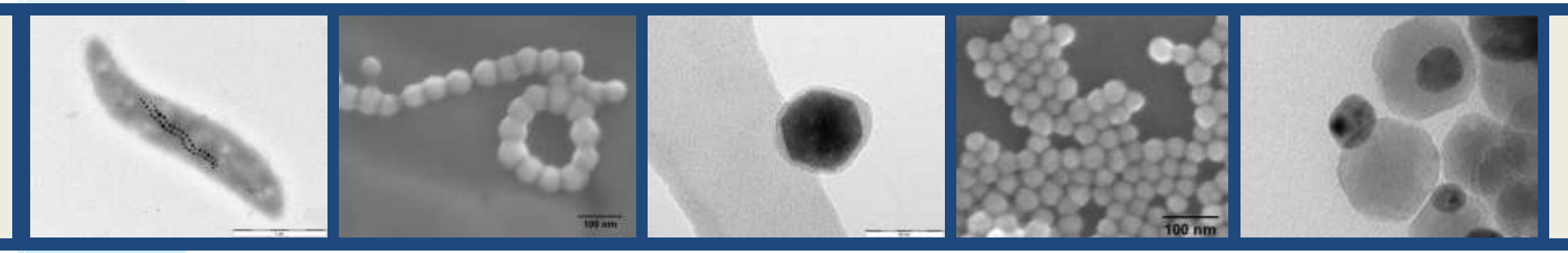
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Bakteriální nanočástice magnetitu

Produkce - biomineralizace, modifikace a aplikace.

Zdenka Marková, Michaela Pečová a kolektiv CVN



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Bakteriální nanočástice magnetitu

1. Biomineralizace a produkce magnetických nanočástic bakteriemi
   - *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR- 1, magnetozomy

2. Modifikace povrchu biogenního magnetitu
   - Vliv detergentů na MM a charakterizace bMNPs
   - charakterizace: SDS-Page, TEM, DLS, zeta-potenciál, Mössbauerova mikroskopie

3. Aplikace
   - Modifikace bMNPs – chitosanem – využití pro imobilizaci enzymů
   - Modifikace PEI, TWEEN 20 – magnetické značení buněk

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1. Biomineralizace

BIM : biologicky indukovaná mineralizace

- minerály vznikají jako produkty metabolismu organismů (tvorba sulfidů železa)

- obecně žádná biologická kontrola vůči velikosti, struktuře, krystalografii – dáno pH, pCO_2, konc. produktů jiných metabolických cest

- prokaryoty – výjimkou je mineralizace v magnetotaktických bakteriích (MTB)

BCM : biologicky kontrolovaná mineralizace

- vzniklé minerály plní určitou biologickou funkci v organismu … jsou tvořeny proto, aby ji plnily

    - mechanické funkce: obrana (schránky), podpora (kosti), pohyb

    - vnímaní gravitace (kalcit v uších), optické vnímání (kalcitové čočky u trilobitů)

    - uchovávání (ferritin)

    - magnetické vnímání (magnetit, greigit; navigace holubů, tučňáků, netopýrů, včel)

- přísná biologická kontrola typu minerálů, velikosti (uniformní), přesně definované morfologie, přísně kontrolované složení a struktura, kontrolovaná krystalografická orientace

- eukaryoty (a magnetotaktické bakterie)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Produkce magnetických nanočástic bakteriemi

- **MTB** – **gram negativní bakterie** (koky, spirila, tyčinky)

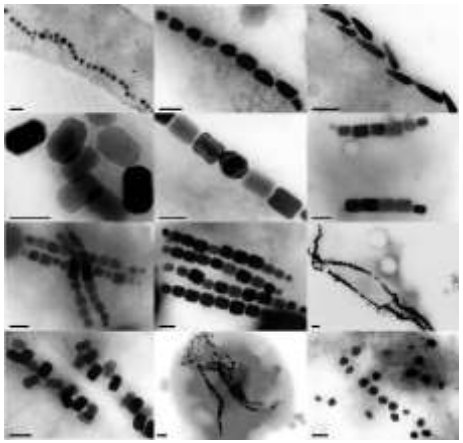
- MTB produkují spec. organely pro vnímání a orientaci (magnetozomy) vůči geomagnetickému poli

- **magnetozomy -** nanokrystaly magnetických minerálů (Fe) v jedno- nebo několikařetízkových strukturách umožňující buňce vnímat a orientovat se podél externího magnetického pole – magnetotaxe

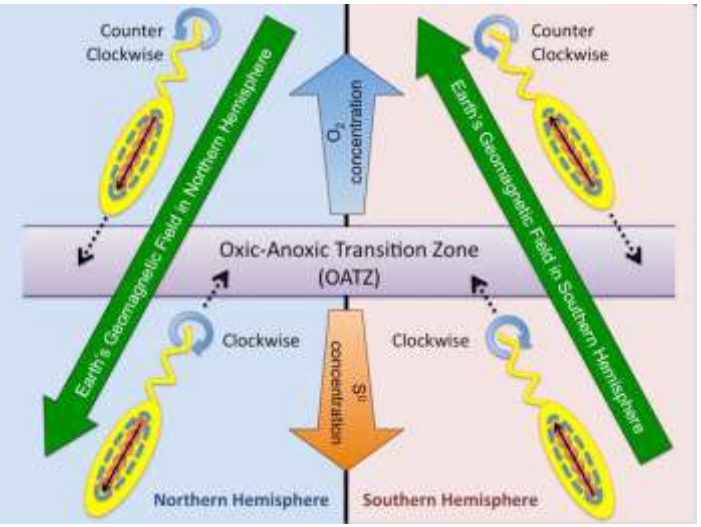
- **magnetotaxe** spolu s chemotaxí, aerotaxií a možná i fototaxií určují směr pohybu buňky do preferující mikrooxické zóny

- magnetozomy - druhově specifická morfologie, velikost, uspořádání a chemické složení krystalů

- **BCM** – formace krystalů magnetozomů je fascinujícím příkladem jak jednoduchý organismus může vytvářet přesné a často jedinečné inorganické struktury na základě informací kódovaných v genomu



Diverzita krystalů magnetitu a uspořádání v různých magnetotaktických bakteriích (D. Schuler et al. 2008)



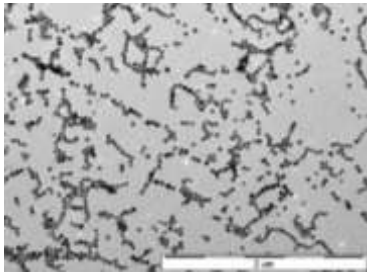
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Magnetospirillum gryphiswaldense MSR- 1, magnetozomy

