

Laboratorní cvičení 10. a 14. 10. – Moderní metody v ekotoxikologii (Metabolity a jejich stanovení)

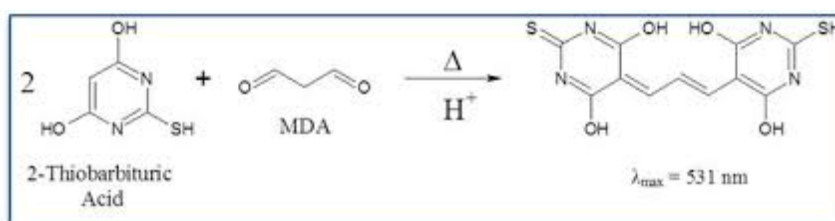
Stanovení malondialdehydu (MDA) metodou HPLC/DAD v živočišných a rostlinných tkáních

Princip:

Malondialdehyd vzniká jako sekundární produkt oxidace polyneenasycených mastných kyselin, je schopen například reagovat s bázemi nukleových kyselin a představuje tak jeden z nejmutagennějších produktů lipidní peroxidace (LPO). MDA je využíván jako biomarker peroxidace lipidů (metabolite target analysis), zejména díky jednoduché reakci s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS test). V kyselém prostředí v přítomnosti antioxidačního činidla vzniká barevný komplex, který se měří spektrofotometricky nebo fluorimetricky. Výsledkem je stanovení barevného TBARS produktu (thiobarbituric acid-reactive substances=látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Specifitu metody lze zvýšit extrakcí TBARS v butanolu a oddělením TBARS konjugátu pomocí HPLC a analýzou barevného produktu DAD detektorem (Bastos et al., 2012, Luschack et al., 2005). Metoda stanovení MDA v butanolovém extraktu využívá měření absorpčního maxima při 532nm po separaci HPLC na koloně (C18).

ROS + nenas. mast. kyseliny → MDA

MDA + 2TBA → barevný komplex



1) Homogenizace

Postup:

- Vzorky zmražených tkání jsou na ledu **krájeny** skalpelem a **váženy** v mikrozkuvkách na analytických vahách, poté udržovány na **ledu**, aby se zabránilo jejich rozmražení.
- Homogenizace zmražených vzorků tkání se provádí ve fosfátovém pufru PBS (8g NaCl; 0,2g KCl; 2,9g Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,2g KH₂PO₄ v 1L deionizované vody; pH 7.2) pro všechny typy použitých tkání v adekvátním objemu 100ul PBS/10mg tkáň. Tkáň jsou homogenizovány (např. homogenizátor Silamat S5, MP Bio) vychlazené s mraženými skleněnými kuličkami po dobu přibližně 2x20s.

2) Stanovení MDA

Chemikálie

TCA 20% kyselina trichloroctová (w/v)[163,39 g/mol]

BHT 2% butylovaný hydrotoluen (w/v) [220,35 g/mol]

0,6M HCl [36.4611 g/mol]

TRIS-TBA (25mM TRIS, 100mM TBA v destilované vodě, pH 7,4)

Standard MDA (0,22% 1,1,3,3-tetraethoxypropan (w/v) v 1% H₂SO₄) [220,31 g/mol]

Butanol

Methanol

Navážky

1) TCA 20%: (**připraven předem**); 10g TCA/50ml destilované vody; 1g BHT /50ml ethanolu; Poté vzít 0,25ml BHT a rozpustit v 50ml TCA.

2)HCl-BHT 0,02%: (**připraven v den stanovení**); 1g BHT /50ml ethanolu; Poté vzít 0,1ml BHT a rozpustit v 10ml 0,6M HCl

3) HCl 0,6M: (**připraven předem**); 302,4mg 35% HCl/14ml destilované vody

4) TRIS-TBA: (**připraven předem**); 151,2 mg TRIS rozpustit v 30ml destilované vody, poté přidat 720mg TBA, k roztoku poté přidávat pevný NaOH do úplného rozpuštění TBA; Upravit pH na 7,4 a doplnit destilovanou vodou na 50ml

5) Standart MDA: (**připravován v den stanovení**)

11,02 mg 0,22% 1,1,3,3-tetraethoxypropanu rozpustit v 5ml 1% H₂SO₄ a 2hod inkubovat při pokojové teplotě, poté vyředit na 100uM roztok MDA v 1% H₂SO₄

6) fosfátový pufr 50mM (MF A): (**připraven předem**); 4,355g K₂HPO₄ (Mr 174,18 g/mol) rozpustit v 500ml destilované vody a 1,701g KH₂PO₄ (Mr 136,09 g/mol) rozpustit v 250ml destilované vody. Oba roztoky postupně smíchat do výsledného pH7.

