



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

BIOFUNKCIONALIZACE VE VODĚ ROZPUSTNÝCH CDTE KVANTOVÝCH TEČEK

BIOFUNCTIONALIZATION OF WATER SOLUBLE CDTE QUANTUM DOTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ANNA ŠIBÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JANA CHOMOUCKÁ, Ph.D.

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Anna Šibíková

ID: 137262

Ročník: 3

Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Biofunkcionalizace ve vodě rozpustných CdTe kvantových teček

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši na téma modifikace/funkcionalizace ve vodě rozpustných kvantových teček vybranou biomolekulou, která společně vytvoří systém vhodný pro diagnostiku zajímavých látek (protein, nukleová kyselina). 2) Syntetizujte CdTe kvantové tečky podle ověřeného postupu. Navažte na kvantové tečky vhodnou biomolekulu. 3) Experimentálně ověřte navázání této biomolekuly na povrch kvantových teček sledováním změny jejich optických (fluorescenčních) vlastností. 4) Ze získaných emisních spekter vyhodnoťte vliv koncentrace biomolekuly na úbytek intenzity fluorescence kvantových teček.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] CHOMOUCKÁ, J.; DRBOHLAVOVÁ, J.; BUŠINOVÁ, P.; RYVOLOVÁ, M.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HUBÁLEK, J. Synthesis of Glutathione Coated Quantum Dots. In State-of-the-Art of Quantum Dot System Fabrications. 1. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. s. 1-18. ISBN: 978-953-51-0649-4.

[2] 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.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 31.5.2013

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

Konzultanti bakalářské práce: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá biofunkcionalizáciou vo vode rozpustných CdTe kvantových bodiek (QDs). Je zložená z troch hlavných častí. Prvá časť je teoretickým úvodom, v ktorom sa hovorí o samotných QDs, ich syntéze, modifikácií, aplikáciách v biológii, ďalej o bielkovinách a biokonjugácií QDs s hovädzím sérovým albumínom (BSA). V druhej experimentálnej časti boli pripravené vo vode rozpustné, glutathionom modifikované CdTe QDs. Tie boli následne prečistené a biokonjugované s BSA o rôznych koncentráciách. Tretia časť je ukážka výsledkov a porovnanie dosiahnutých výsledkov s vedeckými článkami.

Abstract

This bachelor thesis is focused on the research on biofunctionalization of water-soluble glutathione modified CdTe quantum dots (QDs). The thesis is divided into three parts. The first part is a theoretical introduction to the QDs and their synthesis, modifications and applications in biology together with an introduction to proteins and bioconjugation of QDs and BSA. In the second part I present the experimental results of water-soluble glutathione modified CdTe-GSH QDs preparation. The QDs were cleaned and bioconjugated with BSA at different concentrations. This is described in the third part of the thesis. I also discuss the obtained experimental results in the frames of available literature.

Kľúčové slová:

Kvantové bodky, syntéza, modifikácie, bioaplikácie, BSA.

Keywords:

Quantum dots, synthesis, modification, bioapplication, BSA.

Bibliografická citácia diela:

ŠIBÍKOVÁ, A. *Biofunkcionalizace ve vodě rozpustných CdTe kvantových teček*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 50 s. Vedoucí semestrální práce Ing. Jana Chomoucká, Ph.D..

Prehlásenie pôvodnosti diela

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému Biofunkcionalizácia vo vode rozpustných CdTe kvantových bodiek som vypracovala samostatne pod vedením vedúcej bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto práce som neporušila autorské práva tretích osôb, hlavne som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich autorského zákona č. 121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníka č. 40/2009Sb.

V Brne dňa 28.5.2013

.....

PodĎakovanie:

Ďakujem vedúcej bakalárskej práce Ing. Jane Chomouckej, Ph.D. za odborný dohľad, vecné pripomienky a cenné rady pri spracovaní práce. Ďalej by som rada poďakovala všetkým, ktorí ma akýmkoľvek spôsobom podporili pri písaní tejto práce.

V Brne dňa 28.5.2013

.....

Obsah

Abstrakt	3
Abstract.....	3
Kľúčové slová:.....	3
Keywords:.....	3
Bibliografická citácia diela:	3
Prehlásenie pôvodnosti diela	4
Podakovanie:.....	4
Úvod.....	7
1 Kvantové bodky	8
1.1 Definícia	8
1.2 Syntéza QDs	9
1.2.1 Syntéza hydrofóbných QDs.....	10
1.2.2 Solubilizácia QDs	10
1.3 Syntéza vo vode rozpustných QDs	13
1.4 Modifikácie QDs	15
2 Bielkoviny.....	17
2.1 Protilátky	18
2.2 BSA	19
2.3 Biokonjugácia BSA a QDs	19
2.4 Biokonjugácia QDs a DNA	21
3 Aplikácie QDs.....	23
3.1 <i>In vitro</i> diagnostika	23
3.2 <i>In vivo</i> aplikácie.....	23
3.3 Imunosenzory	24
4 Metódy charakterizácie QDs.....	26
4.1 Luminiscencia.....	26
4.2 Fluorescencia	27
5 Experimentálna časť	29

5.1	Použité chemikálie.....	29
5.2	Použité zariadenia a laboratórne vybavenie	29
5.3	Syntéza QDs CdTe ovrstvených glutationom	29
5.4	Prečistenie CdTe-GSH QDs	30
5.5	Naviazanie biomolekuly BSA na CdTe-GSH QDs	30
6	Výsledky a diskusia	31
6.1	Syntéza CdTe QDs	31
6.1.1	Korekcia.....	32
6.2	Biokonjugácia CdTe QDs BSA.....	35
6.2.1	Vplyv koncentrácie QDs na BSA.....	35
6.2.2	Vplyv koncentrácie BSA na QDs.....	39
7	Záver	46
8	Citácie	47
9	Zoznam skratiek.....	50

Úvod

V súčasnosti je dosť často skloňovaná otázka imunosenzorov, aplikácií *in vivo* a *in vitro*. Vo všetkých týchto prípadoch hrajú dôležitú úlohu kvantové bodky. Vedci sa snažia prísť na to ako najúčinnnejšie dostať modifikované kvantové bodky do buniek a zistiť ako sa budú tieto nanokryštály správať v určitých bunkách. Ak sa podarí nájsť bezpečnú cestu prechodu bude to mať veľký význam pre ďalšie štúdie a pokusy. Ďalšou dôležitou stránkou záujmu je výroba kvantových bodiek (QDs), ktoré majú čo najmenšiu toxicitu. Toto je možné zabezpečiť pomocou biofunkcionalizácií QDs. Takéto kvantové bodky hrajú dôležitú rolu v oblasti lekárstva pri zisťovaní nádorov a podobne.

V tejto bakalárskej práci som sa zaoberala biofunkcionalizáciou vo vode rozpustných CdTe QDs. QDs sú záujmom štúdií pre ich vynikajúce a špecifické optické vlastnosti, veľkosť a ich povrch, ktorý sa dá rozmanito modifikovať a tak v konečnom dôsledku sa menia aj ich vlastnosti. Cieľom tejto práce bola syntéza QDs, naviazanie biomolekuly, v mojom prípade BSA na QDs a skúmanie optických vlastností QDs. Výsledky boli porovnané s literatúrou a vyhodnotené vo výsledkoch a diskusií.

1 Kvantové bodky

1.1 Definícia

Kvantové bodky (QDs) sú nanokryštály alebo atómové zhluky zložené s niekoľko 100 až niekoľko miliónov atómov avšak s malým počtom voľných elektrónov (menej ako 100). QDs sú zvyčajne vytvorené s polovodičovými (II-IV skupina v periodickej tabuľke prvkov), menej často s kovovými materiálmi (napr. Ni, Co, Pt, Au) [1]. Typická veľkosť QDs je 2-20 nm odvíjajúca sa od použitých materiálov pri príprave samotných QDs. QDs nazývame nanočastice, ktoré vykazujú tzv. efekt kvantového obmedzenia a ich polomer je menší ako jedna z týchto veličín: Bohrov polomer elektrónu a_e , diery a_h a excitónu a_{exc} [2].

Pri ožiarení QDs viditeľným alebo UV žiarením dochádza k excitácií elektrónov. To znamená, že elektróny kvantových bodiek prijmu energiu žiarenia a následne prechádzajú do vyšších energetických hladín. Po určitej dobe sa vracajú excitované elektróny do svojho pôvodného stavu, pričom dochádza k vyžiareniu fotónov kvantovými bodkami. Opísaný jav sa nazýva fotoluminiscencia a je to jedna z najdôležitejších vlastností QDs.

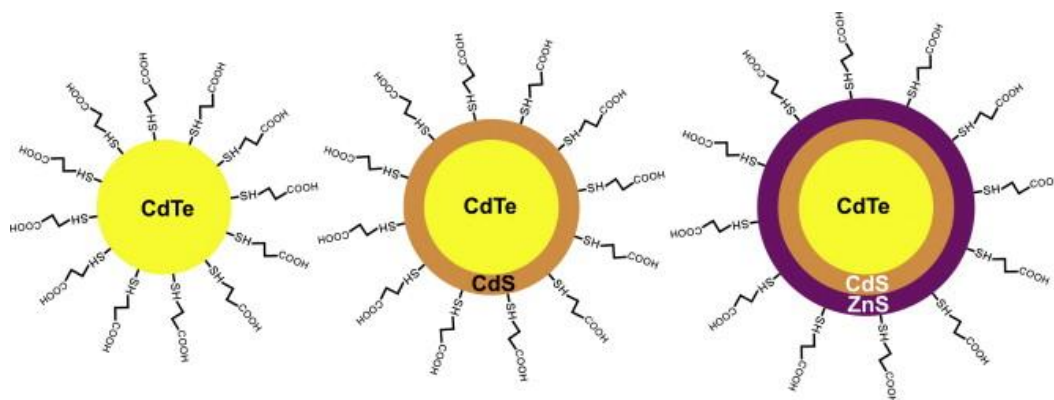
Veľkosť a tvar QDs určuje spektrálnu pozíciu a čistotu fotoluminiscencie. Pri zmenšovaní veľkosti QDs sa poloha maxima emisnej krivky posúva z červenej oblasti spektra (750 nm) do modrej (400 nm). Vďaka transmisnej elektrónovej mikroskopii (TEM) a dynamickému rozptylu svetla (DLS) sa zisťuje veľkosť a morfológia QDs [3].

QDs v porovnaní s bežnými organickými fluorofórmami majú jedinečné fotofyzikálne vlastnosti. QDs majú kontinuálne absorpčné spektrum pre kratšie vlnové dĺžky v porovnaní s vlnovými dĺžkami emisných spektier. Emisné spektrá QDs sú pomerne úzke a symetrické. Liu a kolektív sa zaoberali štúdiom molekulárnych interakcií medzi protilátkou a imunoglobulínom G pomocou FRET techniky. QDs ukazovali 20-krát vyššiu svietivosť a 100-krát väčšiu stabilitu voči fotobieleniu v porovnaní s bežnými fluorofórmami, ktoré majú užšie absorpčné spektrá [2]. Odolnosť voči fotooxidácií tzv. fotobieleniu je jednou z ďalších veľmi dôležitých vlastností QDs. Pre väčšiu ochranu QDs pred fotobielením sa jadro QDs obaluje organickou vrstvou alebo vonkajším obalom, ktorý je z polovodičov s vyšším energetickým pásmom energie [4]. Fotostabilita je dôležitým prvkom vo väčšine fluorescenčných aplikácií. Vďaka odolnosti voči fotobieleniu a obalovaním QDs môžu QDs podstupovať opakované cykly excitácie a fluorescencie aj na niekoľko hodín s vysokou úrovňou jasnosti [19].

Využitie QDs je v biológii veľmi dôležité, avšak QDs majú aj svoje nevýhody. Jednou z najväčších je otázka toxicity vzhľadom na množstvo využívaných nanomateriálov. Veľkosť, náboj, koncentrácia, oxidácia a mechanická stabilita QDs môže vykazovať známky toxicity.

Ako bolo spomínané vyššie QDs sú tvorené polovodičovými materiálmi a zvyčajne majú jadro tvorené kadmiumom, ktorý je veľmi toxický a je schopný viazať sa s thiolovými skupinami a spôsobiť tak až smrť bunky. Bolo preukázané, že jadro CdSe kvantových bodiek v oxidačnom prostredí sa rozpadá. Preto sa vedci snažia o syntézu QDs rozpustných vo vode a o modifikáciu ich povrchu tak, aby sa ich toxicita zmenšila a tým sa zvýšilo využívanie QDs v biológii [1]. V prípade rozpadu spomínaného jadra CdSe vedci zistili, že pridaním oxidu kremičitého (SiO_2) a ZnS obalu sa znižuje oxidácia [19].

QDs delíme z veľa hľadísk. V závislosti na rozložení elektrónov delíme QDs na laterálne, planárne a vertikálne. Rozdiel medzi planárnym a vertikálnym rozložením je v umiestnení a obklopení QDs tunelovacími bariérami. Toto rozdelenie sa vzťahuje hlavne k výrobe deponovaných QDs. Pri koloidných QDs sa stretávame skôr so sférickými nanočasticami. Podľa štruktúry ich môžeme rozdeliť na QDs zložené len z jadra („core“) a QDs pozostávajúce zo štruktúry jadro-obal („core-shell“) a štruktúry jadro-obal-obal („core-shell-shell“) ako je znázornené na Obr. 1. QDs tvorené len jadrom sú zvyčajne zložené z materiálu jedného polovodiča napr. CdTe, CdSe, CdS, CdPb. Tieto QDs nie sú však tak využívané ako QDs štruktúry jadro-obal kde je jadro obklopené polovodičovým obalom. Príkladom takýchto QDs sú CdTe/CdS, CdTe/ZnS, CdS/ZnS, CdSe/ZnS, CdSe/ZnSe. Obal QDs má priaznivý vplyv na stabilitu jadra a fotoluminiscenciu. Rôzne materiály, z ktorých sú zložené jadrá QDs a taktiež aj rôzne veľkosti QDs umožňujú fotoluminiscenciu v rôznych oblastiach spektra. Druhý obal môže byť tvorený napr. ZnS. QDs tvorené štruktúrou jadro-obal-obal majú hlavnú výhodu v tom, že nie sú toxické aj pri vysokej koncentrácii QDs [5].



Obr. 1 Štruktúra jadro (vľavo), jadro-obal (stred) a jadro-obal-obal (vpravo), prevzaté a upravené z [5]

1.2 Syntéza QDs

V snahe získania čo najúčinnějších kvantových bodiek je potreba syntetizovať QDs, ktoré spĺňajú určité požiadavky. Je potrebné aby QDs spĺňovali podmienky pre používanie v biologických aplikáciách. Taktiež je dôležité aby boli odolné voči oxidáciám. Ďalšou dôležitou požiadavkou je čo najmenšia toxicita QDs nakoľko toxické QDs sú škodlivé

pre životné prostredie. Tento problém je možné minimalizovať alebo úplne odstrániť (ako bolo spomínané vyššie) pomocou naviazania obalu na jadro a vytvorenia tak štruktúry jadro-obal alebo dokonca jadro-obal-obal. Modifikáciou obalu môžeme ďalej zabezpečiť lepšiu stabilitu a fotoluminiscenciu QDs.

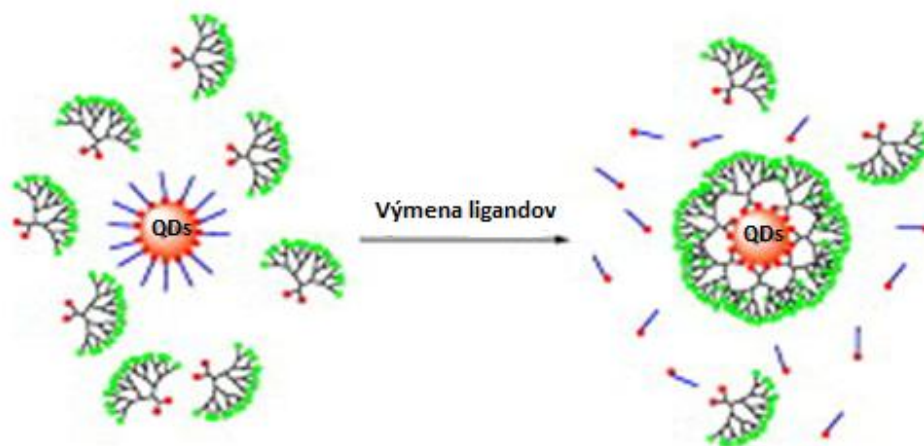
1.2.1 Syntéza hydrofóbných QDs

Pre syntézu koloidných hydrofóbných QDs sa používa metóda kontrolovanej tvorby a rastu častíc v roztoku. Pri syntéze sa využívajú kovové chalkogény (sulfidy, selenidy, teluridy) ako ďalšie sa používajú organokovové prekursor (napr. dimetylkadmium), kovové oxidy (napr. CdO) alebo kovové soli organických a anorganických kyselín (napr. nitrát, acetát). Chalkogénové anióny za zvyčajne získavajú z čistých chalkogénov (napr. Se, Te, S). Nech použijeme akékoľvek prekursor vzniknutá QDs je síce hydrofóbná ale jej kvantový výťažok (QY) je vyšší ako u hydrofilných QDs. Samotná syntéza prebieha v roztokoch spomínaných prekursorov a ich podstata spočíva v strieknutí reaktantov do ohrievaného a intenzívne miešaného koordinačného organického rozpúšťadla. Najčastejšie sa ako rozpúšťadlo používa TOPO (trioctylphosphine oxid), TOP (trioctylphosphine), alebo HDA (hexadecylamin). Nakoľko vzniknuté QDs sú rozpustné len v nepolárnych rozpúšťadlách je potrebné metódou solubilizácie zabezpečiť ich rozpustnosť vo vode [3][20].

