



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv čistoty albuminu hovězího séra na
fluorescenci nanoklastrů ušlechtilých kovů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Věra Bubeníková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Věra Bubeníková
Název práce	Vliv čistoty albuminu hovězího séra na fluorescenci nanoklastrů ušlechtilých kovů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Předmětem diplomové práce bylo studium problematiky vlivu čistoty albuminu hovězího séra na fluorescenci nanoklastrů ušlechtilých kovů a dále ověření změn sekundární struktury BSA metodami cirkulárního dichroismu. Cílem experimentální části diplomové práce bylo zjistit, zda čistota albuminu hovězího séra ovlivňuje fluorescenční aktivitu nanoklastrů ušlechtilých kovů (Au, Ag, Au/Ag). Experimentální strategií byl přístup spočívající ve studiu změn fluorescenčních vlastností nanoklastrů monometalických a bimetalických ušlechtilých kovů v závislosti na čistotě albuminu hovězího séra (čistota 96 %, 98 % a 98 % FA free) a dalších faktorů jako například vliv mikrovln a čas uplynulý od počátku syntézy. Výsledky vedly k závěrům, že každý z výše jmenovaných faktorů hraje důležitou roli při tvorbě fluorescenčních nanoklastrů.</p>
Klíčová slova	nanoklaster, nanočástice, hovězí sérový albumin, fluorescence, ušlechtilý kov
Počet stran	60
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Věra Bubeníková
Title of thesis	Influence of bovine serum albumin purity on fluorescence of noble metal nanoclusters
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Doc. RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

The subject of this master thesis was to study the problems of the influence of bovine serum albumin purity on fluorescence of noble metal nanoclusters and verification of BSA secondary structure changes by circular dichroism. The aim of the experimental part of the thesis was to determine whether BSA purity affects the fluorescence activity of noble metal nanoclusters (Au, Ag, Au/Ag). The approach consisting in the study of the changes of fluorescence properties of monometallic and bimetallic noble metal nanoclusters depending on the BSA purity (96 %, 98 % and 98 % FA free) and other factors such as the effect of microwaves and the time elapsed from the beginning of the synthesis was used as an experimental strategy. Results led to the conclusions that each of the above mentioned factors plays a key role in the formation of fluorescent nanoclusters.

Keywords	nanocluster, nanoparticle, bovine serum albumin, fluorescence, noble metal
Number of pages	60
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Karolíny Machalové Šiškové, Ph.D. a s využitím citované literatury.

V Olomouci dne 29.4.2019

Obsah:

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Nanoklastry	10
2.1.1 Monometalické nanoklastry	10
2.1.2 Bimetalické nanoklastry	11
2.1.3 Příprava nanoklastrů	12
2.1.4 Mikrovlnné syntézy NCs	13
2.2 BSA	14
2.2.1 Struktura BSA	14
2.2.2 Role BSA při tvorbě NCs	16
2.3 Fluorescence	16
2.3.1 Jablonského diagram	17
2.4 Zobrazovací techniky	18
2.5 Cirkulární dichroismus CD	20
2.5.1 CD spektra albuminu při různých pH podmínkách	21
2.6 IČ	22
3 Cíle diplomové práce	25
4 Materiál a metodika	26
4.1 Příprava monometalických nanoklastrů	27
4.2 Příprava bimetalických nanoklastrů	27
4.3 Přístrojové vybavení a použité techniky	27
4.3.1 Fluorescenční spektroskopie	27
4.3.2 Sledování vývoje nanoklastrů v čase	29
4.3.3 Cirkulární dichroismus (CD)	30
4.3.4 Infračervená spektroskopie (IČ)	30
5 Výsledky	32
5.1 Monometalické nanoklastry	32
5.1.1 Au NCs	32

5.1.2	Ag NCs	35
5.1.3	Monometalické NCs vznikající bez účinku mikrovln.....	38
5.2	Bimetalické Au/Ag nanoklastry	40
5.2.1	Poměr 6:1 Au:Ag	41
5.2.2	Poměr 10:1 Au:Ag	44
5.2.3	Au/Ag NCs bez účinku mikrovln	46
6	Diskuze	49
6.1	Monometalické NCs	49
6.2	Bimetalické NCs	50
7	Závěr.....	53
	Citovaná literatura.....	54

Mé poděkování patří Doc. RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, čas a ochotu, kterou mi v průběhu vypracování diplomové práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlíně Andráškové za pomoc a věnovaný čas a celému pracovišti Katedry biofyziky za příjemné pracovní prostředí a vstřícnost.

Seznam zkratek

ATR	<i>attenuated total reflectance</i> , zeslabený úplný odraz
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , hovězí sérový albumin
CD	<i>circular dichroism</i> , cirkulární dichroismus
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
FA free	<i>fatty acid free</i> , bez obsahu mastných kyselin
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> , infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HSA	<i>human serum albumin</i> , lidský sérový albumin
IČ	infračervená spektroskopie
IF	intenzita fluorescence
L-CPL	<i>left-handed circularly polarized light</i> , levostranné kruhově polarizované světlo
MRE	<i>mean residue ellipticity</i> , měřená molární elipticita molekuly
MW	<i>microwave</i> , mikrovlny
NCs	<i>nanoclusters</i> , nanoklastry
NIR	<i>near-infrared spectroscopy</i> , blízká infračervená spektroskopie
NPs	<i>nanoparticles</i> , nanočástice
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
R-CPL	<i>right-handed circularly polarized light</i> , pravostranné kruhově polarizované světlo
UV	<i>ultraviolet</i> , ultrafialové záření
VIS	<i>visible</i> , viditelné záření

1 Úvod

Nanomateriály, tvořeny vzácnými kovy, se zajímavými optickými, magnetickými a chemickými vlastnostmi závislými na jejich velikosti, jsou intenzivně zkoumány nejen pro jejich základní vědecký přínos, ale také pro jejich technologické aplikace. Především fluorescenční kovové nanoklastry (NCs) zaujímají velkou pozornost díky jejich unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem, jako jsou silná fotoluminiscence, fotostabilita, emisní rychlost a malá velikost. Tyto vlastnosti, které doplňují vlastnosti konvenčních fluoroforů, z nich vytváří novou třídu biokompatibilních fluoroforů pro aplikaci v biologických analýzách, zobrazování, a především umožňují jejich využití v oblasti fluorescenčního značení (Shang et al., 2011; L. Zhang et al., 2014).

V teoretické části této diplomové práce (DP) byly shromážděny literární zdroje vztahující se k tématu monometalických a bimetalických nanoklastrů a byla vypracována literární rešerše na dané téma. Jako templát a zároveň redukční činidlo pro nanoklastry mono- a bimetalické, které byly syntetizovány a zkoumány v této DP, byl zvolen albumin hovězího séra (BSA). Ačkoliv bylo publikováno již hojné množství vědeckých článků o nanoklastrech využívajících při syntéze BSA, dosud nebyl nikde popsán vliv čistoty BSA na vznik nanoklastrů.

Experimentální část diplomové práce byla prováděna v laboratořích na Katedře biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením Doc. RNDr. Karolíny Machalové Šiškové, Ph.D.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Nanoklastry

Nanoklastry vzácných kovů (NCs) jako Ag a Au s velikostí pod 2 nm jsou známy jako jedny z nejdůležitějších pokročilých materiálů a v posledním desetiletí se těší velkému zájmu vědeckých týmů (Toshima, 2009). Obsahují několik desítek až stovek atomů vzácných kovů a svým chováním jsou přirovnávány k molekulám, tedy značně se liší od atomů i nanočástic a tvoří mezi nimi jistý mezistupeň. Nanoklastry jsou svojí velikostí srovnatelné s Fermiho vlnovou délkou elektronů (ca 0,7 nm), a proto vykazují diskrétní elektronické stavy a fluorescenci závislou na jejich velikosti. Zajímavé vlastnosti, jako například velmi dobrá biokompatibilita a fotostabilita, z nich činí ideální fluorescenční značky pro zobrazování biologických entit (Shang et al., 2011; Hu et al., 2012; Zhao et al., 2015; Zheng et al., 2015).

2.1.1 Monometalické nanoklastry

Rozsáhlé studie se soustředí především na nanoklastry se silnou luminiscencí jako například Au NCs, Ag NCs, Pt NCs, Pd NCs, které jsou připravovány s využitím peptidových, proteinových, dendrimerových a DNA templátů, a to především pro jejich stabilitu a biokompatibilitu. Tyto nanoklastry přitahují pozornost díky široké škále využití, což zahrnuje katalýzu, detekci biomolekul, fotoniku a molekulární elektroniku. Mezi těmito kovy jsou v posledních několika desetiletích intenzivně zkoumány především zlaté nanoklastry, protože již bylo prokázáno, že proteiny jako například BSA nebo HSA jsou obohaceny o N-koncové aminy a cysteinové zbytky. Tato místa vykazují velmi dobré koordinační schopnosti s ionty přechodných kovů jako je Au^{3+} (ale také Cu^{2+} či Bi^{3+}). Bylo také prokázáno, že proteiny obsahující dostatečné množství cysteinu mohou reagovat s kyselinou chlorozlatitou za tvorby zlatých nanoklastrů s červenou fotoluminiscencí (Gröhn et al., 2000; Ritchie et al., 2007; Zheng et al., 2015; Mu et al., 2017; Tian et al., 2017). Zlaté nanoklastry (NCs) bývají též známé pod názvem fluorescenční zlaté (Au) nanočástice (NPs), ačkoliv z terminologického hlediska je toto označení zavádějící.

Nanoklastry zlata obsahují desítky až několik desítek Au atomů a jejich využití je výhodné z hlediska jejich rozpustnosti ve vodě, nízké toxicitě, význačným fotofyzikálním vlastnostem a snadné povrchové modifikaci, což je dělá vhodnými pro využití například v oblastech molekulárního zobrazování (Hsu et al., 2016). Navíc jsou zlaté nanočástice chemicky inertní, biokompatibilní a mají vysokou elektronovou hustotu. Stříbrné nanoklastry mají nejvyšší elektrickou vodivost a výborné fotoluminiscenční vlastnosti ve srovnání s ostatními kovovými nanoklastry. Hlavní předností stříbrných nanoklastrů je cena. Jelikož jsou cenově dostupnější než ostatní vzácné kovy, zaujímají v posledních letech tolik pozornosti. Nicméně jejich použití je omezené, neboť při syntéze stabilních Ag NCs mohou vznikat jisté komplikace vzhledem k jejich vysoké povrchové energii, která způsobuje jejich nevratnou agregaci (Ghosh et al., 2008; Zheng et al., 2015; Wang et al., 2018).

2.1.2 Bimetalické nanoklastry

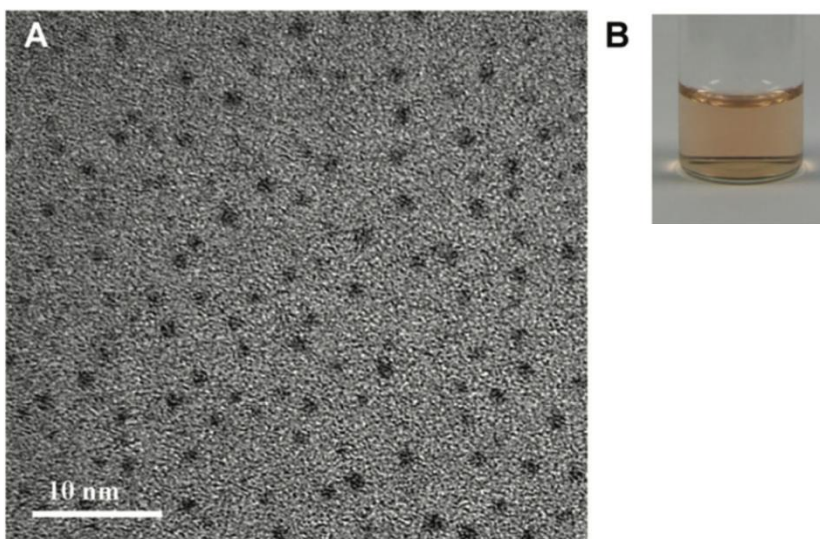
Jak z vědeckého, tak z technologického pohledu jsou zajímavější bimetalické nanoklastry, které jsou složeny ze dvou různých kovových prvků (např. Au a Ag) a při srovnání s monometalickými nanoklastry mají odlišné chování i katalytické vlastnosti. Přidání druhého kovového prvku může zlepšit katalytické vlastnosti původních jednkovových katalyzátorů a vytvořit nové vlastnosti, kterých by působením monometalických katalyzátorů nebylo dosaženo (Toshima, 2009; Zheng et al., 2015).

Tyto bimetalické nanoklastry jsou rovněž velice nadějně kvůli tzv. synergickému efektu, díky kterému vykazují vyšší fluorescenční intenzitu. Bylo zjištěno, že zvýšená intenzita fluorescence bimetalických Au-Ag NCs může být závislá na množství přidaného Ag (N. Zhang et al., 2014). Synergický katalytický efekt je definován jako určitý druh kooperace mezi různými složkami nebo aktivními místy v jednom katalyzátoru, což má za následek výrazné či dokonce nápadné zvýšení katalytických výkonů. Tento efekt musí být přítomen mezi rozdílnými katalytickými komponentami, složkami nebo mezi katalytickými složkami a nosiči (Toshima et al., 1998; Shi, 2012; Zhai et al., 2018).

2.1.3 Příprava nanoklastrů

V poslední době bylo použito hned několik metod pro přípravu bimetalických nanoklastrů. Malá velikost NCs činí jejich syntézu podstatně složitější ve srovnání s jednodušší přípravou větších nanočástic a některé syntézy vyžadují delší čas přípravy nebo komplikované postupy. Pro syntézu vysoce fluoreskujících kovových NCs bývají jako templáty využívány biologické makromolekuly jako jsou peptidy a proteiny. Ve srovnání s krátkými peptidy, dlouhé a složité proteiny poskytují bohatá vazebná místa, která mohou potenciálně vázat a dále redukovat kovové ionty (Shang et al., 2011). Roku 2009 publikovali Xie et al., přípravu nanoklastrů s emisí v červené oblasti. Jejich nanoklastry (BSA-Au) vznikaly za reakčních podmínek 37 °C a pH 12, s využitím hovězího sérového albuminu (BSA) jako templátu (Xie et al., 2009). Tyto nanoklastry vykazovaly vyšší fotostabilitu, rozpustnost a vysoký kvantový výtěžek (~ 6 %). Je třeba poznamenat, že v celém procesu nebyla zapojena žádná další chemická redukční činidla či ligandy a autoři navrhli pravděpodobný mechanismus biomineralizace, tedy přípravy nanoklastrů s využitím proteinu jako templátu.

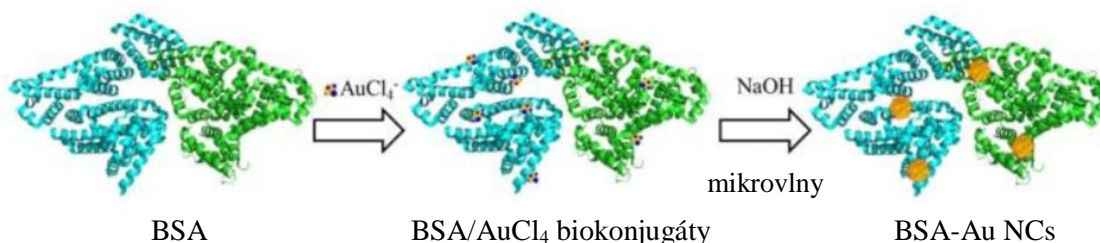
Dalším příkladem může být příprava Au NCs pomocí chemické redukce (např. s NaBH_4) z Au prekurzorů v přítomnosti thiolů (např. glutathion). Zatímco tyto NCs fluoreskovaly v modré a IČ oblasti, kvantové výtěžky byly poměrně nízké (0,001 % - 0,1 %). Později byly Au NCs s výtěžky >10 % připraveny s využitím poly(amidoamin)dendrimeru jako templátu. Nicméně tato syntéza vyžadovala dobu přípravy dva dny a výsledkem byly velké nanočástice jako vedlejší produkty reakce (Xie et al., 2009; Wang et al., 2018). Proto je v současné době potřeba objevit rychlou a účinnou metodu k syntéze NCs (Toshima, 2009; Zheng et al., 2015).



Obrázek 1: (A) Obrázek Au nanoklastrů pořízených pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). (B) Fotografie Au nanoklastrů (převzato a upraveno ze Zhao et al., 2014).

