

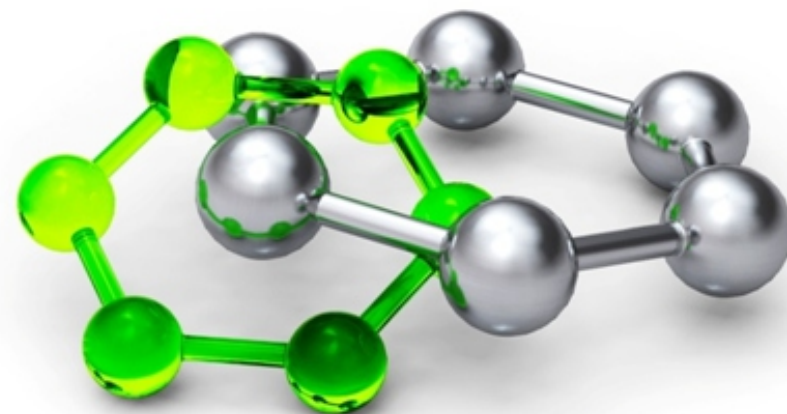


Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

Nanočástice v bioanalytické chemii



INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT



Nanočástice

- Nanočástice
- Biokonjugáty nanočástic
- Vybrané typy a aplikace nanočástic
 - Kvantové tečky
 - Raciometrické nanosenzory
 - Anti-Stokesova luminescence
 - Kovové nanočástice
 - Magnetické nanočástice

Definice nanočástice

- *Nano* je v soustavě SI předpona označující násobky 10^{-9} . Je odvozena z řeckého νᾶνος - trpaslík.
- Nanočástice jsou částice s velikostí 1 až 100 nm.
- Jedná se tedy o struktury větší než malé molekuly, ale polymery (proteiny, DNA, dendrimery) a kovové klastry se mezi nanočástice neřadí, i když rozměrově zapadají. Naproti tomu polymerní nanočástice a kovalentní nanokrystaly (diamant, křemík) se za nanočástice běžně považují. Také například liposomy a polymersomy se obvykle neoznačují jako nanočástice, spíše se používá označení „nanovesicles“.
- Někdy se používá alternativní definice, která říká, že nanočástice je objekt, jehož alespoň jeden rozměr je v rozmezí 1 až 1000 nm. Je však asi vhodnější takové struktury označovat jako nanovlákná a nanopláty
- Rozsah velikostí 1-100 nm se překrývá s rozměry koloidních částic od 1 do 1000 nm (mesoscale). Často se tedy mezi nanočásticemi a koloidními částicemi nerozlišuje.

Nanočástice-historie

- První cíleně vyráběné nanočástice jsou z 5. až 4. století před naším letopočtem-barvení skleněných a keramických předmětů částicemi ušlechtilých kovů; Lykurgovy poháry
- V pozdější době první bioaplikace(?) zlatých nanočástic; léčba nejrůznějších nemocí
- Barvení hedvábí
- 1818 Jeremias Benjamin Richters, 1847 Michael Faraday
 - **Optické vlastnosti zlatých nanočástic se liší od vlastností větších zlatých objektů**
- Počátek 20. století první přímé pozorování nanočástic (Richard Adolf Zsigmondy, ultramikroskop, 10 nm zlaté nanočástice)
- 1931 Ernst Ruska transmisní elektronový mikroskop
- Stále rostoucí zájem až do současnosti

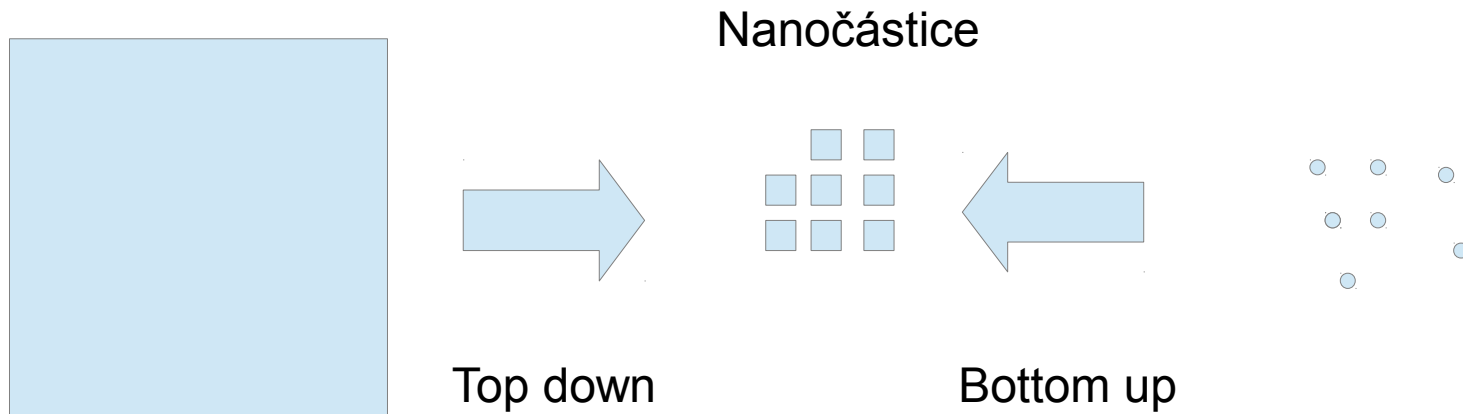
Typy syntéz

- Top down

- mletí (oxidy kovů), exploze, elektrochemický rozpad elektrod (Si, Au)
- většinou se připraví málo definované nanočástice

- Bottom up

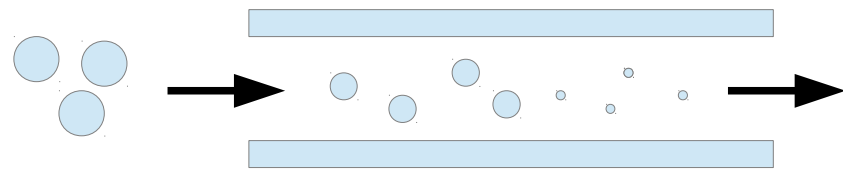
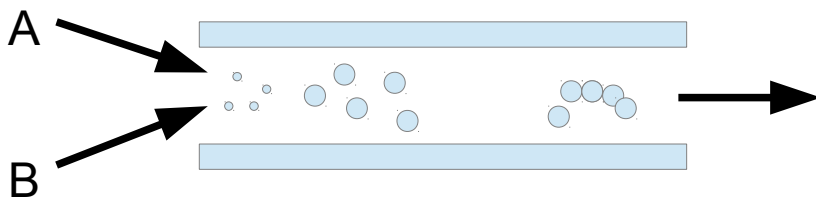
- Chemickou přeměnou prekurzorů vznikají stavební komponenty nanočástic
- Dále lze rozdělit na syntézy v plynné a kapalně fázi



- Syntéza v plynné nebo v kapalně fázi

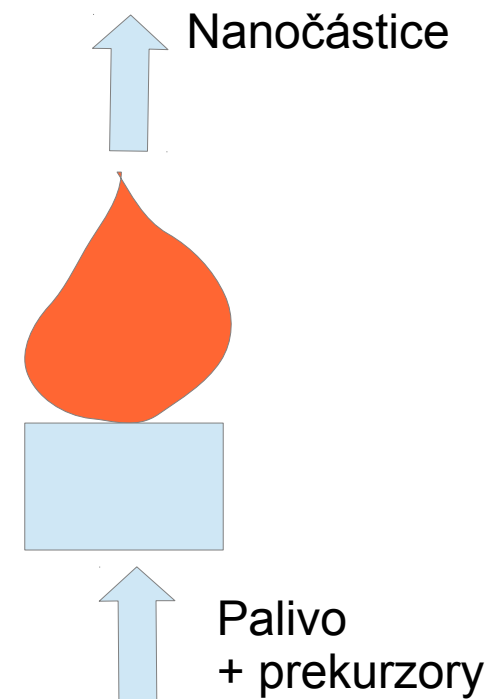
Trubicový reaktor

- Trubicový reaktor s vyhřívanými stěnami
- Energie dodávána stěnami reaktoru
- Dobrá regulace reakčních podmínek
- Možné produkovat velké množství různých materiálů
- Produkce nanočástic kovů, oxidů kovů, sulfidů...
- Další možností přípravy nanočástic je vytvořením kapalného roztoku, jeho rozptýlení do podoby aerosolu, následné odpaření a chemické reakce
- Reakce probíhají v omezeném prostoru, tj. definovaněji
- Kovy, oxidy, soli, polymerní nanočástice



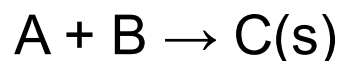
Plamenový reaktor

- Syntéza probíhá za současného spalování paliva v plameni při vysokých teplotách (1000-2400°C)
- Následkem vysoké teploty dochází k chemickým přeměnám prekurzorů nanočástic dodávaných v plynné fázi nebo jako aerosol
- Metoda je vhodná pro produkci velkých objemů nanočástic (SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , soly kovů, kovy)
- Celý proces je obtížné regulovat



Příprava v kapalině

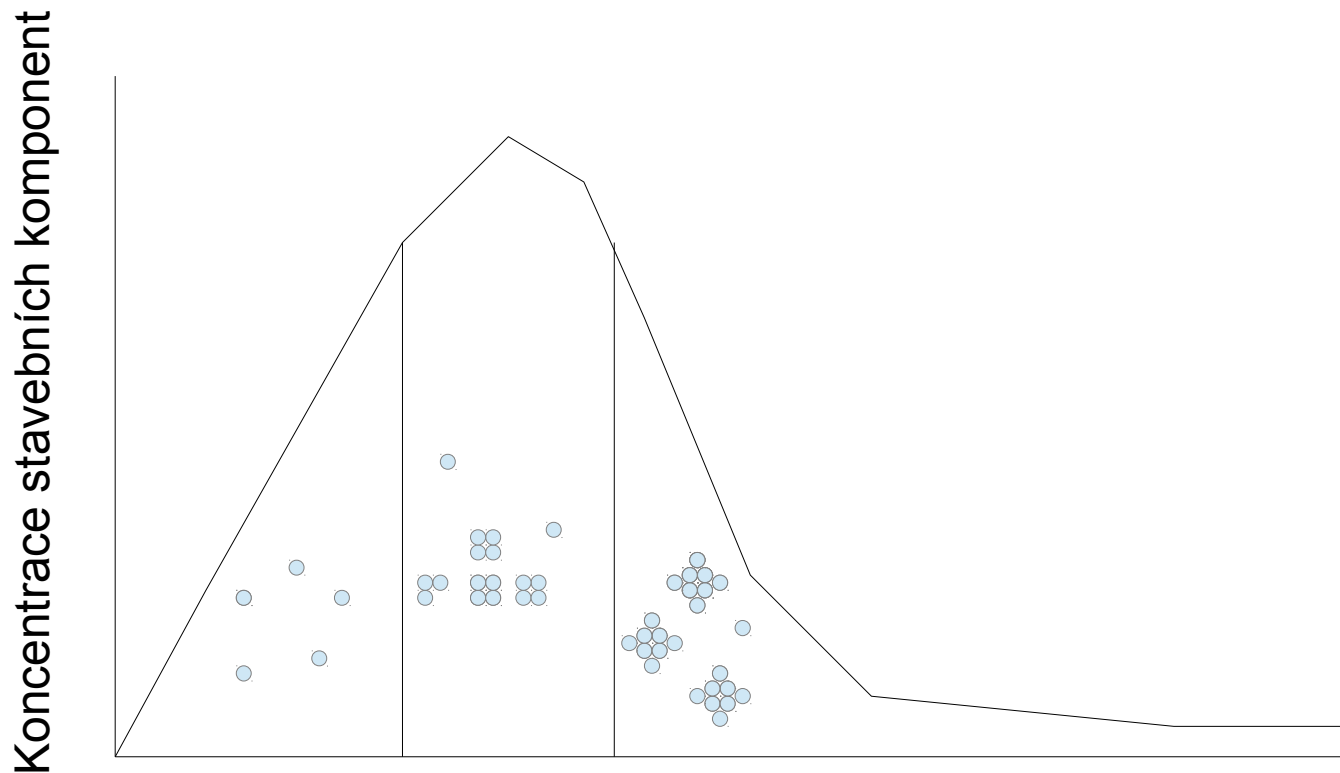
- Velké množství nanočástic je možné připravit v kapalně fázi.
- Příprava je založená na vzniku pevných částic z kapalných nebo rozpuštěných prekurzorů



- Produkt C je obvykle nerozpustná látka, která rychle vytváří nukleační centra, která jsou následně zvětšují za vzniku nanočástic
- Proti předchozím metodám má příprava nanočástic v kapalině několik výhod
 - Dobře kontrolovatelné parametry syntézy (tlak, koncentrace, teplota)
 - Dlouhodobě vyvíjena, existuje velké množství protokolů
 - Aparatura pro syntézy je nenáročná
 - Lze připravit vysoce monodisperzní nanočástice
- Nevýhodou je však:
 - spíše empirický postup při vývoji nových protokolů
 - proces přípravy má obvykle mnoho kroků (příprava směsi, reakce, promývání, vysoušení, purifikace)

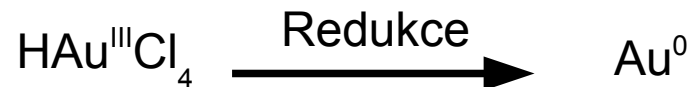
Příprava v kapalině-LaMer

- LaMerova teorie: Předpokládá, že při vzniku nanočástic nejdříve chemickou reakcí prekursorů dochází k vytvoření vysoké koncentrace stavebních komponent nanočástice (přesycený roztok). Následně dojde k vytvoření nukleačních jader, která rostou až do konečné podoby nanočástice. Při tom postupně dochází ke spotřebě prekursorů a zastavení růstu.

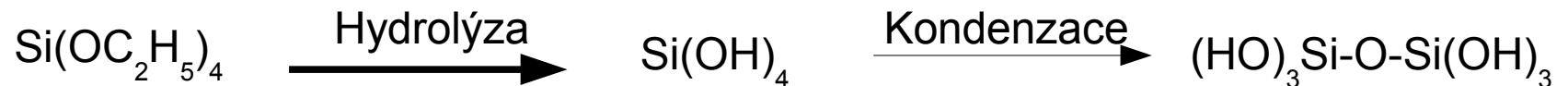


Příprava v kapalině-příklady

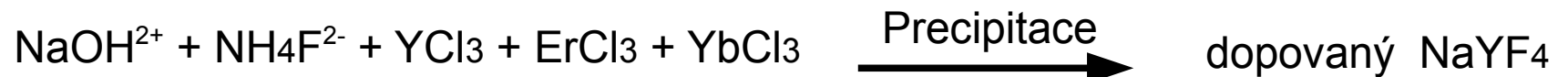
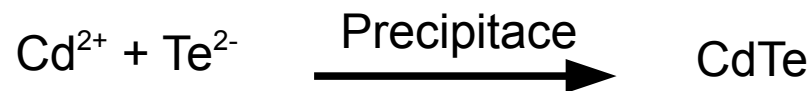
- Příprava zlatých nanočástic



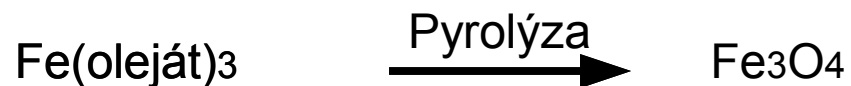
- Příprava silikátových nanočástic



- Příprava chalkogenidových nanokrystalů

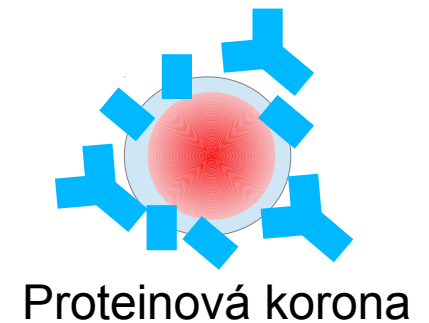
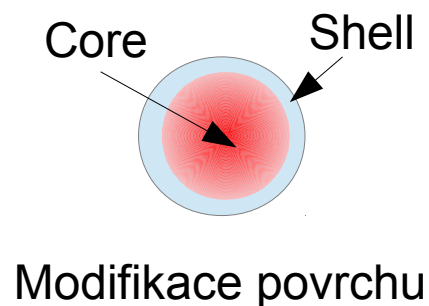
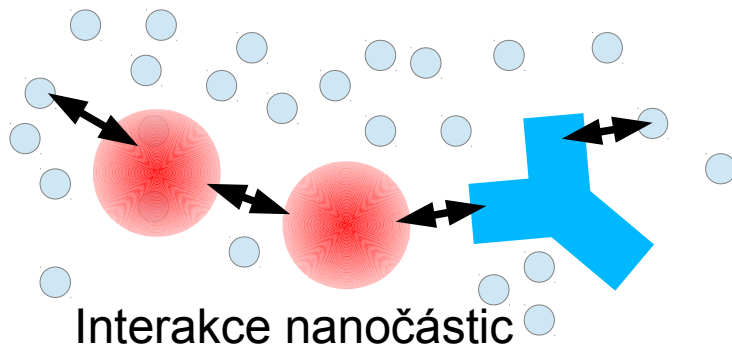


- Příprava nanokrystalů Fe_3O_4



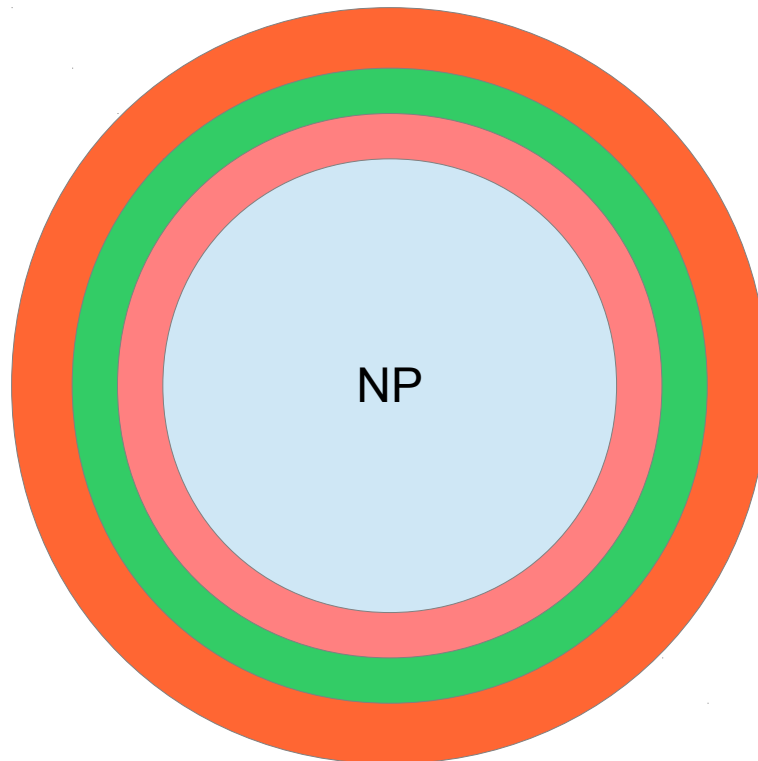
Povrch nanočástic

- Nanočástice se obvykle nevyskytují izolovaně (ve vakuu). Nejčastěji uvažujeme disperze nanočástic, tj. nanočástice rozptýlené v jiné látce:
 - plyn
 - kapalina
 - pevná fáze
- Pro bioaplikace jsou obvykle používány nanočástice dispergované ve vodných roztocích.
- Nanočástice interagují se sebou navzájem, s okolní kapalinou i jinými komponentami v prostředí (buněčná stěna, proteiny, jiné nanočástice, imunitní systém...). Tyto interakce jsou někdy žádoucí a někdy nežádoucí. Účastní se jich povrch nanočástic -> **velká důležitost povrchové chemie pro bioaplikace nanočástic.**



