

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Ústav biochemie

**Kapilární elektroforéza jako nástroj pro
metabolomické studie.**

C6205 - Vybrané biochemické metody - laboratorní cvičení

Brno 2011

Zdeněk Glatz

Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST.....	3
1.1	Metabolomika	3
1.2	Metabolity	3
1.3	<i>In vitro</i> fertilizace	3
1.4	Kapilární zónová elektroforéza.....	4
2	PRAKTICKÁ ČÁST.....	5
2.1	Obecný postup při analýzách	5
2.1.1	Měření opakovatelnosti analýzy za použití dvou různých aditiv.....	8
2.1.2	Volba vhodné koncentrace základního elektrolytu.....	6
3	ZÁVĚR	9

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Metabolomika

Metabolomika je definována jako kvantitativní a kvalitativní analýza všech metabolitů v buňce nebo v organismu za daných fyziologických podmínek. Kompletní sada metabolitů, které se účastní hlavních chemických procesů potřebných pro výživu, růst a normální fungování buňky, se nazývá **metabolom**.

1.2 Metabolity

Metabolity jsou produkty enzymových reakcí a mají důležitou roli při spojování odlišných cest metabolismu. Tyto nízkomolekulární látky se podílejí na reprodukci, růstu i vývoji organismu. Metabolity mají heterogenní vlastnosti, které se projevují zejména ve struktuře funkčních skupin, fyzikálně chemických vlastnostech a koncentraci. Metabolity mohou být například aminokyseliny, anorganické ionty, sacharidy, těkavé alkoholy, ketony a další.

1.3 *In vitro* fertilizace

***In vitro* fertilizace (IVF)**, neboli mimoděložní oplodnění, je nejčastěji užívanou metodou asistované reprodukce, která řeší problém neplodnosti. IVF řeší hlavně problém nepřítomnosti ovulace, neprůchodnosti vejcovodů, mužský faktor neplodnosti (špatná kvalita spermatu), neplodnost spojenou s různými formami hormonálních poruch, imunologické faktory a v neposlední řadě genetické faktory.

Při IVF se nejprve ženě pomocí hormonální stimulace vyvolá zrání vajíček ve vaječnících. Poté se odebrané vajíčko ponechá na misce s fyziologickým roztokem a s kvalitními spermii a následně je na misce oplozeno. Oplodněná vajíčka jsou přenesena do čerstvého kultivačního roztoku a za dalších 24 hodin dochází k vývoji embryí, k dělení buněk (rýhování). Jakmile se vajíčko dostane do osmibuněčného stádia, k tomu dochází kolem 3 dne po oplodnění, nastává fáze „embryotransfer“ tedy zavedení zárodku do dělohy. Velmi kvalitní embrya mohou být uchovávána v mrazícím boxu při -70°C a v případě negativního výsledku z prvního oplození mohou být následně použita.

1.4 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je elektromigrační separační technika. Křemenná kapilára o malém vnitřním průměru je zde naplněna základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém separačním systému. Separace probíhá ve stejnosměrném elektrickém poli, kdy se jednotlivé analyty (ionty) začnou pohybovat. Ionty se stejnou elektroforetickou mobilitou tvoří zóny, které v závislosti na svoji mobilitě putují v kapiláře rozdílnou rychlostí a postupně se od sebe oddělují.



Obrázek 1: Schéma kapilární elektroforézy.

Vlastnosti, pro které je kapilární zónová elektroforéza populární jsou malá spotřeba vzorku a chemikálií, rychlost analýzy, možnost automatizace a „on-line“ detekce.

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Obecný postup při analýzách

Pro všechny analýzy byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 µm. Před prvním použitím kapiláry byla aktivována. Aktivace kapiláry probíhala při 50 °C postupným promýváním: 5 min. H₂O, 10 min. 0,1 M NaOH, 5 min. H₂O a 15 min základním elektrolytem. Další promývání kapiláry již probíhalo při teplotě 25°C. Na začátku každého dne byla kapilára opět podrobena promýváním 5 min. 0,1 M NaOH, 5 min. H₂O a 5 min. základním elektrolytem. Před každou jednotlivou analýzou byla kapilára promývána 1 min. 0,1 M NaOH, 1 min. H₂O, 3 min. BGE a po analýze 2 min. H₂O.