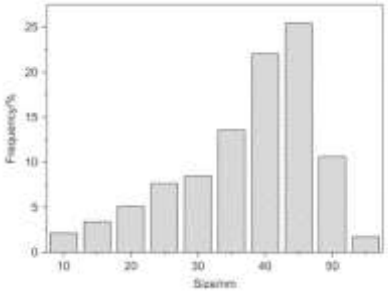
- pro laboratorní kultivace: *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *M. magnetotacticum* MS-1, *M. magneticum* AMB-1 (Německo – Dirk Schuler, Japonsko - Tadashi Matsunaga, USA – Dennis A. Bazylinski, Čína)

Kultivace ve fermentoru
- *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1
  - OD ~ 1
  - C_{mag} ~ 1,5
  - exponenciální fáze do 28 h

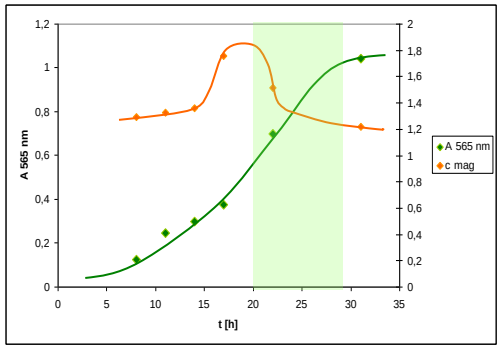
MSR- 1



Izolované magnetozomy



Distribuce velikostí magnetozomů
Han L. et.al. 2007

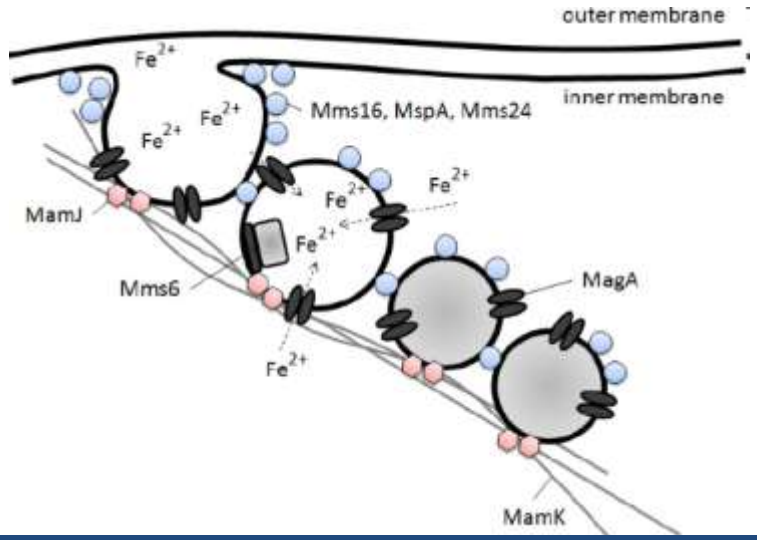


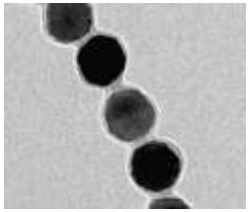
Záznam kultivace

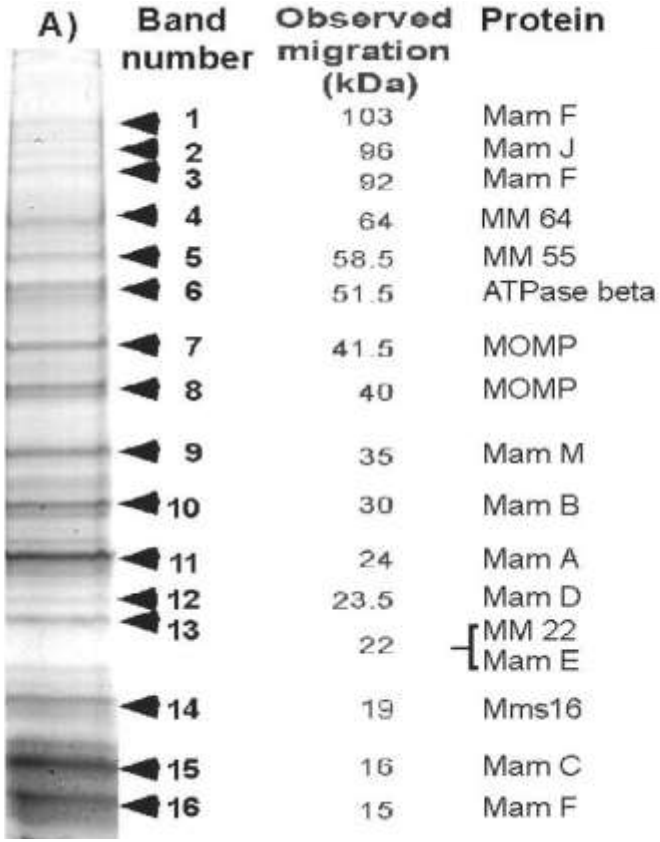
evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Magnetozomy

- Vykazují velmi nízkou toxicitu
- Hlavními možnými toxicitními faktory jsou
  - proteiny magnetozomální membrány (MM)
  - malé množství endotoxinu lipopolysacharidu asociovaného s membránou
  - nanočásticový charakter (povrchový náboj)







Separation of MM-associated protein by SDS-PAGE
Grunberg et al. 2004

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2. Modifikace povrchu biogenního magnetitu

- vliv detergentů na MM a charakterizace bMNPs
- charakterizace: SDS-Page, TEM, DLS, zeta-potenciál, Mössbauerova mikroskopie

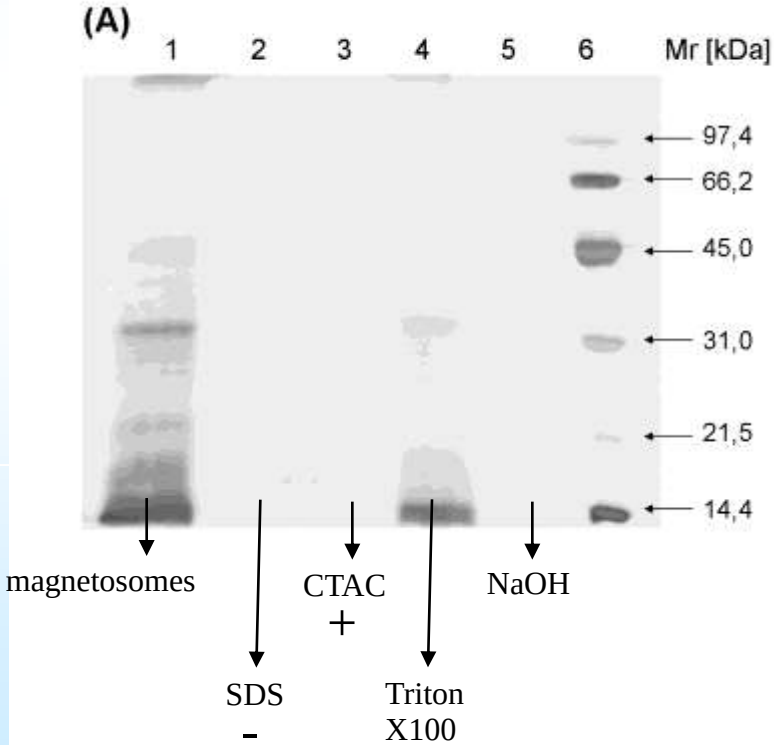
Důvody
- odstranění MM spolu s možnými toxicitními faktory
stabilizace nanočástic proti agregaci, příprava prekurzoru pro další aplikace

