

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Kontrolovaná adsorpce antimikrobiálního enzymu
na povrch plazmového polymeru**

Bakalářská práce

Kateřina Janošťáková

Školitelka práce: RNDr. Petra Havlíčková

Konzultant: MSc. Sanjay Kumar

Konzultant: prof. RNDr. Vítězslav Straňák, Ph.D.

České Budějovice 2024

Janošřáková, K., 2024: Kontrolovaná adsorpce antimikrobiálního enzymu na povrch plazmového polymeru. [Controlled adsorption of an antimicrobial enzyme on the surface of a plasma polymer. Bc. Thesis, in Czech.] – 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na přípravu antimikrobiálního funkčního povrchu pomocí imobilizace modelového enzymu lysozymu, který vykazuje antimikrobiální aktivitu. Byla ověřena čistota použitého lysozymu pomocí biochemické metody SDS-PAGE elektroforézy. Byla testována imobilizace lysozymu na různých typech povrchů, jejichž podkladem byla hliníková fólie, popřípadě hliníková fólie potažená tenkou vrstvou nylonu 6.6. Po detekci přítomnosti lysozymu na těchto materiálech byl studovaný povrch promýván především v deionizované vodě, popřípadě v 1× PBS. Byla pozorována schopnost imobilizovat lysozym v závislosti na době adsorpce lysozymu na povrchu a na délce promývání studovaného povrchu. Detekce lysozymu na povrchu byla prováděna pomocí ATR-FTIR spektroskopie.

Annotation

The bachelor thesis is focused on the preparation of an antimicrobial functional surface by immobilization of a model enzyme lysozyme, which exhibits antimicrobial activity. The purity of the lysozyme was verified by the biochemical method of SDS-PAGE electrophoresis. The immobilization of lysozyme on different types of surfaces was tested on aluminium foil or aluminium foil coated with a thin layer of nylon 6.6. After detecting the presence of lysozyme on these materials, the studied surface was washed mainly in deionized water or 1× PBS. The ability to immobilize lysozyme was observed as a function of the adsorption time of lysozyme on the surface and the length of washing of the studied surface. Detection of lysozyme on the surface was performed by ATR-FTIR spectroscopy.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2024

.....
Kateřina Janošťáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Petře Havlíčkové za ochotu a trpělivost při vedení experimentální části této bakalářské práce. Mé poděkování také patří MSc. Sanjayovi Kumarovi za asistenci a pomoc při měření získaných dat v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Vítězslavu Straňákovi, Ph.D. a také prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné poradenství při provádění experimentální části bakalářské práce. Neméně upřímné poděkování bych ráda poslala celé mé rodině a přáteli, za podporu během celého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce.....	1
3 Literární přehled	1
3.1 Lysozym.....	1
3.1.1 Zdroje a typy lysozymu	2
3.1.2 Účinek lysozymu	4
3.1.3 Použití lysozymu.....	6
3.2 SDS-PAGE elektroforéza	7
3.3 Funkční antimikrobiální povrchy	7
3.4 ATR-FTIR spektroskopie	11
4 Materiály a metody.....	16
4.1 Příprava roztoků lysozymu.....	16
4.2 SDS-PAGE lysozymu.....	19
4.2.1 Příprava gelů pro elektroforézu SDS-PAGE.....	19
4.2.2 Provedení SDS-PAGE elektroforézy	21
4.3 Pomůcky a chemikálie pro přípravu a promývání funkčních povrchů.....	21
4.4 Příprava povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.....	22
4.5 Příprava povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6	22
4.6 Příprava promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6.....	23
4.6.1 Promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6.....	24
4.7 Příprava povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty	24
4.7.1 Promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty	25
4.8 Měření vzorků na FTIR spektroskopu.....	26
5 Výsledky.....	27
5.1 SDS-PAGE elektroforéza lysozymu.....	27
5.2 Povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii	28
5.3 Povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6	29

5.4 Povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 přípraveným za zvýšené teploty	31
6 Diskuze	37
7 Závěr.....	39
8 Seznam použité literatury	40
9 Seznam zkratek a symbolů	47
10 Seznam příloh.....	48
10.1 Seznam tabulek.....	48
10.2 Seznam obrázků.....	48

1 Úvod

V současnosti je ve vědecké sféře zkoumáno téma rezistence bakterií vůči, dnes již běžně používaným, antibiotikům. Takovým příkladem může být rezistence bakterie *Staphylococcus aureus*, která je již odolná proti většině z běžných antibiotik, jako je např. vankomycin [1]. Z tohoto důvodu se velké množství studií zaměřuje na nahrazení dnešních antibiotik jinými látkami o nejlépe stejné efektivitě a účinku proti bakteriím. Jistou nadějí mohou být antimikrobiální enzymy, u kterých se hledá nové využití ve zdravotnictví. Pro prevenci vůči infekcím je zatím prováděna rozsáhlá dezinfekce povrchů, dezinfekce rukou nebo používání preventivních ochranných prostředků. Proto by koncept antibakteriálních a antimikrobiálních funkčních povrchů částečně napomohl k prevenci přenášení infekcí z povrchů, kde se daný mikrob může udržet po dlouhou dobu, např. bylo zjištěno, že SARS-CoV-2, který v roce 2020 způsobil globální pandemii, setrvává např. na kovech, respiračních maskách nebo na tkaninách až po dobu jednoho týdne [2]. Vzhledem k tomu byl zvážen koncept vytvoření povrchu, jenž by sám ze své podstaty byl odolný vůči bakteriím, virům a jiným mikrobům. Pro účely této bakalářské práce byl pro přípravu funkčního povrchu zvolen jako modelový enzym lysozym, a to díky jeho antibakteriálním vlastnostem.

2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

1. Ověření čistoty lysozymu pomocí SDS-PAGE elektroforézy.
2. Příprava funkčních povrchů s lysozymem.
3. Testování připravených povrchů za použití FTIR spektroskopie.

3 Literární přehled

V této části je uveden teoretický přehled k tématu bakalářské práce.

3.1 Lysozym

Lysozym (EC 3.2.1.17) je hydrolytický enzym vyskytující se především u živočichů. Jde o enzym s antimikrobiálními či antibakteriálními vlastnostmi [3], [4], [5]. Byl objeven Alexandrem Flemingem ve 20. letech 20. století, když jeho hlen z nachlazení zlikvidoval kultivační prostředí s bakteriemi [6], [7]. Jeho uplatnění, jako modelového proteinu, se zvýšilo během 60. let 20. století, kdy byla pomocí rentgenové krystalografie popsána jeho primární struktura [8], [9]. Lysozym je aktivní při vniknutí bakterií do organismu. Napadá buněčnou stěnu bakterií, která je na prvním místě tvořena peptidoglykanem, a hydrolýzou přerušuje

β -1,4-D-glykosidovou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglykosaminem. Z tohoto důvodu je také někdy nazýván muramidázou, 1,4- β -N-acetylmuramidázou nebo hydrolázou kyseliny N-acetylmuramové [3], [4], [5], [7].

3.1.1 Zdroje a typy lysozymu

Lysozym je velmi rozšířený protein, který se vyskytuje především v tělech živočichů. Ovšem výzkumy posledních let prokázaly, že se tento protein může v malém množství vyskytovat i v některých rostlinách, houbách, mikrobech nebo virech [4], [5], [10], [11]. Je přítomen nejen v lidských orgánech, tkáních a sekretech, jako jsou sliny, slzy a hlen, ale obsahuje ho i mléko nebo vaječné bílky [4], [5], [7], [10], [12]. Nejčastěji se lysozym získává právě ze slepičích vaječných bílků [10]. Jedním z důvodů je snadná dostupnost vajec v potřebném množství, a druhým důvodem je, že lysozym tvoří přibližně 3,5 % celkových bílkovin obsažených ve slepičím vejci. Díky jeho vysokému obsahu jsme schopni ho z vaječného bílku snadno purifikovat v relativně vysoké čistotě [4], [12].

V rámci výzkumů bylo zjištěno, že existují druhy lysozymu, které se od sebe navzájem liší především aminokyselinovými sekvencemi a svou enzymovou činností. Ovšem antimikrobiální vlastnosti, jež jsou důsledkem štěpení β -1,4-D-glykosidické vazby peptidoglykanu, mají všechny typy lysozymu společné [13]. Prvním typem enzymu muramidázy je lysozym typu c, jemuž se také říká typ kuřecí či konvenční [11], [12], [13]. Jde o lysozym, který je zřejmě jeden z nejrozšířenějších. Určité množství tohoto lysozymu se nachází v tělech všech obratlovců, a dokonce i některých bezobratlých živočichů [13]. Kromě člověka, dalších savců nebo třeba ptáků se může nacházet i v tělech hmyzu jako je např. *Schistocerca gregaria* neboli kobylka pouštní. V jejím případě, stejně jako v případě člověka, zastává lysozym funkci přirozené imunity a zastavuje růst bakterií v jejím těle [14]. Obecná chemická struktura lysozymu typu c se skládá z přibližně 129 aminokyselinových zbytků [7], [9], [11], [12], [13]. Počet aminokyselinových zbytků se může lišit v závislosti na původu lysozymu, např. jestli pochází z lidského, kuřecího nebo jiného organismu [9]. Důležité pro stabilitu jeho struktury jsou čtyři disulfidické můstky [7], [9], [11], [12], [15]. Molekulová hmotnost struktury se pohybuje okolo 14 kDa [9], [11].

Patří sem nejčastěji lidský lysozym, který bývá značený zkratkou hLys, nebo kuřecí či slepičí lysozym, jenž se získává z vaječných bílků. Ten je pak označován zkratkou HEWL. Z hlediska antimikrobiální aktivity, bylo zjištěno, že lidský lysozym vykazuje vyšší aktivitu než lysozym kuřecí. Struktura HEWL má 129 aminokyselinových zbytků a lidský lysozym

obsahuje 130 aminokyselinových zbytků. Molekulová hmotnost HEWL a hLys činí přibližně 14,3 kDa [4], [9], [12], [13].

Další kategorií tohoto enzymu je typ g, neboli tzv. husí typ. Tato skupina byla pojmenována podle živočicha, ve kterém byla poprvé prokázána jeho existence, a to ve vaječných bílcích husy Embdenské v roce 1967 [10], [16]. Podle místa objevu se někdy tento lysozym značí zkratkou GEWL. Jeho výskyt byl nejprve studován především u ptactva, ale později byl nalezen v malém množství i u některých ryb a bezobratlých organismů [12], [13], [17].

Poslední zmíněnou skupinou jsou lysozomy typu i. Tento typ se také nazývá typ bezobratlých. Jeho přítomnost byla předpovězena již při objevení ostatních typů lysozymů, ovšem jeho primární aminokyselinový řetězec byl stanoven až v roce 1999. Jeho řetězec byl zjištěn v jednom z druhů mořských mlžů, a to u *Tapes japonica* [10], [11], [13], [18].

Z hlediska výskytu jednotlivých typů lze říci, že c-typ a g-typ jsou dominantně zastoupeny v říši obratlovců, zatímco i-typ se nachází pouze v tělech bezobratlých organismů [12], [13]. U každého druhu obratlovců je dominantně zastoupen jeden z těchto typů, tedy c-typ nebo g-typ. Ovšem i přes to, je druhý typ zastoupen ve stopovém množství [13], [17]. Výskyt by bylo možno odvodit i ze znalosti hodnot izoelektrického bodu. Jeho hodnoty se obecně u lysozymu pohybují v rozmezí 9,5 – 11 [9], [12]. Lysozomy typu c a typu g mají vysoké hodnoty pI, zatímco lysozym typu i má naprosto rozdílné hodnoty pI. To je pravděpodobně zapříčiněno trochu jinými významy lysozymu v tělech bezobratlých organismů jako je například účast na trávicím procesu [11], [13]. Kromě antibakteriální funkce a funkce trávicího enzymu pomáhají lysozomy při rozmnožování nebo jako podpora buněčného růstu a stability buněčných membrán [19]. Zároveň podporuje schopnost fagocytózy u leukocytů a makrofágů [20]. Z porovnání molárních velikostí jednotlivých typů je vidět, že lysozomy c-typu a i-typu jsou mnohem lehčími proteiny, než jsou lysozomy g-typu. Konkrétní porovnání z hlediska molekulární hmotnosti jsou uvedena v Tab. I [11], [13].

Tab. I: Typy lysozymů podle přibližné hmotnosti [12].

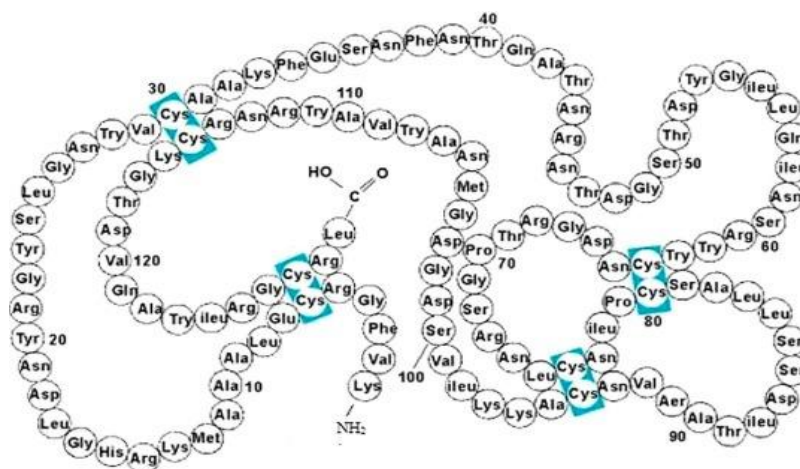
Typ lysozymu	Přibližný počet aminokyselinových zbytků	Molekulární hmotnost [kDa]
c-typ	129	11 - 15
g-typ	185	20 - 22
i-typ	123	11 - 15

3.1.2 Účinek lysozymu

Lysozym vykazuje přirozenou antimikrobiální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím. Obecně se katalytická aktivita muramidázy popisuje jako štěpení neboli lýza β -1,4-D-glykosidové vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem v silné vrstvě peptidoglykanu u grampozitivních bakterií [11], [16], [18], [21]. V posledních letech bylo prokázáno, že lysozym dokáže napadat i některé druhy gramnegativních bakterií jako je například *E. coli* [10], [12], [16], [18]. Peptidoglykanová membrána gramnegativních bakterií má, na rozdíl od grampozitivních bakterií, velmi tenkou a křehkou strukturu. Ta je navíc pokryta silnou vnější membránou, která je tvořena převážně fosfolipidy, ale obsahuje i složky lipoproteinů či lipopolysacharidů [10], [12], [18]. I přes silnou vnější membránu gramnegativních bakterií bylo zjištěno, že lysozym je schopen vykazovat antibakteriální aktivitu, která je neenzymatického charakteru. Takový způsob napadení se nazývá nekatalytická aktivita lysozymu [10], [12], [16], [18].

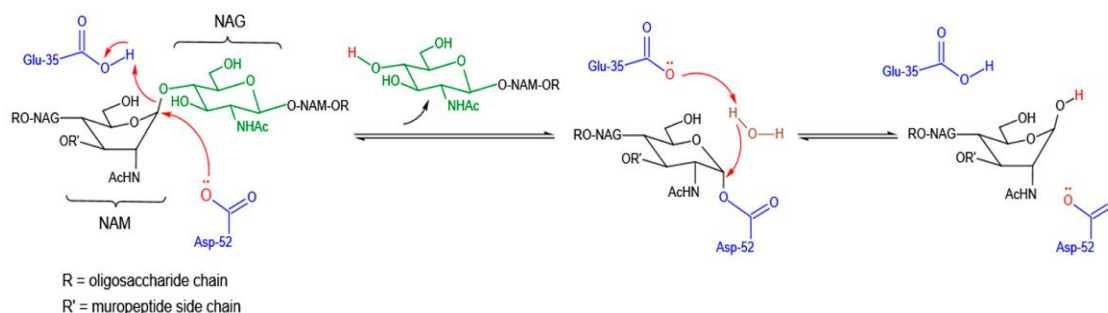
Bakteriální buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena mureinovými neboli peptidoglykanovými (PG) vrstvami, ve kterých se střídají molekuly N-acetylmuramové kyseliny (NAM) a N-acetylglukosaminu (NAG). Lysozym napadá jejich β -1,4-D-glykosidové vazby (C-O) mezi C-1 NAM a C-4 NAG částí své polypeptidové struktury (viz. Obr. 1), která je nazývána jako tzv. aktivní místo enzymu [10], [11], [18]. Tato část enzymu je tvořena kyselinou asparagovou (Asp52) a kyselinou glutamovou (Glu35) [11], [12]. Lysozym ztrácí svou hydrolázovou aktivitu,

pokud po napadení bakterie v jeho struktuře nezbydou alespoň dva disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky (Cys) [11], [22].



