Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 24 (63). 2011. № 4. С. 183-191.

УДК 543.635.24:543.544

ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ ІММОБІЛІЗОВАНИХ НА ПАПЕРОВИХ НОСІЯХ МОДЕЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ

Письменецька І.Ю.[1], Баттерс Т.Д.[2]

[1]Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ, Україна
[2]Інститут глікобіології Оксфордського університету, Оксфорд, Велика Британія
E-mail: pirina2004@list.ru

Спеціально розроблені паперові субстрати дуже корисні для збору, зберігання та пересилки біологічних зразків та широко застосовуються (здебільшого для крові та сироватки) по всьому світу. У даній роботі досліджується рівень екстрагування вуглеводів з різних паперових носіїв (карточок Гатри, хроматографічних дисків Grade AA Discs та хроматографічного паперу 3mm Whatman) для оцінки їх застосування з цією ж метою при вивченні ВЕРХ-спектрів олігосахаридів. Хроматографічні профілі гідролізованого декстрану та N-гліканів трансферину показали, що елюція з усіх досліджених матриксів дозволяє отримати адекватний спектр. Але значно вищій рівень екстрагування з хроматографічного паперу та можливість його застосування для попередньої очистки іммобілізованого матеріалу вказують, що він є найкращою альтернативою в разі необхідності.
Ключевые слова: карточки Гатрі, екстрагування гліканів з паперових матриксів, ВЕРХ-аналіз олігосахаридів.

ВСТУП

Протягом майже півстоліття з того часу, як у 1962 році Роберт Гатри застосував фільтрувальний папір щоб системно збирати кров новонароджених для аналізу на фенілкетонурію, карточки Гатри впровадили для неонатального скринінгу більш ніж у 30 країнах [1, 2]. Фенілкетонурію доповнили вроджений гіпертиреоз, серповидно-клітинна анемія, ВІЧ та інші хвороби [3]. Крім рутинної діагностики новонароджених, такий метод збору біологічного матеріалу знайшов своє достойне місце у генетичних скрінінгах, особливо завдяки швидкому розвитку ДНК-технологій [4–6].

Карточки Гатри та їх модифікації (IsoCode STIX, FTA Gene Guard Collection Matrices – FTA Elute та інші) – це паперові носії з високоочищеної целюлози, що дозволяють збирати, зберігати та транспортувати біологічні зразки при температурі зовнішнього середовища. Найчастіше це зразки цільної крові чи плазми для аналізу білків, ферментів, нуклеїнових кислот, різних метаболітів та ліків. На таких носіях біоматеріал у сухому стані добре зберігається для його подальшого аналізу достатню довго: при температурі тропіків – до 10 років [7], а в менш екзотичних умовах –до 25 років [8] і більше [9].

Екстракцію вуглеводів з біологічних рідин, іммобілізованих на карточках Гатрі, вивчали при мас-спектроментрії глюкозаміногліканів, але аналізували тільки моно- та дисахариди [10]. Інформацію стосовно олігосахаридів не було знайдено.

Оскільки планується транспортувати біологічний матеріал для аналізу вільних олігосахаридів шляхом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), тому здається доцільним дослідити можливості використання з цією метою паперових матриксів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Реактиви для нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії були від VWR International, інші – від Sigma-Aldrich.

В якості модельної суміші олігосахаридів використовували частково гідролізований декстран, що застосовується як зовнішній стандарт у високоефективній рідинній хроматографії вуглеводів, та глікани трансферину з добре відомим хроматографічним спектром.

Крім карточок Гатрі, в якості можливих для подальшого застосування паперових носіїв, були взяті матеріали, що широко використовуються у паперовій хроматографіі – хроматографічні диски Grade AA та хроматографічний папір Whatman.

1. Екстракція з хроматографічних дисків

Для екстракції зразків з паперових дисків (Grade AA Antibiotic Assay Discs 13 mm, cat. 2017013, Whatman®) їх поміщали у скляні колонки (Oxford Glyco System). Диски промивали двічі 1 мл Milli-Q™ H_2O чи застосовували їх без промивки водою, потім двічі 1 мл метанолу та 4 рази 1 мл суміші н-бутанолу, етанолу та Milli-Q™ H_2O (4:1:1/ 4:1: 0,5 / 4:1: 0,25). Наносили зразки для аналізу та залишали диски на 15 хвилин для всмоктування зразків та підсушування. Диски із зразками промивали 4 рази 1 мл суміші н-бутанолу, етанолу та Milli-Q™ H_2O (в різних концентраціях - 4:1:1 / 4:1: 0,5 / 4:1: 0,25), потім 1 мл метанолу. Олігосахариди з дисків елюювали трьома порціями по 0,5 мл Milli-Q™ H_2O, при цьому першу порцію води залишали у колонці на 15-20 хвилин, перекриваючи потік рідини, для кращої екстракції гліканів.

