**3. MATERIJALI I METODE**

**3.1 Materijali**

|  |  |
| --- | --- |
| KEMIJSKA TVAR | PROIZVOĐAČ |
| 2-merkaptoetanol (βME) | Acros Organics |
| Dinatrijev hidrogenfosfat (Na2HPO4) | Acros Organics |
| Etanol (EtOH) | Carlo Erba |
| Natrijev klorid (NaCl) | Carlo Erba |
| Kalijev klorid (KCl) | EMD Milipore |
| Acetonitril - LC-MS kvalitete (ACN) | J.T.Baker |
| Acetonitril - HPLC kvalitete (ACN) | J.T.Baker |
| Metanol (MeOH) | J.T.Baker |
| Natrijev hidroksid (NaOH) | Kemika |
| Mravlja kiselina 98-100% (HCOOH) | Merck |
| Octena kiselina (HAc) | Merck |
| Amonijev formijat - LC-MS kvalitete | Sigma-Aldrich |
| 2-pikolinboran (2-PB) | Sigma-Aldrich |
| Dimetil sulfoksid | Sigma-Aldrich |
| Hidroksibenzotriazol monohidrat (HOBt) | Sigma-Aldrich |
| Igepal CA-630 | Sigma-Aldrich |
| Kalijev dihidrogenfosfat (KH2PO4) | Sigma-Aldrich |
| Kloroform (CHCl3) | Sigma-Aldrich |
| Natrijev azid (NaN3) | Sigma-Aldrich |
| Natrijev dodecil-sulfat (SDS) | Sigma-Aldrich |
| Prokainamid hidroklorid | Sigma-Aldrich |
| Trifluoroctena kiselina (TFA) | Sigma-Aldrich |

|  |  |
| --- | --- |
| ENZIMI | PROIZVOĐAČ |
| Peptidna N-glikozidaza F (PNGase F) 10U/μL | Promega |

