

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Fluorescenční značení biomolekul

Kateřina Kozlová

Bakalářská práce

2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Kozlová**  
Osobní číslo: **C20230**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Fluorescenční značení biomolekul**  
Téma práce anglicky: **Fluorescent Labeling Of Biomolecules**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma fluorescenční značení biomolekul.
2. V práci definujte pojem fluorescence, dále vysvětlete, co to jsou biomolekuly a jak se mohou značit a v poslední části práce se věnujte fluorescenčnímu značení biomolekul.
3. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus* apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Fluorescenční značení biomolekul 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2023

Kateřina Kozlová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji Ing. Lucii Michalcové za její čas a odborné vedení bakalářské práce. Dále děkuji svému příteli za jeho podporu a trpělivost. V neposlední řadě děkuji své rodině, která mě během studia podporuje.

## **ANOTACE**

Tato práce se věnuje fluorescenci, biomolekulám a jejich značení. Fluorescence je popsána v kontextu s luminiscencí. Jsou zmíněny její typy a uveden rozdíl mezi nimi. Dále jsou diskutovány vnitřní a vnější luminofory – se zaměřením na fluorofory a jejich výskytem a využitím. V druhé části jsou popsány biomolekuly a jejich značení, podrobně se práce věnuje nukleovým kyselinám a bílkovinám. Je popsáno imunoanalytické značení biomolekul. Třetí část se věnuje fluorescenčním sondám a značkám. Jsou uvedena jejich využití a vlastnosti.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Fluorescence, biomolekula, značení, sonda, imunoanalytické metody

## **TITLE**

Fluorescent Labeling Of Biomolecules

## **ANNOTATION**

This work focuses on fluorescence, biomolecules, and their labeling. Fluorescence is described in the context of luminescence, and the different types of fluorescence are mentioned, along with their differences. Furthermore, internal and external luminophores are discussed, with a focus on fluorophores and their occurrence and applications. The second part of the work describes biomolecules and their labeling, with a detailed focus on nucleic acids and proteins. The immunoanalytical labeling of biomolecules is described. The third part focuses on fluorescent probes and tags, including their utilization and properties.

## **KEYWORDS**

Fluorescence, biomolecule, labeling, probe, immunoanalytic methods

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	9
SEZNAM TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK.....	10
ÚVOD .....	11
1. Luminiscence .....	12
1.1.1. Vnitřní luminofory .....	13
1.1.2. Vnější luminofory.....	14
1.1. Fluorescence.....	15
1.2. Excitační a emisní spektra.....	17
1.2.1. Stokesův a Anistokesův posun.....	18
1.3. Fluorescenční rezonanční transfer.....	19
2. Biomolekuly a jejich značení.....	22
2.1. Nukleové kyseliny.....	22
2.1.1. Struktura nukleových kyselin.....	22
2.1.2. Funkce nukleových kyselin a DNA.....	24
2.2. Bílkoviny.....	24
2.2.1. Struktura bílkovin.....	25
2.2.2. Funkce bílkovin.....	26
2.3. Imunologické značení biomolekul .....	26
2.3.1. Radioaktivní značení biomolekul.....	27
2.3.2. Značení enzymy .....	28
2.3.1. Značení pomocí nanomateriálů .....	28
3. Fluorescenční značení biomolekul.....	30
3.1. Fluorescenční sondy.....	32
3.1.1. Akridinová oranž.....	32
3.1.2. Ethidium bromid.....	33

3.1.3. DAPI.....	33
3.2. Fluorescenční značky .....	34
3.2.1. FITC a TRITC .....	35
3.2.2. BODIPY .....	35
3.2.3. Cyaniny .....	36
ZÁVĚR .....	38
LITERATURA.....	40



## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Organismy schopné luminiscence .....	13
Obrázek 2 Příklad kočky, která po narození svítí zeleně z důvodu vložení GFP do neoplozeného vajíčka .....	14
Obrázek 3 Diagram dle Jablonského .....	15
Obrázek 4 Struktury typických fluoreskujících látek .....	17
Obrázek 5 Ilustrační obrázek Stokesova a Antistokesova posunu.....	19
Obrázek 6 Podmínky vzniku FRET .....	20
Obrázek 7 Primární struktura nukleových kyselin (DNA a RNA) .....	23
Obrázek 8 Ústřední dogma molekulární biologie .....	24
Obrázek 9 Strukturní uspořádání bílkovin .....	25
Obrázek 10 A) aminové značení; B) hydroxylové značení .....	31
Obrázek 11 Buňky HeLa značené Cy5, FITC, DAPI.....	36

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Poločasy rozpadu jednotlivých radioizotopů .....	27
Tabulka 2 Základní informace o vybraných fluorescenčních.....	32
Tabulka 3 Základní informace o vybraných fluorescenčních.....	34

## SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
BODIPY	dipyrrromethenbordifluoridy
BSA	hovězí sérový albumin
Cy5	pentamethinový cyanin
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleové kyselina
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FAD+	flavinadenindinukleotid
FIA	fluorescenční imunoanalýza
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FRET	fluorescenční rezonanční transfer
G4	G-kvadruplex
GFP	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosintrifosfát
HeLa	nesmrtelná buněčná linie lidských epiteliálních nádorových buněk, podle Henrietty Lacksové
ICG	Indocyaninová zeleň
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NHS-ester	N-hydroxysukcinimidový ester
NIR	blízké infračervenému světlu
ODN	oligodeoxyribonukleotid
POPOP	1,4-bis(5-fenyloxazol-2-yl)benzen
RAS	Rat Sarcoma Virus
RIA	radioimunoanalýza
RNA	ribonukleové kyselina
T	thymín
TRITC	tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát
UV	ultrafialové

## ÚVOD

Tato práce se zabývá využitím jevu fluorescence za účelem značení biomolekul. Fluorescence je jedním z typů luminiscence. Luminiscence je jev, který se vyskytuje přirozeně v přírodě. Práce popisuje vnitřní a vnější luminofory. Pro luminiscenci je charakteristické vyzařování světla po vybuzení elektronů určitou formou energie. Luminiscence vyvolaná elektromagnetickým zářením je fotofosforescence, která se podle trvání záření dále kategorizuje – jednou z těchto kategorií je právě fluorescence.

Vzhledem k tématu se práce zabývá některými biomolekulami v relevantním rozsahu. Zmíněna je struktura a funkce nukleových kyselin a bílkovin – tyto dva typy biomolekul jsou totiž převážně diagnostikovány. Další část práce se věnuje imunoanalytickým metodám diagnostiky. Je popsán začátek imunoanalytických metod s radioaktivními značkami a následný přechod ke značení enzymy, nanočásticemi a fluorescenčnímu značení.

Fluorescenční značení biomolekul se dělí na značení sondami nebo značkami – podle vzniklé vazby. Jako fluorescenční sondy jsou popsány akridinová oranž, ethidium bromid a 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI). Fluorescenční značky popsané v této práci jsou fluorescein-5-isothiokyanát (FITC) a tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (TRITC), dipyrromethenbordinfluoridy (BODIPY) a cyaniny. Značení biomolekul je užitečné pro jejich detekci, diagnostiku nebo léčbu některých onemocnění. Fluorescenční značení má oproti jiným druhům značení výhody. Má nedestruktivní povahu a vysokou citlivost, lze použít malý objem fluorescenčního materiálu o nízké koncentraci.

# 1. Luminiscence

Luminiscencí se rozumí emise světla, která je způsobena návratem excitovaného elektronu do původního nízkoenergetického stavu. Toto záření představuje vyzařování fotonů. Vzhledem k tomu, že se jedná o přebytek záření nad rovnovážným tepelným vyzařováním tělesa, se luminiscence označuje také jako studené světlo. Vyzařované světlo je většinou o větší vlnové délce, než je vlnová délka budícího světla, což popisuje tzv. Stokesův zákon, a je konečné. Elektron se nejčastěji do excitovaného stavu dostane působením energie na látku – vyjma energie tepelné [1].

Rozlišuje se luminiscence podle vzniku luminiscence v různých látkách a podle typu nebo vlastností energie, která luminiscenci vyvolala. Luminiscence se podle jejího vzniku dělí na vnitřní a vnější, přičemž při vnitřní luminiscenci lze molekuly stanovit bez výrazného zásahu do systému, který sledujeme. Vnější luminiscence je popisována u systémů, ke kterým pro analýzu musí být přidáno luminiscenční barvivo, které se na molekuly naváže a výsledná luminiscence je závislá na koncentraci daného analytu [1]. Podrobnější popis vnitřních a vnějších luminoforů se zaměřením na fluorofory následuje v navazujících podkapitolách.

Druhé dělení je podle energie působící na systém za vzniku luminiscence. Rozlišujeme tak několik druhů luminiscence. Vzniká-li světlo při chemických reakcích, jde o chemiluminiscenci nebo bioluminiscenci, což je schopnost organismů produkovat světlo. Radioluminiscence je vyvolaná  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -zářením, rentgenové záření vyvolá rentgenoluminiscenci. Pokud vyvolá luminiscenci elektrická energie, jedná se o elektroluminiscenci. Působí-li na těleso elektromagnetické záření, jedná se o fotofosforescenci. Fotofosforescence se dále dělí na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci. Liší se od sebe dobou trvání sekundárního záření po odstavení zdroje dodávajícího energii – primárního záření. Fluorescence má nejkratší čas sekundárního záření z výše uvedených druhů fotofosforescence [2].

Další podkapitoly pojednávají o vnitřních a vnějších luminoforech a dále uvádějí fluorescenci v kontextu různých druhů luminiscencí.

### 1.1.1. Vnitřní luminofory

Vnitřní luminofory jsou luminofory, které se v daném prostředí vyskytují přirozeně. V přírodě jsou tyto luminofory relativně běžným jevem. Schopnost luminiscence je pozorovatelná u různých druhů hub, hmyzu, rostlin a u některých mořských živočichů nebo rostlin [3, 4, 5] nebo u molekul v lidském těle [6, 7, 8, 9]. Na obrázku č. 1 jsou některé organismy zobrazeny.

K nejznámějším organickým látkám způsobujícím bioluminiscenci patří luciferin. Luciferin se nachází v různých organismech – např. v koryších, rybách, medúzách, houbách, planktonu a v tělech světlušek. Bioluminiscence má vždy své evoluční opodstatnění (například světlušky svícením dávají najevo, že jsou připravené k páření) [5]. Dokonce i v lidském těle jsou přítomny luminofory schopné vnitřní fluorescence, jsou to redukované formy nikotinamidadenindinukleotid (NADH) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) a flavinadenindinukleotid (FAD+) [6], vitamín A [7], hemoglobin [8], myoglobin [9].



Obrázek 1 Organismy schopné luminiscence, zleva: pařezník obecný (*Panellus stipticus*), světluška větší (*Lampyris noctiluca*), krystalová medúza (*Aequorea victoria*), převzato z: [10], [11], [12].

Přírodní úkazy luminiscence a jejich výzkum inspiroval i mnohá praktická využití ve vědě (např. luminiscenční plankton se využívá pro studování proudění ve světových oceánech) [4].

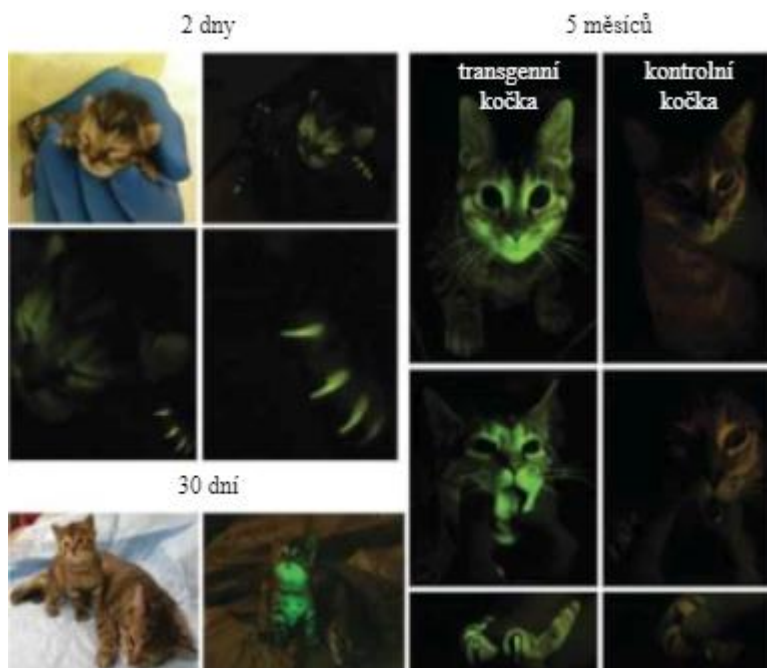
Hlavní význam pro biologický výzkum je případ medúz, kdy byla jejich schopnost světélkovat zkoumána a jejich gen pro tvorbu luminoforů byl využit k diagnostickým účelům. Na základě dalšího výzkumu genů byly syntetizovány další luminofory. Využití přírodně se vyskytujících luminoforů bylo použito např. v případě medúzy *Aequorea victoria*. Ta je schopná bioluminiscence způsobené nezářivým přenosem energie. Luminiscence je umožněna proteinem aequorinem světélkujícím modře. Pro účely výzkumu se aequorin používá jako indikátor vápenatých iontů. Tato medúza je také schopná fluorescence díky zelenému fluorescenčnímu proteinu (GFP). Pokud jsou použity oba proteiny společně, dochází ke zvýšení

intenzity emisního spektra a emisní maximum dosahuje vyšší vlnové délky než u samotného GFP. Tyto proteiny se využívají při diagnostice buněčných struktur *in vitro* i *in vivo* [3].

