

Bloková praktika: 16. – 18. 12. 2009

**CÍLENÁ ANALÝZA ADENINOVÝCH NUKLEOTIDŮ A KOENZYMŮ  
V BAKTERII *PARACOCCLUS DENITRIFICANS* ZA RŮZNÝCH  
METABOLICKÝCH STAVŮ BUŇKY**

Časový rozvrh:

Středa (16. 12. 2009): příprava buněk s rozdílnými koncentracemi intracelulárních metabolitů, extrakce metabolitů z buněk.

Čtvrtek (17. 12. 2009): analýza vzorků pomocí kapilární elektroforézy, vyhodnocení dat.

# 1. TEORIE K CVIČENÍ

## 1.1. Kapilární elektroforéza

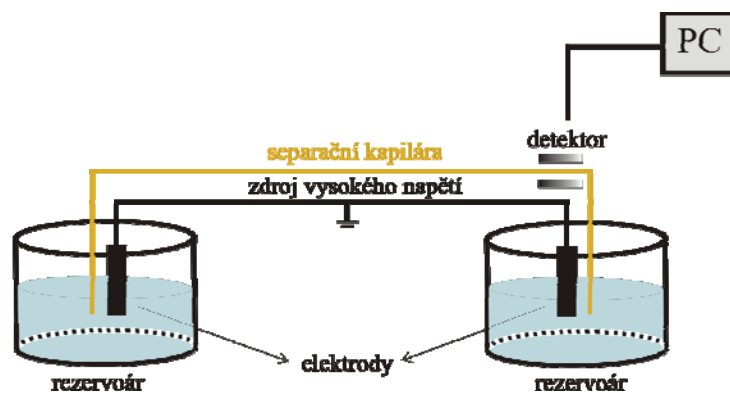
Kapilární elektroforéza (CE) v současné době zaznamenává obrovský rozvoj. Nabízí rozmanité aplikační možnosti a tím umožňuje analýzu širokého spektra látek. Její hlavní výhodou je jednoduché provedení, velmi malá spotřeba vzorku a především minimální organické odpady. Nezanedbatelnou výhodou je i vysoká účinnost a rychlost analýzy.

Podle způsobu provedení lze kapilární elektroforézu rozdělit do několika módů – kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izotachoforéza (CITP) a kapilární izoelektrická fokusace (CIEF). Modifikací kapilární zónové elektroforézy je micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC).

Sestava zařízení pro všechny módy CE se skládá z:

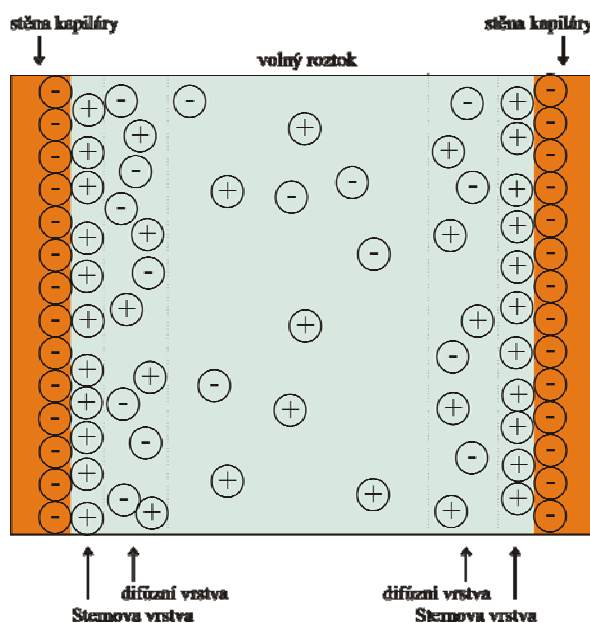
- zdroje vysokého napětí (stejnoseměrné; vysokonapěťové; v rozsahu od 0 do  $\pm 30$  kV; připojeno na elektrody),
- separační kapiláry (z křemenného skla; potažena vrstvou polyimidu; vnitřní průměr kapiláry: 50 – 100  $\mu\text{m}$ , vnější: 350 – 400  $\mu\text{m}$ ; celková délka kapiláry se obvykle pohybuje od 20 do 100 cm; konce kapiláry jsou ponořeny do rezervoárů),
- rezervoárů (tj. zásobníky s pufrů, vzorky nebo chemikáliemi na promývání kapiláry; snadno mezi sebou nahrazovány),
- dvou elektrod (zavedené do rezervoárů),
- detektoru (široké množství detekčních technik: nejpoužívanější UV-VIS absorbance, méně časté fluorescence, hmotnostní spektrometrie, chemiluminiscence, nebo elektrochemické detektory).

