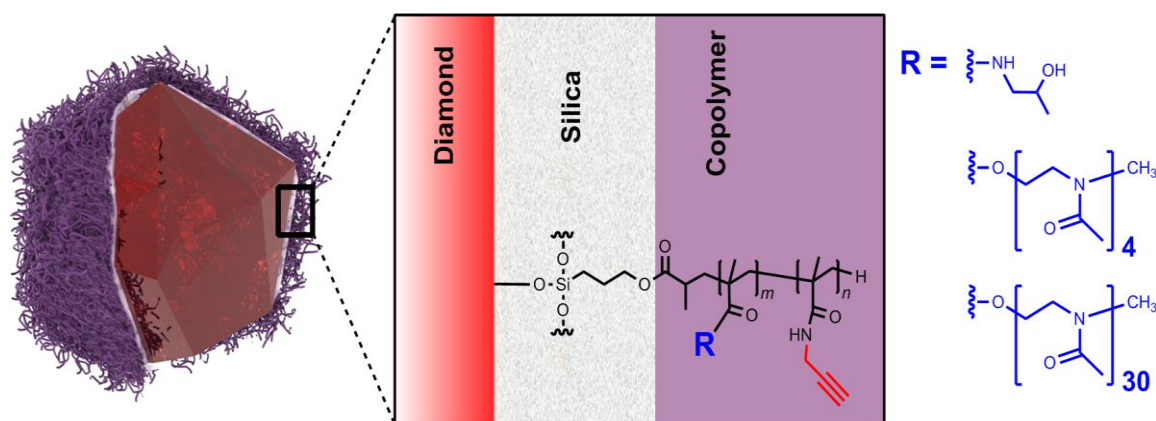




WP5: Biosenzory

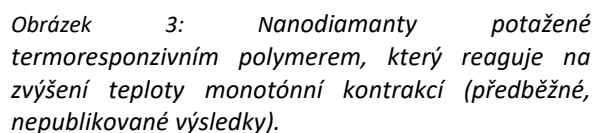
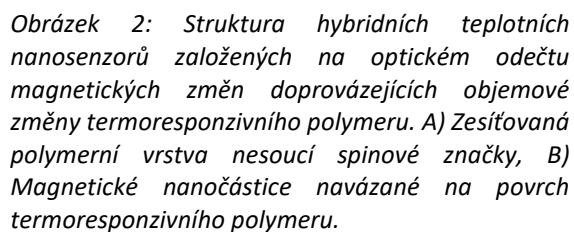
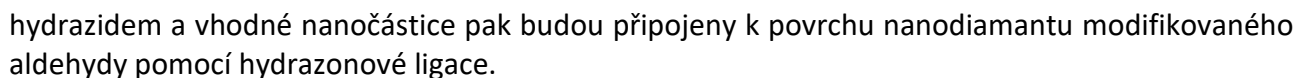
Výzkumná strategie a metodologie

Hlavním cílem WP5 je prozkoumání a nalezení nových principů vedoucích ke konstrukci diamantových nanosenzorů na bázi optických a kvantových detekčních technologií. Zaměříme se na vytvoření analytických nástrojů pro zobrazování biologicky významných parametrů v živých buňkách s ultracitlivým časoprostorovým rozlišením pomocí opticky detekované magnetické rezonance. Základní výzkumná strategie zahrnuje optimalizaci tvorby NV center v nanodiamantech pomocí izotropního ozařování vysokoenergetickými částicemi a vývoj robustních nanorozhraní nanodiamantů, které zajistí biokompatibilitu pro široké spektrum biosystémů. Nanorozhraní budou na bázi bioortogonálně reaktivních hydrofilních polymerů (Obrázek 1). Tato rozhraní ponесou rozpoznávací selektory pro interakci s biomolekulárními analyty (nukleové kyseliny, proteiny) a radikály). Budou zkoumány také nové přístupy vedoucí k modifikaci povrchu nanodiamantů pomocí *poly(glycerolu)*.



