

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Barbora Hamerníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Normalizace proteinového obsahu u vzorků
cervikálního hlenu**

Bakalářská práce

Barbora Hamerníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Barbora Hamerníková
Název práce	Normalizace proteinového obsahu u vzorků cervikálního hlenu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	spektrofotometrie, proteomika, label-free
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

SOUHRN

V této bakalářské práci je řešena problematika týkající se normalizace proteinového obsahu u vzorků cervikálních hlenů. Existuje mnoho metod, kterými je možno měřit koncentrace proteinů v neznámých vzorcích. Problémem, se kterým se v praxi setkáváme, jsou různé hodnoty koncentrací u stejných vzorků měřené odlišnými metodami. V této práci je uvedeno porovnání několika vybraných postupů měření, přičemž jako nejvhodnější se jeví metoda Bradfordova, a to na základě srovnání výsledků z vlastního měření s výsledky získanými nezávislým výpočtem z rovnice.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Barbora Hamerníková
Title	Normalization of protein content in cervical mucus samples
Type of thesis	Bachelors
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
The year of presentation	2020
Keywords	spectrophotometry, proteomics, label-free
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

The problematics of protein mass normalization in cervical mucus samples is discussed in this bachelor thesis. There are many assays that can be used for the measurement of the protein concentration in unknown samples. The problems that can be seen are different concentrations of the same samples when they are measured by different assays. This thesis compares several chosen methods of protein concentration measurement, with Bradford method being the most suitable. Results measured by this method follow closely the theoretical results obtained by independent calculation from equation.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce Mgr. Tomáše Oždiana, Ph.D. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Podpis:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, Mgr. Tomáši Oždianovi, Ph.D., za přátelský přístup, pomoc, rady a trpělivost po celou dobu trvání naší spolupráce. Také bych ráda poděkovala svým blízkým za podporu. Tato práce byla vypracována v rámci grantu AZV ČR (NV18-08-00291).

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Proteiny	3
3.1.1	Struktura proteinů	3
3.1.2	Funkce proteinů	4
3.2	Proteomika	5
3.3	Metody kvantitativní proteomiky	5
3.3.1	Metody bez využití značení (Label-free).....	7
3.4	Stanovení koncentrace proteinů	9
3.4.1	Bradfordova metoda	10
3.4.2	Lowryho metoda.....	10
3.4.3	Pierce 660 nm	10
3.4.4	Bicinchoniová metoda	11
3.4.5	Fluorescence Trp	11
3.4.6	Měření v UV	12
3.4.7	Měření v IČ.....	12
4	Materiál a metody	14
4.1	Biologický materiál.....	14
4.2	Přístroje a zařízení.....	14
4.3	Software	14
4.4	Chemikálie	15
4.5	Soupravy	15
4.6	Roztoky	15
4.7	Použité experimentální a vyhodnocující postupy	15
4.7.1	Modelový systém hovězího sérového albuminu	16
4.7.2	Modelový systém cervikálního hlenu.....	18
5	Výsledky.....	21
5.1	Modelový systém hovězího sérového albuminu.....	21
5.1.1	Metoda BCA.....	21

5.1.2	Metoda Bradfordova.....	22
5.1.3	Metoda měření fluorescence tryptofanu	22
5.1.4	Metoda Pierce 660 nm.....	24
5.1.5	Metoda měření v IČ spektru	24
5.1.6	Porovnání použitých metod pro modelový systém hovězího sérového albuminu.....	25
5.2	Modelový systém cervikálního hlenu	26
5.2.1	Metoda BCA.....	26
5.2.2	Metoda Bradfordova.....	27
5.2.3	Metoda měření fluorescence tryptofanu	27
5.2.4	Metoda Pierce 660 nm (Činidlo pro kompatibilitu s ionogenními detergenty Pierce™ 660 nm).....	29
5.2.5	Metoda měření v UV spektru	30
5.2.6	Měření v IČ spektru.....	30
5.2.7	Porovnání použitých metod pro modelový systém cervikálního hlenu.....	31
5.2.8	Měření koncentrace proteinového obsahu ve vzorku po provedení metody FASP.	32
6	Diskuze	33
7	Závěr.....	40
8	Literatura	41

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Kyselina octová
ACN	Acetonitril
BCA	Bicinchoninová metoda
BSA	Hovězí sérový albumin
DDA	Data dependentní mód
DIA	Data independentní mód
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	Ionizace elektrosprejem
FASP	Příprava vzorků pomocí filtru
ICAT	Izotopově kódované afinitní značky
IČ spektrum	Infračervené spektrum
IDCR	Činidlo pro kompatibilitu s ionogenními deterenty
iTRAQ	Izobarické značení pro relativní a absolutní kvantifikaci
IVF	In-vitro fertilizace
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
SDS	Dodecylsírán sodný
SILAC	Stabilní izotopové značení aminokyselinami v buněčné kultuře
TFA	Kyselina trifluoroctová
TMT	Tandemové hmotnostní značení
Trp	Tryptofan
UV spektrum	Ultrafialové spektrum
UV-Vis	Ultrafialovo-viditelná spektrofotometrie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vyobrazení čtyř stupňů organizace struktury proteinu, jmenovitě primární, sekundární, terciální a kvarterní struktura.

Obrázek 2: Translokace (9;22) a BCR/ABL transkripty asociované s CML, AML a ALL.

Obrázek 3: Princip technik značení peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Obrázek 4: Schéma procesu iontové desolvace.

Obrázek 5: Vývoj jednorázového nosiče vzorků a optimalizace „spot“ vzoru; (a) MIR záznam PTFE membrány; (b) design vzorkovací karty umožňující zadržení analyzovaných vzorků pomocí MIR záření.

Obrázek 6: Kalibrační křivka metody BCA získaná měřením absorbance standardů BSA při 560 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

Obrázek 7: Kalibrační křivka Bradfordovy metody získaná měřením absorbance standardů BSA při 595 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

Obrázek 8: Kalibrační křivky získané měřením fluorescence standardů BSA (A) a standardů Trp (B) při 295 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

Obrázek 9: Kalibrační křivka metody Pierce 660 nm získaná měřením absorbance standardů BSA při 660 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

Obrázek 10: Kalibrační křivka metody BCA získaná měřením absorbance standardů BSA při 560 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

Obrázek 11: Kalibrační křivka Bradfordovy metody získaná měřením absorbance standardů BSA při 595 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

Obrázek 12: Kalibrační křivky získané měřením fluorescence standardů BSA (A) a standardů Trp (B) při 295 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

Obrázek 13: Kalibrační křivka metody Pierce 660 nm získaná měřením absorbance standardů BSA při 660 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

Obrázek 14: Kalibrační křivka získaná měřením absorbance standardů BSA při 280 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

Obrázek 15: Kalibrační křivka metody BCA získaná měřením absorbance standardů BSA při 560 nm po provedení FASP.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Průměrné hodnoty koncentrací [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] získaných měření v IČ spektru.

Tabulka 2: Souhrn výsledků měření jednotlivých výše uvedených metod.

Tabulka 3: Hodnoty koncentrací neředěných vzorků získaných měření v IČ spektru.

Tabulka 4: Souhrn výsledků jednotlivých výše popsaných metod měření.

Tabulka 5: Koncentrace vzorků proteinů po digesci získané metodou BCA.

Tabulka 6: Srovnání hodnot koncentrací BSA ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) získané výpočtem z grafu a výpočtem z rovnice.

Tabulka 7: Srovnání hodnot koncentrací vzorků cervikálních hlenů získané výpočtem z grafu (a) a výpočtem z rovnice (b).

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá normalizací obsahu proteinů ve vzorcích cervikálního hlenu, přesněji stanovením jejich koncentrací různými metodami. Studium proteinů je umožněno lépe porozumět jejich významu při fyziologických i patologických stavech (Kisluk *et al.*, 2014). Kvantifikace proteinů v biologickém vzorku je nezbytná například v purifikačních technikách, elektroforetických separacích, imunologických analýzách, buněčné a molekulární biologii, přičemž každá metoda má své výhody i nevýhody (Okutucu *et al.*, 2007). Koncentrace proteinů souvisí s přesností dávkování vzorků, jelikož pro získání správných dat (například z MS) je nutno zajistit, že bude vždy použito stejné množství vzorku. Dalšími faktory, které mohou ovlivnit výsledky, jsou poté postupy jednotlivých pracovišť a pracovníků. To se může projevit zejména při mezilaboratorním porovnávání. Pro správné vyhodnocení dat je potřeba více se zaměřit na účinnost použitých metod (Gu *et al.*, 2014).

Mnoho pracovišť vyvíjí snahu o nalezení nových biomarkerů různých vážných onemocnění. Biomarkery reprezentují medicínské ukazatele, které definují zdravotní stav pacienta a lze je přesně měřit a reprodukovat, na rozdíl od symptomů, které jsou pacienti schopni vnímat (Sharma *et al.*, 2016). V gynekologii mohou být markery studovány například v souvislosti s receptivitou endometria. Vůbec první publikace detailněji studující vlastnosti endometria byla vydána v roce 1950 (Noyes *et al.*, 1950). Studium receptivity endometria molekulárními metodami souvisí především se selháváním implementace embryí při IVF (Mahajan, 2015). Při studiu vzorků cervikálního hlenu Leonardo Pereira *et al.*, (2007) identifikoval biomarkery související s předčasným porodem. Jako markery identifikoval například fibronektin, S100 proteiny, profilin-1, nebo thymosin β -4.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo měření koncentrací proteinového obsahu u vzorků cervikálních hlenů různými metodami a dále pak navržení nejvhodnější metody s následným porovnáním reprodukovatelnosti výsledků.

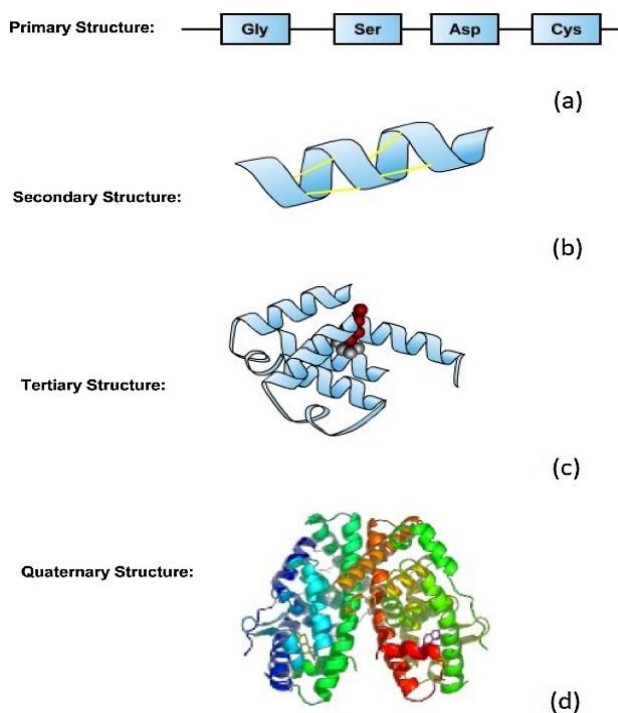
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Proteiny

Podobně jako sacharidy či lipidy jsou proteiny esenciální pro správnou funkci organismu. Jedná se o polymery složené z 20 základních proteinogenních aminokyselin podle pravidel genetického kódu.

