

# AUTOMATIZOVANÁ ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE PROTEINŮ

I. FABRIK, V. ADAM, R. KIZEK

Laboratoř molekulární biochemie a bioelektrochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, kizek@sci.muni.cz

*Specifická analýza proteinů je v dnešní době prováděna především pomocí elektromigračních a imunochemických metod. V omezené míře lze využít i kapalinové chromatografie s UV či elektrochemickou detekcí nebo hmotnostní spektrometrie. Pro možné uvedení do klinické praxe je nicméně nutné, aby metoda byla spolehlivá, citlivá, reprodukovatelná, levná a v neposlední řadě nekladla vysoké nároky na obsluhu. Bohužel splnění těchto podmínek je obtížné a je potřebné hledat nové cesty výzkumu; vše nové je vítáno. Jednou z možných variant je dnes neprávem poněkud opomíjená elektrochemická detekce.*

## Elektrochemie a analýza proteinů

Z počátku byla polarografie spojena spíše s detekcí iontů kovů. V první polovině minulého století ale profesor Brdička učinil objev, který vše změnil.[1] Při analýze kobaltitých komplexů se mu náhodou do vzorku dostalo krevní sérum, což mělo za následek změnu průběhu voltamogramu. Místo jednoho signálu redukce kobaltu pozoroval Brdička tři signály, z nichž minimálně jeden byl katalytické povahy.[2, 3] Reakce byla pojmenována po svém objeviteli a pozdější výzkum osvětlil některé části mechanismu reakce.[4] Tyto poznatky sice nejsou celistvé a je potřebné dále pokračovat ve studiu reakčních pochodů, nicméně z výhod této metody lze těžit již dnes. Při podrobnější analýze biologických vzorků bylo zjištěno, že daleko nejlepší odezvou se vyznačují molekuly s vysokým obsahem cysteinu jako je metalothionein.

## Metalothionein

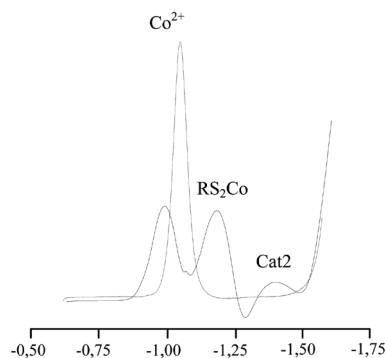
Metalothionein je termostabilní protein, který se svojí hmotností (6-10 kDa) řadí k těm menším.[5] Již bylo naznačeno, že je elektrochemicky aktivní; to je umožněno vysokým obsahem cysteinu (až 30 % hmotnosti). Jeho funkci v organismu je především transport a homeostáza iontů kovů. Ve fyziologickém stavu váže nejčastěji Zn a Cu (celkově je schopen navázat 7 dvojmocných a 12 jednomocných iontů), při otravě poté i Cd, Pb či Hg. Jeho antioxidační vlastnosti nejsou tak významné, nicméně velmi ochotně reaguje s hydroxylovými radikály. V poslední době je spojován i nádorovým onemocněním; některé práce jej označují za potenciální nádorový či dokonce prognostický marker.[6] V několika našich studiích jsme toto potvrdili, pro analýzu jsme však zvolili elektrochemických metod založených na Brdičkově reakci.[7,8,9]

## Materiál a metody

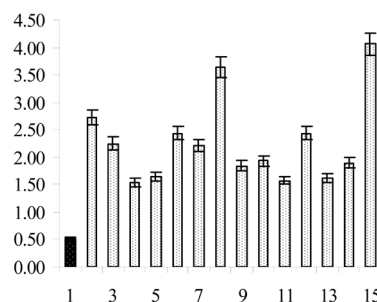
Pro detekci metalothioneinu využíváme automatického elektrochemického analyzátoru 695 Autosampler v zapojení s 747 VA Stand a 746 VA Trace Analyzer (Metrohm, Švýcarsko), který je schopen nástřiku malého objemu vzorku (řádově jednotky  $\mu\text{l}$ ) do měřicí nádoby s elektrolytem. Po dokončení měření je nádobka omyta Mili Q vodou a data jsou odeslána do jednotky 746 VA Trace Analyzer, kde mohou být automaticky vyhodnocena či dále přeposlána do PC. Celý proces je probíhá samostatně bez potřeby obsluhy. Pro udržení konstantní teploty vzorku jsme sestrojili chlazený karusel pro 80 mikrozkušavek, který je propojen s chlazením elektrolytu a měřicí nádoby. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4  $\text{mm}^2$ ; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinovou elektrodou. Základní elektrolyt (1 mmol/l  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  a 1 mol/l  $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ , pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn. DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2 mV, modulační amplituda -250 mV,  $E_{\text{ads}} = 0$  V. Za pomoci výše popsané instrumentace byly analyzovány vzorky krve pacientů s nádorovým onemocněním

