

VYUŽITÍ KATALYTICKÝCH REAKCÍ NA RTUŤOVÉ ELEKTRODĚ PRO ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ METALOTHIONEINŮ

RENÉ KIZEK^a, JAN VACEK^b, LIBUŠE TRNKOVÁ^c,
BOŘIVOJ KLEJDUS^a A LADISLAV HAVEL^b

^aÚstav chemie a biochemie, ^bÚstav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova lesnická a zemědělská univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cKatedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
kizek@sci.muni.cz

Došlo 20.12.02, přepracováno 23.5.03, přijato 22.10.03.

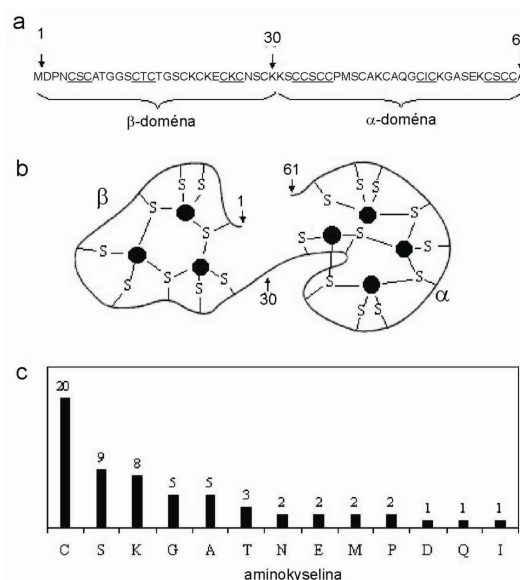
Klíčová slova: metalothioneiny, analýza, elektrochemie, rtuťová elektroda, katalytické signály, prenataliová vlna, pík H, Brdičková reakce

Obsah

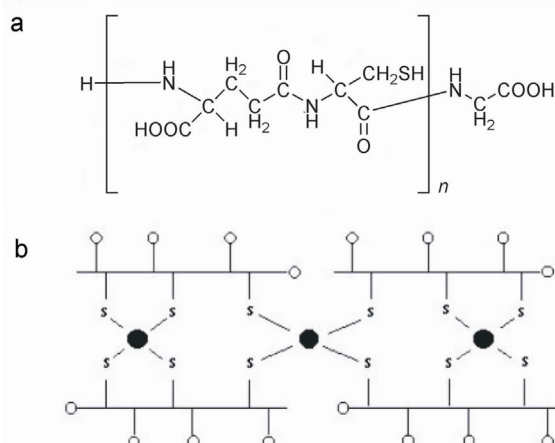
1. Úvod
2. Biologický vzorek a jeho příprava pro stanovení metalothioneinů
3. Elektrochemie metalothioneinů
 - 3.1. Polarografické a voltametrické techniky
 - 3.2. Katalytické reakce proteinů na rtuťové elektrodě
 - 3.2.1. Prenatriová vlna
 - 3.2.2. Brdičková reakce
4. Závěr

1. Úvod

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny proteinů, které regulují fyziologické koncentrace těžkých a esenciálních kovů. Objev MT je datován rokem 1957, kdy Margoshes a Vallee izolovali z koňských ledvin nízkomolekulární protein, který vykazoval vysokou afinitu k iontům kadmia^{1,2}. Rostlinné peptidy, schopné vázat ionty kovů, popsal Grill, Winnacker a Zenk (1985) v pletivech *Rauwolfia serpentina*^{3,4}. Ve stejném roce také Winge a spolupracovníci⁵ stanovili MT v prokaryotních organismech. MT byly původně rozděleny do tří tříd s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, z kterého byly izolovány⁶. Vybraní zástupci MT jsou popsáni v tabulce I. Třída MT-I zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené obvykle z 61 aminokyselin s molekulovou hmotností 6–7 kDa (obr. 1a). V molekulách savčích MT-I nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a 20 cysteinů se v primární sekvenci vyskytuje obvykle v těchto repetitích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X je označení pro jinou amonokyselinu než cystein (viz obr. 1c). Molekula MT je tvořena dvěma



Obr. 1. a) Aminokyselinová sekvence, b) schéma vazebných domén (α , β) a c) zastoupení jednotlivých aminokyselin v molekule lidského metalothioneinu MT1A (GenBank accession number K01383). U primární sekvence jsou cysteinové repetice podtrženy a v schématickém zobrazení vazebných domén jsou ionty kovů vyznačeny (●). C: cystein, S: serin, K: lysin, G: glycin, A: alanin, T: threonin, N: asparagin, E: glutamová kyselina, M: methionin, P: prolin, D: asparagová kyselina, Q: glutamin, I: isoleucin



Obr. 2. a) Strukturální vzorek molekuly fytochelatinu (γ -Glu-Cys)_n-Gly ($n=2-11$), b) model struktury fytochelatinového komplexu kadmia $Cd_3(PC_3)_4$. Struktura se skládá ze čtyř molekul (γ -Glu-Cys)₃-Gly, které prostřednictvím dvanácti -SH skupin vážou 3 atomy kovu (●), karboxylové skupiny jsou vyznačeny (○)

Tabulka I
Přehled vybraných metalothioneinů I. a II. třídy

Organismus	Označení proteinu	Počet aminokyselín	Molekulová hmotnost (Da)	Počet cysteinů	pI ^a	GenBank ^b	Lit.
<i>třída MT-I</i>							
<i>Homo sapiens</i>	MT-1A	61	6133	20	8,38	K01383	101
	MT-2	61	6042	20	8,23	V00594	102,103
	MT-3	68	6927	20	4,79	M93311	8
	MT-4	62	6419	20	8,38	U07807	104
<i>třída MT-II</i>							
<i>Candida glabrata</i>	MT-I	62	6243	18	7,53	J05133	105
	MT-II	51	5454	16	5,53	J05134	105,106
<i>Callinectes sapidus</i>	MT-II	58	6287	18	7,80	P55949	107