3.1.1 Struktura proteinů

Struktura proteinů je rozdělena do čtyř stupňů (viz Obrázek 1). Primární struktura je dána sekvencí aminokyselin v polypeptidovém řetězci, ve kterém jsou jednotlivé aminokyseliny propojeny peptidovými vazbami. Sekundární struktura udává geometrické uspořádání polypeptidového řetězce, takový systém je přitom stabilizován vodíkovými vazbami vedlejších aminokyselinových skupin. Za nejčastěji se vyskytující formy jsou považovány α -helix a β -skládaný list. Terciální struktura je poté charakterizována pokračujícím sbalováním a interakcemi vedlejších skupin řetězců (např. nepolární interakce, SH-vazby či vodíkové můstky), jejichž výsledkem je finální trojrozměrná struktura. Kvarterní struktura je popisována jako prostorové sestavení několika samostatných polypeptidových řetězců (Wardah *et al.*, 2019), takováto konformace může vykazovat allosterický efekt.

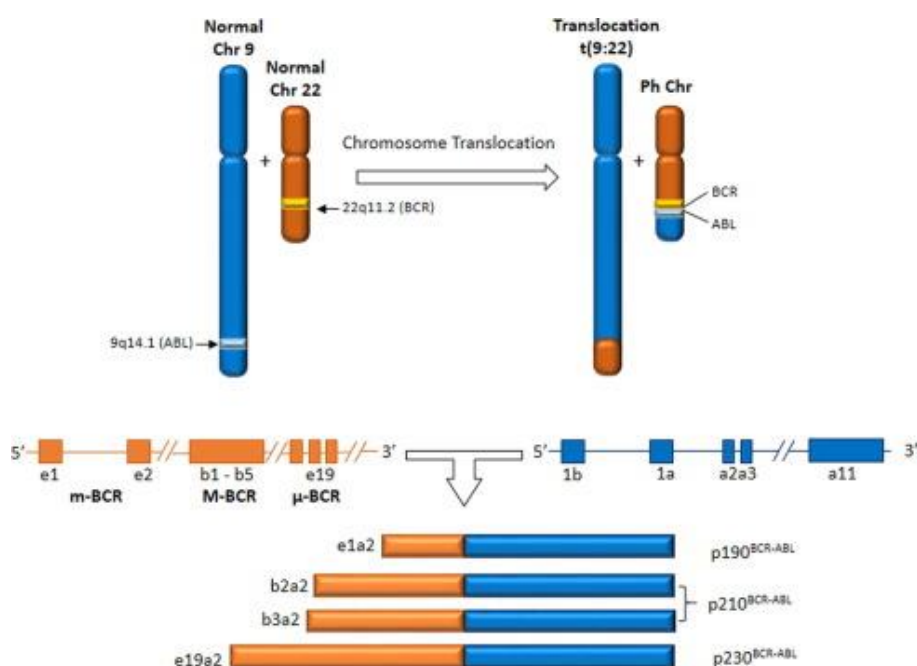


Obrázek 1: Vyobrazení čtyř stupňů organizace struktury proteinu, jmenovitě primární, sekundární, terciální a kvarterní struktura. Převzato z Wardah *et al.*, 2019.

3.1.2 Funkce proteinů

Proteiny plní v organismu mnoho různorodých funkcí, mohou mít například enzymatickou aktivitu, a to často ve spojení s různými ionty kovů jako se svými kofaktory. Mohou se podílet na transportu látek po organismu nebo dále mohou zprostředkovávat imunitní ochranu v podobě imunoglobulinů, které jsou schopny rozpoznávat antigeny (Matouš, 2010). Aby mohl být protein plně funkční, obvykle je potřebné předchozí sbalování do specifické terciální struktury (Zheng *et al.*, 2019).

Z výše uvedeného vyplývá, že při jakýchkoliv změnách týkajících se syntézy, konformace nebo koncentrace proteinů může dojít k nežádoucím fyziologickým změnám, jež se mohou projevit poruchami nebo onemocněními (Zheng *et al.*, 2017). K těmto změnám může docházet vlivem jak indukovaných, tak spontánních mutací. Příkladem takové situace je Philadelphský chromozom (viz Obrázek 2). Jedná se o abnormální lidský chromozom, který vzniká chromozomovou translokací dvou lidských chromozomů. Následně dojde k fúzi genu BCR (breaking cluster region) na chromozomu 22 a c-ABL (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) na chromozomu 9. Gen BCR-ABL kóduje protein s konstitutivně aktivovanou tyrosinkinázovou aktivitou. Odlišné fenotypy transkriptu vedou ke vzniku mírně se lišících proteinů, ale mohou také vést k různým množstvím leukemogenních proteinů a k různé citlivosti vůči tyrosinkinázovým inhibitorům (TKIs) (Avelino *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019).



Obrázek 2: Translokace (9;22) a BCR/ABL transkripty asociované s CML, AML a ALL. Převzato z Avelino *et al.*, 2017.

3.2 Proteomika

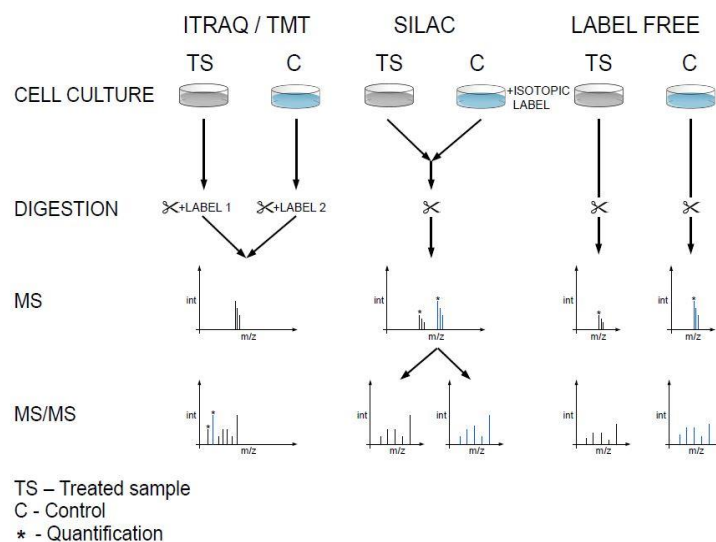
Pojmem proteomika je označován vědní obor, jež se zabývá studiem souboru všech proteinů nacházejících se v organismu. Jedním z cílů je na základě studia všech proteinů obsažených v buňce a jejich buněčné lokalizaci přiblížit biologii organismu. Dalším z cílů je měření a charakterizace exprese proteinů ve specifických tkáních a tělních tekutinách jakožto potenciálních biomarkerů (Wang *et al.*, 2008). Tyto znalosti a analýzy jsou důležité, jelikož proteiny jsou zodpovědné za mnoho procesů, které v buňkách probíhají, a studiem jednotlivých genů bychom nebyli schopni tyto mechanismy pochopit.

Před vyvinutím hmotnostní spektrometrie byla analýza proteinů založena hlavně na purifikaci jednotlivých proteinů nebo proteinových komplexů následovanou sledem experimentů (Wal *et Demmers*, 2015). Do konce 70. let byly používány především elektroforetické, chromatografické a ultracentrifugační metody. Výsledky těchto metod ovšem nebyly velmi přesné, jelikož nezávisely pouze na molekulové hmotnosti, ale také na konformaci nebo hydrofobních vlastnostech proteinu (Hoffmann *et Stroobant*, 2007). Analýzy jsou neustále vědci zdokonalovány, ovšem pro jakékoliv inovace je potřeba znát postup klasické proteomické analýzy.

Klasická proteomická analýza kombinuje separaci proteinů 2D gelovou elektroforézou s vysokým rozlišením (IEF/SDS-PAGE) s následným využitím hmotnostní spektrometrie (MS) nebo tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) pro identifikaci vybraných proteinů, které byly detekovány. Detekce se provádí specifickým barvením proteinů (Aebersold *et al.*, 2006), tento postup má však i své nevýhody, mezi které patří obtížnost extrakce méně rozpustných proteinů (membránové proteiny) a složitost reprezentace celého proteomu. Hlavní nevýhodou specifického barvení proteinů je ale rozsáhlý pracovní postup a nutnost intenzivních obrazových analýz obarvených gelů. Proto jsou preferovanější metody, u kterých není potřeba využívat gel. Častěji využívanou technikou pro separaci peptidů a proteinů je LC-MS. Separované analyty jsou detekovány a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (Tuli *et W. Resson*, 2009).

3.3 Metody kvantitativní proteomiky

Kvantitativní proteomika se stala velmi důležitou oblastí proteomiky. Jejím cílem je kvantifikovat množství proteinů nebo peptidů obsažených ve studovaném vzorku.



Obrázek 3: Princip technik značení peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie: Značení iTRAQ/TMT je založeno na isobarické značce a kvantifikace je provedena na úrovni MS/MS. Značení SILAC je založeno na metabolickém začlenění izotopické značky do buněčné kultury a kvantifikace probíhá na úrovni MS. Toto je ideální pro hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením, kde má MS obvykle větší přesnost než MS/MS. Nicméně SILAC je více méně omezen na buněčné kultury. Při kvantifikaci proteinů závisí label-free přístupy na intenzitách píku, počtu spekter, počtu peptidů a/nebo intenzitě iontových fragmentů. Převzato z Rylova *et al.*, 2015.

Získaná data poté mohou poskytovat informace o množství proteinů v buňce, množství proteinů v 1 mililitru tělní tekutiny nebo v 1 miligramu vzorku. Na základě těchto dat je poté možno provádět i porovnávání jednotlivých pracovišť (Lovric, 2011).

V praxi velmi využívanou technikou může být metoda hmotnostní spektrometrie (viz Obrázek 3). Nejdůležitějším faktorem je její velká citlivost, s čímž souvisí i schopnost identifikovat jednotlivé proteiny až na aminokyseliny pomocí iontových hmotnostních spekter (Aebersold *et Mann*, 2016), které je možné rozlišit použitím izotopového značení. Tyto značky by neměly ovlivňovat chemické a fyzikální vlastnosti, ale pouze odlišit vzorky. Spektrometr poté dokáže rozlišit hmotnostní rozdíl mezi značenou a neznačenou formou peptidu a samotné kvantifikace je dosaženo porovnáním příslušných intenzit získaných signálů (Bantscheff *et al.*, 2007).