Obrázek 1: Poly[N-(2-hydroxypropyl) methakrylamid] a dva "kartáčové" poly(2-methyl-2-oxazolinové) kopolymery vyrostlé z částice nanodiamantu. Řetězce obsahují také alkyňové skupiny pro účinnou a vysoce bioortogonální "klik" konjugační chemii ve vodném prostředí

Bude vyvinut zcela nový přístup umožňující použití takovýchto hybridních struktur pro konstrukci nitrobuněčných teploměrů. Na diamantech budou vytvořeny *reverzibilní termoresponzivní (TR) polymerní architektury*. Tyto vrstvy budou obsahovat buď spinové značky (stabilní radikály nebo komplexy Gd^{3+}) inkorporované v polymeru nebo magnetické nanočástice připojené k povrchu částic a sloužící jako alternativní spinová lázeň s o několik řádů větší odezvou na jiné časové škále (Obrázek 2). Pro zajištění koherentní rotace klasického gigantického spinu nanočástice za normálních podmínek (tzv. superparamagnetické odezvy), průměr nanočástic musí být menší než 8 nm. Pro studium vlivu charakteristického relaxačního času spinové lázně a vzájemné interakce spinových nosičů bude realizována i heterogenní spinová lázeň v podobě nanočástice s precizně navrženou spinovou strukturou jádro – slupka. Jako nejvhodnější kandidáti byly identifikovány spinelové ferity s relativně měkkou magnetickou odezvou: $Mn_xFe_{2-x}O_4$; $x = 0 - 1$. Nanočástice s úzkou distribucí velikostí a definovanou krystalinitou budou připraveny metodou rozkladu oleátů za hydrotermálních podmínek nebo ve vysokotlakových rozpouštědlech. Povrch výsledných částic je stabilizovaný koordinací kyseliny olejové. Ta bude v dalším kroku vyměněna za PEG zakončený



V rámci předběžných experimentů jsme potvrdili, že na nanodiamantech lze nasyntetizovat plánovaný typ polymerní vrstvy vykazující TR chování v biologicky relevantním teplotním rozmezí (Obrázek 3). K optimalizovaným částicím budou pomocí klik chemie dále připojeny penetrační peptidy (TAT, Arg9) a cílicí peptidy pro buněčné organely. Ty umožní průnik do buněk a následné lokalizované měření teploty. K těmto nanoteploměrům budou připevněny také nanodiamanty nesoucí SiV centra, které zde budou sloužit jako interní reference. Měření pomocí opticky detekované magnetické rezonance budou provedena v rámci aktivní a probíhající spolupráce s prof. Joergem Wrachtrupem (Univerzita ve Stuttgartu, Německo).



WP5		Biosenzory
Cíle		
• Optimalizovat tvorbu NV center v nanodiamantech pro konstrukci nanosenzorů. • Formulovat funkční nanorozhraní diamantů pro <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> senzory s extrémním časoprostorovým rozlišením. • Vyvinout vnitrobuněčné nanosenzory na bázi nanodiamantů a spinových entit.		
Aktivity		
A5.1.: Posun detekčních možností nanodiamantů povrchovými a vnitřními modifikacemi		
Trvání: M1 – M48		
Trvání	Popis úkolu	Zahrnuté skupiny
M1-M36	Příprava vakancí v nanodiamantech za použití nových izotropních přístupů. Techniky budou zahrnovat ozařování vysokoenergetickými elektrony v mikrotronu a ozařování homogenních kompozitních materiálů obsahujících nanodiamanty a ^{10}B pomocí neutronů v jaderném reaktoru. Neutronový záchyt vytváří z ^{10}B vysokoenergetické alfačástice, což vede ke tvorbě vakancí. Zkoumány budou též alternativní jaderné reakce.	UOCHB
M6-M24	Optimalizace zpracovávání vzorků (žihání, oxidace), separace frakcí velmi malých nanodiamantů (<10 nm) a jejich čištění. Charakterizace těchto částic pomocí TEM, NTA, XRD, FTIR a XPS.	UOCHB, UFCH, MFF UK
M12-M48	Produkce velkého množství nanodiamantů (gramy až desítky gramů) s vysokou koncentrací NV center za použití optimálních podmínek ozáření a žihání.	UOCHB
M1-M24	Povrchová modifikace nanodiamantů bez poškození povrchu diamantové mřížky a tvorby spinového šumu. Bude zkoumána inserce oxidu uhelnatého na karbokationty generované v kyselém prostředí (Kochova reakce) a jejich následná hydrolýza za vzniku karboxylových kyselin. Charakterizace pomocí EPR, FTIR a NTA.	UOCHB
M18-M42	Vytvoření duálních sond s vnitřní referencí (SiV centrum) a reportérem (NV centrum). Chemická konjugace detonačních nanodiamantů s SiV centry s HPHT nanodiamanty obsahujícími NV centra. Vývoj duálních sp^3 - sp^2 spojek umožňujících spojení HPHT a detonačních diamantů.	UOCHB, OZM, UFCH, MFF UK
M1-M36	Vývoj jednokrokových robustních postupů tvorby povrchových polymerních vrstev v prostředích zajišťujících koloidní stabilitu HPHT a detonačních nanodiamantů. Budou syntetizovány nové typy	UOCHB, OZM



