

Magnetizovatelné mikro a nanočástice pro barkódování unikátních sekvencí

Kristýna Číhalová^a, Dagmar Chudobová^a, Pavel Kopel^{a,b}, Marie Konečná^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Magnetic micro and nanoparticles for unique sequences barcoding

This review is focused on identification of bacterial species by their antigens by barcoding oligonucleotides by application of magnetic micro and nanoparticles. In the first part of this review is discussed the structures and types of magnetic particles and their synthesis. In the next and the most important part we described the principle and the existing status of barcoding system and antigens markers for identification of organisms such as animals, plants and microorganisms.

Přijato k publikování: 2. 6. 2014

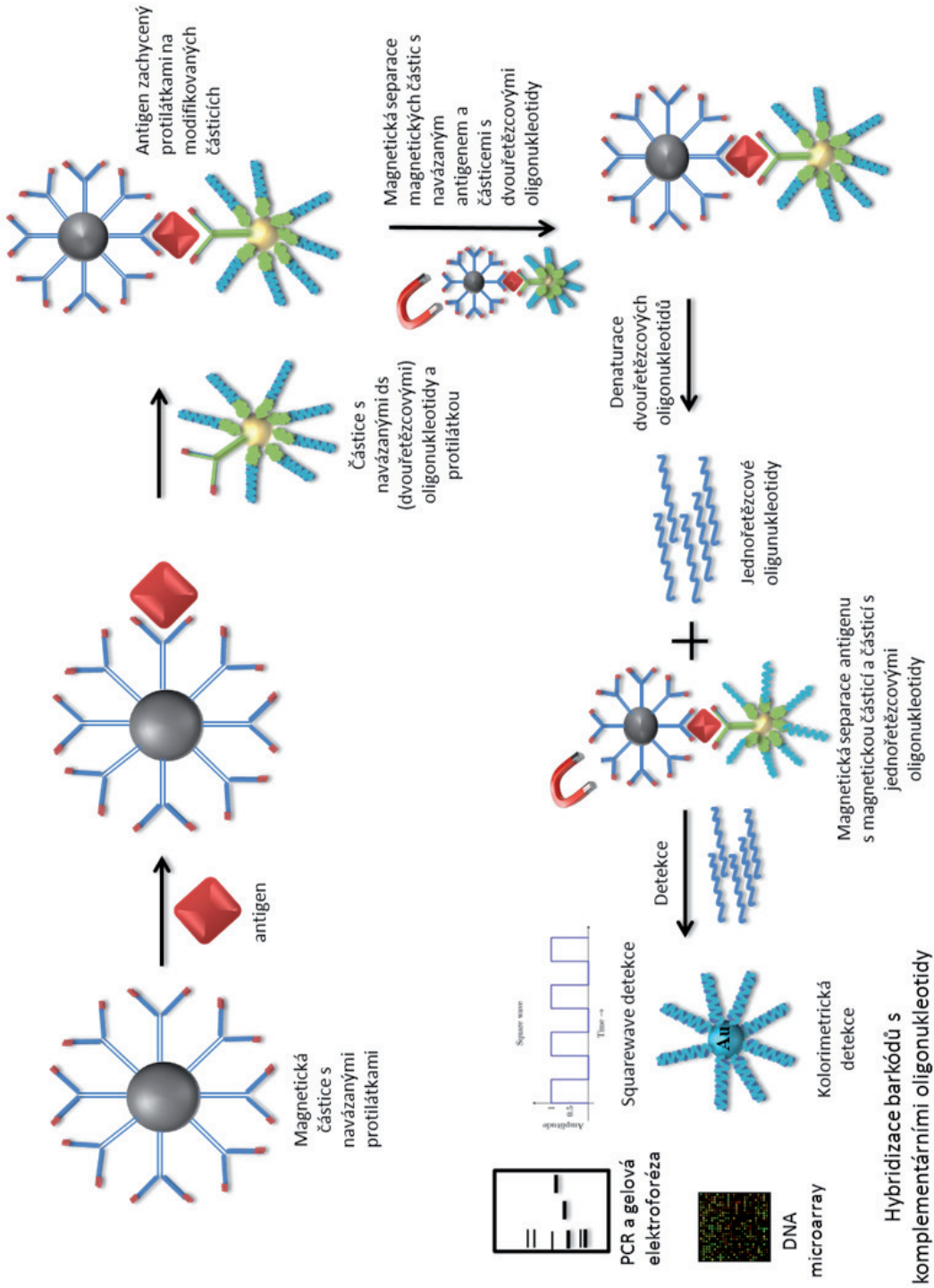
Klíčová slova: magnetické mikročástice, magnetické nanočástice, modifikace, barkódování, oligonukleotidy