Nanočástice v kapalině

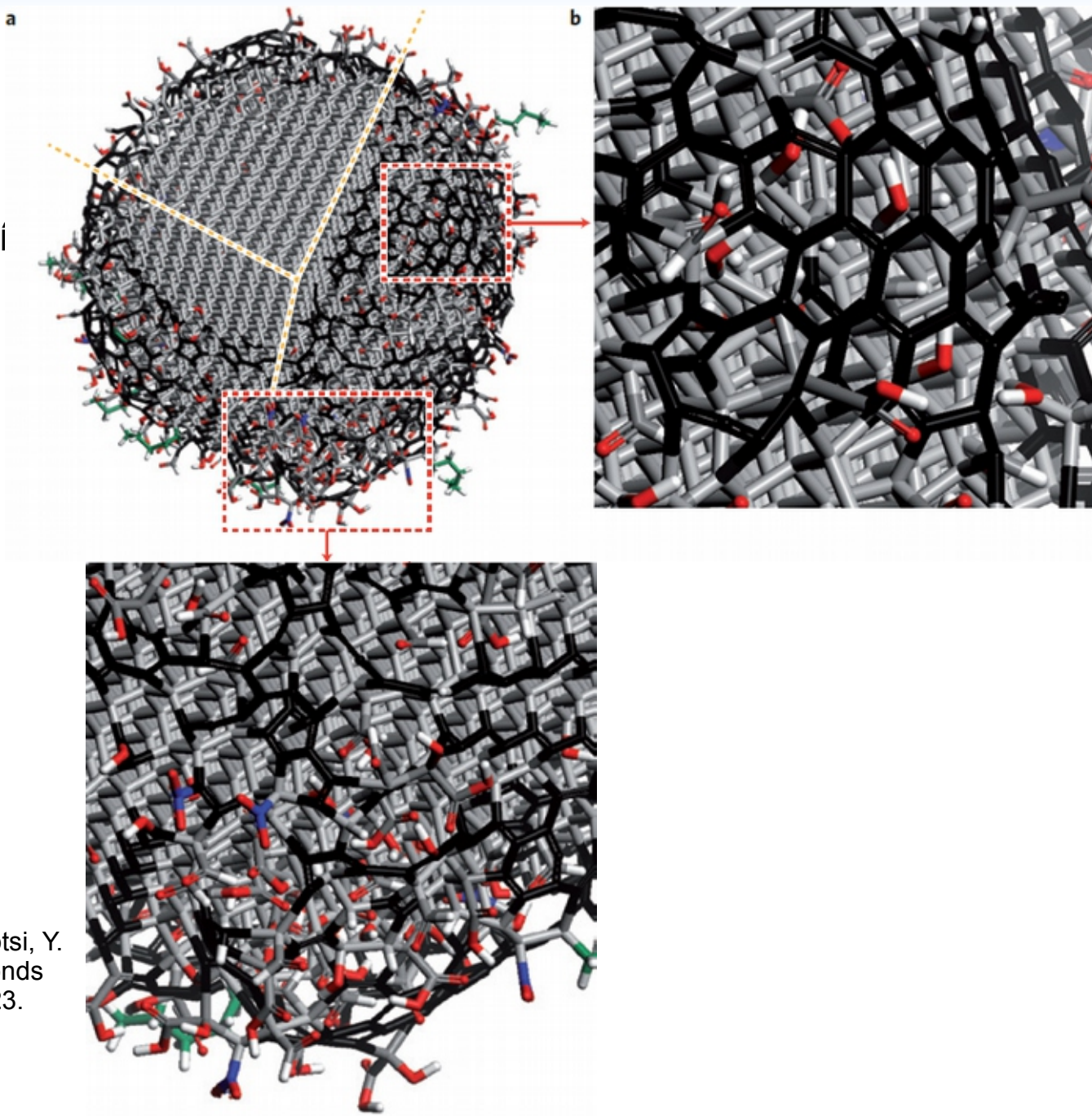
- Povrch nanočástic, které mají být využívány pro „bioaplikace“, je obvykle tvořený vrstvou, která se skládá ze tří částí. Jednotlivé části mají následující funkce:
 - Chemická stabilizace povrchu
 - Stabilizace disperze nanočástic (tj. omezení nechtěných interakcí)
 - Zavedení reaktivních skupin pro další specifické modifikace (syntéza biokonjugátů)



Příklady povrchů nanočástic

● Kovalentní nanočástice

- nanokrystal diamantu: krystalová mřížka tetraedrů uhlíku přechází na povrchu ve vrstvu zbytků organických molekul



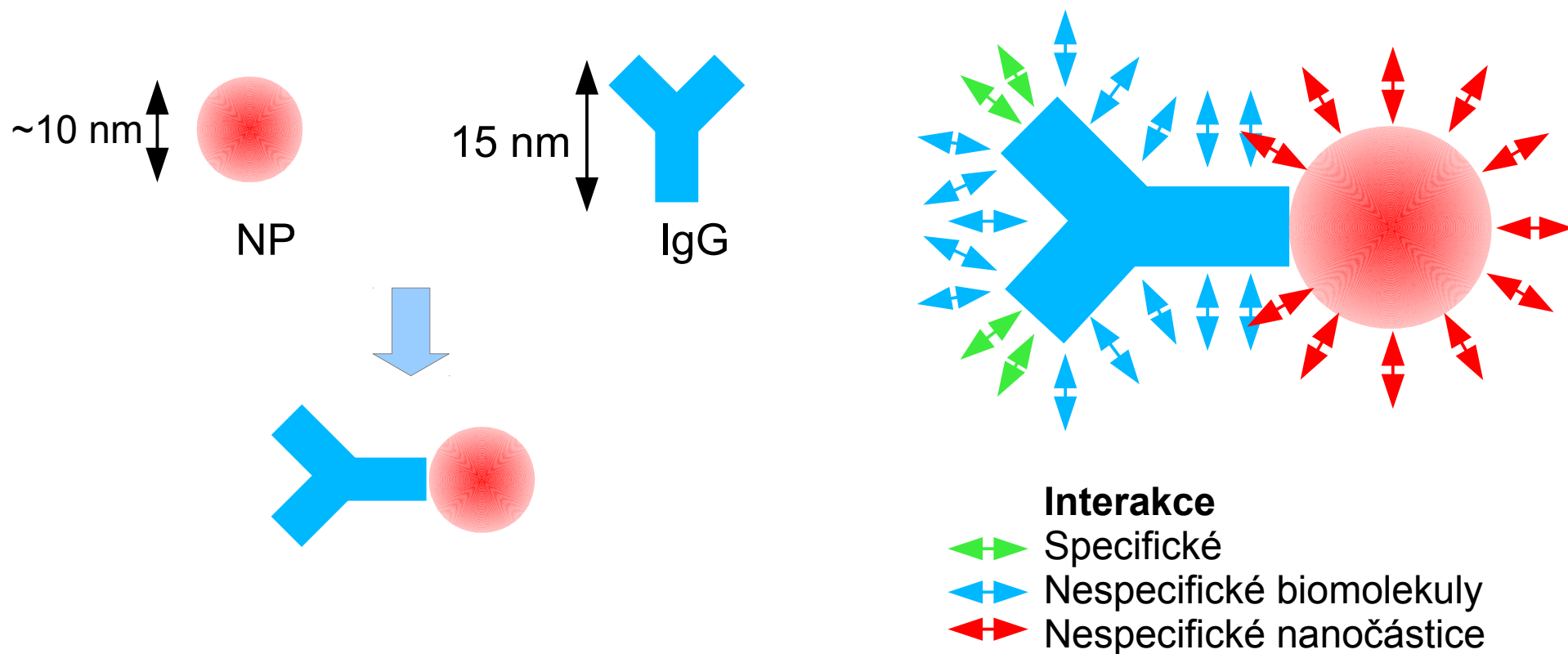
Mochalin, V.N., Shenderova, O., Ho, D., Gogotsi, Y.
The properties and applications of nanodiamonds
(2012) Nature Nanotechnology, 7 (1), pp. 11-23.

Stabilita disperze nanočástic

- Nanočástice v kapalném prostředí neustále interagují s molekulami kapaliny, se sebou navzájem, s pevnými částicemi v prostředí, se stěnami nádoby...
- Interakce lze rozdělit do několika skupin
 - Van der Waalsovy interakce
 - Elektrostatické interakce
 - Solvatační (hydratační) interakce
 - Hydrofobní interakce
 - Sterické interakce
- Tyto interakce jsou jak přitažlivé, tak odpuzivé. Jestliže mezi částicemi převládnu přitažlivé interakce, dojde k vytvoření agregátů nanočástic. Podobně může dojít k adsorpci nanočástic na různé povrchy, membrány...
- Interakce nanočástic s prostředím lze řídit úpravou povrchových vlastností nanočástic.

Biokonjugáty nanočástic

NPs jsou „rozměrově kompatibilní“ s biomolekulami, což umožňuje vytvářet nanostruktury nesoucí biologickou funkci biomolekuly (např. specifická interakce protilátek, rozeznávání specifické sekvence NA) a zajímavé vlastnosti nanočástic usnadňujících jejich detekci (např. luminiscence). Takové struktury nazývané biokonjugáty nanočástic (nanobiokonjugáty) a jejich uplatnění v biologii, medicíně i analytické chemii je široké.



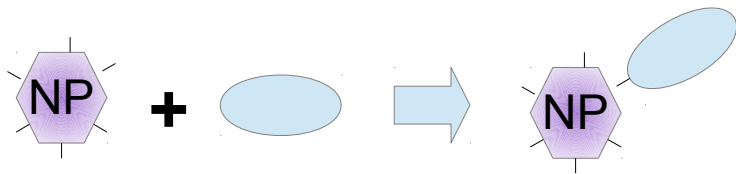
Připojení biomolekul

● Nanočástice

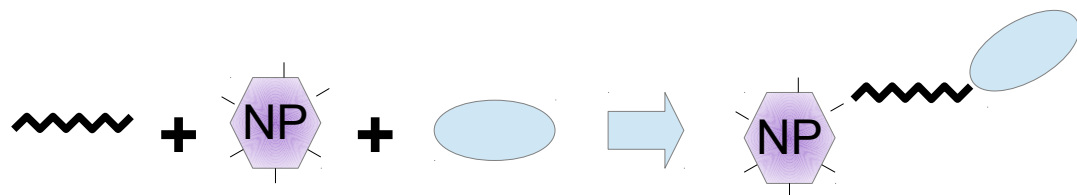
- Karboxyl -COOH
- Amin -NH₂
- Thiol -SH
- Aldehyd -CH=O
- Epoxy skupina
- Maleimidová skupina
- Sacharidy
- Biotin
- DNA
- Bioorthogonální skupiny, click chemistry

● Biomolekula

- Karboxyl -COOH
- Amin -NH₂
- Thiol -SH
- Sacharidy
- Nukleové kyseliny
- Avidin
- Zavádění dalších skupin, bioorthogonální skupiny, click chemistry



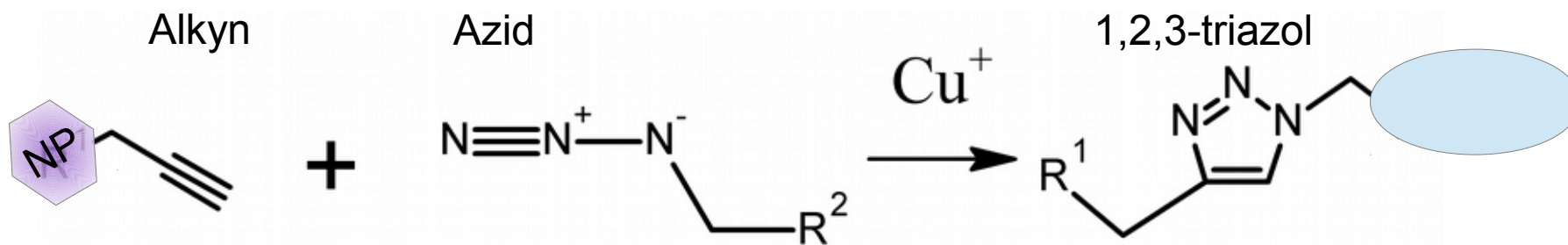
Spojení přímo



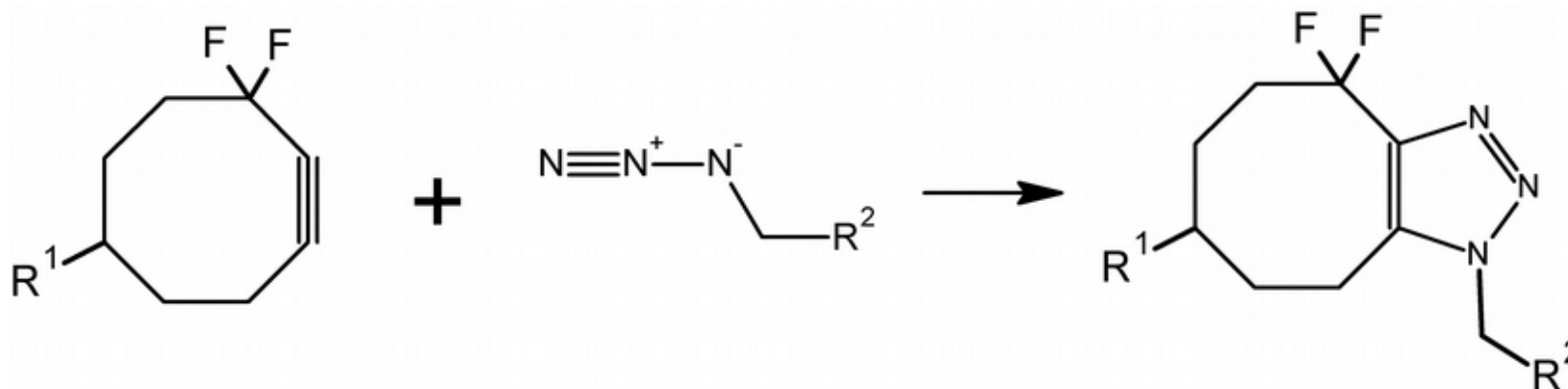
Spojení pomocí linkeru

Azid-alkyn [3 + 2] cycloadice

- Nejznámější „click“ reakce



- Hlavní nevýhodou této reakce je potřeba katalýzy Cu^+ ionty (cytotoxické, modifikace biomolekul, copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition).
- Tyto problémy řeší „strain promoted“ cykloadice mezi alkyny v energeticky nevýhodné konformaci a azidy; není potřeba katalýza Cu^+ ionty, lze použít i pro konjugace *in vitro*, *in vivo*.



Typy nanočastic

- Materiál
- Struktura
- Tvar
- Vlastnosti



Typy nanočástic: vlastnosti

- Luminiscence, interakce s elektromagnetickým zářením
- Katalýza
- Specifické interakce s prostředím (nanosenzory)
- Magnetické vlastnosti
- „Transportní“ vlastnosti (malé molekuly, nukleové kyseliny)
- Schopnost samosestavení
- Jiné (schopnost rozpadnout se, schopnost pohybovat se – nanomotory, nanoroboti)

Polovodičové nanokrystaly

- Obvykle označovány jako kvantové tečky (quantum dots, QDs)
- Velmi malé nanokrystaly 2-20 nm, velikost podobná proteinům
- Materiál obvykle CdTe, CdSe, PbS, InP, Si a jiné
- Často jako vrstevnaté struktury „core/shell“ například CdSe/ZnS, InP/ZnS...
- Vyznačují se zajímavými optickými vlastnostmi
 - Úzké emisní píky
 - Široké absorpční pásy v krátkovlnné oblasti spektra
 - Je možné dosáhnou až 100% kvantových výtěžků
 - Vysoká odolnost proti degradaci zářením (podle prostředí a povrchové modifikace)
 - Emisní i absorpční spektra jsou závislá nejen na materiálu polovodiče, ale i na velikosti kvantové tečky

Kvantové tečky



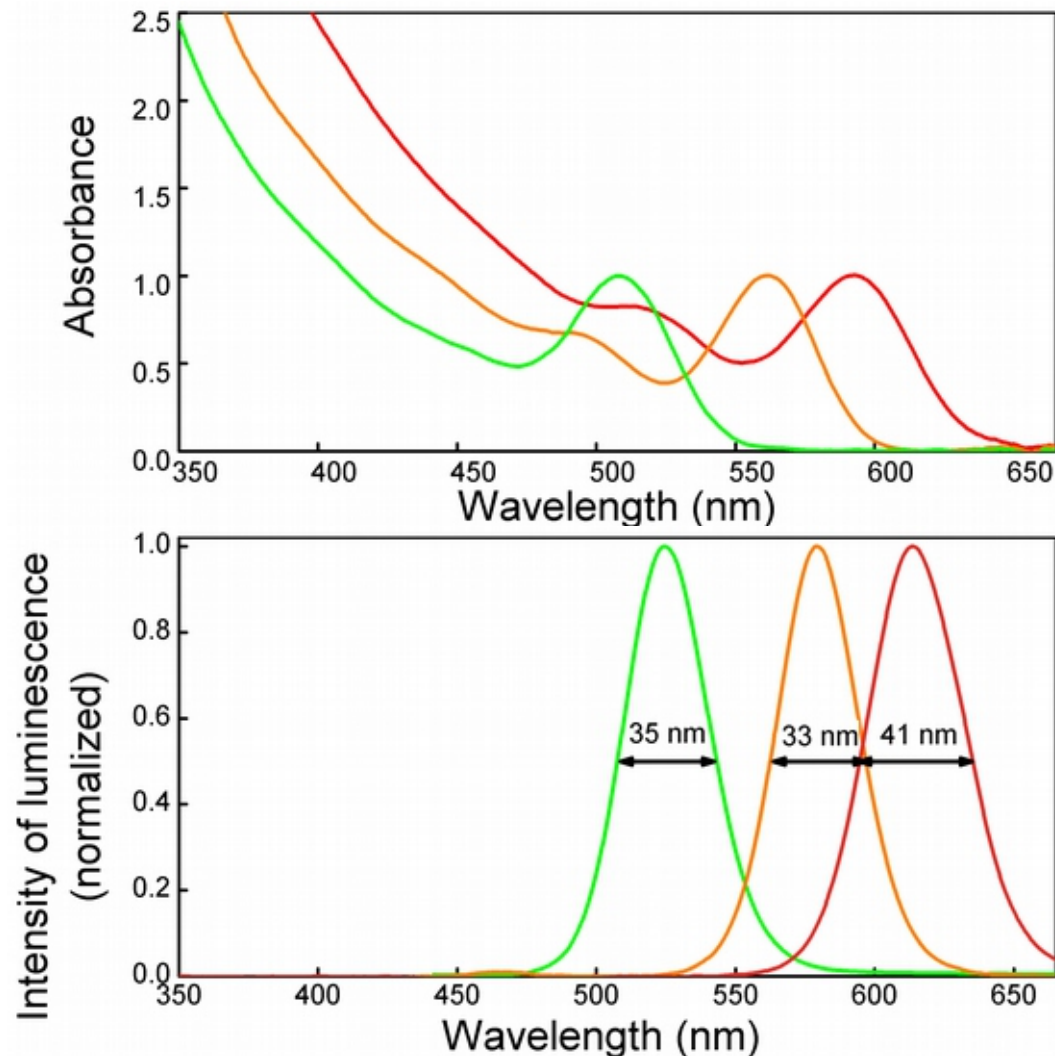
Φ 2.5 nm
CdTe



Φ 3.0 nm
CdTe

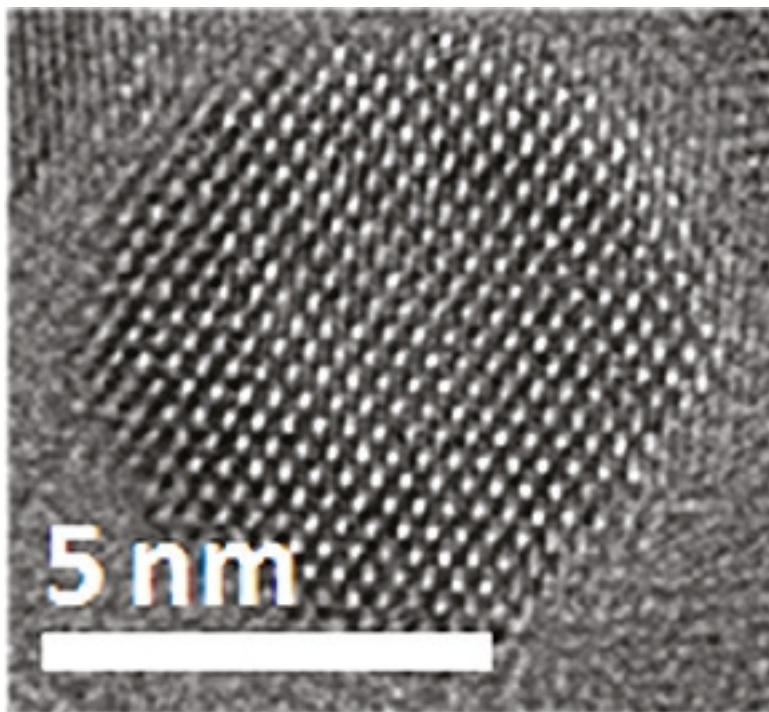


Φ 3.4 nm
CdTe

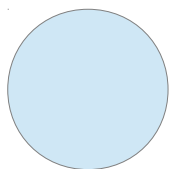


Na rozdíl od organických fluoroforů roste absorpční koeficient QDs s klesající vlnovou délkou. Proto je možné tyto nanočástice excitovat jednou vlnovou délkou v UV oblasti. Při více kanálových zobrazováních proto není nutné používat zdroj s více vlnovými délkami, což snižuje náročnost experimentální aparatury

