektroforézy

Pri vytváraní komplexu CdTe-GSH/ZnS QDs-biomolekuly boli skúmaný vplyv biomolekúl BSA a IgG na QDs. Použitý BSA mal koncentráciu 1 mg/ml, IgG mal koncentráciu 0,1 mg/ml a použité QDs mali výslednú koncentráciu pri biokonjugácii s oboma biomolekulami 1 mg/ml. Vytváranie QDs-biomolekula komplexu bolo za prítomnosti crosslinkera CDI.

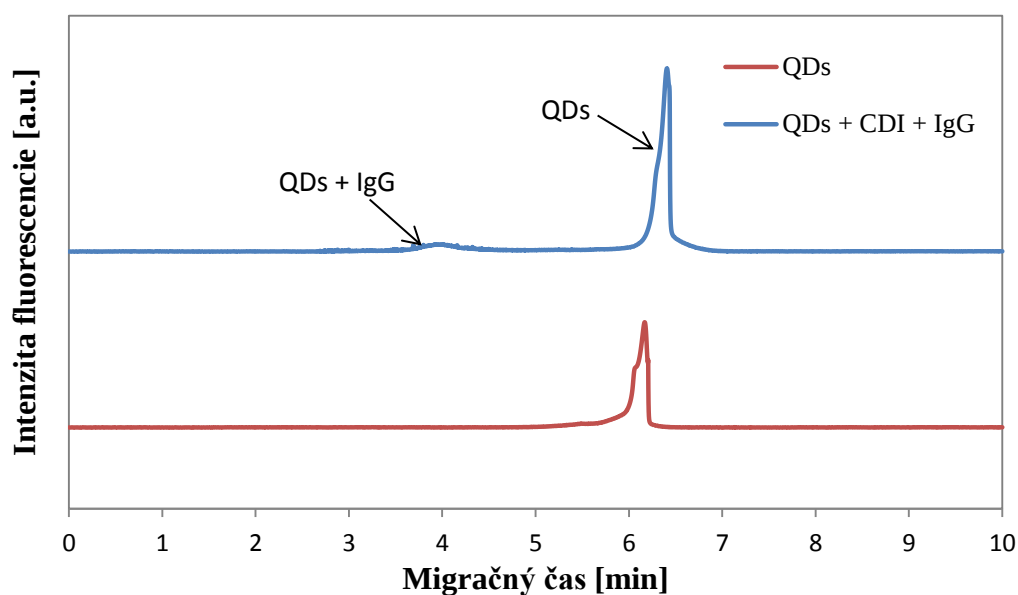
Analýza vzoriek prebiehala na prístroji slúžiacom ku meraniu kapilárnej elektroforézy s názvom 7100 Agilent Technologies pri vlnovej dĺžke excitácie 488nm. U vzoriek bol meraný migračný čas v rozmedzí 0–10 minút.

Výsledné grafy elektroferogramov komplexu QDs-biomolekula vytvoreného pomocou crosslinkera CDI a nekonjugované pôvodné QDs sú zobrazené na Obr. 57. Na elektroferograme je vidieť, že komplex QDs-BSA bol odseparovaný v čase 4 minúty 54 sekundy a nekonjugované QDs nachádzajúce sa v rovnakom roztoku ako konjugované QDs prešli kapilárou v čase 6 minút 13 sekúnd. Meranie prebiehalo pri pH = 9,2. Pri porovnaní výsledkov je vidieť, že komplex QDs-BSA vykazuje širší pík ako nekonjugované QDs. Je to pripisované absorpcií proteínu na vnútornej stene použitej kapiláry. Biomolekula BSA na povrchu QDs spôsobila zníženie negatívneho náboja a taktiež aj zvýšila celkovú hmotnosť QDs [84]. Toto sú hlavné dôvody, že komplex QDs-BSA prechádza rýchlejšie kolónov. Smer migračnej cesty QDs a QDs-BSA je opačný vzhľadom ku elektroosmotickému toku v kapiláre [93].



