

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 3: Chemie**

## **Značení protilátek nanočásticemi a jejich využití v analýze biologických vzorků**

**Eliška Konečná**  
**Jihomoravský kraj**

**Brno 2023**

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 3: Chemie**

## **Značení protilátek nanočásticemi a jejich využití v analýze biologických vzorků**

## **Labelling of antibodies by nanoparticles and their utilization in the analysis of biological samples**

Autor: Eliška Konečná

Škola: Gymnázium Brno Řečkovice, příspěvková organizace, Terezy  
Novákové 2, Brno-Řečkovice 621 00

Kraj: Jihomoravský

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Vlčnovská

Konzultant: Mgr. Michal Kuňák, Ph.D.

**Brno 2023**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 15.2.2023 *Eliška Konečná*

## Poděkování

Ráda bych poděkovala paní doc. Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D., garantce mé práce, za jedinečnou možnost zpracovávat svou Středoškolskou odbornou činnost v Laboratoři bioanalýzy a zobrazování Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Mé největší díky patří Mgr. Marcele Vlčnovské, externí konzultantce, za odborné vedení práce, zasvěcení do problematiky, cenné rady, trpělivost a její čas, který mi byla vždy ochotna věnovat. Dále bych chtěla poděkovat Laboratoři atomové spektrochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity za analýzy vzorků pro praktickou část mé práce pomocí metody LA-ICP-MS. Děkuji i Mgr. Michalu Kuňákovi, Ph.D., mému školnímu konzultantovi, za cenné rady a připomínky. V neposlední řadě děkuji také Jihomoravskému kraji za poskytnutí finanční podpory pro vypracování mé práce.



**jihomoravský kraj**

## **Anotace**

Imunochemické metody se běžně používají pro analýzu biologických vzorků nejen v diagnostice, ale i v základním výzkumu. Na základě unikátní reakce mezi protilátkou a antigenem slouží tyto metody ke specifickému rozpoznání cílových molekul v biologicky komplexních vzorcích. Umožňují rozpoznání analytu v široké škále matric, od vzorků tělních tekutin, jako je moč a krev, až po vzorky buněk a tkání. Prostřednictvím protilátek značených kov obsahujícími nanočásticemi s detekcí pomocí laserové ablace s následnou hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS) je možné stanovit cílový antigen a zároveň také prvkové složení vzorku. Kromě samotného množství prvků je také možné analyzovat jejich distribuci v buňkách a tkáních. Tento typ analýzy by mohl být užitečný například pro studium nádorového mikroprostředí. Práce se zabývá navázáním protilátky DO-1, která rozpoznává protein p53, na 10nm zlaté nanočástice. Vzniklé konjugáty byly použity pro detekci antigenu metodou dot-blot a western blot v buněčných lysátech.

## **Klíčová slova**

Imunochemie, dot-blot, western blot, protein p53, LA-ICP-MS

## **Annotation**

Immunochemical methods are commonly used for the analysis of biological samples not only in diagnostics but also in primary research. Based on the unique reaction between antibody and antigen, these methods are used to specifically recognize target molecules in biologically complex samples. They allow the recognition of the analyte in a wide range of samples, such as the body fluids like urine and blood, to cell and tissue samples. By using antibodies labelled by metal-containing nanoparticles followed by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), the target antigen can be determined, as well as the elemental composition of the sample. In addition to the elemental amount, it is also possible to analyse their distribution in cells and tissues. This type of assay could be useful, for example, for the study of the tumor microenvironment. This work deals with binding the DO-1 antibody, which recognizes the p53 protein, to 10nm gold nanoparticles. The formed conjugates were used for antigen detection by dot-blot and western blot in cell lysates.

## **Keywords**

Immunochemistry, dot-blot, western blot, protein p53, LA-ICP-MS

## Seznam použitých zkratk

AuNPs	Zlaté nanočástice
AuNPs-Anti-IgY	Konjugát zlatých nanočástic a protilátky proti kuřecímu IgY
AuNPs-DO-1	Konjugát zlatých nanočástic a protilátky DO-1, která rozpoznává lidský protein p53
ELISA	Enzymová imunoanalýza
LA-ICP-MS	Laserová ablace s následnou hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
LFIA	Imunoanalýza v laterálním toku
NPs	Nanočástice

# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
Obsah	6
1 ÚVOD	7
2 Nanotechnologie a nanomateriály	8
2.1 Historie nanotechnologií	10
2.2 Výroba nanostruktur	11
2.3 Využití nanomateriálů	12
3 Imunochemie	13
3.1 Antigen a protilátka	13
3.2 Imunochemické metody	14
3.2.1 Typy značení	16
3.2.2 Metody detekce	17
4 Cíle práce	18
5 Materiál	19
5.1 Složení roztoků	20
6 Metody	20
6.1 Navázání zlatých nanočástic na protilátku	20
6.2 Metoda dot-blot	21
6.3 Metoda western-blot	22
6.4 LA-ICP-MS	22
7 Výsledky a diskuze	24
7.1 Příprava konjugátu a ověření jeho schopnosti vázat antigen	24
7.2 Detekce proteinu p53 v lyzátu buněk MCF-7 metodou dot-blot	25
7.3 Detekce standardu proteinu p53 metodou western blot	26
7.4 Detekce proteinu p53 v lyzátu buněk MCF-7 metodou western blot	28
8 Závěr	30
9 Použitá literatura	31
10 Seznam obrázků	38
11 Seznam tabulek	38

# 1 ÚVOD

Přívlastek malý můžeme používat pro popis velmi různorodých předmětů. Většinou jsou to však předměty běžné, které jsou viditelné pouhým okem. Neuvažujeme nad takovými, jejichž velikost je jen těžko představitelná. V přírodě se ale přirozeně vyskytují materiály se specifickými vlastnostmi o velikosti v rozmezí 1–100 nm, které se nazývají nanomateriály. Jedná se například o viry nebo částice vzniklé požárem či částice, které jsou součástí sopečného prachu.

Lidé se však inspirovali přírodou a vznikl obor nanotechnologie, který se zabývá cílenou výrobou nanomateriálů a jejich následným využitím. Vyrábí se nanomateriály odlišných tvarů za použití různých materiálů mající uplatnění v mnoha oborech, jako je například potravinářství, diagnostika či léčba nemocí.

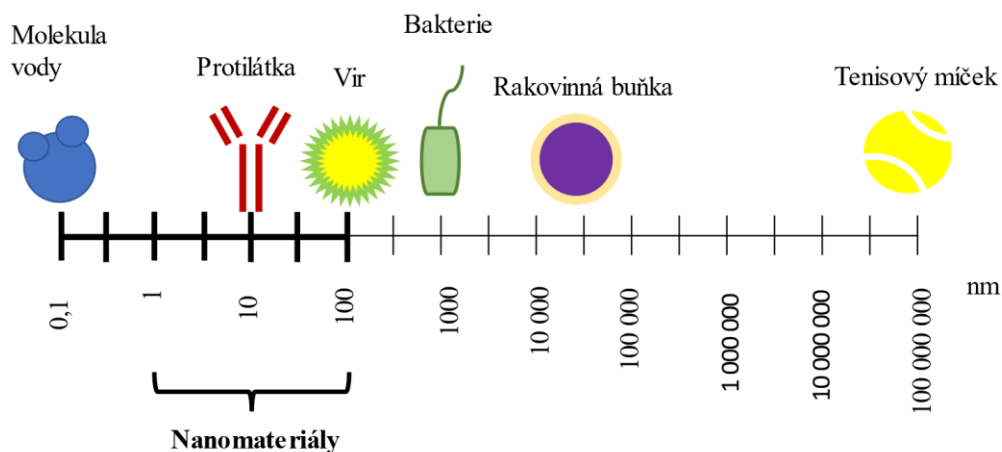
V oblasti zdravotnictví se můžeme například setkat s nanočásticemi ze zlata jako součástí těhotenských testů. Ty fungují na principu imunochemických metod a jsou založeny na detekci antigenu velmi specifickou protilátkou. Imunochemické metody se mohou používat právě pro diagnostiku nebo také ve výzkumu v laboratořích. Cílem těchto metod je detekce vytvořeného komplexu antigenu s protilátkou. Ani antigen, ani protilátka však nejsou za běžných okolností viditelné, proto je nutné jednoho z partnerů označit. Podle typu a vlastností značky se následně použije vhodný detekční systém.

Pro výzkum je žádoucí, aby měly imunochemické metody co nejnižší limity detekce a aby bylo měření přesné. Existuje metoda laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS), která měří stopová množství prvků ve vzorku. Pokud se jako značka použijí právě zlaté nanočástice, je možné je touto metodou detekovat a dosáhnout tak lepších limitů detekce oproti stávajícím technikám.



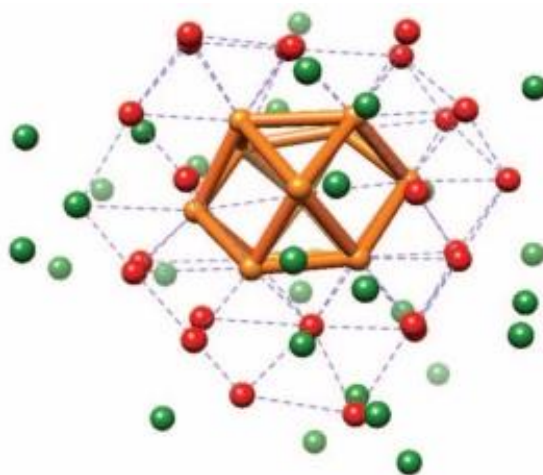
## 2 NANOTECHNOLOGIE A NANOMATERIÁLY

Nanotechnologie je vědní obor zabývající se strukturami v nanoměřítku. Předpona „nano-“ pochází z řečtiny a do českého jazyka se překládá jako trpaslík. Jejím úkolem je navrhovat, charakterizovat, vyrábět a aplikovat struktury v nanorozměrech [1]. Jeden nanometr je miliontina milimetru, což je shruba 100 000× menší velikost než průměr lidského vlasu [2].



Obrázek 1: Příklady struktur v nano-, mikro- a makroměřítku; podle [1]

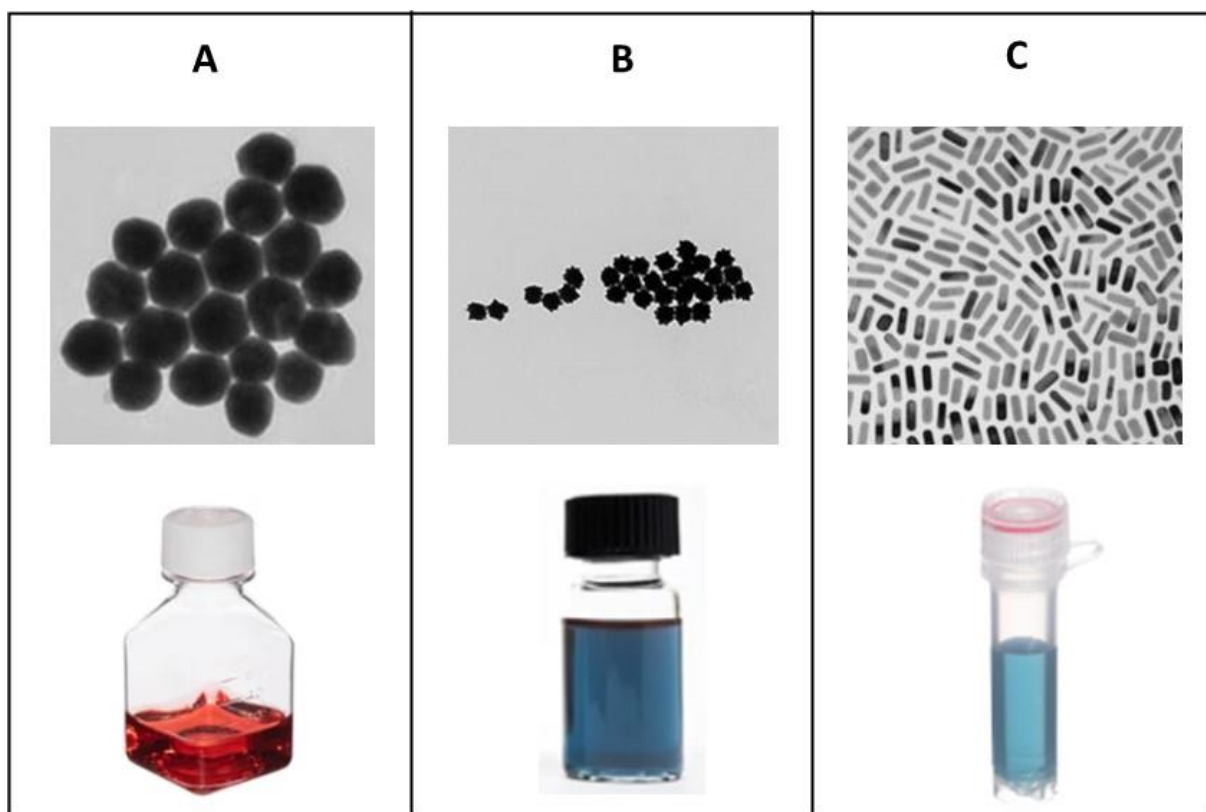
Nanomateriály jsou struktury, které mají alespoň jeden ze svých rozměrů velký 1–100 nm [3] [4], viz Obrázek 1 [1]. Spodní hranice 1 nm je stanovena proto, aby nebyly za nanomateriály považovány samostatné atomy. Nanotechnologie se tedy zabývá shluky atomů, jak znázorňuje Obrázek 2 [5].



