

ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ METALOTHIONEINŮ

HANA VODIČKOVÁ^a, VĚRA PACÁKOVÁ^b,
IVANA ŠESTÁKOVÁ^c a PAVEL MADER^a

^aKatedra chemie, Agronomická fakulta, Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6, ^bKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^cÚstav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademi věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, e-mail: vodickova@af.czn.cz

Došlo dne 16.XI.2000

Klíčová slova: metalothioneiny, analytické metody

Obsah

1. Úvod
2. Izolační postupy
3. Metody stanovení nezahrnující separaci
 - 3.1. Saturační metody
 - 3.2. Imunochemické metody
 - 3.3. Elektrochemické metody
4. Chromatografické metody s UV VIS, fluorimetrickou a elektrochemickou detekcí
 - 4.1. Vylučovací chromatografie
 - 4.2. Iontové výměnná chromatografie
 - 4.3. Afinitní chromatografie
 - 4.4. Reverzní HPLC
5. Elektroforetické metody
6. Přímé spojení HPLC a CE s dalšími detekčními technikami
 - 6.1. AAS detekce
 - 6.2. ICP AES a ICP MS detekce
 - 6.3. HPLC-ESI MS (/MS) detekce
7. Závěr

1. Úvod

Metalothioneiny (MT) byly charakterizovány jako nízko-molekulární proteiny a polypeptidy s vysokým obsahem cysteinu a schopností tvorby komplexů s ionty těžkých kovů. Název metalothionein byl poprvé použit v roce 1957 pro protein izolovaný z koňských ledvin. Na základě chemické struktury byly MT rozděleny do 3 tříd:

MT I. třídy – živočišné metalothioneiny,

61 aminokyselin, bez přítomnosti aromatických kyselin, 20 cysteinových zbytků koordinuje 7 dvojnásobných nebo 12 jednovazných iontů kovů do dvou klastrů, M_r 6000–7000 (apometalothioneiny).

MT II. třídy – polypeptidy se vzdálenou podobností živočišným metalothioneinům,

odlišné rozmístění Cys zbytků ve srovnání s MT I. třídy.

MT III. třídy – rostlinné metalothioneiny,

4–25 aminokyselin, M_r apometalothioneinů 400–2500.

Metalothioneiny (MT I) izolované z živočišných buněk různých organismů vykazují jistou podobnost a výskyt genetických odchylek je označován jako izoformy metalothioneinů I. třídy. Metalothioneiny podobné živočišným (MT II) byly nalezeny u kvasinek, sinic a hub. MT I a MT II jsou geneticky kódované strukturní proteiny a polypeptidy, které byly v mnoha případech sekvenovány a následně k nim izolovány příslušné geny¹. MT III jsou thiolové polypeptidy, vyskytující se v rostlinných organismech jako sekundární metabolity bez přímé genetické determinace. Tyto polypeptidy byly též nazývány kadystiny, fytochelatiny nebo γ -EC peptidy. Polypeptidy příbuzné homogluthathionu byly nazvány homofytochelatin². Rostlinné metalothioneiny se strukturou $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, kde $n = 2\text{--}11$, jsou nazývány fytochelatiny (PC). Pokud je koncová aminokyselina glycin nahrazena alaninem, serinem nebo glutamovou kyselinou, jsou tyto fytochelatiny označovány jako iso-PC. V případě, že koncová aminokyselina chybí, je používán název desglycyl-PC (cit.²).

Základy nomenklatury a klasifikace metalothioneinů byly dány na I. a II. konferenci o metalothioneinech v r. 1978 a 1985. V současné době je známo více než 170 aminokyselinových sekvencí metalothioneinů izolovaných z živočišných, rostlinných a mikrobiálních organismů a byla provedena řada fylogenetických analýz. Na základě nových informací byla navržena na IV. konferenci o metalothioneinech v Kansas City (1997) změna názvosloví a klasifikace proteinů nebo polypeptidů s vazbou kovů s ohledem na fylogenetické a důvodné změny v proteinech nebo ve struktuře genů. Základní definice metalothioneinů byla zachována v původním znění, ale na základě sekvencí specifických charakteristik byly vytvořeny nové třídy, podle systematických skupin živých organismů. Podle stanovených kritérií s ohledem na výsledky sekvencí metalothioneinů statisticky validovanými fylogenetickými metodami byly vytvořeny tzv. podtřídy a podskupiny metalothioneinů³.

Savčí metalothioneiny jsou tvořeny peptidovým řetězcem obsahujícím 61 aminokyselin, kde se molekuly cysteinu nacházejí v jednotkách typu Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys a Cys-X-Cys-Cys (X je variabilní aminokyselinový zbytek bazických aminokyselin a serinu). V peptidovém řetězci živočišného metalothioneinu náleží cysteinu 20 poloh v různých typech jednotek; u metalothioneinů izolovaných z některých kvasinek a plísní obsahujících 25 aminokyselin byl rovněž potvrzen vysoký obsah cysteinu. Spolu s vysokým obsahem cysteinu je pro metalothioneiny charakteristická vazba iontů kovů pomocí thiolátů a tvorba cysteinyl-thiolátových klastrů s charakteristickým prostorovým uspořádáním. Pro řadu savčích metalothioneinů obsahujících Zn(II) a Cd(II) byla prokázána tetraedrická koordinace kovů čtyřmi atomy síry. Prostorový model tohoto proteinu byl navržen na základě spektroskopických studií a studií izotopicky značeného MT. Sedm vazebných míst pro kov je umístěno ve dvou oddělených klastrech A, B, přičemž klaster A obsahuje čtyři vazebná místa, v klasteru B jsou obsažena tři vazebná místa⁴.