2. Хроматографія на папері

Хроматографію на папері проводили з чи без попередньої промивки хроматографічного паперу (Whatman® cellulose chromatography papers 3mm) чи карточок Гатрі (S & S 903, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) Milli-Q™ H_2O у висхідному потоці. У разі промивки паперу чи карточок їх висушували при кімнатній температурі. Зразки: 1) гідролізованого декстрану (1,2,5 чи 10 мкл з концентрацією 10 мг/мл у Milli-Q™ H_2O чи сечовому буфері – 0,17М NaCl та 0,5М сечовини з pH6,0), 2) вільних олігосахаридів трансферину, наносили порціями на відстані 15 мм друг від друга і 20 мм від краю паперу та висушували. Хроматографію проводили із застосуванням суміші н-бутанолу, етанолу та Milli-Q™ H_2O в різних пропорціях: 1) 4:1:0,25; 2) 4:1: 0,5; 3) 4:1:1. Хроматографічний

папір чи карточку Гатри висушивали та вирізали диски із зразками. Олігосахариди з дисків елюювали трьома порціями по 0,5 мл Milli-Q™ H_2O у скляних колонках Oxford GlycoSystem, при цьому першу порцію води залишали у колонці на 15-20 хвилин, перекриваючи потік рідини, для кращої екстракції гліканів.

3. Флуоресцентне маркування антраніловою кислотою (2-АА)

Олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою (Sigma - Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [11]. з деякими модифікаціями. Антранілову кислоту (30мг/мл) розчиняли у суміші 4% (w/v) тригідрату ацетату натрію та 2% (w/v) борної кислоти у метанолі, додавали 45 мг ціаноборгідриду натрію та ретельно перемішували і отримували розчин для маркування. До висушених у концентраторі SpeedVac зразків додавали 30 мкл Milli-Q™ H_2O, 80 мкл розчину для маркування, ретельно перемішували та проводили реакцію впродовж 1 часу при 80^oC. Пробірки охолоджували при кімнатній температурі, додавали 1мл суміші ацетонітрилу у воді (97:3 v/v) та перемішували.

4. Очищення 2-АА-маркованих гліканів

Для очищення маркованих олігосахаридів застосовували твердофазну екстракцію на колонках Spe-ed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) згідно [12] з деякими модифікаціями. Врівноваження колонки проводили 1 мл ацетонітрилу, потім 1 мл Milli-Q™ H_2O та знов 1 мл ацетонітрилу. Олігосахариди після маркування наносили на колонку у суміші ацетонітрилу з водою (97:3 v/v). Колонку промивали сумішшю ацетонітрилу з водою (95:5 v/v). та елюювали глікани 1,5 мл Milli-Q™ H_2O. 2-АА-марковані олігосахариди зберігали при -20^0C.

5. Нормальнофазова високоефективна рідинна хроматографія

Очищені 2АА-марковані олігосахариди поділяли шляхом нормальнофазової високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі [11]. Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Головний недолік паперових носіїв – це низький рівень екстракції з них досліджуваних речовин. Так, екстракція загальної ДНК з цільної крові не перевищує 15-25% [9], трансферину з сироватки -10±0,3% [13]. Наші дослідження показали, що рівень екстракції альбуміну з карточок Гатрі, навіть при застосуванні сонікації, встановлює не більш ніж 25-30% (неопубліковані дані).

Частково гідролізований декстран утворює хроматографічний спектр з представництвом усіх полімерів глюкози у зростаючому порядку від мономеру до 10-14 мономерів в полімері і тому дозволяє пронумерувати кожний пік хроматограми у глюкозних одиницях (ГО) та перевірити рівень екстрагування з

паперових матриксів кожного такого піку. У даній роботі увага зосереджена на ділянці від 1 до 8 мономерів.

Оскільки подальше планується проводити очищення іммобілізованого біоматеріалу, потрібна перевірка впливу реагентів для очищення на кінцевий хроматографічний спектр. Була обрана суміш н-бутанолу, етанолу та Milli-Q™ H_2O, яка широко використовується у паперовій хроматографії вуглеводів, з різним співвідношенням складових - 4:1:1; 4:1: 0,5 та 4:1: 0,25.