Obr. 57 Elektroferogram komplexu QDs-BSA

Na Obr. 58 je vidieť elektroferogramy QDs, QDs+CDI a komplexu QDs-IgG vytvoreného pomocou CDI. Komplex QDs-IgG prešiel kolónou za 3 minúty 50 sekúnd a voľné QDs nachádzajúce sa v rovnakom roztoku mali migračný čas kolónou rovný 6 minút a 13 sekúnd. Pík komplexu QDs-IgG v grafe je širší v porovnaní s nekonjugovanými QDs. Zapríčinil to fakt rovnaký ako pri komplexe QDs-BSA, a to, že pri naviazaní IgG sa znižuje negatívny náboj a zvyšuje hmotnosť QDs [84]. Nakoľko boli na kapilárnej elektroforéze separované anionty elektroforetická migrácia častíc a elektroosmotický tok vo vnútri kapiláry majú opačný smer. Častice s vyššou molekulárnou hmotnosťou prechádza cez kapiláru rýchlejšie. Z tohto dôvodu prechádza komplex QDs-IgG rýchlejšie ako nekonjugované QDs [93].



Obr. 58 Elektroferogram komplexu QDs- IgG

ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo literárna rešeršia na tému syntéza kvantových bodiek core/shell štruktúry pre detekciu proteínov. Taktiež snaha o optimalizáciu syntézy kvantových bodiek core/shell štruktúry a následne naväzovanie biomolekuly za účelom vytvorenia systému vhodného pre diagnostiku zaujímavých látok ako sú proteíny, protilátky.

V prvej časti boli popísané dôležité vlastnosti kvantových bodiek, ich výhody a nevýhody v bioaplikáciách, ďalej bolo popísané delenie QDs ako aj ich využitie. V práci sú podrobne popísané core/shell štruktúry syntézy QDs ako aj jednotlivé modifikácie a zvýšené interakcie k rôznym látkam.

Experimentálna časť práce bola zameraná na syntézu CdTe QDs stabilizovaných glutathionom (GSH), následne vytváranie core/shell štruktúry na QDs pridaním ZnS vrstvy na povrch CdTe QDs. Syntéza QDs prebiehala dvomi spôsobmi pomocou refluxu a hydrotermálnou metódou. Ďalším krokom bola modifikácia QDs pomocou crosslinkerov EDC, NHS a CDI, vďaka ktorým boli naviazané biomolekuly v tomto prípade proteín BSA a protilátka IgG na povrch QDs. Výsledné vzorky boli charakterizované pomocou fluorescenčnej spektroskopie a kapilárnej elektroforézy.

Naväzovanie BSA na syntetizované QDs prebiehalo dvoma postupmi. V prvom prípade pomocou crosslinkerov EDC, NHS a v druhom vďaka crosslinkeru CDI. Postupy sa líšili v koncentračných pomeroch jednotlivých látok ako aj v použitých crosslinkeroch.

Pri naväzovaní BSA a IgG na povrch QDs pomocou crosslinkerov EDC a NHS boli použité rôzne koncentrácie biomolekúl a 1 koncentrácia QDs ($c = 0,33 \text{ mg/ml}$). Ako prostredie pre skúmanie vzniku interakcií medzi biomolekulou a QDs boli zvolené pufrы z pH 6,5–8,5 z dôvodu zistenia, že v takýchto prostrediach vykazujú QDs najväčšiu intenzitu fluorescencie. QDs zo začiatku pri naväzovaní biomolekúl svoju intenzitu emisie zvyšovali ale následne po prekročení koncentrácie biomolekuly o 2 mg/ml dochádzalo ku miernemu znižovaniu intenzity emisie QDs. Táto skutočnosť bola zapríčinená defektami vzniknutými na povrchu QDs pri ich syntéze. Biomolekula najskôr zaplnila tieto defekty (dochádza ku zvyšovaniu intenzity fluorescencie QDs) a následne začalo dochádzať ku zhasaniu intenzity fluorescencie QDs po pridaní biomolekuly.

Biomolekuly BSA a IgG boli na povrch naväzované aj pomocou CDI. QDs mali pri vytváraní komplexov s biomolekulami koncentráciu $c = 1 \text{ mg/ml}$. Pri tejto biokonjugácii boli zisťované vplyvy rôznych koncentrácií biomolekúl na intenzitu fluorescencie QDs tak aj vplyv rôznych koncentrácií CDI na vytváranie komplexu QDs-biomolekula. Preukázalo sa, že pri zvyšovaní koncentrácie CDI dochádza ku zvýšenému zhášaniu intenzity emisie QDs a teda sa tvorí viac komplexov QDs-biomolekula. Najvhodnejšie pomery koncentrácií pri naväzovaní biomolekúl na QDs sú QDs:biomolekula 1:1.