Na rozdíl od živočišných metalothioneinů jsou peptidy tvořené rostlinnými organismy v přítomnosti kovů homology glutathionu. Jejich strukturu lze obecně vyjádřit vzorcem $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{R}$, kde R je koncová aminokyselina a může jí být glycin, serin, alanin či glutamová kyselina. Jednotka $(\gamma\text{-Glu-Cys})$ se v peptidovém řetězci opakuje 2–11 krát. V rostlinných organismech byl zaznamenán častější výskyt komplexů $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2$ a $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3$. Byly rovněž izolovány peptidy, u kterých v řetězci nebyla potvrzena koncová aminokyselina (desglycyl-peptidy). Podobně jako u živočišných metalothioneinů se předpokládá i u komplexů Cd(II) a Zn(II) s peptidy $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ R tetraedrická koordinace kovů čtyřmi atomy síry. Tento předpoklad byl potvrzen pomocí EXAFS spektroskopie zatím pouze pro komplexy Cd(II) s polypeptidy $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ (cit.⁵).

U rostlinných metalothioneinů jsou nejčastěji vázanými kovy Cd a Cu, oproti živočišným metalothioneinům, u nichž byla potvrzena nejčastěji přítomnost Cd a Zn. Měď je nejčastěji koordinována sítou jako Cu(I), a to jak u živočišných, tak rostlinných metalothioneinů. Koordinační čísla a prostorové uspořádání peptidového řetězce koordinujícího měď jsou v současné době předmětem studia. Nejnovější výsledky rentgenografických studií potvrzují u živočišných metalothioneinů Cu-MT trigonální koordinaci Cu(I), u Cu-desglycylpeptidů izolovaných z kvasinek byla nalezena vedle digonální koordinace rovněž trigonální koordinace⁶.

Polypeptidy izolované ze zelené řasy *Chlorella* byly rovněž podrobeny aminokyselinové analýze. Z primární struktury těchto polypeptidů je zřejmá příbuznost ke glutathionu⁷, podobně polypeptid izolovaný z krásnoočka zeleného, *Euglena gracilis*, byl rovněž charakterizován jako homolog glutathionu s nižší molekulovou hmotností a negativnějším nábojem, než je možné identifikovat u živočišných MT, a vysokým obsahem sulfidových iontů⁸.

Při analýze živočišných a rostlinných metalothioneinů se používají podobné postupy jako pro izolaci a identifikaci proteinů. Základní postup stanovení je různě modifikován, v zásadě však zahrnuje použití vylučovací a iontové výměnné chromatografie a chromatografii na reverzní fázi. Obtížnost a délka izolačního postupu závisí především na zdroji živočišného či rostlinného metalothioneinu a obsahu kovů, který je v molekule vázán. Na rozdíl od klasické analýzy speciací, kdy sledované analyty jsou přesně definovány, při identifikaci komplexů s kovy v biologických tkáních je situace zcela odlišná. Je třeba zvolit analytickou metodu, která je dostatečně účinná, aby bylo dosaženo separace jednotlivých izoform a subizoform metalothioneinů, zvolit selektivní detekční metody pro dané kovy a dosáhnout takové citlivosti stanovení, která umožní stanovit stopová množství metalothioneinů⁹.

2. Izolační postupy

Standardní izolační postup živočišných metalothioneinů z tkání zahrnuje přípravu surového extraktu a separaci gelovou a iontově výměnnou chromatografií¹⁰. Nejprve se připraví tkáňový homogenát živočišného materiálu nejčastěji v Tris HCl pufru, pH 7,4. Do pufru se přidává 0,25 M roztok sacharosy¹¹ nebo 0,25 M roztok glukosy¹². Dále je doporučována přítomnost antioxidantu: 2 mM roztoku dithiotreitolu (DTT) nebo 5 mM roztoku merkptoethanolu (ME)¹³. K přípravě ex-

traktu je zpravidla používána centrifugace homogenátu tkáně při zatížení 100 000–170 000 × g. V jiných postupech je navíc zařazen krok tepelné nebo chemické denaturace a takto ošetřený homogenát je znovu centrifugován při zatížení 10 000–40 000 × g (cit.¹⁴).

Podle typu rostlinného materiálu se volí pro izolaci rostlinných metalothioneinů různé postupy¹⁵. Prvním krokem izolačního postupu je po předchozí homogenizaci rostlinného materiálu¹⁶ extrakce Tris nebo fosfátovým pufrům o pH 7,2–8,2 (cit.¹⁷). Při přípravě extraktu z řas po předchozí sonikaci buněk¹⁸ je obvykle používán též Tris obsahující kromě merkptoethanolu NaCl nebo KCl. Výsledný extrakt je připraven centrifugací homogenátu při různých přetížích zvolených podle typu materiálu. Přetížení 105 000 × g po dobu 60 min bylo použito při centrifugaci homogenátu z rostlinných buněčných kultur¹⁷, homogenát z kořenových suspenzí byl centrifugován při 20 000 × g po dobu 20 minut¹⁶.

3. Metody stanovení nezahrnující separaci

3.1. Saturační metody

Saturační metody jsou založeny na vysycení vazebných míst v metalothioneinech kovy s vysokou afinitou k síře. Pro takovéto stanovení je používána Hg nebo Ag, byly vypracovány rovněž metody využívající vazby kadmia ke stanovení MT v tkáňových homogenátech. Specifita stanovení je zajišťována přidávkou hemoglobinu a následným oddělením tepelně stabilního CdMT (Cd-HEM metoda¹⁹). Srovnatelné parametry s CD-HEM metodou má metoda Cd-CHELEX (cit.²⁰).

3.2. Imunochemické metody

RIA a ELISA metody jsou rychlé, přesné a citlivé (detekční limit menší než 1 pg). Nevýhodou těchto metod je však obtížná příprava protilátek, neschopnost kvantifikovat jednotlivé izoformy ve směsi a nemožnost získat informace o přítomnosti kovů. Tyto metody byly využity při stanovení nízkých koncentrací MT v krvi, plazmě a moči. Shodně vysokou citlivost imunologických metod pro identifikaci živočišných MT potvrzuje práce²¹ a rostlinných MT (cit.¹⁶).