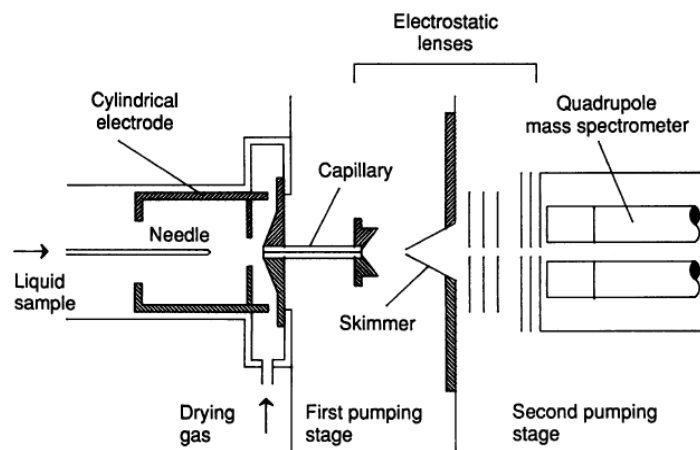
Při výběru izotopových značek přichází v úvahu hned několik možností. Metoda SILAC (Stabilní izotopové značení aminokyselinami v buněčné kultuře) využívá metabolického značení, kdy se do buněčné kultury přidají esenciální aminokyseliny značené těžkými izotopy, které se inkorporují do proteinů, a po několikanásobném buněčném dělení je označen kompletní proteom. SILAC je velice citlivou metodou, která může být využita jako kvantitativní proteomický přístup pro jakoukoliv buněčnou kulturu (Ong *et al.*, 2002).

Metoda ICAT (Izotopově kódované afinitní značky) využívá chemického značení s aplikací stabilních izotopově značených činidel, která obsahují reaktivní skupinu mířenou na cystein, ta je složena z „linker“ regionu a z biotinové skupiny, která umožňuje purifikaci označených peptidů. Nevýhodou této metody jsou nespecifické reakce a neschopnost označení peptidů, které neobsahují cysteinové zbytky (Sap *et* Demmers, 2012).

V neposlední řadě existují i metody izobarického značení: TMT (Tandemové hmotnostní značení) a iTRAQ (Izobarické značení pro relativní a absolutní kvantifikaci). U obou metod dochází k využití izobarických značek, ale označené peptidy nejsou rozeznatelné. Značky mohou být rozeznány až po fragmentaci peptidu, kdy jsou generovány reportérové fragmenty, které jsou pro každou jednu značku typické. Poměry reportérových fragmentů jsou poté chápány jako poměry peptidů ve vzorcích. Limitací těchto metod je cena a dostupnost vybavení (Lovric, 2011). Proto se v praxi uplatňuje tzv. label-free přístup, který není tak finančně náročný a složitý na provedení (Li *et al.*, 2012).

3.3.1 Metody bez využití značení (Label-free)

ESI (Electrospray ionization) je metoda, která umožňuje převod polárních molekul do iontové podoby. Metoda je schopna pokrýt širokou škálu analyzovaných vzorků, a to od malých organických a anorganických molekul až po proteiny a nukleové kyseliny (Dremann *et* Chow, 2019). Pracuje na mechanismu, kdy je vzorek vstříknut do komory pomocí jehly (viz Obrázek 4), jehla a stěny komory jsou udržovány ve stavu, který se liší v napětí několika kilovoltů, to napomáhá k vytvoření potenciálu a přímého toku kapiček vzorku. Elektrické pole na špičce jehly nabije povrch kapaliny a ta je následně rozptýlena v nabitě kapičky, které následně putují kapilárou na konec komory. Zde dochází k takzvané Coulombické explozi, což má za následek rozbití kapiček. Tento postup je opakován, dokud není poloměr zakřivení menších nabitých kapiček dostatečně malý na to, aby pole bylo dostatečně silné a bylo umožněno převést ionty z kapek do okolního plynu (Fenn *et al.*, 1989).



Obrázek 4: Schéma procesu iontové desolvace. Malé, nabité kapičky vyprodukované elektrosprejem se vypařují, čímž generují vysoké elektrické pole na povrchu kapky. Rozpuštěné molekuly analytu se mohou připojit k nábojům a být tak pomocí pole vyneseny do plynné fáze. Převzato z Fenn *et al.*, 1989.

Jak již z názvu vyplývá, u label-free metod nedochází k využívání izotopového či jiného značení. Metodou label-free jsou mezi sebou porovnávány dva či více experimentů, přičemž je využíváno dvou možných přístupů: porovnání získaného signálu po provedení hmotnostní spektrometrie, nebo využití získaných spekter, které odpovídají nějakému peptidu nebo proteinu (tzv. Spectral counting). Tyto spektra pak slouží jako ukazatele peptidového nebo proteinového množství v daném vzorku (Bantscheff *et al.*, 2007).

Metody, které nevyžívají značení, zahrnují čtyři základní kroky. Nejprve je to příprava vzorku, přesněji se jedná o extrakci proteinu, redukci, alkylation a digesci. Dalším krokem je separace vzorku a analýza pomocí LC a MS/MS. Následně je potřebná analýza získaných dat pro identifikaci, kvantifikaci a statistické ohodnocení. Posledním krokem je interpretace získaných dat (Wang *et al.*, 2008).

Ať už je vybrán jakýkoliv postup, tak po separaci proteinu a/nebo následné enzymatické digesci je směs peptidů injekčně vpravena do hmotnostního spektrometru, který je často spojen s kapalinovou chromatografií. Pro vyhodnocování získaných signálů se v praxi začal využívat data dependentní mód (DDA). Další variantou pro vyhodnocení signálů měření je data independentní mód (DIA), který využívá střídání nízké a vysoké kolizní energie (nebo iontovou izolaci) a následnou fragmentaci v definovaných m/z intervalech (Imperlini *et al.*, 2016). Na rozdíl od DIA je DDA založena na výběru peptidů s nejsilnějším signálem pro fragmentaci (He *et al.*, 2019). Porovnání identifikovaných peptidů mezi analýzami ukázalo, že míra nových identifikovaných peptidů prudce stoupá po dvou po sobě jdoucích

injekcích vzorků k analýze (Bateman *et al.*, 2014). Pro porovnatelné výsledky experimentu je potřeba zajistit, aby do analýzy bylo vždy použito stejné množství proteinu. Pro dodržení této podmínky je třeba kvantifikovat proteinový obsah ve vzorku, k čemuž slouží spektrofotometrické postupy a metody.

3.4 Stanovení koncentrace proteinů

Jednou ze základních metod pro stanovení koncentrace organických látek, proteinů nebo DNA v neznámém vzorku je UV–Vis spektrofotometrie. Spektrofotometr je složen ze zdroje záření, dále z komor, kterými záření prochází, z monochromátoru a z detektoru zaznamenávajícího množství světla, které prošlo komorami a vzorkem. Měření může probíhat v několika módech, je možné si nastavit vlnovou délku manuálně nebo je možné nechat přístroj proměřit celé spektrum. Pojem UV–Vis odpovídá rozmezí vlnových délek od 200 po 800 nm (Anderson *et al.*, 2004). UV–Vis spektrofotometrie je důležitým nástrojem, díky kterému je možno zajistit konstantní koncentraci proteinů ve vzorku (Maia *et al.*, 2020).

Základní veličinou spektrofotometrie je absorbance. Absorbance (A) je bezrozměrná veličina, která udává množství světla pohlceného vzorkem, a lze ji definovat jako:

$$A = -\log T,$$

kde T je transmitance, a poté z definice transmitance vyplývá, že

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I}$$

Dalším vyjádřením rovnice lze získat Lambert–Beerův zákon (Parnis *et al.*, 2013). Kde absorbance (A) je přímo úměrná délce dráhy (l) (např. tloušťka kyvety) a koncentraci molekuly (c), která absorbuje záření:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

kde ε je extinkční koeficient molekuly, která absorbuje záření. Jedná se o veličinu, která je pro molekulu charakteristická (Anderson *et al.*, 2004).

Aby bylo možno výsledky považovat za správné, je potřeba vytvořit kalibrační křivku ze standardů o známých koncentracích, díky které lze následně vypočítat koncentraci v neznámých vzorcích. V současné době lze pro měření koncentrace neznámého vzorku využít hned několik různých metod.

3.4.1 Bradfordova metoda

Metoda byla v roce 1976 představena Marion M. Bradfordem a jedná se o jednu ze základních metod měření koncentrace proteinů ve vzorcích.

Hlavní komponentou činidla je barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250. Bylo zjištěno, že barvivo má dvě možné formy, ve kterých se vyskytuje. První forma má hnědočervenou barvu a jedná se o stav, kdy barvivo není v interakci s proteiny. Jakmile dojde k interakci barviva s proteiny, mění se hnědočervená barva do modré, a tedy vzniká druhá forma barviva. Vysoký extinkční koeficient komplexu barvivo-protein zajišťuje vysokou citlivost při následném měření. Celkově lze metodu považovat za časově nenáročnou, jelikož délka tvorby komplexu se pohybuje okolo 2 až 5 min a zároveň je komplex stabilní asi 1 h. Jako interferenty byly identifikovány detergenty typu dodecylsírán sodný nebo Triton X-100. (Bradford, 1976).

3.4.2 Lowryho metoda

V práci zveřejněné roku 1951 Oliverem H. Lowrym je popisována po něm pojmenovaná metoda měření koncentrace proteinů v biologických vzorcích, u které je znatelný lineární průběh v rozmezí 1 až 100 μg (Lowry *et al.*, 1951).

Tato metoda je založena na provedení dvou různých reakcí. Nejprve dochází k reakci mezi měďnatými ionty a peptidovými vazbami, čímž vznikají ionty měďné. Komplex iont-protein má fialové zbarvení. V dalším kroku je přidáno Folin–Ciocalteuovo činidlo, které oxiduje volné měďné ionty na ionty měďnaté, a přitom je samo redukováno. Redukcí Folin–Ciocalteuova činidla vzniká modré zbarvení, hodnocení reakce je prováděno pomocí měření na spektrofotometru při 750 nm.

Metoda vychází z biuretové reakce, ale je asi 100x citlivější. Na druhou stranu se jedná o časově náročnější proces a je známo mnoho látek, které mohou s metodou interferovat a zkreslovat tak výsledky, mezi tyto interferenty patří detergenty, sacharidy, EDTA, Tris nebo glycerol (Olson *et Markwell*, 2007).

