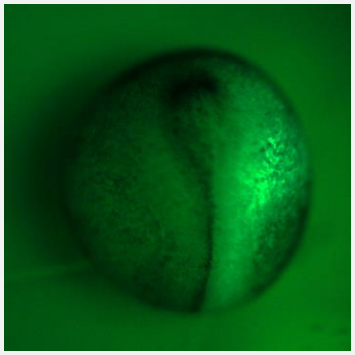
MUNI
SCI



Experimentální embryologie

Bi1130

Analýza lipidů a sacharidů

Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.
2022

Dnešní osnova

ANALÝZA LIPIDŮ A SACHARIDŮ

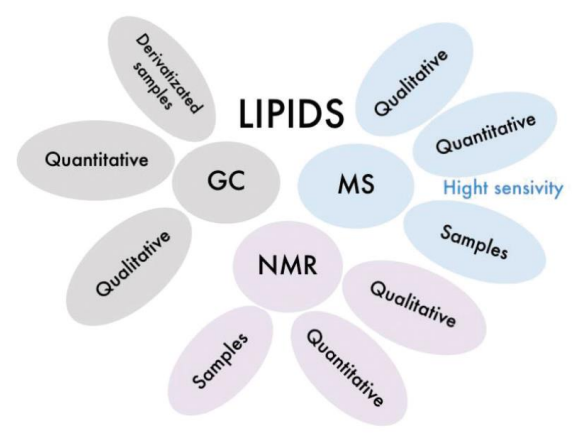
- charakteristika a příprava vzorků
- plynová chromatografie (GC)
- vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)
- hmotnostní spektrometrie (MS)
- nukleární magnetická rezonance (NMR)
- vizualizace lipidů a sacharidů
- enzymové aktivity a inhibitory (analýza proteinů a genů)
- glykomika a lipidomika (metabolomika)

Co jsou lipidy a sacharidy?

Jaká je jejich funkce v embryogenezi?

Lipidy

- fosfolipidy, diacylglycerol (DAG), triacylglyceridy (TAG), fosfatidylinositol fosfáty (PIPs), sfingolipidy, mastné kyseliny, eikosanoidy, steroly (cholesterol, hormony)
- extra-, intracelulární, sérové > výběr vhodné metody a přípravy vzorků (derivatizace)
- chromatografické metody (GC, HPLC), hmotnostní spektrometrie, enzymatické aktivity a komponenty metabolismu lipidů (biochemie, genová exprese - fosfolipázy, COX, LOX apod.), vizualizační techniky



MUNI SCI

Sacharidy

- monosacharidy (fruktóza, glukóza, galaktóza), disacharidy (laktóza, maltóza, sacharóza), oligosacharidy a polysacharidy (škroby, dextriny, glykogen)
- rozpustné ve vodě, málo teplotně stabilní, nemají vlastnosti vhodné pro emisi fluorescence
- redukující sacharidy (sacharóza) mohou fungovat jako redukční činidla
- chromatografické metody (GC, LC), spektrometrie

Chromatografie

- fyzikálně-chemické separační a analytické metody
- rozdělení analytu mezi stacionární a mobilní fází
- rozdílné analyty mají **různou afinitu** ke stacionární fázi, jsou **různě distribuovány** mezi fázemi a **zadržovány** v separační koloně po rozdílnou dobu
- kvalitativní i kvantitativní stanovení

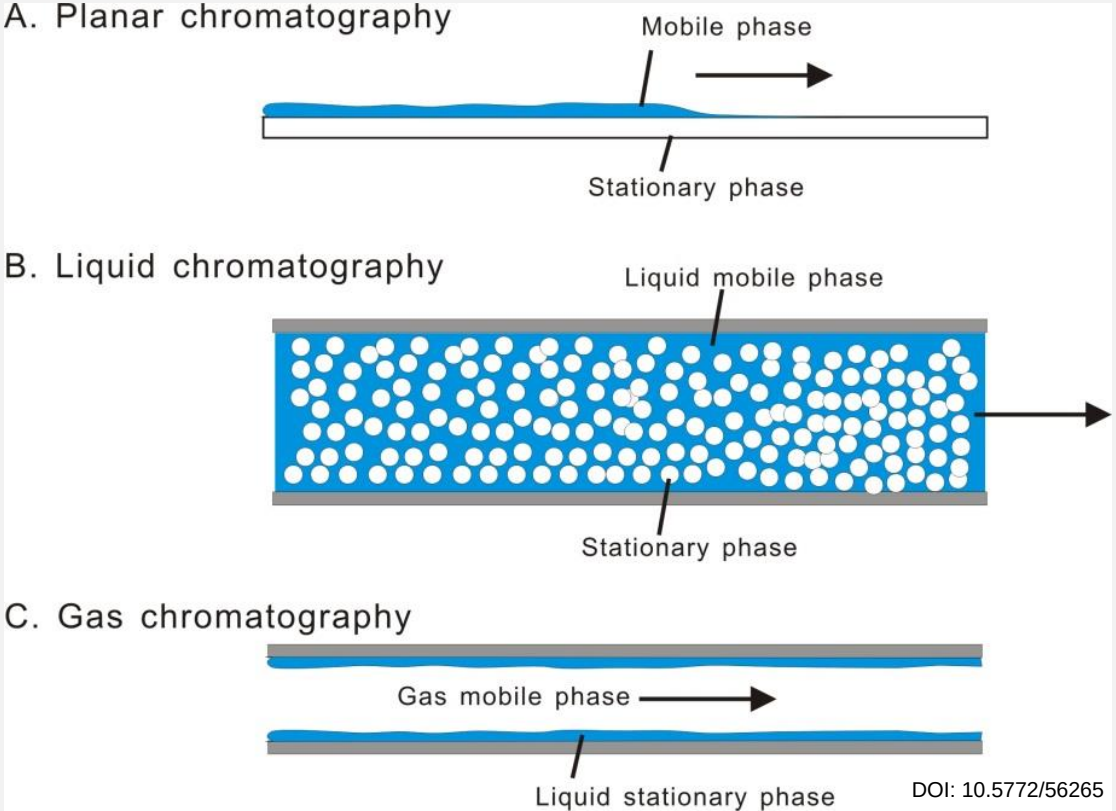
Rozdělení chromatografických metod

- typ mobilní fáze (plynová, kapalinová)
- princip separace (adsorpční, iontově výměnná, gelová, rozdělovací, afinitní)
- uspořádání (kolonová/sloupcová, kapilární, plošná/planární)
- účel (analytická, preparační)

Typ chromatografie	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Princip separace
Tenkovrstvá (TLC) Papírová (PC)	pevná	kapalina	adsorpce
Plynová (GC)	kapalina (GLC) pevná (GSC)	plyn	adsorpce, rozdělení, bod varu
Vysokoúčinná kapalinová (HPLC)	pevná	kapalina	adsorpce, absorpce/rozdělení, molekulová hmotnost, iontový náboj (ionex)
Superkritická fluidní (SFC)	pevná	kapalina v superkritickém stavu (kapalný CO_2)	adsorpce, rozdělení

Rozdělení chromatografických metod

- typ mobilní fáze (plynová, kapalinová)
- princip separace (adsorpční, iontově výměnná, gelová, rozdělovací, afinitní)
- uspořádání (kolonová/sloupcová, kapilární, plošná/planární)
- účel (analytická, preparační)

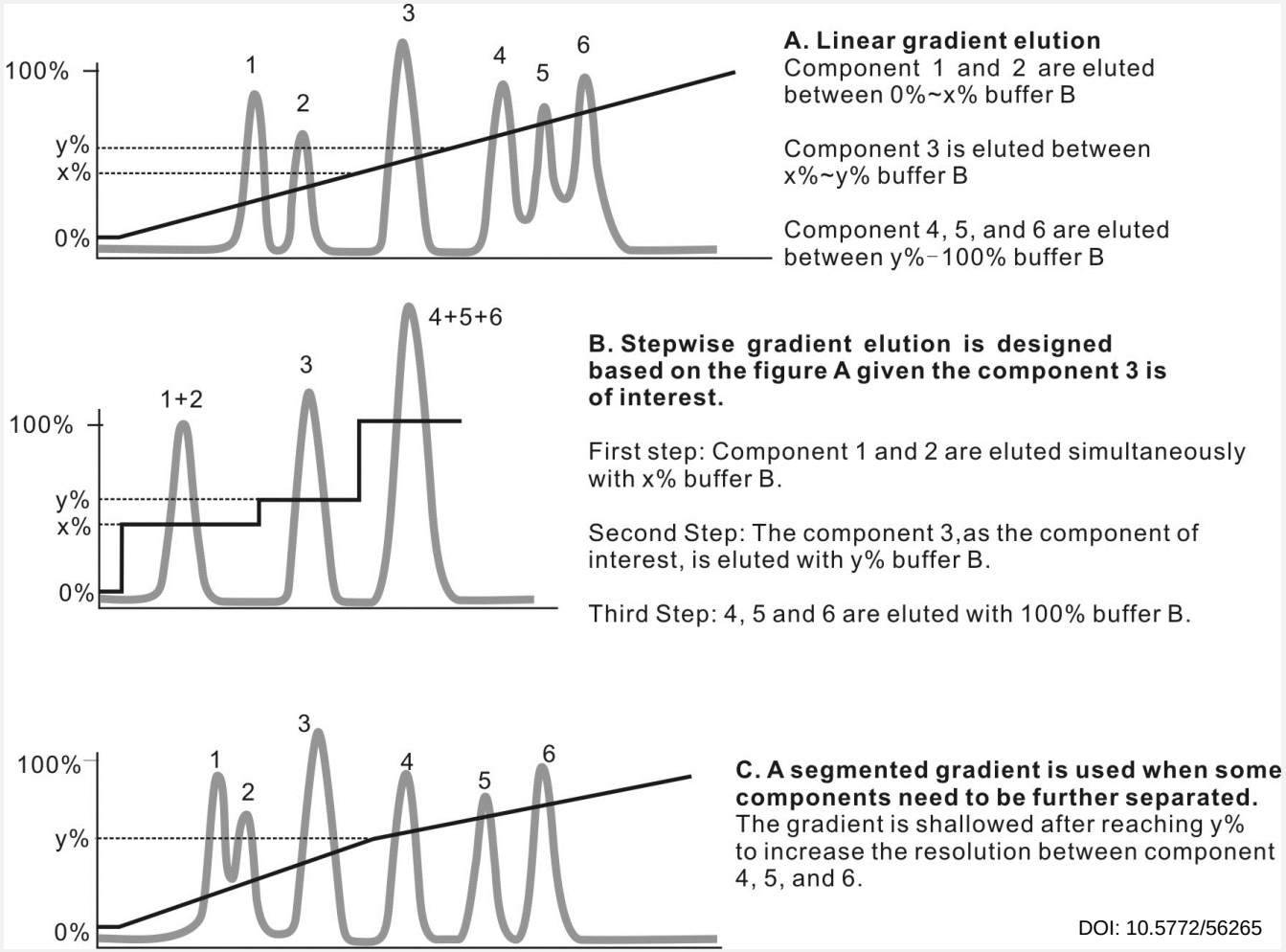


DOI: 10.5772/56265

MUNI SCI

Princip chromatografie

- mobilní fáze (eluent) nese analyty chromatografickým systémem
- analyty nesené mobilní fází interagují se stacionární fází (sorbentem)

