

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Imunochemická detekce a kvantifikace
antimikrobiálních peptidů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavlína Botíková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Daníhlík, Ph.D.
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, pomoc, trpělivost také za velice cenné připomínky při sepisování a vypracovávání této diplomové práce.

Poděkování patří také prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za provedení analýzy proteinů pomocí MALDI-TOF.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé katedře biochemie za vstřícný přístup během studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Pavlína Botíková
Název práce	Imunochemická detekce a kvantifikace antimikrobiálních peptidů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Antimikrobiální peptidy jsou velice významnou složkou ochrany vyskytující se napříč všemi organismy. Velice důležitou roli představují v humorální imunitě živočichů. Tato diplomová práce je zaměřena především na hmyzí antimikrobiální peptidy. Je popsána obecná struktura antimikrobiálních peptidů, mechanismus jejich vzniku a účinku a případné rozdělení. Rovněž jsou popsány antimikrobiální peptidy, které se vyskytují u včely medonosné, jelikož jejich detekcí se zabývá následná experimentální část. V této části byly antimikrobiální peptidy obsažené ve včelí hemolymfě nejprve separovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s následným Western blotem. Separované peptidy byly identifikovány metodou nLC-MALDI-TOF v příslušných oblastech molekulové hmotnosti získaných na základě imunochemické detekce. Identifikovány byly peptidy defensin-1 a hymenoptaecin. Abaecin nebylo možno tímto způsobem prokázat. Tímto tak byla ověřena specifita primárních protilátek cílených na dané peptidy, jichž bylo následně použito pro optimalizaci detekce peptidů ELISA metodou. Optimalizace ELISA metody pro vhodné stanovení daných antimikrobiálních peptidů probíhala v několika krocích, kdy bylo optimalizováno vhodné ředění jednotlivých protilátek specifických pro každý peptid a také sekundární protilátky, stejné pro všechny peptidy. Dále byly optimalizovány vhodné podmínky pro správný průběh imobilizace antigenu na povrch jamek a rovněž byl zkoumán vliv stáří roztoku pro přípravu chromogenního substrátu na výslednou absorbanci. Optimalizovaný postup metody byl vyzkoušen jak na</p>

vzorcích včelí hemolymfy, tak i na vzorcích proteinových extraktů z rozlišných částí včelího těla. ELISA metoda byla vyhodnocena jako další vhodná technika pro detekci a kvantifikaci antimikrobiálních peptidů.

Klíčová slova	Antimikrobiální peptidy, abaecin, defensin, hymenoptaecin, ELISA, Western blot, včela medonosná
Počet stran	75
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Pavlína Botíková
Title	Immunochemical detection and quantification of antimicrobial peptides
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
The year of presentation	
Abstract	<p>Antimicrobial peptides are a very significant component of immune protection occurring across all organisms. They play a very important role in the humoral immunity of animals. This diploma thesis is focused mainly on insect antimicrobial peptides. It describes the general structure of antimicrobial peptides, the mechanism of their formation, their effect, and possible division. Antimicrobial peptides that occur in honey bees are also described, as their detection is addressed in the following experimental section. In this section, the antimicrobial peptides contained in bee hemolymph were first separated by polyacrylamide gel electrophoresis, followed by Western blot. The separated peptides were identified by nLC-MALDI-TOF in the appropriate molecular weight regions obtained by immunochemical detection. The peptides defensin-1 and hymenoptaecin were identified. Abaecin could not be detected by this protocol. Thus, the specificity of the primary antibodies targeted to the given peptides was verified, it was subsequently used to optimize the detection of peptides by ELISA. The optimization of the ELISA method for the appropriate determination of the given antimicrobial peptides took place in several steps, when the appropriate dilutions of individual antibodies specific for each peptide as well as secondary antibodies, were tested and evaluated. Furthermore, suitable conditions for the antigen immobilization on the surface of the wells were optimized and the effect of the age of the solution for the preparation of the chromogenic substrate on the resulting absorbance was investigated. The optimized procedure of the</p>

method was tested both on samples of bee hemolymph and on samples of protein extracts from different parts of the bee body. The ELISA method was evaluated as another suitable technique for the detection and quantification of antimicrobial peptides.

Keywords	Antimicrobial peptides, abaecin, defensin, hymenoptaecin, honey bee, ELISA, Western blot
Number of pages	75
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Antimikrobiální peptidy	2
2.1.1 Struktura a rozdělení	2
2.1.2 Mechanismus účinku.....	2
2.2 Hmyzí imunitní systém	4
2.2.1 Imunita sociálního hmyzu	5
2.2.2 Hmyzí antimikrobiální peptidy	7
2.2.2.1 Peptidy tvořící α -helixy.....	7
2.2.2.2 Peptidy bohaté na cystein.....	7
2.2.2.3 Peptidy bohaté na prolin a glycin.....	8
2.2.3 Produkce hmyzích antimikrobiálních peptidů	8
2.2.4 Signální dráhy kontrolující expresi AmP	9
2.2.4.1 Toll-like dráha.....	9
2.2.4.2 Imunodeficientní dráha	10
2.2.4.3 JAK/STAT dráha	11
2.2.5 Antimikrobiální peptidy včely medonosné	11
2.2.5.1 Apidaecin	11
2.2.5.2 Abaecin	12
2.2.5.3 Defensin	13
2.2.5.4 Hymenoptaecin	14
2.2.5.5 Další včelí antimikrobiální peptidy	14
2.2.6 Antimikrobiální peptidy vybraných druhů sociálního hmyzu	15
2.2.6.1 Čmeláci	15
2.2.6.2 Mravenci	15
2.2.6.3 Vosy	16
2.2.7 Metody analýzy včelích antimikrobiálních peptidů.....	16
2.2.7.1 Analýza antimikrobiálních peptidů pomocí imunochemických metod	17
2.3 Imunochemické metody	17
2.3.1 Antigeny.....	18
2.3.2 Protilátky.....	18
2.3.2.1 Polyklonální protilátky.....	19
2.3.2.2 Monoklonální protilátky	20
2.3.2.3 Fv fragmenty	20
2.3.3 Vazba antigenu a protilátky	21
2.3.4 Western blot analýza	21
2.3.4.1 Příprava vzorků	22
2.3.4.2 Gelová elektroforéza	22
2.3.4.3 Přenos proteinů na membránu.....	23
2.3.4.4 Imunodetekce	23
2.3.5 ELISA stanovení	24
2.3.5.1 Princip metody	24
2.3.5.2 Přímá metoda	26
2.3.5.3 Nepřímá metoda.....	26

2.3.5.4 Kompetitivní metoda.....	26
2.3.5.5 Sendvičová metoda	27
2.3.5.6 Problematika ELISA metody	28
2.3.5.6.1 Příprava primárních protilátek	28
2.3.5.6.2. Příprava sekundárních protilátek.....	29
2.3.5.6.3 Vazebné vlastnosti protilátek	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 Materiál.....	31
3.1.1 Chemikálie	31
3.1.2 Biologický materiál.....	31
3.1.3 Přístrojové vybavení	31
3.1.4 Použité pufrы a roztoky	32
3.2 Metody.....	32
3.2.1 Imunizace včel a odebrání hemolymfy	32
3.2.2 Elektroforéza AmP	33
3.2.2.1 Příprava vzorků z hemolymfy	33
3.2.2.2 Barvení gelů po elektroforéze barvivem Coomassie	33
3.2.3 Western blotting	33
3.2.3.1 Barvení membrány po blottingu.....	33
3.2.4 Imunodetekce	33
3.2.4.1 Barvení membrány po imunodetekci	34
3.2.5 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou	34
3.2.6 ELISA stanovení	35
3.2.6.1 Příprava vzorků z hemolymfy	35
3.2.6.2 Extrakce proteinů z tkání	35
3.2.6.3 Optimalizace postupu ELISA stanovení	35
3.2.6.4 Postup ELISA stanovení	35
3.2.7 Software	36
3.2.8 Statistické vyhodnocení	36
4 VÝSLEDKY	37
4.1 Vazebná specifita primárních protilátek	37
4.1.1 Identifikace vazebné specifity primární protilátky k defensinu-1.....	37
4.1.2 Identifikace vazebné specifity primární protilátky k hymenoptaecinu	42
4.1.3 Identifikace vazebné specifity primární protilátky k abaecinu	44
4.2 Stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorku hemolymfy	49
4.3 Optimalizace ELISA metody pro analýzu včelích AmP.....	50
4.3.1 Optimalizace koncentrace rozpuštěného vzorku hemolymfy a ředění primární protilátky	50
4.3.2 Optimalizace ředění sekundární protilátky	53
4.3.3 Vliv zásaditého pH vazebného pufru	54
4.3.4 Vliv teploty a doby imobilizace antigenu	55
4.3.5 Vliv stáří roztoku 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu na výslednou absorbanci.....	56

4.4 Aplikace ELISA metody pro detekci AmP	57
4.4.1 Stanovení AmP ve vzorcích včelí hemolymfy	57
4.4.2 Detekce AmP v extraktech včelích tělních částí	58
5 DISKUZE.....	59
5.1 Vazebná specifita primárních protilátek	59
5.2 Optimalizace ELISA metody pro stanovení včelích antimikrobiálních peptidů	60
6 ZÁVĚR.....	63
7 LITERATURA	65
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	75

CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše o významu antimikrobiálních peptidů (AmP) pro imunitní systém.
- Zpracování literární rešerše o produkci AmP v jednotlivých orgánech hmyzu a jejich výskytu v hemocytech a hemolymfě, dále pak se zaměřením na včely, čmeláky a další sociální hmyz.
- Rešerše metodických postupů imunochemických metod využívaných pro detekci a kvantifikaci biologicky aktivních peptidů (ELISA, Western blot,) – zpracování vzorků, provedení metod, příprava protilátek či Fv fragmentů.
- Vypracování rešerše o ELISA metodě – problematika přípravy protilátek, specifita protilátek, vyhodnocení výsledků, výběr sekundárních protilátek a detekce.
- Optimalizace zpracování vzorků včel pro imunochemickou detekci AmP.
- Optimalizace ELISA metody pro použití k detekci a kvantifikaci včelích antimikrobiálních peptidů – abaecinu, defensinu-1 a hymenoptaecinu – s využitím standardů a reálných vzorků hemolymfy či tělních extraktů.

1 ÚVOD

Antimikrobiální peptidy jsou významnou součástí humorální imunity mnoha živých organismů. Jedná se o krátké řetězce aminokyselin, které se účastní procesu inhibice růstu patogenu v těle hostitelského organismu a tím zvyšují jeho odolnost vůči těmto patogenům. V současné době se zvyšuje poptávka po hledání léčiv alternativních k antibiotikům, proti nimž si již velká řada bakterií vytvořila rezistenci. Právě antimikrobiální peptidy by mohly být v tomto směru velmi užitečné, neboť většinou je jejich antimikrobiální aktivita cílena právě proti bakteriím.

Včelstva jsou ohrožována velkým množstvím různě závažných chorob různého původu. Některým lze vcelku snadno předcházet, jiné jsou tak nebezpečné, že mohou způsobovat velmi rozsáhlé škody. V některých případech je možné tyto choroby léčit, mnohdy však není žádná léčba dostupná. Pro lepší pochopení včelí imunity a fungování jejich mechanismů je důležité neustále vyvíjet další metody, které by mohly v tomto výzkumu významně posloužit. Velice slibnou metodou pro rychlou detekci včelích antimikrobiálních peptidů by mohla být ELISA metoda založená na imunochemické reakci.

Je všeobecně známým faktem, že dochází k rapidnímu snižování hmyzí populace na celé planetě. Mezi ohrožené druhy patří také různé druhy včel, jejichž četnost neustále klesá. Významný podíl na tomto poklesu mají právě včelí patogeny, kromě nich zde však působí také jiné faktory často související s lidskou hospodářskou činností. Nejen kvůli tomu je důležité zkoumat imunitu včel a stále rozvíjet metody k tomu určené.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AmP) se přirozeně vyskytují v nespecifické imunitě většiny organismů zahrnující jak rostliny, hmyz, obojživelníky a savce, tak i některé bakterie, houby či řasy. Tyto peptidy se od sebe vzájemně liší nejen strukturou, ale také funkcí. Jako první byly objeveny u bezobratlých (Gomes et al., 2015). Antimikrobiální peptidy jsou velice významnou skupinou látek, jež byly během evoluce zakonzervovány jako trvalá složka nespecifické imunity a vyskytují se tak od prokaryot až po obratlovce (Giuliani et al., 2007). Mohou být také produkovány a získávány rekombinantně, čehož lze využít například při hledání vhodné alternativy antibiotik (Gomes et al., 2015)

2.1.1 Struktura a rozdělení

Antimikrobiální peptidy jsou proteiny o nízké molekulové hmotnosti (2–9 kDa) vykazující antimikrobiální aktivitu vůči infekčním patogenům, což jsou nejčastěji bakterie, viry nebo houby (Ongey et al., 2018). Dokonce mohou také vykazovat jistou aktivitu vůči rakovinotvorným buňkám (Borah et al., 2020). AmP se skládají jak z hydrofobních, tak i hydrofilních postranních řetězců, díky čemuž jsou rozpustné ve vodném prostředí (Wu et al., 2018).

Na základě jejich celkového náboje se antimikrobiální peptidy rozdělují na kationické a anionické. Nejvíce zastoupenou skupinou jsou kationické AmP mající kladný náboj, který je způsoben bohatým zastoupením lysinu a argininu (Hultmark, 2003). Anionické AmP, které vykazují záporný charakter náboje, jsou zastoupeny pouze v minoritním množství a vyskytují se zejména v rostlinách (Borah et al., 2020).

Antimikrobiální peptidy se skládají do sekundárních struktur, které jsou nejčastěji zastoupeny čtyřmi motivy: α -helixy, β -listy, smyčky a prodloužené peptidy. Přirozeně se vyskytují nejčastěji α -helixy a β -listy (Giuliani et al., 2007). Exprese antimikrobiálních peptidů je závislá na typu tkáně, buněčných liniích či stavu diferenciaci dané buňky. Samotná exprese probíhá buď kontinuálně, nebo může být spuštěna přítomností patogenu či jiným narušením integrity organismu (Brown & Hancock, 2006).

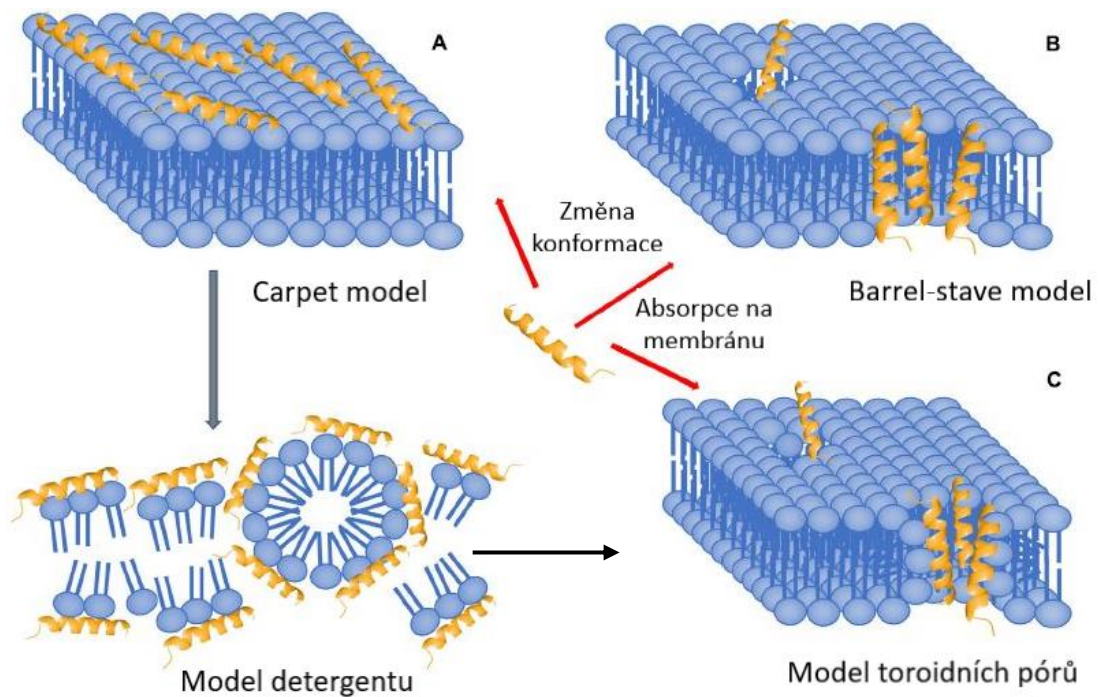
2.1.2 Mechanismus účinku

Přesný mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů dosud není plně objasněn, obecně se však projevuje interakcí a destabilizací mikrobiální buněčné membrány, což následně vede k buněčné smrti (Amso & Hayouka, 2019). Mechanismus membránové

permeace je založen na mnoha parametrech, jako je sekvence aminokyselin (AMK), koncentrace peptidů (Giuliani et al., 2007), náboj, amfipatický charakter nebo sekundární struktura (Seyfi et al., 2020). Na základě jejich interakce s buněčnou membránou lze antimikrobiální peptidy rozdělit na membránově působící a membránově nepůsobící.

První skupina peptidů zahrnuje především kationické AmP, které způsobují narušení buněčné membrány a účastní se hlavně antifungální a antibakteriální aktivity (Wu et al., 2018). Membránově působící antimikrobiální peptidy interagují s bakteriální buněčnou membránou prostřednictvím elektrostatických sil (Teixeira et al., 2012). Tyto síly vznikají mezi záporně nabitými fosfolipidy v membráně prokaryotické buňky a kladnými determinantami AmP rozhodujícími pro interakci. Kationtové AmP reagují prostřednictvím selektivních reakcí se záporně nabitými membránami, což se projeví jejich sbalením do sekundárních struktur, propustností membrány a jejím následným narušením (Wu et al., 2018). Gomes et al., 2015 uvádí, že pro přesnější popsání průchodu AmP přes membránu se používají čtyři modely znázorněné na obr. 1 – Carpet model, barrel-stave model, model toroidních pórů a model detergentu.

Peptidy nepůsobící na membránu vstupují do intracelulárního prostoru cílových buněk prostřednictvím dvou způsobů. Jedná se o přímý vstup spontánním pohybem AmP nebo endocytózu. Vstup do buňky je často zprostředkován za pomoci receptorů a přenašečů na povrchu membrány. Po průchodu membránou AmP uvnitř prokaryotické buňky cílí na intracelulární složky a blokuje rozhodující pochody. Mezi takové procesy patří zejména blokace syntézy nukleových kyselin a proteinů, nesprávné skládání proteinů, odtok ATP či inhibice působení enzymů (Borah et al., 2020).



Obr. 1: Mechanismy působení antimikrobiálních peptidů na membránu. a) Carpet model – peptidy se kumulují na povrchu membrány a vytváří tzv. koberec, čímž ovlivní interakce na povrchu membrány. Ztráta integrity vede ke zhroucení membrány na micely – efekt detergentu; b) Barrel-stave model – peptidy spolu agregují, umísťují se do membrány paralelně s fosfolipidy, a nakonec vytváří iontový kanál; c) Model toroidních pórů – peptidy se zapouzdřují paralelně s orientací membrány – hydrofilní část peptidů směřuje mimo membránu a hydrofobní část je ve středu membrány – načech po jejich ohybu dojde k vytvoření kruhového otvoru (převzato a upraveno dle Huan et al., 2020).

2.2 Hmyzí imunitní systém

Hmyz na rozdíl od savců zcela postrádá mechanismy specifické imunity, a tak je při obraně před účinkem patogenů odkázán pouze na imunitu nespecifickou, která se skládá z buněčné a humorální složky. Buněčná imunita zahrnuje fagocytózu, nodulaci a enkapsulaci patogenů (Williams, 2007), které zprostředkovávají prohemocyty, granulocyty a plasmacyty (Wilson-Rich et al., 2009). Humorální imunita je zastoupena především produkcí antimikrobiálních peptidů, ale její významnou část tvoří také enzym fenoloxidas (PO; EC 1.14.18.1), jehož aktivace vede v konečném důsledku k melanizaci patogenu (Cerenius & Söderhäll, 2004). Komponenty humorální imunity jsou exprimovány převážně v tukovém tělese a hemocytech, dále pak také v kutikule, slinných žlázách nebo ve střevě (Hoffmann et al., 1999; Ilyasov et al., 2013).

Odezvy buněčné imunity a fenoloxidasový systém spadají mezi tzv. konstitutivní imunitní faktory, které jsou vždy přítomné, ačkoliv jejich aktivita není maximální, ale spíše udržovací. Odpověď konstitutivních faktorů je nespecifická, avšak okamžitá. Oproti tomu inducibilní imunitní faktory, mezi něž patří zejména antimikrobiální peptidy,

jsou produkovány až na základě rozpoznání specifického patogenu. Tato imunitní odezva je opožděnější, avšak mnohem účinnější než u konstitutivní odpovědi (Laughton et al., 2011).

2.2.1 Imunita sociálního hmyzu

Sociální hmyz je specifickou kategorií hmyzu, jehož zástupci v ochraně před patogeny kromě individuální imunity vyvinuli i speciální kolektivní imunitu. Objevuje se hlavně u mravenců, čmeláků, včel, termitů nebo vos. Jedinci těchto druhů, kteří spolu žijí ve velmi těsné soudržnosti a v mnoha případech se jedná o genetické příbuzné, si vyvinuli zvláštní fyziologické, behaviorální a organizační mechanismy (Cremer et al., 2007; Wilson-Rich et al., 2009). Kolektivní imunita má pro sociálně žijící hmyz nesmírně důležitý význam. Na rozdíl od hmyzu žijícího samotářsky mají výrazně omezený soubor genů souvisejících s imunitou (Erler et al., 2011).

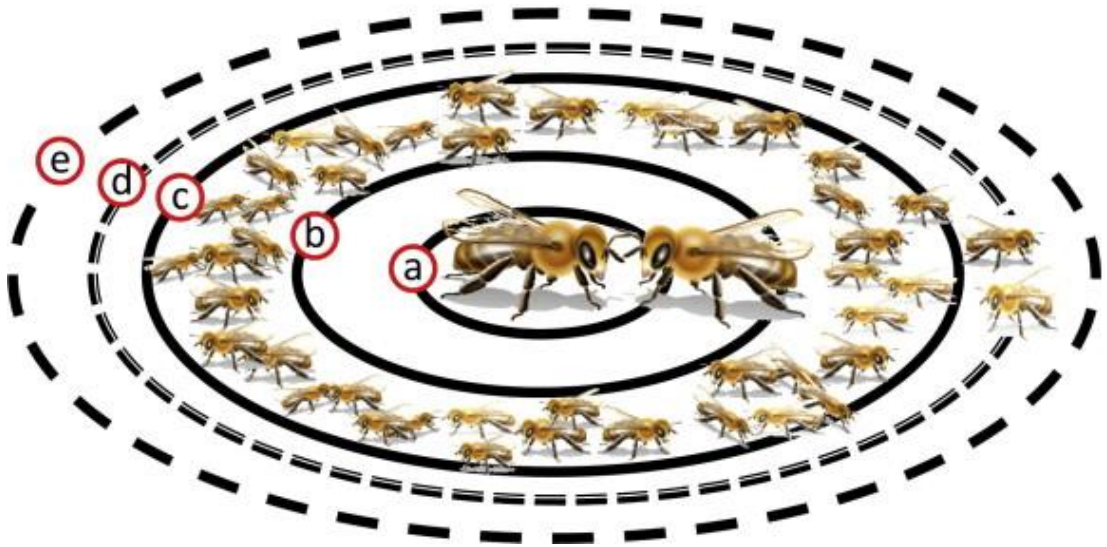
Sociální chování hmyzu je založeno na několika principiálních úrovních (obr. 2). V první řadě stojí především snaha zabránit patogenu vůbec do kolonie vstoupit. Společenstva si mohou zakládat hnízda, a bránit tak vstupu mikroorganismů fyzickou zábranou. Například včely mají speciální funkci strážkyň, které u vstupu do hnízda jednak zabraňují vstupu nepřítele, ale také kontrolují a na základě pachového testu selektují nakažené jedince (Cremer et al., 2007).

Neméně významným mechanismem ochrany je hygiena uvnitř hnízda. Sociální hmyz jednak dezinfikuje vnitřní prostředí hnízda antimikrobiálními látkami (u včel je úl např. vystýlán propolisem, jenž vykazuje antimikrobiální účinky), a za další odstraňuje uhynulé jedince. V některých případech, třeba při napadení včelí kolonie hnilobou včelího plodu nebo kleštíkem včelím, jsou odstraňovány také napadené larvy a kukly (Cremer et al., 2007; Evans & Spivak, 2010; Wilson-Rich et al., 2009).

Velmi důležitým mechanismem ochrany je také tzv. grooming, při němž dochází v reakci na vystavení patogenu k zahřátí těla jedince nad fyziologickou teplotu. Organismus jedince toto krátkodobé vychýlení zvládá, pro mikroorganismus je však značně nepříznivá (Wilson-Rich et al., 2009). Další jev, který výrazně přispívá k ochraně, je organizace práce a dělení kolonie do kast podle stáří, kdy jednotlivé skupiny vykonávají jinou činnost (Evans & Spivak, 2010).

Sociální chování však může mít pro zdraví kolonie i negativní přínos. Díky těsnému soužití a častému kontaktů jedinců se infekce může paradoxně snadněji šířit. Stav může zhoršovat i fakt, že mnohdy se jedná o blízké příbuzné, což snižuje diverzitu a tím

i individuální ochranu. Z toho důvodu je velmi důležité, aby se v plné míře zachovala i imunitní ochrana každého jedince zvlášť (Cremer et al., 2007).



Obr. 2: Jednotlivé úrovně sociální ochrany ve včelí kolonii: a) individuální ochrana založená na humorální a buněčné imunitě, b) párově založené mechanismy, především tzv. grooming, c) organizace kolonie do kast a dělba práce a z toho vycházející hygiena uvnitř hnízda, d) snižování rizika vstupu patogenu do prostředí úlu, e) využívání ochranných prostředků s antimikrobiálním účinkem, např. desinfekce úlu propolisem (spřevzato a upraveno dle Evans & Spivak, 2010).

2.2.2 Hmyzí antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy tvoří u hmyzu zcela nepostradatelnou součást humorální imunity (Li et al., 2012). Úplně první hmyzí antimikrobiální peptid byl izolován v roce 1980 z kukly můry *Hyalophora cecropia*, podle níž byl nazván cecropinem (Yi et al., 2014). Od té doby bylo u zástupců hmyzí říše identifikováno a izolováno přes 200 AmP (Daníhlík et al., 2015). Počet AmP se liší napříč druhy, kdy například invazivní druh slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) disponuje více než 50 peptidy, zatímco u kyjatky hrachové (*Acyrtosiphon pisum*), která se řadí mezi mšice, nebyl identifikován žádný (Rahnamaeian et al., 2015).