^a Teoretické hodnoty izoelektrický bodů (pI) byly převzaty z databáze Swiss-Prot (ExPASy Molecular Biology Server, zdroj: <http://www.expasy.ch>); ^b kód v bázi dat GenBank

Tabulka II
Přehled známých fytochelatinů

Organismus	Název	Vzorec	Lit.
<i>Rauwolfia serpentina</i>	fytochelatin	(γ -Glu-Cys) _n -Gly	4
	homofytochelatin (β -Ala)	(γ -Glu-Cys) _n - β -Ala	108
<i>Zea mays</i>	(hydroxymethyl)fytochelatin (Ser)	(γ -Glu-Cys) _n -Ser	109
	isofytochelatin (Glu)	(γ -Glu-Cys) _n -Glu	110
	desglycin-fytochelatin	(γ -Glu-Cys) _n	111

vazebnými doménami (α , β), které jsou složeny z cysteino-
vých klastrů, přičemž thiolové skupiny cysteinu tvoří kova-
lentní vazby s atomy kovů. N-terminální část peptidu byla
označena jako β -doména a má tři vazebná místa. V případě
 α -domény (C-terminální části) byla potvrzena schopnost vy-
vázat čtyři ionty kovů^{2,7} (obr. 1a,b). Předpokládaná struktura
vazebných domén molekuly MT je ilustrována na obrázku
1b. Třída MT-I je dále členěna na čtyři isoformy (*iso*-MT).
Isoformy MT-1 a MT-2 jsou běžně přítomné ve většině or-
gánů, isoforma MT-3 byla izolována z neuronů a také gliov-
ých buněk, které stabilizují a troficky zásobují neuronové
buňky^{8,9}. Isoforma MT-4 byla pozorována v dlaždicov-
ém epitelu a je exprimována v keratinocytech⁹ (tabulka I).
Třída MT-II zahrnuje metalothioneiny přítomné u některých
prokaryot, kvasinek a nižších rostlin. Jde o peptidy podobné
zástupcům z třídy MT-I. Rozdíl mezi peptidy třídy MT-I a
MT-II je v počtu aminokyselin, přičemž vazebné domény
jsou zachovány^{5,10} (tabulka I). Peptidy přítomné
v rostlinných buňkách jsou označovány jako fytochelatiny
(rostlinné metalothioneiny)⁶. Dříve byly řazeny do třídy
MT-III, dnes již bývají spíše považovány za samostatnou
skupinu peptidů. Fytochelatiny (PC) mají primární strukturu
(γ -Glu-Cys)_n-Gly (cit.^{4,11}). γ -Glutamyl-cysteinová jednotka
(γ -Glu-Cys)_n se může opakovat 2 až 11krát (viz obr. 2a,

cit.¹²). PC obsahují podobně jako savčí MT-I a MT-II velké
množství cysteinů a jsou schopny vytvářet s ionty kovů
komplexy (obr. 2b). Na rozdíl od MT-I a MT-II, které jsou
přímo geneticky determinovány, jsou PC syntetizovány po-
sttranslačně a to transpeptidační reakcí glutathionu (GSH)
katalyzovanou enzymem fytochelatin-syntetasou (γ -Glu-
-Cys dipeptidyltranspeptidasou, cit.¹¹).

Výzkum MT je nejvíce soustředěn na studium meta-
bolismu zinku, mědi, kadmia a rtuti^{13–15}. Za hlavní biologic-
kou funkci MT je považována detoxikace těžkých kovů¹³.
MT bývají nejčastěji studovány v orgánech s akumulací
a metaloregulační schopností jako jsou játra, gonády, slezi-
na nebo nervová tkáň^{13–15}. Často diskutovanou otázkou je
schopnost MT transportovat atomy kovů k apoenzymům a
jejich aktivní zapojení do homeostázy esenciálních prvků.
MT vázající zinek je schopen jej transportovat do struktu-
ry tzv. zinkových prstů, což jsou proteiny, které se vážou na
molekulu DNA (cit.¹⁶). Schopnost MT transportovat kov do
regulačních proteinů má význam v procesu karcinogeneze¹⁷.
MT jsou také důležité látky z hlediska ochrany proti radiač-
nímu¹⁸ a oxidačnímu¹⁹ stresu. Poslední dobou jsou MT in-
tenzivně zkoumány v tkáních nervového systému savců²⁰. U
isoformy MT-3, která je také někdy nazývána růstový inhi-
biční faktor (Growth Inhibition Factor – GIF), je předpoklá-
dána její souvislost s Alzheimerovou chorobou^{8,9}. V případě

fytochelatinů byla doposud prokázána pouze funkce detoxikační, jejich význam pro rostlinný metabolismus esenciálních kovů není dostatečně znám.

2. Biologický vzorek a jeho příprava pro stanovení metalothioneinů

Postupy pro přípravu vzorků pro analýzu MT jsou optimalizovány pro studovaný biologický materiál a liší se v závislosti na tom, zda jde o buňky, pletiva nebo tkáň. Pokud jsou studovány buňky nebo jiný materiál, u kterého předcházela kultivační proces s ionty kovů, je nutné provést promytí buněk pufovaným roztokem ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), čímž jsou odstraněny zbytky kultivačního media a vyvázány kovy adsorbované na povrch buněk. Nejběžněji se používá fosfátový pufr ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) nebo Tris-HCl. Použitý pufr by měl být neutrální a mít optimální iontovou sílu, aby nedošlo k předčasné lýze buněk následkem osmotického šoku. Tato procedura je důležitá pro zabránění kontaminace ionty kovů během homogenizace²¹.

Vzorek buněčné kultury může být homogenizován přímo sonikací. Pokud není efekt mikrovln dostatečný, jako je tomu např. u celistvých tkání nebo pletiv, používá se mechanická dezintegrace v mixéru. Je také možné použít zmrazení vzorku v kapalném dusíku. Během homogenizace vzorku dochází k rozrušení buněčných stěn a membrán. Diferenciální centrifugací lze oddělit buněčné kompartmenty od cytoplazmy²¹.