Uspořádání je znázorněno na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu.

Základem CE separace je **elektroosmotický tok (Electro Osmotic Flow – EOF)**, což je tok kapaliny v celém objemu kapiláry. Ionizací silanolových skupin vnitřního povrchu kapiláry dochází ke vzniku záporných nábojů. U těchto záporně nabitých skupin se shromažďují kladně nabití ionty z elektrolytu, kterým je kapilára naplněna. Toto se však neděje rovnoměrně v celém objemu kapaliny, ale směrem ke středu průřezu kapiláry se vliv záporně nabitě stěny kapiláry a tudíž i shromažďování kationtů snižuje a tím vzniká elektrická dvojvrstva. Těsně u povrchu kapiláry je první část dvojvrstvy, tzv. Sternova vrstva. Tato vrstva je fixní tzn., že po aplikaci napětí se nepohybuje. Ke katodě jsou přitahovány kationty druhé části dvojvrstvy, tzv. difúzní vrstvy. Jelikož jsou tyto kationty solvatovány, jejich pohyb vyvolá tok celého roztoku v kapiláře. Důležitým znakem EOF je rovný profil, čímž nepřispívá k rozmývání zón. EOF způsobuje pohyb všech částic, bez ohledu na jejich náboj a velikost, s rostoucím pH roste i síla EOF.



Obrázek č. 2: Distribuce náboje v kapiláře.

### 1.1.1. CZE

Kapilární zónová elektroforéza je někdy také označována jako kapilární elektroforéza ve volné kapiláře a patří mezi nejjednodušší a zároveň i nejrozšířenější módy CE. Separace analytů je provedena v tenké kapiláře bez speciálních úprav a za použití jednoho základního elektrolytu (BGE), který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Jednotlivé zóny (analyty se stejnou elektroforetickou mobilitou) jsou od sebe

odděleny a migrují různou konstantní rychlostí, takže se v průběhu separace od sebe stále více vzdalují. Pomocí CZE je možno separovat pouze nabitě molekuly, díky separaci založené na různých mobilitách analytů není schopna rozseparovat neutrální látky pohybující se stejnou rychlostí jako EOF. Separace pomocí CZE jsou optimalizovány výběrem vhodného elektroforetického systému s vhodným pH, iontovou silou a složením.

### ***1.1.2. MEKC***

MEKC separuje ionty a především neutrální sloučeniny na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a micelární fází (pseudostacionární fáze). Vytvoření micelární fáze docílíme rozpuštěním surfaktantu v základním elektrolytu o koncentraci vyšší než je jejich kritická micelární koncentrace (např: 8-9 mM pro SDS), aby došlo k agregaci surfaktantů a k tvorbě micel. Za neutrálních a bazických podmínek je EOF dostatečně silný na to, aby micely unášel k detektoru. Během migrace micely interagují s analytem chromatografickým způsobem jak přes hydrofobní tak i elektrostatické interakce. Čím více analyt interaguje s micelami, tím delší je jeho migrační čas, zatímco analyt, který neinteraguje s micelami, migruje pouze pomocí EOF.