1.2.2 Solubilizácia QDs

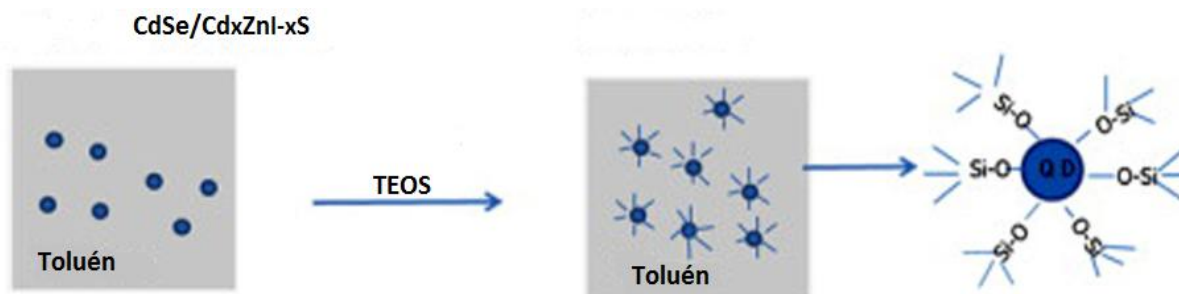
Premena hydrofóbných QDs na hydrofilné je nevyhnutná pre biologické a biomedicínske aplikácie. Táto premena je náročná a má veľa krokov.

Prvá technika spočíva vo výmene ligandov (niekedy nazývaná ako obalová výmena). Na hydrofóbné ligandy sú naviazané bifunkčné ligandy, ktoré sú hydrofilné. Ich jeden koniec je pripojený na povrch QDs (zvyčajne thiolová skupina) a druhý koniec reaktívny (karboxylová alebo hydroxylová skupina) je rozpustný vo vode ako je vidieť na Obr. 2. Nevýhodou tejto techniky je, že bifunkčné molekuly sú drahé a nestabilné [3][7].



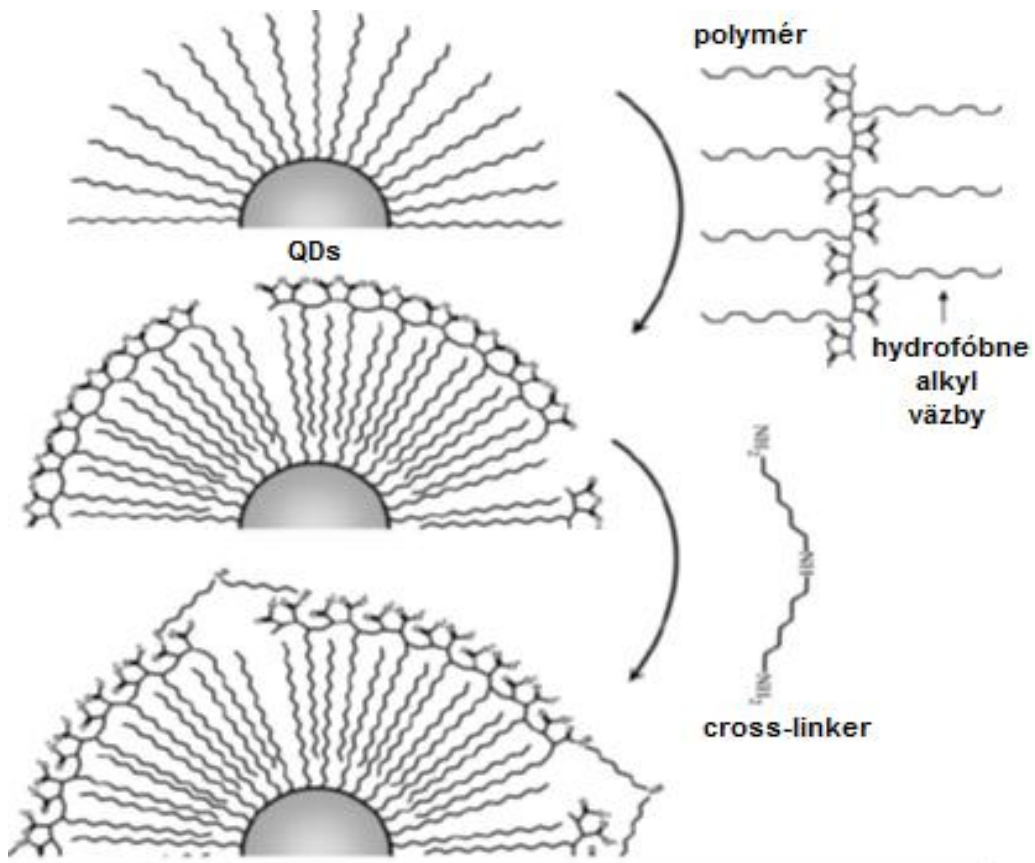
Obr. 2 Solubilizácia QDs pomocou ligandov, prevzaté a upravené z [7]

Druhou technikou je použitie SiO_2 vrstvy. Oxid kremičitý je navrstvený na povrch QDs. Táto vrstva zvyšuje stabilitu a chráni QDs proti oxidácií a aglomerácií. Ako príklad môžeme uviesť QDs, ktoré sú silanizované pomocou TEOS-u (tetraethyl orthosilicatu) naviazaním kyseliny olejovej na povrch QDs ako je znázornené na Obr. 3 [3][8].

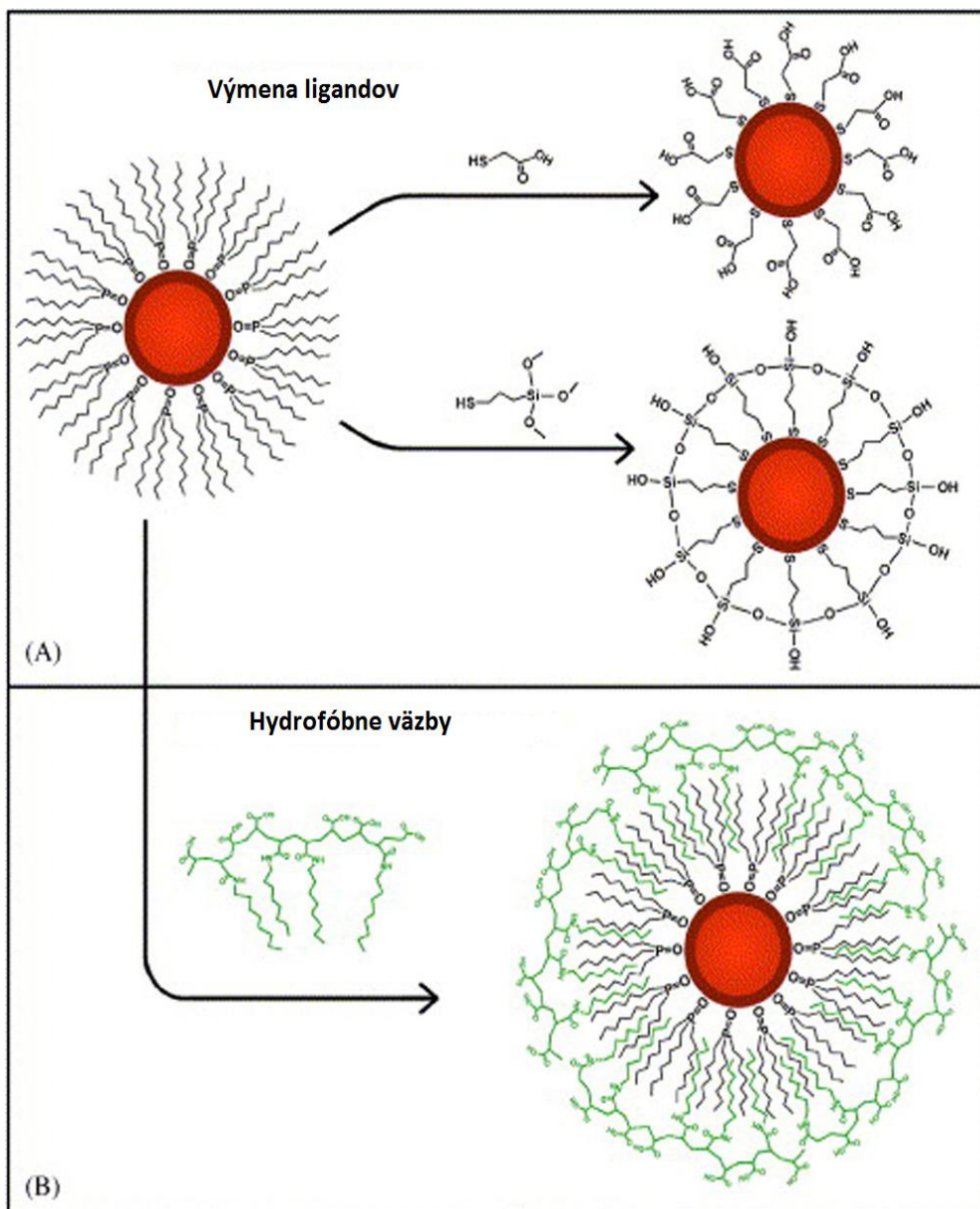


Obr. 3 Silanizácia QDs, prevzaté a upravené z [8]

Tretia metóda spočíva v naviazaní ligandov a polymérov na QDs pomocou hydrofóbných interakcií. Podstata spočíva v zavedení amfifilickej molekuly na povrch QDs. Jedna časť molekuly sa naviaže hydrofóbnymi silami na povrch QDs (napr. polyméry), druhá časť podporuje rozpustnosť a reaktivitu. Ako vhodné molekuly pre realizáciu tejto metódy sú používané dvojblokové alebo trojblokové kopolyméry a fosfolipidy ako je znázornené na Obr. 4 [3][9]. Porovnanie všetkých troch metód je na Obr. 5.



Obr. 4 Solubilizácia QDs s hydrofóbnymi interakciami, prevzaté a upravené z [9]



Obr. 5 Ukážka všetkých spomínaných metód solubilizácie, upravené a prevzaté z [10]

1.3 Syntéza vo vode rozpustných QDs

Takáto syntéza prináša QDs s výbornou biologickou kompatibilitou a stabilitou. V porovnaní s hydrofóbnymi QDs vykazujú vo vode rozpustné QDs lepšiu reprodukovateľnosť, nižšiu toxicitu a ich syntéza je lacnejšia [3].

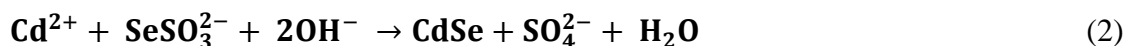
Syntéza hydrofilných QDs sa uskutočňuje najčastejšie v trojhrdelnej banke, ktorá je spojená so spätným chladičom. V banke prebieha reakcia prekursorov ťažkých kovov (napr. octany, dusičnany, chloridy) s prekursorom chalogénu. Prekursor chalogénu môžu byť prášky (napr. Na₂TeO₃ pri výrobe CdTe QDs) alebo prekursor pripravené tesne

pred použitím (H_2Te alebo NaHTe), ktoré sú však nestabilné a preto ich použitie pre syntézu QDs musí prebiehať v inertnom prostredí [3]. Ako príklad sa dá uviesť syntéza CdTe-GSH QDs, ktorej postup je opísaný nižšie v experimentálnej časti.

Nevýhoda pri výrobe QDs je v ich časovej náročnosti. Syntéza QDs môže trvať niekoľko hodín prípadne dní. To má za dôsledok prípravu QDs s nízkym fotoluminiscenčným kvantovým výťažkom (QY). Ako riešenie sa javí mikrovlnná syntéza, ktorá je rýchlejšia, jednoduchšia a má vyššiu efektívnosť. Najčastejšie sú touto metódou syntetizované CdTe, CdSe, CdS, ZnSe QDs. Tieto QDs sú funkcionalizované s rôznymi thiolovými ligandami, ako sú merkaptopropionová kyselina (MPA), thioglykolová kyselina (TGA), glutathion (GSH) [3]. Napríklad Bailey a kolektív pripravil QDs, ktoré majú jadro tvorené CdSe a obal CdSeS a sú rýchlo syntetizované za prítomnosti mikrovlnného žiarenia počas 1 hodiny za stále kontrolovanej teploty. Takto pripravené QDs majú dobré optické vlastnosti a ich QY je až 25% [10].

Veľkosť výsledných QDs aj vlnová dĺžka ich emisie závisí na použitých prekurzoroch a dĺžke zahrievania. Takto pripravené QDs však môžu obsahovať početné defekty a vykazovať slabšiu fotoluminiscenciu, z tohto dôvodu sa využíva mikrovlnná syntéza založená na homogénnom zahrievaní, pri ktorej vzniknuté častice sú uniformnejšie a majú vyšší kvantový výťažok.

Ďalšou syntézou QDs je mikroemulzná syntéza. Táto metóda je jednoduchá, lacná, vysoko reprodukovateľná a umožňuje výbornú kontrolu nad tvarom a veľkosťou QDs. Kontrola nad veľkosťou častíc je dosiahnutá zmenou molárneho pomeru vody a surfaktantu. Avšak mikroemulzná syntéza poskytuje nízky výťažok produktov. Ako príklad možno uviesť syntézu CdSe a CdSe-CdS v AOT (sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinat) /n-heptáne/voda emulznom systéme. Syntéza ma niekoľko krokov:



Prvý krok spočíva v pridaní selénu do roztoku Na_2SO_3 v priebežného prebublávania dusíka. Reakcia prebieha 6 hodín pri teplote 80°C . Vzniknutá reakčná zmes sa potom prefiltruje a číry roztok sa uchováva v tme. Následne sa vzniknutý prekurzor zmieša s reverzným micelárnym systémom pripraveným rozpustením AOT v n-heptáne. Podobne bol pripravený s $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Nakoniec sú tieto emulzie zmiešané, čo vedie k vytvoreniu CdSe QDs podľa reakcie 2 vo vnútri micely. Ďalší krok je v zmiešaní CdSe mikroemulzie a mikroemulzie z $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ a tak vytvoreniu štruktúry jadro-obal, ktorý je možno stabilizovať pridaním thiolových ligandov do roztoku kvantových bodiek [11].

1.4 Modifikácie QDs

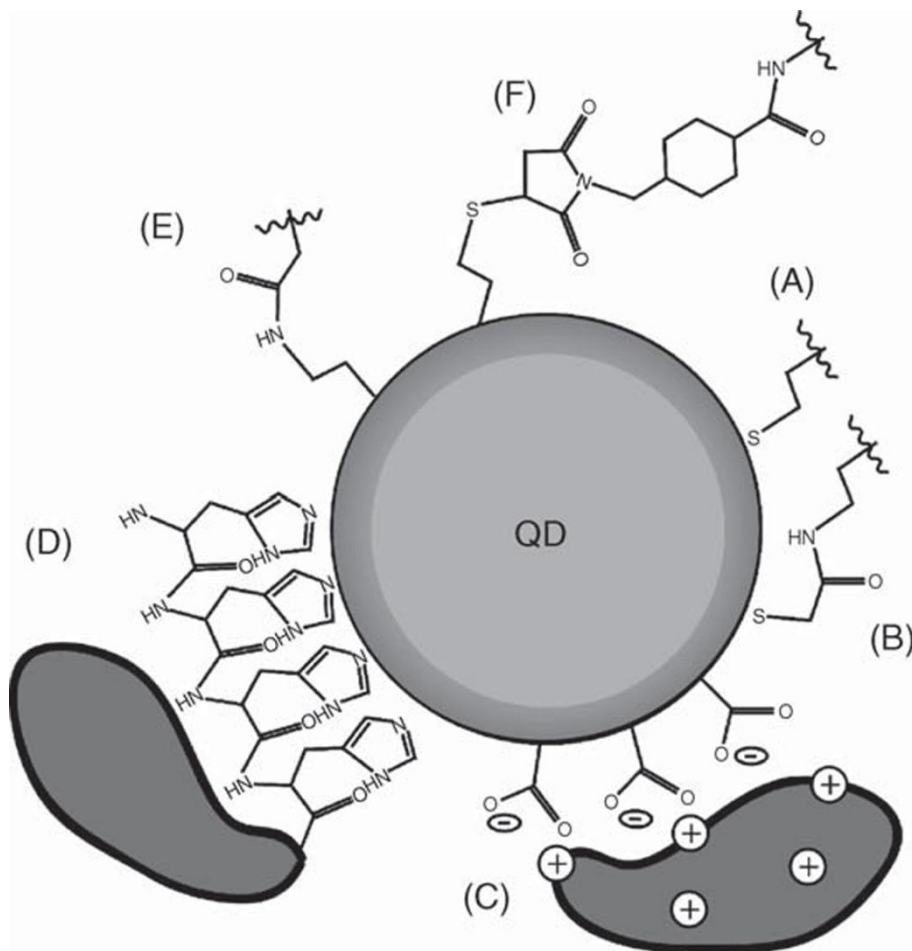
Vyrobené QDs sú pri procese biokonjugácie spojené s biomolekulou vďaka čomu majú širšie využitie v bioaplikáciach. Pri biokonjugácii musí výsledný produkt spĺňať niekoľko požiadaviek:

- aktivita biomolekuly nemôže byť poškodená (znehodnotená)
- väzba QD-biomolekula musí byť stabilná
- hrúbka obalu QD má byť čo najmenšia pri porovnaní s veľkosťou QD
- nízka toxicita výsledného produktu
- vysoká špecificita
- koloidná stabilita
- zabránenie upevneniu ďalších nešpecifických biomolekúl

Spojenie medzi QD a biomolekulou je možné pripraviť niekoľkými spôsobmi. Priama väzba medzi QD a biomolekulou môže byť kovalentná alebo nekovalentná. Priama kovalentná väzba je najčastejšie uskutočnená pomocou thiolových väzieb tak, že thiolové kyseliny na povrchu QDs sú nahradené thiolovými biomolekulami. Takýmito biomolekulami môžu byť DNA, hovädzí sérový albumín (BSA) alebo oligonukleotidy. Napríklad reakcia medzi karboxylovou skupinou na povrchu QDs a amino skupinou imunoglobulínu G [4].

