

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIŃSKI

Izotachoforeza i jej zastosowanie w naukach biologicznych

Z Centralnego Laboratorium Aparaturowego AR w Lublinie

Izotachoforeza jest procesem rozdzielania cząsteczek zjonizowanych, które w polu elektrycznym — przy zastosowaniu odpowiednich elektrolitów podstawowych — grupują się w strefy według malejącej ruchliwości i przesuwają z jednakową szybkością. Jest odmianą metody elektroforetycznej, analogiczną do metody rowowania.

Jako metoda analityczna izotachoforeza rozwinięła się bardzo szybko w ostatnich kilku latach. Pierwsza kompletna monografia o tej metodzie została wydana w 1976 r. (13), chociaż podstawy teorii procesu opracowano jeszcze w ubiegłym wieku. Czynniki opóźniającymi wprowadzenie tej metody do praktyki analitycznej były trudności w wykonaniu wysokonapięciowych stabilizatorów, dobrych materiałów izolacyjnych oraz konstrukcji odpowiednich detektorów.

Zasada metody

W zwykłej elektroforezie strefowej próbka jest rozdzielana między warstwami elektrolitu podstawowego, a strefy jej składników są stale wypierane przez elektrolit podstawowy. Dlatego w metodzie tej nie można osiągnąć ostro zarysowanych granic międzystrefowych.

W izotachoforezie używane są dwa elektrolity — jeden zawiera jon wiodący (leading ion), który w układzie odznacza się największą ruchliwością — zaś drugi — jon terminator (terminating ion) — charakteryzujący się w stosunku do rozdzielanych najmniejszą ruchliwością.

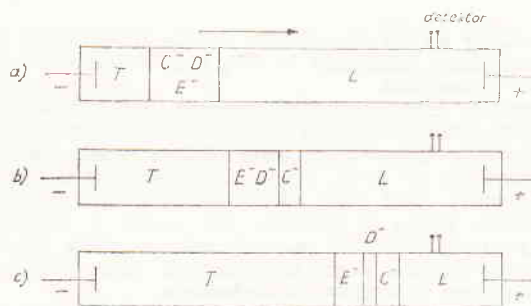
Analizowaną próbkę wstrzykuje się pomiędzy oba elektrolity. W ten sposób jony zawarte w próbce nie są wypierane przez jon terminator, a strefy są niezwykle ostro zarysowane i ułożone według malejącej ruchliwości.

Zwykle składniki próby rozdzielane są w cienkościennych kapilarach (szkło, teflon, inne polimery) w regulowanym polu prądu stałego. W zależności od rodzaju i stężenia mieszanin stosuje się kapilary o średnicy wewn. 0,4–0,6 mm (średn. zewn. 0,6–0,8 mm) i długości 10–100 cm.

Na ryc. 1. przedstawiono przebieg procesu dla trzech anionów (C^- , D^- i E^-) wprowadzonych pomiędzy jon wiodący (L) i terminujący (T). Gdy dokonuje się rozdziału dodatnio naładowanych cząsteczek — zmienia się polarność elektrod i wybiera inną parę elektrolitów dla obu rodzajów jonów (L i T).

W stanie równowagi dynamicznej rozdzielane strefy izotachoferyczne posiadają następujące właściwości (sytuacja c), ryc. 1.:

1. każda strefa zawiera tylko jeden jon rozdzielanej mieszaniny;
2. kolejność strefy jest określona ruchliwością zjonizowanego składnika;
3. stężenie jonu w danej strefie wynika z góry ze składu elektrolitu wiodącego i ruchliwości składnika;
4. stężenie składnika jonowego jest jednakowo w całej strefie;
5. granice międzystrefowe są ostro zarysowane, tak, że każda strefa zachowuje się jak oddzielny dysk;
6. szerokość każdej strefy — po całkowitym rozdzieleniu — nie ulega zmianie;
7. gradient potencjału w każdej ze stref jest określony ruchliwością składnika i jednakowy w każdym punkcie danej strefy;
8. szybkość przesuwania wszystkich stref jest jednakowa.