### ***1.1.3. Prekoncentrační techniky v CE***

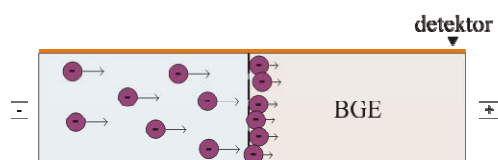
U CE metod s klasickým dávkováním je z důvodu zachování separační účinnosti běžně nadávkováno do kapiláry méně než 1 % objemu kapiláry, což odpovídá pouze několika desítkám nanolitrů vzorku. S tímto faktem je pak spojena hlavní nevýhoda CE a tou je nízká koncentrační citlivost. Jiné detektory (fluorescenční, elektrochemické) se sice vyznačují vyšší citlivostí, ale je možné je aplikovat na méně typů analytů i po modifikaci pomocí chemické derivatizace. Ekonomicky výhodnou a technicky nenáročnou cestu ke zvýšení detekční citlivosti CE analýz s UV detekcí přináší on-line prekoncentrační techniky, díky kterým na základě rozdílných vlastností mezi vzorkem a základním elektrolytem (vodivost, pH, přídavek aditiv) dochází přímo v kapiláře k postupnému zakoncentrování analytů do úzkých zón. Díky tomu je možné nadávkovat do kapiláry větší množství vzorku, výsledkem je pak zvýšení koncentrační citlivosti.

Dosud jsou známé **4 hlavní on-line prekoncentrační techniky**, které se opírají o odlišný fokusační mechanismus: „field enhanced stacking“, „sweeping“, „dynamic pH junction“ a „transient isotachopheresis“. Kombinací těchto technik často dochází k dalšímu zvýšení

schopnosti koncentrace nebo k rozšíření řad analytů efektivně koncentrovaných, např. „dynamic pH junction- sweeping“ nebo „field enhanced stacking- sweeping“ atd. My se zaměříme na nejčastěji používaný „field enhanced stacking“ on-line prekoncentrační techniku.

### „Field enhanced stacking“

„Field enhanced stacking“ prekoncentrační technika (do češtiny překládáno jako zakoncentrování vzorku zesílením pole) využívá rozdílného elektrického pole v zóně vzorku a v zóně základního elektrolytu (obr. 3). Jestliže je vzorek připraven v matrix s nízkou vodivostí (např. rozpuštěn ve vodě nebo v alespoň 10 x méně koncentrovaném matrix než základní elektrolyt), tak po aplikaci napětí bude v zóně vzorku vyšší intenzita elektrického pole než v zóně základního elektrolytu. A protože rychlost iontů je úměrná intenzitě elektrického pole ( $v = \mu_e \times E$ , kde  $v$  je rychlost iontu,  $\mu_e$  je elektroforetická pohyblivost a  $E$  je intenzita aplikovaného elektrického pole), analyty v zóně vzorku se budou pohybovat rychleji než v zóně základního elektrolytu. Vlivem náhlého zpomalení rychlosti migrace analytů na rozhraní obou zón pak dojde k zakoncentrování, tzv. stacking analytů. Separace pak dále probíhá klasickým mechanismem CZE, ale s užší počáteční zónou vzorku. A platí také obráceně, jestliže je vzorek připraven v matrix s vyšší vodivostí než má základní elektrolyt, tak po aplikaci napětí budou analyty v zóně vzorku migrovat pomaleji než v zóně základního elektrolytu a vlivem náhlého zrychlení migrace po doputování analytů do zóny základního elektrolytu dojde k nežádoucímu rozšíření zón. V případě „field enhanced stacking“ je většinou snaha EOF buď co nejvíce potlačit (obr. 3), nebo použít zásadité základní elektrolyty, tak aby velikost EOF byla větší než elektroforetická pohyblivost analytu (obr. 4).

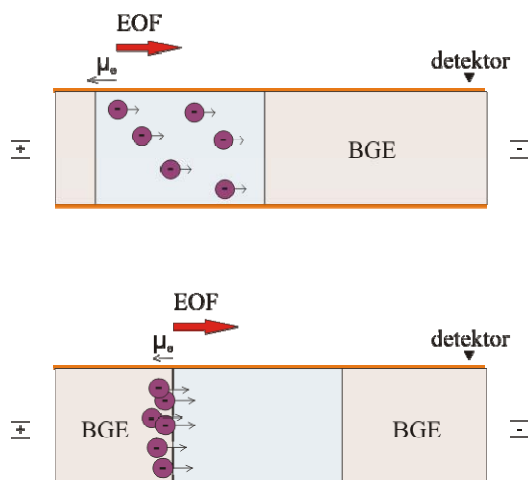


Obrázek č. 3: Field enhanced stacking, EOF potlačen.

