

POUŽITÍ AUTOMATIZOVANÉ ELEKTROFORÉZY NA ČIPU PRO STUDIUM LAKTOFERINU A MATRIXOVÝCH METALOPROTEINAS

ONDŘEJ ZÍTKA^{a,b,*}, SOŇA KRÍŽKOVÁ^b,
VOJTĚCH ADAM^{b,c}, ALEŠ HORNA^{d,e},
JIRÍ KUKAČKA^f, RICHARD PRŮŠA^f,
VĚRA ŽÍŽKOVÁ^g a RENÉ KIZEK^b

^a Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^b Ústav chemie a biochemie a ^c Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^d Univerzitní institut, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, ^e Radanal s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice, ^f Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, ^g Výzkumný ústav pletařský, Šujanovo náměstí 3, 602 00 Brno kizek@sci.muni.cz

Došlo 18.6.09, přepracováno 9.11.09, přijato 3.12.09.

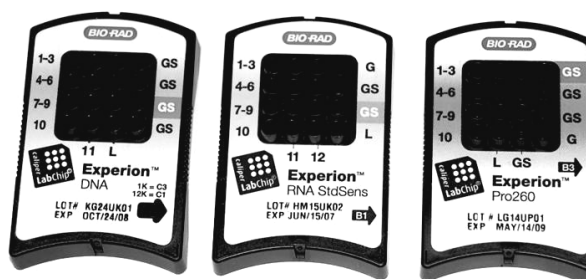
Klíčová slova: čipová elektroforéza, gelová elektroforéza, proteiny, laktoferin, metaloproteiny, automatizace

Úvod

Kapilární elektroforéza na čipu umožňuje simultánní analýzu až několika desítek vzorků během několika minut. Nespornou výhodou mikročipů je minimální objem vzorku potřebný pro analýzu, obvykle v řádech pikolitrů. Prvním přístrojem založeným na mikročipech byl integrovaný plynový chromatograf v roce 1979 (cit.¹). I přesto, že toto zařízení nebylo komerčně úspěšné, předznamenalo nástup dalších zařízení založených na mikročipech, především v kapilární elektroforéze nukleových kyselin, nízkomolekulárních látek, ale i peptidů a proteinů. Separace analytů probíhá v kanálcích vyleptaných do mikročipu za použití mikrofabricačních technik. Poté, co jsou na čip naneseny všechny roztoky, jsou vzorky elektrokineticky vpraveny do injektorové oblasti. Následně probíhá elektroforetická separace vzorků a detekce nejčastěji pomocí laserem indikované fluorescence^{2–4}. Komerčně dodávané čipy pro detekci proteinů, RNA a DNA jsou ukázány na obr. 1.

První systém pro denaturační čipovou elektroforézu proteinů v přítomnosti SDS (dodecyl síran sodný) popsal Yao a spol.⁵, přičemž první komerční zařízení bylo vyvinuto firmou Caliper Technologies v roce 2001 (cit.⁶). V současné době jsou k dispozici automatizované systémy pro SDS elektroforézu na čipu např. od firem Caliper Life Sciences, Agilent Technologies, Bio-Rad, GE Healthcare nebo Shimadzu Biotech.

Experion je automatický systém pro elektroforézu na čipu vyvinutý firmou Bio-Rad. Tento systém je použitelný pro detekci a separaci DNA, RNA a proteinů. Separace probíhá tzv. „Lab on Chip“ mikrofluidní technologií (Caliper Life Sciences) na malém destičkovém čipu s následnou fluorimetrickou detekcí. Na jednom čipu je možné provést analýzu až 10 proteinových nebo 12 vzorků nukleových kyselin během 30 min. Hlavní výhodou, v porovnání s klasickými elektroforetickými systémy, je jednoduchost provedení, snadná obsluha a rychlost provedení celé analýzy včetně zpracování dat. Při analýze proteinů oproti klasické SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS) odpadají časově náročné kroky zahrnující přípravu gelů a detekci proteinů pomocí Coomassie Blue, odbarvování gelů, jejich dehydrataci a dokumentaci. V případě analýzy RNA vzhledem k jejich náchylnosti k degradaci všudypřítomnými RNAsami je obrovskou výhodou celého procesu jeho rychlost. Výsledky jsou dostupné ihned po analýze. Další výhodou je i automatická relativní i absolutní kvantifikace separovaných biomakromolekul. Při práci s Experionem je nutné mít na paměti určitá omezení, kterými jsou posun molekulových hmotností některých detegovaných proteinů ve srovnání s SDS-PAGE, popř. problematická analýza polypeptidů s molekulovou hmotností nižší než 10 kDa, která je způsobena emisním maximem použitého fluorescenčního barviva^{7–9}.