Společnými znaky AmP napříč jednotlivými hmyzími druhy jsou nízká molekulová hmotnost (okolo 5 kDa a méně), kladný náboj při fyziologických hodnotách pH nebo přítomnost amfifilních sekundárních struktur jako jsou α -helixy či β -listy (Bulet et al., 1999). Na základě těchto struktur nebo jiných specifických sekvencí se hmyzí AmP rozdělují do několika skupin.

2.2.2.1 Peptidy tvořící α -helixy

Skupinu peptidů tvořících α -helixy zastupují především cecropiny, které jsou tvořeny dvěma lineárními α -helixy, jež jsou vzájemně spojeny tzv. pantem (Li et al., 2012). Cecropin sestává ze 35–39 aminokyselinových jednotek a jeho antimikrobiální účinek je zacílen především proti bakteriím – gram-pozitivním i gram-negativním – a houbám. Tuto aktivitu zajišťují hlavně lineární α -helixy, které se začleňují do buněčné membrány bakterií a narušují ji (Lee et al., 2015). Kromě toho jsou aktivní také v případě napadení parazity jako jsou plasmodium nebo trypanosoma (Yi et al., 2014). Cecropin byl kromě můr izolován také z bource morušového (*Bombyx mori*), octomilky (*Drosophila melanogaster*) nebo z mouchy domácí (*Musca domestica*) (Lee et al., 2015)

2.2.2.2 Peptidy bohaté na cystein

Nejpočetnější skupinu hmyzích peptidů bohatých na cystein představují defensiny, které byly identifikovány poměrně velké části hmyzu, jako jsou např. zástupci řádu dvoukřídlých, brouků, blanokřídlých nebo vážek (Bulet et al., 1999; Li et al., 2012). Jedná se o molekuly o velikosti menší než 4 kDa sestávajících z 34–51 aminokyselinových jednotek a s kationickým nábojem (Yi et al., 2014) Pro defensiny je charakteristická přítomnost 6 cysteinů, které mezi sebou vytvářejí disulfidové můstky: Cys 3–Cys 30, Cys 16–Cys 36 a Cys 20–Cys 38 (Lepage et al., 1991).

Antimikrobiální aktivita hmyzích defensinů je zaměřena především proti gram-pozitivním bakteriím, v menší míře ale také vykazují určitou aktivitu i vůči gram-negativním bakteriím, houbám, kvasinkám, a dokonce i prvokům (Bulet et al., 1999). Jak popisuje Yamaguchi & Ouchi, 2012, antimikrobiální aktivita defensinů je podmíněna přítomností solí, kdy vysoké koncentrace NaCl jejich aktivitu výrazně snižují.

2.2.2.3 Peptidy bohaté na prolin a glycin

Peptidy jako coleoptericin, diptericyny, attaciny, hymenoptaeciny nebo gloveriny obsahují ve své struktuře velké množství glycinů. Obsah glycinových jednotek ovlivňuje terciální strukturu peptidů, což se ve výsledku projevuje i na mechanismus jejich antimikrobiálního účinku. Většina peptidů bohatých na glycin je nejefektivnější vůči gram-negativním bakteriím, avšak ukázalo se, že například včelí hymenoptaecin vykazuje jistou aktivitu i proti některým z gram-pozitivních bakterií (Mylonakis et al., 2016).

Peptidy bohaté na prolin sestávají z 15–39 aminokyselinových jednotek a řadí se mezi ně např. drosocin, metchnikowin, pyrrhocorin, abaecin, apidaecin, formaecin nebo lebocin. Jejich struktura je tvořena dvěma doménami, z nichž jedna je konzervovaná a odpovídá za obecnou aktivitu, kdežto ta druhá je variabilnější a je spojena spíše se specifickým cílením (Mylonakis et al., 2016). Peptidy s bohatým zastoupením prolinů, jejichž řetězec je tvořen méně než 20 AMK, jsou primárně cíleny proti gram-pozitivním bakteriím, zatímco peptidy s delším řetězcem (více než 20 AMK), vykazují aktivitu vůči gram-negativním bakteriím a také houbám (Rahnamaeian et al., 2015).

2.2.3 Produkce hmyzích antimikrobiálních peptidů

Většina peptidů vzniká ve formě inaktivních prekurzorů a k jejich aktivaci dochází ve výsledné tkáni proteolýzou (Yi et al., 2014). Jak uvádí Rahnamaeian et al., 2015, hmyzí AmP spolu velmi často interagují; dokonce mohou být exprimovány současně a společně se i vyskytovat. Těchto interakcí je dosaženo buď synergismem (více peptidů má větší odezvu), potenciací (jeden peptid zvyšuje aktivitu těch dalších) nebo funkční divergizací (aktivita se násobí a kombinuje, což zvyšuje odpověď).

Ke vzniku AmP dochází převážně v tukovém tělese hmyzu – konkrétně v adipocytech, a to na základě infekce nebo poranění. Odtud jsou pak sekretovány do hemolymfy (Lamberty et al., 2001). Peptidy jako např. defensiny, cecropin či attaciny, vznikají transkripcí genu pro ten daný protein v reakci na rozpoznání specifického znaku

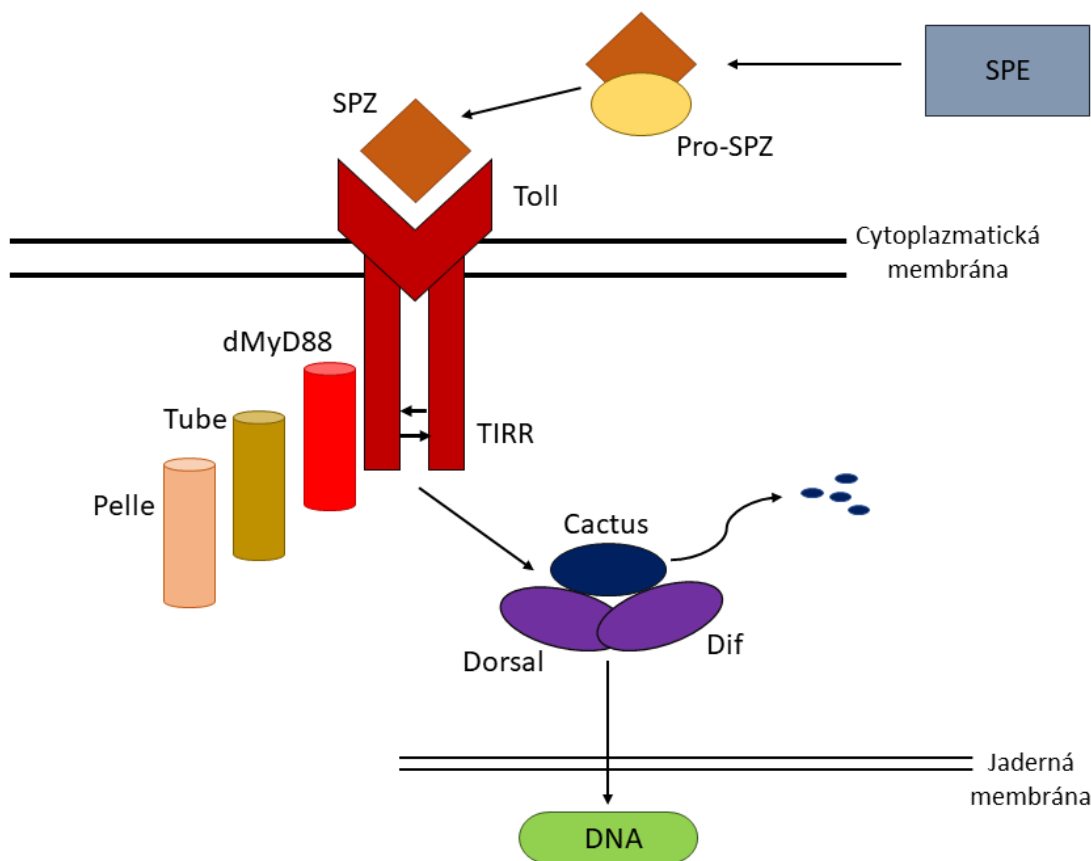
patogenu, který byl rozpoznán určitým receptorem. Dochází k tomu prostřednictvím fagocytů, které pohlcují mikroorganismy a po jejich natrávení generují induktory syntézy AmP. Induktory podněcující syntézu AmP jsou zejména lipolysacharidy, peptidoglykany nebo β -1,3-glykany. Fagocyty tyto induktory buď vylučují do hemolymfy, anebo se přímo vážou s adipocyty tukové tkáně či s hemocyty. (Hoffmann & Hetru, 1992; Ilyasov et al., 2013).

2.2.4 Signální dráhy kontrolující expresi AmP

Proces exprese antimikrobiálních peptidů je primárně regulován na úrovni transkripce (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Lemaitre et al., 1997 demonstrovali, že v případě humorální imunity hmyzu dochází k rozlišování druhů mikroorganismů a na základě toho jsou aktivovány různé dráhy kontrolující expresi, což vyvolává produkci AmP adekvátních k dané infekci. Několik možných drah exprese bylo studováno především na octomilce jakožto modelovém organismu (Engström, 1999).

2.2.4.1 Toll-like dráha

Velmi významnou dráhou kontrolující expresi je Toll-like dráha, která je založena na signalizaci pomocí transmembránových Toll-like receptorů (TLR). Tato dráha je aktivována především gram-pozitivními bakteriemi a houbami. Jak znázorňuje obr. 3, v odpovědi na infekci je nejprve aktivován SPE enzym (Spätzle, processing enzyme), z něhož je proteolyticky odštěpena Spätzle doména, která se váže k Toll-like receptoru vázanému např. v membráně buněk tukového tělesa (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Konformační změna aktivovaného receptoru vyvolá zformování receptorového komplexu proteiny obsahující tzv. mrtvé domény (death-domain, DD) – Pelle, Tube a dMyD88. Aktivace tohoto komplexu vyvolá fosforylaci NF- κ B inhibitoru Cactus, přičemž dojde k uvolnění Rel transkripčních faktorů Dif a Dorsal. Tyto faktory jsou translokovány do jádra, kde vazbou na efektor ovlivňují transkripci genu příslušného antimikrobiálního peptidu (Evans, 2006; Lemaitre & Hoffmann, 2007).



Obr. 3: Schematické znázornění signální dráhy Toll. Kaskádou serinových proteas je aktivován SPE enzym, (Spätzle processing enzyme), z něhož se odštěpí Spätzle protein (SPZ), který se váže na receptorovou doménu Toll v membráně. Tím dojde k dimerizaci TIRR domén. Přes proteiny Pelle, Tube a dMyD88 dochází k přenosu signálu, který vede k fosforylaci inhibitoru Cactus, jež je tímto degradován. Transkripční faktory Dif a Dorsal přechází do jádra, kde aktivují transkripci genů pro expresi AmP (upraveno podle Evans, 2006; Lemaitre et al., 1997).

2.2.4.2 Imunodeficientní dráha

Imunodeficientní (Imd) dráha je aktivována zejména rozpoznáním peptidoglykanů gram-negativních bakterií, nicméně byly pozorovány i případy aktivace gram-pozitivními bakteriemi nebo houbami, které na svém povrchu exprimovaly podobné peptidoglykany (Evans, 2006). K aktivaci genů pro peptidy jako jsou cecropin, drosocin, diptericin nebo attacin (Bulet & Stocklin, 2005, s. 200) dochází interakcí bakteriálních peptidoglykanů s peptidoglykany rozlišujícími receptory (PGRP) vázanými v membráně buněk tukového tělesa, které uvádí v činnost intracelulární protein Imd. Jedná se o protein obsahující mrtvé domény a interagující s adaptérem dFADD, který k sobě váže kaspasu Dredd. Kaspasa Dredd je asociována s NF- κ B transkripčním faktorem Relish, který je aktivován fosforylací a odštěpuje Rel doménu, jež následně putuje do jádra

(Lemaitre & Hoffmann, 2007). Kromě aktivace transkripčního faktoru Relish může Imd dráha aktivovat také komponenty signální dráhy JNK (Evans, 2006).

2.2.4.3 JAK/STAT dráha

JAK/STAT signální dráha sestává ze tří hlavních komponent: cytokinového receptoru (Domeless), JAK tyrosinové kinasy (Hopscotch) a STAT transkripčního faktoru. Jako ligand, který se váže na cytokinový receptor funguje protein Upd, jenž celou dráhu aktivuje. JAK kinasa začne fosforylovat tyrosinové zbytky na receptoru, čímž se vytvoří vazebná místa, na která následně nasedne STAT transkripční faktor. JAK kinasa fosforyluje navázané STAT faktory za vzniku dimeru, který poté může putovat do jádra. Předpokládá se, že JAK/STAT dráha zejména indukuje odpověď na různé stresové stavy, zvláště ty způsobené poraněním tkáně (Evans, 2006; Lemaitre & Hoffmann, 2007).

2.2.5 Antimikrobiální peptidy včely medonosné

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je patrně nejznámějším zástupcem rodu včel. Jedná se o typického zástupce sociálního hmyzu, který žije v sociálním společenství uvnitř hnízda (úlu) a svou kolonii chrání hlavně na základě sociální imunity.

Imunitní systém včely medonosné je tvořen celulární a humorální nespecifickou imunitou. Antimikrobiální peptidy, jakožto součást humorální imunity, mají nepostradatelný význam také pro včely. V současnosti byly u včely medonosné identifikovány čtyři AmP vyskytující se v hemolymfě. Další antimikrobiální peptidy se nachází také v mateří kašičce, v medu a ve včelím jedu (Daníhlík et al., 2015).

2.2.5.1 Apidaecin

Apidaecin je peptid z rodiny peptidů bohatých na proliny, který ve své struktuře obsahuje 17–18 aminokyselin. V hemolymfě včel medonosných infikovaných bakteriemi byly identifikovány 3 isoformy apidaecinu – Ia, Ib, III (Li et al., 2006; Xu et al., 2009). Přítomnost 6 prolinových skupin zajišťuje těmto isoformám apidaecinu stabilitu při nízkém pH a vysoké teplotě (100 °C) (Casteels et al., 1989).

Dutta et al., 2008 publikovali, že C-konec včelího apidaecinu, který je sekvenčně velmi konzervovaný, zodpovídá za antimikrobiálního účinek. Odebrání jedné aminokyseliny z tohoto konce způsobilo více než 50 % ztrátu antimikrobiální aktivity. Oproti tomu odebrání aminokyseliny z N-konce, který je sekvenčně více variabilní, způsobilo jen minimální změnu v aktivitě.

Apidaecin Ia, Ib a III vykazují přiměřeně stejný antimikrobiální účinek vůči gram-negativním bakteriím, avšak jejich koncentrace v hemolymfě se může výrazně lišit. Apidaecin Ib představuje 80–90 % celkového množství, apidaecin III tvoří 5–15 % a množství apidaecinu Ia nepřesahuje víc než 5 %. Celkové množství apidaecinu v hemolymfě včely může tvořit až $50 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Li et al., 2006).

Apidaecin na rozdíl od jiných peptidů při napadání bakterií nenarušuje buněčnou membránu. Jeho účinek je tak spíše bakteriostatický než bakteriolytický. (Casteels et al., 1989; Casteels & Tempst, 1994). Mechanismus účinku spočívá v tom, že apidaecin se váže na komponenty bakteriální membrány, např. LPS. Poté následuje jeho invaze do periplazmatického prostoru, kde se váže na molekuly zapojené do receptorového transportu, díky čemuž se dostává přes vnitřní membránu a uvnitř buňky se váže na svůj cíl (Li et al., 2006).

2.2.5.2 Abaecin

Abaecin je peptid složený z 33–34 aminokyselinových jednotek a řadí se mezi peptidy bohaté na prolin (Casteels et al., 1990). Xu et al., 2009 provedli výzkum na včele východní (*Apis cereana*), v jejíž hemolymfě detekovali dva peptidy. Rozdíl mezi peptidy je dán přítomností různých aminokyselin na stejných pozicích. Byl popsán i prekurzor těchto peptidů, který je tvořen 19 aminokyselinami. Na rozdíl od jiných AmP prekurzor abaecinu zcela postrádá pro-region a je aktivní ihned poté, co opouští endoplazmatické retikulum. Jeden z peptidů, konkrétně abaecin-I, byl identifikován také u včely medonosné (Daníhlík et al., 2015). Exprese abaecinu je regulována IMD dráhou (Tian et al., 2010).

Abaecin je účinný zejména vůči gram-pozitivním bakteriím. K jeho indukci a expresi dochází přibližně 24 hod od vystavení patogenu. V souvislosti v infekcí gram-pozitivní bakterií *Paenibacillus larvae*, která vyvolává onemocnění zvané mor včelího plodu, bylo zjištěno, že abaecin se vyskytuje nejen v hemolymfě dospělých jedinců, ale jeho prekurzor byl detekován také v hemolymfě larev. Z toho vyplývá, že včely jsou schopny reagovat na přítomnost *P. larvae* již v prvních stádiích vývoje, konkrétně v prvním instaru. Poté míra transkripce abaecinu poněkud klesá (Evans, 2004). Zároveň může abaecin vykazovat aktivitu i proti některým gram-negativním bakteriím a to především těm, které jsou rezistentní k apidaecinu (Xu et al., 2009).

2.2.5.3 Defensin

Včelí defensiny jsou zastoupeny dvěma peptidy – defensinem-1 a defensinem-2, které jsou kódovány dvěma různými geny. Defensin-1 je zastoupen třemi izoformami, z nichž jedna se vyskytuje v hemolymfě a další dvě jsou součástí mateří kašičky pod názvem royalisin (Ilyasov et al., 2013).

Na rozdíl od defensinu-1 má defensin-2 o něco delší prekurzor pro-peptidu. Aktivní peptid defensinu-1 se skládá z 51 aminokyselin, zatímco defensin-2 tvoří pouze 43 aminokyselin. Ve výsledku spolu obě formy mají strukturu stejnou pouze z 55,8 % (Ilyasov et al., 2013). Exprese obou genů defensinu je kontrolována synergicky dráhami Toll a Imd (Aronstein et al., 2010) Defensin včel má na rozdíl od defensinu jiných hmyzích druhů amidovaný C-konec (Casteels-Josson et al., 1994).

Defensiny jsou aktivní vůči rozmanité škále gram-pozitivních bakterií. Rovněž však mohou vykazovat aktivitu i proti některým gram-negativním bakteriím a jako jediné včelí AmP jsou účinné i proti některým houbovým patogenům či kvasinkám (Klaudiny et al., 2005). Defensiny jsou obecně produkovány později než jiné antimikrobiální peptidy, jejich aktivita je však na rozdíl od ostatních peptidů schopna přetrvat až po dobu dvou týdnů (Casteels et al., 1989).

Kromě hemolymfy se jedna z isoform defensinu-1 – royalisin – vyskytuje také v mateří kašičce. Jednalo se o první objevený defensin, až poté byl identifikován jako jedna z více isoform. Od peptidu objevujícího se v hemolymfě se royalisin liší pouze v jedné aminokyselině a tím pádem i v pořadí dalších dvou aminokyselin: isoforma defensinu-1 v hemolymfě obsahuje arginin, zatímco v royalisinu je na jeho místě tyrosin (Casteels-Josson et al., 1994; Klaudiny et al., 2005).

Royalisin je významným faktorem podílejícím se na sociální imunitě včel. Je sekretován žlázami v hlavě a hrudníku včely, odkud je pak vylučován do mateří kašičky a medu. Mateří kašička slouží jako potrava pro včelí larvy a díky přítomnosti royalisinu jsou larvy chráněny před bakteriální infekcí (Klaudiny et al., 2005). Kwakman et al., 2010 ve svém výzkumu popsali antimikrobiální vlastnosti medu, jež jsou zaručeny přítomností methylglyoxalu, peroxidu vodíku a samozřejmě antimikrobiálního peptidu royalisinu. Ukázalo se, že již 10 % roztok medu vykazuje antimikrobiální účinek a zabíjí bakterie *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* nebo bakterii rezistentní na methycilin *Staphylococcus aureus*.

2.2.5.4 Hymenoptaecin

Hymenoptaecin patří do rodiny peptidů bohatých na glycin. Jeho struktura je tvořena 93 aminokyselinami, přičemž 18–19 % připadá na glycin (Casteels et al., 1993).

Hymenoptaecin inhibuje životaschopnost jak gram-pozitivních tak i gram-negativních bakterií. Jeho účinek spočívá v permeabilizaci buněčné membrány bakterií (Gao & Zhu, 2010). Spolu s apidaecinem je hymenoptaecin považován za klíčový peptid včelí imunity, a to z toho důvodu, že když byla měřena hladina AmP u včel, které byly přirozeně infikovány běžnými patogeny, byly detekovány hlavně tyto dva proteiny. Vzhledem k tomu, že hymenoptaecin působí i proti gram-pozitivním bakteriím, lze se domnívat, že působí synergicky spolu a apidaecinem (Xu et al., 2009).

Randolt et al., 2008 na základě inokulace larev a mladých včel bakterií *E. coli* zjistili, že v jejich hemolymfě se 24 h po infekci objevuje hymenoptaecin. Zároveň byl hymenoptaecin u larev detekován také v rámci aseptických poranění. Jeho množství je však v hemolymfě larev oproti dospělým jedincům stále výrazně nízké (Chan et al., 2006).

2.2.5.5 Další včelí antimikrobiální peptidy

Kromě royalisinu uvedeného výše se v mateří kašičce vyskytuje také skupina jelleinů tvořená čtyřmi peptidy. Jelleiny I-III vykazují antimikrobiální aktivitu proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím a kvasinkám, zatímco jellein IV antimikrobiální účinek zcela postrádá. Nejvýraznější aktivita byla zaznamenána u jelleinu I. U dalších dvou typů je účinek sice menší, nicméně je mezi všemi peptidy pozorován synergický efekt (Romanelli et al., 2011).

Antimikrobiální peptidy se kromě včelích produktů nachází také ve včelím jedu, což je komplex skládající se ze širokého spektra bioaktivních molekul. Lze jej považovat za další významnou komponentu sociální ochrany včel. Melittin, představující 40–60 % obsahu včelího jedu, se skládá z 26 aminokyselin. Apamin sestávající z 18 aminokyselin, tvoří pouze minoritní obsah jedu, a to necelá 2 %. Melittin vykazuje lytickou aktivitu vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím, kdežto apamin je důležitý z hlediska svého neurotoxického účinku (Baracchi et al., 2011; Schmidt, 1995). Kromě těchto dvou peptidů byly v nedávné době ve včelím jedu domestikovaných a samotářských včel izolovány a popsány i další AmP – melectin, lasioglossiny, halictiny a macropin – které projevují aktivitu vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím (Slaninová et al., 2012).

2.2.6 Antimikrobiální peptidy vybraných druhů sociálního hmyzu

2.2.6.1 Čmeláci

Rod čmeláků (*Bombus*) je dalším z významných opylovatelů, který se vyznačuje sociálním způsobem života. Podobně jako u včel medonosných se v jejich tukovém tělese vytváří apidaecin, abaecin, defensin a hymenoptaecin, které jsou posléze sekretovány do hemolymfy.

Apidaecin čmeláků je tvořen pouze 17 aminokyselinami a mezi jednotlivými druhy se liší většinou v substituci jedné aminokyseliny na určité pozici. Čmeláci hymenoptaecin je o něco delší (98 AMK) než včelí peptid (93 AMK), strukturní podobnost zbylých komponent (59 %) však odkazuje také na funkční analogii. Defensin se podobně jako u včely skládá z 51 aminokyselin. Stejně jako u včel jsou i defensiny čmeláků amidované na C-konci. Zajímavým zjištěním je, že defensin *Bombus ignitus* má na C-konci jeden glycin navíc, zatímco např. *Bombus pascuorum* tuto aminokyselinu postrádá. Peptidy obou druhů se od sebe vzájemně liší aminokyselinami ve třech pozicích, jejich antimikrobiální aktivita však zůstává stejná (Rees et al., 1997). Abaecin identifikovaný u čmeláků je se svou délkou 39 AMK zatím největším peptidem z rodiny bohatých na prolin. Na rozdíl od včelího defensinu je tento peptid *O*-glykosylovaný. Tento jev byl popsán u druhů nežijících ve společenstvu, jako je octomilka nebo bourec morušový (Hara & Yamakawa, 1995; Y. S. Choi et al., 2008; Rees et al., 1997).

2.2.6.2 Mravenci

V hemolymfě zástupců z čeledi mravencovitých (*Formicidae*) bylo identifikováno několik antimikrobiálních peptidů. Nejvýznamnějším a nejlépe prostudovaným peptidem je patrně defensin. Tento defensin není na rozdíl od včelího defensinu amidovaný na C-konci a vykazuje aktivitu především proti gram-pozitivním bakteriím (Taguchi et al., 1998). Viljakainen & Pamilo, 2008 uvádí, že defensin mravenců se v průběhu evoluce na základě pozitivní selekce odklonil ve svém antimikrobiálním působení ve srovnání s defensinem octomilky a nyní se spíše podobá termicinu, což je analog defensinu u termitů. Kromě defensinu byly u zástupců mravencovitých identifikovány také peptidy částečně strukturně a funkčně podobné včelímu hymenoptaecinu – formaecin-1 a formaecin-2 a také abaecinu. (Taguchi et al., 1998; Viljakainen & Pamilo, 2008).

Kromě hemolymfy se antimikrobiální peptidy nachází také v jedu mravenců. Ponericiny tvoří skupinu zastoupenou sedmi peptidy, které si jsou svou strukturou a funkcí velmi příbuzné a velkou mírou podobnosti sdílí také s cecropinem. S melittinem ve včelím jedu vykazují ve své sekvenci asi 70 % analogii. Ponericiny jsou vysoce aktivní vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Některé peptidy mají dokonce i fungicidní aktivitu, ale jen proti *Saccharomyces cerevisiae* (Kuhn-Nentwig, 2003).

2.2.6.3 Vosy

Vosy (*Vespoidea*) ve své hemolymfě disponují peptidy, které jsou více či méně podobné s apidaecinem, abaecinem, defensinem a hymenoptaecinem včel a čmeláků. Hymenoptaecinu podobný peptid nahymenoptaecin-1 byl identifikován v hemolymfě parazitické vosy (*Nasonia vitripennis*), jehož primární struktura je z 58 % shodná se včelím hymenoptaecinem (Gao & Zhu, 2010). Larvy vosíka francouzského (*Polistes dominula*), pokud je společenstvo parazitováno řasníkem vosím (*Xenos vesparum*), dochází ke zvýšené genové expresi defensinu (Manfredini et al., 2010).