	epoxidových derivátů obsahujících azidové a kationické skupiny, které budou kopolymerovány s glycidolem z diamantového povrchu bez použití rozpouštědel. Husté dendritické vrstvy na nanodiamantech budou analyzovány z pohledu biokompatibility a schopnosti biokonjugace.	
Milník MS5.1 v M24: Identifikovaná a potvrzená cesta vedoucí k optimalizovaným nanodiamantům s barevnými centry pro senzing.		
Deliverable D5.1 v M26: Souhrnná zpráva popisující přípravu optimalizovaných nanodiamantů s barevnými centry pro senzing.		
A5.2.: Polymerní rozhraní senzorů na bázi nanodiamantů pro <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> aplikace		
Trvání: M1 – M48		
Trvání	Popis úkolu	Zahrnuté skupiny
M1-M24	Vývoj termoresponzivní polymerní vrstvy na nanodiamantech. Optimalizace složení zaměřená na vhodné zastoupení reaktivních skupin pro další modifikaci. Charakterizace termoresponzivního chování pomocí NTA, QELS, TEM, fluorescenční spektroskopie. Srovnání s jinými materiály (SiC).	UOCHB, UFCH, MFF UK
M12-M48	Řízený růst ultratenkých polymerních vrstev na diamantových površích pro přípravu citlivých senzorů. Optimalizace radikálové polymerace pro diamantové povrchy. Značení vytvořených polymerů "bioznačkami" (biotin, His-tag).	UOCHB
M12-M36	Kovalentní (klik-chemie) a nekovalentní (biotin, His-tag, elektrostatická) konjugace biomolekul (DNA, proteinů) na termoresponzivní i neresponzivní polymerní povrchy. Analýza výtěžků konjugace, kvantifikace biomolekul, schopnost vazby na ligand/cílové struktury.	UOCHB
M1-M24	Syntéza fotolyzovatelných spojek pro manipulaci se senzory v buňkách z vnějšku. Optimalizace spojek na bázi kumarinu pro připojení k polymerům a biomolekulám. Analýza a optimalizace podmínek pro fotolýzu pomocí laserů.	UOCHB
M12 – M48	Nové strategie biokonjugace bez použití mědi pro nanodiamanty potažené polymerem: klik reakce s tetrazinem - <i>trans</i> -cyklooktenem. Navázání <i>trans</i> -cyklooktenových skupin na nanodiamanty a kinetická analýza průběhu biokonjugace s biomolekulami modifikovanými tetrazinem. Fluorogenní „klik reakce“ na diamantech za použití fluorescenčních barviv Bodipy.	UOCHB
Milník MS5.2 in M24: Vyvinutý syntetický postup vedoucí k nanodiamantům s termoresponzivním povrchem.		
Deliverable D5.2 in M26: Souhrnná zpráva popisující syntetický postup k nanodiamantům s termoresponzivním povrchem.		



