

MASARYKOVA UNIVERZITA

Fakulta přírodovědecká

Ústav biochemie

*Studium biointerakcí s využitím  
kombinace piezoelektrického a  
optického systému*

Student: Bc. David Kovář

Obor: Analytická biochemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Brno 2009

## PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma *Studium biointerakcí s využitím piezoelektrického a optického systému* jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Brno 15. 4. 2009

.....

Kovář David

## PODĚKOVÁNÍ:

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Petru Skládalovi, CSc. za metodické a cíleně orientované vedení při realizaci experimentálních úkolů spojených s touto prací.

Děkuji Mgr. Antonínu Hlaváčkovi za poskytnutí kvantových teček a pomoc při jejich konjugaci.

Dále děkuji své manželce za podporu při studiu a všem, kteří jakkoliv přispěli při realizaci a dokončení této práce.

## Seznam zkratek

APDMES	–	3-aminopropyltrimethoxysilan
APTES	–	3-aminopropyltriethoxysilan
BAW	–	bulk acoustic wave – přímý objemový stříh
FIA	–	flow injection analysis – průtoková injekční analýza
FPW	–	flexural plate wave – prohybová vlna destičky
GA	–	glutaraldehyd
GOPS	–	3-glycidoxypropyltriethoxysilan
QCM	–	quartz crystal microbalance – mikrováčky z křemenného krystalu
QD	–	quantum dot – kvantová tečka
SAW	–	surface acoustic wave – povrchová akustická vlna
SH-APM	–	shear horizontal acoustic plate Mode – stříhová horizontální vibrace
SIA	–	sequential injection analysis – sekvenční injekční analýza
PMMA	–	polymetyl metakrylát
POD	–	peroxidasa
PP	–	polypropylén

# Obsah

I.	Teoretická část.....	1
1	Biosensory.....	1
1.1	Afinitní sensory .....	2
2	Piezelektrický biosensor.....	3
2.1	Piezelektrický jev .....	3
2.2	Piezelektrické materiály .....	4
2.3	Krystalové výbrusy a jejich kmity.....	4
2.4	Piezosensor jako chemické mikrováhy.....	6
2.5	Vliv teploty .....	8
2.6	Metody měření.....	9
2.7	Měřicí přístupy .....	9
2.8	Komerčně dostupné sensory .....	11
3	Kinetika afinitních reakcí .....	12
4	Optický biosensor.....	15
4.1	Optické vlákno.....	16
4.2	Měřicí postupy s optickými vlákny .....	17
4.3	Fluorescenční detekce.....	17
5	Imobilizace biorekogniční vrstvy.....	23
5.1	Aktivace povrchu pomocí thiosloučenin .....	24
5.2	Aktivace povrchu silanizací.....	25
6	Analýza v průtočném uspořádání .....	25
6.1	FIA.....	26
6.2	SIA.....	26
7	Modelové antigeny .....	27
7.1	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	27
7.2	Značený albumin .....	27
7.2.1	Křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7).....	28
7.2.2	Fluorescein a FITC.....	28
7.2.3	Kvantové tečky.....	28
8	Cíl práce .....	30
II.	Experimentální část.....	31

9	Seznamy materiálu .....	31
9.1	Chemikálie.....	31
9.2	Biologický materiál .....	31
9.3	Přístroje, software a jiné zařízení .....	32
10	Metodické postupy .....	33
10.1	Příprava pufrů, růstových medií a experimentálních roztoků.....	33
10.2	Kultivace <i>E. coli</i> a stanovení její koncentrace .....	34
10.3	Konjugace QD .....	38
10.3.1	Konjugace anti <i>E. coli</i> s kvantovými tečkami.....	38
10.3.2	Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 1.....	39
10.3.3	Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 2.....	39
10.3.4	Fluorescenční imunostanovení .....	40
10.4	Příprava krystalů .....	41
11	Schéma a postup měření.....	42
11.1	Rušivé vlivy při měření.....	43
11.2	Průběh a hodnocení signálu .....	44
11.3	Regenerace povrchu .....	44
12	Výsledky měření a diskuse.....	45
12.1	Vhodnost optického systému .....	45
12.2	Modifikované sensory.....	49
12.2.1	Sensor Au/Cys/GA/anti <i>E. coli</i> Abcam.....	49
12.2.2	Sensor Au/Cys/GA/anti <i>E. coli</i> Serotec .....	50
12.2.3	Sensor Au/Cys/GA/anti <i>E. coli</i> Těchonín .....	50
12.2.4	Sensor Au/Cys/GA/anti HSA AL-01 .....	53
12.2.5	Ověření citlivosti optického systému .....	55
12.2.6	Konjugace anti <i>E. coli</i> s kvantovými tečkami – výsledky .....	57
12.2.7	Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 1 – výsledky .....	57
12.2.8	Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 2 – výsledky .....	58
	Souhrn .....	62
	Summary .....	63
	Citovaná literatura .....	64

# I. Teoretická část

## 1 Biosensory

Biosensory (1; 2) jsou analytické přístroje, které poskytují kvalitativní nebo kvantitativní výsledky. Obecně vznikají spojením dvou složek. Biologická složka je citlivá na jeden konkrétní nebo na celou skupinu analytů. Druhou složkou je fyzikálně-chemický převodník, pomocí něhož je biologický signál převáděn na vhodný analytický signál (např. elektrický). Biologická složka (biorekogniční) je s převodníkem v těsném kontaktu, nebo je přímo integrována.



Obr. 1: Schematické znázornění biosensoru

Biologickou složku můžeme dále dělit:

- ❖ Biokatalytická – (enzymy, organely, buňky, tkáně, mikroorganismy) – analyt zpravidla vystupuje jako substrát enzymové reakce a je chemicky přeměňován
- ❖ Bioafinitní – (protilátky, nukleové kyseliny, receptory) – společně s analytem vytváří afinitní komplex

Fyzikálně-chemické převodníky můžeme dělit hned do několika skupin:

- ❖ Elektrochemické (potenciometrie, amperometrie, konduktometrie, voltmetrie)
- ❖ Optické (fotometrie, fluorimetrie, luminometrie, nelineární optika)
- ❖ Piezoelektrické a akustické
- ❖ Kalorimetrické

Biosensory mohou být vysoce selektivní, což je jejich přednost oproti jiným analytickým metodám. Díky snadné obsluze, mnohdy velmi rychlé analýze, nenáročnosti na speciální chemikálie a relativně levnému přístrojovému vybavení nacházejí stále širší uplatnění. Další výhodou je možnost miniaturizace.

Jelikož je cílem práce studium biointerakcí využívající piezoelektrické a optické systémy měření, budou oba podrobněji popsány v níže uvedených odstavcích.

## 1.1 Afinitní sensory

Podstatou bioafinitních sensorů (1; 3; 4) je tvorba specifického komplexu imobilizované biomolekuly a strukturně komplementárního analytu. To je dobře vidět na příkladu antigenu a protilátky za vzniku imunokomplexu. Podle použitého převodníku a interagujících biomolekul existuje celá řada typů afinitních sensorů. Převodníky spadají do oblasti optických, elektrochemických a piezoelektrických zařízení.

Obecný pohled rozlišuje afinitní sensory na přímé a nepřímé. Přímé sensory jsou velmi atraktivní a poskytují zpravidla přesnější studium vzniku biokomplexu než sensory nepřímé - přibližujeme se přirozeným podmínkám tvorby komplexu. U nepřímých sensorů se totiž jeden ze sledovaného páru označí např. vhodným fluoroforem nebo enzymem a převodník zprostředkovává informaci o vazbě značky na svém povrchu. Díky tomuto značení může dojít ke změně konformace biomolekuly a ovlivnění afinity.

Limitujícím faktorem pro afinitní sensory je počet vazebných míst vázaných na sensor, proto existuje rozmanitá řada imobilizačních technik a podle postupu měření je důležité zvolit vhodnou techniku.

Jako příklad jsou uvedeny sensory z oblasti optických a piezoelektrických sensorů, kterých se dotýká tato práce (podtržené jsou metody použité v této práci) – výčet není konečný a existuje celá řada afinitních sensorů založených na jiných převodnicích (4).

**Tabulka 1: Přehled afinitních interakcí a některých afinitních sensorů a jejich metod měření**

<i>Typy afinitních interakcí – reakce mezi:</i>	PZ převodník / metoda	Optický převodník / metoda
antigen × protilátka	SAW / přímá	FRET <sup>1</sup> / přímá
hormon × receptor	<u>QCM / přímá</u>	<u>bio/chemiluminiscence</u> / nepřímá
léčiva × receptor		TIRF <sup>2</sup> / přímá
enzym kofaktor × substrát / inhibitor		SPR <sup>3</sup> / přímá
receptor × mikroorganismus / buňka		IOGC <sup>4</sup> / přímá
nukleová kyselina × vazebná bílkovina		
komplementární řetězec nukleové kyseliny		

Kinetika afinitních reakcí je dána asociační a disociační konstantou, Těto problematice je věnována Kapitola 3.

<sup>1</sup> FRET – Fluorescence energy transfer

<sup>2</sup> TIRF – Total internal reflection fluorescence

<sup>3</sup> SPR – Surface plasmon resonance

<sup>4</sup> IOGC – Integrated optical grating coupler

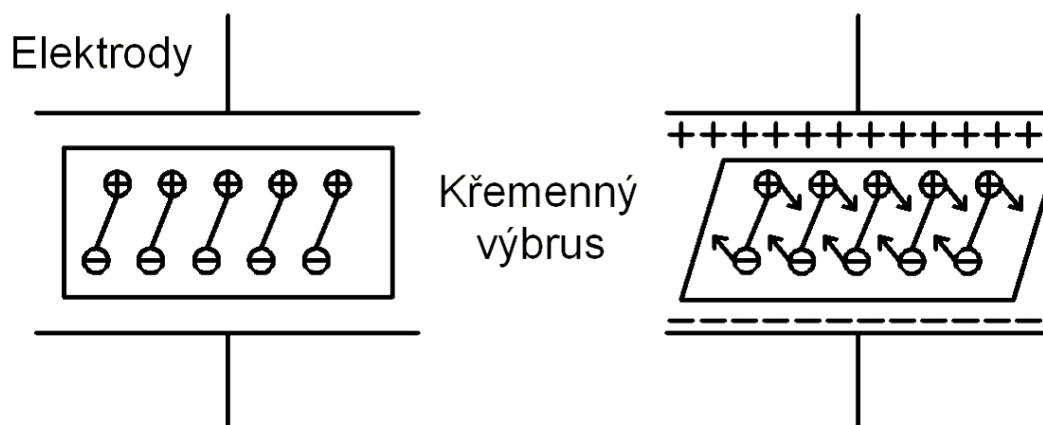


## 2 Piezoelektrický biosensor

### 2.1 Piezoelektrický jev

Roku 1880 byl při krystalografických studiích objeven tzv. piezoelektrický jev (5; 6) (z řeckého  $\pi\epsilon\zeta\omega = \text{piezein} - \text{stlačuji}$ ). Vychází z poznatku, že pokud na krystaly působíme mechanickou silou (tahem, tlakem, ohybem nebo krutem), dochází na takto namáhaných plochách ke vzniku náboje a tedy ke vzniku elektrického napětí. Toto napětí bývá řádově  $10^{-7} V/Pa$  (7). Bratři Pierre a Paul Jacques Curie (Francie) tento jev objevili a poprvé pozorovali u krystalů turmalínu, křemene, topazu, třtinového cukru a Seignettovy (Rochellovy) soli. O rok později byl G. Lippmannem (6) matematicky odvozen a bratry Curie též potvrzen jev opačný (vnější elektrické pole vyvolalo deformaci zkoumaného krystalu).

Piezoelektrický jev vykazují jen krystaly, jejichž elementární buňky postrádají střed symetrie (7). K výrobě piezokrystalů se používají materiály, obsahující kladné i záporné ionty v krystalové mřížce, které se vybrousí (resp. vyříznou) pod určitým úhlem tak, aby jedna plocha nesla kladné a druhá plocha záporné náboje (5). Výbrus se tak stane zdrojem elektrostatického pole o určité intenzitě, která je dána plošnou povrchovou hustotou nábojů a vzdáleností nábojů uvnitř krystalu. Mechanická deformace krystalu pak deformuje i molekuly uvnitř krystalu a to způsobí oddálení těžišť kladně a záporně nabitých iontů, což na výbrusu generuje vznik příslušných stejně velkých nábojů. Elektronový obal je deformován a elektrony se posouvají ve směru síly, která na ně působí - obvykle je tato síla kolmá na optickou i elektrickou osu krystalu (5). Vhodnou analogii tohoto jevu nalézáme při nabíjení kondenzátoru. Opačný jev pak působí deformaci molekul a de facto deformaci celého krystalu (nebo povrchových vrstev) po zavedení vnějšího elektrického pole.



Obr. 2: Opačný piezoelektrický jev na křemenné destičce

## 2.2 Piezoelektrické materiály

Materiály používané pro výrobu sensorů mají přírodní nebo umělý původ.

Přírodní materiály jsou zpravidla monokrystalické a jsou zastoupeny již výše jmenovanými minerály, z nichž největší uplatnění našel křemen (nicméně i ten je ve velké míře vyráběn synteticky). Umělé materiály jsou zastoupeny piezoelektrickou keramikou a organickými polymery.

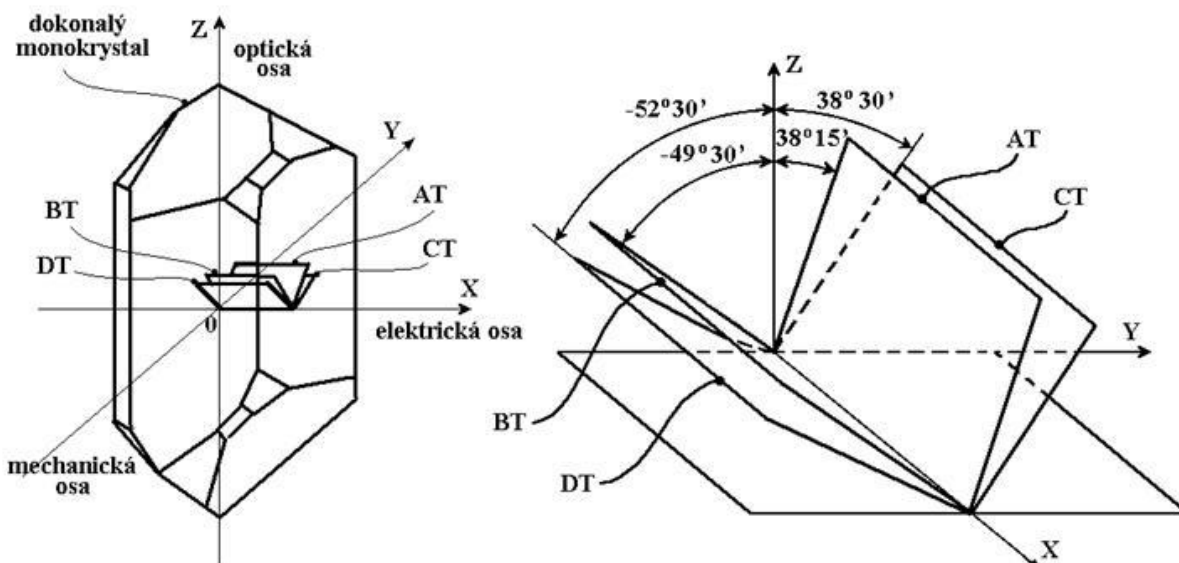
Keramické materiály (8) se navenek jeví jako nepiezoelektrické, ale stávají se piezoelektrickými pouze po polarizaci elektrickým polem (9). Obvykle se jedná o tzv. tuhé roztoky a jsou zastoupeny těmito sloučeninami:  $\text{BaTiO}_3$ ;  $\text{PbZrO}_3$ ;  $\text{PbTiO}_3$ ; a zejména v průmyslu používanými PZT keramikami (odvozeno z latinských názvů prvků) tvořenými binární soustavou  $\text{PbZrO}_3 - \text{PbTiO}_3$  (10). Piezoelektrická keramika nalézá uplatnění při výrobě zapalovačů, generátorů ultrazvuku a v sensorové technice např. pro konstrukci snímačů tlaku.

Organické (piezoelektrické) polymery, též „polární polymery“, se v sensorové technice (zejména průmyslové) používají ve tvaru tenkých filmů. Technologie výroby bývá složitá. Jsou zastoupeny PVC (polyvinylchlorid); PVF (polyvinylfluorid), PVF<sub>2</sub> (difluorpolyetylen). Pro potřeby biosensorů je významný zejména PVDF (polyvinyliden fluorid).

## 2.3 Krystalové výbrusy a jejich kmity

Základem pro výrobu piezosensorů je tenký řez, tzv. krystalový výbrus. Nejpoužívanějším materiálem je křemen v jeho klencové  $\alpha$  modifikaci. Výhodou tohoto použití je jeho nerozpustnost ve vodě – srovnáme-li se Seignetovou solí, která je značně hygroskopická – a také odolnost vůči teplotním změnám – při 579 °C přechází do šesterečné soustavy na  $\beta$  modifikaci a ztrácí piezoelektrické vlastnosti (7; 11; 12).

Z křemenného krystalu můžeme vyrobit několik typů krystalových výbrusů, které mají specifické vlastnosti (podle typu řezu a tloušťky můžeme definovat rezonanční frekvenci). Jako piezoelektrické detektory jsou nejvíce rozšířené výbrusy AT a BT (Obr. 3), přičemž rezonanční frekvence AT řezu je tepelně stálá v rozmezí 10-50°C. Jeho teplotní koeficient je 1 ppm/°C (11).



Obr. 3: Ideální tvar pravotočivého monokrystalu ( $\alpha$  modifikace křemene), roviny výbrusů

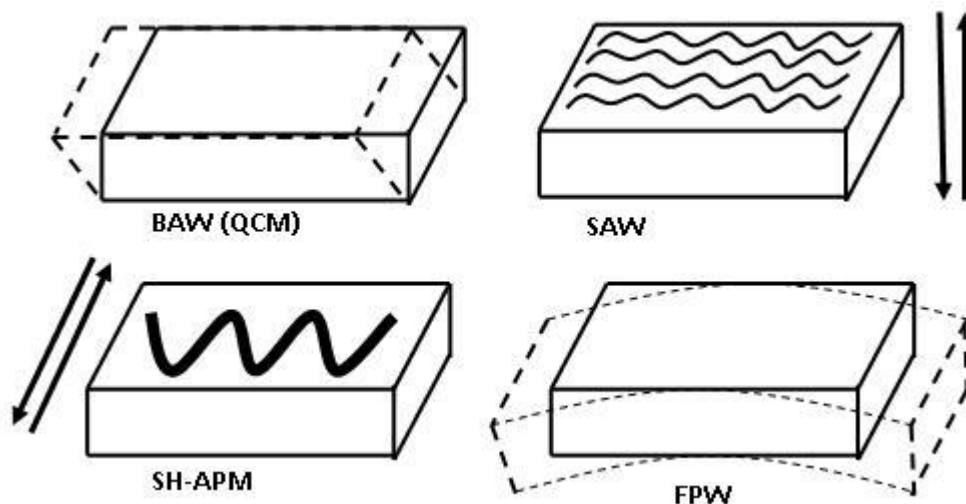
Obr. 4 znázorňuje základní typy oscilací:

BAW – Bulk Acoustic Wave (přímý objemový stříh) = QCM – Quartz Crystal Microbalance

SAW – Surface Acoustic Wave (povrchová akustická vlna)

FPW – Flexural Plate Wave (prohybová vlna) = (Lambova vlna)

SH-APM – Shear Horizontal Acoustic Plate Mode (stříhová horizontální vibrace)



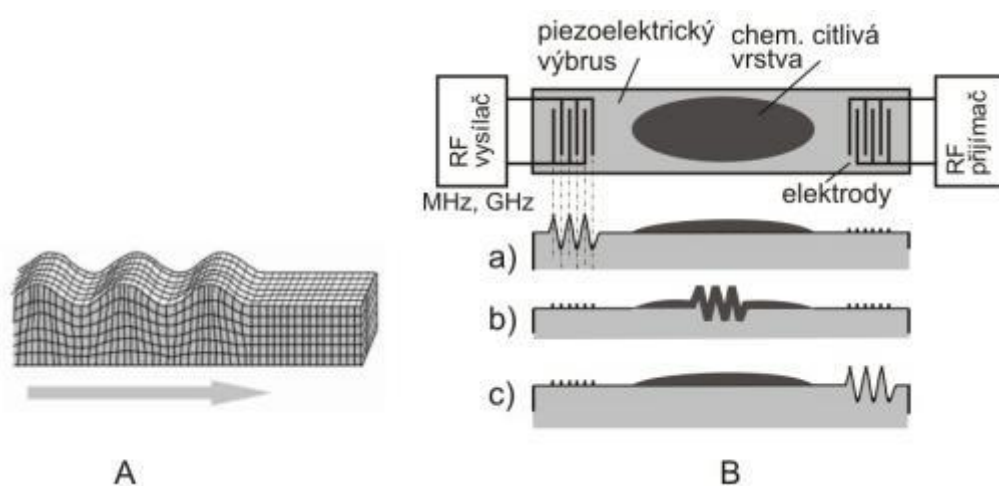
Obr. 4: Kmity krystalových výbrusů (šipky ukazují směr pohybu) (1)

QCM je díky širokému použití v elektrotechnice snadno dostupný a levný. Měření s tímto senzorem je snadné, ale citlivost je o jeden až dva řády horší než u ostatních. Ty vyžadují náročnější instrumentaci a nejsou zdaleka tak rozšířené.

## 2.4 Piezosensor jako chemické mikrováhy

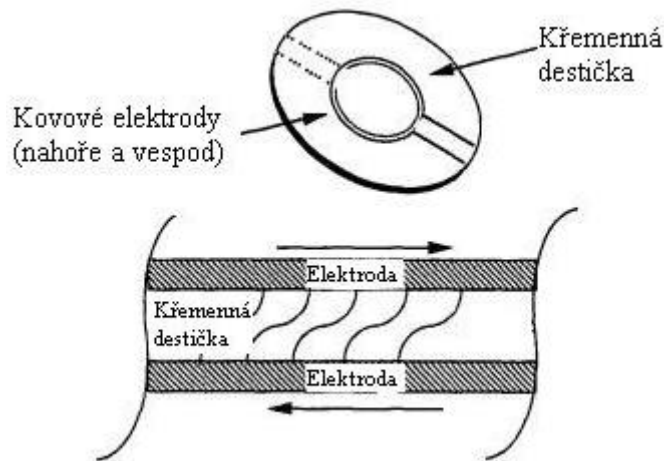
Hmotnostní sensory jsou konstruovány z piezoelektrických materiálů, na jejichž povrchu se nachází citlivá vrstva schopná interakce s analytem. Ta pak vyvolá změnu rezonanční frekvence materiálu, kterou detekujeme. V sensorové praxi se setkáme se dvěma typy hmotnostních sensorů: BAW též označované QCM - křemenné mikrováhy; a druhým typem SAW.

**SAW** sensory využívají povrchové akustické vlny (Rayleighova povrchová vlna), která je generována střídavým napětím vysoké frekvence dvojicí hřebenových elektrod. Vlna se šíří po vhodně modifikovaném selektivně reagujícím povrchu, a je další dvojicí elektrod opětovně převáděna na elektrické napětí. Obě dvojice se nachází na téže straně piezoelektrického materiálu. Analyt adsorbovaný na povrchu, nebo absorbovaný ve vhodném absorbentu imobilizovaném na povrchu, vyvolá změnu rezonanční frekvence ( $\Delta f$ ) – podobně jako v případě BAW. Tato změna je přímo úměrná čtverci rezonanční frekvence a plošné hmotnosti citlivé vrstvy. Povrchovou vlnu lze budít v tenkých filmech piezoelektrika, což oproti BAW umožňuje použít pracovní frekvenci od 10 MHz až do řádově jednotek GHz. Lze dosáhnout detekčních limitů  $10^{-9}$ - $10^{-15}$  g/cm<sup>2</sup>, což reprezentuje např. koncentrace 100 ppb SO<sub>2</sub> ve vzduchu. (13; 14)



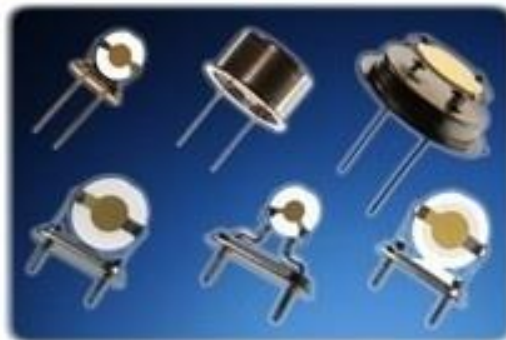
**Obr. 5: (A) Schéma Rayleighovy povrchové vlny (B) princip SAW sensorů**  
a – vznik povrchové vlny v místě vysílacích elektrod, b – ovlivnění povrchové vlny chemicky citlivou vrstvou v přítomnosti analytu, c – generace výstupní frekvence na místě přijímacích elektrod (14)

**QCM** je označení pro citlivé zařízení, které v krátkém časovém horizontu, dokáže měřit i velmi malé hmotnostní změny. Citlivost je přibližně 100× větší než u elektronických vah přesnosti 0,1 mg. Vysoká citlivost a snadná dostupnost tohoto zařízení předurčuje jeho použití v mnoha oblastech (15).