Priamymi nekovalentnými interakciami medzi QDs a biomolekulou sú hlavne elektrostatické sily. Táto konjugácia je najmenej náročná a uskutočňuje sa napríklad pri reakcii proteínov a QDs. Po interakcii proteínov s QDs je kvantový výtlačok podstatne vyšší až v rozmedzí 50-300% v závislosti na povrchu pokrytia [4]. Bolo experimentálne dokázané, že menšie proteíny môžu byť vo väčšom množstve konjugované na povrch QDs. Ako príklad je možné uviesť elektrostatické sily medzi kladne nabitými časťami proteínov (napr.: avidín) a negatívnym komplexom QDs (napr.: alkyl-COOH-QD).

Ďalšou možnosťou vytvorenia interakcie QDs a biomolekuly je spojenie vďaka molekuly, ktorá tvorí tzv. spojku (cross-linker). Tento spôsob funkcionizácie je založený na interakcii medzi povrchom QDs a spojku (napr.: pomocou kovalentnej väzby) a následne vytvorenie väzby medzi spojku a biomolekulou. Spojky môžu reagovať s karboxylovou amino alebo thiol skupinami biomolekúl. Príkladom cross-linkerov je EDC (1-Etyl-3-[3-dimetylamino]propyl]carbodiimid hydrochlorid), NHS (N-hydroxysukcinimid) alebo streptavidin a N-(g-maleimidobutyryloxy) sukcinimid (GMBS). Nevýhodou biofunkcionizácie pomocou cross-linkeru je náročná kontrola počtu naviazaných biomolekúl. Na Obr. 6 je možné vidieť príklady jednotlivých väzieb medzi QDs a biomolekulami [4].



Obr. 6 (A) väzba medzi QDs a thiolovými koncami biomolekúl, (B) amidová väzba s thiolakýlovými 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 [4].

2 Bielkoviny

Bielkoviny sú po chemickej stránke biopolyméry - prírodné makromolekulové látky zložené z aminokyselinových zvyškov, ktoré sú navzájom spojené peptidovou väzbou. Sú základnou stavebnou jednotkou živej hmoty a sú prítomné vo všetkých bunkách. Zúčastňujú sa na stavbe tkanív svalov a i. Poznáme 20 proteinogénnych aminokyselín, ktoré sa podieľajú na stavbe bielkovín [21].

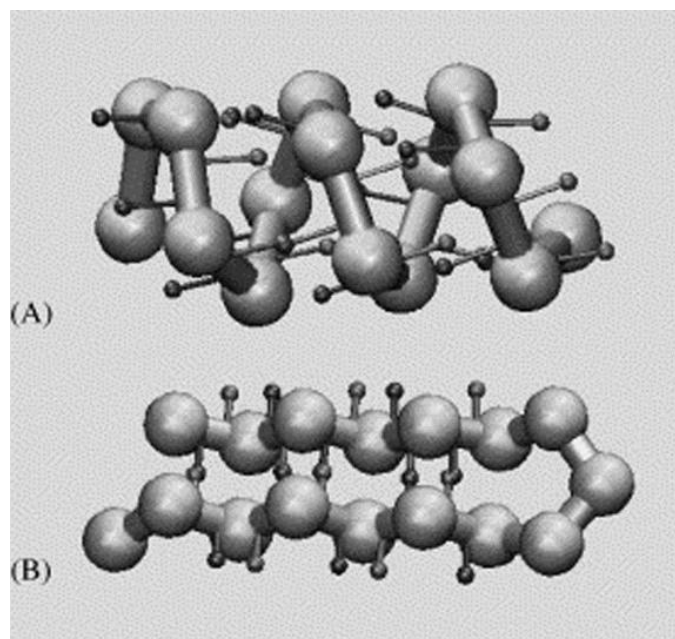
Bielkoviny môžeme rozdeliť na jednoduché, ktoré vo svojich všetkých molekulách obsahujú iba aminokyseliny pospájané peptidovými väzbami. Jednoduché proteíny sa rozdeľujú na fibrilárne - skleroproteíny s vláknitou štruktúrou, ktoré plnia dôležitú stavebnú funkciu. Medzi príklady možno uviesť kolagén, keratín, fibroín. Ďalej globulárne – sféroproteíny s guľovitým tvarom medzi ktoré patria napr. albumíny, globulíny a väčšina bielkovín krvnej plazmy.

Zložené bielkoviny predstavujúce druhú skupinu sú charakteristické tým, že vo svojej štruktúre okrem aminokyselín obsahujú aj nebielkovinové protetické skupiny. Do tejto skupiny patria rôzne bielkoviny s charakteristickými vlastnosťami a funkciami, napríklad glykoproteíny, metaloproteíny, hemoproteíny a iné.

Z hľadiska štruktúry môžeme rozlišovať bielkoviny s rôznymi štruktúrami.

Primárna štruktúra nám udáva poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci a podmieňuje biochemickú funkciu bielkovín. Pri zámene jednej aminokyseliny s inou v sekvencii môže dôjsť k ťažkej poruche organizmu.

Sekundárna štruktúra bielkovín je daná geometrickým usporiadaním polypeptidového reťazca a je rotáciou okolo jednoduchých väzieb α -uhlíkov v polypeptidovom reťazci. Rozlišujeme dve základné sekundárne štruktúry a to α -helix predstavujúci usporiadanie polypeptidového reťazca do pravotočivej závitnice. Druhou sekundárnou štruktúrou bielkovín je β -štruktúra skladaného listu, ktorá predstavuje spojenie mnohých rovnobežných bielkovinových makromolekúl do tvaru pripomínajúceho zložený list. Obe sekundárne štruktúry sú zobrazené na Obr. 7.



Obr. 7 Sekundárna štruktúra bielkovín (A) α -helix, (B) β -štruktúra skladaného listu, prevzaté a upravené z [22]

Terciárna štruktúra zobrazuje usporiadanie α -helixu a β -štruktúry skladaného listu v priestore. Táto štruktúra je typická globulárnym alebo fibrilárnym tvarom, medzi ktorými sú disulfidové väzby.

Kvartérna štruktúra je charakteristická pre enzýmy, hemoglobín a iné proteíny. Kvartérna štruktúra ukazuje vzájomné usporiadanie viacerých polypeptidových reťazcov.

Základnými funkciami bielkovín sú stavebná (napr. kolagén), ďalej katalytická (enzýmy), transportná (hemoglobín) ale aj obranná (protilátky) a iné [21].

2.1 Protilátky

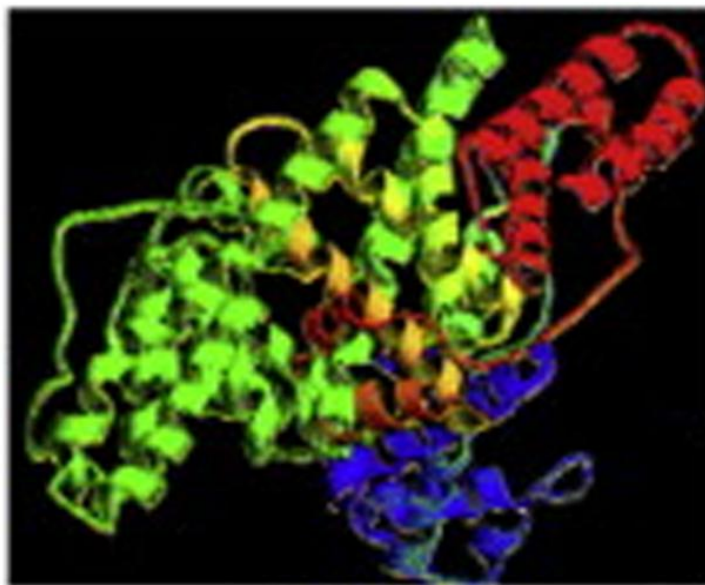
Základnou stavebnou jednotkou každej protilátky sú štyri polypeptidové reťazce a to dva ťažké a dva ľahké, ktoré sú spojené disulfidovými mostíkmi a nekovalentnými hydrofóbnymi väzbami do tvaru Y [23]. Každá takáto jednotka má relatívnu molekulovú hmotnosť okolo 150 000. Ťažké reťazce sa vyskytujú v piatich štrukturálnych typoch označovaných gréckymi písmenami - γ , μ , α , δ , ϵ . Podľa tohto reťazca sa protilátky, označované aj ako imunoglobulíny, delia do piatich tried IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Molekula protilátky je ohybná a to hlavne v mieste kde sa roztvárajú ramienka písmena Y. Ramienka sa môžu otáčať okolo svojej osy a spomínané ramená je možno rozťahnuť až do uhlu 180° .

Protilátka je schopná sa prispôbiť polohe oboch antigénov, ktoré sa na ňu viažu. Protilátky pospájané disulfidovými mostíkmi dosahujú globulárneho tvaru a sú nazývané domény [24].

Protilátky majú obrannú funkciu proti antigénom. Antigény sú cudzorodé látky väčšinou infekčné mikroorganizmy, ktoré sa nachádzajú vo vonkajšom prostredí. Špeciálne naviažu antigén a neutralizujú jeho funkciu tak, že táto väzba vyvolá ďalšie reakcie, ktoré zabezpečia odstránenie antigénu [23].

2.2 BSA

Vo všeobecnosti je sérum albumín najrozšírenejší proteín v plazme cicavcov. Vzhľadom k väzbovým vlastnostiam majú albumíny široké uplatnenie v klinických, farmaceutických a biochemických aplikáciách [25]. Hovädzí sérový albumín (BSA) je jeden z najviac študovaných proteínov z dôvodu jeho štrukturálnej homogenity s ľudským sérovým albumínom. Vďaka tejto skutočnosti je tento proteín veľmi často používané k modifikácii povrchu rôznych nanočastíc [26]. BSA má veľký význam v medicíne a jeho časté využívanie je spôsobené relatívne nízkou cenou a ľahkou dostupnosťou [27]. Na Obr. 8 je znázornená štruktúra BSA.

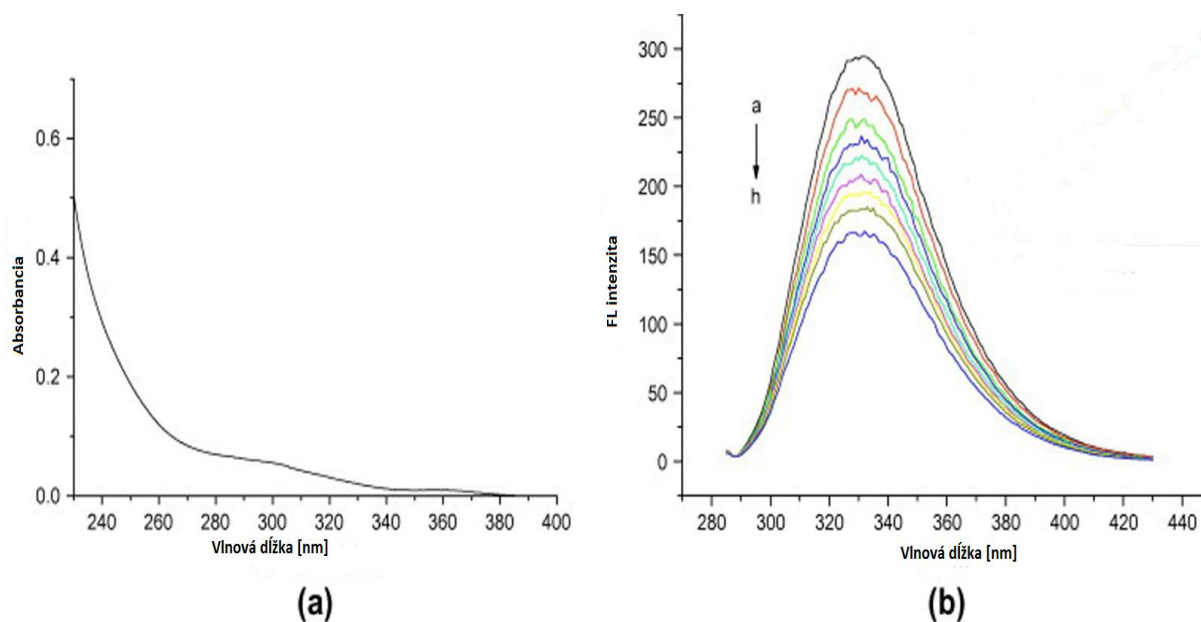


Obr. 8 BSA štruktúra, prevzaté a upravené z [28]

2.3 Biokonjugácia BSA a QDs

Ding a kolektív skúmal väzby medzi ZnSe-ZnS kvantovými bodkami a BSA pomocou fluorescenčnej spektrometrie a izotermickej titračnej kalorimetrie. Bolo zistené, že intenzita fluorescencie BSA bola znižovaná pravidelne so zvyšujúcou sa koncentráciou QDs ako je

vidieť aj na Obr. 9. Ukázalo sa, že aj ióntová sila a pH hodnota má vplyv na väzby BSA a QDs, čo naznačuje, že aj H-väzby prispievajú k interakciám medzi BSA a QDs [29].



Obr. 9 A) UV-VIS absorpčné spektrum QDs, (B) fluorescenčné spektrá BSA v prítomnosti zvyšujúcej sa koncentrácie QDs (a-h), koncentrácie QDs: 0, 0,6, 0,9, 1,2, 1,6, 2,4, 3,2, 4, 4,8 $\times 10^{-5}$ M, prevzaté a upravené z [29]

Vo vode riedené QDs boli používané v niektorých biologických a biomedicínskych odboroch. Wang a kolektív skúmali vplyv QDs CdTe s rôznymi veľkosťami s toxickými interakciami s BSA. Boli testované tri veľkosti QDs s max. emisiou 543 nm, 579 nm a 647 nm. FL výsledky ukázali, že QDs účinne uhasia fluorescenciu BSA, FTIR spektrá ukázali, že sekundárna štruktúra BSA bola zmenená vďaka QDs čo znamená, že QDs vplývajú toxicky na bielkoviny [30].

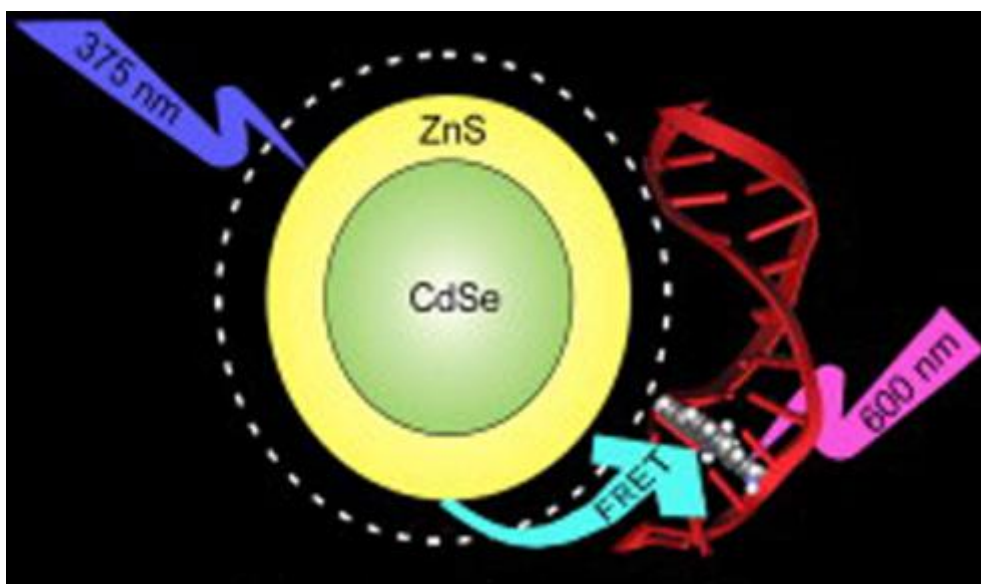
V ďalších štúdiách boli skúmané interakcie medzi rozdielne nabitými povrchmi QDs a BSA. Systematické skúmanie pomocou FL, UV-VIS a metódy cirkulárneho dichroizmu (CD) prebiehalo za fyziologických podmienok. Rôzne povrchové náboje boli na CdSe / ZnS QDs dosiahnuté vďaka sulfanyloctovej kyseline negatívny a cysteamínu pozitívny. Výsledky FL spektroskopie ukázali, že rôzne povrchové náboje QDs znižovali intenzitu fluorescencie BSA s rôznou účinnosťou. CD technika bola použitá k analýze konformačných zmien vyvolaných QDs BSA a výsledky poukazujú na to, že biologická aktivita BSA je ovplyvnená rôznym povrchovým nábojom CdTe/ ZnS QDs [31].