Незалежно від носія, суміш у співвідношенні 4:1:1 не розчиняє олігосахариди вищі за трисахариди (4-8 ГО), добре розчиняє моно- (1 ГО) та дисахариди (2 ГО), частково розчиняє трисахариди (3 ГО), які таким чином повністю (1,2 ГО) чи частково (3 ГО) зникають із хроматографічного спектру, що демонструє Рис.1.

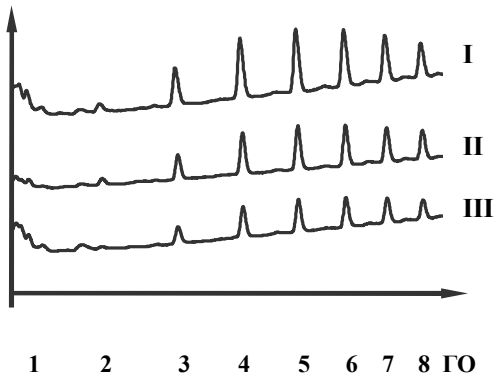

Рис.1. ВЕРХ-спектри декстрану з різних носіїв при застосуванні суміші н-бутанолу, етанолу та Milli-Q™ H_2O у пропорції 4:1:1.

Паперові носії: I - хроматографічний папір, II - диск, III - карточка Гатри.

Тому цю суміш корисно застосовувати у разі необхідності вилучення з біологічного матеріалу моно-, ди- та трисахаридів.

Порівняння спектрів, отриманих після такого очищення, показало, що повнота елюції різна при застосуванні різних носіїв – найвища з хроматографічного паперу, недостовірно нижча ($p>0,05$) з дисків і достовірно нижча ($p<0,001$) з карточок Гатри, що демонструє Рис.2. Рівень елюції з дисків та карточок Гатрі порівнювали з елюцією з найбільш ефективного носія – хроматографічного паперу. Ефективність останнього була прийнята за 100%.

Деяка різниця між хроматографічним папером та дисками, які зроблені з такого ж Whatman- матеріалу, може бути пов’язана із їх різною товщиною. Папір для хроматографії має меншу (0,36 мм) та більш рівномірну по всій площині товщину, що дуже важливо при його використанні у паперовій хроматографії. Диски використовують у антибіотичних дослідженнях, тому вони товстіші – 0,92 мм і не мають високих вимог у рівномірності.

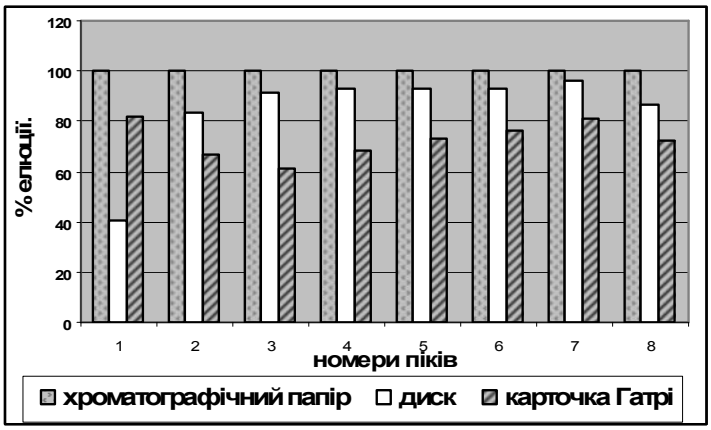

Рис.2. Порівняння ефективності елюції декстрану з різних носіїв. Елюція з хроматографічного паперу прийнята за 100%

Головним складником суміші для очищення, що впливає на зникнення із спектру окремих вуглеводів, є вода. Тому варіювання її часткою від 1 до 0,5 та 0,25 змінює хроматографічний спектр стосовно моно-, ди- та трисахаридів - рис 3. При зменшенні частки води ці вуглеводи пропорційно не вимиваються з паперового носія при очищенні біоматеріалу і тому залишаються у хроматографічному спектрі. Але навіть співвідношення складових 4:1:0,25 не дозволяє повністю зберегти у спектрі концентраційні пропорції 1,2 та 3 піків, про що свідчить наведений рисунок. Тому, якщо ці піки необхідні для дослідження, має сенс вводити коефіцієнт зберігання для кожного з них, використовуючи в якості стандартів спектри іммобілізованого декстрану та декстрану після прямого маркування.

