UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012 Michaela Novotná

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

MOŽNOSTI AMPLIFIKACE SIGNÁLU PŘI ELEKTROCHEMICKÉ DETEKCI

Michaela Novotná

Bakalářská práce

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2011/2012**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Michaela Novotná**
Osobní číslo:	**C09299**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Název tématu:	**Možnosti amplifikace signálu při elektrochemické detekci**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Vypracujte teoretickou rešerši o možnostech zvýšení citlivosti elektrochemické detekce.
V první části uveďte stručně obcné informace o biosenzorech. V další části rozeberte podrobněji jednotlivé možnosti amplifikace signálu se zaměřením na přídavek mediátorů, možnosti modifikce elektrod, využití nanočástic a quantum dots.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Michaela Čadková**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 16.7.2012

Michaela Novotná

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce a cenné rady při jejím zpracování. Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na možnosti amplifikace signálu při elektrochemické detekci, která je důležitá zejména v případě stanovení látek v biologických vzorcích, které jsou komplexní a mohou způsobovat nežádoucí interference. Navíc se jedná o vzorky, kde jsou stanovované látky přítomné většinou v nízkých koncentracích. První část práce se zaměřuje obecně na biosenzory a jejich rozdělení, další část je věnována možnostem amplifikace signálu se zaměřením na elektrochemické biosenzory. Práce shrnuje informace o možnostech amplifikace signálu, které jsou využívány nejvíce, a to o modifikacích elektrod, využití elektronových mediátorů, nanočástic a kvantových teček.

KLÍČOVÁ SLOVA

biosenzor, elektrochemická detekce, modifikace elektrod, elektronový mediátor, nanočástice, kvantové tečky

TITLE

Possibility of amplification of signal of electrochemical detection

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on a possibility of amplification of signal of electrochemical detection, which is mainly important in determination of substances in biological samples, which are complex and they can cause undesirable interferences. Futhermore in this case of samples the determinated substances occur at low concetrations. There is a general introduction about biosensores and their division in the first part of the work, the next part deals with the possibility of amplification of signal of electrochemical detection. There are utilized information about the possibility of amplification, which are used most, namely about modifications of electrodes, utilization of electron mediators, nanoparticles and quantum dots.

KEYWORDS

biosensor, electrochemical detection, modification of electrodes, electron mediator, nanoparticles, quantum dots

Obsah

1. Úvod 9

2. Biosenzor 10

3. Dělení biosenzorů podle biologické složky 11

3.1. Enzymové biosenzory 11

3.2. Mikrobiální a tkáňové biosenzory 11

3.3. DNA biosenzory 12

3.4. Imunosenzory 12

4. Elektrochemické biosenzory 13

4.1. Potenciometrické biosenzory 14

4.2. Amperometrické biosenzory 15

4.3. Konduktometrické biosenzory 15

4.4. Voltametrické biosenzory 15

5. Možnosti amplifikace signálu 16

5.1. Modifikované elektrody 17

5.1.1. Aplikace modifikovaných elektrod 17

5.2. Elektronové mediátory 20

5.3. Nanočástice 24

5.3.1. Platinové nanočástice 25

5.3.2. Zlaté nanočástice 26

5.3.3. Stříbrné nanočástice 28

5.3.4. Křemenné nanočástice 29

5.3.5. Fe_3O_4 nanočástice 30

5.3.6. Fluorescenční nanočástice 31

5.4. Uhlíkové nanotrubice 32

5.5. Kvantové tečky 34

6. Závěr 38

1. Úvod

V současné době dochází k velkému rozvoji elektrochemických metod. Elektrochemické metody nacházejí stále větší uplatnění v bioaplikacích pro detekci DNA, proteinů, enzymů a dalších biologicky aktivních látek. Elektrochemická detekce je senzitivní, selektivní, poměrně rychlá a snadno dostupná. Vývoj v oblasti bioaplikací směřuje ke snaze miniaturizovat elektrochemické senzory za účelem snížení množství biologického vzorku, který je potřeba k analýze. Jejich miniaturizace však může vést k nižšímu limitu detekce, a proto je nutné vhodným způsobem zvýšit signál elektrochemické detekce a snížit tak detekční limit pro dané biologicky aktivní látky, jejichž koncentrace je v biologických vzorcích většinou nízká. Navíc biologické vzorky jsou většinou vysoce komplexní a řada látek může způsobovat interference. Výhodou biosenzorů je jejich univerzálnost a není nutná složitá příprava vzorku před vlastní analýzou.

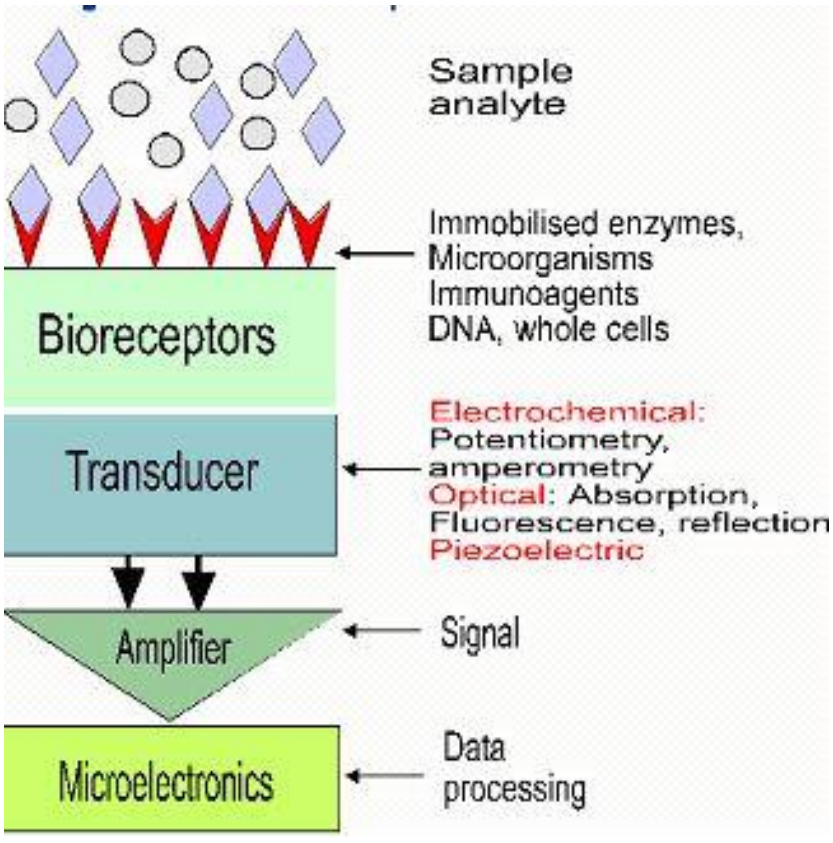
Tato bakalářská práce je zaměřena na možnosti amplifikace elektrochemického signálu. Zvýšení detekovaného signálu lze docílit několika způsoby, mezi které patří modifikace povrchu pracovní elektrody vhodnými materiály, přídavek elektronového mediátoru, který usnadňuje a urychluje výměnu elektronů mezi vzorkem a pracovní elektrodou, využití nanočástic např. s vázaným mediátorem nebo vhodným enzymem zesilujícím reakci nebo použití tzv. kvantových teček.

2. Biosenzor

Biosenzor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí, nebo v těsném kontaktu s fyzikálně chemickým převodníkem (Obr. č.1). Poskytuje průběžný analytický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika látek ve vzorku [1]. Prvkem biologického původu tzv. biorekogničním elementem může být enzym, protilátka, organela aj. Nezbytnou komponentou je také detektor [2].

Jednou z hlavních výhod biosenzorů je dobrá selektivita odezvy. Díky biosenzorům lze detekovat např. konkrétní bílkovinu ve směsi jí podobných bílkovin. Mezi přednosti biosenzorů patří také vysoká rychlost odezvy [3].

Použití biologického materiálu s sebou ale nese i některé komplikace. Je nutné dodržovat optimální podmínky jako je pH, teplota apod. [3].



Obr. č. 1 Schéma biosenzoru (převzato z [4])

3. Dělení biosenzorů podle biologické složky

3.1. Enzymové biosenzory

Enzymy jsou biologický materiál, který se při konstrukci biosenzorů používá nejčastěji. Enzym je bílkovina schopná biokatalyticky přeměnit určitý specifický substrát na produkt. Hlavní výhodou enzymových biosenzorů je jejich jednoduchost a dobrá reprodukovatelnost odpovědi. V případě enzymových biosenzorů lze jednoduše zjistit koncentraci analytu, jelikož při dostatečném množství enzymu je tato koncentrace přímo úměrná rychlosti reakce [5]. Enzym se používá v biosenzorech převážně v purifikovaném stavu [1]. Molekulárně – biologické techniky umožňují levnější produkci enzymů ve větším množství, což je v současné době velmi ceněné a žádané [5].

3.2. Mikrobiální a tkáňové biosenzory

Základem mikrobiálních biosenzorů jsou mikrobiální, rostlinné nebo živočišné buňky, případně jejich organely, kde biologická složka je v aktivním živém stavu [1]. Z hlediska konstrukce biosenzorů patří mezi nejperspektivnější biologický materiál mikroorganismy. Každá buňka představuje nezávislého jedince, a je proto obvykle odolnější a trvanlivější než jednotlivé buněčné části nebo tkáně a pletiva vyšších organismů [5]. Výhodou mikrobiální elektrody oproti enzymové je také v tom, že odpadá nutnost purifikace, což se může příznivě odrazit na ceně. Existují také tzv. hybridní biosenzory, které obsahují současně mikrobiální složku a izolovaný enzym. Za předpokladu zachování životních podmínek použitého mikroorganismu může docházet k samovolné obnově využívané enzymové aktivity [1].

Jednou z možností do budoucna je také využití geneticky modifikovaných mikroorganismů. Mezi nejslibnější patří tzv. bioreportéry. Bioreportéry využívají přirozené schopnosti některých mikroorganismů „zapínat“ a „vypínat“ některé své geny na základě fyziologických podmínek. Výzkum bioreportérů je ale v EU stále spíše ve výzkumném stadiu. V USA již ale byla popsána první “terénní“ použití například při sledování mikrobiální dekontaminace půdy znečištěné ropnými látkami [3].

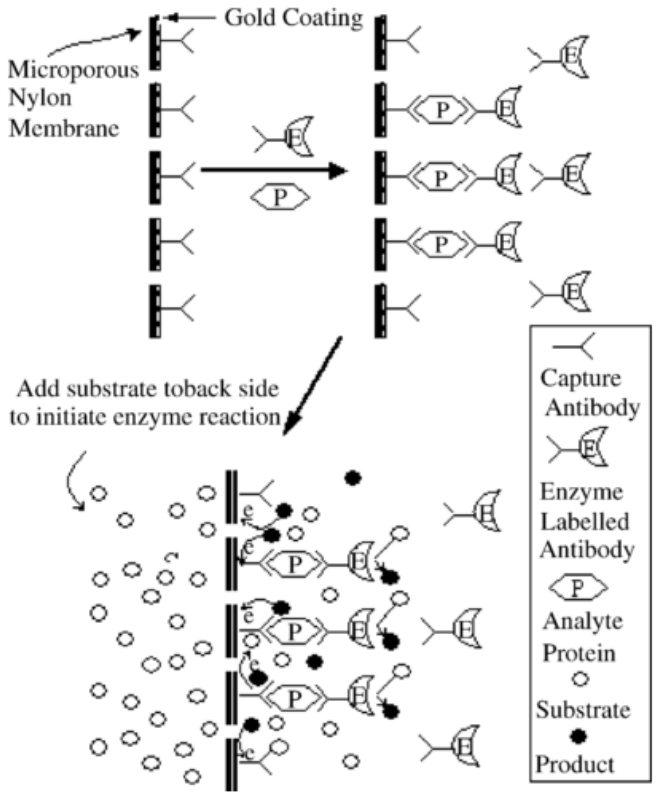
3.3. DNA biosenzory

V souvislosti se sekvenováním genů se jedním ze základních klinických nástrojů pro sledování nemocí stala analýza DNA fragmentů. Tyto biosenzory jsou založeny na hybridizaci nukleových kyselin. Biosenzory pro detekci DNA se pro zvýšení citlivosti kombinují s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) [5].

