

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF UREASE AND UREASE MODIFIED ELECTRODE

ELEKTROCHEMICKÉ CHOVÁNÍ UREASY A UREASOU MODIFIKOVANÁ ELEKTRODA

Hradecký J.¹⁾, Petrlová J.¹⁾, Zehnálek J.¹⁾, Babula P.²⁾, Adam V.¹⁾, Potěšil D.¹⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾ Ústav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²⁾ Ústav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno

E-mail: JanHradecky@seznam.cz

ABSTRACT

Urease enzyme (EC 3.5.1.5) is wide-spread enzyme at plants, moreover, is also presented at number of eukaryotic microorganisms and bacteria. In addition its presence at higher animals has not proved. Urease plays a key role in catalysis of urea degradation with carbon dioxide and ammonia production. It was ascertained that urease has absolute substrate specificity, which means that it can hydrolyse urea only and does not react with any other compound. In our work we primarily studied basic electrochemical behaviour of urease by different electrochemical techniques on mercury but also on carbon electrode. Mostly we focused on study of urease catalytic signals unexamined up to now, in the concrete on study of Brdička procedure and peak H. At Brdička procedure, signals offered by cobalt salt ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$), which is component of basic electrolyte, change. Peak H is a signal that appeared during hydrogen electrodeposition curve at very negative potentials (about -1.7 V). These catalytic signals depend on quantity and also properties of the attendant protein. Furthermore we studied the urease modified mercury electrode.

Keywords: urease, electrochemical methods, catalytic signals, Brdička procedure, peak H

ABSTRAKT

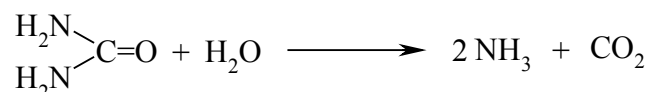
Enzym ureáza (EC 3.5.1.5, močovina amidohydroláza) je obecně rozšířeným enzymem u rostlin a je také přítomna u řady eukaryotických mikroorganismů a bakterií. U vyšších živočichů nebyla přítomnost ureázy prokázána. Ureáza hraje klíčovou roli v katalýze rozkladu močoviny za vzniku oxidu uhličitého a amoniaku. Bylo zjištěno, že vykazuje absolutní substrátovou specifitu, což znamená, že hydrolyzuje pouze močovinu a nereaguje s žádnou jinou sloučeninou. V naší práci jsme nejdříve studovali základní elektrochemické chování ureázy pomocí rozdílných elektrochemických technik na rtuťové, ale také uhlíkové elektrodě.

Nejvíce jsme se zaměřili na studium dosud nezkoumaných katalytických signálů ureasy, konkrétně na studium Brdičkovy reakce a píku H. Při Brdičkově reakci se v přítomnosti proteinu mění signály poskytované kobaltnatou solí ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$), která je součástí základního elektrolytu. Pík H je signál, který se objevuje na křivce vylučování vodíku při velmi negativních potenciálech (okolo $-1,7\text{ V}$). Tyto katalytické signály jsou závislé jednak na množství, ale i na vlastnostech přítomného proteinu. Dále jsme studovali ureásou modifikovanou rtuťovou elektrodu.

Klíčová slova: ureáza, elektrochemické metody, katalytické signály, Brdičkova reakce, pík H

ÚVOD

V roce 1926 byl izolován enzym z *Cannavalia enzyformis* (*Fabaceae*) štěpící močovinu na amoniak a oxid uhličitý a byl označen jako ureáza¹.



Později se podařilo prokázat, že enzym ureáza (EC 3.5.1.5, močovina amidohydroláza) je obecně rozšířeným enzymem u rostlin a je také přítomna u řady eukaryotických mikroorganismů a bakterií². U vyšších živočichů nebyla dosud přítomnost ureázy prokázána. Nejvyšší aktivita ureázy byla pozorována v zárodečných rostlinných pletivech, a to především v semenech řady druhů z rodu *Fabaceae* a *Curcubitaceae*³. U vyvíjejících embryí byl popsán vysoce aktivní izoenzym ureázy. Bylo zjištěno, že enzym vykazuje absolutní substrátovou specifitu, což znamená, že hydrolyzuje pouze močovinu a nereaguje s žádnou jinou strukturně podobnou sloučeninou^{4,5}.