Obr. 6: Běžný typ sensoru se dvěma elektrodami a zvýrazněným kmitáním (12)

QCM je nejdéle využívaný systém pro konstrukci biosensorů tohoto typu. Podstatou QCM sensoru je tenký řez (destička) monokrystalického křemene, vyřezaný pod přesným úhlem (AT řez). Po obou jeho stranách je opatřen *Au*, *Ag* nebo *Pt* elektrodami (nejčastěji metodou napaření). Destička je součástí oscilačního obvodu. Po přivedení střídavého napětí (frekvence blízká rezonanční frekvenci krystalu) se začne střídavě deformovat a tím způsobí vibrační pohyb krystalu a vznik stojatého vlnění o téměř neměnné frekvenci – rezonanční frekvence ( $f_0$ ).



Obr. 7: Ukázka typů piezosensorů (16)

Na obě plochy vhodně aktivovaných (viz kapitoly níže) elektrod se imobilizuje jeden člen interagujícího páru. Druhý člen - analyt - přítomný ve vzorku pak specifickou vazbou vyvolá změnu hmotnosti a pokles frekvence oscilací. G. Sauerbrey (1959) vyjádřil závislost (17) mezi změnou frekvence a hmotností tímto uvedeným vztahem:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad (1)$$

kde:  $\Delta f$  [Hz] je změna frekvence;  $f_0$  [MHz] je základní frekvence oscilátoru;  $\Delta m$  [g] je změna hmotnosti na povrchu krystalu;  $A$  [cm<sup>2</sup>] je plocha citlivé vrstvy;  $\rho_q$  [2.648 g · cm<sup>3</sup>] je hustota křemenné destičky;  $\mu_q$  [2.947 × 10<sup>11</sup> g · cm<sup>-2</sup>] modul pružnosti destičky ve smyku

Dosadíme-li do rovnice (1) konkrétní číselné údaje, dostáváme upravený vztah (2):

$$\Delta f = -2,26 \cdot 10^6 \cdot \frac{f_0^2 \Delta m}{A} \quad (2)$$

Z rovnice plyne, že čím větší je ( $f_0$ ) tím menší změna ( $\Delta m$ ) se projeví na změně frekvence ( $\Delta f$ ). Z toho důvodu se používají řezy o základní frekvenci v rozmezí 1-20 MHz, přičemž nejpoužívanější jsou spíše v rozmezí 5-15 MHz. Např. u krystalu o frekvenci 10 MHz je měřitelná změna frekvence 0,1 Hz způsobena změnou hmotnosti odpovídající 10<sup>-10</sup> g/cm<sup>2</sup> (17; 14).

Rezonanční frekvence ( $f_0$ ) je dána jednak fyzikálními vlastnostmi křemene (řez, hustota, modul pružnosti ve smyku), a jednak také tloušťkou destičky (čím tenčí, tím je  $f_0$  vyšší). Běžné frekvence pro tento typ řezu se pohybují v rozmezí 5-20 MHz. Pro vyšší frekvence jsou destičky příliš tenké a lámou se.

Shora uvedené tvary ovšem platí jen pro měření v plynné fázi. Změna rezonanční frekvence je v tomto případě vyvolána jen změnou hmotnosti systému. Tímto způsobem byly prováděny první analýzy.

Měření v kapalném prostředí bylo možné až od počátku 80. let minulého století. Tedy až poté, kdy se ukázalo, že rezonanční frekvence  $f_0$  je závislá na hustotě  $\rho_L$  a viskozitě  $\eta_L$  kapaliny (18):

$$\Delta f = \sqrt{f_0^3 \frac{\eta_L \rho_L}{\pi \rho_q \mu_q}} \quad (3)$$

## 2.5 Vliv teploty

Jak již bylo uvedeno, je rezonanční frekvence ( $f_0$ ) dána nejen tloušťkou destičky, ale i fyzikálními vlastnostmi křemene (řez, hustota, modul pružnosti ve smyku), které jsou ovlivněny změnou teploty. Také bylo uvedeno, že vysoká stálost rezonanční frekvence AT řezu je v rozmezí 10-50°C (11). Ovlivnění frekvence o 1 Hz je podmíněno změnou teploty o 1°C – tedy efekt téměř zanedbatelný (19). Změnu frekvence vlivem teplotních změn při běžných

laboratorních teplotách můžeme zcela zanedbat jen při měření ve vzduchu nebo ve vakuu. Při měření v kapalně fázi je vliv teploty mnohem vyšší (např. vliv na změnu viskozity) a při delších měřeních by teplota měla být monitorována s přesností na  $0,1^{\circ}\text{C}$  (19).

## 2.6 Metody měření (1)

### ❖ Aktivní metoda

Piezokrystal je součástí širokopásmového oscilačního obvodu, jehož rezonanční frekvence se řídí vlastnostmi krystalu. Aktuální frekvenci udává čítač s rozlišením  $0,1\text{--}1\text{ Hz}$  při základní frekvenci  $10\text{--}20\text{ MHz}$ . Citlivost se pohybuje kolem  $3\text{ ng/Hz}$  a mez detekce kolem  $10\text{ ng/cm}^2$ .

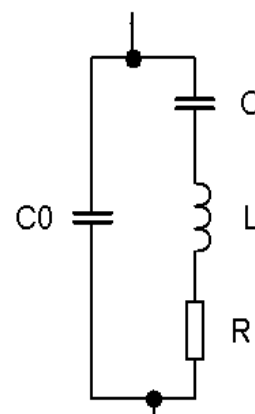
Logická hradla nacházejí uplatnění v oscilačních obvodech nejjednoduššího uspořádání. Jiné oscilační obvody pak využívají operační zesilovače.

Hmotnostní sensory tohoto typu vynikají jednoduchostí a nízkou cenou. Nevýhodou je principiální neodlišitelnost hmotnostních změn od viskozitních.

### ❖ Pasivní metoda

Na piezokrystal se zvenčí přivádí střídavé napětí o známé proměnné frekvenci a v okolí rezonance se proměří impedanční charakteristika - závislost velikosti  $|Z|$  a fázového úhlu  $\theta$  na frekvenci. Postup vyžaduje nákladné zařízení, ale výhodou je odlišení hmotnostních a viskozitních změn.

Odezva piezokrystalu je zpracována pomocí náhradního elektronického schématu (Obr. 8) tvořeného náhradními součástkami.



Obr. 8: Náhradní el. schéma

## 2.7 Měřicí přístupy

### ❖ Měření v plynné fázi

Tento přístup je starší a je zároveň nejjednodušší co do realizace a teorie interpretace odezev. První praktické použití je datováno do roku 1964, kdy King použil QCM detekci pro analýzu uhlovodíků v plynové chromatografii (17).

Metodicky se vychází z postupu, při kterém se vhodně modifikovaný krystal inkubuje s plynným vzorkem, analyt se specificky adsorbuje na povrchu a vyvolá zvýšení hmotnosti krystalu, což se projeví změnou frekvence. Postup je závislý na teplotě a relativní vlhkosti.

Vývoj této oblasti je soustředěn zejména na vhodné biospecifické vrstvy a jejich postupy imobilizace – cílem je dosažení vysoce citlivých biosensorů pro nejrůznější použití.

Sensor lze použít i tak, že se inkubuje v kapalném vzorku s analytem, následuje osušení a měření v plynné fázi – nevýhodou může být reprodukovatelné sušení a čas k tomu potřebný, výhodou naopak vysoká citlivost takového zařízení.

Použití nachází v analýzách atmosféry a jejích součástí – kontrola environmentálního znečištění. Nevýhodou je jistá nelinearita odezvy. Obecně se pro plyny dosahuje detekčních limitů v rozmezí 1–10 ppm. Příklady vhodných sorbentů a stanovovaných plynů jsou uvedeny níže (Tabulka 2).

**Tabulka 2: Příklady stanovení plynů pomocí SAW a QCM; použité sorbenty a hodnoty některých LOD**

<i>Plyn (pára)</i>	<i>Citlivá vrstva</i>	<i>Limit detekce (LOD)</i>
<i>H<sub>2</sub></i>	<i>Pd</i>	<i>50 ppm</i>
<i>NH<sub>3</sub></i>	<i>Pt</i>	<i>&lt; 0,5 %</i>
<i>NH<sub>3</sub></i>	<i>sorbová kys. s AgNO<sub>3</sub></i>	
<i>NO<sub>2</sub></i>	<i>Pb-ftalocyanin</i>	<i>0,5 ppm</i>
<i>H<sub>2</sub>S</i>	<i>WO<sub>3</sub></i>	<i>&lt; 10 ppm</i>
<i>SO<sub>2</sub></i>	<i>triethanolamin</i>	<i>10 ppb</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>polyimid</i>	<i>1,1 kHz/% rel. vlhkosti</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>LiCl v želatině</i>	
<i>toluen</i>	<i>carbowax550</i>	
<i>organofosfáty</i>	<i>fluoropolyol</i>	<i>0,03 ppm</i>

### ❖ Měření v kapalně fázi

Měření v kapalně fázi je mladší z obou měřících přístupů, protože je teoreticky složitější a experimentálně náročnější. Až v počátku 80. let byl matematicky odvozen vztah, který bere v úvahu vliv kapaliny na tlumení vibrací. Ukázalo se, že oscilace krystalového výbrusu je ovlivněna jen tenkou vrstvou kapaliny při povrchu krystalu. Svou roli zde hraje viskozita a hustota kapaliny. Vyřešení tohoto problému umožnilo piezosensorové měření v kapalinách, které se tak hojně rozšířilo. Patrně nejvýhodnější je použití průtočného systému, kdy je krystalový výbrus těsně uzavřen v průtočné cele, kterou kontinuálně proudí pracovní roztoky reagentů a vzorky. Nevýhodou je nerozlišitelnost viskozitních změn od změn hmotnostních, ale chybu lze odstranit vhodnou kalibrací. Nespornou výhodou je ekonomicky i časově nenáročný způsob sledování molekulových interakcí v reálném čase.



## ❖ Multikomponentní analýza

Piezokrystaly nacházejí uplatnění i v multikomponentní analýze, např. při konstrukci elektronických nosů (v angličtině též pojem *artificial olfactory systems*). Využívá se senzorové pole různě modifikovaných QCM citlivých pro různé analyty. Výsledné soubory signálů a dat pak vytváří jakési knihovny („otisky prstů“), na jejichž základě je možno identifikovat komponenty výchozí směsi analytů.

## 2.8 Komerčně dostupné sensory

Na trhu je několik komerčně dostupných QCM systémů, jedním z nich je zařízení ANTQ300 (ANT Technology Co.; Taiwan), které pracuje s vysoce selektivním QCM senzorem ve FIA uspořádání. Dalším přístrojem je NAPiCOS (Nihon Dempa Kogyo; Japan), které je použité pro klinické, imunologické, potravinářské i environmentální testování – přístroj byl představen v říjnu 2008 na výstavě CEATEC JAPAN 2008.

Následuje výčet několika zařízení použitelných v oblasti biosenzorů i mimo ni, která jsou komerčně dostupná, nebo jsou používána k výzkumným účelům.

**Q-Sense E1 a Q-Sense E4** (Q-Sense; Švédsko)

**QCM-3** (QCM lab; Švédsko)

**QCM-Z500** Multifrequency QCM with Impedance Monitoring (KSV Instruments; Finsko)

**Attana 200; Attana A100 a A100 C-Fast System** (Attana AB; Švédsko)

**EQCN-700 a EQCN-900** Electrochemical Quartz Crystal Nanobalances (Elchema; USA)

**PZ-105** gas phase detektor; **PZ-1000** immunobiosensor (Universal Sensors, Inc.; USA)

**QCM100 a QCM200** (Stanford Research Systems, Inc.; USA)

**QCMagic** (ElbaTech; Itálie)

**QCA-917** quartz crystal analyser (EG&G Princeton Applied Research, USA)

**PM-700** series (Maxtek, USA)

**Mark series** thermoelectricpiezoelectric detektor; **Mark series** cryogenic quartz crystal microbalances (QCM Research; USA)

**GasLab 21; LiquiLab 21; QMBLab** (Institute for automation and communication; Německo)

**EMMA Multigas** (Gambro Engstrom AB; Švédsko)

Zajímavé je zařízení EMMA (*Engstrom Multigas Monitor for Anaesthesia*), které je od 80. let používáno ke klinickému monitorování vydechovaných anestetik na bázi halogenova-

ných uhlovodíků. Anestetikum je vedeno přes dva piezokrystaly – jeden s aktivovaným povrchem, druhý holý slouží jako reference.

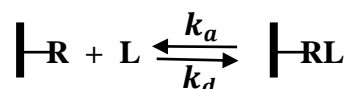
### 3 Kinetika afinitních reakcí (20)

Řada biochemických oblastí se neobejde bez kvantitativní charakterizace afinitních interakcí. Obecně jsou metody studia afinity založeny na dosažení rovnovážného stavu po smísení studovaných interagujících látek a následné separaci jednotlivých komponent.

K tomuto studiu se používá specifické značení – izotopové, fluorescenční nebo enzymové. Získané údaje však neposkytují „pravý“ kinetický charakter reakcí, nevýhodou je častá ztráta nativních vlastností zkoumaných biomolekul.

Pro určení přesných údajů o interakci studovaných členů je vhodné tento děj sledovat přímo. A k tomuto účelu je výhodné použití řady biosensorů včetně piezoelektrických. Principem měření je interakce afinitního páru – jeden člen je imobilizován na povrchu biosensoru a druhý volný člen se nachází v roztoku. Vzniklá interakce vyvolá tvorbu afinitního komplexu v citlivé oblasti a tím změnu fyzikálně-chemických vlastností biosensoru, zároveň poskytuje analytický signál a v reálném čase přímou informaci o interakci.

#### ➤ Sledování asociace a disociace molekul



Metoda je založena na jednoduchém principu. Na povrchu biosensoru je imobilizován R – receptor a na něj se váže vazebný partner L – ligand, který je volný v roztoku a při použití průtočného uspořádání se jeho koncentrace téměř nemění. V průběhu interakce vzniká komplex RL, který můžeme charakterizovat kinetickými rychlostními konstantami – asociací ( $k_a$ ) a disociační ( $k_d$ ). Rychlost tvorby komplexu je dána následující rovnicí:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a[R][L] - k_d[RL] \quad (4)$$

Po ustavení rovnováhy ( $\frac{d[RL]}{dt} = 0$ ) jsou koncentrace všech forem dány rovnovážnými konstantami ( $K_a$ ) a ( $K_d$ ) pro něž platí:

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{k_a}{k_d}$$

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad (5)$$

Množství vznikajícího komplexu RL je úměrné měřenému signálu. U piezosensoru je změna hmotnosti komplexu RL sledována v reálném čase jako změna rezonanční frekvence krystalového výbrusu. Měření je zpravidla prováděno v průtočném systému, kdy je vhodně modifikovaný sensor umístěn v průtočné cele a je zajištěn stálý tok pracovního pufru a pravidelné dávkování vzorků.

Měřicí postup je následující: ustaví se základní linie při průtoku pracovního pufru celou a následně se aplikuje zóna vzorku, díky interakci obou členů dojde ke zvýšení hmotnosti sensoru a poklesu rezonanční frekvence. Po ustálení (ne úplném) frekvence se do cely asi po 10 minutách opět aplikuje pracovní pufr. Tím dojde k disociaci komplexu a v ideálním případě ke změně frekvence až na původní hodnotu v základní linii.

Z experimentálních křivek (asociačních a disociačních) lze vypočítat kinetické konstanty pro studovaný afinitní pár. Podle tvaru křivek se volí typ výpočtu kinetických konstant, ovšem ne vždy je možno vypočítat všechny parametry.

Analýza křivek je následující: Základní linii je přiřazena nulová hodnota ( $Y_0$ ), přičemž vazebná kapacita sensoru je úměrná celkové změně signálu po obsazení všech molekul receptoru na povrchu sensoru ligandem ( $Y_{max}$ ). V průběhu vazby je zbývající množství volného místa úměrné rozdílu ( $Y_{max} - Y$ ), kde ( $Y$ ) je aktuální hodnota signálu. Množství vázaného ligandu je přímo úměrné  $Y$ . Rovnici (4) lze psát ve tvaru:

$$\frac{dY}{dt} = k_a c (Y_{max} - Y) - k_d Y \quad (6)$$

Úpravou lze psát:

$$\frac{dY}{dt} = k_a c Y_{max} - Y(k_a c + k_d) \quad (7)$$

### ➤ Nelineární regrese

K určení kinetických parametrů z experimentálních závislostí ( $Y$ ) na čase ( $t$ ) lze použít dva odlišné postupy, linearizaci transformací nebo nelineární regresi. Exaktnější metodou z obou jmenovaných je nelineární regrese. Postup pro určení kinetických konstant z experimentálně naměřených údajů vede přes integraci rovnice  $dY/dt = k_a c Y_{max} -$

$Y(k_a c + k_d)$  (7) podle času. Integrace vede k výrazu popisujícímu závislost velikosti signálu ( $Y$ ) na čase ( $t$ ):

$$Y = \frac{k_a c Y_{max} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}}{k_a c + k_d} \quad (8)$$

Jediný experiment tak umožní získat požadované kinetické konstanty. Zavedením ( $Y_{eq}$ ) – tedy velikosti signálu při dosažení rovnovážného stavu (i když se reálně při měření obvykle až tak dlouho nepokračuje), lze celý výpočet zjednodušit:

$$Y_{eq} = \frac{k_a c Y_{max}}{k_a c + k_d} = \frac{c Y_{max}}{c + K_D} = \frac{K_A c Y_{max}}{c + K_A} \quad (9)$$

Kombinací rovnic (8) a (9) získáme rovnici:

$$Y = Y_{eq} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\} \quad (10)$$

Tento vztah lze dále zjednodušit zavedením substituce ( $k_{obs} = k_a c + k_d$ ).

Kinetické konstanty se pak určují vynesáním ( $k_{obs}$ ) proti koncentraci volného vazebného partnera.

Velkým pozitivem metody je její univerzálnost, lze ji použít i v případě, kde linearizace selhává nebo není principiálně použitelná.

Metodu lze použít i pro odlišení dvou současných paralelních dějů (např. specifické a nespecifické adsorpce). Také je možné uvažovat vliv nestability základní linie, případně změny signálu vlivem pracovního roztoku.

### ➤ Určení disociační konstanty

Matematické nepřesnosti nedovolují určení disociační konstanty přímo z výsledků asociční fáze. Proto je výhodnější určit disociační konstantu nezávislou analýzou z disociační křivky.

Komplex (RL) se při promývání pracovním roztokem rozpadá a volný ligand (L) je vymýván. Kineticky je stav popsán rovnicí (4) přičemž  $[L]=0$  a výsledný vztah je roven  $dY/dt = -k_d Y$ . Představuje-li signál ( $Y_a$ ) výchozí množství ligandu na povrchu sensoru je vztah po integraci vyjádřen rovnicí:

$$Y = Y_a \exp(-k_d t) \quad (11)$$

Z experimentální disociační křivky lze parametry ( $k_d$ ) a ( $Y_a$ ) určit nelineární regresí nebo jednoduchým logaritmováním rovnice **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**:

$$\ln Y = \ln Y_a - k_d t \quad (12)$$

## 4 Optický biosensor

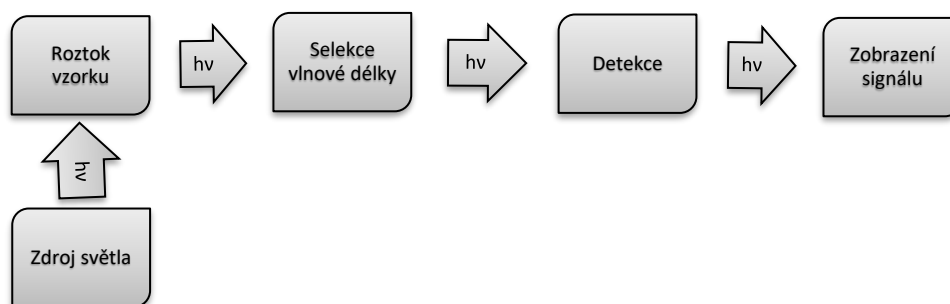
Optický biosensor vzniká spojením několika částí: začíná optickým zdrojem, pokračuje detekční složkou (planární světlovod, optické vlákno) a končí vhodným fotodetektozem. Zařízení měří změny intenzity světla, nebo změny optických vlastností biomateriálu. Principiálně nejjednodušší je měření absorbance, jiné přístupy využívají měření fluorescence nebo luminescence. Pro konstrukci biosensorů se nejčastěji používají optická vlákna, ale časté jsou i planární světlovodné systémy.

V následující části bude blíže specifikována problematika optických vláken a souvisejících biosensorů<sup>5</sup>.

Principy základních optických měřících technik jsou znázorněny na následujícím schématu.



**Obr. 9: Schéma měřícího uspořádání pro absorbanci nebo chemiluminescenci (ta funguje bez zdroje světla)**



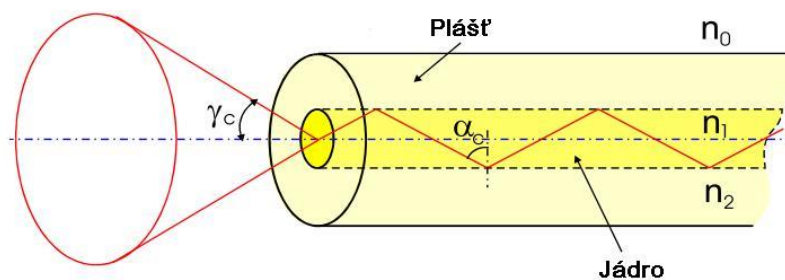
**Obr. 10: Schéma měřícího uspořádání pro fluorescenci**

<sup>5</sup> Planární světlovody a jim příslušející biosensory jsou nad rámec této práce, proto nejsou součástí ani tohoto teoretického úvodu.

## 4.1 Optické vlákno

Technologie, která od roku 1966 doslova způsobila revoluci v telekomunikacích, si našla uplatnění i v sensorové technice. Optická vlákna (světlovody) jsou využita k měření na dlouhé vzdálenosti a díky flexibilitě a miniaturizaci umožňují provádět měření i v hůře přístupném prostředí. Obecně jsou nejčastěji využívána jen k pasivnímu vedení světla do citlivé vrstvy, kde dochází k absorpci, vyvolání emise fluorescenčního záření, nebo odrazu. Opticky změněný paprsek je pak veden zpět do detektoru a to pomocí stejného, nebo jiného vlákna. V detektoru je optický signál převeden na signál elektrický a ten je vyhodnocován. Nesporná výhoda v použití optických vláken je v prostředí s elektromagnetickým rušením. (13)

Optické vlákno je vodič světla složený ze dvou optických materiálů s různým indexem lomu, z nichž jeden tvoří tzv. jádro, druhý tzv. obal. Při vhodné kombinaci materiálů dochází na rozhraní jádra a obalu k totálnímu odrazu světla s velmi malými ztrátami, a vlákno tak může vést světlo na vzdálenost i stovek kilometrů. (2)



Obr. 11: Numerická apertura a vedení paprsku vláknem

Numerická apertura (21) vyjadřuje maximální úhel, pod jakým mohou dopadat světelné paprsky do optického vlákna, aby jím byly šířeny. Tato bezrozměrná charakteristika optického vlákna je dána vztahem:

$$NA = n_0 \sin \gamma_c = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (13)$$

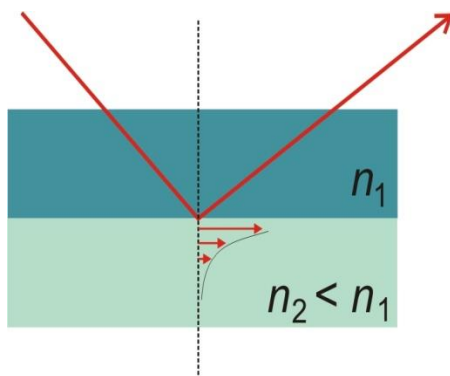
kde:  $n_0$  index lomu okolního prostředí;  $n_1$  index lomu jádra;  $n_2$  index lomu pláště;  $\gamma_c$  úhel vstupu [°]

Maximální hodnota je 1,0 ale v praxi se pohybuje v rozmezí 0,1–0,5.

## 4.2 Měřicí postupy s optickými vlákny

V praxi se používají dva způsoby použití optických vláken:

- Přímé ozařování (extrinsic sensing) – k interakci světla s analytem dochází na konci optického vlákna; chemicky citlivá vrstva leží mimo vlákno; vlákno slouží k pasivnímu vedení světla.
- Nepřímé ozařování (intrinsic sensing) – vlákno neslouží jen jako pasivní vodič, ale sledují se chemické změny v těsném okolí světlovodu vyvolané změnou podmínek pro vedení světla uvnitř tohoto světlovodu. Využívá se interference mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem, dochází ke vzniku elektro-magnetického stojatého vlnění, které je kolmé k odražejícímu povrchu a jehož intenzita exponenciálně klesá se vzdáleností od povrchu. Toto vlnění se nazývá tlumená (evanescent wave), zhášivá či exponenciální vlna.



Obr. 12: Totální odraz a vznik exponenciální vlny

Příkladem nepřímého ozařování je fluorescenční sensor pro stanovení kyslíku – na povrch vlákna je v hydrogelu imobilizován komplex tris(4,7-difenyl-1,10-fenantrolin)ruthenatý; v přítomnosti kyslíku dochází ke zhášení fluorescence; jedno a totéž vlákno tak nese budící záření od zdroje k místu interakce a odtud dále vede záření fluorescenční (14).