První analýza dne byla požadována za orientační a nebyla zahrnuta do souborů výsledků.

- **Biologický materiál.**

Jako biologický materiál sloužily kultivační média G1 z Centra asistované reprodukce na Obilním trhu v Brně.

- **Příprava vzorku**

Vzorek média G1 byl rozmražen a naředěn 100% acetonitrilem v poměru 1:1. Tato směs byla řádně promíchána pomocí vortexu a centrifugována při 12 100 g po dobu 5 minut. Poté byl supernatant odpipetován do vialky na vzorky a nachystán k analýze.

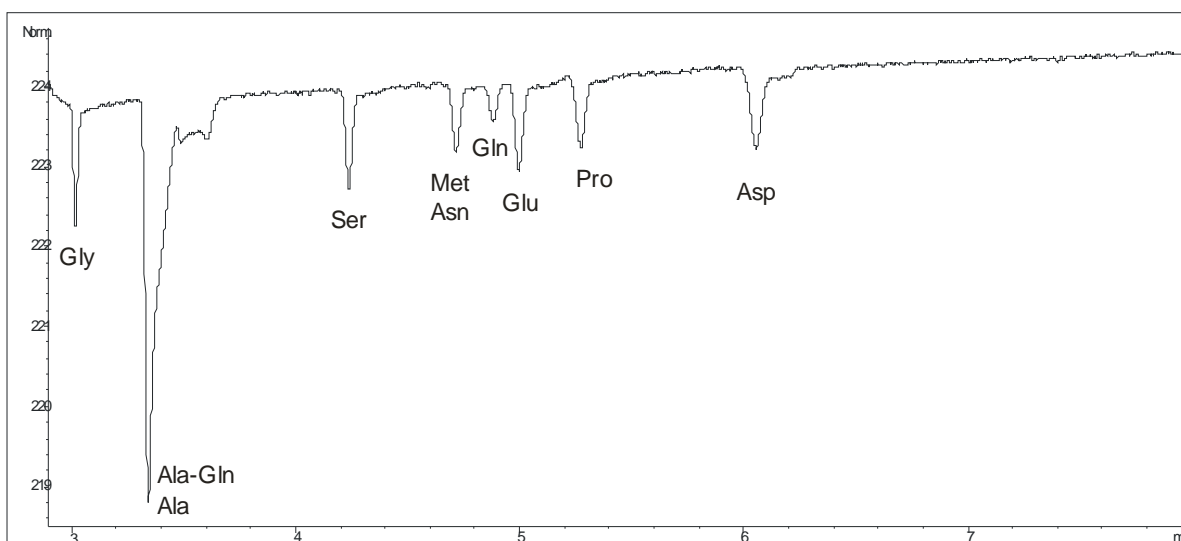
- **Podmínky pro analýzu.**

Podmínky byly zvoleny na základě literatury – P. Coufal (Electrophoresis, 2003, 24, 671 - 677). Jelikož tyto podmínky nebyly pro specifický vzorek – médium G1 – ideální, bylo nutné tyto podmínky zoptimalizovat. Během postupu optimalizace byly podmínky částečně upraveny. Upravené podmínky popisuje Tabulka 1. A schéma separace popisuje následující Obrázek 2.

Optimální separační podmínky pro medium G1.
Křemenná kapilára: vnitřní průměr 50 μ m, celková délka 33,0 cm, efektivní délka 18,3 cm
Základní elektrolyt: 2,3 M kyselina octová, 0,1% HEC
Dávkování: hydrodynamické; 24 s, 50 mbar.
Separací napětí: 30kV, pozitivní polarita
Teplota během separace: 25°C
Detekce: C ⁴ D

Tabulka 1. Optimální separační podmínky.

Pro zlepšení separačních podmínek bylo nadále pokračováno v optimalizacích, a tento postup je popsán v následujících krocích.



Obrázek 2: Schéma separace při zoptimalizovaných podmínkách.