### 1.1.2. Vnější luminofory

Vnější luminofory se v daném prostředí přirozeně nevyskytují. Získávají se ale z přírodních zdrojů (světlušky, medúzy) nebo se syntetizují. Využívají se v zobrazovacích metodách a případně k jiným účelům [3, 5]. V běžném životě je možné potkat např. eskulin. Tento fluorofor je přirozeně obsažen v kůře jírovce maďala. Je to fluorofor, který se používá v pracích prostředcích k bělení. Eskulin po ozáření UV světlem fluoreskuje modře.

Využití však vnější luminofory nacházejí i při výzkumu. Známým příkladem z posledních let je screening nemoci za použití zeleného fluorescenčního proteinu z medúz (*Aequorea victoria*) k boji proti AIDS. Ve výzkumu se vložil zelený fluorescenční protein společně s genem z makaka *rhesus* do neoplozených vajíček kočky pomocí *in vitro* fertilizace. Gen z makaka *rhesus* byl použit, protože blokuje virus kočičí imunodeficiency. Po oplození vajíčka narozené kočky svítily zeleně (viz obrázek č. 2), což značilo přijetí genu makaka *rhesus*, a tím potlačení viru způsobujícího kočičí AIDS [13].



Obrázek 2 Příklad kočky, která po narození svítí zeleně z důvodu vložení GFP do neoplozeného vajíčka, převzato a upraveno z [13].

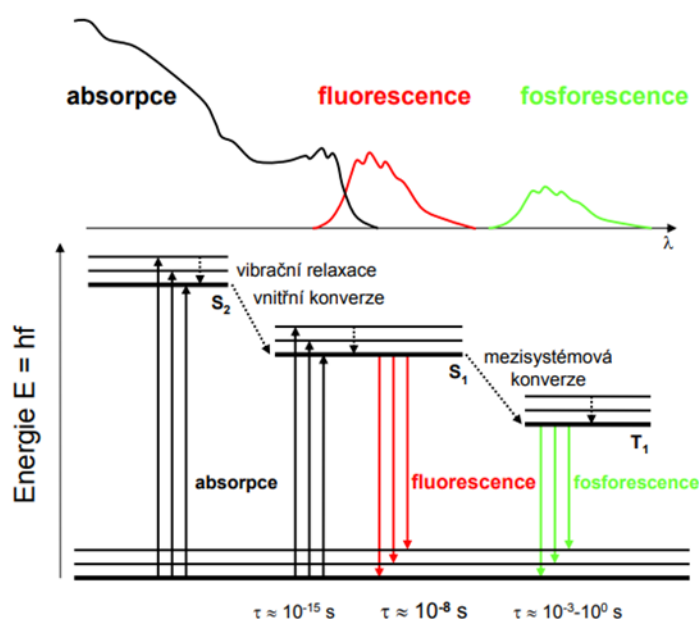
Většina využití luminoforů ve vědě je tvořena vnějšími luminofory – zejména fluorofory, kterým se věnuje tato práce a následující kapitoly.

## 1.1. Fluorescence

Fluorescence je jedním z typů luminiscence, kterou lze obecně popsat jako děj při kterém vzniká světlo. Fluorescence je chemicko-fyzikální děj určitých látek, jejichž elektrony jsou excitovány po ozáření světlem určité vlnové délky. Tento vyšší energetický stav je pro molekulu „nepřirozený“ a proto se snaží navrátit do klidového stavu s nižší energií. Pro návrat do nízkoenergetického stavu excitovaný elektron vyzáří přebytečnou energii ve formě světelného záření o specifické vlnové délce. Toto záření lze detekovat a nazývá se fluorescence [14]. Některé látky se díky této vlastnosti začaly mimo jiné hojně využívat k detekci nebo vizualizaci struktur buněk nebo procesů v nich. Výhodou metod založených na barvivech s fluorescenční složkou je mimořádná citlivost a selektivita detekce. Následuje detailní charakteristika tohoto děje.

Fluorescence je sekundární záření látky po ozáření primárním zářením, kterým je záření elektromagnetické. Při absorpci elektromagnetického záření se elektrony v molekulách díky velké přijaté energii dostávají do excitovaného stavu a mění se i jejich vibrační energie [15].

Nejprve se elektrony zastaví na energeticky nejvyšší možné konfiguraci vybuzeného stavu. Poté elektrony přejdou na metastabilní vibrační hladinu nezářivým přechodem. Metastabilní hladině odpovídá spinové kvantové číslo  $S_1$ . Postupně pak elektron přechází přes méně energeticky náročné konfigurace zpět do původního – nejméně energeticky náročného stavu – vibrační hladiny  $S_0$ , přičemž vyzáří sekundární záření viz obrázek č. 3 [16].



Obrázek 3 Diagram dle Jablonského, převzato z [17].

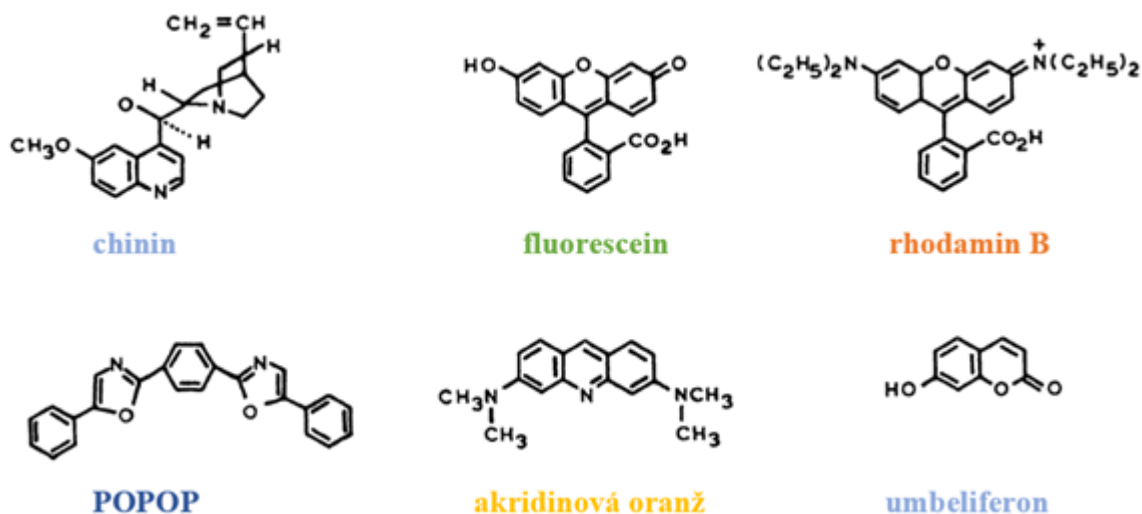
Elektrony látky schopné fluoreskovat, můžou dosáhnout různých excitovaných stavů nebo energetických hladin. Záleží na vlnové délce primárního záření, které absorbují. Podle zbarvení, tedy podle tvaru fluorescenčního spektra svítivé látky lze kvalitativní analýzou zjistit, jaká fluoreskující látka je ve vzorku přítomna. Podle intenzity záření kvantitativní analýzou zjišťujeme její množství [18]. Po odstavení primárního záření je pozorovatelný dosvit, který je v případě fluorescence velmi krátký a trvá  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  sekund. Dosvit je doba, po kterou se molekula nachází v excitovaném stavu [15].

Nejčastěji se fluorescence objevuje u látek organických. Nejvýznamnějšími látkami na detekci jsou pro své intenzivní sekundární záření látky s aromatickým kruhem. Tyto látky schopné fluorescence se nazývají fluorescenční barviva nebo fluorofory [15]. Prvním známým fluoroforem byl chinin a objev jeho fluorescence byl podnětem k sestavení prvních spektrofluorometrů, které se objevily v 50. letech 20. století. Dále se chinin zkoumal za druhé světové války jako lék proti malárii. Na základě těchto výzkumů se vyvíjely další spektrofluorometry [19].

Fluorofory mají široké využití. S některými se lze dokonce setkat v každodenním životě (například stopové množství fluoresceinu a rhodaminu je součástí nemrznoucích směsí). Pro indikaci znečištění životního prostředí ropou se využívají fluorofory polycyklických aromatických vodíků – antracenu nebo perylenu. Dalším příkladem fluoroforu používaném v průmyslu je organická sloučenina 1,4-bis(5-fenyloxazol-2-yl) benzen (POPOP). Akridinová oranž je fluorofor, který našel své využití jako barvivo v medicínské diagnostice. Kumariny jsou často používány jako fluorogenní sondy v enzymových testech (příkladem takového testu je imunisorbentní test ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay). V těchto testech je nejčastěji používán umbelliferyl fosfát, který je nefluorescenční a chemickou úpravou transformován na 7-hydroxykumarát (umbeliferon), který se vyznačuje vysokou fluorescencí [19].



Významné dříve uvedené fluorofory jsou zobrazeny na obrázku č. 4. Barvy názvů jednotlivých molekul jsou na obrázku č. 4 ve stejné barvě, ve které molekuly fluoreskují.



Obrázek 4 Struktury typických fluoreskujících látek, převzato a upraveno z [19].

## 1.2. Excitační a emisní spektra

Při provádění fluorescenční analýzy jsou rozlišována dvě spektra – excitační a emisní. Každá molekula má svoje charakteristická spektra. Excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence (měřené při konstantní vlnové délce) na vlnové délce excitujícího záření. V rámci excitačního spektra jsou některé vlnové délky účinnější než jiné. Tyto vlnové délky, nazývané „excitační maxima“, jsou nejúčinnější pro danou látku a způsobují nejsilnější fluorescenci [16, 20]. Rozsah vlnových délek excitačního spektra fluoroforu odráží rozsah možných excitovaných stavů, kterých může fluorofor dosáhnout. Pro každý fluorofor tedy existuje specifická vlnová délka – excitační maximum, která nejúčinněji vyvolává fluorescenci [16].

Excitovaná molekula fluoroforu vyzářuje světlo s nižší energií než světlo, které bylo molekulou absorbováno. Proto se od sebe vždy liší barevným spektrem světla, které fluorofor při excitaci absorbuje a spektrem, které emituje [20].

Emisní spektrum je závislostí intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího záření. Pokud molekula vyzáří veškerou absorbovanou energii, má fluorescence stejnou vlnovou délku jako absorbované záření (tzv. rezonanční fluorescence).

Běžně dochází k částečnému vyčerpání absorbované energie během vibrační relaxace, což je nezářivý přechod, při kterém se molekula vrací do základního vibračního stavu a dochází ke ztrátě vibrační energie. Emisní záření, které následuje, má obvykle vyšší vlnovou délku než

absorbované světlo. Emisní spektrum molekuly často představuje zrcadlový obraz absorpčního spektra a může být excitováno zářením o vlnové délce uvnitř absorpčního pásma [16].

### 1.2.1. Stokesův a Anistokesův posun

Stokesův posun popisuje rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou, kdy emisní záření má menší energii a zároveň delší vlnovou délku než záření excitační.

Stokesův posun lze vyjádřit pomocí frekvence budících fotonů  $\nu_a$  a frekvence emitovaných fotonů  $\nu_e$  ve tvaru

$$h \nu_a \geq h \nu_e$$

kde  $h$  je Planckova konstanta ( $h = 6,626\,070\,15 \cdot 10^{-34}$  J·s).

Vztah je tedy také možné zapsat následovně

$$E_a \geq E_e$$

Energie fotonů excitačního záření je větší nebo rovna energii fotonů emitovaného záření. Rozdíl energií je přeměněn na kinetickou energii částic tvořící luminiscenční záření.

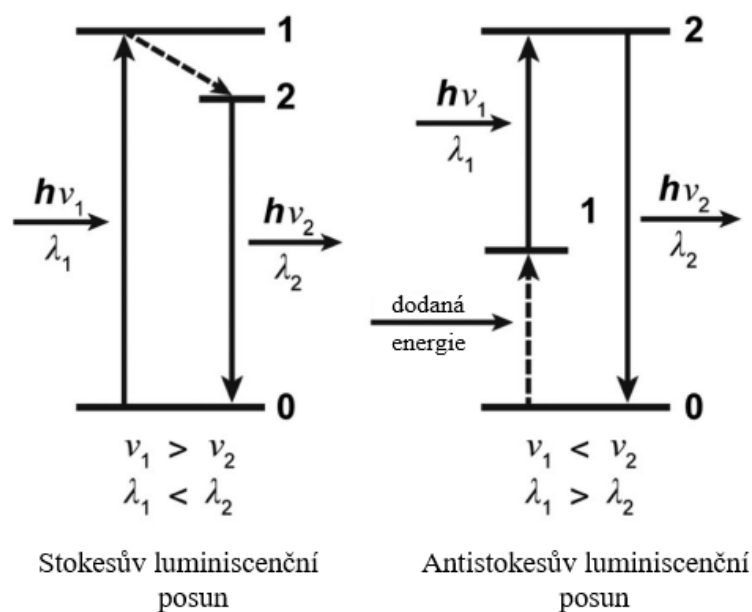
$$h \nu_a - h \nu_e = E_L$$

Stokesův posun tak popisuje zákon zachování energie [1].

