

THE USING OF CARRIER AMPHOLYTE-FREE ISOELECTRIC FOCUSING (CAF-IEF) FOR ANALYSIS OF STRESS PROTEINS

VYUŽITÍ ISOELEKTRICKÉ FOKUSACE BEZ NOSNÝCH AMFOLYTŮ (CAF – IEF) PRO ANALÝZU STRESOVÝCH PROTEINŮ

Procházková B., Pospíchal J.

Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno.

E-mail: barca@chemi.muni.cz

ABSTRACT

The aim of the presented paper was to find and to describe the electrolyte system with suitable pH for the pre-concentration and isolation of ampholytes using Carrier Ampholyte-Free Isoelectric Focusing (CAF-IEF) for analyses. This method is based on the principle of utilization of both side regulated ionic matrix. By influence of current and solvolytic fluxes a sharp boundary of pH is created in the column filled with a sample. Here, ampholytes primarily dissolved in a background electrolyte are focused upon.

Keywords: isoelectric focusing, CAF-IEF, ampholytes, proteins

ABSTRAKT

Cílem práce bylo nalézt a popsat elektrolytový systém s vhodným pH pro předkoncentraci a izolaci stresových proteinů pomocí izoelektrické fokusace bez přítomnosti nosných amfolytů (CAF-IEF). Tato metoda je založena na principu pohyblivého rozhraní, které je tvořeno dvěma elektrolyty (pufrů) s různými hodnotami pH. Tyto dva elektrolyty tvoří ostré rozhraní, na kterém dochází k fokusaci amfolytu. Při různých hodnotách pH elektrolytů se rozhraní pohybuje různou rychlostí. Při určité rychlosti se pohyb rozhraní zastaví. Tento stav je velmi výhodný jak pro fokusaci, tak pro kontinuální dávkování a předkoncentraci vzorku.

Klíčová slova: izoelektrická fokusace, CAF-IEF, amfolyty, proteiny

ÚVOD

Moderní kapilární techniky jako je zónová elektroforéza (CZE), izotachoforéza (ITP), izoelektrická fokusace (IEF) mají vynikající separační vlastnosti jako je selektivita, rozlišení a rychlosti analýzy [1]. Rozvinutí detekčních technik snížilo detekční limit na úroveň jednotlivých molekul [2].

Nejjednodušší elektroforetickou technikou je zónová elektroforéza [3]. CZE je vhodná pro separaci molekul s nábojem (iontů) lišících se svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem [4].

Zde vzorek migruje v prostředí základního elektrolytu, jehož složení zaručuje v celé separační kapiláře konstantní homogenní elektrické pole. Zóny jednotlivých látek migrují konstantní (ale každá svou) rychlostí a postupně se od sebe vzdalují. Zónová rozhraní nejsou ostrá a v průběhu experimentu se rozmývají vlivem difúze [3].

Pro separaci je nutné, aby elektivní mobility, a tím i migrační rychlosti různých látek byly navzájem různé. Toho se docílí vhodnou volbou základního elektrolytu. Separace probíhá tak, že se do kapiláry naplněné základním elektrolytem vnese vzorek. Po vložení napětí mezi konce kapiláry začne protékat elektrický proud a jednotlivé látky vzorku začnou migrovat navzájem různými rychlostmi, a tím se separují [5]. V kapiláře pak látky migrují směrem k detektoru, který je na jedné straně kapiláry. Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat oba dva druhy iontů (anionty, kationty) [4].

Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem. V kapilárách s nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě a jeho rychlost je relativně vysoká (většinou vyšší než rychlost elektroforetická) a anionty i kationty mohou být analyzovány současně během jednoho experimentu [6].

Izotachoforéza je moderní analytická separační technika. Umožňuje analyzovat směsi ionogenních látek v roztocích a získat v krátké době (obvykle 4 až 40 minut) snad vyhodnotitelné údaje o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku. ITP pracuje s malými množstvími vzorku a zpravidla umožňuje stanovit ještě desítky ng látek, což při nástřiku jednotek až desítek μl vzorku vede k analyzovatelným koncentracím na úrovni desítek až jednotek ppm.

