**Uniwersytet Jagielloński**

**Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

# ROZPRAWA DOKTORSKA

## Nanostrukturalne fluorescencyjne materiały hybrydowe do konstrukcji biosensorów

**Łucja Rodzik-Czałka**

Promotor: prof. dr hab. Maria Nowakowska

**Kraków 2018**

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

**Oświadczenie**

Ja niżej podpisana Łucja Rodzik-Czałka (nr indeksu: 1047008) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „Nanostrukturalne fluorescencyjne materiały hybrydowe do konstrukcji biosensorów'' jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Nowakowskiej. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia …… ……

*podpis doktorantki*

Praca realizowana w ramach projektu
Fluorescencyjne biosensory oparte na kropkach kwantowych i zasadach purynowych/pirymidynowych - synteza, właściwości i potencjalne zastosowanie
2016/21/N/ST5/00883

Składam serdeczne podziękowania
***prof. dr hab. Marii Nowakowskiej***
za wiarę, zaufanie i motywację, za każdą radę i pomoc
a także nieocenioną życzliwość i cierpliwość
Dziękuję również
***dr Joannie Lewandowskiej-Łańcuckiej***
za ogromne wsparcie,
za przekazaną wiedzę i pasję do pracy,
za aurę, którą roztacza w Swoim otoczeniu
oraz za wiarę,
która dodaje siły w najtrudniejszych momentach

Pragnę podziękować ***Markowi***
za ogromną pomoc i nieustające wsparcie

Z całego serca dziękuję
***Moim Rodzicom***
***i Mężowi Dominikowi***

**Spis treści**

WSTĘP ..... 9

CZĘŚĆ LITERATUROWA ..... 11

1. Zjawisko fluorescencji ..... 12

1.1. Diagram Jabłońskiego ..... 12

1.2. Właściwości fluorescencji ..... 14

2. Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji ..... 16

2.1. Wykorzystanie kropek kwantowych (QDs) i nanocząstek złota (AuNPs) w badaniach przenoszenia energii według mechanizmu FRET ..... 19

3. Kropki kwantowe ..... 19

3.1. Koncepcja QDs jako półprzewodników ..... 19

3.2. Kropki kwantowe – właściwości, chemia powierzchni ..... 20

3.3. Rodzaje QDs rdzeń/powłoka ..... 23

3.4. Synteza kropek kwantowych ..... 24

3.5. Modyfikacje powierzchni QDs ..... 26

3.6. Biokoniugacja QDs ..... 28

4. Biosensory oparte na kropkach kwantowych ..... 30

5. Znaczenie zasad azotowych, nukleozydów oraz ich pochodnych ..... 32

5.1. Budowa ..... 32

5.2. Zasada komplementarności zasad azotowych ..... 33

5.3. Rola adeniny, guaniny i pochodnych adeniny w organizmie człowieka ..... 33

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA ..... 35

Część Eksperymentalna ..... 36

1. Materiały ..... 36

2. Otrzymywanie ..... 36

2.1. Kropki kwantowe tellurku kadmu stabilizowane kwasem tioglikolowym ..... 36

2.2. Koniugat typu kropki kwantowe – tymina ..... 37

2.3. Biosensor oparty na QDs-tymina – eksperyment w buforze PBS ..... 38

2.4. Otrzymywanie SU ..... 39
2.5. Biosensor bazujący na QDs-tymina – eksperyment w sztucznym moczu ..... 39
2.6. Koniugat typu kropki kwantowe – guanina ..... 40
2.7. Biosensor bazujący na QDs-guanina – eksperyment w buforze PBS ..... 41
2.8. Biosensor bazujący na QDs-guanina – eksperyment w sztucznym moczu ..... 42
2.9. Nanocząstki złota (AuNPs) stabilizowane 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu… ..... 42
2.10. Koniugat AuNPs-cytozyna ..... 43
2.11. Biosensor bazujący na QDs-guanina i AuNPs-cytozyna ..... 44
3. Stosowane metody ..... 45
Rozdział 1 ..... 47
Biosensor bazujący na kropkach kwantowych i zasadzie azotowej – tyminie – otrzymywanie i właściwości ..... 47
Wprowadzenie ..... 48
Wyniki i dyskusja ..... 50
1. Otrzymane materiały ..... 50
2. Synteza i fizykochemiczna charakterystyka QDs i QDs-tymina ..... 50
2.1. Analiza FTIR ..... 50
2.2. Analiza składu chemicznego ..... 53
2.3. Analiza XPS ..... 54
2.4. Analiza XRD ..... 55
3. Średnica hydrodynamiczna i potencjał zeta ..... 56
4. Obrazowanie/Morfologia ..... 58
4.1. TEM(HRTEM) ..... 58
4.2. AFM ..... 60
5. Spektroskopia UV-Vis i spektrofluorymetria CdTe QDs i CdTe-tymina ..... 61
6. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z nukleozasadami, nukleozydami i modyfikowanymi nukleozydami ..... 64

6.1. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z nukleozasadami ..... 64

6.2. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z nuklozydami ..... 66

6.3. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z modyfikowanymi nukleozydami ..... 69

7. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z zasadami azotowymi i nukleozydami w warunkach sztucznego moczu ..... 72

7.1. Oddziaływanie koniugatu CdTe-tymina z zasadami azotowymi w środowisku sztucznego moczu ..... 72

7.2. Oddziaływanie koniugatu CdTe-tymina z nukleozydami w środowisku sztucznego moczu ..... 74

Podrozdział 1.1 ..... 76

Biosensor bazujący na kropkach kwantowych i zasadzie azotowej – guaninie ..... 76

1. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z nukleozasadami i nukleozydami ..... 76

1.1. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z nukleozasadami ..... 76

1.2. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z nuklozydami ..... 78

2. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z zasadami azotowymi i nukleozydami w warunkach sztucznego moczu ..... 80

2.1. Oddziaływanie koniugatu CdTe-guanina z zasadami azotowymi w środowisku sztucznego moczu ..... 80

2.2. Oddziaływanie koniugatu CdTe-guanina z nukleozydami w środowisku sztucznego moczu ..... 82

Podsumowanie ..... 84

Rozdział 2 ..... 86

Fluorescencyjny układ sensorowy bazujący na kropkach kwantowych (QDs) z przyłączoną guaniną i nanocząstkach złota (AuNPs) z przyłączoną cytozyną wykorzystujący zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET, ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) – synteza i właściwości ..... 86

Wprowadzenie ..... 87

Wyniki i dyskusja ..... 89

1. Fizykochemiczne właściwości QDs – guanina i AuNPs-cytozyna ..... 89

1.1. Analiza FTIR ..... 89
1.2. Analiza elementarna ..... 91
1.3. Analiza XPS ..... 92
2. Morfologia koniugatów QDs – guanina i AuNPs-cytozyna ..... 95
2.1. Analiza TEM/HRTEM ..... 95
2.2. Analiza AFM ..... 97
3. Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji (FRET) pomiędzy QDs – guanina a AuNPs – cytozyna. ..... 98
3.1. Właściwości optyczne ..... 98
3.2. Wygaszanie fluorescencji QDs-guanina przez AuNPs-cytozyna ..... 100
Podsumowanie ..... 106
STRESZCZENIE ..... 108
Dorobek naukowy ..... 111
BIBLIOGRAFIA ..... 116

# WSTĘP

W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie możliwością skonstruowania nowych układów biosensorowych. Nanotechnologia jest dziedziną, która dostarcza wielu innowacyjnych materiałów mogących być potencjalnie przydatnymi do tego celu. Wśród nich, fotoluminescencyjne kropki kwantowe znalazły zastosowanie, jako nowa klasa materiałów do konstrukcji chemo- i biosensorów umożliwiających detekcję jonów, małych molekuł, a także szeregu związków organicznych (np. bioaktywnych, toksycznych).

W ramach niniejszej pracy doktorskiej prowadzono badania dotyczące otrzymywania nowych materiałów potencjalnie przydatnych w konstruowaniu biosensorów, które w sposób czuły i selektywny umożliwią określenie stężenia zasad azotowych/nukleozydów w płynach fizjologicznych. Oczekuje się, że biosensory zbudowane przy wykorzystaniu tych materiałów pozwolą stwierdzić czy w organizmie pacjenta występuje zaburzenie spowodowane toczącym się procesem chorobowym. Zakłada się, że zastosowanie tak zbudowanych biosensorów umożliwi wykrycie stanu chorobowego w jego początkowym stadium. Oddziaływania pomiędzy atomami znajdującymi się na powierzchni kropek kwantowych i otaczającymi je cząsteczkami w istotny sposób wpływają na fotoluminescencję QDs. Właściwość ta jest podstawą wykorzystania kropek kwantowych do opracowania nowych, czułych, selektywnych i szybkich metod analitycznych.

**Celem pracy** doktorskiej było otrzymanie i scharakteryzowanie koniugatów opartych na kropkach kwantowych tellurku kadmu i zasad purynowych/pirymidynowych potencjalnie przydatnych jako nowe fluorescencyjne biosensory zdolne do selektywnej detekcji zasad azotowych i nukleozydów.

**Tezę** pracy sformułowano następująco: możliwym jest zaprojektowanie i otrzymanie nowego biosensora opartego na odpowiednio sfunkcjonalizowanych kropkach kwantowych pozwalającego na czułą i selektywną detekcję zasad azotowych/nukleozydów.

Postawione zadania realizowano poprzez otrzymanie materiałów na bazie kropek kwantowych tellurku kadmu (CdTe QDs) stabilizowanych kwasem tioglikolowym (TGA). Kropki kwantowe (QDs, z ang. quantum dots), charakteryzują się znacznie bardziej korzystnymi właściwościami niż obecnie stosowane konwencjonalne, organiczne fluorofory. W szczególności wykazują one wysoką wydajność kwantową luminescencji, fotostabilność, wąski zakres spektralny widma emisyjnego, a także wydłużony czas życia fluorescencji. Co więcej, duża powierzchnia QDs pozwala na ich funkcjonalizację przy użyciu właściwych

ligandów, a następnie na przyłączenie do nich odpowiednich peptydów, biomolekuł, przeciwciał i fotouczulaczy, dzięki czemu mogą one selektywnie wnikać do komórek nowotworowych i służyć zarówno w diagnostyce jak i w terapii.

Otrzymano serię nowych typów koniugatów kropki kwantowe z przyłączoną tyminą (QDs-tymina), a także guaniną (QDs-guanina). Materiały zostały starannie scharakteryzowane, określono ich właściwości fizykochemiczne jak również przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie efektywności działania opracowanych nanosensorów w warunkach buforu oraz modelowej cieczy fizjologicznej - symulowanego sztucznego moczu (ang. Simulated Urine, SU).

Przeprowadzono także badania mające na celu otrzymanie i scharakteryzowanie nowego układu sensorycznego bazującego na koniugatach: kropki kwantowe z przyłączoną guaniną oraz nanocząstki złota z przyłączoną cytozyną, wykorzystującego zjawisko rezonansowego przeniesienia energii (FRET, ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer). Wykonano pełną charakterystykę fizykochemiczną, dzięki czemu określona została zdolność efektywnego utworzenia obu koniugatów QDs-guanina i AuNPs-cytozyna. W końcowym etapie badań uzyskany nanosensor został również poddany badaniom pozwalającym na ocenę jego selektywności. Możliwość praktycznego wykorzystania otrzymanego układu została zweryfikowana przy użyciu modelowej cieczy fizjologicznej, symulowanego sztucznego moczu.

# CZĘŚĆ LITERATUROWA

## 1. Zjawisko fluorescencji

Luminescencja jest to zjawisko emisji światła przez dowolną cząsteczkę, która ulega dezaktywacji promienistej przechodząc z danego wzbudzonego stanu elektronowego na niższy elektronowy stan wzbudzony lub podstawowy. Zjawisko to, w zależności od natury stanu wzbudzonego może mieć charakter fluorescencji lub fosforescencji.

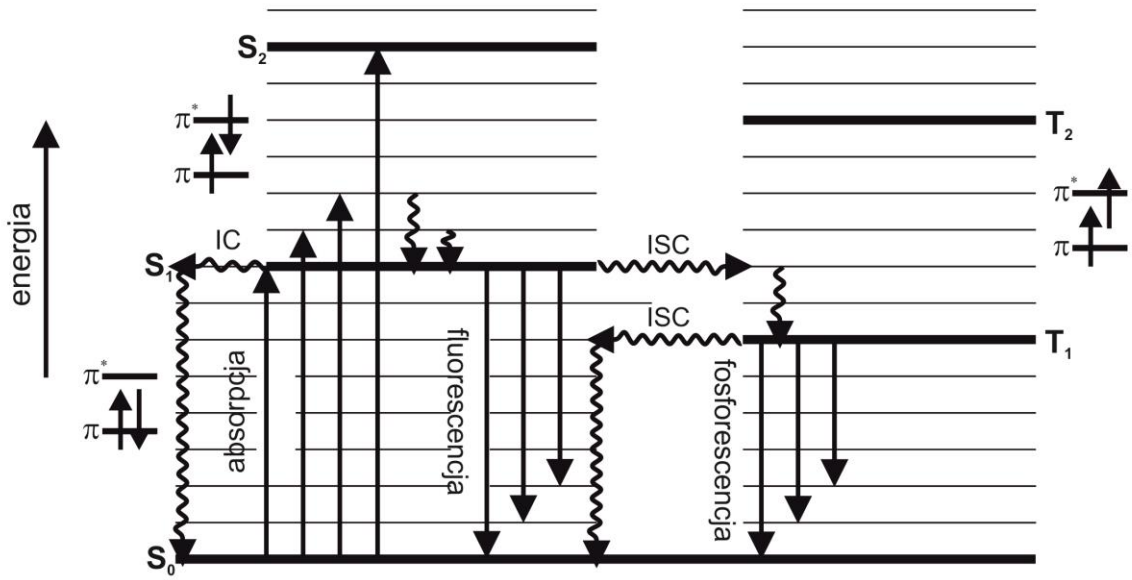
Fluorescencja to zjawisko przejścia cząsteczki z zerowego poziomu oscylacyjnego wzbudzonego stanu singletowego $S_n$ na dowolny poziom oscylacyjno-rotacyjny niższego stanu elektronowego o tej samej multipletowości (np. z $S_1$ do stanu podstawowego $S_0$). Przejście to jest dozwolone przez kwantowo-mechaniczną regułę wyboru i towarzyszy mu emisja fotonu. Emisja fluorescencji zachodzi z szybkością $10^8$ $s^{-1}$, a typowy czas życia fluorescencji wynosi od kilku do kilkudziesięciu ns (1 ns = 1 x $10^{-9}$ s).

Fluorescencja obserwowana jest dla cząsteczek związków aromatycznych takich jak np. cząsteczka chininy, której blado niebieską poświatę jako pierwszy w 1845 roku zaobserwował Sir John Frederick William Herschel. Obserwacje te zostały zarejestrowane podczas wystawienia toniku na działanie ultrafioletowego promieniowania słonecznego; wzbudzona elektronowo cząsteczka chininy podczas powrotu do stanu podstawowego emituje światło niebieskie o długości bliskiej 450 nm. Warto podkreślić, że ten pierwszy znany fluorofor przyczynił się do rozwoju pierwszych spektrofluorymetrów, które pojawiły się w latach 50 XX wieku.

Wykorzystanie fluorescencji pozwala na detekcję związków występujących w badanych układach w bardzo niskich stężeniach. Co ciekawe, czułość fluorescencji została wykorzystywana w roku 1877, aby wykazać, że rzeki Dunaj i Ren były połączone podziemnymi strumieniami. Wykazano to poprzez umieszczenie fluoresceiny w rzece Dunaj, około sześćdziesiąt godzin później jej charakterystyczna zielona barwa pojawiła się w małej rzece, która prowadziła do Renu [1].

### 1.1. Diagram Jabłońskiego

Procesy fotofizyczne zachodzące w cząsteczce absorbującej promieniowanie z zakresu UV/widzialnego ilustruje diagram Jabłońskiego **(Rysunek 1)**. Diagram Jabłońskiego jest często wykorzystywany jako punkt wyjścia do omawiania procesów molekularnych występujących w stanach wzbudzonych dotyczących absorpcji i emisji światła.




*Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego [2].*

Fluorofor jest zazwyczaj wzbudzany do wyższego poziomu wibracyjnego stanu $S_1$ lub $S_2$, co jest związane ze wzbudzeniem elektronu i zmianą konfiguracji elektronowej cząsteczki. Poza kilkoma rzadkimi wyjątkami, cząsteczki w fazie skondensowanej szybko wracają do najniższego poziomu wibracyjnego stanu $S_1$. Proces ten nazywa się konwersją wewnętrzną (IC, ang. *internal conversion*) i zazwyczaj występuje w ciągu $10^{-12}$ s. Ponieważ czasy życia fluorescencji są rzędu $10^{-8}$ s, konwersja wewnętrzna poprzedza proces emisji. Emisja fluorescencji generalnie zachodzi z termicznie zrównoważonego stanu wzbudzonego, czyli najniższego energetycznego poziomu wibracyjnego stanu $S_1$.

Molekuły w stanie $S_1$ mogą również podlegać konwersji spinu do pierwszego stanu trypletowego $T_1$. Emisja ze stanu $T_1$ nazywana jest fosforescencją i na ogół przesunięta jest w stronę większych długości fali (mniejsza energia) względem fluorescencji. Konwersja ze stanu $S_1$ do $T_1$ nazywana jest przejściem międzysystemowym (ISC, ang. *intersystem crossing*). Przejścia międzysystemowe są przejściami wzbronionymi spinowymi regułami wyboru, dlatego przejście ze stanu $T_1$ do stanu podstawowego $S_0$ jest wzbronione i stała szybkości tego procesu jest kilka rzędów wielkości mniejsza niż stała szybkości fluorescencji.

Generalnie terminem konwersji wewnętrznej określane są przejścia bezpromieniste między stanami elektronowymi o jednakowej krotności (np. $S_2 \rightarrow S_1$, $T_2 \rightarrow T_1$). Terminem konwersji międzysystemowej określa się zaś przejścia bezpromieniste między stanami o różnej krotności ($S_1 \rightarrow T_1$, $T_1 \rightarrow S_0$). Mianem fluorescencji nazywa się przejścia promieniste zachodzące między stanami elektronowymi o tej samej krotności (np. $S_1 \rightarrow S_0$).

Kiedy przejście promieniste zachodzi między stanami elektronowymi o różnej krotności (np. $T_1 \rightarrow S_0$), określa się je mianem fosforescencji [2].

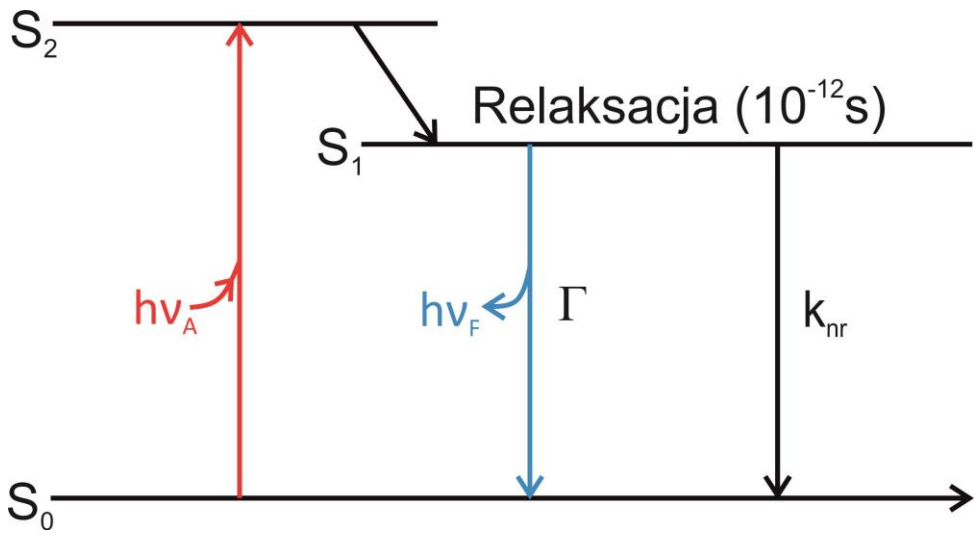
### 1.2. Właściwości fluorescencji

Rozpatrując diagram Jabłońskiego można zauważyć, iż energia emisji fluorescencji jest niższa niż energia absorpcji. Fluorescencja zwykle występuje przy niższych energiach lub dłuższych długościach fal niż absorpcja. Jest to tzw. *przesunięcie Stokesa*. Zjawisko to zostało po raz pierwszy zauważone przez Sir G.G. Stokesa w 1852 roku pracującego na Uniwersytecie w Cambridge.

Jedną z przyczyn przesunięcia Stokesa jest szybki powrót wzbudzonej cząsteczki na najniższy poziom wibracyjny stanu $S_1$. Ponadto, cząsteczki zazwyczaj powracają do wyższych poziomów wibracyjnych stanów $S_0$, co prowadzi do dalszej utraty energii wzbudzenia poprzez termalizację nadmiaru energii wibracyjnej. W przypadku roztworów istotny wpływ może mieć typ rozpuszczalnika.

Inną właściwością fluorescencji jest to, iż widmo fluorescencji jest niezależne od długości fali wzbudzenia zgodnie z regułą Kash'a. Po wzbudzeniu do wyższych stanów elektronowych lub wibracyjnych nadmiar energii ulega rozproszeniu, pozostawiając fluorofor na najniższym poziomie wibracyjnym stanu $S_1$. Proces relaksacji zachodzi w czasie $10^{-12}$ s i jest wynikiem silnego pokrywania się licznych stanów różniących się nieznacznie energią. W wyniku szybkiej relaksacji widma emisji są zazwyczaj niezależne od długości fali wzbudzenia. Znane są jednak pewne wyjątki jak np. fluorofory, które istnieją w dwóch stanach jonizacji, z których każdy ma odrębne widma absorpcji i emisji. Istnieją także molekuły, które emitują fluorescencję ze stanu $S_2$ (np. azulen).

Wydajność kwantowa i czas życia fluorescencji należą do najważniejszych parametrów charakteryzujących fluorofory. Najlepszym możliwym sposobem opisu wydajności kwantowej i czasu życia fluorescencji jest użycie uproszczonego diagramu Jabłońskiego **(Rysunek 2)**.




*Rysunek 2. Uproszczony diagram Jabłońskiego [1].*

Na schemacie tym uwzględniono proces wzbudzenia i procesy odpowiedzialne za powrót molekuły do najniższego stanu energetycznego. W szczególności szybkość emisji fluoroforu (Γ) i szybkość przejścia bezpromienistego do $S_0$ ($k_{nr}$).

Wydajność kwantowa emisji jest definiowana jako stosunek liczby fotonów emitowanych do fotonów zaabsorbowanych:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \qquad (1)$$

gdzie: Q – wydajność kwantowa, Γ – szybkość emisji fluorescencji ($s^{-1}$), $k_{nr}$ - szybkość przejść bezpromienistych ($s^{-1}$).

Wydajność kwantowa jest bliska jedności jeżeli szybkość przejść bezpromienistych jest dużo mniejsza od szybkości przejść promienistych, $k_{nr} < \Gamma$.

Czas życia stanu wzbudzonego jest definiowany jako średni czas przebywania molekuły w stanie wzbudzonym zanim powróci do stanu podstawowego:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \qquad (2)$$

gdzie: τ – czas życia stanu wzbudzonego (s), Γ – szybkość emisji fluorescencji ($s^{-1}$), $k_{nr}$ - szybkość przejścia bezpromienistego ($s^{-1}$).

Co więcej, emisja fluorescencji jest zjawiskiem losowym i tylko kilka molekuł emituje fotony dokładnie gdy t=τ. Czas życia jest średnią wartością czasów cząsteczek spędzanych w stanie wzbudzonym. Statystycznie dla monoeksponencjalnych zaników 63% molekuł emituje w sposób t= τ, 37% w sposób t>τ [1].

## 2. Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji

Zjawisko rezonansowego przeniesienia energii według mechanizmu T. Förstera (zaobserwowane w 1948 r.) FRET (ang. Förster Resonance Energy Transfer) jest procesem fotofizycznym opartym na przekazywaniu energii wzbudzenia pomiędzy wzbudzoną elektronowo molekułą donora, a będącą w podstawowym stanie elektronowym molekułą akceptora znajdującą się w odpowiedniej odległości (na ogół nie większej niż około 10 nm) [3]. Jeśli donor jest fluoroforem wówczas zjawisko można łatwo obserwować poprzez pomiar obniżenia wydajności kwantowej jego fluorescencji w obecności akceptora a proces ten określa się jako rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji. Wydajność procesu FRET jest determinowana przez różne czynniki takie jak: zakres nakładania się widma fluorescencji donora i widma absorpcji akceptora, odległość pomiędzy donorem a akceptorem, a także względna orientacja dipoli elektrycznych donora i akceptora [4,2].

Wydajność transferu energii E, jest tradycyjnie określana jako:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \qquad (3)$$

gdzie: R-odległość między donorem a akceptorem, a $R_0$ jest odległością Förstera, między donorem a akceptorem przy której wydajność FRET (E) wynosi 50%.

Wykazano, że wydajność FRET wzrasta wraz ze wzrostem liczby akceptorów przypadających na cząsteczkę donora.

Zmodyfikowane równanie wydajności transferu energii jest stosowane w celu uwzględnienia wielowartościowości w takich systemach:

$$E = \frac{nR_0^6}{nR_0^6 + R^6} \qquad (4)$$

gdzie: n-liczba akceptorów przypadających na donora.

Gdy w układzie obecnych jest zatem więcej akceptorów, zwiększa się efektywność transferu, a prawdopodobieństwo wygaszenia cząsteczki donora poprzez FRET staje się większe (patrz równanie 4).

Wydajność transferu energii lub prawdopodobieństwo wygaszenia w wyniku transferu energii można wyrazić również poprzez skrócenie czasu życia donora w stanie wzbudzonym lub obniżenie intensywności emisji fluorescencji donora w obecności akceptora.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \qquad (5)$$

gdzie: $\tau_{DA}$ i $\tau_D$ – czas życia donora odpowiednio w obecności i nieobecności akceptora, $F_{DA}$ i $F_D$ – intensywność fluorescencji donora odpowiednio w obecności i nieobecności akceptora.

Na podstawie powyższych równań można zauważyć, że spadek intensywności fluorescencji donora i skrócenie czasu życia wskazują na zwiększoną efektywność mechanizmu FRET.

Wydajność może być również związana z szybkością rezonansowego transferu energii $k_T$ :

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_D} = \frac{k_T}{k_{DA}} \qquad (6)$$

gdzie: $k_D$-szybkość całkowitego zaniku luminescencji donora ($k_D = k_{D,prom} + k_{D,bezprom}$).

Równanie to opisuje efektywność transferu energii jako frakcję transferu energii przez FRET do utraty energii donora na wszystkich drogach w obecności akceptora $k_{DA}$. Po wyodrębnieniu $k_T$ i zastąpieniu równania (3) dotyczącego wydajności energii równanie na szybkość transferu energii przyjmuje postać:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0^6}{R^6}\right) = \frac{1}{\tau_T} \qquad (7)$$

Szybkość procesu FRET, $k_T$ przedstawiana jest jako $(\tau_T)^{-1}$ a skrócenie czasu życia donora w obecności akceptora koreluje z szybszym i bardziej efektywnym transferem energii [5].

Parametr określający odległość oddziałujących fluoroforów można wyrazić przy pomocy odległości Förstera ($R_0$) danej równaniem (8):

$$R_0^6 = \frac{9000(ln10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5 N_A n^4}\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \qquad (8)$$

gdzie: $Q_D$ – wydajność kwantowa fluorescencji donora pod nieobecność akceptora, n– współczynnik załamania światła (dla biomolekuł w roztworze wodnym przyjmuje wartość 1,4), $N_A$ – liczba Avogadro ($6{,}022\cdot10^{23}$ $M^{-1}$), $\lambda$ – długość fali [nm], $F_D(\lambda)$ – znormalizowana intensywność fluorescencji donora w przedziale długości fali od $\lambda$ do $\lambda + d\lambda$, $\varepsilon_A(\lambda)$ – molowy współczynnik absorpcji [$M^{-1}cm^{-1}$], $\kappa^2$ – współczynnik orientacji dipoli przejścia donora i akceptora, $J(\lambda)$ – całka nakładania widma emisji donora i widma absorpcji akceptora.

FRET zachodzi wówczas, gdy widmo emisji fluorofora (donora) nakłada się częściowo z widmem absorpcyjnym molekuły akceptora. Wówczas w obecności akceptora następuje skrócenie czasu życia stanu wzbudzonego donora w wyniku bezpromienistego przekazania energii do akceptora. Wiadomo, że wydajność FRET bardzo silnie zależy od odległości pomiędzy donorem i akceptorem, a wydajne przekazanie energii zachodzi dla odległości rzędu 2-8 nm [1].

### 2.1. Wykorzystanie kropek kwantowych (QDs) i nanocząstek złota (AuNPs) w badaniach przenoszenia energii według mechanizmu FRET

Kropki kwantowe są używane, jako doskonały materiał do konstrukcji nanobiosensorów w zastosowaniach biologicznych ponieważ posiadają wiele zalet w porównaniu do tradycyjnych organicznych par FRET. Zalety te obejmują wysoką fotostabilność, doskonałą intensywność emisji, a także odporność na fotoblaknięcie [6]. Użycie QDs jako donora pozwala na monitorowanie wielu par FRET przy zastosowaniu jednej długości fali wzbudzenia. Wąskie i symetryczne widmo fluorescencji donora minimalizuje zakłócenia związane z widmem fluorescencji akceptora. Użycie QDs jako donorów poprawia również wydajność mechanizmu FRET. Nakładanie się widm pomiędzy donorem – QDs a akceptorem można łatwo zapewnić poprzez zmianę rozmiarów kropek kwantowych. Zazwyczaj można to uzyskać w prosty sposób na etapie syntezy poprzez dostosowanie czasu wzrostu QDs. Ze względu na dużą powierzchnię QDs istnieje możliwość obecności wielu akceptorów na ich powierzchni. Zwiększa to szybkość transferu energii od donora do akceptora [7].

Nanocząstki złota (AuNPs) cieszą się olbrzymim zainteresowaniem jako akceptory energii ze względu na wysokie wartości współczynników ekstynkcji i szeroki zakres absorpcji w zakresie światła widzialnego [8]. Nanocząstki złota AuNPs są doskonałym wygaszaczem fluorescencji, co czyni je bardzo użytecznym materiałem w technikach sensorowych [9]. Dodatkowo AuNPs ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne wykorzystywane są również w transporcie i w uwalnianiu leków [10].

Kropki kwantowe i nanocząstki złota stanowią doskonałą parę: donor - akceptor, która może znaleźć zastosowanie jako selektywny i specyficzny nanosensor w analizach chemicznych i biologicznych [11].

## 3. Kropki kwantowe

### 3.1. Koncepcja QDs jako półprzewodników

Półprzewodniki mają zapełnione pasmo nazywane pasmem walencyjnym i puste pasmo znane jako pasmo przewodnictwa. W wymiarze nanoskali, zwykle normalne elektroniczne właściwości półprzewodników ulegają poważnym zmianom a elektrony poruszają się zgodnie z teorią cząstki w pudle, która uwzględnia przybliżoną strukturę pasmową (Murray, 1993). Z punktu widzenia mechaniki kwantowej, gdy półprzewodnik jest napromieniowywany światłem o energii fotonu (hν) wyższej niż $E_g$, elektron będzie przechodził z pasma

walencyjnego do pasma przewodnictwa, pozostawiając „dziurę" lub „deficyt elektronu" w paśmie walencyjnym. „Dziura” jest uważana za „cząstkę” z masą efektywną i dodatnim ładunkiem. Stan elektron-dziura określa się mianem ekscytonu (Brus, 1984). Ekscyton można uznać za układ podobny do atomu wodoru a przybliżenie atomu Bohra może być użyte do obliczenia przestrzennego rozdzielenia pary elektron-dziura ekscytonu według równania:

$$r = \frac{\varepsilon h^2}{\pi m_r e^2} \qquad (9)$$

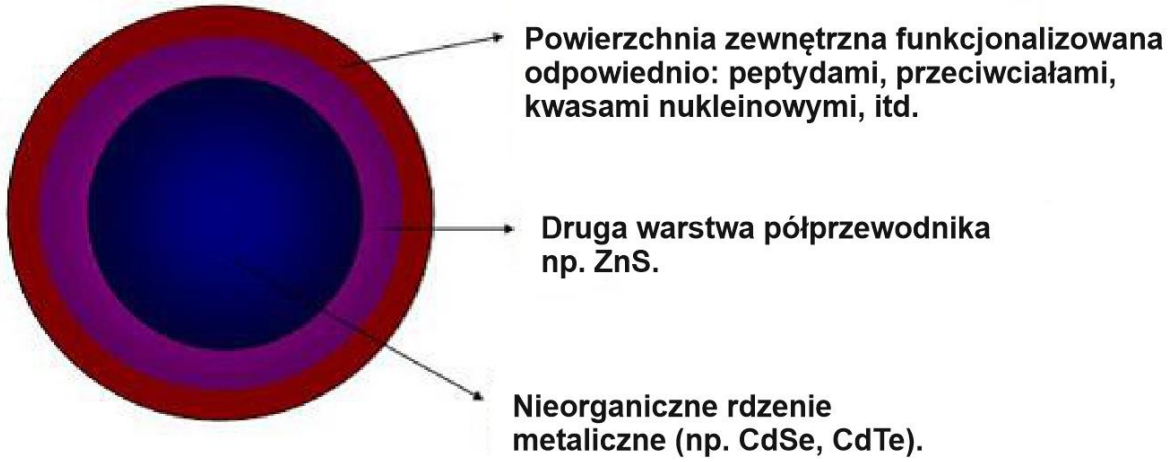
gdzie: r jest promieniem kuli, zdefiniowanym przez separację 3-D pary elektron-dziura, ε jest wartością przenikalności dielektrycznej półprzewodnika, $m_r$ oznacza zredukowaną masę elektronu-dziury elektronowej, h - stała Plancka, e - ładunek elektronu.

Dla wielu półprzewodników masy elektronu i dziury zostały wyznaczone przy użyciu rezonansu cyklotronowego jonów i generalnie mieszczą się w przedziale 0,1-3 $m_e$ ($m_e$ jest masą elektronu) [12].

### 3.2. Kropki kwantowe – właściwości, chemia powierzchni

Kropki kwantowe (QDs, z ang. quantum dots) są sferycznymi cząstkami półprzewodników o średnicy rzędu 2-10 nm, zbudowane z około 200-10000 atomów. Charakter półprzewodnikowy i fluorescencja zależna od wielkości nanokryształów sprawiły, że są one bardzo atrakcyjne do zastosowań w optoelektronice, biologicznej detekcji, a także jako podstawowe prototypy do badania koloidów oraz w badaniach właściwości nanomateriałów zależnych od wielkości [13]. Unikalne właściwości elektrooptyczne QDs wynikają z połączenia materiału i wymiarowości, znanej jako pułapka kwantowa [14,15]. Pomimo pojawienia się innych materiałów [16,17], wciąż najbardziej popularne pozostają kropki kwantowe na bazie selenku kadmu (CdSe) i tellurku kadmu (CdTe) [18,19,20]. W literaturze dostępne są liczne opisy metod otrzymywania, a także charakterystyki QDs zbudowanych z tych materiałów. Zazwyczaj otrzymywane są struktury typu rdzeń-otoczka z nieorganiczną warstwą ZnS **(Rysunek 3)**, która służy do poprawy właściwości luminescencyjnych (np. CdSe/ZnS) [21,22]. Korzystne właściwości optyczne QDs obejmują: wysoką wydajność kwantową luminescencji, fotostabilność, wąski zakres spektralny widma emisyjnego, a także wydłużony czas życia fluorescencji. Inne, często mniej pożądane cechy

optyczne QDs mogą obejmować: wielowykładniczy zanik fluorescencji, fotoblaknięcie oraz utlenianie (oksydacja) [23].

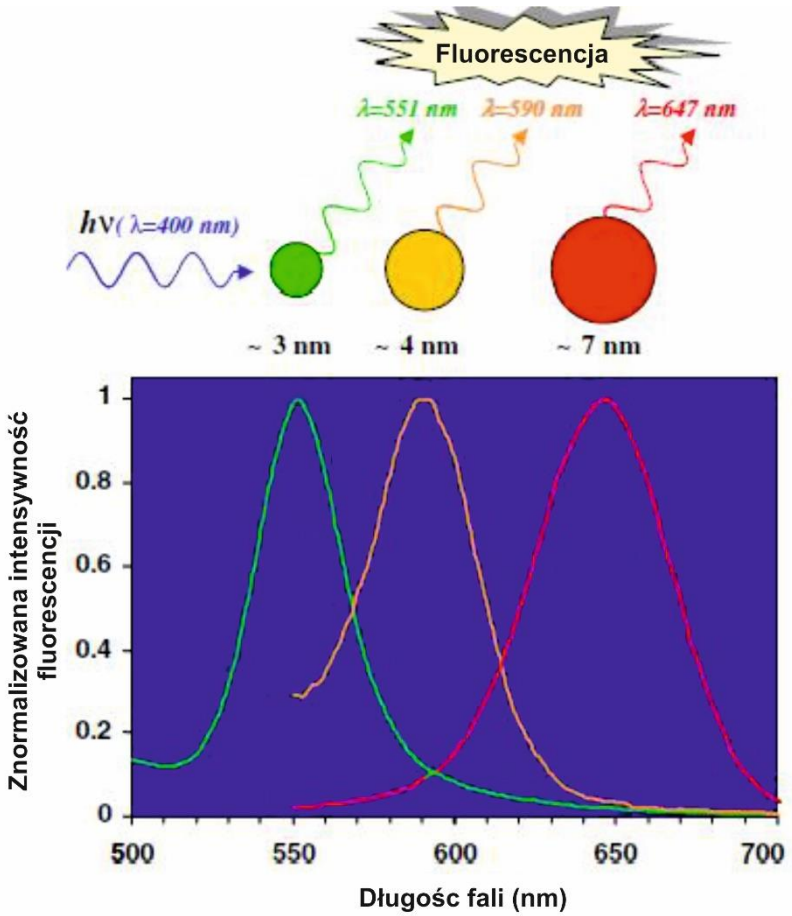



*Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie kropki kwantowej. QDs to nanokryształy zbudowane z rdzenia półprzewodnika, zwykle złożonego z pierwiastków z grup II-IV, np. CdSe, lub grupy III-V, np. InP. Powłoka jest zwykle materiałem o wyższej przepuszczalności, takim jak ZnS. Warstwa zewnętrzna, zapewnia obszar o dużej powierzchni, przydatny do kowalencyjnego przyłączania molekuł takich jak peptydy, przeciwciała, kwasy nukleinowe i małe cząsteczki, ligandy [24].*

Emisja fluorescencji zależna od wielkości kropek kwantowych jest prawdopodobnie najbardziej ciekawą i najlepiej przebadaną właściwością optyczną QDs. Ze względu na to, iż właściwości emisyjne półprzewodnikowych nanokryształów zależą w dużej mierze od energii i gęstości stanów elektronowych, mogą być one zmieniane poprzez zmianę rozmiaru i kształtu tych struktur. **Rysunek 4** przedstawia widma fluorescencji CdSe QDs o różnych średnicach. Jak widać nanokryształy CdSe mogą wykazywać fluorescencję w zakresie 500-700 nm.

Ze względu na dyskretną atomową strukturę, QDs mają wąskie pasmo emisji o szerokości połówkowej rzędu 15-50 nm. Ponieważ pasma emisji są znacznie węższe w porównaniu do tych obserwowanych dla barwników organicznych, zaburzenia detekcji QDs są znacznie mniejsze. Co więcej QDs wykazują większą wydajność kwantową fluorescencji niż konwencjonalne organiczne fluorofory, co wpływa na większą czułość analityczną. Wydajność kwantowa emisji luminoforu jest funkcją względnego udziału rekombinacji radiacyjnej (produkującej światło) i mechanizmów rekombinacji nieradiacyjnej.

Rekombinacja nieradiacyjna, która w znacznym stopniu występuje na powierzchni nanokryształów jest szybszym mechanizmem niż rekombinacja radiacyjna i silny wpływ ma na nią chemizm powierzchni QDs [5]. W tym kontekście wykazano na przykład, że pokrywanie nanokryształu powłoką nieorganicznego szerokopasmowego półprzewodnika (np. ZnS) zmniejsza nieradiacyjne dezaktywacje w wyniku czego otrzymuje się jaśniejszą emisję [25]. Dodatkowo QDs są około 100 razy bardziej fotostabilne w porównaniu do konwencjonalnych fluoroforów i ulegają znacznie wolniej procesom fotoblaknięcie [26].




