

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
KEEMIA INSTITUUT

Eteri Libe

Immunosensorsüsteem *Escherichia coli* määramiseks

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Delia Peedel, magister  
Toonika Rinken, PhD vanemteadur

Tartu 2014

## SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
1.1. Ülevaade <i>Escherichia coli</i> bakterist ja selle bioloogilisest toimest .....	5
1.1.1. <i>E. coli</i> raku ehitus.....	5
1.1.2. <i>E. coli</i> biotoime .....	6
1.2. Erinevad <i>E. coli</i> määramismeetodid.....	7
1.3. Biosensorid <i>E.coli</i> määramiseks. ....	9
1.3.1. Elektrokeemiline kvartskristall mikrokaal (EQCM, Electrochemical Quartz Crystal Microbalance).....	9
1.3.2. Akustilise laine meetod (BAW, Bulk acoustic wave).....	9
1.3.3. BIAcore süsteemid (Biomolecular Interaction Analysis) .....	10
1.3.4. Mikrograanulite voogsisestusanalüüs (BIA, Bead Injection Analysis) .....	11
1.3.5. Immunosensorite tööpõhimõte .....	11
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	13
2.1. Kasutatud seadmed.....	13
2.2. Kasutatud reaktiivid .....	13
2.3. Lahuste valmistamine.....	14
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> suspensiooni valmistamine.....	14
2.3.2. Sephadex G-50 mikrograanulite aktiveerimine <i>E. coli</i> sidumiseks .....	14
2.4. Mõõtmiste läbiviimine .....	15
2.4.2. Piimaproovide ettevalmistus .....	18
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	19
3.1. Mõõtesüsteem <i>E. coli</i> määramiseks .....	19
3.2. Erineva lainepikkusega valguse hajumine süsteemis.....	20
3.3. <i>E. coli</i> määramine fosfaatpuhvrts.....	21
3.4. <i>E. coli</i> määramine piimas .....	22
KOKKUVÕTE.....	24
KASUTATUD KIRJANDUS .....	25
SUMMARY .....	28

## TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

BAW - akustilise laine meetod (Bulk acoustic wave)

BIA - mikrograanulite voogsisestusanalüüs (Bead Injection Analysis)

CFU - kolooniaid moodustav üksus

EaggEC - enteroagregatiivne *E. coli*

EIEC - enteroinvasiivne *E. coli*

ELISA - ensüüm-immunosorptsioon analüüs

*E. coli* - *Escherichia coli*

EPEC - enteropatoogiline *E. coli*

EQCM - elektrokeemiline kvartskristall mikrokaal (Electrochemical Quartz Crystal Microbalance)

ETEC - enterotoksigeeniline *E. coli*

FIA - voogsisestusanalüüs (Flow Injection Analysis)

FITC - fluorestsüüanisotiotsüanaat

IgG - immunoglobuliin G

LPS - lipopolüsahhariid

PBS - fosfaatpuhver soolaga

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon

RT-PCR - pöördtranskriptaasi PCR

SPR - pinna plasmon resonants (Surface Plasmon Resonance)

STEC - shigatoksiini tootev *E. coli*

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

## SISSEJUHATUS

*Escherichia coli* on üks põhilistest lüpsilehmadel udarapõletikku ehk mastiiti tekitavatest keskkonna kaudu levivatest bakteritest. Piimatööstusele toob mastiit kaasa suure majandusliku kahjumi, kuna haiguse ajal langeb toodangu maht ja piima kvaliteet ning piima ei ole võimalik müüa, samuti kaasnevad loomade ravimisega

märkimisväärsed kulud ravimitele.

Loomade efektiivseks ravimiseks on vajalik mastiiditekitajate kiire identifitseerimine, et alustada õigeaegset ravi konkreetse haigustekitaja vastu. Praegusel ajal on see protseduur väga aeganõudev, sest bakterite määramiseks kasutatakse peamiselt mikrobioloogilisi meetodeid. Tavaliselt kasutatakse praktikas universaalset ravi enamlevinud patogeenide vastu, mis aga eeldab laiatoimelisemate antibiootikumide kasutamist ning võib viia ravimresistentsete bakteritüvede tekkimiseni.

Piim on analüüsimiseks keeruline kolloidlahus, sisaldades rasva, vett, süsivesikuid ja valke. [1] Patogeenide kiireks identifitseerimiseks piimas on võimalik kasutada biosensoreid, mis ei nõua analüüsitavaid proovide eeltötlust ning võimaldavad valitud patogeenide selektiivset identifitseerimist vähem kui 30 minuti jooksul.

Käesoleva töö eesmärgiks on antigeen/antikeha vastastiktoimel ja mikrograanulite voogsisestusanalüüsil põhineva biosensorsüsteemi konstrueerimine ja uurimine *E. coli* bakteri määramiseks toorpiimas, mida saaks tulevikus kombineerida teiste olulisemate mastiiditekitajate määramisega ning rakendada patogeenide kiireks määramiseks.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

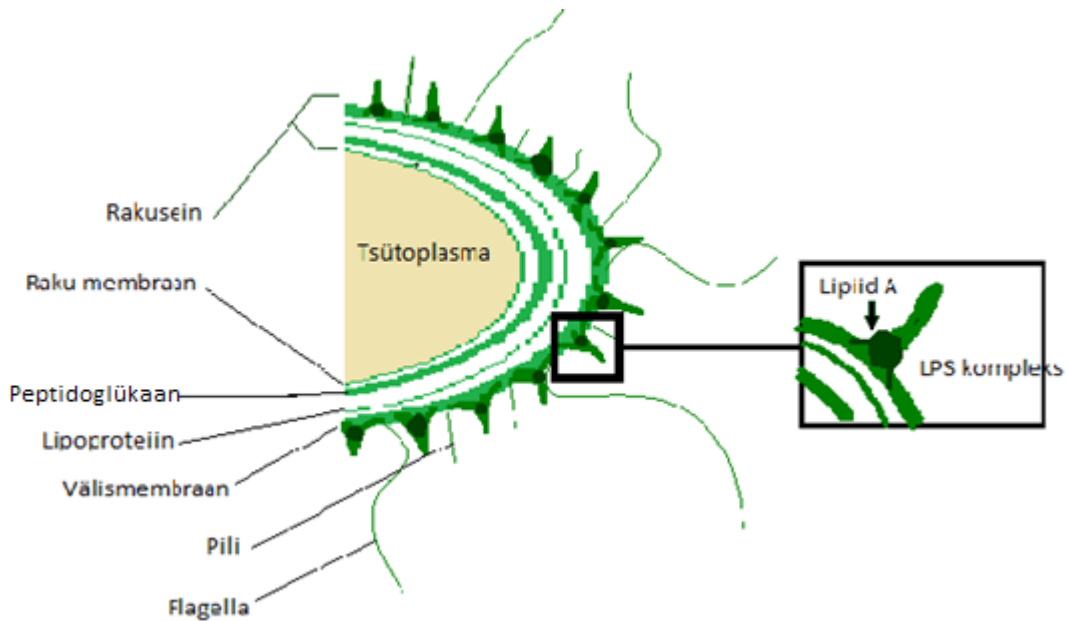
## 1.1. Ülevaade *Escherichia coli* bakterist ja selle bioloogilisest toimest

