

## PLNĚ AUTOMATIZOVANÁ IZOLACE ZINKOVÝCH PROTEINŮ VÁZAJÍCÍCH ZINEK Z BUNĚK *Staphylococcus aureus* POMOCÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC

EVA JÍLKOVÁ<sup>a\*</sup>, SOŇA KRÍŽKOVÁ<sup>a,b</sup>,  
LUDMILA KREJČOVÁ<sup>a</sup>, DAVID HYNEK<sup>a,b</sup>,  
JIŘÍ SOCHOR<sup>a,b</sup>, JINDŘICH KYNICKÝ<sup>b,c</sup>,  
VOJTĚCH ADAM<sup>a,b</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká Republika, <sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Česká Republika, <sup>c</sup> Ústav geologie a pedologie, Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká Republika  
kizek@sci.muni.cz

Došlo 22.3.12, přepracováno 14.11.12, přijato 25.1.13.

Klíčová slova: Magnetické nanočástice, *Staphylococcus aureus*, automatizace, zinek

### Úvod

Magnetické nanočástice (MPs) nacházejí uplatnění v široké škále biomedicinských a biotechnologických oborů. Hojně se používají pro izolaci a detekci biomolekul, jako jsou nukleové kyseliny či bílkoviny, ale také pro izolaci a detekci různých typů buněk včetně mikroorganismů<sup>1,2</sup>. Jejich předností jsou příznivé fyzikální vlastnosti, díky nimž je při jejich použití pro izolaci a separaci analytu dosahováno vyšší selektivity ve srovnání s běžnými metodami. Izolace a detekce mikroorganismů a jejich biokomponent patří mezi jeden z rozvíjených směrů uplatnění MPs (cit.<sup>2,3</sup>). Mezi klinicky velmi významnou skupinu prokaryot řadíme bakterie rodu *Staphylococcus*, především *Staphylococcus aureus*, který se přirozeně vyskytuje na kůži a sliznicích teplokrevných zvířat a lidí<sup>4</sup>. V určitých případech může tento mikroorganismus způsobit infekce v rozsahu od mírných zánětů kůže a měkkých tkání až po život ohrožující sepse, syndrom toxického šoku a nekrotizující pneumonie<sup>5</sup>. Kromě toho *S. aureus* způsobuje nebezpečné nozokomiální infekce ve zdravotnických zaříze-

ních s multirezistencí některých kmenů k doposud známým antibiotikům<sup>6</sup>. Výzkum věnující se studiu mechanismů rezistence je velmi intenzivní a jedním z nejvýznamnějších objevených mechanismů je vztah zinečnatých iontů k methicilinové rezistenci u stafylokoků<sup>7</sup>.

Obsah zinku v buňce musí být regulován, přičemž zinečnaté ionty jsou v intracelulárním prostoru u mikroorganismů v přebytku. Regulace buněčné homeostázy je tak usměrňována různými buněčnými mechanismy, které zabraňují nadměrnému příjmu zinku<sup>2</sup>. Je nutné, aby byly mikroorganismy schopny tyto ionty přijímat pomocí různých transportních systémů. V bakteriálních buňkách může být jeden prvek přenašen několika typy přenašečů, stejně tak jeden přenašeč může transportovat více typů iontů kovů<sup>12</sup>. Předpokládá se, že důležitou roli v přenosu zinku hrají chaperony, přesný mechanismus však znám není. Práce Hankeho<sup>13</sup> naznačila, že specifická vazba zinečnatých iontů může být spojena s různými proteiny obsahujícími zinek.

Cílem této práce bylo navrhnout plně automatizovanou izolaci bakterií *S. aureus* pomocí paramagnetických částic modifikovaných protilátkou. V dalším kroku jsme se zaměřili na optimalizaci detekce zinečnatých iontů v bakteriích *S. aureus*, které jsme vystavili třem různým formám  $Zn^{2+}$  ( $ZnCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $Zn(NO_3)_2$ ) po dobu 12 hodin.

### Experimentální část

#### Aparatura

Kultivace bakterií probíhala na termostátované třepačce, Incubator Hood TH 15, Edmund Buhler GmbH, Německo. Pro měření zákalu v průběhu kultivace byl použit spektrofotometr Specord 210 (Analytic Jena, Německo) s termostatem F12/ED (Julabo, Německo). Bakterie byly dezintegrovány pomocí ultrazvukové jehly (Bandelin, Německo). Pro automatickou izolaci buněk byla využita automatická pipetovací stanice epMotion 5075 (Eppendorf, Německo).

Vzorky pro analýzu  $Zn^{2+}$  byly mineralizovány pomocí mikrovlnného rozkladu Microwave Anton Paar 3000 (Anton Paar, Rakousko) a následně použity pro elektrochemické stanovení  $Zn^{2+}$ , které probíhalo na automatizovaném elektrochemickém analyzátoru složeném z autosampleru (Autosampler 813 Compact) a měřicí jednotky VA Computrace 797 (Metrohm AG, Švýcarsko). Systém je dále tvořen pumpou, která dávákuje elektrolyt do měrné cely (s přesností na jednotku  $\mu$ l). Druhá pumpa dávákuje roztok  $Zn^{2+}$  o koncentraci ( $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) a je využita pro metody standardního přídatku. Dále systém obsahuje dvě peristaltické pumpy (Metrohm 772 Pump Unit, řízených

\*Prezentováno Evou Jilkovou na 15. ročníku celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie, O cenu firmy Merck. Práce získala ocenění poroty.

pomocí Metrohm 731 Relay Box), které se využívají na oplach měřící cely.

