

# Nanobiotechnologie a bionanotechnologie

Ivo Šafařík

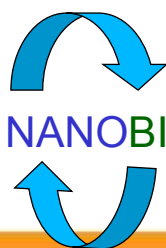
Oddělení nanobiotechnologie  
Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, v.v.i  
České Budějovice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Nanobiotechnologie a bionanotechnologie z pohledu nanočástic

- Nanobiotechnologie → např. využití nanočástic pro modifikaci a ovlivnění biologických systémů a procesů
- Bionanotechnologie → např. produkce nanočástic biologickými systémy



NANOBIOTECHNOLOGIE

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Bio ↔ nanotechnologie

- Obrovské množství nanomateriálů, biologických struktur, interakcí a procesů
- V přednášce bude pozornost zaměřena zejména na interakce buněk (příp. subcelulárních struktur a významných makromolekul) a různých typů nano- a mikročástic

## Nanomateriály

- Mnoho možných způsobů klasifikace (podle charakteru materiálu, fyzikálních vlastností, velikosti, isotropie atd.)
- V přednášce bude pozornost zaměřena zejména na magnetické nanomateriály, částečně i na některé další anorganické nanomateriály

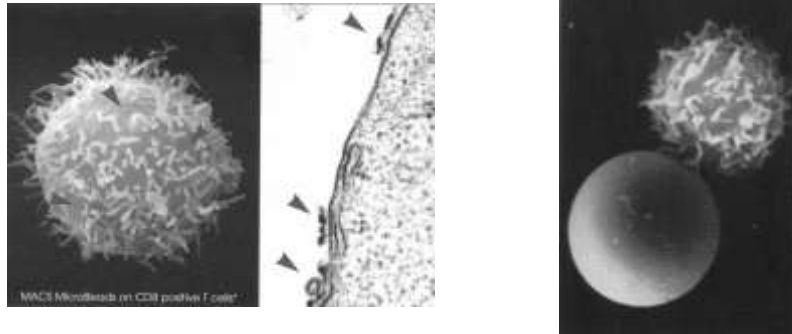
## Využití magnetických nano- a mikromateriálů

- (Imuno)magnetická separace buněk
- Detekce apoptických buněk
- Magnetické značení buněk
- Separace buněčných organel
- Magnetofekce
- „Magnetic tissue engineering“
- „Magnetic tweezers“
- „Magnetic twisting cytometry“
- Magnetické nano/mikrovrtáky
- Magnetické celobuněčné biokatalyzátory
- Magnetické nanobiokompozitní materiály

## (Imuno)magnetická separace buněk

- Selektivní separace buněk z komplexních suspenzí
- Nutné selektivní navázání magnetických částic na cílové buňky (většinou interakce navázané specifické protilátky a příslušných epitopů; někdy lze využít i interakce navázaného lektinu a sacharidové struktury)
- **Pro efektivní separaci buněk jsou potřeba magnetické nano- i mikročástice !!**

## (Imuno)magnetická separace buněk



Značení T-lymfocytů magnetickými nanočásticemi (Miltenyi Biotec, ca 50 nm) a mikročásticemi (Dynal, 4.5  $\mu$ m)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## (Imuno)magnetická separace buněk

Rozdílná magnetická separace značených buněk



HGMS (High gradient magnetic separator)



Magnetické separátory pro zkumavky a mikrozukavky

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



# HGMS

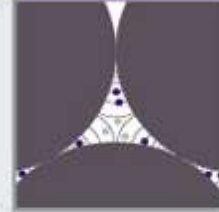
## MACS Columns and Separators



MACS® Columns and MACS Separators are designed for fast and easy cell separation of cells which are labeled with MACS MicroBeads. MACS Separators consist of strong permanent magnets.



MACS Columns are composed of a spherical steel matrix. When a column is placed in a MACS Separator, a high-gradient magnetic field is induced within the column.



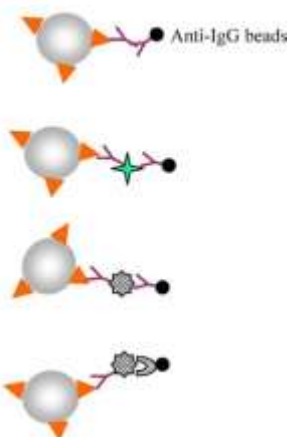
The high-gradient magnetic field efficiently retains the cells that are magnetically labeled with minimal amounts of MACS MicroBeads.

