

Detekcja mikroorganizmów – biosensory

Zagrożenia mikrobiologiczne to jeden z problemów z jakimi spotyka się współczesny przemysł spożywczy. Głównymi zagrożeniami spotykanymi w przemyśle spożywczym są zakażenia mikrobiologiczne, które są przyczyną zatruc pokarmowych. Kontrola jakości mikrobiologicznej produktów żywnościowych prowadzona jest za pomocą technik mikrobiologii klasycznej (posiewy, metoda fermentacyjno-probówkowa), które są czasochłonne i wymagają wykwalifikowanego personelu. Alternatywnym rozwiązaniem dla powszechnie stosowanych procedur są techniki bazujące na specyficznych czujnikach – biosensorach.

Biosensory – grupa czujników (kolorymetrycznych, elektrycznych), w których elementem odpowiedzialnym za specyficzną detekcję jest układ biologiczny – enzym, przeciwciało, kwas nukleinowy. Główną zaletą tego typu rozwiązań jest wysoka specyficzność, niski koszt i łatwość analiz.

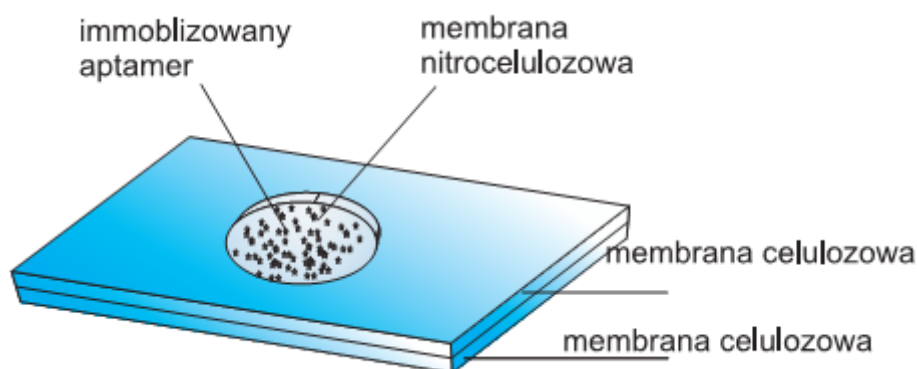
Aptamery – grupa receptorów molekularnych (oligopeptyd lub jednoniciowy kwas nukleinowy) specyficznie oddziałujących z określonym targetem (komórka, białko, cukier a nawet jon). Aptamery stosowane w diagnostyce otrzymywane są za pomocą różnych metod selekcji z syntetycznie otrzymywanych bibliotek oligonukleotydów. Do głównych zalet aptamerów należą:

- niski koszt selekcji w porównaniu do produkcji przeciwciał,
- specyficzność porównywalna a niekiedy wyższa niż przeciwciał,
- procedura selekcji receptora nie wymagająca eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt.

Sondy hybrydyzacyjne jednoniciowe cząsteczki oligonukleotydów specyficznie oddziałujące z określonym fragmentem genu za pomocą typowych oddziaływań typu Wathson-Crick

Zadanie 1 **Test diagnostyczny z aptamerem.**

Membranowy test diagnostyczny to sensor kolorymetryczny, których podstawą zasada działania jest chromatografia. Membranowy test diagnostyczny diagnostyczny to układ kanapkowy zbudowany z trzech membran.



Ryc. 1. Schemat kasety diagnostycznej

Membrana nitrocelulozowa z immobilizowanym aptamerem to membrana służąca do specyficznego wychwytu określonego analitu (komórek bakteryjnych) z analizowanej próbki.

Membrany celulozowe - dwie membrany tworzące wraz z membraną nitrocelulozową strukturę kanapki. Membrany te pełnią funkcje buforową dla płynów (próbka, pigment) aplikowanych na powierzchnie próbki.

Pigment – barwny indykator pełniący funkcję wskaźnika obecności danego analitu, w przygotowywanym teście diagnostycznym funkcję pigmentu spełniają nanocząstki złota funkcjonalizowane aptamerem.

