

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 21822

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*G01N 33/532* (2006.01)

*C01G 5/00* (2006.01)

*C01G 7/00* (2006.01)

*B82B 1/00* (2006.01)

*B82Y 15/00* (2011.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010 - 23645**  
(22) Přihlášeno: **17.12.2010**  
(47) Zapsáno: **24.02.2011**

(73) Majitel:

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Praha, CZ  
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha, CZ  
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha, CZ  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice, CZ

(72) Původce:

Šlouf Miroslav RNDr. Ph.D., Praha, CZ  
Šloufová Ivana RNDr. Ph.D., Praha, CZ  
Hozák Pavel Prof. RNDr. DrSc., Jesenice-Zdiměřice, CZ  
Nebesářová Jana Ing. CSc., Hluboká nad Vltavou, CZ

(74) Zástupce:

Středisko společných činností AV ČR, v.v.i.; Patentové a licenční služby, Národní  
1009/3, Praha 1, 11000

(54) Název užitého vzoru:

**Soubor tří vzájemně mikroskopicky rozlišitelných nanočástic se zlatým povrchem pro současné trojnásobné imuno značení**

CZ 21822 U1

## Soubor tří vzájemně mikroskopicky rozlišitelných nanočástic se zlatým povrchem pro současné trojnásobné imunoznačení

### Oblast techniky

5 Technické řešení se týká nového souboru vzájemně rozlišitelných nanočástic se zlatým povrchem, který umožní současné trojnásobné imunoznačení tří antigenů v biologických strukturách s vysokým rozlišením.

### Dosavadní stav techniky

#### Úvod a definice základních pojmů

10 Molekulární a buněčná biologie se v současnosti velmi dynamicky rozvíjí. Oba tyto úzce propojené obory objasňují podstatu fungování organismů a mají dlouhou řadu aplikačních výstupů, například v oblasti humánní a veterinární medicíny. Jedním z klíčových úkolů molekulární a buněčné biologie je odhalování složitých strukturně-regulačních vztahů mezi jednotlivými makromolekulami (zejména proteiny) v buňce.

15 K identifikaci a lokalizaci makromolekul v buněčných strukturách se používají tzv. protilátky (nejčastěji imunoglobuliny typu IgG), které specificky rozeznávají jednotlivé antigeny (obvykle právě proteiny). Je známa řada preparačních postupů, které umožňují navázání molekul protilátek/imunoglobulinů na hledané antigeny/proteiny v biologických strukturách. Na molekulu protilátky musí být navázána specifická značka, která je pomocí mikroskopických metod přímo viditelná. Identifikace a lokalizace antigenů pomocí protilátek se nazývá imunoznačení (immunolabeling) nebo též (ultra)strukturální diagnostika.

#### Světelná mikroskopie a její omezení

25 V případě světelné mikroskopie (metoda LSCM = Laser Scanning Confocal Microscopy) se na molekulu protilátky naváže jiná molekula - fluorescenční značka (fluorofor). Po dopadu světla vhodné vlnové délky emituje molekula fluoforu světelné záření charakteristické barvy. Kombinací různých fluoforů lze identifikovat zároveň více antigenů/proteinů. Metoda LSCM má však jedno zásadní omezení: fyzikální zákony omezují rozlišení na ~200 nm. Přitom právě makromolekulární komplexy, které jsou zodpovědné za hlavní buněčné děje, jako je čtení genetické informace nebo její zdvojování před buněčným dělením, mají velikost mezi 30 až 100 nm. Nezbytností je tedy zkoumání pomocí metod elektronové mikroskopie, jejichž rozlišení je v řádu jednotek nanometrů nebo lepší.

#### Elektronová mikroskopie a její omezení

35 V případě elektronové mikroskopie (metody TEM = Transmission Electron Microscopy, FEGSEM = Field Emission Gun Scanning Electron microscopy) se na molekulu protilátky naváže nanočástice zlata (Au) s rozměry v oblasti 5 až 15 nm. Vysoká elektronová hustota Au zajišťuje dobrou detekovatelnost částice na elektronových mikrofotografiích biologických preparátů. Uvedené rozměry nanočástic zajišťují současně dobré rozlišení (nanočástice jsou dostatečně malé) spolu s intenzivním značením (nanočástice jsou dostatečně lehké). V současnosti jsou komerčně dostupné sférické Au nanočástice o velikostech 5 až 20 nm s již navázanými protilátkami. Nanočástice lze v elektronovém mikroskopu rozeznat podle velikosti. V současnosti lze pomocí těchto komerčních nanočástic značit pouze dva antigeny/proteiny současně. Nanočástice totiž nutně mají jistou nenulovou šířku distribuce velikostí, takže při značení dvěma částicemi musí být rozdíl ve velikostech alespoň 5 nm. V případě ultratenkých biologických preparátů pro TEM značně klesá značící schopnost, pokud částice překročí velikost kolem 12 až 14 nm. V případě povrchů nebo lomových ploch, které lze u biologických preparátů pozorovat pomocí 45 FEGSEM sice značící schopnost s rostoucí velikostí nanočástic tolik neklesá, ale malé částice zpravidla nejsou na členitých površích dobře rozeznatelné, takže optimální velikost částic se pohybuje v rozmezí 10 až 20 nm.

