# VARIOUS METHODS FOR STUDYING HEAVY METALS AFFECTING OF CARPS

## SPECIÁLNÍ METODY PRO STUDIUM VLIVU TĚŽKÝCH KOVŮ U KAPRŮ

**Bláhová P.[1)], Křížková S.[1)], Šobrová P.[1)], Diopan V.[1,2)], Beklová M.[3)], Adam V.[1)], Svobodová Z.[4)], Kizek R.[1)]**

[1]Ústav chemie a biochemie, a [2]Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; [3]Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, a [4]Oddělení veterinární toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno

E-mail: blahovapavlina@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

## ABSTRACT

The aim of this work was determination the heavy metals content in the carps with use electrophoresis and electrochemical methods. We used binding of heavy metals to protein metallothionein (MT) and determine MT in carp tissues by adsorptive transfer stripping technique in connection with differential pulse voltammetry – Brdicka reaction and by SDS-PAGE. Carp was exposed action of cadmium for 14 days. As samples gonads, muscles, livers, kidney and blood were used. In this tissues level of MT and concentration of heavy metal with used electrochemical methods was determined. Electrophoresis (PAGE) was utilized as a comparative methods for determine MT. Of our results implicit that MT can be used as indicator higher content of heavy metals in animals' food products.

**Key words**: metallothionein, cadmium, carp, electrochemical and electrophoresis detection.

## ABSTRAKT

Cílem práce bylo stanovení obsahu těžkých kovů u kaprů s použitím elektrochemických a elektroforetických metod. Využili jsme vlastnosti těžkých kovů vázat se na protein metalothionein (MT), který jsme dále detekovali adsorptivní přenosovou technikou ve spojení s diferenční pulsní voltametrií – Brdičkova reakce a SDS-PAGE u vzorků tkáně kapra obecného. Kapr obecný byl vystaven působení různých koncentrací kadmia po dobu 5 dnů. Ze získaných vzorků kaprů byly odebrány gonády, svalovina, játra, ledviny a krev. V těchto tkáních byla následně detekována hladina MT a koncentrace těžkého kovu pomocí elektrochemických technik. Dále byla použita SDS-PAGE jako srovnávací technika pro detekci MT. Zjistili jsme, že se vzrůstající koncentrací těžkého kovu, rostl obsah MT. Zjistili jsme, že MT může sloužit jako ukazatel zvýšeného obsahu těžkého v živočišných produktech.

**Klíčová slova:** metalothionein, kadmium, kapr, elektrochemická a elektroforetická detekce.

## ÚVOD

Ryby jsou ideálním bioindikátorem zatížení životního prostředí těžkými kovy a to díky všeobecnému výskytu, velikostní a věkové diferenci [1]. V České republice i ve světě se řadí mezi nejvíce rozšířenou sladkovodní rybu kapr obecný (*Ciprinus carpio*). Podle ČSN 46 6802 je řazen do skupiny tržních ryb. Proto je ve tkáních těchto ryb třeba monitorovat hladiny polutantů. Mezi jedním ze závažných polutantů se řadí těžké kovy, z nichž sledované jsou např. kadmium, olovo, rtuť. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí obsah kadmia v rybách kolem 20 μg/kg. Tolerovaný týdenní příjem kadmia je v rozmezí 500-600 μg/osobu, což odpovídá týdennímu přijmu 7 μg/kg a koresponduje s denním příjmem 70 μg na osobu nebo 1 μg na kg [2].

Kadmium patří mezi prvky, které vysoce zatěžují životní prostředí. Na obsahu tohoto kovu se podílí spalovací procesy, aplikace čistírenských kalů, hnojiva a jiné [3]. Od 80. let je zaznamenán vzrůst zatížení živočišných produktů kadmiem a naopak u ostatních rizikových prvků je patrný pokles [4]. Proto je snaha najít alternativní způsoby jak hodnotit kvalitu potravinových výrobků vzhledem k obsahu těžkých kovů. Jednou z možností je detekovat nízkomolekulární protein metalothionein (MT). Jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 6-10 kDa a díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, se podílí na detoxikačních procesech a tím udržuje homeostázu v organizmu. MT se skládá ze dvou vazebných domén α a β, které jsou složeny z cysteinových klastrů. N-terminální část proteinu je značená jako β doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem až 12 atomů [5,6]. Pro detekci MT jsou nejčastěji používané elektroforetické metody, méně často je pak používaná vysoce účinná kapalinová chromatografie, afinitní chromatografie či spektrofotometre [7] V posledních letech je zaznamenán nárůst použití elektrochemických metod a využití jejich vysoké senzitivity [7-10].