Obrázek 2: Schéma zlaté nanočástice, která je jako nanomateriál složena pouze z atomů, na obrázku konkrétně nanočástice s 64 atomy; převzato z [5]

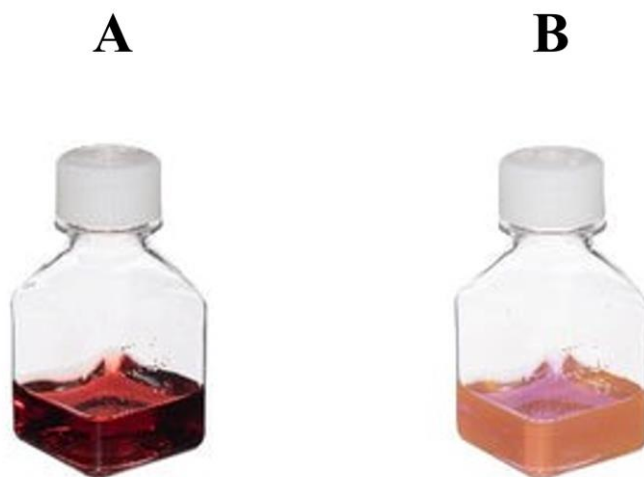
Nanověda není jen věda o malém, ale věda, ve které materiály s malým rozměrem vykazují nové fyzikální jevy, souhrnně nazývané kvantové efekty, které jsou závislé na velikosti a výrazně se liší od vlastností materiálů v makroměřítku [1].

Struktury v nanoměřítku a makroměřítku mohou mít odlišné, někdy i opačné [1] fyzikální a chemické vlastnosti [1] [3]. Příkladem může být různý bod tání či jejich odlišná barva. Zlato má v makroměřítku žlutou barvu. Nanočástice zlata (AuNPs) mají ale jedinečné optické vlastnosti, které závisí především na jejich tvaru a také na velikosti [6]. Pokud se jedná o koloidní nanočástice, viz Obrázek 3A, mají červené odstíny, nanourchins („nanoježci“), viz Obrázek 3B, mají odstíny modré a nanorods („nanotyčinky“), viz Obrázek 3C, jsou ve světle modrých odstínech [7].



Obrázek 3: Zlaté nanočástice různých tvarů; A) Koloidní nanočástice – 100 nm, B) Nanoježci - 100 nm C) Nanorods - 25 nm; upraveno z [6]

Tyto vlastnosti jsou dány interakcí světla s elektrony na povrchu zlatých nanočástic [6]. Barva nanočástic se také mění s rostoucí velikostí z tmavších na světlejší odstíny, viz Obrázek 4. Liší se i katalytické vlastnosti. Zlato v makroměřítku jako katalyzátor nikdy nefunguje, protože je chemicky méně reaktivní [3], ale zlaté nanočástice jsou dobrým katalyzátorem díky jejich velkému povrchu vůči objemu [3].



Obrázek 4: Barva zlatých nanočástic podle jejich velikosti; A) AuNPs 10nm, B) AuNPs 100nm; upraveno z [6]

Nanomateriály mohou vznikat přirozeně, příkladem biologických nanomateriálů jsou viry a proteiny. Nanočástice také vznikají při sopečné činnosti, spalování ropy [1] či působením zemních proudů na ložiska rud. Např. ve Zlaté studánce u Křemešníku je léčivost vody ovlivňována nanočásticemi pocházejícími ze stříbrné rudy [3].

Nanotechnologie jako obor se však soustředí na ty záměrně vyráběné definovaným výrobním procesem. Podle toho, kolik rozměrů mají nanomateriály menších než 100 nm, je dělíme do tří skupin, viz Tabulka 1 [1].

Tabulka 1: Rozdělení nanomateriálů upraveno dle [1]

Počet rozměrů menších než 100 nm	Příklady
Všechny tři rozměry jsou menší než 100 nm	Nanočástice, kvantové tečky
Dva rozměry jsou menší než 100 nm	Nanotrubice, nanodráty, nanovlákná
Jeden rozměr je menší než 100 nm	Tenké vrstvy, filmy a povlaky

## 2.1 Historie nanotechnologií

Nejstarší prokázané využití nanomateriálů sahá do 4. století n.l. V té době byl vyroben římský pohár ze sodnovápenatého skla, který obsahuje nanočástice zlata a stříbra [3] [4]. Podrobně zkoumán byl až během 70. let 20. století, kdy bylo zjištěno, že jeho zbarvení je způsobeno právě nanočásticemi a liší se v závislosti na osvětlení [8]. Pokud pozorovatel stojí na stejné straně, jako je zdroj světla, vidí pohár zeleně, viz Obrázek 5 vlevo. Pokud stojí na straně opačné tak, že světlo pohárem prostupuje, vidí ho tmavě červený, viz Obrázek 5 vpravo. Zelenou barvu způsobuje absorpce světla nanočásticemi stříbra, tmavě červenou pak nanočásticemi zlata [9] [10] [11].



*Obrázek 5: Římský pohár ze sodnovápenatého skla obsahující nanočástice zlata a stříbra, převzato z [11]*

Dalším příkladem použití nanomateriálů v historii je mayská modř. Jedná se o barvivo vynalezené v 7.–8. století n.l. [12], které je jako kompozitní nanomateriál složeno z barviva indigo a jílových nanopórů [13]. Výjimečné je barvivo svou vysokou odolností vůči biokorozi a kyselinám [2] a tím, že je jeho pigment stabilní [12].

Koncept nanotechnologie, tak jak ji známe dnes, poprvé představil Richard Feynman v roce 1959 během své přednášky „There is Plenty of Room at the Bottom“. Pracoval s myšlenkou o umělém vytváření materiálů na úrovni atomů a molekul [3] [4]. Něčemu takovému totiž nebrání žádné přírodní zákony. Jediným problémem byla lidská neschopnost pracovat na atomární úrovni kvůli nedostatku vhodných technik a vybavení [14]. V roce 1974 pojem nanotechnologie definoval japonský vědec Norio Taniguchi [4].

V 80. letech poté dochází k posunu oboru nanotechnologie díky objevu speciálních mikroskopových metod. Skenovací tunelovací mikroskop (STM) byl vyvinut v roce 1982 a mikroskop atomových sil (AFM) byl vyvinut v roce 1986. Oba přístroje umožňují zkoumat děje až na úrovni atomů [3].

## **2.2 Výroba nanostruktur**

V nanotechnologiích existují dva přístupy k tvorbě struktur. Prvním je top-down (z anglického shora dolů) a je to metoda, kdy z větších struktur vznikají ty menší. Druhým je bottom-up (zespodu nahoru), který je založen na výrobě větších a složitějších struktur z atomů a molekul [3].

Top-down metoda je označována jako fyzikální, bottom-up jako chemická. Příkladem top-down metody je nanomletí, protahování či řezání. Během metody bottom up probíhá řízená manipulace s uspořádáním atomů a molekul [4]. Příkladem je krystalizace a odpařování kapek pro výrobu nanočástic [15].

## 2.3 Využití nanomateriálů

Nanotechnologie a nanomateriály nachází využití mezi mnoha obory. Komerčně nejvyužívanější jsou kovové nanočástice, hlavně stříbrné a zlaté, méně často pak i dalších kovů. [3]. Ve zdravotnictví se magnetické nanočástice například používají při vysokoteplotní léčbě rakoviny. Rakovinné buňky jsou totiž náchylnější na zvýšenou teplotu více než buňky zdravé a magnetické nanočástice jsou schopné generovat teplo až 45 °C [16]. Ve stejném oboru jsou nanomateriály využívány i jako značky různých organických skupin k cílenému transportu léčiv či kontrastní zobrazovací látky pro magnetickou rezonanci [16].

Dále se z kovových nanomateriálů využívají stříbrné nanočástice, které jsou silným katalyzátorem a mají antibakteriální účinky. Konkrétním využitím je přidavek stříbrných nanočástic do praček, lednic, klimatizací, PC myší, respirátorů, obvazů či mastí na hnisavé rány nebo popáleniny. Pro snížení zápachu se užívají také v textiliích nebo ložním prádle. Stříbrné nanočástice v takovém případě hubí bakterie, které produkují těkavé mastné kyseliny [3].

Kovy jako nikl nebo wolfram se přidávají do solárních článků a do elektronických součástek. Nanočástice železa se používají k dekontaminaci podzemních vod, protože díky reaktivitě rozkládají nežádoucí látky [3].

Zlaté nanočástice jsou široce používány jako materiály pro značení a zobrazování [17] a to díky jejich jedinečným optickým vlastnostem [18]. Mají bohatou historii, která sahá až do starověkých římských dob, kdy se používaly jako barvivo do skel pro dekorativní účely. Moderní éra zlatých nanočástic však začala již před více než 150 lety [19].

V roce 1971 britští vědci Faulk a Taylor vypracovali revoluční metodu konjugace protilátka-koloidní zlato pro vizualizaci povrchových antigenů Salmonely pomocí elektronové mikroskopie. Tento objev inicioval další studie v příštích letech věnované biomedicínským aplikacím nanočástic zlata, které specificky rozpoznávaly různé biomakromolekuly [20].

Nyní se hojně využívají v kolorimetrických testech, které jsou díky nim velmi citlivé. Detekce je možná pouhým okem bez požadavků na komplikované přístrojové vybavení [18]. Příkladem mohou být imunoanalýzy v laterálním toku (LFIA) vhodné pro samotestování, jako jsou těhotenské testy [21], případně antigenní testy na Covid-19 [22], viz Obrázek 6.



Obrázek 6: Pozitivní antigenní test na Covid-19, vlastní fotografie

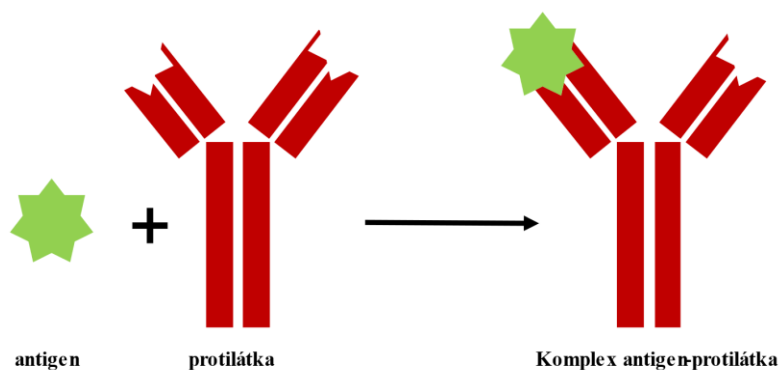
### 3 IMUNOCHEMIE

Imunochemie je obor chemie, který se zabývá studiem molekulárních mechanismů spojených se základními funkcemi imunitního systému, konkrétně chemickou reakcí imunity. Zabývá se zejména povahou protilátek, antigenů a jejich interakcí. Zahrnuje metody pro detekci a lokalizaci proteinů a dalších buněčných složek pomocí protilátek [23]. Imunochemie a její techniky mohou být použity pro diagnostiku a prognózu nemocí jako je rakovina, neurodegenerativní poruchy, mozková traumata či svalová onemocnění [24]. Základním principem imunologických metod je vazba protilátky na antigen [25].

