

## Laboratorní cvičení 6.12.2015 – Moderní metody v ekotoxikologii (Metabolity a jejich stanovení)

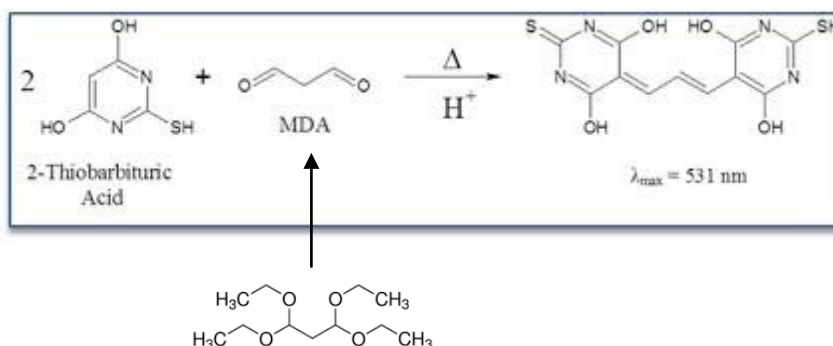
### Stanovení malondialdehydu (MDA) - koncového produktu lipidní peroxidace (LPO) metodou HPLC/DAD v živočišných a rostlinných tkáních jako příklad "metabolite target analysis"

#### Princip:

Malondialdehyd vzniká jako sekundární produkt oxidace polyneenasycených mastných kyselin, je schopen například reagovat s bázemi nukleových kyselin a představuje tak jeden z nejmutagennějších produktů lipidní peroxidace. MDA je využíván jako biomarker peroxidace lipidů (metabolite target analysis), zejména díky jednoduché reakci s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS test). V kyselém prostředí a v přítomnosti antioxidačního činidla vzniká barevný komplex, který se měří spektrofotometricky. Výsledkem je stanovení barevného TBARS produktu (thiobarbituric acid-reactive substances=produkt látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou). Specifitu metody lze zvýšit extrakcí TBARS produktu do butanolu a dále separací TBARS konjugátu pomocí HPLC a analýzou barevného produktu DAD detektorem (Bastos et al., 2012, Luscheck et al., 2005). Metoda stanovení MDA v butanolovém extraktu využívá měření absorpce barevného konjugátu (absorpční maximum 531nm) po separaci HPLC na koloně (C18).

ROS + nenas. mast. kyseliny → MDA

MDA + 2TBA → barevný komplex



#### 1) Homogenizace

#### Postup:

- Vzorky zmražených tkání jsou na ledu **krájeny** skalpelem a **váženy** v mikrozkuvkách na analytických vahách, poté udržovány na **ledu**, aby se zabránilo jejich rozmražení.
- Homogenizace zmražených vzorků živočišných tkání se provádí ve fosfátovém pufru PBS (8g NaCl; 0,2g KCl; 2,9g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ; 0,2g  $KH_2PO_4$  v 1L deionizované vody; pH 7.2) pro všechny typy použitých tkání v adekvátním objemu 300 $\mu$ L PBS/30mg tkáň. Tkáň jsou homogenizovány (homogenizátor Silamat S5, MP Bio) vychlazené s mraženými skleněnými kuličkami po dobu přibližně 2x20s. Homogenizaci u rostlinných tkání předchází nastříhání/krájení a rozmělnění nebo rozdrčení v třecí misce.

## 2) Stanovení MDA (TBARs)

### Chemikálie

TCA 20% kyselina trichloroctová (w/v)[163,39 g/mol]  
BHT 2% butylovaný hydrotoluen (w/v) [220,35 g/mol]  
0,6M HCl [36.4611 g/mol]  
TRIS-TBA (25mM TRIS, 100mM TBA v destilované vodě, pH 7,4)  
Standard MDA (0,22% 1,1,3,3-tetraethoxypropan (w/v) v 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [220,31 g/mol]  
Butanol  
Metanol  
Fosfátový pufr 50mM

### Roztoky

- 1) TCA 20%: (**připraven předem**); 10g TCA/50ml destilované vody; 1g BHT /50ml ethanolu; Poté vzít 0,25ml BHT a rozpustit v 50ml TCA.
- 2)HCl-BHT 0,02%: (**připraven v den stanovení**); 1g BHT /50ml ethanolu; Poté vzít 0,1ml BHT a rozpustit v 10ml 0,6M HCl
- 3) HCl 0,6M: (**připraven předem**); 302,4mg 35% HCl/14ml destilované vody
- 4) TRIS-TBA: (**připraven předem**); 151,2 mg TRIS rozpustit v 30ml destilované vody, poté přidat 720mg TBA, k roztoku poté přidávat pevný NaOH do úplného rozpuštění TBA; Upravit pH na 7,4 a doplnit destilovanou vodou na 50ml
- 5) Standart MDA: (**připravován v den stanovení**)  
11,02 mg 0,22% 1,1,3,3-tetraethoxypropanu rozpustit v 5ml 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2hod inkubovat při pokojové teplotě, poté vyředit na 100 $\mu$ M roztok MDA v 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 6) Fosfátový pufr 50mM (MF A): (**připraven předem**); 4,355g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Mr 174,18 g/mol) rozpustit v 500ml destilované vody a 1,701g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Mr 136,09 g/mol) rozpustit v 250ml destilované vody. Oba roztoky postupně smíchat do výsledného pH7.