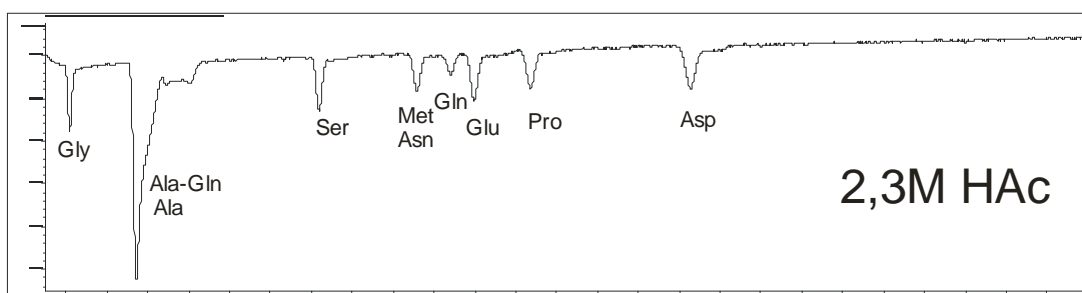
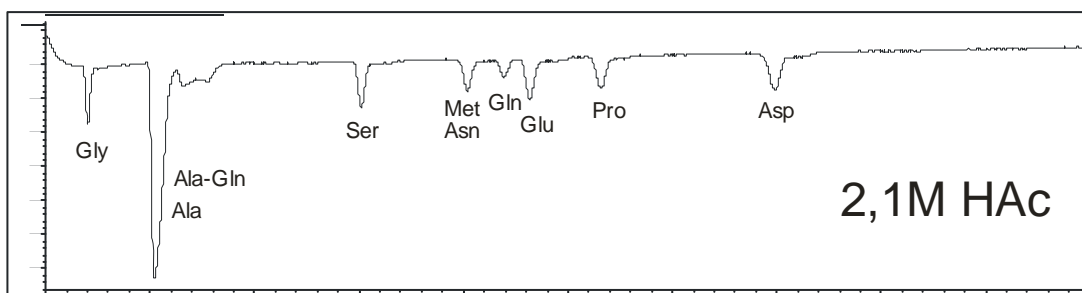
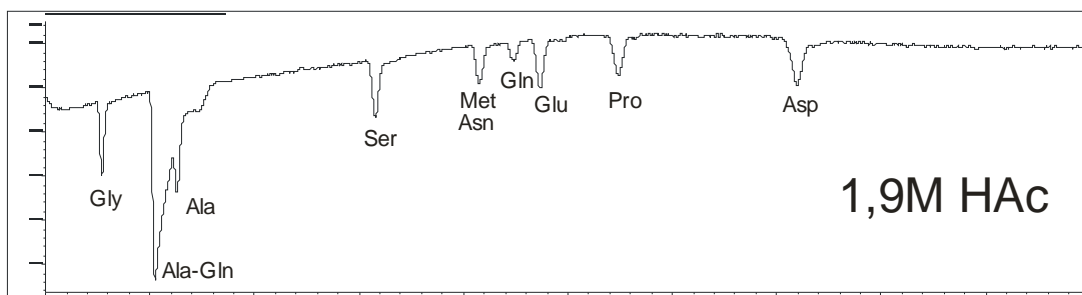
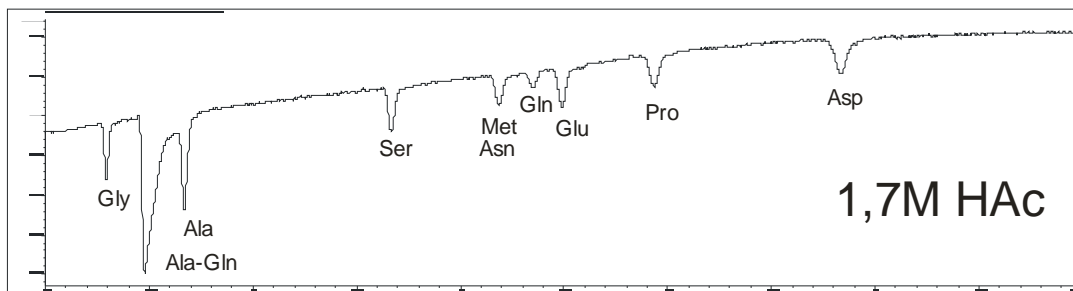
Podmínky: Vzorek: médium G1 bez embrya 2x ředěné ACN
BGE: 2,3M HAc, 0,1% HEC
Parametry: Inj.: 1200 mbar . s, napětí : 30kV, teplota: 25°C, kapilára 33,0 cm, 50 μ m id