Vedci sa zaoberali aj väzbami medzi CdTe QDs modifikovanými kyselinou mercaptopropionovou, L-cysteínom a glutathionom spolu s BSA. Pomocou FL, UV-VIS a CD sa skúmali spektrá QDs- BSA. Zistenie bolo rovnaké ako už je vyššie spomínané a to, že QDs môžu efektívne znižovať fluorescenciu BSA. CD spektrá ukázali, že sekundárna

a terciárna štruktúra BSA bola zmenená. Tieto štúdie prispeli k lepšiemu pochopeniu QDs-proteín interakcií, čo je stály a zásadný problém pre aplikácie *in vivo* [32].

2.4 Biokonjugácia QDs a DNA

Ako príklad biokonjugácie QDs a DNA je možné uviesť biokonjugáciu argininom pokryté CdSe/ZnS QDs s ethidium bromidom (EB) značeným syntetickým dodekamerom DNA. Vďaka fluorescenčnému rezonančnému prenosu energie (FRET) dochádza k výmene fluorescenčnej energie medzi donorom a akceptorom pričom ich vzdialenosť musí byť menšia ako veľkosť Försterovho polomeru, ako bolo spomínané už vyššie. Arginin/QDs predstavuje donor a etidium bromidom-DNA akceptor, ako je znázornené aj na Obr. 10[12].



Obr. 10 Biokonjugácia QDs a DNA, prevzaté a upravené z [33]

Rotella a kolektív preukázali, že väzby medzi aminokyselinou a QDs- proteín sú veľmi podobné interakciám proteín-proteín, pretože tieto väzby medzi proteínmi sú v podstate medzi aminokyselinami. Podobne je to aj medzi nanočasticou a DNA. Ich väzby sú veľmi podobné ako u väzieb proteín- DNA. Nešpecifické väzby medzi QDs a DNA bol skúmané pomocou ultrarýchlej spektroskopie. Nedávno He a kolektív preukázali, že tieto väzby medzi QDs (presne CdTe QDs) a DNA sa dajú využiť v sondách pre snímanie vírusov hepatitídy typu B [34].

Ďalším pokusom bolo modifikovanie CdSe QDs Merkaptó- β -cyklodextrínom. Pri vlnovej dĺžke $\lambda_{ex} = 370$ nm dosahoval fluorescenčný pík CdSe/CD QDs 525nm. Fenantrolín (Phen) je schopný túto fluorescenciu uhasiť, pridaním DNA je ju možné znova

obnoviť. Stratou a následnou obnovou intenzity fluorescencie bolo zistené, že je priama úmera medzi pridanými množstvami Phen a DNA [35].

3 Aplikácie QDs

Pri úspešnej syntéze a biokonjugácií je možné QDs využívať v rôznych biologických aplikáciách. Nakoľko QDs majú výbornú fotostabilitu dajú sa dlhodobo používať a pozorovať. Vďaka schopnosti fotoluminiscencie je ich využitie veľmi zaujímavé a žiadané. Aplikácie QDs môžeme rozdeliť do skupín *in vitro*, *in vivo* a v imunosenzoroch.

3.1 *In vitro* diagnostika

Tri najdôležitejšie vlastnosti QDs v *in vitro* diagnostiku sú:

- vysoký jas a fotostabilita
- farba a úzke emisné pásy
- tvar a veľkosť

Tieto vlastnosti poskytujú výhody vzhľadom k požiadavkám *in vitro* diagnostiky, ktorými sú citlivosť, selektivitu a multiplexitu (súčasné meranie viacerých biomarkerov). Farebná laditeľnosť a úzke emisné pásy umožňujú optickú multiplexitu niekoľkých markerov s veľmi vysokou selektivitou, pretože rôzne QD emisné pásy vykazujú oveľa nižší spektrálny prekryv v porovnaní s konvenčnými organickými farbivami alebo fluorescenčnými proteínmi.

Aplikácia QDs *in vitro* v rámci tkanív a buniek je veľmi náročná v dôsledku zložitého prostredia, morfológie a funkcie buniek. Veľkosť, tvar a povrchové vlastnosti môžu byť vážnou prekážkou pre citlivé a reprodukovateľné pozorovanie subcelulárnej funkcie a interakcií. Ďalším často diskutovaným problémom je cytotoxicita, ktorá zvyčajne závisí na štruktúre a materiáli aplikovanej QDs a vyšetřovaných biologických systémov. Žiadny jasný a najmä žiadny všeobecný záver nebol nájdený o QD toxicite, preto táto diskusia je priebežne v budúcnosti. Vysoký jas a fotostabilita (vysoký signál pri dlhých pozorovacích termínoch), rovnako ako farebná laditeľnosť a úzke emisné pásy (uľahčená optická multiplexita) sú zaujímavé funkcie QDs pre fluorescenčné zobrazovanie tkanív a buniek [16].

3.2 *In vivo* aplikácie

In vivo prístup zahŕňa experimenty vykonávané vo veľkom systéme tŕiel experimentálnych zvierat. V porovnaní s *in vitro* *in vivo* aplikácie čelia rôznym problémom, ktoré sú spôsobené nárastom zložitosti mnohobunkových organizmov. Aplikácie *in vivo* sa delia na 4 základné druhy:

- biodistribúcia QDs *in vivo*
- cievne zobrazenie pomocou *in vivo*
- sledovanie QDs vďaka *in vivo*

- *in vivo* nádorové zobrazenie

Ako príklad je možné uviesť QDs, ktoré boli využité pre *in vivo* značenie buniek. Výsledky ukazujú, že veľké množstvo QDs môže byť dodané do živých buniek cicavcov prostredníctvom troch rôznych mechanizmov: nešpecifickej pinocytózy, mikroinjektovania, a peptid-indukovanej dopravy (napr. pomocou proteínu vnútrobunkových doménov HIV-1 peptidu Tat). Prekvapivým zistením bolo, že dve miliardy QDs mohli byť doručené do jadra jedinej bunky bez toho, aby bola ohrozená jej životaschopnosť, šírenie alebo migrácia. Schopnosť vytvorenia fotografie jednobunkovej migrácie a diferenciácie v reálnom čase je dôležitá v niekoľkých výskumných oblastiach, ako je embryogeneza, rakovina metastáz, terapeutika kmeňových buniek a imunológia lymfocytov. Pre aktívny tumor cielene Gao a kolektív použil protilátky konjugované na QDs, ktoré boli zamerané na prostatický špecifický membránový antigén (PSMA). PSMA bol vybraný ako atraktívny cieľ pre liečebné intervencie karcinómu prostaty. Akumulácia protilátky PSMA v mieste rastu nádoru je základom radiologickej imunologickej scintigrafie a cielenej terapie pri metastázach karcinómu prostaty [14].

QDs sa ukázali ako relatívna cesta aj k značeniu bunkových proteínov. Napríklad označenie F-aktínových vlákien preukázali, že QDs by mohli byť použité na označenie proteínov, pri ktorých je dôležité zachovanie ich enzýmové aktivity. QDs pokryté streptavidínom boli použité na označenie jednotlivých vlákien F-aktínu [19].

Potenciálne toxické účinky polovodičových QDs sa stali nedávnou témou diskusie. Naozaj, toxicita *in vivo* je pravdepodobne kľúčovým faktorom pri určovaní, či by mohli byť QDs zobrazovacie sondy schválené regulačnými úradmi pre humánne klinické použitie. Nedávna práca Derfusa a jeho kolektívu uvádza, že CdSe QDs sú vysoko toxické pre kultivované bunky v UV osvetlení. To nie je prekvapujúce, pretože energia UV žiarenia je blízka kovalentnej chemickej väzbe a rozpúšťa polovodičové častice v procese známom ako fotolýza. QDs so stabilnou vrstvou polyméru je v podstate netoxické v bunkách a živočíchoch. *In vivo* štúdie podľa Ballou a spol. tiež potvrdili netoxický charakter trvalo chránených QDs. Napriek tomu, že je naliehavo potrebné skúmať bunkovú toxicitu na *in vivo* rozklade pomocou QDs sond. Pre polymérom obalených QDs, chemické alebo enzymatické degradácie polovodičových jadier je nepravdepodobná. Polymérom chránené QDs môžu byť vylúčené z tela pomalou filtráciou von. Táto a ďalšie možné mechanizmy musia byť starostlivo preskúmané pred akýmkoľvek aplikáciami v nádoroch alebo cievnom zobrazovaní [3][13][14].

3.3 Imunosenzory

Vo vode rozpustné QDs môžu byť krížovo prepojené s biomolekulami ako sú protilátky, fosfooligonukleotídy alebo malé molekuly ligandov, ktoré zabezpečia špecificky

biologicky cieleňé využitie. To sa dá dosiahnuť pomocou štandardných biokonjugačných metód, ako je napríklad párovanie maleimidovo aktivovaných QDs s thiolovými koncami protilátok. U reaktivity mnohých typov biomolekúl bolo zistené, že tieto biomolekuly zostávajú aj po konjugácii povrchovými nanočasticami. Optimalizácia povrchového usporiadania biomolekúl je v súčasnosti v štádiu výskumu. Povrchy QDs môžu byť modifikované hydrofilnými molekulami ako je polyetylén glykol. Pomocou zložitej sondy je možné využiť QDs na zistenie prítomnosti biomolekúl. Ako príklad je možné uviesť QDs, ktoré sú prispôsobené tak, aby reagovali na prítomnosť cukrovej maltózy konjugovaním maltózy spájajúcej proteíny k povrchu nanokryštálov.

FRET zahŕňa prenos fluorescenčnej energie z donorovej častice k akceptorom vždy, keď vzdialenosť medzi nimi je menšia ako kritický polomer, známy ako Försterov polomer. FRET je výhodný pre meranie zmien vzdialeností čo je vhodné pre meranie zmien proteínových konformácií a stanovení enzýmovej aktivity [19]. QDs sa objavili ako nová trieda snímačov, ktoré sprostredkovávajú energiu pre prenos do organických farbív (FRET). Tiež bolo nedávno oznámené, že QDs dokážu vydávať fluorescenciu bez externého zdroja excitácie ak sú konjugované na enzýmy, ktoré katalyzujú bioluminescenčné reakcie, kvôli bioluminiscenčnému rezonančnému energetickému transféru (BRET).

Elektrochemiluminiscencia (ECL) v CdSe QDs sa výrazne zvýšila v kombinácii s uhlíkovými nanotrubicami (CNTs) a poly (hmotnostných chloridov) (PDDA) vo filme CdSe QDs. Môže byť úspešne použitá na vytvorenie citlivého ECL immunosensory pre detekcia ľudského IgG (Ag). CdSe QDs-CNTs kompozícia vykazovala vysokú intenzitu ECL, dobrú biokompatibilitu, a vysokú stabilitu, ktorá drží veľký prísľub pre výrobu týchto ECL biosenzory s lepším citlivosťou [15][17].

4 Metódy charakterizácie QDs

4.1 Luminiscencia

Luminiscencia je jav, pri ktorom dochádza k absorbovaní žiarenia s vhodnou vlnovou dĺžkou látkou, ktorá následne prejde do excitovaného stavu. Táto látka po určito čase vyžiari získanú energiu ako luminiscenciu.

Luminiscenciu možno rozdeliť na :

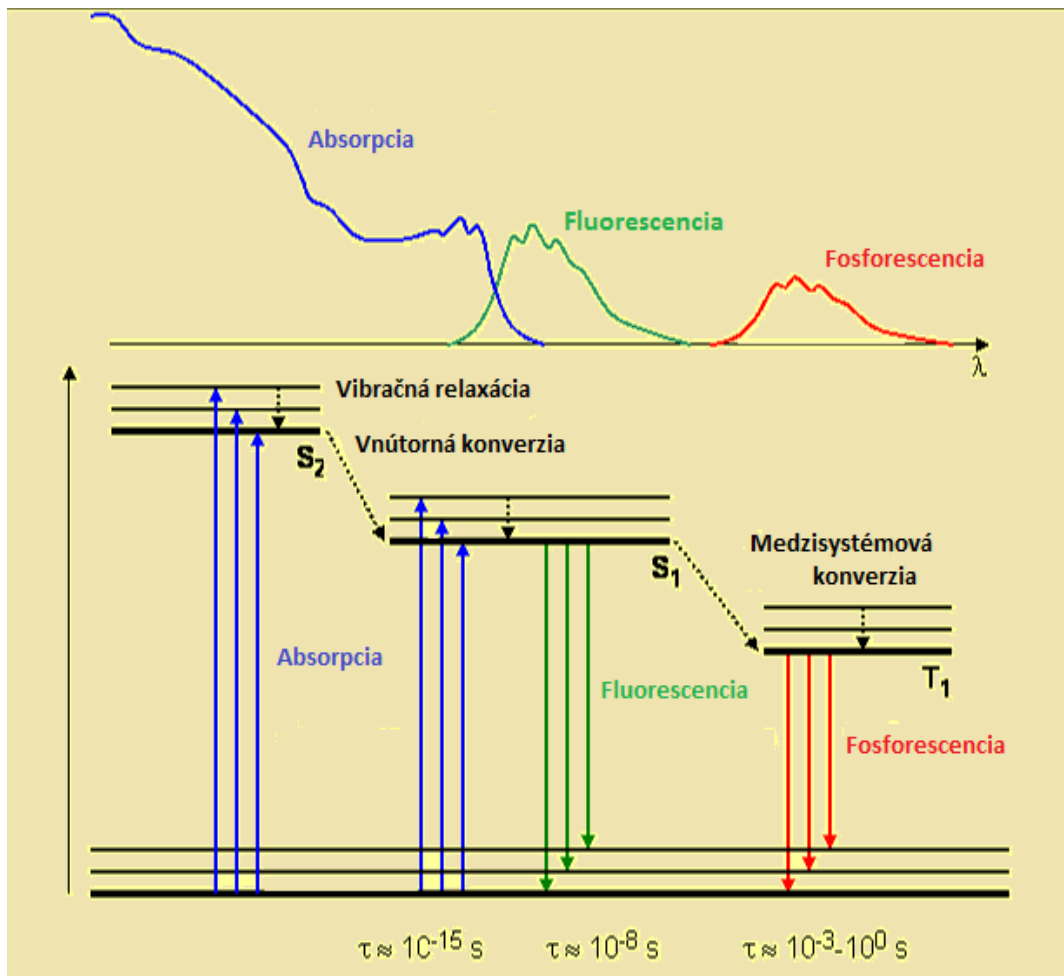
- Fluorescenciu
- Fosforescenciu
- Oneskorenú fluorescenciu

Fluorescencia nazývame jav, pri ktorom emisia žiarenia z excitovaného stavu nastane jedným alebo viacej spontánnymi energetickými prechodmi. Fluorescenciu možno pozorovať počas budenia a po jeho ukončení prakticky ihneď zmizne.

Fosforescencia nastáva keď sa pri emisii žiarenia z excitovaného elektrónového stavu uplatňuje metastabilná hladina. Fosforescencia má v porovnaní z fluorescenciou dlhšiu dobu dohasínania.

Oneskorená fluorescencia je žiarivý prechod z rovnakého stavu ako pri fluorescencií avšak s dlhšou dobou dohasínania danou časom, pri ktorom je látka v metastabilnom tripletovom stave.

Po absorpcií svetelného kvanta budiaceho žiarenia prechádzajú elektróny látky z singletného stavu S_0 do excitovaných singletných stavov S_1, S_2, \dots a tripletných stavov T_1, T_2, \dots . Látka prejde z rovnovážnej vibračnej hladiny stavu S_0 do vibračnej hladiny niektorého z excitovaných stavov. K deexcitácii elektrónov látky dochádza buď žiarivými prechodmi (luminiscencia) alebo nežiarivými prechodmi (vnútorná konverzia, medzisystémová konverzia, vibračná relaxácia). Na Obr. 11 sú vidieť žiarivé a nežiarivé prechody medzi elektrónovo vibračnými stavmi (Jablonského diagram).



Obr. 11 Jablonského diagram, prevzaté a upravené z [36]

Doba trvania absorpcie je rádovo 10^{-15} s, fluorescencie 10^{-8} s, fosforescencie 10^{-3} až 10^0 s, vibračnej relaxácie 10^{-12} - 10^{-13} s, vnútornej konverzie 10^{-6} - 10^{-12} s a medzisystémovej konverzie 10^{-4} - 10^{-12} s.

4.2 Fluorescencia

Fluorescencia je teda žiarivý prechod z rovnovážnej vibračnej hladiny stavu S_1 (excitovaný stav) do vibračnej hladiny základného stavu S_0 . Pri využívaní fluorescenčných metód je dôležité stanovenie kvantového výťažku. Kvantový výťažok fluorescencie je pomer počtu svetelných kvánt emitovaných a absorbovaných látkou za sekundu [36]. Fluorescencia sa riadi niekoľkými dôležitými pravidlami. Na začiatok je to Stokesov zákon, podľa ktorého musí byť vlnová dĺžka luminiscencie emisie väčšia alebo rovná vlnovej dĺžke excitačného svetla. Ďalej je to tzv. Kashovo pravidlo, ktoré tvrdí, že dochádza pred emisiou fluorescenčného kvanta k relaxácii vibračnej energie a vnútornej konverzie, čo má za dôsledok, že fluorescenčný prechod nastáva z najnižšej vibračnej hladiny prvého

excitovaného stavu. Tretím princípom je Vavilové pravidlo, ktoré hovorí , že doba trvania excitovaného stavu a kvantový výťažok molekúl v roztoku nezávidí na vlnovej dĺžke. Z čoho vyplýva, že emisie spektier sú nezávislé na vlnovej dĺžke excitácie.