Pro pozorování a fotodokumentaci vzorků bakterie *Staphylococcus aureus* byla použita metoda odražených elektronů na přístroji FEG-SEM Tescan MIRA 3 XMU (Tescan, ČR). Sledované vzorky byly pro účely elektronové mikroskopie pokoveny 5 nm částicemi zlata pomocí vakuové naprašovačky Emitech K950X (Quorum Technologies, Velká Británie).

#### Chemikálie

ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Imunoglobulin G (IgG) z lidského séra, hovězí sérový albumin, NaN<sub>3</sub>, HCl, NaCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Tween-20 a H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> v ACS čistotě (firemní označení) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, USA. Médium pro kultivaci bakterií (masový pepton 5 g l<sup>-1</sup>, NaCl 5 g l<sup>-1</sup>, hovězí extrakt 1,5 g l<sup>-1</sup>, kvasniční extrakt 1,5 g l<sup>-1</sup>, pH 7,4±0,2) bylo pořízeno od firmy HIMEDIA, Indie.

Paramagnetické částice Dynabeads®MyOne™ Tosylactivated byly pořízeny od firmy Invitrogen, Norsko. Pro výměnu pufrů během přípravy paramagnetických částic modifikovaných protilátkami byly použity kolonky Amicon Ultra 0,5 s membránou 50 K (Millipore, USA).

#### Pracovní postupy

##### Kultivace bakteriální kultury *S. aureus*

Pro všechny experimenty byl použit *S. aureus* (NCTC 8511, Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika), který byl uchováván na masopeptonovém agaru. Kultivace probíhala v tekutém médiu (masový pepton 5 g l<sup>-1</sup>, NaCl 5 g l<sup>-1</sup>, hovězí extrakt 1,5 g l<sup>-1</sup>, kvasniční extrakt 1,5 g l<sup>-1</sup>, pH 7,4±0,2, HIMEDIA, Indie). *S. aureus* byl kultivován na třepačce (600 rpm, Incubator Hood TH 15, Edmund Buhler GmbH, Německo) při 37 °C po dobu 6 hodin, dokud nebyl zákal kultivované kultury roven hodnotě 0,1 při vlnové délce 600 nm (Specord 210, AnalytikJena, Německo). Narostlá bakteriální kultura v exponenciální fázi růstu byla dána do osmi 100ml Erlenmeyerových baněk, ke kterým bylo přidáno 0, 1,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 μmol l<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> (ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Roztok byl promíchán a pipetován do plastových kyvet (AnalytikJena, Německo) o objemu 3 ml. Následně byla na spektrofotometru (SPECORD 210, AnalytikJena, Německo) v 30minutových intervalech po dobu 24 h měřena absorbance při vlnové délce 600 nm. Kyvetový systém byl zahříván termostatem na teplotu 37 °C (F12/ED Julabo, Německo). Všechna měření byla provedena pětkrát. Výsledné absorbance byly zprůměrovány a přepočítány ke kontrolní variantě (0 μmol l<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup>, která představovala 100 %). Pro izolaci buněk a zinkových proteinů *S. aureus* bylo odebráno 25 ml narostlé kultury a k ní bylo přidáno 100 μmol l<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>, takto připravený vzorek byl kultivován na třepačce (Incubator Hood TH 15, Edmund Buhler GmbH, Německo) při 600 RPM 37 °C po dobu 6 hodin.

##### Příprava vzorků pro detekci množství zinku

100 ml vzorku *S. aureus*, které byly odebrány ze šikmého agaru do tekutého média a inkubovány na třepačce při 37 °C po dobu, než zákal odpovídal absorbanci 0,1, bylo pipetováno do osmi 100ml Erlenmeyerových baněk a byl přidán zinek(II) v koncentracích 0; 1,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 μmol l<sup>-1</sup> (ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Připravené vzorky byly inkubovány a třepány 24 h při 37 °C. Po 24 hodinách bylo z takto připravených vzorků odebráno 2 ml vzorku do mikrozkušavky a proběhla centrifugace při 1500 rpm po dobu 15 min. U 500 μl supernatantu bylo změřeno množství zinku, zbytek byl odseparován a získané buňky byly 3krát promyty fosfátovým pufrům, pH 7 o koncentraci 0,1 mol l<sup>-1</sup>. Po posledním promytí bylo k buňkám přidáno 1,5 ml fosfátového pufru. Takto připravený vzorek byl ultrazvukován pomocí ultrazvukové jehly po dobu 2 min. Poté byly všechny vzorky 5 min třepány na vortexu (420 rpm) a poté 15 min centrifugovány. Ze získaného supernatantu bylo odebráno 500 μl na detekci volného zinku. K získaným buňkám bez supernatantu bylo přidáno 350 μl HNO<sub>3</sub> a 150 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a takto připravené vzorky byly mineralizovány. Mineralizace probíhala v aparatuře Microwave Anton Paar 3000 po dobu 50 min (10 min – 50 W, 30 min – 100 W, 10 min – 0 W)<sup>24</sup>. U 500 μl zmineralizovaného vzorku bylo detegováno množství vázaného zinku. Tento postup byl převzat z publikace Hynek a spol.<sup>8</sup>