Wykonanie ćwiczenia

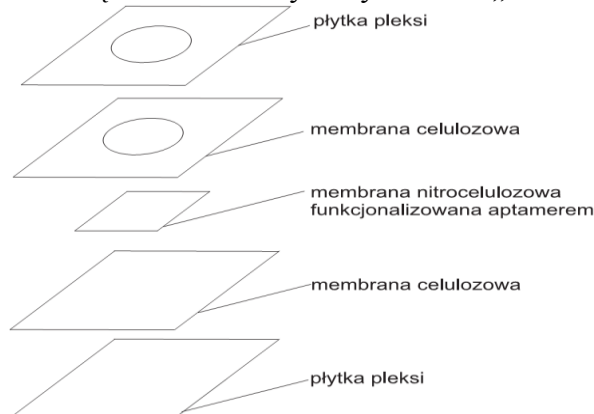
1) *Przygotowanie membrany nitrocelulozowej funkcjonalizowanej aptamerem.*

W tym celu należy zmieszać 3 ul awidyny, 10 ul biotynylowanego aptametu.

Otrzymaną mieszaninę inkubować przez 20 minut w celu utworzenia się kompleksów biotyna-aptamer. (Proszę zwrócić uwagę na zmiany barwy roztworów wyjściowych oraz roztworu powstałego po ich zmieszaniu, o czym może świadczyć zaobserwowane zjawisko). Po inkubacji dodać do otrzymanej mieszaniny 2 ul etanolu oraz 15 ul wody dejonizowanej. 1,5 ul otrzymanej mieszaniny dodać na membranę nitrocelulozową (o wymiarach 1,5 cm x 1,5 cm). Po wyschnięciu membranę zanurzyć w 2% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze TBS i inkubować przez 20-60 minut. Po inkubacji membranę przemyć 3 krotnie w buforze TBS. Przemyta membranę wysuszyć.

2) *Przygotowanie kasetki diagnostycznej.*

W celu przygotowania kasetki diagnostycznej należy ułożyć w strukturę kanapki membranę celulozową, membranę nitrocelulozową, membranę celulozową po czym zamknąć otrzymany „stos” w płytkach plexi.



3) *Przygotowanie pigmentu.*

Synteza nanocząstek złota.

Do kolby dodać 93 ml wody dejonizowanej oraz 2 ml roztworu chlorku złota o stężeniu 5 mg/ml. Mieszaninę ogrzewać do wrzenia po czym dodać 5 ml 1% roztworu cytrynianu sodowego. Mieszaninę ogrzewać przez 5 minut (lub momentu uzyskania barwy czerwonego wina)

Funkcjonalizacja nanocząstek złota aptamerem.

10 ul modyfikowanego tiolem aptametu zmieszać z 100 ul 0.1 M roztworu karboksytetrylofisyfyny. Mieszaninę inkubować przez 20 minut. Do mieszaniny dodać 1,5 ml nanocząstek złota. Otrzymaną mieszaninę inkubować przez 2 h.

Po inkubacji otrzymaną mieszaninę odwirować 30 minut 14400 g. Usunąć supernatant a osad zawiesić w 200 ul wody dejonizowanej z 1% dodatkiem tween 20. Po czym ponownie odwirować jak poprzednio i usunąć supernatant.

Osad zawiesić:

Grupa I w 50 ul buforu (wodny roztwór 5% BSA, 10% sacharoza, 1% tween, 01% triton x)

Grupa II w 60 ul buforu (wodny roztwór 5% BSA, 10% sacharoza, 1% tween, 01% triton x)

Grupa III w 70 ul buforu (wodny roztwór 5% BSA, 10% sacharoza, 1% tween, 01% triton x)

Grupa IV w 80 ul buforu (wodny roztwór 5% BSA, 10% sacharoza, 1% tween, 01% triton x)

Grupa V w 90 ul buforu (wodny roztwór 5% BSA, 10% sacharoza, 1% tween, 01% triton x)

4) Procedura analityczna

Na powierzchnię testu diagnostycznego dodać 30 ul badanej próbki i odczekać do momentu jej całkowitego wnikięcia w powierzchnię membrany nitrocelulozowej. Następnie na powierzchnię testu dodać 15 ul pigmentu. Po jego wnikięciu powierzchnię testu przemyć za pomocą 30 ul buforu (wodny roztwór 5% BSA, 10% sacharoza, 1% tween, 01% triton x) Zaobserwować wyniki wyjaśnić zachodzące zjawiska na powierzchni testu.

