

# Použití elektromigračních technik jako užitečného nástroje pro identifikaci mikroorganismů

C9320 Metody biochemického výzkumu - laboratorní cvičení

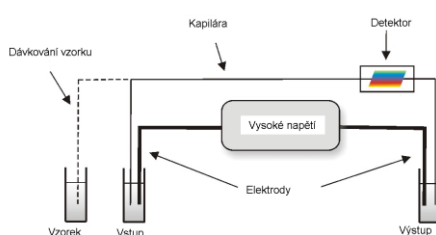
Pro separaci biočástic, včetně mikroorganismů, se jeví v posledních několika letech slibné použití kapilárních elektromigračních technik. Tato úloha přináší praktické seznámení s kapilární a gelovou isoelektrickou fokusací a kapilární zónovou elektrophorezou se zaměřením na rychlou separaci a identifikaci mikroorganismů (MO). Výsledky z elektromigračních technik porovnejte z výsledky běžně používané metody plynové chromatografie, viz příloha.

## Princip úlohy

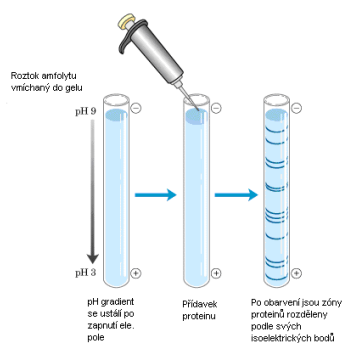
### Isoelektrická fokusace

Isoelektrická fokusace (IEF) umožňuje dělení amfoterních látek (bílkovin a peptidů), ale i MO podle jejich isoelektrických bodů, tj. podle distribuce kladných a záporných nábojů v jejich molekulách. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je tvořen působením elektrického pole na směsi amfolytů, jež tvoří nosný elektrolyt této metody. Dělené látky (MO) v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. Kromě klasických proteinových standardů, jsou používány i barevné nízkomolekulární pI markery. Podle způsobu provedení lze isoelektrickou fokusaci rozdělit na:

#### 1) kapilární isoelektrická fokusace – diet



#### 2) isoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu - IEF



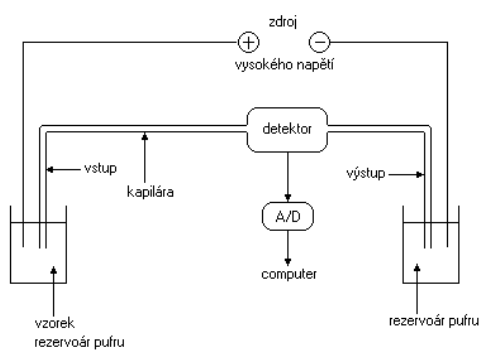
## Kapilární elektroforéza

K separaci v kapilární elektroforéze (CE) dochází kombinací vlivu elektroforetické migrace a elektroosmotického toku. Elektroforetickou migrací rozumíme pohyb nabitých molekul v elektrickém poli:

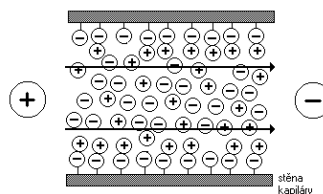
$$v = \mu E,$$

kde  $\mu$  je elektroforetická mobilita dané látky a  $E$  je intenzita elektrického pole.

Elektroosmotický tok je tok elektrolytu způsobený nábojem vnitřní stěny kapiláry a aplikovaným potenciálem. Ve styku s elektrolytem mají silanové skupiny podél vnitřní stěny kapiláry tendenci ionizovat a vytvářet tak na rozhraní stěny kapiláry a elektrolytu elektrickou dvojrstvu. Když se do systému zavede stejnosměrný proud, kationty v elektrolytu v blízkosti stěny kapiláry se pohybují směrem ke katodě a strhávají elektrolyt s sebou. Tak se vytváří elektroosmotický tok směrem ke katodě. Kladně nabitě molekuly dosáhnou katody jako první, neboť elektroforetická migrace i elektroosmotický tok mají stejný směr, jako další dorazí k detektoru neutrální molekuly a nakonec jsou separovány molekuly záporně nabitě. Čas, který potřebují molekuly k pohybu kapilárou, závisí na řadě faktorů : na délce kapiláry, na elektroforetické pohyblivosti jednotlivých molekul, na použitém elektrolytu a na použitém napětí.