Obr. 1: Schéma struktury lysozymu [11].

Přiblížením lysozymu k peptidoglykanu dojde k iniciaci reakce enzym-substrát kyselinou glutamovou, která v tomto případě vystupuje jako donor protonů. Proton napadne kyslík glykosidické vazby a dojde ke vzniku karbeniového iontu. Ten posléze reaguje s nukleofilním zbytkem kyseliny asparagové a vzniká meziproduct enzymatické reakce. Následně je meziproduct rozložen hydroxylovým iontem a z reakce odchází hydrolyzovaný substrát peptidoglykanu. Enzymatickou reakcí poškozená bakteriální stěna se rozpadá, dochází k lýze a následné buněčné smrti bakterie. Mechanismus enzymatické hydrolyzy lysozymu je znázorněn na Obr. 2 [10], [11], [12], [18].

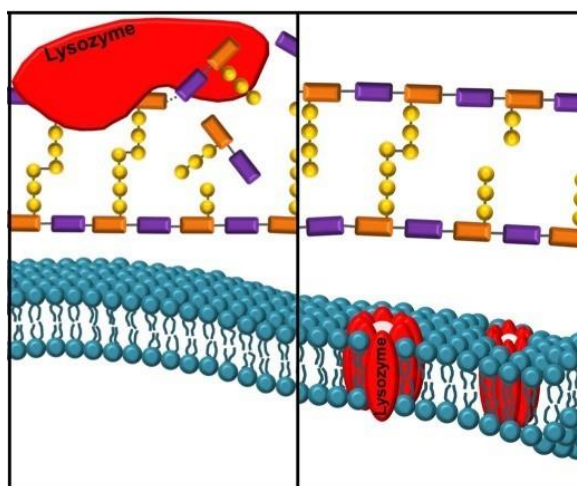


Obr. 2: Hydrolytický mechanismus působení lysozymu na $\beta(1-4)$ vazby mezi NAM a NAG zbytky páteře bakteriální buněčné stěny [10].

Lysozym je schopen působit antibakteriálně, i když nehydrolyzuje peptidoglykanovou bakteriální stěnu. Tento efekt je způsoben strukturálními vlastnostmi lysozymu jako je jeho kationtový, lipofilní a hydrofobní charakter [10], [11], [15], [16]. Zároveň k tomu přispívá flexibilita jeho struktury [21]. Díky těmto vlastnostem je schopen zvýšit

svou antimikrobiální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím, ale také vůči gramnegativním bakteriím bez enzymatické hydrolyzy peptidoglykanu [10], [11], [16]. Neenzymatické napadení je prozatím jediným vysvětlením antibakteriální aktivity lysozymu vůči gramnegativním bakteriím. Ten při napadení utváří póry ve dvojvrstvě fosfolipidů pomocí elektrostatických vazeb [18]. Tím dojde k narušení bakteriální plazmatické membrány a následné smrti bakterie. V mnoha studiích bylo dokázáno, že hydrofobnost enzymu muramidázy může být navýšena chemickými nebo tepelnými úpravami, jako je např. tepelná denaturace nebo suchý ohřev práškového lysozymu. Při zvýšení hydrofobnosti je pozorováno zvýšení antimikrobiální aktivity lysozymu [10], [11], [12], [21].

Katalytické i nekatalytické napadení bakterií lysozymem je znázorněno na Obr. 3.



Obr. 3: Lysozym porušuje buněčnou stěnu bakterií 2 mechanismy. Výše (fialová, oranžová barva) se nachází peptidoglykanová vrstva. Níže je pak zobrazena dvojvrstva fosfolipidů (modrá barva). Vlevo: Peptidoglykanová vrstva je napadena lysozymem a dochází tak k jejímu hydrolytickému rozkladu. Vpravo: ve struktuře fosfolipidové dvojvrstvy lysozym vytvořil póry, které způsobí její následný rozpad [18].

3.1.3 Použití lysozymu

Lysozym je jeden z nejzásadnějších enzymů, které byly kdy prozkoumány. Je široce používán v biochemických studiích, v molekulární biologii nebo v proteinové krystalografii [11], [13]. V těchto studiích lysozym funguje především jako modelový protein k výzkumu krystalogeneze, funkcí a reakcí enzymů a jiných proteinů [10]. Pro své antibakteriální a antimykotické vlastnosti je široce používán ve farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu [5], [10], [11]. Právě ve farmacii a v lékařství může být použit jako preventivní látka proti různým onemocněním [4]. Byl zjištěn jeho účinek proti růstu

rakovinotvorných buněk způsobující především rakovinu žaludku nebo rakovinu prsu [4], [23]. V posledních letech je zkoumán i jeho účinek proti HIV [23]. Jeho zvýšená přítomnost v krevní plazmě nebo v moči může indikovat např. monocytární leukémii [9]. V potravinářství je díky jeho vlastnostem využit především jako přírodní konzervant potravin jako je maso nebo sýry [11], [22]. Dříve býval využíván jako přísada do krmiv pro hospodářská zvířata [5].

3.2 SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která se využívá pro rozdělení makromolekul v elektrickém poli. V tomto typu elektroforézy je použit jako nosič makromolekul polyakrylamid, skrze jehož síť putují proteiny od záporně nabitě katody ke kladně nabitě anodě. To je zajištěno denaturací proteinu pomocí sodium dodecylsulfátu (SDS) a β -merkapt ethanolu, který se nachází ve vzorkovacím puftru, přidaném ke vzorku proteinu. SDS je aniontový detergent, který se váže na části proteinu a způsobuje tak rozklad jeho struktury a zajištění stejného rozprostření záporného náboje v komplexu protein-SDS. K rozložení struktury proteinu přispívá i β -merkapt ethanol, díky němuž dochází k rozkladu disulfidických můstků v makromolekule. Po připojení elektroforézy ke zdroji napětí, se molekula proteinu se záporným nábojem přesouvá směrem ke kladně nabitě anodě (směrem dolů) přes síť polyakrylamidu. Během separace dochází k rozdělení proteinů pouze na základě jejich molekulové hmotnosti, protože byl zajištěn jednotný náboj molekuly. SDS-PAGE gelová elektroforéza je používána k identifikaci molekul proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Proteiny s nižší molekulovou hmotností se v gelu přesouvají rychleji než molekuly s větší hmotností [24], [25], [26], [27].

3.3 Funkční antimikrobiální povrchy

Jedním z intenzivně diskutovaných témat dnešní doby je problém zvyšující se rezistence bakterií vůči běžně používaným antibiotickým přípravkům. Proto jsou hledány jiné formy antibiotického působení proti bakteriím. Takovéto působení by bylo oceněno zvláště v nemocnicích a jiných zdravotnických zařízeních, kde je velká kumulace nemocných lidí roznášejících různé mikroby a bakterie. Jejich infekce mohou být způsobeny přilnavostí bakterií k rozhraním kapalina-pevná látka nebo plyn-pevná látka. Jejich setrváváním na těchto rozhraních mohou být přeneseny do těla člověka např. díky zavedení implantátu, katétru nebo při používání dentálních nástrojů. Jednoduchý přenos bakterií přes adhezi na rozhraní kapalina-pevná látka může být dotýkání se kohoutku v umývárkách, na toaletách nebo ve sprchových koutech. Jinak jejich přenos přes adhezi na rozhraní plyn-pevná látka

může být dotýkání se kliky u dveří, telefonu, klávesnice, u počítače a další běžné úkony. Obranou proti těmto formám infekce je výroba antimikrobiálních povrchů nebo nátěrů, které díky svým základním vlastnostem budou bakterie odpuzovat nebo přímo zabíjet. Ovšem příprava funkčního povrchu je velmi náročná. Je potřeba, aby povrch neztratil antibakteriální vlastnosti a zároveň, aby např. při vložení ve formě implantátu do těla destruktivně interagoval směrem k bakteriím, ale nenapadal jiné buňky v těle [2], [28], [29].

Existuje velké množství metodologií přípravy antibakteriálních a antimikrobiálních povrchů. Jedním z významných zástupců jsou povrchy antiadhezivní. Účel takových povrchů je zabránit přímo přilnutí bakterií k povrchu. Nemají schopnost ničit bakterie. Jedním z jejich hlavních charakteristik je nadměrná hydrofobnost nebo naopak hydrofilnost, která zabraňuje adsorpci bakterií. Negativní adsorpce byla prokázána u siloxanových a fluorosiloxanových hydrofobních povrchů. Dalším antiadhezivním povrchem se ukázaly být nanostrukturované povrchy. Byl vytvořen ultrahydrofilní povrch pomocí polystyrenových nanovláken podrobené úpravě kyslíkovou plazmou. Tento povrch vykazoval zeta-potenciál -40 mV. I díky tomu vykazoval tento povrch sníženou vazbu bakterií *E. coli*, která byla použita jako model pro posuzování přilnavosti bakterií k povrchu [28], [30].

Dalším nadějným mechanismem pro výrobu antimikrobiálního povrchu je jeho pokrývání uhlíkovými strukturami různých typů, jako je grafen nebo tzv. CNT (uhlíkové nanotrubičky). Tyto povlaky vykazovaly aktivitu vůči adsorbovaným bakteriím různými způsoby jako je např. oxidativní stres, inaktivace proteinů, narušení bakteriální membrány nebo inhibice transkripce. Tyto mechanismy může ovlivňovat i faktor jako je koncentrace uhlíkové vrstvy [28].

Dalším významným typem povrchu jsou kontaktně aktivní povrchy. Problémem při přípravě takových povrchů je inaktivace antimikrobiálního účinku při imobilizaci biocidu na povrch. Proto byly použity tzv. polymerové kartáče. Jsou to polymerní vlákna kovalentně vázaná na anorganickém povrchu a jejich funkcí je imobilizace biocidů. Při takovéto metodologii byl zachován antimikrobiální účinek biocidu. Mechanismus napadení je v tomto případě závislý na délce polymerní struktury a na hustotě náboje na připravovaném povrchu. Většinou kladně nabitá antibakteriální molekula připevněná na kartáč se natáhne k bakterii, které prolomí bakteriální stěnu tvořenou především záporně nabitými fosfolipidy. Provedené experimenty ukazují, že zřejmě hustota náboje na povrchu je významnějším faktorem primárně určujícím výslednou antibakteriální aktivitu povrchu. Proběhla imobilizace QAC (kvartérní amoniové sloučeniny) na povrch pomocí poly-2-(dimethylamino)ethylmethakrylátových řetězců. Imobilizace byla provedena

radikálovou polymerací na povrchu. Hustota náboje povrchu byla stanovena na více než 5×10^{15} aminových jednotek/cm². Ukázalo se, že antimikrobiální aktivita zůstala zachována navzdory tomu, že řetězec použitého polymeru je, oproti jiným polymerům dosti kratší, na to, aby došlo k přepokládanému napadení bakterie [28], [31].

Jako další skupinou látek, které se snadno ukotvují pomocí polymerních kartáčů jsou AMP (antimikrobiální peptidy). Ty jsou vhodné zejména kvůli svému širokospektrálnímu antibakteriálnímu působení. To znamená, že dokážou negativně působit i na bakterie, které už jsou vůči běžným antibiotikům rezistentní. Jako anorganický povrch, na kterém byla iniciována radikálová polymerace s přenosem atomů, byl použit křemíkový podklad potažený titanem nebo i samotný křemíkový substrát. Je důležité, aby tento anorganický povrch nebyl potenciálně toxický pro buňky hostitele jako tomu bylo v případech přípravy povrchu pomocí sloučenin kovů jako je stříbro. Byl tedy vytvořen povrch s N-substituovanými polyakrylamidovými kartáči, na které byly navázány různé AMP. Jejich celková koncentrace na povrchu sahala až k hodnotě 5,9 µg/cm². Experiment na potkanech dokázal funkčnost připravených povrchů v porovnání s účinkem roztoku určitého AMP. Výsledek tohoto experimentu byl pozitivní i z toho důvodu, že povrch nenarušoval žádné buňky v těle. Závěrem je tedy připravenost testování těchto povrchů k výrobě tělních implantátů [28], [29].

Kromě zdravotnictví jsou antimikrobiální povrchy přínosné i např. pro textilní průmysl. Látky, které nejsou uměle syntetizovány, ale jsou vyráběny z přírodních zdrojů, jako je např. hedvábí, jsou velmi snadno napadnutelné bakteriemi nebo mikroby. Proto byl minulý rok vyzkoušen koncept výroby antibakteriálního a antimikrobiálního povrchu přímo na hedvábných textiliích. Byly zvažovány dva přístupy. První z nich byl chemické roubování. Při této úpravě hedvábí se biocid spojuje s vlákny fibrionů v hedvábí, které obsahují serin, tyrosin nebo lysin, a tvoří tak povrch odolný vůči mikrobům. Takové látky jsou např. fenolické sloučeniny nebo tyrozináza. Tento způsob antimikrobiální modifikace hedvábí byl zavržen kvůli narušení jeho mikrostruktury. Druhým, mnohem nadějnějším, přístupem je povrchová úprava hedvábí pomocí nanočástic. Jako ekonomicky přijatelný materiál pro povrchové lakování nanostruktur byl zvolen ZnO (oxid zinečnatý). Ten byl již v některých studiích používán jako antimikrobiální látka v závislosti na povrchu, který se jím potahoval. Např. pro použití hedvábí ve zdravotnictví např. jako stehů, byly tenké hedvábné nitě ponořeny do porézní suspenze ZnO. V tomto případě byla použita technika ALD (Atomic Layer Deposition)

pro cílenou povrchovou aplikaci ZnO na vlákna hedvábí, které byly vystaveny ZnO v 800 opakováních [32].

Další z možných využití antimikrobiálních povrchů je v potravinářském průmyslu, kde je dnes kladen velký důraz na nahrazování neekologických obalů takovými, které jsou pro zdraví nezávadné, zároveň dobře rozložitelné a popřípadě skutečně jedlé. Výhodou takových povrchů je samozřejmě i antimikrobiální a antibakteriální aktivita pro ochranu a trvanlivost balených potravin, které snadno podléhají zkáze. Jedlé obaly jsou vlastně primární vrstvy, kterými jsou obaleny potraviny jako je zelenina nebo ovoce. Takové obaly by měly zamezovat pohybu vzduchu a vlhkosti v potravine, tzn že by měly dobře konzervovat potravinu. Již před mnoha staletími se pro konzervaci a ochranu potravin používaly především látky na bázi biologických makromolekul, jako jsou lipidy, proteiny nebo polysacharidy. Používaly se např. vosky na potažení ovoce a zeleniny pro konzervaci nebo do zavařených potravin jako jsou rajčata nebo houby se přidávaly lipidy ve formě oleje nebo sádla. Jako příklad konzervace anorganickými sloučeninami bylo např. maso uchováváno v soli. V současné době se využívá přidávání antimikrobiálních látek, jako je chitosin, přímo do potravin. V takovém případě není možné vyloučit ztráty antimikrobiálních vlastností látky při její reakci s látkami obsaženými přímo v potravine. Proto se jedlé obaly uvádějí jako výhodnější možnost ochrany proti mikrobům. Testují se různé biomakromolekuly v souvislosti výroby jedlých povrchů jako např. pektin, škrob, celulóza, již dříve zmíněný chitosin, kolagen ve spojení s dalšími proteiny jako je keratin. Antimikrobiální vlastnost obalu může být podpořena přidáním některých silic jako je kmínová silice, skořicová silice, hřebíčková silice nebo majoránková silice. V dnešní době jsou proteiny na výrobu takových obalů shledávány jako nejlepší řešení náhrady plastových obalů. Nejpoužívanějšími proteiny pro tyto studie jsou kasein, želatina, zein nebo sójový protein. Jejich výhodami jsou schopnosti stavby tkání nebo enzymatické aktivity, jako může být např. antimikrobiální aktivita [33], [34].

V případě lysozymu byl např. připravován jeho povrch na polyvinylalkoholu, který by potenciálně mohl sloužit jako obal potravin, který byl díky lysozymu prokazatelně aktivní vůči *Micrococcus lysodeikticus*, který je vůči němu vysoce citlivý. Film lysozymu byl v tomto případě s polyvinylalkoholem připraven litím. Jejich promýváním v dH₂O byl pozorován únik lysozymu do vody a jeho množství bylo detekováno pomocí HPLC. Takto bylo prokázáno, že vytvořený film je, tím účinnější vůči *Micrococcus lysodeikticus*, čím větší množství lysozymu bylo pro přípravu filmu použito [35].

