UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018 Dominika Josefová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití grafenu v oblasti biosenzorů

Dominika Josefová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Dominika Josefová**
Osobní číslo:	**C15218**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Klinická biologie a chemie**
Název tématu:	**Využití grafenu v oblasti biosenzorů**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

1) Obecný úvod o grafenu, o jeho vlastnostech a možnostech přípravy.
2) Stručná rešerše o rozdělení biosenzorů se zaměřením na elektrochemické imunosenzory, v nichž je grafen využíván.
3) Část shrnující informace o konkrétních aplikacích grafenu v elektrochemické detekci se zaměřením na analýzu proteinů.

Rozsah grafických prací:	**dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:	
Forma zpracování bakalářské práce:	**tištěná**
Seznam odborné literatury:	

Původní vědecké práce zařazené v databázích WOS, SCOPUS apod.

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

Datum zadání bakalářské práce:	**27. listopadu 2017**
Termín odevzdání bakalářské práce:	**4. července 2018**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

v z. Hunt

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne ……..

Podpis: ……

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a Mgr. Anetě Kovářové za odborné vedení a konzultování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům a blízkým za morální a materiální podporu, které se mi dostávalo po celou dobu studia.

ANOTACE

Hlavní náplní práce je popsání základních vlastností grafenu, postupu jeho výroby a možností aplikací. Grafen je v poslední době používán převážně k modifikaci elektrod v elektrochemických imunosenzorech, kde slouží k amplifikaci signálu ve spojení s vhodnou generující značkou nejen pro detekci proteinů.

KLÍČOVÁ SLOVA

grafen, oxid grafenu, modifikace elektrody, imunosenzor

TITLE

Use of graphene in the field of biosensors.

ANNOTATION

The main task of this thesis is to describe the basic properties of graphene, the process of its production and the possibilities of its applications. Graphene has recently been used primarily to modify electrodes in electrochemical immunosensors, where it serves to amplify the signal in conjunction with a suitable generic tag not only for protein detection.

KEYWORDS

graphene, graphene oxide, electrode modification, immunosensor

Obsah

ÚVOD 10

1 Uhlík 11

1.1 Diamant 11

1.2 Grafit 11

1.3 Uhlíkové nanomateriály 12

1.3.1 Fullereny 13

1.3.2 Uhlíkové nanotrubice 13

1.3.3 Grafen 14

1.4.3 Oxid grafenu 17

2 Příprava grafenu 18

3 Biosenzory 22

3.1 Definice biosenzoru 22

3.2 Rozdělení biosenzorů na základě fyzikálně-chemického převodníku 23

3.2.1 Elektrochemické biosenzory 23

3.2.2 Optické biosenzory 25

3.3 Rozdělení biosenzorů podle biologické složky 25

3.3.1 Enzymové biosenzory 25

3.3.2 Imunosenzory 25

4 Aplikace grafenu v elektrochemické detekci proteinů 27

5 Závěr 40

6 Použitá literatura 41

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1- Struktura diamantu 11

Obrázek 2 - Hexagonální struktura grafitu 12

Obrázek 3 - Struktura fullerenů 13

Obrázek 4 - a) struktura SWNT, b) struktura MWNT 14

Obrázek 5 - Rozmístění elektronů v okolí atomu C ve struktuře grafenu 15

Obrázek 6 - Struktura jednovrstvého grafenu 15

Obrázek 7 - Struktura vícevrstvého grafenu 15

Obrázek 8 - Struktury grafenu, oxidu grafenu a redukovaného oxidu grafenu 17

Obrázek 9 - Mechanismus mechanické exfoliace 18

Obrázek 10 - Schéma biosenzoru 22

Obrázek 11 - Schéma elektrochemického imunosenzoru 26

Obrázek 12 - Schématické znázornění procesu výroby elektrochemického senzoru (au-GO) založeného na monoklonální anti-PSA protilátce imobilizované na AuGO elektrodě 29

Obrázek 13 - Schéma detekce AFP 30

Obrázek 14 - Schéma syntézy N-dopovaného pr-GO a schema detekce Troponinu 1 30

Obrázek 15 - Schéma úpravy povrchu GO nanočásticemi zlata 33

Obrázek 16 - Schéma konstrukce a detekce PSA pomocí rGO 35

Obrázek 17- Schéma konstrukce imunosenzoru pro detekci HSP70 38

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CNT	uhlíková nanotrubice (carbon nanotube)
SWNT	jednovrstvá uhlíková nanotrubice (single-walled carbon nanotube)
MWNT	vícevrstvá uhlíková nanotrubice (multi-walled carbon nanotube)
GO	oxid grafenu
rGO	redukovaný oxid grafenu
CVD	chemická depozice z plynné fáze (chemical vapor deposition)
LV	lineární voltametrie
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenčně pulsní voltametrie
Ab	protilátka
ELISA	enzymová imunoanalýza v heterogenním uspořádání (sandwich enzyme linked immunosorbent assay)
DNA	deoxy-ribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
LOD	limit detekce (limit of detection)
PSA	prostatický specifický antigen
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
HRP	křenová peroxidáza (horseradisch peroxidase)
GQD	grafenová kvantová tečka
SPCE	tištěná uhlíková elektroda (screen-printed carbon electrode)
ITO	elektroda z oxidu indito-číničitého
AuNPs	zlaté nanočástice (gold nanoparticles)
GC	skelný uhlík

Úvod

Uhlíkové nanomateriály se v posledních letech těší zájmu vědců, neboť díky jejich výjimečným vlastnostem mohou být uplatněny v mnoha oborech. Tyto struktury jsou podrobně studovány a z důvodu dvé netoxičnosti je pravděpodobná jejich aplikace ve zdravotnictví.

Grafen, jeden z uhlíkových nanomateriálů byl objeven poměrně nedávno. Jedná se o chemickou sloučeninu, která vyniká svými mechanickými, optickými či elektrickými vlastnostmi. V současné době je nejvíce využíván v elektronickém průmyslu jako součást baterií, ale je publikována celá řada prací o grafenu ve spojení s biosenzory. V elektrochemických imunosenzorech slouží k amplifikaci výsledného signálu ve spojení s vybranými značkami, případně jako značka samotná. Při jeho použití lze pro řadu proteinů dosáhnout nízkých limitů detekce, což v důsledku může přispět k včasné detekci různých typů onemocnění.

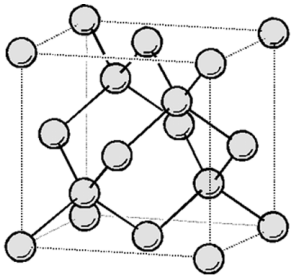
Tato práce popisuje vlastnosti grafenu, možnosti výroby a jeho aplikaci v elektrochemických imunosenzorech. Práce přehledně shrnuje použití grafenu k modifikaci elektrod při detekci proteinů, ale i jiných klinicky významných látek.

1 Uhlík

Uhlík je nepostradatelným chemickým prvkem pro existenci života na Zemi. Tvoří základní stavební kámen všech organických sloučenin. Četností výskytu v zemské kůře se jako prvek nachází na 17. místě. Navzdory jeho značnému rozšíření na Zemi, je možné nalézt jen dvě polymorfní modifikace jako minerály – grafit a diamant. Nicméně díky technologickému pokroku jsou vyvíjeny stále nové umělé modifikace uhlíku [1].

1.1 Diamant

Jak již bylo uvedeno, mezi nejvýznamnější modifikace uhlíku patří diamant. Vnitřní struktura je uspořádána do krystalové mřížky, která se skládá z 18 atomů uhlíku, kde se 8 atomů uhlíku nachází na vrcholech krychle, 6 ve středech stran a 4 se vyskytují uvnitř krychle. V této struktuře je každý atom uhlíku vázán kovalentní vazbou ke 4 atomům uhlíku, které jsou umístěny ve vrcholech čtyřstěnu [2]. Tato struktura je zobrazena na obrázku 1.



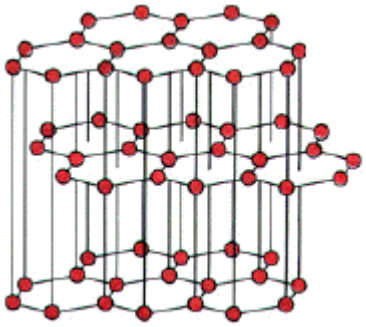
Obrázek 1- Struktura diamantu (převzato z [3])

Uspořádání atomů dává diamantu unikátní vlastnosti: výjimečnou tvrdost, nízkou stlačitelnost a tuhost. Diamant je do teploty 800 °C stálý, po překročení této teploty se začíná oxidovat na CO_2. Při zahřátí na 1500 °C bez přístupu kyslíku dochází k jeho přeměně na grafit [4]. Jeho reaktivita je nízká, jako inertní materiál reaguje jen v přítomnosti silných oxidačních činidel a za použití vysokých teplot. Syntetický diamant se dá vyrobit z grafitu působením vysokých teplot a tlaků a využívá se jako brusný materiál, zatímco přirozená forma se po vybroušení používá ve šperkařství [5].

1.2 Grafit

Další přírodní modifikací uhlíku je grafit, jehož struktura je tvořena vrstvami hexagonálně uspořádaných atomů uhlíku (obrázek 2). Je to rovinná molekula, v níž jsou jednotlivé atomy uhlíku od sebe vzdáleny 0,142 nm a jsou k sobě vázány silnými kovalentními vazbami. Jednotlivé hexagonální vrstvy jsou od sebe vzdáleny 0,335 nm vázající se mezi sebou slabými Van der Waalsovými silami, což je příčinou výborné štěpnosti a kluznosti grafitu. Grafit se

v přírodě nachází v ložiscích vázaný na pararuly, mramory, fylity a jiné. Jeho zisk z přírodních zdrojů je však nedostačující, a tak se vyrábí synteticky zahříváním koksu s křemenem za vysokých teplot. Na rozdíl od diamantu je velmi málo chemicky a mechanicky odolný. A to zejména díky své přístupnější vrstevnaté struktuře. Může tvořit interkalátové sloučeniny, které vznikají vmezeřením mezi jednotlivé vrstvy grafitu. Grafit je především využíván v papírenském průmyslu, kde slouží jako náplň do tužek [1, 6].



Obrázek 2 - Hexagonální struktura grafitu (převzato z [7])

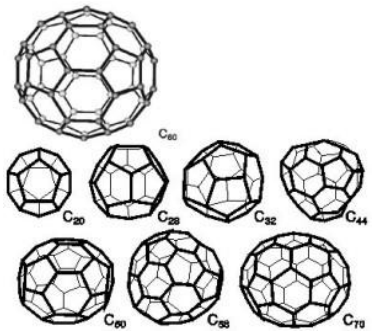
1.3 Uhlíkové nanomateriály

Nanomateriály provází lidstvo po staletí, nicméně jejich masivnímu rozšíření bránily nedostatečné znalosti o jejich struktuře. Situace se změnila s rozvojem mikroskopů, které mohou rozlišovat částice o velikosti atomů a umožnily tak bližší zkoumání nanomateriálů a jejich rozvoj. Studiem struktur o velikosti od 1 do 100 nanometrů a jejich možným využitím se zabývá obor nanotechnologie [8]. Uhlíkové nanomateriály se vyskytují v různých modifikacích a pro jejich vlastnosti (mechanické, optické, biologické) je lze využít v širokém spektru oblastí. Využití jejich vlastností je následující:

- Mechanické vlastnosti: jsou 3x pevnější než železo a zároveň velmi lehké, proto nachází uplatnění ve sportovním náčiní, součástkách do aut či letadel.
- Optické vlastnosti: některé uhlíkové nanostruktury mohou být opticky aktivní, této vlastnosti se poté využívá například ve zdravotnictví, kde se využívají jako součásti zobrazovacích přístrojů.
- Biologické vlastnosti: mohou být využívány jako účinné nosiče léčiv pro transport do zasažené tkáně.
- Senzorické vlastnosti: uhlíkové nanočástice mohou být použity pro amplifikaci signálu buď po zvolení vhodné detekční techniky nebo ve spojení se signál generující značkou [9, 10].