Ryc. 1. Schematyczny przebieg izotachoforezy. a) próbka zawierająca trzy aniony C^- , D^- i E^- zostaje wprowadzona między jon wiodący (L) a terminujący (T); b) po podłączeniu prądu między elektrodami aniony wędrują do anody; c) każda strefa zawiera tylko jeden składnik jonowy

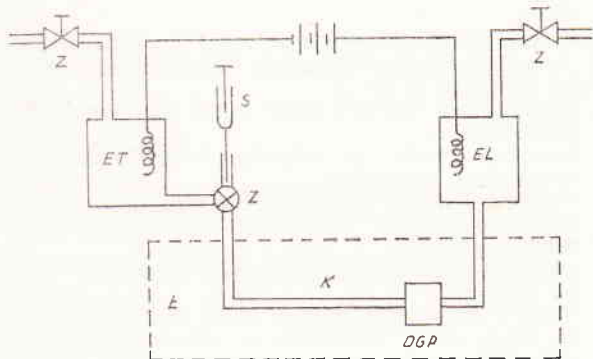
Właściwości określone w pkt. 3, 4 i 6 określają dogodne warunki dla analizy ilościowej — pomiary długości stref odpowiadają bezwzględny ilościom składnika jonowego w próbce. Inną zaletą — wynikającą z tych właściwości — jest efekt zateżnienia rozcieńczonych składników. Jeśli stężenie jakiegoś jonu w próbce jest niższe niż wartości określone w pkt. 3 — składnik automatycznie zagęszcza się. To zjawisko jest szczególnie korzystne dla prób rozcieńczonych.

Właściwość określona w pkt. 7 daje podstawę do analizy jakościowej. W ten sposób można uzyskać jednoczesną informację dotyczącą składu i stężenia poszczególnych zdysocjowanych składników rozdzielanych mieszanin. Obok analizy jakościowej i ilościowej proces można wykorzystać do celów preparatywnych (19).

Ostatnia właściwość jest źródłem nazwy metody (izo-tacho-foreza).

Aparatura

Schemat budowy aparatu do izotachoforezy pokazano na ryc. 2. Ścisłe odmierzoną próbkę wprowadza się pomiędzy dwa elektrolity przy pomocy strzykawki mikrolitrowej i zaworów obrotowych. Stosując wysokonapięciowy stabilizator ustala się wartości prądowe. Ściany kapilar są chłodzone w łaźni termostatu z uwagi na wydzielanie się ciepła, którego źródłem jest opór roztworu wypełniającego kapilarę. Najważniejszą częścią aparatu jest detektor. Umieszczenie detektora bezpośrednio w kapilarze lub na jej ściankach daje natychmiastowe sygnały o zachodzącym procesie, bez konieczności wywoływania stref po dokonanym rozdzieleniu.



Ryc. 2. Schemat budowy aparatu do izotachoforezy

Objaśnienia: K — kapilara, DGP — detektor gradientu potencjału, EL — elektroda jonu wiodącego, ET — elektroda jonu terminującego, S — strzykawka, Z — zawór, Ł — łaźnia termostatu.

Możliwe są do stosowania 4 typy detektorów: termometryczny, absorpcji w UV, przewodnictwa i gradientu potencjału.

Detektor termometryczny złożony jest z małej termopary umieszczonej na zewnętrznej ściance kapilary i rejestruje temperaturę stref. Każda strefa różni się temperaturą od innej, ponieważ ciepło oporu wytwarzane przez prąd stały zależy od gradientu potencjału strefy. Mimo iż detektor jest prosty w konstrukcji, jego rozdzielczość jest stosunkowo niska dla wykazania wąskich stref utworzonych przez składniki, występujące w śladowych stężeniach.

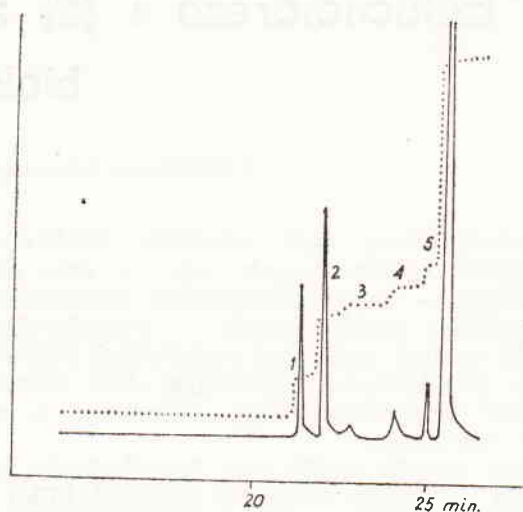
Detektor UV składa się z przezroczystej rurki, źródła światła i fotodetektora. Rozdzielczość jego sięga 0,05 mm, lecz — co jest oczywiste — może być stosowany tylko do składników absorbujących tę część widma.