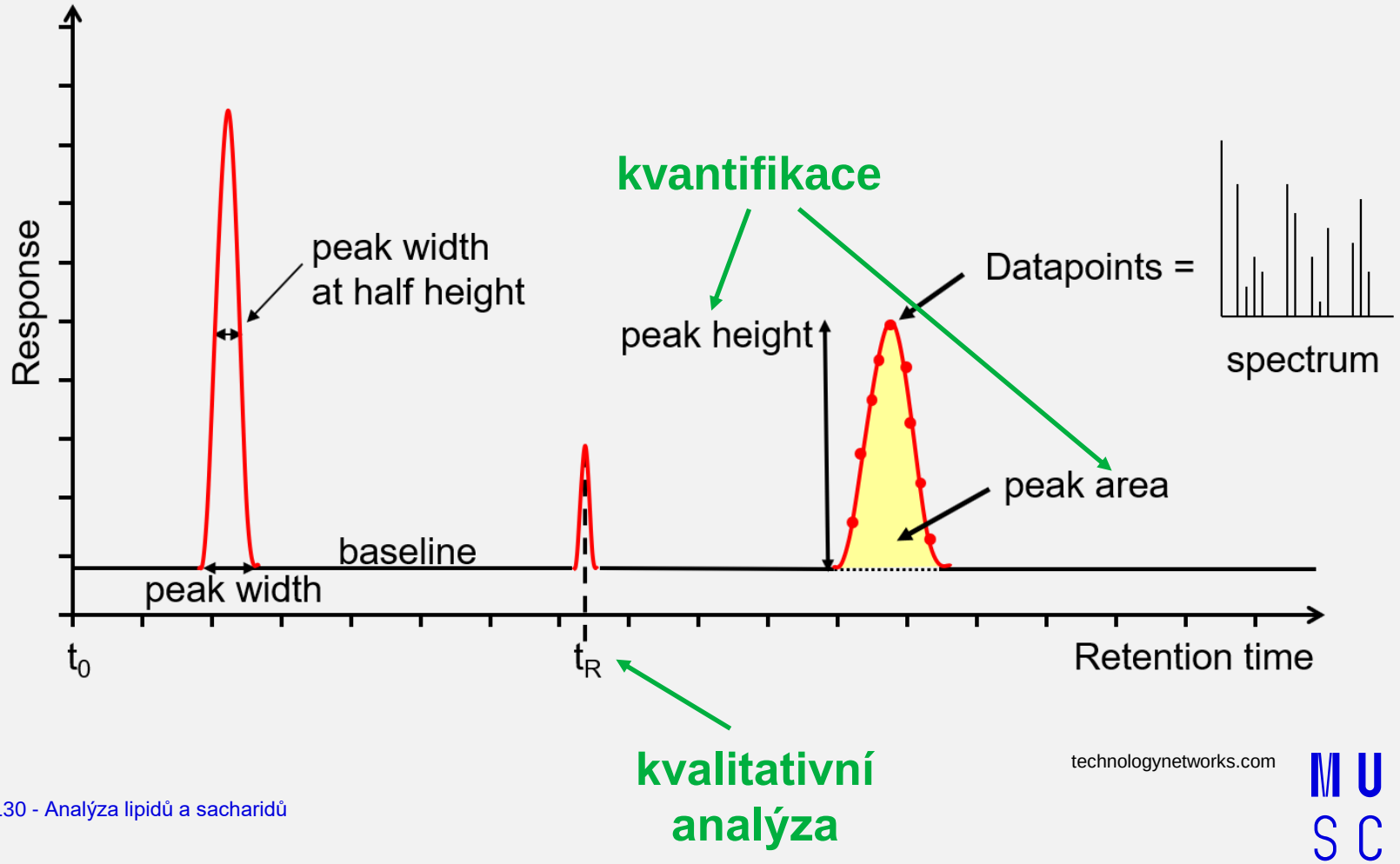


DOI: 10.5772/56265

MUNI SCI

Princip chromatografie

- peaky, frakce
- retenční čas
- vnitřní nebo vnější standardy



technologynetworks.com

MUNI SCI

Chromatografie - detektory

- UV-VIS spektrofotometry
- fluorimetry
- refraktometry
- coulometry (elektrický náboj)
- ampérmetry (elektrický proud)
- konduktometry (vodivost)
- detektory s diodovým polem (Diode Array Detectors, DAD)
- teplotně vodivostní detektory
- plamenoionizační detektory (pro GC)
- detektory elektronového záchytu
- radiometry (pro TLC)
- hmotnostní spektrometry
- a další typy detektorů

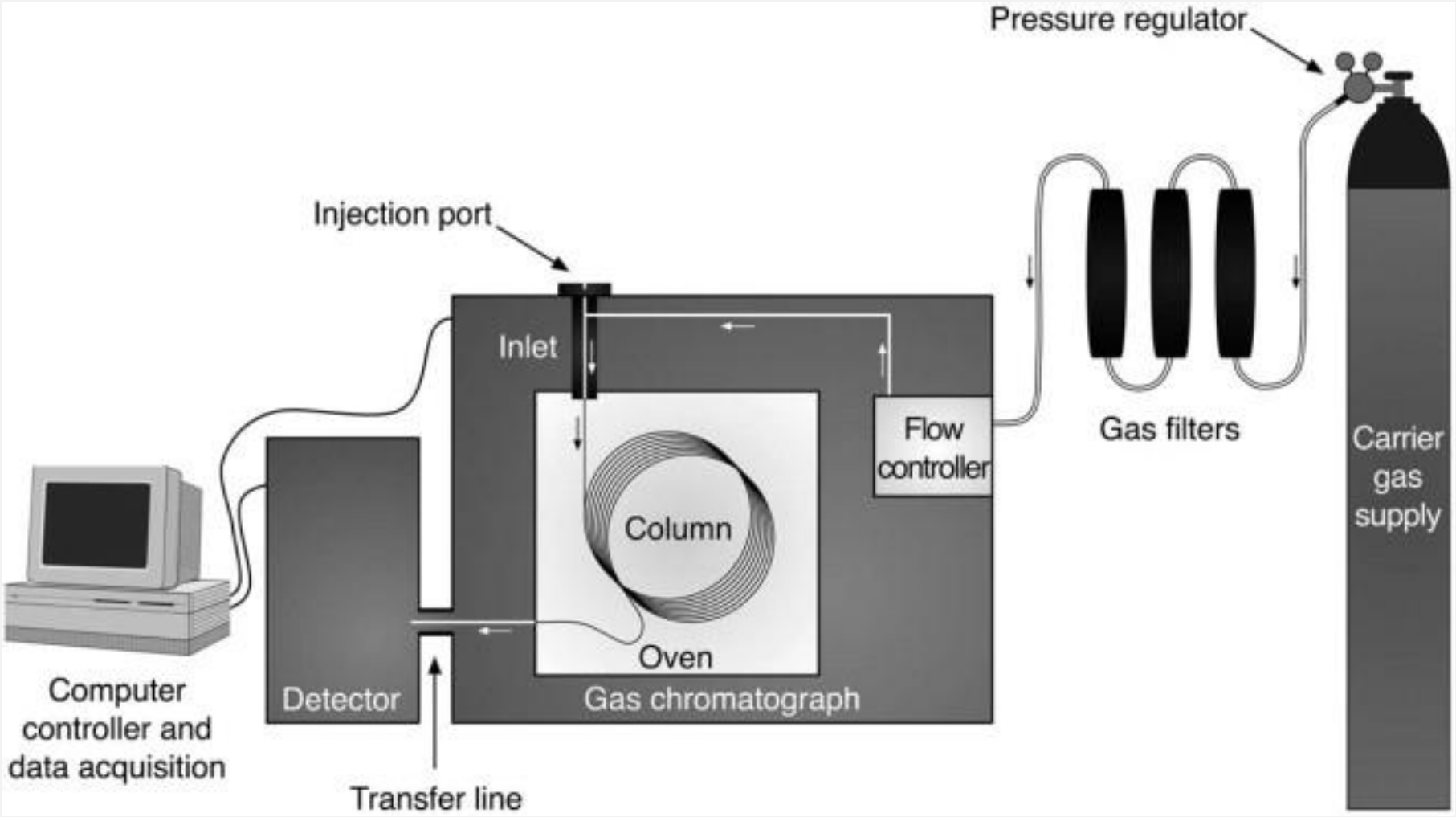
GC

- Gas Chromatography (plynová chromatografie)
- separace organických látek a plynů
- těkavé molekuly se pohybují GC systémem rychle, méně volatilní pomaleji

+
- robustní metoda
- analýza stovek až tisíců látek najednou (GC x GC) v různých vzorcích
- snadné propojení s dalšími metodami (MS)

−
- pouze pro volatilní a termostabilní látky
- obvykle pro látky do molekulové hmotnosti 1250 Da
- může docházet k úniku plynu ze systému

GC


Pressure regulator
Injection port
Inlet
Flow controller
Gas filters
Carrier gas supply
Column
Oven
Computer controller and data acquisition
Detector
Gas chromatograph
Transfer line

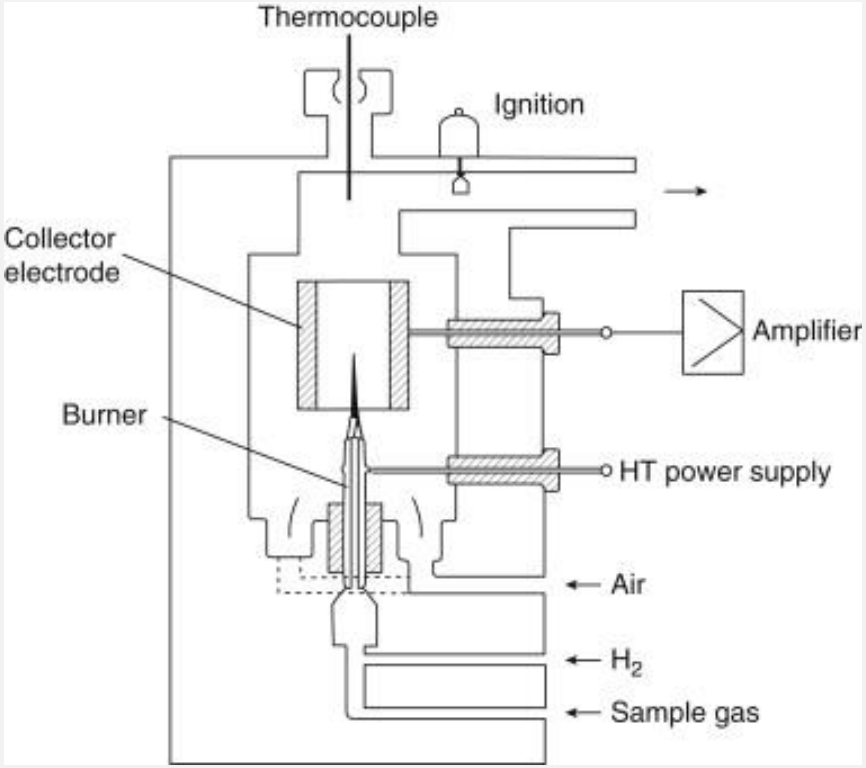
MUNI SCI

GC

- mobilní fází je inertní plyn (helium, dusík, agon)
- průchod mobilní fáze přes molekulární síta > odstranění kyslíku, vody, uhlovodíků
- průtok náplňové kolony 10-60 ml/min, kapilární kolony 1-2 ml/min
- vzorky (jednotky/desítky µl) míchány s rozpouštědly (heptan, aceton, metanol) a vstřikovány injekčně do proudu mobilní fáze přes septum
- stacionární fáze na vnitřním povrchu kolony (sklo, nerezová ocel; délka 1-150 m; vnitřní průměr 0,1-4 mm)
- kolona umístěna ve vyhřívané komoře kvůli regulaci teploty
- stacionární fáze pevná nebo kapalná (silikonové polymery a polyestery jako kyanopropyl-/polydimethyl-siloxan, polyethylenglykol)
- vzorky se injikují těsně před kolonou přes septum, nástřik při teplotě o 20-50 °C vyšší než v koloně (rychlý přechod do plynné fáze)
- teplota v koloně 150-300 °C