##### Modifikace paramagnetických částic

Pro kovalentní imobilizaci IgG byly použity paramagnetické částice (Dynabeads®MyOne™ Tosylactivated, Invitrogen, Norsko). Bylo použito 1000 μg IgG na 25 mg paramagnetických částic. Před navázáním byl odstraněn azid sodný a pH roztoku bylo upraveno na 2,5 přidávkem HCl. Po 15 min byly protilátky vloženy do fosfátového pufru (PBS, pH 7,4). Pro všechny filtrace byly použity filtry Amicon Ultra 0,5 s membránou 50 K (Millipore, USA). Kovalentní imobilizace byla provedena v celkovém objemu 625 μl v 0,1 M borátovém pufru (pH 9,5) s 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po dobu 24 h za mírné rotace. Volný povrch částic byl následně zablokován 0,5% hovězím sérovým albuminem (BSA) ve fosfátovém pufru s přidávkem 0,15 M NaCl (PBS) (w/v) s 0,05% Tween-20 (v/v) po dobu 10 h. Po zablokování byly částice třikrát promyty 1 ml promývacího pufru (0,1% BSA v PBS (w/v) s 0,05% Tween-20 (v/v)) a následně resuspendovány v 625 μl skladovacího pufru (promývací pufr s 0,02% NaN<sub>3</sub> (w/v)).

##### Plně automatická imunoseparace

Pro automatickou izolaci buněk byla využita automatická pipetovací stanice epMotion 5075 (Eppendorf, Německo). Tento přístroj obsahuje příslušenství, které bylo použito pro potřeby imunomagnetické separace, a to magnetický separátor (Promega), termostát (Eppendorf PCR96) ModuleReservoir, s promývacími roztoky a nádobou na odpad. Přenos zabezpečuje robotické rameno s pipetovacími nástavci (TS50, TS300, TS1000) a přemis-

řovací chytač (TG-T). Vzorky jsou umístěny v adaptéru Ep 0,5/1,5/2 ml. Zařízení je ovládáno mikroprocesorem a editace programové sekvence byla provedena v epEditoru 4.0. Jako pracovní jednotky jsou používány 96 hluboko jamkové mikrotitrační destičky (DPW). Pro přípravu vzorků byly použity dvě platformy: Thermorack pro  $24 \times 1,5 - 2$  ml mikrozkuvek, a mikrotitrační destička s jamkami o objemu 1000  $\mu\text{l}$ . Imunoseparace proběhla pomocí magnetické podložky (Promegacorp, USA), následně byly odseparované vzorky přepipetovány do nové DPW destičky. Takto připravené vzorky byly použity pro elektrochemické stanovení  $\text{Zn}^{2+}$ .

#### Mikroskopická analýza *S. aureus*

Bakterie byly přefiltrovány přes injekční filtry (0,45 a 0,2  $\mu\text{m}$ ) a promyty ve dvou krocích ethanolem (70%, 100%). Sledované vzorky byly následně pokoveny 5 nm částicemi zlata pomocí vakuové naprašovačky Emitech K950X (Quorum Technologies, Velká Británie). Pro pozorování a fotodokumentaci vzorků bakterie *Staphylococcus aureus* byla použita metoda odražených elektronů na přístroji FEG-SEM Tescan MIRA 3 XMU (Tescan, ČR). Tento model skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) je vybaven detektory a snímači obrazu s nízkou hladinou šumu při rychlém skenování. SEM byl vybaven detektorem SE typu Everhart-Thronley, vysokorychlostními scintilátory YAG na BSE detektoru, detektorem panchromatické katodové luminiscence (CL) a EDX spektrometrem. Vzorky byly potaženy 3 a 5 nm uhlíku, aby se zabránilo nabíjení vzorku. Byly testovány různé podmínky pro pořízení citlivého fotozáznamu s maximálním možným zvětšením tak, aby bylo dosaženo buď minimálního, nebo maximálního kontrastu bakteriálního materiálu oproti částicím, na něž jsou navázány. Záznam probíhal při urychlovacím napětím 5, 10, 15 a 25 kV a proudcích o 1–5 nA. Za všech výše zmíněných podmínek byly získány uspokojivé výsledky.

#### Elektrochemické stanovení zinečnatých iontů

Pro stanovení obsahu  $\text{Zn}^{2+}$  ve vzorcích jsme použili elektrochemický analyzátor (viz část Aparatura). Systém je dále tvořen pumpou, která dává elektrolyt do měrné cely (s přesností na jednotku  $\mu\text{l}$ ). Druhá pumpa dává roztok  $\text{Zn}^{2+}$  o koncentraci 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a je využita pro metody standardního přídatku. Dále systém obsahuje dvě peristaltické pumpy (Metrohm 772 Pump Unit, řízené pomocí Metrohm 731 Relay Box).

