

**Vypracování praktické úlohy věnované využití elektromigračních technik  
při studiu vlastností mikroorganismů**

## **OBSAH:**

<b>1. TEORIE K CVIČENÍ</b>	<b>3</b>
1.1. Isoelektrická fokusace	3
1.2. Kapalinová chromatografie s monolytickou kolonou	5
1.3. <i>Candida parapsilosis</i>	6
<b>2. ZADÁNÍ ÚLOHY</b>	<b>7</b>
2.1. Přístroje a pomůcky	7
2.2. Chemikálie	7
2.3. Úkoly k úloze	7
2.4. Vlastní analýza	8
2.4.1. Vzoroky, příprava lyzátů	8
2.4.2. IEF analýza	8
2.4.3. Příprava roztoků a analýza cIEF	9
2.4.4. Analýza HPLC	9
<b>3. VRACOVÁNÍ PROTOKOLU</b>	<b>10</b>
3.1. Analýza jednotlivých kvasinek cIEF	10
3.2. Analýza lyzátů kvasinek metodou IEF	11
3.3. Analýza lyzátů kvasinek metodou HPLC	12
	12
<b>4. ZÁVĚR</b>	<b>13</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>14</b>

# 1. Teorie k cvičení

Účinné, široce aplikovatelné analytické techniky pro detekci, separaci a kvantifikaci mikroorganismů (MO) (analogicky jako je tomu při analýze molekul) mohou změnit aspekty mikrobiologie při diagnostice lidských, zvířecích i rostlinných patogenů v medicíně, zemědělské výrobě, biotechnologii, životním prostředí a v mnoha jiných oborech. Rozvoj moderních kapilárních elektroforetických technik (CE) umožňuje detekci až jednotlivých buněk, takových jako např. červených krvinek [1 – 5]. Vysoce selektivní a účinné separační postupy, používané při analýzách jednotlivých molekul, mohou být vhodné i pro mikroorganismy [6,7].

Dále je možné sledovat zejména molekulární složení v buňkách (tzn. proteiny, mastné kyseliny, fosfolipidy, peptidy, atd.), kdy lze na základě tzv. “fingerprintu” – specifických, jednoho nebo více znaků, charakterizovat konkrétní mikroorganismus [8,9].

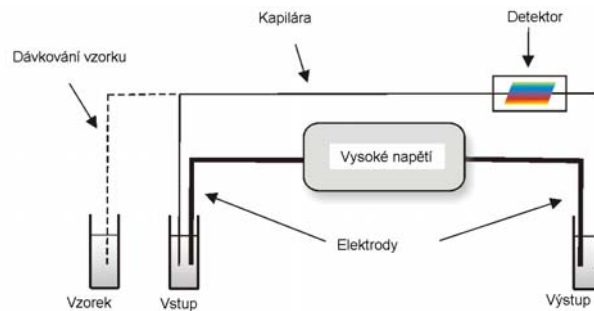
Cílem této úlohy je zavedení elektromigračních metod pro studium vlastností kvasinek. Zaměření bude na rozlišení biofilmových a nebiofilmových kvasinek *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) pomocí isoelektrické fokusace v kapiláře, analýza a vytvoření fingerprintu proteomického složení pomocí isoelektrické fokusace na gelu a kapalinové chromatografie.

## 1.1. Isoelektrická fokusace

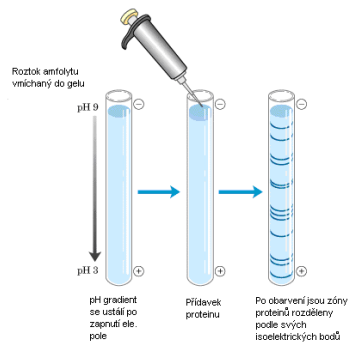
Isoelektrická fokusace (isoelectric focusing - IEF) umožňuje dělení amfoterních látek (bílkovin a peptidů), ale i MO podle jejich isoelektrických bodů, tj. podle distribuce kladných a záporných nábojů v jejich molekulách. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je tvořen působením elektrického pole na směsi amfolytů, jež tvoří nosný elektrolyt této metody. Dělené látky (MO) v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. Pro dosažení vysoké účinnosti analýzy jsou potřebné tzv. pI markery. Kromě klasických proteinových standardů, jsou používány i nízkomolekulární pI markery [10,11].