### Nanočástice se zlatým povrchem pro imunoznačení

V současné době jsou pro imunoznačení komerčně dostupné pouze sférické zlaté nanočástice s velikostmi v rozsahu 5 až 20 nm. Zlatý povrch nanočástic má z hlediska imunoznačení dvě důležité velké výhody: (i) koloidní roztok zlatých nanočástic vykazuje velmi dobrou dlouhodobou stabilitu a (ii) na zlatý povrch se velmi dobře vážou protilátky prostřednictvím hydrofobních, iontových i kovalentních vazeb. Jiné druhy zlatých nanočástic s velikostí <15 nm a morfologií mikroskopicky odlišitelnou od sférické se podle dostupné literatury k imunoznačení nepoužívají. Syntéza vrstevnatých nanočástic AgAu se stříbrným jádrem a zlatou obalovou vrstvou byla již popsána, přičemž v klíčovém kroku syntézy, při kterém vznikají zlaté obaly stříbrných nanočástic, bylo použito redukčního činidla  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , takže průměrná velikost vrstevnatých částic, u nichž bylo ještě možno spolehlivě rozeznat stříbrné jádro, byla >15 nm. Navíc se částice vyznačovaly poměrně širokou distribucí velikostí [Smova-Sloufova I et al 2000 Langmuir 16, 9928-9935; Moskovits M et al. 2002 J. Chem. Phys. 116, 10435-10446], takže tyto nanočástice jsou nevhodné pro vícenásobné značení v TEM a FEGSEM.

### 15 Souhrn

V současné době je možno použít k lokalizaci makromolekul v buněčných strukturách metod světelné mikroskopie nebo elektronové mikroskopie. V případě světelné mikroskopie sice dosáhneme troj-, čtyř- i vícenásobného imunoznačení, ale ne už dostatečného rozlišení na úrovni desítek nanometrů [Heintzmann R et al. 2006 Breaking the resolution limit in light microscopy. Briefings in Functional Genomics and Proteomics. Vol. 5: 289-301]. V případě elektronové mikroskopie s komerčně dostupnými isometrickými zlatými nanočásticemi dosáhneme vyššího rozlišení, ale pouze dvojnásobného imunoznačení, tj. dokážeme značit jen dva typy molekul současně [Park K et al. 1989 Factors affecting the staining with colloidal gold. Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications, Vol. 1 (ed. by M.A.Hayat), pp. 489-518. Academic Press, San Diego]. V poslední době se proto objevilo několik prací, které se pokouší rozšířit soubor nanočástic pro imunoznačení tak, že se využijí nanočástice s odlišným chemickým složením, například Ag nebo Pd [Meyer DA et al 2010 Microsc. Microanal. 16, 33-42.].

### Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je sada tří typů nanočástic se zlatým povrchem, které jsou vzájemně odlišitelné pomocí standardních technik elektronové mikroskopie (TEM, FEGSEM) a umožňují současné trojnásobné imunoznačení biologických vzorků. Zmíněná sada vznikne ze standardní sady dvou typů komerčně dostupných sférických Au nanočástic (vzájemně mikroskopicky odlišitelných podle velikosti), ke které se přidají dvojrstevné AgAu nanočástice se zlatým povrchem (mikroskopicky odlišitelné od předchozích dvou typů standardních nanočástic na základě své vnitřní morfologie). Sada tří typů nanočástic se zlatým povrchem vyniká nad dosud používané sady dvou typů sférických zlatých nanočástic tím, že umožňuje trojnásobné imunoznačení neboli přesnou lokalizaci tří antigenů v biologických preparátech současně.

AgAu nanočástice, které jsou klíčovou součástí sady nanočástic pro trojnásobné imunoznačení podle technického řešení, se vyznačují vrstevnatou (core-shell) morfologií takovou, že vnitřní stříbrné jádro má průměr 5 až 6 nm a vnější zlatá vrstva obohacená stříbrem má tloušťku 3 až 4 nm, takže celková průměrná velikost částice nepřesahuje 14 nm a distribuce velikostí je velmi úzká (směrodatná odchylka vypočtená z číselné distribuce velikostí částic menší než 3 nm). Přitom pro AgAu nanočástice připravené podle technického řešení platí, že stříbrné jádro vykazuje znatelně nižší kontrast než zlatý obal v TEM i FEGSEM mikroskopii, takže částice se v obou typech mikroskopie jeví jako dvojrstevné a lze je snadno rozlišit od komerčně dostupných, sférických, homogenních Au nanočástic. Svou nižší velikostí a užší distribucí vynikají AgAu nanočástice připravené podle technického řešení v oblasti imunoznačení nad dosud známé AgAu nanočástice připravené podle starších postupů, které jsou pro danou aplikaci příliš velké. Pro FEGSEM mikroskopii lze s výhodou použít i o něco větších AgAu částic s celkovým rozměrem do cca 20 nm, protože na řezných či lomových plochách bývá značení obecně účinnější, takže velikost částic ho zásadním způsobem neovlivní. Větší AgAu nanočástice ve FEGSEM jsou pak s

výhodou ještě lépe rozlišitelné od komečných nanočástic Au - jednak díky celkovým větším rozměrům, jednak díky tomu, že větší stříbrné jádro je snáze detekovatelné.

AgAu nanočástice se připravují řízenou redukcí rozpustných solí stříbra a zlata. V prvním kroku se připraví stříbrná jádra nanočástic (kontrolovaná redukce  $\text{AgNO}_3$  pomocí  $\text{NaBH}_4$ ) a ve druhém kroku se stříbrná jádra nanočástic obalí zlatou vrstvou (kontrolovaná redukce  $\text{HAuCl}_4$  pomocí  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ ). Klíčové zlepšení oproti dříve popsané přípravě spočívá v tom, že ve druhém kroku se namísto redukčního činidla  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  použije redukční činidlo  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ , což umožní dosažení užší distribuce velikostí AgAu částic (směrodatná odchylka vypočtená z číselné distribuce velikostí částic menší než 3 nm) a současně dosažení menší průměrné velikosti AgAu částic (méně než 14 nm), při které jsou ještě dobře mikroskopicky rozeznatelná stříbrná jádra částic. Průměrná velikost menší než 14 nm a úzká distribuce velikostí umožňují použít částice pro vícenásobné imunoznačení v TEM i FEGSEM. Navíc lze velikost nanočástic řídit změnou přidaného objemu  $\text{HAuCl}_4$  a  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  v poměru 1:1, přičemž úzká distribuce velikostí nanočástic zůstává zachována, velikost stříbrných jader se nemění a narůstá vnější obalová zlatá vrstva. Větší nanočástice lze s výhodou použít pro vícenásobné značení ve FEGSEM, kde se optimální velikost částic pohybuje v rozmezí 10 až 20 nm.