VLEVO: zóna vzorku – zóna s nízkou elektrickou vodivostí →  
zóna s vysokým elektrickým polem

VPRAVO: zóna základního elektrolytu – zóna s vysokou elektrickou vodivostí →  
zóna s nízkým elektrickým polem.

V případě separace kationtů je nutné obrátit polaritu kladeného napětí!



**Obrázek č. 4:** Field enhanced stacking

Rychlost EOF je vyšší než rychlost elektroforetického pohybu.

Tuto on-line prekoncentrační techniku můžeme využít jak v módu CZE, přičemž můžeme separovat pouze nabitě analyty, tak v módu MEKC, kde pomocí přidavku surfaktantu do základního elektrolytu můžeme separovat i neutrální látky.

## 1.2. Nukleotidy a koenzymy

Jednou z hlavních úloh **purinových a pyrimidinových nukleotidů** je účast ve fosfotransferázových reakcích, při kterých hydrolyzují svůj fosfát a tím pohánějí jinak endergonické reakce. Slouží též k regulacím (např. ADP řídí rychlost mitochondriální oxidativní fosforylace, cAMP a cGMP plní úlohu „druhého posla“), ADP je substrát a ATP je produkt oxidativní fosforylace a ve formě monomerů jsou významnými prekurzory RNA a DNA.

Analýza nukleotidů ve tkáních a buňkách je široce využívána v biochemických, medicínských a farmaceutických studiích. Jejich monitorování jak ve zdravých tak v nemocných buňkách má význam především pro zhodnocení toxicity některých léků (zejména u antivirotik a chemoterapeutik) a pro lepší porozumění mechanismu jejich působení. Běžně jsou nukleotidy kvantifikovány pomocí HPLC, poslední dobou však i pomocí CE, díky níž jsou analýzy rychlejší, méně nákladné a nevyžadují velké množství základního elektrolytu a vzorku.

Nukleotidy jsou obecně snadno analyzovány, protože v pH od 2 do 12 jsou negativně nabitě. V selektivitě separace jednotlivých nukleotidů hraje důležitou roli jak struktura, tak iontový náboj molekuly. Určení celkového náboje nukleotidu je komplikované, záleží především na množství přítomných fosfátových skupin a dílčích iontových nábojů na purinových a pyrimidinových bázích. Pokud mají nukleotidy stejné množství fosfátových skupin, za selektivitu separace mezi nukleotidy zodpovídá purinové a pyrimidinové báze. Spektra nukleotidů jsou závislá na pH, neboť připojení či disociace protonu ovlivní rozložení nábojů v molekule. Nicméně při pH = 7 všechny běžné nukleotidy absorbují světlo o vlnové délce kolem 260 nm.

Řada enzymů vyžaduje kromě příslušného substrátu další organickou molekulu zvanou kofaktor, bez její přítomnosti je enzym neaktivní. Kofaktory jsou definovány jako termostabilní nízkomolekulární organické sloučeniny nezbytné pro aktivitu enzymů. Kofaktory, které jsou vázány nekovalentními vazbami, se nazývají koenzymy a ty, které jsou vázány kovalentně, se nazývají prosthetické skupiny. Součástí mnohých koenzymů (např.  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ ) jsou nukleotidy.  $\text{NAD(H)}$  a  $\text{NADP(H)}$  jsou koenzymy dehydrogenas, jsou redukovány specifickým substrátem a reoxidovány vhodným akceptorem elektronů. Obecně  $\text{NAD}^+$  - dependentní dehydrogenasy katalyzují oxidoredukční reakce v oxidační části metabolismu, zejména při glykolýze, v citrátovém cyklu a v respiračním řetězci mitochondrií.  $\text{NADP}^+$  - dependentní dehydrogenasy se účastní zejména redukčních syntéz, jako je extramitochondriální dráha syntézy mastných kyselin a steroidů.

