

---

# Možnosti využití magnetických nosičů v molekulární diagnostice mikroorganismů

---

Doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Ing. Daniel Horák, CSc.

Studenti magisterského studia

---

# Pro řadu oborů je důležitá identifikace:

- virů
- bakterií
- hub
- parazitů

v reálných vzorcích a v krátkém čase.

---

---

# Molekulárně diagnostické metody používané pro průkaz mikroorganismů :

- nekultivační
  - založeny na detekci specifických molekul (antigeny, proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy, lipidy)
  - lze je použít pro identifikaci nekultivovatelných mikroorganismů
-

---

# Molekulární diagnostika splňuje nároky kladené na diagnostiku :

- vysokou specificitu
  - vysokou citlivost
  - jednoduchost
  - robustnost
-

# Prognóza vývoje molekulární diagnostiky:

- dynamicky se rozvíjející
- jedním z kritérií hodnocení rozvoje je objem prodeje přípravků (Glick a spol. 2003)

Přípravky	Rok/10 <sup>9</sup> USD		
	1999	2003	2008
Imunodiagnostické	7,7	8,5	9,3
DNA diagnostické	0,5	0,75	2,0

---

## Nové trendy:

- vývoj nových postupů je založen na využití známých principů: interakce antigen-protilátka, hybridizace NK, PCR
  - automatizace (robotizace) postupů analýzy
  - miniaturizace
  - uplatnění nacházejí imobilizované systémy s využitím magnetických nosičů
-

---

# Základní kroky v přípravě imobilizovaných systémů:

- výběr nosiče a jeho matrice
  - volba afinitního ligandu (funkční skupiny) – dle povahy molekuly, kterou chceme izolovat
  - imobilizace ligandu na nosič
-

---

## Magnetické nosiče:

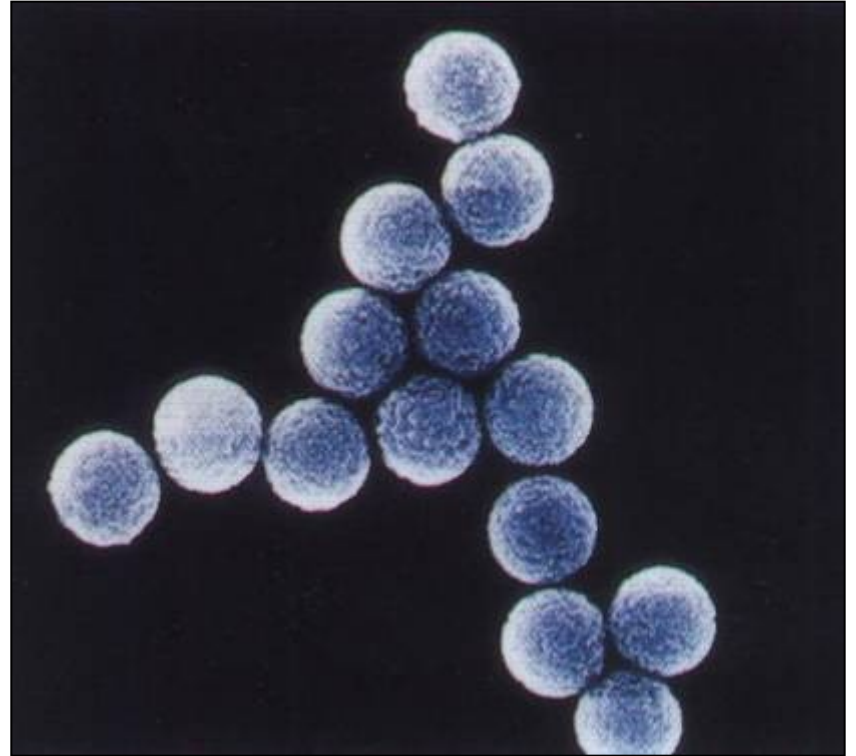
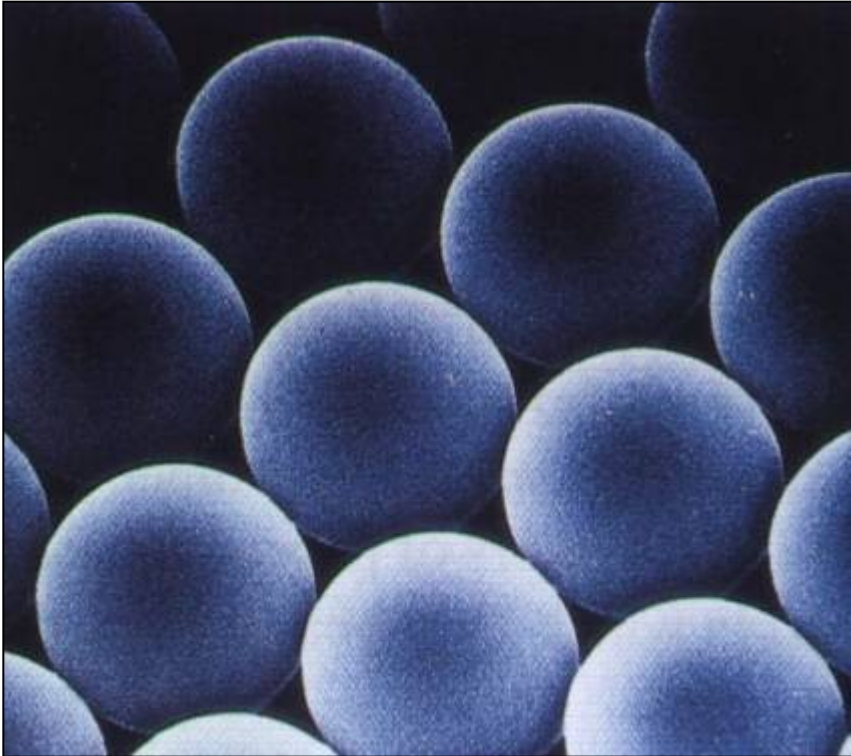
- tuhé částice (nosiče) s magnetickou komponentou
  - magnetické jádro (oxidy železa) je obaleno nosičem během syntézy
  - částice jsou paramagnetické – magnetické vlastnosti se projevují pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole, v suspenzi nedochází k jejich shlukování
  - použití vsádkovým způsobem
-



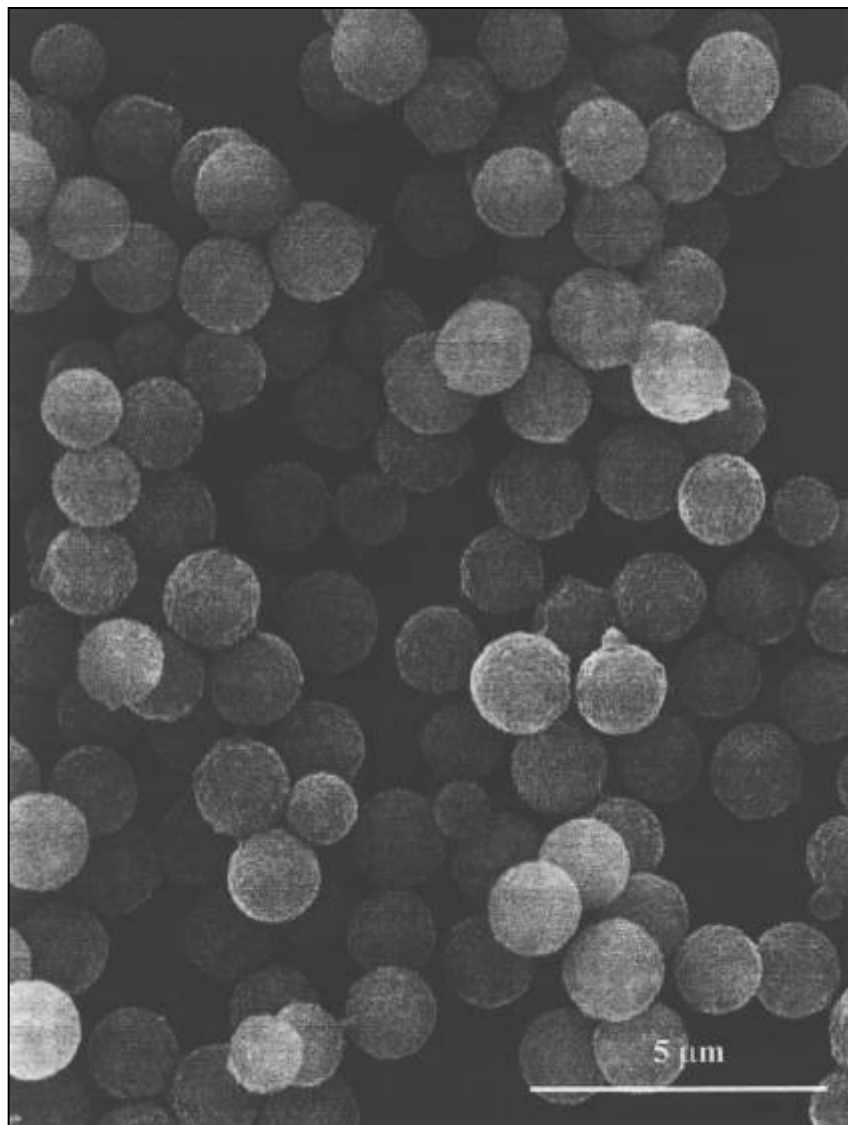
---

## Jako nosiče se používají:

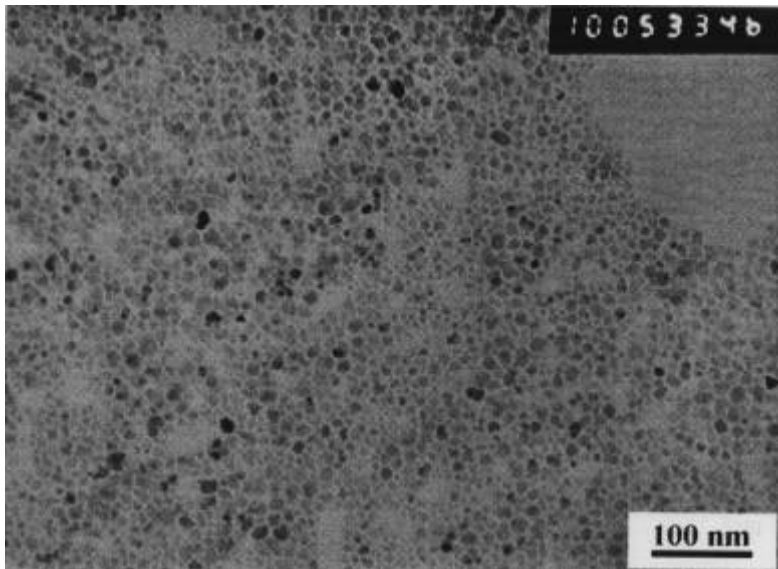
- přírodní polymery
  - syntetické polymery
  - anorganické nosiče – sklo, silikagel, oxidy železa
  - porézní, neporézní
  - různé velikosti:  $\mu\text{m}$  – rychlost sedimentace, pipetování,  $\text{nm}$  – nemusí se promíchávat (Brownův pohyb)
-