Jen v ojedinělých případech místo Stokesova posunu dochází k tzv. Antistokesově posunu. V tomto případě je vlnová délka emisního záření kratší než délka záření excitačního. Této jedinečné schopnosti je využíváno pro bioaplikace, protože zdroj světla o delší vlnové délce, která je obvykle blízká infračervenému světlu, má větší průnik a umožňuje delší pracovní vzdálenost pro aplikace *in vivo*. Tato speciální schopnost konverze vlnové délky pochází z využití dodané energie z tepla nebo jiného excitačního fotonu [21].

V typickém luminiscenčním procesu, tedy při Stokesově posunu, luminiscenční centrum absorbuje jeden excitační foton s energií  $h\nu_1$  nebo s vlnovou délkou  $\lambda_1$  a přejde do excitovaného stavu 1. Po rychlém nezářivém relaxačním procesu přejde do excitovaného stavu 2 se ztrátou části energie, pak následuje emisní přechod z excitovaného stavu 2 zpět do základního stavu. Při této fázi dojde k emisi fotonů s energií  $h\nu_2$  nebo vlnovou délkou  $\lambda_2$ . Vzhledem k zákonu zachování energie musí být energie emitovaného fotonu menší než excitovaného [21].

Rozdíl mezi těmito jevy je znázorněn na obrázku č. 5.

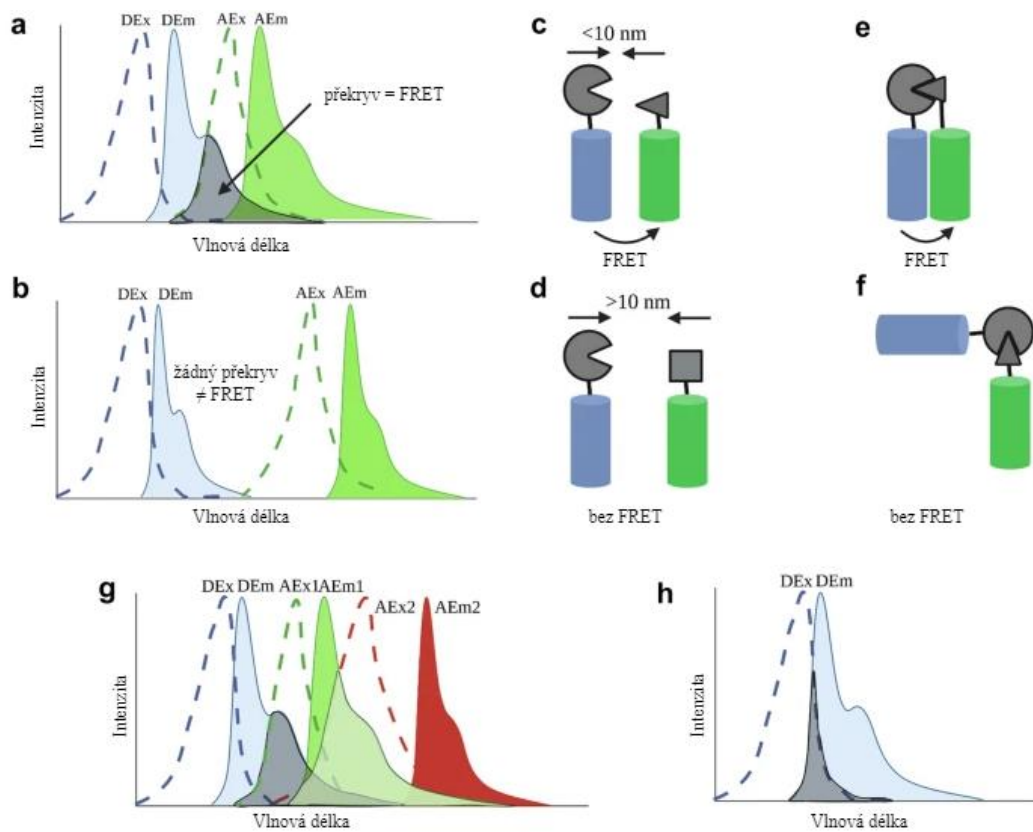


Obrázek 5 Ilustrační obrázek Stokesova (vlevo) a Antistokesova posunu (vpravo), převzato a upraveno z [21].

### 1.3. Fluorescenční rezonanční transfer

Fluorescenční rezonanční transfer nebo Försterův rezonanční přenos energie (FRET) je nesvitivý přenos energie mezi dvojicí molekul citlivých na světlo [22]. Dvojicí molekul je excitovaná molekula donorového fluoroforu v blízkosti akceptorové molekuly fluoroforu. Většinou se pro zobrazování založeném na FRET používají bílkoviny a nanomateriály schopné fluorescence. Díky použití dvou různých molekul fluoroforů lze při jejich výběru zajistit vysokou specifickou a citlivost [23].

Aby FRET fungoval, musí se překrývat emisní spektrum donoru s excitačním spektrem akceptoru [22]. Dále musejí mít donor s akceptorem vhodnou orientaci sami k sobě, protože FRET nepřenáší energii prostřednictvím fotonů, ale pomocí dipól-dipólové interakce [24]. Další podmínkou je, že donor-akceptorový pár musí být ve vzdálenosti, kdy se molekuly navzájem ovlivňují. Tato vzdálenost bývá do 10 nm [22]. Podmínky pro vznik FRET jsou shrnuty v obrázku č. 6.



Obrázek 6 Podmínky vzniku FRET, převzato a upraveno z [24].

Na obrázku č. 6 je písmenem „A“ označen akceptor, písmenem „D“ donor. „Ex“ a „Em“ označují intenzitu excitačního a emisního spektra v závislosti na vlnové délce. V grafu *a* je šedě vyznačen překryv emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru – vzniká FRET. V grafu *b* se tato spektra nepřekrývají a FRET nemůže vzniknout. Graf *g* ukazuje možnost vzniku FRET tří fluoroforů, kde se z akceptoru 1 zároveň stane donor pro akceptor 2. Šedá oblast je překryvem spekter donoru a akceptoru 1 a světle zelená oblast je překryvem spekter akceptoru 1 a akceptoru 2. V grafu *h* je případ vzniku FRET s jedním fluoroforem, kdy se excitační spektrum překrývá s emisním spektrem (šedá oblast).

Dále je na obrázku č. 6 pod písmeny *e* a *f* zobrazena podmínka vzájemné orientace molekul donoru a akceptoru a pod písmeny *c* a *d* je zobrazena podmínka vzdálenosti mezi donorem a akceptorem.

Vzdálenost donoru od akceptoru ovlivňuje FRET – a tím intenzitu fluorescence. Těto vlastnosti se využívá při detekci a kvantifikaci biomolekul. Biomolekula, na kterou se fluorofor naváže, změní vzdálenost od druhého fluoroforu, čímž se změní účinnost FRET. Biosenzory založené na FRET jsou využívány při intramolekulárních interakcích. FRET umožňuje citlivé sledování biologických procesů a molekul v reálném čase pomocí detekce změn fluorescence [23].

Nevýhody při využití FRET jsou v tom, že mohou poskytovat falešnou pozitivitu. K takovým případům dochází, pokud jsou molekuly ve zkoumaném prostředí strukturou příbuzné fluoroforům. Pak dochází ke zkřížené reaktivitě. Dále můžou FRET negativně ovlivnit interakce mezi molekulami (elektrostatické, hydrofobní, aj.). Dále aplikace FRET často vyžadují světlo o vysoké intenzitě, které může být fototoxické pro živé buňky a tkáně [23].

FRET se tradičně vyhodnocuje pomocí mikroskopie, v posledních letech se do popředí dostává vyhodnocení průtokovou cytometrií. Průtoková cytometrie se ve spojení s FRET využívá při detekci protein-proteinových interakcí v živých buňkách a ke zjištění funkčnosti nebo farmakologické léčby. Dá se využít na buňky vyšších organismů i na prvoky, bakterie a viry [24].

Konkrétně byla tato metoda využití FRET například použita pro detekci aktivity katepsinu B *in vitro* a *in vivo*. Donorem byly nanočástice s lanthanoidy. Tyto speciálně vyrobené částice dokáží měnit světlo blízké infračervenému světlu (NIR) na vícebarevné ultrafialové (UV) světlo. Akceptorem energie byl pentamethinový cyanin (Cy5). Na povrch donorových nanočástic byl kovalentně navázán peptidový substrát modifikovaný Cy5 s katepsinem B. To vedlo k FRET donorovými nanočásticemi (excitace: 980 nm; emise: 541/655 nm) a Cy5 (excitace: 645 nm) [25].

## **2. Biomolekuly a jejich značení**

Tato práce se věnuje značení biomolekul fluorescenčními barvivy. Následující kapitola se proto detailněji věnuje relevantním biomolekulám a jejich charakteristikám. Všechny živé organismy se skládají ze čtyř hlavních organických molekul – bílkovin, nukleových kyselin, sacharidů a lipidů. Tyto molekuly – biomolekuly jsou stavebními kameny buněčných struktur, enzymů, hormonů a dalších biologicky aktivních látek. Biomolekuly plní řadu klíčových funkcí, jako je ukládání a přenos energie, řízení metabolismu, uchování a přenos genetické informace, strukturální podpora a regulace buněčných procesů [26].

V biomolekulách se nejčastěji objevují tyto prvky – vodík, kyslík, uhlík, dusík a síra. Některé biomolekuly obsahují ještě další prvky, ale ty jsou zastoupeny jen v malých koncentracích. Biomolekuly se od sebe liší nejen zastoupením různých prvků, ale i velikostí a funkcí [27].

Níže jsou popsány biomolekuly, díky kterým jsou předávány signály a informace k důležitým pochodům v lidském těle. Následující kapitoly se detailněji věnují nukleovým kyselinám a bílkovinám, protože jsou převážně předmětem diagnostiky. Dále je popsáno jejich značení pro diagnostiku.

### **2.1. Nukleové kyseliny**

V jádře každé buňky jsou uloženy instrukce, které poskytují veškeré informace potřebné k růstu a životu organismu. Tyto instrukce mají podobu deoxyribonukleové kyseliny (DNA), v níž je zakódována genetická informace. DNA se nachází v jádře buněk v komplexu s proteiny. Tento komplex tvoří tzv. chromozom. Každý chromozom obsahuje řadu genů a každý gen poskytuje informaci pro stavbu určitého proteinu. V roce 1953 James Watson a Francis Crick objevili dvoušroubovicovou strukturu DNA [28]. Od té doby se biologie posunula na molekulární úroveň a pozornost dostala zejména replikace DNA. Následující kapitoly se proto věnují struktuře a funkci nukleových kyselin.

#### **2.1.1. Struktura nukleových kyselin**

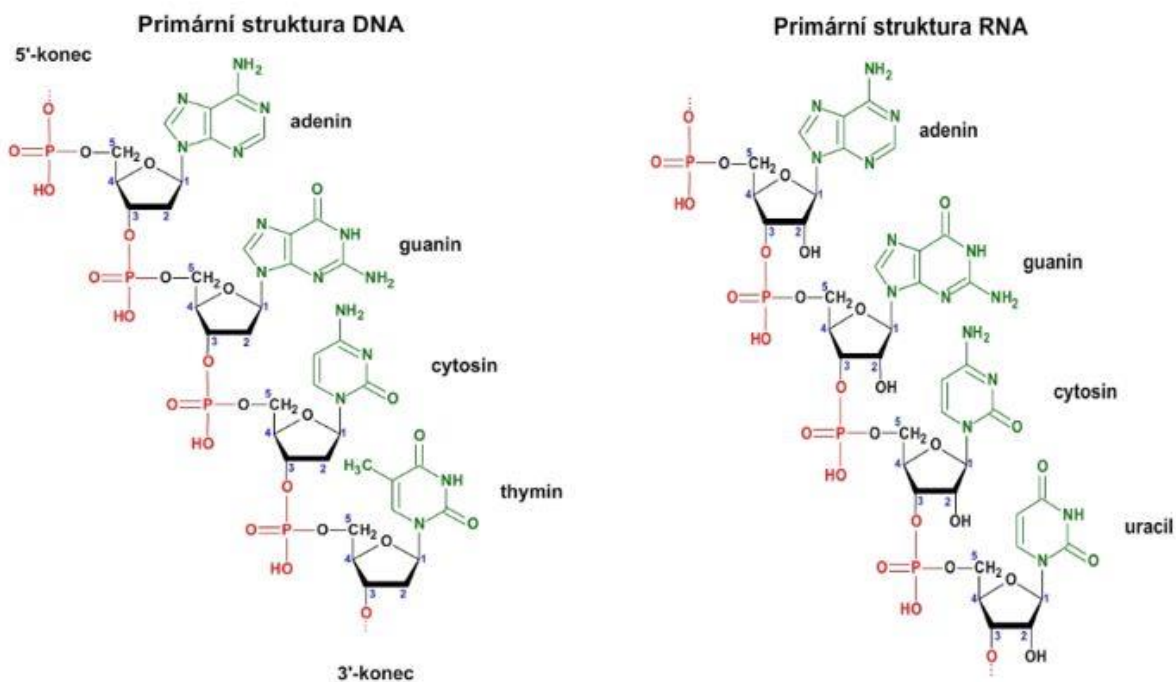
RNA a DNA jsou nukleovými kyselinami skládajícími se z vláknů nukleotidů navzájem spojených kovalentními vazbami. RNA je obvykle jednovláknová šroubovice. DNA je ze dvou polynukleotidových řetězců, které tvoří dvoušroubovici, většinou pravotočivou. RNA se dále od DNA liší přítomností hydroxylové skupiny na každé molekule pentózy a místo nukleové báze thyminu je používán uracil [29, 30].

