

Izolace bakteriálních buněk pomocí paramagnetických částic

Bc. Eva Jílková

10. 2. 2012

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



Úvod

- *S. aureus*
- Onemocnění vyvolaná bakterií *S. aureus*
- Rezistence kmenů *S. aureus* na dostupná ATB
- Proteiny vázající zinek v buňkách *S. aureus* a jejich souvislost k rezistenci na ATB
- Standardní mikrobiologický postup vs. imunomagnetická separace
- Paramagnetické částice

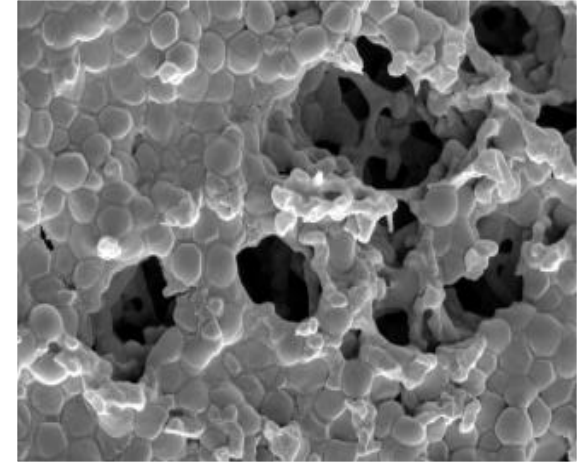
Cíle

1. Automatizovaná izolace bakterií *S. aureus*
2. Automatizovaná izolace zinkových proteinů *S. aureus*
3. Elektrochemické stanovení zinku z bakteriálních proteinů
4. Elektroforéza SDS - PAGE