Nakoniec bola biokonjugácia QDs a biomolekuly vyhodnocovaná kapilárnou elektroforézou. Výsledky pri tejto metóde rozdelili komplexy QDs-biomolekula a QDs nachádzajúce sa v rovnakom roztoku podľa prechodu kapilárou. Komplexy QDs-biomolekula prešli kapilárou rýchlejšie vďaka redukcii negatívneho náboju a väčšej molekulárnej hmotnosti vzniknutého komplexu. Samotné QDs boli odseparované pomalšie a teda mali väčší migračný čas.

Pri zhrnutí výsledkov sa dá povedať, že najvhodnejšie prostredie pre naväzovanie biomolekúl na povrch QDs pomocou crosslinkerov je v rozmedzí 6,5–8,5 v závislosti na naväzovanej biomolekule. Naväzovanie biomolekúl pomocou EDC a NHS je účinne až po prekročení koncentrácie biomolekúl 2 mg/ml z dôvodu výskytu defektov na povrchu QDs. Pri biokonjugácii pomocou CDI je najvhodnejšie využívať 40 mM CDI pričom pomery koncentrácií QDs:biomolekula musia byť rovné aspoň 1:1 alebo musí byť koncentrácia biomolekuly vyššia. Cieľom kapilárnej elektroforézy bolo odseparovanie komplexom QDs-biomolekula od samotných QDs nachádzajúcich sa v rovnakom roztoku. Kapilárna elektroforéza ukázala, že komplex QDs:biomolekula má menší migračný čas ako samotné QDs nachádzajúce sa v roztoku.

LITERATURA

- [1] DING, L. et al. Microwave-assisted synthesis of l-glutathione capped ZnSe QDs and its interaction with BSA by spectroscopy. *Journal of Luminescence*, 2013, sv. 142, č. 0, s. 167-172. ISSN 0022-2313.
- [2] CHOMOUCKA, J. et al. Synthesis of Glutathione Coated Quantum Dots. *InTech*.
- [3] DRBOHLAVOVÁ, J. et al. Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009.
- [4] EOM, N. S. A. et al. Core-size-dependent properties of CdSe/CdS core/shell QDs. *Materials Letters*, 2013, sv. 99, č. 0, s. 14-17. ISSN 0167-577X.
- [5] CHOMOUCKA, J. et al. Quantum Dots – Biological and Biomedical Applications. *Nova Science Publishers*, 2008.
- [6] SMITH, A. M. et al. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, sv. 60, č. 11, s. 1226-1240. ISSN 0169-409X.
- [7] KUZYNIAK, W. et al. Synthesis and characterization of quantum dots designed for biomedical use. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, sv. 466, č. 1–2, s. 382-389. ISSN 0378-5173.
- [8] TANG, Y. et al. The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core–shell quantum dots. *Biomaterials*, 2013, sv. 34, č. 34, s. 8741-8755. ISSN 0142-9612.
- [9] ZHANG, B. et al. A novel method to make hydrophilic quantum dots and its application on biodetection. *Materials Science and Engineering: B*, 2008, sv. 149, č. 1, s. 87-92. ISSN 0921-5107.
- [10] MERKOCI, A. Biosensing Using Nanomaterials. *Wiley series in Nanoscience and Nanotechnology*, 2009.
- [11] TOMCZAK, N. et al. Designer polymer–quantum dot architectures. *Progress in Polymer Science*, 2009, sv. 34, č. 5, s. 393-430. ISSN 0079-6700.
- [12] JAGADEESWARI, S. et al. Photoinduced interaction between MPA capped CdTe QDs and certain anthraquinone dyes. *Journal of Luminescence*, 2011, sv. 131, č. 4, s. 597-602. ISSN 0022-2313.
- [13] YUAN, J. et al. Glutathione-capped CdTe quantum dots for the sensitive detection of glucose. *Talanta*, 2009, sv. 77, č. 5, s. 1858-1863. ISSN 0039-9140.
- [14] YU, X. et al. Application of mercaptosuccinic acid capped CdTe quantum dots for latent fingerprint development. *Forensic Science International*, 2013, sv. 231, č. 1–3, s. 125-130. ISSN 0379-0738.