3.3. Elektrochemické metody

Ke stanovení celkového obsahu metalothioneinů v různých typech tkáňových homogenátů je používána modifikovaná Brdičkova reakce²², jejíž výsledky dobře korelují jak s metodami saturačními²⁰, tak imunochemickými²¹. Tato metoda byla použita k identifikaci SH skupin přítomných v cyanobakteriálních MT (cit.²³) nebo v polypeptidech izolovaných z kořenové části vyšších rostlin²². Zvýšení citlivosti dostatečné i pro stanovení metalothioneinů v tělních tekutinách skýtá využití potenciometrické rozpouštěcí analýzy²⁴.

Další možnosti elektrochemických metod spočívají v rozlišení chování nekomplexovaných iontů kovů a iontů kovů vázaných v různých typech komplexů. Velká pozornost byla v této oblasti věnována zejména živočišným metalothioneinům obsahujícím Zn a Cd (cit.²⁵) i synteticky připraveným MT fragmentům²⁶. Z oblasti rostlinných metalothioneinů byly polarografickými a voltametrickými metodami studovány fyto-

chelatinu – a to izolované z *Agrostis capillaris* a *Phaelodactylum tricornutum*²⁷ nebo synteticky připravené peptidy (γ -Glu-Cys)₂-Gly a (γ -Glu-Cys)₃-Gly (cit.²⁸). Při použití rtuťové elektrody bylo pro Cd a Zn komplexy fytochelatinů pozorováno obdobné chování jako u metalothioneinů živočišných; v obou případech jsou voltamogramy či polarogramy komplikovány tvorbou sloučenin se rtuť. Při použití rtuťové elektrody s filmem trifenyfosfinoxidu je tvorba těchto sloučenin potlačena a s použitím adsorptivního nahromadění bylo možné stanovit CdMT až v koncentracích 10^{-10} mol.l⁻¹ (cit.²⁹). Dále byly provedeny studie s různými typy uhlíkových elektrod. Při použití uhlíkové kompozitní elektrody³⁰ bylo možné selektivní stanovení apometalothioneinu, uhlíková kompozitní pastová elektroda byla použita pro studium tvorby Cd-komplexů v případě živočišného metalothioneinu³¹ a peptidu (γ -Glu-Cys)₂-Gly (cit.³²). Aplikace potenciometrické rozpouštěcí analýzy umožňuje pracovat s uhlíkovou kompozitní pastovou elektrodou ve stejné oblasti koncentrací jako při použití rtuťové elektrody³¹.

Ke stanovení celkového obsahu metalothioneinů byla dále navržena metoda stanovení Cu(I) komplexu, který vzniká po přidání měďnatých iontů do roztoku obsahujícího metalothionein v elektrochemické nádobce. S využitím adsorptivního nahromadění Cu(I)-komplexu na povrchu rtuťové kapky bylo pro živočišné metalothioneiny dosaženo citlivosti stanovení 10^{-10} mol.l⁻¹ (cit.³³), pro fytochelatinu ($n = 2-4$) citlivosti 10^{-9} mol.l⁻¹ (cit.³⁴).

4. Chromatografické metody

4.1. Vylučovací chromatografie

Vylučovací chromatografie (SEC) je nejčastěji používána k separaci komplexů s kovy podle velikosti molekul a k určení jejich zdánlivé molekulové hmotnosti. Ve vylučovací chromatografii se běžně používají silikagelové náplně, byl však u nich zaznamenán tzv. silanolový efekt způsobující ztrátu kovů v přítomnosti mobilních fází s nízkou iontovou silou. Proto byly testovány i další náplně na bázi organických polymerů, např. kopolymer styrenu a divinylbenzenu, který nevykazoval během separace extraktů výrazné interakce s kadmii. Rozlišení SEC je však obvykle nedostatečné pro dělení malých peptidů odlišných pouze ve složení aminokyselin. Nejčastěji se tato technika používá ke stanovení molekulových hmotností pro separaci extraktů do frakcí obsahujících metalothioneiny³⁵. Extrakty z rostlinných³⁶ i živočišných¹⁰ tkání byly separovány vylučovací chromatografií na Sephadexu G-75 nebo na Sephadexu G-50. V jímáných frakcích byl stanoven obsah těžkých kovů metodou AAS nebo byly frakce analyzovány na obsah aminokyselin¹⁴. U zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* po expozici kadmii byl nízkomolekulární peptidový komplex s vysokým obsahem Cd rovněž izolován vylučovací chromatografií na Sephadexu G-50. Byla studována závislost zdánlivé molekulové hmotnosti na iontové síle mobilní fáze³⁷. Vybrané aplikace SEC jsou uvedeny v tabulce I.

4.2. Iontově výměnná chromatografie

Negativně i pozitivně nabitě komplexu lze separovat iontově výměnnou chromatografií. Nejčastěji se používají slabé

měníče aniontů s dimethylaminoethylovými funkčními skupinami v kombinaci s vodnými pufrů a koncentračním gradientem. Hunzinker a Kägi⁴² pomocí iontově výměnné chromatografie ve frakcích získaných vylučovací chromatografií potvrdili heterogenitu humánního MT v jaterním cytosolu. Podobně byly separovány iontově výměnnou chromatografií negativně nabitě izoformy metalothioneinu, izolované z různých tkáňových extraktů. Stejně úspěšně byly separovány rostlinné metalothioneiny iontově výměnnou chromatografií na koloně DEAE Sephadex A-25 s mobilní fází Tris HCl o pH 7,2–8. Při separaci proteinových komplexů z rostlinných materiálů, které obsahují nadbytek hnědého pravděpodobně fenoloxidasového produktu, se ukázal být účinnější silný měnič aniontů QAE-Sephadex A-25 než DEAE Sephadex A-25. Příklady aplikací separace metalothioneinů jsou rovněž uvedeny v tabulce I.