3.4 ATR-FTIR spektroskopie

Infračervená spektroskopie je technika založená na absorpci infračerveného záření funkčními skupinami, které jsou tvořeny kovalentními vazbami mezi atomy. Pro detekci malých i makroorganických molekul byla používána přibližně od začátku 20. století. Absorpci diskrétního záření přechází molekuly do vyšších vibračních a rotačních hladin. K nejvýznamnější absorpci IR záření molekulami dochází v tzv. střední infračervené oblasti. Touto oblastí je rozmezí vlnočtu přibližně od $4\,000 - 400\text{ cm}^{-1}$, popř. $4\,000\text{ cm}^{-1} - 1\,000\text{ cm}^{-1}$. Zdroje se v určování tohoto rozmezí střední IR oblasti často rozcházejí. To je zřejmě dáno rozdílnými účely a vzorky, které jsou pomocí této metody testovány [36], [37], [38].

Pro každou molekulu s nelineární strukturou a určitým počtem atomů (N -atomů) platí, že má celkově $3N-6$ vibračních módů [36]. Ve střední infračervené oblasti pozorujeme nejsilnější základní vibrace vazeb v testovaných molekulách, a to vibrace valenční a deformační. Valenční vibrace jsou charakteristické natahováním vazby v molekule a vibrace deformační neboli ohybové, se oproti tomu vyznačují změnou vazebného úhlu mezi atomy [36], [38], [39], [40]. Ovšem ne všechny takové vibrace je možno detekovat pomocí IR spektroskopie. To, zda bude vibrace určité funkční skupiny aktivní v daném spektru určuje změna dipólového momentu takové vibrace. Pokud je valenční vibrace vazby v molekule symetrická, tzn. že se vazby v molekule natahují směrem od sebe, pak tato skupina není IR spektroskopii detekovatelná, protože při takové vibraci se dipólový moment vibrace nemění. Ale pokud dochází v molekule k asymetrické valenční vibraci, tzn. že se jedna vazba zkracuje a druhá prodlužuje, a naopak, tak tato skupina je detekovatelná pomocí IR spektroskopie, jelikož v takovém případě se během vibrace dipólový moment mění [36], [38]. Z toho plyne, že pro každou základní asymetrickou vibraci je dána oblast absorpce IR záření, tzv. absorpční pás [36], [39], [40].

Každý infračervený absorpční pás je charakterizován určitým vlnočtem. Pro valenční vibrace je používána aproximace harmonického oscilátoru. V takovém vzoru je pro popis této vibrace použita představa, že atomy podílející se na vazbě, jsou dva hmotné body spojené pružinou. Frekvence kmitání vibrace je pak dána rovnicí 1 [36].

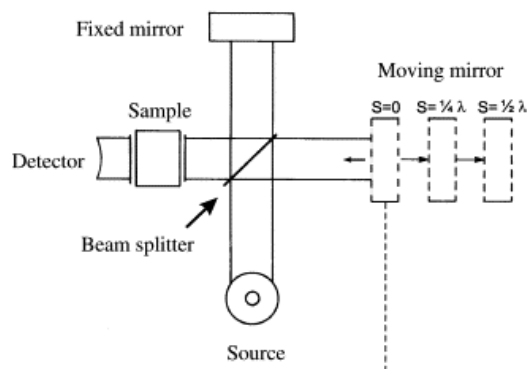
$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \times \sqrt{k \times \frac{m_1 + m_2}{m_1 m_2}} \quad (1)$$

Rovnice 1 popisuje vztah pro frekvenci vibrace, kde c je rychlost světla v $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Písmeno k je v modelu harmonického oscilátoru napětí pružiny, které zde aproximativně vystupuje jako pevnost vazby mezi atomy v $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$. Hmotnosti m_1 a m_2 jsou

hmotnosti hmotných bodů, které zde vystupují jako hmotnosti atomů nebo skupin atomů podílejících se na vazbě v gramech. Výsledná hodnota frekvence je v jednotkách cm^{-1} . Podle tohoto vztahu je tedy frekvence vibrace závislá na pevnosti chemické vazby. Pokud by byly vazby porovnány z hlediska násobnosti, tak trojné a dvojnásobné vazby se nacházejí v oblasti vyšších frekvencí než jednoduché vazby. Frekvence se také mění podle prostředí, ve kterém se molekuly nacházejí. Proto jí mohou ovlivnit nevazebné interakce mezi molekulami jako jsou např. vodíkové můstky. Ty snižují pevnost chemické vazby, a tím snižují i samotnou frekvenci. Poslední efekt zasahující do hodnoty frekvence je relativní hmotnost atomů podílejících se na chemické vazbě. Z těchto ovlivňujících faktorů vyplývá, že každá funkční skupina je popsána určitým absorpčním pásem. Každý pás je popsán oblastí frekvencí. Proto je možno podle specifického pásu dohledat určitou funkční skupinu v infračerveném spektru [36]. I z důvodu těchto faktorů je infračervené spektrum zcela jedinečné, v podstatě takový „otisk prstu“, pro každou látku [41], [42], [43].

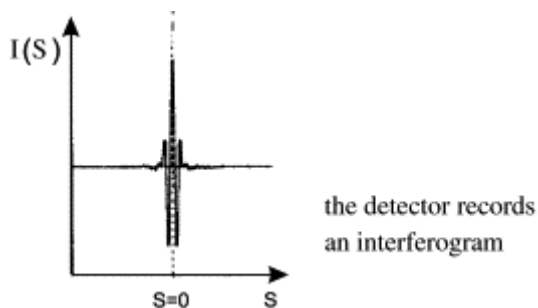
FTIR spektroskopie neboli infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací je odvětví infračervené spektroskopie, které se rozšířilo přibližně v polovině 20. století. Je to technologie, která nevyžaduje nijak složitou přípravu vzorku. FTIR spektroskopie zastřešuje mnoho rozdílných metod, které se liší zejména ve způsobu směřování IR záření ze zdroje na měřený vzorek, v podmínkách měření nebo např. v použití rozdílných detektorů, které jsou pro měření použity. Obecně lze říci, že FTIR spektroskopy se dělí na dva druhy, a to na jednopaprskový a dvoupaprskový. U jednopaprskového se setkáváme s eliminací signálů pozadí, které je třeba provést pro každé měření zvlášť, ale naopak u dvoupaprskového je pozadí trvale eliminováno od měřeného vzorku [37], [41], [44], [45].

Jednou ze základních technik je transmisní FTIR spektroskopie. Při tomto měření je vzorek vložen mezi pohyblivé a fixní zrcadlo, kde jím prochází IR záření přicházející ze zdroje, jak je zobrazeno na Obr. 4 [44], [46].



Obr. 4: Schématické znázornění základních součástí transmisního FTIR spektroskopu [46].

Měření začíná produkcí IR záření ze zdroje (Source), které putuje směrem k rozdělovači paprsku (Beam splitter). Záření se rozdělí do dvou směrů. Jeden jde směrem k fixnímu zrcadlu (Fixed mirror) a druhý jde směrem k pohyblivému zrcadlu (Moving mirror). Pohyb tohoto zrcadla je důvodem vzniku jevu interference IR záření s paprskem záření, které se odrazilo od fixního zrcadla. Tato interferující vlna jde od děliče paprsků směrem k měřenému vzorku (Sample). Interferující vlna projde vzorkem, který pohlcuje část záření charakterizovaného danými vlnovými délkami. Absorpce tohoto záření způsobuje excitaci molekul ve vzorku do vyšších vibračních a rotačních hladin. Zbylá část záření je vzorkem propuštěna na detektor. Detektor trvale zaznamenává zbylý rozsah vlnových délek záření, které bylo propuštěno a dojde k porovnání s původním rozsahem záření, které bylo zdrojem produkováno. Zaznamenáním detektoru vznikne tzv. interferogram (Obr. 5) [44], [46], [47].

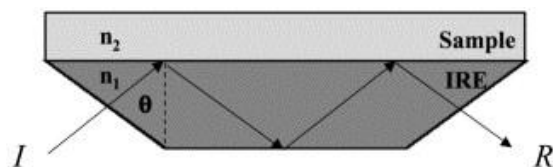


Obr. 5: Interferogram [46].

Na Obr. 5 je zobrazena závislost intenzity záření $I(S)$ na poloze pohyblivého zrcadla S , jenž se nazývá interferogram. Tento graf je počítačem převeden matematickou operací tzv. Fourierovou transformací na výsledné IR spektrum [45], [46].

Při měření vodných roztoků touto metodou je důležité podotknout, že voda je silným absorbérem IR záření. Z toho důvodu je třeba, aby vzdálenost fixního a pohyblivého zrcadla nepřesáhla 10 μm . Kdyby byla vzdálenost delší, pak by mohlo dojít k absorpci veškerého záření vodným vzorkem. Z toho plyne, že by nedošlo k zachycení signálu detektorem [44].

Další běžnou technikou je ATR-FTIR spektroskopie. Zkratka ATR znamená Attenuated Total Reflection, tedy tlumený totální odraz. Schéma ATR-FTIR spektroskopu je zobrazeno na Obr. 6 [44], [48], [49].



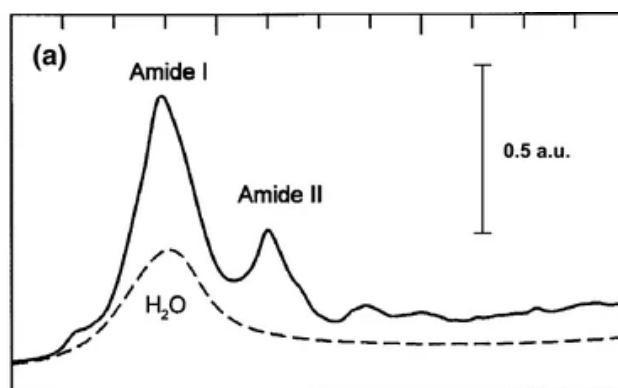
Obr. 6: Schéma ATR-FTIR spektroskopu [50].

Podstatnou částí ATR-FTIR je tzv. vnitřní reflexní prvek, zkratkou označovaný jako IRE nebo také jako ATR-krystal [38], [44], [50]. Jde o hranolovitý prvek s vysokým indexem lomu, jehož složení většinou bývá ZnSe, křemík, germanium nebo i diamant [43], [44], [50]. Pro změření kvalitního spektra by měl být vzorek dobře připevněn, aby se během měření vzorek správně dotýkal IRE prvku [49], [51]. Paprsek IR záření je ze zdroje namířen na IRE [43], [50]. Zde prochází prostředím s vyšším indexem lomu (n_1) a dopadá na vzorek pod úhlem θ , jehož velikost přesahuje hodnotu kritického úhlu. Proto dochází k efektu, který se nazývá úplný vnitřní odraz. Při tomto odrazu vzniká tzv. evanescentní (stojatá) vlna [43], [44], [50]. Ta prochází opticky hustším prostředím, kde se odráží na povrchu vzorku. Při těchto interakcích se vzorkem dochází k jejímu částečnému průniku do měřeného vzorku, který absorbuje určitou část záření, a tím dochází k oslabení této vlny [43], [44], [50]. IR záření o neabsorbovaných vlnových délkách odchází z IRE prvku směrem do detektoru [50]. Hloubka, do které vlna dokáže proniknout je přibližně 0,5 – 2 μm [44]. Tento fakt je považován za výhodu ATR-FTIR, a to z důvodu nenáročnosti na přípravu měřeného vzorku [49]. Je výhodná především pro studium roztoků proteinů nebo jiných látek, které jsou dostupné pouze v malém množství [38], [44]. Hloubka penetrace (d_p) IR záření do vzorku je dána rovnicí 2 [44], [50].

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \times \left((\sin \theta)^2 - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (2)$$

Z rovnice 2 plyne, že hloubka je závislá na vlnové délce IR záření (λ), na indexu lomu vzorku (n_2), na indexu lomu IRE (n_1) a na úhlu dopadu IR záření (θ) [44], [50].

Pro účely této bakalářské práce je podstatná ATR-FTIR spektroskopie proteinů. Je důležité, že pro analýzu vzorku proteinu nebo jiného biologického materiálu je ve většině případů k měření použit roztok dané látky. V IR spektru jsou pak patrné pouze vibrační módy chemických vazeb [46]. Jak již bylo řečeno, pro každou vazbu v molekule jsou charakteristické infračervené absorpční pásy, podle kterých je možno z IR spektra definovat přítomnost dané látky. Pro proteiny jsou charakteristické tzv. amidové pásy. Proteiny poskytují v IR spektru více takových pásů, ovšem nejcitlivějšími jsou pásy Amidu I a Amidu II [36], [40]. To znamená, že ve spektru poskytují nejintenzivnější píky. Příklad takového spektra je zobrazen na Obr. 7. Jde o závislost intenzity píku na vlnočtu [36].



Obr. 7: Spektra amidových pásů [36].

Pás Amidu I je charakteristický pro nejvyšší hodnotu absorpce IR záření. Hodnota vlnočtu tohoto pásu se nachází v rozmezí $1\ 600\ \text{cm}^{-1} - 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$. Nejčastěji se pohybuje kolem hodnot $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$. Tento pás je dán především valenčními (protahovacími) vibracemi $\text{C}=\text{O}$ vazeb. Je zároveň propojen s napínáním vazby $\text{C}-\text{N}$ a s ohnutím $\text{N}-\text{H}$ vazeb. Pás Amidu II je ve spektru umístěn v rozmezí vlnočtů $1\ 500\ \text{cm}^{-1} - 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$. Přesněji se většinou nachází kolem hodnoty $1\ 545\ \text{cm}^{-1}$. Tato spektrální oblast je dána valenčními (protahovacími) vibracemi vazeb $\text{C}-\text{N}$ a deformačními (ohybovými) vibracemi $\text{N}-\text{H}$ vazeb [36], [44], [46], [48]. Jako další je pás Amidu III. Tento pás se nachází v oblasti vlnočtu $1\ 200\ \text{cm}^{-1} - 1\ 300\ \text{cm}^{-1}$. Určují ho ohybové vibrace $\text{N}-\text{H}$ vazeb, valenční vibrace $\text{C}-\text{N}$ vazeb a další ohybové vibrace $\text{C}-\text{H}$ vazeb [44]. Některé zdroje uvádějí, že pás Amidu III je nepodstatný pro určování sekundární struktury proteinu, a pro takovouto analýzu jsou dostačující pásy Amidu I a Amidu II. Jiné zdroje uvádějí, že Amid III by mohl být zahrnut do analýzy struktury, protože je ovlivněn rozvětvením proteinu a projevují se na něm změny vedlejších řetězců [48]. Ovšem spektrální pásy Amidu I a Amidu II jsou pro identifikaci sekundární struktury proteinu stěžejní [44]. Identifikace pomocí pozice Amidu I ve spektru

může být ovlivněna např. vodíkovými můstky a dalšími ne vazebnými interakcemi v molekule [44], [46]. Důkazy sekundárních struktur jako je α -helix nebo skládaný β -list je možno odhalit na základě spektra [36], [46]. Zmíněné α -helixy se ve většině případů nacházejí ve spektrální oblasti $1\ 650\ \text{cm}^{-1} - 1\ 658\ \text{cm}^{-1}$. Skládané β -listy se nejčastěji nacházejí v oblasti vlnočtů $1\ 620\ \text{cm}^{-1} - 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ nebo v rozmezí $1\ 670\ \text{cm}^{-1} - 1\ 695\ \text{cm}^{-1}$ [40], [44].

4 Materiály a metody

V této části bakalářské práce jsou popsány použité chemikálie, pomůcky, přístroje a použité metody, kterými byly provedeny experimenty pro přípravu antibakteriálního povrchu s lysozymem.

4.1 Příprava roztoků lysozymu

K přípravě roztoků byl použit práškový lysozym z kuřecího vaječného bílku, dialyzovaný, lyofilizovaný, ve formě prášku od výrobce Sigma Aldrich (~10 000 U/mg, CAS: 12650-88-3, 62970). Dále byla použita dH_2O .

Poté byly použity mikropipety (5 ml, 1 ml, 100 μl , 20 μl), špičky na příslušné velikosti mikropipet, analytické váhy, mikrozkušavky (0,5 ml, 1,5 ml), zkušavka Falcon (15 ml), laboratorní lžička, vortex a kádinka o objemu 5 ml.

Práškový lysozym byl ve všech případech navažován na analytických vahách pomocí laboratorní lžičky, kádinky (5 ml) a mikrozkušavky o příslušném objemu. Po navážení byl do mikrozkušavky napipetován příslušný objem dH_2O mikropipetou odpovídajícího rozsahu objemu. Následně byl roztok promíchán pomocí vortexu. Používaný zásobní roztok lysozymu o koncentraci 1 mg/ml nebylo potřeba připravovat pro každý experiment zvlášť, pokud byl uchováván při stálé teplotě $4\ ^\circ\text{C}$ v lednici.

V případě ředění roztoku byl napipetován potřebný objem zásobního roztoku lysozymu (1 mg/ml) mikropipetou odpovídajícího rozsahu objemu. Následně byl vhodnou mikropipetou doplněn objem dH_2O do stejné mikrozkušavky. Roztok byl pokaždé promíchán pomocí vortexu. Všechny připravené roztoky lysozymu byly uchovávány v lednici, stejně jako samotný práškový lysozym.