3.4.3 Pierce 660 nm

Pierce 660 nm patří mezi novější metody stanovení koncentrace proteinů v biologických vzorcích. Jedná se o rychlou a citlivou metodu, která není citlivá k interferentům jako jsou detergenty, redukční činidla nebo ostatní běžné reagenty, které jako interferenty působí.

Metoda je založena na vazbě komplexu polyhydroxybenzensulfonftaleinového barviva a přechodného kovu na proteiny v kyselém prostředí, což způsobuje posun absorpčního maxima komplexu ze 450 na 660 nm. Tento posun je důležitý pro vzorky obarvené bromfenolovou modří pro následnou SDS–PAGE. Komplex barviva a kovu má hnědočervenou barvu, po vazbě na protein se barva mění do zelené. Vznik zbarvení je rychlý (asi 5 min) a zbarvení je stabilní (přibližně 1 h při pokojové teplotě). Platí, že čím vyšší je koncentrace proteinů, tím je zbarvení intenzivnější (Antharavally *et al.*, 2009).

3.4.4 Bicinchoniová metoda

Metoda, která byla v roce 1985 popsána Smithem *et al.*, je založena na komplexotvorné reakci mezi solemi kyseliny bicinchoninové (BCA) a měďnými ionty. Tyto měďné ionty vznikají reakcí peptidových vazeb s měďnatými ionty, množství redukovaných měďnatých iontů odpovídá množství proteinů ve vzorku. Následně dvě molekuly bicinchoninové kyseliny chelatují s měďnými ionty, což způsobuje vznik fialového komplexu s absorpčním maximem při 562 nm. Reakce vyžaduje inkubaci při 37 °C, což zajišťuje urychlení vzniku barevného komplexu. BCA činidlo je připraveno vždy těsně před samotným experimentem, a to smícháním roztoku A a B v poměru 50:1. Jako potenciální interferenty byly určeny redukující sacharidy, EDTA nebo Triton X–100 (Smith *et al.*, 1985).

3.4.5 Fluorescence Trp

Tryptofan, jakožto hlavní zdroj vnitřní fluorescence proteinu, může také sloužit pro kvantifikaci proteinu ve vzorku. Z trojice tyrosin, tryptofan a fenylalanin je zastoupen v nejvyšším množství. Fluorescence tryptofanu je velmi citlivá a může být snižována jak přidanými látkami (tzv. zhášecí), tak i sousedními skupinami proteinu. Ovšem i tato vlastnost se dá využít při studiu struktury a funkce proteinů. Pro tuto metodu byla potřebná analýza vlastností fluorescence Trp, jako jsou změny v emisní vlnové délce a intenzitě, dále v absorpčních maximech a anizotropii s ohledem na konformační změny proteinů. Fluorescence Trp může být ovšem zeslabena několika faktory, například rezonančním přenosem energie nebo vlastnostmi okolního prostředí, jako je polarita (Ghisaidoobe *et Chung*, 2014).

3.4.6 Měření v UV

Měření v UV oblasti je standardní spektroskopická metoda založená na jedné proměnné, která se používá ke kvantifikaci proteinů ve vodných roztocích. Je založena na aplikaci Lambert–Beerova zákona na hodnoty absorbovaného UV záření, které byly získány měřením rozpuštěných proteinů. Ve většině případů je využíváno schopnosti absorpce UV záření aromatickými strukturami v reziduích tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu. Jejich spektra mohou být charakterizována dvěma maximy ve střední UV oblasti, nejvyšší intenzita je sledována při 230 nm a druhé maximum je sledováno okolo 280 nm. Metoda je použitelná pouze pro čisté roztoky proteinů, jelikož se v závislosti na množství a druhu aromatických zbytků v proteinech mění extinkční koeficient (Hansen *et al.*, 2011). Problém kvantifikace proteinů v UV oblasti může nastat v případě kontaminace vzorku nukleovými kyselinami, které působí jako interferenty měření při 280 nm (Contreras-Martos *et al.*, 2018).

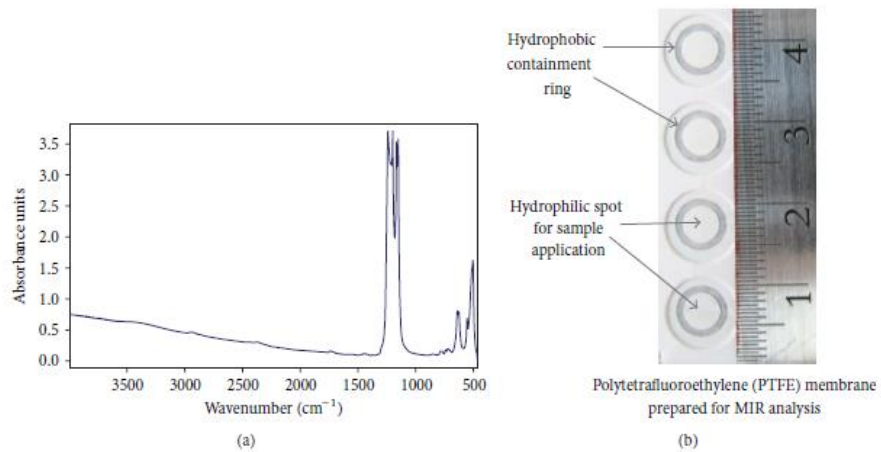
3.4.7 Měření v IČ

Infračervená spektroskopie je analytická metoda, pomocí které lze detekovat a analyzovat biomedicínsky důležité sloučeniny jako proteiny, lipidy, sacharidy nebo nukleové kyseliny. Slibnou technikou pro biomedicínské účely a diagnostiku je midinfrared (MIR) spektroskopie, která je založena na absorpci záření v rozmezí od 4 000 do 400 cm^{-1} .

Bylo identifikováno několik amidových skupin, které umožňují charakterizaci a kvantifikaci proteinů. Amidová skupina I (1 600–1 690 cm^{-1}) a Amidová skupina II (1 480–1 575 cm^{-1}) jsou považovány za nejvíce reprezentativní. Absorpci skupiny I přispívá především valenční vazba C=O (okolo 80 %) s malým přispěním valenční vazby C–N (okolo 20 %), zatímco u skupiny II je absorpce rovnoměrně rozložena mezi vazby N–H (okolo 60 %) a C–N (okolo 40 %).

Metoda představuje výhodu oproti tradičním metodám, jako jsou absorpce v UV oblasti nebo kolorimetrické metody, jelikož kvantifikace v IČ spektru je méně závislá na kompozici aminokyselin v řetězci a není citlivá k různým detergentům, redukčním činidlům nebo chelatačním činidlům, což je významný rozdíl oproti výše uvedeným metodám. Nevýhodou této metody může být vyšší cena potřebného vybavení.

Pro měření přístrojem DirectDetect jsou potřebné speciální karty (viz Obrázek 5) s polytetrafluoroethylenovými (PTFE) membránami, na které je nanášen vzorek o objemu 2 μl . Takto malý objem zabezpečuje, že infračervený paprsek prozáří celý vzorek (Strug *et al.*, 2014).



Obrázek 5: Vývoj jednorázového nosiče vzorků a optimalizace „spot“ vzoru; (a) MIR záznam PTFE membrány; (b) design vzorkovací karty umožňující zadržení analyzovaných vzorků pomocí MIR záření. Převzato ze Strug *et al.*, 2014.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Vzorky cervikálního hlenu odebrané v rámci studie BIOMER, avšak nesplňující inclusion kritéria do studie. Všechny vzorky byly odebrány na základě informovaného souhlasu pacientky.

4.2 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy SBC21 (Scaltec)
- Centrifuga ROTINA 420R (Hettich)
- Direct Detect® (Millipore)
- Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf)
- Eppendorf MiniSpin (Eppendorf)
- Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Lyofilizátor SPD131DDA (Thermo Scientific™)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH 300 (Biosan)
- MS Vortex Incubator (Major Science)
- pH metr UltraBasic UB-10 (Denver Instruments)
- Sonopuls (Bandelin)
- Sonorex (Bandelin)
- Spektrofotometr EnSpire® (PerkinElmer)
- Třepačka Reax control (Heidolph)
- Vodní vyhřívání lázeň SUB Aqua 12 Plus (Grant)
- Vyhřívání termostat Bio TDB-100 (Biosan)
- Zásobník deionizované vody Milli-Q (Millipore)

4.3 Software

- DirectDetect™, verze 2.0.0.28
- EnSpire Manager, verze 4.10.3005.1440
- Microsoft® Excel®, verze 16.0.11929.20436

4.4 Chemikálie

- Acetonitril (Merck Millipore, kat. č. 100029)
- Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, kat. č. B6916)
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, kat. č. D9779)
- Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 71729)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, kat. č. A7906)
- Hydrogenuhličitan amonný (Sigma-Aldrich, kat. č. 09830)
- Jodacetamid (Sigma-Aldrich, kat. č. I1149)
- Kyselina octová (Fluka; Sigma-Aldrich, kat. č. 49199)
- Methanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.06035)
- Močovina (Sigma-Aldrich, kat. č. U5378)
- MS voda (Merck Millipore)
- Pierce™ kyselina trifluoroctová (Thermo Scientific™, kat. č. 85183)
- Pierce® 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific™, kat. č. 22660)
- Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific™, kat. č. 23223)
- Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific™, kat. č. 23224)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (SERVA, kat. č. 37180)
- Trypsin (Promega, kat. č. V507A)
- Tryptofan (závod Khimreaktivkomplekt)

4.5 Soupravy

- Pre-Diluted Protein Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set (Thermo Scientific™, kat. č. 23208)

4.6 Roztoky

- FASP lyzační pufr (4% SDS, 0,1 mol.l⁻¹ dithiothreitol v 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,6)

4.7 Použité experimentální a vyhodnocující postupy

Pro kvantifikaci obsahu proteinů byly použity dva modelové systémy. K vytvoření kalibrační křivky, která sloužila pro výpočet koncentrací v našich vzorcích, byly využity standardy o známých koncentracích. Byly použity vzorky BSA o koncentraci 500 µg.ml⁻¹ a BSA po digesci a dále vzorky cervikálního hlenu. Dva vzorky cervikálního hlenu (č. 2 a č. 3) byly lyofilizované a další tři vzorky (č. 10, č. 12 a č. 14) byly rozpuštěny ve FASP lyzačním pufru. Po provedení měření byla u vzorků taktéž provedena digestce.

4.7.1 Modelový systém hovězího sérového albuminu

Pro srovnání se systémem využívajícím vzorky cervikálního hlenu (viz 4.6.2 Modelový systém cervikálního hlenu) byl použit jak vzorek BSA ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), tak vzorek po digesci. Vzorek získaný odpařením byl rozpuštěn ve $100 \mu\text{l}$ deionizované vody, následně z něj byl odebrán $1 \mu\text{l}$ a doplněn vodou do $100 \mu\text{l}$.

