

ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF METAL-BINDING PEPTIDES AND PROTEINS

ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ PEPTIDŮ A PROTEINŮ VÁZAJÍCÍCH KOVY

Vacek J.^{1,2}, Kizek R.¹, Havel L.², Klejdus B.¹

¹Ústav chemie a biochemie, ²Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: jan.vacek@iol.cz

ABSTRACT

Analytical determination of metal-binding peptides and proteins is very difficult. The most commonly used method of thiol determination is its reaction with Ellman reagent utilizing spectrophotometrically detection. Recently high sensitive electrochemical methods (differential pulse voltammetry and chronopotentiometry stripping analysis) and high selective separative method (liquid chromatography with mass spectrometry or with electrochemical detector) were described.

Keywords: metalloproteins, spectrophotometry, voltammetry, chronopotentiometry, high-performance liquid chromatography, heavy metals, glutathione, phytochelatin, metallothioneins

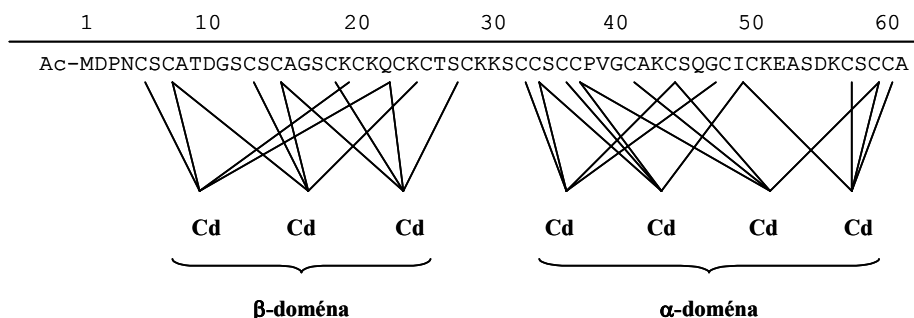
ABSTRAKT

Analytické stanovení peptidů a proteinů schopných vazby s ionty kovů je obtížné. Nejběžnější metodou stanovení je reakce těchto thiolů s Ellmanovým činidlem využívající spektrofotometrické detekce. Nedávno byly popsány vysoce citlivé elektrochemické metody jako diferenční pulzní voltametrie a chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza, a vysoce selektivní separační metoda kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, popřípadě s elektrochemickým detektorem.

Klíčová slova: metaloproteiny, spektrofotometrie, voltametrie, chronopotenciometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, těžké kovy, glutathion, fytochelatin, metalothioneiny

Zkratky: HPLC: vysoko-účinná kapalinová chromatografie (MS: hmotnostní spektrometrie, ECD: elektrochemická detekce); DPV: diferenční pulzní voltametrie; AdTS CPSA: adsorptivní rozpouštěcí přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou za konstantního proudu; GSH: glutathion (redukováná forma); GSSG: oxidovaný glutathion; PC: fytochelatin; MT: metalothionein; TFA: trifluoroctová kyselina; HMDE: rtuťová kapková visící elektroda; DTNB²⁻: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (Ellmanovo činidlo); TNB²⁻: 5-thio-2-nitrobenzoová kyselina, SH: sulfhydrylová skupina.

Obr. 2: Schématické vyznačení vazeb atomů kadmia s cysteiny v molekule metalothioneinu izolovaného z krysích jater. Model byl vytvořen pomocí ^1H ^{113}Cd NMR-spektroskopie. Nahoře nad linkou je uveden počet aminokyselin. Upraveno podle Vašáka *et al.*, viz. cit. [4].



Tab.: Vybrané proteiny vázající kovy

Kov	Protein
Zinek	Je známo asi 200 proteinů, z toho tvoří převážnou část enzymy jako jsou karboxypeptidasy, alkalické fosfatasy, anhydrasy, nebo aminopeptidasy.
Měď	Enzym tyrosinasa, dále ceruloplasmin, monoaminoxidasa, superoxidismutasa.
Olovo	Olovo je v krvi vázáno hemoglobinem, také albuminy a vysokomolekulárními globuliny.
Chrom	Cr^{3+} může být vázáno transferinem, v případě iontu Cr^{5+} dochází k redukci na trojmocnou formu v červených krvinkách.
Ostatní	Selen váže glutathionperoxidasa, železo je obsaženo v molekulách hemoglobinu, myoglobinu, cytochromu a také feritinu či transferinu.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

Všechny použité sloučeniny byly čistoty ACS dodané firmou Sigma Aldrich Chemical Corp. (USA). Roztoky byly připraveny v deionizované vodě stejného výrobce a též čistoty. Pouze fytochelatin (PC_2 , 90% čistota) byl dodán firmou Clonestar Biotech (CZ).