Hodnoty hmotnosti práškového lysozymu a příslušná ředění roztoků lysozymu pro SDS-PAGE elektroforézu jsou uvedeny v Tab. II.

Tab. II: Příprava roztoků lysozymu pro SDS-PAGE elektroforézu.

Příprava zásobního roztoku (ZR) lysozymu			
Koncentrace [mg/ml]	Hmotnost [g]	Objem dH ₂ O [μl]	Celkový objem roztoku [μl]
1	0,0011	1 000	1 000
Ředění roztoků lysozymu			
Koncentrace [mg/ml]	Objem ZR [μl]	Objem dH ₂ O [μl]	Celkový objem roztoku [μl]
0,75	37,5	12,5	50
0,5	25	25	50
0,25	12,5	37,5	50
0,1	5	45	50

Pro přípravu vzorků na testování čistoty pomocí SDS-PAGE elektroforézy bylo do nových mikrozkušavek (0,5 ml) převedeno 5 μl roztoku o příslušné koncentraci, ke kterým byly přidány 2,5 μl 4× Laemmliho vzorkového pufru. Vzorky byly umístěny do předehřátého termobloku (95,5 °C) na přibližně 3,5 minuty.

Pro přípravu funkčního povrchu lysozymu na hliníkové fólii byl připraven roztok na základě hodnot uvedených v Tab. III.

Tab. III: Příprava roztoku lysozymu pro funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.

Koncentrace [mg/ml]	Hmotnost [g]	Objem dH ₂ O [μl]	Celkový objem roztoku [μl]
150	0,015	100	100

Příprava funkčního povrchu s lysozymem na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 byla provedena pomocí roztoků lysozymu, pro jejichž přípravu jsou uvedeny hodnoty v Tab. IV.

Tab. IV: Příprava roztoků lysozymu pro funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6.

Příprava zásobního roztoku (ZR) lysozymu			
Koncentrace [mg/ml]	Hmotnost [g]	Objem dH ₂ O [μl]	Celkový objem roztoku [μl]
1	0,01	10 000	10 000
Ředění roztoků lysozymu			
Koncentrace [mg/ml]	Objem ZR [μl]	Objem dH ₂ O [μl]	Celkový objem roztoku [μl]
0,5	25	25	50
0,1	5	45	50

Funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6 byl znovu připraven pro testování imobility lysozymu po promývání. Pro jeho přípravu byl použit zásobní roztok (1 mg/ml) připravený v předešlém případě (Tab. IV). Jeho způsob ředění je uveden v Tab. V.

Tab. V: Příprava roztoku lysozymu pro přípravu funkčního povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6 pro promývání.

Koncentrace [mg/ml]	Objem ZR [μl]	Objem dH ₂ O [μl]	Celkový objem roztoku [μl]
0,1	100	900	1 000

Pro další funkční povrch s lysozymem na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připravený za zvýšené teploty byl připraven roztok lysozymu ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml (Tab. IV). Hodnoty pro naředění použitého roztoku jsou uvedeny v Tab.VI.

Tab. VI: Příprava roztoku lysozymu pro funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty.

Koncentrace [mg/ml]	Objem ZR [μ l]	Objem dH ₂ O [μ l]	Celkový objem roztoku [μ l]
0,1	200	1 800	2 000

4.2 SDS-PAGE lysozymu

K provedení SDS-PAGE elektroforézy byl použit roztok lysozymu (1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,1 mg/ml), 4× Laemmliho pufr (pH 6.8), protein ladder (PageRuler Unstained Protein Ladder (#266 14), Thermo Fisher Scientific), ethanol, 2-propanol, 10× SDS-PAGE elektroforetický pufr, fixační roztok (50 % ethanol, 2 % kyselina fosforečná), barvicí roztok (Commassie modro-stříbrné barvení), deionizovaná voda (dH₂O), 30 % akrylamid, 1,5 M Tris pH 8.8, 1,5 M Tris pH 6.8, 10 % SDS (sodium dodecyl sulfát), 10 % APS (ammonium persulfát) a TEMED.

Dále byla použita elektroforetická aparatura, elektroforetická vana, zdroj, termoblok, 4 skla pro tvorbu gelu (spodní a krycí), plastová náhrada za gel mezi sklíčky, stojan na přípravu skel, guma, držák na přípravu skel, kádinky pro přípravu gelů o objemu 100 ml, kádinka o objemu 5 ml, analytické váhy, laboratorní lžička, skleněné pipety, elektrický pipetovací nástavec, automatické mikropipety o různých objemech, špičky pro mikropipety o různých velikostech, mikrozkuhavky Eppendorf o objemech 1,5 ml a 0,5 ml, vortex, odměrný válec o objemu 1 000 ml, plastová stěrka, skleněná krabička, horizontální třepačka, igelitový pytlík, fix a papírová lepicí páska.

4.2.1 Příprava gelů pro elektroforézu SDS-PAGE

Spodní i krycí sklíčka byly očištěny pomocí dH₂O a ethanolu. Pomocí držáku byly upevněny k sobě a vloženy do stojanu. Poté byl připraven 15 % separační gel podle Tab. VII.

Tab. VII: Příprava separačního gelu (15 %).

15% separační gel	
	Objem [ml]
30% akrylamid	10
H ₂ O	4,6
1,5M Tris (pH 8.8)	5
10% SDS	0,2
10% APS	0,2
TEMED	0,02

Pomocí mikropipety (1 000 μ l) byla připravená směs převedena do prostoru mezi spodní a krycí skličko. Prostor byl zaplněn tak, aby od horního okraje krycího sklíčka po hladinu separačního gelu zbyly přibližně 2 cm. Na vrstvu gelu bylo, tou samou mikropipetou, převedeno malé množství 2-propanolu. Bylo vyčkáno 25 minut do ztuhnutí gelu. Mezitím byl připraven 5 % zaostřovací gel podle Tab. VIII.

Tab. VIII: Příprava zaostřovacího gelu (5 %).

5% zaostřovací gel	
	Objem [ml]
30% akrylamid	1,3
H ₂ O	5,5
1M Tris (pH 6.8)	1
10% SDS	0,08
10% APS	0,08
TEMED	0,008

Z prostoru mezi sklíčky byl odebrán 2-propanol a gel byl promyt dH₂O. Následně byl do zbylého prostoru převeden mikropipetou (1 000 μ l) připravený zaostřovací gel. Do něho byl následně zasunut hřebínek o 10 jamkách. Poté bylo vyčkáno přibližně 20 minut do ztuhnutí zaostřovacího gelu. Poté byly 2 gely mezi sklíčky vyjmuty ze stojanu a držáku na sklíčka, byly zabaleny do ubrousku a namočeny do dH₂O. Takto byly zabaleny do igelitového pytlíku a popsány datumem a koncentrací gelu. Byly uchovány po dobu 1 dne v lednici při 4 °C.

4.2.2 Provedení SDS-PAGE elektroforézy

Byla připravena elektroforetická aparatura, do které byl zasazen 15 % gel mezi sklíčky a plastová náhrada tohoto gelu. Aparatura byla vsazena do elektroforetické vany. Následně byl připraven 1× SDS elektroforetický pufr naředěním 10× SDS elektroforetického pufru. Do odměrného válce bylo vpraveno 70 ml elektroforetického pufru (10× SDS), které byly naředěny 630 ml dH₂O. Tento pufr byl přelit do elektroforetické vany mezi vložený gel a plastovou náhradu, tak aby hladina pufru dosahovala výšky dostačující pro pouštění 2 gelů. Automatickou mikropipetou (1 000 µl) byly jamky gelu promyty elektroforetickým pufrem. Po vyjmutí z termobloku byly vzorky a proteinový ladder (Thermo Fisher Scientific (#266 14)) nanesen podle schématu na Obr. 8.

Proteinový ladder		0,1 mg/ml	0,25 mg/ml		0,5 mg/ml		0,75 mg/ml		1 mg/ml
-------------------	--	-----------	------------	--	-----------	--	------------	--	---------

Obr. 8: Schéma vzorků v SDS-PAGE elektroforéze.

Elektroforetická vana byla přikryta a zapojena do zdroje, který byl nastaven na 1,5 hodiny. Prvních 30 minut elektroforéza probíhala při napětí 100 V. Poté bylo napětí zvýšeno na 150 V, při kterých elektroforéza probíhala 1 hodinu. Po uběhnutí této doby, byly sklíčka s gelem vyjmuty z aparatury. Pomocí plastové stěrky byly skla od sebe oddělena a gel byl sesunut do skleněné krabičky, do které bylo pomocí skleněné pipety (25 ml) převedeno 20 ml fixačního roztoku. Krabička s gelem byla uzavřena a přemístěna na horizontální třepačku, kde se gel promýval 30 minut. Následně byl promyt v dH₂O dvakrát po 10 minutách. Nakonec byl promýván v barvicím roztoku po dobu jednoho víkendu. Poté byl barvicí roztok opět nahrazen dH₂O, ve které byl následně uchováván.

4.3 Pomůcky a chemikálie pro přípravu a promývání funkčních povrchů

Pro přípravu funkčních antimikrobiálních povrchů s lysozymem byly použity roztoky lysozymu o různých koncentracích (viz. kapitola 4.1), deionizovaná voda (dH₂O), ethanol a isopropanol. Pro promývání povrchů byla použita dH₂O a 1× PBS.

Dále byla použita hliníková fólie, hliníková fólie pokrytá vrstvou nylonu 6.6 (200 nm), hliníková fólie pokrytá vrstvou nylonu 6.6 (200 nm) připravená za zvýšené teploty, mikropipety (2,5 µl, 20 µl), špičky k mikropipetám o různých velikostech, nůžky, pinzeta a digestoř. K promývání připravených povrchů byly použity krystalizační destičky pro metodu

visící kapky (Greiner bio-one, ref: 662150, 24 well), mikropipeta o objemu 1 000 μl , horizontální třepačka a stopky.

Měření vzorků bylo prováděno pomocí FTIR spektroskopu (BrukerTensor II).

4.4 Příprava povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii

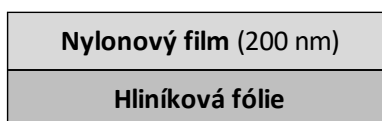
Nůžky byly omyty ethanolem a lehce otřeny ubrouskem. Poté bylo nastříháno 9 čtverečků hliníkové fólie o délce strany přibližně 1 cm až 1,5 cm. Na papír byla nakreslena tabulka, podle které byly roztríděny jednotlivé čtverečky hliníkové fólie. Na každý čtvereček bylo pipetováno množství roztoku lysozymu podle schématu na Obr. 9. Na čtvereček sloužící jako slepý vzorek bylo pipetováno 15 μl dH₂O. První čtyři vzorky byly ponechány v digestoři, a to po dobu 4 hodin a další čtyři byly ponechány v digestoři 18 hodin.

4 hodiny					
2 μl	5 μl	10 μl	15 μl	slepý vzorek	
18 hodin					
2 μl	5 μl	10 μl	15 μl		

Obr. 9: Schéma přípravy povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.

4.5 Příprava povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6

Pokrývání hliníkové fólie vrstvou nylonu 6.6, jehož tloušťka činila 200 nm, bylo provedeno MSc. Sanjayem Kumarem bez přispění autorky bakalářské práce. Schéma povrchu je zobrazeno na Obr. 10.



Obr. 10: Schéma hliníkového povrchu s nylonovou (6.6) vrstvou.

Pro každou koncentraci vzorku lysozymu byly připraveny 3 čtverečky povrchu. Byly připraveny tři další vzorky povrchu, a to pro slepý vzorek, který tvořila pouze dH₂O. Na každý vzorek povrchu bylo napipetováno 15 μl příslušného vzorku lysozymu. Pipetování bylo provedeno podle schématu zobrazeném na Obr. 11. Bylo tedy připraveno celkem 12 vzorků povrchu lysozymu, které byly ponechány v digestoři po dobu 2 hodin.

0,1 mg/ml				
15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	slepý vzorek
0,5 mg/ml				
15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	slepý vzorek
1 mg/ml				
15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	slepý vzorek

Obr. 11: Schéma přípravy povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté nylonovou (6.6) vrstvou.

4.6 Příprava promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6

MSc. Sanjayem Kumarem bylo připraveno 48 vzorků hliníkové fólie s vrstvou nylonu 6.6, na kterou byl napipetován roztok lysozymu o jednotné koncentraci 0,1 mg/ml a jednotném objemu 15 μ l. Ovšem byly připraveny rozdílné časy adsorpce lysozymu na povrchu. Lysozym byl na nylon 6.6 adsorbován po dobu 1 minuty, 10 minut, 15 minut, 30 minut, 45 minut a 1 hodiny. Pro každý čas adsorpce lysozymu byly ponechány 2 vzorky bez roztoku lysozymu. Automatickou mikropipetou (20 μ l) bylo napipetováno 15 μ l roztoku lysozymu na připravený povrch. Jako první byly připraveny vzorky pro dobu adsorpce 1 hodinu. Po 15 minutách byly připraveny vzorky pro dobu adsorpce 45 minut. Po následujících 15 minutách byly přichystány vzorky pro dobu adsorpce 30 minut a po následujících 15 minutách byly připraveny vzorky s dobou adsorpce 15 minut. Bylo vyčkáno 5 minut a byly přichystány povrchy s dobou adsorpce 10 minut. Po následujících 9 minutách byly připraveny vzorky povrchu pro dobu adsorpce 1 minutu. Celkově bylo tedy připraveno 6 vzorků s lysozymem naneseným na povrch a 2 slepé vzorky pro každý adsorpční čas. Všechny vzorky byly ponechány v digestoři. Po uběhnutí adsorpčního času bylo přistoupeno k promývání připraveného povrchu.

4.6.1 Promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6

Jednotlivé čtverečky připraveného lysozymového povrchu byly promyty v dH₂O a v 1× PBS. K promývání byly použity krystalizační destičky pro metodu visící kapky (Greiner bio-one, ref: 662150, 24 well). Každý adsorpční čas byl promyt v časech 1 minuta, 15 minut a 45 minut pro deionizovanou vodu i pro 1× PBS. Schéma promývání je zobrazeno na Obr. 12.

	1	2	3	4	5	6
A	1 min	1 min	1 min	1 min	45 min	45 min
	1 min	15 min	45 min	SV	1 min	15 min
B	10 min	10 min	10 min	10 min	45 min	45 min
	1 min	15 min	45 min	SV	45 min	SV
C	15 min	15 min	15 min	15 min	1 hod	1 hod
	1 min	15 min	45 min	SV	1 min	15 min
D	30 min	30 min	30 min	30 min	1 hod	1 hod
	1 min	15 min	45 min	SV	45 min	SV

Obr. 12: Schéma promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6.

Na Obr. 12 jsou zobrazeny adsorpční časy (šedá barva) a časy promývání (oranžová barva). Zkratka SV značí slepý vzorek pro příslušnou dobu adsorpce. Promývání v dH₂O i v 1× PBS měly stejné schéma jako je uvedeno na Obr. 12. Všechny vzorky byly umístěny do jamek krystalizačních destiček, kam bylo mikropipetou (1 000 µl) napipetováno 500 µl dH₂O nebo 1× PBS. Destičky byly umístěny na třepačku. Po uběhnutí 1 minuty byly z třepačky odebrány první promyté vzorky. Po dalších 14 minutách byly z jamek odebrány vzorky, které byly promyty po dobu 15 minut. Po posledních 30 minutách byly ze třepačky odebrány poslední vzorky, které byly promývány po dobu 45 minut. Promyté vzorky byly následně použity pro měření FTIR spekter.

4.7 Příprava povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty

Samotný základ povrchu, tedy hliníkovou fólii pokrytou vrstvou nylonu 6.6 připravenou za zvýšené teploty, připravil MSc. Sanjay Kumar bez přispění autorky bakalářské práce. Celkem bylo připraveno 57 vzorků povrchu. Lysozym byl adsorbován na povrch po dobu 15 minut, 30 minut a 45 minut. Následně byl povrch promýván v dH₂O po dobu 1 minuty, 2 minut, 3 minut, 4 minut a 5 minut. Pro každý adsorpční čas bylo připraveno

18 vzorků povrchu lysozymu. Na každý vzorek povrchu bylo napipetováno automatickou mikropipetou (20 μ l) 15 μ l roztoku lysozymu (0,1 mg/ml) a vzorky byly dány do digestoře. Tři vzorky povrchu byly ponechány bez roztoku lysozymu a byly použity jako slepé vzorky pro následné měření FTIR spekter. Pro každou dobu promývání v dH₂O byly vzaty 3 vzorky od každého adsorpčního času.