Detektor przewodnictwa oparty jest na pomiarze przewodnictwa elektrycznego stref. Charakteryzuje się stosunkowo wysoką czułością, lecz jest bardzo wrażliwy na zmiany warunków pracy.

Detektor gradientu potencjału składa się z dwu platynowych elektrod umieszczonych w niewielkiej odległości od siebie w kierunku, w którym zachodzi ruch stref i mierzy między nimi różnice potencjałów. Rozdzielczość tego detektora zbliża się także do 0,05 mm. Detekcja wykorzystuje podstawowe zasady izotachoforezy wymienione w punktach 1—8. Przy pomocy tego detektora najmniejsza ilość substancji, jaka może być wykryta w próbce, została obniżona przynajmniej 50 razy w porównaniu z detekcją termometryczną. Również rozpiętość stężeń składników w próbce — przy wykorzystaniu tego detektora — może być znacznie rozszerzona.

Sygnały detektorów są wzmacniane i zapisywane w rejestratorze potencjometrycznym. Granica detekcji wynosi zwykle 10^{-9} mola.

Na ryc. 3 pokazano typowy wykres analizy mieszaniny kwasów organicznych z wykorzystaniem detektora gradientu potencjału. Warunki rozdzielenia: elektrolit wiodący: 0,01 M D-histydyna + 0,01 M L-histydyna, HCl, elektrolit terminujący: 0,01 M kwas glutaminowy, temp. 20°C, prąd 50 μ A.



Ryc. 3. Typowy wykres izotachoforezy mieszaniny kwasów organicznych z wykorzystaniem detektora gradientu potencjału

Objaśnienia: 1 — kwas szczawiowy, 2 — kwas winowy, 3 — kwas cytrynowy, 4 — kwas fumarowy, 5 — kwas maleinowy. Linia ciągła — sygnał różniczkowany detekcji, linia przerywana — sygnał całkowity detekcji.

Zastosowanie

Lista substancji, które mogą być analizowane przy pomocy izotachoforezy jest długa. Należy jednak podkreślić, że każda próba zawierająca mieszaniny innych zjonizowanych składników wymaga doboru odpowiednich elektrolitów — wiodącego i terminującego oraz utrzymania właściwego stężenia jonów wodorowych. Większość rozdzielanych substancji — z wyjątkiem niektórych silnych elektrolitów — zmienia swoją efektywną ruchliwość odpowiednio do stopnia dysocjacji — który zależy od wartości pH środowiska.

W odróżnieniu od zwykłych metod elektroforetycznych oraz metod chromatograficznych — izotachoforeza w kapilarach nie wymaga w zasadzie żadnych wypełnień kolumnowych. Obniża to koszt i upraszcza proces analityczny, a co wydaje się jeszcze bardziej ważne — umożliwia uzyskiwanie w stosunkowo krótkim czasie stabilnych i powtarzalnych wyników. Zastosowanie szybkiej wysokonapięciowej izotachoforezy z detekcją gradientową pozwala przeprowadzić analizę ilościową przy użyciu standardu wewnętrznego. Otrzymane tą drogą wyniki obarczone są błędem od 1,0 do 1,2% (33). Dokładność ta jest lepsza niż dokładności osiągnięte innymi instrumentalnymi metodami analitycznymi. Dane te świadczą o ogromnych

możliwościach pomiarowych i dużej przyszłości metody w badaniach naukowych w chemii, biologii i medycynie.