Podmínky
- ionické surfaktanty – kladný CTAC, záporný SDS
- neionické surfaktanty – TRITON X100
- NaOH
- extrakce lipidů – chloroform/ethanol/hexan
- sonikace (2h), inkubace 98°C (1h)

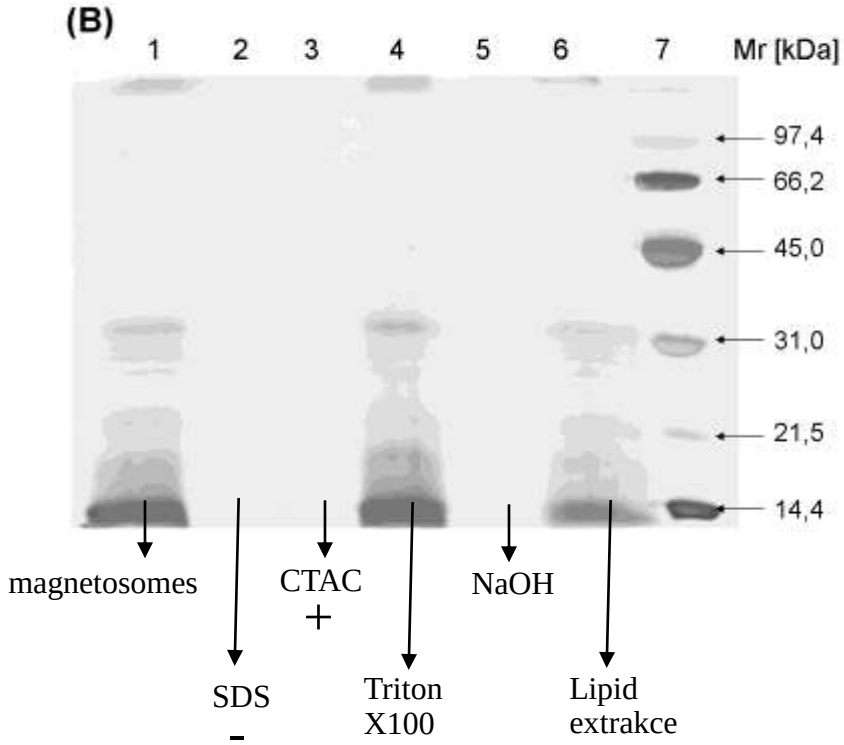
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Stanovení proteinů magnetozomální membrány po aplikaci detergentů za využití SDS - 12%PAGE

Inkubace 98°C – 1 h



Sonikace – 2 h



evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TEM

zobrazení membrány
a uspořádání bMNPs

Magnetozomy

SDS

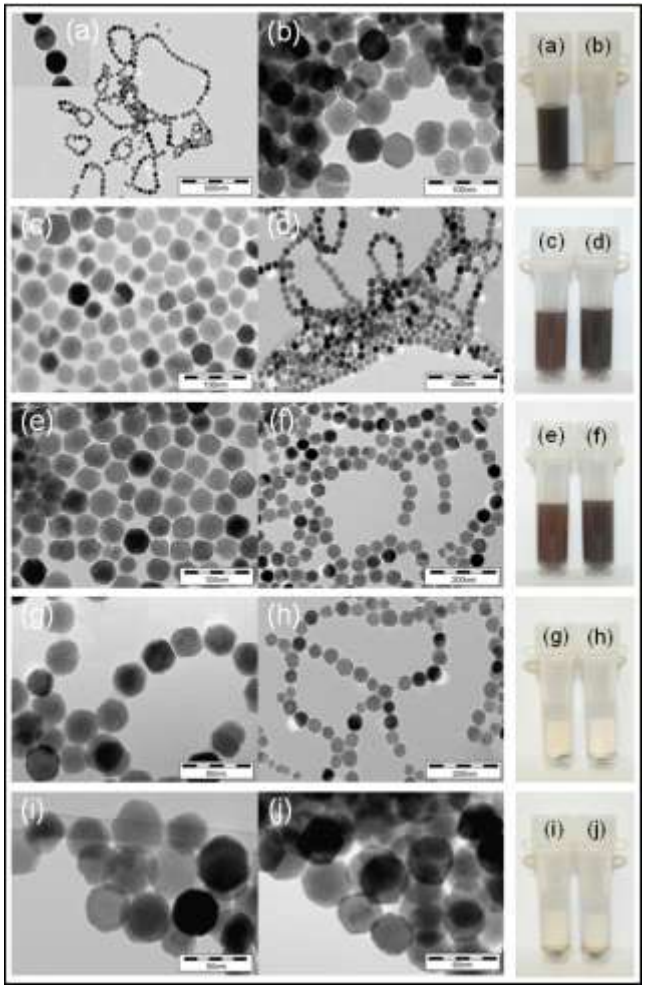
98°C

1 h

CTAC

Triton X100

NaOH



Magnetozomy

SDS

Sonikace

2 h

CTAC

Triton X100

NaOH

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Určení povrchového náboje bMNPs po účinku ionických detergentů - zeta potential measurements

Sample	Treatment	Zeta potential [mV]
magnetosomes	-	-23 ± 6
$mSDS^t$	98 °C, 1 hour	-50 ± 9
$mCTAC^t$	98 °C, 1 hour	51 ± 5