Obr. 1. Komerčně dodávané čipy pro detekci proteinů, RNA a DNA od firmy Bio-Rad

* Prezentováno Ondřejem Zítkou na 12. ročníku celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie O cenu firmy Merck.

Pro své přednosti lze předpokládat uplatnění přístroje Experion pro rutinní aplikace jako klinická praxe¹⁰, sledování a ověřování separačních procesů^{11,12}, ověřování odrůdové jakosti^{13–15}, přesnější a reprodukovatelné vyhodnocení restriční analýzy DNA¹⁶ a kontroly kvality extrahovaných nukleových kyselin¹⁷. Získané závislosti intenzity fluorescence na čase mohou být zahrnuty do databází odrůd a využity pro ověřování odrůdové jakosti a kvality výrobků^{13–15,18}.

Cílem tohoto článku je shrnutí našich dosavadních zkušeností s použitím systému Experion pro detekci laktoferinu a matrixové metaloproteinasy 9 (MMP-9). Oba proteiny jsou kovy vázající a bez jejich přítomnosti nejsou aktivní. Laktoferin (laktotransferin) je metaloprotein vyskytující se v granulích neutrofilů a mukózních sekretech, především v mléce. Nižší koncentrace byly nalezeny v slzách, slinách a dalších tělesných tekutinách. Biologický význam laktoferinu dosud není zcela objasněn, vzhledem ke své schopnosti vázat železo z okolí vykazuje baktericidní vlastnosti, kromě toho má také antiflogistické schopnosti¹⁹. Mimo jiné je schopen modulovat imunitní odpovědi a má pozitivní efekt na růst mléčných bakterií, což ještě zesiluje jeho antimikrobiální působení²⁰. Matrixové metaloproteinasy jsou enzymy schopné štěpit proteiny extracelulární matrix. Tato schopnost je spojuje s mnoha fyziologickými procesy, jako jsou apoptóza, děložní cyklus, embryonální vývoj, ovulace anebo zánět, ale také jsou dávány do souvislosti s mnoha onemocněními, např. artritida, Alzheimerova choroba, ateroskleróza, cévní onemocnění, gastritický vřed, choroby centrální nervové soustavy, jaterní cirhóza, metastázy a rakovina. Podle substrátové specifity a mechanismů štěpení substrátu se dělí na želatinasy, kolagenasy, stromelysiny, matrilysiny, membránově vázané MMP a ostatní, přičemž MMP-9 se řadí mezi želatinasy, které štěpí především kolagen (IV, V, VII, X a XIV) jako základní stavební složku pojivové tkáně²¹.

Bioanalytická chemie zahrnuje řadu rozdílných oblastí počínaje kvantifikací cílového analytu ve vzorku až po určení struktury či schopnosti interakce biomakromolekuly s dalšími látkami. Proto je nezbytné hledat nástroje, které by bylo možné využít pro různé aplikace s dobrou opakovatelností a zároveň nízkou časovou náročností. V naší práci jsme se zaměřili na možnost testovat přístroj Experion pro kvantifikaci proteinů a zároveň pro studium interakce proteinu s dalším proteinem.

Experimentální část

Chemikálie

Lidská MMP-9 byla dodána firmou Chemicon International (Temecula, USA). Lyofilizovaný prasečí kolagen byl získán od Výzkumného ústavu pletářského (Brno, Česká republika). Standard laktoferinu byl dodán firmou NUTRA ingredients (Nizozemí). Ostatní použité chemikálie byly od firmy Sigma-Aldrich (USA) v ACS čistotě.

