

Analýza magnetických mikročástic mikroskopii atomárních sil

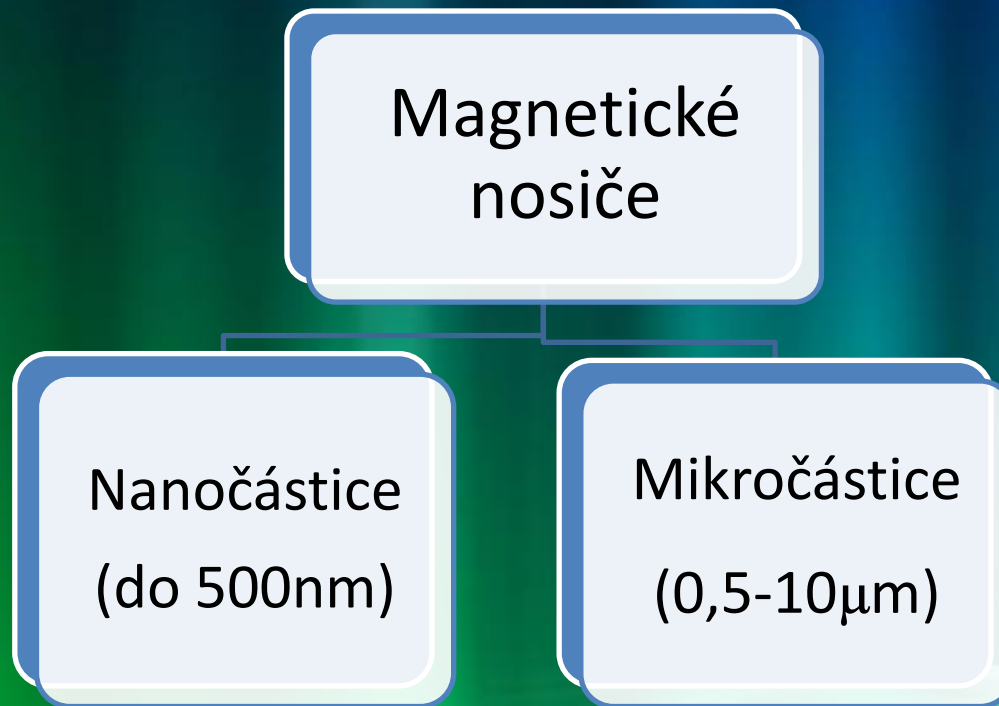
Zapletalová¹ H., Tvrdíková² J.,
Kolářová¹ H.



¹Ústav lékařské biofyziky, LF UP Olomouc

²Ústav chemie potravin a biotechnologií, CHF VUT Brno

Magnetické částice (MP)



Magnetické částice (MP)

Superparamagnetické (nulový zbytkový magnetismus)

X

feromagnetické (velmi rychlá separace i ve viskózním prostředí)

- Snadná resuspendovatelnost
- Pomalá sedimentace
- Velká povrchová plocha (cca 100 m²/g částic, dle velikosti)
- Uniformní distribuce velikosti částic
(pro zachování fyzikálních a chemických vlastností)
- Biokompatibilita

Aplikace magnetických částic (MP)

In vivo

- terapeutické využití (nosiče léčiv)
- magnetofekce (magneticky řízená transfekce genu)
- hypertermie (uvolňování tepla v cílové tkáni prostřednictvím hysteretických ztrát MP ve vnějším proměnném magnetickém poli)
- MRI - kontrastní agens

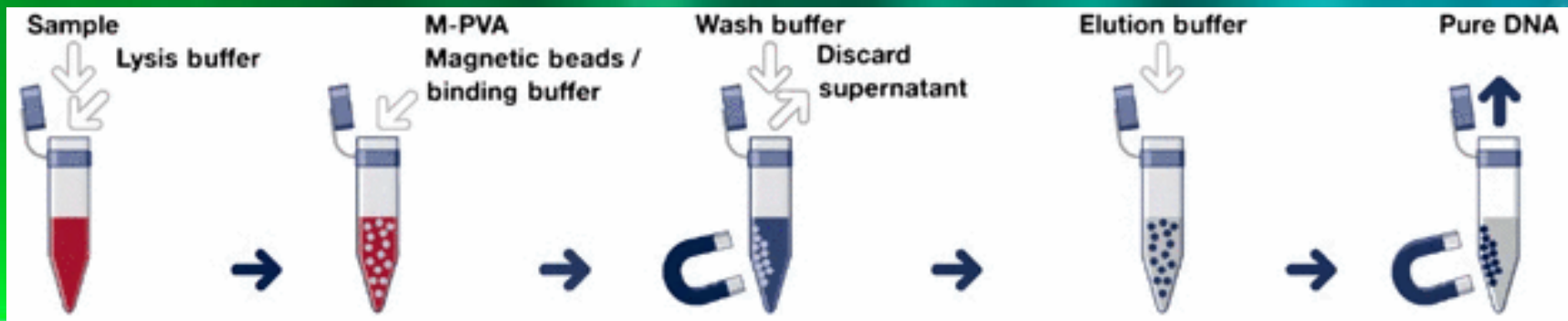
In vitro

- diagnostika / separace / značení

povrchově modifikované polymerní magnetické mikročástice usnadňují separace buněk, proteinů či buněk ze složitých směsí pomocí externího magnetického pole

Aplikace magnetických mikročastic - izolace NK

- (1) Lyze buněčného materiálu
- (2) adsorpce NK
- (3) promývací krok
- (4) eluce NK



- (převzato z chemagen, Biopolymer-Technologie AG, Germany)

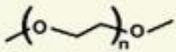
Stavba magnetických částic

- magnetické jádro
 - Magnetické vlastnosti
(nanočástice oxidů železa: magnetit Fe_3O_4 , maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, hematit $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)
- biokompatibilní obal
 - ochrana jádra + modifikace vhodnými funkčními skupinami
 - syntetický polymer (polystyren, polyakrylamid, porézní sklo, křemičitanová vrstva, silanová vrstva, ...)
 - biopolymer (agarosa, celulóza, chitosan,...)
 - lipidová membrána

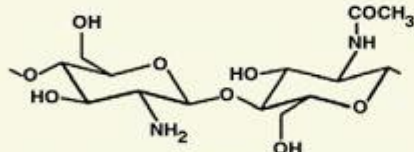
Velikost a tvar magnetických mikročástic závisí na způsobu přípravy, reakční teplotě, pH, použité iontové síle apod.