Je dobře známo, že bakterie mají výraznou ureázou aktivitu, což se u řady z nich využívá pro jejich identifikaci. Nedávno se však podařilo prokázat, že bakterie rodu *Helicobacter pylori* (způsobuje záněty žaludku a vyvolává vznik žaludečních vředů) lze velmi dobře diagnostikovat podle množství aktivní ureázy⁶⁻¹¹.

Z tohoto důvodu je potřebné hledat vhodné nástroje pro rychlou analýzu ureázy. Většina metod stanovení pro stanovení ureázy je založena na studiu její enzymové aktivity¹². Přímé stanovení proteinu je však obtížné. V nedávné době byly uveřejněny práce, které umožňují vysoce senzitivní stanovení proteinů pomocí elektrochemických technik¹³⁻²¹.

Cílem této práce bylo analyzovat enzym ureázu pomocí elektroanalytických technik a studovat vliv niklu na změnu elektrochemické odpovědi enzymu.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

Ureáza EC 3.5.1.5 (Jack Beans, type III; 45 000 jednotek/g) byla zakoupena od Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Zásobní roztoky standardu ureázy v koncentraci 1 mg.ml^{-1} byly připravovány pomocí ACS vody (Sigma-Aldrich, USA) a uchovávány ve tmě při 4°C . Pracovní standardní roztoky byly připravovány denně ředěním roztoků zásobních. Všechny další použité sloučeniny byly čistoty ACS dodané firmou Sigma Aldrich Chemical Corp. (USA). Roztoky byly připraveny v deionizované vodě stejného výrobce a téže čistoty.

Hodnoty pH byly měřeny pomocí WTW inoLab Level 3 pH metrem (Weilheim, Germany), který byl propojen s osobním počítačem a řízen programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Germany). pH-elektroda (SenTix- H, pH 0–14/3M KCl) byla pravidelně kalibrována sadou WTW pufrů (Weilheim, Germany).

Elektrochemická analýza

Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém, který se skládal z visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) jako pracovní elektrody s plochou 0.4 mm^2 , Ag/AgCl/ 3 mol.l^{-1} KCl elektrody jako referenční elektrody a platinového drátku jako pomocné elektrody. GPES software (EcoChemie, Holandsko) byl aplikován na zpracování hrubých dat za použití úrovně 4 Savitzky and Golay filtru. Analyzované vzorky byly deoxygenovány pro měření pomocí probublávání argonem (99.999%) nasyceného vodou po 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při pokojové teplotě. DPV parametry pro analýzu ureázy: počáteční potenciál -0.9 V , konečný potenciál -0.3 V , modulační čas 0.057 s , časový interval 0.2 s , potenciálový krok 1.05 mV/s , modulační amplituda 25 mV .

Adsorpční přenosová rozpouštěcí (AdTS) diferenční pulzní voltametrie (DPV) ureázy

Ureáza byla detekována pomocí AdTS DPV. Základním elektrolytem byl 0.2 M acetátový pufr, pH 5.0. DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0.9 V , konečný potenciál -0.3 V , modulační čas 0.057 s , časový interval 0.2 s , potenciálový krok 1.05 mV/s , modulační amplituda 25 mV .

VÝSLEDKY A DISKUSE

Enzym ureáza se skládá z 840 aminokyselinových zbytků a molekulová hmotnost je větší než 90 kDa (označení podle databáze expasy-P07374). Strukturní model ureázy je ukázán na schématu 1.

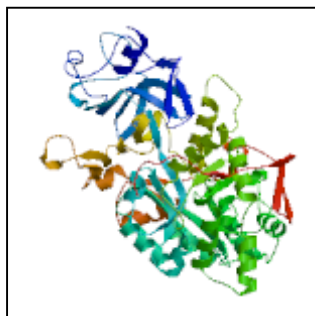
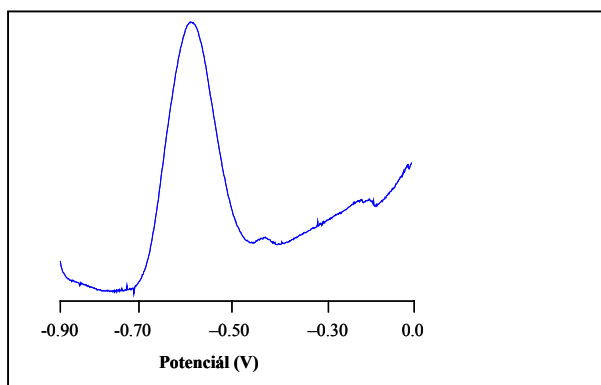


Schéma 1: Strukturní model ureasy z Canavalia ensiformis²².