#### 3.1 Antigen a protilátka

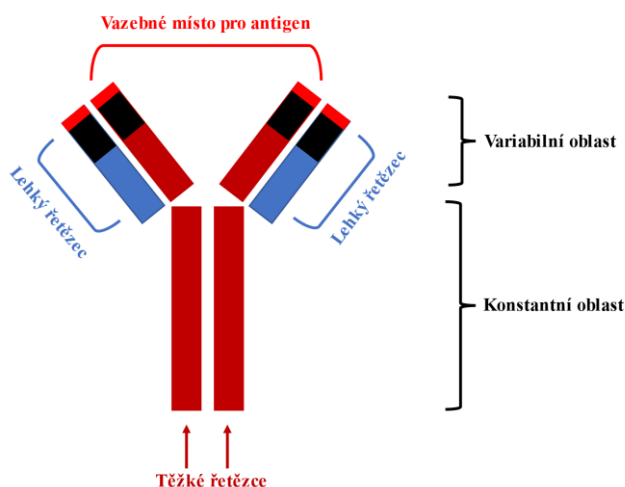
Antigeny jsou látky, které vyvolávají imunitní odpověď. Jsou to nejčastěji proteiny, sacharidy, lipidy nebo nukleové kyseliny. Imunitní odpověď znamená tvorbu specifických protilátek pro daný antigen v lymfocytech a liší se podle zdraví, věku a genetiky jedince [26]. Nejčastěji se jedná o tzv. exoantigeny, což jsou antigeny pocházející z vnějšího prostředí, tj. mikroorganismy, nebo jejich produkty, které jsou infekční. Speciálním příkladem exoantigenů jsou alergenů, které dokážou v daném organismu vyvolat patologickou reakci. Může se však jednat také o autoantigeny, což jsou antigeny, které jsou organismu vlastní [27].

Protilátky se pak vyskytují hlavně v krevním řečišti a dalších tělních tekutinách. Tato forma imunitní obrany je specifická pro obratlovce [28]. Nejmenší jednotkou antigenu je tzv. epitop, který je na jejich povrchu. Jedná se o část antigenu, která je schopná vyvolat imunitní odpověď [26], přičemž organismus si vytváří protilátky pouze na pro něho neznámé epitopy. Jedná se o místo nazývané vazebné, na které se protilátka váže [25]. Protilátky neboli imunoglobuliny [28] jsou soubory proteinů [29], které v těle vznikají jako reakce na výskyt antigenu [28]. Jsou produkovány B lymfocyty [29], konkrétně plazmatickými buňkami [28]. Protilátky rozeznávají jednotlivé antigeny [28] a velmi specificky [30] se na ně nekovalentními interakcemi vážou [28]. Takto vzniká komplex antigen-protilátka [30], viz Obrázek 7 [31]. Kromě vzniku komplexu jsou protilátky také zodpovědné za aktivaci dalších složek imunitního systému k boji s patogeny [28].



Obrázek 7: Schéma interakce protilátky s antigenem, podle [29]

Struktura protilátek připomíná písmeno „Y“ a obsahuje dva těžké a dva lehké řetězce, viz Obrázek 8. V jejich horní části se nachází specifické vazebné místo pro antigen a podle těžkého řetězce ve spodní části se dělí do 5 tříd protilátek – IgG, IgM, IgA, IgE a IgD [28].



Obrázek 8: Struktura protilátky, převzato a upraveno z [26]

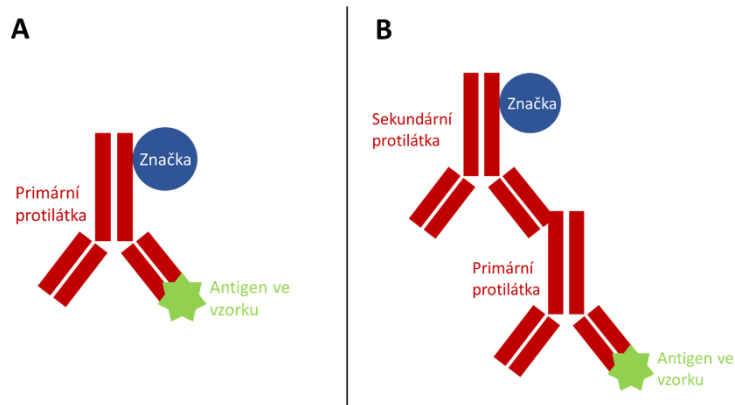
### 3.2 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou základní analytické techniky v laboratořích klinické chemie [25]. Jedná se o kombinaci metod biochemických a imunologických [27]. Díky nim je za použití protilátek [32] možné detekovat proteiny, hormony, buňky či nukleové kyseliny ze séra, krve, tkání či orgánů [25]. Stanovují ale také látky, které jsou pro organismus cizorodé, např. patogeny a farmaka [33]. První imunochemickou metodu vyvinula Rosalyn Yallow roku 1959 a jednalo se o metodu fungující na základě značení protilátek radionuklidem. Za tento objev ji byla roku 1977 udělena Nobelova cena [25].

Selektivní povaha protilátek zaručuje vysokou specificitu metod, které je možné díky této povaze využívat také u složitých vzorků, jako je krev, plazma nebo moč. Imunochemické metody se dělí na ty, které využívají značených protilátek či antigenů a ty, které ne. Detekce testů, kde se značky využívají, následně probíhá pomocí fluorescence, kolorimetrie, chemiluminiscence nebo pomocí hmotnostní spektrometrie, dle povahy použité značky. Specificitu těchto metod lze vhodným výběrem značky zvyšovat [34].

Mezi imunotesty patří ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, imunoenzymatické stanovení) [34], při této metodě je na protilátku navázaný enzym, který po reakci se substrátem generuje barevný, nebo luminiscenční signál. ELISA se obvykle používá pro kvantifikaci antigenů ve vzorku. Do jamky se vzorkem je přidána primární protilátka a je vytvořen imunokomplex. Primární protilátka může být přímo značena enzymem, pokud není, následuje reakce s enzymem označenou protilátkou sekundární. Po přidání substrátu je možné detekovat antigen ve vzorku [35]. Dalším příkladem je LFIA, která se využívá nejen ve zdravotnických zařízeních, ale také pro domácí screening. Výhodou je jejich nízká provozní cena, dostupnost a rychlé použití [36].

Imunochemická metoda dot-blot se používá pro detekci proteinů. Využívá se např. při diagnostice nemocí, při testování bezpečnosti potravin nebo při monitorování znečišťujících látek. Vzorek je přímo nanášen na blotovací membránu, která je z nitrocelulózy, případně z polyvinylidendifluoridu. Následně je membrána blokována, aby se zabránilo nespecifickým interakcím protilátky na její povrch. Po zablokování probíhá inkubace s primární protilátkou, která rozpoznává zkoumaný analyt ve vzorku. Antigen může být detekován přímo značenou primární protilátkou, jak znázorňuje Obrázek 9A. Možností je také detekce značky na sekundární protilátce, která je navázána na protilátku primární, viz Obrázek 9B [37].



Obrázek 9: Schéma detekce antigenu protilátkou; A) přímo – značenou primární protilátkou, B) nepřímou – značenou sekundární protilátkou rozpoznávající protilátku primární; podle [38]

Další blotovací imunometodou je tzv. western blot. Jedná se o rutinní techniku pro analýzu proteinů v komplexním biologickém vzorku, který se ředí pufrům s obsahem dodecylsulfátu sodného (SDS). Následně jsou vzorky denaturovány zahřátím a nanášený do jamek [38] polyakrylamidového či agarového gelu [39] vybraného podle očekávané velikosti detekovaného proteinu [38]. Následně je provedena elektroforetická separace a proteiny, které jsou obaleny SDS, jež jim udělil negativní náboj, migrují ke kladnému pólu a rozdělují se na základě jejich velikosti, čímž se western blot liší od metody dot-blot. Takto rozseparovaný vzorek se přenáší na blotovací membránu z nitrocelulózy nebo polyvinylidenfluoridu. Navázané proteiny na membráně se dále detekují opět buď přímo pomocí značené primární protilátky, případně nepřímou pomocí nejprve primární a následně značené sekundární protilátky [38].



### 3.2.1 Typy značení

Pro větší citlivost testů a možnost detekce nižší koncentrace analytu je využíváno značení jednoho z reakčních partnerů (antigenu nebo protilátky) [40]. Vazebné činidlo je označeno připojením částice či molekuly, která slouží pro následnou detekci [25].

#### Radionuklidy

Radionuklid je atom s nestabilním jádrem, který podléhá radioaktivnímu rozpadu. Poločas rozpadu je doba potřebná k tomu, aby se rozpadlo 50 % radionuklidu. V laboratořích se nejčastěji využívá radionuklid vyzařující gama záření. Přístroj, který se pro tuto metodu využívá, obsahuje fluor, který je energií ze záření excitován. Takový fluor poté uvolňuje foton viditelného světla, které detekujeme [25]. Radioizotopy byly značkami nejpoužívanějšími asi před 40 lety. Výhodou tohoto typu detekce je rozpoznání malého množství široké škály sloučenin ve vzorku. Nicméně vzorky značené izotopy mají relativně krátkou skladovatelnost. Analýza nese zdravotní rizika a odpad musí být bezpečně zlikvidován. Zařízení měřící radioaktivitu je navíc finančně náročné. Kvůli těmto nevýhodám se začaly používat jiné značky, a to se zachováním citlivosti metody [41].

#### Enzymy

Enzymy jsou biologické katalyzátory, to znamená, že zvyšují rychlost reakce a reakcí nejsou změněny a spotřebovávány. Příkladem používaných enzymů je křenová peroxidáza (HRP) a alkalická fosfatáza (ALP). Enzym během detekce reaguje s vhodným substrátem, podle jehož výběru se vzorek měří fotometricky, fluorimetricky nebo chemiluminiscenčně. Typickým příkladem je zvýšená generace kyslíku při reakci za použití enzymu peroxidáza. Kyslík pak oxiduje chromogen, který je součástí substrátu, a jeho přeměnou vzniká barevná sloučenina následně měřená pomocí fotometru [25].

#### Fluorescenční značky

Fluorescenční značky jsou sloučeniny, které absorbují zářivou energii jedné vlnové délky a vyzařují nižší energii o delší vlnové délce [25]. Toto vyzařované světlo je detekované fluorometrem nebo modifikovaným spektrometrem. Delší vlnová délka způsobí zpoždění při fluorescenci a díky času lze právě nové záření odlišit [25]. Příkladem nejčastěji používaných fluorescenčních barviv je fluorescein, či rhodamin a deriváty odvozené od jejich struktury, jako jsou komerčně dostupné fluorescenční značky druhé generace typu Alexa Fluor® a DyLight® [42].

#### Luminiscenční značky

Luminiscenční značky jsou organické sloučeniny, které vyzařují foton světla jako výsledek elektrické, biochemické nebo chemické reakce. Když jsou totiž oxidovány substrátem, tak se dostávají do vyššího excitovaného stavu a při návratu do základního stavu emitují právě foton světla, který je detekován [25].

### 3.2.2 Metody detekce

Podle typu značky je volen vhodný detekční systém. Pokud je značkou enzym, je použit spektrofotometr [25] [43] nebo můžeme výsledek vidět pouhým okem [18], když se enzym využije pro kolorimetrii [44]. Pro značku fluorescenční se může použít také spektrofotometr [25] [43] nebo fluorescenční mikroskop [45].

Na začátku 21. století došlo k pokroku v oblasti detekce biomolekul s využitím principů nanotechnologií. Nanočástice (NPs) s různými vlastnostmi patří mezi nanomateriály široce využívané v různých druzích analytických technik. Díky jedinečné struktuře, elektronickým, magnetickým, optickým, katalytickým a biokompatibilním vlastnostem je lze použít jako značku pro detekci analytů pomocí kolorimetrických nebo různých elektrochemických technik [46].

Ve srovnání s jinými kovovými nanočásticemi našly AuNPs široké uplatnění v bioanalytických metodách. Vzhledem k vysokým elektronovým hustotám byly široce používány v imunochémii, imunohistochemii a imunoblotu pro elektronovou mikroskopii. Další výhodou zlatých nanočástic je jejich stabilita a schopnost kombinovat se s biomolekulami [46]. Zlaté nanočástice se využívají také v kolorimetrických testech díky svým jedinečným optickým vlastnostem. Takové testy jsou velmi citlivé, jsou jednoduché na provoz a také je detekce možná pouhým okem [18]. AuNPs je možné detekovat také pomocí LA-ICP-MS [47].