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

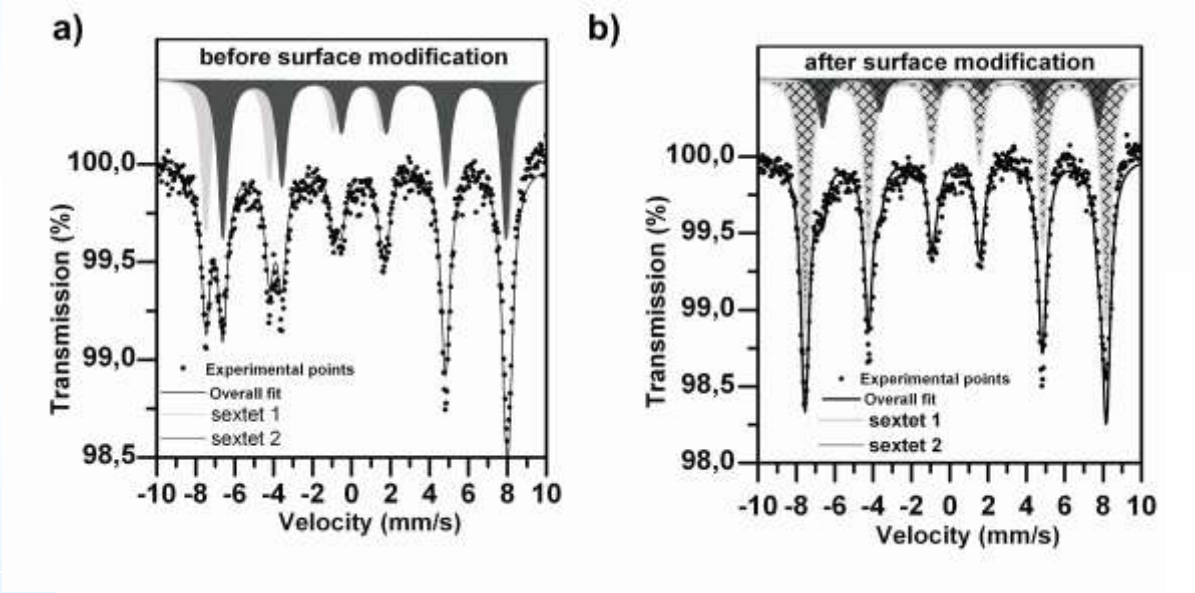
Stanovení velikosti částic / agregátů pomocí DLS

Sample	Size distribution (number mode)						Size distribution (intensity mode)					
	1. peak			2. peak			1. peak			2. peak		
	d [nm]	h.w. [nm]	Int. [%]	d [nm]	h.w. [nm]	Int. [%]	d (H) [nm]	h.w. [nm]	Int. [%]	d [nm]	h.w. [nm]	Int. [%]
Magnetosome	**46**	**15**	**100**	-	-	-	74	26	24	532	284	69
mSDS^{t}	**41**	**13**	**100**	-	-	-	74	28	45	394	176	55
mCTAC^{t}	**40**	**9**	**100**	-	-	-	53	13	6	888	320	34
mNaOH^{t}	110	21	99	987	271	1	125	21	7	1354	351	88
mSDS^{s}	223	76	81	763	387	19	253	59	5	1864	1194	95
mCTAC^{s}	179	98	100	-	-	-	446	280	98	4708	771	2
m NaOH^{s}	953	260	100	-	-	-	1337	365	100	-	-	-

where d - average particle diameter; h.w. - half-width of peak from distribution curve, Int.- percentage representation of particles size in the peak.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Mössbauerova analýza – oxidace povrchu bMNPs vlivem teploty

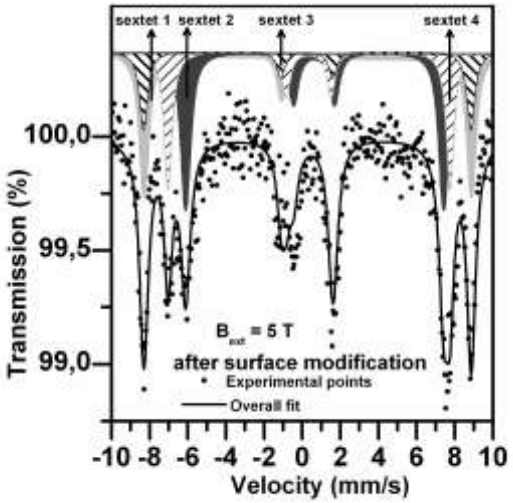


Zero-field Mössbauer spectrum při pokojové teplotě

(a) magnetozomy

(b) bMNPs inkubovány při 98°C

Mössbauer spectrum při pokojové teplotě ve vnějším magnetickém poli 5T pro bMNPs po jejich inkubaci při 98°C →



core@shell struktura – magnetit@maghemit

68@32 ± 5 %

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

3. Aplikace

- bMNPs - specifické vlastnosti: rel. monodisperzita, velikost nanočástic,

magnetické vlastnosti – ferromagnetikum (odezva na vnější magnetické pole)

- separace biomolekul pro bioanalytické účely

- magnetická separace buněk

- lokální (chemo)terapie pomocí funkčních látek či buněk (kmenové) značených magnetickými nanočásticemi s využitím „magnetické navigace“

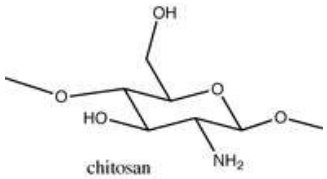
- magnetická hypertermie

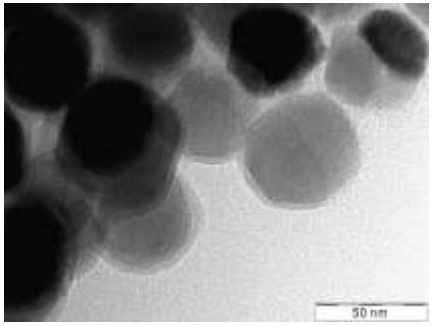
Vlastní aplikace

- Modifikace bMNPs – chitosanem – využití pro imobilizaci enzymů
- Modifikace PEI, TWEEN 20 – magnetické značení buněk

Aplikace - Modifikace bMNPs – chitosanem – využití pro imobilizaci enzymů

Chitosan – obalení nanočástic magnetitu a zavedení -NH_2 skupiny - precipitace



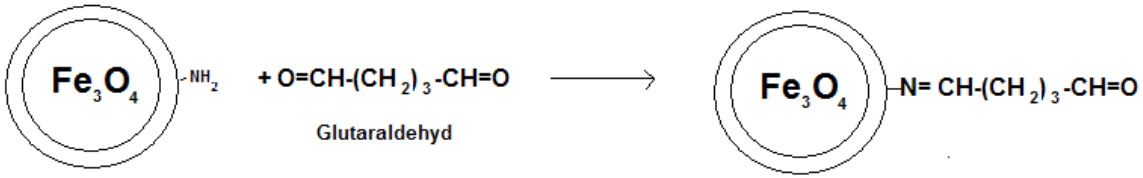


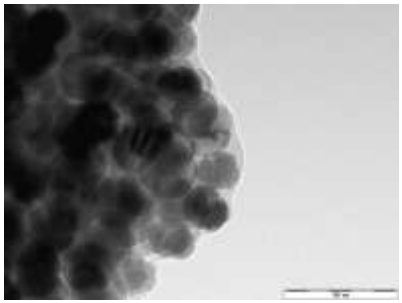
Sample	Temperature (°C)[a]	Solubility (pH)[b]												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Chitosan	–													

Solid sample (10 mg) was dispersed in H_2O (50 ml) on the base of method of Sashiwa et al. (1999).

[b] White bar: solution; black bar: insoluble.

