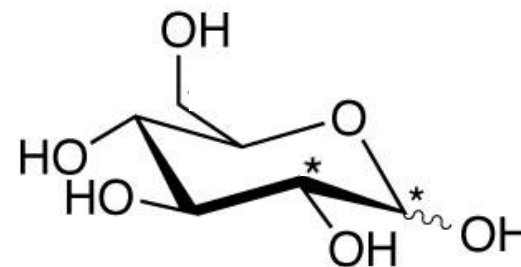


# Izotopické značení ve výzkumu metabolických cest



**Martin Moos**

Laboratoř analytické biochemie a metabolomiky  
Biologické centrum AVČR (Entomologický ústav)

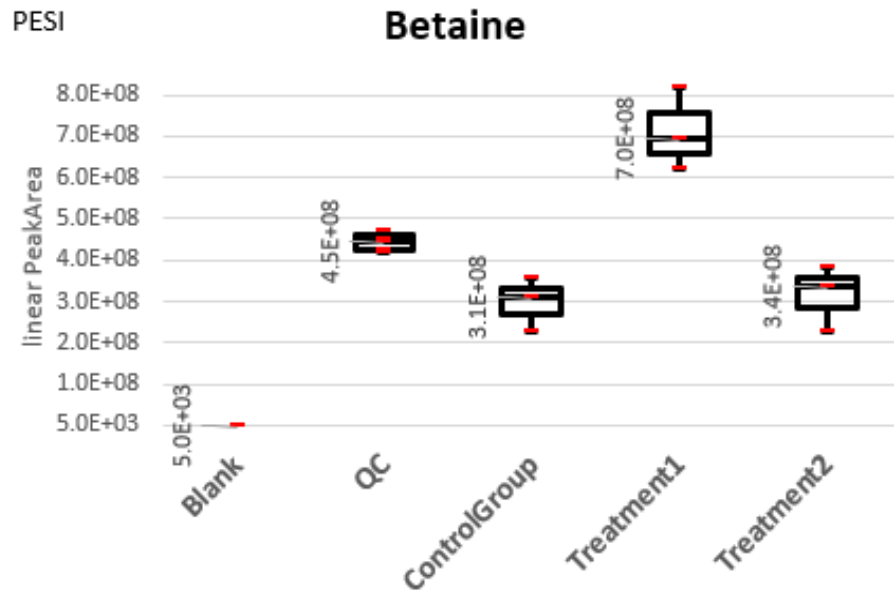


# Proč to děláme??? – flux analysis

Sledujeme tok metabolitů (metabolic flux) v biochemických drahách

- doplňující informace k naměřeným koncentracím (plochám píků) metabolitů (metabolomika)
- informace o aktivitě dané dráhy

Běžný výstup z metabolomické analýzy - statická informace



Zvýšení koncentrace metabolitů může naznačovat, jak zvýšenou aktivitu enzymů produkujících metabolity, ale také sníženou aktivitu enzymů spotřebovávajících metabolity.

**Potřebujeme informace o „dynamice“ dráhy (metabolic flux) !!!**

|                                          |                    |         | Treatment1/ControlGroup |        | Treatment2/ControlGroup |        |
|------------------------------------------|--------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| Name                                     | Sheet              | KEGG ID | FoldCh.                 | T-Test | FoldCh.                 | T-Test |
| <a href="#">beta-D-Sedoheptulose</a>     | Glycolysis Pentose | C08333  | ↓ -0.6                  | ●      | ↓ -0.4                  | ●      |
| <a href="#">Betaine</a>                  | 1Carbon Mtb        | C00719  | ↑ 1.2                   | ●      | → 0.1                   | ●      |
| <a href="#">Betaine</a>                  | LeuVal             | C00719  | ↑ 1.2                   | ●      | → 0.1                   | ●      |
| <a href="#">Betaine</a>                  | Proline Mtb        | C00719  | ↑ 1.2                   | ●      | → 0.1                   | ●      |
| <a href="#">beta-L-Alanyl-L-arginine</a> | SerThrAlaAsp       | C05340  | ↓ -0.8                  | ●      | ↓ -0.6                  | ●      |

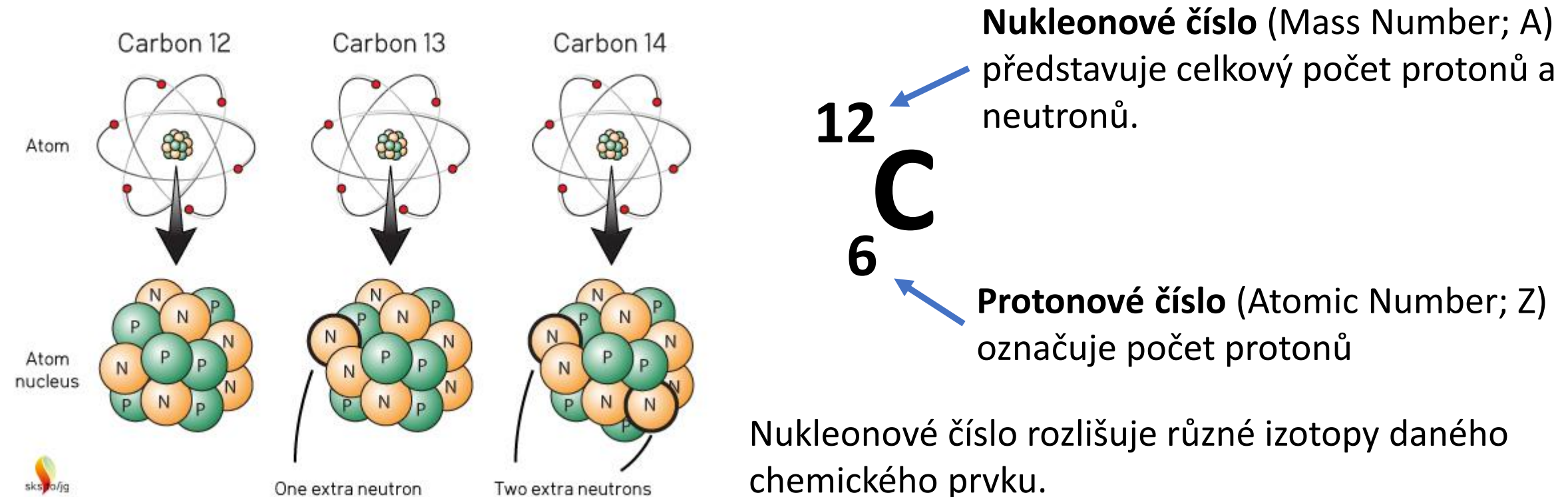
Dynamika – za jak dlouho projde značený metabolit danou metabolickou drahou

Tato data však sama o sobě nestačí k odhalení intracelulárních toků v různých metabolických drahách.

# Metabolic flux

**Metabolic flux** – nelze měřit přímo, pohyb metabolitů v biochemických drahách může být zjištěn pomocí „izotopických stopařů“ (isotope tracer)

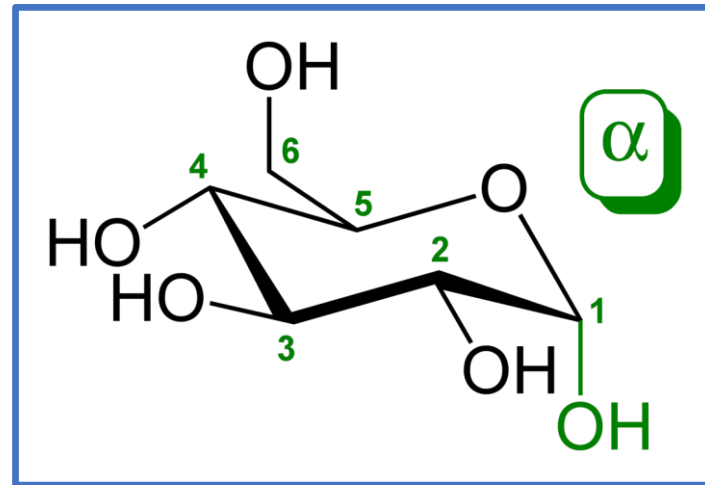
**Isotope tracer** – látka, ve které je jeden nebo více atomů nahrazen svým izotopem



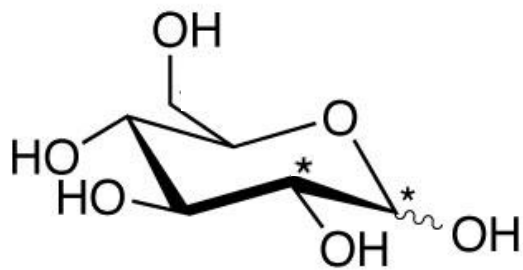
# Isotope tracer

**Isotope tracer** – látka, ve které je jeden nebo více atomů nahrazen svým izotopem

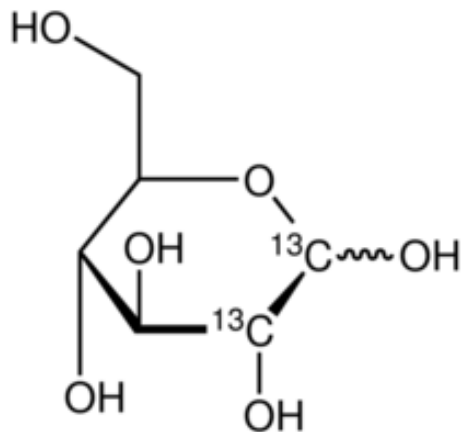
**Naprostu stejné chemické chování!!!**



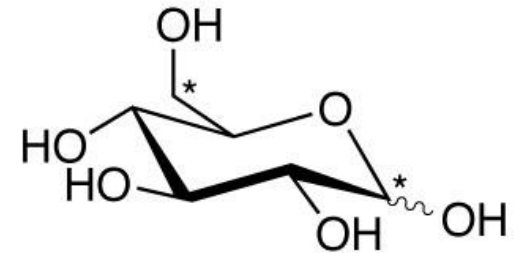
[1,2- $^{13}\text{C}$ ]glucose



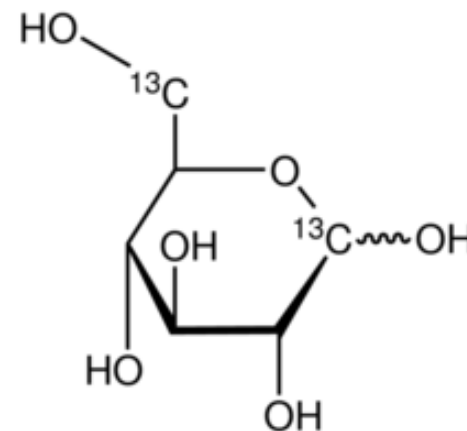
[1,2- $^{13}\text{C}$ ]glc



[1,6- $^{13}\text{C}$ ]glucose



[1,6- $^{13}\text{C}$ ]glc



# Používají se pouze $^{13}\text{C}$ ? - NE

## Mám se bát radioaktivity? – ANO i NE

### NE

stabilní izotopy

$^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}(\text{D})^*$

\* Metabolity označené více D se nepoužívají



Detekce: **Hmotnostní spektrometrie (MS)**  
Nukleární magnetická resonance (NMR)

Zcela odlišný způsob detekce!!!