*Rysunek 4. Widma fluorescencji zależne od rozmiaru kropek kwantowych CdSe [27].*

Ze względu na duży stosunek powierzchni do objętości QDs, właściwości powierzchni nanokryształu zależą silnie od jakości rdzenia, co jest ważne przy określaniu obserwowanych właściwości fluorescencji. Zmniejszenie wydajności kwantowej, zmiany w rozkładzie PL, przesunięcie na widmie i pojawienie się niepożądanej przerwy energetycznej może być związane ze stanami powierzchniowymi QDs. Wzrost jakości nieorganicznej powłoki wokół rdzenia nanokryształu zmniejsza wpływ powierzchni na PL. Jednak na obserwowaną

fluorescencję wpływa nie tylko powierzchnia QDs ale również adsorbaty, ligandy lub inne powłoki.

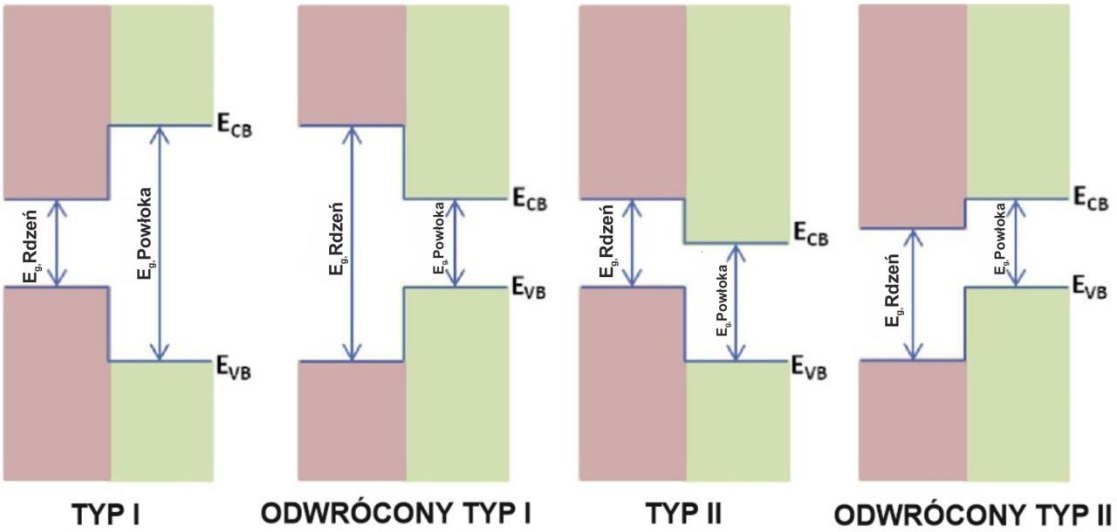
Chemia powierzchni jest niezwykle ważnym czynnikiem w rozwoju wszystkich rodzajów biosond i biosensorów opartych na QDs. Oprócz zachowania korzystnych właściwości optycznych QDs, wybrana modyfikacja powierzchni powinna również umożliwiać biokoniugację, nadawać rozpuszczalność w wodzie i nie utrudniać efektywnego wykorzystania takich zjawisk jak FRET, BRET (ang. Bioluminescence Resonance Energy Transfer, bioluminescencyjne rezonansowe przeniesienie energii) lub ECL (ang. Electrochemiluminescence, elektrochemiluminescencja) [28].

**W oparciu o dokonany przegląd literaturowy można podsumować najważniejsze właściwości kropek kwantowych:**

1. Długość fali emisji (od UV do IR) zależy od rozmiarów kropek kwantowych (w miarę zmniejszania się rozmiaru kropek kwantowych długość fali, którą emitują ulega skróceniu).
2. Fluorescencja QDs ma dłuższe czasy życia niż obserwowana dla konwencjonalnych barwników.
3. Fluorescencyjne kropki kwantowe zwykle składają się z pierwiastków grup II do VI i III do V na przykład Ag, Cd, Hg, Ln, P, Pb, Se, Te i Zn itp.
4. Kropki kwantowe są o wiele bardziej odporne na degradację niż inne optyczne sondy, co pozwala m.in. na ich wykorzystanie do śledzenia procesów komórkowych przez dłuższy czas i dostarczanie informacji o interakcjach molekularnych.
5. Kropki kwantowe wykazują zwiększoną aktywność optyczną, co umożliwia ich szerokie potencjalne zastosowania w biotechnologii i naukach o życiu [29].

### 3.3. Rodzaje QDs rdzeń/powłoka

W zależności od pozycji pasma walencyjnego i pasma przewodnictwa, a także szerokości przerwy energetycznej pomiędzy nimi można wyróżnić różne kategorie CSQDs (ang. Core-Shell QDs, kropki kwantowe rdzeń-powłoka) **(Rysunek 5)**. Rdzeń może mieć większą przerwę energetyczną niż powłoka (typ I) lub odwrotnie (odwrócony typ I). Ponadto pasmo przewodnictwa lub pasmo walencyjne rdzenia może być zlokalizowane w obrębie pasma wzbronionego powłoki (typ II) [30].




*Rysunek 5. Rodzaje QDs rdzeń-powłoka [31].*

Kropki kwantowe opłaszczone materiałem, który posiada większą przerwę energetyczną mogą pasywować powierzchnię w wyniku rekombinacji nieradiacyjnej, co prowadzi do poprawy wydajności kwantowej fotoluminescencji. Taka pasywacja z użyciem powłoki nieorganicznej jest korzystniejsza niż z użyciem powłoki organicznej ze względu na dużą tolerancję warunków procesu przez CSQDs. Typowymi przykładami takich struktur rdzeń-powłoka są (CdSe) CdS, (ZnS) CdSe [32] i (CdSe) InAs [33]. W systemie odwrotnym do typu I przerwa energetyczna rdzenia jest większa niż powłoki. Ładunki są częściowo zdelokalizowane w obrębie powłoki a grubość powłoki kontroluje długość fali emisji. Typowe przykłady odwrotnych struktur typu I obejmują (CdS) HgS [34], (CdS) CdSe [35] i (ZnSe) CdSe [36]. W QDs typu II: (CdTe) CdSe [37], (CdTe) CdSe [38], (CdSe) ZnTe i (CdSe) ZnTe CSQDs, jeden nośnik jest ograniczony do rdzenia a drugi znajduje się głównie w powłoce. Dlatego przestrzenny rozdział ładunków nośników, który odpowiedzialny jest za szereg właściwości CSQDs odróżnia je od typu I CSQDs.

### 3.4. Synteza kropek kwantowych

Synteza QDs została po raz pierwszy opisana w 1982 r. przez Efrosa i Ekimova, którzy wyhodowali nanokryształy i mikrokryształy półprzewodników w matrycach szklanych [39,40]. Od tamtej pory opracowano szeroki wachlarz syntez pozwalających na otrzymywanie QDs w różnych mediach, w tym roztworach wodnych, wysokotemperaturowych rozpuszczalnikach organicznych, a także w stałych matrycach [41]. Koloidalne zawiesiny QDs syntetyzowane są poprzez wprowadzenie prekursorów półprzewodników w warunkach,

które termodynamicznie sprzyjają wzrostowi kryształów a także w obecności ligandów wiążących półprzewodniki, których funkcją jest kinetyczne kontrolowanie wzrostu kryształów i utrzymywanie ich odpowiedniej wielkości. W roku 1993 Bawendi i współpracownicy opracowali strategię syntezy metaloorganicznej fluorescencyjnych QDs w fazie organicznej. W ich pracy nanokryształy CdSe o monodyspersyjnym rozkładzie wielkości i wysokiej krystaliczności wytworzono stosując dimetylokadm jako prekursor kadmu [42]. W 2001 r. Peng i współpracownicy przeprowadzili dalszą optymalizację metod metaloorganicznych poprzez wykorzystanie CdO jako prekursora zamiast dimetylokadmu [43]. Warto zauważyć, że strategia ta była łatwa i powtarzalna, ułatwiając produkcję QDs na dużą skalę. W tym samym roku, systematycznie badali oni związek między właściwościami optycznymi a warunkami syntezy, przedstawiając cenne informacje odnośnie skutecznego kontrolowania fluorescencji nanokryształów CdSe.

Synteza przeprowadzona w fazie wodnej jest alternatywną metodą bezpośredniej syntezy dyspergowalnych w wodzie QDs. W 1999 r. Rogach i współpracownicy [44] zastosowali grupy tiolowe jako hydrofilowe ligandy, aby bezpośrednio otrzymać dyspergujące w wodzie fluorescencyjne QDs. W tym przypadku $Cd(ClO_4)_2$ rozpuszczono z tiolowymi stabilizatorami w wodzie otrzymując roztwory o odpowiednich wartościach pH, następnie wprowadzono do nich gazowy $H_2Te$ w celu wytworzenia prekursorów CdTe. Następnie otrzymane prekursory ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 100°C w obecności powietrza, uzyskując nanokryształy CdTe o doskonałej zdolności do tworzenia dyspersji wodnej. Stwierdzono, że przygotowane nanokryształy CdTe miały względnie niskie wartości QY (<30%), co wynikało z dużej liczby wad powierzchniowych generowanych podczas długotrwałej syntezy. Aby rozwiązać ten problem, badano stosunek molowy ligandów (kwasu tioglikolowego) do monomerów (jonów $Cd^{2+}$) w roztworze prekursorowym. Wang i współpracownicy otrzymali CdTe QD o wartościach PLQY 50% w optymalnym stosunku między ligandem i monomerem 1:2 [45]. Zhang i współpracownicy opracowali hydrotermalną technikę otrzymywania fluorescencyjnych CdTe QDs (PLQY: 50%) w wysokiej temperaturze 200°C. Otrzymane w ten sposób nanocząstki charakteryzowały się mniejszą liczbą powierzchniowych defektów i większą wartością PLQY [46].

### 3.5. Modyfikacje powierzchni QDs

Najnowsze badania pokazują niezwykle obiecującą przyszłość dla zastosowań QDs w zakresie nauk biologicznych. Chociaż QDs posiadają bardzo wysoką fotostabilność, dają możliwość dostosowania zakresu widma fluorescencji, a także charakteryzują się wydłużonym czasem życia fluorescencji w porównaniu z konwencjonalnymi fluoroforami, niemodyfikowane QDs nie mogą być wykorzystywane bezpośrednio do celów biologicznych [47]. Wynika stąd potrzeba ich powierzchniowych modyfikacji, pozwalająca na poprawę ich istotnych cech.

1. Właściwości powierzchniowe QDs (charakterystyka fluorescencji/emisji)

Wysoka energia powierzchniowa związana z krystalicznymi nanocząstkami może powodować powstawanie defektów powierzchniowych, co w konsekwencji może wpływać na wygaszanie fluorescencji niemodyfikowanych QDs [48,49]. Ponadto niemodyfikowane QDs ulegają utlenianiu powierzchniowemu, degradacji fotochemicznej i ługowaniu jonów metali z rdzenia QDs, co może występować przy długotrwałej ekspozycji QDs na działanie mediów jonowych lub komórkowych powodując toksyczne działanie jonów metali [50,51]. W związku z tym konieczne jest pokrycie powierzchni QDs stabilnymi związkami umożliwiającymi zmniejszenie defektów powierzchni i ograniczenie wysokiej reaktywności. ZnS jest często używany jako czynnik blokujący w celu poprawy stabilności wydajności kwantowej QDs [52].

2. Rozpuszczalność w mediach wodnych i biologicznych

Pokrywanie QDs zewnętrzną powłoką, taką jak ZnS, poprawia stabilność i wydajność QDs, ale nie poprawia ich rozpuszczalności w środowisku wodnym. Kropki kwantowe (rdzeń lub rdzeń/powłoka) są zwykle produkowane w procesach wysokotemperaturowych w rozpuszczalnikach organicznych (takich jak toluen, oktan i heksan) i stabilizowane są przez grupy hydrofobowe, takie jak aminy lub fosfiny w celu zapewnienia kontroli ich wielkości i zapobiegania dalszej aglomeracji. Rdzeń QDs można pokryć powłoką ZnS, aby uzyskać morfologię typu rdzeń/powłoka w jednym etapie syntezy. Jednakże, rozpuszczalność QDs stabilizowanych takimi hydrofobowymi ligandami w roztworze wodnym jest niewystarczająca. W celu zwiększenia rozpuszczalności w środowisku wodnym, powierzchnia QDs może być modyfikowana ligandami hydrofilowymi [53,54]. Istnieją trzy główne strategie zastępowania lub pokrywania QDs ligandami hydrofilowymi:

a) Wymiana ligandów

Wymiana ligandów jest procesem podstawiania natywnych hydrofobowych ligandów, takich jak TOP (trioktylofosfina), TOPO (tlenek trioktylofosfiny), HDA (heksadecyloamina)

występujących na powierzchni kropek kwantowych hydrofilowymi ligandami [55]. Każdy z tych podstawianych ligandów posiada grupy funkcyjne: tiolowe (-SH), karboksylowe (-COOH), aminowe (-$NH_2$) lub hydroksylowe (OH) poprawiające rozpuszczalność QDs w wodzie i umożliwiające przyłączenie do drugorzędowych biomolekuł takich jak białka, leki lub przeciwciała [56,57].

b) Silanizacja powierzchni

Jest to proces pokrywania powierzchni QDs warstwą silanów, które można następnie sieciować [58]. Właściwości elektrochemiczne krzemionki sprawiają, że jest to odpowiedni materiał pozwalający na zwiększenie rozpuszczalności QDs w środowisku wodnym przy zachowaniu większości jego właściwości fotofizycznych. Krzemionka wykazuje anomalne zachowanie w wodzie, ponieważ nie ulega koalescencji powyżej punktu izoelektrycznego (IEP) i wykazuje silną stabilność przy prawie neutralnym pH [59]. Główna zaleta procesu silanizacji polega na tym, że cząsteczki ligandu są wysoce usieciowane i dlatego tworzą bardzo stabilną powłokę blokującą [57].

c) Połączenia amfifilowe

Metoda ta zachowuje natywne warstwy TOP/TOPO/HDA na powierzchni i polega na elektrostatycznym oddziaływaniu (przyciąganiu) pomiędzy grupami hydrofobowymi kopolimerów dwublokowych lub trójblokowych a powierzchniowymi grupami hydrofobowymi QDs. Rozpuszczalność w roztworze wodnym jest w tym przypadku zapewniana przez hydrofilowe grupy kopolimerów [60,61].

3. Celowane dostarczanie QDs

Względna rozpuszczalność QDs w wodzie nie jest wystarczająca dla zastosowań kropek kwantowych w badaniach *in vitro* i *in vivo* [62]. Selektywne dostarczanie kropek kwantowych jest niezbędne, aby zminimalizować ekspozycję na nie komórek mało istotnych dla prowadzonych badań, zwiększyć kontrast i umożliwić zastosowanie procesów opartych na FRET.

Wykazano, iż koniugacja przeciwciał do QDs z wykorzystaniem obecnych na ich powierzchni grup aminowych jest bardzo obiecującym podejściem. Również QDs pokryte poliamidoaminą (PAMAM) i poliizoprenem wykazały duży potencjał aplikacyjny w celowanym ich dostarczaniu do komórek nowotworowych [63]. Pomimo, iż w literaturze opisanych zostało wiele biomedycznych zastosowań QDs opartych na czynnikach sieciujących jakimi są mostki dwusiarczkowe, takie podejście powoduje zmiany stanów fizycznych i chemicznych QDs, co w konsekwencji prowadzi do spadku wydajności kwantowej fluorescencji.

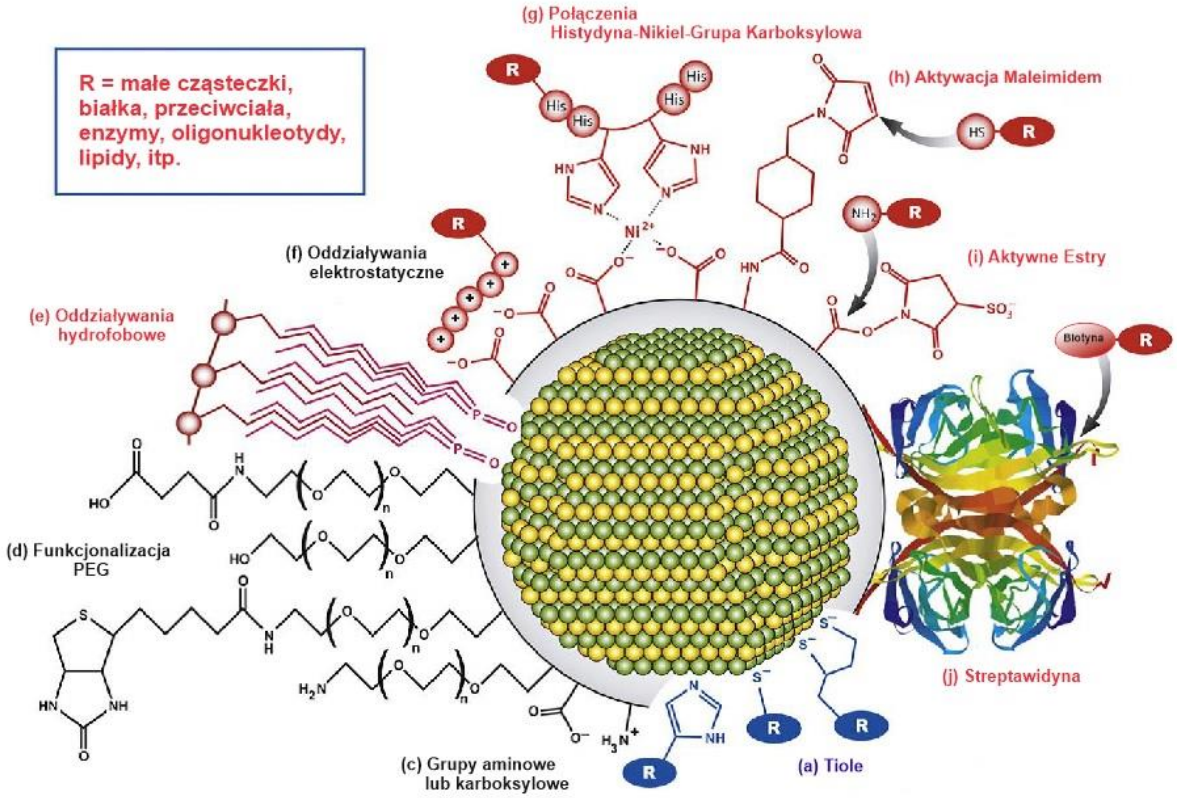
### 3.6. Biokoniugacja QDs

Preparatyka biokoniugatów QDs ma zasadnicze znaczenie dla rozwoju różnego rodzaju biosensorów i biosond. Na **Rysunku 6** przedstawiono kilka różnych strategii koniugacji. Enzymy [64,65], przeciwciała [66,67], małe cząsteczki wiążące białka [68,69] i oligonukleotydy [70,71,72] są wśród czynników które mogą być sprzężone z QDs. Na przykład redukcja mostków dwusiarczkowych przeciwciał zapewnia dostęp do grup tiolowych [73,74]. Reszty cysteinowe w innych białkach (często wprowadzane przez ukierunkowaną mutagenezę) można sprzęgać z QDs aktywowanymi melaimidem [75]. Reszty lizyny białek mogą być również przyłączane do QDs aktywowanych karboimidem lub estrem sukcynoimidu [76]. Syntetyczne oligonukleotydy modyfikowane grupami tiolowymi lub aminowymi można analogicznie sprzęgać z powierzchnią QDs. Pomimo, iż koniugacja poprzez sprzęganie posiada wiele zastosowań, jest także obarczona pewnymi wadami. Orientacja białka na powierzchni QDs jest często niekontrolowana i może dochodzić do niepożądanych połączeń białko-białko lub mediowanych przez białko połączeń QDs-QDs. Ponadto, konkurencyjne reakcje hydrolizy i nadmiar środka sieciującego mogą powodować słabą kontrolę nad koniugatem (tj. liczbą cząsteczek biomolekuł przypadającą na QD). Dodatkowo, jeśli aktywacja pozbawionym ładunku czynnikiem sieciującym jest nadmierna może dochodzić do agregacji. Co więcej, skład niektórych buforów i wartości ich pH nie są kompatybilne z czynnikami sprzęgającymi. Na przykład sprzęganie karboimidem jest hamowane w buforach zawierających aminy lub fosforany, a optymalną reaktywność można uzyskać przy pH <6 [77].

Alternatywą dla strategii sieciowania jest samoorganizacja biokoniugatów. Dla przykładu białka połączone z polihistydyną [78,79] lub znaczniki melationeiny [80] mogą spontanicznie koordynować z nieorganiczną powierzchnią QDs i zapewniać stabilną koniugację. To podejście zapewnia znacznie lepszą kontrolę nad orientacją białka [81], zapobiega niepożądanemu sieciowaniu białko-białko lub QD-QD i ma mniej ograniczeń jeżeli chodzi o użycie buforów. Zastosowanie metody z użyciem polihistydyny może być również wykorzystane do utworzenia koniugatów QDs-oligonukleotyd [82,83]. Podobnie oligonukleotydy zakończone grupami tiolowymi mogą zostać użyte do otrzymania koniugatów QDs-oligonukleotydy ulegających samoorganizacji [84]. QDs otoczone ligandami najlepiej nadają się do syntezy biokoniugatów przy użyciu tej metody ponieważ umożliwiają dostęp do nieorganicznej powierzchni QDs.

Dobrze znana reakcja wiązania pomiędzy biotyną a streptawidyną (SA) jest również często używaną metodą do otrzymywania biokoniugatów na bazie QDs z przyłączonymi

przeciwciałami [85], oligopeptydami [86], białkami [87] a także oligonukleotydami [88]. Zakładając relatywnie wąską dystrybucję dostępnych miejsc wiązań w koniugatach QDs-SA, metoda ta pozwala uzyskać dobrą kontrolę nad strukturą otrzymanych koniugatów.
Jeżeli biotynylacja przebiega w sposób specyficzny w określonym miejscu [89] to możliwym jest również uzyskanie pewnej kontroli nad orientacją biomolekuły.




*Rysunek 6. Schemat ilustrujący wybrane metody koniugacji dostępne dla QDs. Szara powłoka wokół QDs oznacza ogólną powłokę. Powłoka ta może być związana z powierzchnią poprzez (e) oddziaływania hydrofobowe lub koordynację ligandów. Przykłady koordynacji ligandów obejmują (a) jedno lub dwukleszczowe tiole, (b) imidazol, poliimidazol (np. polihistydyna). Zewnętrzna strona powłoki zapewnia rozpuszczalność poprzez obecność (c) grup aminowych lub karboksylowych lub (d) funkcjonalizowanego PEG. Typowe strategie biokoniugacji obejmują (a) modyfikacje grupami tiolowymi lub (b) wprowadzenie polihistydyny - znacznik, który penetruje powłokę i oddziałują z powierzchnią QD; (f) oddziaływania elektrostatyczne z powłoką; (g) przyłączenie polihistydyny z udziałem metalu (np. niklu) do powłok zawierających ugrupowania karboksylowe; (h) aktywację i sprzęganie maleimidu; (i) tworzenie aktywnego estru i sprzęganie; (j) znakowanie biotyną i koniugaty streptawidyna-QD [28].*

## 4. Biosensory oparte na kropkach kwantowych

Sensory nieustannie cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na szeroki zakres ich zastosowań w wielu różnych obszarach takich jak: produkcja urządzeń, medycyna, monitorowanie środowiska. Biosensor jest urządzeniem analitycznym, zaprojektowanym dla umożliwienia detekcji określonych związków chemicznych, takich jak: białka, peptydy, DNA, RNA w analicie biologicznym. Zaletami biosensorów są ich: wysoka czułość i selektywność, możliwość prowadzenia pomiaru w czasie rzeczywistym, ograniczona podatność na zakłócenia oraz miniaturowe rozmiary [90].

Najbardziej popularną metodą wykrywania i oznaczania biomolekuł nadal pozostaje fluorescencja [14], co wiąże się z zastosowaniem fluorescencyjnych znaczników. Wcześniejsze klasy znaczników bazowały głównie na wykorzystaniu barwników organicznych, białek fluorescencyjnych i chelatów lantanowców, które wciąż są powszechnie stosowane, głównie ze względu na łatwość ich użycia i istnienie standardowych protokołów umożliwiających ich biokoniugację. Ogromna liczba fluoroforów została zsyntetyzowana z myślą o bardzo specyficznych aplikacjach. Takie sondy fluorescencyjne znalazły szerokie zastosowanie w otrzymywaniu wielu różnych biosensorów, w tym testów immunologicznych, układów umożliwiających wykrywanie kwasów nukleinowych, testów klinicznych/diagnostycznych i w znakowaniu komórkowym. Jednakże szereg barwników organicznych i fluoroforów opartych na białkach posiada wiele ograniczeń chemicznych i fotofizycznych, co w efekcie negatywnie wpływa na ich stabilność w dłuższej skali czasowej i możliwość jednoczesnej detekcji wielu sygnałów fluorescencyjnych. Niektóre z tych ograniczeń to: wąskie przedziały zakresów spektralnych absorpcji, szerokie widma emisji, krótkie czasy życia fluorescencji, zależność od pH, samowygaszanie przy wysokich stężeniach i podatność na fotowybielanie. Unikalne właściwości fluorescencyjne i optyczne półprzewodnikowych kropek kwantowych, czynią je bardzo interesującymi fluoroforami, zarówno w badaniach biologicznych *in vivo*, jak i *in vitro* [91]. Możliwość chemicznej modyfikacji powierzchni luminescencyjnych kropek kwantowych zachęciła do opracowania wielu sensorów bazujących na cząsteczkach przyłączonych do QDs takich jak peptydy, kwasy nukleinowe lub ligandy.

*Kropki kwantowe znalazły zastosowania do opracowania następujących biosensorów:*

1. Sensory pH

Zsyntetyzowanie hybrydowych nanokoniugatów poprzez przyłączenie do nieorganicznych QDs określonych organicznych ligandów prowadzi do otrzymania czułych na zmiany pH

układów QDs z bardzo obiecującymi zastosowaniami do różnych celów analitycznych, w szczególności do opracowywania luminescencyjnych chemosensorów. W ramach tej strategii do powierzchni CdSe/ZnS QDs przyłączany jest związek organiczny zawierający grupę ditiolanową, bogaty w elektrony indol, chromofor 4-nitrofenyloazofenoksylowy lub pierścień 1,3-oksazyny [92]. W przypadku tego ostatniego związku pomiar pH opiera się na otwarciu pierścienia 1,3-oksazyny po dodaniu do układu zasady lub kwasu. W pierwszym przypadku, chemiczna stymulacja generuje chromofor 4-nitrofenyloazofenolanu, który pełni rolę wygaszacza luminescencji. Gdy pierścień 1,3-oksazyny otwiera się w kwasowym pH, powstaje 4-nitrofenyloazofenol, który nie absorbuje w obszarze widzialnym, tj. chromofor nie jest akceptorem energii wzbudzania z QDs i jest również słabym donorem elektronów. W rezultacie następuje wzrost wydajności kwantowej. Stosowanie tego odwracalnego przełączania luminescencji jest zatem bardzo obiecujące przy projektowaniu urządzeń sensorowych. Inne podejście opisane w literaturze opiera się na mechanizmie FRET między CdSe/ZnS QDs zamkniętymi w amfifilowym polimerze i wrażliwym na pH barwniku przyłączonym na powierzchni. Ponieważ widmo absorpcyjne barwnika jest zależne od pH, więc i efektywność FRET oraz stosunek emisji QDs i emisji barwnika staje się funkcją pH [93].

2. Sensory jonów

Metody detekcji jonów bazujące na zmianach stężeń analitów mierzone poprzez fotoluminescencję QDs są prężnie rozwijającą się dziedziną badań. W tym celu wykorzystuje się szereg ligandów kwasu tioalkilowego (np. MAA, również nazywanego kwasem tioglikolowym, TGA, czy też kwasu dihydroliponowego, DHLA). Gdy samoorganizacja przebiega poprzez oddziaływanie z metalem grup tiolowych, ugrupowania karboksylowe wystawiane są na działanie otaczającego roztworu wodnego. Ligand jest zatem równocześnie odpowiedzialny za udział w odpowiedzi na jony metalu i za rozpuszczalność QDs w środowisku wodnym. Przydatność QDs jako sond jonowych została również przetestowana w obecności różnych czynników zewnętrznych, takich jak L-karnityna lub albumina surowicy bydlęcej [94]. Luminescencyjne QDs jako sensory dla jonów w fizjologicznych próbkach buforowych po raz pierwszy opisali Chen i Rosenzweig [95], którzy uzyskali selektywność, zmieniając charakter warstwy otaczającej CdS QDs. Optyczne właściwości QDs funkcjonalizowanych L-cysteiną okazały się być zależne od stężenia jonów $Zn^{2+}$, co skutkowało wzrostem luminescencji, podczas gdy emisja tioglicerol-CdS QDs została wygaszona w obecności $Cu^{2+}$. Na ogół oddziaływanie jonów z QDs powoduje wygaszanie

fluorescencji, co można przypisać występowaniu efektów wewnętrznych, bezpromienistych procesów rekombinacji i procesów przeniesienia elektronu [96].

3. Sensory związków organicznych

Pestycydy nadal są powszechnie stosowane w zabiegach rolniczych, pomimo problemów zdrowotnych i środowiskowych, które mogą wynikać z ich nagromadzenia w środowisku oraz w organizmach zwierząt i ludzi. Zastosowano QDs i techniki immunologiczne w celu wykrycia i ilościowego oznaczenia kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Enzym - fosfatazę alkaliczną (ALP) skoniugowano z herbicydem 2,4-D i utworzono wiązanie amidowe między grupą karboksylową MPA-CdTe QDs a grupą aminową ALP. Następnie przeprowadzono analizę ilościową 2,4-D przy użyciu tak otrzymanego fluorescencyjnego biosensora [97].

4. Sensory białek i enzymów

Pierwszy raport dotyczący koniugacji cząsteczek białek do luminescencyjnych CdSe/ZnS QDs powstał w grupie Mattoussi [68]. W tych badaniach ujemnie naładowane QDs, zostały elektrostatycznie skoordynowane z chimerycznym białkiem fuzyjnym opartym na występującym w bakteriach Escherichia coli białku wiążącym maltozę (MBP). To podejście niekowalencyjnej elektrostatycznej organizacji zostało dodatkowo wykorzystane do otrzymania biokoniugatów CdSe/ZnS QDs z przeciwciałami do zastosowania w testach fluoroimmunologicznych:

(a) przy użyciu genetycznej fuzji pomiędzy immunoglobuliną G (IgG) wiążącą się z domeną β2 białka G streptokoków (PG) z dodatnio naładowanym suwakiem (zamkiem) leucynowym, który umożliwia łatwe tworzenie biokoniugatów QDs-IgG;

(b) przy użyciu dodatnio naładowanej awidyny do tworzenia koniugatów QDs-przeciwciało w reakcji z biotynylowaną IgG [98].

## 5. Znaczenie zasad azotowych, nukleozydów oraz ich pochodnych

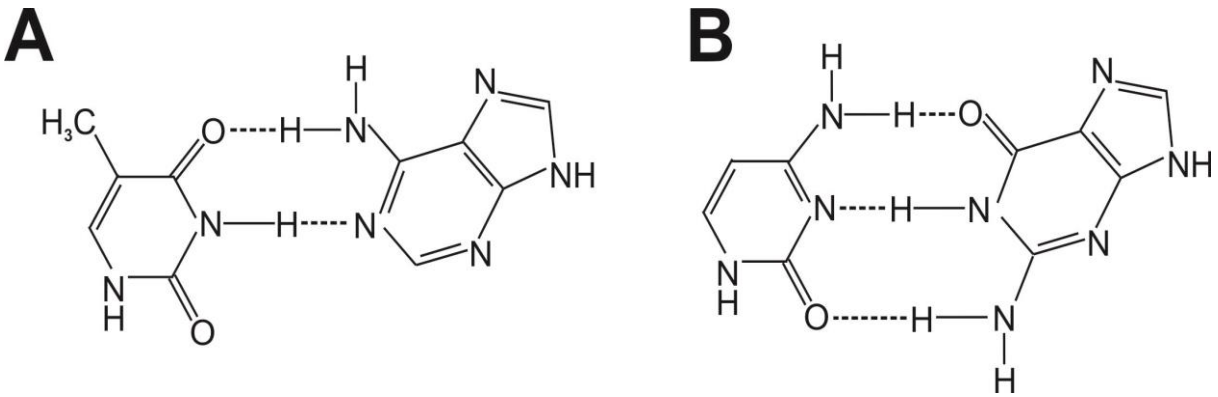
### 5.1. Budowa

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) jest wielkocząsteczkowym organicznym związkiem chemicznym, pełniącym w organizmie rolę nośnika informacji genetycznej pozwalającej na biosyntezę białek, a także ekspresję materiału genetycznego [99]. Każdy kwas nukleinowy zawiera cztery typy zasad: purynowe adenina (A) i guanina (G) występują zarówno w DNA jak i w RNA, oraz pirymidynowe cytozyna (C) i tymina (T). W RNA zamiast tyminy (T) występuje uracyl (U) [100].

Nukleozydy są pochodnymi zasad azotowych połączonymi poprzez jeden z ich atomów azotu z węglem C1 rybozy lub deoksyrybozy. Nukleozydy i ich modyfikacje pochodzące z rozpadu RNA odgrywają ważną rolę w procesach biochemicznych, a ich podwyższony poziom związany jest z różnymi chorobami i zaburzeniami metabolicznymi [101]. Poziom nukleozydów i ich metabolitów stanowi istotny marker w diagnostyce wielu chorób [102].

### 5.2. Zasada komplementarności zasad azotowych

Zgodnie z modelem Watsona-Cricka zaproponowanym w 1953 r. dwa łańcuchy polinukleotydowe w podwójnej helisie łączą się wiązaniami wodorowymi powstającymi pomiędzy cząsteczkami zasad azotowych, przy czym powstają one zawsze w sposób komplementarny, tj. w DNA między adeniną i tyminą (lub adeniną i uracylem w RNA) oraz między cytozyną i guaniną **(Rysunek 7)** [103].




*Rysunek 7. Wiązanie wodorowe między parami zasad typu Watson-Crick tymina-adenina (A), cytozyna-guanina (B) (linią przerywaną zaznaczono wiązania wodorowe) [104].*

### 5.3. Rola adeniny, guaniny i pochodnych adeniny w organizmie człowieka

Adenina spełnia ważne funkcje związane z procesami fizjologicznymi organizmu człowieka. Kontroluje ona przepływ krwi, zapobiega arytmii serca, hamuje uwalnianie neuroprzekaźnika, wpływa na krążenie mózgowe i moduluje aktywność cyklazy adenylanowej [105].

Uważa się, że guanina spełnia kluczową rolę w utlenianiu DNA przez różne typy utleniaczy i wolne rodniki [106]. W ten sposób może być ona wykorzystywana do określenia mechanizmów fizycznych i chemicznych odpowiedzialnych za stopień, lokalizację i chemiczny wpływ uszkodzeń oksydacyjnych DNA [107]. Znaczenie takiego określania wynika z faktu, że nieprawidłowe stężenie tych puryn w komórkach może odzwierciedlać

zmiany w aktywności katabolicznej, anabolicznej, interkonwersji enzymów i występowania różnych chorób [108].

Co więcej, zmiany w stężeniu zasad azotowych w organizmie człowieka mogą świadczyć o niedoborze, jak również mutacjach układu odpornościowego i być wskaźnikiem toczącego się w organizmie procesu patologicznego. Wyższe niż normalne stężenie zasad nukleinowych może być traktowane, jako istotny parametr w diagnostyce chorób nowotworowych, AIDS, a także, co ważne, jako wskaźnik stopnia zaawansowania choroby. Dlatego też duże znaczenie ma analiza stężenia zasad azotowych i nukleozydów w procesie diagnostyki klinicznej [109]. Szybkie i ilościowe metody badania markerów różnych chorób są niezbędne do wdrożenia prawidłowego i efektywnego leczenia

# CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

## Część Eksperymentalna

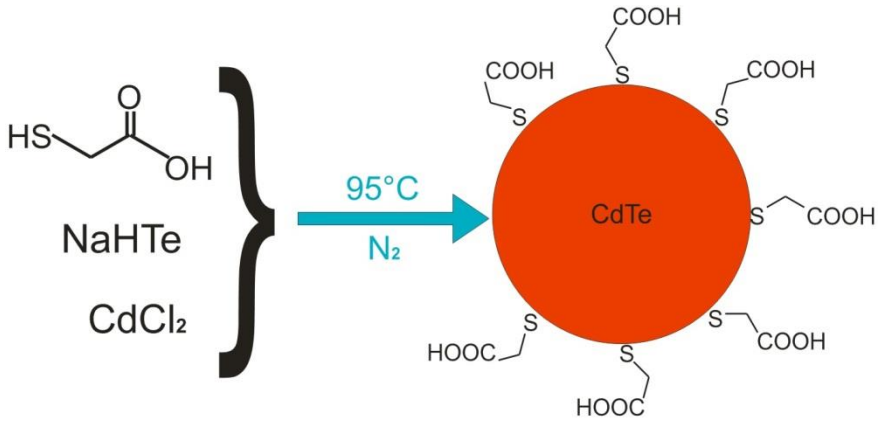
### 1. Materiały

Tetrahydroboran sodu ($NaBH_4$, Sigma Aldrich, 98%), tellur - proszek (Sigma Aldrich, 99,999%), chlorek kadmu ($CdCl_2 \cdot 5/2\ H_2O$, Sigma Aldrich, 98%), kwas tioglikolowy ($C_2H_4O_2S$, TGA, Sigma Aldrich, 98%), 2-propanol ($C_3H_8O$, Sigma Aldrich, 99,9%), tymina (TCI America, 98%), adenina (TCI America, 98%), guanina (TCI America, 98%), cytozyna (TCI America, 98%), tymidyna (TCI America, 98%), adenozyna (TCI America, 98%), guanozyna (TCI America, 98%), cytydyna (TCI America, 98%), 5′-deoksy-5′-(metylotio)adenozyna (MTA, Sigma Aldrich, 98%), 2'-O-metyloadenozyna (Sigma Aldrich, 98%), wodorofosforan sodu ($Na_2HPO_4$, Sigma Aldrich, 99%), diwodorofosforan potasu ($KH_2PO_4$, Sigma Aldrich, 99%), dwuwodny chlorek wapnia ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Sigma Aldrich, 99%), chlorek sodu (NaCl, Sigma Aldrich, 99%), siarczan sodu ($Na_2SO_4$, Sigma Aldrich, 99%), chlorek potasu (KCl, Sigma Aldrich, 99%), mocznik ($CH_4N_2O$, Sigma Aldrich, 98%), kreatynina ($C_4H_7N_3O$, Sigma Aldrich, 98%), kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy ($C_8H_{18}N_2O_4S$, HEPES, Sigma Aldrich, 99,5%), 3-merkapto-1-propanosulfonian sodu ($HS(CH_2)_3SO_3Na$, 3MPS, Sigma Aldrich, 90%), kwas tetrachlorozłotowy(III) trihydrat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, Sigma Aldrich, 99,5%).

### 2. Otrzymywanie

#### 2.1. Kropki kwantowe tellurku kadmu stabilizowane kwasem tioglikolowym

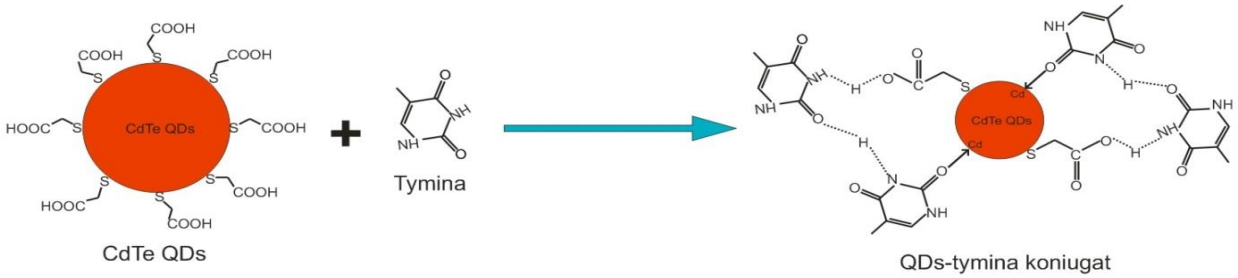
Pierwszym etapem badań było otrzymanie kropek kwantowych tellurku kadmu w reakcji pomiędzy $Cd^{2+}$ i NaHTe w obecności kwasu tioglikolowego (TGA), jako stabilizatora **(Rysunek 8)**. Opracowana na podstawie danych literaturowych procedura obejmuje następujące etapy. W pierwszym etapie syntezy przeprowadza się reakcję tetrahydroboranu sodu ($NaBH_4$) z tellurem, w wodzie, w celu otrzymania NaHTe. W drugiej kolbie zostaje rozpuszczony w wodzie chlorek kadmu oraz wkroplony kwas tioglikolowy pełniący funkcję stabilizatora. W ostatnim etapie syntezy do powyższego roztworu dodawany jest świeżo otrzymany wodorotellurek sodu (NaHTe). Reakcja jest prowadzana w atmosferze gazu obojętnego w temperaturze 96°C przez 1 godzinę. Po zakończonej syntezie kropki kwantowe zostają oczyszczone i strącone przy użyciu 2-propanolu, a następnie pozostawione w piecu próżniowym do wysuszenia.