Fluorescenčná spektrometria je metóda, ktorá umožňuje zistiť optické vlastnosti nanoštruktúr vďaka fluorescenciám. Vďaka fluorescenčnej spektrometrii je možné zistiť emisné spektrá, ktoré nám hovoria o závislosti vlnovej dĺžky na intenzite skúmanej vzorky. Spektrometer sa skladá zo zdroja svetla, ktorý väčšinou slúži ako xenónová výbojka, ďalej excitačný monochromátor, do ktorého prichádza svetlo z výbojky a ktorý určuje konkrétnu vlnovú dĺžku excitačného žiarenia, ktorá následne dopadá na vzorku, ktorá zvyčajne býva v kyvete umiestnenej v držiaku na kyvety. Na emisný monochromátor dopadá svetlo. Ten vymedzuje vlnovú dĺžku žiarenia, ktorá následne dopadá na detektor. Výstupom je buď emisné alebo excitačné spektrum podľa toho, ktorý monochromátor sa zapája do analýzy [41].

5 Experimentálna časť

V tejto práci som sa zamerala na syntézu CdTe QDs a následné naviazanie biomolekuly BSA na vytvorené kvantové bodky.

5.1 Použité chemikálie

- Borohydrid sodný 99%, Sigma-Aldrich
- Citrát sodný dihydrát, Sigma-Aldrich
- Glutathion, Merck spol. s.r.o.
- Hovädzí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- Chlorid kademnatý, p.a., Sigma-Aldrich
- Isopropanol, p.a., Lach-Ner, s.r.o.
- Teluričitan sodný, Sigma-Aldrich
- N-(3-dimetylamo-propyl), Sigma-Aldrich
- N-hydrohysukcinimid, Sigma-Aldrich
- Voda MiliQ, Milipore

5.2 Použité zariadenia a laboratórne vybavenie

- Centrifúga, Hettich EBA 20
- Chladič, Haake DC 30
- Magnetická miešačka, Heidolph MR Hei-End
- Pipeta, Eppendorf
- Ultracentrifúga Minispin plus Eppendorf
- pH meter, Cybescan PC 6500
- Trepačka, Thermo-shaker MSC-100
- UV-VIS spektrofotometer Helios α , Spectronic Unicam
- Fluorolog, HORIBA Jobin Yvon
- Infinite M200 Pro, Tecan

5.3 Syntéza QDs CdTe ovrstvených glutationom

CdTe-GSH boli syntetizované nasledujúcim spôsobom. Do roztoku chloridu kademnatého (2 ml, $c = 0,04$ mol/l) a deionizovanej vody (21 ml) boli za stáleho miešania pridané nasledujúce reaktanty: GSH (150 mg), citrát sodný dihydrát (50 mg), teluričitan sodný (2 ml, $c = 0,01$ mol/l), borohydrid sodný (25 mg). Vzniknutá zmes bola preliata do trojhrdlovej banky, ktorá bola spojená so spätným chladičom a následne bola zahrievaná

za stáleho miešania (500 otáčok/min) na 95°C počas 3 hodín. Na konci ohrievania mal roztok žltú farbu a po vychladnutí bol uskladnený v chlade ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a temne [37]. pH vzniknutých QDs bolo 6,7.

5.4 Prečistenie CdTe-GSH QDs

Po ukončení syntézy boli všetky CdTe-GSH QDs prečistené isopropanolom. Kvantové bodky boli zriedené s isopropanolom v pomere 1:2 a následne odstredené v centrifúge (6000 otáčok/min) po dobu 15 minút.

5.5 Naviazanie biomolekuly BSA na CdTe-GSH QDs

Biokonjugácia kvantových bodiek a BSA bola zrealizovaná nasledovne. Do QDs o rôznych koncentráciách ($c = 5, 10, 15\text{ mg/ml}$, $V = 200\text{ }\mu\text{l}$) bol pridaný EDC ($c = 50\text{ mM}$, $V = 100\text{ }\mu\text{l}$) a NHS ($c = 5\text{ mM}$, $V = 100\text{ }\mu\text{l}$). Vzniknutá zmes bola inkubovaná pri teplote $T = 32^{\circ}\text{C}$ počas 30 minút. Následne sa do zmesi pridalo BSA o rôznych koncentráciách ($c = 0; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20\text{ mg/ml}$, $V = 200\text{ }\mu\text{l}$). Výsledná zmes bola trepaná pri 32°C 3 hodiny. Po uplynutí tejto doby sa pripravené QDs uchovávali v chlade ($T = 4^{\circ}\text{C}$) a temne [38].

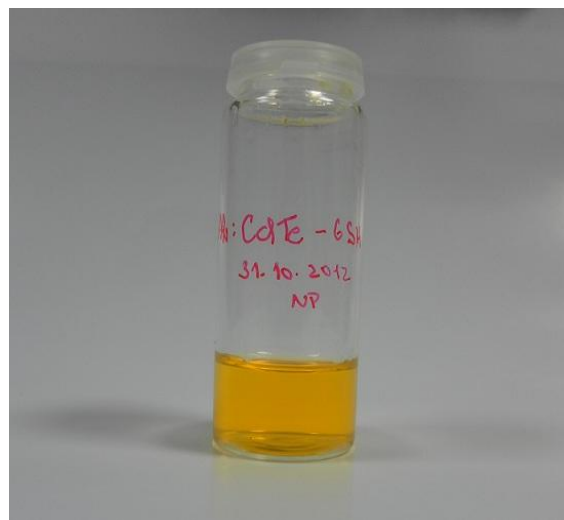
6 Výsledky a diskusia

6.1 Syntéza CdTe QDs

Pre praktickú časť syntézy QDs bola vybraná syntéza koloidných CdTe stabilizovaných glutathionom (GSH), ktoré boli následne modifikované BSA. Postupy experimentu sú už opísané podrobne v predchádzajúcej kapitole.

Na Obr. 12 sú vidieť CdTe QDs, ktoré ešte nie sú modifikované hovädzím sérovým albumínom (BSA). Koloidný roztok pripravených QDs má žltoranžovú farbu a jeho pH je 6,7. Maximálna emisia je pri vlnovej dĺžke 510 nm. Takéto QDs sú vhodné na biofunkcionalizáciu a následné skúmanie ich optických vlastností, čo je ďalším krokom k využitiu QDs v medicínskych oboroch.

Analýza jednotlivých vzorkov prebiehala na fluorescenčnom spektroskope Fluorog HORIBA Jobin Yvon s xenónovou výbojkou. Excitácia bola nastavená na 380 nm, šírka štrbiny bola 2,5 nm a polarizátory nastavené na 90°. Emitované žiarenie bolo detekované v rozsahu 360–680 nm s použitím fotonásobičového (T1 PMT) detektoru s dvojitým monochromátorom.



Obr. 12 Pripravené vo vode rozpustné CdTe QDs stabilizované glutathionom, vľavo sú QDs pod UV lampu, vpravo QDs na dennom svetle

6.1.1 Korekcia

Jeden z faktorov skresľujúcich presnosť merania fluorescence je vnútorný filtračný efekt. Pre presnosť merania je dôležitý fakt, že intenzita fluorescence je úmerná koncentrácií QDs. Tento predpoklad však platí len v obmedzenom rozsahu optických hustôt, pri vyšších koncentráciách QDs je prítomná odchýlka od linearity, ktorá sa nazýva vnútorný filtračný efekt. Preto boli získané emisné spektrá upravené podľa vzťahu:

$$F_{kor} = F_{abs} \cdot 10^{0,5(OD_{ex} + OD_{em})} \quad (3)$$

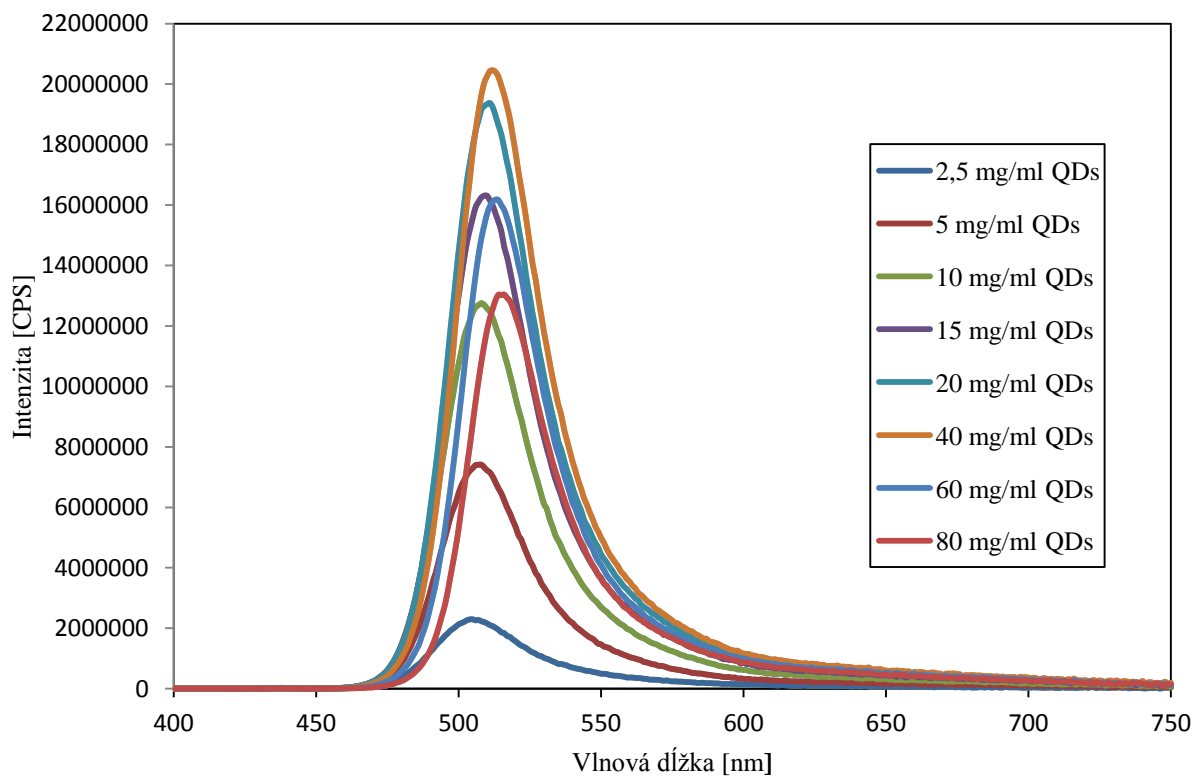
Pričom F_{obs} je nameraná fluorescence, OD_{ex} je optická hustota pri vlnovej dĺžke excitácie a OD_{em} je optická hustota pri vlnovej dĺžke emisie. Vďaka tomuto vzťahu je korigovaný už spomínaný vnútorný filtračný efekt a aj zakalenie skúmanej vzorky. Korekcia bola prevedená pomocou absorpčného spektrofotometra Helios α (Spectronic Unicam) použitou kvetou o optickej dráhe 1 cm. Absorpčné spektrá boli namerané v rozsahu 200-700.

Optická hustota vzorky zodpovedá absorbancii a vzťah uvedený vyššie po úprave vyzerá:

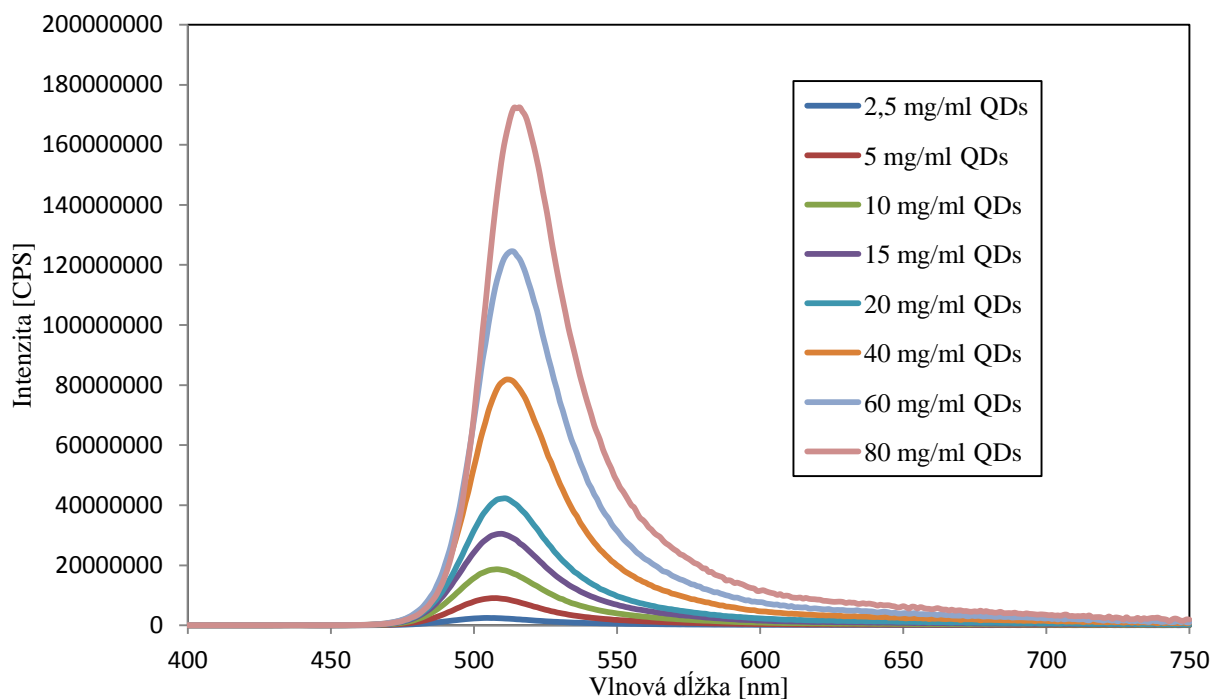
$$F_{kor} = F_{abs} \cdot 10^{0,5(A_{ex} + A_{em})} \quad (4)$$

kde A_{ex} je absorbanca pri vlnovej dĺžke excitácie a A_{em} je absorbanca pri vlnovej dĺžke emisie [41].

Na Obr.13 je vidieť závislosť intenzity fluorescence na koncentrácií vo vode rozpustných CdTe QDs modifikovaných glutathionom, pričom výsledné spektrá rôznych koncentrácií QDs nie sú korelované. V tomto prípade boli vzorky zakalené a ako je vidieť na obrázku zákal rástol so zvyšujúcou sa koncentráciou QDs. Na Obr.14 sú výsledné QDs spektrá rovnakých koncentrácií QDs, ktoré sú už korelované pomocou rovnice (4).

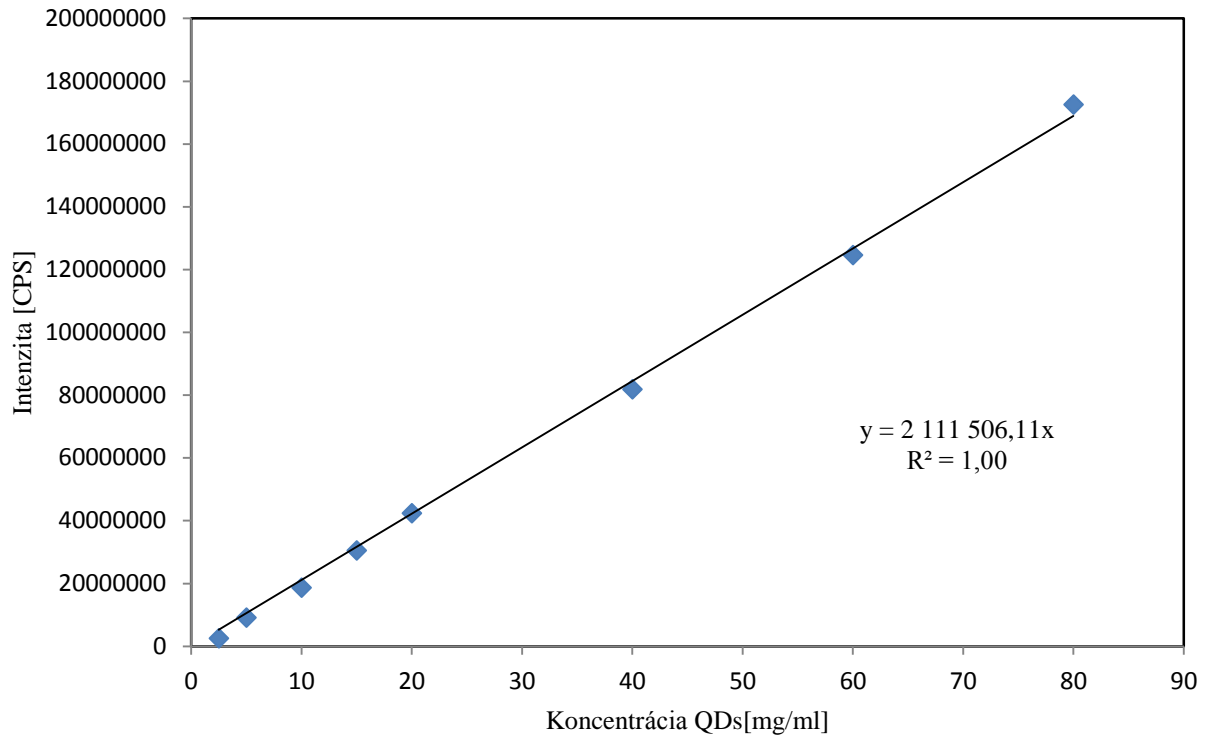


Obr. 13 Fluorescenčné spektrá CdTe QDs o rôznych koncentráciách ($c = 2,5; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80$ mg/ml) bez korekcie



Obr. 14 Fluorescenčné spektrá CdTe QDs o rôznych koncentráciách ($c = 2,5; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80$ mg/ml) po korekcií

Na Obr.15 je ukážka vplyvu koncentrácie QDs ($c = 2,5; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80$ mg/ml) na intenzitu fluorescenie. Je vidieť, že intenzita emisie lineárne rastie so zvyšujúcou sa koncentráciou QDs. Rovnica regresie je $y = 2111506,11x$ a interval spoľahlivosti je $R^2 = 1,00$.



