

SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:
B2/MS-TOX

**Identifikace proteinových toxinů (ricinu, abrinu a viscuminu)
pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní metodou LC-MS**

RNDr. Michal Dřevínek, Ph.D.

Realizační výstup projektu MV ČR „Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury“ číslo VF20112015013.

Oponenti: RNDr. Martin Štícha, PřF UK Praha
RNDr. Hana Kubátová, Ph.D., SÚJB Praha

2015

SÚJCHBO, v.v.i.	Název metodiky: Identifikace proteinových toxinů (ricinu, abrinu a viscuminu) pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní metodou LC-MS		Označení metodiky B2/MS-TOX
Normativní odkaz:		-	
Verze metodiky	01	počet stran:	8
Počet řízených výtisků:	2	Distribuce výtisků:	výt. č. 1 - LBMO výt. č. 2 - kanc. Ústavu
		+ umístění aktuální verze na intranetu SÚJCHBO, v.v.i.	
Řídí:	vedoucí LBMO SÚJCHBO, v.v.i.		
Autor metodiky:	RNDr. Michal Dřevínek, Ph.D. SÚJCHBO, v.v.i. - odbor biologické ochrany, Laboratoř biologického monitorování a ochrany		
Metodiku schválil:	RNDr. Josef Břínek, Ph.D. zast. vedoucí odboru BO SÚJCHBO, v.v.i.		
	MUDr. Stanislav Brádka, Ph.D. ředitel SÚJCHBO, v.v.i.		

Metodika zavedena dne:	12. 12. 2014	
Platnost metodiky:	neomezeně	

Interval přezkoumávání metodiky:	2 roky				
Termín:	2016	2018	2020	2022	2024
Přezkoumal:					

Obsah

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ.....	6
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	6
5. POUŽITÁ LITERATURA	6

1. CÍL METODIKY

Hlavním cílem metodiky je poskytnout zejména inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti vysoce rizikových biologických toxinů abrinu, ricinu a viscuminu ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost identifikace abrinu, ricinu a viscuminu např. v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Jedná se o novou metodiku, která je zaváděna z důvodu potřeby rychlé identifikace vysoce rizikových biologických toxinů proteinové povahy (ricinu, abrinu a viscuminu), uvedených v Příloze č. 1 vyhlášky č. 474/2002 Sb., metodou LC-MS.

Identifikace je založena na LC-MS analýze specifických sekvencí peptidů získaných trypsinovým štěpením proteinových toxinů.

2.1. Chemikálie a spotřební materiál

FA (kys. mravenčí), ACN (acetonitril), MeOH, CHCl₃, guanidin.HCl, Tris.HCl, EDTA, DTT (dithiothreitol), jodoacetamid, NH₄HCO₃, trypsin

Amicon MWCO 10000 filtr

2.2. Vzorkování (odběry vzorků, zásady odběru, plán odběru, podmínky transportu, konzervace, příprava k analýze)

Tato metoda je vyvinuta pro identifikaci toxinů ve vzorcích doručených do stacionárních laboratoří SÚJCHBO. Vzorkování není tedy součástí této metody, ale metody zabývající se strategií vzorkování pro stacionární laboratoře SÚJCHBO.

2.3. Přístroje a pomocná zařízení

Pipety, chladnička, třepačka, centrifuga, termostat, LC-MS systém (Agilent 1200 - HCTultra)

2.4. Příprava vzorku pro měření na hmotnostním spektrometru

K 500 µl vzorku se přidá 300 µl pufru (6M guanidin.HCl, 100mM Tris.HCl, 5mM EDTA), směs je přenesena na Amicon filtr a odstředěna při 12000 rpm po dobu 1 hod. K redukovanému objemu na filtru se přidá 100 µl 100mM DTT ve 100mM NH₄HCO₃ a směs se nechá inkubovat při 56°C po dobu 1 hod. Směs na filtru je poté opět odstředěna a alkylována působením 100 µl 300 mM jodoacetamidu při 25°C po dobu 30 min v temnu. Vzorek je poté opět odstředěn, 2x promyt 200 µl 50mM NH₄HCO₃ v 5% ACN, přidáno dalších 100 µl tohoto pufru s 0,2 µg trypsinu a směs ponechána v termostatu při 37°C přes noc. Po ukončení digesce jsou peptidy odstředěny při 12000 rpm po dobu 1 hodiny, filtr

promyt 50 µl 0,1% FA v 30% ACN a 50 µl 60% ACN. Peptidy jsou následně vysušeny ve vakuu a rozpuštěny v 30 µl 0,1% FA v 2% ACN, čímž jsou připraveny k LC-MS analýze.