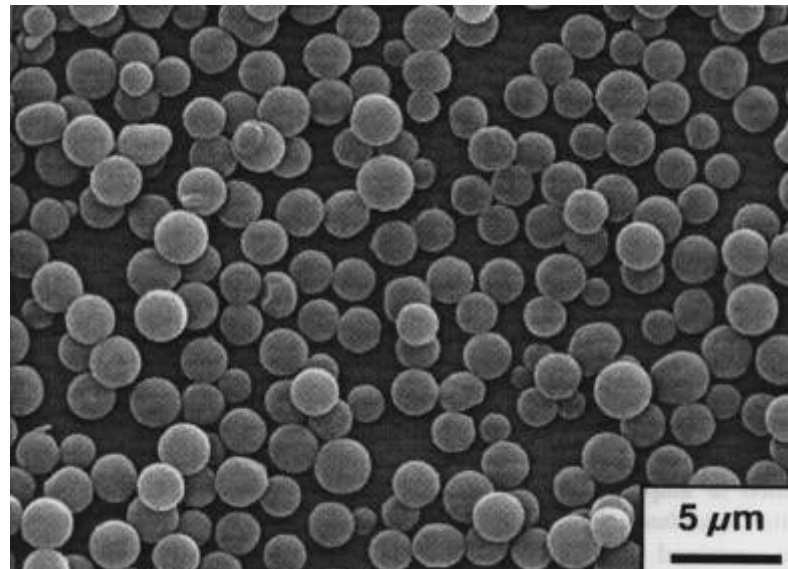
Magnetické polystyrenové nosiče Dynabeads (částice 4,5  $\mu\text{m}$  a 2,8  $\mu\text{m}$ )



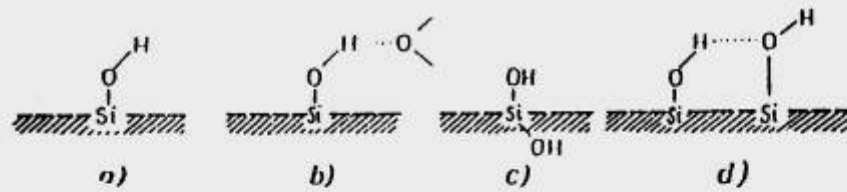
Magnetický poly(2-hydroxyethylmethakrylátový) nosič (Horák D. a spol. 2001)



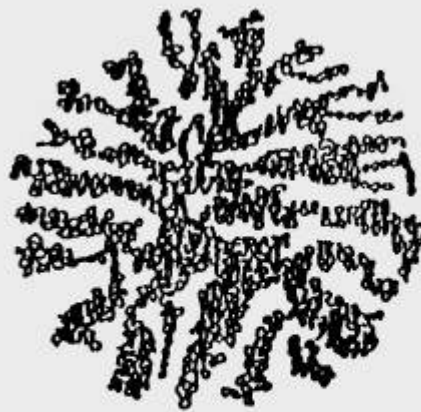
EM fotografie maghemitu (Rittich  
B. a spol. 2004)



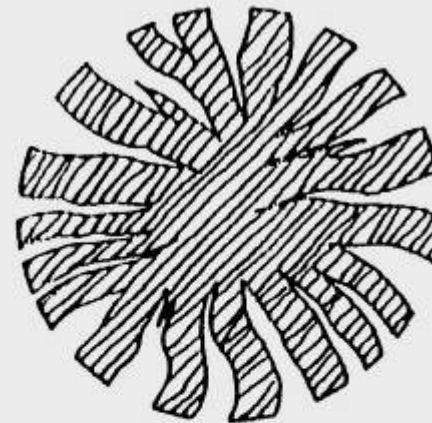
Magnetický P(HEMA-co-GMA)  
nosič (Španová A. a spol. 2004)



Typy hydroxylových skupin na povrchu silikagolu [85]  
*a* – volná, *b* – vázaná, *c* – geminální, *d* – reaktivní



SILIKAGEL



PORÉSNÍ SKLO

# Ligand určuje charakter použití nosiče:

- musí obsahovat vhodnou skupinu, pomocí níž je imobilizován na nosič
- musí mít dostatečnou afinitu pro izolovanou látku (afinitní konstanta  $K=10^{-4} - 10^{-8}$ )

Nejčastěji se vyskytující afinitní konstanty u některých afinitních párů:

Vazebná bílkovina	Cílová molekula	$K_D$ ( $M^{-1}$ )
Avidin	Biotin	$10^{-15}$
Streptavidin	Biotin	$10^{-15}$
Receptory	Hormony, toxiny apod.	$10^{-9}$ – $10^{-12}$
Protilátky	Antigeny	$10^{-7}$ – $10^{-11}$
Transportní proteiny	Vitaminy, cukry apod.	$10^{-6}$ – $10^{-8}$
Lektiny	Sacharidy	$10^{-3}$ – $10^{-6}$
Enzymy	Substráty	$10^{-3}$ – $10^{-5}$

---

# Afinitní ligandy v molekulární diagnostice:

- celé buňky
  - protilátky
  - enzymy
  - oligonukleotidy
  - streptavidin, biotin
  - lektiny, sacharidy
  - barviva
  - nízkomolekulární látky (EDTA nebo IDA)
-

---

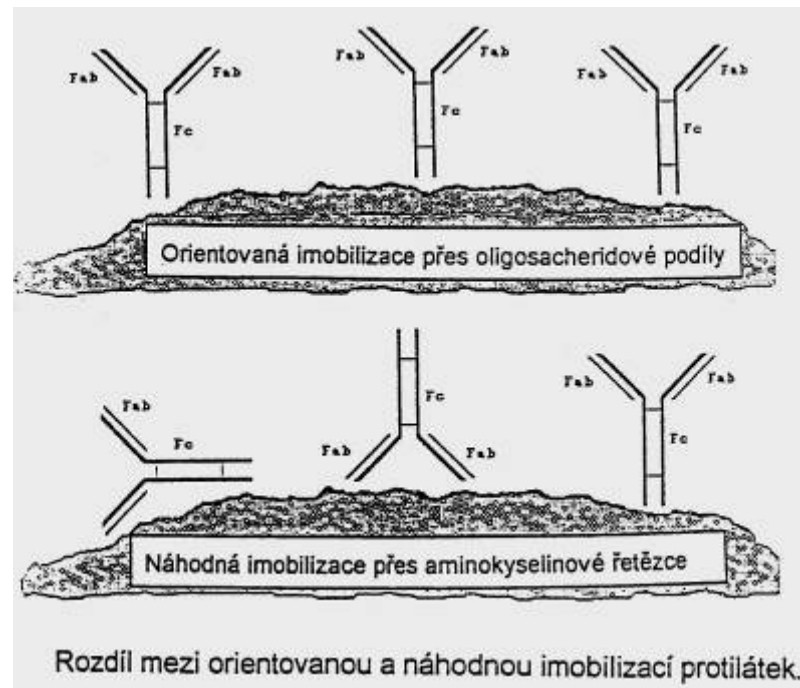
## Způsoby imobilizace ligandu na nosič:

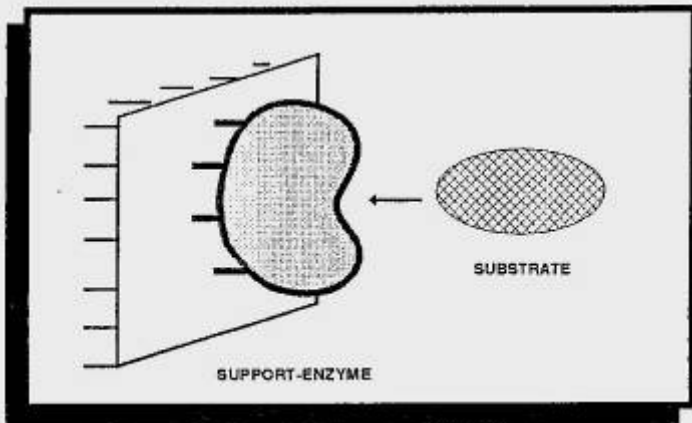
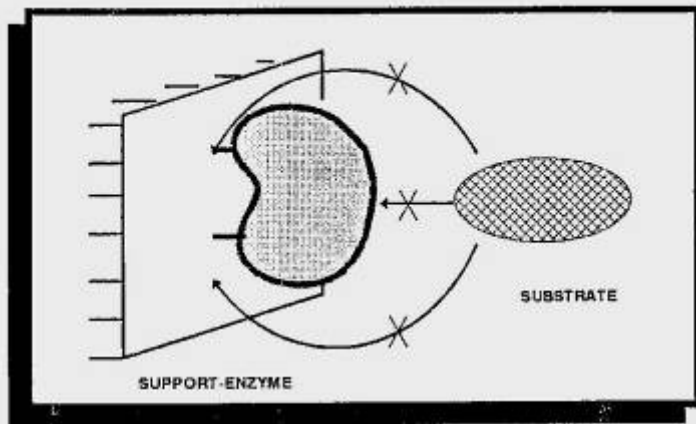
- fyzikální adsorbce (nekovalentní připojení) - snadná, rychlá, bez poškození ligandu, vymývání
  - chemická vazba (kovalentní) – umožňuje imobilizovat různé makromolekuly – protilátky, proteiny, nukleové kyseliny
-