Novinkou v oblasti DNA biosenzorů jsou tzv. DNA-čipy. DNA-čipy jsou malé kousky křemíkové matrice, na kterých jsou v pravidelné mřížce imobilizovány různé sekvence DNA o určité délce. Vyšetřovaný vzorek je pak hybridizován s touto sadou. Čím silnější je vazba na čip, tím podobnější je sekvence vzorku příslušné části čipu. Takto navázaná sekvence na čipu se poté detekuje fluorescenčně. Intenzita fluorescence odpovídá podobnosti struktury vzorky a příslušného místa čipu [3].

3.4. Imunosenzory

Imunochemické afinitní biosenzory používají jako biorekogniční element protilátky – bílkoviny schopné specificky rozpoznávat molekuly různé chemické struktury. Pro imunosenzory je charakteristická dobrá selektivita při použití protilátek a senzitivita. Jsou schopny detekovat i stopová množství látek. V případě použití miniaturizovaných imunosenzorů je nutná amplifikace signálu, protože miniaturizace biosenzoru vede ke snížení limitu detekce. V současnosti se při konstrukci biosenzorů využívají protilátky modifikované vhodnou značkou. Nejčastěji bývá použita fluorescenční nebo enzymová značka v závislosti na použité detekční metodě. Nejznámějšími imunosenzory se v této oblasti detekce v poslední době staly senzory založené na ELISA metodě (enzyme linked immunosorbent assay) (Obr. č.2) [5].



Obr. č. 2 Schéma elektrochemického enzymatického imunosenzoru pro detekci proteinu v neředěném vzorku na mikroporézní zlatem potažené nylonové membráně založeném na principu ELISA metody (převzato z [6])

Rozvoj imunotechnik je možný rovněž díky rozvoji metod pro produkci protilátek. Dřívější získávání protilátek přímo z krevního séra imunizovaných zvířat je nahrazováno genetickými manipulacemi produkčních bakterií, konjugacemi nádorových buněk s bílými krvinkami a dalšími postupy. I přesto je pořizovací cena protilátek poměrně vysoká [5].

4. Elektrochemické biosenzory

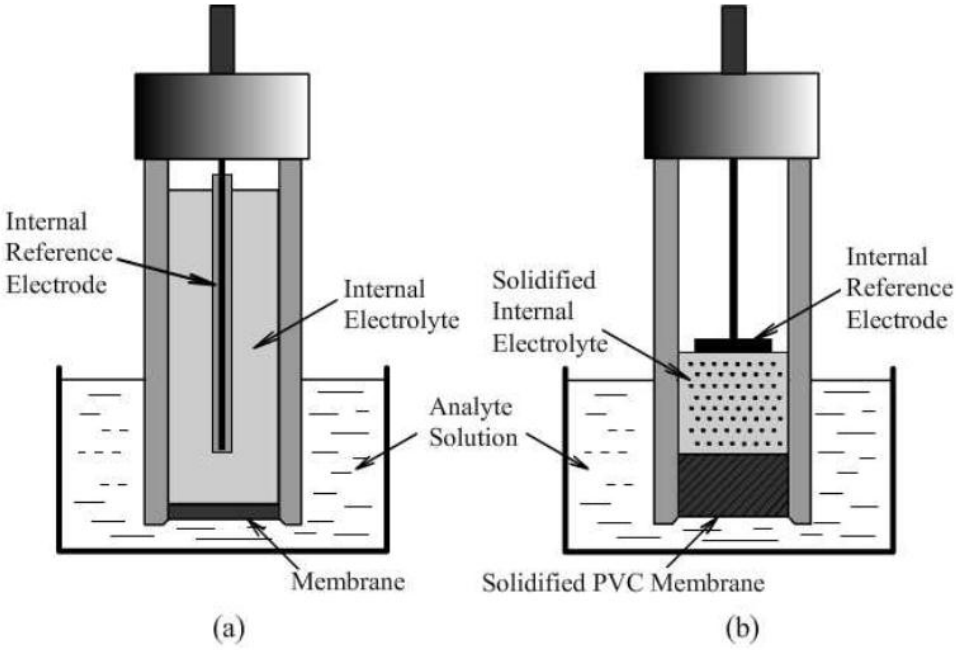
Vedle dělení biosenzorů podle biorekogniční složky jsou biosenzory rozdělovány do několika skupin podle převodníku. Podle tohoto kritéria jsou biosenzory děleny na potenciometrické, amperometrické, konduktometrické a voltametrické biosenzory [7].

Elektrochemické biosenzory se v současnosti těší velkému zájmu odborníků. To pramení z vysoce výhodných vlastností těchto biosenzorů. Mezi ceněné vlastnosti biosenzorů patří vysoká citlivost, kompatibilita s moderními mikrotechnologiemi,

ekonomická dostupnost a nezávislost signálu vzorku na jeho zákalu či barvě [7]. Pro sestavení elektrochemického měřícího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody, pracovní (měřící) a referentní [1]**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**. racovní elektroda mění svůj potenciál v závislosti na koncentraci stanovované látky. Naproti tomu referentní elektroda je nepolarizovatelná a v průběhu měření si udržuje svůj stálý neměnný potenciál. Pro některá měření lze využít i třetí pomocnou elektrodu, která bývá elektrochemicky neaktivní [7]. Elektrochemické biosenzory dále dělíme podle použité metody.

4.1. Potenciometrické biosenzory

Principem potenciometrických biosenzorů je měření rovnovážného napětí mezi elektrodami. Rovnovážné napětí, které se ustanoví mezi pracovní a referentní elektrodou, je přímo úměrné koncentraci vzorku. Nejpoužívanějšími elektrodami jsou iontově-selektivní elektrody (ISE) (Obr. č.3). Vzrůstající zájem o potenciometrické senzory pro biologické aplikace vytvořila také poptávka po miniaturizovaných ISE. Bakker a Pretsch (2008) např. zkoumali důležitost současného vývoje nanopotenciometrie, která se soustředí především na miniaturizaci iontově-selektivní membrány elektrody. To napomáhá ke zlepšení limitu detekce, biokompatibilitě a stabilitě senzoru [8]. Potenciometrická měření mají ale také určité nevýhody. Jednou z hlavních nevýhod tohoto typu detekce zejména v případě imunosenzorů je relativně malá změna potenciálu, kterou vyvolává vznik imunokomplexu mezi antigenem s protilátkou [7].



Obr. č. 3 a) ISE s kapalným vnitřním elektrolytem b) ISE s tuhým vnitřním elektrolytem (převzato z [9])

4.2. Amperometrické biosenzory

Při amperometrických měřeních je signálem proud, který je přímo úměrný koncentraci stanovované látky ve vzorku. Proud bývá měřen za konstantního napětí měrné elektrody. Velikost proudu prošlá za daný čas *t* v systému pak udává náboj, který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách [7].

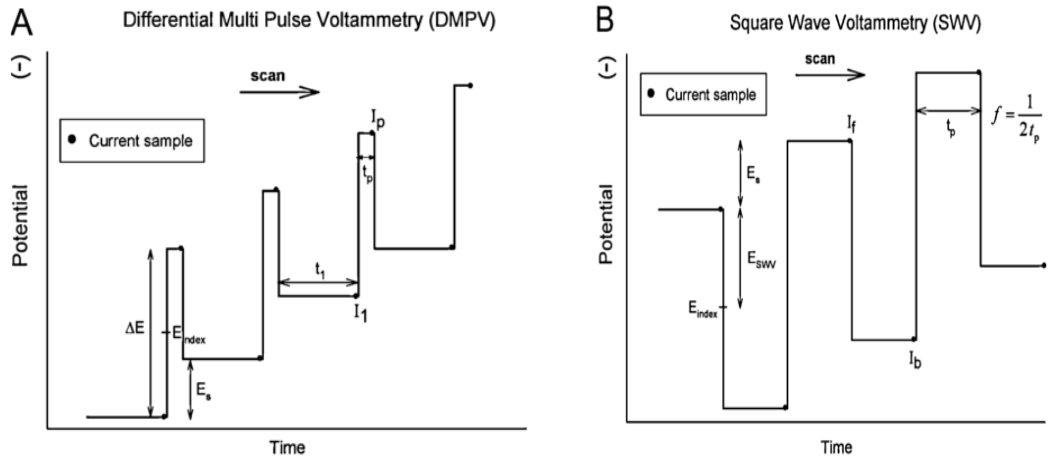
4.3. Konduktometrické biosenzory

Při stanovení látek pomocí konduktometrických respektive vodivostních biosenzorů se využívá střídavého elektrického napětí na měrné elektrodě. Měření vodivosti je málo specifické, takže se může do jisté míry uplatnit jako univerzální typ převodníku. Nevýhodou této metody je vlastní vodivost pracovního prostředí. Proto je vhodné použít pufry [1].

4.4. Voltametrické biosenzory

Voltametrické senzory patří mezi nejčastěji používané elektrochemické biosenzory. Principem voltametrické detekce je vložení potenciálu na pracovní elektrodu tvořenou nejčastěji rtutí, platinou, zlatem, uhlíkem, amalgamy nebo jinými látkami. Potenciál vložený na pracovní elektrodu se mění libovolně zvolenou rychlostí a měří se závislost proudu přímo úměrného koncentraci analytu na

vloženém potenciálu. Nevýhodou voltametrických metod je jejich údajná toxicita a to především v případě rtuťových elektrod. Jednou z hojně využívaných voltametrických metod je tzv. rozpouštěcí (stripping) voltametrie. Této metody se využívá především ve spojení s nanomateriály, které disponují velkým specifickým povrchem. Mohou tak zesílit měřený signál, a proto jsou pro rozpouštěcí voltametrii výhodné [8]. Pro detekci vzorku za použití povrchově modifikovaných elektrod se nejčastěji využívá diferenční multi-pulsní voltametrie (DMPV) nebo tzv. square wave voltametrie (SWV) (Obr. č.4) [10].



Obr. č. 4 a) diferenční multi-pulsní voltametrie, b) square wave voltametrie (převzato z [10])

5. Možnosti amplifikace signálu

Detekce analytu pomocí elektrochemických biosenzorů je v současné době hojně využívanou a stále se rozvíjející metodou. Ačkoliv elektrochemické biosenzory vykazují vysokou selektivitu a specifitu, jejich citlivost především v případě jejich miniaturizace není dostatečně vysoká. Z tohoto důvodu je stále větší pozornost věnována modifikaci elektrochemických biosenzorů za účelem amplifikace signálu a zlepšení citlivosti biosenzorů pro stanovované analyty. Následující kapitoly se zabývají možnostmi amplifikace signálu pomocí několika základních technik jako je modifikace elektrod různými povrchovými materiály, přídavek mediátoru, aplikace nanočástic a nebo kvantových teček.

5.1. Modifikované elektrody

Modifikace elektrod je jednou z možností amplifikace signálu při elektrochemické detekci. Vhodnou modifikací elektrody lze docílit vyšší senzitivity a specifity [11]. Pro modifikaci elektrod lze použít mnoho technik, jako je například chemisorpce, kovalentní navázání na elektrodu a další [12]. Modifikovat elektrody lze například elektrolytickým potažením nebo chemickým navázáním polymerů na povrch elektrody [13]. Vhodné materiály pro modifikaci elektrod mohou být polymery jako je PVC, polyetylen, dále pak organické komplexy, PEG, anorganické sloučeniny a další [14]. Modifikované elektrody mohou nalézt své uplatnění například při elektrokatalýzách, zobrazovacích technikách, analytických měřeních nebo fotoelektrochemických měřeních [11]. Hlavním cílem modifikace elektrod je zvýšení signálu za účelem zlepšení analytické senzitivity elektrod [10].

