

KRYOGENICKÁ POSTSEPARAČNÍ ÚPRAVA POLYAKRYLAMIDOVÝCH GELŮ PRO METALOPROTEOMICKÉ ANALÝZY KOMBINACÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY, LASEROVÉ ABLACE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S IONIZACÍ INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

HANA OVADOVÁ-NEJEZCHLEBOVÁ^a, TOMÁŠ VACULOVIC^b, PAUL EK^c, JAN HAVLIŠ^{d,e}
a VIKTOR KANICKÝ^{a,b}

^aMasarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie, Oddělení analytické chemie, Laboratoř atomové spektrochemie, 611 37 Brno, ^bMasarykova univerzita, Středoevropský technologický institut, Centrum nano- a mikrotechnologií, Laboratoř syntézy a analýzy nanostruktur, 601 77 Brno, ^cÅbo Akademi University, Laboratory of Analytical Chemistry, 20500 Åbo (Turku), Finsko, ^dMasarykova univerzita, Středoevropský technologický institut, Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin, Proteomika CF, 601 77 Brno, ^eMasarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Centrální laboratoř, 611 37 Brno
jdqh@sci.muni.cz

Došlo 12.9.11, přijato 5.10.11.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: gelová elektroforéza, laserová ablace, indukčně vázané plazma, hmotnostní spektrometrie, metaloprotein, kov vázající protein, kryogenická ablační cela, celofánová fólie, sušení gelu

Úvod

Přibližně třetina všech biogenních proteinů obsahuje vázanou kovovou specii¹. Obecně dělíme proteiny obsahující kovové specie na metaloproteiny (metalloproteins; kovová specie je integrální součástí struktury proteinu) a kov vázající (metaloligentní) proteiny (metal-binding proteins; kovová specie není integrální součástí struktury proteinu). Proteiny obou těchto tříd se pak skládají z (apo)proteinu (výraz apoprotein zde má smysl jen u metaloproteinů) a kovové specie². Kovové specie vázané na proteiny hrají různé esenciální role v organismech (biokatalytické, strukturní, vazebné a depozitní/transportní), mohou však způsobovat i toxicitu³. Takže úplná informace o proteinech

obsahujících kovovou specii, tj. identita (apo)proteinu a speciace kovového prvku, umožňuje studovat jejich role v metabolismu (esencialita i toxicita).

Proteiny interagují slabě s ionty prvků 1. skupiny (sodík, draslík), silněji s ionty prvků 2. skupiny (vápník, hořčík). Na druhé straně, např. přechodové kovy mají díky svému malému atomovému poloměru a interakcím skrze elektromagnetické a elektrostatické síly silné koordinační vazby²; k nim patří i ionty zinku a kobaltu, zahrnuté v této studii. Kobalt se často v kontextu metaloproteinů vyskytuje v souvislosti s výskytem zinku, i když na rozdíl od zinku, kobalt hraje v biologických systémech méně endogenních rolí^{1,4}. Specie kobaltu se mohou vázat do stejných vazných míst jako specie zinku⁵, výpočetní interakční studie ale poukazují na rozdílné vazné vlastnosti kobaltu a zinku v metaloproteinech⁶.

Metalomice (analýze souborů kovových specií v organismech) a metaloproteomice (podoborů metalomiky, zabývajícího se soubory metaloproteinů a metaloligentních proteinů) byla a je pro jejich význam věnována značná pozornost⁷. Hlavním zobecněním dosavadních studií je tzv. metalomický analytický přístup (MAA; metallomics analytical approach) popsáný v práci³, shrnující základní analytický postup sestávající se ze tří hlavních komponent:

- selektivitní komponenta – separační technika (např. SDS-PAGE, CE, HPLC),
- citlivostní komponenta – prvkově vysoce citlivý detektor (např. XRF nebo ICP-MS),
- strukturní komponenta – molekulově specifický detektor (např. MS).

Separální komponentu lze prakticky realizovat buď v on-line spojení separační techniky (LC, gelové elektroforézy (GE)⁸ nebo CZE) s citlivostní komponentou (ICP-AES nebo ICP-MS) nebo off-line spojením obou komponent, např. detekcí metaloproteinů ve frakcích po chromatografické separaci či separaci plošnou GE⁹.

Separace pomocí GE je stále považována za jednu z neúčinnějších metod separace (metalo)proteinů spolu s identifikací kovové specie pomocí PIXE¹⁰ nebo ICP-MS⁷. S postupy uplatňujícími ICP-MS úzce souvisí postseparační úpravy gelů (převážně polyakrylamidových). Spojení GE a ICP-MS se nejčastěji realizuje prostřednictvím laserové ablace (LA) materiálu gelu a separovaných metaloproteinů s následnou atomizací a ionizací v ICP¹¹; alternativou je rozklad gelu a následná přímá analýza prvkových specií¹². Poněvadž elektroforetický gel obsahuje vysoké procento vody (~90 %), jejíž odpařování způsobuje deformace a trhání gelu při ablaci, musíme snížit obsah vody v gelu. Děje se tak buď sušením (např. bez dalších úprav v sušičce gelů¹³ nebo mezi celofánovými fóliemi¹⁴) nebo nahrazením vody vhodnou kapalinou (např. glycerolem)¹⁴. Proces sušení musí nejenom zajistit geometrické vlastnosti gelu (planaritu), ale i fyzikálně-chemické (obsah vody), a také intaktnost separovaných proteinů. Úspěšnou studií aplikující kombinaci GE-LA-ICP-MS (GLIM) je práce Becker a spol.¹³ zahrnující analýzu sérového albuminu s vázanými ionty Cu²⁺ a Zn²⁺.