Stavba magnetických nanočástic

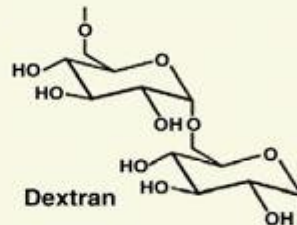
Coating Polymers



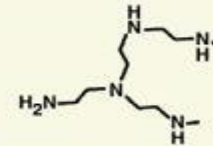
Poly(ethylene glycol) (PEG)



Chitosan



Dextran



Poly(ethylenimine) (PEI)

Polymer Types

End-grafted Polymers



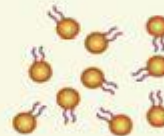
PEG

Surface Adsorption Polymers



Chitosan, Dextran, PEI

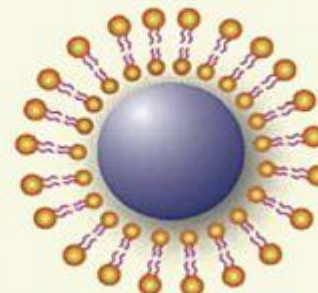
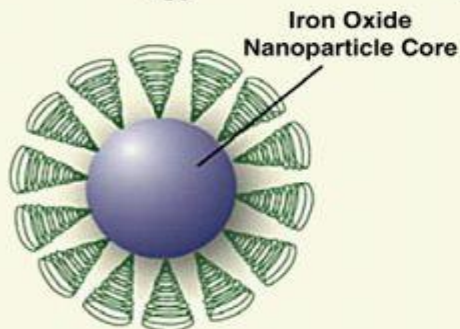
Phospholipids



CoPolymers

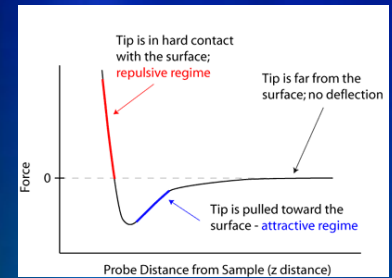


PVA-PEG, Chitosan-PEG



(převzato z Veiseh et al, 2010, *Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging*)

Mikroskopie atomárních sil



Bioscope Catalyst, Bruker

- **Zobrazovací režim:**

 - **Scan asyst mode**

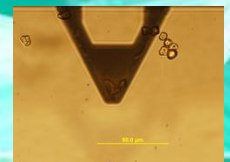
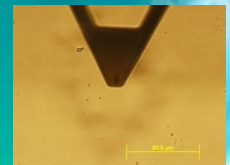
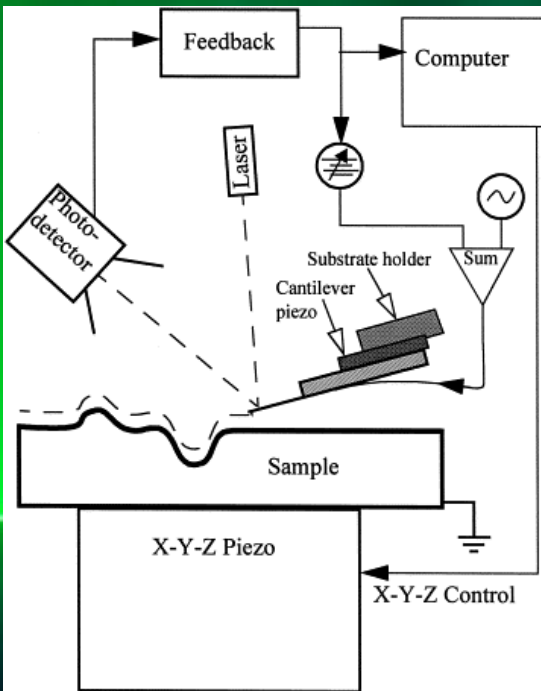
 - F-d křivka v každém bodu rastru = precizní kontrola silové interakce mezi měřícím hrotem a zobrazovaným vzorkem zabrání posunu vzorku během skenování

- **Skenující sonda:**

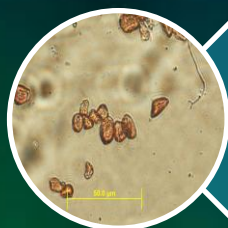
 - hrot scan asyst, $k \sim 0,7 \text{ N/m}$

- **Imobilizace MP**

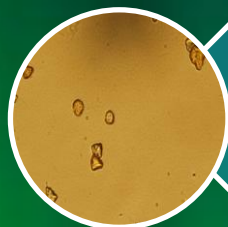
 - 0,5% agarózový gel nanesen na krycím sklíčku, neodýmový magnet



