

STANOVENÍ ENZYMŮVÝCH AKTIVIT KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU*

ZDENĚK ŠVAGERA^a, TOMÁŠ ADAM^{b,c}, PETR
BARTÁK^c a JURAJ ŠEVČÍK^{a,c}

^aKatedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^bLaboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, ^cCentrum analytické chemie molekulárních struktur, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 26 Olomouc

Došlo dne 19.III.1998

Úvod

Kapilární elektroforéza (CE), vzhledem k rychlosti analýzy, účinnosti dosahující až miliónů teoretických pater, nízkým požadavkům na množství vzorku, pružné změně separačních podmínek a nízkým provozním nákladům se přímo nabízí pro použití v laboratořích klinické biochemie, kde v posledních letech úspěšně konkuruje dosud používaným metodám kapalinové a plynové chromatografie^{1,2}. V oblasti diagnostiky dědičných poruch purinového a pyrimidinového metabolismu bylo doposud publikováno několik prací, které umožňují efektivní screening^{3,5} a diagnostiku⁶⁻⁹ těchto onemocnění kapilární elektroforézou.

Cílem práce je stanovení aktivit enzymů purinového metabolismu (purinnukleosidfosforylasy (PNP), adeninfosforibosyltransferasy (APRT), adenosindeaminasy (ADA) a hypoxanthinguanosinofosforibosyltransferasy (HPRT)) v lidských erythrocytech metodou CE a srovnání vyvinutých metod se standardními HPLC metodami¹⁰.

Experimentální část

Chemikálie

Všechny použité látky byly obdrženy od Sigma (St. Louis, MO, USA).

Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda (Milli-Q, 5,3 μScm^{-1}).

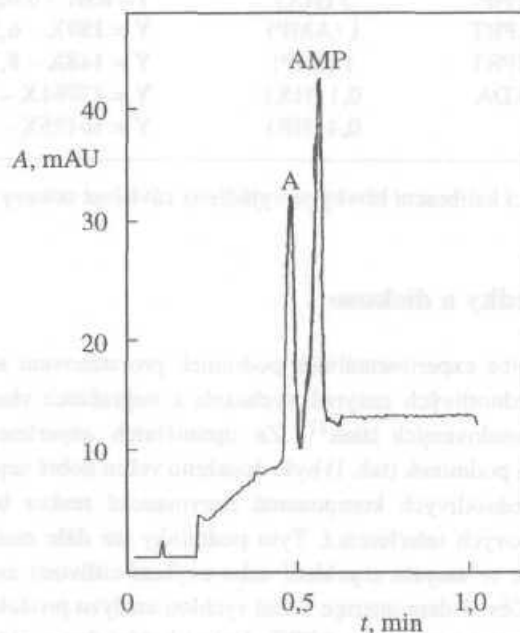
Aparatura

CZE experimenty byly prováděny v nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm na přístrojích SpectraPHORESIS 100 s rychle snímajícím detektorem SpectraFOCUS (PNP), Beckman P/ACE 5510 s diode array detektorem (APRT, HPRT, ADA).

Pro HPLC bylo použito přístroje Millipore-Waters¹⁰.

Příprava vzorku a inkubace enzymů

Promyté lidské erythrocyty byly lýzovány opakovaným zmrazením a rozmrazením ve vodě (1:6). Lyzát byl ředěn a inkubován s odpovídajícím substrátem v reakčním pufru při 37 °C. Enzymatické reakce byly po 15 minutách zastaveny přidáním čtyřicetiprocentní kyseliny trichlorotové, která byla reextrahována diethyletherem¹⁰. Vzorky byly před analýzou centrifugovány (5 min., 3000 g).



Obr. 1. Separace produktu enzymatické konverze APRT. Základní elektrolyt: 20 mmol.l^{-1} H_3BO_3 + 5 mmol.l^{-1} H_3PO_4 adj. NaOH, pH 9,5, kapilára: 27 cm x 20 cm x 75 μm i.d., $E = 1111 \text{ V.cm}^{-1}$, externí hydrodynamický tlak 0,5 psi

* Tato práce získala 2. cenu v Soutěži mladých analytických chemiků v Olomouci v únoru 1998

Tabulka I

Experimentální podmínky pro stanovení aktivit jednotlivých enzymů

Enzymy	Substrát ^a	Produkt ^a	Základní elektrolyt	Int. el. pole [V.cm ⁻¹]	UV detekce [nm]	Kapilára ^b
PNP	HR	HX	0,1 M-H ₃ BO ₃ adj. NaOH, pH 9,5	415	210	72 cm/45 cm i.d. 75 μm
APRT	A	AMP	0,04 M-H ₃ BO ₃ + 0,01 M-H ₃ PO ₄ adj. NaOH, pH 9,5	810	254	37 cm/30 cm i.d. 75 μm
HPRT	HX	IMP	0,04 M-H ₃ BO ₃ + 0,01 M-H ₃ PO ₄ adj. NaOH, pH 9,5	810	254	37 cm/30 cm i.d. 75 μm
ADA	AR	HR, HX	0,3 M-H ₃ BO ₃ adj. NaOH, pH 10	191	260	47 cm/40 cm i.d. 75 μm