V izotachoforéze je vzorek umístěn mezi dva pomocné elektrolyty – vedoucí a koncový. Po ukončení separace, každá zóna obsahuje kromě protiiontu pouze ionty jediné látky, všechny zóny migrují stejnou rychlostí, odtud název izotachoforézy (řecky isos = stejný, tachos = rychlost), stýkají se ostrými rozhraními a postupem času se nerozmývají. Zatímco zónová elektroforéza umožňuje kombinaci migrace a elektroosmozy látek na obě strany od startu a současnou separaci kationtových a aniontových složek vzorku, jsou u izotachoforézy v jedné analýze separovány pouze složky migrující jedním směrem. Proto u izotachoforézy hovoříme o kationtové a aniontové separaci [3].

Metodou izoelektrické fokusace se separují v biochemii amfolyty. Amfolyt může existovat ve formě kladné, záporné i neutrální částice. Na to, v jaké podobě se nachází, má zásadní vliv pH prostředí. Typickým příkladem amfolytů jsou aminokyseliny, peptidy a proteiny. Prostor, ve kterém je amfolyt v elektricky neutrální formě, má právě určité pH. Toto pH se rovná izoelektrickému bodu pI příslušného amfolytu. Jestliže je pH prostředí vyšší než izoelektrický bod, převládá záporná forma amfolytu, jestliže je nižší, převládá jeho kladná forma [5].

Izoelektrická fokusace je založena na migraci vzorku v pH gradientu. Vzorek je zakonzentrován v určitém pH, které odpovídá jeho izoelektrickému bodu - pI. V praxi, se gradient vytvoří tak, že se separační kapilára naplní roztokem směsi amfolytů s různými pI. Po aplikaci vzorku a zapnutí proudu začnou směs amfolytů i vzorek migrovat v elektrickém poli. Migrující amfolyty postupně ztrácí náboj a vzniká pH gradient. Dělené látky v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. Zde budou mít z makroskopického hlediska nulový náboj a migrace se zastaví [7].

Po dosažení ustáleného stavu je třeba fokusované zóny mobilizovat, aby prošly detektorem a byly detekovány. K přirozené mobilizaci zón dochází při IEF v přítomnosti elektroosmotického toku v křemenných kapilárách s neupraveným vnitřním povrchem [8].

V extrémním případě, vhodném zvláště pro mikropreparativní účely, se mohou amfolyty vypustit a nahradit dvěma elektrolyty s regulovatelnou hodnotou pH. Ty vytvoří v koloně ostré rozhraní pH, kde se amfolyty vzorku zafokusují podle jejich pI. Tato metoda se nazývá izoelektrická fokusace bez nosných amfolytů CAF – IEF (Carrier Ampholyte Free-Isoelectric Focusing) [9]. Je založena na oboustranné regulaci pohybu neutralizačního reakčního rozhraní (dále jen rozhraní), které je tvořeno dvěma elektrolyty (pufrů) s různými hodnotami pH [10]. Tyto dva elektrolyty tvoří ostré rozhraní, na kterém dochází k fokusaci amfolytu. Při různých hodnotách pH elektrolytů se rozhraní pohybuje různou rychlostí. Při určité dvojici hodnot pH, odpovídající rovnosti toků H^+ a OH^- iontů se pohyb rozhraní zastaví. Regulací pH a tedy rychlostí pohybu rozhraní můžeme dosáhnout stavů kdy rozhraní stojí, nebo se pohybuje. Stacionární stav o nulové rychlosti je velmi výhodný jak pro fokusaci, tak pro kontinuální dávkování a předkonzentraci vzorku, stav nenulové, ale známé rychlosti je vhodný pro mobilizaci zafokusovaných látek a jejich převedení do místa detekce. Výhodou CAF-IEF je nepřítomnost nosných amfolytů. Ty jsou drahé a tvoří komplexy s analytem, což je nežádoucí pro další analýzu a identifikaci (Maldi-TOF MS).