- [15] LI, M. et al. Preparation and purification of l-cysteine capped CdTe quantum dots and its self-recovery of degenerate fluorescence. *Journal of Luminescence*, 2010, sv. 130, č. 10, s. 1935-1940. ISSN 0022-2313.
- [16] SONG, Y. et al. Effect of CdS QDs linked functional groups on interaction between CdS QDs and EcoRI. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, sv. 444, č. 0, s. 299-306. ISSN 0927-7757.
- [17] KHATEI, J. a KOTESWARA RAO, K. S. R. Hydrothermal synthesis of CdTe QDs: Their luminescence quenching in the presence of bio-molecules and observation of bistable memory effect in CdTe QD/PEDOT:PSS heterostructure. *Materials Chemistry and Physics*, 2011, sv. 130, č. 1–2, s. 159-164. ISSN 0254-0584.
- [18] SU, Y. et al. The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating. *Biomaterials*, 2009, sv. 30, č. 1, s. 19-25. ISSN 0142-9612.
- [19] PENG, H. et al. Preparation of water-soluble CdTe/CdS core/shell quantum dots with enhanced photostability. *Journal of Luminescence*, 2007, sv. 127, č. 2, s. 721-726. ISSN 0022-2313.
- [20] LIU, Y.-F. a YU, J.-S. In situ synthesis of highly luminescent glutathione-capped CdTe/ZnS quantum dots with biocompatibility. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, sv. 351, č. 1, s. 1-9. ISSN 0021-9797.
- [21] WANG, J. et al. Photostable water-dispersible NIR-emitting CdTe/CdS/ZnS core-shell-shell quantum dots for high-resolution tumor targeting. *Biomaterials*, 2013, sv. 34, č. 37, s. 9509-9518. ISSN 0142-9612.
- [22] ZHANG, W. et al. Toxicity assessment of zebrafish following exposure to CdTe QDs. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, sv. 213–214, č. 0, s. 413-420. ISSN 0304-3894.
- [23] YANG, P. et al. SiO₂ beads with quantum dots: Preparation and stability investigation for bioapplications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, sv. 385, č. 1–3, s. 159-165. ISSN 0927-7757.
- [24] ZHANG, W. et al. Toxicological effect of MPA–CdSe QDs exposure on zebrafish embryo and larvae. *Chemosphere*, 2012, sv. 89, č. 1, s. 52-59. ISSN 0045-6535.
- [25] SEIDL, K. a ZINKERNAGEL, A. S. The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, sv. 92, č. 3, s. 307-309. ISSN 0167-7012.
- [26] SADIK, O. A. et al. Sensors as tools for quantitation, nanotoxicity and nanomonitoring assessment of engineered nanomaterials. *Journal of Environmental Monitoring*, 2009.
- [27] ULUKAYA, E. et al. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*, 2008, sv. 22, č. 1, s. 232-239. ISSN 0887-2333.
- [28] KATSUMITI, A. et al. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the

- toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 2014, sv. 153, č. 0, s. 39-52. ISSN 0166-445X.
- [29] GHASEMIAN, E. et al. In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 2012, sv. 22, č. 4, s. 322-328. ISSN 1156-5233.
- [30] BLANCO-CANOSA, J. B. et al. Recent progress in the bioconjugation of quantum dots. *Coordination Chemistry Reviews*, 2014, sv. 263–264, č. 0, s. 101-137. ISSN 0010-8545.
- [31] TANG, G. et al. Detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and Rhodamine B. *Food Chemistry*, 2013, sv. 141, č. 4, s. 4060-4065. ISSN 0308-8146.
- [32] FENG, X. et al. Photoluminescence properties of a novel conjugate of water-soluble CdTe quantum dots to guanine. *Journal of Luminescence*, 2010, sv. 130, č. 4, s. 648-653. ISSN 0022-2313.
- [33] LIANG, W. et al. A novel surface modification strategy of CdTe/CdS QDs and its application for sensitive detection of ct-DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, sv. 196, č. 0, s. 336-344. ISSN 0925-4005.
- [34] HERMANSON, G. T. *Bioconjugate Techniques*. 2013. s.
- [35] ŠIBÍKOVÁ, A. Biofunkcionalizace ve vodě rozpustných CdTe kvantových teček. *Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií*, 2013.
- [36] KARAKOTI, A. S. et al. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, č. 0. ISSN 0001-8686.
- [37] XING, Y. et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nat. Protocols*, 2007, sv. 2, č. 5, s. 1152-1165. ISSN 1750-2799.
- [38] DONG, W. et al. CdTe QDs-based prostate-specific antigen probe for human prostate cancer cell imaging. *Journal of Luminescence*, 2009, sv. 129, č. 9, s. 926-930. ISSN 0022-2313.
- [39] SHAN, Y. et al. NHS-mediated QDs-peptide/protein conjugation and its application for cell labeling. *Talanta*, 2008, sv. 75, č. 4, s. 1008-1014. ISSN 0039-9140.
- [40] LIŠKOVÁ, M. et al. Conjugation reactions in the preparations of quantum dot-based immunoluminescent probes for analysis of proteins by capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, sv. 400, č. 2, s. 369-379. ISSN 1618-2642.
- [41] SHANKARA NARAYANAN, S. et al. Ultrafast energy transfer from 3-mercaptopropionic acid-capped CdSe/ZnS QDs to dye-labelled DNA. *Chemical Physics Letters*, 2008, sv. 463, č. 1–3, s. 160-165. ISSN 0009-2614.