MT se v organismu vyskytují, podobně jako většina proteinů, v redukováném stavu. Aby se zabránilo oxidaci a degradaci vzorku, používají se antioxidanty 2-sulfanyl-ethanol^{22,23}, dithiothreitol (DTT, cit.^{24,25}) nebo tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP, cit.²⁶). Pokud je nebezpečí mikrobiální infekce, hlavně je-li vzorek skladován po delší dobu, používá se antibaktericidní 0,02% NaN_3 (cit.²⁷). Své uplatnění nachází také inhibitory proteas, jako je fenylnmethansulfonylfluorid^{27,28}. V případě elektrochemické analýzy se používání antioxidantů a jiných látek nedoporučuje z důvodu jejich interference a nežádoucí kompetice se studovanou látkou a povrchem elektrody. Redukční stav proteinu lze zabezpečit udržováním vzorku v inertním prostředí (dusík, argon)²⁹.

Při stanovení MT v biologickém materiálu lze využít odolnost MT proti termokoagulaci a precipitaci v kyselém prostředí. V tepelně upraveném (60 °C, 15 min) buněčném extraktu lze vysrážet většinu proteinů. Získaný supernatant obsahuje pouze termostabilní peptidy jako jsou MT^{30–32}. Někteří autoři navrhli vyšší teploty denaturace (95 °C, 15 min, cit.³³), přičemž MT jako termostabilní peptid zůstává nedaturován (podrobnosti viz cit.³⁴).

3. Elektrochemie metalothioneinů

Ke stanovení a charakterizaci kovy vázajících peptidů a proteinů je používána řada metod; jejich přehled viz cit.^{21,35–39}. Uplatnění elektrochemie metalothioneinů spadá přednostně do

oblasti studia vazby kovů s molekulami MT a vývoje citlivých potenciostatických a galvanostatických detektorů (biosenzorů), které by našly uplatnění při stanovení nízkých koncentrací peptidů v biologickém materiálu^{40,41}.

3.1. Polarografické a voltametrické techniky

Pro elektrochemické studium MT je významná přítomnost sirmých zbytků na molekulách cysteinu (R–SH) a cystinu (R–SS–R). Řada autorů studovala problematiku vazby iontů vazebnými doménami molekul MT právě elektrochemickými metodami. Jako polarizovatelná elektroda je používána rtuťová kapková elektroda (Dropping Mercury Electrode – DME) nebo visící rtuťová kapková elektroda (Hanging Mercury Drop Electrode – HMDE).

Vzhledem k tomu, že thiolové skupiny cysteinu jsou důležité pro elektrochemické stanovení MT, je podstatná znalost adsorpce a reakce samotné aminokyseliny na rtuťových elektrodách^{42–44}. Kromě rtuťové elektrody bylo pro studium elektrochemie cysteinu využito měděné tuhé amalgamové elektrody⁴⁵.

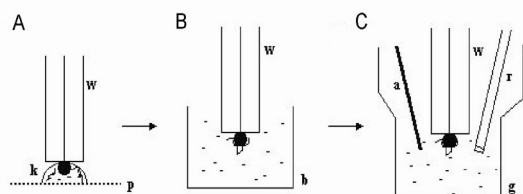
Často používanou elektrochemickou metodou pro studium MT je cyklická voltametrie (Cyclic Voltammetry – CV, cit.^{46–48}) a diferenční pulzní polarografie (Differential Pulse Polarography – DPP, cit.⁴⁹). Metodou DPP byla studována interakce molekul MT s ionty zinku ve fosfátovém pufru. Vzhledem k tomu, že vazebné domény MT obsahovaly kadmium a zinek, byl zaznamenán signál komplexu MT s ionty kadmia při $E_p -0,78$ V a komplexu MT obsahujícího ionty zinku při $E_p -1,10$ V (cit.⁵⁰). Dobře vyvinuté signály je možné dosáhnout akumulací MT na HMDE, čehož lze dosáhnout katodickou rozpouštěcí voltametrií (Cathodic Stripping Voltammetry – CSV) a diferenční pulzní voltametrií (Differential Pulse Voltammetry – DPV, cit.^{52–54}). Řada elektrochemických studií byla provedena na fragmentu Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala α -domény MT izolovaného z myších jater. Heptapeptid byl studován, kromě zmíněných elektrochemických metod, také square wave voltametrií (SWV), která umožnila sledovat schopnost peptidu vytvářet komplex s ionty zinku⁵⁵. Šestáková a spol. použili pro studium komplexů fytochelatinů s Cd, Cu, Zn, u zelených řas rodu *Chlorella*, kromě HMDE také tuhou uhlíkovou a uhlíkovou pastovou elektrodu^{56–58}.

3.2. Katalytické reakce proteinů na rtuťové elektrodě

Ve třicátých letech minulého století bylo zjištěno, že proteiny poskytují na rtuťové elektrodě dva typy katalytických signálů, prenatriovou vlnu⁵⁹ a Brdičkovu reakci⁶⁰.

3.2.1. Prenatriová vlna

Prenatriová vlna je katodická odezva proteinů znamenající na rtuťové elektrodě při negativních potenciálech předcházející redukci sodných iontů základního elek-