Konjugace protilátky na AgAu nanočástice může s výhodou probíhat zcela analogickým způsobem jako u běžných, komerčně dostupných Au nanočástic, protože v kontaktu s protilátkami je vnější Au vrstva a není třeba zásadně měnit zavedené konjugační protokoly. Nejprve se upraví pH roztoků nanočástic a protilátek na hodnotu pH 8,0 až 8,5. Roztok protilátky je pak přidán k solu nanočástic a intenzivně míchán po dobu 1 až 2 minut. K zamezení nespecifické vazby a agregace konjugovaných částic se pak přidá polyetylglykol (PEG) do konečné koncentrace 0,25 % hmotn. nebo bovinní sérový albumin (bovine serum albumin; BSA) do konečné koncentrace 0,25 mg/mL. K odseparování konjugovaných nanočástic od volných protilátek se používá odstředění při 15000 až 25000 g za použití glycerolového gradientu 20%/10%. Supernatant a vrstva 10% glycerolu se poté odstraní, pelet je resuspendován v 1% roztoku PEG nebo BSA ve fosfátovém pufru (Phosphate Buffered Saline; PBS) o pH 8,5 a směs je nadále skladována při 4 °C. Úspěšná separace konjugovaných nanočástic je klíčová pro následující imunoznačení, neboť volné protilátky by snižovaly účinnost značení. Množství navázaných protilátek se testuje a případně optimalizuje pomocí proteinové elektroforézy. Před elektroforézou se imunoglobuliny odštěpí z částic v denaturujícím pufru a nanesou se na 10% gel. Po průběhu elektroforézy se rozdělené proteiny v gelu kvantitativně obarví PageBlue a obsah proteinu v jednotlivých prouzcích se kvantifikuje v infračerveném spektru. Pro kalibraci množství proteinu se na gel paralelně ke vzorku nanáší koncentrační série volné protilátky stejného typu, která byla použita pro konjugaci s nanočásticemi. To pak umožňuje kvantifikovat skutečné množství na částice vázané protilátky.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že sada tří nanočástic ze zlatým povrchem obsahující vrstevnaté AgAu nanočástice může být použita pro současné trojnásobné imunoznačení tří antigenů v biologických strukturách s vysokým rozlišením.

#### Přehled obrázků ve výkresech

Obr. 1. Morfologie vrstevnatých AgAu nanočástic a jejich odlišitelnost od standardních sférických Au nanočástic v TEM mikroskopii: (a) TEM mikrofotografie Au nanočástic s průměrnou velikostí ~5 nm, (b) TEM mikrofotografie Au nanočástic s průměrnou velikostí ~12 nm, (c) TEM mikrofotografie vrstevnatých AgAu nanočástic s průměrnou velikostí ~14 nm, (d) TEM mikrofotografie vrstevnatých AgAu nanočástic s průměrnou velikostí do ~20 nm. Všechny mikrofotografie byly pořízeny na standardním TEM mikroskopu za stejných podmínek. AgAu nanočástice jsou na první pohled rozlišitelné od sférických zlatých nanočástic podle světlejšího stříbrného jádra.

Obr. 2. Odlišitelnost standardních sférických Au nanočástic a vrstevnatých AgAu nanočástic ve FEGSEM mikroskopii. FEGSEM mikrofotografie, pořízená v režimu zpětně odražených elektronů, je ukázána na směsi tří typů Au nanočástic: (i) malé sférické nanočástice = komerční Au nanočástice o průměrné velikosti 6 nm, (ii) větší sférické nanočástice = komerční Au nanočástice o

průměrné velikosti 12 nm, (iii) velké částice se světlejšími středy = nanočástice AgAu o průměrné velikosti 16 nm.

Obr. 3. Konjugace protilátky na AgAu nanočástice - kontrola kvality a kalibrace množství navazované protilátky pomocí SDS elektroforézy: (A) analýza navázaných protilátek na polyakrylamidovém gelu. Černá šipka - těžké řetězce, šedá šipka - lehké řetězce imunoglobulinů. (B) výsledný graf kvantifikace množství navázaných protilátek na povrchu nanočástic.

Obr. 4. AgAu nanočástice konjugované s proteinem A byly použity ke značení bovinního sérového albumínu (BSA), který byl zalit do epoxidové pryskyfice LR White. Jako primární protilátka byla použita králičí anti BSA. Na snímku je patrné rozhraní mezi oblastí ultratenkého řezu obsahující BSA a čistou pryskyficí.