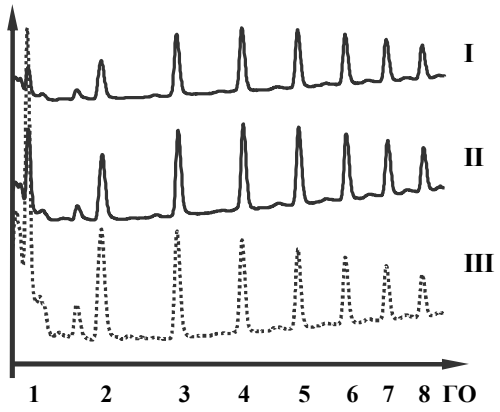

Рис.3. ВЕРХ-спектри декстрану з диску при застосуванні суміші н-бутанолу, етанолу та Milli-Q™ H_2O у пропорції: **I** - 4:1:0,5, **II** - 4:1:0,25 у порівнянні з прямим маркуванням - **III**.

Для встановлення абсолютної повноти елюції отримані з різних носіїв спектри порівнювали зі спектрами декстрану після прямого, без нанесення на папір, 2АА-маркування. Незалежно від типу паперового матриксу, чим вище молекулярна маса полімеру глюкози, тим краще він елююється з носія – Рис.4.

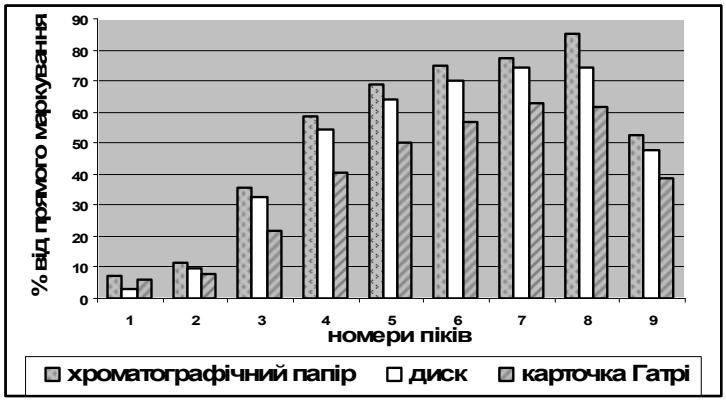

Рис.4. Порівняння ефективності елюції декстрану з різних носіїв відносно прямого маркування. Різниця вірогідна для хроматографічного паперу при $p < 0,01$, для дисків та карточок Гатри при $p<0,001$.

Для покращення екстрагування застосовували попередню обробку паперових носіїв. Їх промивали до нанесення декстрану, а потім висушували. Крім того, перевіряли вплив повного чи часткового просушування нанесеного на папір зразка. Однак усі ці заходи не впливали на хроматографічний спектр і не можуть бути рекомендовані для підвищення екстракції.

Оскільки планується вивчати олігосахариди сечі, то перевірили, чи змінює хроматографічний спектр сечовина – Рис.5.

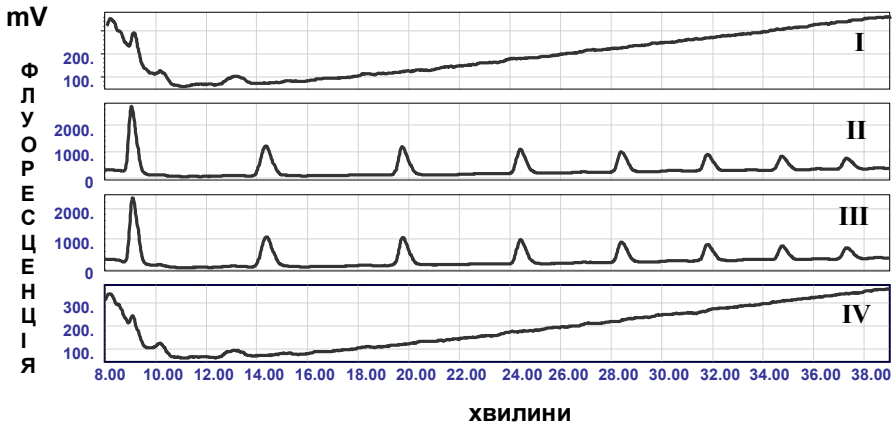

Рис.5. Вплив сечовини на ВЕРХ-спектр гідролізованого декстрану:

I - вода, II - декстран у воді, III - декстран у сечовому буфері, IV - сечовий буфер

Для цього гідролізований декстран розчиняли у сечовому буфері та, крім того, перевіряли спектр самого концентрованого сечового буферу в порівнянні з водою. Як свідчить рисунок, сечовий буфер не екстрагує додаткових речовин з паперу, які б впливали на хроматографічний спектр олігосахаридів, та не змінює рівень екстракції їх з паперових носіїв.