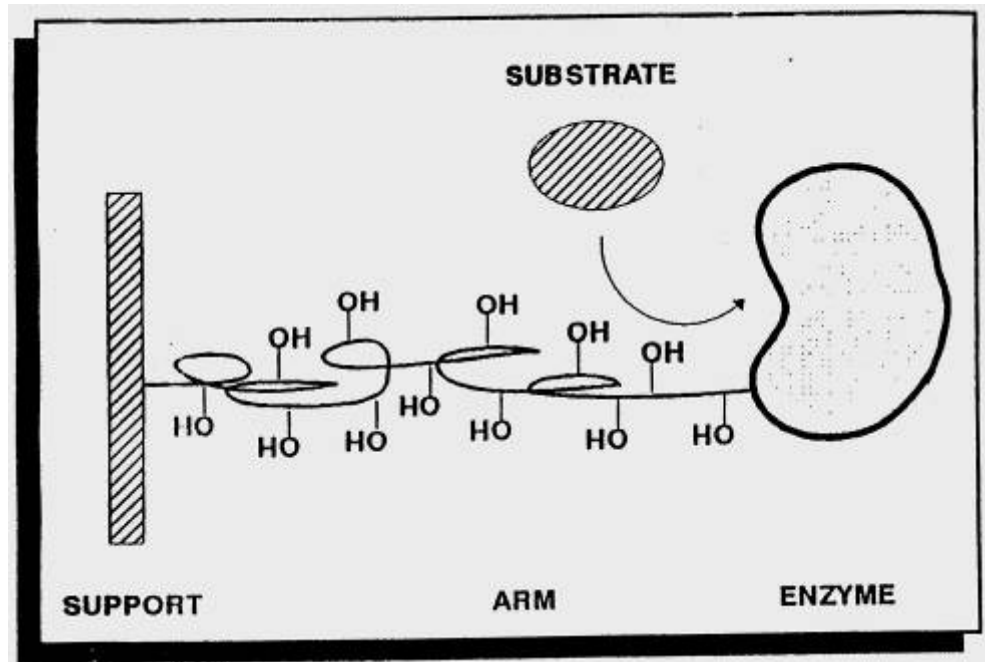
# Důležitá je stérická přístupnost ligandu pro izolovanou buňku (molekulu):

- přístupnost lze zvýšit orientovanou immobilizací (např. protilátky)
- použitím mezerníku





Stérická překážka u imobilizovaného enzymu a její odstranění



Odstranění stérické překážky použitím raménka (Šafařík a spol. 1999)

---

## Imobilizované systémy s magnetickými nosiči nacházejí v molekulární diagnostice uplatnění:

- 1. při přípravě vzorků k analýze
  - 2. jako součást detekčních systémů
  - 3. jako nosiče katalyzátorů
-

---

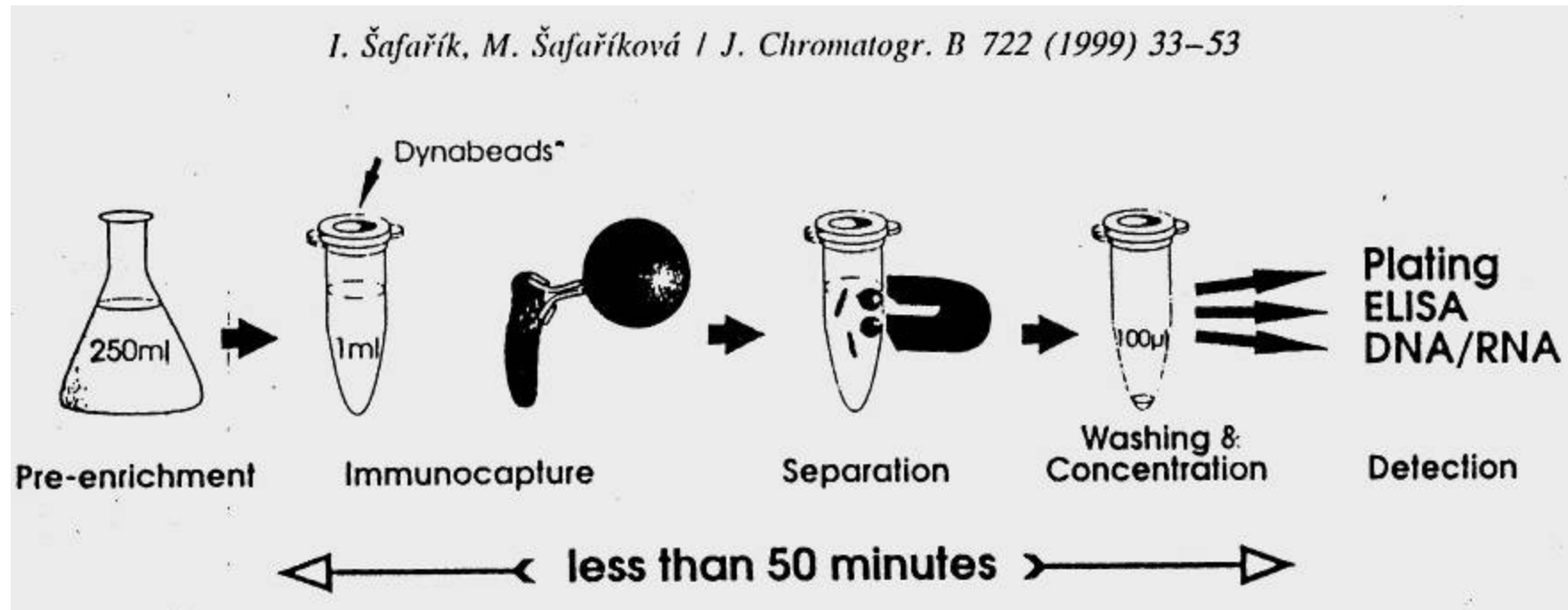
# 1. Příprava vzorků k analýze

## Izolace mikrobiálních buněk:

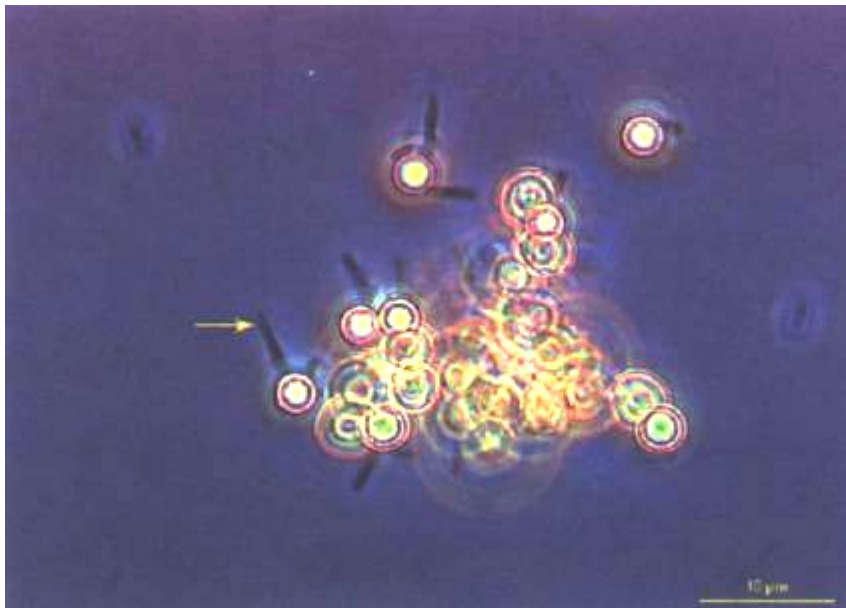
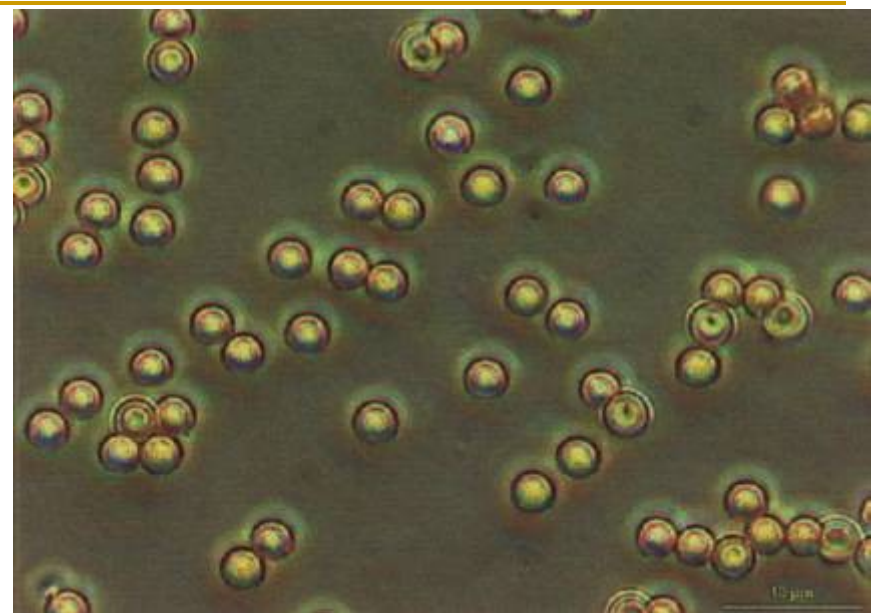
- buňky bakteriální
  - *Salmonella*
  - *E. coli* O157
  - *Listeria monocytogenes*
-

# Imunomagnetická separace buněk (IMS)

IMS buněk ze vzorku obsahujícího inhibitory PCR pomocí protilátek navázaných na povrch nosiče. IMS umožňuje izolaci subletálně poškozených buněk a nekultivovatelných buněk.