Pro fotometrický převodník byl Opitzem a Lübbesem definován výraz „optoda“ (někdy též optroda, analogický elektrodám používaným jako elektrochemické převodníky (22)).

## 4.3 Fluorescenční detekce

Existuje řada optických metod, které jsou používány ke studiu biomolekul. Fluorescenční detekce je jednou z nich a její předností je vysoká citlivost (vzhledem k absorbanci) a jedno-

duchost provedení. Obecně se používá jako řadová spektrofotometrická detekce, nebo jako fluorescenční mikroskopická detekce. Je založena na fyzikálně-chemickém ději, který je označován jako luminiscence – výraz je společným označením pro řadu dějů.

### **Luminiscence**

Luminiscence je proces, při kterém excitované molekuly přecházejí do základního stavu za současného vyzáření energie - hlavně světelného záření a jen minimálního zanedbatelného množství tepla (proto se luminiscence někdy označuje jako studené světélkování). Excitovaný stav (stav o vyšší energii) vzniká přijetím vymezeného množství (kvanta) energie. Takovýto energetický stav je nestabilní – velmi krátká životnost řádově ve zlomcích sekundy - a přechází zpět do stavu základního za vyzáření energie. Podle druhu budící energie rozlišujeme několik typů luminiscence. Nejvíce významnou pro biochemii je přeměna chemické energie ~ chemiluminiscence (bioluminiscence – specifický typ) a energie fotonu UV-VIS záření ~ fotoluminiscence (formálně dělíme do dvou kategorií: fluorescence; fosforescence).

### **Fluorescence**

- Emise z excitovaných singletových stavů
- Fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí rychle mizí
- Doba dohasínání<sup>6</sup> je řádově 1 – 10 nanosekund
- Pozn.: světlo urazí za 1 ns 30 cm

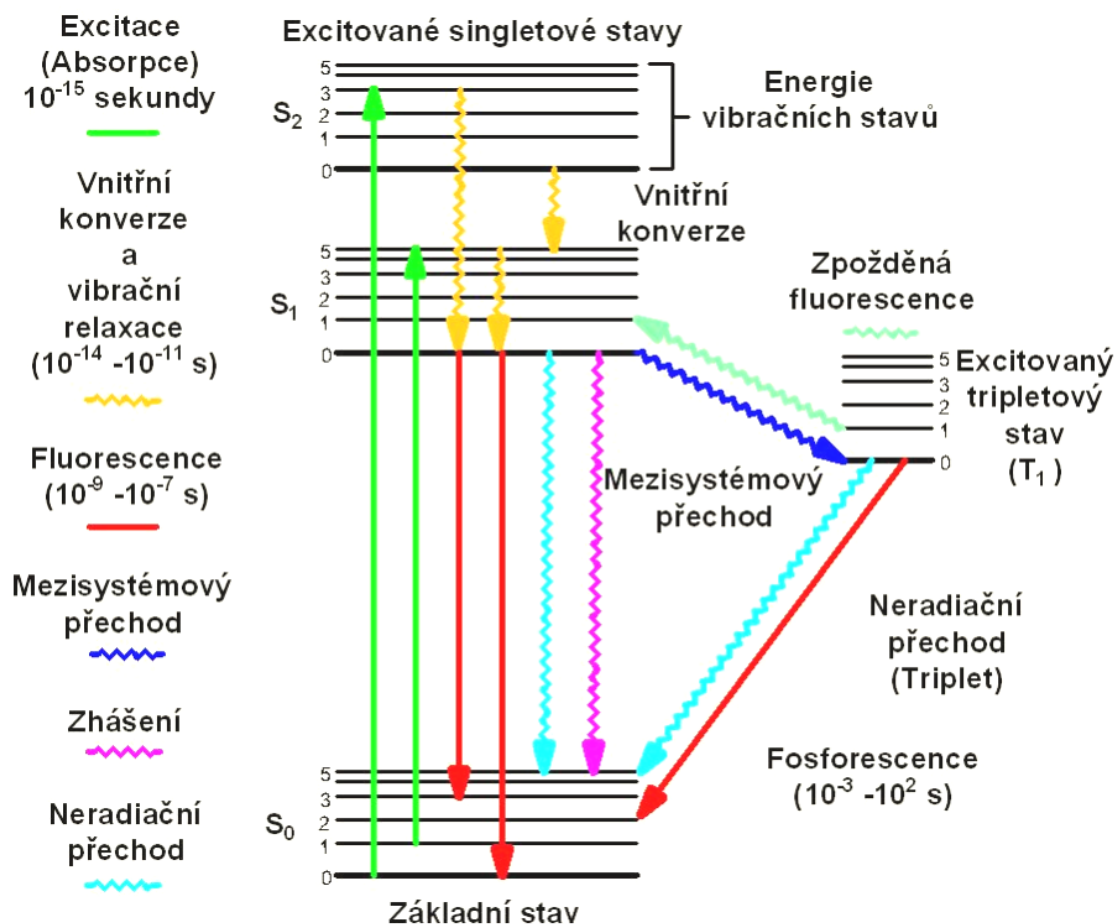
### **Fosforescence**

- Emise z excitovaných (zakázaných) tripletových stavů
- Fosforescence má mnohem delší dobu dohasínání než fluorescence
- Doba dohasínání řádově milisekundy až sekundy
- Pozn.: světlo urazí za tu dobu 300 až 300000 km

---

<sup>6</sup> Doba dohasínání -  $\tau$  ~ “lifetime“ - je průměrný čas, který uplyne od excitace po emisi





Obr. 13: Jablonského diagram – zářivé a nezářivé přechody

### Stokesův zákon

„Vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla“

$$\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$$

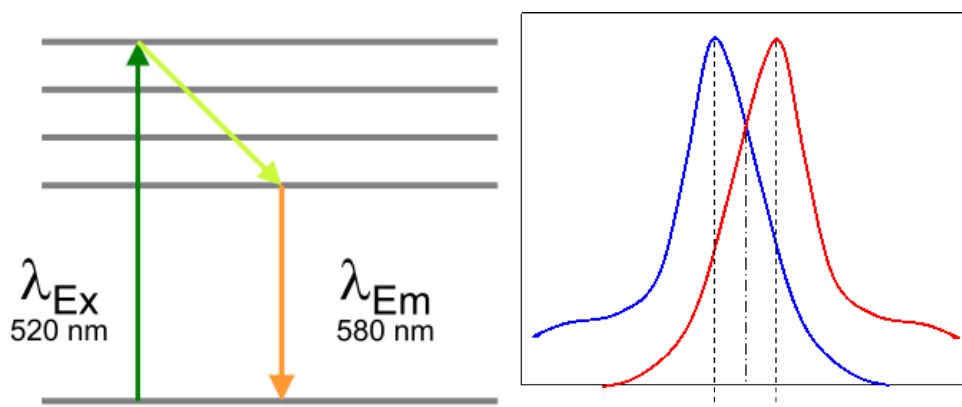
Změna je dána částečnou ztrátou energie (tepla) při přechodu z vyšších excitovaných elektronových stavů do metastabilního nejnižšího excitovaného stavu

### Stokesův posun a zákon zrcadlové symetrie

Zrcadlová symetrie platí pro množství organických látek a je dána stejnou relativní pravděpodobností absorpce a emise v odpovídajících si vibračních hladinách. Absorbující i emitující molekuly se většinou nacházejí v rovnovážném vibračním stavu, vibrační struktura základního i excitovaného stavu je přitom stejná. Elektron absorbující energii přechází z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_1$ , následuje rychlá vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu  $S_1$  – teprve nyní následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_0$  a vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu  $S_0$ . Následkem toho vzniká zrcadlová symetrie absorpčního a emisního

fluorescenčního spektra. Praktický důsledek zrcadlové symetrie je zjištění absorpčního spektra z fluorescenčního spektra i při velmi nízké koncentraci vzorku.

Emise má vždy menší energii (větší  $\lambda$ ) než je energie absorbovaná (menší  $\lambda$ ). Stokesův posun pak vyjadřuje rozdíl energií mezi maximem absorpčního a maximem fluorescenčního emisního spektra - je to specifická charakteristika daného flouroforu.



Obr. 14: A) Stokesův posun spojený s vnitřní konverzí energie; B) zrcadlová symetrie

### Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek  $Q$  ( $\Phi$ ) je poměr počtu emitovaných a absorbovaných fotonů za sekundu. Udává účinnost, s jakou budící fotony vyvolávají fluorescenci. Maximální hodnota kvantového výtěžku je 1, skutečná je zpravidla nižší, protože dochází k nežádoucím přechodům molekul z excitovaného stavu.

Tabulka 3: Kvantový výtěžek některých fluoroforů (23)

Fluorofor	Q [%]	Podmínky	Excitace [nm]
Cy3	4	PBS	540
Cy5	27	PBS	620
kresyl violet'	53	MetOH	580
fluorescein	95	0,1M NaOH; 22°C	496
POPOP	97	Cyklohexan	300
chinin sulfát	58	0,1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 22°C	350
rhodamin 101	100	EtOH	450
rhodamin 6G	95	H <sub>2</sub> O	488
rhodamin B	31	H <sub>2</sub> O	514
tryptofan	13	H <sub>2</sub> O; 20°C	280
tyrosin	14	H <sub>2</sub> O	275

POPOP = 1,4 – bis(5-fenyloxazol-2-yl)benzen

Největších kvantových výtěžků dosahují rodaminové fluorofory (~1,00) a fluorescein (0,95). (23)

Charakteristické je teplotní zhášení luminiscence, tj. snižování kvantového výtěžku s teplotou.

### **Absorpční a emisní spektra – vliv prostředí**

Solvatace fluoreskujících molekul je způsobena elektrostatickými interakcemi (dipól-dipól; dipól-indukovaný dipól) mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla. Dipólový moment se mění v závislosti na základním nebo excitovaném stavu molekuly, vlivem různosti solvatace pak dochází ke změnám optických spekter. Relaxace molekuly je delší než rychlost elektronového přechodu, obvykle však kratší než doba života excitovaného stavu. Teprve po dosažení rovnovážného stavu dochází k emisi. Energie emitovaného fluorescenčního záření je menší, než odpovídá čistému elektronovému přechodu. To nastává v důsledku spotřeby energie při relaxaci molekul rozpouštědla v okolí fluoroforu a to jak v excitovaném tak v základním stavu.

### **Intenzita fluorescence**

Je úměrná součinu intenzity absorpce, kvantového výtěžku fluorescence a koncentrace fluoreskující látky:

$$I_f = 2,303\Phi_f I_0 \alpha c l \quad (14)$$

kde:  $\Phi_f$  kvantový výtěžek fluorescence;  $I_0$  – intenzita excitačního záření;  $\alpha$  – absorpční koeficient;  $l$  – optická dráha médiem;  $c$  – koncentrace luminoforu

Při běžném luminiscenčním měření je intenzita emitovaného záření detekována kolmo k budícímu paprsku. Limit detekce je řádově v ppb.

Je ovlivněna několika jevy. Efekt vnitřního filtru vzniká absorpcí budícího záření v povrchových vrstvách kolmých k rovině budícího záření. Vzdálenější vrstvy jsou tedy excitovány nižší intenzitou. Tato chyba se projevuje pouze u silněji absorbujících roztoků.

Doba dohasínání (doba života) je průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního. Za nepřítomnosti neradiačních zhášecích procesů hovoříme o vnitřní (přirozené, nebo též radiační) době života –  $\tau_n$ .

### Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence (resp. intenzitu fluorescence) a to beze změny fluorescenčního emisního spektra. Vzniká z několika příčin.

Dynamické zhášení nastává deaktivací excitovaného stavu při srážce s molekulou zhášedla. Nedochází k chemické změně jako v případě statického zhášení, kdy se vytváří nefluorescenční komplex.

Samozhášení nastává při vysokých koncentracích fluoroforu samého, nebo vysoké hustotě značení. Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno Sternovou-Volmerovou rovnicí:

$$\Phi_0/\Phi = 1 + k_q\tau_0|Q| \quad (15)$$

kde:  $\Phi_0$  je kvantový výtěžek za nepřítomnosti zhášedla;  $\Phi$  kvantový výtěžek za přítomnosti zhášedla;  $k_q$  bimolekulární zhášecí konstanta;  $\tau_0$  doba dohasínání v nepřítomnosti zhášedla.

Nejčastějším dynamickým zhášedlem fluorescence i fosforescence je molekulární kyslík ( $O_2$ ). Vlivem mezisystémové konverze jsou to i atomy halogenů jako bróm a jód. Používaným zhášedlem je akrylamid.

Sternovou-Volmerovou rovnicí je popsáno i statické snížení fluorescence:

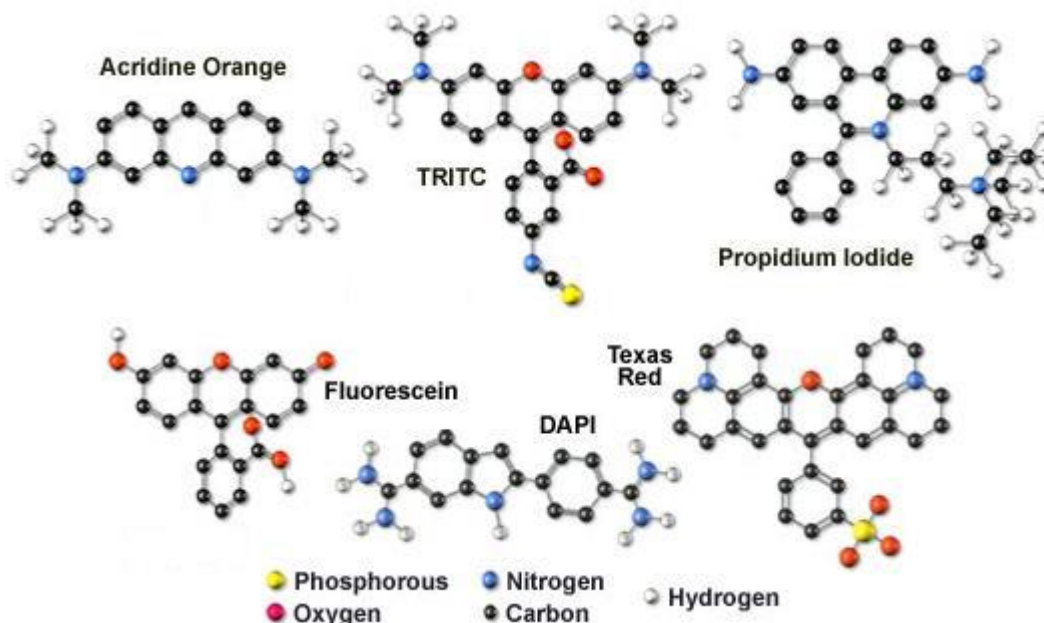
$$\Phi_0/\Phi = 1 + K_A\tau_0|Q| \quad (16)$$

kde:  $K_A$  je asociační konstanta fluoroforu a zhášedla

Typická statická zhášedla jsou base NK, nikotinamid, těžké kovy.

### Fluorescenční barviva

Nejčastěji organické látky charakteristické svou intenzivní fluorescencí. Obvykle s aromatickou strukturou nebo s konjugovanými dvojnými vazbami, zejména látky s nepohyblivou planární strukturou. Větší struktury a více konjugované mají významnější výtěžek fluorescence oproti fosforescenci. Výhodná je přítomnost skupin schopných reagovat s nukleofilními skupinami ( $NH_2$ ;  $OH$ ;  $SH$ ) biomolekul. Vznikající konjugáty se pak používají v mnoha diagnostických postupech.



Obr. 15: Některá fluorescenční barviva<sup>7</sup>

## 5 Imobilizace biorekogniční vrstvy

Pro správnou funkci biosensoru je nezbytné, aby biologická složka byla pevně uchycena k převodníku. Tak, aby neunikala do prostředí a zároveň umožnila opakované použití senzoru (ovšem ne vždy je toto podmínkou, viz komerční glukometry s výměnnými pásky). Dále je nutno zajistit, aby si imobilizovaná biologická složka ponechala svoji nativní aktivitu. Je nutno zajistit optimální podmínky (pH, obsah solí, teplota), aby použité enzymy a protilátky nedenateurovaly, a použité buňky si ponechaly svou životaschopnost.

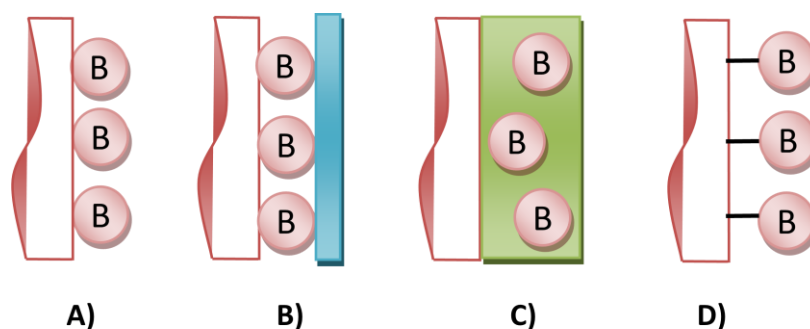
Modifikovaný povrch senzoru jednak poskytuje specifické vazebné nebo katalytické skupiny schopné rozeznat cílový analyt ve vzorku, a jednak zvyšuje selektivitu snížením nespecifických interakcí. Pro modifikaci můžeme použít buď kovalentní, nebo nekovalentní vazby. Při kovalentní modifikaci vzniká pevná vazba mezi povrchem a použitou částicí nesoucí specifickou skupinu. Pokud použijeme nekovalentní vazbu, dochází zpravidla k adsorpci na povrch pomocí van der Waalsových sil. To se může dít na základě interakcí náboj-náboj, náboj-dipól, dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól a indukovaný dipól-indukovaný dipól. Modifikovaný povrch pak může nést různé funkční skupiny a může mít různé vlastnosti - např. bude polární, ponese chelatační skupiny, případně ponese náboj. (24)

Existuje několik způsobů imobilizace, které se v oblasti biosensory používají. V případě piezosensory byly v literatuře popsány zejména tyto možnosti. Prvně zasíťování molekul

<sup>7</sup> Převzato z <http://www.olympusconfocal.com/theory/fluorophoresintro.html>

pomocí glutaraldehydu (GA); dále imobilizace silanizací, nebo užitím systému avidin/biotin; do třetice imobilizace v matrici (gel či jiný polymer) a v neposlední řadě imobilizace prostou adsorpcí na zlatý povrch sensoru (17).

Shons a kol. imobilizovali albumin a  $\gamma$ -globulin zasítováním GA při první konstrukci piezosensoru. Tento způsob imobilizace byl použit i v konstrukci dalších piezosensů. Imobilizace silanizací je poměrně rozšířená, zatímco vazba avidin/biotin byla sice aplikována při některých měřeních, ale není příliš rozšířena. Použití gelových a polymerních matric je též hojně rozšířené (17).



Obr. 16: Schematické znázornění imobilizačních technik

A) adsorpce (stálost ~ den) B) imobilizace membránou – encapsulation (stálost ~ týden) C) imobilizace v polymeru – entrapment (stálost ~ týdny) D) kovalentní vazba (stálost ~ rok)

Při kovalentní imobilizaci se příslušný povrch musí nejprve aktivovat (pokud již není) tj. musí nést vhodné funkční skupiny pro umožnění dalších vazeb. Na tyto skupiny se zpravidla váží bifunkční činidla, která jednou skupinou reagují s povrchovou skupinou a druhou svou skupinou poskytují vazbu s povrchovou skupinou biomolekuly. Pokud je na povrchu sensoru vázána aminoskupina nabízí se použití levného a dostatečně reaktivního glutaraldehydu, který vazbou s povrchovou aminoskupinou a aminoskupinou biomolekuly vytvoří Schiffovy base

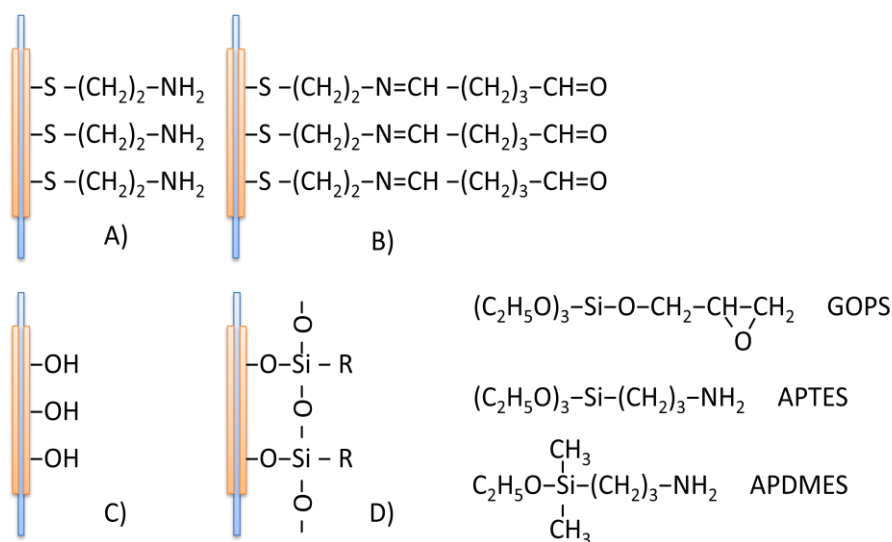
## 5.1 Aktivace povrchu pomocí thiosloučenin

Tento přístup je atraktivní a v posledních letech využívanou metodou. Thioly utvářejí na povrchu zlata a platiny organizované „self-assembled“ filmy. Jedná se o účinnou chemisorpci, energie vazby mezi zlatem a sírou je přibližně 150 kJ/mol (24). Technika tvorby molekulárních monovrstev (SAM = self-assembled monolayer) spočívá v aktivaci povrchu elektrody vhodnou thiosloučeninou, která pak váže (přímo nebo přes můstkovou sloučeninu) jednoho členu afinitního páru (biorekogniční molekulu). V poslední době je to nejpoužívanější technika imobilizace na piezokrystalový povrch. Zvýšení citlivosti lze dosáhnout nahrazením mo-

novrstvy více vrstvami, případně zasítováním rekogničních molekul a vytvořením 3D struktury – docílí se zvýšené vazby ligandu a úměrně amplifikace signálu.

## 5.2 Aktivace povrchu silanizací

Silanizaci lze použít k modifikaci křemenného povrchu SAW nebo oxidovaného zlatého povrchu QCM. Thompson a kol. provedli modifikaci povrchu SAW sensoru pomocí aminopropyl-triethoxysilanu, což umožnilo analýzu nitrobenzenových derivátů (24). Selektivita je dána komplementaritou vodíkových vazeb mezi aminoskupinou na povrchu a nitroskupinou analytu. Stejný způsob modifikace byl použit jako základ pro vazbu biomolekul na QCM modifikací povrchové aminoskupiny.



Obr. 17: Schematické znázornění aktivovaného Au povrchu piezosensoru

A) aktivace povrchu cysteaminem B) následná vazba glutaraldehydu (vznikající Schiffova base se může redukovat  $\text{NaBH}_4$ ) C) oxidovaný povrch D) aktivace silanizačním činidlem (nejčastější silanizační činidla jsou uvedeny na obrázku)

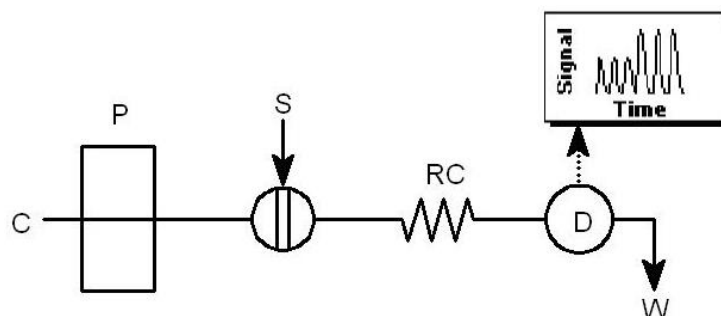
## 6 Analýza v průtočném uspořádání

Pro účely této práce je průtočné uspořádání použito pouze pro dopravu vzorku. Nedochozí k chemické reakci, jak je to obvyklé v níže popsaných technikách. Průtočné uspořádání zajišťuje stálý tok kapaliny (pufry, reagentů, bakterií, nebo proteinů) a tím dovoluje udržet téměř neměnnou koncentraci látek v blízkosti piezokrystalu.

## 6.1 FIA (25; 26; 27)

Průtoková injekční analýza (FIA = flow injection analysis) je též označována jako analýza v nesegmentovaném toku. Metodu poprvé publikovali Růžička a Hansen v roce 1975. Principem metody je postupné nastřikování malých objemů vzorků do proudu základního pufru. Objem nastřikovaného vzorku se obvykle pohybuje v rozmezí 10–100  $\mu\text{l}$ . Injektovaný vzorek vytváří zónu, která je transportována směrem k detektoru, který zajišťuje kontinuální zaznamenávání signálu, ať už se jedná o absorpenci, elektrický potenciál nebo jiný fyzikálně-chemický parametr, který se kontinuálně mění při průchodu vzorku průtočnou celou. Výhodou je, že aparatura se v průběhu měření nemusí promývat.

