

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Nové nanočástice v ultrastrukturální diagnostice

Diplomová práce

Bc. Denisa Martykánová

Školitelka: Ing. Jana Nebesářová, CSc.

České Budějovice 2014

Martykánová, D., 2014: Nové nanočástice v ultrastrukturální diagnostice [The new nanoparticles in the ultrastructural diagnostics. Mgr. Thesis, in Czech.] – p. 56., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this master thesis is to focus on a various methods of the conjugation of palladium nanoparticles of different shapes on the protein. The main point was to use both covalent and non-covalent conjugation of palladium nanoparticles on the protein and to use the functional conjugates to find out their stability in time.

Tato práce byla financována Laboratoří elektronové mikroskopie BC-PaÚ AV ČR.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 17.04.2014

.....

Denisa Martykánová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Janě Nebesářové, CSc. za vedení práce, za rady a konzultace a za možnost pracovat v Laboratoři elektronové mikroskopie. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Marii Vancové, Ph.D. za odborné rady a konzultace. Za konzultace a hlavně za pomoc při konjugaci nanočástic děkuji Ing. Anně Heydové. Také děkuji Petře Masařové za pomoc a rady při přípravě vzorků, Jiřímu Vaněčkovi a Mgr. Tomáši Bílému za pomoc a trpělivost při práci s transmisním a skenovacím elektronovým mikroskopem, Mgr. Martině Tesařové za rady a pomoc při práci v laboratoři a Mgr. Janu Langhansovi za pomoc při počítačovém zpracování vzorků. Všem zmíněným bych také chtěla poděkovat za ochotu a příjemnou atmosféru v laboratoři. Stejně tak bych moc chtěla poděkovat svým rodičům a příteli za morální i finanční podporu během studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
1.1	Úvod do imunoznačení.....	1
1.2	Antigen	2
1.3	Protilátka.....	2
1.4	Vazba nanočástice na protein	6
1.5	Metody imunoznačení	9
1.6	Typy elektronových mikroskopů.....	10
1.6.1	Transmisní elektronový mikroskop.....	10
1.6.2	Skenovací elektronový mikroskop	10
2	CÍLE PRÁCE	12
3	MATERIÁLY A METODY.....	13
3.1	Seznam použitých chemikálií a materiálů	13
3.2	Seznam nanočástic.....	14
3.3	Příprava vzorků	15
3.3.1	Testování suspenze nanočástic a dodaných konjugátů.....	15
3.3.2	Příprava vzorku BSA.....	15
3.4	Postup při imunoznačení	16
3.5	Postupy konjugace různých nanočástic	18
4	VÝSLEDKY.....	26
4.1	Charakterizace nanočástic	26
4.1.1	Stanovení distribuce nanočástic Pd10s v TEM	27
4.1.2	Stanovení distribuce nanočástic Pd10s ve FESEM	28
4.1.3	Stanovení distribuce nanočástic Pd15c v TEM.....	31
4.1.4	Stanovení distribuce nanočástic Pd15c ve FESEM.....	32
4.1.5	Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin v TEM	35
4.1.6	Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin ve FESEM	36
4.1.7	Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + protein A v TEM.....	39
4.1.8	Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + protein A ve FESEM..	40
4.2	Příprava konjugátů.....	43
4.3	Testování připravených konjugátů	44
5	DISKUZE.....	48
6	ZÁVĚRY	52
7	ZDROJE	53

1 ÚVOD

1.1 Úvod do imunoznačení

Imunoznačení (také imunolokalizace) je imunocytochemická metoda, pomocí které můžeme lokalizovat antigen v buňce, tkáni, nebo organismu. Díky imunoznačení je možné lokalizovat specifické struktury uvnitř buňky (např. peptidy, proteiny, glykoproteidy aj.) (Osamura et al. 2000, Goldberg 2008) a jinak nerozpoznatelné buněčné komponenty (Verkleij a Leunissen 1989).

Tato metoda byla zavedena roku 1942 Coonsem a spol., kteří vyvinuli fluorochromem značené primární protilátky. Následovaly enzymem značené protilátky (křenová peroxidáza) a dále protilátky značené markerem, který obsahoval kov (ferritin). Tyto ferritinové markery byly používány pro značení povrchů buněk, markery z křenové peroxidázy naopak dobře pronikaly do buněk. Oba tyto markery ale nejsou dostatečně elektron-denzní, což ztěžuje jejich odlišení od buněčných struktur, které byly obarveny těžkými kovy (Robinson et al. 1998).

Roku 1971 byly do imunocytochemie zavedeny Faulkem a Taylorem nové markery. Jednalo se o koloidní zlaté částice. Koloidní zlaté částice jsou sférické částice, které mají vysokou elektronovou hustotu, a proto jsou dobře odlišitelné od ostatních buněčných struktur (Robinson et al. 1998). Mezi jejich další vlastnosti patří negativní náboj, díky kterému nedochází k agregaci nanočástic a hydrofobní charakter (Hermanson 2008, Hermann et al. 1991).

Tato technika se nejprve začala využívat pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM), později i pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) (Robinson et al. 1998). Koloidní zlaté nanočástice patří dnes mezi nejpoužívanější markery pro imunolokalizaci, a to z důvodů jejich snadné přípravy, jednoduché detekce a stability (Griffiths 1993, Herman et al. 1991).

V případě potřeby je možné značit i více antigenů zároveň. Pro metodu vícenásobné imunolokalizace je třeba mít k dispozici protilátky označené markery, které je možné v elektronovém mikroskopu dobře odlišit (Bleher et al. 2007). Nejvhodnější je použít Au nanočástice, které se dají vyrobit ve velikosti od 1 nm do 150 nm (Meyer et al. 2010, Hagiwara et al. 2010, Mayhew a Lucocq 2011), ale pro použití v elektronové mikroskopii

jsou nejvhodnější nanočástice, které nepřesahují velikost 20 nm (Bleher et al. 2007). Pro vícenásobné značení ale není vhodné použít nanočástice příliš odlišných velikostí (jako např. 1, 10, 20 nm). Velké markery se nepoužívají z důvodu prostorové blokáce vazebných míst, protože dochází ke snížení účinnosti imunoznačení (Meyer et al. 2010). Nejsou vhodné ani příliš malé markery, a to z důvodu snadného pronikání do tkání, což má za následek zvýšení účinnosti imunoznačení. (Bleher et al. 2007, Hermann et al. 1996). Pro vícenásobné značení byly proto vyvinuty částice různých tvarů (sférické, kubické) a částice z různých kovů (zlato, stříbro, palladium, platina) (Meyer et al. 2010, Kandela et al. 2007, Vancová et al. 2011, Schatten a Pawley 2008).

1.2 Antigen

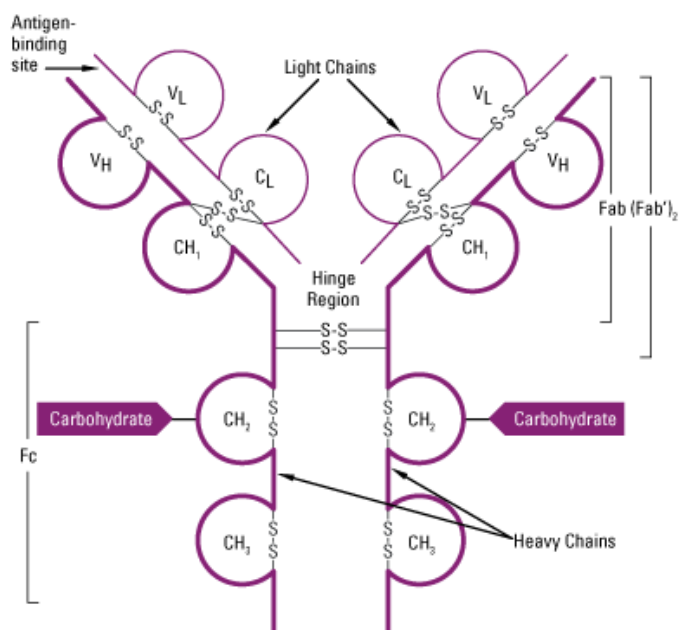
Antigeny jsou molekuly, které stimulují imunitní systém a tím i produkci protilátek. Antigenem může být látka, která je organismu cizí, ale může se jednat i o buňky vlastní, které jsou vnímány jako cizí. Nejčastěji se jedná o proteiny, polysacharidy, nebo nukleové kyseliny. Antigeny, které mají molekulovou hmotnost menší než 5 kDa, musí být navázány na nosič. Takovými antigenům poté říkáme hapteny. V případě, že antigeny nejsou na nosič navázány, nedojde ke stimulaci imunitního systému. Antigeny obsahují místa, tzv. epitopy, kterými se váží na paratopy protilátek = F(ab) konce (Griffiths 1993).

1.3 Protilátka

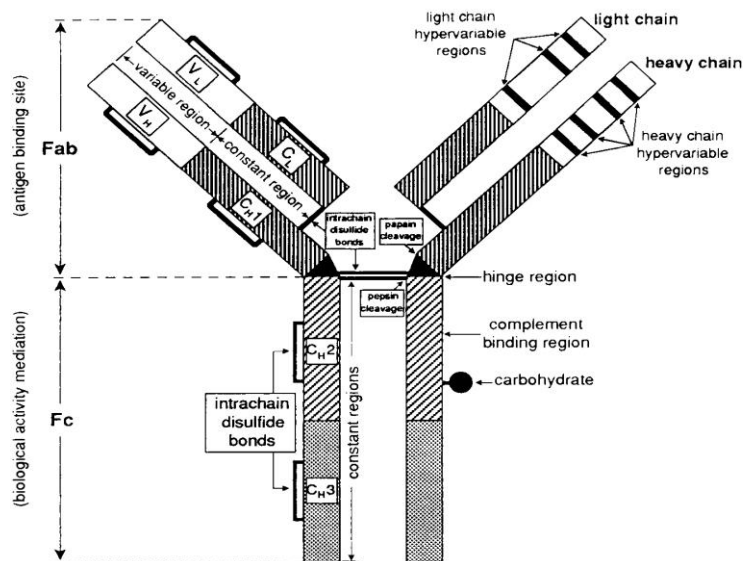
Protilátka neboli imunoglobulin je glykoprotein produkovaný imunitním systémem, jako následek setkání s antigenem. Imunoglobuliny jsou tvořeny B lymfocyty a plasmatickými buňkami.

Protilátka (Obr. 1, 2) má tvar písmene Y a skládá se ze dvou identických těžkých (H, heavy chain) a dvou identických lehkých (L, light chain) řetězců, které jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky (S-S). Každý těžký řetězec má molekulovou hmotnost 50 kDa a každý lehký řetězec 25 kDa. Ve střední části jsou těžké řetězce spojeny disulfidickými můstky prostřednictvím tzv. pantové oblasti. Tato oblast je důležitá pro přizpůsobení tvaru vazebného místa pro konkrétní antigen. Jednotlivé řetězce se skládají z konstantních a variabilních oblastí. Na variabilních oblastech těžkých a lehkých řetězců (tzv. Fab fragment = Fragment antigen binding) se nachází vazebná místa pro antigeny (tzv.

paratopy). Na tyto paratopy se antigeny váží nekovalentními interakcemi. Konstantní oblasti těžkých řetězců tvoří tzv. Fc fragment (= crystallizable fragment), kterým se protilátka váže na Fc receptory (např. na protein A) (Griffiths 1993, Bier et al. 1984, Krejsek a Kopecký 2004).



Obr. 1 – Protilátková molekula, převzato z [32].



Obr. 2 – Vazby mezi řetězci v protilátkové molekule, převzato a upraveno z Griffiths 1993.

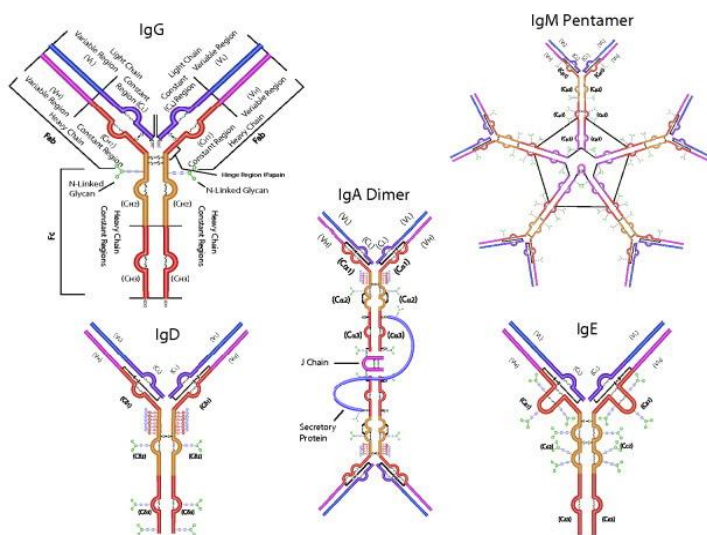
Lehké řetězce se skládají přibližně z 220 aminokyselin a jsou rozděleny do dvou domén. Jsou známy jako kappa (κ) a lambda (λ). Jedna protilátková molekula má pouze jeden typ lehkých řetězců a poměr mezi kappa a lambda je 2 : 1 (Griffiths 1993, Krejsek a Kopecký 2004).

Těžké řetězce se skládají ze 440 až 570 aminokyselin a podle typu imunoglobulinu jsou rozděleny do čtyř, nebo pěti domén (Griffiths 1993). Podle typu těžkých řetězců (γ , α , μ , ϵ a δ) dělíme protilátky do pěti tříd:

- IgG (Obr. 3) je nejčastěji se vyskytujícím imunoglobulinem. Je charakteristický přítomností těžkých řetězců γ . Tvoří 75 % všech imunoglobulinů v séru. Jedná se o monomer, který se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců a jeho molekulová hmotnost je kolem 150 kDa. Tento imunoglobulin má čtyři další podtřídy – IgG₁, IgG₂, IgG₃ a IgG₄ (Krejsek a Kopecký 2004, Griffiths 1993, Bier et al. 1984, Fučíková 1997). Právě tento imunoglobulin i jeho fragmenty se pro imunolokalizaci používá nejčastěji.
- IgA (Obr. 3) je tvořen těžkými řetězci α . Tvoří přibližně 15 % všech protilátek a nacházejí se v sekretech, jako jsou slzy, sliny, nebo mateřské mléko. V séru se

může nacházet jako monomer, ale častěji se nachází jako dimer. Jednotlivé monomerní jednotky jsou spojeny polypeptidovým řetězcem J (= Joining). IgA má molekulovou hmotnost 390 kDa. Tento imunoglobulin má dvě podjednotky – IgA₁ a IgA₂ (Krejsek a Kopecký 2004, Bier et al. 1984, Fučíková 1997).

