

Adam V.¹, Křížková S.¹, Fabrik I.^{1,2}, Šobrová P.¹, Stejskal K.^{1,2}, Trnková L.², Kizek R.*

1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

2) Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

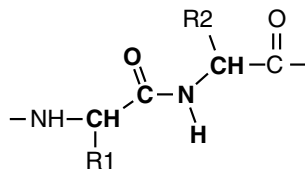
*) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova: Thiolové sloučeniny – analytické metody – elektrochemické metody – katalytické a oxidační signály

Úvod

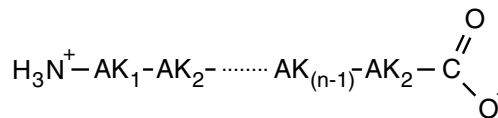
Proteiny jsou nezbytnou součástí všech živých organismů. Je známo, že jsou složeny převážně z 21 druhů -aminokyselin vycházejících z genetického kódu. Jednotlivé aminokyseliny jsou spolu spojeny peptidovou vazbou (Obr. 1a) a propojením několika aminokyselin vzniká polypeptidický řetězec (Obr. 1b).

(a)



trans – peptidová vazba

(b)



Obr. 1 (a) Peptidová vazba mezi jednotlivými aminokyselinami (b) struktura polypeptidového řetězce

Biologická rozmanitost proteinů

Biologická funkce je spojena s jejich strukturou, určenou pořadím jednotlivých aminokyselin a dále prostorovým uspořádáním jednotlivých molekul. V organismech se vyskytují jako enzymy, regulační proteiny, receptory, transportéry, hrají roli ve smyslovém vnímání, imunitním a oporném systému. Samotná složitost proteinového složení organismů je dána již tvorbou protei-

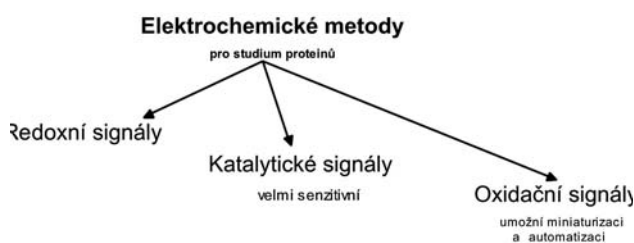
nových polymerů, které mohou tak být i) monodisperzní (mají stejnou molekulovou hmotnost) ii) disperzní (mají molekulovou hmotnost výrazně rozdílnou a molekuly tak mohou mít desítky až stovky aminokyselin). Tvar proteinu může být také rozdílný, od molekuly jednoduché vláknité, přes kulovité.

Strukturní uspořádání proteinů

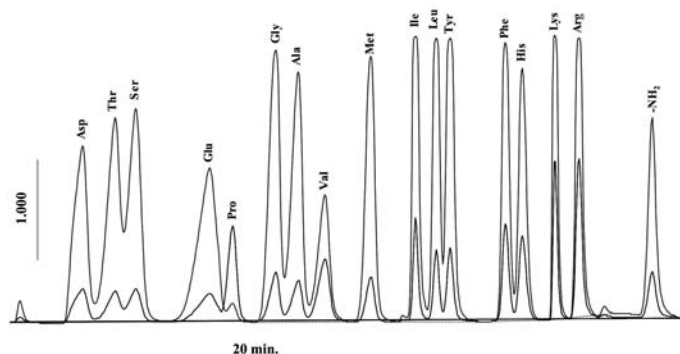
Primární struktury vytváří vyšší uspořádání, dvou základních typů i) helixu nebo ii) skládaného listu. Takto vzniklé sekundární struktury vedou ke vzniku prostorového terciárního uspořádání proteinu. Navíc obecně platí, že u globulárních proteinů míří polární nabitě skupiny ven z povrchu proteinu a jsou hydratovány. Dovnitř struktury míří jen v případech, když zde mají nějakou specifickou funkci (vazbu kovových iontů). V případě dlouhého polypeptidového řetězce vznikají domény, které mohou mít svou specifickou funkci. Na vzniku terciárních struktur se podílí celá řada interakcí jako: elektrostatické přitažlivé síly mezi atomy a dipóly, vodíkové vazby, interakce mezi polárními skupinami a vodou, disulfidické vazby, disperzní síly mezi hydrofobními skupinami. Mnohé proteiny se skládají z více samostatných polypeptidových jednotek vytvářející kvartérní strukturu, přičemž i zde se uplatňují všechny typy interakcí. Velmi významnou je schopnost dalších biologicky aktivních látek vázat se na proteiny.