## Přímé a nepřímé značení buněk

### Direct magnetic cell labeling



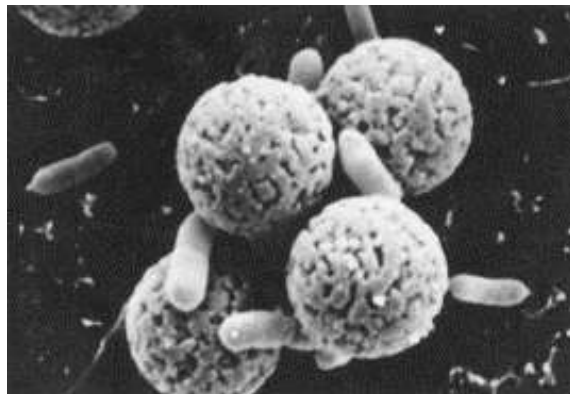
### Indirect magnetic cell labeling



**Legend**

- cell
- IgG-conjugated magnetic bead
- PE-conjugated IgG
- Biotinylated IgG
- Streptavidin-conjugated magnetic bead

## Buňky *Escherichia coli* O157 navázané na Dynabeads M280

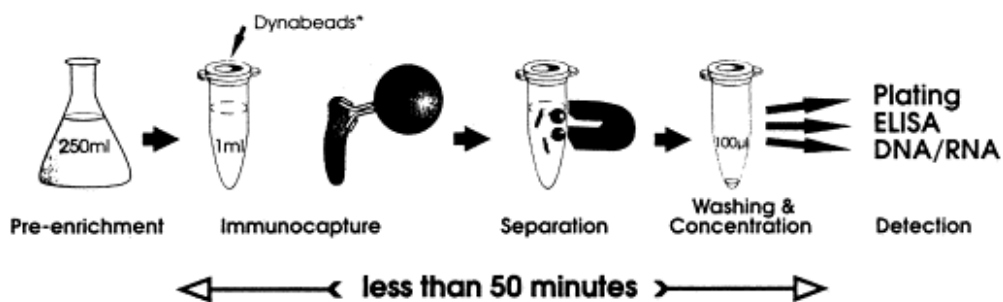


Velmi nízká infekční dávka (cca 10 buněk)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Imunomagnetická separace mikrobiálních patogenů



Použití magnetických mikročástic → možnost aseptické práce v uzavřeném systému!!

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Imunomagnetická separace cílových buněk ve větším měřítku



CliniMACS (Miltenyi Biotec)

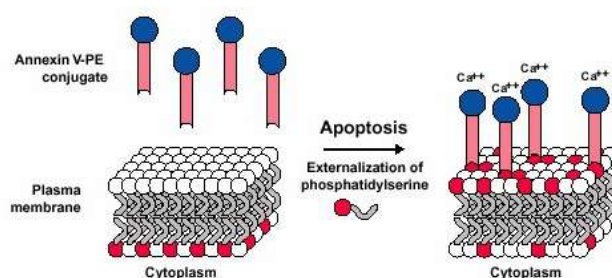


ISOLEX 300i (Baxter)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Detekce apoptických buněk



Schematic representation of the Annexin V assay.

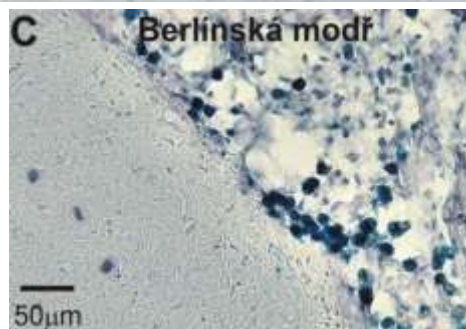
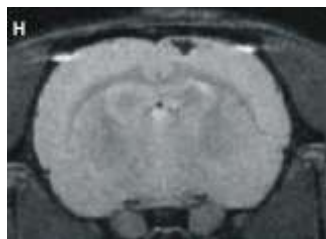
- Detekce exponovaného serinu v buněčné membráně
- Annexin V vázaný na magnetické částice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Magnetické značení buněk