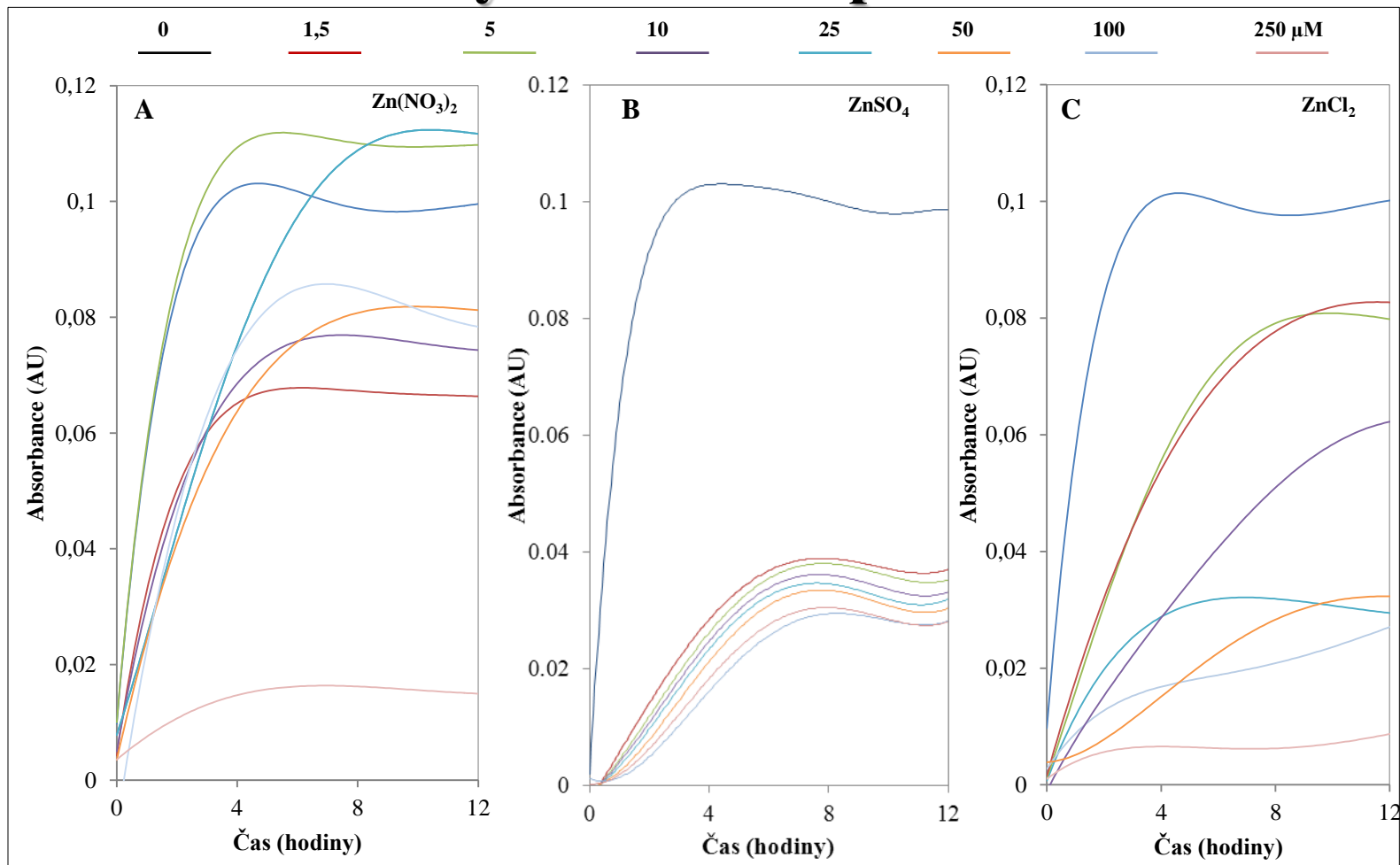


Příprava mikroorganismu, základní charakteristika růstu při interakci se zinečnatými ionty

- *Staphylococcus aureus*
- Přeočkování
- Kultivace 37 °C, absorbance 0,1 $\lambda=600\text{nm}$
- Přídavek ZnCl_2 , ZnSO_4 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$
- Fotometrické měření růstových křivek ($\lambda = 600\text{nm}$)



Růstové křivky *S. aureus* v přítomnosti Zn^{2+}



Příprava *S. aureus* pro izolaci pomocí MPs

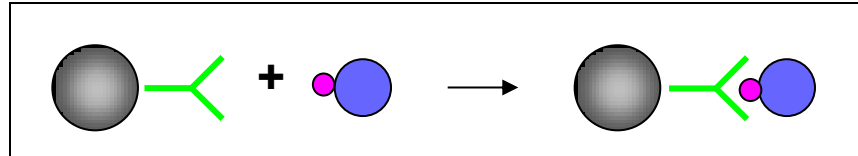
Kultivace obdobná jako pro růstové křivky

Přídavek $ZnCl_2$ - 100 μ M

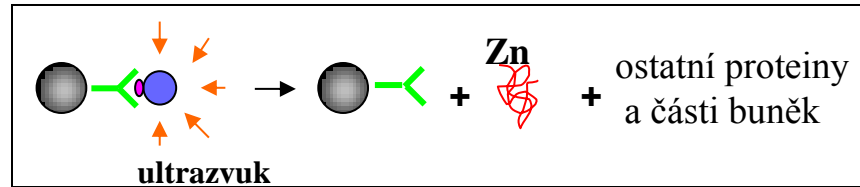
Kultivace 37°C, $\lambda = 600$ nm

Automatická izolace bakteriálních buněk a zinkových proteinů pomocí MPs

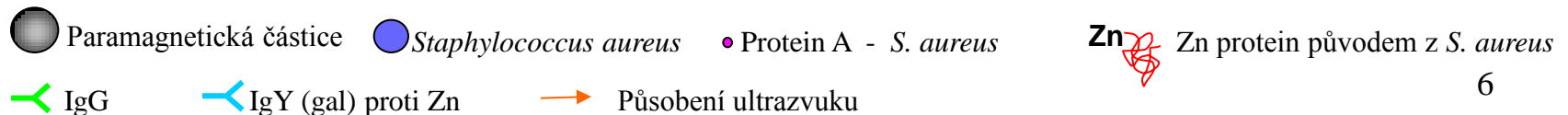
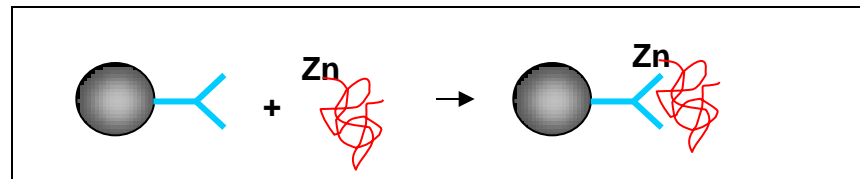
Fáze I.: Izolace bakterií *Staphylococcus aureus* pomocí MPs modifikovaných IgG



Fáze II.: Uvolnění proteinů z bakterií *S. aureus*, které se navázaly na povrch MPs pomocí ultrazvuku