Základní systém se skládá ze čtyř částí:



Obrázek 1: Schéma systému FIA: C – nosné médium; P - peristaltická pumpa; S – vzorek nastřikovaný ventilem; RC - reakční cívka; D – detektor; W - odpad

Pohyb vzorku a činidel, jejich míchání a vzájemná chemická reakce se uskutečňuje v tetrafluorových nebo polyetylenových hadičkách (vnitřní průměr 0,5 – 1 mm). Výsledkem analýzy je řada píků, představujících závislost signálu (např. absorpance) na čase. Výška píku je mírou analytické koncentrace. Vzorek je při průchodu systémem trubiček rozmýván a reaguje s činidly za vzniku koncentračního gradientu produktu. Tato kontrolovaná disperze je základní charakteristikou metody. K disperzi dochází přímo v rozpouštědle, nebo při chemické reakci v proudu reagentů.

Velký důraz se klade na provedení analýzy za konstantních experimentálních podmínek, jako je například délka hadiček aparatury, použitý průtokový reaktor, nebo použitá průtoková rychlost.

## 6.2 SIA (25; 26; 27)

Sekvenční injekční analýza (SIA = sequential injection analysis) byla vyvinuta na základě zdokonalování techniky FIA. Charakteristickým rozdílem obou technik je použití oddělených



měřených cyklů. Zóny nosného média, vzorku a činidla jsou postupně dávkovány do smyčky jednokanálového systému použitím vícecestného ventilu a pístové pumpy, obrácením toku dojde k promísení zóny vzorku a činidla, vzniklý produkt je tokem kapaliny dopraven do detektoru – tím je ukončen jeden cyklus. Výsledný analytický signál (pík) je podobný jako ve FIA – jedná se o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu procházejícího detektorem.

Zatímco FIA využívá přímý konstantní tok, je podstatou SIA změna přímého a zpětného toku. Tímto postupem, je dosaženo vyššího stupně konverze analytu v detekovaný produkt.

Výhoda SIA proti FIA je v menší spotřebě reagentů a snadné automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků.

## **7 Modelové antigeny**

### **7.1 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$**

Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní bičíkatou bakterii, mající tvar tyčky se zaoblenými konci. Jako jedna z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry teplokrevných živočichů, včetně člověka, zajišťuje správný průběh trávicích procesů. Délka bakterie se pohybuje v rozmezí 2-3  $\mu\text{m}$  a šířka okolo 0,6  $\mu\text{m}$ . Některé typy mohou tvořit pouzdra a jejich kolonie pak mají hlenovitý charakter. Některé kmeny *E. coli* mohou být patogenní a mohou působit zánětlivě, např. zánět močového měchýře, v některých případech (např. při přemnožení) mohou způsobovat průjmy. Díky jejím vlastnostem, pomineme-li patogenitu některých kmenů, je hojně využívána jako modelový organismus zejména pro studium bakterií.

Našemu účelu posloužil kmen *E. coli* DH5 $\alpha$ , je běžně komerčně dostupný a práce s tímto kmenem je relativně bezpečná, na rozdíl od jiných divokých nebo geneticky modifikovaných forem.

### **7.2 Značený albumin**

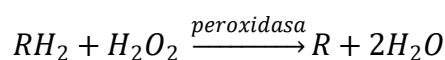
Molekula lidského albuminu (HSA) obsahuje 585 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 65 500. Tento globulární plazmatický protein není, jako jeden z mála, glykosylován. Jeho struktura je stabilizována 17 disulfidickými můstky. Komerčně dostupný produkt je získáván přímo z lidského séra.

Pro účely této práce byly použity tři typy značeného HSA. Albumin značený FITC, fluoresceinem a HRP. Také byla zkoušena konjugace HSA s kvantovými tečkami.

### 7.2.1 Křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7)

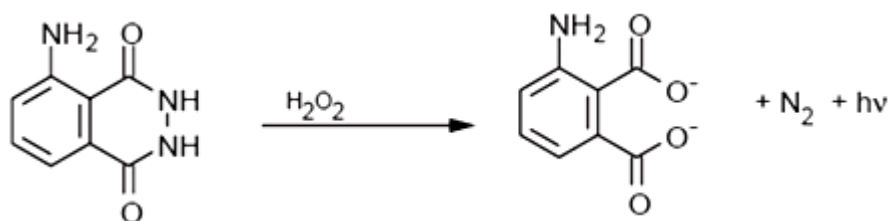
Peroxidasy jsou početná skupina oxidoreduktas vyskytující se v mnoha isoformách ve všech typech organismů. Hlavní funkcí peroxidas je odstraňování toxického peroxidu vodíku z organismů.

Peroxidasa (donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreduktasa) katalyzuje oxidaci různých látek peroxidem vodíku podle obecné rovnice:



Nejvíce studovanou peroxidasou je křenová peroxidasa (HRP – Horseradish peroxidase). Získává se z kořene křenu selského (*Armoracia rusticana*), kde bylo postupně identifikováno 42 isoenzymů (28).

HRP se běžně používá pro značení Ag nebo Ab. Následně se měří intenzita vznikající chemiluminiscence, např. při oxidaci luminolu za vzniku aminoftalátového dianionu. V tomto případě nastává emise záření při 425 nm (29).



Obr. 18: Oxidace luminolu peroxidem vodíku za vzniku chemiluminiscenčního záření

### 7.2.2 Fluorescein a FITC

Fluorescein je oranžovo-červená sloučenina. V diagnostice hojně používané fluorescenční barvivo, zvláště vhodné pro konjugaci. Absorpční maximum kolem 494 nm, emisní maximum kolem 519 nm (ve vodném roztoku). Existuje celá řada derivátů, přičemž FITC je izothiokyanát fluoresceinu. Jeho absorpční i emisní maxima jsou velmi blízké fluoresceinu.

### 7.2.3 Kvantové tečky

Kvantové tečky (dále jen QD – quantum dots) (30; 31) jsou izolované krystalky polovodičových materiálů (spíše jde o shluky atomů) o velikosti řádu nanometrů. Mají diskrétní rozdělení energetických hladin – podle podobnosti s atomy, jsou někdy nazývány umělé atomy

(artificial atoms) – a řídí se zákony kvantové mechaniky, jak už název napovídá. Velikostí teček mohou být energetické hladiny kontrolovány. Velikost určuje i samotné zabarvení teček - velké tečky jsou zabarveny v červené části spektra, menší pak v modré části. Tečky se skládají z jádra nejrůznějšího složení (CdS; ZnSe; ZnS; CdSe; CdSe/Te; CdTe; CdSe; PbS; PbSe/Te) a ochranné slupky, která brání oxidaci a rozpadu jádra (obvykle ZnS nebo CdS). Taková tečka je ve vodě nerozpustná. Pro zvýšení rozpustnosti a i pro biologické použití (umožnění dalších vazeb) je nutné zavedení malé organické molekuly (ligandu) vazbou na Zn.

QD absorbují blízké UV záření a emitují záření vyšších vlnových délek. Výhodou oproti jiným fluoroforům je mnohem větší Stokesův posun (až stovky nm) a také symetrický a relativně úzký pás emitujícího záření.

Zájem o kvantové tečky v biologických aplikacích v posledních letech narůstá. Jejich snadné použití jako fluoroforů nachází uplatnění stále ve větším množství *in vivo* a *in vitro* výzkumných aplikacích. Úspěchy slaví i v biomedicíně v oblasti cíleného zobrazování tumorů (32). Výhodné je použití QD jako fluorescenčních biosensorů a značek.



**Obr. 19:** Schematické znázornění kvantové tečky: CdSe jádro obalené ZnS a aktivované organickým ligandem pro zvýšení rozpustnosti ve vodě a zprostředkování vazebných interakcí (ligand je znázorněn jako kompaktní vrstva, v reálu tomu tak není)

## II. Cíl práce

Cílem práce je studium biointerakcí se současným použitím piezoelektrického a optického systému. Piezoelektrický systém umožní získat data o interakci molekul v reálném čase a pomocí optického systému získáme kontrolu o probíhající ději na povrchu piezokrystalu. Afinita bude zkoumána pomocí modelových antigenů, přičemž protilátky budou kovalentně vázány na povrchu elektrody piezokrystalu. Jako modelové antigeny budou použity HSA a *E. coli* DH5 $\alpha$ . Kombinací těchto dvou nezávislých přístupů získáme údaje, které v budoucnu poslouží ke zdokonalení tohoto měřicího procesu a následně přispěje k lepšímu pochopení biointerakcí běžně používaných v biotechnologických procesech.

### III. Experimentální část

## 8 Seznamy materiálu

### 8.1 Chemikálie

Kyanoborohydrid sodný – **Aldrich**

LB Agar Low Salt; LB Broth Low Salt - **Duchefa**

Glutaraldehyd; Luminol; Tween 20 – **Fluka**

Glycin; Kyselina sírová; – **Merck**

Aceton; Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát; Hydrogenfosforečnan disodný – dodekahydrát; Chlorid barnatý – dihydrát; Jodistan sodný; Kys. chlorovodíková; Peroxid vodíku – **Penta**

Cysteamin (2-merkaptoethylamin) – **Sigma**

Borohydrid sodný – **Ubichem**

tris(hydroxymetyl)metylamín (TRIS) – **Zdravotnické zásobování**

Kvantové tečky CdSe-ZnS aktivované glutationem – **Mgr. Antonín Hlaváček**

Deionizovaná voda *Milli-Q* – **Millipore System**

### 8.2 Biologický materiál

*E. coli* DH5 $\alpha$  – poskytnul **Dr. Jan Beneš**

BSA (hovězí sérový albumin) – **Fluka**

HSA (lidský sérový albumin) – **Sigma**

HSA: FITC; HSA: Flou ; HSA: HRP – **připravil P. Skládal**

Křenová peroxidasa (HRP) – **Fluka**

Rabbit Anti *E. coli* – **AbD Serotec**

Goat polyclonal Anti *E. coli* – **Abcam**

Mouse IgG+IgM Anti *E. coli* – **Těchonín**

Rabbit Anti *E. coli* – **BioGENESIS**

Mouse Monoclonal Antibody anti Albumin AL-01 – **EXBIO Praha**

Rabbit Anti *E. coli*: FITC – **AbD Serotec**

Rabbit Anti *E. coli*: HRP – **Abcam**

### 8.3 Přístroje, software a jiné zařízení

Průtočný analyzátor FIALab 3500b a ovládací program FIALab (FIALab Instruments; USA)

Peristaltická pumpa Gilson Minipuls 3 (Gilson; Francie)

Piezoelektrický detektor Multilab – J. Kitlička.

Piezoelektrický detektor UZ2400 – (Grundig; Německo)

Ovládací program LabTools – P. Skládal

Termoelektricky chlazený optovláknový spektrofotometr AvaSpec-2048TEC (Avantes; USA)

Ovládací software AvaSoft (Avantes; USA)

Optický zdroj (VIS) HL-6000 (Avantes; USA)

Optický zdroj (UV) Model D-1000 (Analytical Instrument Systems; USA)

Optovláknový spektrometr S2000-UV-VIS (Ocean Optics; USA)

Ovládací software OOIBase32 (Ocean Optics; USA)

Optický zdroj AvaLight-LED [400nm] (Avantes; USA)

Mikrodestičková čtečka Synergy 2 (BioTek; USA)

LED diody – 400 nm; 455 nm; 465 nm; 470 nm 1W; 500 nm – (Philips Lumileds; USA)

Ponorná próba DipTip Miniature Transmission (World Precision Instruments; USA)

Reflexní próba (Avantes; USA)

NanoPhotometer (IMPLEN; Německo)

Termoblok Thermomixer Comfort R (Eppendorf; Německo)

Centrifuga Minispin Plus (Eppendorf; Německo)

Váhy - Scaltec SPB-54 (Scaltec; Německo)

Analytické váhy - Scaltec SBC-22 (Scaltec; Německo)

Třepačka - Titramax 101 (Heidolph; Německo)

Ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex Digitec Ultrasonic Baths DT52 (Bandelin; Německo)

pH metr - inoLab pH 720 (WTW; Německo)

Magnetická míchačka - non-heating stirrers MONO (Variomag; USA)

Napěťový zdroj - EP-613 (Manson; Čína)

Třepačka Yellowline TTS2 (IKA; Německo)

Autokláv (Adolf Wolf SANOClav; Německo)

Průtoková cela - konstrukce P. Skládal

Opticky matné křemenné výbrusy se zlatými elektrodami, AT-řezy, 10 MHz (ICM International Crystal Manufacturing, USA)

Mikrotitrační deska – 96 jamek (Thermo Fisher Scientific; Dánsko)

Program pro zpracování vědeckých dat Origin 6.1 (OriginLab; USA)

## 9 Metodické postupy

### 9.1 Příprava pufrů, růstových medií a experimentálních roztoků

#### ❖ Fosfátový pufr 0,05M (PB)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3,90 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	8,95 g
Rozpustit Nastavit pH 7,0 Doplnit do 1000 ml H <sub>2</sub> O	

#### ❖ Fosfátem pufovaný solný roztok 0,02M PB a 0,15M NaCl (PBS)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	5,6 g
NaCl	8,77 g
Rozpustit Nastavit pH 7,4 Doplnit do 1000 ml H <sub>2</sub> O	

#### ❖ Tris-HCl pufr 0,1M

TRIS	6,055 g
HCl	Dle potřeby
Rozpustit Nastavit pH 8,5 Doplnit do 500 ml H <sub>2</sub> O	

### ❖ Příprava LB bujónu

2 g LB Broth Low Salt (Duchefa) se rozpustí do 100 ml vody (Milli-Q) a pH se upraví na 7,0. Po rozvaření a sterilizaci v autoklávu (20 minut při 121°C) je bujón pipetován po 1 ml do sterilních mikrozku mávek Eppendorf (1,5 ml) – vše sterilně ve „Flowboxu“.

LB-bujón složení: 10 g trypton; 5 g kvasniční autolyzát; 5 g NaCl

### ❖ Příprava LB agaru

3 g LB Agar Low Salt (Duchefa) se rozpustí do 100 ml vody (MiliQ) a pH se upraví na 7,0. Po rozvaření a sterilizaci v autoklávu (20 minut při 121°C) je agar ještě za tepla rozlit na sterilní Petriho misky kde se nechá zchladnout – vše sterilně ve „Flowboxu“.

LB-Agar složení: 10 g trypton; 5 g kvasniční autolyzát; 5 g NaCl; 10 g agar

### ❖ Příprava substrátu pro HRP

Výsledná koncentrace (0,01M luminol a přibližně 0,005M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) složek substrátové směsi se připravuje smícháním 0,5 ml 0,3% (0,0979M) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5 ml 0,02M luminolu.

#### Luminol

35,7 mg luminolu je rozpuštěno ve 3 ml 0,1M NaOH (33) (rozpuštění podporuje ultrazvuková lázeň – 10 min) a následně je doplněn do 10 ml Tris/HCl pufru. Vzniklý zásobní roztok je plněn po aliquotech (1 ml) a při -18 °C uchován do použití, kdy je podle potřeby naředěn.

#### Peroxid vodíku

Připravuje se vždy čerstvý 100 násobným ředěním zásobního 30% roztoku.

## 9.2 Kultivace *E. coli* a stanovení její koncentrace

Kultivace je prováděna na dvou růstových médiích podle Luria Bertani (LB) - LB agaru a LB bujónu. Přesné složení obou médií je uvedeno v kapitole 9.1. Za běžných kultivačních podmínek (37°C, obsah živin) je ve stacionární fázi růstu dosaženo koncentrace cca  $2 \times 10^9$  buněk / ml.

Kultivace v bujónu je pro účely této práce výhodnější hned z několika důvodů. Kultivace je 2–3 -krát rychlejší než na agaru a příprava buněčné suspenze v pufru je dána jen centrifugací, slitím bujónu a doplněním pufru na původní objem.

### ❖ Kultivace v LB bujónu

Sterilní platinovou kličkou se jedna kolonie suspenduje v bujónu (1 ml bujónu v mikrozku mávce), vzniklé inokulum se přímo kultivuje. Je možno očkovat i tekutou kulturou,



kdy se několik  $\mu\text{l}$  (10–20  $\mu\text{l}$ ) buněčné suspenze pipetuje do bujónu. Za občasného třepání se kultivuje 12–24 hodin při 37 °C na termoboxu. Po skončení kultivace se buněčná suspenze centrifuguje 5 min při 6000 ot. Supernatant se odlije a bakteriální pelet se vortexováním resuspenduje ve sterilním fosfátovém pufru na původní objem, tedy 1 ml. Proces se opakuje asi 3× aby se z buněčné suspenze dokonale vymylo růstové médium.

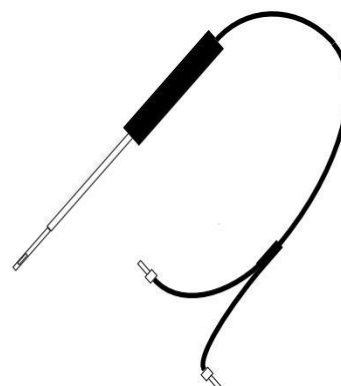
### ❖ Kultivace na LB agaru

Sterilní platinovou kličkou se očkuje jedna kolonie na agar a rozetře se po celé ploše agaru. Je možno očkovat i tekutou kulturou, kdy se 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze rozetře po agaru. Kultivuje se 48–72 hodin při 37°C. Po skončení kultivace se z narostlých kolonií připraví buněčná suspenze – podle velikosti kolonií je jedna nebo více suspendována ve sterilním fosfátovém pufru. Suspenzi je možné centrifugovat a znovu suspendovat v čistém sterilním pufru čímž se buněčná suspenze promyje.

### ❖ Vyhodnocení nárůstu

Hodnocení růstu je důležitý parametr, který poskytuje informace o vhodnosti kultivačního média nebo o době růstu vhodné ke sklizení kultur. Je výhodné si pro dané podmínky kultivace sestrojít tzv. růstovou křivku, což je závislost množství bakterií (může jít i O.D.) na čase. Obecně se na základě růstové křivky určuje několik fází růstu bakterií, pro účely této práce byla růstová křivka konstruována jen pro zjištění exponenciální fáze růstu, protože právě v exponenciální fázi je nejvýhodnější bakterie sklízet. Konstrukce růstové křivky předpokládá měření O.D.<sub>600</sub> v pravidelných časových intervalech – malé množství média (10  $\mu\text{l}$ ) je odebráno a absorbance je měřena na spektrofotometru NanoPhotometer. Naměřené absorbance se vynášejí do grafu v závislosti na čase odběru vzorku.

Za účelem rychlého zjištění koncentrace buněk existuje několik metod. V tomto případě je použita spektrofotometrická metoda měření. Je využito turbidimetrického měření, kdy se na základě spektrofotometrického měření zákalu (nejčastěji při 600 nm) odhadne množství mikroorganismů. Koncentrace buněk je zpravidla uváděna jako optická hustota (O.D. z angl. optical density), pravý dolní index pak značí při jaké vlnové délce byla měřena (O.D.<sub>600</sub>). Podle hrubého odhadu obsahuje kultura *E. coli* vykazující O.D.<sub>600</sub> ~ 0,1 přibližně  $10^8$  buněk/ml. Naměřená hodnota absorbance a tím odhad množství buněk je dána optickou dráhou. Pro přesnější odhad je nutné zavedení kalibrace



pomocí kultury o známé koncentraci buněk (lze spočítat např. v Bürkerově komůrce). V této práci je množství buněk kalibrováno podle tzv. McFarlandovy řady. Jedná se o koncentrační řadu suspenze BaSO<sub>4</sub> (lze použít i latexové částice), jejím proměřením vzniká kalibrační přímka, přičemž jednotlivé absorbance odpovídají přibližné koncentraci buněk (CFU/ml)<sup>8</sup>. Absorbance je měřena ponornou próbou, jejíž optická dráha je 4 mm – jedná se o opto-vláknový nástroj, jehož schéma je zobrazeno na obrázku výše, první optické vlákno vede k optickému zdroji a druhé vlákno vede odražený paprsek do spektrofotometru Avantes. Měří se přímo v mikrozkuhavce - próba se ponoří do vzorku a SW AvaSoft zaznamená hodnotu absorbance. Samozřejmě je nutné nejprve změřit referenční vzorek.

### **Příprava suspenzí**

Suspenze sraženiny BaSO<sub>4</sub> o stoupající koncentraci jsou připraveny smísením 1% BaCl a 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v objemových poměrech podle následující tabulky. Správná tvorba sraženiny je z počátku podporována třepáním a následně ustavením rovnováhy alespoň přes noc. Vzniklé suspenze se uchovávají ve tmě při teplotě 20–25 °C a jsou stále přibližně 6 měsíců.

---

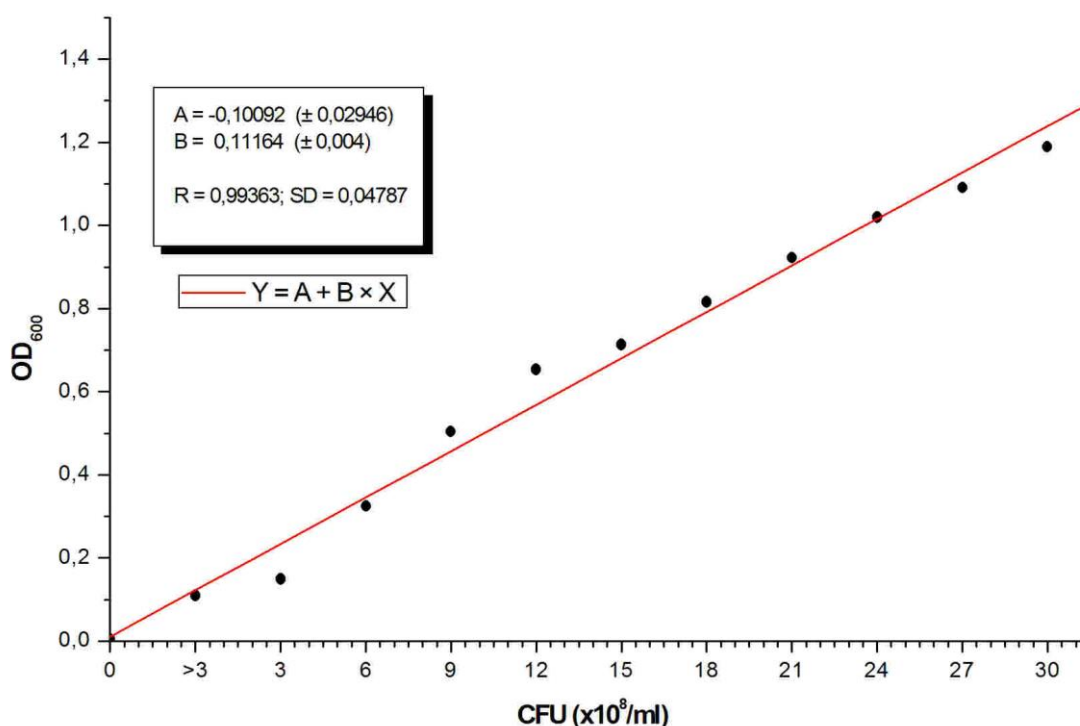
<sup>8</sup> CFU (Colony-Forming Unit) značí množství bakterií nacházejících se v daném prostředí (roztoku, infekčním materiálu) a schopných při vyočkování na tuhé kultivační médium vytvořit samostatnou kolonii. Původně mikrobiologická jednotka byla převzata jinými obory, kde se používá pro hodnocení počtu rostlinných nebo živočišných buněk, vzniká proto tendence nahradit stávající pojem CFU pojmem CBU (Colony-Forming Bacteria)

**Tabulka 4: Příprava suspenze BaSO<sub>4</sub> a odhad koncentrace *E. coli***

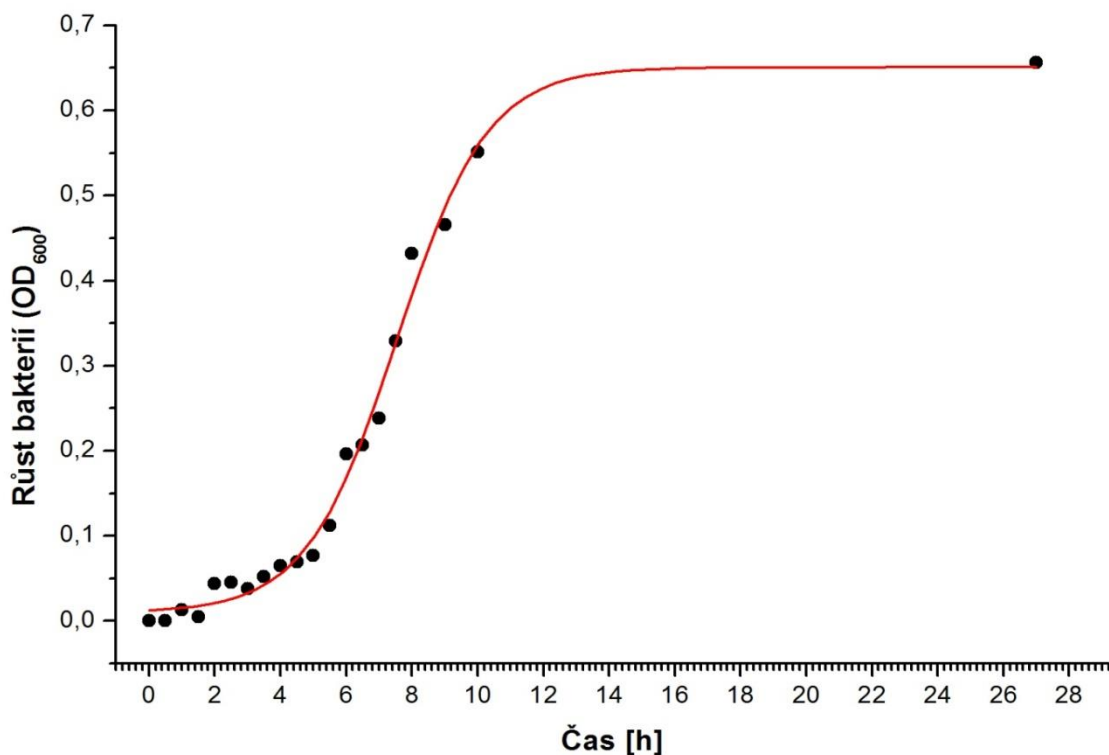
McFarlandova řada	CFU (x10 <sup>6</sup> /ml)	1% BaCl <sub>2</sub> / 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)
0.5	<300	0,05 / 9,95
1	300	0,10 / 9,90
2	600	0,20 / 9,80
3	900	0,30 / 9,70
4	1200	0,40 / 9,60
5	1500	0,50 / 9,50
6	1800	0,60 / 9,40
7	2100	0,70 / 9,30
8	2400	0,80 / 9,20
9	2700	0,90 / 9,10
10	3000	1,00 / 9,00

Ze získaných hodnot absorbancí se sestrojí kalibrační přímka a z její rovnice lze kdykoliv v budoucnu (při zachování podmínek měření) odvodit přibližnou koncentraci buněk.