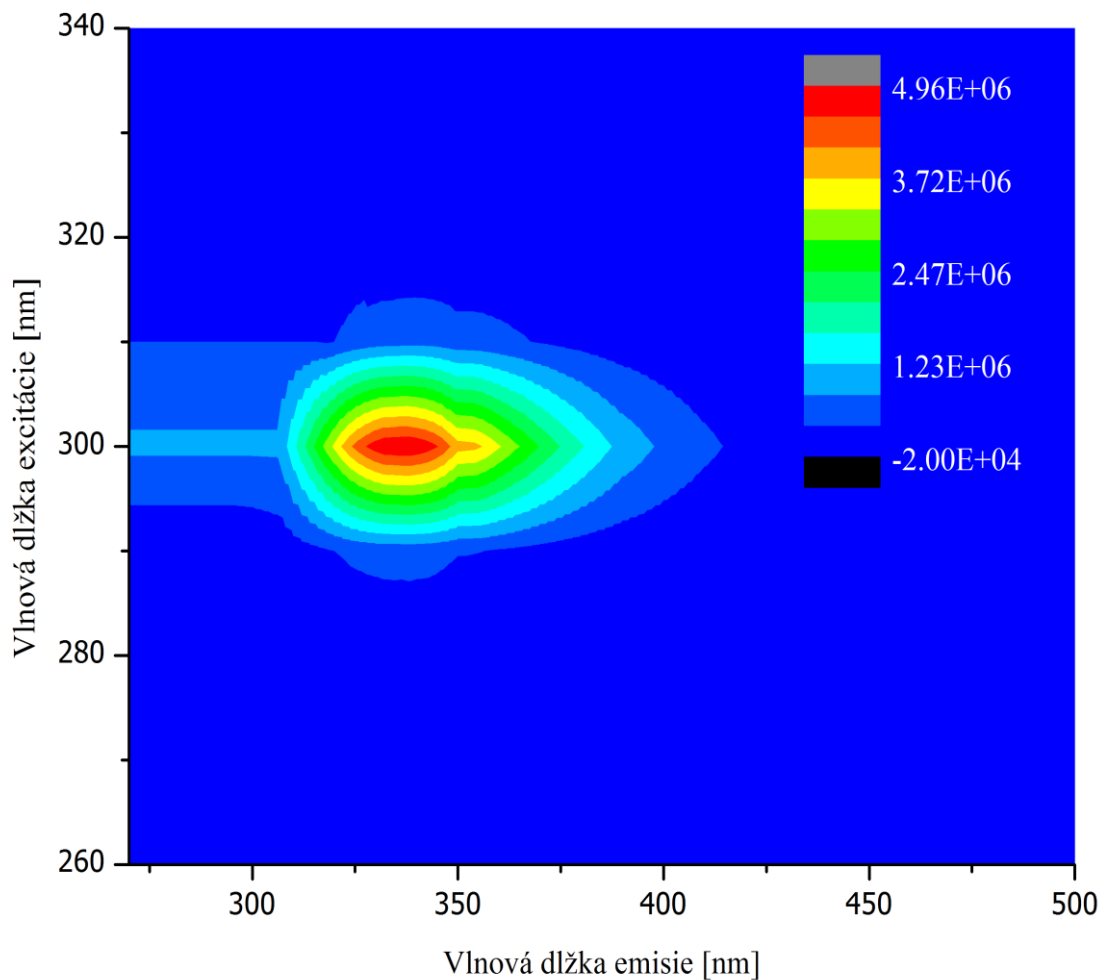
Obr. 15 Závislosť intenzity emisie na koncentrácii QDs

6.2 Biokonjugácia CdTe QDs BSA

Po syntéze CdTe QDs nasledovala ďalej modifikácia BSA. V prvom kroku boli použité EDC a NHS k aktivácii karboxylových skupín na povrchu CdTe QDs, v druhom kroku došlo k samotnému naviazaniu BSA na aktívny povrch CdTe QDs. Rovnako ako bolo modifikované QDs pomocou BSA, tak aj BSA bolo modifikované pomocou QDs. Pre obe typy biokonjugácie boli vyhodnotené spektrá emisie.

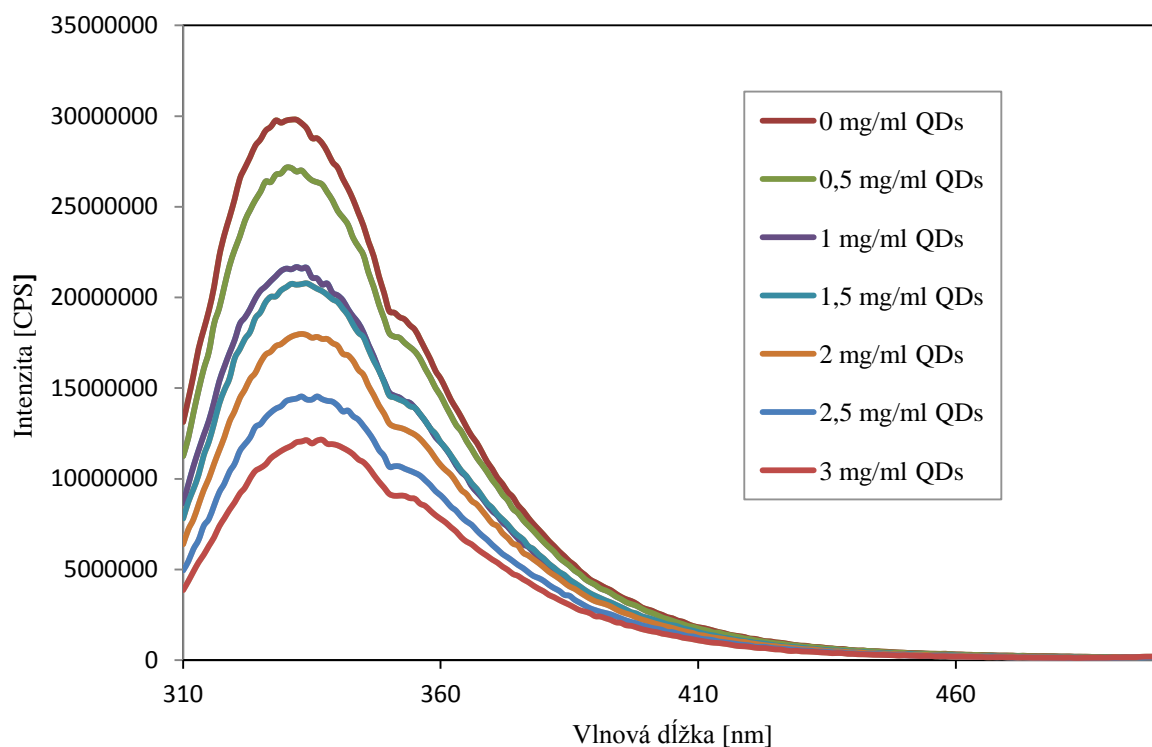
6.2.1 Vplyv koncentrácie QDs na BSA

Pri biokonjugácii QDs na BSA boli použité rôzne koncentrácie QDs ($c = 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3$ mg/ml) a jedna koncentrácia BSA ($c = 10$ mg/ml). Najskôr však bolo namerané 3D spektrum BSA Obr. 16, aby som zistila vhodnú vlnovú dĺžku excitácie BSA. Excitácia bola meraná v rozsahu 260-340 nm s krokom 10 nm. Z grafu Obr. 16 je patrné, že maximálna intenzita emisie BSA je dosiahnutá pri vlnovej dĺžke excitácie 300 nm.



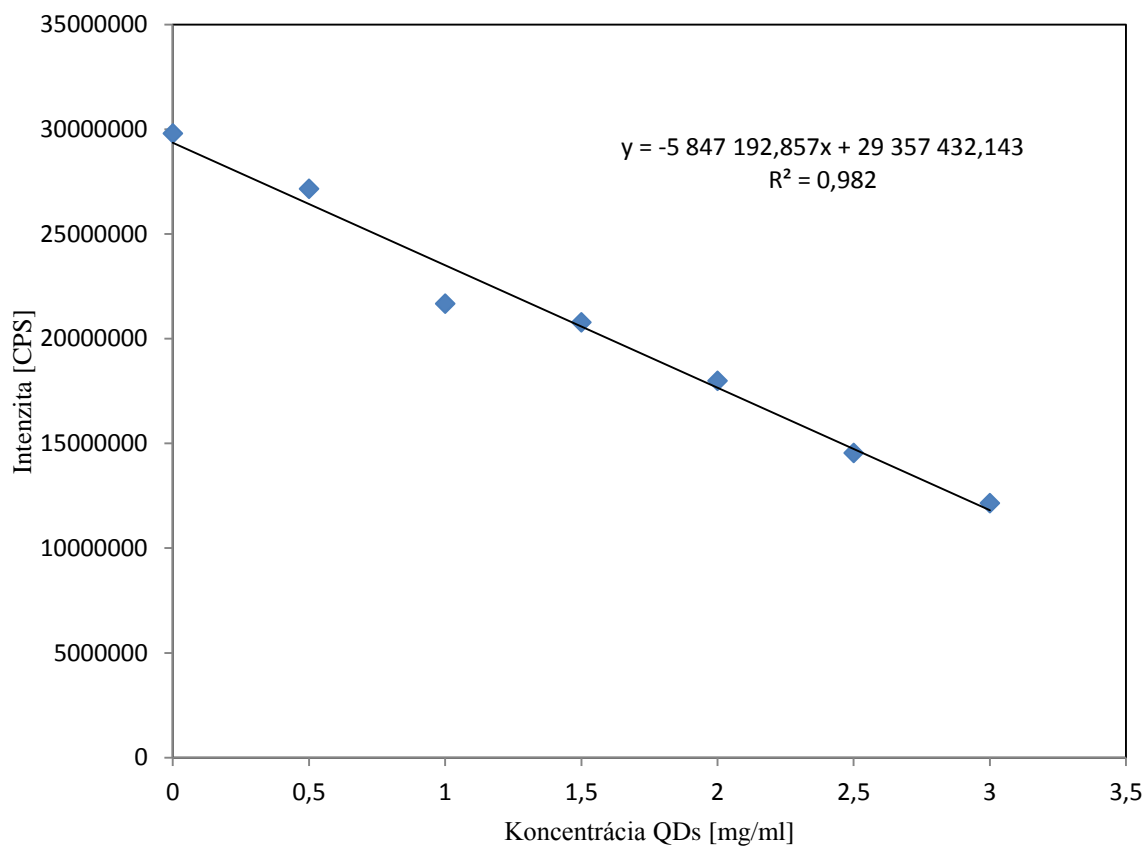
Obr. 16 3D spektrum BSA

Na Obr. 17 sú emisné spektrá BSA, ktoré sú vo väzbe s rôznymi koncentraciami CdTe QDs. Z grafu je vidieť úbytok intenzity emisie so zvyšujúcou sa koncentráciou QDs. Tento výsledok bol očakávaný, pretože aj Ding a spol. preukázali, že QDs zhasínajú intenzitu fluorescence BSA [29]. Maxima intenzity emisie BSA boli v okolí vlnovej dĺžky 335 nm.



Obr. 17 Fluorescenčné spektrá BSA ($c = 10 \text{ mg/ml}$) modifikované rôznymi koncentraciami QDs

Na Obr. 18 je vidieť lineárnu závislosť zhášania fluorescence na koncentrácií QDs. Z rovnice regresie, ktorá je $y = -5847192,857x + 29357432,143$ je vidieť, že naviazanie QDs na BSA spôsobuje zhasínanie intenzity emisie BSA. Interval spoľahlivosti vyšiel $R^2 = 0,982$.



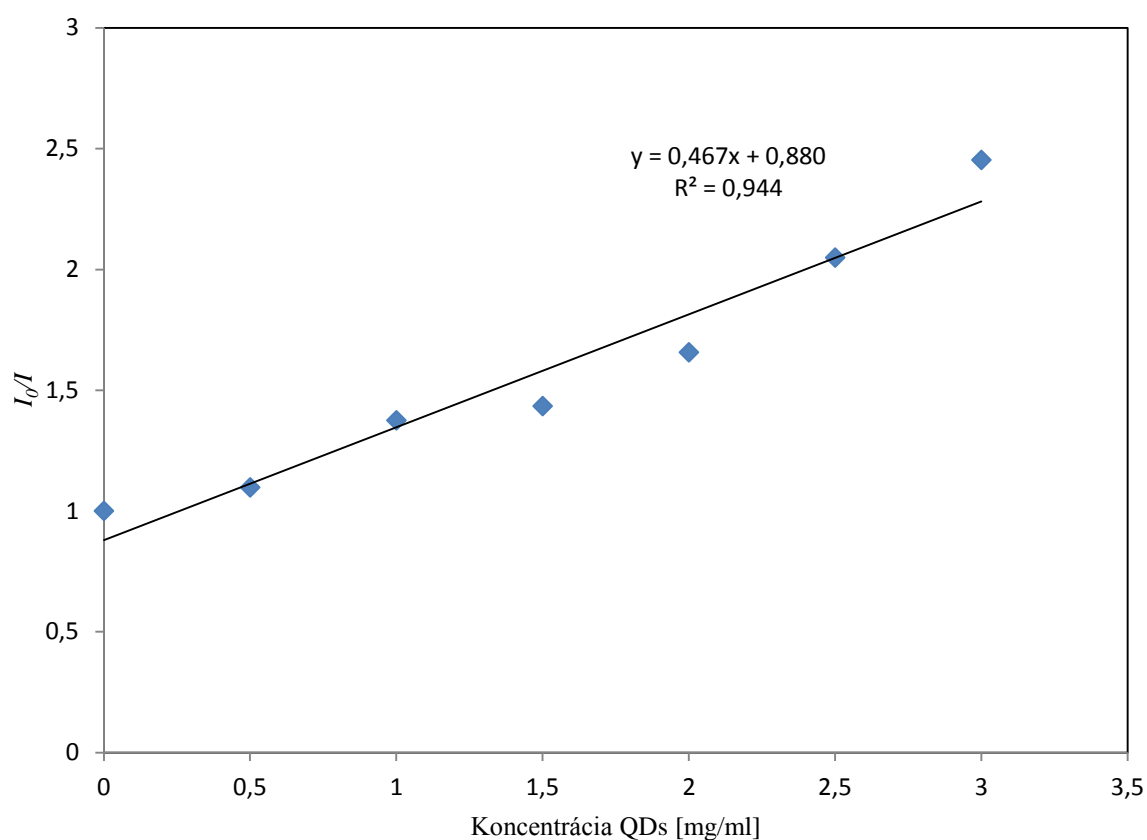
Obr. 18 Priebeh zhášania fluorescence BSA v závislosti na koncentrácií QDs

Fluorescenčné zhášanie či už BSA alebo QDs môže byť popísané pomocou Stern-Volmerovej rovnice.

Stern-Volmerova rovnica má tvar

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[C] \quad (5)$$

Kde I_0 a I sú intenzity v neprítomnosti a prítomnosti zhášača (látky, ktorá znižuje intenzitu emisie skúmanej vzorky), K_{SV} je Stern-Volmerova konštanta zhášača a $[C]$ je koncentrácia zhášača [39]. Na Obr. 19 je Stern-Volmerova závislosť pre rôzne koncentrácie CdTe QDs. Ide o lineárnu stúpajúcu závislosť, pričom rovnica regresie je $y = 0,467x + 0,880$ a interval spoľahlivosti má hodnotu $R^2 = 0,944$.