Implantace kmenových buněk, značených nanočásticemi oxidů železa, do mozkové kůry potkana s ischemickou lézí



## Separace buněčných organel

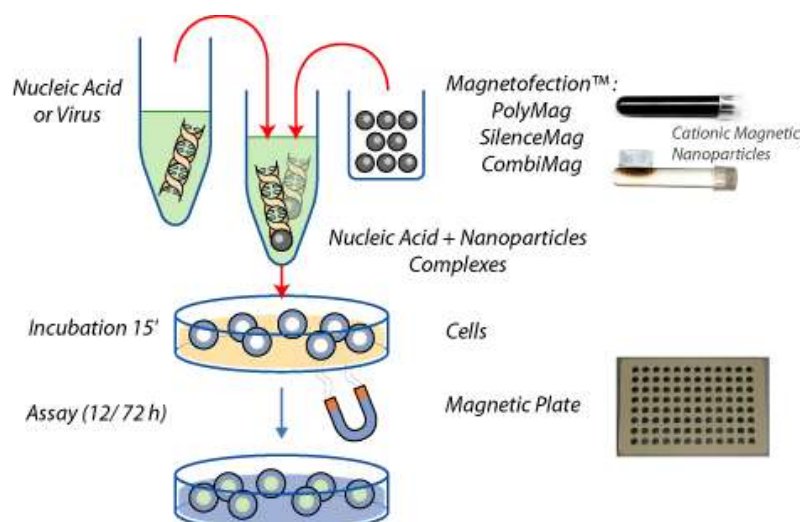
- Možnost separace fagosomů po fagocytose magnetických částic buňkami
- Možnost separace fagosomů definovaného stáří



## Magnetofekce

- **Nová transfekční technologie**
- Vazba DNA na magnetické nanočástice pokryté kladně nabitými molekulami
- Vytvořené komplexy jsou poté transportovány do buněk za pomoci vnějšího magnetického pole

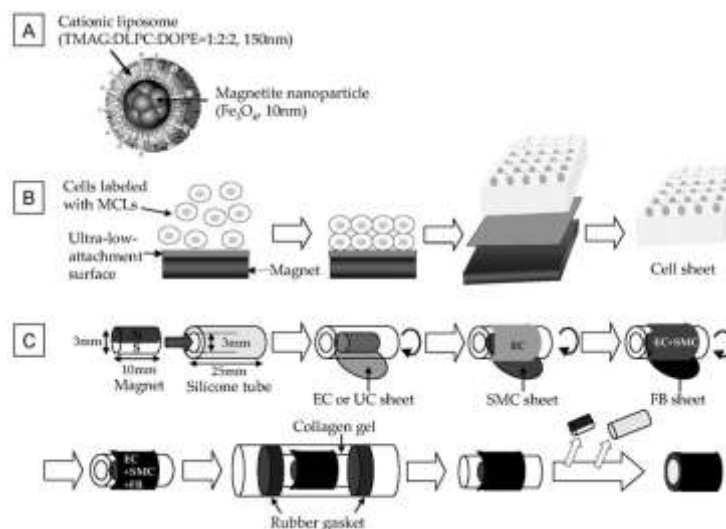
## Magnetofekce



## Magnetic tissue engineering

- Možnost přípravy komplexních tkáňových kultur
- Příprava tkáňových kultur ze dvou nebo více typů buněk (vrstevnaté struktury)
- Příprava 3-D struktur

## Magnetic tissue engineering – tvorba tubulárních struktur (Tissue Eng. 11 (2005) 1553)

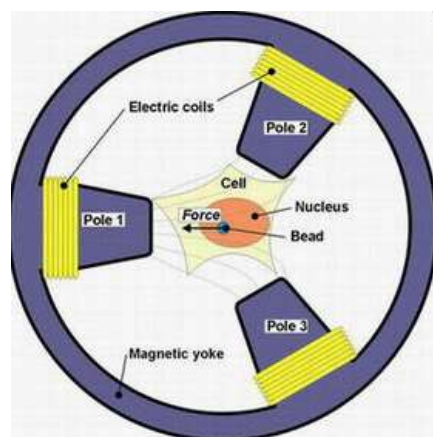


## „Magnetic tweezers“

- „magnetická pinzeta“
- Instrument umožňující přenos síly na magnetické částice v gradientovém magnetickém poli
- Měření rheologických vlastností
- Manipulace s jednotlivými biomolekulami