### 1.1.1. *E. coli* raku ehitus

*Escherichia coli* rakk on pulgakujuline ning suurusega 0,5–0,8 x 1,0–2,0 µm. Enamik tüvedest on varustatud viburitega, seega on neil liikumisvõime. Nad saavad elada nii hapnikurohkes kui ka hapnikuvaeses keskkonnas. Nende optimaalseks elamistemperatuuriks 37 °C. [2]

*E. coli* on Gram-negatiivne bakteri liik, mis kuulub enterobakterite sugukonda. See bakter elab põhiliselt imetajate soolestikus, kuuludes seedetrakti normaalsesse mikrofloorasse. Jämesooles elavad *E. coli* bakterid aitavad kaasa toidu imendumisele organismi, jääkainete töötlemisele ja K-vitamiini tootmisele. Inimese soolestikus on leitud viis erinevasse kategooriasse kuuluvat *E. coli* bakteriliiki: shigatoksiini tootev *E. coli* (STEC), enteropatogeeniline *E. coli* (EPEC), enteroinvasiivne *E. coli* (EIEC), enteroagregatiivne *E. coli* (EaggEC) ja enterotoksigeeniline *E. coli* (ETEC). [2, 3]

Gram-negatiivse bakteri rakusein koosneb harilikult kolmest kihist: tsütoplasma membraanist ja välismembraanist, mis on eraldatud peptidoglükaani kihiga (Joonis 1). Välimine rakumembraan koosneb fosfolipiididest, valkudest ja lipopolüsahhariididest (LPS). LPS koosneb lipiid-A'st, lipopolüsahhariidi tuumast ja korduvate polüsahhariidide kogumitest, mida nimetatakse O-antigeenideks. Lipiid-A on LPS'i kompleksi lipofiilne seesmine osa. LPS'i teatakse ka endotoksiinina, mille toksilisust põhjustab lipiid-A. Bakteri välispinnal võivad olla narmad, mis ulatuvad välja raku seinalt. Välispind võib olla kaetud paksu polüsahhariidi kihiga, mida nimetatakse kapsliks. *E.coli* jagatakse erinevatesse rühmadesse serotüüpide järgi, vastavalt O:H:K serotüüpideks. Selle alusel eristatakse erinevate antigeensete struktuuride alusel O-, K- ja H-antigeene. [4]



**Joonis 1.** *Escherichia coli* raku ehitus. [4]

### 1.1.2. *E. coli* biotoime

*E. coli* mastiit põhjustab põletikku ja infektsiooni lüpsilehmade piimanäärmete ümber poegimise ajal ja imetamise varases staadiumis. [5]

Põllumajandusloomad on patogeenidele ideaalseks elamiskohaks, need omakorda võivad sattuda sel teel piima. Toorpiim pakub suure potentsiaaliga kasvukeskkonda bakteritele. [6]

Enamik *E. coli* tüvedest on kahjutud ja võtavad osa normaalsest mikrofloorast, ent mõned serotüübid on kahjulikud tekitades järgmisi haiguseisundeid: gastroenteriit ehk soolepõletik, kuseteede infektsioon, vastündinu meningiit. [7] Mitmed *E. coli* serotüübid on omandanud virulentsusfaktori, mis lasevad neil kohaneda uute keskkondadega, mis mõnedel juhtudel põhjustavad tõsiseid haiguseid. Mõned neist tekitavad haigust juba 5–50 raku olemasolul. *Salmonella* ja *Escherichia coli* bakterid on enamjaolt bakteriaalsete toidumürgituste põhjustajateks. [6,8]

## 1.2. Erinevad *E. coli* määramismeetodid

*Escherichia coli* määramiseks kasutatakse mitmeid meetodeid, mis erinevad analüüsiks kuuluva aja, tundlikkuse ja usaldatavuse poolest. Vanim on mikrobioloogiliste külvide tegemine, millele lisaks on tulnud mitmeid meetodeid juurde. Erinevaid meetodeid tutvustatakse lähemalt antud peatükis.

Mikrobioloogilise meetodi puhul külvatakse uuritavad proovid selektiivsele söötmele, kus elusad rakud hakkavad kasvama ja moodustavad kolooniaid, mida teatud aja möödudes loendatakse. Kolooniate visualiseerimiseks kasutatakse kromogeenseid ühendeid ja spetsiifilisi substraate ehk söötmeid, mis inhibeerivad analüüsi segavate mikroorganismide kasvu ja samas annavad uuritavale mikroorganismile kindla värvi. Nii saab bakterite olemasolu kindlaks teha optiliste meetoditega ja ka visuaalsel vaatlusel. Mikrobioloogilise meetodi eeliseks on odav hind, tundlikkus, selektiivsus, usaldusväärsus, kuid see meetod on liiga aeganõudev ning tülikas. [9, 10]

ELISA (ensüüm-immunosorptsiooni analüüs) on kvantitatiivne määramise meetod. ELISA tööpõhimõtteks on antikeha või antigeeni märgistamine ensüümiga, säilitades seejuures ensüümi aktiivsuse ja antikeha/antigeeni spetsiifilisuse. ELISA on kiire, tundlik ja spetsiifiline meetod, kuid kallid ja sama antikeha ei sobi teistele antigeenidele. [11]

PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) meetod põhineb määratava bakteri geneetilist materjali sisaldava DNA järjestuse isoleerimisel, amplifitseerimisel ja kvantiseerimisel. Enimlevinud on reaalaaja-, multipleksne- ja pöördtranskriptaas PCR. PCR on tundlik, kiire, spetsiifiline, täpne, robustne, kuid kallid, ega tee vahet elusal ja surnud mikroorganismil, polümeraasil võivad tekkida vead. Analüüsiks kulub PCR'ga tavaliselt 5-24 tundi. [10]

Biosensorid on seadmed, milles määratavate ainete ja mikroorganismide ära tundmiseks kasutatakse bioselektiivset komponenti, näiteks antikehasid, ensüüme jms, mis on integreeritud signaali muunduriga. Viimase abil on võimalik registreerida ära tundmise reaktsiooni signaali, mille alusel leitakse uuritava aine kontsentratsioon. Enamasti on biosensorseadmed kiired, täpsed ja spetsiifilised, kuid nende väljatöötamine võib olla keeruline ja töömahukas. [9]

Kokkuvõtlik ülevaade *E. coli* määramiseks kasutatavate meetodite määramispiiridest ja mõõtmiseks kuluvast ajast *E. coli* kultuuris ja erinevates toiduainetes on toodud Tabelis 1.