Co se musí udělat se vzorkem pro stanovení proteinů?

Primárním úkolem je správné odebrání a převedení získaného biologického vzorku do odběrové zkumavky. Podle charakteru sledovaného proteinu je vhodné jeho okamžité zamražení kapalným dusíkem a dále uchování v hlubokomrazícím boxu při -80°C . Vzorek je před vlastní analýzou homogenizován pomocí různých způsobů a technik závislých na hledaném proteinu. Obecně je však vždy potřebné biologický vzorek mechanicky upravit (mechanické a ultrazvukové homogenizátory). Cílem je rozbití buněk a uvolnění intracelulárního obsahu do roztoku. Získaný homogenát je centrifugován, aby došlo k oddělení zbytků buněk a supernatantu (obsahující proteiny). Takový vzorek je možné již použít k vlastní analýze. Většinou je však potřebné provést jeho vhodné naředění či další úpravu vzorku podle analyzovaného proteinu.



Obr. 2 Chromatogram hydrolyzátu aminokyselin. Ionexová kolona, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, derivatizace ninhydrinem, snímaná vlnová délka 440 a 560 nm.



Obr. 3 Schéma elektroanalytického stanovení proteinů a peptidů

Analýza proteinů – stanovení obsahu aminokyselin

Abychom zjistili, které aminokyseliny obsahuje polypeptidový řetězec a v jakém jsou zastoupení, musíme provést úplnou hydrolyzu na aminokyseliny. Kyselá hydrolyza probíhá zahříváním vzorku při $100-120^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h v prostředí 6 M HCl. Vzniklá směs aminokyselin (kromě tryptofanu, který se rozkládá) se analyzuje pomocí chromatografie. Alkalická hydrolyza probíhá působením 2M NaOH po dobu 8 hodin při 120°C a umožní stanovení tryptofanu. Pro analýzu takové směsi je velmi vhodná iontová chromatografie, kde na ionexu dochází k rozdělení jednotlivých aminokyselin. Pro jednoduchou analýzu hydrolyzovaných aminokyselin pomocí jednoduché a levné UV detekce je nezbytné aminokyseliny tzv. „zviditelnit“. Z tohoto důvodu jsou deprivatizovány vhodnými barevnými činidly např. ninhydrin. Vzniklý barevný produkt je snímán pomocí jednoduchého spektrofotometrického detektoru (Obr. 2).

Elektrochemické stanovení proteinů

V případě, že je nutné analyzovat „celé“ proteiny, jsou nejběžněji používané metody elektroforéza na polyarylamidovém gelu. Kromě běžných metod využitelných pro studium proteinů je možné použít i metody elektrochemické. Elektrochemické metody detekují změny (proudu/potenciálu/náboje) na povrchu pracovních elektrod. Elektrochemické zařízení je složeno z části elektrodové a části převodníkové. Elektrodová část je pro přesná měření tvořena více elektrodami: i) pracovní (indikační), na takové elektrodě probíhá vlastní stanovení studované látky; ii) pomocné, která snižuje vliv rušivých proudů; iii) referentní, která určuje hodnotu potenciálu, ke které je vztaženo vlastní měření. Převodníková část je pak tvořena především zařízením umožňujícím udržení konstantního potenciálu nebo proudu.

Elektrochemické signály proteinů

Pomocí elektrochemických metod je možné sledovat několik rozdílných signálů závislých na použité pracovní elektrodě. Na rtuťové elektrodě je možné pozorovat signály redoxní povahy (redukční/oxidační). Za tento signál je odpovědná redukce vzniklého komplexu proteinu s povrchem pracovní elektrody. Za vlastní signály pak odpovídají elektroaktivní skupiny proteinu nebo peptidu, zejména však SH a NH₂ skupiny. Dalším typem elektrochemických signálů proteinů jsou oxidační signály na pevných elektrodách. Za vzniklé elektrochemické signály jsou odpovědné především aminokyseliny tyrosin a tryptofan. Tyto metody přinášejí možnosti pro jejich miniaturizaci a využití nejen ve specializovaných laboratořích.