Pro dlouhodobé uchování kultur je vhodné zmrazení na nízkou (-20 °C) nebo velmi nízkou teplotu (-80 °C nutný přídavek 50% glycerolu k buňkám v poměru 1:3).



**Obr. 20: Odhad koncentrace *E. coli* na základě McFarlandovy aproximační řady**



Obr. 21: Růstová křivka *E. coli* v LB bujónu (NanoPhotometer)

## 9.3 Konjugace QD

### 9.3.1 Konjugace anti *E. coli* s kvantovými tečkami

Připraví se Pufř A (0,1 M fosfát; 150 mM NaCl; pH 7,2

Oxidační činidlo NaIO<sub>4</sub> se připraví rozpuštěním 21,4 mg NaIO<sub>4</sub> v 1 ml H<sub>2</sub>O. Podobně se rozpustí 3 mg QD v 150 µl H<sub>2</sub>O.

#### ❖ Oxidace cukerného řetězce protilátky

K 100 µl protilátky se přidá 10 µl Pufřu A a 11 µl roztoku NaIO<sub>4</sub>. Inkubuje se ve tmě a při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Oxidace se ukončí separací na koloně (SF Sephadex G25; MF Pufř A; průtok 0,68 ml/min) – detekce při 280 nm.

#### ❖ Konjugace

K celému objemu aktivovaných Ab se přidá 50 µl QD a nechá se inkubovat ve tmě za laboratorní teploty po dobu 180 min. Konjugace se ukončí separací vysokomolekulární frakce (SF Sephadex G150; MF Pufř A; průtok 0,68 ml/min; nástřik 400 µl) – detekce 280 a 420 nm.

### 9.3.2 Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 1 (34)

Připraví se Pufr B (20 mM PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7,4). V 100 µl Pufru B se rozpustí 0,1 mg HSA.

#### ❖ Odstranění nadbytku ligandů z QD

3 mg QD se rozpustí v 150 µl H<sub>2</sub>O, následně se odvzdušněný roztok (30 min míchat pod vakuem) nanese na kolonu (SF Sephadex G25; MF Pufr B; průtok 0,68 ml/min) a odebere se vysokomolekulární frakce (asi 174 – 330 s) – detekce 420 nm.

Přečištěný roztok QD (získaný objem cca 1,4 ml) se smísí se 100 µl HSA a 14 µl 25% GA (GA se přidává v množství 10 µl na každý 1 ml reakční směsi). Inkubuje se 2 h při 4 °C. Vzniklé Schiffovy base se redukují přidavkem 10 mg NaBH<sub>3</sub> na každý 1 ml reakční směsi (tedy 14 mg) – redukce probíhá 1 h při 4 °C za občasného třepání (uvolňují se bublinky plynu). Následuje separace vysokomolekulární frakce (SF Sephadex G150; MF Pufr B; průtok 0,68 ml/min, nástrík 400 µl), odebírá se frakce v rozmezí 174 – 330 s – detekce při 280 a 420 nm.

### 9.3.3 Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 2 (35)

Rozpustí se 47 mg NaCNBH<sub>3</sub> v 100 µl 1N NaOH a 11 mg Gly v 50 µl 1N NaOH. Smísením obou roztoků vznikne redukční směs (1M Gly a 5M NaCNBH<sub>3</sub>).

160 µl přečištěných QD (viz předchozí kapitola) se smísí se 160 µl HSA (1 mg/ml) a 80 µl 5% GA. Směsi se inkubují v různých časových intervalech (5; 15; 45; 120 min). Jako kontrolní vzorek se inkubuje 320 µl QD s 80 µl GA po dobu 30 minut.

Reakce se ukončí přidavkem 10 µl redukční směsi na každý 1 ml reakční směsi – tedy přidavkem 4 µl (vazba Gly vysytí volné aldehydové skupiny a NaCNBH<sub>3</sub> redukuje Schiffovy base) – nechá se inkubovat 30 minut. Po redukci se provede separace vysokomolekulární frakce na Sephadexu G150. Odebrané vysokomolekulární frakce se podrobí fluorescenčnímu imunostranění.

### 9.3.4 Fluorescenční imunostanovení

#### ❖ Chemikálie

Myší monoklonální anti HSA AL-01 se pro nanesení na desku vhodně naředí (28,6  $\mu$ l protilátky do 20 ml 50 mM uhličitanového pufru pH 9.4). Podobně se fosfátovým pufrem 333 $\times$  naředí zásobní HSA-Fluo. HSA o koncentraci 1 mg/ml.

#### ❖ Nanesení protilátky na desku a blokace

Na desku se nanese po 70  $\mu$ l protilátek a nechá se inkubovat v lednici přes noc. Deska se 2 $\times$  promyje promývacím pufrem a 2 $\times$  deionizovanou vodou. Následuje inkubace s blokovacím pufrem (po 150  $\mu$ l) 2 h při laboratorní teplotě a 450 ot./min. Po inkubaci se deska 3 $\times$  promyje promývacím pufrem a 3 $\times$  deionizovanou vodou. Po vysušení je možné desku hned použít, nebo uschovat v exsikátoru se silikagelem v lednici.

#### ❖ Nanesení konjugátu

Rozpis nanesení jednotlivých konjugátů (včetně ředění a kontrol) je uveden na schématu níže (Tabulka 5). Deska se inkubuje 1 h při laboratorní teplotě a 450 ot./min. Následuje promytí 3 $\times$  promývacím pufrem a 3 $\times$  deionizovanou vodou. Po vysušení následuje měření.

#### ❖ Měření fluorescence na Synergy 2

Intenzita fluorescence je měřena podle přednastavených parametrů:

Fluorescein: EX485/20 - EM528/20 - citlivost 110

Kvantové tečky: EX360/40 - EM620/40 - citlivost 160

**Tabulka 5: Fluorescenční imunostanovení – návrh mikrotitrační desky**

Do sloupců 1–4 (vyjma řady G) je pipetováno 50  $\mu$ l PB. Do sloupců 5 a 6 a řady G je pipetováno 50  $\mu$ l HSA. Následně se přidá 50  $\mu$ l roztoků podle rozpisu. Číslo (5;15;45;120) znamená konjugát s příslušnou dobou inkubace. V závorce je uvedeno ředění konjugátů. K1 je kontrolní konjugát QD-GA inkubovaný 30 min. K2 je frakce odebraná po vyjití konjugátu (inkubace 15 min) z kolony

<b>A</b>	5 (20x)	5 (20x)	5 (200x)	5 (200x)	15 (20x)	15 (20x)
<b>B</b>	15 (20x)	15 (20x)	15 (200x)	15 (200x)	45 (20x)	45 (20x)
<b>C</b>	45 (20x)	45 (20x)	45 (200x)	45 (200x)	120 (20x)	120 (20x)
<b>D</b>	120 (20x)	120 (20x)	120 (200x)	120 (200x)	15 (200x)	15 (200x)
<b>E</b>	K1 (20x)	K1 (20x)	K1 (200x)	K1 (200x)	45 (200x)	45 (200x)
<b>F</b>	K2 (20x)	K2 (20x)	K2 (200x)	K2 (200x)	120 (200x)	120 (200x)
<b>G</b>	5 (20x)		5 (20x)			
<b>H</b>	HSA-Fluo	HSA-Fluo	HSA-Fluo	HSA-Fluo		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>

## 9.4 Příprava krystalů

Před samotnou aktivací je nutno povrch PZ sensoru důkladně odmastit, děje se tak ponořením do acetonu na 30 minut. Po opláchnutí deionizovanou vodou a osušení krystalu volně na vzduchu, je na obě zlaté elektrody sensoru aplikován vodný roztok cysteaminu (15 mg/ml) v množství 10  $\mu$ l. Sensor se inkubuje 2 hodiny při laboratorní teplotě a následně je pečlivě opláchnut deionizovanou vodou a osušen volně na vzduchu. Aktivované povrchy se dále modifikují navázáním glutaraldehydu, kdy se aplikuje 3% roztok v 0,05M PB v množství 10  $\mu$ l na každou elektrodu sensoru. Inkubace probíhá hodinu při laboratorní teplotě. Po důkladném opláchnutí deionizovanou vodou je sensor osušen a připraven pro vazbu biorekogniční složky. Vazbou několika různých protilátek, jejichž výčet je uveden níže, je vytvořeno několik typů sensorů. Protilátky (anti *E. coli* nebo anti HSA) jsou aplikovány v množství 10  $\mu$ l na každou elektrodu a inkubace probíhá přes noc při 4 °C (v lednici). Následuje důkladný oplach deionizovanou vodou a osušení na vzduchu. Veškerá inkubace krystalu s roztoky se děje ve vlhké komůrce. Modifikované krystaly se uchovávají v chladu a suchu a měli by být stále půl roku až rok. Pro kontrolu imobilizované vrstvy se měří frekvence krystalu mezi jednotlivými kroky imobilizace. Změna frekvence je uvedena v následující tabulce.

**Tabulka 6: Změna rezonanční frekvence sensoru mezi jednotlivými kroky modifikace**

	<b>Abcam</b>	<b>Abcam</b>	<b>Těchonín</b>	<b>Těchonín</b>	<b>Těchonín</b>	<b>anti HSA</b>
	<b>QCM1</b>	<b>QCM2</b>	<b>QCM8</b>	<b>QCM9</b>	<b>QCM10</b>	<b>QCM11</b>
<b>Cys</b>	147	156	34	97	171	279
<b>GA</b>	-9	-21	114	-4	-21	-62
<b>Ab</b>	-302	-275	-278	-230	-362	-545

## 10 Schéma a postup měření

Měření bylo prováděno v průtočném systému FIALab, součástí systému byl PZ sensor umístěný v průtočné cele. Průtočná cela byla vyrobena z průhledného plastu (PMMA) a skládala se ze tří částí. V horní části byly vlepeny kovové trubičky, na které se nasazují teflonové hadičky průtočného systému. Do jejího středu bylo posléze vlepeno optické vlákno, které prostupovalo celým blokem, a na vnitřní straně bylo těsně zbrušeno a vyleštěno do roviny s povrchem cely. Střední část tvořilo jádro, ve kterém byl umístěn konektor pro připojení kontaktů krystalu. Spodní část je tvarově shodná s horní částí. Kontakty krystalu byly vloženy do konektoru a krystal byl upevněn mezi horní a dolní část, přičemž jemný a těsný kontakt cely a krystalu byl zprostředkován těsníci „O“ kroužky. Všechny tři součásti cely byly spojeny dvěma kovovými šrouby s maticemi.

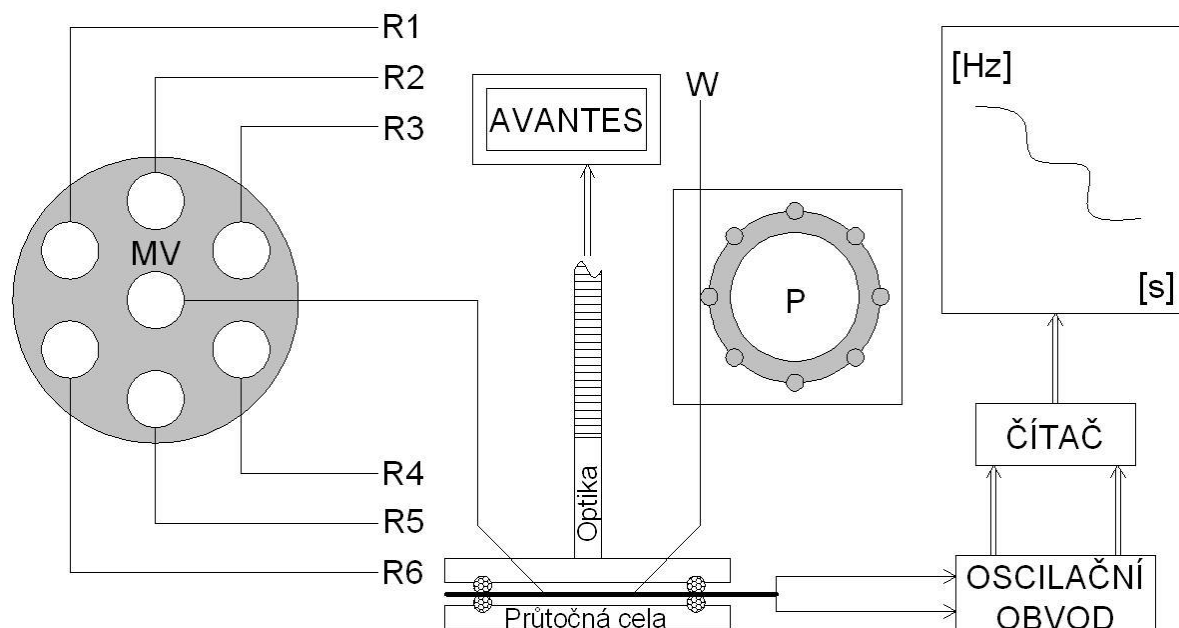
Průtočná cela byla umístěna v plastové (PP) dóze, která byla z vnější strany chráněna alobalem a vnitřní strana byla polepena černou tapetou – tím bylo docíleno improvizovaného odstínění od EMP<sup>9</sup> vlivů a zároveň byla cela umístěna ve tmě. Ve stěně dózy byly vyvrtány drobné otvory, kterými prostupují vodiče od konektoru a teflonové hadičky. Ve víku dózy byl též otvor, který byl v průměru jen o něco málo větší než průměr koncovky reflexní próby. Otvor byl umístěn tak, aby se přesně překrýval se středem zlaté elektrody PZ krystalu. V první fázi experimentů sloužil pro již zmíněnou próbu, v dalších fázích jim prostupovalo optické vlákno a vodiče s připojenými LED diodami. Průtočný systém byl dále realizován peristaltickou pumpou a šesticestným ventilem (technická závada sice znemožnila další práci s tímto ventilem, ale pro úplnost je uvedeno celé schéma). Všechny části systému byly spojeny teflonovými hadičkami. Peristaltická pumpa byla zařazena za průtočnou celou, aby kapalina byla nasávaná skrz celu – to bylo výhodné jednak kvůli šetření roztoky a také se eliminoval vliv rázu kapaliny na měřenou oscilační frekvenci. Na Obr. 22 bylo znázorněno experimentální uspořádání měřicího systému (bez ovládacího PC). Zařízení FIALab lze ovládat pomocí jednoduchého skriptu a tak docílit automatizace. Připojené PC pak ovládá celé zařízení a shromažďuje údaje přicházející s čítače a optovláknového detektoru Avantes.

Změna frekvence byla v tomto případě měřena aktivní metodou (viz kapitola 2.6). PZ krystal byl umístěn do konektoru ve střední části cely a byl těsně sevřen mezi zbylé dvě. Prostor mezi vrchní částí cely a krystalem byl necelý milimetr. Po šetrném dotažení šroubů byla cela umístěna v dóze a systém pomalu plněn pracovním pufrem.

---

<sup>9</sup> EMP = elektro-magnetické pole





**Obr. 22: Schéma měřícího uspořádání: R1-6 - roztoky; MV - multipoziční ventil; P - peristaltická pumpa; W – odpad; Optika je realizována optickou próbou nebo optickým vláknem**

Zásadním problémem průtočného uspořádání jsou bublinky, které se nejčastěji zdržují v prostoru cely a mají významný vliv na měřený signál. Tvorbě bublinek lze zabránit sonikací pracovního pufru a dostatečnou teplotou roztoků na laboratorní teplotu po vytažení z lednice. Pokud se bublinky přesto vyskytnou je nutno je ze systému vypudit. Buď jemným poklepáním celou za současného zvýšeného průtoku pufru, střídáním nízké a vysoké rychlosti průtoku, nebo střídavým nasáváním pufru a vzduchu. Po dokonalém zaplnění systému se započne samotné měření, kdy se systémem postupně transportují roztoky a ty (ne)reagují s aktivním povrchem krystalu za současné změny signálu (jak změny frekvence, tak změn optických). Změna pořadí transportovaných roztoků je dána přepínáním šesticestného ventilu, nebo je změna prováděna manuálním přemístěním hadičky mezi zásobními nádobkami.

## 10.1 Rušivé vlivy při měření

Oscilační obvod je citlivý ke změnám elektromagnetického pole v jeho bezprostřední blízkosti. Zdrojem rušení mohou být elektromotory, mobilní telefony nebo elektrostatické změny v atmosféře. Nepříznivé vlivy mohou být odstraněny umístěním oscilačního obvodu s PZ krystalem do tzv. Faradayovy klece. Minimalizovat vliv těchto změn lze i improvizovaným stíněním pomocí alobalu, čehož je použito i v případě této práce.

I přes tepelnou stabilitu  $\alpha$  modifikace křemene použitého pro výrobu krystalů (Kap.2.5) by teplota neměla kolísat více než v rozmezí 1 °C. Výraznější změny teploty mohou nastat při excitaci luminoforů pomocí LED diod umístěných v temném boxu společně s průtokovou ce-

lou. Tepelné záření diod není zpravidla významné, ale v malém uzavřeném prostoru je teplotní vliv jistě větší než v otevřeném prostoru.

## 10.2 Průběh a hodnocení signálu

Měřený signál PZ sensoru má charakteristický průběh a lze jej definovat několika fázemi:

- 1) ustavení základní linie – dochází k ustálení signálu při průtoku pracovního pufrou celou
- 2) fáze asociační – průtok analytu v pracovním pufrou a změna signálu při vazbě na imobilizovaný ligand
- 3) fáze ekvibrace – ustálení pozměněného signálu průtokem pracovního pufrou
- 4) regenerace – regenerační činidlo působí disociaci vzniklého komplexu
- 5) ustavení základní linie – dochází k ustálení signálu při průtoku pracovního pufrou celou

Pokud je interakce imobilizovaný ligand – analyt slabá, dochází ke spontánní disociaci a již pouhým vymytím pracovním pufrou dochází k ustavení základní linie bez nutnosti použití regeneračního činidla. Asociační fáze je většinou definována v konstantním časovém intervalu (nejčastěji 5–15 min), protože ustavení základní linie vysycením všech dostupných ligandů na povrch krystalu dochází i po několika hodinách a doba analýzy by byla zbytečně dlouhá.

Změna frekvence v průběhu měření a v následném grafickém znázornění je brána jako relativní, přičemž základní linie určuje nulovou výchozí frekvenci a hmotnostní změny v aktivní vrstvě sensoru jsou zpravidla definovány jako záporný rozdíl (ke kladným změnám může dojít např. při narušení aktivní vrstvy, nebo v průběhu imobilizačního postupu, kdy cysteamin narušuje zlatý povrch). Relativní hodnota signálu se získá odečtením jisté části od skutečné hodnoty rezonanční frekvence PZ sensoru (cca 10 MHz v případě této práce).

## 10.3 Regenerace povrchu

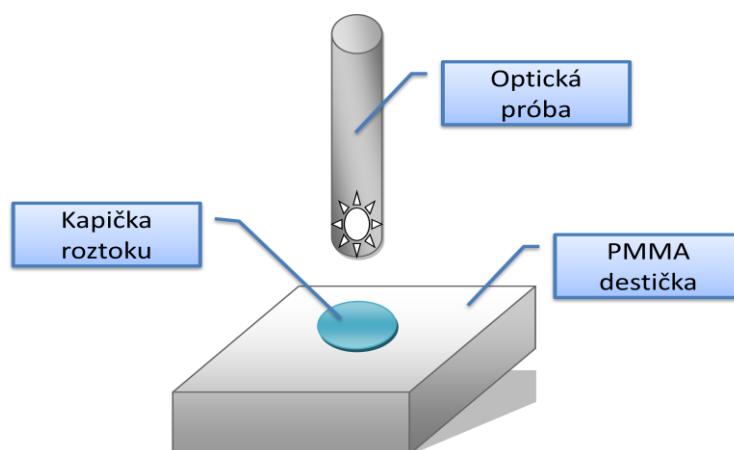
Regenerace je dvojího typu. Šetrným způsobem regenerace disociují navázané ligandy a tím je možno použít sensor pro okamžité opakované měření. Regenerace se děje např. roztokem 20 mM glycinu (pH 2,0); výhodně mezi měřeními přímo v průtočném systému. Totální regenerací se z povrchu elektrody odstraní imobilizované receptory a krystal je připraven pro nový postup imobilizace. Totální regenerace se provádí chromsírovou směsí tak, aby kapka činidla jen o málo přesahovala povrch elektrody. Po hodinové inkubaci se krystal důkladně opláchne destilovanou vodou.

# 11 Výsledky a diskuse

## 11.1 Vhodnost optického systému

Originalita práce spočívá v současném měření hmotnostních změn při interakci biomolekul na povrchu krystalu a měření optických změn této biovrstvy. V literatuře se obdobné kombinované přístupy nepodařilo nalézt. Dřívější pokusy v diplomové práci K. Adamcové (36) používaly průtočný fotometrický detektor zařazený v sérii až za piezodetektozem, takže zde zavedená měřící cela je významným inovačním pokrokem. Kombinace dvou měřících přístupů vyžaduje nalézt řešení pro několik otázek technické povahy. Jsou zkoumány možnosti, jakými by bylo možno optické změny studovat a jaké jsou nejvhodnější experimentální podmínky pro optickou analýsu.

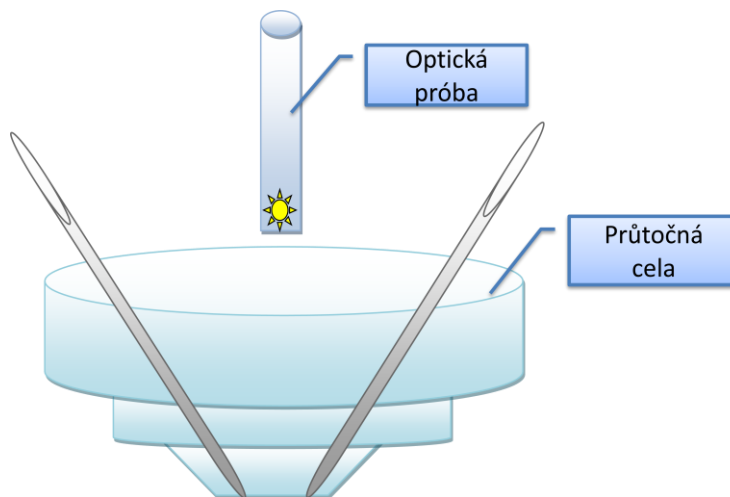
V první fázi bylo studováno použití reflexní UV/VIS próby (Avantes). Reflexní próba je světelný vodič složený z několika optických vláken. Slouží k přímému ozařování a snímání spektrálních vlastností materiálů rozptylujících nebo odrážejících anebo způsobujících zpětný rozptyl (37). Je složena ze dvou světlovodících částí, jedna je složena ze šesti optických vláken a vede světlo od zdroje, druhou část představuje optické vlákno vedoucí k detektoru. Obě větve se sbíhají v jednu, jejíž konec je chráněn nerezovou koncovkou.