UV-VIS spektrofotometrie

Pro UV-VIS spektrofotometrické stanovení byl použit přístroj Hewlett Packard (Model 8452A, USA) s diodovým polem. Kyveta (1 cm) byla během měření umístěna v integrované termostátované cele. Stanovení bylo provedeno v objemu 100 μl fosfového pufru (7,3 pH) s přídatkem 5 μl DTNB $^{2-}$ (3 mM). Po přidání GSH byl vzorek inkubován 5 minut a poté analyzován.

Elektrochemická analýza

DPV analýza byla prováděna na elektrochemické stanici AUTOLAB (EcoChemie, Netherlands) v zapojení s tříelektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland). Byla použita pracovní elektroda – HMDE (plocha rtuťové kapky: 0.4 mm²), referenční elektroda (Ag/AgCl, 3M KCl) a platinový drátek jako pomocná elektroda. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných v GPES softwaru (EcoChemie). Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě.

DPV – Brdičkova procedura: Při stanovení GSH byla použit základní elektrolyt (pH 9,5): 1 M NH₄Cl + 1 M NH₄OH + 0,6 mM Co(NH₃)₆Cl₃. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od -0,9 do -1,7 V s následujícími parametry: potenciálový krok 5 mV/s, pulsní amplituda 25 mV, časový interval 0,5 s. Aby nedocházelo ke změnám koncentrace amonného pufru nebyl elektrolyt deoxygenován.

AdTS CPSA: Metoda byla aplikována pro stanovení MT. Jako základní elektrolyt jsme použili borátový pufr při pH 8 (0,05 M Na₂B₄O₇ + 0,1 M H₃BO₃). Parametry měření: rozpouštěcí proud -1 μA, doba akumulace 120 s, kondiční potenciál -0,1 V.

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

K separaci byl použit chromatografický systém Hewlett-Packard (HP 1100, Waldbronn, Německo) opatřený: vakuovým degaserem (G1322A), binární pumpou (G1312A), autosamplerem (G13113A), termostatem kolony (G1316A) a detektorem (diodové pole, model G1315A). Tento systém byl on-line zapojen s Hewlett-Packard hmotnostním detektorem (G 1946A, Palo Alto, USA). Ke kontrole a zpracování výstupních dat z on-line systému jsme použili program ChemStation (Rev A07.01). GSH byl separován na chromatografické koloně s reverzní fází MetaChem Polaris C18-A (150 mm x 2.0 mm, 3 μm velikost částic, Ansys Technologies Torrance, CA, USA) v izokratickém módu s acetonitrilem : 0,01% trifluorooctová kyselina v Milli-Q vodě (5 : 95) s rychlostí průtoku 0,1 ml/min (temperováno na 30 °C). Efluent byl detekován při 210 nm (diodové pole) a zaváděn do kvadrupolového hmotnostního detektoru v pozitivním ESI módu, tlaku plynu v nebulizeru – 50 psi, sušící plyn byl dusík 10 l/min při teplotě 350 °C a kapilární napětí 4 000 V. Fragmentace byla realizována při 40 eV. Spektra (m/z) byla snímána v selektovaném iontovém módu (SIM). Hmotnostní detektor byl kalibrován na ESI standardní roztok Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA).

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

HPLC-ECD systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0,001–9,999 ml/min), a chromatografické kolony Polaris C18A (150x2.0x3 μm) a osmi-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru

(Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující referenční, pomocnou (Pd) a osm porézních grafitových elektrod. V řídicím modulu je uložena chromatografická kolona, elektrochemický detektor, prostor je termostatovaný. Vzorek (5 μ l) byl injektován manuálně.