Jako alternativa k ablaci gelů, a tudíž eliminaci kroku sušení, může posloužit přenos otisku gelu na membránu (blotting) a následná ablace otisku. Tento postup přináší riziko uvolnění vázané kovové specíe; s úspěchem byl proto zatím použit jen pro proteiny obsahující kovalentně vázané heteroatomy; selenoproteiny¹⁵ a fosfoproteiny¹⁶.

Dalším, hypoteticky možným, postupem pro ablaci elektroforetických gelů v procesu GLIM je využití ablace v kryogenické cele. Tento postup byl poprvé pro analýzu kovových specií v biologickém materiálu použit v práci Ek a spol.¹⁷ Využití kryogenické cely minimalizuje odpařování vody při ablaci a zaručilo by tak integritu gelu. Navíc, díky toku inertního plynu celou by proces zmrazení gelu byl zároveň doprovázen částečným vysoušením.

V této studii se zaměřujeme na využití laserové ablace v kryogenické cele jako techniky paralelní k jiným post-separačním postupům v procesu analýzy metaloproteinů dělených pomocí plošné gelové elektroforézy s detekcí kovových specií hmotnostní spektrometrií s ionizací indukčně vázaným plazmatem. Naším cílem je poukázat na možnosti využití laserové ablace polyakrylamidových gelů v tomto procesu. Studie byla provedena s modelovým metaloproteinem alkoholdehydrogenasou (ADH), obsahujícím specíe zinku, a modelovým kov vázajícím proteinem hovězím sérovým albuminem (BSA) s vázanými ionty Co^{2+} .

Experimentální část

Reagencie

Pro přípravu polyakrylamidových (PA) gelů byl použit akrylamid (30% v/v) a bis-akrylamid (37,5:1 v/v), dodecylsírán sodný (SDS), 1,2-bis(dimethylaminoethan) (TEMED), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (vše Bio-Rad, Philadelphia, USA). Methylenová modř (Lachema, Brno) byla použita jako vodící barvivo pro separaci proteinů pomocí nedenuaturující PAGE, bromofenolová modř (Lachema, Brno) pak jako vodící barvivo pro separaci proteinů v denaturující PAGE. Methanol, thiosíran sodný, dusičnan stříbrný, heptahydrát síranu zinečnatého, hydrogenuhlíčan sodný a formaldehyd (čistý) byly od fy Lachema (Brno, ČR), hexahydrát chloridu kobaltnatého od fy Merck (Darmstadt, SRN). ADH (obsahující Zn^{2+}), BSA, peroxosíran amonný (APS) a glycin byly od fy Sigma-Aldrich (Steinheim, SRN). BSA- Co^{2+} 1:1 byl pak připraven rozpuštěním přesně naváženého BSA v ekvimolárním roztoku iontů Co^{2+} (10^{-4} mol dm^{-3}). Elektroforetický Lämmliho vzorkovací pufr pro denaturující PAGE, merkaptóethanol a celofánová fólie byly od fy Bio-Rad, a glycerol od fy Vitrum Rožnov s.r.o., (Rožnov pod Radhoštěm). Modř Coomassie Brilliant R-250 (CBB R-250) byla od fy Serva (Heidelberg, SRN). Kapalný dusík (Linde Gas, Brno) byl použit pro chlazení kryogenické ablační cely. Všechny experimenty byly konány s dvojnásobně destilovanou vodou z křemenného aparátu Heraeus Bi-8 (Heraeus Quarzglass, GmbH & Co. KG, Kleinheim, SRN).

Aparatura

Vertikální gelová elektroforéza ve verzi mini byla prováděna na zařízení Mini-Protean® 3 Cell doplněném zdrojem PowerPacBasic™ (Bio-Rad), rozměry gelů byly 7,3 cm × 10,2 cm. Jako sušička gelů bylo použito zařízení GD5040 (Scie-Plas, Cambridge, Velká Británie). Pro stanovení kovových specií byl použit spektrometer ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) vybavený oktapólovou reakční celou a laserovým ablačním systémem UP213 (ESI New Wave Research, Fremont, USA) s laserem Nd:YAG operujícím na vlnové délce 213 nm. Laserová ablace byla prováděna v kryogenické cele vlastní výroby (Laboratory of Analytical Chemistry, Åbo Akademi University, Åbo, Finsko) a bez vymrazování v ablační cele Supercell (ESI New Wave Research).

