

VÝVOJ ČIPU PRO SEPARACI BIOLOGICKÝCH AGENS POMOCÍ IZOELEKTRICKÉ FOKUSACE V ROZBÍHAVÉM TOKU

DEVELOPMENT OF DIVERGENT-FLOW ISOELECTRIC FOCUSING CHIP FOR SEPARATION OF BIOLOGICAL AGENTS

Filip Duša^{a*}, Jiří Šalplachta^a, Marie Horká^a, Kamila Lunerová^b, Kateřina Rosenbergová^b, Oldřich Kubíček^b

^a Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, 602 00 Brno, Česká republika

^b Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i., tř. Jaroše 5, Brno 602 00, ČR

*Korespondující autor. e-mail: dusa@iach.cz, tel.: +420 532 290 211

Abstrakt

Izoelektrická fokusace (IEF) je účinnou metodou schopnou separovat jednotlivé druhy bakterií. IEF v rozbíhavém toku (DF-IEF) umožňuje kontinuálně separovat větší objem vzorku a separované analyty jímát do frakcí k pozdější analýze. Těchto vlastností bylo využito při vývoji DF-IEF čipu pro separaci biologických agens (B-agens) inaktivovaných parami H₂O₂. Čip byl navržen pro separaci ve vertikální poloze, která zabránila sedimentaci běžně se vyskytující u bakteriálních vzorků a znemožňující účinnou separaci. Po optimalizaci separační metody za využití barevných markerů izoelektrického bodu byla provedena separace čtyř druhů B-agens. Všechny získané frakce byly dále analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s matricí asistovanou laserovou desorpcí/ionizací (MALDI-MS). Hmotnostní spektra prokázala účinnost vyvinutého DF-IEF čipu pro separaci inaktivovaných b-agens.

Klíčová slova: izoelektrická fokusace, B-agens, čip

Abstract

Isoelectric focusing (IEF) is an efficient method for separation of different bacterium species. Divergent flow format of IEF (DF-IEF) enables continual separation of large volumes of samples and fractionation of the separated analytes for later analysis. The mentioned properties enabled development of DF-IEF chip for separation of H₂O₂ inactivated biological agents (B-agents). The chip was designed to perform separation in vertical alignment which solved issues connected with sedimentation of bacterial cells. The separation method was optimized using colored markers of isoelectric point and four different b-agents were separated using the DF-IEF chip. The obtained fractions were subsequently analyzed with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). The mass spectra proved that the developed DF-IEF chip is an effective tool for separation of inactivated B-agents.

Key words: isoelectric focusing, B-agents, chip

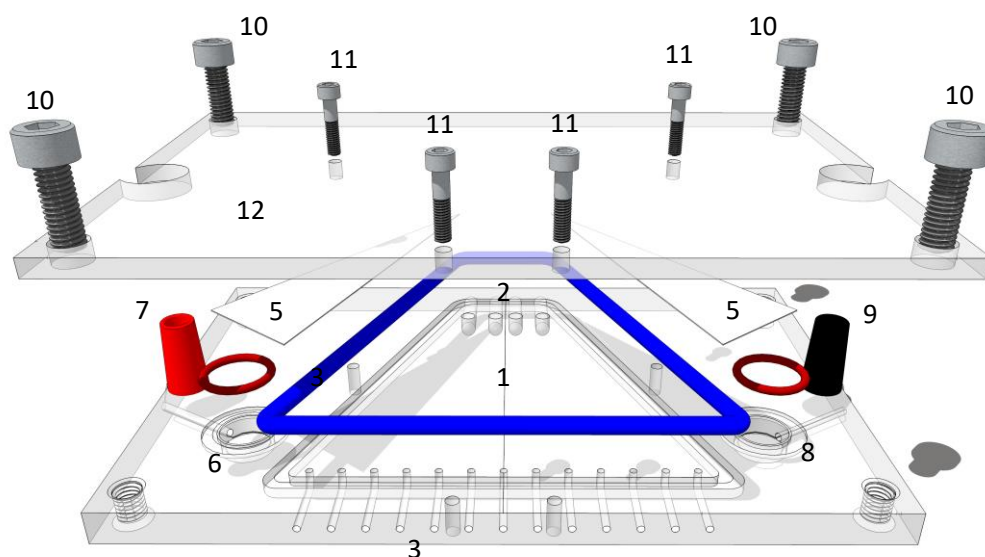
1. DF-IEF

IEF umožňuje separovat amfoterní molekuly nebo struktury (např. organely, liposomy, nanočástice nebo buňky) podle jejich vlastního izoelektrického bodu (pI). K takové separaci je nutné vytvořit pH gradient pokrývající oblast pI separovaných analytů. V případě využití nosných amfolytů se pH gradient formuje autonomně v separačním prostoru po aplikaci elektrického pole. Formáty IEF zahrnují kapilární, či gelovou IEF případně IEF frakcionace založené na komůrkových systémech. Nicméně tyto systémy nejsou schopny rozdělit vzorky obsahující sedimentující částice (např. částice $>1 \mu m$, typicky buňky). Vliv sedimentace může být potlačen v případě využití vertikálně orientované IEF v rozbíhavém toku, kdy separace probíhá ve stejném směru jako sedimentace v uzavřeném plexisklovém čipu (viz obr. 1).