Čipová gelová elektroforéza – Experion

Pro analýzy byl použit čipový elektroforetický systém Experion (Bio-Rad, USA). Vzorky byly připraveny podle metodického postupu dodavatele analytických kitů (Bio-Rad). Všechny analyzované vzorky byly ředěny tak, aby koncentrace proteinů nepřesáhla $300 \mu\text{g ml}^{-1}$. Následně byly $4 \mu\text{l}$ naředěného vzorku smíchány s $2 \mu\text{l}$ redukčního pufru (systémový pufr ve směsi s merkaptoethanolem (100%) v poměru 30:1 (v/v)). Tato směs byla ponechána 4 min při 100°C a poté bylo přidáno $84 \mu\text{l}$ vody (ACS kvalita, Sigma-Aldrich, Německo). Po naplnění čipu gelem a přípravě barvicího roztoku byla zředěná směs vzorku, redukčního pufru a vody ($6 \mu\text{l}$) nanášena do jednotlivých jamek v čipu. Jako standard byl použit Pro260 Ladder (Bio-Rad), který je součástí analytického kitu. Pro inkubaci vzorků před analýzou byl použit termomixer (Eppendorf 5430, USA).

SDS-PAGE

Analýzy vzorků byly ověřeny polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Pro studium metaloproteinasy a laktoferinu byl použit 7,5% separační gel a koncentrace zaostřovacího gelu byla 5 %. SDS-PAGE probíhala na aparatuře Maxigel od firmy Biometra (Německo). Separace probíhala při napětí 150 V dokud čelo proteinů nedosáhlo dolního konce gelu (~ 2 h). Během separace byl gel chlazen vodou. SDS-PAGE a detekce proteinů stříbrem byly provedeny podle klasických protokolů²².

Purifikace laktoferinu

Vzorky kravského kolostra odebrané po 1, 12, 24, 36 a 48 hodinách od porodu byly obdrženy ze Školního statku Mendelovy univerzity v Žabčicích. Vzorky (~ 10 ml) byly po odběru zamrazeny na -20°C . Po rozmražení byl vzorek $10\times$ naředěn v $0,2$ M fosfátovém pufru, vortexován a centrifugován po dobu 30 min při 14 000 rpm (Hettich centrifugen, Německo). Po centrifugaci byl vzorek filtrován přes $0,45 \mu\text{m}$ filtr a opět $10\times$ naředěn $0,2$ M fosfátovým pufrům. Jeden ml takto připraveného vzorku byl za použití peristaltické pumpy Minipulse 3 (Gilson, Francie) aplikován na monolitickou kolonu tvořenou iontoměničovým diskem CIM (BIA separations, Slovinsko).

Enzymová reakce

Štěpení kolagenu pomocí MMP-9 bylo prováděno v $0,066$ M fosfátovém pufru o pH 7,5. Enzymová reakce probíhala po dobu 30 min při teplotě 70°C . Byla použita následující vstupní koncentrace jednotlivých reaktantů: 100 ng MMP-9 a 20 ng kolagenu.

Výsledky a diskuse

Kvantifikace proteinů

Software k přístroji Experion nám umožňuje zobrazit výsledky v podobě elektroforeogramu, kde sledujeme závislost výšky fluorescenčního signálu na čase. Na obr. 2a je zobrazena detekce standardů laktoferinu o různých koncentracích. Kalibrační přímka pro laktoferin ($y = 0,0126x - 1,978$, $R^2 = 0,994$, relativní směrodatná odchylka 5,5 %) je ukázána na vloženém obrázku v obr. 2a. Detekční limit byl stanoven postupným ředěním jako 125 ng proteinu v 90 μl (1,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$). V porovnání s průtokovou injekční analýzou spojenou s UV detektorem je detekční limit téměř o dva řády vyšší, ale pro detekci laktoferinu v mléce a dalších biologických vzorcích, které tento protein obsahují, je dostatečný. Navíc nám tato technika nabízí možnosti sledovat rozklad popř. tvorbu složitějších struktur (vicemerů), které bychom nebyli schopni průtokovou injekční analýzou postihnout.