#### 3.2.2.1 LA-ICP-MS

LA-ICP-MS neboli laserová ablace s následnou hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem je analytická metoda [48] pro stanovování hlavních, vedlejších a stopových prvků a izotopů [49] ve dvourozměrném i trojrozměrném zobrazování, v tzv. mapování. Prostorové rozlišování prvků pomocí LA-ICP-MS našlo širokou použitelnost při mapování tkání, či pozorování chování nanočástic v biologickém systému [50]. Tato metoda byla poprvé představena roku 1985 [49].

Prvním krokem je snímání vzorku výkonným pulzním laserem, kdy je laserový paprsek zaostřen na povrch vzorku. Následně je ablatován, což znamená, že se částice uvolňují jako jemný hustý aerosol [50], který putuje do ICP, kde je ionizován. Po ionizaci jsou ionty s různými poměry hmotnosti k náboji filtrovány systémem hmotnostního spektra a jsou detekovány detektorem [48].

LA-ICP-MS je schopné analyzovat malé množství vzorku a přímou analýzu pevných látek bez předešlého rozpouštění, čímž se předchází kontaminaci [49]. Protilátky značené nanočásticemi s obsahem iontů kovů umožňují využívat tuto metodu také pro detekci antigenů ve vzorku. Za použití protilátek značených různými nanočásticemi je možné ve vzorku detekovat více analytů, např. nádorových biomarkerů ve vzorku tkáně [51].

## 4 CÍLE PRÁCE

- Označit protilátku zlatými nanočásticemi (AuNPs) o velikosti 10 nm.
- Za použití standardu proteinu ověřit, zda byla konjugace protilátky s nanočásticemi úspěšná a zda byla funkčnost protilátky zachována.
- Detekovat protein v reálném vzorku pomocí imunochemické techniky s detekcí pomocí LA-ICP-MS.
- Na základě experimentálních dat zhodnotit výhody a nevýhody metody a zda a za jakých podmínek je použitelná v praxi v porovnání s běžnými detekčními technikami.

## 5 MATERIÁL

Při přípravě všech roztoků byla použita MiliQ voda deionizovaná systémem Millipore společnosti Merck (Německo). Veškeré použité chemikálie byly dodány firmou Sigma Aldrich, respektive Merck (Německo), jestliže není uvedeno jinak.

Jako modelový protein byl zvolen lidský rekombinantní protein p53 (Recombinant Human p53 protein ab43615) od společnosti Abcam (Velká Británie).

Buněčný lyzát linie lidského karcinomu prsu MCF-7 byl použit jako reálný vzorek a byl poskytnut laboratoří Masařík Lab z Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

Modelové protilátky byly též pořízeny od firmy Abcam (Velká Británie), a to myší monoklonální protilátka DO-1 (Anti-p53 antibody [DO-1] - ChIP Grade ab1101), která rozpoznává lidský protein p53 a kozí polyklonální protilátka proti kuřecímu imunoglobulinu IgY (Goat Anti-Chicken IgY H&L ab6872), která byla použita jako kontrola.

Dále byly použity protilátky sekundární, a to protilátka proti myšimu imunoglobulinu označená křenovou peroxidázou (Horse Anti-Mouse IgG Antibody (H+L), Peroxidase, PI-2000-1) od firmy Vector Laboratories' (USA) a fluorescenčně značená protilátka proti myšimu imunoglobulinu (Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) ab150113) od firmy Abcam (Velká Británie), která emituje zelenou fluorescenci.

Pro přípravu konjugátu mezi protilátkou a nanočásticemi byla použita komerčně dostupná sada GOLD Conjugation Kit (10 nm 200D) ab201808, Abcam (Velká Británie). Veškeré reagenty pro průběh reakce, viz Tabulka 2, byly součástí sady.

*Tabulka 2 Komponenty komerční sady GOLD Conjugation Kit (10 nm 200D) ab201808*

Název reagentu	Účel použití
Gold 10nm	Zlaté nanočástice velikosti 10 nm připravené k použití
Gold 10nm Antibody Diluent	Roztok pro zředění protilátky
Gold 10nm Reaction Buffer	Pufr pro reakci, která umožňuje vazbu protilátek na povrch zlatých nanočástic
Gold 10 nm Quencher	Roztok pro ukončení konjugační reakce

## 5.1 Složení roztoků

Název roztoku	Složení roztoku
PBS	1 tableta/200 ml (2,7mM KCl; 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 137mM NaCl)
2x Blotovací pufr (zásobní roztok)	150mM glycin; 25mM Tris; 10 % (v/v) MeOH (zásobní roztok)
Blotovací pufr	50 % (v/v) 2x Blotovací pufr, 40 % (v/v) H <sub>2</sub> O, 10 % (v/v) MeOH
Blokovací pufr	3% BSA v PBS
Protilátkový pufr	0,1% BSA v PBS
PBS-T (Promývací pufr)	PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
Separáční pufr	144 g/l glycin, 30 g/l Tris, 10 % (v/v) 10% SDS
Transferový pufr	144 g/l glycin, 30 g/l Tris

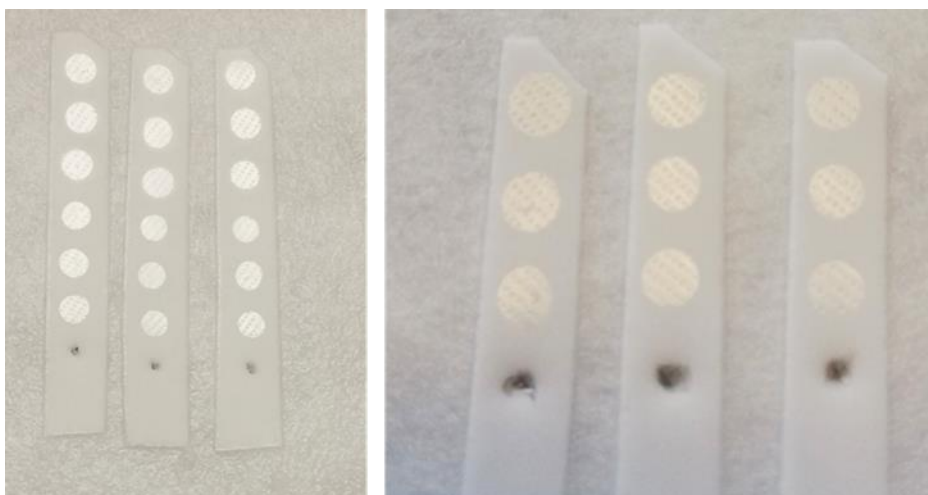
## 6 METODY

### 6.1 Navázání zlatých nanočástic na protilátku

Všechny součásti sady bylo nutné před použitím temperovat na laboratorní teplotu. Protilátka byla naředěna na koncentraci 0,25 mg/ml pomocí reagentu „Antibody Diluent“. 12 µl takto naředěné protilátky bylo smícháno s 42 µl reakčního pufru. Následně bylo 45 µl pufru s naředěnou protilátkou přidáno do lahvičky se zlatými nanočásticemi. Při tomto kroku bylo nutné roztok důkladně, ale opatrně propipetovat. Po 15 minutách bylo k roztoku s nanočásticemi přidáno 5 µl quencheru pro ukončení reakce. Tento roztok byl důkladně promíchán a po dalších 5 minutách bylo možné konjugát použít pro experiment. Mezi jednotlivými analýzami byly konjugáty uchovávány v lednici při 4 °C.

## 6.2 Metoda dot-blot

Do Petriho misky vyčištěné EtOH byly vloženy dvě vrstvy filtračního papíru. Filtrační papír byl navlhčen čerstvě připraveným blotovacím pufrům tak, aby v průběhu analýzy nevyschnul. PVDF membrána o šířce asi 0,4 cm a délce asi 4 cm s ustříženým jedním rohem byla aktivována namočením v methanolu na dobu 30 s. Následně byla 30 s promývána v blotovacím pufru a položena na filtrační papír do Petriho misky tak, aby ustřížený roh byl vpravo nahoře. Na membránu byly postupně od shora napipetovány vzorky o objemu 0,5  $\mu$ l od nejvyšší po nejnižší koncentraci. Vzorky byly na membráně nechány 20–30 minut vsáknout, viz Obrázek 10.



Obrázek 10: Aktivované PVDF membrány s naneseným vzorkem pro analýzu metodou dot-blot, vlastní fotografie

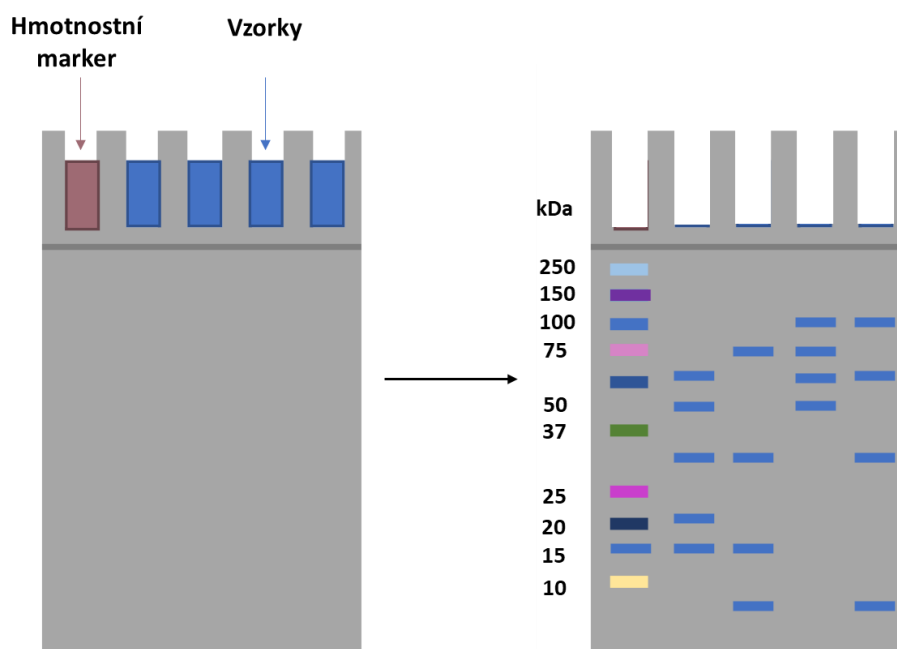
Poté byla membrána se vzorky blokována v blokovacím pufru 30 min. Blokování membrány probíhalo v 2ml Eppendorf zkumavce, kam byl přidán 1 ml blokovacího pufru a vložena membrána tak, aby se strana se vzorky nedotýkala stěn zkumavky. Zkumavka byla položena na kývačku tak, aby se blokovací pufr neustále přeléval přes membránu. Po zablokování byla membrána inkubována v protilátkovém pufru s naředěným konjugátem. Nakonec byly membrány promývány 3×5 min pomocí 1 ml PBS-T. Po promytí byla membrána položena na suchý čistý filtrační papír a nechána schnout. Uschlá membrána byla nalepena oboustrannou lepicí páskou na mikroskopické podložní sklíčko a připravena k analýze, viz Obrázek 11.