Podle způsobu provedení lze isoelektrickou fokusaci rozdělit na:

a) kapilární isoelektrická fokusace - cIEF



b) isoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu - IEF



Sestava zařízení pro cIEF se skládá z:

- zdroje vysokého napětí (stejnoseměrné; vysokonapět'ové; v rozsahu od 0 do  $\pm 30$  kV; připojeno na elektrody),
- separační kapiláry (z křemenného skla; potažena vrstvou polyimidu; vnitřní průměr kapiláry: 50 – 100  $\mu\text{m}$ , vnější: 350 – 400  $\mu\text{m}$ ; celková délka kapiláry se obvykle pohybuje od 20 do 100 cm; konce kapiláry jsou ponořeny do rezervoárů),
- rezervoárů (tj. zásobníky s katolytem a anolytem, vzorky nebo chemikáliemi na promývání kapiláry; snadno mezi sebou nahrazovány),
- dvou elektrod (zavedené do rezervoárů),
- detektoru (UV-VIS)

Sestava zařízení pro IEF se skládá z:

- zařízení BIO-RAD model 111 mini IEF cel,
- zdroje vysokého napětí (stejnoseměrné; vysokonapět'ové; v rozsahu od 0 do  $\pm 30$  kV; připojeno na elektrody).

## 1.2. Kapalinové chromatografie s monolitickou kolonou

Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi.

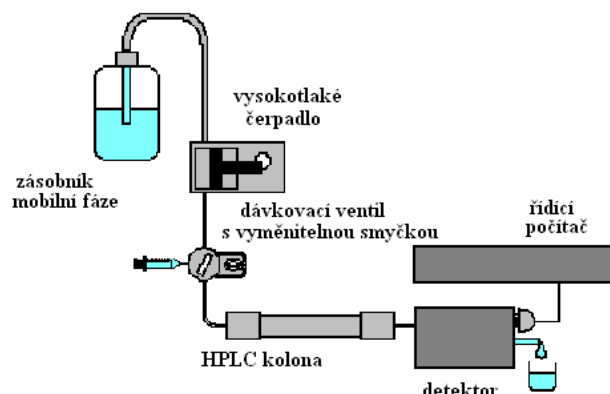
### Mobilní fáze

Mobilní fáze je ta, která se v chromatografickém systému pohybuje. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn. Je-li mobilní fází kapalina, pak takovou chromatografii nazýváme „kapalinová chromatografie“.

### Stacionární fáze

Stacionární fáze je v chromatografickém systému ta fáze, která je nepohyblivá. Stacionární fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce.

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo ul). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC.



Obrázek 2: schéma HPLC sestavy

### ***1.3. Candida parapsilosis***

*C. parapsilosis* je druh kvasinky izolované nejčastěji z pokožky, zejména z prostoru pod nehty zdravých lidí (12) a je považován za součást normální mikroflóry kůže. Na druhé straně může být významný nozokomiální patogen, který způsobuje závažné onemocnění, zejména infekcí krevního řečiště a endokarditida (zánět vnitřní výstelky srdce) (13).

Extracelulární polysacharidová substance (EPS), někdy též zvaná sliz, je klíčovou stavební složkou biofilmů a je zodpovědná za většinu jejich fyzikálních, chemických i biologických vlastností. V první fázi tvorby biofilmu se obvykle podílí na primární adhezi buněk k pevnému podkladu, později pak na vzájemné agregaci bakteriálních buněk a na tvorbě mikrokolonií. EPS má také zásadní vliv na schopnost biofilmu odolávat účinkům nepříznivým vlivům zevního prostředí. V těle hostitele jde především o omezení účinku antibakteriálních látek používaných při terapii a o imunitní systém, chrání bakteriální buňky před opsonizací, účinky komplementového systému a chrání buňky před fagocytózou. Znalost struktury EPS obklopující mikrobiální buňky v biofilmu má význam jak pro pochopení mechanismů tvorby biofilmu, tak pro vysvětlení její schopnosti chránit bakteriální buňky před působením imunitního systému i před účinky některých antibiotik.