### 1.3. *Paracoccus denitrificans*

Bakterie *Paracoccus denitrificans* je gramnegativní půdní bakterie schopna růst za aerobních i anaerobních podmínek. Při aerobní respiraci využívá všech čtyř respiračních komplexů, se kterými se setkáváme u mitochondriálního respiračního řetězce, a proto je velmi často studovaná zejména v oblasti bioenergetiky.

Anaerobní růst bakterie je závislý na přítomnosti elektron-akceptorů jako dusičnanů, dusitanů, které se postupně redukují na plynnou formu dusíku: oxid dusný nebo plynný dusík. Tento proces konverze nitrátu na  $\text{N}_2\text{O}$  nebo  $\text{N}_2$  se nazývá denitrifikace.

Schéma postupné denitrifikace:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

## **2. PRAKTICKÁ ČÁST**

Cílem této úlohy je pomocí kapilární zónové elektroforézy v kombinaci s field enhanced stacking prekoncentrační technikou identifikovat a následně kvantifikovat energeticky důležité metabolity-adeninové nukleotidy a koenzymy-v bezbuněčných extraktech bakterie *Paracoccus denitrificans*.

### **2.1. Přístrojová technika**

- kapilární elektroforéza HP <sup>3D</sup>Capillary Electrophoresis od firmy Agilent Technologies, vybavená spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem (rozsah 190-600 nm), zdrojem napětí (do 30 kV, obojí polarita), autosamplerem (48 pozic), temperací kapiláry, elektrokinetickým i hydrodynamickým tlakovým dávkováním a počítačem se softwarem Chem Station,
- centrifuga Centrifuge 5415 R od firmy Eppendorf,
- vakuový koncentrátor Concentrator 5301 od firmy Eppendorf,
- termomixer Thermomixer comfort od firmy Eppendorf.

### **2.2. Pomůcky a chemikálie**

- 100 mM uhličitanový/hydrogenuhličitanový pufr (100 mM uhličitan sodný + 100 mM hydrogenuhličitan sodný, pH je dáno složením pufru) s obsahem 10 mM  $\beta$ -cyklodextrinu – *základní elektrolyt pro separaci*.
- standardy - ATP, ADP, AMP,  $\text{NAD}^+$ , NADH,  $\text{NADP}^+$  a NADPH
- 0,1 M NaOH, deionizovaná voda Mili Q kvality
- acetonitril (ACN),  $\text{Na}_2\text{NO}_3$
- špičky, pipety, filtrační set

### **2.3. Mikroorganismy**

- Bakterie *Paracoccus denitrificans* CCM 982

### **2.4. Příprava buněk s rozdílnými koncentracemi adeninových nukleotidů a koenzymů**

Pro vytvoření odlišných koncentrací adeninových nukleotidů ATP, ADP a AMP a koenzymů  $\text{NAD}^+$ , NADH,  $\text{NADP}^+$ , NADPH v buňkách zvolíme anaerobní podmínky, za kterých bakterie bude mít dostatečný přísun živin (jantaran), ale žádný přísun terminálního akceptoru respiračního řetězce. Bez terminálního akceptoru respiračním řetězcem



elektrony netečou, nevytvoří se protonový gradient, tudíž touto cestou, oxidační fosforylací, se netvoří ATP.

Po přidavku dusičnanu (terminálního akceptoru) se respirační řetězec bakterie okamžitě rozběhne. Pomocí vychlazeného ACN se veškeré bílkoviny v buňce zdenaturují a koncentrace jednotlivých nukleotidů a koenzymů se již více nemění.

#### 2.4.1. Pozastavení respiračního řetězce v buňkách za anaerobních podmínek

Po anaerobní kultivaci (1 litr kultivačního média), sklizení a důkladné homogenizaci buněk získáme cca 10 ml bakteriální suspenze. Z toho 2 ml rozpipetujeme do mikrozkušavek po 200  $\mu$ l, označíme (viz. tab. níže) a zbývajících cca 8 ml zamrazíme. Při 30 °C teplotě ke každé suspenzi buněk přidáme 10  $\mu$ l 0,5 M jantaranu sodného a k mikrozkušavkám označené K<sub>A</sub> a K<sub>B</sub> navíc přidáme 10  $\mu$ l deionizované vody. Všechny mikrozkušavky s buňkami následně profoukneme argonem, abychom se zbavili kyslíku uvnitř a ihned je zalepíme parafilmem.