4.7.1.1 In solution digesce hovězího sérového albuminu

Do mikrozkušavky bylo napipetováno $100 \mu\text{l}$ roztoku proteinu. V dalším kroku bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ acetonitrilu, $200 \mu\text{l}$ $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenuhličitanu amonného a $50 \mu\text{l}$ $65\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dithiothreitolu. Následovala inkubace při 57°C po dobu 30 min a po uplynutí inkubační doby bylo ke vzorku přidáno $50 \mu\text{l}$ $135\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ jodacetamidu a vzorek byl inkubován po dobu 1 h ve tmě. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno $200 \mu\text{l}$ hydrogenuhličitanu amonného a $20 \mu\text{l}$ trypsinu o koncentraci $0,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Následovala inkubace vzorku při 37°C přes noc. Obsah zkumavky byl přenesen do zkumavky druhé a byl odpařen, následně byl obsah rozpuštěn ve $100 \mu\text{l}$ deionizované vody. Digescí bylo získáno $0,606 \text{ mg}$ peptidu.

4.7.1.2 Metoda BCA

Do 96 jamkové destičky byly napipetovány komerční standardy BSA a jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardy ($125\text{--}2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) i voda byly nanášeny ve dvou opakováních do sousedních jamek po $25 \mu\text{l}$. Vzorky byly nanášeny ve třech opakováních do sousedních jamek po $25 \mu\text{l}$. BCA činidlo bylo vytvořeno smícháním roztoku A a B (50:1) a bylo postupně přidáno do všech obsazených jamek po $200 \mu\text{l}$. Destička byla inkubována po dobu 30 min ve 37°C a následně byla změřena absorbance při 562 nm . V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice grafu byly vypočítány neznámé koncentrace.

4.7.1.3 Bradfordova metoda

Do 96 jamkové destičky byly napipetovány komerční standardy BSA, jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardy ($125\text{--}2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), voda i vzorky byly napipetovány do destičky po $5 \mu\text{l}$ ve stejném pořadí jako u metody BCA. Činidlo bylo postupně přidáno do všech obsazených jamek po $250 \mu\text{l}$. Následně byla destička inkubována po dobu 10 min při pokojové teplotě a byla změřena absorbance při 595 nm . V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice grafu byly vypočítány neznámé koncentrace.

4.7.1.4 Metoda měření fluorescence tryptofanu

Pro tuto metodu byly v laboratoři vytvořeny standardy pro kalibrační křivky BSA i tryptofanu. Koncentrace standardů BSA zůstala nezměněna od předchozích metod, ale koncentrace standardů tryptofanu byla v rozmezí $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ až $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro výpočet celkového obsahu proteinů v lidských vzorcích totiž platí, že jeden gram celkového proteinu odpovídá 0,0117 g Trp (Wiśniewski *et* Gaugaz, 2015). Standardy byly připraveny do objemu 1 ml. Do 96 jamkové destičky byly do prvních dvou sloupců napipetovány standardy BSA a blank po 200 μl . Do sloupců 3 a 4 byly napipetovány standardy tryptofanu a blank také po 200 μl . Do prvních dvou řádků sloupců 5 a 6 byly napipetovány vzorky o neznámé koncentraci pod sebe. Destička byla změřena při 295 nm a vyhodnocení bylo provedeno v programu Excel. Byla vytvořena kalibrační křivka pro standardy BSA, i pro standardy tryptofanu.

4.7.1.5 Metoda Pierce 660 nm

Do 96 jamkové destičky byly opět napipetovány komerční standardy BSA a jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardy ($125\text{--}2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), voda i vzorky byly napipetovány do destičky po 10 μl ve stejném pořadí jako u metody BCA. Činidlo bylo postupně přidáno do všech obsazených jamek po 150 μl . Následně byla destička 1 min míchána a poté inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě a byla změřena absorbance. V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice grafu byly vypočítány neznámé koncentrace.

4.7.1.6 Měření v IČ (Direct Detect)

Byly využity komerční standardy BSA ($125, 500, 1\,000$ a $2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), vzorky zředěné 100x, 50x a 20x a jako blank byla použita deionizovaná voda. 2 μl vzorku byly nanášeny na speciální karty a po vysušení byly vloženy do přístroje pro změření koncentrace.

4.7.2 Modelový systém cervikálního hlenu

4.7.2.1 Příprava vzorků

Prvním typem vzorků byly vzorky lyofilizované. Vzorky cervikálního hlenu (č. 2 a č. 3) byly z mrazu ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) přeneseny do předem vychlazeného lyofilizátoru. Proces lyofilizace trval do druhého dne, kdy byly následně vzorky zváženy a rozpuštěny ve 300 μl deionizované vody. Ovšem vzorky nebylo možno rozpustit ve vodě ihned, ale až po použití ultrazvuku. Vzorek č. 3 nebylo při práci možno použít, jelikož byl silně hemolytický. Vzorek č. 2 (získáno 1,92 mg po lyofilizaci) byl po použití ultrazvuku připraven k dalšímu použití.

Dalším druhem vzorků byly vzorky cervikálního hlenu rozpuštěné ve FASP lyzačním puftru. Po vyjmutí vzorků z mrazu a jejich následném rozmrazení byly vzorky stočeny ve stolní centrifuze. Jelikož jsou v lyzačním puftru obsaženy detergenty, které mohou interferovat při měření, bylo potřeba pro některé metody vzorky naředit.

4.7.2.2 Metoda BCA

Nejprve bylo potřeba vzorky naředit 100x, aby nedošlo k interferenci. Do 96 jamkové destičky byly napipetovány komerční standardy BSA ($125\text{--}2\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardy i voda byly nanесeny ve dvou opakováních do sousedních jamek po 25 μl . Vzorky byly nanесeny ve dvou opakováních do sousedních jamek po 25 μl . BCA činidlo bylo vytvořeno smícháním roztoku A a B (50:1) a bylo postupně přidáno do všech obsazených jamek po 200 μl . Destička byla inkubována po dobu 30 min ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně byla změřena absorbance při 562 nm. V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice grafu byly vypočítány neznámé koncentrace.

4.7.2.3 Bradfordova metoda

Do 96 jamkové destičky byly opět napipetovány standardy BSA ($125\text{--}2\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardy, voda i vzorky byly napipetovány do destičky po 5 μl ve stejném pořadí jako u metody BCA. Pro tuto metodu bylo potřeba vzorky ředit 40x. Činidlo bylo postupně přidáno do všech obsazených jamek po 250 μl . Následně byla destička inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě a byla změřena absorbance při 595 nm. V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice grafu byly vypočítány neznámé koncentrace.

4.7.2.4 Metoda měření fluorescence tryptofanu a měření UV

Pro tuto metodu byly v laboratoři vytvořeny standardy pro kalibrační křivky BSA i tryptofanu. Koncentrace standardů BSA zůstala nezměněna od předchozích metod ($125\text{--}2\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ale koncentrace standardů tryptofanu byla v rozmezí od $1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $20\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, tedy asi 1% vůči standardům BSA. Standardy byly připraveny v objemu 1 ml. Do 96 jamkové destičky byly do prvních dvou sloupců napipetovány standardy BSA a blank po 200 μl . Do sloupců 3 a 4 byly napipetovány standardy tryptofanu a blank také po 200 μl . Vzorky cervikálního hlenu byly zředěny 2x a byly napipetovány pouze v jednom opakování po 200 μl . Destička byla změřena při 295 nm a následně při 260 a 280 nm. Vyhodnocení bylo provedeno v programu Excel. Pro fluorescenci Trp byla vytvořena kalibrační křivka standardů BSA i standardů tryptofanu.

4.7.2.5 Metoda Pierce 660 nm (Činidlo pro kompatibilitu s ionogenními detergenty pro Pierce™ 660 nm)

Jelikož bylo využito činidlo pro kompatibilitu s ionogenními detergenty, byly vzorky ředěny jen 2x. Do 96 jamkové destičky byly opět napipetovány komerční standardy BSA ($125\text{--}2\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a jako blank byla použita deionizovaná voda. Standardy, voda i vzorky byly napipetovány do destičky po 10 μl ve stejném pořadí jako u metody BCA. Činidlo bylo postupně přidáno do všech obsazených jamek po 150 μl . Následně byla destička míchána 1 min, poté inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě a byla změřena absorbance. V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a pomocí rovnice grafu byly vypočítány neznámé koncentrace.

4.7.2.6 Měření v IČ spektru

Měření bylo provedeno na přístroji DirectDetect®. Pro tuto metodu byly využity 2x ředěné vzorky a jako blank byla použita deionizovaná voda. Vzorky o objemu 2 μl byly nanášeny na speciální karty a po vysušení byly vloženy do přístroje pro změření koncentrace.

4.7.2.7 Štěpení proteinů ze vzorků cervikálního hlenu na membráně (FASP)

Pro štěpení proteinů byly využity membránové filtry Millipore Microcon 30. Na membránu bylo nanášeno 64,4 μg peptidu z každého vzorku (k výpočtu byla použita metoda Pierce 660 nm) s 200 μl $8\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močoviny v $0,1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl pH 8,5 (dále jen UA) a následně byly centrifugovány při 14 000 g 15 min. Dále bylo přidáno 200 μl UA a zkumavky byly opět centrifugovány při 14 000 g 15 min. Po vyjmutí zkumavek z centrifugy byl vylit obsah, který protekl filtrem. Na filtry bylo přidáno 100 μl jodacetamidu a zkumavky byly

protřepány a inkubovány ve tmě 20 min. Zkumavky byly stočeny při 14 000 g 10 min. Poté bylo přidáno 100 μl UA a zkumavky byly stočeny při 14 000 g 15 min. Tento krok byl proveden 2x. V dalším kroku bylo přidáno 100 μl Tris/HCl pH 8,5 a zkumavky byly stočeny při 14 000 g 10 min a tento krok byl opakován 2x. Následně bylo na filtr přidáno 100 μl ABC a opět byly zkumavky centrifugovány 10 min při 14 000 g. Po posledním kroku bylo na filtry přidáno 38 μl 50mmol.l⁻¹ ABC a 2 μl 50 ng. μl^{-1} trypsinu a zkumavky byly inkubovány přes noc ve vodní komoře při 37 °C. Další den byly zkumavky vyjmuty z komory a byly centrifugovány při 14 000 g 10 min. Dále bylo přidáno 40 μl ABC a následovala centrifugace při 14 000 g 10 min. Koncentrace peptidů po digesci byla zjištěna pomocí BCA metody.