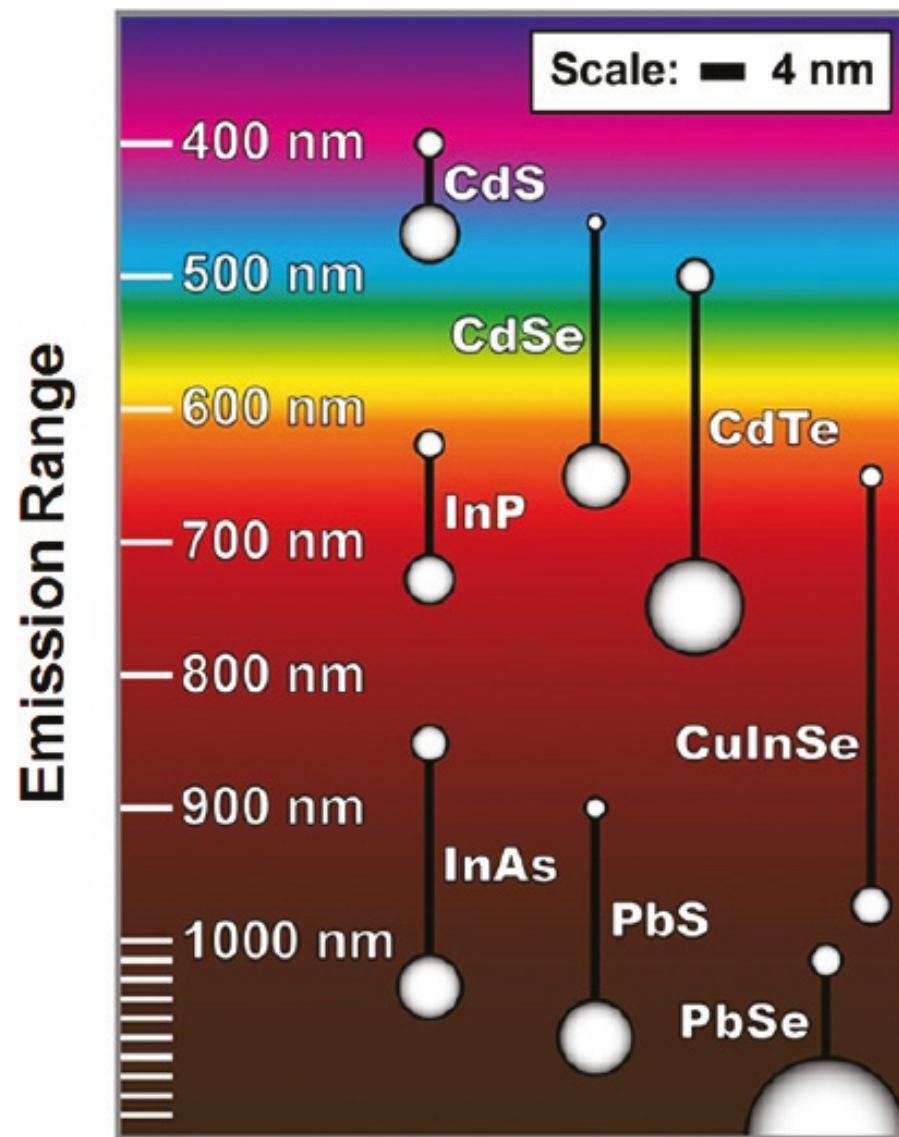
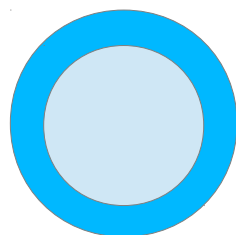
Polovodičové nanokrystaly



CdSe



Core/Shell
CdSe/ZnS



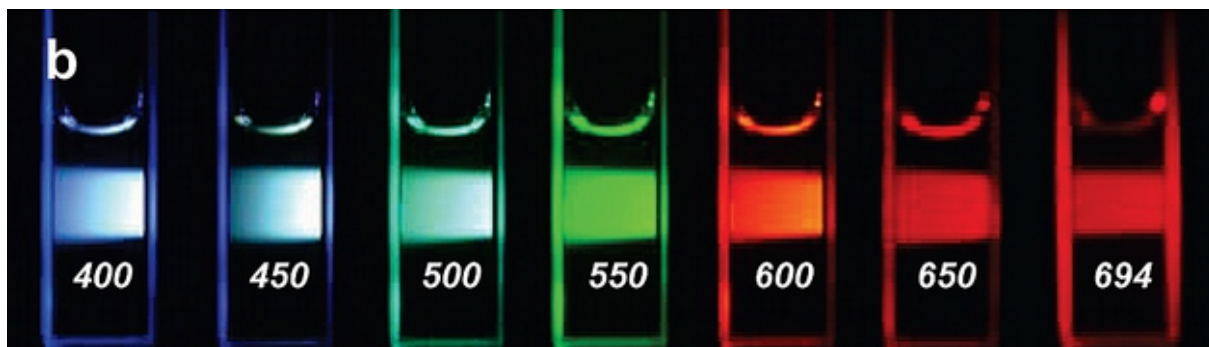
Core Material & Sizes

Polovodičové nanokrystaly

- Vedle CdSe nanokrystalů jsou CdTe QDs nejvíce používané pro biologické aplikace; CdTe nanokrystaly lze snadno připravovat ve vodném prostředí
- Vlastnosti CdTe
 - Emisní maxima v závislosti na velikosti od asi 500 nm do 800 nm (velikost nanokrystalů 2 až 20 nm)
 - Kvantové výtěžky kolem 50%, po biokonjugaci nižší, kolem 20%
- Klasické materiály jsou toxické (CdTe, CdSe, HgTe, PbS...); začínají se používat jiné materiály
 - Si
 - ZnS dopované manganem
 - InP, InP/ZnS
 - Ag₂S, Ag₂Se

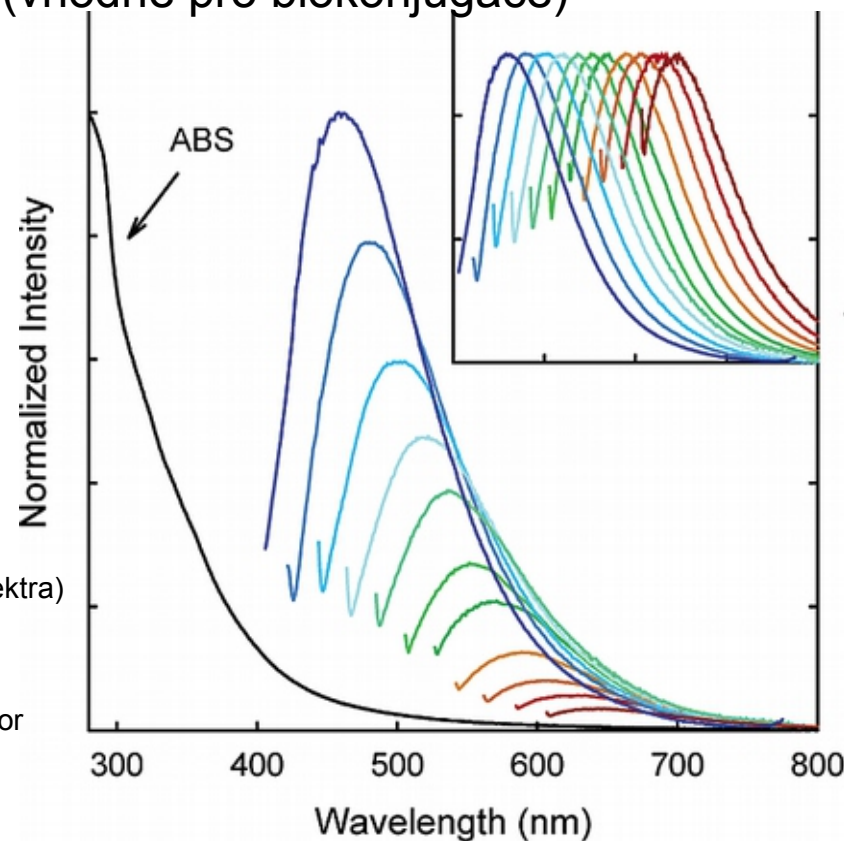
Uhlíkové nanočástice

- Označované jako C-dots (někdy se jako C-dots označují i dopované silikátové nanočástice)
- Vznikají mnoha způsoby při rozkladu organických molekul, poprvé byly izolovány ze sazí vznikajících při výrobě uhlíkových nanotrubiček, lze izolovat i ze sazí parafinových svíček
- Emisní spektra závislá na velikosti nanočástic a na vlnové délce excitujícího záření, emitují ve viditelné oblasti, kvantové výtěžky většinou do 10% (u některých syntéz až 50%)
- Uhlík netoxický, povrch pokrytý -COOH skupinami (vhodné pro biokonjugace)



C-dots excitované při různých vlnových délkách (nahore fotografie roztoků, vpravo emisní spektra)

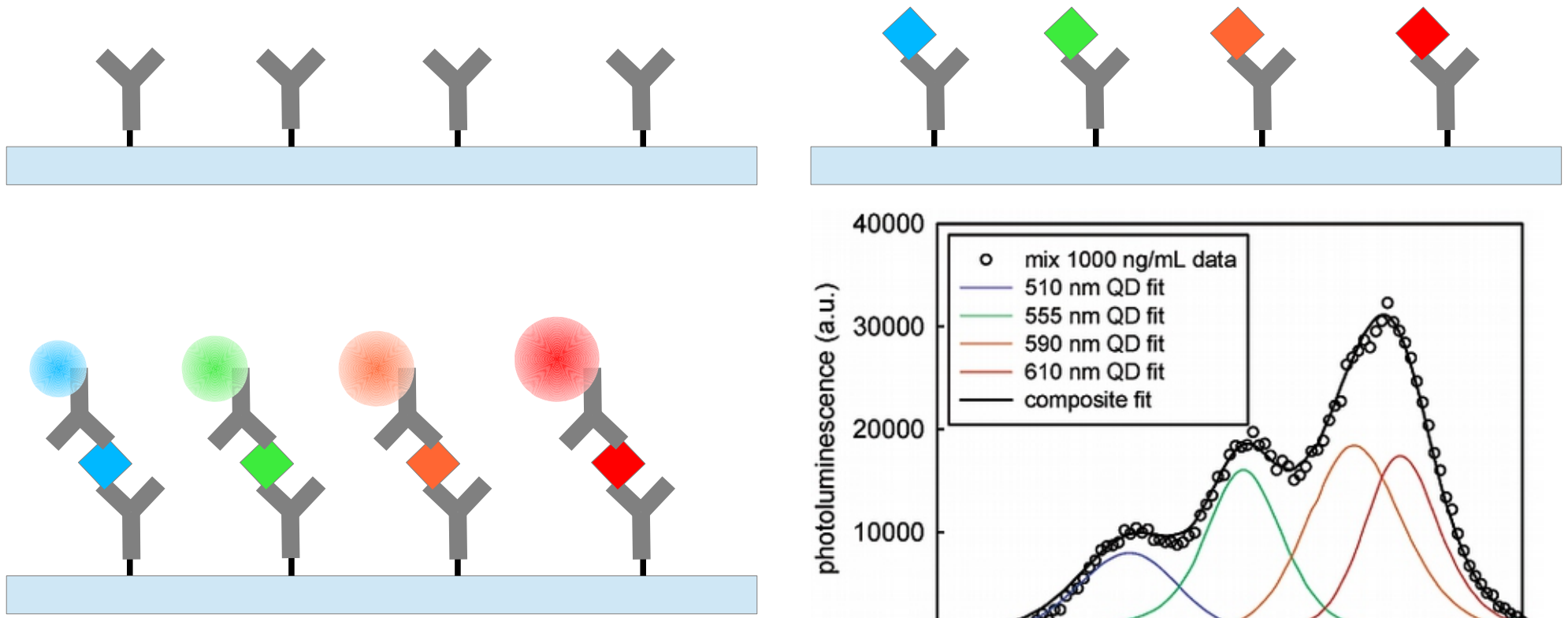
Sun Y-P, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, Meziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie S-Y Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence (2006)
Journal of the American Chemical Society 128 (24) 7756-7757



Využití polovodičových nanokrystalů

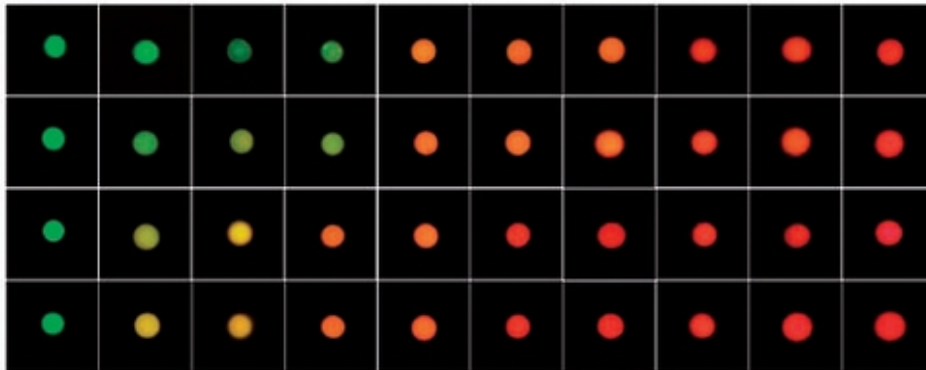
● Multiplexed fluoroimmunoassays

- Protilátky s různou specifitou jsou označeny QDs, které se liší polohou emisního maxima. Lze detekovat několik analytů.
- Proveditelné na mikrotitračních destičkách



Využití polovodičových nanokrystalů

- **Microparticle barcoding** Slouží k detekci mnoha různých biomolekul ve složitých směsích. Různé mikročástice jsou kódovány směsí QDs, které emitují při různých vlnových délkách; spektra různých částic se liší a je možné je rozlišovat v zařízení, které je podobné průtočným cytometrům. Je možné detekovat desítky až stovky analytů v jednom vzorku. Pro detekci je možné využít například interakce protilátka-antigen a párování bází nukleových kyselin.



Polystyrenové mikročástice fluorescenčně kódované různými poměry kvantových teček lišících se emisními spektry (velikost nanokrystalů)

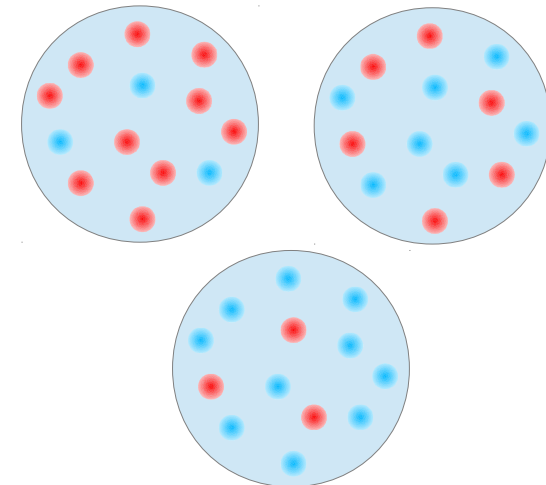
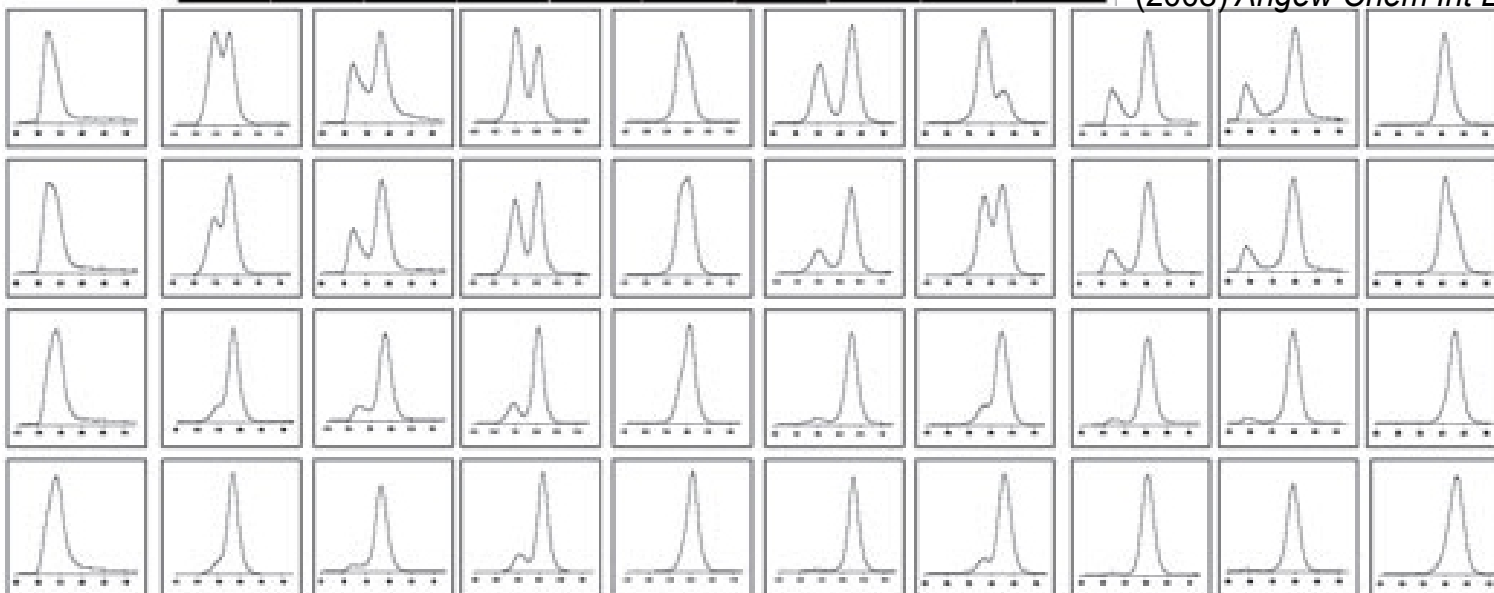
Vlevo: Mikroskopické fotografie mikročástic

Dole: Spektra kódovaných mikročástic

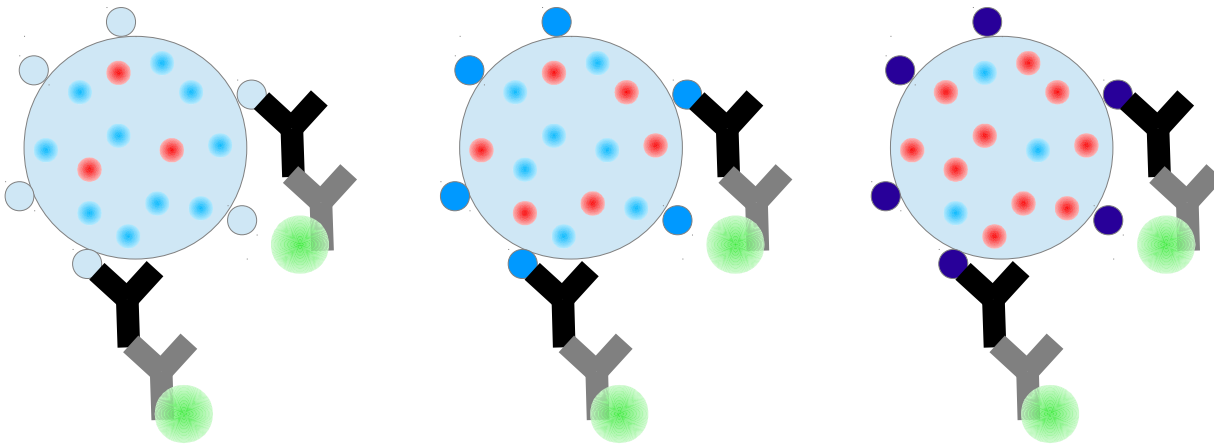
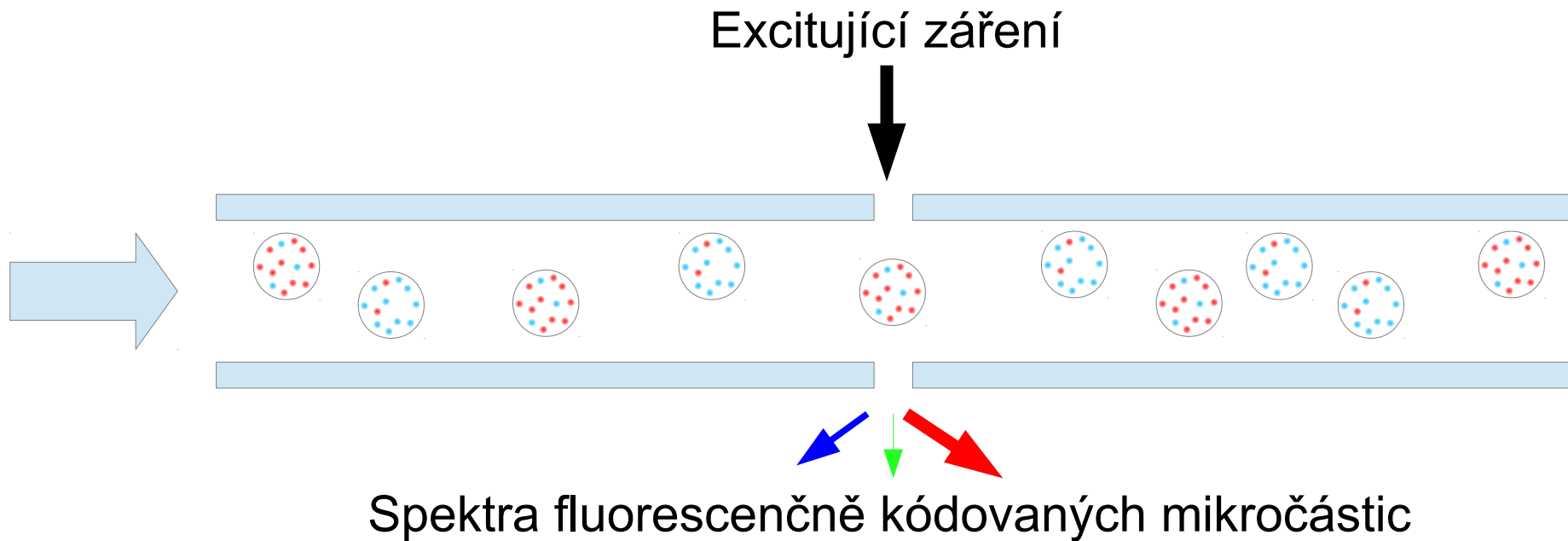
Fournier-Bidoz S, Jennings TL, Klostranec JM, Winnie Fung, Rhee A, Li D, Chan WCW

Facile and Rapid One-Step Mass Preparation of Quantum-Dot Barcodes

(2008) *Angew Chem Int Ed* 47, 5577–5581



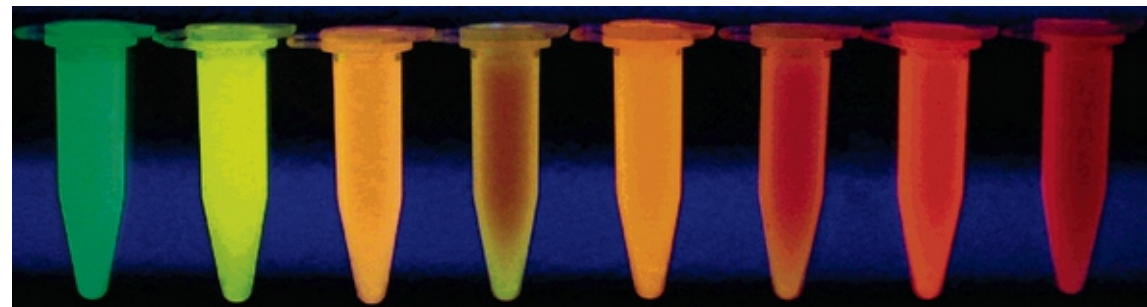
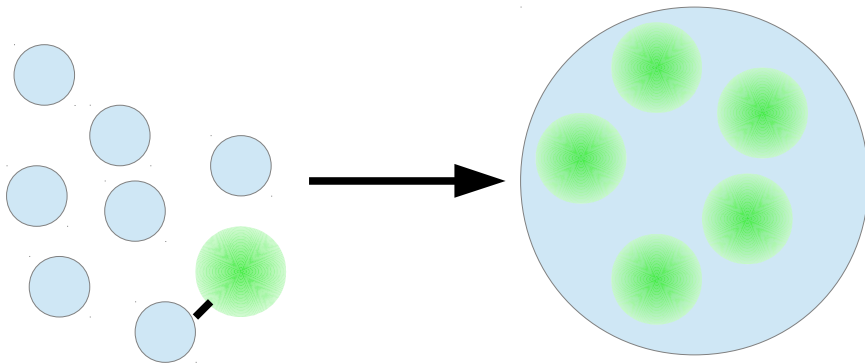
Využití polovodičových nanokrystalů



Kompetitivní stanovení; fluorescenční kód částice určuje její specifitu (přítomnost určitého antigenu nebo sekvence DNA). Samotná vazba odpovídající protilátky nebo komplementární DNA je detekována fluorescenční značkou, která je pro všechny analyty společná.