V naší práci jsme se zaměřili na využití moderních elektroforetických a elektrochemických technik pro detekci hladin MT v tkáních kapra obecného (*Ciprinus carpio*), které byly vystaveny působení různých koncentrací kadmia.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Biologický materiál*

Kapři byli dodáni Výzkumným ústavem rybářství Vodňany. Byli uloženi ve 100 l akváriích, kde jim byla denně měněna voda a přidávána příslušná koncentrace kadmia (2,5mg/l; 5mg/l; 7mg/l; 10mg/l; 12,5 mg/l). Vzorky pro stanovení MT byly připravovány podle postupu dříve publikovaného [7]. Vzorek byl umístěn na 15 min do 99 $^{o}$C (Eppendorf 5430, USA), poté ochlazen na 4 $^{o}$C. Denaturovaný homogenát byl centrifugován při 4 $^{o}$C, 15 000 *g* po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA).

***Chemikálie***

Použili jsme 5% AA (nanášecí gel), 10% AA (seperační gel), 1,88 M Tris HCl, 0,625 M Tris HCl, 0,5 % SDS, redestilovaná voda, TEMED, 10% APS na přípravu SDS-PAGE. K western blotu byla pužita nitrocelulosová membrána, filtrační papír Whatman o rozměru 8*11 cm, pufr pro elektropřenos (20mM Tris, 150 mM glycin, 20% methanol o pH 8,4, roztok pro blokování membrány (5% odtučněné mléko v pufr o pH 7,5, roztok A (5% odtučněné mléko V TBS s 0,1 % Tweenem 20), roztok B (TBS s 0,1 % Tweenem 20), roztoky pro detekci křenové peroxidázy, 0,1 M Tris- HCl pufr o pH 9,5 s 0,5 mM MgCl2, roztok C (5% roztok NBT[ p-nitrotetrayoliová modř] v 70 % dimethylformamidu, roztok D ( 3% roztok BCIP [5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát] ve 100% dimethylformamidu, vzorek bílkovin, primární slepičí protilátka od firmy Hena s.r.o.vAnti MT, sekundární slepičí protilátky proti primárním slepičím protilátkám značené křenovou peroxidázou od firmy Hena s.r.o., chromogenní substrát pro detekci peroxidázy (9 ml 0,01 M Tris-HCl o pH 7,6; 1 ml 0,3 % $NiCl_2$, 10 µl 30 % $H_2O_2$).

***Elektroforetická analýza***

K měření jsme použili elektroforézu Whatman Boimetra a blotovací zařízení na western blotting od téže firmy. SDS-PAGE byla zhotovena na 15% gelu podle návodu dodaným výrobcem a western blotting dle laboratorních návodů Káš 2005. Po skončení separace proteinů na akrylamidovém gelu jsme mohli připravit blotovací sendvič. Na přístroji pro western blotting bylo nastaveno napětí na 50 V po dobu jedné hodiny. Následovalo blokování membrány a to vložením na 1 hodinu do blokovacího roztoku (5% odtučněné mléko v pufr o pH 7,5). Takto připravené nitrocelulosové membrány se nechaly inkubovat po jedné hodině v první protilátce a následně v druhé, značené křenovou peroxidásou. Posledním krokem je detekce křenové peroxidázy pomocí chromogenního substrátu (9 ml 0,01 M Tris-HCl o pH 7,6; 1 ml 0,3 % $NiCl_2$, 10µl 30 % $H_2O_2$) diaminobenzidinu (DAB).