**Obr. 23:** Měřící schéma s PMMA destičkou - vzdálenost próby od destičky je cca 1 cm a kapka roztoku BSA různé koncentrace (nebo referenčního fosfátového pufru) o objemu 100  $\mu$ l; vše umístěno v zatemněné krabici

Byly zkoumány optické vlastnosti roztoků BSA na povrchu plastové cely, která byla umístěna na filtračním papíře, aby nedocházelo k odrazu od podložky. Účelem bylo získání referenčních dat pro měření v plastové cele. Tedy zjistit jestli je možné použít próbu pro měření světelných paprsků ovlivněných lomem světla na dvojici optických rozhraní a jestli je výsledek tímto lomem nějak významněji ovlivněn. Světelný paprsek vedený próbou se totiž láme na

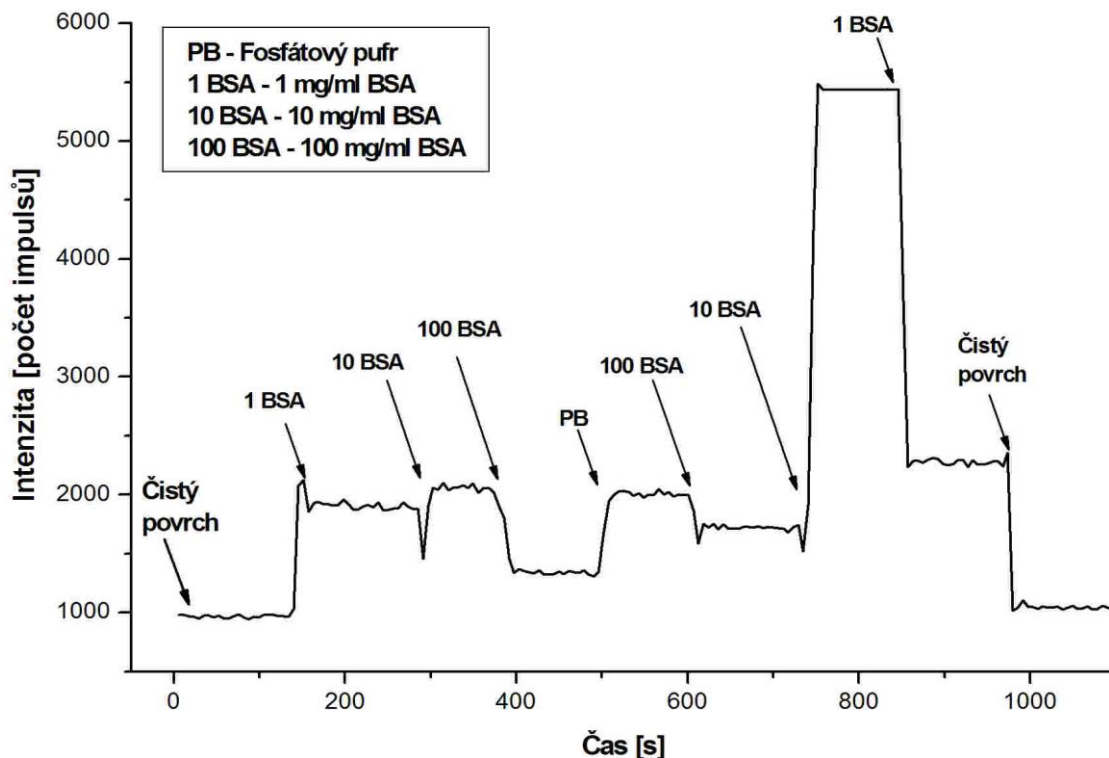
rozhraní vzduch/PMMA a po prostupu plastem se láme na dalším rozhraní PMMA/kapalina v cele, dále se paprsek odrazí od zlatého povrchu elektrody PZ sensoru, opět se láme na obou rozhraních a teprve nyní vstupují do sběrného vlákna próby. Cílem tedy bylo změřit intenzitu paprsku pro různě koncentrované roztoky BSA na povrchu plastové cely a následně uvnitř.



**Obr. 24: Měřicí schéma s průtočnou celou - vzdálenost a úhel próby vůči povrchu cely je nastaven podle aktuálního spektra zobrazeného SW AvaSoft; cela je plněna roztoky BSA různé koncentrace a referentním roztokem fosfátového pufru; vše umístěno v zatemněné krabici**

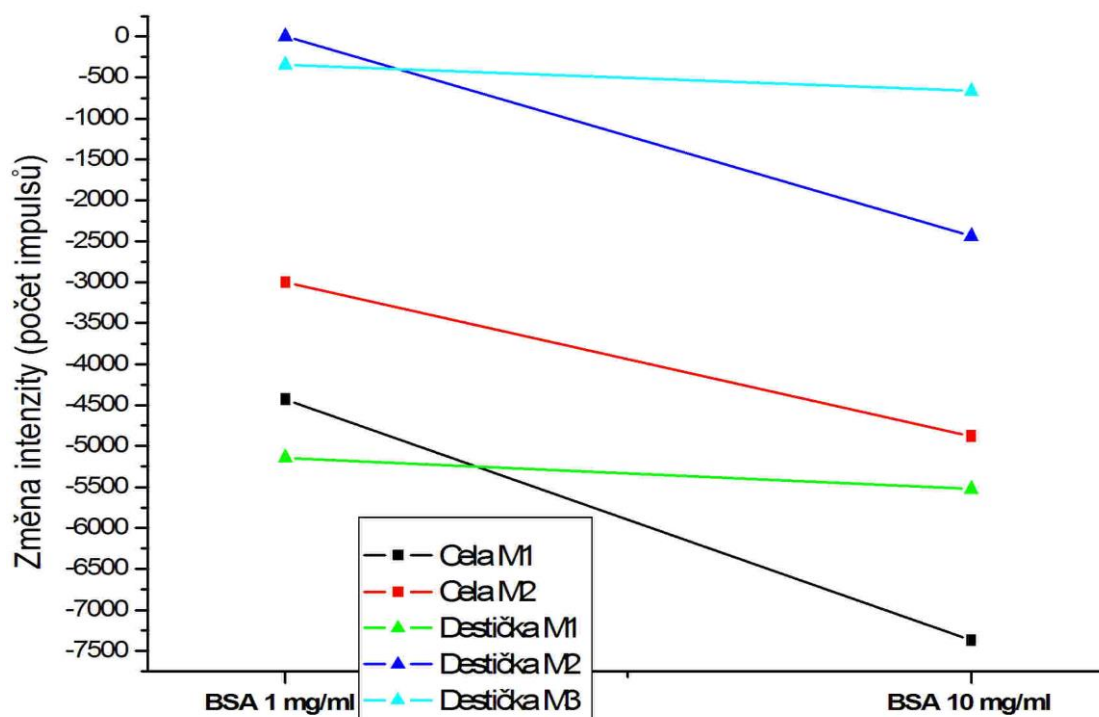
Intenzita záření pro oba postupy a příslušné roztoky byla velmi podobná. Nedá se však hodnotit statisticky, protože metodicky jsou to zcela nezávislé údaje a v tomto případě slouží jejich hodnoty spíše orientačně. Souhrnný výsledek z obou měřících postupů znázorňuje Graf 2. Měření intenzity bylo provedeno při 280 nm a jako zdroj byl použit UV D-1000, jako reference sloužil fosfátový pufr. Byla použita koncentrace BSA 1, 10 a 100 mg/ml. Intenzita pro BSA o koncentraci 100 mg/ml poskytla velmi různorodé výsledky a nebyla v celkovém přehledu zařazena.

Nutno poznamenat, že z celé řady výsledků byla vybrána jen malá část, která byla shrnuta právě pod Graf 2. Měřicí uspořádání s kapkou roztoku na PMMA destičce často vedlo k velmi zavádějícím výsledkům. Intenzita sledovaného signálu byla ovlivněna odrazem a rozptylem na této kapce. Bylo nutno přesně dodržet velikost a pokud možno tvar kapky a próbu zacílit přesně na střed kapky. Proměnlivost těchto výsledků vystihuje Graf 1.



**Graf 1: Intenzita měřená na povrchu PMMA destičky - ukázka vlivu zacílení próby na povrch kapky šipky naznačují počátek měření kapky různé koncentrace BSA a kapky fosfátového pufru**

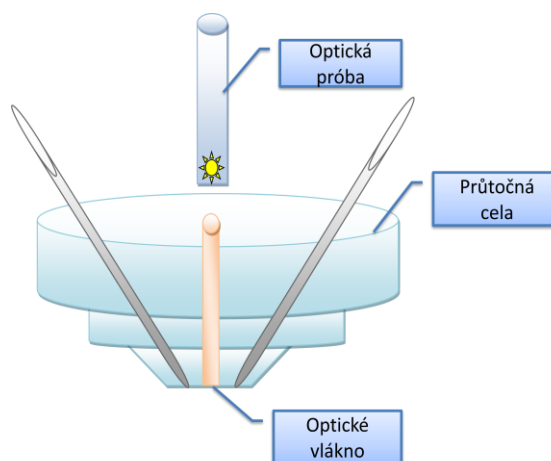
Experiment s reflexní prábou poskytl sice uspokojivé výsledky, na druhou stranu však jejich získání bylo provázáno řadou neúspěšných měření, která jsou připisována právě lomu světla na již zmíněných rozhraních. Reflexní próba totiž musí být orientována pod vhodným úhlem vzhledem k povrchu cely a zároveň umístěna ve vhodné vzdálenosti. Také záleží na samotném povrchu cely – ten byl v průběhu hledání vhodných podmínek matně zbrúšen a poté postupně dolešťován. Tyto komplexní vlivy nakonec vedly k opuštění této metodiky, protože nastavit prábou do vhodné polohy bylo časově zdlouhavé a neflexibilní vzhledem k sestavení celé měřicí aparatury v opakovaných případech měření.



**Graf 2: Zobrazení změny intenzity pro dvě nezávislá měření s celou a tři nezávislá měření s destičkou vždy pro dvě koncentrace BSA. Jako reference je použit fosfátový pufr. Spojnice jsou uvedeny jen pro lepší orientaci. Změna intenzity je téměř stejná, ale z metodického hlediska nelze statisticky analyzovat**

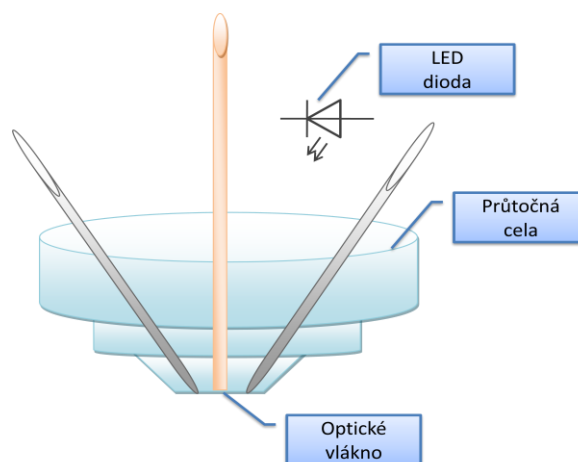
V další fázi hledání vhodného optického systému byla použita dvě nezávislá optická vlákna. Tentokrát byl sledován vliv optických změn pouze s průtočnou celou. První „zdrojové“ vlákno bylo umístováno v různých úhlech a vzdálenostech od povrchu a druhé „detekční“ vlákno bylo umístováno obdobným způsobem. Výsledky nevyhověly požadovaným nárokům (nejsou v práci uvedeny), ale vedly ke třetí realizaci optického systému.

Optické vlákno (průměr 1 mm) bylo vlepeno přímo do horní části cely tak, že prostupovalo celou tuto část a na vnitřní straně bylo těsně zbrušeno a vyleštěno s povrchem cely. Při prvním pokusu se vlákno v horní části zlomilo, bylo tedy zbrušeno a vyleštěno po obou stranách. Naskytla se možnost vyzkoušet reflexní próbu s touto modifikovanou celou (Obr. 25), ale nedokonalý zákryt sedmi optických vláken próby a vlepeného vlákna také neposkytl uspokojivé výsledky.



**Obr. 25: Měřicí schéma s průtočnou celou s vlepeným optickým vláknem (průměr 1 mm) a reflexní próbou**

Realizace optického systému tedy zaktivovala na optickém vlákne vlepeném do průtočné cely. Zdroj záření je na Obr. 26 znázorněn jako LED dioda, ale v průběhu experimentů bylo využito i jiné optické vlákno. Na vlepené vlákno bylo přes koncovku napojeno sběrné vlákno (průměr 600 nm) které vedlo k DAD detektoru Avantes. Všechna následující optická měření byla získána tímto uspořádáním.



Obr. 26: Průtočná cely s vlepeným optickým vláknem

## 11.2 Modifikované sensory

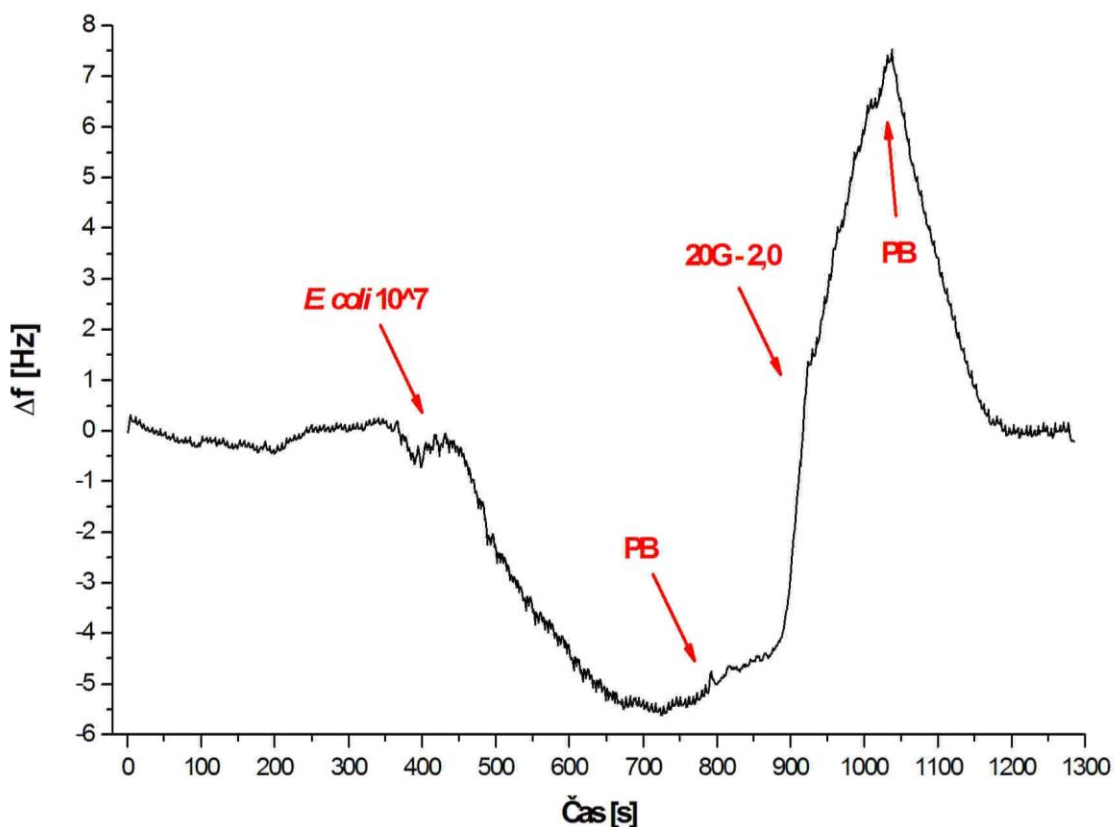
Pro studium biointerakcí bylo za tímto účelem konstruováno několik modifikovaných PZ sensorů.

Studujeme-li afinitu biomolekul pomocí QCM je pro nás směrodatná změna frekvence v průběhu asociace a disociace sledovaného páru. K disociaci může dojít i spontánně pouhým vymýváním puřem a to až na základní linii. To je nevýhodné pokud chceme sledovat hmotnostní změnu po vazbě sekundární biomolekuly a zvláště v tomto případě optickou aktivitu na povrchu asociovaných molekul.

### 11.2.1 Sensor Au/Cys/GA/anti *E. coli* Abcam

Změna frekvence s tímto typem sensoru nebyla příliš výrazná. Imobilizovaná protilátka zřejmě není vhodná, nebo byla její aktivita ovlivněna stabilitou při skladování. Podle dokumentace by měla specificky reagovat s daným typem *E. coli* avšak i přes opakovaná měření se změna frekvence pohybovala kolem 3,5 Hz.

$$\Delta f = 3,39 \pm 0,23 \text{ Hz}$$



Graf 3: Změna frekvence při asociaci *E. coli* o koncentraci  $10^7$  CFU

### 11.2.2 Sensor Au/Cys/GA/anti *E. coli* Serotec

Tento typ sensoru se neukázal být vhodný, protože vazba *E. coli* byla téměř na hranici stanovitelnosti. Vezmeme-li v úvahu limit detekce  $S/N=3$ , nelze změnu signálu vůbec považovat za měřitelnou, i když tu malý náznak v průběhu křivky byl, ale zanikal v šumu.

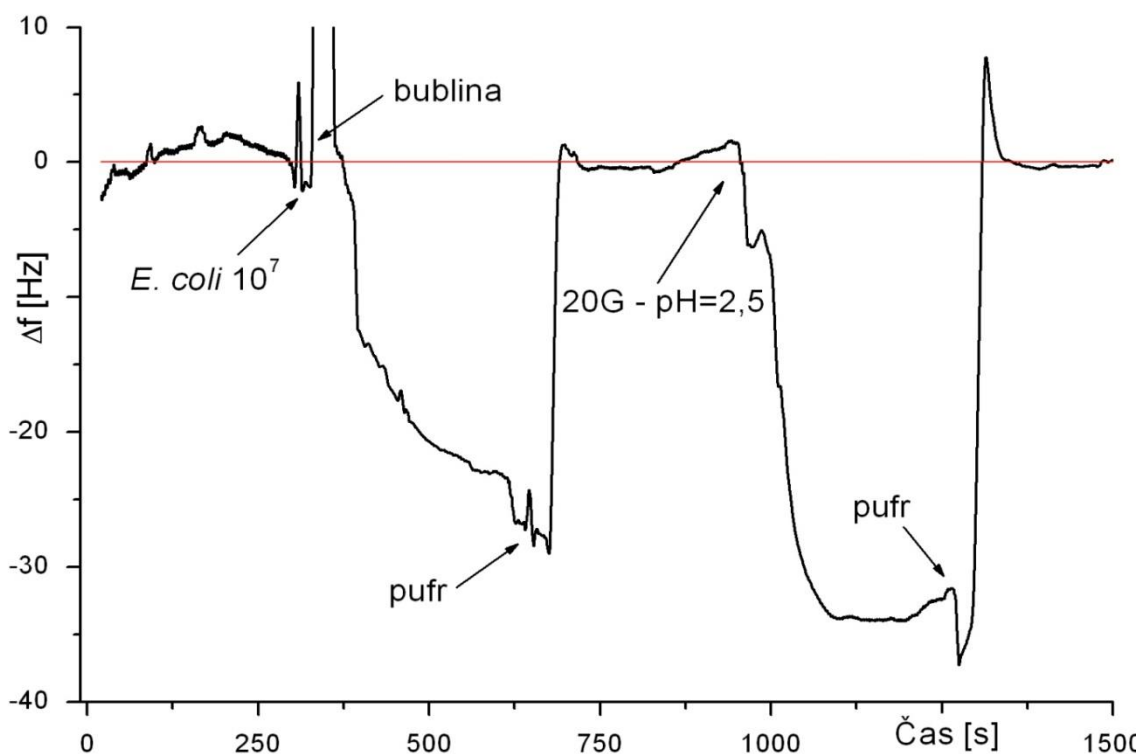
### 11.2.3 Sensor Au/Cys/GA/anti *E. coli* Těchonín

Změna frekvence (Graf 4) u tohoto typu sensoru byla podstatně vyšší než v případě sensoru s imobilizovanou protilátkou (Abcam). Pro další práci bylo využito právě těchto sensorů.

Cílem bylo získat optický signál z biovrstvy sensoru dynamicky se měnící v průběhu asociace *E. coli* a hlavně v následné asociaci sekundárně značené protilátky anti *E. coli*. V Graf 5 byla sledována emise (519 nm) záření pocházející z FITC značené protilátky excitované LED-470 diodou. V grafu je dokonce patrný pokles intenzity ( $t=300$  s) korespondující s průtokem *E. coli*. Je vidět nárůst intenzity záření při průtoku značené protilátky celou. Nicméně jak vyplývá ze změny frekvence došlo prakticky k úplné disociaci navázané *E. coli*. Značená protilátka se nevázala a po vymytí celý pracovním pufrem se optický signál vrátil na původní hladinu.



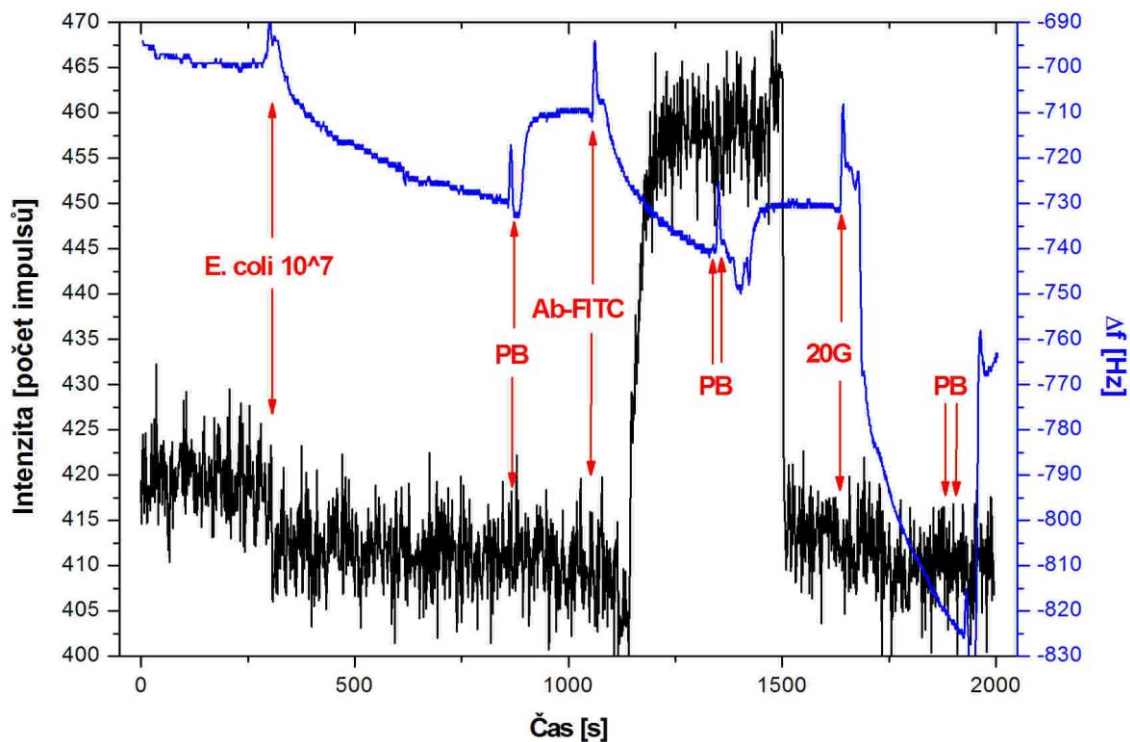
V ideálním případě, by se vazba značené protilátky měla projevit ve spektru i po vymytí volné protilátky.



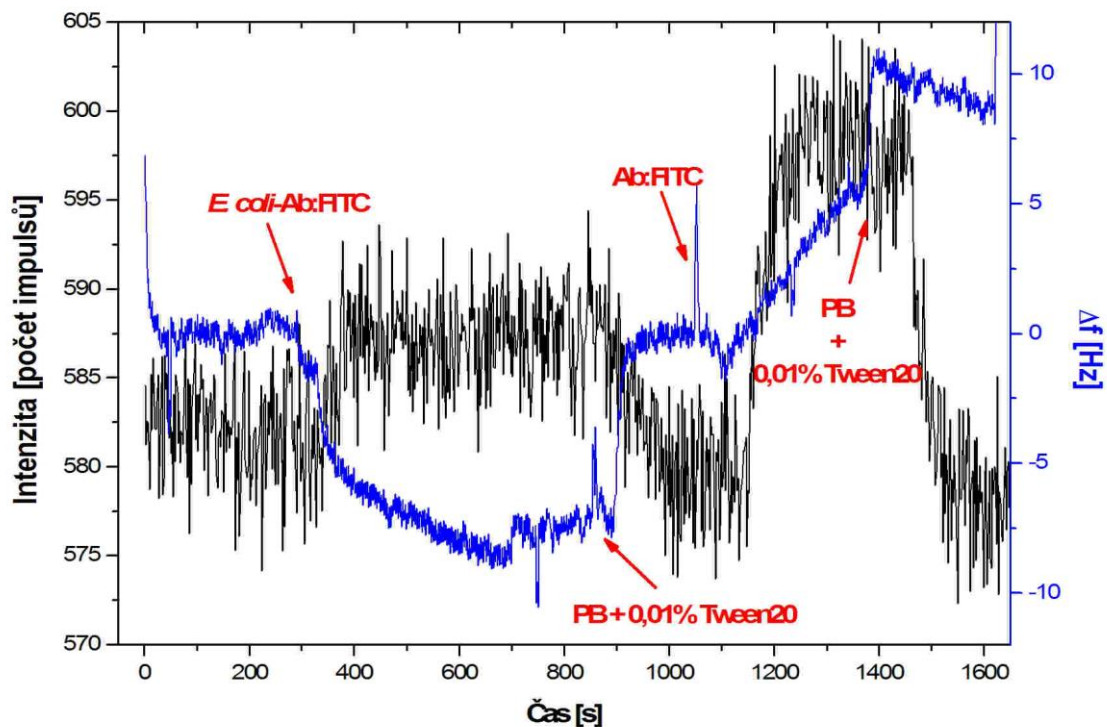
Graf 4: Změna frekvence v průběhu asociace *E. coli* s imobilizovanou protilátkou na povrchu sensoru

Změna frekvence koresponduje s literaturou (37) a zpravidla se pohybovala okolo 15 Hz. Nicméně vazba protilátky a *E. coli* nebyla příliš pevná a docházelo ke spontánní disociaci již vymýváním pufrům. To mělo samozřejmě vliv na výsledek optického měření. Sekundární protilátka značená opticky aktivní molekulou se po vymytí *E. coli* neměla kde vázat a proto bylo optické měření znemožněno právě touto slabou vazbou. V ideálním případě by alespoň část asociované *E. coli* zůstala vázána na povrchu i po vymytí systému pufrům a sekundární značená protilátka by měla možnost vazby. Po vymytí neasociované sekundární protilátky by se změnil optický signál v aktivní vrstvě a poskytl informaci o vazbě. Žádná s použitých protilátek neposkytla natolik pevnou vazbu, aby nedocházelo ke spontánní disociaci *E. coli*.