- IgM (Obr. 3) je charakteristický přítomností těžkých řetězců μ . Tvoří přibližně 10 % všech protilátek v séru a vyskytuje se jako pentamer uspořádaný do kruhu. Tyto monomery jsou spojeny polymerním řetězcem J. IgM se skládá z deseti těžkých a deseti lehkých řetězců, proto by měl teoreticky vázat až 10 antigenů. Z 10 vazebných míst je ale použitelných pouze 5, ostatní vazebná místa jsou prostorově blokována. Jeho molekulová hmotnost je 950 kDa (Krejsek a Kopecký 2004, Griffiths 1993, Bier et al. 1984, Fučíková 1997).
- IgE (Obr. 3) je tvořen těžkými řetězci ϵ a nachází se ve velmi malé koncentraci. Je zodpovědný za alergické reakce a ochranu proti parazitům. Jeho molekulová hmotnost je 200 kDa (Krejsek a Kopecký 2004, Fučíková 1997).
- IgD (Obr. 3) je typický přítomností těžkých řetězců δ . Tento imunoglobulin se vyskytuje v nízké koncentraci. Tvoří asi 0,2 % sérových imunoglobulinů. Jeho funkce není známa, ale spolu s IgM je receptorem B lymfocytů. Jeho molekulová hmotnost je 180 kDa (Krejsek a Kopecký 2004, Fučíková 1997).



Obr. 3 – Jednotlivé třídy imunoglobulinů, převzato z [33].

1.4 Vazba nanočástice na protein

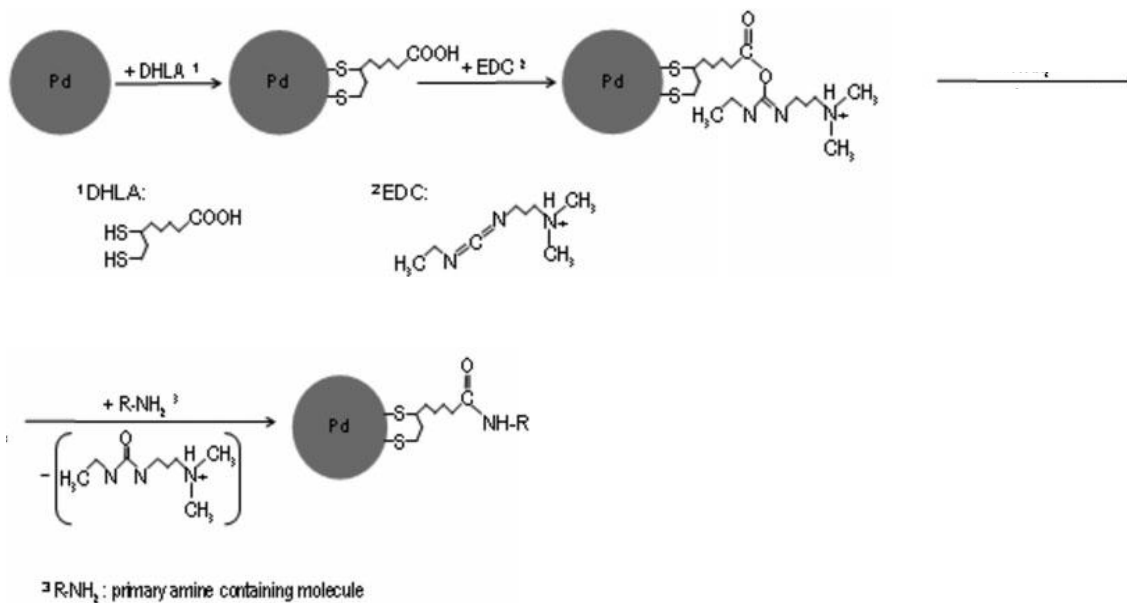
Existují dva typy konjugace nanočástice na protein – nekovalentní a kovalentní.

V případě nekovalentní interakce dochází k vytvoření vazby na základě náboje, kdy má protein kladný náboj, zatímco povrch nanočástice záporný náboj. Mezi tyto interakce patří slabé vazebné interakce, jako jsou hydrofobní interakce, vodíkové můstky, nebo Van der Waalsovy síly (Verkleij a Leunissen 1989).

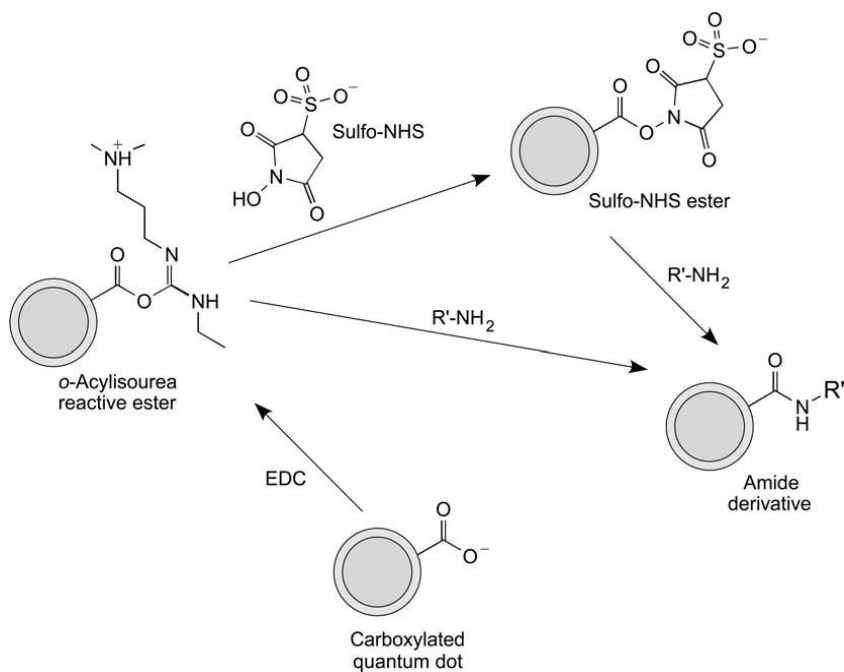
Při kovalentní konjugaci vzniká kovalentní vazba mezi nanočásticí a proteinem. Nanočástice se na proteiny neváží přímo, ale přes kyselinu dihydrolipoovou (DHLA). DHLA obsahuje thiolové skupiny, které se na nanočástici naváží, a DHLA zároveň poskytne karboxylové skupiny pro další konjugaci (Hermanson 2008).

Nanočástici na protein lze navázat přes nekovalentní interakci, nebo je možné použít jednokrokovou reakci přes EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), který nanočástici aktivuje a zajišťuje vazbu mezi karboxylovou skupinou DHLA a aminoskupinou proteinu. (Obr. 4) (Hermanson 2008, Bartczak a Kanaras 2011, Vancová et al. 2011). Také lze použít dvoukrokovou reakci, při které je použito EDC zároveň se sulfo-NHS a poté dochází k vazbě proteinu (Obr. 5).

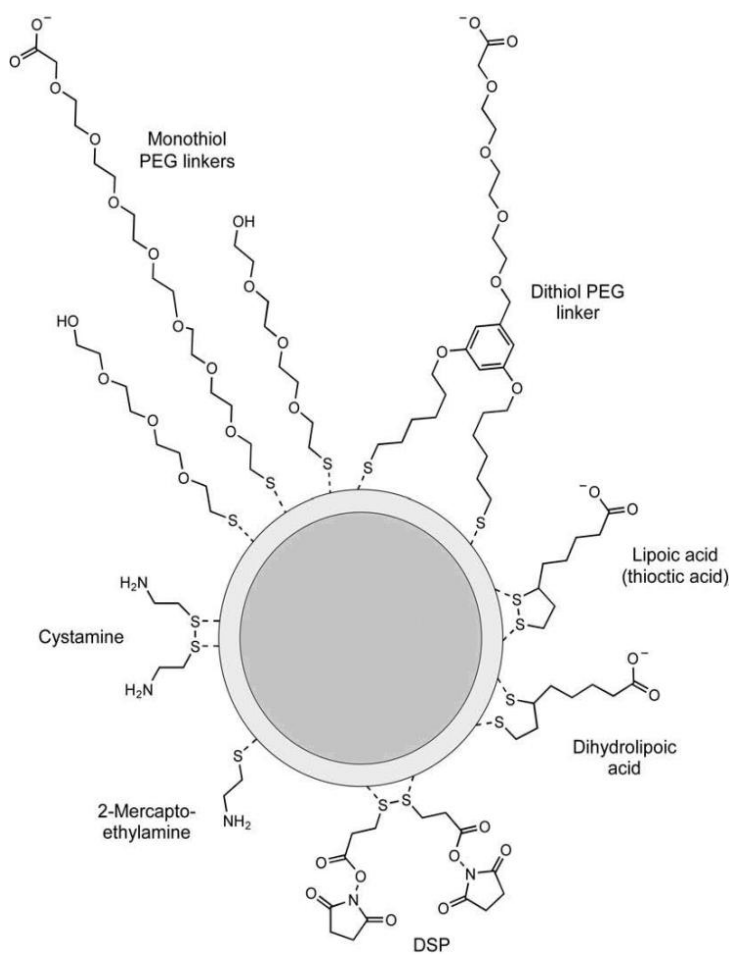
Existují i jiné možnosti, jak navázat nanočástici na protein (Obr. 6), ale u těchto možností je nevýhoda zvětšujícího se průměru nanočástice (Hermanson 2008).



Obr. 4 – Obalení nanočástice pomocí DHLA a následná vazba EDC, převzato a upraveno z Vancová 2011.



Obr. 5 – Jednokroková a dvoukroková reakce, převzato z Hermanson 2008.



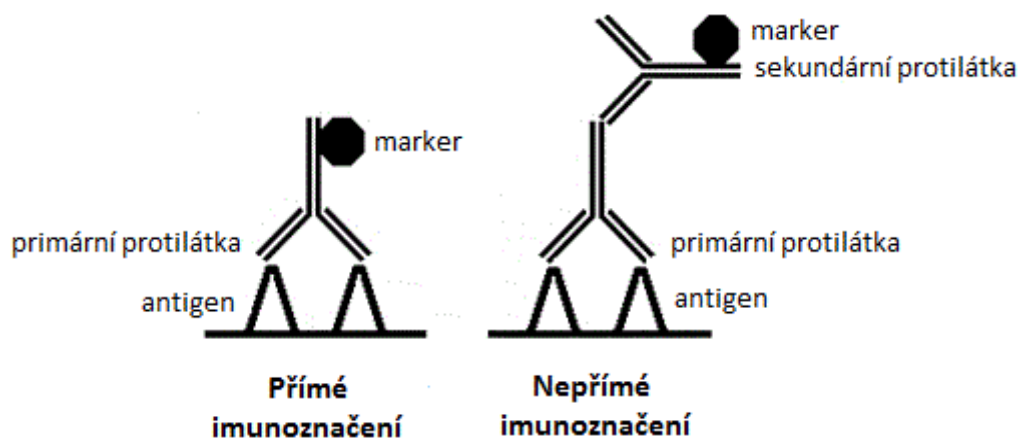
Obr. 6 – Jiné možnosti vazby nanočástice na protein, převzato z Hermanson 2008.

1.5 Metody imunozačeni

Existují dvě metody imunozačeni – přímé a nepřímé (Obr. 7).

Při přímém imunozačeni reaguje primární protilátka, na kterou je navázán marker, přímo s antigenem.

Při nepřímém imunozačeni se primární protilátka váže svým F(ab) fragmentem na antigen. Na Fc konec primární protilátky se naváže sekundární protilátka, protein A, nebo protein G, na který je navázán marker. Sekundární protilátka je většinou polyklonální tzn., že se na primární protilátku může navázat více molekul protilátky sekundární. Tím dochází k zesílení signálu (Hermann et al. 1991, Hermann et al. 1996, Goldberg 2008).



Obr. 7 – Přímé a nepřímé imunozačeni, převzato a upraveno z ^[34].

1.6 Typy elektronových mikroskopů

Pro detekci imunoznačených preparátů se mimo jiné používá transmisní a skenovací elektronový mikroskop. Obraz v těchto elektronových mikroskopech vzniká interakcí mezi elektrony a preparátem.

1.6.1 Transmisní elektronový mikroskop

Tento typ elektronového mikroskopu je obdobou světelného mikroskopu. Liší se tím, že je světelný zdroj nahrazen zdrojem elektronů. Elektrony jsou emitovány wolframovou katodou o průměru ~ 100 nm. Dále procházejí soustavou elektromagnetických čoček a dopadají na preparát. Při dopadu může dojít ke dvěma situacím. V případě, že se elektron odchýlí do jiného směru, ale nedojde ke ztrátě energie, nastává tzv. pružný rozptyl. V případě, že dochází ke ztrátě energie elektronu (např. při srážce s jiným elektronem), ale nedojde k vychýlení z jeho dráhy, mluvíme o nepružném rozptylu (Goldberg 2008).

1.6.2 Skenovací elektronový mikroskop

Pro detekci imunoznačených preparátů je nezbytné použít tzv. vysoko-rozlišovací SEM, ve kterém se jako zdroj primárních elektronů používá autoemisní tryska, jejíž průměr je 60 – 200 nm. Rozlišení v SEM závisí na průměru fokusovaného svazku primárních elektronů dopadajících na vzorek, dále na použitém urychlovacím napětí a pozici preparátu vůči detektoru. Výhodou autoemisní trysky je, že poskytuje vysoké rozlišení i v případě použití nízkého urychlovacího napětí (pod 5 kV). Např. FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) JEOL 7401F v Laboratoři elektronové mikroskopie dosahuje rozlišení 1,5 nm při urychlovacím napětí 1 kV v sekundárních elektronech v gentle beam modu (mod bržděných elektronů). K SEM s největším rozlišením patří mikroskopy, ve kterých se vzorek vkládá do nejtěsnější blízkosti pólových nástavců objektivové čočky (semi-lens systém), nebo přímo do nich (in lens systém).

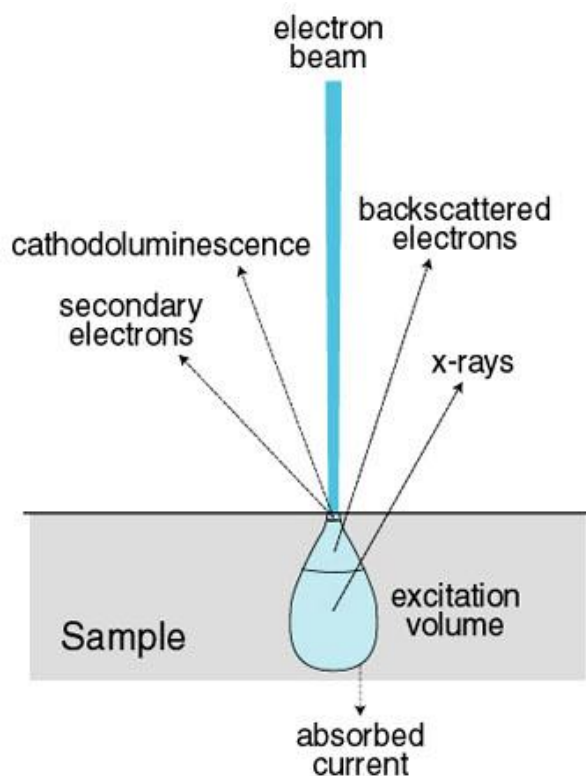
Autoemisní tryska emituje elektrony, které procházejí soustavou elektromagnetických čoček, jejichž hlavním úkolem je fokusovat svazek elektronů, aby v co nejmenší stopě dopadl na preparát. Stejně jako v případě transmisního elektronového

mikroskopu, při interakci primárních elektronů s atomy vzorku dochází k pružnému a nepružnému rozptylu. Při pružném rozptylu vznikají zpětně odražené elektrony a při nepružném rozptylu dochází k předání energie elektronů atomům preparátu a poté k uvolnění sekundárních elektronů, rentgenova záření, Augerových elektronů a katodoluminiscenci (Obr. 8) (Goldberg 2008).