4.7.1 Promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty

Jednotlivé vzorky určené pro promývání byly vyndány z digestoře a pinzetou ošetřenou ethanolem byly přeneseny do jamek v krystalizačních destičkách pro metodu visící kapky (Greiner bio-one, ref: 662150, 24 well). Následně bylo opatrně do jamek napipetováno automatickou mikropipetou (1 000 μ l) 500 μ l dH₂O. Vzorky byly do destičky umístěny podle schématu zobrazeném na Obr. 13. Destičky byly přeneseny na třepačku

na dobu 5 minut. Po každé jedné minutě byly triplety vzorků vyndány podle svého určeného promývacího času.

1	1	2	3	4	5	6
A	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min
	5 min	5 min	5 min	5 min	4 min	4 min
B	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min
	5 min	5 min	5 min	5 min	4 min	4 min
C	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min
	5 min	5 min	5 min	5 min	4 min	4 min
D	45 min	45 min	45 min	60 min	60 min	60 min
	4 min	4 min	4 min	4 min	4 min	4 min
2	1	2	3	4	5	6
A	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min
	3 min	3 min	3 min	3 min	2 min	2 min
B	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min
	3 min	3 min	3 min	3 min	2 min	2 min
C	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min
	3 min	3 min	3 min	3 min	2 min	2 min
D	45 min	45 min	45 min	60 min	60 min	60 min
	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min
3	1	2	3	4	5	6
A	15 min	30 min	45 min	60 min		
	1 min	1 min	1 min	1 min		
B	15 min	30 min	45 min	60 min		
	1 min	1 min	1 min	1 min		
C	15 min	30 min	45 min	60 min		
	1 min	1 min	1 min	1 min		
D						

Obr. 13: Schéma promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty.

Po vyjmutí promytých vzorků povrchů bylo přistoupeno k měření FTIR spekter.

4.8 Měření vzorků na FTIR spektroskopu

Pro všechny povrchy probíhalo měření stejným způsobem. Byl zapnut FTIR spektroskop (Bruker Tensor II), vedle kterého byl zapnut program OPUS. V něm byl zvolen rozsah měření $4\ 000\ \text{cm}^{-1} - 370\ \text{cm}^{-1}$. Před samotným měřením, a také mezi měřeními jednotlivých vzorků, byl měřicí prostor vyčištěn isopropanolem a byl změřen signál pozadí. Vzorky byly do měřicího prostoru přenášeny pomocí pinzety, která byla předem ošetřena isopropanolem. Vzorek povrchu byl do měřicího prostoru vždy vložen, tak aby strana,

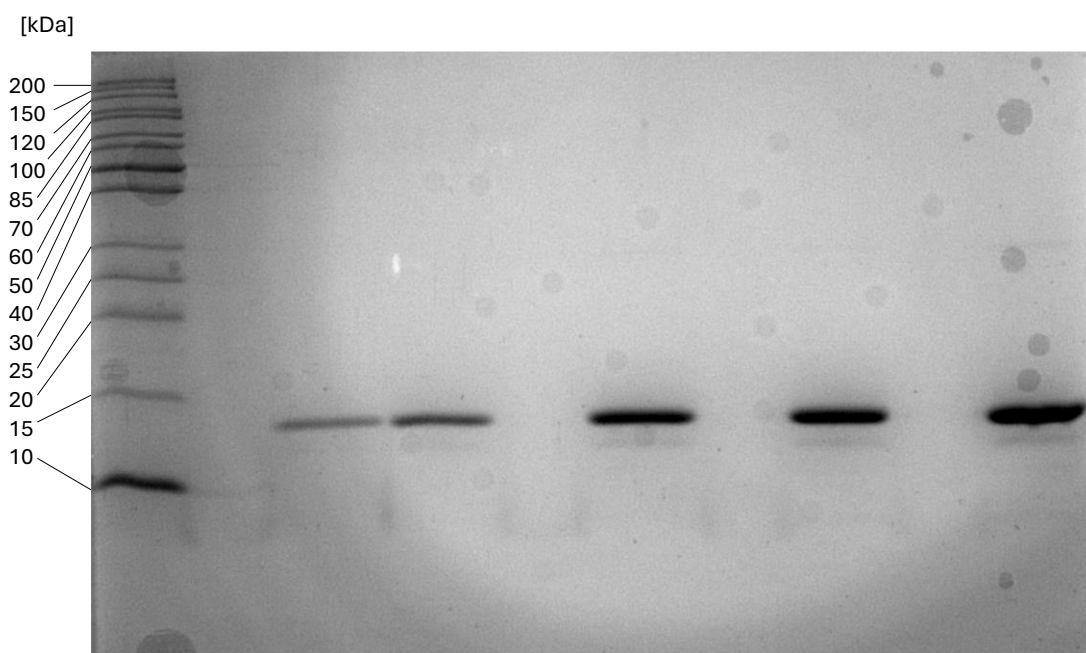
na které byla nanášena vrstva nylonu 6.6 s lysozymem nebo bez něj, směřovala směrem k ATR-kryystalu. Jako první byly změřeny slepé vzorky a následně bylo přistoupeno k měření vzorků povrchu. Vzorky, které prošly promýváním byly měřeny od nejkratší doby promývání po nejdelší dobu promývání povrchu. Získané signály byly zpracovány v programu Origin ve výsledná FTIR spektra.

5 Výsledky

V této části bakalářské práce jsou zveřejněny výsledky provedených experimentů.

5.1 SDS-PAGE elektroforéza lysozymu

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena se vzorkem práškového lysozymu získaného z kuřecího vaječného bílku. Roztoky tohoto lysozymu byly použity v koncentracích 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,1 mg/ml. Finální gel z SDS-PAGE elektroforézy je zobrazen na Obr. 14.

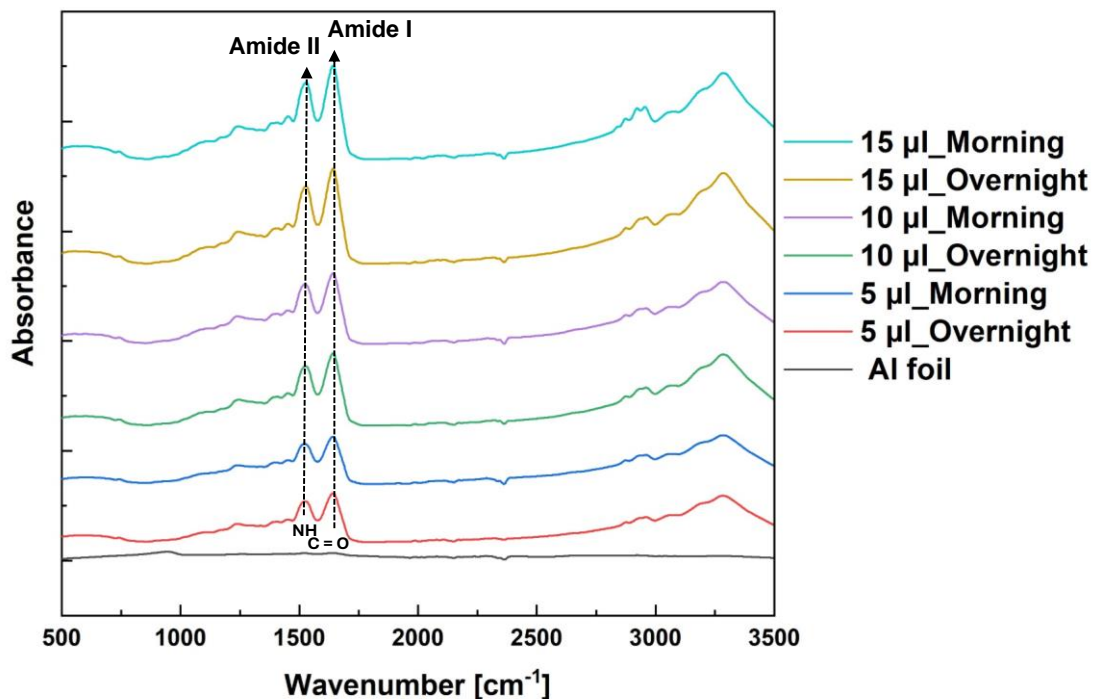


Obr. 14: SDS-PAGE gel (15 %) lysozymu.

Na levé straně na Obr. 14 se nachází proteinový marker. Pozice vzorků lysozymu jsou uvedeny na Obr. 8. Ke standardům proteinového markeru byly přiřazeny příslušné velikosti v jednotkách kDa. Z SDS-PAGE gelu je vidět, že lysozym má takovou velikost, jaká je od něj očekávána, a to přibližně 14,3 kDa. Z gelu je také patrné, že čistota lysozymu je velmi vysoká.

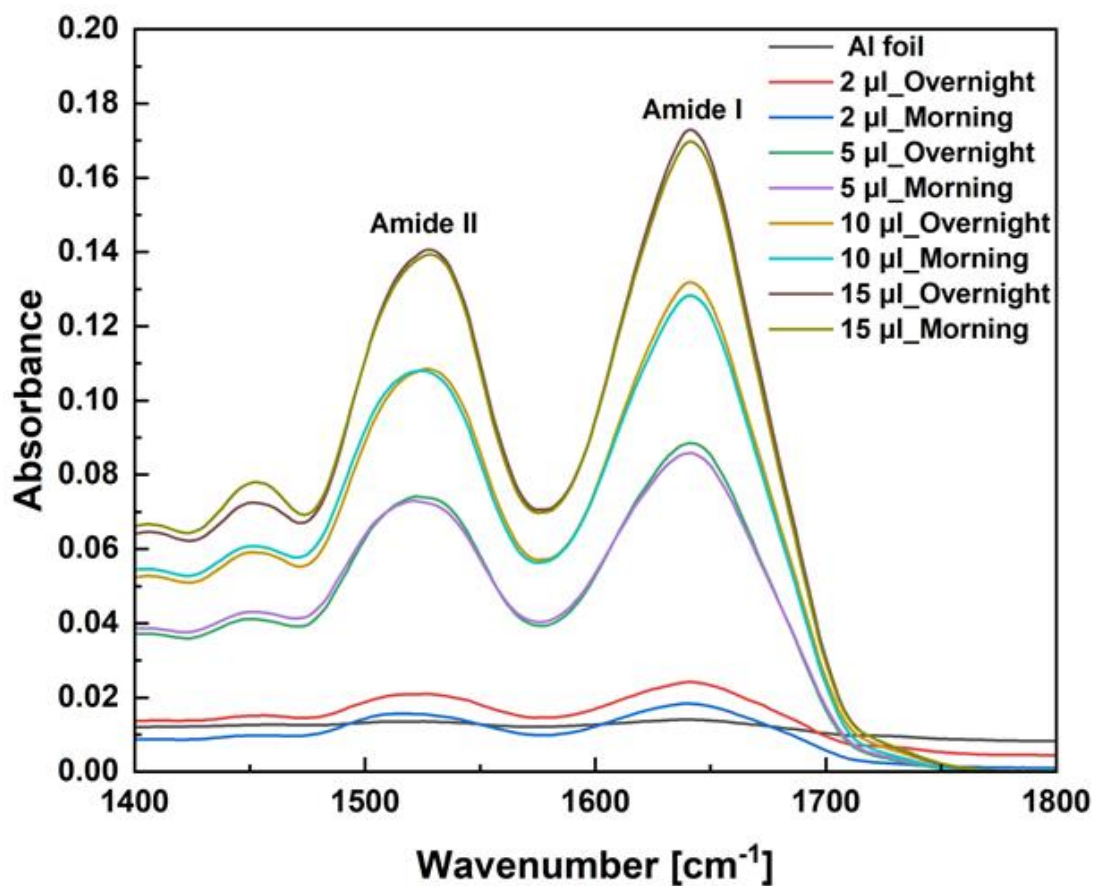
5.2 Povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii

Vzorky připraveného povrchu s lysozymem byly změřeny pomocí FTIR spektroskopie. Výsledné FTIR spektrum je zobrazeno na Obr. 15.



Obr. 15: FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.

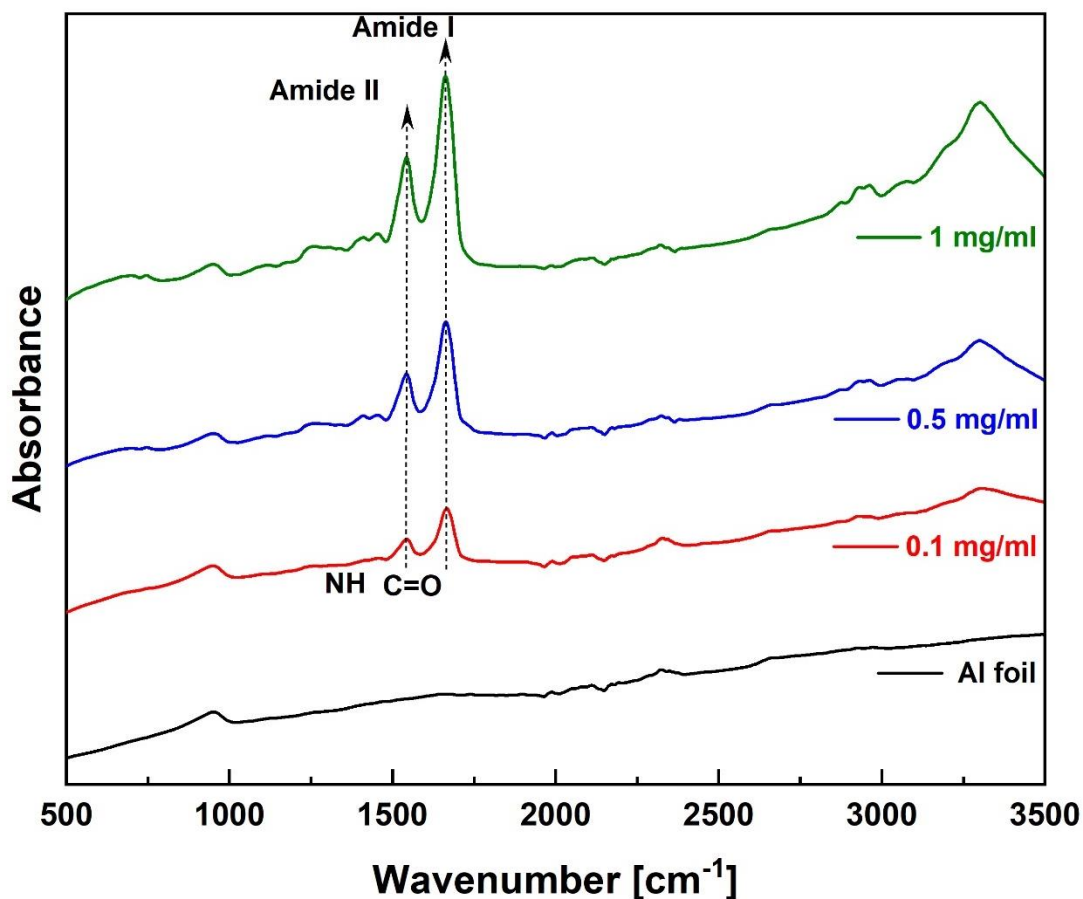
Výsledky uvedené ve spektru na Obr. 15 neobsahují data z měření objemu napipetovaného lysozymu 2 μl, protože se jednalo o signály, které byly v tomto měřítku velmi málo viditelné. Proto byly zobrazeny až v detailní části spektra na Obr. 16, kde jsou amidové pásy lépe patrné.



Obr. 16: Detail FTIR spektra povrchu s lysozymem immobilizovaným na hliníkové fólii.

5.3 Povrch s lysozymem immobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6

V dalším experimentu byl připraven povrch s lysozymem, který byl též tvořen hliníkovou fólií, ovšem v tomto případě, pokrytou nylonovou (6.6) vrstvou. Výsledky získané měření na FTIR spektroskopu jsou zobrazeny na Obr. 17.