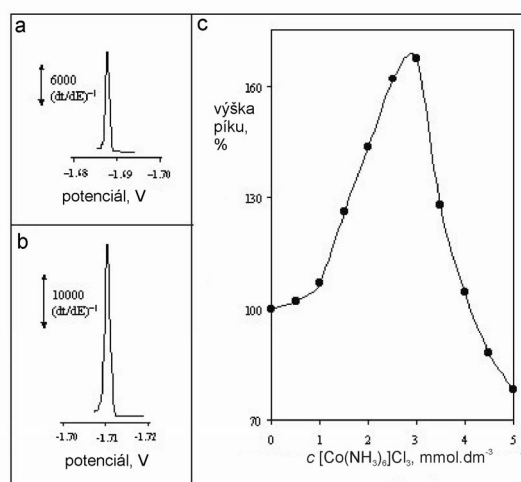
Obr. 3. Postup adsorpční rozpouštěcí přenosové techniky (AdTS) používaný k nahromadění MT na visící rtuťovou kapkovou elektrodou (w: pracovní elektroda HMDE); A) rtuťová kapka je ponořena do kapky analytu (k), která je nanášena na povrch parafilmu (p); B) po uplynutí času akumulace (t_A) je elektroda omyta v pufru (b) a C) stanovení MT metodou chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy s konstantním proudem (CPSA) v tříelektrodeovém zapojení HMDE s platinovou pomocnou (a) a referenční Ag/AgCl elektrodou (r) v pufru (g – elektrochemická nádobka)

trolytu. Typ tohoto signálu byl poprvé pozorován Heyrovským a Babičkou⁵⁹. Měření bílkovin v přítomnosti amonných iontů ukázalo, že katodické proudy odpovídající za prenatriovou vlnu souvisí s vylučováním vodíku. Celý elektrodový proces je katalyzován proteiny. Bylo navrženo, že by tento signál mohl sloužit k jejich kvantitativní analýze. Později se také ukázalo, že původně použitý chlorid sodný nebo amonný pufr, který se mimo jiné zúčastňuje protonace proteinu, může být zaměněn za jiný základní elektrolyt s podobnou aciditou. Prenatriovou vlnu lze pozorovat přibližně o 100 až 250 mV pozitivněji, než-li je potenciál vylučování základního elektrolytu. Za katalytickou reakci jsou pravděpodobně odpovědné $-SH$ a $-NH_2$ skupiny proteinu. Původní pokusy byly prováděny s proteiny krevního séra^{61–63} a později i s mnoha dalšími látkami, jako jsou alkaloidy, pyrimidiny a jiné⁶⁴.

Prenatriové vlny bylo Tomschikem a spolupracovníky využito pro stanovení vasopresinu a angiotensinu^{65–67}. K měření byla použita derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (Chrono-Potentiometric Stripping Analysis – CPSA). Metodu CPSA řadíme mezi galvanostatické metody, kde se vychází z derivace napětí podle času $(dE/dt)^{-1}$ a elektrochemický záznam obsahuje závislost této derivace na polarizačním potenciálu. Chronopotenciometrický signál ekvivalentní polarografické prenatriové vlně byl autory pracovně označen jako „pík H“ (cit.⁶⁵). Píku H bylo použito pro stanovení MT izolovaného z králíčích jater v prostředí borátového pufru (pH 8), který je pravděpodobně protonován podle rovnice⁶⁸:



Redukce je iniciována při počátečním potenciálu 0 V a ukončena při konečném potenciálu $-1,9$ V. Pík H metalothioneinu byl pozorován v oblasti negativních potenciálů kolem $-1,7$ V (cit.⁶⁹). Metodou CPSA v kombinaci s adsorpční přenosovou rozpouštěcí technikou (Adsorptive Trans-



Obr. 4. Prenatriové signály 100 ng.ml^{-1} metalothioneinu (MT1A), izolovaného z králíčích jater s obsahem 5,9 % kadmia a 0,5 % zinku (Sigma Aldrich), zaznamenané metodou derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem v kombinaci s technikou adsorpčního přenosu v prostředí a) samotného elektrolytu (borátový pufr: $0,05 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 0,2 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ H}_3\text{BO}_3$; pH 8, b) s přidavkem $3 \text{ mmol.dm}^{-3} [\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a c) závislost výšky AdTS CPSA signálu na koncentraci $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ v pufru. 100 % odpovídá výšce signálu bez přidavku kobaltitého komplexu. Experimentální podmínky: rozpouštěcí proud $-1 \mu\text{A}$, doba akumulace 120 s, potenciál při předúpravě $-0,1$ V. Měření byla prováděna na přístroji AUTOLAB Electrochemical Instrument (Ecochemie, Utrecht, Nizozemí) v zapojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Zurich, Švýcarsko) v tříelektrodeovém systému: pracovní elektroda – HMDE, referenční Ag/AgCl/3M KCl a pomocná platinová elektroda. Získaná data byla upravena jednak matematickou korekcí křivek (GPES software), jednak vyhlazením (Savitzky – Golay, level 4) a opravou na základní linii (baseline correction). Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě.

fer Stripping Technique – AdTS) je možné detegovat až femtomolární množství MT ve velmi malých ($5 \mu\text{l}$) objemech vzorku (obr. 5, cit.^{69,70}), při uplatnění postupu podle obr. 3. Bylo zjištěno, že jak výška, tak poloha píku H jsou závislé na pH základního elektrolytu, což má pravděpodobně souvislost s izoelektrickou pohyblivostí (pI) proteinu. Hodnoty pI se u různých MT liší (uvedeno v tabulce I). Katalytický proces MT je také značně ovlivněn koncentrací kyslíku v základním elektrolytu⁶⁸. Ukázalo se, že nepřítomnost kyslíku dramaticky snižuje výšku píku H a naopak přítomnost kyslíku je pro katalytický proces příznivá⁶⁸. Metoda AdTS CPSA byla použita pro studium produkce metalothioneinu u buněk kvasinky *Yarrowia lipolytica*, které byly vystaveny různým koncentracím Zn, Co, Ni a Cd (cit.⁷¹). Předběžné výsledky ukazují, že AdTS CPSA by mohla nalézt uplatnění i pro stanovení fytochelatinů⁷².

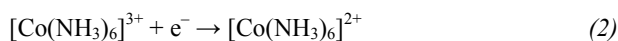
Elektrodové procesy, které odpovídají za píku H, nebyly doposud detailně objasněny ani přesto, že vylučování vodíku je jedním z nejdéle studovaných elektrochemických dějů. Proces vylučování vodíku na rtuťové elektrodě je charakteristický a je popsán Heyrovského reakcí: $H(\text{ads}) +$

$\text{H}_3\text{O}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + \text{H}_2\text{O}$, dále Tafelovou empirickou rovnicí a rovnicí podle Volmera^{73,74}. Vzhledem ke složitosti katalytického procesu, který zasahuje do vylučování vodíku, je kromě katalyzujícího proteinu velmi důležitá jeho koncentrace, složení, pH a teplota základního elektrolytu^{62,75}.