K tvorbě obrazu se používají nejčastěji sekundární a zpětně odražené elektrony. Sekundární elektrony poskytují topografický obraz, zatímco zpětně odražené elektrony jsou citlivé na prvkové složení vzorku, a proto jsou vhodné k detekci kovových nanočástic používaných jako markery při imunolokalizaci (Müller et al. 1989).

K detekci zpětně odražených elektronů se ve FESEM používá Atrata YAG detektor (Yttrium aluminium garnet), který vykazuje vysokou citlivost a proto je vhodný k detekci zpětně odražených elektronů, které jsou produkovány koloidními nanočásticemi.

Pokud mají molekuly ve vzorku, které pozorujeme v modu zpětně odražených elektronů vysokou molekulovou hmotnost, je oblast, kterou vidíme bílá, v opačném případě je tmavá a špatně rozpoznatelná (Verkleij a Leunissen 1989, Hermann et al. 1991).



Obr. 8 – Excitační objem, převzato z ^[35].

2 CÍLE PRÁCE

- 1/** Provést literární rešerši k zadané problematice.
- 2/** Zvládnout teoretické i experimentální základy práce s transmisním a skenovacím elektronovým mikroskopem.
- 3/** U vybraných nanočástic vyzkoušet různé postupy jejich konjugace a pomocí transmisního a skenovacího elektronového mikroskopu ověřit kvalitu získaného konjugátu.
- 4/** Vhodné konjugáty použít k imunolokalizaci v elektronových mikroskopech.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Seznam použitých chemikálií a materiálů

2-MEA – Cysteamine hydrochloride, Fluka Analytical, MW = 113,61

BSA – Hovězí sérový albumin, Sigma Aldrich

Centrifugační kolonky Corning® Spin-X® UF 500 µl Concentrators

Cut off kolonky – Amicon Ultra - 0,5 ml, 100 kDa centrifugal filters, EMD Millipore Corporation Billerica

DHLA – Dihydrolipoová kyselina, Sigma Aldrich, MW = 208,34

Dihydrogenfosforečnan sodný – Sigma Aldrich, MW = 119,98

EDC – N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochlorid, Sigma Aldrich, MW = 191,70

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová, Sigma Aldrich, MW = 292,24

FSG – Želatina z kůže ryb, Sigma Aldrich

Glycin – Sigma Aldrich, MW = 75,07

Hydrogenuhlíčan sodný – Lachema, MW = 84,01

Chlorid sodný – Sigma Aldrich, MW = 58,44

IgG – ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), unconjugated, Thermo Scientific, Mr = 150 kDa

Kolonky na sacharózový gradient - Beckman

Králičí anti-BSA biotin – Sigma Aldrich

Kuřecí anti-BSA biotin – Agrisera

Myší anti-BSA biotin – Sigma Aldrich

PBS – fosfátový pufr, obsahuje $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a NaCl

Polyetylglykol – Polyethylene glycol 20 000, Serva

Protein A – Protein A izolovaný z bakterie *Staphylococcus aureus*, Sigma Aldrich, Mr = 42 kDa

Streptavidin – ThermoFisher Scientific, Mr = 60 kDa

Sulfo-NHS – N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, MW = 217,13

Tween 20 – ChemCruz™, MW = 1228

Uhlíčan draselný – Lachema, MW = 138,2

3.2 Seznam nanočástic

V tabulce (Tab. I) jsou uvedeny všechny nanočástice, které jsem při své práci používala.

Tab. I – Seznam použitých nanočástic.

NANOČÁSTICE/ /KONJUGÁT	VELIKOST (nm)	TVAR	pH	VÝROBCE	KONJUGACE
Pd	10	sférické	6,5	ÚMCH	Kovalentní konjugace <ul style="list-style-type: none"> • se streptavidinem • s proteinem A
Pd	15	kubické	~ 7	ÚMCH	Kovalentní konjugace <ul style="list-style-type: none"> • se streptavidinem • s proteinem A • se sulfo-NHS a streptavidinem • s IgG (r IgG) Nekovalentní konjugace <ul style="list-style-type: none"> • s IgG
Au + streptavidin	10	sférické	8,4	AURION	-
Au + protein A	10	sférické	8,2	AURION	-

Sférické palladiové nanočástice o velikosti 10 nm byly připraveny v laboratoři RNDr. Miroslava Šloufa, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i (ÚMCH). Tyto nanočástice byly připraveny řízenou redukcí chloridu palladnatého s citrátem sodným (Vancová 2011).

Kubické palladiové nanočástice o velikosti 15 nm byly také připraveny v laboratoři RNDr. Miroslava Šloufa, Ph.D. Tyto nanočástice byly vyrobeny řízenou redukcí tetrachloropalladnanu sodného s kyselinou askorbovou ve vodě. Výroba probíhala za přítomnosti polyvinylpyrrolidonu a bromidu draselného (Slouf et al. 2012).

Konjugáty sférických zlatých nanočástic byly dodány firmou AURION. Konjugáty byly dodány v PBS s 1% BSA a 15mM NaN₃. Tyto konjugáty sloužily jako standardy^[30].

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Testování suspenze nanočástic a dodaných konjugátů

Suspenze nanočástic a dodaných konjugátů jsem testovala v TEM. Pro tyto účely jsem používala neznačené niklové síťky 300 MESH s ultratenkou loukotí (SPI Supplies), které jsem potáhla tenkou formwarovou blánou. Na ně jsem nakápla 6 μ l nanočástic nebo dodaných konjugátů, nechala 5 minut adherovat, poté jsem odsála přebytek roztoku a nechala uschnout na vzduchu. Před pozorováním v mikroskopech jsem síťky pouhlikovala v napařovací aparatuře JEOL JEE 4C tenkou vrstvičkou uhlíku, čímž dojde k odvedení náboje. Cílem pozorování v TEM a FESEM bylo stanovit distribuci velikostí nanočástic v suspenzi a přítomnost agregátů.

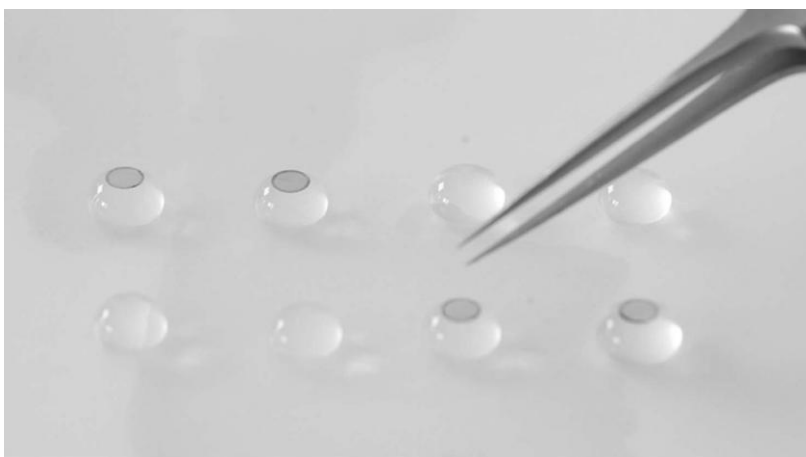
3.3.2 Příprava vzorku BSA

Pro vyhodnocení imunoznačení jsem použila vzorek BSA, který mi sloužil jako standard. 150 mg BSA bylo rozpuštěno v 5 ml 10% roztoku želatiny. Roztok byl poté nalit na Petriho misku a nechán v chladu, aby ztuhl. Po ztuhnutí byl rozkrájen a fixován po dobu 24 hodin na ledu 4% paraformaldehydem s přídavkem 0,1% glutaraldehydu v 0,1M fosfátovém pufru. Potom byl na ledu 3x promyt po 15 minutách 0,1M fosfátovým pufrům s 0,02M glycinem. Po promytí 30% etanolem (30 minut na ledu) byl přemístěn do jednotky pro mrazovou substituci (Leica EM AFS), kde byl při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny postupně dehydratován roztoky 50%, 70%, 90% a 100% etanolu. Na závěr byl vzorek BSA prosycen při $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pryskyřicí LR White po dobu 1 hodiny v poměru 1 díl LR White : 2 díly 100% etanolu, dále 1 : 1, 2 : 1 a ve 100% pryskyřici byl ponechán přes noc. Další den byl vzorek přendán do polyetylenových kapslí a nechán při $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 48 hodin polymerovat při UV světle. Výsledné bločky s BSA byly poté nakrájeny pomocí diamantového nože (Diatome) na 70 - 80 nm silné řezy na ultramikrotomu Leica UCT.

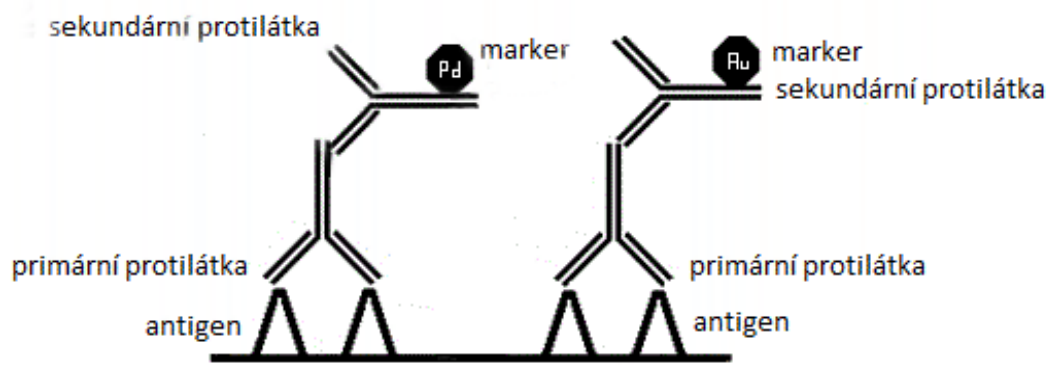
3.4 Postup při imunoznačení

Do Petriho misky jsem vložila parafilm a po okrajích misky naskládala mokrou buničinu, aby nedošlo k odpaření následně napipetovaných kapek různých roztoků. Nejprve jsem na parafilm napipetovala několik kapek blokovacího roztoku (Obr. 9), do kterého jsem dala síťky, aby došlo k zablokování nescifických vazebných míst. Blokovací roztok obsahuje fosfátový pufr (PBS) o $\text{pH} = 7,30 - 7,40$, 0,05% Tween a 0,02M Glycin. Po zablokování nescifických vazebných míst následuje navázání primární protilátky. Poté následuje první promytí sítěk v mycím roztoku, aby došlo k odstranění nenavázaných primárních protilátek. Mycí roztok obsahuje 0,05% Tween v 0,01M PBS. Dalším krokem je navázání sekundární protilátky, která nese marker, na protilátku primární. Po navázání sekundární protilátky opět následuje promytí sítěk v mycím roztoku, dále v roztoku 0,01M PBS a nakonec ve vodě.

Při vícenásobném imunoznačení je postup podobný. Nejdříve se zablokují nescifická vazebná místa, následuje navázání primární protilátky a promytí. Poté se na primární protilátku váže protilátka sekundární, která obsahuje dva, nebo tři markery (podle toho, zda se jedná o dvojnásobné, nebo trojnásobné imunoznačení) (Obr. 10). Opět následuje promytí v mycím roztoku, dále v roztoku 0,01M PBS a nakonec ve vodě.



Obr. 9 – Značení sítěk, převzato z Griffiths 2003.



Obr. 10 – Princip vícenásobného imunozačení.

3.5 Postupy konjugace různých nanočástic

PROTOKOL č. 1 - Pd10s konjugovány se streptavidinem

Odebrala jsem 500 μ l nanočástic (o koncentraci 10 μ g/ml) a přidala DHLA v hmotnostním poměru 1 : 10 (c DHLA = 2 mg/ml, tj. přidáno 25 μ l). Směs jsem poté nechala míchat 2 hodiny při pokojové teplotě.

Poté jsem přidala roztok streptavidinu v hmotnostním poměru 10 : 1 streptavidin : nanočástice (c streptavidinu = 1 mg/ml, tj. přidáno 50 μ l) Směs jsem nechala míchat 1 hodinu při pokojové teplotě.

Nakonec jsem přidala 20 μ l 0,026M konjugačního činidla EDC ve vodě. Směs jsem nechala míchat 1,5 hodiny při pokojové teplotě.

K přečištění konjugátu od nezreagovaného proteinu a ostatních složek a k jeho zakoncentrování jsem použila 100 kDa cut off kolonky. Konjugát jsem promývala 7x (přidavky po 400 μ l) 5mM borátovým pufrům o pH = 7 za použití centrifugy 4500 g/4 °C/5 minut.

Nakonec jsem oddělila promytý konjugát od nezreagovaných nanočástic centrifugací 25800 g/4 °C/15 minut. Konjugát jsem poté odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. II).

Tab. II – Postup při značení sítěk konjugátem Pd10s + streptavidin.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,40 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin (2 hod.)	Kuřecí anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd10s + streptavidin (2 hod.), neředěno Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 2 - Pd10s konjugovány s proteinem A

Odebrala jsem 500 μ l nanočástic (o koncentraci 10 μ g/ml) a přidala DHLA v hmotnostním poměru 1 : 10 (c DHLA = 2 mg/ml, tj. přidáno 25 μ l). Směs jsem nechala míchat 2 hodiny při pokojové teplotě.

Poté jsem k palladiovým nanočásticím přidala roztok proteinu A v hmotnostním poměru 1 : 90 nanočástice : protein A (c proteinu A = 6 mg/ml, tj. přidáno 75 μ l). Směs jsem nechala míchat a mezitím jsem připravila 50 μ l 10,4mM konjugačního činidla EDC, které jsem přidala k nanočásticím a nechala míchat 1,5 hodiny při pokojové teplotě.

K přečištění konjugátu od nezreagovaného proteinu a ostatních složek a k jeho zakoncentrování jsem použila 100 kDa cut off kolonky. Konjugát jsem promývala 7x (přidavky po 400 μ l) 5mM borátovým pufrem o pH = 7 za použití centrifugy 4500 g/4 °C/5 minut.

Nakonec jsem oddělila promytý konjugát od nezreagovaných nanočástic centrifugací 25800 g/4 °C/15 minut. Konjugát jsem poté odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. III).

Tab. III – Postup při značení sítěk konjugátem Pd10s + protein A.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,40 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin + 1% FSG (2 hod)	Králíčí anti-BSA biotin (2 hod), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd10s + protein A (2 hod), ředěno 1 : 10 Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 3 - Pd15c konjugovány se streptavidinem

Odebrala jsem 500 μ l nanočástic (o koncentraci 500 μ g/ml) a přidala DHLA v hmotnostním poměru 1 : 10 (c DHLA = 2 μ g/ μ l, tj. přidáno 1250 μ l). Směs jsem nechala míchat 2 hodiny při pokojové teplotě.