Zcela odlišný způsob detekce!!!

### Není předmětem dnešní přednášky!!!

### ANO

nestabilní izotopy

$^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$



Detekce: 1) Scintilační počítač – emise záblesků vznikajících interakcí e- se scintilačním roztokem.  
2) Autoradiograf – určení přesné polohy radioisotopu ve vzorku.

# Jsou stabilní izotopy antropogenní?

## Přírodní zastoupení stabilních izotopů

| Prvek      | Symbol              | Stabilní izotop | Mass [amu] | Přírodní zastoupení [%] |
|------------|---------------------|-----------------|------------|-------------------------|
| Vodík (H)  | $(^1_1\text{H})$    | 1               | 1.0078     | 99,985                  |
|            | $(^2_1\text{H})$    | 2               | 2.0141     | 0,015                   |
| Uhlík (C)  | $(^{12}_6\text{C})$ | 12              | 12.0000    | 98,89                   |
|            | $(^{13}_6\text{C})$ | 13              | 13.0034    | 1,11                    |
| Dusík (N)  | $(^{14}_7\text{N})$ | 14              | 14.0030    | 99,63                   |
|            | $(^{15}_7\text{N})$ | 15              | 15.0001    | 0,37                    |
| Kyslík (O) | $(^{16}_8\text{O})$ | 16              | 15.9949    | 99,76                   |
|            | $(^{18}_8\text{O})$ | 18              | 17.9992    | 0,24                    |

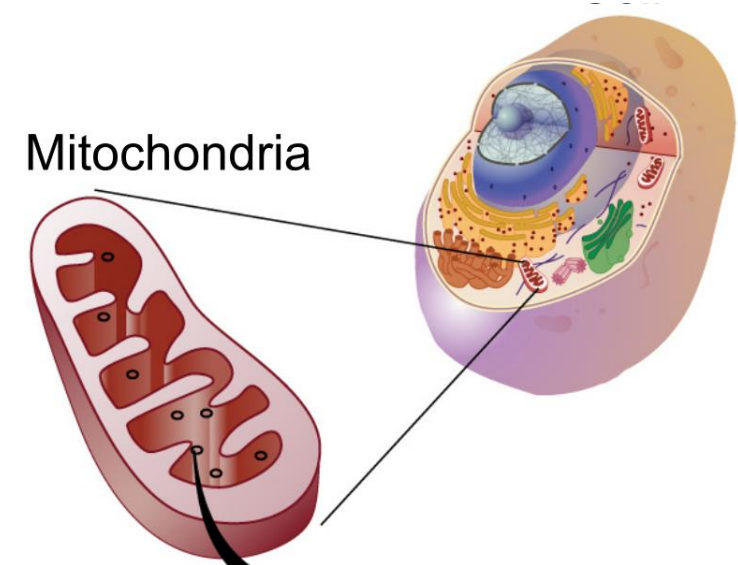


Na  
100  $^{12}\text{C}$  v  
přírodě  
1.11  $^{13}\text{C}$

Pozor důležité při vyhodnocení dat

# Na co je důležité myslet před realizací biologického pokusu

- Výběr správného růstového média
  - Preferované chemicky definované oproti komplexním
  - Pozor na komplexní (nedefinované) součásti média – Yeast Extract
- Metabolicky(ý) ustálený stav - Hladiny intracelulárních metabolitů a intracelulární metabolické toky jsou konstantní. Častěji jsou experimenty prováděny v pseudoustáleném stavu, kde jsou změny v koncentracích metabolitů a tocích minimální v časovém rámci, během kterého je měření prováděno. Neplést s izotopicky ustáleným stavem.
  - Exponenciální růstová fáze buněk je považována za metabolický pseudo-ustálený stav, protože buňky v kultuře se stabilně dělí svou maximální rychlostí
- Komplexní vzorek - Nutné si uvědomit, že lze měřit pouze průměrný vzorek a hladiny metabolitů ve všech kompartmentech buňky najednou.
  - Techniky dělení buněk na kompartmenty jsou v dnešní době nedokonalé.
    - Vždy se jedná spíše o podíl bohatý na izolovaný kompartment, nejčastěji mitochondriální podíl

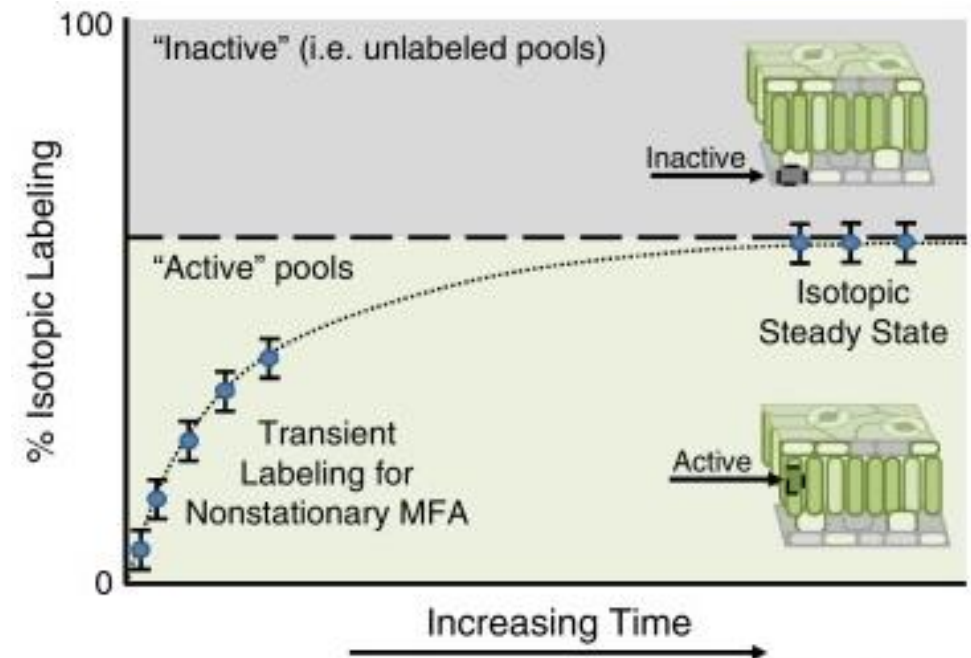




- Doba značení I

- Do izotopicky ustáleného stavu (Steady state labeling)

- Doba potřebná k dosažení izotopového rovnovážného stavu závisí jak na rychlosti přeměny živin na příslušný metabolit, tak na velikosti zásob tohoto metabolitu.
  - Glykolýza 10 min,
  - TCA cyklus 2 hod,
  - Nukleotidy 1 den
- Pozor např. některé aminokyseliny nemusí dosáhnout izotopicky ustáleného stavu z důvodu intracelulární x extracelulární výměny metabolitu nikdy

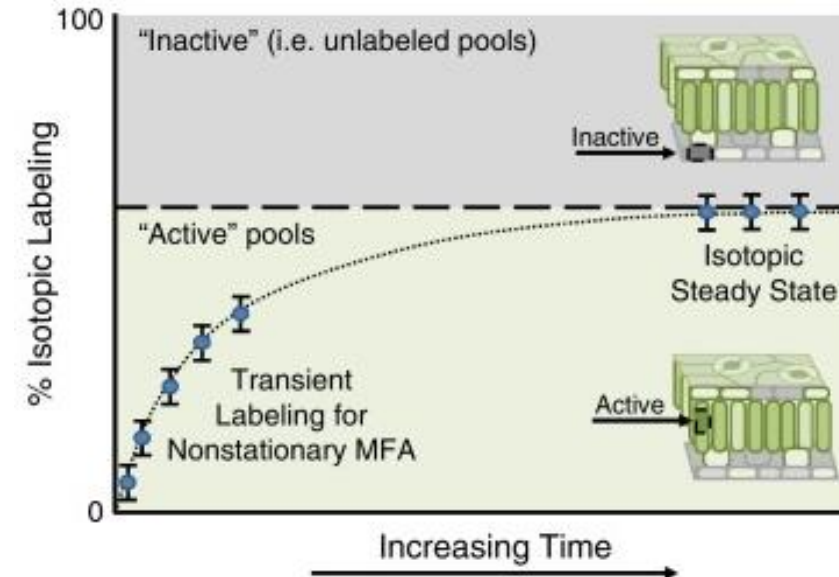




## • Doba značení II

### • Měření dynamiky metabolických drah

- Během dynamického značení se měří, jak rychle se metabolický pool značí. Základním principem je, že čím větší je tok, tím rychleji se metabolický pool značí
- Pro smysluplnou přímou interpretaci dynamiky mtb. dráhy je nezbytné vhodné časové rozlišení (tj. více časových bodů, které pokrývají dynamiku značení)
  - glykolýza v řádu sekund až desítek sekund
  - TCA časové intervaly 15, 30, 60, 120 min
- Interpretace jednotlivých časových bodů není spolehlivá
- Dynamické značení je omezeno proveditelným časovým rozlišením (např. glykolýza)
- Pozor při velké provázanosti studované dráhy s jinou (časté výměně mtb.) nelze přímou interpretaci dynamiky mtb. dráhy využít



- Jaké množství Isotope tracer použít
  - Nutné provést kvantitativní analýzu vzorku
    - Některé mtb. jsou ve vyšších koncentracích toxické (glycin atd...)
    - Většina mtb. je ve vzorku přítomna, značeného alespoň 1/3 ideálně ½, pozor na toxicitu!
- Zamezit (omezit) ovlivnění metabolických drah při změně média
  - Není ideální biologický pokus provádět v minimálním médiu, někdy ale nelze jinak
- Zastavení metabolické aktivity
  - snížení teploty,
  - denaturace enzymů
    - organická rozpouštědla,
    - změna pH (kyselina mravenčí)
- Stabilita analyzovaných metabolitů
  - Neutralizace kyselé extrakční směsi (NADH → NAD, NADPH → NADP)
  - Využít speciálních pufrů (ATP → ADP → AMP)
- Dostupnost a cena Isotope tracer
  - Cambridge Isotope Lab
  - C/D/N Isotopes Inc
  - Merck - Sigma Aldrich
  - TRC Canada

**Při plánování myslet na to že:**

**!!! Organismy mají více redundantních signálních drah, které mohou zastupovat jedna druhou, odpověď na nepříznivé podmínky (treatment) musí být (jsou) obvykle rozsáhlejší!!!**

# Čistota Isotope tracer

Pozor nutno kontrolovat čistotu standardu před samotným biologickým pokusem!!!

