

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Název: Magnetické částice, izolace a detekce chřipky (hemaglutininu)

Školitel: Ludmila Krejčová, MVDr.

Datum: 7.11. 2013

Reg. č. projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu

Izolace chřipkového proteinu pomocí paramagnetických částic

Paramagnetické částice (MPs)

- nejčastěji vyrobené z magnetitu nebo maghemitu
- jsou využívány pro izolaci, separaci a transport molekul (nukleových kyselin, proteinů) nebo i celých buněk
- MPs jsou schopny reagovat na vnější magnetické pole, čehož se využívá pro efektivní separaci molekul ze vzorku
- velikost částic se pohybuje v rozsahu 1-100nm (nanočástice) nebo 1-100 μm (mikročástice)
- částice a na ně navázané molekuly se mohou rychle aglomerovat nebo resuspendovat v médiu v závislosti na změnu vnějšího magnetického pole
- tyto magnetické vlastnosti MPs se široce používají při izolaci nukleových kyselin, proteinů a dalších molekul. Výhodou magnetické separace je možnost modifikace povrchu MPs (tedy obalení povrchu látkou biologického původu, která má afinitu k látce, kterou potřebujeme izolovat

Modifikované paramagnetické částice

Modifikované paramagnetické částice - detail

Principy izolace pomocí MPs

- využívá se afinity dvou látek (streptavidin-biotin, antigen-protilátka, enzym-substrát)
- jestliže potřebujeme izolovat antigen – můžeme MPs modifikovat protilátkou
- jestliže potřebujeme izolovat DNA – modifikujeme jeden konec DNA biotinem a povrch MPs modifikujeme streptavidinem

Tento způsob izolace biomolekul je ve spojení s detekcí (např.: elektrochemickou) méně náročný na čas a vybavení laboratoře a je vysoce senzitivní. Další velká výhoda je to, že při izolaci ze vzorku nezáleží na typu matrice (to co je ve vzorku mimo cílovou molekulu – proteiny, sacharidy...)

Využití MPs: cílený transport léčiv, genová terapie, diagnostika onemocnění

Paramagnetické částice

Chřipka

- je akutní infekční onemocnění způsobené virem z čeledi Orthomyxoviridae
- chřipkové viry jsou považovány za potenciální původce pandemie
- největší pandemií byla Španělská chřipka (1918)
- nebezpečí spočívá v rychlosti mutace chřipkových virů – až 100x větší v porovnání s ostatními (Ebola)
- Antivirotika dostupná jsou, ale některé subtypy chřipky vykazují rezistenci až v 70%

Schéma chřipkového virionu

model chřipkového virionu

Izolace pomocí paramagnetických částic – vazba chřipkového proteinu

Principy izolace pomocí MPs značeného glykanu

- využívá se afinity dvou látek (glykan a hemagglutinin)
- glykanem je v tomto případě zbytek sialové kyseliny, která se vyskytuje na povrchu buněk plicních sklípků
- Hemagglutinin (povrchový antigen chřipky) vykazuje vysokou afinitu k sialové kyselině)
- Hemagglutiny a sialové kyseliny jsou druhově specifické

Izolace od chřipky odvozeného oligonukleotidu pomocí paramagnetických částic

A

vazba glykanu

vazba H5N1

uhrazení

Electrochemická detekce proteinu a Cd: +

Schéma H5N1-CdS electrochemické izolace a detekce. A - streptavidinem značená magnetická částice (MPs), B - biotinylovaný glykan který se naváže ke streptavidinem značené MPs (afinita biotin-streptavidin), C - vazba hemagglutininu, který byl přidelem značen kvanovou tečkou (CdS), D - Electrochemická detekce proteinu (hemagglutinin) a Cd (z kvantové tečky).

2

Izolace chřipkového proteinu pomocí paramagnetických částic

Tento způsob izolace je ve spojení s detekcí (např.: elektrochemickou) méně náročný na čas a vybavení laboratoře a je vysoce senzitivní. Další velká výhoda je to, že při izolaci ze vzorku nezáleží na typu matrice.

Využití této metody: diagnostika chřipkových virů