GC – detekce pomocí ionizace v plameni

- Flame Ionization Detectors (FIDs)
- zapotřebí přívod vodíku a kyslíku do oblasti detektoru za kolonou
- eluované analyty jsou spáleny v plameni (destrukce analytu!)
- vzniklé ionty zvyšují vodivost plamene
- anionty putují k anodě a kationty ke katodě, měřen vznikající proud

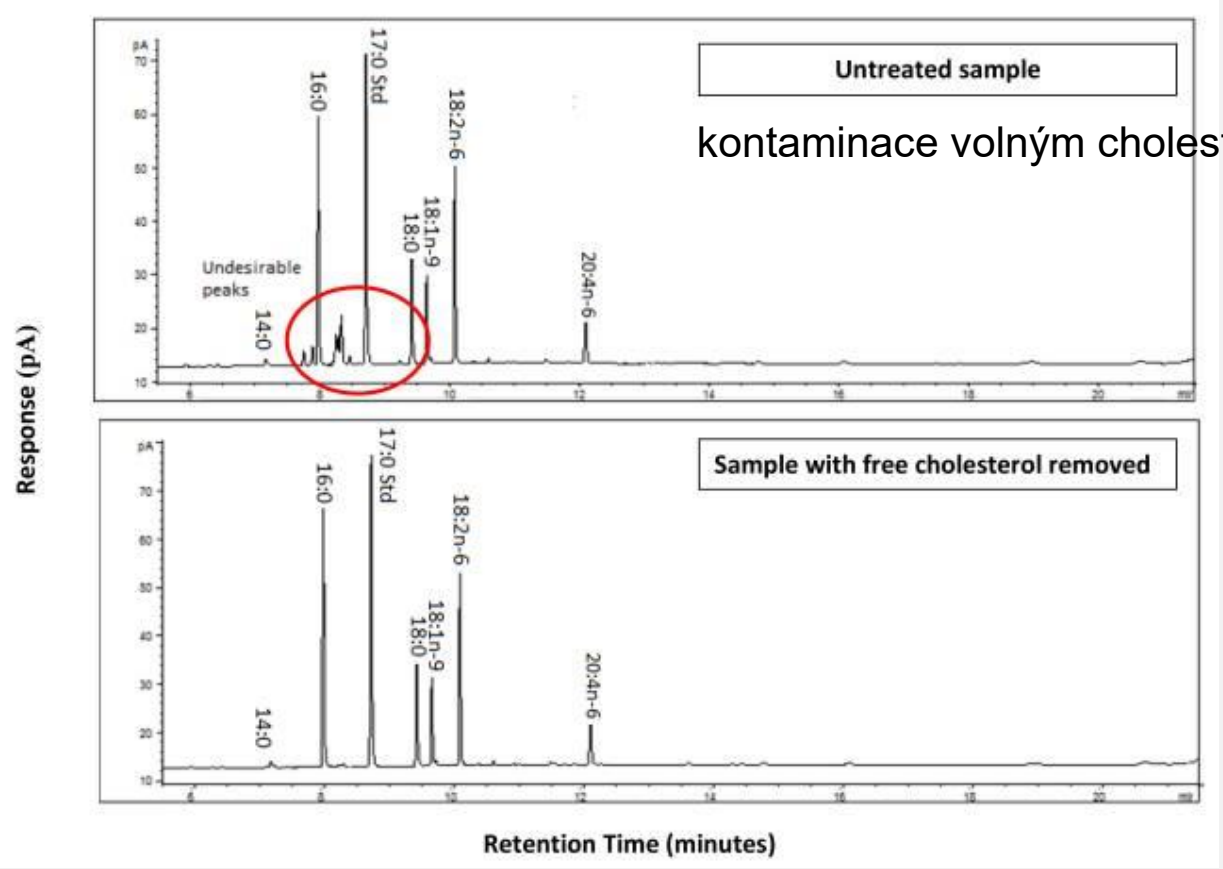


doi.org/10.1016/B978-0-08-096949-7.00016-9

MUNI SCI

GC výstup

- kvantifikace mastných kyselin v jaterní tkáni potkana
- optimalizace přípravy vzorků (např. přečištění, hydrolýza esterových vazeb, zvýšení těkavosti acylací, esterifikací apod.)



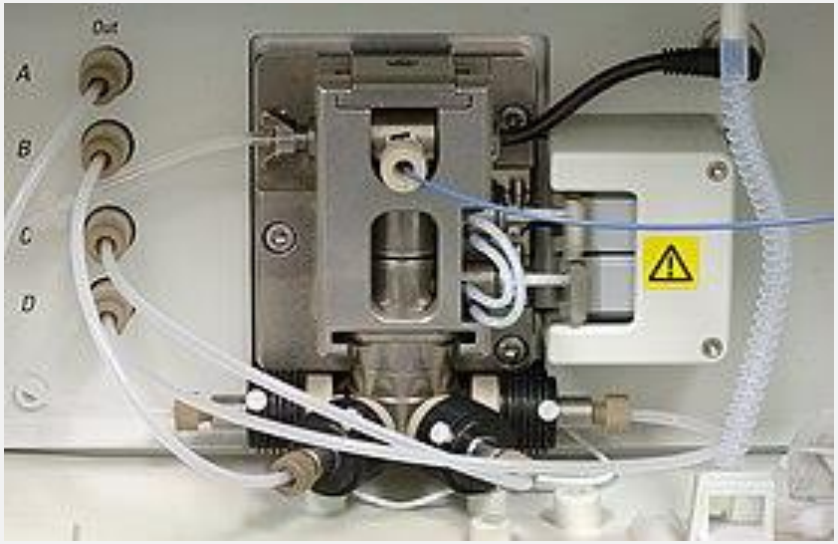
kontaminace volným cholesterolem

doi: 10.3791/51445

MUNI SCI

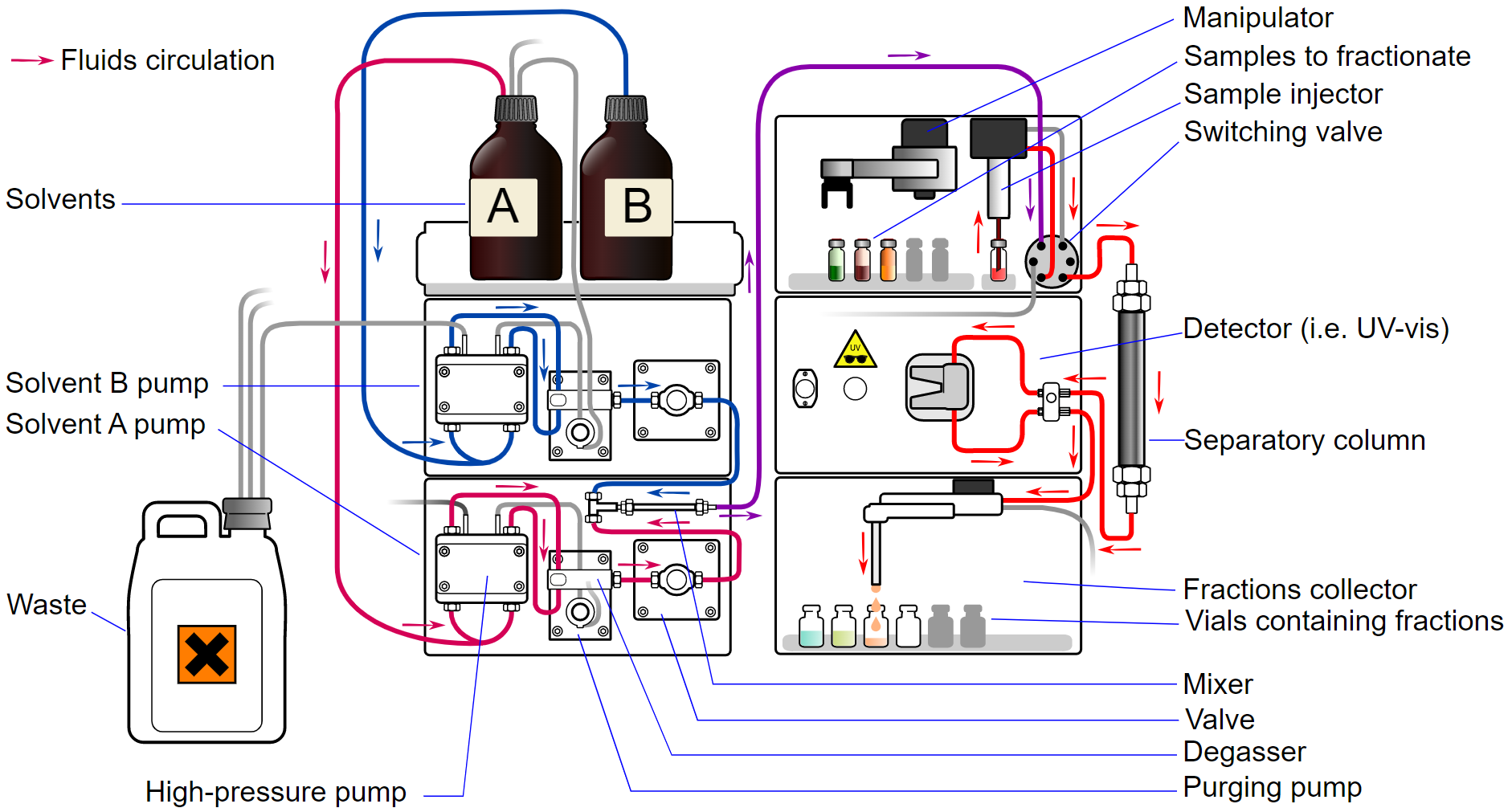
HPLC

- High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), High Pressure LC (200–250 bar), High-Priced LC
- kvalitativní analýza, kvantifikace i preparace jednotlivých analytů
- vysokotlaká pumpa zajišťuje pohyb mobilní fáze (0,5 – 2 ml/min)
- vzorky (desítky µl) se aplikují přes dávkovací smyčky
- stacionární fáze v koloně kryté kovovým pláštěm



MUNI SCI

HPLC



https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC

MUNI SCI

HPLC kolony

- náplňové i kapilární
- ideálně s malým objemem a vnitřním průměrem (0,1 - 5 mm) > vyšší účinnost, nižší limit detekce, stačí malé objemy mobilní fáze
- nanobore kolony (vnitřní průměry 25 - 100 μm), open-tubular kolony (pod 25 μm), analytické HPLC čipy
- velikost částic náplně (1,8-10 μm) určuje účinnost kolony vs. potřeba vysokých tlaků nebo krátké kolony
- stacionární fáze navázaná na silikagel a relativně polární (např. silanol-, amino- nebo nitrilové skupiny), polymerní (uhlovodíkové zbytky nebo ionexy navázané na grafitovém polymeru) a další specifické

- mobilní fází nepolární rozpouštědlo (obvykle hexan, pentan, chloroform)
- filtry pro odstranění nečistot (HPLC grade chemikálie), degassery

HPLC vs. RP-HPLC

- reverse phase HPLC
- separace polárních látek
- polární mobilní fáze (směs vody a organického rozpouštědla jako je acetonitril, tetrahydrofuran nebo metanol)
- nepolární stacionární fáze (silikagel s navázanými ligandy ve formě uhlíkatých řetězců –C8, –C18 nebo jiných skupin jako –CN)

