

<sup>1</sup>Laboratoř metalomiky a nanotechnologií, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika, Evropská unie<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut, VUT v Brně, Technická 3058/10, CZ-616 00 Brno, Česká republika, Evropská unie<sup>3</sup>Slovenská organizácia pre vesmírne aktivity, Čukárska Paka 562, SK - Veľká Paka 930 51, Slovenská republika, Evropská unie<sup>4</sup>Hvězdárna Valašské Meziříčí, p.o., Vsetínská 78, 757 01 Valašské Meziříčí, Česká republika, Evropská unie

## Abstrakt

Díky svým optickým vlastnostem jsou kvantové tečky (polovodičové nanokrystaly) používány jako součást biosenzorů, nebo pro *in vivo*, *in vitro* zobrazování. V této práci byla pomocí instrumentálních metod (UV/Vis spektrofotometrie, elektrochemie a fluorescenční analýzy) zkoumána afinita CdTe QDs k PCR fragmentu  $\lambda$  bakteriofága. Zeleně fluoreskující CdTe o velikosti 7,5 nm vykazovaly maximální intenzitu fluorescence při  $\lambda_{ex} = 350$  nm a  $\lambda_{em} = 510$  nm. Zeta potenciál byl stanoven na -36 mV. Denaturační studie neprokázala pokles teploty tání 20  $\mu$ g/ml DNA se vzrůstající koncentrací CdTe (0; 0,125; 0,25; 0,5 a 1 mM). Vzhledem k tomu, že je DNA záporně nabitá a zkoumané CdTe mají záporný náboj (ZP = -36 mV), je toto zjištění v souladu. Elektrochemická analýza prokázala pokles CA píku u konjugátu CdTe-DNA oproti kontrolní DNA

## Úvod

Jednou z hlavních oblastí nanotechnologií je syntéza a charakterizace různých typů nanočástic pro široké spektrum aplikací. Vstupem do nanosvěta se otevřely nové možnosti využití fluorescenčních nanokrystalů, tedy kvantových teček - (QDs) a jejich výjimečných vlastností. QDs vynikají širokým spektrem možností použití, které je dáno jejich variabilitou přípravy a možnostmi funkcionalizací. QDs si udržují část vlastností materiálu, z kterého jsou vyrobeny, ale také přejímají nové vlastnosti, které souvisejí s jejich velikostí. Pro biologické aplikace jsou nejvyužívanější nanokrystaly CdSe a CdSe/ZnS nebo CdTe a CdTe/CdS. Vhodně funkcionalizovaný povrch QDs může být spojen s různými typy biomolekul, jako jsou aromatické heterocykly, proteiny nebo DNA.

## Materiály a metody

### Chemikálie

Chemikálie použité v této studii byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) v ACS čistotě. Destilovaná voda byla připravena s použitím reverzní osmózy pomocí zařízení AQUAL 25 (Česká republika). Destilovaná voda byla dále čištěna zařízením MiliQ QUV. Odpor destilované vody byl 18 M $\Omega$ . Hodnota pH byla zaznamenána pH metrem pH WTW inoLab (Weilheim, Německo).

### Syntéza CdTe QDs

Byl připraven roztok skládající se z 5 ml octanu kademnatého (20 mM), 38 ml vody, 45 mg merkaptopropionové kyseliny, 1 M NH<sub>3</sub> (1,3 ml) a 1,25 ml Na<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> (20 mM). Do bezbarvého roztoku bylo přidáno 50 mg NaBH<sub>4</sub>.