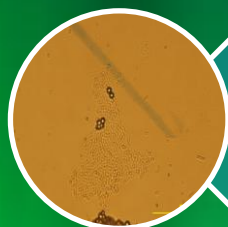
Typy zobrazovaných MP



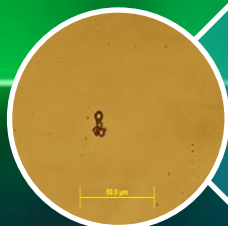
MPG – uncoated



MPG – STV-coated

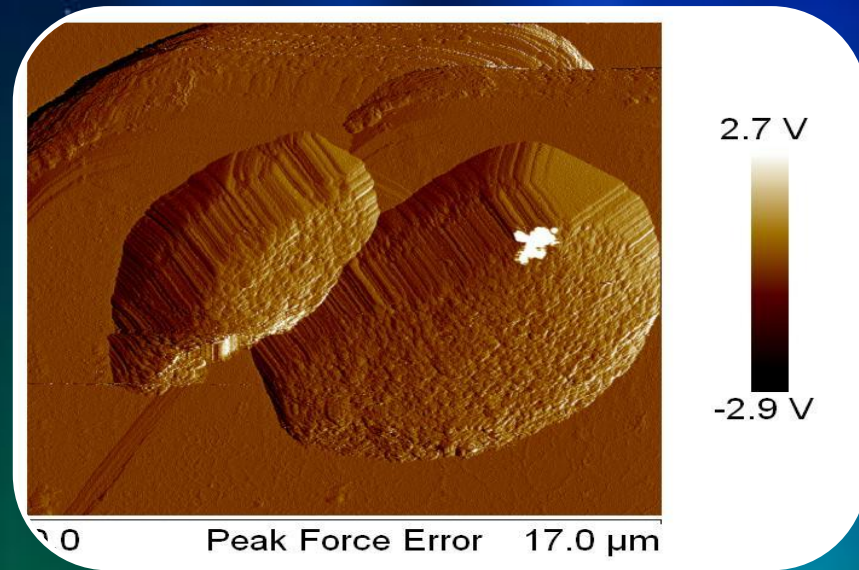
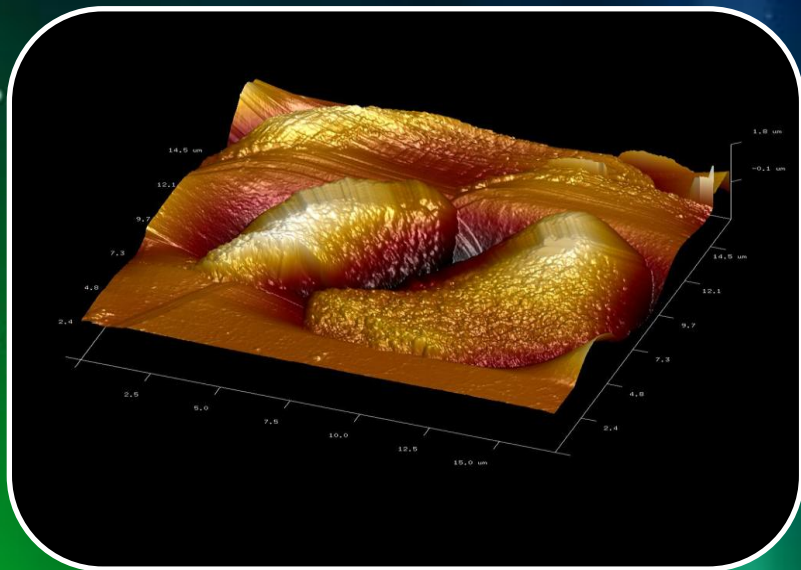


Fcoll



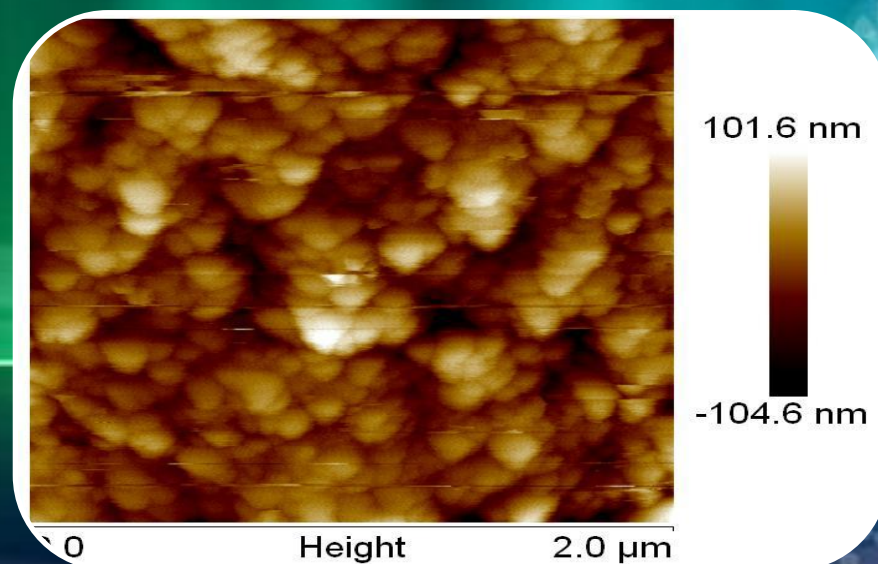
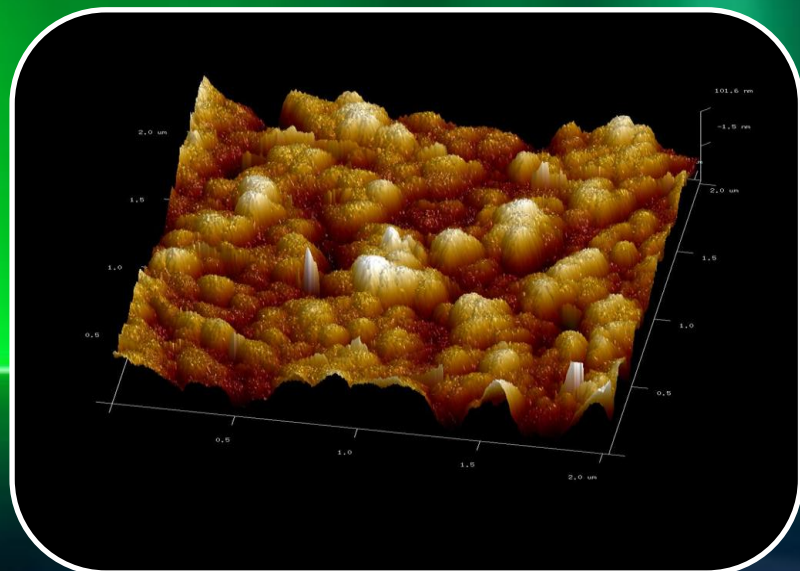
P(HEMA)