4.3. Afinity chromatografie

K identifikaci převážně živočišných metalothioneinů byla též využita afinity chromatografie, založená na silné interakci se specifickými ligandy. Cherian⁴⁴ izoloval živočišné MT na Sepharose-DTNB [5,5-dithio-bis-2(nitrobenzoová kyselina)]. Afinity chromatografií lze vhodně využít k separaci apoproteinů, které jsou stabilní při nízkých pH a vykazují specifickou interakci s navázaným ligandem. Jak uvádí Rauser³⁶, čistý proteinový komplex byl získán afinity chromatografií na thiopropyl Sepharose-6B po předchozí separaci vylučovací chromatografií.

4.4. Reverzní HPLC

Pro separaci a ověření čistoty jednotlivých izoform živých metalothioneinů je zpravidla používána HPLC na reverzních fázích s chemicky vázaným oktylem nebo oktadecylem (RPC) v kombinaci s polární mobilní fází. Reverzní fáze se vyznačují vysokou účinností a neobsahují ligandy, které by mohly ireverzibilně vázat kovy. Běžně se používají mobilní fáze obsahující 10–50 mM roztoky pufrů s organickými modifikátory.

Apoizoformy jsou nejčastěji separovány gradientovou elucí v 0,1% TFA (cit.¹⁴). Rovněž jednotlivé formy rostlinných apometalothioneinů lze separovat v kyselém prostředí výše uvedenou metodou⁴⁵. Rozlišení jednotlivých izoform závisí na pH.

V RPC se nejčastěji používá UV detekce, je však málo selektivní a vzhledem k nízkým koncentracím metalothioneinů v biologických vzorcích je málo citlivá. Živočišné, jim podobné metalothioneiny a rostlinné metalothioneiny neobsahují aromatické kyseliny, a nevykazují tudíž absorpenci při 280 nm. Proto se často k identifikaci SH skupin využívá předkolonová nebo postkolonová derivatizace Elmannovým činidlem [DTNB – (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou)] a výsledný produkt je detegován při 410 nm (cit.⁴⁶). Obdobný postup, pouze s odlišným složením mobilní fáze, byl použit k identifikaci sedmi izoform metalothioneinu izolovaného ze sinice *Synechococcus* TX-20 (cit.²³). Rovněž rostlinné metalothioneiny byly separovány na kolonách s reverzní fází C-18 s gradientovou elucí v acetonitrilu a trifluoroctové kyselině⁴⁵ nebo kyselině fosforečné³⁷.

Fluorimetrická a elektrochemická detekce jsou ve srovnání s UV spektrofotometrickou detekcí mnohem selektivnější

Tabulka I
Vybrané metody pro separaci metalothioneinů

Materiál	Extrakce	Mobilní fáze	Metoda	Detekce	Lit.
Řasa <i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i>	10 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 7,4, 10 mmol.l ⁻¹ KCl, 1,5 mmol.l ⁻¹ MgCl ₂ , 50 mmol.l ⁻¹ ME	50 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 7,8	SEC, Sephadex G-50	UV detekce	38
Řasa <i>Scenedesmus</i> <i>subspicatus</i>	10 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 7,8, 100 mmol.l ⁻¹ NaCl	10 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 7,8, 100 mmol.l ⁻¹ NaCl	SEC, Sephadex G-50	UV detekce	7
Řasa <i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i>	10 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 8,5	10 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 8,5, 0,02% NaN ₃	SEC, Sephadex G-75	UV detekce	39
Řasa	10 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 8,5	20 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 8, 100 mmol.l ⁻¹ KCl	SEC, Sephadex G-50	UV detekce	40
Řasa <i>Chlorella vulgaris</i>	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O, 1% SDS	10 mmol.l ⁻¹ Bicin +1% SDS	SEC, Sephadex G-75	UV detekce	41
Řasa <i>Scenedesmus</i> <i>quadricauda</i>	50 mmol.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , pH 8, 10 mmol.l ⁻¹ ME	50 mmol.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , pH 8, 10 mmol.l ⁻¹ ME, 500 mmol.l ⁻¹ NaCl, 5 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 8, 1 mol.l ⁻¹ KCl	IEC, DEAE- -cellulose, SEC, Sephadex G-50	UV detekce	43
Řasa <i>Chlorogonium</i> <i>elongatum</i>	25 mmol.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , pH 6, +25 mmol.l ⁻¹ DTT, 100 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 8,5, +2% SSA, pH 7,	15 mmol.l ⁻¹ octan sodný, izokratická eluce	RPC, C ₁₈ Beckman Ultrasphere (5 µm)	fluorescenční detekce ex. 340 nm, em. 420 nm, derivatizace OPA	57
Řasa <i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i>	10 mmol.l ⁻¹ methansulfonová kyselina, DTT	42 mmol.l ⁻¹ kyselina octová, pH 4, 0,64 mmol.l ⁻¹ octan sodný, tetraoktylamonium bromid, 18% acetonitril	RPC C18, Adsorbosphere	fluorescenční detekce, derivatizace monobromobimanem	58
Buněčná kultura	100 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 8	gradientová eluce, kyselina fosforečná, acetonitril	RPC, Nukleosil C18	detekce při 412 nm, postkolonová derivatizace DNTB	45
Buněčná kultura	5-sulfosalicylová kyselina	0,1% TFA, acetonitril	RPC, Ultrasphere C18	detekce při 412 nm, postkolonová derivatizace DNTB	59
Tabáková kultura	10 mmol.l ⁻¹ Tris, 5 mmol.l ⁻¹ NaCl, pH 8, ME	0,1% TFA, acetonitril	RPC, Waters C18	detekce při 412 nm, postkolonová derivatizace DNTB	6
Vyšší rostliny	50 mmol.l ⁻¹ Tris, 10 mmol.l ⁻¹ DTT, pH 8	gradientová eluce 0,05% TFA, methanol	RPC, Hypersil C18	ICP MS detekce, detekce při 412 nm, post- kolonová derivatizace, DNTB, MS-MS	69
Kořenová kultura, kvasinky	50 mmol.l ⁻¹ HEPES, 50 mmol.l ⁻¹ Tris, 1 mmol.l ⁻¹ PMSF, 1% Tween, pH 8,6	gradientová eluce 0,1% TFA, acetonitril	RPC, Nucleosil C18	MS-MS, derivatizace TNB	70
Kořeny rostlin	Tris tricínový pufr	100 mmol.l ⁻¹ Tris tricínový pufr, pH 8,3	CGE	UV detekce	64
Eukaryota	10 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 9	elektrolyt 50 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 9,1	CZE	UV detekce	65
Kořenová kultura	1 mol.l ⁻¹ NaOH, 0,1% NaBH ₄	100 mmol.l ⁻¹ borátový pufr, pH 8,5	CZE	detekce při 380 nm, derivatizace ABD-F	66
Řasa <i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i>	10 mmol.l ⁻¹ fosfátový pufr, pH 7	0,1% TFA, acetonitril	RPC, Econosphere C18	detekce při 412 nm, postkolonová derivatizace DNTB	71
Sinice	10 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 8, 1 mmol.l ⁻¹ DTT	50 mmol.l ⁻¹ Tris, 200 mmol.l ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 mmol.l ⁻¹ EDTA, pH 7	SEC, Ashipak GFA-30F	ICP MS detekce	72
Živočišný MT	20 mmol.l ⁻¹ Tris HCl, pH 8, sacharosa	120 mmol.l ⁻¹ Tris, pH 7,5	SEC, Superose 12	ICP MS detekce	10
Buněčná kultura	10 mmol.l ⁻¹ Tris, 10 mmol.l ⁻¹ KCl, 1,5 mmol.l ⁻¹ MgCl ₂ , pH 7	10 mmol.l ⁻¹ Tris, 0,9% NaCl, 1,5 mmol.l ⁻¹ MgCl ₂ , pH 7	SEC, Asahipak GSICP, 520HQ	MS detekce, ESI MS	73
Buněčná kultura	20 mmol.l ⁻¹ Tris, 10 mmol.l ⁻¹ ME, pH 8,6	10 mmol.l ⁻¹ octan amonný, pH 7	SEC, Eurogel GFC	ICP MS detekce, ESI MS, detekce při 412 nm, postkolonová derivatizace	74