|  |  |
| --- | --- |
| OTOPINE I PUFERI | PRIPRAVA |
| amonijev formijat, 50mM, pH 4.4 (UPLC kvalitete) | 3.153 g krutog amonijeva formijata otopi se u 1L ultra-čiste vode, pH otopine podesi se dodavanjem HCOOH (98-100%) do postizanja pH 4.4. |
| amonijev formijat, 2M, pH 4,4 | 300 ml hladne (ledene) ultra-čiste vode prenese se u bocu od 500 ml uz dodatak 37,75 ml HCOOH. Otopini se uz miješanje polako dodaje 75 ml NH4OH do postizanja pH 4,2. Smjesa se ostavi preko noći na sobnoj temperaturi te se doda ostatak NH4OH do pH 4,4. Ukupni volumen pufera iznosi 500 ml. Otopina se filtrira kroz 0.2 µm PES membranu i puni u tamnu bocu koja se čuva pri sobnoj temperaturi |
| amonijev formijat, 100mM, pH 4,4 | 50 mL pripremljene 2M otopine amonijeva formijata (pH 4.4) prenese se u volumetrijsku posudu volumena 1L i dopuni do konačnog volumena 1L ultra-čistom vodom |
| 50% metanol 4°C (V/V) | 100 ml MeOH pomiješa se s 100ml ultra-čiste vode. Otopina se čuva u hladnjaku na 4°C. |
| 70% etanol (V/V) | 70 ml EtOH pomiješa se s 30 ml ultra-čiste vode |
| 96 % acetonitril (V/V) | 96 ml ACN pomiješa se s 4 ml ultra-čiste vode, otopina se čuva u hladnjaku na 4°C. |
| 85 % acetonitril (V/V) | 85 ml ACN pomiješa se s 15 ml ultra-čiste vode. |
| 85 % acetonitril (V/V) 1% trifluoroctena kiselina, TFA (m/V) | 1 mL trifluoroctene kiseline doda se u 100 mL 85% otopine ACN i miješa do potpunog otapanja. |
| 10% natrijev dodecil-sulfat (m/V) | 1g SDS otopi se u 10 ml ultračiste vode, nakon vorteksiranja i potpunog otapanja otopina se čuva na 37 °C. |
| 10 % Igepal CA-630 (V/V) | 1ml Igepal-630 pomiješa se s 9 ml ultra-čiste vode. Otopina se čuva u hladnjaku na 4°C. |
| 10 % Natrijev azid (m/V) | 1g natrijeva azida otopi se u 10ml ultra-čiste vode. |
| 30 % octena kiselina u dimetil-sulfoksidu, DMSO (V/V) | 750 μL octene kiseline pomiješa se s 1750 μL DMSO za ukupni volumen 2500 μL |
| otopina prokainamida s pikolin boranom (ProA) | 0,83 mg prokainamid hidroklorida doda se 50 μL otopini 30% octene kiseline u DMSO, smjesa se miješa do potpunog otapanja. U homogenu mjesu doda se 2,24 mg pikolin borana - smjesa se miješa do potpunog otapanja. Volumen odgovara količini potrebnoj za jedan uzorak. |
| PBS 10x otopina | Priprema 1L otopine započinje dodavanjem NaCl (80,028 g), Na2HPO4 (13,832 g), KH2PO4 (2,964 g) i KCl (1,976 g) u 800 ml destilirane vode u staklenoj čaši koju se nakon dodavanja kemikalija stavlja magnetski mješač, čaša se pokriva Parafilmom, stavlja na magnetski mješač i miješa do potpunog otapanja. Nakon otapanja smjesa se prebacuje u menzuru, nadopunjava vodom do ukupnog volumena od 1L i dobro promiješa protresanjem. Dobivena smjesa filtrira se kroz 0.2 μm filtar u čistu staklenu bocu. Po potrebi podesiti pH 6.6-6.8. Otopina se čuva u hladnjaku na 4°C. |
| PBS 1x otpina | 100 ml PBS 10x otopine prenese se u staklenu čašu od 1L, čaša se dopuni vodom do volumena 0.9L. Podešavanje pH vrijednosti na 7.4 vrši se otopinom 1M NaOH. Pufer se prenese u menzuru i dopuni vodom do konačnog volumena od 1L. Otopina se filtrira kroz 0.2 μm filtar u čistu bocu i čuva u hladnjaku na 4 °C. |
| suspenzija poroznog grafita 50mg/mL | 500 mg grafita uzetog s Extract-Clean™ SPE Carbograph kolone pomiješati s 10 ml vode (suspenzija je koncentracije 50 mg/mL) |