MPG uncoated



MPG – uncoated, 3D topografie, výškový profil, 17μm²

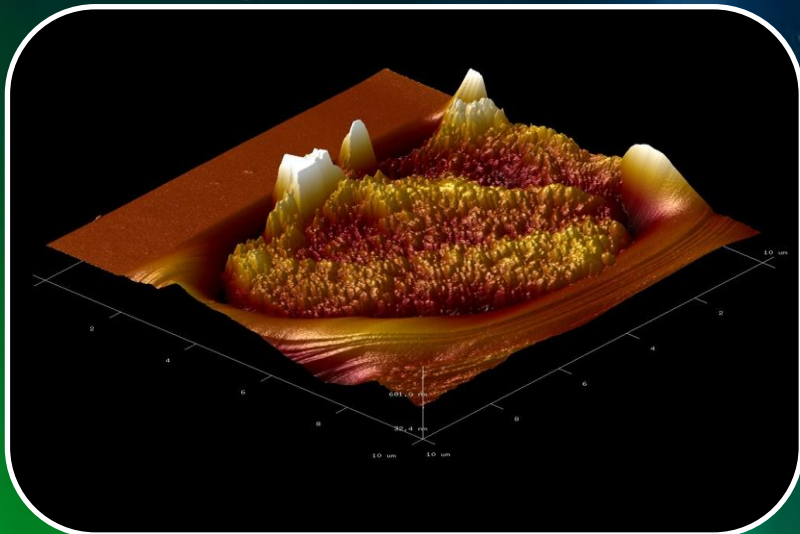
MPG – uncoated, 2D struktura, 17μm²



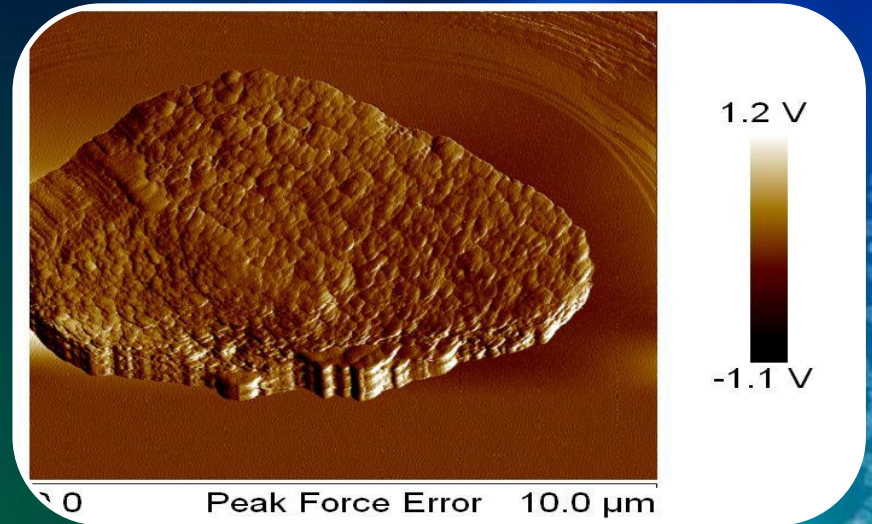
MPG – uncoated, 3D topografie, ZOOM 2μm²