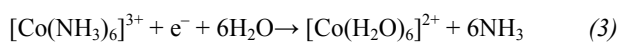
Nové poznatky dosažené v derivační chronopotenciometrii s konstantním proudem naznačují možnost jejího širšího využití, s tím, že jde o nejcitlivější elektrochemickou metodu pro stanovení proteinů^{68,69,71,72}. Nejnovější výsledky ukazují, že detekční limit metody lze snížit přidáním chloridu hexaamminkobaltilového $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, který je používán při Brdičkově reakci, do základního elektrolytu^{29,66}. Touto modifikací lze dosáhnout zvýšení prenatriového signálu až o 30 %, přičemž pravděpodobně dochází k vytvoření sloučeniny komplexu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ s molekulami MT ve prospěch katalytické reakce (obr. 4). Přítomnost komplexu posouvá potenciál katalytického píku (E_p) do pozitivnějších potenciálů přibližně o 30 mV (obr. 4a,b). Optimální koncentrace komplexu pro dosažení maximální odezvy ($3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byla stanovena titrací, což je ukázáno na obr. 4c.

3.2.2. Brdičkova reakce

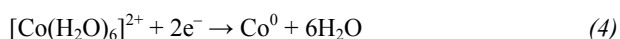
Metodu pro polarografické stanovení proteinů obsahujících –SH skupiny na rtuťové elektrodě publikoval Brdička^{60,76} a dále ji rozvíjel Paleček a spol.⁷⁷ Jde o katalytické reakce proteinů v Brdičkově roztoku, který se skládá z amoniakálního pufru ($\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$) a komplexu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (cit.^{60,62,76,78}). Brdičkův postup byl původně navržen pro analýzu sírných látek jako jsou organické thio-sloučeniny (2-sulfanylpropanová kyselina, 2-(diethylamino)-ethan-1-thiol-hydrochlorid), aminokyseliny (cystein, cystin) a proteiny (nejčastěji albuminy) (cit.^{75,79,80}). Za poznámku bezesporu také stojí možnost využití Brdičkou navrženého postupu jako diagnostické metody v klinické medicíně a farmakologii^{81–83}. Možnosti stanovení MT prostřednictvím Brdičkových proudů publikoval Olafson (shrnuje v cit.³³). Bylo zjištěno, že za katalytický signál proteinu v Brdičkově roztoku jsou odpovědný limitní proudy (I_{lim}). Autoři popisují ireverzibilní redukci amonného komplexu Co^{3+} podle reakce⁸⁴:



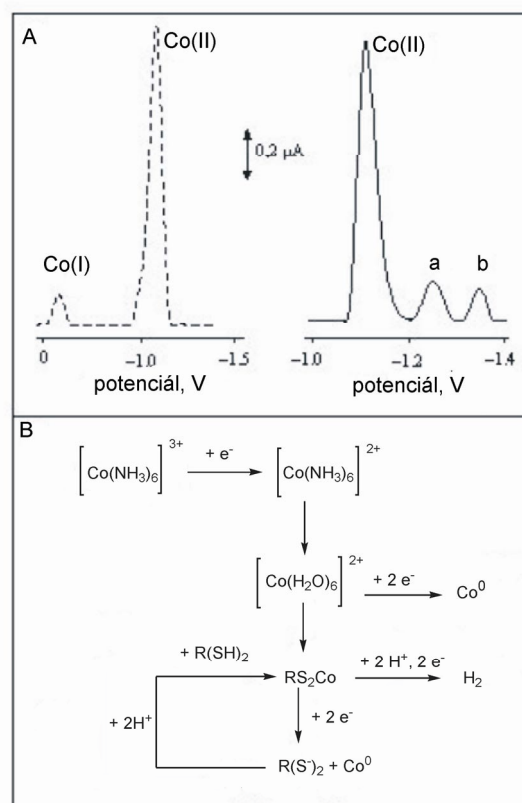
Vzniklý amonný komplex je nestabilní a podléhá reakci (viz pík Co(I) na obr. 5a):



Pravděpodobně po redukci Co^{3+} na Co^{2+} pokračuje reakční mechanismus redukcí komplexu $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ na Co^0 (viz pík Co(II) na obr. 5a):

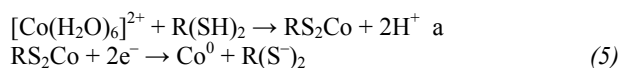


Samotné stanovení MT se obvykle realizuje při negativních potenciálech a měření se většinou provádí v potenciálovém



Obr. 5. A) Voltamogramy a B) reakční mechanismus redukce $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ metalothioneinu na rtuťové elektrodě v přítomnosti Brdičkova roztoku ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl} + 0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$). Elektrochemické signály redukce kobaltu v Brdičkově roztoku (signály vlevo); Co(I) a Co(II) vyznačuje první a druhou redukci Co-komplexů, a katalytické signály MT (signály a, b vpravo) získané v Brdičkově roztoku. Další podrobnosti viz. obr. 4. Schéma elektrodových procesů navrhla B. Rasporová⁸⁶.

rozsahu od 0 V do $-1,6 \text{ V}$. Na obrázku 5a (vlevo) je ukázán DP voltamogram Brdičkova roztoku bez přidavku proteinu. První redukce komplexu Co(I) probíhá kolem $-0,2 \text{ V}$ a druhý redukční pík Co(II) je zaznamenán kolem $-1,0 \text{ V}$. Celý redukční proces na povrchu rtuťové elektrody je katalyzován vylučováním vodíku. V případě samotné redukce komplexů kobaltu se předpokládá difuzí řízený proces⁸⁵. Reakční mechanismus je ovlivněn přítomností –SH skupin proteinu a nestabilní $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ komplex je zapojen do reakce typu:



Bílkoviny a peptidy stanovené v prostředí Brdičkova roztoku způsobují potlačení proudového maxima komplexu Co(II) (díky povrchové aktivitě stanovených bílkovin nebo peptidů) a vznik jedné nebo dvou polarografických vln (nebo voltametrických píků) proteinu v oblasti potenciálů E_p

–1,2 až –1,5 V (obr. 5a, vpravo). Bylo prokázáno, že tuto reakci způsobují sulfidové skupiny (proteinů, peptidů i jednodušších látek) ve spojení s komplexy iontů kobaltu (viz cit.⁷⁸). Jak popisuje rovnice (5), preferuje $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ komplex vazbu s –SH skupinou. Za první katalytický signál (obr. 5a, pík a) je pravděpodobně odpovědná redukce $\text{R}(\text{SH})_2$ komplexu, která probíhá kolem –1,35 V. Proudová odezva se mění v závislosti na teplotě, proto se předpokládá, že jde o difuzí řízený proces^{85,86}. Výška katalytických signálů odpovídá za koncentraci MT v analytu. Koncentrace $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ musí být dostatečná vůči analyzovanému MT, aby signál redukováného komplexu RS_2Co (obr. 5a, pík a) mohl narůstat úměrně s koncentrací proteinu. Další pík (obr. 5a, pík b) je závislý na katalytickém vylučování vodíku. Pokles tohoto píku s rostoucí teplotou indikuje povrchovou reakci⁸⁷.

Mechanismus elektrodového procesu Brdičkovy reakce není dodnes detailně znám, předpokládá se, že v katalytickém procesu hraje významnou roli komplex $\text{Co}(\text{II})$ s proteinem. Schéma redukce MT na rtuťové elektrodě v Brdičkově roztoku je ilustrováno na obrázku 5b.

Při stanovení MT Brdičkovou reakcí se nejčastěji využívá metody DPP či DPV. Brdičková reakce byla použita ke studiu fyziologických koncentrací MT u celé řady organismů, např. *Mytilus galloprovincialis*^{88,89}, *Asterias rubens*⁹⁰, *Pachygrapsus marmoratus*⁹¹, *Macoma balthica*⁹², *Mus musculus*⁹³, *Scylla serrate*⁹⁴ a další. Široké uplatnění našla Brdičková reakce pro stanovení MT u řady mořských a sladkovodních živočichů (viz Olafson a spol.^{47,95–98}). Experimentální podmínky detekce MT Brdičkovou reakcí byly modifikovány, autoři se liší především v koncentracích složek Brdičkovy roztoku. Rasporová a spol. použili k přípravě Brdičkovy roztoku 2 mol.dm⁻³ NH_4Cl + NH_4OH , s 1,2 mmol.dm⁻³ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a redukcí prováděli v rozmezí potenciálů od –0,9 V do –1,9 V (cit.⁸⁵). Olafson a další navrhuje použít pro stanovení MT roztok o složení 1 mol.dm⁻³ NH_4Cl + NH_4OH , s 0,6 mmol.dm⁻³ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (cit.^{33,99}). Stanovení proteinů Brdičkovou reakcí má široké spektrum použití, např. nedávno byla publikována práce pojednávající o stanovení čistoty separovaného supresorového proteinu p53 (cit.¹⁰⁰). Byly vypracovány metody stanovení proteinů nejen na rtuťových, ale i na tuhých elektrodách. Např. Tomschik a spol. se zabývali rozpouštěcí chronopotenciometrií vasopresinu a angiotensinu za konstantního proudu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE, cit.⁶⁵).

4. Závěr

Elektrochemické metody, jako jsou DPV nebo CPSA, umožňují stanovení velmi nízké koncentrace MT. Vzhledem k výhodám, které elektrochemické metody přinášejí, se elektroanalýza stala běžně používanou metodou pro studium fyziologických koncentrací MT. Jednou z předností je časová nenáročnost stanovení MT a snadná příprava vzorku, na rozdíl od imunologických technik nebo metod založených na radioaktivním značení. Aplikací adsorpční přenosové rozpouštěcí techniky (obr. 3) je možné provádět analýzu ve

vzorcích o objemu 5 μl , což žádná dosavadní metoda neumožňuje. Každá analytická metoda má nejen své klady, ale i nežádoucí vlastnosti. Jedním z omezení elektrochemie je fakt, že není možné ve vzorku tkáň stanovit jednotlivé isoformy a že při stanovení může docházet k interferencím se sloučeninami obsaženými ve vzorku (např. povrchově aktivní látky, složky pufrů atd.). Jednou z výhod elektroanalýzy MT je možnost stanovení vzorku opakovaně, protože nedochází k jeho degradaci, jako je tomu např. u atomové absorpční spektrometrie, což umožňuje studium kinetiky vazby iontů do vazebných domén MT. Budoucnost vývoje elektroanalytických metod pro stanovení MT v biologickém vzorku je v použití elektrochemie v multidimenzionální analýze a v technologii biosenzorů.

Tato práce byla financována z dlouhodobého záměru Agronomické fakulty MZLU 4321 00001, z grantů: GA ČR 203/02/0422, 525/04/P132 a GA AV ČR A 1163201, IGA MZLU 3/2004.

