

IDENTIFIKACE METALOPROTEINŮ A STANOVENÍ JIM PŘÍSLUŠNÝCH KOVOVÝCH SPECIÍ

Hana Ovadová, Tomáš Vaculovič, Viktor Kanický, Jan Havliš

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita

Kotlářská 2, 611 37 Brno

E-mail: Hana.Ovadova@seznam.cz

Úvod

Kovové ionty hrají důležitou roli v biologické aktivitě. Studování kovových specií v lidských tkáních je nezbytné pro porozumění jejich esenciálním, toxickým, a biochemickým dopadům na biologické systémy. Mezi biomolekuly obsahující kovové specie se řadí i metaloproteiny. Bylo odhadnuto, že kolem 40 % proteinů a enzymů obsahuje ve své struktuře kovové ionty¹. Metaloprotein, složená bílkovina, obsahuje ve své molekule kovový iont jako kofaktor nebo prostetickou skupinu. Z analytického hlediska je tvořen ze dvou částí, z apoproteinu a kovové specie, které je třeba stanovit paralelně beze ztrát informací. Interakce, ke kterým dochází mezi proteinem a kovovým iontem, by měly být zachovány v průběhu manipulace se vzorkem. Separace nekovalentních komplexů, např. kovových komplexů s proteiny, vyžaduje nedenuroující podmínky separace. Mezi metody pro separaci proteinů patří gelová elektroforéza (GE). GE v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS) nebo GE při vysokém napětí vedou pravděpodobně ke ztrátě kovového iontu během takové separace². Metalomický analytický přístup (MAA) zabývající se metaloproteiny, se skládá ze tří částí i) selektivní složky – separace, ii) citlivé složky – prvkového detektoru, iii) strukturní složky – molekulově specifického detektoru³⁻⁵. GE jako selektivní složka se velmi dobře kombinuje s LA ICP-MS (laserová ablace s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu) jako citlivou složkou i se strukturní složkou MALDI TOF MS.

Cílem této práce bylo studovat podmínky separace GE v nedenuroujícím prostředí, z důvodu zachování vazby kovového iontu a proteinu, dále optimalizovat spojení off-line metody GE s LA ICP-MS na modelovém analytu kov vázícího proteinu.

Experimentální část

Chemikálie

Pro GE byly používány chemikálie zakoupené od firmy Bio-Rad, (Philadelphia, USA) o čistotě ACS. Barvicí činidlo CBB R-250 bylo vyrobeno firmou Serva (Heidelberg, Německo). Ostatní použité chemikálie byly od firmy Lachema a Sigma o čistotě ACS.

Modelové vzorky

Nativní GE byla studována pomocí proteinů získaných od firmy Sigma (Steinheim, Německo), BSA - hovězí sérový albumin, cytochrom C - z koňského srdce, ribonukleasa - z hovězí slinivky břišní, inzulin - z hovězí slinivky břišní a myoglobin - koňský. Lysozym - ze slepičího bílku byl vyroben firmou Fluka (Buchs, Švýcarsko).

Gelová elektroforéza

GE byla uskutečněna pomocí přístroje Mini-Protean[®] 3 Cell od firmy Bio-Rad (Philadelphia, USA) dle Orstein-Davise⁶⁻⁷. Používal se koncentrační gel o zesílení 4 % a separační gel o 8 % zesílení. Pro zakoncentrování vzorku bylo použito napětí 100 V po dobu 10 minut a separace trvala 30 minut při 200 V.

Laserová ablace

K předběžnému studiu chování gelu a k analýze modelového vzorku byl použit nanosekundový Nd:YAG laser (New Wave, USA) pracující při vlnové délce 213 nm s délkou pulzu 4 ns a frekvencí 20 Hz. Laserové záření bylo zaostřováno na povrch vzorku a velikost ozářené plochy je vybírána pomocí clon. Pro studium chování gelu byla její velikost 110 μm a hustota zářivého výkonu se měnila v rozsahu od 0,0125 $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$ do 9,25 $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Hustota zářivého výkonu laserového záření použitého k ablaci modelového vzorku byla 3 $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Vzorek gelu byl umístěn do ablační cely o objemu 10 cm^3 . Poté byl spuštěn záznam ICP-MS signálu a po 10 vteřinách byla spuštěna i laserová ablace. Ta byla prováděna při rychlosti pohybu ablační cely 50 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Laserem generovaný aerosol gelu byl unášen do ICP-MS spektrometru proudem argonu o průtoku 1,30 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. ICP-MS spektrometr zaznamenával signál odpovídající ^{63}Cu a ^{65}Cu .

ICP-MS

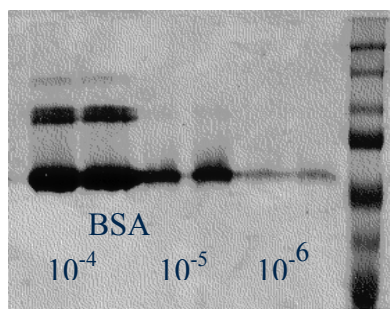
Časově rozlišený záznam hmotnostních spekter byl měřen pomocí ICP-MS spektrometru Agilent 7500 (Agilent Technologies, USA). Podmínky ICP-MS spektrometru byly optimalizovány pomocí standardu NIST 612. Optimalizované podmínky jsou shrnuty v Tabulce I.

Tabulka I : Optimalizované podmínky ICP-MS

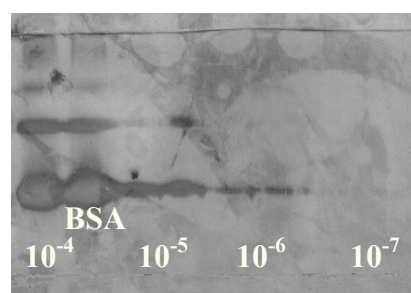
vzdálenost cívky od vstupu do MS	9,4 [mm]	proud nosného plynu	1,3 [l/min]
poloha plazmatu vůči vstupu do MS - H	0 [mm]	výkon generátoru	1410 [W]
poloha plazmatu vůči vstupu do MS - V	0 [mm]	napětí na vstupu	-26 [V]
napětí na iontové čočce 1	4,7 [V]	napětí na výstupu	-44 [V]
napětí na iontové čočce 2	-134 [V]	detektor	duální mód

Výsledky a diskuse

Pro nativní GE se dle separovaných látek volí příslušné podmínky, protože dochází k dělení látek nejen dle velikosti / tvaru ale i dle náboje. Při separaci proteinů s nižším pI (kyselé proteiny) bylo postupováno dle příslušného protokolu⁷. Gel byl vizualizován barvicím činidlem CBB R-250 a Ag. Na obr.1. a obr.2. je znázorněna separace v nativním prostředí s rozdílnými molárními koncentracemi modelového analytu BSA od 10^{-4} mol.l⁻¹ do 10^{-7} mol.l⁻¹ s vizualizací CBB R-250 i Ag. Barevná zóna na gelu značí přítomnost modelového vzorku.



Obr.1. BSA, Vizualizace CBB R-250



Obr.2. BSA, Vizualizace Ag

Při separaci proteinů s vyšší hodnotou pI (zásadité proteiny) bylo postupováno dle návodu⁷. Bylo používáno 10 minut pro zakoncentrování vzorku při 100 V a 45 minut trvala separace při 145 V. Nejprve se volilo vodící činidlo pro indikaci konce separace, protože se při separaci mění směr elektromigrace a bromfenolová modř nemigruje stejným směrem jako zásadité proteiny. Nejlepší vlastnosti vykazovala methylenová modř. Měnila se koncentrace indikátoru čela. Při 0,25% (W/W) byla viditelnost barvy nízká. Při 0,75% (W/W) docházelo k velkému rozmývání indikátoru čela separace. Nejvhodnější byla koncentrace 0,50 % (W/W) indikátoru čela. Při napětí 145 V po dobu separace 45 minut, zásadité proteiny vykazovaly nízký retenční faktor, proto se zvyšovalo napětí na 200 V, 250 V a 300 V a zkracovala se doba separace na 30 minut. Při napětí 250 V nedocházelo k velkému zahřívání aparatury jako při 300 V a migrační vzdálenost byla delší než při 200 V.

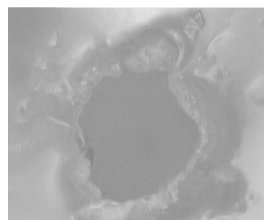
Pro studium chování gelu při laserové ablacii se používaly gely o různém zesílení separačního gelu vizualizovaném Ag nebo CBB R-250 po nativní GE i po SDS GE. Ablatoval

se gel sušený po dobu 24, 48, 120 a 360 hodin. Zesítnění separačního gelu (8 %, 12 %) nemělo vliv na průběh vzniku kráteru. Doba sušení gelu při LA ovlivňovala nejen manipulaci s gelem, ale i vznik kráteru. Průběh a vzniku kráteru se lišil podle toho, zda byl gel obarven nebo ne. Nejpravidelnější krátery byly získány při ablaci gelu obarveného stříbrem. Stav gelu, zda byl suchý či zmražený kapalným dusíkem, vykazoval při ablaci odlišné chování. Se zmraženým gelem se obtížně manipulovalo a záznam a průběh vzniku kráteru byl znesnadněn nadměrným vypařováním vody obsažené v gelu. Průběh ablace gelu získaného po GE v denaturujícím a nedenaturujícím prostředí se neměnil.

Byl studován vliv hustoty zářivého výkonu na tvorbu kráteru a bylo zjištěno, že tento parametr průběh tvorby kráteru ovlivňuje nejvíce. Hustota zářivého výkonu byla měněna v rozmezí od $0,125 \text{ GW}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr.3.) po $9,25 \text{ GW}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr.4.). Pro průběh a vznik kráteru při ablaci gelu byla vybrána hustota zářivého výkonu $3 \text{ GW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Tato hustota byla používaná při LA ICP-MS modelového vzorku BSA saturovaného Cu^{2+} v poměru 1:1 ($1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)



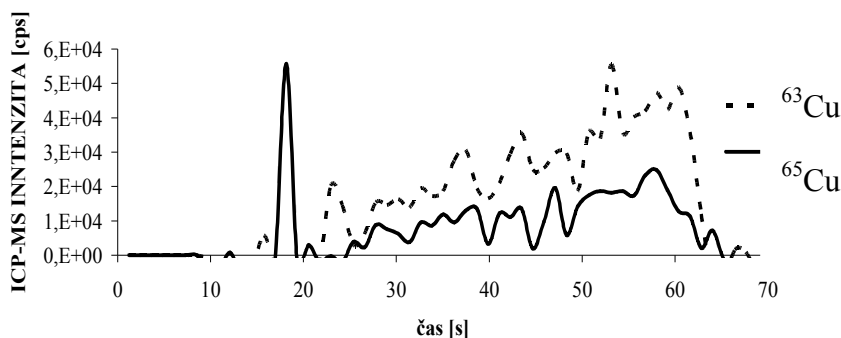
Obr.3. $0,125 \text{ GW}\cdot\text{cm}^{-2}$



Obr.4. $9,25 \text{ GW}\cdot\text{cm}^{-2}$

Gelová separace modelového vzorku BSA saturovaného Cu^{2+} v poměru 1:1 ($1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byla provedena v denaturujícím i v nedenaturujícím prostředí. V obou případech byl použit 4% koncentrační gel a 8% separační gel. Bylo použito 100 V pro zkoncentrování vzorku po dobu 10 minut a separace proběhla při napětí 200 V po dobu 30 minut. Gel byl vizualizován barvicím činidlem CBB R-250 i Ag a sušen mezi fóliemi 24 hodin. Při LA ICP-MS byl pozorován signál ^{63}Cu a ^{65}Cu ve vybarvené zóně (BSA s Cu^{2+}) a mimo tuto zónu na stejném gelu. Získané signály byly od sebe odečteny a byl získán výsledný signál (Obr.5.).

Vyšší intenzitu má signál ^{63}Cu z důvodu vyššího izotopového zastoupení. Intenzita signálu získaná při LA ICP-MS na vybarvené zóně je 6x intenzivnější než mimo tuto zónu. Z výsledného signálu vyplývá, že v oblasti vybarvené zóny je vyšší obsah Cu^{2+} než v jiné části gelu, což potvrzuje navázání Cu^{2+} na BSA. Intenzita signálu ze zóny by měla být mnohem vyšší (až 100krát) než pozadí.



Obr. č.5. ICP-MS signál ^{63}Cu a ^{65}Cu získaný ablací gelu po nativní GE obarvený Ag

Závěr

Nejnižší koncentrace modelového vzorku BSA, kterou lze použít vzhledem k vizualizaci při nativní GE kyselých proteinů, je 10^{-6} mol.l⁻¹. Pro separaci zásaditých proteinů v nativní GE je nejvhodnějším indikátorem čela separace methylenová modř o koncentraci 0,50% (W/W), dále zvýšené napětí na 250 V po dobu separace 30 minut.

Pro LA ICP-MS modelový analyt BSA saturovaný Cu^{2+} nelze použít z důvodu vysokého signálu Cu^{2+} mimo jeho separační zónu. Pro další analýzy se musí modelový analyt BSA saturovat Co^{2+} , u kterého se předpokládají nižší izobarické interference a nižší hodnota pozadí ve srovnání s Cu^{2+} .

Dalším úsilím naší práce bude uskutečnit separaci zásaditých proteinů odlišným postupem, v modré nativní gelové elektroforéze (BN PAGE)⁸, optimalizovat podmínky LA ICP-MS ve spojení s GE a nakonec separace metaloproteinů a následná analýza získaných zón v gelu pomocí LA ICP-MS.

Poděkování

Práce na tomto příspěvku byla financována grantem MSM0021622413.

Literatura

1. J. S. Garcia, C. Schmidt de Magalhães, M. A. Zezzi Arruda, *Talanta* (2006), 69, 1–15
2. Joanna Szpunar, *The Analyst* (2005), 130, 442–465
3. J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo and Ana Arias, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (2005), 85, 255–266
4. J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M.J. Villegas, V. Oliveira, *Analytica Chimica Acta* (2004), 524, 15–22
5. Juan López-Barea and José Luis Gómez-Ariza, *Proteomics* (2006), 6, S51–S62
6. Ornstein, L. and Davis, B. J., *Anal. NY Acad. Sci.*, 121, 321 (1964)
7. [http://researchlink.labvelocity.com/protocols/protocol.jhtml;\\$sessionid\\$RHDELSYA-AAWOQCQBAT3SFEQ?sourceId=25&path=0%7C30%7C32%7C50&nodeId=50&id=2164](http://researchlink.labvelocity.com/protocols/protocol.jhtml;$sessionid$RHDELSYA-AAWOQCQBAT3SFEQ?sourceId=25&path=0%7C30%7C32%7C50&nodeId=50&id=2164) (10.12.2006)
8. Veronika Reisinger and Lutz Andreas Eichacker, *Practical Proteomics* (2006), 1, 6–15