Na druhou stranu z pohledu senzitivity jsou tyto redoxní signály poměrně málo významné. Mnohem významnější jsou signály katalytické povahy. Tyto signály odpovídají jevům probíhajícím na rtuťových elektrodách, především toho, že přítomný protein vyvolá urychlení uvolnění vodíku ze základního elektrolytu. V přítomnosti proteinů tak vznikají signály, které jsou závislé na koncentraci proteinu. Byly popsány dva takové signály a to i) Brdičkova reakce a ii) pík H. Pro vznik katalytických signálů Brdičkovy reakce je potřebné k roztoku proteinu přidat ionty kobaltu(III) a zvýšit pH základního elektrolytu. Po splnění těchto podmínek vznikají typické signály, které odpovídají koncentraci proteinu přítomného v roztoku. Druhým a velmi senzitivním katalytickým signálem je pík H. Tento signál vzniká v negativnějším potenciálu a pro jeho analýzu je velmi vhodná chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza s konstantním proudem. Metoda pak umožňuje v roztoku analyzovat ultrastopová množství proteinů.

Využití elektrochemie pro studium nádorových onemocnění

Přesně před sto jedna lety (25. února 1906) se narodil jeden z významných žáků Jaroslava Heyrovského Rudolf Brdička, který objevil signál vznikající v přítomnosti proteinů obsahující ve své molekule atomy síry. Na počest objevitele byl tento jev pojmenován jako Brdičkova reakce, viz výše. Rudolf Brdička se však nezastavil a pokusil se metodu využít pro diagnostiku rakoviny a výsledky své práce publikoval v roce 1937 v časopise Nature. Zjistil, že průběh analýzy krevního séra zdravého člověka a pacienta s nádorovým onemocněním je výrazně odlišný a mohl být využit pro rozlišení zdravého a nemocného člověka. Nebylo však zcela zřejmé, které proteiny byly podle vypracované metodiky stanovovány. Později se podařilo objevit skupinu mukoproteinů (MP-1, MP-2 a MP-3), ale proteinům o nižší molekulové hmotnosti nebyla věnována žádná pozornost. Jak se v poslední době ukazuje, nízkomolekulární proteiny (jako je metalothionein) a peptidy (jako je glutathion) hrají významnou roli v řadě biologických procesů včetně regulace buněčného dělení.

Závěr

Elektrochemické metody patří mezi méně používané postupy v analýze peptidů a proteinů. Je však nezbytné připomenout, že vykazují velmi dobrou senzitivitu, reprodukovatelnost a navíc jsou poměrně snadno miniaturizovatelné.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha a Běh Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Vodickova H, Pacakova V, Sestakova I, Mader P. Analytical methods for determination of metallothioneins. *Chemicke Listy*. 2001;95(8):477-83.
2. Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Havel L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. *Chem Listy*. 2004;98(4):160-7.
3. Kizek R, Trnkova L, Palecek E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal Chem*. 2001 Oct; 1573(20):4801-7.
4. Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Kuban V. Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis. *Chem Listy*. 2003;97(10):1003-6.
5. Petrlova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Mikelova R, Stiborova M, et al. Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého střeva a nebo melanomem. *Klin Onkol*. 2006;19(2):58-62.
6. Petrlova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Potesil D, Mikelova R, et al. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomedical Papers*. 2005;149(2):485-8.
7. Petrlova J, Potesil D, Mikelova R, Blastik O, Adam V, Trnkova L, et al. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim Acta*. 2006;51(24):5112-9.
8. Brdicka R. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. – Part XXXII. - Activation of hydrogen in sulphhydryl group of some thio-acids in cobalt salts solutions. *Coll Czech Chem Commun*. 1933;5:148-64.
9. Brdicka R. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. – Part XXXI. – A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. *Coll Czech Chem Commun*. 1933;5:112-28.
10. Brdicka R. Polarographic investigation in serological cancer diagnosis. *Nature*. 1937;139:1020-1.
11. Brdicka R. Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis. *Nature*. 1937;139:330-.
12. Brdicka R. Zur frage nach der natur der polarographisch feststellbaren serumveränderungen bei Krebs. *Klinische Wochenschrift*. 1938;18:305-8.