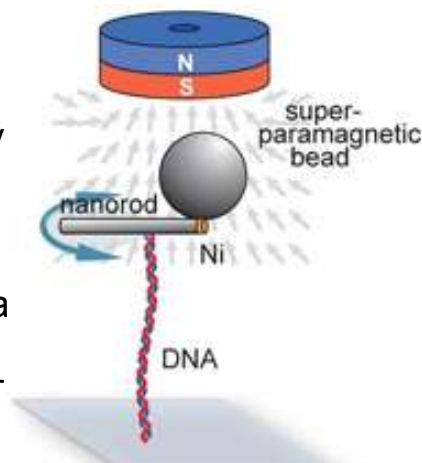
## Magnetic tweezers

- Scheme of the micromechanical experiments. Magnetic poles (6  $\mu\text{m}$  wide, 20  $\mu\text{m}$  separation) generate a force on a magnetic bead (1  $\mu\text{m}$ ) positioned in the nucleus of a HeLa cell. Electric coils allow the control of amplitude and direction of the force. From the nanometer distances the bead is allowed to move, the elasticity and viscosity of the chromatin can be determined. Magnetic yoke and electric coils are not to scale. Credit: University of Twente
- <http://www.physorg.com/news98378757.html>



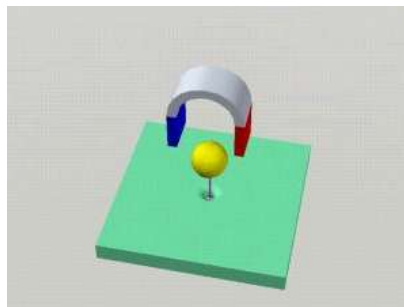
## Magnetic tweezers

- Měření kroutícího momentu molekuly DNA
- Jeden konec DNA upevněn ke skleněné podložce, druhý konec DNA navázán na nanovláknko s magnetickou částicí
- <http://inbt.jhu.edu/mechanical-engineers-use-magnets-nanobeads-to-measure-dna-torque/2009/04/21>



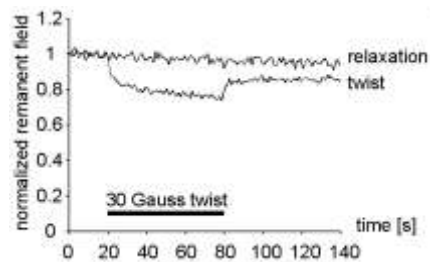
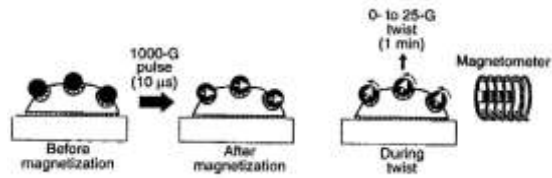
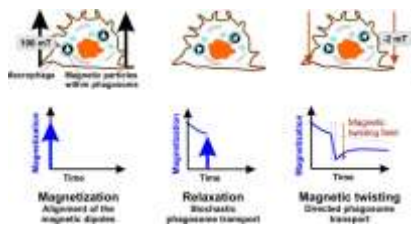
## Magnetic tweezers

- Kontrolovaný průchod molekuly DNA nanopórem
- Regulace rychlosti průchodu díky navázané magnetické částici a „magnetické pinzetě“
- Potenciální možnost sekvenování DNA
- [http://insciences.org/article.php?article\\_id=4323](http://insciences.org/article.php?article_id=4323)



## Magnetic twisting cytometry

- Možnost studia zdánlivé „pružnosti“ buněk
- <http://www.hsph.harvard.edu/physiology/projects/bfabry/details.html>

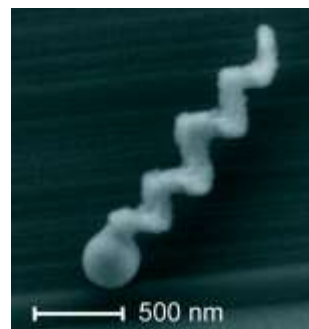


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Magnetické „nanovrtáky“

- „Nanovrtáky“ pro potenciální lékařské aplikace (cílené dávkování léčiv, mikrochirurgie)
- Magnetická částice umožňuje přesnou navigaci
- Nano Lett., 2009, 9 (6), pp 2243–2245