#### 2.4.2. Nastartování procesu denitrifikace

K buňkám označené jako K<sub>A</sub> a K<sub>B</sub> přidáme propíchnutím přes parafilm 700  $\mu$ l předem vychlazeného 50 % ACN. K buňkám označené jako 3<sub>A</sub> nejprve přidáme propíchnutím přes parafilm Hamiltonovou stříkačkou 10  $\mu$ l 1 M NaNO<sub>3</sub> a teprve po době 3s od přidání dusičnanu injekční stříkačkou vstříkneme 700  $\mu$ l předem vychlazeného 50 % ACN.

To samé provedeme u mikrozkušavek označené jako 3<sub>B</sub>, 6<sub>A</sub>, 6<sub>B</sub>, 10<sub>A</sub>, 10<sub>B</sub>, 15<sub>A</sub>, 15<sub>B</sub> ale s tím rozdílem, že postupně prodlužujeme interval mezi přidáním dusičnanu a vychlazeného 50 % ACN na 3, 6, 10, 15 s.

označení mikrozkušavky	K <sub>A</sub>	K <sub>B</sub>	3 <sub>A</sub>	3 <sub>B</sub>	6 <sub>A</sub>	6 <sub>B</sub>	10 <sub>A</sub>	10 <sub>B</sub>	15 <sub>A</sub>	15 <sub>B</sub>
doba trvání denitrifikace	0 s	0 s	3 s	3 s	6s	6 s	10 s	10 s	15 s	15 s

### 2.5. Extrakce metabolitů z buněk

Bakteriální suspenzi stočíme (8 min, 7 300 rpm), k peletu přidáme 300  $\mu$ l 50 % ACN, rozsuspendujeme, mixujeme na vortexu a necháme inkubovat v termomixeru při teplotě +4 °C. Po 15 minutách suspenzi stočíme (5 min, 13 200 rpm, 4 °C), supernatant (1. frakce)

opatrně slijeme do čisté mikroskopické pipety (1,5 ml) a prozatím umístíme na led. K peletu přidáme 200 µl 50 % ACN, opět rozsuspendujeme, mixujeme a necháme inkubovat 15 min při 4 °C. Stočíme, získaný supernatant (2. frakce) slijeme k 1. frakci a necháme na ledu. Proces extrakce opakujeme ještě 1 x s 200 µl 50 % ACN. Postupným slíváním tří frakcí získáme asi 700 µl bezbuněčného extraktu, který do sucha vysušíme na vakuovém koncentrátoru. K vysušenému extraktu přidáme 300 µl deionizované vody, pořádně rozmixujeme a 200 µl odebereme k filtraci. Filtraci provedeme centrifugačně na 5 kDa filtru Ultrafree-MC od firmy Millipore. Filtrát ředíme deionizovanou vodou v poměru 1:9.

## 2.6. Vlastní analýza

**Při obsluze stroje a následném vyhodnocování se řiďte pokyny vedoucího cvičení!**

Nejprve kapiláru promyjte 5 min deionizovanou vodou, 5 min 0,1 M NaOH a 10 min opět deionizovanou vodou.

Pro analýzu vzorku využijte přednastavenou metodu: NUCLEO.M. S vedoucím cvičení zkontrolujte zda jsou parametry metody správně navoleny (viz. tab. níže), proved'te popis vzorku v dialogovém okně.

<b>Promytí kapiláry před analýzou:</b>	2 min 0,1 M NaOH 2 min deionizovaná voda 3 min BGE
<b>Nástřík vzorku:</b>	20 s při tlaku 35 mbar
<b>Analýza:</b>	<u>napětí:</u> 18 kV (pozitivní polarita) <u>teplota kapiláry:</u> 20 ± 0,1 °C <u>čas analýzy:</u> 23 min.
<b>Detekce:</b>	260 nm, 340 nm
<b>Promytí kapiláry po analýze:</b>	5 min deionizovaná voda

Po sepětí napětí lze sledovat proud pohybující se okolo 105 – 120 mA.