## 2. Zadání úlohy

### 2.1. *Přístroje a pomůcky*

- centrifuga MiniSpinn - Eppendorf,
- vakuový koncentrátor Concentrator 5301 - Eppendorf.
- špičky, pipety, filtrační set
- Sonorex - (Bandelin electronic, Berlin, Germany)
- 111 Mini IEF Cell - (Bio-Rad)
- Modifikované skla pro 111 Mini IEF Cell
- Spellman CZE 1000 R (Plainview, NY, USA)
- UV-Vis detector LCD 2082 (Ecom, Prague, Czech Republic)

### 2.2. *Chemikálie*

- deionizovaná voda
- metanol - Lach-Ner,s.r.o. (Neratovice, ČR)
- kyselina trichloroctová - Reanal (Budapest, Hungary)
- NaOH - Lach-Ner,s.r.o. (Neratovice, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) - Bio-Rad laboratories (Hercules, CA, USA)
- glycerol - Onex (Rožnov pod Radhoštěm, Czech Republic)
- akrylamid - Bio-Rad laboratories (Hercules, CA, USA)
- N,N'-methylene bis acrylamide (Bis) - Merck (Darmstadt, Germany)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) - Merck (Darmstadt, Germany)
- amonium persulfat - Merck (Darmstadt, Germany)
- ampholytes, Biolyte, pH 3 – 10 - Bio-Rad laboratories (Hercules, CA, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- non-ionic tenside Brij 35 - Sigma (St. Louis, MO, USA)
- pI markery, pI = 2.0, 2.7, 3.0, 3.3, 3.7, 3.9, 4.0, 4.3, 4.7, 5.3, 6.3, pro sledování pH gradientu pH v rozmezí 2,0-4,7 a 2-10 v gel IEF 60 byly syntetizovány na Ústavu analytické chemie Akademie věd České republiky, vvi, Brno.

### 2.3. Úkoly k úloze

- a) Identifikujte biofilmové a nebiofilmové kvasinek pomocí cIEF.
- b) Připravte si lyzáty vzorků biofilmových a nebiofilmových kvasinek a proved' te analýzu IEF.
- c) Proved' te s jedním vzorkem biofilmového a jedním nebiofilmovým vzorkem analýzu HPLC a navzájem techniky b) a c) porovnejte.

### 2.4. Vlastní analýza

#### 2.4.1. Vzorky, příprava lyzátů

##### 1) Vzorek pro cIEF

- Nakultivovaná *Candida parapsilosis* – CCM na Petriho miskách je skladována v lednici
- Pro cIEF odeberte jednu kličku kvasinek z Petriho misky a setřete je do ependorfky s 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . To samé proved' te se všemi vzorky.

##### 2) Vzorek pro IEF a HPLC

- Do ependorfky naberte kličkou z Petriho misky 50 mg kvasinek a setřete je do 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . To samé proved' te se všemi vzorky.
- Všechny vzorky zmrazte a pak ultrazvukujte po dobu 10 min. Opakujte alespoň 10krát. Teplota v ultrazvuku nesmí překročit 20°C.
- Nakonec vzorky centrifugujte 10 min při 6000 rpm, supernatant slijte do nové ependorfky (0,2 ml) a prozatím umístěte na led.

#### 2.4.2. IEF analýza

- Velikost gelu je 125  $\times$  65  $\times$  0,4 mm. Po polymeraci je gel zabalený na podložce v plastové fólii a uložen přes noc při teplotě 4 °C.
- Sejměte gel z podložky a položte jej skleněnou částí na stůl.
- Na spodní část (50 mm od okraje) přiložte vzorkovací šablonu.
- Do první pozice šablony nadávkujte pI markry, dále pak do dalších pozic nadávkujte jednotlivé lyzáty vzorků.