1.3.1 Fullereny

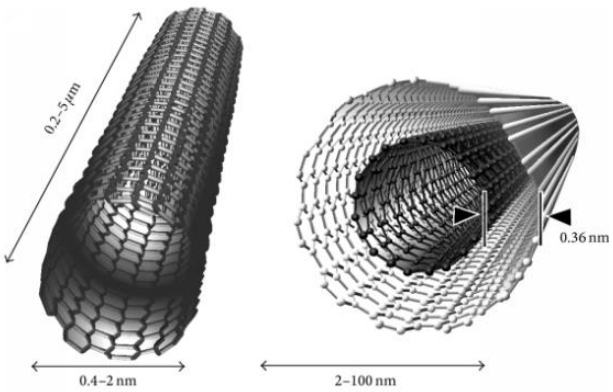
Fullereny, objevené roku 1985 jsou složeny z 20 a více atomů uhlíku a jejich obecný vzorec je C_n. Shluky atomů tvořící fullereny dostaly název klastry [1]. Tyto struktury vznikají neustálým dělením tuhé látky. Fullereny jsou tvořeny atomy uhlíku, které jsou uložené ve vrcholech a uspořádané do vrstvy z pěti- až šestiúhelníků a tato vrstva je prostorově svinuta do uzavřeného tvaru (viz obrázek 3). Tato struktura je nazývána klečovitou a umožňuje fullerenům odolávat fyzikálním jevům, především tlaku a teplotě. Fullereny typu C_{60} a C_{70} se vyskytují v přírodě, nicméně přítomnost ozonu je příčinou jejich rozkladu na vzduchu a světle. Nejdostupnějším fullerenem je C_{60}, který se mimo přirozený výskyt vyrábí i komerčně. Fullereny lze připravit pomocí elektrického oblouku vytvořeného mezi grafitovými elektrodami nebo pomocí laserového odpařování grafitu [9]. V dnešní době se fullereny využívají především jako tuhé palivo pro rakety. Fullereny se také přidávají do maziva, kde molekuly C_{60} působí jako malé aktivní ložiskové kuličky [11, 12].



Obrázek 3 - Struktura fullerenů (převzato z [13])

1.3.2 Uhlíkové nanotrubice

Uhlíkové nanotrubice (carbon nanotube - CNT) jsou uspořádané duté grafitické materiály v podobě válců, jejichž hybridizace je sp^2. U CNT rozlišujeme dva podtypy – jednovrstvé uhlíkové nanotrubice (single-walled nanotube - SWNT), pro které je typická jedna vrstva grafitu svinutá do tvaru trubice (viz obrázek 4a). Vícevrstvé uhlíkové nanotrubice (mono-walled nanotube - MWNT), jejichž struktura obsahuje několik vrstev uhlíku, které mají společnou podélnou osu (viz obrázek 4b) [14].



Obrázek 4 - a) struktura SWNT, b) struktura MWNT (převzato z [15])

MWNT jsou vodiče, zatímco SWNT mohou být vodiče nebo polovodiče, v závislosti na jejich průměru a chiralitě. Válcovitá struktura je důvodem lepší elektrické i tepelné vodivosti, než je tomu u grafitu. CNT jako jednorozměrné uhlíkové alotropy dosahují délky od několika set nanometrů do několika milimetrů, ovšem jejich průměry se v závislosti na jejich podtypu liší. SWNT mají průměr 0,4-2 nm u MWNT jsou průměry 2-100 nm. MWNT se navíc ještě mohou vyskytovat v různých morfologických podobách, jako jsou "dutá trubka", "bambus" či "rybí kosti", a to v závislosti na způsobu jejich přípravy. Uhlíkové nanotrubice mohou být modifikovány různými funkčními skupinami, což rozšiřuje jejich spektrum možných aplikací. Stejně jako ostatní formy uhlíku jsou v současné době využívány také v průmyslové sféře [16].

1.3.3 Grafen

Grafen je poměrně novým materiálem, který je v posledních letech zkoumán díky jeho vynikajícím fyzikálním a chemickým vlastnostem jako jsou: velká povrchová plocha, vynikající vodivost či vysoká mechanická pevnost [17].

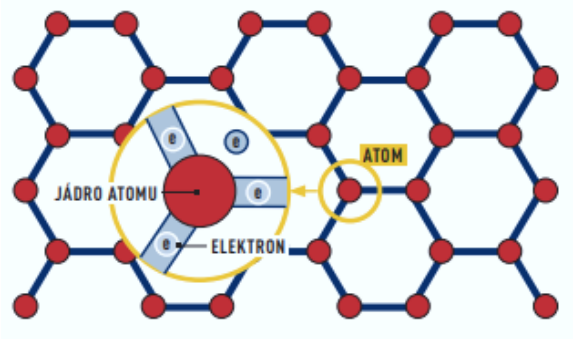
Historie

Grafen byl poprvé vyroben v roce 2004 týmem vědců z Univerzity v Manchesteru pod vedením Andreje Geima. Teoreticky byl ovšem grafen studován již o několik desítek let dříve, tehdy se fyzikové domnívali, že jeho jedno-atomární struktura by byla velmi nestabilní. Tato domněnka byla podporována tvrzením, že kvůli tepelným kmitům krystalové mřížky, které měly být natolik silné, by docházelo k přemisťování atomů a přeměně části jedno-atomární vrstvy do nanotrubic a fullerenových struktur [18].

Struktura

Ideální struktura grafenu je dvourozměrná. Obsahuje jedinou vrstvu sp^2-hybridizovaných atomů uhlíku spojených kovalentními vazbami za vzniku ploché šestiúhelníkové mřížky [9].

Ve struktuře grafenu jsou tři vnější elektrony atomu uhlíku spojeny se sousedními atomy, důsledkem toho je grafen pevný. Zbylý čtvrtý elektron pak zůstává v nevázané podobě, což zajišťuje vodivost grafenu (viz obrázek 5) [19].

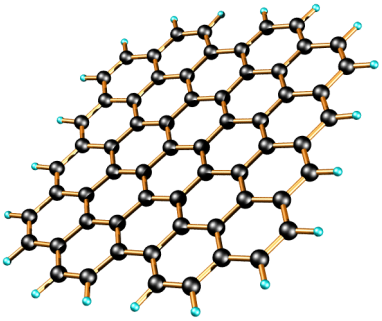


Obrázek 5 - Rozmístění elektronů v okolí atomu C ve struktuře grafenu (převzato z [19])

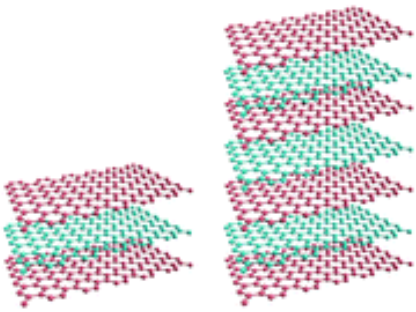
Grafen má specifický povrch 2630 m^2/g, což je ve srovnání se SWNT 2x více, neboť oproti grafenu mají jen 1000 m^2/g [20]. V praxi se však setkáváme s tím, že ideální strukturu grafenu komplikuje obtížná izolace jednotlivých vrstev grafenu při jeho výrobě.

Často bývá jako „grafen“ označován i materiál, který ve skutečnosti obsahuje více grafenových vrstev, a proto je nezbytné měřit počet vrstev například mikroskopií atomárních sil, Ramanovou spektroskopií, kontrastní spektroskopií nebo nízkoenergetickou elektronovou mikroskopií, aby se zjistilo, zda se jedná o jednovrstvý (obrázek 6), dvouvrstvý nebo dokonce vícevrstvý grafen (neboli také nazýván jako "tenký grafit") viz obrázek 7 [16].

Struktura grafenu může být ovlivněna i pružností, neboť díky ní může docházet k prostorovým změnám jako je kroucení, skládání, či vlnění vrstev. Naopak grafenová struktura je charakteristická svou pevností, a proto ji lze zničit až po vyvinutí velké síly. Grafen je velmi náchylný na kvalitu, jakákoliv dislokace, případně znečištění grafenové struktury vedou ke zhoršení jeho výsledných vlastností [16].



Obrázek 6 - Struktura jednovrstvého grafenu (převzato z [21])



Obrázek 7 - Struktura vícevrstvého grafenu (převzato z [22])

Vlastnosti

Elektrické vlastnosti jsou bezesporu těmi, které grafen charakterizují nejvíce. Grafen je výborný vodič elektrického proudu, jehož vodivost ale klesá s počtem jeho jednotlivých vrstev. Jako u každého vodiče, je i u grafenu vodivost ovlivněna teplotou. Při vysokých teplotách dochází k rychlému poklesu elektrického odporu a tím ke zvýšení vodivosti. Vliv na elektrické vlastnosti má také struktura grafenu – přítomnost nečistot nebo navázaných funkčních skupin snižuje jeho vodivost [23].

Vodivost grafenu je dlouhodobě zkoumána, neboť se jeví jako vhodný materiál pro průmyslovou výrobu. Mezi další elektrické vlastnosti patři: vynikající mobilita nosiče náboje, typické ambipolární chování v elektrickém poli, při kterém negativní vstupní napětí vyvolává velké koncentrace otvorů, zatímco pozitivní napětí indukuje velké množství elektronů. Přítomnost delokalizovaných vazeb π nad a pod bazální rovinou, které vznikají z hybridizace sp^2, jsou zodpovědné za vrstvenou strukturu grafenu. Tyto delokalizované elektrony a kvalita grafenové mřížky způsobují vysokou elektrickou vodivost a pohyblivost: mobilita nosičů náboje při pokojové teplotě v grafenu s jednou až třemi vrstvami byla stanovena na 15 000 cm^2 V^{-1} s^{-1}. Mnoho studií ukázalo, že grafen a jeho deriváty mohou vykazovat lepší elektrochemické vlastnosti ve srovnání s jinými elektrodami, jako je skelný uhlík, grafit nebo dokonce uhlíkové nanotrubice [24].

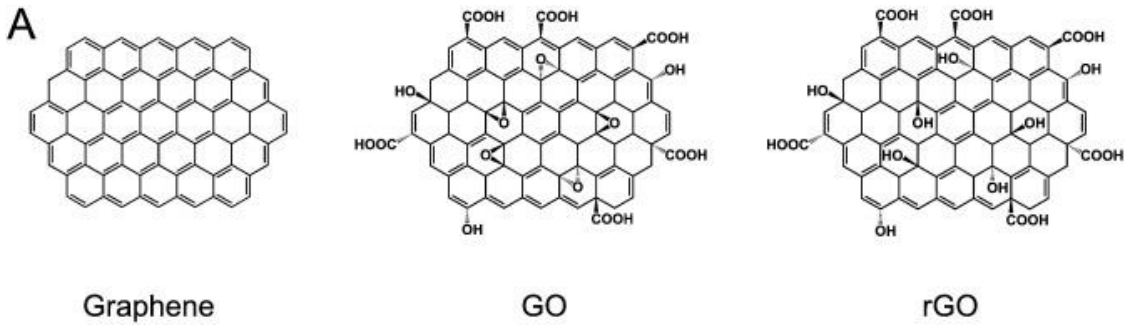
Optické vlastnosti grafenu byly více studovány až s rozvojem Ramanovy a infračervené spektroskopie, které mohou poskytovat podrobné informace o jeho strukturních pásmech. Celkově existují dvě vysoce charakteristická Ramanova pásma v grafenu: pásmo G (pík má hodnotu okolo 1 560 cm^{-1}) a pásmo D (pík dosahuje hodnot cca 1 360 cm^{-1}) [16, 25].

Díky své tuhosti, může být grafen aplikovatelný jako výztužný materiál v kompozitech [26]. Mechanická pevnost grafenu je důsledkem jeho vazeb, kde délka vazby C-C je přibližně 0,14 nm a meziplanární vzdálenost 0,34 nm. Je to nejsilnější materiál s pevností v tahu 130 GPa a tuhost 1 TPa. Pro představu 1 m^2 grafenové vrstvy může unést až 4 kg materiálu [20].

Grafen má vysokou hodnotu tepelné vodivosti (κ), což je opět způsobeno silným propojením atomů uhlíku v jeho struktuře. Tepelná vodivost suspendovaného jednovrstvého grafenu je stanovena z Ramanovy spektroskopie na 5000 W/mK, tato hodnota je vyšší než u diamantu i grafitu [27].

1.4.3 Oxid grafenu

Oxid grafenu (GO) má strukturu grafenové uhlíkové mřížky, na které jsou navázány kyslíkové skupiny, což je znázorněno na obrázku 8. Přítomnost kyslíkových skupin silně ovlivňuje mechanické a elektrochemické vlastnosti GO v porovnání s grafenem. Navázané funkční skupiny usnadňují rozpustnost GO ve vodě a různých rozpouštědlech, což umožňuje snadnou přípravu polymerních nanokompozitů. Na druhou stranu kovalentní kyslíkové funkční skupiny v GO generují strukturní defekty, které naopak ovlivňují elektrickou vodivost, což omezuje využití GO v elektricky vodivých materiálech [26].



Obrázek 8 - Struktury grafenu, oxidu grafenu a redukovaného oxidu grafenu (převzato z [28])

2 Příprava grafenu

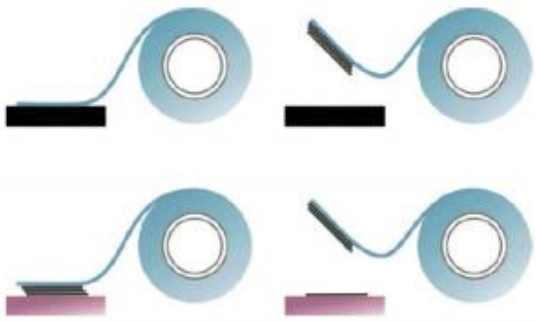
V současné době je grafen připravován několika metodami lišícími se finanční náročností a následnými výnosy. Před výběrem vhodné techniky výroby grafenu, je nutné si dopředu uvědomit, zda bude použit pro průmyslovou výrobu nebo pro vědecké účely [27]. Většina studií nepoužívala ve svých pracích čistou formu grafenu (tzv. pristine graphene), neboť jeho výroba je velice náročná a jeho výtěžek nízký. Z toho důvodu se využívají především deriváty jako GO či redukovaný oxid grafenu (rGO), které jsou z finančního hlediska daleko dostupnějšími [29].