UHPLC

– ultra-HPLC

+

– operuje za vyšších tlaků

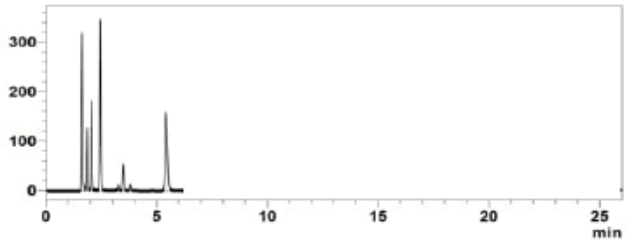
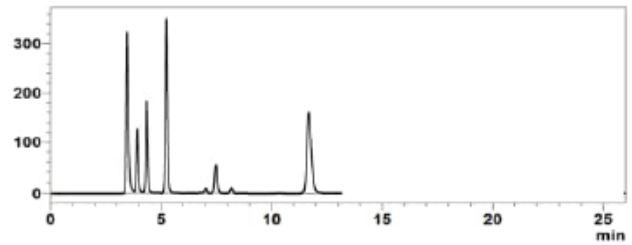
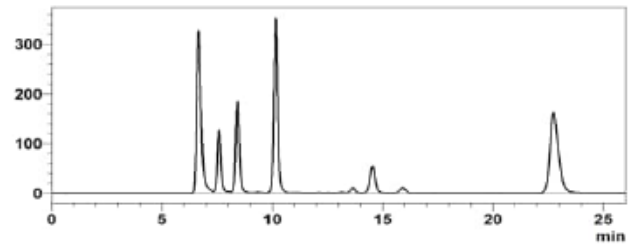
– vyšší rozlišení, průchodnost a účinnost než klasická HPLC

–

– technicky náročnější

– dražší

ssi.shimadzu.com

Application Goal	Optimum LC Column Particle Size	System Pressure Tolerance	Chromatogram Run Time
UHPLC - Highest resolution - Highest throughput - 90 to 120 runs per 8 hr. day - Highest Performance	1.7 - 5 µm	**XS** 105 MPa 15,000 PSI **X3** 130 MPa 19,000 PSI	
UHPLC - High resolution - High throughput - 40 to 60 runs per 8 hr. day - Performance	3- 5 µm	66 MPa 10,000 PSI	
Conventional HPLC - Forgiving for new users - 16 to 24 runs per 8 hr. day - Economy	5 µm	42 MPa 6,000 PSI	

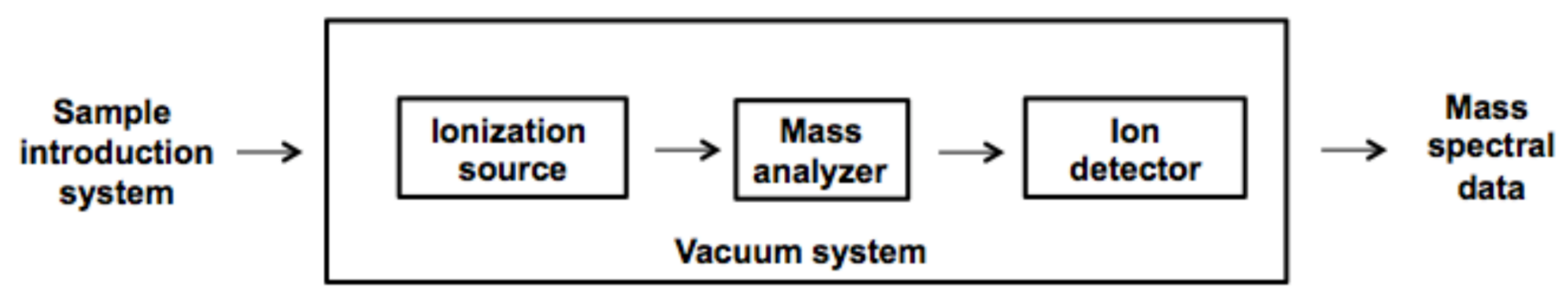
Hmotnostní spektrometrie

- Mass Spectrometry (MS)
- analytická metoda založená na **převedení analytů na ionty** a jejich následnému **rozlišení podle poměru hmotnosti a náboje** (m/Q)
- zaznamenávají se relativní intenzity jednotlivých iontů

+
- vysoká citlivost
- kvalitativní i kvantitativní
- minimální objemy vzorku

−
- vysoké pořizovací a provozní náklady
- destruktivní metoda

Hmotnostní spektrometr



- iontový zdroj (převod neutrálních molekul analytu do ionizovaného stavu v plynné fázi)
- vakuový systém
- hmotnostní analyzátor (rozdělení iontů ve vakuu)
- detektor (detekce iontů a určení relativní intenzity)
- zařízení pro záznam a zpracování dat

MUNI SCI

Hmotnostní spektrometr – iontové zdroje

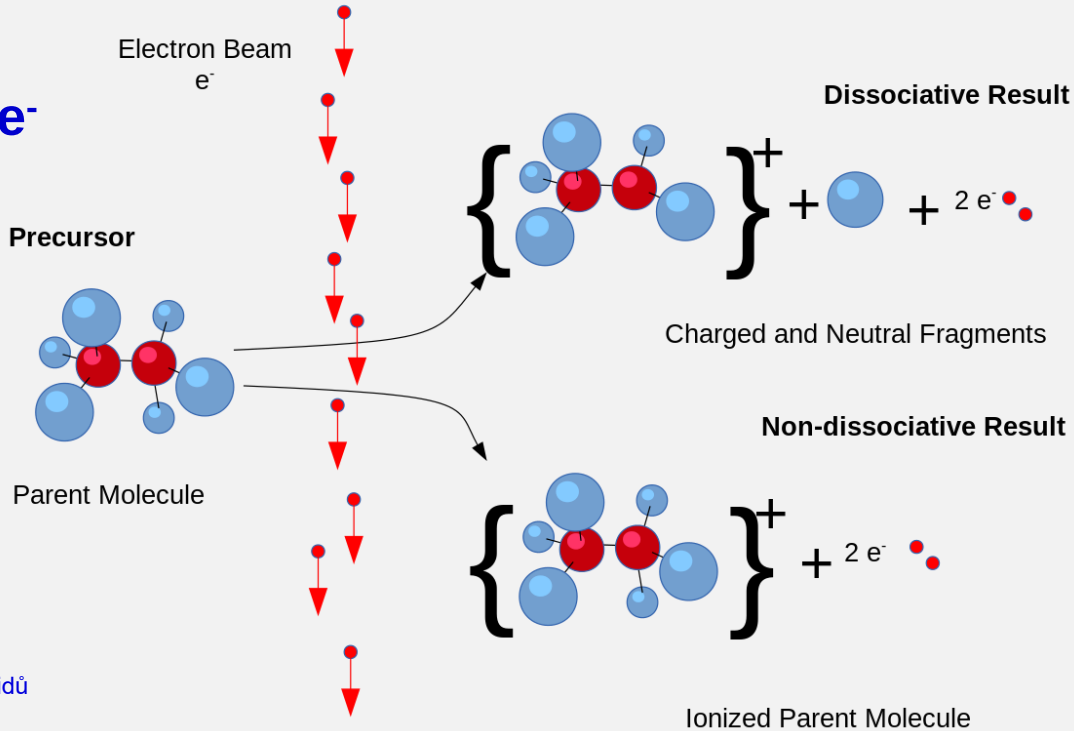
- nutné volit podle charakteristiky analytu
- fungují za atmosférického tlaku nebo ve vakuu
- udělují analytu různé množství vnitřní energie (tvrdé vs. měkké)
- ESI (nejšetrnější) < MALDI < APCI < CI < EI (nejtvrdší)

- Elektronová ionizace (EI)
- Chemická ionizace (CI)
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- Elektrosprejová ionizace (ESI)
- Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI)
- Fotoionizace
- Indukčně vázané plazma (ICP)
- a další

Elektronová ionizace (EI)

- tvrdá technika, ionizace v proudu elektronů (70 eV)
- fragmentace molekulárních iontů > vznik iontů s lichým počtem elektronů ($M^{+\cdot}$)
- těkavé a termostabilní látky; hmotnostní rozsah do 1000 Da
- probíhá ve vakuu (10^{-3} až 10^{-4} Pa)
- rozsáhlé knihovny EI spekter

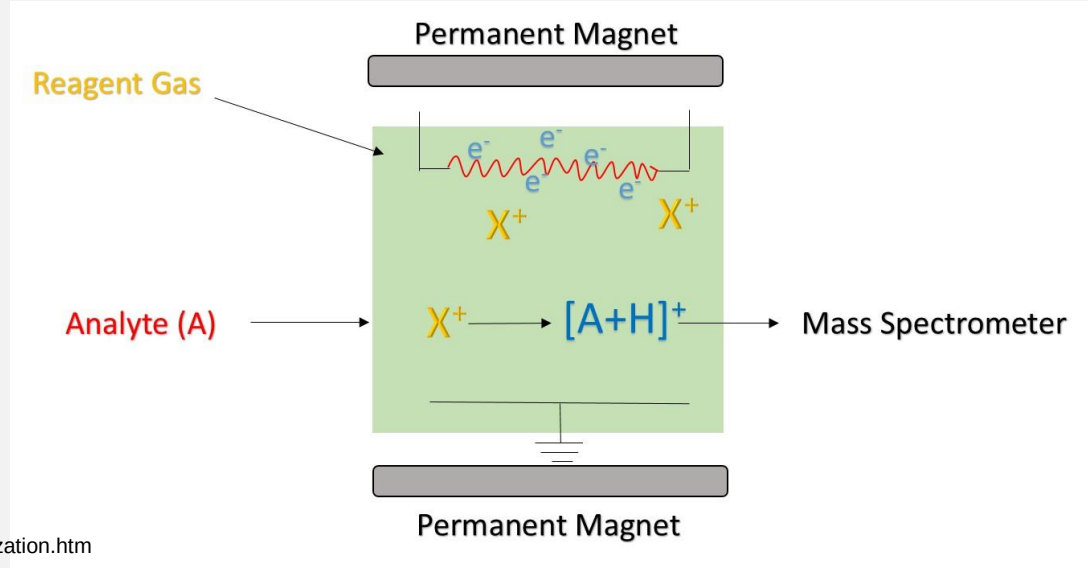
$M + e^- > M^{+\cdot} + 2e^-$



Evan Mason CC BY-SA 4.0,

Chemická ionizace (CI)

- měkká technika
- v principu EI se zdrojem reakčního plynu (metan, amoniak, vodní pára) o tlaku 50-100 Pa, který je ve výrazném nadbytku oproti vzorku
- nejdříve se ionizují molekuly reakčního plynu, které následně ionizují analyty
- vznik $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ (de-/protonace) a jiných aduktových iontů se sudým počtem elektronů
- pouze těkavé látky; hmotnostní rozsah do 1000 Da
- modifikací chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