Zadanie 2 Membranowy test diagnostyczny z sondami hybrydizacyjnymi.

Membranowy test diagnostyczny z sondami hybrydizacyjnymi to rozwiązanie alternatywne dla układu z aptamerem. Podstawą działania tego testu jest kasetka diagnostyczna z immobilizowaną na powierzchni awidyną (białko o wysokim powinowactwie względem biotyny), oraz mix diagnostyczny złożony z:

- nanocząstek złota funkcjonalizowanych pierwszą sondą hybrydizacyjną,
- sondy hybrydizacyjnej znakowanej biotyną.

Kasetka diagnostyczna funkcjonalizowana awidyną pełni funkcję podłoża powinowactwa wychwytyjącego specyficznie biotynylowaną sondę, która może tworzyć strukturę hybrydową ze znakowaną złotem sondą.

W ramach poniższego ćwiczenia opracowany zostanie test do identyfikacji bakterii z *Pseudomonas* opornych na karbapenemy w oparciu o gen *BLA_{VIMA}*, którego obecność w genomie bakteryjnym czy też w plazmidach warunkuje mechanizm oporności tego szczepu na tego typu antybiotyki.

Wykonanie ćwiczenia

1) *Przygotowanie membrany nitrocelulozowej funkcjonalizowanej aptamerem.*

W tym celu należy zmieszać 3 ul awidyny, z 24 ul wody dejonizowanej oraz 3 ul etanolu) 1,5 ul otrzymanej mieszaniny dodać na membranę nitrocelulozową (o wymiarach 1,5 cm x 1,5 cm) . Po wyschnięciu membranę zanurzyć w 5% roztworze BSA w wodzie i inkubować przez 20-60 minut. Po inkubacji membranę przemyć 3 krotnie w wodą. Przemyta membranę wysuszyć.

2) *Przygotowanie kasety diagnostycznej.*

W celu przygotowania kasety diagnostycznej należy ułożyć w strukturę kanapki membranę celulozową, membranę nitrocelulozową, membranę celulozową po czym zamknąć otrzymany „stos” w płytkach plexi.

3) *Przygotowanie pigmentu.*

Synteza nanocząstek złota.

Do kolby dodać 93 ml wody dejonizowanej oraz 2 ml roztworu chlorku złota o stężeniu 5 mg/ml. Mieszaninę ogrzewać do wrzenia po czym dodać 5 ml 1% roztworu cytrynianu sodowego. Mieszaninę ogrzewać przez 5 minut (lub momentu uzyskania barwy czerwonego wina)

Funkcjonalizacja nanocząstek złota aptamerem.

5 ul modyfikowanego tiolem aptameru zmieszać z 100 ul 0.1 M roztworu karboksytetrylofisyfyny. Mieszaninę inkubować przez 20 minut. Do mieszaniny dodać 1,5 ml nanocząstek złota. Otrzymaną mieszaninę inkubować przez 2 h.

Po inkubacji otrzymaną mieszaninę odwirować 30 minut 14400 g. Usunąć supernatant a osad zawiesić w 200 ul wody dejonizowanej z 1% dodatkiem tween 20. Po czym ponownie odwirować jak poprzednio i usunąć supernatant.

Osad zawiesić:

Grupa I i II w 50 ul buforu (wodny roztwór 1% Tween, 01% triton x)

Grupa III i IV w 75 ul buforu (wodny roztwór 1% Tween, 01% triton x)

Grupa V w 100 ul buforu (wodny roztwór 1% Tween, 01% triton x)

Do otrzymanej mieszaniny dodać 1,5 ul sondy biotynylowanej

4) Procedura analityczna

Do eppendorfki dodać 20 ul próbki bakteryjnej oraz 20 ul pigmentu mieszaninę inkubować w temperaturze 95° C. Po czym 15 ul otrzymanej mieszaniny nanieść na powierzchnię kasety diagnostycznej, powierzchnię kasety przemyć wodą dejonizowaną. Zanotować obserwacje.