Studovali jsme enzym ureázu pomocí diferenční pulzní voltametrie na rtuťové kapkové visící elektrodě. Nejdříve bylo studováno základní elektrochemické chování ureázy v roztoku základního elektrolytu (acetátový pufr). Na obrázku je ukázán signál ureázy (500 $\mu\text{g/ml}$). Ureáza poskytuje elektrochemický signál při potenciálu kolem -0.55 V . Pozorovaný signál pravděpodobně odpovídá sloučenině proteinu se rtuť (obrázek 1).

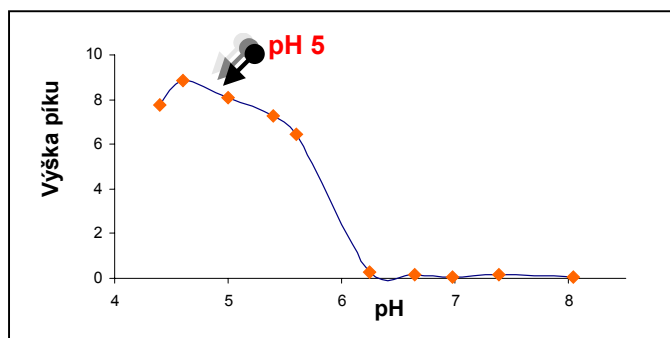


Obr. 1: DPV voltamogram ureázy v 0.2 M acetátovém pufru (500 $\mu\text{g/ml}$)

Vliv pH na DPV signál ureázy

Z důvodu získání co největší elektrochemické odpovědi, byla studována závislost změny výšky signálu ureázy na změně pH acetátového pufru. Zjistili jsme, že nejvyšší pozorované DPV odezvy byly pozorovány v rozmezí pH 4,8 až 5,8. Poté studovaný signál ureázy dramaticky klesá a ureázový pík se posouvá do negativnějších potenciálů kolem

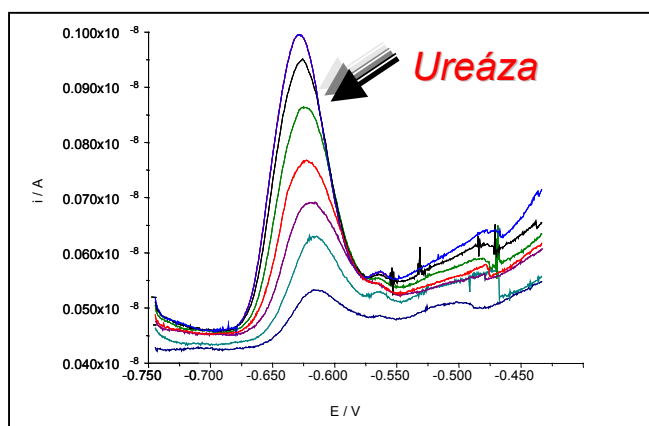
potenciálu -0.6 V (Obrázek 2). Předpokládáme, že pozorované změny mohou pravděpodobně souviset se změnou struktury ureázy.



Obr. 2: Vliv pH na výšku DPV signálu ureázy (500 µg/ml)

Vliv doby akumulace na DPV signál ureázy

Proteiny reagují s povrchem pracovní elektrody. Čím je doba interakce proteinu s povrchem pracovní elektrody delší, tím narůstá pozorovaný signál. Proto jsme studovali signál ureázy v závislosti na době akumulace. Získaná Langmuierovská závislost je přibližně do času 60 s lineární a poté se mění již velmi pozvolně. Potenciál píku ureázy se posouval směrem k negativnějším potenciálům. Pozorovaná změna v signálu ureázy je pravděpodobně způsobena zaplněním povrchu pracovní elektrody proteinem a tvorbou více vrstev.