4.7.2.8 Přečištění směsi peptidů ze vzorků cervikálního hlenu po digesci

Pro přečištění vzorků byla využita metoda Stage Tip. Kolonky byly aktivovány přidáním 100 μl metanolu a centrifugací při 3 000 g 2 min. Následoval přidavek 100 μl 80% ACN, 0,1% AA na kolonky a centrifugace při 3 000 g 2 min. Dále byly kolonky propláchnuty 100 μl AA s následnou centrifugací se stejnými parametry jako v předchozích krocích. V dalším kroku byly nanесeny vzorky s obsahem 10 μg proteinu a opět proběhla centrifugace. Poté byly kolonky propláchnuty 100 μl 0,1% AA a zcentrifugovány. Kolonky byly přeneseny do nových zkumavek a následovala eluce 100 μl 80% ACN, 0,1% AA. Zkumavky byly poté odpařeny a obsah jednotlivých zkumavek byl rozpuštěn v 50 μl 0,1% TFA. Takto připravené vzorky byly připraveny pro testování pomocí hmotnostního spektrometru, které již nebylo součástí experimentální části práce.

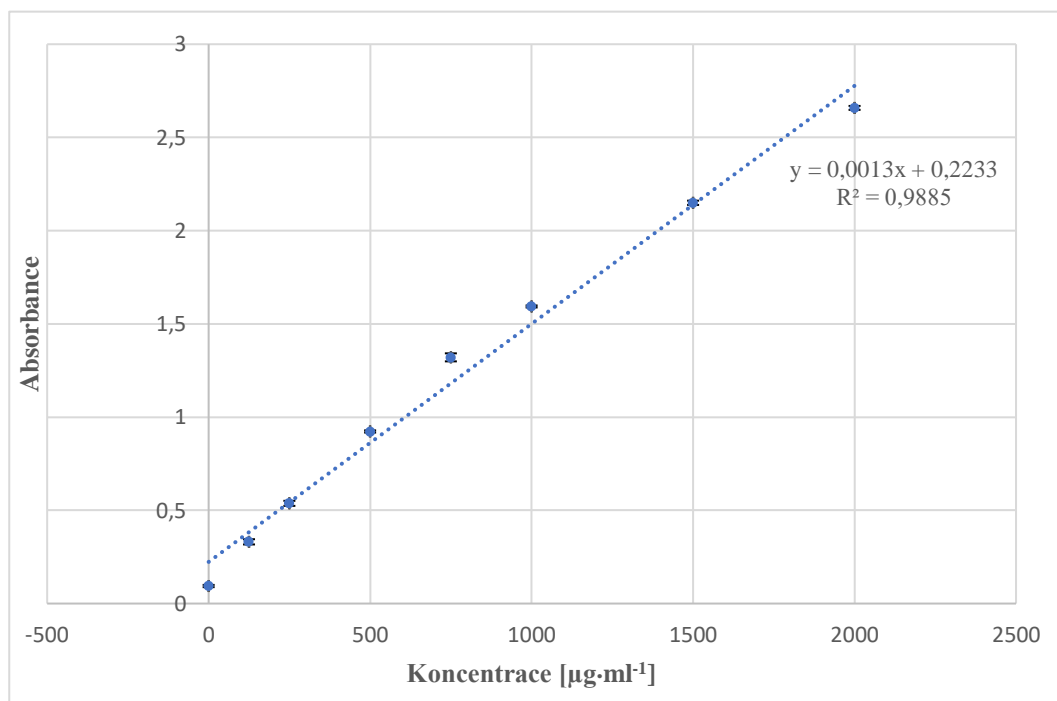
5 VÝSLEDKY

U obou modelových systémů byl použit stejný postup vyhodnocování výsledků pro jejich vzájemné porovnání. Po každém proměření vzorku byly data přeneseny do programu Microsoft Excel, kde byla následně vytvořena kalibrační křivka standardů BSA nebo Trp. Podle vygenerované rovnice regrese byla vypočítána koncentrace neznámých vzorků a do grafu byly vneseny chybové úsečky. Jelikož byly některé vzorky ředěny, bylo nutné výsledky převést na neředěné hodnoty s využitím znalosti faktoru ředění.

5.1 Modelový systém hovězího sérového albuminu

5.1.1 Metoda BCA

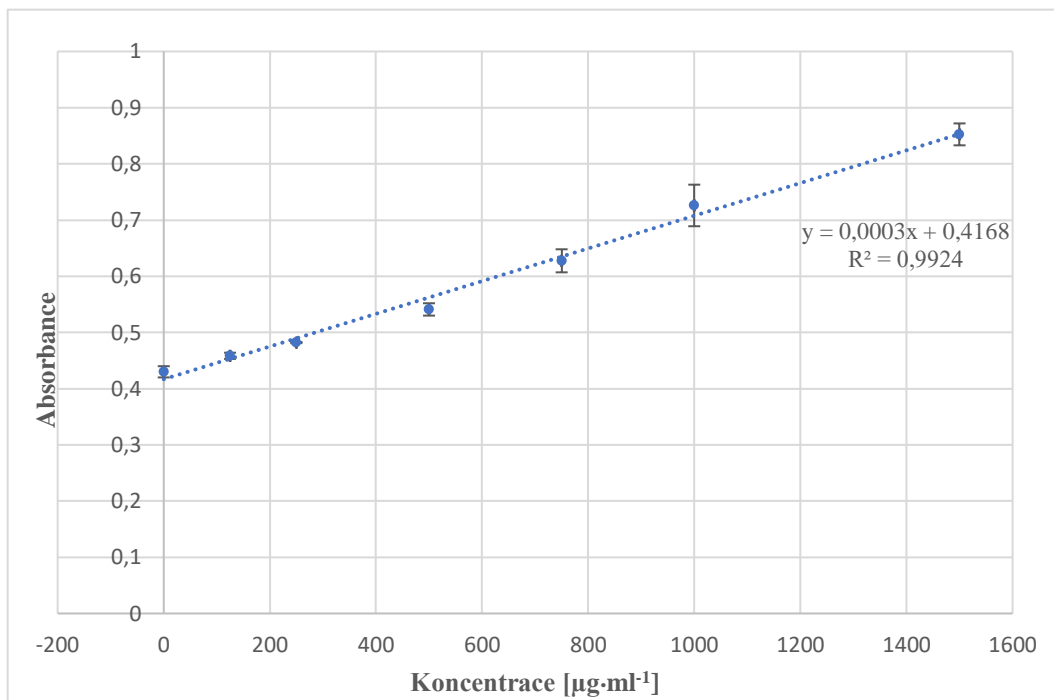
Koncentrace BSA ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla stanovena na $616,69 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pomocí kalibrační křivky a rovnice regrese (viz Obrázek 6) a koncentrace vzorku po digesci byla stanovena na $163,35 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Tabulka 2).



Obrázek 6: Kalibrační křivka metody BCA získaná měřením absorbance standardů BSA ($0\text{--}2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 560 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

5.1.2 Metoda Bradfordova

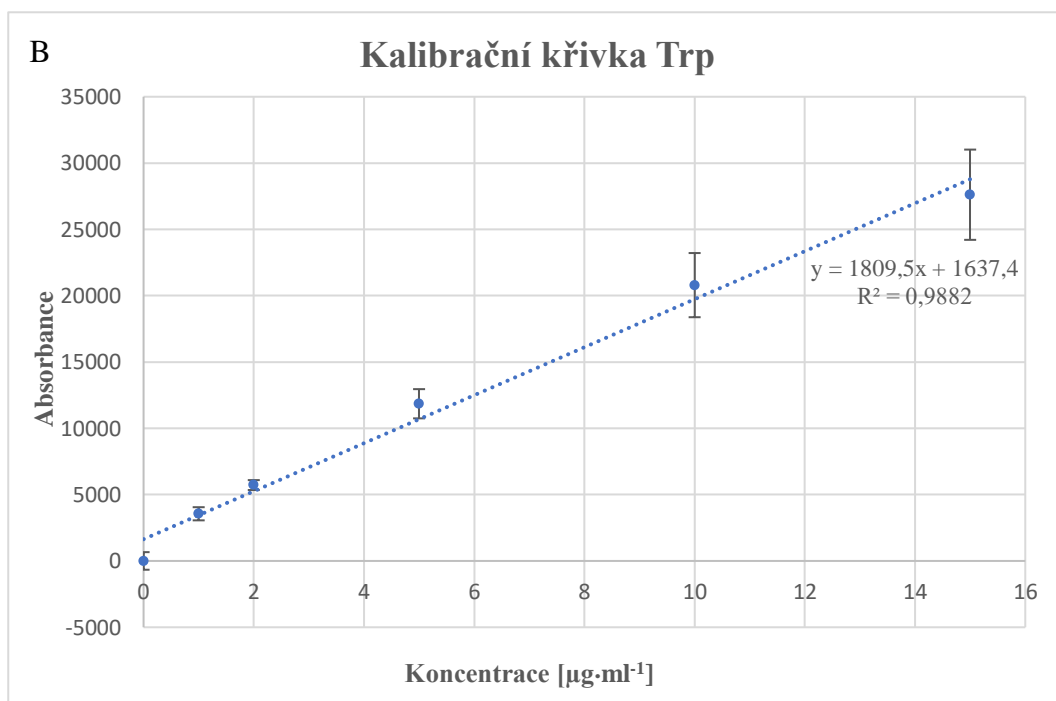
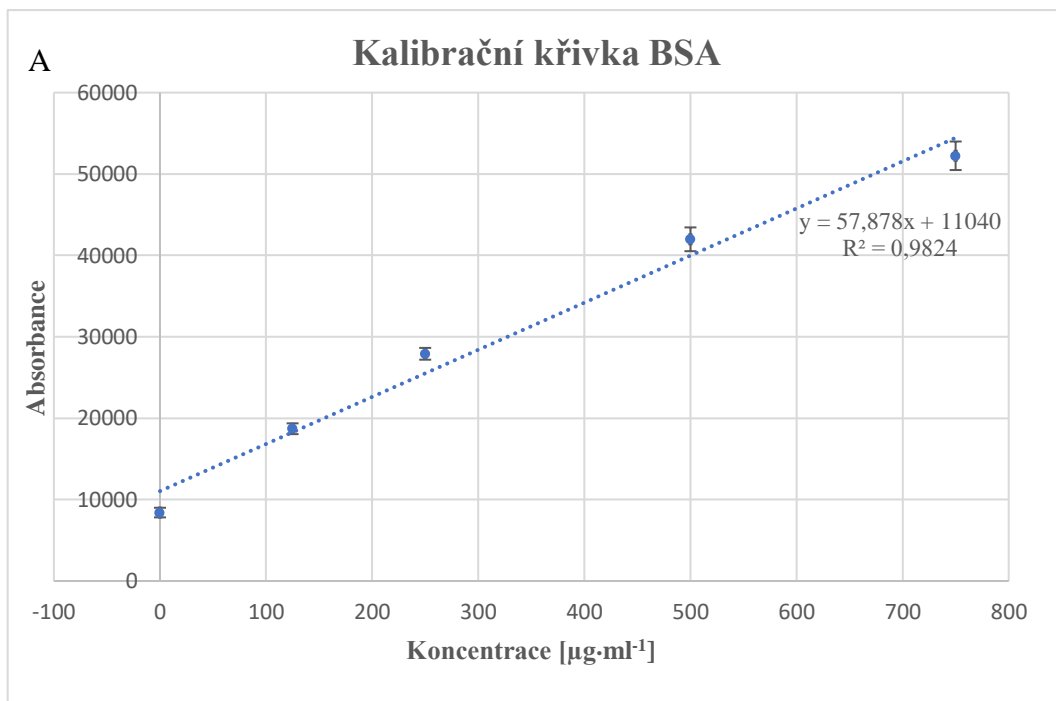
Pro vzorek BSA o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla naměřena koncentrace $548,44 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pomocí kalibrační křivky a rovnice regrese (viz Obrázek 7) a pro vzorek po digesci byla získána koncentrace $85,11 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Tabulka 2).