Úvod

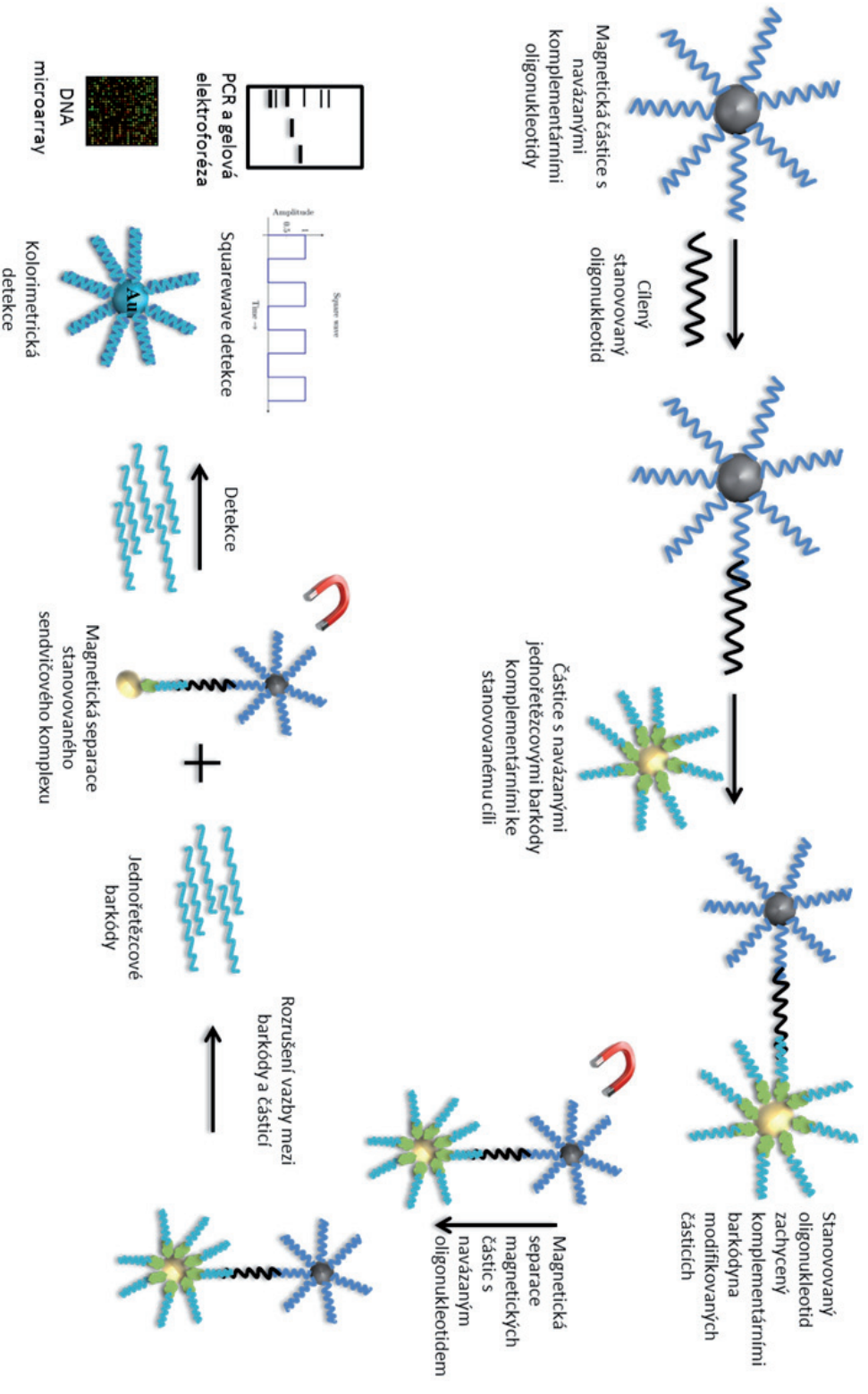
Magnetizovatelné mikro a nanočástice jsou v současnosti jedním z nejvyužívanějších nástrojů moderního biochemického a molekulárně biologického výzkumu. Postupně se jejich využití dostává i do lékařské praxe, kde jsou v podobě kontrastních látek využívány pro zobrazování pomocí magnetické rezonance¹ či cílenému transportu léčiv². Tyto částice nalézají využití hlavně v separaci a transportu jednotlivých molekul (nukleové kyseliny, proteiny), ale i celých buněk. Pro své fyzikální vlastnosti a možnosti modifikace povrchu jsou nedílnou součástí diagnostiky, kde jsou využívány pro extrakci biologicky důležitých látek z tělních tekutin³. Magnetizovatelné mikro a nanočástice představují nové unikátní nástroje pro separaci a následnou senzitivní detekci biomolekul DNA, proteinů a metabolitů. V následujících letech lze očekávat jejich další velmi významný rozvoj⁴.