Při výrobě jednovrstvého grafenu hrají významnou roli také prekurzory. Existuje několik typů prekurzorů všech skupenství, nicméně neznámějším prekurzorem je bezpochyby grafit, ten je ovšem v posledních letech nahrazován methanem nebo vhodnými kovy [30].

Nejpoužívanějšími metodami pro přípravu grafenu jsou: mechanická exfoliace, chemická exfoliace, chemická depozice z plynné fáze (CVD), epitaxiální růst.

Mechanická exfoliace

Mechanická exfoliace je jednou z nejjednodušších metod přípravy grafenu. Za technikou známou také jako „metoda izolepy“ stojí Geim a Novoselov, kteří za ni v roce 2010 obdrželi Nobelovu cenu za fyziku. Při této technice je jako prekurzor používán grafit, který je následně podroben opakovanému přikládání a odlupování pásky. Vločky grafitu, které se přilepí na pásku jsou přednostně rozštěpeny podél roviny krystalu a zanechávají atomicky plochý povrch. K získání jednovrstvého grafenu se čistá páska přitiskne proti grafitovým vločkám přilepeným k první pásce, na níž jsou už kusy odloupnutého grafitu. Oddělením těchto dvou pásek dojde ke štěpení grafitu na ještě tenčí vločky. Tento proces se podle potřeby opakuje. Tenké vločky se pak lisují v důsledku silnější adheze grafenu na substrát (například SiO_2 na křemíku) [31]. Počet přenesených vrstev je pak hodnocen různými metodami od jednoduché mikroskopie, přes



Obrázek 9 - Mechanismus mechanické exfoliace (převzato z [32])

Ramanovu spektroskopii až po mikroskopii atomových sil. Tato metoda přípravy je velmi efektivní a lze získat kvalitní krystaly. Již z popisu metody je zřejmé, že je použitelná spíše pro experimentální laboratoře než využití v praxi [33, 34].

Chemická depozice z plynné fáze

Chemická depozice z plynné fáze (Chemical Vapor Deposition – CVD) je také využívána pro přípravu jednovrstvého grafenu. Grafen s velkou plochou může být připraven vystavením kovu různým uhlovodíkovým prekurzorům při vysokých teplotách. Princip této metody je založen tvorbě grafenu pomocí rozkladu prekurzoru - plynu obsahující uhlík (nejčastěji methan, ethylen nebo hexan), který je při teplotě 900 °C adsorbován na povrchu substrátu (tím je nejčastěji měď nebo nikl) [35]. Růst na niklu vyžaduje oproti mědi o trochu nižší teploty, nicméně postupy jsou u obou kovů podobné. Zpracování se provádí zahřátím substrátu přibližně na 1000 °C za kontinuálního proudění směsi vodíku a argonu v poměru 1:10. Vodík se používá pro udržení redukčního prostředí, zatímco argon slouží pro udržení tlaku, který je ideální pro růst grafenu. Samotný růst se provádí v rozmezí teplot 800 až 1100 °C. Celý postup výroby grafenu je prováděn ve speciálních CVD pecích [31].

Exfoliace v kapalné fázi

Exfoliace v kapalné fázi kompenzuje nedostatky mechanické exfoliace, která není vhodná pro průmyslové využití. V důsledku rozvoje této metody byly v poslední době objeveny a zavedeny rozšiřující metody exfoliace v kapalné fázi, které dokáží navýšit produkci 2D uhlíkových nanostruktur. Exfoliace v kapalné fázi je založena na odlupování objemného grafitu až do struktury grafenu v kapalném médiu [36]. Tato metoda se skládá ze 3 odlišných fází. První fází je disperze grafitu v čistém rozpouštědle nebo povrchově aktivním činidle, kde dojde k narušení slabých Van der Waalsových sil. Druhou fází je odlupování, kdy dochází k odlupování vrstev grafitu, kdy jsou grafenové vločky izolovány z vícevrstvého grafenu (grafitu) ultrazvukem, čímž se vytváří monovrstvé grafenové desky pokryté povrchově aktivní látkou [37]. Poslední fází je čistění, při němž je získaný grafenový materiál centrifugován. Tím dojde k oddělení exfoliovaného materiálu od neexfoliovaného a výsledkem jsou tenké grafenové vločky [38].

Touto metodou lze získat velmi čistý grafen bez velkých finančních nákladů, nicméně získané grafenové vločky jsou obvykle malé (do1 μm) [33].

Elektrochemická exfoliace

Specifický přístup zahrnuje použití kapalného roztoku (elektrolytu) a elektrického proudu, který se používá ke spotřebování elektrody sestávající z grafitu. Tento proces se provádí buď

anodickou oxidací nebo katodickou redukcí elektrody na bázi grafitu [31]. Anodická exfoliace zahrnuje interkalaci aniontů v reakční směsi do grafitu. Kladně nabité částice odebírají elektrony z grafitové anody, což vytváří pozitivní náboj, který podporuje interkalaci negativních iontů (síranové anionty), a ty zvyšují mezery mezi grafeny a pomáhají při následném odlupování listů. Při katodické exfoliaci přitahuje negativně nabité prostředí na grafitové pracovní elektrodě kladně nabité ionty v roztoku (např. Li^+) společně s ko-interkalujícími molekulami [39]. Elektrolytickými roztoky mohou být: HBr, HCl, H_2SO_4 nebo HNO_3 [40].

Výhodou elektrochemické exfoliace je, že probíhá v jednom kroku. Ve srovnání s exfoliací v kapalné fázi lze získat produkt interkalací s neoxidačními solemi o rozměrech 50 μm s tloušťkou 2-3 vrstev. Díky výše uvedeným vlastnostem je tato metoda přípravy grafenu vhodná pro potenciální průmyslové využití. Metoda ovšem není dokonalá, neboť finanční nároky na používané iontové kapaliny představují velké finanční zatížení [33].

Redukce oxidu grafenu

Metody oxidace a redukce jsou běžně užívanými metodami v přípravě derivátů grafenu. Grafen je polovodič a neobsahuje žádné aktivní a funkční skupiny, které by umožnily jeho rozpustnost ve vodě či organických rozpouštědlech. Proto se využívají jeho dva deriváty - redukovaný derivát – rGO a oxidovaný derivát – GO. GO obsahuje ve své struktuře četné kyslíkaté skupiny, které mohou snadnou reagovat s organickými molekulami tak, aby byl rozpustný ve vodě [35].

Redukční procesy GO mohou být dvojího typu, a to chemické nebo tepelné. Chemická redukce je jednou z nejvyužívanějších metod. Tato metoda spočívá v redukci oxidu grafenu na redukovaný oxid grafenu. Vzorky GO jsou ponořeny do vybraného chemického redukčního činidla po určitou dobu a určité rozmezí teplot. Tento postup v podstatě odstraňuje nadměrné funkční skupiny jako jsou COOH a OH. K redukci dochází například působením hydrazinu při teplotě 600 °C Tepelná redukce GO je účinná při výrobě rGO. Při této metodě dochází k prudkému zvyšování teploty GO (ta dosahuje minimálně 1000 °C), v důsledku toho se molekuly vody spolu s funkčními skupinami kyslíku odpaří a spálí [41].

Redukce GO se projevuje barevnou změnou. Hnědý GO přechází na černý grafen v důsledku zvýšení hydrofobního charakteru, a tedy následným srážením grafenu. K této redukci lze použít celou řadu redukčních činidel, například $NaBH_4$, AlH_3, halogenovodíkové kyseliny, činidla obsahující síru nebo dusík (hydrazin, hydroxylamin). Ovšem u většiny těchto redukčních

činidel není znám mechanismus redukce, a ne vždy jsou vhodná pro produkci ve velkém množství [33, 42].

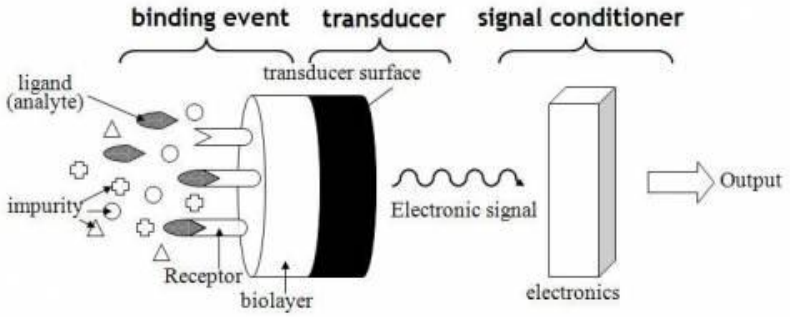
Epitaxní růst

Epitaxe je proces, při němž na povrchu substrátu roste tenká krystalická vrstva. Pro výrobu grafenu se jako substrát používá karbid křemíku. Proces, při němž dochází k odpařování karbidu křemíku probíhá za vysokých teplot (1400° C – 1600° C). U zbylých atomů uhlíku pak dochází k přeuspořádání do struktury grafenu. Vytvořením a dodržením specifických podmínek pak lze připravit jednovrstvý grafen [33, 43].

3 Biosenzory

3.1 Definice biosenzoru

Chemický senzor je analytický přístroj, který převádí chemický nebo fyzikální signál na jiný, jenž je lépe měřitelný. Biosenzor, je zařízení, které obsahuje citlivý prvek biologického původu (bioelement), který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Schéma biosenzoru je zobrazeno na obrázku 10. Biosenzor poskytuje elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné či několika skupin chemických látek, které jsou přítomny ve vzorku. Jako bioreceptory mohou být použity enzymy, protilátky, bílkoviny aj. [44].



Obrázek 10 - Schéma biosenzoru (převzato z [45])

Podle biorekogniční části lze biosenzory řadit do dvou skupin. První skupinou jsou biosenzory obsahující biokatalytické části, které přeměňují analyt v průběhu chemické reakce. V této skupině vystupuje analyt (enzym, buňka, orgán či organela) obvykle jako substrát enzymové reakce. Druhá skupina biosenzorů má bioafinitní biorekogniční část, u této skupiny je analyt specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu [46].

Součástí biosenzoru je fyzikálně-chemický převodník, který má za úkol poskytnout signál vhodný k dalšímu zpracování. Biosenzory můžeme na základě fyzikálně-chemického převodníku rozdělit do několika skupin.

- elektrochemické (s potenciometrickou, amperometrickou, konduktometrickou, či voltametrickou detekcí)
- optické (s fotometrickou, luminometrickou, fluorimetrickou detekcí)
- piezoelektrické a akustické
- kalorimetrické

Důležitými vlastnostmi biosenzorů jsou jejich velká selektivita a citlivost. Využití nacházejí především v medicíně, kde nacházejí uplatnění například v klinické diagnostice, při stanovení

nejrůznějších složek krve či u detekce metabolických produktů atd. V potravinářském průmyslu je pak využíváme při kontrole kvality potravin, a to k identifikaci patogenních mikroorganismů nebo při stanovování základních složek potravin (např. sacharidy, tuky, bílkoviny). Další neméně důležitou oblastí uplatnění je ochrana životného prostředí nebo jejich role v biotechnologických procesech [46, 47].

3.2 Rozdělení biosenzorů na základě fyzikálně-chemického převodníku

3.2.1 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické detekce jsou často používanými metodami v oblasti biosenzorů. Od doby, kdy Clark a Lyons sestavili první amperometrickou elektrodu, došlo k velkému rozvoji elektrochemických senzorů. V elektrochemickém biosenzoru je elektrochemický převodník úzce spojen s biologickým prvkem a dochází tak k měření elektrochemického signálu, buď proudu, vodivosti nebo potenciálu v závislosti na zvolené detekční technice. V závislosti na způsobu detekce jsou elektrochemické biosenzory rozděleny na následující třídy: amperometrické, potenciometrické, konduktometrické a voltametrické [44, 48].

Biosenzory s amperometrickou detekcí

V amperometrické detekci se detekuje proud na pracovní elektrodě, který je úměrný koncentraci analytu. Tento proud je generován z elektrochemické oxidace nebo redukce elektroaktivních látek. Obvykle je měření prováděno udržováním konstantního potenciálu pracovní elektrody, která je konstruována z platiny, zlata nebo uhlíku [47]. K amperometrickému měření se využívají dvou- nebo tříelektrodové systémy. Pokud se k měření využije systém tří elektrod, třetí elektrodou je elektroda pomocná. Základ amperometrických biosenzorů mohou představovat Clarkovy elektrody, u nichž je velikost proudu přímo úměrná koncentraci kyslíku. Měření probíhá za pomocí redukce kyslíku na platinové pracovní elektrodě (platinový drátek o průměru 0,1 až 5 mm zatavený ve skle) v porovnání k referentní elektrodě Ag/AgCl. Jako elektrolyt se využívá roztok KCl a neutrální až slabě alkalický uhličitanový či fosfátový pufr [46, 49]. Mezi nejvýznamnější amperometrické senzory patří senzor pro detekci glukózy, kterým lze detegovat peroxid vodíku. Amperometrické biosenzory jsou hojně používány v kombinaci s imuno-citlivými technikami například pro detekci β-podjednotky lidského choriogonadotropinu pro testování těhotenství [48].