Poté jsem k nanočásticím přidala roztok streptavidinu v hmotnostním poměru 10 : 1 streptavidin : nanočástice (c streptavidinu = 2 mg/ml, tj. přidáno 1250 μ l). Připravila jsem 20 μ l 10,4mM konjugačního činidla EDC, které jsem poté přidala k nanočásticím a nechala míchat 1,5 hodiny při pokojové teplotě.

K přečištění konjugátu od nezreagovaného proteinu a k jeho zakoncentrování jsem použila 100 kDa cut off kolonky. Konjugát jsem promývala 6x (přidavky po 400 μ l) 5mM borátovým pufrům o pH = 7 za použití centrifugy 4500 g/4 °C/5 minut.

Nakonec jsem oddělila promytý konjugát od nezreagovaných nanočástic centrifugací 25800 g/4 °C/15 minut. Konjugát jsem odsála do nové vialky a použila k imunozačení (Tab. IV).

Tab. IV – Postup při značení sítěk konjugátem Pd15c + streptavidin.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,34 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin (2 hod.)	Kuřecí anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd15c + streptavidin (2 hod.), ředěno 1 : 10 Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 4 - Pd15c konjugovány s proteinem A

Odebrala jsem 500 µl nanočástic (o koncentraci 500 µg/ml) a přidala protein A v hmotnostním poměru 1 : 2 nanočástice : protein A (c proteinu A = 2 mg/ml, tj. přidáno 250 µl). Směs jsem nechala míchat 2 minuty při pokojové teplotě.

Mezitím jsem připravila 1% PEG. Na 1 ml konjugátu jsem přidala 25 µl roztoku PEG (tj. přidáno 12,5 µl). Směs jsem nechala míchat 5 minut při pokojové teplotě, poté 1 hodinu při 4 °C.

K přečištění konjugátu od nezreagovaného proteinu a ostatních složek a k jeho zakoncentrování jsem použila 100 kDa cut off kolonky. Konjugát jsem promývala 8x (přídavky po 400 µl) 5mM NaHCO₃ puforem o pH = 7 za použití centrifugy 4500 g/4 °C/7 minut.

Nakonec jsem promytý konjugát oddělila od nezreagovaných nanočástic centrifugací 25800 g/4 °C/15 minut. Připravený konjugát jsem odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. V).

Tab. V – Postup při značení sítěk konjugátem Pd15c + protein A.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,30 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin (90 min.)	Králičí anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd15c + protein A (2 hod.), ředěno 1 : 10 Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 5 - Pd15c – dvoukroková reakce se sulfo-NHS a streptavidinem

Odebrala jsem 15 µl nanočástic (o koncentraci 500 µg/ml). Připravila jsem 100 µl 0,2M sulfo-NHS a přidala k nanočásticím. Směs jsem nechala míchat 1 hodinu při pokojové teplotě.

Poté jsem připravila 50 µl 0,2M konjugačního činidla EDC a přidala k nanočásticím. Poté jsem přidala roztok streptavidinu v hmotnostním poměru 1 : 5 streptavidin : nanočástice (c streptavidinu = 1 mg/ml, tj. přidáno 50 µl). Směs jsem nechala míchat 24 hodin při pokojové teplotě.

K zakoncentrování a oddělení nanočástic od nezreagovaných složek jsem použila 100 kDa cut off kolonky. Konjugát jsem promývala 7x (přídavky po 400 µl) 5mM borátovým pufrům o pH = 7 za použití centrifugy 4500 g/4 °C/6 minut.

Nakonec jsem oddělila promytý konjugát od nezreagovaných nanočástic centrifugací 25800 g/4 °C/15 minut. Připravený konjugát jsem poté odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. VI).

Tab. VI – Postup při značení sítěk konjugátem Pd15c + sulfo-NHS + streptavidin.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,30 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin (2 hod.)	Kuřecí anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd15c + streptavidin (1 hod.), ředěno 1 : 10 Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 6 - Pd15c – dvoukroková reakce se sulfo-NHS a streptavidinem

Odebrala jsem 100 µl nanočástic (o koncentraci 500 µg/ml) a 5x promyla 5mM borátovým pufrům o pH = 7. Připravila jsem 100 µl 0,2M sulfo-NHS a přidala k nanočásticím. Směs jsem nechala míchat 1 hodinu při pokojové teplotě.

Poté jsem připravila 50 µl 0,2M konjugačního činidla EDC a přidala k nanočásticím. Poté jsem k nanočásticím přidala roztok streptavidinu v hmotnostním poměru 1 : 18 nanočástice : streptavidin (c streptavidinu = 2 mg/ml, tj. přidáno 450 µl). Směs jsem nechala míchat 24 hodin při pokojové teplotě.

K přečištění konjugátu od nezreagovaného proteinu a ostatních složek a k jeho zakoncentrování jsem použila 100 kDa cut off kolonky. Konjugát jsem promývala 7x (přidavky po 400 µl) 5mM borátovým pufrům o pH = 7 za použití centrifugy 4500 g/21 °C/6 minut.

Nakonec jsem oddělila promytý konjugát od nezreagovaných nanočástic centrifugací 25800 g/21 °C/15 minut. Připravený konjugát jsem odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. VII).

Tab. VII – Postup při značení sítěk konjugátem Pd15c + sulfo-NHS + streptavidin.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,30 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin (2 hod.)	Kuřecí anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd15c + streptavidin (1 hod.), ředěno 1 : 10 Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 7 - Pd15c konjugovány s r IgG

Připravila jsem si pufr, který obsahuje 0,01M dihydrogenfosforečnan sodný, 0,25M chlorid sodný a 5mM EDTA. Upravila jsem jeho pH pomocí K₂CO₃ na 7,2.

Poté jsem odebrala 10 µl IgG protilátky (c = 2 mg/ml) a naředila v poměru 1 : 1 s pufrém (viz výše). Přidala jsem 120 µl 50mM 2-MEA a nechala inkubovat 90 minut při 37 °C.

Poté jsem směs promyla v kolonce Corning Spin-X UF 500µl Concentrators centrifugací 14100 g/22 °C/15 minut. Ke směsi jsem přidala 120µl nanokostek a nechala inkubovat 60 minut. Nakonec jsem oddělila konjugát od nezreagovaného proteinu centrifugací 25800 g/21 °C/15 minut. Připravený konjugát jsem odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. VIII).

Tab. VIII – Postup při značení sítěk konjugátem Pd15c + r IgG.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
PBS, pH 7,34 + 0,05% Tween + 0,02M Glycin (2 hod.)	Kuřecí anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 40 Následuje mytí 1*	Pd15c + IgG (2 hod.), ředěno 1 : 5 Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 0,01M PBS + 0,05% Tween

– promývat 6x po 3 min.

* Mytí 2 – 3x 0,01M PBS + 0,05% Tween

– 3x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat vždy 3x po 3 min.

PROTOKOL č. 8 - Pd15c – nekovalentní interakce s IgG

Odebrala jsem 100 µl nanočástic Pd15c (o koncentraci 500 µg/ml) a upravila jejich pH pomocí K₂CO₃ na 8,5. Poté jsem přidala 10 µl IgG (c = 11,5 mg/ml). Intenzivně jsem směs míchala 2 minuty. Poté jsem k zabránění agregace přidala 0,25 % PEG. PEG jsem k nanočásticím přidala v hmotnostním poměru 1 : 1 (tj. přidáno 110 µl). Směs jsem nechala míchat 5 minut, poté jsem ji nechala inkubovat přes noc při 4 °C.

K oddělení nenačíslených protilátek jsem použila sacharózový gradient (centrifugace 6600 g/4 °C/1 hodina). Připravený konjugát jsem odsála do nové vialky a použila k imunoznačení (Tab. IX).

Tab. IX – Postup při značení sítěk konjugátem Pd15c + IgG.

BLOKOVACÍ ROZTOK	PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA	SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA
1% FSG (2 hod.)	Myší anti-BSA biotin (2 hod.), ředěno 1 : 30 Následuje mytí 1*	Pd15c + IgG (2 hod.), ředěno 1 : 1 s 1% FSG Následuje mytí 2*

* Mytí 1 – 1% FSG

– promývat 6x po 2 min.

* Mytí 2 – 6x 0,01M PBS

– 3x H₂O

– promývat po 2 min.

4 VÝSLEDKY

4.1 Charakterizace nanočástic

Prvním krokem mé diplomové práce bylo u laboratorně připravených Pd nanočástic zjistit jejich stabilitu pod elektronovým svazkem a rozložení velikostí nanočástic.

Charakterizaci velikosti jsem provedla pomocí prohlížení sítěk, které byly připraveny dle postupu uvedeného na str. 15. Tyto sítěky jsem pozorovala v TEM při zvětšení 300 000 a urychlovacím napětí 80 kV a ve FESEM při zvětšení 100 000 a urychlovacím napětí 8 kV.

Ze snímků Pd10s, Pd15c, Au10s + streptavidin a Au10s + protein A, které jsem získala v TEM i FESEM, jsem stanovila distribuci velikostí těchto nanočástic. Snímky, které jsem pořídila v TEM jsem vyhodnocovala na obrazovce monitoru CCD kamery pomocí měřicího softwaru během jejich pořizování. Snímky, které jsem pořídila ve FESEM jsem vyhodnocovala pomocí programu Image J ^[36]. V tomto programu jsem využila funkce prahování, která mi dovolila určit stupeň šedi, pod kterým byl objekt bílý, nad kterým byl černý. V takto upravených snímcích jsem poté pro nanočástice určila počet pixelů a z nich jsem vypočítala plochu, kterou zaujímají. Tato plocha byla ekvivalentní kruhovému průmětu nanočástic. Ze vztahu pro plochu kruhu jsem poté vypočítala ekvivalentní průměr nanočástic. Dále jsem pomocí programu Image J zjistila Feretův průměr, což je největší vzdálenost mezi dvěma body na obvodu nanočástice.

Zjištěná data jsem poté zpracovala v programu Microsoft Office Excel, pomocí kterého jsem určila aritmetický průměr velikosti nanočástic a směrodatnou odchylku.

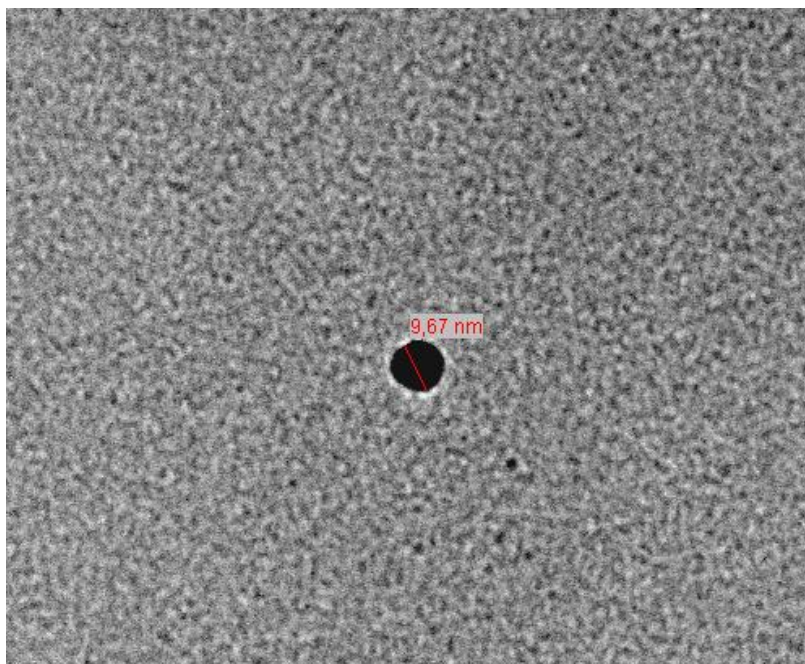
Na každé síťce jsem náhodně zaznamenávala snímky tak dlouho, dokud jsem nezískala dostatečný počet nanočástic, který převyšoval 500. Měření jsem nejprve prováděla v TEM, poté ve FESEM.

U sférických nanočástic jsem zjišťovala jejich průměr a u kubických délku strany. Naměřené hodnoty jsem zaokrouhlovala tak, že když byl průměr nanočástice 5,2 zaokrouhlovala jsem na 5, pokud byl 5,3, zaokrouhlovala jsem na 5,5.

Získané výsledky jsem zaznamenala do tabulek (Tab. X, XI, XIV, XV, XVIII, XIX, XXII, XXIII), kde jsou uvedena rozložení počtu nanočástic pro jednotlivá velikostní pásma. Z těchto tabulek jsem poté vytvořila histogramy (Obr. 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26).

Porovnání ekvivalentních průměrů a Feretův průměr jsem uvedla v závěrečných tabulkách (Tab. XII, XIII, XVI, XVII, XX, XXI, XXIV, XXV).

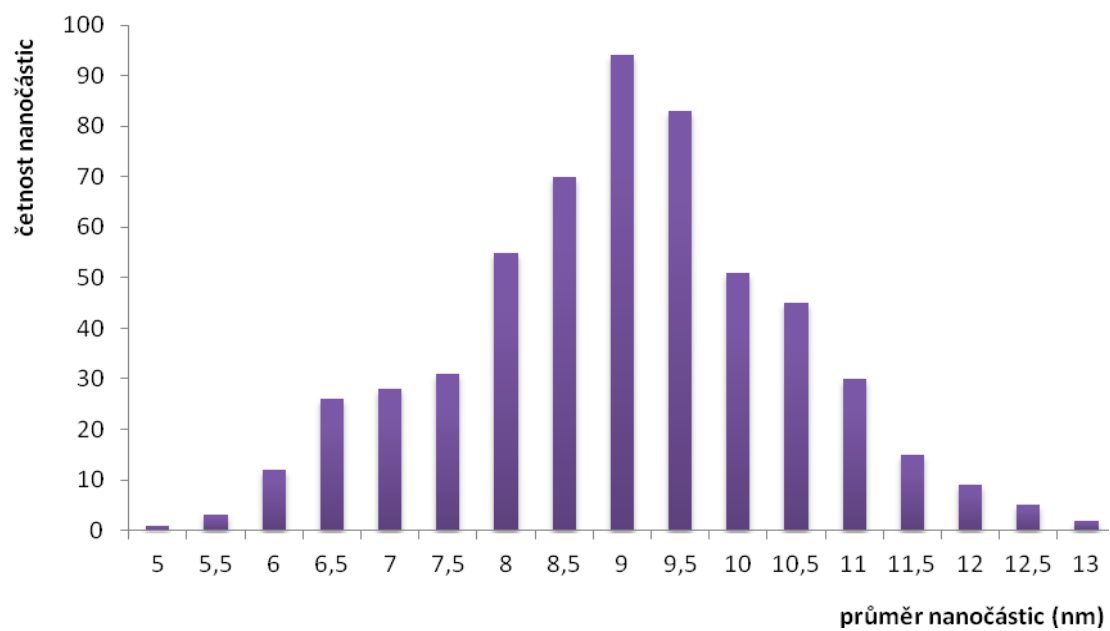
4.1.1 Stanovení distribuce nanočástic Pd10s v TEM



Obr. 11 – Měření průměru nanočástic Pd10s v TEM.