MPG – uncoated, 2D topografie, ZOOM 2μm²

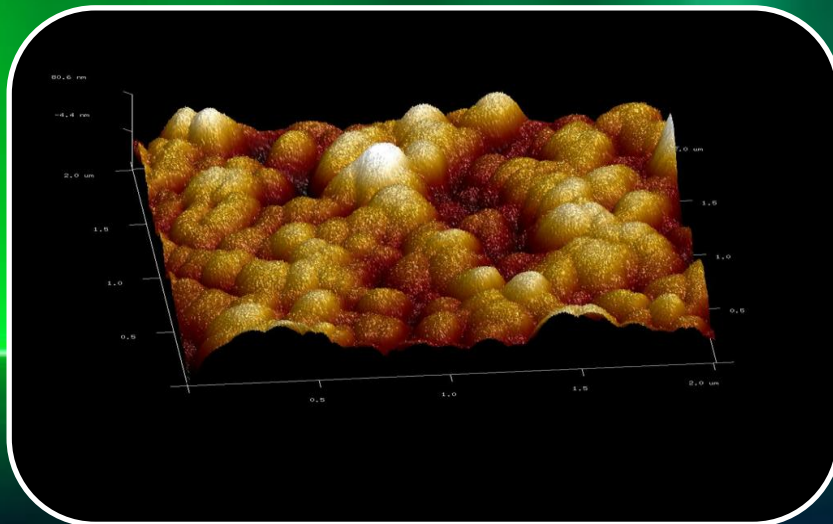
MPG – STV-coated



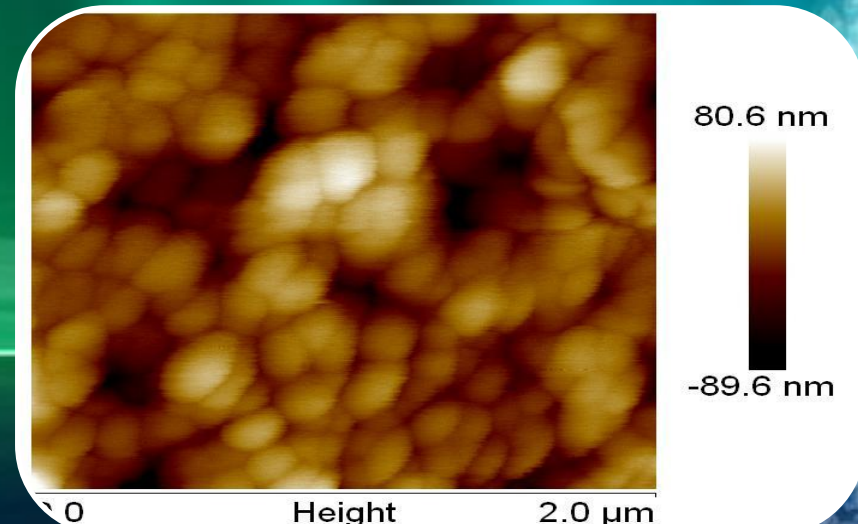
MPG-STV-coated, 3D topografie, výškový profil, 10μm²