Polymerní fluoreskující nanočástice

- Jedna nanočástice pojme tisíce molekul fluoroforu → vysoká jasnost (brightness)
- Velikost několik nm až stovky nm
- Organické polymery, silikátové částice
- Vytváří se polymerací směsi monomerů a monomerů modifikovaných fluorofory
- Často slouží jako nanochemosenzory

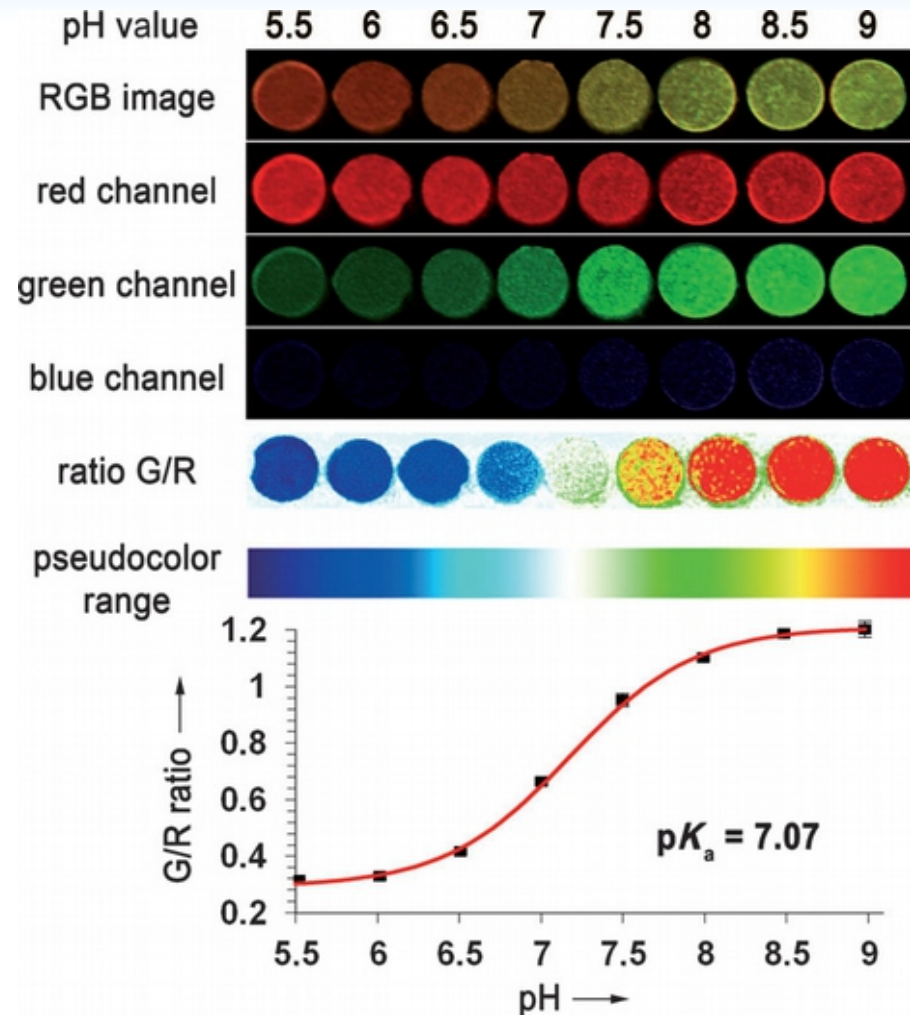
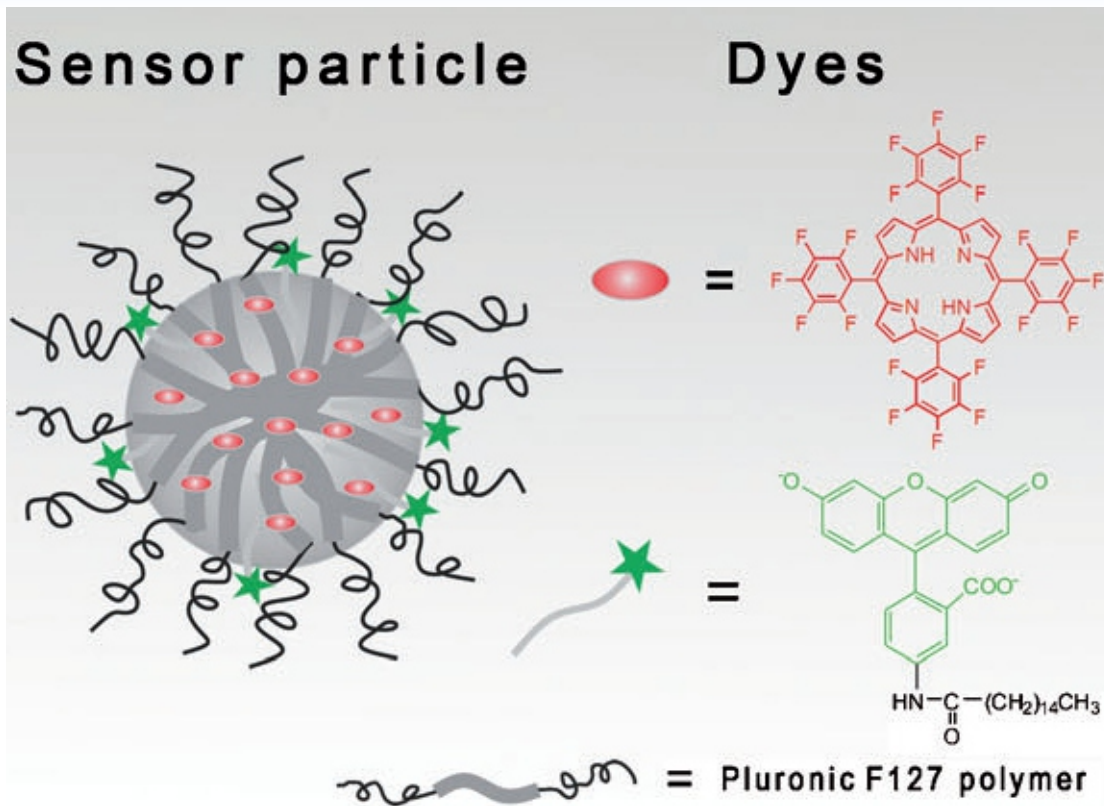


Silikátové nanočástice dopované různými fluorofory
Wang L, Tan W Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation (2006) *Nano Letters* 6 (1) 84-88

Fluorescenční nanosensory

- V poslední době se začínají vyvíjet nanočástice, které pozorovatelně mění své vlastnosti na základě změn chemického složení okolního prostředí – **nanochemosenzory** – **Lab on particle**.
- Pomocí těchto nanosenzorů je možné „pozorovat“ chemické složení vzorku v mikrometrovém rozlišení v okolí jednotlivých nanočástic (s využitím mikroskopie).
- Asi nejznámějším typem nanochemosenzorů jsou polymerní nanočástice dopované fluorofory, jejichž emisní spektrum specificky reaguje na přítomnost analytu v prostředí. Kromě specifického fluoroforu jsou tyto nanosensory doplněny i tzv. referenčním fluoroforem, jehož emisní spektrum je nezávislé na změnách prostředí. Přítomnost a koncentraci analytu lze určit z poměru intenzit těchto fluoroforů → ratiometrické nanosensory
- V současné době byly připraveny ratiometrické nanosensory pro různé analyty, například H^+ , O_2 , CO_2 , H_2O_2 , Zn^{2+} , Ca^{2+} a jiné.
- Je možné vytvářet i nanosensory, které pro detekci využívají biomolekuly → nanobiosensory

Fluorescenční nanosensory



Nahoře: Konstrukce ratiometrického polymerního nanosenzoru pro pH (pH senzitivní fluorofor-zelená a referenční fluorofor-červená).

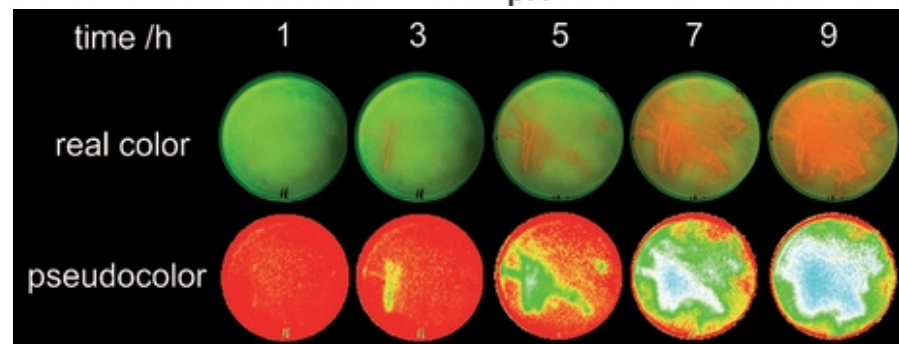
Nahoře vpravo: Poměr červené a zelené barvy se mění v závislosti na pH (G/R ratio).

Vpravo dole: Nanosensory použity pro zobrazení změn pH v agarosovém gelu, na kterém rostou bakterie.

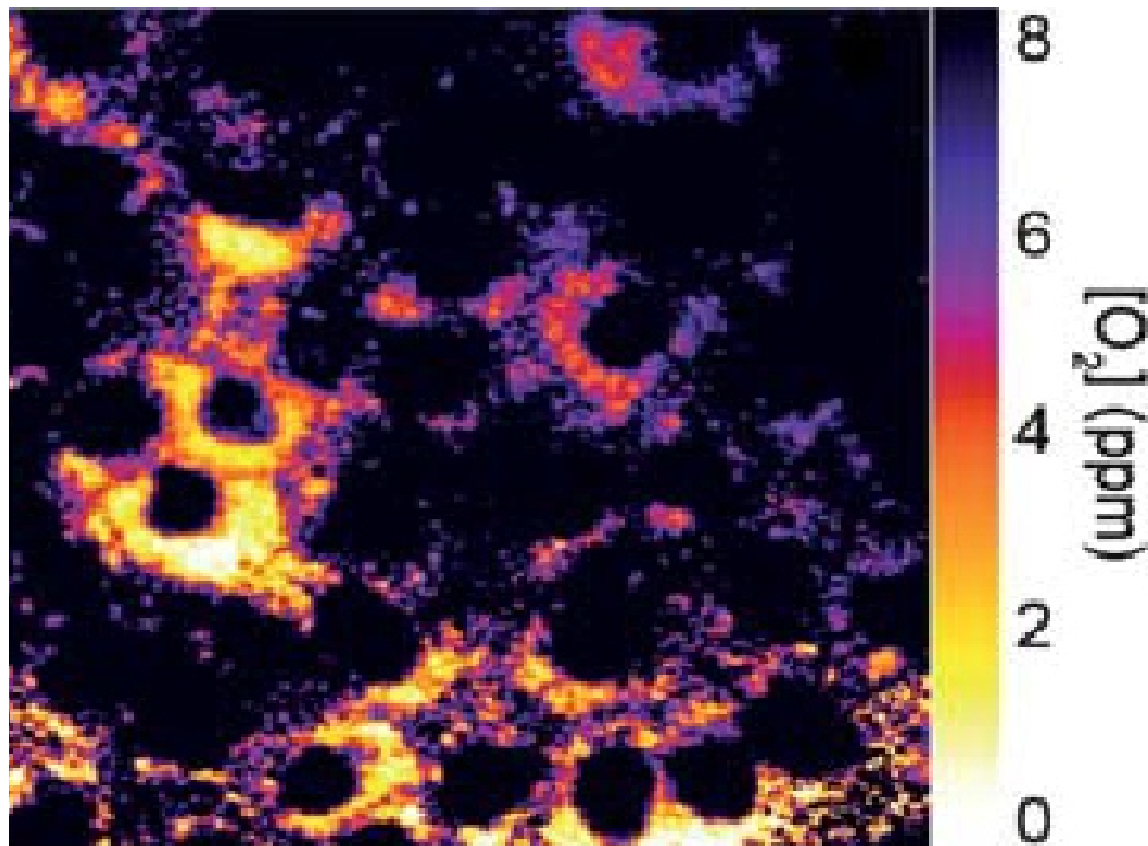
Wang XD, Meier RJ, Wolfbeis OS

Fluorescent pH-sensitive nanoparticles in an agarose matrix for imaging of bacterial growth and metabolism

(2013) *Angewandte Chemie - International Edition*, 52 (1) 406-409



Fluorescenční nanosensory

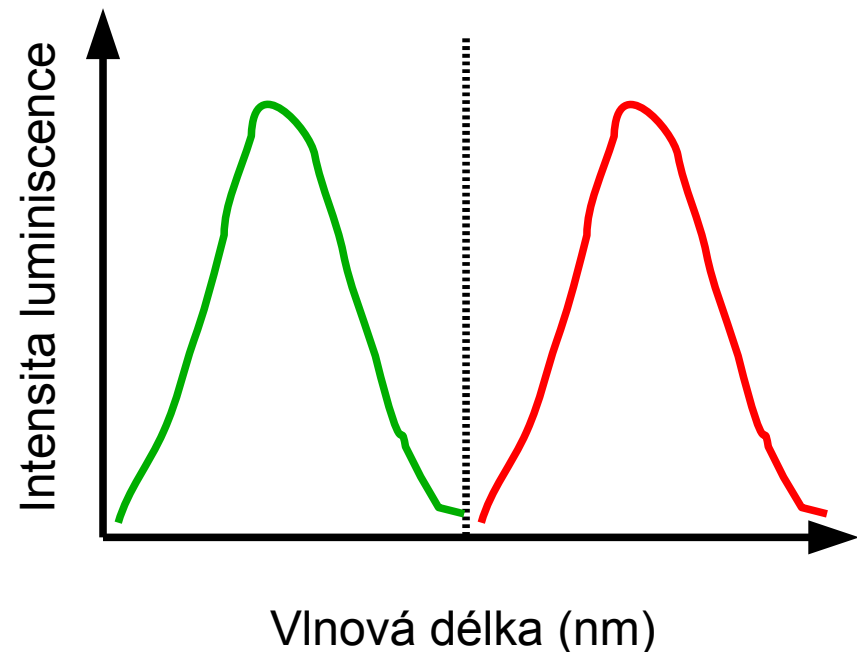


Zobrazení koncentrací intracelulárního kyslíku pomocí ratiometrického nanosenzoru

Wang XD, Gorris HH, Stolwijk JA, Meier RJ, Groegel DBM, Wegener J, Wolfbeis OS
Self-referenced RGB colour imaging of intracellular oxygen
(2011) *Chemical Science* 2 (5) 901-906

Anti-Stokesova luminescence

- Organické fluorofory mohou být excitovány krátkovlnným zářením, absorbovaná energie je částečně disipována nezářivými přechody a případně emitována jako záření s delší vlnovou délkou. Při těchto přechodech je intenzita emitovaného záření přímo úměrná intenzitě excitačního záření. Existuje však několik procesů, které umožňují převést dlouhovlnné záření na krátkovlnné. Energie několika absorbovaných fotonů je „sečtena“ a emitována ve formě fotonu s vyšší energií. Tyto procesy se označují jako nelineární, protože intenzita emitovaného záření je úměrná vyšším mocninám intenzity excitačního záření.
- Multi-photon luminescence
- Second harmonic generation
- „Upconversion“



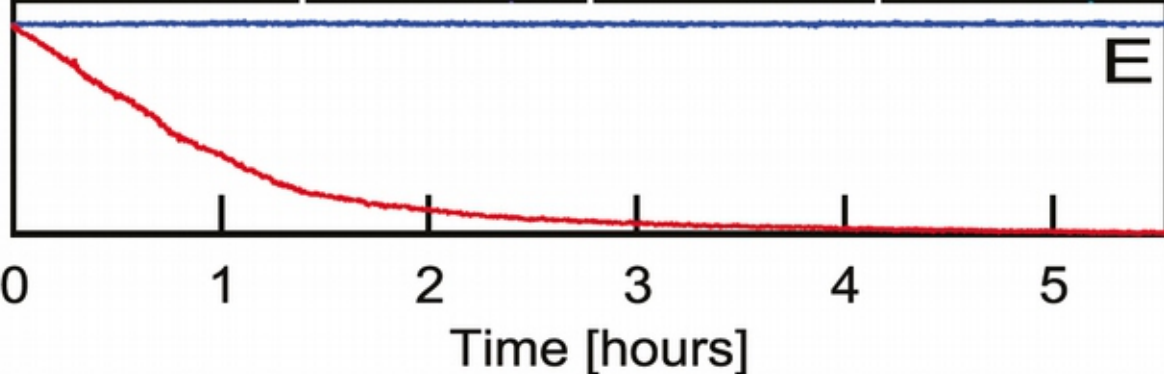
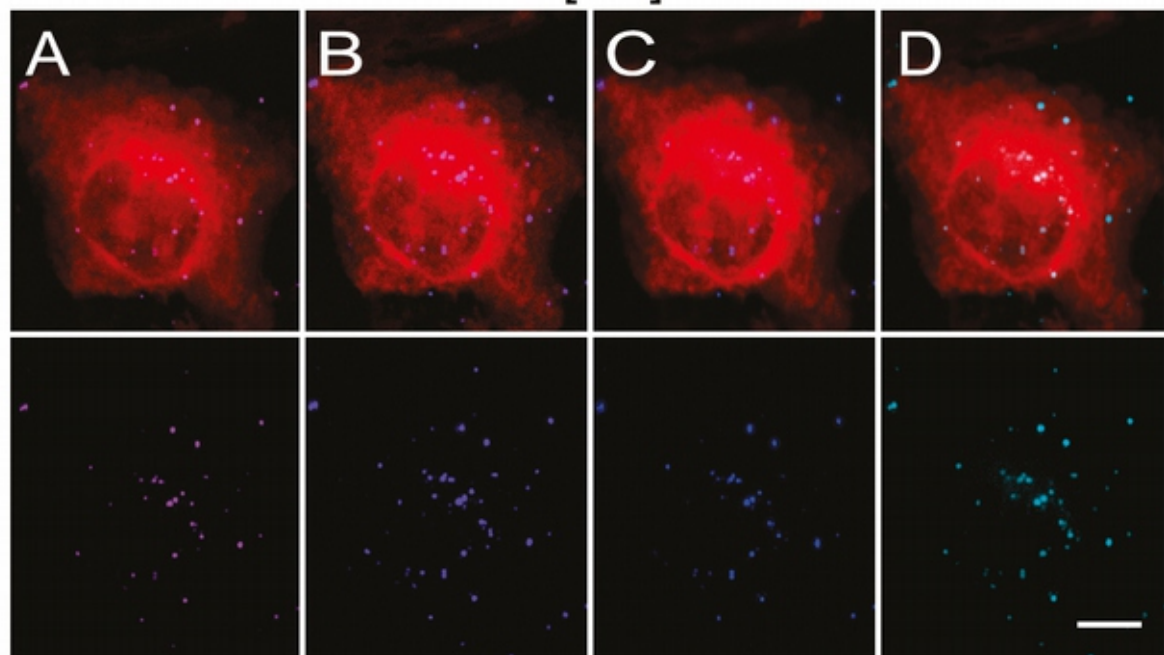
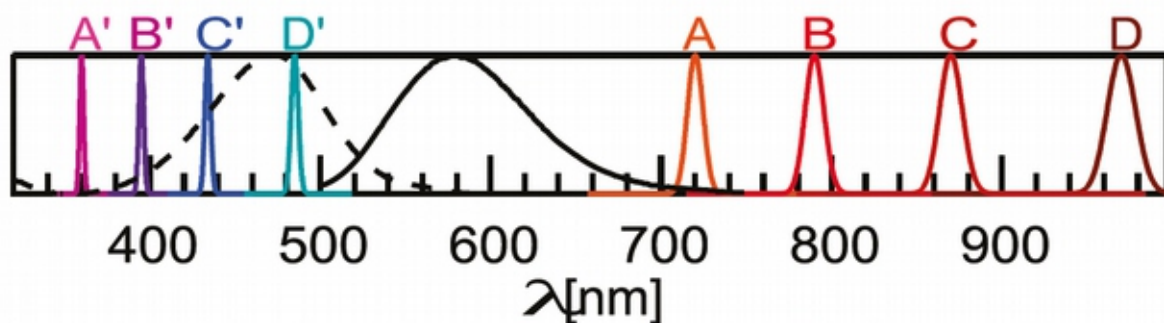
Two and multi-photon luminescence