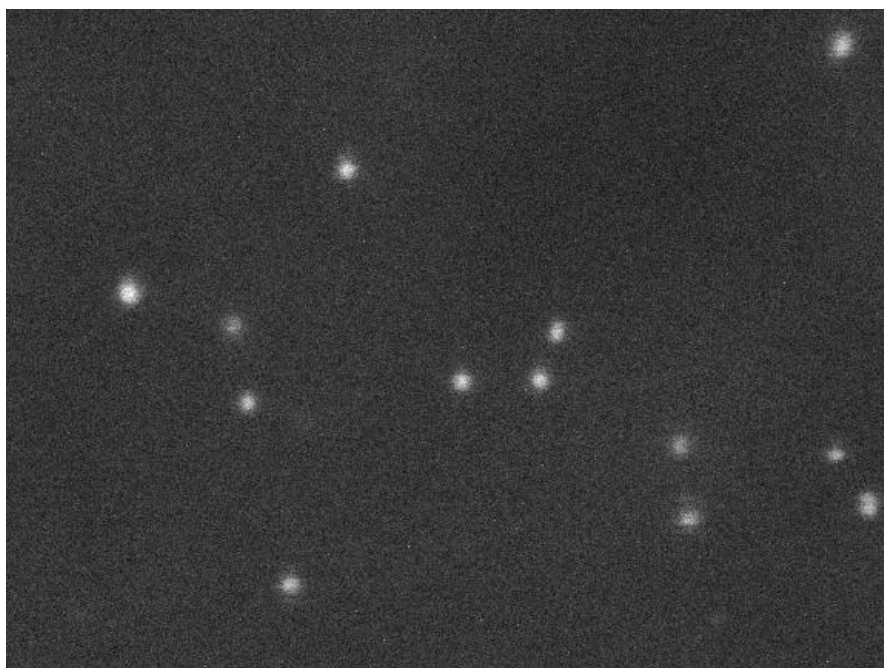
Tab. X – Průměr nanočástic Pd10s a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
5	1	9,5	83
5,5	3	10	51
6	12	10,5	45
6,5	26	11	30
7	28	11,5	15
7,5	31	12	9
8	55	12,5	5
8,5	70	13	2
9	94		



Obr. 12 – Distribuce velikostí nanočástic Pd10s.

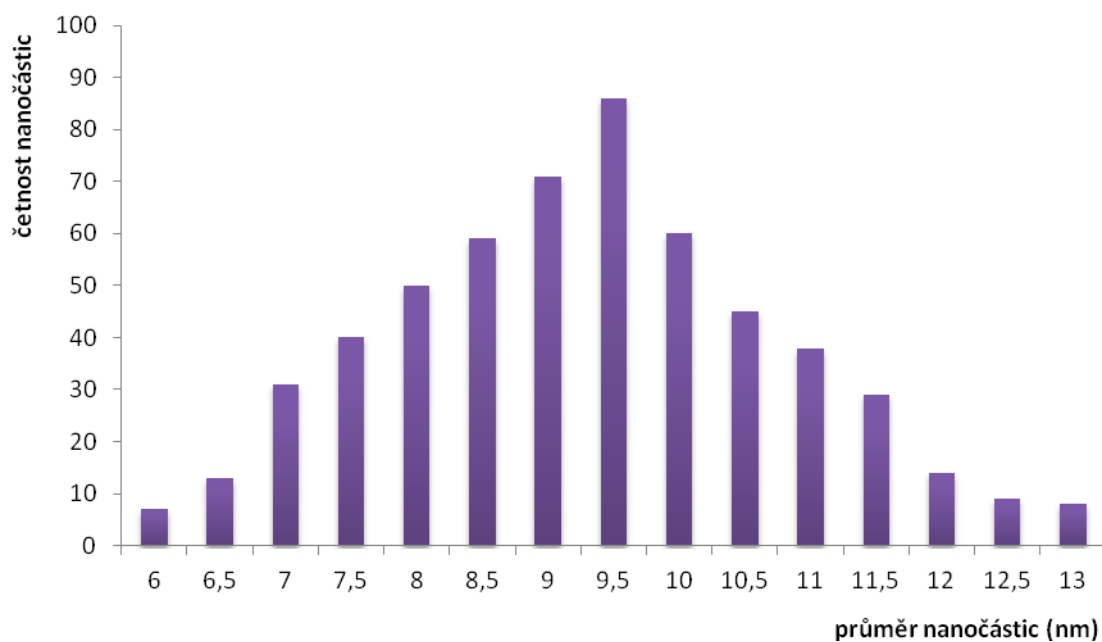
4.1.2 Stanovení distribuce nanočástic Pd10s ve FESEM



Obr. 13 – Měření průměru nanočástic Pd10s ve FESEM.

Tab. XI – Průměr nanočástic Pd10s a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
6	7	10	60
6,5	13	10,5	45
7	31	11	38
7,5	40	11,5	29
8	50	12	14
8,5	59	12,5	9
9	71	13	8
9,5	86		



Obr. 14 – Distribuce velikostí nanočástic Pd10s.

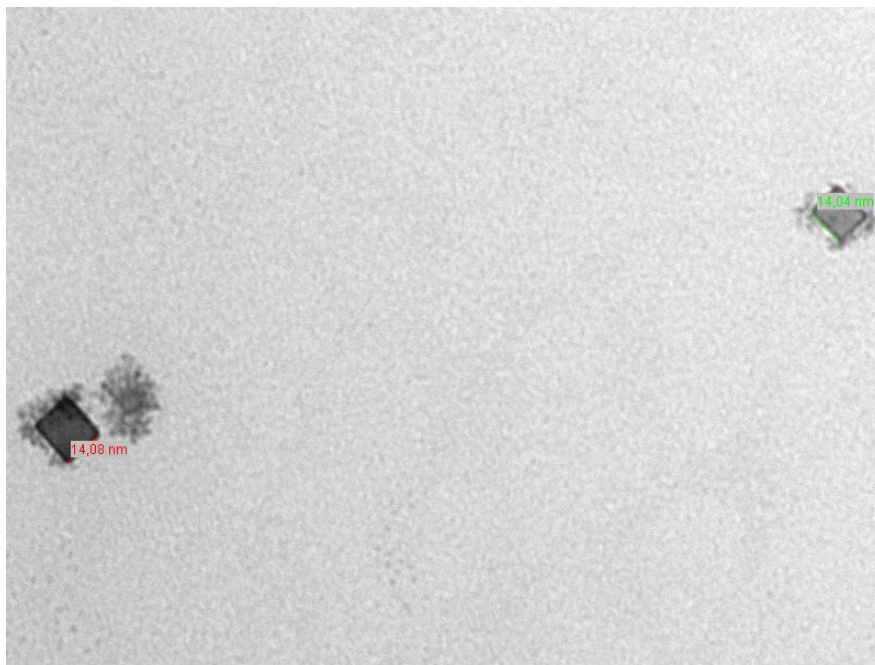
Tab. XII – Hodnoty získané měřením v TEM a FESEM.

TEM		FESEM	
Počet nanočástic	560	Počet nanočástic	560
Ekvivalentní průměr	9,0	Ekvivalentní průměr	9,3
Směrodatná odchylka	1,4	Směrodatná odchylka	1,5
Minimum	5,0	Minimum	6,0
Maximum	13,0	Maximum	13,0

Tab. XIII – Hodnoty získané měřením ve FESEM.

FESEM – Feret	
Počet nanočástic	560
Feretův průměr	12,8
Směrodatná odchylka	1,8
Minimum	9,0
Maximum	18,0

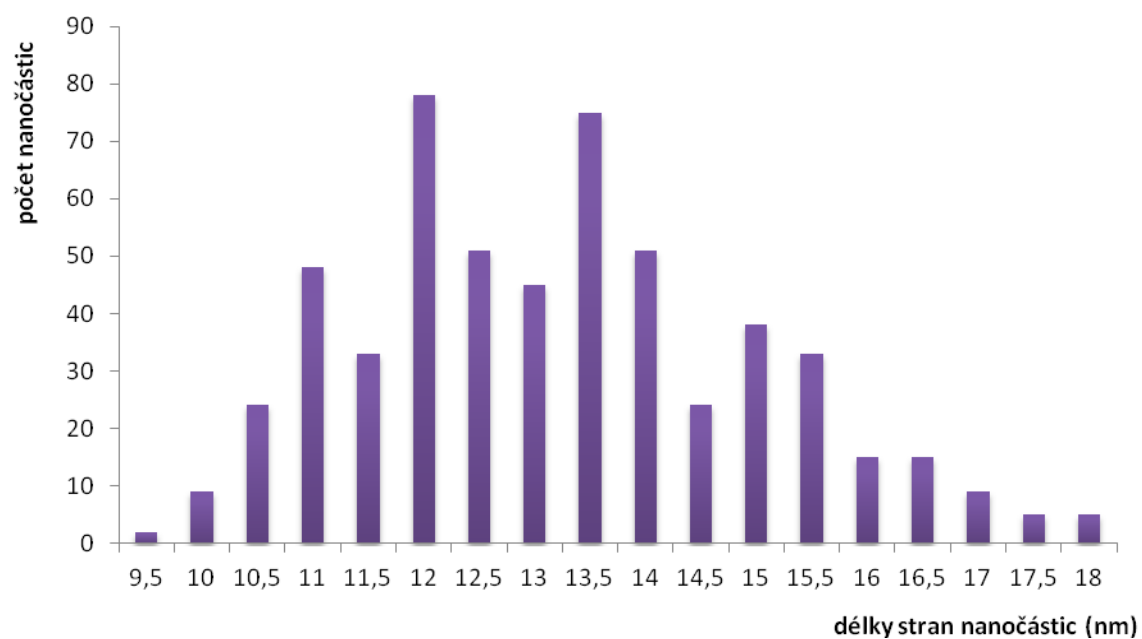
4.1.3 Stanovení distribuce nanočástic Pd15c v TEM



Obr. 15 – Měření délky strany nanočástic Pd15c v TEM.

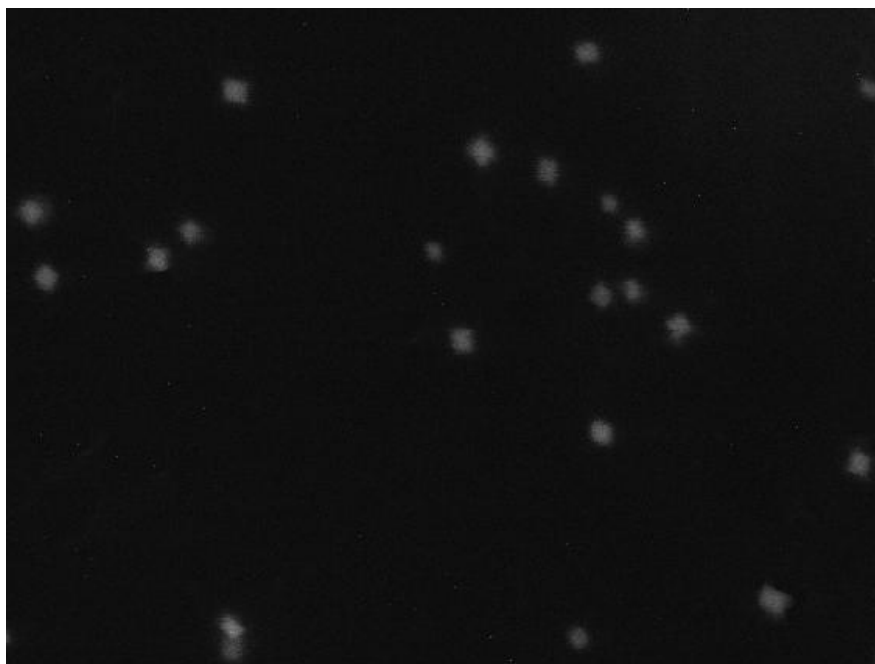
Tab. XIV – Délky stran nanočástic Pd15c a jejich četnost.

DÉLKY STRAN NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	DÉLKY STRAN NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
9,5	2	14	51
10	9	14,5	24
10,5	24	15	38
11	48	15,5	33
11,5	33	16	15
12	78	16,5	15
12,5	51	17	9
13	45	17,5	5
13,5	75	18	5



Obr. 16 – Distribuce velikostí nanočástic Pd15c.

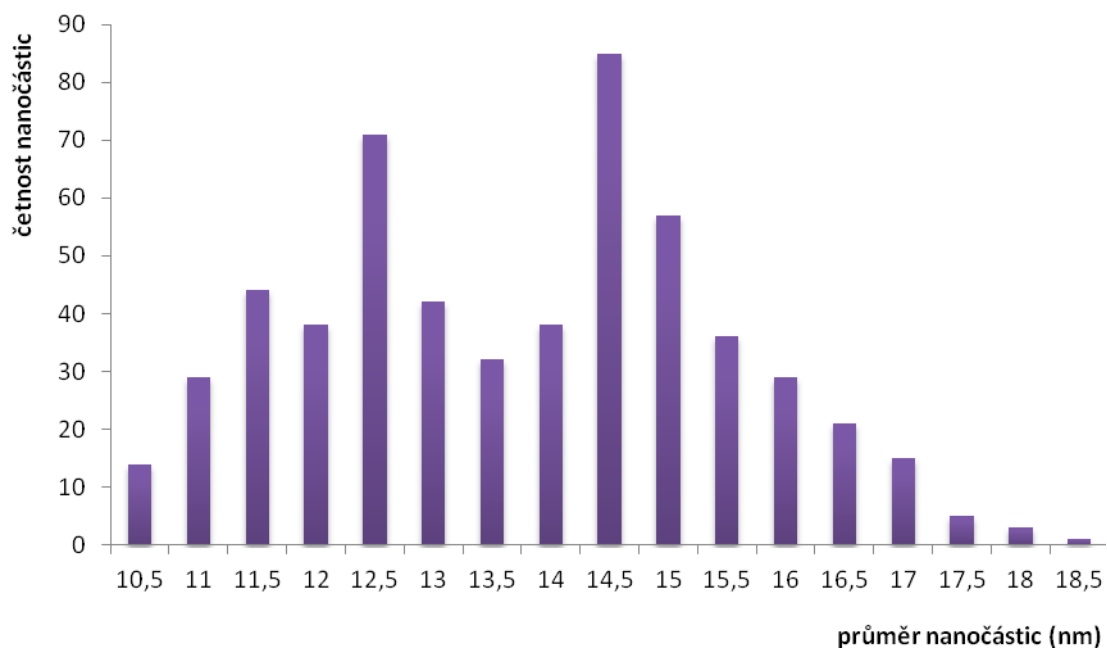
4.1.4 Stanovení distribuce nanočástic Pd15c ve FESEM



Obr. 17 – Měření délky strany nanočástic Pd15c ve FESEM.