Chitosan – glutaraldehyd – funkcionalizace a aktivace povrchu pro navázání biologických molekul - enzymů





evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

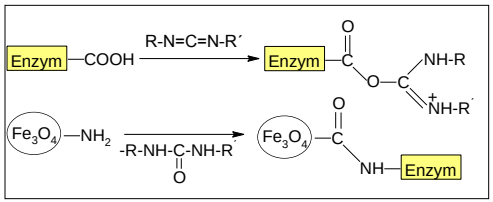
Biotinylace a imobilizace – proteolytické enzymy

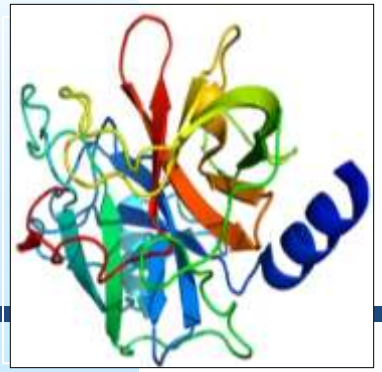
Hovězí trypsin

- Ec 3.4.21.4
- serinová endopeptidasa
- 23,3 kDa, 223 AMK
- Arginyl-X, Lysyl-X
- nízká termostabilita
- autolýza

Výhody modifikace a imobilizace trypsinu

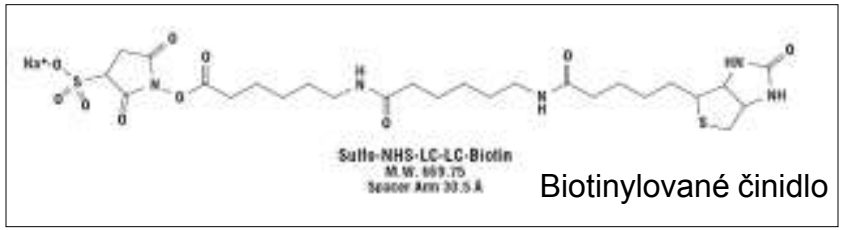
-vyšší teplotní stabilita
- zkrácení doby štěpení
- vysoká koncentrace
- magnetická separace
- opakované použití
- redukce autolýzy
- čistota produktu





Ovlivnění vlastností enzymu:

- Chemická modifikace
- imobilizace na pevné nosiče

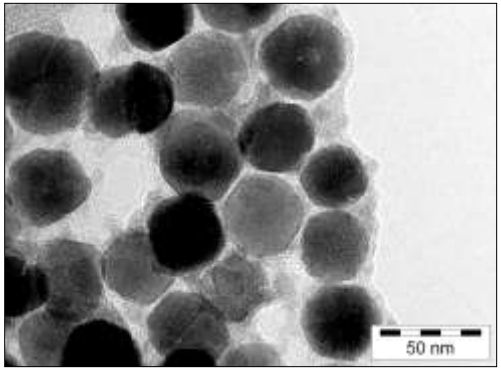


Biotinylované činidlo

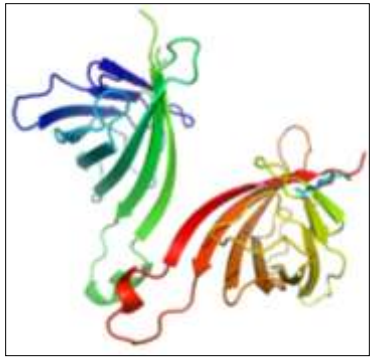
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Imobilizace biotinylovaného trypsinu na avidinové nanočástice a jeho využití v proteomice

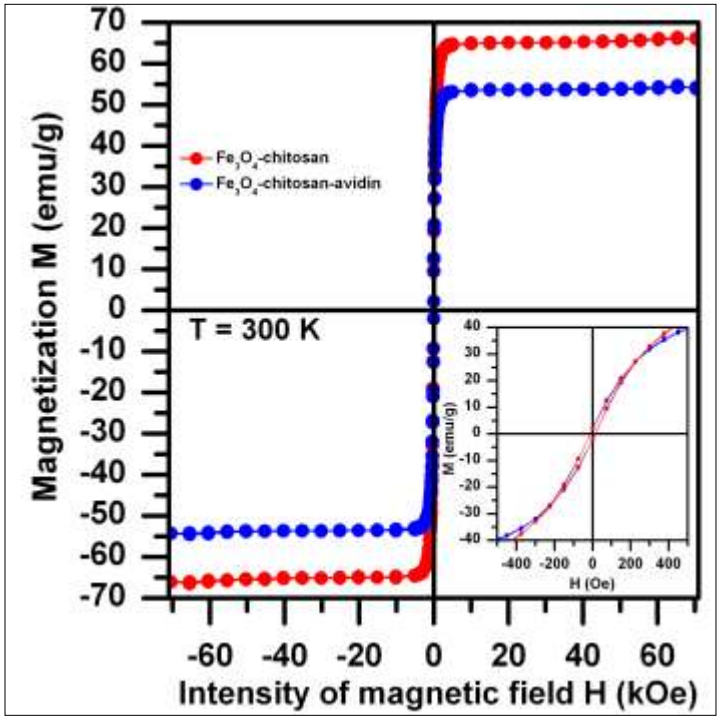
Kovalentní imobilizace avidinu:
- glutaraldehydová metoda
- Avidin – 0,2 mg.ml-1
- magnetická separace



Fe_3O_4-chitosan-avidin



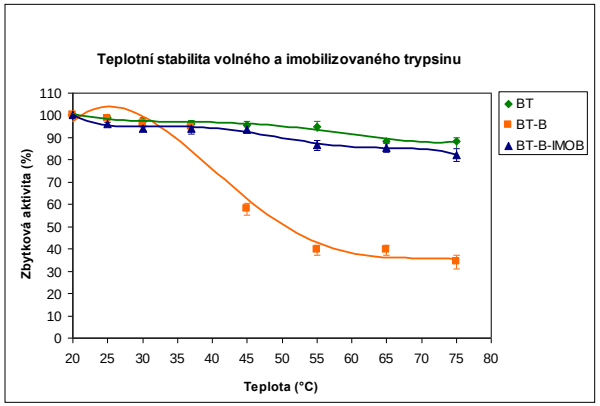
Squid – snížení magnetizace



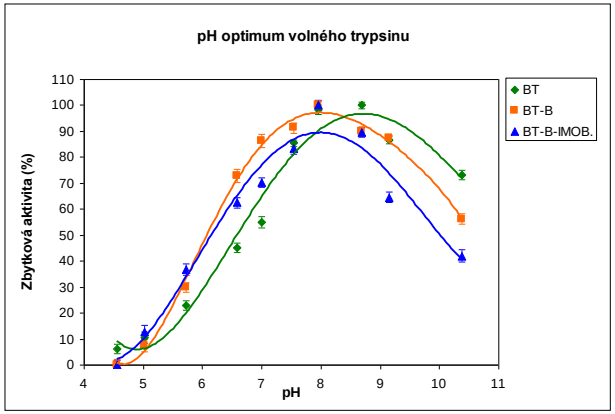
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Biotinylace hovězího trypsinu