Kapilární elektroforéza



elektroosmotický tok

## **Pseudomonas syringae pathovars (P. s. pv.)**

*Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) jsou gram-negativní bakterie, jedním z neprostudovanějších rostlinných patogenů, který může infikovat celou řadu druhů rostlin a existuje ve více než 50 různých pathovarech. Mnoho z těchto pathovarů byly kdysi považovány za jednotlivé druhy rodu *Pseudomonas*, ale pomocí technik molekulární biologie, jako je DNA hybridizace, se ukázalo, že tyto jednotlivé druhy jsou ve skutečnosti součástí druhu *P. syringae*. Každý patogení kmen je specifický pro konkrétní druh rostliny, kterou napadá. Nicméně je třeba poznamenat, že ne všechny kmene *Pseudomonas syringae* jsou nezbytně patogenní. Nepatogenní kmene byly zkoumány jako potenciální zdroj očkování pro rostliny, které slouží jako forma antimykotické léčby.

V naší úloze jsou zahrnuty sbírkové kmene *P. s. pv. syringae, persicae, tomato, morsprunorum, mori a lachrymans*.

## Praktická část

### Stanovení *Pseudomonas syringae* pomocí kapilární isoelektrické fokusace.

#### Chemikálie:

deionizovaná voda  
20 mM roztok NaOH  
0,1 M roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
ampholytes, Biolyte, pH 3 – 10  
pI markery, pI = 3,3, 3,7, 3,9, 4,0, 4,3, 4,7.  
non-ionogenic tenside Brij 35  
ethanol

#### Postup:

Nakultivované *Pseudomonas syringae* na Petriho miskách jsou skladovány v lednici. Pro cIEF odeberte jednu kličku bakterií z Petriho misky a setřete je do ependorfky s 100 µl H<sub>2</sub>O. To samé proved'ete se všemi vzorky 1-12, viz příloha.

Do vialek připravte katolyt 20 mM roztoku NaOH a anolyt 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Do každého přidejte 1% (v / v) ethanolu. Před každou injekcí je kapilára promyta směsí aceton / etanol (1:10) po dobu 1 min, a poté katolytem po dobu 2 minut.

Segmentové dávkování: vzorek je vstříkván do kapiláry ve třech částech - 1) jednoduché amfolytické elektrolyty HEPES a ASP (2:1) rozpuštěné v katolytu. 2) vzorek směsi bakterií. 3) vodný roztoku pI markerů (25 µg.ml<sup>-1</sup> každého) a směs syntetických nosných amfolytů: 2,5% (w/v) Biolyte pH 3 – 10, 5% (w/v) Ampholyte pH 3 – 4,5 a 10% (w/v) Ampholyte pH 2 – 4. Amfolytické elektrolyty v katolytu dávkujte 10 s, vzorek s bakteriemi 5 s, a segment nosných amfolytů a pI markerů 10 s. Použijte stejný postup pro každý P. s. pv. *syringae*, *persicae*, *tomato*, *morsprunorum*, *mori* a *lachrymans* a nakonec směsi všech bakterií.

#### Vyhodnocení:

Určete isoelektrické body jednotlivých P. s. pv. a porovnejte výsledky s výsledky z plynové chromatografie uvedené v tabulce, viz příloha.

## **Stanovení *Pseudomonas syringae* pomocí kapilární elektroforézy.**

### **Chemikálie:**

deionizovaná voda  
tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)  
non-ionic tenside Brij 35  
polyethylenglykol PEG 4000  
etanol

### **Postup:**

Nakultivované *Pseudomonas syringae* na Petriho miskách jsou skladovány v lednici. Pro CZE odeberte jednu kličku bakterií z Petriho misky a setřete je do ependorfky s 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. To samé proveďte se všemi vzorky 1-12, viz příloha.