Jednotlivá vlákna jsou složená z nukleotidů. Tento pojem zahrnuje tři jednotky: cukr – ribózu (u DNA deoxyribózu), fosfátovou skupinu a dusíkatou bázi. V molekulách se dusíkaté

báze vyskytují ve čtyřech různých formách. Tyto báze jsou rozděleny na purinové (adenin, guanin) a pyrimidinové (cytosin, uracil, thymin) [31]. Tato primární struktura obou nukleových molekul je znázorněná na obrázku č. 7.

V nukleotidech zaujímá cukerná složka centrální pozici. Z jedné strany ji obklopuje fosfátová skupina a z druhé dusíkatá báze. Vlákno nukleové kyseliny tvoří polymery se střídavou sekvencí cukrů a fosfátů, které jsou propojeny kovalentními fosfodiesterovými vazbami. V pozici 1' je na pentózu navázána dusíkatá báze, v pozici 3' i 5' je navázán zbytek kyseliny fosforečné [28].

Dusíkaté báze, které jsou navázány na pentóze, směřují dovnitř šroubovice. V případě DNA se díky protilehlým antiparalelním vláknům (jedno vlákno směřuje 5' → 3', druhé 3' → 5') báze propojují vodíkovými můstky na základě komplementarity bází. Při párování thyminu (nebo uracilu v případě RNA) s adeninem vznikají dvě vazby tvořené vodíkovými můstky. Mezi cytosinem a guaninem se vytváří tři vodíkové můstky. Díky vazbám vodíkovými můstky mezi bázemi na základě jejich komplementarity je vytvořena trojrozměrná struktura DNA [33].



Obrázek 7 Primární struktura nukleových kyselin (DNA a RNA), převzato z [34].

Šroubovice DNA je v jádru eukaryotické buňky zhuštěna pomocí oktameru histonů (bazických proteinů), které obmotává. Histonový komplex s ovinutou DNA tvoří tzv. nukleozom, který je zapečetěn histonem H1, aby nebylo možné DNA od histonů zase

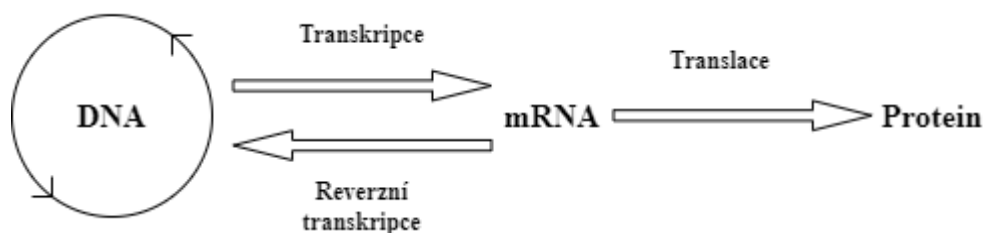
oddělit. Dále je molekula DNA svinuta, až vytvoří solenoid, což už je chromatinové vlákno. Takto je DNA uložena v chromatidě [35].

### 2.1.2. Funkce nukleových kyselin a DNA

Funkcí nukleových kyselin je uchovávat genetickou informaci. Geny uložené v DNA poskytují informaci pro stavbu bílkovin a tyto bílkoviny se podílejí na většině životně důležitých úkolů – od výstavby různých buněčných struktur po přeměnu energie nebo molekulární signalizaci aj. [28].

DNA se před dělením buňky replikuje, a proto každá buňka v organismu obsahuje genetickou informaci. Když jsou potřeba v těle bílkoviny, příslušné geny se přepisují do ribonukleové kyseliny (RNA). Tento proces se nazývá transkripce. RNA je nejprve zpracována tak, že jsou odstraněny nekódující části (introny) a zachovány kódující části (exony). Tento sestřih je označován jako splicing. Poté je RNA transportována z jádra a na základě kódu v RNA jsou vytvořeny bílkoviny (translace) [36].

Tento pohled na tok informací od DNA k proteinu se v molekulární biologii označuje jako ústřední dogma molekulární biologie. Ústřední dogma zajišťuje udržení a expresi každého genu [37] a jeho schéma je znázorněno na obrázku č. 8.



Obrázek 8 Ústřední dogma molekulární biologie, vlastní zpracování podle [32].

## 2.2. Bílkoviny

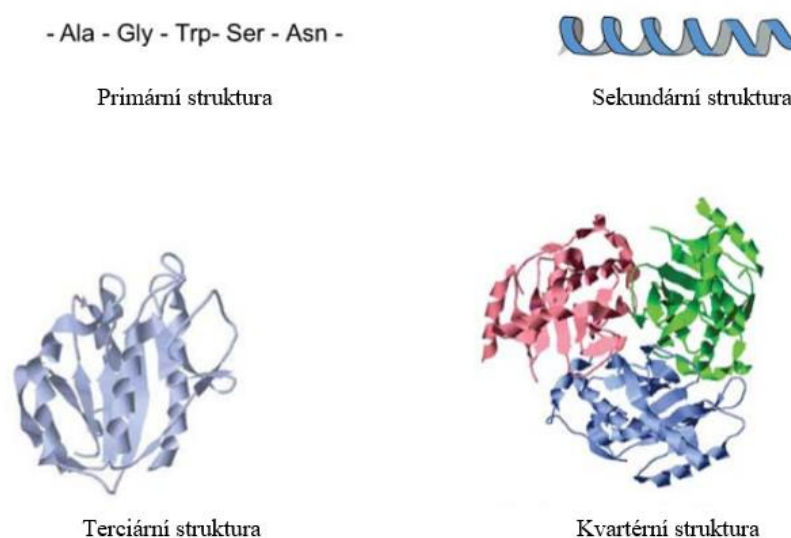
Bílkoviny jsou makromolekulami o vysoké relativní molekulové hmotnosti vyšší než 10 000 [38], jsou složeny z více než sta nerozvětvených řetězců L-aminokyselin, které jsou navzájem spojeny peptidovými vazbami. Polypeptidové řetězce se sestavují v ribozomech ze sekvenční předlohy RNA [39].

Pokud jsou bílkoviny složeny jen z aminokyselin, pak to jsou tzv. jednoduché bílkoviny. Nebo na aminokyselinách mohou být navázány i neaminokyselinové struktury jakými jsou např. sacharidy, lipidy, kovy, a takové bílkoviny se nazývají konjugované [38].



### 2.2.1. Struktura bílkovin

Každá bílkovina je jednoznačně identifikována podle sekvence aminokyselin. Tato sekvence je dána podle sekvence genu, z něhož se bílkovina vyrábí. Bílkoviny jsou tvořeny na základě genetického kódu. Struktury bílkovin se rozdělují do čtyř základních úrovní – primární, sekundární, terciární a kvartérní viz obrázek č. 9 [40].



Obrázek 9 Strukturní uspořádání bílkovin, převzato a upraveno z [40].

Primární struktura se vztahuje k pořadí jednotlivých aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Sekundární struktura je složitější, protože se jedná o prostorové uspořádání aminokyselin s vodíkovými můstky zajišťujícími stabilitu molekuly. Existují dvě základní formy sekundární struktury –  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaný list.  $\alpha$ -helix je označení pro řetězec aminokyselin stočený do pravotočivé šroubovice [32]. Sekundární struktura  $\alpha$ -helix je přítomna hlavně u bílkovin se stavebními a kontraktilními funkcemi [41].

Struktura  $\beta$ -skládaného listu se vyznačuje rovnoběžně a antiparalelně uspořádanými řetězci [41].  $\beta$ -skládaný list se vyskytuje u amyloidů – bílkovinných agregátů, které jsou nedílnou součástí buněčných procesů a zároveň některé z nich hrají roli při vzniku významných lidských neurodegenerativních onemocnění [42].

V terciární struktuře jsou kromě vodíkových můstků ještě další intramolekulární vazebné interakce – van der Waalsovy síly a disulfidické můstky [41]. Bílkoviny s terciární strukturou mohou být fibrilární nebo globulární. U proteinů ze dvou a více polypeptidových

řetězců vzniká kvartérní struktura, která vypovídá o prostorovém uspořádání molekuly [43]. Zde se uplatňují extramolekulární vazebné interakce, které spojují jednotlivé řetězce. Kvartérní strukturu má např. hemoglobin [41].

### **2.2.2. Funkce bílkovin**

Bez bílkovin by nedocházelo k životně důležitým procesům. Bílkoviny jsou potřebné k nejzákladnějším pochodům v jednotlivých buňkách i mezi nimi. Od vzniku, přes samotný vývoj až po udržení živého organismu, se vše řídí správným fungováním a správnou funkcí bílkovin. Např. metabolické dráhy, jakými jsou syntéza mastných kyselin a citrátový cyklus, obě jsou nezbytné pro téměř každý organismus a neobejdou se bez bílkovin – enzymů [39].

Existují řady dalších procesů, jako je například přenos signálu, což zajišťují hormony, neuromodulátory a imunoglobuliny nebo regulace exprese, kde je vysoký stupeň specifčnosti a účinnosti bílkovin a jejich interakce jsou nepostradatelné pro správnou biologickou funkci [44].

Bílkoviny mohou působit jako specifické rozpoznávací místo (protilátky, antigeny). Díky složení krve (fibrinogen, fibrin, trombin, tkáňový faktor) zajišťují ochranou funkci. Jiné bílkoviny jsou součástí svalové tkáně (myosin, aktin, tropomyosin). Dále mají bílkoviny několik dalších funkcí, jakými jsou stavební a podpůrné funkce, ty zajišťují kolageny, elastiny, keratiny. Některé bílkoviny (hemoglobin, myoglobin, albumin) mají transportní funkci. Feritin, kasein mají funkci skladovací [45].

## **2.3. Imunologické značení biomolekul**

Ke sledování biomolekul (bílkovin, protilátek, peptidů a aminokyselin) je potřeba značení pomocí reportérů a senzorů. Podle jejich druhu se rozlišují typy značení. Využívají se izotopové značky u radioaktivních metod, enzymové značky u kolorimetrických metod. Dále se využívají elektrochemické senzory, fotochromní sloučeniny a fluorescenční značky a sondy [46]. Tato část práce se věnuje různým druhům imunologického značení biomolekul a následující kapitola je věnována samotnému fluorescenčnímu značení biomolekul.

Základem všech imunologických metod je specifická interakce antigenu s protilátkou za vzniku imunokomplexu [47, 48]. Díky tomu lze bílkoviny – antigeny a protilátky detekovat [49]. Imunoanalýza se dělá za účelem kvalitativního i kvantitativního stanovení [48].

První imunoanalýzou byla radioimunoanalýza (RIA), která je založená na radioaktivním značení. Berson a Yalow ji vyvinuli k detekci endogenního plazmatického inzulínu a v roce 1977 byla za tento vývoj udělena Yalowovi Nobelova cena za medicínu.

Imunoanalytické metody si získaly pozornost po celém světě. Díky své relativní jednoduchosti a vysoké specifitě reakce se používají dodnes. Během let došlo k několika modifikacím RIA. Kvůli bezpečnosti při práci se radioaktivní látky začaly postupně nahrazovat enzymy (ELISA) [48] a fluorofory – fluorescenční imunoanalýza (FIA) [48, 49, 50].

Imunoanalýza je prováděna u diagnostik nemocí, ve farmakologickém průmyslu a nachází využití i v dalších oborech, kde lze provést reakci za vzniku imunokomplexu [48].

V následujících podkapitolách jsou uvedeny bližší informace o různých metodách značení biomolekul.

### 2.3.1. Radioaktivní značení biomolekul

Značení radioaktivními značkami bylo vyvinuto v 60. letech 20. století. Po objevu tohoto značení se začalo velmi často využívat v imunoanalytických metodách. Postupně se od radioaktivních látek v imunoanalýze začalo ustupovat, kvůli jejich neblahému vlivu na zdraví [48]. Radioaktivní látky se nyní ke značení biomolekul nepoužívají jen při RIA, ale i při jiných reakcích, které nejsou založeny na vzniku imunokomplexu. Radioaktivní značky se využívají v nukleární medicíně k terapii [50, 51].