- Předpovězena 1930., prokázána 1961; krátce po objevení LASERu
- Dochází k současné interakci několika fotonů s jednou molekulou, nutná vysoká intezita záření, větší rozvoj s objevem femtosekundových LASERů (1990.)
- Vícefotonovou luminiscenci vykazují organické molekuly i některé nanokrystaly
- Využití: Two-photon fluorescence confocal microscopy; menší excitovaný objem, menší rozptyl záření, záření proniká do větší hloubky vzorku, lepší rozlišení (podobné u jiných materiálů s anti-stokesovou emisí)

Second harmonic generation

- Dochází ke zvýšení energie fotonů, které prochází krystalickým materiálem s určitými vlastnostmi. Výstupní záření má dvojnásobnou frekvenci než záření vstupující.
- Poprvé objeven v roce 1961, umožněno s objevením LASERu; intenzita emitovaného záření je opět úměrná druhé mocnině excitovaného záření.
- Nanokrystaly KNbO_3 , LiNbO_3 , BaTiO_3 , ZnO
- Biologické využití ve fluorescenční mikroskopii
 - Nedochází k degradaci zářením, vhodné pro dlouhodobé experimenty
 - Volně měnitelná excitační/emisní vlnová délka
 - Velmi úzké emisní píky
 - Emitované záření je koherentní

Second harmonic generation



Nahoře: Excitační (A, B, C, D) a emisní spektra (A', B', C', D') KNbO₃ nanočástic a organického fluoroforu FM 1-43 (absorpční spektrum čárkovaně, emisní spektrum plná čára)

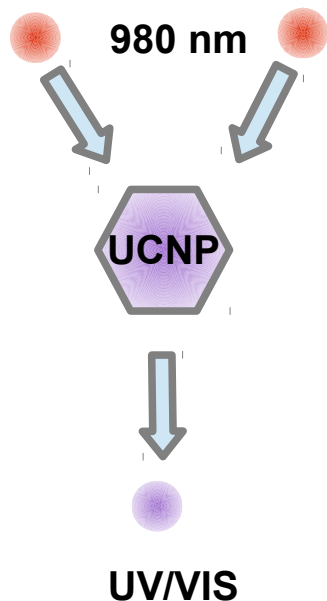
Uprostřed: buněčná membrána označená fluoroforem FM 1-43 a nanočástice KNbO₃ excitované při různých vlnových délkách

Dole: Srovnání poklesu fluorescence (degradace) fluoroforu FM 1-43 a second harmonic generation nanočástic KNbO₃

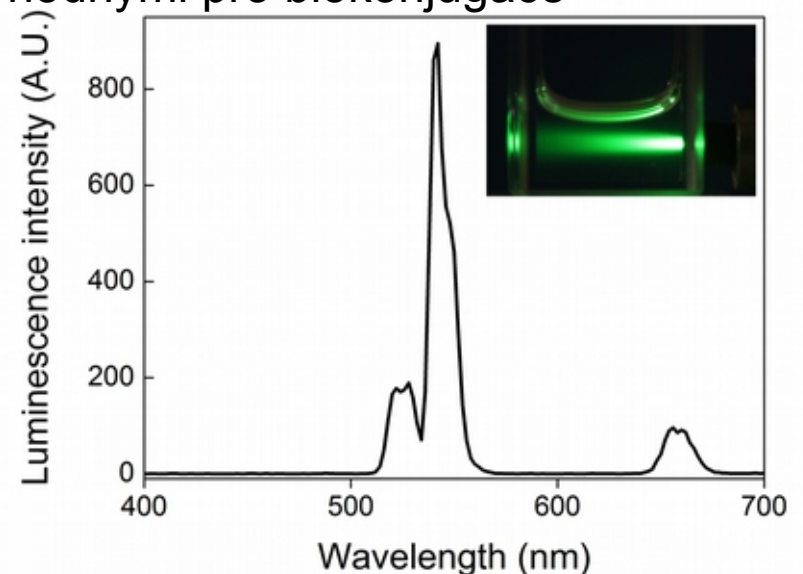
Staedler D, Magouroux T, Hadji R, Joulaud C, Extermann J, Schwung S, Passemard S, Kasparian C, Clarke G, Germann M, Dantec RL, Mugnier Y, Rytz D, Ciepielewski D, Galez C, Gerber-Lemaire S, Juillerat-Jeanneret L, Bonacina L, Wolf JP
Harmonic nanocrystals for biolabeling: A survey of optical properties and biocompatibility (2012) ACS Nano 6 (3) 2542-2549

Upconverting NPs

- Postupná absorpce několika fotonů; intenzita emitovaného záření je úměrná vyšším mocninám excitačního záření, ale není potřeba tak vysoká intenzita jako u vícefotonové luminiscence a second harmonic generation. K vytvoření viditelné emise postačuje excitace běžnými polovodičovými LASERy.
- „Upkonverze“ byla pozorována v materiálech dopovaných některými d prvky (např. Ti, Ni, Mo, Os) a aktinoidy
- Vysokou „upconverzi“ vykazují nanočástice různých materiálů dopovaných ionty kovů vzácných zemin, asi nejpoužívanější je krystalická matrice NaYF_4 dopovaná různými lanthanoidy, např. Yb^{3+} a Er^{3+} nebo Yb^{3+} a Tm^{3+} ; V současnosti se hledají způsoby, jak dosáhnout syntézy uniformních, malých nanokrystalů (několik nm) s dostatečně dobrými luminiscenčními vlastnostmi a reaktivními skupinami vhodnými pro biokonjugace



$$I_{emit} = K[I_{excit}]^2$$

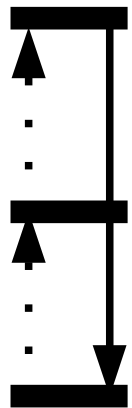


Upconverting spektrum 12 nm NaYF_4 NPs dopovaných Yb^{3+} , Er^{3+} a Gd^{3+} , excitace NIR laser 980 nm

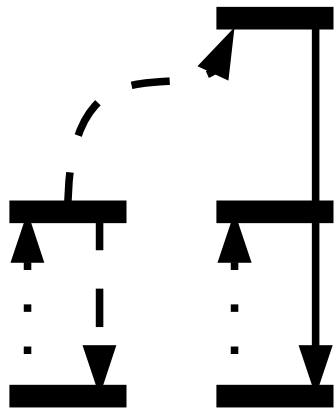
Mechanismus „upconverze“

- ESA (excited-state absorption); Ionty se postupně excitují absorpcí několika fotonů, po dosažení určité hladiny dojde k emisi
- ETU (energy transfer upconversion); Ionty s vyšším extinkční koeficientem (sensitizers) jsou excitovány absorpcí fotonu a energii přenáší na sousedící ionty (emitters)

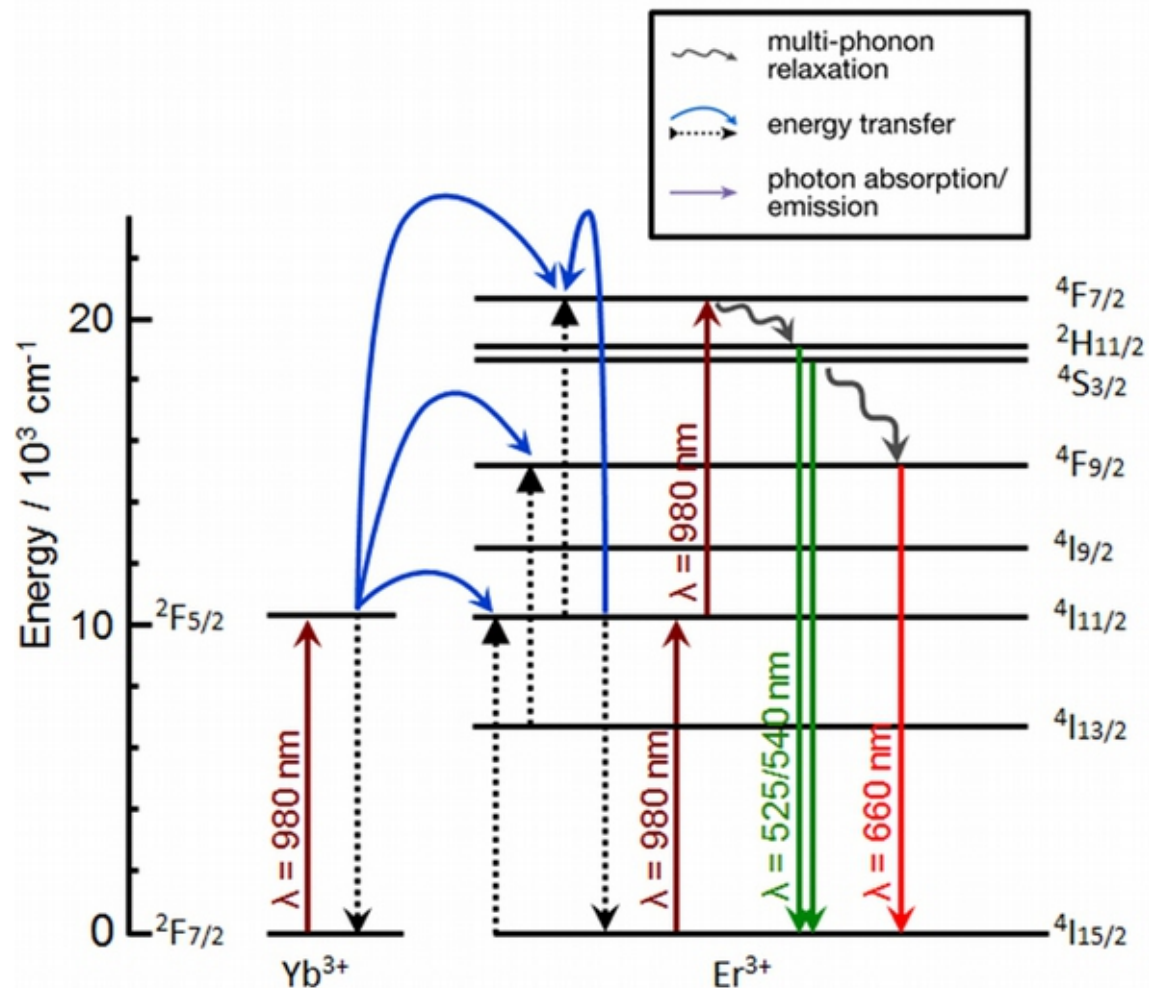
ESA



ETU



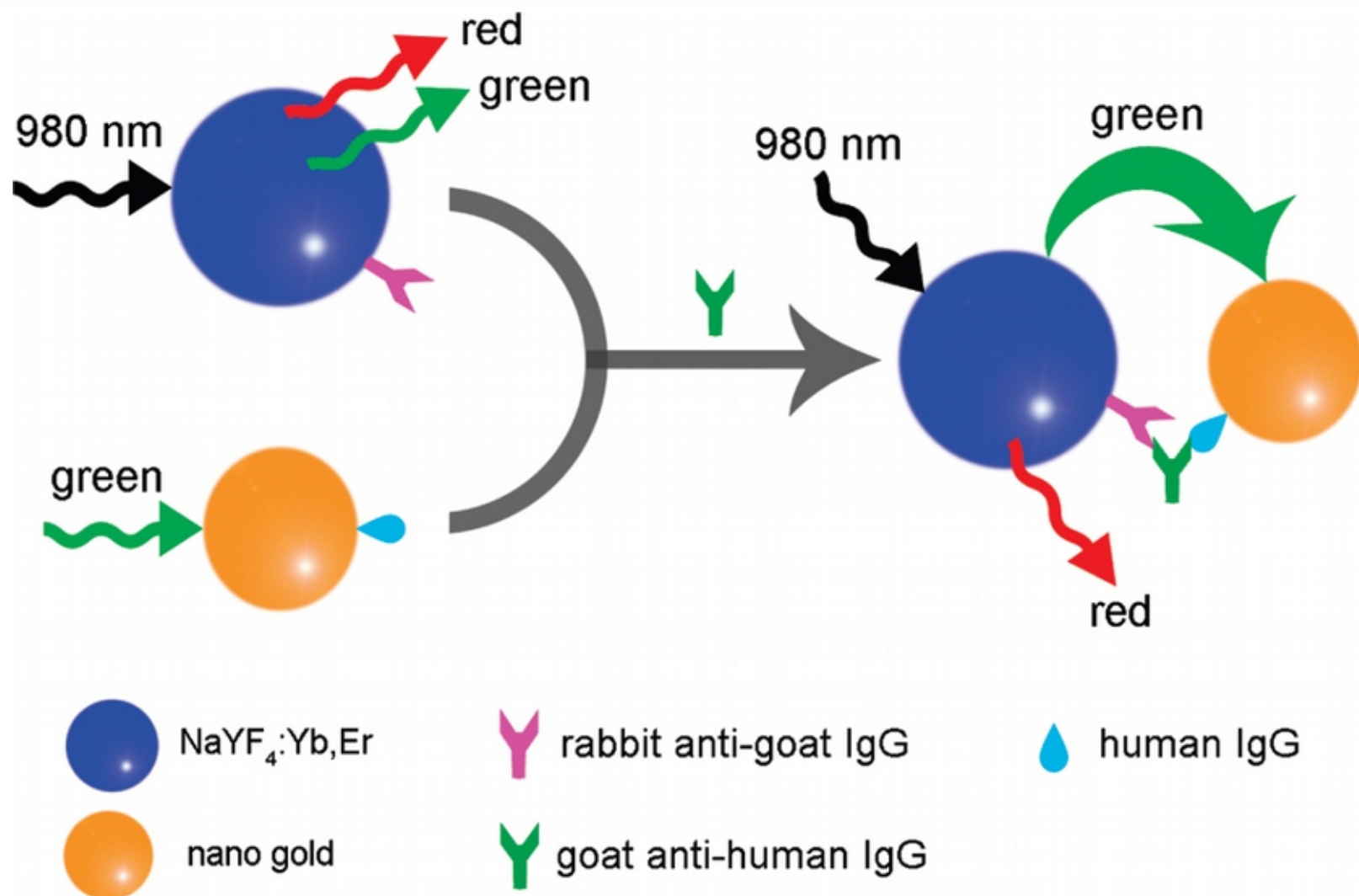
- Photon excitation
- - - - Energy transfer
- Emission



Energetické přechody v β -phase NaYF_4

nanokrystalech, které jsou dopované Yb^{3+} (sensitizer; obsah 20 %) a Er^{3+} (emitters; 2 %) ionty Gargas DJ, Chan EM, Ostrowski AD, Aloni S, Altoe MVP, Barnard ES, Sanii B, Urban JJ, Milliron DJ, Cohen BE, Schuck PJ (2014) Nature Nanotechnology, DOI: 10.1038/NNANO.2014.29

Využití upconverting NPs LRET



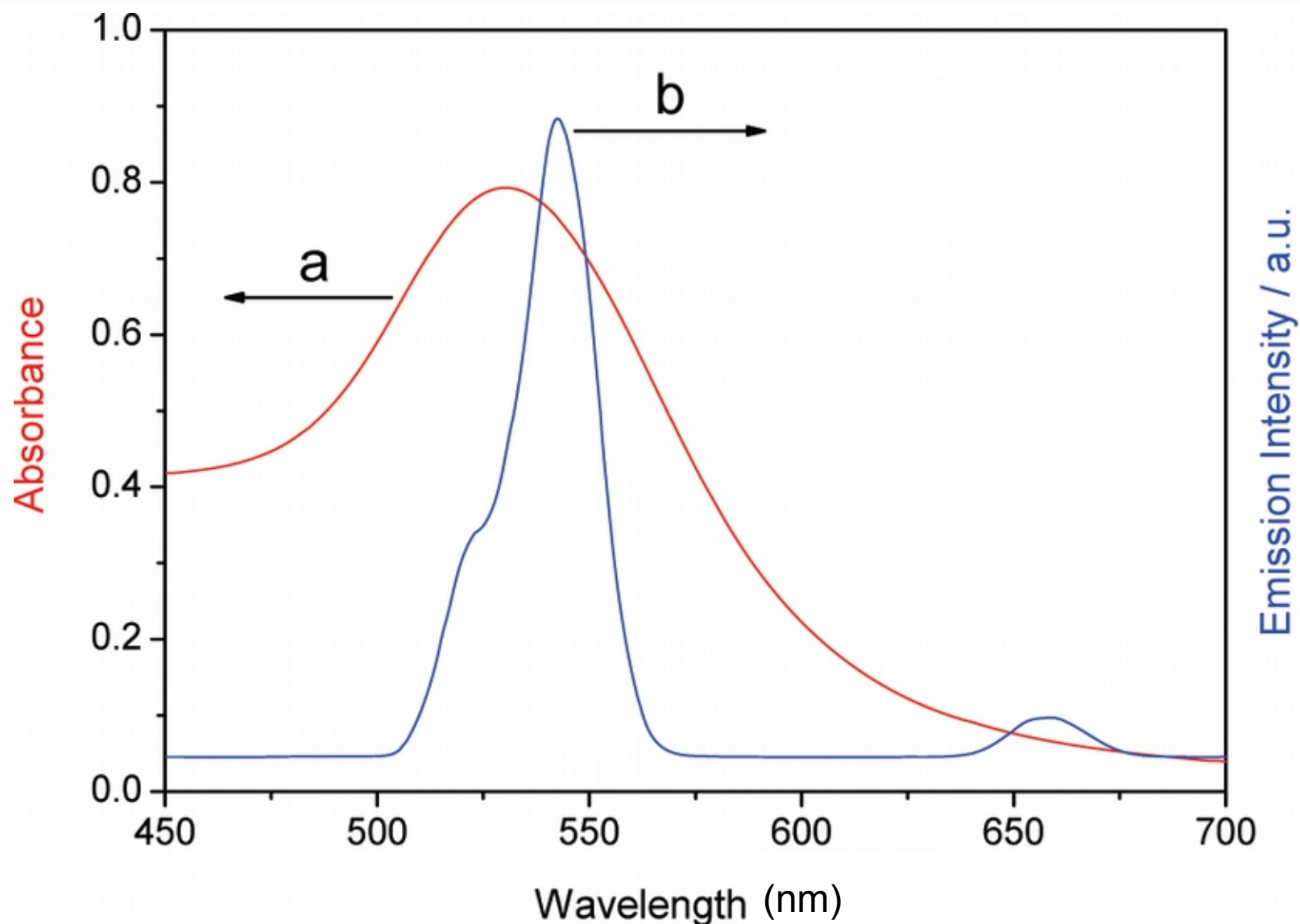
Princip stanovení kozí protilátky se specifitou proti lidským IgG. Upconverting nanočástice NaYF₄:Yb, Er jsou excitovány při 980 nm a emitují záření při 542 nm a 658 nm, energie zeleného záření (542 nm) může být přenesena na zlaté částice → pokles zelené emise v přítomnosti kozí protilátky.