### Příklady provedení technického řešení

#### Příklad 1

V prvním kroku byly připraveny roztoky  $\text{HAuCl}_4$  o koncentraci  $4,65 \times 10^{-4}$  M a  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-3}$  M. Při přípravě je nutno použít vysoce čistou, deionizovanou redestilovanou vodu. Ve druhém kroku byl připraven stříbrný (Ag) koloid dle známého postupu [Vlčková B et al: J.Phys.Chem. 1993, 97, 9719]: 3,5 mg  $\text{NaBH}_4$  bylo rozpuštěno v 75 mL deionizované redestilované vody a vychlazeno na  $2^\circ\text{C}$ ; poté bylo za stálého míchání přidáváno po kapkách 9 mL roztoku  $\text{AgNO}_3$  o koncentraci  $2,2 \times 10^{-3}$  M, rovněž vychlazeného na  $2^\circ\text{C}$ ; připravený koloid byl ponechán následujících 45 min za stálého míchání na magnetické míchačce; rozměry vzniklých Ag nanočástic se v tomto okamžiku pohybovaly v průměru v rozmezí 10 až 11 nm. Ve třetím kroku bylo odebráno 12,5 mL připraveného Ag koloidu, přidáno 30 mL deionizované redestilované vody a v 250 mL Erlenmayerově baňce umístěno na magnetickou míchačku. Ve čtvrtém kroku bylo k naředěnému Ag koloidu (připraveného v kroku 3) po kapkách (rychlostí cca 2 mL/min) přidáváno za laboratorní teploty současně 10 mL  $\text{HAuCl}_4$  o koncentraci  $4,65 \times 10^{-4}$  M a 10 mL  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-3}$  M (připravených v kroku 1). Po ukončení přikapávání roztoků vznikl AgAu koloid (tj. koloid obsahující nanočástice se stříbrnými jádry a zlatými obaly), který se ponechal míchat dalších 45 min. Stříbrná jádra se zmenšila na velikost cca 5 až 6 nm a kolem nich se vytvořil zlatý obal (obohacený uvolněnými Ag atomy) o velikosti cca 3 až 4 nm. Celková průměrná velikost nanočástic AgAu tedy nepřesáhla 14 nm. Morfologie nanočástic (velikost, vnitřní struktura, kontrast, odlišitelnost od zlatých nanočástic) byla zkontrolována pomocí TEM (obr. 1a-c).

#### Příklad 2

Bylo prokázáno, že velikost připravených AgAu nanočástic je možno řídit změnou přidávaného objemu roztoků  $\text{HAuCl}_4$  o koncentraci  $4,65 \times 10^{-4}$  M a  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-3}$  M v poměru 1:1.

Nanočástice AgAu s průměrnou velikostí pod 14 nm byly opakovaně připraveny podle příkladu 1, kde v klíčovém, čtvrtém kroku přípravy bylo přidáno 10 mL  $\text{HAuCl}_4$  o koncentraci  $4,65 \times 10^{-4}$  M a 10 mL  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-3}$  M.

Nanočástice AgAu s průměrnou velikostí 20 nm byly připraveny stejným postupem jako v příkladu 1, pouze ve čtvrtém kroku bylo ke směsi přikapáváno 25 mL  $\text{HAuCl}_4$  a 25 mL  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ . Velikost Ag jader zůstala zachována (5 až 6 nm), stejně jako úzká distribuce velikostí částic (směrodatná odchylka počítaná z číselné distribuce velikostí částic  $< 3$  nm), zvětšila se tloušťka obalové zlaté vrstvy na cca 6 až 7 nm (obr. 1d).

Nanočástice AgAu s průměrnou velikostí v rozsahu 14 až 20 nm lze připravit analogicky s tím, že se vhodně upraví množství přidávaných roztoků  $\text{HAuCl}_4$  o koncentraci  $4,65 \times 10^{-4}$  M a  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci  $6,25 \times 10^{-3}$  M. Velikost nanočástic je úměrná množství přidávaných roztoků, kdy 10 mL roztoků odpovídá 14 nm částicím a 25 mL roztoků odpovídá 20 nm částicím, jak je popsáno výše.

## Příklad 3

Rozlišitelnost nanočástic ve FEGSEM byla doložena pomocí modelového systému, který obsahoval dva typy komerčních sférických nanočástic Au o průměrných velikostech 6 a 12 nm a jeden typ doplněna vrstevnatých AgAu nanočásticemi o velikosti 16 nm. Příprava 16 nm AgAu nanočástic proběhla podle příkladu 1, přičemž jejich průměrná velikost byla optimalizována podle příkladu 2 tak, že ve čtvrtém kroku přípravy bylo přidáno 15 mL HAuCl<sub>4</sub> o koncentraci  $4,65 \times 10^{-4}$  M a 15 mL (NH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o koncentraci  $6,25 \times 10^{-3}$  M. Tím se opět dosáhlo zachování velikosti stříbrných jader (5 až 6 nm) a úzké distribuce velikostí částic (do 3 nm), přičemž tloušťka obalové zlaté vrstvy činila cca 5 nm a celková velikost částic cca 16 nm. Směs všech nanočástic byla nakápnuta na mikroskopickou síťku potaženou uhlíkovou podložní fólií a pozorována ve FEGSEM JEOL 7401F pomocí signálu zpětně odražených elektronů, které byly detekovány Atrratovým YAG detektorem. FEGSEM mikrofotografie byla pořízena při urychlovacím napětí 10 kV, emisním proudu 20 μA a pracovní vzdálenosti 7,1 mm. Za daných podmínek bylo možné nanočástice Au na mikrofotografii dobře rozlišit na základě jejich rozdílné velikosti, zatímco vrstevnaté částice AgAu byly jednoznačně odlišitelné díky výrazně světlejšímu jádru, který odpovídá jádru z lehčího prvku, kterým je Ag (obr. 2).

## Příklad 4

Konjugace protilátek GAM IgG (Invitrogen) na nanočástice byla testována na 5 vzorcích následovně: nejprve se upravilo pH roztoků nanočástic a protilátek pomocí 0,1M NaOH na hodnotu pH 8,5. K pěti vzorkům 0,5 mL koloidního roztoku nanočástic o velikosti 14 nm v koncentraci  $1,3 \times 10^{12}$  částic/mL bylo přidáno 125 μL, 208 μL, 292 μL, 458 μL a 542 μL roztoku protilátky o koncentraci 240 μg/mL a intenzivně mícháno po dobu 1,5 min. K zamezení nespecifické vazby a agregace konjugovaných částic byl přidán polyethylenglykol (PEG) do konečné koncentrace 0,25 % hmotn., směs byla míchána dalších 5 minut a bez míchání pak inkubována 2 hodiny při 4 °C.