MPG – STV-coated, 2D struktura, 10μm²

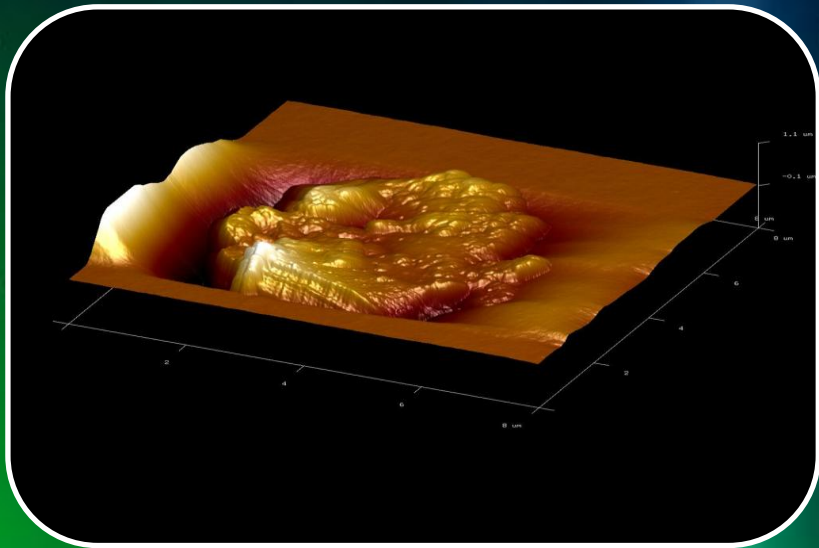


MPG – STV-coated, 3D topografie, ZOOM 2μm²

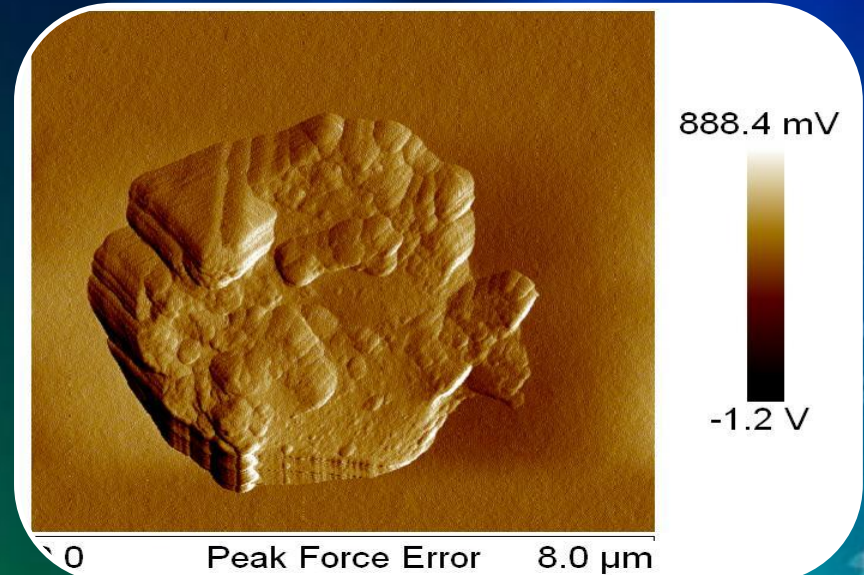


MPG – STV-coated, 2D topografie, ZOOM 2μm²

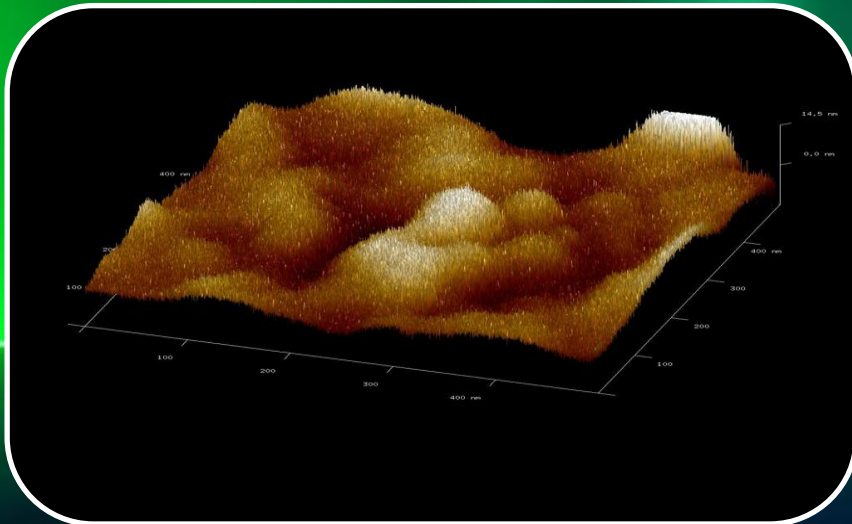
Fcoll



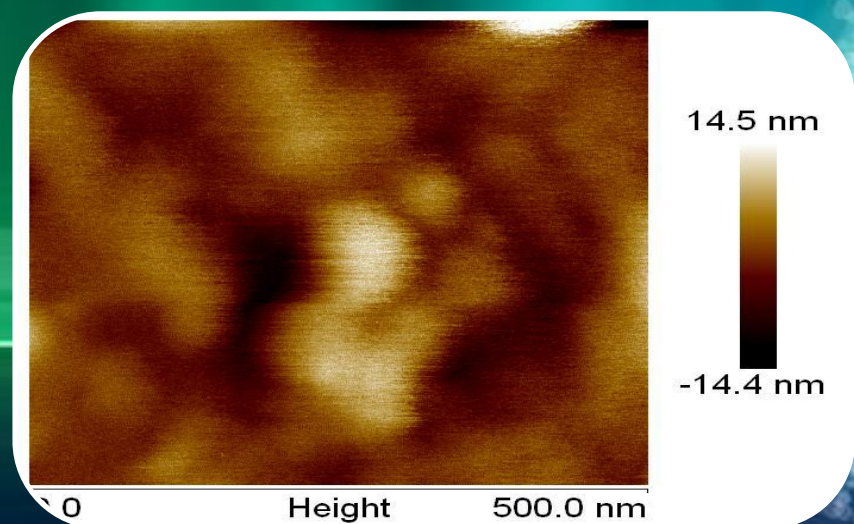
Fcoll - 3D topografie, výškový profil, 8μm²