LITERATURA

- Margoshes M., Vallee B. L. A.: J. Am. Chem. Soc. 79, 4813 (1957).
- Kägi J. H. R., Kojima Y.: Experientia. Suppl. 52, 25 (1987).
- Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., Murasugi A., Wada-Nakagawa C., Hayashi Y.: Tetrahedron Lett. 25, 3869 (1984).
- Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: Science 320, 674 (1985).
- Winge D., Nielson K., Gray W., Hamer D.: J. Biol. Chem. 260, 14464 (1985).
- Kojima Y.: Methods Enzymol. 205, 8 (1991).
- Kägi J. H. R., Schäffer A.: Biochemistry 27, 8509 (1988).
- Palmiter R. D., Findley S. D., Whitmore T. E., Durnam D. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 6333 (1992).
- Palmiter R. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 8428 (1998).
- Romero-Isart N., Vašák M.: J. Inorg. Biochem. 88, 388 (2002).
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6838 (1989).
- Cobbett C. S.: Curr. Opin. Plant Biol. 3, 211 (2000).
- Nordberg M., Nordberg G. F.: Cell Mol. Biol. 46, 451 (2000).
- Templaton D. M., Cherian M. G.: Methods Enzymol. 205, 11 (1991).
- Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S.: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39, 267 (1999).
- Roesijadi G., Bogumil R., Vašák M., Kägi J. H. R.: J. Biol. Chem. 273, 17425 (1998).
- Ebadi M., Iversen P. L.: Gen. Pharmacol. 25, 1297 (1994).
- Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M. G.: Toxi-

- cology 132, 85 (1999).
19. Dalton T. D., Shertzer H. G., Puga A.: *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* 39, 67 (1999).
 20. Hidalgo J., Aschner M., Zatta P., Vašák M.: *Brain Res. Bull.* 55, 133 (2001).
 21. Szpunar J., Lobinski R.: *Pure Appl. Chem.* 71, 899 (1999).
 22. Van-Beek H., Baars A. J.: *J. Chromatogr.* 442, 345 (1988).
 23. Leopold I., Guenther D.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 359, 364 (1997).
 24. Clelant W. W.: *Biochemistry* 3, 480 (1963).
 25. Sears D. W.: *Biochemistry* 16, 2031 (1977).
 26. Burns J. A., Butler J. C., Moran J., Whitesides G. M.: *J. Org. Chem.* 56, 2648 (1991).
 27. High K. A., Azani R., Fazekas A. F., Chee Z. A., Blais J. S.: *Anal. Chem.* 64, 3197 (1992).
 28. Ang S. G., Wong V. W. T.: *J. Chromatogr.* 599, 21 (1992).
 29. Kizek R., Vacek J., Trnková L.: nepublikované výsledky (2002).
 30. Crews H. M., Dean J. R., Ebdon L., Massey R. C.: *Analyst* 114, 895 (1989).
 31. Stillman M. J., Shaw C. F., Suzuki K. T.: *Metallothioneins: synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complex*. VCH, New York 1992.
 32. Stillman M. J.: *Coord. Chem. Rev.* 144, 461 (1995).
 33. Olafson R. W., Olsson P. E.: *Methods Enzymol.* 205, 205 (1991).
 34. Erk M., Ivanković D., Raspor B., Pavičić J.: *Talanta* 57, 1211 (2002).
 35. Szpunar J., Lobinski R. S.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363, 550 (1999).
 36. Szpunar J.: *Analyst* 125, 963 (2000).
 37. Szpunar J., Lobinski R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 404 (2002).
 38. Dabrio M., Rodríguez A. R., Bordin G., Bebianno M. J., De Ley M., Šestáková I., Vašák M., Nordberg M.: *J. Inorg. Biochem.* 88, 123 (2002).
 39. Vodičková H., Pacáková V., Šestáková I., Mader P.: *Chem. Listy* 95, 477 (2001).
 40. Gooding J. J., Hibbert D. B., Yang W.: *Sensors* 1, 75 (2001).
 41. Speiser B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 39 (2002).
 42. Heyrovský M., Vavříčka S.: *J. Electroanal. Chem.* 423, 125 (1997).
 43. Heyrovský M., Mader P., Vavříčka S., Veselá V., Fedurco M.: *J. Electroanal. Chem.* 430, 103 (1997).
 44. Heyrovský M., Vavříčka S.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48, 43 (1999).
 45. Yosypchuk B., Novotný L.: *Talanta* 56, 971 (2002).
 46. Harlyk C., Bordin G., Nieto O., Rodríguez A. R.: *Electroanalysis* 9, 608 (1996).
 47. Olafson R. W.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19, 111 (1988).
 48. Díaz-Cruz M. S., Mendieta J., Tauler R., Esteban M.: *Anal. Chem.* 71, 4629 (1999).
 49. Muñoz A., Rodríguez A. R.: *Analyst* 120, 529 (1995).
 50. Nieto O., Hellemans G., Bordin G., De Ley M., Rodríguez A. R.: *Talanta* 46, 315 (1998).
 51. Honeychurch M. J.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 44, 13 (1997).
 52. Scarano G., Morelli E.: *Electroanalysis* 8, 396 (1996).
 53. Scarano G., Morelli E.: *Anal. Chim. Acta* 319, 13 (1996).
 54. Fedurco M., Šestáková I.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40, 223 (1996).
 55. Nieto O., Rodríguez A. R.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40, 215 (1996).
 56. Šestáková I., Vodičková H., Mader P.: *Electroanalysis* 10, 764 (1998).
 57. Šestáková I., Mader P., Vodičková H., Pacáková V.: *Voltammetric methods in isolation and identification of plant metallothioneins from alga Chlorea*. Birkhäuser Verlag, Basel 1999.
 58. Šestáková I., Mader P.: *Cell. Mol. Biol.* 46, 257 (2000).
 59. Heyrovský J., Babička J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1930, 370 (1930).
 60. Brdička R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5, 148 (1933).
 61. Babička J., Heyrovský J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2, 270 (1930).
 62. Brdička R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 8, 366 (1936).
 63. Herles F., Vančura A.: *Rozpr. II tř. Čes akad.* 42, 4 (1932).
 64. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie*. ČSAV, Praha 1962.
 65. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Electroanalysis* 10, 403 (1998).
 66. Tomschik M., Havran L., Paleček E., Heyrovský M.: *Electroanalysis* 12, 274 (2000).
 67. Heyrovský M.: *Electroanalysis* 12, 935 (2000).
 68. Trnková L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
 69. Kizek R., Trnková L., Paleček E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
 70. Paleček E., Postbieglová I.: *J. Electroanal. Chem.* 214, 359 (1986).
 71. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Němec M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
 72. Vacek J., Petřek J., Havel L., Koutná D., Adam V., Trnková L., Kizek R.: *VI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, 2002*. Sborník. Masarykova univerzita, Brno 2002.
 73. Dvořák J., Koryta J., Boháčková V.: *Elektrochemie*. Academia, Praha 1975.
 74. Murray R. W., Reilley C. N.: *Electroanalytical principles*. Wiley, London 1963.
 75. Kolthoff I. M., Yamashita K., Hie T. B., Kanbe A.: *J. Electroanal. Chem.* 58, 375 (1975).
 76. Brdička R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5, 112 (1933).
 77. Paleček E., Pechan Z.: *Anal. Biochem.* 42, 59 (1971).