## Výsledky a diskuse

### Sledování bakteriálního růstu

Primárně byla sledována růstová charakteristika *S. aureus* spektrofotometricky při  $\lambda=600$  nm. Na počátku experimentu byla použita bakteriální kultura rostoucí 24 hodin, ze které byla do čistého média připravena startovací kultura o OD 0,1. Narostlá bakteriální kultura *S. au-*

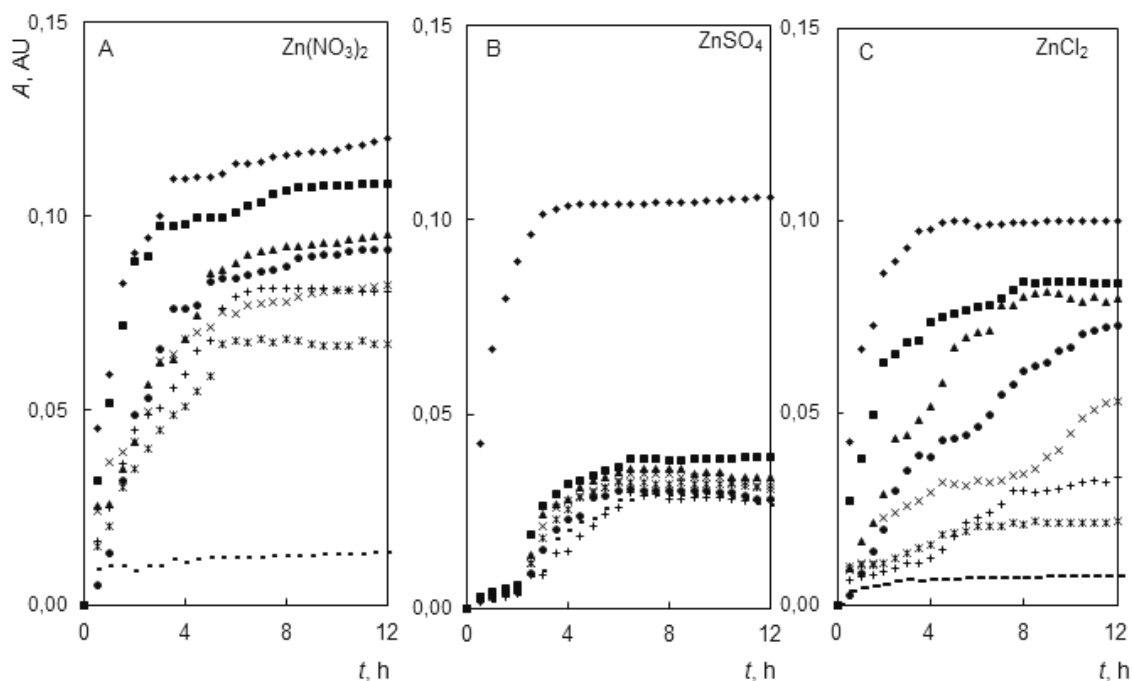
*reus* byla pipetována do osmi 100ml Erlenmeyerových baněk, ke kterým bylo přidáno 0; 1,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$   $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ). Roztok byl promíchán a pipetován do plastových kyvet o objemu 3 ml. Následně byla na spektrofotometru v 30minutových intervalech po dobu 12 h měřena absorbance při vlnové délce  $\lambda=600$  nm. Všechna měření byla provedena v pěti opakováních. V přítomnosti  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  a  $\text{ZnCl}_2$  buňky *S. aureus* rostly se zjevným rozdílem mezi přidávanými koncentracemi oproti buňkám kultivovaným v přítomnosti  $\text{ZnSO}_4$  (obr. 1A). U bakterií s aplikací  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  byl růst u jednotlivých variant vůči variantě kontrolní inhibován: u koncentrace 1,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 10 %; 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 21 %; 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 24 %; 25  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 32 %; 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 33 %; 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 44 %; 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 88 % (obr. 1A).

Po aplikaci  $\text{ZnSO}_4$  byl růst bakterií výrazně inhibován již u nízkých koncentrací. Růst u varianty  $\text{ZnSO}_4$  byl inhibován u koncentrace 1,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 63 %; 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 68 %; 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 70 %; 25  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 71 %; 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 74 %; 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 74 %; 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 74 % (obr. 1B). U bakterií s aplikací  $\text{ZnCl}_2$  byl růst u jednotlivých variant vůči variantě kontrolní inhibován: u koncentrace 1,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 16 %; 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 20 %; 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 27 %; 25  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 46 %; 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 33 %; 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 44 %; 250  $\mu\text{mol l}^{-1}$  o 88 % (obr. 1C). Ze získaných výsledků vyplývá, že v mikrobiální buňce jsou transportní mechanismy pro zinečnaté ionty rozdílné a jsou do značné míry ovlivněny aniontem<sup>2,9</sup>. Dále je možné konstatovat, že použitá bakteriální kultura je značně citlivá již k nízké aplikované koncentraci  $\text{ZnSO}_4$ .