- [42] WANG, Q. et al. Thermodynamic and conformational investigation of the influence of CdTe QDs size on the toxic interaction with BSA. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012, sv. 230, č. 1, s. 23-30. ISSN 1010-6030.
- [43] LI, S. et al. Non-covalent conjugation of CdTe QDs with lysozyme binding DNA for fluorescent sensing of lysozyme in complex biological sample. *Talanta*, 2014, sv. 129, č. 0, s. 86-92. ISSN 0039-9140.
- [44] XIAO, Q. et al. Systematically investigation of interactions between BSA and different charge-capped CdSe/ZnS quantum dots. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012, sv. 249, č. 0, s. 53-60. ISSN 1010-6030.
- [45] BERKOWITZ, S. A. a J. HOUE, D. Chapter 1 - The Complexity of Protein Structure and the Challenges it Poses in Developing Biopharmaceuticals. In BERKOWITZ, D.J.H.A. *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*. Amsterdam: Elsevier, 2015, s. 1-21.
- [46] AFANEH, C. et al. *Modern Immunosuppression Regimens in Kidney Transplantation*. 2012. s.
- [47] TORCHYNSKA, T. V. et al. Emission of CdSe/ZnS and CdSeTe/ZnS quantum dots conjugated to IgG antibodies. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2013, sv. 51, č. 0, s. 60-64. ISSN 1386-9477.
- [48] TORCHYNSKA, T. V. et al. Photoluminescence of double core/shell infrared (CdSeTe)/ZnS quantum dots conjugated to Pseudo rabies virus antibodies. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2013, sv. 51, č. 0, s. 55-59. ISSN 1386-9477.
- [49] PENG, J. et al. A study on the interaction between CdTe quantum dots and chymotrypsin using optical spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, sv. 359, č. 1-3, s. 13-17. ISSN 0927-7757.
- [50] TORCHYNSKA, T. V. Re-charging the luminescence states in CdSe/ZnS quantum dots at the conjugation to Osteopontin antibodies. *Journal of Luminescence*, 2012, sv. 132, č. 8, s. 1848-1852. ISSN 0022-2313.
- [51] QUINTOS VAZQUEZ, A. L. et al. Electronic effects in emission of core/shell CdSe/ZnS quantum dots conjugated to anti-Interleukin 10 antibodies. *Journal of Luminescence*, 2013, sv. 143, č. 0, s. 38-42. ISSN 0022-2313.
- [52] SHU, Y. et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. *Food Chemistry*, 2015, sv. 173, č. 0, s. 31-37. ISSN 0308-8146.
- [53] ERTÜRK, G. et al. Microcontact-BSA imprinted capacitive biosensor for real-time, sensitive and selective detection of BSA. *Biotechnology Reports*, 2014, sv. 3, č. 0, s. 65-72. ISSN 2215-017X.
- [54] MAJOREK, K. A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 2012, sv. 52, č. 3-4, s. 174-182. ISSN 0161-5890.
- [55] XIAO, J. et al. Systematic investigation of the influence of CdTe QDs size on