Obrázek 11: PVDF membrány po metodě dot-blot připravené pro analýzu pomocí LA-ICP-MS, vlastní fotografie

### 6.3 Metoda western-blot

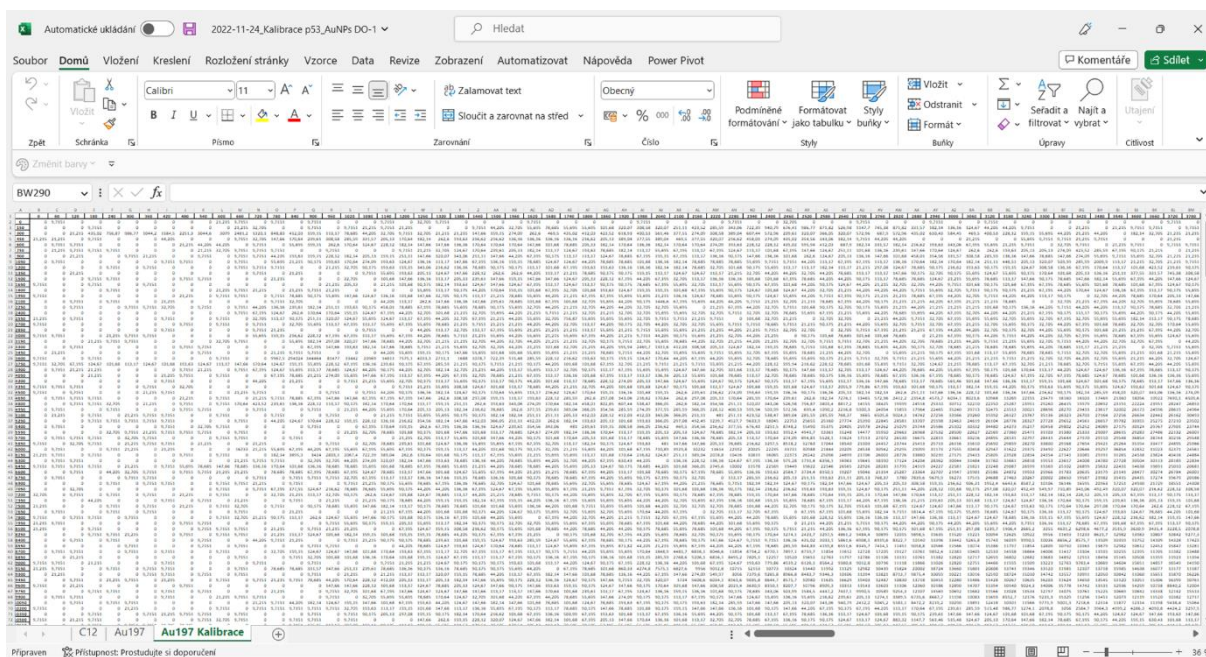
Pomocí Bio-Rad elektroforézy MiniPROTEAN Tetracell naplněné separačním pufrem byly separovány proteiny v 10% polyakrylamidovém gelu, jak znázorňuje Obrázek 12. Do každé jamky bylo naneseno 20  $\mu\text{g}$  vzorku. Elektroforetická separace probíhala 20 minut za konstantního napětí 80 V, dále pak za napětí 120 V 1 hodinu. Následně byl proveden transfer separovaných proteinů z gelu na blotovací membránu za působení konstantního napětí 100 V po dobu 60 minut v transferovém pufru. Blokování membrány, reakce se značenou primární protilátkou a promývání, byly provedeny identicky jako v případě metody dot-blot, viz výše. V případě luminiscenční a fluorescenční detekce byly membrány inkubovány v primární protilátce přes noc a následně po promytí byla na membrány nanesena protilátka sekundární. Po hodině inkubace proběhlo opět promytí membrán a membrány byly vizualizovány přístrojem Azure Imager c400 (Azure Biosystems, USA)



Obrázek 12: Schéma separace pomocí SDS-PAGE během metody western blot

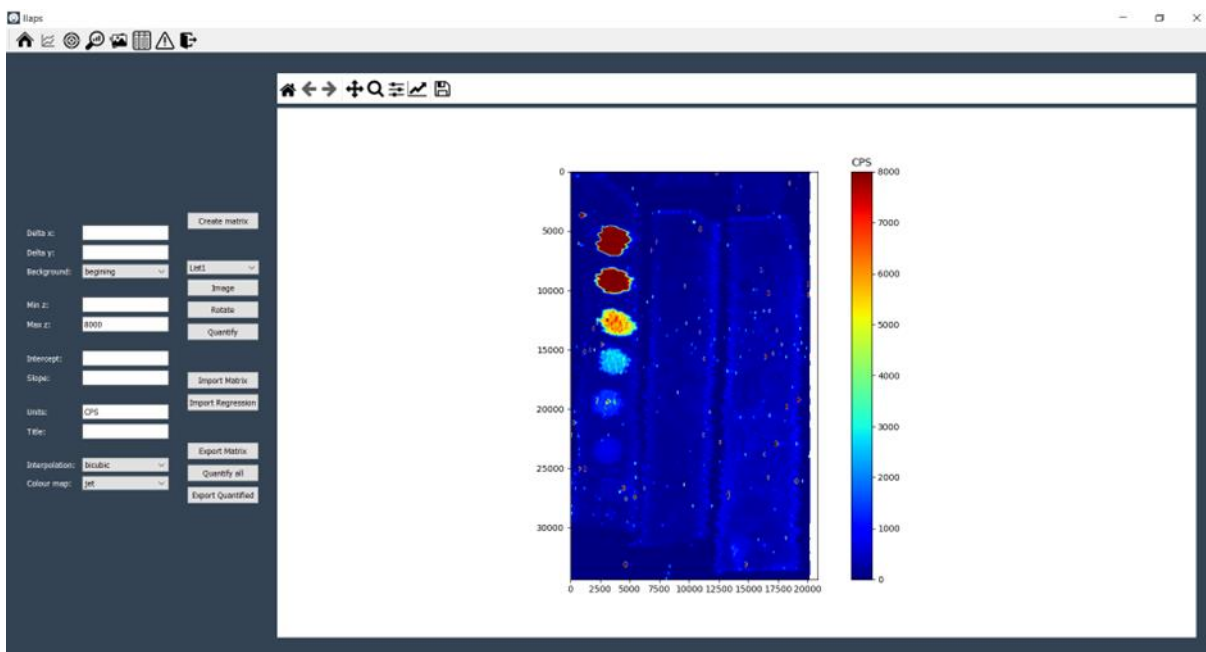
### 6.4 LA-ICP-MS

PVDF membrány přilepené na mikroskopovacím sklíčku oboustrannou lepící páskou byly laserovým ablačním systémem LSX213 (CETAC, USA) a kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) Agilent 7900 (Agilent Technologies, Japonsko) analyzovány na každém řádku vždy bod po bodu. Tento přístroj je vybaven kolizní celou pro potlačení polyatomických interferencí. Parametry analýzy byly zvoleny dle Vlčnovská et al. [47] s rozdílem, že byly měřeny pouze ionty Au. Intenzita signálu pro Au byla změřena pro každý laserem ablatovaný bod. Naměřené hodnoty byly následně převedeny do tabulky, kde každá buňka odpovídá jednomu bodu měření, jak ukazuje Obrázek 13.



Obrázek 13: Naměřené hodnoty zobrazené v programu Excel ve formě tabulky

Laboratorní navrhnutý program Ilaps následně hodnoty převede na 2D mapu, na které je rozpoznatelná jak intenzita signálu, tak i jeho prostorové uspořádání. Naměřeným hodnotám nebo určitým rozsahům hodnot byla vždy přiřazena příslušná barva od tmavě modré (pro nejnižší naměřené hodnoty) po tmavě červenou (pro nejvyšší naměřené hodnoty). Rozmezí minima a maxima může být voleno dle potřeby. Pak se signály vykreslují různě a může se regulovat kontrast mezi naměřeným signálem a pozadím. Barevně kódovanou mapu v programu Ilaps znázorňuje Obrázek 14.



Obrázek 14: Barevně kódovaná 2D mapa generovaná programem Ilaps, vlastní



## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

LA-ICP-MS nachází čím dál více oblibu v analýze biologických vzorků. Díky možnosti vázat na protilátky značky, které obsahují vzácné prvky, je tato metoda schopná analyzovat nejen přirozenou, či patologickou distribuci prvků ve vzorku, ale také proteiny skrze vhodně označené protilátky [51].

Cílem práce bylo vytvořit konjugát 10nm zlatých nanočástic s protilátkou proti vybranému modelovému proteinu, ověřit schopnost konjugátu vybraný protein vázat a stanovit jej v reálném biologickém vzorku pomocí imunochemické metody s následnou detekcí pomocí LA-ICP-MS. Jako vybraný modelový protein byl použit protein p53 a jemu příslušná protilátka DO-1, obojí od firmy Abcam.

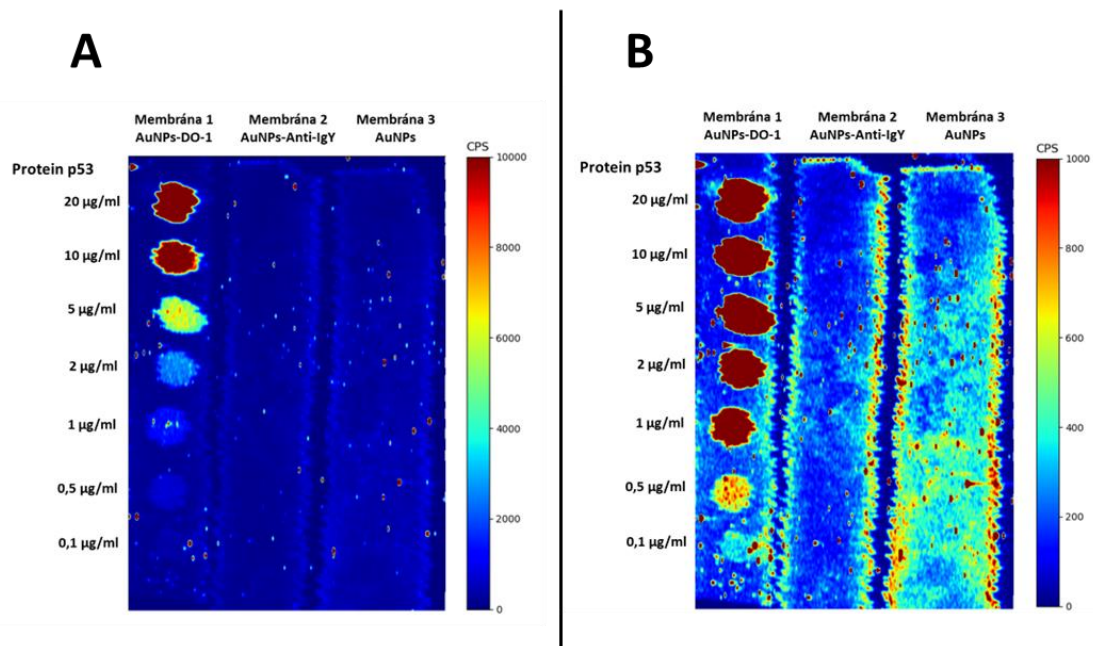
Protein p53 je multifunkční [52] jaderný protein [53] objevený roku 1979 [54]. Tento protein reguluje procesy nezbytné pro správné fungování buněk [55]. Geny proteinu p53 jsou jedny z tumor supresorových genů [56]. To znamená, že má protein preventivní účinky před rozvojem nádorů [54], protože brání růstu a metastázování buněk. [57]. Jestliže buňka podléhá stresovým faktorům, protein p53 se více tvoří, v buňce se dostává i do mitochondrií. Dokáže regulovat opravu DNA, při vážném poškození buňky indukuje řízenou buněčnou smrt [55]. Pokud však dojde k poškození proteinu p53, např. mutací, tak nádorovou supresorovou funkci ztrácí [57]. V případě více než poloviny lidských nádorových onemocnění je protein p53 zmutován. Takové mutace mohou být i dědičné [54]. Další funkcí proteinu p53 je regulace stárnutí buňky a regulace vstupu buňky do dalších buněčných fází [55]. Cílem této práce nebylo studium proteinu p53 jako takového. Sloužil pouze jako modelový antigen, jak již bylo zmíněno výše.

Jako reálný biologický vzorek byly použity buňky lidského karcinomu prsu MCF-7, které se dle výrobce protilátky DO-1 mohou používat jako pozitivní kontrola pro protein p53. Po vystavení buněk cytostatickému léčivu např. cisplatině dochází ke zvýšené produkci proteinu p53 [58].

### 7.1 Příprava konjugátu a ověření jeho schopnosti vázat antigen

Navázání protilátky DO-1 na zlaté 10nm nanočástice bylo provedeno přesně podle pokynů výrobce, viz kapitola Navázání zlatých nanočástic na protilátku 6.1. U připraveného konjugátu AuNPs-DO-1 bylo nejprve nutné otestovat, zda navázaná protilátka neztratila během reakce schopnost vázat antigen. K tomu byla použita metoda dot-blot.

Kalibrační řada komerčně zakoupeného proteinu p53 o koncentracích 0,20–20,00 µg/ml byla nanesena na 3 identické blotovací membrány. První z nich byla inkubována v konjugátu AuNPs-DO-1. Druhá membrána byla inkubována v konjugátu AuNPs-Anti-IgY, kde byla na AuNPs navázána protilátka proti kuřecímu imunoglobulinu IgY. Tento konjugát byl použit jako negativní kontrola, protože se imunoglobulin IgY ve vzorku nevyskytuje. V obou případech použitá koncentrace protilátky odpovídala 6,5 ng/ml. Třetí membrána byla inkubována pouze v přítomnosti samotných nanočástic, abychom zjistili míru nespecifické vazby samotných nanočástic na vzorek.