Tab. XV – Délky stran nanočástic Pd15c a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
10,5	14	15	57
11	29	15,5	36
11,5	44	16	29
12	38	16,5	21
12,5	71	17	15
13	42	17,5	5
13,5	32	18	3
14	38	18,5	1
14,5	85		



Obr. 18 – Distribuce velikostí nanočástic Pd15c.

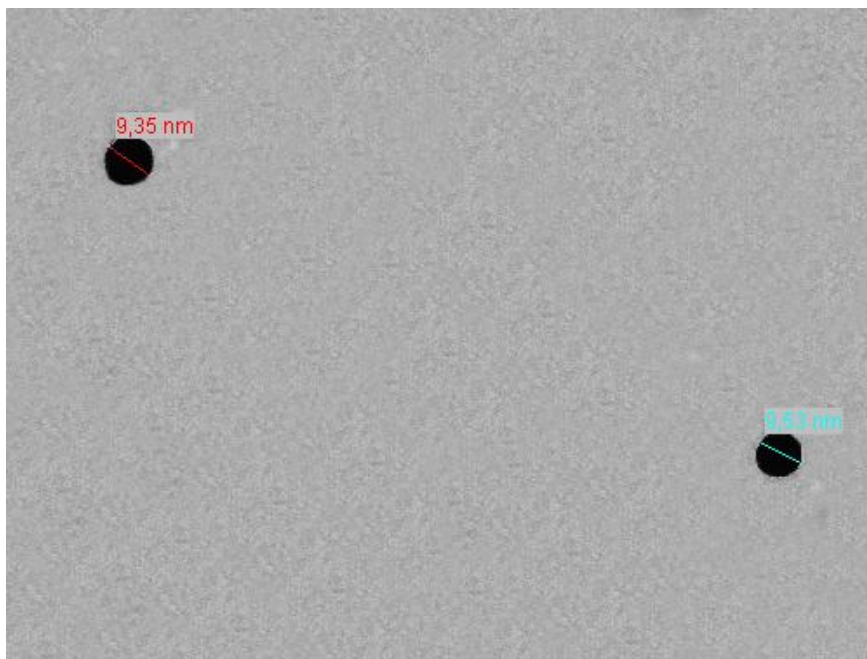
Tab. XVI – Hodnoty získané měřením v TEM a FESEM.

TEM		FESEM	
Počet nanočástic	560	Počet nanočástic	560
Ekvivalentní průměr	13,2	Ekvivalentní průměr	13,7
Směrodatná odchylka	1,7	Směrodatná odchylka	1,7
Minimum	9,5	Minimum	10,5
Maximum	18,0	Maximum	18,5

Tab. XVII – Hodnoty získané měřením ve FESEM.

FESEM – Feret	
Počet nanočástic	560
Feretův průměr	15,6
Směrodatná odchylka	1,6
Minimum	12,5
Maximum	20

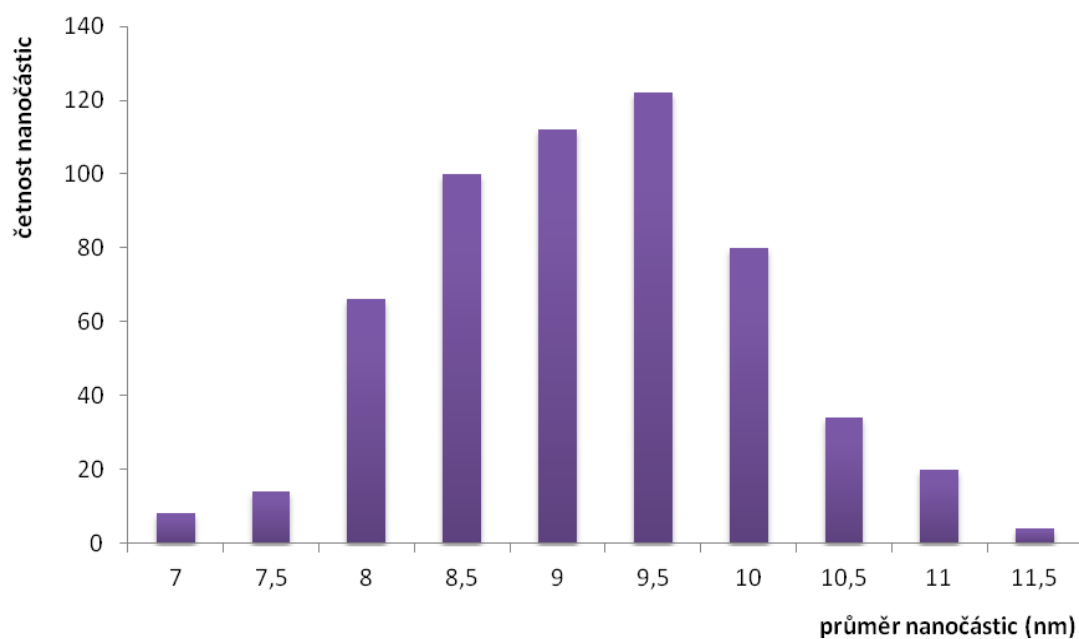
4.1.5 Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin v TEM



Obr. 19 – Měření průměru nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin.

Tab. XVIII – Průměr nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
7	8	9,5	122
7,5	14	10	80
8	66	10,5	34
8,5	100	11	20
9	112	11,5	4



Obr. 20 – Distribuce velikostí nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin.

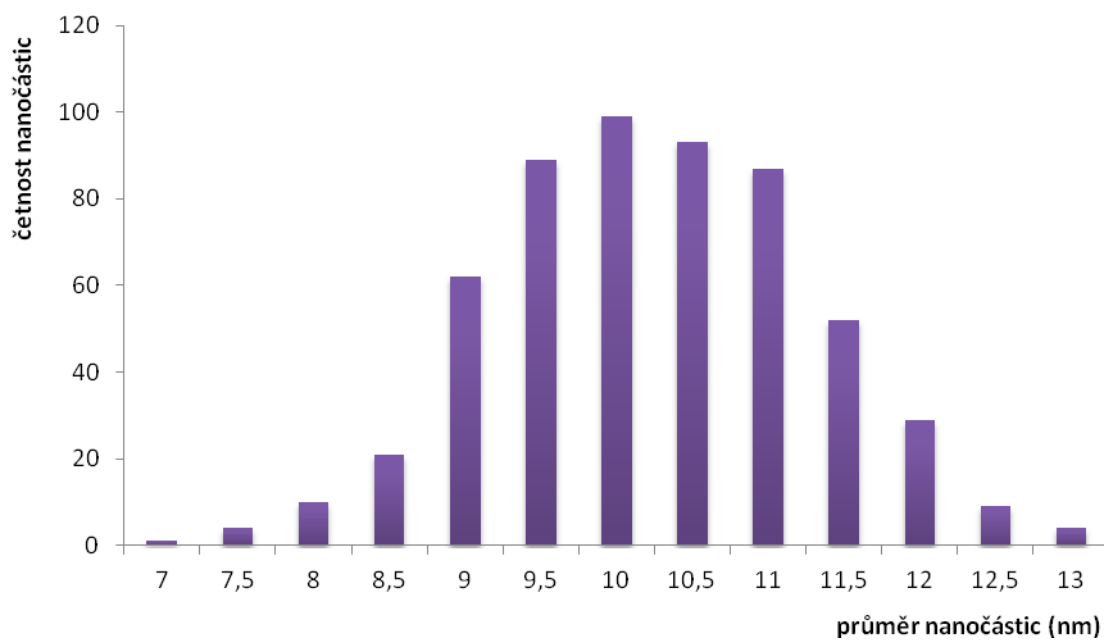
4.1.6 Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin ve FESEM



Obr. 21 – Měření průměru nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin ve FESEM.

Tab. XIX – Průměr nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
7	1	10,5	93
7,5	4	11	87
8	10	11,5	52
8,5	21	12	29
9	62	12,5	9
9,5	89	13	4
10	99		



Obr. 22 – Distribuce velikostí nanočástic v konjugátu Au10s + streptavidin.

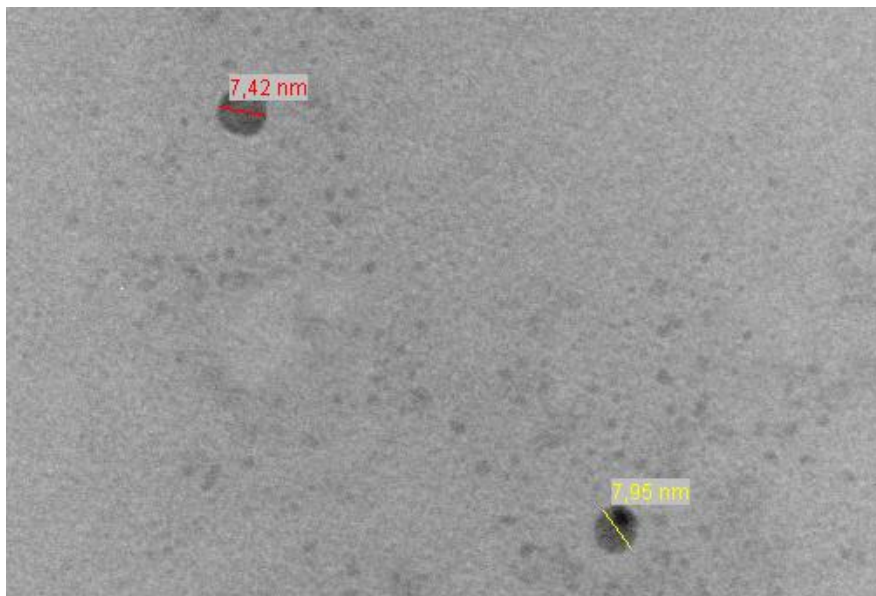
Tab. XX – Hodnoty získané měřením v TEM a FESEM.

TEM		FESEM	
Počet nanočástic	560	Počet nanočástic	560
Ekvivalentní průměr	9,2	Ekvivalentní průměr	10,2
Směrodatná odchylka	0,8	Směrodatná odchylka	1,0
Minimum	7,0	Minimum	7,0
Maximum	11,5	Maximum	13,0

Tab. XXI – Hodnoty získané měřením ve FESEM.

FESEM – Feret	
Počet nanočástic	560
Feretův průměr	12,4
Směrodatná odchylka	1,1
Minimum	9,5
Maximum	16,0

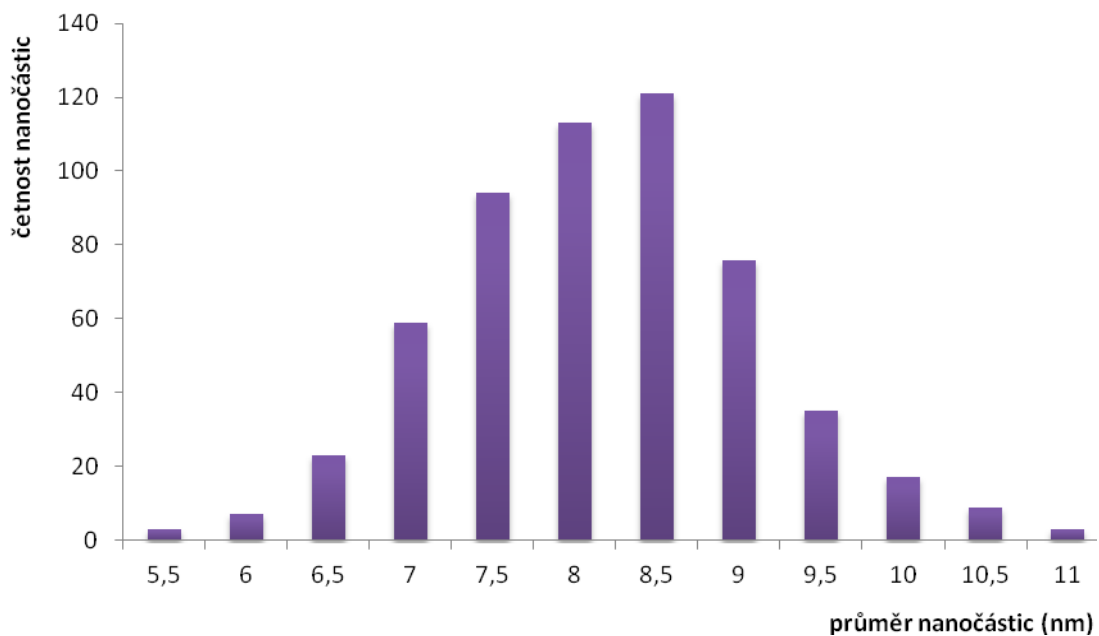
4.1.7 Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + protein A v TEM



Obr. 23 – Měření průměru nanočástic v konjugátu Au10s + protein A.

Tab. XXII – Průměr nanočástic v konjugátu Au10s + protein A a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
5,5	3	8,5	121
6	7	9	76
6,5	23	9,5	35
7	59	10	17
7,5	94	10,5	9
8	113	11	3



Obr. 24 – Distribuce velikostí nanočástic v konjugátu Au10s + protein A.

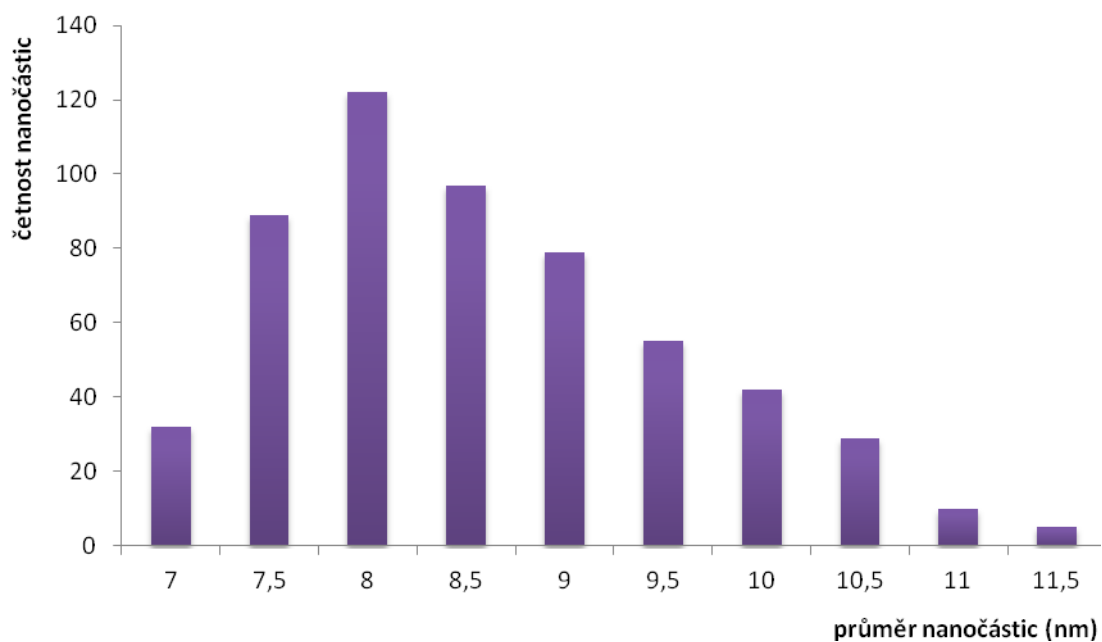
4.1.8 Stanovení distribuce nanočástic v konjugátu Au10s + protein A ve FESEM



Obr. 25 – Měření průměru nanočástic Au10s + protein A ve FESEM.

