

Jiří KUDR^{1,2}, Lukáš NEJDL^{1,2}, Bára GREGOROVÁ³, Jiří SRBA³,
Olga KRYŠTOFOVÁ^{1,2}, Zbyněk HEGER^{1,2}, Vojtěch ADAM^{1,2}, René KIZEK^{1,2}

¹Laboratoř metalomiky a nanotechnologií, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

²Středoevropský technologický institut Brno, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie

³Hvězdárna Valašské Meziříčí, Vsetínská 78, CZ-757 01 Valašské Meziříčí, Česká republika, Evropská unie

Úvod

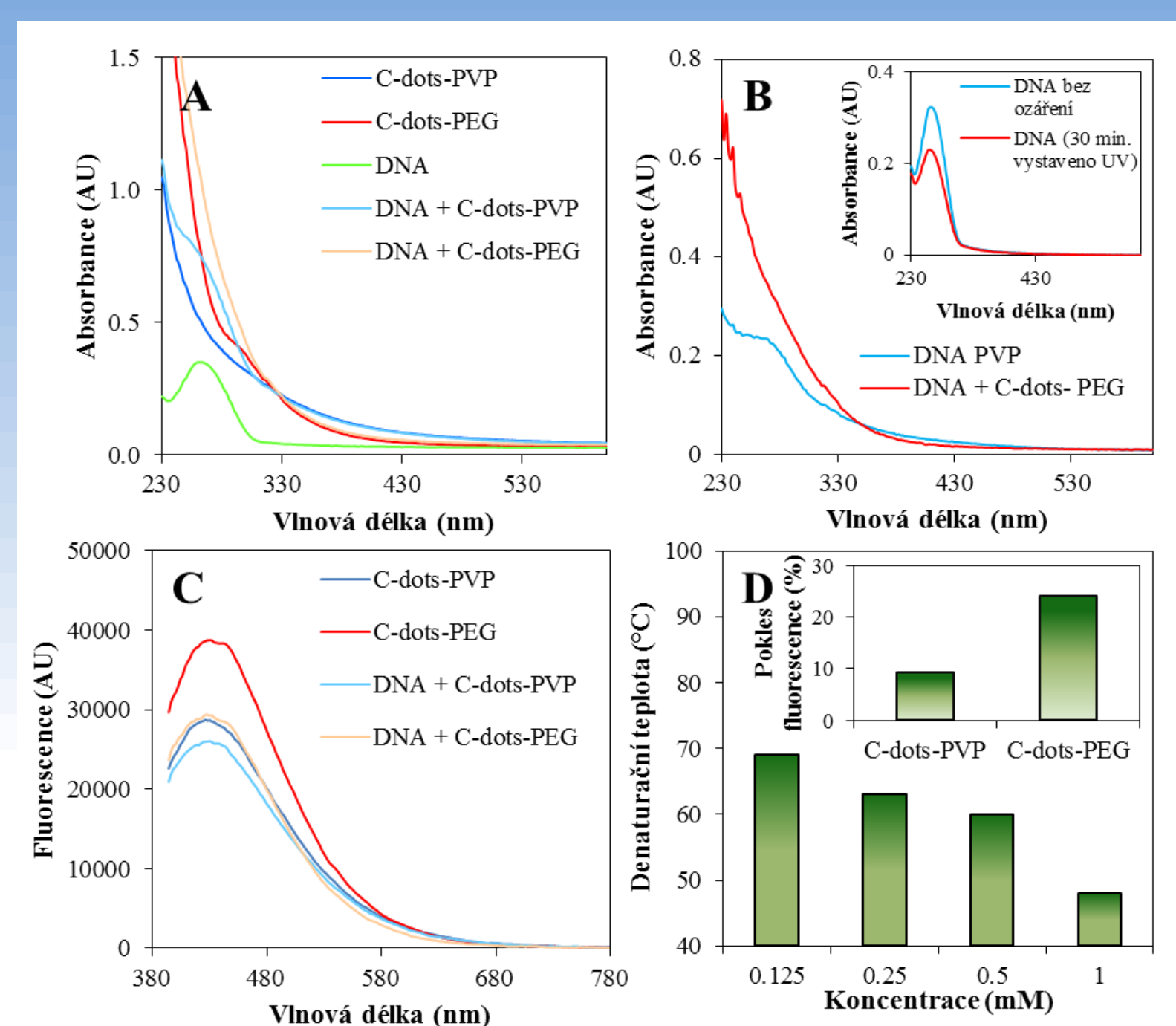
Polovodičové nanokrystaly (kvantové tečky) přitahují mnoho pozornosti vědecké komunity díky jejich opto-elektronickým vlastnostem závislým na velikosti. Jejich unikátní vlastnosti jsou využívány např. v zobrazování, konstrukci senzorů a fotovoltaice. V porovnání s fluorescenčními organickými barvivy mají mnoho výhod – mají výbornou fotostabilitu, široký pás excitačních vlnových délek a vysoký kvantový výtěžek. Na druhou stranu jejich vysoká toxicita limituje možnosti jejich využití. Hledání netoxických nanomateriálů podobných svými vlastnostmi kvantovým tečkám vyústilo v objev uhlíkových teček (C-dots). Tyto tečky pokryté organickými molekulami nebo biomolekulami vykazují silnou fluorescenci v oblasti viditelného a infračerveného spektra díky pasivaci hydroxylových a/nebo karboxylových skupin. Výhoda těchto teček je v jejich výborné rozpustnosti ve vodě a nízké toxicitě. Ačkoliv byly pozorovány negativní efekty uhlíkových nanomateriálů (fullerenů a uhlíkových nanotrubiček) na živé organismy, uhlík je obecně považován za netoxický. Bylo prokázáno, že látky používané k povrchové pasivaci C-dots představují pro organismy větší riziko než samotné uhlíkové jádro. Fluorescenční látky jsou hojně využívány v bioanalýzách, senzorech a *in vivo* zobrazovacích technikách. Pro aplikaci v těchto metodách je nezbytné provést interakční studie s biomolekulami jako je DNA, které jak bylo prokázáno dříve, poměrně ochotně s nanomateriály reagují. Cílem této studie je na základě fluorescence zkoumat interakce DNA a dvou typů uhlíkových kvantových teček.