*Rysunek 8. Schemat syntezy kropek kwantowych stabilizowanych kwasem tioglikolowym.*

### 2.2. Koniugat typu kropki kwantowe – tymina

W celu otrzymania koniugatu typu CdTe-tymina **(Rysunek 9)**, kropki kwantowe (1 mg/ml) zostały zawieszone w buforze PBS (0,5 ml, 0,1 mol/l, pH=7,5). Do tej zawiesiny (objętość próbek wynosiła 0,5 ml) wprowadzono różne objętości roztworu tyminy (1 mg/ml, 7,9 mmol/l) **(Tabela 1).** Całość została uzupełniona buforem PBS do objętości 4 ml. Roztwór był mieszany przy użyciu mieszadła magnetycznego w łaźni z lodem, w ciemności przez 24 godziny. Po zakończonej syntezie otrzymany koniugat został oczyszczony i strącony przy użyciu 2-propanolu, przesączony i pozostawiony w piecu próżniowym do wysuszenia.




*Rysunek 9. Schemat syntezy koniugatu kropki kwantowe-tymina.*

*Tabela 1. Objętości i stężenia użytych reagentów do syntezy koniugatów.*

| **CdTe:tymina Stosunek molowy** | **$V_{CdTe}$ [ml]** | **$V_{tymina}$[µl]** | **[Tymina] [µmol/dm$^3$]** |
|---|---|---|---|
| kontrola | 0,5 | 0 | 0 |
| 1:1 | 0,5 | 1,4 | 2,8 |
| 1:2 | 0,5 | 2,8 | 5,6 |
| 1:3 | 0,5 | 4,2 | 8,3 |
| 1:5 | 0,5 | 7,0 | 13,9 |
| 1:6 | 0,5 | 8,4 | 16,7 |
| 1:7 | 0,5 | 9,8 | 19,4 |

### 2.3. Biosensor oparty na QDs-tymina – eksperyment w buforze PBS

***Układ 1 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–tymina (1:6, pH=7,5), a zasadami azotowymi: adeniną, guaniną oraz cytozyną, sporządzono ich roztwory o stężeniach 1 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. Przygotowaną próbkę koniugatu (opis przedstawiony powyżej, rozdział 2.2.) podzielono na 4 części zawierające po 1,0 ml a następnie do każdej objętości dodawano oddzielnie kolejne objętości roztworów zasad azotowych (adeniny, guaniny i cytozyny) oraz PBS (próba kontrolna) od 10-500 µl.

***Układ 2 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–tymina (1:6, pH=7,5), a nukleozydami: adenozyną, guanozyną oraz cytydyną, sporządzono ich roztwory o stężeniach 2 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. Przygotowaną próbkę koniugatu (opis przedstawiony powyżej, rozdział 2.2.) podzielono na 4 części zawierające po 1,0 ml a następnie do każdej

objętości dodawano osobno kolejne objętości roztworów nukleozydów (adenozyny guanozyny i cytydyny) oraz PBS (próba kontrolna) od 10-500 µl.

### 2.4. Otrzymywanie SU

**Do sporządzenia sztucznego moczu użyto związków w następujących ilościach:**

1. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,103 g
2. NaCl 2,925 g
3. $Na_2SO_4$ 2,250 g
4. $KH_2PO_4$ 1,400 g
5. KCl 1,600 g
6. $NH_4Cl$ 1,000 g
7. mocznik 25,000 g
8. kreatynina 1,100 g

***Procedura przygotowania sztucznego moczu przebiegała według następującej kolejności:***

Do 1000 ml wody dejonizowanej dodano związki przedstawione powyżej. Rozpuszczano je w kolejności od 1 do 8 (kolejny związek dodawano po całkowitym rozpuszczeniu uprzedniego). pH roztworu została ustalona na 6,0 dodając NaOH. Roztwór filtrowano za pomocą filtru strzykawkowego o rozmiarach porów 0,22 µm w celu wyeliminowania ewentualnych zanieczyszczeń. SU przechowywano w plastikowej kolbie w lodówce w temperaturze 5-10°C przez okres 30 dni.

### 2.5. Biosensor bazujący na QDs-tymina – eksperyment w sztucznym moczu

***Układ 1 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–tymina, a zasadami azotowymi: adeniną, guaniną oraz cytozyną, sporządzono roztwory tych nukleozasad o stężeniach 1 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. W następnym etapie przygotowano serie pomiarowe dla każdej zasady azotowej: adeniny, guaniny oraz cytozyny. Każda próbka w serii zawierała 0,1 ml sztucznego moczu (SU), 0,5 ml koniugatu, różne objętości zasady azotowej (10 µl, 30 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 250 µl i 500 µl), a także bufor PBS w ilości uzupełniającej objętość każdej próbki w serii do 1,5 ml. Przygotowano również próbę kontrolną, która

nie zawierała nukleozasad. Tak przygotowaną serię roztworów inkubowano przez 1 godzinę w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym.

***Układ 2 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–tymina, a nukleozydami: adenozyną guanozyną oraz cytydyną, sporządzono ich roztwory o stężeniach 2 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. W następnym etapie przygotowano serie pomiarowe dla każdego nukleozydu: adenozyny guanozyny oraz cytydyny. Każda próbka w serii zawierała 0,1 ml sztucznego moczu (SU), 0,5 ml koniugatu, różne objętości zasady azotowej (10 µl, 30 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 250 µl i 500 µl), a także bufor PBS w ilości uzupełniającej objętość każdej próbki w serii do 1,5 ml. Przygotowano również próbę kontrolną, która nie zawierała nukleozydów. Tak przygotowaną serię roztworów inkubowano przez 1 godzinę w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym.

## 2.6. Koniugat typu kropki kwantowe – guanina

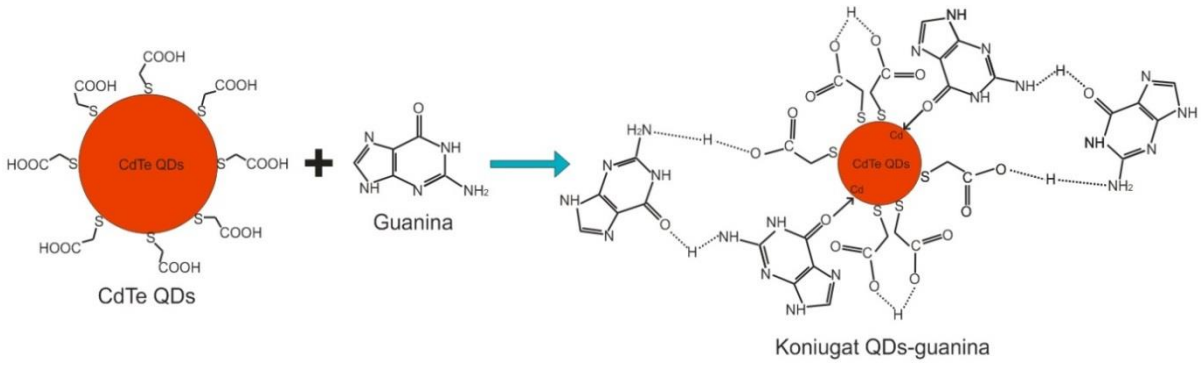
*Synteza koniugatu QDs-guanina w buforze PBS*

W celu otrzymania koniugatu typu QDs-guanina **(Rysunek 10)**, kropki kwantowe (1 mg/ml) zostały zawieszone w buforze PBS (0,5 ml, 0,1 mol/l, pH=7,5). Do tej zawiesiny (objętość próbek wynosiła 0,5 ml) dodano określoną objętość roztworu guaniny (8,4 µl) w buforze PBS (pH=7,5) o stężeniu (1 mg/ml) Całość została uzupełniona buforem PBS do objętości 4 ml. Roztwór był mieszany przy użyciu mieszadła magnetycznego w łaźni z lodem bez dostępu światła przez 24 godziny. Po zakończonej syntezie otrzymany koniugat został oczyszczony i strącony przy użyciu 2-propanolu, przesączony i pozostawiony w piecu próżniowym do wysuszenia.

*Synteza koniugatu QDs-guanina w buforze HEPES*

Oczyszczone i wytrącone QDs (synteza opisana w rozdz. 2.1.) zawieszono w buforze HEPES (1 mg/ml), a następnie dodano określoną objętość roztworu guaniny (16,8 µl) w buforze HEPES (pH=7,6) o stężeniu (1 mg/ml) **(Rysunek 10)**. Całość została uzupełniona do objętości 8 ml. Roztwór był mieszany przy użyciu mieszadła magnetycznego w łaźni z lodem, w ciemności przez 4 godziny. Po zakończonej syntezie otrzymany koniugat został

oczyszczony i strącony przy użyciu 2-propanolu, a następnie pozostawiony w piecu próżniowym do wysuszenia.




*Rysunek 10. Schemat reakcji otrzymywania koniugatu QDs-guanina.*

### 2.7. Biosensor bazujący na QDs-guanina – eksperyment w buforze PBS

***Układ 1 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–guanina (1:6, pH=7,5), a zasadami azotowymi: cytozyną, adeniną oraz tyminą, sporządzono ich roztwory o stężeniach 1 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. Przygotowaną próbkę koniugatu (opis przedstawiony powyżej, rozdział 2.6.) podzielono na 4 części o objętości 1,0 ml każda, a następnie do każdej próbki dodawano oddzielnie kolejne objętości roztworów zasad azotowych (cytozyny, adeniny i tyminy) oraz PBS (próba kontrolna) od 10-500 µl.

***Układ 2 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–guanina (1:6, pH=7,5), a nukleozydami: cytydyną, adenozyną oraz tymidyną sporządzono ich roztwory o stężeniach 2 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. Przygotowaną próbkę koniugatu (opis przedstawiony powyżej, rozdział 2.6.) podzielono na 4 części objętości po 1,0 ml każda, a następnie do każdej z nich dodawano osobno kolejne objętości roztworów nukleozydów (cytydyny, adenozyny i tymidyny) oraz PBS (próba kontrolna) od 10-500 µl.

## 2.8. Biosensor bazujący na QDs-guanina – eksperyment w sztucznym moczu

***Układ 1 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–guanina, a zasadami azotowymi: cytozyną, adeniną oraz tyminą, sporządzono roztwory tych nukleozasad o stężeniach 1 mg/ml w buforze PBS. Otrzymane roztwory mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. W następnym etapie przygotowano serie pomiarowe dla każdej zasady azotowej: cytozyny, adeniny oraz tyminy. Każda próbka w serii zawierała 0,1 ml sztucznego moczu (SU), 0,5 ml koniugatu, różne objętości zasady azotowej (10 µl, 30 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 250 µl i 500 µl), a także bufor PBS w ilości uzupełniającej objętość każdej próbki w serii do 1,5 ml. Przygotowano również próbę kontrolną, która nie zawierała nukleozasad. Tak przygotowaną serię roztworów inkubowano przez godzinę w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym.

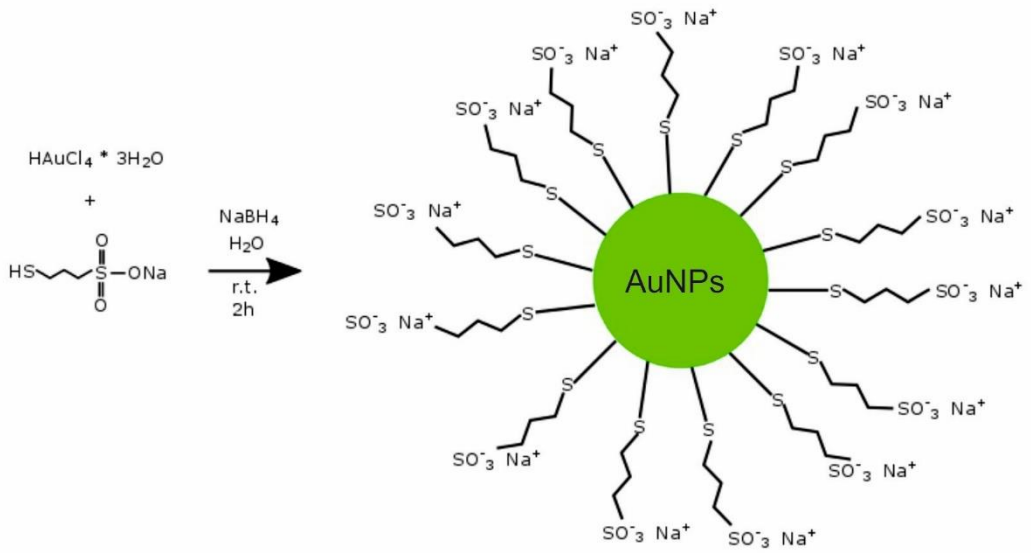
***Układ 2 – warunki eksperymentalne***

W celu zbadania oddziaływań między koniugatem CdTe–guanina, a nukleozydami: cytydyną, adenozyną oraz tymidyną, sporządzono ich roztwory o stężeniach 2 mg/ml w buforze PBS. Następnie roztwory te mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 24 godziny. W następnym etapie przygotowano serie pomiarowe dla każdego nukleozydu: cytydyny, adenozyny oraz tymidyny. Każda próbka w serii zawierała 0,1 ml sztucznego moczu (SU), 0,5 ml koniugatu, różne objętości zasady azotowej (10 µl, 30 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 250 µl i 500 µl), a także bufor PBS w ilości uzupełniającej objętość każdej próbki w serii do 1,5 ml. Przygotowano również próbę kontrolną, która nie zawierała nukleozydów. Tak przygotowaną serię roztworów inkubowano przez godzinę w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym.

## 2.9. Nanocząstki złota (AuNPs) stabilizowane 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu (synteza ta została przeprowadzona przez Autorkę niniejszej rozprawy w grupie prof. Fratoddi, w trakcie odbywanego stażu naukowego)

W 20 ml wody destylowanej rozpuszczono 200 mg $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ a następnie dodano 340 mg 3-merkapto-1-propanosulfonianu sodu (3MPS). 3MPS został wybrany spośród szerokiej gamy stabilizatorów, jako zapewniający najlepszą rozpuszczalność AuNPs w wodzie, co jest wymogiem koniecznym w kontekście potencjalnych zastosowań biomedycznych. Do powyższego roztworu został dodany $NaBH_4$ (190 mg w 20 ml wody

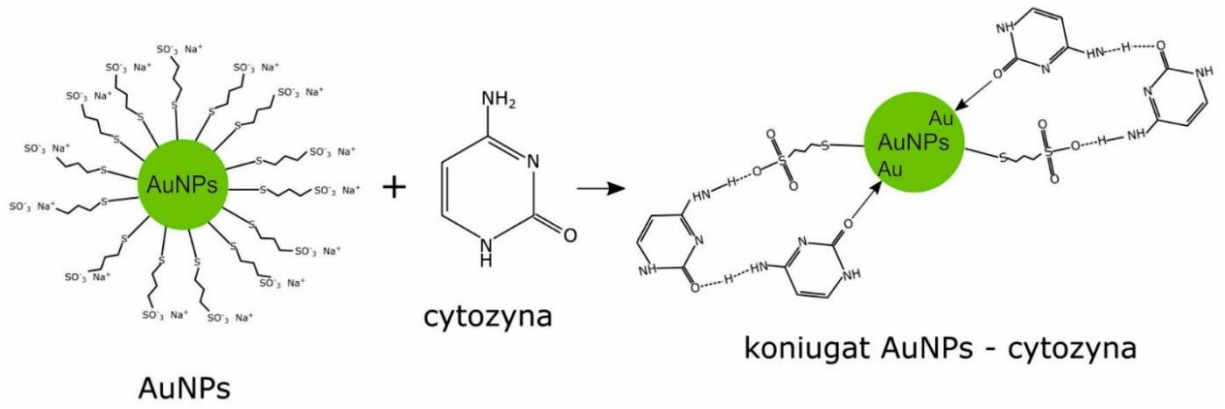
destylowanej) **(Rysunek 11)**. Reakcja prowadzona była w temperaturze pokojowej przez 3 godziny, a następnie otrzymany brązowy osad oczyszczono poprzez 5-krotne cykle wirowania (13000 rpm, 20 min) i płukania wodą destylowaną.




*Rysunek 11. Schemat syntezy nanocząstek złota (AuNPs) stabilizowanych 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu.*

### 2.10. Koniugat AuNPs-cytozyna

Oczyszczone AuNPs zawieszono w buforze HEPES (1 mg/ml), a następnie dodano określoną objętość roztworu cytozyny (12,4 µl) w buforze HEPES (pH=7,6) o stężeniu (1 mg/ml) **(Rysunek 12)**. Całość została uzupełniona do objętości 8 ml. Roztwór był mieszany przy użyciu mieszadła magnetycznego w łaźni z lodem, w ciemności przez 4 godziny. Po zakończonej syntezie otrzymany koniugat został oczyszczony poprzez odwirowanie, a następnie pozostawiony w piecu próżniowym do wysuszenia.




*Rysunek 12. Schemat reakcji otrzymywania koniugatu AuNPs-cytozyna.*

## 2.11. Biosensor bazujący na QDs-guanina i AuNPs-cytozyna

*Eksperyment w buforze HEPES*

Koniugaty QDs-guanina i AuNPs-cytozyna zostały przygotowane jak przedstawiono powyżej (rozdział 2.6. i 2.10.). Roztwory o różnych stężeniach wolnej guaniny, adeniny i tyminy (0,1 mg/ml w buforze HEPES) (2,10 ml; 1,85 ml; 1,50 ml; 1,34 ml; 1,07 ml; 0,80 ml; 0,40 ml; 0,20 ml; 0,05 ml; 0,0125 ml; 0,003 ml) zostały dodane do określonej objętości (0,5 ml) dyspersji AuNPs-cytozyna. Tak otrzymane roztwory inkubowano przez 2 godziny. Następnie, dokładnie określona, jednakowa objętość koniugatu QDs-guanina (0,5 ml) została dodana do każdej próbki. W celu uniknięcia różnicy stężeń próbek związanej z efektem rozcieńczenia, określona objętość buforu HEPES została dodana do każdej zawiesiny. Dodatkowo, została przygotowana próba kontrolna składająca się z AuNPs–cytozyna i QDs-guanina (bez wolnych zasad azotowych). Próbki były następnie inkubowane jeszcze przez 30 minut.

*Eksperyment w SU*

W celu określenia potencjalnego zastosowania proponowanego biosensora, koniugaty zostały również przetestowane w warunkach symulowanego sztucznego moczu. W tym celu skład wszystkich reakcyjnych komponentów był dokładnie taki sam, jednakże do każdej próbki z koniugatem AuNPs-cytozyna z wolną zasadą azotową dodano po 0,1 ml sztucznego moczu.

## 3. Stosowane metody

*Analiza elementarna*

Analizę elementarną kropek kwantowych CdTe, koniugatu CdTe-tymina, QDs-guanina, AuNPs-cytozyna i AuNPs-cytozyna-guanina wykonano za pomocą CHNS Vario Micro Cube Elemental Analyzer.

*Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)*

Pomiary dynamicznego rozpraszania światła jak również potencjału zeta wykonano przy użyciu aparatu Malvern Nano ZS light scattering. Próbki, które badano poddano działaniu lasera emitującego promieniowanie o długości fali 633 nm, intensywność światła rozproszonego badano przy ustalonym kącie rozpraszania 173° w temperaturze 25°C. Potencjał zeta wyznaczono stosując technikę laserowego pomiaru prędkości metodą Dopplera (LDV). Analizę danych przeprowadzono wykorzystując oprogramowanie dostarczone przez firmę Malvern.

*Spektrofluorymetria*

Pomiary fluorescencji wykonano przy użyciu spektrofotometru fluorescencyjnego Hitachi F-2700. Próbka została wzbudzona światłem monochromatycznym generowanym przez krótkołukową lampę ksenonową. Spektrofluorymetr sterowano za pośrednictwem komputera wyposażonego w oprogramowanie FL-Solution.

*Spektrofotometria*

Widma absorpcji wykonano przy pomocy spektrofotometru UV-Vis Hitachi U-2900. Spektrofotometr Hitachi U-2900 sterowany był za pomocą oprogramowania UV-Solutions zainstalowanego na zewnętrznym komputerze.

*Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)*

Widma FTIR wykonano przy pomocy spektrometru Thermo Fisher Scientific Nicolet IR200.

*Dyfraktometria rentgenowska (XRD)*

Pomiary wykonano przy użyciu dyfraktometru proszkowego X'PERT PRO MPD. Jako źródło promieniowania rentgenowskiego użyto miedziowej lampy rentgenowskiej. Warunki

pracy generatora ustawiono na: napięcie 40 kV i natężenie 30 mA. Użyto monochromatora grafitowego w celu wybrania tylko promieniowania Cu Kα (1,54054 Å - Kα1 i Kα2 - 1,54439 Å).

*Spektroskopia fotoelektronów (XPS)*

Analiza techniką XPS została przeprowadzona przy użyciu wielofunkcyjnego spektrometru ESCA z osprzętem pomocniczym PREVAC. Próbki QDs, QDs-guanina, AuNPs i AuNPs-cytozyna przeznaczone do analizy techniką XPS były suszone w piecu próżniowym przez 24 godziny.

*Mikroskopia sił atomowych (AFM)*

Obrazy mikroskopii sił atomowych (AFM) uzyskano za pomocą mikroskopu sił atomowych Dimension Icon (Bruker, Santa Barbara, CA) pracującego w trybie PeakForce w powietrzu w temperaturze pokojowej. Do pomiarów użyto ostrza krzemowego na wspornikach azotkowych (Bruker) o nominalnej stałej sprężystości 0,24 N/m i promieniu końcówki 2 nm.

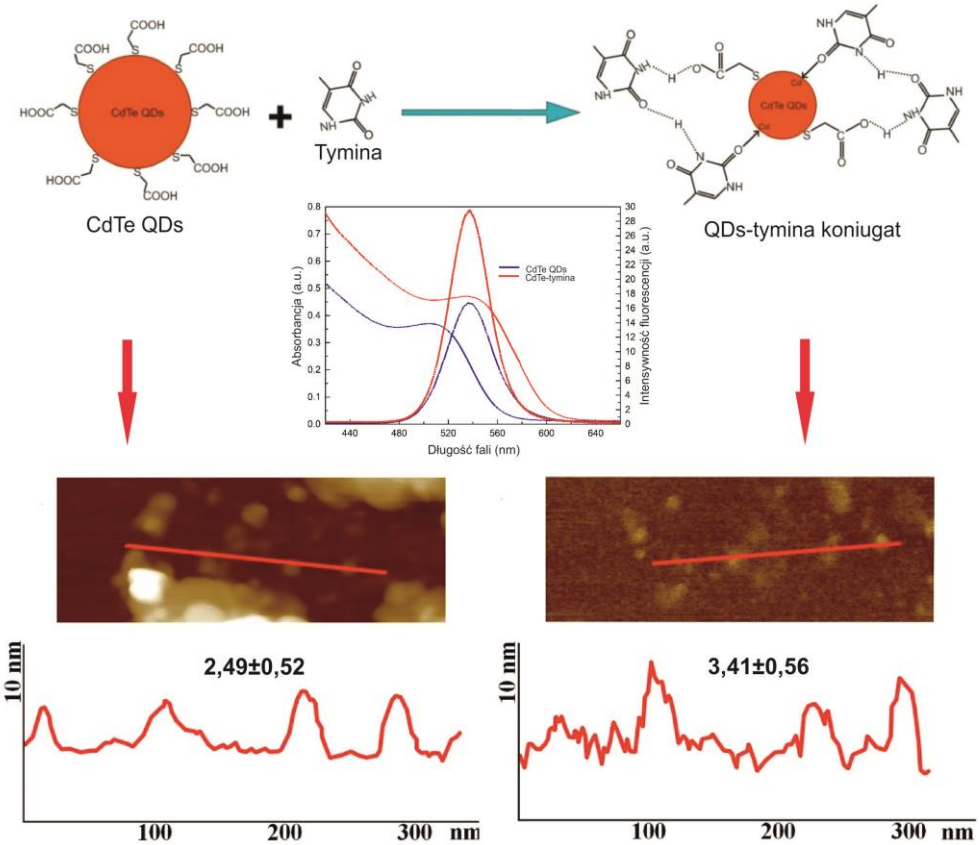
*Transmisyjna mikroskopia elektronowa i wysokorozdzielcza mikroskopia elektronowa (TEM i HRTEM)*

Obserwacje TEM i HRTEM przeprowadzono przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego FEI TECNAI TF20 X-TWIN. Jest to mikroskop o rozproszonym polu widzenia 200 kV (FEG) z rozdzielczością punktową ≤ 0,25 nm. Kratkę miedzianą 200 mesh powleczoną folią Formvar/węgiel (Pacific Grid-Tech) zanurzono w dyspersji próbki i pozostawiono na około 20 minut. Nadmiar próbki usunięto bibułą filtracyjną.

# Rozdział 1

# Biosensor bazujący na kropkach kwantowych i zasadzie azotowej – tyminie – otrzymywanie i właściwości

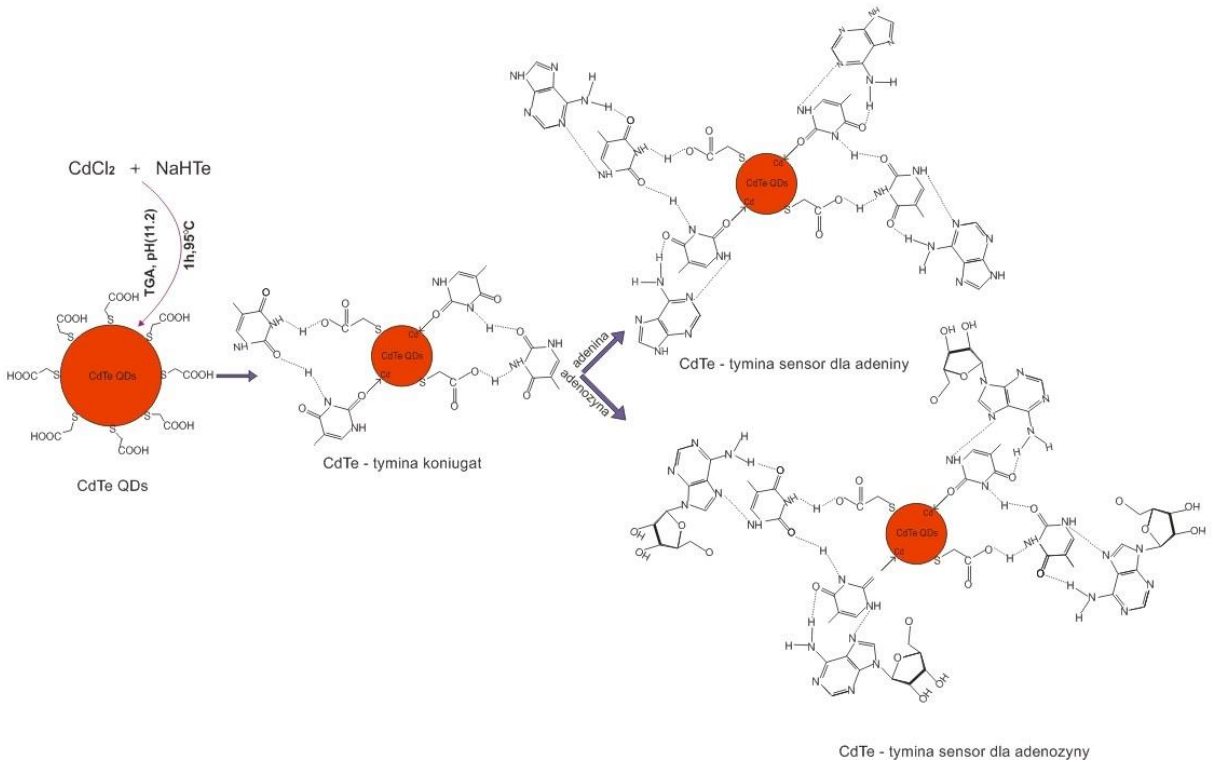
**Abstrakt graficzny**



# Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania rozwojem biosensorów. Wiąże się on z rozwojem nanotechnologii, która dostarcza wielu innowacyjnych materiałów mogących znaleźć zastosowanie w biosensoryce. Przydatne do tego celu są nanocząstki i materiały nanostrukturalne takie jak: nanorurki, nanopręty, nanodruty, kropki kwantowe. Charakteryzują się one unikalnymi właściwościami spektralnymi, fotofizycznymi i elektrochemicznymi, pozwalającymi na rozwój rożnych metod monitorowania szeregu substancji ważnych w aspekcie analityki biomedycznej.

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań dotyczących opracowania i scharakteryzowania koniugatów bazujących na kropkach kwantowych (QDs) tellurku kadmu i zasadzie azotowej-tyminie potencjalnie przydatnych jako nowe fluorescencyjne biosensory zdolne do selektywnej detekcji zasad azotowych i nukleozydów **(Rysunek 13)**.




*Rysunek 13. Schemat ilustrujący główne etapy prowadzonych badań.*

Pierwszym etapem badań było otrzymanie kropek kwantowych telluru kadmu (CdTe QDs) stabilizowanych kwasem tioglikolowym. Otrzymane kropki kwantowe zostały scharakteryzowane przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej w normalnym (TEM) i wysokorozdzielczym trybie (HRTEM), mikroskopii sił atomowych (AFM), a także analizy

elementarnej, dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i spektroskopii w podczerwieni (IR). Optyczne właściwości zostały określone przy użyciu spektroskopii UV-VIS, a także poprzez pomiary widm fotoluminescencji. Skład fazowy i chemiczny QDs został określony techniką dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD) i spektroskopii fotoelektronów (XPS). W kolejnym etapie badań, w celu utworzenia nowych układów sensorowych, do uprzednio zsyntetyzowanych CdTe QDs przyłączono zasadę azotową: tyminę. Otrzymane koniugaty QDs-tymina zostały poddane charakterystyce fizykochemicznej. Oddziaływania pomiędzy QDs a zasadą zostały scharakteryzowane przy użyciu zaawansowanych technik eksperymentalnych, takich jak: analiza elementarna, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), potencjał zeta, spektroskopia w podczerwieni (IR), spektroskopia UV-VIS jak również pomiary fotoluminescencji. Przeprowadzone zostały również badania mające na celu zobrazowanie QDs-tymina przy użyciu następujących technik: transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) i wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HRTEM), mikroskopia sił atomowych (AFM). Skład fazowy i chemiczny został określony stosując dyfrakcyjną analizę rentgenowską (XRD) i analizę rentgenowską fluorescencyjną (XPS). Na podstawie powyższych badań fizykochemicznych, określona została możliwość efektywnego utworzenia koniugatu QDs-tymina.

Celem określenia przydatności uzyskanego materiału do otrzymania nanosensora został on poddany badaniom pozwalającym na ocenę selektywności i czułości jego oddziaływań z komplementarnymi i niekomplementarnymi zasadami azotowymi/nukleozydami, a także modyfikowanymi nukleozydami. Badania oddziaływań między tymi układami prowadzone były poprzez pomiary fluorescencji.

W końcowym etapie prowadzono badania mające na celu sprawdzenie możliwości wykorzystania biosensora w warunkach modelowej cieczy fizjologicznej, symulowanego sztucznego moczu (SU). SU został przygotowany zgodnie z procedurą opracowaną przez Griffith [110].

W podrozdziale 1.1 zaprezentowano wyniki dotyczące badań koniugatu QDs-guanina, pozwalające na ocenę jego selektywności poprzez śledzenie oddziaływań z zasadami azotowymi i nukleozydami. Ważnym aspektem były również badania prowadzone w celu określenia działania opracowanego nanosensora w warunkach symulowanego sztucznego moczu.

## Wyniki i dyskusja

### 1. Otrzymane materiały

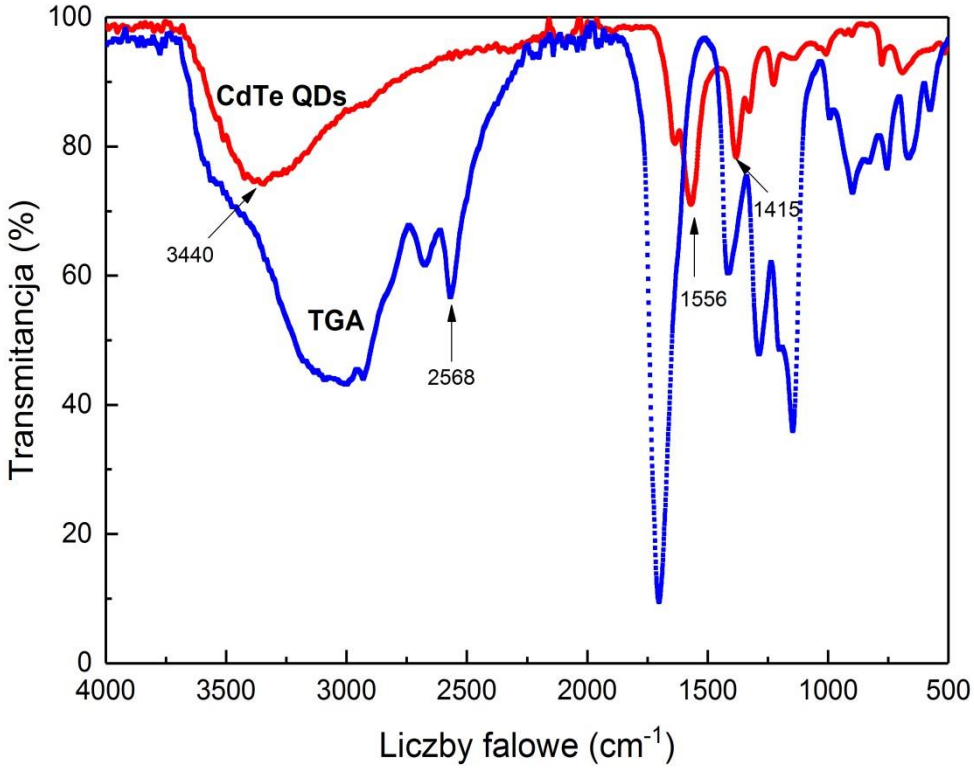
W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymano kropki kwantowe tellurku kadmu stabilizowane kwasem tioglikolowym (TGA), a także serię koniugatów CdTe-tymina o różnym stężeniu przyłączonej zasady azotowej – tyminy.

Kwas tioglikolowy zapewnia steryczną stabilizację QDs, ochrania ich powierzchnię poprzez usuwanie możliwych defektów, które mogą obniżać wydajność fluorescencji, a także zapobiega występowaniu bezpromienistych rekombinacji elektron-dziura. TGA kontroluje również kinetykę wzrostu kropek kwantowych i ogranicza ich agregację. Dodatkowo, czynnik stabilizujący umożliwia interakcje QDs z innymi molekułami poprzez wiązania kowalencyjne, wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne [111]. Odziaływania kropek kwantowych ze środowiskiem jest bardzo ważne z punktu widzenia ich stabilności i właściwości fotoluminescencyjnych [112].

### 2. Synteza i fizykochemiczna charakterystyka QDs i QDs-tymina

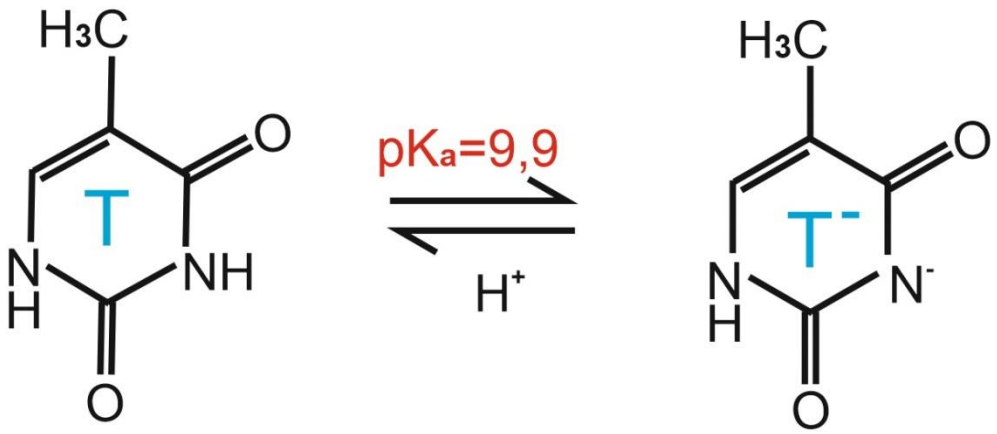
#### 2.1. Analiza FTIR

W celu potwierdzenia kowalencyjnego przyłączenia kwasu tioglikolowego do QDs porównano widma FTIR TGA oraz CdTe QDs stabilizowanych TGA **(Rysunek 14)**. Dla TGA-CdTe QDs zaobserwowano pasma absorpcyjne przy 3440 $cm^{-1}$ (drganie rozciągające OH), 2865 $cm^{-1}$ ($CH_2$ symetryczne drganie rozciągające), 1556 $cm^{-1}$ ($COO^-$ asymetryczne drganie rozciągające), 1415 $cm^{-1}$ ($CH_2$ drganie nożycowe), 1369 $cm^{-1}$ ($COO^-$ symetryczne drganie rozciągające) i 1145 $cm^{-1}$ (CO drganie rozciągające) [113]. Dodatkowo drganie absorpcyjne na widmie TGA z maksimum pasma przy ok 2568 $cm^{-1}$ związane z drganiami rozciągającymi S-H nie jest obserwowane na widmie TGA-CdTe QDs. Świadczy to o kowalencyjnym przyłączeniu kwasu tioglikolowego do powierzchni kropki kwantowej, czemu towarzyszy zanik wiązania S-H i utworzenie wiązania S-Cd. Biorąc pod uwagę przesunięcie asymetrycznego drgania rozciągającej grupy karbonylowej w grupie karboksylowej TGA z 1711 do 1578 $cm^{-1}$ stwierdzono, iż grupa karboksylowa została pozbawiona protonów co zapewnia dodatkową elektrostatyczną stabilizację QDs. W oparciu o poczynione obserwacje można wnioskować, iż TGA zapewnia efektywną stabilizację CdTe QDs.



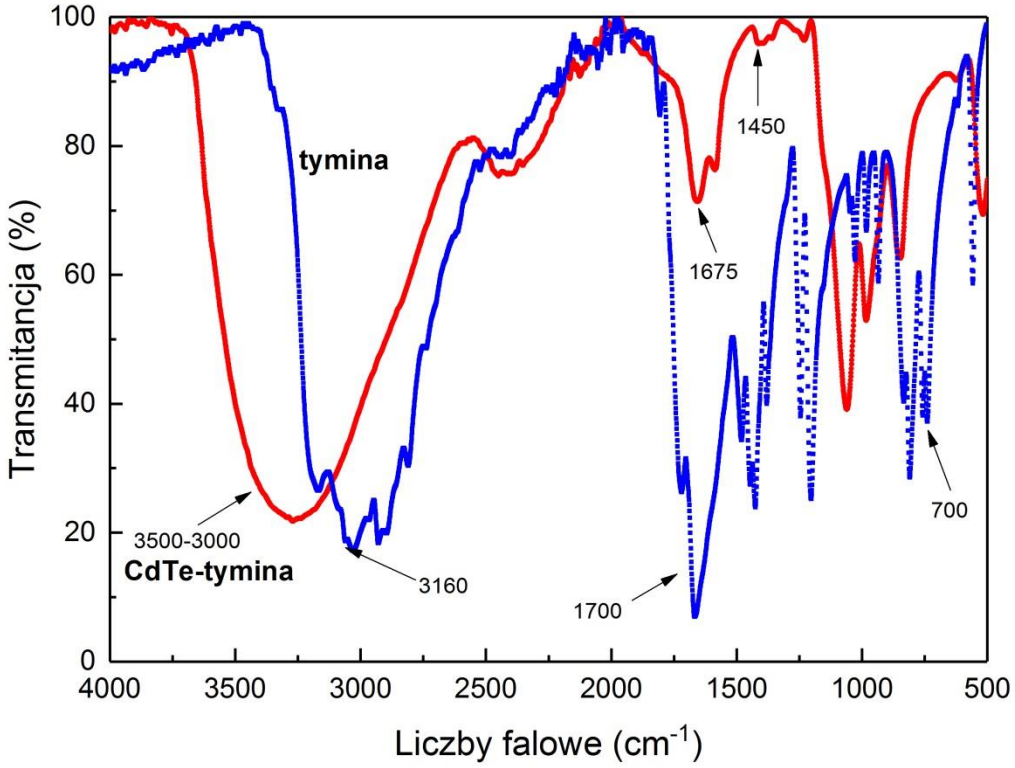

*Rysunek 14. Widmo FTIR TGA i CdTe QDs stabilizowanych przy pomocy TGA.*

W kolejnym etapie badań przygotowano koniugaty CdTe-tymina z różną liczbą jednostek tyminy przyłączonych do powierzchni QDs. Proces ten został schematycznie przedstawiony na **Rysunku 9**. Jednym z najważniejszych parametrów tej syntezy jest pH roztworu. Feng i współpracownicy [114] zaobserwowali, że stabilną zawiesinę koniugatu QDs-guanina można otrzymać gdy pH układu wynosi 7,49. W tych warunkach wzrasta efektywność utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy grupą $-NH_2$ guaniny i grupy -COOH pochodzącej od TGA obecnego na powierzchni QDs. Tak dobrane pH umożliwia również utworzenie wiązania koordynacyjnego pomiędzy jonami $Cd^{2+}$ a atomem tlenu pochodzącym od guaniny. Biorąc pod uwagę wyniki tych badań oraz uwzględniając wartość $pK_a$ tyminy **(Rysunek 15)** syntezę koniugatu CdTe-tymina przeprowadzono w buforze PBS o wartości pH=7,5, przy stałej sile jonowej równej I=0,01 M.