Podmínky LA-ICP-MS

Pro ablaci gelu byl použit laser Nd:YAG buzený xenonovou výbojkou, emitující záření o vlnové délce 213 nm (pátá harmonická frekvence) s délkou pulzu 4 ns. Energie laserového záření byla nastavena na hodnotu cca 3 mJ. Procento maximálního výkonu xenonové výbojky bylo nastaveno podle výsledků optimalizace a tomu odpovídající hustota zářivého výkonu laserového záření byla měřena v průběhu ablace, protože tato hodnota v průběhu času kolísá. Gely s metaloproteiny byly ablatovány ve směru separace. Ablatovaný materiál byl potom transportován proudem hélia do indukčně vázaného plazmatu. Ionty vytvořené v ICP byly extrahovány do hmotnostního spektrometru a separovány podle jejich efektivní hmotnosti (m/z) v kvadrupólovém hmotnostním analyzátoru. Pracovní podmínky laseru a ICP-MS jsou shrnuty v tab. I. Detegovány a měřeny byly izotopy ^{59}Co , ^{13}C , ^{66}Zn . Intenzita signálu (iontočet) těchto izotopů byla sledována při průtoku nosného plynu (He) 1 $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$. Intenzita signálu izotopu ^{13}C byla použita na korelaci fluktuací výkonu xenonové výbojky (normalizace intenzity signálu), neboť jeho obsah se v gelu pokládá za rovnoměrný oproti iontům měřených kovových specií. Výsledná normalizovaná hodnota intenzity signálu je poměrem intenzity signálu izotopu analyzované specíe kovu a izotopu ^{13}C .

Tabulka I

Podmínky měření. Systém pro laserovou ablaci Nd:YAG laser UP 213

Parametr	Hodnota
Hustota zářivého výkonu, GW cm^{-2}	~0,5
Vlnová délka, nm	213
Opakovací frekvence, Hz	20
Rychlost skenování, $\mu\text{m s}^{-1}$	50
Rychlost toku nosného plynu, He , $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	1
Rychlost toku pomocného plynu, Ar , $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$	0,6

Jak v případě ablace v kryogenické cele, tak i v případě ablace sušených gelů bylo třeba vyřezat z gelu část separační stopy, obsahující separační zóny proteinů, a ty umístit horizontálně na Z-stojan ablační cely. Rozměry těchto částí byly cca $2,5 \times 4,5$ cm (šířka $\times$ výška). V případě kryogenické ablace není potřeba žádných adhezivních materiálů, gel přimrzne ke skleněné podložce, jež zapadá do manipulační pohyblivé plochy Z-stojanu cely. V případě ablace sušených gelů byly tyto mechanicky upevněny páskou.

Podmínky separace gelovou elektroforézou

Metaloproteiny byly po nadávkování prekoncentrovány izotachoforézou v koncentračním segmentu diskontinuálního gelu (4% zesíťení) po dobu 10 min při stálém napětí 100 V a po té separovány v separačním segmentu gelu (12% zesíťení) podle jejich molekulové hmotnosti pomocí 1D polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) v denaturačním (SDS) modu podle Laemmliho¹⁸ nebo podle velikosti a náboje pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v nedenaturačním (SDS) modu s využitím protokolu Ornsteina¹⁹ a Davise²⁰. Separace v obou případech trvala 40 min s konstantním napětím 200 V.

Vizualizace proteinů v gelech

Polyakrylamidové gely byly barveny stříbrnými ionty²¹ a skladovány v 1% kyselině octové při 4 °C, nebo modří CBB R-250²⁰ a také skladovány při 4 °C. V případě potřeby byly gely barvené modří CBB R-250 odbarvovány roztokem 5% methanolu a 7,5% kyseliny octové.

Postseparační úpravy gelů pro laserovou ablaci

Abychom předešli nežádoucí deformaci gelů při ablaci (uvolňování plynné vody a z toho plynoucí ztráta planarity a trhání), polyakrylamidové gely musí před ablací projít úpravou. Studovali jsme chování systému GLIM s kryogenickým vymražením gelu ve srovnání s klasickými postupy (prosté sušení a sušení mezi celofánovými fóliemi). Hlavními hledisky byla identifikace přítomnosti kovové specíe pocházející z proteinu obsahujícího kov v jeho separační zóně.

Kryogenické vymražení

Nebarvené gely byly skladovány ve fixačním roztoku (45% methanol, 2% kyselina octová) při 4 °C, gely barvené stříbrnými ionty byly skladovány v roztoku 1% kyseliny octové a modří CBB v roztoku 5% methanolu a 7,5% kyseliny octové při 4 °C.

Prosté sušení v sušičce gelů

Gel na filtračním papíru byl vložen na desku sušičky gelů a poté byl pokryt membránou z polyvinyliden chloridu (PVDC). Teplota sušení byla 40 °C.