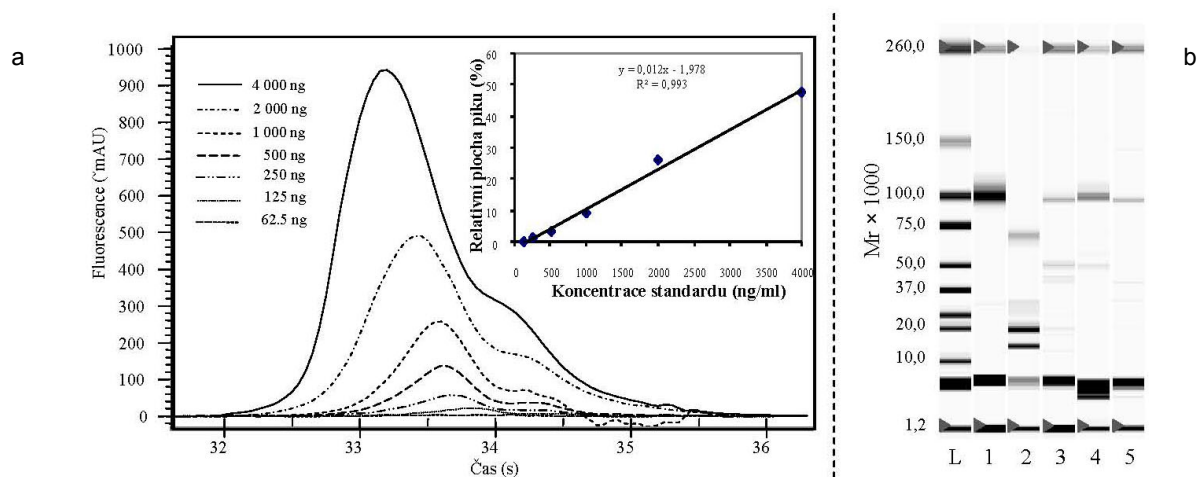
Izolace laktoferinu z kravského kolostra byla provedena pomocí monolitické kolony a postupu převzatého z práce Adam a spol.²³. Průtok mobilní fáze (5 mM fosfátový pufr o pH 7,25) byl po dobu prvních 20 min separace 0,75 ml min^{-1} . Během této doby došlo k zachycení proteinů o izoelektrickém bodu 7,25. V 21. min separace byl fosfátový pufr nahrazen 1,3; 1,5 anebo 2,0 M-NaCl, čímž došlo k eluci zachycených proteinů. Po uplynutí 35 min byla kolona regenerována pomocí 1 M-NaOH po dobu 10 min. Na obr. 2b je ukázána optimalizace separace laktoferinu na monolitické koloně. Dráha číslo 1 zobrazuje standard laktoferinu, kde můžeme vidět intenzivní signál

v oblasti $M_r \sim 100\,000$. V dráze číslo 2 je vzorek kravského kolostra před purifikací. Z obrázku je jasně patrné, že zastoupení laktoferinu v původním vzorku bylo minimální, byly detegovány především balastní proteiny. Proto jsme následně použili pro vymytí z monolitické kolony tři výše zmíněné roztoky NaCl o různých koncentracích (1,3; 1,5 a 2,0 M). Analýzu získaných frakcí můžeme vidět v drahách číslo 3, 4 resp. 5. Z obrázku je jasně patrné, že k neúčinnější eluci navázaných proteinů došlo za použití 1,5 M-NaCl (dráha č. 4, obr. 2b). Výsledky byly srovnatelné s daty získanými metodou SDS-PAGE (není ukázáno). Množství laktoferinu kvantifikovaného ve vzorcích kolostra odebraných po 1, 12, 24, 36 a 48 hodinách od porodu byly 0,8; 0,9; 1,2; 0,6 a 0,4 g l^{-1} . Výsledky kvantifikace laktoferinu byly srovnatelné s výsledky obdrženy pomocí UV detekce²³.