2.1.4 Mikrovlnné syntézy NCs

V současné době se vysoce emitující BSA-Au NCs připravují pomocí mikrovlnné syntézy. Tato syntéza zaujímá pozornost především poskytováním uniformního ohřívání směsi v krátkém reakčním čase, nízké spotřebě energie a šetrnosti k životnímu prostředí. Hnací síla pro urychlení chemických reakcí pochází z elektromagnetického pole, vznikajícího oscilačním třením mezi polarizovanými molekulami, které zahřívá celou směs. Proto je mikrovlnná energie často využívána ke zkrácení reakční doby a vytvoření jednotných nanokrystalů z hlediska velikosti a složení. Čas přípravy BSA-Au NCs může být zkrácen z původních 12 hodin na méně než 20 minut (Cao et al., 2013; Cui et al., 2014; Chen et al., 2015; Hsu et al., 2016).



Obrázek 2: Schéma analýzy zlatých nanoklastrů s BSA (převzato a upraveno ze Hsu et al., 2016).

První syntéza fluorescenčních NCs s proteinem, který sloužil jako templát, byla zveřejněna Ying et al. v roce 2009. Od té doby bylo demonstrováno, že rozmanité druhy a množství proteinů, zahrnujících BSA, lidský sérový albumin, lysozym, lactoferin, křenovou peroxidázu a spoustu dalších, lze úspěšně použít pro syntézu luminiscenčních nanoklastrů. Zajímavou vlastností proteinem stabilizovaných nanoklastrů je, že většina proteinů má schopnost si udržet svoji vnitřní biologickou aktivitu, což vede k přípravě biokonjugátů typu protein-nanoklaster s rozmanitým biologickým využitím. Příkladem využití může být například zacílení místa nádoru, indikace intracelulárního pH a díky mimořádné kapacitě pro vazbu ligandů také využití ve farmaceutickém průmyslu (Shang et al., 2011; Yu et al., 2016; Chi et al., 2018).

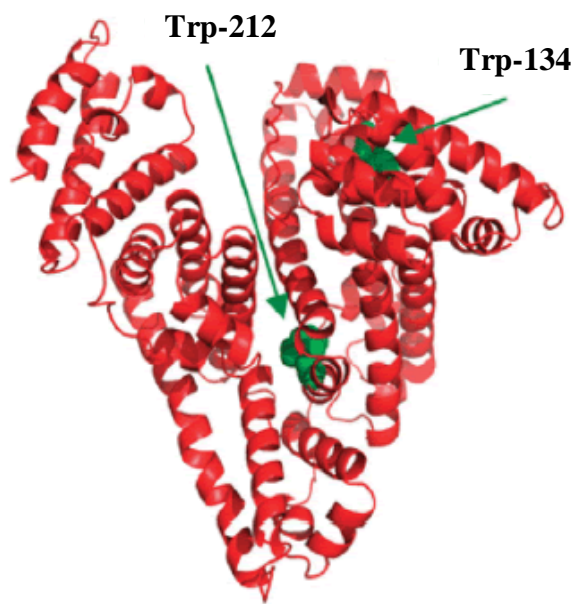
2.2 BSA

Jedním z nejvíce studovaných proteinů k syntéze různorodých nanoklastrů je hovězí sérový albumin (BSA, z angl. *bovine serum albumin*) (Huang et al., 2010). Vysoká homologie (76 %) a nízká cena BSA jej činí vhodnějším templátem oproti lidskému sérovému albuminu (HSA, z angl. *human serum albumin*), jehož krystalická struktura a vazba s mastnými kyselinami byla již dříve charakterizována. Sérový albumin je hlavním extracelulárním proteinem a nejdůležitějším proteinem v oběhovém systému obratlovců a tvoří asi 60 % celkových plasma proteinů. Jako nejdůležitější transportní protein v krvi má významné fyzikální vlastnosti jako je transport endogenních a exogenních látek, transport mastných kyselin, jinak nerozpustných v cirkulující plazmě, aminokyselin, steroidů a léčiv, udržování krevního osmotického tlaku, odbourávání volných radikálů a inhibice agregace krevních destiček a krevních sraženin (Huang et al., 2004; Mu et al., 2017; Chi et al., 2018).

2.2.1 Struktura BSA

Strukturně je BSA o molekulové hmotnosti 69 000 tvořen jedním polypeptidovým řetězcem, který je složen z 583 aminokyselinových zbytků a jeho sekundární struktura je převážně α -helikální. Terciální struktura BSA je složena ze tří homologních domén se

dvěma tryptofany na pozicích 134 a 212, které také nejvíce přispívají k intenzitě fluorescence (kolem 95 %), a 35 cysteinovými zbytky formujícími disulfidické vazby. Homologní domény (I, II, III) jsou rozděleny na devět smyček (L1-L9) pomocí sedmnácti disulfidických vazeb. Smyčky v každé doméně jsou tvořeny sekvencí velká-malá-velká smyčka, vytvářejících triplet. Každá doména je pak produktem dvou subdomén (IA, IB, etc.) (Papadopoulou et al., 2005; Ravindran et al., 2010; Chi et al., 2018).



Obrázek 3: Struktura BSA s vyznačenými Tryptofanovými zbytky (převzato a upraveno z Li, 2017).

Sérový albumin může velmi snadno podstoupit konformační změny se změnami pH hodnot a jeho prostorová struktura, formovaná spiralizací a skládáním, je základem jeho biologické aktivity (Chi et al., 2018). Biologická funkce proteinu totiž závisí na jeho konformaci. Nejvíce informativní metodou ke studiu 3D struktury proteinů je rentgenová krystalografie, která poskytuje informace o atomových vzdálenostech krystalické sloučeniny. Tato metoda není vždy použitelná, protože ne všechny proteiny mohou být snadno krystalizovány, a navíc proteiny jen zřídka existují jako krystaly za fyziologických podmínek, ale jsou rozpustné v cytosolu nebo spojené s jinými složkami buňky. K udržení optimální biologické aktivity proteinů je často vyžadována jejich nativní forma označovaná jako „N“. Ta se převážně objevuje při neutrálním pH. Označení „B“ je pro bazickou formu, objevující se nad pH=8 a konečně „F“ značí rychle se pohybující formu BSA, která

se objevuje při hodnotách $\text{pH} < 4,3$ (Huang et al., 2004; Cao et al., 2013). V takovém silně kyselém prostředí lze sledovat především změny sekundární struktury BSA, kdy tato struktura již není kompaktní, a také změny hodnot fluorescence. V kyselém a bazickém prostředí jsou hodnoty fluorescence nižší, zatímco při $\text{pH} 6-7$ je hodnota fluorescence nejvyšší, což ukazuje, že struktura BSA je při této pH hodnotě kompaktní a hydrofobicita Tyr a Trp zbytků nejslabší (Chi et al., 2018).

2.2.2 Role BSA při tvorbě NCs

Protože pH zásadně ovlivňuje proteinovou strukturu, je považováno za klíčový faktor ve tvorbě BSA-Au NCs. S rostoucím pH od 9-11 roste intenzita fluorescence BSA-Au komplexu. To je způsobeno především vzrůstem redukčních schopností BSA a tvorbou AuNCs. Během přípravy nanoklastrů proteiny nejprve koordinují s Au^{3+} skrz cysteinové zbytky, které vystupují jako templáty, za vzniku silné Au-S vazby. Fenolická skupina tyrosinového zbytku BSA, která má redukční schopnosti v alkalickém prostředí, je následně zodpovědná za redukci Au^{3+} na Au^0 při pH hodnotě větší, než je hodnota pK_a tyrosinu (Papadopoulou et al., 2005; Wang et al., 2018). To znamená, že proteiny vystupují jako redukující a stabilizační činidla. Při nízké bazické pH hodnotě ($\text{pH} < 10$) BSA nevykazuje redukční efekt a je omezena tvorba BSA-Au NCs. Oproti tomu při hodnotách pH vyšších než 11 může být fluorescenční intenzita BSA-Au nanoklastrů snížena přítomností hydroxidu sodného o vysoké koncentraci (Hsu et al., 2016).

2.3 Fluorescence

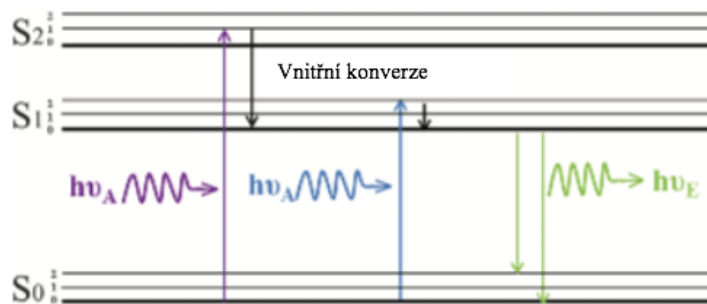
K pozoruhodnému nárůstu využívání fluorescence v biologických vědách došlo během uplynulých dvaceti let. Tato metoda je dnes dominantní především v oblasti biotechnologií, průtokové cytometrie, lékařské diagnostiky nebo také sekvenování DNA. Za primární výzkumné nástroje v oblasti biofyziky a biochemie jsou považovány především fluorescenční spektroskopie a časově rozlišená fluorescence. Vysoká citlivost a široká škála využití fluorescenční spektroskopie z ní dělají cennou metodu v oblastech jako je klinická, či forenzní chemie.

V závislosti na povaze emitovaného světla můžeme rozlišovat dvě formy luminiscenčního jevu – fluorescenci a fosforescenci. Dle Vavilova lze luminiscenci chápat jako záření tělesa (obvykle v oblasti UV-VIS-NIR), které představuje přebytek nad tepelným rovnovážným zářením, kdy toto záření má nějakou konečnou dobu trvání, podstatně převyšující periodu světelných kmitů. Základními charakteristikami jsou tedy dlouhá a konečná doba trvání a dále také to, že dochází k oddělení procesů excitace a emise přechodovými ději a stavy (Johnson et al., 1977; Lakowicz, 2006; Kubala, 2018).

Jak již bylo zmíněno, fluorescence je formou luminiscenčního jevu a lze ji definovat jako emisi světla látky, která absorbovala světlo nebo byla excitována jiným způsobem. Emitované světlo má ve většině případů delší vlnovou délku (nižší energii) než absorbované světlo (Li et al., 2014). Fluorescence je výsledkem třístupňového procesu (excitace, excitovaný stav, emise), který se vyskytuje u určitých molekul (obecně především u polyaromatických uhlovodíků nebo heterocyklů) nazývaných fluorofory či fluorescenční barviva. Fluorescenční sonda je fluorofor konstruovaný tak, aby reagoval na specifický podnět v určité oblasti biologického vzorku. K ilustraci procesu, který nastává mezi emisí a absorpcí světla, je hojně využíván Jablonského diagram (ThermoFisher Scientific, 2010; Ao et al., 2016).

2.3.1 Jablonského diagram

Výchozím bodem pro diskusi o absorpci a emisi světla jsou Jablonského diagramy, které se používají v různých formách a ilustrují molekulární procesy, které mohou nastat v excitovaných stavech. Tyto diagramy jsou pojmenovány dle profesora Alexandra Jablonského, a to zejména na počest jeho mnohým úspěchům při studiu této problematiky, včetně definování pojmu „anizotropie“ pro popis polarizované emise z roztoků (Lakowicz, 2006).



Obrázek 4: Zjednodušený Jablonského diagram ukazující molekulové procesy během excitačního a emisního cyklu fluoroforu. Na obrázku je znázorněn singletový základní stav (S_0), první (S_1) a druhý (S_2) excitovaný elektronový stav. V každém elektronovém energetickém stavu jsou různé vibrační energetické úrovně, zobrazeny jako 0, 1 a 2. Fluorofor může existovat v jakémkoliv z těchto vibračních energetických úrovní. Po absorpci světla je fluorofor obvykle excitován na vyšší vibrační úroveň prvního S_1 nebo druhého elektronového stavu S_2 . Molekula rychle zrelaxuje na nejnižší vibrační úroveň S_1 prostřednictvím procesu zvaného vnitřní konverze. Tento proces se obvykle vyskytuje v rozmezí 10 ps nebo méně a je obecně dokončen před emisí světla. Vzhledem k tomu, že fluorofor ztrácí energii během tohoto procesu, emitované světlo má obvykle nižší energii než absorbované světlo. Nakonec fluorofor emituje světlo, když se vrátí do základního stavu S_0 (převzato a upraveno z Ao et al., 2016).

2.4 Zobrazovací techniky

Vývoj luminiscenčních nanomateriálů jako fluorescenčních značek je velmi zajímavou oblastí výzkumu. Dodnes bylo objeveno několik typů luminiscenčních nanomateriálů a ve srovnání s již existujícími fluorescenčními proteiny a molekulovými barvivy, jejichž výhoda spočívá především v jejich malé velikosti, kompatibilitě a velkém detekčním signálu, vykazují NCs coby fluorescenční značky dokonalejší fotofyzikální vlastnosti. V důsledku toho se očekává, že by v budoucnu mohly doplnit nebo dokonce zcela nahradit konvenční fluorescenční sondy a nabídnout tak nové možnosti v oblastech nanomedicíny a biosenzoringu (Shang et al., 2011; Zhang et al., 2018).

Možnou oblastí použití fluorescenčních kovových nanoklastrů je biodetekce, jelikož mají slibné využití jako optické reportéry v biologické detekci, a to především díky jejich vlastnostem jako je malá velikost, biokompatibilita a v porovnání s běžně používanými CdSe/ZnS NPs, také nízká toxicita.

První možností biodetekce je využití NCs jako senzorů kovových iontů. Bylo zjištěno, že DNA stabilizovaná Ag NCs může sloužit jako dobrý indikátor pro selektivní

identifikaci Hg^{2+} založené na zhášení fluorescence kovových NCs pomocí Hg^{2+} . Tyto vysoce toxické ionty a jejich negativní vliv, především na mozek, ledviny a nervový systém i ve velmi nízké koncentraci, jsou velmi dobře známé. Další možností je detekce malých biomolekul, proteinů a nukleových kyselin (Shang et al., 2011; Mathew et al., 2014; Huang et al., 2018; Ju et al., 2018; Zhang et al., 2018; Liu et al., 2019).

Lin et al. využili Au NCs jako fluorescenčních značek pro značení rakovinných buněk a buněk normálních. Výsledky ukázaly, že fluorescenční signály byly distribuovány nejen v cytoplazmě, ale že většina signálů pocházela především z buněčného jádra obou typů buněčných linií. Později přišla skupina Wang et al. s novou strategií pro syntézu AuNCs a tu použili ve fluorescenčním zobrazování *in vivo*. Fluorescenční Au nanoklastry byly spontánně biosyntetizovány rakovinnou buňkou (Hep G2, leukemická buněčná linie), skrz redukci Au^{3+} v cytoplazmě buňky, a nakonec koncentrovány kolem jádra. To umožnilo velmi precizní buněčné zobrazování a novou strategii pro fluorescenční bioznačení nádorů, což otevírá možnosti pro biomedicínské aplikace vyžadující specifické a senzitivní zobrazování nádorů bez přímé injekce nanočástic (L. Zhang et al., 2014).

Multifunkční nano-konjugáty založené nejen na kovových (především Au) nanoklastrech jsou aplikovány jako fluorescenční sondy pro zobrazování nádorů. Využití BSA-Au nanoklastrů bylo studováno skupinou Gu et al., kdy AuNCs byly konjugovány s methioninem (Met) a fluorescenčním barvivem (MPA) za vzniku sondy Au-Met-MPA. Konkrétně byla studována internalizace BSA-Au a Au-Met-MPA pomocí normálních a nádorových buněk. Výsledné obrázky z fluorescenční mikroskopie ukázaly u normálních buněk pouze slabou fluorescenci pomocí Au NCs, což ukazuje, že se do buňky dostalo jen velmi malé množství BSA-Au nebo Au-Met-MPA. Oproti tomu Au NCs v nádorových buňkách ukázaly velmi silnou fluorescenci. Fluorescence buněk inkubovaných s komplexem Au-Met-MPA, který má zřejmě schopnost pronikat do cytoplazmy a jádra nádorových buněk, může nejspíš zastínit fluorescenci buněk upravených pomocí BSA-Au. Přítomnost Met na povrchu Au nanoklastrů tedy zvýhodnilo schopnost zacílit nádor, což také zvýšilo jeho absorpci nádorovými buňkami (Chen et al., 2012; Ch. Wang et al., 2013; J.G. Wang et al., 2013; L. Zhang et al., 2014).