***Elektrochemické měření***

Analýza vzorků byla provedena pomocí univerzálního elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (Eco Chemie, Nizozemí) v tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), jejíž plocha byla 0,4 $mm^2$. Pomocná elektroda byla ze skelného uhlíku a referentní elektroda Ag/AgCl/ 3 M KCl. Elektrolyt, určený pro Brdičkovu reakci, se skládá ze dvou hlavních složek. První je amonný pufr. Ten se vytvoří smícháním 1 M roztoku chloridu amonného ($NH_4Cl$) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 1 M vodného roztoku čpavku ($NH_3$) (Fluka, Milano, Itálie) ve stejném poměru. Druhou složkou je hexaaminochlorid kobaltitý (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), jehož koncentrace v elektrolytu byla v rámci práce optimalizována. Výsledné pH elektrolytu bylo 9,6. Tato směs se uchovávala při 4°C.

Elektrolyt byl měněn po každém změřeném vzorku a výsledné voltamogramy se po dále upravovaly (vyhlazování s využitím filtru Savitzky a Golay), Měření probíhalo Brdičkovou metodou, kde se využívá diferenční pulzní voltametrie. Při našem měření byl nataven

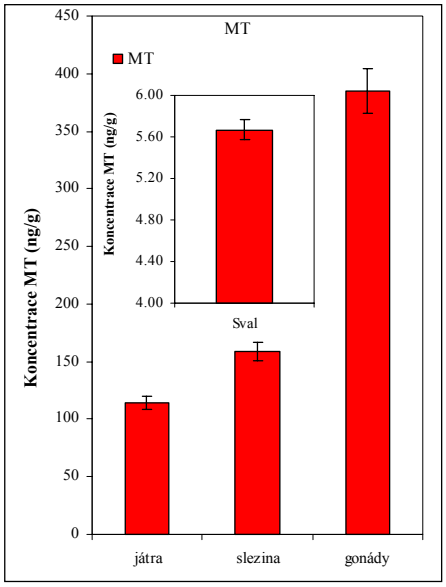
modulační čas na hodnotu 0,057s a časový interval 0,2s. Měření probíhalo v potenciálu od -0,7 do -1,75. V tomto intervalu byly pozorovány všechny potřebné proudové odezvy pro stanovení MT. Krokový potenciál byl 1mV a modulační amplituda 0,025 V.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

K našemu experimentu stanovení kadmia pomocí detekce MT jsme využili adsorptivní přenosovou technikou ve spojení s diferenční pulsní voltametrií – Brdičkova reakce a elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE).

Při detekci metallothioneinu jsem postupovali podle návodu Vacek et al. [10] a určili jsem kalibrační křivku ($y = 0.506x - 3.7144$; $R^2 = 0.9974$). Určená závislost byla striktně linární od 0,1-500 ng/ml. Po provedené kalibraci jsme mohli začít s vlastním rozborem jednotlivých tkání. Nejvyšší koncentraci kadmia a s tím korespondující obsah MT jsem naměřili v gonádách (620 na gram čisté váhy), následovaly játra, slezina a svalovina (Obr. 1). Je předpoklad, že v těchto orgánech probíhá intenzivní metabolismus kovů, a proto jsou zde detoxikační mechanismy účinné a také obsah MT je velmi vysoký [11,12]. Námi navržená metodika umožnila, že jsme mohli stanovit obsah MT i v tkáních jako je svalovina, kde je obsah do 10 ng/g. Obsah MT v rybách je závislý na jejich metabolismu, velikosti, stáří, vystavení působení těžkých kovů.