Jed sociálních vos obsahuje především antimikrobiální peptidy způsobující lýzi buňky – mastoparan a jeho ostatní formy, které se liší u jednotlivých druhů, crabrolin nebo anoplin. Mastoparany se vyznačují širokou škálou bioaktivních účinků, jako je hemolýza, degranulace žírných buněk a následné uvolňování histaminu, působení na fosfolipasu A₂ nebo aktivace GTP vázajícího proteinu. Crabrolin a anoplin působí podobně jako mastoparany, jejich účinek je však daleko menší. Anoplin navíc vykazuje aktivitu také proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím (Kuhn-Nentwig, 2003).

2.2.7 Metody analýzy včelích antimikrobiálních peptidů

Včelí peptidy mohou být analyzovány několika různými metodami. Nejčastěji používanými metodami detekce a kvantifikace AmP ve včelí hemolymfě nebo mateří kašičce jsou metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS nebo MS detekcí, proteinového sekvenování, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF nebo polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE).

Metoda MALDI-TOF byla použita k studiu funkce a porovnání mellitinu a apimisinu ve včelím jedu (Baracchi et al., 2011; Baracchi & Turillazzi, 2010). Pomocí HPLC byla v mateří kašičce detekována přítomnost jelleinů (Fontana et al., 2004). Ke kvantifikaci včelího AmP apidaecinu se používá nanokapilární kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Daníhlík et al., 2014). Dříve se uplatnila metoda

proteinového sekvenování, díky níž byly stanoveny sekvence včelích antimikrobiálních peptidů (Casteels et al., 1989, 1990, 1993). Kombinací sekvenování a HPLC izoloval Fujiwara et al., 1990 royalisin z mateří kašičky. Bachanová et al., 2002 pomocí elektroforézy a sekvenování identifikovali kromě royalisinu také defensin. Velká část studií se zabývala výzkumem AmP prostřednictvím metody PCR a jejích modifikací. Zaměřovaly se především na míru exprese genů kódujících AmP nebo jejich prekurzory a případné změny v této expresi (Evans, 2004; Klaudiny et al., 2005).

2.2.7.1 Analýza antimikrobiálních peptidů pomocí imunochemických metod

Detekce a kvantifikace antimikrobiálních včelích peptidů na základě imunochemické reakce byla dlouho realizována pouze pomocí Western blot analýzy, např. detekce aktivního proteinu mateří kašičky (Šimúth et al., 2004). Kromě metody Western blotu se však v poslední době začaly objevovat studie zabývající se detekcí AmP pomocí jiné imunochemické metody – tzv. ELISA metody.

ELISA metoda byla použita převážně k detekci proteinů přítomných ve včelích produktech jako jsou apalbumin v medu (Bíliková & Šimúth, 2010), proteiny z rodiny jelleinů obsažené v mateří kašičce (Yamaguchi et al., 2013), anebo také defensin-1 přítomný v medu (Valachová et al., 2016). Co se týče AmP přítomných přímo ve včelím těle, Shen et al., 2014 provedli úspěšně rychlou detekci royalisinu ELISA metodou ve včelí hemolymfě.

Nicméně zatím nebyla ELISA metoda výrazně rozšířena ani pro detekci AmP z jiných živočišných druhů či jiných organismů. V případě hmyzu byla tato metoda použita pro detekci např. thanatinu pocházejícího z polokřídleho hmyzu *Podisus maculiventris* (G. Wu et al., 2011) nebo scolopendinu-1 u stonožek z rodu *Scolopendra* (Choi et al., 2014). ELISA metoda byla také vyvíjena pro detekci piscidinu 4 v různých druzích ryb (Corrales et al., 2010), anebo byla použita pro stanovení hladiny proteinů produkovaných lidskou kůží (Harder et al., 2010).

2.3 Imunochemické metody

K důkazu, stanovení či separaci analytu se používají imunochemické metody, které jsou založeny na specifické interakci tohoto analytu s protilátkami. Využívají se tak specifické produkty imunitního systému obratlovců, které byly původně *in vivo* namířeny v rozpoznání a likvidaci cizorodého agens (antigeny) (Králová, 2001).

2.3.1 Antigeny

Antigeny jsou obecně struktury, které mají schopnost specificky reagovat s protilátkou nebo buněčným receptorem pro antigen. Dělí se na kompletní – imunogeny, které jsou schopné vyvolávat imunitní odpověď organismu, a nekompletní antigeny – hapteny, jež nejsou schopny samy o sobě imunitní odpověď vyvolat, musí být navázány na nosič (Kuby et al., 2007). Nejčastějšími a nejsilnějšími imunogeny jsou proteiny, glykoproteiny nebo polysacharidy (Králová, 2001).

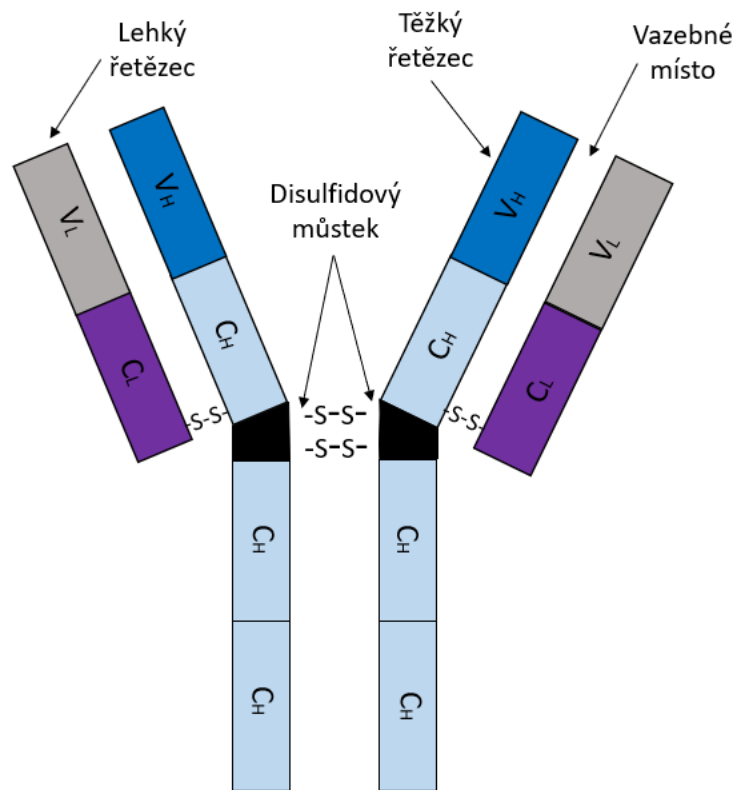
Kompletní antigen se skládá z několika menších skupin atomů, tzv. epitopů (též determinantní skupina). Epitopy jsou konkrétní oblasti antigenů, které jsou schopny imunologické reakce s protilátkami nebo s antigen-specifickými receptory na lymfocytech (Kuby et al., 2007). Jsou tvořeny většinou aminokyselinovými jednotkami, obvykle 5–21 jednotek (Ramos-Vara, 2005). Antigeny mohou být buď purifikované z biologického materiálu (přírozený původ), anebo syntetické – vyrobené na základě znalosti jejich sekvence (Mandel et al., 1992).

2.3.2 Protilátky

Protilátky jsou látky glykoproteinové povahy, k jejichž sekreci dochází na základě imunizace živočichů antigeny. Jsou produkovány plazmatickými buňkami, známými též jako β -lymfocyty. Protilátky mají globulární strukturu, která v základě společná všem typům, a proto se označují také jako imunoglobuliny (Ig). Dále se pak rozdělují do pěti tříd: IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Všechny typy imunoglobulinů mají schopnost specificky se vázat na antigen (Kuby et al., 2007; Lipman et al., 2005).

Základní molekula imunoglobulinů je tvořena dvěma typy polypeptidových řetězců – lehkých (L) a těžkých (H), které jsou spojeny disulfidovými a nekovalentními vazbami. Dva lehké a dva těžké řetězce dohromady vytváří strukturu ve tvaru písmene Y (obr. 4). Oba typy řetězce se vyskytují v konstantní formě, která je společná pro všechny třídy Ig a ve formě variabilní, která se liší v aminokyselinové sekvenci a je specifická pro každý typ Ig (Fitzpatrick et al., 2000).

Imunoglobuliny je možné proteolyticky štěpit za vzniku Fab a Fc fragmentů. Každé rameno ypsilonového motivu tvoří jeden Fab fragment, přičemž obsahují vazebné místo pro antigen, které vzniká mezi variabilními doménami lehkých a těžkých řetězců. Fc fragment schopnost vázat se na antigen postrádá (Bennett et al., 1997).



Obr. 4: Schématické znázornění molekuly imunoglobulinu IgG. Každý těžký (H) a lehký (L) řetězec je tvořen variabilními (V) a konstantními (C) oblastmi (upraveno podle Kuby et al., 2007).

2.3.2.1 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky vznikají imunizací neboli umělým aplikováním imunogenu do živočišného organismu. K produkci polyklonálních protilátek se nejčastěji používají zvířata z rodu savců, jako jsou králci, myši, kozy, ovce nebo koně. Poté, co se do těla zvířete vpraví antigen, začne imunitní systém produkovat protilátky specifické vůči tomuto antigenu. Nejvyšší koncentrace protilátek je dosaženo v krvi zvířete, která se také odebírá. K dalším aplikacím se využívá buď kompletní krevní sérum (antisérum), nebo se izoluje globulinová frakce (Lipman et al., 2005).

Polyklonální protilátky představují směs protilátek, které byly produkovány několika typy B-lymfocytů. Na jeden epitop imunogenu totiž může reagovat více buněk lymfocytů za vzniku klonů, z nichž pak protilátky vznikají. Protilátky se pak mohou významně lišit svou afinitou. (Leenaars et al., 1999). Polyklonální protilátky vykazují docela vysokou specifitou vůči antigenu, právě díky produkci větším počtem klonů plazmatických buněk, z nichž každý vytváří protilátky proti specifickému epitopu (Lipman et al., 2005).

2.3.2.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou na rozdíl od protilátek polyklonálních produktem pouze jednoho klonu protilátek. Z nich vznikají homogenní protilátky, jež mají stejnou strukturu, specifitu i afinitu k antigenu (Králová, 2001)

K imunizaci se používají především myši, kterým se odebere slezina, z níž se izolují β -lymfocyty. Vzhledem k tomu, že lymfocyty mají *in vitro* jen omezenou dobu k přežití, je nutné je nejprve zfúzovat s nádorovými lymfocyty (myelomy), které se dodávají komerčně. Tak vznikají tzv. hybridomy, které mohou jednak produkovat specifické protilátky, a jednak se mohou snadno a opakovaně množit. Pro další postup je nutné hybridomy oddělit od nezfúzovaných myelomových buněk, což se provádí pomocí speciálního selektivního média (HAT médium). Hybridní buňky v tomto médiu, porostou, zatímco nezfúzované buňky zahynou. Následuje klonování hybridních buněk, které jsou průběžně testovány na přítomnost požadovaných protilátek. Každá jednotlivá buňka pozitivní na žádané protilátky se nechá pomnožit za vzniku klonů a po určité době je opět provedena kontrola specifity. Nejvhodnější hybridomy jsou použity k produkci protilátek buď *in vitro* v kultivačních lahvích anebo *in vivo* injektováním do břišní dutiny myši (Králová, 2001; Köhler & Milstein, 1975).

2.3.2.3 Fv fragmenty

Fv fragment představuje fúzní protein připravený rekombinantními technikami. Jedná se o variabilní části lehkých a těžkých řetězců imunoglobulinu spojené krátkým peptidem (Huston et al., 1988), nekovalentní vazbou (Skerra & Plücker, 1988), disulfidovou vazbou (Brinkmann et al., 1993) nebo kombinací peptidu a disulfidové vazby (Young et al., 1995). I přes odstranění konstantních oblastí si Fv fragment zachovává specifitu původního imunoglobulinu (Huston et al., 1988).

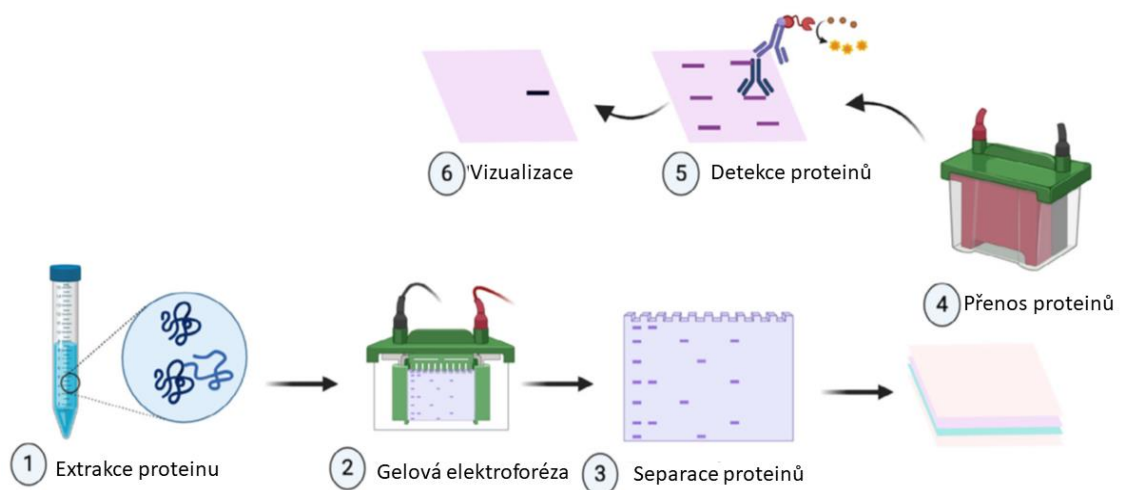
Pro tvorbu Fv fragmentů mohou být použity buňky produkující protilátky používané při tvorbě monoklonálních protilátek, z nichž je extrahována mRNA. Podle templátu mRNA se syntetizuje řetězec cDNA, podle něhož se pomocí PCR namnoží specifický gen pro tvorbu protilátek. Tento gen je následně vložen do vektoru, kterým může být např. plazmid nebo fág bakterie *Escherichia coli*. Dochází k množení bakterie, která na svém povrchu zároveň exprimuje klonované protilátky, jež tak mohou být snadno separovány a detekovány. (Liu et al., 2019; Skerra & Plücker, 1988).

2.3.3 Vazba antigenu a protilátky

Vzájemnou nekovalentní interakcí antigenu se specifickou protilátkou dochází ke vzniku imunokomplexu. Na interakci se podílí nejčastěji elektrostatické, disperzní, vodíkové nebo hydrofobní síly. Primárně se uplatňují Coulombovy síly, k nimž dochází mezi opačně nabitými aminokyselinami antigenu a protilátky. Obecně platí, že pokud dochází ke vzniku vazby prostřednictvím Coulombovy síly, začnou působit také van der Waalsovy síly. Oba druhy sil jsou efektivní na větší vzdálenosti. Sekundárně pak v delším časovém odstupu vznikají také vodíkové vazby. Ačkoliv jsou vodíkové vazby mnohdy silnější než Coulombovy či van der Waalsovy, působí na mnohem kratší vzdálenosti (Kuby et al., 2007). Hydrofobní interakce jsou při tvorbě vazby dominantní. Při těsném kontaktu dvou hydrofobních povrchů se vytlačují molekuly vody, což zároveň zvyšuje pevnost ostatních vazeb. Disperzní síly při interakci dvou nepolárních skupin atomů a rovněž působí spíše na kratší vzdálenosti. (Králová, 2001).

2.3.4 Western blot analýza

Western blot představuje velice účinnou a široce používanou techniku separace a analýzy proteinů na základě specifické vazby vznikající mezi analytem a k němu příslušnou protilátkou. Western blot jako metoda imunochemické detekce vznikla vylepšením předchozích metod Southern a Northern blot. Towbin et al., 1979 poprvé separovali proteiny za pomoci polyakrylamidového gelu a následně je přenesli na nitrocelulosovou membránu. Burnette, 1981 pak tento postup vylepšil modifikací polyakrylamidového gelu použitím dodecylsírany sodného (SDS). Western blot probíhá v sérii několika kroků (obr. 5), které vedou od extrakce proteinu, přes jeho separaci v gelu až k přenesení na membránu, na níž je následně detekován.



Obr. 5: Schématické znázornění průběhu Western blotu. (převzato od Meftahi et al., 2021).

2.3.4.1 Příprava vzorků

Velice důležitým krokem, na němž závisí i všechny ostatní postupy, je samotná příprava vzorků. Většinou se používají celé části tkání nebo tkáňové kultury, které se po odebrání zamrazují či lyofilizují za účelem zabránění případné degradaci proteinů účinkem proteas (Jensen, 2012).

Vzorky obecně obsahují proteinový extrakt, lyzační pufr a vzorkovací pufr (např. Laemmliho nebo tricinový pufr). Lyzační pufr z izolovaných tkání či buněk uvolňují a rozpouští obsažené proteiny. Výběr vhodného pufru je závislý na používané protilátce, která obvykle na proteinu rozeznává jen malou část (epitop), na niž se váže. Epitop však může být schován terciální strukturou proteinu, a protože většina protilátek rozpoznává epitopy jen v denaturovaném stavu, musí dojít k jejich denaturaci, nejčastěji použitím detergentu a zahřátím směsi. Proteinový extrakt se lyzačním pufrem ustavuje na požadovanou koncentraci, a proto se obvykle přidává spolu se vzorkovacím pufrem poměrem 1:1 k extraktu (MacPhee, 2010).

Vzorkovací pufr je tvořen pufrem, např. TRIS, bromfenylovou modří, jež umožňuje vizualizovat průběh elektroforézy; dále pak glycerol, který zvyšuje hustotu pro lepší proudění do jamek a rovněž také β -mercaptoethanol, jenž jako redukční činidlo působí na disulfidové vazby a přispívá k další denaturaci proteinů. (Jensen, 2012; MacPhee, 2010).

2.3.4.2 Gelová elektroforéza

Pro separaci proteinů se používá elektroforéza, která probíhá v polyakrylamidovém gelu. Polyakrylamid vzniká polymerací akrylamidu a zesíťtím biskakrylamidu. Vytváří se tak molekulové síto, které má výrazné zpomalovací vlastnosti. Rozsah separace je dán

velikostí pórů, již ovlivňuje procentuální poměr akrylamidu a bisakrylamidu (Hjerten, 1963).

Proteiny mohou být rozděleny na základě elektrického náboje, izoelektrického bodu, molekulové hmotnosti, anebo kombinace těchto vlastností. Po aplikaci napětí dochází k migraci proteinů různou rychlostí, což se projeví jako vznik tzv. bandů (Jensen, 2012). Velmi často elektroforéza probíhá v přítomnosti SDS, v tomto případě mluvíme o tzv. SDS-PAGE. SDS je součástí pufru a obaluje uvolňované proteiny, zajišťuje jejich denaturaci a zároveň jim uděluje uniformní záporný náboj. Díky tomu se proteiny při elektroforéze nepohybují na základě různého náboje a velikosti či tvaru molekuly, ale rozdělují se jen podle své molekulové hmotnosti (Burnette, 1981).

2.3.4.3 Přenos proteinů na membránu

Po proběhnutí elektroforézy se rozdělené proteiny většinou přenáší z gelu na membránu. V případě Western blotu jsou proteiny na membránu přenášeny za působení konstantního elektrického proudu či napětí, mluvíme o tzv. elektroblotu. Úspěšnost přenesení proteinů na membránu závisí na povaze gelu, molekulární hmotnosti proteinů a také na použité membráně. Nejčastěji používanými pro Western blotting jsou nitrocelulosová a polyvinilidenfluoridová membrána (PVDF), dále pak membrána z aktivovaného papíru nebo aktivovaného nylonu (Kurien & Scofield, 2009; MacPhee, 2010).

Elektroblot může probíhat několika způsoby. Přenos může být uskutečněn pomocí úplného ponoření membrán a gelu uzavřené spolu s dalšími komponenty ve speciální nádobě obsahující elektrodu a naplněné blotovacím (přenosovým) pufrům, která je připojena ke zdroji elektrického proudu. V tomto případě se jedná o tzv. Tank blot. Druhým způsobem přenosu je umístění komponent nasáklých blotovacím pufrům mezi elektrody. Jako přenosový pufr slouží pouze pufr nasáklý v membráně, gelu a filtračních papírech. Oproti ponoření do roztoku je metoda Semi-dry rychlejší, vyžaduje menší spotřebu elektrické energie a také je relativně levnější (Kurien & Scofield, 2006). Po ukončení elektroblotu je možné membránu nejprve obarvit pomocí speciálních barviv jako jsou Ponceau S či amidočern, které ověří přítomnost přenesených proteinů na membráně (Kurien & Scofield, 2009).

2.3.4.4 Imunodetekce

Po ukončení elektroblotu je nejprve nutné na membráně zablokovat veškerá volná místa tak, aby se protilátka vážala pouze na daný antigen. Jako blokovací pufr se nejčastěji

používá 5% roztok bovinní sérový albumin (BSA) nebo 5% roztok sušeného mléka. Blokovací pufr by měl být vhodný jak pro membránu, tak pro protilátky (MacPhee, 2010).

Samotná imunodetekce je založena na inkubaci membrány v roztoku primární protilátky, promytí a následně inkubaci se sekundární protilátkou. Je nutné stanovit ideální koncentraci protilátek z hlediska výsledné senzitivity celé metody, aby byl podíl šumu pozadí co nejmenší (Kurien & Scofield, 2009).

V posledním kroku dochází k samotné detekci proteinů. V závislosti na použitém značení sekundární protilátky se používá kolorimetrické, radioaktivní, fluorimetrické nebo chemiluminiscenční vyhodnocení. V případě použití enzymu jako značky se membrána inkubuje v roztoku speciálního barviva, přičemž dochází k obarvení bandů detekovaných proteinů. (Kurien & Scofield, 2009; MacPhee, 2010).

2.3.5 ELISA stanovení

ELISA stanovení (Enzyme-linked immunoassay) je kvantitativní analytická metoda, která detekuje interakci mezi antigenem a protilátkou za následné detekce měřitelného signálu – absorbance, fluorescence či radioaktivity... Výhodou této metody je možnost použití i pro velmi nízké koncentrace analytu, jimiž mohou být proteiny (peptidy), hormony či vitaminy. Jedná se velice citlivou, specifickou, reprodukovatelnou a relativně časově nenáročnou metodu analýzy (Hornbeck, 1992).

Základní principy ELISA metody a RIA metody (radioimmunoassay) byly známy už od roku 1941, nicméně k masivnímu rozšíření použití obou metod došlo až ve druhé polovině 20. století. V roce 1971 Engvall a Perlmann modifikovali RIA metodu, když nahradili radioizotopovou značku na protilátce enzymem a pomocí této nové metody stanovili hladinu imunoglobulinů G v králičím séru (Engvall & Perlmann, 1971). Nezávisle na tomto výzkumu byl ve stejné roce publikován také výzkum detekující choriový gonadotropin v moči s využitím křenové peroxidasy jako enzymové značky (Van Weemen & Schuurs, 1971). Od té doby začínala být metoda stále častěji využívána a její uplatnění se tak rozšířilo do mnoha vědeckých oborů. Významným průlomem byla modifikace metody v podobě použití mikrotitrační destičky, kterou v roce zavedl Siegle et al., 1980 na experimentálním stanovení koncentrace proteinů a hormonů.

2.3.5.1 Princip metody

Základní podstatou ELISA metody, jak již bylo zmíněno výše, je detekce reakce mezi antigenem a protilátkou. Antigen je nejprve imobilizován na specifický povrch, kterým

je nejčastěji polystyren, polyvinyl nebo polypropylen. Nejčastěji se využívá 96-jamková mikrotitrační destička, použity však také mohou být speciální zkumavky. Na povrch se mohou být absorbovány nejen antigeny, ale také protilátky, vždy v kapalně fázi (Engvall & Perlmann, 1971; Gabaldón et al., 1999).

Samotný proces metody sestává ze čtyř obecných kroků: tzv. „coating“, blokování, detekce a měření signálu (Konstantinou, 2017). Mezi každým krokem musí být jamky propláchnuty speciálním promývacím pufrem, čímž se odstraní nenavázané antigeny či protilátky. Takovými pufrů jsou fosfátový (PBS) nebo trisový (TBS) pufr, které jsou doplněny o detergent neionické povahy, což je např. Tween 20 (Kohl & Ascoli, 2017a).

Při procesu zvaném „coating“ se na povrch jamek mikrotitrační destičky absorbují antigeny, které jsou rozpuštěny ve speciálním pufru. Inkubace probíhá v závislosti na typu vzorku a stanovovaném analytu různě dlouhou dobu. Rozhodující může být také teplotní náročnost (Hornbeck, 1992). Absorpce se uskutečňuje pomocí elektrostatických, hydrofobních, van der Waalsových nebo nekovalentních vazeb (Fitzpatrick et al., 2000).

Blokování je proces, při němž dochází k zablokování všech nenasyčených vazeb v mikrotitrační jamce přidáním proteinu. Nejčastěji se k tomuto účelu používá roztok BSA (Konstantinou, 2017).

Detekce spočívá v přidání enzymu, který reaguje se specifickým substrátem za vzniku zbarvení. Enzymová značka může být navázána buď přímo na primární protilátku, jež se váže přímo na absorbovaný antigen, anebo se v reakci používají protilátky dvě, přičemž jedna slouží jako tzv. primární (detekční) protilátka a druhá protilátka (sekundární) enzymovou značku a specificky se váže na primární protilátku. (Engvall & Perlmann, 1971; Hornbeck, 1992). Nejhojněji používanými enzymy jsou avidin-peroxidasa (křenová peroxidasa, HRP, EC 1.11.1.x) a alkalická fosfatasa (AP, EC 3.1.3.1) (Nakane & Pierce, 1967).

Po přidání chromogenního substrátu dochází za katalýzy přítomného enzymu k reakci za vzniku zbarvení, což je nejčastěji využívaný typ detekce. Jako substrát pro HRP se velice často používá 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), pro AP je to *p*-nitrofenylfosfát (pNPP) (Konstantinou, 2017).

Vyhodnocení se provádí za použití spektrofotometrických zařízení, které v případě kolorimetrického produktu měří absorbanci, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu. Měřit lze přímo barevný produkt, častěji se však enzymová reakce zastavuje, např. změnou pH přidáním zředěného roztoku kyseliny a měří se tak až výsledný produkt (Hornbeck, 1992).