Sušení mezi celofánovými fóliemi

Gel a dvě celofánové fólie byly ponořeny do 2% roztoku glycerolu na dvě hodiny při 4 °C. Poté byl gel vložen mezi obě fólie, spodní fólie spočívala na skleněné desce

a okraje horní přesahovaly rozměr gelu. Okraje obou fólií byly zarovnány a po odstranění bublin vzduchu byl gel sušen ve tmě. Po minimálně dvou až třech dnech byl gel v celofánové folii odstraněn ze sklíčka a přesahující okraje fólie zastříhány.

Výsledky a diskuse

Optimalizace procesu GLIM

Optimalizace spočívala v nalezení podmínek získání maximální intenzity signálu v MS a její minimální RSD. Další podmínkou optimalizace byla rovnoměrná tvorba kráterů. Podle předběžných experimentů tyto parametry závisí na hustotě zářivého výkonu laseru, typu barvení a způsobu úpravy gelu. Optimalizace základních parametrů probíhala se všemi třemi způsoby úpravy gelu na polyakrylamidových gelech se zesíťením 12 %, které byly saturované roztokem Co^{2+} či Zn^{2+} (10^{-4} mol dm^{-3}). Obecně, ablace a záznamy signálu ICP-MS byly dělány ve třech opakováních na třech různých místech gelu za stejných experimentálních podmínek. Výsledné sady dat posloužily k výpočtu průměrných hodnot intenzit signálu a jejich RSD pro jednotlivé sady. Z nich byly následně vypočítány hodnoty sdružených průměrů, standardních a relativních standardních odchylek nepřekrývajících se sad dat.

Vliv úpravy gelu na hodnotu intenzity signálu a její RSD

Výsledky jsou shrnuty v tab. II a III. Údaje v nich obsažené vymezují použitelné rozsahy hustot zářivého výkonu pro efektivní ablaci gelů po úpravě.

Vliv barvení gelu na hodnotu intenzity signálu a její RSD

Separací zóny metaloproteinů v elektroforetogramech po denaturační PAGE byly vizualizovány stříbrem nebo modří CBB R-250. Poté byly upraveny pro laserovou ablaci (prosté sušení, sušení mezi celofánovými fóliemi, kryogenické vymražení). Ablace byla prováděna v místě separační zóny. Výsledky ukazují, že ablace stříbrnými ionty barvených gelů vykazují vyšší hodnoty intenzity signálu (až dvojnásobně) a nižší RSD (až o dvě třetiny) než ablace gelů barvených modří CBB. Proto bylo barvení stříbrnými ionty výhradně použito v dalších experimentech.

Vliv rozměru ablačního kráteru a rychlosti skenování gelu na hodnotu intenzity signálu a její RSD

Velikost ablačního kráteru byla dalším optimalizovaným parametrem vzhledem k zahlcení ICP-MS ablatovaným materiálem. Volilo se mezi mezními poloměry 15 μm a 100 μm v souladu s předběžnými experimenty a z nich plynoucím výhledem na hodnoty intenzity signálu ICP-MS a její RSD. Nejmenší poloměr kráteru neposkytoval téměř žádný měřitelný signál, v druhém případě byl signál o čtyři řády vyšší než pozadí. Aby byla účinnost ablace maximální, byla nadále používána průměrná velikost ablačního krá-

Tabulka II

Vliv hustoty zářivého výkonu na intenzitu signálu v ICP-MS a její sdružené RSD při detekci $^{59}\text{Co}^{2+}$

Hustota zářivého výkonu [GW cm ⁻²]	Normalizovaná intenzita signálu $^{59}\text{Co}/^{13}\text{C}$			Sdružená RSD [%]		
	prosté sušení	sušení mezi celofánovými fóliemi	kryogenická cela	prosté sušení	sušení mezi celofánovými fóliemi	kryogenická cela
0,02	2,35	0,35	0,01	54	34	86
0,03	3,89	1,74	0,20	41	29	104
0,13	1,69	6,30	2,97	15	18	79
0,50	3,43	8,52	4,11	24	13	93
1,03	9,55	10,4	8,24	20	13	82
1,61	10,0	10,6	15,2	22	12	66
2,31	11,1	10,5	29,9	21	12	30
2,90	11,9	10,4	41,1	22	11	28
3,49	16,3	9,67	46,4	20	11	22

Tabulka III

Vliv hustoty zářivého výkonu na intenzitu signálu v ICP-MS a její sdružené RSD při detekci $^{66}\text{Zn}^{2+}$

Hustota zářivého výkonu [GW cm ⁻²]	Normalizovaná intenzita signálu $^{66}\text{Zn}/^{13}\text{C}$			Sdružená RSD [%]		
	prosté sušení	sušení mezi celofánovými fóliemi	kryogenická cela	prosté sušení	sušení mezi celofánovými fóliemi	kryogenická cela
0,02	3,05	0,02	3,60	44	39	98
0,03	6,30	0,11	3,60	36	43	98
0,44	6,60	0,20	3,90	30	36	83
0,84	4,37	0,23	2,67	45	38	75
1,57	5,71	0,32	3,29	46	31	74
2,24	4,20	0,29	2,39	34	38	46
3,15	4,84	0,49	3,33	47	32	60
3,85	4,45	0,48	2,93	73	48	49
4,43	4,88	0,17	3,99	74	36	37

ru 100 μm . Rychlost ablačního skenování hodnoty intenzity signálu neovlivnila, takže ta byla volena jen na základě požadovaného laterálního rozlišení, a sice 50 $\mu\text{m s}^{-1}$.