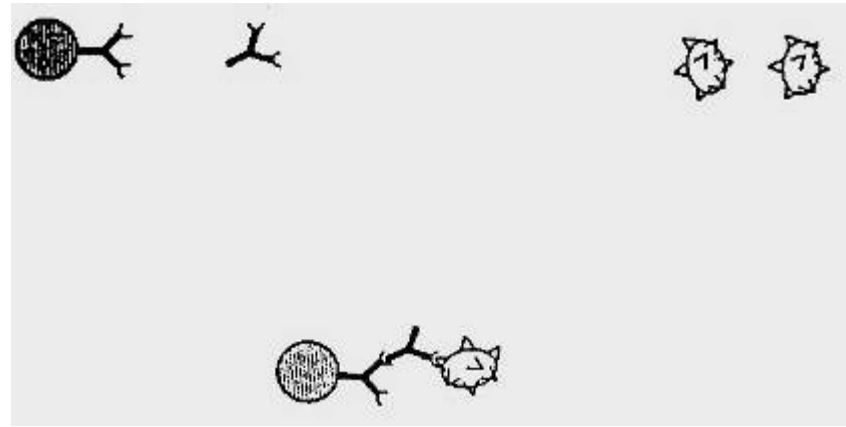
Použití magnetických kuliček antiSalmonella pro izolaci buněk *Salmonella*



Vazba buněk na protilátku  
imobilizovanou na nosiči (Horák D. a  
spol. 2003, Španová A. a spol. 2003)  
Ukázka magnetického nosiče,  
separátoru a jeho použití

# Izolace eukaryotních buněk:

- krevní leukocyty
- T a B lymfocyty
- granulocyty
- monocyty
- makrofágy
- NK buňky
- nediferencované buňky - hematopoetické progenitorové buňky
- hybridomy
- transfekované buňky



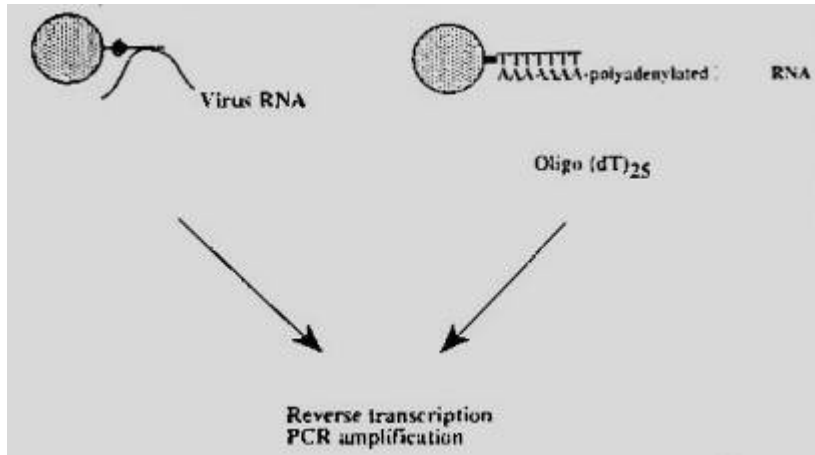
Imunomagnetická separace eukaryotních buněk (Dynal)

---

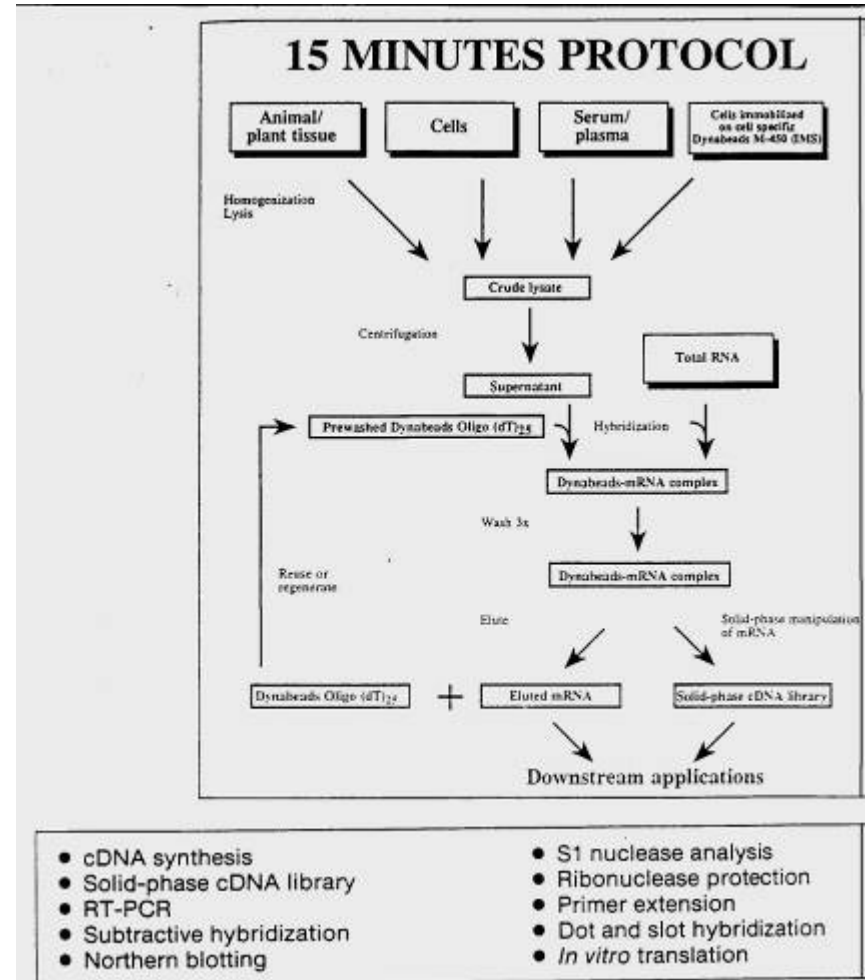
## Izolace makromolekul:

- izolace mRNA z eukaryotních buněk s využitím imobilizovaného oligo (dT)<sub>25</sub>
  - izolace cílových sekvencí ssRNA a ssDNA s využitím oligonukleotidů specifické sekvence, nabohacení
  - Pro izolaci rekombinantních proteinů s His značkou lze použít magnetické nosiče s imobilizovanými cheláty (komplexy) kovů (Co, Zn, Cu)
-





Izolace specifických molekul ssRNA  
(Dyna)



Izolace mRNA z hrubých lyzátů buněk  
(Dyna)

---

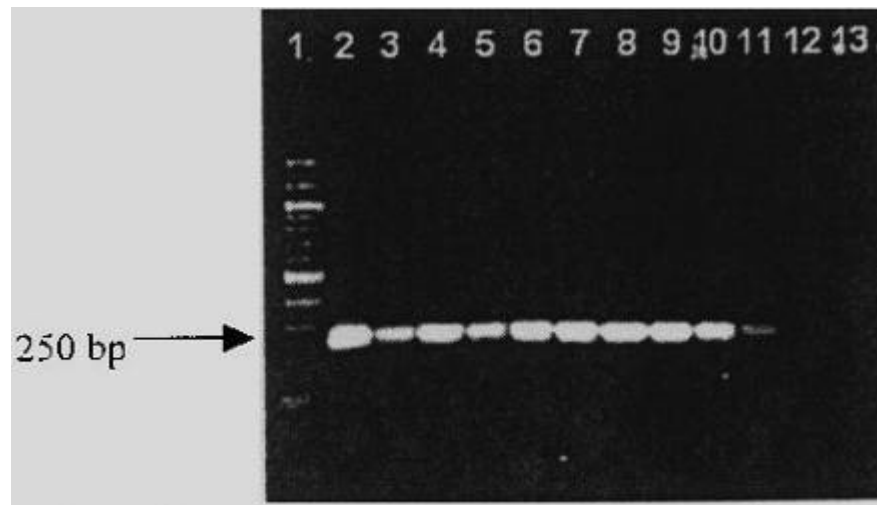
## Izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR s magnetickými nosiči pokrytými karboxylovými skupinami

- v přítomnosti NaCl a PEG
  - izolace genomové DNA z hrubých lyzátů buněk
  - purifikace PCR produktů (před sekvencováním, RFLP)
-