K lékařskému použití je např. několik izotopů jodu ( $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ). Izotopy se liší délkou poločasu rozpadu a silou záření. Radioizotopy jodu se používají jako radiofarmaka a zároveň jako diagnostické prostředky, protože dokážou značit biomolekuly [51].

Radioaktivní značení lze použít i nepřímou. Př: kvantové tečky ze zlata, železa nebo organických materiálů, které jsou schopné vyvolat fluorescenci za daných okolností, jsou před zavedením značeny radioizotopy. Díky tomu lze detekovat oba signály – fluorescenci i radioaktivní záření. Toho se nověji využívá pro radioaktivní sledování biodistribuce nanočástic [50].

Pro samotnou scintigrafii se používají  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  a  $^{111}\text{In}$ , ty jsou ale kvůli jejich relativně krátkému poločasu rozpadu, viz tabulka 1, oproti dlouhé clearance kvantových teček nevhodné. Proto je použit  $^{125}\text{I}$ , jehož poločas rozpadu je 59,4 dne. Jeho dlouhý poločas rozpadu je užitečný pro studium dlouhodobých biologických procesů [50].

Tabulka 1 Poločasy rozpadu jednotlivých radioizotopů [50].

Radioizotopy	Poločas rozpadu
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h
$^{64}\text{Cu}$	12,7 h
$^{111}\text{In}$	2,83 dne
$^{125}\text{I}$	59,4 dne

Ve studii provedené Menghuan Tang et al, hodnotili distribuci kvantových teček radiojodací pomocí Bolton-Hunterova činidla [90]. Při jodaci je totiž možné využít vodný roztok jodu nebo Bolton-Hunterovo činidlo (N-succinimidyl 3-(4-hydroxyfenyl)propionát), které je účinnější v případech, kdy na biomolekule nejsou tyrozinové zbytky [52]. Distribuce radioaktivně značených kvantových teček *in vivo* byla hodnocena pomocí fluorescenčního zobrazování v NIR oblasti a jednofotonovou emisní výpočetní tomografií [50].

### **2.3.2. Značení enzymy**

Imunoanalytickými metodami založenými na značení pomocí enzymů je ELISA, někdy označovaná jako enzyme immunoassay (EIA) a chemiluminiscenční analýza [53]. V případě ELISA jsou těmito enzymy křenová nebo sójová peroxidáza [47,53] nebo alkalická fosfatáza [48]. Enzym je kovalentní vazbou navázán na antigenu nebo protilátku [47] pomocí glutaraldehydu [48]. V případě chemiluminiscence se používá luminol s peroxidem vodíku jako oxidační činidlo a křenová peroxidáza jako katalyzátor [54].

Navázané enzymy katalyzují přeměnu substrátu na barevný produkt, který lze detekovat spektrofotometricky nebo pomocí chemiluminiscenčního detektoru [47]. Výhodami této metody jsou vysoká specifita zajištěná specifickou interakcí antigenu s protilátkou, jednoduchost provedení, praktičnost a cenová dostupnost. Nevýhodou je komplikovaná příprava vhodných protilátek [49].

### **2.3.1. Značení pomocí nanomateriálů**

Nanomateriály byly vyvinuty k použití v medicíně, hlavně pro diagnostiku založenou na imunoanalýze. Díky různým fyzikálním a chemickým vlastnostem je tento obor velmi široký. Nejznámějšími nanomateriály jsou koloidní zlato, stříbro, kvantové tečky a magnetické nanočástice – např. oxid železitý [55].

Magnetické částice, zejména nanočástice, se díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem využívají ke tvorbě rozpoznávacích a vazebných míst v biomolekulách [56]. Využívá se k vyhledávání biomolekul, jakými jsou např. protilátky (často monoklonální), jiné bílkoviny a peptidy na povrchu buňky [57] a toxinů [58]. Značení pomocí magnetických částic je relativně variabilní. Detekce jednotlivých druhů biomolekul se liší v pracovním postupu. Cílové antigeny jsou spojeny s magnetickými částicemi díky afinitě [57]. Selektivita tohoto typu značení je zajištěna a ovlivněna velikostí vazebného místa, povrchovou energií a nábojem částic. Další roli při selektivitě hraje hydrofobnost a hydrofilnost nanočástic [56].

Diagnostika pomocí magnetických částic je citlivá, a proto je využívána v pokročilých klinických metodách, kdy na detekci už nestačí běžné imunoanalytické metody [59]. Detekce probíhá pomocí elektrobiochemických senzorů [58] nebo pomocí metody ELISA [57].

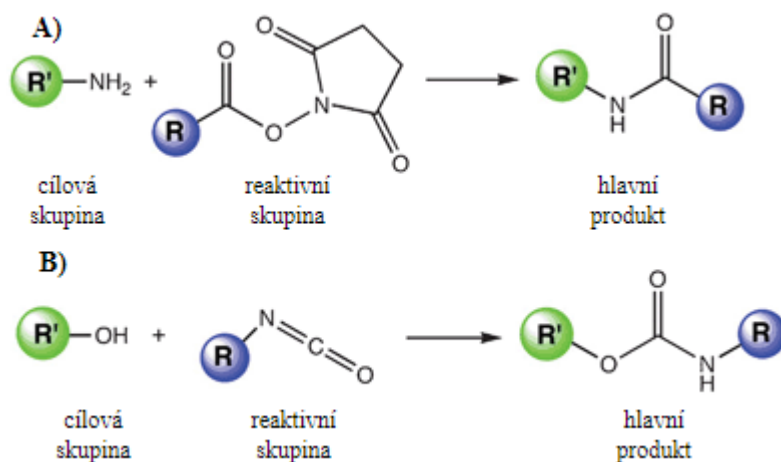
### 3. Fluorescenční značení biomolekul

Základní strukturou i funkční jednotkou organismů je buňka. Detekce nebo kvantifikace buněk je velmi důležitým prvkem medicínských procesů. Značení buněčných struktur je využíváno nejen pro diagnostické účely [60], ale je důležité i pro léčbu bakteriálních [61] a virových infekcí [62]; uplatňuje se také v teranostice – při detekci a léčbě nádorů [61, 63]. Značení buněčných struktur se také uplatňuje pro monitorování terapeutických účinků léčby [64] a obecně při zkoumání různých procesů probíhajících v buňkách [63]. Nově se pro tyto účely používají molekulární fluorescenční sondy, které jsou specifické, jednoduché [61], ekonomicky šetrné a jednoduché na přípravu. Dalšími výhodami molekulárních fluoroforů je jejich neinvazivnost, vysoká specifičnost a malý počet vedlejších účinků [60].

Vzhledem k důležitosti bezpečnosti, účinnosti a kontroly v biomedicínských aplikacích je ideální, když jsou používány biozobrazovací systémy co nejjednodušší na přípravu. Pro zajištění bezpečnosti je před zavedením sondy do těla důležité prozkoumat cytotoxicitu fluorescenčních sond, aby bylo možné používat je v klinických aplikacích. Konkrétně je důležité studovat chování fluorescenčních sond a značení v lidském těle, včetně distribuce, potenciální degradace, clearance a biokompatibility *in vivo*, aby byla zajištěna jejich účinnost. Z ekonomického i praktického hlediska je klíčové, aby byly sondy a značení reprodukovatelné a snadno škálovatelné [64].

Značení biomolekul se obvykle provádí pomocí reaktivního derivátu fluoroforu, který se váže na funkční skupinu v cílové biomolekule [65]. Fluorofory jsou navrženy tak, aby se mohly kovalentně nebo nekovalentně vázat na biomolekuly. Vždy je tedy část molekuly fluoroforu reaktivní, aby se mohla vázat s funkční skupinou molekuly. V nejčastějších případech se fluorofor v biomolekulách váže s aminokyselinami. Nejpoužívanější metodou založenou na tomto principu je tzv. aminové značení. Při této metodě vzniká kovalentní vazba mezi fluoroforem a biomolekulou. Reakce probíhá buď acylací nebo alkylací na vazbách *C-H* nebo *N-H* za vzniku stabilní amidové nebo aminové vazby. Většina reakcí, které jsou založeny na tomto principu, je velmi rychlá a probíhají při pH v rozmezí 7-8. Na obrázku č. 10 v části A) je naznačena reakce mezi aminoskupinou biomolekuly a NHS-esterovou (N-hydroxysukcinimidovo-esterovou) částí, což je reaktivní skupina molekuly fluoroforu. Biomolekula je na obrázku označena zeleně s řetězcem R', fluorofor modře s řetězcem R. Dále je na obrázku č. 10 v části B) naznačena reakce mezi reaktivní hydroxylovou skupinou biomolekuly s izokyanátem fluoroforu. Vzniklý produkt není stabilní ve vodném prostředí

a hydrolyzuje. Proto lze tyto reakce s pozitivním výsledkem provádět jen v prostředí organických rozpouštědel. Tato reakce se označuje jako hydroxylové značení [65].



Obrázek 10 A) aminové značení; B) hydroxylové značení; převzato a upraveno z [65].

Protože bílkoviny se skládají z jednotlivých aminokyselin, jsou výše uvedené reakce nescifické. Proto se tyto reakce většinou používají ke značení proteinů a jiných biomolekul s aminovými skupinami mimo živý systém [65].

Dalšími možnostmi, jak značit biomolekuly, je např. značení enzymy a jinými organickými látkami, nukleovými kyselinami a anorganickými látkami. Při určitých aplikacích mohou dosahovat zmíněné druhy značení vysokou specifitu. Tyto metody lze použít ke značení nejen *in vitro*, ale i *in vivo* [65].

Mezi molekulou fluoroforu a biomolekulou mohou vzniknout kovalentní nebo nekovalentní vazby. Nekovalentní interakce mezi molekulami mohou být hydrofobní, iontové, elektrostatické a vodíkové. Nevýhodou nekovalentní vazby je menší stabilita vazby než u kovalentní vazby. Výhodou nekovalentní vazby je to, že reakce probíhají rychleji a ve fyziologickém rozmezí pH. Dále je také výhoda v tom, že při navázání sondy nedochází k velkému ovlivňování funkční aktivity molekuly [66, 67].

Při navázání vzniká mezi fluoroforem a biomolekulou vazba. Podle typu vazby fluoroforu navázaného na biomolekulu se fluorescenční značení dělí na sondy a značky [68], kterým se věnují následující kapitoly.

### 3.1. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy se nejčastěji používají ke studiu změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu, vizualizaci DNA ve forenzních aplikacích. Vazba, která vzniká při použití fluorescenční sondy, je nekovalentní [68]. Dále jsou fluorescenční sondy používány pro účely fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). FISH je cytogenetická metoda, díky níž lze obarvit části chromozomů k jejich identifikaci a vizualizaci. Pro tyto účely se používá např: akridinová oranž [67], ethidium bromid [43, 67], DAPI. DAPI je jedna z nejnámějších a nejpoužívanějších fluorescenčních sond pro vizualizaci veškeré jaderné DNA [68]. Uvedeným sondám se více věnují následující podkapitoly a tabulka 2 shrnuje jejich vlastnosti.

Tabulka 2 Základní informace o vybraných fluorescenčních sondách.

Fluorescenční sonda	Excitační maximum [nm]	Emisní maximum [nm]	Barva emise	Označuje struktury
Akridinová oranž	490	520	zelená	DNA, RNA
Ethidium bromid	480	610	oranžová	DNA, RNA
DAPI	340	453-461	modrá	DNA, RNA

#### 3.1.1. Akridinová oranž

Emisní maxima akridinové oranže jsou při vlnové délce 525 nm za vzniku zelené barvy vyzařeného světla a při vlnové délce 650 nm, kdy vzniká světlo červené barvy [69].

Akridinová oranž se používá pro kovalentní značení RNA nebo DNA. Dále lze metodu použít nejen *in vitro*, ale i *in vivo* ke studiu živých buněk a buněčných organel [70]. Akridinová oranž se také stala výzkumnou fluorescenční sondou s předpokladem využití u protinádorové léčby. Proteiny RAS, které jsou hlavními produkty protoonkogenů, byly označeny téměř za neléčitelné [71]. Zkoumáním KRAS, což je membránová GTPáza, na kterou jsou proteiny RAS vázány [72], bylo *in silico* zjištěno, že vyvinutá sonda s akridinovou oranží se váže s vysokou afinitou a stabilizuje KRAS. Při výzkumu bylo cíleno na G4 struktury KRAS za účelem zablokování transkripce a exprese genu. Studie *in vivo* s HeLa (nesmrtelná buněčná linie lidských epiteliálních nádorových buněk, podle Henrietty Lacksové) buňkami ukázaly, že účinné ligandy ve studii *in silico* jsou proti nim vysoce cytotoxické. Studie ukazuje potenciální využití ligandů na základě akridinové oranže [71].



Akridinová oranž je od roku 2018 také používána při diagnostice parazitémie malárie. Princip této diagnostické metody stojí na interakci akridinové oranže s krevními filmy, které obarvuje. Díky akridinové oranži je vyhodnocení malárie rychlé a lze zpracovat více vzorků než s barvením dle Giemsy – dnes už zastaralým [73].