Biosenzory s potenciometrickou detekcí

Potenciometrické biosenzory měří potenciálový rozdíl mezi pracovní a referentní elektrodou v elektrochemické cele za podmínky, že mezi elektrodami neproudí proud. Z toho důvodu je potenciometrie využívána pro monitorování iontové aktivity v elektrochemických reakcích. Iontově selektivní elektrody umožňují detekci iontů jako je H^+, Na^+, $Ca^{2+,}$ I^- nebo CN^- v komplexních biologických matricích měřením změn potenciálu elektrod [49]. Elektrochemickým čidlem je zde iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou. V potenciometrii je vztah mezi koncentrací a potenciálem určen Nernstovou rovnicí. Nejnižší detekční limity pro potenciometrické detekční přístroje jsou v dnešní době dány vlastnostmi ISE. Tyto detekční limity se pohybují v koncentracích od 10^{-8} do 10^{-11} M. Výhodou potenciometrických senzorů je, že jsou použitelné k měření nižších koncentrací analytů v roztoku, kde vzorek nikterak chemicky neovlivňují. Ovšem ionty, pro které jsou možné nízké detekční limity jsou v současné sobě velmi omezené a chybějící analyty jako: nikl, mangan, rtuť nebo ionty arsenu [46, 50].

Biosenzory s konduktometrickou detekcí

Konduktometrické biosenzory jsou založeny na měření změn vodivosti mezi dvěma kovovými elektrodami v důsledku biochemické reakce. Konduktometrické biosenzory mohou být použity ke studování katalytických reakcí, kde iontová síla a tím i vodivost roztoku se mění jako důsledek enzymatické reakce [44, 48]. Konduktometrické měření enzymatických reakcí je omezeno několika faktory, jako je variabilní iontové pozadí klinických vzorků a požadavkem na měření malých změn vodivosti. Změny vodivosti mohou být monitorovány přímo imobilizací enzymu na povrch elektrody. V poslední době je poměrně často využívána kombinace konduktometrických biosenzorů s nanovodiči pro efektivní bio-snímání. Konduktometrie může být využita pro detekci znečištění v říčních vzorcích, detekci laktózy v mléce, či pro detekci drog v moči [48, 51].

Biosenzory s voltametrickou detekcí

Voltametrie je elektroanalytická metoda, kde se měří výsledný proud s ohledem na měnící se vložený potenciál. Vzhledem k tomu, že existuje více způsobů, jak lze dosáhnout změny potenciálu, rozlišujeme proto také více forem voltametrie, jako jsou: lineární voltametrie (LV), cyklická voltametrie (CV), normální pulsní voltametrie (NPV), diferenčně pulsní voltametrie (DPV), square-wave voltametrie (SWV) aj. Nejčastěji využívaná detekční technika je cyklická voltametrie, neboť je užitečná při získávání informací týkajících se redoxního potenciálu a

elektrochemických reakčních rychlostí. Získané hodnoty jsou vyneseny jako závislost proudu na napětí, tedy získáváme voltamogram [46, 52].

3.2.2 Optické biosenzory

Optické biosenzory jsou široce využívanými typy senzorů ve zdravotnictví, biomedicínském výzkumu, farmakologii nebo v monitorování životního prostředí. Klíčem úspěšnosti optických biosenzorů je jejich rychlost, vysoká citlivost, jednoduchost a odolnost vůči elektromagnetické interferenci. Optické měření je založeno na změnách absorbance, fluorescence nebo fosforescence, chemiluminiscence, rozptylu světla nebo na refrakčním indexu. Optické biosenzory jsou založeny na interakci světelného záření s chemickými látkami. Zdrojem záření je světelný zdroj, kterým zde může být laser, světlo emitující diody, výbojky či lampy v závislosti na vybrané detekční technice. Pokles intenzity světelného paprsku po průchodu měřící kyvetou je přímo úměrný koncentraci stanovované látky [44, 48].

3.3 Rozdělení biosenzorů podle biologické složky

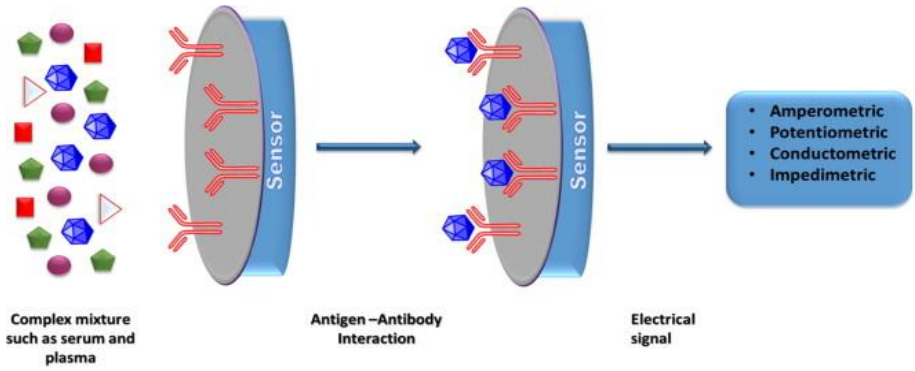
Biosenzory dělíme do skupin podle přítomného bioelementu nebo převodníku, případně jejich kombinací. O přítomnosti jednotlivých typů bioelementů či převodníků rozhoduje měřená fyzikální veličina a vlastnosti vzorku.

3.3.1 Enzymové biosenzory

U enzymových biosenzorů slouží jako rekogniční element enzym. Enzym je bílkovina, která má schopnost biokatalyticky přeměnit určitý specifický substrát na produkt. Enzymy se využívají zejména pro svou specifickou vazebnou vlastnost a katalytickou aktivitu. Principem reakce enzymu je, že selektivně reaguje s chemickou substancí, a tím dochází k její modifikaci [53].

3.3.2 Imunosenzory

Imunosenzory jsou biosenzory založené na interakcích mezi protilátkou a antigenem, které jsou buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Imunorozpoznávací složka může být imobilizována na povrch elektrodového převodníku pro následnou detekci antigenu nebo protilátky (Ab). Vzhledem k silným vazebným silám mezi těmito biomolekulami vykazují imunosensory vysokou selektivitu a velmi vysokou citlivost. Elektrochemické imunosenzory měří elektrický signál, který je produkovaný na elektrochemickém převodníku (schéma elektrochemického imunosenzoru na obrázku 11) [54].



Obrázek 11 - Schéma elektrochemického imunosenzoru (převzato z [55])

Analyzované molekuly mohou být imobilizovány přímo na snímací plochy buď fyzikální adsorpcí nebo chemickými prostředky. Fyzikální adsorpce může být provedena připojením molekul přímo na povrch nebo vytvořením komplexu s jinými částicemi. Adsorpce Ab na povrch je provedena pomocí Van der Waalsových sil, hydrofobních interakcí, elektrostatických interakcí nebo pomocí vodíkové vazby. Příkladem fyzikální adsorpce je imobilizace Ab na povrchu mikrotitrační destičky (jako v ELISA) [56].

Chemická imobilizace může být specifičtější v důsledku reakce mezi různými zbytky interakčních molekul. Obecná chemická imobilizační metoda zahrnuje imobilizaci Ab nebo jiných proteinů na základě reakce mezi aminovými zbytky na proteinu a skupinami na snímacím povrchu, které mohou reagovat s aminy, jako je N-hydroxysukcinimid, jodistan, glutaraldehyd, isothiokyanát nebo aktivní ester [56].

Úspěšnost imunosensoru se odvíjí od různých faktorů, těmi jsou: povrchová funkcionalizace imunosenzoru, vhodná orientace protilátek, hustota protilátek a v neposlední řadě také vhodná konfigurace imunosensoru. Pečlivou optimalizací všech těchto faktorů lze dosáhnout co nejlepších výsledků daného imunosenzoru [57].

4 Aplikace grafenu v elektrochemické detekci proteinů

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3, biosenzory dokáží citlivě detegovat širokou škálu sloučenin. Grafen je v biosenzorech využíván díky svým jedinečným vlastnostem, mezi které patří především tloušťka grafenového plechu. Další vlastností, kvůli které je v biosezorech využíván je poměr jeho povrchu vůči objemu, který ve finále činí takovýto materiál vysoce citlivým vůči změně místních podmínek daného prostředí.

Senzory s grafenem mohou být využity:

a) V klinických aplikacích, například pro detekci glukózy, cholesterolu, peroxidu vodíku, dopaminu, kyseliny askorbové, kyseliny močové, alfa-fetoproteinu, aj.
b) K detegování kovových iontů Cd^{2+} a Pb^{2+}, pesticidů jako je methylparation, apod. v životním prostředí.
c) V potravinovém průmyslu k detekci bakterií, jejich toxinů či antibiotik.

Label – free detekce DNA s použitím elektrody modifikované oxidem grafenu

Tým Bing Li v roce 2015 publikoval práci, která byla zaměřena na label-free detekci DNA. Hlavním záměrem byla imobilizace a detekce DNA bez použití látek, které by DNA označily nebo jiných přídavných látek, které by amplifikovaly výsledný signál. Detekce DNA byla prováděna pomocí modifikovaných tištěných grafenových elektrod, které by mohly splňovat požadavky pro průmyslovou výrobu.

Oxid grafenu byl imobilizován na povrchu grafenové elektrody prostřednictvím vazeb π-π a následně redukován pomocí cyklické voltametrie. Takto vytvořené dvouvrstvé elektrody oxid grafenu-grafen poskytovaly vyšší redoxní proud (o 42 % a 36,7 % vyšší) v porovnání s elektrodou nahromaděného grafenu nebo elektrody z redukovaného oxidu grafenu. Rychlý přenos elektronů je dán kombinací velkého počtu elektroaktivních míst v redukovaném oxidu grafenu a výbornou vodivostí grafenu. Sonda ssDNA (jednovláknová DNA) byla imobilizována na povrchu dvouvrstvé elektrody redukovaného grafen oxid-grafenu přes systém π-π vazeb a poté hybridizována s cílovou cDNA (komplementární DNA). Vznik dsDNA (dvouvláknová DNA) byl monitorován diferenčně pulsní voltametrií, kde byla zaznamenána výška píku a byla vytvořena kalibrační závislost. Tento systém umožnil detegovat gen viru lidské imunodeficience 1 v lineárním rozsahu od 10^{-7} do 10^{-12} M s detekčním limitem (LOD) 1,58 x 10^{-13} M [58].

Detekce glykovaného hemoglobinu pomocí nanočástic zlata zabudovaných do N-dopované desky

Glykovaný hemoglobin (HbA1c) se stanovuje u pacientů, kteří trpí onemocněním diabetes mellitus. Hladina HbA1c poskytuje informaci o průměrné hladině glukózy v krvi v delším časovém období (2 až 3 měsíce). Utkarsch Jain a kol. se v roce 2017 zabýval vytvořením biosenzoru, který by mohl detegovat HbA1c v co nejnižší koncentraci.

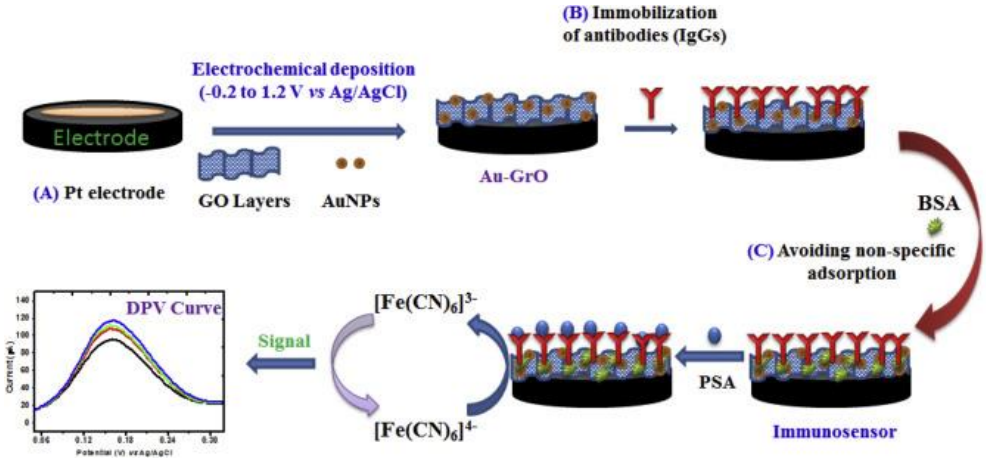
Zabývali se sestavením biosenzoru z N-dopovaného grafenu, do kterého byly zabudovány nanočástice zlata. Takto zhotovený film byl elektrochemicky adsorbován na FTO (vrstva fluoru dopovaná cínem) elektrodu. Na modifikovanou elektrodu byl imobilizován enzym FAO (fructosyl amino-acid oxidase). Takto konstruovaný biosenzor vykazoval široký lineární rozsah v rozmezí koncentrací od 0,3 do 2000 μM při potenciálu +0,2 V. LOD systém činil 0,2 μM, přičemž daný systém byl stabilní po dobu 4 měsíců. Zlepšení limitu detekce u tohoto biosenzoru bylo docíleno synergickým účinkem grafenu s nanočásticemi zlata. Tento proces byl sledován pomocí impedanční spektroskopie. V porovnání s konvenčními metodami, je tato elektrochemická technika více specifická, snadná a především rychlá [59].