I přes průměrnou hodnotu frekvence, existuje několik důvodů, proč nelze určit asociační a disociační konstanty děje probíhajícího na povrchu sensoru. Jednak se při některých měřeních objevil drift signálu, který znesnadnil odečtení asociační fáze a také nebyla změřena kalibrační křivka pro různé koncentrace *E. coli*. Měření provedená s nižší koncentrací *E. coli* nebylo možno statisticky vyhodnotit, protože odezva pro tyto koncentrace byla příliš nízká a mnohdy se ji nepodařilo ani zachytit.



Graf 5: Změna frekvence a intenzity emise FITC anti *E. coli*:FITC je 40× ředěný



Graf 6: Změna frekvence a intenzity emise FITC v závislosti a asociaci *E. coli* inkubované se značenou protilátkou a následně aplikovanou v průtočném systému

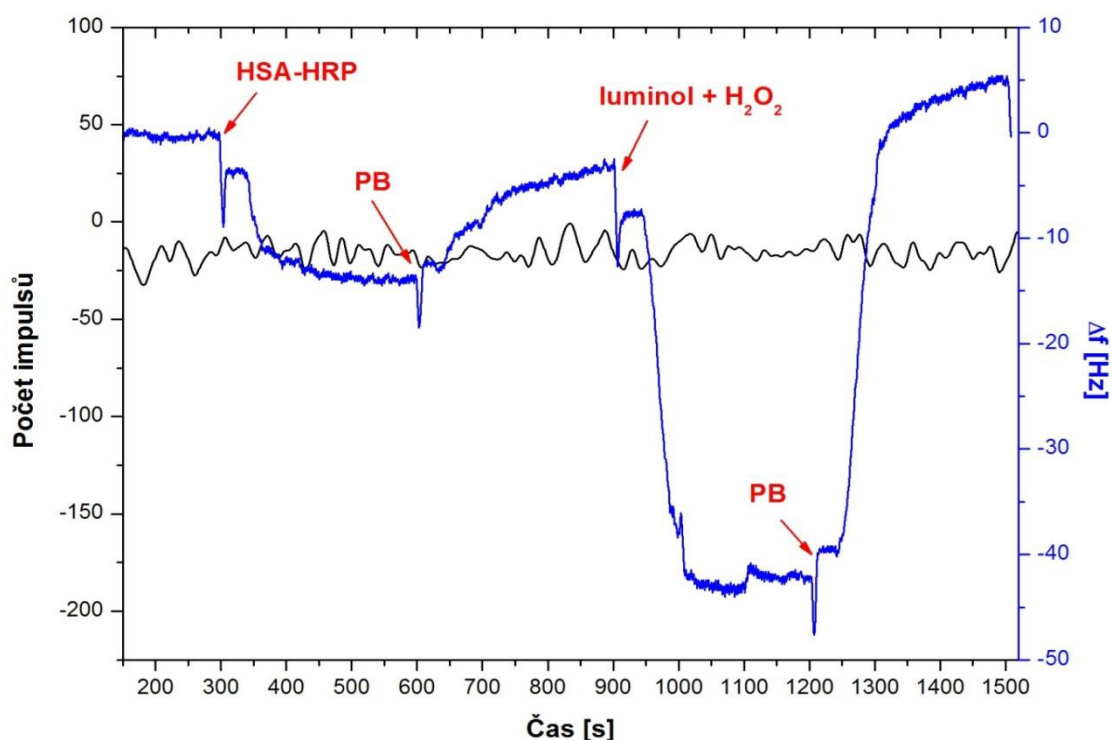
Graf 6 vyjadřuje závislost frekvence a změnu intenzity při asociaci *E. coli* inkubované se značenou protilátkou. 1 ml *E. coli* o koncentraci  $10^8$  CFU byl za občasného třepání inkubován

se 40× ředěnou anti *E. coli*:FITC po dobu 30 min. Pelet získaný centrifugací (5000 ot. / 5 min) byl resuspendován v 1 ml PB (0,05M; pH = 7,0). V grafu pozorujeme změnu intenzity emise utvořeného konjugátu korelující se změnou frekvence a následně změnu intenzity čistě značené protilátky.

Pro mnohem lepší výsledky je vhodnější protilátka s vyšší afinitou.

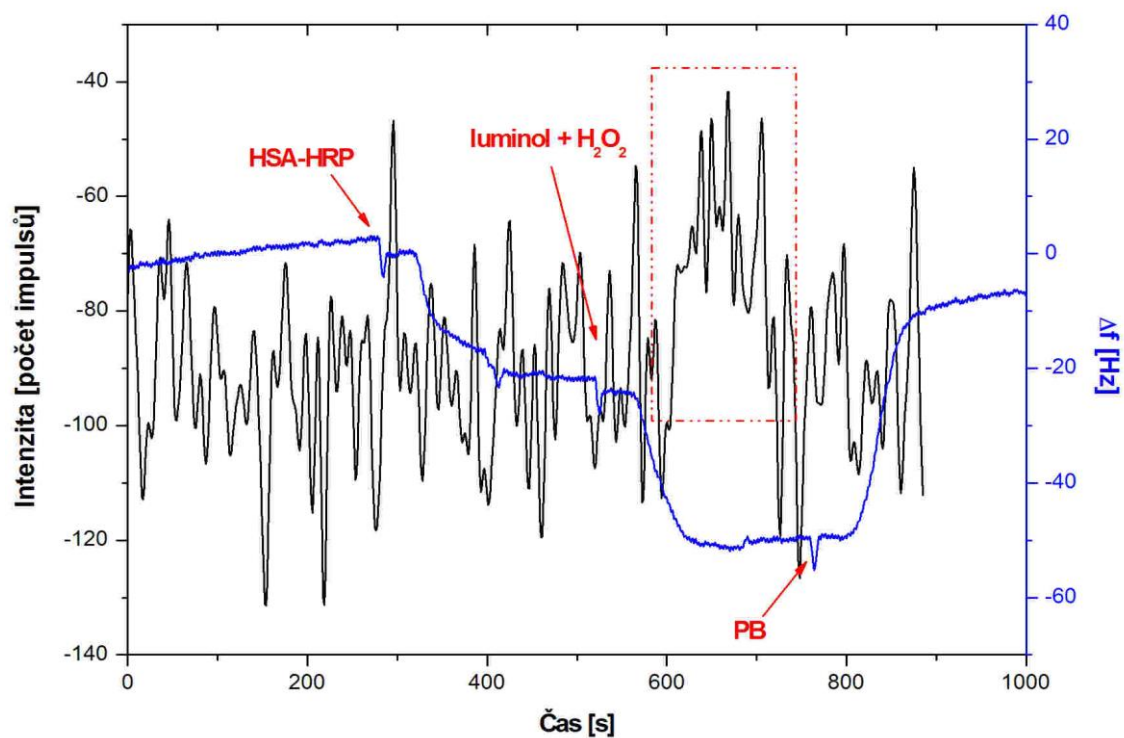
#### 11.2.4 Sensor Au/Cys/GA/anti HSA AL-01

Pomocí krystalu s imobilizovanou protilátkou proti HSA byla studována odezva na různě značený HSA. V první fázi byla sledována asociace konjugátu HSA-HRP. Substrátem pro HRP byl luminol v přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vznikající chemiluminiscence byla detekována při 425 nm (36).

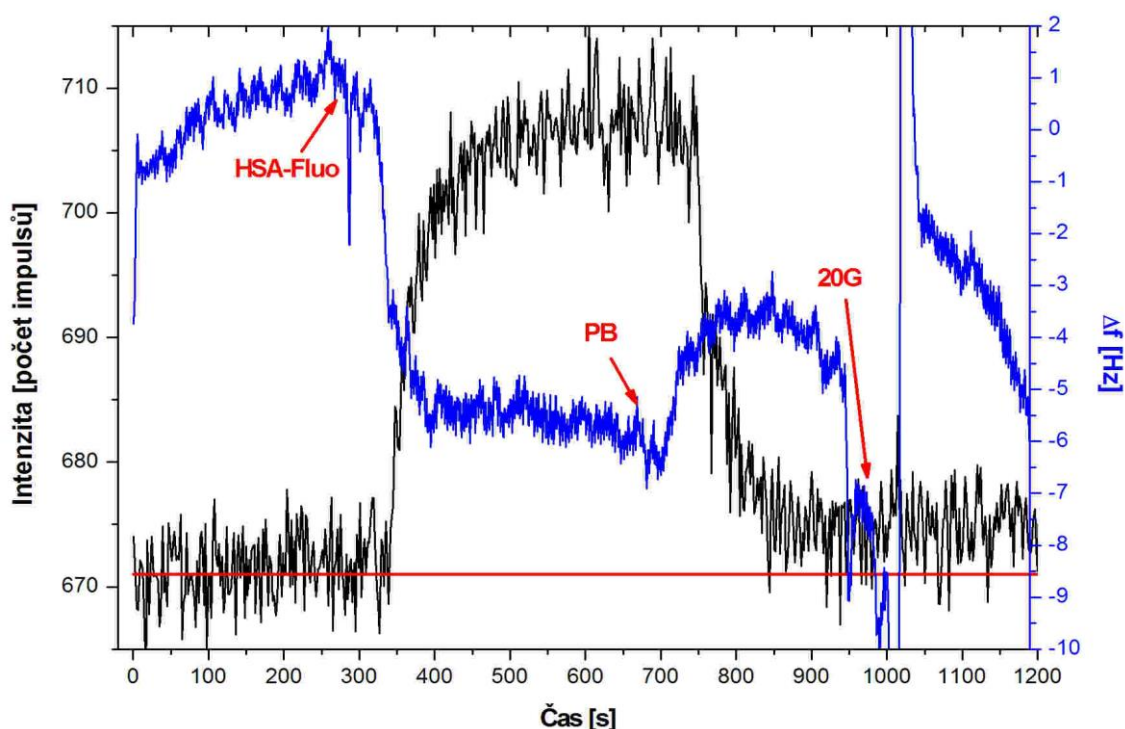


**Graf 7: Změna frekvence a intenzity emise**  
**Podmínky: HSA-HRP 10× ředěno v PB -- 0,01 M luminol + 0,005M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Intenzita emise se v průběhu měření zachyceném na Graf 7 vůbec nezměnila. Změna frekvence poukazuje na postupnou, ale úplnou disociaci HSA-HRP po vymytí pomocí PB. V době nástupu substrátu do cely zde již zřejmě nebyl přítán žádný enzym, což se neprojevovalo změnou intenzity. Naopak Graf 8 zachycuje průběh měření, kde přímo za asociační fázi byl zařazen průtok substrátu. Výsledkem byl malý nárůst intenzity (označen rámečkem), těsně před tím, než substrát vymyl HSA-HRP z povrchu krystalu.



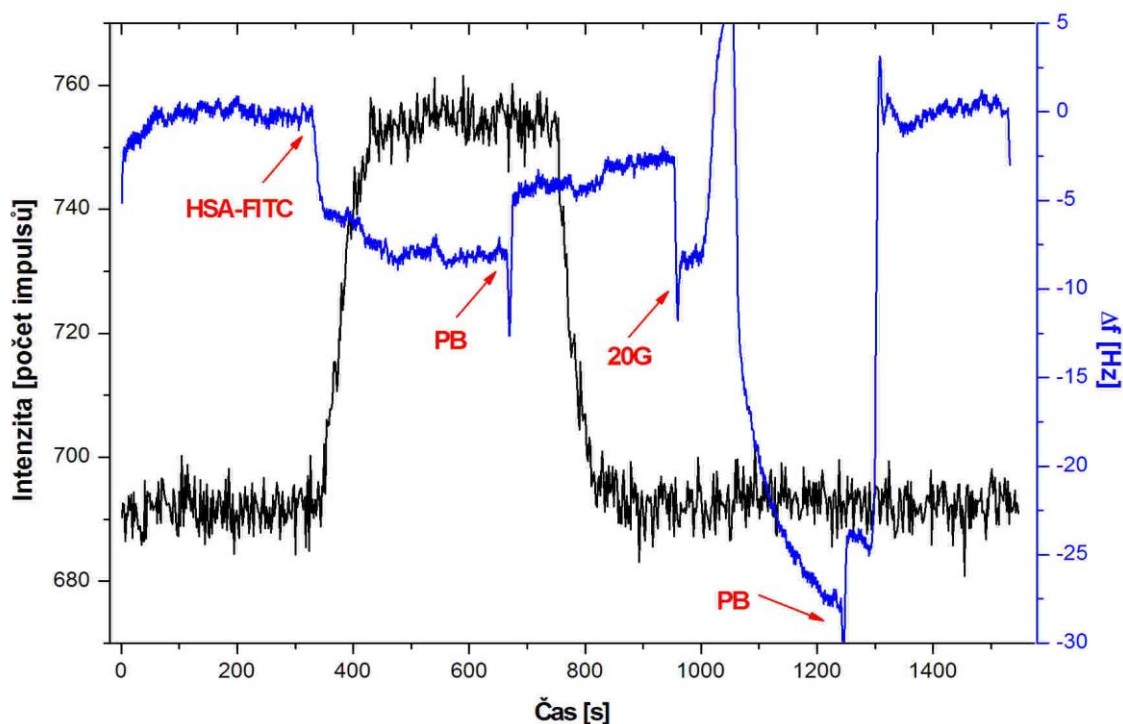
**Graf 8: Změna frekvence a intenzity emise**  
 Podmínky: HSA-HRP 10× ředěno v PB -- 0,01 M luminol + 0,005M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**Graf 9: Změna frekvence a intenzity emise pro 10× ředěný HSA-Fluo**

Dále byla sledována asociace fluoresceinem značeného HSA (HSA-Fluo). Byl použit 10× ředěný konjugát HSA-Fluo, aby byla vůbec zaznamenána nějaká změna intenzity. Excitace byla vyvolána LED-470 nm. Emise byla měřena při 520 nm. Ze změny frekvence (Graf 9) je

patrné, že po promytí pufrům nedošlo k úplné disociaci a část HSA-Fluo zůstala vázána na povrchu sensoru, což se projevilo i na intenzitě emise – srovnáme-li signál se základní hladinou (viz červená čára úroveň 672).



**Graf 10: Změna frekvence a intenzity emise pro 10× ředěný HSA-FITC**

Poslední v řadě je asociace HSA značeného FITC. Taktéž je 10× ředěn. Zde je třeba upozornit na změnu frekvence, která neodpovídá asociaci, ale artefaktu díky vypnutí peristaltické pumpy. Jedná se o změnu při průtoku HSA-FITC z hodnoty 0 Hz na hodnotu -7 Hz. Změna frekvence při asociaci byla tedy kolem 3 Hz. Vymytí pracovním pufrům, pak způsobilo totální disociaci HSA-FITC z povrchu, takže nelze pozorovat nárůst intenzity oproti základní hladině, jako tomu bylo v případě HSA-Fluo.

Srovnáme-li změnu frekvence při asociaci na povrchu sensoru pro všechny tři konjugáty HSA, dostaneme nejlepší výsledek pro HSA-Fluo. Asociace může být ovlivněna právě i těmito značkami, kdy dochází k nepříznivému ovlivnění epitopů molekuly. Rychlá disociace je zřejmě největší problém, který při měření optických vlastností v tomto měřicím uspořádání vyvstal.

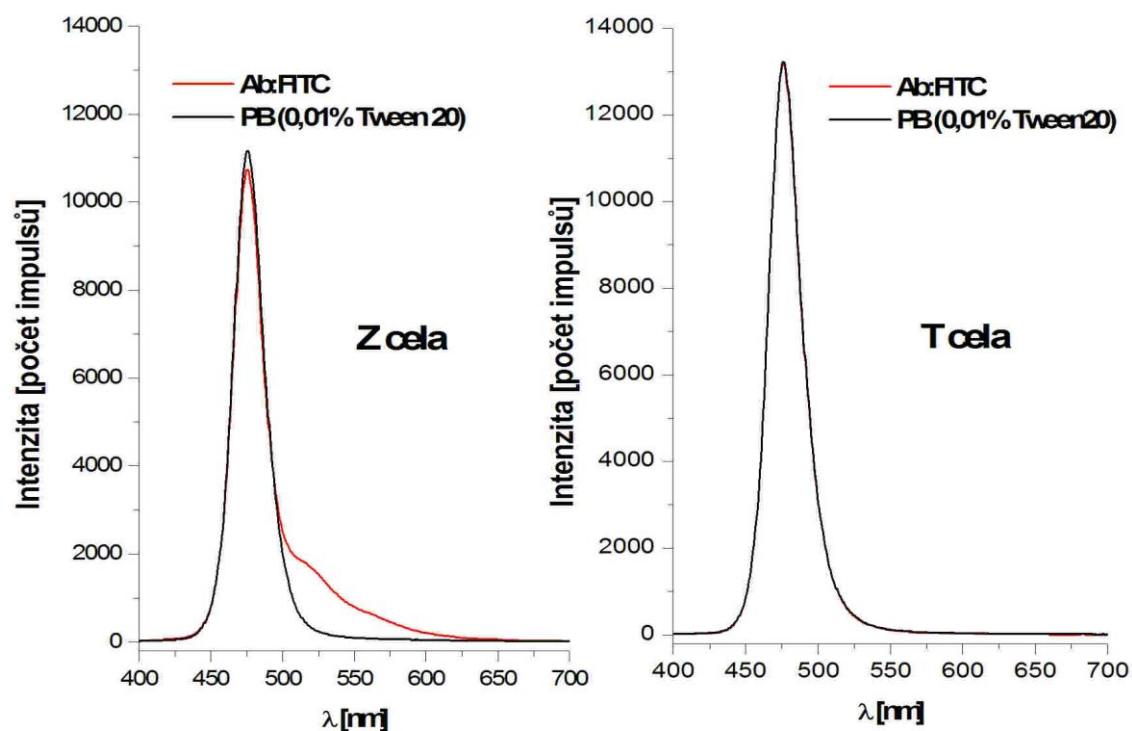
### 11.2.5 Ověření citlivosti optického systému

Měření bylo provedeno s průtočnou celou pro piezosenzor („T“) a klasickou průtočnou celou tvaru „Z“. Fosfátový pufr (0,05M pH 7,0) sloužil jako reference a rozpouštědlo pro anti *E. coli*:FITC (v grafu Ab:FITC). Budící záření je zajištěno LED diodou (470 nm), která je v případě

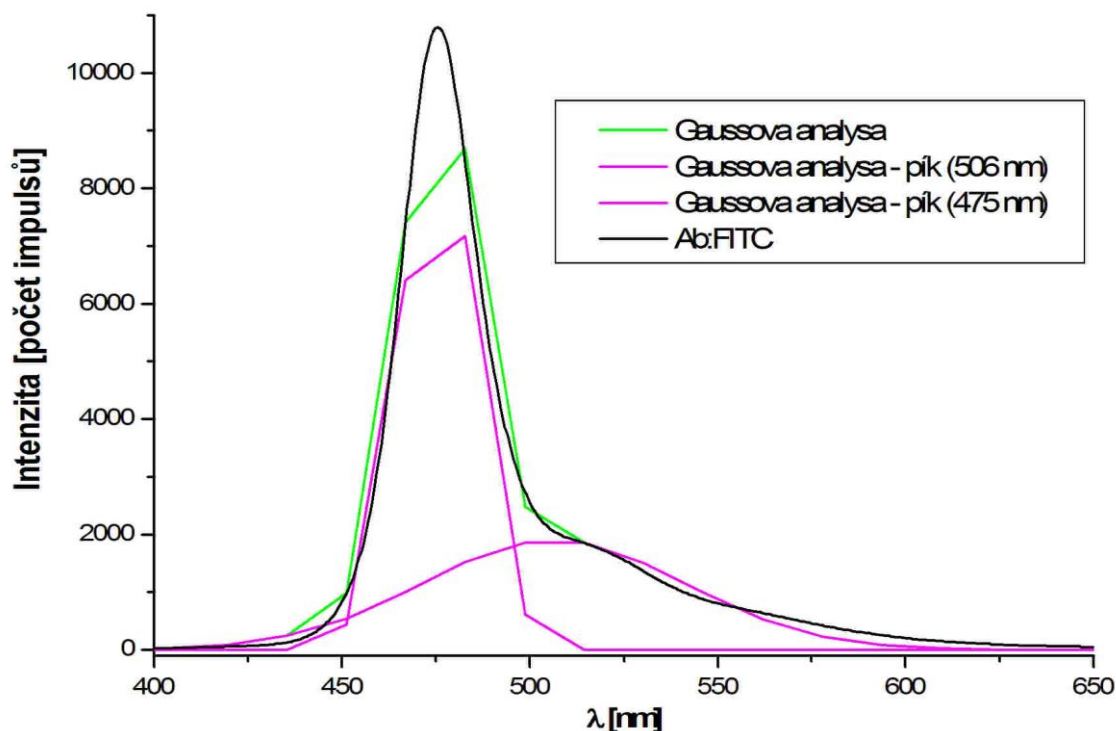
„Z“ cely orientována kolmo k rovině průtoku, takže měřená intenzita pocházela stejně jako v případě „T“ cely z rozptýleného, nebo odraženého světla. Optické vlákno vedoucí k detektoru bylo stejné pro oba případy (600 nm). Rozdíl je pouze u „T“ cely, kde bylo zapuštěno vlákno (100 nm). Podstatnější rozdíl byl v objemu sledovaného vzorku. Zatímco klasická „Z“ cely má optickou dráhu 10 mm, v případě „T“ cely jsou to již diskutované necelé 2 mm. To byl zřejmě důvod velmi nízké intenzity emisního záření FITC, získané v tomto experimentu (Graf 11). Zatímco pro klasickou „Z“ cely byla intenzita emise téměř 2000 impulsů, pro „T“ se jí nepodařilo zachytit.

Změřený signál intenzity „Z“ cely byl Gaussovsky proložen a byly získány teoretické píky (Graf 12) pro budící záření zdroje a emisní záření.

Pro studium optických vlastností pomocí FITC nebo fluoresceinu je zřejmě nutná citlivější detekce. Naopak pro použití tohoto měřicího uspořádání je vhodné studované biomolekuly konjugovat s mnohem intenzivnějším fluoroforem – zde se naskýtá možnost využít kvantové tečky.



Graf 11: Srovnání intenzity mezi dvěma typy cel pro roztok 100x ředěného Ab:FITC



**Graf 12: Gaussovo proložení pro intenzitu Ab:FITC (znázorněno černě)**  
 - fialově jsou vypočtené a znázorněné píky pro emisi FITC a pozadí LED diody  
 - zelená je vypočtená „obálka“ pro fialové vypočtené hodnoty

### 11.2.6 Konjugace anti *E. coli* s kvantovými tečkami – výsledky

Konjugace anti *E. coli* s kvantovými tečkami se nezdařila i přes dodržení konjugačního postupu. Hlavní příčinou byly zřejmě nedostatečně přečištěné kvantové tečky. Podíl nevázaného ligandu (glutathionu) byl zřejmě stále vysoký a nejspíš došlo k přednostnímu vyvázání aktivovaných protilátek s tímto volným ligandem. Pro další postup je třeba dokonalejší pročištění na Sephadexu G25.

### 11.2.7 Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 1 – výsledky

Postup vycházel s použitím přečištěných teček. Konjugace se podle prvotní detekce při separaci na koloně vydařila. Vzniklý konjugát byl přes víkend uchován v lednici a následující pracovní týden již nebylo možno s tímto konjugátem pracovat, protože došlo k jeho vysrážení. Možnou příčinou je nedostatečná blokace reagujících skupin, více pravděpodobná je stále vysoká přítomnost GA ve frakci. Opakované přečištění vzniklého konjugátu a jímání vysokomolekulární frakce by mohlo přispět k vyšší stabilitě.