Obrázek 15: Dot blot kalibrační řady standardu p53 zobrazený ve dvou různých škálách intenzit, vlastní

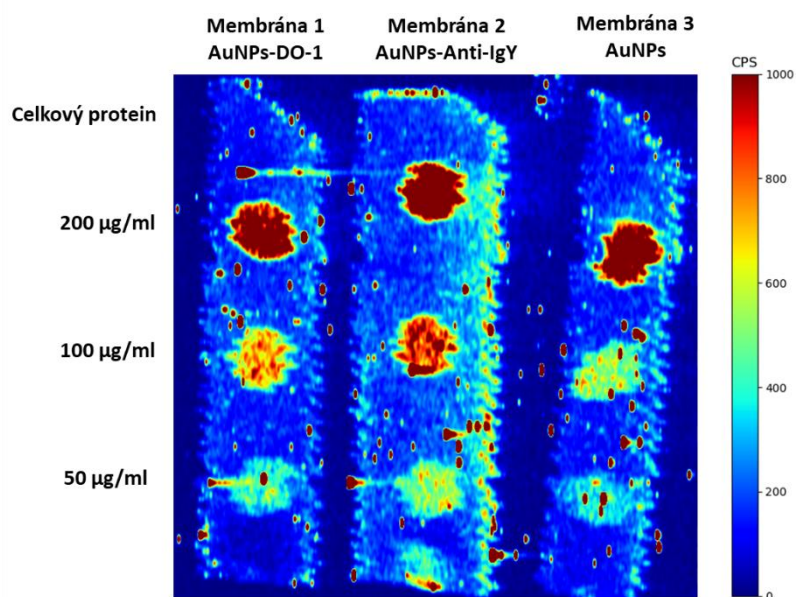
Obrázek 15A ukazuje, že k naměření zvýšeného signálu zlata v místě aplikace vzorků na membránu došlo pouze u membrány 1. Z toho vyplývá, že se na standard proteinu p53 vázal pouze konjugát AuNPs-DO-1, což potvrzuje, že protilátka neztratila během konjugace schopnost vázat antigen. U negativních kontrol nedošlo k naměření tohoto zvýšeného signálu. Abychom dokázali, že tedy nedochází k nespecifické sorpci jiných konjugátů a samotných AuNPs na vzorek standardu, prezentujeme výsledek ve dvou škálách intenzit, které se od sebe liší o jeden číselný řád, viz Obrázek 15B.

## 7.2 Detekce proteinu p53 v lyzátu buněk MCF-7 metodou dot-blot

Jako komplexní biologický vzorek byl zvolen lyzát buněk MCF-7. Vzorek byl poskytnutý laboratoří Masařík Lab Lékařské Fakulty Masarykovy univerzity a aby se co nejvíce zabránilo jeho degradaci, byl až do chvíle použití uchováván při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Celková koncentrace proteinů v lyzátu byla  $0,8\text{ mg/ml}$ .

Lyzát byl naředěn lyzačním pufrem (Pierce® RIPA od firmy Thermo Fisher Scientific, USA) na koncentrace  $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ ,  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  a  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Na tři membrány bylo aplikováno vždy  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  vzorku od každého ředění a membrány byly inkubovány v konjugátech a nanočásticích stejně jako v případě vzorků standardu.

Naměřená data z tohoto experimentu zobrazuje Obrázek 16. Detekce proteinu p53 v reálném vzorku nebyla pomocí konjugátu AuNPs-DO-1 úspěšná. Nespecifické sorpce konjugátu AuNPs-Anti-IgY a samotných AuNPs byly natolik vysoké, že nebylo možné na první pohled určit, na kterou membránu byl aplikován konjugát rozpoznávající pouze protein p53.



Obrázek 16: Dot-blot reálného vzorku lyzátu buněk MCF-7, vlastní

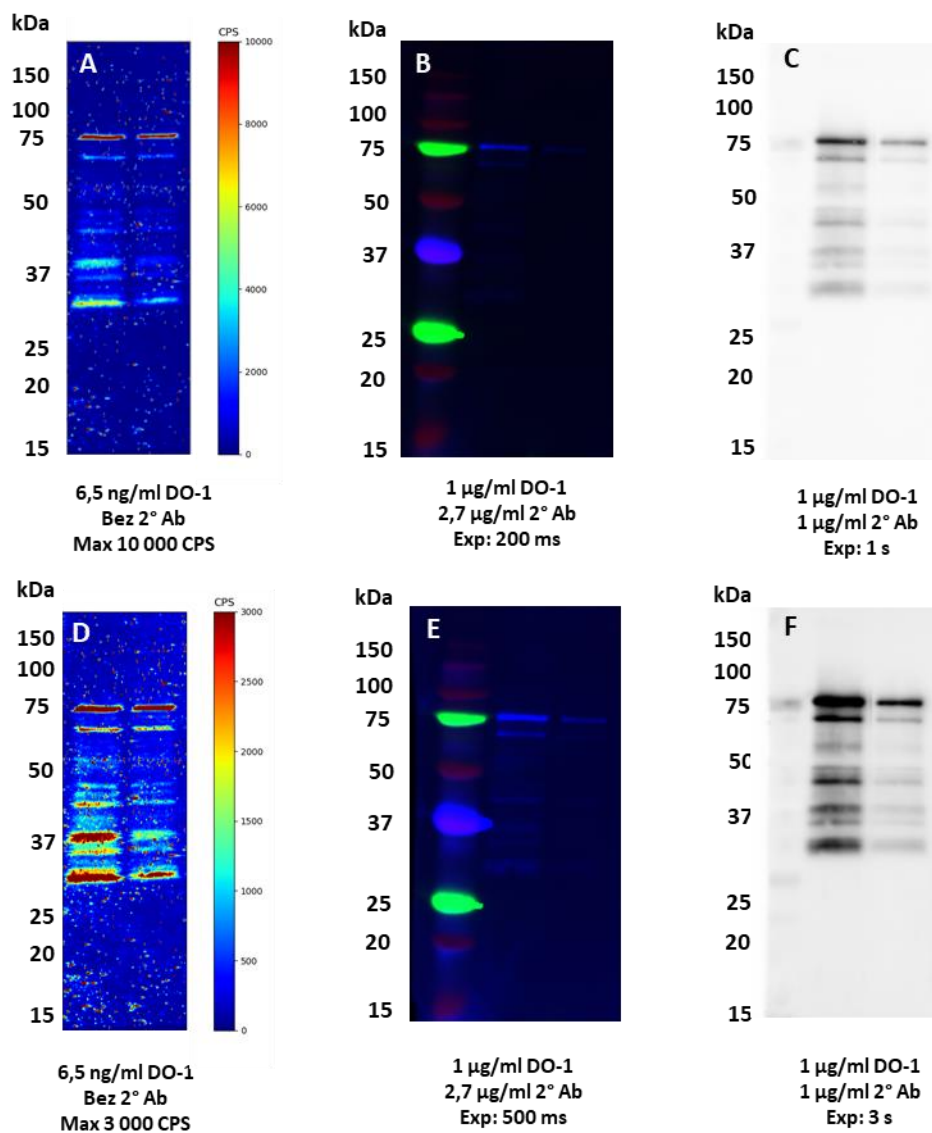
To může být způsobeno velkou složitostí vzorku. Ve vzorku se mohou nacházet nejenom proteiny, ale i nukleové kyseliny, sacharidy, či lipidy, které mohou nespecificky interagovat s použitými nanočásticemi a vytvářet tak falešně negativní signál, který by mohl být špatně interpretován.

### 7.3 Detekce standardu proteinu p53 metodou western blot

Protože se nepovedlo úspěšně identifikovat protein p53 v buněčném lyzátu metodou dot-blot, bylo přistoupeno ke složitější imunochemické metodě western blot. Vzorky standardu i lyzátů byly vždy nejprve redukovány a denaturovány a následně separovány v gelu pomocí SDS-PAGE. Vzorky rozseparované dle velikosti byly poté přeneseny na blotovací membránu a membrány byly dále blokovány a inkubovány s protilátkami jako v případě dot-blotu.

Nejprve byl proveden western blot dvou různých koncentrací standardu proteinu p53 (5 µg/ml a 1 µg/ml), aby se ověřilo, zda je možné použít identické podmínky, jako u metody dot-blot, nebo je třeba metodu optimalizovat. Jak zobrazuje Obrázek 17A a D, pomocí LA-ICP-MS byly za daných podmínek úspěšně detekovány signály, obrázky se liší zobrazenými škálami intenzit. Oproti předpokladu však nebyly detekovány signály pouze kolem velikosti 79 kDa, jak uvádí výrobce proteinu (rekombinantní protein p53 obsahuje i tzv. GST Tag a je tudíž větší než přirozeně se vyskytující protein), ale byly detekovány signály i v proteinech o nižší velikosti. Je možné, že výrobcem dodávaný protein částečně degradoval a byly detekovány jeho menší fragmenty, případně že byl vzorek nedostatečně přečištěn a obsahoval i jiné proteiny a byly detekovány nespecifické interakce.

Aby bylo ověřeno, že se nejedná o nespecifické interakce konjugátu AuNPs-DO-1 způsobené přítomností nanočástic, byl western blot proveden také rutinním způsobem za použití primární protilátky DO-1 a sekundární protilátky. V jednom případě se jednalo o fluorescenční sekundární protilátku a detekce byla založena na snímání fluorescence, ve druhém případě se jednalo o protilátku značenou enzymem křenové peroxidázy a detekována byla luminiscence.



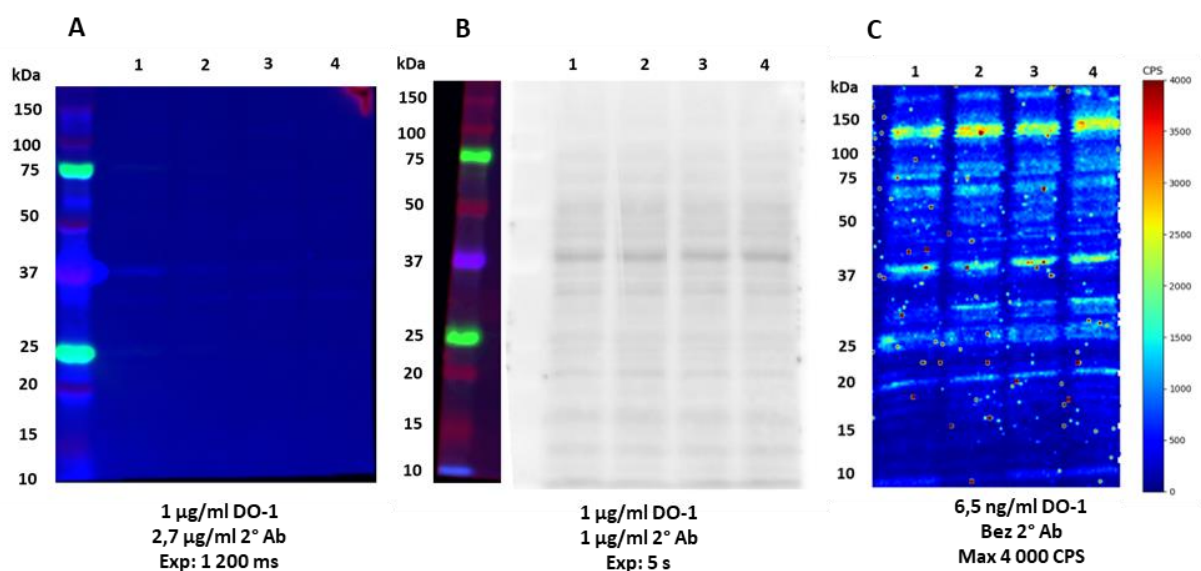
Obrázek 17: Western blot standardu p53 (5 µg/ml a 1 µg/ml) analyzován různými detekčními metodami; A), D) LA-ICP-MS ve dvou škálách intenzit, B), E) Fluorescence s různým expozičním časem, C), F) Luminiscence s různým expozičním časem.

Obrázek 17B a E zobrazuje výsledky získané měřením fluorescence, které se liší expozičním časem. Jak z naměřených dat vyplývá, fluorescenční detekce byla nejméně citlivá, i když bylo použito cca 150× větší množství primární protilátky oproti LA-ICP-MS. S přehledem byl detekován pouze standard o vyšší koncentraci, u nižší koncentrace byl detekován pouze nejsilnější ze signálů.