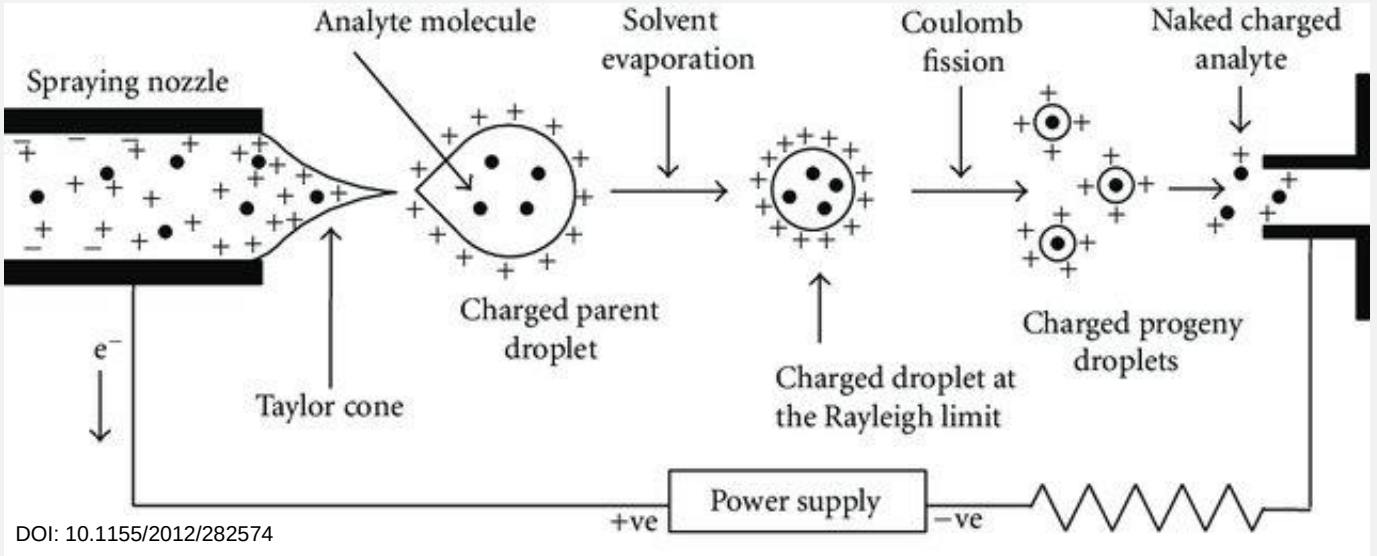


creative-proteomics.com/support/chemical-ionization.htm

MUNI SCI

Elektrosprejová ionizace (ESI)

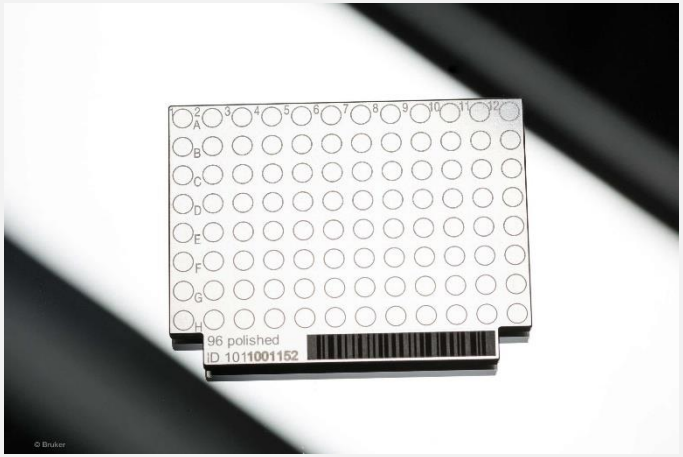
- měkká technika > $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$, aduktové ionty, fragmentové ionty minimálně (více informací o struktuře analytů ESI-MS/MS)
- rozpuštěný analyt se přivádí kovovou kapilárou > pod vysokým napětím rozprášení do nabitých kapiček (zmlžovací plyn) > odpařování rozpouštědla a zvýšení povrchového napětí > rozpad na menší kapičky s dílčím nábojem (Coulombická exploze)
- látky středně polární až iontové; nejčastěji kombinace HPLC/MS
- hmotnostní rozsah v řádu stovek kDa
- vhodná pro biomakromolekuly včetně např. sacharidů

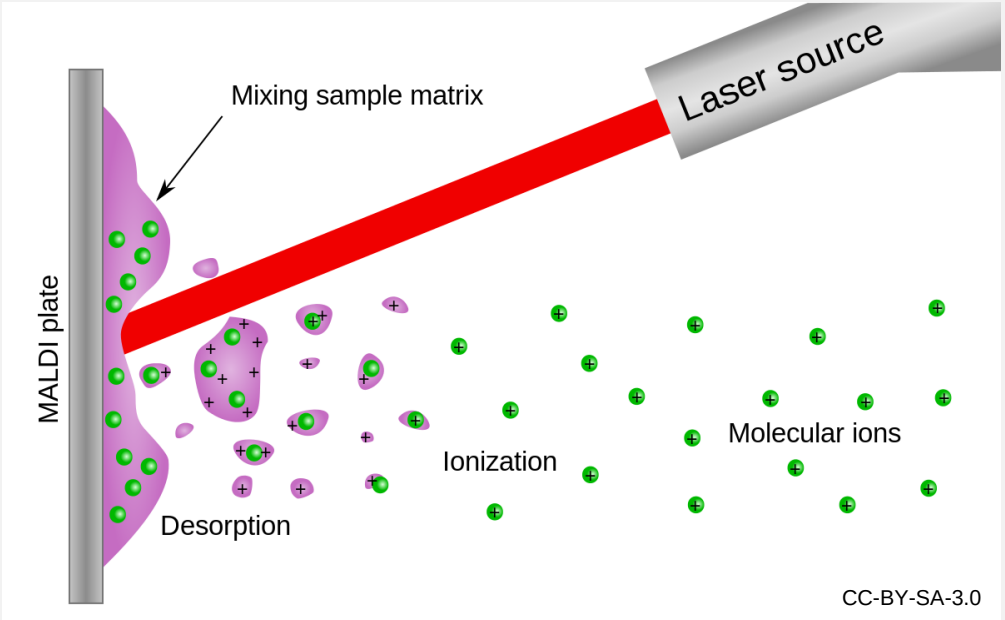


DOI: 10.1155/2012/282574

Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI)

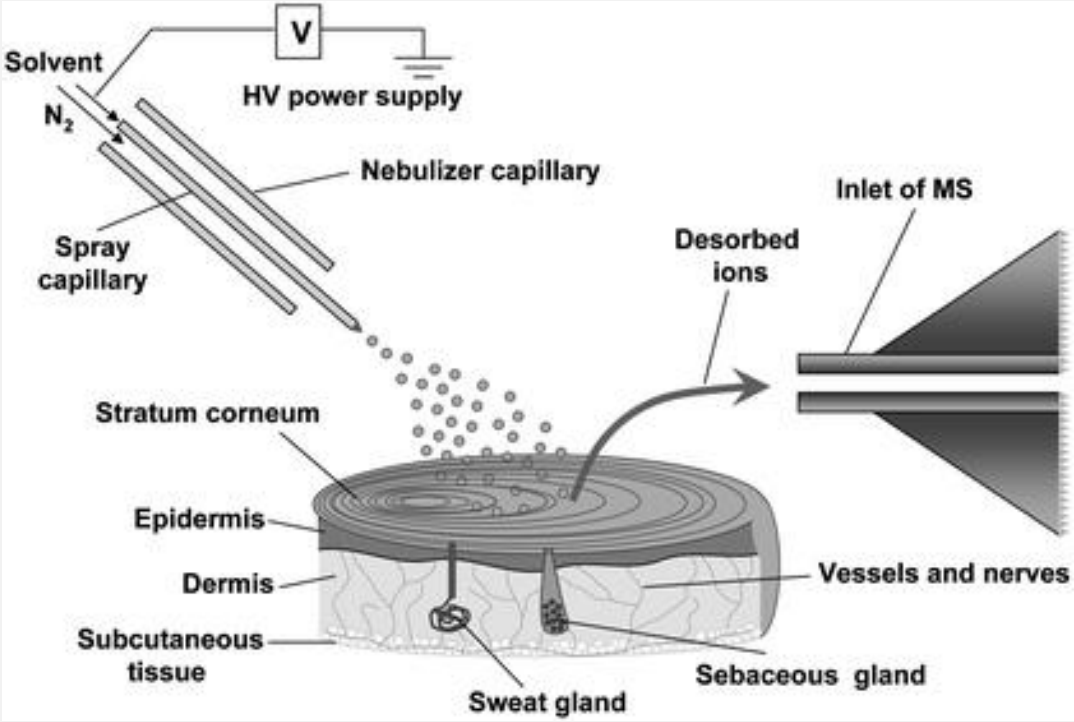
- měkká technika > $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M-H]^-$, aduktové ionty
- pro látky s vysokou molekulovou hmotností (stovky kDa, biopolymery)
- nepolární i polární analyty
- vakuum, snížený i atmosférický tlak
- vzorek a matrice (např. aromatické karboxylové kyseliny) naneseny na MALDI terčík > desorpce laserovým pulzem (dusíkový UV, IČ) > excitované molekuly matrice stabilizovány za vzniku iontů analytu





Desorpční ionizace elektrosprejem (DESI)

- kombinace ESI a desorpční ionizační techniky
- vzorek je umístěn před sprejovací kapilárou a vstupem analytu k detektoru
- lze použít přímo živočišnou tkáň bez úprav



DOI: 10.1039/C0AN00688B

MUNI SCI

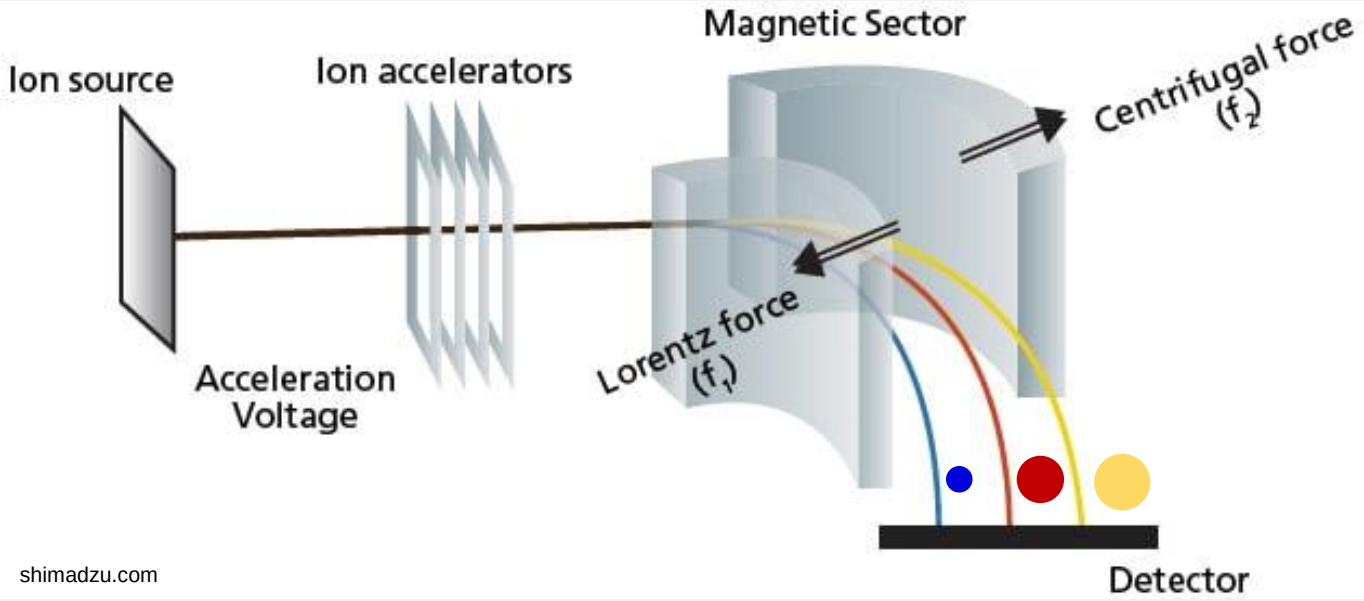
Hmotnostní spektrometr – analyzátory

- **dělení iontů** v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje
- typicky v prostředí vysokého vakua (10^{-3}-10^{-11} Pa) kvůli možným kolizím iontů s neutrálními atomy