- Provádět slepé pokusy
- Standard bývá znečištěn svými izotopology

## Zakoupeno

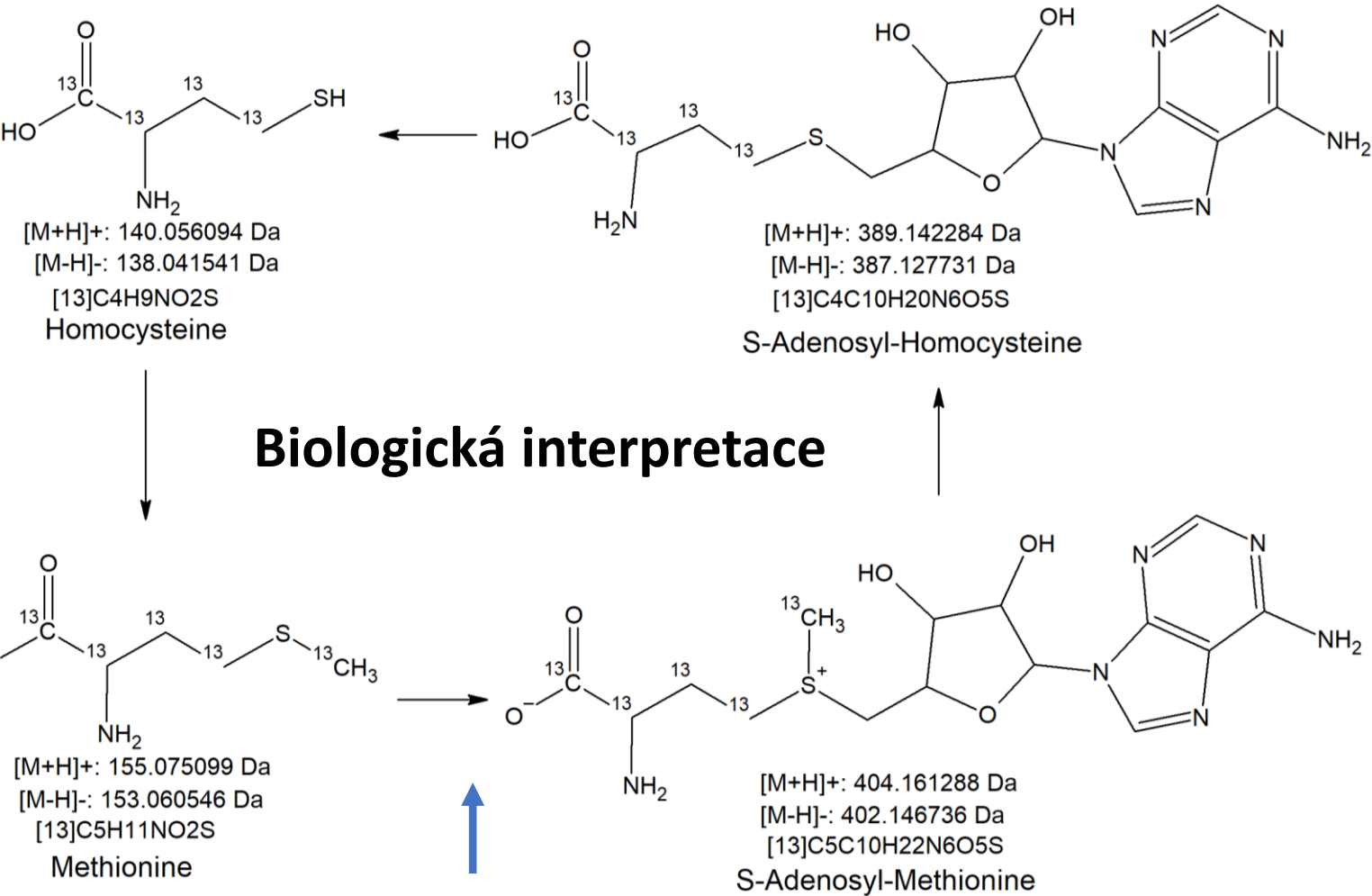
L-METHIONINE (13C5, 99%)

|                   |                            |
|-------------------|----------------------------|
| Item Number       | CLM-893-H-PK               |
| Chemical Formula  | *CH3S*CH2*CH2*CH(NH2)*COOH |
| Unlabeled CAS#    | 63-68-3                    |
| Labeled CAS#      | 202326-57-6                |
| Molecular Weight* | 154.17                     |
| Chemical Purity   | 98%                        |

\* For isotopically labeled compounds, MW listed is for the fully enriched product.

## Naměřeno

|         | m/z (M-H)- | Plocha píku | Rela. zastoupení |
|---------|------------|-------------|------------------|
| 12C5Met | 148.0438   | 2465347     | 0.03%            |
| 13C3Met | 151.0538   | 6348886     | 0.08%            |
| 13C4Met | 152.0571   | 366789810   | 5%               |
| 13C5Met | 153.0605   | 7325878350  | 100%             |



|          | Methionine_ (13C4) | Methionine_ (13C5) | [%] |
|----------|--------------------|--------------------|-----|
| I1-20min | 5964129            | 121812204          | 4.9 |
| I2-20min | 4819935            | 97217357           | 5.0 |
| I3-20min | 4955254            | 102704112          | 4.8 |
| I1-40min | 1840963            | 36500658           | 5.0 |
| I2-40min | 3898603            | 81540796           | 4.8 |
| I3-40min | 1392273            | 28725957           | 4.8 |

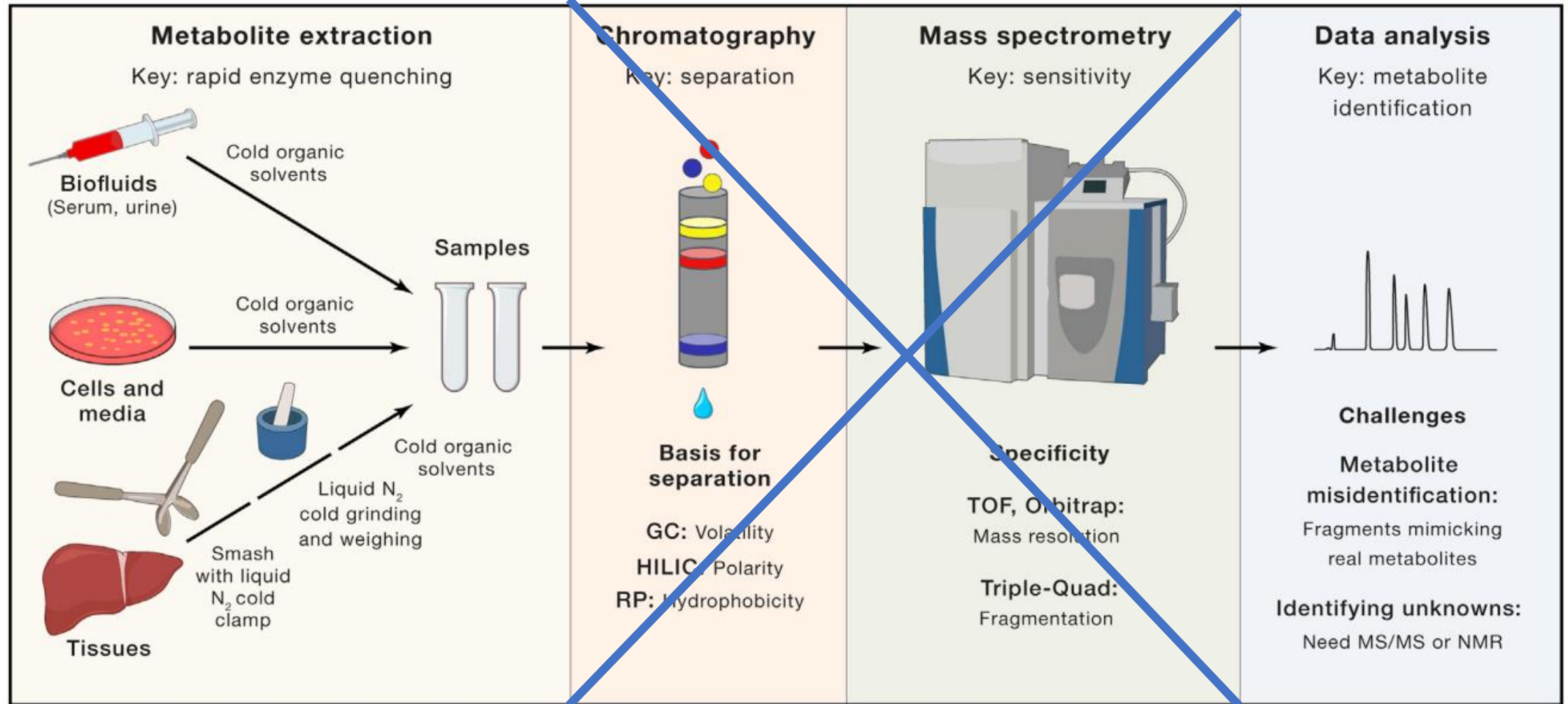
# Kroky v metabolomické analýze

**A**

**B**

**C**

**D**



# A – Extrakce metabolitů (příprava vzorku)

## 1) Tělní tekutiny

- precipitace - 80% organické rozpouštědlo (4°C, -40°C)

Postup: srážení (odstranění proteinů) → sonifikace → centrifugace → LC/MS

## 2) Buněčné kultury

- narušení buňky - 80% organické rozpouštědlo (4°C, -40°C)
  - tekutý dusík (rozmražení a zamražení vzorku)