**Tabel 1.** *E. coli* määramismeetodid.

Määramismeetod	Proovi tüüp	Aeg	Määramispiir (CFU/mL)	Kirjanduse viide
PCR-ELISA	Piim	5 h		[10]
ELISA	Säilitatud või värske piim	3 h	$10^5$	[10]
PCR	Mastiitne piim	6 h	$5,5 \times 10^1$	[10]
RT-PCR	Hakkliha, piim	3 h 20 min	$1,3 \times 10^4$ rakku/g $1,6 \times 10^3$	[10]
Reaalaja PCR	Kultuur	5 h 20 min		[9]
PCR-elektroforees		2 h		[9]
SPR-biosensor	Piim	Vähem kui 1 h	25 rakku/ml 23 rakku/ml	[10]
Amperomeetriline biosensor	Kultuur	10 min	$7 \times 10^1$	[10]
Potentsiomeetriline biosensor	Aedviljad	1,5 h	10 rakku/ml	[10]
Fluorestseeruvad värvained	Pinnas	-	$10^7 - 10^8$ rakku/cm <sup>3</sup>	[10]
Fiiberoptiline immuunosensor	Kultuur	30 min	1 ng/ml (valk A)	[10]
EQCM immuunosensor	Kultuur/vesi	170 min	1 ng/cm <sup>3</sup>	[9, 12]
Konduktomeetriline biosensor	Segatud kultuur, mis koosneb kuni viiest erinevast mikroorganismist	10 min		[9]



	mist			
Impedimeetrilised immuunosensorid	Kultuur/vesi	10 min		[9]

### 1.3. Biosensorid *E.coli* määramiseks.

#### 1.3.1. Elektrokeemiline kvartskristall mikrokaal (EQCM, Electrochemical Quartz Crystal Microbalance)

Kvartskristall mikrokaalude (QCM) biosensorsüsteemis mõõdetakse kristalli võnkumise resonantssageduse muutumisest tulenevalt selle pinnale spetsiifiliselt seonduvate osakeste massist. Analüüsiks kulub aega 12 -24 tundi ja mõõtmispiirkonnaks on  $10^2 - 10^5$  CFU/ml. [13] Elektrokeemilise QCM korral on süsteemi integreeritud ka elektrood ning selle meetodi korral määratakse elektroodi pinnal seonduvad aine massi ja elektroodi läbinud vooluhulga suhe, mida nimetatakse ka vooluefektiivsuseks. [12] *E. coli* bakterite selektiivseks seondumiseks kaetakse elektrood sellele vastava antikehaga. [14] Süsteemi selektiivsuse tagamiseks kasutatakse elektroodide katmiseks erinevaid polümeere ja elektrokeemilisi kontrollmuutujaid. [12]

#### 1.3.2. Akustilise laine meetod (BAW, Bulk acoustic wave)

Akustilise laine meetod põhineb söötme omaduste muutuste mõõtmisel, mis toimub bakterite kasvu tõttu. Sööde põhjustab juhtivuse ja läbitavuse muutust, kusjuures bakterite hulk on vastavuses sensori sageduse muutustega. *E. coli* määramispiirkond on  $60 - 4 \times 10^6$  rakku/mL. Eksperimendi läbiviimiseks kulub kuni 900 sekundit. [15]

### 1.3.3. BIAcore süsteemid (Biomolecular Interaction Analysis)

BIAcore süsteemid iseloomustavad molekule nende spetsiifiliste vastastikmõjude, kineetika ja afiinsuse alusel. [16] BIAcore mõõtesüsteemi puhul kinnitatakse analüüti detekteeriv retseptor (kinnitatud ligand) õhukesest kullast sensorkiibile õhukese dekstraanikihi abil, mille paksus on kuni 100 nm ja mis moodustab voolukambri kõrgusest 0,2 % (Joonis 2).. Analüüti sisaldav proov voolab kiibist mööda. [17]



**Joonis 2.** BIAcore tööpõhimõte. [9]

Analüüdi seondumisel retseptorile toimub kiibile seondunud aine kogumassi suurenemine. SPR on optiline meetod, mille korral detekteeritakse murdumisnäitaja muutused, mille põhjustavad massimuutused retseptori pinnal. Selle tehnika positiivseteks külgedeks on väga hea tundlikkus, spetsiifilisus, kiirus ja täpsus. Negatiivseteks külgedeks on kõrge hind, keeruline aparatuur ning asjaolu, et kõrgetel retseptorite tihedustel ei ole tulemused usaldusväärsed. Piimaproovide korral on oluliseks segavaks faktoriks piima hägusus ja piimas esinevad valgud. [1, 17]

#### **1.3.4. Mikrograanulite voogsisestusanalüüs (BIA, Bead Injection Analysis)**

Mikrograanulisestusanalüüs (BIA) on voogsisestusanalüüsi alaliik, milles kasutatakse graanuleid, mida transporditakse voolavas lahuses. Graanuleid kasutatakse kui tahkeid kandjaid, et eelkontsentreerida või ekstraheerida analüüti ning reaktsiooni mugavamaks läbiviimiseks. Voolavat lahust kasutatakse graanulite edasikandmiseks süsteemis. Graanuleid kasutatakse ühekorra. Sellega vähendatakse proovi ja süsteemi saastumise ning bioselektiivse osa denaturatsiooni võimalusi. Samuti vähendab see oluliselt analüüsiks kuluvat aega, sest jääb ära vajadus graanuli regenereerimiseks. [18]

BIA analüüsil kasutamiseks sobivad hästi Sephadexi ja Sepharose mikrograanulid, sest need on läbipaistvad ja ei mõjuta spektroskoopiliste või fluorestsentsignaali mõõtmist. Erinevate funktsionaalrühmadega funktsionaliseeritud mikrograanulid on kommertsiaalselt saadaval erinevates suurustes. Analüüti sisaldava proovi suurus on tavaliselt 5 kuni 200 µl, enamasti jääb aga 10 kuni 30 µl juurde. Eduka katse jaoks peab sisestama proovilahuse võimalikult täpselt ja kiirelt. Sisestused ei tohiks tekitada voolukanalis mingeid muutusi. [19]

BIA'ga saab teha mõõtmisi reaalajas. Eeliseks on võimalus uuendada automaatselt kolonni moodustavat tahket faasi, millesse analüüdi osakesed kvantitatiivseks määramiseks selektiivselt seotakse. Probleeme võivad tekitada järgmised juhud:

- mikrograanuleid ei ole läbivoolurakust võimalik täielikult eemaldada
- valguse neeldumine võib mikrograanuleid sisaldavas lahuses muutuda, mis sel juhul muudaks spektroskoopilise mõõtmise ebausaldusväärseks
- mikrograanulid võivad ummistada voolukanaleid
- edasikantud osakeste hulka on keeruline kontrollida
- mikrograanulite kolonn voolukanalis on katsete kordamisel erinev [20]

#### **1.3.5. Immunosensorite tööpõhimõte**

Biokeemilisi detekteerimissüsteeme, mis kasutavad bioäratundmise elementidena antikehi nimetatakse immunosensoriteks. [21]

Antikehad seotakse enamasti klaasist, silikoonist või polümeerist valmistatud kandjale, millega viiakse kontakti antigeeni sisaldav proov. Moodustuvate antikeha/antigeen komplekside kõige levinum tuvastamismeetod on fluorestsentsi mõõtmine, aga tihti kasutatakse ka elektrokeemilist detekteerimist. Immunosensorid on tundlikud ja spetsiifilised neis toimuvate antikeha-antigeeni vahelise interaktsiooni tõttu. Immunosensorid võimaldavad erinevate analüütide ja proovide samaaegset äratundmist. [22]

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Kasutatud seadmed

- 1) Voogsisestusanalüüsi seade FIA lab 3500B (FIALab)
- 2) Spektrofotomeeter USB4000 (Ocean Optics)
- 3) Valgusallikas DH-2000+ (Ocean Optics)
- 4) pH-meeter (Mettler Toledo)
- 5) Vortex segaja (Heidolph)
- 6) Loksuti K<sub>2</sub>R Series (Centurion Scientific Ltd)
- 7) Magnetsegaja MS 3000 (Biosan)
- 8) Analüütiline kaal PB 602-S/FACT (Mettler Toledo)
- 9) Nefelomeeter Crystal Spec
- 10) Tsentrifuug CM-50 Sky (Elmi)
- 11) Tsentrifuug Biofuge primo R (Heraeus)
- 12) Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
- 13) Tsentrifuug Centrifuge 5417C (Eppendorf)