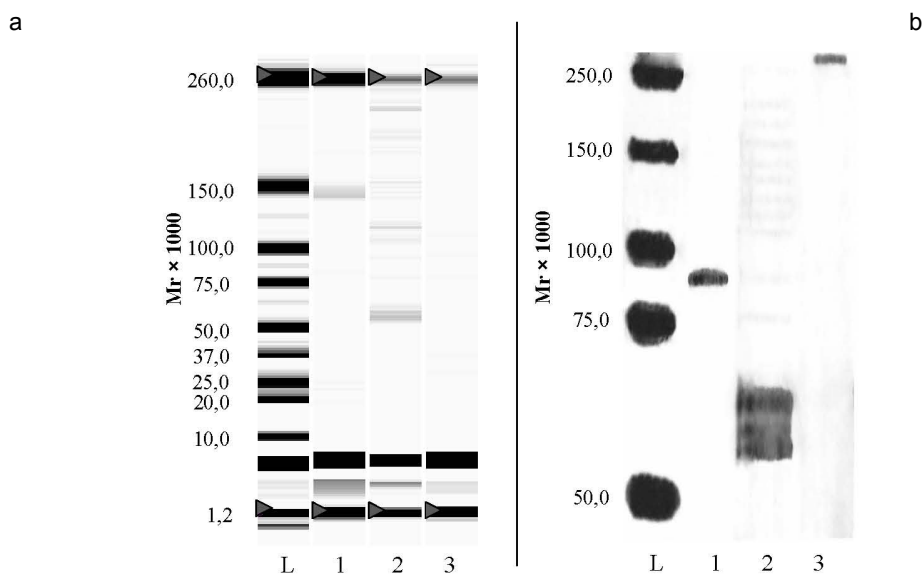
Protein-protein interakce

Dále jsme se zaměřili na další kovy vázající protein MMP-9. Použili jsme stejnou koncentrační řadu jako v případě laktoferinu a získali jsme lineární závislost výšky detegovaného signálu na koncentraci v podobě $y = 0,0112x - 2,015$, $R^2 = 0,990$. Relativní směrodatná odchylka stanovení byla 6,4 %. Detekční limit stanovený postupným ředěním byl 31,3 ng proteinu v 90 μl (350 ng ml^{-1}).

V předchozí práci jsme studovali elektrochemickými technikami interakci MMP-9 s kolagenem a prokázali jsme, že jsme schopni tento děj citlivě detegovat²⁴. Rozhodli jsme se použít čipovou elektroforézu pro studium štěpení kolagenu pomocí MMP-9 a ověřit tak schopnost této techniky nejen kvantifikovat proteiny, ale také postihnout



Obr. 2. Detekce laktoferinu čipovou gelovou elektroforézou. Elektroforeogram 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 a 4000 ng laktoferinu (množství proteinu je vztaženo na objem 90 μl) (a), ve vloženém obrázku je zobrazena kalibrační křivka. Virtuální gel, L: standard Pro-260, dráha 1: standard laktoferinu, 500 ng, dráhy 2–5: kolostrum získané 24 h po porodu izolované za různých experimentálních podmínek, dráha 2: vzorek surového kolostra 10 \times naředěný v 5 mM fosfátovém pufru o pH 7,25, dráha 3: 1,3 M-NaCl, dráha 4: 1,5 M-NaCl, dráha 5: 2,0 M-NaCl, šipka ukazuje systémové piky (b)



Obr. 3. Použití přístroje Experion studium štěpení kolagenu pomocí MMP-9. Virtuální gelový výstup z přístroje Experion: L: standard Pro260, dráha 1: 100 ng MMP-9, dráha 2: 100 ng MMP-9 a 20 ng kolagenu po 30 min při 70 °C, dráha 3: 20 ng kolagenu (a). SDS-PAGE dráha 1: 100 ng MMP-9, dráha 2: 100 ng MMP-9 a 20 ng kolagenu po 30 min při 70 °C, dráha 3: 20 ng kolagenu (b)

nout jejich vzájemné interakce. V dráze číslo 1 na obr. 3a je zobrazena detekce 100 ng MMP-9. V případě analýzy kolagenu (dráha č. 3) není na virtuálním gelu zachycen žádný signál, což odpovídá kompaktnosti a velké molekulové hmotnosti vláken kolagenu. Interakce obou proteinů přinesla výsledek v podobě směsi fragmentů o různé molekulové hmotnosti, která je zobrazena v dráze číslo 2. Tento výsledek nejen potvrzuje štěpení kolagenu pomocí MMP-9, ale také fakt, že jsme schopni tuto interakci detegovat automatickou elektroforézou na čipu. Celý experiment jsme také uskutečnili na SDS-PAGE (obr. 3b). V drahách číslo 1 a 3 můžeme vidět standardy MMP-9 resp. kolagenu. Pomocí této techniky jsme byli schopni detegovat přítomnost fragmentu kolagenu o molekulové hmotnosti přesahující M_r 250 000, kterou jsme díky přístrojovému omezení nebyli schopni rozlišit pomocí Experionu. V případě analýzy směsi obou proteinů jsme získali řadu fragmentů o různých molekulových hmotnostech s nejsilnějším pásem mezi M_r 50 000 až 75 000, což zcela odpovídá záznamu z automatické elektroforézy na čipu (obr. 3a, b). Další fragmenty již nejsou dobře kvantifikovatelné, na rozdíl od čipové elektroforézy, která je citlivější.