I přes značný pokrok v otázce kovových nanoklastrů zůstává stále řada výzev, které musí být dále objasněny. Jednou z hlavních výzev je nedostatek efektivních způsobů přípravy velikostně přesně kontrolovaných kovových NCs vysoké kvality a výtěžku.

Kritické body syntézy kovových NC jsou právě zejména vysoká čistota a monodisperzita. Mnoho výzkumů se dosud soustředilo na Au a Ag NCs. Teprve v posledních letech se postupně začaly objevovat studie Cu a dalších kovových NCs a tyto nově vznikající nanoklastry vykazovaly také jedinečné a vynikající vlastnosti. Ty je činí potenciálně užitečnými pro širokou škálu aplikací v oblasti fluorescenční detekce. Proto je nezbytné vyvinout metody pro syntézu dalších kovových nanoklastrů, včetně velikostně řízené syntézy a charakterizace struktury. V uplynulých desetiletích bylo dosaženo významného pokroku v oblasti nanoklastrů ušlechtilých kovů a do budoucna se předpokládá jejich uplatnění při řešení důležitých otázek souvisejících s nejrůznějšími oblastmi výzkumu, zejména *in vitro/in vivo* zobrazování (L. Zhang et al., 2014).

2.5 Cirkulární dichroismus CD

Studium struktury proteinů a rychlá charakterizace nových proteinů má velký význam především pro oblasti strukturní genomiky a proteomiky. Široce využívanou metodou pro rychlé vyhodnocení sekundární struktury a vazebných vlastností proteinů je cirkulární dichroismus (CD). Je definován stručně jako rozdíl v absorbanci levotočivého (L-CPL) a pravotočivého (R-CPL) kruhově polarizovaného světla. Tento rozdíl je nenulový, když molekula obsahuje jednu nebo více skupin preferenčně absorbujících polarizované světlo jedním směrem - tzv. chirální chromofory. V případě přítomnosti chirálních chromoforů je tudíž jeden stav kruhově polarizovaného světla absorbován ve větší či menší míře než druhý. Signál cirkulárního dichroismu může být pozitivní nebo negativní v závislosti na tom, zda je L-CPL absorbován ve větší míře než R-CPL (pozitivní CD signál) nebo v menší míře (CD negativní signál) (Greenfield, 2006; Applied Photophysics Ltd., 2018).

Opticky aktivní makromolekuly, jako jsou proteiny, vykazují diferenciální absorpci kruhového polarizovaného světla. Spektroskopie proteinů a peptidů (180-250 nm) v daleko vzdáleném UV spektru je založena převážně na excitaci elektronových přechodů v amidových skupinách. Páteřní peptid vytváří charakteristické sekundární struktury jako jsou α -helixy, β -struktury a neuspořádané úseky se specifickými úhly (Micsonai et al., 2015).

Například α -helikální proteiny mají negativní CD signál při 222 nm a 208 nm a pozitivní při 193 nm. Proteiny s dobře definovanými antiparalelními beta-strukturami mají negativní

CD signál při 218 nm a pozitivní při 195 nm, zatímco nesourodé proteiny mají velmi nízkou elipticitu nad 210 nm a negativní CD signál blíží se 195 nm (Greenfield, 2006).

Pro odhad složení sekundární struktury z CD spekter bylo vyvinuto množství algoritmů, ovšem tyto metody často neposkytují přijatelné výsledky u bílkovin bohatých na β -struktury jako jsou membránové proteiny, proteinové agregáty nebo amyloidní fibrily. Problém vychází ze spektrální a morfologické rozmanitosti β -struktur, což bylo dosud považováno za podstatné omezení techniky (Micsonai et al., 2015).

2.5.1 CD spektra albuminu při různých pH podmínkách

Obsah výše zmíněných sekundárních struktur albuminu se dále mění v závislosti na změnách pH podmínek. Obsah α -helixu BSA při různých hodnotách pH byl vypočítán z rovnic (a) a (b), převzatých z (Chi et al., 2018):

$$\text{MRE} = \frac{\text{Observed CD(mdeg)}}{C_p n l * 10} \quad (\text{a})$$

kde C_p je molární koncentrace proteinu; n je počet aminokyselinových zbytků (574); l je šířka křemenné květy (1 mm).

$$\alpha\text{-Helix}(\%) = \frac{-\text{MRE}_{208} - 4000}{33,000 - 4000} * 100 \quad (\text{b})$$

kde MRE_{208} je získaná hodnota MRE (z angl. *mean residue ellipticity*, měřená molární elipticita molekuly dělená počtem monomerních zbytků v molekule) při 208 nm; 4000 je MRE β -struktur a náhodných konformací při 208 nm; 33,000 je MRE hodnota čistého α -helixu při 208 nm (Chi et al., 2018).

Když se tedy například pH zvýší z hodnoty 2 na 4,5, obsah α -helixu BSA se zvětšuje ze 43 % (pH = 2) na 62 % (pH = 3,5) a nakonec se sníží na 55 %. Když se pH zvýší z 4,5 na 6, obsah α -šroubovice se zvětší z 55 % na 68 %. V rozmezí pH 6 až 8 dosáhne obsah α -

helixu maximální hodnoty a zůstává konstantní. Při dalším zvýšení pH z 8 na 11, začne obsah α -helixu klesat z 68 % na 60 %. V silně alkalickém prostředí (pH 11-12) se obsah α -šroubovice mírně zvyšuje z 60 % na 63 % (Chi et al., 2018).

BSA má tedy nejkompaktnější konformaci v prostředí s téměř neutrálním pH 6-8 (v blízkosti izoelektrického bodu BSA, pH 5,8), což naznačuje nejvyšší obsah α -helixu BSA (68 %). Zatímco v alkalickém prostředí nebo v silně kyselém prostředí se struktura BSA uvolňuje s klesajícím obsahem α -helixu. Tyto výsledky poskytují cenné informace pro výzkum, a především aplikace sérových albuminů za různých pH podmínek a pomáhají pochopit jejich fyziologickou funkci.

Použití CD spektroskopie tudíž poskytuje obecný nástroj pro rychlou a spolehlivou strukturní analýzu proteinů, studium intermolekulárních interakcí a nedávno byla tato technika použita též při vyšetřování poruch proteinů (Micsonai et al., 2015; Chi et al., 2018).

2.6 IČ

Infračervená spektroskopie je dnes jednou z nejdůležitějších analytických metod určených především pro strukturní charakterizaci a identifikaci organických a anorganických látek. Tato technika sleduje vibrace atomů v molekule při její interakci s dopadajícím zářením. Ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly dochází v důsledku absorpce IČ při průchodu vzorkem. Infračervené spektrum je grafickým zobrazením funkční závislosti absorbované/propuštěné energie na vlnové délce dopadajícího záření (vyjádřené ve vlnočtové škále). Energie, při níž se objeví jakýkoliv vrchol v absorpčním spektru, odpovídá frekvenci vibrační části molekuly vzorku. Rozsah vlnových délek infračerveného záření se pohybuje v rozmezí 0,78-1000 mm. Tato hodnota odpovídá rozsahu vlnočtů 12 800-10 cm^{-1} . Kvůli aplikačním a přístrojovým důvodům je vhodné rozdělit oblast IČ na blízké (NIR, z angl. *near infrared*), střední (MIR, z angl. *middle infrared*) a daleké (FIR, z angl. *far infrared*) dílčí oblasti. Většina analytických aplikací se nachází v prostřední oblasti, která se rozkládá od 4000 do 500 cm^{-1} (2,5 až 20 μm) (Derrick et al, 1999; Stuart, 2004; VŠCHT, 2018).

Infračervené spektrometry byly komerčně dostupné již od čtyřicátých let dvacátého století. V té době se přístroje opíraly o optické hranoly, které fungovaly jako disperzní

prvky, ale od poloviny padesátých let byly zavedeny do disperzních strojů difrakční mřížky. Použití disperzních spektrometrů ovšem neumožňovalo analýzu silně absorbujících matric a analýza vzorků pevného skupenství byla omezena na materiály práškové, měřené v různých matricích. Nejvýznamnější pokroky v infračervené spektroskopii vznikly v důsledku zavedení infračervených spektrometrů s Fourierovou transformací. Tento typ přístroje využívá interferometru a dobře zavedeného matematického procesu Fourierovy transformace. Přístroje pracují na principu interference a měření interferogramu svazku záření po průchodu analytem. Fourierova transformovaná infračervená spektroskopie (FTIR) dramaticky zlepšila kvalitu infračervených spekter a minimalizovala čas potřebný k získání dat. Další výhodou FTIR spektrometrů je možnost měření silně absorbujících vzorků, tedy provádění experimentů, u nichž může docházet k velkým ztrátám energie (Oberg et al., 1998; Chan et al., 2003; Stuart, 2004; Schuttlefield et al., 2008; VŠCHT, 2018).

Mnohem univerzálnější metodou je tzv. zeslabený úplný odraz (ATR), která umožňuje sbírání spekter netransparentních vzorků, používání vzorků s velmi nízkou koncentrací bílkovin (<0,3 mg/ml) a výzkum bílkovin v přítomnosti silně absorbujících látek, jako jsou například denaturační látky. Tato metoda využívá materiálu s vysokým indexem lomu (tzv. ATR krystal) a odrazu infračerveného světla na rozhraní mezi vzorkem a krystalem. Je vyžadováno, aby byl zajištěn maximální kontakt mezi zkoumaným vzorkem a krystalem. Paprsek IČ ze spektrometru směřuje na krystal pod úhlem, který je větší než kritický úhel, takže infračervené světlo prochází vnitřním odrazem. V každém bodě vnitřního odrazu se vytváří tzv. evanescentní vlna s omezenou hloubkou průniku řádově 1 μm , ze které může být záření absorbováno vzorkem, který je umístěn v přímém kontaktu s krystalem. Zeslabená úplná reflaktance se využívá především ke studiu konformačních změn v polypeptidech, ale také pro strukturní analýzu měření rychlosti vazby proteinů na různé povrchy (Oberg et al., 1998; Chan et al., 2003; Stuart, 2004; Schuttlefield et al., 2008; VŠCHT, 2018).

Jednou z velkých výhod infračervené spektroskopie je skutečnost, že prakticky jakýkoliv vzorek v prakticky jakémkoliv stavu může být studován. Pomocí správného výběru techniky vzorkování mohou být zkoumány kapaliny, roztoky, pasty, prášky, filmy, vlákna a plyny. Pro zkoumání dříve nevyhovujících vzorků bylo nyní vyvinuto množství nových citlivých technik a s neustálým zlepšováním výpočetních technik učinila infračervená

spektroskopie další velké pokroky (Oberg et al., 1998; Chan et al., 2003; Stuart, 2004; Schuttlefield et al., 2008; VŠCHT, 2018).

3 Cíle diplomové práce

Hlavním cílem provedených experimentů bylo zjistit, jaký vliv má čistota albuminu hovězího séra na vznik a fluorescenci monometalických (Au, Ag) a bimetalických (Au/Ag) nanoklastrů kovů. Ke tvorbě nanoklastrů bylo využito BSA různé čistoty (96 %, 98 %, 98 % FA free), které reagovalo vždy za stejných podmínek (alkalické prostředí) s následujícími látkami: a) kyselinou tetrachlorozlatitou, nebo b) dusičnanem stříbrným, nebo c) směsí kyseliny tetrachlorozlatité a dusičnanu stříbrného v poměrech 6:1 anebo 10:1; celá reakce byla urychlena účinkem mikrovln.

Druhým cílem bylo sledování okamžité změny (a její kvantifikace) obsahu α -helixu BSA vystaveného různým podmínkám (přidávání kovu, účinek mikrovln, změna pH) metodou cirkulárního dichroismu. Struktura a přítomnost charakteristických funkčních skupin výchozího BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free byla ověřena metodou infračervené absorpční spektroskopie. Všechny experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v metodice.

4 Materiál a metodika

Chemikálie: Dusičnan stříbrný (AgNO_3 , 10 mM), Aldrich
Hovězí sérový albumin (40 mg/ml) o čistotě 96 %, 98 %, 98 % FA free, Sigma-Aldrich
Deionizovaná voda, Millipore, 18 $\text{M}\Omega$ cm
Kyselina chlorozlatitá (HAuCl_4 , 10 mM), Aldrich
Kyselina chlorovodíková (HCl , 0,2 M), Lachner
Hydroxid sodný (NaOH , 1 M), Ultra > 98 %, Sigma

Čištění používaného laboratorního skla bylo zajištěno připraveným roztokem lučavky královské ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$, v poměru 3:1)

Pomůcky: laboratorní kádinky Pyrex, odměrný válec, skleněné vialky s víčkem (P-lab), křemenné kyvety (Chrom Spec), automatická pipeta (1 ml, 200 μl), plastové špičky k pipetám, magnetické míchátko, centrifugační zkumavky 5 ml, stojánek na centrifugační zkumavky, porcelánová navažovací lodička, laboratorní lžička

Přístroje: analytické váhy, magnetická míchačka, pH metr, fluorescenční spektrofluorimetr Hitachi F4500, mikrovlnná trouba SMW 3717, chladnička, mražák (-20 °C), IČ spektrometr Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR s ATR nástavcem iD7, JASCO J-815 CD spektrometr pro měření cirkulárního dichroismu

4.1 Příprava monometalických nanoklastrů

V provedených experimentech bylo využito BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free. K 1 ml roztoku BSA byl přidán vždy 1 ml roztoku H_{Au}Cl₄ (10 mM) nebo AgNO₃ (10 mM). Obsah kádinky byl po dobu 1 minuty míchán na magnetické míchače a poté bylo ke směsi připipetováno 200 μl roztoku NaOH (1 M). Kádinka s reakční směsí byla vložena do mikrovlnné trouby, bylo nastaveno 20 % výkonu po dobu 10 s. Z kádinky bylo odpipetováno 80 μl roztoku do fluorescenční křemenné kyvety a byl přidán 1 ml deionizované vody. Každá z příslušných syntéz a následných spektroskopických měření byla zopakována 2x pro ověření reprodukovatelnosti.

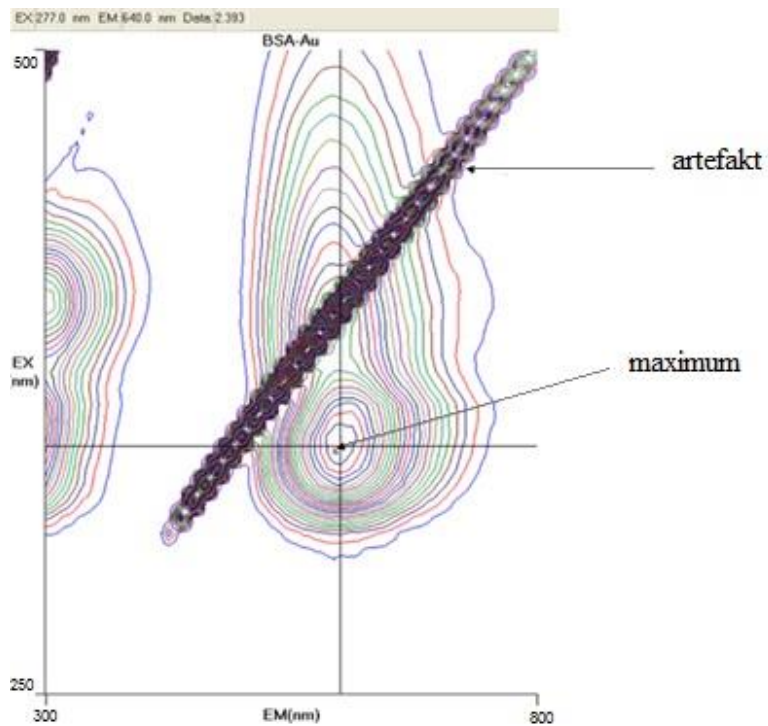
4.2 Příprava bimetalických nanoklastrů

Příprava nanoklastrů zlato-stříbrných ve dvou různých poměrech těchto kovových iontů (6:1 a 10:1) v reakční směsí s BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free byla analogická k přípravě monometalických nanoklastrů. Každá z příslušných syntéz a následných spektroskopických měření byla zopakována 2x pro ověření reprodukovatelnosti.