### 2.2. Kasutatud reaktiivid

- 1) Geel Sephadex G-50 Medium, Lot nr 7088, "Pharmacia Fine Chemicals"
- 2) *E. Coli* vastane küüliku IgG FITC-ga märgistatud antikeha, 10 mg/ml, Lot nr 356898, "Abcam"
- 3) Etanoolamiin (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO), Lot nr 1A006111, "AppliChem"
- 4) Dinaatriumvesinikfosfaat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Lot nr 76H1024, 99% "Sigma"
- 5) Naatriumdivesinikfosfaat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Lot nr 50000977, 99% "AppliChem"
- 6) Naatriumkarbonaat-dekahüdraat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>\*10H<sub>2</sub>O), Lot nr 9V004416,

99% “AppliChem”

7) Naatriumkloriid (NaCl), хч, “Reachim”

8) Epikloorhüdriin (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>ClO), Lot nr BCBB3601, ≥ 98% “Fluka Analytical”

9) Inimese IgG fc fragment (saadud TÜ Bio- ja siirdemeditsiini instituudist)

10) Vesinikkloriid (HCl), 35-38% “Reachim”

### **2.3. Lahuste valmistamine**

Kõik lahused valmistati Milli-Q vett kasutades. Puhverlahuste pH määrati pH-meetriga, mille täpsus on ±0,02 ühikut. Puhverlahuseid hoiti 4 °C juures. Reagendid kaaluti analüütiliste kaaludega, mille täpsuseks oli ±0,01 mg. Eksperimentides kasutati järgmisi puhverlahused: 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,50); 0,01 M fosfaatpuhver, millele on lisatud 0,15 M NaCl (pH 7,20 ja pH 6.50).

#### **2.3.1. *Escherichia coli* suspensiooni valmistamine**

*E. coli* (ATCC 25922) kultuur külvati Petri tassil asuvale Oxod Blood Agar Base No.2 söötmele ning kultiveeriti aeroobsetes tingimustes 24 h 37 °C juures. Mikroobikolooniad võeti steriilse tampooniga ja lahustati 25-30 ml fosfaatpuhvrts (0,01 M PBS 0,15 M NaCl pH 6,50). *E. coli* kontsentratsiooni mõõdeti nefelomeetriselt. Rakususpensiooni kontsentratsiooniga 6\*10<sup>8</sup> CFU/ml säilitati 4 °C juures.

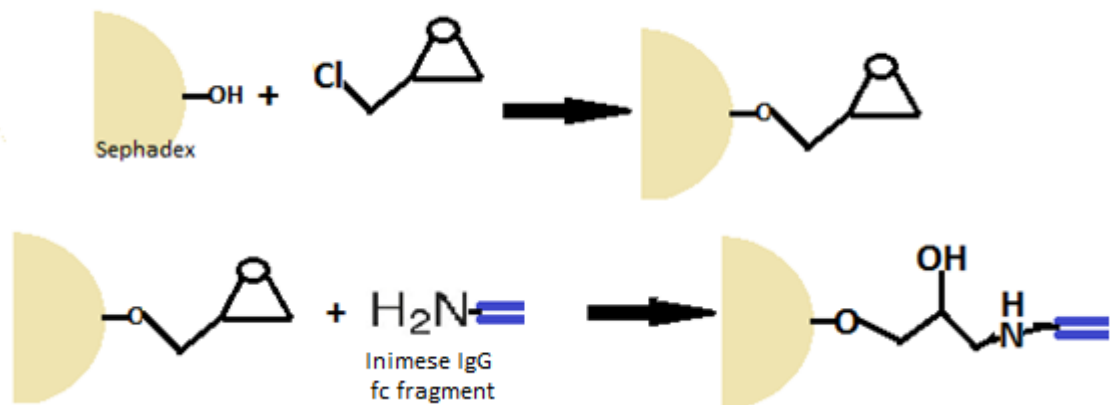
#### **2.3.2. Sephadex G-50 mikrograanulite aktiveerimine *E. coli* sidumiseks**

*E. coli* sidumiseks mikrograanulitele immobiliseeriti sellele eelnevalt inimese IgG fc fragment (Joonis 3.). Selleks kaaluti 0,1 g Sephadex G-50 mikrograanuleid, millele lisati 2 ml Milli-Q vett ja jäeti 24 tunniks punduma. Võeti 500 µl geeli ja tseentrifuugiti seda 5 minutit (2450xg) ning eemaldati vedelik. Geelile lisati 1 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,50) puhverlahust ja 50

$\mu\text{l}$  5% epikloorhüdriini, inkubeeriti toatemperatuuril 2 tundi loksutil ja tsentrifugeeriti 5 minutit ( $2450\times g$ ). Sadet pesti kaks korda  $500\ \mu\text{l}$  Milli-Q veega.

Geelile lisati  $300\ \mu\text{l}$  inimese IgG fc fragmenti, ( $0,01\ \text{M}$  PBS, pH 7,20), millele oli lisatud  $0,15\ \text{M}$  NaCl puhverlahuses ( $0,01\ \text{M}$  PBS, pH 7,20).

Lisati  $300\ \mu\text{l}$   $0,5\ \text{M}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 9,50) puhverlahust ja jäeti loksutile 24 tunniks. Tehti lahus  $425\ \mu\text{l}$  etanoldiamiinist ja  $5\ \text{ml}$   $0,5\ \text{M}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 9,50) puhverlahusest, sellest võeti  $300\ \mu\text{l}$  ning lisati geelile. Saadud segu inkubeeriti loksutil kaks tundi. Viimaks pesti lahust kuus korda  $500\ \mu\text{l}$  Milli-Q veega, ühe korra  $500\ \mu\text{l}$   $0,01\ \text{M}$   $0,15\ \text{M}$  PBS (pH 7,20) puhverlahusega, lisati  $300\ \mu\text{l}$   $0,01\ \text{M}$   $0,15\ \text{M}$  PBS (pH 7,20) puhverlahust ja hoiustati  $4\ ^\circ\text{C}$  juures. Fc fragmendi seostumist kontrolliti kvalitatiivselt lisades geelile Coomassie brilliant blue G 350 lahust.