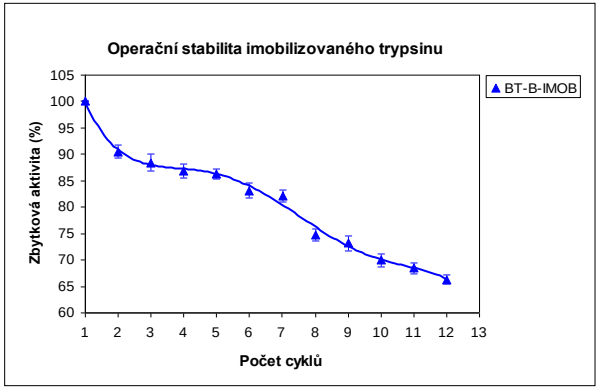
Termostabilita – 20-75°C, 0.1 % HCOOH



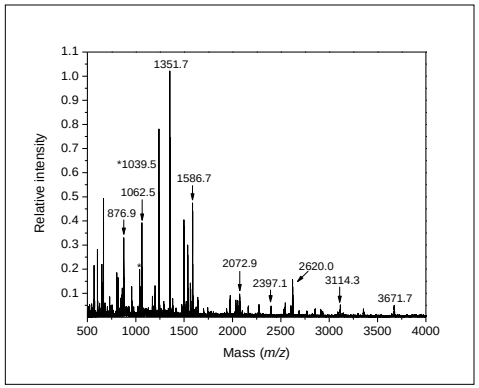
pH optimum – 4.36-10.38

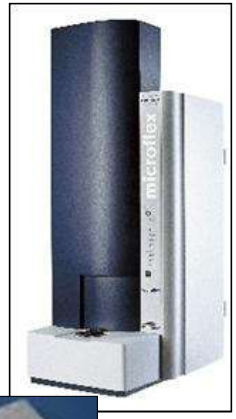


Operační stabilita – 12 cyklů



PMF-křenová peroxidasa – 2 h při 37°C





evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Magnetické značení buněk

bMNPs a jejich modifikace

- bMNPs + PEI

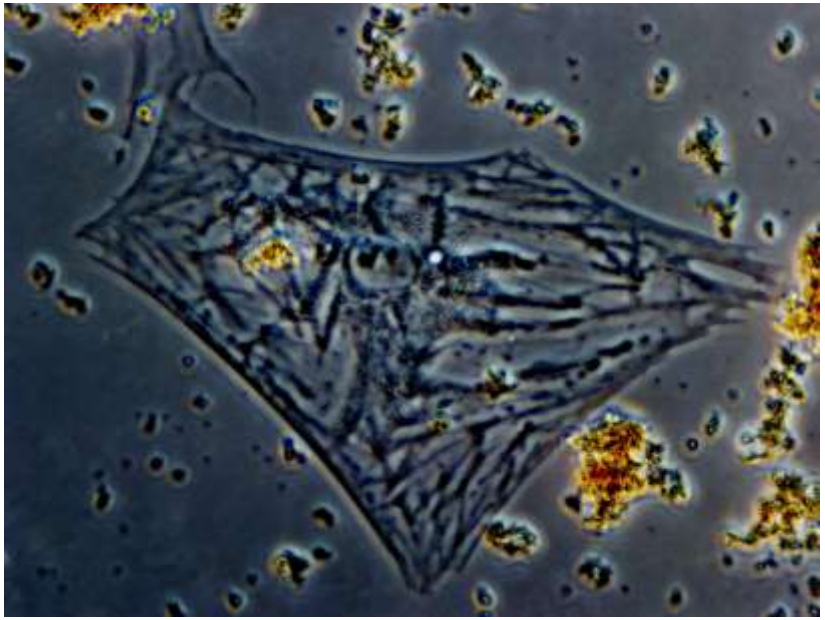
- bMNPs + TWEEN

- podmínky výběru: netoxicita a stabilizace, funkční skupiny – povrchový náboj

Buňky:

-testováno na mesenchymálních potkaních buňkách – fixovaných (glutaraldehyd)

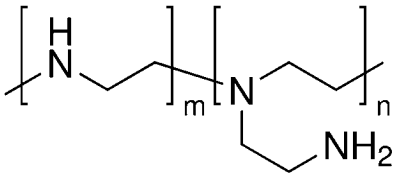
- vývoj absorpce nanočástic v čase

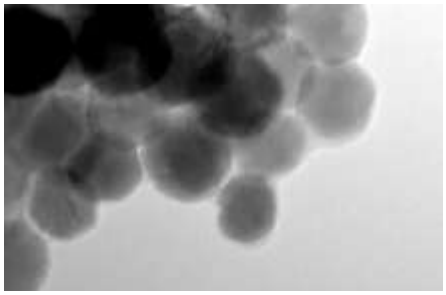


mTween 20, 72 h

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

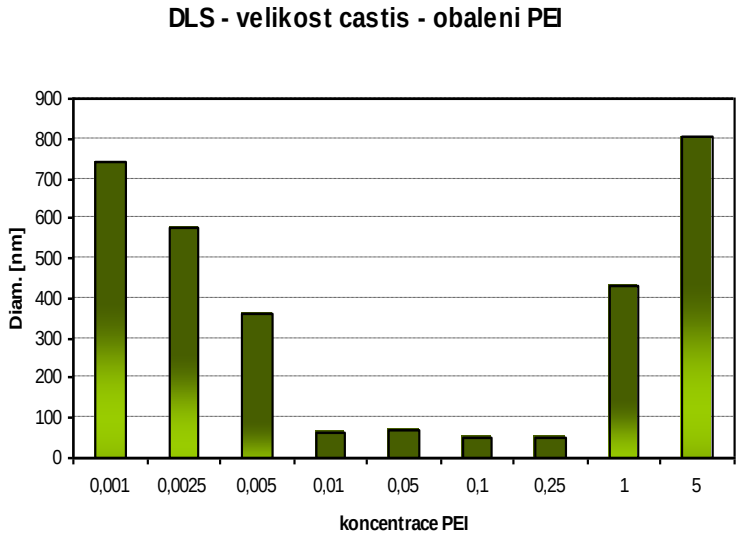
Magnetické značení buněk - PEI

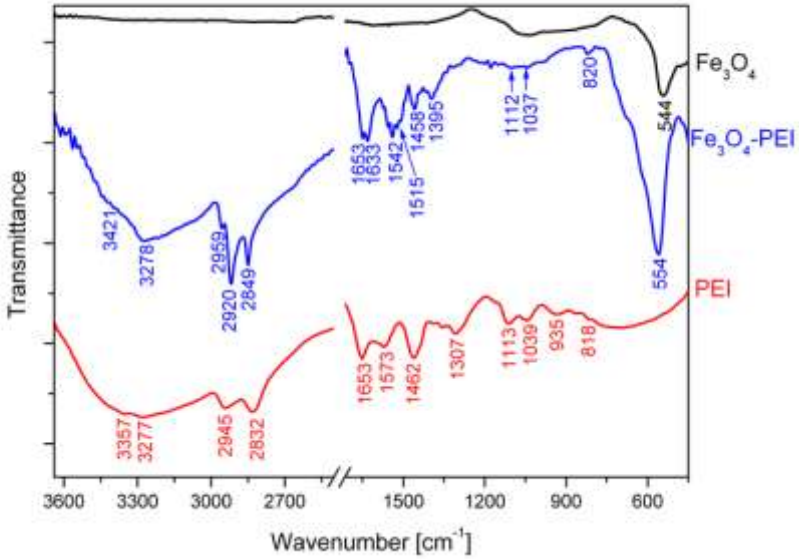




Částice biogenního magnetitu s kladně nabitým povrchem

- DLS: velikost částic ~ 60 nm
- Zeta potenciál: potvrdil kladně nabitý povrch: + 45 mV