1.1 Čip pro DF-IEF

Čip se skládá ze dvou plexisklových plátů, těsnění a membrán pro vodivé spojení s externím zdrojem elektrického proudu. Podrobně je celé zařízení popsáno na obr. 1 a v nedávno vydaném článku [1]. Po sestavení je celé zařízení nejprve zaplněno vodou pomocí peristaltické pumpy v pozici, kdy výstupní kanálky směřují vzhůru. Následuje otočení čipu o 180 stupňů a peristaltické čerpadlo kontinuálně dávákuje tři roztoky: analyt/nosné amfolyty/katolyt. Po 10 minutách je aplikováno elektrické pole pomocí elektroforetického zdroje (lineární zvyšování napětí z 0 na 500 V za 1 hod). Během 60 minut se vytvoří pH gradient který následně umožňuje kontinuální separaci analytů. Kvalita a stabilita pH gradientu byla vizuálně kontrolována v průběhu separace pomocí barevných linií interních pI standardů tzv. pI markerů.

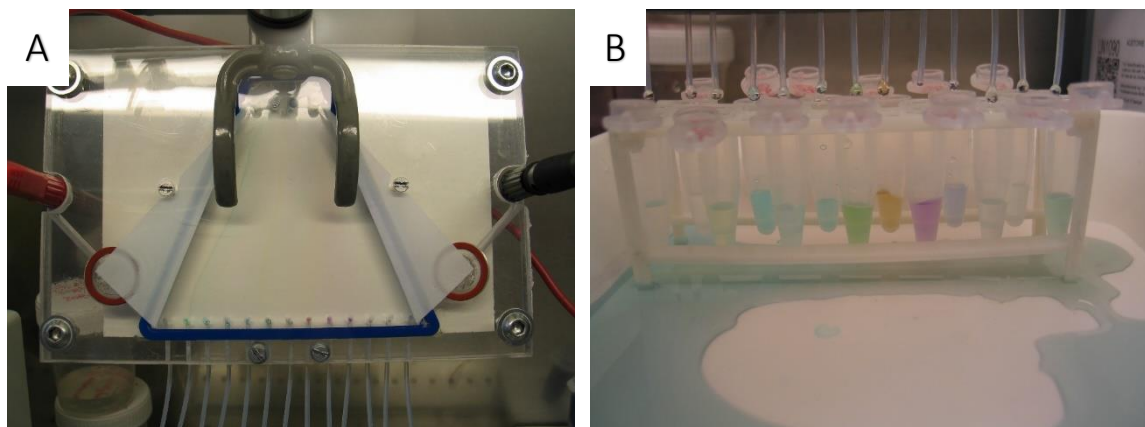
Obrázek 1: 3D model DF-IEF čipu: 1 – separační prostor definovaný horním (5 mm) a spodním plátem (8 mm) plexiskla a silikonovým těsněním; 2 – vstupní otvory (zleva analyt, rezerva, vzorek/nosné amfolyty, katolyt); 3 – silikonový o-kroužek (100/3.8 mm); 4 – třináct výstupních kanálků; 5 – hydrofilní nylonové membrány; 6 – komůrka na analyt s o-kroužkem; 7 – konektor anody; 8 – komůrka na katolyt s o-kroužkem; 9 – konektor katody; 10 – šrouby M6; 11 – šrouby M3; 12 – horní deska plexiskla



Separace biologických agens

Biologické agens (*Bacillus Anthracis* - vakcinační kmen „Antraxen“ SU025, *Yersinia pestis* 570, *Brucella abortus* 5660T, *Burgholderia mallei* 12938T) byly po kultivaci inaktivovány pomocí peroxidu vodíku dle [2]. B-agens byly poté jednotlivě dávkovány do DF-IEF čipu o koncentracích 10^7 až 10^9 CFU a separované frakce byly jímány do mikrozkrumavek (viz obr. 2).

Obrázek 2: A – sestavený čip se stabilním pH gradientem během separace; B – najímané frakce po IEF separaci (pl markery: modrý pl 2,4; žlutý pl 7,24; fialový pl 10,1)



1.2 Identifikace biologických agens

Najímané frakce byly dále podrobeny analýze pomocí hmotnostní spektrometrie s matricí asistovanou laserovou desorpčí/ionizací (MALDI-MS). Identifikace pomocí MALDI-MS je velmi závislá na čistotě vzorku, kde přítomnost matrice a solí může významně snížit účinnost identifikace pomocí hmotnostních spekter. U všech b-agens bylo potvrzeno po IEF separaci zlepšení identifikačního profilu spekter spojené s koncentračním efektem, odstraněním matrice vzorku (suspenze bakteriálních buněk v glycerolu) a odsolením vzorku. Ze třinácti frakcí byly jednotlivé b-agens fokusovány v 3 (*Y. pestis* a *B. abortis*) nebo 5 frakcích (*B. anthracis* a *B. mallei*) přičemž jedna až tři frakce byly identifikovány jako hlavní - poskytující nejlepší MS profil. Výsledky potvrdili, že vyvinutá separační metoda je vhodná pro separaci b-agens a umožňuje jejich rychlou identifikaci ve spojení s MALDI-MS.

Poděkování

Výzkum byl podpořen z projektů Ministerstva vnitra České republiky (číslo VI20172020069 a VI04000062) a z výzkumného záměru - RVO:68081715 Akademie věd České republiky.

Použitá literatura

[1] Duša, F., Šalplachta, J., Horká, M., Lunerová, K., Rosenbergová, K., & Kubiček, O. Novel chip-based isoelectric focusing device for fractionation of bacteria prior to their mass spectrometry identification. *Anal. Chim. Acta*, vol. 1192, pp. 339333, 2022.

[2] Kubiček, O., Lunerová, K., Rosenbergová, K. Inaktivace patogenů ve vzorcích s rizikem přítomnosti VRA/RA s možností jejich následného průkazu pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní, Schválená metodika SÚJCHBO, v. v. i. B2/Inakt/2021, <https://www.sujb.cz/dokumenty-a-publikace/schvalene-metodiky>, 2021.