*Rysunek 15. Wartość $pK_a$ dla tyminy.*

**Rysunek 16** prezentuje widmo FTIR tyminy i koniugatu CdTe-tymina. Pasmo absorpcyjne tyminy przy około 3185 $cm^{-1}$ i 3160 $cm^{-1}$ przypisano drganiom rozciągającym grupy N-H natomiast pasmo przy 1700 $cm^{-1}$ jest charakterystyczne dla grupy C=O. Pasma rozciągające pierścienia pirymidynowego są kombinacją drgań rozciągających grup: C-N, C=N, C-C i C=C. Pasma przy 1445, 1290, 1240, 1030 i 700 $cm^{-1}$ przypisano do drgań rozciągających pierścienia. Analiza widma koniugatu CdTe-tymina wskazuje, iż pasmo absorpcyjne w zakresie 3500-3000 $cm^{-1}$ może zostać przypisane drganiu rozciągającemu i wiązaniu wodorowemu grupy N-H. Pasma z maksimum przy około 1675 i 1450 $cm^{-1}$ przypisano odpowiednio drganiom rozciągającym asymetrycznym i symetrycznym grupy $COO^-$. Pasmo przy 1400 $cm^{-1}$ przypisano wiązaniu O-H kropek kwantowych stabilizowanych TGA. Utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy grupą $–NH_2$ tyminy a grupą –COOH CdTe QDs zostało potwierdzone obecnością drgania absorpcyjnego przy około 3400 $cm^{-1}$, zmniejszeniem intensywności drgania absorpcyjnego przy 1680 $cm^{-1}$ a także obecnością szerokiego pasma w zakresie 1325-1675 $cm^{-1}$ [115]. Dodatkowo rozdzielenie pasma C=O przy 1700 $cm^{-1}$ świadczy o utworzeniu wiązania koordynacyjnego pomiędzy tlenem a kadmem. Obecność wielu rozdzielonych pasm grup C-N i N-H w zakresie 1500-750 $cm^{-1}$ wskazuje na fakt utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy różnymi molekułami (TGA-tymina; tymina-tymina; TGA-TGA).




*Rysunek 16. Widmo FTIR tyminy i koniugatu CdTe-tymina.*

### 2.2. Analiza składu chemicznego

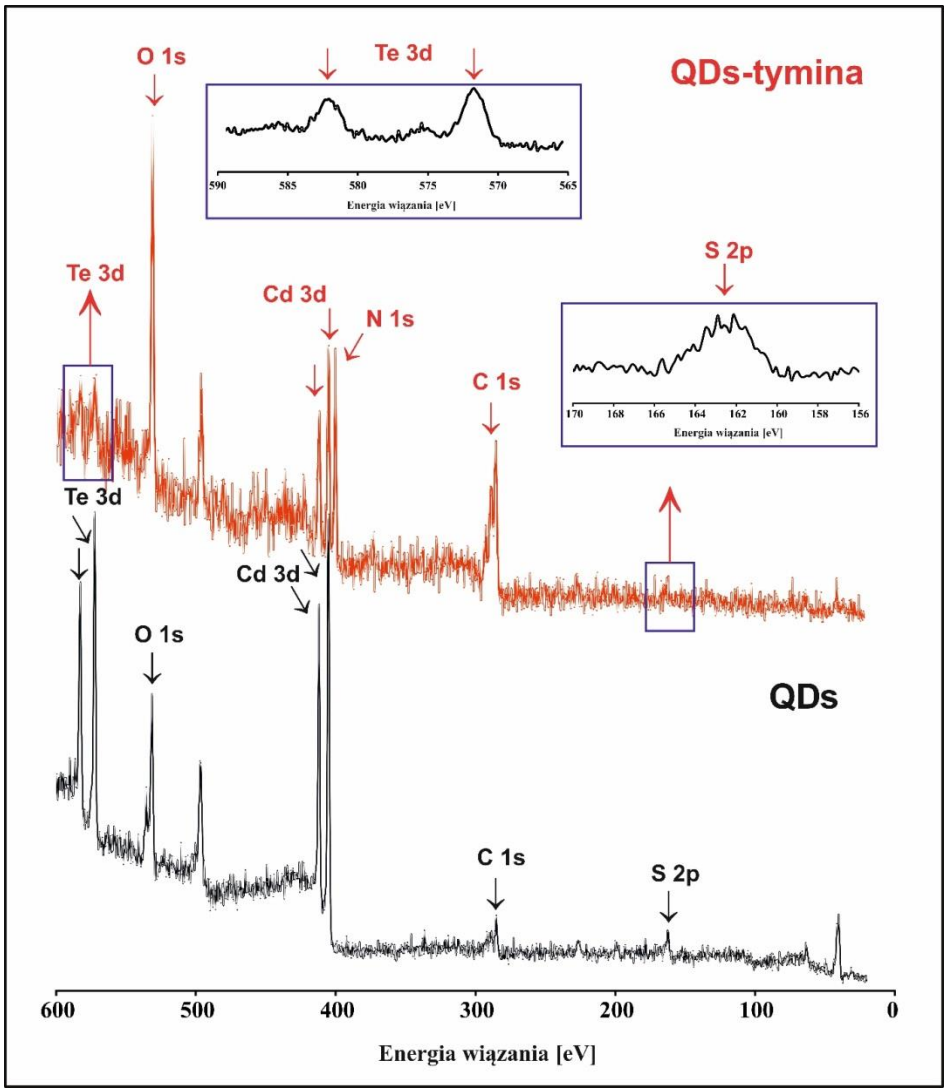
Przeprowadzono analizę elementarną CdTe QDs oraz koniugatu CdTe-tymina 1:6. Wyniki analizy składu – dane dotyczące zawartości procentowej węgla, wodoru, azotu oraz siarki w badanych materiałach zebrano w **Tabeli 2**. Obecność siarki w próbce CdTe QDs świadczy o ich stabilizacji kwasem tioglikolowym, natomiast obecność atomów azotu potwierdza efektywne przyłączenie zasady azotowej - tyminy do kropek kwantowych.

*Tabela 2. Skład chemiczny (zawartość procentowa pierwiastków) w CdTe QDs i w koniugacie CdTe-tymina otrzymany techniką analizy elementarnej.*

| **Materiał** | **Skład[%]** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **C** | **H** | **N** | **S** |
| **CdTe QDs** | 7,27±0,23 | 1,58±0,02 | - | 12,95±0,12 |
| **CdTe-tymina (1:6)** | 5,77±0,01 | 1,23±0,00 | 0,18±0,02 | 6,85±0,03 |

### 2.3. Analiza XPS

W celu otrzymania informacji o składzie chemicznym powierzchni obu materiałów wykorzystano technikę XPS. W trakcie pomiaru próbki są bombardowane fotonami z zakresu promieniowania X zdolnymi do penetracji do około 2-10 nm w głąb materiału, co w efekcie prowadzi do emisji fotoelektronów, których energie są charakterystyczne dla wiązań tworzonych prez pierwiastki obecne na powierzchni materiału [116]. Na **Rysunku 17** przedstawiono widma XPS dla CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina. Obserwuje się sygnały charakterystyczne dla Te 3d (582,6 i 572,4 eV), Cd 3d (411,9 i 405 eV), O 1s (531,3 eV), C 1s (285,3 eV) i S 2p (162,6 eV) [117,118] co potwierdza, iż otrzymane CdTe QDs są stabilizowane kwasem tioglikolowym, zawierającym tlen, siarkę i węgiel. W pełnym zakresie widma XPS dla koniugatu CdTe-tymina pojawia się nowy pik N 1s z maksimum przy energii wiązania równej 400 eV, dodatkowo sygnał pochodzący od O 1s i C 1s staje się bardziej intensywny. W przypadku koniugatu piki przypisane do Te 3d i S 2p są widoczne tylko na widmie w wysokiej rozdzielczości (dodatkowe widma na **Rysunku 17**). Zmiany te mogą być wyjaśnione biorąc pod uwagę obecność jednostek tyminy przyłączonych do powierzchni QDs. Ponieważ XPS pozwala monitorować jedynie skład powierzchni QDs, można zauważyć, że przyłączenie tyminy do powierzchni QDs obniża sygnały pochodzące od Cd, Te i S. Wyniki otrzymane techniką XPS potwierdzają wcześniejsze wnioski dotyczące składu otrzymanych materiałów CdTe QDs i CdTe-tymina uzyskane w oparciu o analizę elementarną i spektroskopię FTIR.

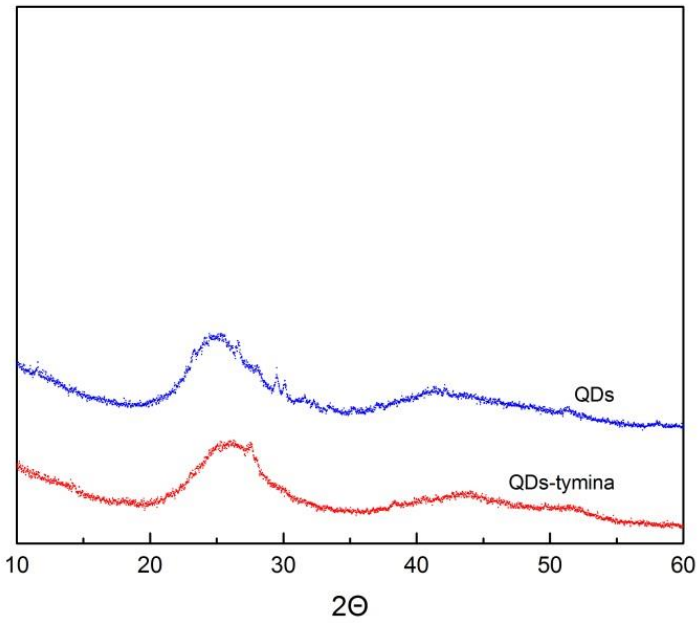



*Rysunek 17. Widmo XPS dla CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina.*

## 2.4. Analiza XRD

Struktura krystaliczna materiałów została scharakteryzowana techniką dyfraktometrii rentgenowskiej. **Rysunek 18** przestawia dyfraktogram dla CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina. Analizując dyfraktogram dla CdTe można przypisać pasma w zakresie 22–28,9°, 41,5–44,6° i słaby pik przy 51,4° jako charakterystyczne dla płaszczyzn dyfrakcyjnych (111), (220) i (311), należące do struktury blendy kubiczno cynkowej [119]. Dyfraktogram XRD otrzymany dla materiału CdTe-tymina jest podobny do dyfraktogramu otrzymanego dla CdTe QDs, jednak obserwuje się nowy pik przy 2θ=27,5°, który można przypisać tyminie. Jak wskazuje literatura [120] dyfraktogram filmu zawierającego tyminę wykazuje bardzo wyraźny pik przy około 2θ=27,2°. Pik ten pokrywa się z pikiem pochodzącym od CdTe QDs, co w rezultacie powoduje poszerzenie tego pasma obserwowanego dla CdTe-tymina.

Dodatkowo przesunięcie pasma w stronę większych kątów 2θ dla koniugatu CdTe-tymina świadczy o efektywnym przyłączeniu nukleozasady do CdTe QDs. Jiang i współpracownicy [121] zsyntetyzowali kropki kwantowe CdTe domieszkowane gadolinem i zaobserwowali, że piki dyfrakcyjne Gd:CdTe QDs były przesunięte w stronę większych kątów 2θ w miarę wzrostu zawartości domieszkowanego $Gd^{3+}$. Potwierdza to hipotezę, że jony $Gd^{3+}$ zostały wbudowane w krystaliczną siatkę CdTe QDs. Zhang i współpracownicy [122] przedstawili syntezę fluorescencyjnych magnetycznych nanocząstek CdTe@GdS otrzymanych jako dwufunkcyjny kontrast przydatny w celowanym obrazowaniu nowotworu. Zastosowali oni analizę XRD do badania krystalicznej struktury materiałów: CdTe QDs i nanocząstek CdTe@GdS. Autorzy ci wykazali, że piki należące do nanocząstek CdTe@GdS przesunęły się w stronę wyższych kątów 2θ w porównaniu do CdTe QDs, co potwierdziło, że GdS efektywnie otoczyły powierzchnię CdTe QDs. Wyniki tych badań potwierdzają, że pierwotna krystaliczna struktura materiału CdTe QDs została zachowana również w nowo otrzymanym koniugacie CdTe-tymina.




*Rysunek 18. Widmo wykonane techniką XRD dla QDs i koniugatu QDs-tymina.*

### 3. Średnica hydrodynamiczna i potencjał zeta

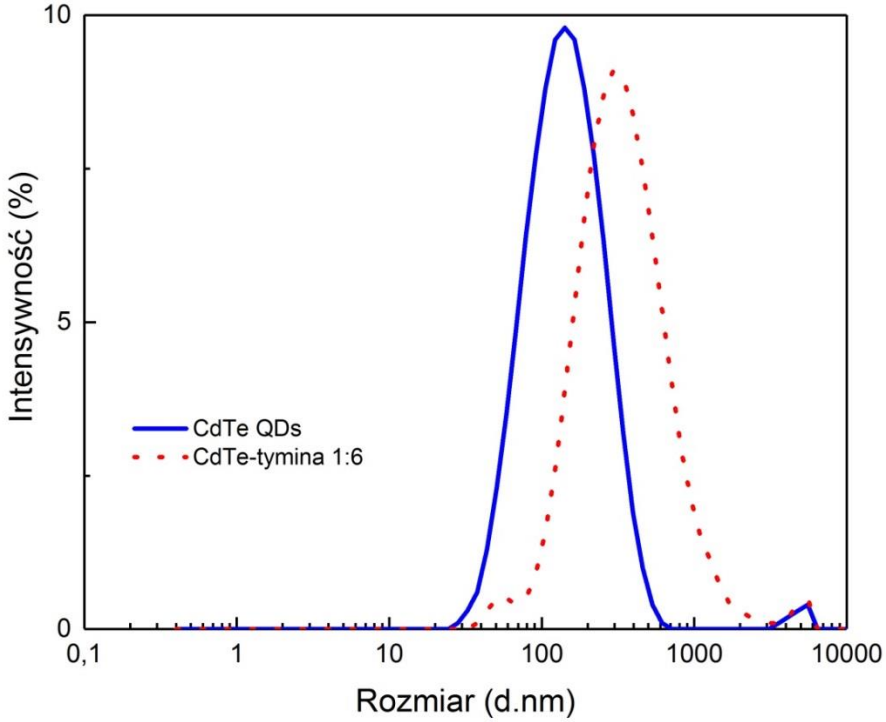
Potencjał zeta i pomiary dynamicznego rozpraszania światła zostały wykonane dla otrzymanych materiałów ponieważ intensywność fluorescencji i położenie plazmonowego

pasma rezonansowego QDs silnie zależy od ich rozmiarów [123]. W **Tabeli 3** zestawiono uzyskane wartości średnich średnic hydrodynamicznych (dz), współczynników dyspersji (DI), a także wartości potencjałów zeta (ζ) i wartości pH roztworów. Uzyskane wartości średnic hydrodynamicznych dla CdTe QDs stabilizowanych TGA wynoszą 119,7±2,2 nm, natomiast w przypadku koniugatów CdTe-tymina rozmiary te mieszczą się w zakresach od 196±3,1 nm (dla koniugatu 1:1) do 960±8,7 nm (dla koniugatu 1:2). Na **Rysunku 19** przedstawiono rozkłady średnic hydrodynamicznych otrzymanych dla CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina 1:6. Potencjał zeta wyznaczony dla stabilizowanych TGA kropek kwantowych przyjmuje wartości ujemne, ze względu na obecność ujemnie naładowanych grup tiolowych na powierzchni QDs. Wartości potencjałów zeta nie zmieniają się w sposób znaczący w przypadku koniugatów. W kilku układach dochodzi do tworzenia agregatów na co wskazuje znaczący rozmiar obiektów i wysokie wartości współczynników dyspersji (DI) próbki.

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) a także pomiarów fluorescencyjnych (rozdział 5) do dalszych badań wybrano koniugat 1:6, jako wykazujący najbardziej optymalne właściwości.

*Tabela 3. Zestawienie wartości średnic hydrodynamicznych ($D_h$), współczynników dyspersji (DI), wartości potencjału zeta (ζ) i pH.*

| Rodzaj materiału | pH | $D_h$ [nm] | DI | ζ [mV] |
|---|---|---|---|---|
| CdTe QDs | 7,5 | 119,7±2,2 | 0,313 | -37,7±2,7 |
| CdTe – tymina 1:1 | 7,5 | 196,0±3,1 | 0,281 | -38,9±2,5 |
| CdTe – tymina 1:2 | 7,5 | 960,1±8,7 | 0,702 | -36,0±3,5 |
| CdTe – tymina 1:3 | 7,5 | 458,5±9,7 | 0,399 | -34,9±4,7 |
| CdTe – tymina 1:5 | 7,5 | 776,1±8,4 | 0,787 | -36,3±2,9 |
| CdTe – tymina 1:6 | 7,5 | 273,6±9,1 | 0,267 | -37,7±2,7 |
| CdTe – tymina 1:7 | 7,5 | 308,4±1,1 | 0,398 | -39,7±2,6 |

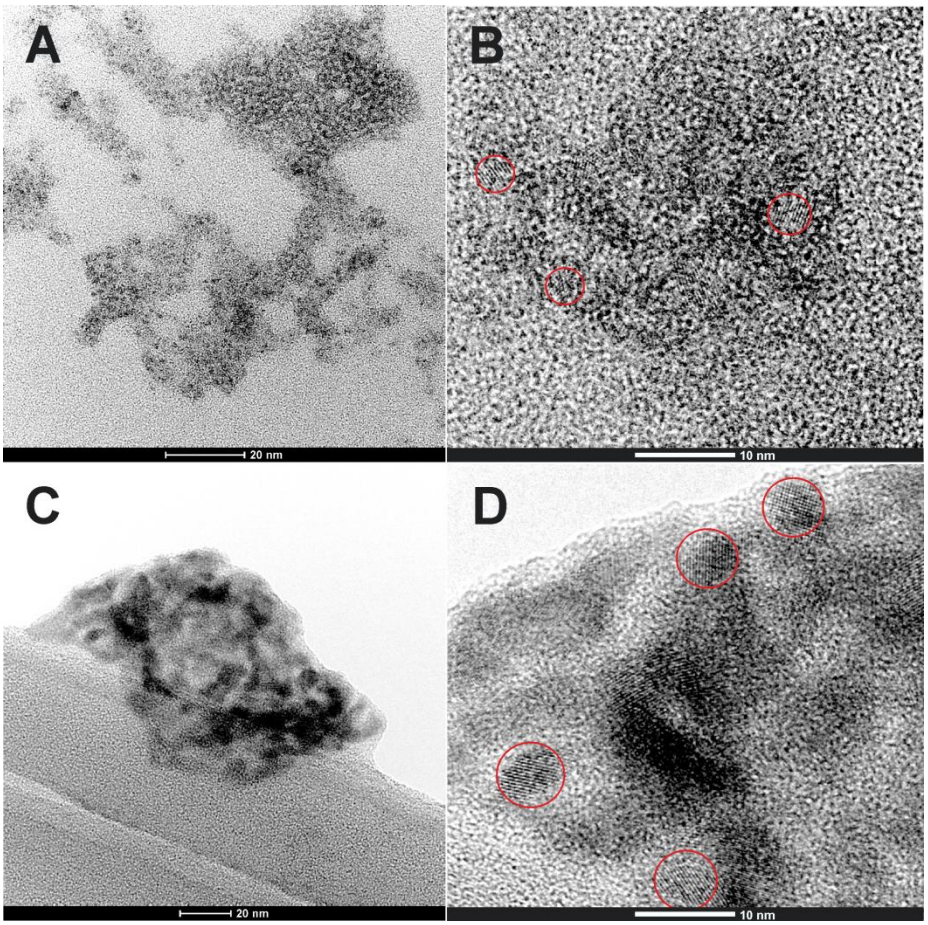



*Rysunek 19. Rozkład profili średnic hydrodynamicznych otrzymanych metodą DLS dla CdTe QDs (linia niebieska) i koniugatu CdTe-tymina 1:6 (linia czerwona).*

## 4. Obrazowanie/Morfologia

### 4.1. TEM(HRTEM)

Morfologia otrzymanych materiałów została zbadana techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) w normalnym i wysokorozdzielczym trybie (HRTEM). Na **Rysunku 20** przedstawiono mikrofotografie TEM/HRTEM dla kropek kwantowych CdTe stabilizowanych TGA i koniugatu CdTe-tymina. W przypadku obu materiałów można zauważyć, iż uzyskane obiekty wykazują tendencję do agregacji **(Rysunek 20 A i C)**. W przypadku agregatów można dostrzec obecność wielu blisko siebie ułożonych nanocząstek. Na podstawie zdjęć HRTEM **(Rysunek 20 B, D)** określono średnie rozmiary CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina, które wynoszą odpowiednio 3-4 nm i 5-6 nm.

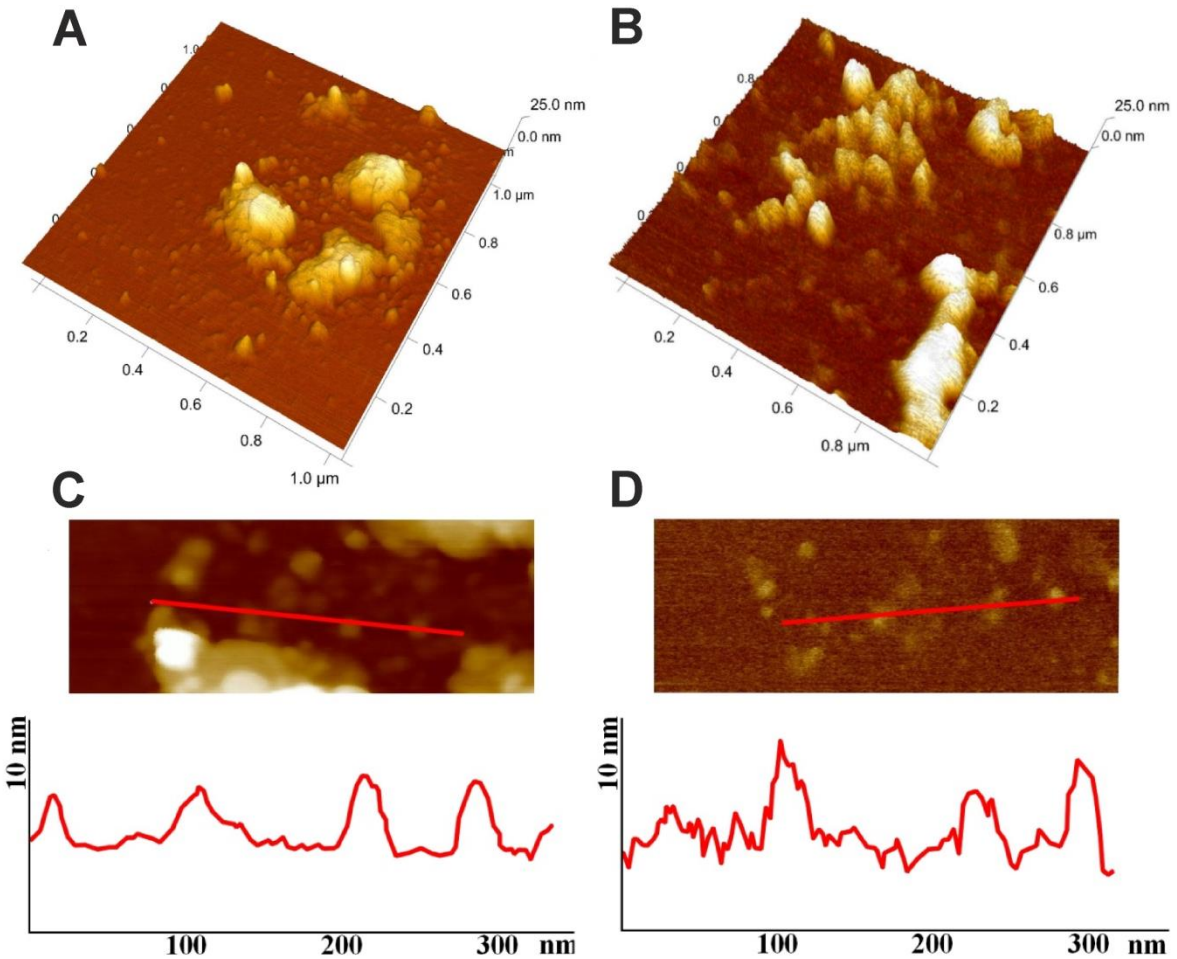



*Rysunek 20. Mikrofotografie otrzymane za pomocą techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej i wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej dla CdTe QDs: A (TEM), B (HRTEM) i koniugatu CdTe-tymina: C (TEM), D (HRTEM).*

Jak przedstawiono powyżej (rozdz. 3) średnie średnice hydrodynamiczne otrzymane techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) wynoszą dla CdTe QDs 120 nm i dla koniugatu CdTe-tymina 1:6 274 nm. Średnice nanocząstek otrzymane tą techniką są znacznie większe niż te otrzymane techniką HRTEM. Dzieje się tak, ponieważ technika DLS dostarcza informacji o wartościach średnich średnic hydrodynamicznych czyli pozwala określić rozmiar cząstek razem z otaczającą je warstwą jonów i molekuł rozpuszczalnika. Dodatkowo intensywność rozpraszania światła wzrasta wraz ze wzrostem obiektów, a wartości uśrednionych średnich średnic hydrodynamicznych otrzymanych z tych analiz są przeszacowane i zazwyczaj większe niż te otrzymane techniką TEM [124]. Generalnie technika TEM dostarcza informacji o rozmiarze i kształcie rdzenia nanocząstek, natomiast technika DLS informuje o średnicy nanocząstek (wraz z ich otoczkami hydratacyjnymi) w roztworze wodnym.

### 4.2. AFM

W celu dokładniejszej analizy morfologii otrzymanych materiałów wykonano badanie techniką mikroskopii sił atomowych (AFM). **Rysunki 21 A i B** przedstawiają skany 3D natomiast **Rysunki 21 C i D** przekroje kropek kwantowych stabilizowanych TGA **(Rysunek 21 C)** i koniugatu CdTe-tymina **(Rysunek 21 D)**. W przypadku materiału kropki kwantowe stabilizowane TGA zaobserwowano, że jest on dobrze rozseparowany na powierzchni próbki. Średnica uzyskanych struktur krystalicznych wynosi około 2,5±0,5 nm dla QDs, natomiast średnica nanocząstek koniugatu CdTe-tymina około 3,4±0,6 nm. Otrzymane wyniki korelują ze średnicami tych obiektów uzyskanych techniką HRTEM. Porównując skany 3D dla CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina można wskazać kilka różnic. W przypadku materiału CdTe-tymina zaobserwowano większą tendencję do tworzenia agregatów. Tendencję tę można wytłumaczyć uwzględniając pojawianie się dodatkowych oddziaływań pomiędzy jednostkami tymina-tymina przyłączonych do QDs



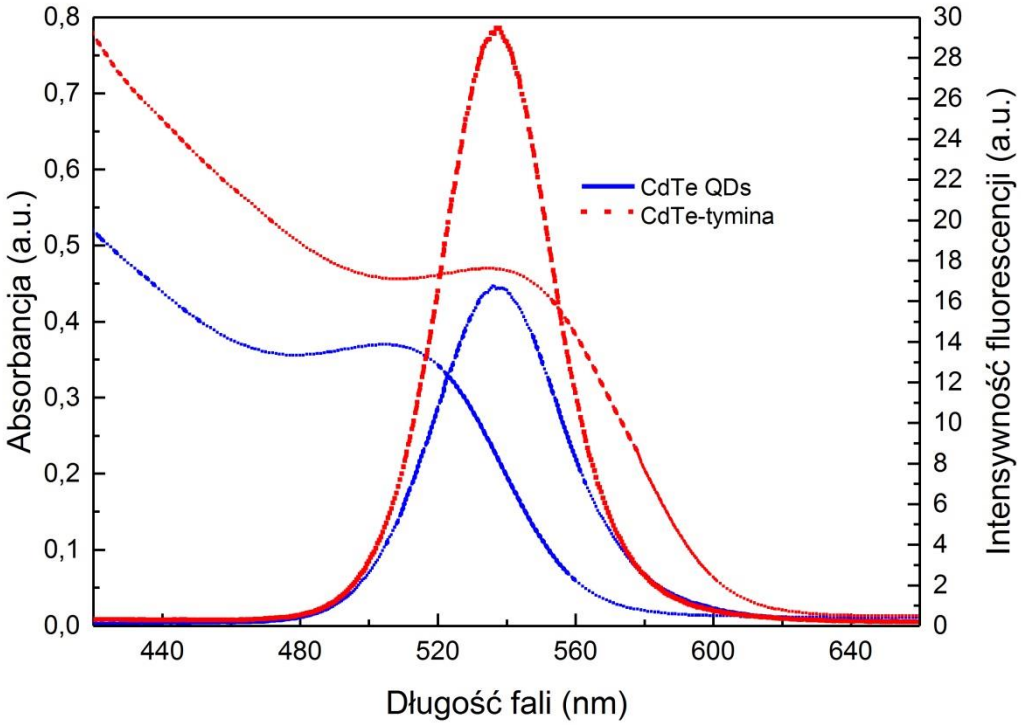

*Rysunek 21. Skany i przekroje uzyskane techniką AFM dla CdTe QDs (A i C) i QDs-tymina (B i D).*

Wyniki otrzymane techniką AFM potwierdzają wcześniejsze rezultaty i wskazują, że tymina została efektywnie przyłączona do CdTe QDs, co można tłumaczyć większym rozmiarem cząstek koniugatu niż CdTe. Ponadto prezentowane wyniki korelują z wynikami otrzymanymi techniką TEM/HRTEM.

## 5. Spektroskopia UV-Vis i spektrofluorymetria CdTe QDs i CdTe-tymina

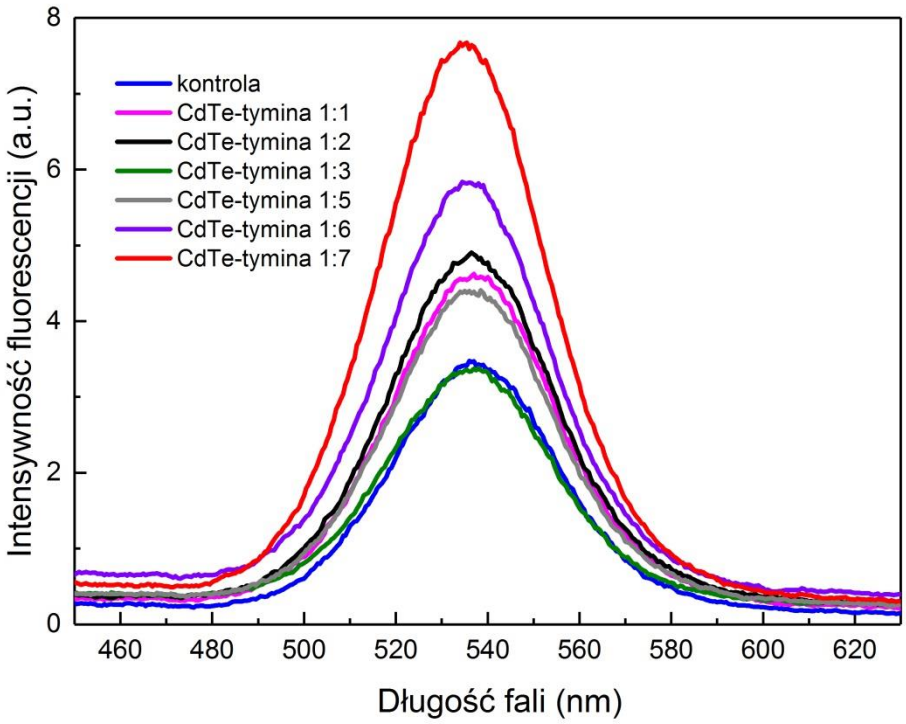
**Rysunek 22** przedstawia widmo absorpcyjne i fluorescencyjne: CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina. Dla obu materiałów otrzymano typowe dla tego typu nanocząstek szerokie pasmo absorpcyjne. Widmo absorpcyjne koniugatu CdTe-tymina w porównaniu z CdTe QDs wykazuje większą intensywność a także jest przesunięte w stronę większych długości fal. Różnicę tę można tłumaczyć oddziaływaniami pomiędzy jonami $Cd^{2+}$ obecnymi na powierzchni CdTe QDs, a atomem tlenu pochodzącym od tyminy [114], a także różnicami w rozmiarach pomiędzy tymi nanocząstkami. Widmo fluorescencji wykazuje plazmonowe pasmo rezonansowe emisji przy około 540 nm przy wzbudzaniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{wz}$=351 nm. Widma emisji dla obu materiałów: CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina charakteryzują się wąskimi pasmami. Szerokość połówkowa (ang. FWHM) fluorescencyjnego pasma dla CdTe QDs wynosi 46 nm zaś dla koniugatu CdTe-tymina wynosi 37 nm, co wskazuje na lepsze właściwości optyczne koniugatu w porównaniu do CdTe QDs. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi za wąskie pasmo luminescencyjne uważa się takie, które mieści się w zakresie 38-52 nm szerokości połówkowej [125]. Dla przykładu, widmo fluorescencyjne CdTe QDs i CdTe-adenina charakteryzuje się symetrycznym i wąskim pasmem o wartości FWHM odpowiednio 66 nm i 49 nm [126]. Co ciekawe zauważono przesunięcie w stronę większych długości fali widma absorpcyjnego otrzymanego koniugatu, podczas gdy nie zaobserwowano istotnej zmiany w widmie emisyjnym. Zjawisko to można tłumaczyć biorąc pod uwagę występujące w półprzewodnikowych kropkach kwantowych przesunięcie Stokesa. W celu wyjaśnienia przesunięcia Stokes'a w QDs w literaturze zaproponowano dwa różne mechanizmy. Proces absorpcji zachodzi z udziałem ugrupowań chemicznych znajdujących się w stanie elektronowym S, który leży głębiej niż stan optyczny pasywny (stan P) w paśmie walencyjnym, tworząc ekscyton w stanie singletowym elektronu i dziury. Biorąc pod uwagę pierwszy mechanizm postulowano, że relaksacja bezpromienista zachodzi w stanie P przy pomocy fononów, a zatem przesunięcie Stokesa jest podawane przez $\Delta E_{SP}$ (różnica energii między stanami ekscytonu utworzonymi w stanach S i P) [127]. Zgodnie z drugim

mechanizmem [128] ekscyton w stanie singletowym najpierw termalizuje do formy trypletowej, z której relaksuje bezpromieniście przy pomocy fononów albo do stanu S, z przesunięciem Stokes'a podanym przez $\Delta E_{ST}$ (reprezentującą rozdział singlet-triplet) lub do stan P pasma walencyjnego, z przesunięciem Stokes'a: $\Delta E_{SP}+\Delta E_{ST}$. Oprócz tych mechanizmów, można również zauważyć, że przesunięcie w stronę większych długości fali występuje wtedy, gdy początkowy i końcowy stan wzbudzenia mają inną konfigurację atomową. Przesunięcie w stronę większych długości fali, znane jako przesunięcie Franka-Condona, jest powszechnie obserwowane w molekułach i wskazuje na defekty substancji stałych i może być również istotne w QDs [129]. Według literatury przesunięcie Stokesa zmniejsza się wraz ze wzrostem promienia kropki kwantowej i zanika przy pewnym rozmiarze QDs [130]. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia literaturowe można przypuszczać, że przyłączanie tyminy silnie wpływa na stan elektronowy CdTe QDs, co w konsekwencji powoduje przesunięcie w stronę większych długości fali na widmie absorpcyjnym, a tym samym ogranicza przesunięcie Stokesa.

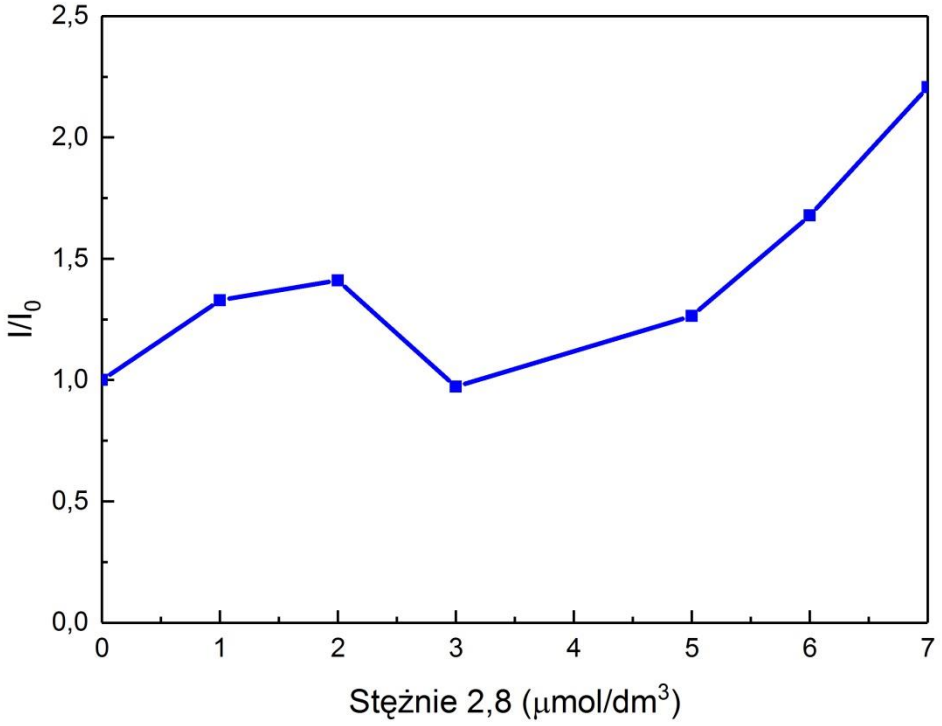



*Rysunek 22. Widmo absorpcyjne i fluorescencyjne dla CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina.*

Analizując **Rysunek 23** można zaobserwować, że pozycja pasma fluorescencyjnego nie zależy od ilości tyminy w koniugacie CdTe-tymina, natomiast intensywność fluorescencji zależy od tego parametru. Intensywność fluorescencji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia tyminy, jednakże nie w sposób monotoniczny **(Rysunek 24)**. Najwyższą intensywność fluorescencji zaobserwowano dla koniugatu CdTe-tymina o stosunku molowym 1:7 **(Tabela 1)**. Wskazuje to na występowanie wiązań koordynacyjnych pomiędzy powierzchnią CdTe QDs a atomem azotu pochodzącym od tyminy, a także na tworzenie wiązań wodorowych. Odziaływania te mogą w sposób efektywny usuwać niewysycone wiązania i defekty powierzchniowe co w rezultacie przyczynia się do wzrostu intensywności fluorescencji koniugatu CdTe-tymina [126]. Jak donosi literatura usuwanie lokalnych pułapek energetycznych na powierzchni materiału i neutralizacja ładunku powierzchniowego wpływa również na wzrost intensywności fluorescencji [114]. Istnieje jednak ograniczenie, w modyfikacji powierzchni QDs tyminą ponieważ zbyt duża zawartość biocząsteczek może powodować destabilizację układu koloidalnego, co powoduje agregację QDs i zmniejsza intensywność fluorescencji.




