

EPITACHOFORÉZA – METODA PRO ZÍSKÁVÁNÍ BIOMAKROMOLEKUL Z KOMPLEXNÍCH MATRIC

*Nové pohledy na analytickou chemii**

HELENA HRUŠKOVÁ^{a,b}, IVONA VORÁČOVÁ^a, MARKÉTA LAŠTOVIČKOVÁ^a, MICHAEL KILLINGER^{a,b}
a FRANTIŠEK FORET^a

^a Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 967/97, 602 00 Brno,

^b Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika
HelenaHruskova@email.cz

Došlo 10.6.23, přijato 17.7.23.

Epitachoforéza je nová separační preparativní technika založená na diskontinuální elektroforéze umožňující zakoncentrování a přečištění biomakromolekul z komplexních biologických matric. Zároveň umožňuje převést tyto sloučeniny z biologických tekutin zahrnujících například moč nebo živné sérum do jednoduššího roztoku vhodného pro následnou analýzu. V našich nedávno publikovaných vědeckých pracích jsme konkrétně cílili na využití epitachoforézy pro předúpravu vzorků obsahujících proteiny a DNA. Technika umožňovala více než sedmdesátinásobné zakoncentrování vzorku s výtěžností přes 90 %. Preparativní povaha epitachoforézy umožňuje následnou analýzu různými technikami zahrnujícími hmotnostní spektrometrii, kapilární elektroforézu, gelovou elektroforézu, ELISA analýzu nebo sekvenování nové generace.

Klíčová slova: DNA, proteiny, epitachoforéza, koncentrace, matrice

Úvod

Tělní tekutiny (například krev a moč) obsahují množství sloučenin, jejichž zastoupení reflektuje stav organismu. Mezi takovéto látky spadá i DNA a proteiny, které v lidském těle plní řadu různorodých funkcí. Analýzu těchto biomakromolekul v biologické matrici lze použít k diagnostickým účelům a tyto sloučeniny potom slouží jako biomarkery určitého onemocnění^{1,2}. Přímá detekce těchto biomarkerů v tělních tekutinách je však obtížná, neboť jejich analytický signál může interferovat se signály ostatních sloučenin přítomných v matrici. Biomakromolekuly se navíc ve vzorcích běžně vyskytují v nízkých koncentracích, což ještě více komplikuje analýzu z hlediska nároků na citlivost³. Z tohoto důvodu je nutné vyvíjet nové postupy pro zakoncentrování a přečišťování biomarkerů z biologických matric. V tomto článku se pokusíme seznámit čtenáře s využitím moderní separační metody – epitachoforézy (ETP) – k těmto účelům.



Mgr. Helena Hrušková získala Cenu Metrohm 2023 za nejlepší článek v oblasti kapalinové chromatografie pro separaci iontových a polárních sloučenin. V letech 2014–2017 absolvovala bakalářské studium chemie na Masarykově univerzitě, Přírodovědecké fakultě, Oddělení chemie, v Brně a v letech 2017–2019 magisterské studium analytické chemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze a v současné době je studentem doktorského studia na Masarykově univerzitě, Přírodovědecké fakultě, Oddělení chemie v Brně. Svoji doktorskou práci zaměřenou na mikro- a mezo- fluidní instrumentaci pro obohacování biologických vzorků vypracovává na Oddělení bioanalytické instrumentace Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně pod vedením Ing. Františka Foreta, CSc. Mj. získala i cestovní studentský grant CASSS na prestižní mezinárodní konferenci HPLC 2022 symposium v San Diegu (USA).

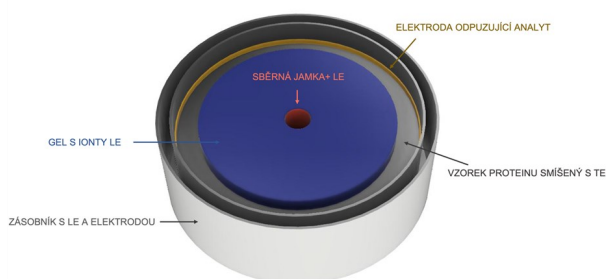
Koncentrování biomakromolekul pomocí epitachoforézy

ETP již byla popsána v několika našich studiích^{4–7}. Jedná se o preparativní separační metodu založenou na diskontinuální elektroforéze umožňující koncentrovat a přečistit roztoky biomakromolekul z velkých objemů (až desítky ml) biologických matric (viz obr. 1).