Tabulka I – pokračování

Materiál	Extrakce	Mobilní fáze	Metoda	Detekce	Lit.
Tabáková kultura	10 mmol.l ⁻¹ Tris, 10 mmol.l ⁻¹ KCl, 1,5 mmol.l ⁻¹ MgCl ₂ , pH 7,4, ME	50 mmol.l ⁻¹ Tris, 150 mmol.l ⁻¹ NaCl, pH 7	SEC, Spherogel TSK 3 000 SW	off line – radiochemická detekce	18

a citlivější. Vývoj derivatizačních metod s fluorescenční detekcí byl směřován k rychlé analýze a možnosti stanovit stopová množství vzorků. Pro analýzu aminokyselin⁴⁷ a stanovení glutathionu⁴⁸ iontově výměnnou chromatografií byla zpočátku používána derivatizační činidla jako *o*-ftaldehyd (OPA) a fenylisothiokyanát (PITC) (cit.⁴⁹). Předkolonové derivatizace s 9-fluorenylmethyl chlormravenčanem (FMOC-Cl), výše uvedená derivatizační činidla a dansyl (dabsyl) chloridy byly rovněž použity ke stanovení aminokyselin iontově výměnnou chromatografií ve spojení s fluorescenční detekcí⁵⁰.

V poslední době byla vyvinuta nová metoda RPC pro analýzu aminokyselin⁴⁷, polyaminů⁵¹ a nehydrolyzovaných peptidů⁵², založená na derivatizaci primárních a sekundárních aminoskupin s 6-aminochinoly-*N*-hydroxysukcinimidylkarbamátem (AQC). K identifikaci glutathionu a dalších peptidů obsahujících sírné aminokyseliny fluorimetrickou detekcí bylo využito předkolonové derivatizace s 7-fluorbenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonátem amonným (SBD-F) (cit.⁵³) nebo monobromobimane⁵⁴.

Elektrochemické detekce bylo použito k analýze peptidů obsahujících cystein a charakterizaci jejich chromatografického chování na reverzní fázi⁵⁵. Glutathion, cystein a jejich oxidované formy byly stanoveny RPC s elektrochemickou detekcí jak v živočišných tkáních, tak i v rostlinných vzorcích. Nízkých detekčních limitů při stanovení obou forem cysteinu a glutathionu bylo rovněž dosaženo RPC s elektrochemickou detekcí na modifikovaných elektrodách. Elektrochemická detekce peptidů byla testována HPLC na kapilárních kolonách. Po derivatizaci biuretovým činidlem byly peptidy detegovány na uhlíkové elektrodě⁵⁶.

5. Elektroforetické metody

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je velmi používaná separační metoda pro identifikaci proteinů a k určení jejich molekulových hmotností. Po předchozí karboxymethylaci metalothioneinů a následném barvení stříbrem nebo Coomassovou modří CB-250 se analyty zpravidla detegují denzitometricky při 570 nm. Obdobný způsob barvení gelu při separaci rostlinného metalothioneinu použili Roesijadi a spol.⁶⁰. Zpravidla se používá 18–20 % polyakrylamidový gel v pufovacím systému. Analogickým postupem byl v tkáňovém cytosolu stanoven živočišný metalothionein spolu s glutathionem. U zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* byl metodou SDS-PAGE identifikován protein s *M_r* 8100 a rovněž byla touto metodou zaznamenána změna indukce proteinů u vodních rostlin vystavených zátěži Hg a Pb.