Vliv teploty v kryogenické cele a doby vymrazování na intenzitu signálu v ICP-MS a její RSD

Hodnoty teplot volené pro tyto experimenty byly $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a časy 0 až 70 min. Experimenty probíhaly jinak za podmínek, které vyplynuly z minulých experimentů. Nejvyšší intenzity signálů byly dosaženy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po 25 min vymrazování při této teplotě. Tyto podmínky pak byly použity v dalších experimentech při ablaci v kryogenické cele.

Srovnání intenzit signálů po laserové ablaci gelů podrobených různým procedurám úpravy po separaci v denaturačním a nedenaturujícím módu PAGE

Vliv použití kryogenické cely oproti klasickým způsobům úpravy gelů byl zkoumán při laserové ablaci metalloproteinů separovaných PAGE.

V prvním případě šlo o gely obsahující BSA- Co^{2+} 1:1 o koncentraci $10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$ separované v denaturujícím módu. Jedna sada gelů byla barvena stříbrem a druhá nebarvena. Při ablaci v normální ablační cele byla použita hustota zářivého výkonu 0,13 GW cm⁻², v kryogenické cele 2,30 GW cm⁻². Při barvení stříbrem ablaci sušených gelů ve standardní cele poskytovala vyšší intenzitu signálu

než ablaci v kryogenické cele. Situace je naproti tomu opačná při ablaci nebarvených gelů (nedokumentováno).

Při separaci v nedenaturujícím módu poskytovaly u barvených gelů nejvyšší intenzity signálů v ICP-MS ablaci gelů sušených mezi celofánovými fóliemi. V případě ablaci nebarvených gelů po nativní PAGE v kryogenické cele byly hodnoty intenzit signálů opět vyšší než u gelů sušených (nedokumentováno).

V případě separace ADH s obsahem zinečnatých iontů 10^{-4} mol dm^{-3} separované v denaturujícím módu. Opět byla jedna sada gelů barvena stříbrem, a druhá nebarvena. Pro ablaci v normální ablační cele byla použita hustota zářivého výkonu $0,43 \text{ GW cm}^{-2}$, v kryogenické cele $3,15 \text{ GW cm}^{-2}$. Při barvení stříbrem ablaci gelů pro všechny tři způsoby úpravy poskytovala přibližně stejné intenzity signálů, v případě sušení mezi celofánovými fóliemi byly nejnižší. Při ablaci nebarvených gelů byly intenzity signálů při ablaci vymražených gelů až pětkrát vyšší než pro zbylé dva způsoby úpravy (nedokumentováno).

Při ablaci gelů po nedenaturující separaci poskytovaly u barvených gelů nejvyšší intenzity signálů v ICP-MS ablaci vymražených gelů (třikrát vyšší než u gelů sušených v sušičce gelů a až desetkrát vyšší než u gelů sušených mezi celofánovými fóliemi). V případě ablaci nebarvených gelů po nativní PAGE v kryogenické cele byly hodnoty intenzit signálů asi dvakrát vyšší než u gelů sušených, nicméně absolutní hodnoty signálů byly nízké ve všech třech případech (nedokumentováno).

Závěr

Úprava gelů před laserovou ablací ve spojení s ICP-MS v procesu GLIM je jednou z nejdůležitějších fází procedury.

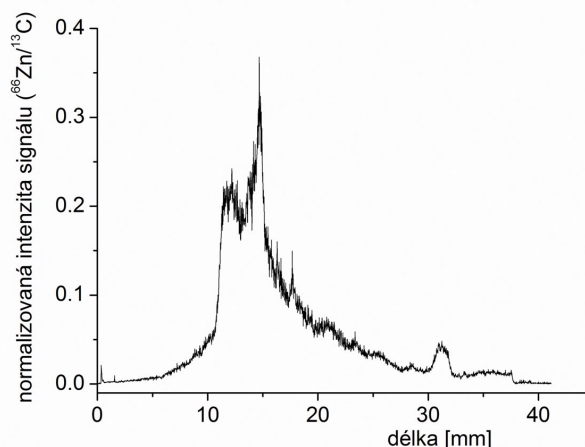
Gely sušené jen v sušičce neschly rovnoměrně, což činilo manipulaci s gelem, včetně ablaci, obtížnou a méně účinnou. Čas přípravy byl dlouhý (1 týden), gely měly tendenci se lámat a trhat i v průběhu ablaci. Intenzity signálů v ICP-MS byly pro tuto úpravu za všech podmínek vysoké, ale jejich sdružené RSD také, v případě barvených gelů byly hodnoty RSD relativně nejnižší. To vše činí tento postup nepraktickým.

