



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“

4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymo(si) metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 321. BIOCHEMIJA

Laboratorinis darbas

Biologinių objektų piridino ir adenino nukleotidų ekstrakcija ir chromatografinis skirstymas

Teorinė dalis

Įvairių organizmo metabolizmo tarpinių junginių ir produktų (metabolitų) kokybinė ir kiekybinė analizė pastaraisiais metais tapo labai aktuali. Informacija apie metabolomą (organizmo metabolitų visumą) kartu su žiniomis apie proteomą (baltymų visumą) ir transkriptomą (iRNR visumą) padeda spręsti sudėtingus sistemų biologijos uždavinius, paaiškinti organizmų funkcijų molekulinis mechanizmus ir išaiškinti sąsajas tarp įvairių gyvybinių procesų. Metabolomas, skirtingai nei genomai, yra labai dinamiškas ir kinta kiekvieną sekundę. Adenino (AMP, ADP, ATP, ADP-ribozė) ir piridino (NAD, NADP, NADH, NADPH) nukleotidai yra vieni svarbiausių tarpusavyje susietų ląstelės metabolitų, lemiantys energetinę ląstelės būseną ir žūties mechanizmus, todėl jų ekstrakcijos, skirstymo ir analizės metodai yra labai aktualūs.

ATP yra labiausiai žinomas nukleotidas, atliekantis energijos nešiklio funkcijas. ATP susidaro fosforilavimo metu iš ADP. Cheminė potencinė energija yra išlaisvinama, kai ATP perduoda vieną (arba dvi) fosfato grupes kitai molekulei, virsdamas ADP (dažniausiai) ar AMP. AMP dažniau susidaro ląstelėse hidrolizuojant ADP, o ne tiesiogiai ATP.

Piridino dinukleotidai (NAD^+ , NADP^+ ir jų redukuotos formos NADH , NADPH) yra vieni iš svarbiausių ląstelės medžiagų ir energijos apykaitos tarpininkų. Esant normaliai fiziologinei būsenai, redukuotos ir oksiduotos piridino dinukleotido formų – NAD(P)H/NAD(P)^+ santykis ląstelėje atspindi jos oksidacinių ir redukcinių procesų būseną, pusiausvyrą tarp anabolinių ir katabolinių vyksmų. Kartu su ATP kiekiu, NAD(P)H/NAD(P)^+ santykis dažnai yra nustatomas, siekiant įvertinti ląstelių energetinės būsenos pokyčius. Tačiau neseniai atskleisti nauji duomenys apie piridino dinukleotidų funkcijas ląstelės atsako į stresą metu. Jie įgalina teigti, kad redukuotų NAD formų ir bendro NAD kiekio kitimai gali suteikti ir svarbios informacijos streso poveikio ląstelių ir audinių funkcijoms ir gyvybingumui grįžtamumą. Streso metu aktyvinamas oksiduotų piridino nukleotidų formų NAD(P)^+ skaidymas (žr. apžvalgą [1]), dėl kurio mažėja bendras piridino dinukleotidų kiekis audinyje arba ląstelėse. Nutraukus stresą, audinio ar ląstelės funkcijų atstatymo galimybė priklauso nuo likusių ląstelės NAD(P)^+ ir NAD(P)H išteklių.

Beveik nėra literatūros duomenų apie laisvos ADP-ribozės kiekio matavimų rezultatus, taip pat yra mažai žinoma apie laisvos ADP-ribozės metabolizmą [2]. ADP-ribozės monomerai, atskylantys iš NAD(P)^+ molekulių, naudojami baltymų poli-ADP-ribozilinimui streso sąlygomis, atsiradus DNR pažeidimų, tačiau tuomet padaugėja ir laisvos ADP-ribozės [3]. Laisva ADP-ribozė yra labai reaktyvi molekulė, ji dalyvauja baltymų glikinimo ir glikoksidinimo reakcijose kaip pentozės donorė. Ląstelių ekstraktuose jos aptinkami labai maži kiekiai arba iš viso neaptinkama.