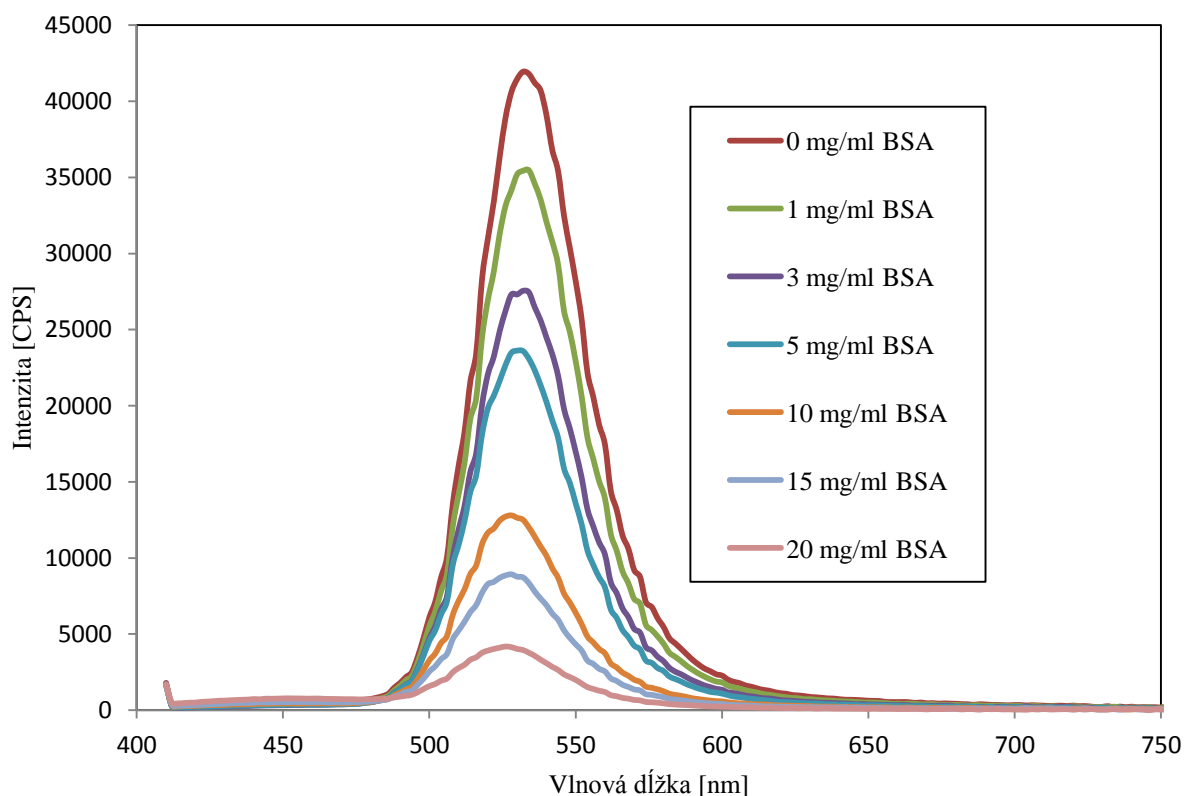


Obr. 19 Stern-Volmerova závislosť zhášanie fluorescence BSA pri rôznej koncentrácií CdTe QDs

6.2.2 Vplyv koncentrácie BSA na QDs

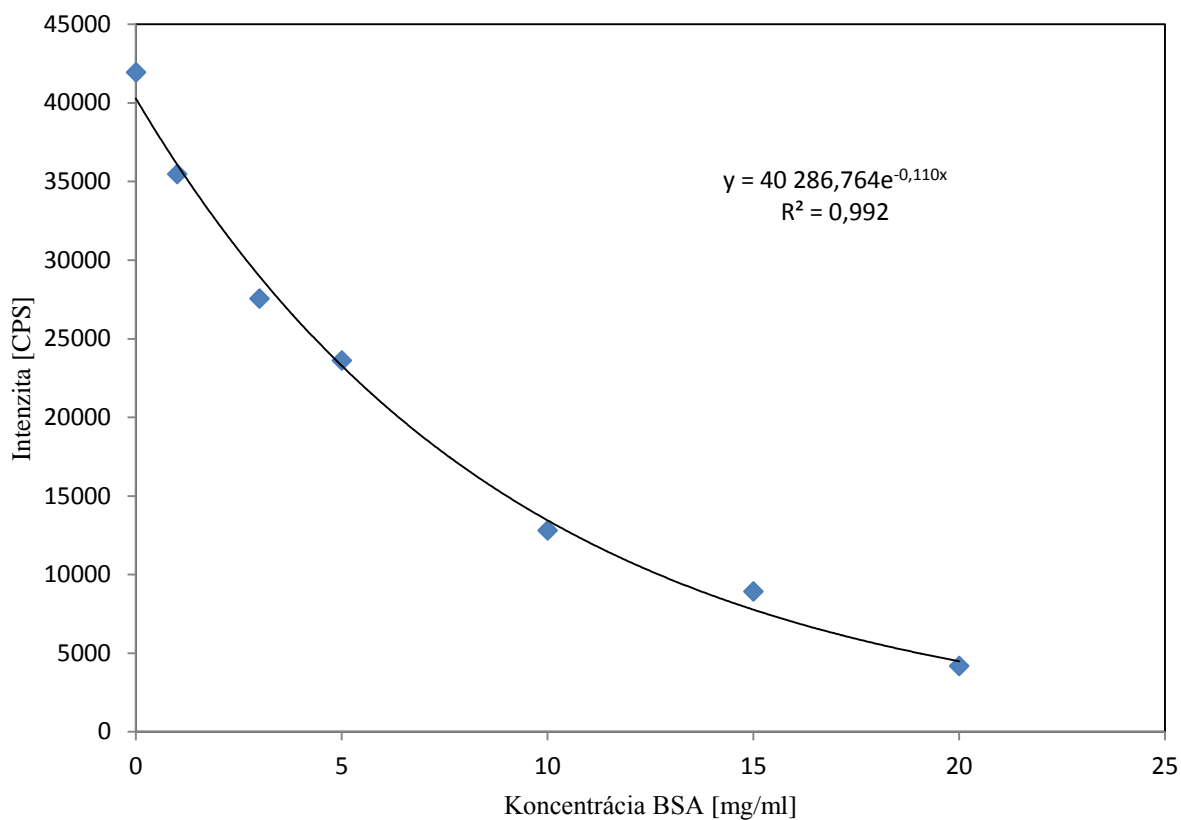
V ďalšej časti práce som sa venovala sledovaniu vplyvu rôznych koncentrácií BSA na zhasávanie CdTe QDs. Boli použité 3 rôzne koncentrácie CdTe QDs ($c = 5; 10; 15$ mg/ml). Všetky vzorky boli analyzované na prístroji Infinite M200 Pro pri vlnovej dĺžke excitácie 380 nm. Vzorky boli najskôr napipetované na mikrotitačnú doštičku a následne vložené do prístroja, pomocou ktorého bola prevedená analýza.

Obr. 20 ukazuje fluorescenčné spektrá modifikovaných QDs ($c = 5$ mg/ml) pomocou BSA ($c = 0; 1; 3; 5; 10; 15; 20$ mg/ml). Všetky spektrá QDs boli korelované podľa vzorca $(4) F_{kor} = F_{abs} \cdot 10^{0,5(A_{ex} + A_{em})}$ (4). Najväčšiu intenzitu emisie mala vzorka s koncentráciou BSA $c = 0$ mg/ml a to 27239 CPS. So zvyšujúcou koncentráciou BSA sa znižovala intenzita emisie QDs. Maximálne intenzity žiarenia boli dosiahnuté pri emisnej vlnovej dĺžke 530 nm. Singh a spol. tiež skúmali vplyv rôznych pomerov koncentrácií QDs – BSA, pričom zistili, že so zvyšujúcou sa koncentráciou BSA naviazaného na QDs sa intenzita emisie znižovala [40].



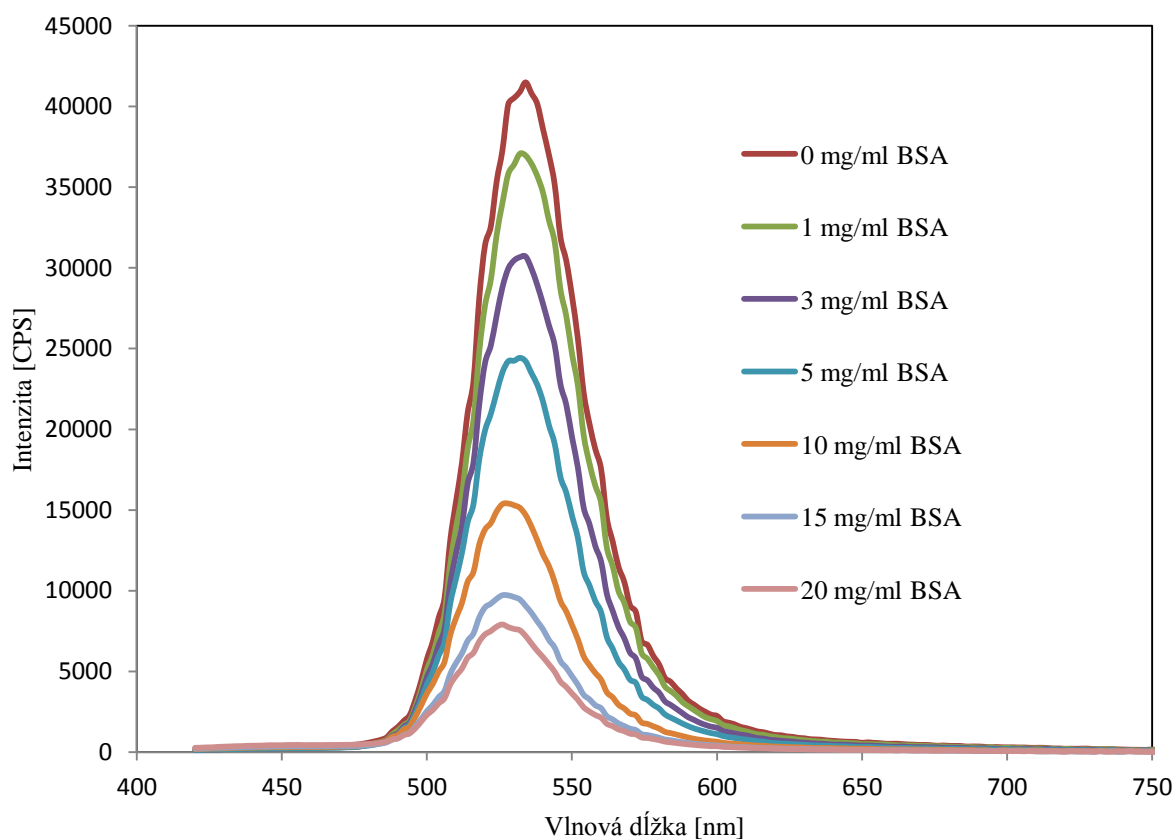
Obr. 20 Fluorescenčné spektrá QDs ($c = 5$ mg/ml) modifikované BSA o rôznych koncentráciách

Na Obr. 21 je uvedená závislosť maximálnej intenzity emisie na rôznych koncentráciách BSA modifikujúcich QDs ($c = 5 \text{ mg/ml}$). Uvedená závislosť je exponenciálna, so zvyšujúcou sa koncentráciou BSA sa znižuje intenzita fluorescence. Rovnica regresie je $y = 40286,764e^{-0,110x}$. Interval spoľahlivosti vyšiel $R^2 = 0,992$.



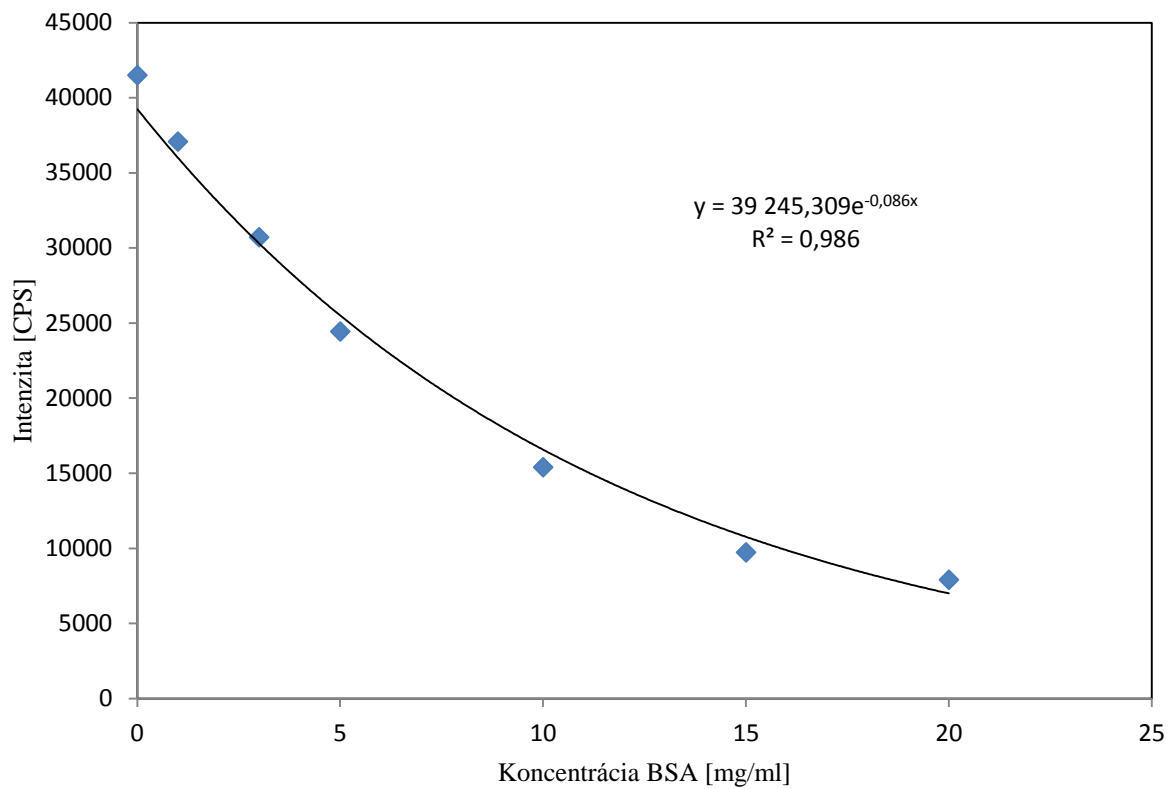
Obr. 21 Priebeh zhášania fluorescence QDs ($c = 5 \text{ mg/ml}$) v závislosti na koncentrácii BSA

Obr. 22 ukazuje fluorescenčné spektrá modifikovaných QDs ($c = 5 \text{ mg/ml}$) pomocou BSA ($c = 0; 1; 3; 5; 10; 15; 20 \text{ mg/ml}$). Vzorky vykazovali maximálnu emisiu pri vlnovej dĺžke 530 nm . Najväčšiu intenzitu emisie mala vzorka s koncentráciou BSA $c = 0 \text{ mg/ml}$ a to 41491 CPS . Pri porovnaní všetkých modifikovaných QDs bola dosiahnutá exponenciálne klesajúca závislosť maximálnej intenzity emisie na rôznych koncentráciách BSA modifikujúcich QDs (Obr. 23). Opäť sa potvrdili predpoklady získané v odbornej literatúre [40].



Obr. 22 Fluorescenčné spektrá QDs ($c = 10 \text{ mg/ml}$) modifikované BSA s rôznymi koncentraciami

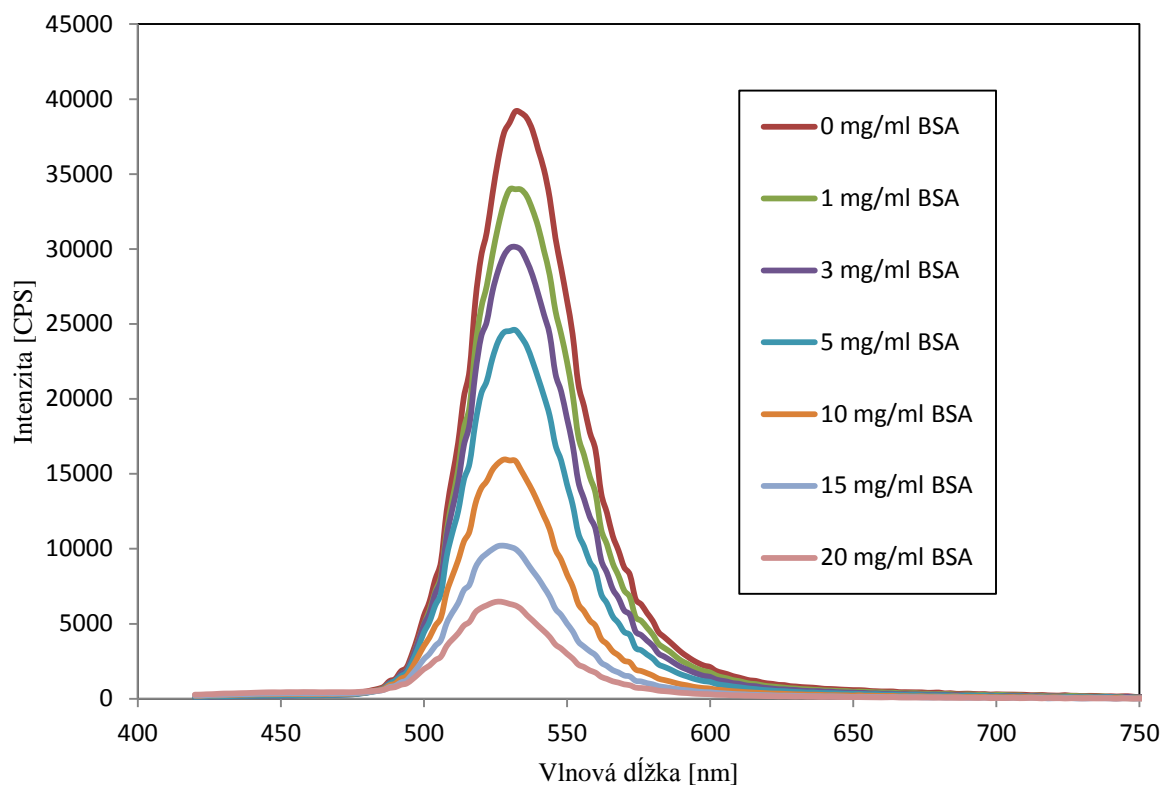
Táto skutočnosť je vyjadrená aj rovnicou regresie $y = 39245,309e^{-0,086x}$. Interval spoľahlivosti je rovný $R^2 = 0,986$.