*Rysunek 23. Widma fluorescencyjne koniugatów CdTe-tymina otrzymane dla różnych stosunków molowych CdTe:tymina, $\lambda_{wz}$=351 nm.*




*Rysunek 24. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) dla różnych stosunków molowych CdTe:tymina.*

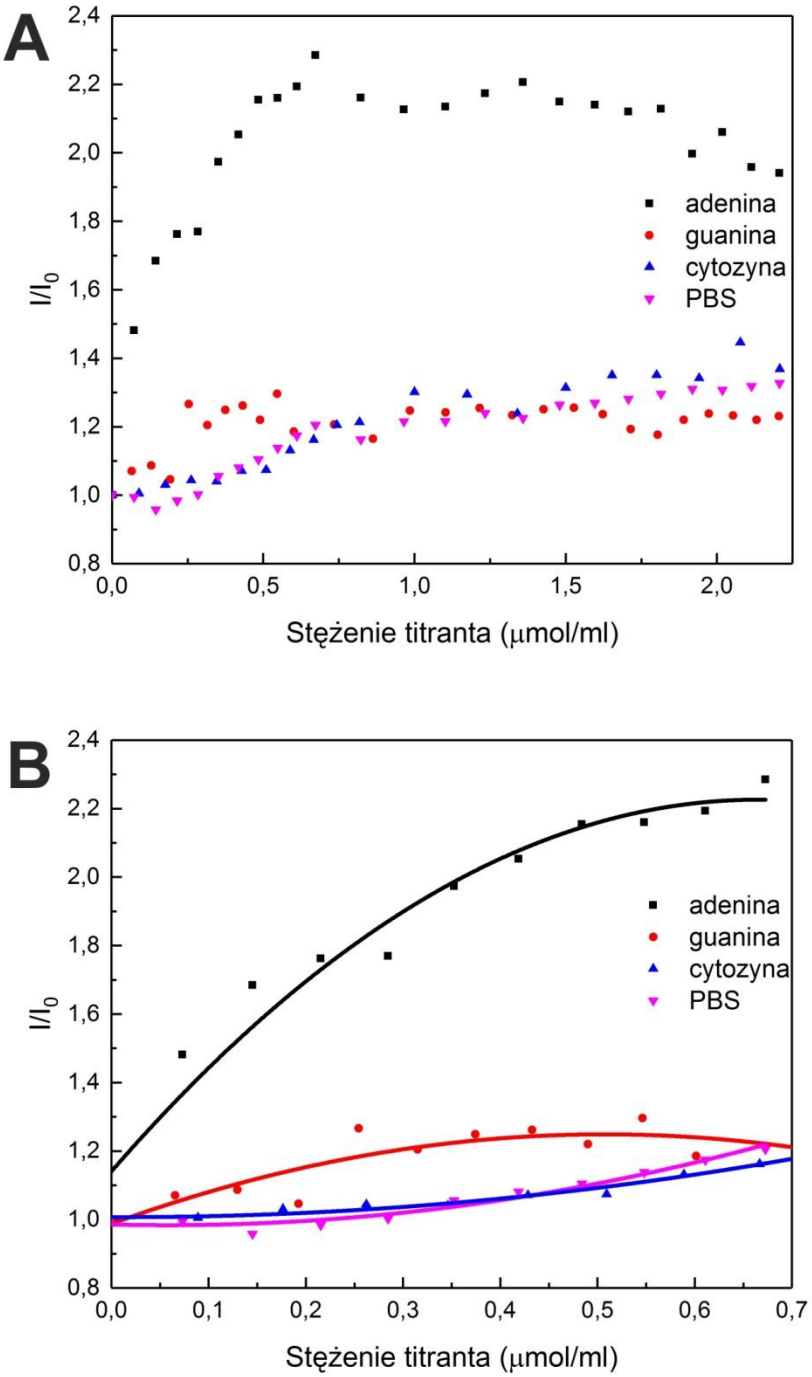
## 6. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z nukleozasadami, nukleozydami i modyfikowanymi nukleozydami

### 6.1. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z nukleozasadami

W celu zbadania selektywności oddziaływania otrzymanego koniugatu CdTe-tymina (1:6) z komplementarną zasadą, adeniną, przeprowadzono serię miareczkowań spektrofluorymetrycznych.

Koniugat CdTe-tymina (1:6, pH=7,5) został zmiareczkowany roztworem adeniny, a także pozostałymi nukleozasadami z jednoczesnymi pomiarami intensywności fluorescencji. Zaobserwowano, iż intensywność fluorescencji koniugatu CdTe–tymina wzrasta wraz z dodatkiem adeniny (wysoka czułość układu). Zauważono, iż efekt ten jest szczególnie wyraźny w zakresie stężenia adeniny do 0,7 μmol/ml **(Rysunek 25 B)**. W dodatkowym eksperymencie upewniono się, że za efekt ten nie odpowiada wpływ rozcieńczenia. Dla większych stężeń dodawanego titranta fluorescencja osiąga plateau a następnie powoli się

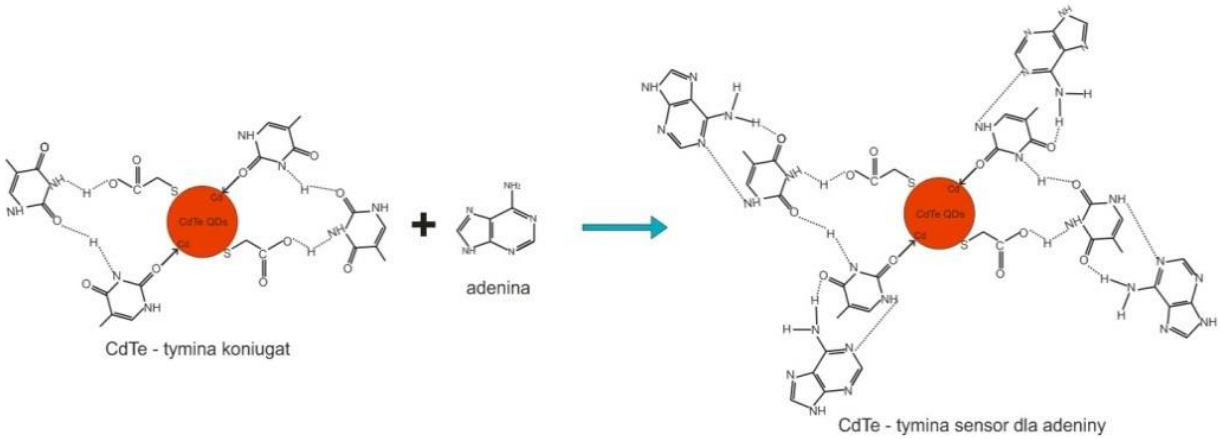
zmniejsza **(Rysunek 25 A)**. Dla pozostałych zasad azotowych nie zarejestrowano tak znacznego wzrostu intensywności fluorescencji wraz ze wzrostem ich stężania **(Rysunek 25)**.




*Rysunek 25. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-tymina od stężenia titranta, nukleozasad: adeniny, guaniny, cytozyny i PBSu (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm), (A) pełny zakres stężeń, (B) zakres zawężony do niższych stężeń.*

Eksperyment ten potwierdził wysoką selektywność i czułość koniugatu CdTe-tymina względem komplementarnej nukleozasady – adeniny. Jak pokazuje literatura [131] taką zależność można tłumaczyć specyficznymi oddziaływaniami pomiędzy tyminą a adeniną. Tworzenie wiązania koordynacyjnego i wodorowego między cząsteczkami zasady azotowej i CdTe QDs stabilizowanymi kwasem tioglikolowym na swojej powierzchni, może skutecznie zwiększać intensywność PL i stabilność CdTe QDs. W literaturze wskazano, że poprzez usunięcie lokalnych pułapek energetycznych na powierzchni i neutralizację ładunku powierzchniowego można zwiększyć intensywność PL [114]. Wang i współpracownicy [100] przedstawili dane eksperymentalne wykazujące, że intensywność fluorescencji CdTe-adeniny jest wyższa niż CdTe QDs. Przedstawione wyjaśnienie opierało się na roli skoordynowanych oddziaływań między powierzchnią CdTe QDs a atomami azotu adeniny, które skutecznie usuwają niewysycone wiązania i defekty powierzchni. Grupa $-NH_2$ adeniny może oddziaływać z grupami -COOH kwasu tioglikolowego obecnego na powierzchni CdTe QDs tworząc wiązania wodorowe.

Na **Rysunku 26** zaproponowano mechanizm odziaływań pomiędzy koniugatem CdTe–tymina a adeniną pokazujący wiązania koordynacyjne pomiędzy $Cd^{2+}$ na powierzchni CdTe QDs a atomem tlenu tyminy i wodoru między grupą $-NH_2$ a grupą –COOH, a także wiązania wodorowe pomiędzy tyminą i adeniną.

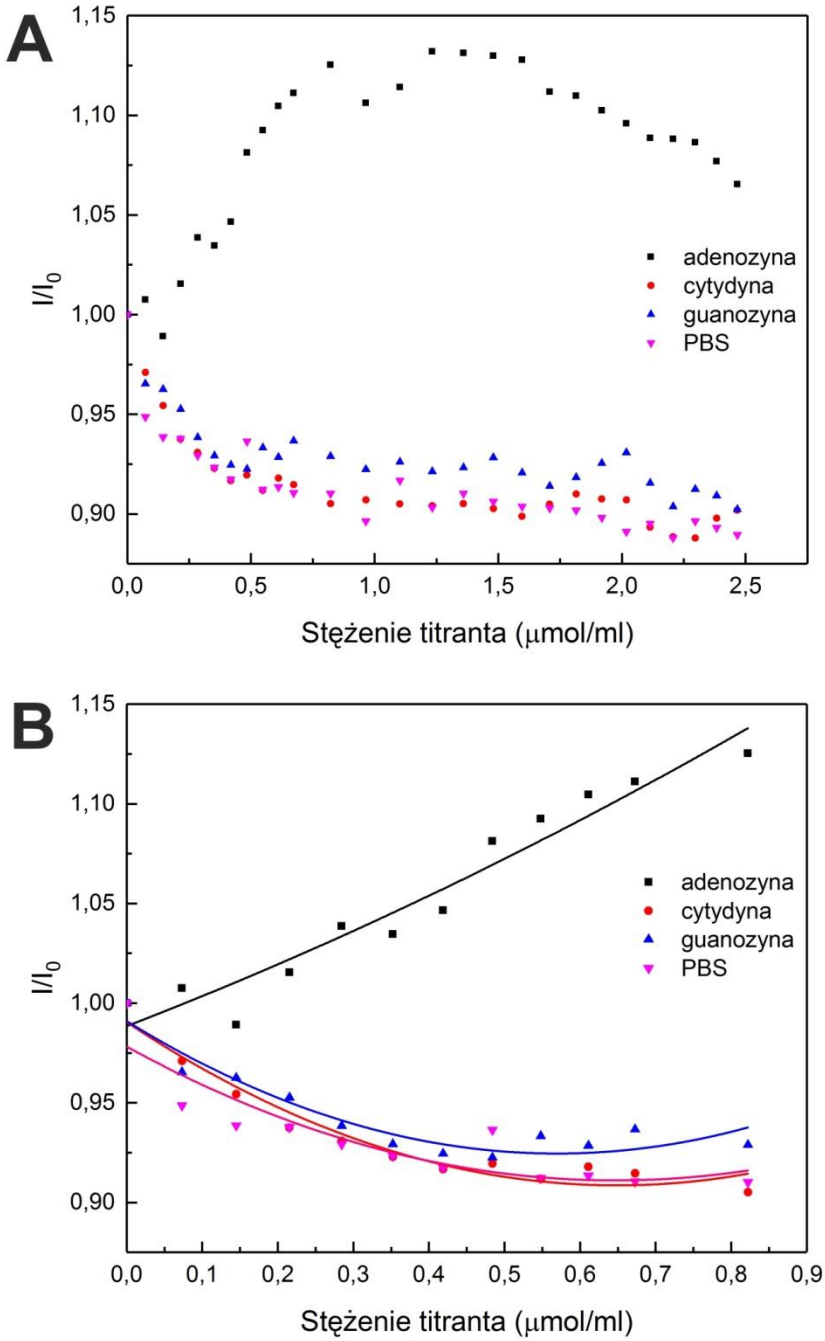



*Rysunek 26. Schematyczna ilustracja mechanizmu detekcji adeniny przy użyciu koniugatu QDs-tymina.*

### 6.2. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z nuklozydami

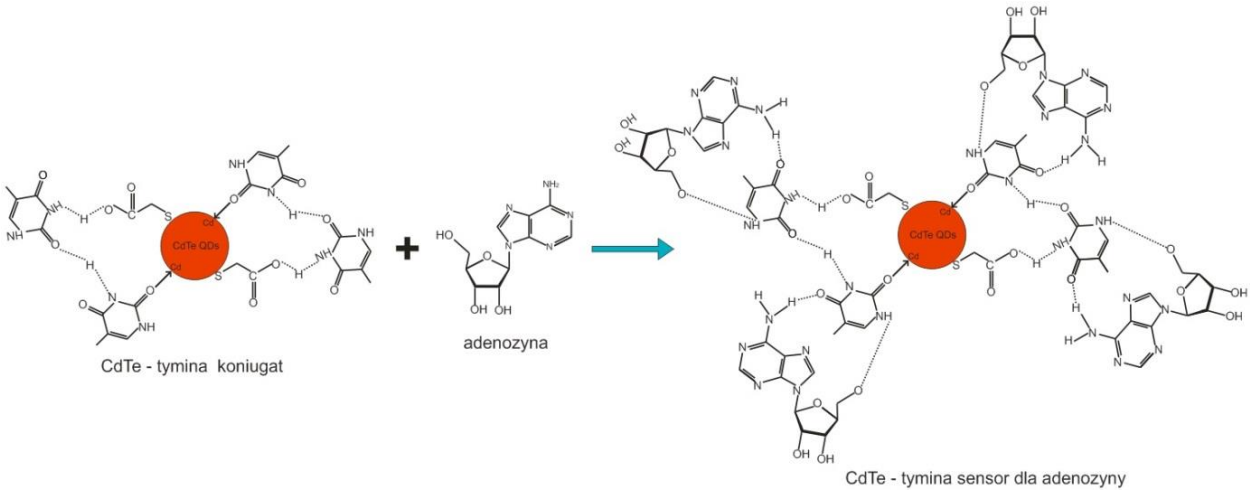
W kolejnym etapie badań wykonano analogiczny eksperyment do omówionego powyżej (w rozdz. 6.1.), jednakże w tym przypadku koniugat CdTe-tymina został

zmiareczkowany roztworem nukleozydu zawierającego jednostkę komplementarną do tyminy - adenozynę, a także pozostałymi nukleozydami. Badania oddziaływań między tymi układami prowadzone były poprzez pomiary fluorescencji. Analizując wyniki przedstawione na **Rysunku 27 A i B** zaobserwowano, iż intensywność fluorescencji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia adenozyny, podczas gdy dla pozostałych nukleozydów nie zanotowano takiej zmiany. Efekt wzrostu fluorescencji, podobnie jak w przypadku miareczkowania komplementarną zasadą azotową jest szczególnie wyraźny w zakresie stężenia adenozyny do około 0,7 µmol/ml **(Rysunek 27 B)**. Również w tym przypadku można zauważyć spadek intensywności fluorescencji dla wyższych stężeń dodawanej adenozyny.




*Rysunek 27. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-tymina od stężenia dodawanego titranta, nukleozydów: adenozyny, guanozyny, cytydyny i PBSu (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm), (A) pełny zakres stężeń i (B) zakres stężeń ograniczony.*

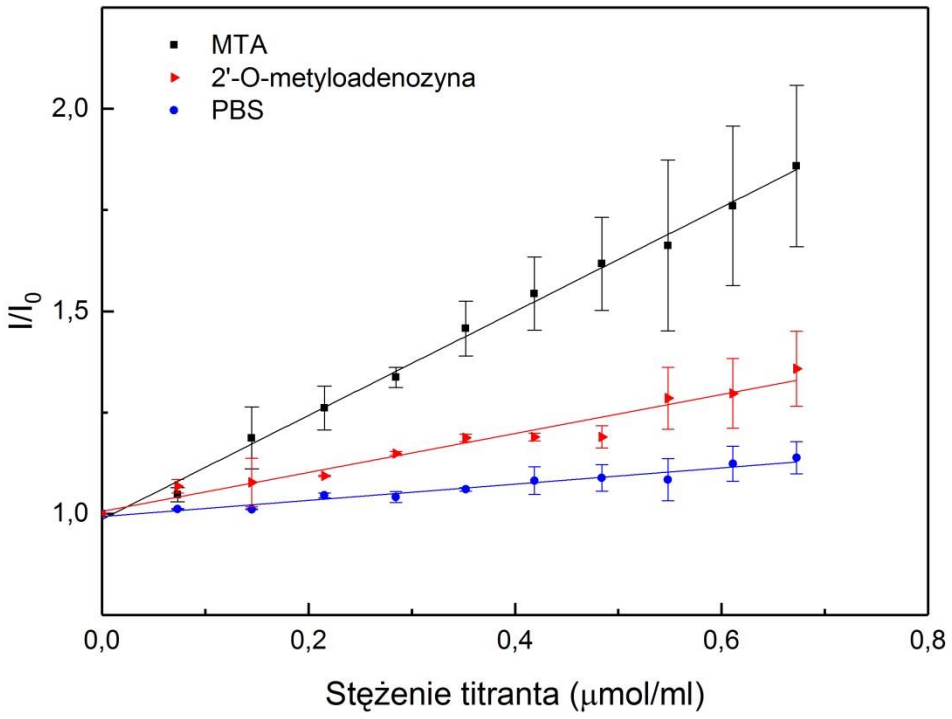
Na **Rysunku 28** przedstawiono proponowany mechanizm oddziaływań koniugatu CdTe-tymina z adenozyną.




*Rysunek 28. Schematyczna prezentacja mechanizmu detekcji adenozyny przy użyciu biosensora QDs-tymina.*

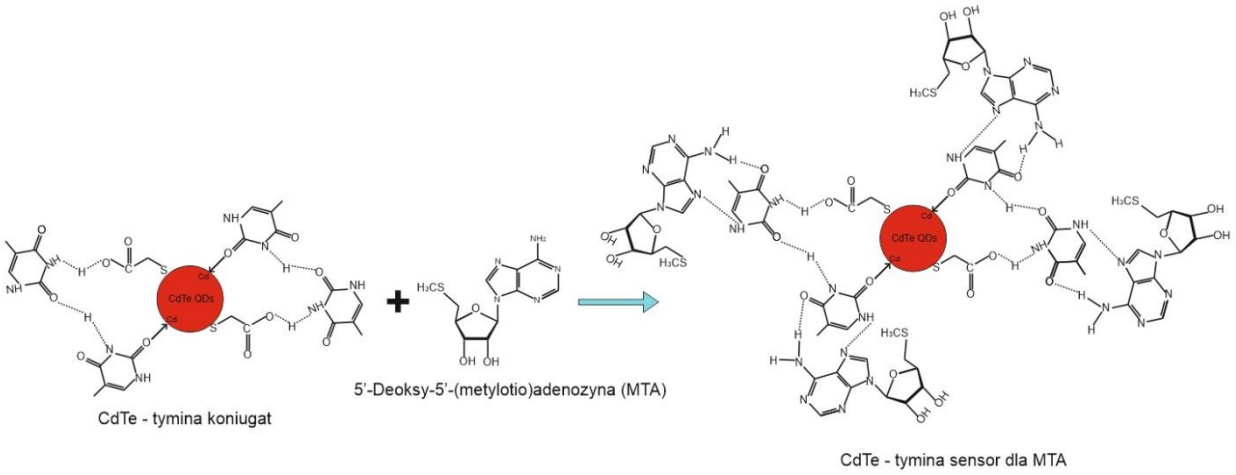
### 6.3. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z modyfikowanymi nukleozydami

W celu określenia możliwości zastosowania otrzymanego materiału do detekcji modyfikowanych nukleozydów w płynach ustrojowych zbadano wpływ oddziaływań pomiędzy koniugatem CdTe-tymina a 5′-deoksy-5′-(metylotio)adenozyną (MTA) i 2’-*O*-metyloadenozyną. Eksperyment ten wykonano analogicznie jak w przypadku badań przedstawionych w rozdz. 6.1. i 6.2. Jak zaprezentowano na **Rysunku 29** intensywność fluorescencji koniugatu CdTe-tymina znacznie wzrasta w obecności MTA i 2’-*O*-metyloadenozyny. Warto zauważyć, iż zmiana ta nie jest związana z efektem rozcieńczenia, co potwierdza przeprowadzony eksperyment przy użyciu buforu PBS.

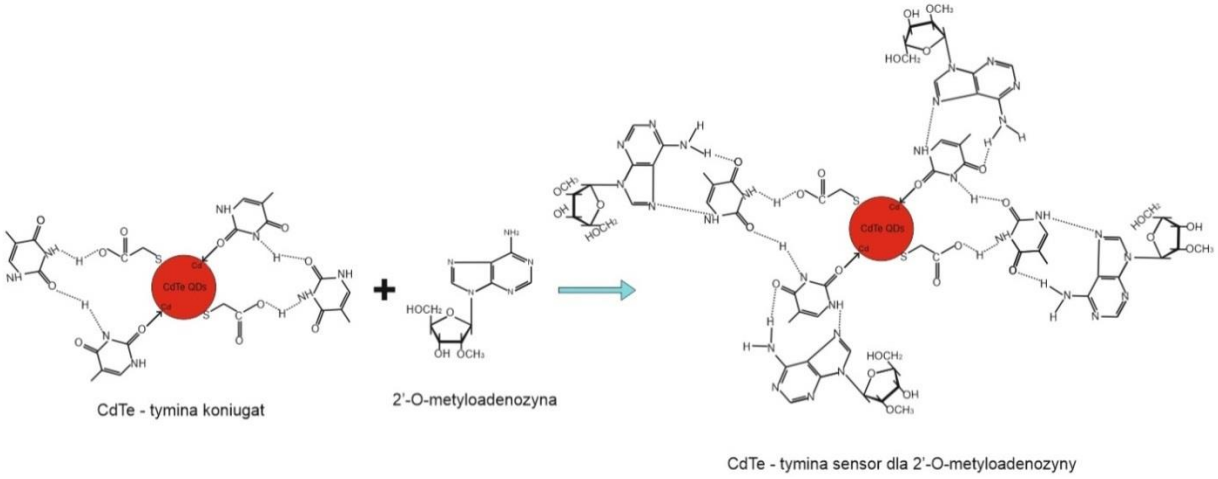



*Rysunek 29. Zależność względnej intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-tymina w obecności MTA i 2'-O-metyloadenozyny. W celu uwzględnienia wpływu efektu rozcieńczenia fluorescencja została również zmierzona po każdorazowym dodaniu buforu PBS.*

**Rysunki 30 i 31** przedstawiają proponowany mechanizm oddziaływań pomiędzy koniugatem CdTe–tymina a modyfikowanymi nukleozydami: 5′-deoksy-5′-(metylotio)adenozyny (MTA) i 2'-O-metyloadenozyny.




*Rysunek 30. Schemat mechanizmu detekcji 5′-deoksy-5′-(metylotio)adenozyny (MTA) przy użyciu biosensora QDs-tymina.*




*Rysunek 31. Schemat mechanizmu detekcji 2'-O-metyloadenozyny przy użyciu biosensora QDs-tymina.*

Modyfikowane nukleozydy zawierające jednostkę adeniny stanowią markery nowotworowe wykrywane w moczu, dlatego opracowanie metody ich detekcji i ilościowego oznaczania może być przydatne do uzyskania informacji o chorobie nowotworowej, jak również stanie jej zaawansowania. Dodatkowo, modyfikowane nukleozydy w moczu mogą również świadczyć o występowaniu takich chorób jak AIDS, mukowiscydozy i ciężkich chorób układu odpornościowego będących wynikiem niedoboru deaminazy adenozynowej (ADA). Co więcej, uważa się, że akumulacja 2′-O-metyloadenozyny może również pełnić rolę w patologicznym procesie u pacjentów z brakiem odporności w wyniku niedoboru deaminazy adenozynowej [132]. MTA może być również obecny w ludzkim

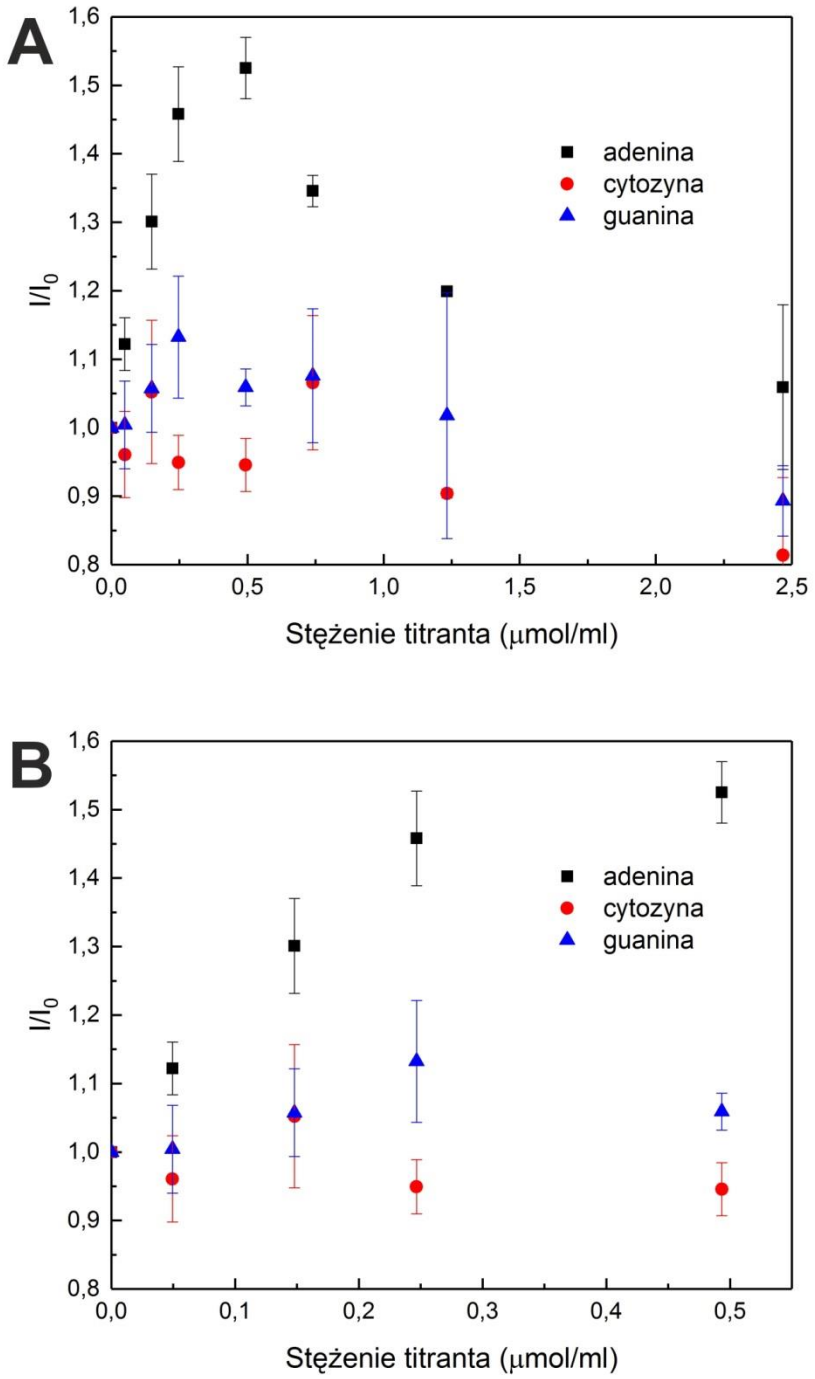
moczu – związek ten jest substratem 5'-metylotioadenozyno-fosforylazy (MTAP), enzymu używanego przez geny supresorowe do transformacji nowotworowej [133].

## 7. Oddziaływania koniugatu CdTe-tymina z zasadami azotowymi i nukleozydami w warunkach sztucznego moczu

### 7.1. Oddziaływanie koniugatu CdTe-tymina z zasadami azotowymi w środowisku sztucznego moczu

Możliwość praktycznego wykorzystania otrzymanych materiałów do otrzymania biosensorów została zweryfikowana poprzez pomiary fotoluminescencji koniugatów, które prowadzone były w warunkach modelowej cieczy fizjologicznej - symulowanego sztucznego moczu.

Przeprowadzono eksperyment, w którym koniugat CdTe-tymina został zmiareczkowany roztworem komplementarnej nukleozasady: adeniny w warunkach sztucznego moczu. W celu określenia selektywności oddziaływań pomiędzy koniugatem a adeniną, przeprowadzono analogiczne eksperymenty z pozostałymi zasadami azotowymi: cytozyną i guaniną. Na **Rysunku 32 A, B** można zauważyć, iż intensywność fluorescencji koniugatu CdTe–tymina wzrasta wraz z dodatkiem adeniny. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w zakresie stężenia adeniny do 0,5 µmol/ml **(Rysunek 32 B)**.

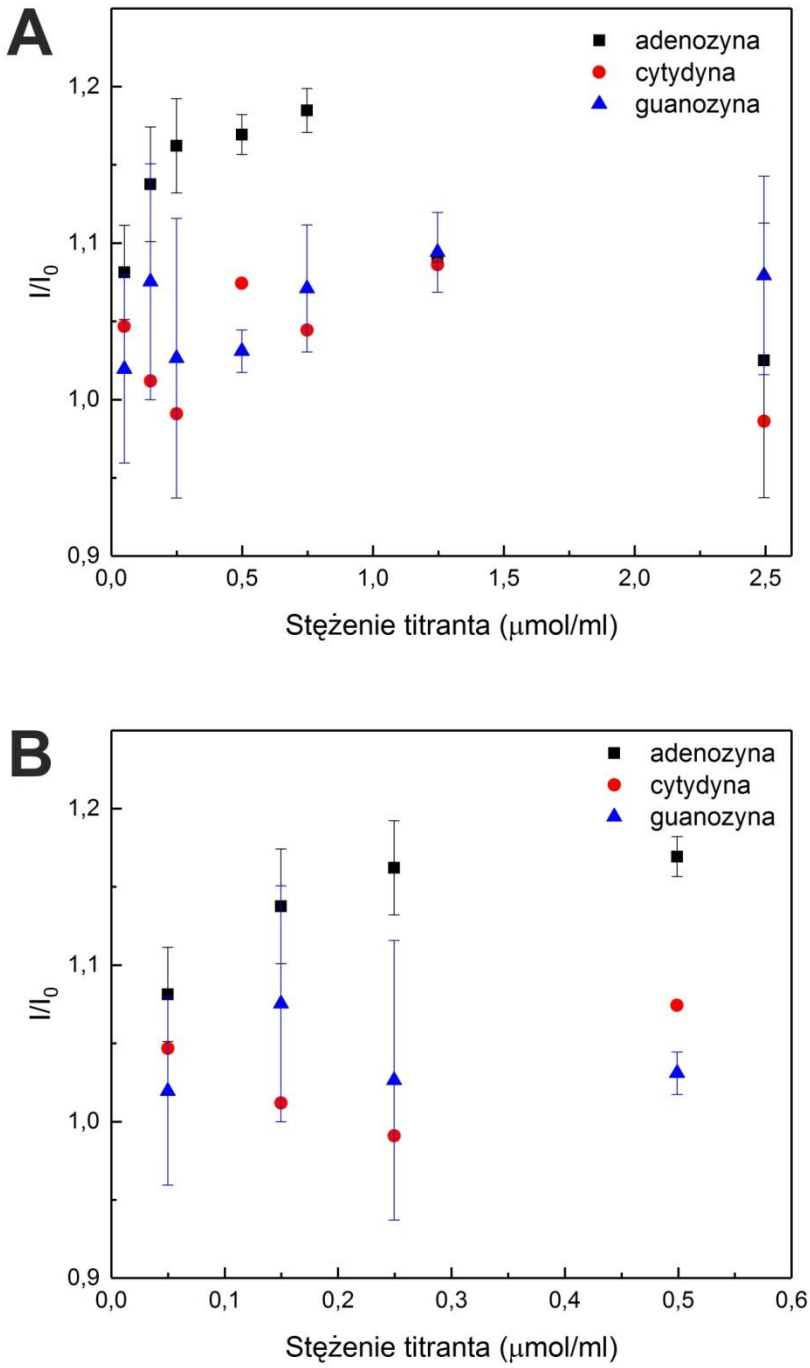



*Rysunek 32. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-tymina od stężenia titranta, nukleozasad: adeniny, guaniny, cytozyny i PBSu (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm) w warunkach sztucznego moczu, (A) pełny zakres stężeń i (B) zakres niskich stężeń w warunkach sztucznego moczu.*

## 7.2. Oddziaływanie koniugatu CdTe-tymina z nukleozydami w środowisku sztucznego moczu

W sposób analogiczny jak w poprzednim etapie badań, testowano otrzymany koniugat CdTe-tymina pod kątem określenia jego zdolności do selektywnej detekcji nukleozydów w warunkach modelowej cieczy fizjologicznej, symulowanego sztucznego moczu. Na **Rysunku 33 A i B** przedstawiono zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-tymina od stężenia dodawanego nukleozydu. Zgodnie z oczekiwaniami intensywność fluorescencji koniugatu CdTe–tymina wzrastała wraz ze wzrostem stężenia adenozyny. Efekt ten wyraźnie zaznacza się w zakresie stężenia adenozyny do 0,5 µmol/ml.

Analiza przedstawionych widm pozwala wnioskować, że otrzymany koniugat CdTe-tymina może służyć jako selektywny biosensor do detekcji adeniny i/lub jej pochodnych.




*Rysunek 33. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-tymina od stężenia dodawanego titranta, nukleozydów: adenozyny, guanozyny, cytydyny i PBSu w warunkach sztucznego moczu, (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm), (A) pełny zakres pełny i (B) zakres niskich stężeń.*

# Podrozdział 1.1

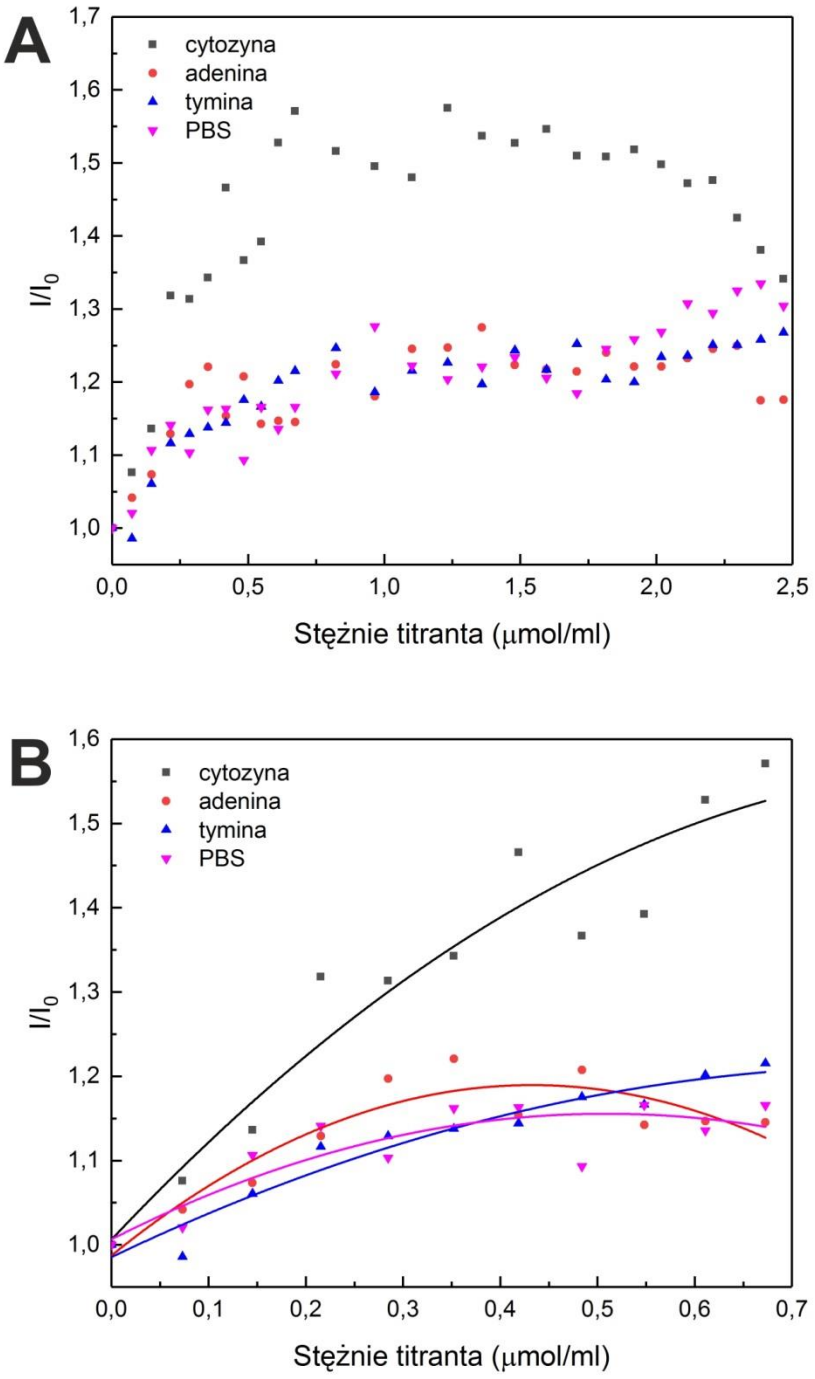
## Biosensor bazujący na kropkach kwantowych i zasadzie azotowej – guaninie

### 1. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z nukleozasadami i nukleozydami

### 1.1. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z nukleozasadami

Selektywność otrzymanego koniugatu CdTe-guanina zbadano poprzez wykonanie serii miareczkowań spektrofluorymetrycznych z komplementarną zasadą azotową-cytozyną.

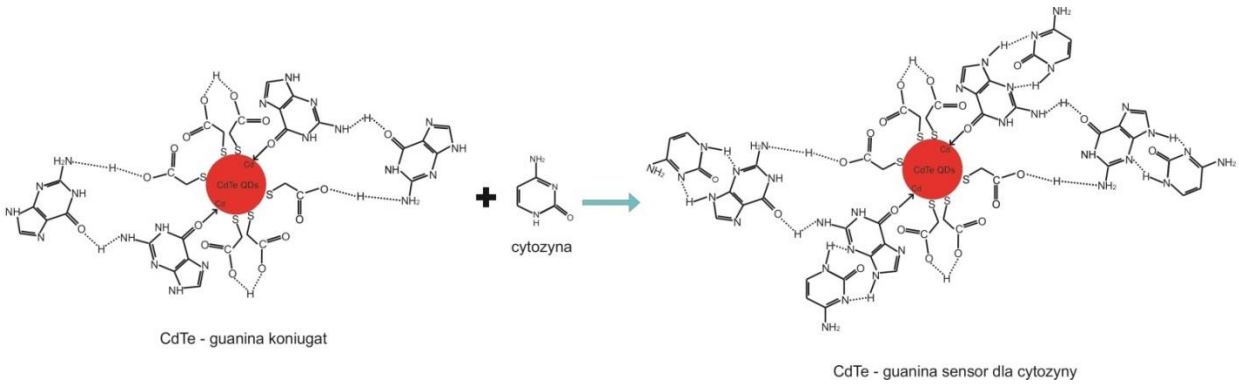
W tym celu koniugat CdTe-guanina został zmiareczkowany roztworem cytozyny, a także roztworami pozostałych zasad azotowych. Rejestrowano zmiany intensywności fluorescencji. Analizując **Rysunek 34 B** zaobserwowano, wzrost intensywności fluorescencji koniugatu CdTe–guanina wraz z dodatkiem komplementarnej zasady azotowej - cytozyny. Efekt wzrostu fluorescencji jest szczególnie wyraźny w zakresie stężenia cytozyny do około 0,7 μmol/ml. Dla pozostałych zasad azotowych nie zarejestrowano tak znacznego wzrostu intensywności fluorescencji towarzyszącej wzrostowi ich stężania **(Rysunek 34)**.