V minulosti bylo pro vlastní nastavování pH elektrolytů v průběhu analýzy použito speciální zařízení s elektrickou regulací [11]. Toto zařízení je příliš složité, proto jsme přistoupili k použití pufrujících elektrolytů o konstantním složení, kde požadované změny pro mobilizaci je dosaženo výměnou elektrolytu v komůrce.

Cílem práce byla charakterizace elektrolytového systému a nalezení vhodných elektrolytů (pufrů) s vhodnými pH pro předkoncentraci a izolaci stresových proteinů. Tyto elektrolyty nejsou známy, a proto se hledaly takové, které by měly vhodné vlastnosti, jako je regulovatelná migrační rychlost a schopnost dostatečně pufrvat analyzované zóny tak, aby u nich nedocházelo ke změně migračních časů.

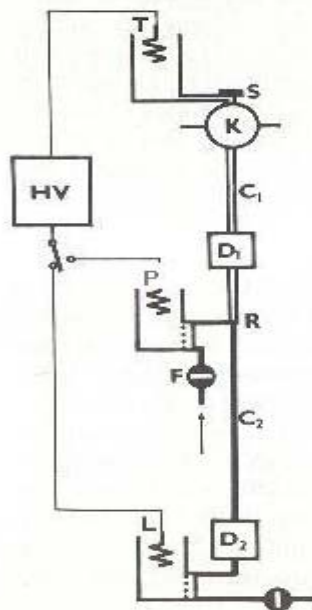
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro měření byl použit přístroj CS Isotachophoretic Analyser (Ústav radioekologie a využití jaderné techniky, Spišská Nová Ves, SK), viz obr.1. Přístroj má především analytické využití pro analýzu aniontů i kationtů ve vodných prostředích, avšak přípustná jsou i prostředí směsná /voda alkohol/. Přístroj je dvoukolonový (s dvěma teflonovými kapilárami), s pomocnou třetí elektrodou a vtokem pro koncentrační kaskádu. Vzorek lze vnášet buď dávkovacím kohoutem, nebo stříkačkou. Detekce je vodivostní s výstupem funkčním i derivačním. Pracovní proud je 500 μ A. Zdroj je vybaven přepět'ovou ochranou nastavitelnou v rozmezí 6-16 kV. Časový průběh separace, přepnutí kolon, spuštění zapisovače a ukončení celé analýzy je možno předem naprogramovat [3].

Migrační rychlost byla sledována pomocí pohybu rozhraní dvou elektrolytů o různém pH v separační kapiláře o průměru 0.8 mm. Terminátorový blok (T) byl naplněn koncovým - dávkovacím elektrolytem (terminátor) a pomocný blok (P) s blokem cílové elektrody (L) byl naplněn vedoucím elektrolytem s přídavkem bromthymolové modři (leading), pro snadnou identifikaci rozhraní. Po nastavení vhodného proudu 200 μ A a zapnutí přístroje byl měřen čas pohybu rozhraní. Pufrы byly připraveny z běžných chemikálií s označení p.a.

VÝSLEDKY A DISKUSE:

Bylo měřeno několik dávkovacích elektrolytových systémů viz tabulka 1, graf 1. pK pro jednotlivé kyseliny a hydroxid jsou uvedeny v tabulce 2. Vedoucí elektrolyt vždy obsahoval 0.0001M bromthymolovou modř pro zviditelnění rozhraní. Koncentrace NH_4^+ soli v koncovém – dávkovacím elektrolytu se měnily v rozmezí od 0 M do 0.0085 M. Se stoupající koncentrací NH_4^+ soli v dávkovacím elektrolytu se migrace zpomalovala až ustala. Nulové migrace se dá využít pro kontinuální dávkování vzorku amfolytu, pro jeho