Izotachoforeza znalazła zastosowanie w badaniu jakości żywności, ocenie przemysłowych procesów przetwarzania produktów spożywczych, kontroli skażeń środowiska (1), badania wód (37) i nawozów (11). W biochemicznych zastosowaniach typowymi przykładami są: rozdział i oznaczanie kwasów w cyklu Krebsa (10), produktów utleniania cukrów (14), analiza kwasów tłuszczowych i innych kwasów organicznych (3, 7, 28), pirogronianu i bursztynianu w badaniach enzymatycznych (25), aminokwasów, peptydów i białek (2, 5, 15, 26, 27, 29, 31, 34, 36, 41), nukleotydów (19), jonów metali (6) oraz oznaczanie stężeń metabolitów tkankowych (23, 24, 38, 39).

Coraz częściej obserwuje się wykorzystanie izotachoforezy do celów klinicznych (12, 21, 42). Metodą tą frakcjonuje się i oznacza białka w surowicy i osoczu (8, 31), w tym makroglobuliny (17) i immunoglobuliny (44), białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (20, 42), pocie i moczu (21, 43). W badaniach toksykologicznych izotachoforezę stosuje się do oznaczania w moczu kwasów: hipurowego, metylohipurowego, fenylloglioksalowego i migdałowego (40). W diagnostyce schorzeń alergicznych próbuje się stosować tę metodę do analizy i preparacji histoplazminy (32). W diagnostyce stwardnienia rozsianego oraz chronicznego zapalenia mózgu i opon mózgowych do analizy płynu mózgowo-rdzeniowego i rozkładu gamma-globulin (12, 21). Inne publikacje donoszą o zastosowaniu metody w badaniu fenylketonurii i anemii sierpowatej (2, 30).

Izotachoforeza znalazła także zastosowanie do określenia surowiczych kinin oraz zredukowanego i utlenionego glutationu (34), izohormonów wzrostowych (4) i prolaktyny (22), rodzajów protrombin u bydła (35), a również do oczyszczania wyizolowanego antygenu raka oskrzeli (16).

Znane są także pozytywne próby wykorzystania tej metody do rozdziału wirusów a nawet całych komórek (13).

Na przeszkodzie szerszego wykorzystania izotachoforezy w praktyce analitycznej stoi jednak niski stopień rozpowszechnienia aparatury oraz stosunkowo wysoki jej koszt.