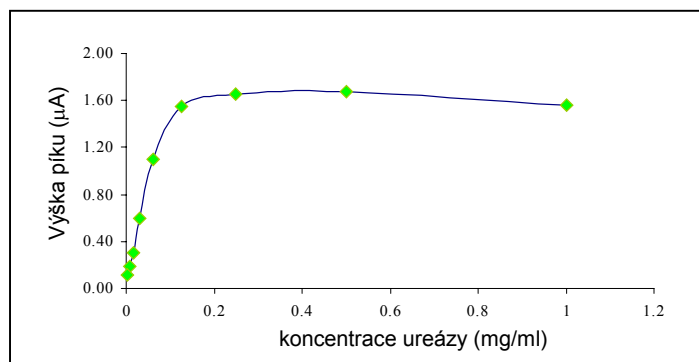


Obr. 3: Závislost doby akumulace na DPV signál ureázy (500 µg/ml)

Vliv koncentrace ureázy

Dále nás zajímalo jak budeme schopni studovat DPV signály ureázy v závislosti na její koncentraci (obrázek 4). Koncentrační závislost nebyla v celém rozsahu lineární (Langmuierovská izoterma). Pozorovaný tvar křivky souvisí s nasycením povrchu pracovní elektrody a tvorbou více vrstev na povrchu elektrodového povrchu. Avšak v nižším

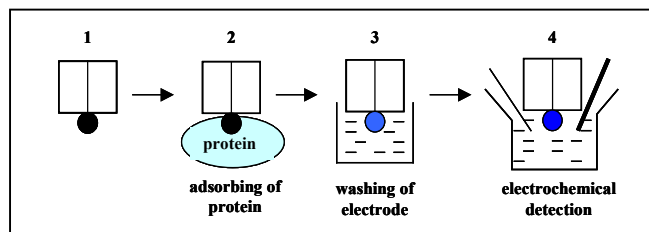
koncentračním rozsahu (100 – 1 µg/ml) je pozorovaná závislost lineární ($y = 16.79x + 0.0533$; $R^2 = 0.9994$). Ze získaných experimentálních dat byl určen limit detekce jako 3S/N 250 ng/ml.



Obr. 4: Závislost DPV signálu ureázy na koncentraci při době akumulace 60 s

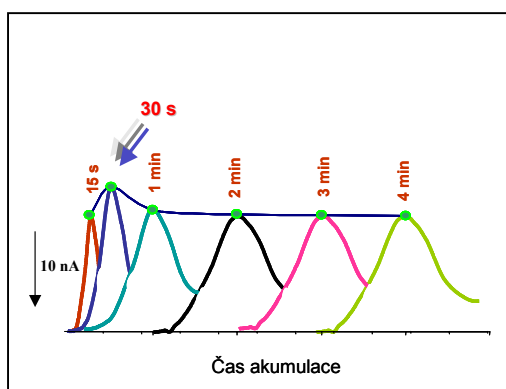
Adsorptivní přenosová technika pro analýzu ureázy

Adsorptivní přenosová technika byla vyvinuta jako vhodný nástroj pro elektrochemickou analýzu biomolekul, jako jsou proteiny a DNA²³⁻³¹. Princip analýzy spočívá v adsorbování studovaného analytu na povrch pracovní elektrody (HMDE). Po ukončení expozice je přebytek analytu z povrchu pracovní elektrody omyt v pufru. Bylo prokázáno, že na povrchu HMDE vzniká pouze film z látek vysokomolekulárních nebo silně interagujících s povrchem elektrody (za vzniku celé řady fyzikálně chemických interakcí). Při této technice je možné nejen analyzovat malé množství vzorku 3 – 5 µl, ale také provést jednoduchou separaci (oddělit látky nízkomolekulární od látek vysokomolekulárních). V našich experimentech jsme uvedené techniky použili pro analýzu ureázy v 5 µl kapce (obrázek 5).