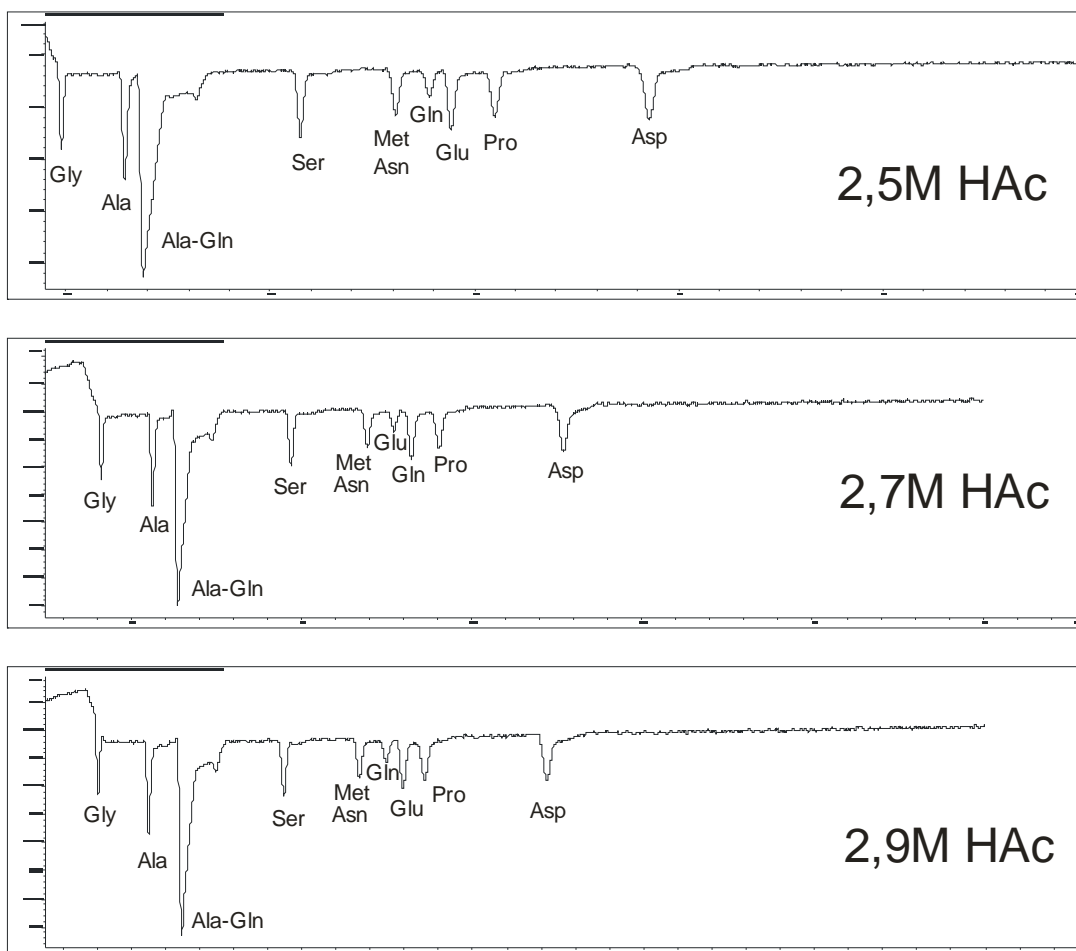
2.1.1 Volba vhodné koncentrace základního elektrolytu

Jelikož při daných podmínkách docházelo ke komigraci píků Ala-Gln s Ala a Asn s Met, nebyly by tyto analyty schopny kvantifikace. Koncentrace základního elektrolytu má vliv na separaci metabolitů, a proto jeho změnou bylo možné zlepšit jejich separaci. Vzorek média G1 bez embrya byl měřen při již zmíněných podmínkách s výjimkou koncentrace kyseliny octové (HAc) v základním elektrolytu, která byla volena v rozmezí 1,7 – 2,9 mM a postupně se zvyšovala o 0,2 mM. K nejlepší separaci docházelo v oblasti koncentrací 2,7- 2,9

mM HAc, kdy byl Ala úplně odseparován od Ala-Gln. Narozdíl od píků Met a Asn, které spolu komigrovaly po celou škálu koncentrací HAc.