### 3.1.2. Ethidium bromid

Ethidium bromid má vlnovou délku excitačního maxima 480 nm ve vodném roztoku a emisní maximum dosahuje vlnové délky 610 nm. Při emisi je možné pozorovat oranžové světlo. Pokud se měří excitační a emisní maxima ethidium bromidu spojeného s DNA, posouvají se obě hodnoty – excitační maximum na 520 nm, emisní maximum na 596 nm. Při emisi je možné pozorovat záření žluté barvy. Tyto změny hodnot ukazují silnou vazebnou interakci mezi oběma interagujícími látkami [74].

Ethidium bromid je interkalační činidlo běžně používané jako fluorescenční sonda nukleových kyselin v různých oborech přírodních věd [75]. Ethidium bromid se vmezuje do roviny mezi páry bází DNA a díky tomu působí jako silný inhibitor DNA polymerázy [74]. Tato vlastnost zapříčiňuje, že je mutagenní a karcinogenní látkou. Proto je využíván jen v neinvazivních metodách [75]. Jedním z příkladů, kdy byl ethidium bromid používán pro neinvazivní a velmi rychlou detekci, bylo při screeningu a diagnostice rakoviny ústní v raném stádiu. Metoda byla provedena z DNA získané ze slin [76].

Dále byl ethidium bromid použit kvůli své toxicitě *in vitro* u zjišťování způsobu přepínání podávání léčiv z endogenního na exogenní nebo naopak (v závislosti na situaci). Ethidium bromid zde zastupoval léčivo, díky své interkalační vazbě s DNA a dobře prozkoumanému fotofyzikálnímu chování [74].

### 3.1.3. DAPI

DAPI dokáže proniknout neporušenou buněčnou membránou a navázat se na minoritní drážky dvouřetězcové DNA (jedna molekula DAPI je schopná obsadit tři páry AT bází) [77]. DAPI tak vytvoří s DNA vysoce fluorescenční komplex [78]. Proto je sonda DAPI používána při cíleném zobrazování jader [77] ve fluorescenčních zobrazovacích metodách [78].

DAPI tvoří komplexy i s jinými biomolekulami než jen s DNA, např. RNA, tubulinem, hovězím sérovým albuminem (BSA), enzymy,  $\beta$ -cyklodextrinem. Na základě typu vazby ve vytvořeném komplexu DAPI-biomolekula je různá intenzita fluorescence nebo posun fluorescenčního píku. Při vazbě DAPI-dvouřetězcovou DNA je intenzita fluorescence zvýšená přibližně 20krát, při vazbě DAPI-protein se intenzita fluorescence zvýší přibližně 10krát oproti intenzitě fluorescence samotného barviva DAPI. Samotné barvivo DAPI má excitační maximum 340 nm, emisní maximum 453-461 nm [78]. Po excitaci vyzařuje modrou barvu [77].

Podle vytvořeného komplexu DAPI-biomolekula se liší excitační a emisní maxima. Komplex DAPI-DNA má excitační maximum 360 nm, emisní maximum v rozpětí 455-463 nm. Při vazbě DAPI-RNA jsou maxima 360 nm pro emisi a 468 nm pro excitaci. Komplex DAPI-tubulin 360 a 452-460 nm. Vazba DAPI-BSA poskytuje emisní maximum při vlnové délce 380 nm a excitační maximum při 455 nm [78].

### 3.2. Fluorescenční značky

Následující kapitola se věnuje některým z významných fluorescenčních značek a jejich využití. Fluorescenční značky se nejčastěji používají k fluorescenčnímu značení proteinů, ke kterým se vážou kovalentní vazbou [79, 80]. Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou FITC a TRITC [79]. Citlivost FITC je ovlivněna pH, a proto je použití této fluorescenční značky v některých případech nevýhodou [81]. Nově se proto používá skupina fluorescenčních značek, která není závislá na hodnotě pH a polaritě prostředí – je to skupina BODIPY [82].

Další značkou často využívanou v medicíně je skupina cyaninů, z nichž nejznámějšími jsou derivát pentamethinový cyanin (Cy5) [83, 84] a indocyaninová zeleň (ICG) [85, 86]. Souhrn nejpoužívanějších značek je v tabulce 3.

Tabulka 3 Základní informace o vybraných fluorescenčních značkách.

Fluorescenční značka	Excitační maximum [nm]	Emisní maximum [nm]	Barva emise	Navázané struktury
FITC	480	520	zelená	bílkoviny
TRITC	550	580	žlutá	bílkoviny (protilátky; zapouzdřené, konjugované buňky)
BODIPY	290	545	zelená	bílkoviny
Cy5	645	670	červená	lipofilní buňky
ICG	750–800	830	infračervené záření	bílkoviny

### 3.2.1. FITC a TRITC

Fluorescein a rhodamin, společně ještě s eozinem, jsou podskupinami [80] organických [87] barviv xanténů. Proto mají zmíněná barviva podobné vlastnosti. Samotný fluorescein a rhodamin se pro účely zobrazovacích technik používají jen ojediněle. Častěji se kvůli stabilitě a možnosti specifického navázání na požadovanou strukturu používají jejich sloučeniny např. s polymery, oligonukleotidy, biomolekulami [80].

FITC je organické fluorescenční barvivo s afinitou k amino, thiolovým, imidazolovým, tyrosinovým a karbonylovým skupinám na bílkovinách [77]. Vlnová délka excitačního maxima je při 480 nm, emisního maxima je při 520 nm, kdy je možné pozorovat zelené světlo [88].

TRITC je hydrofobní fluorescenční barvivo. Používá se ke značení bílkovin (často protilátek) a ke značení zapouzdřených nebo konjugovaných buněk [89]. Dále se využívá k detekci kationtů kovů a reaktivních forem kyslíku [80]. Vlnová délka excitačního maxima je při 550 nm, emisního maxima při 580 nm, za pozorování žlutého světla [90].

### 3.2.2. BODIPY

Sloučeniny BODIPY jsou posledních několik let studovány jako potenciální fluorescenční značky díky svým vlastnostem, jako jsou silné emisní a excitační pásy, vysoký fluorescenční kvantový výtěžek [91], dobrá rozpustnost a malý Stokesův posun (10-20 nm) [92]. BODIPY jsou také stabilnější a mají univerzálnější použití než jiné fluorescenční značky např. fluorescein, cyaniny [91] a rhodamin [81, 82]. Používají se nejen ke značení v biologických systémech jako značky a markery (především bílkovin), využívají se i jako laserová barviva, dále v solárních člancích a ve fotokatalyzátorech [91].

BODIPY se také sledují pro schopnost produkce  $^1\text{O}_2$  a reaktivních forem kyslíku z molekulárního kyslíku. Vzniklý  $^1\text{O}_2$  a reaktivní formy kyslíku mohou oxidovat biomolekuly, což vede ke smrti nádorových buněk. Produkce  $^1\text{O}_2$  je však nízká, proto se k BODIPY navazují další sloučeniny, které produkci  $^1\text{O}_2$  podpoří. Další výhodou navázání jiné skupiny je posunutí emisního maxima k NIR. Tyto sloučeniny jsou zatím stále vyvíjeny [91].

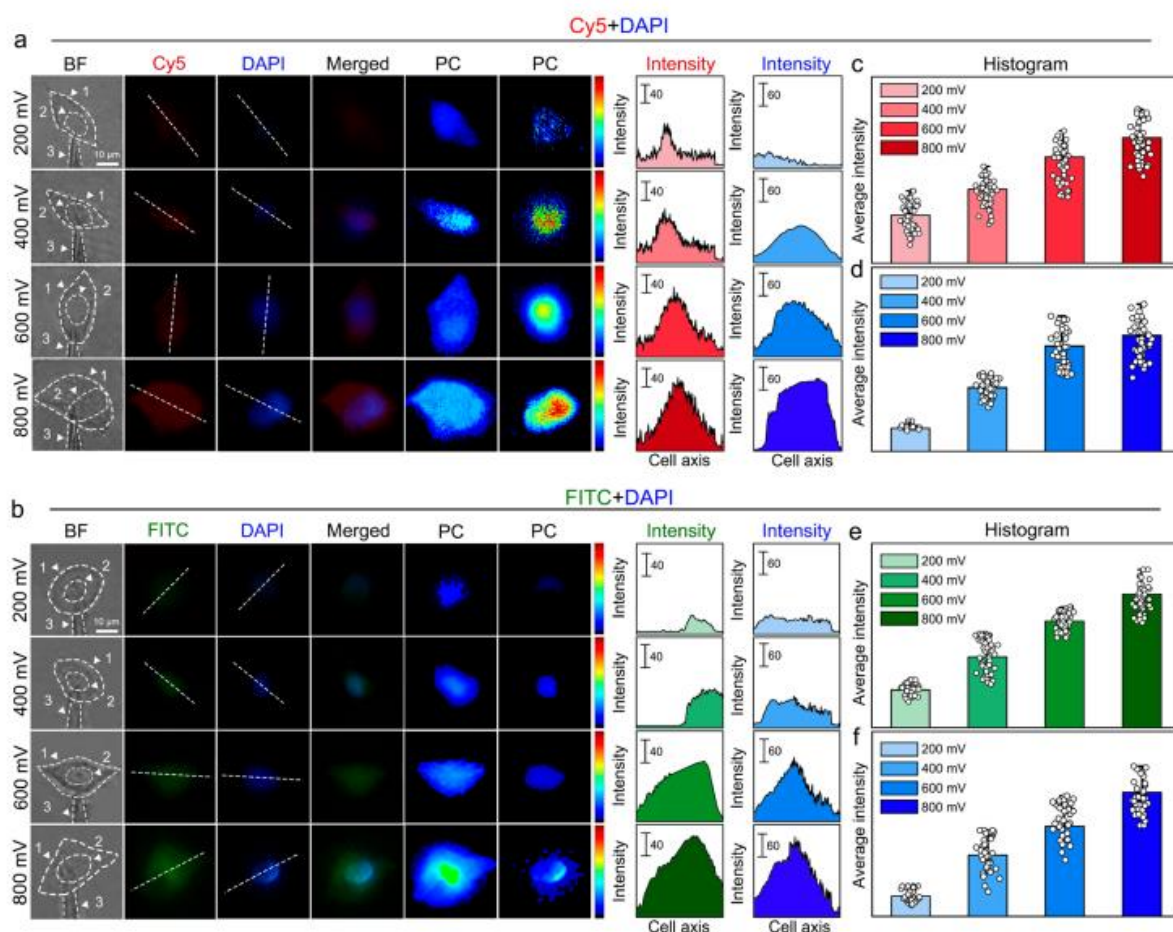
Excitační a emisní maxima BODIPY jsou 290 nm a 545 nm. Při emisi dochází k vyzáření zeleného světla [92].

### 3.2.3. Cyaniny

Cyaninová barviva mají díky své přizpůsobivé struktuře možnost dosáhnout u excitačního a emisního maxima vlnových délek NIR oblasti [66]. Proto se deriváty cyaninu, schopné tohoto jevu, často používají u medicínských diagnostik. Nejčastěji využívanými deriváty k tomuto účelu jsou pentamethinový cyanin (Cy5) [83, 84] a indocyaninová zeleň (ICG) [85, 86].

Cy5 je značka pro značení lipofilních buněk (často lipofilních neuronů a buněk s alkylovými ocásky (12 uhlíků) připojenými k lipofilním neuronům) [77], používá se také k diagnostickým účelům u rakoviny [83, 84]. Jeho excitační maximum je při vlnové délce 645 nm a emisní maximum při 670 nm. Vzniká červená barva záření [25].

Fluorescenční značka Cy5 byla společně se značkou FITC a sondou DAPI použita ve výzkumu nanopipet. V tomto výzkumu byly fluorescenčně zviditelňovány živé buňky HeLa (viz obr. 11).



Obrázek 11 Buňky HeLa značené Cy5, FITC, DAPI; převzato z [77].

Fluorescenční značka Cy5 byla společně se značkou FITC a sondou DAPI použita ve výzkumu nanopipet. V tomto výzkumu byly fluorescenčně zviditelňovány živé buňky HeLa. Na obrázku č. 11 v části *a* je možné pozorovat cytoplazma obarvená Cy5 a jádro buňky obarvené DAPI. V části *b* je použito stejné barvivo pro jádro, cytoplazma je ale zviditelněna FITC. Šipka číslo 1 představuje cytoplazmatickou membránu, šipka č. 2 jádro buňky a šipka č. 3 hrot nanopipety. Měření intenzity fluorescence probíhalo za různých potenciálů. Intenzita fluorescence se s rostoucím potenciálem zvyšovala, což bylo také potvrzeno z histogramů (obrázek č. 8 části *c*, *e*) zobrazujících průměrné intenzity fluorescence v rámci buněčných oblastí [77].