*Rysunek 34. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-guanina od stężenia titranta, nukleozasad: cytozyny, adeniny, tyminy i PBSu (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm), (A) pełny zakres stężeń, (B) zakres zawężony do niższych stężeń.*

Wysoką selektywność i czułość koniugatu CdTe-guanina względem komplementarnej zasady azotowej – cytozyny można tłumaczyć specyficznymi oddziaływania pomiędzy

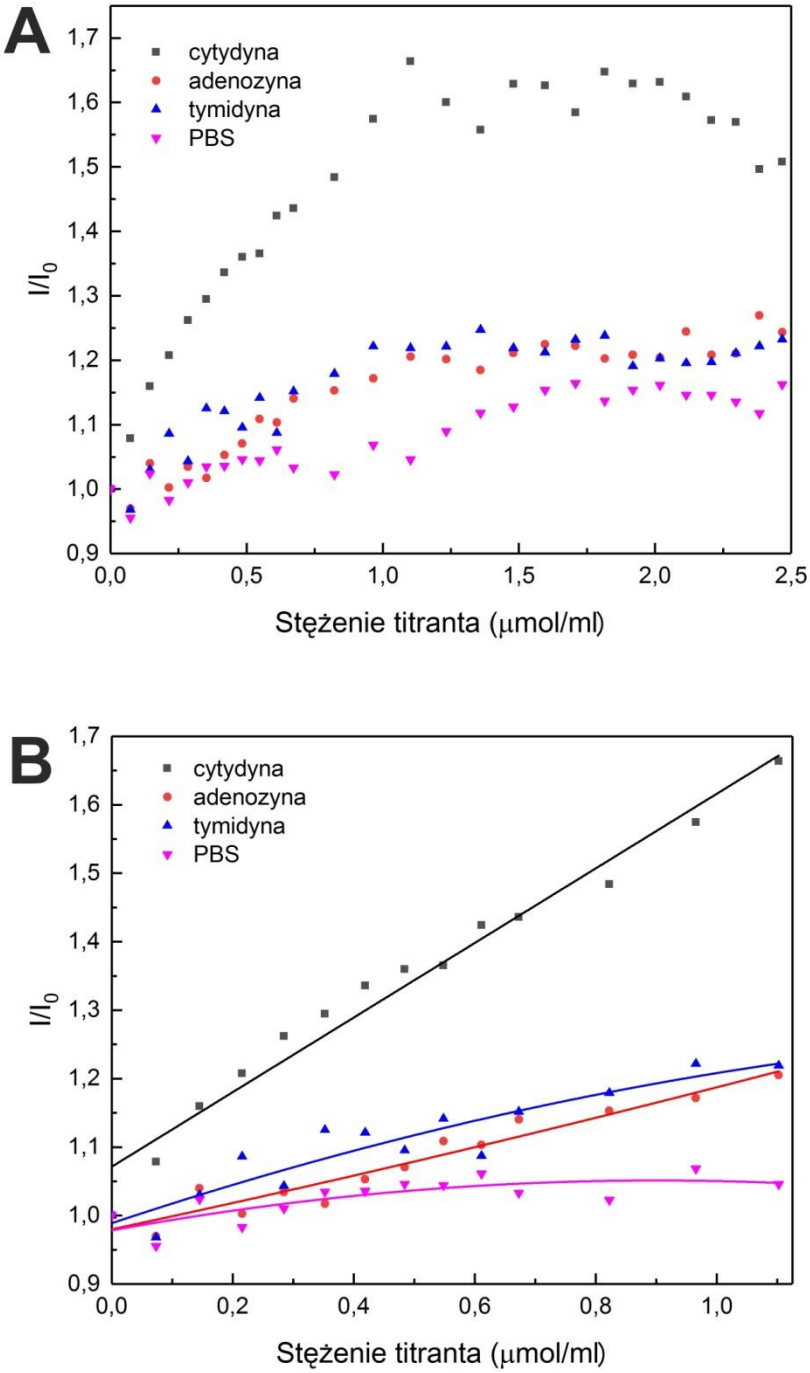
guaniną a cytozyną. Mechanizm odziaływań pomiędzy koniugatem CdTe–guanina a cytozyną zilustrowano na **Rysunku 35.**



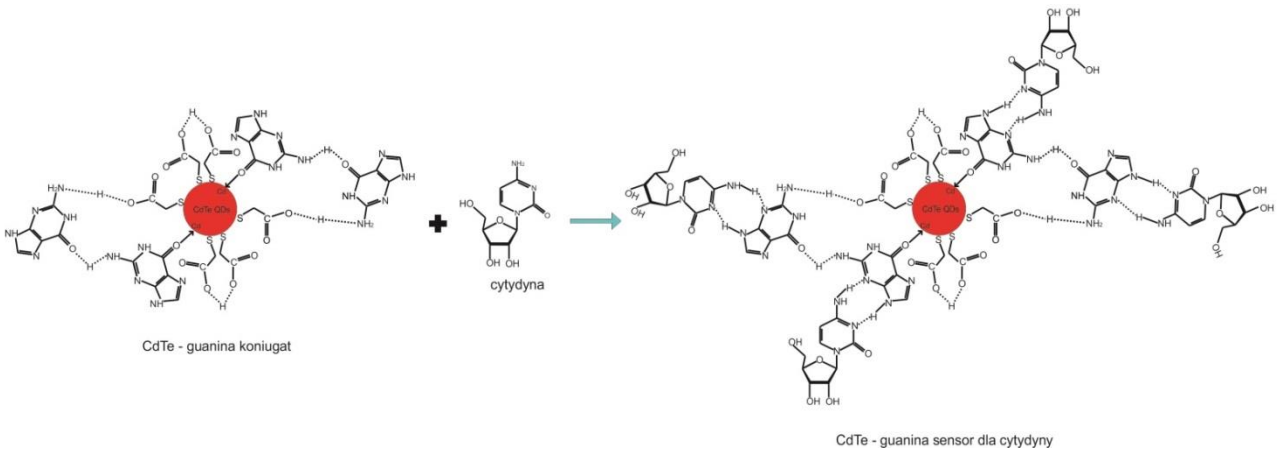

*Rysunek 35. Schematyczna ilustracja mechanizmu detekcji cytozyny przy użyciu koniugatu QDs-guanina.*

### 1.2. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z nuklozydami

W sposób analogiczny jak w poprzednim etapie badań, testowano otrzymany koniugat CdTe-guanina. Poprzez prowadzenie pomiarów fluorescencji zbadano wpływ oddziaływań między tymi układami. Zaobserwowano, iż intensywność fluorescencji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia cytydyny, natomiast dla pozostałych nukleozydów nie zanotowano takiej zmiany **(Rysunku 36 A i B)**. Wpływ ten jest szczególnie wyraźny w zakresie stężenia cytydyny do około 1,1 µmol/ml **(Rysunek 36 B)**. Upewniono się, również iż za efekt ten nie odpowiada wpływ rozcieńczenia – koniugat CdTe-guanina został zmiareczkowany PBS. Dla większych stężeń dodawanego titranta fluorescencja osiąga plateau. **Rysunek 37** przedstawia proponowany mechanizm oddziaływań koniugatu CdTe-guanina z cytydyną.




*Rysunek 36. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-guanina od stężenia dodawanego titranta, nukleozydów: cytydyny, adenozyny, tymidyny i PBSu (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm), (A) pełny zakres stężeń i (B) zakres stężeń ograniczony.*

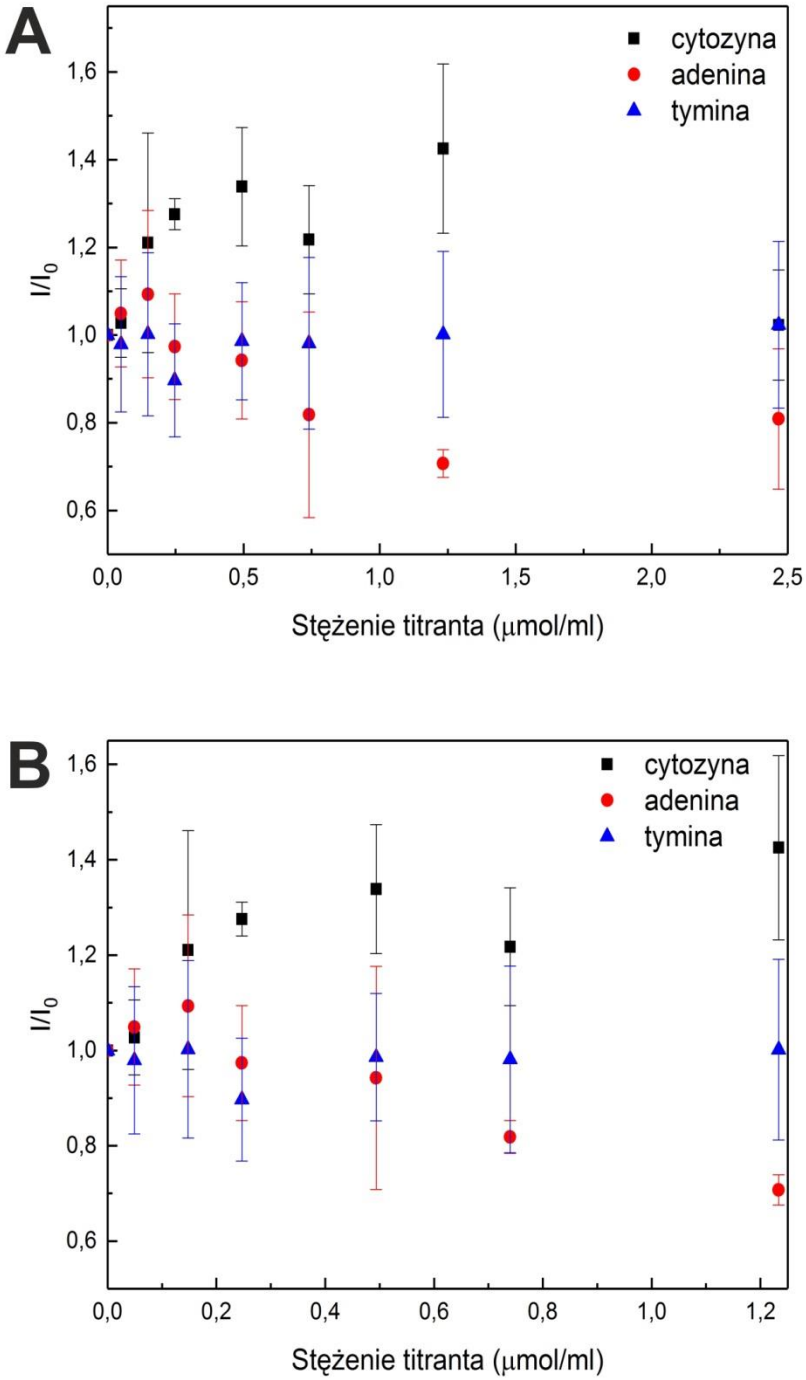



*Rysunek 37. Schematyczna prezentacja mechanizmu detekcji cytydyny przy użyciu biosensora QDs-guanina.*

## 2. Oddziaływania koniugatu CdTe-guanina z zasadami azotowymi i nukleozydami w warunkach sztucznego moczu

### 2.1. Oddziaływanie koniugatu CdTe-guanina z zasadami azotowymi w środowisku sztucznego moczu

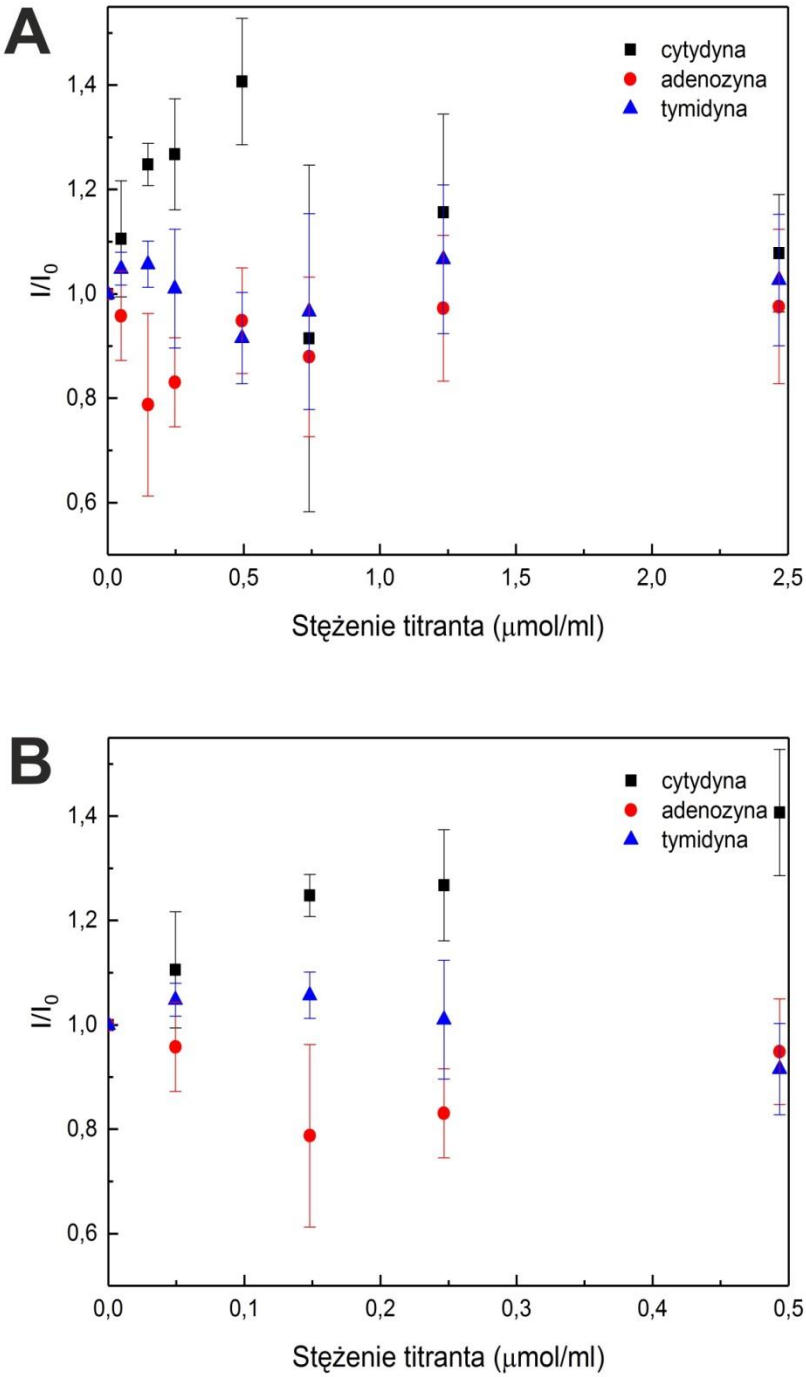
W warunkach symulowanego sztucznego moczu sprawdzono możliwość praktycznego wykorzystania otrzymanego koniugatu CdTe-guanina. W tym celu koniugat CdTe-guanina wprowadzony do sztucznego moczu został zmiareczkowany roztworem komplementarnej nukleozasady: cytozyny. Dodatkowo aby określić selektywność oddziaływań pomiędzy koniugatem CdTe-guanina a cytozyną, zbadano w tych warunkach wpływ pozostałych zasad azotowych: adeniny i tyminy. **Rysunek 38 A i B** przedstawia zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-guanina od stężenia zasad azotowych. Zaobserwowano, iż intensywność fluorescencji koniugatu CdTe–guanina wzrastała wraz ze wzrostem stężenia cytozyny. Zależność ta zaznacza się w zakresie stężenia cytozyny do około 1,25 µmol/ml.




*Rysunek 38. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-guanina od stężenia titranta, nukleozasad: cytozyny, adeniny, tyminy i PBSu (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm) w warunkach sztucznego moczu, (A) pełny zakres stężeń i (B) zakres niskich stężeń w warunkach sztucznego moczu.*

## 2.2. Oddziaływanie koniugatu CdTe-guanina z nukleozydami w środowisku sztucznego moczu

W kolejnym etapie badań wykonano analogiczny do omówionego powyżej eksperyment (w rozdz. 2.1.). Koniugat CdTe-guanina testowano pod kątem możliwości detekcji nukleozydów w warunkach modelowej cieczy fizjologicznej, symulowanego sztucznego moczu. Koniugat ten zawarty w sztucznym moczu został zmiareczkowany roztworem nukleozydu zawierającego jednostkę komplementarną do guaniny – cytydyną, Selektywność działania koniugatu CdTe-guanina sprawdzono poprzez wykonanie eksperymentu z pozostałymi nukleozydami. Na **Rysunku 39 A, B** można zauważyć, iż intensywność fluorescencji koniugatu CdTe –guanina wzrasta wraz z dodatkiem cytydyny. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w zakresie stężenia cytydyny do 0,5 µmol/ml **(Rysunek 39 B)**.




*Rysunek 39. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) koniugatu CdTe-guanina od stężenia dodawanego titranta, nukleozydów: cytydyny, adenozyny, tymidyny i PBSu w warunkach sztucznego moczu, (pH=7,5, $\lambda_{wz}$=351 nm), (A) pełny zakres stężeń i (B) zakres niskich stężeń.*

**Podsumowanie**

W tej części pracy omówiono wyniki badań zmierzające do otrzymania materiałów przydatnych do sporządzenia nowych fluorescencyjnych układów sensorowych opartych na sfunkcjonalizowanych zasadą azotową kropkach kwantowych tellurku kadmu (CdTe QDs).

W tym celu do uprzednio zsyntetyzowanych CdTe QDs przyłączono zasadę pirymidynową – tyminę. Określona została natura oddziaływań w tych układach i parametry umożliwiające intensyfikację wydajności fluorescencji. Oddziaływania pomiędzy CdTe QDs a tyminą zostały scharakteryzowane przy użyciu zaawansowanych technik eksperymentalnych, takich jak: analiza elementarna, spektroskopia w podczerwieni (IR), spektroskopia fotoelektronów (XPS), spektroskopia UV-VIS jak również pomiary fotoluminescencji. Przeprowadzone zostały również badania mikroskopowe: mikroskopia sił atomowych (AFM), wysokorozdzielcza/transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) i (HRTEM) mające na celu zobrazowanie koniugatów QDs-tymina.

Wykonane analizy pozwoliły na wyselekcjonowanie koniugatu o najbardziej optymalnych właściwościach (CdTe-tymina 1:6).

Następnie określono przydatność uzyskanego koniugatu CdTe-tymina do detekcji adeniny, zasady azotowej komplementarnej w stosunku do tyminy. Dodatkowo, koniugat został również poddany badaniom pozwalającym na ocenę jego selektywności poprzez śledzenie oddziaływań z niekomplementarnymi zasadami azotowymi. W tym celu koniugat CdTe-tymina został zmiareczkowany roztworem komplementarnej zasady – adeniny jak i pozostałych nukleozasad.

Określono także zdolność koniugatu do selektywnej detekcji nukleozydów, jak również modyfikowanych nukleozydów. Na podstawie pomiarów fluorescencyjnych stwierdzono, że utworzony koniugat oddziałuje specyficznie i selektywnie nie tylko z komplementarną zasadą azotową – adeniną, ale również z modyfikowanymi nukleozydami 5'-deoksy-5'-metylotioadenozyną (MTA) i 2'-O-metyloadenozyną.

Wykazano możliwość praktycznego wykorzystania otrzymanego materiału biosensora poprzez pomiary fotoluminescencji koniugatów, które prowadzone były w warunkach modelowej cieczy fizjologicznej - symulowanego sztucznego moczu.

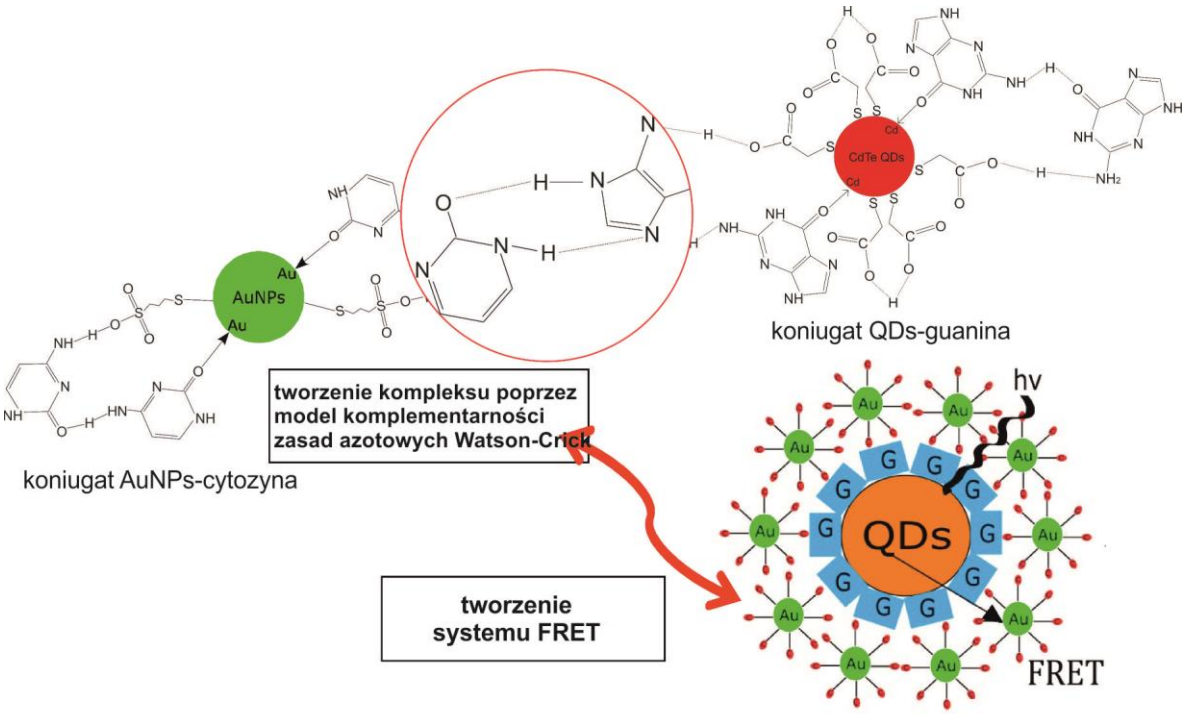
Dodatkowo określono zdolność koniugatu QDs-guanina do detekcji komplementarnej zasady azotowej – cytozyny, a także nukleozydu – cytydyny. Selektywność układu potwierdzono poprzez śledzenie oddziaływań z pozostałymi nukleozasadami i nukleozydami. Badania oddziaływań między tymi układami prowadzone były poprzez pomiary fluorescencji.

W końcowym etapie prowadzone były badania mające na celu sprawdzenie możliwości wykorzystania biosensora w warunkach symulowanego sztucznego moczu.

# Rozdział 2

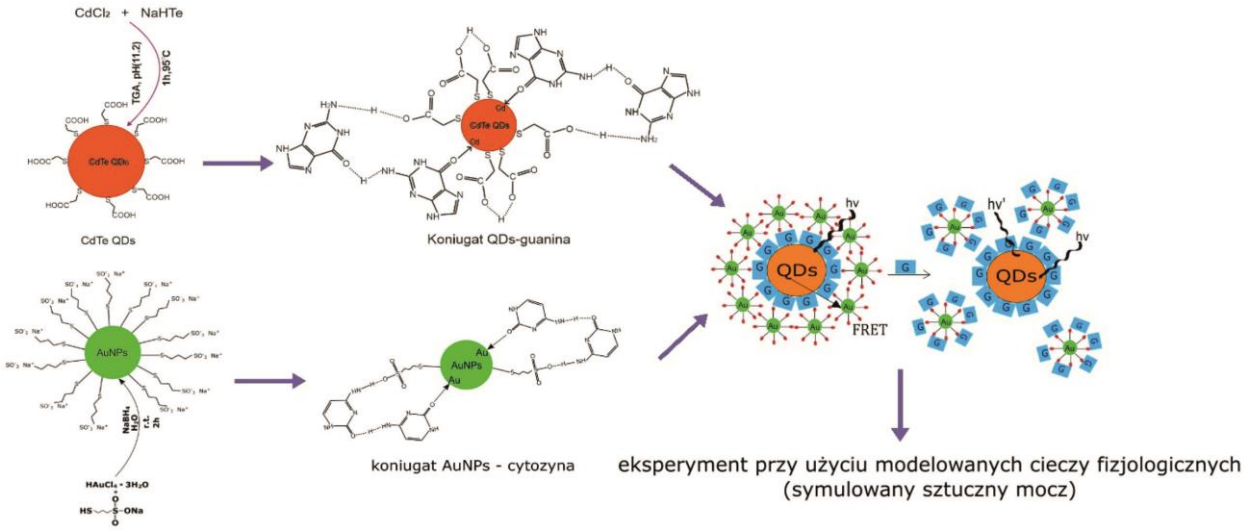
# Fluorescencyjny układ sensorowy bazujący na kropkach kwantowych (QDs) z przyłączoną guaniną i nanocząstkach złota (AuNPs) z przyłączoną cytozyną wykorzystujący zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET, ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) – synteza i właściwości

**Abstrakt graficzny**



# Wprowadzenie

Głównym celem badań omawianych w tej części pracy było otrzymanie oraz określenie właściwości fizykochemicznych nowych fluorescencyjnych materiałów przydatnych do sporządzenia układów sensorowych wykorzystujących zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET, ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer). Układy te bazują na odpowiednio sfunkcjonalizowanych kropkach kwantowych (QDs) i nanocząstkach złota (AuNPs) **(Rysunek 40)**.




*Rysunek 40. Schematyczna ilustracja etapów prowadzonych badań.*

W pierwszym etapie badań wykorzystano otrzymane nanocząstki półprzewodnikowe – kropki kwantowe tellurku kadmu (CdTe QDs) stabilizowane kwasem tioglikolowym. Jak już zauważono, wybór CdTe QDs podyktowany jest tym, iż wykazują one szereg właściwości czyniących je bardziej atrakcyjnymi niż wykorzystywane obecnie organiczne luminofory takie jak: wysoka wydajność kwantowa fluorescencji, szerokie pasmo absorpcji i wąskie pasmo emisji, a także stosunkowo wysoka fotostabilność czyli tzw. „odporność na fotowybielanie". W kolejnym etapie badań zsyntetyzowane zostały koniugaty kropek kwantowych z guaniną (QDs-guanina). Otrzymane koniugaty QDs-guanina zostały następnie poddane pełnej charakterystyce fizykochemicznej.

Otrzymane zostały także koniugaty AuNPs-zasada nukleinowa. W tym celu zsyntetyzowane zostały nanocząstki złota AuNPs stabilizowane 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu, do których została przyłączona zasada azotowa - cytozyna.

Określono właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanocząstek złota oraz ich koniugatów z zasadami nukleinowymi. Nanocząstki złota (AuNPs) ze względu na wysoki współczynnik ekstynkcji i szeroki zakres absorpcji w zakresie światła widzialnego są często wykorzystywane jako akceptory energii. Kropki kwantowe i nanocząstki złota jako para donor-akceptor znajdują zastosowanie jako selektywny i specyficzny nanosensor w analizach biochemicznych.

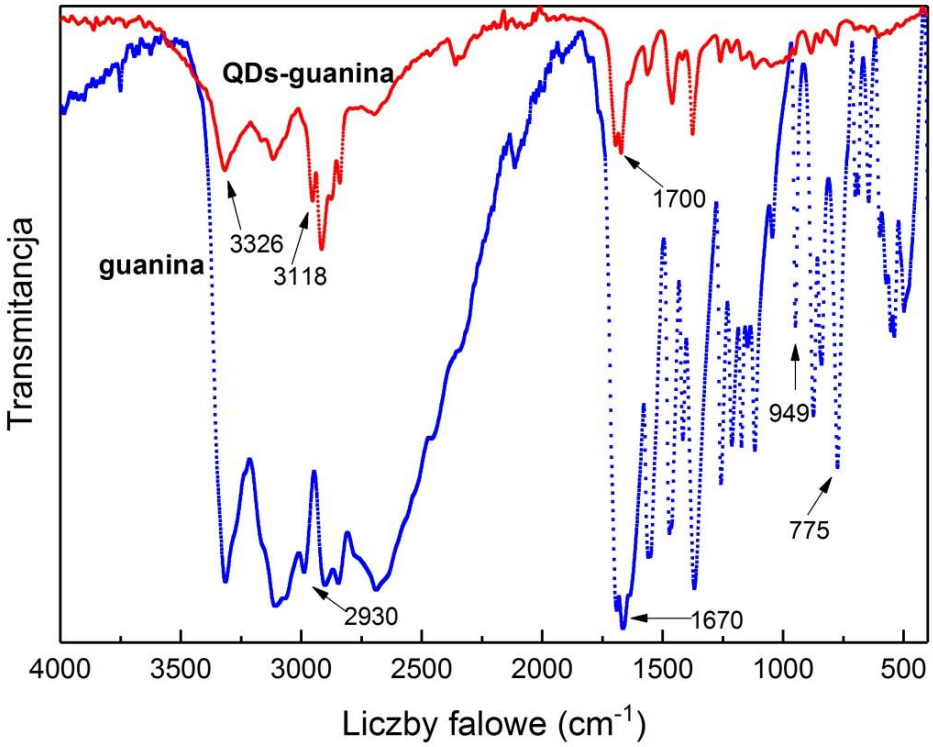
Kluczowym etapem przeprowadzonych badań było zaprojektowanie i zoptymalizowanie układu sensorowego bazującego na uprzednio zsyntetyzowanych koniugatach: kropki kwantowe-guanina i nanocząstki złota-cytozyna (QDs-guanina/AuNPs-cytozyna). Badania oddziaływań między tymi układami prowadzone były poprzez pomiary fluorescencji. Określona została efektywność rezonansowego przeniesienia energii pomiędzy donorem QDs-guanina a akceptorem AuNPs-cytozyna pod nieobecność i w obecności różnych stężeń analitu - wolnych cząsteczek guaniny wprowadzonych do badanego układu. W końcowym etapie uzyskany nanosensor został również poddany badaniom pozwalającym na ocenę jego selektywności. W tym celu wykorzystano inne, niekomplementarne zasady azotowe oraz modelowy płyny fizjologiczny, symulowany sztuczny mocz.

## Wyniki i dyskusja

### 1. Fizykochemiczne właściwości QDs – guanina i AuNPs-cytozyna

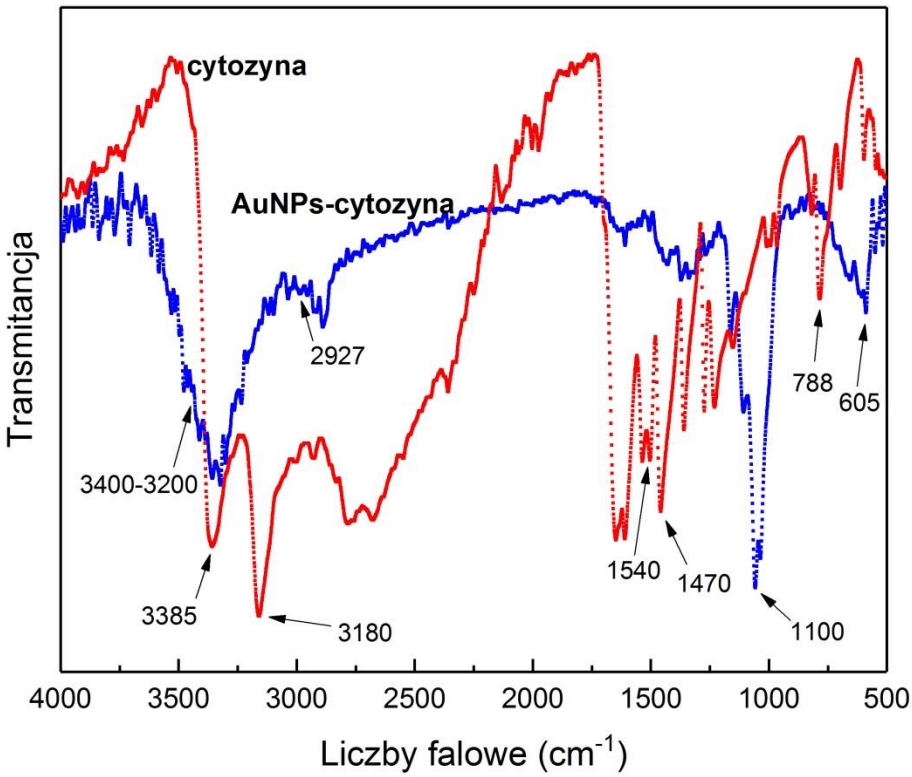
### 1.1. Analiza FTIR

Celem potwierdzenia utworzenia koniugatów CdTe-guanina i AuNPs-cytozyna wykonano badanie techniką FTIR. **Rysunek 41** przedstawia widma FTIR guaniny i koniugatu CdTe–guanina. Na widmie guaniny można zaobserwować szerokie pasmo przy około 3100–3400 $cm^{-1}$ należące do grupy OH. Pasma absorpcyjne z maksimami przy 2930, 1670, 1577 i 1375 $cm^{-1}$ można przypisać odpowiednio do C–H, N–H, C=C drgań rozciągających i drgania deformacyjnego C–H. Pasma absorpcyjne przy 2692 i 775 $cm^{-1}$ odpowiadają drganiom rozciągającym grupy $CH_2$. Pasma przy 1119 i 949 $cm^{-1}$ można przypisać drganiom rozciągającym C–C [134], zaś te przy około 1675 i 1450 $cm^{-1}$ są charakterystyczne odpowiednio dla asymetrycznych i symetrycznych drgań COO−. Dodatkowo na widmie FTIR koniugatu CdTe–guanina można zaobserwować dwa główne pasma pochodzące od guaniny. Piki przy 3326 i 3118 $cm^{-1}$ są charakterystyczne odpowiednio dla drgań rozciągających i N–H. Co więcej utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy $–NH_2$ pochodzącym od guaniny a grupą –COOH CdTe QDs potwierdza obecność pasma absorpcyjnego przy około 3400 $cm^{-1}$. Dodatkowo warto zwrócić uwagę, iż wiele rozdzielonych pasm pochodzących od drgań wibracyjnych C–N i N–H w zakresie 1500–750 $cm^{-1}$ może wynikać z tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy różnymi cząsteczkami (TGA-TGA, guanina-guanina, TGA-guanina) [28]. Ponadto rozdzielone pasmo przy 1700 $cm^{-1}$ drgania wibracyjnego C=O pochodzi od nowo utworzonego wiązania koordynacyjnego pomiędzy tlenem a kadmem [114].




*Rysunek 41. Widmo FTIR dla guaniny i koniugatu QDs-guanina.*

Spektroskopię FTIR wykorzystano również do scharakteryzowania koniugatu AuNPs-cytozyna. Na **Rysunku 42** przedstawiono widmo FTIR cytozyny i AuNPs-cytozyny. Dla cytozyny charakterystyczne pasma absorpcyjne, które można przypisać asymetrycznym i symetrycznym drganiom N-H występują odpowiednio przy 3385 $cm^{-1}$ i 3180 $cm^{-1}$. Pasmo przy około 3010 $cm^{-1}$ może być związane z drganiami rozciągającymi wiązań N-H. Można również zaobserwować rozciągające drganie grupy C=O przy 1667 $cm^{-1}$ i pierścienia przy 1540 $cm^{-1}$ Ponadto pasma pochodzące od drgań pierścienia pojawiają się przy 1470 i 1280 $cm^{-1}$ a także przy 788 $cm^{-1}$ [135]. Analiza spektralna widma koniugatu AuNPs-cytozyna wskazuje na to, iż pasma absorpcyjne obecne przy 1100, 1050, 605 $cm^{-1}$ można przypisać grupie sulfonowej 3MPS (w szczególności grupie $SO_3^-$), co stanowi potwierdzenie obecności tychże grup na powierzchni materiału [34]. Pasma przy 2927 i 2854 $cm^{-1}$ są charakterystyczne dla drgań asymetrycznych i symetrycznych grupy $CH_2$. Ponadto pasmo absorpcyjne w zakresie 3400-3200 $cm^{-1}$ można przypisać drganiom rozciągającym i wiązaniu wodorowemu grupy N-H.




*Rysunek 42. Widmo FTIR dla cytozyny i koniugatu AuNPs-cytozyna.*

### 1.2. Analiza elementarna

W **Tabeli 4** przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych techniką analizy elementarnej dla koniugatów QDs-guanina, AuNPs-cytozyna i AuNPs-cytozyna-guanina. Obecność siarki w koniugacie QDs-guanina potwierdza stabilizację CdTe QDs kwasem tioglikolowym (TGA). Obecność azotu w koniugacie potwierdza przyłączenie guaniny do CdTe QDs. W przypadku koniugatu AuNPs-cytozyna zaobserwowano obecność C, H, N i S. Potwierdza to obecność 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu stabilizującego AuNPs, a także utworzenie koniugatu AuNPs-cytozyna. Dodatkowo o utworzeniu koniugatu AuNPs-cytozyna-guanina świadczy większa zawartość azotu.

*Tabela 4. Skład procentowy pierwiastków w koniugacie QDs-guanina, AuNPs-cytozyna i AuNPs-cytozyna-guanina otrzymany przy użyciu analizy elementarnej.*

| **Materiał** | **Skład [%]** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **C** | **H** | **N** | **S** |
| **QDs-guanina** | 10,9±0,6 | 1,7±0,1 | 6,0±0,7 | 9,1±0,1 |
| **AuNPs-cytozyna** | 4,7±0,4 | 1,0±0,1 | 2,7±0,2 | 3,7±0,2 |
| **AuNPs-cytozyna-guanina** | 3,7±0,2 | 0,8±0,1 | 3,5±0,1 | 2,6±0,1 |

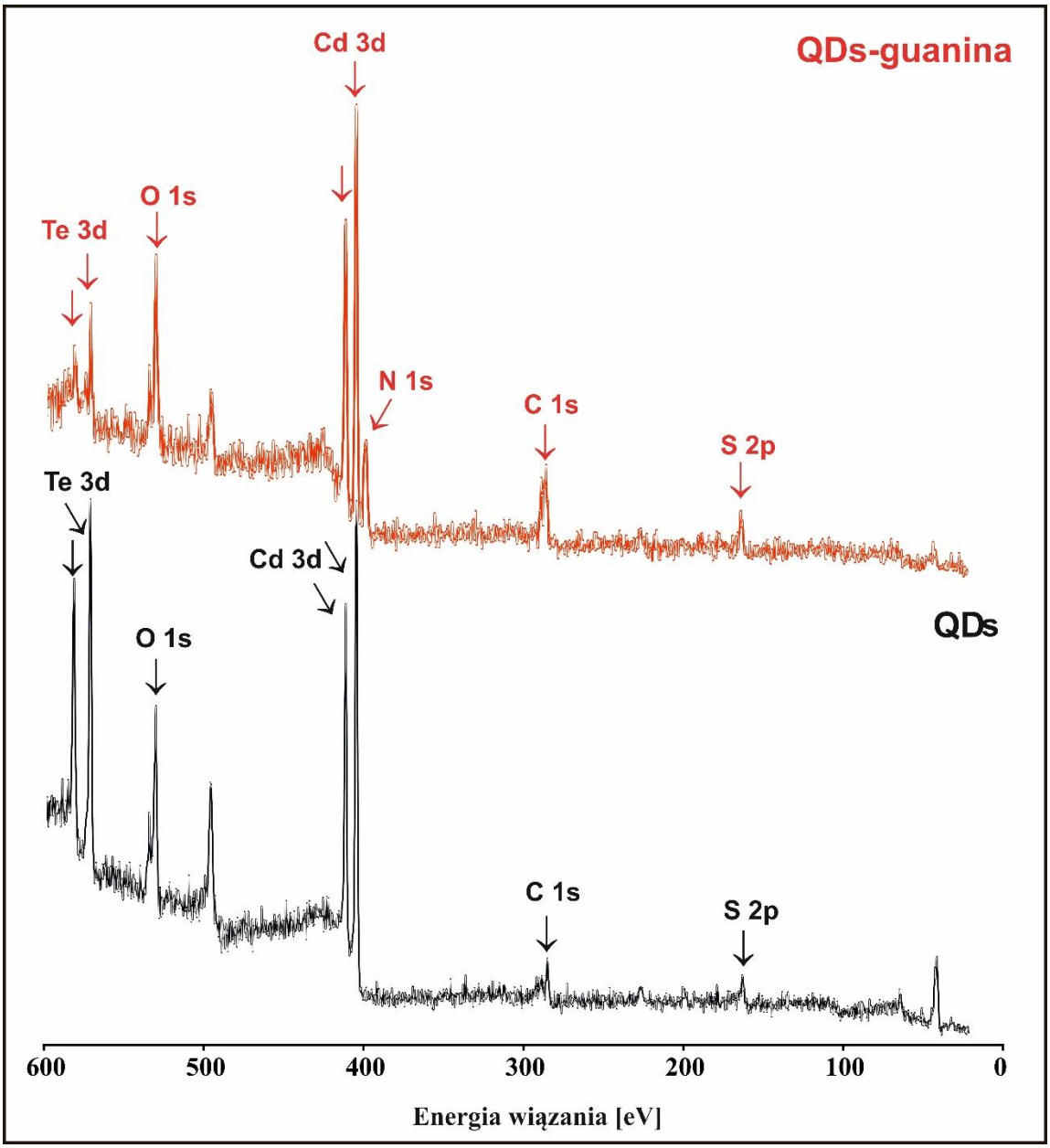
### 1.3. Analiza XPS

W celu dokładniejszej analizy składu chemicznego powierzchni otrzymanych materiałów przeprowadzono analizę XPS **(Rysunki 43 i 44)**. Widmo XPS dla QDs i QDs-guanina zostało przedstawione na **Rysunku 43**. W **Tabeli 5** zamieszczono wyniki otrzymane techniką XPS przedstawiające skład procentowy powierzchni otrzymanych nanocząstek. Obserwowane piki można przypisać Te 3d (582,6 i 572,4 eV), Cd 3d (411,9 i 405 eV), O 1s (531,3 eV), C 1s (285,3 eV) i S 2p (162,6 eV) [117,118]. Wyniki te potwierdziły, że QDs są efektywnie stabilizowane przy użyciu kwasu tioglikolowego zawierającego tlen, siarkę i węgiel [28]. Na widmie XPS dla koniugatu QDs-guanina zarejestrowano nowy pik N 1s z maksimum energii wiązania 400 eV. Dodatkowo sygnał pochodzący od O 1s i C 1s jest bardziej intensywny, a pik przypisany do Te 3d jest zdecydowanie mniej wyraźny **(patrz Tabela 5)**. Wyniki te potwierdziły efektywne przyłączenie guaniny do powierzchni QDs.