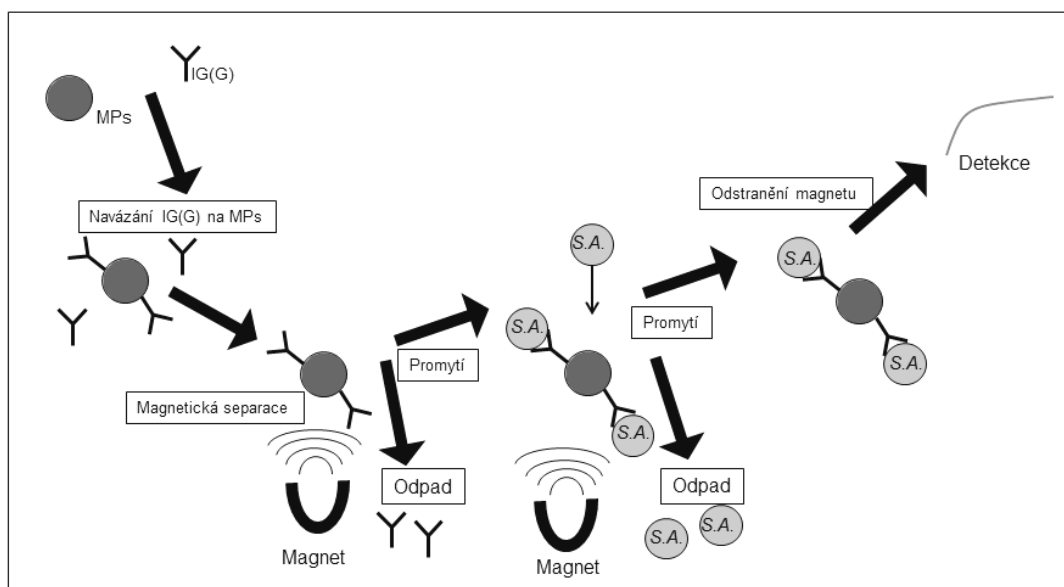
### Imunoseparace buněk *S. aureus*

Pro izolaci buněk *S. aureus* byla vyvinuta plně automatická izolace za využití robotického zařízení a celý imunoseparační postup je znázorněn na obr. 2. Pro účely imunoseparace byla zvolena kultivace s přidávkou 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$  v celkovém objemu 25 ml a byla navržena následující pracovní sekvence. Magnetizovatelné mikročástice s navázaným IgG (10  $\mu\text{l}$ ) byly pipetovány do 8 jamek DPW destičky. Poté byly MPs 2krát promyty (kultivační médium, 300  $\mu\text{l}$ ), následovalo pipetování různého množství (0, 1, 10, 25, 100, 200, 300 a 400  $\mu\text{l}$ ) bakteriální kultury *S. aureus* a doplnění na celkový objem 500  $\mu\text{l}$  kultivačním médiem. V jednotlivých variantách, díky naředění médiem bylo 0; 0,1; 0,8; 8,0; 17,0; 34,0; 50,0 a 67,0 $\cdot 10^3$  buněk. Následoval přenos destičky na termostátovanou pozici, kde probíhá inkubace vzorků 37 °C po dobu 60 min. Po dobu inkubace bylo aplikováno velmi pomale promíchání 1krát za 15 min, promyty 4krát (kultivační médium, 750  $\mu\text{l}$ ). Po skončení inkubace bylo provedeno odpipeptování supernatantu a přidání 500  $\mu\text{l}$  kultivačního média a bakterie byly kultivovány při 37 °C další 3 h.

Za účelem potvrzení efektivity imunoseparace *S. aureus* byly srovnávány růstové křivky bakterií navázaných na nanočástice a přenesených do nového kultivačního mé-



Obr. 1. Růstové křivky *S. aureus* po aplikaci Zn (II) ve formě (A)  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ , (B)  $\text{ZnSO}_4$ , a (C)  $\text{ZnCl}_2$  o koncentracích (0; 1,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250  $\mu\text{mol/l}$ ), celkový objem 3 ml. Měřeno po dobu 24 hodin v 30 minutových intervalech při 37 °C, výchozí  $\text{OD}_{600} = 0,1$ ,  $n = 5$ . Ostatní podrobnosti experimentu jsou uvedeny v části Chemikálie a Pracovní postupy;  $\blacklozenge$  0;  $\blacksquare$  1,5;  $\blacktriangle$  5;  $\bullet$  10;  $\times$  25;  $+$  50;  $*$  100;  $\dashrightarrow$  250  $\mu\text{M}$

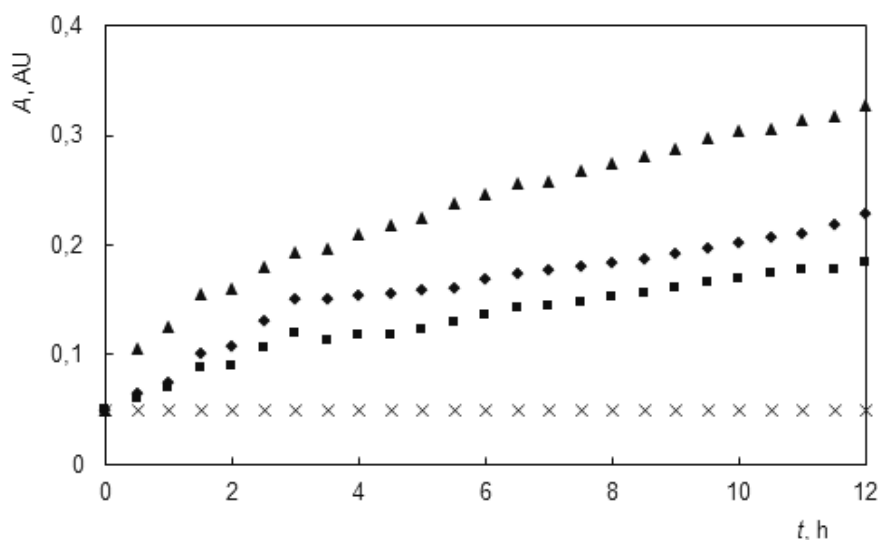


Obr. 2. Schéma imunomagnetické separace *S. aureus* pomocí magnetických nanočástic. Nejprve proběhlo navázání imunoglobulinů IgG na magnetické nanočástice (MPs). MPs byly následně uchyceny na magnet, roztok byl promyt a nenavázané IgG byly vyplaveny (odpad). V dalším kroku proběhlo přidání *S. aureus* (S.A.) k MPs a jejich následné navázání na tyto MPs. Po navázání proběhlo opět promytí, byly vyplaveny mikroorganismy, které se nenavázaly (odpad). V posledním kroku došlo k odstranění magnetu, vzorek byl takto připraven k dalším analýzám