Tab. Množství DNA eluované z 10  $\mu$ l nosiče

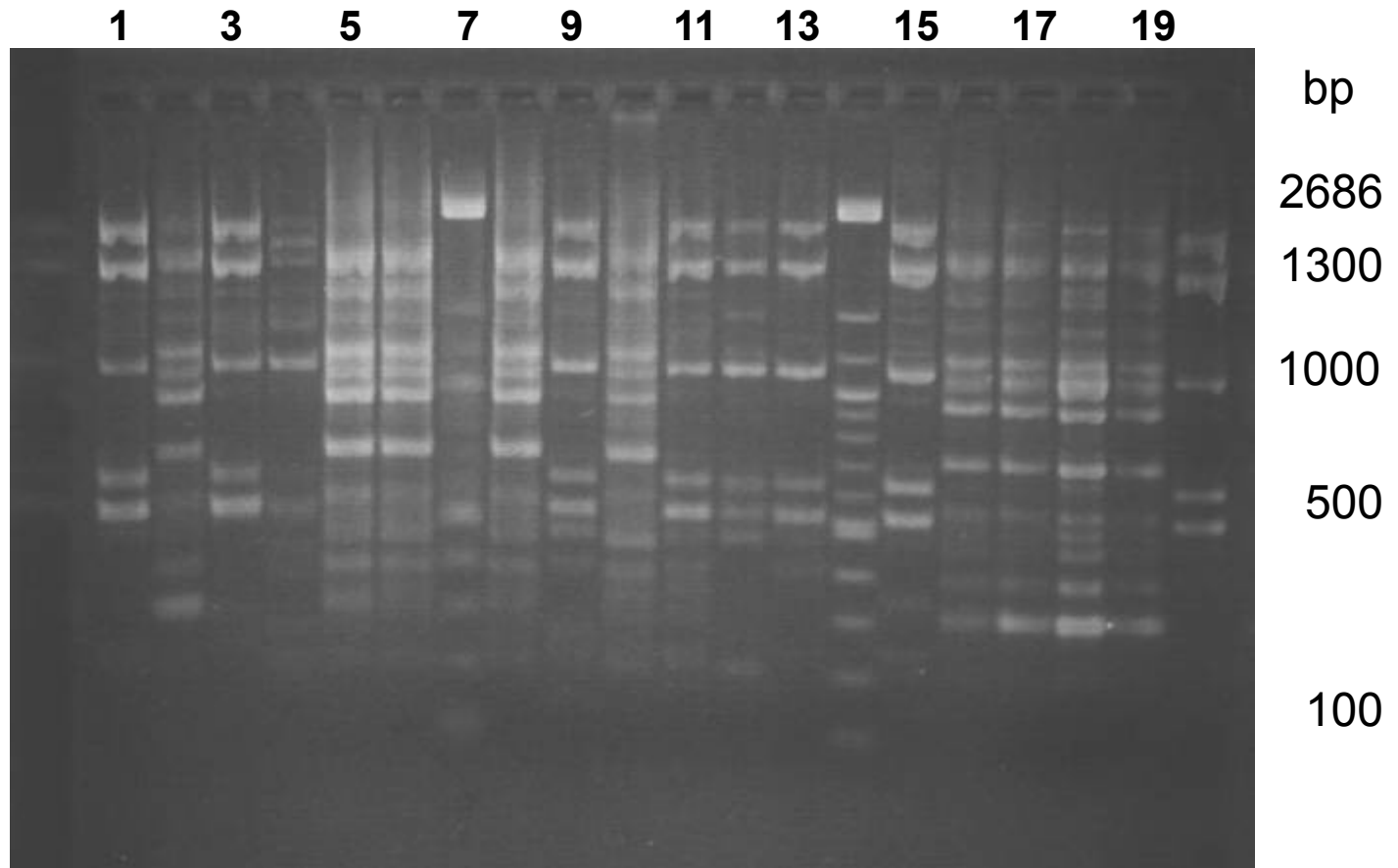
Běh č.	DNA	Výsledek	Množství DNA [ng]	
1	Hmotnostní standard <i>Salmonella typhimurium</i> LB5000	+	25	
2		+	50	
3		++	100	
4		+++	200	
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	81/00	++++	>200
6		82/00	++++	>200
7		85/00	+++	100
8		91/00	+++	100
9		92/01N	++++	>200
10		98/01N	++	100
11		102/00	++	100
12		109/00	++	100
13		63/00	++	100
14		382/01	++	100

Obr. Gelová elektroforéza PCR produktů. Běh č. 1 DNA standard, běh č. 2-10 specifické PCR produkty



Izolace bakteriální DNA z HL buněk z lyofilizátů pomocí FH46-COOH nosiče a její amplifikace v PCR (Petrová 2004, DP)

Obr. Gelová elektroforéza RAPD produktů různých kmenů hub. Běh č. 7 a 14 DNA standard.



Molekulární typizace genomové DNA separované s využitím nosiče FH46-COOH (Španová A. a spol. 2003)

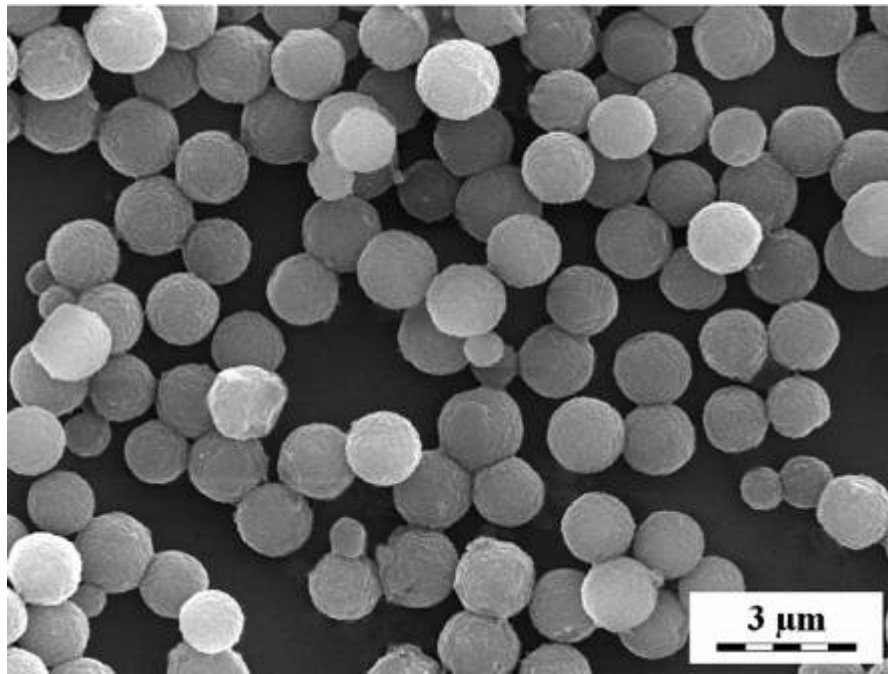
# Bajkalské sedimenty

Depth (cm)	Sample No	Bacterial cells cfu/g (4 °C)		DNA isolation (phenol extraction)	PCR	
		Posolsky Bank OZ-18A	Selenga Delta OZ-19B		ii	iii
0 - 10	1	470		++	-	+++
	2		730	+++	-	+++
10 - 20	3	195		+/-	-	+
	4		420	++	-	++
20 - 30	5		32	+	-	+++
	6	70		+/-	-	++
30 - 40	7		9	+	-	++
	8	0		+/-	-	+
40 - 50	9	0		+/-	-	++
	10		49	+	-	+
50 - 54	11		18	+/-	-	-

- Characteristics of analysed samples and the effect of DNA isolation procedure on PCR course
- (ii) - Soil DNA Isolation Kit, (iii) - Soil DNA Isolation Kit with additional DNA purification by carboxyl-functionalised magnetic P(HEMA-co-EDMA) microspheres. DNA isolation and PCR: +++, ++, +, +/- denote bands of very high, high, good, and weak intensity; - no band.

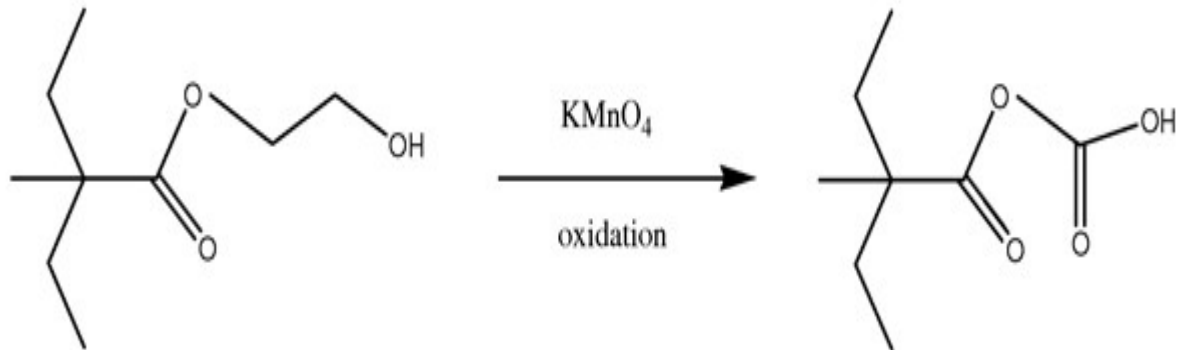
# Bajkalské sedimenty

- A scanning electron micrograph of magnetic nonporous P(HEMA-co-EDMA) microspheres