Piśmiennictwo

1. Application Data of Shimadzu Isotachophoretic Analyzer, 1976.
2. Arlinger L.: Proceedings of the Electrofocusing and Isotachopheresis Symposium, Milano. North Holland Publ. Co., Amsterdam 1974.
3. Arlinger L., Lundin H.: Protides Biol. Fluids 21, 667, 1974.
4. Baumann G., Chrambach A.: Proc. Natl. Sci. USA 73, 732, 1976.
5. Beckers J. L., Everaerts F. M.: J. Chromatogr. 71, 380, 1972.
6. Beckers J. L., Everaerts F. M.: J. Chromatogr. 68, 207, 1972.
7. Beckers J. L., Everaerts F. M., Houtermans W. J. M.: J. Chromatogr. 76, 277, 1973.
8. Bier M., Cuddeback R. M., Kopwillem A.: J. Chromatogr. 132, 437, 1977.
9. Boček P., Deml M., Janák J.: J. Chromatogr. 91, 329, 1974.
10. Boček P., Lekova K., Janák J.: J. Chromatogr. 117, 97, 1976.
11. Boček P., Kaplonova B., Deml M., Janák J.: J. Chromatogr. 153, 287, 1978.
12. Delmotte P.: Symposium on Isoelectric Focusing and Isotachopheresis, Hamburg 1976.
13. Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen T. P. E. M.: Isotachopheresis — Theory, Documentation and Applications. Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York 1976.
14. Everaerts F. M., Konz W. J. M.: J. Chromatogr. 65, 287, 1972.
15. Everaerts F. M., Van der Put A. J. M.: J. Chromatogr. 52, 413, 1970.
16. Frost M. J., Rogers G. T., Bagshawe K. D.: J. Cancer 31, 379, 1975.
17. Gautier F., Gutman N., Muh J. P., Mouray H.: Anal. Biochem. 71, 181, 1976.
18. Grundbaum B. W., Hjalmarsson S. G.: J. Forensic Sci. Soc. 16, 323, 1976.
19. Haglund H.: Science Tools 17, 1, 1970.
20. Kjellin K. G., Hallander L., Moberg U.: J. Neurol. Sci. 26, 617, 1975.
21. Kjellin K. G., Moberg U., Hallander L.: Science Tools 22, 3, 1973.
22. Knight P. J., Gronow M., Hamilton J. M.: J. Endocrinol. 69, 127, 1976.
23. Kopwillem A.: LKB Application Note 59, 1973.
24. Kopwillem A.: LKB Application Note 60, 1973.
25. Kopwillem A.: J. Chromatogr. 82, 407, 1973.
26. Kopwillem A.: Protides Biol. Fluids 22, 715, 1975.
27. Kopwillem A., Chillemi F., Bosio-Righetti A. B., Righetti P.: Protides Biol. Fluids 21, 657, 1973.
28. Kopwillem A., Eriksson C.: LKB Application Note 11, 1974.
29. Kopwillem A., Lundin H.: LKB Application Note 183, 1974.
30. Kopwillem A., Lundin H., Bosio-Righetti A. B., Righetti P.: Protides Biol. Fluids 22, 737, 1975.
31. Kopwillem A., Merriman W. G., Cuddeback R. M., Smolka A. J. K., Bier M.: J. Chromatogr. 118, 35, 1976.
32. Lancaster M. V., Sprouse R. F.: Anal. Biochem. 77, 158, 1977.
33. Miedzak J., Waksmundzki A.: Wiadomości Chem. 2, 71, 1978.
34. Miyazaki H., Katoh K.: J. Chromatogr. 119, 369, 1976.
35. Prowse C. V., Mattock P., Esnouf M. P., Russel A. M.: Biochim. Biophys. Acta. 434, 265, 1976.
36. Rosseneu M. Y., Biaton V., Caster H., Peeters H., Kopwillem A.: Protides Biol. Fluids 22, 697, 1975.
37. Ryšlavý Z., Boček P., Deml M., Janák J.: Chemické Listy 72, 641, 1978.
38. Sjödin B., Kopwillem A., Karlsson J.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, 307, 1974.
39. Sjödin B., Kopwillem A., Karlsson J.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 35, 699, 1975.
40. Sollenberg J., Baldesten A.: J. Chromatogr. 132, 469, 1977.
41. Strongin A. J., Levin E. D., Stiepanov V. M.: Bioorg. Chimija, 2, 869, 1976.
42. Uyttendaele K., DeGroot M., Biaton V., Peeters H., Alexander F.: Protides Biol. Fluids 22, 743, 1975.
43. Uyttendaele K., DeGroot M., Biaton V., Peeters H., Alexander F.: J. Chromatogr. 132, 361, 1977.
44. Ziegler A., Koehler G.: FEBS Lett. 71, 142, 1976.

Adres autora: doc. dr hab. Janusz Wierciński, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin.

CLAMPITT R. B., HART R. J.: Aktywność tkankowa niektórych enzymów odgrywających znaczenie w diagnostyce u 10 gatunków ssaków. (The tissue activities of some diagnostic enzymes in ten mammalian species). J. comp. Path. 88, 607—621, 1978 (4).

Aktywność enzymów plazmy dostarcza informacji o miejscu, natężeniu i czasie trwania uszkodzeń tkanek. Enzymy wykorzystywane w diagnostyce pojawiają się w płazmie w następstwie martwicy tkanek, zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych lub zmian postępowych w organellach komórkowych. W badaniach określono u 10 gatunków ssaków (koty, psy, fretki, Erythrocebus potas, Popio anubis, myszek, szczurów, świnek morskich, królików i owiec) aktywność GOT, GPT, GDH, SDH, ICDH (dehydrogenaza izocytrynianowa), LDH, HBDH (dehydrogenaza hydroksymasłowa), CPK (fosfokinaza kreatyny), AP, GGT (gamma glutamyl-transferaza). Wysoki poziom GOT, LDH, HBDH i ICDH stwierdzono u większości badanych gatunków zwierząt. GDH i SDH przeważały w wątrobie, CPK występowała w mięśniach szkieletowych, mięśni serca i mózgu, AP w nerkach i w jelitach cienkich, GOT głównie w nerkach. GPT cechowała się swoistością wątrobową u psów, kotów, fretki, myszek i szczurów. U naczelnych, świnek morskich i królików enzym ten występował ponadto w mięśniu serca i w mięśniach szkieletowych.

G.