Obrázek 7: Kalibrační křivka Bradfordovy metody získaná měřením absorbance standardů BSA ($0\text{--}1\ 500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 595 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

5.1.3 Metoda měření fluorescence tryptofanu

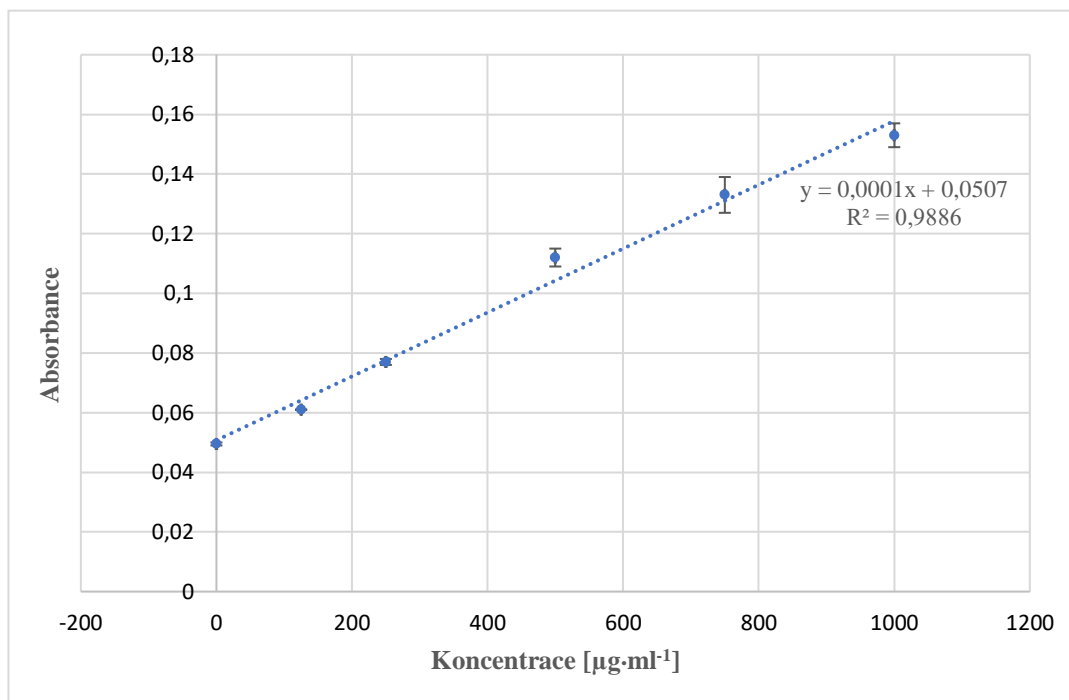
Z důvodu začínající saturace nebyly do kalibrační křivky BSA zahrnuty hodnoty nad $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, ze stejného důvodu nebyla do kalibrační křivky Trp zahrnuta hodnota $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty koncentrací získané pomocí standardů BSA byly $449,57 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u vzorku BSA o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $17,74 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u BSA po digesci. Hodnoty koncentrací z měření standardů Trp byly stanoveny na $1\ 268,82 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u vzorku BSA o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $88,26 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u BSA po digesci (viz Tabulka 2 a Obrázek 8). U kalibrační křivky Trp bylo potřeba provést další přepočítání. Pro výpočet koncentrace neznámého vzorku bylo potřeba počítat s hodnotou $0,0117 \text{ g}$ tryptofanu, jelikož odpovídá průměrnému zastoupení v jednom gramu proteinu ve vzorku.



Obrázek 8: Kalibrační křivky získané měřením fluorescence standardů BSA v rozmezí koncentrací 0–750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A) a standardů Trp v rozmezí koncentrací 0–15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (B) při 295 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

5.1.4 Metoda Pierce 660 nm

Z důvodu začínající saturace nebyly do grafu zahrnuty hodnoty koncentrací standardů BSA nad 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro BSA o koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla výsledná hodnota stanovena na 925,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u BSA po digesci na 42,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Tabulka 2 a Obrázek 9).



Obrázek 9: Kalibrační křivka metody Pierce 660 nm získaná měřením absorbance standardů BSA (0–750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 660 nm pro modelový systém hovězího sérového albuminu.

5.1.5 Metoda měření v IČ spektru

Pro měření v infračerveném spektru byl využit přístroj DirectDetect® a měřením bylo zjištěno, že detekční limit přístroje se pohybuje okolo koncentrace 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorek po digesci byl nejprve ředěn 100x, ale koncentraci vzorku nebylo možno změřit, jelikož byla pod detekčním limitem. Z tohoto důvodu byl vzorek ředěn 20x a 50x (viz Tabulka 1 a 2).

Tabulka 1: Průměrné hodnoty koncentrací [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] získaných měření v IČ spektru.

Standardy [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]				Vzorky [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]			
125	500	1 000	2 000	500	Digest (100x)	Digest (50x)	Digest (20x)
0,00	450	1 129	2 102	479	0,00	177	589

5.1.6 Porovnání použitých metod pro modelový systém hovězího sérového albuminu

Tabulka 2: Souhrn výsledků měření jednotlivých výše uvedených metod.

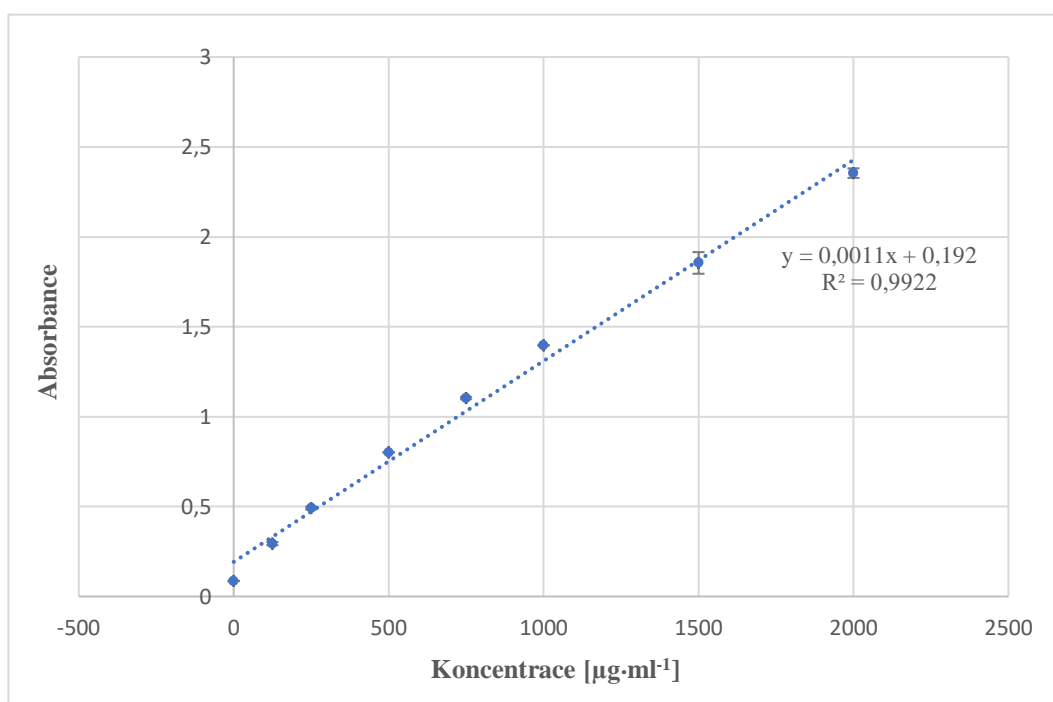
Metoda	Koncentrace BSA 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace vzorku po digesci [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
BCA	616,69	163,35
Bradfordova	548,44	85,11
Fluorescence	449,57	17,74
BSA		
Fluorescence	1 268,82	88,26
Trp		
Pierce 660 nm	925,33	42,00
DirectDetect	479,00	177,00 (50x zředěný vzorek) 589,00 (20x zředěný vzorek)

5.2 Modelový systém cervikálního hlenu

Výsledky jednotlivých měření u tohoto systému byly více rozptýlené než u předchozího modelu. Tento fakt vychází ze skutečnosti, že se jedná o složitější a komplexnější systém, než je model s hovězím sérovým albuminem. Všechny výsledné koncentrace byly přehledně zapsány do Tabulky 4.