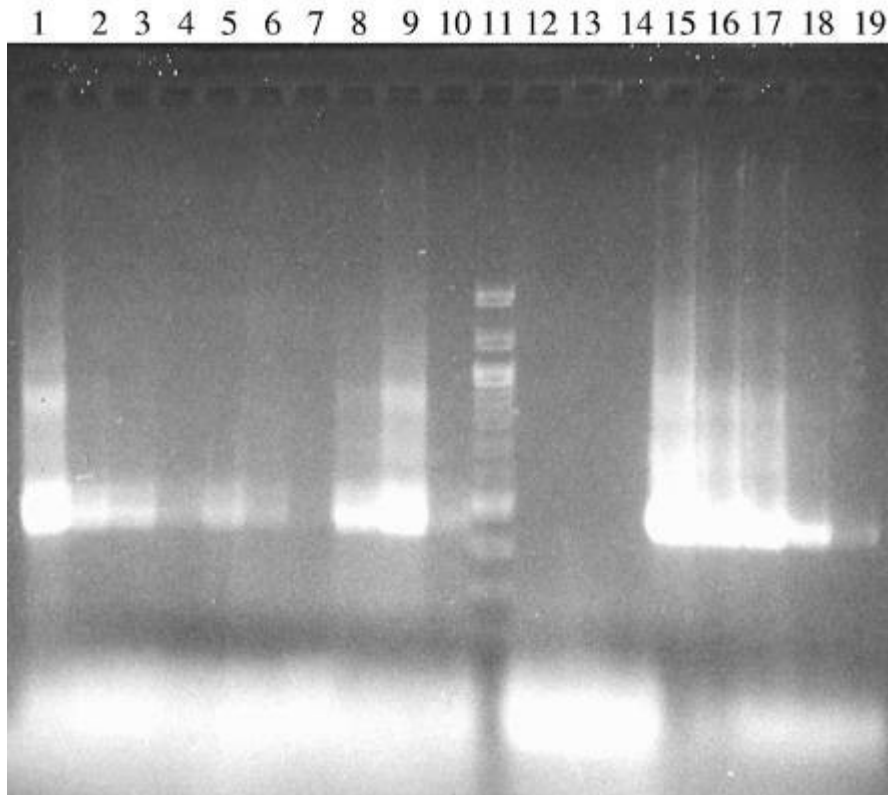


# Bajkalské sedimenty

- Schéma oxidace magnetických P(HEMA-co-EDMA) mikročastic



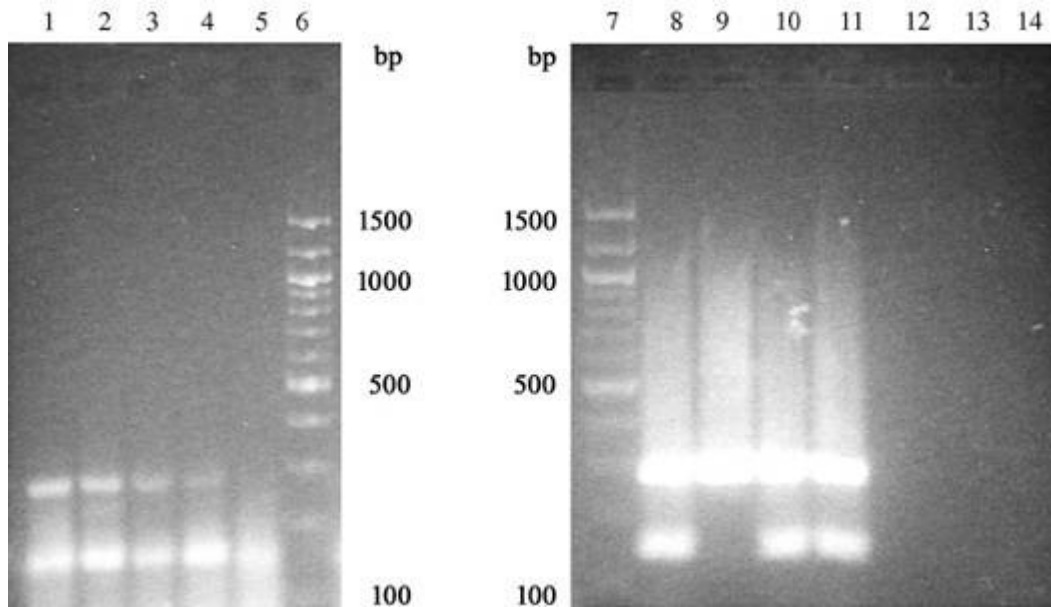
# Bajkalské sedimenty – PCR, univerzální primery



- Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNA extracted using kit and carboxyl-functionalised magnetic P(HEMA-co-EDMA) microspheres.
- Lanes 1-10: samples from different locations and depths of Lake Baikal,
- lane 11: DNA standard (100 bp ladder),
- lanes 12-14: DNA isolated using the kit without the step of DNA repurification with magnetic microspheres,
- lanes 15-19: amplicons amplified from bacterial weight DNA standards (5 ng, 500, 50, 5 pg, and 500 fg).



# Bajkalské sedimenty – PCR, psychrotrofní



- Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNA isolated using carboxyl-functionalised magnetic P(HEMA-co-EDMA) microspheres.
- Lanes 1-5: Selenga Delta samples from 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, and 40-50 cm depths, respectively;
- lanes 6 and 7: DNA standard (100 bp ladder);
- lane 8: psychrotrophic *Bacillus cereus* CCM145 control DNA (10 ng);
- lane 9: mesophilic *B. thuringiensis* CCM19T control DNA (10 ng);
- lanes 10 and 11: psychrotrophic *B. mycoides* strains isolated from Baikal Lake sediments at 0-10 and 20-30 cm depth (10 ng);
- lane 12: negative control (water instead of DNA);
- lanes 13 and 14: DNA from Baikal Lake sediment samples (Selenga Delta, 0-10 cm) isolated using the kit or phenol extraction, respectively (without the step with magnetic microspheres).

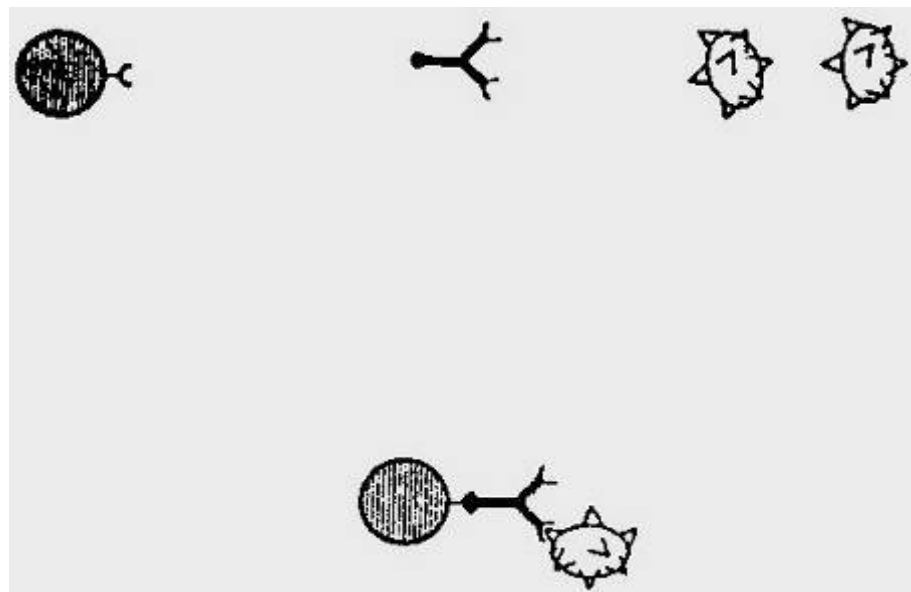
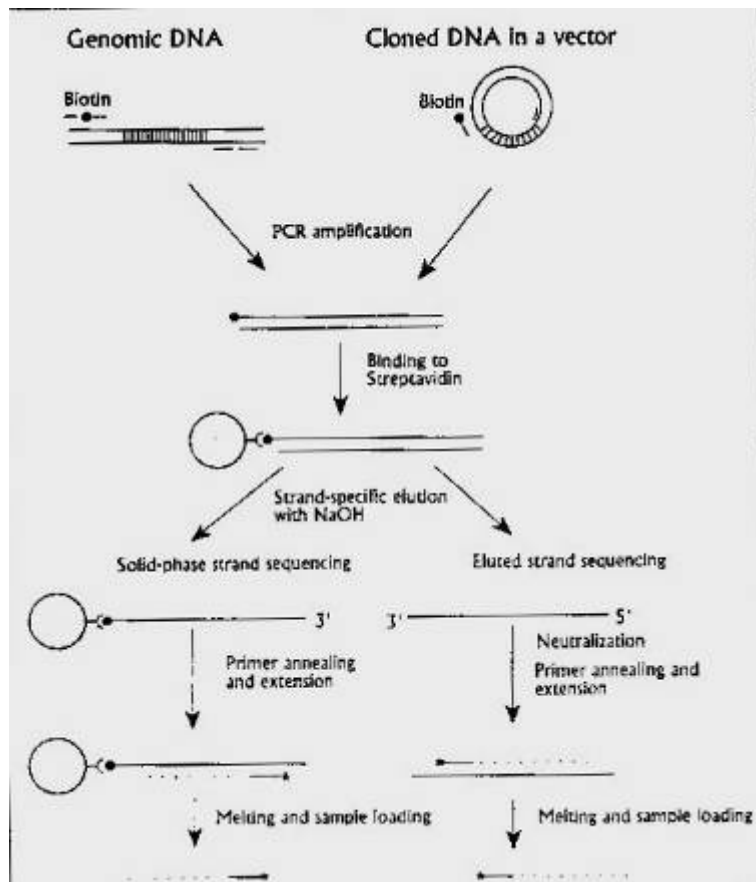
---

2. Magnetické nosiče jako součást detekčních systémů – jako ligand se používá streptavidin, na který se váže:

- komplex buňky s biotinylovanou protilátkou
  - biotinem značená DNA
-



Ing. Jaroslava Turková, DrSc., prof. M. Wilchek



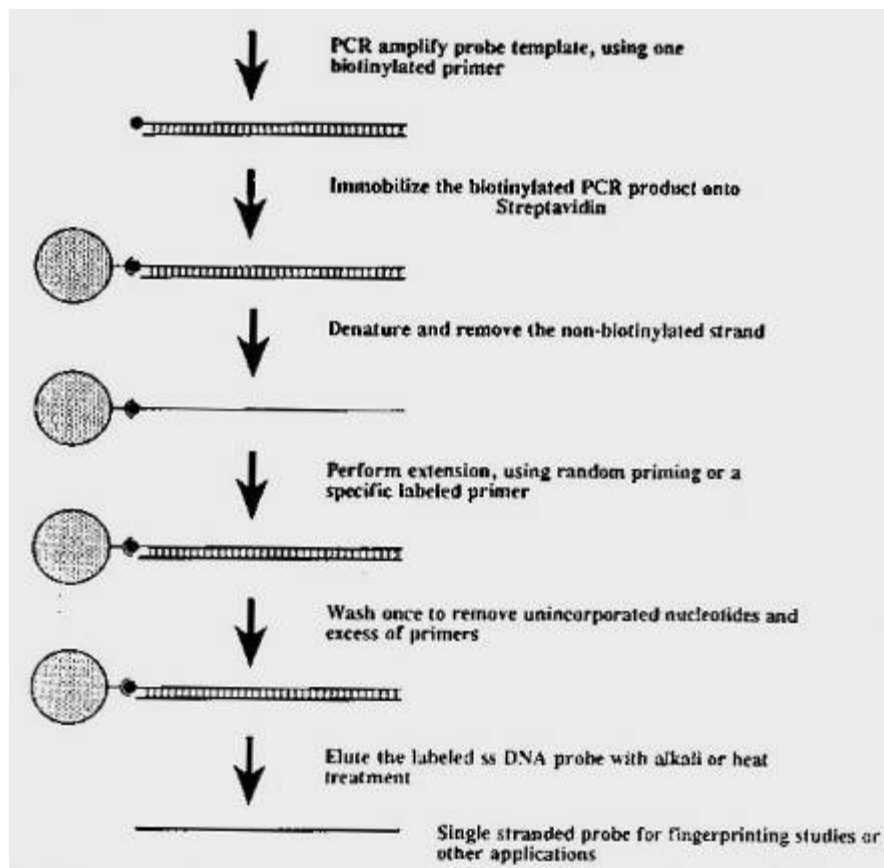
Využití nosiče s imobilizovaným streptavidinem při izolaci biotinylované DNA (Dyna)