Використання хроматографічного паперу для збору та транспортування зразків дозволяє провести попереднє очищення та частковий розподіл вуглеводів шляхом паперової хроматографії, але при цьому може втрачатися частина матеріалу. Паперова хроматографія 2-АА-маркованих гліканів з трансферину показала, що при ретельному дотриманні процедур втрати можуть бути мінімальні і не перевищувати 5-10% – Рис.6.

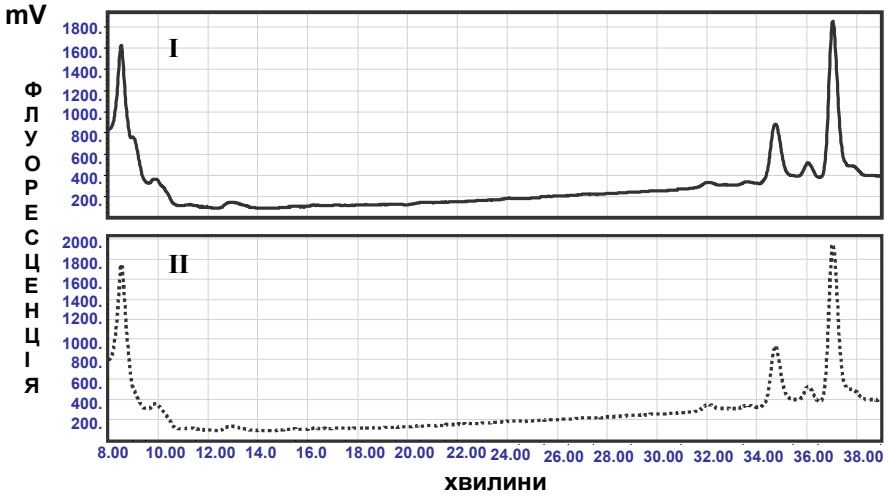

Рис.6. ВЕРХ-спектри гліканів трансферину після паперової хроматографії та після прямого маркування: I - паперова хроматографія, II - пряме маркування

ВИСНОВКИ

1. Порівняння якості екстракції олігосахаридів з хроматографічних дисків, карточок Гатри чи хроматографічного паперу показало, що усі вони можуть застосовуватися для іммобілізації біологічної матеріалу при вивченні ВЕРХ-спектрів олігосахаридів, але найкращий результат дає хроматографічний папір. Як показав аналіз вуглеводів з трансферину, більш ніж 90% високомолекулярних олігосахаридів може бути елюювано з цього носія.
2. Попередня обробка дисків, карточок Гатри чи хроматографічного паперу (промивка та сушка до та після нанесення декстрану) не впливає на якість екстракції гліканів.
3. Застосування сечового буферу замість води для розчинення досліджуваних зразків гідролізованого декстрану чи олігосахаридів трансферину також не оказувало дії ні на рівень екстракції з паперових носіїв, ні на якість ВЕРХ-

спектрів. Це дозволить використати паперові носії для вивчення ВЕРХ-спектрів олігосахаридів сечі.

4. Головний вплив на рівень екстракції мали пропорції суміші (н-бутанол, етанол та Milli-Q™ H_2O) для попереднього очищення іммобілізованого матеріалу. Зменшення частки води з 1 до 0,25 дозволило елюювати весь склад гідролізованого декстрану по всій шкалі піків та всі вуглеводи з трансферину. Коли ж є необхідність вилучити моно-, ди- та частково трисахариди із матеріалу, що аналізується, краще використовувати цю суміш у пропорції 4:1:1.

ПОДЯКИ

Роботу було виконано при підтримці міжнародного гранту EMBO (ASTF209-2007) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (м.Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D.Butters).