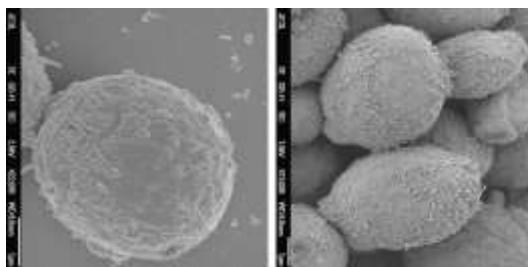


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



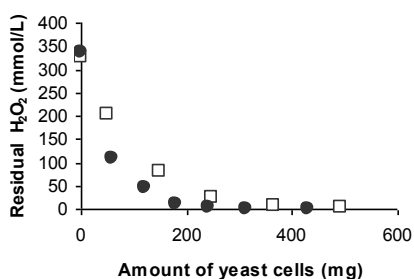
## Magnetické celobuněčné biokatalyzátory

- Možnost využití celých buněk jako biokatalyzátorů
- Cenově výhodnější než izolované enzymy
- Magnetická modifikace buněk umožňuje snadnou manipulaci

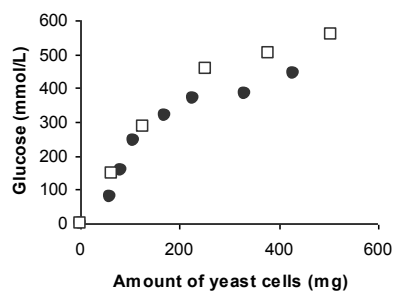


*Saccharomyces cerevisiae*

## Magnetické celobuněčné biokatalyzátory



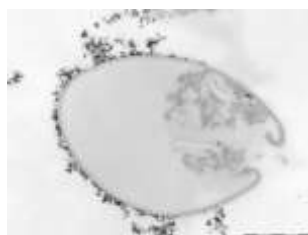
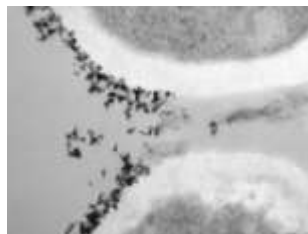
Rozklad peroxidu vodíku (katalasa)



Konverze sacharosu na glukosu a fruktosu (invertasa)

## Magnetické nanobiokompozitní materiály

- Magneticky modifikované mrtvé mikrobiální nebo řasové buňky
- Potenciální možnost využití při odstraňování organických a anorganických xenobiotik (např. barviva, ionty těžkých kovů a radionuklidů apod.)



*Kluyveromyces fragilis*



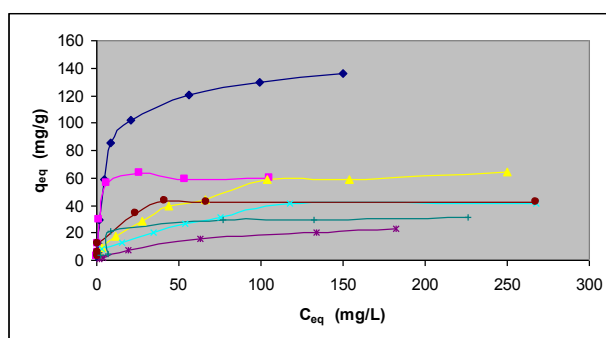
*Chlorella vulgaris*



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Magnetické nanobiokompozitní materiály



Rovnovážné adsorpční isothermy vybraných organických barviv (magneticky modifikované buňky *Kluyveromyces fragilis* jako adsorbent)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