Detekce prostatického specifického antigenu založená na oxidu grafenu s nanočásticemi zlata

Rakovina prostaty je nejčastějším nádorovým onemocněním mužů v rozvinutých zemích a hned po karcinomu plic je druhou nejčastější příčinou úmrtí z onkologických důvodů. Riziko onemocnění karcinomem prostaty se u mužů s věkem zvyšuje. Při diagnostice karcinomu prostaty se detekuje zvýšená hladina prostatického specifického antigenu (PSA) krvi. PSA, známý též pod názvem kalikrein 3, je serinová proteáza produkovaná buňkami prostaty. Fyziologická hodnota PSA v séru je pod 4 ng/ml. Vyšší hodnota PSA nemusí hned poukazovat přímo na karcinom prostaty, ale také na benigní hyperplazii nebo na zánět prostaty [60].

Konstrukcí biosenzoru, který by disponoval přesnou, citlivou a spolehlivou detekcí se zabýval biotechnologický a analytický tým z Indie pod vedením Mintu Pal a Raju Khan (2017). Základem biosenzoru byla platinová elektroda, která byla ponořena do roztoku $HAuCl_4$, pomocí kterého na ni byly elektrochemicky naneseny nanočástice zlata a následně i GO. Po aktivaci povrchu elektrody na ni byly imobilizovány monoklonální protilátky anti-PSA, které vychytávaly PSA ze vzorku (schéma metody viz obrázek 12). Na závěr byla elektroda se vzniklým imunokomplexem promyta v hovězím sérovém albuminu (BSA) a uhličitanovém pufru, aby se zamezilo nespecifické vazbě analytu na elektrodu. Funkčnost takto sestaveného

biosenzoru byla ověřena cyklickou voltametrií. Bylo prokázáno, že synergií GO a Au dochází ke zvýšení vodivosti. Tato skutečnost je dána eletrokatalytickým efektem Au-GO elektrody, který je způsoben interakcí π-π s sp^2 hybridizací grafenu. K určení koncentrace PSA byla použita metoda DPV. Citlivost této metody se pohybovala v rozmezí od 0,001 $fgmL^{-1}$ do 0,02 μgmL^{-1}. LOD byl stanoven na 0,24 $fgmL^{-1}$ [61].



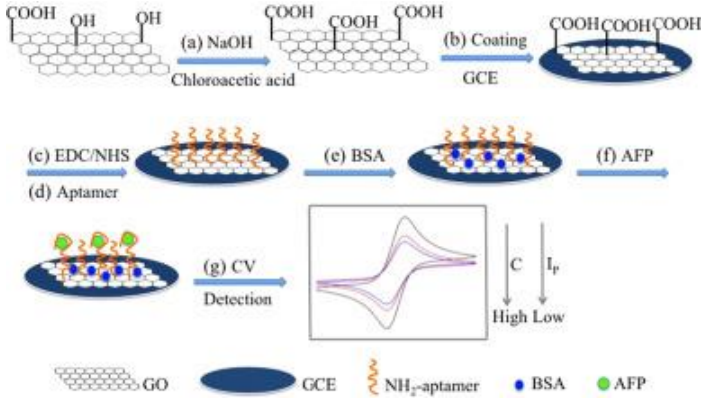
Obrázek 12 - Schématické znázornění procesu výroby elektrochemického senzoru (au-GO) založeného na monoklonální anti-PSA protilátce imobilizované na AuGO elektrodě (převzato z [61])

Label-free detekce alfa-fetoproteinu pomocí aptasenzoru založeného na oxidu grafenu

Alfa-fetoprotein (AFP) je onkofetální protein, který se ve velkých koncentracích vyskytuje v organismu lidského plodu. Po narození jeho hladina v séru novorozence prudce klesá. AFP se vyšetřuje v těhotenství v období 16. týdne pro případnou diagnostiku vrozených chorob například Downův syndrom nebo vady nervové trubice. Naopak po narození jeho zvýšená hladina poukazuje na rakovinu jater nebo jaterní metastázy.

Shaohong Yang a kol. (2018) se zabývali sestrojením elektrochemického aptasenzoru na bázi GO. Aptasenzor je senzor založený na aptamerech, což jsou krátké úseky jednovláknové DNA nebo RNA. V současné době jsou stále častěji využívány místo protilátek, neboť mnohé studie prokázaly vyšší specifitu k analytům než vyráběné protilátky. Grafen byl použit na modifikaci elektrody ze skleného uhlíku (GC), na jejíž povrch byly imobilizovány NH_2-funkcionalizované aptamery se specifitou k AFP pomocí karbodiimidové metody za vzniku kovalentních vazeb. Povrch GO díky velkému množství funkčních skupin (karboxylových a hydroxylových) je ideální pro imobilizaci NH_2 skupin. Takto zhotovený aptasenzor představuje výhody oproti stávajícím – není potřeba sekundární značené protilátky, vykazuje větší stabilitu, vyšší efektivitu a zejména menší časovou náročnost. Sestrojení takovéhoto senzoru popisuje obrázek

13. Lineární rozsah takto sestaveného aptasenzoru v rozmezí koncentrací 0,01–100 ng mL^{-1} a LOD byl stanoven na 3 pg mL^{-1}. AFP bylo detegováno pomocí cyklické voltametrie [62].

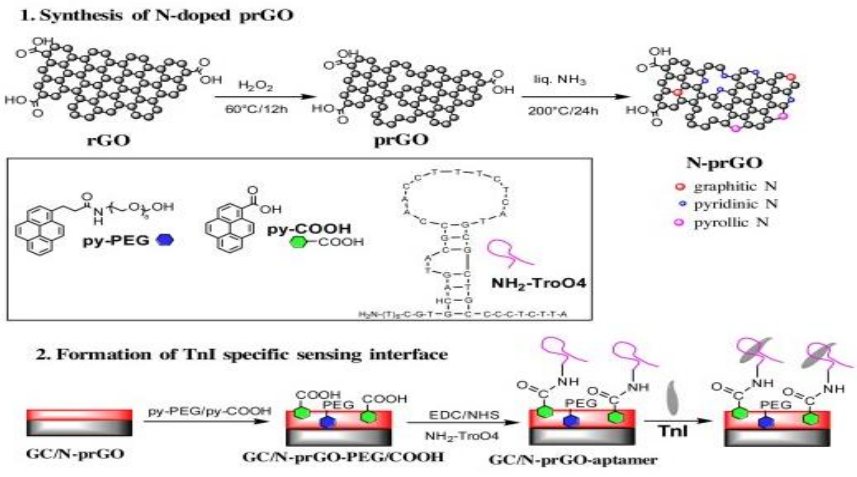


Obrázek 13 - Schéma detekce AFP (převzato z [62])

Detekce srdečního troponinu I pomocí N-dopované grafenoxidové elektrody

Kardiovaskulární nemoci představují jedno z nejvyšších rizik mortality u všech nemocí ve vyspělých zemí. Troponin I se vyskytuje v kosterním svalstvu a myokardu a slouží jako kardiomarker k monitorování poškození myokardu. Dojde-li k jeho poškození, troponinový komplex se rozbije a následně dojde k uvolnění proteinů do krevního oběhu.

Výzkumný tým Fereshteha (2018) se zabýval sestrojením elektrochemického imunosenzoru na bázi dusíkem dopovaného redukovaného oxidu grafenu (N-prGO), který slouží pro detekci cTnI (schéma znázorněno na obrázku 14).



Obrázek 14 - Schéma syntézy N-dopovaného pr-GO a schema detekce Troponinu 1 (převzato z [63])

Elektroda modifikovaná povrchem (N-dopovaným redukovaným oxidem grafenu) N-rGO byla dále funkcionalizována pyren-COOH a pyren-PEG-OH, na které byl kovalentně (karbodiimidová metoda) navázán aptamer Tro4, díky kterému mohl být specificky navázán

cTnI a následně detegován. Pro label-free detekci troponinu I pomocí aptasenzoru byla použita metoda DPV za použití $[Fe(CN)_6]^{4-}$ jako redoxní sondy. LOD tohoto imunosenzoru činil 1 pg/ml. Takto zhotovený senzor disponuje oproti současným metodám pro stanovení cTnI svou větší selektivitou, nižším LOD, a především nižší časovou náročností [63].

Senzitivní amperometrická detekce nádorových markerů pomocí nanočástic Fe_2O_3 zabudovaných do struktury GO

Přesnost, citlivost a nízká nákladovost, tyto faktory jsou rozhodující pro měření několika analytů ve vzorku pacienta. Mohamed Sharafeldin a kol. (2017) se zabývali funkčností elektochemického imunosenzoru, ten byl sestrojen ze sekundárních protilátek, na které byly navázány nanočástice Fe_3O_4 modifikované GO. Takto značené protilátky sloužily k vychytávání antigenu (prostatického specifického antigenu – PSA a prostatického specifického membránového antigenu - PSMA) ze vzorku. Následně pomocí magnetické separace ve zkumavce, byly přeneseny do čipu, kde došlo k jejich navázání na povrch, který byl značen primárními protilátkami.

PSA A PSMA byly detegovány amperometrickou metodou. Výsledky této studie ukázaly, že nanočástice Fe_3O_4 nanesené na redukovaném GO jako značky protilátek usnadňují detekci proteinů v analyzovaném vzorku a elektrochemickou detekci. Připojení četného množství Fe_3O_4 zesiluje amperometrický signál pro každý protein. Další výhodou takto zkonstruovaného senzoru je jeho dobrá reprodukovatelnost. Touto metodou bylo dosaženo výborných LOD a to 15 fg/ml pro PSA a 4,8 fg/ml pro PSMA v séru [64].

Label-free imunosenzor pro detekci srdečního myoglobinu s využitím grafenových kvantových teček

Myoglobin je bílkovina, která se běžně vyskytuje buňkách srdeční a kosterní svaloviny a která slouží k diagnostice jejich poškození. Hlavním úkolem myoglobinu je vázat kyslík a přenášet do tkání, které jej využívají. Za fyziologických podmínek je myoglobin uvnitř tkání, dojde-li k nějaké patologii, je uvolněn do krve, kde je snadno detegovatelný.

Satish a K. Tuteja a kol. (2017) se zaměřili na sestrojení label-free imunosenzoru, který je založen na elektrochemické impedanční spektroskopii pro citlivou detekci srdečního myoglobinu. Hydrotermálně syntetizované grafenové kvantové tečky (GQD) byly adsorbovány na povrch tištěné elektrody. Na takto modifikovanou elektrodu byly navázány specifické protilátky proti myoglobinu.

Imobilizace specifických protilátek na sítotiskové elektrodě modifikované GQD poskytla nástroj pro přímou detekci srdečního myoglobinu. Funkce tohoto biosenzoru byla ověřena pomocí DPV a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). LOD byl stanoven 0,01 ng/ml [65].

Neinvazivní detekce rakoviny dutiny ústní pomocí rGO obohaceného oxidem zirkoničitým

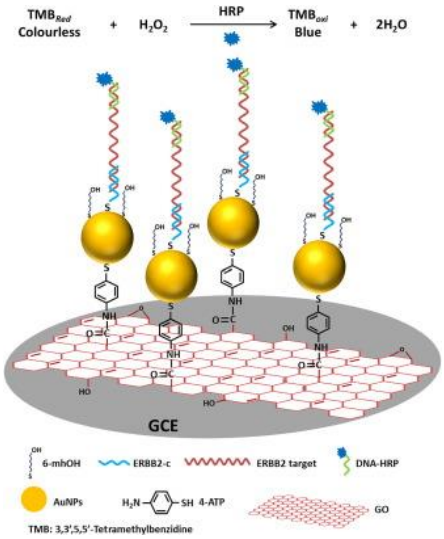
Tým autora Suveen Kumar a kol. (2016) jako první publikovali studii, která spojovala účinky oxidu zirkoničitého a redukovaného GO. Tento tým se zabýval studií neinvazivní a label-free detekce perorálního biomarkeru CYFRA-21-1. Orální rakovina je šestou nejčastější rakovinou, jež je způsobena nekontrolovatelným růstem buněk v dutině ústní, rtů, dutin, jazyka, apod. Hlavními příčinami vzniku je žvýkání tabáku, kouření, konzumace alkoholu, či lidský papilomavirus.