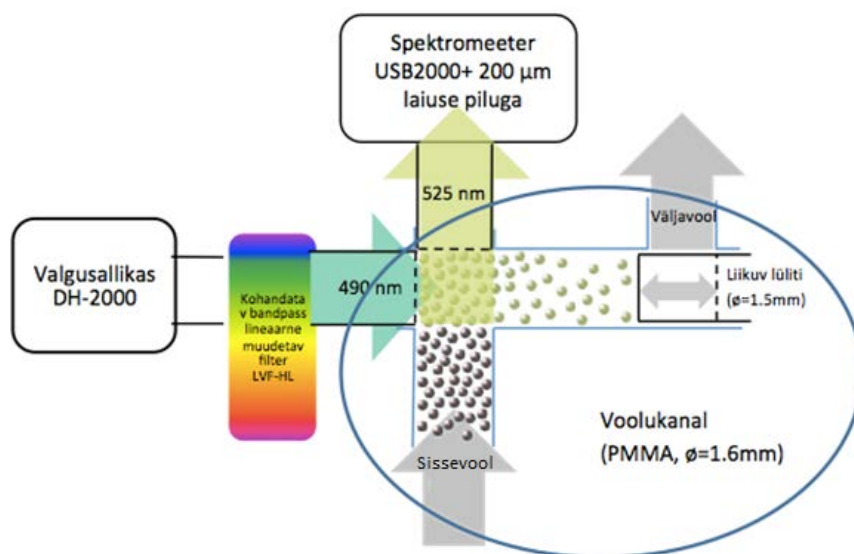


**Joonis 3.** Sephadex graanulite aktiveerimine. [23]

## 2.4. Mõõtmiste läbiviimine

Kuna biosensorsüsteemi puhtus oli väga oluline, siis esmalt pesti iga sisestusvoolik läbi vähemalt kolm korda  $1000\ \mu\text{l}$  Milli-Q veega kiirusel  $200\ \mu\text{l/s}$ . Puhvri sisestuskoht pesti 3 korda puhvriga läbi sama kogusega ja samal kiirusel.

Mõõtmised viidi läbi FIALab 3500B süsteemi voolurakus toatemperatuuril. Voolurakk oli valmistatud polümetüülmetakrülaadist (PMMA) ja see kaeti musta valgustpidava kattega, et ära hoida juhusliku valguse mõju. Valgusallikana kasutati lampi DH-2000 ja fluorestsentsmarkeri ergastamiseks kasutatud valgus ( $\lambda = 490$  nm) filtreeriti kohandatava lineaarse muutuva filtriga (Ocean Optics LVF-HL). Fluorestsentsi signaal ( $\lambda = 520$  nm) mõõdeti Ocean Optics USB 2000+ elektrooniliselt täiustatud spektrofotomeetriga, mille pilu laiuseks oli  $200 \mu\text{m}$  ja sellele oli lisatud detektori kogumisobjektiivid.

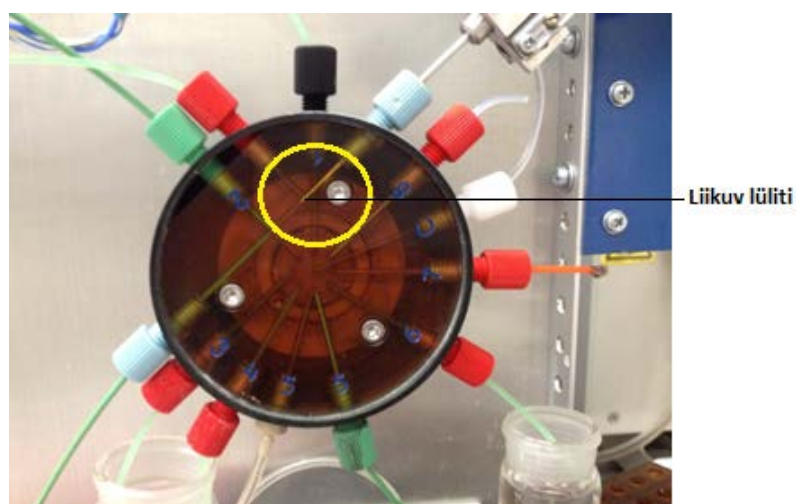


**Joonis 4.** *E. coli* määramiseks kasutatud süsteemi skeem. Voolu ja valguse suund on näidatud nooltena: hallid nooled näitavad voolu ja graanulite liikumist; värvitud nooled näitavad valguse ergastuse ja emissiooni suundi. [20]

Väljavoolukanali suleti liikuva lülitiga (Joonis 5.). Mikrograanulitest kolonni moodustamiseks süstiti mõõterakku  $20 \mu\text{l}$  aktiveeritud mikrograanuleid voolukiirusel  $1 \mu\text{l/s}$ . Lahus loksutati eelnevalt korralikult läbi. Mikrograanulite transport mõõterakku jõudmiseks tagati  $30 \mu\text{l}$  puhverlahuse ( $0,01 \text{ M PBS}$ ;  $0,15 \text{ M NaCl}$ ,  $\text{pH } 7,20$ ) lisamisega voolukiirusel  $2 \mu\text{l/s}$ . Sisestati  $150 \mu\text{l}$  *E. coli* puhverlahuses või piimas voolukiirusel  $1 \mu\text{l/s}$ .



*E. coli* lahust inkubeeriti 180 sekundit. Mitteseostunud bakteri rakud eemaldati pestes süsteemi 150  $\mu$ l puhverlahusega (0,01 M PBS; 0,15 M NaCl, pH 7,20) voolukiirusel 2  $\mu$ l/s. Mõõterakku viidi 20  $\mu$ l *E. coli* vastane FITC-ga märgistatud küüliku IgG antikeha voolukiirusel 1  $\mu$ l/s ja inkubeeriti 120 sekundit. Mitteseondunud antikeha pesti 80  $\mu$ l puhverlahusega (0,01 M PBS; 0,15 M NaCl, pH 7,20) voolukiirusel 1  $\mu$ l/s. Fluorestsentsi intensiivsus mõõdeti 5 minuti jooksul emissiooni lainepikkusel 520 nm (ergastamise lainepikkus 490 nm). Mõõteprotsessi etapid toimusid automatiseeritult ja neid kontrolliti arvuti programmiga FIAlab 5.0. Peale igat mõõtmist voolukanal avati ja süsteemi pesti vähemalt 2 minutit puhverlahusega (0,01 M PBS; 0,15 M NaCl, pH 7,20) voolukiirusel 50  $\mu$ l/s. Iga proovi jaoks tehti 3 kuni 5 kordusmõõtmist. [24]



**Joonis 5.** Voogsisestusanalüüsi seadme FIA lab 3500B voolurakk.

Mõõtmistulemused leiti lõppsignaali ja algsignaali vahena. Igal mõõdetud *E. coli* kontsentratsioonil tehti vähemalt neli kordusmõõtmist ja arvutati nende keskmine. Vea hindamiseks arvutati standardhälve.

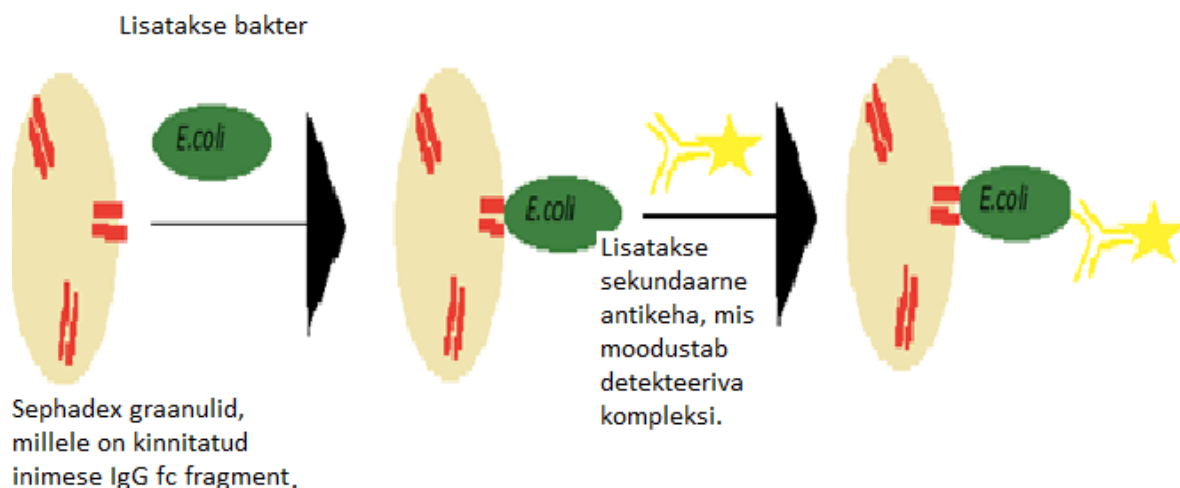
#### **2.4.2. Piimaproovide ettevalmistus**