### 11.2.8 Konjugace HSA s kvantovými tečkami – postup 2 – výsledky

Legenda:

5min – 120 min = vzniklé konjugáty definované dobou inkubace

K1 = kontrolní konjugát vzniklý vzájemnou reakcí QD a GA po dobu 30 min

K2 = frakce (200-400 s) získaná bezprostředně po výstupu 15min vysokomolekulární frakce z kolony

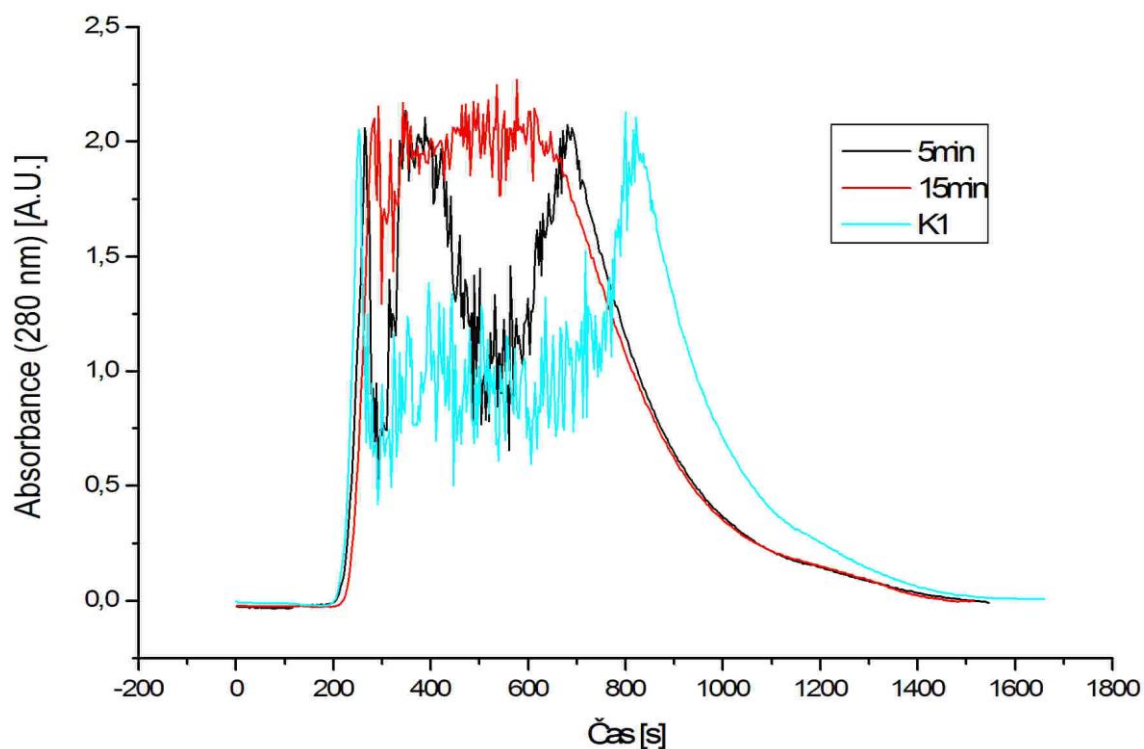
Navržený postup (viz 9.3.3) vedl ke vzniku několika konjugátů charakterizovaných různou dobou inkubace s GA. Výsledný konjugát ovšem nebyl stabilní a do 48 h se vysrážel na dně nádoby. Jak také prokázala mikrodestičková analýza FIA, není konjugát schopen vázat se na protilátku. Redukce volných NH<sub>2</sub> skupin vedla zřejmě k ovlivnění epitopů HSA a ke snížení vazby protilátky.

Graf 13 a Graf 14 představují závislost absorbance na čase měřenou na výstupu z kolony při 280 nm. Vysokomolekulární frakce jsou jímány v průměrném časovém rozmezí 200 – 360 s. V grafech jsou patrna 2 maxima. Prvé (max. kolem 250 s) představuje absorpci konjugátů (a to i v případě konjugátu QD-GA – K1). Druhé (max. kolem 600s) představuje absorpci nekonjugovaného HSA a QD. Vzhledem k obsahu QD, které jsou vůči HSA v nadbytku je vyšší podíl této absorpce přisouzen právě nekonjugovaným QD. Obdobný průběh měla absorbance měřená na výstupu z kolony při 420 nm (Graf 15). To je vlnová délka, při které absorbují zejména QD.

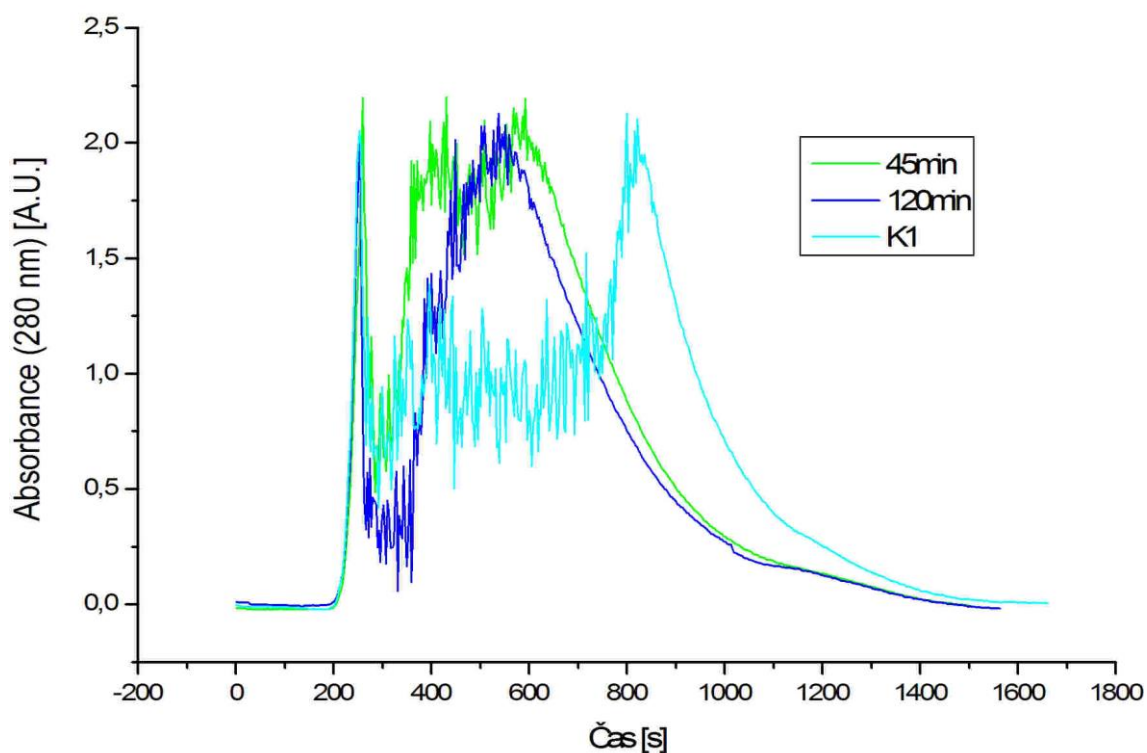
Tvorbu konjugátu a podíl vázaných QD můžeme snadno odvodit z Graf 15. Srovnáme-li absorbanci jednotlivých konjugátů s různou dobou inkubace, pozorujeme s prodlužující se délkou inkubace nárůst u prvního maxima (cca 300 s) a naopak pokles u druhého maxima (cca 600 s). S prodloužením doby inkubace se tedy množství konjugátu s QD zvyšuje a množství volných QD snižuje. Srovnáme-li 120min inkubaci s 30min inkubací kontroly (QD-GA) je hodnota absorbance téměř shodná – nutno zdůraznit mnohonásobně vyšší obsah GA v reakční směsi kontroly. Méně výrazný pokles absorbance volných QD můžeme pozorovat i v Graf 13 a Graf 14.

Jako vhodná doba inkubace může být zvoleno 15 min.

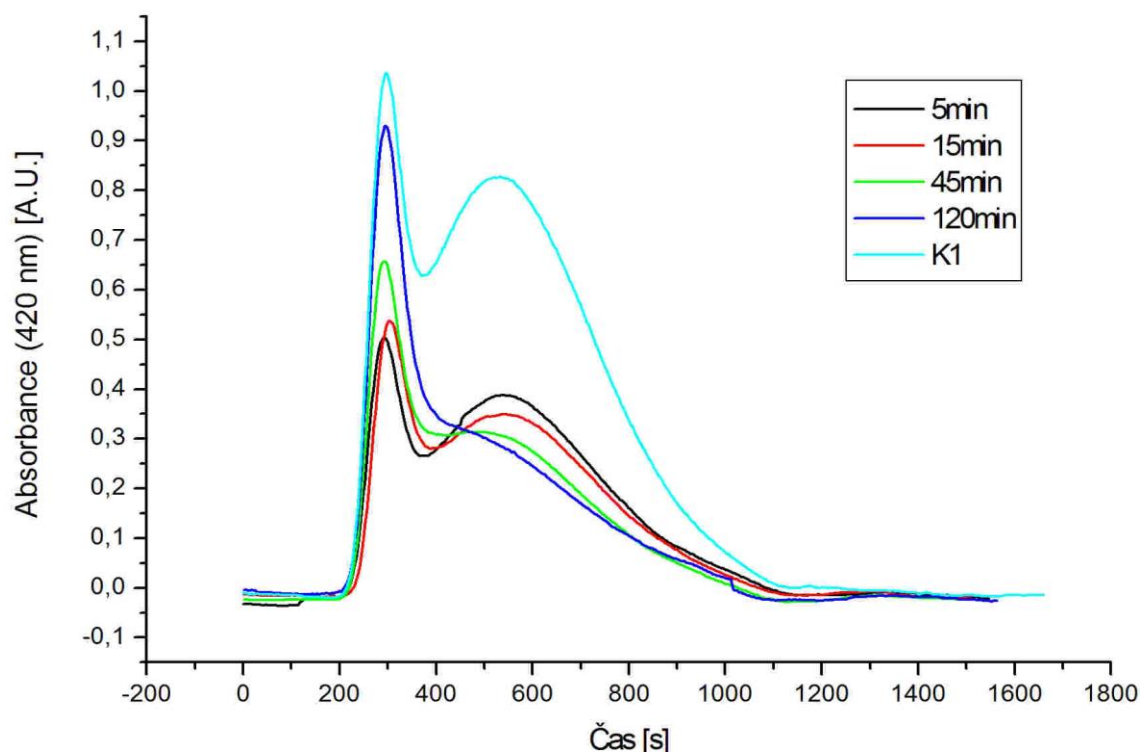




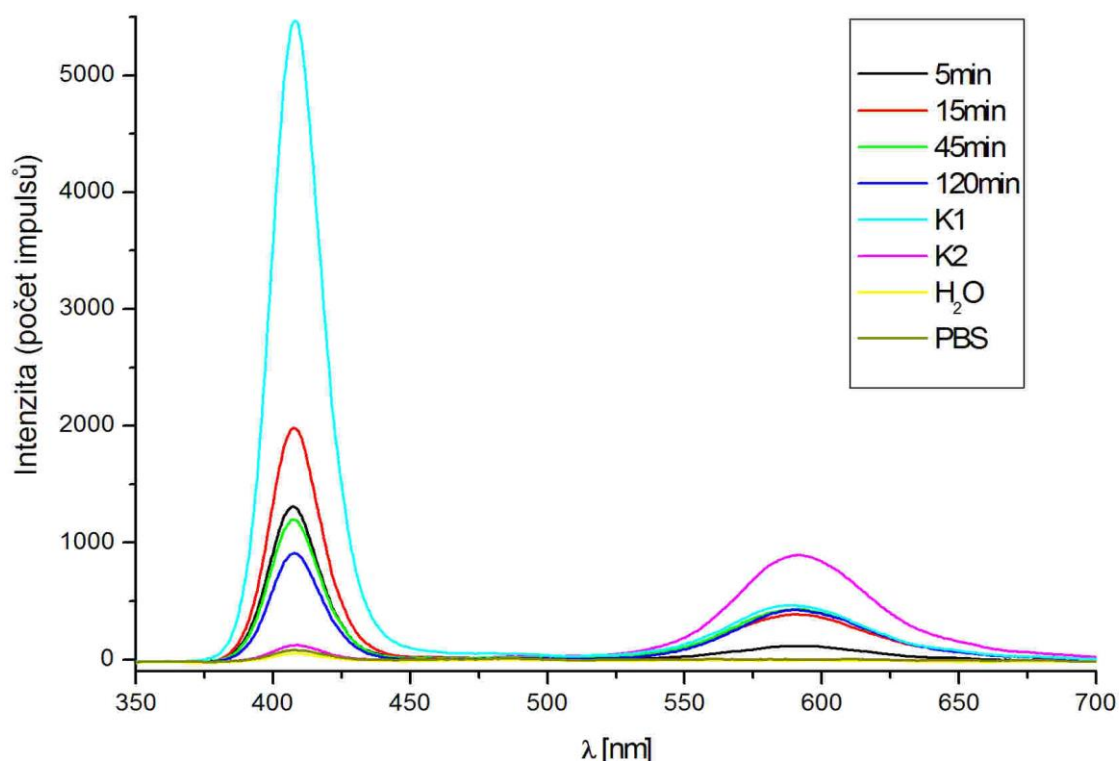
**Graf 13:** Závislost absorbance na čase měřená při 280 nm na výstupu z kolony 5min konjugát (černá); 15min konjugát (červená); K1 (sv. modrá). V grafu jsou patrná dvě maxima: kolem 250 s absorpce konjugátu s QD; 600 s a dále absorpce nekonjugovaného HSA a QD (v případě K1 nekonjugovaných QD)



**Graf 14:** Závislost absorbance na čase měřená při 280 nm na výstupu z kolony 45min konjugát (zelená); 120min konjugát (tm. modrá); K1 (sv. modrá). V grafu jsou patrná dvě maxima: kolem 250 s absorpce konjugátu s QD; 600 s a dále absorpce nekonjugovaného HSA a QD (v případě K1 nekonjugovaných QD)



**Graf 15: Závislost absorbance na čase měřená při 420 nm na výstupu z kolony**  
 5min konjugát (černá); 15min konjugát (červená); 45min konjugát (zelená); 120min konjugát (tm. modrá);  
 K1 (sv. modrá). V grafu jsou patrná dvě maxima: kolem 300 s absorpce konjugátu s QD; kolem  
 600 s absorpce nekonjugovaných QD



**Graf 16: Intenzita rozptýleného (max. 400 nm) a emitovaného záření (max. 600 nm) pro všechny konjugáty.**  
 Jako reference je brán fosfátový pufr a destilovaná voda. K1 konjugát QD-GA (sv. modrá), K2 (růžová)  
 obsahuje jen nepatrné množství tohoto konjugátu s hlavním podílem nekonjugovaných QD.

Graf 16 vyjadřuje závislost intenzity na vlnové délce pro jednotlivé frakce s rozdílnou dobou inkubace, dále pro kontrolu obsahující pouze prokřížené QD-GA konjugáty (sv. modrá) a pro frakci bez konjugátu jímanou při separaci 15 min inkubované směsi (zelená). Jako referenční jsou brány fosfátový pufr a deionizovaná voda. Detekce probíhala v křemenné kyvetě, v kolmém směru od budícího záření (LED 400 nm). V grafu jsou patrná dvě maxima, přičemž první maximum (cca 400 nm) přísluší rozptylu na vzorku a druhé (cca 600 nm) je emisní záření kvantových teček.

Nejvyšší intenzitu v prvním maximu pozorujeme u K1, kdy je tu vysoký podíl konjugátu QD-GA. Emise pro K1 je srovnatelná s jinými konjugáty, ovšem v porovnání s K2 je nižší. Možno usoudit, že v případě kontroly K1, vysoký podíl QD v konjugátu působí samozhášecím vlivem. Na rozdíl od K2, kde je intenzita v prvním maximu sice velmi nízká (díky nízké koncentraci QD konjugátu), ale emise záření je nejvyšší – vlivem volně difundovaných QD se uplatňuje minimální vliv samozhášení.

Intenzita prvního maxima je dána rozptylem záření na jednotlivých konjugátech (vyjdeme-li z měřícího uspořádání), kdy referenční vzorky vykazují nízkou intenzitu a vzorky s konjugátem pak postupně vyšší. Emise jednotlivých konjugátů je téměř shodná, kromě 5min konjugátu kdy je nízký podíl navázaných QD. Emise konjugátů je shodná s emisí K1 - zřejmě se uplatňuje samozhášení. Otevřenou otázkou tedy zůstává, jakou emisi by měly konjugáty za daných podmínek konjugace inkubované v časovém rozmezí 5 – 15 min.

Podle výše diskutovaných výsledků konjugát vznikl, ale podle negativního výsledku FIA není schopen vázat se s protilátkou. Zřejmě došlo k ovlivnění epitopů molekuly HSA – je otázka nakolik redukce volných  $\text{NH}_2$  skupin způsobila toto ovlivnění. Kdyby se totiž jednalo o přesytní QD byla by přinejmenším aktivní molekula po 5min nebo 15min inkubaci.

## Souhrn

Sledování optických změn v citlivé oblasti sensoru je komplikováno několika jevy. Sledovaná plocha je v porovnání s celkovou aktivní plochou sensoru několikanásobně menší. Pro studium afinity se musí vyjít z předpokladu, že sledovaná plocha je rovnoměrně pokryta protilátkou a protilátka je rovnoměrně aktivní v celé ploše. Takto malá sledovaná plocha souvisí i s nízkou optickou aktivitou. Pro důkladnější studium afinit biomolekul je třeba mnohem citlivější optická detekce.

Nejzávažnější problém souvisí s nízkou afinitou protilátek k značeným antigenům. Pro účely piezoelektrické detekce je afinita sice dostačující ale v kombinaci s následnou optickou detekcí nikoli. Pro další studium by bylo výhodnější zvýšit afinitu tak, aby disociace neproběhla při promývání systému pufrem, aby mohla být sledována optická změna po vazbě fluoroforu na aktivní povrch sensoru.

Funkční konjugát HSA s kvantovými tečkami by mohl pomoci při řešení problému zmíněného výše. Příprava konjugátu se sice podařila, ale vzniklý konjugát nebyl schopný vazby s protilátkou.

Přínosem práce je konstrukce kombinované průtočné cely, která se v kombinaci s použitím citlivější optické detekce stane vhodným nástrojem pro studium interakcí biomolekul.

## Summary

Monitoring of optical changes in a sensitive sensor's area is complicated by several phenomena. The monitored area is severalfold less than the total active sensor's surface. For an affinity study there has to be presumed that the monitored area is equally coated by an antidote and the antidote is equally active on the whole monitored surface. Such a small monitored area is also connected with a low optical activity. For a full affinity study there is necessary a much more sensitive optical detection.

The most severe problem is connected with a low antidote affinity to marked antigens. The affinity is sufficient for piezoelectric detection purposes, but it is not sufficient for a subsequent optical detection. For further research it would be more efficient to increase the affinity in a way that this higher affinity would prevent dissociation of an antidote and marked antigens during a buffer washing process and it would enable to monitor an optical change after a fluorophore linkage to the active sensors surface.

A functional conjugate HSA with quantum dots may facilitate to solve the problem mentioned above. The conjugate preparation has succeeded, but the created conjugate has not been able to link the antidote.

Contribution of this work is a construction of the combined flow-trough cell, which together with a sensitive optical detection becomes a handy tool for a study of biomolecules interactions.

## Citovaná literatura

---

1. **Skládal, P.** *Biosensory*. Brno : PřF MU, 2002.
2. **Trögl, J.** Biosenzory. *Automa*. 2006, 04.
3. **Skládal, P.** Biosensory - současný stav a perspektivy. *Chem. Listy*. 1997, Sv. 91, 2, 105 - 113.
4. **Rogers, K. R. a Mulchandani, A.** *Affinity Biosensors: Techniques and Protocols*. New Jersey : Humana Press, 1998. ISBN 0-89603-539-5.
5. **Reichl, J. a Všeticka, M.** Piezoelektrický jev. *Encyklopedie fyziky*. [Online] [Citace: 18. 12. 2008.] <http://fyzika.jreichl.com/index.php?sekce=browse&page=419>.
6. **PIEZO SYSTEMS, INC.** . History of piezoelectricity. *PIEZO SYSTEMS, INC.* [Online] [Citace: 18. 12. 2008.] <http://www.piezo.com/tech4history.html>.
7. **Čičmanec, P.** *Všeobecná fyzika 2, Elektrina a magnetismus*. Bratislava : Alfa a SNTL, 1980.
8. **Erhart, J.** Piezoelektrické „chytré“ materiály pro elektrotechniku. *ELEKTRO*. 2002, 11.
9. **APC International, Ltd.** Piezoelectricity. *Americanpiezo*. [Online] [Citace: 28. 11. 2008.] [http://americanpiezo.com/piezo\\_theory/index.html](http://americanpiezo.com/piezo_theory/index.html).
10. **Reichl, J. a Všeticka, M.** Piezoelektrická keramika. *Encyklopedie fyziky*. [Online] [Citace: 18. 12. 2008.] <http://fyzika.jreichl.com/index.php?sekce=browse&page=422>.
11. **Kumar, A.** Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. *JOM*. 09 2000, Sv. 52, 10.
12. **Mascini, M.; Minunni, M.; Guilbault, G. G.; Carter, R.** Immunosensors Based on Piezoelectric Crystal Device. [autor knihy] K. R., Mulchandani, A. Rogers. *Affinity Biosensors: Techniques and Protocols*. místo neznámé : Humana Press, 1998, 4, 55-63.
13. **Král, V.; Křondřák, M.; Šťastný, M.; Volf, R.; Broncová, G.; Shishkanová, T.; Hlávka, K.; Z., Kejík.** Chemické sensory: představují budoucnost analytické chemie? [autor knihy] K. Štulík a J. Barek. *Sensory*. Praha : VŠCHT, 2007, 154-155.
14. **Opekar, F.** Sensory plyných látek. [autor knihy] Barek J. Štulík K. *Sensory*. Praha : Pražské analytické centrum inovací, 2007, 197-198.
15. **Tel Aviv University.** Quartz Crystal Microbalance. *Tel Aviv University*. [Online] [Citace: 18. 12. 2008.] <http://www.tau.ac.il/~phchlab/experiments/QCM/QCM.html>.
16. **ICM.** Quartz Crystal Microbalance (QCM) Products . *International Crystal Manufacturing Company, Inc. (ICM)*. [Online] [Citace: 18. 12. 2008.] <http://www.icmfg.com/quartzmicrobalance.html>.
17. **Bunde, R. L., Jarvi, E. J. a Rosentreter, J. J.** Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*. 8 1998, Sv. 46, 6, 1223-1236.

18. **Skládal, P.** Piezoelektrické biosensory. *Chem. listy*. 1995, Sv. 89, 170-179.
19. **Horáček, J.** Piezoelektrické biosenzory. *Diplomová práce*. Brno : PřF MU, 1996. Vedoucí DP: RNDr. Petr Skládal, CSc..
20. **Skládal, P.** Použití biosensorů ke studiu afinitních interakcí biomolekul. *Chem. Listy*. 1996, Sv. 90, 863-872.
21. **Reichl, J. a Všetická, M.** Optická vlákna. *Encyklopedie fyziky*. [Online] [Citace: 18. 12. 2008.] <http://fyzika.jreichl.com/index.php?sekce=browse&page=557>.
22. **Buerk, D. G.** Photometric transduction. [autor knihy] R. F. Taylor a J. S. Schultz. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*. místo neznámé : IOP Publishing, 1996.
23. **ISS, Inc.** Fluorescence Quantum Yield Standards. *Innovations in Fluorescence*. [Online] [Citace: 09. 01. 2009.] <http://www.iss.com/resources/yield.html>.
24. **Batflett, P. N.** Modification of sensor surfaces. [autor knihy] R. F. Taylor a S. J. Schultz. *Handbook of Chemical and Biological Sensors*. místo neznámé : IOP Publishing Ltd., 1996.
25. **Global FIA, Inc.** FIA/SIA Tutorial. [Online] [Citace: 16. 12. 2008.] <http://www.globalfia.com/tutorial.html>.
26. **FIAlab Instruments.** FIA/SIA Principles. [Online] [Citace: 16. 12. 2008.] <http://www.flowinjection.com/method2.aspx>.
27. **Ruzicka, J.** *Principles, Tutorials, and Resources - Flow Injection Analysis*. [CD] First Edition.
28. **Kawaoka, A.; Matsunaga, E.; Endo, S.; Kondo, S.; Yoshida, K.; Shinmyo, A.; H., Ebinuma.** Ectopic Expression of a Horseradish Peroxidase Enhances Growth Rate and Increases Oxidative Stress Resistance in Hybrid Aspen. *Plant Physiol*. Sv. 132, stránky 1177-1185.
29. **Molecular Probes: The Handbook.** *Invitrogen*. [Online] [Citace: 19. 03. 2009.] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Generating-and-Detecting-Reactive-Oxygen-Species.html>.
30. **Zheng, Y., Gao, S. a Ying, J. Y.** Synthesis and Cell-Imaging Applications of Glutathione-Capped CdTe Quantum Dots. *Advanced Materials*. 2007, Sv. 19, 3, 376–380.
31. **Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H.** Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *nature materials*. June 2005, Sv. 4, 6, stránky 435-446.

32. **Cai, W.; Shin, D. W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.; Wang, S. X.; Gambhir, S. S.; Chen, X.** Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects. *NANO LETTERS*. 2006, Sv. 6, 4, stránky 669-676.
33. **Kumar, S. S., Chouhan, R. S. a Thakur, M. S.** Enhancement of chemiluminescence for vitamin B12 analysis. *Analytical Biochemistry*. 15. May 15 May 2009, Sv. 388, 2, stránky 312-316.
34. **Hermanson, G. T.** *Bioconjugate Techniques*. 2nd Edition. San Diego : Academic Press, 2008. 798-799. ISBN: 978-0-12-370501-3.
35. —. *Bioconjugate Techniques*. 2nd Edition. San Diego : Academic Press, 2008. 602; 798-800; 804. ISBN 978-0-12-370501-3.
36. **Adamcová, K.** Studium enzymových biokonjugátů pomocí biosensorů. *Diplomová práce*. Brno : PřF MU, 2006. Vedoucí DP: doc. RNDr. Petr Skládal, CSc..
37. **Avantes.** Reflection Probe (Standard). *Avantes Solutions in Spectroscopy*. [Online] [Citace: 03. 11. 2008.] <http://www.avantes.com/Chemistry/Reflection-Probe-Standard/Detailed-product-flyer.html>.
38. **Pohanka, M., Skládal, P. a Pavliš, O.** Label-Free Piezoelectric Immunosensor for Rapid Assay of Escherichia coli. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2008, Sv. 29, 1, stránky 1532-1819.