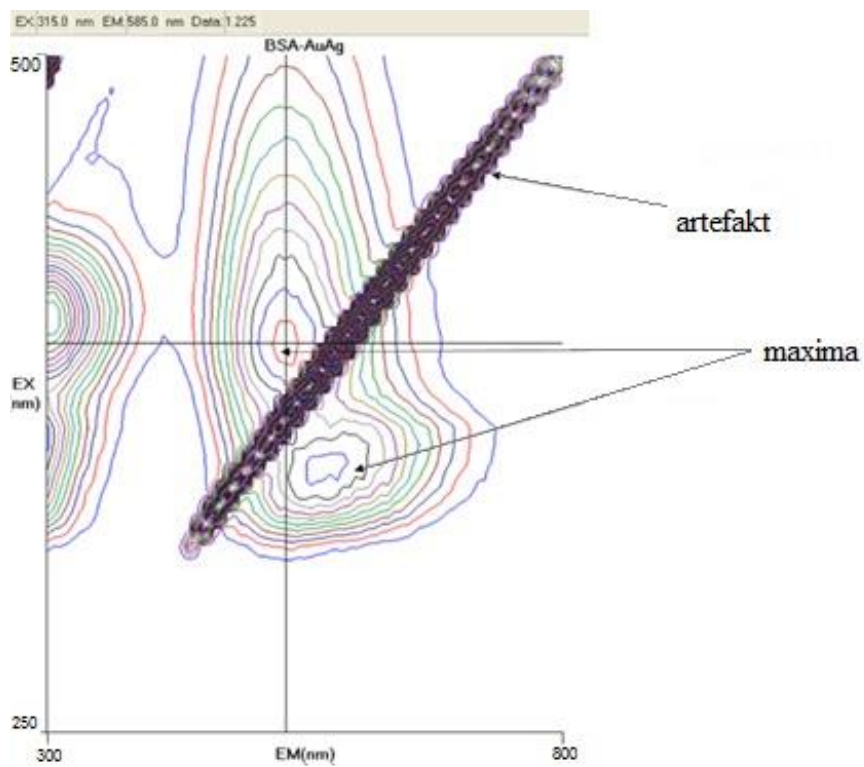
4.3 Přístrojové vybavení a použité techniky

4.3.1 Fluorescenční spektroskopie

Pomocí spektrofluorimetru Hitachi F4500 byla změřena fluorescenční emisní spektra připravených monometalických (BSA-Au, BSA-Ag) a bimetalických (BSA-Au/Ag) nanoklastrů. Nejprve byly nastaveny parametry pro měření 3D map spekter, kdy rozsah excitace byl 250-500 nm a rozsah emise byl 300-800 nm.



Obrázek 6: Příklad 3D mapy spekter vzniklého nanoklastaru BSA-Au (96 %).



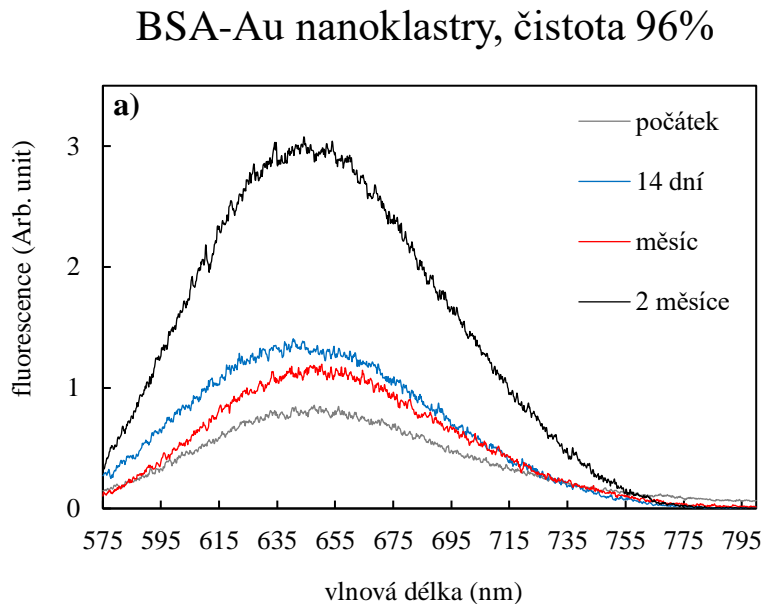
Obrázek 7: Příklad 3D mapy spekter vzniklého nanoklastaru BSA-Au/Ag (96 %).

Na základě 3D map spekter byla zvolena excitační vlnová délka s maximální intenzitou luminiscence (280 nm). Poté byla detailně proměřena emisní a také excitační spektra připravených nanoklastrů. Emisní spektrum pro nalezené maximum bylo měřeno v rozsahu 550-800 nm. Dále byla měřena excitační spektra v rozsahu 200-600 nm při emisi 400, 640 a 585 nm. Rychlost skenu byla nastavena na 2400 nm/min a šířka štěrbin na 5 nm.

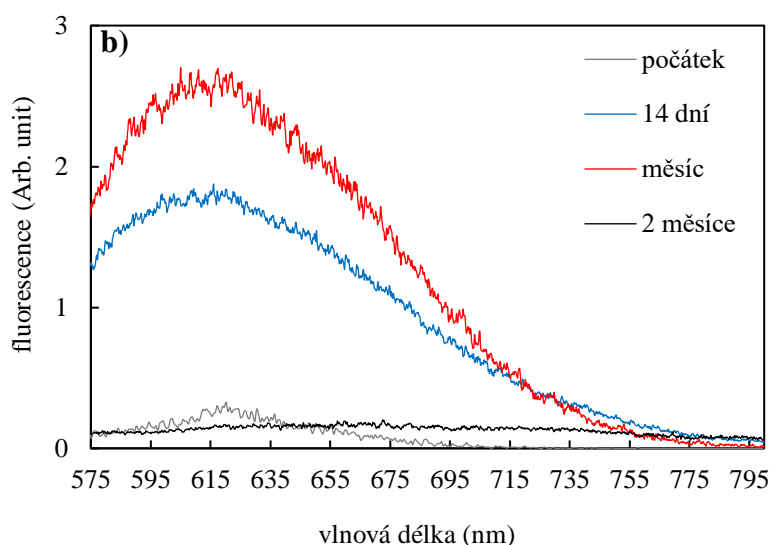
Každá z příslušných syntéz a následných spektroskopických měření byla zopakována 2x pro ověření reprodukovatelnosti dat a z naměřených spekter bylo vytvořeno průměrné fluorescenční spektrum charakteristické pro každý typ systému. Z výsledných průměrných hodnot byly zpracovány grafy závislosti vlnové délky na fluorescenci daných systémů. Pro sestavení grafů bylo využito programu Microsoft Excel 2019.

4.3.2 Sledování vývoje nanoklastrů v čase

Vývoj fluorescenčních vlastností nanoklastrů byl sledován v delším časovém rozsahu, tzn. po dobu 14 dní, měsíce a dvou měsíců – obr. 8.



BSA-Au/Ag nanoklastry (6:1), čistota 98%



Obrázek 8: Srovnání vývoje nanoklastrů a) monometalických, b) bimetalických v čase.

4.3.3 Cirkulární dichroismus (CD)

Spektra připravených monometalických a bimetalických nanoklastrů a také samotného BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free byla měřena od 190 do 400 nm v intervalu 1 nm pomocí JASCO CD spektrometru. S využitím křemenné kyvety o šířce 1 mm a rychlostí skenu 100 nm/min byly pro každé CD spektrum provedeny celkově čtyři skeny (Chi et al., 2018). Pro úpravu pH byl použit zásobní roztok NaOH (1 M) a HCl (0,2 M). Výsledná koncentrace BSA měřených vzorků byla upravena na 0,25 mg/ml. Z výsledných hodnot měření byly zpracovány grafy závislosti absorpance na orientaci kruhově polarizovaného záření a na základě vztahů (a) a (b) uvedených v kapitole 2.5.1 ze článku Chi et al., 2018 byl určen obsah α -helixu BSA. Pro sestavení grafů bylo využito programu Microsoft Excel 2019.

4.3.4 Infračervená spektroskopie (IČ)

Spektra samotného BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free byla měřena pomocí spektroskopu IČ (Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR) metodou tzv. úplné zeslabené reflektance (ATR). Pomocí laboratorní lžičky byl odebrán vzorek práškového BSA o požadované čistotě, který byl umístěn na krystal, a pomocí šroubu s nastavitelným

přítlakem byl vzorek přitlačen na krystal. Díky softwaru přístroje (OMNIC od firmy Nicolet) probíhalo samotné měření v intervalu 400-4000 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} .

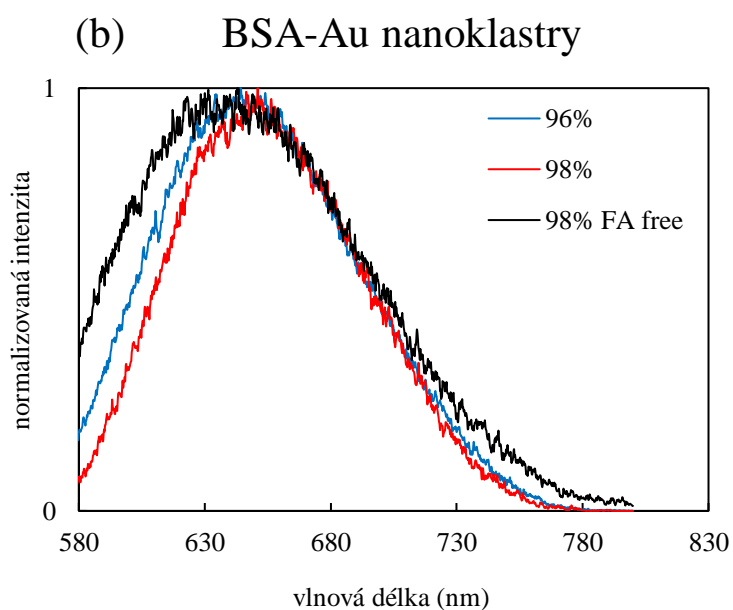
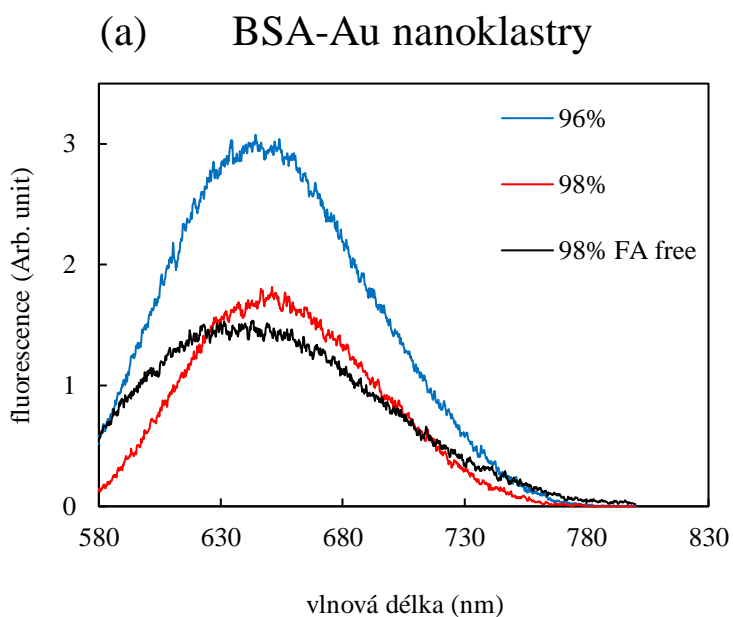
5 Výsledky

Prvotním cílem provedených experimentů bylo zjistit, jaký vliv má čistota albuminu hovězího séra na vznik a fluorescenci monometalických (Au, Ag) a bimetalických (Au/Ag) nanoklastrů kovů. Ke tvorbě nanoklastrů bylo využito BSA různé čistoty (96 %, 98 %, 98 % FA free), které reagovalo vždy za stejných podmínek (alkalické prostředí) s následujícími látkami: a) kyselinou tetrachlorozlatitou, nebo b) dusičnanem stříbrným, nebo c) směsí kyseliny tetrachlorozlatité a dusičnanu stříbrného v poměrech 6:1 anebo 10:1; celá reakce byla urychlena účinkem mikrovln. K posouzení fluorescence jednotlivých typů nanoklastrů byla využita fluorescenční měření po delších časových intervalech uplynulých od započetí syntézy (2 měsíce v případě monometalických, 1 měsíc v případě bimetalických), a to zejména z důvodu dosažení nejvyšších hodnot intenzity fluorescence (obr. 8) a eliminace nestejněměrného časového intervalu uplynulého mezi syntézou a měřením fluorescence čerstvých NCs.

5.1 Monometalické nanoklastry

5.1.1 Au NCs

Fluorescence vznikajících monometalických nanoklastrů (Au, Ag) byla ovlivňována přidavkem BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free, jak je dokumentováno na následujících obrázcích.



Obrázek 9: (a) Emisní spektrum BSA-Au nanoklastrů při excitaci 280 nm s použitím mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po dvou měsících měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

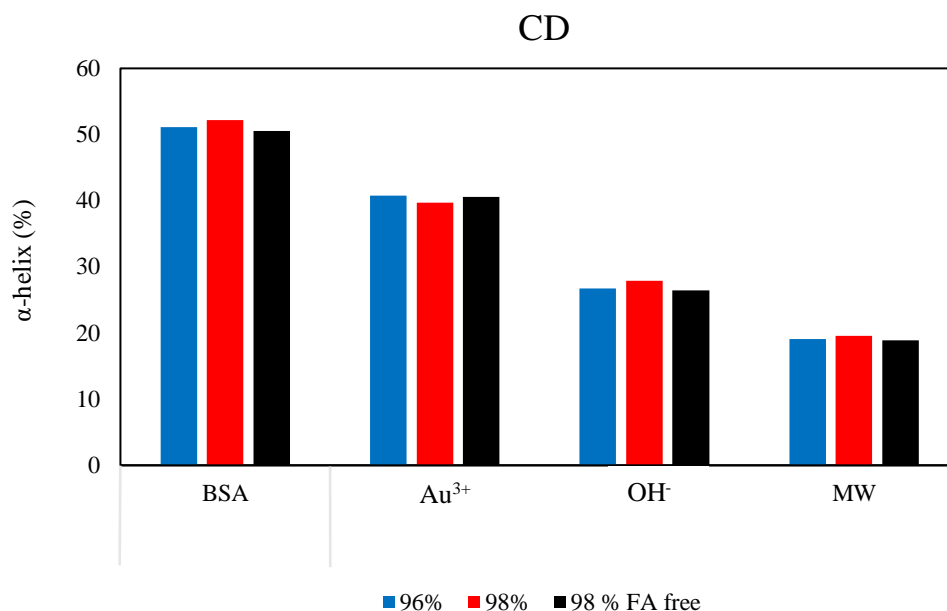
Z obrázku 9a lze vyčíst, že maximální hodnoty fluorescence BSA-Au NCs bylo dosaženo při použití BSA o čistotě 96 % : fluorescence dosahovala hodnot intenzity okolo 3 (644 nm); zatímco se zvyšující se čistotou BSA tato hodnota klesla téměř o polovinu. Poloha maxima fluorescence (1,54; 643 nm) se mírně odlišuje zejména pro vzorek s 98 %

BSA FA free; taktéž šířka a tvar fluorescenčního pásu BSA-Au NCs se liší pro jednotlivé čistoty výchozího BSA – obr. 9b. Čistota albuminu tedy hraje důležitou roli ve vzniku a výsledné fluorescenci nanoklastrů.

Dalším důležitým faktorem je čas uplynulý od započetí syntézy. Jak již bylo zmíněno, měření probíhalo v delším časovém rozsahu (14 dní, měsíc, dva měsíce). S rostoucím intervalem mezi začátkem syntézy a měřením fluorescence narůstaly hodnoty fluorescence nanoklastrů a po jednom či dvou měsících byly hodnoty intenzity fluorescence až třikrát vyšší než ty, které byly změřené ihned po syntéze, tzn. na počátku vzniku NCs.

Třetím podstatným faktorem ovlivňujícím vznik a fluorescenci kovových NCs s různou čistotou výchozího BSA je působení mikrovln na systém, a proto bude tento faktor ještě dále probrán v separátní podkapitole.

Ve snaze ověřit, zda jednou z hlavních příčin rozdílného vlivu různě čistých BSA na vznik Au NCs není sekundární struktura příslušného proteinu, byla proměřena CD spektra. Obsah α -helixu byl určován na základě vztahů uvedených v teoretické části (2.5.1).