- Rostliny – buněčná stěna!!!
- Vytvoření krystalků ledu (roztržení buňky)

Postup: 80% org.; N<sub>2</sub> (liquid) → sonifikace → centrifugace → LC/MS

## 3) Tkáně

- Homogenizace (mechanické rozrušení tkáně)
  - 80% organické rozpouštědlo (4°C, -40°C)
  - tekutý dusík

Postup: Homogenizace (80% org.; N<sub>2</sub> (liquid)) → sonifikace → centrifugace → LC/MS

## SOUHRN

Přenos metabolitů ze vzorku

Zastavení enzymatické aktivity

Chemická stabilita metabolitů  
(OX-RED)

**Individualizace postupu!!!**

**Jeden z nejdůležitějších kroků!!!**

**Dobře připravený vzorek**

**II**

**Dobrý výsledek**

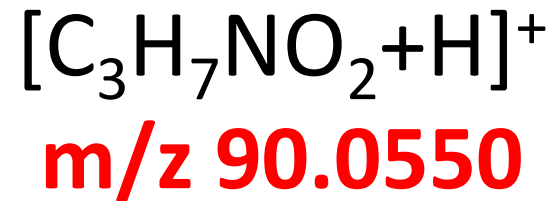
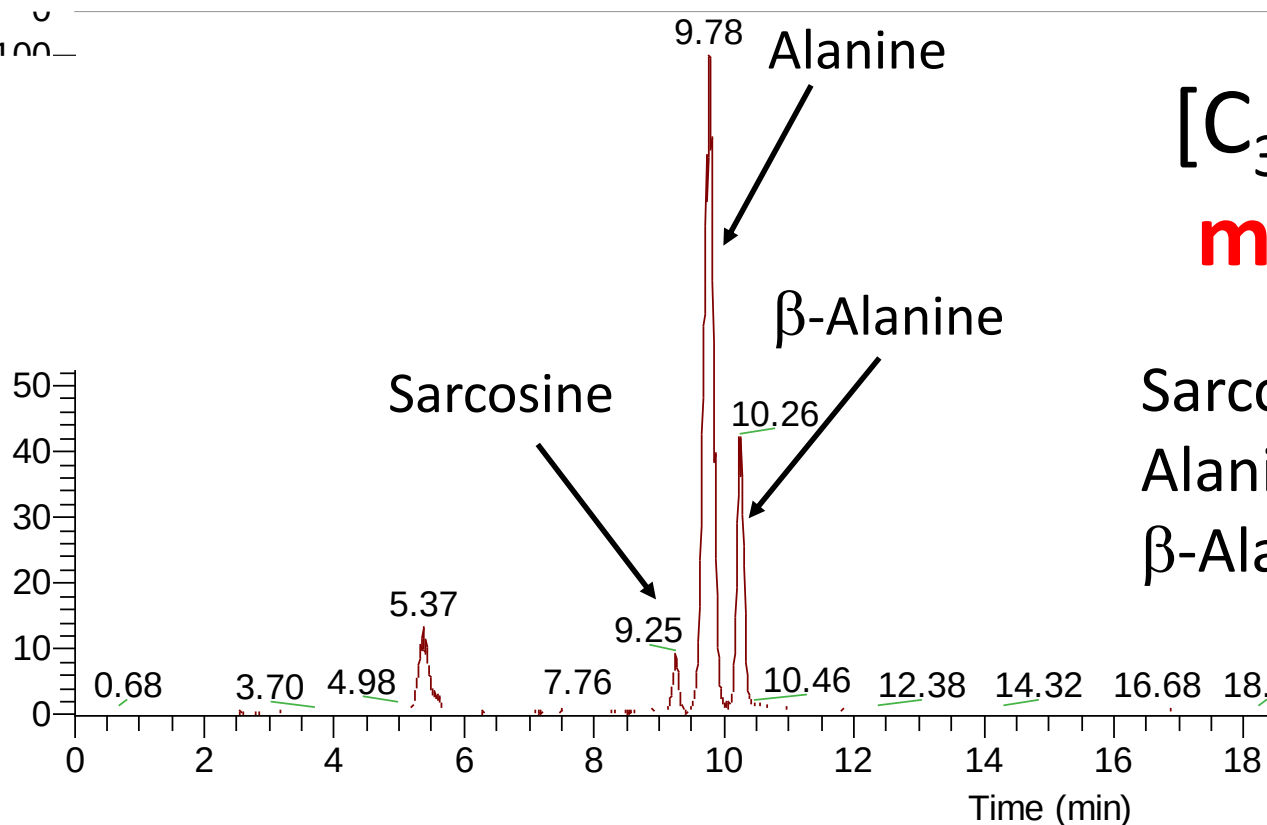
**A naopak!!!**

# B, C - Proč chromatografie i hmotnostní spektrometrie?

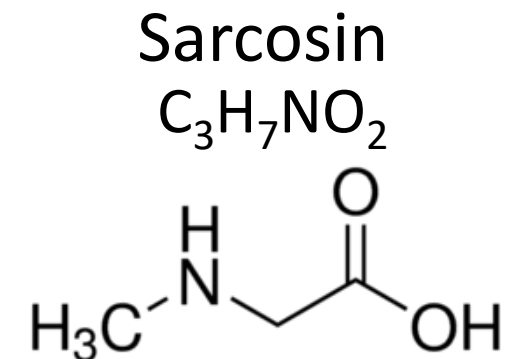
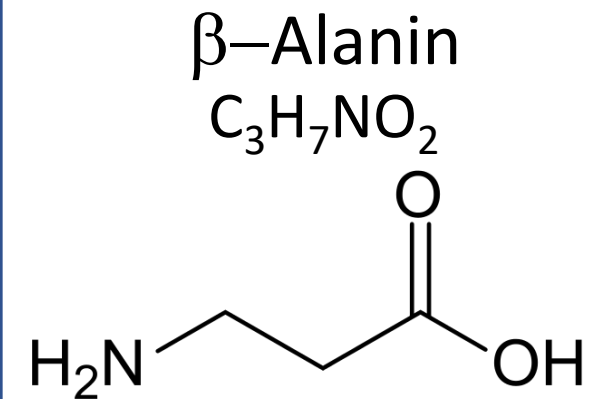
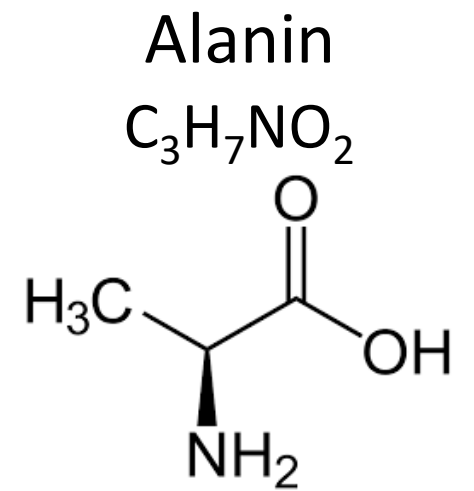
!!! Stejné elementární složení rovná se stejná hmota !!!

## Isobary

*isos* – „stejný“ + *baros* – „váha“



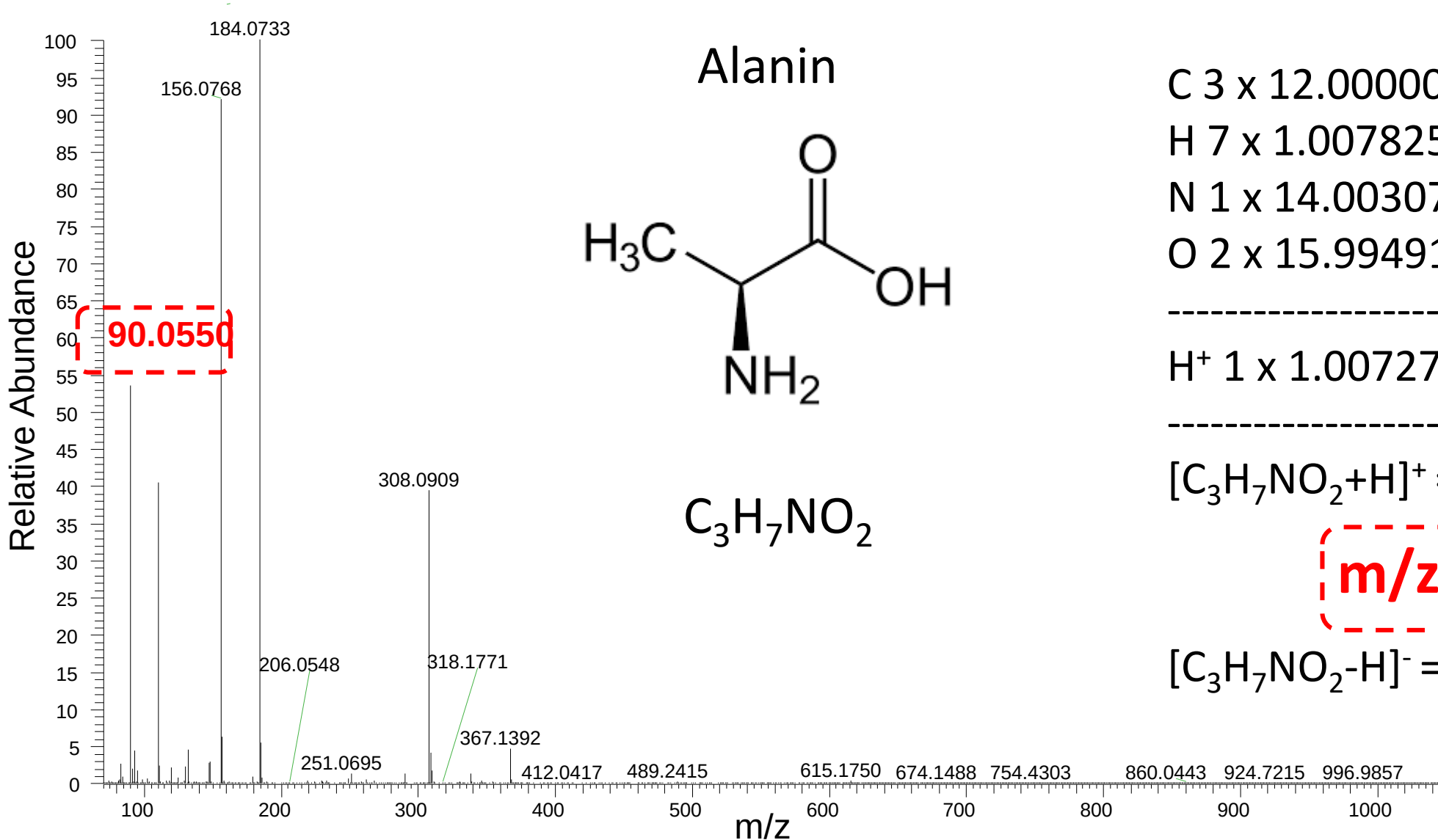
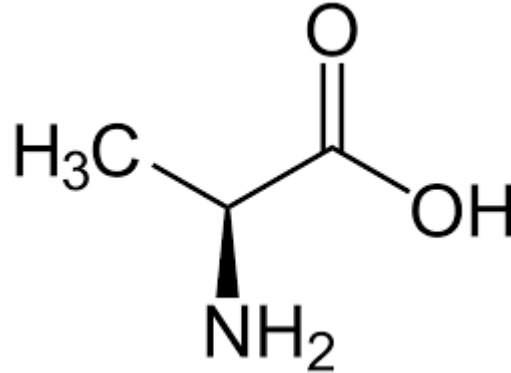
Sarcosine RT 9.25 min  
Alanine RT 9.78 min  
beta-Alanine RT 10.26 min