Obr. 1. CS Isotachophoretic Analyser
Terminátorový blok (T), Dávkovací kohout (K),
Septum (S), Teflonová separační kapilára (C1),
Detekční cela pomocného detektoru (D1)
Rozdělovací blok (R), Pomocná elektroda (P)
Analytická kapilára (C2), Detekční cela (D2),
Blok cílové elektrody (L)

předkoncentraci a zafokusování. Po zafokusování vzorku amfolytu by mělo dojít k mobilizaci. Ta se provede tak, že se vymění dávkovací elektrolyt v terminátorové komůrce a rozhraní se dá do pohybu.

Rychlosti jednosytných kyselin se dají vypočítat, jak demonstruje obrázek 1. Na obrázku 1 je prostorový graf vypočítaných závislostí pohybu rozhraní na složení elektrolytů a na jejich pH. Výpočet pro více- sytné kyseliny ještě není znám, proto se musí rychlosti experimentálně změřit graf 1.

pH pro jednosytných kyseliny se dá ověřit jak experimentálně, tak i teoreticky. Výpočet pro pH vícesytných kyselin je složitější a není znám jednotný postup pro výpočet. Výhoda vícesytných je v tom, že pufrují v širším rozsahu pH, což je výhodné pro analýzu proteinů a pro experimentální dávkování, kdy nedochází k regulaci elektrolytů.

Tabulka 1: Elektrolytové systémy

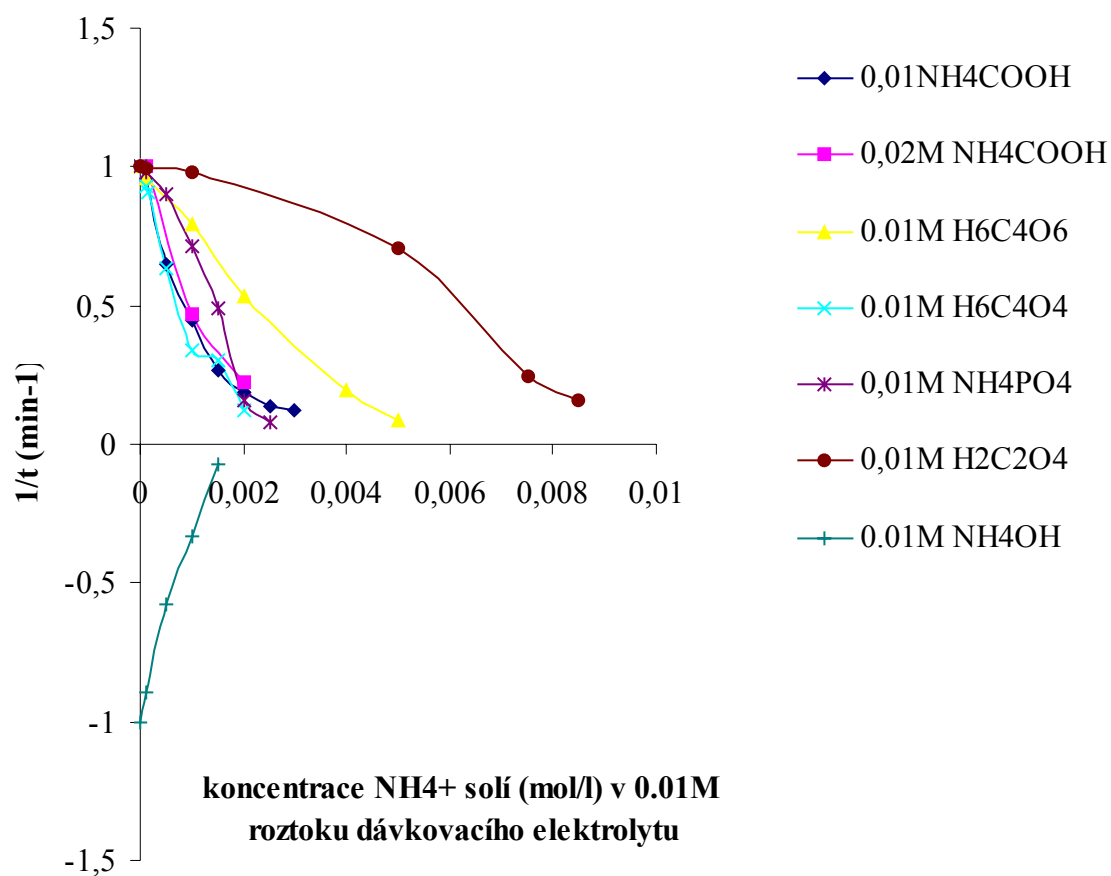
Vedoucí elektrolyt (L)	Koncový elektrolyt (T)
0.01M NH_4OH , 0.01M NH_4COOH , pH 9,4	0,01M CH_3COOH ; x M NH_4COOH
0.02M NH_4OH , 0.01M NH_4COOH , pH 9.7	0,01M CH_3COOH ; x M NH_4COOH
0.01M NH_4OH , 0.01M $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, pH 9.6	0.01M H_3PO_4 , x M $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$
0.01M NH_4OH , 0.01M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_4\text{C}_4\text{O}_6$, pH 9.2	0,01M $\text{H}_6\text{C}_4\text{O}_6$, x M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_4\text{C}_4\text{O}_6$
0.01M NH_4OH , 0.01M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_4\text{C}_4\text{O}_4$, pH 8.9	0,01M $\text{H}_6\text{C}_4\text{O}_4$, x M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_4\text{C}_4\text{O}_4$
0.01M NH_4OH , 0.01M $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, pH 9.4	0,01M $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, x M $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$
0,01M CH_3COOH , 0,01M NH_4COOH , pH 4.4	0.01M NH_4OH , x M NH_4COOH