Fcoll, 2D struktura, PF error mode, 8μm²

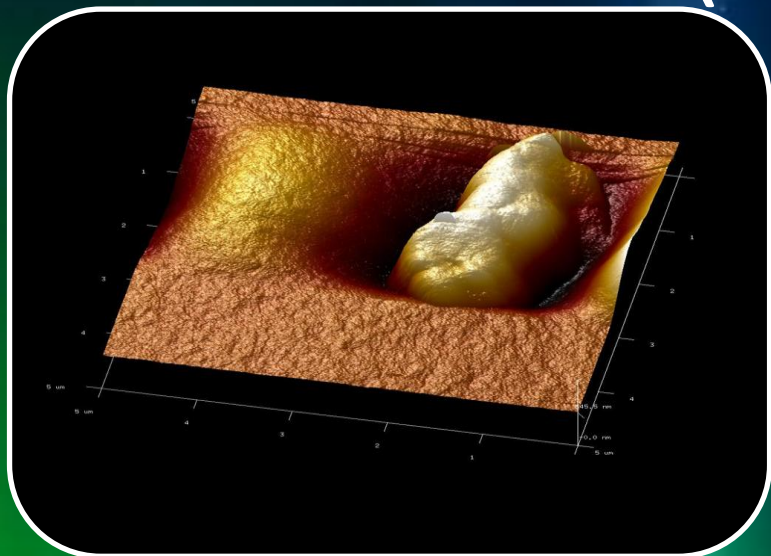


Fcoll - 3D topografie, ZOOM 0,5μm²

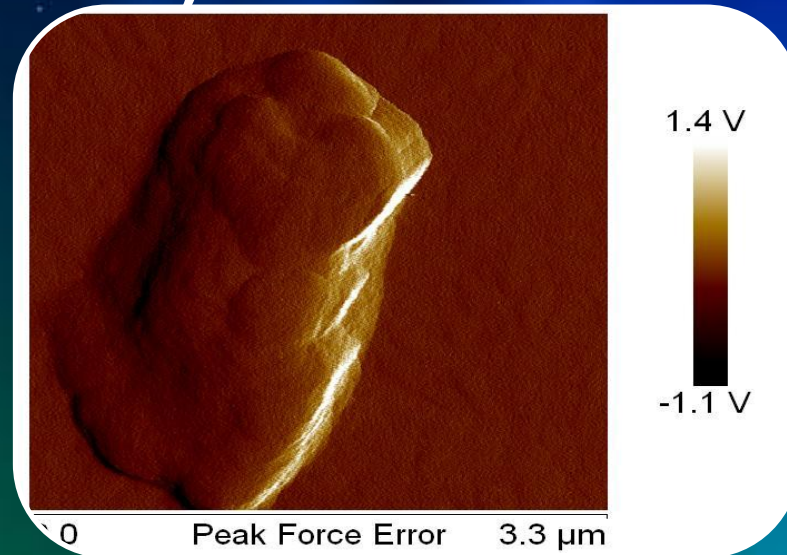


Fcoll, 2D topografie, ZOOM 0,5μm²

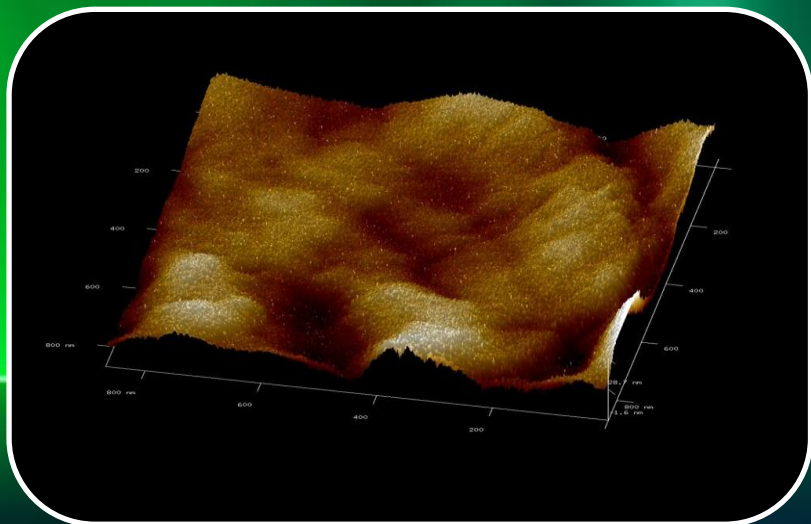
P(HEMA)



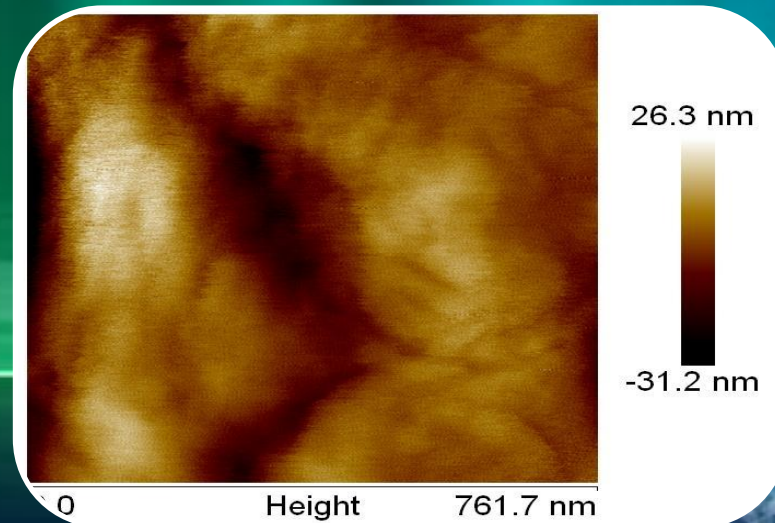
P(HEMA), 3D topografie, výškový profil; $3,3\mu\text{m}^2$



P(HEMA), 2D struktura, PF error mode; $3,3\mu\text{m}^2$



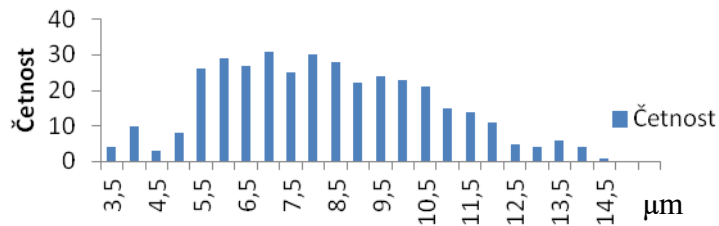
P(HEMA), 3D topografie, scan $0,76\mu\text{m}^2$



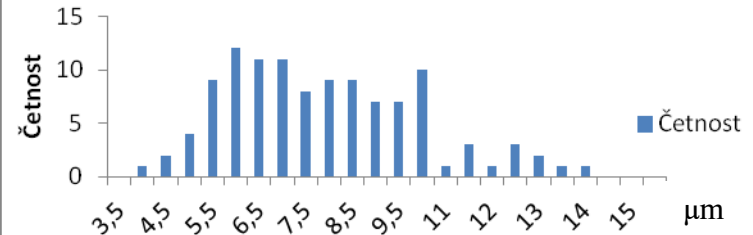
P(HEMA), 2D topografie, scan $0,76\mu\text{m}^2$