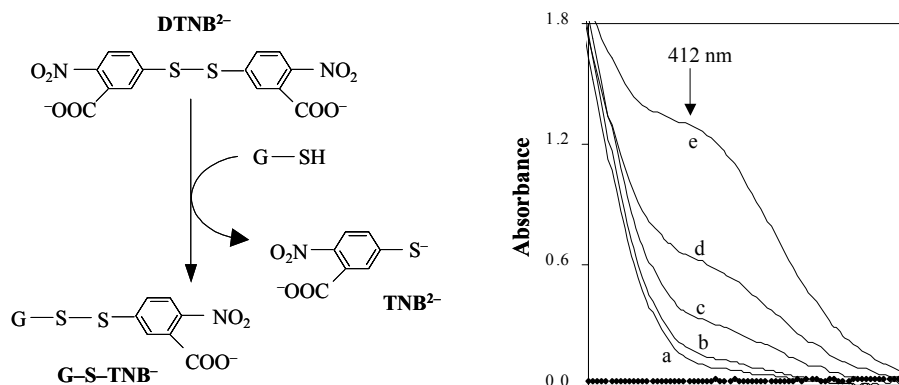
VÝSLEDKY A DISKUSE

Kovy vázající proteiny a peptidy, jako je metalothionein, fytochelatin a glutathion jsou molekuly typické vysokým zastoupením cysteinových zbytků. Této typické vlastnosti, lze velmi dobře využít pro jejich studium a stanovení.

Spektrofotometrické stanovení glutathionu

Pro stanovení thiolů byla Ellmanem v roce 1959 vyvinuta spektrofotometrická metoda, která se posléze osvědčila a začala být obecně využívána pro detekci molekul obsahujících síru [6]. Podstatou stanovení je reakce Ellmanova činidla: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB^{2-}) se sulfhydrylovými skupinami (SH) stanovované látky za vzniku ekvivalentního množství 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB^{2-}), který poskytuje absorpční vlnu při 412 nm (reakční schéma viz. obr. 3) [7]. Na obrázku 3 jsou ukázány spektra TNB^{2-} získané reakcí Ellmanova činidla s různými koncentracemi redukované formy glutathionu. Vzhledem k možnosti využití této metodiky pro stanovení celého spektra sírných látek anorganické i organické povahy, byla metoda modifikována v řadě analytických pracích [7-9].

Obr. 3: Schématická reakce Ellmanova činidla (DTNB^{2-}) s látkou obsahující sulfhydrylovou skupinu (glutathion: G-SH). Produktem reakce je G-S-TNB^- a TNB^{2-} (vlevo). UV-VIS spektrofotometrické záznamy TNB^{2-} (vpravo). K Ellmanovu roztoku byly přidány různé koncentrace glutathionu: (a) 6,25 (b) 12,5 (c) 25 (d) 50 (e) 100 μM . Pro analýzu byl použit 100 μl objem vzorku; fosfátový pufr (7,3 pH). Ke každému vzorku bylo přidáno 5 μl 3 mM DTNB^{2-} (5 minut inkubace). Tečkovaně je vyznačeno spektrum samotného glutathionu, který v spektrální oblasti uvedeného grafu neposkytuje absorpenci.

