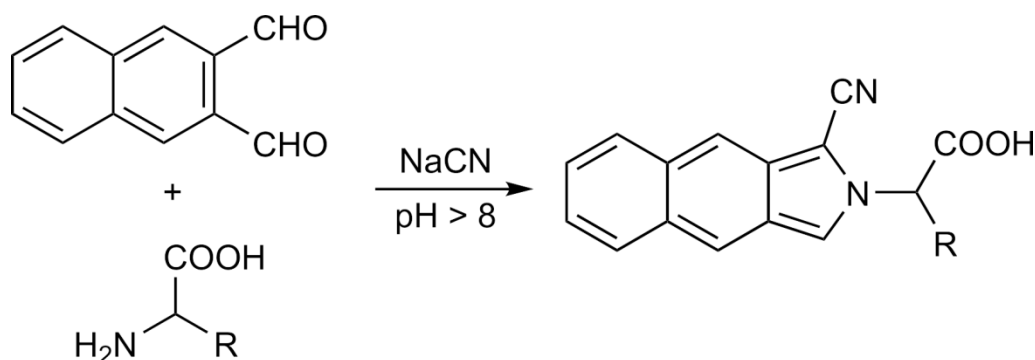


Metabolomické profilování aminokyselin v netradičních vzorcích biologické povahy pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí

Teoretická část

Metabolomika je vědní disciplína zabývající se studiem metabolomu. Metabolom je definován jako soubor všech metabolitů daného organismu. K velmi významným metabolitům patří *aminokyseliny*, které plní v živém organismu celou řadu rolí. Aminokyseliny nejsou pouze stavebními kameny proteinů, ale jsou také zapojeny do buněčné signalizace a exprese genů. Jejich aktuální hladiny v tělních tekutinách odráží komplexní fyziologický stav organismu, a proto může jejich stanovení sloužit k diagnostickým účelům. Aminokyseliny bohužel až na výjimky (aromatické aminokyseliny) nevykazují nativní fluorescenci, a proto je pro jejich citlivé stanovení pomocí fluorescenční detekce nutná jejich derivatizace. K derivatizaci aminokyselin je možné využít jejich reakce s fluorogenním derivatizačním činidlem, naftalen-2,3-dikarboxaldehydem (NDA), v přítomnosti vhodného nukleofilu, kyanidu sodného. Schéma derivatizační reakce je znázorněno na Obr. 1. Vzniklé fluorescenční deriváty, N-substituované 1-kyanobenz[*f*]isoindoly, je možné separovat micelární elektrokinetickou chromatografií.



Obr. 1: Reakční schéma derivatizace aminokyseliny pomocí NDA v přítomnosti NaCN za vzniku N-substituovaného 1-kyanobenz[*f*]isoindolu

Fluorescenční detekce ve spojení s moderními separačními technikami, jako jsou kapalinová chromatografie a *kapilární elektroforéza*, se stále více zavádí do laboratorní praxe z důvodů vysokých citlivostí a účinností separace.

Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační separační techniky. CE umožňuje separaci částic různé velikosti; od jednoduchých iontů až po nabitě koloidní částice, makromolekuly (proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy), či dokonce živé bakteriální buňky. Našla si proto uplatnění v mnoha oborech. Používá se k analýzám potravin, léčiv, biologických vzorků, při identifikaci a stanovení metabolitů, a také při studiu enzymů. K jejím nesporným výhodám patří možnost separace nabitých i neutrálních látek, jednoduché provedení, vysoká účinnost, rychlost analýzy, potřeba malých objemů vzorků, malé množství odpadů, a také malé nároky na čistotu vzorku.

K základním jevům uplatňujícím se v CE patří *elektroforéza* a *elektroosmóza*. Projevem elektroforézy je pohyb iontů v elektrickém poli (potenciálovém spádu). Projevem elektroosmózy je tok celé kapaliny, kterým je kapilára naplněna, vlivem napětí.