ICG je ve vodě rozpustné fluorescenční barvivo. ICG se podává intravenózně. V intravaskulárním prostoru se lipofilní složka ICG váže na hydrofobní části plazmatických bílkovin, především na albumin [85]. Díky vazbě na bílkoviny se zamezí vylučování barviva a toxicitě. Proto je ICG relativně netoxickým barvivem [86]. V játrech je barvivo metabolizováno na jodid a následně odvedeno do žluči. ICG je excitováno laserem s vlnovou délkou mezi 750 a 800 nm a jeho emisní maximum je při 830 nm [85]. Excitační i emisní spektrum je v NIR oblasti, což umožňuje průnik až 15 mm do tkání a zabraňuje autofluorescenci z endogenních tkání [86]. Díky tomu je zajištěna vysoká citlivost a vysoký kontrast při zobrazování. ICG je levné a snadno dostupné barvivo a díky tomu je hojně využíváno v lékařství, zejména v chirurgii [85]. ICG se používá pro zobrazování neurovaskulárního systému, očních struktur a lymfatických uzlin [86], v chirurgii pak při běžných onkologických operacích (rakovina hypofýzy, plic, prsu, jater, žaludku a tlustého střeva). ICG má potenciál nejen pro diagnostiku a screening nádorů, studuje se její využití pro léčbu nádorů [85].

## ZÁVĚR

Byla vypracována rešerše na téma Fluorescenční značení biomolekul. Informace pro vytvoření literární rešerše byly vyhledávány převážně v elektronických vědeckých databázích – *Web of science*, *Scopus* a *NCBI Pubmed*.

Práce se věnuje fluorescenci, která je typem luminiscence. Luminiscence je popsána v 1. kapitole práce, viz kapitola 1. Dále je uvedena fluorescence v kontextu luminoforů (látek schopných luminiscence) a také v kontextu dalších typů luminiscence. Luminiscence je v přírodě běžným jevem. V kapitole 1.1.1. a 1.1.2. jsou popsány luminofory, které se nachází běžně v přírodě a zároveň je uvedeno, jak jsou využívány. V podkapitole 1.1. je definován pojem fluorescence. Fluorescence je vyvolána elektromagnetickým zářením. Více viz kapitola 1.1.

Podle excitačního a emisního spektra lze rozlišit jednotlivé fluorofory. Pro každý fluorofor jsou charakteristická excitační a emisní maxima. Excitační a emisní maxima jsou popsána v kapitole 1.2. Dále je uveden Stokesův a Antistokesův posun, který je definován excitačním a emisním spektrem. Excitačních a emisních spekter využívá nezářivý přenos energie – fluorescenční rezonanční transfer, popsáný v kapitole 1.3. viz např. obrázek č. 6.

Druhá část práce je věnována biomolekulám. Biomolekuly jsou organické molekuly. Plní řadu důležitých funkcí v těle. K podrobnější charakteristice byly vybrány dva druhy biomolekul – nukleové kyseliny (kapitola 2.1.) a bílkoviny (kapitola 2.2), protože se diagnostikují a jsou k diagnostice používány převážně ony. Dále je popsáno imunoanalytické značení biomolekul. Podkapitola 2.3. popisuje začátky značení biomolekul a postupný přechod k jiným druhům značení, např. značení enzymy, magnetickými nanočásticemi a koloidním zlatem.

O samotném fluorescenčním značení biomolekul pojednává kapitola 3. Fluorescenční značení je oblíbené kvůli malému narušení buněčných struktur, citlivosti a specifčnosti. Značení buněčných struktur je využíváno k diagnostickým účelům a zároveň je využíváno i k léčbě bakteriálních a virových infekcí více viz kapitola 3. Fluorescenční značení našlo své místo i v teranostice, kdy se nádory nejen detekují, ale dochází i k jejich léčbě. Dále se pak značení využívá ke sledování terapeutického účinku a sledování pochodů v jednotlivých buňkách.

Fluorescenční sondy a značky se liší vazbou mezi biomolekulou a fluoroforem. Fluorescenční sondy jsou méně invazivní než značky (výjimkou je mutagenní ethidium bromid), protože s biomolekulou tvoří nekovalentní vazbu. V kapitole 3.1. jsou uvedeny nejběžněji využívané fluorescenční sondy – akridinová oranž (kapitola 3.1.1.), ethidium bromid

(kapitola 3.1.2.) a DAPI (kapitola 3.1.3.). Fluorescenční sondy se nejčastěji používají ke studiu změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu a vizualizaci DNA ve forenzních aplikacích. Základní charakteristiky fluorescenčních sond jsou shrnuty v tabulce 2.

Fluorescenční značky jsou popsány v kapitole 3.2. Nejčastěji se používají ke značení bílkovin, váží se k nim kovalentní vazbou. Základní charakteristika jednotlivých fluorescenčních značek je shrnuta v tabulce 3. Podrobněji je popsáno značení FITC a TRITC (kapitola 3.2.1.), BODIPY (kapitola 3.2.2.) a cyaniny (kapitola 3.2.3.). U všech sond a značek jsou zároveň uvedené jejich excitační a emisní maxima a barva emise.

## LITERATURA

- [1] DVOŘÁK, Lubomír a Zdeněk KUPKA. Fyzikální podstata a využití luminiscence. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1980. Odborná literatura pro učitele.
- [2] PROSSER, Václav. Experimentální metody biofyziky. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3.
- [3] BAKAYAN, Adil et al. Fluorescent Protein-photoprotein Fusions and Their Applications in Calcium Imaging. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2017, 93(2), 448-465 [cit. 2023-06-09]. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/php.12682
- [4] ROHR, Jim et al. Bioluminescence flow visualization in the ocean: an initial strategy based on laboratory experiments. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* [online]. 2002, 49(11), 2009-2033 [cit. 2023-06-09]. ISSN 09670637. Dostupné z: doi:10.1016/S0967-0637(02)00116-4
- [5] ARRANZ, Alicia a Jorge RIPOLL. Advances in optical imaging for pharmacological studies. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2015, 6 [cit. 2023-06-09]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2015.00189
- [6] VENTURAS, Marta et al. Noninvasive metabolic profiling of cumulus cells, oocytes, and embryos via fluorescence lifetime imaging microscopy: a mini-review. *Human Reproduction* [online]. 2023, 38(5), 799-810 [cit. 2023-06-09]. ISSN 0268-1161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/dead063
- [7] CRONIN, Therese et al. Effect of retinol dehydrogenase gene transfer in a novel rat model of Stargardt disease. *The FASEB Journal* [online]. 2021, 35(11) [cit. 2023-06-09]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.202002525RRR
- [8] VIGNESHWARAN, Nadanathangam et al. Autofluorescence characterization of advanced glycation end products of hemoglobin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2005, 61(1-2), 163-170 [cit. 2023-06-09]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2004.03.027
- [9] EGELANDSDAL, Bjørg et al. Autofluorescence quantifies collagen in sausage batters with a large variation in myoglobin content. *Meat Science* [online]. 2005, 69(1), 35-46 [cit. 2023-06-09]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2004.06.004
- [10] Encyclopædia Britannica, Inc. [online]. [cit. 2023-06-09]. Dostupné z: <https://cdn.britannica.com/62/177862-050-25C02A96/oyster-fungus-bioluminescence-family-species-Mycenaceae-Australia.jpg>



[11] Encyclopædia Britannica, Inc. [online]. [cit. 2023-06-09]. Dostupné z: <https://cdn.britannica.com/16/188516-050-EB7DD64E/firefly-light-mate.jpg>

[12] Vichigh Marine [online]. [cit. 2023-06-09]. Dostupné z: <https://www.vichighmarine.ca/wp-content/uploads/2017/03/Aequorea-1030x600.jpg>

[13] WONGSRIKEAO, Pimpraparet et al. Antiviral restriction factor transgenesis in the domestic cat. *Nature Methods* [online]. 2011, 8(10), 853-859 [cit. 2023-06-09]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1703

[14] WAYCHUNAS, Glenn A. Luminescence Spectroscopy. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* [online]. 2014, 78(1), 175-217 [cit. 2023-03-13]. ISSN 1529-6466. Dostupné z: doi:10.2138/rmg.2014.78.5

[15] Thermo Fisher Scientific [online]. 2006 [cit. 2023-01-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/fluorescence-fundamentals/process-fluorescence.html>

[16] FOX, Mark. *Optical properties of solids*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2010. Oxford master series in condensed matter physics. ISBN 978-0-19-957336-3.

[17] VRZALOVÁ, Aneta. [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci [cit. 2023-01-01]. Dostupné z: [https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/MTSB/MTSB\\_2020/2.\\_MTSB\\_-\\_Sondy\\_2020.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/MTSB/MTSB_2020/2._MTSB_-_Sondy_2020.pdf)

[18] KIRKBRIGHT, Gordon F. a Mike SARGENT. *Atomic absorption and fluorescence spectroscopy*. London: Academia, 1974. ISBN 0-12-409750-2.

[19] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. New York: Springer New York, NY, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1.

[20] Thermo Fisher Scientific [online]. 2006 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/fluorescence-fundamentals/light-spectrum-fluorescence.html#exrange>

[21] ZHU, Xingjun et al. Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications. *Chemical Society Reviews* [online]. 2017, 46(4), 1025-1039 [cit. 2023-05-02]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C6CS00415F

[22] ZHANG, Xiaojing et al. Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2019, 138 [cit. 2023-06-09]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2019.05.019

- [23] VERMA, Awadhesh K. et al. FRET Based Biosensor: Principle Applications Recent Advances and Challenges. *Diagnostics* [online]. 2023, 13(8) [cit. 2023-06-08]. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics13081375
- [24] LIM, Jia W. et al. Flow cytometry based-FRET: basics, novel developments and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2022, 79(4) [cit. 2023-06-09]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-022-04232-2
- [25] LI, Xinxin et al. Upconversion nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer sensing platform for the detection of cathepsin B activity in vitro and in vivo. *Microchimica Acta* [online]. 2023, 190(5) [cit. 2023-06-11]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-023-05771-6
- [26] RAVI, Rajeev, Ravikrishnan. VINU a Sathyanarayana N. GUMMADI. Coulson and Richardson's Chemical Engineering: Volume 3A: Chemical and Biochemical Reactors and Reaction Engineering. 4. Elsevier Science & Technology, 2017. ISBN 978-0-08-101096-9.
- [27] GRUMEZESCU, Alexandru. *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. 1. Elsevier Science & Technology, 2016. ISBN 978-0-323-42865-1.
- [28] WATSON, James D. a Francis H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1953, 171(4356), 737-738 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/171737a0
- [29] BANSAL, Manju. DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix. *Current science*. 2003, 85(11), 1556. ISSN 0011-3891.
- [30] KADYSHEVICH, Elena A., Victor E. OSTROVSKII. From Minerals to Simplest Living Matter: Life Origination Hydrate Theory. *Acta Biotheoretica* [online]. 2023, 71(2) [cit. 2023-05-16]. ISSN 0001-5342. Dostupné z: doi:10.1007/s10441-023-09463-9
- [31] MOHANTY, Saraju P. a Ashok SRIVASTAVA. *Nano-CMOS and Post-CMOS Electronics – Circuits and Design* [online]. 2. London: Institution of Engineering and Technology (The IET), 2016 [cit. 2023-05-16]. ISBN 978-1-5231-0317-1. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010XTMZ5/nano-cmos-post-cmos-electronics/new-paradi-introduction>
- [32] TSENG, Ampere A. *Nanofabrication - Fundamentals and Applications* [online]. Singapore: World Scientific, 2008 [cit. 2023-05-15]. ISBN 978-1-61344-778-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt009XNMPT/nanofabrication-fundamentals/using-biomolecules-self>

[33] WILLIAMS, Peter A. Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials - Polysaccharides, Proteins and Polyesters [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry (RSC), 2011 [cit. 2023-05-16]. ISBN 978-1-62870-152-4. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C4RFU8/renewable-resources-functional/structure-of-dna>

[34] TEPLÁ, Milada. Studium biochemie.cz [online]. 21.11.2013 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>

[35] SZERLONG, Heather J. a Jeffrey C. HANSEN. Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled 31st Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology* [online]. 2011, 89(1), 24-34 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0829-8211. Dostupné z: doi:10.1139/O10-139

[36] FALKENBERG, Maria, Nils-Göran LARSSON a Claes M. GUSTAFSSON. DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2007, 76(1), 679-699 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028

[37] LIU, Chang C. et al. Toward an orthogonal central dogma. *Nature Chemical Biology* [online]. 2018, 14(2), 103-106 [cit. 2023-05-16]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2554

[38] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 2nd ed. New York, N.Y.: Wiley, c2006. ISBN 0-471-21495-7.