Tab. XXIII – Průměr nanočástic v konjugátu Au10s + protein A a jejich četnost.

PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC	PRŮMĚR NANOČÁSTIC (nm)	ČETNOST NANOČÁSTIC
7	32	9,5	55
7,5	89	10	42
8	122	10,5	29
8,5	97	11	10
9	79	11,5	5



Obr. 26 – Distribuce velikostí nanočástic v konjugátu Au10s + protein A.

Tab. XXIV – Hodnoty získané měřením v TEM a FESEM.

TEM		FESEM	
Počet nanočástic	560	Počet nanočástic	560
Ekvivalentní průměr	8,2	Ekvivalentní průměr	8,6
Směrodatná odchylka	0,9	Směrodatná odchylka	1,0
Minimum	5,5	Minimum	7,0
Maximum	11,0	Maximum	11,5

Tab. XXV – Hodnoty získané měřením ve FESEM.

FESEM – Feret	
Počet nanočástic	560
Feretův průměr	10,2
Směrodatná odchylka	0,8
Minimum	8,5
Maximum	12,5

Laboratorně připravené palladiové i komerčně dodané zlaté konjugáty byly jak v TEM, tak ve FESEM stabilní, nedocházelo k jejich vypařování a nenacházely se v nich žádné agregáty.

Laboratorně připravené palladiové nanočástice vykazovaly větší rozptyl částic než komerčně dělané.

Palladiové i zlaté nanočástice jsou vhodné pro konjugaci a pro imunoznačení.

4.2 Příprava konjugátů

Při přípravě palladiových konjugátů jsem vyzkoušela různé postupy konjugace. Tyto postupy jsou uvedeny na stranách 18-25. V následující tabulce je popsáno, s jakými proteiny jsem jednotlivé nanočástice konjugovala a jaký byl výsledek.

Tab. XXVI – Výsledky imunoznačení.

NANOČÁSTICE	PROTEIN	VÝSLEDEK	TESTOVÁNÍ NA STABILITU
Pd10s	streptavidin	výborný	ano
Pd10s	protein A	výborný	ne
Pd15c	streptavidin	žádný	ne
Pd15c	protein A	žádný	ne
Pd15c	sulfo-NHS + streptavidin	žádný	ne
Pd15c	r IgG	žádný	ne
Pd15c	IgG	dobrý	ne

4.3 Testování připravených konjugátů

Konjugátem připraveným dle protokolu č. 1, který je uveden na straně 18, jsem naznačila vzorek BSA. Značení jsem provedla podle postupu uvedeného na straně 16. Připraveným konjugátem jsem BSA značila v den konjugace, po 14 dnech a po 28 dnech.

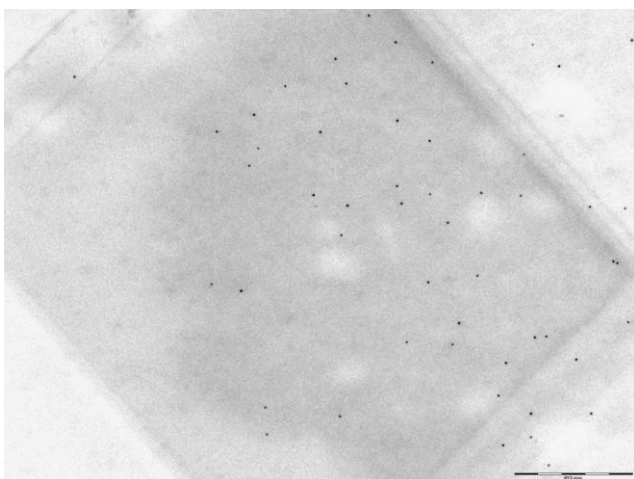
Naznačené síťky jsem poté pozorovala v TEM i ve FESEM. Síťky jsem prohlížela při zvětšení 50 000. V TEM jsem jednotlivé síťky prohlížela při urychlovacím napětí 80 kV, ve FESEM při urychlovacím napětí 8 kV. Po každém imunoznačení jsem pořídila snímky identického místa na síťce v TEM i ve FESEM, které jsem poté porovnávala. Pro statistické vyhodnocení stability konjugátu v čase jsem pro jednotlivá imunoznačení pořídila celkem 9 snímků v TEM i FESEM.

Ze snímků, které jsem v těchto mikroskopech pořídila, jsem pomocí programu Image J vyhodnotila, jak se konjugát v čase rozpadá a tím také kvalitu připraveného konjugátu.

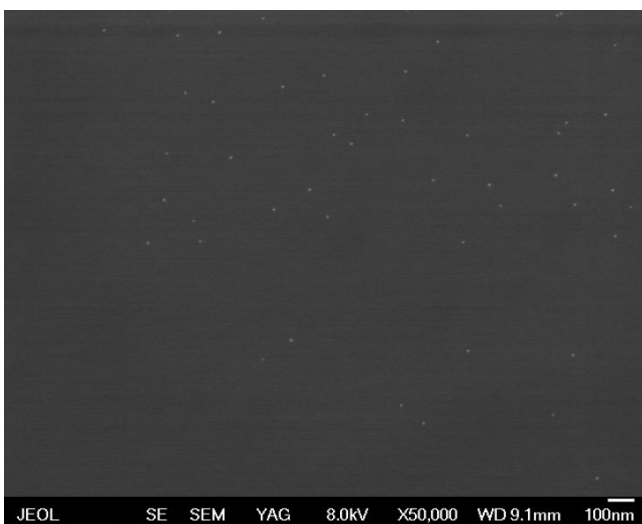
Data, která jsem získala při prohlížení vzorků v TEM i ve FESEM (Obr. 19, 20), jsem vložila do tabulky (Tab. XXVII).

Průměrné výsledky značení Pd10s + streptavidin jsem poté porovnávala se značením Au10s + streptavidin (Tab. XXVIII), které byly komerčně vyráběné.

Pro lepší orientaci jsem z výsledků vytvořila také grafy (Obr. 21, 22).



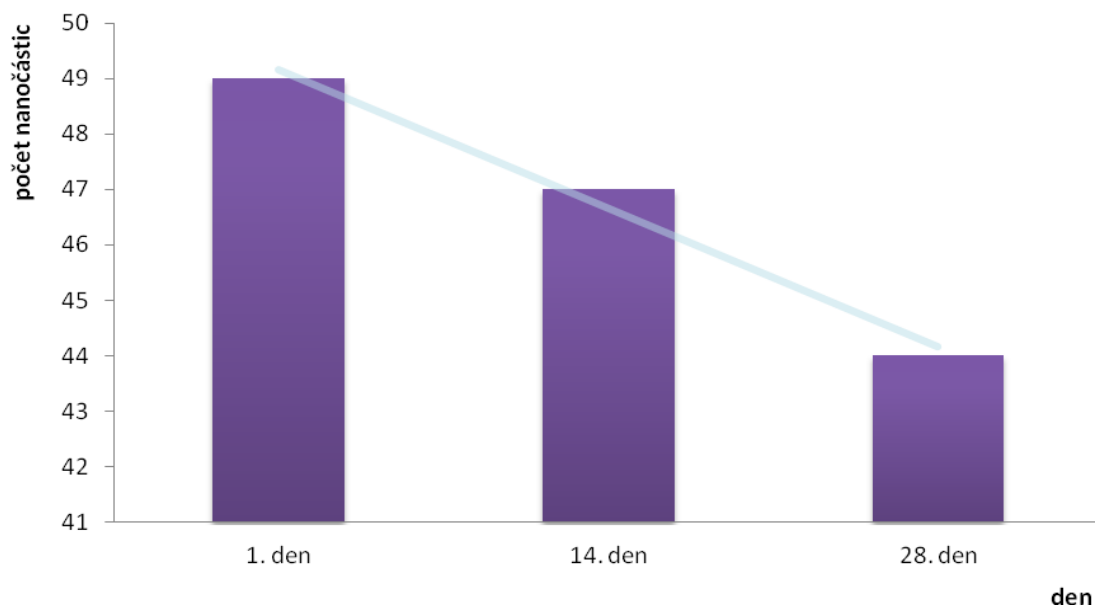
Obr. 19 – Imunoznačení BSA konjugátem Pd10s + streptavidin, fotografie z TEM.



Obr. 20 – Imunoznačení BSA konjugátem Pd10s + streptavidin, fotografie z FESEM.

Tab. XXVII – Přehled počtu nanočástic Pd10s+ streptavidin při jednotlivých značeních.

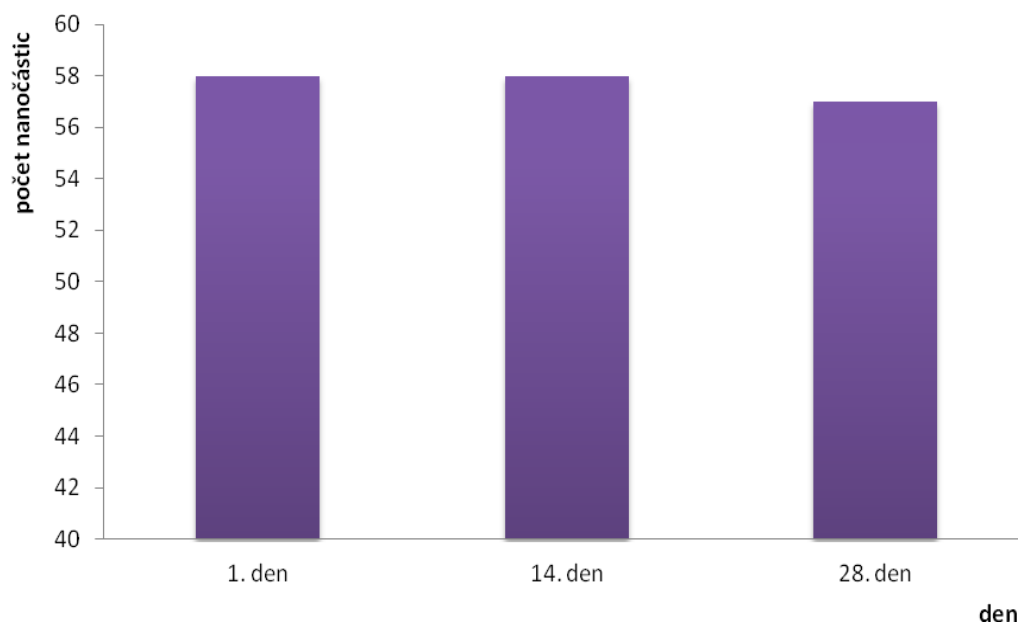
1. značení				2. značení				3. značení			
Počet částic	Prům. počet částic	Kontrolní síťka		Počet částic	Prům. počet částic	Kontrolní síťka		Počet částic	Prům. počet částic	Kontrolní síťka	
		Počet částic	Prům. počet			Počet částic	Prům. počet			Počet částic	Prům. počet
113	49	1	0	32	47	3	3	22	44	1	3
61		0		56		4		26		6	
21		0		51		5		44		2	
43		1		59		7		40		9	
86		0		25		2		43		3	
18		0		63		1		56		2	
43		0		36		3		37		3	
26		0		48		4		112		2	
32		0		59		0		19		1	



Obr. 21 – Značení konjugátem Pd10s + streptavidin v čase.

Tab. XXVIII – Přehled počtu nanočástic Au10s + streptavidin při jednotlivých značeních.

1. značení				2. značení				3. značení			
Počet částic	Prům. počet částic	Kontrolní síťka		Počet částic	Prům. počet částic	Kontrolní síťka		Počet částic	Prům. počet částic	Kontrolní síťka	
		Počet částic	Prům. počet			Počet částic	Prům. počet			Počet částic	Prům. počet
63	58	0	0	60	58	1	0	54	57	0	0
61		0		26		0		49		0	
46		0		64		0		52		1	
60		0		62		0		51		0	
72		0		70		1		60		0	
57		0		64		0		63		0	
52		1		67		0		59		0	
43		0		52		0		57		0	
68		0		65		0		64		0	



Obr. 22 – Značení konjugátem Au10s + streptavidin v čase.

5 DISKUZE

Úkolem této práce bylo připravit protilátky značené novým markerem – Pd nanočásticemi – které budou vhodné pro vícenásobnou imunolokalizaci vybraných molekul ve skenovacím elektronovém mikroskopu s vysokým rozlišením. Ke splnění tohoto úkolu jsem musela nejprve vybrat a otestovat vhodné nanočástice, poté je skonjugovat s protilátkou a nakonec otestovat kvalitu vzniklého konjugátu při imunoznačící reakci.

Při výběru nanočástic jsem se soustředila na Pd nanočástice ve tvaru koule a krychle s velikostí od 10 do 15 nm. Tento výběr byl založen na předchozích studiích prováděných v Laboratoři elektronové mikroskopie (Nebesarova et al. 2013), které prokázaly, že Pd kromě Au je nejvhodnější variantou k využití jako nového markeru pro imunolokalizaci ve FESEM.

Pd nanočástice je možné laboratorně připravit ve stejném rozsahu velikostí jako doposud nejběžněji používané Au nanočástice. V roztocích jsou poměrně stabilní a mají přibližně shodné vlastnosti jako Au, což se jeví výhodné z hlediska konjugačních postupů. Ke stejnému závěru dospěl ve své práci Kandela et al. 2007, který hledal vhodné markery pro korelativní světelnou a elektronovou mikroskopii.

Ve své práci jsem používala laboratorně syntetizované nanočástice Pd, které byly připravovány v laboratoři RNDr. Miroslava Šloufa, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. (Slouf et al. 2012). Proto bylo důležité nejprve konjugáty zkontrolovat a určit v nich distribuci velikostí nanočástic. Měření se týkalo nanočástic Pd10s a Pd15c a pro srovnání kvality i nanočástic v komerčně získaných konjugátech Au10s + streptavidin a Au10s + protein A. V průběhu stanovení distribuce velikostí nanočástic jsem zjistila, že se v dodaných nanočásticích a v dodaných konjugátech žádné agregáty nenachází. Rovněž nedochází k odpařování nanočástic ani ke změnám jejich objemů a pod svazkem primárních elektronů jsou stabilní.

Měření velikosti nanočástic jsem prováděla jak ve FESEM pracujícím při 8 kV, tak v TEM pracujícím při 80 kV. Ukázalo se, že hodnoty ekvivalentních průměrů, které jsem získala měřením nanočástic ve FESEM byly větší než hodnoty získané měřením nanočástic v TEM. Tento výsledek byl ve shodě s výsledky měření Au a Pd nanočástic v práci Nebesarova et al. 2013, kde také průměry nanočástic naměřené ve FESEM byly větší.