2.3.5.2 Přímá metoda

Přímá metoda ELISA stanovení byla vůbec prvním vyvinutým postupem a na jejích základech byly později založeny i ostatní metody. Antigen, který je imobilizován na povrch jamky a následně se váže s protilátkou, jež je přímo označena enzymem (obr. 6a). Po přidání odpovídajícího substrátu se po proběhnutí enzymem katalyzované reakce měří vzniklý signál (Engvall & Perlmann, 1971; Hornbeck, 1992). Přímá metoda je vhodná pro stanovování zejména látek s vyšší molekulovou hmotností, v současné době však ustupuje dalším metodám, které jsou přesnější, citlivější a mohou být použity i pro nižší koncentrace analytu (Kohl & Ascoli, 2017c; Konstantinou, 2017).

2.3.5.3 Nepřímá metoda

Podobně jako přímá metoda i nepřímý typ stanovení vyžaduje nejprve absorpci antigenu na povrch jamky. Na imobilizovaný antigen se následně váže protilátka specifická k tomuto antigenu získaná imunizací ze séra laboratorního zvířete. Takto získaná protilátka se nazývá primární. Charakteristickým znakem nepřímé metody je použití druhé – sekundární – protilátky, jež je konjugována s enzymem a je specifická vůči primární protilátce (obr. 6b) (Kohl & Ascoli, 2017a).

Nepřímá metoda je mnohem citlivější a lze ji použít k detekci vzorků s velice nízkým množstvím hledaného antigenu. Kromě toho je metoda výhodnější také pro stanovování analytu, který má díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem nižší přilnavost k povrchu, anebo je ve vzorku přítomno kromě tohoto proteinu i mnoho jiných (Kohl & Ascoli, 2017a; Konstantinou, 2017).

2.3.5.4 Kompetitivní metoda

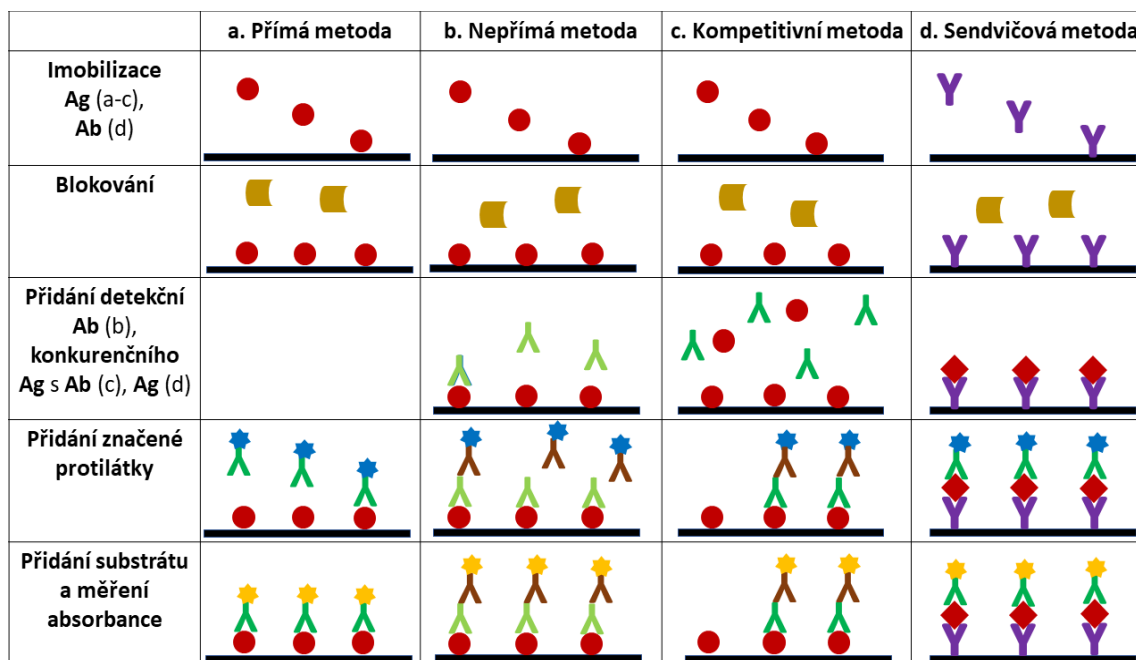
Hlavním odlišovacím znakem kompetitivní metody je kombinace referenčního analytu daném množstvím s neznámým množstvím stejného analytu, které spolu soutěží o navázání na vazebná místa protilátky, jejichž počet je omezený. Metoda může probíhat s absorbovaným antigenem nebo protilátkou na povrch jamky. V prvním případě je na povrch jamky navázán referenční analyt, k němuž se poté přidá neznámé množství analytu v roztoku (obr. 6c). Tyto dva antigeny po přidání značené protilátky spolu soutěží o její navázání. Čím více je ve směsi neznámého antigenu, tím více bude navázáno konjugované protilátky. Množství antigenu je přímo úměrné inhibici hydrolýzy substrátu, a absence signálu tak svědčí o jeho přítomnosti ve vzorku. Pokud je na povrch jamky navázána protilátka v omezeném množství, v roztoku se následně přidává neznámý

vzorek analytu a referenční analyt, jenž má na sobě navázanou značku (Clark et al., 1986; Engvall & Perlmann, 1971; Hornbeck, 1992; Konstantinou, 2017).

Hlavní výhodou kompetitivní metody je možnost měření koncentrace analytu jak molekul o nízké molekulové hmotnosti, tak i větších molekul, např. proteinů (Yorde et al., 1976).

2.3.5.5 Sendvičová metoda

Na rozdíl od přímé a nepřímé metody začíná sendvičová metoda nikoliv absorpcí antigenu, ale protilátky na povrch jamky (obr. 6d). Taková protilátka se pak nazývá záchytná, na niž se posléze specificky váže antigen. Následuje stejný postup jako u předchozích metod, tedy navázání primární a sekundární protilátky a přidání enzymového substrátu. Název sendvičové metody byl odvozen od komplexu, tzv. sendviče, který spolu antigen a protilátky vytváří. Vyznačuje se vysokou citlivostí ke stanovovanému antigenu, je však časově náročnější a dražší z důvodu použití třetí protilátky. Pro přesnější stanovení je rovněž důležité, aby nedocházelo ke konkurenci o vazbu na antigen mezi primární a sekundární protilátkou (Kato et al., 1977; Kohl & Ascoli, 2017b).



Obr. 6: Běžně používané formáty ELISA metody, (a) přímá metoda využívající detekční značenou protilátku, (b) nepřímá metoda s požitím primární a sekundární protilátky, (c) kompetitivní metoda vyhodnocovaná nepřímou, (d) sendvičová metoda s přímým vyhodnocením (upraveno podle Fitzpatrick et al., 2000).

2.3.5.6 Problematika ELISA metody

2.3.5.6.1 Příprava primárních protilátek

Polyklonální protilátky jsou velmi často používány pro analýzu pomocí ELISA metody, ale také při Western blotu. Jejich přípravu však provází řada důležitých kroků, u nichž je potřeba dbát doporučených postupů

Před přípravou primárních protilátek je velice důležitá příprava antigenu, který má produkcí těchto protilátek vyvolat. Použitý antigen by měl být co nejvíce čistý, aby výsledná specifita byla co nejvyšší. Ačkoliv je proces purifikace antigenu časově náročnějším krokem, ve výsledku může být velice hodnotný. Rovněž by mělo být zaručeno, aby antigen nebyl pro cílové zvíře toxický. Toxicitu antigenu způsobují buď endotoxiny, jako lipopolysacharidy, chemické látky používané k likvidaci mikroorganismů, např. formaldehyd nebo extrémní pH mimo fyziologické rozmezí. (Hau & Schapiro, 2002). Důležitá je také optimalizace dávky antigenu, která má být k imunizaci použita. Nepřiměřené množství antigenu může zapříčinit nežádanou imunitní odpověď ve formě suprese, tolerance, vznik přecitlivělosti nebo jiné (Leenaars & Hendriksen, 2005).

Podle požadovaného množství produkované protilátky je nutné optimalizovat výběr vhodného zvířete. Zatímco k produkci monoklonálních protilátek se používají výhradně myši, u polyklonálních protilátek se kromě myši nejčastěji používají také králíci. Jejich výhodou je bezesporu delší doba života, zejména však produkují přiměřené množství antiséra o vysoké afinitě protilátek (Hau & Schapiro, 2002; Leenaars & Hendriksen, 2005). Pokud je zapotřebí produkovat větší množství protilátek, používají se k imunizaci zvířata jako koza, ovce či koně (Fitzpatrick et al., 2000). Důležitými faktory, které mají na imunizaci podstatný vliv, je stáří zvířete, pohlaví a samozřejmě zdravotní stav (Hau & Schapiro, 2002).

Pro zesílení a zefektivnění imunizace se používají adjuvans, která zejména v případě slabého antigenu zesilují imunitní reakci. Prvními vyvinutými a nejpoužívanějšími jsou Freundovo kompletní adjuvans obsahující emulzi vody a minerálního oleje spolu s usmrcenými mykobakteriemi a Freundovo neúplné adjuvans, jež mykobakterie neobsahuje (Freund et al., 1937; Johnston et al., 1991).

Samotný imunizační protokol je ovlivňován několika kroky – způsob injektování, množství dávky a použití posilující dávky. Roztok obsahující antigen může být zvířeti podán injekcí do svalu (intramuskulárně), do kůže (intradermálně), do podkoží

(subkutánně), do dutiny břišní (intraperitoneálně) nebo přímo do žíly (intravenózně) (Leskowitz et al., 1960). Množství aplikované dávky se odvíjí od koncentrace antigenu v roztoku. V ideálním případě by mělo být v závislosti na vlastnostech antigenu (koncentrace) a na použitém zvířeti aplikováno co nejmenší možné množství injekční dávky (Droual et al., 1990). Možnost podání posilovací dávky přichází v úvahu tehdy, pokud po určité době od podání injekce hladina protilátek začne stagnovat nebo dokonce klesat. Další dávka, která ne pokaždé musí obsahovat adjuvans se aplikuje nejdříve po 4 týdnech od první imunizace (Leenaars et al., 1999).

V průběhu celé imunizace je zvíře pravidelně kontrolováno a pozorováno na výskyt možných nežádoucích účinků. Odebráním krve zvířete se stanovuje titer protilátek. Pokud je množství protilátek dostatečné, většinou se odebere zvířeti část krve tak, aby bez úhony přežilo a mohlo se zotavit (Diehl et al., 2001).

2.3.5.6.2. Příprava sekundárních protilátek

Sekundární protilátky používané k detekci primárních protilátek, které vznikly imunizací např. králíka, musí být produkovány v jiném zvířeti tak, aby výsledné protilátky byly zaměřeny proti izotypům králíčích imunoglobulinů. Je výhodnější použít směs protilátek produkovaných více zástupci druhu, aby se minimalizovaly rozdíly v odezvě. Většina laboratoří dává přednost použití komerčních obecných sekundárních protilátek, jejichž spektrum detekce IgG je velice široké (Manning et al., 2012).

Připravují se imunizací za pomoci purifikovaných imunoglobulinů či jejich fragmentů. Absorpcí se odstraní oblasti reaktivity na běžné epitopy, např. lehké řetězce nebo zbytky jiných fragmentů, které by mohly produkci protilátek ztěžovat. Výsledná protilátka se validuje a ověřuje se její specifita (Ramlau, 1987).

Na rozdíl od primárních protilátek jsou sekundární protilátky značeny za použití další molekuly, která pak umožňuje generovat měřitelný signál. Sekundární protilátka může být konjugována s enzymem, radionuklidem, fluorescenční či chemiluminiscenční molekulou, biotinem anebo s nanočásticí (Poláchová et al., 2019).

Nejvíce používanými značkami jsou enzymy, hlavně křenová peroxidasa a alkalická fosfatasa. Dále mohou být použity také enzymy jako β -D-glukosa:kyslík-1-oxidoreduktasa (glukosaoxidasa, GOD, EC 1.1.3.4), β -D-galaktosidgalaktohydrolasa (β -galaktosidasa, EC 3.2.1.23) (Kato et al., 1977), α -1,4-glukosidasa (glukoamylasa, EC 3.2.1.3) nebo ureasa (EC 3.5.1.5) (Hornbeck, 1992). Alkalická fosfatasa – patrně nejrozšířenější enzym konjugovaný s protilátkou, se vyznačuje především dobrou

stabilitou, výbornou katalytickou rychlostí, odolností vůči činidlům a také díky své snadné konjugaci s protilátkou. Kromě toho, substráty alkalické fosfatasy mají tu výhodu, že nejsou toxické a jsou poměrně stabilní (Hornbeck, 1992).

2.3.5.6.3 Vazebné vlastnosti protilátek

Detekce antigenu ELISA metoda je založena na rozpoznání a specifické vazbě protilátky na epitopy toho daného antigenu. Velkým problémem imunochemických metod může být zkřížená reaktivita, která představuje schopnost protilátky reagovat s podobnými epitopy na jiných proteinech. Křížená reaktivita může zcela změnit výsledek analýzy a mít tak dopad na reprodukovatelnost. Schopnost protilátky rozeznávat specifický epitop v přítomnosti jiných epitopů se nazývá specifitou. Čím větší bude specifita protilátky, tím je menší pravděpodobnost výskytu křížové reaktivity (Abbott et al., 2010; Konstantinou, 2017; Lipman et al., 2005).

Afinita je označována jako míra vazebné síly jednoho vazebného místa protilátky k epitopu. Pro imunochemická stanovení jsou vhodné protilátky s vysokou hodnotou afinity, protože vážou větší množství antigenu s větší stabilitou za kratší dobu. Kromě specifity a afinity rozlišujeme u protilátky ještě také aviditu, která vyjadřuje celkovou sílu vazby mezi protilátkami a antigenem. Je dána afinitou protilátky k epitopu a počtem vazebných míst na protilátce (Lipman et al., 2005).

Pro snížení výskytu křížové reaktivity bývají protilátky purifikovány, aby jejich čistota byla co nejvyšší. Jedním z takových kroků je preadsorpce protilátky, která spočívá v průtoku protilátky kolonou obsahující proteiny z takových zvířecích druhů, které by potenciálně mohly s danou protilátkou reagovat. Rozhodující je také použití celé imunoglobulinové frakce, nebo jen afinitně purifikované protilátky. Zatímco IgG frakce mají vyšší afinitu, purifikované protilátky vykazují méně nespecifických reakcí. Další možností eliminace nespecifických vazeb je použití Fab fragmentů postrádajících Fc fragment (Sigmaaldrich, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Applichem: dodecylsulfát sodný (SDS), hovězí sérový albumin (BSA)

Bio-Rad: tricínový vzorkovací pufr

Clonostar: primární králičí polyklonální protilátka

Lachema: močovina, síran hlinitý

Lachner: hydrogenfosforečnan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina fosforečná, kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, methanol, uhličitan sodný.

Merck: perborát sodný

ROTH: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), tetramethylethyldiamin (TEMED), Tween 20

Sigma-Aldrich: Akrylamid, anti-králičí sekundární protilátka konjugovaná s AP, anti-králičí sekundární protilátka konjugovaná s HRP, N,N'-bisakrylamid, 5-Brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP), Coomassie blue G250, dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, dimethylformamid, dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol, glycin, glycerol, chlorid hořečnatý, kyselina trifluoroctová, lipopolysacharidy z *E. Coli*, β -merkptoethanol, nitrotetrazoliová modř (NBT), Ponceau S, peroxodisíran amonný (APS), sušené mléko, tricín, TRIS.

3.1.2 Biologický materiál

Včely, které byly pro potřeby diplomové práce imunizovány, pocházely ze včelnice prof. Mgr. Marka Petřivalského, Dr.

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Denver Summit (Denver Instruments, USA)

Centrifuga 5425 R (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr pH 50+ DHS (Giorgio Bormac, Itálie)

Digitální předvážky (Radwag®, ČR)

Dokumentační systém Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)

Homogenizátor FastPrep FP120 (MP Biomedicals, France)

Inkubační lázeň (MajorScience, USA)

Lyofilizátor Lyovac GT-2 (Leybold-Heraeus, Germany)

Magnetická míchačka IKA (Verkon, ČR)
Mikrocentrifuga MS-6000 (Biosan, Lotyšsko)
Termoblok PST-100HL (Biosan, Lotyšsko)
Třepačka Bio Vortex 1 (Biosan, Lotyšsko)
Spektrofotometr Reader Synergy H1 (Biotek Instruments, USA)
Zdroj pro elektroforézu (Cleaver Scientific, Velká Británie)

3.1.4 Použité pufrы a roztoky

Anodový pufr pH 8,9: 0,1 mol·l⁻¹ Tris
Blotovací pufr pH 8,3: 0,02 mol·l⁻¹ Tris, 0,2 mol·l⁻¹ glycin
ELISA substrát: 0,1 mol·l⁻¹ TMB ve fosfo-citrátovém pufru
Fosfo-citrátový pufr s perborátem sodným pH 4,6: 0,2 mol·l⁻¹ hydrogen fosforečnan sodný, 0,1 mol·l⁻¹ kyselina citronová, 0,002 mol·l⁻¹ perboritan sodný
Gelový pufr pH 8,45: 3,0 mol·l⁻¹ Tris, 0,3 % SDS
Katodový pufr pH 8,25: 0,1 mol·l⁻¹ Tris, 0,1 mol·l⁻¹ tricin, 0,1 % SDS
Promývací pufr pH 7,5: 1,50 mol·l⁻¹ chlorid sodný, 0,03 mol·l⁻¹ dihydrogen fosforečnan sodný monohydrát, 0,012 mol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný
Pufr pro alkalickou fosfatasu pH 9,5: 0,1 mol·l⁻¹ Tris, 0,05 mol·l⁻¹ chlorid hořečnatý, 0,1 mol·l⁻¹ chlorid sodný
TBS pufr pH 7,5: 0,1 mol·l⁻¹ Tris, 2,5 mol·l⁻¹ glycin
Uhličitanový (vazebný) pufr pH 9,6: 0,04 mol·l⁻¹ uhličitan sodný, 0,06 mol·l⁻¹ hydrogen uhličitan sodný

3.2 Metody

3.2.1 Imunizace včel a odebírání hemolymfy

Imunizace včel byla prováděna na základě postupu, který uvádí Dostálková et al., 2021. Včely byly uspány oxidem uhličitým zhruba po dobu 2 min a poté byly imunizovány 1 μl roztoku lipopolysacharidů o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Imunizace jednotlivých včel byla prováděna za pomoci 5 μl Hamiltonovy pipety s ostrou šikmou špičkou, přičemž vpich byl proveden na dorzální straně zadečku. Kontrolní skupina včel byla pouze rozdělena do klíček bez jakéhokoliv zásahu. Obě skupiny včel byly na 24 h umístěny v klíčkách spolu s výživou v podobě roztoku 50% sacharosu do inkubátoru. Po 24 h byly včely opět uspány a byla jim oddělena hrud' od zadečku. Hemolymfa byla odebírána z hrudní části a byla sbírána po 2 μl do 20 μl 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA). Finální vzorek

obsahoval hemolymfu z 5 včel (10 μ l hemolymfy ve 100 μ l 0,1% TFA). Hemolymfa byla lyofilizována přes noc a zamrazena pro další použití.

3.2.2 Elektroforéza AmP

Byla provedena tricínová elektroforéza antimikrobiálních peptidů v 16% polyakrylamidovém gelu s přídavkem močoviny podle Schäggera & von Jagowa, 1987. Počáteční napětí při elektroforéze činilo 50 V, po zaostření jednotlivých zón bylo zvýšeno na 100 V.

3.2.2.1 Příprava vzorků z hemolymfy

Lyofilizované vzorky hemolymfy byl rozpuštěny ve 20 μ l 0,1 M Tris-HCl pufru a následně byl v poměru 1:1 přidán tricínový vzorkovací pufr smíchaný s β -merkaptoethanolem. Zkumavky s takto připravenými vzorky byly inkubovány 5 min při 95 °C a následně krátce centrifugovány. Do jamky bylo nanášeno 10 μ l vzorku hemolymfy nebo proteinového standardu s navázaným epitopem daného peptidu.

3.2.2.2 Barvení gelů po elektroforéze barvivem Coomassie

Po skončení elektroforézy byly gely barveny Coomassie barvivem pro detekci separovaných proteinů. Gel byl opláchnut destilovanou vodou a poté vložen na 2–12 h do koloidního roztoku obsahujícího 0,02% Coomassie blue G-250, 5% síran hlinitý, 10% methanol a 8% kyselinu fosforečnou. Po ukončení barvení byl gel 3 \times propláchnut odbarvovacím roztokem tvořeným 10% methanolem a 2% kyselinou fosforečnou (Pink et al., 2010).

3.2.3 Western blotting

Přenos proteinů z gelu na membránu byl realizován tzv. tank-blot uspořádáním. Byla použita polyvinilidenfluoridová (PVDF) membrána. Blotování běželo přes noc při konstantním proudu 0,8 mA \cdot cm⁻².

3.2.3.1 Barvení membrány po blottingu

Pro zviditelnění přenesených proteinů byla membrána vložena na 10 min do barvicího roztoku Ponceau S (0,1% Ponceau S v 1% kyselině octové) (Schägger, 2006).

3.2.4 Imunodetekce

Membrána byla po skončení blotování vložena do roztoku tvořeného BSA v 1 \times koncentrovaném TBS pufru. Ředění roztoku BSA se lišilo podle typu detekovaného

peptidu – pro detekci defensinu a hymenoptaecinu byl použit 5% roztok BSA, pro abaecin 1% roztok BSA. Blokování probíhalo 2 h při 4 °C na třepačce. Po skončení blokování byla membrána 3× po 10 min propláchnuta 0,1% roztokem TBS s přídavkem Tweenu 20 (TBS-T) pro defensin a hymenoptaecin, nebo 0,05% roztokem TBS s přídavkem Tweenu 20 pro abaecin.

Následně byla membrána inkubována v roztoku primární protilátky v 1×koncentrovaném roztoku TBS-T. V případě defensinu a hymenoptaecinu byla primární králičí protilátka ředěna v poměru 1:500, pro detekci abaecinu byla primární protilátka ředěna v poměru 1:250. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C.

Následující den byla membrána opět 3× promyta TBS-T pufrem a poté byla inkubována 1 h při 4 °C v roztoku sekundární anti-králičí protilátky. Pro defensin a hymenoptaecin byla sekundární protilátka konjugovaná s AP v TBS-T pufru ředěna v poměru 1:15000, pro abaecin byla sekundární protilátka ředěna v poměru 1:2000. Po inkubaci byla membrána finálně 3× promyta TBS-T.

3.2.4.1 Barvení membrány po imunodetekci

Barvicí roztok byl připraven smícháním pufru pro alkalickou fosfatasa, BCIP a NBT. Do připraveného roztoku byla vložena membrána. Po zviditelnění bandů byla membrána opláchnuta destilovanou vodou.

3.2.5 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou

Celkový obsah proteinů ve vzorku hemolymfy byl stanovován pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Hemolymfa byla rozpuštěna v 650 µl uhličitanového pufru. Ze zásobního roztoku BSA byly připraveny jednotlivé koncentrace pro kalibrační křivku v rozmezí 50–500 µg·ml⁻¹. Do spektrofotometrické mikrotitrační jamky bylo pipetováno nejprve 5 µl vzorku nebo standardu (u blanku 5 µl pufru) a následně 45 µl pufru, v němž byly vzorky ředěny. Nakonec bylo přidáno 200 µl roztoku Bradfordova činidla. Po inkubaci 5 min byla měřena absorbance při 590 a 450 nm. Kalibrační přímka byla získána linearizací hodnot absorbance.

3.2.6 ELISA stanovení

3.2.6.1 Příprava vzorků z hemolymfy

Lyofilizované vzorky hemolymfy z 5 včel byly rozpuštěny v 650 μl uhličitanového pufru a ponechány k rozpuštění po dobu 10 min při 4 °C. Posléze byly vzorky krátce centrifugovány na stolní mikrocentrifuze.

3.2.6.2 Extrakce proteinů z tkání

Postup extrahování proteinů z částí včelího těla (hlava, hrudník, zadeček) byl obdobný jako uvádí Danihlík et al., 2014 s drobnými úpravami. Tělní části byly vloženy do 500 μl 0,1% TFA a homogenizovány 5 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 20 s. Vzniklý homogenát byl centrifugován za laboratorní teploty při 15000 $\times g$ 10 min. Supernatant byl odpipetován do čisté zkumavky a opět centrifugován za laboratorní teploty při 15000 $\times g$ 10 min. Výsledný supernatant byl přes noc lyofilizován. Lyofilizované vzorky byly před použitím rozpuštěny v 650 μl uhličitanového pufru, ponechány 10 min při 4 °C k rozpuštění a následně krátce centrifugovány na stolní mikrocentrifuze.

3.2.6.3 Optimalizace postupu ELISA stanovení

Nejprve byla provedena optimalizace jednotlivých podmínek a dílčích kroků ELISA metody. Bylo určováno ideální ředění vzorku včelí hemolymfy, primární i sekundární protilátky. Následně byl sledován vliv doby a teploty na inkubaci antigenu, vliv zásaditého pH uhličitanového pufru na inkubaci antigenu nebo vliv stáří chromogenního substrátu na výsledný signál.

3.2.6.4 Postup ELISA stanovení

Postup provedení ELISA metod byl se sestaven na základě doporučených postupů udávaných výrobcem s menšími úpravami (Bergeron et al., 2018) Do 96-jamkové destičky bylo nanášeno 100 μl vzorku hemolymfy z 5 včel rozpuštěné v uhličitanovém pufru. Destička přes noc inkubována při 4 °C, přičemž následující den byly jamky 3 \times promyty 200 μl pracovního promývacího pufru. Po promytí bylo všech jamek přidáno 200 μl 0,5% mléka v pracovním promývacím pufru, načež byla destička inkubována 2 h při 37 °C za mírného třepání. Po skončení blokování byly jamky opět promyty promývacím pufrům a do každé jamky bylo přidáno 100 μl naředěné primární protilátky v definovaném poměru pro stanovovaný peptid. Inkubace probíhala 1 h při 37 °C za mírného třepání, po jeho skončení byly jamky opět promyty. Následně bylo přidáno

100 μl sekundární protilátky konjugované s HRP ředěné u určeném poměru, načež inkubace opět probíhala 1 h při 37 °C za mírného třepání. Po skončení inkubace a promytí jamek bylo do všech jamek pipetováno 100 μl substrátu pro ELISU, přičemž inkubace 1 h při 37 °C a za mírného třepání probíhala ve tmě. Posléze byla reakce zastavena přidáním 50 μl H_2SO_4 o koncentraci 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pomocí spektrofotometrického zařízení byla měřena absorbance při 450 nm.

3.2.7 Software

Polyakrylamidové gely a PVDF membrány byly zachycovány pomocí programu Image Lab.

Absorbance pro vyhodnocení ELISA stanovení byla zaznamenávána pomocí programu Gene 5.