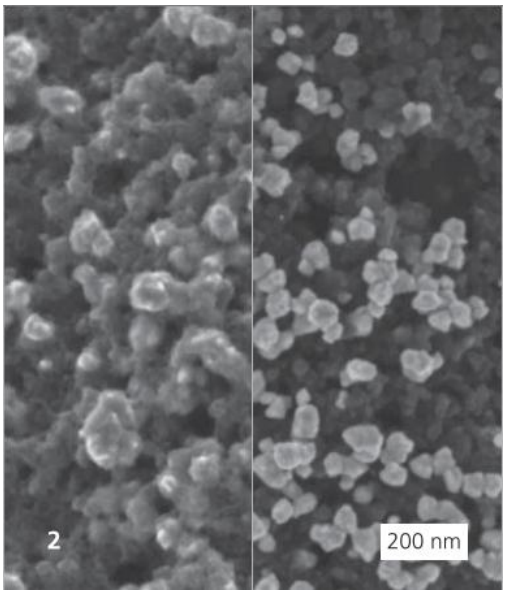
5.1.1. Aplikace modifikovaných elektrod

Teixeira a kol. (2005) zkoumali elektrochemické vlastnosti uhlíkové elektrody modifikované oxovanadiovým komplexem. Tato modifikovaná elektroda byla použita pro detekci cysteinu. Cystein je biologicky významná látka v živých systémech. Oxidovaná forma cysteinu, tzv. cystin se používá jako model pro sledování disulfidických vazeb a thiolových skupin v bílkovinách. V dané studii byla sledována elektrokatalytická činnost komplexu při oxidaci cysteinu za relativně nízkého potenciálu. Elektrody modifikované oxovanadiovým komplexem (s ohledem na jejich dobrou stabilitu) jsou slibné v oblasti senzorů pro detekci cysteinu např. ve farmaceutických přípravcích [15].

Mano a Kuhn (2001) popsali skleněnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou deriváty nitrofluorenonu pro detekci glukózy. Výsledkem bylo, že nitrofluorenonové deriváty jsou velmi aktivní a stabilní redox mediátory pro reverzibilní NADH oxidaci. Výrazné zvýšení aktivity modifikované elektrody (až o 500%) lze navíc pozorovat po přidání vápenatých iontů do elektrolytu [16].

Modifikace elektrod lze dosáhnout také navázáním pruské modři na povrch elektrody. Pruská modř je anorganický polovodič, který pracuje jako elektrokatalyzátor pro oxidaci a redukci peroxidu vodíku. H_2O_2 lze díky pruské modři detekovat v nanomolárních množstvích. Pro ještě větší zesílení signálu lze

na elektrodu modifikovanou pruskou modří navázat zlaté nanočástice (Obr. č.5) [13].



Obr. č. 5 Vrstva pruské modři na biosenzoru se zlatými nanočásticemi (převzato z [13])

Shankaran a Narayanan (2002) popsali chemicky modifikovaný amperometrický senzor tvořený z hexakyanoželeznatanu kobaltnatého (CoHCF) pevně vázaného na povrch parafinem impregnované uhlíkové elektrody pro stanovení thiosulfátu. CoHCF má podobné vlastnosti jako Pruská modř. Takto modifikované elektrody pro stanovení thiosulfátu mají řadu výhod, jako jsou nízké pořizovací náklady, citlivost, dobrá stabilita a reprodukovatelnost. Thiosulfát je primární látka znečišťující životní prostředí vznikající ve fotografickém průmyslu, proto může být CoHCF modifikovaná elektroda v budoucnu aplikována pro on-line sledování thiosulfátu [12].

Jayasri a Narayanan (2007) popsali smíšenou uhlíkovo-voskovou elektrodu modifikovanou hexakyanoželeznatanem manganatým (MnHCF). Grafitový prášek byl rozmíchán v roztaveném parafínu za účelem vzniku vodivé směsi, která byla použita jako materiál elektrody. Takto byla vytvořena obnovitelná trojrozměrná MnHCF modifikovaná elektroda. Tato elektroda byla použita pro detekci hydrazinu. Hydrazin a jeho deriváty mají široké uplatnění v průmyslu, zemědělství, jako výbušniny, antioxidanty, pohonné hmoty a další. Hydrazin je základní produkt palivových článků a jeho stanovení je také důležité ve farmacii, jelikož byl označen

jako karcinogenní a hepatotoxická látka, která má negativní dopad na játra a mozek. Tato elektroda vykazovala vysokou stabilitu, reprodukovatelnost, lze ji povrchově obnovovat. MnHCF modifikovaná elektroda tedy může být použita jako amperometrický senzor pro monitorování hydrazinu ve vzorcích [17].

Hasanzadeh a kol. (2009) popsali modifikovanou elektrodu schopnou detekovat aminokyseliny při nízkých koncentracích. Problém s použitím elektrochemických metod pro analýzu aminokyselin a bílkovin spočívá v nedostatku elektrochemicky aktivních skupin ve většině těchto sloučenin. K vyřešení tohoto problému navrhli dva postupy. První postup je derivování analytu s elektrochemicky aktivní skupinou před samotným stanovením. Druhý postup je založen na vytváření *in situ* chemických reakcí na povrchu elektrody za účelem tvorby elektrochemicky aktivních produktů vhodných pro detekci. Pro tento výzkum navrhli skleněnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou nanočásticemi hydroxidu kobaltnatého v zásaditém roztoku. Takto modifikované elektrody mohou usnadnit detekci proteinů v komplexním vzorku [18].

Liu a Kirchhoff (2007) navrhli dehydrogenázou modifikovanou elektrodu pro stanovení methanolu. Methanol je jedním z nejpoužívanějších organických rozpouštědel zejména v průmyslu a výrobcích pro domácnost. Je také vhodný jako alternativní palivo do automobilů. Avšak vdechování methanolu nebo jeho absorpce do kůže může vést k bolestem hlavy až ke slepotě. Vysoká toxicita methanolu může v extrémních případech vést dokonce až k úmrtí organismu. Tento navržený senzor využívá velmi malé množství enzymu a vykazuje vynikající reprodukovatelnosti a stabilitu v kombinaci s vhodným mediátorem. Jako mediátor se nejlépe osvědčil ferrocen [19].

Zhang a kol. (2005) popsali zlatou elektrodu modifikovanou uhlíkovými nanotrubicemi. V přítomnosti kyseliny askorbové tak stanovovali koncentraci dopaminu ve vzorcích. Experimentální výsledky odhalily, že zlatá elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubicemi je výhodná pro selektivní detekci dopaminu v komplexním vzorku [20].

Lee a kol. (2008) použili elektrochemický impedanční biosensor založený na pyrolizovaném uhlíkovém filmu, který představuje pracovní elektrodu. Pracovní elektroda byla modifikovaná tzv. aptamerem, což jsou uměle vytvořené nukleové

kyseliny. Tímto biosenzorem detekovali trombin. Změny odporu vzniklé díky elektronovému přenosu při navázání trombinu na povrch uhlíkového filmu umožňují měřit koncentraci trombinu v rozmezí 0,5 nM až 500 nM. Tato metoda může poskytnout nový přístup k miniaturizaci, integraci a nižším pořizovacím nákladům elektrochemických biosenzorů [21].

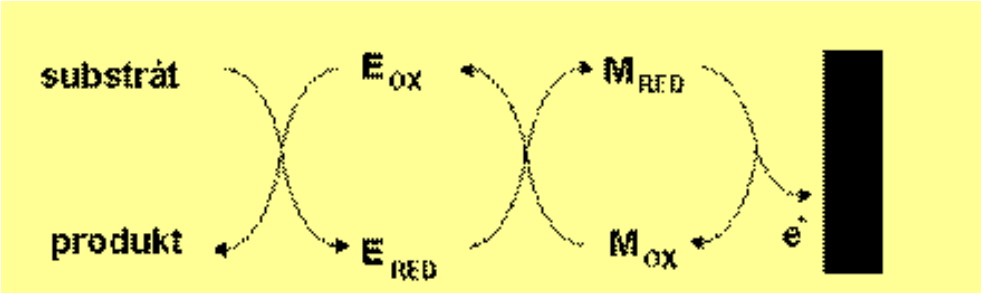
Díaz-Gonzáles a kol. (2004) popsali voltametrický imunosenzor založený na streptavidinem modifikované uhlíkové elektrodě. Streptavidin byl navázán na elektrodu pomocí biotinylace, což je proces vazby biotinu k molekule pomocí NH_2 skupiny. Jako modelový analyt byly použity králičí IgG. Takto modifikovaný imunosenzor pracoval na principu interakce králičích IgG s protilátkami proti králičím IgG, které byly navázány přes streptavidin na uhlíkové elektrodě. Šlo o přímé stanovení kompetitivní reakcí mezi IgG značenými alkalickou fosfatázou a IgG bez značky. Výsledky ukázaly, že streptavidinem modifikovaný imunosenzor umožňuje detekci koncentrace králičího IgG kolem 7,0 ng / ml, což byla do té doby nejnižší naměřená hodnota a zároveň je tento imunosenzor stabilní až po 4 měsíce bez ztráty reprodukovatelnosti analytického signálu [22].

5.2. Elektronové mediátory

Mediátory jsou nízkomolekulární látky redoxní povahy, které usnadňují výměnu elektronů mezi enzymy nebo jinými redoxními biomolekulami (Obr. č.6). Mediátory by měly splňovat následující kritéria:

- reaktivita s biologickou složkou a s elektrodou
- rychlý přenos elektronů
- stabilní forma při daných podmínkách reakce
- žádné nežádoucí vedlejší reakce
- netoxický
- vhodný pro imobilizaci.

Z hlediska začlenění mediátoru do systému biosenzoru je nejjednodušší použití rozpustných mediátorů volně v roztoku nebo uvnitř micel. Na povrch kovových elektrod lze mediátor navázat kovalentně. Další možností je navázání mediátoru přímo na povrch enzymu. Navázání mediátoru přímo na povrch enzymu se využívá pro enzymové biosenzory. V případě imunosenzorů se používá rozpustný mediátor [1].



Obr. č. 6 Přenos elektronů pomocí mediátoru (převzato z [23])

Vlastnostem ideálního mediátoru se asi nejvíce blíží ferrocen, jelikož splňuje výše uvedené podmínky [1]. Ferrocen lze jako mediátor použít např. při detekci glukózy v krvi. Protože onemocněním Diabetes Mellitus, vyznačujícím se vysokou glykémií, trpí velké procento populace, je žádoucí hledat stále lepší možnosti detekce glukózy. Mediátor ferrocen ve spojení s platinovou elektrodou nabízí jednoduché neinvazivní stanovení pouze z lidských slin. Výhodou tohoto biosenzoru je také nízký limit detekce v rozmezí 0,008-0,21 mM [23].

Jiang a kol. (2008) popsali biosenzor složený z komplexu osmiového mediátoru a glukózooxidázy, které byly pevně přichyceny na povrchu elektrody. Osmiový mediátor se skládá z osmium-polyvinylpyridinu spojeného s křenovou peroxidázou díky poly(ethylenglykol)diglycidyl etheru (PEGDGE). Kromě výrazného snížení detekčního limitu nabízí tento biosenzor také vysokou stabilitu. Navíc po skladování po dobu 15 měsíců při teplotě 4°C vykazoval biosenzor stále více než 90% původní aktivity [24].