Elektroforéza spočívá v migraci nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. To je vytvářeno vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody vyrobené z inertních materiálů. K separaci dochází na základě různé *elektroforetické mobility* jednotlivých složek vzorku. Elektroforetická mobilita je definována jako rychlost pohybu nabitě částice roztokem ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě, což vyjadřuje vztah (1), kde μ_e je elektroforetická mobilita, v je rychlost pohybu nabitě částice a E je intenzita elektrického pole.

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou vzájemně opačných sil. Síla elektrického pole F_e uvádějící ion do pohybu je dána vztahem (2), kde Q je náboj iontu.

$$F_e = QE \quad (2)$$

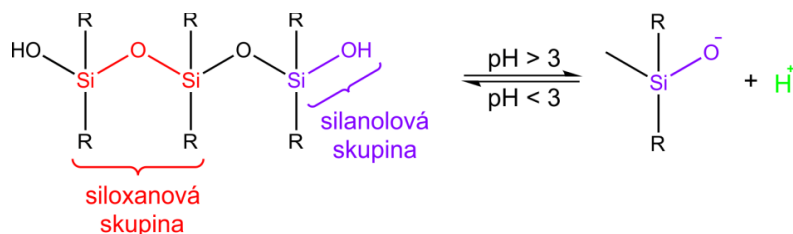
Opačným směrem působí frikční síla. S využitím Stokesovy aproximace tvaru částice jako koule s poloměrem r v roztoku o viskozitě η platí pro frikční sílu F_f vztah (3).

$$F_f = -6\pi\eta rv \quad (3)$$

V ustáleném stavu se obě síly rovnají ($F_e = F_f$) a s využitím předchozích vztahů dostáváme pro elektroforetickou mobilitu vztah (4). Elektroforetická mobilita je tedy přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku.

$$\mu_e = \frac{Q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

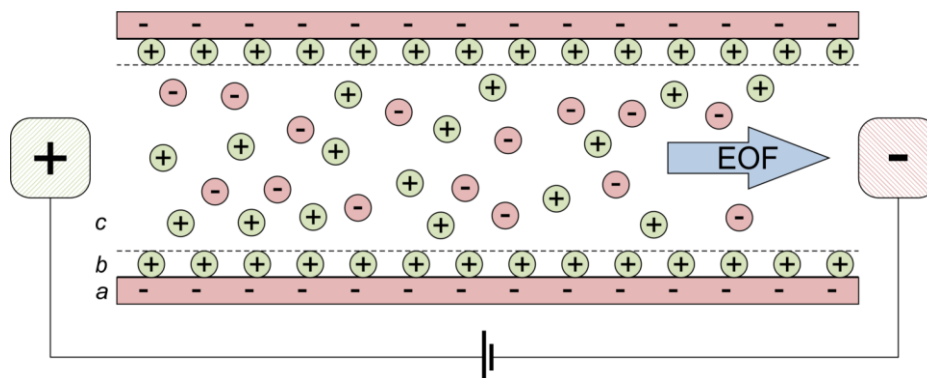
Elektroosmotický tok (EOF) je základním elektrokinetickým jevem v CE. Uvádí do pohybu i neutrální látky a je tak intenzivní, že umožňuje současnou separaci kationtů a aniontů. EOF je závislý na materiálu, ze kterého je kapilára vyrobena. V CE se nejčastěji používají křemenné kapiláry pro jejich vysokou transparentnost v UV oblasti a dobrou tepelnou vodivost pro odvod Jouleova tepla. Vnitřní vrstva křemenné kapiláry obsahuje silanolové a siloxanové skupiny. Silanolové skupiny při $\text{pH} > 3$ disociují. Reakční schéma je uvedeno na Obr. 2.



Obr. 2: Reakční schéma disociace silanolové skupiny

Vnitřní povrch křemenné kapiláry s vyšším pH získává záporný náboj a přitahuje z elektrolytu kationty. Ty vytvářejí na stěně kapiláry statickou Sternovu vrstvu. Ionty elektrolytu vzdálenější od

stěny kapiláry tvoří pohyblivou neboli difuzní vrstvu. Mezi vrstvami vzniká elektrokinetický potenciál dvojvrstvy označovaný jako ζ -potenciál (viz Obr. 3). Po aplikaci elektrického napětí se začne difuzní vrstva spolu s molekulami rozpouštědla díky silné solvataci kationtů pohybovat směrem ke katodě (katodický EOF) konstantní rychlostí EOF.