3.2.8 Statistické vyhodnocení

Veškeré statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2021. V tomto programu byly provedeny všechny statistické výpočty a byly v něm vytvořeny také všechny grafy.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vazebná specifita primárních protilátek

4.1.1 Identifikace vazebné specifity primární protilátky k defensinu-1

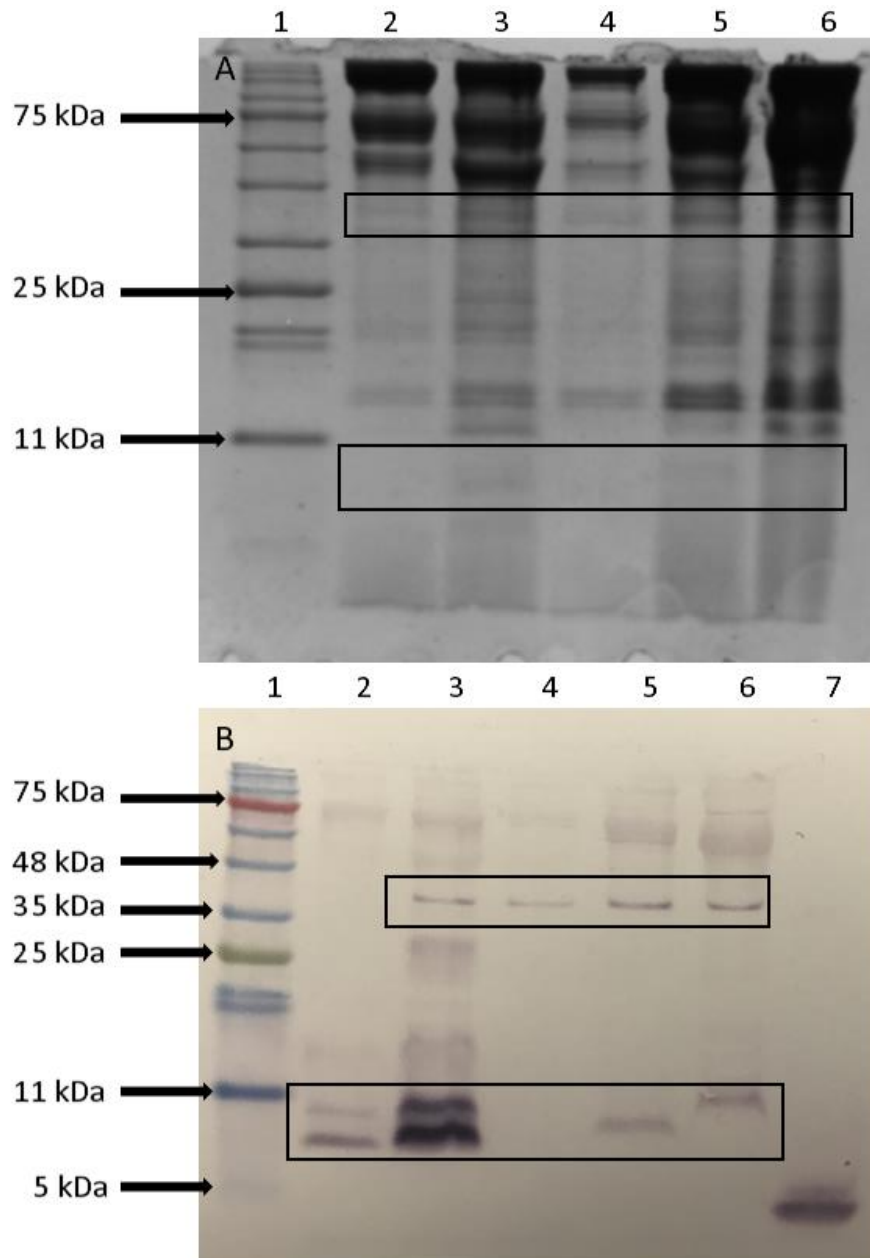
Peptidy obsažené v hemolymfě získané z 5 imunizovaných včel byly rozděleny pomocí elektroforézy v tricínovém gelu s přidavkem močoviny. Byly vždy připraveny dva gely, z nichž jeden byl obarven Coomassie G-250 (obr. 7A) a následně použit pro identifikaci peptidového složení v požadované oblasti. Peptidy separované na druhém gelu byly pomocí techniky Western blot v tank blot uspořádání přeneseny na PVDF membránu. Transferované peptidy byly následně imunodetekovány použitím specifické polyklonální králičí anti-defensin-1 primární protilátky a anti-králičí sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase. Obr. 7B znázorňuje membránu po finálním obarvení, kdy došlo ke vzniku dvou bandů v různých oblastech molekulové hmotnosti, a to v oblastech přibližně 10 kDa a 35–48 kDa.

Kromě tricínového gelu byl pro separaci peptidů vyzkoušen také tzv. rozpustný gel disulfidový gel (Hansen, 1976; Hansen et al., 1980), který namísto bisakrylamidu obsahoval analog akrylamidu N,N'-bis-(akryloyl)-cystamin. Díky němu měl být tento gel v přítomnosti redukčního činidla snáze rozpustný a separované proteiny by tak byly lépe přístupné k proteolytickému štěpení. Bohužel v případě vzorků lyofilizované hemolymfy rozpuštěných v tricínovém vzorkovacím pufru, s vynecháním β -merkaptoethanolu, nedošlo k požadovanému rozdělení peptidů ani markeru molekulové hmotnosti (obr. 8). Proto bylo od používání tohoto gelu v dalších postupech upuštěno.

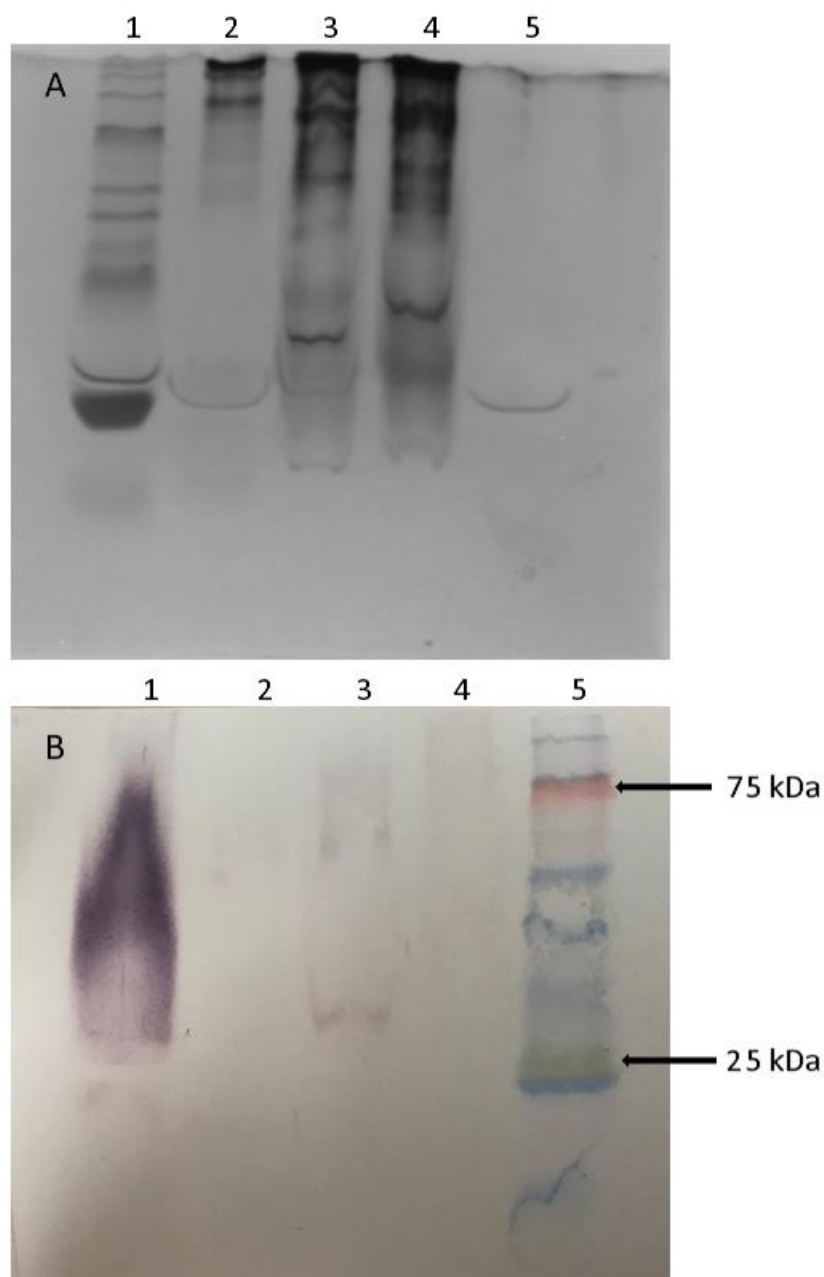
Polyakrylamidový gel nabarvený Coomassie G-250 s rozdělenými peptidy ve vzorcích hemolymfy z imunizovaných včel byl použit pro analýzu proteinového složení pomocí MALDI-TOF, která byla provedena prof. Mgr. Markem Šebelou, Dr. Byly analyzovány dvě oblasti molekulové hmotnosti, které byly na membráně detekovány specificky značenou anti-defensin-1 protilátkou. Jednalo se o oblast okolo 10 kDa a oblast mezi 35–48 kDa.

V oblasti o molekulové hmotnosti 10 kDa, kde by se měl defensin-1 vyskytovat s největší pravděpodobností, jelikož jeho udávaná velikost činí přibližně 5 kDa, byly identifikovány po naštěpení proteinů trypsinem 4 peptidy s odpovídající sekvencí k defensinu-1 (obr. 9). Tyto 4 peptidy vykazovaly sekvenční pokrytí 27 %. Defensin-1 byl identifikován také v oblasti 35–48 kDa, kde byly nalezeny 2 peptidy s pokrytím

sekvence 27% (obr. 10). Průměrná molekulová hmotnost peptidů v obou oblastech činila přibližně 10 kDa. Přítomnost defensinu-1 v oblasti o takto vysoké molekulové hmotnosti je pravděpodobně způsobena vznikem oligomerní sloučeniny s jiným peptidem o větší velikosti.



Obr. 7: Elektroforéza a imunochemická detekce defensinu-1 ve vzorcích včelí hemolymfy. (A) Elektroforetický profil peptidů v tricinovém gelu po obarvení Coomassie G-250, (B) analýza pomocí Western blotu za použití specifické anti-defensin-1 králičí polyklonální protilátky. 1 – marker molekulové hmotnosti, 2 – hemolymfa z 1 imunizované včely, 3 – hemolymfa z 5 imunizovaných včel, 4 – hemolymfa z 1 neimunizované včely, 5 – hemolymfa z 5 neimunizovaných včel, 6 – směsný vzorek hemolymfy z neimunizovaných včel, 7 – peptidový epitop defensinu-1 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).



Obr. 8: Elektroforéza a imunochemická detekce defensinu-1 v rozpustném gelu. (A) Elektroforetický profil peptidů v 12,5% gelu po obarvení Coomassie G-250, (B) detekce defensinu-1 metodou Western blot za použití anti-defensin-1 specifické králičí polyklonální protilátky. 1 – marker molekulové hmotnosti, 2 – vzorek hemolymfy z 1 imunizované včely, 3 – vzorek hemolymfy z 5 imunizovaných včel, 4 – směsný vzorek hemolymfy z neimunizovaných včel, 5 – peptidový epitop defensinu-1 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Project View: D:\Data\PEAKS_Studio_8.0\Marek_Sebela_projects\220104_Irka_Danhik_De...
 Sample 1: F10-MAX09635_MS-JD_A_2u_RD1_01_18015.mgf
 Sample 2: F10-MAX09635_MS-JD_A_5u_RD1_01_18025.mgf
 Sample 3: F13-MAX09637_MS-JD_2_2u_RD3_01_18019.mgf
 Sample 4: F14-MAX09637_MS-JD_2_5u_RD3_01_18029.mgf
 Sample 5: DATA REFINE 18 [2022-01-04 10:07]
 Sample 6: DENOVO 20 [2022-01-04 10:07]
 Sample 7: PEAKS 21 [2022-01-04 10:07]
 Sample 8: PEAKS 22 [2022-01-04 10:07]

Accession	-10lgP	Coverage	Coverage Sampl...	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description	Mark
#CONTAM#sp K2C1_HUMAN]	237.02	48%	48%	63	55		65886	#CONTAM#sp K2C1_HUMAN]	
#CONTAM#sp K1C10_HUMAN]	232.63	59%	59%	55	50		59519	#CONTAM#sp K1C10_HUMAN]	
#CONTAM#sp K2E_HUMAN]	222.17	59%	59%	45	38		65865	#CONTAM#sp K2E_HUMAN]	
#CONTAM#sp TRYP_PIG]	200.32	47%	47%	29	29		24409	#CONTAM#sp TRYP_PIG]	
#CONTAM#sp K1C9_HUMAN]	194.38	47%	47%	32	32		62129	#CONTAM#sp K1C9_HUMAN]	
t Q1W633 Q1W633_APIME	159.21	69%	69%	10	9		15204	OBP21 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=551935 PE=2 SV=1	
t Q1W641 Q1W641_APIME	153.41	61%	61%	12	12		15105	OBP13 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=677674 PE=2 SV=1	
#CONTAM#sp ALBU_BOVIN]	143.24	28%	28%	18	14		69294	#CONTAM#sp ALBU_BOVIN]	
t Q1W640 Q1W640_APIME	138.00	72%	72%	14	14		15201	OBP14 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=677673 PE=1 SV=1	
t Q816X7 Q816X7_APIME	130.51	49%	49%	7	7		14954	Antennal-specific protein 3c OS=Apis mellifera OX=7460 GN=...	
sp Q868N5 VIT_APIME	129.51	6%	6%	10	10		201046	Vitellogenin OS=Apis mellifera OX=7460 GN=Vg PE=1 SV=1	
sp Q10416 HYTA_APIME	120.25	50%	50%	7	7		14492	Hymenoptaecn OS=Apis mellifera OX=7460 PE=2 SV=1	
#CONTAM#sp K1C15_SHEEP]	107.00	10%	10%	7	2		48770	#CONTAM#sp K1C15_SHEEP]	
sp O18330 MRJP1_APIME	106.03	14%	14%	6	6		48886	Major royal jelly protein 1 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=MR...	
t Q86PH6 Q86PH6_APIME	103.37	8%	8%	6	6		78657	Transferrin OS=Apis mellifera OX=7460 GN=trf PE=2 SV=1	
#CONTAM#sp ALBU_HUMAN]	89.39	11%	11%	8	4		69367	#CONTAM#sp ALBU_HUMAN]	
t Q1W636 Q1W636_APIME	88.64	42%	42%	4	3		15000	OBP18 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=677677 PE=2 SV=1	
t A0A7M7R759 A0A7M7R75...	86.48	11%	11%	7	7		65249	Carboxylic ester hydrolase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=4...	
sp P17222 DEF1_APIME	85.48	27%	27%	4	4		10717	Defensin-1 OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=3	
t A0A7M7SQ18 A0A7M7SQ...	77.17	3%	3%	8	8		376811	Uncharacterized protein OS=Apis mellifera OX=7460 PE=4 SV=1	
t Q86M14 Q86M14_APIME	54.98	4%	4%	3	3		80094	Prophenoloxidase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=406155 PE...	
t Q1W635 Q1W635_APIME	46.50	22%	22%	4	4		15625	OBP19 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=677665 PE=2 SV=1	
sp H9KJ27 OCLP1_APIME	45.03	42%	42%	2	2		8298	Omega-conotoxin-like protein 1 OS=Apis mellifera OX=7460 P...	
#CONTAM#sp LYSC_HUMAN]	39.43	8%	8%	1	1		16537	#CONTAM#sp LYSC_HUMAN]	
#CONTAM#sp K2M2_SHEEP]	36.73	3%	3%	2	1		53682	#CONTAM#sp K2M2_SHEEP]	
#CONTAM#sp RS27A_HUMAN]	33.93	16%	16%	2	2		17965	#CONTAM#sp RS27A_HUMAN]	
t A0A7M7M7KH A0A7M7M7K...	33.19	4%	4%	1	1		41758	Uncharacterized protein OS=Apis mellifera OX=7460 PE=3 SV=1	
t Q1W639 Q1W639_APIME	31.46	13%	13%	2	2		15218	OBP15 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=677664 PE=2 SV=1	
t A0A7M7M5M2 A0A7M7M5M...	26.92	2%	2%	1	1		72229	Uncharacterized protein OS=Apis mellifera OX=7460 PE=3 SV=1	
#CONTAM#sp REF_HEVBR]	25.92	19%	19%	2	2		14722	#CONTAM#sp REF_HEVBR]	
t Q8WRW4 Q8WRW4_APIME	24.83	7%	7%	1	1		15330	Odorant binding protein ASP4 OS=Apis mellifera OX=7460 GN...	
t A0A7M7G509 A0A7M7G50...	24.47	18%	18%	1	1		7386	40S ribosomal protein S28 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=72...	

Tasks: Running Info Properties
 PEAKS Search details: Instrument_default
 Search Engine Name: PEAKS
 Parent Mass Error Tolerance: 10.0 ppm
 Fragment Mass Error Tolerance: 0.04 Da
 Precursor Mass Search Type: monoisotopic
 Enzyme: Trypsin
 Max Missed Cleavages: 2
 Digest Mode: Semispecific
 Fixed Modifications: Carbamidomethylation 57.02
 Variable Modifications: Oxidation (M): 15.99, Acetylation (N-term): 42.01, Deamidation (NQ): 0.98
 Max Variable PTM Per Peptide: 3
 Database: 220104_Apis_mellifera_LP000005203.fasta
 Taxon: All
 Contaminant Database: 190304_crapContaminants
 Searched Entry: 19386
 FDR Estimation: Enabled
 De Novo Dependencies: 20

Coverage | Peptides | Denovo Only Tags
 >sp|P17222|DEF1_APIME Defensin-1 OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=3
 1 MKIYFIVGLL FMAMVAIMAA PVEDEFEPLE HFENEERADR HRRVTCDLLS FKGQVNSAC AANCLSLGKA GGHCEKGVCI
 81 CRKTSFKDLW DKRFEG

Obr. 9: Identifikace peptidů v bandu označeného na obr. 7 po vyřezání z gelu po akrylamidové elektroforéze pomocí MALDI-TOF v oblasti molekulové hmotnosti přibližně 10 kDa.

The screenshot displays a proteomics software interface with a project view on the left and a main data table. The table lists protein groups with columns for Accession, -logP, Coverage, Coverage Sampl..., #Peptides, #Unique, PTM, Avg. Mass, Description, and Mark. A detailed view of a peptide is shown at the bottom, including its sequence and various search parameters.

Accession	-logP	Coverage	Coverage Sampl...	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description	Mark
#CONTAM#ipK1C10_HUMAN	246.69	48%	48%	53	48		59519	#CONTAM#ipK1C10_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipK2C1_HUMAN	240.95	52%	52%	58	50		65886	#CONTAM#ipK2C1_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipK2ZE_HUMAN	230.03	57%	57%	47	39		65865	#CONTAM#ipK2ZE_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipK3C9_HUMAN	205.26	43%	43%	37	37		62129	#CONTAM#ipK3C9_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipTRIP_PIG	177.88	35%	35%	20	20		24489	#CONTAM#ipTRIP_PIG	[?]
#CONTAM#ipALBU_BOVIN	174.19	34%	34%	22	16		59294	#CONTAM#ipALBU_BOVIN	[?]
#CONTAM#ipALBU_HUMAN	113.90	10%	10%	7	2		48770	#CONTAM#ipALBU_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipRS27A_HUMAN	101.15	8%	8%	7	1		69367	#CONTAM#ipALBU_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipRS27A_HUMAN	89.59	30%	30%	4	1		17965	#CONTAM#ipRS27A_HUMAN	[?]
trJAGA7M7C7P7JAGA7M7C7P...	82.35	37%	37%	4	1		14703	6S ribosomal protein L40 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=72...	[?]
spI17722 DEF_APIME	66.11	27%	27%	2	2		10717	Defensin1 OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=3	[?]
#CONTAM#ipHBB_HUMAN	59.27	16%	16%	2	2		15867	#CONTAM#ipHBB_HUMAN	[?]
trJAGA7M7M7H7JAGA7M7M7H...	55.60	11%	11%	4	4		41758	Uncharacterized protein OS=Apis mellifera OX=7460 PE=3 SV=1	[?]
#CONTAM#ipLYSC_HUMAN	52.44	8%	8%	1	1		16537	#CONTAM#ipLYSC_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipREF_HEVER	49.33	35%	35%	4	4		14722	#CONTAM#ipREF_HEVER	[?]
trJAGA7M7R7597JAGA7M7R75...	42.04	3%	3%	2	2		65249	Carboxylic ester hydrolase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=4...	[?]
spIO18330 MRP1_APIME	41.49	5%	5%	2	2		48886	Major royal jelly protein 1 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=MR...	[?]
trIQ1W640 Q1W640_APIME	37.58	10%	10%	1	1		15201	DEF14 OS=Apis mellifera OX=7460 GN=677673 PE=1 SV=1	[?]
#CONTAM#ipTHIO_HUMAN	37.14	12%	12%	1	1		11606	#CONTAM#ipTHIO_HUMAN	[?]
#CONTAM#ipSRPP_HEVER	28.30	10%	10%	2	2		22345	#CONTAM#ipSRPP_HEVER	[?]
#CONTAM#ipCATD_HUMAN	27.55	2%	2%	1	1		44552	#CONTAM#ipCATD_HUMAN	[?]
trIQ86M4 IQ86M4_APIME	27.35	1%	1%	1	1		80094	Prophenoloxidase OS=Apis mellifera OX=7460 GN=406155 PE...	[?]
spIQ86M5 INT_APIME	26.42	0%	0%	1	1		201046	Vitellogenin OS=Apis mellifera OX=7460 GN=wig PE=1 SV=1	[?]
#CONTAM#ipKRH6_HUMAN	25.61	4%	4%	2	1		53501	#CONTAM#ipKRH6_HUMAN	[?]
trJAGA7M7F216 JAGA7M7F21...	23.84	7%	7%	1	1		13694	Histone H2B OS=Apis mellifera OX=7460 GN=726447 PE=3 SV...	[?]
trJAGA7M7PE3 JAGA7M7PE3...	23.23	2%	2%	1	1		50449	Uncharacterized protein OS=Apis mellifera OX=7460 PE=4 SV=1	[?]
trJAGA7M7MPD7 JAGA7M7MP...	21.56	1%	1%	1	1		143826	Uncharacterized protein OS=Apis mellifera OX=7460 PE=4 SV=1	[?]

Peptide Details:

Search Engine Name: PEAKS
 Parent Mass Error Tolerance: 10.0 ppm
 Fragment Mass Error Tolerance: 0.04 Da
 Precursor Mass Search Type: monoisotopic
 Enzyme: Trypsin
 Max Missed Cleavages: 2
 Digest Mode: Semispecific
 Fixed Modifications: 57.02
 Variable Modifications: Oxidation (M): 15.99, Acetylation (N-term): 42.01, Deamidation (NQ): 0.98
 Max Variable PTM Per Peptide: 2
 Database: 220104_Apis_mellifera_LIP000005203.fasta
 Taxon: all
 Contaminant Database: 190304_crapContaminants
 Searched Entry: 19186
 FDR Estimation: Enabled
 De Novo Dependencies: 10

Peptide Sequence: 1 MKIYFIVGLL FMAMVAIMAA PVEDEFEPLE HFENESEADR HRRVTCDLLS FKGQVNSAC AANCLSLGKA GGHCHEKGVCI

Peptide Details:

Coverage: Peptides Denovo Only Tags
 >spI17722|DEF_APIME Defensin-1 OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=3

81 CRKTSEKDLW DKRFQ

Sequence Display Option: Fasta

Show de novo only sequences:
 de novo tags sharing: 6 AAs
 de novo peptides fully matched
 show confident modification site

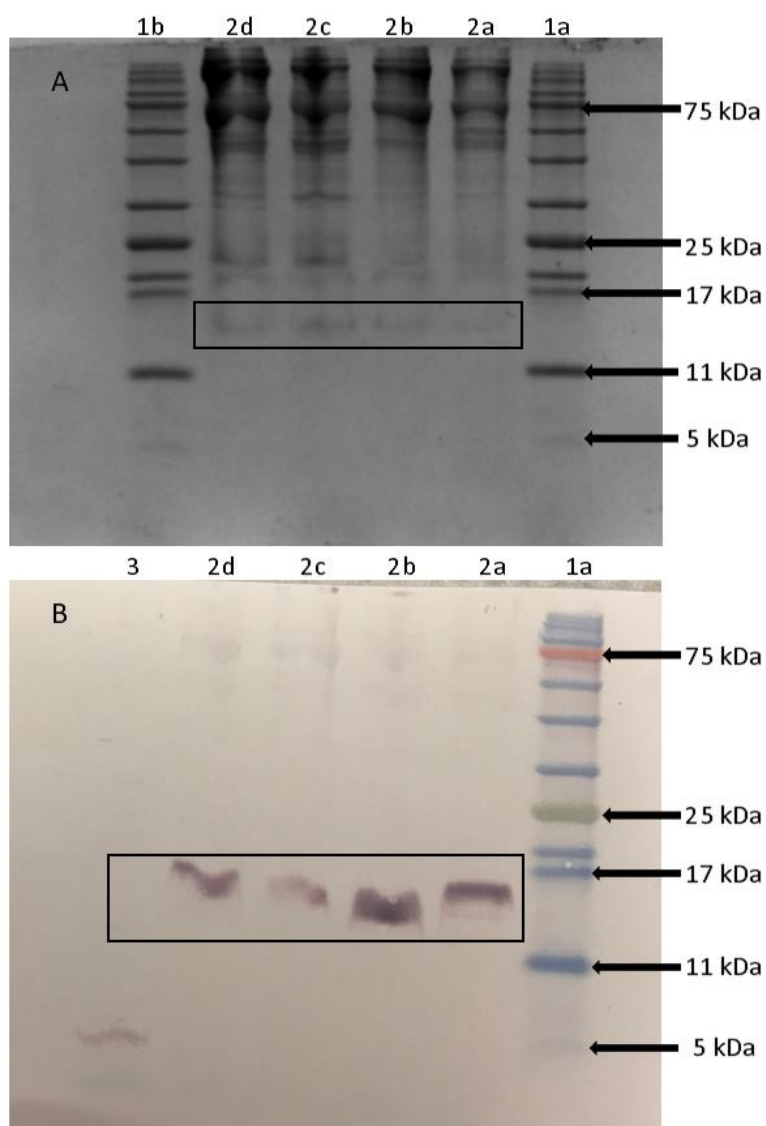
minimal ion intensity: 5 %
 minimal score: 20.0