Pod názvem biobarcode assay se ukrývá technologie, která je kombinací imunochemických reakcí a polymerázové řetězové reakce (**Obr. 1**). Jedná se o metodu časově náročnou, ale na druhou stranu je její nespornou výhodou vysoká citlivost, která je přibližně 100krát vyšší než ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay) metody⁵. Metoda je založena na sendvičové imunoreakci⁴. Sledovaný analyt se váže pomocí specifických protilátek mezi magnetickou partikulí a částicí značenou určitou DNA sekvencí, barkódem DNA. Pro multiplexní analýzu má každý měřený parametr svou vlastní dvojici partikulí. Vzniklý imunokomplex se z roztoku separuje působením magnetického pole. K detekci se využívá pro analyt specifická nukleotidová sekvence uvolněná z partikulí. Pro stanovení barkódové DNA je možné využití běžných metod a modifikací PCR (polymerase chain reaction) techniky⁶. Hebert et al. (2003) je toho názoru, že taxonomický systém se hroutí, a proto je důležité věnovat se vývoji identifikace a zařazování bakterií pomocí oligonukleotidových sekvencí^{7,8}. Naopak Packer et al. (2009) tvrdí, že nynější systematika bakteriálních druhů je bezproblémová⁹. Nicméně zdá se, že začínající fáze vývoje používání barkódování je velmi efektivní. Vzhledem k velmi široké biodiverzitě bylo ale zatím zahájeno velmi málo experimentů. Rozvoj digitalizace barkódování je tak stále v počátcích¹⁰.



Obr. 1: Izolace antigenu pomocí protilátek, oligonukleotidů a magnetickou separací s následnou detekcí navázání odseparovaného oligonukleotidu ke komplementárním oligonukleotidům pomocí různých metod



Obř. ř. 2: Izolace oligonukleotidů pomocí komplementárních oligonukleotidů na magnetické částici a na částici s barkódovými oligonukleotidy, komplementárními zátověň na stanovený oligonukleotid. Magnetickou separací s následnou detekcí navázání odseparovaného oligonukleotidu ke komplementárním oligonukleotidům pomocí různých metod.

Spojením magnetických nosičů, v podobě magnetických nano (velikost do 100 nm) a mikro částic, s biologicky aktivní látkou lze dosáhnout unikátních vlastností vzniklých materiálů využitelných v biochemii, molekulární a buněčné biologii, nanobiotechnologii, nanomedicině a jinde^{17,18}. Cílové molekuly je tak možné separovat i ze složitých biologických systémů jako jsou buněčné suspenze, homogenity či fermentační média¹⁹. Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických nosičů biologicky aktivních látek jsou biokompatibilní magnetické oxidy železa - magnetit a maghemit²⁰, s příslušnou modifikací s vhodnou afinitou k vázané látce²¹. Unikátní magnetické vlastnosti nanočástic, spolu s jejich velkým specifickým povrchem umožňujícím navázat velké množství ligandů, jsou podstatou jejich využití jako efektivních nosičů pro účinnou a rychlou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek²².

Modifikace magnetických částic pro barkódování

K detekci organismů prostřednictvím barkódování pomocí magnetických částic se běžně používá jako vhodná modifikace magnetických částic streptavidin, který tvoří silnou specifickou vazbu s biotinem, na který je možné navázat příslušný, biotinem modifikovaný oligonukleotid sloužící k zachycení komplementárního proteinu²³. Dalším vhodným modifikátorem povrchu magnetických částic je zlato, nebo použití zlatých mikro či nano částic. Příslušný oligonukleotid značený thiolovou skupinou zajistí pevnou vazbu mezi zlatou částicí a oligonukleotidem²⁴. Další možností modifikace magnetických částic pro vazbu s oligonukleotidy je použití 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) nebo 3-[2-(2-aminoethylamino)-ethylamino]-propyltrimethoxysilane (AEEA) tvořící povrchové amino skupiny, které zachycují oligonukleotidy²⁵.