Izolace komplexu buňka-biotinylovaná protilátka s využitím nosiče s imobilizovaným streptavidinem (Dyna)

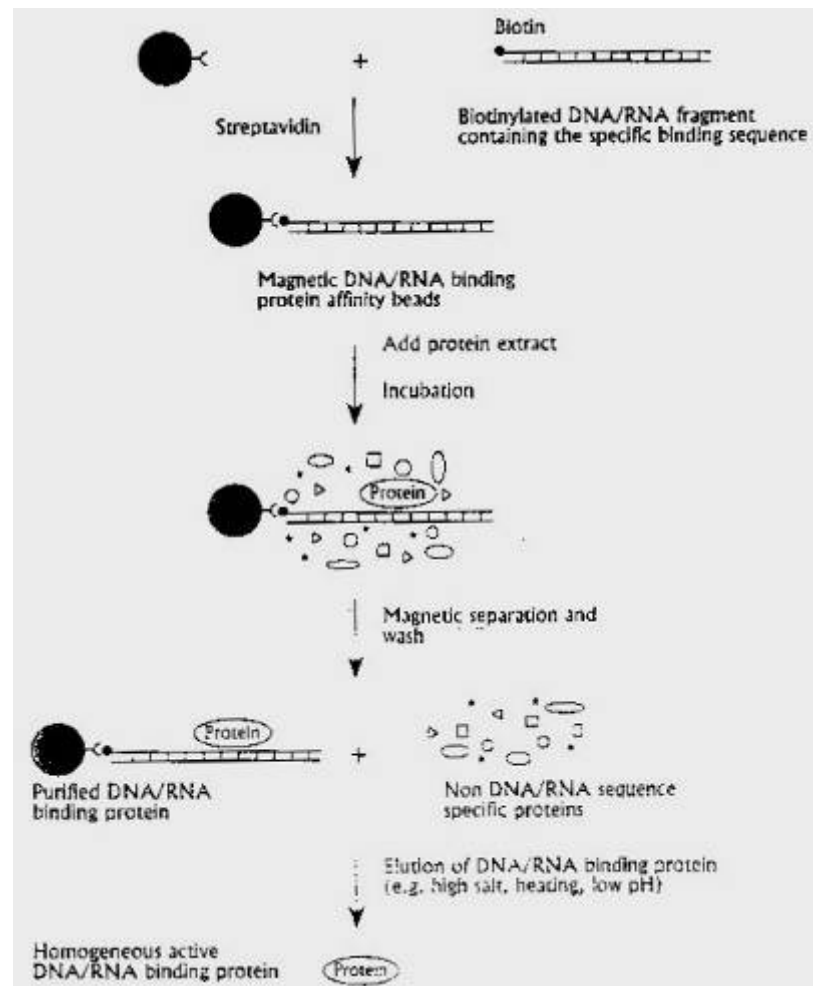
---

Biotinem značená DNA navázaná na nosič se streptavidinem může být použita:

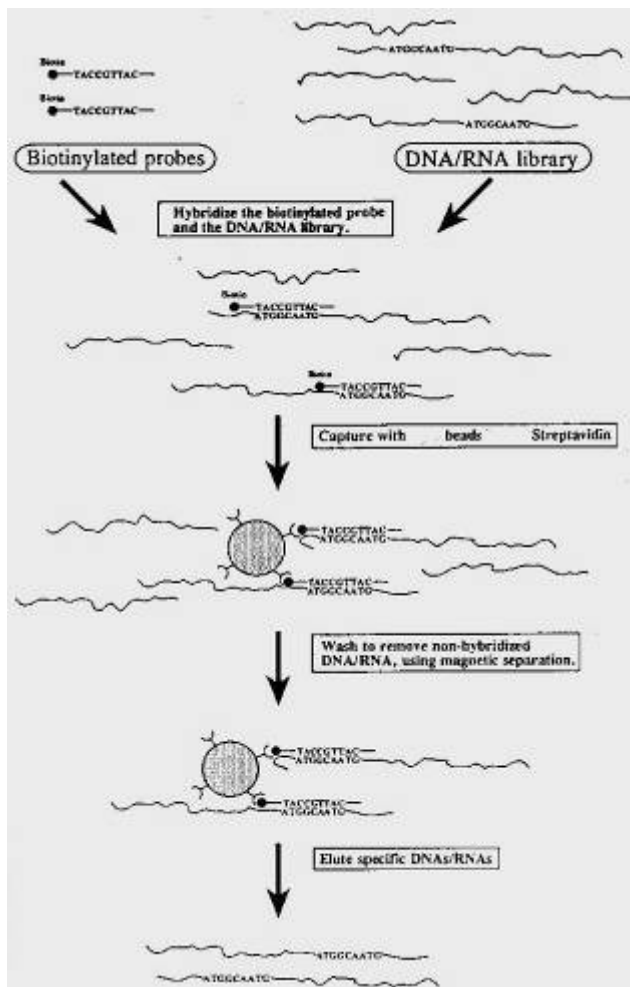
- pro sekvencování
  - pro přípravu sondy (značení ssDNA)
  - pro izolace proteinů vázajících se na DNA
  - pro vyhledávání specifických fragmentů DNA
  - pro přípravu syntetického genu
-



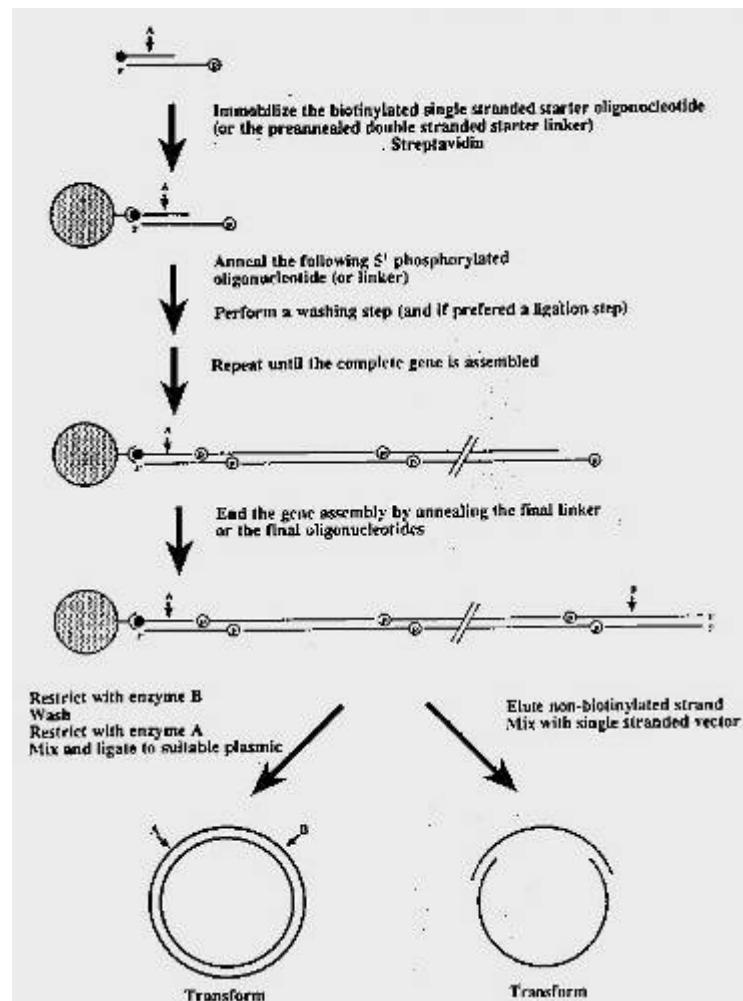
Příprava jednořetězové DNA sondy  
(Dynal)



Izolace proteinů vázajících se na DNA  
(Dynal)



Využití biotinylovaných DNA sond při vyhledávání specifických fragmentů DNA (Dynal)



Příprava syntetického genu s využitím imobilizovaného systému (Dynal)

---

### 3. Magnetické nosiče jako nosiče katalyzátorů

Imobilizací enzymu na nosič vznikne heterogenní katalyzátor:

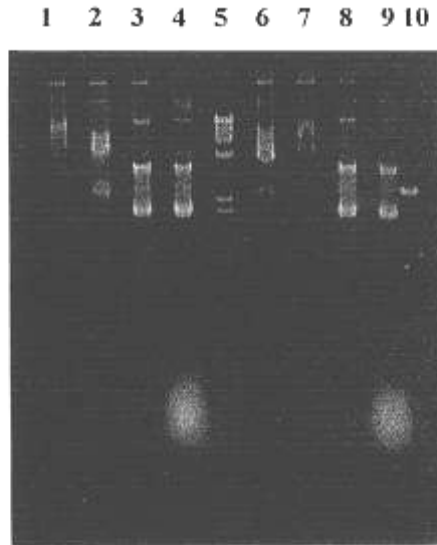
- snadno oddělitelný z reakční směsi
  - možnost okamžitého ukončení reakce
  - možnost opakovaného použití
-