z oblasti hlavy a krku (n = 14), konkrétně lokalizace hrtanové části hltanu (*hypofarynx*). Krve byly naředěny fosfátovým pufrům (pH 6,98), následně zahřáty na teplotu 99 °C (15 minut; Thermomixer comfort, Eppendorf, Německo) a centrifugovány (25 000g, 30 minut, 4 °C, Centrifuge 5417R, Eppendorf, Německo). Měření byla provedena ze supernatantu a vyhodnocován byl pík Cat2 závislý na koncentraci metalothioneinu (Obr. 1).

**Obr. 1 – Voltamogramy Brdičkovy reakce metalothioneinu o koncentraci 6,25  $\mu\text{M}$ . Množství proteinu je odečítáno z výšky Cat2 signálu**



**Obr. 2 – Výsledné koncentrace MT ( $\mu\text{M}$ ) v krvích pacientů se zhoubným nádorem hypofaryngu. Černý sloupec odpovídá koncentraci MT u kontrolní skupiny**



## Výsledky a závěr

Výsledky ukazují, že hladina metalothioneinu je u pacientů s nádorovým onemocněním hypofaryngu (spinoocelulární karcinom) více než čtyřikrát vyšší ( $2,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ) než u kontrolní skupiny dobrovolníků ( $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) jak je velmi dobře zřejmé z Obr. 2. Zvýšená hladina poukazuje na možnou prediktivní hodnotu metalothioneinu ve vztahu k tumorovému onemocnění. Práce zpřístupňuje elektrochemickou detekci širšímu použití v biologii a medicíně, kde by se mohly uplatnit přednosti těchto metod, zejména pak citlivost, rychlost a relativní ekonomická nenáročnost. Plně automatizovaná jednotka poté neklade ani přílišné nároky na obsluhu a při zachování měřicích podmínek je možné elektrochemický detektor využít pro masovou analýzu vzorků.

*Dokončení na další straně*

**Literatura**

- [1] Brdicka, R.: Coll. Czech. Chem. Commun., 5, 148–164 (1933).
- [2] Petrlova, J., et al.: Electrochim. Acta, 51, 5112–5119 (2006).
- [3] Kizek, R., et al.: Chem. Listy, 98, 166–173 (2004).
- [4] Raspor, B.: Journal of Electroanalytical Chemistry, 503, 159–162 (2001).
- [5] Kagi, J. H. R., Schaffer, A.: Biochemistry, 27, 8509–8515 (1988).
- [6] Adam, V., et al.: Tumor Biol., 28, 43–43 (2007).
- [7] Petrlova, J., et al.: Klinicka Onkologie, 19, 138–142 (2006).
- [8] Adam, V., et al.: Chem. Listy, 102, 51–58 (2008).
- [9] Fabrik, I., et al.: Klinicka Onkologie, 20, 384–389 (2007).

*Poděkování: Práce na projektu byla podpořena projektem GA AVIAA401990701.*

**Abstract:****AUTOMATED ELECTROCHEMICAL DETECTION OF PROTEINS**

**Summary:** *Specific analysis of proteins is carried out by using of electrophoretic and/or immunochemical methods. Liquid chromatography coupled with UV, electrochemical or mass detector can be also used for this purpose, but there are some limitations. However, to use a technique in clinical practise it must be sensitive, accurate, low cost and with low demands on operation. Unfortunately it is difficult to fulfil all of the mentioned requirements. Therefore new approaches and techniques are proposed and developed. One of the new and promising techniques is rather unheeded electrochemical detection.*

**Key words:** proteins, electrochemical detection, metallothionein, tumour diseases