x – hodnoty koncentrací NH_4^+ solí v rozmezí od 0 M do 0.0085 M

Tabulka 2: pK kyselin a hydroxidu

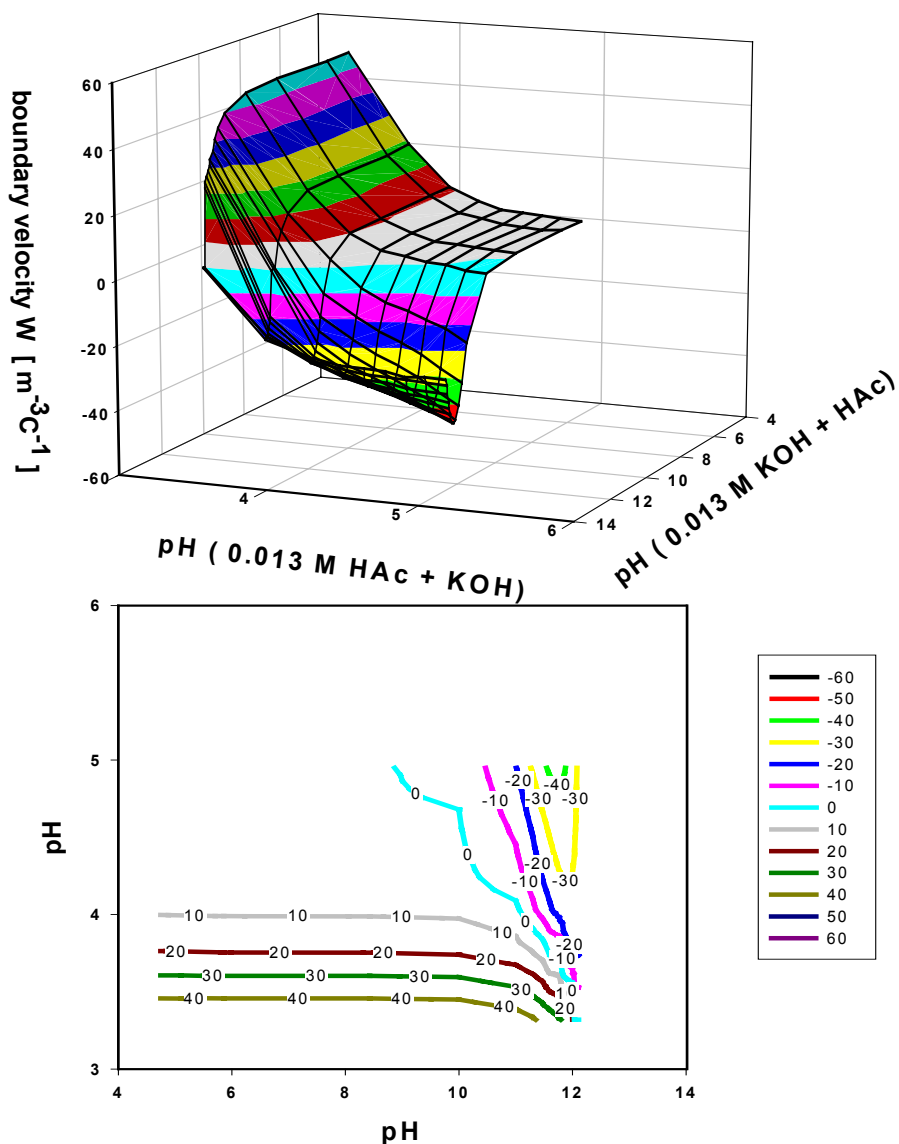
	PK_1	PK_2	PK_3
Kyselina octová	4.75		
Kyselina trihydrogenfosforečná	2.16	7.21	12.32
Kyselina jantarová	4.21	5.64	
Kyselina vinná	2.98	4.34	
Kyselina šťavelová	1.23	4.19	
Hydroxid amonný	9.53		

Graf 1: Graf závislosti rychlosti neutralizačního reakčního rozhraní v závislosti na koncentraci soli v 0.01M roztoku dávkovacího elektrolytu.



Obrázek 1: Graf vypočítané závislosti pohybu rozhraní na složení adjustovaných elektrolytů a na jejich pH

Calculated dependence of boundary velocity on the composition of adjacent electrolytes - their pH



ZÁVĚR

Byly charakterizovány některé elektrolytové systémy, vybrané tak, aby byly schopny pufovat v celé oblasti měřitelného pH. Byla prakticky ověřena schopnost elektrolytů pracovat ve fokusačním i mobilisačním modu, čímž byla završena první etapa práce. Dalším krokem bude pomocí vybraných elektrolytových systémů zafokusovat modelové i stresové proteiny.

Výpočet byl proveden podle již dříve publikovaného programu [11].

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] C. A. Monning, R. T. Kennedy; *Anal .chem.*, 66, (1994), R 280
- [2] D. Y. Chen, K. Adelhelm.X. L. Cheng, N. J. Dovichi; *Analyst*, 119, (1994), 349
- [3] P. Boček: Analytická kapilární izotachoforéza, Praha (1987), 19- 20
- [4] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html>
- [5] P. Kouda: Moderní analytické metody, Ostrava 1996
- [6] V .Dolník: Úvod do kapilární elektroforézy, Brno 1987,
- [7] P. Boček, M. Deml ,P. Gebauer, V. Dolník; *Analytical Isotachophoresis*, (1988), 13-15
- [8] V. Kašička: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, *Chemické listy* 91, 1997
- [9] J. Pospíchal, M. Deml, P. Boček; *J. Chromatogr*, 638, (1993), 179-186
- [10] J. Pospíchal, E. Glovinová; *J. Chromatogr. A*, 918, (2001), 195-203
- [11] M. Deml, J. Pospíchal, J. Chmelík; *J. Chromatogr. A*, 709, (1995), 39-49