K odseparování konjugovaných nanočástic od volných protilátek bylo použito odstředění při 15000 g. Objem 1 ml byl odstředěn 45 minut při 4 °C za použití glycerolového gradientu 20%/10% v PBS (pH 8,5), supernatant a vrstva 10% glycerolu byly odstraněny, pelet resuspendována v 1% roztoku PEG v PBS o pH 8,5 a výsledná směs byla dále skladována při 4 °C.

Množství navázaných protilátek na odseparované nanočástice bylo určeno pomocí proteinové elektroforézy (SDS PAGE). Před elektroforézou se imunoglobuliny odštěpily z částic ve vzorkovém pufru (50 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 100 mM dithiothreitol a 0,01% bromophenolová modř, pH 6,8), povafily se 1 minutu a nanasly se na 10% polyakrylamidový gel. Po průběhu elektroforézy byly rozdělené proteiny v gelu kvantitativně obarveny pomocí PageBlue (Fermentas) a obsah proteinu v jednotlivých prouzcích byl kvantifikován v infračerveném spektru (LI-COR Biosciences, USA). Pro kalibraci množství proteinu byly paralelně ke vzorku nanaseny koncentrační série volné protilátky stejného typu, která byla použita pro konjugaci s nanočásticemi. To umožnilo kvantifikovat množství protilátky navázané na částice (příklad je uveden na obr. 3; koncentrace protilátek v konjugačním roztoku byla 30, 50, 70, 110 a 130 μg/mL v prouzcích 2 až 6). Tento průkaz má výhodu, že kromě detekce samotné protilátky by na gelu byly vidět i případné proteinové nečistoty, které se na nanočástice navázaly, anebo degradované fragmenty protilátek. Při přesném dodržení postupu však žádné shora zmíněné nečistoty nebyly pozorovány. Pro konjugaci protilátek na nanočástice doporučujeme takovou koncentraci protilátky v konjugačním roztoku, která je o 10 % nižší než koncentrace v bodě nasycování křivky.

## Příklad 5

Nanočástice AgAu připravené postupem uvedeným v příkladu 1 s výslednou velikostí 16 nm a koncentrací  $1,24 \cdot 10^{-5}$  g/ml byly použity ke konjugaci s proteinem A (Sigma) izolovaném z bakterie *Staphylococcus aureus*, který vykazuje velkou afinitu ke králičím imunoglobulinům třídy G (IgG). Konjugát byl připraven podle postupu v příkladu 4 za použití přídatku polyethylenglykolu (PEG) do konjugačního roztoku z důvodu k zabránění agregace konjugovaných nanočástic. Výsledný konjugát byl použit k detekci bovinního sérového albumínu (dále BSA), ze kterého byl

připraven standardizovaný preparát pro kontrolu značící schopnosti konjugovaných AgAu nanočástic. BSA (typV, Serva) byl rozpuštěn při 37 °C v 10% želatině (Serva) tak, aby výsledná koncentrace byla 30 mg/mL. Takto připravený roztok byl zchlazen na 4 °C a fixován 4% formaldehydem s přídavkem 0,1 % glutaraldehydu. Po promytí ve fosfátovém pufru byla želatina nakrájena na krychličky o velikosti cca 1 mm<sup>3</sup> a postupně odvodňována v roztocích se stoupající koncentrací ethanolu (30, 50, 70, 80, 90 a 100 % obj.), přičemž se zároveň snižovala teplota rychlostí 15 °C za hodinu. Při -10 °C byl materiál prosycen pryskyřicí LR White a polymerizován za použití UV lampy. Z připraveného bločku byly nařezány ultratenké řezy o tloušťce zhruba 70 nm, které byly inkubovány v lednici 24 hod na kapkách roztoku obsahujícího 0,5% Tween 20 a 0,02 M glycin ve fosfátovém pufru s přídavkem chloridu sodného (PBS, 0,01 M PB + 0,15M NaCl, pH 7,2). Dále byly ultratenké řezy umístěny na kapky primární protilátky, kterou byla polyklonální komerčně králičí IgG proti BSA (výchozí koncentrace 0,005 mg/mL, Abcam ) zředěná 1:40. Sekundární protilátkou byly protein A konjugovaný s AgAu (výsledná koncentrace proteinu A v konjugátu 49 µg/ml) ve zředění 3,5:1, který se váže na Fc konce primární protilátky. Značené síťky byly bez kontrastování prohlíženy v TEM JEOL 1010, typickou finální TEM mikrofotografií ukazuje obr. 4. Na TEM mikrofotografiích (obr. 4) bylo jasné patrné rozhraní mezi oblastí obsahující BSA a čistou pryskyřicí, které vzniklo profixnutím části vzorku obsahujícím v želatině zalitý BSA a čisté pryskyřice při přípravě ultratenkých řezů. V oblasti obsahující BSA byla hustota imunoznačení stejná jako v případě použití sekundární protilátky značené Au nanočásticemi.

#### 20 Průmyslová využitelnost

Technické řešení slouží současnému trojnásobnému imunoznačení, neboli k analýze distribuce tří antigenů v biologických strukturách (zejména ve virech, bakteriích, buňkách či tkáních nebo v jejich fragmentech) a popisu jejich interakcí, jehož výsledky jsou využitelné především v oblastech humánní a veterinární medicíny, zemědělství, bio- a nano-technologií.