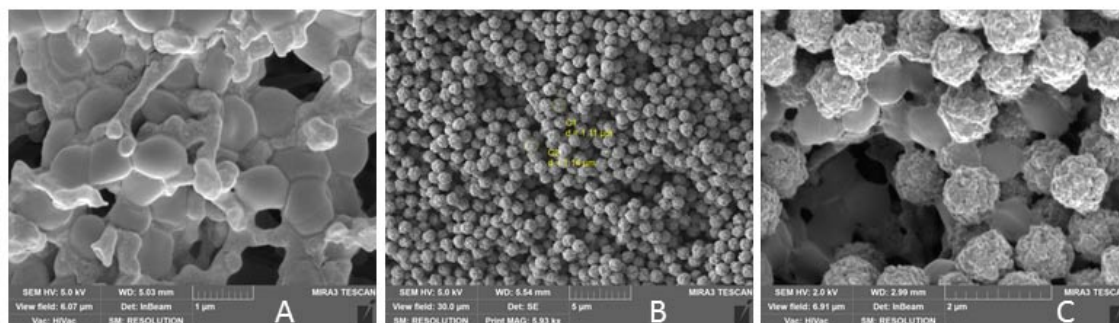
dia, bakterií zbylých v médiu po separaci, intaktní bakteriální kultury, jako kontrola bylo použito sterilní kultivační médium. Během 12hodinové kultivace byl pozorován růst bakterií u všech variant s výjimkou kontrolní. Ve srovnání s intaktní kulturou rostly bakterie izolované pomocí paramagnetických částic rychleji, bakteriální nárůst byl s výjimkou dvou nejnižších ředění ( $0,1 \cdot 10^3$  a  $0,8 \cdot 10^3$  buněk) pozorován i v médiu po separaci. Tento nárůst byl však výrazně pomalejší v porovnání s odseparovanými a intaktními bakteriemi (obr. 3). Pomocí této metody bylo možno izolovat méně jak 100 mikroorganismů *S. aureus* z objemu vzorku 500  $\mu\text{l}$ . Navázání mikroorganismů na MPs bylo potvrzeno také mikroskopicky (obr. 4), kdy byla sledována kultura před imunoseparací (obr. 4A), samotné MPs (obr. 4B) a kultura uchycená na MPs (obr. 4C).

### Elektrochemické stanovení zinku

Po imunoseparaci následovalo vyjmutí DPW destičky z prostoru pipetovacího robota a rozbití buněk *S. aureus* navázaných na MPs pomocí ultrazvukové jehly ( $t = 2$  min, 450 Hz). Poté byla destička vrácena do prostoru pipetovacího robota a získaný lyzát byl pipetován do čistých pozic v DPW destičce. Následoval odběr a elektrochemická analýza obsahu zinečnatých iontů v bakteriálních buňkách. Bilanční experiment porovnal obsah zinečnatých iontů v médiu, v bakteriálních buňkách před mineralizací (zinek volný) a po mineralizaci (zinek vázaný). Ve shodě s cit.<sup>10,11</sup> se potvrdilo, že elektrochemické techniky jsou pro sledování obsahu zinečnatých iontů u mikroorganismů velmi vhodné, je však třeba zvolit vhodný způsob extrakce.



Obr. 3. Růstové křivky *S. aureus*, *S. aureus* s magnetickými nanočásticemi, *S. aureus* po odseparování magnetických nanočástic a samotných magnetických nanočástic; ◆ *S. aureus*, ■ *S. aureus* po odseparování MPs, ▲ *S. aureus* + MPs, × MPs



Obr. 4. SEM fotografie (A) *S. aureus*, (B) magnetických nanočástic MPs a navázání (C) *S. aureus* na magnetické nanočástice. Foto-grafováno skenovacím elektronovým mikroskopem. Průměrná velikost MPs částic je 1,1  $\mu\text{m}$ , velikost *S. aureus* 0,9  $\mu\text{m}$