- the toxic interaction with human serum albumin by fluorescence quenching method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, sv. 76, č. 1, s. 93-97. ISSN 1386-1425.
- [56] IDOWU, M. et al. Interaction of water-soluble thiol capped CdTe quantum dots and bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2008, sv. 198, č. 1, s. 7-12. ISSN 1010-6030.
 - [57] DZAGLI, M. M. et al. Study of the interaction between CdSe/ZnS core-shell quantum dots and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2010, sv. 215, č. 1, s. 118-122. ISSN 1010-6030.
 - [58] RAPOSO, A. N. a GOMES, A. J. P. 3D molecular assembling of B-DNA sequences using nucleotides as building blocks. *Graphical Models*, 2012, sv. 74, č. 4, s. 244-254. ISSN 1524-0703.
 - [59] NELSON, H. C. M. Right/Left Handed DNA. In HUGHES, S.M. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 2013, s. 264.
 - [60] PARAMANIK, B. et al. Steady state and time resolved spectroscopic study of QD–DNA interaction. *Journal of Luminescence*, 2013, sv. 134, č. 0, s. 401-407. ISSN 0022-2313.
 - [61] LI, D. et al. Glutathione-mediated release of functional plasmid DNA from positively charged quantum dots. *Biomaterials*, 2008, sv. 29, č. 18, s. 2776-2782. ISSN 0142-9612.
 - [62] XING, Y. a RAO, J. Quantum dot bioconjugates for *in vitro* diagnostics & *in vivo* imaging. *Molecular Imaging Program at Stanford*, 2008.
 - [63] PAN, J. a FENG, S.-S. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials*, 2009, sv. 30, č. 6, s. 1176-1183. ISSN 0142-9612.
 - [64] WANG, Y. a CHEN, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011, sv. 7, č. 4, s. 385-402. ISSN 1549-9634.
 - [65] TERADA, N. et al. Visualization of microvascular blood flow in mouse kidney and spleen by quantum dot injection with “*in vivo* cryotechnique”. *Microvascular Research*, 2010, sv. 80, č. 3, s. 491-498. ISSN 0026-2862.
 - [66] ANANTH, D. A. et al. Antibacterial potential of rutin conjugated with thioglycolic acid capped cadmium telluride quantum dots (TGA-CdTe QDs). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, č. 0. ISSN 1386-1425.
 - [67] LIU, Y. et al. Bacteria-mediated *in vivo* delivery of quantum dots into solid tumor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, sv. 425, č. 4, s. 769-774. ISSN 0006-291X.
 - [68] LIU, F. F. et al. Visualization of hormone binding proteins *in vivo* based on Mn-doped CdTe QDs. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, sv. 131, č. 0, s. 9-16. ISSN 1386-1425.

- [69] LI, Z. et al. Quantum dots loaded nanogels for low cytotoxicity, pH-sensitive fluorescence, cell imaging and drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 2015, sv. 121, č. 0, s. 477-485. ISSN 0144-8617.
- [70] MAGUIRE, C. M. et al. Heparin conjugated quantum dots for in vitro imaging applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, sv. 10, č. 8, s. 1853-1861. ISSN 1549-9634.
- [71] JIE, G. et al. Enhanced electrochemiluminescence of CdSe quantum dots composited with CNTs and PDDA for sensitive immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, sv. 24, č. 11, s. 3352-3358. ISSN 0956-5663.
- [72] WU, H. et al. Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1 α . *Electrochemistry Communications*, 2007, sv. 9, č. 7, s. 1573-1577. ISSN 1388-2481.
- [73] WOOK CHANG, D. et al. Efficient energy transfer between amphiphilic dendrimers with oligo(p-phenylenevinylene) core branches and oligo(ethylene oxide) termini in micelles. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013, sv. 51, č. 1, s. 168-175. ISSN 1099-0518.
- [74] WANG, X. et al. Fluorescence immunoassay of octachlorostyrene based on Förster resonance energy transfer between CdTe quantum dots and rhodamine B. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, sv. 60, č. 0, s. 52-56. ISSN 0956-5663.
- [75] ADARSH, K. S. et al. FRET from core and core-shell quantum dots to laser dye: A comparative investigation. *Journal of Luminescence*, 2015, sv. 160, č. 0, s. 216-222. ISSN 0022-2313.
- [76] MA, Q. et al. QDs-labeled microspheres for the adsorption of rabbit immunoglobulin G and fluoroimmunoassay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, sv. 64, č. 2, s. 248-254. ISSN 0927-7765.
- [77] DE LIU, Z. et al. Light scattering sensing detection of pathogens based on the molecular recognition of immunoglobulin with cell wall-associated protein A. *Analytica Chimica Acta*, 2007, sv. 599, č. 2, s. 279-286. ISSN 0003-2670.
- [78] OMARY, M. A. a PATTERSON, H. H. Luminescence, Theory. In LINDON, J.C. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, 1999, s. 1372-1391.
- [79] FIŠAR, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurověděch. *Praha*, 2009.
- [80] HALASOVÁ, T. Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyseliny-tenzid. *Brno, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně*, 2009.
- [81] MCCLELLAND, R. A. et al. Erzeugung, UV-VIS/Spektren und Reaktivitäten von Phenylcarbenium-Ionen in Trifluorethanol und Hexafluor-2-propanol, zum UV-Spektrum des Benzyl-Kations. *Angewandte Chemie*, 1991, sv. 103, č. 10, s. 1389-1391. ISSN 1521-3757.
- [82] TAGLIARO, F. et al. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. *Forensic Science International*, 1996, sv. 77, č. 3, s. 211-229. ISSN 0379-0738.
- [83] WANG, L.-J. et al. An ion-pair principle for enantioseparations of basic analytes