Wang M, Hou W, Mi C-C, Wang W-X, Xu Z-R, Teng H-H, Mao C-B, Xu S-K

Immunoassay of goat antihuman immunoglobulin G antibody based on luminescence resonance energy transfer between near-infrared responsive NaYF₄:Yb, Er upconversion fluorescent nanoparticles and gold nanoparticles

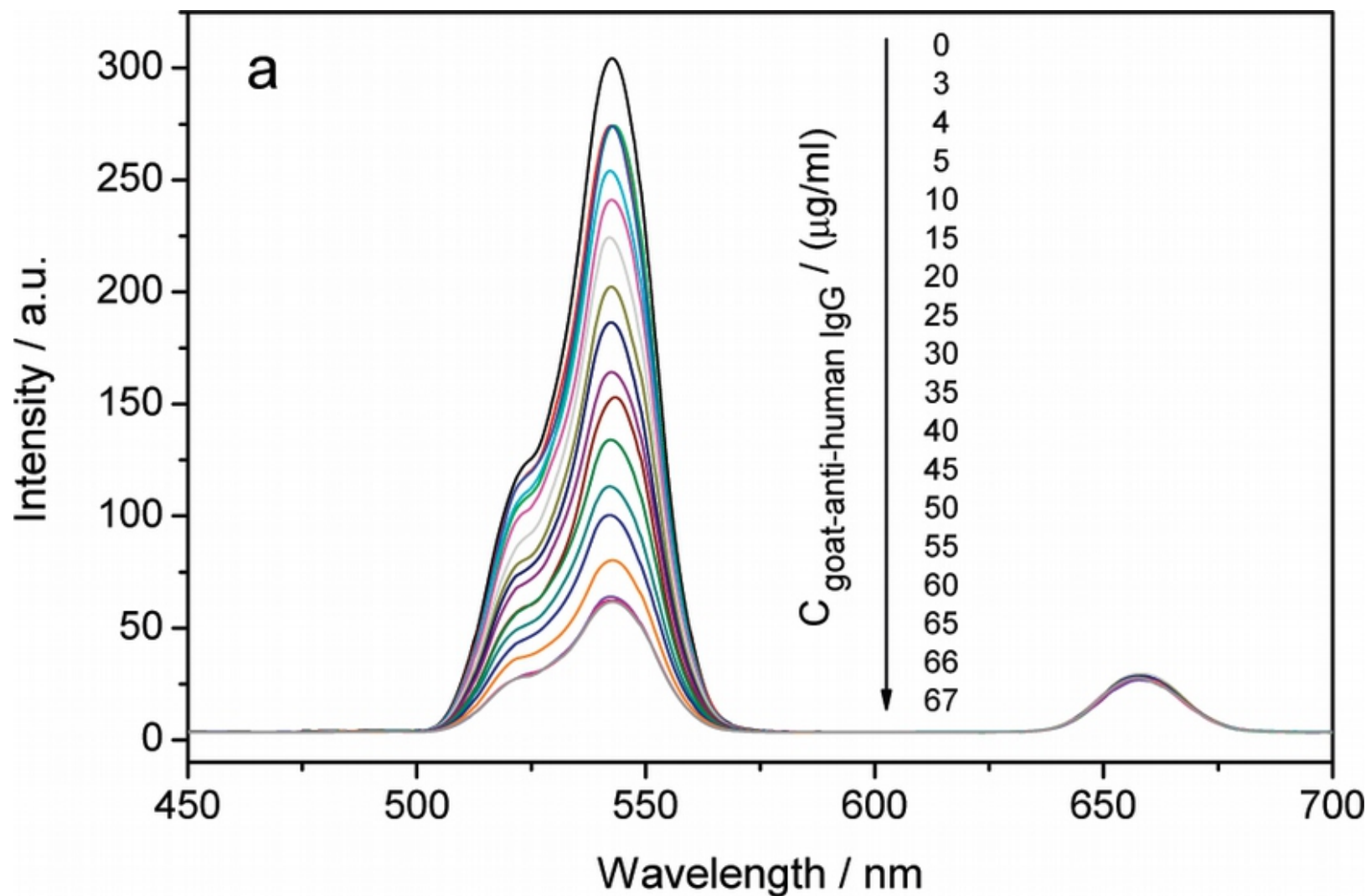
(2009) *Analytical Chemistry* 81 (21) 8783-8789

Využití upconverting NPs LRET



Překryv emisního spektra NaYF₄:Yb, Er nanočástic a absorpčního spektra zlatých nanočástic označených lidskými IgG
Immunoassay of goat antihuman immunoglobulin G antibody based on luminescence resonance energy transfer between near-infrared responsive NaYF₄:Yb, Er upconversion fluorescent nanoparticles and gold nanoparticles
(2009) *Analytical Chemistry* 81 (21) 8783-8789

Využití upconverting Nps LRET



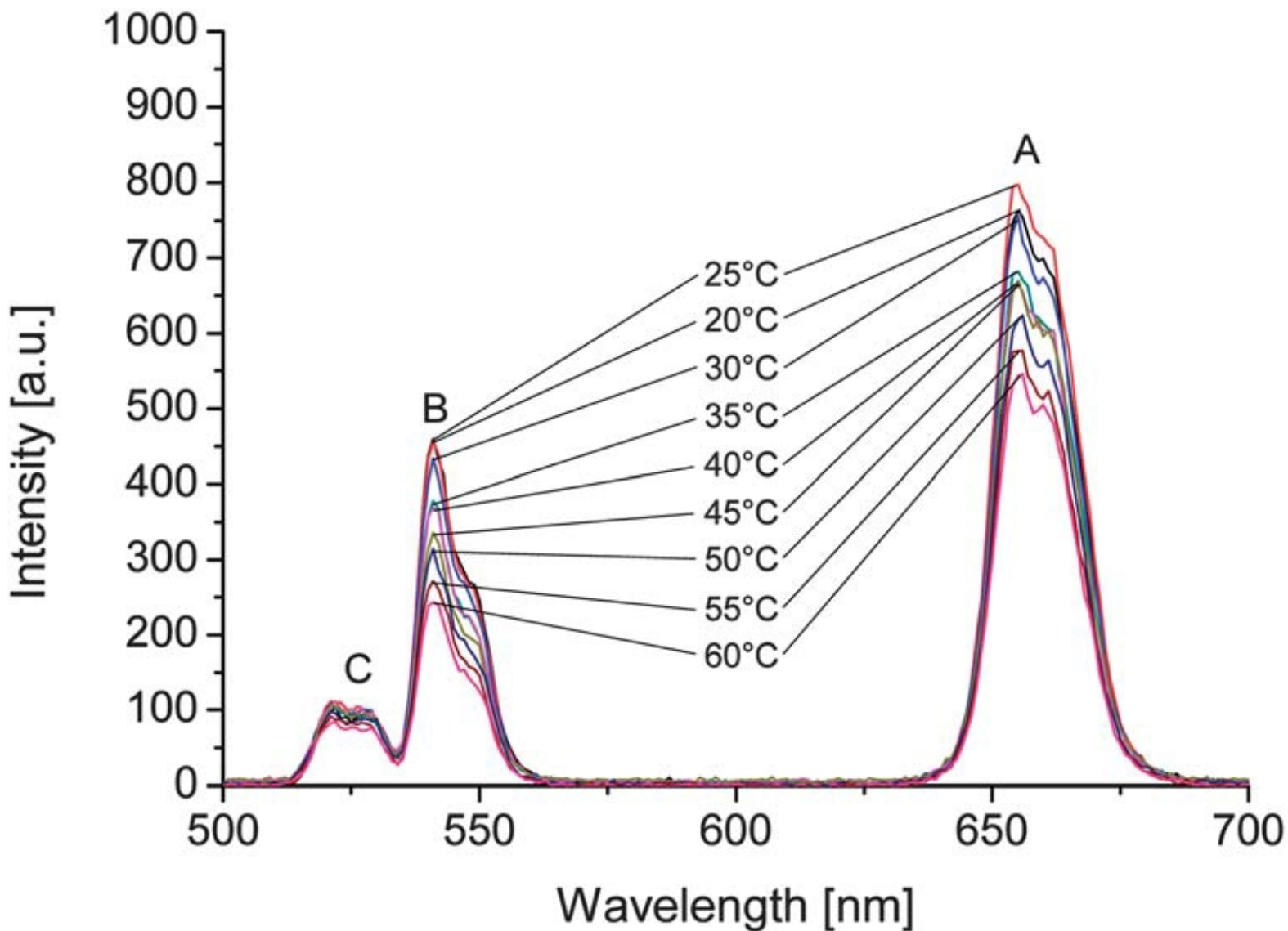
Závislost emise při 542 nm na koncentraci kozí protilátky se specificitou proti lidským IgG

Wang M, Hou W, Mi C-C, Wang W-X, Xu Z-R, Teng H-H, Mao C-B, Xu S-K

Immunoassay of goat antihuman immunoglobulin G antibody based on luminescence resonance energy transfer between near-infrared responsive NaYF₄:Yb, Er upconversion fluorescent nanoparticles and gold nanoparticles

(2009) *Analytical Chemistry* 81 (21) 8783-8789

Využití upconverting NPs



Změny emisních spekter upconverting NPs v závislosti na teplotě, teplotu lze určit s přesností 0.5°C

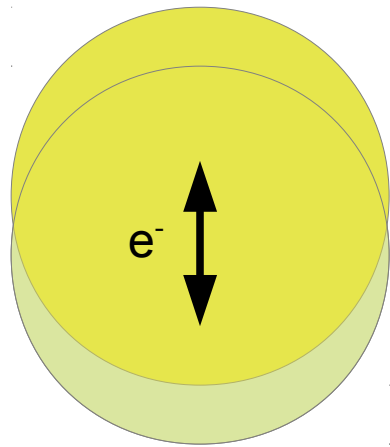
Sedlmeier A, Achatz DE, Fischer LH, Gorris HH, Wolfbeis OS

Photon upconverting nanoparticles for luminescent sensing of temperature

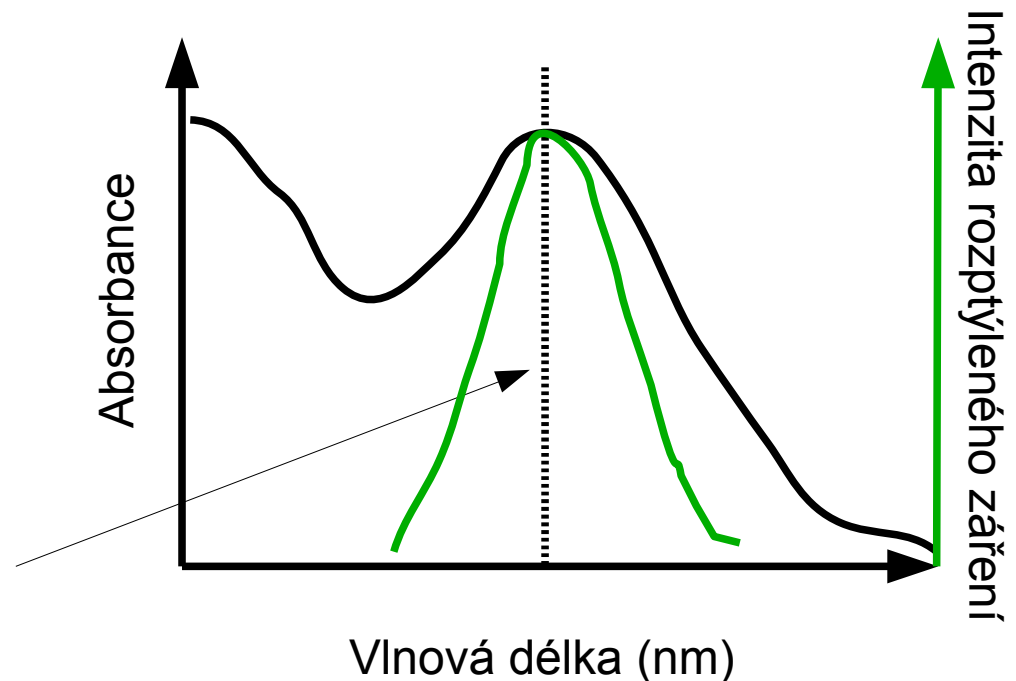
(2012) *Nanoscale* 4, 7090-7096

Kovové nanočástice

- Interakcí elektromagnetického záření s kovy dochází k rozkmitání elektronů. Při určité frekvenci záření dochází k rezonanci s přirozenou frekvencí kmitání elektronů v kovové částici; lze pozorovat v absorpčních spektrech a spektrech rozptýleného záření jako maxima absorpce nebo intenzity rozptýleného záření. U zlatých nanočástic k této rezonanci dochází ve VIS/NIR oblasti. Způsob kmitání a frekvence záleží na materiálu, tvaru, seskupení a velikosti kovových nanočástic a indexu lomu prostředí.

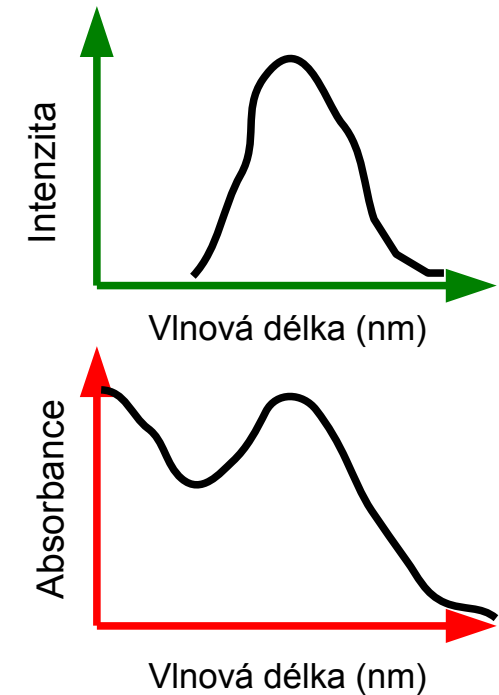
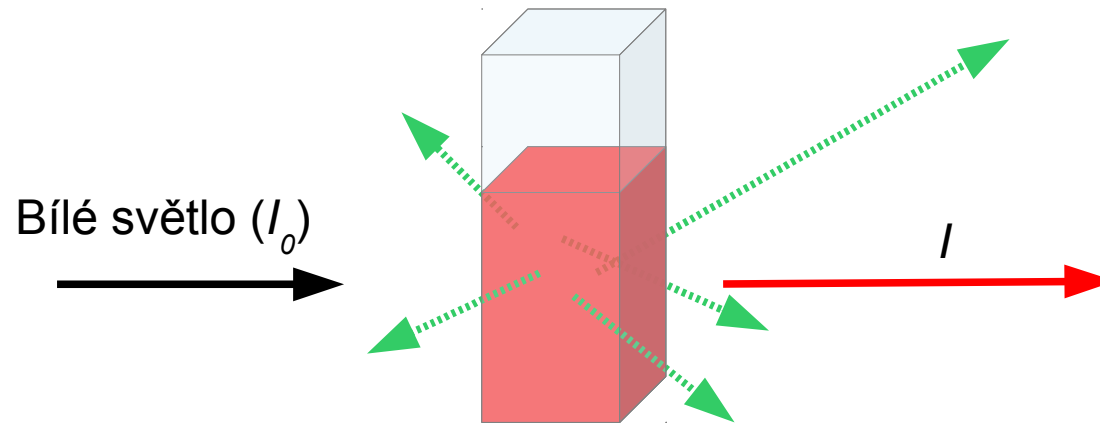


Rezonanční
frekvence



Interakce s elektromagnetickým zářením

- Absorpce a rozptyl záření



Absorbance/scattering cross-section

$$A = C \cdot l \cdot cs$$

A...absorbance; $\log_{10}(I_0/I)$, předpoklad vzorek jen absorbuje

l ...dráha světla [m]

C ..koncentrace jako počet částic na objem [m^{-3}]

cs ...cross-section [m^2]; odpovídá pravděpodobnosti

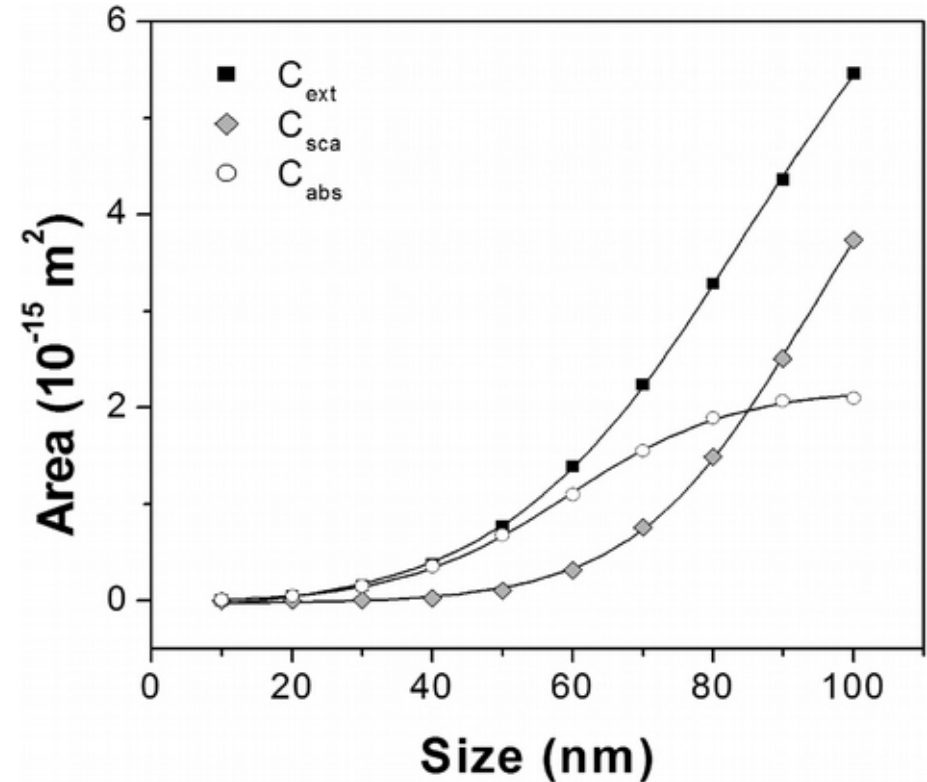
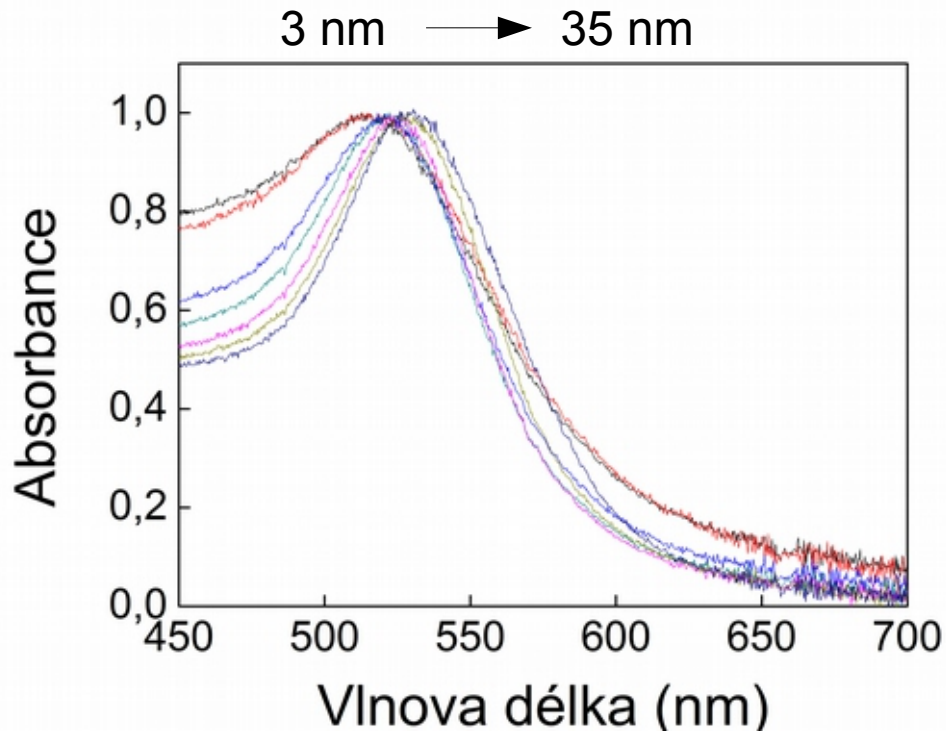
absorpce/rozptýlení fotonu částicí, lze přepočítat z

molárního absorpčního koeficientu vydělením avogadrovou

konstantou

Interakce s elektromagnetickým zářením

● Závislost na velikosti

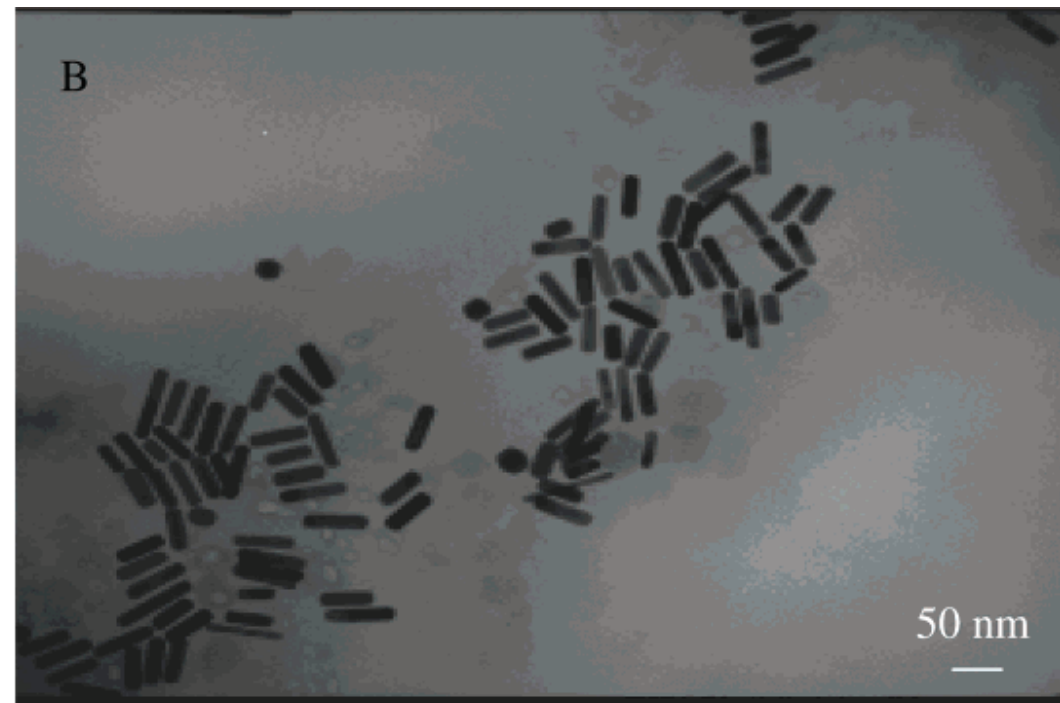
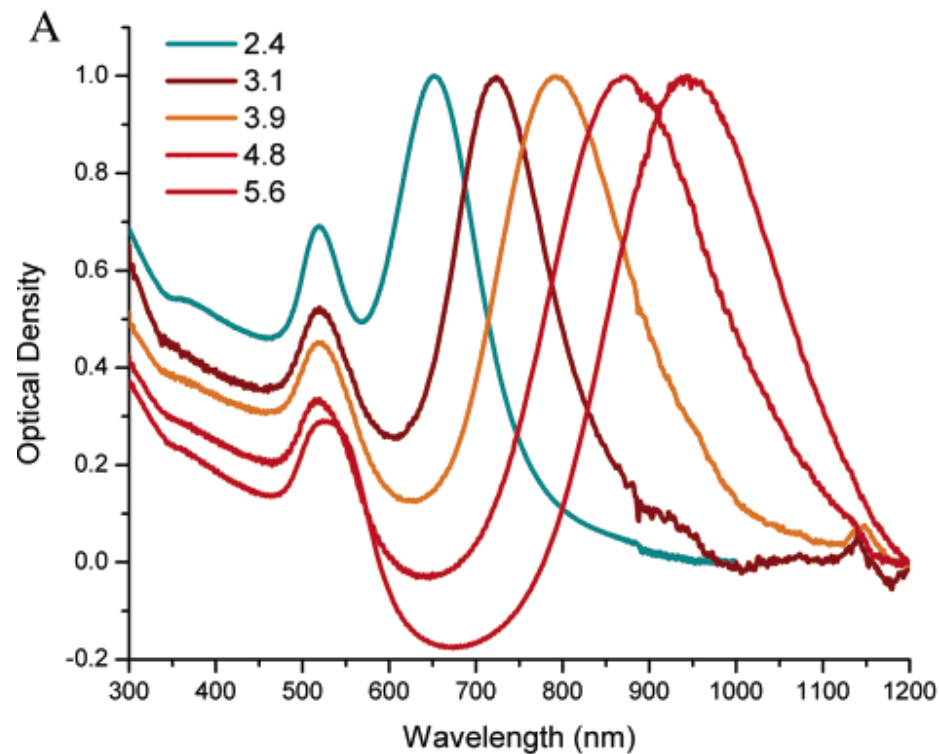


Jans, H., Huo, Q. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis (2012) *Chemical Society Reviews*, 41 (7), pp. 2849-2866

Mayer, K.M., Hafner, J.H. Localized surface plasmon resonance sensors (2011) *Chemical Reviews*, 111 (6), pp. 3828-3857

Interakce s elektromagnetickým zářením

- Absorpční spektra závisí i na tvaru kovových nanočástic, např. u zlatých nanotyček se objevuje nový rezonanční pík v NIR oblasti. Pozici tohoto píku lze měnit v závislosti na poměru délky/průměru nanotyčky.