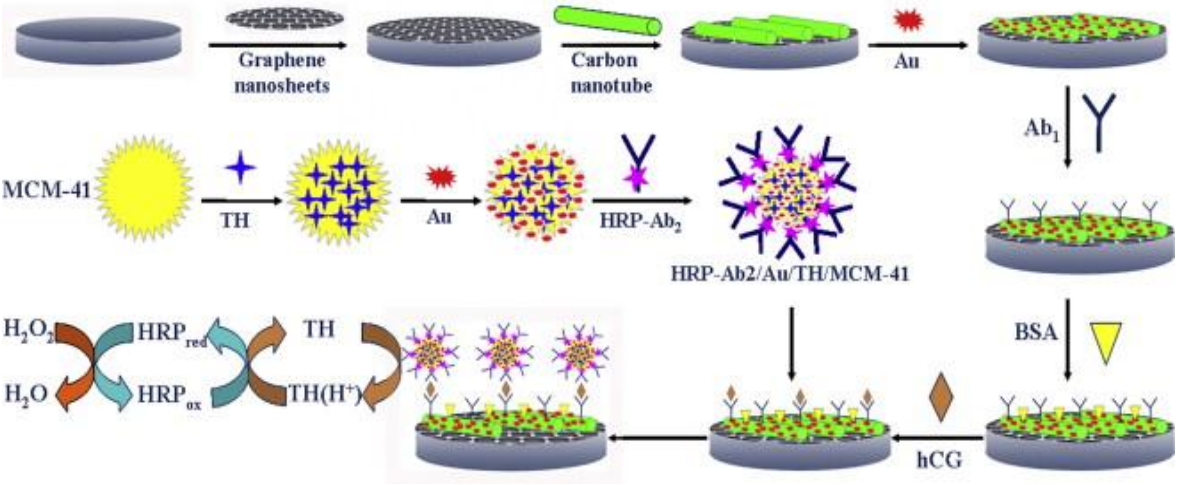
Dalším kvalitním mediátorem je indigokarmín, který byl využit například při detekci hydrazinu. Hydrazin je malá reaktivní molekula s dobrými redukčními schopnostmi, ale je také označován za látku znečišťující životní prostředí. Elektroanalytické techniky využívané pro detekci hydrazinu bez mediátoru byly založeny na elektrooxidaci hydrazinu. Přímá oxidace hydrazinu na elektrodě však vyžaduje vysoký potenciál nutný pro redoxní reakce hydrazinu na většině elektrod. Z tohoto důvodu byla použita uhlíková elektroda modifikovaná TiO_2 nanočásticemi ve spojení s mediátorem indigokarmínem. Ten navíc zajistí snížení potenciálu a zvýšení kinetického přenosu elektronů. Takto modifikovaný senzor s přídavkem mediátoru vykazuje lepší selektivitu pro hydrazin než většina předchozích elektrod [25].

Ueda a kol. (2006) uvedli ve své odborné publikaci velmi efektivní serotonin-selektivní membránovou elektrodu, ke které přidali rozpustný mediátor Tris(2-ethylhexyl)phosphin oxid. Dosáhli tak nejnižších limitů detekce, které byly do té doby pro serotonin-selektivní elektrody naměřeny. Selektivita této elektrody byla více než 10^3krát vyšší než při měřeních elektrodou bez selektivní membrány. Tento systém je využíván také pro stanovení anorganických kationtů či acetylcholinu. Výsledky získané pomocí této elektrody korespondovaly s těmi, které byly získány při fluorimetrickém stanovení serotoninu. Navíc touto mediátorem modifikovanou elektrodou lze měřit množství serotoninu uvolněného z krevních destiček *in situ* bez nutnosti oddělení serotoninu od kultivačního média [26]. Stanovení serotoninu s využitím mediátorů provedli také Tang a kol. (2008). Použili ale jako první k detekci serotoninu uhlíkovou elektrodu pokrytou mediátorem oxidem zinečnatým. Tato modifikovaná elektroda vykazovala výborné elektrokatalytické vlastnosti také při detekci kyseliny askorbové, dopaminu a kyseliny močové v neutrálním pufru. ZnO-elektroda byla také úspěšně využita při současné detekci těchto tří komponent v jednom směsném roztoku [27].

Jód je nezbytný prvek pro hormony štítné žlázy. Hraje hlavní roli v rozvoji a funkci mozku a v růstu buněk. Pro zamezení nemocím a jejich prevenci jako je například mentální retardace, která vzniká při nedostatku jódu, se přidává do kuchyňské soli jodičnan draselný. Na druhou stranu nadměrný příjem jódu může způsobovat hyperthyreózu. Pro stanovení jodidu použili Li a kol. (2011) skleněnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou polymerovým flavin adenin dinukleotidovým mediátorem. Flavin adenin dinukleotid (FAD) je přítomen jako mediátor pro detekci jodičnanu, 3,4-ethylendioxythiofen (EDOT) se přidává pro zachycení FAD a vytvoření vodivé polymerní matrix poly(3,4,-ethylendioxythiofen) (PEDOT). Vytvoření této matrix napomáhá k lepší katalýze při redukci jodičnanu [28].

Pro detekci hemolytických bakterií v biologických vzorcích byla vynalezena nová elektrochemická metoda využívající liposomálního mediátoru 2,6-dichlorofenolindofenolu. Principem této specifické detekce je hemolytické působení bakterie *Listeria monocytogenes* na liposomy a současné redukční působení bakterie na liposomární mediátor. Oxidace redukovaného mediátoru vytváří na pracovní elektrodě měřitelný amperometrický signál závislý na množství bakterií [29].

Juanjuan a kol. (2012) navrhli citlivý elektrochemický imunosenzor pro detekci lidského choriového gonadotropinu (hCG) (Obr. č.7). Imunosenzor byl složen z grafenu pokrytého uhlíkovými nanotrubicemi (MWCNTs). Tyto uhlíkové nanotrubice byly pokryty vrstvou zlatých nanočástic. Takto vytvořený grafen byl navázán na pracovní elektrodě. Tato speciální úprava umožňuje zvýšit plochu elektrody a zachytit tak velké množství primárních protilátek (Ab1) a zároveň zlepšit přenos elektronů. Dále využili speciální nanobioznačky složené z křemičitých mezoporézních nanočástic (MCM-41) modifikovaných zlatými nanočásticemi (AuNPs). Spojení mezi MCM-41 a AuNPs zajišťoval elektronový mediátor thionin. Tyto nanobioznačky umožnily adsorpci sekundární protilátky (Ab2) značené křenovou peroxidázou (HRP). Měření provedené s tímto elektrochemickým imunosenzorem vykazovalo lepší citlivost imunosenzorů než doposud a jeví se jako nadějná strategie pro budoucnost detekce hCG [30].



Obr. č. 7 Schéma imunosenzoru pro detekci hCG (převzato z [30])

Lin a kol. (2011) představili zlatou elektrodu modifikovanou $Mo_6S_{9-X}I_X$ nanodráty, kterou aplikovali pro detekci DNA. Jako mediátor použili thionin. Thionin je elektroaktivní snadno dostupné barvivo, které je schopno silně vázat DNA. Detekce je založena na poklesu voltametrické odpovědi v důsledku vazby DNA na thionin. Tento postup je jednoduchý a není potřeba žádných značek. Navíc poskytuje velmi citlivé a efektivní snímání [31].

5.3. Nanočástice

Nanočástice jsou částice, jejichž velikost alespoň v jednom rozměru dosahuje hodnot v rozmezí 1 nm až 100 nm [32]. Nanočástice mají velký dopad na rozvoj elektrochemických biosenzorů a přinášejí nové možnosti v konstrukci biosenzorů [33]. Aplikace nanočástic při elektrochemických detekcích může být rozdělena podle funkce na 2 kategorie: (1) elektrochemické převodníky modifikované pomocí nanomateriálů, (2) bimolekulární nanomateriály využité jako značky pro elektrochemickou detekci [34].

Existuje mnoho technik na výrobu nanočástic. Jednou z nejčastěji užívaných metod pro přípravu pro přípravu nanomateriálů je tzv. water-in-oil mikroemulzní technika. V této metodě jsou reverzní micely, resp. vodní nanokapénky tvořeny v organickém médiu. Tyto nanokapénky jsou pak použity jako nanoreaktory pro tvorbu nanočástic. Velikost takto připravených částic lze dobře řídit nastavením poměru voda/olej [35].

Jinou metodou pro výrobu nanočástic může být použití tzv. nedisperzního plynového membránového kontaktoru nebo novější metoda, při níž je použit tzv. polodávkovací plynový membránový kontaktor [36].

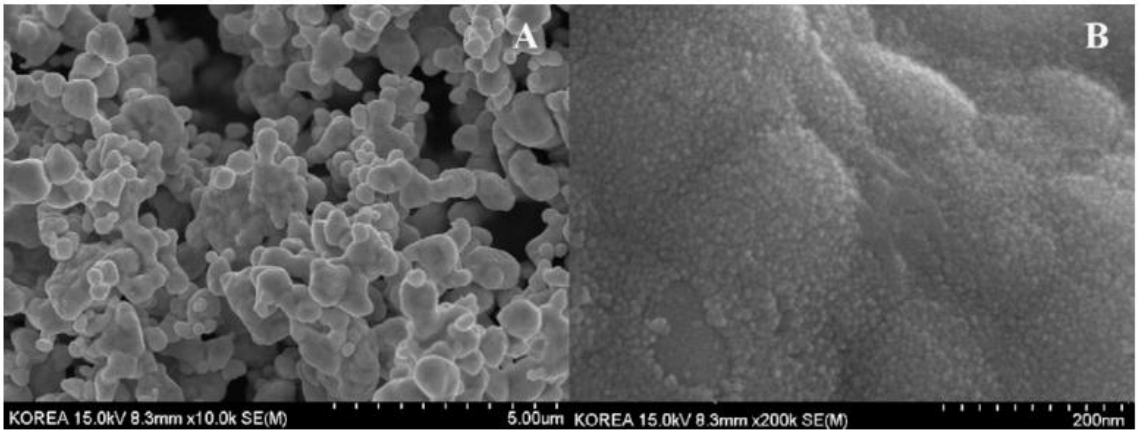
Další možností je výroba nanočástic v tzv. Polyelectrolyte multilayer reactor (PEMR). PEMR poskytuje reakční místa pro syntézu kovových a polovodivých nanočástic, které vznikají redukcí nebo hydrolýzou odpovídajících kovových iontů. Tyto kovové ionty jsou selektivně vázány na funkční skupiny v rámci PEMR. Koncentrace a velikost syntetizovaných nanočástic lze korigovat například úpravou koncentrace reaktantů [37].

Existují tři typy nanočástic – přírodní, vedlejší a uměle vyrobené. Přírodní částice vznikají ze sopečného prachu, měsíčního prachu apod. Vedlejší nanočástice vznikají například z výfukových plynů nebo při spalování uhlí. Jde většinou o odpad, který vzniká lidským působením. Tato kapitola je podrobněji zaměřena na částice uměle vyrobené, kam patří např. nanomateriály vyrobené z kovu, polymery s nano rozměry, nebo materiály složené z uhlíku – tzv. uhlíkové nanotrubice (viz kapitola 5.4.) [38].

5.3.1. Platinové nanočástice

Platinové nanočástice (PtNPs) o velikosti 2-3nm se připravují a využívají v kombinaci s uhlíkovými nanotrubicemi pro výrobu elektrochemických senzorů a vykazují vyšší citlivost [39]. Tato kombinace dvou nanomateriálů se využívá k lepší detekci DNA, proteinů apod. Díky schopnosti uhlíkových nanotrubic vybuzovat elektron-transferové reakce a díky vysoké katalytické aktivitě platinových nanočástic je citlivost již zmíněných biosenzorů vyšší. Limit detekce pro tato měření je až $1*10^{-11}$ M [33].

Yi-Jae a Jae-Yeong (2010) představili makroporézní zlatou elektrodu modifikovanou platinovými nanočásticemi (Obr. č.8). Tato elektroda je určena pro extrémně citlivou a selektivní neenzymatickou detekci cholesterolu. Platinové nanočástice zde zajišťují drsnost povrchu a elektrochemickou katalytickou aktivitu. Navázání platinových nanočástic na povrch zlaté elektrody přineslo také další výhodu, kterou je rychlá odezva [40].