Obrázek 10: Obsah α -helixu (%) BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free pozměněný vlivem působení jednotlivých faktorů během syntézy kovových NCs. Obsah byl vypočítán z hodnot naměřených metodou CD s využitím vzorců uvedených v kapitole 2.5.1.

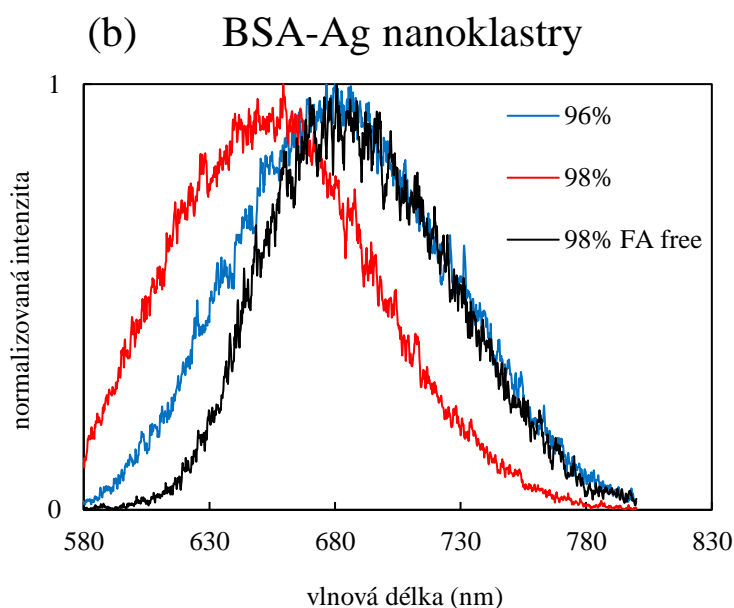
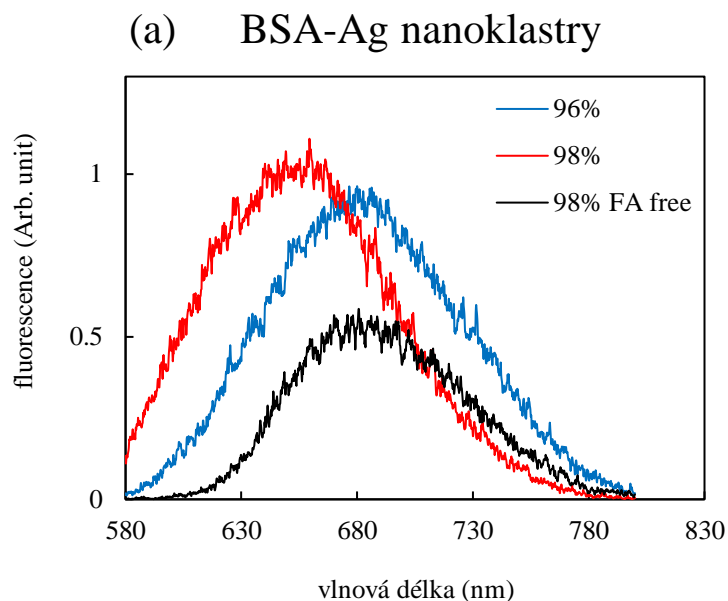
Z obrázku 10 lze vyčíst, že obsah α -helixu klesal v závislosti na přidávání kovového iontu Au(III) k BSA, dále v závislosti na přidávání hydroxidu sodného (OH^-) a působením mikrovln (MW). Samotné BSA má pH hodnotu okolo 7. Po přidání kovových iontů, konkrétně Au(III), došlo k okyselení směsi a pH se snížilo na hodnotu 2. Přidáním hydroxidu sodného se pH zvýšilo na hodnotu 12. Nakonec byl sledován i značný vliv mikrovln (MW) na celou směs.

Když se tedy pH snížilo z hodnoty 7 na 2, obsah α -helixu BSA se snížil u všech tří typů BSA z 50 % (pH = 7) na 40 % (pH = 2). Můžeme pozorovat, že po přidání Au(III) byl obsah α -helixu nejvyšší u BSA s čistotou 96 % na rozdíl od neutrálního prostředí, kde dosahuje obsah α -helixu maximální hodnoty u BSA o čistotě 98 %. Vzhledem k tomu, že pH po přidání hydroxidu sodného stoupl na hodnoty okolo 12, obsah α -helixu začal klesat z 40 % na 26 % a působením mikrovln obsah ještě více klesl na hodnoty kolem 19 %, ovšem hodnota pH se už neměnila. V těchto případech byl opět obsah α -helixu nejvyšší u BSA o čistotě 98 %.

Z grafu na obr. 10 tedy můžeme dedukovat, že BSA má nejkompaktnější konformaci v prostředí s téměř neutrálním pH 6-8, což naznačuje nejvyšší obsah α -helixu BSA (50 %). Zatímco v alkalickém prostředí a působením mikrovln se struktura BSA uvolňuje s klesajícím obsahem α -helixu. Uvolňování struktury BSA přímo souvisí se vznikem kovových nanoklastrů, a tudíž dochází i k ovlivnění fluorescence výsledných nanoklastrů.

5.1.2 Ag NCs

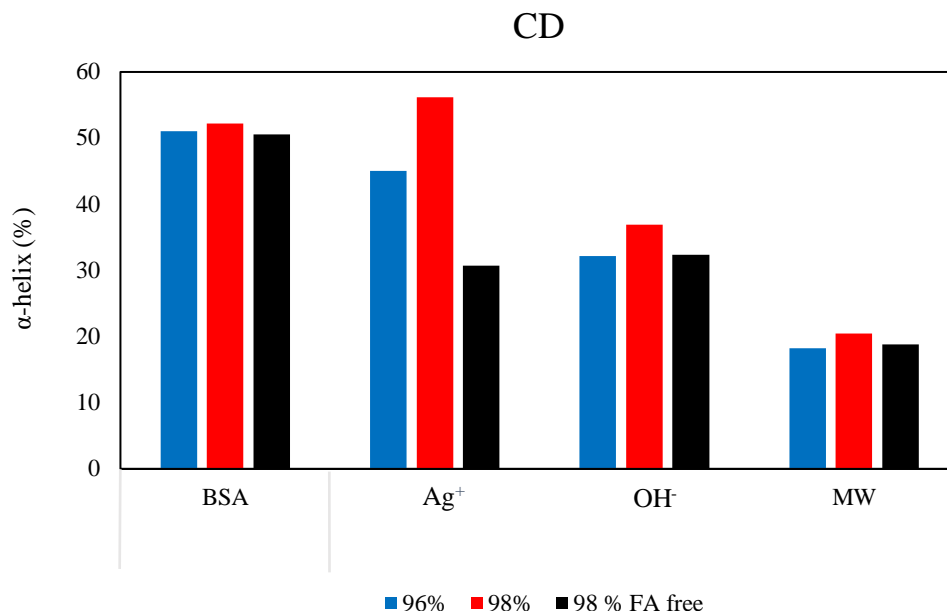
V této podkapitole je demonstrován (obr. 11) a diskutován vliv čistoty BSA na vznik a fluorescenci Ag NCs. Tyto nanoklastry budou často srovnávány s BSA-Au NCs. Trend časového vývoje intenzity fluorescence Ag NCs byl stejný jako u BSA-Au (tzn. byl pozorován postupný vzrůst v čase).



Obrázek 11: (a) Emisní spektrum BSA-Ag nanoklastrů při excitaci 280 nm s použitím mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po dvou měsících měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

Ze srovnání obrázků 9a a 11a můžeme vidět, že na rozdíl od systému BSA-Au jsou hodnoty intenzity fluorescence u měřených BSA-Ag nanoklastrů po dvou měsících viditelně nižší. Dalším rozdílem u BSA-Ag NCs oproti BSA-Au NCs je, že maximální hodnoty intenzity fluorescence (1,109) bylo dosaženo při použití BSA o čistotě 98 % při

vlnové délce 659 nm (na rozdíl od 96 % BSA v případě BSA-Au NCs). Je patrný hypsochromní posun fluorescence pro Ag NCs s 98 % BSA. Též tvar a šířka fluorescenčního pásu BSA-Ag NCs pro jednotlivé čistoty se liší – obr. 11b.

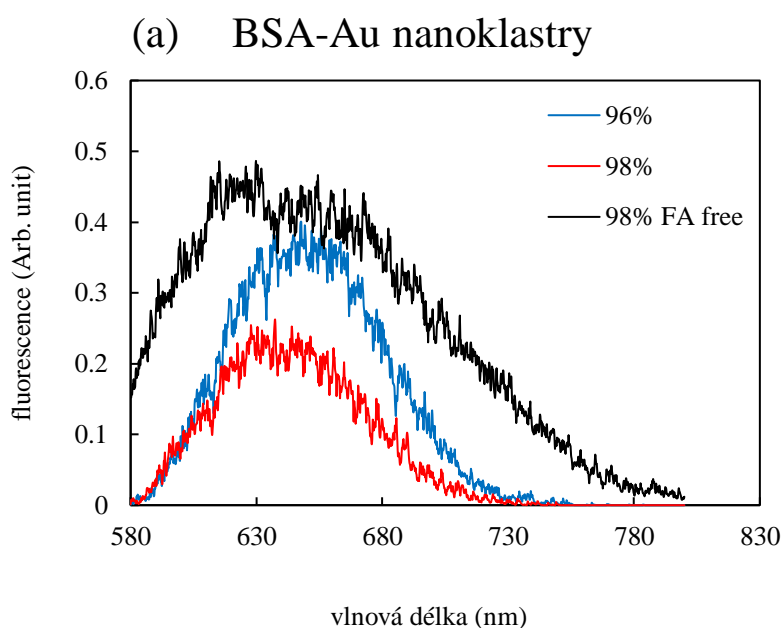


Obrázek 12: Obsah α -helixu (%) BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free pozmeněný vlivem působení jednotlivých faktorů během syntézy kovových NCs. Obsah byl vypočítán z hodnot naměřených metodou CD s využitím vzorců uvedených v kapitole 2.5.1.

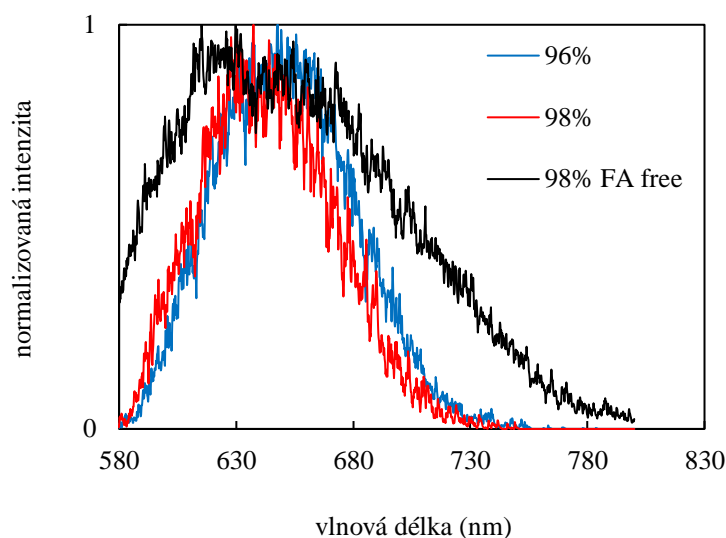
Stran měření spekter CD – srovnáním obr. 10 a obr. 12 - je možné opět pozorovat významné rozdíly mezi Ag NCs a Au NCs. Zatímco u Au NCs byl sledován relativně monotónní pokles obsahu alfa helixu v BSA vlivem jednotlivých faktorů (přidání kationtu kovu, dále působení alkalického prostředí, nakonec účinek mikrovln), a to u všech čistot BSA; pro Ag NCs byl pozorován významný rozdíl v chování 98 % BSA. V tomto případě po přidání kovu, a tedy okyselení směsi vzrostl obsah α -helixu u BSA o čistotě 98 % nad hodnotu 50 % a po přidání hydroxidu sodného a působením mikrovln tento obsah viditelně klesal, ovšem ve srovnání s čistotami 96 % a 98 % FA free byl stále vyšší – obr. 12.

5.1.3 Monometalické NCs vznikající bez účinku mikrovln

Jak je patrné z obrázku 13a, bez účinku mikrovln je intenzita fluorescence poměrně nízká. V případě BSA-Au NCs výsledná intenzita fluorescence působením mikrovln viditelně vzrostla, jak můžeme vidět ze srovnání obrázků 9a a 13a: maximální hodnoty fluorescence BSA-Au NCs s využitím mikrovln bylo dosaženo při použití BSA o čistotě 96 % (oproti 98 % FA free BSA v případě BSA-Au NCs bez účinku mikrovln, kde byla maximální hodnota fluorescence 0,49 při vlnové délce 630 nm). Trend časového vývoje intenzity fluorescence bez účinku mikrovln a s jejich využitím byl stejný (tzn. byl pozorován postupný vzrůst v čase). Tvar, počet a šířka pásů se rovněž liší v případě BSA-Au NCs bez účinku mikrovln – obr. 13b.



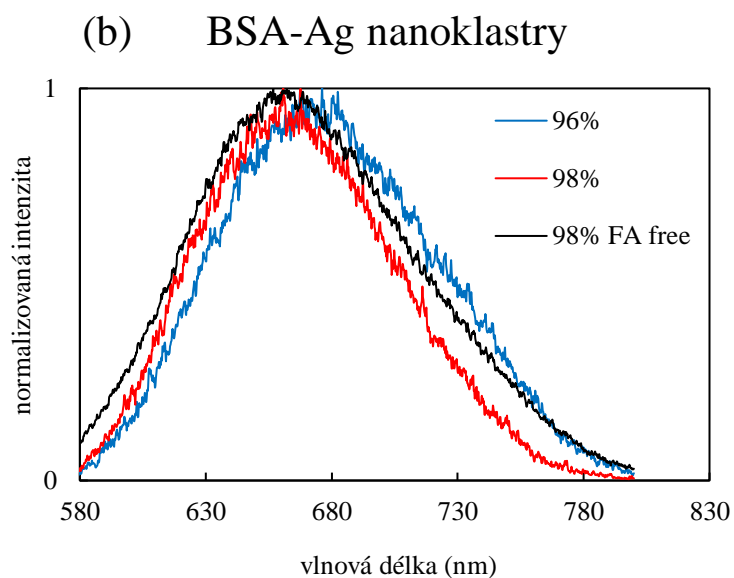
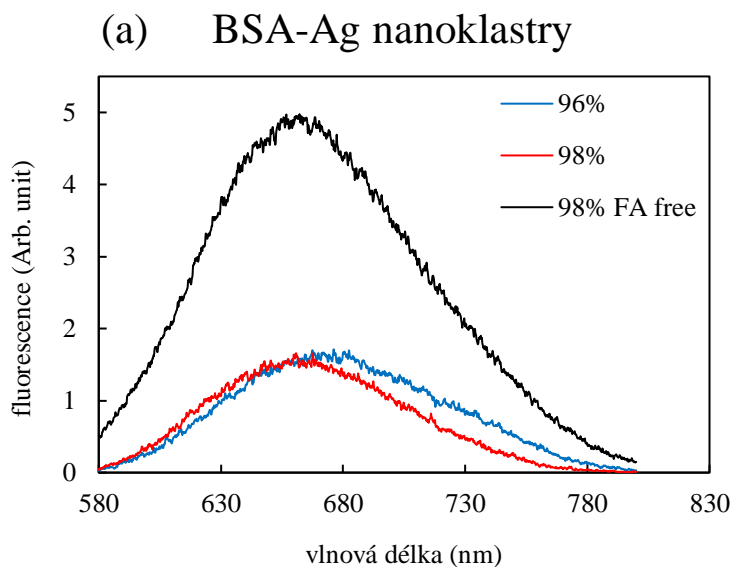
(b) BSA-Au nanoklastry



Obrázek 13: (a) Emisní spektrum BSA-Au nanoklastrů při excitaci 280 nm bez použití mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po dvou měsících měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

Obdobně byly vyzkoušeny systémy BSA-Ag NCs bez mikrovln – obr. 14. Jak je evidentní ze srovnání obr. 14a a 11a, působení mikrovln na systém BSA-Ag NCs vedlo ke snížení hodnot intenzity fluorescence. Toto je velký rozdíl oproti BSA-Au NCs.