Obrázek 17C a F ukazuje výsledky úspěšné luminiscenční detekce snímané opět po různou dobu expozice. U všech detekčních metod však byly pozorovány vícenásobné signály. Je tedy pravděpodobné, že protein p53 byl částečně degradován a v rámci analýz detekujeme jeho menší fragmenty. Z výsledků také vyplývá, že díky metodě LA-ICP-MS dochází k výrazné úspoře protilátky oproti standardním metodám, což může být výhodou např. při využívání na zakázku vyráběných protilátek, které jsou obvykle velmi drahé.

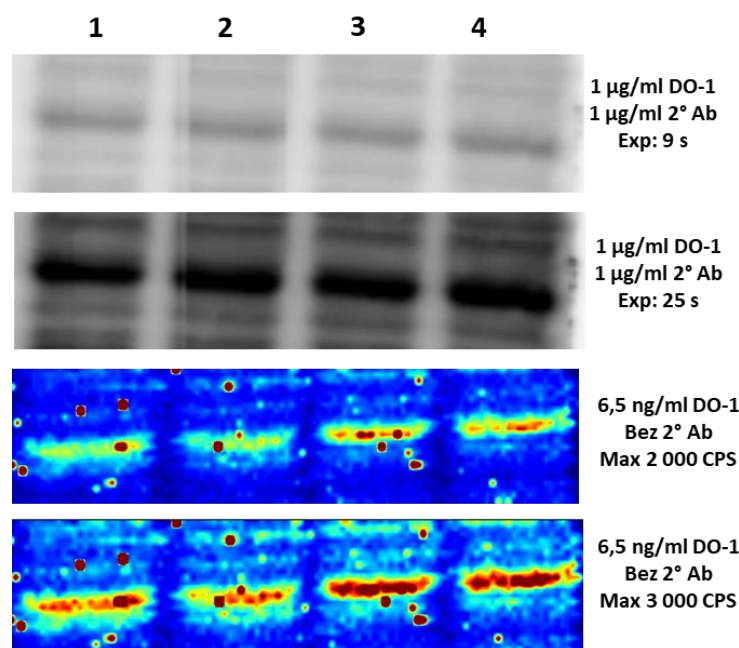
#### 7.4 Detekce proteinu p53 v lyzátu buněk MCF-7 metodou western blot

Dalším krokem byl pokus o detekci proteinu p53 v reálném vzorku lyzátu buněk MCF-7. Byl analyzován lyzát buněk MCF-7 (jamka 1) a tři lyzáty stejných buněk vystavených různým koncentracím cytostatického léčiva cisplatině (250 nM, 500 nM, 1000 nM – jamky 2, 3 a 4). V literatuře již bylo popsáno, že přítomnost tohoto léčiva zvyšuje tvorbu proteinu p53 [58]. Do každé jamky bylo nanášeno 20  $\mu\text{g}$  proteinu a membrány byly opět analyzovány třemi různými detekčními technikami.



Obrázek 18: Western blot reálného vzorku buněk MCF-7 detekovaný A) Fluorescencně, B) Luminiscenčně, C) LA-ICP-MS, vlastní

Stejně jako v případě analýzy standardu p53 nejnižší signál vykazovala fluorescenční detekce, jak ukazuje Obrázek 18A. U luminiscenční detekce, Obrázek 18B, byl detekován ve všech vzorcích zvýšený signál něco málo nad velikostí 37 kDa. Stejné signály byly naměřeny také pomocí LA-ICP-MS, u které byly ale navíc detekovány bandy mezi 100 a 150 kDa. Bude potřeba ověřit, zda signály odpovídající vyšším strukturám patří proteinu p53 navázanému na nějaký jiný protein či se jedná o nespecifické interakce použitého konjugátu. U obou metod byla zároveň detekována vysoká míra signálů na pozadí, což odpovídá pravděpodobně nespecifickým interakcím protilátky se vzorkem. Z toho důvodu bude potřeba metodu dále optimalizovat, aby mohlo být dosaženo více prokazatelných výsledků.



Obrázek 19: Přibližné pozitivní signály mezi 37 a 50 kDa zobrazené vždy ve dvou různých intenzitách, vlastní

Obrázek 19 zobrazuje signály naměřené mezi 37 a 50 kDa ve dvou zobrazeních, které se od sebe liší intenzitou signálu. Budeme-li předpokládat, že se jedná o jednu z variant proteinu p53, u luminiscenční detekce není patrné, že by se množství proteinu v buněčném lyzátu lišilo na základě předešlého vystavení buněk cisplatině. U zobrazení pomocí LA-ICP-MS naopak můžeme pozorovat mírné zvýšení signálu především u druhé a třetí koncentrace cisplatin. Oproti předpokladu nebyly rozdíly v lyzátech nijak velké, což ale může být způsobeno použitými nízkými koncentracemi cisplatiny či velmi malou koncentrací použité protilátky. Do budoucna bude třeba experiment zopakovat s lyzáty buněk, které budou vystaveny většímu rozmezí koncentrací cisplatin, aby bylo ověřeno, zda by tato metoda mohla být vhodná nejen pro vizuální zobrazování dat, ale také pro jejich číselné vyhodnocování. To by mohlo umožnit následné statistické zpracování a případnou kvantitativní nebo semikvantitativní analýzu.

## 8 ZÁVĚR

Bylo experimentálně ověřeno, že využití protilátek značených nanočásticemi může najít uplatnění v imunochemických metodách s detekcí pomocí LA-ICP-MS. Z naměřených výsledků vyplývá, že protilátka po vazbě na nanočástice neztrácí schopnost vázat antigen, což bylo prokázáno metodou dot-blot za použití standardu proteinu p53. Tato metoda však nebyla úspěšná pro identifikaci proteinu p53 v reálném vzorku, lyzátu buněk MCF-7.

Z experimentů založených na metodě western blot vyplývá, že metoda je vhodná pro analýzu blotovacích membrán, nicméně bude potřeba najít optimální podmínky pro její provedení. Membrány detekované LA-ICP-MS vykazovaly vysoké pozadí a signály naměřené u vyšších proteinových struktur. Vzhledem k tomu, že vysoké pozadí měla i detekce luminiscenční, která je standardně používanou metodou, je pravděpodobné, že problém nebude způsobený používáním konjugátu nanočástice-protilátka, ale může být způsobený samotnou protilátkou.

Při nalezení správných podmínek pro imunoanalýzu s LA-ICP-MS detekcí by bylo možné v budoucnu využívat výhody hmotnostní analýzy, jako je snížení limitů detekce, oproti rutinně používaným metodám, případně možnost používat několikanásobně menší množství protilátky, než je v současnosti běžné. Navíc díky tomu, že metoda měří signál ve formě exaktních čísel, je možné s výsledky dále pracovat a podrobovat je nejrůznějším statistickým analýzám. Z toho důvodu by metoda mohla mít potenciál pro semikvantitativní a kvantitativní analýzy.

Další výhodou by mohlo být, že LA-ICP-MS je schopná měřit nejen zlato v AuNPs, ale také jiné nejen vzácné, ale i přirozeně se vyskytující prvky. To by mohlo umožnit analýzu většího množství antigenů v rámci jedné analýzy, pokud by různé protilátky byly označené odlišnými nanočásticemi obsahujícími např. zlato, stříbro, platinu či ostatní vzácné prvky, jako jsou třeba lanthanoidy. V případě aplikace této metody na detekci antigenů ve vzorcích, jako jsou celé buňky a tkáně, by metoda umožnila navíc analyzovat zároveň přirozenou i patologickou distribuci prvků. To může být zajímavé např. pro studium nádorového mikroprostředí.

## 9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *NANOTECHNOLOGIES: Principles, Applications, Implications and Hands-on Activities*. European Union. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2012. ISBN 978-92-79-21437-0.
- [2] *INTRODUCTION TO NANOMATERIALS*. In: ALAGARASI, A. 2011.
- [3] HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8.
- [4] BAYDA, Samer, Muhammad ADEEL, Tiziano TUCCINARDI, Marco CORDANI a Flavio RIZZOLIO. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* [online]. 2020, **25**(1) [cit. 2022-09-14]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25010112
- [5] AZUBEL, Maia, Jaakko KOIVISTO, Sami MALOLA et al. Electron microscopy of gold nanoparticles at atomic resolution. *Science* [online]. 2014, **345**(6199), 909-912 [cit. 2023-01-24]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1251959
- [6] *Cytodiagnosics: Gold Nanoparticle Properties* [online]. Burlington, ON L7L 4X8, 2023 [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <https://www.cytodiagnosics.com/pages/gold-nanoparticle-properties#>
- [7] *Cytodiagnosics: Gold Nanoparticles* [online]. Burlington, ON L7L 4X8, 2023 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.cytodiagnosics.com/pages/gold-nanoparticles>
- [8] BARBER, D. J. a I. C. FREESTONE. AN INVESTIGATION OF THE ORIGIN OF THE COLOUR OF THE LYCURGUS CUP BY ANALYTICAL TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY. *Archaeometry* [online]. 1990, **32**(1), 33-45 [cit. 2022-12-30]. ISSN 0003-813X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x
- [9] KANO, Shinya, Tsukasa TADA a Yutaka MAJIMA. Nanoparticle characterization based on STM and STS. *Chemical Society Reviews* [online]. 2015, **44**(4), 970-987 [cit. 2022-10-16]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C4CS00204K
- [10] DROZDOV, Andrey, Maxim ANDREEV, Maxim KOZLOV, Dmitriy PETUKHOV, Sergey KLIMONSKY a Claudio PETTINARI. Lycurgus cup: the nature of dichroism in a replica glass having similar composition. *Journal of Cultural Heritage* [online]. 2021, **51**, 71-78 [cit. 2022-12-30]. ISSN 12962074. Dostupné z: doi:10.1016/j.culher.2021.07.002



- [11] This 1,600-Year-Old Goblet Shows that the Romans Were Nanotechnology Pioneers. In: *Smithsonian magazine* [online]. Zeeya Merali, 2013 [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <https://www.smithsonianmag.com/history/this-1600-year-old-goblet-shows-that-the-romans-were-nanotechnology-pioneers-787224/>
- [12] SÁNCHEZ DEL RÍO, Manuel, Michel PICQUART, Emmanuel HAROPONIATOWSKI, Elsa VAN ELSLANDE a Victor HUGO UC. On the Raman spectrum of Maya blue. *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2006, **37**(10), 1046-1053 [cit. 2023-01-04]. ISSN 0377-0486. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.1607
- [13] BARHOUM, Ahmed, María Luisa GARCÍA-BETANCOURT, Jaison JEEVANANDAM et al. Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. *Nanomaterials* [online]. 2022, **12**(2) [cit. 2023-02-13]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano12020177
- [14] NASROLLAHZADEH, Mahmoud, S. Mohammad SAJADI, Mohaddeseh SAJJADI a Zahra ISSAABADI. An Introduction to Nanotechnology. In: *An Introduction to Green Nanotechnology* [online]. Elsevier, 2019, s. 1-27 [cit. 2023-01-11]. Interface Science and Technology. ISBN 9780128135860. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8
- [15] CHAN, Hak-Kim a Philip Chi Lip KWOK. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2011, **63**(6), 406-416 [cit. 2023-02-13]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2011.03.011
- [16] FARZIN, Ali, Seyed Alireza ETESAMI, Jacob QUINT, Adnan MEMIC a Ali TAMAYOL. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2020, **9**(9) [cit. 2023-01-04]. ISSN 2192-2640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201901058
- [17] *Sigma-Aldrich: Gold* [online]. Darmstadt, 2023 [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/636347>
- [18] JIANG, Ying, Hong ZHAO, Yuqing LIN, Ningning ZHU, Yurong MA a Lanqun MAO. Colorimetric Detection of Glucose in Rat Brain Using Gold Nanoparticles. *Angewandte Chemie* [online]. 2010, **122**(28), 4910-4914 [cit. 2023-02-13]. ISSN 00448249. Dostupné z: doi:10.1002/ange.201001057
- [19] ZHANG, Guomei. Functional gold nanoparticles for sensing applications. *Nanotechnology Reviews* [online]. 2013, **2**(3), 269-288 [cit. 2023-02-13]. ISSN 2191-9097. Dostupné z: doi:10.1515/ntrev-2012-0088