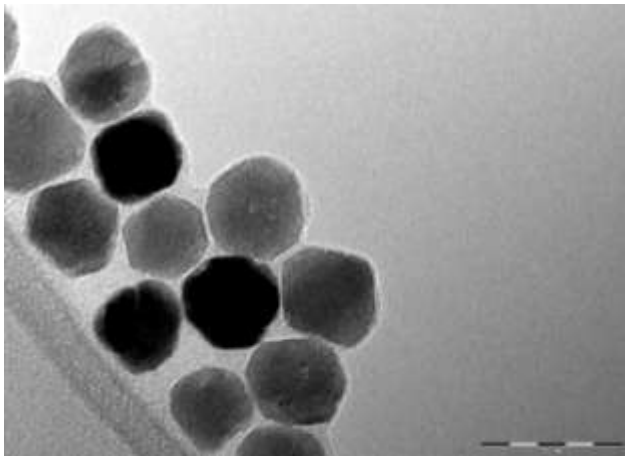


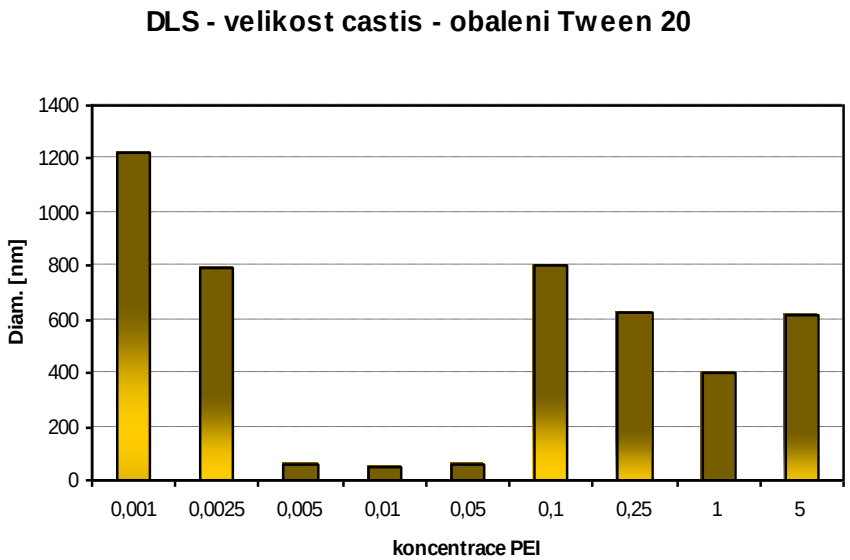
evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

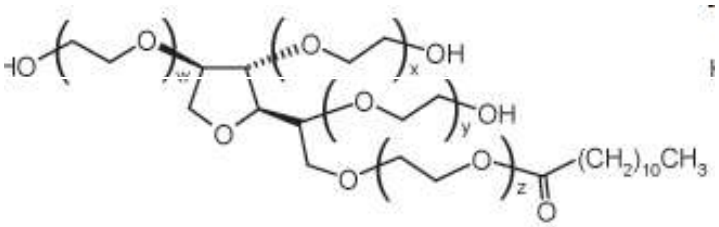
Magnetické značení buněk – TWEEN 20

biogenní magnetit stabilizovaný Tween 20

- DLS: velikost částic ~ 55 nm
- Zeta potenciál: ±0
- vizuálně se chová jako PEI - magnetit



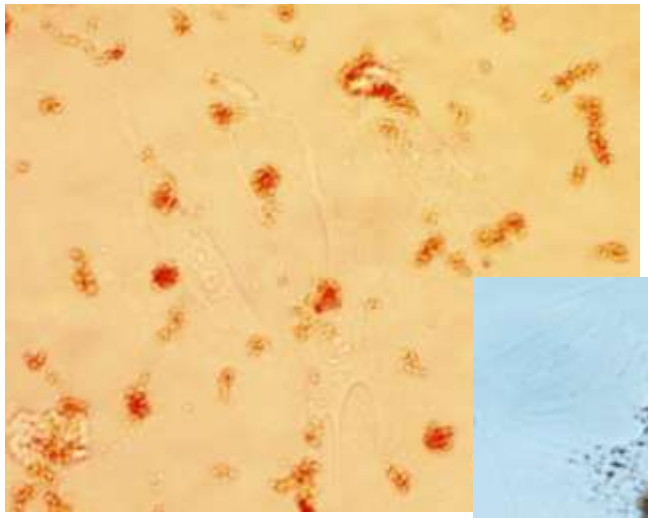




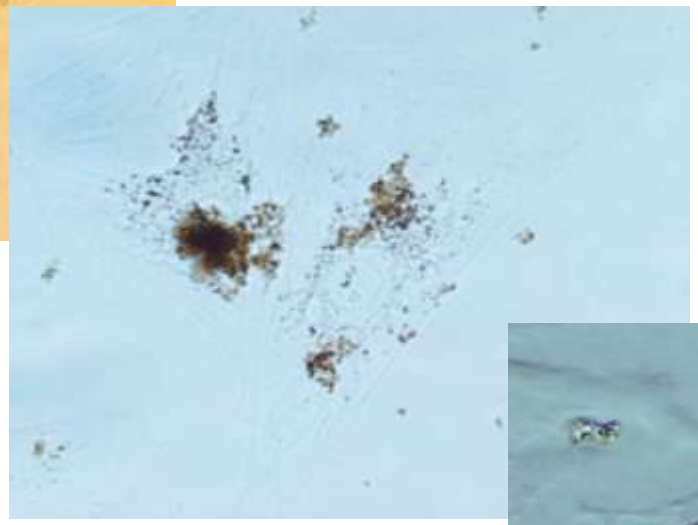
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Magnetické značení buněk – PEI