Piim saadi Eesti Maaülikooli Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudist. Piim oli värskelt lüpstud ja jahutamata. Värskeid piimaproove säilitati loksutil toatemperatuuril kuni 6 tundi. Enne mõõtmist tsentrifugiti proove 5 minutit (2450xg) rasva eemaldamiseks. Piim lisati vastava kontsentratsiooniga *E. coli* lahust (vahekorras 1:1). Piimalahus ja bakteri suspensioon valmistati vahetult enne proovi sisestamist mõõtesüsteemi, sest piim on bakteritele heaks kasvukeskkonnaks.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. Mõõtesüsteem *E. coli* määramiseks

*E. coli* määramiseks pakuti välja biosensorsüsteem, mis põhines samasugusel tehnoloogilisel platvormil, kui varem väljapakutud biosensorsüsteem *Staphylococcus aureuse* määramiseks. *E. coli* määramise põhimõtteline skeem on toodud Joonisel 6.



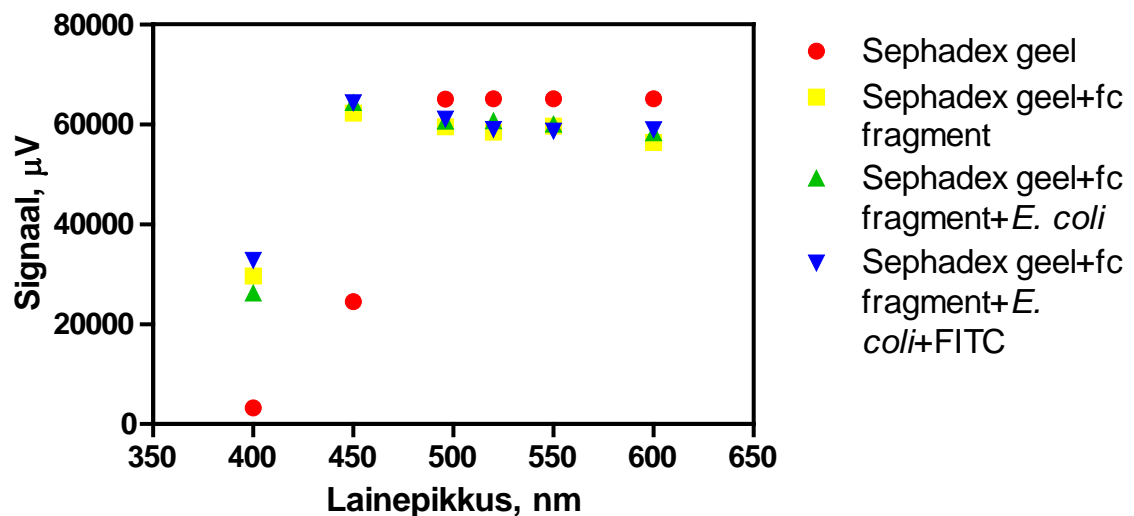
**Joonis 6.** *E. coli* määramise põhimõtteline skeem. [20]

Mikrokolonnide tegemiseks kasutati Sephadex graanuleid, millele oli epikloorhüdrini abil seotud inimese IgG fc fragment, mida kasutatakse peamiselt valk A, mida leidub ka *Staphylococcus aureuse* membraanil, selektiivseks sidumiseks. Ehkki varem arvati, et *Escherichia coli* IgG fc fragmendile ei seondu, on leitud, et tegelikkuses on *E. coli* ja *S. aureuse* afiinsus IgG fc fragmendi suhtes samas suurusjärgus, vastavalt 50 – 200 nM ja  $10^7$ - $10^8$  mol/l. *S. aureuse* sidumine on seejuures spetsiifiline ning *E. coli* sidumine mittespetsiifiline. Mitme põhilise mastiiditekitaja sidumine IgG fc fragmendiga aktiveeritud geelile annab võimaluse nende patogeenide üheaegseks eraldamiseks proovist. Erinevate patogeenide üheaegseks määramiseks kasutatakse nende suhtes selektiivseid sekundaarseid antikehasid, mis on

märgistatud erinevate fluorestsentsmarkeritega. Nii on kasutatud *S. aureuse* määramiseks Texas Red'ga märgistatud *S. aureuse* vastaseid antikehasid, mille ergastus- ja emissiooni lainepikkused on erinevad *E. coli* lainepikkustest. *E. coli* määramiseks kasutati FITC-ga märgistatud *E. coli* vastast küüliku antikeha. FITC-i ergastus- ja emissiooni lainepikkused on oluliselt madalamatel lainepikkustel, vastavalt 490 nm ja 520 nm ning FITC'i ja Texas Red'ga märgistatud antikehasid on võimalik süsteemis ka üheaegselt detekteerida. [24]

### 3.2. Erineva lainepikkusega valguse hajumine süsteemis

Esmalt uuriti kuidas mõõtmise erinevates staadiumites graanulid mõjutavad mõõdetava valguse intensiivsust ning milline on mõõtesüsteemist endast tulenevate mürade osakaal signaalides. Signaalid mõõdeti Sephadex geeliga, millele oli kinnitatud inimese IgG fc fragment, Sephadex geel+fc fragment+*Escherichia coli* ja Sephadex geel+fc fragment+*Escherichia coli*+ *E. Coli* vastane sekundaarne küüliku IgG FITC-ga märgistatud antikeha. Seda tehti erinevatel lainepikkustel, et teada saada mõõtesüsteemist endast tulenevate mürade osakaale signaalides. Saadud tulemused on väljatoodud Joonisel 7 .

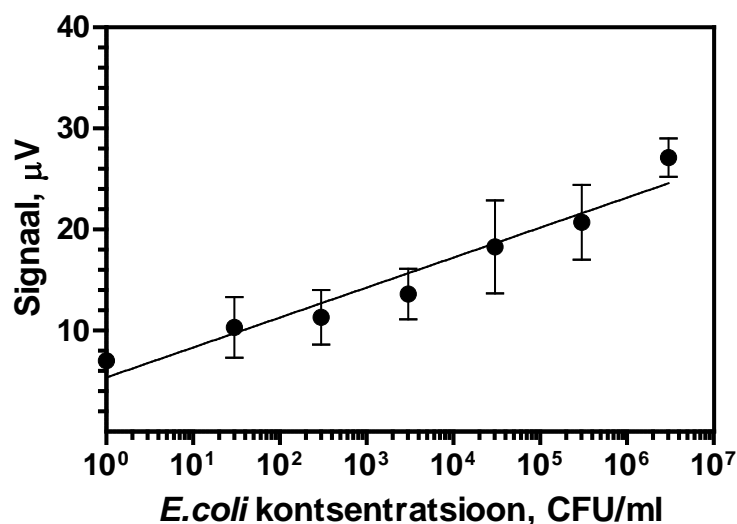


Joonis 7. Signaali intensiivsus erinevatel lainepikkustel.