Připravte do dvou vialek základní elektrolyt 1.5  $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> Taurine-Tris (pH 8.4), v elektrolytu jsou dále zastoupeny 0.1% w/v PEG 4000 a 1% v/v EtOH. Před každou injekcí je kapilára promyta směsí aceton / etanol (1:10) po dobu jedné minuty, a poté elektrolytem po dobu 2 minut.

Vzorky *P. s. pv.* jsou dávkovány po dobu 5 s. Použijte stejný postup pro každý *P. s. pv. syringae, persicae, tomato, morsprunorum, mori a lachrymans* a nakonec směsí všech bakterií.

### **Vyhodnocení:**

Určete jednotlivé *P. s. pv.* a porovnejte výsledky s výsledky isoelektrické fokusace a zhodnoťte, která z uvedených metod je vhodnější a pro stanovení *P. s. pv.*

## **Stanovení *Pseudomonas syringe* pomocí gelové isoelektrické fokusace.**

### **Chemikálie:**

deionizovaná voda

metanol

kyselina octová

kyselina trichloroctová

glycerol

akrylamid

N,N'-methylene bis acrylamide (Bis)

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

amonium persulfat - Merck (Darmstadt, Germany)

ampholytes, Biolyte, pH 3 – 10

non-ionogenic tenside Brij 35

pI markery, pI = 2.0, 2.7, 3.0, 3.3, 3.7, 3.9, 4.0, 4.3, 4.7, 5.3, 6.3

coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)

### **Postup:**

Do ependorfy naberte kličkou z Petryho misky 50 mg bakterií *P. syringe* a setřete je do 100 µl roztoku 8% BRIJ 35 a 2% ethanolu. To samé proved'te se všemi vzorky. Roztok s bakterií nechte protřepat na třepače při 30°C po dobu 30 min. Nakonec vzorky centrifugujte 15 min při 6000 rpm, supernatant přepipetujte do nové ependorfy (0,1 ml) a prozatím umístěte na led.

Velikost gelu je 125 × 65 × 0,4 mm. Po polymeraci je gel zabalený na podložce v plastové fólii a uložen přes noc při teplotě 4 °C. Sejměte sklíčko s gelem z podložky a položte jej skleněnou částí na stůl. Na spodní část (10 mm od okraje) přiložte vzorkovací šablonu. Do první pozice šablony nadávkujte pI markery, dále pak do dalších pozic nadávkujte jednotlivé vzorky. Po 10 min sundejte šablonu z gelu a opatrně přiložte gel se sklem gelovou částí na elektrody do 111 Mini IEF Cell. Pod dohledem vyučujícího zapněte elektrický zdroj nastavený na hodnoty napětí 400V a výkon 0,6 W. Po dokončení analýzy IEF (cca 2 hod) ponořte gel do roztoku kyseliny trichloroctové (12,5g na 100ml) a methanolu (30ml na 100ml roztoku), po 30 min přendejte do CBB na dobu 2 hodin. Nakonec gel odbarvěte roztokem 50% methanolu a 10% kyseliny octové. Gely skladujte v 5% kyselině octové.

### **Vyhodnocení:**

Porovnejte jednotlivé P. s. pv. mezi sebou a zhodnoťte, zda se dají dobře touto metodou od sebe odlišit.

Číslo	Kmen	Původ	Procentuelní určení plynovou chromatografií	PI
1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CCM 2870	<i>P. syringae</i> 71,7%	
2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Isolate PPBOL 1048	Not identified	
3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	LMG 5184	<i>P. viridiflava</i> 93% nebo <i>P. syringae</i> 90,3%	
4	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	LMG 5078	<i>P. syringae</i> 35,9%	
5	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	IVIA 1733.3	<i>P. tomato</i> 74,7%	
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CCM 7019	<i>P. syringae</i> 93,2%	
7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunoram</i>	CCM 2859	<i>P. s. mori</i> 94,6%	
8	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunoram</i>	CCM 2860	<i>P. s. mori</i> 95,7%	
9	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	IVIA 1003.1a	<i>P. s. syringae</i> 74,6%	
10	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	CFBP 1642	<i>P. s. syringae</i> 88,7%	
11	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	CFBP 6465	<i>P. s. syringae</i> 75%	
12	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	CCM 2857	Not identified	