[39] SCHMIDT, Alexander a Victor S. LAMZIN. From atoms to proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2007, 64(15), 1959-1969 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-007-7195-7

[40] CREIGHTON, Thomas E. *Biophysical Chemistry of Nucleic Acids and Proteins* [online]. Helvetian Press, 2010 [cit. 2023-05-15]. ISBN 978-0-9564781-1-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00TXWTQ2/biophysical-chemistry/protein-structure>

[41] PHILLIPS, Glyn O. a Peter A. WILLIAMS. *Handbook of Food Proteins* [online]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011 [cit. 2023-05-15]. ISBN 978-0-85-709363-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt009YAIUC/handbook-food-proteins/introduction->

[42] MATIIV, Anton B et al. Structure and Polymorphism of Amyloid and Amyloid-Like Aggregates. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2022, 87(5), 450-463 [cit. 2023-06-02]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297922050066

[43] BRÍŽĎALA, Jan. E-ChemBook: Multimediální učebnice pro [online]. [cit. 2023-05-29]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/bilkoviny>

[44] TSAI, Chung-Jung, Antonio DEL SOL a Ruth NUSSINOV. Protein allostery, signal transmission and dynamics: a classification scheme of allosteric mechanisms. *Molecular BioSystems* [online]. 2009, 5(3) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1742-206X. Dostupné z: doi:10.1039/b819720b

[45] HARRISON, Roger G. et al. *Bioseparations Science and Engineering (2nd Edition)*. 2. New York: Oxford University Press, 2015. [cit. 2023-05-15]. ISBN 978-1-68015-865-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00UPAEL1/bioseparations-science/functions-commercial>

[49] TSURUSAWA, Naoko et al. Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2021, 10(21) [cit. 2023-06-22]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10215197

[46] SAHOO, Harekrushna. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback. *RSC Advances* [online]. 2012, 2(18) [cit. 2023-06-22]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c2ra20389h

[47] NIU, Xiangheng et al. Review—Nanozyme-Based Immunosensors and Immunoassays: Recent Developments and Future Trends. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2019, 167(3) [cit. 2023-06-22]. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:10.1149/2.0082003JES

[48] SAKAMOTO, Seiichi et al.. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* [online]. 2018, 72(1), 32-42 [cit. 2023-06-22]. ISSN 1340-3443. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-017-1144-z

[50] JUN PARK, Jae, T. et al. Radioiodination and biodistribution of quantum dots using Bolton–Hunter reagent. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2011, 69(1), 56-62 [cit. 2023-06-22]. ISSN 09698043. Dostupné z: doi:10.1016/j.apradiso.2010.09.004

[51] KUMAR, Krishan. Radioiodine Labeling Reagents and Methods for New Chemical Entities and Biomolecules. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* [online]. 2022, 37(3), 173-185 [cit. 2023-06-22]. ISSN 1084-9785. Dostupné z: doi:10.1089/cbr.2021.0233

[52] LEVIN, Gabriel et al. Two-step enzymatic strategy for the synthesis of a smart phenolic polymer and further immobilization of a  $\beta$ -galactosidase able to catalyze transglycosylation reaction. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 117, 264-270 [cit. 2023-06-22]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.177

[53] ZHAO, Fang et al. The Enzyme Linked Immunosorbent and Chemiluminescence Assay for the Detection of Human Chorionic Gonadotrophin Using Soybean Peroxidase as Label Enzyme. *Current Analytical Chemistry* [online]. 2015, 11(2), 80-86 [cit. 2023-06-22]. ISSN 15734110. Dostupné z: doi:10.2174/1573411011666141223220346

[54] YANG, Xiaoyan, Yingshu GUO a Aiguo WANG. Luminol/antibody labeled gold nanoparticles for chemiluminescence immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, 666(1-2), 91-96 [cit. 2023-06-22]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.03.059

[55] TESTE, Bruno a Stephanie DESCROIX. Colloidal nanomaterial-based immunoassay. *Nanomedicine* [online]. 2012, 7(6), 917-929 [cit. 2023-06-22]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/nnm.12.58

[56] EIVAZZADEH-KEIHAN, Reza et al. Functionalized magnetic nanoparticles for the separation and purification of proteins and peptides. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2021, 141 [cit. 2023-06-21]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2021.116291

[57] CH'NG, Angela Ch. W., Zoltán KONTHUR a Theam S. LIM. Magnetic bead-based semi-automated phage display panning strategy for the directed evolution of antibodies. In: *Nanoarmoring of Enzymes with Carbon Nanotubes and Magnetic Nanoparticles* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 159-178 [cit. 2023-06-21]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780128201435. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2019.10.023

[58] GAIANI, Greta, Ciara K. O'SULLIVAN a Mònica CAMPÀS. Magnetic Beads in Marine Toxin Detection: A Review. *Magnetochemistry* [online]. 2019, 5(4) [cit. 2023-06-21]. ISSN 2312-7481. Dostupné z: doi:10.3390/magnetochemistry5040062

[59] OTIENO, Brunah A., Colleen E. KRAUSE a James F. RUSLING. Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads. In: *Rational Design of Enzyme-Nanomaterials* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 135-150 [cit. 2023-06-22]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780128046807. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2015.10.005

[60] CHEN, Wenrong et al. A review of advances in aptamer-based cell detection technology. *Molecular Biology Reports* [online]. 2023, 50(6), 5425-5438 [cit. 2023-05-27]. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-023-08410-8

[61] KONG, Yangzhi et al. Small Molecular Fluorescent Probes: Application Progress of Specific Bacteria Detection and Antibacterial Phototherapy. *Chemistry – An Asian Journal* [online]. [cit. 2023-05-27]. ISSN 1861-4728. Dostupné z: doi:10.1002/asia.202300178

[62] XU, Qian, Barnoybin XIAO a Hengyi XU. Fluorescent detection of emerging virus based on nanoparticles: From synthesis to application. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2023, 161 [cit. 2023-05-27]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2023.116999

[63] BARNOY, Eran A., Rachela POPOVTZER a Dror FIXLER. Fluorescence for biological logic gates. *Journal of Biophotonics* [online]. 2020, 13(9) [cit. 2022-12-31]. ISSN 1864-063X. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.202000158

[64] SARDARU, Monica-Cornelia et al. Nucleic Acid Probes in Bio-Imaging and Diagnostics: Recent Advances in ODN-Based Fluorescent and Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticle and Nanostructured Systems. *Molecules* [online]. 2023, 28(8) [cit. 2023-05-28]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28083561

[65] SAHOO, Harekrushna. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback. *RSC Advances* [online]. 2012, 2(18) [cit. 2023-06-06]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c2ra20389h

[66] PATONAY, Gabor et al. Noncovalent Labeling of Biomolecules with Red and Near-Infrared Dyes. *Molecules* [online]. 2004, 9(3), 40-49 [cit. 2023-06-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/90300040

[67] CAGLAR, Sinem et al. In vivo and in vitro decondensation of human sperm and assisted reproduction technologies. *In Vivo* [online]. Německo: International Institute of Anticancer Research, 2005, 19(3), 623-630 [cit. 2023-06-03]. ISSN 1791-7549.

[68] BUEL, Eric a Margaret SCHWARTZ. The Use of DAPI As a Replacement for Ethidium Bromide in Forensic DNA Analysis. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 1995, 40(2) [cit. 2023-06-03]. ISSN 00221198. Dostupné z: doi:10.1520/JFS15357J

[69] PAWLOWSKI, Michal E. a Yiran YANG. Achromatization method for multichannel fluorescence imaging systems. *Optical Engineering* [online]. 2019, 58(01) [cit. 2023-06-03]. ISSN 0091-3286. Dostupné z: doi:10.1117/1.OE.58.1.015106

[70] DOYNIKOVA, Anastasiya N. a Nikolaj L. VEKSHIN. Detection of RNA Hydrolysis with Binase by Acridine Orange Fluorescence. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2019, 55(5), 518-523 [cit. 2023-06-03]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683819050028

[71] CARVALHO, Josué et al. Fluorescent light-up acridine orange derivatives bind and stabilize KRAS-22RT G-quadruplex. *Biochimie* [online]. 2018, 144, 144-152 [cit. 2023-06-03]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2017.11.004

[72] SCHMICK, Malte.et al. KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport. *Cell* [online]. 2014, 157(2), 459-471 [cit. 2023-06-03]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2014.02.051

[73] KIMURA, Masatsugu et al. Improvement of malaria diagnostic system based on acridine orange staining. *Malaria Journal* [online]. 2018, 17(1) [cit. 2023-06-03]. ISSN 1475-2875. Dostupné z: doi:10.1186/s12936-018-2214-8

[74] KUNDU, Pronab, Sinjan DAS a Nitin CHATTOPADHYAY. Switching from endogenous to exogenous delivery of a model drug to DNA through micellar engineering. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2020, 203 [cit. 2023-06-04]. ISSN 10111344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111765

[75] LI, Zhaohui et al. Enhanced removal of ethidium bromide (EtBr) from aqueous solution using rectorite. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2020, 384 [cit. 2023-06-04]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121254

[76] JAYACHNADRAN, Sadaksharam, Aruna PRAKASARAO, Sangeetha RAMAMOORTHY a Yuvaraj MANOHARAN. Significance of Fluorescent Spectroscopy in Screening Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Cancer by Characterization of Salivary DNA Using Ethidium Bromide—A Comparative Study. *South Asian Journal of Cancer* [online]. s-0042-1750186 [cit. 2023-06-04]. ISSN 2278-330X. Dostupné z: doi:10.1055/s-0042-1750186

[77] LV, Jian et al. Specially Resolved Single Living Cell Perfusion and Targeted Fluorescence Labeling Based on Nanopipettes. *Analytical Chemistry* [online]. 2022, 94(40), 13860-13868 [cit. 2023-06-05]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.2c02537

[78] LIU, Ting et al. Identification of coexistence of biological and non-biological aerosol particles with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) stain. *Particuology* [online]. 2023, 72, 49-57 [cit. 2023-06-05]. ISSN 16742001. Dostupné z: doi:10.1016/j.partic.2022.02.009

[79] TANG, Menghuan et al. Hollow carbon dots labeled with FITC or TRITC for use in fluorescent cellular imaging. *Microchimica Acta* [online]. 2018, 185(4) [cit. 2023-06-03]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-018-2761-2

[80] BEIJA, Mariana, Carlos A. M. AFONSO a José M. G. MARTINHO. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, 38(8) [cit. 2023-06-08]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b901612k

[81] MELEDEO, Michael A. et al. Investigation of pH and temperature effects on FRET systems for glucose sensing. *Opticaldiagnostic and sensing of biological fluids and glucose and cholesterol monitoring II* [online]. San Jose: Spie-international SOC OPTICAL ENGINEERING, 2002, (4624), 55-65 [cit. 2023-06-03]. Dostupné z: doi:10.1117/12.468327

[82] ZHOU, Jinfeng et al. A novel near-infrared colorimetric and fluorescent probe based on a piperidine-substituted aza-BODIPY photosensitizer for detection of extreme acidity. *Analytical Methods* [online]. 2021, 13(36), 4099-4104 [cit. 2023-06-03]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/D1AY00995H

[83] UM, Wooram et al. A Comparative Study on Albumin-Binding Molecules for Targeted Tumor Delivery through Covalent and Noncovalent Approach. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2019, 30(12), 3107-3118 [cit. 2023-06-07]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00760

[84] LAPA, Sergey et al. A Simultaneous Use of Cy5-Modified Derivatives of Deoxyuridine and Deoxycytidine in PCR. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [online]. 2020, 46(4), 557-562 [cit. 2023-06-07]. ISSN 1068-1620. Dostupné z: doi:10.1134/S1068162020040111

[85] DAI, Zhang-Yi et al. The primary application of indocyanine green fluorescence imaging in surgical oncology. *Frontiers in Surgery* [online]. 2023, 10 [cit. 2023-05-27]. ISSN 2296-875X. Dostupné z: doi:10.3389/fsurg.2023.1077492

[86] REINHART, Michaela B. et al. Indocyanine Green. *Surgical Innovation* [online]. 2016, 23(2), 166-175 [cit. 2023-06-07]. ISSN 1553-3506. Dostupné z: doi:10.1177/1553350615604053

[87] FARAT, Oleg K. et al. Novel xanthene-like dyes: synthesis and spectral properties. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* [online]. 2022, 153(5-6), 443-459 [cit. 2023-06-08]. ISSN 0026-9247. Dostupné z: doi:10.1007/s00706-022-02931-x



[88] PEI, Yanling et al. Synthesis and Characterization of One-Dimensional Bifunctional Carbon Nanotubes/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (FITC) Nanohybrids. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2013, 13(6), 3928-3935 [cit. 2023-06-08]. ISSN 1533-4880. Dostupné z: doi:10.1166/jnn.2013.7154

[89] ZEINI, Darya et al. Influence of Lysine and TRITC Conjugation on the Size and Structure of Dextran Nanoconjugates with Potential for Biomolecule Delivery to Neurons. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2021, 4(9), 6832-6842 [cit. 2023-06-08]. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.1c00544

[90] TANG, Menghuan et al. Hollow carbon dots labeled with FITC or TRITC for use in fluorescent cellular imaging. *Microchimica Acta* [online]. 2018, 185(4) [cit. 2023-06-08]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-018-2761-2

[91] SARIKAYA, Semiha Y. et al. Novel BODIPY-Fluorene-Fullerene and BODIPY-Fluorene-BODIPY Conjugates: Synthesis, Characterization, Photophysical and Photochemical Properties. *Journal of Fluorescence* [online]. 2023, 33(1), 297-304 [cit. 2023-06-12]. ISSN 1053-0509. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-022-03060-8

[92] MALLAH, Ramnath et al. Excitation energy transfer processes in BODIPY based donor-acceptor system - Synthesis, photophysics, NLO and DFT study. *Optical Materials* [online]. 2018, 84, 795-806 [cit. 2023-06-12]. ISSN 09253467. Dostupné z: doi:10.1016/j.optmat.2018.08.007