Kapilární elektroforéza (CE) se stala v poslední době

nejprogresivnější analytickou metodou. Je to dáno jejími výhodami, mezi něž patří zejména vysoká separační účinnost, rychlost a jednoduchost provedení, rychlý vývoj analytické metody a minimální spotřeba vzorku a chemikálií. V kapilární zónové elektroforéze (CZE) se látky separují v elektrickém poli podle velikosti poměru náboje ku hmotnosti. I neutrální látky lze separovat v CE, přidáme-li do základního elektrolytu nabitě micely (micelární elektrokinetická chromatografie, MEKC). Významné aplikace CE zahrnují analýzy proteinů a biologických peptidů. Vysoká účinnost CE umožňuje nejen separaci izoform MT, ale umožňuje i další rozdělení do podskupin. Využívají se různé pufrů jako základní elektrolyty, např. fosfát, borát, Tris, Tris borát atd. Základními požadavky na použité pufrů jsou nízká elektrolytická vodivost a nízká absorpce v UV oblasti. Při separacích se používají jak nemodifikované křemenné kapiláry, tak kapiláry s modifikovaným vnitřním povrchem, u nichž je potlačena sorpce proteinů. UV detekce při 214 nm, běžně používaná v HPLC a v CE, je však obvykle málo citlivá a málo selektivní. Derivatizace –SH skupin s ABD-F činidlem (4-aminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazol) dovoluje selektivní detekci při 380 nm (cit.⁶¹).

CE byla využita hlavně u živočišných MT (cit.⁶²). Tris tricinový pufr, pH 7,5 v kombinaci s detektorem s diodovým polem byl použit k charakterizaci izoform živočišných MT. Vliv pH, teploty, složení a koncentrace pufru na CZE separaci živočišných MT byl studován v práci⁶³.

CE analýza rostlinných MT je mnohem komplikovanější, neboť jejich UV absorpce i stabilita jsou nižší a standardní látky nejsou k dispozici. Vysokou účinnost CE při separaci rostlinných MT dokumentuje práce⁶⁴, kde MT o molekulové hmotnosti 10 000, identifikovaný jako chemické individuum SDS-PAGE metodou, se v CE rozštěpil na několik dalších látek.

6. Přímé spojení HPLC a CE s dalšími detekčními metodami

6.1. AAS detekce

Klasický postup při identifikaci metalothioneinů spočívá v separaci extraktů na jednotlivé frakce, v nichž se stanoví obsah kovů off-line metodou. Daleko výhodnější je přímé spojení chromatografické separace se specifickým detektorem, mezi něž patří atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP AES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP MS) a hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku (ESI MS (/MS)).

Kovy, které se přednostně váží do MT (Cd, Cu, Zn), patří mezi prvky, které dávají nejcitlivější odezvu v AAS (cit.¹²).

Plamenová AAS je kompatibilní s průtokem a s mobilními fázemi používanými v HPLC (cit.³⁵). Základní interface je velmi jednoduchý. Výstup z UV detektoru je zapojen ke zmlžovači atomového absorpčního spektrometru a Cd, Cu a Zn jsou stanovovány při 228,8 nm (Cd), 324,8 nm (Cu) a 213,8 nm (Zn). Kromě tohoto typu interface byla použita různě modifikovaná spojení HPLC s AAS, která umožnila dosažení nižších detekčních limitů (ng) ve vodných i methanových fázích. Mikroatomizační interface s křemennou trubicí plněnou vodíkem umožňuje pracovat pouze s vodnými fázemi, avšak ve srovnání s předchozími technikami je citlivější. Vzhledem k tomu, že HPLC-AAS není multielementární technika, je využívána především k identifikaci izoform metalothioneinů po předchozí saturaci kovem³⁵. Výhodou HPLC-AAS techniky je především jednoduchost spojení, kompatibilita s mobilními fázemi používanými v HPLC a široká použitelnost.

6.2. ICP AES a ICP MS detekce

ICP AES je velmi citlivá a selektivní metoda ke stanovení prvků. Pomocí této metody lze získat informace nejen o celkovém obsahu kovu, ale současně s kovy je možné monitorovat i síru. Problémem ICP AES detekce je nízká tolerance k organickým rozpouštědlům i přítomným solím. Maximálně je tolerováno 10 % organického modifikátoru v mobilní fázi a 50 mM roztoky pufrů⁶⁷. Podobně je tomu u ICP MS, která však má ve srovnání s ICP AES tu výhodu, že umožňuje současně stanovit více kovů i jejich izotopů a s vyšší citlivostí. Nevýhodou je vysoká cena přístroje a vysoké provozní náklady. Bylo popsáno několik typů interface. V případě klasického spojení, přímého zavedení výstupu z kolony do zmlžovače (pneumatická nebulizace), zhoršují organická rozpouštědla stabilitu plazmy a způsobují depozici uhlíku. Vysoká koncentrace solí blokuje zmlžovač a dávkovač. Další typ interface (DIN – direct injection nebulizer), kdy dochází k přímému nástřiku kapalného vzorku do centrálního kanálu kužele plazmy, se většinou používá pro méně stabilní vzorky komplexů se rtuť. Při nízkých průtocích methanických mobilních fází je vhodný hydraulický vysokotlaký nebulizér (HHPN), který je méně citlivý na obsah solí v mobilní fázi s nižší depozicí uhlíku³⁵.

Bylo rovněž popsáno několik typů spojení kapilární elektroforézy s ICP MS. Hlavní problémy v této technice způsobují malé objemy vzorků (10–100 µl), které vyžadují vysokou citlivost detekce a velmi nízké průtoky (1–5 µl.min⁻¹), což omezuje volbu zmlžovače. Některá spojení byla testována pro charakterizaci izoform metalothioneinů³⁸.