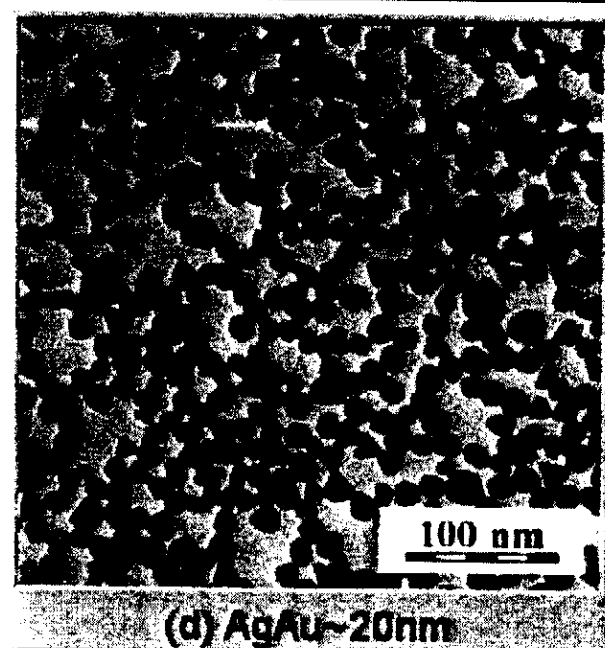
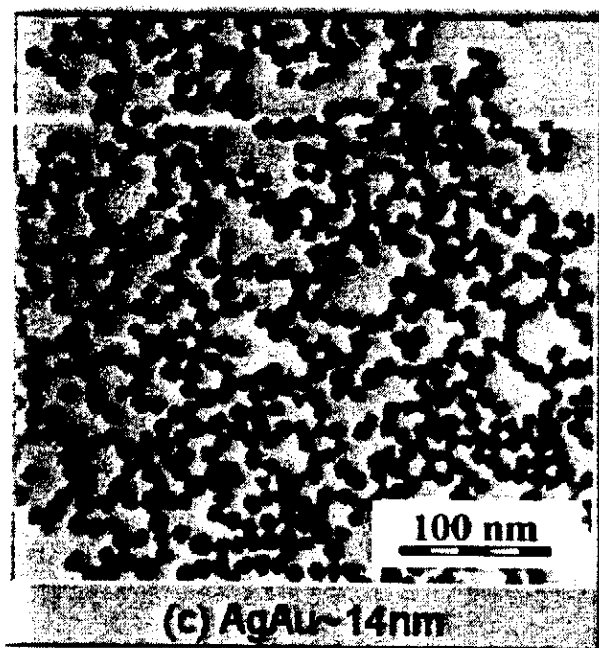
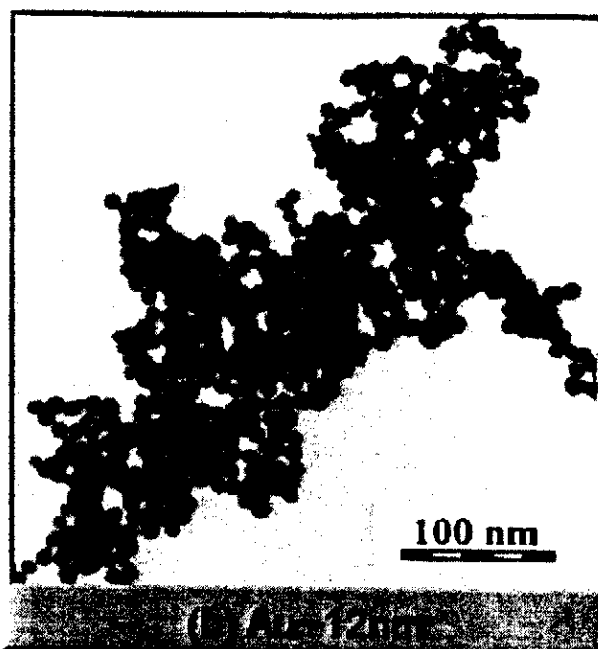
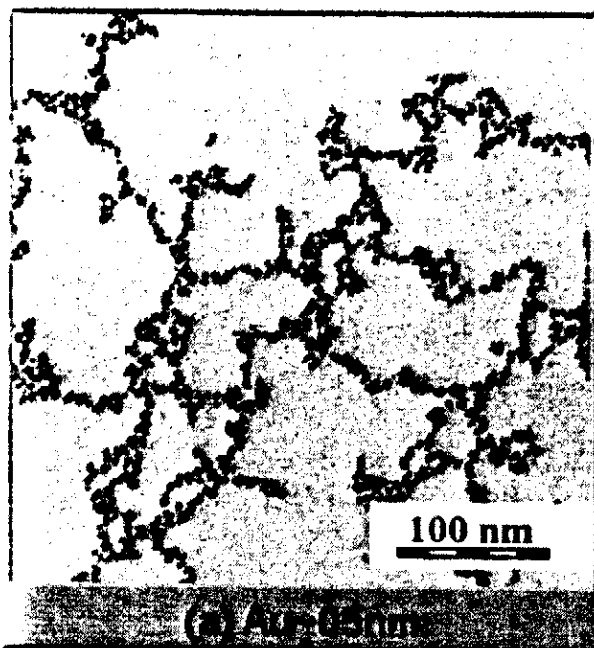
25