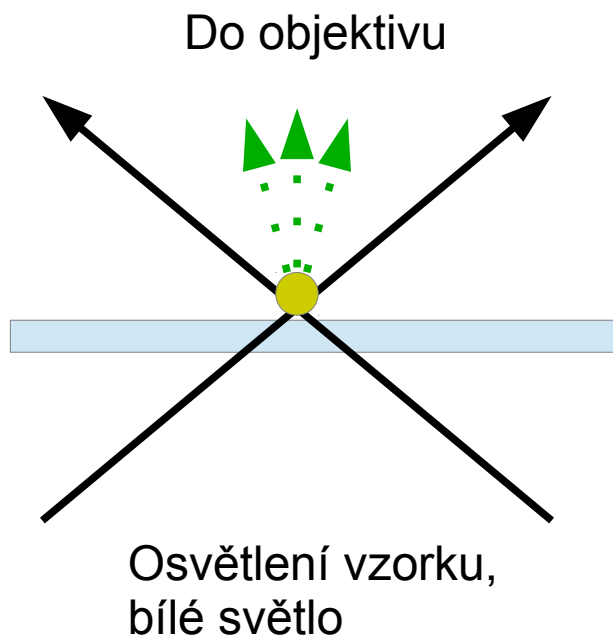
Huang, X., El-Sayed, I.H., Qian, W., El-Sayed, M.A.

Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods (2006) *Journal of the American Chemical Society*, 128 (6), pp. 2115-2120

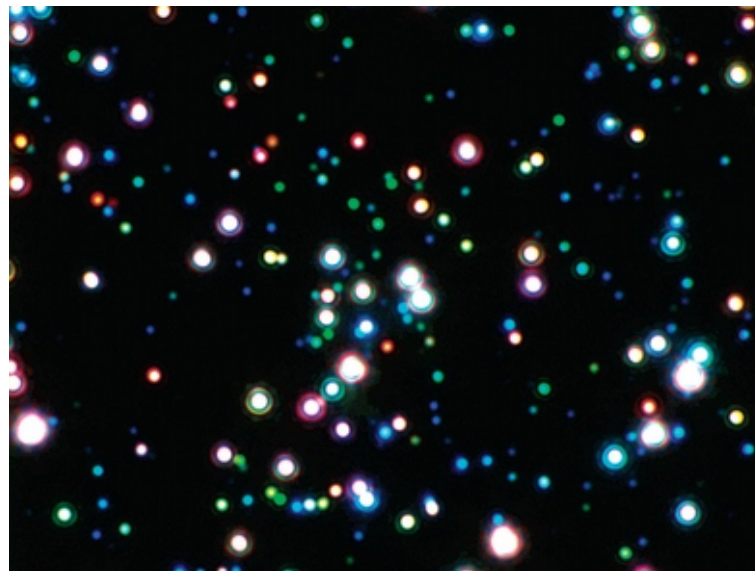
Rozptyl záření

Množství světla rozptýleného jednou nanočásticí o mnoho řádů převyšuje množství světla, které absorbují/emitují molekuly organických fluoroforů. Jednotlivé nanočástice lze pozorovat v dark-field mikroskopu, lze měřit i spektra záření jednotlivých nanočástic.

Scattering cross-section	80 nm Ag NP.....	30000 nm ²
Absorption cross-section	Fluorescein.....	0,012 nm ²



Ag nanočástice v dark-field mikroskopu



Využití měření rozptylu světla

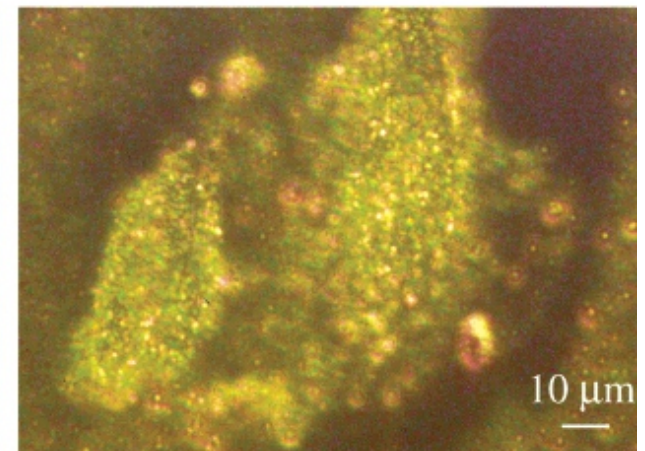
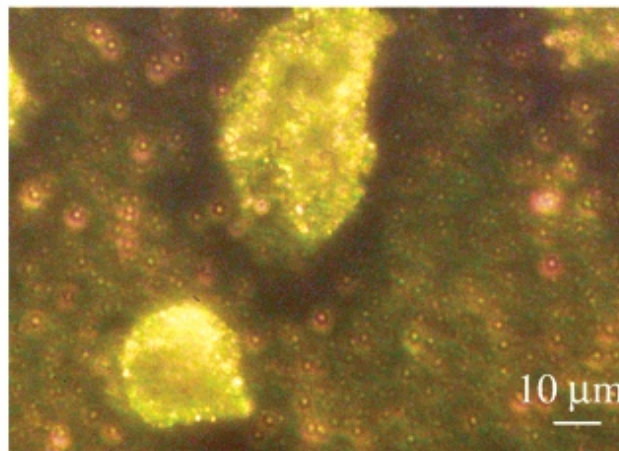
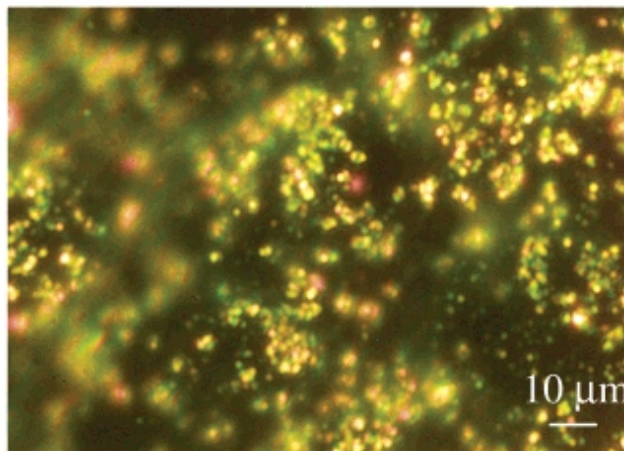
Rozptyl světla na zlatých nanočásticích převyšuje rozptyl záření způsobený biologickým materiálem. Kovové nanočástice v dark-field mikroskopii tak mohou fungovat jako náhrada organických fluoroforů ve fluorescenční mikroskopii. Výhodou je neomezená doba pozorování v porovnání s organickými fluorofory, které podléhají rychlému rozkladu.

HaCaT nonmalignant cells

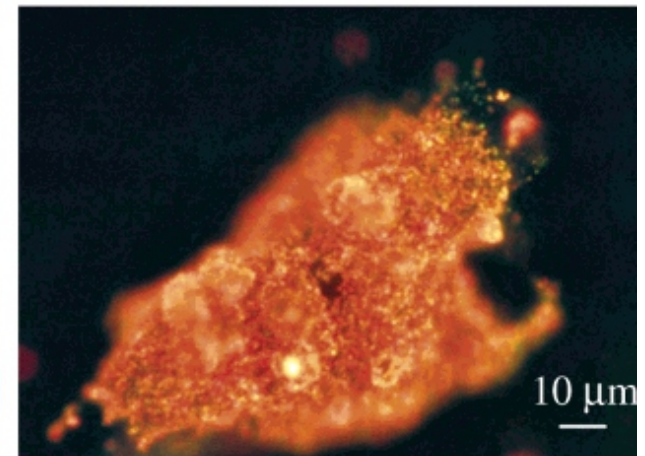
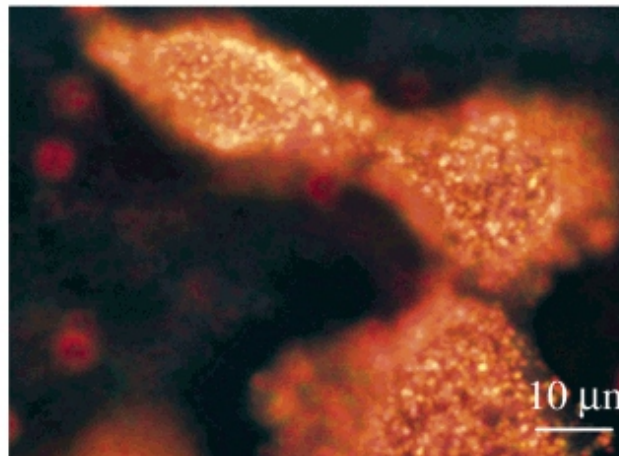
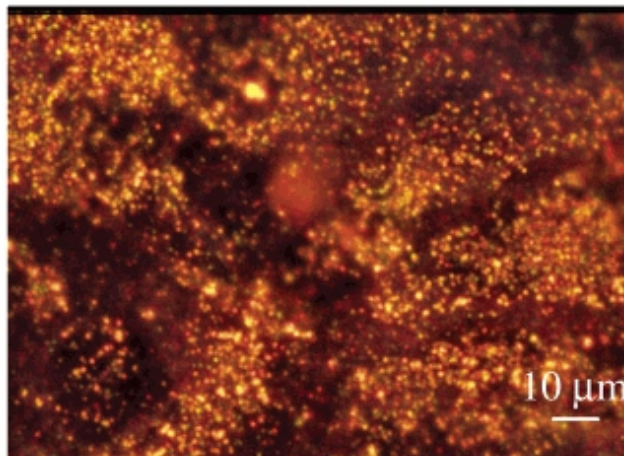
HSC malignant cells

HOC malignant cells

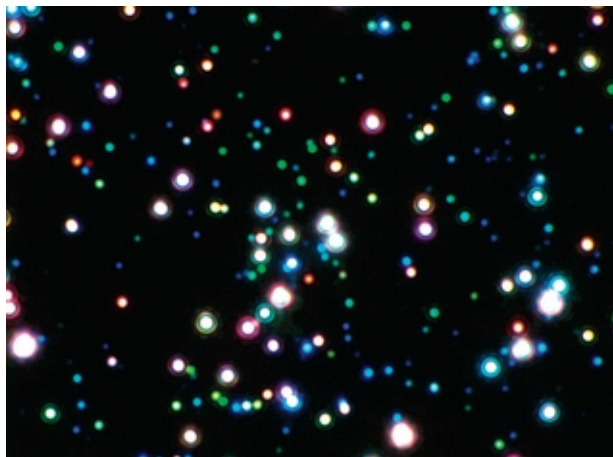
A



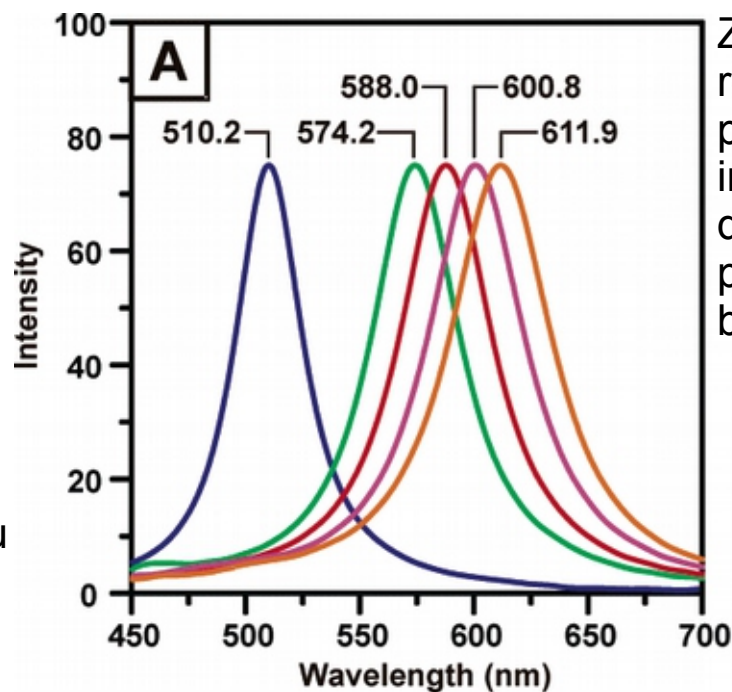
B



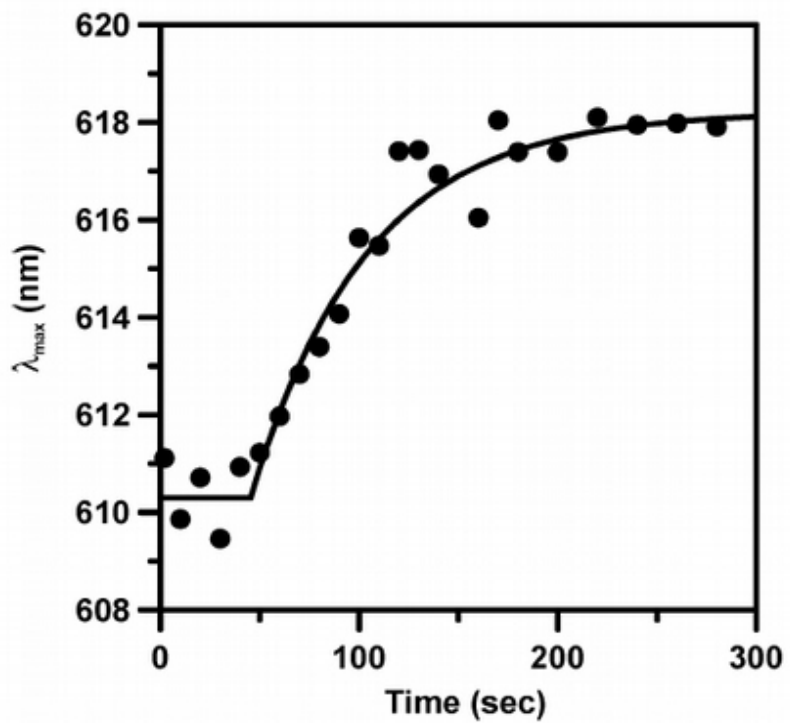
Rozptyl záření



Stříbrné nanočástice v dark-field mikroskopu



Změny spekter rozptýleného záření v prostředí s různým indexem lomu. Zleva: dusík, methanol, 1-propanol, chloroform, benzen

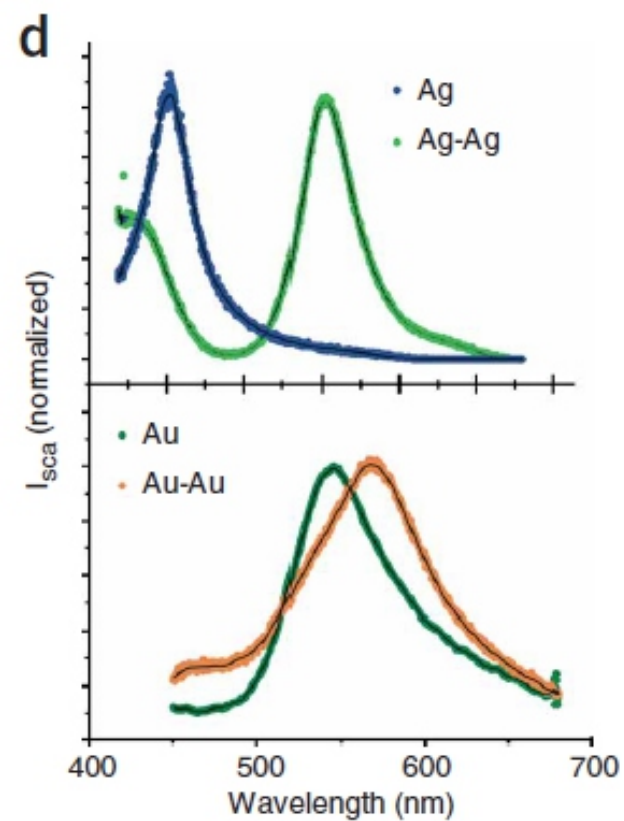
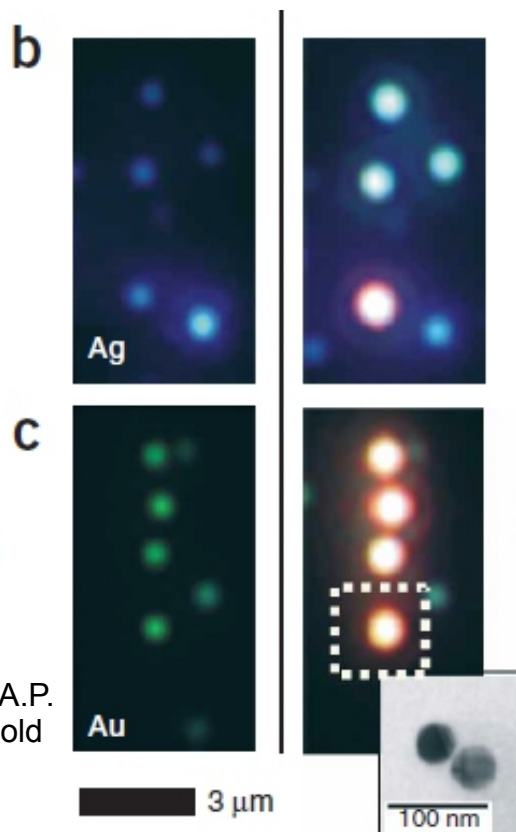
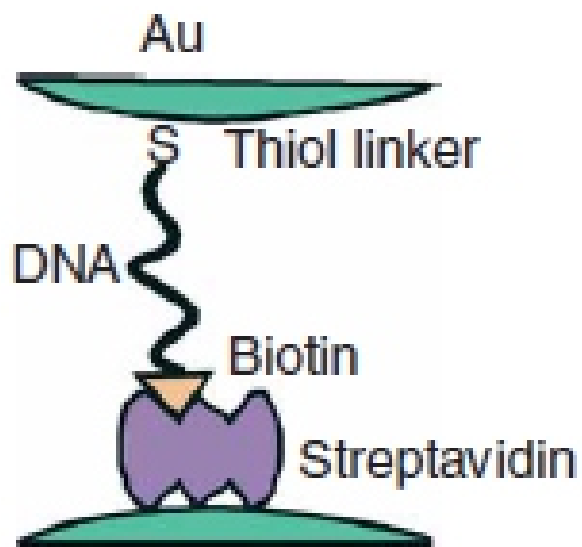
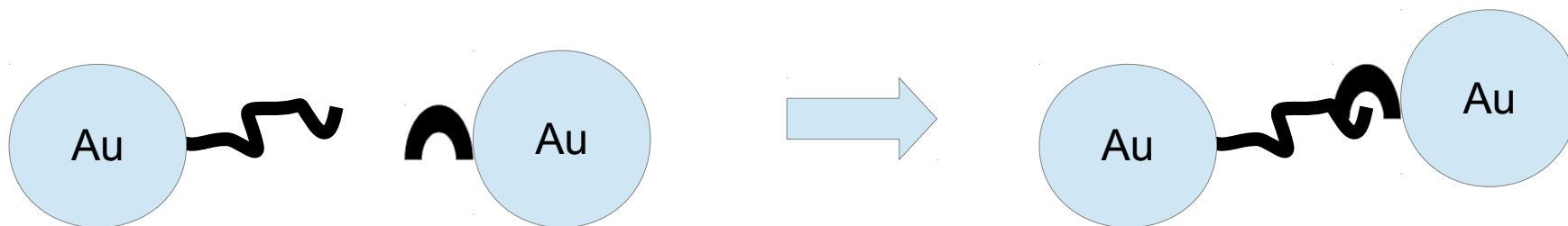


Sledování adsorpce 1-oktanthiolu na povrch stříbrné nanočástice. Z roztoku 1 mM 1-oktanthiolu se postupně adsorbovalo asi 60000 molekul.