Obr. 3: Schéma vnitřního povrchu kapiláry a vznik EOF

- a) záporně nabitá stěna kapiláry, b) Sternova vrstva tvořená pevně adsorbovanými kationty, c) difuzní vrstva; směr EOF je od anody ke katodě (katodický EOF)

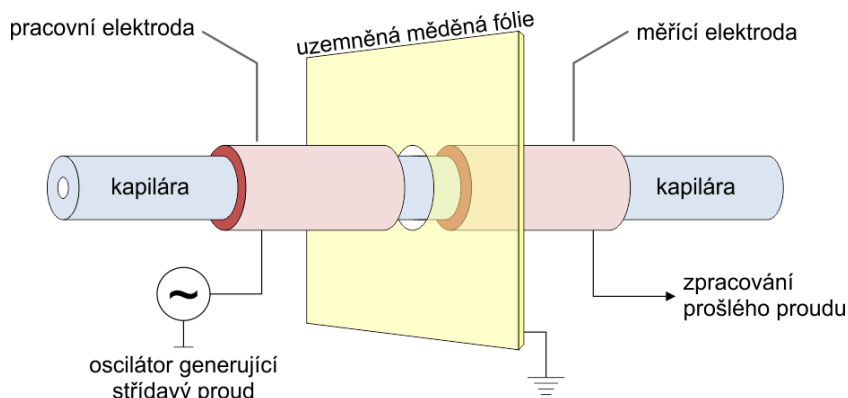
Směr a rychlost pohybu iontu jsou obecně dány součtem elektroforetické mobility a mobility EOF. EOF unáší všechny ionty stejnou rychlostí a působí tedy jako neselektivní síla. Je silně závislý na iontové síle a pH základního elektrolytu. EOF mezi pH 3-8 několikanásobně vzrůstá a způsobuje pohyb všech částic ve stejném směru. Nejprve jsou detekovány kationty, které migrují ke katodě a jsou urychleny EOF; dále neutrální látky, které nejsou separovány a migrují pouze rychlostí EOF; nakonec anionty, které migrují k anodě, ale mobilita EOF je obvykle větší než mobilita aniontů, a proto jsou také unášeny ke katodě.

Přístroj pro CE se v základním uspořádání skládá ze separační kapiláry, zdroje vysokého napětí, dvou elektrod, které jsou spolu s kapilárou ponořeny do nádob (vialek) se základním elektrolytem (background electrolyte, BGE), systému dávkování, detektoru a zařízení pro záznam a vyhodnocení analytického signálu, kterým je v současné době počítač s vhodným softwarem.

CE je možné kombinovat s různými typy detekčních technik, výběr závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech stanovované látky. Detektor zaznamenává změnu signálu v čase a tento záznam se nazývá *elektroforeogram*.

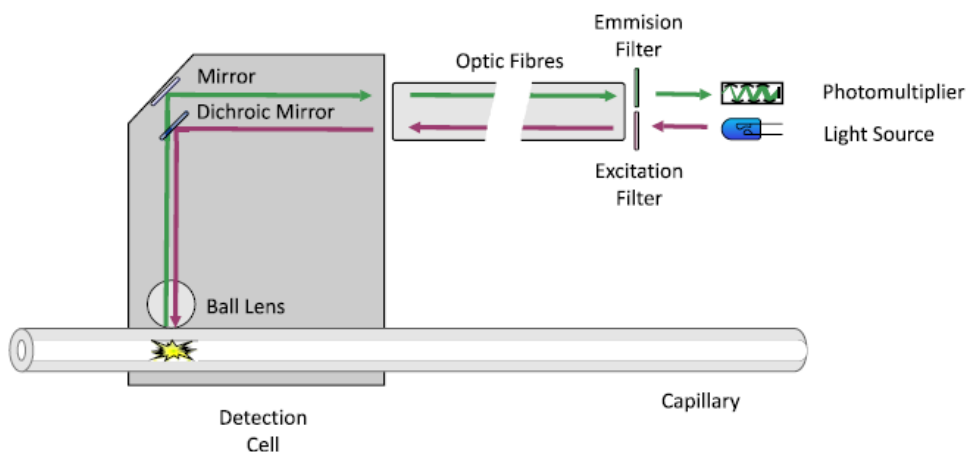
Mezi univerzální detekční techniky používané ve spojení s CE patří *hmotnostní spektrometrie* a *vodivostní detekce*. Hmotnostní spektrometrie poskytuje informace o molekulární hmotnosti a struktuře, které mohou být použity pro identifikaci látek. K nevýhodám patří její komplikovanější spojení s CE.