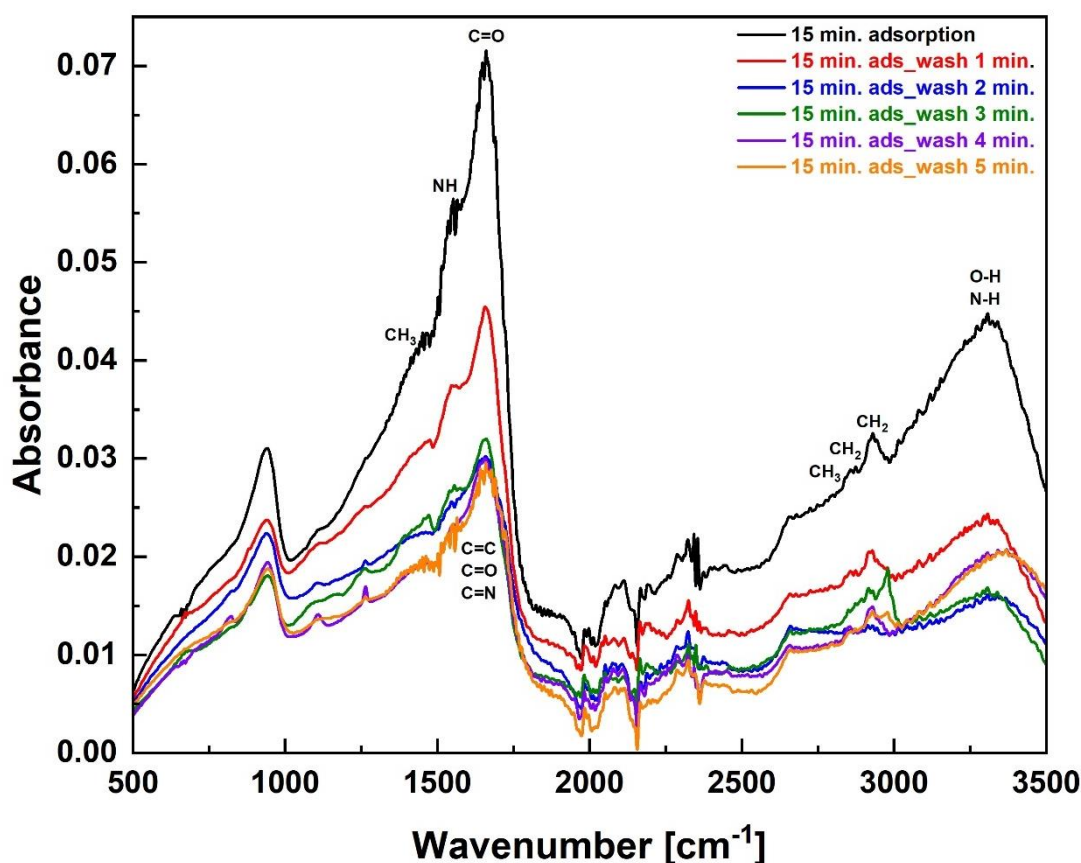
Obr. 17: FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu (6.6).

Důležitým faktem získaným tímto experimentem je nejnižší detekovatelná koncentrace lysozymu na povrchu, které bylo dosaženo, a to je koncentrace 0,1 mg/ml.

Po získání těchto výsledků byl tento experiment zopakován, ale pouze pro koncentraci lysozymu 0,1 mg/ml. Vzorky byly po napipetování roztoku lysozymu ponechány v digestoři po různě dlouhou dobu a následně byly promyty také po různě dlouhou dobu. Promývání probíhalo v deionizované vodě a v 1× PBS. Následně bylo přistoupeno k měření vzorků pomocí FTIR spektroskopie. Bohužel v tomto případě nebyly získány žádné signály přítomnosti lysozymu na povrchu, protože promýváním došlo k odstranění i nylonové vrstvy.

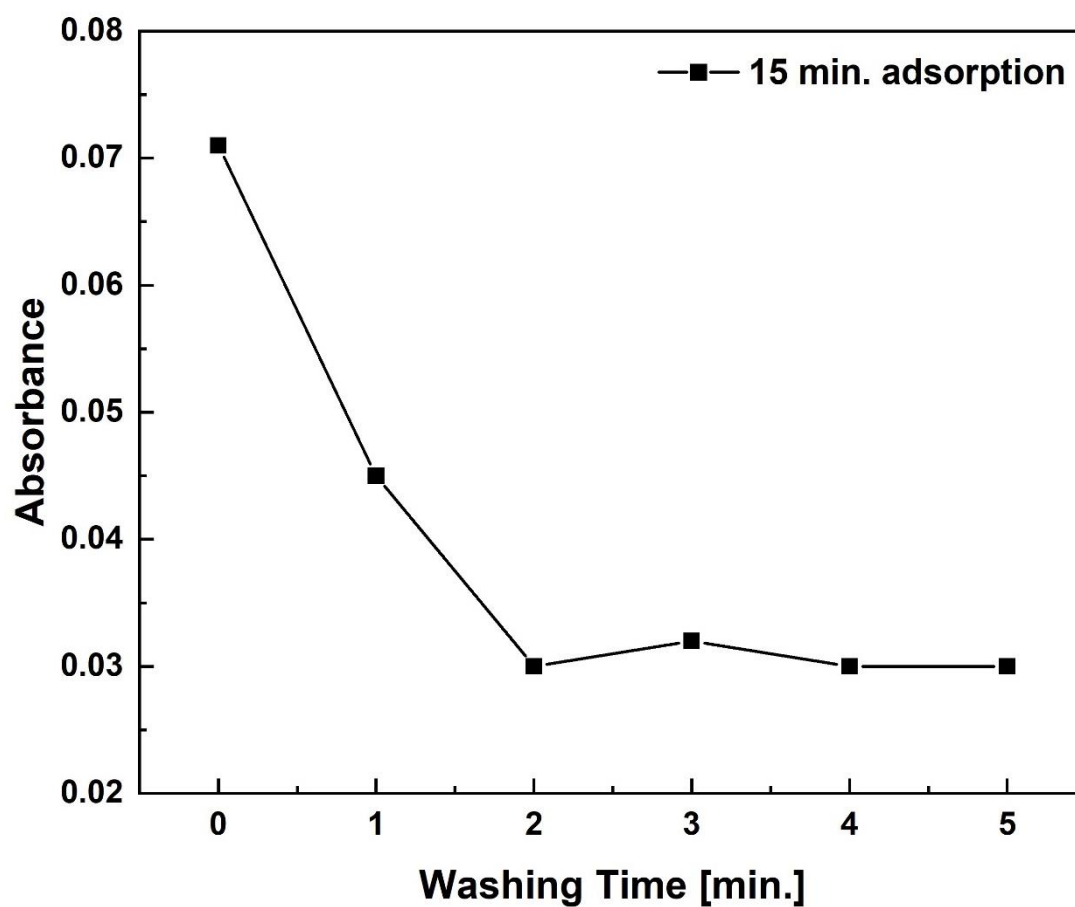
5.4 Povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty

Byly připraveny vzorky povrchů s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připravené za zvýšené teploty v adsorpčních časech 15 minut, 30 minut a 45 minut. Vzorky byly následně promývány v dH₂O po dobu 1 minuty, 2 minut, 3 minut, 4 minut a 5 minut. Na FTIR spektroskopu (Bruker Tensor II) byla změřena FTIR spektra vzorků bez promývání a s promýváním. V uvedených spektrech je v popisku použita zkratka ads, která zastupuje anglické slovo adsorption, tedy adsorpce. To značí dobu, po kterou se lysozym na nylon 6.6 adsorboval. Následně byla vzata absorbance nejintenzivnějšího signálu Amidu I naznačujícího přítomnost adsorbovaného lysozymu na vrstvě nylonu 6.6 a tato hodnota byla položena do závislosti na době promývání povrchu v dH₂O. FTIR spektrum pro dobu adsorpce lysozymu 15 minut je zobrazeno na Obr. 18(a).



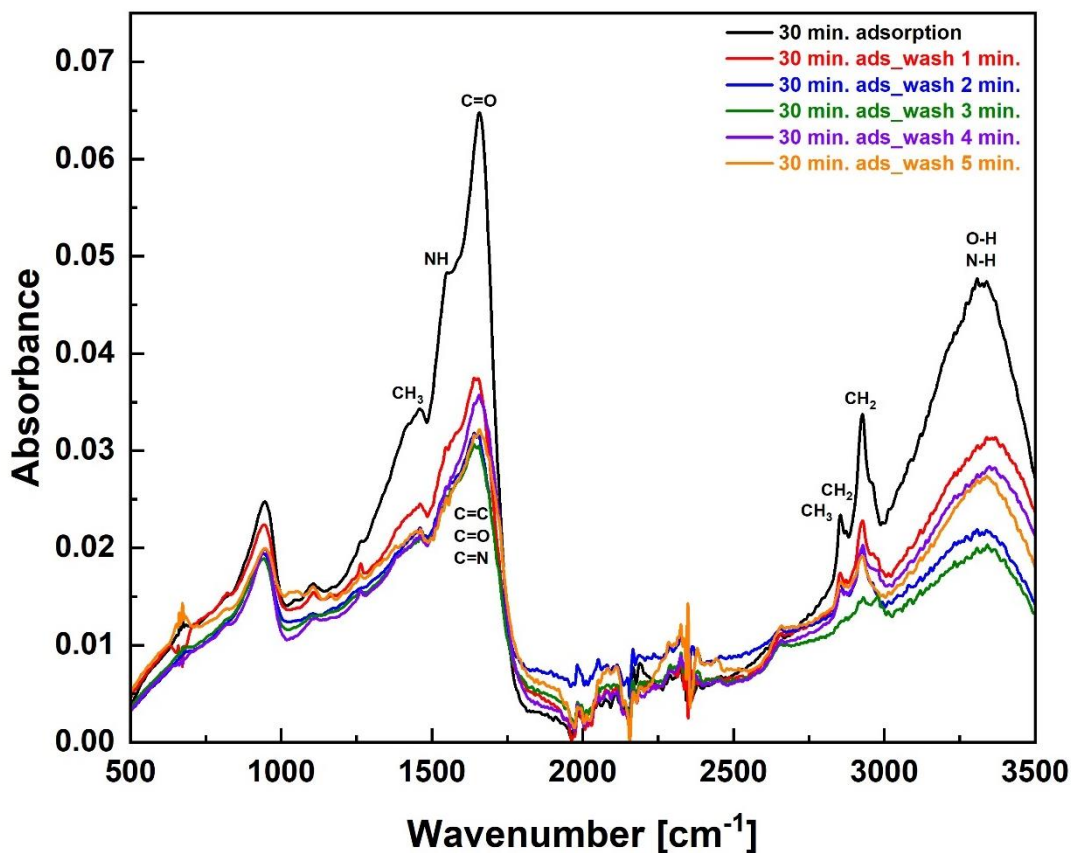
Obr. 18(a): FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připravovaným za zvýšené teploty, na němž byl lysozym adsorbován po dobu 15 minut a následně byl promýván v dH₂O v různých časech.

Závislost absorbance nejintenzivnějšího píku Amidu I na době promývání v dH₂O pro dobu adsorpce lysozymu 15 minut je zobrazena na Obr. 18(b).



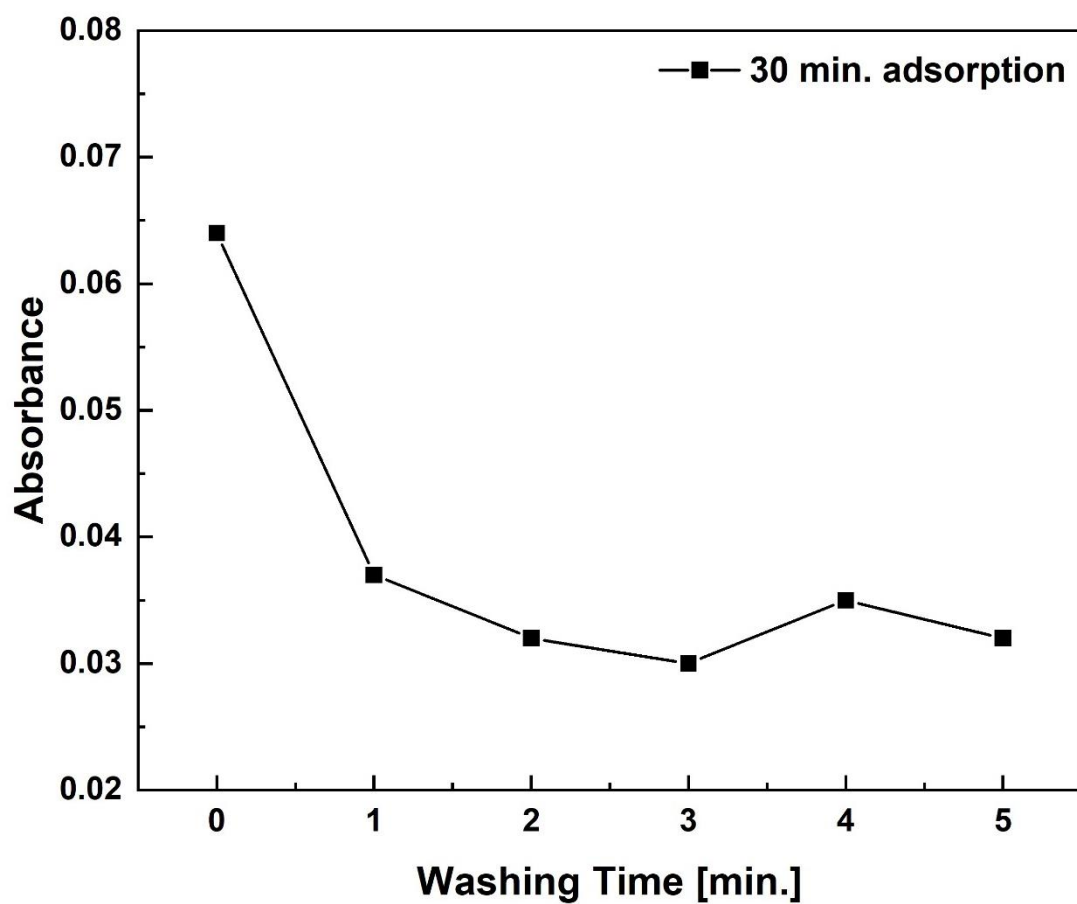
Obr. 18(b): Závislost absorbance Amidu I lysozymu na době promývání povrchu v dH₂O pro adsorpční dobu lysozymu 15 minut.

FTIR spektrum pro dobu adsorpce lysozymu na povrchu 30 minut je zobrazeno na Obr. 19(a).



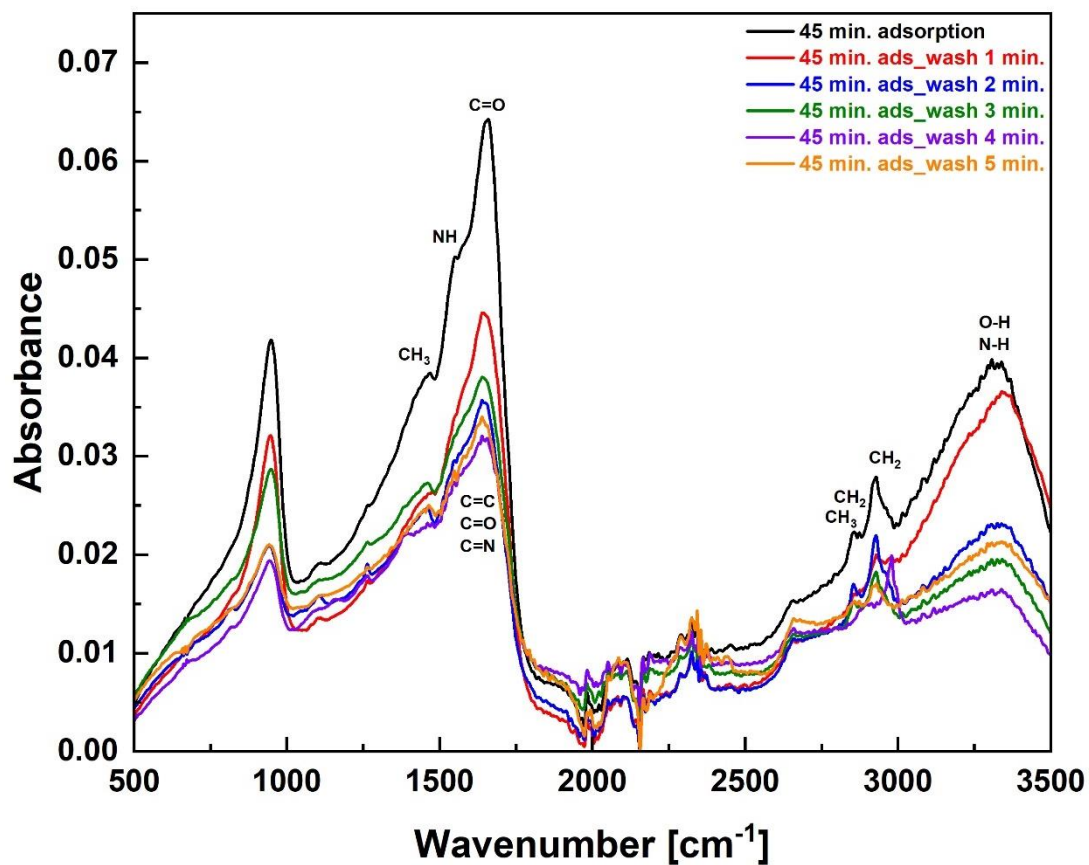
Obr. 19(a): FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připravovaným za zvýšené teploty, na němž byl lysozym adsorbován po dobu 30 minut a následně byl promýván v dH₂O v různých časech.