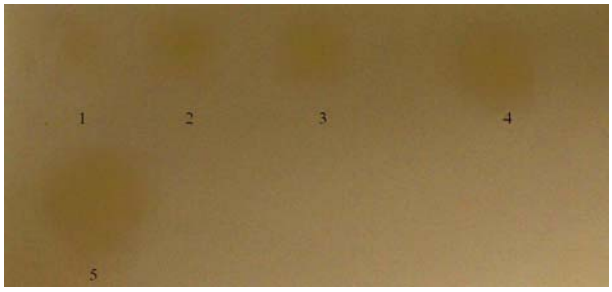
*Obr. 1 Hladina MT v různých tkáních kapra obecného.*




Pomocí SDS-PAGE byla v kaprech detekována přítomnost proteinu o velikosti cca 7,7 KDa, přičemž intenzita proužku se s zvyšující koncentrací dávky kadmia zvyšovala. Identita proteinu byla potvrzena pomocí detekce specifickými protilátkami, konkrétně pomocí dot blotu (Obr. 2). Koncová reakce byla použita pro detekci MT po rozdělení proteinů na 15% AA gelu a přenosu proteinů na memebránu (western blotu), intenzita proužku se s rostoucí

koncentrcí Cd a dobou expozice v obou případech zvyšovala, což velmi dobře korespondovalo s elektrochemickou detekcí MT.

*Obr. 2 Detekce primární protilátky o koncentracích (1. 2,85µg/µl; 2. 5,7µg/µl; 3. 28,5µg/µl; 4. 85,8µg/µl; 5. 114µg/µl)*




## ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že se stoupícím obsahem kadmia u námi analyzovaných vzorků kapra obecného vzrůstá koncentrace MT. Z výsledků vyplývá, že MT by mohl být použit při určování obsahu těžkých kovů a má určitě vysoký potenciál i v jiných studiích. Je třeba hledat vysoce citlivé, snadné a v neposlední řadě cenově dostupné detekční metody [13,14]. Můžeme říci, že námi použité techniky tyto kritéria splňují.

## LITERATURA

[1] F. Yilmaz Bioaccumulation of heavy metals in water, sediment, aquatic plants and tissues of Cyprinus carpio from Kizilirmak, Turkey, Fresenius Environmental Bulletin 15 (2006) 360-369.

[2] G. Nordberg Excursions of intake above ADI: Case study on cadmium, Regulatory Toxicology and Pharmacology 30 (1999) S57-S62.

[3] Nedoma Anorganická a analytická chemie, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 1998.

[4] Ingr Jakost a zpracování ryb, 2005.

[5] J.H.R. Kagi and A. Schaffer Biochemistry of Metallothionein, Biochemistry 27 (1988) 8509-8515.

[6] J.H.R. Kagi Overview of metallothionein. Metallobiochemistry Part B: metallothionein and related molecules, Methods Enzymol. 205 (1993) 613-626.

[7] R. Kizek, L. Trnkova and E. Palecek Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, Analytical Chemistry 73 (2001) 4801-4807.

[8] R. Prusa, D. Potesil, M. Masarik, V. Adam, R. Kizek and F. Jelen Fast and sensitive electrochemical detection of native, denatured, and aggregated forms of tumor suppressor protein p53, Molecular Biology of the Cell 15 (2004) 249A-249A.

[9] L. Trnkova, R. Kizek and J. Vacek Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping, Bioelectrochemistry 56 (2002) 57-61.

[10] J. Vacek, Z. Andrysik, L. Trnkova and R. Kizek Determination of azidothymidine - an antiproliferative and virostatic drug by square-wave voltammetry, Electroanalysis 16 (2004) 224-230.

[11] G. Nordberg, T. Jin, P. Leffler, M. Svensson, T. Zhou and M. Nordberg Metallothioneins and diseases with special reference to cadmium poisoning, Analusis 28 (2000) 396-400.

[12] M. Nordberg and G.F. Nordberg Toxicological aspects of metallothionein, Cellular and Molecular Biology 46 (2000) 451-463.

[13] V. Adam, J. Petrlova, D. Potesil, P. Lubal, J. Zehnalek, B. Sures and R. Kizek New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatics to DNA structure, Chemicke Listy 99 (2005) 353-393.

[14] S. Billova, R. Kizek, F. Jelen and P. Novotna Square-wave voltammetric determination of cefoperazone in a bacterial culture, pharmaceutical drug, milk, and urine, Analytical and Bioanalytical Chemistry 377 (2003) 362-369.

**Poděkování:** Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, FRVŠ 699/F4a a MSMT 6215712402.