ΔM PTM #
 +57.02 Carbamidomethyl... 45

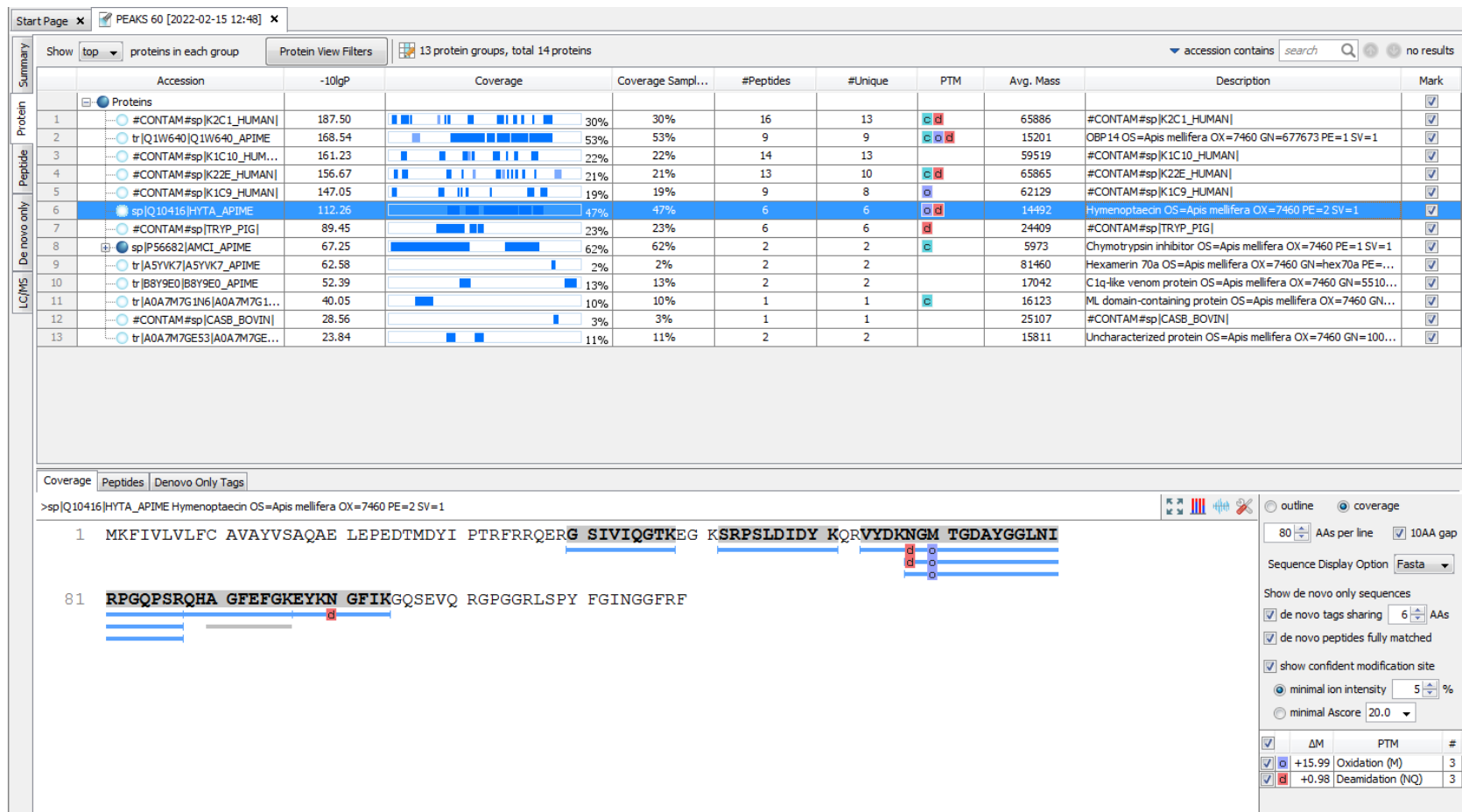
Obr. 10: Identifikace peptidů v bandu označeného na obr. 7 po vyřezání z gelu po akrylamidové elektroforéze pomocí MALDI-TOF v oblasti molekulové hmotnosti v rozmezí 35–48 kDa.

4.1.2 Identifikace vazebné specifity primární protilátky k hymenoptaecinu

Při použití anti-hymenoptaecin specifické polyklonální protilátky k imunochemické detekci hymenoptaecinu ve vzorcích hemolymfy z 5 imunizovaných včel, došlo na rozdíl od detekce defensinu-1 ke vzniku pouze jednoho specifického bandu v oblasti přibližně 14 kDa (obr. 11). Po následné analýze této oblasti pomocí MALDI-TOF bylo v této oblasti molekulové hmotnosti identifikováno celkem 6 peptidů se sekvenčním pokrytím 47 % (obr. 12). Průměrná molekulární hmotnost těchto peptidů činila přibližně 14,5 kDa.



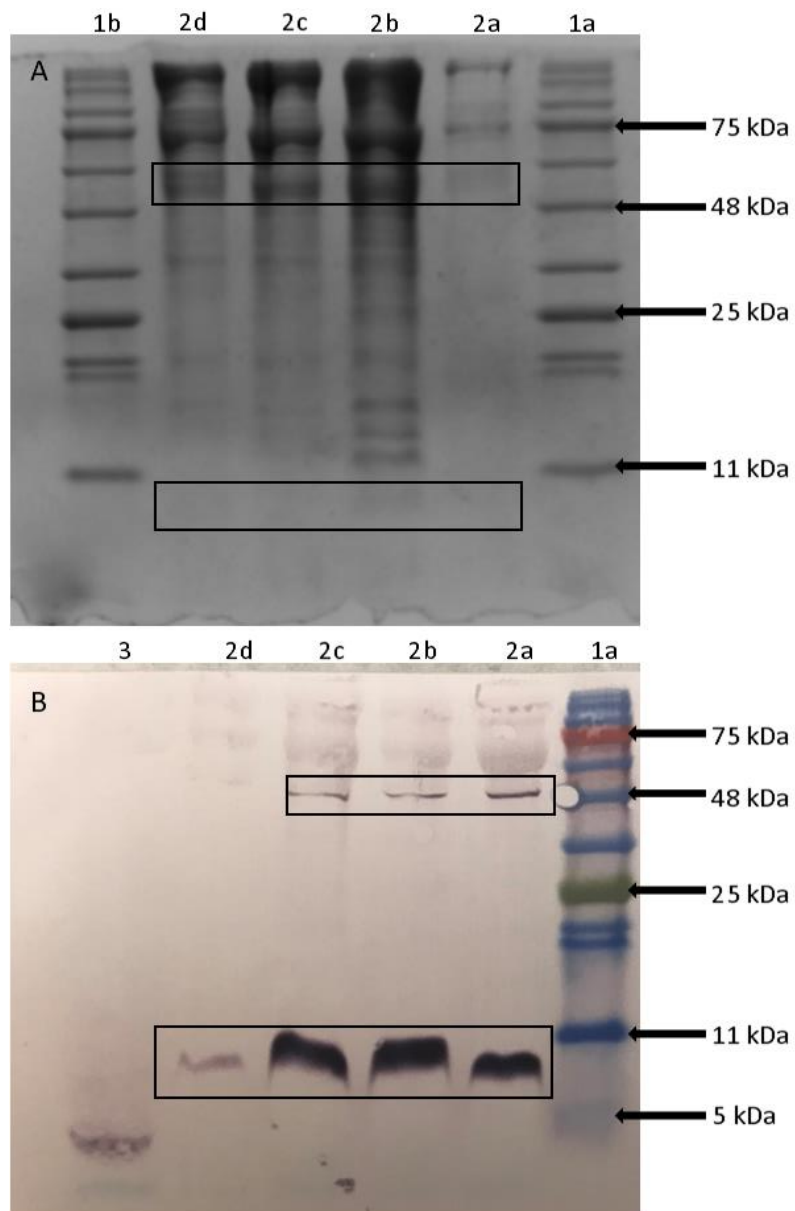
Obr. 11: Elektroforéza a imunochemická detekce hymenoptaecinu ve vzorcích včelí hemolymfy. (A) Elektroforetický profil peptidů v tricinovém gelu po obarvení Coomassie G-250, (B) analýza pomocí Western blotu za použití specifické anti-hymenoptaecin králičí polyklonální protilátky. 1(a-b) – marker molekulové hmotnosti, 2(a-d) – vzorky hemolymfy z 5 imunizovaných včel, 3 – peptidový epitop hymenoptaecinu ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).



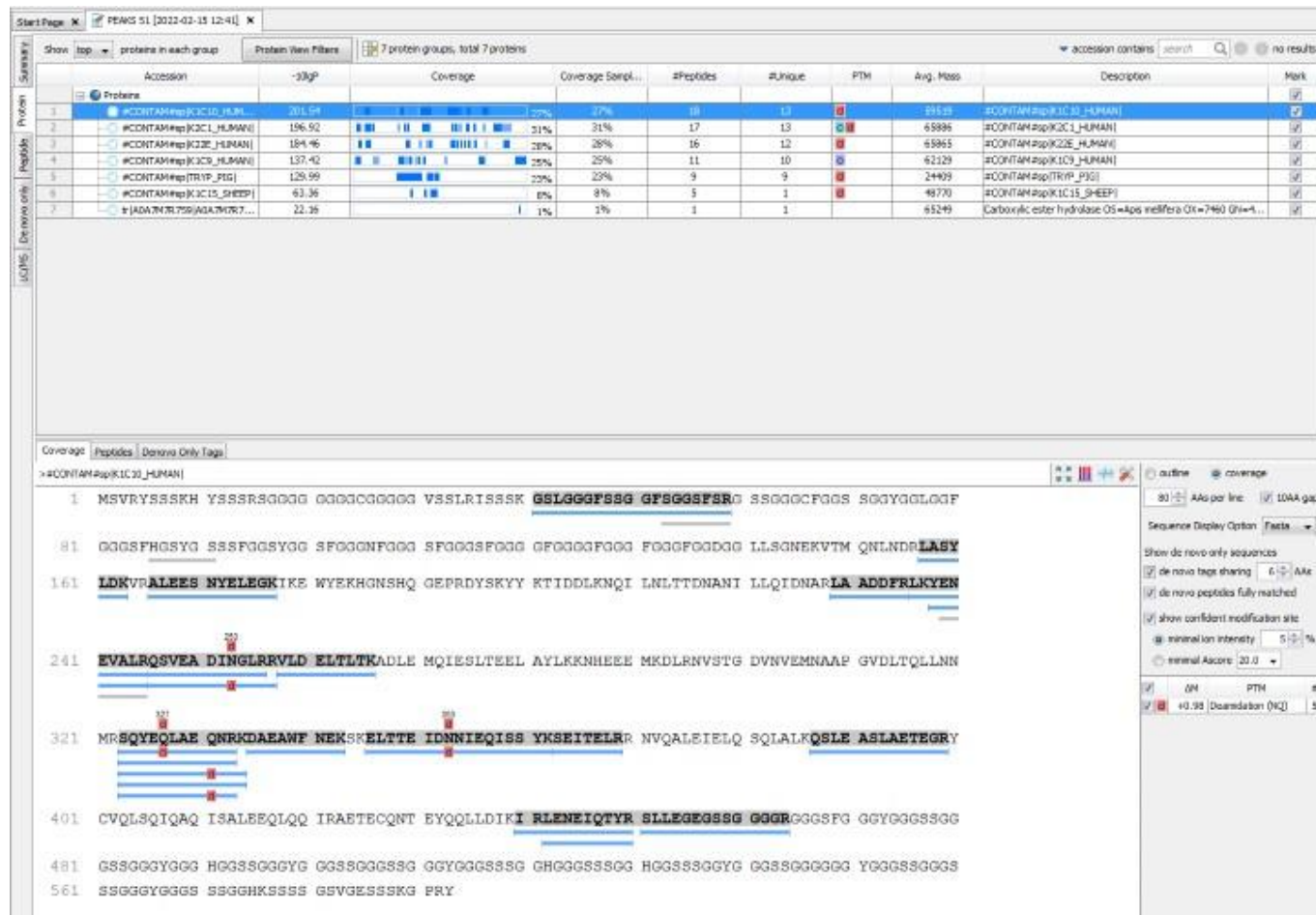
Obr. 12: Identifikace peptidů v bandu označeného na obr. 11 po vyřezání z gelu po akrylamidové elektroforéze pomocí MALDI-TOF v oblasti molekulové hmotnosti přibližně 14 kDa.

4.1.3 Identifikace vazebné specifity primární protilátky k abaecinu

Podobně jako v případě defensinu-1, i při imunochemické detekci abaecinu specifickou polyklonální protilátkou na PVDF membráně došlo ke vzniku dvou bandů v oblastech o různé molekulové hmotnosti, tj. 10 kDa a 50 kDa (obr. 13). Následná analýza MALDI-TOF neprokázala ani v jedné oblasti přítomnost abaecinu. Ačkoliv bylo v prvním případě nalezeno 48 peptidů, pokrytí 14 % bylo pro úspěšnou identifikaci nedostatečné (obr. 14). Ve druhém případě nebyla nalezena žádná sekvenční shoda (obr. 15). Neschopnost identifikovat abaecin byla s největší pravděpodobností způsobena vysokým obsahem prolinů, které znemožňují štěpení trypsinu (EC 3.4.21.4) za argininem a lysinem, pokud spolu sousedí (Rodriguez et al., 2008). Z tohoto důvodu byl pro identifikaci abaecinu vyzkoušen ke štěpení peptidů také chymotrypsin (EC 3.4.21.1). Bohužel ani v tomto případě nebylo dosaženo požadovaného výsledku a nebyl identifikován žádný sekvenčně podobný peptid (obr. 16).



Obr. 13: Elektroforéza a imunochemická detekce abaecinu ve vzorcích včelí hemolymfy. (A) Elektroforetický profil peptidů v tricinovém gelu po obarvení Coomassie G-250, (B) analýza pomocí Western blotu za použití specifické anti-abaecin králičí polyklonální protilátky. 1(a-b) – marker molekulové hmotnosti, 2(a-d) – vzorky hemolymfy z 5 imunizovaných včel, 3 – peptidový epitop abaecinu (5 µg·ml⁻¹).



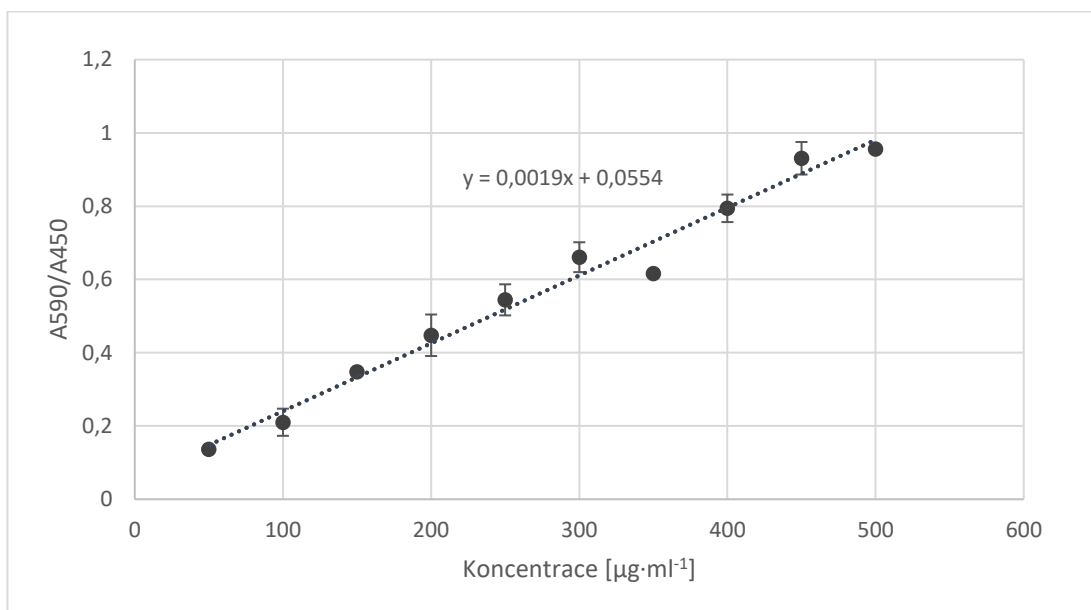
Obr. 14: Identifikace peptidů v bandu označeného na obr. 13 po vyřezání z gelu po akrylamidové elektroforóze pomocí MALDI-TOF v oblasti molekulové hmotnosti přibližně 10 kDa, přičemž štěpení peptidů v bandu bylo provedeno trypsinem.



Obr. 15: Identifikace peptidů v bandu označeného na obr. 13 po vyřezání z gelu po akrylamidové elektroforéze pomocí MALDI-TOF v oblasti molekulové hmotnosti přibližně 50 kDa, přičemž štěpení peptidů v bandu bylo provedeno trypsinem.

4.2 Stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorku hemolymfy

Celkový obsah proteinů v lyofilizovaném vzorku hemolymfy z 5 imunizovaných včel byl stanoven spektrofotometricky pomocí Bradfordovy metody. Nejprve byla stanovena kalibrační křivka BSA o koncentracích v rozsahu 50–500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (obr. 17), podle jejíž rovnice regrese byly následně spočítány koncentrace proteinů ve vzorku. Průměrná koncentrace proteinů ve vzorku hemolymfy z 5 včel rozpuštěné v 650 μl vazebného pufru činila 55,7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ve 100 μl rozpuštěné hemolymfy představující objem nanášený do jamky mikrotitrační destičky, odpovídal celkový obsah proteinů 8,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obr. 17: Kalibrační křivka Bradfordovy metody získaná měřením absorbance a následnou linearizací hodnot absorbancí standardů BSA při 450 a 590 nm.

4.3 Optimalizace ELISA metody pro analýzu včelích AmP

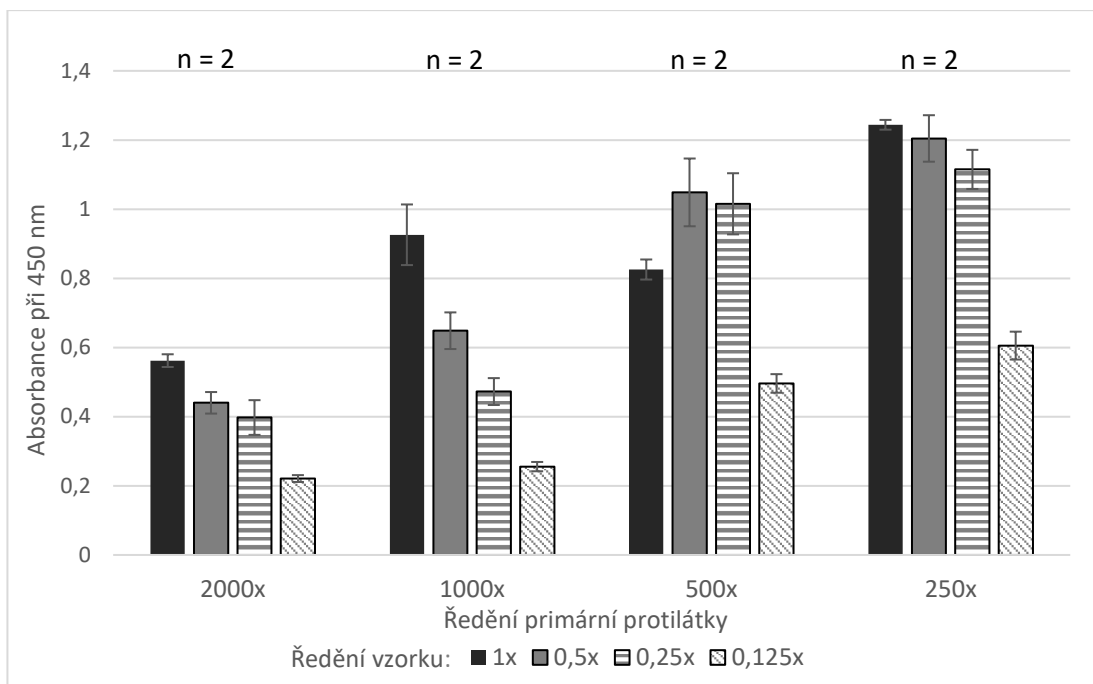
4.3.1 Optimalizace koncentrace rozpuštěného vzorku hemolymfy a ředění primární protilátky

Vzorek hemolymfy z 5 včel byl nejprve rozpuštěn v 650 μ l uhličitanového vazebného pufru. Z tohoto roztoku byly následně připraveny 2–krát, 4–krát a 8–krát ředěné vzorky. Takto připravené vzorky byly použity ke stanovení ELISA metodou za pomoci specificky cílených primárních protilátek proti abaecinu, defensinu-1 a hymenoptaecinu, které byly vždy ředěny v pracovním promývacím pufru v poměru 1:250, 1:500, 1:1000 a 1:2000.

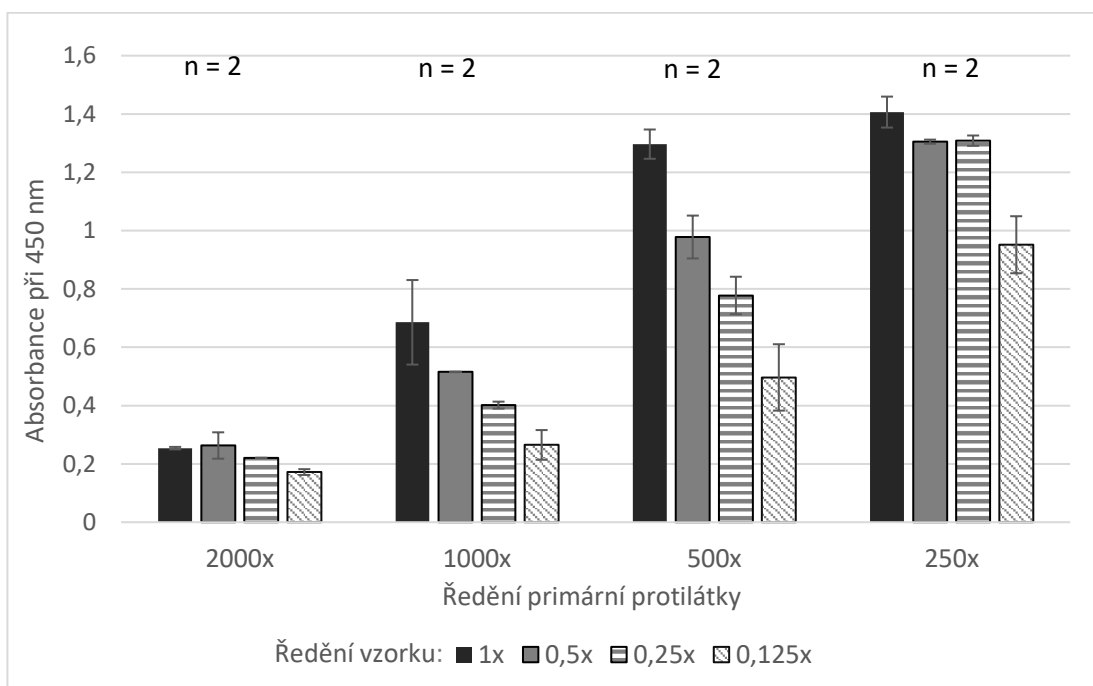
Králičí primární protilátky byly následně detekovány sekundární anti-králičí protilátkou značenou křenuvou peroxidasou a ředěnou v poměru 1:3000. Byla měřena výsledná absorbance při 450 nm, což je absorpční maximum produktu enzymové reakce.

Porovnáním průměrných absorbancí 4 vzorků pro každé ředění protilátky při 450 nm bylo vyhodnoceno následující: pro anti-abaecin králičí protilátku bylo nejvhodnější ředění protilátky 1:250 (obr.18), pro anti-defensin-1 králičí protilátku (obr. 19) i anti-hymenoptaecin králičí protilátku (obr. 20) bylo shodně vůči výsledné absorbanci vhodnější ředění primární protilátky 1:500.

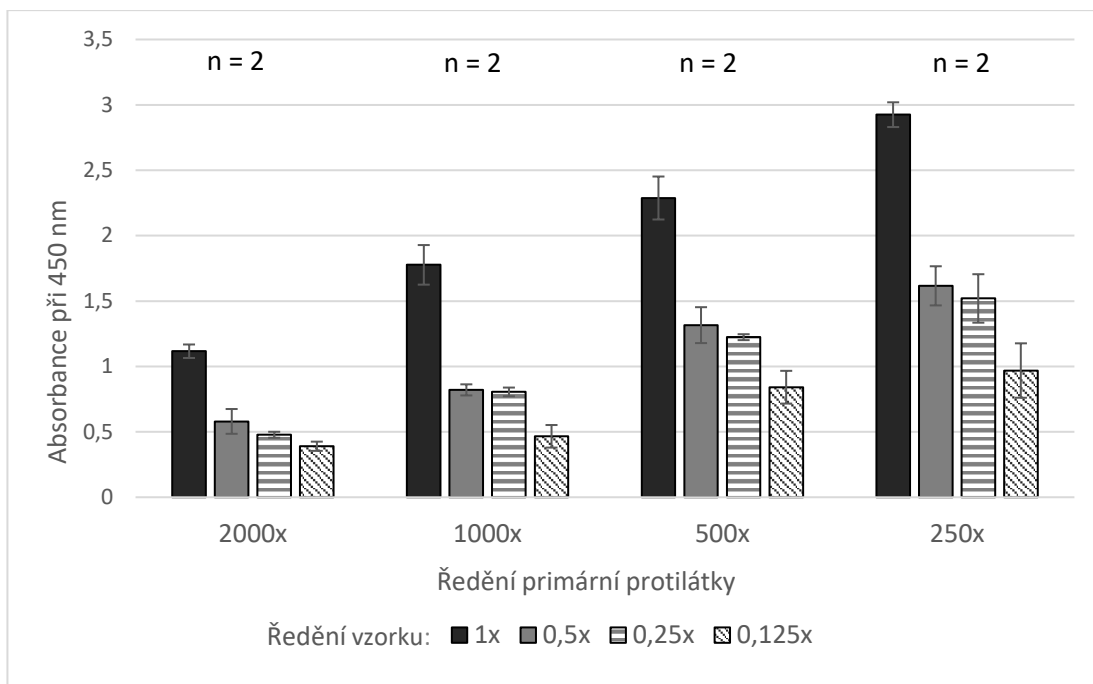
Srovnáním absorbancí byl pro všechny peptidy vyhodnocen jako nejvhodnější koncentrovaný vzorek hemolymfy, který byl používán pro další stanovení. Zředěné vzorky vykazovaly menší výsledný signál, a proto byly výsledného postupu vyřazeny.