K sestrojení senzoru použili rovnoměrného rozmístění ZrO_2 na povrch redukovaného oxidu grafenu, toho bylo docíleno pomocí jednokrokového hydrotermálního zpracování. Zabudováním ZrO_2 bylo dosaženo vyšší elektrochemického účinku. Následně byl tento film adsorbován na povrch skleněné elektrody z oxidu indito-číničitého (ITO). Takto modifikované elektroda ZrO2–rGO/ITO byla funkcionalizována 3-aminopropyl triethoxanem (APTES) pro zavedení aminoskupin, které byly využity pro vazbu protilátek proti CYFRA-21-1. Následná inkubace s BSA sloužila pro zabránění nespecifické sorpce. Výsledné měření ukázalo, že takto sestavený biosenzor vykazuje oproti současným metodám (např. ELISA) zlepšení heterogenního přenosu elektronů, vyšší citlivost, lineární detekční rozsah 2-22 ng mL^{-1} a nižší LOD, který byl 0,122 ng mL^{-1} [66].

Detekce biomarkeru karcinomu prsu pomocí DNA biosenzoru na bázi redukovaného GO modifikovaného nanočásticemi zlata

Karcinom prsu je nejčastějším onemocněním rakoviny u žen a současně také největší příčinou úmrtí. Karcinom prsu lze diagnostikovat pomocí dvou markerů – HER2 (též nazýván ERBB2), transmembránový protein, který podporuje růst a dělení buněk a při jeho nadměrné expresi může dojít ke vzniku nádoru. Druhým markerem je CD24, což je buněčný membránový protein.

Ayman Ali Saeed se spolu se svým kol. (2017) zabýval sestrojením senzoru na bázi DNA. Tyto senzory jsou levné, citlivé a jednoduché diagnostické nástroje pro genetické testy. Nanočástice zlata (AuNPs) a oxid grafenu byly zabudovány do struktury elektrody ze skelného uhlíku (viz obrázek 15). Do této struktury elektrochemicky vneseny i 2 typy úseků DNA a to ERBB2c a CD24c. V tomto elektrochemickém DNA senzoru byla využita metoda "sendvičového typu" a její odezva byla měřena amperometricky. Takto zhotovený biosenzor se ukázal jako vynikající platforma pro imobilizaci thiolovaných sond pro zachycování nukleových kyselin. Elektrochemická detekce markeru rakoviny prsu ERBB2 a kontrolní značka CD24 pomocí této platformy jasně ukázaly, že došlo oproti samotné GC elektrodě ke zlepšení signálu pomocí AuNPs a GO. LOD naměřený tímto senzorem byl 0,16 nM a 0,23 nM pro ERBB2 a CD24 [67].



Obrázek 15 - Schéma úpravy povrchu GO nanočásticemi zlata (převzato z [67])

Detekci nádorového supresorového proteinu p53 za použití nanokompozitu na bázi poly-cysteinu/grafenových kvantových teček/Au nanočástic

Protein p53 funguje v organismu jako transkripční faktor, reguluje expresi mnoha genů. Tento protein vyhledává na úsecích DNA chybová místa, v případě jejich nálezu spustí produkci genu p21, jehož pomocí se zastaví další dělení buňky. Pokud dojde k mutaci v genu p53, dochází k proliferaci chybně sekvenovaných buněk.

Mohammad Hasanzade a kol. (2018) se ve své studii zabývali sestrojením elektrochemického imunosenzoru. Základní matricí tohoto imunosenzoru byly grafenové kvantové tečky (GQD), nanočástice zlata (AuNPs) a poly-cystein. Tímto kompozitem byla modifikována zlatá elektroda.

Došlo tedy k sestavení senzoru (P-cys/GQD/AuNPs/Au), na který byly imobilizovány protilátky proti proteinu p53. Funkčnost byla sledována pomocí diferenčně pulsní voltametrie a square-wave voltametrie. Bylo dosaženo LOD 0,065 fM [68].

Detekce karcinoembryonálního antigenu pomocí imunosenzoru na bázi nanokompozitů grafenu obalených nanočásticemi zlata

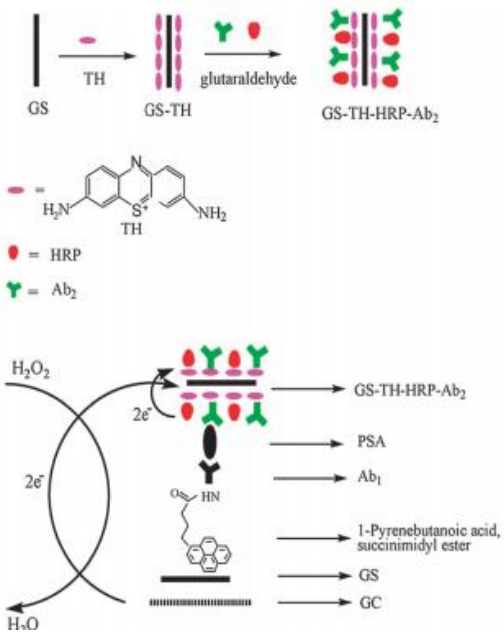
CEA je běžně vytvářen během fetálního vývoje v epiteliálních buňkách. Pokud dojde k jeho zvýšené koncentraci v séru, slouží jako biomarker nádorových onemocnění, a to zejména v nádorech trávícího traktu, plic, prostaty, aj.

Zhong a kol. (2010) publikovali studii, ve které zkoumali zvýšení citlivosti imunosenzoru pomocí nanokompozitů grafenu (NGGNs) obalených nanočásticemi zlata. Takto zkonstruovaný senzor byl použit k detekci CEA. AuNPs byly elektrochemicky adsorbovány na GC elektrodu, která byla modifikovaná pruskou modří. Na takto zhotovený povrch pak byly adsorbovány specifické molekuly zachycující analyt – protilátky anti-CEA. Sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou (HRP) byla navázána na vzniklý imunokomplex a detegována elektrochemicky. Výsledný záznam z HRP/anti-CEA/NGGN senzoru vykazuje vysokou citlivost a rovněž dynamický lineární rozsah 0,05-350 ng ml^{-1} s nízkým LOD 0,01 ng nm^{-1} CEA. Aplikace tohoto imunosenzoru pro detekci CEA ve vzorcích séra byly získanými metodami porovnatelné s referenčními hodnotami [69].

Detekce PSA pomocí imunosenzoru založeném na grafenu

Imunosenzor byl sestaven z vrstvy redukovaného oxidu grafenu, který byl modifikován thioninem (TH), křenovou peroxidázou a sekundárními protilátkami anti-PSA a z GC elektrody, na kterou byl opět adsorbován redukovaný oxid grafenu a následně byly na takto modifikovanou elektrodu imobilizovány primární protilátky anti-PSA. Antigen byl poté vychytán ze vzorku vazbou na dané protilátky. Schéma tohoto imunosenzoru je zobrazeno na obrázku 16.

Sestrojený imunosenzor vykazoval odezvy v rozmezí 0,002-10 ng/ml a LOD 1 pg/ml, dobrou reprodukovatelnost, selektivitu a stabilitu. Dobrý výkon tohoto imunosenzoru (nízký LOD, selektivita) je přičítána grafenovému vysokému poměru povrchu k objemu, což umožňuje imobilizaci velkého množství Ab_1, Ab_2, TH i HRP a jeho dobrou elektrickou vodivostí, která umožní zlepšení elektronového transferu mezi TH, HRP, H_2O_2 a elektrodou [70].



Obrázek 16 - Schéma konstrukce a detekce PSA pomocí rGO (převzato z [70])

Detekce PSA pomocí grafen/Ag nanokompozitu

Lei Yu a kol. (2017) se zabývali sestrojením elektrochemického imunosenzoru pro detekci PSA. Tento imunosenzor byl sestaven vrstvu po vrstvě, obsahoval bovinní sérový albumin k zabránění nespecifické sorpce, funkcionalizované grafenové nanočástice a nanočástice stříbra. Všechny tyto komponenty byly tepelně žíhány při 340 °C za účelem vzniku tenkého a rovnoměrného filmu AgNP s porózním inkorporovaným grafenem - (AgEPG). Následně byl tento film nanesen na povrch FTO elektrody. Na povrch zalata byly imobilizovány protilátky anti-PSA. Detekce byla provedena pomocí vazby specifické antigenu na protilátku.

Takto sestavený senzor byl použit pro detekci PSA. Za optimálních elektrochemických a imunoreakčních podmínek byl stanoven LOD na 0,44 ng/ml. Hladina PSA byla detegována metodou lineární voltametrie [71].

Detekce proteinu Ki-67 jako biomarkeru karcinomu pankreatu pomocí imunosenzoru založeném na grafeno-polydopaminovém nanokompozitu

Ki-67 je antigen, který je vázán na jádra buněk v buněčném cyklu. Je detegovatelný v buňkách, které prošly fází dělení. Pokud je detegován v jiné fázi cyklu, slouží jako ukazatel nádorového bujení. V současné době je jeho stanovení prováděno imunohistochemicky.

Liguo Hao a kol. (2017) studovali účinnost elektrochemické imunosenzoru založeného na duálním amplifikačním mechanismu, který byl výsledkem účinku nanočástic zlata (AuNP) a polydopaminu (PDA). Tyto komponenty byly společně s grafenem použity jako platformy

studovaného imunosenzoru, který byl zkonstruován pro detekci proteinu Ki-67. PDA byl použit k imobilizaci protilátek i ke značení.

Tento imunosenzor byl konstruován na bázi amplifikace mezi sondou a modifikovanou elektrodou. Jako sonda zde sloužil povrch grafenu, na kterém byly naneseny AuNPs, HRP, PDA a neznačené sekundární protilátky anti-Ki-67 značené HRP. ITO elektroda byla modifikována povrchem AuNPs-PDA a následně na ni byly imobilizovány primární protilátky anti-Ki-67. Antigen byl poté ze vzorku vychytán vazbou na protilátky. Detekce Ki-67 byla provedena amperometricky a výsledný LOD byl stanoven na 1,7 pg/ml [72].

Detekce proteinu EN2 pomocí biosenzoru na bázi uhlíku a grafenu

Výzkumný tým Kalpana Settu (2017) provedl studii elektrochemického biosenzoru na bázi aptameru, který sloužil pro detekci proteinu EN2. Tento protein patří mezi další biomarkery karcinomu prostaty. Je známý jako silné pojivo pro specifickou sekvenci DNA (5'-TAATTA-3'), která reguluje transkripci. Pro využití této vlastnosti byly aptamerové sondy se sekvencí TAATTA imobilizovány na povrchu tištěné uhlíko-grafenové elektrody pomocí karbodiimidové metody. Pro kvantitativní detekci proteinu EN2 byla použita cyklická voltametrie. Elektrochemická měření úspěšně detegovala protein EN2 v lineárním rozsahu od 35 do 185 nM a LOD byl stanoven na 33,8 nM [73].

Detekce antigenu 15-3 pomocí skleněné uhlíkové elektrody modifikované N-dopovaným grafenem

Liqiong Liu a jeho kol. (2017) se zaměřili na sestrojení elektrochemického imunosenzoru na bázi N-dopovaných grafenových listů pro senzitivní detekci antigenu CA 15-3, který slouží jako nejdůležitější biomarker karcinomu prsu. Rakovina prsu je onemocnění vyskytující se u žen. Za fyziologických podmínek je tento antigen CA 15-3 obsažen v séru v koncentraci 25 U/ml.

Tato studie představuje label-free elektrochemický imunosenzor, který v důsledku N-dopovaného grafenu vykazuje vyšší vodivost a lepší přenos elektronů. Pracovní elektroda byla modifikována připojením cílové protilátky, tedy anti-CA 15-3 na povrch N-dopované grafenem modifikované elektrody ze skelného uhlíku. Tento systém vykazoval LOD 0,017 U/ml s použitím diferenčně pulsní voltametrie jako detekční techniky [74].

Detekce C-reaktivního proteinu na bázi antrachinonem značených protilátek s pomocí sítotiskové grafenové elektrody

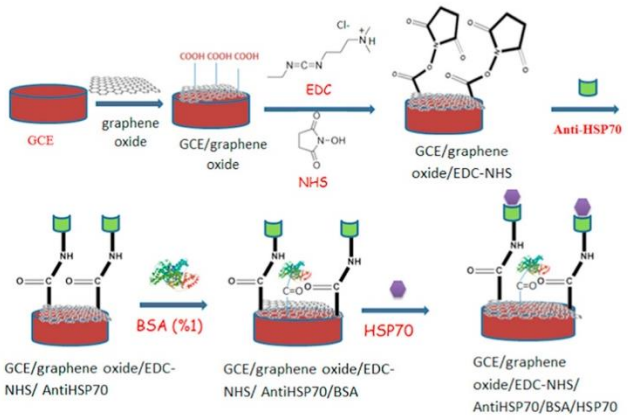
V této studii se Sakda Jampasa a kol. (2018) zaměřili na sestrojení elektrochemického imunosenzoru, k němuž využili tištěnou grafenovou elektrodu (SPGE) pro jednoduché a vysoce citlivé stanovení C-reaktivního proteinu (CRP). Tento protein je proteinem akutní fáze, je produkován v játrech a je považován za důležitý biomarker zánětu nebo kardiovaskulárních onemocnění.