Obr. č. 8 Makroporézní zlatá elektroda modifikovaná PtNPs, emisní rastrovací elektronový mikroskop (převzato z [40])

Kang a kol. (2008) popsali novou strategii pro vylepšení citlivosti biosenzoru pro stanovení glukózy. Glukózový biosensor byl modifikován uhlíkovými nanotrubicemi, platinovými nanočásticemi a tzv. sol-gelem složeným z chitosanu a křemičitých organicko-anorganických hybridních složek. Takto modifikovaný biosensor má řadu výhod jako je vysoká citlivost při nízkém potenciálu, dobrá stabilita a snadná příprava. Dále byl tento biosensor použit pro stanovení glukózy v lidském vzorku séra a výsledky se shodovaly s těmi, které byly naměřeny

spektrofotometricky. Biosenzor také vykazuje dobrou reprodukci v rozmezí 95%-104% [41].

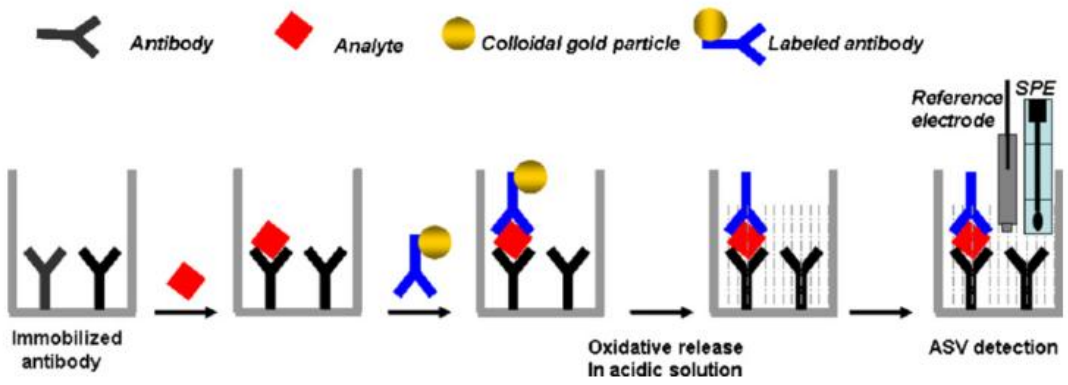
Zhu a kol. (2005) popsali skleněnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou platinovými nanočásticemi ve spojení s uhlíkovými nanotrubicemi. Tuto modifikovanou elektrodu použili jako biosenzor pro detekci DNA. Uhlíkové nanotrubice jsou schopny podporovat elektron-transferové reakce, platinové nanočástice vykazují vysokou katalytickou aktivitu při chemických reakcích. Tyto vlastnosti umožňují výrazné zesílení snímaného signálu při detekci DNA [42].

5.3.2. Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice (AuNP) si získaly značnou oblibu díky svým výjimečným vlastnostem. Velká chemická stabilita, unikátní optické vlastnosti [29] a snadná příprava [43] umožnily vědcům aplikovat AuNP v mnoha oblastech. AuNP lze využít pro teoretické elektronové transfery, katalýzy, nanosenzory, značení testů a další [44].

Elektrochemická detekce DNA pomocí AuNP byla představena například Limogyho skupinou a skupinou Wanga (2001) [34]. Podobně byly založeny testy na využití stříbrných nanočástic. O stříbrných nanočásticích pojednává následující kapitola.

Koloidní zlato jako elektrochemická značka pro voltametrickou analýzu bylo využito skupinou Gonzales- Garcia a kol. a Dequaire a kol. (2000) (Obr. č. 9). Principem imunoanalýzy byla nekompetitivní heterogenní elektrochemické reakce se značkou z koloidní zlaté částice. Citlivost metod využívajících zlacených značek závisí na koncentraci imunoglobulinu G (IgG) ve vzorku [34].



Obr. č. 9 Schematické znázornění nekompetitivní heterogenní elektrochemické imunoanalýzy se značkou z koloidní zlaté částice (převzato z [34])

Pro vylepšení citlivosti testů využívajích AuNP byly vynalezeny další metody a postupy přípravy testů. Například precipitace zlatých nanočástic označených jiným typem nanočástic byla využita pro zvýraznění tvorby imunokomplexu v případě imunosenzorů [34].

Rusling a kol. (2009) připravili elektrodu ze zlatých nanočástic vázaných na glutathionu (GSH-AuNP). Ty byly vyrobeny redukcí zlaté soli v přítomnosti roztoku glutathionu. Navázání zlatých nanočástic na glutathion přináší zvětšení jejich povrchu. Větší povrch nanočástic pak umožňuje lepší a silnější navázání proteinových biomarkerů karcinomu a tím i přesnější detekci [45].

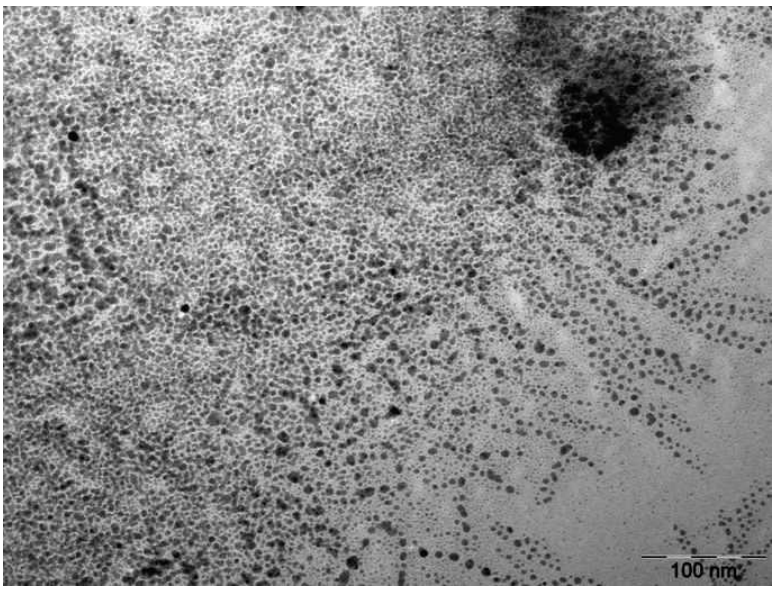
Tang a kol. (2005) popsali platinovou elektrodu modifikovanou zlatými nanočásticemi pro detekci povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg). Platinová elektroda modifikovaná AuNPs vykazovala velkou citlivost a reprodukovatelnost a také vysokou stabilitu především díky vysoké povrchové aktivitě nanočástic [46].

Kim a kol. (2009) použili skleněnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou zlatými nanočásticemi pro detekci Annexinu II. a MUC5AC. Annexin II je antigen, který se nachází pouze u nemocných pacientů s karcinomem plic. Naopak MUC5AC je použit jako indikátor k rozpoznání zdravých bronchiálních buněk. Hydrazin a protilátky proti alexinu II a MUC5AC byly kovalentně navázány na AuNPs modifikovanou elektrodu. Hydrazin fungoval jako katalyzátor pro snížení H_2O_2, který je tvořen oběma antigeny i vzorky. Imunosenzor využívá kompetitivní reakce ve vzorku mezi proteiny značenými glukózooxidázou a proteiny bez značky. Takto

připravený imunosenzor vykazuje vysokou citlivost a je potenciálně využitelný pro včasnou diagnózu rakoviny plic [47].

5.3.3. Stříbrné nanočástice

Hlavní výhodou stříbrných nanočástic je jejich snadná syntéza. Pozornost vědců přitahují díky jejich vlastnostem jako je malý průměr nanočástic okolo 50 nm a velký specifický povrch (Obr. č. 10) [48].



Obr. č. 10 Nanočástice stříbra v transmisním elektronovém mikroskopu (převzato z [49])

Lin a kol. (2008) představili elektrodu modifikovanou koloidními stříbrnými nanočásticemi. Tato elektroda byla připravena pro detekci cytochromu C. Výsledky ukázaly, že koloidní stříbrné nanočástice zlepšily proces přenosu signálu mezi cytochromem C a elektrodou ve srovnání s nemodifikovanou stříbrnou elektrodou. Elektroda modifikovaná koloidními stříbrnými nanočásticemi také vykazovala relativně vysokou citlivost, stabilitu a dlouhou životnost. Tato metoda byla tedy označena jako vhodná pro stanovení cytochromu C [48].

Chen a kol. (2011) modifikovali skleněnou uhlíkovou elektrodu stříbrnými nanočásticemi. Tuto modifikovanou elektrodu použili pro detekci H_2O_2. Takto sestrojený senzor vykazoval výbornou katalytickou aktivitu a je tedy vhodný pro detekci H_2O_2 [50].

Důležitým aspektem při využití stříbrných nanočástic je jejich stabilizace. Z testovaných látek vykazuje vysokou schopnost stabilizace nanočástic stříbra zejména anionický tenzid SDS, dále pak želatina či kasein [51].

5.3.4. Křemenné nanočástice

Křemenné nanočástice vynikají v široké konkurenci nanočástic především díky vlastnostem jako jsou fotostabilita a jednoduchost povrchové modifikace různými funkčními skupinami. Této povrchové modifikace se využívá pro následnou biokonjugaci. Dále také velikost částic lze přizpůsobit specifickým požadavkům jednotlivých biologických aplikací [35].

Nevýhodou křemenných nanočástic je tendence ireverzibilního shlukování se a tvorba nespecifických vazeb. Tvorba shluků a nespecifických vazeb může vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům [35].

Experimentální výsledky ukazují, že křemenné nanočástice lze využít i pro imobilizaci enzymů. Imobilizované enzymy na povrchu nanočástic vykazují výbornou enzymovou aktivitu v příslušných reakcích. Takovýto biochemický povrch nanočástic demonstruje užitečnost a další možnost využití nanočástic pro biosenzory a další aplikace [52].

Současná výroba křemenných nanočástic je velmi drahá a procesy probíhající při výrobě jsou náročné na energii a nebezpečné s ohledem na životní prostředí. Vzhledem k vzrůstající poptávce po křemenných nanočásticích pro nové aplikace je žádoucí hledat alternativní cestu výroby křemíku. Výskyt křemíku v široké škále biologických systémů je znám již dlouho. Jde především o biomineralizaci křemíku v rozsivkách (jednobuněčné fotosyntetické organismy). Tato biomineralizace rozsivek vede k tvorbě mnoha stupňovitě rozvrstvených nanostruktur křemíku. Tento proces inspiroval vědce k rozsáhlým studiím pro přípravu podobně strukturovaného křemíku v laboratořích. Ačkoliv je známo více než 10 000 druhů rozsivek, napodobit biomineralizaci křemíku *in vitro* je stále vědecká výzva [53].

Dalším příkladem biomineralizace křemenu je jeho příprava z buněčné stěny rýžových slupek (RHs) (Obr. č. 11). Ačkoliv struktury křemíku z RHs jsou mikroskopicky hůře pozorovatelné než struktury křemíku z rozsivek, obrovské

množství RHs biomasy nabízí příležitost pro masovou produkci nanostruktur křemíku [53].

Obr. č. 11 Biomineralizace křemenu z rýžových slupek (převzato z [53])

Ru-Ping a kol. (2012) představili nový typ elektrody modifikované multistěnnou uhlíkovou nanotrubicí a křemičitými nanočásticemi. Touto modifikovanou elektrodou detekovali např. α-fetoprotein. Výsledky ukázaly, že tato metoda nabízí ultrasenzitivní detekci α-fetoproteinu a je vhodná pro komplexní vzorky [54].

Fengli Yu a kol. (2011) popsali citlivý a stabilní senzor pro stanovení nádorových buněk založený na zesílení signálu rutheniem II kovalentně navázaným na Si nanočástice. Vazba křemenné nanočástice na elektrodu zvýšila citlivost detektoru. Senzor vykazuje vynikající reprodukovatelnost a především vysokou spolehlivost [55].