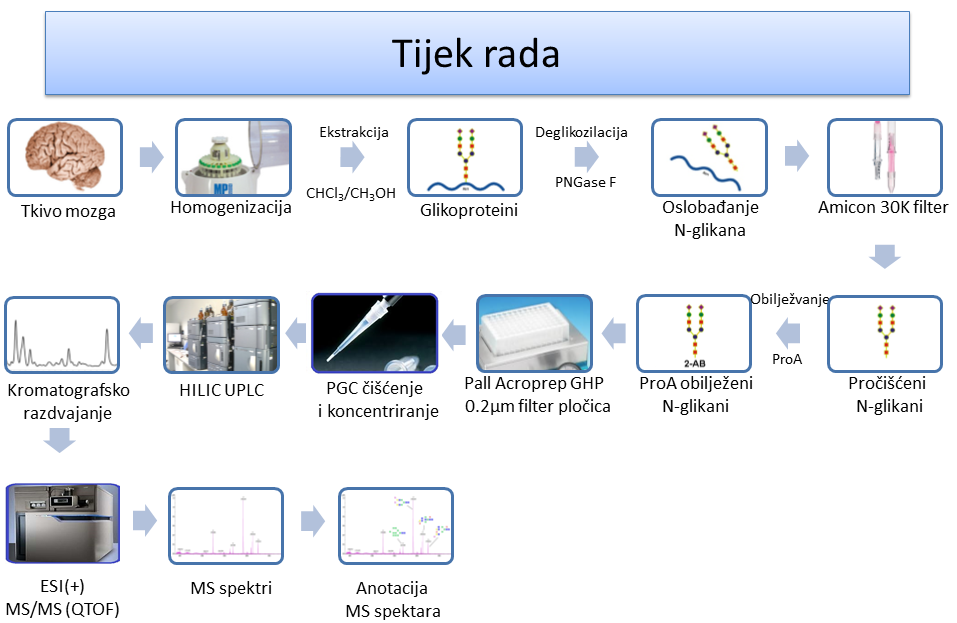
|  |  |
| --- | --- |
| OPREMA | PROIZDOĐAČ |
| Lysing matrix D -  1.4 mm keramičke kuglice (Vickers čvrstoće 800) | MP Biomedicals |
| FastPrep® - 24 - Homogenizator | MP Biomedicals |
| Savant™ SC210 SpeedVac™ + RVT400-230  vakuum koncentrator | Thermo Scientific |
| Pipet-Lite XLS - mikropipete | Rainin |
| RSLab - 6PRO - vorteks mješač | RSLab |
| MiniSpin® Pro | Eppendorf |
| Centrifuge 5804 - centrifuga | Eppendorf |
| Themomixer® comfort - mješač s grijačem | Eppendorf |
| Water System, Ultrapure, Millipore® Synergy® with UV -  sustav za pročišćavanje vode | Hach |
| 1mL AcroPrep™ GHP membranske filtar pločice s 96 jažica (0.2 μm membrana) | Pall |
| Vakuumski usini razvodnik  (Multi-Well Plate Vacuum Manifold) | Pall |
| Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter (NMWL: 30kDa) - centrifugalni filtar s veličinom pora koja onemogućava prolaz česticama > 30kDa | Merck Milipore Ltd. |
| C18 ZipTip® nastavak pipete | Merck |
| Extract-Clean™ SPE Carbograph PGC kolona | Grace |
| Acquity UPLC Glycan BEH Amide - kromatografska kolona  130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm | Waters |
| Acquity UPLC instrument H-klase s fluorescentnim detektorom | Waters |
| SYNAPT G2-Si - maseni spektrometar | Waters |

**3.2 Uzorci**

Uzorci mozga štakora primljeni su od Jedinice za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada gdje su životinje žrtvovane na human način prema važećim smjernicama. Istraživanje obuhvaća 5 odraslih jedinki štakora, 3 jedinke postnatalne starosti 48 sati i 4 jedinke postnatalne starosti 24 sata. Mlade jedinke različite starosti potječu iz različitih legla. Uzorci su čuvani u zamrzivaču na -20°C bez ikakvih dodataka do trenutka uporabe u tubicama volumena 15 mL.

**3.3 Priprema N-glikana mozga za UPLC-ESI-MS analizu**

Metoda pripreme N-glikana mozga za analizu, uz izmjene, preuzeta je iz (Klarić i Gudelj, 2016), a sastoji se od metanolno-kloroformne izolacije ukupnih proteina iz homogenata tkiva (cijelokupna kortikalna regija mozga u slučaju novorođenih mladih mužjaka i ženki štakora starosti 24 ili 48 sati - zbog male ukupne količine tkiva; lijeva kortikalna regija mozga u slučaju odraslih ženki štakora) nakon čega slijede uzastopni koraci pročišćavanja proteina. Pročišćeni proteini podvrgavaju se denaturaciji u prisustvu natrijeva dodecil-sulfata i 2-merkaptoetanola (uz povišenu temperaturu) nakon koje slijedi enzimska deglikozilacija PNGazom F kroz sljedećih 48 sati. Nakon pročišćavanja reducirajući krajevi reakcijom reduktivne aminacije (Ruhaak i sur, 2010) označavaju se fluorescentnom sondom te dodatno pročišćavaju da se ukloni suvišak reagensa. Ovako pripremljeni uzorci analiziraju se niže opisanom kromatografijom hidrofilnih interakcija ultra-visoke učinkovitosti uparenom s fluorescencijskom detekcijom i "on-line" elektrosprej ionizacijskom spektrometrijom masa u tandemskom načinu rada (HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS/MS). **Slika 3.1** sažeto prikazuje tijek rada.