### NÁROKY NA OCHRANU

1. Soubor tří vzájemně mikroskopicky rozlišitelných nanočástic se zlatým povrchem pro současné trojnásobné imunoznačení, **v y z n a ě n ý t í m**, že sestává ze zlatých nanočástic o dvou různých průměrných velikostech v rozsahu 5 až 20 nm, jejichž průměr se liší alespoň o 5 nm a vrstevnatých AgAu nanočástic o průměrné velikosti v rozsahu 11 až 20 nm, s šířkou distribuce velikostí pod 3 nm, se stříbrným jádrem o průměrné velikosti 5 až 6 nm a zlatým obalem o průměrné tloušťce 3 až 7 nm.
2. Soubor tří vzájemně mikroskopicky rozlišitelných nanočástic se zlatým povrchem pro trojnásobné imunoznačení podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že zlaté nanočástic mají průměrnou velikost v rozsahu 5 až 12 nm a vrstevnaté AgAu nanočástice mají průměrnou velikost do 14 nm, přičemž zlatý obal má průměrnou tloušťku 3 až 4 nm.
3. Soubor tří vzájemně mikroskopicky rozlišitelných nanočástic se zlatým povrchem pro trojnásobné imunoznačení podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že vrstevnaté AgAu nanočástice mají průměrnou velikost v rozsahu 13 až 20 nm, přičemž zlatý obal má průměrnou tloušťku 4 až 7 nm.
4. AgAu nanočástice s vrstevnatou morfologií pro imunoznačení, **v y z n a ě n é t í m**, že jejich průměrná velikost nepřesahuje 14 nm a šířka distribuce velikostí nepřesahuje 3 nm, přičemž stříbrné jádro nanočástic má průměrnou velikost 5 až 6 nm a jejich zlatý obal má průměrnou tloušťku 3 až 4 nm.
5. AgAu nanočástice s vrstevnatou morfologií pro imunoznačení, **v y z n a ě n é t í m**, že jejich průměrná velikost nepřesahuje 20 nm a šířka distribuce velikostí nepřesahuje 3 nm, přičemž stříbrné jádro nanočástic má průměrnou velikost 5 až 6 nm a jejich zlatý obal má průměrnou tloušťku 4 až 7 nm.