Vodivostní detekce je založena na měření elektrické vodivosti vzorku. Bezkontaktní vodivostní detektor (C^4D , Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection) je tvořen například dvěma válcovými elektrodami umístěnými za sebou a oddělenými detekční mezerou. Schéma možného geometrického řešení C^4D je uvedeno na Obr. 4. Na jednu elektrodu je vkládán střídavý signál o dané frekvenci. Střídavý signál prochází i dielektrikem, a tedy přes stěnu kapiláry do roztoku, je snímán druhou elektrodou. Změna signálu střídavého proudu je způsobena rozdílnou elektrickou vodivostí vzorku.



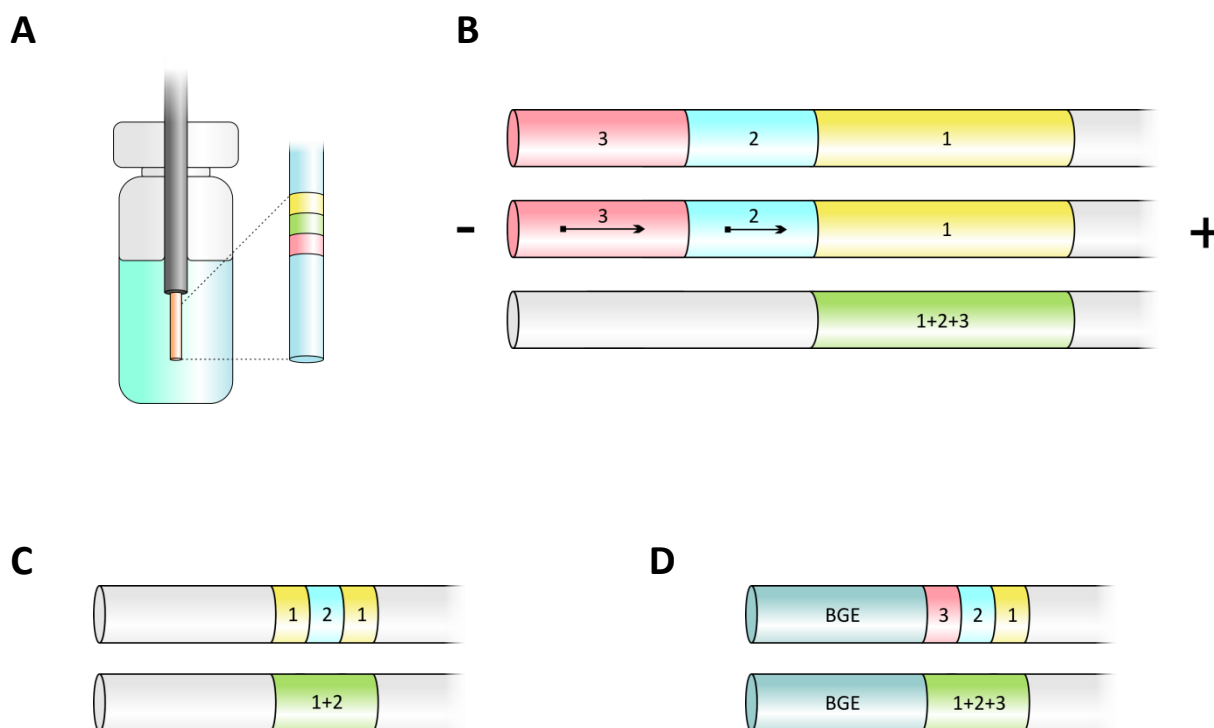
Obr. 4: Schéma nekomerčního bezkontaktního vodivostního detektoru