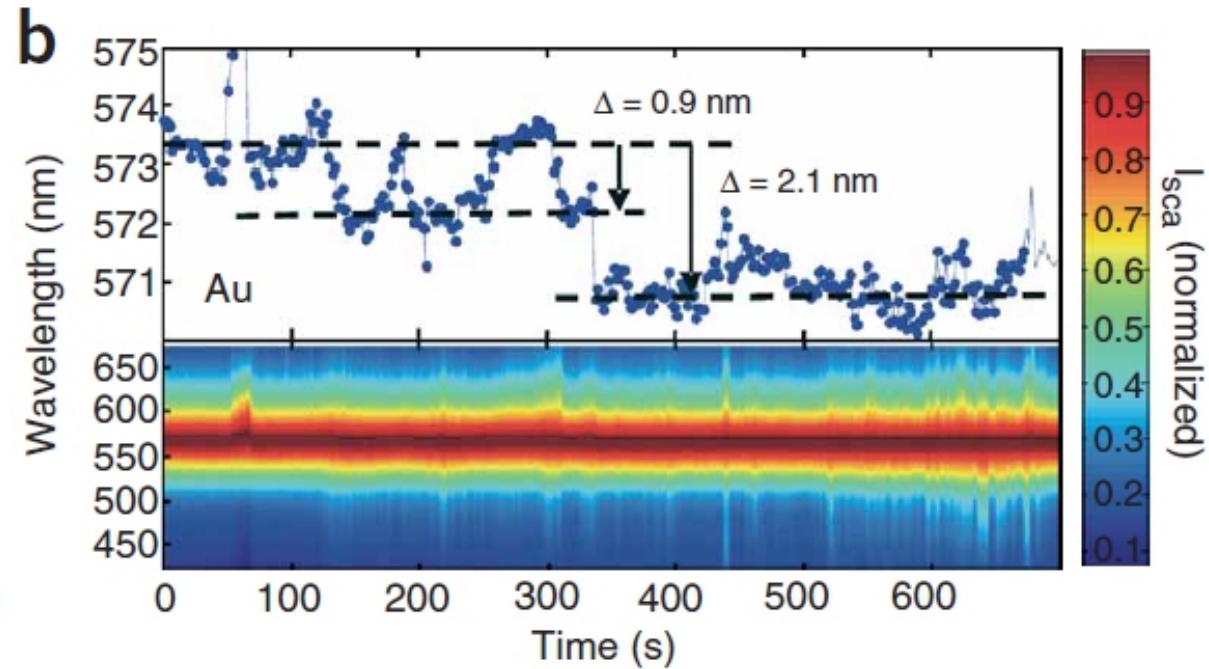
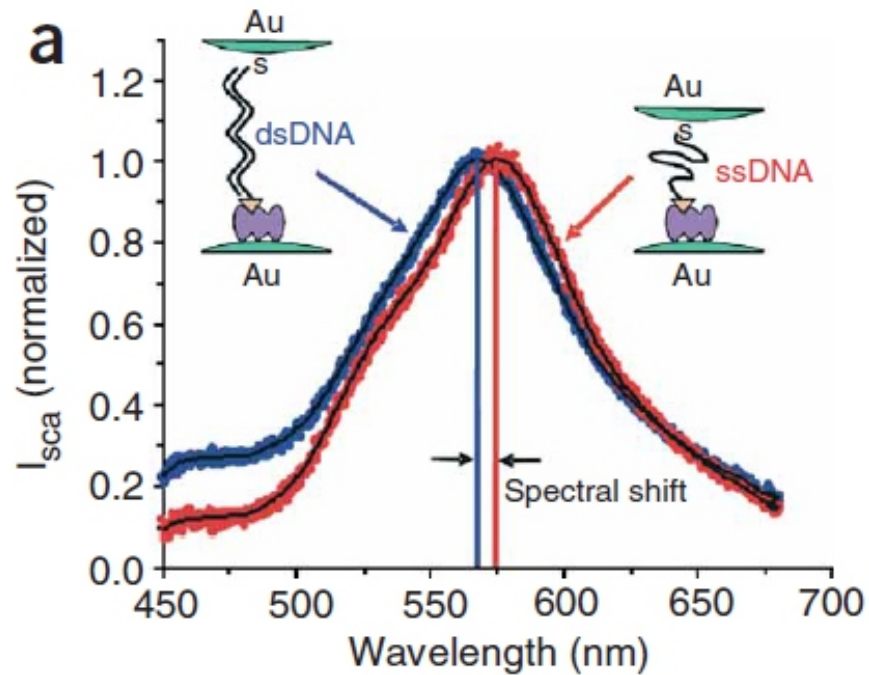
Rozptyl záření

Přiblížením kovových nanočástic dochází k velkým změnám spekter rozptýleného záření; lze využít pro sledování interakcí jednotlivých biomolekul



Sönnichsen, C., Reinhard, B.M., Liphardt, J., Alivisatos, A.P.
A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold
and silver nanoparticles
(2005) Nature Biotechnology, 23 (6), pp. 741-745

Rozptyl záření



Sönnichsen, C., Reinhard, B.M., Liphardt, J., Alivisatos, A.P.
A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles
(2005) Nature Biotechnology, 23 (6), pp. 741-745

Magnetické nanočástice

- Původem magnetismu je magnetický moment elementárních částic a elektrický proud, které vytváří magnetické pole silově působící na okolní magnetické momenty a pohybující se částice nesoucí elektrický náboj.

- Magnetická síla

$$F = \nabla(m \cdot B)$$

- F...magnetická síla
- m...magnetický moment
- B...magnetická indukce

- Magnetizace

$$M = dm/dV$$

- M...magnetizace
- V...objem
- m...magnetický moment

- Diamagnetické látky

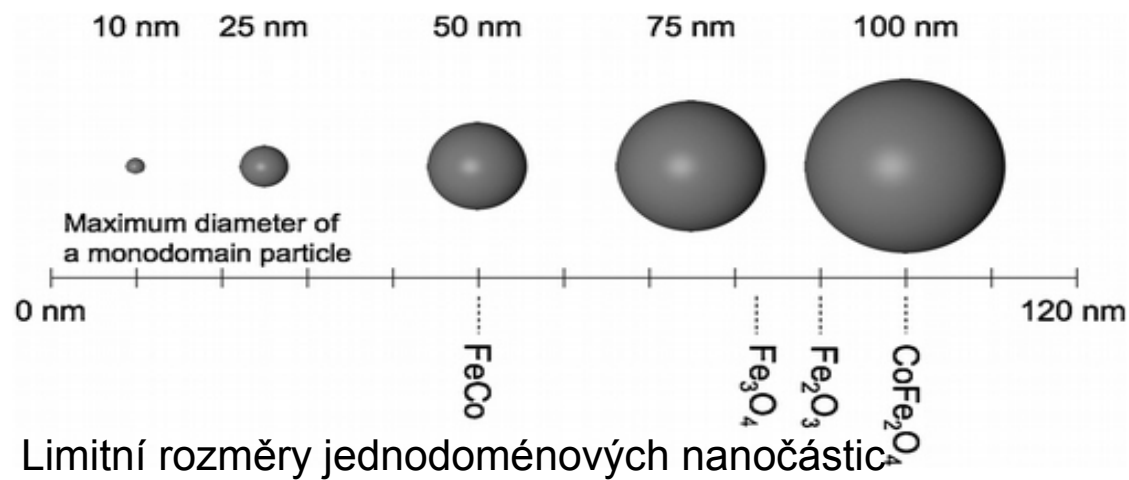
- látka snižují intezitu magnetického pole

- Paramagenetické látky

- v molekulových orbitalech nepárové elektrony, orientují se podle vnějšího magnetického pole, magnetické pole zesilují

- Ferromagnetické látky

- vytváří trvalé domény obsahující souhlasně orientované dipólové momenty, trvalá magnetizace i bez přítomnosti vnějšího magnetického pole

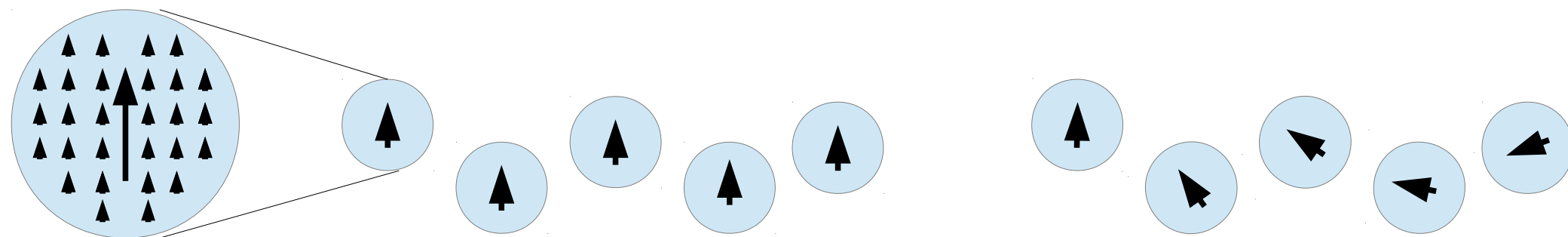


Limitní rozměry jednodoménových nanočástic

Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M.F., Gutiérrez, L., Morales, M.P., Böhm, I.B., Heverhagen, J.T., Prosperì, D., Parak, W.J. Biological applications of magnetic nanoparticles (2012) Chemical Society Reviews, 41 (11), pp. 4306-4334

Magnetické nanočástice

- Jako magnetické nanočástice jsou označovány nanočástice vyráběné z ferromagnetických materiálů (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, MnFe_2O_4 , NiFe_2O_4 , ZnFe_2O_4 ...)
- Většinou se vyrábí z různých feritů (oxidy kovů, hlavně Fe_2O_3) případně kovů, nicméně kovové nanočástice jsou reaktivní a v normálních podmínkách nestabilní.
- Postupným zmenšováním rozměrů částic připravených z ferromagnetických nebo ferrimagnetických materiálů lze připravit superparamagnetické nanočástice, tj. nanočástice, které jsou tvořeny jednotlivými magnetickými doménami. V nepřítomnosti vnějšího magnetického pole jsou tyto domény náhodně orientovány. V přítomnosti magnetického pole se magnetické dipóly orientují podle směru magnetického pole. Tyto nanočástice je možné snadno magnetizovat působením magnetického pole.



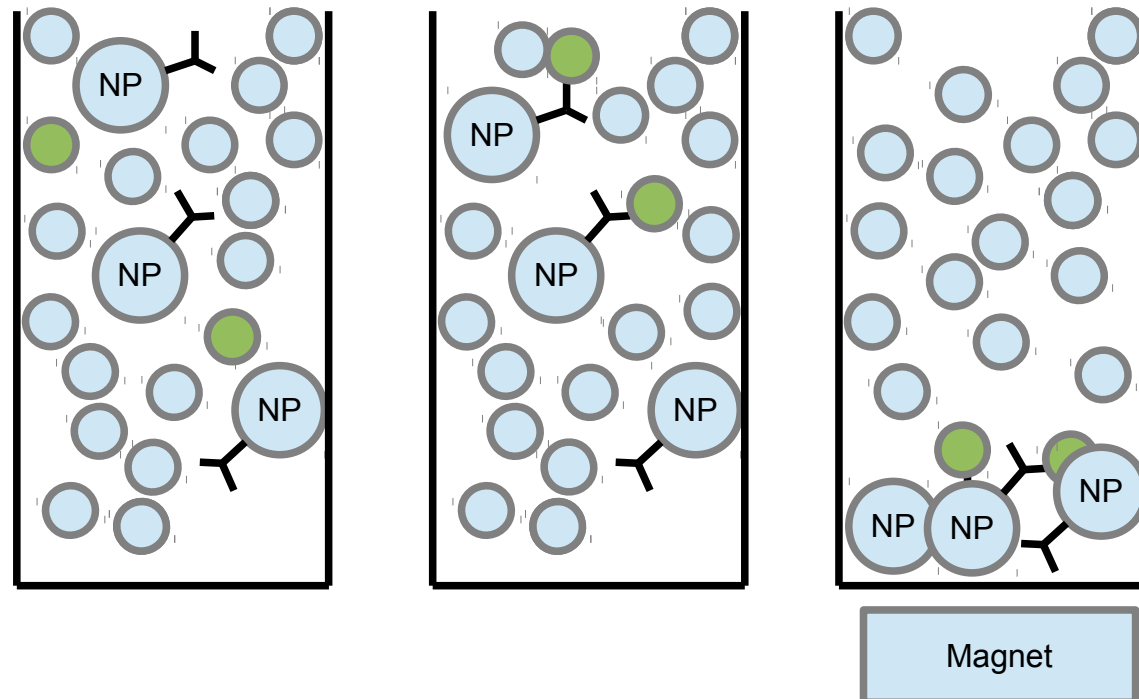
Magnetické momenty superparamagnetických částic

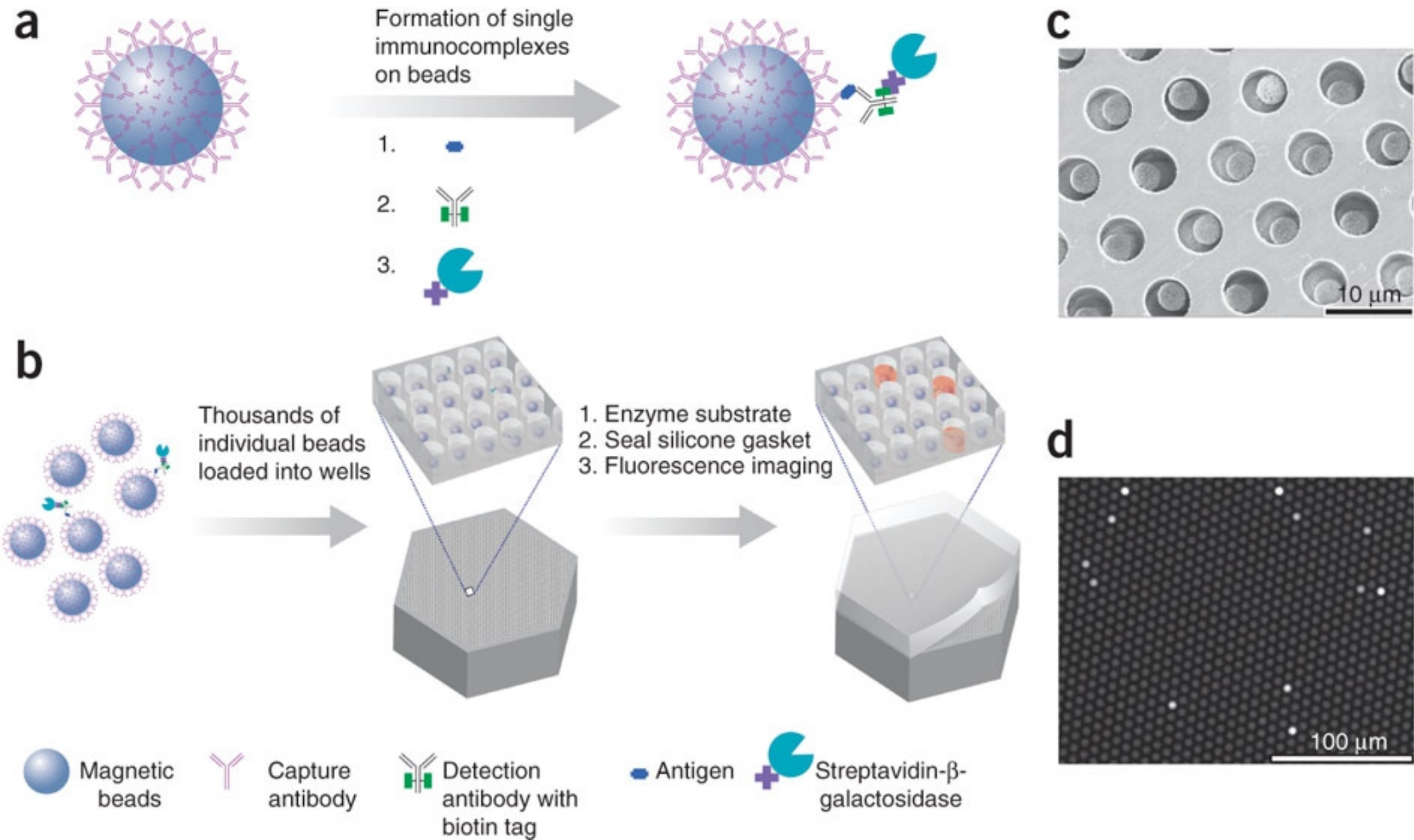
a) v přítomnosti magnetického pole

b) bez přítomnosti magnetického pole

Aplikace

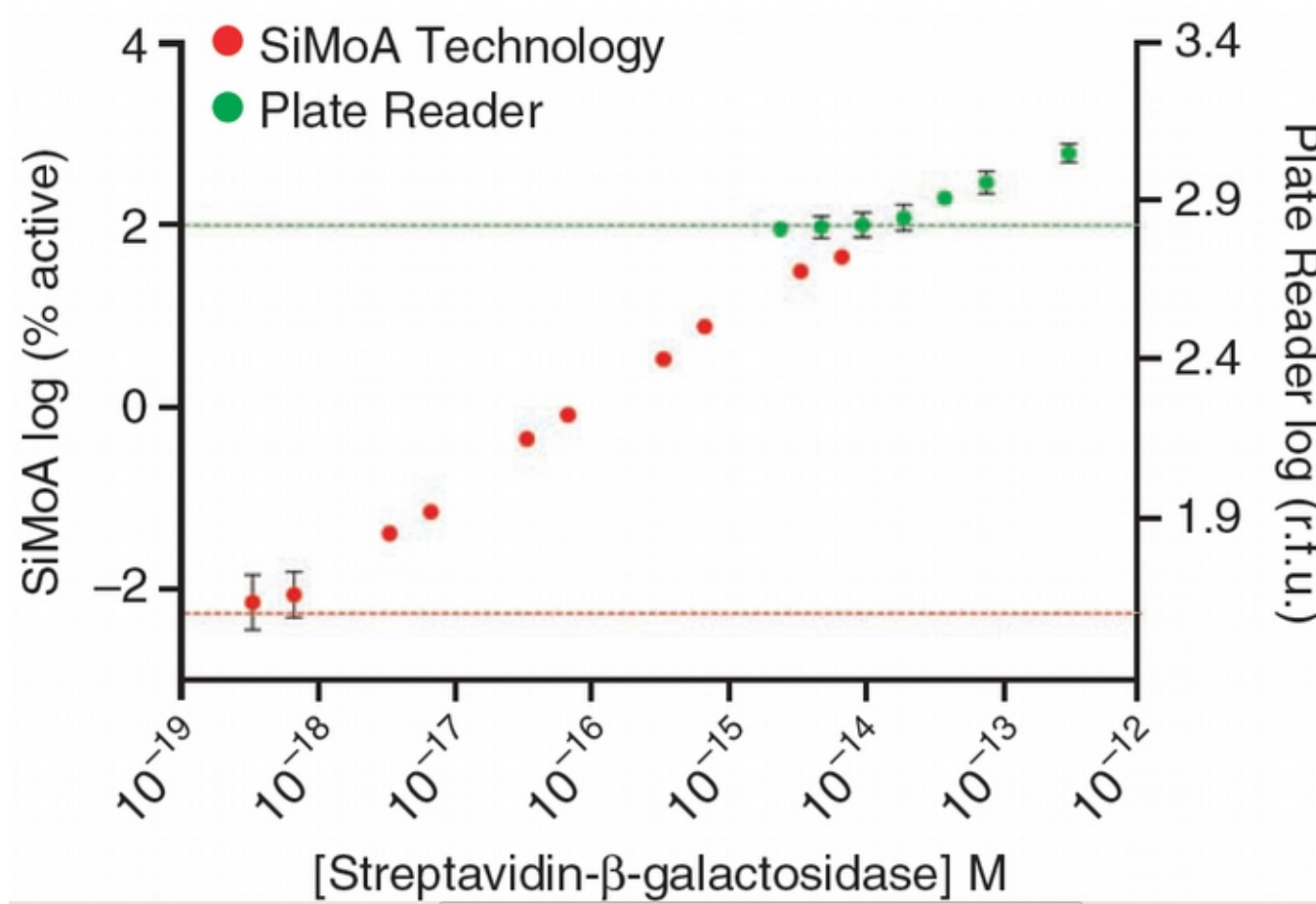
- **Magnetické značení biomolekul** – využitelné podobně jako luminiscenční značky, využitelné např. pro imunochemická stanovení.
- **Magnetická separace (zakoncentrování)** – nahrazuje složitější metody jako je centrifugace a chromatografie. Modifikované magnetické částice specificky vážou určité biomolekuly, viry, buňky → separace přiložením magnetu. Využitelné pro stanovení velmi nízkých koncentrací, použito pro **digitální ELISA**





Aplikace

- **Digitální ELISA** – příklad jednomolekulové detekce s využitím magnetických nanočástic. **Jde o počítání molekul?**



Děkuji za pozornost