- Po 10 min sundejte šablonu z gelu a opatrně přiložte gel se sklem gelovou částí na elektrody do 111 Mini IEF Cell.
- Po dokončení analýzy IEF gelu ponořte gel do CBB po dobu 3 hodin. Nakonec gel odbarvěte roztokem 50% methanolu a 10% kyseliny octové. Gely skladujte v 5% kyselině octové.

#### 2.4.3. Příprava roztoků a analýza cIEF

- Připravte katolyt  $2 \times 10^{-2}$  hydroxidu sodného a anolyt  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ , do každého přidejte 1% (v / v) ethanolu.
- Před každou injekcí promýjте kapiláru směsí aceton / etanol (1:10) po dobu pěti minut, a poté promýjте kapiláru katolytem po dobu 2 minut. Oplachování postupy proved'te hydrodynamicky.
- Segmentové dávkování: vzorek je vstřikován do kapiláry ve třech částech - 1) nadávkujte jednoduché amfolytické elektrolyty HEPES a ASP (2:1) rozpuštěné v katolytu. 2) nadávkujte segment neznámého vzorku směsi kvasinek 3) nadávkujte segment směsi 5% (w / v) nosných ampholytů a nízkomolekulárních pI markerů pro detekci UV, pI 3,3, 3,9, 4,0, 4,25, 4,7 ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  každého) v pH gradientu 3,3 - 4,7 a pak 3,3 - 3,9.
- Dále pak proved'te separaci bez nosných ampholytů a nízkomolekulárních pI markerů. Nakonec proved'te analýzu pomocí standartního přídávku známého kontrolního biofilmového (+) kmene *C. parapsilosis*.
- Amfolytické elektrolyty v katolytu dávkujte 25 s, vzorek s kvasinkami 10 s, a segment nosných ampholytů a pI markerů 35 s.

#### 2.4.4. Analýza HPLC

- *Candida parapsilosis* (+) a (-) dělená pomocí lineární gradientu acetonitrilu (A) ve vodě (B) s 0,1% kyselinou trifluoroctovou.
- Methakrylátová monolitická kolona C16/18 (l = 70 mm, 0,22 mm id )
- Průtok =  $1 \mu\text{l}/\text{min}$
- Gradient ve stříkačce: 20  $\mu\text{l}$  60% A, 20  $\mu\text{l}$  40% A, 10  $\mu\text{l}$  20% A, 10  $\mu\text{l}$  10% A, 30  $\mu\text{l}$  0% A v B.
- Vstřikovaný objem 2  $\mu\text{l}$
- UV detekce při 214 nm.