Postup extrakce:

a) K 100 ul **necentrifugovaného**, dobře homogenizovaného vzorku (př. jaterní tkáň) je přidáno 150 ul PBS a 75ul 20% TCA (**precipitace proteinů**). V případě standardu, k 250 ul vzorku standardu je přidáno 75 ul 20% TCA. Vzorek je promíchán na vortexu a 20 minut centrifugován při 1500 g a 4°C. Zpracování vzorků i kalibrace se provádí v duplikátu (v rámci cvičení **duplikát být nemusí**).

b) Do mikrozkušky se pipetuje 250ul supernatantu vzorku nebo standardu, 50ul HCl-BHT a 200ul TRIS-TBA a **vaří se** 30minut na termobloku při 90 °C. Po ochlazení je k roztoku přidáno 200ul butanolu a vzorek je promíchán, vortexován a následně centrifugován 10 minut při 1500 g a 4°C. Vrchní butanolová nafialověle zbarvená vrstva cca 100-150ul je přenesena do skleněného inzertu a zmražena při -18°C k analýze LC/DAD (v rámci cvičení se **měří ihned**).

Postup analýzy:

Analýza obsahu MDA - TBARS ve vzorcích tkáně je provedena s využitím kapalinového chromatografu Agilent 1100 Series. Separace analytu probíhá na koloně Supelcosil ABZ+ ((5 um), 250x4,6 mm, stacionární fáze C18) pomocí mobilní fáze: A (50 mM fosfátový pufr, pH 7) a mobilní fáze B (methanol) isokratickou elucí (25% složky B). Průtok 1 ml/min, teplota 30°C. Pro analýzu je nastřikováno 40 ul

vzorku, blanku, standardu v butanolu ze skleněného insertu ve vialce. Konjugát MDA-TBARS je detekován pomocí detektoru DAD, sledujeme absorbanci v intervalu 400-600 nm a vyhodnocování chromatogramu se provádí při 532 nm (SW HP Agilent Chemstation 1100), retenční čas sledovaného analytu je cca 2.5 minuty. Koncentrace analytu ve vzorku se vyhodnocuje na základě externí kalibrační křivky standardů, které byly zpracovávány stejným postupem jako vzorky.

Kalibrace MDA: (nebude součástí cvičení)

Kalibrační křivka je připravena v rozsahu 0.25-2uM. **Standard MDA:** 10mM zásobní roztok - 11,02mg (1,1,3,3-tetraethoxypropanu) se rozpustí v 5ml 1% H₂SO₄, promíchá se a nechá 2 hodiny stát (aby proběhla hydrolyza), poté se roztok vyředí na 100 uM roztok MDA v 1% H₂SO₄ (ředění 100x) a připraví se koncentrační řada:

K0	990ul PBS/10ul 1% H ₂ SO ₄	0uM
K1	997.5ul PBS/2.5ul 100 uM roztoku MDA	0.25uM
K2	995ul PBS/5ul 100 uM roztoku MDA	0.5uM
K3	990ul PBS/10ul 100 uM roztoku MDA	1.0uM
K4	980ul PBS/20ul 100 uM roztoku MDA	2.0uM

Vyhodnocení:

Množství vzniklého produktu TBARS vypočteme na základě externí kalibrační křivky závislosti plochy píků standardů MDA při 532 nm na jejich koncentraci (uM). Výsledné hodnoty množství MDA ve vzorku (TBARS) se vyjadřují jako nmol TBARS/mg mokré váhy tkáně/sušiny nebo nmol TBARS/mg proteinů (**analýza obsahu proteinů nebude součástí cvičení**).