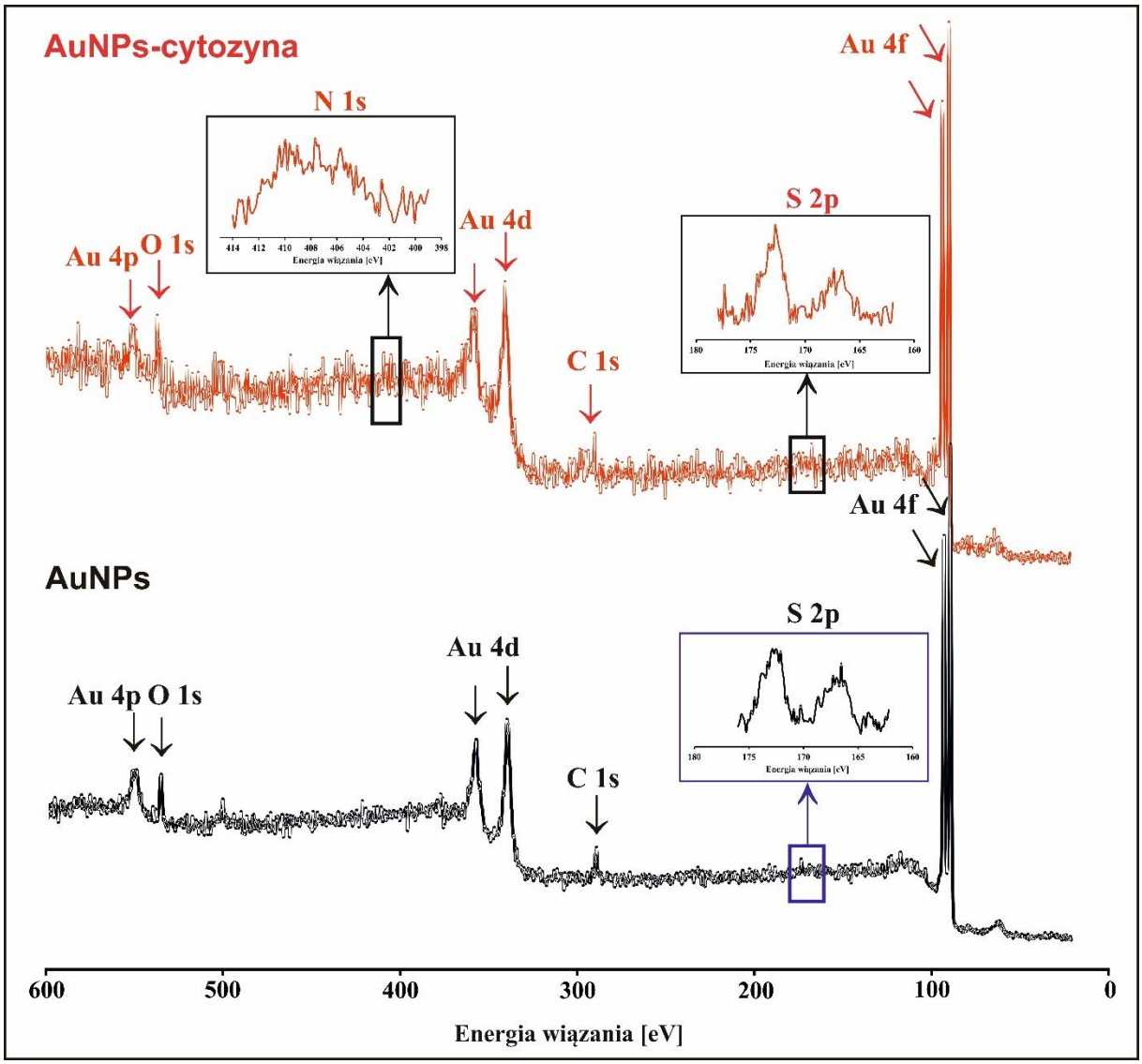
*Tabela 5. Wyniki otrzymane techniką XPS przedstawiające skład procentowy pierwiastków na powierzchni otrzymanych nanocząstek.*

| | **Te3d** | **Cd3d** | **Au4f** | **O1s** | **C1s** | **S2p** | **N1s** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **QDs** | 39 | 38 | - | 17 | 4 | 2 | - |
| **QDs-guanina** | 14 | 45 | - | 19 | 10 | 3 | 9 |
| **AuNPs** | - | - | 84 | 9 | 4 | 3 | - |
| **AuNPs-cytozyna** | - | - | 76 | 8 | 9 | 2 | 5 |

Na **Rysunku 44** przedstawiono widmo XPS dla AuNPs i koniugatu AuNPs-cytozyna. Piki zarejestrowane dla AuNPs są charakterystyczne dla Au 4f (88 eV, 92 eV), Au 4d (340 eV, 358 eV), Au 4p (551 eV), S 2p (172 eV, 167 eV), C 1s (290 eV) i O 1s (536 eV), co odzwierciedla skład analizowanych nanocząstek złota stabilizowanych 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu. Na widmie dla koniugatu AuNPs-cytozyna oprócz sygnałów od pierwiastków wchodzących w skład nanocząstek pojawia się nowy pik N 1s w zakresie 398-414 eV (widmo XPS o wysokiej rozdzielczości **Rysunek 44**) pochodzący od zasady azotowej – cytozyny. Dodatkowo dla AuNPs-cytozyna sygnał pochodzący od C 1s staje się bardziej intensywny, natomiast pik przypisany Au 4f jest znacząco mniej wyraźny **(Tabela 5)**. Obserwowane zmiany widma XPS można tłumaczyć, biorąc pod uwagę obecność jednostek cytozyny przyłączonych do powierzchni AuNPs. Podsumowując wyniki analizy XPS potwierdziły wcześniejsze rezultaty dotyczące składu QDs-guaniny i AuNPs-cytozyny otrzymane w oparciu o analizę elementarną i spektroskopię FTIR. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, a także dane literaturowe [136] zaproponowano mechanizmy koniugacji zasad azotowych do powierzchni nanocząstek **(Rysunki 10 i 12)**.




*Rysunek 43. Widmo XPS dla QDs i koniugatu QDs-guanina.*



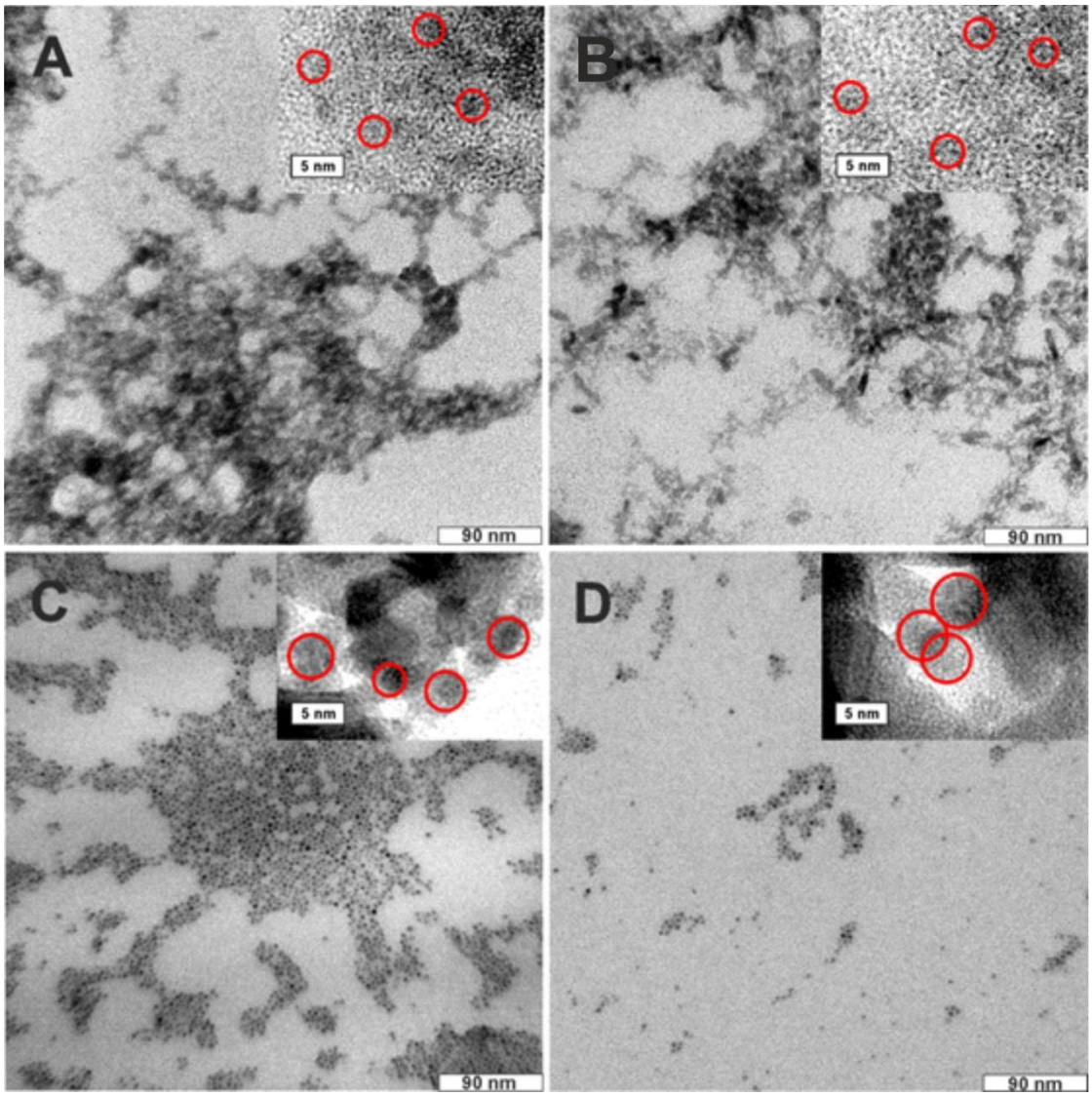

*Rysunek 44. Widmo XPS dla AuNPs i koniugatu AuNPs-cytozyna.*

## 2. Morfologia koniugatów QDs – guanina i AuNPs-cytozyna

### 2.1. Analiza TEM/HRTEM

Przeprowadzono badania techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (HRTEM) w celu charakterystyki morfologii otrzymanych materiałów. Otrzymane mikrofotografia dla QDs (A), QDs-guanina (B), AuNPs (C) i AuNPs-cytozyna zaprezentowano na **Rysunku 45**. Jak można zauważyć na **Rysunku 45 A i B** zarówno QDs jak i koniugat QDs-guanina wykazują podobny rodzaj organizacji. W przypadku obu materiałów można zaobserwować tendencję do tworzenia sieci agregatów z wieloma ściśle ułożonymi nanocząsteczkami i w związku z tym trudno jest precyzyjnie oszacować wielkości poszczególnych obiektów QDs i ich

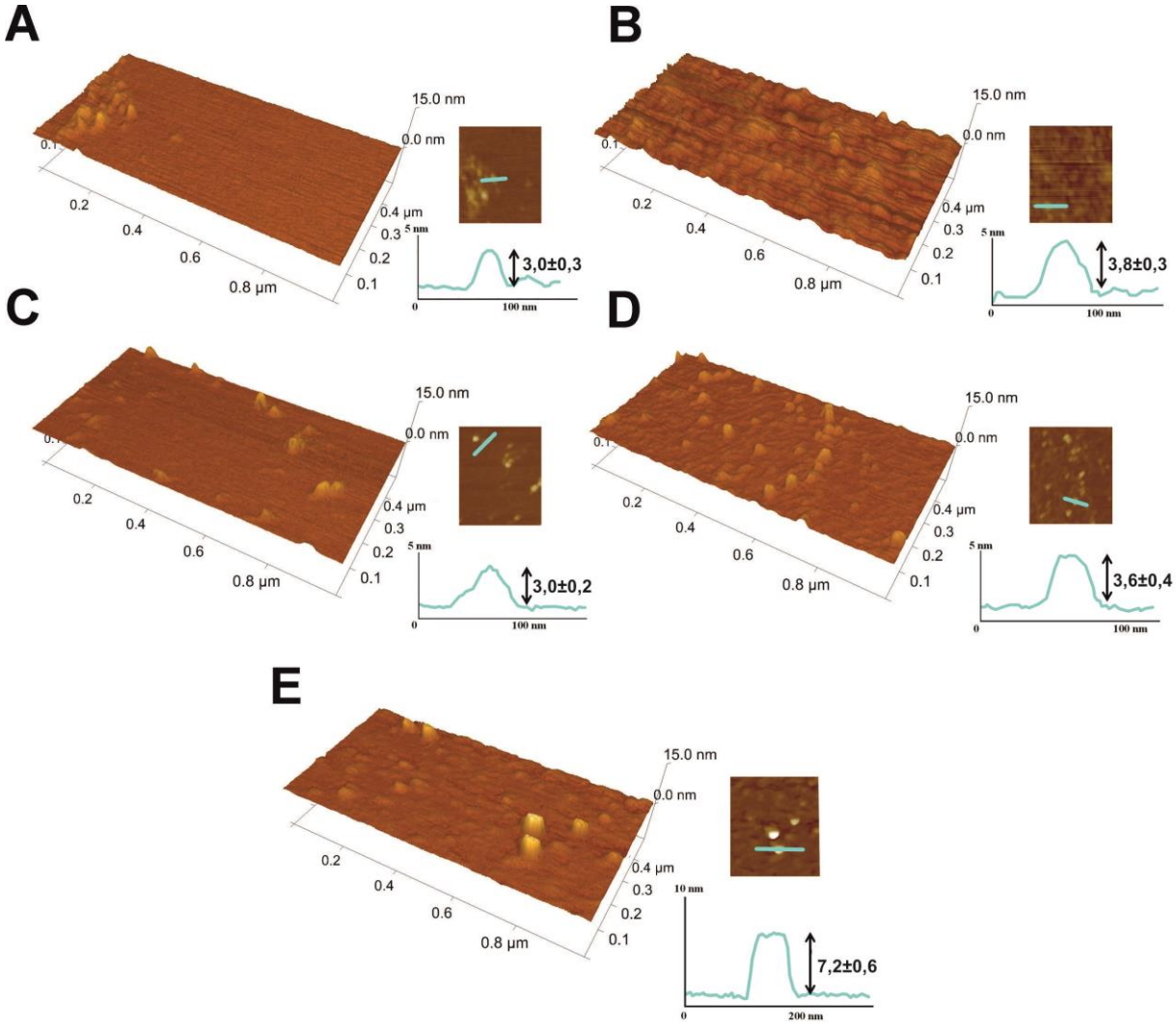
koniugatów. Analizując wyniki otrzymane dla AuNPs i koniugatu AuNPs-cytozyna można zaobserwować, że oba typy materiałów mają tendencję do agregacji **(Rysunek 45 C i D)**, jednakże, wykazują one kształt kulisty i jednolity rozmiar. Na mikrofotografiach HRTEM na **Rysunku 45** można zauważyć obecność siatek płaszczyznowych, potwierdzających krystaliczność CdTe QDs, AuNPs i ich koniugatów. Jednakże biorąc pod uwagę cechy badanych materiałów, trudno jest precyzyjnie oszacować granice płaszczyzn krystalograficznych (czerwone kółka na obrazach HRTEM). Na podstawie uzyskanych obrazów można wnioskować zatem, że rozmiary nanocząsteczek są w zakresie około 5 nm.




*Rysunek 45. Mikrofotografie uzyskane techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej i wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej dla CdTe QDs (A), QDs-guanina (B), AuNPs (C) i AuNPs-cytozyna (D).*

## 2.2. Analiza AFM

W celu zbadania morfologii a także dokładnego oszacowania rozmiarów otrzymanych materiałów wykonano badania wykorzystując technikę mikroskopii sił atomowych (AFM). Wyniki otrzymane techniką AFM dostarczają informacji o zmianach wielkości nanocząstek (QDs i AuNPs) wynikających z ich koniugacji biocząsteczkami. **Rysunki 46 A i B** przedstawiają obrazy AFM 3D i obrazy AFM z przekrojami poprzecznymi AuNPs i koniugatu AuNPs-cytozyna. Średnica struktury krystalicznej materiału AuNPs wynosi 3,0±0,3 nm natomiast średnica koniugatu AuNPs-cytozyna wynosi około 3,8±0,3 nm. **Rysunki 46 C i D** prezentują obrazy CdTe QDs oraz koniugatu QDs-guanina. Średnie wartości średnic obiektów CdTe QDs wynoszą 3,0±0,2 nm, podczas gdy średnie średnice koniugatów QDs-guanina wynosiły około 3,6±0,4 nm. Można zatem stwierdzić, iż obserwacje AFM potwierdziły wcześniejsze ustalenia, że guanina i cytozyna zostały z powodzeniem przyłączone odpowiednio do CdTe QD i AuNPs, co w efekcie prowadzi do zwiększenia rozmiarów tych obiektów.




*Rysunek 46. Zdjęcia AFM dla AuNPs (A), koniugatów AuNP – cytozyna (B), QDs (C), koniugatów QDs – guanina (D) i koniugatów QDs – guanina – AuNPs – cytozyna (E).*

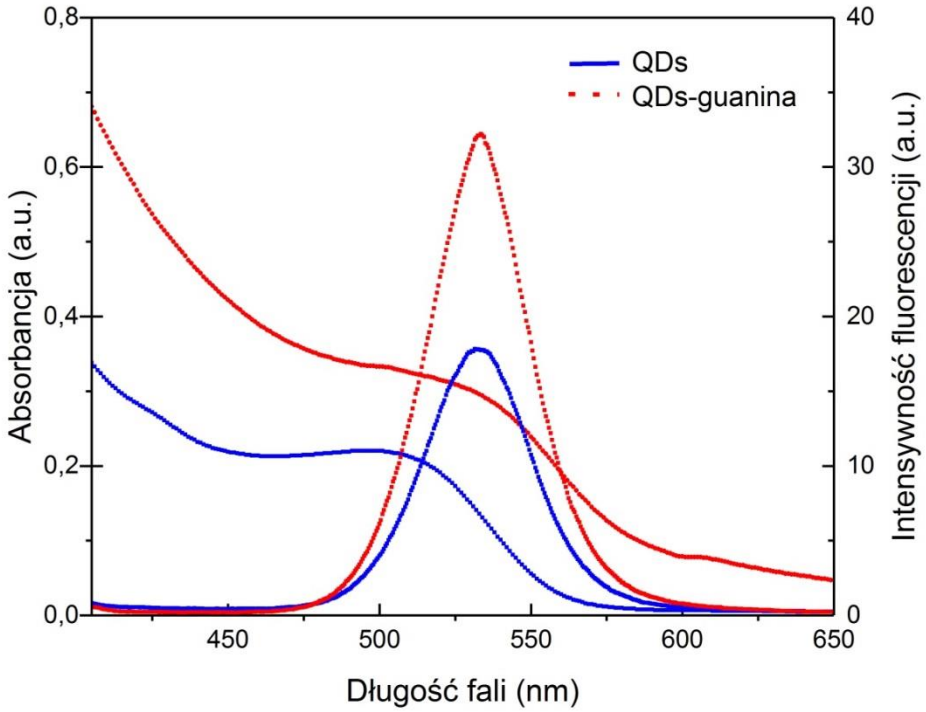
## 3. Rezonansowe przeniesienie energii wzbudzenia fluorescencji (FRET) pomiędzy QDs – guanina a AuNPs – cytozyna.

### 3.1. Właściwości optyczne

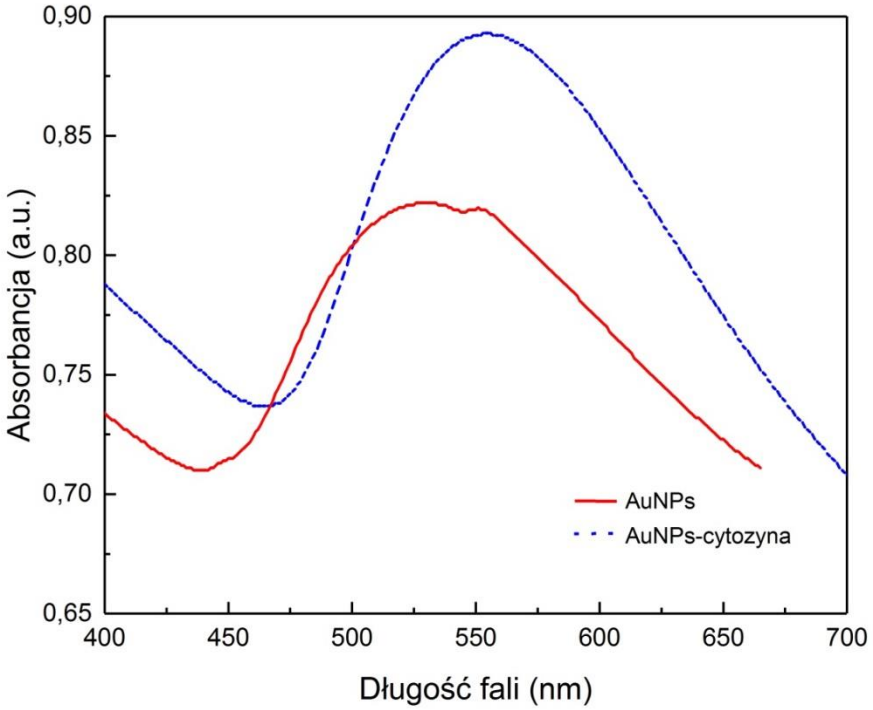
W celu zweryfikowania czy mechanizm FRET może funkcjonować w opracowanym układzie zmierzono widma absorpcji i emisji AuNPs, QDs oraz ich koniugatów **(Rysunki 47 i 48)**. Widmo fluorescencji dla koniugatu QDs-guanina wykazuje maksymalną wartość przy 540 nm, która jest zbliżona do maksymalnej absorpcji obserwowanej dla AuNP-cytozyna. Sugeruje to, iż CdTe QDs i AuNPs mogą pełnić rolę pary akceptor-donor. Można również zauważyć, że pasmo fluorescencji jest stosunkowo wąskie (szerokość w połowie wysokości (FWHM) wynosiła około 42 nm dla CdTe QD i 37 nm dla QDs-guanina)

i symetryczne co świadczy, że zarówno CdTe QDs, jak i koniugat QDs-guanina są układami o niskim stopniu dyspersji i homogenicznymi.

Dodatkowo, widmo UV-Vis AuNPs stabilizowanych przez 3MPS **(Rysunek 48)** wykazuje rezonans plazmonowy przy długości fali około 525 nm, co jest typowe dla nanocząstek złota o małej średnicy [137]. Zatem można zauważyć, że widmo absorpcyjne zarówno AuNPs i koniugatu AuNP-cytozyna pokrywa się z widmem emisji fluorescencji CdTe QD i QDs-guaniny.



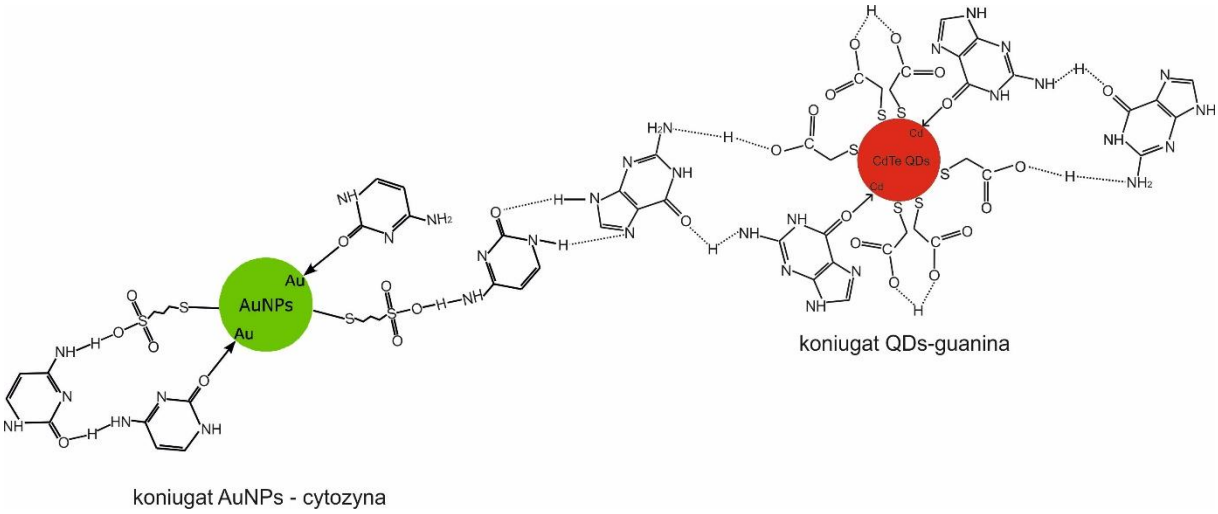

*Rysunek 47. Widmo absorpcyjne UV-Vis i widmo fluorescencyjne dla QDs i QDs – guanina.*



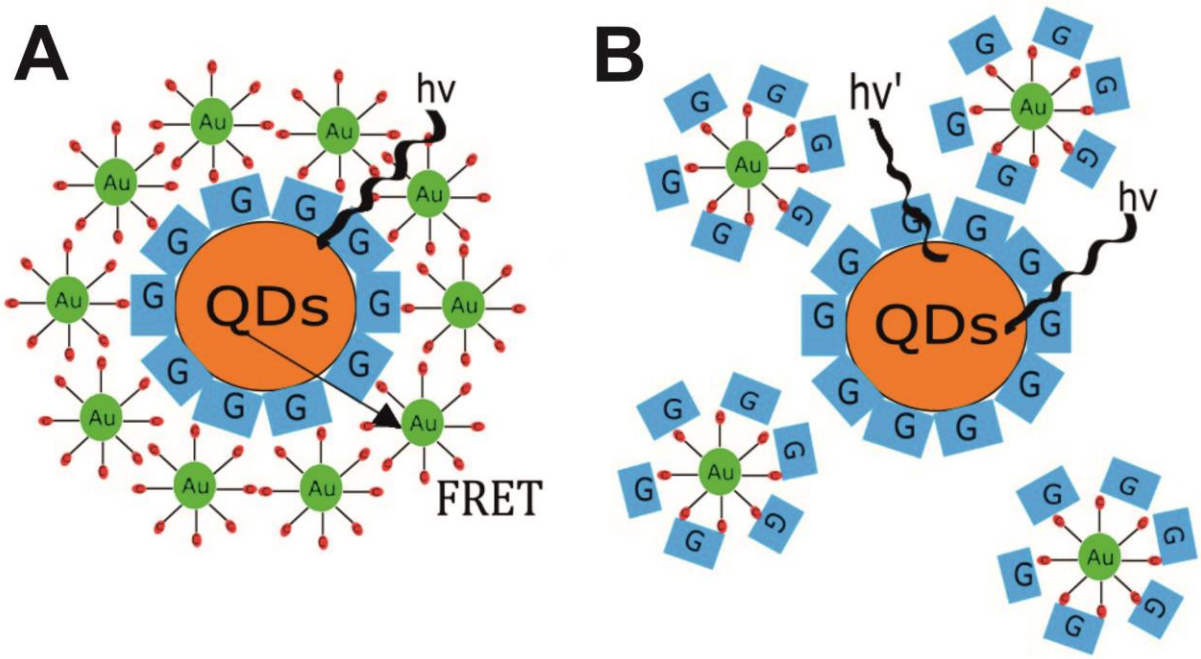

*Rysunek 48. Widma absorpcyjne dla AuNPs i AuNPs-cytozyna.*

### 3.2. Wygaszanie fluorescencji QDs-guanina przez AuNPs-cytozyna

Jak wspomniano wcześniej, koniugaty CdTe-guanina i AuNPs-cytozyna zostały otrzymane z myślą, by pełnić rolę pary donor-akceptor w badaniach prowadzących do opracowania metody detekcji zasad nukleinowych bazującej na FRET. **Rysunek 50 A** przedstawia schematycznie zasadę mechanizmu proponowanego podejścia. Stabilizacja kropek kwantowych kwasem tioglikolowym umożliwiła uzyskanie na powierzchni QDs grup karboksylowych. Dzięki temu QDs mogłyby być związane z guaniną poprzez wiązania kowalencyjne i oddziaływanie wodorowe **(Rysunek 10)**, co znacznie wpłynęło na zwiększenie ich intensywności fluorescencji **(Rysunek 51, krzywe c i d)**. Co więcej dzięki specyficznym oddziaływaniom pomiędzy cząsteczkami guaniny i cytozyny przyłączonymi odpowiednio do QDs i AuNPs, dochodzi do tworzenia układu QDs–guanina–cytozyna-AuNPs **(Rysunek 49).**




*Rysunek 49. Schemat tworzenia kompleksu QDs–guanina–cytozyna-AuNPs w oparciu o model komplementarności zasad azotowych Watson-Crick.*




*Rysunek 50. Schemat mechanizmu zjawiska rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET) w układzie kropki kwantowe-guanina (QDs-guanina) - nanocząstki złota-cytozyna (AuNPs-cytozyna) (A) i schemat oddziaływań koniugatu AuNPs-cytozyna preinkubowanego z guaniną i QDs-guaniną (B).*

W celu uzyskania dokładniejszej informacji dotyczącej powyższych oddziaływań przeprowadzono analizę techniką mikroskopii sił atomowych (AFM). Jak omówiono powyżej (rozdz. 2.2.), wielkości otrzymanych koniugatów wynoszą odpowiednio około 3,8 nm

i 3,6 nm dla AuNP-cytozyna i QDs-guanina. Obraz AFM przedstawiony na **Rysunku 46 E** dla kompleksu QDs-guanina-AuNP–cytozyna wykazał, że jego wielkość wynosi 7,2±0,6 nm, co jest sumą średnic pojedynczych koniugatów. Na podstawie tych danych można stwierdzić, że QDs i AuNPs znajdują się w niewielkiej odległości ze względu na specyficzną interakcję cząsteczek guanina-cytozyna. Zgodnie z literaturą [138] fluorescencyjne przeniesienie energii wzbudzenia (FRET) zachodzi wówczas, gdy donor energii znajduje się w dostatecznej bliskości w stosunku do akceptora (odległość Förstera ($R_0$) podana poniżej – równanie 10) – w praktyce bliżej niż 10 nm.

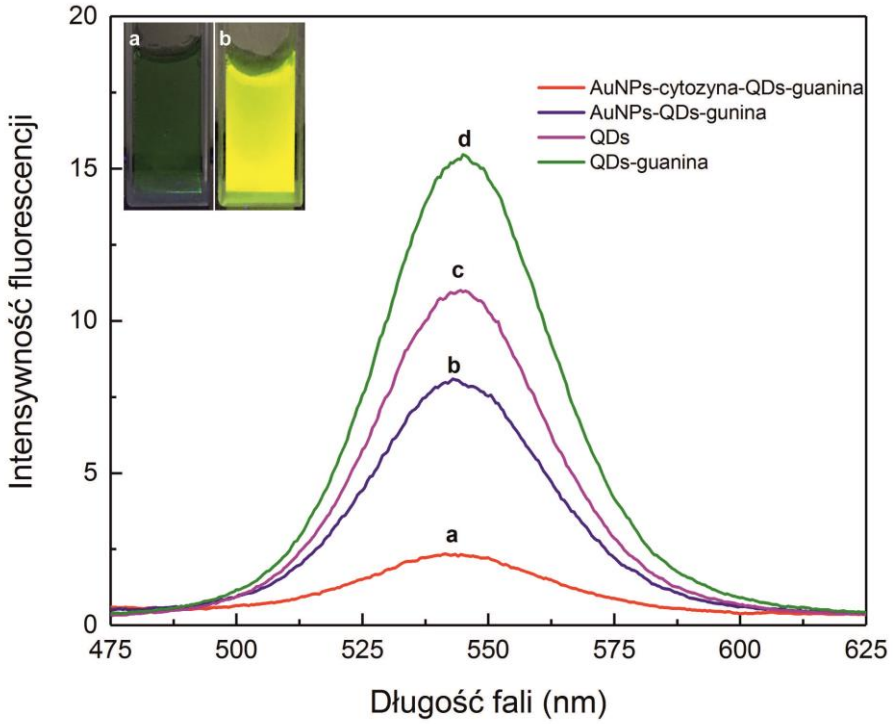
$$R_0^6 = \frac{9000(ln10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5 N_A n^4}\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \qquad (10)$$

Obrazy AFM wskazują zatem, że odległość pomiędzy donorem a akceptorem, wymagana w mechanizmie FRET, jest spełniona w badanym układzie, a co za tym idzie energia wzbudzonej cząsteczki QDs może być przenoszona do AuNPs poprzez oddziaływania dipol–dipol. Jak widać na **Rysunku 51 (krzywa a)**, zjawisko takie zachodzi w opracowanym układzie. Wykazano, że wprowadzenie do układu AuNPs-cytozyny do roztworu zawierającego QDs-guaninę powoduje efektywne wygaszanie fluorescencji QDs **(Rysunek 51, krzywa a)**. Efektu tego nie obserwowano, gdy AuNPs-cytozyna preinkubowana była w roztworze modelowym, zawierającym wolną guaninę. Guanina obecna w roztworze utworzyła kompleks AuNPs-cytozyny-guanina, poprzez oddziaływanie komplementarnych zasad nukleinowych, ograniczając tego typu oddziaływanie z QDs-guaniną w układzie QDs-guanina-wolna guanina-AuNPs-cytozyna, co skutkowało eliminacją procesu przeniesienia energii (FRET). W układzie takim obserwowano wzrost intensywności fluorescencji QDs **(Rysunek 51, krzywa b)**. Zatem QDs-guanina-AuNPs-cytozyna jest obiecującym materiałem do konstrukcji biosensora typu „turn-on" umożliwiającego detekcję guaniny **(Rysunek 50 B)**.

Wykonano również zdjęcia dla opisanych powyżej układów przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali λ=365 nm. Na **Rysunku 51 załącznik a** nie zaobserwowano widocznej fluorescencji - próbka była przezroczysta i ciemnozielona. Jednakże kiedy cytozyna nie została przyłączona do AuNPs **(Rysunek 51 krzywa b)**, nie występują specyficzne oddziaływania i można obserwować fluorescencję. W obrazie optycznym wykonanym dla tej próbki przy wzbudzeniu światłem przy λ=365 nm obserwowano jasno

zieloną fluorescencję **(Rysunek 51 załącznik b)**. Wyniki te potwierdzają iż czułość systemu FRET jest znacznie poprawiona przez połączenie QDs i AuNP poprzez oddziaływanie guaniny z cytozyną.

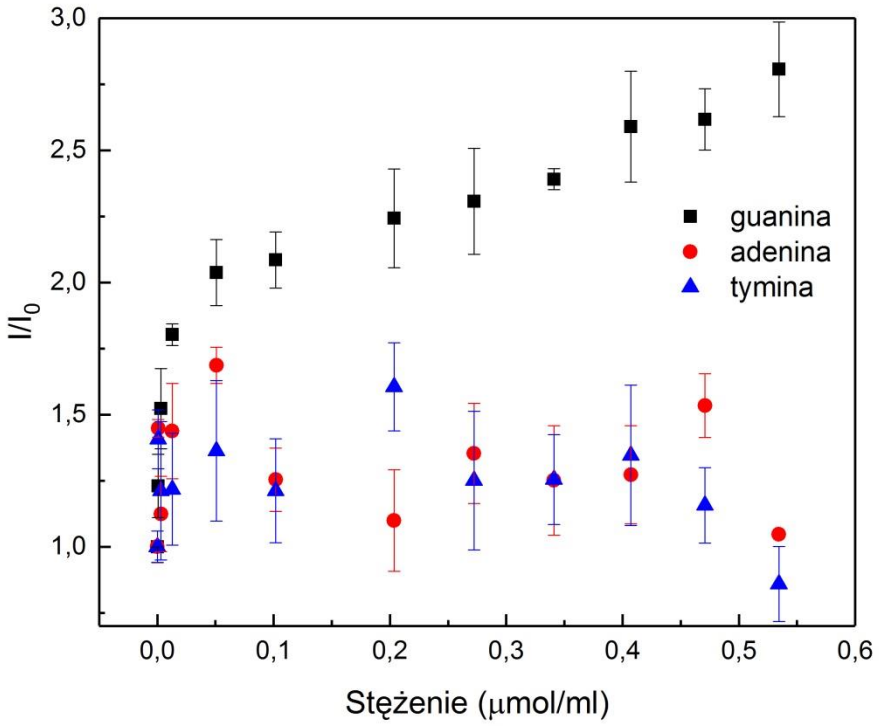
Na podstawie przedstawionego widma QDs-guanina w obecności i pod nieobecność AuNPs-cytozyna (**Rysunek 51, krzywe a i d)** można wnioskować, iż nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cytozyną pełnią funkcję efektywnego wygaszacza fluorescencji koniugatu QDs-guanina. Energia wzbudzenia jest skutecznie przenoszona z QDs-guanina do AuNPs-cytozyna, co jest obserwowane jako wygaszanie fluorescencji koniugatu QDs **(Rysunek 51, krzywa a)**.




*Rysunek 51. Widmo fluorescencji QDs-guanina w obecności AuNPs-cytozyna (a), QDs-guanina w obecności AuNPs (b), QDs (c) i koniugat QDs-guanina (d), załącznik: zdjęcia układów QDs-guanina-AuNPs-cytozyna (system FRET) (a) i QDs-guanina-AuNPs (b) przy wzbudzeniu lampą o długości fali 365 nm.*

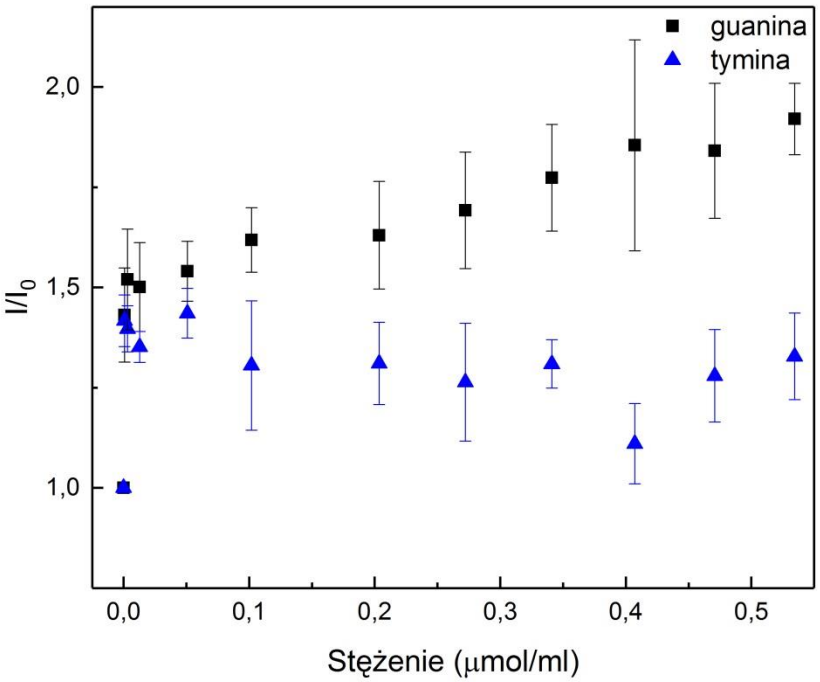
Celem określenia możliwości ilościowej analizy stężenia guaniny przeprowadzono badania zależności intensywności fluorescencji QDs-guanina w obecności AuNPs-cytozyna preinkubowanych w roztworach zawierających różne stężenia guaniny **(Rysunek 50 B)**.

Biorąc pod uwagę specyficzne interakcje komplementarnych zasad azotowych guanina-cytozyna podczas procesu inkubacji, guanina oddziałuje z koniugatem AuNPs-cytozyna i tworzy kompleksy AuNPs-cytozyna-guanina **(Rysunek 52)**. Prowadzi to do utrudnienia interakcji pomiędzy QDs-guanina i akceptorem energii AuNPs-cytozyna, co w rezultacie skutkuje wzrostem intensywności fluorescencji QDs, ponieważ efektywność przenoszenia energii jest ograniczona. W związku z tym przy zwiększaniu stężenia wolnej guaniny w badanym układzie, intensywność fluorescencji koniugatu QDs-guaniny również powinna wzrastać. Taką też tendencję obserwowano we wszystkich badanych próbkach z roztworami wolnej guaniny w zakresie od 0,80 nmol/ml do 0,53 μmol/ml. Potwierdza to oddziaływanie wolnej guaniny z powierzchnią koniugatu AuNPs-cytozyna na etapie inkubacji i tym samym zahamowanie mechanizmu FRET. W celu oceny selektywności otrzymanego układu względem guaniny, zbadano wpływ pozostałych zasad azotowych – adeniny i tyminy. Jak przedstawiono na **Rysunku 52** adenina i tymina nie miały istotnego wpływu na intensywność fluorescencji. Można zatem stwierdzić, że układ QDs-guanina-AuNPs-cytozyna wykazuje selektywność względem zasady azotowej - guaniny.