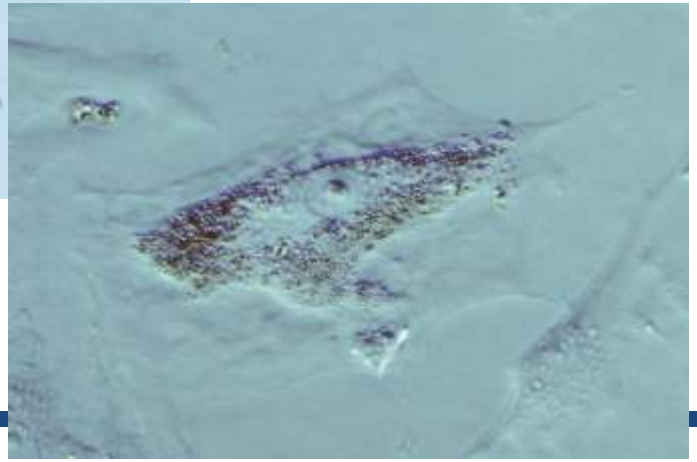
- ukázka



1 hod



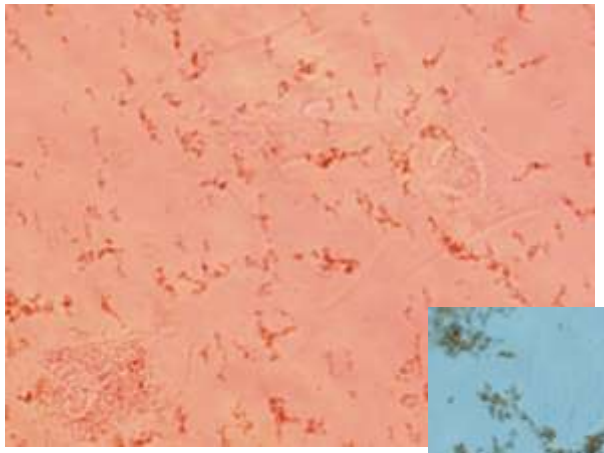
48 hod



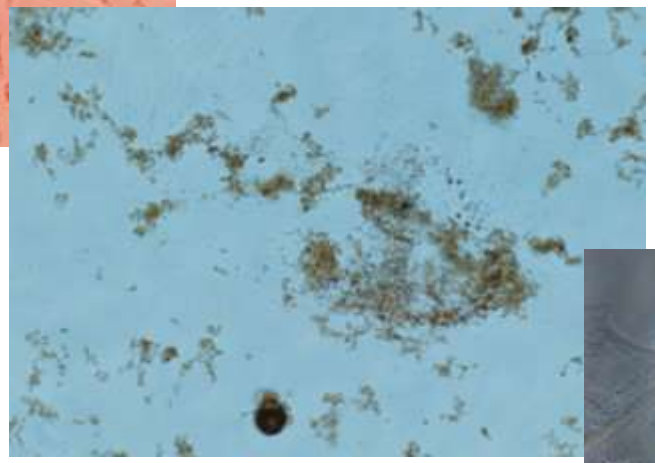
72 hod

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

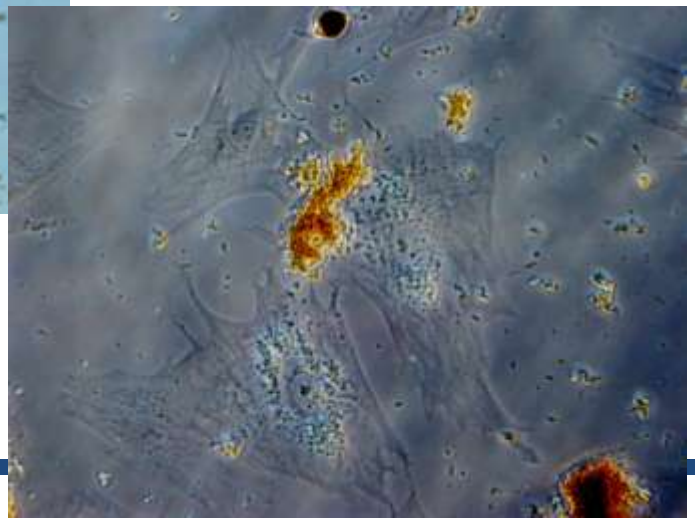
Magnetické značení buněk – TWEEN 20 - ukázka



1 hod



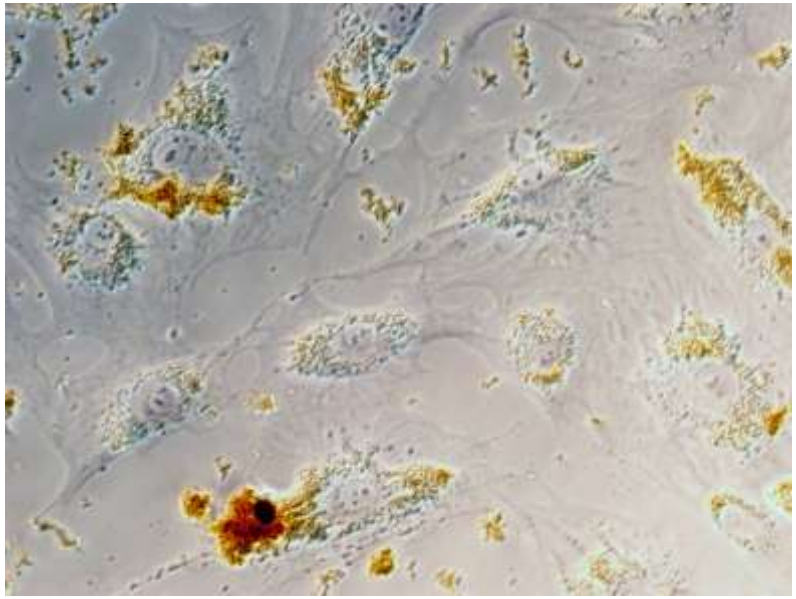
48 hod



72 hod

evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Magnetické značení buněk



– TWEEN 20, absorpce

… lokalizace

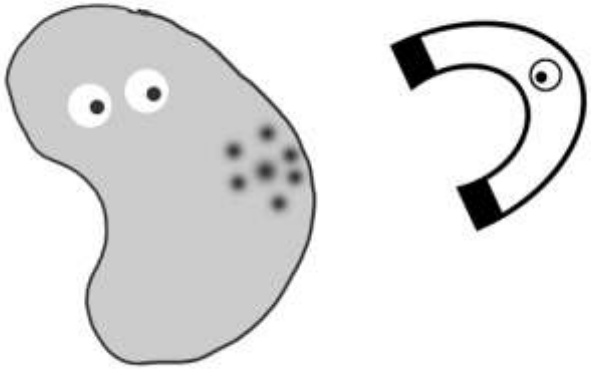
??? biokompatibilita, vliv bMNPs na diferenciaci buněk
??? vliv vnějšího mag. pole na značené buňky

evropský sociální fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Děkuji Vám za pozornost