Obr. 5: Schéma adsorptivní přenosové techniky (1) povrch pracovní elektrody (2) adsorpce proteinu na povrch pracovní elektrody (3) omytí pracovní elektrody (4) elektrochemická detekce

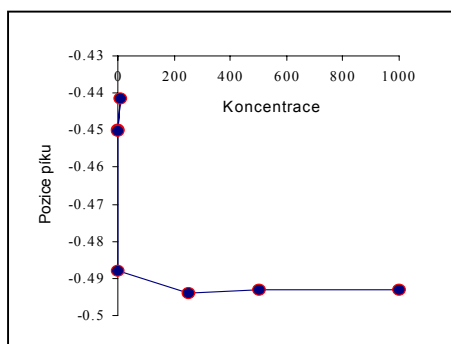
Pro dobrou analýzu bylo znovu nezbytné zaznamenat chování ureázy v závislosti na době akumulace a koncentraci. Závislost na době akumulace měla tvar Langmuierovské izotermy a maximální proudová odpověď byla pozorována při době akumulace 30 s (obrázek 6). Potenciál píku se posouval směrem k pozitivnějším potenciálům. Při 30 s době akumulace ureázy na povrch pracovní elektrody jsme studovali změny signálu na koncentraci. Získaná závislost byla také nelineární, ale v rozsahu (100 – 1 $\mu\text{g/ml}$) je pozorovaná závislost lineární se směrnici přímky; $y = 17.407x + 0.0452$; $R^2 = 0.9985$. Limit detekce byl určen jako $3S/N$ 200 ng/ml.



Obr. 6: Závislost AdTS DPV signálu ureázy na době akumulace (500 $\mu\text{g/ml}$)

Vliv niklu na stanovení ureázy

Enzym ureáza je závislý na přítomnosti niklu. Do struktury ureázy jsou vždy vázány dva atomy niklu. Zajímalo nás jak bude přítomnost niklu ovlivňovat stanovení ureázy. Nejdříve byla přidána konstantní koncentrace niklu (100 ng/ml). Sledovali jsme změny v DPV signálech ureázy v závislosti na její koncentraci. Na voltamogramech je možné pozorovat další signály, které pravděpodobně odpovídají komplexům ureázy s atomy niklu. Z tohoto důvodu jsme dále studovali vliv měnící se koncentrace niklu na signál ureázy. Se vzrůstající koncentrací niklu se objevují další dva signály komplexu ureázy s niklem. Pozorovali jsme, že s narůstající koncentrací niklu se DPV signál ureázy posouvá směrem k negativnějším potenciálům o více jako 50 mV (obrázek 7).



Obr. 7: Závislost pozice AdTS DPV signálu ureázy [V] na koncentraci přidaného niklu [ng/ml].

ZÁVĚR

Analýza proteinů a peptidů představuje v současné době velmi intenzivně a rychle se rozvíjející obor analytické biochemie. Významný nástroj pro detekci proteinů a peptidů představují elektroanalytické techniky umožňující vysoce senzitivní detekci. V naší práci jsme optimalizovali stanovení enzymu ureázy, která se vyskytuje nejen u rostlin, ale je přítomen i u řady bakterií a způsobuje závažná onemocnění.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory FRVŠ 164/2004, IGA MZLU 3/2004, IGA FaF VFU IG342012, GAČR 525/04/P132 a Národního výzkumného centra LN00A081.

LITERATURA

1. Sumner, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69, 435-441 (1926).
2. Mobley, M. L. & Hausinger, R. P. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53, 85-108 (1989).
3. Polacco, J. C. & Winkler, R. G. Soyabean leaf urease: a seed enzyme. *Plant. Physiol.* 74, 800-803 (1984).
4. Zehnálek, J. et al. in *VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů* (eds. Wimmerová, M., Beneš, P., Trnkova, L. & Zbořil, P.) x (Masarykova univerzita v Brně, Brno, 2004).
5. Zehnálek, J. & Minář, J. Response of sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.) to foliar application of DAM-390, ammonium nitrate and urea solutions. *Scripta Fac. Sci. Nat. Brun.* 17, 203-214 (1987).
6. Robotis, J. Two rapid urease tests comparison (CLO Vs PRONTO DRY) for the detection of HP infection. *Gastroenterology* 124, A176-A177 (2003).