*Rysunek 52. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) QDs-guanina w obecności AuNPs-cytozyna, które inkubowano w roztworach zawierających różne stężenia guaniny, adeniny i tyminy.*

W celu oceny możliwości zastosowania sensora FRET skonstruowanego przy użyciu układu QDs-guanina-AuNPs-cytozyna do detekcji zasad azotowych w próbkach rzeczywistych otrzymany koniugat badano także w warunkach symulowanego sztucznego moczu. Zaobserwowano, że intensywność fluorescencji QDs-guanina w obecności AuNPs-cytozyna znacznie zwiększyła się po wprowadzeniu guaniny do układu i wzrastała wraz ze wzrostem jej stężenia **(Rysunek 53)**. Selektywność sensora FRET oceniono również w sztucznym moczu stosując tyminę jako model cząsteczki niekomplementarnej. Wyniki przedstawione na **Rysunku 53** wyraźnie wskazują, że tymina nie powoduje wzrostu intensywności fluorescencji, a obserwowane zmiany sygnału w układach zawierających różne stężenia tyminy są w granicach błędu. Wynik ten wskazuje, że pomiędzy niekomplementarną zasadą azotową a układem QDs-guanina i AuNPs-cytozyna nie dochodzi do znaczących interakcji.




*Rysunek 53. Zależność intensywności fluorescencji ($I/I_0$) QDs-guanina w obecności AuNPs-cytozyna, który inkubowano w roztworach, odpowiednio guaniny i tyminy o różnych stężeniach w warunkach symulowanego sztucznego moczu.*

**Podsumowanie**

Otrzymano i scharakteryzowano materiał potencjalnie przydatny do konstrukcji biosensora bazujący na koniugatach: kropki kwantowe z przyłączoną guaniną oraz nanocząstki złota z przyłączoną cytozyną wykorzystujący zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET). W opracowanym układzie rolę donora energii pełni koniugat QDs-guanina a akceptora koniugat AuNPs-cytozyna. W badaniach wykazano, iż zsyntetyzowane QDs i koniugat QDs-guanina posiadają doskonałe właściwości spektralne. QDs-guanina charakteryzuje się obecnością szerokiego pasma absorpcji i wąskiego pasma emisji (szerokość połówkowa ang. FWHM dla QDs wyniosła 46 nm i dla QDs-guanina 37 nm). Widmo fluorescencji dla koniugatu QDs-guanina wykazuje maksimum przy 540 nm, czyli w zakresie zbliżonym do maksimum pasma absorpcji obserwowanego dla AuNP-cytozyna. Wskazuje to, iż CdTe QDs i AuNPs mogą z powodzeniem pełnić rolę pary donor-akceptor energii. Wyniki analizy elementarnej potwierdziły stabilizację kropek kwantowych kwasem tioglikolowym (TGA) i nanocząstek złota 3-merkapto-1-propanosulfonianem sodu (3MPS) (obecność S w analizowanym materiale). W otrzymanych materiałach QDs-guanina i AuNPs-cytozyna potwierdzono obecność azotu, co świadczy o efektywnym przyłączeniu guaniny i cytozyny. Do obrazowania morfologii QDs, QDs-guanina, AuNPs i AuNPs-cytozyna wykorzystano mikroskopię sił atomowych (AFM), transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) i wysokorozdzielczą transmisyjną mikroskopię elektronowa (HRTEM). Badania te potwierdziły nanometryczne rozmiary QDs, AuNPs (około 3 nm) i koniugatów (około 4 nm). Zastosowanie techniki FTIR umożliwiło ustalenie natury grup funkcyjnych obecnych w analizowanych związkach. Stosując spektroskopię XPS określono skład powierzchniowy badanych układów.

Potwierdzono, iż oddziaływania pomiędzy komplementarnymi parami zasad cytozyną i guaniną zapewniają osiągnięcie między QDs (donor) i AuNPs (akceptor) odległości optymalnej dla wystąpienia FRET. Na podstawie danych otrzymanych przy użyciu techniki AFM wykazano, że rozmiar układu QDs-guanina-AuNP–cytozyna wynosi około 7 nm. Wykazano, że obecność w układzie wolnych cząsteczek guaniny wpływa na oddziaływana pomiędzy koniugatami, co w efekcie prowadzi do zależnych od stężenia guaniny zmian w efektywności zachodzenia FRET skutkujących wzrostem intensywności fluorescencji kropek kwantowych. Uzyskany układ sensoryczny został również poddany badaniom pozwalającym na dokonanie oceny jego selektywności poprzez śledzenie oddziaływań

z niekomplementarnymi zasadami azotowymi. Zaobserwowano, że adenina i tymina nie miały istotnego wpływu na intensywność fluorescencji.

Możliwość praktycznego wykorzystania otrzymanych biosensorów sprawdzono w warunkach symulowanego sztucznego moczu. Wykazano wzrost intensywności fluorescencji QDs-guanina w układzie QDs-guanina-AuNP–cytozyna w obecności wolnej guaniny. Stwierdzono, że odpowiedź układu jest liniowo zależna od stężenia komplementarnej zasady azotowej. Stosując tyminę jako model cząsteczki niekomplementarnej potwierdzono selektywność opracowanego układu.

## STRESZCZENIE

W ramach niniejszej pracy doktorskiej otrzymano i scharakteryzowano nowe nanostrukturalne fluorescencyjne materiały bazujące na kropkach kwantowych tellurku kadmu (CdTe QDs) sfunkcjonalizowanych zasadami azotowymi potencjalnie przydatne do konstrukcji biosensorów. Otrzymano kropki kwantowe tellurku kadmu stabilizowane kwasem tioglikolowym (TGA), a także serię koniugatów CdTe-tymina. Analiza elementarna i FTIR potwierdziły kowalencyjne przyłączenie kwasu tioglikolowego do QDs, a także efektywne przyłączenie tyminy do powierzchni QDs. Analiza przeprowadzona techniką XPS dostarczyła informacji o składzie chemicznym QDs i koniugatu QDs-tymina. Potwierdzono stabilizację CdTe QDs kwasem tioglikolowym, który zawiera tlen, siarkę i węgiel, a także zaobserwowano, iż w przypadku koniugatu CdTe-tymina pojawia się nowy pik N 1s z maksimum przy energii wiązania równej 400 eV. Struktura krystaliczna materiałów została określona techniką dyfraktometrii rentgenowskiej. Analiza dyfraktogramów materiałów umożliwiła przypisanie charakterystycznych płaszczyzn dyfrakcyjnych (111), (220) i (311) należących do struktury blendy kubiczno cynkowej. Morfologia otrzymanych materiałów została scharakteryzowana techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) w normalnym i wysokorozdzielczym trybie (HRTEM), a także techniką mikroskopii sił atomowych (AFM). W przypadku obu materiałów uzyskane obiekty charakteryzują się tendencją do agregacji. W przypadku materiału CdTe-tymina zaobserwowano większą tendencję do tworzenia agregatów. Na podstawie zdjęć HRTEM określono średnie rozmiary CdTe QDs i koniugatu CdTe-tymina, które wynoszą odpowiednio 3-4 nm i 5-6 nm, co koreluje z rozmiarami uzyskanymi techniką AFM (2,5±0,5 nm dla QDs i około 3,4±0,6 nm dla koniugatu). Techniką spektroskopii UV-Vis i spektrofluorymetrii wykazano, iż oba materiały charakteryzują się typowym dla tego rodzaju nanocząstek szerokim pasmem absorpcyjnym, a także wąskim pasmem emisji z maksimum przy około 540 nm. Dodatkowo analizując widma fluorescencyjne koniugatów CdTe-tymina otrzymanych dla różnych stosunków molowych CdTe:tymina stwierdzono, iż intensywność fluorescencji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia tyminy, jednakże nie w sposób monotoniczny. Dzięki przeprowadzonym analizom zaproponowano mechanizm oddziaływań kropka kwantowa -zasada azotowa – tymina. W kolejnym etapie badań wykazano, że fluorescencja otrzymanego koniugatu ulega znacznemu wzmocnieniu w obecności komplementarnej zasady azotowej – adeniny jak również nukleozydu - adenozyny zawierającego jednostkę komplementarną w stosunku do tyminy. Efekt wzmocnienia fluorescencji QDs-tymina wzrasta wraz ze wzrostem stężania zasady azotowej i nukleozydu. W obecności

niekomplementarnych zasad azotowych lub nukleozydów następuje wygaszenie fluorescencji koniugatu CdTe-tymina lub jego intensywność nie ulega zmianie. Wykazano również, że koniugat ten posiada zdolność do selektywnej detekcji zmodyfikowanych związków adenozyny czyli związków zawierających w swojej strukturze adeninę - 2'-deoksyadenozyny (2'-dA) i 5'-deoksy-5'-(metylotio)adenozyny (MTA). Związki te są szczególnie istotne z punktu widzenia potencjalnych zastosowań biomedycznych otrzymanych materiałów. Są one biomarkerami wielu groźnych chorób, w tym nowotworów (występują w zwiększonym stężeniu w moczu pacjentów onkologicznych), choroby Alzheimera, niedoboru deaminazy adenozynowej (ang. ADA) oraz alkoholowego zespołu płodowego (ang. FASD). Eksperymenty przeprowadzone w sztucznym moczu wykazały, że także i w tym złożonym układzie, otrzymane materiały również wykazują selektywność względem komplementarnej zasady azotowej jak i nukleozydu zawierającego komplementarną jednostkę.

Dodatkowo, wykazano iż koniugat QDs-guanina w sposób selektywny pozwala na detekcję zarówno komplementarnej zasady azotowej – cytozyny, jak i nukleozydu – cytydyny. Prowadzone pomiary fluorescencji pozwoliły stwierdzić, iż intensywność fluorescencji koniugatu CdTe–guanina wzrasta wraz ze stężeniem komplementarnej zasady azotowej jak i nukleozydu. Co więcej, wykazano że koniugat ten posiada zdolność do selektywnej detekcji komplementarnych nukleozasad/nukleozydów w warunkach sztucznego moczu.

W drugiej części niniejszej rozprawy zaprezentowano badania mające na celu otrzymanie oraz określenie właściwości fizykochemicznych i luminescencyjnych nowych fluorescencyjnych układów sensorowych opartych na sfunkcjonalizowanych zasadami azotowymi kropkach kwantowych (QDs) oraz funkcjonalizowanych komplementarną zasadą nanocząstkach złota (AuNPs) wykorzystujących zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET, ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer). Badania wykonane technikami analizy elementarnej i FTIR potwierdziły efektywne utworzenie koniugatów CdTe-guanina i AuNPs-cytozyna. Opracowano efektywne procedury otrzymywania obu koniugatów. Analiza składu chemicznego powierzchni badanych materiałów wykonana techniką XPS potwierdziła stabilizację QDs kwasem tioglikolowymi oraz stabilizację AuNPs przy użyciu 3-merkapto-1-propanosulfonianu sodu, a także efektywne przyłączenie odpowiednich zasad azotowych do obu typów nanoczastek. Analizy zarówno mikrofotografii wykonanych technikami transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM i HRTEM) jak i obrazów uzyskanych przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM)

dostarczyły informacji o zmianach wielkości nanocząstek (QDs i AuNPs) wynikających z ich koniugacji biocząsteczkami. Rozmiary AuNPs wynoszą 3,0±0,3 nm, koniugatu AuNPs-cytozyna około 3,8±0,3 nm, CdTe QDs 3,0±0,2 nm i koniugatu QDs-guanina około 3,6±0,4 nm. Analiza właściwości spektroskopowych koniugatów QDs-guanina i AuNP-cytozyna sugeruje, iż mogą one pełnić rolę odpowiednio rolę donora i akceptora energii (widmo fluorescencji dla koniugatu QDs-guanina wykazuje maksimum przy 540 nm, która jest zbliżona do maksimum absorpcji dla AuNP-cytozyna). Obrazy AFM uzyskane dla układu QDs-guanina-AuNP-cytozyna wskazują, że odległość pomiędzy donorem a akceptorem, jest optymalna dla wystąpienia efektywnego przeniesienia energii wg. mechanizmu FRET. Zasadniczą częścią tego etapu pracy były badania prowadzone nad nowym układem sensorycznym wykorzystującym rezonansowe przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji (FRET) w układzie donor-akceptor (QDs-guanina – AuNPs-cytozyna). Zaobserwowano iż, w układzie QDs-guaniną i AuNPs-cytozyna, fluorescencja QDs jest gwałtownie wygaszana przez AuNPs na skutek przeniesienie energii wzbudzenia. Prowadzone pomiary fluorescencji w układzie: QDs-guanina i AuNPs-cytozyna, w obecności zmiennych stężeń analitu - wolnych cząsteczek guaniny wykazały, iż guanina oddziałuje z koniugatem AuNPs-cytozyna i tworzy kompleksy AuNPs-cytozyna-guanina (powstawanie tego układu potwierdzono techniką analizy elementarnej), co prowadzi do ograniczenia interakcji pomiędzy QDs-guanina i akceptorem energii AuNPs-cytozyna i w rezultacie skutkuje wzrostem intensywności fluorescencji. Uzyskany materiał sensorowy został również poddany badaniom pozwalającym na ocenę jego selektywności. Śledzenie oddziaływań z komplementarną zasadą azotową – guaniną i modelową niekomplementarną zasadą azotową – tyminą w warunkach symulowanego sztucznego moczu potwierdziły, iż otrzymany biosensor reaguje na zmiany jedynie w przypadku zmian stężenia guaniny, komplementarnej w stosunku do cytozyny zasady azotowej.

W wyniku realizacji badań zaplanowanych w ramach pracy doktorskiej zostały otrzymane i scharakteryzowane nowe koniugaty typu kropki kwantowe – zasady purynowe/pirymidynowe umożliwiające selektywną detekcję komplementarnych zasad azotowych/nukleozydów. Przeprowadzone badania fizykochemiczne pozwoliły określić wpływ różnych czynników na właściwości luminescencyjne układów QDs-biomolekuła. Możliwość praktycznego wykorzystania otrzymanych materiałów do konstrukcji biosensorów została zweryfikowana przy użyciu modelowej cieczy fizjologicznej. Przeprowadzone badania dostarczyły nowej wiedzy dotyczącej nanostrukturalnych fotoaktywnych materiałów

hybrydowych bazujących na QDs i zasadach azotowych, potencjalnie przydatnych do konstrukcji biosensorów.

## Dorobek naukowy

**Spis publikacji Autorki pracy doktorskiej:**

1. Ł. Rodzik-Czałka, J. Lewandowska-Łańcucka, V. Gatta, I. Venditti, I. Fratoddi, M. Szuwarzyński, M. Romek, M. Nowakowska, Nucleobases functionalized quantum dots and gold nanoparticles bioconjugates as a fluorescence resonance energy transfer (FRET) system – Synthesis, characterization and potential applications, Journal of Colloid and Interface Science, 2018, 514, 479-490.

2. Ł. Rodzik, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Szczubiałka, M. Szuwarzyński, M. Nowakowska, Novel fluorescent CdTe quantum dot-thymine conjugate-synthesis, properties and possible application, Nanotechnology, 2017, 28(4):045701.

3. Ł. Rodzik-Czałka, J. Lewandowska-Łańcucka, M. Nowakowska, Thymine modified CdTe quantum dots for direct nucleobases quantification in simulated urine conditions, (w trakcie przygotowania).

4. J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, Ł. Rodzik, M. Kozieł, M. Nowakowska, Bioactive hydrogel-nanosilica hybrid materials: a potential injectable scaffold for bone tissue engineering, Biomed. Mater. 2015, 0, 1-17.

5. J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, Ł. Rodzik, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, Novel hybrid materials for preparation of bone tissue engineering scaffolds, J. Mater Sci: Mater Med, 2015, 26:231, 1-15.

**Projekty naukowe:**

**Kierownik projektu** Preludium 11, Narodowe Centrum Nauki, 17.03.2017-16.03.2018.
Tytuł projektu: Fluorescencyjne biosensory oparte na kropkach kwantowych i zasadach purynowych/pirymidynowych - synteza, właściwości i potencjalne zastosowanie, (2016/21/N/ST5/00883).

**Zgłoszenie patentowe:**

„Nanorozmiarowy czujnik jonów rtęci i sposób jego otrzymywania oraz sposób wykrywania jonów $Hg^{2+}$", Krzysztof Szczubiałka, Maria Nowakowska, Joanna Lewandowska-Łańcucka, Agnieszka Iwanowska, Magdalena Wytrwał-Sarna, Łucja Rodzik, Wydział Chemii UJ, UPRP, 10 października 2017, zgłoszenie nr P423126.

**Staże naukowe:**

1. Staż zagraniczny na Wydziale Chemii La Sapienza University Rzym, Włochy, luty 2015.
2. Szkoła letnia 9th International Summer Schools on Nanosciences & Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine (ISSON15), Saloniki, Grecja, 04-11.07.2015.

**Spis wystąpień konferencyjnych Autorki pracy doktorskiej:**

1. 2nd Global Congress & Expo on Materials Science and Nanoscience, Walencja, Hiszpania, 25-27.09.2017, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
   Hybrid materials based on magnetic and non-magnetic nanoparticles for imaging and tissue repair.
   S. Fiejdasz, J. Lewandowska-Łańcucka, **Ł. Rodzik**, W. Prendota, C. Kapusta, S. Zapotoczny, M. Nowakowska

2. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Ateny, Grecja, 4-8.09.2017, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.

Novel fluorescent biosensor for nucleobases/nucleosides detection based on CdTe QDs-thymine conjugate.

**Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, M. Szuwarzyński, K. Szczubiałka, M. Nowakowska

3. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Ateny, Grecja, 4-8.09.2017, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
   FRET-based biosensor for selective and sensitive detection of nucleobases based on CdTe quantum dots-guanine and gold nanoparticles-cytosine conjugates.
   **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, V. Gatta, I. Venditti, I. Fratoddi, M. Romek, M. Nowakowska

4. ICANM 2017: International Conference & Exhibition on Advanced & Nano Materials, Toronto, Kanada, 7-9.08.2017, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **prezentacja ustna**.
   CdTe QDs-thymine Conjugate based Fluorescence Biosensor for Sensitive Determination of Nucleobases/Nucleosides.
   **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Szczubiałka, M. Nowakowska

5. 18$^{th}$ JCF-Frühjahrssymposium Kiel, Niemcy, 16-19.03.2016, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
   Quantum Dot – guanine and Gold Nanoparticles – cytosine as a complex biosensor based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).
   **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, V. Gatta, I. Venditti, I. Fratoddi, M.V. Russo, M. Nowakowska

6. Suspensions – designing, synthesis, properties, application (SUSPENS), Kraków, Polska, 25.09.2015, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
   Synthesis and characterization of thymine-conjugated CdTe quantum dots.
   **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Szczubiałka, M. Nowakowska

7. 27th European Conference on Biomaterials, Kraków, Polska, 30.08-03.09.2015, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **prezentacja ustna**.

Novel bioactive hydrogel – nanosilica hybrid materials as a potential injectable scaffold for bone tissue engineering.
J. Lewandowska-Łańcucka , S. Fiejdasz, **Ł. Rodzik**, M. Kozieł, M. Nowakowska

8. GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2015, Drezno, Niemcy, 30.08-02.09.2015, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
   Synthesis and photoluminescence properties of a novel conjugates based on water – soluble CdTe quantum dots and thymine and their application as a potential fluorescent sensors.
   **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Szczubiałka, M. Nowakowska

9. The 17th JCF – Frühjahrssymposium Münster, Niemcy, 25-28.03.2015, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
   Synthesis and characterization of cysteamine-stabilized CdTe and its thymine-acetic acid bioconjugates and their application as a potential fluorescent sensors.
   **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Szczubiałka, M. Nowakowska

10. Nanostructural Thin Films and Capsules Workshop, Kraków, Polska, 24.10.2014 konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
    Synthesis and photoluminescence properties of a novel conjugates based on water – soluble CdTe quantum dots and purines/pyrimidines and their application as a potential fluorescent sensors.
    **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Szczubiałka, M. Nowakowska

11. Fifth Young European Scientists Workshop, Kraków, Polska, 07-11.09.2014 konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
    Synthesis and characterization of a novel conjugates based on thiol-stabilized CdTe quantum dots and purines/pyrimidines and their application as a potential fluorescent sensors.
    **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, M. Nowakowska

12. The 16-th International Conference-School ADVANCED MATERIALS AND TECHNOLOGIES, Palanga, Litwa, 27-31.08.2014, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.

Novel conjugates based on thiol-stabilized CdTe quantum dots and purines/pyrimidines as a potential fluorescent sensors - synthesis and characterization.
**Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, M. Nowakowska

13. Silesian meetings on polymer materials POLYMAT60, 60 Years of Centre of Polymer and Carbon Materials Polish Academy of Sciences, Zabrze, Polska, 30.06-1.07.2014, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
    Characterization of bioactive hybrid materials based on silica nanoparticles and biopolymers for bone tissue engineering.
    **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, M. Kozieł, M. Nowakowska

14. 16th JCF-Fruhjahrssymposium, Jena, Niemcy, 26-29.03.2014, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
    Bioactive scaffolds based on silica nanoparticles and natural polymers for bone tissue engineering applications.
    **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, M. Kozieł, M. Nowakowska

15. Workshop on Polymeric Nanostructural Systems Kraków, Polska, 29.11.2013, konferencja międzynarodowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
    Preparation of the hybrid materials – silica nanoparticles in biopolymer based hydrogels as a potential scaffold for tissue repair.
    **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, M. Kozieł, M. Nowakowska

16. IV Ogólnopolska Studencka Konferencja Nowoczesne Metody Doświadczalne w fizyce, chemii i inżynierii, Lublin, Polska, 22-24.11.2013, konferencja krajowa, rodzaj wystąpienia - **poster**.
    Układy hybrydowe – materiały krzemionkowe w hydrożelach kolagenowych i chitozanowych jako potencjale podłoże do hodowli komórek kostnych.
    **Ł. Rodzik**, J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, M. Kozieł, M. Nowakowska

**Stypendia naukowe:**

Stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych na Uniwersytecie Jagiellońskim adresowane do 30% najlepszych doktorantów na danym roku

studiów doktoranckich Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ – na kierunku biofizyka, 2017/2018.

Stypendium dla najlepszych doktorantów adresowane do 10% doktorantów danego roku studiów doktoranckich Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ – na kierunku biofizyka, 2017/2018.

Stypendium dla najlepszych doktorantów adresowane do 10% doktorantów danego roku studiów doktoranckich Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ – na kierunku biofizyka, 2015/2016.

## BIBLIOGRAFIA


[1] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd edition, Spronger Science-Business Media LLC, New York, USA, **2006**.

[2] K. Pigoń, Z. Ruziewicz, Chemia Fizyczna, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, **1980**.

[3] D. Yanga, S. Xua, Q. Chenc, Y. Wang, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2008**, 32, 938–943.

[4] G. Tang, L. Du, X. Su, *Food Chemistry*, **2013**, 141, 4060–4065.

[5] K.F. Chou, A.M. Dennis, *Sensors*, **2015**, 15, 13288-13325.

[6] Y. Zhang, T.-H. Wang, *Theranostics*, **2012**, 2, 631–654.

[7] W.R. Algar, U.J. Krull, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 1609–1618.

[8] J. Li, H. Qi, H. Wang, Z. Yang, P. Zhu, G. Dia, *Microchim. Acta*, **2014**, 181, 1109-1115.

[9] G. Qin, S. Zhao, Y. Huang , J. Jiang , Y.-M. Liu, *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 46, 119–123.

[10] I. Venditti , L. Fontana, I. Fratoddi, C. Battocchio, C. Cametti, S. Sennato, F. Mura, F. Sciubba, M. Delfini, M.V. Russo, *J. Colloid Interf. Sci*., **2014**, 418, 52–60.

[11] I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, M.V. Russo, *Nano Research*, **2015**, 8, 1771-1799.

[12] J. Zhang, C. Li, W. Zhao, B. Liu, Y. Liu, G. Aletan, *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications*, Prof. Pier Andrea Serra (Ed.), **2011**, ISBN: 978-953-307-448-1, InTech.

[13] A.M. Smith, H. Duan, A.M. Mohs, S. Nie, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, 60, 1226–1240.

[14] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater*., **2005**, 4, 435–446.

[15] A. M. Smith, S. Nie, *Acc. Chem. Res.*, **2010**, 43, 190–200.

[16] R.G. Xie, X.G. Peng, *J. Am. Chem. Soc*., **2009**, 131, 10645–10651.

[17] J.H. Warner, A. Hoshino, K. Yamamoto, R.D. Tilley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44 4550–4554.

[18] Y. Yin, A.P. Alivisatos, *Nature*, **2005**, 437, 664–670.

[19] A.L. Rogach, T. Franzl, T.A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmueller, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 14628–14637.

[20] L. Qu, Z.A. Peng, X. Peng, *Nano Lett*., **2001**, 1, 333–337.

[21] X. Peng, M.C. Schlamp, A.V. Kadavanich, A.P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7019–7029.

[22] J.J. Li, Y.A. Wang, W. Guo, J.C. Keay, T.D. Mishima, M.B. Johnson, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc*., **2001**, 123, 12567–12575.

[23] S.F. Lee, M.A. Osborne, *Chem. Phys. Chem*., **2009**, 10, 2174–2191.

[24] L. Shao, Y. Gao, F. Yan, *Sensors*, **2011**, 11, 11736-11751.

[25] B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M.G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 9463.

[26] W.C. Chan, S. Nie, *Science*, **1998**, 281, 2016-2018.

[27] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25, 207-218.

[28] W.R. Algar, A.J. Tavares, U.J. Krull, *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 673, 1–25.

[29] S. Tope, S. Saudagar , N. Kale, S. Khambayat, K. Bhise, *The Pharma Innovation – Journal*, **2014**, 2, 86-105.

[30] D. Bera, L. Qian, T.K. Tseng, P.H. Holloway, *Materials*, **2010**, 3, 2260–2345.

[31] D. Vasudevan, R.R. Gaddam, A. Trinchi, I. Cole, *J. Alloys Compd.*, **2015**, 636, 395–404.

[32] S.A. Ziaudeen, R.R. Gaddam, P.K. Pallapothu, M.K. Sugumar, J. Rangarajan, *J. Nanophotonics*, **2013**, 7, 073075.

[33] P. Reiss, M. Protiere, L. Li, *Small*, **2009**, 5, 154–168.

[34] Y.W. Cao, U. Banin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1999**, 38, 3692–3694.

[35] A. Mews, A. Eychmüller, M. Giersig, D. Schooss, H. Weller, *J. Phys. Chem*., **1994**, 98, 934–941.

[36] D. Battaglia, J.J. Li, Y. Wang, X. Peng, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 5035–5039.

[37] X. Zhong, R. Xie, Y. Zhang, T. Basché, W. Knoll, *Chem. Mater*., **2005**, 17, 4038–4042.

[38] H. Kim, M. Achermann, L.P. Balet, J.A. Hollingsworth, V.I. Klimov, *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, 127, 544–546.

[39] A.L. Efros, A.L. Efros, *Sov. Phys. Semicond*., **1982**, 16, 772–775.

[40] A.I. Ekimov, A.A. Onushchenko, *Sov. Phys. Semicond*., **1982**, 16, 775–778.

[41] P. Bhattacharya, S. Ghosh, A.D. Stiff-Roberts, *Annu. Rev. Mater. Res.*, **2004**, 34, 1–40.

[42] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc*., **1993**, 115, 8706.

[43] Z.A. Peng, X.G. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 183.

[44] A. Rogach, A. Kornowski, M. Gao, A. Eychmiiller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 3065.

[45] J. Guo, W. Yang, C. Wang, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 17467.

[46] H. Zhang, L. Wang, H. Xiong, L. Hu, B. Yang, W. Li, *Adv. Mater*., **2003**, 15, 1712.

[47] L.O. Cinteza, *Journal of Nanophotonics*, **2010**, 4, 042503.

[48] L. Manna, E.C. Scher, L.S. Li, A.P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 7136-7145.

[49] B.C. Hess, I.G. Okhrimenko, R.C. Davis, B.C. Stevens, Q.A. Schulzke, K.C. Wright, C.D. Bass, C.D. Evans, S.L. Summers., *Phys. Rev. Lett.*, **2001**, 86, 3132-3135.

[50] J.A. Kloepfer, R.E. Mielke, J.L. Nadeau, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71, 2548-2557.

[51] J.E.B. Katari, V.L. Colvin, A.P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 4109-4117.

[52] A.R. Clapp, I.L. Medintz, H. Mattoussi, *Chem. Phys. Chem.*, **2006**, 16, 47-57.

[53] C. Graf, S. Dembski, A. Hofmann, E. Ruhl, *Langmuir*, **2006**, 20, 5604-5610.

[54] X. Gao, Y. Cui, R.M. Levenson, L.W. Chung, S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22, 969-976.

[55] Q. Wang, Y. Kuo, Y. Wang, G. Shin, C. Ruengruglikit, Q. Huang, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 31, 16860-16866.

[56] B.A. Kairdolf, M.C. Mancini, A.M. Smith, S. Nie, *Anal. Chem.*, **2008**, 15, 3029-3034.

[57] N.T.K. Thanha, L.A.W. Green, *NANO Today*, **2010**, 5, 213-230.

[58] H. Li, W.Y. Shih, W.H. Shih, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2010**, 49, 579–582.

[59] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, *Phys. Chem. Chem. Phys*, **1999**, 12, 2887 – 3057.

[60] C.M. Lukehart, R.A. Scott, Nanomaterial Inorganic and Bioinorganic Perspective, WILEY, **2013**, 512-513.

[61] J. Li, N. Wu, Biosensors Based on Nanomaterials and Nanodevices, CRC Press, **2017**.

[62] M.A. Walling, J.A. Novak, J.R. Shepard, *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, 10, 441-491.

[63] M. Akin, R. Bongartz, J.G Walter, D.O. Demirkol, F. Stahl, S. Timur, T. Scheper, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 11529-11536.

[64] P. Wu, Y. He, H.F. Wang, X.P. Yan, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 1427–1433.

[65] X. Ji, J. Zheng, J. Xu, V.K. Rastogi, T.C. Chen, J.J. DeFrank, R.M. Leblanc, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 3793–3799.

[66] E.R. Goldman, I.L. Medintz, J.L. Whitley, A. Hayhurst, A.R. Clapp, H.T. Uyeda, J.R. Deschamps, M.E. Lassman, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 6744–6751.

[67] S. Pathak, M.C. Davidson, G.A. Silva, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 1839–1845.

[68] H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12142–12150.

[69] I.L. Medintz, A.R. Clapp, H. Mattoussi, E.R. Goldman, B. Fisher, J.M. Mauro, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 630–638.

[70] M. Ikanovic, W.E. Rudzinski, J.G. Bruno, A. Allman, M.P. Carrillo, S. Dwarakanath, S. Bhahdigadi, P. Rao, J.L. Kiel, C.J. Andrews, *J. Fluoresc.*, **2007**, 17, 193–199.

[71] D. Zhou, J.D. Piper, C. Abell, D. Klenerman, D.J. Kang, L. Ying, *Chem. Commun.*, **2005**, 0, 4807–4809.

[72] J.H. Kim, D. Morikis, M. Ozkan, *Sens. Actuators B*, **2004**, 102, 315–319.

[73] Q. Wei, M. Lee, X. Yu, E.K. Lee, G.H. Seong, J. Choo, Y.W. Cho, *Anal. Biochem.*, **2006**, 358, 31–37.

[74] M.M.C. Sun, K.S. Beam, C.G. Cerveny, K.J. Hamblett, R.S. Blackmore, M.Y. Torgov, F.G.M. Handley, W.C. Ihle, P.D. Senter, S.C. Alley, *Bioconjug. Chem.*, **2005**, 16, 1282–1290.

[75] B. Barat, S.J. Sirk, K.E. McCable, J. Li, E.J. Lepin, R. Remenyi, A.L. Koh, T. Olafsen, S.S. Gambhir, S. Weiss, A.M.Wu, *Bioconjug. Chem.*, **2009**, 20, 1474–1481.

[76] M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Analyst*, **2008**, 133, 444–447.

[77] Thermo Scientific: Pierce Protein Research Products, EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride, http://piercenet.com/ Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=02030312, **2010**.

[78] K.E. Sapsford, T. Pons, I.L. Medintz, S. Higashiya, F.M. Brunel, P.E. Dawson, H. Mattoussi, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 11528–11538.

[79] E.R. Goldman, I.L. Medintz, A. Hayhurst, G.P. Anderson, J.M. Mauro, B.L. Iverson, G. Georgiou, H. Mattoussi, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 534, 63–67.

[80] M.G. Sandros, D. Gao, C. Gokdemir, D.E. Benson, *Chem. Commun.*, **2005**, 22, 2832–2834.

[81] I.L. Medintz, J.H. Konnert, A.R. Clapp, I. Stanish, M.E. Twigg, H. Mattousssi, J.M. Mauro, J.R. Deschamps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, 101, 9612–9617.

[82] I.L. Medintz, L. Berti, T. Pons, A.F. Grimes, D.S. English, A. Alessandrini, P. Facci, H. Mattoussi, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 1741–1748.

[83] L. Berti, P.S. D'Agostino, K. Boeneman, I.L. Medintz, *Nano Res*., 2009, 2, 121–129.

[84] R. Gill, I. Willner, I. Shweky, U. Banin, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 23715–23719.

[85] E.R. Goldman, E.D. Balighian, H. Mattoussi, M.K. Kuno, J.M. Mauro, P.T. Tran, G.P. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6378–6382.

[86] T.Q. Vu, R. Maddipati, T.A. Blute, B.J. Nehilla, L. Nusblat, T.A. Desai, *Nano Lett.*, **2005**, 5, 603–607.

[87] D.S. Lidke, P. Nagy, R. Heintzmann, D.J. Arndt-Jovin, J.N. Post, H.E. Grecco, E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, *Nat. Biotechnol*,. **2004**, 22, 198–203.

[88] C.Y. Zhang, H.C. Yeh, M.T. Kuroki, T.H. Wang, *Nat. Mater*., **2005**, 4, 826–831.

[89] S. Chattopadhaya, L.P. Tan, S.Q. Yao, *Nat. Protocol*, **2006**, 1, 2386–2398.

[90] S.M. Borisov, O.S. Wolfbeis, *Chem. Rev.*, **2008,** 108, 423–461.

[91] K.E. Sapsford, T. Pons, I.L. Medintz, H. Mattoussi, *Sensors*, **2006**, 6, 925–953.

[92] M. Tomasulo, I. Yildiz, S.L. Kaanumalle, F.M. Raymo, *Langmuir*, **2006**, 22, 10284–10290.

[93] P.T. Snee, R.C. Somers, G. Nair, J.P. Zimmer, M.G. Bawendi, D.G. Nocera, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 13320–13321.

[94] H. Li, Y. Zhang, X. Wang, Z. Gao, *Microchim. Acta*, **2008**, 160, 119–123.

[95] Y. Chen, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 5132–5138.

[96] X. Wang, M.J. Ruedas-Rama, E.A.H. Hall, *Anal. Lett.* **2007**, 40, 1497–1520.

[97] A.C. Vinayaka, S. Basheer, M.S. Thakur, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24, 1615–1620.

[98] E.R. Goldman, E.D. Balighian, M.K. Kuno, S. Labrenz, P.T Tran, G.P. Anderson, J.M. Mauro, H. Mattoussi, *Phys. Stat. Sol. B*, **2002**, 229, 407–414.

[99] L. Wang, J. Song, S. Liu, C. Hao, N. Kuang, Y. He, *J. Colloid Interf. Sci.*, **2015**, 457, 162–168.

[100] L. Li, Y. Lu, Y. Ding, F. Zhang, Y. Wang, *Can. J. Chem.*, **2012**, 90, 173-179.

[101] A. Poma, H. Brahmbhatt, J.K. Watts, N.W. Turner, *Macromolecules*, **2014**, 47, 6322-6330.

[102] K. Wybrańska, W. Niemiec, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, Y. Morishima, *Chem. Mater*., **2010**, 22, 5392-5399.

[103] M. Monajjemia, B. Chahkandi, *J. Mol. Struc-Theochem*., **2005**, 714, 43–60.

[104] Chemia medyczna pod redakcją Iwony Żak, Śląska Akademia Medyczna, Katowice **2001**.

[105] A. Pietrzyk, S. Suriyanarayanan, W. Kutner, R. Chitta, M.E. Zandler, F. D'Souza, *Biosens. Bioelectron*., **2010**, 25, 2522.

[106] M.M. Ardakani, Z. Taleat, H. Beitollahi, M. Salavati-Niasari, B.B.F. Mirjalili, N. Taghavinia, *J. Electroanal. Chem*., **2008**, 624, 73-78.

[107] D.B. Hall, S.O. Kelley, J.K. Barton, *Biochemistry*, **1998**, 37, 15933.

[108] J.M. Zen, M.R. Chang, G. Ilangovan, *Analyst*, **1999**, 124, 679.

[109] S. Ren, H. Wang, H. Zhang, L.Yu, M. Li, M. Li, *J. Electroanal. Chem.*, **2015**, 750, 65–73.

[110] D.P. Griffith, D.M. Musher, *C. Itin, Invest. Urol*. **1976**, 13, 346.

[111] M.A. Jhonsi, R. Renganathan, *J. Colloid Interf. Sci*., **2010**, 344, 596–602.

[112] Y. Zhang, L. Mi, P.-N. Wang, J. Mab, J.-Y. Chen, *J. Luminescence*, **2008**, 128, 1948–1951.

[113] M.S. Abd El-sadek, S.M. Babu, *Physica B*, **2010**, 405, 3279–3283.

[114] X. Feng, Q. Shang, H. Liu, W. Wang, Z. Wang, J. Liu, *J. Luminescence*, **2010**, 130, 648-653

[115] J.S. Singh, *J. Mol. Struct*., **2008**, 876, 127-133.

[116] Z. Han, L. Wang, J. Zhu, S. Zhang, W. Zhou, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2011**, 122, 43-49.

[117] Z. Li, W. Xu, Y. Wang, B.R. Shah, Ch. Zhang, Y. Chen, Y. Li, B. Li, *Carbohydr. Polym.*, **2015**, 121, 477-485.

[118] J. Khatei, K.S.R. Koteswara Rao, *Mater. Chem. Phys.*, **2011**, 130, 159-164.

[119] Y. Huang, J. Liu, Y. Yu, S. Zuo, *J. Alloys Compd.*, **2015**, 647, 578-584.

[120] S.M. Silaghi, Optical Characterisation of DNA Bases on Silicon Surfaces (*PhD thesis*), **2005**.

[121] C. Jiang, Z. Shen, C. Luo, H. Lin, R. Huang, Y. Wang, H. Peng, *Talanta*, **2016**, 155, 14–20.

[122] F. Zhang, X.-Q. Kong, Q. Li, T.-T. Sun, C. Chai, W. Shen, Z.-Y. Hong, X.-W. He,

W.-Y. Li, Y.-K. Zhang, *Talanta*, **2016**, 148, 108–115.

[123] L. Qu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc*., **2002**, 124, 2049-2055.

[124] M. Kępczyński, J. Bednar, J. Lewandowska, M. Staszewska, M. Nowakowska, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2009**, 9, 3138–3143.

[125] N. Gaponik, D.V. Talapin, A.L. Rogach, K. Hoppe, E.V. Shevchenko, A. Kornowski, A. Eychmüller, H.J. Weller, *Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 7177–7185.

[126] X. Feng, Q. Shang, H. Liu, H. Wang, W. Wang, Z. Wang, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113 6929-6935.

[127] J. Li, J.B. Xia, *Phys. Rev. B*, **2000**, 61, 15880.

[128] Al L. Efros, M. Rosen, M. Kuno, M. Nirmal, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *Phys. Rev. B*, **1996**, 54, 4843

[129] A. Franceschetti, S.T. Pantelides, *Phys. Rev. B*, **2003**, 68, 033313.

[130] A. Bagga, P.K. Chattopadhyay, S. Ghosh, *Physical Review B*, **2006**,74, 035341.

[131] A. Di Garbo, *Biophys. Chem.*, **2016**, 208, 76-83.

[132] A. Mikulska, M. Inoue, K. Kuroda, A. Iwanowska, S.-I. Yusa, M. Nowakowska, K. Szczubiałka, *Eur. Polym. J.*, **2014**, 59, 230-238.

[133] P. Andreu-Pérez, J. Hernandez-Losa, T. Moliné, R. Gil, J. Grueso, A. Pujol, J. Cortés, M.A. Avila, J.A. Recio, *BMC Cancer*, **2010**, 10, 3-11.

[134] V.L. Chandraboss, B. Karthikeyan, S. Senthilvelan, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2015**, 17, 12100-12114.

[135] S. Chakraborty, S. Ganguly, G.R. Desiraju,. *Cryst. Eng. Comm*., **2014**, 16, 4732-4741.

[136] N.H. Jang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, 23, 1790-1800.

[137] H. Bessar, I. Venditti, L. Benassi, C. Vaschieri, P. Azzoni, G. Pellacani, C. Magnoni, E. Botti, V. Casagrande, A. Costanzo, L. Fontana, G. Testa, F.F. Mostafa, S.A. Ibrahim, M.V. Russo, I. Fratoddi, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **2016**, 141, 141–147.

[138] Y. Wang, N. Gan, Y. Zhou, T. Li, Y. Cao, Y. Chen, *Biosens. Bioelectron*., **2017**, 87, 508–513.