# Co měří hmotnostní spektrometr - typické hmotnostní spektrum



Alanin



$$\text{C } 3 \times 12.0000000 = 36.0000000$$

$$\text{H } 7 \times 1.0078250 = 7.0547750$$

$$\text{N } 1 \times 14.0030740 = 14.0030740$$

$$\text{O } 2 \times 15.9949146 = 31.9898292$$

$$\text{H}^+ 1 \times 1.0072766 = 1.0072766$$

$$[\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2 + \text{H}]^+ = 90.0549550$$

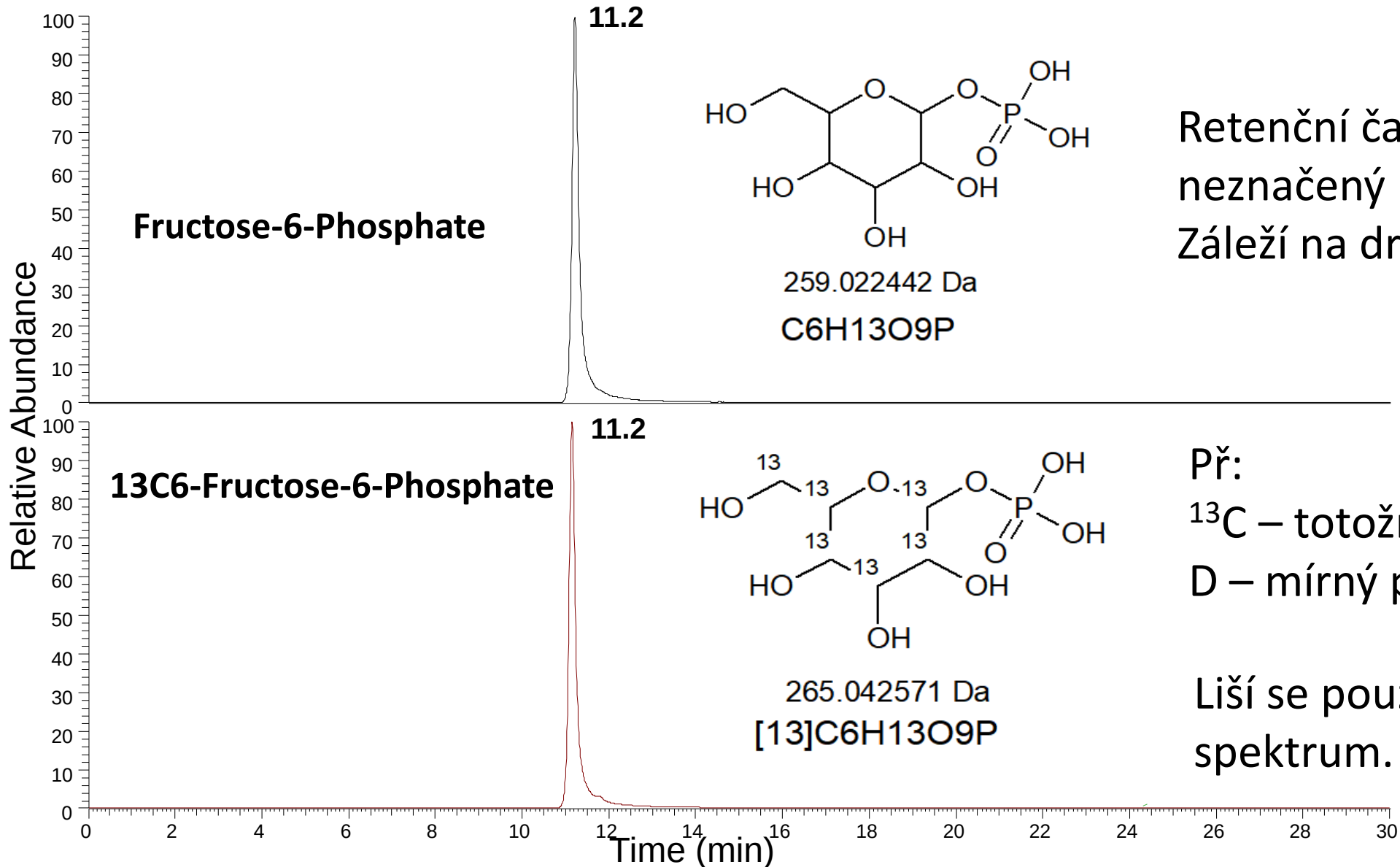
$$m/z \text{ 90.0550}$$

$$[\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2 - \text{H}]^- = 88.04040243$$

Reálný vzorek DM-CL8



# CHROMATOGRAM isotopicky značené x neznačené Fru-6-P

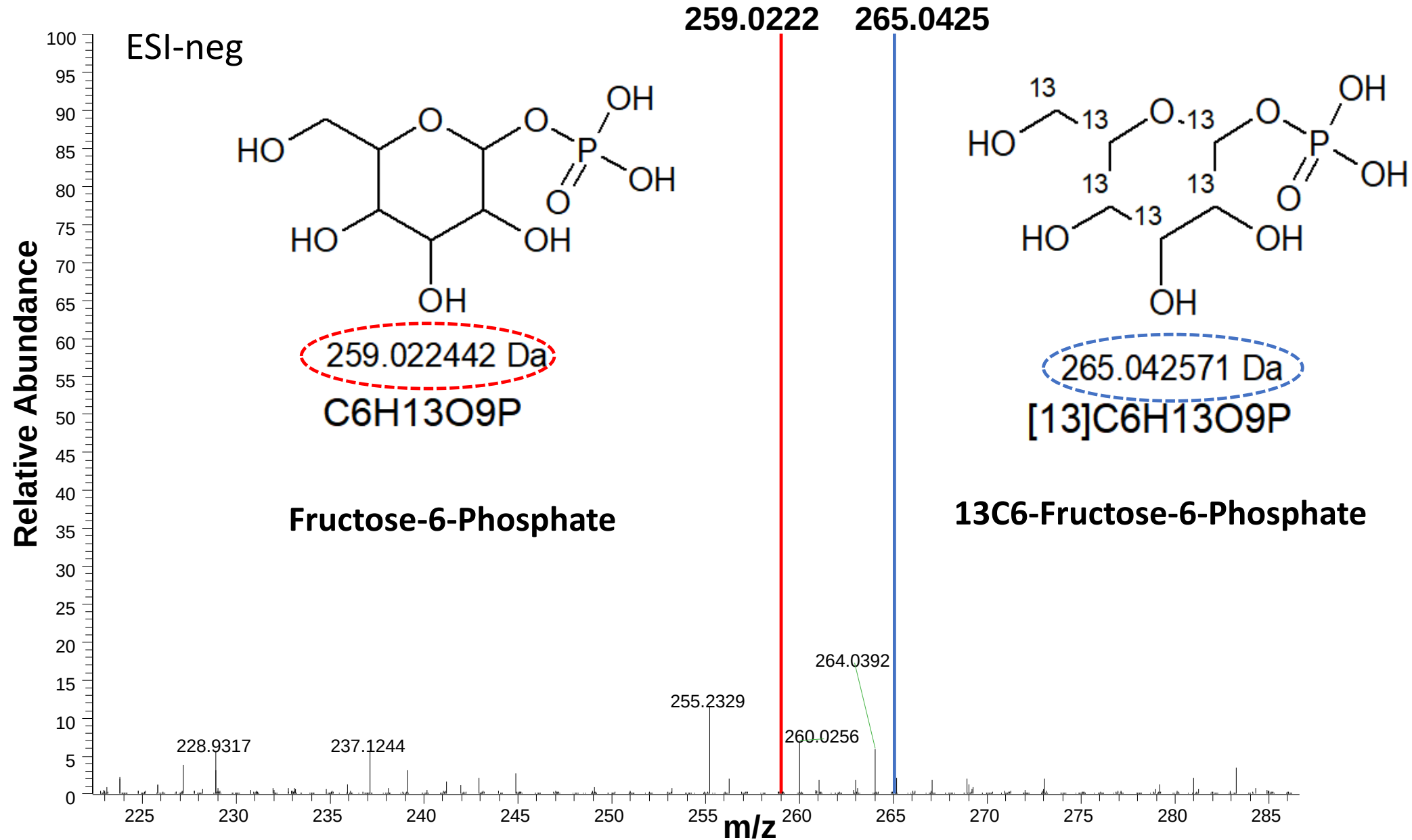


Retenční čas je pro značený a neznačený metabolit cca stejný. Záleží na druhu značky.

Př:  
<sup>13</sup>C – totožný RT  
D – mírný posun RT

Liší se pouze hmotnostní spektrum.

# Hmotnostní spektrum – Směs Fru-6-P a $^{13}\text{C}_6\text{Fru-6-P}$ (1:1)



# Přírodní zastoupení stabilních izotopů (izotopová obálka)

Hmotnostní spektrometr měří monoizotopickou hmotnost molekuly.

Součet hmotností jednotlivých izotopů – nikoli jejich průměrná hmotnost (MW)

Každá naměřená látka, nemá na hmotnostním spektru pouze jednu hmotu, ale tzv. izotopovou obálku.

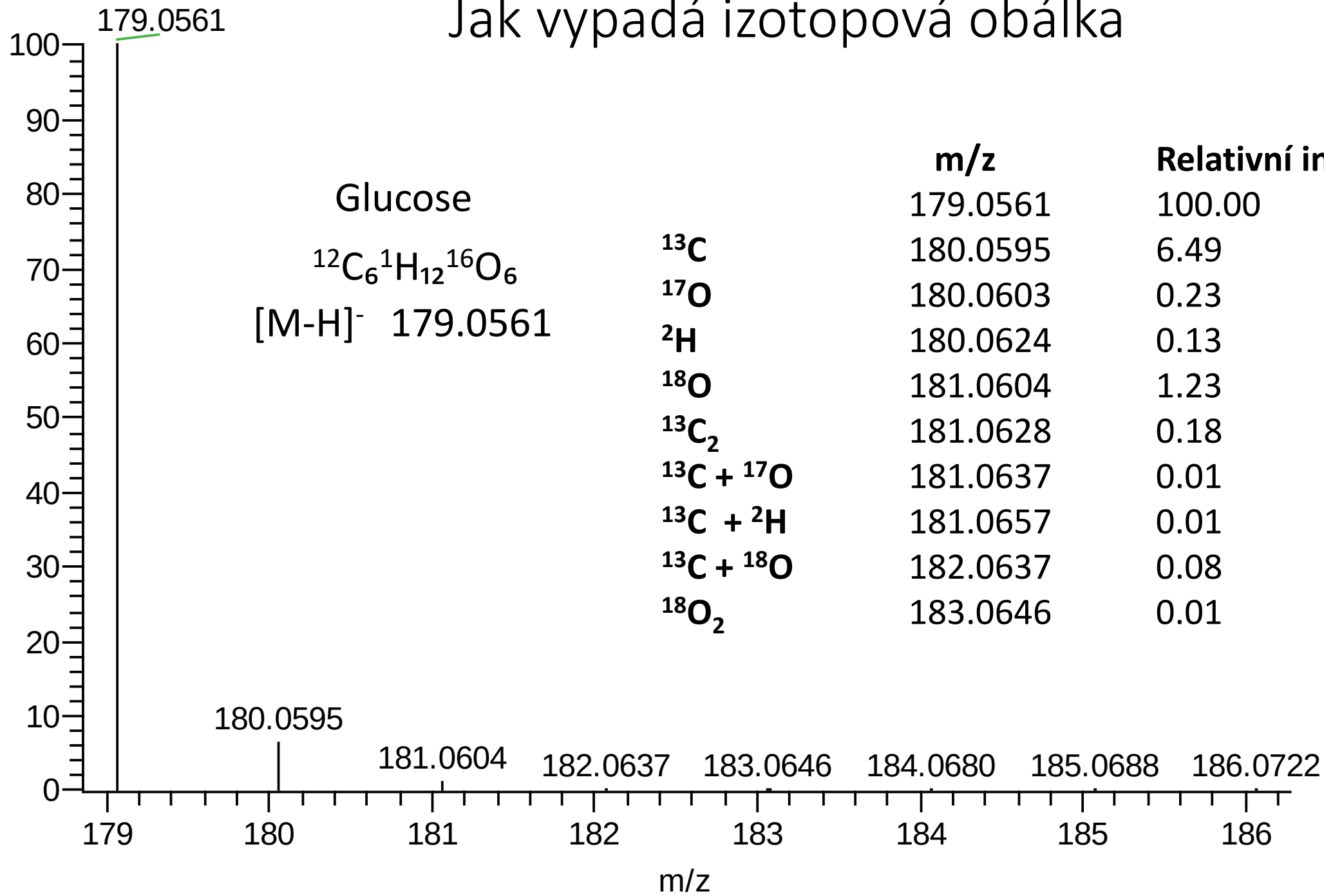
Proč?

Protože, každý atom má v přírodě běžně se vyskytující izotopy a hmotnostní spektrometr měří monoizotopickou hmotnost.

Pro každou molekulu existuje několik různých hmot podle zastoupení jednotlivých izotopů v molekule. Je to kombinatorika, čím zastoupenější izotop, tím intenzivnější protože je pravděpodobnější jeho výskyt.

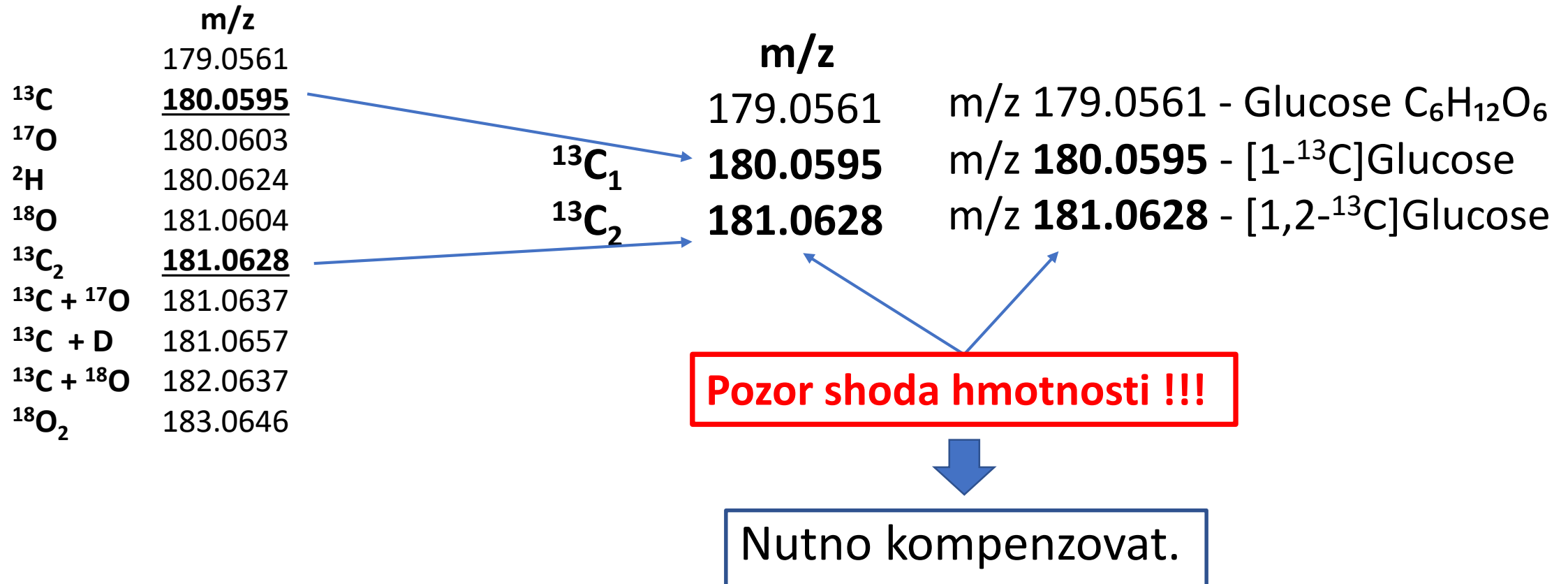
Nejintenzivnější je kombinace nejzastoupenějších izotopů v přírodě ( $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$  atd.)

# Jak vypadá izotopová obálka



# Proč dnes mluvíme o izotopové obálce?

Není rozdíl mezi metabolitem přírodně a uměle označeným.



# Při vyhodnocení nutno kompenzovat přírodní příspěvek, zejména u $^{13}\text{C}$ !

Proč zrovna zejména u  $^{13}\text{C}$ ?

Jak kompenzovat?

|                   | m/z      | Relative intensity [%] |                                |
|-------------------|----------|------------------------|--------------------------------|
|                   | 179.0561 | 100.00                 |                                |
| $^{13}\text{C}$   | 180.0595 | 6.49                   | [1- $^{13}\text{C}$ ]Glucose   |
| $^{18}\text{O}$   | 181.0604 | 1.23                   | [1,2- $^{13}\text{C}$ ]Glucose |
| $^{13}\text{C}_2$ | 181.0628 | 0.18                   |                                |

| Prvek      |                       | Přírodní zastoupení [%] |
|------------|-----------------------|-------------------------|
| Vodík (H)  | ( $^1_1\text{H}$ )    | 99,985                  |
|            | ( $^2_1\text{H}$ )    | 0,015                   |
| Uhlík (C)  | ( $^{12}_6\text{C}$ ) | 98,89                   |
|            | ( $^{13}_6\text{C}$ ) | <b>1,11</b>             |
| Dusík (N)  | ( $^{14}_7\text{N}$ ) | 99,63                   |
|            | ( $^{15}_7\text{N}$ ) | 0,37                    |
| Kyslík (O) | ( $^{16}_8\text{O}$ ) | 99,76                   |
|            | ( $^{18}_8\text{O}$ ) | 0,24                    |

Čím méně značená molekula, tím větší kompenzace.

Kompenzace není nutná cca při použití izotop traceru s 3 a více izotopy.

- To že na začátku použiji dostatečně značený izotope tracer, neznamená, že nemusím kompenzovat vůbec. V průběhu metabolismu nebo ionizace (EI) ztrácím značku, někdy i celou naráz. Vždy musím tento fakt reflektovat při výběru izotope traceru.

# D – Analýza dat - Metabolomika a izotopové značení

**Mass distribution vector (MDV) nebo tzv. mass isotopomer distribution (MID) vector**

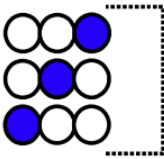
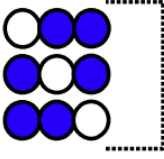
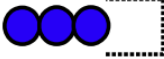
**Neplést s relativním zastoupením izotopologu v isotopické obálce.**

MDV popisují zastoupení každého izotopologu normalizovaného na součet všech možných izotopologů.