Barkódování unikátních sekvencí Mikrobiologické rozmanitosti a barkódování DNA pro mikrobiální společenstva

Barkódování se používá jako účinný nástroj pro identifikaci již známých druhů a objevování druhů nových. Rozpoznávání vzorků vede díky proteinové rozmanitosti k alternativnímu postupu identifikace od jednotlivého kmene až ke konkrétnímu poddruhu organismu²⁶. Unikátními sekvencemi jsou geny, které se v haploidním genomu vyskytují pouze v jedné kopii nebo několika málo kopiích. Také to mohou být antigeny specifické pro jednotlivé druhy²⁷ a díky jim a jejich vazby ke komplementárním oligonukleotidům nebo protilátkám lze tyto druhy pomocí knihoven zařadit²⁸. Značný počet bakterií není kultivovatelný, protože netvoří kolonie na agarových živných půdách. Proto je velkou výzvou pro mikrobiology vyvíjet další možnosti identifikace bakterií bez jakékoli selektivity²⁹, jen díky použití specifických antigenů³⁰.

Barkódování unikátních sekvencí

Klíčem barkódování je separace antigenů sendvičovou metodou pomocí částic, na kterých jsou navázány oligonukleotidy. Částice nesou specifické protilátky. V tomto případě je protilátka komplementární ke stanovovanému druhu bakterie, k jeho specifickému povrchu²⁴.

K protilátkám na modifikované magnetické částici je navázaná protilátka, pomocí které chceme stanovit přítomnost antigenu, který je typický pro stanovované buňky. Antigen stanovované buňky, je zachycen další, specifitější protilátkou, která je navázaná na další částici s oligonukleotidy. Tento magnetický komplex je odseparován z roztoku obsahující přebytečné částice s dvouřetězcovým oligonukleotidem a získáme roztok pouze s komplexem obsahující antigen. Denaturací dvouřetězcových oligonukleotidů je získán komplex s magnetickou částicí, antigenem a s částicí, která je pokryta již jednořetězcovými oligonukleotidy a oddělené jednořetězcové oligonukleotidy. Komplex s magnetickou částicí, antigenem a částicí s jednořetězcovým oligonukleotidem je magneticky odseparován a roztok obsahující pouze

jednořetězcové oligonukleotidy je použit pro detekci^{31–33}. Tyto oligonukleotidy mohou být potvrzeny pomocí elektrochemických metod³⁴, kolorimetricky³⁵, gelovou elektroforézou³⁶ nebo pomocí DNA microarray³⁷ (**Obr. 1**).

Na stanovování oligonukleotid je navázán oligonukleotid komplementární k levému konci stanovovaného oligonukleotidu na modifikované magnetické částici. Pravý konec stanovovaného oligonukleotidu je zachycen druhým komplementárním oligonukleotidem na další částici modifikované barkódy. Vzniklý magnetický sendvičový komplex je odseparován z roztoku obsahující přebytečné nenavázané částice komplementární k pravému konci oligonukleotidu. Po odštěpení jednořetězcových barkódů z částic dochází k magnetické separaci magnetického komplexu^{38,39} a následná detekce přítomných barkódů stejnými metodami jako je zmíněno výše (**Obr. 2**).

Lze tedy poznamenat, že metoda je využitelná jak pro stanovení oligonukleotidů, tak pro jakýkoliv další antigen.

Porovnání rutinní identifikace bakteriálních druhů s barkódováním

Hlavním problémem při konvenční identifikaci druhů je fenotypová flexibilita a genetická variabilita znaků, které vedou k identifikaci jiných druhů organismů, což směřuje k nepřesným výsledkům⁴⁰. Naopak použití metody barkódování DNA se při identifikaci druhů ukázalo být rychlejší, přesnější, z ekonomického hlediska výhodnější a časově nenáročné. Automatizovaný proces barkódování může klasifikovat velké počty vzorků ve stejnou dobu, například 1000 a více vzorků za den. Barkódování je tedy podle všeho perspektivní metoda ve srovnání s tradičními postupy⁴¹.