6.3. HPLC-ESI MS (/MS) detekce

Metodou ESI MS lze získat několikanásobně nabitě stabilní ionty i pro velké molekuly, jako jsou proteiny, bez předchozí fragmentace. Ze záznamů ESI spektra lze tak získat přesné informace o molekulových hmotnostech analyzovaných látek. ESI MS metodou lze určit, jaké kovy a v jakém množství jsou vázány v MT, určit molární distribuci a relativní zastoupení různých komplexů. V MS/MS technikách se data získávají po disociaci nabitých iontů při kolizi s neutrálním plynem. Hodnoty *m/z* produktů disociace se pak měří v dalším hmotnostním analyzátoru⁶⁸. Při použití ESI techniky je možnost zvýšit fragmentaci až na jednotlivé ionty.

V současné době je metoda ESI MS testována pro charakterizaci izoform živočišných metalothioneinů a jejich komplexů s kovy³⁵. Ve vzorku živočišného MT-2 byla potvrzena přítomnost dvou izoform, které se odlišují 30 hmotnostními jednotkami, a charakteristická spektra apoproteinu a kovem nasyceného proteinu v kyselém a alkalickém prostředí poskytla informace o množství a totožnosti kovů vázaných v proteinu. Metoda ESI MS ve spojení s HPLC byla použita k charakterizaci jak živočišných, tak rostlinných metalothioneinů.

Spojení CE s ESI MS je teoreticky poměrně jednoduché, protože průtokové rychlosti v CE a v ESI MS jsou obdobné (1–10 ml.min⁻¹). Jedná se o velmi citlivé zařízení.

7. Závěr

Studium komplexů s kovy je důležité pro pochopení jejich funkcí. K objasnění všech funkcí metalothioneinů vede izolace těchto polypeptidů a jejich charakterizace vhodně zvolenými analytickými metodami.

Interpretace údajů o metalothioneinech závisí na konkrétních experimentálních podmínkách. Indukce metalothioneinů závisí na koncentraci kovových iontů v živném médiu, způsobu kultivace a délce expozice rostlinného materiálu. Způsob zpracování biologického materiálu spolu s použitými analytickými metodami hraje významnou roli při výsledné charakterizaci rostlinných metalothioneinů. Charakterizace vyžaduje vysokoúčinné separační metody (metoda SEC, RPC, CE). Tyto metody je třeba kombinovat se selektivními detekcemi (AAS, ICP MS, ESI MS). Vedle separačních metod jsou velmi účinné elektrochemické metody.

Tato publikace je součástí řešení výzkumného záměru MSM 113 100002 a projektu GAČR 204/97/K0 84, MŽP VaV/340/2/97/ a Oxford Colleges Hospitality Scheme 1999.

LITERATURA

1. Kägi J. H. R., Schäfer A.: *Biochemistry* 27, 8510(1988).
2. Zenk W.: *Gene* 179, 21 (1996)
3. Binz P. A., Kägi J. H. R., v knize: *Metallothionein IV* (Klaassen C., ed.), str. 7. Birkhäuser Verlag, Basel 1999.
4. Robins A. H., Stout C. D., v knize: *Metallothioneins* (Stillman M. J., Shaw C. F., Suzuki K. T., ed.), str. 31. VCH Publishers, Inc. New York 1992.
5. Kotrba P.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1057 (1999)
6. Stillman M. J.: *Coord. Chem. Rev.* 144, 461 (1995).
7. Gekeler W., Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H.: *Arch. Microbiol.* 150, 197 (1988).
8. Shaw C. F., Petering D. H., Weber D. N., Gingrich D. J., v knize: *Metal Ion Homeostasis* (Winge D., Hamer D., ed.). Alan R. Liss, New York 1989.
9. Lobinski R., Gautier M. P.: *Anal. Magazine* 261, 21 (1998).
10. Vašák M., v knize: *Methods in Enzymology* 205 (Riordan J. F., Valle B. L., ed.), str. 452. Academic, New York 1991.
11. Beattie J. H., Richards M. P., Self R.: *J. Chromatogr.* 632, 127 (1993).
12. Suzuki K. T., Sunaga E., Kobayashi E., Sugihira N.: *J. Chromatogr.* 442, 345 (1987).
13. Van Beek H., Baars A. I.: *J. Chromatogr.* 400, 233 (1988).
14. Richards M. P.: *Comp. Biochem. Physiol.* 93A, 811 (1989).