Nejčastěji používaným typem optické detekce je absorpční *UV-Vis detekce*. Je založena na absorpci látek při určité vlnové délce v rozsahu 180-750 nm. Analyt musí ve své struktuře obsahovat chromofor. Mnohem lepší citlivosti dosahuje *fluorescenční detekce*, zvláště její varianta laserem indukovaná fluorescence, kde jako zdroj záření slouží lasery. V současné době se často místo laseru využívají LED, které poskytují dostačující intenzitu světla, jsou cenově dostupnější a mají delší životnost. Stejně jako u UV-Vis detekce je důležitá struktura analytu, která musí obsahovat vhodný fluorofor. Pokud jej neobsahuje, je nutná derivatizace pomocí vhodných fluorescenčních činidel. Pro fluorescenční detekci je základní geometrické uspořádání ortogonální, kdy se emisní záření detekuje kolmo k excitačnímu záření. S využitím optických prvků, jako jsou dichroické zrcadlo a optické filtry, je možné geometrické uspořádání tzv. kolineární, jehož zjednodušené schéma je na Obr. 5. V kolineárním uspořádání prochází excitační záření excitačním filtrem, který vymezí požadovaný rozsah excitační vlnové délky. Záření je vedeno ke kulové čočce, jejímž úkolem je fokusovat paprsek přímo na kapiláru, kterou prochází analyt obsahující vhodný fluorofor. Emisní záření poté prochází dichroickým zrcadlem, je odraženo druhým zrcadlem a následně vedeno optickým vláknem přes emisní filtr až k fotonásobiči, který je umístěn rovnoběžně se zdrojem záření.



Obr. 5: Schéma fluorescenčního detektoru v kolineárním geometrickém uspořádání (ZETALIF™ LED, Picometrics, Francie)

Ke stanovení většiny látek fluorescenční detekcí je nutná jejich derivatizace. CE umožňuje provádět derivatizační reakci přímo v kapiláře v objemu několika desítek nanolitrů (Obr. 6A). Reaktanty jsou v tomto případě jednotlivě dávkovány do kapiláry a vhodným způsobem promíchány. Separace vzniklých produktů následuje ihned po jejich derivatizaci, proto je tento přístup vhodný i pro méně stabilní deriváty. Umožňuje také plnou automatizaci a současně se minimalizuje spotřeba obvykle drahých derivatizačních činidel. Míchání reaktantů v kapiláře je možné rozdělit na elektroforetické (Obr. 6B) a difuzní (Obr. 6C a 6D). Difuzní míchání je založeno na difuzi a je možné je dále rozdělit podle směru difuze na míchání pomocí podélné difuze (tzv. *at-inlet*) a pomocí příčné difuze v laminárním toku (tzv. *transverse diffusion of laminar flow profile*, TDLFP). Společnou výhodou difuzního způsobu míchání reaktantů je snadná optimalizace. *At-inlet* umožňuje míchání pouze 2 samostatně dávkovaných reaktantů a vyžaduje úzké zóny. TDLFP míchání je vhodné pro více než 2 samostatně dávkované reaktanty, ale poskytuje omezený překryv dlouhých zón. Elektroforetické míchání (tzv. *electrophoretically mediated microanalysis*, EMMA) je založeno na elektromigraci a jeho předpokladem je rozdílná elektroforetická mobilita reaktantů. Poskytuje vysokou účinnost míchání a umožňuje překryv velmi širokých zón. Nevýhodou EMMA je však obtížná optimalizace.



Obr. 6: Schéma reakce v kapiláře v nanoměřítku (A); schématické znázornění míchání reaktantů v kapiláře – elektroforetické míchání (B); míchání pomocí podélné difuze (*at-inlet*, C); míchání pomocí příčné difuze v laminárním toku (TDLFP, D).