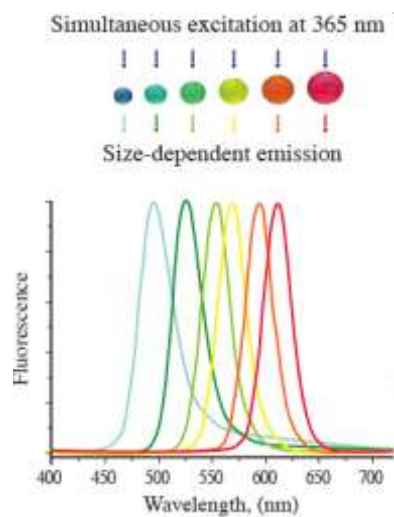
## Další nanomateriály

- Kvantové tečky
- Nanočástice zlata

## Kvantové tečky



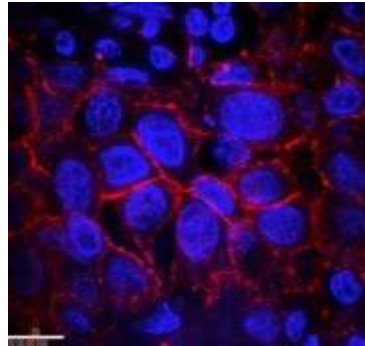
- Polovodičové nanočástice
- Velikost částice ovlivňuje barvu emitovaného světla
- Barva není ovlivněna změnou pH, iontové síly apod.





## Kvantové tečky

- Možnost značení buněk a buněčných struktur
- Možnost navázání specifických protilátek



Červeně emitující kvantové tečky s navázanou protilátkou proti nádorovému markeru. Potvrzení přítomnosti markeru v buněčné membráně.

## Nanočástice zlata

- Transfekce buněk pomocí genového děla
- Nanočástice zlata s navázanou DNA



## Biologická produkce nanočástic

- Magnetické nanočástice produkované magnetotaktickými bakteriemi
- Extracelulární produkce magnetických oxidů železa
- Tvorba nanočástic (zejména ušlechtilých kovů) mikrobiální cestou

## Magnetotaktické bakterie

- Existují různé morfologické typy
- Gram-negativní prokaryota
- Nalézají se v sedimentech
- Magnetické nanočástice jsou přítomny v magnetosomech



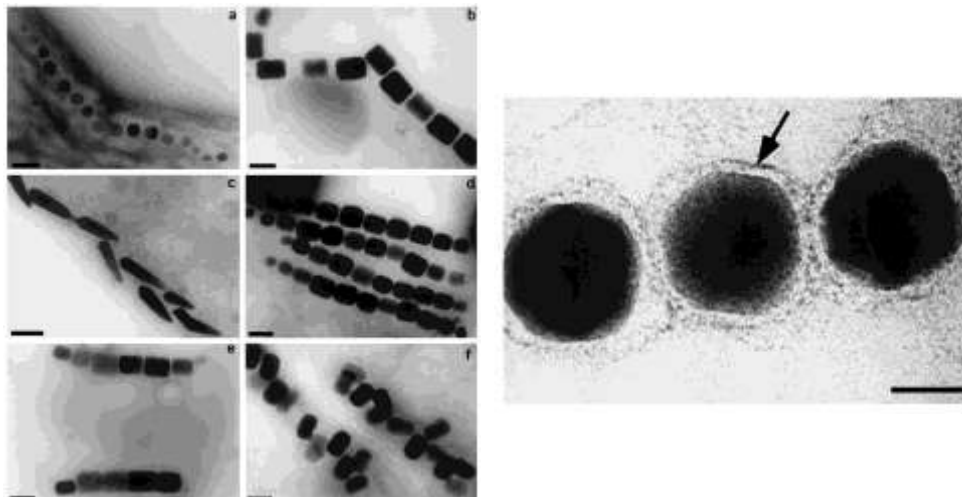
## Magnetosomy

- Složeny z magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo greigitu ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ )
- Ca 50 nm v průměru
- Pokryty lipidickou membránou
- Biokompatibilní charakter
- Důležité pro navigaci bakterií do prostředí o vhodné koncentraci kyslíku
- Uplatnění v biovědách

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Magnetosomy



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



## Produkce magnetitu extrémofilními bakteriemi

- Microorganismy využívající Fe(III) jako akceptor elektronů
- Fe(III) je redukován na Fe(II) za současné tvorby magnetického minerálu magnetitu
- Kmen 121 (kok, ca 1.0  $\mu\text{m}$  v průměru) přežívá 121 °C !!
- Kashefi and Lovley, Science 301 (2003) 934

Po 10 hod klávování při 121 °C



Bez buněk



## Děkuji za pozornost