Selgus, et lainepikkusel 400 nm ja 450 nm muutus signaal kõige rohkem, eriti puhta Sephadex geeli korral. Teistel lainepikkustel signaali intensiivsus erinevate lahuses leiduvate osakeste puhul märgatavalt ei muutunud ja suurt valguse hajuvust ei tekkinud. Kuna fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmisel toimusid 520 nm juures, siis 400 nm ja 450 nm juures kõrvalekalded edasisi mõõtmisi ei seganud.

### 3.3. *E. coli* määramine fosfaatpuhvis

*E. coli* määramiseks mõõdeti fluorestsentssignaali intensiivsus lainepikkusel 520 nm. Mõõtmised fosfaatpuhvis viidi läbi kuuel erineval bakteri kontsentratsioonil:  $3 \times 10^1$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  CFU/ml. Lisaks mõõdeti signaal ka puhtas fosfaatpuhvis, kuhu ei olnud *E. coli* lisatud; see signaal vastab süsteemi taustasignaale. Mõõtmistulemustest koostati kalibreerimisgraafik, mis on toodud Joonisel 8.



**Joonis 8.** *E. coli* määramine puhverlahuses (pH 7,20). Toodud tulemused on vähemalt nelja kordusmõõtmise keskmised.

*E. coli* kalibreerimisgraafik oli lineaarne vahemikus  $3 \times 10^1$  kuni  $3 \times 10^6$  CFU/ml ning biosensori määramispiir, mis leiti kui kontsentratsioon, mille vastav signaal oli suurem kui taustasignaali ja selle standardhälbe kolmekordne suhe, oli  $3 \times 10^1$  CFU/ml.

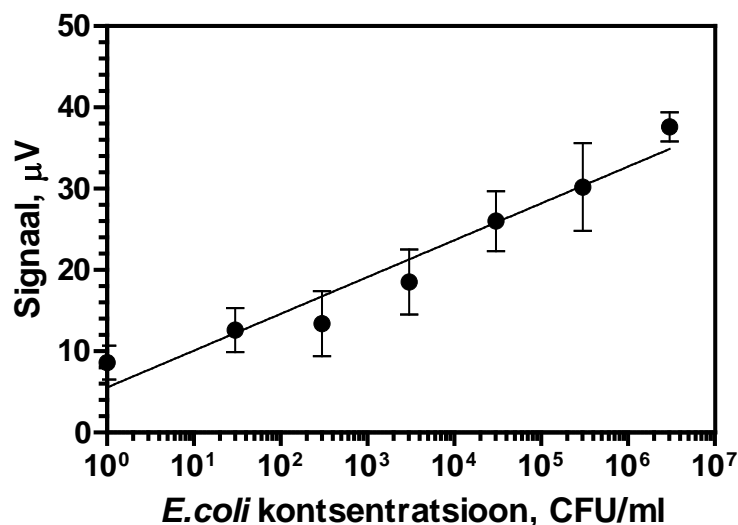
Kalibreerimisgraafiku tõus vahemikus  $3 \times 10^0$  kuni  $3 \times 10^6$  oli  $2,97 \pm 0,33 \mu\text{V} \cdot \text{ml}/\text{CFU}$ .

Süsteemist endast tuleneva taustasignaali väärtuseks saadi  $5,36 \pm 1,31 \mu\text{V}$ , mis on sama kui analoogse *S. aureuse* kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutatud biosensorsüsteemi taustasignaali. Kõrgematel *E. coli* kontsentratsioonidel muutus luminesentsi intensiivsuse sõltuvus *E. coli* kontsentratsioonist mittelineaarseks. [24]

### 3.4. *E. coli* määramine piimas

*E. coli* määramiseks mõõdeti fluorestsentsignaali intensiivsus lainepikkusel 520 nm. Mõõtmised toorpiimas viidi läbi kuuel erineval *E. coli* kontsentratsioonil:  $3 \times 10^1$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  CFU/ml. Lisaks mõõdeti signaal ka puhtas piimas, kuhu *E. coli* baktereid ei lisatud; see signaal vastas süsteemist ning piima maatriksist tulenevale taustasignaali.

*E. coli* kalibreerimisgraafik toorpiimas on toodud Joonisel 9.



**Joonis 9.** *E. coli* kalibreerimisgraafik piimas. (pH 7,20) Toodud tulemused on vähemalt nelja kordusmõõtmise keskmised.

Joonisel 9. on näha, et *E. coli* kalibreerimisgraafik oli lineaarne vahemikus  $3 \times 10^1$  kuni  $3 \times 10^6$  ning *E. coli* määramispiir piimas, mis leiti, kui kontsentratsioon, mille vastav signaal oli suurem kui taustasignaal ja selle standardhälbe suhe, oli  $3 \times 10^1$  CFU/ml. Kalibreerimisgraafiku tõus vahemikus  $3 \times 10^1$  kuni  $3 \times 10^6$  oli  $4,53 \pm 1,93 \mu\text{V} \cdot \text{ml}/\text{CFU}$ . kõrgematel kontsentratsioonidel muutus sõltuvus mittelineaarseks.

Taustasignaali suuruseks piimaproovides saadi  $5,54 \pm 1,93 \mu\text{V}$ , mis on sama puhverlahuse jaoks saadud taustasignaali. Seega võib öelda, et antud mõõtesüsteemi piima maatriks ei mõjuta.

Võrreldes kalibreerimisgraafikute tõuse piimas ja puhverlahuses selgus, et piimas on tõus 1,5 korda suurem, kui puhverlahuses. Samas on suurem ka selle määramatus. See võib tuleneda sellest, et toorpiimas võis juba eelnevalt olla mingi kogus *Escherichia coli* bakterit. Kuna *E. coli* bakteri poolestusaeg piimas on  $25^\circ\text{C}$  juures 120 minutit, siis see mõõtetulemusi ei mõjuta. [26]

*E. coli* määramispiir toorpiimas oli  $3 \times 10^1$  CFU/ml. Vastavalt Euroopa komisjoni määrusele Nr. 2073/2005 on toorpiimas *E.coli* patogeenide lubatud sisaldus  $<10$  CFU/g (määratud ISO standardi 16649-1 või 16649-2 alusel). Seega on väljapakutud biosensorsüsteemi tundlikkus samas suurusjärgus ning vajaliku määramispiiri saamiseks oleks ilmselt vajalik suurendada analüüsitava proovi suurust.

## KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli antigeen/antikeha vastastiktoimel ja mikrograanulite voogsisestusanalüüsil põhineva biosensorsüsteemi konstrueerimine ja uurimine *E. coli* bakteri määramiseks puhverlahuses ja toorpiimas.

*Escherichia coli* sidumiseks proovist ja kontsentreerimiseks kasutati inimese IgG fc-fragmendiga aktiveeritud Sephadex geeli, millest moodustati mõõtesüsteemi ühekordsed mikrokolonnid. Seondunud patogeeni detekteerimiseks kasutati FITC'ga märgistatud *E. coli* vastast sekundaarset küüliku IgG antikeha.