# Příklady využití imobilizovaných enzymů:

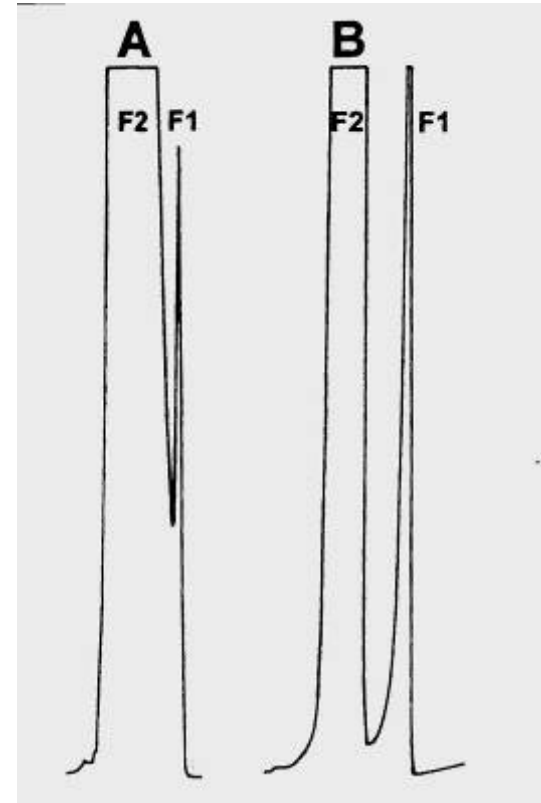
## ■ Imobilizovaná RNáza A

### Obr. Gelová elektroforéza plasmidové DNA



Crude cell lysates digested for 30 min (lanes 1-3), or 60 min (lanes 6-8)  
1,6 free RNase A; 2,7 free RNase A (DNase activity lost by boiling); 3,8 RNase A immobilized on MBC 1; 4,9 blanks without RNase A; 5 lambda DNA/Hind III standard;  
10 linearised pUC19 DNA

Štěpení bakteriální RNA v nepurifikovaném vzorku plasmidové DNA pomocí imobilizované RNázyA (Rittich a spol. 2000)



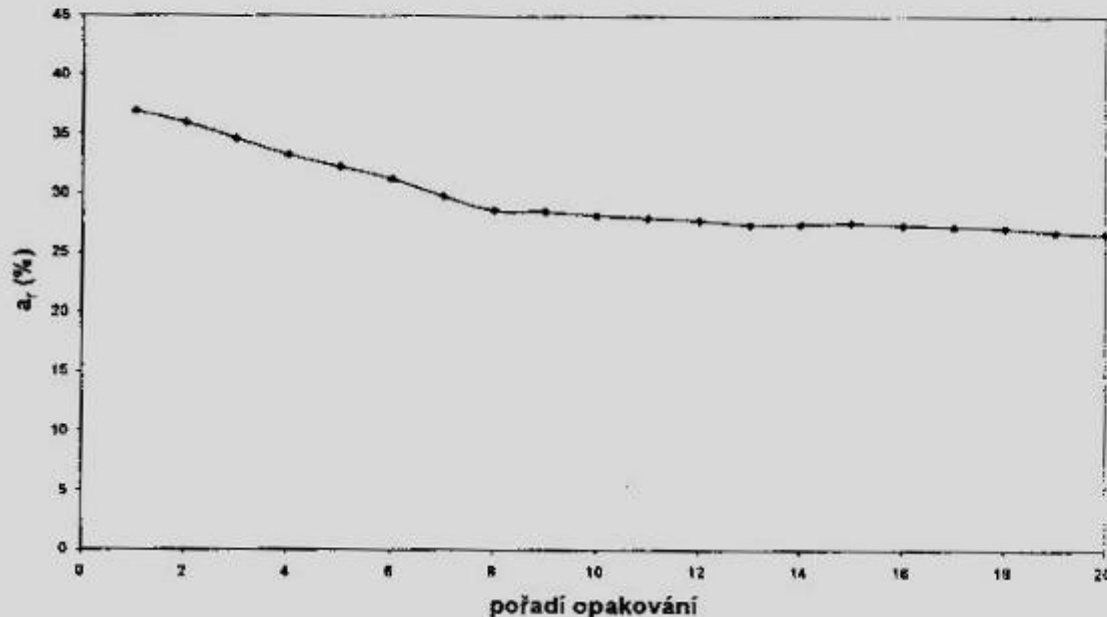
A) RNA neštěpena  
B) RNA štěpena

Chromatografická purifikace plasmidové DNA pUC 19 (Rittich a spol. 2000)

# Příklady využití imobilizovaných enzymů:

## ■ Imobilizovaná DNáza I

**Graf** Studium opakovaného použití DNázy I imobilizované na magnetické perlové celulóze při degradaci vysokomolekulární DNA po aktivaci ionty  $Mn^{2+}$

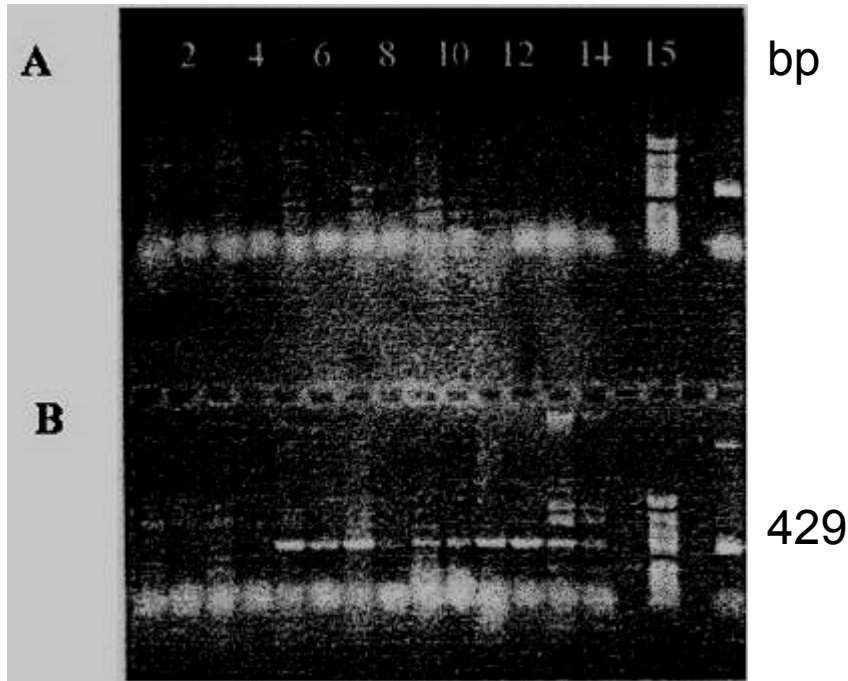


Aktivita imobilizované DNázy I při štěpení vysokomolekulární DNA  
(Rudolf I. 2001, DP)

# Příklady využití imobilizovaných enzymů:

## ■ Imobilizovaná proteináza K

Obr. Gelová elektroforéza PCR produktů



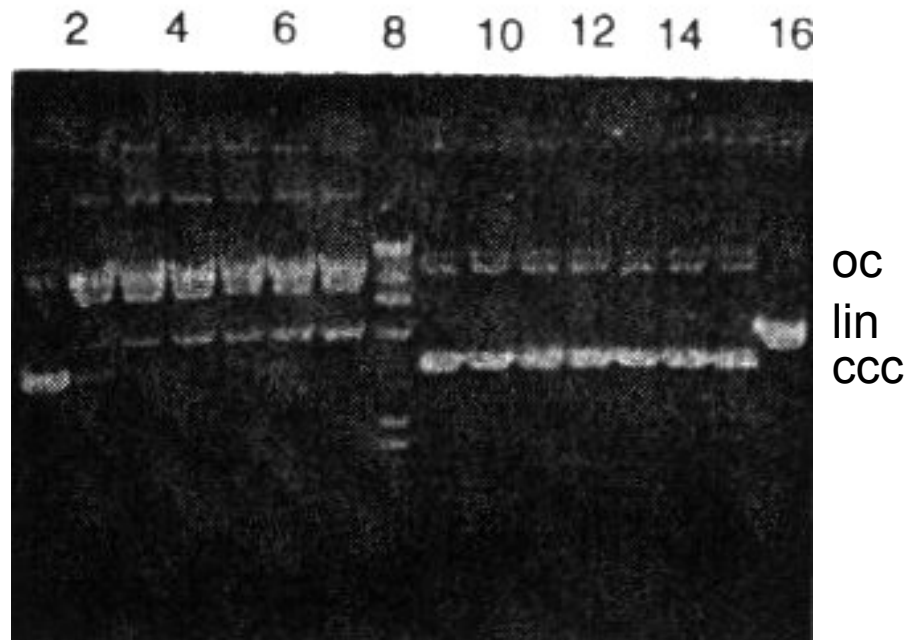
Běh č.	Ředění DNA matrice		Způsob eliminace inhibitoru PCR		Přítomnost PCR produktu	
	A	B	A	B	A	B
1	N	N	var 10 minut	IPK I. 1h / 55°C	-	-
2	10x	10x			-	-
3	N	N	var 20 minut	IPK I. ON / 55°C	+/-	-
4	10x	10x			-	+/-
5	N	N	var 30 minut	IPK II. 1h / 55°C	+/-	+++
6	10x	10x			-	++
7	N	N	volná PK 1 mg/ml	IPK II. ON / 55°C	+/-	+++
8	10x	10x			-	+
9	N	N	volná PK 10 mg/ml	IPK III. 1h / 55°C	+/-	+
10	10x	10x			-	+
11	N	N	volná PK 100 mg/ml	IPK III. ON / 55°C	-	+++
12	10x	10x			-	+++
13	N	N	bez volné PK	purifikovaná DNA	-	++
14	10x	10x			-	+
15	DNA marker 155-970					
16	<i>Salmonella Typhimurium</i> LB 5000 (22/3)					

Použití imobilizované proteinázy K při štěpení vnitrobuněčného inhibitoru PCR v hrubém lyzátu buněk terénního kmene *Salmonella* (Prodělalová J. 2001, DP)

# Příklad využití imobilizovaného systému – IDA, EDTA

- Imobilizované komplexy lanthanoidů při štěpení plasmidové DNA

Obr. Gelová elektroforéza plasmidové DNA pBR322 Běh č. 1-7 štěpení 0-180 min. při 63 C, č.9-15 kontrola, č.8 DNA marker, č. 16 pBR322/EcoRI



Štěpení plasmidové DNA imobilizovaným komplexem  $Nd^{3+}$  (Rittich a spol. 2004)

---

## Závěr:

Magnetické nosiče bývají řazeny mezi tzv. inteligentní částice, jelikož mění své vlastnosti změnou vnějších podmínek – magnetického pole. Pro svou schopnost reagovat na změnu prostředí bývají tyto částice rovněž nazývány částicemi 3. tisíciletí.

---