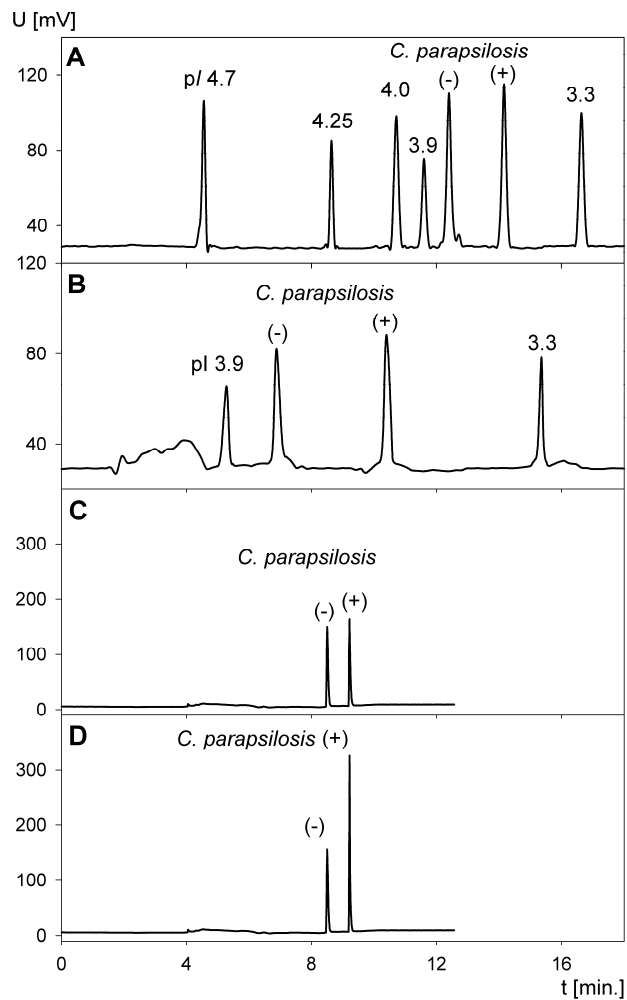
### 3. Vypracování protokolu

Při obsluze stroje a následném vyhodnocování se řiďte pokyny vedoucího cvičení!

#### 3.1. Analýza biofilmových a nebiofilmových kvasinek pomocí cIEF

Do protokolu vložte elektroforegram separace biofilmových (+) a nebiofilmových (-) *C. parapsilosis* v gradientu 3,3 - 4,7 a 3,3 - 3,9. Dále pak separace bez nosných ampholytů a nízkomolekulárních pI markerů. Nakonec vložte elektroforegram standartního přídavku známého kontrolního biofilmového (+) kmene *C. parapsilosis*.

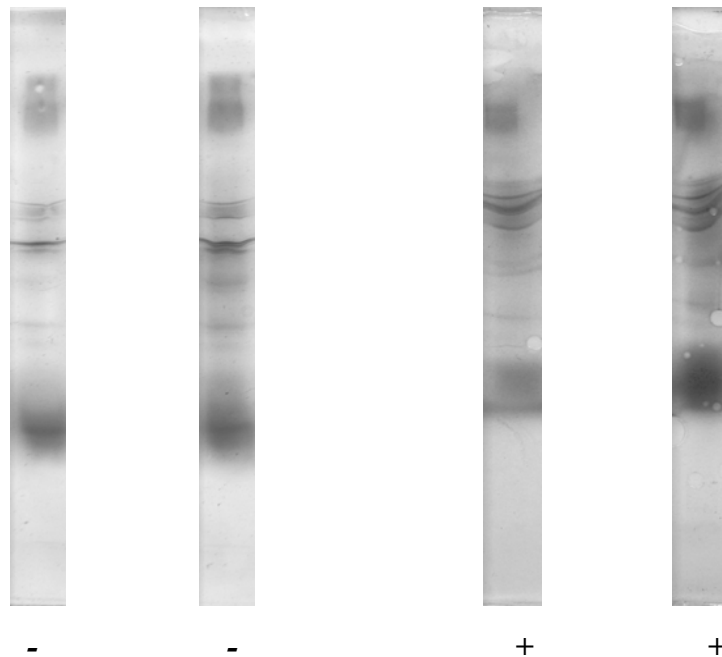
Příklad vyhodnocení elektroforegramu:



### 3.2. *Analýza lyzátů kvasinek pomocí IEF*

Do protokolu vložte vyfocené gely separací biofilmových (+) a nebiofilmových (-) lyzátů *C. parapsilosis* a porovnejte své výsledky se vzorovými gely. Odchytky diskutujte v závěru.

Příklad vyhodnocení gelů:

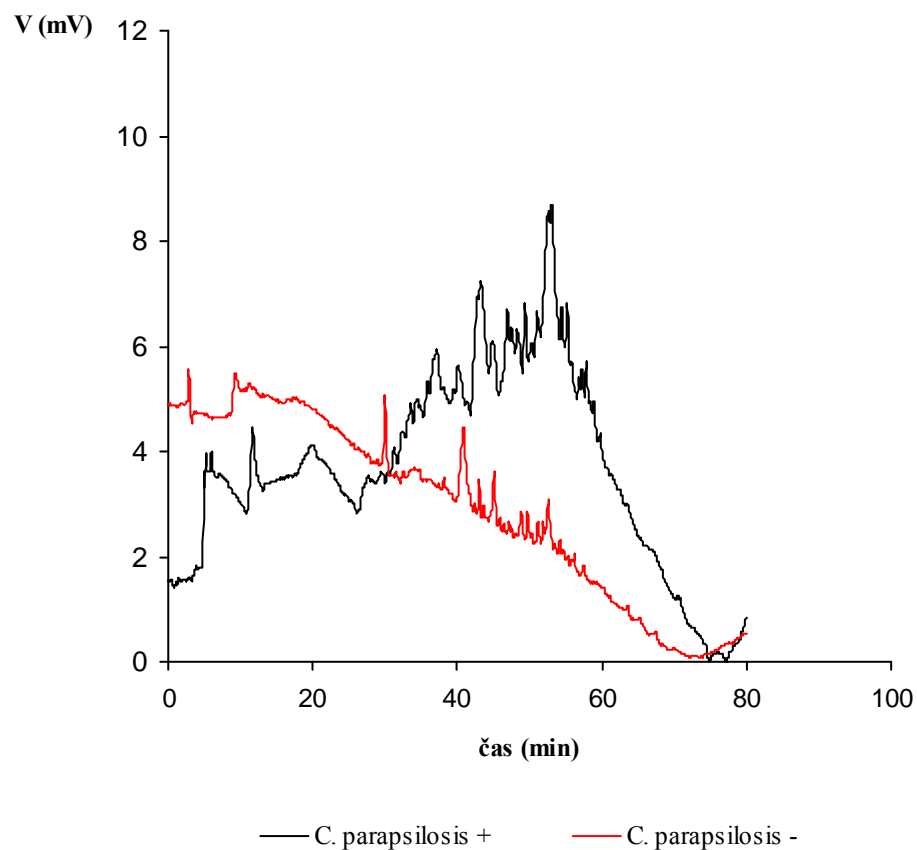


### 3.3. Analýza lyzátů kvasinek pomocí HPLC

Do protokolu vložte chromatogram eluce lyzátů *Candida parapsilosis* (+) a (-) pomocí lineárního gradientu acetonitrilu (A) ve vodě (B) s 0,1% kyselinou trifluoroctovou na methakrylátové monolitické koloně C16/18.

Příklad vyhodnocení chromatogramu:

Srovnání fingerprintu of *C. parapsilosis* + a  
*C. parapsilosis* -



## **4. Závěr**

Do závěru protokolu zhodnoťte, zda se Vám podařilo identifikovat jednotlivé biofilmové a nebiofilmové kvasinky *C. parapsilosis* a jaké přednosti mají jednotlivé metody pro jejich stanovení.

## Literatura

1. B. L. Hogan, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2841 – 2845.
2. N.-H. Cheung, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 929 – 936.
3. Q. Xue, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1175 – 1178.
4. A. Zhu, Y. Chen, *J. Chromatogr.* 470 (1989) 251 – 260.
5. Z. Rosenzweig, E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1771 – 1776.
6. D. W. Armstrong, G. Schulte, J. M. Schneiderheinze, D. J. Westenberg, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 5465 – 5469.
7. D. W. Armstrong, J. M. Schneiderheinze, J. P. Kullmann, L. F. He, *FEMS Microbiol. Letters*, 194 (2001) 33 – 37.
8. D. W. Armstrong, J. M. Schneiderheinze, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4474 – 4476.
9. J. Bundy, C. Fenselau, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1460 – 1463.
10. K. Šlais, Z. Friedl, *J. Chromatogr. A*, 661 (1994) 249-256.
11. K. Šlais, Z. Friedl, *J. Chromatogr. A*, 695 (1995) 113 - 122.
12. K. J. McGinley, E. L. Larson and J. J. Leyden, *J. of Clinical Microbiology*, 26 (1988) 950-953.
13. J. J. Weems, *Clinical infectious diseases*, 14 (1992) 756-766 .