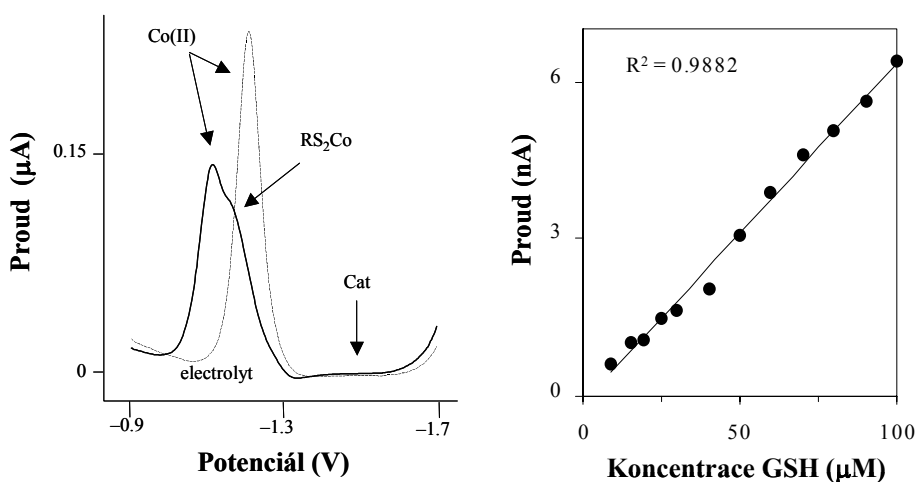


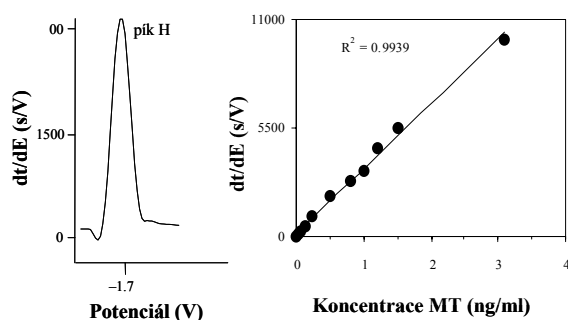
Elektrochemická analýza

Vazba M^{n+} iontů do struktur biomakromolekul je velmi důležitá pro udržení biologicky aktivní konformace. Jednou z možností jak tyto vazby studovat je použití nedestruktivních metod. K těmto účelům můžeme využít elektrochemii. Pro analýzu se nejčastěji používá rtuťová elektroda (HMDE), ale v poslední době i elektroda pevná např. Cu-amalgamová elektroda [10]. Jako velmi efektivní se jeví pozorování tzv. katalytických proudů – vznikajících na rtuťových elektrodách při poměrně negativních potenciálech. Tyto proudové odezvy jsou pozorovány v přítomnosti molekul obsahujících sírné atomy.

Nejvíce rozšířenou je *Brdičkova metoda*. Stanovovaná látka přitom vytváří specifické Co-komplexy. Tyto komplexy se tvoří po přidání do roztoku: $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ v amonném (popř. borátovém) pufru. V našich experimentech jsme se pokusili stanovit redukovaný glutathion (Obr. 4). Jak je z voltamogramu patrné byly získány tři elektrochemické odpovědi a sice redukční pík Co^{2+} ($\sim -1,1$ V), pík označený jako RS_2Co což je komplex Brdičkovy roztoku s GSH ($\sim -1,15$ V) a katalytický pík *Cat* ($\sim -1,4$ V). Výška píku *Cat* (odpovídající proudové odezvě) byla vynesena proti měnící se koncentraci GSH (viz. Obr. 4).

Obr. 4: Voltamogram 30 μM glutathionu (GSH) zaznamenaný diferenční pulzní technikou na rtuťové elektrodě (HMDE). Měření bylo prováděno v 1 ml elektrolytu (Brdičkova roztok: NH_4Cl a NH_4OH 1 M, + 0,6 mM $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, pH 9,5). Elektrolyt je vyznačen čárkovaně. V pravé části obrázku 4 je ukázána kalibrační závislost GSH v rozsahu 10–100 μM . Vysvětlivky: *Cat* – katalytický signál; $\text{Co}(\text{II})$ – redukční pík kobaltu; RS_2Co – komplex GSH s Brdičkovou reagentií





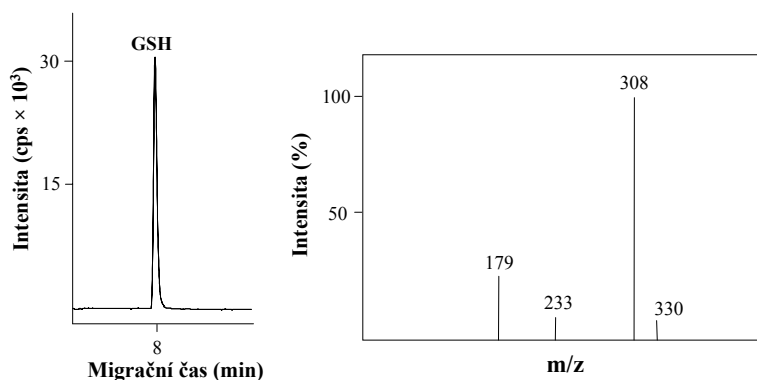
Obr. 5.: Chronopotenciogram 1 ng/ml metalothioneinu (MT1A) měřený metodou AdTS CPSA; izolát byl získán z králíčích jater (obsah kovů: 5,9 % Cd; 0,5 % Zn). Kalibrační závislost (AdTS CPSA) v rozsahu 0,001–3 ng/ml je vyobrazena v pravé části obrázku.

Nedávno bylo popsáno vylučování vodíku ze složek základního elektrolytu ve velmi negativních potenciálech v přítomnosti proteinů. Elektrochemická odezva zaznamenaná chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou (CPSA) byla označena jako *pík H* [11-14]. Na Obr. 5 je chronopotenciogram 1 ng/ml metalothioneinu. Konkrétně 5 μ l vzorku bylo adsorbováno na HMDE, po 120 s byla elektroda opláchnuta a přenesena do nádoby s borátovým pufrům (tzv. AdTS), kde byl získán uvedený CPSA záznam (Obr. 5).