Vysvětlení můžeme hledat v rozdílném urychlovacím napětí v mikroskopech (TEM 80 kV, FESEM 8 kV). Při nižším urychlovacím napětí dochází k většímu rozptylu na hraně nanočástice, proto se nanočástice může jevit jako větší. U všech nanočástic byl také výrazně větší Feretův průměr, což může být způsobeno astigmatismem a také vlivem skenování částic ve FESEM, které má tendenci kulové tvary protahovat do oválů ve směru pohybu primárního svazku.

Ke stejným závěrům v podstatě došli autoři práce (Nebesarova et al. 2013), kteří dále zjistili, že naměřená velikost ve FESEM může být ovlivněna i řadou dalších parametrů, jako je například urychlovací napětí, velikost měřených nanočástic, hodnotou zvětšení a rozlišením digitálního záznamu.

Z histogramů na str. 28, 29, 36, 37, 40 a 41 je vidět, že rozložení četnosti nanočástic dle jejich průměru v případě kulových nanočástic Pd10s a Au10s má charakter Gaussova rozložení. Jinak tomu bylo v případě kostek Pd15c, u kterých je možné v histogramu na str. 32 a 33 zaznamenat dva píky. Tuto zvláštnost si vysvětlují tím, že se nanočástice mohou orientovat vůči svazku primárních elektronů různě. Navíc některé se ve výsledném obrazejevily jako kruhové. Těmto objektům přiřítám menší průměr (tvoří první pík v histogramu), který je pravděpodobně dán tím, že se plně nevyvinul jejich krychlový tvar. U těch nanočástic, které dozrály do tvaru kostek, jsem pravděpodobně naměřila větší průměr odpovídající druhému píku.

Při měření průměru komerčně vyrobených konjugátů Au10s + streptavidin a Au10s + protein A (Tab. XX, XXIV), se ukázalo, že distribuce velikostí je výrazně menší. Zatímco u laboratorně připravených nanočástic Pd10s se při měření v TEM jejich průměr pohyboval v intervalu od 5 nm do 13 nm, u Au10s + streptavidin se jejich průměr pohyboval v intervalu od 7 nm do 11,5 nm. Dokazuje to tvrzení výrobce, který udává, že je koeficient variace u 10 nm nanočástic menší jak 10 % ^[31].

Následným krokem v přípravě protilátek s novým markerem – Pd nanočásticemi – byla jejich konjugace s proteinem. V případě Pd nanočástic kulového tvaru jsem použila postup popsany v práci Vancová et al 2011, který je založen na kovalentní konjugaci nanočástic s proteinem. Pd koloidní nanočástice se liší od Au především v barvě a stabilitě jejich koloidních roztoků. Změna barvy Au koloidních roztoků pomáhá určit nestabilizovaný a stabilizovaný roztok v koagulačním testu. To usnadňuje nastavení optimálních podmínek

pro konjugaci s proteinem, jako je pH, iontová síla a koncentrace proteinu (Leunissen a De Mey 1989). U bezbarvých Pd koloidních roztoků přidavek elektrolytů nezpůsobí žádnou barevnou změnu. Stejně tak nebyly nalezeny žádné rozdíly v absorpci UV záření či viditelného světla (Vancová et al. 2011). Proto byl ke konjugaci použit postup, při němž byl nejprve modifikován povrch Pd nanočástice pomocí DHLA a na takto upravený povrch byly navázány molekuly proteinu. Tento postup se s výbornými výsledky používal již dříve ke konjugaci Au nanočástic (Roux et al. 2005). V případě Pd nanočástic kulového tvaru jsem touto metodou získala konjugát, jehož kvalitu jsem testovala stejně jako v práci Vancová et al. 2011 při imunoznačení na standardním vzorku. K tomu mi sloužil preparát se zalitým BSA, který jsem připravila postupem uvedeným na str. 15. Porovnáním četnosti imunoznačení za použití připraveného Pd konjugátu a komerčního Au konjugátu jsem zjistila, že Pd10s konjugáty se streptavidinem a proteinem A jsou svoji kvalitou srovnatelné s komerčně dostupnými produkty.

V případě Pd nanokostek jsem zjistila, že postup kovalentní konjugace pomocí DHLA nefunguje. Postupně jsem vyzkoušela několik modifikací této metody. Důvodem bylo hledání optimálního postupu, který by poskytl vysoce citlivý a stabilní konjugát. Nicméně žádná z těchto metod nevedla ke kýženému úspěchu.

Jako nejlepší cesta se v případě Pd nanočástic krychlového tvaru jevila pouze nekovalentní konjugace nanočástic na protein. Pomocí této metody jsem získala funkční konjugát. Bylo to zapříčiněno způsobem výroby Pd nanokostek (Slouf et al. 2012). Při výrobě bylo možné ovlivnit depozici atomů Pd na preferenčních místech tak, že vznikla kostka. Ke stabilizaci kostek byla poté použita vrstva polyvinylpyrrolidonu (PVP) a bromidu draselného (KBr). Z tohoto důvodu nebylo možné vytvořit funkční konjugát pomocí kovalentní konjugace.

Posledním krokem bylo určit, jak jsou připravené Pd konjugáty stabilní, nebo jinými slovy, jak se mění jejich účinnost s časem. To jsem zjistila pomocí imunoznačení vzorku BSA připraveným Pd konjugátem, které jsem porovnávala s výsledkem imunoznačení vzorku BSA komerčně vyrobeným Au konjugátem. Tento konjugát mi sloužil jako standard a umožnil mi porovnat intenzitu a četnost imunoznačení.

Naznačené síťky jsem poté pozorovala v TEM i ve FESEM. Abych mohla porovnat intenzitu a četnost imunoznačení, vyfotila jsem vždy stejné místo na síťce. Nejprve jsem tyto

síťky prohlížela v TEM a poté jsem se snažila dohledat stejné místo i ve FESEM. Protože jsem ale použila neznačené síťky a ve FESEM je vidět vždy jen malý výřez síťky, bylo velmi těžké se zorientovat a stejné místo na síťce dohledat. Z tohoto důvodu jsem postup prohlížení sítěk změnila a vhodná místa na síťkách jsem nejdříve vyfotila ve FESEM a poté jsme síťky přenesla do TEM, kde již bylo dohledání, kvůli radiačnímu poškození, snadné.

Při porovnání stejných fotografií z TEM a FESEM jsem zjistila, že se počet nanočástic na těchto fotografiích shoduje. Došla jsem k závěru, že při pozorování sítěk v TEM i ve FESEM získám stejné výsledky. I když se ve FESEM používají mnohem vyšší proudy primárního svazku a ohřev vzorku je tak intenzivnější, evidentně nedocházelo k odpařování Pd nanočástic při vyhodnocení imunolokalizace ve FESEM, ani ke změnám jejich polohy na ultratenkém řezu. Z pořízených snímků jsem poté provedla statistické vyhodnocení nanočástic a vyhodnotila tak kvalitu připraveného konjugátu a jeho stabilitu v čase.

Nejlepší výsledky v tomto směru vykázal konjugát Pd10s + streptavidin. Četnost značení standardního vzorku s BSA pomocí tohoto konjugátu byla bezprostředně po přípravě konjugátu, ale i v časovém intervalu jednoho měsíce, srovnatelná se značením pomocí komerčně dodaného konjugátu Au10s + Streptavidin.

Na základě popsanych pokusů mohu konstatovat, že Pd nanočástice různého tvaru jsou vhodným markerem pro vícenásobnou imunolokalizaci ve FESEM. Z hlediska konjugace se kulové nanočástice jeví vhodnější než krychlové. U těchto nanočástic bude třeba ještě v budoucnosti vylepšit metodu jejich konjugace a zajistit větší stabilitu získaných konjugátů.

6 ZÁVĚRY

- Zlaté i palladiové nanočástice jsou pod svazkem primárních elektronů stabilní, nedochází ke změnám objemu ani vypařování, a proto jsou vhodné pro imunoznačení.
- Hodnoty ekvivalentních průměrů, získané měřením nanočástic ve FESEM, jsou větší než hodnoty získané měřením nanočástic v TEM.
- Feretův průměr je větší než hodnoty ekvivalentních průměrů naměřené v TEM i ve FESEM.
- Distribuce velikostí nanočástic v případě kulových nanočástic Pd10s a Au10s má charakter Gaussova rozložení.
- Distribuce velikostí nanokostek Pd15c má jiný charakter než distribuce velikostí kulových nanočástic.
- Komerčně syntetizované nanočástice mají menší rozptyl velikostí než laboratorně připravené nanočástice.
- U kulových Pd nanočástic je možné získat funkční konjugát pomocí kovalentní konjugace na protein.
- V případě krychlových Pd nanočástic lze vyrobit funkční konjugát pouze nekovalentní konjugací na protein.
- Při potřebě pozorování stejného místa na dané síťce je jednodušší prohlížet síťku nejdříve ve FESEM a poté ji přenést do TEM.
- Na stejných fotografiích z TEM a FESEM se nachází stejný počet nanočástic.
- Četnost značení BSA pomocí Pd10s + streptavidin je srovnatelná se značením BSA pomocí komerčně dodaného konjugátu Au10s + Streptavidin.

7 ZDROJE

- [1] **BARTCZAK D. and KANARAS A. G.**, Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir*. 2011, 27: 10119–10123
- [2] **BASCHONG W. and STIERHOF Y-D.**, Preparation, Use, and Enlargement of Ultrasmall Gold Particles in Immunoelectron Microscopy. *Microscopy Research and Technique*. 1998, 42: 66–79
- [3] **BIER O. G., DIAS DA SILVA W., GÖTZE D. and MOTA I.**, Základy imunologie. Praha: Avicenum, 1984
- [4] **BLEHER R., KANDELA I., MEYER D. A. and ALBRECHT R. M.**, Immun-EM using colloidal metal nanoparticles and electron spectroscopic imaging for co-localization at high spatial resolution. *Journal of Microscopy*. 2008, 230: 388–395
- [5] **FERENČÍK M., ROVENSKÝ J. and MAŤHA V.**, Ilustrovaný imunologický slovník. Galén, 2004
- [6] **FUČÍKOVÁ T.**, Klinická imunologie v praxi. Galén, 1997
- [7] **GOLDBERG M. W.**, Immunolabeling for Scanning Electron Microscopy (SEM) and Field Emission SEM. *Methods in Cell Biology*. 2008, 88: 109–130
- [8] **GRIFFITHS G.**, Fine Structure Immunocytochemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993
- [9] **GRIFFITHS G.**, The Use of Electron Microscopy in Cell Biology. 2003

- [10] **HAGIWARA H., AOKI T., SUZUKI T. and TAKATA K.**, Double-Label Immunoelectron Microscopy for Studying the Colocalization of Proteins in Cultured Cells. *Immunoelectron Microscopy*. 2010, 657: 249–257
- [11] **HERMANN R., SCHWARZ H. and MÜLLER M.**, High Precision Immunoscanning Electron Microscopy Using Fab Fragments Coupled to Ultra-small Colloidal Gold. *Journal of Structural Biology*. 1991, 107: 38–47
- [12] **HERMANN R., WALTHER P. and MÜLLER M.**, Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem Cell Biol*. 1996, 106: 31–39
- [13] **HERMANSON G. T.**, Bioconjugate Techniques. Elsevier, 2. vydání 2008
- [14] Instructions, Field Emission Scanning Electron Microscope, 2005 Tokyo, Japan
- [15] **LEUNISSEN J. L. M. and DE MEY J. R.**, Preparation of gold probes. In Immuno-Gold Labeling in Cell Biology, Verkleij A. J. and Leunissen, J. L. M., pp. 3–16. Boca Raton, FL: CRC Press 1989
- [16] **KANDELA I. K., ALBRECHT R. M.**, Fluorescence Quenching by Colloidal Heavy Metals Nanoparticles: Implications for Correlative Fluorescence and Electron Microscopy Studies. *Scanning*. 2007, 29: 152–161
- [17] **KANDELA I. K., BLEHER R. and ALBRECHT R. M.**, Multiple Correlative Immunolabeling for Light and Electron Microscopy Using Fluorophores and Colloidal Metal Particles. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007, 55(10): 983–990
- [18] **KREJSEK J., KOPECKÝ O.**, Klinická imunologie. NUCLEUS HK[®], 2004

- [19] **MAYHEW T. M. and LUCOCQ J. M.**, Multiple-labelling immunoEM using different sizes of colloidal gold: alternative approaches to test for differential distribution and colocalization in subcellular structures. *Histochem Cell Biol.* 2011, 135: 317–326
- [20] **MEYER D. A., OLIVER J., A. and ALBRECHT R. M.**, Colloidal Palladium Particles of Different Shapes for Electron Microscopy Labeling. *Microsc. Microanal.* 2010, 16: 33–42
- [21] **MÜLLER M., WALTHER P., HERMANN R. and SCHWARB P.**, SEM Immunocytochemistry with Small (5–15 nm) Colloidal Gold Markers. 1989
- [22] **NEBESAROVA J., LANGHANS J., SLOUF M., PAVLOVA E. and VANCOVA M.**, Is it possible to measure diameters of metal nanoparticles using BSE imaging in FESEM? *Micron.* 2013, 44: 159–166
- [23] **OSAMURA R. Y., ITOH Y. and MATSUNO A.**, Applications of Plastic Embedding to Electron Microscopic Immunocytochemistry and In Situ Hybridization in Observations of Production and Secretion of Peptide Hormones. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2000, 48(7): 885–891
- [24] **ROBINSON J. M., TAKIZAWA T., VANDRÉ D. D. and BURRY R. W.**, Ultrasmall Immunogold Particles: Important Probes for Immunocytochemistry. *Microsc. Res. Tech.* 1998, 42:13–23
- [25] **ROUX S., GARCIA B., BRIDOT J. L., SALOMÉ M., MARQUETTE C., LEMELLE L., GILLET P., BLUM L., PERRIAT P. and TILLEMENT O.**, Synthesis, characterization of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles, and functionalization by the electroluminescent luminol. *Langmuir.* 2005, 21(6): 2526–2536

- [26] **SCHATTEN H. and PAWLEY J. B.**, Biological Low-Voltage Scanning Electron Microscopy. Springer Science+Business Media, LLC, 2008
- [27] **SLOUF M., HRUBY M., BAKAEVA Z., VLKOVA H., NEBESAROVA J., PHILIMONENKO A. A. and HOZAK P.**, Preparation of stable Pd nanocubes and their use in biological labeling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, 100: 205– 208
- [28] **VANCOVÁ M., ŠLOUF M., LANGHANS J., PAVLOVÁ E. and NEBESÁŘOVÁ J.**, Application of Colloidal Palladium Nanoparticles for Labeling in Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.* 2011, 17: 810–816
- [29] **VERKLEIJ A. J. and LEUNISSEN J. L. M.**, Immuno-Gold Labeling in Cell Biology. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1989
- [30] <http://www.aurion.nl/products/ultrasmall.php>
- [31] <http://www.aurion.nl/products/conventional.php>
- [32] <http://www.piercenet.com/method/antibody-structure-classes>
- [33] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/learning-center/antibody-explorer/technical-support/antibody-basics.html>
- [34] http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007_978-1-60327-375-6_58-1
- [35] <http://www4.nau.edu/microanalysis/Microprobe-SEM/Signals.html>
- [36] <http://imagej.en.softonic.com/>