- by nonaqueous capillary electrophoresis using the di-n-butyl l-tartrate–boric acid complex as chiral selector. *Journal of Chromatography A*, 2013, sv. 1284, č. 0, s. 188-193. ISSN 0021-9673.
- [84] HUANG, X. et al. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection. *Journal of Chromatography A*, 2006, sv. 1113, č. 1–2, s. 251-254. ISSN 0021-9673.
 - [85] DUAN, J. et al. One-Pot Synthesis of Highly Luminiscent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺ Sensitive Properties *Nano Res*, 2008.
 - [86] LIU, F. Y. a YU, S. J. In situ synthesis of highly luminiscent glutathione-capped CdTe/ZnS quantum dots with biocompatibility. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010.
 - [87] CHOPRA, A. et al. CdTe nanobioprobe based optoelectrochemical immunodetection of diabetic marker HbA1c. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, sv. 44, č. 0, s. 132-135. ISSN 0956-5663.
 - [88] WANG, S. et al. Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates 2002.
 - [89] ZHU, Y. et al. Ultrasonic-assisted synthesis of aqueous CdTe/CdS QDs in salt water bath heating. *Journal of Alloys and Compounds*, 2014, sv. 608, č. 0, s. 141-147. ISSN 0925-8388.
 - [90] YU, Y. et al. Hydrothermal synthesis of GSH–TGA co-capped CdTe quantum dots and their application in labeling colorectal cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, sv. 95, č. 0, s. 247-253. ISSN 0927-7765.
 - [91] LIU, Z. et al. Determination of rifampicin based on fluorescence quenching of GSH capped CdTe/ZnS QDs. *Journal of Luminescence*, 2012, sv. 132, č. 9, s. 2484-2488. ISSN 0022-2313.
 - [92] DING, L. et al. Systematic investigation of the toxicity interaction of ZnSe@ZnS QDs on BSA by spectroscopic and microcalorimetry techniques. *Chemosphere*, 2013, sv. 92, č. 8, s. 892-897. ISSN 0045-6535.
 - [93] SHAO, L. W. et al. Using capillary electrophoresis mobility shift assay to study the interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin. *Chinese Chemical Letters*, 2008, sv. 19, č. 6, s. 707-710. ISSN 1001-8417.

ZOZNAM SKRATIEK

BSA - hovädzí sérový albumín

CDI - 1,1-Karbonyldiimidazol

CPS - počet za sekundu

EDC - (1-Etyl-3-[3-dimetylamino]propyl)carbodiimid hydrochlorid)

FRET - Fluorescenčný rezonančný energetický transfér

FWHM - šírka piky v polovici maxima

GSH - glutathion

HSA - ľudský sérový albumín

Ig - Imunoglobulín

IgG - Imunoglobulín G

MAA - metakrylová kyselina

MPA - merkaptopropionová kyselina

MSA - merkaptojantárová kyselina

NHS - (N-hydroxysukcinimid)

QDs - kvantové bodky

QY - kvantový výťažok

TGA - thioglykolová kyselina

TOP - trioctylphosphine

TOPO - trioctylphosphine oxid

UV - ultrafialové žiarenie

UV-VIS - ultrafialovo-viditeľná spektroskopia