2.5. Akvizice spekter a vyhodnocení analýzy

Parametry měření - HCTultra:

Metoda: MD_peptTOX.par
Rozsah: 250-3000 Da
Polarita: pozitivní
Mod: multiple SIM

Separace – Agilent 1200:

Kolona: Zorbax SB-C18 150x2,1mm
Gradient mobilní fáze: 5 – 60% ACN / 40 min
Průtok: 150 µl/min

Vyhodnocení:

Zjištění přítomnosti sady charakteristických peptidických fragmentů:

Druh	Fragment	m/z (Da)
<i>abrin</i>	DGMCVDVYDNGYHNGNR	1929,0
	QIILWPYTGKPNQIWLTLF	2331,8
	TLVIIQMVAEAAR	1527,9
<i>ricin</i>	QYPIINFTTAGATVQSYTNFIR	2505,3
	YTFAFGGNYDR	1310,6
	WQIWDNGTIINPR	1612,8
<i>viscumin</i>	QNQDQCLTCGR	1265,5
	WALYGDGSIRPK	1362,7
	FNPIILWR	945,5

2.6. Validace

Metoda byla ověřena na panelu intralaboratorních slepých testů a v případě ricinu i v mezinárodních mezilaboratorních srovnávacích testech organizovaných v rámci EU projektu EQuATox (Establishment of Quality Assurance for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk).

2.7. Bezpečnost při práci

Vzhledem k potenciálně vysoké toxicitě vzorků je třeba provádět veškeré práce až do ukončení procedury trypsinového štěpení v laminárním boxu za použití ochranných pomůcek (rukavice, ochranný štít, příp. respirátor).

2.8. Nebezpečné odpady a jejich likvidace

Veškerý odpad je třeba považovat za potenciálně nebezpečný a zajistit jeho likvidaci ve spalovně.

3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do doby zavedení této metodiky byla v oblasti analýzy toxinů v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (dále jen LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (dále jen SÚJCHBO) využívána pouze metoda pro detekci ricinu založená na základě specifických protilátek proti ricinu (RAMP). Metody identifikace uvedených toxinů nebyly do této doby k dispozici.

Inovační aspekt této metodiky tkví ve využití kombinace specifických sekvencí peptidů charakteristických pro sledované toxiny. Byla tak vyvinuta nová originální metoda identifikace pro ricin, abrin a viscumin.

V rámci jednoho LC-MS experimentu je možno identifikovat přítomnost cílových toxinů ve vzorku (ať už jednotlivě, nebo ve směsi) bez nutnosti použití specifických reagensů (protilátek).

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO při plnění úkolů státního dozoru SÚJB v oblasti zákazu biologických zbraní pro zmíněné toxiny.

Metodika bude využívána pro potřeby dozoru nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb., konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti abrinu, ricinu a viscuminu ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k identifikaci toxinů ricinu, abrinu a viscuminu pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedených toxinů v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.). Nicméně metodiku lze využít i v laboratořích orgánů ochrany veřejného zdraví, vybavených odpovídající instrumentací.

5. POUŽITÁ LITERATURA

F. Becher, E. Duriez, H. Volland, J.C. Tabet, E. Ezan: Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal Chem*, 79 (2007):659–665

V.L.H. Bevilacqua, J.M. Nilles, J.S. Rice, T.R. Connell, A.M. Schenning, L.M. Reilly, et al.: Ricin activity assay by direct analysis in real time mass spectrometry release detection of adenine release, *Anal Chem*, 82 (2010):798–800

E. Duriez, F. Fenaille, J.C. Tabet, P. Lamourette, D. Hilaire, F. Becher, et al.: Detection of ricin in complex samples by immunocapture and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J Proteome Res*, 7 (2008):4154–4163

Tonevitsky AG, Marx U, Agapov I, Moisenovich M.: Detection of isolated mistletoe lectin chains in plant extracts. *Arzneimittelforschung*. 2002;52(1):67-71.

Hussein F, Daniels R.: Improvement of an enzyme linked lectin assay to determine recombinant mistletoe lectin I. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Jan 17;43(2):758-62