Senzor se skládá ze dvou protilátek specifických pro CRP. První je neznačená protilátka (Anti-1 Ab), druhá je antrachinonem značená sekundární protilátka (AQ-2 Ab). Protilátka Anti-1 Ab byla kovalentně připojena k povrchu SPGE pomocí L-cysteinu a modifikovaného Au za účelem vytvoření anti-CRP povrchu. Po vazbě CRP a AQ-2 Ab byla měřena odezva takto zhotoveného imunosenzoru. Odezva byla měřena diferenciálně pulsní voltametrií. Koncentrace CRP byla detegována v rozmezí 0,01 až 150 μg/ml [75].

Label-free imunosenzor na bázi oxidu grafenu pro rychlé a citlivé stanovení nádorového markeru HSP70

HSP70 (z angl. heat shock protein) je protein, který patří do skupiny chaperonů, které se podílejí na správném sbalování dalších bílkovin. Jejich syntéza nastává při buněčném stresu (změna pH, změna teploty, atd.).

Burcu Özcan a kol. (2016) publikovali práci, ve které se zabývali sestrojením label-free imunosenzoru na bázi oxidu grafenu pro detekci HSP70. Biosenzor byl zkonstruován z pracovní elektrody ze skleného uhlíku, která byla následně potažena vrstvou oxidu grafenu. Na takto zhotovenou elektrodu byly jako biorozpoznávací prvek pomocí kovalentních vazeb imobilizovány protilátky proti HSP70 (tedy anti-HSP70) viz obrázek 17. Detekce HSP70 proběhla díky specifické vazbě na imobilizované protilátky. Účinnost imobilizace byla detegována pomocí cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie. Lineární rozsah takto zkonstruovaného imunosenzoru činil 12-144 fg/ml. LOD nebyl uveden [76].



Obrázek 17- Schéma konstrukce imunosenzoru pro detekci HSP70 (převzato z [76])

Elektrochemický imunosenzor na bázi polyethyleniminem modifikovaným GO pro detekci GFAP

GFAP neboli gliální fibrilární acidický protein, je bílkovina přechodného vlákna a je exprimována určitými buňkami centrálního nervového systému. V medicíně dnes slouží jako spolehlivý biomarker poškození CNS.

Kanadský výzkumný tým Sultana Kethani a kol. (2018) se zabýval sestrojením imunosenzoru na bázi GO, který byl modifikován polyethyleniminem (PEI). PEI byl adsorbován na tištěnou grafenovou elektrodu, na kterou byly následně imobilizovány protilátky anti-GFAP. Tento komplex byl následně použit pro zachycení GFAP ze vzorku. Funkčnost tohoto imunosenzoru byla detegována pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) . Tato metoda detegovala přítomnost proteinu v lineárním rozsahu od 1 pg/ml do 100 ng/ml. Takto konstruovaný imunosenzor poskytuje oproti klasické ELISA metodě značné výhody. Disponuje vyšší citlivostí, selektivitou a zejména nižší časovou náročností. U toho imunosenzoru se výsledky měření získají za 45 minut, kdežto u ELISA metody za 3-5 hodin [77].

Nanočástice stříbra adsorbované na povrchu grafenu pro detekci viru ptačí chřipky subtypu H7

Virus ptačí chřipky subtypu H7 je nízko patogenní, který se může vyskytovat u slepic nebo vykrmovaných krůt. Běžnými projevy nákazy tímto virem jsou respiratorní symptomy nebo zvýšená mortalita. Tento subtyp je náchylný k mutacím a pro ptáky tak velice ohrožujícím virem, jenž je přenosný i na člověka.

Jiaoling Huang a kol. (2016) sestavili senzor pro detekci ptačí chřipky subtypu H7. Základem byla zlatá elektroda potažená nanočásticemi zlata a grafenem. Na tento povrch pak byly

imobilizovány monoklonální protilátky H7 (MAbs). Imunoanalýza byla provedena pomocí specifické vazby antigenu ze vzorku a polyklonálních protilátek H7 (PAbs), které byly imobilizovány na povrchu grafenu s nanočásticemi stříbra. Účinnost tohoto imunosenzoru sendvičového typu byla ověřena pomocí CV. LOD byl stanoven na 1,6 pg/mL. Výsledky ukázaly, že takto zhotovený imunosenzor je vysoce specifický a citlivý a jeho potenciální aplikace by mohla být využitelná pro rychlou detekci patogenních organismů [78].

5 Závěr

Grafen jako uhlíkový nanomateriál vyniká svými specifickými vlastnostmi. Je velice pevný, má výborné elektrické a optické vlastnosti. Pro tyto vlastnosti je široce uplatnitelný, ovšem problémem stále zůstává jeho výroba. V současné době již sice známe více způsobů, jak ho vyrobit nebo připravit, ale u každé metody se nacházejí velká negativa – nízká kvalita vyrobeného grafenu, vysoká finanční náročnost nebo malá výtěžnost metody. Proto je zapotřebí zvýšit povědomí a zájem o takovémto materiálu a zaměřit se na další způsoby jeho možné výroby.

Studie, které byly ohledně grafenu publikovány, dokazují, že jeho využití v elektrochemické detekci by mohlo být zásadní v klinické praxi. Grafen byl buď použit jako film na úpravu povrchů elektrod, díky němuž došlo k vylepšení elektrochemických vlastností daného elektrodového systému nebo byl použit jako značka protilátek. V mnohých studií byly použity také jeho dva deriváty – oxid grafenu a redukovaný oxid grafenu. V některých studiích byl grafen obohacen jinými nanokompozity (nanočásticemi zlata, stříbra, dusíku), což vedlo ke zlepšení především jeho elektrochemických vlastností. Všechny uvedené studie prokázaly, že aplikace grafenu vykazovala nižší limity detekce, větší citlivost a selektivitu.

Grafen tedy do budoucna nabízí velmi slibnou aplikaci na poli biosenzorů a to zejména k detekci proteinových biomarkerů, jejichž koncentrace jsou zásadní k diagnostice karcinomů.

6 Použitá literatura

[1] GRÉGR, J. Moderní pohled na formy a modifikace uhlíku. *ResearchGate*. Technická Univerzita v Liberci (2004).

[2] AMPOLA, L. *Supertvrdé materiály a jejich efektivní využití*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství, 2011. 59 s. Dostupné z: http://hdl.handle.net/11012/1583. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství. Ústav strojírenské technologie. Vedoucí práce Anton Humár.

[3] Diamant. Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova. Praha. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/ugmnz/mineral/mineral/diamant.html

[4] KRATOCHVÍL B., ŠVORČÍK V., VOJTĚCH D.: *Úvod do studia materiálů*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2005. Str. 111. ISBN 80-7080-568-4

[5] YANG, N., HUANG W., LEI D. The effects of diamond amorphous layer on the diamond lapping surface. Procedia CIRP. 2018, 71, 140-143. DOI: 10.1016/j.procir.2018.05.086. ISSN 22128271. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212827118307145

[6] SMITH, R., WELLER T., CHOWARD Ch., DEAN M., RAHNEJAT K., SAXENA S. a ELLERBY M. Superconductivity in graphite intercalation compounds. Physica C: Superconductivity and its Applications. 2015, 514, 50-58. DOI: 10.1016/j.physc.2015.02.029. ISSN 09214534. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921453415000568

[7] Projekt VEGA Současná fyzika pro budoucí experty. VIRTUÁLNÍ KATEDRA FYZIKÁLNÍCH VĚD A INFORMATICKÉ PEDAGOGIKY. Praha 6. Dostupné z: http://vega.fjfi.

[8] HOŠEK, J. Úvod do nanotechnologie. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8.

[9] BERKA, K. *Uhlíkový nanosvět*. Olomouc. Dostupné z: http://www.popup.upol.cz/files/-forSchoolsDocuments/2013080812013857_PrF-Berka.pdf. Univerzita Palackého v Olomouci.

[10] D'AMORA, GIORDANI M. a S. Carbon Nanomaterials for Nanomedicine. Smart Nanoparticles for Biomedicine. Elsevier, 2018, 2018, s. 103-113. DOI: 10.1016/B978-0-12-814156-4.00007-0. ISBN 9780128141564. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/B9780128141564000070

[11] WEISS, Z.: 2004, Nanostruktura fullerenů, fulleritů a fulleridů, Chemické listy 98, 487

[12] SHUAI, Z. a J.L. BRÉDAS. Electronic structure and nonlinear optical properties of fullerenes. Synthetic Metals. 1993, 56(2-3), 2973-2978. DOI: 10.1016/0379-6779(93)90065-5. ISSN 03796779. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0379677993900655

[13] *Nanotechnologie v medicíně//Fullereny*. Wikiskripta. Dostupné z: https:// www.wiki-skripta.eu/w/Nanotechnologie_v_medic%C3%ADn%C4%9B//Fullereny

[14] VAIRAVAPANDIAN, D., VICHCHULADA P. a LAY M. Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing. Analytica Chimica Acta. 2008, 626(2), 119-1. DOI: 10.1016/j.aca.2008.07.052. ISSN 00032670. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008013901

[15] *Research gate*. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Carbon-nanotubes-single-walled-carbon-nanotubes-SWCNTs-on-the-left-and-multiwalled_fig2_264118957

[16] YANG, W., RATINAC R. K., RINGER S., THORDARSON P., GOODING J. a BRAET F. Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You Use Nanotubes or Graphene? Angewandte Chemie International Edition. 2010, 49(12), 2114-2138. DOI: 10.1002/anie.200903463. ISSN 14337851. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200903463

[17] PHIRI, J., GANE P. a MALONEY C. T. General overview of graphene: Production, properties and application in polymer composites. Materials Science and Engineering: B 2017, 215, 9-28.DOI: 10.1016/j.mseb.2016.10.004. ISSN 09215107. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921510716301568

[18] KUMAR, Ch. V. a PATTAMMATTEL A. Discovery of graphene and beyond. Introduction to Graphene. Elsevier, 2017, 2017, s. 1-15. DOI: 10.1016/B978-0-12-813182-4.00001-5. ISBN 9780128131824. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128131824000015

[19] MANDAU, M. Zázračný materiál grafen. Dostupné z: https://www. aldebaran.cz/-bulletin/2014_10/chip_cz-zazracny-grafen.pdf

[20] FOO, M. E. a GOPINATH C. B. S. Feasibility of graphene in biomedical applications. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017, 94, 354-361. DOI: 10. 1016/j.biopha. -2017. 07.122. ISSN 07533322. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve-/pii/S0753332217319753

[21] LA NANOTECNOLOGIA Y EL GRAFENO. Anaelua. Dostupné z: https://anaelua2. -wordpress.com/2013/06/15/la-nanotecnologia-y-el-grafeno/

[22] PUMERA, M. Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry. Chemical Society Reviews. 2010, 39(11), 4146. DOI: 10.1039/c002690p. ISSN 0306-0012. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=c002690p

[23] RAO, C. N. R., A. K. SOOD, K. S. SUBRAHMANYAM a A. GOVINDARAJ. Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial. Angewandte Chemie International Edition. 2009, 48(42), 7752-7777. DOI: 10.1002/anie.200901678. ISSN 14337851. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200901678

[24] MAMMANO, A. a ROSINO L. The spectrum 1966-67 of the peculiar object MHalfa 328-116 (V 1016 CYG): note II. Firenze: Tipografia Raccini & Chiappi, 1968. Memorie della Societa astronomica Italiana, vol. 39, fasc. 3.

[25] SHAO, Y., WANG J., WU H., LIU J., AKSAY I. A. a LIN Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. Electroanalysis. 2010, 22(10), 1027-1036. DOI: 10.1002/elan.200900571. ISSN 10400397. Dostupné z: http://doi.wiley.com-/10.1002/elan.200900571

[26] PAPAGEORGIOU, D. G., KINLOCH I. A. a YOUNG R. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. Progress in Materials Science. 2017, 90, 75-127. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.07.004. ISSN 00796425. Dostupné z: http:// -linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642517300968

[27] ZHONG Y., ZHEN Z., a ZHU H. Graphene: Fundamental research and potential applications. FlatChem. 2017, 4, 20-32. DOI: 10.1016/j.flatc.2017.06.008. ISSN 24522627. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452262717300508

[28] ZHANG, B., WEI P., ZHOU Z. a WEI T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. Advanced Drug Delivery Reviews. 2016, 105, 145-162. DOI: 10.1016/j.addr.2016.08.009. ISSN 0169409X. Dostupné z: http://linkinghub-elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16302411

[29] LAWAL, A. T. Progress in utilisation of graphene for electrochemical biosensors. Biosensors and Bioelectronics. 2018, 106, 149-178. DOI: 10.1016/-j.bios.2018.01.030. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/-S0956566318300447

[30] LEE, H. Ch., LIU W., CHAI S., et al. Synthesis of Single-layer Graphene: A Review of Recent Development. Procedia Chemistry .2016, 19, 916-921. DOI: 10.1016/j.proche. -

2016.03.135. ISSN 18766196. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S18766-19616001819

[31] WHITENER, K. E. a SHEEHAN P. Graphene synthesis. Diamond and Related Materials. 2014, 46, 25-34. DOI: 10.1016/j.diamond.2014.04.006. ISSN 09259635. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925963514000983

[32] NOVÁK, M. Analýza transportních vlastností grafenových nanostruktur. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké technické učení v Brně. Vedoucí práce Ing. Zuzana Lišková.