### Postup extrakce:

- a) K 100  $\mu$ L **necentrifugovaného**, dobře homogenizovaného vzorku živočišné tkáně je přidáno 150  $\mu$ L PBS a 75 $\mu$ L 20% TCA (**precipitace proteinů**). Pokud analyzujeme rostlinnou tkáň, odebereme 250  $\mu$ L homogenátu a přidáme 75  $\mu$ L 20%TCA. V případě standardu, k 250  $\mu$ L vzorku standardu je také přidáno 75  $\mu$ L 20% TCA. Vzorek je promíchán na vortexu a 20 minut centrifugován při 1500x g a 4°C. Zpracování vzorků i kalibrace se provádí v duplikátu (v rámci cvičení **duplikát být nemusí a kalibrace se také neprovádí**).
- b) Do mikrozkušavky se pipetuje 250  $\mu$ L supernatantu vzorku nebo standardu, 50  $\mu$ L HCl-BHT a 200  $\mu$ L TRIS-TBA a **vaří se** 30-45minut na termobloku při 90 °C. Po ochlazení (může být i prudké v ledové lázni) je k roztoku přidáno 200  $\mu$ L butanolu a vzorek je promíchán, vortexován a následně centrifugován 10 minut při 1500x g a 4°C. Vrchní butanolvá nafialověle zbarvená vrstva bez zbytků vodného roztoku - cca 80-150 $\mu$ L- je přenesena do skleněného inzertu a buď následně analyzována nebo zmrazena při -18°C k analýze LC/DAD (v rámci cvičení se **měří ihned**).

## Postup analýzy:

Analýza obsahu MDA - TBARS ve vzorcích tkáně je provedena s využitím kapalinového chromatografu Agilent 1100 Series. Separace analytu probíhá na koloně Supelcosil ABZ+ (5  $\mu$ m), 250x4,6 mm, stacionární fáze C18) pomocí mobilní fáze: A (50 mM fosfátový pufr, pH 7) a mobilní fáze B (methanol) isokratickou elucí (25% složky B). Průtok 1 ml/min, teplota 30°C. Pro analýzu je nastříkováno 40  $\mu$ L vzorku, blanku, standardu v butanolu ze skleněného insertu ve vialce. Konjugát MDA-TBARS je detekován pomocí detektoru DAD, sledujeme absorbanci v intervalu 400-600 nm a vyhodnocování chromatogramu se provádí při 532 nm (SW HP Agilent Chemstation 1100), retenční čas sledovaného analytu je cca 2.6 minuty. Koncentrace analytu ve vzorku se vyhodnocuje na základě externí kalibrační křivky standardů, které byly zpracovávány stejným postupem jako vzorky.

## Kalibrace MDA: (nebude součástí cvičení)

Kalibrační křivka je připravena v rozsahu 0.1-2 $\mu$ M. **Standard MDA:** 10mM zásobní roztok - 11,02mg (1,1,3,3-tetraethoxypropanu) se rozpustí v 5ml 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, promíchá se a nechá 2 hodiny stát (aby proběhla hydrolýza), poté se roztok vyředí na 100  $\mu$ M roztok MDA v 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ředění 100x) Přesná koncentrace MDA (cca 100  $\mu$ M) se stanoví spektrofotometricky v skleněné kyvetě, měřením absorbance při 245nm, extinkční koeficient v 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je  $\epsilon=13\ 700$ ). Koncentrovaný roztok se následně vyředí na 10 $\mu$ M v PBS (ředění 10x). Z 10 $\mu$ M roztoku se připraví následující koncentrační řada:

	koncentrace [ $\mu$ M]	MDA 10 $\mu$ M[ $\mu$ l]	PBS [ $\mu$ l]	celkový objem [ $\mu$ l]
K5	2	<b>70</b>	<b>280</b>	350
K4	1	<b>35</b>	<b>315</b>	350
K3	0.4	<b>14</b>	<b>336</b>	350
K2	0.2	<b>7</b>	<b>343</b>	350
K1	0.1	<b>3.5</b>	<b>346.5</b>	350
K0	0	<b>0</b>	<b>350</b>	350

## Vyhodnocení:

Množství vzniklého produktu TBARS vypočteme na základě externí kalibrační křivky závislosti plochy píků standardů MDA-TBA při 532 nm na jejich koncentraci ( $\mu$ M). Výsledné hodnoty množství MDA ve vzorku (MDA-TBA neboli TBARS) se vyjadřují jako nmol TBARS/g mokré váhy tkáně/sušiny nebo nmol TBARS/mg proteinů (**analýza obsahu proteinů nebude součástí cvičení**).

## Literatura:

Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak O.V., Storey, J.M., Storey, K.B. (2005) Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 :1319–1330

Bastos, A.S., de Melo Loureiro, A.P., Franco de Oliveira, T., Corbi, S.C.T, Caminaga, R.M.S., Júnior, C.R., Orrico, S.R.P. (2012) Malondialdehyde in gingival crevicular fluid. *Anal. Biochem.* 423: 141–146