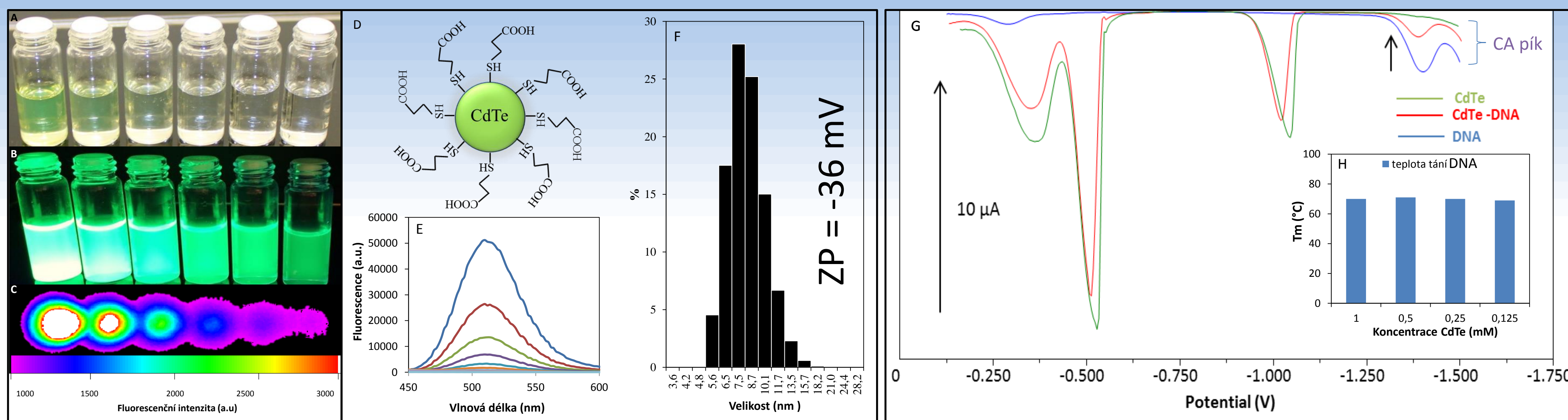
### Fluorescenční analýza

Fluorescenční spektra byla provedena pomocí multifunkčního fluorescenčního analyzátoru Tecan Infinite 200 PRO (TECAN, Švýcarsko). Excitační vlnová délka byla nastavena na hodnotu  $\lambda = 350$  nm. Následná emise záření byla zaznamenána v rozsahu 450 – 600 nm. Výtěžek detektoru byl nastaven na hodnotu 80. Vzorky (50  $\mu$ l) byly umístěny do 96-jamkové UV-transparentní mikrodestičky s plochým dnem od firmy Nunc (Thermo Scientific, USA). Všechna měření byla prováděna při teplotě 25 °C. Roztok byl zahříván na 60 °C po dobu 10 min.

### Elektrochemická analýza

Elektrochemické stanovení proběhlo pomocí analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) propojeném s VA Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko), který využívá standardní tříelektrodevé zapojení. Elektrochemické signály byly zaznamenány metodou square wave voltametrie (SWV). Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s povrchem kapky 0,4 mm<sup>2</sup>. Jako referenční sloužila argentochloridová (Ag/AgCl/3M KCl) elektroda, pomocnou byla platinová elektroda.

## Výsledky



**Obrázek:** Kadmium telurové (CdTe) polovodičové krystaly (kvantové tečky) o koncentraci 2; 1; 0,5; 0,25 a 0, 125 mM, **A)** v ambientním světle, **B)** pod UV zářivkou ( $\lambda = 312$  nm) a **C)** fotografie zaznamenaná fluorescenční kamerou (In-vivo Xtreme) při  $\lambda_{ex} = 410$  nm a  $\lambda_{em} = 535$  nm. **D)** Schématický náčrt kvantové tečky CdTe. **D)** Emisní spektra 0 – 2 mM CdTe. **F)** disperze CdTe. **G)** Voltamogram znázorňující interakci CdTe QDs (1 mM) s DNA (20  $\mu$ g/ml) červená, DNA (20  $\mu$ g/ml) modrá a CdTe QDs (1mM) zelená.

V našich experimentech jsme se zaměřili na studium interakcí CdTe (**obr. A, B, C a D**) s DNA (fragment  $\lambda$  bakteriofága). Nejdříve byla zaznamenána emisní spektra CdTe v rozsahu koncentrací 0 – 2 mM (**obr. E**). Dále byla pomocí Zetasizeru determinována velikost CdTe krystalů (7,5 nm), **obr. F**. Pomocí square wave voltametrie bylo zjištěno, že konjugát CdTe-DNA (1 mM CdTe a 20  $\mu$ g/ml DNA) vykazuje nižší signál (CA pík), než kontrolní DNA (20  $\mu$ g/ml DNA), **obr. G**. U zásobního roztoku 1 mM CdTe nebyl tento signál pozorován. Zjištěné výsledky naznačují, že CdTe mohou ovlivnit strukturu DNA. Nakonec byla u konjugátů CdTe-DNA studována teplota tání (Tm) DNA. Bylo prokázáno, že u konjugátů CdTe –DNA nedošlo ke změně Tm při denuraci vzorků (**obr. H**). Tímto způsobem bylo zjištěno, že CdTe pravděpodobně neměly vliv na vodíkové vazby, které spojují řetězce DNA.

## Závěr

V této práci byla studována spektrofotometrickými a elektrochemickými metodami afinita CdTe k DNA fragmentu  $\lambda$  bakteriofága. Elektrochemicky byl zjištěn rozdíl v CA píku mezi kontrolní DNA a CdTe-DNA. Na základě konstantních Tm při denuraci konjugátů usuzujeme, že CdTe neporušují v DNA vodíkové vazby.

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