Töös uuriti erineva lainepikkusega valguse hajumist mõõtesüsteemis ning koostati kalibreerimisgraafikud *E. coli* määramiseks puhverlahuses ja toorpiimas. Saadud kalibreerimisgraafikud olid lineaarsed vahemikes  $3 \cdot 10^0$ -  $3 \cdot 10^6$  CFU/ml. Kalibreerimisgraafiku tõus toorpiimas oli 1,5 korda suurem, kui puhverlahuses. Biosensorsüsteemist tulenev taustsignaal oli ühesugune nii puhverlahuses kui piimas vastavalt  $- 5,36 \pm 1,31 \mu\text{V}$  ja  $5,54 \pm 1,93 \mu\text{V}$ .

Antud töös kirjeldatud tehnoloogiat patogeeni määramiseks on võimalik kasutada *Escherichia coli* kiireks ja täpseks määramiseks toorpiima proovides. Kui seda tehnoloogiat edasi arendada ja täiendada, siis on võimalik seda kasutada mitme erineva patogeeni samaaegseks tuvastamiseks. Suurendades analüüsitavate proovide koguseid on võimalik alandada ka määramispiiri.



## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Mortari A., Lorenzelli L., Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review, *Biosensors and Bioelectronics* 60 (2014) 8-21.
2. Bentley R. and Meganathan R., Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol. Rev.* 1982, 46(3):241.
3. Fujioka M., Otomo Y. and Ahsan C. R., A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*, *Journal of Microbiological Methods*, 92(2013)289-292.
4. Lehtolainen T., *Escherichia coli* mastitis Bacterial factors and host response, Helsinki 2004.
5. Regenhard P., Petzl W., Zerbe H., Sauerwein H., The antibacterial psoriasin in induced by *E. coli* infection in the bovine udder, *Veterinary Microbiology* 143 (2010) 293-298.
6. Farrokh C., Jordan K., Auvray F., Glass K., Oppegaard H., Raynaud S., Thevenot D., Condron R., De Reu K., Kovaris A., Heggum K., Heyndrickx M., Hummerjohann J., Lindsay D., Miszczycha S., Moussiég S., Verstraete K., Cerf O., Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production, *International Journal of Food Microbiology* 162 (2013) 190–212.
7. Wu S., Chen J., Ai X., Yan Z., Detection of *Escherichia coli* in drugs with antibody conjugated quantum dots as immunofluorescence probes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78–79(2013) 9–13.
8. Kulagina N. V., Shaffer K. M., Anderson G. P., Ligler F. S., Taitt C. R., Antimicrobial peptide-based array for *Escherichia coli* and *Salmonella* screening, *Analytica Chimica Acta* 575 (2006) 9–15.
9. Lazcka O., Del Campo F. J., Munoz F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22, 1205-1217.
10. Kurvits K., *Staphylococcus Aureus*'e määramine bisensorsüsteemiga, magistritöö, Tartu 2010, 37 lehekülge.

11. Banada P. P., Bhunia A. K., Antibodies and immunoassays for detection of bacterial pathogens, Principles of bacterial detection, Biosensors, Recognition Receptors and Microsystem, 2008, pp. 567-602, Springer Science+Business Media, LLC, New York.
12. Edelman P. G., Wang J. Biosensors & Chemical Sensors, Optimizing Performance Through Polymeric Materials, ACS Symposium Series 487, American Chemical Society, Washington, DC 1992.
13. Li D., Feng Y., Zhou L., Ye Z., Wang J., Ying Y., Ruan C., Wang R., Li Y., Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7, analytical Chimica Acta 687 (2011) 89-96.
14. Su X., Li Y., A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7, Biosensors and Bioelectronics volume 19, issue 6, 2004, pages 563–574.
15. Jianwen Z., Zhu W., He F. Sensors and Actuators B: Chemical, Rapidly determining *E.coli* and *P.aeruginosa* by an eight channels bulk acoustic wave impedance biosensor, 107(2005)271-276.
16. [www.biacore.ee](http://www.biacore.ee) viimati alla laetud 13.05.2014.
17. Myszka D. G., He X., Dembo M., Morton T. A., Goldstein B. Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data, Biophysical Journal, 1998, 75, 583–594.
18. Hartwell S. K., Christian G. D., Grudpan K., Bead injection with a simple flow-injection system: an economical alternative for trace analysis, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 9, 2004.
19. Skoog D. A., F. J. Holler, T. A. Nieman, Principles of Instrumental Analysis Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, 1997, p 833.
20. Ruzicka J. CD-ROM: 4<sup>th</sup> Edition of Flow Injection Analysis. [www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com) viimati alla laetud 13.05.2014
21. Rabbany S. Y., Donner B. L., Ligler F. S. Optical immunosensors, Critical Reviews in Biomedical Engineering, 1994, 22(5–6):307–346.

22. Bange A., Halsall H. B., Heineman W. R. Microfluidic immunosensor systems, *Biosensors and Bioelectronics*, volume 20, issue 12, 2005, 2488–2503.
23. [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) viimati alla laetud 28.05.2014
24. Peedel D., Rinken T., Rapid biosensing of *Staphylococcus aureus* bacteria in milk, *Anal. Methods*, 2014, 6, 2642.
25. No.2073/2005.Microbiologicalcriteriaforfoodstuffs.Official Journalofthe European Union.<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32005R2073> viimati alla laetud 28.05.2014.
26. G. H. Joyce, R. K. Hammond and D. C. White, *J. Bacteriol.*, 1970, 104(1), 323–330.

## SUMMARY

### **Immunosensorsystem for the detection of *Escherichia coli***

Eteri Libe

*Escherichia coli* is one of the most common pathogens causing environmental mastitis. Mastitis in dairy cattle leads to big economic losses because of the reduction of milk production and substandard quality. In addition, the treatment costs can be extremely high.

At present, the identification of mastitis-causing pathogens takes 24 - 48 hours using microbiological methods. The application of biosensors enables to determine pathogens in less than 30 minutes, as no pretreatment of milk samples is required.

The aim of the present work was to construct and study a biosensing system based on antigen/antibody biorecognition and bead injection analysis to detect *E. coli* bacteria in buffer solution and raw milk.

Sephadex G-50 gel, activated with human IgG Fc fragment was used to bind and concentrate *Escherichia coli*. For the detection of bound pathogen we used a secondary rabbit IgG antibody, conjugated with a fluorescence marker (FITC).

Light scattering in the measurement system was characterized at different wavelengths. It was found, that at 520 nm, the wavelength of emission of FITC, there was no scattering of light caused by the system itself.

Calibration graphs were constructed for *E. coli* in milk and in buffer solution. Calibration graphs were linear between  $3 \cdot 10^0$  -  $3 \cdot 10^5$  CFU/ml. The slope of calibration graph in raw milk was 1,5 times bigger than in buffer. The background signal from biosensor system was same in buffer and in raw milk –  $5,45 \pm 1,62 \mu\text{V}$ .

The technology described in the present work for the detection of *E. coli* has potential to be developed for the rapid and simultaneous detection of several pathogens in raw milk.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Eteri Libe,

(sünnikuupäev: 31.03.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„IMMUNOSENSORSÜSTEEM *ESCHERICHIA COLI* MÄÄRAMISEKS“,

mille juhendajad on Delia Peedel ja Toonika Rinke,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2014