Obr. 23 Priebeh zhášania fluorescence QDs ($c = 10$ mg/ml) v závislosti na koncentrácii BSA

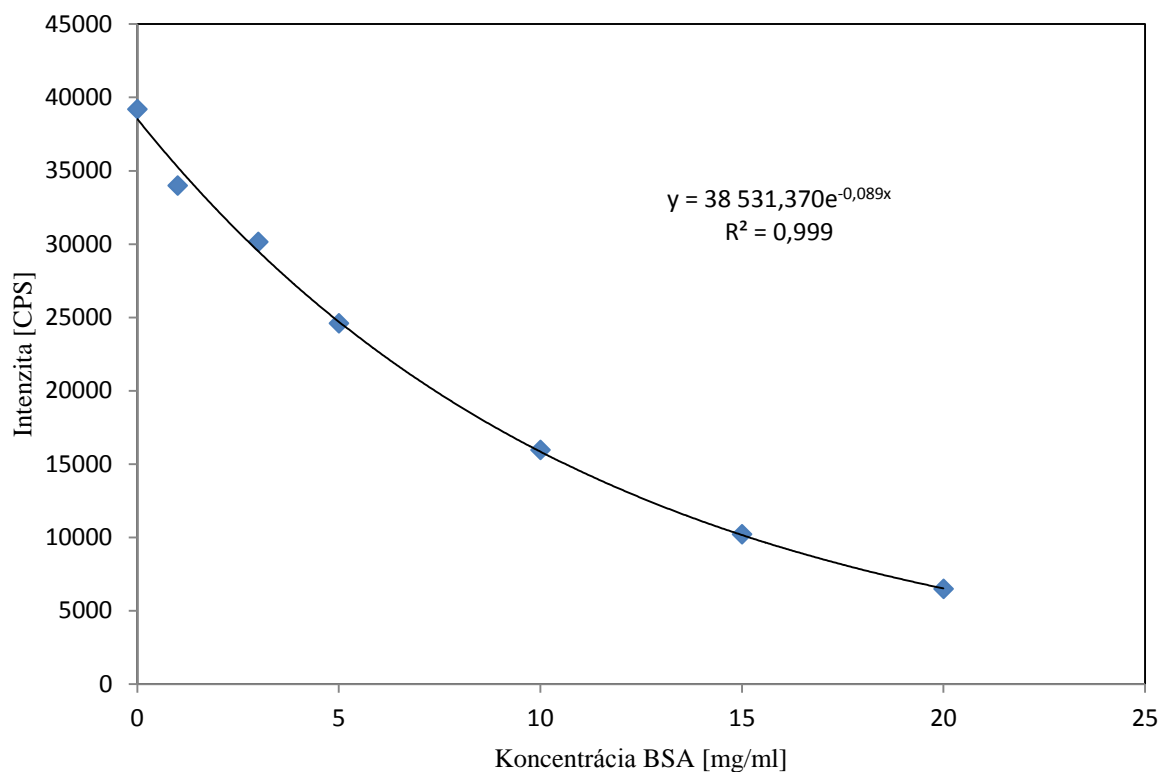
Z Obr. 24 je opäť patrné, že so zvyšujúcou sa koncentráciou BSA ($c = 0; 1; 3; 5; 10; 15; 20$ mg/ml) sa znižuje intenzita emisie QDs.

Maximálna intenzita emisie bola dosiahnutá pre CdTe QDs nemodifikované BSA ($c = 0$ mg/ml) a to 39188 CPS pri vlnovej dĺžke 530 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke majú aj ostatné modifikované QDs svoje maximálne intenzity emisie.



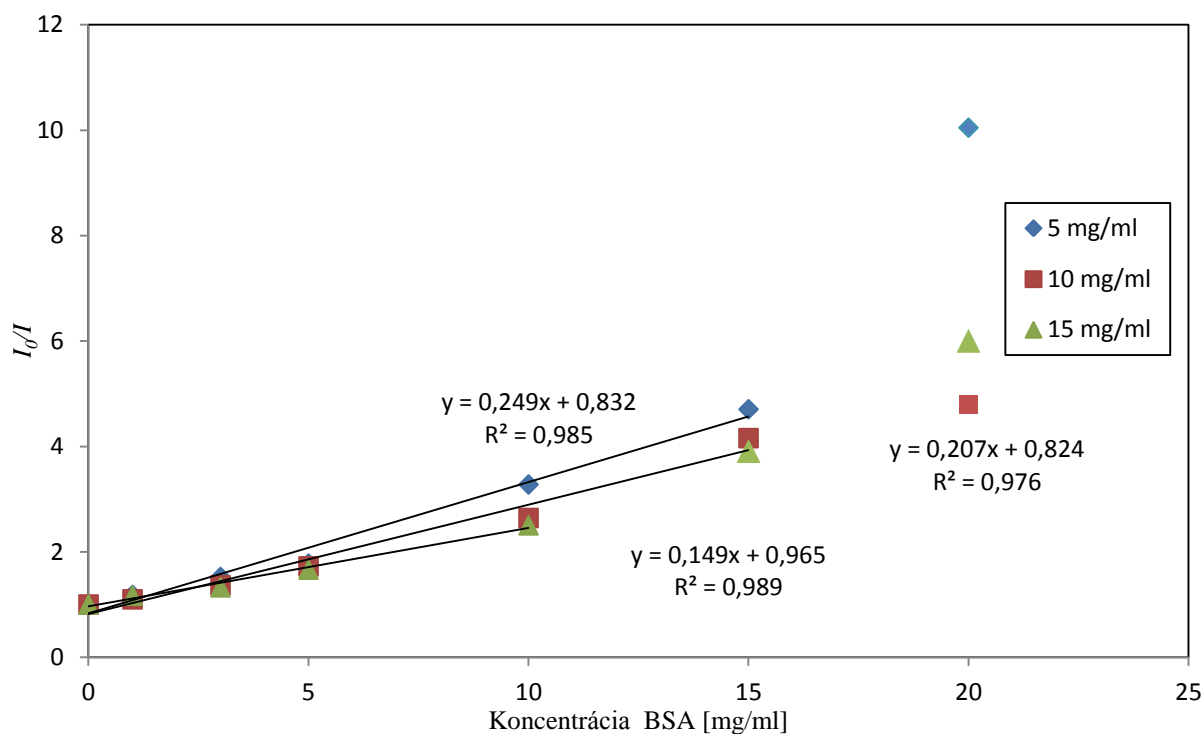
Obr. 24 Fluorescenčné spektrá QDs ($c = 15$ mg/ml) modifikované rôznymi koncentraciami BSA

Na Obr. 25 je znázornená exponenciálne klesajúca závislosť maximálnej intenzity emisie na rôznych koncentráciách BSA naviazaných na QDs. Rovnica regresie je $y = 38531,370e^{-0,089x}$ a $R^2 = 0,999$. Bolo pozorované, že priebeh zhášania fluorescence pomocou BSA bolo pre všetky koncentrácie CdTe QDs rovnaké.



Obr. 25 Priebeh zhášania fluorescence QDs ($c = 15$ mg/ml) v závislosti na koncentrácii BSA

Stern-Volmerove rovnice nám ukazujú zhášanie fluorescence troch rôznych koncentrácií QDs vplyvom BSA. Na Obr. 26 je vidieť, že so zvyšujúcou sa koncentráciou QDs dochádza k pomalšiemu zhášaniu QDs. Pre vyhodnotenie Stern-Volmerových rovníc boli použité lineárne krivky predstavujúce statické zhášanie. Pri vyšších koncentráciách BSA (od $c = 10$ mg/ml) nastáva aj dynamické zhášanie. Hodnotenie Obr. 26 bolo pre lineárne závislosti QDs, čiže statické zhášanie. Rovnice regresie pre QDs ($c = 5; 10; 15$ mg/ml) boli $y_1 = 0,249x + 0,832$; $y_2 = 0,207x + 0,824$ a pre najkoncentrovanejšie QDs bola $y_3 = 0,149x + 0,965$. Intervaly spoľahlivosti boli $R_1^2 = 0,985$; $R_2^2 = 0,976$ a $R_3^2 = 0,989$.



Obr. 26 Stern-Volmerová závislosť zhášanie fluorescence QDs ($c = 5; 10; 15$ mg/ml) pri rôznych koncentráciách BSA

7 Záver

Cieľom bakalárskej práce bola biofunkcionalizácia vo vode rozpustných CdTe QDs naviazaním vhodnej biomolekuly a následné sledovanie optických zmien, vďaka ktorým môžeme overiť naviazanie biomolekuly na QDs.

V bakalárskej práci som sa zamerala na syntézu, modifikáciu CdTe QDs pomocou BSA a taktiež aj na skúmanie optických vlastností naviazania BSA na QDs. Boli vyrobené koloidné QDs stabilizované glutationom (GSH). V ďalšom kroku bol ich povrch, modifikovaný pomocou EDC a NHS, ktoré aktivovali karboxylové skupiny CdTe QDs. Na takto upravený povrch bola naviazaná biomolekula BSA. Výsledné vzorky boli skúmané pomocou fluorescenčnej spektroskopie.

Najskôr bolo zmerané 3D spektrum BSA aby som vedela určiť, pri akej vlnovej dĺžke excitácie je najvhodnejšie meranie fluorescenčného spektra. Zo získaných fluorescenčných spektier som stanovila závislosť koncentrácie zhášača na maximálnej intenzite emisie. Bolo preukázané, že QDs zhášajú BSA lineárne ako to bolo uvedené aj v odbornej literatúre. Maximálne intenzity emisie BSA boli pri vlnových dĺžkach 335 nm nemeniacich sa ani pri naviazaní QDs na túto biomolekulu.

CdTe QDs zhášané BSA vykazovali exponenciálnu závislosť, pri ktorej platilo, že so zvyšujúcou koncentráciou BSA naviazaného na QDs sa znižovala intenzita emisie QDs. CdTe QDs mali maximálne intenzity emisie pri vlnovej dĺžke 530 nm a tieto maximálne intenzity emisie sa nezmenili ani pri naviazaní BSA.

Nakoniec boli porovnané závislosti Stern-Volmerových rovníc pre 3 koncentrácie QDs ($c = 5; 10; 15$ mg/ml) zhášané BSA. Zistenie bolo také, že so zvyšujúcou sa koncentráciou QDs sa znižuje vplyv zhášania BSA lineárne. Pri vyšších koncentráciách BSA ($c = 10$ a viac) zhášanie už nie je lineárne.

8 Citácie

- [1] CHOMOUCKÁ, J.; DRBOHLAVOVÁ, J.; BUŠINOVÁ, P.; RYVOLOVÁ, M.; ADAM, V.; KIZEK, R.; HUBÁLEK, J. *Synthesis of Glutathione Coated Quantum Dots. InTech.*
- [2] DRBOHLAVOVÁ, J., ADAM, V., KIZEK, R., HUBÁLEK, J. *Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. International Journal of Molecular Sciences.* 2009
- [3] CHOMOUCKÁ, J.; DRBOHLAVOVÁ, J.; RYVOLOVÁ, M.; SOBROVÁ, P.; JANU, L.; ADAM, V.; HUBÁNEK, J.; KIZEK, R. *Quantum Dots – Biological and Biomedical Applications.* Nova Science Publishers. 2008
- [4] MERKOCI, A. *Biosensing Using Nanomaterials.* Wiley series in Nanoscience and Nanotechnology. 2009
- [5] SU, Y., HE, Y., et al., The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating, *Biomaterials*, 2009, 30, 1, 19-25.
- [6] YANG, P. and ZHOU, G., Phase transfer of hydrophobic QDs for water-soluble and biocompatible nature through silanization, *Materials Research Bulletin*, 2011, 46, 12, 2367-2372.
- [7] ZHAO, Y., LI, Y., et al., Architecture of stable and water-soluble CdSe/ZnS core-shell dendron nanocrystals via ligand Exchange, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 339, 2, 336-343.
- [8] WANG, S., LI, C., et al., Silica encapsulation of highly luminescent hydrophobic quantum dots by two-step microemulsion method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2012, 395, 0, 24-31.
- [9] TOMCZAK, N., JAŃCZEWSKI, D., et al., Designer polymer-quantum dot architectures, *Progress in Polymer Science*, 2009, 34, 5, 393-430.
- [10] BAILEY, R., SMITH, E. A. M., et al. (2004), Quantum dots in biology and medicine, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2004, 25, 1, 1-12.
- [11] QIAN, H., LI, L., et al., One-step and rapid synthesis of high quality alloyed quantum dots (CdSe-CdS) in aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature, *Materials Research Bulletin*, 2005, 40, 10, 1726-1736.
- [12] SARAN, A. D. and BELLARE, J. R., Green engineering for large-scale synthesis of water-soluble and bio-taggable CdSe and CdSe-CdS quantum dots from microemulsion by double-capping, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, 369, 1-3, 165-175.

- [13] GIRI, A., GOSWAMI, N., et al., Preparation of water soluble l-arginine capped CdSe/ZnS QDs and their interaction with synthetic DNA: Picosecond-resolved FRET study, *Materials Research Bulletin*, 2012, 47, 8, 1912-1918.
- [14] SMITH, A. M., DUAN, H., et al., Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 11, 1226-1240.
- [15] GAO, X., YANG, L., et al., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16, 1, 63-72.
- [16] JIE, G., LI, L., et al., Enhanced electrochemiluminescence of CdSe quantum dots composited with CNTs and PDDA for sensitive immunoassay, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 11, 3352-3358.
- [17] JIN, Z. and HILDEBRANDT, N., Semiconductor quantum dots for in vitro diagnostics and cellular imaging, *Trends in Biotechnology*, 2012, 30, 7, 394-403.
- [18] MA, Q., SONG, T. Y., et al., QDs-labeled microspheres for the adsorption of rabbit immunoglobulin G and fluoroimmunoassay, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 64, 2, 248-254
- [19] JAMIENSON, T., et al., Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 2007. 28(31): p. 4717-4732.
- [20] ZHANG, B., et al., A novel method to make hydrophilic quantum dots and its application on biodetection. *Materials Science and Engineering: B*, 2008. 149(1): p. 87-92.
- [21] DOSTÁL, J., et al., *Biochemie pro posluchače bakalářských oborů* 2009, Brno.
- [22] CHEN, J.Z.Y. and H. IMAMURA, Universal model for α -helix and β -sheet structures in protein. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2003. 321(1-2): p. 181-188.
- [23] HOŘEJŠÍ, V. and J. BARTUŇKOVÁ, *Základy imunologie*. 4 ed 2009, Praha: Nakladatelství TRITON.
- [24] VOTAVA, M., *Lékařská mikrobiologie obecná* 2005, Brno: Neptun.
- [25] MAJOREK, K.A., et al., Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 2012. 52(3-4): p. 174-182.
- [26] WU, D., Z. CHEN, and X. LIU, Study of the interaction between bovine serum albumin and ZnS quantum dots with spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2011.
- [27] WANG, Q., et al., Interaction of different thiol-capped CdTe quantum dots with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 2011.
- [28] KHAN, N.-u.H., et al., Influence of chirality of V(V) Schiff base complexes on DNA, BSA binding and cleavage activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011. 46(10): p. 5074-5085.
- [29] DING, L., et al., Systematic investigation of the toxicity interaction of ZnSe@ZnS QDs on BSA by spectroscopic and microcalorimetry techniques. *Chemosphere*, (0).

- [30] 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. 230(1): p. 23-30.
- [31] 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. 249(0): p. 53-60.
- [32] WANG, Q., et al., Interaction of different thiol-capped CdTe quantum dots with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 2012. 132(7): p. 1695-1700.
- [33] SHANKARA NARAYANAN, S., et al., Ultrafast energy transfer from 3-mercaptopropionic acid-capped CdSe/ZnS QDs to dye-labelled DNA. *Chemical Physics Letters*, 2008. 463(1-3): p. 160-165.
- [34] PARAMANIK, B., S. BHATTACHARYYA, and A. PATRA, Steady state and time resolved spectroscopic study of QD-DNA interaction. *Journal of Luminescence*, 2013. 134(0): p. 401-407.
- [35] LIANG, Y., et al., Recognition of DNA based on changes in the fluorescence intensity of CdSe/CD QDs-phenanthroline systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010. 75(5): p. 1617-1623.
- [36] FIŠAR, Z., *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*, 2009: Praha.
- [37] DUAN, J., SONG, L., and ZHAN, J., One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties. *Nano Res*, 2008.
- [38] CHOPRA, A., et al., CdTe nanobioprobe based optoelectrochemical immunodetection of diabetic marker HbA1c. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012.
- [39] YANG, P., N. MURASE, and J. YU, SiO₂ beads with quantum dots: Preparation and stability investigation for bioapplications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011. 385(1-3): p. 159-165.
- [40] SINGH, S., et al., Conjugation of nano and quantum materials with bovine serum albumin(BSA) to study their biological potential. *Journal of Luminescence*, 2012.
- [41] HALASOVÁ, T., *Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyseliny-tenzid*, Brno 2009. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně.

9 Zoznam skratiek

QDs – kvantové bodky

TEM – transmisný elektrónový mikroskop

AOT – sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate

GSH – glutathion

HDA – hexadecylamin

MPA – merkaptopropionová kyselina

TOP – trioctylphosphine

TOPO – trioctylphosphine oxid

TGA – thioglykolová kyselina

BSA – hovädzí sérový albumín

FRET – fluorescenčný rezonančný prenos energie

DLS – dynamický rozptyl svetla

PSMA – prostatický špecifický membránový antigén

F_{kor} – korelovaná fluorescencia

F_{abs} – nameraná fluorescencia

OD_{ex} – optická hustota pri vlnovej dĺžke excitácie

OD_{em} – optická hustota pri vlnovej dĺžke emisie

A_{ex} – absorbanca pri vlnovej dĺžke excitácie

A_{em} – absorbanca pri vlnovej dĺžke emisie

I_0 – intenzita v neprítomnosti zhášača

I – intenzita v prítomnosti zhášača

K_{sv} – Stern-Volmerova konštanta zhášača

C – koncentrácia zhášača