5.3.5. Fe_3O_4 nanočástice

Magnetické nanočástice jsou důležitým materiálem jak pro praktické aplikace nanotechnologií, tak pro výzkum [56]. Magnetické nanočástice si získaly svou oblibu především díky jejich dobré biokompatibilitě, silným superparamagnetickým vlastnostem, nízké toxicitě a snadné přípravě. Magnetické nanočástice jsou připravovány mikroemulzí z metakrylové kyseliny a hydroxyethylmetakrylátu [57]. Přesto však stabilita a biokompatibilita magnetitu jsou nižší než například stabilita a biokompatibilita zlatých nanočástic. Proto bývají Fe_3O_4 nanočástice často využity pro spojení se zlatými nanočásticemi [56].

Wenbin Liang a kol. (2010) využili spojení Fe_3O_4 a zlatých nanočástic pro konstrukci imunosenzoru pro detekci α-fetoproteinu (AFP). AFP je dobře známý

nádorový marker, který se využívá pro diagnostiku hepatocelulárního karcinomu (HCC). Výsledky ukázaly, že tato metoda umožňuje jednoduché a efektivní stanovení α-fetoproteinu i dalších biologicky významných látek [56].

Magnetické nanočástice našly své uplatnění také při detekci biofenolu A. Biofenol A si získal svou pozornost díky jeho negativnímu účinku na endokrinní systém a jeho možným toxickým účinkům na životní prostředí a zdraví člověka. Detekce Biofenolu A se provádí v klinických a potravinových vzorcích a dále ve vzorcích vody. Biofenol A je tradičně detekován chromatografickými technikami, hmotnostní spektrometrií, kapilární elektroforézou a mikroextrakcí tuhou fází. Tyto metody jsou časově náročné a nevyhovující. Elektrochemický senzor modifikovaný Fe_3O_4 nanočásticemi nabízí rychlou a citlivou amperometrickou detekci přímo v místě výskytu Biofenolu A. Doba odezvy biosenzoru je méně jak 30 sekund [58].

Fe_3O_4 nanočástice byly také využity pro detekci prostatického specifického antigenu (PSA) v klinických vzorcích. Elektrochemický imunosenzor se skládal z polyethylenglykolu a kyseliny mléčné (PEGePLA), dále z Fe_3O_4 nanočástic a imobilizované sekundární protilátky (Ab2). Tento jednoduchý a citlivý imunosenzor může najít své široké uplatnění v klinické analýze pro detekci různých nádorových markerů [59].

5.3.6. Fluorescenční nanočástice

Tradiční fluorescenční barviva jako je fluorescein, rhodamin a další jsou nejčastěji používanými fluorescenčními činidly, avšak jejich nízká intenzita fluorescence a nízká fotostabilita nedovolují využití fluorescenčních barviv pro vysoce citlivou detekci a monitorování v reálném čase. Naproti tomu nedávno objevené fluorescenční latexové nanočástice, fluorescenční křemenné nanočástice a tzv. kvantové tečky by mohly nahradit stávající fluorescenční barviva při biologické detekci [60].

5.3.6.1. Fluorescenční latexové nanočástice

Fluorescenční latexové nanočástice stejně jako polystyrenové nanočástice či metakrylové nanočástice již byly vyzkoušeny v některých biologických analýzách [60]. Biologický dopad fluorescenčních latexových nanočástic byl zkoumán na sladkovodních rybách Medaka (Oryzias latipes) [61]. Jejich hydrofóbnost,

agregace, příliš velká velikost (>100 nm), bobtnavé vlastnosti a barevný rozptyl však brání širšímu využití fluorescenčních latexových částic pro bioanalýzu [60].

5.3.6.2. Fluorescenční křemenné nanočástice

Fluorescenční křemenné nanočástice jsou vysoce hydrofilní a jednoduché na separaci, povrchovou úpravu a značení. Nabízejí několik základních výhod: vysokou intenzitu fluorescence, dobrou fotostabilitu a dobrý potenciál pro povrchové modifikace s různými biomolekulami. Fluorescenční křemenné nanočástice se připravují začleněním křemenných nanočástic do fluorescenční barvy při jejich tvorbě nebo při připojení fluorescenční barvy na povrch částice [60].

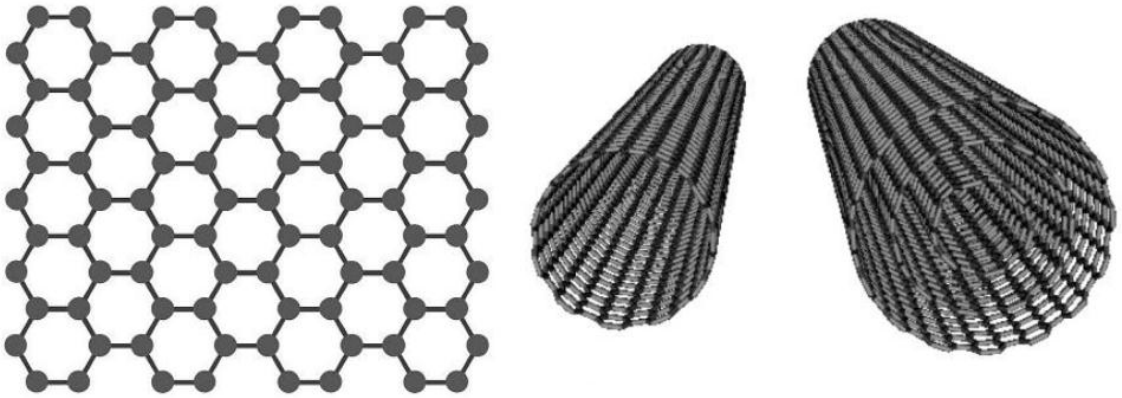
Gang Wang a kol. (2008) popsali elektrodový senzor modifikovaný fluorescenčními křemennými nanočásticemi. Tento biosenzor testovali pro detekci glukózy. Výsledné hodnoty ukázaly, že elektroda modifikovaná Si nanočásticemi vykazuje lepší citlivost, selektivitu a stabilitu než elektroda bez modifikace. Celý biosenzor je vhodný pro miniaturizaci a umožňuje tedy další zkoumání pro využití *in vivo* [62].

Fluorescenční křemenné nanočástice byly využity jako pomocníci při přenosu léčiv do buněk díky své malé velikosti pod 300 nm. Jejich velikost jim také umožňuje vmezeření do buněčné membrány a následnou lokalizaci absorbovaného léku [63].

5.4. Uhlíkové nanotrubice

Uhlíkové nanotrubice jsou struktury, které se skládají pouze z uhlíku. Jsou uspořádány do tvaru trubky, který vznikne stočením grafenového listu [64]. Existují dva typy uhlíkových nanotrubic. Prvním typem jsou jednostěnné (SWCNTs), druhým typem jsou vícestěnné nanotrubice (MWCNTs) [65] (Obr. č. 12). Mezi ceněné mechanické vlastnosti patří silná vazebnost mezi uhlíkovými atomy, pružnost nanotrubic, ale i pevnost materiálu. Elektrochemické vlastnosti závisí na prostorovém uspořádání nanotrubic. Mohou se chovat jako vodiče, polovodiče nebo i izolátory. Velkou výhodou uhlíkových nanotrubic z hlediska využití v biosenzorech jsou elektrochemické vlastnosti uhlíkových nanotrubic a schopnost

vázat na sebe biomolekuly. Schopnost vázat na sebe molekuly vyvolává změnu vodivosti CNTs. Tato změna vodivosti je principem pro detekci látek [64].



Obr. č. 12 Zleva struktura grafenu, SWCNT, MWCNT (převzato z [64])

První zpráva o uhlíkově elektrodě modifikované nanotrubicemi pro biodetekci byla založena na popisu rozptylu CNT a teflonového pojiva [66]. Uhlíkové nanotrubice hrají důležitou roli v elektronickém snímání DNA [33]. Dále mohou zvýšit přenos elektronů mezi elektroaktivním centrem biologických buněk a elektrodou [67]. Toho bylo využito například při monitorování účinnosti protinádorových léků na buňkách Leukemia K562 [33]. Dalším příkladem využití uhlíkových nanotrubic je detekce cholera toxinu. Tento elektrochemický imunosenzor se skládá ze snímací plochy složené z monoklonální protilátky proti podjednotce B cholera toxinu, který je spojený s poly(3,4-ethylendioxythiofenem) potaženým uhlíkovou nanotrubicí [33].

Senzor založený na CNTs byl využit také pro detekci antibiotik. Antibiotika jsou běžně a někdy i zbytečně přidávány do zvířecí potravy a pitné vody z důvodu prevence nemocí nebo pro podporu růstu hospodářských zvířat. Nadužívání antibiotik má dopad i na lidské zdraví, jelikož může způsobit rezistenci bakteriálních kmenů na tyto antibiotika. Na CNT-senzor byl navázán lehký řetězec variabilní oblasti protilátek (scFv). Tyto protilátky se váží na specifická antibiotika, což je v tomto případě enrofloxacin. Výsledky ukázaly, že senzor na bázi CNT překonává nevýhody dosud známých biosenzorů. Hlavní výhodou CNT-senzoru je časová nenáročnost výroby a jeho menší velikost v porovnání s jinými biosenzory [68].

Ahmadalinezhad a kol. (2011) navrhli senzor pro glukózu, který nepotřebuje žádný mediátor (Mediátory viz kapitola 5.2.). Tento glukózový biosenzor je založen na nedávno objeveném materiálu. Jde o tzv. buckypaper. Buckypaper je složen z tenkých membrán sítě uhlíkových nanovláken. Jako substrát byl vybrán titan díky své dobré vodivosti, biokompatibilitě a odolnosti vůči korozi. Takto vytvořený glukózový senzor vykazuje vysokou senzitivitu, stabilitu, selektivitu a reprodukovatelnost. Buckypaper otvírá dveře pro tvorbu stále sofistikovanějších elektrochemických biosenzorů pro medicinální diagnózy a pro sledování životního prostředí [69].

5.5. Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou polovodivé nanokrystaly o velikosti kolem 10 nm [70]. Mají podobné rozdělení energetických hladin srovnatelné s atomem, proto jsou někdy nazývány umělými atomy (artificial atoms) [71].

Mezi ceněné vlastnosti kvantových teček patří jejich skvělá fotostabilita. Lze s nimi pracovat v širokém rozmezí absorpčního spektra. Kvantové tečky mají schopnost excitovat všechny své barvy současně s jediným zdrojem světla excitace. Díky nim lze také minimalizovat autofluorescenci vzorku výběrem příslušné vlnové délky excitace [72]. Je ovšem nutno říci, že výsledná fotostabilita je značně závislá na zvoleném způsobu stabilizace kvantových teček a dále na složení okolního prostředí [70].