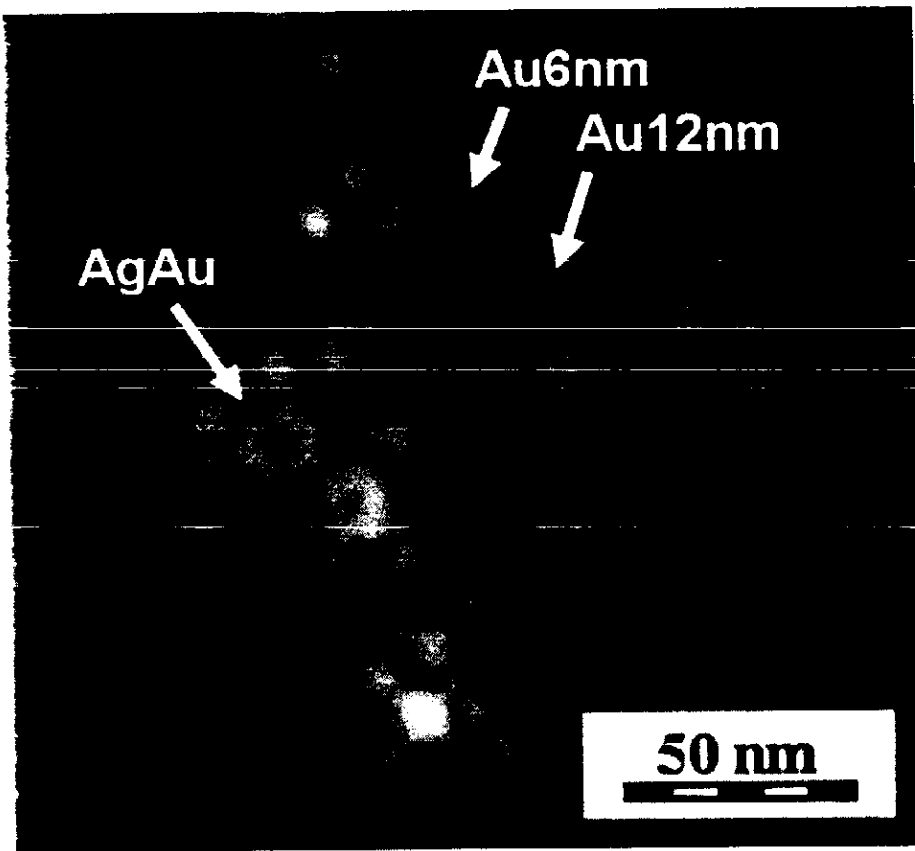
4 výkresy

Obr. 1

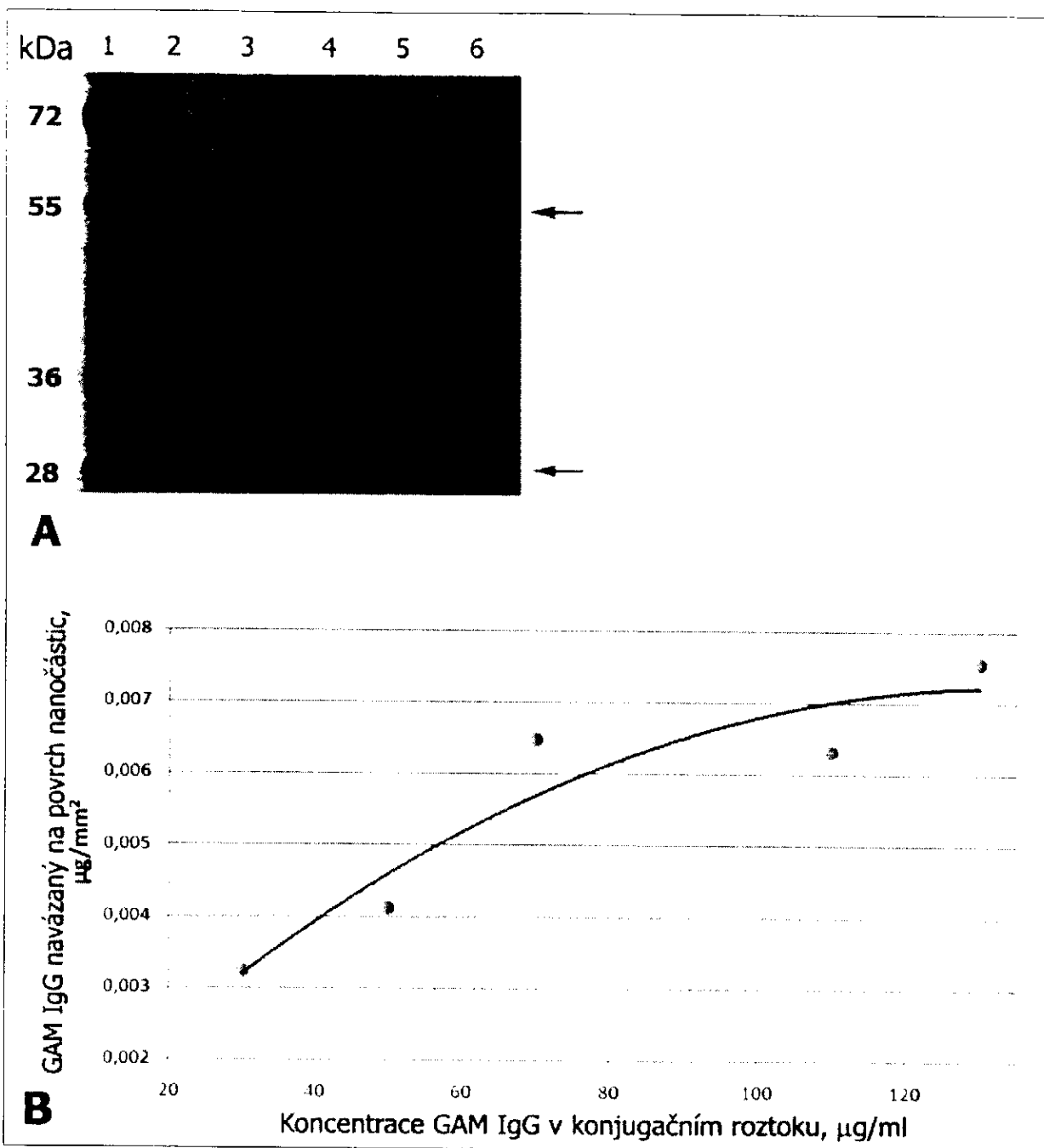




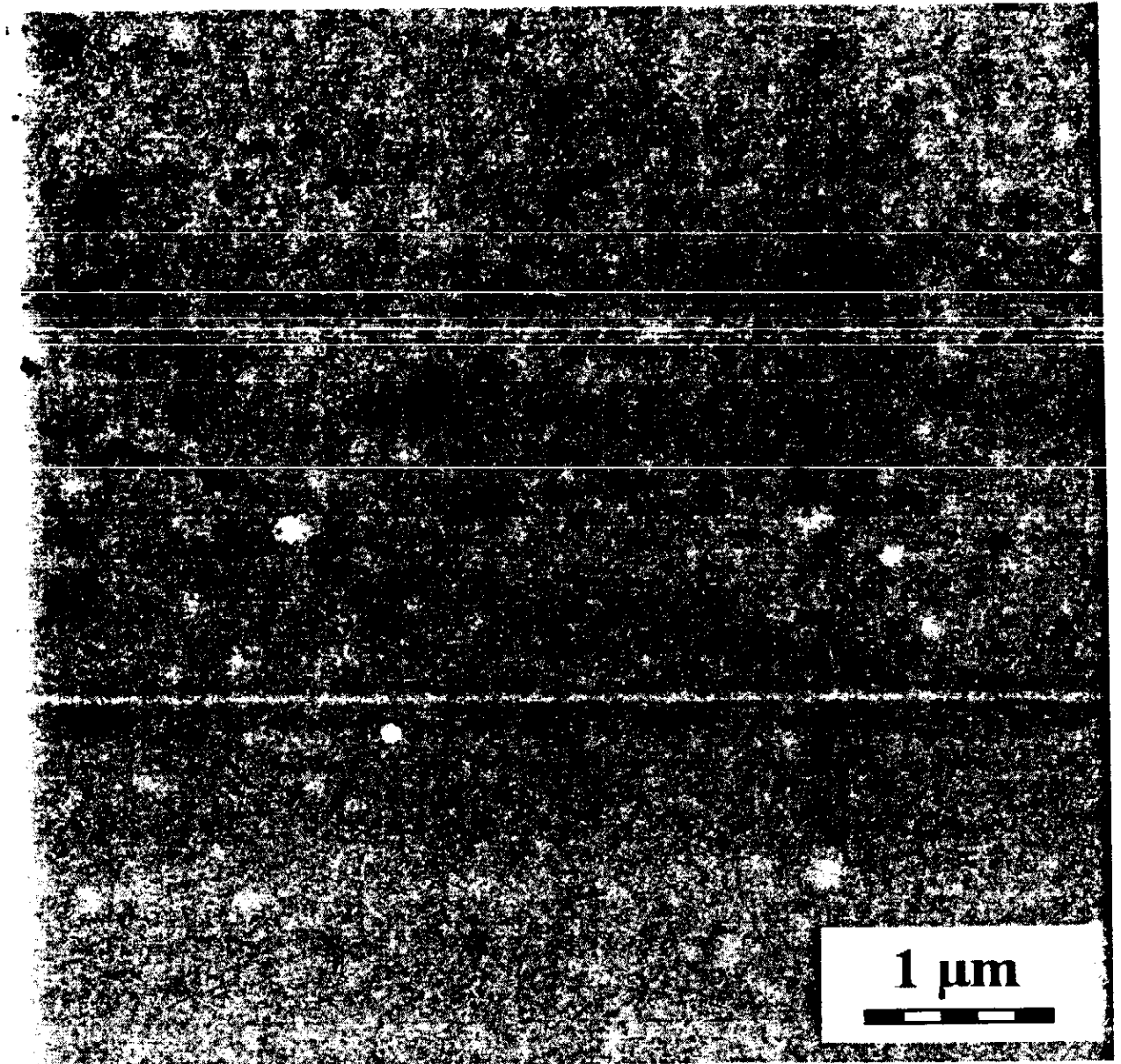
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4.



5

Konec dokumentu