- magnetické a elektrostatické (zakřivení dráhy letu)
- kvadrupól a iontové pasti (oscilace)
- TOF (doba rychlosti letu)
- orbitrap (frekvence harmonických oscilací)
- a další

Sektorové analyzátory

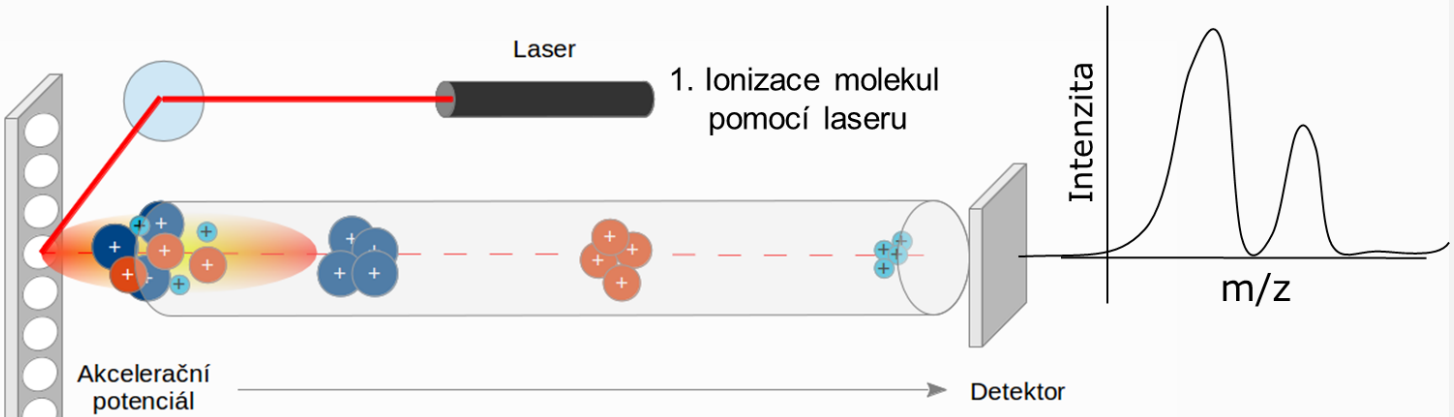
- využívají elektrického a/nebo magnetického pole k ovlivnění dráhy a/nebo rychlosti pohybu iontů
- větší zakřivení pro ionty s nižší hodnotou m/Q
- výběr iontů podle hmotnosti/náboje, magnetické nebo potenciálové skenování, sledování v reálném čase



MUNI SCI

Analyzátory doby letu (Time of Flight, TOF)

- urychlení iontů napěťovým pulzem a směrovány do analyzátorové trubice
- pulzní ionizace často MALDI (MALDI-TOF)
- měří se doba letu než urychlený iont dorazí na detektor
- ionty o stejném náboji mají stejnou kinetickou energii a rychlost závislou na své hmotnosti
- lehčí ionty detekovány nejdříve
- rychlá analýza (časy řádově ns až μs), neomezený rozsah pro detekci poměru hmotnosti a náboje

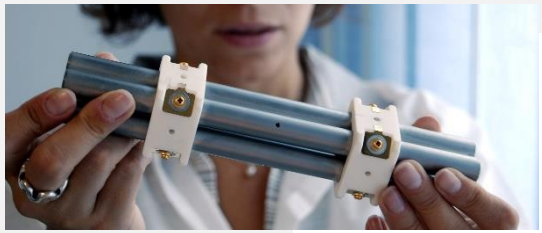


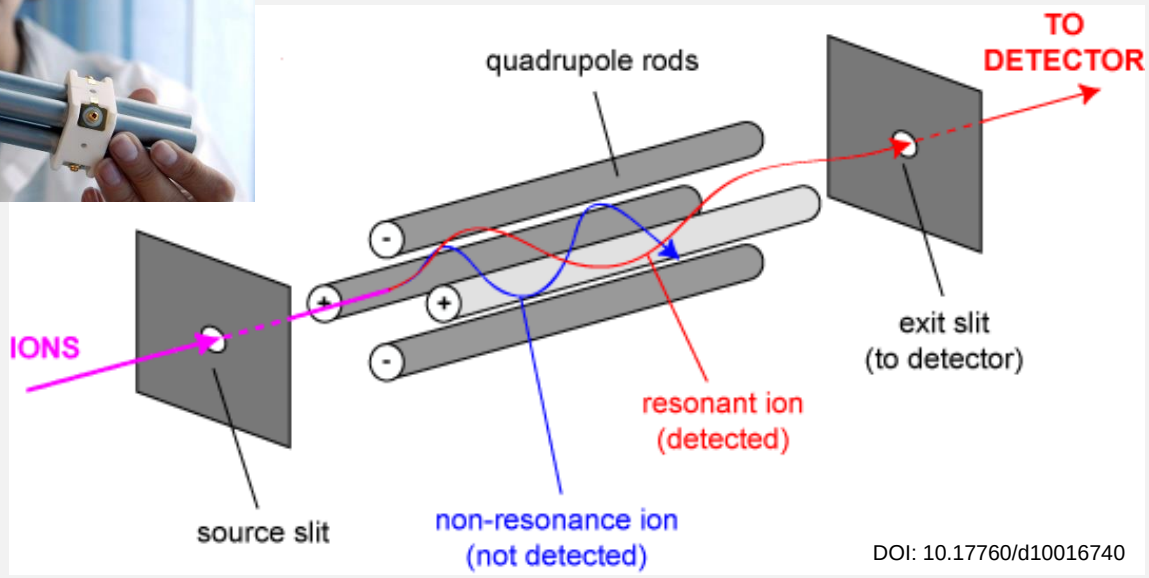
https://portal.matematickabiologie.cz

MUNI SCI

Kvadrupólový analyzátor

- nízká cena, jednoduchost
- často používán v kombinaci s GC, LC a v hybridních MS
- elektrické pole vytvořené ze čtyř paralelních elektrod
- oscilace elektrického pole de-/stabilizuje dráhu procházejících iontů
- selektivní hmotnostní filtr (v aktuálním nastavení jsou oscilace stabilní vždy pouze pro ionty s určitou hodnotou hmotnost/náboj; změna potenciálu elektrod zajišťuje rozsah zachycovaných m/Q = skenování)



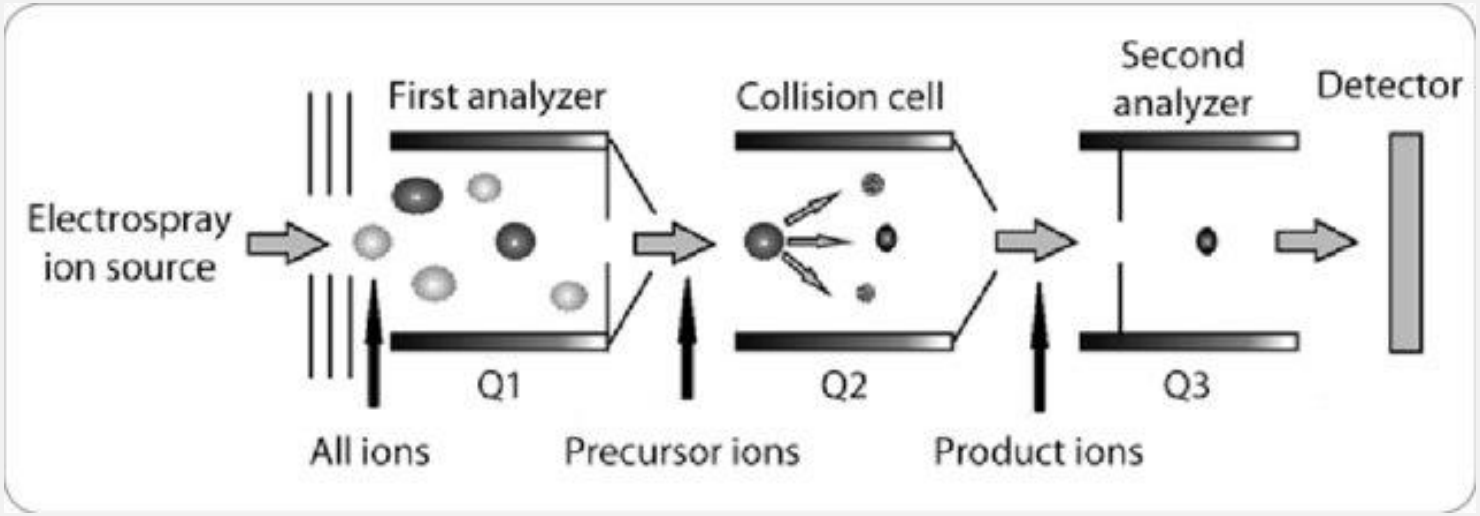


DOI: 10.17760/d10016740

MUNI SCI

Kvadrupólový analyzátor

– trojitý kvadrupól (QqQ):
  Q1 – hmotnostní filtr
  q2 – kolizní cela s plynem (excitace iontů a vznik fragmentů)
  Q3 – analýza fragmentů



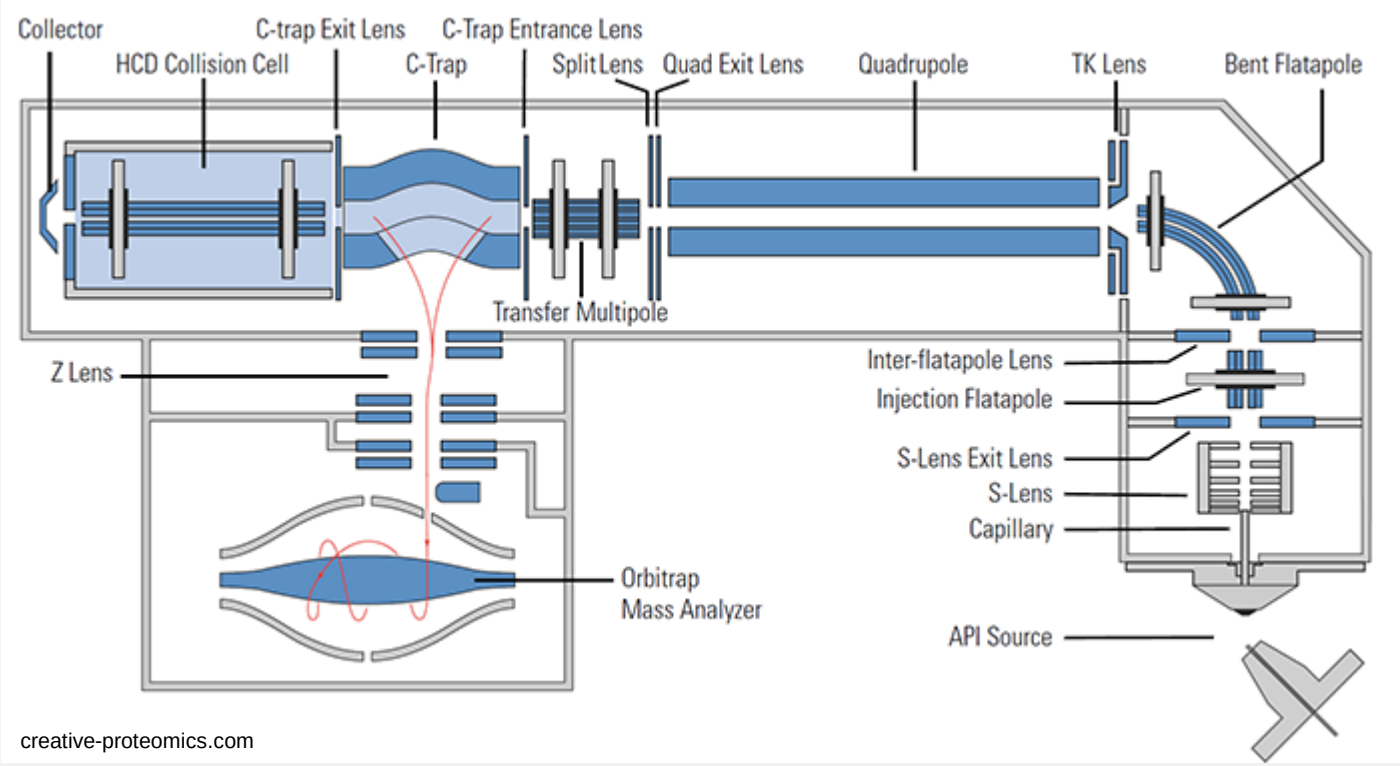
Klin Onkol 2012; 25(Suppl 2): 2S70– 2S77