Závislost absorbance nejintenzivnějšího píku Amidu I lysozymu na době promývání v dH₂O pro dobu adsorpce lysozymu 30 minut je zobrazeno na Obr. 19(b).



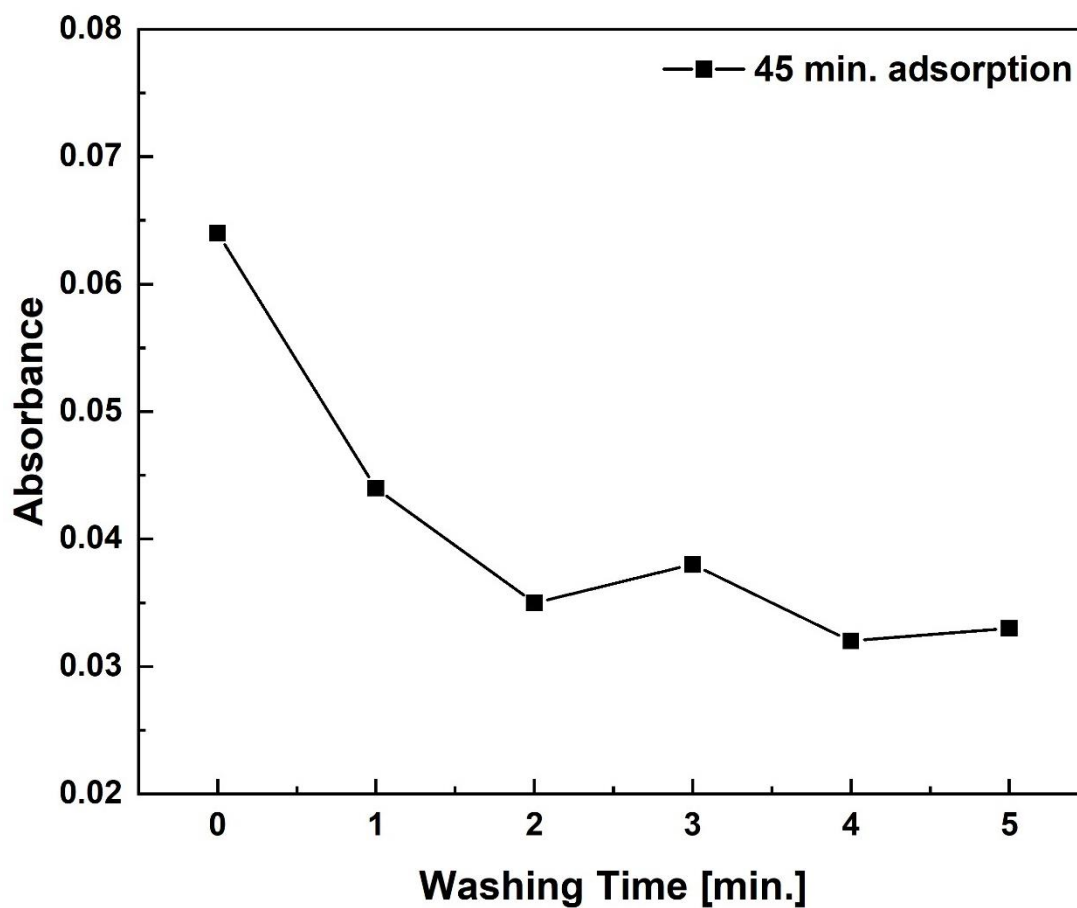
Obr. 19(b): Závislost absorbance Amidu I lysozymu na době promývání povrchu v dH₂O pro adsorpční dobu lysozymu 30 minut.

FTIR spektrum pro dobu adsorpce lysozymu 45 minut je zobrazeno na Obr. 20(a).



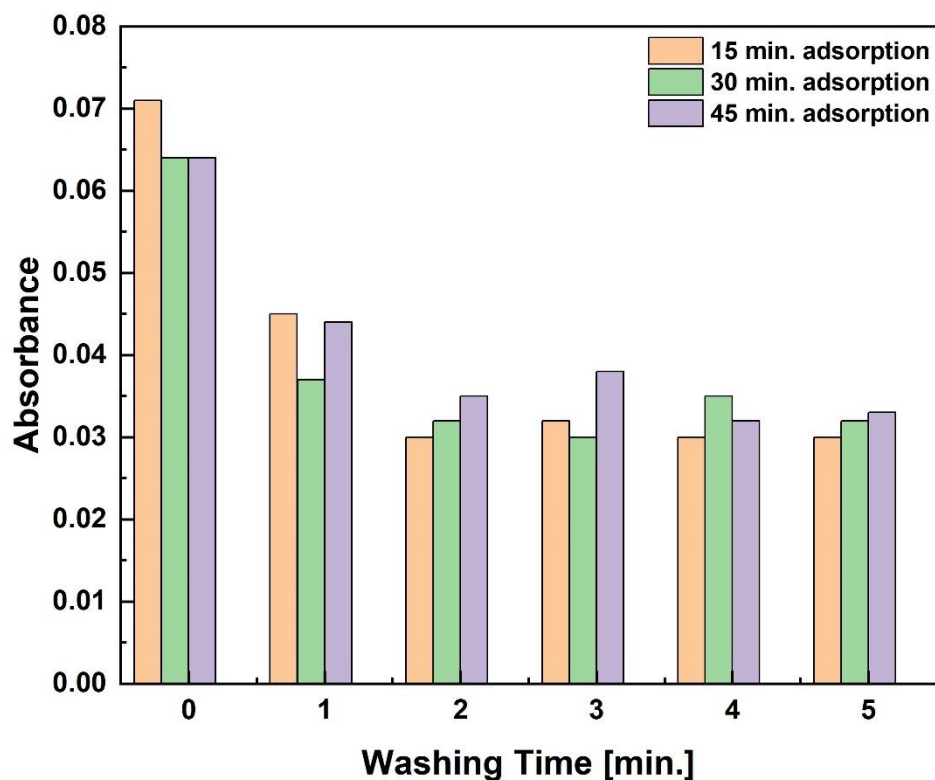
Obr. 20(a): FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty, na němž byl lysozym adsorbován po dobu 45 minut a následně byl promýván v dH₂O v různých časech.

Závislost absorbance nejintenzivnějšího píku Amidu I lysozymu na době promývání v dH₂O pro dobu adsorpce lysozymu 45 minut je zobrazena na Obr. 20(b).



Obr. 20(b): Závislost absorbance Amidu I lysozymu na době promývání povrchu v dH₂O pro adsorpční dobu lysozymu 45 minut.

Následně byly data ze závislostí na Obr. 18(b), Obr. 19(b) a na Obr. 20(b) vloženy do jednoho grafu, pro porovnání průběhu promývání v dH₂O pro jednotlivé adsorpční časy lysozymu na povrchu. Tato závislost je zobrazena na Obr. 21.



Obr. 21: Shrnutí závislosti absorbance Amidu I na době promývání v dH₂O pro různé časy adsorpce lysozymu.

6 Diskuze

Před přípravou funkčního povrchu bylo provedeno ověřování čistoty lysozymu, který byl pro přípravy povrchu používán. Na SDS-PAGE gelu zobrazeného na Obr. 14 je vidět, že lysozym měl vysokou míru čistoty.

Při přípravě funkčních antimikrobiálních povrchů s lysozymem byla měřením na FTIR spektroskopu získána IR spektra. Na získaných spektrech (Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17) byly nalezeny dva hlavní amidové pásy, které zřejmě naznačují přítomnost lysozymu na povrchu [44]. Amidový pás I byl nalezen v blízkosti vlnočtu 1 650 cm⁻¹. Tento signál byl přiřazen natahovacím vibracím peptidových vazeb (C = O) v amidových skupinách adsorbovaného lysozymu [52]. Signál Amidu II byl nalezen v oblasti vlnočtu 1 520 cm⁻¹. Ten byl přiřazen vibracím při ohybech N – H vazby [46], [48]. To znamená, že tyto dva signály mohou indikovat přítomnost sekundárních struktur α -helixů a β -listů molekul lysozymu, které jsou dány hlavně Amidem I [36], [46]. V případě spekter na Obr. 18(a), na Obr. 19(a) a na Obr. 20(a) byl pás Amidu I detekován v oblasti vlnočtu 1 662 cm⁻¹ a pás Amidu II v oblasti vlnočtu 1 551 cm⁻¹. Tento posun je zřejmě způsoben přípravou povrchu za zvýšené

teploty [53]. V těchto případech byly také detekovány tři amidové pásy nylonu 6.6. Amid I nylonu 6.6 se obvykle nachází v oblasti vlnočtu $1\ 600\ \text{cm}^{-1} - 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ a náleží natahovacím vibracím peptidových vazeb $\text{C} = \text{O}$. Amid II se nachází v oblasti vlnočtu $1\ 500\ \text{cm}^{-1} - 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ a je dán ohybovými vibracemi $\text{N} - \text{H}$ vazeb a natahovacími vibracemi $\text{C} = \text{N}$ vazeb. Amid III se nachází v oblasti vlnočtu $1\ 200\ \text{cm}^{-1} - 1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ [54], [55]. Dále se ukazuje široký pík v oblasti vlnočtu $3\ 300\ \text{cm}^{-1} - 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$, který je dán roztahovacími vibracemi $\text{N} - \text{H}$ vazeb a $\text{O} - \text{H}$ vazeb [54]. Nakonec signály, které byly nalezeny v oblasti vlnočtu $2\ 800\ \text{cm}^{-1} - 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ zřejmě náleží vibracím uhlíkového řetězce [55].

Byl připraven povrch s lysozymem na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6. Při tomto experimentu byla zjištěna nejnižší detekovaná koncentrace lysozymu, která činila $0,1\ \text{mg/ml}$. Ta byla tedy zvolena pro další testování povrchů. Při testování tohoto povrchu promýváním v dH_2O a v $1\times\text{PBS}$ byly získané signály porovnávány se signálem hliníkové fólie a se signálem hliníkové fólie pokryté vrstvou nylonu 6.6. Z tohoto porovnání bylo patrné, že promývané vzorky v obou prostředích (dH_2O , $1\times\text{PBS}$) byly zcela zbaveny nylonového povrchu, a tím i lysozymu adsorbovaném na povrchu. Z tohoto důvodu byla promyšlena modifikace nylonu 6.6, která by vedla k větší stabilitě vazby nylonu 6.6 na hliníkovou fólii.

Byla zvolena příprava povrchu na základě naprašování nylonu 6.6 na hliníkovou fólii za zvýšené teploty. Zvýšenou stabilitu nylonu 6.6 po této modifikaci povrchu potvrdil experiment, při kterém byl povrch testován bez i s jeho promýváním v dH_2O . Byly testovány doby adsorpce lysozymu na povrch, a to 15 minut, 30 minut a 45 minut. Vzorky povrchu byly testovány, jak bez promývání, tak s promýváním v dH_2O . Z FTIR spekter na Obr. 18(a), na Obr. 19(a) a na Obr. 20(a) bylo usouzeno, že i po nejkratší době adsorpce lysozymu došlo k jeho imobilizaci na vrstvu nylonu 6.6, protože byly detekovány charakteristické amidové pásy. Z grafů na Obr. 18(b), na Obr. 19(b) a na Obr. 20(b) bylo usouzeno, že na vrstvě nylonu 6.6 došlo k chemisorpci monovrstvy lysozymu. Následně byly další vrstvy lysozymu na tuto monovrstvu adsorbovány fyzisorpcí [56]. Postupným promýváním povrchu v dH_2O zřejmě docházelo k odstraňování jednotlivých vrstev lysozymu, které byly na povrchu drženy pouze ne vazebnými interakcemi jako jsou např. van der Waalovy síly [56]. Z grafu na Obr. 21 je vidět, že přibližně u druhé až třetí minuty promývání v dH_2O zůstává zachována určitá absorbance Amidu I, která se s časem dále nijak značně nemění. Proto je předpokládáno, že na povrchu s nylonem 6.6 zůstala monovrstva lysozymu, která je zde držena pomocí kovalentních vazeb k vrstvě nylonu 6.6 [56]. Je pravděpodobné, že po navázání monovrstvy

lysozymu na nylon 6.6 je tato vrstva stabilně ukotvená na povrchu a jejím promýváním v dH₂O se zřejmě vazby k nylonu 6.6 neoslabují. U páté minuty promývání je na Obr. 21 vidět, že se absorbance jednotlivých adsorpčních časů téměř vyrovnaly. Tyto výsledky naznačují, že doba adsorpce lysozymu neovlivňuje míru adsorpce lysozymu na povrchu s nylonem 6.6.

Při porovnání spektra povrchu tvořeného hliníkovou fólií s vrstvou nylonu 6.6 a spektra povrchu tvořeného hliníkovou fólií s vrstvou nylonu 6.6 připraveného za zvýšené teploty je pravděpodobné, že zvýšená teplota způsobila změnu konformace nylonu 6.6 [53]. Díky tomu se nylon 6.6 silněji navázal na hliníkovou fólii, kde zůstal ukotven i po promývání povrchu v dH₂O. Tato změna konformace mohla s určitou pravděpodobností ovlivnit i sílu chemisorpce lysozymu na nylon 6.6. Zvýšení míry adsorpce mohly, kromě kovalentních vazeb, podpořit i např. vodíkové můstky nebo další nevazebné interakce mezi amidovými skupinami vrstvy nylonu 6.6 a aminovými nebo karboxylovými skupinami monovrstvy lysozymu, což může pravděpodobně dokazovat široký pík v oblasti 3 300 cm⁻¹ – 3 500 cm⁻¹, který náleží O – H vazbám a N – H vazbám [54]. Je možné předpokládat, že tyto zmíněné faktory (nevazebné interakce a teplota) ovlivňují i samotný tvar a pozici Amidu I ve spektru, protože po použití zvýšené teploty k přípravě povrchu s vrstvou nylonu 6.6 došlo, k již zmíněnému posunu oblastí vlnočtu pro Amid I a Amid II lysozymu [46], [53].

Pro další testování adsorpce lysozymu na nylon 6.6 by bylo zapotřebí zjistit závislost absorbance Amidu I na delších časech promývání v dH₂O.

7 Závěr

Cíle bakalářské práce byly splněny. Byl připraven funkční povrch, jehož základ tvořila hliníková fólie pokrytá vrstvou nylonu 6.6 připraveného za zvýšené teploty. Na tento polymer byl adsorbován lysozym o koncentraci 0,1 mg/ml, jehož přítomnost byla potvrzena na základě FTIR spektroskopie. Imobilizace lysozymu byla testována na základě promývání povrchu pomocí především dH₂O. Stabilita lysozymu na povrchu byla testována též za pomoci FTIR spektroskopie. Závěrem je třeba konstatovat, že lysozym byl pravděpodobně na vrstvu nylonu 6.6 navázán pomocí chemisorpce a imobilizace jeho monovrstvy na nylon 6.6 je nezávislá na době adsorpce lysozymu. Adsorpce lysozymu na nylon 6.6 by měla být dále testována v závislosti na delších časech promývání povrchu v dH₂O.

8 Seznam použité literatury

- [1] J. Jayakumar, V. A. Kumar, L. Biswas, a R. Biswas, „Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*“, *J Appl Microbiol*, roč. 131, č. 3, s. 1072–1082, zář. 2021, doi: 10.1111/jam.14985.
- [2] U. Mahanta, M. Khandelwal, a A. S. Deshpande, „Antimicrobial surfaces: a review of synthetic approaches, applicability and outlook“, *J Mater Sci*, roč. 56, č. 32, s. 17915–17941, lis. 2021, doi: 10.1007/s10853-021-06404-0.
- [3] Lubomír Opletal, „Systematika nutraceutik“, in *Přírodní látky a jejich biologická aktivita (Nutraceutika Primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech)*, roč. 1, Praha: Karolinum, 2010, s. 102–112, ISBN: 978-80-246-1884-5.
- [4] P. Ferraboschi, S. Ciceri, a P. Grisenti, „Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic“, *Antibiotics*, roč. 10, č. 12, pro. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10121534.
- [5] W. T. Oliver a J. E. Wells, „Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production“, *J Anim Sci Biotechnol*, roč. 6, č. 1, srp. 2015, doi: 10.1186/s40104-015-0034-z.
- [6] S. Y. Tan a Y. Tatsumura, „Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin“, *Singapore Medical Journal*, roč. 56, č. 7. Singapore Medical Association, s. 366-367, 1. červenec 2015. doi: 10.11622/smedj.2015105.
- [7] Vladimír Klaban, *Ekologie a patogenita mikroorganismů (Biologické, biochemické a enviromentální souvislosti)*. Univerzita Pardubice, 2023, ISBN: 978-80-7560-455-2.
- [8] T. Durek, V. Y. Torbeev, a S. B. H. Kent, „Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme“, *PNAS*, 2007. Viděno: 11. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0610630104>
- [9] R. Swaminathan, V. K. Ravi, S. Kumar, M. V. S. Kumar, a N. Chandra, „Lysozyme: A model protein for amyloid research“, *Adv Protein Chem Struct Biol*, roč. 84, s. 63-111, 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3.