^a HX - hypoxanthin, IMP - inosinmonofosfát, AR - adenosin, AMP - adenosinmonofosfát, HR - inosin, A - adenin;^b celková délka/délka k detektoru

Tabulka II

Analytické parametry metod

Enzym	Limit detekce [μmol.l ⁻¹]	Rovnice kalibrační křivky	R	Korelační rovnice CE versus HPLC	R
PNP	5(HX)	Y= 83X - 0,02	0,999	Y= 0,826X + 14,9	0,983
APRT	1 (AMP)	Y= 189X-6,51	0,998	Y=1,051X-3,66	0,998
HPRT	1 (IMP)	Y=148X-8,12	0,999	Y=1,298X-37,3	0,996
ADA	0,1 (HX)	Y=12761X-3933	0,998	Y= 0,798X + 3,565	0,889
	0,4 (HR)	Y=16125X-5523	0,999		

Rovnicí kalibrační křivky je vyjádřena závislost odezvy detektoru Y [mAU] na koncentraci X [(μmol.l⁻¹)

Výsledky a diskuse

Volba experimentálních podmínek pro stanovení aktivit jednotlivých enzymů vycházela z migračních vlastností studovaných látek¹¹. Za optimálních experimentálních podmínek (tab. I) bylo dosaženo velmi dobré separace jednotlivých komponentů enzymatické reakce bez matricových interferencí. Tyto podmínky lze dále modifikovat ve smyslu zrychlení nebo zvýšení citlivosti analýzy. Obr. 1 demonstruje velmi rychlou analýzu produktu enzymatické konverze APRT. Velmi krátký čas analýzy (cca 30 s) byl docílen použitím základního elektrolytu o nízké iontové síle a aplikací souběžného hydrodynamického tlaku.

Problém velmi nízké koncentrace produktů konverze ADA byl vyřešen kombinací vysokého objemu nástřiku

(70 % objemu kapiláry) a vysoké koncentrace základního elektrolytu. Pozitivně v analýze přispívá i rozdíl v pH vzorku a nosného elektrolytu. V daném systému je závislost odezvy detektoru na koncentraci lineární. Limit detekce (S/N = 3) produktů je 0,1 μmol.l⁻¹ pro HX a 0,4 μmol.l⁻¹ pro HR. Stanovení aktivity ADA a diskusi principu separace bude věnována samostatná práce.

Výsledky dosažené metodou CE byly korelovány s výsledky obdrženými HPLC metodami (tab. II).

Závěr

Prezentované CE postupy umožňují rychlé, levné a experimentálně snadné stanovení ADA, APRT, HPRT a PNP v lidských erythrocytech.

Autoři děkují L. D. Fairbanks a dr. A. H. Simmonds (Londýn) za provedení srovnávacích HPLC analýz. Práce vznikla za podpory grantu IGA MZČR 3439-3 a MŠMT ČR VS 96021.

LITERATURA

1. Landers J. P.: Clin. Chem. 41, 495 (1995).
2. Adam T., Ševčík J.: Klin. Biochem. Metab. 5, 265 (1997).
3. Ševčík J., Adam T., Mazáčová H.: Clin. Chim. Acta 245, 85 (1996).
4. Ševčík J., Adam T., Sázel V.: Clin. Chim. Acta 259, 73 (1997).
5. Bory C, Chantin C, Bouliou R.: J. Chromatogr. A 730, 329 (1996).
6. Perrett D., Ross G., v knize: *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man* (Elion G. B., Harkness R. A., Zollner N., ed.), VII díl B. Plenum Press, New York 1991.
7. Adam T., Ševčík J., Fairbanks L. D., Barták P.: J. Chromatogr. B 698, 308 (1997).
8. Adam T., Ševčík J., Fairbanks L. D., Barták P., Lochman P.: Suppl. Biochem. Clin. 21, 55 (1997).
9. Adam T., Ševčík J., Fairbanks L. D., Barták P., v knize: *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man IX*

(Griesmacher A., Müller A. A., ed.). Plenum Press, New York (v tisku).

10. Simmonds H. A., Duley J. A., Davies P. M.: *A Laboratory Manual* (Hommes F. A., ed.). Wiley, New York 1991.
11. Ševčík I, Adam T., Barták P., Švagera Z., Friedecký D.: Suppl. Biochem. Clin. 21, 55 (1997).

Z. Švagera^a, T. Adam^{b,c}, P. Barták^c, and J. Ševčík^{a,c}
(^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Clinical Biochemistry, Faculty Hospital, ^cCentre of Analytical Chemistry of Molecular Structures, Medical Faculty, Palacký University, Olomouc): **Determination of Enzyme Activities by Capillary Zone Electrophoresis**

Capillary electrophoresis was applied for the determination of activities of purine-metabolism enzymes: purine nucleoside phosphorylase (PNP), adenine phosphoribosyl transferase (APRT), adenosine deaminase (ADA), and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT). The enzyme activities were determined in the lysate of human erythrocytes after incubation with the corresponding substrate. For clinical purposes, the developed methods were validated by comparison with the standard HPLC methods.