Atvirkščių fazių jonų porų efektyvioji skysčių chromatografija. Atvirkščių fazių jonų porų efektyviojoje skysčių chromatografijoje (RP-IP HPLC, *angl.* reversed phase ion-pair high performance liquid chromatography) į mobiliąją fazę pridedama jonų porų reagento, pvz. tetrametil-, tetraetil- ar tetrabutilamonio druskų. Jonų porų reagentas sudaro kompleksus su molekulėmis, turinčiomis neigiamą krūvį, taip padidindamas jų hidrofobiškumą. Komplexo hidrofobiškumas priklauso nuo jonų porų reagento: tetrabutilo priedas padidina junginių užlaikymą hidrofobinėje kolonėlėje labiau nei tetrametilo grupę turintis reagentas [4]. Analizei jonų porų chromatografija labai svarbus pavyzdžio paruošimas: įleidžiamas į chromatografinę sistemą bandinys turi būti vandeninis ar buferinis tirpalas be organinių tirpiklių.

Joniniai junginiai, tokie kaip fosforilinti adenzino dariniai, labai greitai išeina iš kolonėlės atvirkščių fazių chromatografinės analizės metu tokia tvarka: ATP, ADP,

AMP [4]. Daudojant RP-IP HPLC, šių junginių išėjimo tvarka yra priešinga: ATP, turintis daugiausiai fosfato grupių, sudaro labiau hidrofobinį jonų porų kompleksą ir išeina po AMP ir ADP.

Darbo tikslas:

Nustatyti piridino nukleotidų (NAD, NADP, NADH, NADPH) ir adenino nukleotidų (AMP, ADP, ATP, ADP-ribozės) koncentracijų pokyčius ląstelių kultūroje po pasirinkto efektoriaus (temperatūrinio streso, specifinių inhibitorių, vaistų, aplinkos teršalų ar kt.) poveikio.

Darbo užduotys:

1. Pagaminti standartų ir standartų mišinio tirpalus.
2. Atlikti standartų mišinio RP-IP HPLC skirstymą.
3. Atlikti adenino ir piridino nukleotidų ekstrakciją iš ląstelių kultūros.
4. Atlikti paruošto pavyzdžio RP-IP HPLC kokybinę ir kiekybinę analizę.

Darbo priemonės ir sąlygos:

Chromatografinė sistema: Agilent 1200 Series, susidedanti iš diodų matricos detektoriaus, automatinio pavyzdžių įvedimo įrenginio, keturių kanalų siurblio, vaakuminio nudujinimo įrenginio ir kompiuterinės duomenų apdorojimo programos ChemStation 3D LC (Agilent Technologies, Valdbronas, Vokietija). Naudojama chromatografinė kolonėlė Atlantis dC18, 4,6x100 mm, 3 μm (Waters corporation, JAV).

Kolonėlės termostato temperatūra: 25°C.

Mėginių termostato temperatūra: 4°C.

Injekcijos tūris: 45 μl

Eliuentų sudėtis:

A 10mM KP_i pH 5, 2 mM TBA (tetrabutilamonio bromidas), 3% acetonitrilo

B 10mM KP_i pH 7,5, 2 mM TBA, 30% acetonitrilo

Eliucijos gradientas: Elientas B - 8 min 1%, 3,75 min 1-45%, 11,25 min 45-60%, 2 min 60-95%, 3 min 95%, 2 min 95-1 %.

Detekcija: 257 nm, 340 nm (redukuotiems NAD ir NADP).

Standartiniai junginiai: NAD, NADP, NADH, NADPH, AMP, ADP, ATP, ADP-ribozė.

Objektas: ląstelių kultūra (auganti prisitvirtinusi prie paviršiaus, *angl.* adherent) 10 cm Petri lėkštelėse, dengianti 80-100% lėkštelės paviršiaus (1 kontrolinė ir 1 po efektoriaus poveikio. Ląstelės turi būti vieno sėjimo, vienodo užsėto ląstelių skaičiaus ir augintos identiškomis sąlygomis)

Priemonės pavyzdžio paruošimui: indas su lelais, 4 Eppendorf tipo 1,5 ml mėgintuvėliai, 4 ultrafiltravimo vienetai Ultrafree-MC (5000 NMWL, Millipore), 11 chromatografinių (pritaikytų naudojamam automatiniam pavyzdžių įvedimo įrenginiui) buteliukų, Drigalski mentelė, automatinės pipetės su antgaliais (100-1000 µl, 1-10 ml), PBS tirpalas (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), 0,5 M KOH tirpalas, 8,5% H₃PO₄ tirpalas (visos išvardintos priemonės ir tirpalai turi būti atšaldyti iki 4°C), šaldoma centrifuga, purtyklė.