Obr. 18: Výsledek stanovení abaecinu ELISA metodou při použití různého ředění vzorku lyofilizované hemolymfy a různého ředění anti-abaecin specifické protilátky; n = počet měřených vzorků.



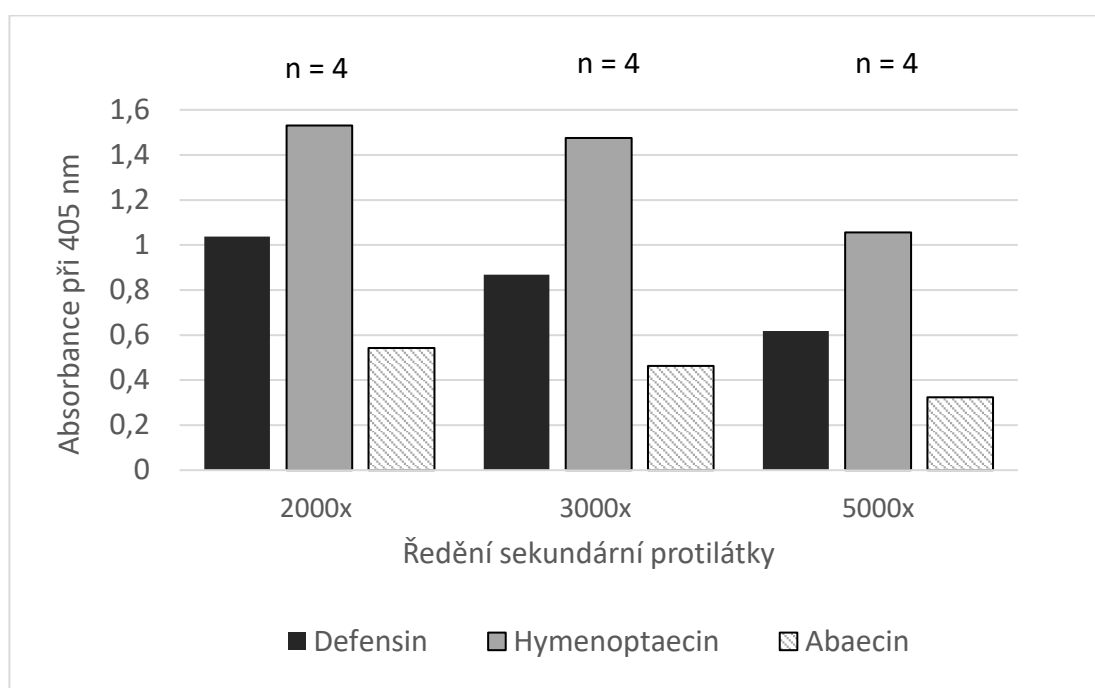
Obr. 19: Výsledek stanovení defensinu-1 ELISA metodou při použití různého ředění vzorku lyofilizované hemolymfy a různého ředění anti-defensin-1 specifické protilátky; n = počet měřených vzorků.



Obr. 20: Výsledek stanovení hymenoptacinu ELISA metodou při použití různého ředění vzorku lyofilizované hemolymfy a různého ředění anti-hymenoptacin specifické protilátky; n = počet měřených vzorků.

4.3.2 Optimalizace ředění sekundární protilátky

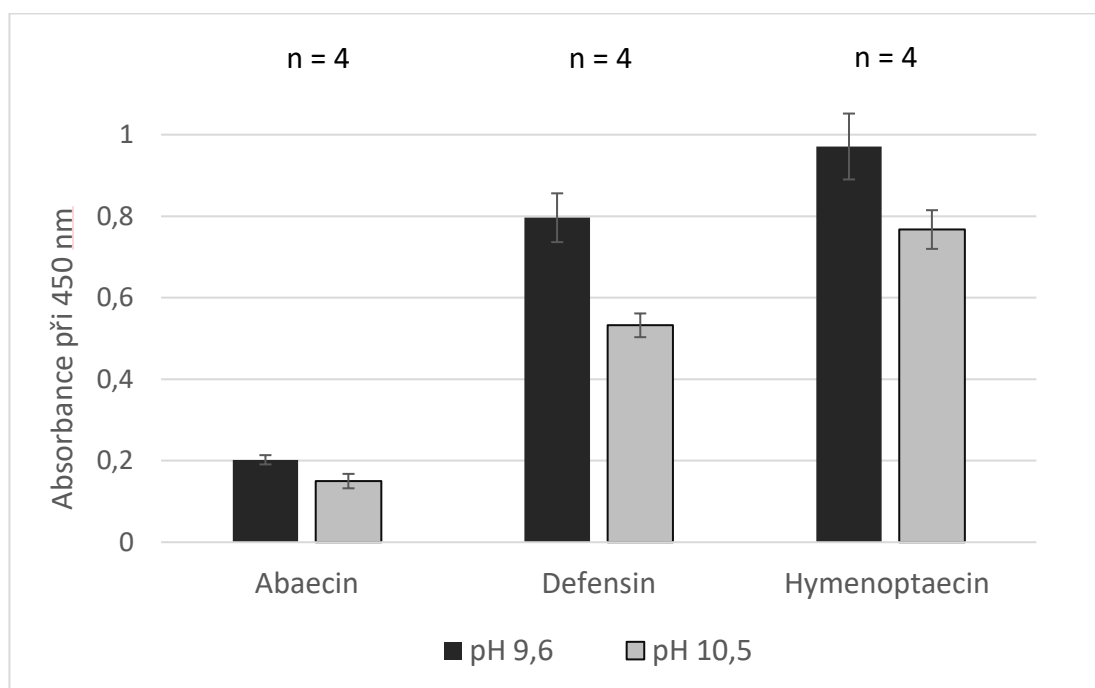
Za využití koncentrovaného vzorku hemolymfy a koncentrací primárních protilátek z předchozího stanovení byla optimalizována také koncentrace sekundární protilátky anti-králičí polyklonální protilátky konjugované s křenovou peroxidasou, která byla ředěna v poměru 1:2000, 1:3000 a 1:5000. Podle výsledných absorbancí při 405 nm (obr. 21) je pro stanovení abaecinu, defensinu i hymenoptaecinu nejvhodnější ředění sekundární protilátky 1:3000 a 1:2000, které poskytovaly přijatelně vysoký signál, při ředění 1:5000 byly hodnoty absorpance nižší.



Obr. 21: Výsledek stanovení AmP ELISA metodou při použití různého ředění sekundární anti-králičí protilátky; n = počet měřených vzorků.

4.3.3 Vliv zásaditého pH vazebného pufru

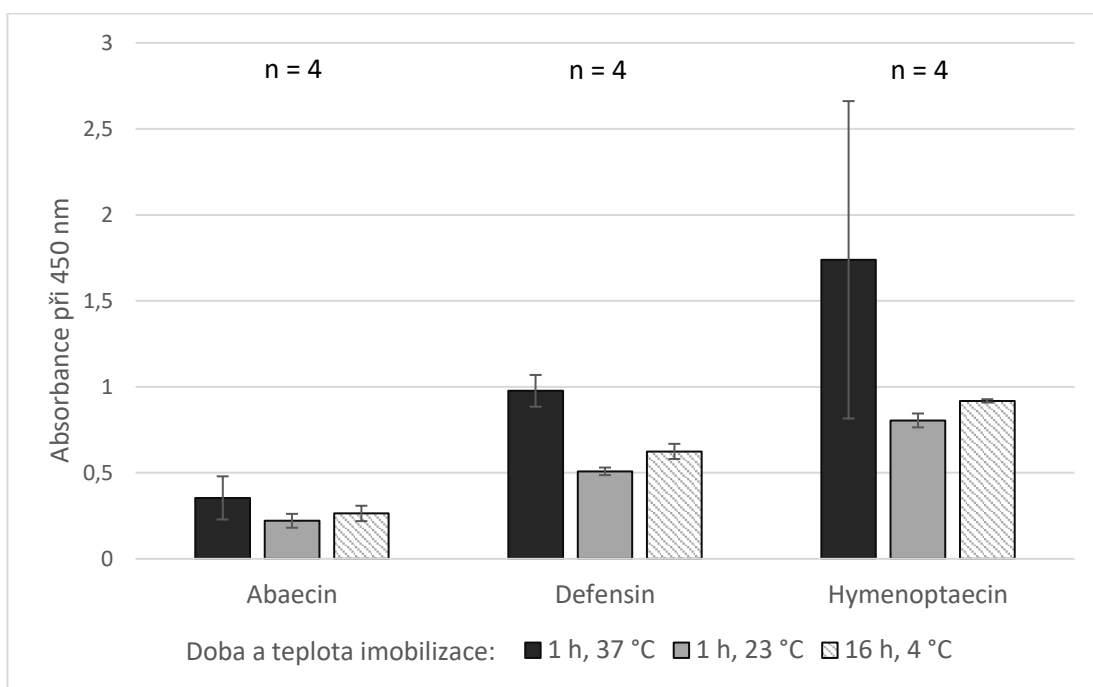
Byl studován vliv změny pH vazebného pufru na výslednou absorbanci. Byly připraveny dva pufrы, jejichž pH bylo upraveno buď pomocí $1 \text{ mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ na běžně používanou hodnotu 9,6; anebo pomocí koncentrovaného roztoku NaOH na hodnotu 10,5. Tyto pufrы byly poté použity pro imobilizaci antigenů, načež další postup stanovení proběhl již na základě předchozího postupu. Z obr. 22 vyplývá, že posun pH do zásaditéjšího prostředí snižuje výsledný detekovaný signál. Z tohoto důvodu je v optimalizovaném postupu doporučeno používat vazebný pufr o pH 9,6.



Obr. 22: Výsledek stanovení AmP ELISA metodou při použití vazebného pufru o různé hodnotě pH; n = počet měřených vzorků.

4.3.4 Vliv teploty a doby imobilizace antigenu

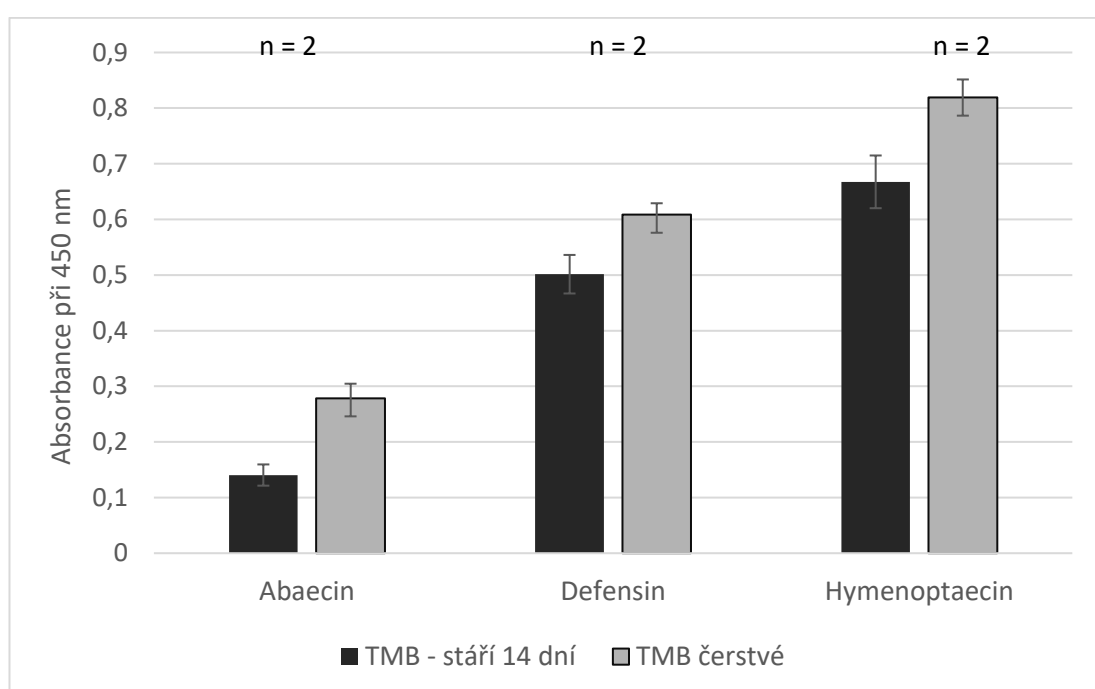
Kromě určení vhodného pH vazebného pufru bylo nutné také optimalizovat konkrétní postup imobilizace antigenu. Byly vyzkoušeny tři různé postupy: imobilizace přes noc (cca 16 h) při 4 °C, imobilizace 1 h při 37 °C a také imobilizace 1 h při laboratorní teplotě. Stanovení všech tří možností probíhalo souběžně se stejnými vzorky hemolymfy, primárních i sekundárních protilátek o stejném ředění. Na obr. 23 je zobrazen výsledek stanovení, kdy nejnižší absorbance byla naměřena u imobilizace při laboratorní teplotě. Vyšší signál byl detekován u imobilizace při 4 °C, avšak úplně nejvyšší absorbanci vykazovaly vzorky inkubované při 37 °C. Z hlediska úspory času by se tento postup imobilizace jevil jako nejvhodnější, je však nutno počítat s tím, že díky vyšší teplotě může docházet k částečnému odpaření naneseného vzorku. Pro spolehlivější výsledky s nižšími odchylkami, ale patrně s nižším signálem, je lepší použít postup imobilizace antigenu při 4 °C přes noc.



Obr. 23: Výsledek stanovení AmP ELISA metodou při třech různých teplotách a době imobilizace antigenu; n = počet měřených vzorků.

4.3.5 Vliv stáří roztoku 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu na výslednou absorbanci

Posledním studovaným kritériem byl vliv stáří roztoku 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) v dimethylsulfoxidu (DMSO), z něhož byl připravován ELISA substrát, na výslednou absorbanci. Roztok byl připraven rozpuštěním 12 mg TMB v 500 μ l DMSO 14 dní předem, přičemž byl skladován ve tmě při 4 °C v lednici. Srovnávací roztok byl připraven až v den provádění stanovení. Z výsledků vyplývá (obr. 24), že vyššího signálu bylo dosaženo při použití čerstvě připraveného roztoku, zatímco u staršího roztoku docházelo spíše ke snížení výsledné absorbance.

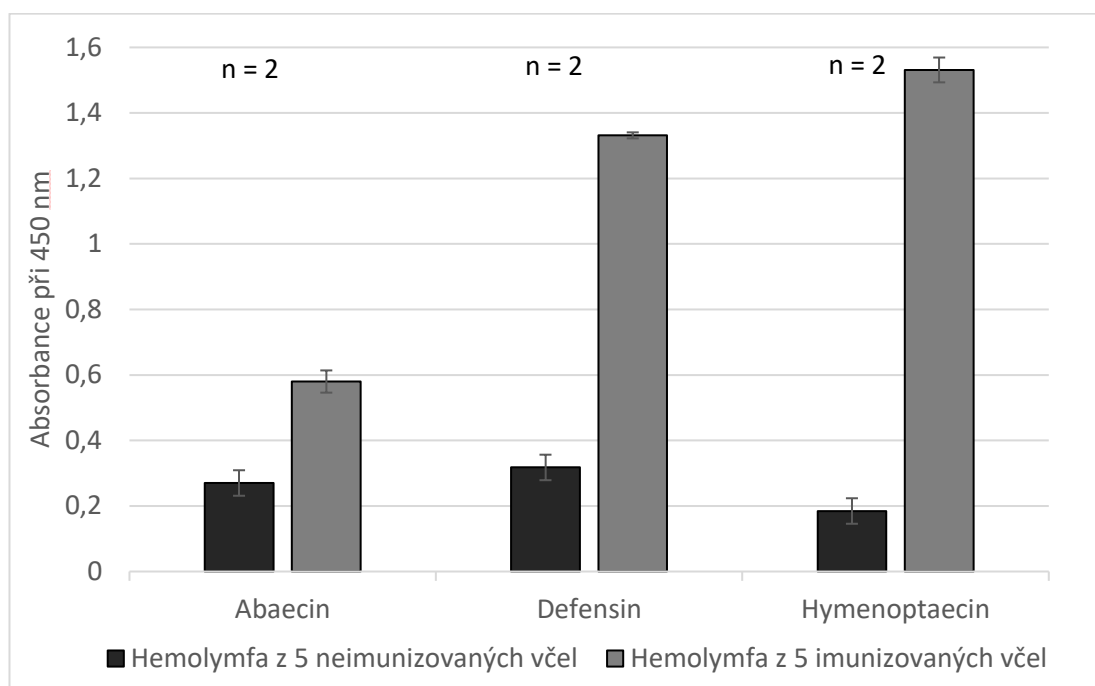


Obr. 24: Výsledek stanovení AmP ELISA metodou při použití dvou chromogenních substrátů připravených z různě starých roztoků 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu; n = počet měřených vzorků.

4.4 Aplikace ELISA metody pro detekci AmP

4.4.1 Stanovení AmP ve vzorcích včelí hemolymfy

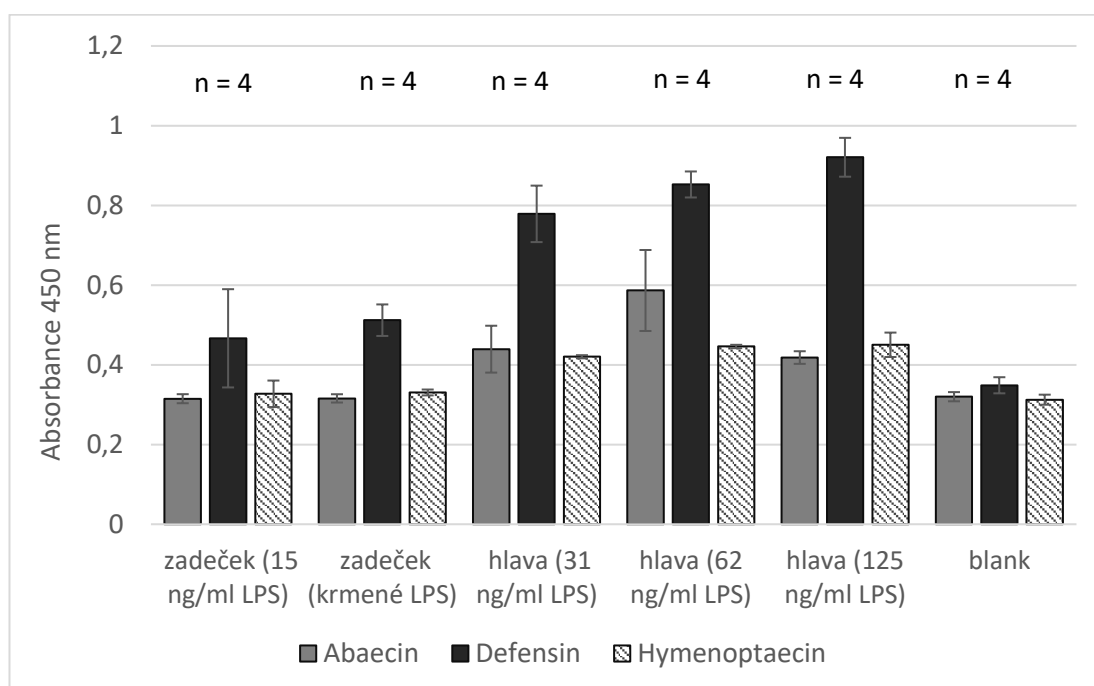
Optimalizovaný postup ELISA metody byl následně použit pro detekci a srovnání absorbance mezi imunizovanými a neimunizovanými vzorky včelí hemolymfy. Jak je patrné z obr. 25, v případě vzorku hemolymfy včel imunizovaných LPS dochází k výraznému vzestupu absorbancí oproti vzorku hemolymfy z neimunizovaných včel, což odpovídá hypotéze, že při vystavení včel imunitnímu stimulu dochází ke zvýšení exprese a tvorby AmP.



Obr. 25: Výsledek stanovení AmP ELISA metodou ve vzorcích hemolymfy z imunizovaných a neimunizovaných včel; n = počet měřených vzorků.

4.4.2 Detekce AmP v extraktech včelích tělních částí

Vzhledem k tomu, že optimalizovaný postup ELISA stanovení včelích antimikrobiálních peptidů byl přizpůsoben pro detekci ve včelí hemolymfě, bylo nutné ověřit, bude-li tento postup použitelný také pro jiný biologický materiál. Pro potřeby stanovení byly připraveny proteinové extrakty z různých částí včelího těla, konkrétně byly extrahovány proteiny z hlavy a zadečku včel, které byly imunizované LPS o různé koncentraci. Z výsledků (obr. 26) je patrné, že vyšší obsah AmP se nacházel v extraktech ze včelí hlavičky, zatímco ve včelím zadečku byl obsah spíše minimální v porovnání s blankem. Jako blank byl použit samotný vazebný pufr, na němž byl demonstrován vliv prostředí a protilátek. Nejvyšší obsah u obou druhů extraktů byl pozorován v případě defensinu-1. Kromě toho byla sledována také závislost obsahu peptidů, a tedy výše výsledného signálu na množství LPS, jimiž byly včely imunizovány. Byl pozorován nárůst obsahu AmP při imunizaci vyšší koncentrací LPS, který lze demonstrovat v případě defensinu-1 u proteinových extraktů ze včelích hlav.



Obr. 26: Výsledek stanovení AmP ELISA metodou v proteinových extraktech z různých částí včelího těla; n = počet měřených vzorků.

5 DISKUZE

5.1 Vazebná specifita primárních protilátek

Tricinová elektroforéza (Schägger & von Jagow, 1987) představuje metodu vhodnou pro separaci peptidů obsažených ve včelí hemolymfě a jejich následnou imunochemickou detekci na membráně pomocí specifických protilátek. Tato metoda kvalitativní analýzy může být použita pro detekci včelích AmP obsažených v hemolymfě – abaecinu, defensinu-1 a hymenoptaecinu.

V případě hymenoptaecinu bylo potvrzeno, že výsledný band detekovaný pomocí protilátek opravdu odpovídá hymenoptaecinu. Z vazby protilátky na konkrétní band, můžeme usuzovat vhodnost použití anti-hymenoptaecin cílené protilátky, která při imunochemických stanoveních bude poskytovat odpovídající signál detekující specifickou přítomnost hymenoptaecinu.

Při imunochemické detekci jak defensinu-1 tak i abaecinu došlo v obou případech ke zviditelnění dvou bandů v různých oblastech molekulové hmotnosti. V případě defensinu-1, byly peptidy sekvenčně shodné s defensinem-1 identifikovány v oblasti přibližně 10 kDa. Kromě toho byly peptidy defensinu-1 detekovány také v oblasti molekulové hmotnosti v rozmezí 35–48 kDa. Přítomnost epitopů defensinu-1 v oblasti s takto vysokou molekulovou hmotností může být vysvětlena oligomerizací jednotlivých monomerních jednotek, která byla prokázána např. u rostlinných či lidských defensinů, a tudíž by k jejich vzniku mohlo docházet také u hmyzích forem (Shafee et al., 2017).

Při detekci abaecinu specifickou protilátkou došlo podobně jako u defensinu-1 ke zviditelnění bandů ve dvou různých oblastech molekulové hmotnosti. Nicméně ani v jednom případě nebylo možné spolehlivě potvrdit přítomnost abaecinu. Nejpravděpodobněji byla tato skutečnost způsobena samotnou strukturou abaecinu, která ve své primární struktuře obsahuje 30 % prolinu (Cociancich et al., 1994). Ke štěpení proteinů po MALDI-TOF analýzu byl používán trypsin, který štěpí za aminokyselinami argininem a lysinem, pokud však tyto nesousedí právě s prolinem. V takovém případě pak ke štěpení nedochází (Rodriguez et al., 2008). Z tohoto důvodu byl ke štěpení použit jiný enzym – chymotrypsin, avšak ani v tomto případě nedošlo k identifikaci abaecinu. Chymotrypsin štěpí v karboxylových místech aminokyselin jako jsou tryptofan, tyrosin, fenylalanin, leucin či methionin. I v tomto případě, pokud za těmito aminokyselinami následuje prolin, ke štěpení nedochází (Appel, 1986; Nelson & Cox, 2000).

Specifitu primární protilátky lze zatím ověřit pouze v případě defensinu-1 a hymenoptaecinu. V případě abaecinu by bylo možné zvážit použití jiného štěpícího enzymu, který by dokázal štěpit i za té okolnosti, že je aminokyselina vázána na prolin. Takovým enzymem by mohla být např. Lys-C endoproteinasa (EC 3.4.21.50), která hydrolyzuje vazby lysinu, a to včetně vazeb s prolinem (Krenkova et al., 2009; Tsunasawa et al., 1989), anebo Arg-C endoproteinasa (EC 3.4.21.35) štěpící na koncích argininu a také lysinu, rovněž včetně vazeb s prolinem, ačkoliv v tomto případě by byla problémem spíše nižší specifita a enzymu a jeho vyšší finanční náklady (Wu et al., 2018).

5.2 Optimalizace ELISA metody pro stanovení včelích antimikrobiálních peptidů

V současné době jsou hmyzí antimikrobiální peptidy analyzovány především pomocí metod HPLC a MS, konkrétně např. apidaecin (Daníhlík et al., 2014). Detekce těchto peptidů pomocí ELISA metody založené na imunochemické reakci mezi antigenem a protilátkou a následném vzniku detekovatelného imunokomplexu, by představovala významný krok v budoucím výzkumu těchto včelích peptidů. Ačkoliv by se dalo předpokládat, že metoda HPLC-MS je pro detekci AmP tou nejvhodnější z hlediska citlivosti a selektivity, v případě molekul o větší molekulové hmotnosti může dojít k nedostatečnému štěpení peptidů a stanovení by se tak komplikovalo.

ELISA metody bylo prozatím využito pouze ke stanovení peptidů obsažených ve včelích produktech jako jsou mateří kašička nebo med. Pomocí ELISA metody byly detekovány např. apisimin či apalbumin, peptidy charakteristické pro mateří kašičku a med (Bíliková & Šimůth, 2010; Bíliková et al., 2002). Kromě nich byl touto metodou detekován také defensin-1 přítomný v medu (Valachová et al., 2016).

Konkrétní postup ELISA metody byl sestaven a dále optimalizován na základě podkladů od výrobce (Bergeron et al., 2018). Nejvhodnější je pro detekci AmP ve včelí hemolymfě používat vzorky lyofilizované hemolymfy rozpuštěné ve vazebném pufru bez dalšího ředění; výsledný signál je v tomto případě dostatečně vysoký. Naopak optimální ředění primárních protilátek se mezi testovanými protilátkami liší. Pro detekci abaecinu je vhodné použití příslušné protilátky ředěné pracovním pufrům 1:250, pro defensin-1 a hymenoptaecin je nejlépe ředit dané protilátky v poměru 1:500. Co se týče sekundární protilátky, jako nejvhodnější se ukázalo ředění v poměru 1:3000, které bylo doporučováno také výrobcem.