****

**Slika 3.1** Sažeti vizualni prikaz koraka prilikom izvođenja modificirane metode preuzete iz (Klarić i Gudelj, 2016)

**3.3.1 Homogenizacija tkiva**

Postupak koristi ultra-čistu vodu (18.2 ΜΩ cm at 25°C), 50% vodena otopinu metanola (MeOH 50%) i kloroform (CHCl3) ohlađene na 4 °C. U tubicu od 2mL umetne se uzorak tkiva i doda Lysing Matrix D - da bi se postigla potpuna homogenizacija potrebno je 5 do 6 kuglica na svakih 25 mg tkiva. U isu tubicu doda se ohlađena ultra-čista voda (4 °C), tubica se zatvori i čep se obloži slojem parafilma da se spriječi gubitak uzorka. Ovako pripremljene tubice premjeste se u FastPrep®-24 homogenizator tkiva. Homogenizacija se vrši na sljedećim postavkama: brzina: 6; trajanje: 40s; dok se ne postigne mliječna boja uzorka. Supernatant (bez kuglica) premjesti se u 15 mL (tzv. "Falcon") tubicu. Tubica u kojoj je vršena homogenizacija ispere se s 1mL MeOH 100% (4 °C), a sadržaj (bez kuglica) prenese se u prethodno spomenutu 15 mL tubicu. Ovaj korak ponovi se još jednom s 0.75 mL MeOH 50% (4 °C) nakon čega je 15mL tubicu potrebno vorteksirati (Klarić i Gudelj, 2016).

**3.3.2. Izolacija i pročišćavanje proteina**

U 15mL tubicu doda se 3.25mL kloroforma (CHCl3) ohlađenog na 4 °C. Tubica se vorteksira i centrifugira na 4500 x g kroz 30 minuta. Nakon centrifugiranja vidljive su dvije faze: gornja faza - metanol, voda, hidrofilne nečistoće; i donja hidrofobna faza. Na njihovoj interfazi vidljiv je disk koji sadržava ukupne proteine uzorka. Gornja faza oprezno se ukloni iz 15mL tubice, a zatim se u istu tubicu doda volumen MeOH 50% jednak preostalom volumenu donje faze. Smjesa se vorteksira i centrifugira na 4500 x g kroz 30 minuta. Prethodne korake ponoviti još jednom.

U sljedećoj fazi postupka, nakon centrifugiranja, potrebno je ukloniti gornju fazu - kao i u prethodnom koraku - te dodati volumen čistog metanola (MeOH 100%) ohlađenog na 4 °C u volumenu jednakom volumenu preostale donje faze. Smjesa se vorteksira i centirfugira pri 4500 x g kroz 30 minuta da se dobije talog proteina na dnu 15 mL tubice. Nakon centrifugiranja supernatant se odstrani, a talog se resuspendira u 500 µL MeOH 100% (4 °C) i pomoću širokog nastavka pipete (koji može biti dodatno obrezan) premjesti se u čistu 2mL tubicu. 15mL tubica dodatno se ispere s 500 µL MeOH 100% (4 °C) i sadržaj se prenese u 2mL tubicu. 2mL tubica centrifugira se na 13000 okretaja (rpm) kroz 15 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant se ukloni, a talogu se doda 1 mL MeOH (4 °C). Tubica se vorteksira, a nakon toga centrifugira na 13000 rpm kroz 15 minuta. Koraci uklanjanja supernatanta nakon centrifugiranja, dodavanje novog volumena MeOH 100% (4 °C), centrifugiranja na 13000 rpm kroz 15 min i ponovnog uklanjanja supernatanta ponove se još 2 puta. Naposljetku, tubice s talogom proteina suše se u vakuum koncentratoru kroz 10 minuta s poklopcem u otvorenom položaju (Klarić i Gudelj, 2016).

**3.3.3. Enzimsko oslobađanje N-glikana PNGazom F i pročišćavanje slobodnih N-glikana**

Osušeni talog proteina lagano se zdrobi suhim nastavkom za pipetu. U istu tubicu doda se 1mL PBS da se talog resuspendira. U tubicu s resuspendiranim talogom doda se 2-merkaptoetanol (βME, 6 µL) do konačne koncentracije 0.5% (V/V) i 10% otopina natrijeva dodecil-sulfat do konačne koncentracije 0.57% (m/V, 37 µL). Smjesa se vorteksira i inkubira 10 minuta pri 95 °C uz treskanje u Themomixer®-u. Nakon inkubacije, tubicu s uzorkom potrebno je ostaviti na ledu ili u zamrzivaču na 5 minuta. Potom, u tubicu se dodaje 130 µL 10% otopine Igepal CA - 630 do konačne koncentracije 1% i 15 µL 10% otopine natrijeva azida do končne koncentracije 0.12%. Enzim PNGaza F dodaje se volumenu 0.5 µL (5 U), tubica se vorteksira, čep obloži parafilmom i smjesa se inkubira na 37 °C preko noći. Sljedeći dan u smjesu se doda još 0.5 µL PNGaze F, tubica se vorteksira, čep omota parafilmom i smjesa se inkubira preko noći na 37 °C.

Oslobođeni N-glikani pročišćavaju se Amicon® Ultra-2 centrifugalnim filterima koji ograničavaju prolazak česticama većim od 30kDa (NMWL: 30 000 Da). Centrifugalni filter priprema se dodavanjem 1mL ultra-čiste vode i centrifugiranjem pri 2450 x g kroz 5 minuta. Nakon centrifugiranja eluat se ukloni, a centrifugalni filtar napuni se s još 1mL ultra-čiste vode i centrifugira pri 2450 x g kroz 5 minuta. Nakon ovog koraka centrifugalni filtar spreman je za uporabu.

Ukupni volumen smjese deglikozilacijske reakcije prenese se iz tubice u kojoj je vršena reakcija u za to predviđeni otvor centrifugalnog filtra i centrifugira pri 4000 x g kroz 20 minuta. Nakon centrifugiranja, tubica u kojoj se vršila reakcija dodatno se ispere s 500 µL ultra-čiste vode. Sadržaj se prenese u centrifugalni filtar koji se centrifugira pri 4000 x g kroz 15 minuta. Prethodna dva koraka ispiranja i centrifugiranja još jednom se ponove. Nakon posljednjeg centrifugiranja, spremnik za sakupljanje eluata odvoji se od ostatka centrifugalnog filtra i suši se kroz 2-4 sata u vakuum koncentratoru. Nakon toga, sadržaj donjeg dijela spreminka za sakupljanje eluata premjesti se u 2mL tubicu, spremnik se ispere 2 puta s 200 µL ultra-čiste vode, a sadržaj se nakon svakog ispranja prenese u 2mL tubicu u koju je premješten prvobitni eluat. Sadržaj tubica uparava se do suha preko noći u vakuum koncentratoru (Klarić i Gudelj, 2016).

**3.3.4. Fluorescentno obilježavanje reducirajućih krajeva slobodnih N-glikana i pročišćavanje**

U tubice s preko noći sušenim slobodnim N-glikanima doda se 100 µL ultra-čiste vode i sadržaj se resuspendira. Ovako resuspendirani slobodni N-glikani prenesu se na pločicu s 96 jažica da se ubrza postupak obilježavanja i uklanjanja viška reagensa, uzorci se stavljaju pojedinačno - stavlja se po 1 uzorak u 1 jažicu. U svaku jažicu s uzorkom stavlja se 50 µL unaprijed pripremljene otopine prokainamida s pikolin boranom (ProA) za obilježavanje reducirajućih krajeva slobodnih N-glikana reakcijom reduktivne aminacije (Ruhaak i sur, 2010) (**Slika 3.1**). Prokainamid služi kao fluorescentna sonda, a pikolin boran kao reducens.

Nakon dodatka 50 µL ProA sadržaj jažice oprezno se promiješa pipetiranjem. Pločica s jažicama zapečati se ljepljvom trakom i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano treskanje, a potom inkubira 2 sata pri 65 °C. Po završetku inkubacije pločice se ostave hladiti 30 minuta na sobnoj temperaturi (Klarić i Gudelj, 2016).

AcroPrep™ GHP hidrofilne membranske filtar pločice s 96 jažica s 0.2 μm membranom (GHP-pločica) pripremaju se za uporabu dodavanjem 200 µL 70% otopine etanola u svaku korištenu jažicu i provlačenjem sadržaja jažice pod sniženim tlakom kroz filtar pomoću uređaja za filtiranje pod sniženim tlakom (engl. *Vacuum manifold*). Korišten je podtlak oko 25 mm Hg. Filtrat se baca u otpad. Zatim se u jažicu doda 200 ultra-čiste vode i sadržaj jažice provuče kroz filtar na isti način kao u prethodnom koraku. Priprema pločice završava dodavanjem 200 µL 96% otopine ACN u jažicu i provlačenjem kroz filtar kao u prethodna 2 koraka.

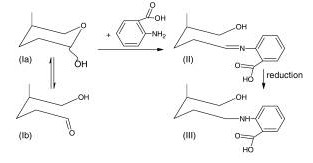
Uzorcima N-glikana doda se po 800 µL 100% ACN (4°C), smjesa se promiješa pipetiranjem, a ukupni volumen svakog uzorka prenese se na ranije pripremljenu GHP-pločicu. Pločica se inkubira 2 minute na sobnoj temperaturi. Sadržaj jažice provlači se kroz filtar pri sniženom tlaku, filtrat se baca. Nakon filtriranja svakom uzorku dodaje se 200 µL 96% ACN (4°C), sadržaj jažice se filtrira, a filtrat baca. Ova dva koraka ponove se još 3 puta.

Zatim, GHP-pločica postavi se na stalak s jažicama volumena 2 mL, a uzorcima na GHP-pločici doda se 200 µL 96% ACN (4°C). Sve se centrifugira pri 165 x g kroz 5 minuta. Filtrat se odbacuje.

Nakon centrifugiranja GHP-pločica stavlja se na pločicu za sakupljanje uzoraka s 96 jažica, svakom uzorku na GHP-pločici doda se 90 µL ultra-čiste vode i ostavi 15 minuta pri sobnoj temperaturi uz lagano treskanje.

Nakon 15 minuta, GHP-pločica i pločica za sakupljanje uzoraka centrifugiraju se pri 165 x g kroz 5 minuta. Glikani u filtratu sakupljaju se u jažice pločice za sakupljanje uzoraka. Ovi koraci ponove se još dva puta. Po završetku postupka, jažice pločice za sakupljanje uzoraka zapečate se plastičnim čepovima. Ovako pripremljeni uzorci obilježenih N-glikana mogu se čuvati na -20 °C do uporabe (Klarić i Gudelj, 2016).

Korištenje prokainamida opravdano je činjenicom da N-glikani obilježeni ovom sondom zadržavaju sposobnost dobrog razdvajanja pri uvjetima tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti uparene s fluorescencijskom detekcijom (UPLC-FLR) usporedivu s češće korištenom metodom obilježavanja 2-aminobenzamidom (2-AB) uz veći intenzitet kromatografskih pikova, što omogućava učinkovitiju integraciju pikova nižeg intenziteta (Kozak i sur, 2015). Osim toga, N-glikani obilježeni prokainamidom pokazuju 30 puta veći intenzitet signala pri uvjetima elektrosprej ionizacijske masene spektrometrije (ESI-MS) u usporedbi s 2-AB. Ova činjenica može se objasniti većim afinitetom za proton (H+) zbog prisustva 2-(dietilamino) etilne skupine u molekuli prokainamida (Kozak i sur, 2015).



**Slika 3.2** Prikaz reakcije reduktivne aminacije - *obilježavanje reducirajućeg kraja N-glikana. Reakcijom -NH2 skupine fluorescentne boje (prikazan 2-aminobenzamid) s aldehidnom skupnom molekule N-glikana (reducirajući kraj) nastaje imid. U sljedećem stupnju reakcije nastali imid se reducira (pikolin boranom) čime se stabilizira veza između reducirajućeg kraja N-glikana i fluorescentne boje. (preuzeto iz i modificirano prema* Ruhaak i sur, 2010*).*

**3.4. HILIC-UPLC-FLR analiza prokainamidom obilježenih N-glikana**

15 µL uzorka N-glikana obilježenih fluorescentnom sondom (ProA) resuspendira se u 35 µL ACN. Pripemljeni uzorci razdvajaju se HILIC-UPLC metodom u Waters Acquity UPLC instrumentu H-klase s fluorescentnim detektorom na Acquity UPLC Glycan BEH-amid kromatografskoj koloni sljedećih specifikacija: veličina pore čestica čvrste faze: 130 Å; promjer čestica čvrste faze: 1.7 μm; dimenzije kolone: 2.1 x 150 mm; početni uvjeti protoka otapala za analizu: 0.561 mL/min s omjerom 27 % 100 mM natrijeva formijata pH 4.4 (otapalo A) i 73% 100% ACN LS-MS kvalitete (otapalo B); uvjeti linearnog gradijenta postavljeni su na 27-29.5% otapala A kroz prvih 15 minuta analize, a zatim 29.5-38,7% otapala A kroz sljedećih 80 minuta; temperatura kolone: 25 °C; temperatura uzorka u uređaju za automatsko uzorkovanje: 10 °C; injektirani volumen uzorka: 40 µL. Preuzeto i modificirano prema (Klarić i Gudelj, 2016). Detekcija razdvojenih N-glikana vrši se FLR-detektorom (određivanje retencijskog vremena pojedinačnih pikova) podešenim na valne duljine: 310 nm za ekscitaciju i 370 nm za emisiju zračenja (Kozak i sur, 2015). Integracija površine ispod krivulje kromatograma za svaki eluirani pik izvršena je pomoću Waters Empower 3 paketa za obradu kromatografskih podataka.

**3.5 PGC pročišćavanje i koncentriranje obilježenih N-glikana**

Grafitne čestice uklone se iz Extract-Clean™ SPE Carbograph PGC kolone i koriste za pripremu metanolne (MeOH) suspenzije grafita konačne koncentracije 50 mg/mL u prikladnom laboratorijskom posuđu. Pripravljena suspenzija sabija se u PGC mikrokolonu grafita iznad C18 mikrokolone unutar ZipTip® nastavka pipete apliciranjem 50 μm (oko 5 mg grafita) pripremljene metanolne suspenzije (50 mg/mL) grafita u pripremljeni ZipTip® postavljen u mikrotubicu prikladnog volumena (1 mL) i centrifugira 30 sekundi pri 2000x g. Centrifugiranjem se formira PGC mikrokolona i uklanjaju sitne čestice PGC. Pripravljena PGC mikrokolona priprema se za uporabu ispiranjem s 50 μL ACN s 0.1% TFA i centrifugiranjem 30 sekundi pri 2000x g, eluat se odbacuje. Postupak se ponovi. Zatim se kolona ispire s 50 μL ultra-čiste vode s 0.1% TFA i centrifugira pri 2000x g 30 sekundi, eluat se odbacuje. Korak se ponovi.

Na pripremljene PGC mikrokolone nanese se 60 μL otopine uzorka obilježenih N-glikana, centrifugira se 30 sekundi pri 2000x g, a eluat se baca. Postupak nanošenja uzorka ponavlja se dok se ne aplicira sav uzorak – u ovom slučaju korišteno je 100 μL. U ovom trenutku mikrokolona sadrži vezane N-glikane koji se pročišćavaju s 60 μL ultra-čiste vode. Korak pročišćavanja može se ponoviti više puta, ovisno o potrebi.

Ovako pročišćeni i ukoncentrirani obilježeni N-glikani eluiraju se s PGC mikrokolone uz 40 μL 73 % ACN u 100mM amonijevom formijatu (pH 4.4). Eluat se prebacuje u posudice za HPLC analizu uz dodatak 10 μL 100% ACN. Postupak je vršen prema (Jensen i sur, 2012) uz manje modifikacije.