**Izotopology** - Látky z chemického hlediska stejné, které se liší pouze ve složení izotopů ( $^1\text{H}_2\text{O}$ ,  $^2\text{H}_2\text{O}$ ,  $^3\text{H}_2\text{O}$ )

**Izotopomery** - Látky se stejným izotopovým složením ale různým rozmístěním izotopů v molekule

○  $^{12}\text{C}$  ●  $^{13}\text{C}$

| <i>raw labeling data</i>      |                                                                                         | <i>ion count (IC)</i><br><i>(freely chosen example)</i> | <i>total ion count (TIC)</i> | <i>MDV (IC/TIC)</i> |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|
| metabolite with three C atoms |  M+0   | 10500                                                   | Σ = 88000                    | 0.12                |
|                               |  M+1  | 22000                                                   |                              | 0.25                |
|                               |  M+2 | 15000                                                   |                              | 0.17                |
|                               |  M+3 | 40500                                                   |                              | 0.46                |

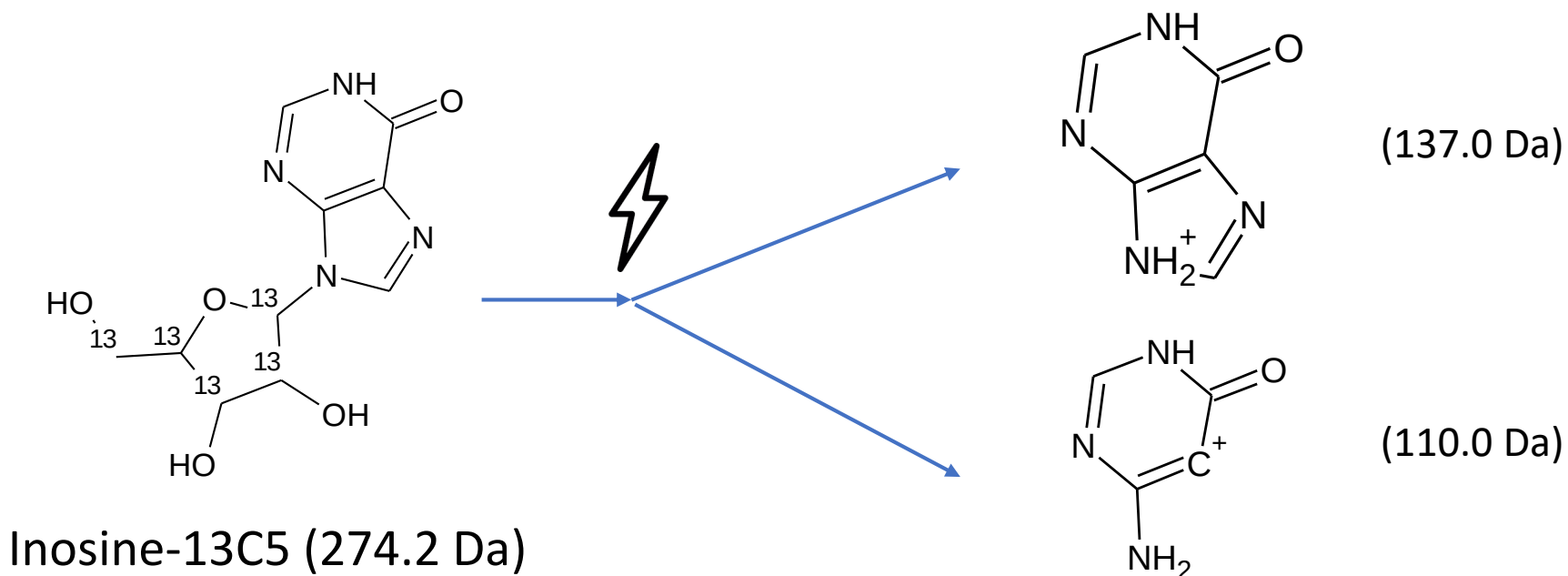
Izotopomery lze měřit pouze pomocí detekčních metod, schopných určit konkrétní polohu  $^{13}\text{C}$  v molekule (např. NMR,  $\text{MS}^n$ ).

Poloha  $^{13}\text{C}$  se běžně nesleduje, měříme izotopology nikoli izotopomery.



- Kvantitativní analýza – v LABM QQQ
  - MRM ladíme ze standardů (12C) a následně přepočteme
  - v případě nedostupnosti ladíme ze vzorku
  - kolizní energie stejné pro 12C a 13C
  - provádíme kvantifikaci 13C mtb. na kalibrační křivku 12C

| Name         | EC              | RT [min] | Precursor | Product 1 | CE1 | Product 2 | CE2 |
|--------------|-----------------|----------|-----------|-----------|-----|-----------|-----|
| Inosine      | C10H12N4O5      | 6.8      | 269.2     | 137.0     | 24  | 110.0     | 52  |
| Inosine-13C5 | [13]C5C5H12N4O6 | 6.8      | 274.2     | 137.0     | 24  | 110.0     | 52  |



- Pozor vždy je nutné při interpretaci brát ohled na experimentální chybu měření.
  - Vhodné ověřit např. pomocí QC vzorku (pool sample) – RSD [%]
  - Je nutné vždy provádět více pravých opakování min 3, ideální min 5
    - Málo abundantní metabolity
    - Metabolity se špatnou odezvou v MS
  - Vždy je potřeba provádět analýzu slepého vzorku
    - Ideální využívat procesní slepý pokus, nikoliv pouze analytický
      - Přípravu vzorku provádí více lidí
    - Kontaminace z prostředí (laktát, acetát atd...)
    - Kontrola čistoty použitého izotop traceru

Ke studiu: Scientific Reports (2019) 9:13705; Anal. Chem. 2017, 89, 11, 5940–5948

- Pro vyhodnocování značených biologických pokusů existuje mnoho softwarových řešení.
  - GC/MS x LC/MS

# Software

| Název           | Citace                                        |
|-----------------|-----------------------------------------------|
| DExSI           | Bioinformatics. 2018 Jun 1; 34(11): 1957–1958 |
| <i>13CFLUX2</i> | Bioinformatics. 2013 Jan; 29(1): 143–145      |
| OpenFLUX2       | Microbial Cell Factories 13, 152 (2014)       |
| mzMatch–ISO     | Bioinformatics, 2013 Jan 15;29(2): 281-3      |
| X13CMS          | Anal Chem, 2014 Feb 4;86(3): 1632-9           |
| geoRge          | Anal Chem, 2016 Jan 5;88(1): 621-8            |
| HiResTEC        | <i>Anal. Chem</i> , 2018, 90, 12, 7253–7260   |

# Příklady využití

Cell

Leading Edge  
Primer

## Metabolomics and Isotope Tracing

Cholsoo Jang,<sup>1</sup> Li Chen,<sup>1</sup> and Joshua D. Rabinowitz<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Lewis Sigler Institute for Integrative Genomics and Department of Chemistry, Princeton University, Washington Rd, Princeton, NJ 08544, USA

\*Correspondence: [josh@princeton.edu](mailto:josh@princeton.edu)

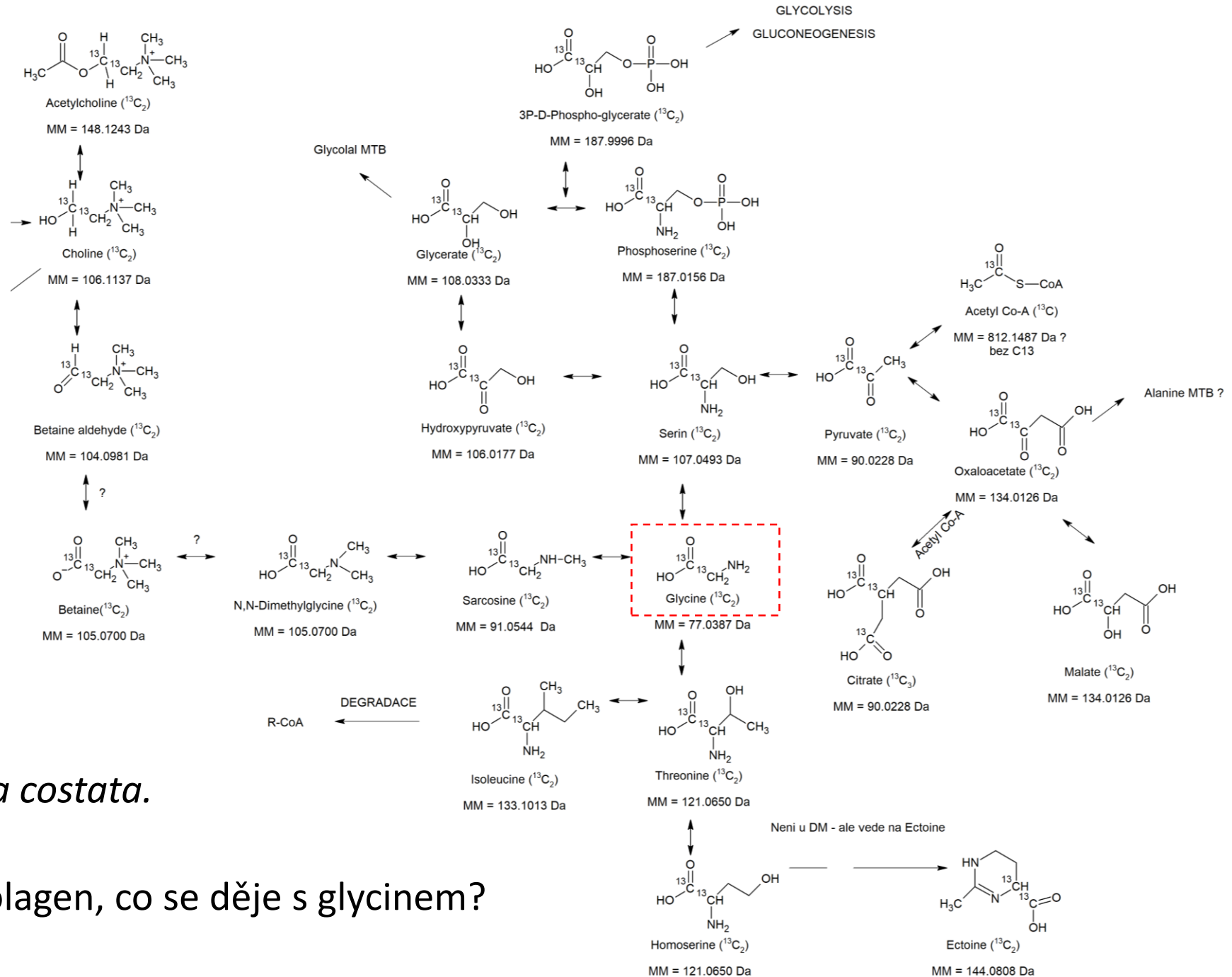
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.055>