Základem ETP jsou dvě do sebe vložené kruhové nádoby propojené ve středu pomocí sběrné jamky s dialyzační membránou. Každá nádobka také obsahuje kruhové elektrody, jejichž polarita je nastavena dle typu analytu. Svrchní elektroda vždy odpuzuje analyt směrem ke středu zařízení a elektroda ve spodní nádobce ho přitahuje. Spodní nádobka a sběrná jamka jsou před experimentem naplněny vedoucím elektrolytem (LE – leading electrolyte). Do svrchní nádoby je vložen gel obsahující ionty LE. Mezi gel a okraj větší nádoby je nalita biologická tekutina (např. moč nebo kultivační médium) smíšená s ionty koncového elektrolytu (TE – terminating electrolyte).

Po připojení elektrod ke zdroji napětí dojde k odpuzování DNA/proteinů horní elektrodou směrem do středu zařízení. Jelikož systém elektrolytů je zvolen tak, aby probíhala diskontinuální elektroforéza, molekuly analytu vytvoří velmi úzkou kruhovou zónu migrující do středu zařízení. V okamžiku, kdy zóna analytu pronikne do sběrné jamky, je cílová sloučenina zachycena pomocí dialyzační membrány. Experiment je následně zastaven snížením elektrického napětí na nulovou hodnotu. DNA/proteiny je potom možné odebrat pomocí pipety. Analyty jsou zakoncentrovány z celkového objemu nadávkovaného do zařízení na začátku experimentu do objemu LE ve středu zařízení, který je obvykle několik desítek až stovek mikrolitrů. V našich publikacích jsme dosáhli koncentračního faktoru 75.

Dalším efektem, kterého lze pomocí ETP dosáhnout, je přečištění biomakromolekul od složek matrice. Toto přečištění dále umožňuje analýzu vzorku pomocí technik citlivých na obsah interferujících látek (solí, albuminu apod.). Převod analytu do čistšího roztoku probíhá díky



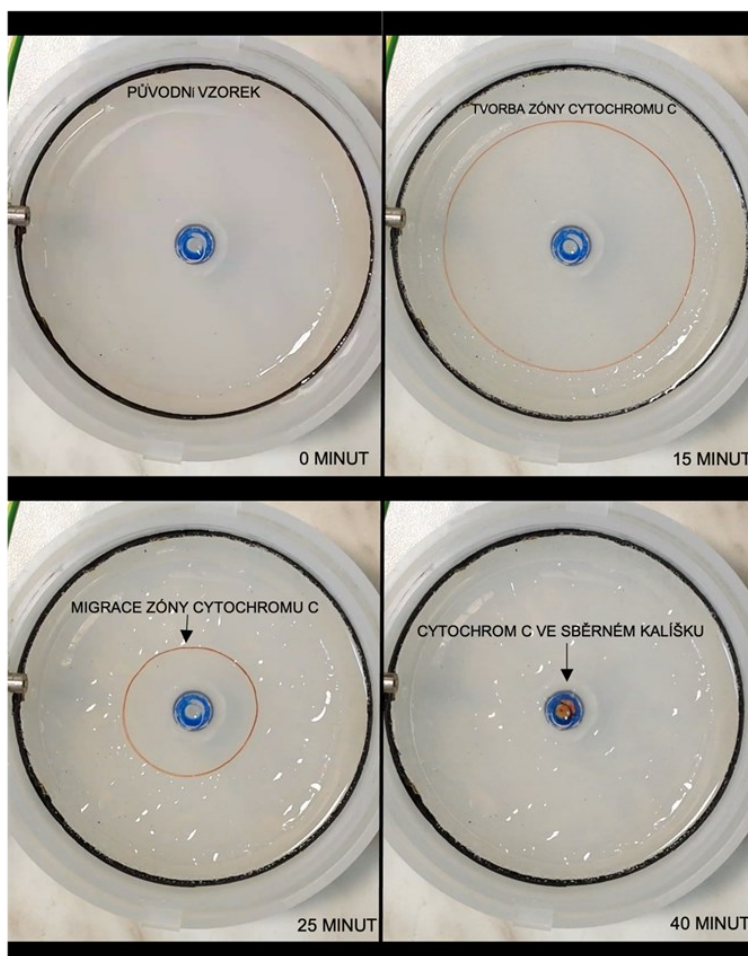
Obr. 1. Schématické zobrazení ETP zařízení. Převzato a upraveno s povolením z literatury⁷.

několika dějům. DNA nese díky přítomnosti fosfátových skupin záporný náboj, proto je koncentrována v aniontovém módu. Proteiny mohou nabývat jak kladného, tak záporného náboje v závislosti na pH roztoku. Pro naše potřeby jsme zvolili kladné pH (více je popsáno v kap. 3). Opačně nabité ionty, než jsou ionty analytu, migrují směrem k elektrodě, která analyt odpuzuje, a díky tomu dochází k jejich separaci od analytu. Dalším efektem této techniky je snížení obsahu solí a malých molekul. Ve sběrné jamce umístěné na středu zařízení probíhá dialýza. Sloučeniny, které do jamky doputují migrací a jsou menší, než je cut-off použité dialyzační membrány, nejsou membránou zachyceny. Narozdíl od makromolekul přecházejí přes membránu do druhé nádoby, čímž opět dochází k jejich eliminaci ze vzorku.