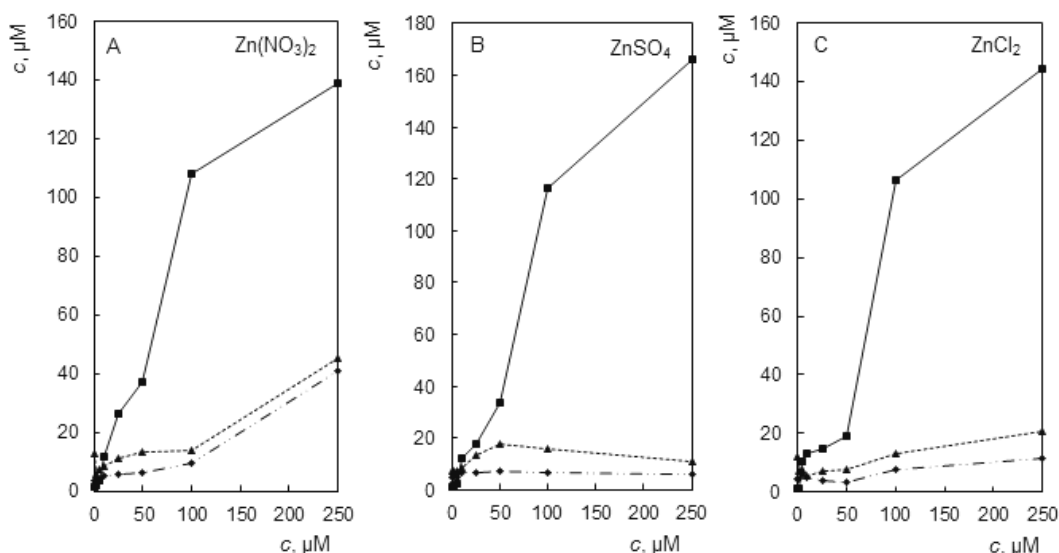
*Optimalizace stanovení zinku*

Pro vlastní analýzu zinečnatých iontů byla optimalizována detekční metoda. Nejdříve bylo optimalizováno množství aplikovaného vzorku (buněčného lyzátu nebo mineralizátu). Malé množství aplikovaného biologického vzorku (10–30  $\mu\text{l}$ ) poskytovalo dobře definované signály zinečnatých iontů ( $E_p = 1,04 \text{ V}$ ), ale relativní směrodatná odchylka (R.S.D.) přesahovala 10 %. ( $n = 6$ ). Pokud bylo aplikováno větší množství vzorku (50 až 100  $\mu\text{l}$ ), a tedy i větší množství analytu, zlepšila se opakovatelnost stanovení (R.S.D. 5 %). V experimentu bylo dále používáno 100  $\mu\text{l}$  vzorku společně s 900  $\mu\text{l}$  0,2 M acetátového pufru (pH 5). Mikrozskumavky s takto připraveným vzorkem byly umístěny do autosampleru. Měření bylo prováděno metodou diferenční pulsní voltametrie s následujícími parametry: odstranění kyslíku argonem 120 s; potenciál deposice  $-1,2 \text{ V}$ ; čas deposice 240 s; počáteční potenciál měření  $-1,2 \text{ V}$ ; konečný potenciál měření  $-0,5 \text{ V}$ ; pulsní amplituda 0,025 V; pulsní čas 0,04 s; napěťový krok 0,005035 V; čas napěťového kroku 0,4 s; celkový objem měřící cely 2 ml.

*Stanovení zinečnatých iontů u *S. aureus**

V této části experimentu jsme se zaměřili na studium akumulace tří chemicky rozdílných sloučenin obsahujících zinečnaté ionty ve sledované bakteriální kultuře. Byl sledován obsah zinku v supernatantu – médiu, kde se mikroorganismy kultivovaly a obsah zinku v mikroorganismu, kde jsme se zaměřili na sledování obsahu zinku volného a celkového. Zinek je obsažen v nízkomolekulárních sloučeninách, jako jsou thiolové sloučeniny nebo kofaktory enzymů, proteiny, ale také na DNA nebo polysacharidy<sup>14</sup>.

U variant s aplikací  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  byl průkazný příjem zaznamenán už při aplikaci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  (o 17 % vůči kontrolní variantě) a u mineralizovaných vzorků až u koncentrace  $25 \mu\text{mol l}^{-1}$  (o 26 % vůči kontrolní variantě) (obr. 5A). Příjem  $\text{Zn}^{2+}$  byl u nejvyšší varianty vůči kontrolní zvýšen o 411 %. U variant s aplikací  $\text{ZnSO}_4$  neprobíhal zvýšený příjem zinečnatých iontů do buněk až do koncentrace  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ , kdy byla zvýšená přijatá koncentrace zaznamenána až u aplikované dávky  $100 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $7,95 \mu\text{mol l}^{-1}$  u volného zinku,  $13,39 \mu\text{mol l}^{-1}$  u celkového) a  $250 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $11,53 \mu\text{mol l}^{-1}$  u volného zinku,  $20,72 \mu\text{mol l}^{-1}$  u celkového), jak je ukázáno na obr. 5B. Příjem celkového  $\text{Zn}^{2+}$  byl u nejvyšší varianty vůči kontrolní zvýšen o 162 %. U aplikace  $\text{ZnCl}_2$  se hodnoty obsahu volného zinku v mikroorganismu výrazně nezvyšovaly (obr. 5C). Po mineralizaci byl zaznamenán zvyšující se obsah celkového zinku od koncentrace  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  do koncentrace  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ . U skupin s aplikací  $100$  a  $250 \mu\text{mol l}^{-1}$  se obsah vázaného zinku snižoval (obr. 5C). Příjem celkových iontů Zn byl u nejvyšší varianty vůči kontrolní zvýšen o 48 %, a u varianty s aplikací  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ , kde byl příjem nejvyšší, zvýšen o 145 %. Zjistili jsme, že zinečnaté ionty byly nejlépe přijímány u buněčné kultury vystavené působení  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  (obr. 5). U nejvyšší aplikované dávky  $250 \mu\text{mol l}^{-1}$  byl obsah zinečnatých iontů u této varianty vyšší vůči variantě se  $\text{ZnCl}_2$  o 94 %, a u varianty s aplikací  $\text{ZnSO}_4$  byl obsah zvýšen o 423 %. Množství zinku v supernatantu se zvyšovalo úměrně s aplikovanou dávkou zinečnatých iontů u všech tří forem (obr. 5).