Jang, C., et al. (2018). "Metabolomics and Isotope Tracing." **Cell** **173(4): 822-837.** - **Table 2**

**Table 2. Isotopic Tracers for Measuring Pathway Activities**

| Application                                                     | Tracer                        | Metabolite readouts       | Interpretation                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pentose phosphate pathway (PPP)                                 |                               |                           |                                                                                                                                                                                                                                                   |
| PPP overflow                                                    | [1,2- <sup>13</sup> C]glucose | Lactate M+1, M+2          | Flux through the combined oxidative and non-oxidative PPP generates M+1 lactate from [1,2- <sup>13</sup> C]glucose, while glycolysis generates only M+2 lactate (Lee et al., 1998). LacM+1 / LacM+2 reflects ratio of PPP overflow to glycolysis. |
| Source of ribose (oxidative versus non-oxidative branch of PPP) | [1,2- <sup>13</sup> C]glucose | Ribose phosphate M+1, M+2 | The oxPPP make M+1 ribose phosphate; the non-oxPPP makes M+2. Ratio of M+1/M+2 depends on the gross flux (net flux + exchange flux) of each branch: Reversibility of the non-oxPPP can make M+2 even if all net ribose production is by oxPPP.    |

# Využití $^{13}\text{C}_2$ Glycinu



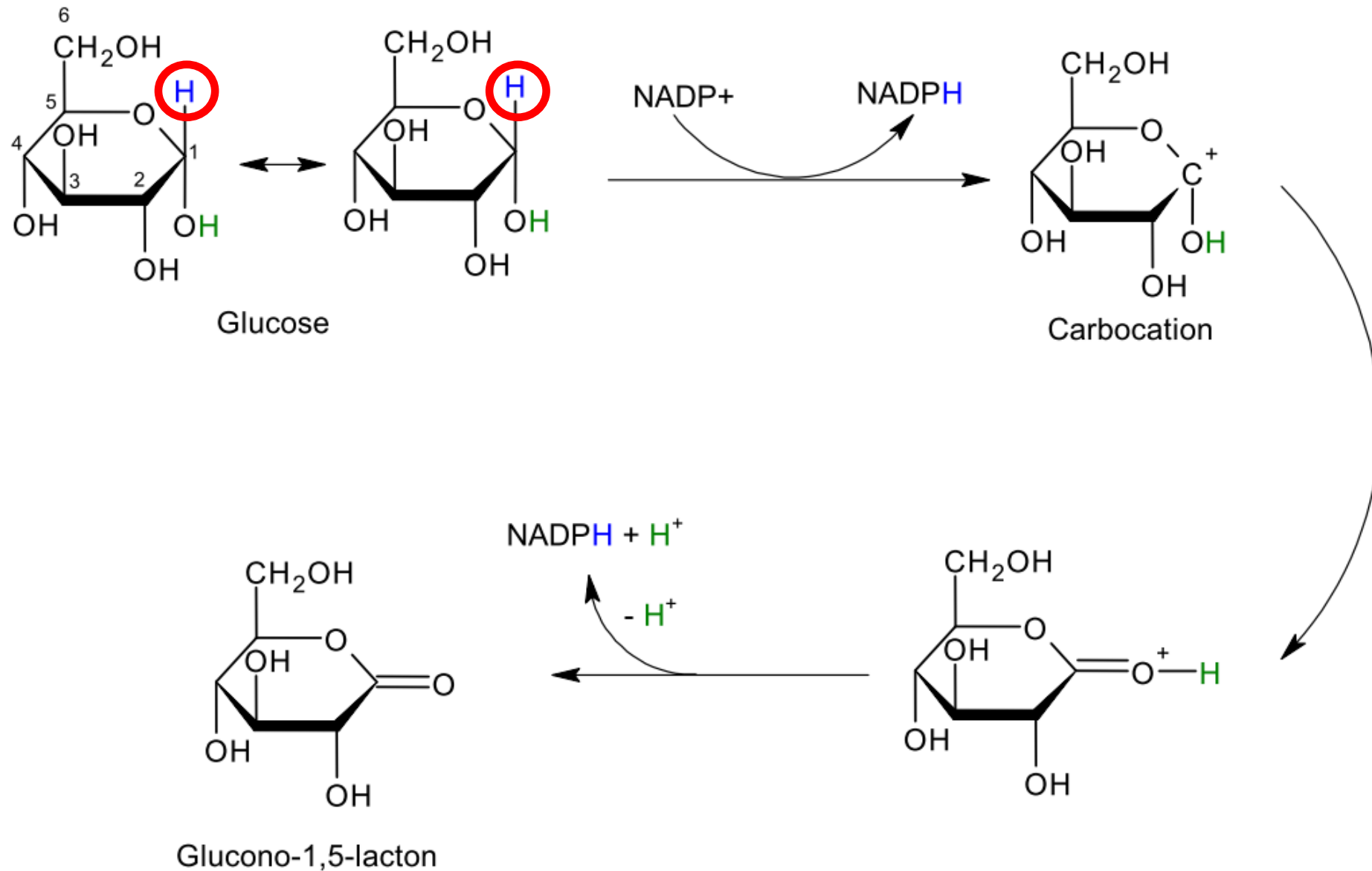
Chladová aklimace *Chymomyza costata*.

Velká nadprodukce prolinu.

Kde se bere? Kolagen? Jestli kolagen, co se děje s glycinem?

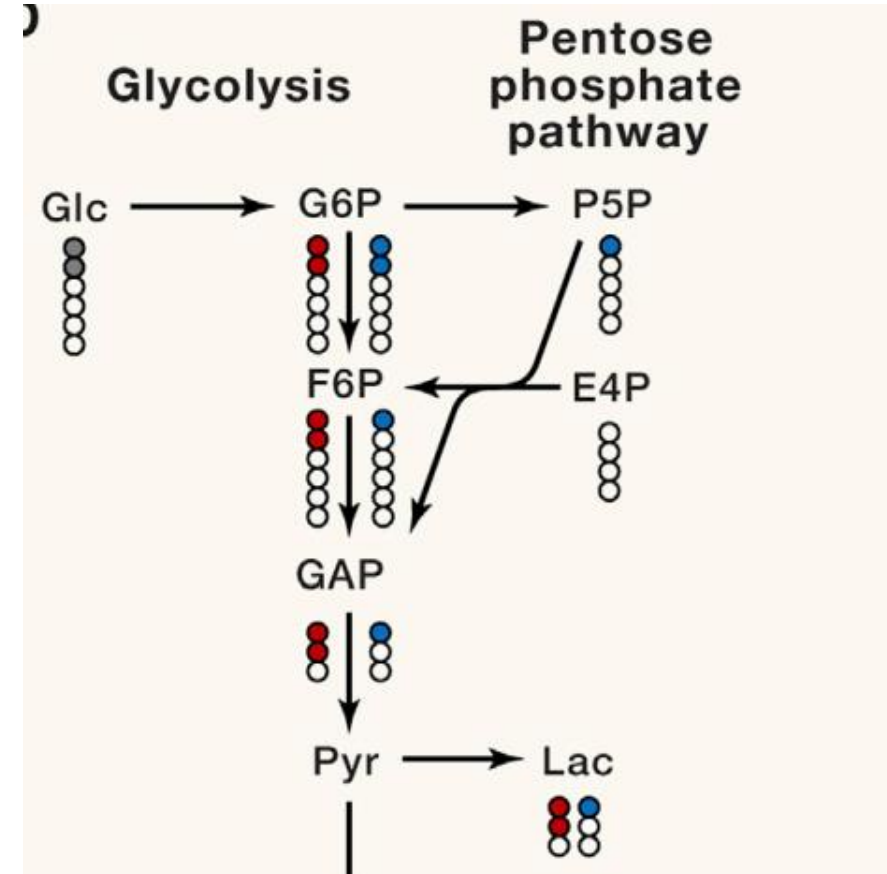
Nepublikováno !!!

# Využití $\alpha$ -Glucose-1-d1 pro značení NADPH



# Hledání aktivních metabolických drah PPP x glykolýza

- Značení v ustáleném stavu
- glukóza značená selektivně na uhlicích 1 a 2 (1,2- $^{13}\text{C}_2$  glukóza).
- Tok skrz kombinovaný oxidační a neoxidační PPP vytváří M + 1 laktát.
- zatímco glykolýza generuje pouze M + 2 laktát
- LacM + 1 / LacM + 2 odráží poměr PPP/glykolýzy



## Zdroj ribozy (oxidační versus neoxidační větve PPP),

- Ox PPP tvoří M + 1 ribóza fosfát;
- non-oxPPP vytváří M + 2 ribóza fosfát.

# Literatura

Obečné (review) publikace vhodné pro orientaci v problematice:

1. Antoniewicz, M. R. (2013). "<sup>13</sup>C metabolic flux analysis: optimal design of isotopic labeling experiments." *Curr Opin Biotechnol* 24(6): 1116-1121.
2. Buescher, J. M., et al. (2015). "A roadmap for interpreting (13)C metabolite labeling patterns from cells." *Curr Opin Biotechnol* 34: 189-201.
3. Dai, Z. and J. W. Locasale (2017). "Understanding metabolism with flux analysis: From theory to application." *Metab Eng* 43(Pt B): 94-102.
4. Jang, C., et al. (2018). "Metabolomics and Isotope Tracing." *Cell* 173(4): 822-837.
5. Balcells, C., et al. (2019). "Tracing metabolic fluxes using mass spectrometry: Stable isotope-resolved metabolomics in health and disease." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 120; ARTN 115371 10.1016/j.trac.2018.12.025
6. Long, C. P. and M. R. Antoniewicz (2019). "High-resolution (13)C metabolic flux analysis." *Nat Protoc* 14(10): 2856-2877.





# Laboratoř analytické biochemie a metabolomiky BCLAB Team

[www.bclab.eu](http://www.bclab.eu) – momentálně v přestavbě

Petr  
Šimek

Martin  
Moos

Kružberská  
Pavla

Berková  
Petra

Zahradníčková  
Helena

Stanislav  
Opekar

Jegorov  
Alexandr jr.

Vodrážka  
Petr

Řimnáčová  
Lucie

Járová  
Jana



Mateřská dovolená: Jana Moosová, Iva Opekarová, Klára Pilsová, Marešová Lucie