- [20] SZTANDERA, Krzysztof, Michał GORZKIEWICZ a Barbara KLAJNERT-MACULEWICZ. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2019, **16**(1), 1-23 [cit. 2023-02-13]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810
- [21] ESTRELA, Pedro, Katarzyna M. KOCZULA a Andrea GALLOTTA. Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry* [online]. 2016, **60**(1), 111-120 [cit. 2023-02-15]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20150012
- [22] ARDEKANI, Leila Safaee a Peter Waaben THULSTRUP. Gold Nanoparticle-Mediated Lateral Flow Assays for Detection of Host Antibodies and COVID-19 Proteins. *Nanomaterials* [online]. 2022, **12**(9) [cit. 2023-02-15]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano12091456
- [23] OLANIYAN, Mathew Folaranmi. *BASIC IMMUNOCHEMISTRY: Chemical pathology/Immunochemistry of Infectious diseases* [online]. Owo [cit. 2023-01-24].
- [24] RIAZ, Muhammad, Fatima YOUSAF, Muhammad AKRAM et al. Immunology and immunochemistry. In: *Analytical Techniques in Biosciences* [online]. Elsevier, 2022, s. 251-268 [cit. 2023-01-24]. ISBN 9780128226544. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822654-4.00014-2
- [25] BISHOP, Michael L., Edward P. FODY a Larry E. SCHOEFF. *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations*. 7th ed. 2013. ISBN 978-1-4511-1869-8.
- [26] LYDYARD, P., A. WHELAN a M.W. FANGER. *Immunology* [online]. 2nd. 2004 [cit. 2023-01-08]. ISBN 0-203-48828-8.
- [27] DOLEŽALOVÁ, Věra. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. Vyd. 4., přeprac. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-198-5.
- [28] KAPINGIDZA, A. Brenda, Krzysztof KOWAL a Maksymilian CHRUSZCZ. Antigen–Antibody Complexes. In: HOEGGER, Ulrich a J. Robin HARRIS, ed. *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 465-497 [cit. 2023-01-12]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-030-41768-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-41769-7\_19
- [29] MOSER, Muriel a Oberdan LEO. Key concepts in immunology. *Vaccine* [online]. 2010, **28**, 2-13 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.022

- [30] DAVIES, David R. a Eduardo A. PADLAN. *ANTIBODY-ANTIGEN COMPLEXES*.
- [31] *Britannica: antibody* [online]. 2022 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/antibody>
- [32] HAGE, David S. Immunoassays. In: *Analytical chemistry*. 1999, s. 294-304.
- [33] NOVÁK, František. *Úvod do klinické biochemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0366-7.
- [34] DEBNATH, Mousumi, Godavarthi B.K.S. PRASAD a Prakash S. BISEN. Immunoassay. In: DEBNATH, Mousumi, Godavarthi B.K.S. PRASAD a Prakash S. BISEN. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, s. 171-180 [cit. 2023-01-15]. ISBN 978-90-481-3260-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-3261-4\_11
- [35] SHAH, Karishma a Panagiotis MAGHSOUDLOU. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine* [online]. 2016, **77**(7), 98-101 [cit. 2023-02-13]. ISSN 1750-8460. Dostupné z: doi:10.12968/hmed.2016.77.7.C98
- [36] G. ANDRYUKOV, Boris. Six decades of lateral flow immunoassay: from determining metabolic markers to diagnosing COVID-19. *AIMS Microbiology* [online]. 2020, **6**(3), 280-304 [cit. 2023-02-06]. ISSN 2471-1888. Dostupné z: doi:10.3934/microbiol.2020018
- [37] SURTI, Parini V., Min Woo KIM, Le Minh Tu PHAN, Suresh Kumar KAILASA, Arvind Kumar MUNGRAY, Jong Pil PARK a Tae Jung PARK. Progress on dot-blot assay as a promising analytical tool: Detection from molecules to cells. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2022, **157** [cit. 2022-12-11]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116736
- [38] HNASKO, Thomas S. a Robert M. HNASKO. The Western Blot. In: HNASKO, Robert, ed. *ELISA* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 87-96 [cit. 2023-02-13]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2741-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2742-5\_9
- [39] STOTT, D.I. Immunoblotting and dot blotting. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1989, **119**(2), 153-187 [cit. 2022-12-07]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(89)90394-3
- [40] BISHOP, Michael L., Edward P. FODY a Larry E. SCHOEFF, ed. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2010. ISBN 978-1-4511-0900-9.

- [41] O'SULLIVAN, M. J., J. W. BRIDGES a V. MARKS. Enzyme Immunoassay: A Review. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* [online]. 1979, **16**(1-6), 221-239 [cit. 2022-12-11]. ISSN 0004-5632. Dostupné z: doi:10.1177/000456327901600162
- [42] E, Aikawa. Immunohistochemistry. In: A, Aikawa. *Immunohistochemistry*. Harvard Medical School, Boston, MA, USA, 2011. ISBN 978-0-08-055294-1.
- [43] *Labmark: Fluorometer, luminometer and spectrophotometer CLARIOstarPlus* [online]. Pod Cihelnou 23 161 00 Praha 6-Ruzyně, 2023 [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: <https://www.labmark.eu/fluorometer-luminometer-and-spectrophotometer-clariostarplus>
- [44] GAO, Zhuangqiang, Li HOU, Mingdi XU a Dianping TANG. Enhanced Colorimetric Immunoassay Accompanying with Enzyme Cascade Amplification Strategy for Ultrasensitive Detection of Low-Abundance Protein. *Scientific Reports* [online]. 2014, **4**(1) [cit. 2023-02-14]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep03966
- [45] ARNDT-JOVIN, Donna J. a Thomas M. JOVIN. Chapter 16 Fluorescence Labeling and Microscopy of DNA. In: *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture Part B. Quantitative Fluorescence Microscopy—Imaging and Spectroscopy* [online]. Elsevier, 1989, s. 417-448 [cit. 2023-02-14]. Methods in Cell Biology. ISBN 9780125641302. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(08)60989-9
- [46] OMIDFAR, Kobra, Fahimeh KHORSAND a Maedeh DARZIANI AZIZI. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2013, **43**, 336-347 [cit. 2023-02-13]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2012.12.045
- [47] VLCNOVSKA, Marcela, Aneta STOSSOVA, Michaela KUCHYNKA et al. Comparison of Metal Nanoparticles (Au, Ag, Eu, Cd) Used for Immunoanalysis Using LA-ICP-MS Detection. *Molecules* [online]. 2021, **26**(3) [cit. 2022-12-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26030630
- [48] LIU, YongSheng, ZhaoChu HU, Ming LI a Shan GAO. Applications of LA-ICP-MS in the elemental analyses of geological samples. *Chinese Science Bulletin* [online]. 2013, **58**(32), 3863-3878 [cit. 2022-12-11]. ISSN 1001-6538. Dostupné z: doi:10.1007/s11434-013-5901-4
- [49] MOKGALAKA, N. S. a J. L. GARDEA-TORRESDEY. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Principles and Applications. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2006, **41**(2), 131-150 [cit. 2023-01-08]. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704920500510703

- [50] VAN ELTEREN, Johannes T., Vid S. ŠELIH a Martin ŠALA. Insights into the selection of 2D LA-ICP-MS (multi)elemental mapping conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2019, **34**(9), 1919-1931 [cit. 2023-02-13]. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C9JA00166B
- [51] GIESEN, Charlotte, Thomas MAIRINGER, Lina KHOURY, Larissa WAENTIG, Norbert JAKUBOWSKI a Ulrich PANNE. Multiplexed Immunohistochemical Detection of Tumor Markers in Breast Cancer Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(21), 8177-8183 [cit. 2023-02-15]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac2016823
- [52] JIANG, Ming, Tracy AXE, Robert HOLGATE, Carlos P RUBBI, Andrei L OKOROKOV, Trevor MEE a Jo MILNER. P53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene* [online]. 2001, **20**(39), 5449-5458 [cit. 2022-12-04]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1204705
- [53] NAKASHIMA, T., X.-F. WANG, M. MASUDA, A. INOKUCHI a S. KOMIYAMA. Overexpression of p53 nuclear protein in premalignant and malignant laryngeal lesions. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [online]. 1999, **256**(1), 56-59 [cit. 2022-12-04]. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/PL00014155
- [54] BRADY, Colleen A. a Laura D. ATTARDI. P53 at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. 2010, **123**(15), 2527-2532 [cit. 2022-12-04]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.064501
- [55] WAWRYK-GAWDA, Ewelina, Patrycja CHYLIŃSKA-WRZOS, Marta LIS-SOCHOCKA, Katarzyna CHIAPEK, Kamila BULAK, Marian JęDRYCH a Barbara JODŁOWSKA-JęDRYCH. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma* [online]. 2014, **251**(3), 525-533 [cit. 2022-12-04]. ISSN 0033-183X. Dostupné z: doi:10.1007/s00709-013-0548-1
- [56] LUNG, For-Wey, Bih-Ching SHU, Wei-Tsung KAO, C Nathan CHEN, Yu-Chi KU a Dong-Sheng TZENG. Association of DRD4 uVNTR and TP53 codon 72 polymorphisms with schizophrenia: a case-control study. *BMC Medical Genetics* [online]. 2009, **10**(1) [cit. 2022-12-04]. ISSN 1471-2350. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2350-10-147
- [57] HARRIS, Curtis C. a Monica HOLLSTEIN. Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. *New England Journal of Medicine* [online]. 1993, **329**(18), 1318-1327 [cit. 2022-12-03]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199310283291807
- [58] FATTAH, Abolfazl, Ali MOROVATI, Zahra NIKNAM et al. The Synergistic Combination of Cisplatin and Piperine Induces Apoptosis in MCF-7 Cell Line. *Iranian*

*Journal of Public Health* [online]. 2021 [cit. 2023-02-15]. ISSN 2251-6093. Dostupné z:  
doi:10.18502/ijph.v50i5.6121

## 10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Příklady struktur v nano-, mikro- a makroměřítku podle [1] .....	8
Obrázek 2 Schéma zlaté nanočástice, která je jako nanomateriál složena pouze z atomů, na obrázku konkrétně nanočástice s 64 atomy, převzato z [5].....	8
Obrázek 3 Zlaté nanočástice různých tvarů; A) Koloidní nanočástice - 100nm, B) Nanoježci - 100 nm, C) Nanorods - 25 nm, upraveno z [6] .....	9
Obrázek 4 Barva zlatých nanočástic podle jejich velikosti; A) AuNPs 10nm, B) AuNPs 100nm; upraveno z [6].....	10
Obrázek 5 Římský pohár ze sodnovápenatého skla obsahující nanočástice zlata a stříbra; převzato z [11].....	11
Obrázek 6 Pozitivní antigenní test na Covid-19, vlastní fotografie .....	12
Obrázek 7 Schéma interakce protilátky s antigenem podle [29].....	13
Obrázek 8 Struktura protilátky převzato a upraveno z [26] .....	14
Obrázek 9 Schéma detekce antigenu protilátkou; A) přímo – značenou primární protilátkou, B) nepřímo – značenou sekundární protilátkou rozpoznávající protilátku primární; podle [38]..	15
Obrázek 10 Aktivované PVDF membrány s naneseným vzorkem pro analýzu metodou dot-blot .....	21
Obrázek 11 PVDF membrány po metodě dot-blot připravené pro analýzu pomocí LA-ICP-MS .....	21
Obrázek 12 Schéma metody western blot .....	22
Obrázek 13 Naměření hodnoty zobrazené v programu Excel ve formě tabulky .....	23
Obrázek 14 Barevně kódovaná 2D mapa generovaná programem Ilaps .....	23
Obrázek 15 Dot blot kalibrační řady standardu p53 zobrazený ve dvou různých škálách intenzit .....	25
Obrázek 16 Dot-blot reálného vzorku lyzátu buněk MCF-7.....	26
Obrázek 17 Western blot standardu p53 (5 µg/ml a 1 µg/ml) analyzován různými detekčními metodami; A), D) LA-ICP-MS ve dvou škálách intenzit, B), E) Fluorescence s různým expozičním časem, C), F) Luminiscence s různým expozičním časem.....	27
Obrázek 18 Western blot reálného vzorku buněk MCF-7 detekovaný A) Fluorescenčně, B) Luminiscenčně, C) LA-ICP-MS .....	28
Obrázek 19 Přiblížené pozitivní signály mezi 37 a 50 kDa zobrazené vždy ve dvou různých intenzitách .....	29

## 11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Rozdělení nanomateriálů upraveno dle [1] .....	10
Tabulka 2 Komponenty komerční sady GOLD Conjugation Kit (10 nm 200D) ab201808 ...	19