Obr. 5. Elektrochemické stanovení celkového a volného  $\text{Zn}^{2+}$  v lyzátech *S. aureus* kultivovaných v přítomnosti (A)  $\text{ZnCl}_2$ , (B)  $\text{ZnSO}_4$ , (C)  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  o koncentracích (0; 1,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250  $\mu\text{mol/l}$ ) po dobu 24 h při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; ■ supernatant, ◆ před mineralizací (volný zinek), ▲ po mineralizaci (celkový zinek)

## Závěr

Podářilo se nám vyvinout rychlou a automatizovanou metodu pro izolaci bakterií *S. aureus* pomocí paramagnetických částic v množství menším jako 100 mikroorganismů v 500 µl vzorku, přičemž jsme schopni odhalit mikrobiální kontaminaci v čase do 5 hodin. Dále byla optimalizována elektrochemická metoda pro stanovení zinečnatých iontů v mikroorganismu a v supernatantu. Výsledky stanovení zinku poukázaly na rozdílný příjem různých forem zinečnatých iontů mikroorganismem.

*Tato práce byla finančně podpořena grantem CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0123.*

## LITERATURA

- Dong X. Y., Zhao W. W., Xu J. J., Chen H. Y.: *Sci. China-Chem.* 54, 1304 (2011).
- Baldrich E., Munoz F. X.: *Analyst* 133, 1009 (2008).
- Khlyntseva A. E., Belova E. V., Zharnikova I. V., Tyumentseva I. S., Kulichenko A. N., Dyatlov I. A., Shemyakin I. G.: *Appl. Biochem. Microbiol.* 47, 700 (2011).
- Peacock S. J., de Silva I., Lowy F. D.: *Trends Microbiol.* 9, 605 (2001).
- Fitzgerald J. R., Sturdevant D. E., Mackie S. M., Gill S. R., Musser J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8821 (2001).
- Murray P. R. R. L., Tenover F. C., Tenover F. C.: *Medical Microbiology*. C. V. Mosby, Philadelphia 2005.
- Aarestrup F. M., Cavaco L., Hasman H.: *Vet. Microbiol.* 142, 455 (2010).
- Hynek D., Prasek J., Pikula J., Adam V., Hajkova P., Krejčová L., Trnkova L., Sochor J., Pohanka M., Hubalek J., Beklova M., Vrba R., Kizek R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 6, 5980 (2011).
- Conrady D. G., Brescia C. C., Horii K., Weiss A. A., Hassett D. J., Herr A. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19456 (2008).
- Majzlik P., Strasky A., Adam V., Nemeč M., Trnkova L., Zehnalek J., Hubalek J., Provaznik I., Kizek R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 6, 2171 (2011).
- Sochor J., Majzlik P., Salas P., Adam V., Trnkova L., Hubalek J., Kizek R.: *Lis. Cukrov. Repar.* 126, 414 (2010).
- Nies D. H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 730 (1999).
- Hantke K.: *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 196 (2005).
- Smith J. C., Doft F. S., McBean L. D., McDaniel E. G., Halsted J. A.: *J. Nutr.* 102, 711 (1972).
- Nies D. H.: *Fems Microbiol. Rev.* 27, 313 (2003).
- Hantke K.: *Biometals* 14, 239 (2001).
- Kovacova S., Sturdik E.: *Biologia* 57, 651 (2002).
- Ramamoorthy S., Kushner D. J.: *Microb. Ecol.* 2, 162 (1975).
- Ziebandt A. K., Kusch H., Degner M., Jaglitz S., Sibalbald M., Arends J. P., Chlebowicz M. A., Albrecht D., Pantucek R., Doskar J., Ziebuhr W., Broker B. M., Hecker M., van Diji J. M., Engelmann S.: *Proteomics* 10, 1634 (2010).
- Sochor J., Zitka O., Hynek D., Jilkova E., Krejčová L., Trnkova L., Adam V., Hubalek J., Kynický J., Vrba R., Kizek R.: *Sensors* 11, 10638 (2011).
- Enshaei M., Khanafari A., Sepahey A. A.: *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* 7, 287 (2010).
- Robinson N. J., Whitehall S. K., Cavet J. S.: *Adv. Microb. Physiol.* 44, 183 (2001).
- Silver S.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 1 (1998).
- Shin J. H., Jung H. J., An Y. J., Cho Y. B., Cha S. S., Roe J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5045 (2011).
- Kallifidas D., Pascoe B., Owen G. A., Strain-Damerell C. M., Hong H. J., Paget M. S. B.: *J. Bacteriol.* 192, 608 (2010).
- Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G. L., Thornton J. M.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 1205 (2008).

**E. Jílková<sup>a</sup>, S. Křížková<sup>a,b</sup>, D. Hynek<sup>a,b</sup>, L. Krejčová<sup>a</sup>, J. Sochor<sup>a,b</sup>, J. Kynický<sup>c</sup>, V. Adam<sup>a,b</sup>, and R. Kizek<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University, Brno, <sup>b</sup> Central European Institute of Technology, University of Technology, Brno, <sup>c</sup> Department of Geology and Pedology, Mendel University, Brno): **Fully Automated Isolation of Proteins Binding Zn from *Staphylococcus aureus* Cells Using Paramagnetic Particles**

Immunomagnetic separation of pathogenic microorganisms opens new prospects of rapid and precise diagnosis. We focused our attention to separation of *Staphylococcus aureus* using paramagnetic particles as well as differential pulse voltammetry of Zn<sup>2+</sup> in the Zn-treated bacteria.