Příprava vzorků

Byla použita metoda přípravy ve vodě rozpustných C-dots podle Wanga et al. [1]. Vzorky C-dots byly míchány v poměru 1:1 s DNA o koncentraci 50 µg/ml (tj. výsledná koncentrace DNA byla 25 µg/ml). Vzorky byly po 15 minutách interakce vystaveny UV záření o vlnové délce 312 nm po dobu 30 minut v přístroji UV transiluminator TFX-35 MC (Vilbert Lourmat, Eberhardzell, Německo) o výkonu 2 x (6 x 15 wattů). Následně byly vzorky 15 minut ponechány při teplotě 25 °C a analyzovány.

Výsledky

Byly syntetizovány dva typy uhlíkových teček, které se lišily látkou stabilizující jejich povrch – v prvním případě se jednalo o poly(vinylpyrolidon) a v druhém o poly(etylen glykol). Oba vzorky vykazovaly vizuální fluorescenci v modré oblasti viditelného spektra při excitaci vlnovou délkou 312 nm. Jak již zmiňuje Wang et al., samotný PEG není za podmínek přípravy C-dots schopen poskytnout jakoukoliv fluorescenci a PVP pouze slabou, z čehož lze usuzovat na přítomnost fluorescenčních C-dots ve vzorcích. Nejprve byly změřeny absorpční spektra jednotlivých vzorků – DNA (25 µg/ml), C-dots-PVP, C-dots-PEG, C-dots-PVP + DNA (25 µg/ml) a C-dots-PEG + DNA (25 µg/ml) (Obr. 1 A).



Obr. 1 Absorpční spektra DNA (25 µg/ml), C-dots-PVP, C-dots-PEG, C-dots-PVP + DNA (25 µg/ml) a C-dots-PEG + DNA (25 µg/ml) (A). Diferenční absorpční spektrum mezi vzorky C-dots-PVP + DNA (25 µg/ml) a C-dots-PEG + DNA (25 µg/ml) nevystavenými a vystavenými působení UV záření (312 nm) (B). V insertu absorpční spektrum DNA (25 µg/ml) nevystaveného a vystaveného UV záření (30 min.). Fluorescenční spektra C-dots-PVP, C-dots-PEG, C-dots-PVP + DNA (25 µg/ml) a C-dots-PEG + DNA (25 µg/ml) vystavených UV záření (C). Denaturační teploty DNA (20 µg/ml) vystavených různým koncentracím C-dots-PEG (D). V insertu procentuální pokles fluorescenčního signálu C-dots-PVP + DNA (25 µg/ml) a C-dots-PEG + DNA (25 µg/ml) oproti ozářeným C-dots-PVP a C-dots-PEG.

Vzorek DNA se projevuje typickým absorpčním peakem při 260 nm, čemuž odpovídá i nárůst absorpcí směsných vzorků. Po vystavení vzorků UV záření (312 nm, 30 min.) byly opětovně měřeny jejich absorpční a fluorescenční spektra. Z absorpčních spekter byly vyhotoveny spektra diferenční, kdy byly od hodnot absorpčních vzorků C-dots-PVP + DNA a C-dots-PEG + DNA před ozářením odečteny absorbance odpovídající vzorků po vystavení UV (Obr. 1 B). Absorbance v obou případech po ozáření klesla. Vezmeme-li v úvahu pokles absorpce samotné DNA při ozáření UV (insert obr. 1 B), tyto spektra naznačují, že v případě C-dots-PVP došlo k menší interakci s DNA reprezentované lokálním absorpčním maximem při 260 nm. Domníváme se, že se jedná o signál DNA, které není navázáno na C-dots-PVP. Zatím co v případě C-dots-PEG tento peak není přítomen a poukazuje na silnější interakci. Fluorescenční spektra potvrzují předchozí závěry, kdy došlo k razantnímu poklesu fluorescence C-dots-PEG s DNA po ozáření UV v porovnání s kontrolním ozářeným vzorkem C-dots-PEG (Obr. 1 C). K jemnějšímu poklesu došlo v případě C-dots-PVP. Procentuální poklesy signálu jsou uvedeny v insertu obr. 1 D. V následujícím experimentu byl pozorován pokles denaturační teploty DNA po interakci DNA s různými koncentracemi C-dots-PEG (Obr. 1D). Tyto poklesy potvrzují předchozí zjištění.

Závěr

Úspěšně byly syntetizovány dva typy C-dots. Z uvedené interakční studie vyplývá silnější interakce mezi DNA a uhlíkovými tečkami modifikovanými poly(etylen glykolem) než s modifikovanými poly(vinyl pyrolidonem). Interakce byla popsána na základě změny absorpčních a fluorescenčních spekter a v případě C-dots-PEG poklesu denaturační teploty DNA.

Reference

1. F. Wang, S. P. Pang, L. Wang, Q. Li, M. Kreiter and C. Y. Liu, *Chemistry of Materials*, 22 (2010) 4528.

Poděkování: SPOLEČNĚ PRO VÝZKUM, ROZVOJ A INOVACE CZ/FMP.17A/0436