Závěr

Barkódování DNA poskytuje taxonomický význam, výsledky v populační genetice, fylogenezi a výpočetní biologii pro záznam na základě barkódu. Zpočátku bylo barkódování DNA navrženo pro identifikaci živočichů, kdy Hebert et al. (2003) testovali gen k identifikaci druhů ptáků pomocí barkódování DNA. Vědci zkoušeli gen mitochondriálního cytochromu

c oxidázy (COI), který vykazuje nižší vnitrodruhovou variabilitu bazí než mimodruhovou a slouží globálně jako jádro bioidentifikace zvířat⁷. Od té doby byla COI sekvence využita jako indikátor u většiny živočišných kmenů, včetně obratlovců⁴² a bezobratlých⁴³. V uplynulých letech se barkódování projevilo jako atraktivní nástroj, který pomůže vyřešit taxonomické nejasnosti⁷, ukázat biodiverzitu a podpořit aplikaci ochrany přírody^{44,45}. Databáze sekvencí DNA se rozrůstá o více než 100 000 vzorků za rok. Identifikace organismů pomocí jejich antigenů a protilátek může probíhat stejným způsobem jako snímač čárového kódu v supermarketu¹⁰. To znamená, že musí být stále rozvíjena digitalizace barkódů DNA. Tak by mohla být v budoucnu pro identifikaci vzorků použita jakási čtecí zařízení, která podle databáze určí, díky detekované sekvenci DNA, druh organismu. První etapou tohoto systému je vytvoření spojení identifikace unikátní sekvence pomocí barkódování DNA s digitalizačními zařízeními⁴⁶. S rozvojem sekvenování a výpočetní techniky mají vědci jak z různých genomických center, tak z akademických obcí standardizované sekvence DNA pro identifikaci mikroorganismů pomocí krátkých sekvencí⁴⁷. Mnoho sekvencí, unikátních pro vybraný druh mikroorganismu, je evidováno ve veřejných databázích. Identifikace bakteriálních druhů pomocí digitálního barkódování DNA je vizí moderních identifikačních technik, a proto je třeba podstupovat výzkumné kroky, které pomohou tuto metodu zavést do odvětví vyžadujících přesnou a rychlou identifikaci bakterií jako je lékařská, potravinářská, ekologická či environmentální praxe.