Doba sušení gelů mezi celofánovými fóliemi je podstatně kratší (cca 3 dny), ale toto provedení je manuálně náročné. Gel je po vysušení mechanicky homogenní a lze jej snadno skladovat. Intenzity signálů v ICP-MS byly pro tuto úpravu srovnatelné s gely sušenými v sušičce. Výjimkou byly ablaci barvených gelů s BSA- Co^{2+} 1:1, kde byly intenzity nejvyšší a s nejnižšími RSD. Sdružené RSD byly obecně pro tuto metodu sušení nižší než při sušení v sušičce, viz tab. II a III. Jedinou nevýhodou tohoto způsobu úpravy gelu je potřeba ablatovat nejprve vrstvu celofánu, což může negativně ovlivnit výsledek při nevhodném provedení.

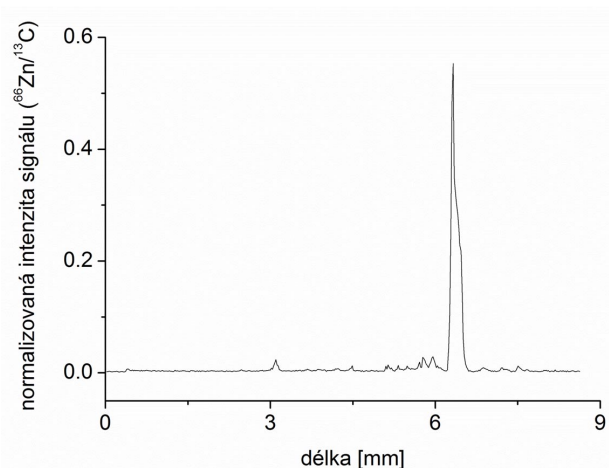
Hlavní výhodou ablaci vymražených gelů je minimální časová ztráta při úpravě gelu. Po obarvení může být gel skladován při 4°C ve fixačním roztoku nebo rovnou zpracován. Před ablací, aby se zabránilo zamlžení kamery

laseru kondenzací odpařené vody, je třeba ablační celu čistit tokem inertního pomocného plynu, nejlépe argonu. Intenzity signálu měřené ICP-MS obdržené po ablaci gelu vymrazovaného po 25 min při -80°C ukazují jiné chování než u ostatních způsobů sušení. Zpočátku jsou hodnoty intenzit nízké a růst začíná až při dosažení hustoty zářivého výkonu $2,3 \text{ GW cm}^{-2}$. Hodnoty RSD těchto intenzit, zpočátku velmi vysoké, výrazně klesají se stoupajícím výkonem laseru. Spotřeba kapalného dusíku pro chlazení ablační cely a možné zanesení vodících cest kondenzujícím materiálem jsou hlavními nevýhodami GLIM vymražených gelů. Kritéria intenzit signálu a doby úpravy gelu jsou však rozhodující pro kvalitu získaných dat. Ablaci v kryogenické cele poskytují ať už srovnatelné nebo vyšší intenzity signálů, s výjimkou ablaci barvených gelů, kde jsou tyto hodnoty většinou nižší než u ablaci gelů upravených sušením. V neposlední řadě výhodou kryogenické ablaci může být to, že gel *de facto* nebyl suchý a je možné s ním poté opět nakládat jako s gelem, kdežto gely sušené kterýmkoliv z obou jiných postupů jsou po ablaci již nepoužitelné.

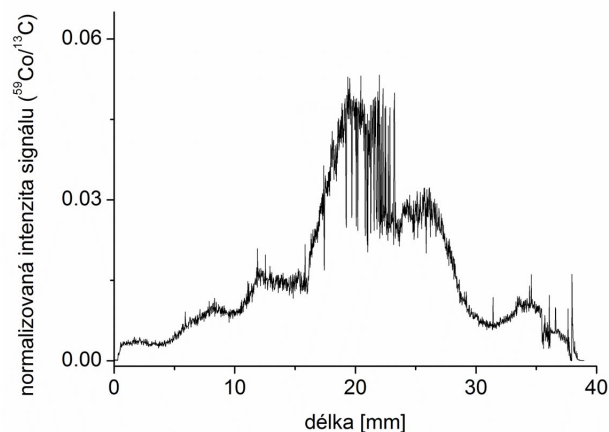
V rámci ověření účinnosti ablaci v kryogenické cele byly také ověřeny jiné předpoklady této účinnosti. Za prvé, neboť hlavním cílem separace pomocí PAGE je také udržet kovovou specii vázanou na protein, v literatuře se často setkáváme s názorem, že nedenaturující, tzv. nativní PAGE je vhodnější metodou, než denaturující, tzv. SDS PAGE²², PAGE se sníženým obsahem SDS²³ a samozřejmě s nativní PAGE²⁴. Naše výsledky ukazují, že ablaci gelů po separaci ADH i BSA- Co^{2+} v SDS módu poskytuje vysoké intenzity signálů nezávisle na způsobu úpravy gelu, viz srovnání obr. 1 a 5.