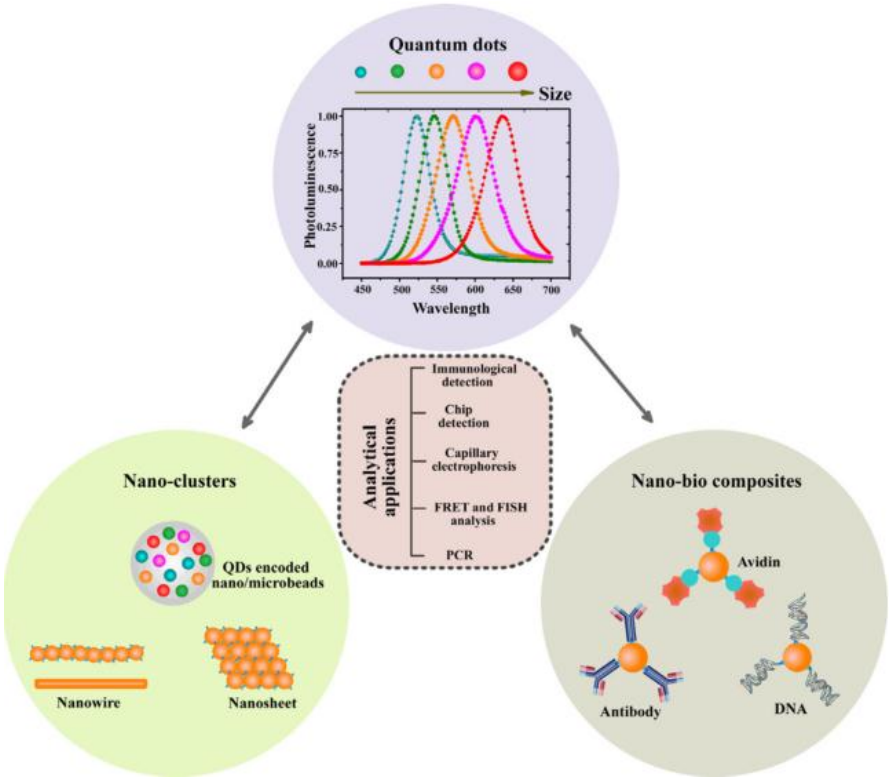
Spornou otázkou u kvantových teček bývá jejich potenciální cytotoxicita. Ačkoliv cytotoxicita například selenito-kademnatých a CdS QDs je již dávno prokázána, existují i buňky cytokompatibilní s CdSe kvantovými tečkami. Jedním z příkladů je cytokompatibilita CdSe kvantových teček s některými nádorovými buněčnými liniemi. Derfus M. Austin a kol. (2004) použili primární hepatocyty jako model jater a přišli na to, že jádra CdSe QDs byla za určitých podmínek akutně toxická. Zjistili, že cytotoxicita kvantových teček se mění v průběhu jejich tvorby, dále při vystavení ultrafialovému záření a při povrchové úpravě. Dále odhalili, že cytotoxicita koreluje s uvolňováním volných kademnatých iontů díky poškození mřížky selenidu kademnatého [73].

I přesto, že cytotoxické vlastnosti kvantových teček přímo neohrožují organismus, je žádoucí snižovat toxické účinky QDs. Jednou z možností jak snížit toxicitu

kvantových teček je povrchová úprava např. silikonem. Silikon není toxický a je finančně poměrně snadno dostupný. Syntéza silikonových a germaniových kvantových teček nabývá v posledních několika letech velkého významu [74].

Navíc dlouhá inkubace kvantových teček může měnit zeta potenciál v živých buňkách na nižší negativní hodnotu. Toto snížení zeta potenciálu může způsobit nežádoucí oxidační účinky na buňky [75].

Kvantových teček se využívá při imunochemických stanoveních ELISA metodami [71],[76]. Jejich schopnost emitovat při různých vlnových délkách umožňuje stanovit v jednom kroku současně několik analytů [70]. Kromě imunochemických stanovení lze kvantové tečky aplikovat i při kapilární elektroforéze a metodě PCR (Obr. č. 13) [76].



Obr. č. 13 Vlastnosti kvantových teček a jejich analytické aplikace (převzato z [76])

Další z metod je také analýza v čipu. Pomocí této metody byly již rozsáhle detekovány nukleové kyseliny a proteiny. Tennico a kol. (2010) využili čipovou analýzu pro detekci trombinu [76]. Jokerst a kol. (2009) popsali začlenění QDs do tzv. „nano-bio-chip“ (NBC) systému pro měření tří známých biomarkerů rakoviny: CEA (karcinoembryogenní antigen), CA125 (kancerogenní antigen) a Her-2/Neu

(prsní nádorový marker, více viz dále). Tento NBC systém umožňuje citlivou a specifickou diagnostiku karcinomu jak z krevního séra, tak ze vzorku slin [77].

Kvantové tečky lze také využít ve spojení s elektrodami. QDs excitované elektromagnetickým zářením v blízkosti elektrody mohou vytvářet redoxní řetězec transportující elektrony z vhodného redukčního činidla v roztoku na elektrodu. Redukčním činidlem bývá kyselina askorbová, glutathion nebo acetylcholin. Vzniká tak řetězec redukční činidlo – kvantová tečka – elektroda. Tímto řetězcem jsou přenášeny elektrony a je měřen elektrický proud. Velikost proudu je závislá na intenzitě osvětlení elektrody kvantovými tečkami a na rychlosti transportu redukčního činidla na povrchu elektrody. Rychlost transportu ovlivňuje například změna koncentrace redukčního činidla v roztoku nebo změna difúzní vrstvy elektrody. Změnou difúzní vrstvy elektrody se rozumí např. imobilizace protilátky, vazba antigen nebo adsorpce buněk. Tohoto principu se využívá při konstrukci nových typů biosenzorů [70].

Shi Lifang a kol. (2007) popsali vývoj luminiscenčních sond s kvantovými tečkami pro enzymatickou aktivitu a pro screening enzymových inhibitorů. Základ luminiscenčních sond představuje fluorescenční resonanční energetický přenos (FRET) mezi luminiscenčními kvantovými tečkami, které slouží jako donory a rhodaminem, který slouží jako akceptor. Rhodamin je imobilizován na povrchu kvantových teček pomocí peptidových vazeb. Takto připravená FRET QDs sonda může být využita ke zjištění množství enzymu a k testům inhibice enzymů. Sonda byla poprvé využita pro testování enzymatické aktivity trypsinu a pro ověření účinnosti inhibitorů trypsinu [78].

Liu a kol. (2005) navrhli skleněnou uhlíkovou elektrodu modifikovanou kvantovými tečkami. Kvantové tečky byly vytvořeny z $CdCl_2$ a Na_2S. Tuto modifikovanou elektrodu použili ke stanovení hemoglobinu. Měření bylo provedeno jak pomocí cyklické voltametrie tak průtokovou injekční analýzou. Výsledky poukazovaly na vysokou stabilitu, selektivitu a reprodukovatelnost modifikované elektrody. Tato metoda by mohla napomoci k praktickému, spolehlivému a pohodlnému stanovení Hb ve vzorku [79].

Wu a kol. (2007) použili imunosenzor na bázi kvantových teček (CdSe a ZnS) pro detekci proteinového biomarkeru interleukinu-1α (IL-1α). IL-1α je cytokin zapojený

do mnoha imunitních reakcí, zánětlivých procesů, hematopoézy, nociceptivní neurotransmise a dalších. IL-1α je důležitý pro zahájení a průběh zánětlivých a infekčních onemocnění. QDs byly použity jako značky pro anti-IL-1α protilátky. Principem detekce je sendvičová reakce mezi primární anti-IL-1α protilátkou (imobilizovanou na avidin-modifikovaných magnetických kuličkách), IL-1α a kvantovými tečkami označenou sekundární protilátkou. Ke kvantifikaci koncentrace IL-1α byla použita elektrochemická rozpouštěcí analýza zachycených QDs. Takto konstruovaný imunosenzor umožňuje jednoduché, rychlé, efektivní, selektivní a citlivá měření IL-1α a otevírá dveře pro detekci dalších biomarkerů [80].

6. Závěr

Biosenzory jsou v současné době prudce se rozvíjející oblastí zejména v analytické chemii a lékařské diagnostice. Senzory lze rozdělit podle biologické složky a podle typu detekce. Dělení podle biologické složky zahrnuje enzymové biosenzory, tkáňové a mikrobiální biosenzory, DNA biosenzory a imunosenzory. Imunosenzory, které pracují na interakci antigen-protilátka, nacházejí široké uplatnění již v současnosti a do budoucna se jeví jako velmi perspektivní při současném trendu, kterým je snaha o co nejnižší mez detekce.

Z hlediska typu detekce je ve spojení s biosenzory hojně využívaná a osvědčená elektrochemická detekce. Existuje několik typů elektrochemických biosenzorů: potenciometrické, amperometrické, konduktometrické a voltametrické senzory. Nejvíce využívanými senzory jsou biosenzory potenciometrické a voltametrické.

Amplifikace signálu se provádí za účelem stanovení látky v nižších koncentracích, než bylo doposud možné a zároveň umožňuje stanovovat látky v biologických vzorcích, které jsou komplexní a mohou způsobovat nežádoucí interference. Je známa řada látek a postupů, kterými lze amplifikovat signál při elektrochemické detekci. První možností je modifikace povrchu elektrod. Elektrody lze modifikovat různými látkami jako je oxovanadiový komplex, deriváty nitrofluorenonu, navázání pruské modři na povrch elektrody, použití hexakyanoželeznatanu kobaltnatého a další. Druhou možností je použití mediátoru jako je ferrocen, indigokarmín nebo thionin. Třetí možností jsou nanočástice, které v současnosti zažívají velký boom. Nanočástice mohou být tvořeny z platiny, zlata, stříbra, křemíku a jiných materiálů. Lze také využít nanočástice ve spojení s fluorescenčními barvivy. Poslední možností, která je v této bakalářské práci uvedena, jsou kvantové tečky.

Všechny uvedené modifikace mají za úkol napomáhat při detekci látek v menším množství biologického materiálu a zároveň umožňují snížit mez detekce při jejich stanovení v biologických vzorcích.

Použitá literatura

[1] Skládal Petr, *Biosenzory,* Brno (2002)

[2] Pohanka M. a kol., Imobilizace acetylcholinesterasy a konstrukce elektrochemického biosenzoru pro stanovení toxických organofosfátů, *Vojenské zdravotnické listy* 3 (2010), 105-110

[3] Josef Trögl, Biosenzory, *Automa* 4 (2006)

[4] http://dipcia.unica.it/superf/researchsensors_0.html, převzato dne 28.6.2012

[5] Bansi D. Malhotra a Asha Chaubery, Biosensors for clinical diagnostics industry*, Sensors and Actuators B: Chemical* 91 (2003), 117-127

[6] Jiehua Lin a Huangxian Ju, Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005), 1461–1470

[7] Jeremy M. Fowler a kol., Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors, *Elektrochemical senzors, biosenzors and thein biomedical applications* (2008), 115-140

[8] Privett J. Benjamin a kol., Elektrochemical senzors *, Analytical Chemistry* 82 (2010), 4723–4741

[9] You Wang a kol., Electrochemical Sensors for Clinic Analysis, *Sensors* 8 (2008), 2043-2081

[10] Laborda E. a kol., Electrode modification using porous layers. Maximising the analytical response by choosing the most suitable voltammetry: Differential Pulse vs Square Wave vs Linear sweep voltammetry, *Electrochimica Acta* 73 (2012), 3-9

[11] Bard J. Allen, Chemical modification of eletrodes, *Journal of Chemical Education* 4 (1983), 302-304

[12] D. Ravi Shankaran a kol., Amperometric sensor for thiosulphate based on cobalt hexacyanoferrate modified electrode, *Sensors and Actuators B* 86 (2002), 180–184

[13] Thomas J. Rabbow a kol., Surface modification of electrodes for biosensor applications,http://www.ikts.fraunhofer.de/en/Images/32_Surface%20modification%20of%20electrodes%20for%20biosensor%20applications_tcm244-102388.pdf, převzato dne 16.6.2012

[14] S. Zhang a kol., Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosensors and Bioelectronics* 5-6 (2000), 273–282

[15] Marcos F.S. Teixeira et al., Sensor for cysteine based on oxovanadium(IV) complex of Salen modified carbon paste electrode, *Sensors and Actuators B* 106 (2005), 619–625

[16] N. Mano, A. Kuhn, Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors, *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001), 653–660

[17] D. Jayasri a S. Sriman Narayanan, Amperometric determination of hydrazine at manganese hexacyanoferrate modified graphite–wax composite electrode, *Journal of Hazardous Materials* 144 (2007), 348–354

[18] Mohammad Hasanzadeh a kol., Cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode as a biosensor for electrooxidation and determination of some amino acids, *Analytical Biochemistry* 389 (2009), 130–137

[19] Qinfeng Liu, Jon R. Kirchhoff, Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 601 (2007), 125–131

[20] Ping Zhang a kol., Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid at multi-walled carbon nanotube modified gold electrode, *Bioelectrochemistry* 67 (2005), 109–114