7. Vilaichone, R., Mahachai, V., Nunthapisud, P., Thong-Gyam, D. & Kullavanijaya, P. Gastric juice urease test and brushing urease test for *Helicobacter pylori* detection. *Gut* 51, A111-A112 (2002).
8. Wisniewska, M. et al. Detection of specific *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stool samples in dyspeptic patients and healthy subjects. *Microbiology and Immunology* 46, 657-665 (2004).
9. Xia, H. H. X. & Wong, B. C. Y. Gastric biopsy-based rapid urease tests for the detection of *Helicobacter pylori*: Progress, advantages and limitations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17, 629-632 (2002).
10. Yee, Y. K. et al. Efficacy of enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* antigens in frozen stool specimens: local validation. *Alimentary pharmacology and Therapeutics* 16, 1739-1742 (2002).
11. Berdoz, J. & Cortesy, B. Human polymeric IgA is superior to IgG and single-chain Fv of the same monoclonal specificity to inhibit urease activity associated with *Helicobacter pylori*. *Molecular Immunology* 41, 1013-1022 (2004).
12. Tripathi, R. N., Nath, N. & Gandhi, A. P. Studies on the quality of canned baked soybeans. *J. Food Sci. Technol.-Mysore* 41, 131-134 (2004).
13. Šestáková, I., Kopanica, M., Havran, L. & Paleček, E. Constant Current Chronopotentiometric Stripping Analysis of Cd-Metallothionein on Carbon and Mercury Electrodes. Comparison with Voltammetry. *Electroanalysis* 12, 100 - 104 (2000).
14. Šestáková, I. & Mader, P. Voltammetry on mercury and carbon electrodes as a tool for studies of metallothionein interactions with metal ions. *Cellular and Molecular Biology* 46, 257-267 (2000).
15. Šestáková, I., Mihalová, D., Vodičková, H. & Mader, P. Electrochemical Behavior of Metallothioneins at Mercury and Carbon Electrodes. *Electroanalysis* 7, 237-245 (1995).
16. Šestáková, I., Vodičková, H. & Mader, P. Voltammetric Methods for Speciation of Plant Metallothioneins. *Electrochemistry* 10, 764-769 (1998).
17. Kizek, R., Trnková, L. & Paleček, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.* 73, 4801-4807 (2001).

18. Kizek, R., Trnkova, L., Sevcikova, S., Smarda, J. & Jelen, F. Silver electrode as a sensor for determination of zinc in cell cultivation medium. *Anal. Biochem.* 301, 8-13 (2002).
19. Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejdus, B. & Havel, L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. *Chem. Listy* 98, 8-16 (2004).
20. Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejdus, B. & Kubáň, V. Elektrochemické biosenzory v analýze zemědělských produktů a vzorků životního prostředí. *Chem. Listy* 97, 1003–1006 (2003).
21. Klejdus, B. et al. Sub-picomolar HPLC/MS determination of glutathione in the maize (*Zea mays L.*) kernels exposed by cadmium. *Anal. Chim. Acta* 520, 117-124 (2004).
22. Anon. (swissmodel.expasy.org/repository, 2004).
23. Palecek, E. New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 20, 179-194 (1988).
24. Palecek, E. Adsorptive transfer stripping voltammetry - determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface. *Anal. Biochem.* 170, 421-431 (1988).
25. Palecek, E. Adsorptive transfer stripping voltammetry: Effect of electrode potential on the structure of DNA adsorbed at the mercury surface. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28, 71-83 (1992).
26. Palecek, E., Jelen, F. & Postbieglová, I. Adsorptive transfer stripping voltammetry offers new possibilities in DNA research. *Studia Biophysica* 130, 51-54 (1989).
27. Paleček, E. & Postbieglová, I. Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer. *J Electroanal Chem* 214, 359–371 (1986).
28. Fojta, M. et al. Two-surface strategy in electrochemical DNA hybridization assays: Detection of osmium-labeled target DNA at carbon electrodes. *Electroanalysis* 15, 431-440 (2003).
29. Ozkan, D. et al. DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry* 58, 119-126 (2002).
30. Jelen, F., Fojta, M. & Palecek, E. Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs. *J. Electroanal. Chem.* 427, 49-56 (1997).
31. Jelen, F., Tomschik, M. & Palecek, E. Adsorptive stripping square-wave voltammetry of DNA. *J. Electroanal. Chem.* 423, 141-148 (1997).