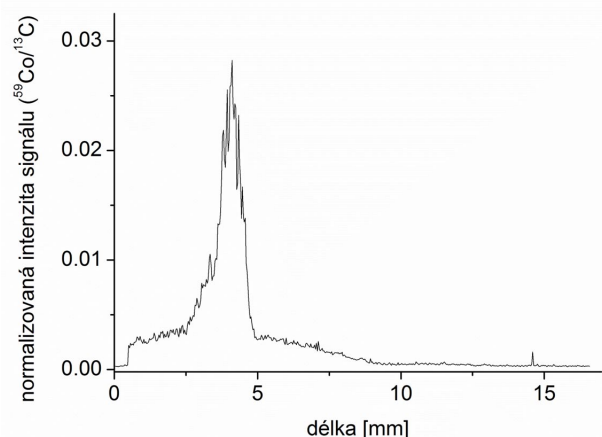
Obr. 1. Záznam závislosti normalizované intenzity signálu $^{66}\text{Zn}^{2+}$ na délkové souřadnici rozměru separační stopy získané kryogenickou ablací části gelu obsahujícího stříbrem barvenou separační zónu ADH po separaci v denaturujícím módu PAGE



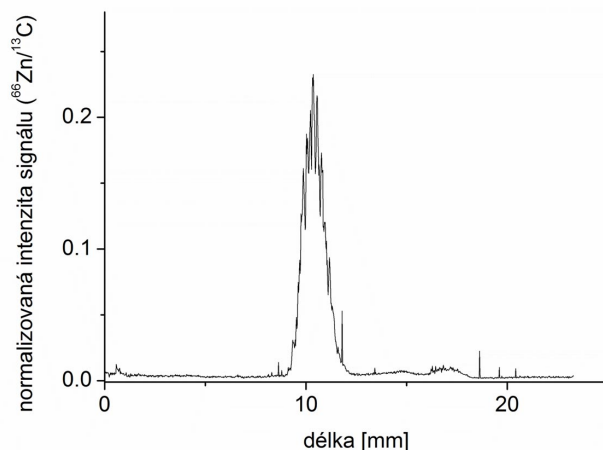
Obr. 2. Záznam závislosti normalizované intenzity signálu $^{66}\text{Zn}^{2+}$ na délkové souřadnici rozměru separační stopy získaný ablací části gelu sušeného v sušičce gelů obsahujícího stříbrem barvenou separační zónu ADH po separaci v denaturujícím módu PAGE



Obr. 4. Záznam závislosti normalizované intenzity signálu $^{59}\text{Co}^{2+}$ na délkové souřadnici rozměru separační stopy získaný ablací části gelu sušeného v sušičce gelů obsahujícího stříbrem barvenou separační zónu BSA: Co^{2+} 1:1 po separaci v denaturujícím módu PAGE



Obr. 3. Záznam závislosti normalizované intenzity signálu $^{59}\text{Co}^{2+}$ na délkové souřadnici rozměru separační stopy získaný kryogenicou ablací části gelu obsahujícího stříbrem barvenou separační zónu BSA: Co^{2+} 1:1 po separaci v denaturujícím módu PAGE



Obr. 5. Záznam závislosti normalizované intenzity signálu $^{66}\text{Zn}^{2+}$ na délkové souřadnici rozměru separační stopy získaný kryogenicou ablací části gelu obsahujícího stříbrem barvenou separační zónu ADH po separaci v nendenaturujícím módu PAGE

Dalším diskutovaným tématem je vliv vizualizace proteinů gelu jejich barvením na proces GLIM, neboť se předpokládá, že při něm dochází k narušení vazby kovové specíe na protein^{14,25}. Literatura uvádí úspěšné použití barvení gelů stříbrnými ionty pro GLIM^{22,26}, což naše výsledky potvrzují, viz srovnání obr. 1 s 2, a 3 s 4. Naopak barvení CBB R-250 se ukázalo v našich experimentech jako nevhodné, neposkytující při GLIM žádný měřitelný signál kovové specíe, ačkoliv v literatuře existují doložené případy úspěšného použití²⁷.

Ablace v kryogenické cele je tedy vhodnou alternativou k tradičně používaným metodám úpravy gelů v procesu GLIM (sušení). Na jedné straně vyžaduje speciální ablační celu, chlazenou kapalným dusíkem, na té druhé ale výrazně zkracuje dobu úpravy gelu z řádově dnů na desítky minut při zachování výstupních parametrů ablace, tj. vysoké intenzity signálu měřených iontů a jejich nízké RSD, a umožňuje znovupoužití gelů po ablaci, kupř. pro identifikaci proteinové složky metaloproteinu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tato práce byla realizována s finanční podporou Grantové agentury České republiky GA203/07/1391 a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM 0021622412, MSM 0021622413 a MSM 0021622415.