**3.6 HILIC-UPLC-FLR-ESI-MS/MS analiza prokainamidom obilježenih N-glikana**

Priprema uzoraka za analizu i kromatografsko razdvajanje N-glikana vrši se na način opisanom u poglavlju 3.4 uz volumen injektiranja od 30 μL. Nakon razdvajanja, eluat se prosljeđuje se na priključeni *("on-line"*) Waters SYNAPT G2-Si maseni spektrometar u ESI(+) načinu rada. Uvjeti rada stroja su sljedeći: raspon snimljenih masa: 500-3000 Da; protok plina za desolvataciju: 800 L/h; temperatura desolvatacije 350 °C; napon kapilare: 3.0 kV; temperatura izvora: 120 °C; brzina infuzije uzorka; 5μL/min; , broj odabranih iona prekursora za fragmentaciju: 2; način rada povećane rezolucije; raspon snimljenih masa pri fragmentacijskoj analizi 100-3000 Da. Kolizijska energija – kontrola kolizijske energije: Trap CE opcija; rampa (gradijent): 7-10 V za molekule niske molekulske masem, 103-111 V za molekule visoke molekulske mase.

**3.7 Određivanje pretpostavljenih struktura N-glikana**

Pretpostavljene strukture N-glikana određivane su iz masenih spektara pomoću *Glycomod* bioinformatičkog sustava (dostupno na https://web.expasy.org/glycomod/) (Cooper i sur, 2001) na način opisan u (Cooper i sur, 2003). Ukratko, navedeni softver omogućava izračunavanje svih mogućih kompozicija glikana (mogući broj pojedinih monomera u strukturi) iz esperimentalnih masa glikana dobivenih analizom masenih spektara (Cooper i sur, 2001). Softver omogućava definiranje mase (Da) molekule kojom su analizirani glikani derivatizirani, definiranje vrste i stanja naboja adukta koji nastaje pri uvjetima analize masenim spektrometrom. (Cooper i sur, 2003). U slučaju postojanja izračunatog glikana čija je masa približno jednaka eksperimentalno dobivenoj masi (alat omogućava definiranje veličine pogreške; korištena je maksimalna pogreška od 0.5Da) alat registrira postojanje para: [teoretska masa (Da) - eksperimentalna masa (Da)] te se korisniku prikazuje tablica kompozicija glikana koje posjeduju specifičnu izračunatu masu uz odstupanje eksperimentalne mase od terijski izračunate mase (Cooper i sur, 2003). Koristeći opća znanja glikobiologije pri analizi iona prekursora, moguće je iz pretraživanja sustavom *Glycomod* isključiti izračunate strukture koje se ne pojavljuju u prirodi ili nisu relevantne za tkivo ispitivane vrste ograničavanjem broja pojavljivanja određenog monomera u strukturi glikana ili potpunim isključivanjem glikana koje posjeduju određeni monomer u strukturi. Tako je primjerice moguće pri analizi iona prekursora isključiti strukture koje ne posjeduju pentasaharidnu sržnu strukturu (Hex)3(HexNAc)2 prisutnu kod svih N-glikana.

Koristeći podatak o retencijskom vremenu dobiven HILIC-UPLC-FLR metodom, moguće je zaključiti o svojstvima hidrofilnosti molekule N-glikana što se može koristiti kao dodatna komponenta pri određivanju pretpostavljene strukture glikana.

Maseni spektri dobiveni fragmentacijom iona prekursora (MS/MS podaci) imaju dodatnu ulogu u određivanju strukture N-glikana, što će reći da fragmentacijski spektri omogućavaju razlučivanje između izomernih struktura N-glikana jednake molekulske mase.

Za vizualizaciju molekulskih struktura N-glikana korišten je *Glycoworkbench* alat za računalnu anotaciju masenih spektara razvijen od strane (Ceroni i sur, 2008).

**3.8 Statistička obrada podataka**

Podaci dobiveni integriranjem kromatografskih podataka sustavom Empower 3 obrađeni su i vizualizirani uz pomoć statističkog paketa R (R Core Team, 2018) uz integirano razvojno okruženje RStudio (RStudio Team, 2016) te korištenjem SciPy (Jones i sur, 2001) i Matplotlib (Hunter i sur, 2007) biblioteka programskog jezika Python.