Ze srovnání obrázků 11a a 14a můžeme dále vidět, že maximální hodnoty fluorescence BSA-Ag NCs s využitím mikrovln bylo dosaženo při použití BSA o čistotě 98 %, oproti 98 % FA free BSA v případě BSA-Ag NCs bez účinku mikrovln (maximální hodnota fluorescence 4,98 při vlnové délce 662 nm). Trend časového vývoje intenzity fluorescence bez účinku mikrovln a s jejich využitím byl stejný (tzn. byl pozorován postupný vzrůst v čase). Jak je patrné z obrázku 14a, bez účinku mikrovln je intenzita fluorescence viditelně vyšší, nejmarkantnější rozdíl je pozorován pro systém obsahující 98 % BSA FA free. Taktéž tvar a šířka pásů se liší pro jednotlivé čistoty BSA u Ag NCs vznikajících bez účinku mikrovln – obr. 14b.



Obrázek 14: (a) Emisní spektrum BSA-Ag nanoklastrů při excitaci 280 nm bez použití mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po dvou měsících měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

5.2 Bimetalické Au/Ag nanoklastry

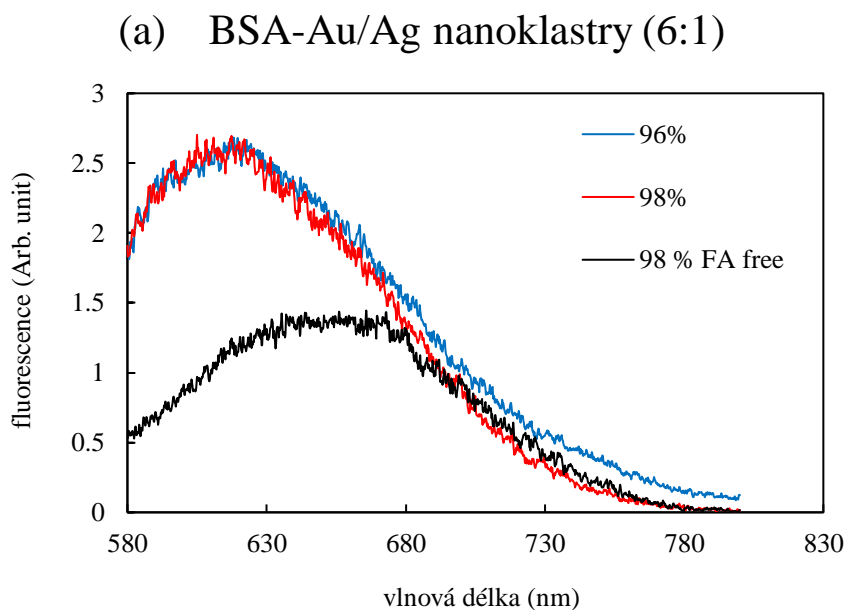
Jak již bylo zmíněno, ve srovnání s monometalickými nanoklastry, bimetalické nanoklastry, složené ze dvou různých kovových prvků, mají odlišné vlastnosti založené na efektu přidávání dalšího kovového prvku. Fluorescenční vlastnosti BSA-Au/Ag NCs

mohou být ovlivněny složením nanoklastrů, tedy různými poměry molekul Au:Ag, nejčastěji v rozmezí 2:1~10:1. Z výsledků Zheng et al., bylo zjištěno, že maxima fluorescenční intenzity Au:Ag je dosaženo při poměru 6:1 a tyto výsledky ukazují, že přítomnost Ag může zvyšovat fluorescenční intenzitu vzorku (Zheng et al., 2015). S ohledem na tento článek byly tudíž zvoleny dva poměry Au:Ag, a sice 6:1 a 10:1.

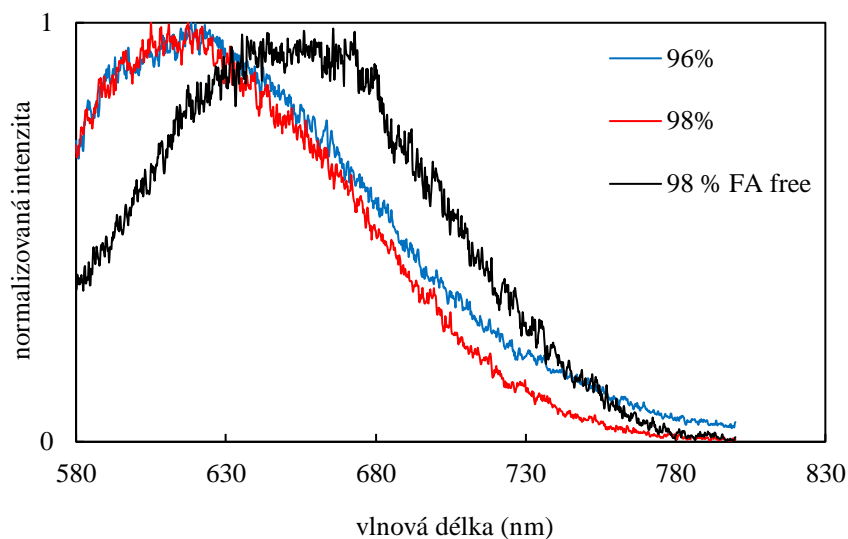
Fluorescence vznikajících bimetalických nanoklastrů Au/Ag v poměrech 6:1 a 10:1 byla ovlivňována přidavkem BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free stejně jako u monometalických NCs a jednotlivé výsledky jsou diskutovány v následujících podkapitolách. Pro posouzení fluorescenčních vlastností jsou však sledovány hodnoty fluorescence po měsíci od započetí syntézy bimetalických nanoklastrů (na rozdíl od monometalických, kde byly srovnávány hodnoty po dvou měsících).

5.2.1 Poměr 6:1 Au:Ag

V této podkapitole je demonstrován (obr. 15) a diskutován vliv čistoty BSA na vznik a fluorescenci bimetalických Au/Ag NCs v poměru 6:1, měřené měsíc od syntézy těchto NCs.



(b) BSA-Au/Ag nanoklastry (6:1)

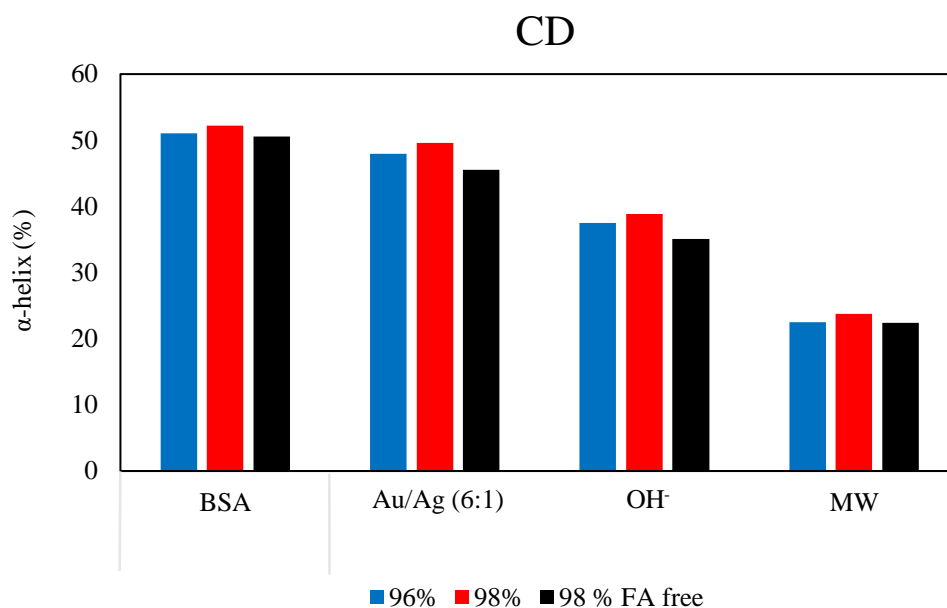


Obrázek 15: (a) Emisní spektrum BSA-Au/Ag nanoklastrů v poměru 6:1 při excitaci 280 nm s použitím mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po měsíci měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

Z obrázku 15a lze vyčíst, že maximální hodnoty fluorescence BSA-Au/Ag NCs v poměru 6:1 bylo dosaženo při použití dvou typů BSA, a to o čistotě 98 a 96 % (2,68 při vlnové délce 618 nm pro 96 % BSA a 2,7 při vlnové délce 605 nm pro 98 % BSA). Tyto hodnoty byly nižší, ve srovnání s BSA-Au a zároveň vyšší ve srovnání s BSA-Ag. Obdobně jako u monometalických NCs se poloha maxima fluorescence mírně odlišuje, zde zejména pro vzorek s 98 % BSA FA free (1,45 při vlnové délce 665 nm); šířka a tvar fluorescenčního pásu BSA-Au/Ag NCs (6:1) se liší pro jednotlivé čistoty BSA – obr. 15b.

Trend časového vývoje intenzity fluorescence Au/Ag NCs (6:1) byl odlišný od monometalických NCs. Hodnoty fluorescence nanoklastrů s rostoucím intervalem mezi začátkem syntézy a měřením fluorescence narůstaly po dobu jednoho měsíce. Po dvou měsících byl ovšem pozorován významný pokles hodnot u obou testovaných poměrů NCs. Působení mikrovln na systém bude dále probrán v separátní podkapitole.

Pro tyto bimetalické nanoklastry bylo opět důležité proměřit spektra CD a na jejich základě vyhodnotit obsah α -helixu, který nám vypovídá o sekundární struktuře daného BSA v příslušném prostředí (obr. 16).



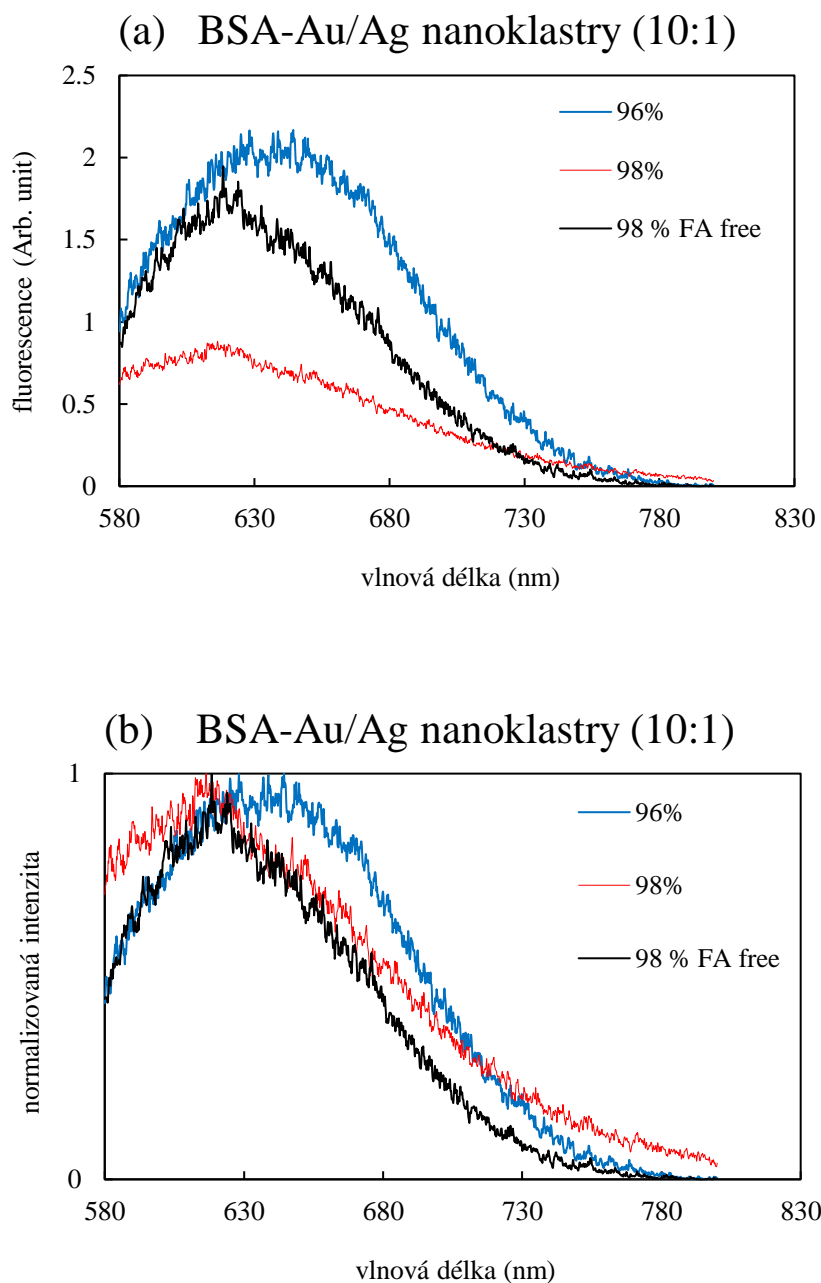
Obrázek 16: Obsah α -helixu (%) BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free při různých hodnotách pH. Obsah byl vypočítán z hodnot naměřených metodou CD s využitím vzorců uvedených v kapitole 2.5.1.

Z obrázku 16 lze vyčíst, že obsah α -helixu klesal vlivem jednotlivých faktorů (přidání směsi kovů, působení alkalického prostředí, účinek mikrovln). Po přidání Au/Ag (6:1) se obsah alfa helixu snížil, ovšem pokles nebyl tak významný jako u monometalických NCs. Můžeme pozorovat, že po přidání směsi kovů byl obsah α -helixu nejvyšší u BSA s čistotou 98 %, stejně jako u neutrálního a bazického prostředí. Působením mikrovln obsah ještě více klesal. S ohledem na vyšší obsah Au(III) v reakční směsi dvou kovů je vcelku logické, že trend změn obsahu α -helixu je analogický jako pro BSA-Au NCs (obr. 10). Vliv Ag(I) v reakční směsi dvou kovů je ovšem též zřejmý, a to právě s ohledem na nejvyšší obsah α -helixu naměřený v jednotlivých setech sledování různých faktorů na 98 % BSA.

Z výsledného grafu na obr. 16 tedy můžeme pozorovat stejný trend jako u monometalických NCs, tedy že BSA má nejkompaktnější konformaci v prostředí s téměř neutrálním pH a v alkalickém prostředí a působením mikrovln se struktura BSA uvolňuje s klesajícím obsahem α -helixu.

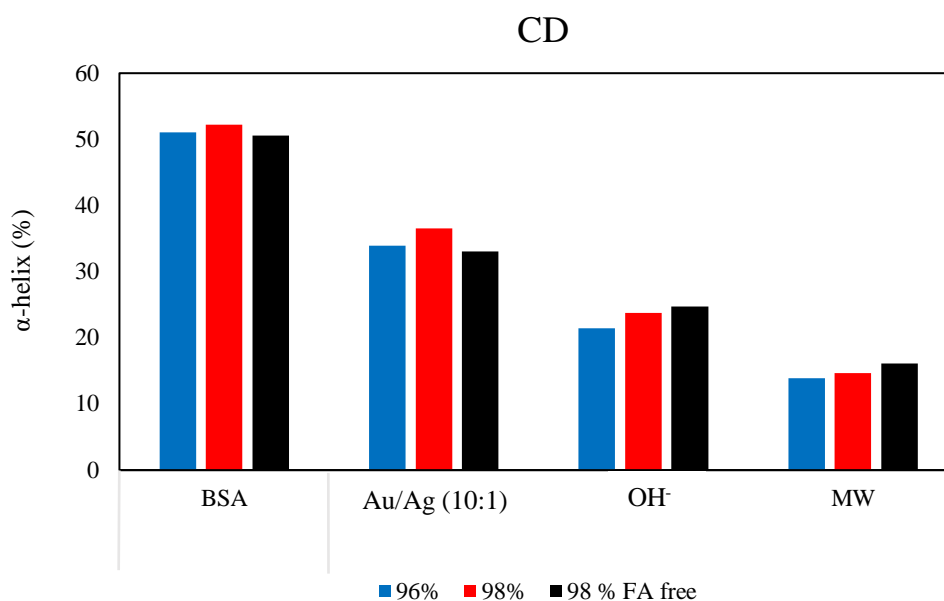
5.2.2 Poměr 10:1 Au:Ag

V této podkapitole je demonstrován (obr. 17) a diskutován vliv čistoty BSA na vznik a fluorescenci bimetalických Au/Ag NCs v poměru 10:1.