Darbo eiga:

1. Standartų ir standartų mišinio tirpalų paruošimas.

Paruošiama po 1ml 10mM kiekvieno standarto (NAD, NADH, NADP, NADPH, ADP-ribose, ATP, ADP, AMP) tirpalo. Junginių molekulinės masės, apskaičiuoti kiekiai ir realiai pasveriami kiekiai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Standartų molekulinės masės ir sveriami kiekiai.

Junginys	Molekulinė masė (g/mol)	Kiekis 1 ml 10 mM tirpalui paruošti (mg)	Sveriamas kiekis (mg)
NAD ⁺	663,43	6,63	7
NADH (dinatrio druska)	709,40	7,09	8
NADP ⁺ (natrio druska)	765,39	7,87	8
NADPH (tetranatrio druska)	833,35	8,33	9
AMP (natrio druska)	347,22	3,47	4
ADP (natrio druska)	427,20	4,27	5
ATP (dinatrio druska)	551,14	5,51	6
ADP-ribozė (natrio druska)	559,32	5,59	6

Kiekvienas junginys pasveriamas ir ištirpinamas 800µl dejonizuoto (18,2 MΩ) H₂O. ATP tirpalo pH privedamas 1M Tris tirpalu iki maždaug pH 7,0. Tris tirpalas lašinamas po 10 µl į ATP tirpalą, sumaišoma ir tikrinamas pH, užlašinant 10 µl tirpalo ant indikatorinės juostelės. Visi tirpalai laikomi leduose.

10µl kiekvieno tirpalo praskiedžiama 990 µl dejonizuoto H₂O ir išmatuojama tirpalo absorbcija. Naudoti standartų absorbcijos bangos ilgiai ir moliniai ekstinkcijos koeficientai (ε) pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Standartų absorbcijos bangos ilgiai ir ε.

Standartas	Bangos ilgis, nm	ε, cm ⁻¹ M ⁻¹
ATP, ADP, AMP	259	15400
NAD	260	18000
NADH	338	6200
NADP	260	18000
NADPH	260	18000

Pagal gautą absorbciją ir molinius ekstinkcijos koeficientus (ε) kiekvienam tirpalui apskaičiuojamas reikalingas vandens tūris praskiedimui, kad būtų gautas 10 mM tirpalas:

$$V_{H_2O} = \frac{A \cdot V_{st}}{\varepsilon \cdot 10^{-4}} - V_{st} \quad (1)$$

V_{H_2O} – trūkstamas vandens kiekis (µl), norint praskiesti norimą tūrį standartinio tirpalo iki 10 mM koncentracijos,

A – tirpalo absorbcija (s.v.)

$\varepsilon \cdot 10^{-4}$ – 100 µM tirpalo ekstinkcija 1cm kiuvetėje (s.v.)

V_{st} - norimas praskiesti standartinio tirpalo tūris (µl).

Pagal apskaičiuotus rezultatus, standartų tirpalai praskiedžiami iki 10 mM koncentracijos. Iš šių tirpalų paruošiami 1 mM tirpalai skiedžiant 100 µl standarto tirpalo 900 µl vandens. Standartų mišinio 1 mM tirpalas paruošiamas supilant po 100 µl kiekvieno standarto tirpalo ir 200 µl vandens. 20 µl 1 mM tirpalų skiedžiami 980 µl vandens chromatografiniuose buteliukuose. Gauti 20 µM standartų tirpalai dedami į šaldomą (4°C) chromatografinės sistemos automatinio pavyzdžių įvedimo įrenginį, o 10 mM ir 1 mM tirpalai užšaldomi.

2. Adenino ir piridino nukleotidų standartų ir standartų mišinio skirstymas

Užprogramuojamas eliuacijos gradientas, injekcijos tūris, pavyzdžio įvedimo įrenginio ir kolonėlių termostato temperatūros bei detekcijos bangų ilgiai. Užprogramuojama standartų ir standartų mišinio įleidimo į chromatografinę sistemą seka ir seka paleidžiama programiškai.

Pasibaigus analizei, duomenys iš kiekvieno junginio chromatografinės analizės ataskaitos surašomi į 3 lentelę. Mišinio skirstymo chromatogramoje patikrinama, ar smailių išėjimo laikai sutampa su kiekvieno standarto, analizuoto atskirai, išėjimo laikais ir ar smailės yra gerai atskirtos.

3 lentelė. Standartų smailių laikai ir plotai.