[21] Jung A Lee a kol., An electrochemical impedance biosensor with aptamer-modified pyrolyzed carbon electrode for label-free protein detection, *Sensors and Actuators B: Chemical* 129 (2008), 372-379

[22] M. Díaz-González a kol., Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin modified screen-printed carbon electrodes, *Talanta* 2 (2005), 565-573

[23] Na Young Shim a kol., All-Plastic Electrochemical Transistor for Glucose Sensing Using a Ferrocene Mediator, *Sensors* 9 (2009), 9896-9902

[24] Liying Jiang a kol., A sensitive biosensor based on Os-complex mediator and glucose oxidase for low concentration glucose determination, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 619–620 (2008), 11–16

[25] Mohammad Mazloum-Ardakani a kol., Homogeneous and nanomolar detection of hydrazine by indigocarmine as a mediator at the surface of TiO2 nanoparticles modified carbon paste electrode, *Chinese Chemical Letters* 23 (2012), 213–216

[26] Keisuke Ueda a kol., Tris(2-ethylhexyl)phosphine oxide as an effective solvent mediator for constructing a serotonin-selective membrane electrode, *Analytica Chimica Acta* 565 (2006), 36–41

[27] Chun-Fang Tang a kol., Zinc oxide/redox mediator composite films-based sensor for electrochemical detection of important biomolecules, *Analytical Biochemistry* 380 (2008), 174–183

[28] Ta-Jen Li a kol., Fabrication of a polymer/mediator composite modified electrode and its application to electrochemical detection of iodate*, Procedia Engineering* 25 (2011), 1453 -1456

[29] Hyung Joo Kim a kol., Performance of an electrochemical sensor with different types of liposomal mediators for the detection of hemolytic bakteria, *Sensors and Actuators B* 119 (2006), 143–149

[30] Juanjuan Lu a kol., Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on Au nanoparticles dotted carbon nanotube–graphene composite and functionalized mesoporous materials, *Biosensors and Bioelectronics* 33 (2012), 29–35

[31] Hong Lin a kol., Thionin attached to a gold electrode modified with self-assembly of Mo6S9−XIX nanowires for amplified electrochemical detection of natural DNA, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), 1866–1870

[32] Přikryl Jan a kol., Využití nanočástic ve fluorescenční mikroskopii a Ramanově spektrometrii,http://www.nanocon.cz/data/nanocon2009/sbornik/Lists/Papers/095.pdf, (převzato dne 2.3.2012)

[33] Pumera M. a kol., Electrochemical nanobiosensors, *Sensors and Actuators B* 123 (2007), 1195–1205

[34] Guodong Liu, Yuehe Lin, Nanomaterials labels in electrochemical immunosenzors and immunoassays, *Talanta* 74 (2007), 308–317

[35] Rahul P. a kol., Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding, *Langmuir* 22 (2006), 4357-4362

[36] Zhiqian Jia a kol., Preparation of nanoparticles with a semi-batch gas–liquid membrane contactor, *Chemical Engineering and Processing* 50 (2011), 810–814

[37] Won San Choi a kol., Synthesis of Two Types of Nanoparticles in Polyelectrolyte Capsule Nanoreactors and Their Dual Functionality, *Americal Chemical Society* 127 (2005), 16136–16142

[38] Tereza Válová, Vliv nanočástic stříbra na proces klíčení, Univerzita Palackého, Olomouc (2011), 13, http://theses.cz/id/9fb3c2/diplomka__final_pro_PDF_do_clanku.pdf, (převzato dne 26.6.2012)

[39] Hrapovic S. a kol., Electrochemical Biosensing Platforms Using Platinum Nanoparticles and Carbon Nanotubes, *Analytical Chemistry* 76 (2004), 1083–1088

[40] Yi-Jae Lee a Jae-Yeong Park, Nonenzymatic free-cholesterol detection via a modified highly sensitive macroporous gold electrode with platinum nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010), 1353–1358

[41] Xinhuang Kang a kol., Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol–gel chitosan/silica hybrid, *Talanta* 74 (2008), 879–886

[42] Ningning Zhu a kol., Electrochemical DNA biosensors based on platinum nanoparticles combined carbon nanotubes, *Analytica Chimica Acta* 1 (2005), 21–26

[43] Zhengzhi Yin a kol., Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), 1890–1894

[44] Wang Libing a kol., Nanoparticles-based environmental sensors, *Materials Science and Engineering R* 70 (2010), 265–274

[45] Rusling J. F. a kol., Designing nanomaterial-enhanced electrochemical immunosensors for cancer biomarker proteins, *Bioelectrochemistry* 76 (2009), 189–194

[46] Dianping Tang, New amperometric and potentiometric immunosensors based on gold nanoparticles/tris(2,2′-bipyridyl)cobalt(III) multilayer films for hepatitis B surface antigen determinations, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005), 539–548

[47] Dong-Min Kim a kol., Immunosensors for detection of Annexin II and MUC5AC for early diagnosis of lung cancer, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009), 456–462

[48] Li Lin a kol., Colloidal silver nanoparticles modified electrode and its application to the electroanalysis of Cytochrome c, *Electrochimica Acta* 53 (2008), 5368–5372

[49] http://www.nanotrade.cz/produkty/produkty-s-antibakterialnimi-ucinky-2 (převzato dne 26.6.2012)

[50] Huihui Chen a kol., A hydrogen peroxide sensor based on Ag nanoparticles electrodeposited on natural nano-structure attapulgite modified glassy carbon electrode, *Talanta* 86 (2011), 266–270

[51] Libor Kvítek a kol., Nanočástice stříbra - příprava, vlastnosti a aplikace , http://www.nanocon.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/008.pdf (převzato dne 15.4.2012)

[52] Qhobosheane M. a kol., Biochemically functionalized silica nanoparticles, *Analyst* 126 (2001), 1274–1278

[53] Weixing Wang a kol., Silica Nanoparticles and Frameworks from Rice Husk Biomass, *American Chemical Society* 4 (2012), 977−981

[54] Ru-Ping Liang, A label-free amperometric immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on highly ordered porous multi-walled carbon nanotubes/silicananoparticles array platform, *Sensors and Actuators B: Chemical* 166-167 (2012), 569–575

[55] Feng li Yu a kol., An electrochemiluminescence aptasensor for tumor cells assay based on signal amplification of Ru(II) covalently doped silica nanoparticles, *Electrochemistry Communications* 13 (2011), 1244–1247

[56] Wenbin Liang et al., A novel magnetic Fe3O4 gold composite nanomaterial: Synthesis and application in regeneration-free immunosensor, *Materials Letters* 64 (2010), 2616–2619

[57] Dresco P.A. a kol., Preparation and properties of magnetite 259 and polymer magnetite nanoparticles, *Langmuir* 15 (1999), 1945–51

[58] Alkasira a kol., Enzyme functionalized nanoparticles for electrochemical biosensors: A comparative study with applications for the detection of bisphenol A, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010), 43–49

[59] Qin Wei a kol., Fe3O4 nanoparticle s-loaded PEG ePLA polymeric vesicles as labels for ultrasensitive immu nosensors, *Biomaterials* 31 (2010), 7332-7339

[60] Michihiro Nakamura a kol., Synthesis, Characterization, and Biological Applications of Multifluorescent Silica Nanoparticles, *Analytical Chemistry* 79 (2007), 6507–6514

[61] Masahiko Manabe a kol., Uptake, excretion and toxicity of nano-sized latex particles on medaka (Oryzias latipes) embryos and larvae, *Aquatic Toxicology* 105 (2011), 576– 581

[62] Gang Wang a kol., Fluorescent Si nanoparticle-based electrode for sensing biomedical substances, *Optics Communications* 281 (2008), 1765–1770

[63] Hui Li a kol., In situ route to novel fluorescent mesoporous silica nanoparticles with 8-hydroxyquinolinate zinc complexes and their biomedical applications, *Microporous and Mesoporous Materials* 151 (2012), 293–302

[64] Hana Kynclová, Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pro elektrochemické biosenzory, Vysoké učení technické v Brně (2012), 14-15

[65] S. Laschi a kol., Disposable electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes for biosensor applications, *ITBM-RBM* 29 (2008), 202–207

[66] Wang J., Musameh M., Carbon/nanotube teflon composite electrochemical senzors and biosenzors, *Analytical Chemistry* 75 (2003), 2075–2079

[67] J. Chen a kol., Electrochemical antitumor drug sensitivity test for leukemia K562 cells at a carbon-nanotube-modified electrode, *Chemistry-A European Journal* 11 (2005), 1467–1472

[68] Kim Byeongju a kol., Family-selective detection of antibiotics using antibody-functionalized carbon nanotube sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2012), 193-199

[69] Asieh Ahmadalinezhad a kol., Mediator-free electrochemical biosensor based on buckypaper with enhanced stability and sensitivity for glucose detection, *Biosensors and Bioelectronics* 30 (2011), 287–293

[70] Antonín Hlaváček a Petr Skládal, Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii, *Chemické listy* 105 (2011), 611-615

[71] Truhlář Michal, Kvantové tečky a jejich využití, http://mealtiner.net/Publikace/tecky.pdf (převzato dne 16.6.2012)

[72] Xingyong Wu a kol., Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nature biotechnology* 21 (2003), 41-46

[73] Austin M. Derfus a kol., Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots, *Nano Letters* 4 (2004), 11–18

[74] Shiohara Amane a kol., Chemical Reactions on Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots, *American Chemical Society* 132 (2010), 248–253

[75] Rafael B. Lira a kol., Non-specific interactions of CdTe/Cds Quantum Dots with human blood mononuclear cells, *Micron* 43 (2012), 621–626

[76] Kuang Hua a kol., Recent developments in analytical applications of quantum dots, *Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011), 1620-1636

[77] Jesse V. Jokerst a kol., Nano-bio-chips for high performance multiplexed protein detection: Determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009), 3622–3629

[78] Lifang Shi a kol., Luminescent Quantum Dots Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Probes for Enzymatic Activity and Enzyme Inhibitors, *Analytical Chemistry* 79 (2007), 208-214

[79] Meichuan Liu a kol., Quantumdots modified electrode and its application in electroanalysis of hemoglobin, *Electrochemistry Communications* 8 (2006), 305–310

[80] Hong Wu a kol., Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1α, *Electrochemistry communications* 7 (2007), 1573-1577

Zkratky

DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent-Assay)
ISE	iontově-selektivní elektroda
DMPV	diferenční multi-pulsní voltametrie
SWV	square wave voltametrie
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PEGDGE	poly(ethylenglykol)diglycidyl ether
FAD	Flavin adenin dinukleotid
EDOT	3,4-ethylendioxythiofen
PEDOT	poly(3,4,-ethylendioxythiofen)
hCG	lidský choriový gonadotropin
MWCNTs	vícevrstvé uhlíkové nanotrubice
Ab1	primární protilátka
MCM-41	křemičité mezoporézní nanočástice
AuNPs	zlaté nanočástice
Ab2	sekundární protilátka
HRP	křenová peroxidáza
PEMR	Polyelectrolyte multilayer reactor
PtNPs	platinové nanočástice
IgG	imunoglobulin G
GSH-AuNP	elektroda ze zlatých nanočástic vázaných na glutathionu

HBsAg	povrchový antigen hepatitidy B
MUC5AC	gen pro mucin-5AC
SDS	dodecylsulfát sodný
RHs	buněčná stěna rýžových slupek
AFP	α-fetoprotein
HCC	hepatocelulární karcinom
PSA	prostatický specifický antigen
PEGePLA	polyethylenglykol a kyselina mléčná
QDs	kvantové tečky
SWCNTs	jednostěnné uhlíkové nanotrubice
CNT	uhlíkové nanotrubice
scFv	lehký řetězec variabilní oblasti protilátek
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
NBC	„nano-bio-chip
CEA	karcinoembryogenní antigen
CA125	kancerogenní antigen
Her-2/Neu	prsní nádorový marker
FRET	fluorescenční resonanční energetický přenos
Hb	hemoglobin
IL-1α	interleukin-1α