Obrázek 17: (a) Emisní spektrum BSA-Au/Ag nanoklastrů v poměru 10:1 při excitaci 280 nm s použitím mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po měsíci měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

Ze srovnání obrázků 15a a 17a můžeme vidět, že hodnoty intenzity fluorescence u měřených BSA-Au/Ag nanoklastrů obou poměrů jsou po měsíci měření poměrně stejné. Maximální hodnoty intenzity fluorescence u BSA-Au/Ag NCs (10:1) bylo dosaženo při použití BSA o čistotě 96 % (2,17 při vlnové délce 644 nm). Toto je analogické k pozorování fluorescence pro monometalické Au NCs (obr. 9).

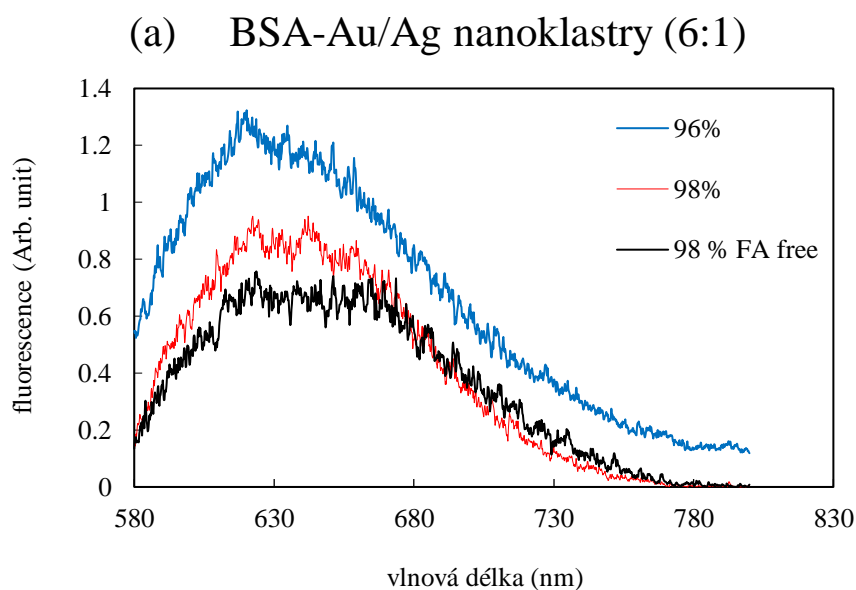


Obrázek 18: Obsah α -helixu (%) BSA o čistotě 96 %, 98 % a 98 % FA free při různých hodnotách pH. Obsah byl vypočítán z hodnot naměřených metodou CD s využitím vzorců uvedených v kapitole 2.5.1.

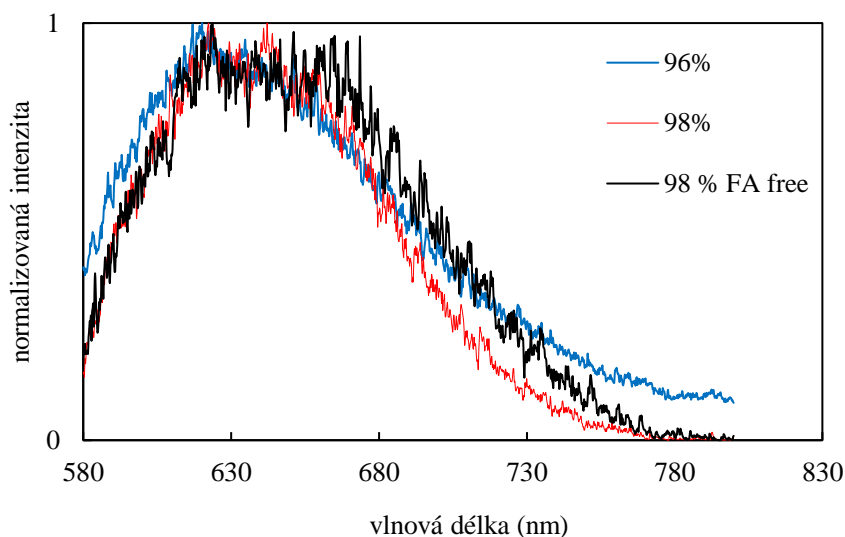
Stran měření spekter CD – srovnáním obr. 16 a obr. 18 - je možné pozorovat rozdíly mezi Au/Ag NCs (6:1) a Au/Ag NCs (10:1). Zatímco u poměru 6:1 byl sledován relativně monotónní pokles obsahu alfa helixu v BSA u všech čistot BSA; pro poměr 10:1 byl pozorován významný pokles obsahu alfa helixu BSA u všech čistot a také rozdíl v chování 98 % FA free BSA. V tomto případě po přidání hydroxidu sodného vzrostl obsah α -helixu u BSA o čistotě 98 % FA free nad hodnoty čistot 96 % a 98 % a působením mikrovln tento obsah klesal, ovšem ve srovnání s čistotami 96 % a 98 % byl stále vyšší – obr. 18.

5.2.3 Au/Ag NCs bez účinku mikrovln

V případě bimetalických nanoklastrů, stejně jako u monometalických BSA-Au, výsledná intenzita fluorescence působením mikrovln viditelně vzrostla. Ze srovnání obrázků 15a a 19a můžeme vidět, že maximální hodnoty fluorescence BSA-Au/Ag NCs (6:1) bez použití mikrovln bylo dosaženo vlivem BSA o čistotě 96 %, kde maximální intenzita fluorescence byla 1,32 při vlnové délce 620 nm, (oproti 96 a 98 % BSA v případě BSA-Au/Ag NCs s účinkem mikrovln). Trend časového vývoje intenzity fluorescence pro bimetalické nanoklastry v poměru 6:1 bez účinku mikrovln a s jejich využitím byl stejný (tzn. byl pozorován postupný vzrůst v čase po dobu jednoho měsíce, poté intenzita viditelně klesala). Jak je patrné z obrázku 19a, bez účinku mikrovln je intenzita fluorescence poměrně nízká, ovšem ve srovnání s BSA-Au NCs (bez účinku mikrovln – obr. 13a) je tato intenzita až dvakrát vyšší a je tedy zřejmé, že přítomnost Ag zvyšuje intenzitu fluorescence.

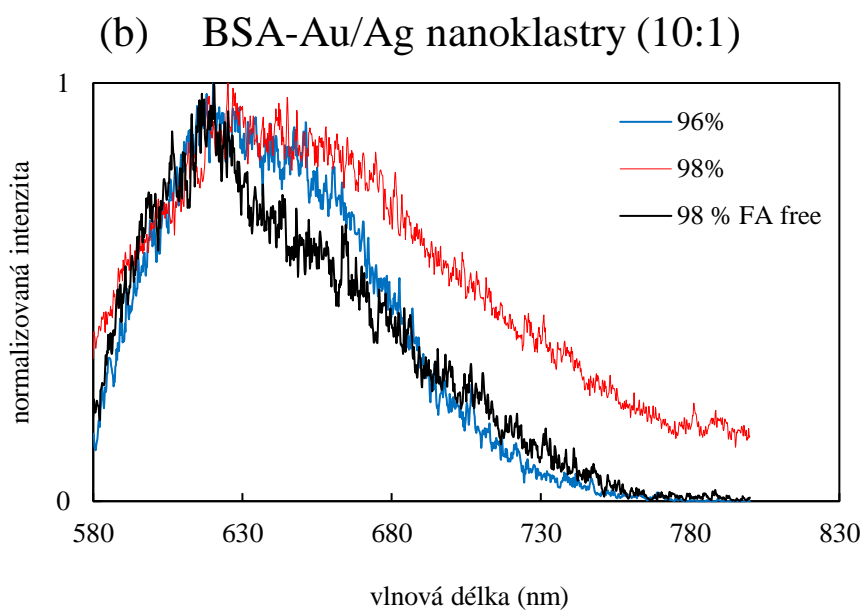
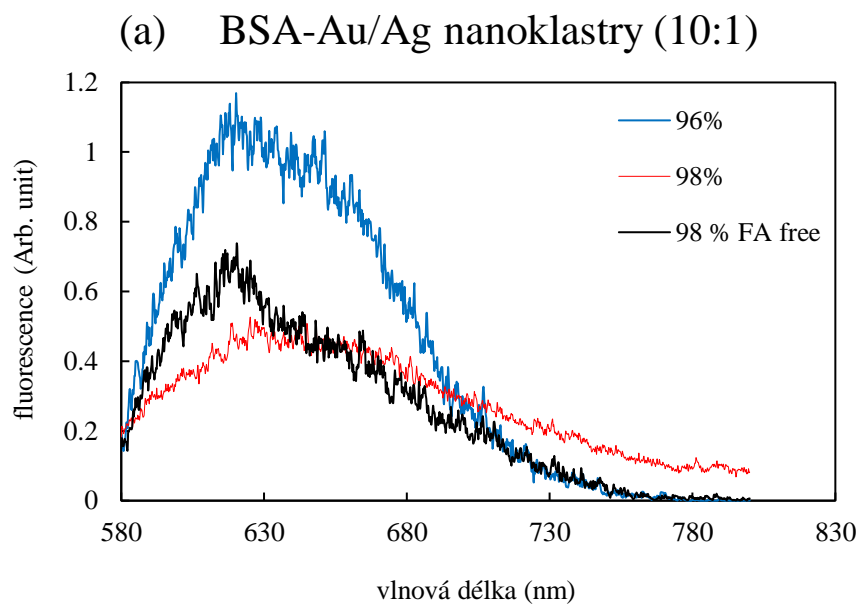


(b) BSA-Au/Ag nanoklastry (6:1)



Obrázek 19: (a) Emisní spektrum BSA-Au/Ag nanoklastrů v poměru 6:1 při excitaci 280 nm bez použití mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po měsíci měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

Působení mikrovln na systém BSA-Au/Ag NCs (10:1) také vedlo ke zvýšení hodnot intenzity fluorescence, a to téměř o polovinu. Jak je patrné z obrázku 20a, bez účinku mikrovln je intenzita fluorescence viditelně nižší (1,17 při 620 nm). Ze srovnání obrázků 17a a 20a můžeme vidět, že maximální hodnoty fluorescence BSA-Au/Ag NCs (10:1) s využitím mikrovln bylo dosaženo při použití BSA o čistotě 96 %, což nepochybně souvisí s vyšším obsahem Au(III) v reakční směsi. Trend časového vývoje intenzity fluorescence bimetalických NCs o poměru 10:1 bez účinku mikrovln a s jejich využitím byl obdobný jako u předchozích systémů (tzn. byl pozorován postupný vzrůst v čase po dobu jednoho měsíce).



Obrázek 20: (a) Emisní spektrum BSA-Au/Ag nanoklastrů v poměru 10:1 při excitaci 280 nm bez použití mikrovln. Graf ukazuje průměrné hodnoty fluorescenčních spekter po měsíci měření získané ze 2 nezávislých experimentů (b) normované fluorescenční křivky.

6 Diskuze

6.1 Monometalické NCs

Naše výsledky ukázaly, že u monometalických nanoklastrů měla čistota BSA velký vliv na jejich fluorescenční vlastnosti. Výsledky experimentů s BSA-Au nanoklastry ukázaly, že se zvyšující se čistotou BSA docházelo ke snižování hodnot fluorescence a nejvyšší fluorescenční intenzity (IF) bylo u Au NCs dosaženo s využitím BSA o čistotě 96 %.

Jako další důležitý faktor se ukázal čas od počátku syntézy NCs, kdy s rostoucím intervalem mezi začátkem syntézy a měřením fluorescence narůstaly hodnoty fluorescence BSA-Au nanoklastrů a po jednom či dvou měsících byly hodnoty intenzity fluorescence až třikrát vyšší než ty, které byly změřené ihned po syntéze, tzn. na počátku vzniku NCs.

Stejný efekt byl i u BSA-Ag NCs, u nichž bylo dosaženo nejvyšší IF s využitím BSA o čistotě 98 %, ovšem ve srovnání s BSA-Au NCs byly hodnoty viditelně nižší.

Dále jsme zjistili, že působení mikrovln na systém také významně měnilo fluorescenční vlastnosti. Především u monometalických BSA-Au NCs byla fluorescence s působením mikrovln vyšší a je tedy zřejmé, že reakční teplota je dalším významným faktorem. Jak již bylo zjištěno, při teplotě 25 °C se Au NCs tvořily velmi pomalu a ani po dvanácti hodinách reakce nebyly detekovány žádné klastry. Reakce při teplotě 37 °C byla ukončena po dvanácti hodinách a byly získány Au NCs s vysokým kvantovým výtěžkem (6 %) a pokud byla teplota reakce zvýšena na 100 °C, reakce byla dokončena v řádu několika minut ovšem s relativně nízkým kvantovým výtěžkem (0,5 %) (Xie et al., 2009). Důvody mohou být následující: rozpustnost proteinu se zvyšuje s rostoucí teplotou a postupně se rozkládá, což vede k tomu, že tryptofan a tyrosin uvnitř proteinu přechází z hydrofobní oblasti do hydrofilní, což ukazuje, že se konformace proteinu mění. Cystein obsahující thiolovou vazbu je vystaven okolí, může tedy lehce reagovat s kovovými ionty v roztoku a vytvářet kovové S-vazby. Když teplota vzroste na 90 °C, reakce dosáhne maxima. Zatímco když teplota stále roste, hydrofobní efekt proteinu se zvyšuje, což vede k agregaci proteinových molekul (Tian et al., 2017).

Syntézou bez použití mikrovln se ukázalo, že maximální IF u Au NCs byla získána s použitím BSA o čistotě 98 % FA free, ale všechny intenzity byly daleko nižší než ty s použitím mikrovln a vlnové délky maxim IF byly často posunuté či zdvojené (zdvojení se netýkalo systému 98 % BSA). Maximální IF s použitím BSA o čistotě 98 % FA free bylo

dosaženo i u Ag NCs bez účinku mikrovln, ovšem v tomto případě vykazovaly všechny systémy daleko vyšší IF než s využitím mikrovln a tato intenzita překonala i nejvyšší IF u Au NCs s použitím mikrovln, tj. s 96 % BSA. V obou případech s i bez použití mikrovln vlnová délka maxima IF u Ag NCs převyšovala vlnovou délku maxima u Au NCs, jak můžeme vyčíst z Tabulky 1.

Tabulka 1: Odečty pozic maxim IF a hodnot IF (Arb. unit) pro monometalické NCs po dvou měsících měření

	96 %	98 %	98 % FA free
Au NCs (MW)	IF ₆₄₄ ~ 3,08	IF ₆₅₁ ~ 1,82	IF ₆₄₃ ~ 1,54
Ag NCs (MW)	IF ₆₈₀ ~ 0,96	IF ₆₅₉ ~ 1,11	IF ₆₈₁ ~ 0,59
Au NCs (bez MW)	IF ₆₄₈ ~ 0,40	IF ₆₃₇ ~ 0,26 IF ₆₅₀ ~ 0,22	IF ₆₃₀ ~ 0,49 IF ₆₆₀ ~ 0,45
Ag NCs (bez MW)	IF ₆₇₆ ~ 1,71	IF ₆₆₁ ~ 1,66	IF ₆₆₂ ~ 4,98

Z uvedeného je zřejmé, že se podstatně liší vznik Au NCs a Ag NCs účinkem BSA o různých čistotách, čímž je ovlivněna i fluorescence těchto NCs. Jednotlivé typy BSA mění svou sekundární (a nejspíše i terciální) strukturu vlivem dílčích kroků při syntéze nanoklastrů. Toto významně ovlivňuje dostupnost reakčních míst (příslušných aminokyselin) pro ionty Ag(I) a Au(III). Také do značné míry závisí na rozdílné reaktivitě Ag(I) vs. Au(III), tudíž vznikající monometalické nanoklastry těchto dvou kovů se mezi sebou vzájemně velmi liší.

6.2 Bimetalické NCs

Výsledky experimentů s bimetalickými BSA-Au/Ag nanoklastry v poměrech 6:1 a 10:1 s využitím mikrovln ukázaly, že pro zvolený poměr Au:Ag (6:1) byly hodnoty fluorescence nejvyšší pro BSA o čistotě 98 % a tyto hodnoty byly opět zvýšeny působením mikrovln. Zajímavé pak bylo sledování časového vývoje, kdy se fluorescence NCs od počátku syntézy průběžně zvyšovala po dobu jednoho měsíce, ovšem poté rapidně klesla, a

to u obou testovaných poměrů. Jelikož počet Au atomů dominuje v obsahu, ať už 6:1 či 10:1, tak logicky bimetalické NCs ve většině případů svítí více než Ag NCs a méně než Au NCs a je tedy zachována vlastnost, kterou jsme pozorovali pro monometalické NCs. Jednotný nárůst IF vlivem přídavku Ag atomů do nanoklastrů nebyl pozorován, jedině v případě BSA o čistotě 98 % lze hovořit o nárůstu IF o cca 47 % při srovnání Au NCs s těmi Au/Ag NCs (6:1). Nárůst byl pozorován též u BSA 98 % FA free u bimetalických Au/Ag (10:1), ale pouze o cca 17 %.