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie glutathionu

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie umožňuje efektivní separaci. Detekce je možná řadou rozdílných detektorů mezi nejběžnější patří UV detektor diodového pole, případně méně využívané detektory elektrochemické. My jsme studovali koncentrace glutathionu za využití hmotnostního detektoru. Při nastavení optimálních parametrů, byl GSH pozorován při retenčním čase 8 min. Limit detekce redukovaného glutathionu metody byl stanoven na 3 fmol GSH na kolonu. Záznam hmotnostního spektra je zobrazen na obr. 6. Pík glutathionu (GSH $M_r = 307$) byl sledován při m/z 308 což je molekulární iont $[M+H]^+$, m/z 330 odpovídá hmotě iontu $[M+Na]^+$ a další píky m/z 179 a m/z 233 jsou specifické produkty fragmentace molekuly glutathionu.

Obr. 6: Chromatogram 1 nM GSH detegovaného hmotnostním detektorem (vlevo) a samotné MS-spektrum (vpravo). Podrobnosti v textu a sekci Materiály a metody.



Vysoko-účinná kapalinová chromatografie fytochelatinu

Na chromatografické koloně při použití isokratické mobilní fáze obsahující 92% 80 mM kyseliny trifluoroctové a 8% acetonitrilu a optimálním průtokem mobilní fáze 0,4 ml/min byl separován PC₂ v retenčním čase 17,10 min. Rovnice kalibrační přímky pro PC₂: $y = 0,0118x - 0,3081$, $R^2 = 0,9943$. Limit detekce byl PC₂ 500 ng/ml. Vzhledem k tomu, že ECD je složen z osmi porézních uhlíkových elektrod lze využít při stanovení součet získaných výšek píku. Podrobnosti týkající se HPLC-ECD analýzy cysteinu, GSH a PC byly popsány jinde [15].

ZÁVĚR

Analytická chemie proteinů a peptidů s homeostatickou nebo detoxikační funkcí je dynamicky se rozvíjející součástí dnešní biochemie a biofyziky. V tomto krátkém příspěvku bylo pojednáno především o skupině látek jako je GSH, PC a MT, které obsahují molekuly cysteinu díky jimž dochází k vazbě iontů kovů. Ke studiu těchto látek v nativním stavu se kromě výše uvedených metod efektivně využívá kapilární elektroforéza (CE) [5].

PODĚKOVÁNÍ

Práce na této publikaci byla financována z dlouhodobého záměru Agronomické fakulty MZLU č. 4321 00001, FRVŠ 1203/2003 a Národního výzkumného centra LN00A081 a Grantu 203/02/0422 od GA ČR.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. Vacek, R. Kizek, B. Klejdus, L. Havel, *Biol. Listy* 68 (2003) 133–153.
- [2] E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, *Science* 320 (1985) 674–676.
- [3] M.H. Zenk, *Gene* 179 (1996) 21.
- [4] J.H.R. Kägi, A. Schäffer, *Biochemistry* 27 (1988) 8509–8515.
- [5] M.B.C. Guntinas, G. Bordin, A.R. Rodriguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 369–378.
- [6] G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [7] C.K. Reiner, G. Kada, H.J. Gruber, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 266–276.
- [8] O. Nekrassova, P.C. White, S. Threlfell, G. Hignett, A.J. Wain, N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, *Analyst* 127 (2002) 797–802.
- [9] P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 224–227.
- [10] B. Yosypchuk, I. Šestáková, L. Novotný, *Talanta* 59 (2003) 1253–1258.
- [11] M. Tomschik, L. Havran, M. Fojta, E. Paleček, *Electroanalysis* 10 (1998) 403.
- [12] R. Kizek, L. Trnková, E. Paleček, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4801.
- [13] L. Trnková, R. Kizek, J. Vacek, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 57–61.
- [14] M. Strouhal, R. Kizek, J. Vacek, L. Trnková, M. Němec, *Bioelectrochemistry* 60 (2003) 29.
- [15] V. Adam, R. Kizek, J. Vacek, B. Klejdus, L. Trnková, L. Havel, *Mendelnet* 2003.