Závěr

Automatizovaná čipová elektroforéza je alternativou klasické SDS-PAGE, kde vyjma několikanásobného zrychlení analýzy jsou její další výhodou výstupy v elektronické podobě ve formě virtuálních gelů a závislosti intenzity fluorescence na čase, což umožňuje spoleh-

livou kvantifikaci sledovaných proteinů a zvyšuje spolehlivost a opakovatelnost analýz.

Tato práce byla financována ze zdrojů MPO 2A-1591/122 a GA AV KAN208130801. Dále autoři děkují Ing. Marii Balabánové za poskytnutí vzorků kravského kolostra.

LITERATURA

1. Terry S. C., Jerman J. H., Angell J. B.: IEEE Trans. Electron Devices 26, 1880 (1979).
2. Dolnik V., Liu S. R., Jovanovich S.: Electrophoresis 21, 41 (2000).
3. Dolnik V.: Electrophoresis 29, 143 (2008).
4. Dolnik V., Liu S. R.: J. Sep. Sci. 28, 1994 (2005).
5. Yao S., Anex D. S., Caldwell W. B., Arnold D. W., Smith K. B., Schultz P. G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 5372 (1999).
6. Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: Anal. Chem. 73, 1207 (2001).
7. Zhu K., Nguyen M., Strong W., Whitman-Guliaev C.: Bio-Rad bulletin 2005, 5299.
8. Zhu K., Strong W.: Bio-Rad bulletin 2006, 5423.
9. Wu F., Strong W.: Bio-Rad bulletin 2007, 5784.
10. Debaugnies F., Gulbis B., Cotton F.: Acta Clin. Belg. 64, 179 (2009).
11. He X., Strong W.: Mol. Cell. Proteomics 4, S365 (2005).
12. Gingrich J., Freeby S., Paulus A.: Mol. Cell. Proteomics 4, S364 (2005).

13. Siriamornpun S., Suttajit M., Uthayakumaran S., Wrigley C. W.: *Food Aust.* 57, 448 (2005).
14. Uthayakumaran S., Batey I. L., Wrigley C. W.: *J. Cereal Sci.* 41, 371 (2005).
15. Uthayakumaran S., Listiohadi Y., Baratta M., Batey I. L., Wrigley C. W.: *J. Cereal Sci.* 44, 34 (2006).
16. Minucci A., Delibato E., Castagnola M., Concolino P., Ameglio F., Zuppi C., Giardina B., Capoluongo E.: *J. Sep. Sci.* 31, 2694 (2008).
17. Pfaffl M. W., Fleige S., Riedmaier I.: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 22, 829 (2008).
18. Butikofer U., Meyer J., Rehberger B.: *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* 61, 263 (2006).
19. Jenssen H., Hancock R. E. W.: *Biochimie* 91, 19 (2009).
20. Gonzalez-Chavez S. A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 8 (2009).
21. Puente X. S., Sanchez L. M., Overall C. M., Lopez-Otin C.: *Nat. Rev. Genet.* 4, 544 (2003).
22. Krizkova S., Hrdinova V., Adam V., Burgess E. P. J., Kramer K. J., Masarik M., Kizek R.: *Chromatographia* 67, S75 (2007).
23. Adam V., Zitka O., Dolezal P., Zeman L., Horna A., Hubalek J., Sileny J., Krizkova S., Trnkova L., Kizek R.: *Sensors* 8, 464 (2008).
24. Huska D., Adam V., Zitka O., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis* 21, 536 (2008).

O. Zitka^{a,b}, S. Křížková^b, V. Adam^{b,c}, A. Horna^{d,e}, J. Kukacka^f, R. Průša^f, V. Žízková^g, and R. Kizek^b
(^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, and ^cDepartment of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno, ^dUniversity Institute, Tomas Bata University, Zlin, ^eRadanal Ltd., Pardubice, ^fDepartment of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ^gResearch Institute for Knitting, Brno): **Utilizing Automated Chip Electrophoresis for Study of Lactoferrin and Matrix Metalloproteinases**

Automated chip capillary electrophoresis was used in detection and isolation of lactoferrin and a human matrix metalloproteinase (MMP-9) as well as in investigation of interactions and cleavage of collagen with MMP-9. The method is a sensitive and simple technique superior to SDS-PAGE. It is useful in proteomic research.