Epitachoforéza proteinů

V práci⁷, která byla součástí soutěže o Cenu Metrohm 2023, jsme se věnovali využití ETP k zakoncentrování proteinů. Náboj proteinů je určen pH roztoku, ve kterém jsou rozpuštěny. Pro zakoncentrování proteinů pomocí ETP jsme zvolili nízké pH odpovídající jejich kladnému náboji. Získaná frakce byla rozpuštěna v kyselém těkavém pufru, což do budoucna umožňuje vývoj online spojení s hmotnostní spektrometrií, případně s dalšími online technikami. Vývoj metody zahrnoval optimalizaci několika parametrů. Nejprve byl zvolen elektrolytový systém, dále elektrický výkon a typ separačního gelu. Jako modelový protein byl použit cytochrom c v dostatečné koncentraci ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$), aby byla vyvinutá zóna dobře pozorovatelná pouhým okem. Důležitými kritérii byl celkový čas experimentu, zahřívání středu ETP zařízení v důsledku vysoké proudové hustoty a tvar vyvinuté zóny proteinu. Proces optimalizace vyústil v zavedení elektrolytového systému sestávajícího se z 40 mM octanu amonného pH 4 (LE) a 20 mM octové kyseliny (TE). Tento elektrolytový systém poskytl nízký koncentrační čas, nízkou teplotu středu zařízení a symetrickou zónu proteinu (viz obr. 2).

V experimentech byla použita hodnota elektrického výkonu 5 W, přičemž po 25 minutách od začátku experimentu byla původní hodnota snížena na 1 W. Snížení výkonu zamezilo možné denaturaci či degradaci proteinu v důsledku přehřívání středu zařízení. Dalším důležitým parametrem byl typ použitého gelu, který v experimentech sloužil zejména jako antikonvekční a separační médium. Pro zakoncentrování cytochromu c bylo možné využít agarózové gely. V experimentech s myoglobinem a hemoglobinem se však při použití agarózového gelu projevila silná adsorpce proteinu na okraj gelu viditelná pouhým okem. Z tohoto důvodu byl testován další typ separačního média – polyakrylamid. Na okraji polyakrylamidových gelů se adsorpce neprojevovává. V důsledku jejich vyšší hustoty se však prodloužil koncentrační čas. Proto byl jejich průměr snížen na 3 cm nebo 3,5 cm, aby čas experimentu nepřesáhnul 45 minut (detailní popis je uveden v článku⁷).



Obr. 2. **Optimalizovaný ETP proces.** Koncentrace proteinu v 10 ml TE činila $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$. V experimentu byl použit 0,5% agarózový gel s průměrem 7,5 cm, 40 mM octan amonný pH 4 jako LE a 20 mM octová kyselina jako TE. Proces byl zachycen v 0., 15., 25. a 40. minutě. Převzato a upraveno s povolením z literatury⁷.

Elektrolytový systém jsme poté použili pro testování výtěžnosti a koncentračního faktoru. Vyvinutá metoda dosahovala koncentračního faktoru 29–67 a až 98% výtěžnosti. Podobné hodnoty výtěžnosti potom byly získány při aplikaci metody na biologickou matrici (moč) s přidávkem proteinu (viz obr. 3). Koncentrační faktor v tomto případě činil 32. V poslední fázi výzkumu se nám podařilo koncentrací živného kultivačního média HeLa buněk detegovat cytochrom c. Bez ETP předúpravy tato analýza nebyla možná⁷.