A5.3. Vnitrobuněčné nanosenzory se spinovou komponentou

Trvání: M1 – M36

Trvání	Popis úkolu	Zahrnuté skupiny
M1-M24	Syntéza a povrchová modifikace magnetických nanočástic pro konstrukci hybridních kvantových senzorů z nanodiamantů. Jejich strukturní a magnetická charakterizace (TEM, SEM, XRD, FTIR, termogravimetrie, objemová a lokální magnetometrie).	UFCH, MFF UK, UOCHB
M1-M24	Syntéza nových sloučenin obsahujících stabilní radikál verdazyl na flexibilní hydrofilní spojce. Připojení těchto molekul k nanodiamantům s NV centry pokrytým polymerem. Kvantifikace a charakterizace konjugátů pomocí EPR, TEM a termogravimetrie.	UOCHB
M21-M36	Chemická konjugace magnetických nanočástic a Gd^{3+} komplexů s termoresponzivními nanodiamanty. Optimalizace velikosti odezvy, koloidní stability a množství magnetických nanočástic/ Gd^{3+} -komplexů. Strukturní a magnetická charakterizace.	UFCH, MFF UK, UOCHB
M1-M36	Manipulace s magnetickými nanokonjugáty za použití magnetického pole. Orientovaný pohyb, magneticky řízený transport.	UFCH, MFF UK
M24-M36	Vytvoření intracelulárních teplotních senzorů s vysokou citlivostí z nanodiamantů s termoresponzivními polymery nesoucími připojené magnetické nanočástice. Intracelulární zacílení těchto senzorů na místa určení (mitochondrie, perinukleární prostor, endoplasmatické retikulum) za použití navržených cílících skupin (trifenylfosfoniový kation, peptidy).	UFCH, MFF UK, UOCHB
M30 – M48	Vysokofrekvenční stimulace magnetických nanokonjugátů za účelem testování nových protokolů funkcionalizace a samouspořádání a určení kalorických parametrů nanokonjugátů.	MFF UK
Milník MS5.3 v M36: Vyvinutá příprava magnetických a spinových značek pro připojení k nanodiamantovým senzorům.		
Deliverable D5.3 v M38: Protokol pro přípravu magnetických a spinových značek.		
Milníky		
Pořadí	Měsíc	Popis
MS5.1	M24	Identifikovaná a potvrzená cesta vedoucí k optimalizovaným nanodiamantům s barevnými centry pro sensing.
MS5.2	M24	Vyvinutý syntetický postup vedoucí k nanodiamantům s termoresponzivním povrchem.
MS5.3	M36	Vyvinutá příprava magnetických a spinových značek pro připojení k nanodiamantovým senzorům.



Deliverables		
Pořadí	Měsíc	Popis
D5.1	M26	Souhrnná zpráva popisující přípravu optimalizovaných nanodiamantů s barevnými centry pro senzing.
D5.2	M26	Souhrnná zpráva popisující syntetický postup vedoucí k nanodiamantům s termoresponzivním povrchem.
D5.3	M38	Protokol pro přípravu magnetických a spinových značek.



WP5 GANTT Chart

	2018	2019	2020	2021	2022
A5.1.: Posun detekčních možností nanodiamantů povrchovými a vnitřními modifikacemi					
Příprava vakancí v nanodiamantech za použití nových izotropních přístupů.					
Optimalizace zpracovávání vzorků (žíhání, oxidace), separace frakcí.					
Produkce velkého množství nanodiamantů s vysokou koncentrací NV center.					
Povrchová modifikace nanodiamantů bez poškození povrchu diamantové mřížky a tvorby spinového šumu.					
Vytvoření duálních sond s vnitřní referencí a reportérem.					
Vývoj jednokrokových robustních postupů tvorby povrchových polymerních vrstev.					
A5.2.: Polymerní rozhraní senzorů na bázi nanodiamantů pro <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> aplikace					
Vývoj termoresponzivní polymerní vrstvy na nanodiamantech.					
Řízený růst ultratenkých polymerních vrstev na diamantových površích pro přípravu citlivých senzorů.					
Kovalentní a nekovalentní konjugace biomolekul na termoresponzivní i neresponzivní polymerní povrchy.					
Syntéza fotolýzovatelných spojek pro manipulaci se senzory v buňkách z vnějšku.					
Nové strategie biokonjugace bez použití mědi pro nanodiamanty potažené polymerem: klik reakce s tetrazinem - trans-cyklooktenem.					
A5.3. Vnitrobuněčné nanosenzory se spinovou komponentou					
Syntéza a povrchová modifikace magnetických nanočástic.					
Syntéza nových sloučenin obsahujících stabilní radikál verdazyl na flexibilní hydrofilní spojce.					
Chemická konjugace magnetických nanočástic a Gd3+ komplexů s termoresponzivními nanodiamanty.					
Manipulace s magnetickými nanokonjugáty za použití magnetického pole.					
Vytvoření intracelulárních teplotních senzorů s vysokou citlivostí.					
Vysokofrekvenční stimulace magnetických nanokonjugátů.					