Praktická část

Úkol

Stanovení aminokyselin v biologických vzorcích

Stanovte koncentraci jednotlivých aminokyselin v biologických vzorcích. Tipněte si, jaké vzorky budou nejlépe bohaté na aminokyseliny a jaké nejméně? U kterých vzorků budou absolutní koncentrace aminokyselin nejlépe proměnlivé? Jak lze tuto proměnlivost korigovat?

Přístroj a metoda

Separační podmínky pro stanovení aminokyselin									
Přístroj	CE System Agilent G7100A								
Detekce	ZETALIF™ LED 480, λ_{ex} 480 nm, λ_{em} 515 nm, PMT 600 V, RT 0.5 s								
Kapilára	křemenná, vnitřní průměr 50 μm , celková délka 66.0 cm, efektivní délka 45.0 cm								
Promývání kapiláry	<table border="0"> <tr> <td>Před analýzou</td> <td>2 min BGE</td> </tr> <tr> <td>Po analýze</td> <td>0.5 min H₂O</td> </tr> <tr> <td></td> <td>2 min 1 % (m/m) Tween 20</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1 min H₂O</td> </tr> </table>	Před analýzou	2 min BGE	Po analýze	0.5 min H ₂ O		2 min 1 % (m/m) Tween 20		1 min H ₂ O
Před analýzou	2 min BGE								
Po analýze	0.5 min H ₂ O								
	2 min 1 % (m/m) Tween 20								
	1 min H ₂ O								
Základní elektrolyt	50 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 73 mM SDS, pH neadj. (\approx 9.3) 5 mM SDC, 2.5 mM HP- β -CD								
Dávkování	Hydrodynamické, derivatizace v kapiláře, TDLFP míchání 50 mbar 3 s (150 mbar s) 1 mM NDA 50 mbar 3 s (150 mbar s) 50xD biologický vzorek 50 mbar 3 s (150 mbar s) 10 mM NaCN 50 mbar 15 s (750 mbar s) BGE (k indukci laminárního toku) 5 min reakce								
Separační napětí	+30 kV								
Teplota kazety	25 °C								

Úprava vzorků

Tabulka A

Biologický vzorek	Plasma/sérum	moč	sliny	slzy	pot	G-TL médium
Ředění v ACN - precipitace proteinů	5x	5x	5x	5x	5x	5x
Ředění v RP	10x	10x	10x	10x	10x	10x
Celkové ředění	50x	50x	50x	50x	50x	50x

Tabulka B

Koncentrace v zónách, mM				Zásobní koncentrace, mM				Objem, μl		
H ₃ BO ₃ (RP)	NaCN	NDA	vzorek	H ₃ BO ₃ (RP)	NaCN*	NDA**	vzorek	Zóna 1 (NDA + RP)	Zóna 2 (vzorek + RP)	Zóna 3 (NaCN + RP)
100	10	1	50x D	111.1	100	10	5xD	20 + 180	10 + 90	50 + 450

* NaCN rozpuštěn v H₂O

** NDA rozpuštěno v ACN

Postup a vyhodnocení**A) Příprava vzorků a reagensí**

- Příslušné biologické vzorky upravte dle údajů uvedených v tabulce A. Po přidání acetonitrilu (ACN) vzorky promíchejte na vortexu a centrifugujte 5 min při 10 000×g. Poté je zředte v reakčním pufru (RP), viz zóna 2 tabulka B.
- Připravte reagensie dle tabulky B.

B) Stanovení aminokyselin v biologických vzorcích

- Pomocí CE s fluorescenční detekcí stanovte aminokyseliny v biologických vzorcích. Využijte možnosti derivatizace v kapiláře a míchání pomocí TDLFP (metoda AA1.M).
- Z časových důvodů byly kalibrační závislosti stanoveny předem. Zintegrujte píky všech/vybraných aminokyselin. Na základě uvedených rovnic kalibračních přímek vypočítejte koncentrace aminokyselin v příslušných biologických vzorcích. Nezapomeňte zohlednit ředění vzorku.

Laboratorní cvičení vzniklo díky finanční podpoře udělené Masarykovou univerzitou v rámci projektu Fondu rozvoje Masarykovy univerzity (FRMU 1243/2019).

**MUNI
SCI**