78. Brdička R., Březina M., Kalous V.: *Talanta* 12, 1149 (1965).
79. Kadleček J., Anzenbacher P., Kalous V.: *J. Electroanal. Chem.* 86, 421 (1977).
80. Kolthoff I. M., Yamashita K., Hie T. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2044 (1975).
81. Březina M., Zuman P.: *Polarografie v lékařství, biochemii a farmácii*. SZN, Praha 1952.
82. Velazquez A., Hernandezperez O., Gomez P., Gallegos G., Rosado A.: *Archivos de investigacion medica* 19, 133 (1988).
83. Yang J., Cao Y., Yang M. S.: *Chem.-Biol. Interact.* 114, 109 (1998).
84. Willis J. B., Friend J. A., Mellor D. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 67, 1680 (1945).
85. Raspor B., Paič M., Erk M.: *Talanta* 55, 109 (2001).
86. Raspor B.: *J. Electroanal. Chem.* 503, 159 (2001).
87. Mairanovskii S. G.: *Catalytic and kinetic waves in polarography*. Plenum Press, New York 1968.
88. Raspor B., Pavičić J.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354, 529 (1996).
89. Bebianno M. J., Machado L. M.: *Marine Pollut. Bull.* 34, 666 (1997).
90. Temara A., Warnau M., Dudois P., Langston W. J.: *Aquat. Toxicol.* 38, 17 (1997).
91. Mouneyrac C., Amiard-Triquet C., Amiard J. C., Rainbow P. S.: *Comp. Biochem. Physiol., C* 129, 193 (2001).
92. Bordin G., McCourt J., Raposo F. C., Rodriguez A. R.: *Marine Biol.* 129, 453 (1997).
93. Leber A. P., Miya T. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 37, 403 (1976).
94. Thompson J. A. J., Cosson R. P.: *Marine Environ. Res.* 11, 137 (1984).
95. Olafson R. W., Sim R. G.: *Anal. Biochem.* 100, 343 (1979).
96. Olafson R. W., Sim R. G., Boto K. G.: *Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol.* 62, 406 (1979).
97. Olafson R. W., Loya S., Sim R. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1495 (1980).
98. Olafson R. W.: *J. Biol. Chem.* 256, 1263 (1981).
99. Kehr P. F.: *PhD Thesis*. Purdue University, West Lafayette 1973.
100. Brázdová M., Kizek R., Havran L., Paleček E.: *Bioelectrochemistry* 55, 115 (2002).
101. Richards R. I., Heguy A., Karin M.: *Cell* 37, 263 (1984).
102. Kissling M. M., Kägi J. H. R.: *FEBS Lett.* 82, 247 (1977).
103. Karin M., Richards R. I.: *Nature* 299, 797 (1982).
104. Quairfe C. J., Findley S. D., Erickson J. C., Froelick G. J., Kelly E. J., Zambrowicz B. P., Palmiter R. D.: *Biochemistry* 33, 7250 (1994).
105. Mehra R. K., Garey J. R., Butt T. R., Gray W. R., Winge D. R.: *J. Biol. Chem.* 264, 19747 (1989).
106. Mehra R. K., Garey J. R., Winge D. R.: *J. Biol. Chem.* 265, 6369 (1990).
107. Brouwer M., Enghild J., Hoexum-Brouwer T., Thøgersen I., Truncali A.: *Biochem. J.* 311, 617 (1995).
108. Grill E., Gekeler W., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: *FEBS Lett.* 205, 47 (1986).
109. Klapheck S., Chrost B., Starke J., Zimmermann H.: *Bot. Acta* 105, 174 (1992).
110. Meuwly P., Thibault P., Schwan A. L., Rauser W. E.: *Plant J.* 7, 391 (1995).
111. Bernhard W. R., Kägi J. H. R.: *Experientia. Suppl.* 52, 309 (1952).

R. Kizek^a, J. Vacek^b, L. Trnková^c, B. Klejdus^a, and L. Havel^b (^a Department of Chemistry and Biochemistry, ^b Department of Botany and Plant Physiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, ^c Department of Physical Chemistry, Masaryk University, Brno): **Application of Catalytic Reactions on a Mercury Electrode for Electrochemical Detection of Metallothioneins**

Metallothioneins (MTs) belong to a group of peptides and proteins which play an important role in the metabolism of metals in animals, plants and microorganisms. The metabolic function of MTs consists not only in detoxication of an organism but also in the homeostasis of essential metals. This paper reports a novel approach to electroanalysis of MTs. The electrochemical determination of MTs is based on catalytic processes which proceed at very negative potentials on mercury electrodes (from -1.7 V to -1.9 V vs. Ag/AgCl/KCl). These processes accompanied by evolution of hydrogen from supporting electrolyte components, include the presodium wave and/or the Brdička reaction. It was found that SH groups present in MTs are responsible for catalytic processes. The catalytic signal of a MT at nanomolar concentrations can be detected on mercury electrodes using potentiostatic electrochemical methods. The highest sensitivity in the determination of MTs was observed with a galvanostatic method such as differential chronopotentiometric stripping analysis (CPSA), which produces the peak H. The coupling of CPSA with the adsorptive transfer stripping technique (AdTS) allows the determination of MTs at femtomol level in a low amount of sample ($5 \mu\text{L}$). Our recent results obtained by the AdTS-CPSA show that detection limits for particular MTs can be improved by adding $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ to the analyzed sample. This is probably due to the formation of a complex between $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ and MT. We assume that the peak H can be used in physiological studies of metal metabolism.