[33] PAPAGEORGIOU, G. D., KINLOCH I. A. a YOUNG R. J. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. Progress in Materials Science. 2017, 90, 75-127. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.07.004. ISSN 00796425. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642517300968

[34] GAO, E., LIN S., QIN Z., M., BUEHLER M. J., FENG X. a XU Z. Mechanical exfoliation of two-dimensional materials. Journal of the Mechanics and Physics of Solids. 2018, 115, 248-262. DOI: 10.1016/j.jmps.2018.03.014. ISSN 00225096. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022509618300280

[35] REN, S, RONG P. a YU Q. Preparations, properties and applications of graphene in functional devices: A concise review. Ceramics International. 2018, 44(11), 11940-11955. DOI: 10.1016/j.ceramint.2018.04.089. ISSN 02728842. Dostupné z: http://linkinghub. -elsevier.com/retrieve/pii/S0272884218309647

[36] AMIRI, A., NARAGHI M., AHMADI G., SOLEYMANIHA M. a SHANBEDI M. A review on liquid-phase exfoliation for scalable production of pure graphene, wrinkled, crumpled and functionalized graphene and challenges. FlatChem. 2018, 8, 40-71. DOI: 10.1016/j.flatc.2018.03.004. ISSN 24522627. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S2452262718300047

[37] YANG, J., YANG X. a LI Y. Molecular simulation perspective of liquid-phase exfoliation, dispersion, and stabilization for graphene. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2015, 20(5-6), 339-345. DOI: 10.1016/j.cocis.2015.10.005. ISSN 13590294. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029415000692

[38] HUO, Ch.,YAN Z., SONG X. a ZENG H. 2D materials via liquid exfoliation: a review on fabrication and applications. Science Bulletin. 2015, 60(23), 1994-2008. DOI: 10.1007/s11434-015-0936-3. ISSN 20959273. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S2095927316302535

[39] YU, P., LOWE S. E., SIMON G. P. a ZHONG Y. L. Electrochemical exfoliation of graphite and production of functional graphene. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2015, 20(5-6), 329-338. DOI: 10.1016/j.cocis.2015.10.007. ISSN 13590294. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029415000710

[40] AMIRI, A., NARAGHI M., AHMADI G., SOLEYMANIHA M. a SHANBEDI M. A review on liquid-phase exfoliation for scalable production of pure graphene, wrinkled, crumpled and functionalized graphene and challenges. FlatChem. 2018, 8, 40-71. DOI: 10.1016/j.flatc.2018.03.004. ISSN 24522627. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com-/retrieve/pii/S2452262718300047

[41] MOHAN, V., LAU B. K., HUI D. a BHATTACHARYYA D. Graphene-based materials and their composites: A review on production, applications and product limitations. Composites Part B: Engineering. 2018, 142, 200-220. DOI: 10.1016/j.compositesb.2018.01.013. ISSN 13598368. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359836817344426

[42] GAO, H. a DUAN H. 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications. Biosensors and Bioelectronics. 2015, 65, 404-419. DOI: 10.1016/j.bios.2014.10.067. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S0956566314008665

[43] RODNER, M., BAHONJIC J., MATHISEN M., et al. Performance tuning of gas sensors based on epitaxial graphene on silicon carbide. Materials & Design. 2018, 153, 153-158. DOI: 10.1016/j.matdes.2018.04.087. ISSN 02641275. Dostupné z: http://linkinghub. elsevier.com-/retrieve/pii/S0264127518303630

[44] CHAUBEY, A. a MALHOTRA B.D. Mediated biosensors. Biosensors and Bioelectronics. 2002, 17(6-7), 441-456. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00313-X. ISSN 09565663.

[45]Biosensor. Medical electronics laboratory 2013. Dostupné z: http://melab.snu.ac.kr/melab-/doku.php?id=research:research.in.melab:biosensor

[46] Skládal P. Biosenzory, Masarykova univerzita, Brno, 1999

[47] THÉVENOT, D. R., TOTH K., DURST R. A. a WILSON G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry. Biosensors and Bioelectronic. 2001, 16(1-2), 121-131. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub. elsevier. -com/retrieve/pii/S0956566301001154

[48] LI, S. Biosensor nanomaterials. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, c2011. ISBN 978-3-527-32841-3.

[49] EGGINS, B. R. Chemical sensors and biosensors. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2002. Analytical techniques in the sciences. ISBN 978-0-471-89914-3.

[50] LUPPA, P. B., SOKOLL L. J., and CHAN D. W. (2001). Immunosensors - Principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, *314*(1-2), 1-26. DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00629-5

[51] BAHADIR, E. B. a SEZGINTÜRK M. K. Electrochemical biosensors for hormone analyses. Biosensors and Bioelectronics. 2015, 68, 62-71. DOI: 10.1016/j.bios.2014.12.054. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314010082

[52] SHRIVASTAVA, A., SHARMA J. a SONI V. Various electroanalytical methods for the determination of uranium in different matrices. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University 2013, 51(1), 113-129. DOI: 10.1016/j.bfopcu.2012.09.003. ISSN 11100931. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110093112000361

[53] MUGURUMA, H. Biosensors: Enzyme Immobilization Chemistry. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, 2017, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.13486-9. ISBN 9780124095472. Dostupné z: http://linkinghub-.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472134869

[54] FELIX, F. S. a ANGNES L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. Biosensors and Bioelectronics. 2018, 102, 470-478. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.029. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S0956566317307583

[55] BURCU BAHADIR, E. a KEMAL SEZGINTÜRK M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. Talant. 2015, 132, 162-174. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.08.063. ISSN 00399140. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S0039914014007449

[56] GOPINATH, S. C.B., TANG T.-H., CITARTAN M., CHEN Y. a LAKSHMIPRIYA T. Current aspects in immunosensors. Biosensors and Bioelectronics. 2014, 57, 292-302. DOI: 10.1016/j.bios.2014.02.029. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S0956566314001079

[57] LUPPA, P. B., SOKOLL L. J a CHAN D. W. Immunosensors principles and applications to clinical chemistry. Clinica Chimica Acta. 2001, 314(1-2), 1-26. DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00629-5. ISSN 00098981. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/-S0009898101006295

[58] LI, B., PAN G., AVENT N.D., LOWRY R.B., MADGETT T. E. a WAINES P. L. Graphene electrode modified with electrochemically reduced graphene oxide for label-free DNA detection. Biosensors and Bioelectronics. 2015, 72, 313-319. DOI: 10.1016/j.bios-.2015.05.034. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/-S0956566315301305

[59] JAIN, U. a CHAUHAN N. Glycated hemoglobin detection with electrochemical sensing amplified by gold nanoparticles embedded N-doped graphene nanosheet. Biosensors and Bioelectronics. 2017, 89, 578-584. DOI: 10.1016/j.bios.2016.02.033. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316301403

[60] ČAPOUN, O. Karcinom prostaty. Česká urologická společnost ČLS JEP. Dostupné z: http://www.cus.cz/pro-pacienty/diagnozy/karcinom-prostaty/

[61] PAL, M. a KHAN R. Graphene oxide layer decorated gold nanoparticles based immunosensor for the detection of prostate cancer risk factor. Analytical Biochemistry 2017, 536, 51-58. DOI: 10.1016/j.ab.2017.08.001. ISSN 00032697. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269717303330

[62] YANG, S., ZHANG F., WANG Z. a LIANG Q. A graphene oxide-based label-free electrochemical aptasensor for the detection of alpha-fetoprotein. Biosensors and Bioelectronics 2018, 112, 186-192. DOI: 10.1016/j.bios.2018.04.026. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566318302859

[63] CHEKIN, F., VASILESCU A., JIJIE R., et al. Sensitive electrochemical detection of cardiac troponin I in serum and saliva by nitrogen-doped porous reduced graphene oxide electrode. Sensors and Actuators B: Chemical. 2018, 262, 180-187. DOI: 10.1016/j.snb.2018.01.215. ISSN 09254005. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/-retrieve/pii/S0925400518302405

[64] SHARAFELDIN, M., BISHOP G. W., BHAKTA S., EL-SAWY A., SUIB S. L. a RUSLING J. F. Fe 3 O 4 nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins. Biosensors and Bioelectronics. 2017, 91, 359-366. DOI: 10.1016/j.bios.2016.12.052. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub. - elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316313033

[65] TUTEJA, S. K., CHEN R., KUKKAR M., et al. A label-free electrochemical immunosensor for the detection of cardiac marker using graphene quantum dots (GQDs). Biosensors and Bioelectronics. 2016, 86, 548-556. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.052. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316306819

[66] KUMAR, S., SHARMA J. G., MAJÍ S. a MALHOTRA B. D. Nanostructured zirconia decorated reduced graphene oxide based efficient biosensing platform for non-invasive oral cancer detection. Biosensors and Bioelectronics. 2016, 78, 497-504. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.084. ISSN 09565663. Dostupné z: http://linkinghub. elsevier.com/-retrieve/pii/S0956566315306370

[67] SAEED, A. A., SÁNCHEZ J. L. A., O'SULLIVAN C. K a ABBAS M. A. DNA biosensors based on gold nanoparticles-modified graphene oxide for the detection of breast cancer biomarkers for early diagnosis. Bioelectrochemistry. 2017, 118, 91-99. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.07.002. ISSN 15675394. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567539417301755

[68] HASANZADEH, M., BAGHBAN H. N., SHADJOU N. a MOKHTARZADEH A. Ultrasensitive electrochemical immunosensing of tumor suppressor protein p53 in unprocessed human plasma and cell lysates using a novel nanocomposite based on poly-cysteine/graphene quantum dots/gold nanoparticle. International Journal of Biological Macromolecules- 2018, 107, 1348-1363. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.006. ISSN 01418130. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017327253

[69] ZHONG, Z.Y., WE, W., WANG, D., WANG, D., ShAN J.L., QING Y., and ZHANG, Z.M. (2010) Biosens. Bioelectron., 25, 2379-2383.

[70] YANG, M.H., JAVADI, A., LI., H., and GONG, S.Q. (2010) Biosens. Bioelectron., 26, 560-565.

[71] YU, L. Ultrasensitive Electrochemical Detection of Prostate-Specific Antigen (PSA) Based on Graphene-Silver Nanocomposite. International Journal of Electrochemical Science. 2017, 8188-8197. DOI: 10.20964/2017.09.62. ISSN 14523981. Dostupné z: http://www.electrochemsci.org/abstracts/vol12/120908188.pdf

[72] HAO, L. Electrochemical Analysis of Ki67 Protein As Pancreatic Cancer Biomarker Based on Graphene-Polydopamine Nanocomposite. International Journal of Electrochemical Science. 2017, 3040-3049. DOI: 10.20964/2017.04.66. ISSN 14523981. Dostupné z: http://www.electrochemsci.org/abstracts/vol12/120403040.pdf

[73] SETTU, K., LIU J. T., CHEN CH. J., a TSAI J. Z. Development of carbon−graphene-based aptamer biosensor for EN2 protein detection. Analytical Biochemistry. 2017, 534, 99-107. DOI: 10.1016/j.ab.2017.07.012. ISSN 00032697. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269717303068

[74] LIU, L. Nitrogen-doped Graphene Modified Glassy Carbon Electrode for Electrochemical Determination of Breast Cancer Marker Carbohydrate Antigen 15-3. International Journal of Electrochemical SciencE. 2017, 8280-8287. DOI: 10.20964/2017.09.68. ISSN 14523981. Dostupné z: http://www.electrochemsci.org/abstracts/vol12/120908280.pdf

[75] JAMPASA, S., SIANGPROH W., LAOCHAROENSUK R., VILAIVAN T. a CHAILAPAKUL O. Electrochemical detection of c-reactive protein based on anthraquinone-labeled antibody using a screen-printed graphene electrode. Talanta. 2018, 183, 311-319. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.075. ISSN 00399140. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914018301838

[76] ÖZCAN, B. a SEZGINTÜRK M. K. Graphene oxide based electrochemical label free immunosensor for rapid and highly sensitive determination of tumor marker HSP70. Talanta. 2016, 160, 367-374. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.07.039. ISSN 00399140. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914016305392

[77] KHETANI, S., OZHUKIL KOLLATH V., KUNDRA V., NGUYEN M. D., DEBERT Ch., SEN A., KARAN K. a SANATI-NEZHAD A. Polyethylenimine Modified Graphene-Oxide Electrochemical Immunosensor for the Detection of Glial Fibrillary Acidic Protein in Central Nervous System Injury. ACS Sensors. 2018, 3(4), 844-851. DOI: 10.1021/acssensors.8b00076. ISSN 2379-3694. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssensors.8b00076

[78] HUANG, J., XIE Z., XIE Z., et al. Silver nanoparticles coated graphene electrochemical sensor for the ultrasensitive analysis of avian influenza virus H7. Analytica Chimica Acta. 2016, 913, 121-127. DOI: 10.1016/j.aca.2016.01.050. ISSN 00032670. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267016301386