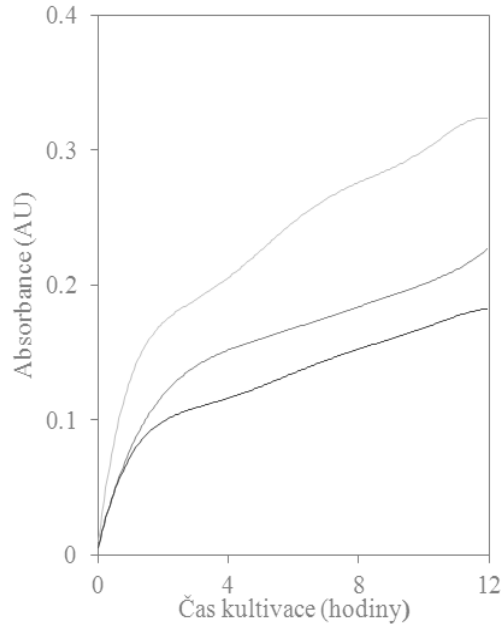


Fáze III.: Následná izolace Zn proteinů pomocí MPs s navázanými IgY proti Zn

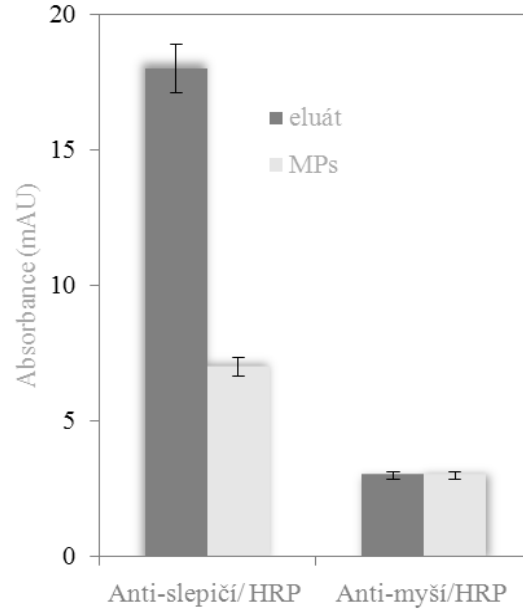


Výsledky

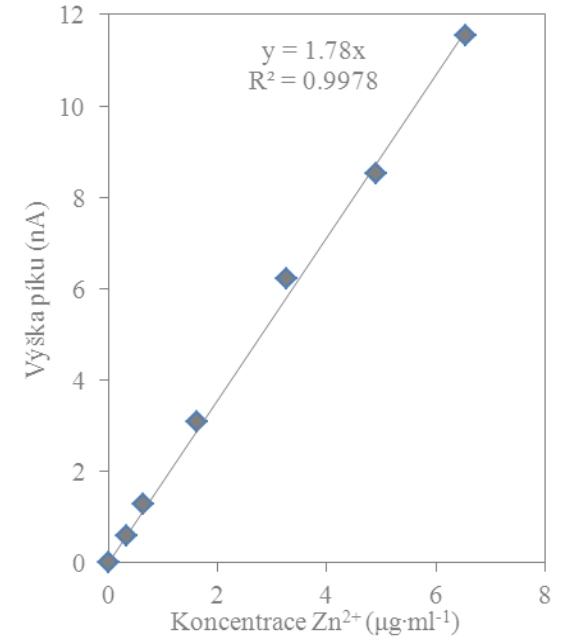
Ověření imobilizace IgG na MPs



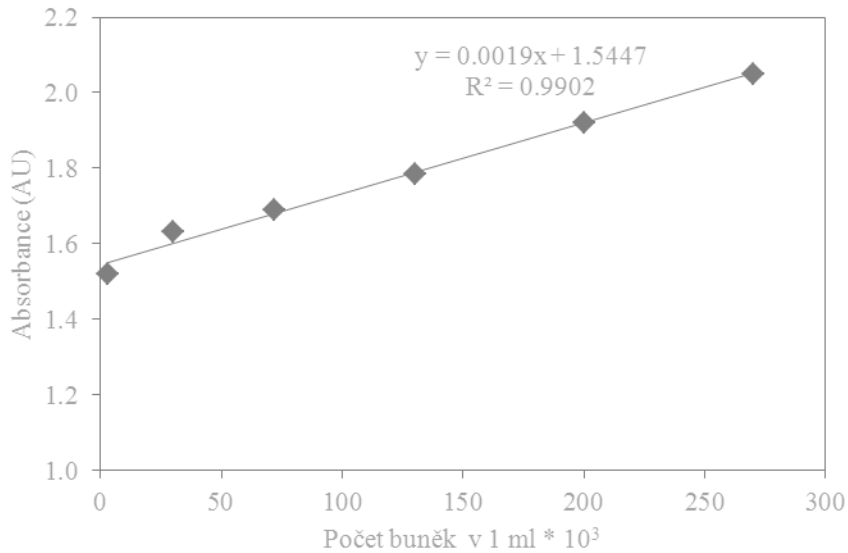
Ověření imobilizace IgY na MPs



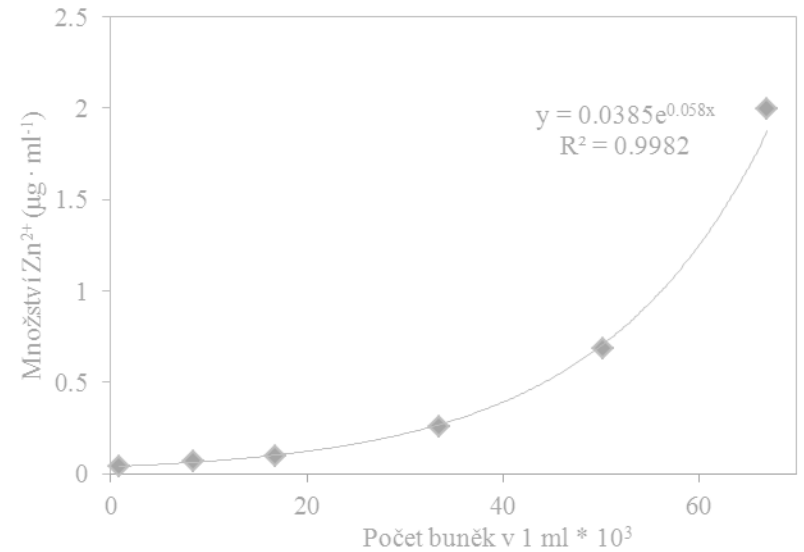
Kalibrační křivka Zn²⁺



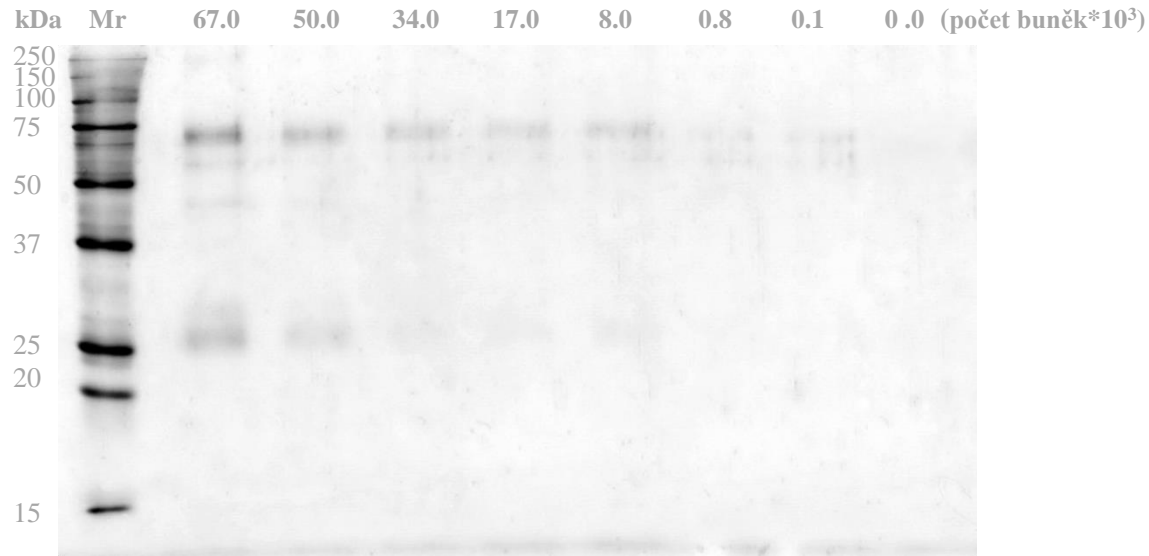
Kalibrační křivka *S. aureus*



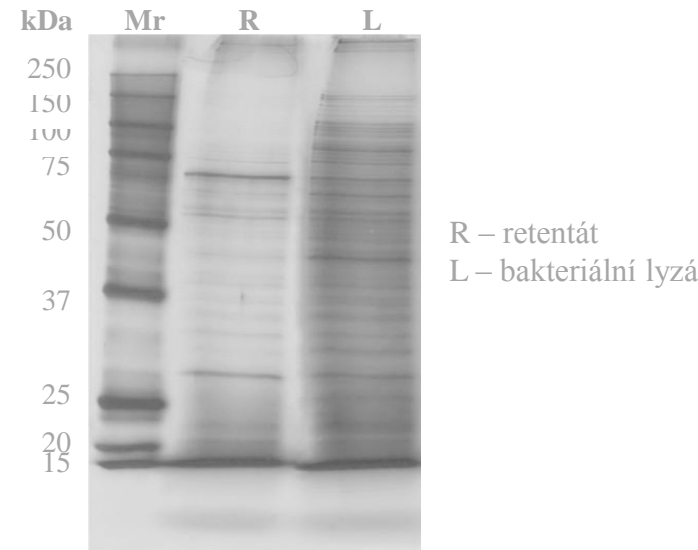