Distribuce velikosti MP

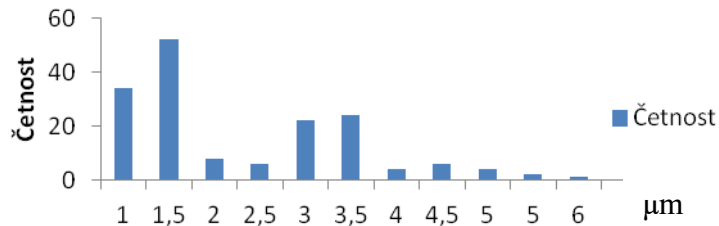
Histogram - MPG uncoated



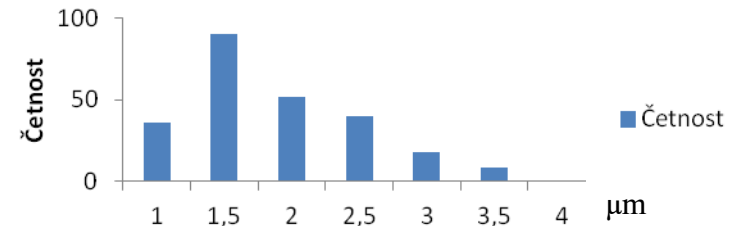
Histogram - MPG - STU



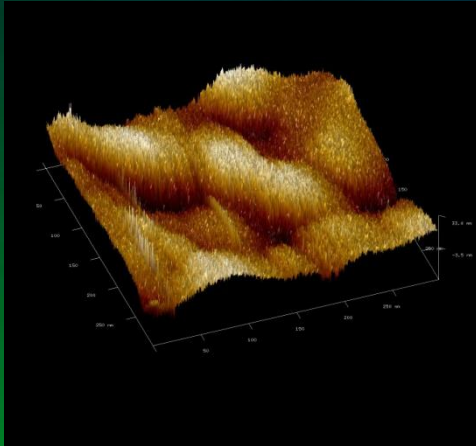
Histogram - Fcoll



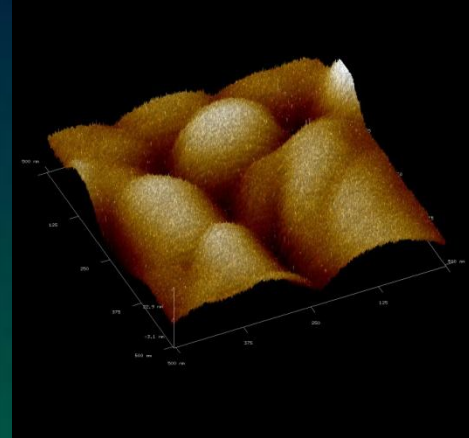
Histogram - P(HEMA)



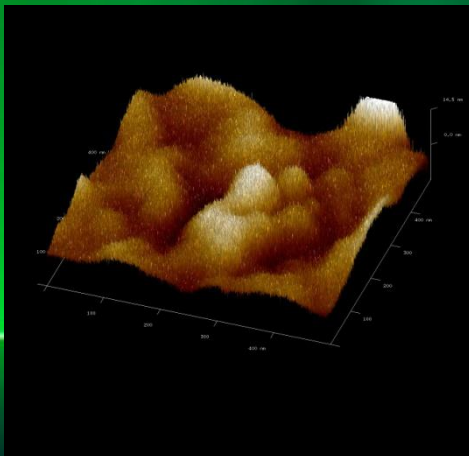
Detailní výškový profil MP



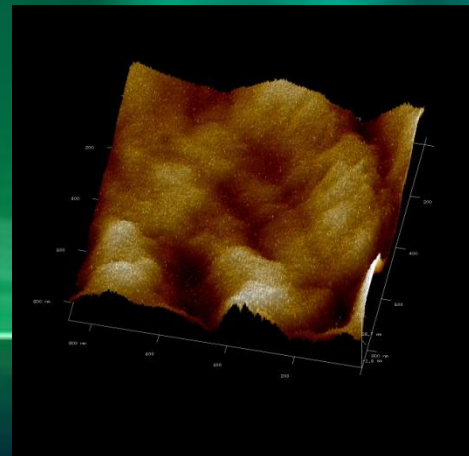
MPG- uncoated – výškový profil 33nm,
scan 300nm², RMS (18,4 ± 6,2) nm



MPG- STV – výškový profil 27m,
scan 600nm², RMS (17,2 ± 8,1) nm



F coll – výškový profil 14nm,
scan 600nm², RMS (7,2 ± 4,1) nm



P(HEMA) – výškový profil 28nm,
Scan 760nm², RMS (13,2 ± 6,1) nm

Charakterizace zobrazovaných MP

Úzká distribuce velikostí: PHEMA, následuje F koll, nejširší distribuci velikosti částic má komerční MP – MPG.

- **Povrchové modifikace:**

- MPG – porézní sklo (SiO_2 , $-\text{OH}$ funkční skupiny na povrchu)
- MPG-STV – streptavidin
- Fcoll – COOH funkční skupiny
- P(HEMA) – NH_2 funkční skupiny

- **Povrchová topografie:**

- MPG – RMS ($18,4 \pm 6,2$) nm
- MPG-STV – RMS ($17,2 \pm 8,1$) nm
- Fcoll – RMS ($7,2 \pm 4,1$) nm
- P(HEMA) – RMS ($13,2 \pm 6,1$) nm

Efektivita MP při izolaci bakteriální DNA z komplexních vzorků

- Princip reversibilní adsorpce DNA na magnetický nosič:
 - Za přítomnosti PEG a NaCl_2 dochází k dehydrataci DNA. Při nízké koncentraci NaCl_2 se DNA vyskytuje v relaxované formě, při vysoké koncentraci NaCl_2 dochází ke srážení makromolekul DNA a vzniku jejich kondenzátů, které snadno adsorbují na povrch MP.
 - Selektivní adsorpce DNA na magnetický nosič může být zvýšena modifikací povrchu – např. kladně nabitými funkčními skupinami - NH_2 (elektrostatická interakce)
 - Vliv na efektivitu selektivní adsorpce DNA má:
pH, iontová síla a teplota roztoku
+ funkční skupiny na povrchu MP

Efektivita MP při izolaci bakteriální DNA z komplexních vzorků

- Všechny AFM analyzované částice byly úspěšně použity k magnetické separaci a izolaci bakteriální DNA z reálných vzorků (hrubý lyzát) v kvalitě vhodné pro PCR.
- Odlišná topografie i distribuce velikosti použitých magnetických nosičů neprokázala vliv na kvalitu a množství izolované bakteriální DNA.
- Větší výtěžek izolované DNA byl získán izolací DNA prostřednictvím MP - Fcoll (povrch modifikován funkční skupinou –COOH), méně izolací P(HEMA) magnetickým nosičem (povrch modifikován funkční skupinou –NH₂).
- Čistota izolované DNA byla u všech čtyř analyzovaných MP v kvalitě vhodné pro PCR.

PODĚKOVÁNÍ

- Projektu:

LF_2013_006 CZ.1.05/2.1.00/01.0030

Ústavu molekulární a translační medicíny

Vám všem za pozornost 😊