Tato práce byla financována z projektu PGS18_2013.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Yezhelyev M. V., Gao X., Xing Y., Al-Hajj A., Nie S. M., O'Regan R. M.: *Lancet Oncology*, 7, 657 (2006).
2. Gupta A. K., Gupta M.: *Biomaterials*, 26, 3995 (2005).
3. Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T.: *Electroanalysis*, 19, 755 (2007).
4. Hill H. D., Mirkin C. A.: *Nature Protocols*, 1, 324 (2006).
5. Tang S. X., Zhao J. Q., Storhoff J. J., Norris P. J., Little R. F., Yarchoan R., Stramer S. L., Patno T., Domanus M., Dhar A., Mirkin C. A., Hewlett I. K.: *Jaids-Journal of Acquired Immunity Deficiency Syndromes*, 46, 231 (2007).
6. Nam J. M., Thaxton C. S., Mirkin C. A.: *Science*, 301, 1884 (2003).
7. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., DeWaard J. R.: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, 313 (2003).
8. Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R.: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, S96 (2003).
9. Packer L., Gibbs J., Sheffield C., Hanner R.: *Molecular Ecology Resources*, 9, 42 (2009).
10. Merker J. D., O'Grady N., Gojenola L., Dao M., Lenta R., Yeakley J. M., Schrijver I.: *PeerJ*, 1, e91 (2013).
11. Vainshtein M., Belova N., Kulakovskaya T., Suzina N., Sorokin V.: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41, 657 (2014).
12. Kilianova M., Pucek R., Filip J., Kolarik J., Kvitok L., Panacek A., Tucek J., Zboril R.: *Chemosphere*, 93, 2690 (2013).
13. Asgharinezhad A. A., Mollazadeh N., Ebrahimezhad H., Mirbabaei F., Shekari N.: *Journal of chromatography. A*, 1338, 1 (2014).
14. Maschke M.: (2014).
15. Tasoglu S., Gurkan U. A., Wang S. Q., Demirci U.: *Chemical Society Reviews*, 42, 5788 (2013).
16. Belinsky M. I.: *Chemical Physics*, 325, 326 (2006).
17. Tamada J., Oaku Y., Mishima F., Akiyama Y., KiomyOsako M., Shimamura M., Nakagami H., Nishijima S.: *Ieee Transactions on Applied Superconductivity*, 24, (2014).
18. Song Z. L., Zhao X. H., Liu W. N., Ding D., Bian X., Liang H., Zhang X. B., Chen Z., Tan W. H.: *Small*, 9, 951 (2013).
19. Rittich B., Spanova A.: *Journal of Separation Science*, 36, 2472 (2013).
20. Schwalbe M., Pachmann K., Hoffken K., Clement J. H.: *Journal of Physics-Condensed Matter*, 18, S2865 (2006).
21. Pecova M., Zajoncova L., Polakova K., Cuda J., Safarikova M., Sebelka M., Safarik I.: *Chemicke Listy*, 105, 524 (2011).
22. Hamoudeh M., Fessi H.: *Journal of Colloid and Interface Science*, 300, 584 (2006).
23. Gong P. J., Peng Z. Y., Wang Y., Qiao R., Mao W. X., Qian H. S., Zhang M. Y., Li C. C., Shi S. Y.: *Journal of Nanoparticle Research*, 15, (2013).
24. Loo J. F. C., Lau P. M., Ho H. P., Kong S. K.: *Talanta*, 115, 159 (2013).
25. Nakagawa T., Tanaka T., Niwa D., Osaka T., Takeyama H., Matsunaga T.: *Journal of Biotechnology*, 116, 105 (2005).
26. Aliabadian M., Beentjes K. K., Roselaar C. S. K., van Brandwijk H., Nijman V., Vonk R.: *Zookeys*, 25 (2013).
27. Berman H. F., Riley L. W.: *Bmc Microbiology*, 13, (2013).
28. Godfray H. C. J.: *Nature*, 420, 461 (2002).
29. Schloss P. D., Handelsman J.: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 686 (2004).
30. Curtin K., Samowitz W. S., Wolff R. K., Ulrich C. M., Caan B. J., Potter J. D., Slattery M. L.: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18, 3384 (2009).
31. Wang Y., Mao H. J., Zang G. Q., Zhang H. L., Jin Q. H., Zhao J. L.: *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38, 1133 (2010).
32. Walsh P. C.: *Journal of Urology*, 183, 1838 (2010).
33. Thaxton C. S., Elghanian R., Thomas A. D., Stoeva S. I., Lee J. S., Smith N. D., Schaeffer A. J., Klocker H., Horninger W., Bartsch G., Mirkin C. A.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18437 (2009).
34. Mir L. M., Bureau M. F., Rangara R., Schwartz B. T., Scherman D.: *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 321, 893 (1998).
35. Thavanathan J., Huang N. M., Thong K. L.: *Biosensors & Bioelectronics*, 55, 91 (2014).
36. Rocha M. S., Cavalcante A. G., Silva R., Ramos E. B.: *The journal of physical chemistry. B*, 118, 4832 (2014).
37. Kiyama R., Zhu Y.: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71, 2065 (2014).
38. Liu Z. B., Zhou B., Wang H. Q., Lu F., Liu T. J., Song C. X., Leng X. G.: *Journal of Nanoparticle Research*, 15, (2013).
39. Pratiwi F. W., Rijiravanich P., Somasundrum M., Surareungchai W.: *Analyst*, 138, 5011 (2013).
40. Crainey J. L., Mattos-Gloria A., Hamada N., Luz S. L. B.: *Acta Tropica*, 131, 47 (2014).
41. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R. H., Vogler A. P.: *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 70 (2003).
42. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., Francis C. M.: *Plos Biology*, 2, 1657 (2004).
43. Hajibabaei M., Janzen D. H., Burns J. M., Hallwachs W., Hebert P. D. N.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968 (2006).
44. Plaisance L., Knowlton N., Paulay G., Meyer C.: *Coral Reefs*, 28, 977 (2009).
45. Hebert P. D. N., deWaard J. R., Landry J. F.: *Biology Letters*, 6, 359 (2010).
46. Chen S., Guo B., Zhang G., Yan Z., Luo G., Sun S., Wu H., Huang L., Pang X., Chen J.: *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, 37, 1043 (2012).
47. Kharytonchuk S., Pedersen F. S.: *Rna-a Publication of the Rna Society*, 16, 572 (2010).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.