Kromě vhodného ředění antigenu a protilátek byly zkoušeny různé postupy a vlastnosti pufru při samotné imobilizaci antigenu. Podle materiálů dostupných od výrobce mikrotitrační destičky (Gibbs et al., 2017) byly sestaveny různé postupy imobilizace na povrch destičky lišící se dobou upevňování antigenu na nosič a teplotou, při níž proces probíhal. Jako nejspolehlivější byla vyhodnocena imobilizace probíhající přes noc při 4 °C, a to zejména díky konstantním podmínkám, za nichž probíhá a také době inkubace, která je optimální pro ustanovení rovnováhy mezi navázaným antigenem a volnými molekulami. Oproti tomu např. inkubace při 37 °C není příliš vhodná z důvodů vyššího odpařování, které může např. zapříčinit zvýšenou denaturaci imobilizovaných proteinů jejich vyschnutím (Gibbs et al., 2017). Mimo jiné byl také zkoušen vliv pH vazebného pufru na imobilizaci antigenu. pH vazebného pufru má na pasivní imobilizaci obrovský vliv, protože biomolekuly se nejefektivněji vážou při takovém pH, při němž dochází k odkrytí jejich hydrofobních oblastí, které bývají za normálních podmínek skryty. Bylo potvrzeno, že při slabě bazickém pH 9,6 je výsledný signál vyšší, než v zásaditějším pH 10,5 (Gibbs et al., 2017).

Během provádění optimalizace postupu metody byl vyzorován možný vliv stáří připravovaného TMB roztoku na výsledný signál. Roztok TMB připravovaný více než 14 dní před samotným měřením vykazoval špatné rozpouštěcí vlastnosti z hlediska vysrážení části obsahu. Porovnáním s roztokem připraveným čerstvě v den stanovení bylo zjištěno, že použití staršího TMB roztoku uchovávaného v lednici, snižuje výsledný signál. Tento výsledek se shoduje i s doporučovými postupy přípravy a uchovávání roztoku (Gibbs et al., 2017; Harlow, 1988), neboť krátkodobá stabilita a špatná rozpustnost jsou již delší dobu známé jako velmi problematické vlastnosti tohoto roztoku, což popsali např. Goka & Farthing, 1987.

Optimalizovaný postup ELISA metody byl použit převážně pro detekci AmP ve vzorcích včelí hemolymfy. Nicméně bylo zjištěno, že je také vhodný pro detekci AmP v proteinových extraktech z různých částí včelího těla, konkrétně zadečku a hlavičky. Hladina přítomných AmP se však pravděpodobně v jednotlivých částech těla výrazně liší, což bylo v nedávné době potvrzeno také ve studii, již provedli Houdelet et al., 2021. Zajímavým zjištěním bezesporu je, že ačkoliv se předpokládá, že AmP vznikají převážně v tukovém tělese hmyzu (Lamberty et al., 2001), které se u včel nachází v zadečku, v daných extraktech je hladina přítomných AmP nižší než v extraktech z hlavičky. Valachová et al., 2016 zjistili, že k expresi defensinu-1 dochází také v hypofaryngeálních

žlázách včelích dělnic, což může být jeden z faktorů vysvětlujících zvýšenou přítomnost defensinu-1 právě v proteinových extraktech z hlav.

Ačkoliv byl proveden jeden krátký pokus na detekci AmP v proteinových extraktech z různých tělních částí, lze na něm i tak vcelku bezpečně demonstrovat, že získané výsledky odráží skutečnou podobu výskytu AmP ve včelím organismu. Je patrné, že u imunizovaných včel dochází ke zvýšení exprese a následného výskytu antimikrobiálních peptidů, jak bylo také předpokládáno. Zároveň je možné říci, že výskyt těchto AmP je také úměrný množství podávaného či injektovaného LPS. Je zřejmé, že i pouhé krmení LPS do jisté míry hladinu těchto AmP zvyšuje. Pro další výzkumy je důležité zjištění, že tímto postupem lze detekovat včelí AmP nejen v hemolymfě, ale také v extraktech z tělních částí, což je efektivní zejména pro rychlou analýzu, kdy není možné získat imunizovanou hemolymfu.

Tento optimalizovaný postup ELISA metody pro detekci včelích antimikrobiálních peptidů přináší novou možnost studia včelí imunity a významně rozšiřuje portfolio používaných metod. V prozatímním uspořádání slouží především ke kvalitativní analýze peptidů obsažených v hemolymfě či tělních extraktech. Dalším krokem vylepšení metody je nutné separovat, purifikovat či rekombinačně připravit dané peptidy tak, aby mohly sloužit pro kvantitativní vyhodnocení detekce jednotlivých proteinů.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na antimikrobiální peptidy, jejich výskyt u hmyzu a možnosti kvalitativního a kvantitativního stanovení. Experimentální část se zabývala některými antimikrobiálními peptidy, jimiž disponuje včela medonosná, přičemž bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Byla vypracována literární rešerše o významu a funkci antimikrobiálních peptidů se zaměřením na hmyz, především na včelu medonosnou.
2. Byla sepsána literární rešerše o fungování a problematice používání imunochemických metod se zaměřením na ELISA metodu.
3. V praktické části byla ověřena vazebná specifita primárních protilátek specifických k daným antimikrobiálním peptidům včely medonosné. Pomocí tricínové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a následné analýzy pomocí MALDI-TOF je možné identifikovat vazebnou specifitu primárních protilátek k defensinu-1 a k hymenoptaecinu. Není možné identifikovat vazebnou specifitu primární protilátky k abaecinu, a to zejména z důvodu primární struktury peptidu, která znemožňuje štěpení běžně používanými enzymy.
4. Pro detekci daných antimikrobiálních peptidů ve včelí hemolymfě byla optimalizována ELISA metoda. Bylo vyhodnoceno, že pro detekci je nejvhodnější ředit primární králičí polyklonální protilátky specifické pro defensin-1 a hymenoptaecin v poměru 1:500, zatímco pro abaecin je vhodnější poměr 1:250. Sekundární anti-králičí polyklonální protilátku konjugovanou s křenovou peroxidasou je výhodné ředit v poměru 1:3000. Imobilizace antigenu probíhá nejspolehlivěji přes noc při 4 °C za současného použití vazebného pufru o pH 9,6. Pro co nejvíce odpovídající hodnoty absorbance je důležité připravovat TMB roztok vždy čerstvý v den plánovaného stanovení.
5. Optimalizovaný postup ELISA metody je možné použít nejen pro detekci antimikrobiálních peptidů v hemolymfě, ale také v proteinových extraktech z různých tělních částí včely medonosné. Bylo zjištěno, že hladina AmP se v rámci jednotlivých částí patrně liší, přičemž může být ovlivněna také množstvím LPS, jímž byly dané včely imunizovány.
6. Optimalizovaná metoda ELISA stanovení má potencionální využití pro další studium produkce a výskytu včelích antimikrobiálních peptidů, zejména co se

týče jejich tvorby a následného výskytu v jednotlivých tkáních či různých ošetřeních pokusných včel.

Další práce by měla být zaměřena na nalezení vhodného enzymu a dokončení charakterizace vazebné specifity primární protilátky k abaecinu. Dále by měly být purifikovány či rekombinačně připraveny jednotlivé antimikrobiální peptidy, aby mohly být v daných tkáních stanoveny také kvantitativně.

7 LITERATURA

- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S. B., Ulberth, F., Van Hengel, A. J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J. M., Wehling, P., Taylor, S. L., Poms, R. E., & Delahaut, P. (2010). Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(2), 442–450. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.2.442>
- Amso, Z., & Hayouka, Z. (2019). Antimicrobial random peptide cocktails: A new approach to fight pathogenic bacteria. *Chemical Communications*, 55(14), 2007–2014. <https://doi.org/10.1039/C8CC09961H>
- Appel, W. (1986). Chymotrypsin: Molecular and catalytic properties. *Clinical Biochemistry*, 19(6), 317–322. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(86\)80002-9](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(86)80002-9)
- Aronstein, K. A., Murray, K. D., & Saldivar, E. (2010). Transcriptional responses in Honey Bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC Genomics*, 11(1), 391. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-391>
- Bachanová, K., Klauđiny, J., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*, 33(3), 259–269. <https://doi.org/10.1051/apido:2002015>
- Baracchi, D., Francese, S., & Turillazzi, S. (2011). Beyond the antipredatory defence: Honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon*, 58(6), 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.017>
- Baracchi, D., & Turillazzi, S. (2010). Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology*, 56(4), 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.013>
- Bennett, K. L., Smith, S. V., Truscott, R. J. W., & Sheil, M. M. (1997). Monitoring Papain Digestion of a Monoclonal Antibody by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 245(1), 17–27. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9904>
- Bergeron, A. B., Bortz, C. J., Rossi, A., & Usa, M. (2018). *Corning® Medium and High Binding ELISA Microplates for Select Target Size Binding Assays*. 3. <https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/applications/CLS-AN-497%20DL.pdf>
- Bíliková, K., & Šimúth, J. (2010). New Criterion for Evaluation of Honey: Quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in Honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8776–8781. <https://doi.org/10.1021/jf101583s>
- Bíliková, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klauđiny, J., & Šimúth, J. (2002). Apisimin, a new serine–valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: Purification and molecular characterization. GeneBank accession number bankit 422221 AY055108 10-SEP-2001. *FEBS Letters*, 528(1), 125–129. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03272-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03272-6)
- Borah, A., Deb, B., & Chakraborty, S. (2020). A Crosstalk on Antimicrobial Peptides. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 229–244. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10075-x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B., & Pastan, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7538–7542. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7538>
- Brown, K. L., & Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4), 329–344. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00015-4)
- Bulet, P., & Stocklin, R. (2005). Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *Protein and Peptide Letters*, 12(1), 3–11. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044–7054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53143-4)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387–2391. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., van DAMME, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., & Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x>
- Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Apidaecin-Type Peptide Antibiotics Function through a Nonporeforming Mechanism Involving Stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(1), 339–345. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1234>
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569–28575. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61943-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61943-5)
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Clark, M. F., Lister, R. M., & Bar-Joseph, M. (1986). ELISA techniques. In *Methods in Enzymology*, 118, s. 742–766. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18114-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6)
- Cociancich, S., Bulet, P., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today*, 10(4), 132–139. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90260-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90260-7)
- Corrales, J., Mulero, I., Mulero, V., & Noga, E. J. (2010). Detection of antimicrobial peptides related to piscidin 4 in important aquacultured fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(3), 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.004>
- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>

- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2015). Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity: Physiology, biochemistry, and chemical ecology. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123–136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- Danihlík, J., Šebela, M., Petřivalský, M., & Lenobel, R. (2014). A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1374, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.041>
- Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., & Vorstenbosch, C. V. D. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>
- Dostálková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2021). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune responses than summer populations after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, 224(3). <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Droual, R., Bickford, A. A., Charlton, B. R., & Kuney, D. R. (1990). Investigation of Problems Associated with Intramuscular Breast Injection of Oil-Adjuvanted Killed Vaccines in Chickens. *Avian Diseases*, 34(2), 473–478. <https://doi.org/10.2307/1591439>
- Dutta, R. C., Nagpal, S., & Salunke, D. M. (2008). Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(5), 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.005>
- Engström, Y. (1999). Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4), 345–358. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00016-6)
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Erlor, S., Popp, M., & Lattorff, H. M. G. (2011). Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). *PLOS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018126>
- Evans, J. D. (2004). Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.004>
- Evans, J. D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.004>
- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- Fitzpatrick, J., Fanning, L., Hearty, S., Leonard, P., Manning, B. M., Quinn, J. G., & O’Kennedy, R. (2000). Applications and Recent Developments in the use of Antibodies for Analysis. *Analytical Letters*, 33(13), 2563–2609. <https://doi.org/10.1080/00032710008543210>
- Fontana, R., Mendes, M. A., Souza, B. M. de, Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the

- Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25(6), 919–928. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Freund, J., Casals, J., & Hosmer, E. P. (1937). Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 37(3), 509–513. <https://doi.org/10.3181/00379727-37-9625>
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11333–11337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38596-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38596-5)
- Gabaldón, J. A., Maquieira, A., & Puchades, R. (1999). Current Trends in Immunoassay-Based Kits for Pesticide Analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(6), 519–538. <https://doi.org/10.1080/10408699991279277>
- Gao, B., & Zhu, S. (2010). Characterization of a hymenoptaecin-like antimicrobial peptide in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Process Biochemistry*, 45(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.017>
- Gibbs, J., Vessels, M., Rothenberg, M., & Usa, M. (2017). *Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules for ELISA Assays*. 6. <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-455.pdf>
- Gibbs, J., Vessels, M., Rothenberg, M., & Usa, M. (2017). *Selecting the Detection System – Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods for ELISA Assays*. 10. https://www.labcluster.com/news4_4/elisa5.pdf
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1–33. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>
- Goka, A. K. J., & Farthing, M. J. G. (1987). The use of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunoassay*, 8(1), 29–41. Scopus. <https://doi.org/10.1080/01971528708063053>
- Gomes, A. P., Mano, J. F., Queiroz, J. A., & Gouveia, I. C. (2015). Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications. *Carbohydrate Polymers*, 127, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.089>
- Hara, S., & Yamakawa, M. (1995). A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical Journal*, 310(2), 651–656. <https://doi.org/10.1042/bj3100651>
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T., & Gläser, R. (2010). Enhanced Expression and Secretion of Antimicrobial Peptides in Atopic Dermatitis and after Superficial Skin Injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1355–1364. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.432>
- Harlow, E. (1988). Antibodies. *A Laboratory Manual*, 53–138. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(89\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0307-4412(89)90165-9)
- Hau, J., & Schapiro, S. J. (2002). *Handbook of Laboratory Animal Science: Essential Principles and Practices, Volume I*. CRC Press.
- Hjerten, S. (1963). „Molecular-sieve” electrophoresis in cross-linked polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography*, 11, 66–70. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80870-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80870-0)
- Hoffmann, J. A., & Hetru, C. (1992). Insect defensins: Inducible antibacterial peptides. *Immunology Today*, 13(10), 411–415. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90092-L](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90092-L)

- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. B. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, 284(5418), 1313–1318. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>
- Hornbeck, P. (1992). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, 1(1), 2.1.1–2.1.22. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s01>
- Houdelet, C., Arafah, K., Bocquet, M., & Bulet, P. (2022). Molecular histoproteomy by MALDI mass spectrometry imaging to uncover markers of the impact of *Nosema* on *Apis mellifera*. *PROTEOMICS*, 2100224. <https://doi.org/10.1002/pmic.202100224>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hultmark, D. (2003). Drosophila immunity: Paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*, 15(1), 12–19. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00005-5)
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., & Crea, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), 5879–5883. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281868/>
- Chan, Q. W. T., Howes, C. G., & Foster, L. J. (2006). Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph * S. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(12), 2252–2262. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600197-MCP200>
- Choi, H., Hwang, J.-S., & Lee, D. G. (2014). Identification of a novel antimicrobial peptide, scolopendin 1, derived from centipede *Scolopendra subspinipes mutilans* and its antifungal mechanism. *Insect Molecular Biology*, 23(6), 788–799. <https://doi.org/10.1111/imb.12124>
- Choi, Y. S., Choo, Y. M., Lee, K. S., Yoon, H. J., Kim, I., Je, Y. H., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2008). Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(2), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.007>
- Ilyasov, R. A., Gaifullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskryakov, A. V., & Nikolaenko, A. G. (2013). Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(1), 1–9. <https://doi.org/10.1134/S0022093013010015>
- Valachová, I., Bučeková, M., & Majtán, J. (2016). Quantification of bee-derived peptide defensin-1 in honey by competitive enzyme-linked immunosorbent assay, a new approach in honey quality control. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(3), 233–243. <https://doi.org/10.17221/422/2015-CJFS>
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, 295(3), 369–371. <https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Johnston, B. A., Eisen, H., & Fry, D. (1991). An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Laboratory Animal Science*, 41(1), 15–21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1849580/>
- Kato, K., Hamaguchi, Y., Okawa, S., Ishikawa, E., Kobayashi, K., & Katunuma, N. (1977). Use of Rabbit Antibody IgG Bound onto Plain and Aminoalkylsilyl Glass Surface for the Enzyme-Linked Sandwich Immunoassay. *The Journal of Biochemistry*, 82(1), 261–266. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131678>

- Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.007>
- Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017a). Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093708>
- Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017b). Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(6), pdb.prot093724. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093724>
- Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017c). Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(7), pdb.prot093740. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093740>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1592, 79–94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_7
- Krenkova, J., Lacher, N. A., & Svec, F. (2009). Highly Efficient Enzyme Reactors Containing Trypsin and Endoproteinase LysC Immobilized on Porous Polymer Monolith Coupled to MS Suitable for Analysis of Antibodies. *Analytical Chemistry*, 81(5), 2004–2012. <https://doi.org/10.1021/ac8026564>
- Králová, B. (2001). *Bioanalytické Metody*. (3. vydání). Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie.
- Kuby, J., Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Immunology* (Sixth edition). Freeman.
- Kuhn-Nentwig, L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(12), 2651–2668. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3106-8>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2009). Introduction to protein blotting. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 536, 9–22. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-542-8_3
- Lamberty, M., Zachary, D., Lanot, R., Bordereau, C., Robert, A., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (2001). Insect Immunity: Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4085–4092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002998200>
- Laughton, A. M., Boots, M., & Siva-Jothy, M. T. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 57(7), 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.020>
- Lee, E., Shin, A., & Kim, Y. (2015). Anti-inflammatory activities of cecropin A and its mechanism of action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88(1), 31–44. <https://doi.org/10.1002/arch.21193>
- Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. M. (2005). Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal*, 46(3), 269–279. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>
- Leenaars, P. P. A. M., Hendriksen, C. F. M., de Leeuw, W. A., Carat, F., Delahaut, P., Fischer, R., Halder, M., Hanly, W. C., Hartinger, J., Hau, J., Lindblad, E. B., Nicklas, W., Outschoorn, I. M., & Stewart-Tull, D. E. S. (1999). The Production of Polyclonal

- Antibodies in Laboratory Animals. *Alternatives to Laboratory Animals*, 27(1), 79–102. <https://doi.org/10.1177/026119299902700106>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14614–14619. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14614>
- Leskowitz, S., Waksman, B. H., & Bardow, A. (1960). Studies in Immunization: I. The Effect of Route of Injection of Bovine Serum Albumin in Freund Adjuvant on Production of Circulating Antibody and Delayed Hypersensitivity. *The Journal of Immunology*, 84(1), 58–72. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14415989/>
- Li, W. F., Ma, G. X., & Zhou, X. X. (2006). Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, 27(9), 2350–2359. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.016>
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Liu, C., Kobashigawa, Y., Yamauchi, S., Toyota, Y., Teramoto, M., Ikeguchi, Y., Fukuda, N., Sato, T., Sato, Y., Kimura, H., & Morioka, H. (2019). Preparation of single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* by simplified and systematic chaperone optimization. *The Journal of Biochemistry*, 166(6), 455–462. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz059>
- MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.12.001>
- Mandel, U., Therkildsen, M. H., Reibel, J., Sweeney, B., Matsuura, H., Hakomori, S.-I., Dabelsteen, E., & Clausen, H. (1992). Cancer-associated changes in glycosylation of fibronectin. *APMIS*, 100(7–12), 817–826. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1992.tb04005.x>
- Manfredini, F., Beani, L., Taormina, M., & Vannini, L. (2010). Parasitic infection protects wasp larvae against a bacterial challenge. *Microbes and Infection*, 12(10), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.001>
- Manning, C. F., Bundros, A. M., & Trimmer, J. S. (2012). Benefits and Pitfalls of Secondary Antibodies: Why Choosing the Right Secondary Is of Primary Importance. *PLOS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038313>
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(4), 509–517. <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., & Vilcinskis, A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>

- Nakane, P. K., & Pierce, G. B., Jr. (1967). Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *Journal of Cell Biology*, 33(2), 307–318. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.2.307>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry* (Third edition). Maxmillan Learning.
- Pink, M., Verma, N., Rettenmeier, A. W., & Schmitz-Spanke, S. (2010). CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *ELECTROPHORESIS*, 31(4), 593–598. <https://doi.org/10.1002/elps.200900481>
- Poláčková, V., Pastucha, M., Mikušová, Z., Mickert, M. J., Hlaváček, A., Gorris, H. H., Skládal, P., & Farka, Z. (2019). Click-conjugated photon-upconversion nanoparticles in an immunoassay for honeybee pathogen *Melissococcus plutonius*. *Nanoscale*, 11(17), 8343–8351. <https://doi.org/10.1039/C9NR01246J>
- Rahnamaeian, M., Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., Dobszlaff, K., Wiesner, J., Twyman, R. M., Zuchner, T., Sadd, B. M., Regoes, R. R., Schmid-Hempel, P., & Vilcinskis, A. (2015). Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1806), 20150293. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0293>
- Ramlau, J. (1987). Use of secondary antibodies for visualization of bound primary reagents in blotting procedures. *ELECTROPHORESIS*, 8(9), 398–402. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080906>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M. J., Albert, S., Tautz, J., & Beier, H. (2008). Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69(4), 155–167. <https://doi.org/10.1002/arch.20269>
- Rees, J. A., Moniatte, M., & Bulet, P. (1997). Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, apoidea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(5), 413–422. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00013-1)
- Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D., & Pevzner, P. A. (2008). Does Trypsin Cut Before Proline? *Journal of Proteome Research*, 7(1), 300–305. <https://doi.org/10.1021/pr0705035>
- Romanelli, A., Moggio, L., Montella, R. C., Campiglia, P., Iannaccone, M., Capuano, F., Pedone, C., & Capparelli, R. (2011). Peptides from Royal Jelly: Studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of Peptide Science*, 17(5), 348–352. <https://doi.org/10.1002/psc.1316>
- Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(3), 1451–1463. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09946-9>
- Shen, L.-R., Dilireba, S., Zhou, W.-X., Wang, Y.-R., Li, M.-L., & Zhai, L. (2014). Rapid Detection of Immunity Against Bacteria in Asian Honeybee and Western Honeybee with Quantification of Royalisin in the Hemolymph by Fast ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9305–9309. <https://doi.org/10.1021/jf501637g>
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *166*(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schmidt, J. O. (1995). Toxinology of venoms from the honeybee genus *Apis*. *Toxicon*, *33*(7), 917–927. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00011-A](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00011-A)
- Siegle, R. L., Jennings, B. R., Adams, P. L., & King, L. P. (1980). Development of a Model Using Polypeptide Antibodies for Scintigraphy of the Pancreas. *Investigative Radiology*, *15*(5), 457–461. <https://doi.org/10.1097/00004424-198009000-00151>.
- Sigmaaldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/> (31.1.2022)
- Skerra, A., & Plückthun, A. (1988). Assembly of a Functional Immunoglobulin Fv Fragment in *Escherichia coli*. *Science*, *240*(4855), 1038–1041. <https://doi.org/10.1126/science.3285470>
- Slaninová, J., Mlsová, V., Kroupová, H., Alán, L., Tůmová, T., Monincová, L., Borovičková, L., Fučík, V., & Čerovský, V. (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides*, *33*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.002>
- Šimúth, J., Bíliková, K., Kováčová, E., Kuzmová, Z., & Schroder, W. (2004). Immunochemical Approach to Detection of Adulteration in Honey: Physiologically Active Royal Jelly Protein Stimulating TNF- α Release Is a Regular Component of Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(8), 2154–2158. <https://doi.org/10.1021/jf034777y>
- Taguchi, S., Bulet, P. & Hoffman, J. A. (1998). A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. *Biochimie*, *80*(4), 343–346. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80078-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80078-3)
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, *51*(2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Tian, C., Gao, B., Fang, Q., Ye, G., & Zhu, S. (2010). Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: A genomic perspective. *BMC Genomics*, *11*, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-187>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Tsunasawa, S., Masaki, T., Hirose, M., Soejima, M., & Sakiyama, F. (1989). The primary structure and structural characteristics of *Achromobacter lyticus* protease I, a lysine-specific serine protease. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(7), 3832–3839. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84926-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84926-8)
- Van Weemen, B. K., & Schuur, A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen—Enzyme conjugates. *FEBS Letters*, *15*(3), 232–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80319-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80319-8)
- Viljakainen, L., & Pamilo, P. (2008). Selection on an Antimicrobial Peptide Defensin in Ants. *Journal of Molecular Evolution*, *67*(6), 643. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9173-6>
- Williams, M. J. (2007). Drosophila Hemopoiesis and Cellular Immunity. *The Journal of Immunology*, *178*(8), 4711–4716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4711>
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., & Starks, P. T. (2009). Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual*

- Review of Entomology*, 54(1), 405–423.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>
- Wu, G., Wang, S., Wang, X., Li, X., Deng, X., Shen, Z., & Xi, T. (2011). Determination of a new antibacterial peptide S-thanatin in rat plasma by an indirect-ELISA. *Peptides*, 32(7), 1484–1487. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.009>
- Wu, Q., Patočka, J., & Kuča, K. (2018). Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. *Toxins*, 10(11), 461. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
- Wu, Z., Huang, J., Lu, J., & Zhang, X. (2018). Reversible Lysine Derivatization Enabling Improved Arg-C Digestion, a Highly Specific Arg-C Digestion Using Trypsin. *Analytical Chemistry*, 90(3), 1554–1559. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04410>
- Xu, P., Shi, M., & Chen, X. (2009). Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. *PLOS ONE*, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004239>
- YAMAGUCHI, K., HE, S., LI, Z., MURATA, K., HITOMI, N., MOZUMI, M., ARIGA, R., & ENOMOTO, T. (2013). Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Fresh Royal Jelly by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(6), 1310–1312. <https://doi.org/10.1271/bbb.130013>
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., & Yu, X. Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5807–5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Yorde, D. E., Sasse, E. A., Wang, T. Y., Hussa, R. O., & Garancis, J. C. (1976). Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clinical Chemistry*, 22(8), 1372–1377. <https://doi.org/10.1093/clinchem/22.8.1372>
- Young, N. M., MacKenzie, C. R., Narang, S. A., Oomen, R. P., & Baenziger, J. E. (1995). Thermal stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. *FEBS Letters*, 377(2), 135–139. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01325-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01325-3)

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AP	alkalická fosfatasa
APS	peroxodisíran amonnýtem
AmP	antimikrobiální peptid
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin
DMSO	dimethylsulfoxid
HRP	avidin-peroxidasa (křenová peroxidasa)
LPS	lipopolysacharidy
MALDI-TOF	desorpční ionizace za účasti matrice
NBT	nitrotetrazoliová modř
PVDF	polyvinilidendifluorid
TBS	TRIS-pufrovaný solný roztok
TEMED	tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin