**Nanoinkapsulacija BMK**

**Cilj:** nanoinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata egzopolisaharida i S-proteina, kao i njihovih purificiranih terapijskih biomolekula, „layer by layer“ metodom, primjenom otopine polielektrolita koja će sadržavati poli (dialil-dimetil-amonij klorid) (PDDA; kationski polielektrolit) i natrijev polistiren sulfonat (PSS; anionski polielektrolit); liofilizacija nanokapsula i ispitivanje njihove stabilnosti tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta (GIT), primjenom RAPD metode

**Princip:** stanice BMK su negativno nabijene pa nanoinkapsulacija započinje dodatkom kationskog polielektrolita (PDDA), a zatim anionskog (PSS)

**Literatura:** Franz i sur. (2010)

**Radni mikroorganizmi:** *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1 i D12

**Potrebno**

- 6 x 50 mL MRS bujona (za svaku BMK)

- 6 x 250 mL MRS bujona (za svaku BMK)

- 0,5 L PSS (2 mg/mL)

- 0,5 L PDDA (2 mg/mL)

- 10 x 300 mL destilirane vode

- 100 mL obranog mlijeka (10 %)

- sterilne Falconice (15 i 50 mL)

- sterilni tipsevi

- sterilne pencilinike i čepovi

- 50 MRS agar ploča

**Nanoinkapsulacija**

**25.03.2023.**

**-** sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 50 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**26.03.2023.**

**-** sojeve *L. fermentum* MC1 i D12 te *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 precijepiti u 250 mL svježeg MRS bujona i staviti na anaerobnu prekonoćnu inkubaciju na 37 °C

**27.03.2023.**

- 300 mL prekonoćne kulture BMK sojeva centrifugirati (4200 o/min, 5 min), stanice isprati s 25 mL sterilne deionizirane vode

- uzeti uzorak za mjerenje zeta potencijala (uzeti 100 µL; 20 µL uzorka pomiješati s 2 mL destilirane vode i izmjeriti zeta potencijal; IRB, Tanja Jurkin)

- 10 mL uzorka odvojiti da imamo kontrolu (slobodne stanice)

- centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i stanice (talog) resuspedirati s 15 mL pozitivno nabijene otopine polimera (PDDA; 2 mg/mL) te inkubirati 10 min

- suspenziju centrifugirati i talog stanica isprati 2 puta sa sterilnom deioniziranom vodom (15 mL)

- uzeti uzorak za mjerenje zeta potencijala (uzeti 100 µL; 20 µL uzorka pomiješati s 2 mL destilirane vode i izmjeriti zeta potencijal)

- centrifugirati (4200 o/min) i stanice resuspedirati s 15 mL negativno nabijene otopine polimera (PSS; 2 mg/mL) te inkubirati 10 min

- suspenziju centrifugirati i talog stanica isprati 2 puta s deioniziranom vodom → PRVI SLOJ

- uzeti uzorak za mjerenje zeta potencijala (uzeti 100 µL; 20 µL uzorka pomiješati s 2 mL destilirane vode i izmjeriti zeta potencijal)

- postupak ponoviti do željenog broja slojeva → 3 SLOJA!

- konačno, dobije se 15 mL nanoinkapsuliranih (3 sloja) i 10 mL slobodnih stanica (kontrola)

- napraviti razrjeđenja i odrediti CFU/mL nanoinkapsuliranih i slobodnih stanica (do 108 raz.)

**29.03.2023.**

- izvaditi ploče iz inkubatora i prebrojati kolonije

**Liofilizacija**

**27.03.2023.**

- po 1 mL slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica centrifugirati i resuspendirati u 1 mL obranog mlijeka (za liofilizaciju, ŽS, GIT u dvije paralele), pa rasporediti u penicilinke

- zamrznuti na -80 °C

**28.03.2023.**

- liofilizirati

**29.03.2023.**

- uzorake označene s liofilizacija (1) resuspendirati u 1 mL destilirane vode i prebaciti u epice → za svaki soj imamo po dvije epice (za izolaciju DNA)

**Preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a (nakon liofilizacije)**

**29.03.2023.**

- u penicilinke s oznakama „ŽS“ i „GIT“ dodati 3 mL simuliranog želučanog soka, inkubirati 2h pri 37 °C

- nakon 2h sve prebaciti u Falconice od 15 ml

- uzorke ŽS centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i talog isprati u destiliranoj vodi (1 mL) dva puta → za svaki soj imamo po dvije epice (za izolaciju DNA)

- uzorke GIT centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i talog resuspendirati u 3 ml simuliranog soka tankog crijeva, inkubirati 4h pri 37 °C; nakon 4h uzorke centrifugirati (4200 o/min, 5 min) i isprati u destiliranoj vodi (1 mL) dva puta → za svaki soj imamo po dvije epice (za izolaciju DNA)

**Određivanje stabilnosti liofiliziranih nanokapsula nakon prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a RAPD metodom**

**Izolacija DNA**

**03.04.2023.**

- uzorke namijenjene za RAPD centrifugirati i talog resuspendirati u 480 µL 50 mM EDTA i prebaciti čitav sadržaj u epice

- dodati 120 µL otopine lizozima (10 mg/mL), lagano pipetirati dok se ne resuspendira talog i inkubirati uzorak u vodenoj kupelji na 37 °C 30-60 min

- centrifugirati 2 min na 13000-16000 g i ukloniti supernatant

- dodati 600 µL Nuclei Lysis Solution i lagano pipetirati dok sve stanice ne budu resuspendirane

- inkubirati u vodenoj kupelji na 80 °C 5 min kako bi se lizirale stanice a zatim ohladiti na sobnoj temperaturi

- dodati 3 µL RNAse Solution staničnom lizatu i rukom okrenuti epicu 2-5 puta da se izmiješaju

- inkubirati na 37 °C u kupelji 15-60 min te ohladiti uzorak na sobnoj temperaturi

- dodati 200 µL Protein Precipitation Solution staničnom lizatu i vorteksirati na visokoj brzini 20 sekundi

- inkubirati uzorke na ledu 5 minuta

- centrifugirati na 13000-16000 g 3 minute

- prebaciti supernatant koji sadrži DNA u čistu epicu od 1.5 mL u koju je prethodno dodano 600 µL izopropanola sobne temperature\*

- nježno izmiješati okretanjem epice dok ''konci'' DNA ne formiraju vidljivu masu

- centrifugirati 2 min na 13000-16000g

- pažljivo odliti supernatant i osušiti epicu na čistom apsorbirajućem papiru

- dodati 600 µL 70 % etanola sobne temperature i nježno okretati epicu nekoliko puta da se ispere talog DNA

- centrifugirati 2 min na 13000-16000 g i ukloniti etanol aspiracijom ili pipetmanom

- osušiti tubice na čistom apsorbirajućem papiru i ostaviti 10-15 min otvorene epice da se talog osuši na zraku

- dodati 100 µL DNA Rehydration Solution u epicu i rehidrirati DNA inkubacijom 1h na 65 °C u kupelji. Za to vrijeme nekoliko puta promiješati otopinu lupkanjem epice. Alternativno, DNA se može rehidrirati i inkubacijom preko noći na sobnoj temperaturi ili na 4 °C

- izmjeriti koncentracije DNA pomoću Biocpec-nano uređaja (Shimatzu, Japan) i pohraniti DNA na 2-8 °C

\* malo supernatanta može ostati u epici koja sadrži proteinski pelet. Bolje je ostaviti to u epici da se spriječi kontaminacija otopine DNA s istaloženim proteinima

**RAPD (M13 početnice)**

**04.04.2023.**

- uzorci prije nanoinkapsulacije (oznaka P) te nakon liofilizacije i simuliranih uvjeta GIT-a (oznaka 3) → ukupno **18 uzoraka**

**05.04.2023.**

- PCR reakcija s M13 početnicama → ukupno 19 uzoraka (18 uzoraka + negativna kontrola)

- pripremiti 1 %-tni agarozni gel:

1. gel → St, K, MB1 (P), MB1 (S, 3), MB1 (N, 3), MB2 (P), MB2 (S, 3), MB2 (N, 3), MB13 (P), MB13 (S, 3), MB13 (N, 3), MB20 (P), MB20 (S, 3), MB20 (N, 3), MC1 (P), MC1 (S, 3), MC1 (N, 3), D12 (P), D12 (S, 3), D12 (N, 3)

\* oznake: St (standard), K (kontrola), P (početno), 3 (nakon GIT-a), S (slobodne stanice), N (nanoinkapsuilarne stanice)

**Reakcijska smjesa (25 µL) → 25 UZORAKA**

voda 10 µL → 850 µL

EmeraldAmp 12,5 µL → 1062,5 µL

početnica M13 0,5 µL → 42,5 µL

kalup 2 µL

- negativna kontrola ne sadrži DNA, već vodu

- PCR reakcija: početna denaturacija DNA pri 94 °C tijekom 1 min, 35 ciklusa denaturacije pri 94 °C tijekom 1 min, sparivanja početnica pri 40 °C tijekom 20 s i sinteze komplementarnih lanaca 80 s pri 72 °C, a zatim 5 min završne elongacije pri 72 °C

**06.04.2023.**

- dobivene PCR produkte razdvojiti DNA elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu pri 60 V, pri čemu se kao standard korišti smjesa 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder

- prebaciti gelove u otopinu za bojanje pola sata (Diamond boja:1x TAE pufer=1:10000)

- slikati gel