Na rozdíl od monometalických NCs byla vlnová délka maxim IF u bimetalických NCs posunuta k nižším hodnotám; jedinou výjimkou byl systém Au/Ag NCs (6:1) s BSA o čistotě 98 % FA free, kde byla vlnová délka maxima situována mezi Au NCs a Ag NCs. V souladu s literaturou byl pozorován pokles vlnové délky maxima IF (z např. 650 nm na 610 nm pro 98 % BSA) u většiny systémů. V případě 98 % BSA FA free však bylo pozorováno zvýšení vlnové délky maxim IF při srovnání Au NCs s těmi Au/Ag NCs (6:1).

Bimetalické systémy bez účinku mikrovln měly podstatně nižší IF, což nepochybně souviselo s vyšším obsahem Au atomů v systémech a výsledky účinku mikrovln na Au NCs a Au/Ag NCs (6:1, 10:1) tedy korelovaly. Systematicky byla pozorována dvě maxima u bimetalických systémů bez použití mikrovln (s jedinou výjimkou u 96 % BSA-Au NCs bez MW, kde je patrné pouze jedno maximum IF) ve srovnání s jedním maximem u bimetalických systémů s MW (Tab. 2). S tím také souvisely jiné hodnoty vlnových délek maxim IF při srovnání těchto systémů. Dvě maxima IF mohou souviset s různou afinitou Ag(I) a Au(III) k příslušným aminokyselinovým zbytkům, které jsou v daném prostředí k dispozici, a rychlostí redukce, ke které na těchto centrech dochází.

Tabulka 2: Odečty pozic maxim IF a hodnot IF (Arb. unit) pro bimetalické NCs po měsíci měření

	96 %	98 %	98 % FA free
Au/Ag NCs 6:1 (MW)	IF ₆₁₈ ~ 2,68	IF ₆₀₅ ~ 2,70	IF ₆₆₅ ~ 1,45
Au/Ag NCs 10:1 (MW)	IF ₆₄₄ ~ 2,17	IF ₆₁₆ ~ 0,88	IF ₆₁₈ ~ 1,95
Au/Ag NCs 6:1 (bez MW)	IF ₆₂₀ ~ 1,32 IF ₆₅₀ ~ 1,15	IF ₆₉₂ ~ 0,95 IF ₆₂₀ ~ 0,95	IF ₆₂₃ ~ 0,76 IF ₆₆₅ ~ 0,75
Au/Ag NCs 10:1 (bez MW)	IF ₆₂₀ ~ 1,17 IF ₆₆₀ ~ 0,93	IF ₆₂₅ ~ 0,53 IF ₆₇₀ ~ 0,45	IF ₆₂₀ ~ 0,74 IF ₆₇₀ ~ 0,40

Naše výsledky naznačují, že vliv čistoty BSA na vznik a další vlastnosti nanoklastrů je zcela zřejmý. Znalost mechanismu tohoto vlivu je velice omezena, a i když jsou proteiny jako templáty v syntéze NCs intenzivně studovány, neexistují práce, které by informovaly konkrétně o tom, zda a jak jejich čistota ovlivňuje fluorescenční vlastnosti NCs. Zajímavé by určitě bylo zjistit, jaký vliv na fluorescenční vlastnosti bimetalických NCs může mít postupné přidávání kovových iontů (Au, Ag) v různých poměrech ke směsi BSA, což je však už nad rámec této diplomové práce.

7 Závěr

Z výsledků a diskuze předkládané diplomové práce vyplývají tyto závěry. Zaprvé je ze získaných výsledků zřejmé, že u všech typů nanoklastrů má čistota použitého BSA velký vliv na jejich vznik a výsledné fluorescenční vlastnosti. Dalším důležitým faktorem je čas od počátku syntézy, kdy s rostoucím časovým obdobím fluorescenční aktivita nanoklastrů výrazně roste. Z našich výsledků je dále evidentní, že působení mikrovln jistým způsobem ovlivňuje fluorescenci vznikajících monometalických i bimetalických NCs.

Čistota BSA podstatně mění fluorescenční vlastnosti vznikajících monometalických NCs. Jak víme dále z CD měření, dochází k relativně monotónnímu poklesu obsahu α -helixu a rozvolňování prostorové struktury všech typů zkoumaných BSA během přípravy NCs, a to vlivem změn pH, přídavku kovového iontu a účinku MW. S tím nepochybně souvisí měnící se dostupnost aminokyselin a jejich funkčních skupin (postranních řetězců), které jsou významné, jak je již z literatury známé, pro vznik a tvorbu NCs. Jde zejména o tyrosinové, cysteinové a tryptofanové zbytky.

Molekuly BSA o různé čistotě se evidentně jinak přizpůsobují prostředí nastavenému pro vznik nanoklastrů při příslušném experimentu, díky tomu dochází ke tvorbě nanoklastrů za mírně odlišných podmínek a z toho pak plynou rozdíly v pozorovaných IF těchto nanoklastrů. Je důležité připomenout, že každý atom hraje v nanoklastru roli, takže mírně odlišné podmínky při jejich vzniku mají dalekosáhlý dopad na jejich fluorescenční vlastnosti.

Taktéž se evidentně liší způsob a rychlost redukce Ag(I) a Au(III), je to zejména patrné bez použití MW versus s jejich použitím: redukce Ag(I) probíhá ochotněji než Au(III).

Rovněž na vznikající bimetalické Au/Ag NCs s fluorescenčními vlastnostmi má významný vliv čistota použitého BSA. Dále využití či vynechání MW z procesu při syntéze bimetalických nanoklastrů má dalekosáhlé dopady na jejich vznik a výslednou IF. Je tak ještě více patrné, že účinkem mikrovln je proces redukce Au(III) urychlen, zatímco redukce Ag(I) je potlačena. S ohledem na vyšší obsah Au v bimetalických nanoklastrech je však dominantní potlačení tvorby Au/Ag NCs při nevyužití MW.

Citovaná literatura

Ao, H., Qian, Z., Zhu, Y., Zhao, M., Tang, C., Huang, Y., Feng, H., Wang, A. (2016) A fluorometric biosensor based on functional Au/Ag nanoclusters for real-time monitoring of tyrosinase activity. *Biosensors and Bioelectronics*, **86**: 542-547.

Cao, X.L., Li, H.W., Yue, Y., Wu, Y. (2013) PH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission. *Vibrational Spectroscopy*, **65**: 186–192.

Cui, M., Zhao, Y., Song, Q. (2014) Synthesis, optical properties and applications of ultra-small luminescent gold nanoclusters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **57**: 73-82.

Derrick, M.R., Stulik, D. and Landry, J.M. (1999) Infrared spectroscopy in conservation science, scientific tools for conservation. The Getty Conservation Institute, Los Angeles, p.: 4-15.

Ghosh, A., Han, G., De, M., Kim, Ch.K., Rotello, V.M. (2008) Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**(11): 1307-1315.

Greenfield, N.J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, **1**(6): 2876-90.

Gröhn, F., Bauer, B.J., Akpalu, Y.A., Jackson, C.L., Amis, E.J. (2000) Dendrimer Templates for the Formation of Gold Nanoclusters. *Macromolecules*, **33**(16): 6042-6050.

Hsu, N.Y., Lin, Y.W. (2016) Microwave-assisted synthesis of bovine serum albumin-gold nanoclusters and their fluorescence-quenched sensing of Hg²⁺ ions. *New Journal of Chemistry*, **40**: 1155-1161.

Hu, L., Han, S., Parveen, S., Yuan, Y., Zhang, L., Xu, G. (2012) Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters. *Biosens Bioelectron*, **32**(1): 297–299.

Huang, B.X., Kim, H.Y., Dass, Ch. (2004) Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, **15**(8): 1237–1247.

Huang, P., Li, Z., Hu, H., Cui, D. (2010) Synthesis and characterization of Bovine Serum Albumin-conjugated copper sulfide nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, **2010**.

Huang, Y.Q., Yang, L.N., Wang, Y.S., Xue, J.H., Chen, S.H. (2018) Protamine-stabilized gold nanoclusters as a fluorescent nanoprobe for lead (II) via Pb (II)–Au(I) interaction. *Microchimica Acta*, **185**: 483.

Chan, K.L.A., Hammond, S.V., Kazarian, S.G. (2003) Applications of attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging to pharmaceutical formulations. *Analytical Chemistry*, **75**(9): 2140–2146.

Chen, H., Li, B., Ren, X., Li, S., Ma, Y., Cui, S., Gu, Y. (2012) Multifunctional near-infrared-emitting nano-conjugates based on gold clusters for tumor imaging and therapy. *Biomaterials*, **33**(33): 8461-8476.

Chen, L.Y., Wang, Ch.W., Yuan, Z., Chang, H.T. (2015) Fluorescent gold nanoclusters: recent advances in sensing and imaging. *Analytical Chemistry*, **87**(1): 216–229.

Chi, Z., Hong, B., Ren, X, Cheng, K., Lu, Y., Liu, X. (2018) Investigation on the conformational changes of bovine serum albumin in a wide pH range from 2 to 12. *Spectroscopy Letters*, **51**(6): 279-286.

Johnson, D.W., Callis, J.B., Christian, G.D. (1977) Rapid scanning fluorescence spectroscopy. *Analytical Chemistry*, **49** (8): 747 A-757 A.

Ju, Y.J., Li, N., Liu, S.G., Han, L., Xiao, N., Luo, H.Q., Li, N.B. (2018) Ratiometric fluorescence method for malachite green detection based on dual-emission BSA-protected gold nanoclusters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **275**: 244-250.

Lakowicz, J.R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy (3rd edition), Springer US, p.: 1-26.

Li, D. (2017) Studies on the interaction of cefepime hydrochloride with Bovine Serum Albumin by fluorescence, synchronous fluorescence, three-dimensional fluorescence and circular dichroism. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, **9**: 107-113.

Li, X., Que, L. (2014) Fluorescence enhancement enabled by nanomaterials and nanostructured substrates: A brief review. *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology*, **3**(3): 161-176.

Liu, Y., Dong, P., Jiang, Q., Wang, F., Pang, D.W., Liu, X. (2019) Assembly-enhanced fluorescence from metal nanoclusters and quantum dots for highly sensitive biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **279**: 334-341.

Mathew, A., Thalappil, P. (2014) Noble metal clusters: Applications in energy, environment, and biology. *Particle & Particle Systems Characterization*, **31**(10): 1017-1053.

Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(24): E3095-103.

Mu, X., Yan, C., Tian, Q., Lin, J., Yang, S. (2017) BSA-assisted synthesis of ultrasmall gallic acid-Fe(III) coordination polymer nanoparticles for cancer theranostics. *International journal of nanomedicine*, **12**: 7207-7223.

Oberg, K.A., Fink, A.L. (1998) A new attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution. *Analytical Biochemistry*, **256**(1): 92-106.

- Papadopoulou, A., Green, R.J., Frazier, R.A. (2005) Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(1): 158–163.
- Ravindran, A., Singh, A., Raichur, A.M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. (2010) Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids Surf B Biointerfaces*, **76**(1): 32–37.
- Ritchie, C.M., Johnsen, K.R., Kiser, J.R., Antoku, Y., Dickson, R.M., Petty, J.T. (2007) Ag Nanocluster Formation Using a Cytosine Oligonucleotide Template. *The Journal of Physical Chemistry C*, **111**(1): 175-181.
- Shang, L., Dong, S., Nienhaus, G.U. (2011) Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today*, **6**(4): 401-418.
- Shi, J. (2012) On the synergetic catalytic effect in heterogeneous nanocomposite catalysts. *Chemical Review*, **113**(3): 2139–2181.
- Schuttlefield, J.D., Grassian, V.H. (2008) ATR–FTIR Spectroscopy in the Undergraduate Chemistry Laboratory. Part I: Fundamentals and Examples. *Journal of Chemical Education*, **85**(2): 279.
- Stuart, B.H. (2004) Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: J. Wiley, p.: 1-13.
- Tian, L., Li, Y., Ren, T., Tong, Y., Yang, B., Li, Y. (2017) Novel bimetallic gold–silver nanoclusters with “Synergy”-enhanced fluorescence for cyanide sensing, cell imaging and temperature sensing. *Talanta*, **170**: 530-539.
- Toshima, N. (2009) Core/shell-structured bimetallic nanocluster catalysts for visible-light-induced electron transfer. *Pure and Applied Chemistry*, **72**(1-2): 317-325.

- Toshima, N., Yonezawa, T. (1998) Bimetallic Nanoparticles – Novel Materials for Chemical and Physical Applications. *New Journal of Chemistry*, **22**: 1179-1201.
- Wang, Ch., Wang, Y., Xu, L., Shi, X., Li, X., Xu, X., Sun, H., Yang, B., Lin, Q. (2013) A galvanic replacement route to prepare strongly fluorescent and highly stable gold nanodots for cellular imaging. *Small*, **9**(3): 413–420.
- Wang, J., Ma, S., Ren, J., Yang, J., Qu, Y., Ding, D., Zhang, M., Yang, G. (2018) Fluorescence enhancement of cysteine-rich protein-templated gold nanoclusters using silver(I) ions and its sensing application for mercury(II). *Sensors and Actuators B: Chemical*, **267**: 342-350.
- Wang, J.G., Jang, S.S., Wong, D.S.H., Shieh, S.S., Wu, Ch.W. (2013) Soft-sensor development with adaptive variable selection using nonnegative garrote. *Control Engineering Practice*, **21**(9): 1157-1164.
- Xie, J., Zheng, Y., Ying, J.Y. (2009) Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, **131**(3): 888-889.
- Yu, Y., Geng, J., Ong, E.Y.X., Chellappan, V., Tan, Y.N. (2016) Bovine Serum Albumin protein-templated silver nanocluster (BSA-Ag₁₃): An effective singlet oxygen generator for photodynamic cancer therapy. *Advanced Healthcare Materials*, **5**(19): 2528–2535.
- Zhai, Q., Xing, H., Fan, D., Zhang, X., Li, J., Wang, E. (2018) Gold-silver bimetallic nanoclusters with enhanced fluorescence for highly selective and sensitive detection of glutathione. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **273**: 1827-1832.
- Zhang, L., Han, F. (2018) Protein coated gold nanoparticles as template for the directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Nanotechnology*, **29**(16): 165702.
- Zhang, L., Wang, E. (2014) Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, **9**(1): 132-157.

Zhang, N., Si, Y.M., Sun, Z.Z., Chen, L.J., Li, R., Qiao, Y.C., Wang, H. (2014) Rapid, selective, and ultrasensitive fluorimetric analysis of mercury and copper levels in blood using bimetallic gold-silver nanoclusters with "silver effect"-enhanced red fluorescence. *Analytical Chemistry*, **86**(23): 11714-11721.

Zhao, J.Y., Cui, R., Zhang, Z.L., Zhang, M., Xie, Z.X., Pang, D.W. (2014) Cytotoxicity of nucleus-targeting fluorescent gold nanoclusters. *Nanoscale*, **6**(21): 13126–13134.

Zhao, T., Zhou, T., Yao, Q., Hao, Ch., Chen, X. (2015) Metal nanoclusters: applications in environmental monitoring and cancer therapy. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, **33**(2): 168–187.

Zheng, B. Zheng, J., Yu, T., Sang, A., Du, J., Guo, Y., Xiao, D., Choi, M.M.F. (2015) Fast microwave-assisted synthesis of AuAg bimetallic nanoclusters with strong yellow emission and their response to mercury (II) ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **221**: 386-392.

Internetové odkazy:

Thermofisher Scientific (2010) Introduction to fluorescence techniques. A guide to fluorescent probes and labeling technologies, 11 th edition.

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/Molecular%20Probes%20Handbook/chapter-pdfs/Intro-to-Fluorescence.pdf>,

staženo 3.2.2019

Applied Photophysics Ltd.

<https://www.photophysics.com/circular-dichroism/chirascan-technology/chirality-and-cd/>,

staženo 27.12.2018

Autoři VŠCHT

<http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>, staženo 19.12.2018

Kubala, M.

<http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/OSP1-5Web.pdf>, staženo 19.12.2018