– sekvenční analýza, levné a vysoce účinné uspořádání

MUNI SCI

Orbitrap

- elektrostatická orbitální past vřetenovitého tvaru
- ionty se pohybují mezi středovou a vnější elektrodou
- na vnějších elektrodách se měří proud indukovaný ionty
- převedení dat na hmotnostní spektrum Fourierovou transformací



MUNI SCI

Hmotnostní spektrometr – detektory

- detekce iontů přicházejících z analyzátoru (Orbitrap je i detektorem)
- pracuje ve vakuu
- dříve využití fotografických desek

- elektronové násobiče (dopad iontu na dynodu a uvolnění elektronu)
- fotonásobiče (ionty dopadají na konverzní dynodu a uvolněné elektrony na fosforovou destičku uvolňující fotony)
- Faradayova klec (dopad iontů na dynodu a uvolnění elektronů > indukce proudu, který je měřen)

Kombinace GC-MS, HPLC-MS

- použití MS jako chromatografického detektoru
- ionizace neutrálních analytů pocházejících z chromatografické kolony
- problémem mohou být rozdíly tlaků mezi GC/HPLC a MS (vakuum)
- odstranění nosného plynu (GC) a kapaliny (HPLC)
- mobilní fáze se může účastnit ionizace
- určení poměru hmotnost/náboj
- 3D data, kvalitativní i kvantitativní analýza

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

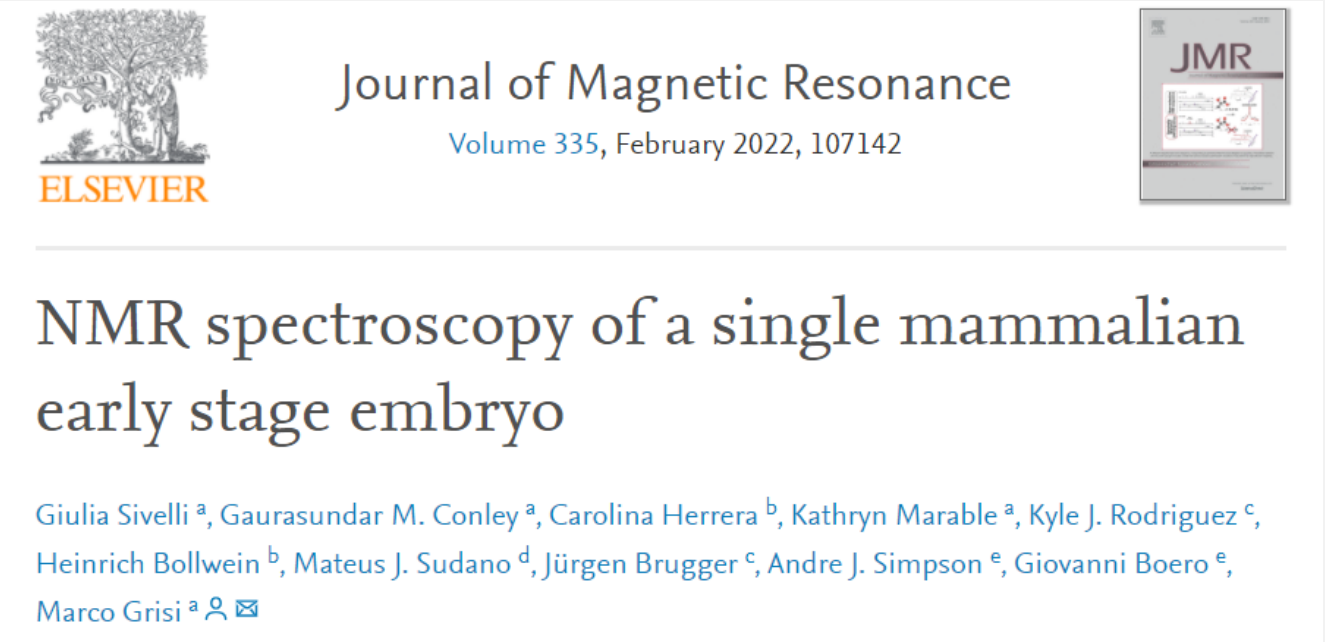
+

- vysoká rozlišovací schopnost a citlivost
- využití statického magnetického pole (o síle do 7 T; neionizující záření), a tedy možnost neinvazivního použití *in vivo*

−

- nutno brát ohled na ohřívání vzorku radiofrekvenčním zářením (Specific Absorption Rate = SAR)

NMR v embryologii



ELSEVIER

Journal of Magnetic Resonance

Volume 335, February 2022, 107142

JMR

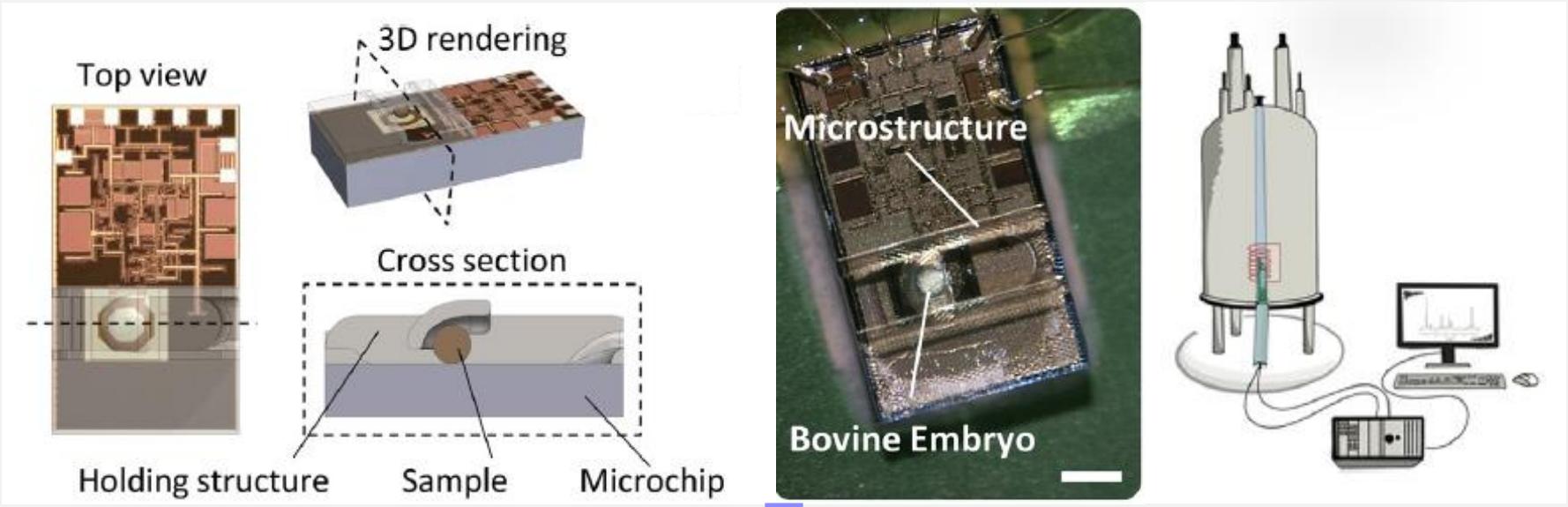
NMR spectroscopy of a single mammalian early stage embryo

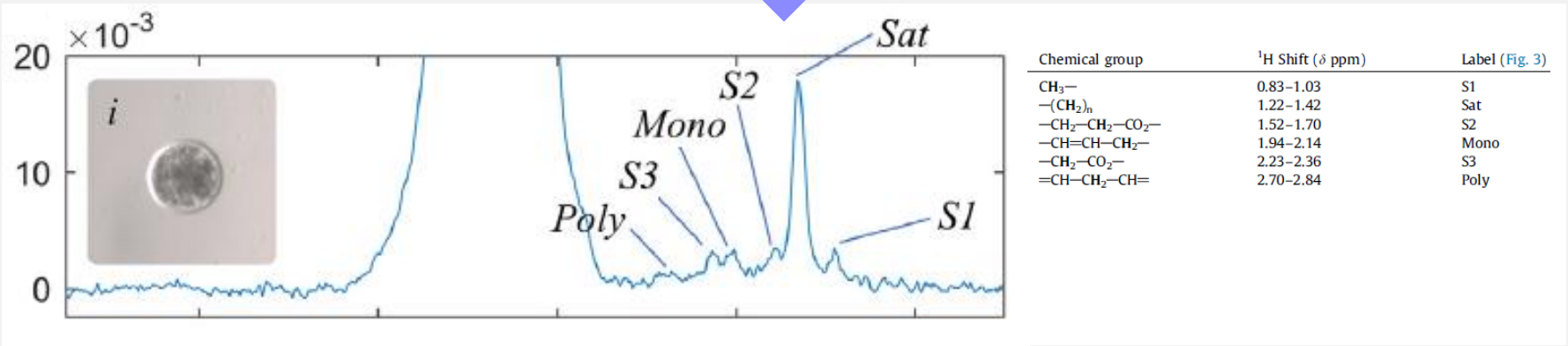
Giulia Sivelli [a], Gaurasundar M. Conley [a], Carolina Herrera [b], Kathryn Marable [a], Kyle J. Rodriguez [c], Heinrich Bollwein [b], Mateus J. Sudano [d], Jürgen Brugger [c], Andre J. Simpson [e], Giovanni Boero [e], Marco Grisi [a]

- doi: 10.1016/j.jmr.2021.107142
- studium možnosti využití NMR na mikroskopických vzorcích (savčí embrya, organoidy apod.) > sledování kvality embryí při IVF
- využití mikročipu v kombinaci s 3D mikrotiskem
- bovinní embrya v tekutém dusíku (dvoubuněčné až morula) > rozmraženo > měřeno po dobu 50 min na embryo

MUNI SCI

NMR v embryologii





Chemical group	^{1}H Shift (δ ppm)	Label (Fig. 3)
CH_3–	0.83–1.03	S1
–$(CH_2)_n$	1.22–1.42	Sat
–CH_2–CH_2–CO_2–	1.52–1.70	S2
–CH=CH–CH_2–	1.94–2.14	Mono
–CH_2–CO_2–	2.23–2.36	S3
=CH–CH_2–CH=	2.70–2.84	Poly

MUNI SCI

Vizualizace lipidů a sacharidů

- především pro sledování distribuce v tkáních a buňkách (kvantitativní: biochemické stanovení celkových TAG a volného cholesterolu)
- simultánní analýza vzorků umožňuje relativní kvantifikaci (vliv teploty, koncentrace barvy, inkubačních časů, nastavení mikroskopu atd.)