- [10] N. Nawaz *et al.*, „Lysozyme and Its Application as Antibacterial Agent in Food Industry", *Molecules*, roč. 27, č. 19, říj. 2022, doi: 10.3390/molecules27196305.
- [11] T. Wu *et al.*, „What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review", *Food Chem*, roč. 274, s. 698-709, úno. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.017.
- [12] N. Khorshidian, E. Khanniri, M. R. Koushki, S. Sohrabvandi, a M. Yousefi, „An Overview of Antimicrobial Activity of Lysozyme and Its Functionality in Cheese", *Front Nutr*, roč. 9, bře. 2022, doi: 10.3389/fnut.2022.833618.
- [13] L. Callewaert a C. W. Michiels, „Lysozymes in the animal kingdom", *J Biosci*, roč. 35, č. 1, s. 127-160, bře. 2010, doi: 10.1007/s12038-010-0015-5.
- [14] A. A. Mohamed *et al.*, „Molecular characterization of a c-type lysozyme from the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae)", *Dev Comp Immunol*, roč. 61, s. 60-69, srp. 2016, doi: 10.1016/j.dci.2016.03.018.
- [15] M. Jafari a F. Mehrnejad, „Molecular insight into human lysozyme and its ability to form amyloid fibrils in high concentrations of sodium dodecyl sulfate: A view from molecular dynamics simulations", *PLoS One*, roč. 11, č. 10, říj. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0165213.
- [16] J. C. Luo, J. Zhang, a L. Sun, „A g-type lysozyme from deep-sea hydrothermal vent shrimp kills selectively gram-negative bacteria", *Molecules*, roč. 26, č. 24, pro. 2021, doi: 10.3390/molecules26247624.
- [17] N. Hinds Vaughan a S. L. Smith, „Isolation and characterization of a c-type lysozyme from the nurse shark", *Fish Shellfish Immunol*, roč. 35, č. 6, s. 1824-1828, 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.001.
- [18] S. A. Ragland a A. K. Criss, „From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme", *PLoS Pathog*, roč. 13, č. 9, zář. 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006512.
- [19] A. Mohapatra, S. Parida, J. Mohanty, a P. K. Sahoo, „Identification and functional characterization of a g-type lysozyme gene of *Labeo rohita*, an Indian major carp species", *Dev Comp Immunol*, roč. 92, s. 87-98, bře. 2019, doi: 10.1016/j.dci.2018.11.004.

- [20] H. R. Ibrahim, T. Matsuzaki, a T. Aoki, „Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function", *FEBS Lett*, roč. 506, č. 1, s. 27-32, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02872-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02872-1).
- [21] M. Derde *et al.*, „Antimicrobial activity of lysozyme isoforms: Key molecular features", *Biopolymers*, roč. 107, č. 12, pro. 2017, doi: 10.1002/bip.23040.
- [22] A. M. Hamdani, I. A. Wani, N. A. Bhat, a R. A. Siddiqi, „Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme", *Food Chem*, roč. 240, s. 1201-1209, úno. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.060.
- [23] M. Imran Khan, D. Dowarha, R. Katte, R. H. Chou, A. Filipek, a C. Yu, „Lysozyme as the anti-proliferative agent to block the interaction between S100A6 and the RAGE V domain", *PLoS One*, roč. 14, č. 5, kvě. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0216427.
- [24] K. K. Chandel, S. Pahadiya, a P. D. Research Scholar, „Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Technique and Its Applications", 2005. Viděno: 19. únor 2024. [Online]. Dostupné z: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/36688364/SDS-PAGE_Technique_and_Its_Application-libre.pdf?1424315762=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DSodium_Dodecyl_Sulfate_polyacrylamide_ge.pdf&Expires=1712871559&Signature=JCuuu7XpyZZKI8hYsQ1BsOYHcD~40qx7czSXwryf0nCR9N44JruhnmxHFc-q7RDpvxXqFYb8GYA9Tv44PIMQ-8Dz4KicWBUQLHXF1u0C-OWK8wq85yo1aqFVOxZoG7L8sYxWkxAaQuOjJ8SpQtldpU-IP7YerBX3TCpdsAziRpi1Z72ZGBueJ-W46QcHE4IKeVQpWdK5YD9s8Vpxw7CPT5JFXtpuGIaa117s84c1A9lGxyfSY4NRjx0p7j~lWQ5JjDBAupCs5bqGKkahjdIs~u7x1MkG4Mh61FmW2MT753rEgxIF3cyw3Rn4crUF1uY6MEAKthvfbKzlbRlF2ixNMA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- [25] Z. Zhu, J. J. Lu, a S. Liu, „Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review", *Analytica Chimica Acta*, roč. 709, s. 21-31, 4. leden 2012. doi: 10.1016/j.aca.2011.10.022.

- [26] A. B. Nowakowski, W. J. Wobig, a D. H. Petering, „Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions", *Metallomics*, roč. 6, č. 5, s. 1068-1078, 2014, doi: 10.1039/c4mt00033a.
- [27] A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, a C. M. Deber, „Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins", *PNAS*, roč. 106, č. 6, s. 1760-1765, úno. 2009, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>.
- [28] C. Adlhart *et al.*, „Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview", *Journal of Hospital Infection*, roč. 99, č. 3, s. 239-249, čvc. 2018, doi: 10.1016/j.jhin.2018.01.018.
- [29] G. Gao *et al.*, „The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides", *Biomaterials*, roč. 32, č. 16, s. 3899-3909, čer. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.013.
- [30] Y. Yuan, M. P. Hays, P. R. Hardwidge, a J. Kim, „Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates", *RSC Adv*, roč. 7, č. 23, s. 14254-14261, 2017, doi: 10.1039/c7ra01571b.
- [31] H. Murata, R. R. Koepsel, K. Matyjaszewski, a A. J. Russell, „Permanent, non-leaching antibacterial surfaces-2: How high density cationic surfaces kill bacterial cells", *Biomaterials*, roč. 28, č. 32, s. 4870-4879, lis. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.012.
- [32] X. Xiao *et al.*, „Controllable coating of zinc oxide on protein-based fibers/fabrics for superior antibacterial performance preserving wearable abilities", *Appl Surf Sci*, roč. 610, úno. 2023, doi: 10.1016/j.apsusc.2022.155487.
- [33] B. Hassan, S. A. S. Chatha, A. I. Hussain, K. M. Zia, a N. Akhtar, „Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review", *Int J Biol Macromol*, roč. 109, s. 1095-1107, dub. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097.
- [34] V. Mihalca *et al.*, „Protein-based films and coatings for food industry applications", *Polymers (Basel)*, roč. 13, č. 5, s. 1-24, bre. 2021, doi: 10.3390/polym13050769.

- [35] A. Conte, G. G. Buonocore, M. Sinigaglia, a M. A. Del Nobile, „Development of immobilized lysozyme based active film", *J Food Eng*, roč. 78, č. 3, s. 741-745, úno. 2007, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.013.
- [36] C. Berthomieu a R. Hienerwadel, „Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy", *Photosynth Res*, roč. 101, č. 2-3, s. 157-170, zář. 2009, doi: 10.1007/s11120-009-9439-x.
- [37] J. Ryczkowski, „IR spectroscopy in catalysis", *Catal Today*, roč. 68, č. 4, s. 263-381, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(01\)00334-0](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(01)00334-0).
- [38] Y. Chen, C. Zou, M. Mastalerz, S. Hu, C. Gasaway, a X. Tao, „Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—A Review", *Int J Mol Sci*, roč. 16, č. 12, s. 30223-30250, pro. 2015, doi: 10.3390/ijms161226227.
- [39] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, a C. Petibois, „Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy", *Anal Bioanal Chem*, roč. 395, č. 3, s. 829-837, 2009, doi: 10.1007/s00216-009-3019-y.
- [40] P. I. Haris a F. Severcan, „FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media", *J Mol Catal B Enzym*, roč. 7, s. 207-221, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00030-2).
- [41] M. Wenning a S. Scherer, „Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 97, č. 16, s. 7111-7120, srp. 2013, doi: 10.1007/s00253-013-5087-3.
- [42] C. Baudot, C. M. Tan, a J. C. Kong, „FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization", *Infrared Phys Technol*, roč. 53, č. 6, s. 434-438, lis. 2010, doi: 10.1016/j.infrared.2010.09.002.
- [43] M. M. Beasley, E. J. Bartelink, L. Taylor, a R. M. Miller, „Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: Implications for assessment of bone bioapatite diagenesis", *J Archaeol Sci*, roč. 46, č. 1, s. 16-22, 2014, doi: 10.1016/j.jas.2014.03.008.

- [44] S. E. Glassford, B. Byrne, a S. G. Kazarian, „Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins", *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, roč. 1834, č. 12, s. 2849-2858, 2013, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.07.015.
- [45] S. Petit, „Chapter 12.6 Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Dev Clay Sci*, roč. 1, s. 909-918, 2006, doi: 10.1016/S1572-4352(05)01032-9.
- [46] M. Beekes, P. Lasch, a D. Naumann, „Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research", *Vet Microbiol*, roč. 123, č. 4, s. 305-319, srp. 2007, doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.010.
- [47] A. Fadlelmoula, D. Pinho, V. H. Carvalho, S. O. Catarino, a G. Minas, „Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices", *Micromachines (Basel)*, roč. 13, č. 2, úno. 2022, doi: 10.3390/mi13020187.
- [48] H. Tiernan, B. Byrne, a S. G. Kazarian, „ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals", *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, roč. 241, lis. 2020, doi: 10.1016/j.saa.2020.118636.
- [49] S. G. Kazarian a K. L. A. Chan, „Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples", *Biochim Biophys Acta Biomembr*, roč. 1758, č. 7, s. 858-867, čvc. 2006, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.011.
- [50] A. R. Hind, S. K. Bhargava, a A. Mckinnon, „At the solid/liquid interface: FTIR/ATR - the tool of choice", *Advances in Colloid and Interface Science*, roč. 93, č. 1-3, s. 91-114, zář. 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00079-8).
- [51] V. Hospodarova, E. Singovszka, a N. Stevulova, „Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials", *Am J Analyt Chem*, roč. 09, č. 06, s. 303-310, 2018, doi: 10.4236/ajac.2018.96023.
- [52] T. S. Anirudhan a T. A. Rauf, „Lysozyme immobilization via adsorption process using sulphonic acid functionalized silane grafted copolymer", *Colloids Surf B Biointerfaces*, roč. 107, s. 1-10, čvc. 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.063.
- [53] Y. Yoshioka, K. Tashiro, a C. Ramesh, „Structural change in the Brill transition of Nylon m/n (2) conformational disordering as viewed from the temperature-dependent

- infrared spectral measurements", *Polymer (Guildf)*, roč. 44, č. 20, s. 6407-6417, zář. 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(03)00593-7.
- [54] B. K. Shrestha, H. M. Mousa, A. P. Tiwari, S. W. Ko, C. H. Park, a C. S. Kim, „Development of polyamide-6,6/chitosan electrospun hybrid nanofibrous scaffolds for tissue engineering application", *Carbohydr Polym*, roč. 148, s. 107-114, zář. 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.094.
- [55] R. Sengupta, A. Bandyopadhyay, S. Sabharwal, T. K. Chaki, a A. K. Bhowmick, „Polyamide-6,6/in situ silica hybrid nanocomposites by sol-gel technique: Synthesis, characterization and properties", *Polymer (Guildf)*, roč. 46, č. 10, s. 3343-3354, dub. 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.02.104.
- [56] I. Firkowska-Boden, X. Zhang, a K. D. Jandt, „Controlling Protein Adsorption through Nanostructured Polymeric Surfaces", *Adv Healthc Mater*, roč. 7, č. 1, led. 2018, doi: 10.1002/adhm.201700995.

9 Seznam zkratk a symbolů

Tab.	tabulka
Obr.	obrázek
hLys	lysozym lidského typu
HEWL	lysozym bílku slepičího vejce
GEWL	lysozym z bílku vejce husy Embdenské
pI	izoelektrický bod
E. coli	bakterie <i>Escherichia coli</i>
PG	peptidoglykan
NAM	N-acetylmuramová kyselina
NAG	N-acetylglukosamin
C1-NAM	uhlík č. 1 N-acetylmuramové kyseliny
C4-NAG	uhlík č. 4 N-acetylglukosaminu
Asp52	kyselina asparagová na pozici 52
Glu35	kyselina glutamová na pozici 35
Cys	cystein
SDS	sodium dodecylsulfát
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
dH ₂ O	deionizovaná voda
APS	ammonium persulfát
TEMED	tetramethylethylendiamin
IR	infračervená oblast elektromagnetického záření
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ATR	Attenuated Total Reflection (Tlumený totální odraz)
IRE	vnitřní reflexní prvek
QAC	kvartérní amoniové sloučeniny
AMP	antimikrobiální peptidy
Ads	adsorpce (angl. adsorption)

10 Seznam příloh

V této části bakalářské práce je uveden seznam tabulek a obrázků, které byly použity.

10.1 Seznam tabulek

Tab. I: Typy lysozymů podle přibližné hmotnosti.	4
Tab. II: Příprava roztoků lysozymu pro SDS-PAGE elektroforézu.....	17
Tab. III: Příprava roztoku lysozymu pro funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.	17
Tab. IV: Příprava roztoků lysozymu pro funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6.	18
Tab. V: Příprava roztoku lysozymu pro přípravu funkčního povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu 6.6 pro promývání.....	18
Tab. VI: Příprava roztoku lysozymu pro funkční povrch s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty.	19
Tab. VII: Příprava separačního gelu (15 %).	20
Tab. VIII: Příprava zaostřovacího gelu (5 %).	20

10.2 Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma struktury lysozymu.....	5
Obr. 2: Hydrolytický mechanismus působení lysozymu na $\beta(1-4)$ vazby mezi NAM a NAG zbytky páteře bakteriální buněčné stěny.....	5
Obr. 3: Lysozym porušuje buněčnou stěnu bakterií 2 mechanismy. Výše (fialová, oranžová barva) se nachází peptidoglykanová vrstva. Níže je pak zobrazena dvojvrstva fosfolipidů (modrá barva). Vlevo: Peptidoglykanová vrstva je napadena lysozymem a dochází tak k jejímu hydrolytickému rozkladu. Vpravo: ve struktuře fosfolipidové dvojvrstvy lysozym vytvořil póry, které způsobí její následný rozpad.....	6
Obr. 4: Schématické znázornění základních součástí transmisního FTIR spektroskopu.	13
Obr. 5: Interferogram.	13
Obr. 6: Schéma ATR-FTIR spektroskopu.	14
Obr. 7: Spektra amidových pásů.	15
Obr. 8: Schéma vzorků v SDS-PAGE elektroforéze.....	21
Obr. 9: Schéma přípravy povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.	22
Obr. 10: Schéma hliníkového povrchu s nylonovou (6.6) vrstvou.	22

Obr. 11: Schéma přípravy povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté nylonovou (6.6) vrstvou.	23
Obr. 12: Schéma promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6.....	24
Obr. 13: Schéma promývání povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty.....	26
Obr. 14: SDS-PAGE gel (15 %) lysozymu.	27
Obr. 15: FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.	28
Obr. 16: Detail FTIR spektra povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii.	29
Obr. 17: FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii s vrstvou nylonu (6.6).	30
Obr. 18(a): FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připravovaným za zvýšené teploty, na němž byl lysozym adsorbován po dobu 15 minut a následně byl promýván v dH ₂ O v různých časech.....	31
Obr. 18(b): Závislost absorbance Amidu I lysozymu na době promývání povrchu v dH ₂ O pro adsorpční dobu lysozymu 15 minut.	32
Obr. 19(a): FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připravovaným za zvýšené teploty, na němž byl lysozym adsorbován po dobu 30 minut a následně byl promýván v dH ₂ O v různých časech.....	33
Obr. 19(b): Závislost absorbance Amidu I lysozymu na době promývání povrchu v dH ₂ O pro adsorpční dobu lysozymu 30 minut.	34
Obr. 20(a): FTIR spektrum povrchu s lysozymem imobilizovaným na hliníkové fólii pokryté vrstvou nylonu 6.6 připraveným za zvýšené teploty, na němž byl lysozym adsorbován po dobu 45 minut a následně byl promýván v dH ₂ O v různých časech.....	35
Obr. 20(b): Závislost absorbance Amidu I lysozymu na době promývání povrchu v dH ₂ O pro adsorpční dobu lysozymu 45 minut.	36
Obr. 21: Shrnutí závislosti absorbance Amidu I na době promývání v dH ₂ O pro různé časy adsorpce lysozymu.	37