Jako výchozí koncentrace byla tedy zvolena 2,7 M HAc.





Obrázek 3 Testování optimální koncentrace HAc

Podmínky: Vzorek: médium G1 bez embrya 2x ředěné ACN

BGE: 1,7 - 2,9 M HAc, 0,1% HEC

Parametry: Inj.: 1200 mbar . s, napětí : 30kV, teplota: 25°C, kapilára 64,5 cm, 50µm id

2.1.2 Měření opakovatelnosti analýzy za použití dvou různých aditiv

Jelikož přidavek viskózních aditiv do základního elektrolytu má pozitivní vliv na opakovatelnost měření, byla tyto aditiva jednotlivě testována. Pro stanovení opakovatelnosti metody byly vybrány dvě různé aditiva, hydroxyethylcelulosa (HEC) v koncentraci 0,1% (w/v) a polyethylenglykol (PEG) v koncentraci 2% (w/v).

Medium G1 bez embrya bylo připraveno dle výše uvedeného postupu a bylo 6krát po sobě analyzováno. Z experimentálně zjištěných hodnot, migračního času a plochy píků, byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (RSD). Statistické vyhodnocení metody popisují tabulky 2 a 3 Jelikož analyty Met a Gln spadají pod limit detekce, nejsou uvedené v následujících tabulkách. Současně píky, které nám částečně komigrovaly (Asn s Met) nebyly do statistiky rovněž započteny.

PLOCHA	Gly	Ala	Ala-Gln	Ser	Glu	Pro	Asp
RSD pro HEC (n = 6) (%)	9,81	12,02	11,20	11,38	20,57	6,52	17,12
RSD pro PEG (n = 6) (%)	11,13	12,65	8,97	12,27	15,52	11,89	10,33

MIGRAČNÍ ČAS	Gly	Ala	Ala-Gln	Ser	Glu	Pro	Asp
RSD pro HEC (n = 6) (%)	1,88	1,86	1,86	1,91	2,04	2,14	2,17
RSD pro PEG (n = 6) (%)	1,18	1,16	1,16	1,19	1,25	1,31	1,34

Tabulka 2 a 3: Statistické vyhodnocení.

Byla testována shodnost dvou metod pomocí Lordova testu. Vzorec, z kterého jsem vycházela je uveden níže. Statistické vyhodnocení popisuje Tabulka 4.

$$u = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{R_A + R_B}$$

ČAS	Gly	Ala	Ala-Gln	Ser	Asn	Glu	Pro	Asp
U_a	3,19	2,69	1,73	2,15	1,74	1,58	1,84	1,53

Tabulka 4. Testování shodnosti metody.

Kritická hodnota Lordova rozdělení pro šest měření je na hladině významnosti 0,05 (95%) je 0,250. Vypočtené hodnoty u_a uvedené v Tabulce 4 jsou všechny větší, než kritická hodnota 0,250. Z toho vyplývá, že mezi metodami je statisticky významný rozdíl. Z hodnot směrodatných odchylek, uvedených v tabulce 2., se jeví jako lepší metoda s použitím 2% PEGu.

3 ZÁVĚR

Během své návštěvy v laboratoři bioanalytického centra v pavilonu A5 v kampusu jsem se seznámila se separační metodou kapilární elektroforéza s kombinací s vodivostním detektorem. Vyzkoušela jsem si práci na již zmíněném přístroji, obeznámila jsem se s řídicím softwarem a podílela jsem se na přípravách vzorku a základního elektrolytu. Dále jsem se seznámila s postupem při optimalizování metody a s řešením problémům při optimalizaci.

Během mé stáže byla měřena opakovatelnost migračních časů a opakovatelnost velikosti ploch píků u dvou různých aditiv – 0,1% HEC a 2% PEG. Jak ukazují Tabulky 2 a 3 RSD opakovatelnosti ploch píku byla u 0,1% HECu menší než 17,5 % a u migračních časů menší než 2,17 %. V metodě s 2% PEGem byla pro plochy píků RDS menší než 15,6 % a u migračních časů RDS nepřesáhla hodnotu 1,5 %.

Byla stanovena optimální koncentrace základního elektrolytu na 2,7 mM HAc s 2% PEGem.