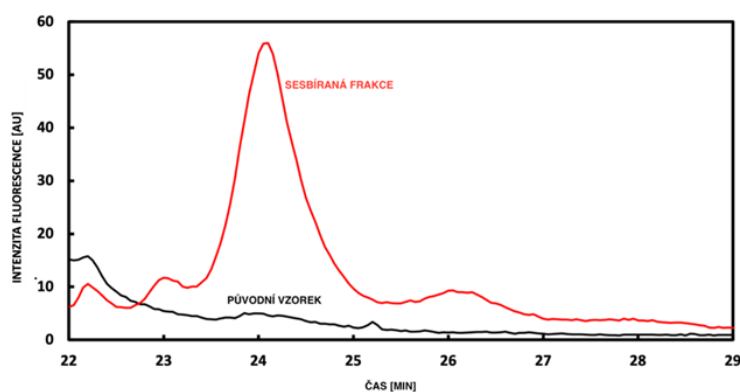
Závěr

Naše dříve dosažené výsledky zveřejněné v pracích^{4–7} jednoznačně dokazují, že ETP by mohla být důležitou technikou pro získávání proteinů a DNA z biologických matric. Umožňuje podstatné zakoncentrování cílových biomolekul a zároveň je schopná převést vzorek do čistší-

ho roztoku. Další předností ETP je vynikající výtěžnost, která může dosahovat i přes 90 %.

Závěrem lze uvést několik charakteristik vyvinuté metody, které ji zvyhodňují oproti ostatním preparativním technikám. Pro zpracování proteinů pomocí ETP není potřeba používat surfaktanty a další aditiva, koncentrační čas je nižší než 1 h. Přečištění a zakoncentrování proteinů pomocí afinitních a mikroextrakčních metod je obvykle více krokové. ETP je jednokrokový proces, přičemž výsledná frakce je rozpuštěná v pufru o nízké koncentraci, čehož lze v budoucnu využít při spojení ETP s hmotnostní spektrometrií a dalšími technikami.

Tato práce byla podpořena grantem European Regional Development Fund-Project „SINGING 521 PLANT“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008446) a podporována výzkumným záměrem Ústavu analytické chemie. AV ČR, v. v. i. (projekt RVO: 68081715).



Obr. 3. CGE-LIF původního vzorku (5 ml moči s přidavkem 1 ml 1 mg ml⁻¹ roztoku standardního cytochromu c – černá křivka) a frakce po ETP procesu (červená křivka). Koncentrace standardního cytochromu c v TE činila 50 μg ml⁻¹. Do celkového objemu 20 ml TE bylo přidáno 5 ml moči. V experimentu byl užít 6% (37,5:1 – acrylamid:bisacrylamid) polyakrylamidový gel s průměrem 3,5 cm, 40 mM octan amonný pH 4 (LE) a 20 mM octová kyselina (TE). Převzato a upraveno s povolením z literatury⁷.

LITERATURA

1. Wishart D. S., Bartok B., Oler E., Liang K. Y. H., Budinski Z., Berjanskii M., Guo A., Cao X., Wilson M.: *Nucleic Acids Res.* 49, D1 (2021).
2. Aronson J. K., Ferner R. E.: *Curr. Protoc. Pharmacol.* 76, 1 (2017).
3. Thway T., Salimi-Moosavi H.: *Bioanalysis* 6, 8 (2014).
4. Foret F., Datinská V., Voráčová I., Novotný J., Gheibi P., Berka J., Astier Y.: *Anal. Chem.* 91, 11 (2019).
5. Voráčová I., Příkryl J., Novotný J., Datinská V., Yang J., Astier Y., Foret F.: *Anal. Chim. Acta* 1154, 338246 (2021).
6. Datinska V., Gheibi P., Jefferson K., Yang J., Paladugu S., Dallett C., Voracova I., Foret F., Astier Y.: *Sci. Rep.* 11, 1 (2021).
7. Hrušková H., Voráčová I., Laštovičková M., Killinger M., Foret F.: *J. Chromatogr. A* 1685, 463591 (2022).

H. Hrušková^{a,b}, I. Voráčová^a, M. Laštovičková^a, M. Killinger^{a,b}, and F. Foret^a (^a*Institute of Analytical Chemistry, Czech Academy of Sciences, Brno*, ^b*Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic*): **Epitachophoresis – A Method for the Extraction of Biomacromolecules from Complex Biological Matrices**

Epitachophoresis is a new separation preparative technique based on discontinuous electrolyte systems ena-

bling the preconcentration of biomacromolecules from complex biological matrices. Moreover, it enables the transfer of these compounds from biological liquids, such as urine or growth medium, to a simpler solution, suitable for subsequent analyses. In our recently published papers, we focused on the use of epitachophoresis to pretreat the samples containing proteins and DNA. The technique enabled more than seventyfold preconcentration with recoveries reaching more than 90%. The preparative nature of epitachophoresis enables one to subsequently analyse the isolated biomacromolecules by various techniques including mass spectrometry, capillary electrophoresis, gel electrophoresis, ELISA analysis, or new-generation sequencing.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: DNA, proteins, epitachophoresis, concentration, matrix

Acknowledgements

This work was supported by grants European Regional Development Fund-Project „SINGING 521 PLANT“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008446) and project RVO 68081715.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.