Lipidy

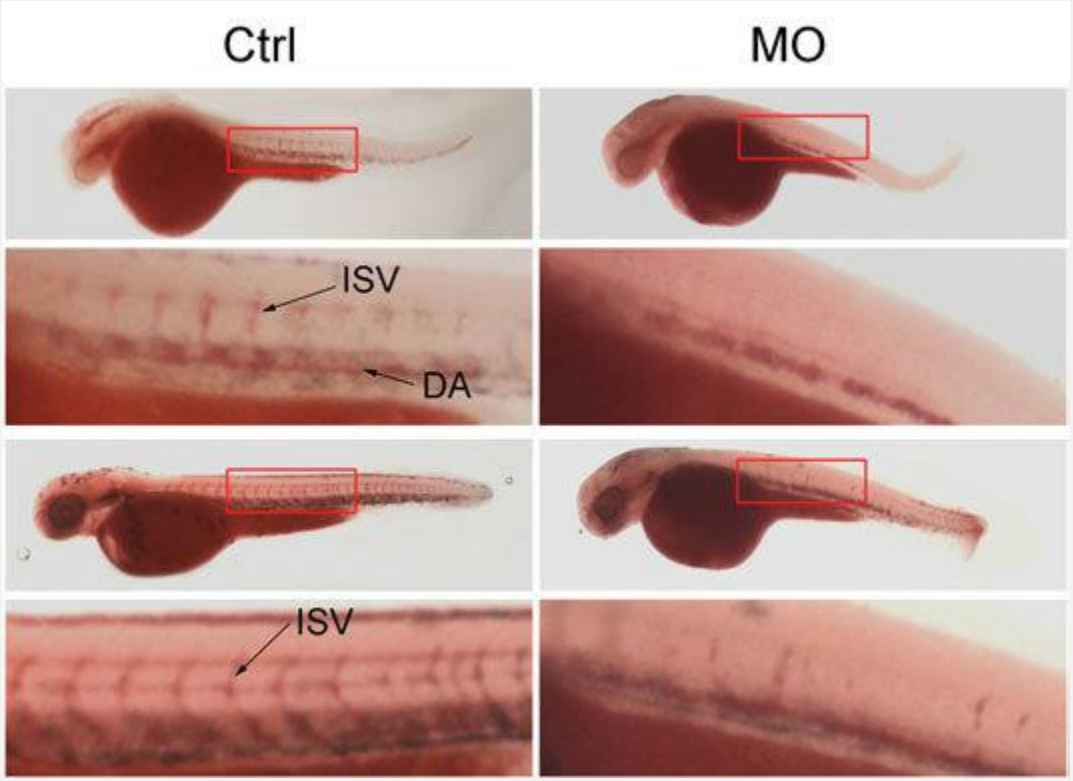
- rozpustné v organických rozpouštědlech (rozpouští tkáně celkově!)
- velká část lipidů mizí při přípravě parafinových řezů, použití kryořezů
- kolorimetrická stanovení
- membránové lipidy

Sacharidy

- enzymatická stanovení, lectin-based staining
- Alcian blue stain (barvení mucinů); kyselina jodistá - Schiff (PAS = Periodic Acid Shiff, barvení polysacharidů, glykogenu) a další

Oil Red O (ORO staining)

- vizualizace neutrálních lipidů ve fixovaných tkáních a buňkách
- fixace ve 4% paraformaldehydu



ORO barvení vaskulatury

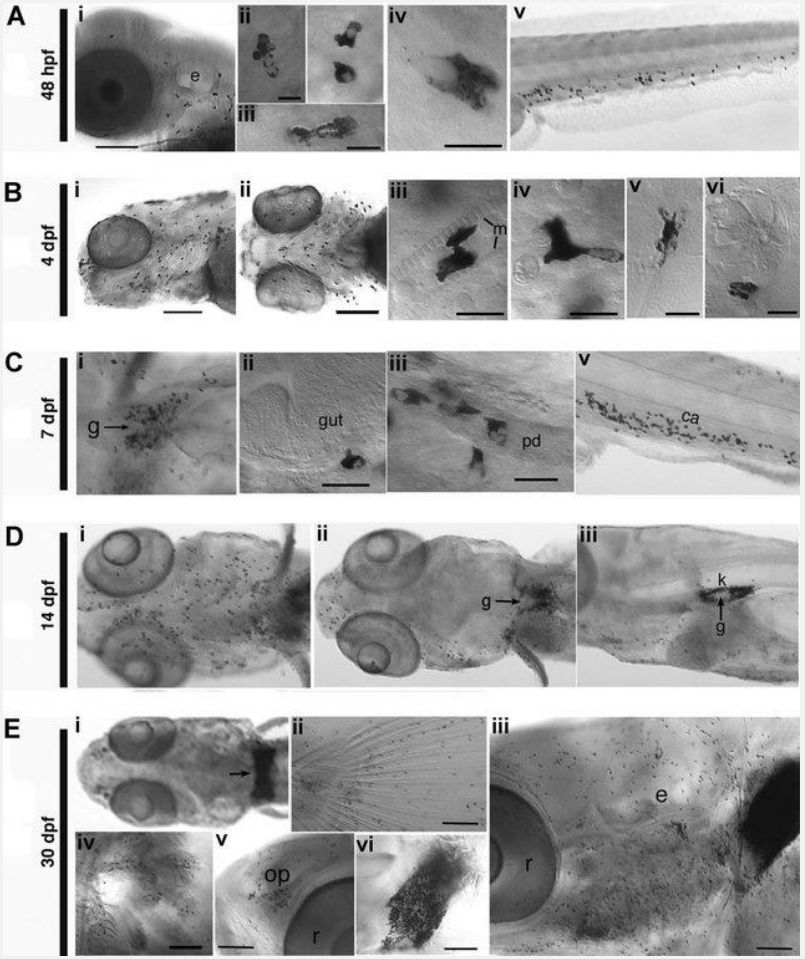
ISV, intersegmental vessels
DA, dorsal aorta

DOI: 10.1387/ijdb.072519jx

MUNI SCI

Sudan Black

- vizualizace neutrálních lipidů ve fixovaných tkáních a buňkách
- fixace ve 4% paraformaldehydu
- barvení méně výrazné proti ORO > vysoké koncentrace lipidů (fat body)



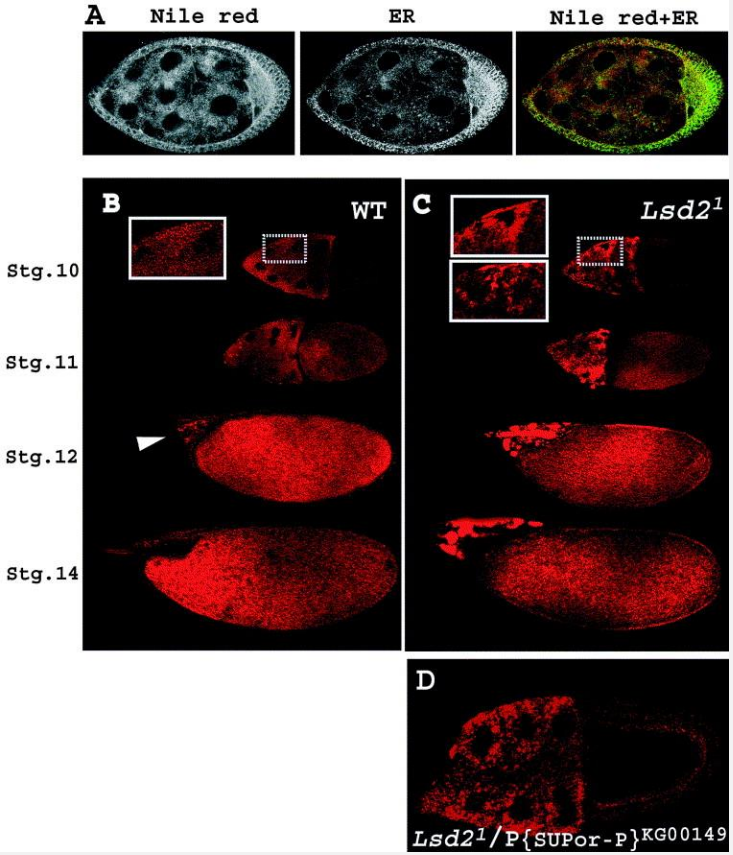
Zebrafish embryo

DOI: 10.1182/blood-2007-06-095398

MUNI SCI

Nile Red

- vizualizace neutrálních lipidů v nezafixovaných tkáních a buňkách
- kvalitativní stanovení velikosti a tvaru tukových kapének, nedoporučeno pro kvantifikaci tukových zásob
- obarvení a vysušení preparátu s NR a 75% glycerolem
- konfokální mikroskopie



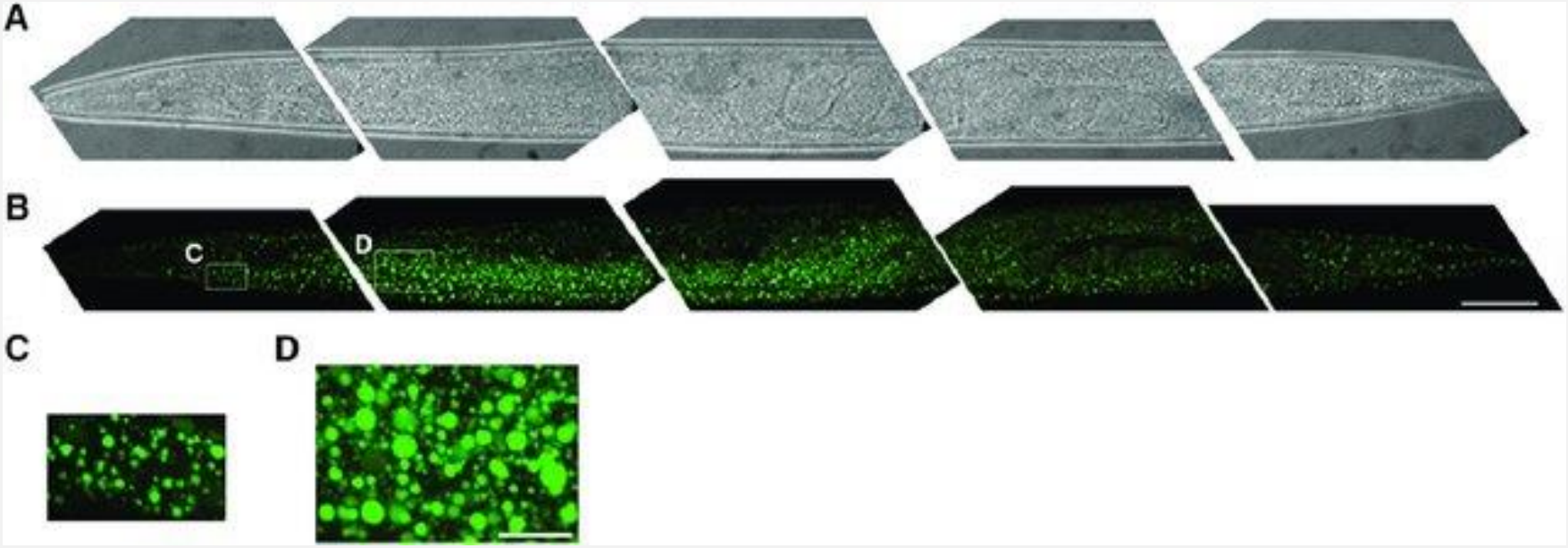
Akumulace neutrálních lipidů během oogeneze u *Drosophila melanogaster*.

DOI: 10.1016/S0925-4773(03)00158-8

MUNI SCI

BODIPY fluorescenční značení

- značení živých (průtoková cytometrie) i fixovaných buněk a tkání
- barvení vnitrobuněčných lipidů, tukových kapének a buněčných membrán



Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in *Caenorhabditis elegans* reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches
doi: 10.1194/jlr.D011940

MUNI SCI

Děkujeme Vám za pozornost

MUNI SCI