Standartinis junginys	Išėjimo laikas (min)	Smailės plotas (s.v.*s)
NAD ⁺		
NADH		
NADP ⁺		
NADPH		
AMP		
ADP		
ATP		
ADP-ribozė		

3. Adenino ir piridino nukleotidų ekstrakcija iš ląstelių kultūros

Paruošiami 2 ląstelių ekstraktai: vienas iš kontrolinių ląstelių (be efektoriaus poveikio), kitas – iš ląstelių, paveiktų tam tikru efektoriumi (temperatūra, įvairių fermentinių sistemų slopikliais ar aktyvikliais ir t.t.).

10cm Petri lėkštelė su ląstelėmis dedama ant ledu, ląstelės 2 kartus praplaunamos, užpilant ir nupilant po 5ml PBS. Likęs lėkštelėje nenusipylęs PBS atsargiai nusiurbiamas automatine pipete, kad ant ląstelių liktų kuo mažiau skysčio.

Užpilama 1ml 4°C KOH 0,5 M tirpalo ir ląstelės lizuojamos Drygalski mentele. Lizatas sumaišomas purtykle ir inkubuojamas 3 min leduose. Paimama 840 µl lizato ir neutralizuojama 4°C 190 µl 8,5% H₃PO₄ tirpalo. Mišinys sumaišomas purtykle ir inkubuojamas 3 min leduose, paskui centrifuguojamas 3 min 16100 x g, 4°C. Į 2

ultrafiltracijos vienetus įpilama po 400 µl supernatanto ir centrifuguojama 30 min 5000 x g, 4°C. Efluentas analizuojamas chromatografiškai.

4. Adenino ir piridino nukleotidų kokybinė ir kiekybinė analizė

Lašelių ekstraktų analizei naudojamas tas pačios chromatografijos sąlygos, kaip ir standartų skirstymui. Pasibaigus analizei, išėjimo laiko ir analičių smailių plotų duomenys iš kiekvieno pavyzdžio chromatografinės analizės ataskaitos surašomi į 4 lentelę (viena lentelė – kontroliniam pavyzdžiui, antra – pavyzdžiui po efektoriaus poveikio).

4 lentelė. Analčių išėjimo laikai, smailių plotai ir apskaičiuotos koncentracijos.

Analitė	Išėjimo laikas (min)	Smailės plotas (s.v.*s)	Analitės koncentracija pavyzdyje (µM)
NAD ⁺			
NADH			
NADP ⁺			
NADPH			
AMP			
ADP			
ATP			
ADP-ribozė			

Analitės koncentracija pavyzdyje (µM) apskaičiuojama pagal formulę (2):

$$C = \frac{S_a \cdot 20}{S_{st}} \quad (2)$$

C – analitės koncentracija pavyzdyje (µM)
 S_a – analitės smailės plotas pavyzdyje
 20 – standarto koncentracija (µM)
 S_{st} – standarto (20 µM) smailės plotas (3 lentelė).

Analičių koncentracijos pavyzdyje (µM) surašomos į 4 lentelę. Palyginamos analčių koncentracijos kontroliniame ir tiriamajame pavyzdyje bei paaiškinami gauti rezultatai.

Pastabos. Koncentracija (μM) pavyzdyje gali būti naudojama to paties sėjimo (vienodo ląstelių skaičiaus) ląstelių kultūrų pavyzdžių palyginimui, tačiau, norint lyginti skirtingų eksperimentų ir skirtingų ląstelių kultūrų adenino ir piridino nukleotidų koncentracijas, būtina jas perskaičiuoti mg ląstelės baltymo ar ląstelei, tuo pačiu įvertinant praskiedimą ir degradaciją pavyzdžio ruošimo metu. Norint chromatografinį metodą naudoti moksliniui tyrimui, yra būtinas analizės metodo validavimas, nusakantis smailių identifikavimo būdą, metodo specifiškumą, aptikimo ribą, linijiškumą, sistemos tikslumą ir pavyzdžio komponentų atgavimą (angl. *recovery*).

Literatūros sąrašas

1. Pollak N., Dolle C., Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.*, 2007, 402, 205-18.
2. Jacobson E.L., Cervantes-Laurean D., Jacobson M.K. ADP-ribose in glycation and glycoxidation reactions. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 419, 371-9.
3. Cervantes-Laurean D, Minter DE, Jacobson EL, Jacobson MK. Protein Glycation by ADP-ribose: Studies of Model Conjugates. *Biochemistry*, 1993, 32, 1528-1534.
4. Hearn M.T.W. HPLC of proteins, peptides and polynucleotides. Contemporary topics and applications. 1991, VCH Publishers, Inc, NY.