LITERATURA

- Shi W., Chance M. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 144 (2011).
- Garcia J. S., Schmidt de Magalhães C., Arruda M. A. Z.: *Talanta* 69, 1 (2006).
- López-Barea J., Gómez-Ariza J. L.: *Proteomics* 6, S51 (2006).
- Cvetkovic A., Menon A. L., Thorgersen M. P., Scott J. W., Poole II F. L., Jenney Jr. F. E., Lancaster W. A., Praissman J. L., Shanmukh S., Vaccaro B. J., Trauger S. A., Kalisiak E., Apon J. V., Siuzdak G., Yannoni S. M., Tainer J. A., Adams M. W. W.: *Nature* 466, 779 (2010).
- Sénèque O., Latour J.-M.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 17760 (2010).
- Seebeck B., Reulecke I., Kämper A., Rarey M.: *Proteins* 71, 1237 (2008).
- Da Silva M. A., Sussulini A., Arruda M. A.: *Expert Rev. Proteomics* 7, 387 (2010).
- Brüchert W., Krüger R., Tholey A., Montes-Bayón M., Bettmer J.: *Electrophoresis* 29, 1451 (2008).
- Gao Y., Chen Ch., Chai Z.: *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 856 (2007).
- Szokefalvi-Nagy Z., Kocsonya A., Kovács I., Hopff D., Lüthje S., Niecke M.: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* 267, 2163 (2009).
- Becker J. S., Zoriy M., Krause-Buchholz U., Becker J. S., Pickhardt C., Przybylski M., Pompe W., Rödel G.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 1236 (2004).
- Chéry C. C., Chassaigne H., Verbeeck L., Cornelis R., Vanhaecke F., Moens L.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 576 (2002).
- Becker J. S., Pozebon D., Dressler V. L., Lobinski R., Becker J. S.: *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 1076 (2008).
- Raab A., Pioselli B., Munro C., Thomas-Oates J., Feldmann J.: *Electrophoresis* 30, 303 (2009).
- Ballihaut G., Kilpatrick L. E., Kilpatrick E. L., Davis W. C.: *J. Anal. At. Spectrom.* 26, 383 (2011).
- Venkatachalam A., Koehler C. U., Feldmann I., Lampen P., Manz A., Roos P. H., Jakubowski N.: *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1023 (2007).
- Feldmann J., Kindness A., Ek P.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 813 (2002).
- Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
- Orstein L.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321 (1964).
- Davis B. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: *Anal. Chem.* 68, 850 (1996).
- Becker J. S., Zoriy M., Przybylski M., Becker J. S.: *Int. J. Mass Spectrom.* 261, 68 (2007).
- Lustig S., Lampaert D., De Cremer K., De Kimpe J., Cornelis R., Schramel P.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1357 (1999).
- Binet M. R. B., Ma R., McLeod C. W., Poole R. K.: *Anal. Biochem.* 318, 30 (2003).
- Jiménez M. S., Rodríguez L., Gomez M. T., Castillo J. R.: *Talanta* 81, 241 (2010).
- Becker J. S., Zoriy M., Becker J. S., Pickhardt C., Damoc E., Juhacz G., Palkovits M., Przybylski M.: *Anal. Chem.* 77, 5851 (2005).
- Deitrich C. L., Braukmann S., Raab A., Munro C., Pioselli B., Krupp E. M., Thomas-Oates J. E., Feldmann J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3515 (2010).

H. Ovadová-Nejezchlebová^a, T. Vaculovič^a, P. Ek^c, J. Havlíš^{c,d}, and V. Kanický^a (^a Masaryk University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Division of Analytical Chemistry, Laboratory of Atomic Spectrochemistry, Brno, ^b Masaryk University, Central-European Institute of Technology, Centre for Nanotechnology and Microtechnology, Laboratory for Synthesis and Analysis of Nanostructures, Brno, ^c Åbo Akademi University, Laboratory of Analytical Chemistry, Åbo (Turku), Finland, ^d Masaryk University, Central-European Institute of Technology, Mendel Centre for Plant Genomics and Proteomics, Proteomics CF, Brno, ^e Masaryk University, Faculty of Science, Department of Experimental Biology, Division of Functional Genomics and Proteomics, Central Laboratory, Brno): **Cryogenic Postseparation Treatment of Acrylamide Gels for Metalloproteomic Analyses by Combination of Gel Electrophoresis, Laser Ablation and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**

Analysis of metal species in cryogenic frozen gels originated in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) by laser ablation (LA) connected to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) – GLIM in abbreviation – has been investigated to detect/quantitate them in separated metalloproteins. It was compared to traditional ways of gel drying procedures prior to ablation (plain drying, drying gel sandwiched between two cellophane foils), which are necessary operations before laser ablation to prevent undesired interferences related to gas production during laser ablation because of liquid content. Laser ablation of the gels containing BSA:Co(II) 1:1 and ADH with Zn(II) in cryogenic ablation cell (at –80 °C for 25 min) is a relevant alternative to the traditional procedures because of significant time spared during the procedure (down to tens of hours instead of days), it yields comparable outcome of metal species analysis by means of their high signal intensities and low RSD in ICP-MS and because of reusability of gels after cryogenic ablation, e.g. for mass spectrometry driven identification of protein moiety of metalloprotein.