15. Domažlická E., Vodičková H., Mader P.: *Biol. Listy* 59, 81 (1994).
16. Rauser W. E.: *Plant Science* 57, 37 (1988).
17. Reese R. N., Wagner G. J.: *Plant Physiol.* 84, 547 (1987).
18. Reddy G. N., Prasad M. N. V.: *Curr. Sci.* 58, 1380 (1989).
19. Havrdová J., Tichý M.: *Prakt. Lek.* 41, 347 (1989).
20. Bartsch, R., Klein D., Summer K. H.: *Arch. Toxicol.* 64, 177 (1990).
21. Hogstrand C., Haux C.: *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 137 (1989).
22. Olafson R. W., Olson P. E.: *Meth. Enzymol.* 205, 205 (1991).
23. Olafson R. W.: *Biochem. Bioenerg.* 19, 111 (1988).
24. Tomschik M., Havran L., Paleček E., Heyrovský M.: *Electroanalysis* 12, 274 (2000).
25. Dabrio M., Rodríguez A. R.: *Electroanalysis* 12, 1026 (2000).
26. Díaz-Cruz M. S., Mendieta J., Monjonell A., Tauler R., Esteban M.: *Anal. Chim. Acta* 385, 353 (1999).
27. Scarano G., Morelli E.: *Electroanalysis* 10, 39 (1998).
28. Šestáková I., Vodičková H., Mader P.: *Electroanalysis* 10, 764 (1998).
29. Fedurco M., Šestáková I.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40, 223 (1996).
30. Šestáková I., Mihalová D., Vodičková H., Mader P.: *Electroanalysis* 7, 237 (1995).
31. Šestáková I., Kopanica M., Havran L., Paleček E.: *Electroanalysis* 12, 100 (2000).
32. Šestáková I., Mader P.: *Cell. Mol. Biol.* 46, 237 (2000).
33. Scarano G., Morelli E.: *Electroanalysis* 8, 396 (1996).
34. Scarano G., Morelli E.: *Anal. Chim. Acta* 319, 13 (1996).
35. Lobinski R., Chassaigne H., Szpunzar J.: *Talanta* 46, 271 (1998).
36. Rauser W. E.: *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61 (1990).
37. Baunemann R., Hofner W.: *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 154, 81 (1991).
38. Szpunzar J., Chassaigne H., Donard O. F. X., Bettmer J., Lobinski R., v knize: *Plasma Source Mass Spectrometry* (Holland G., Tanner S. D., ed.), str. 131. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1997.
39. Collard J. M., Matagne R. F.: *Environ. Exp. Bot.* 34, 235 (1994).
40. Kaplan D., Heimer Y. M., Abeliovich A., Goldsbrough P. B.: *Plant Sci.* 109, 129 (1995).
41. Maeda S., Miyoguchi M., Ohki A., Inanaga J., Takeshita T.: *Chemosphere* 21, 965 (1990).
42. Hunziker P. E., Kägi J. H. R.: *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease*, str. 349. Academic, New York 1988.
43. Ochi T.: *Chem.-Biol. Interact.* 65, 1 (1988).
44. Cherian M. G.: *Sborník konference 3rd IUPAC Cadmium Workshop, Juelich 1985*, str. 227. Springer, Wien 1988.
45. Tukendorf A., Rauser W. E.: *Plant Sci.* 70, 155 (1990).
46. Grill E., Lofler S., Winnacker E. L., Zenk M. H.: *Biochemistry* 86, 6838 (1989).
47. Hill D. W., Walters F. H., Wilson T. D., Stuart J. D.: *Anal. Chem.* 51, 1338 (1979).
48. Mokrasch L. C., Teschke E. J.: *Anal. Biochem.* 140, 506 (1984).
49. Heinrikson R. L., Meredith A. K.: *Anal. Biochem.* 136, 65 (1984).
50. Wandelen Ch., Cohen S. A.: *J. Chromatogr.* 763, 11 (1997).
51. Merali S., Clarkson A. B.: *J. Chromatogr.* 675, 321 (1996).
52. Antonis K. M., Brown P. R., Cheng Y.-F., Cohen S. A.: *J. Chromatogr.* 661, 279 (1994).
53. Oe T., Ohyagi T., Naganuma A.: *J. Chromatogr.* 708, 285 (1998).
54. Ahner B. A., Kong S., Morel F. M. M.: *Limnol. Oceanogr.* 40, 658 (1995).
55. Bordin G., Raposo F. C., Rodriguez A. R.: *Chromatographia* 39, 146 (1994).
56. Shen H., Witowski S. R., Boyd B. W., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 71, 987 (1999).
57. Agrawal S. B., Agrawal M., Lee E. H., Kramer G. F., Pillai P.: *Environ. Exp. Bot.* 32, 145 (1992).
58. Ahner B. A., Kong S., Morel M. M.: *Limnol. Oceanogr.* 40, 649 (1995).
59. Mendum M. L., Gupta S. C., Goldsbrough P. B.: *Plant Physiol.* 93, 484 (1990).
60. Roesijadi G., Kielland S., Klerks P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 403 (1989).
61. Kubota H., Sato K., Yamada T., Maitani T.: *J. Chromatogr., A* 803, 315 (1998).
62. Richards M. P., Beattie J. H., Self R.: *J. Chromatogr.* 632, 127 (1993).
63. Virtanen V., Bordin G., Rodriguez A.-R.: *J. Chromatogr., A* 734, 391 (1996).
64. Mori A., Leita L.: *J. Plant Nutr.* 21, 2335 (1998).
65. Richards M. P., Beattie J. H., Self R.: *J. Chromatogr.* 16, 2113 (1993).
66. Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T., v knize: *Metallothioneins IV* (Klaassen C., ed.), str. 201. Birkhauser Verlag, Basel 1999.
67. Kubota H., Sato K., Yamada T., Maitani T.: *Plant Sci.* 106, 157 (1995).
68. Yates J. R. A., McCormack L., Link A. J., Schieltz D., Eng J., Hays L.: *Analyst* 121, 65 (1996).
69. Corr J. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 537 (1997).
70. Meuwly P., Thibault P., Rauser W. E.: *FEBS Lett.* 336, 472 (1993).
71. Howe G., Merchant S.: *Plant Physiol.* 98, 127 (1992).
72. Takatera K., Osaki N., Yamaguchi H., Watanabe T.: *Anal. Sci.* 10, 567 (1994).
73. Beattie J. H.: *Talanta* 46, 255 (1998).
74. Leopold I., Günther D., Neumann D.: *Analisis* 26, M28 (1998).

H. Vodičková^a, V. Pacáková^b, I. Šestáková^c, and P. Mader^a (^aDepartment of Chemistry, Faculty of Agronomy, Czech University of Agriculture, Prague, ^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^cJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Analytical Methods for Determination of Metallothioneins**

The review deals with analytical methods for determination of plant metallothioneins. Special attention is given to chromatographic and electrophoretic methods and their combination with selected detection techniques (AAS, MS, ICP MS). Very useful in the characterization of metallothioneins are voltammetric methods. Isolation procedures are also discussed.