Stanovení zinku v buňkách *S. aureus*



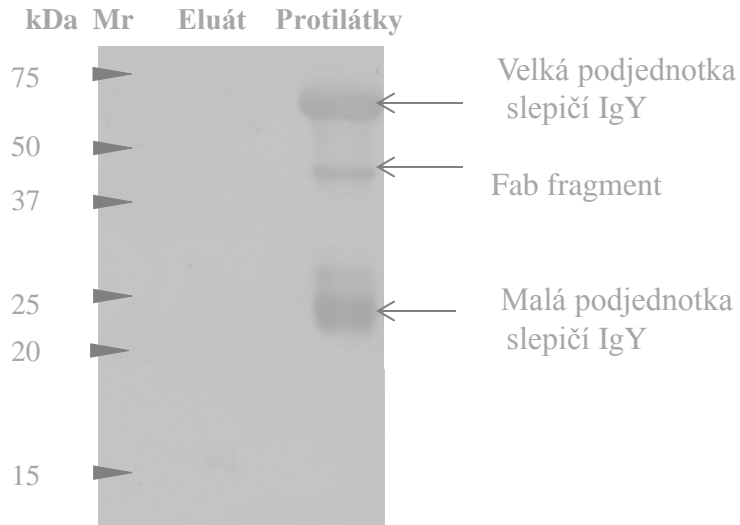
Elektroforetická detekce mikrobiálních proteinů



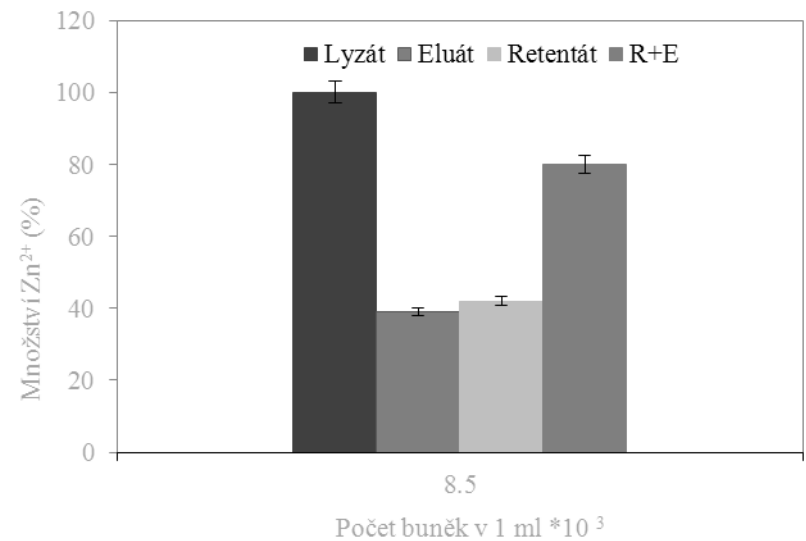
Ověření izolace proteinů pomocí MPs z lyzátu



Western blotting pomocí sekundární protilátky



Bilance Zn²⁺



Závěr

- Podařilo se nám vyvinout rychlou a automatizovanou metodu pro izolaci bakterií a izolaci zinkových proteinů uvolněných z těchto bakterií.
- Pomocí paramagnetických mikročástic dokážeme izolovat *S. aureus* v množství menším, než 100 buněk v 1 ml vzorku.
- Do budoucna proteomická analýza bakteriálních proteinů, které způsobují jejich rezistenci.

Poděkování

- Pracovníkům Laboratoří metalomiky a nanotechnologií pod vedením docenta Kizeka
- Mgr. Jindřichu Kynickému, Ph.D za realizaci elektronových mikrofotografií
- NANIMEL GA ČR 102/08/1546
- NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068
- NANOSEMED GA AV KAN208130801
- CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068



DĚKUJI ZA POZORNOST !