Список літератури

1. Guthrie R. A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants/Guthrie R., Susi A. // Pediatrics – 1963.-V.32.-P.338-343.
2. Mei J.V. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens/Mei J.V., Alexander J.R., Adam B.W., Hannon W.H.//J Nutr.-2001.-131,№5.-P.1631S-1636S.
3. Матулевич С.А. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмела как часть системы медико-генетической помощи населению: автореф. дис. на соискание науч. степени докт.мед. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / С.А.Матулевич. - Москва, 2009.- 44 с
4. Jinks D.C. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening/ Jinks D.C., Minter M., Tarver D.A., Vanderford M. [et al.] // Hum. Genet.-1989.-№81.-P.363-366.
5. McCabe E.R.B. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters:potential applications to newborn screening /McCabe E.R.B., Huang S-Z, Seltzer W-K, Law ML. // Hum.Genet. -1987.-№75.-P.213-216.
6. Zhong K.J.Y. Comparison of IsoCode STIX and FTA Gene Guard Collection Matrices as Whole-Blood Storage and Processing Devices for Diagnosis of Malaria by PCR / Zhong K.J.Y., Salas C.J., Shafer R., Gubanov A. [et al.]//J. Clin Microbiol -2001.- 39, №.3.- P.1195-1196.
7. Chaisomchit S. Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper/Chaisomchit S., Wichajarn R., Janejai N., Chareonsiriwatana W.//Southeast Asian J Trop Med Public Health.-2005.- 36, №1.- P.270-273.
8. Searles N.S.Risk of brain tumors in children and susceptibility to organophosphorus insecticides: the potential role of paraoxonase (PON1)/ Searles N.S., Mueller B.A., De Roos A.J., Viernes H.M. [et al.] // Environ Health Perspect -2005.- V.113.-P.909–913.
9. Hollegaard M.V. Genotyping whole-genome-amplified DNA from 3- to 25-year-old neonatal dried blood spot samples with reference to fresh genomic DNA/ Hollegaard M.V., Thorsen P., Norgaard-Pedersen B., Hougaard D.M. //Electrophoresis -2009.-30, №14.-P.2532-2535.
10. Ramsay S.L. Determination of monosaccharides and disaccharides in mucopolysaccharidoses patients by electrospray ionisation mass spectrometry/ Ramsay S.L., Meikle P.J., Hopwood J.J. // Mol Genet Metab. -2003. – 78, №3. – P.193–204.
11. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling / Neville D.C., Coquard V., Priestman D.A., te Vruchte D.J.M. [et al.]. //Anal Biochem. – 2004. – Vol. 331. – P. 275–282.
12. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition / Alonzi D.S., Neville D.C., Lachman R.H., Dwek R.A. [et al.] // Biochem J. – 2008. – 409, №2. – P.571–580.

13. Use of serum on Guthrie cards in screening for congenital disorders of glycosylation / H.A. Carchon, C.N. Ndosimao, S. Van Aerschot [et al.] // Clin Chem – 2006. – Vol. 52. – P.774–775.

Письменецкая И.Ю. Хроматографический анализ иммобилизированных на бумажных носителях модельных олигосахаридов/ И.Ю. Письменецкая, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 4. – С.183-191

Специально разработанные бумажные субстраты очень удобны для сбора, хранения и пересылки биологических образцов и широко используются (в основном для крови и сыворотки) по всему миру. В данной работе сравнивался уровень экстрагирования углеводов с разных бумажных носителей (карточек Гатри, хроматографических дисков Grade AA Discs и хроматографической бумаги 3mm Whatman) для оценки их использования с этой же целью при изучении ВЭЖХ-спектров олигосахаридов. Хроматографические профили гидролизированного декстрана и гликанов трансферрина показали, что все исследованные матриксы позволяют получить адекватные спектры. Однако, более высокий уровень экстракции с хроматографической бумаги и возможность использования ее для предварительной очистки иммобилизированного материала указывают на этот носитель, как лучшую альтернативу в случае необходимости.

Ключевые слова: карточки Гатри, экстрагирование гликанов с бумажных носителей, ВЭЖХ-анализ олигосахаридов.

Pismenetskaya I.U. Chromatographical analysis of model oligosaccharides immobilized on paper matrixes / I.U. Pismenetskaya, T.D. Butters // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 4. – P. 183-191.

Since various paper matrixes are very helpful for collection, keeping and sending of different biological samples and widely used (mostly for blood and serum) all over the world, we compared levels of carbohydrate recovering from several paper substrates (Guthrie cards, Grade AA Discs, Whatman chromatography paper) to evaluate their appropriateness for the same purposes in the case of glycan investigations. HPLC profiles of hydrolyzed dextran and N-glycans of transferrin showed that all studied matrixes can be used. Nevertheless, better glycan recovering from Whatman chromatography as well as the possibility of using the same paper sheet for preliminary paper chromatography of the samples, Whatman chromatography paper could give the best alternative.

Keywords: Guthrie cards, glycan recovering from paper matrixes, HPLC of oligosaccharides.

Поступила в редакцию 13.11.2011 г.