5.2.1 Metoda BCA

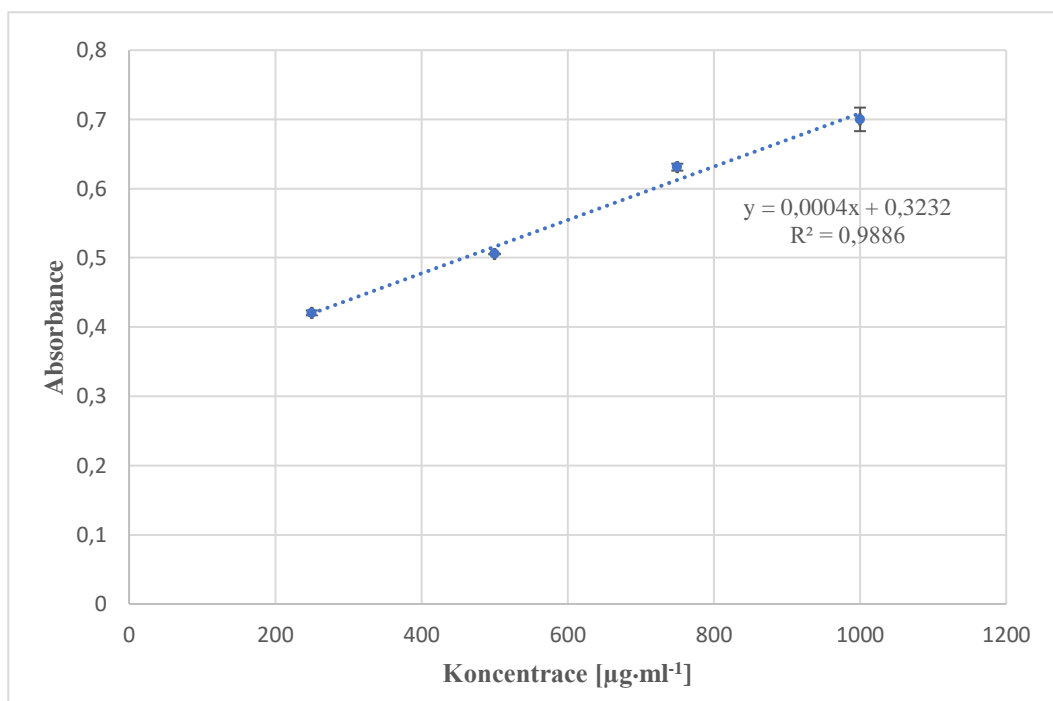
Koncentrace jednotlivých vzorků byly metodou stanoveny na $-7\,363,64\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u vzorku č. 2; $2\,909,09\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u vzorku č. 10; $1\,954,54\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u vzorku č. 12 a $-4\,500\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u vzorku č. 14 (viz Tabulka 4 a Obrázek 10).



Obrázek 10: Kalibrační křivka metody BCA získaná měřením absorbance standardů BSA (0–2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 560 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

5.2.2 Metoda Bradfordova

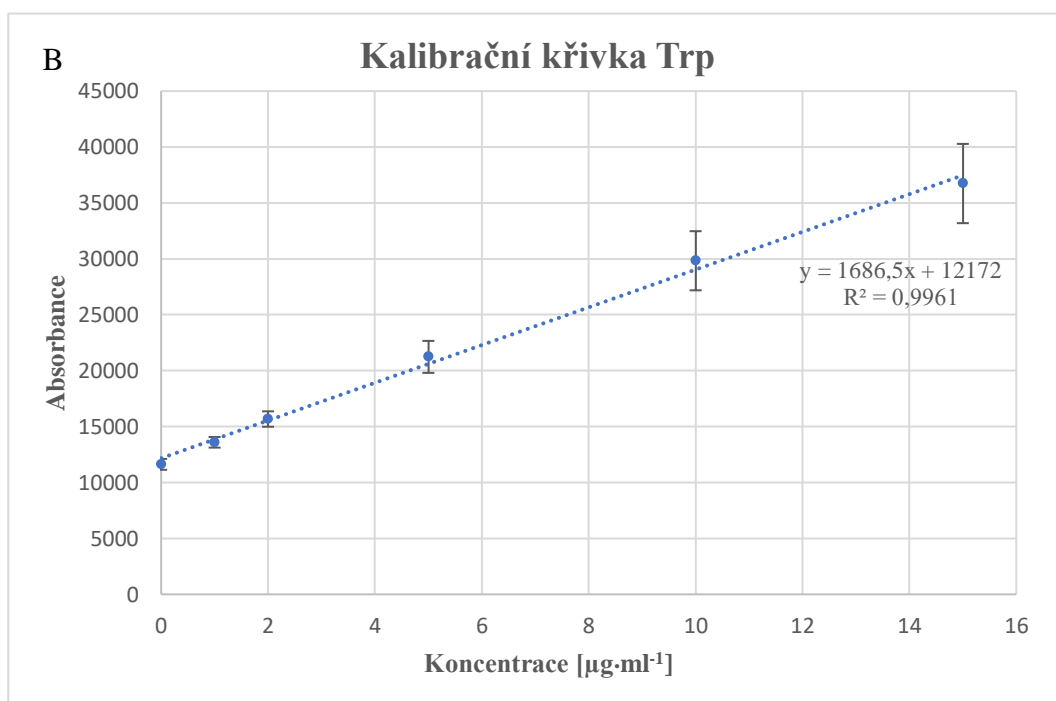
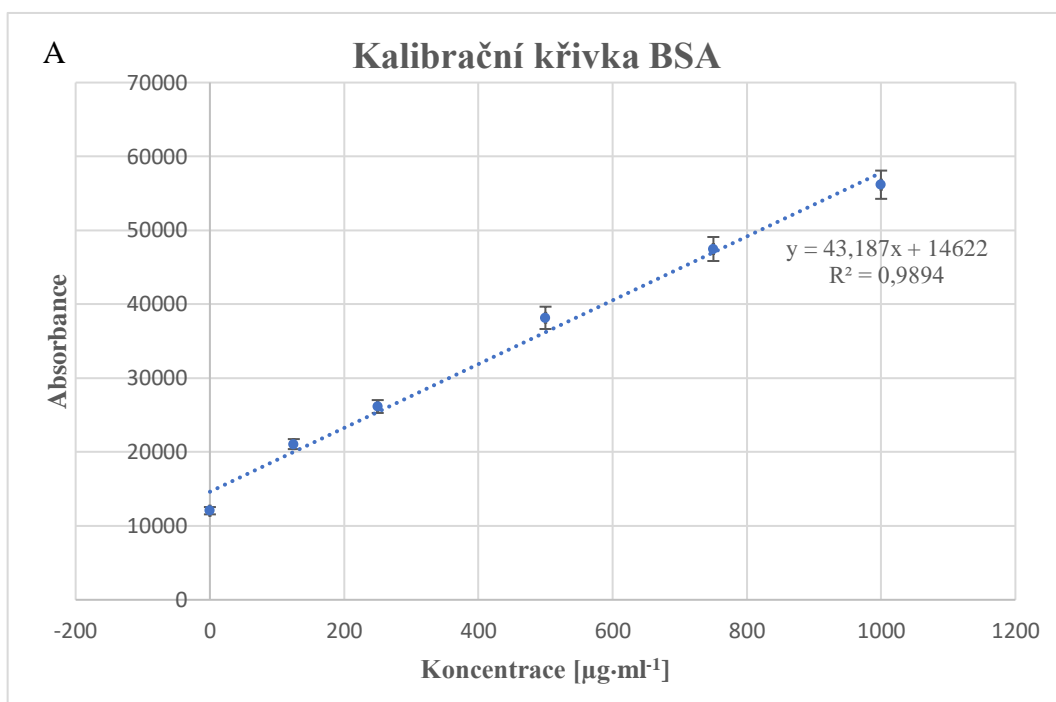
Z důvodu začínající saturace byly pro tvorbu křivky použity koncentrace od $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledné hodnoty koncentrací byly stanoveny na $4\,630 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 2; $4\,580 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 10; $4\,980 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 12 a $6\,430 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 14 (viz Tabulka 4 a Obrázek 11).



Obrázek 11: Kalibrační křivka Bradfordovy metody získaná měřením absorpance standardů BSA ($250\text{--}1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 595 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

5.2.3 Metoda měření fluorescence tryptofanu

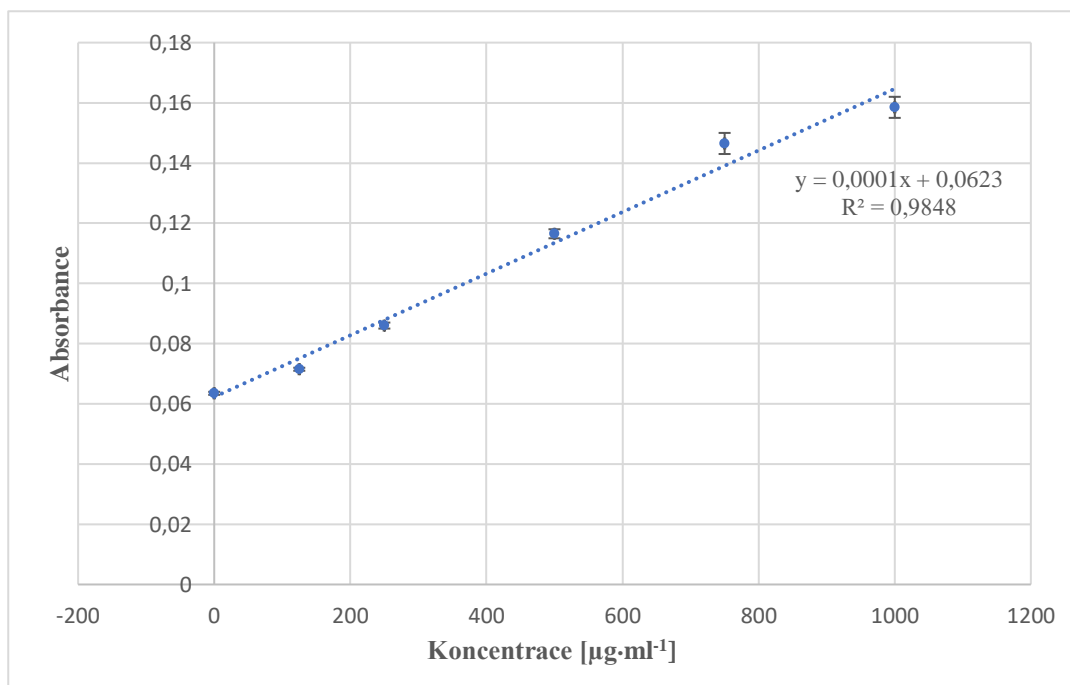
Podobně jako v případě Bradfordovy metody se projevila začínající saturace a do kalibrační křivky BSA tak nebyly zahrnuty hodnoty nad $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, ze stejného důvodu nebyla do kalibrační křivky Trp zahrnuta hodnota $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledky měření jsou znázorněny v tabulce 4. U kalibrační křivky Trp bylo potřeba provést další přepočítání, jelikož pro výpočet koncentrace neznámého vzorku bylo nutné opět počítat s $0,0117 \text{ g}$ tryptofanu na gram proteinového obsahu ve vzorku. Hodnoty koncentrací pro neznámé vzorky byly s využitím kalibrační křivky BSA stanoveny na $2\,017,68 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 2; $-644,50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 10; $-509,24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 12 a $-292,95 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 14. S využitím kalibrační křivky Trp byly získány hodnoty $4\,664,37 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 2; $-1\,162,28 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 10; $-866,24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 12 a $-392,84 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 14 (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Kalibrační křivky získané měřením fluorescence standardů BSA v rozpětí koncentrací 0–1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A) a standardů Trp v rozpětí koncentrací 0–15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (B) při 295 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

5.2.4 Metoda Pierce 660 nm (Činidlo pro kompatibilitu s ionogenními detergenty Pierce™ 660 nm)

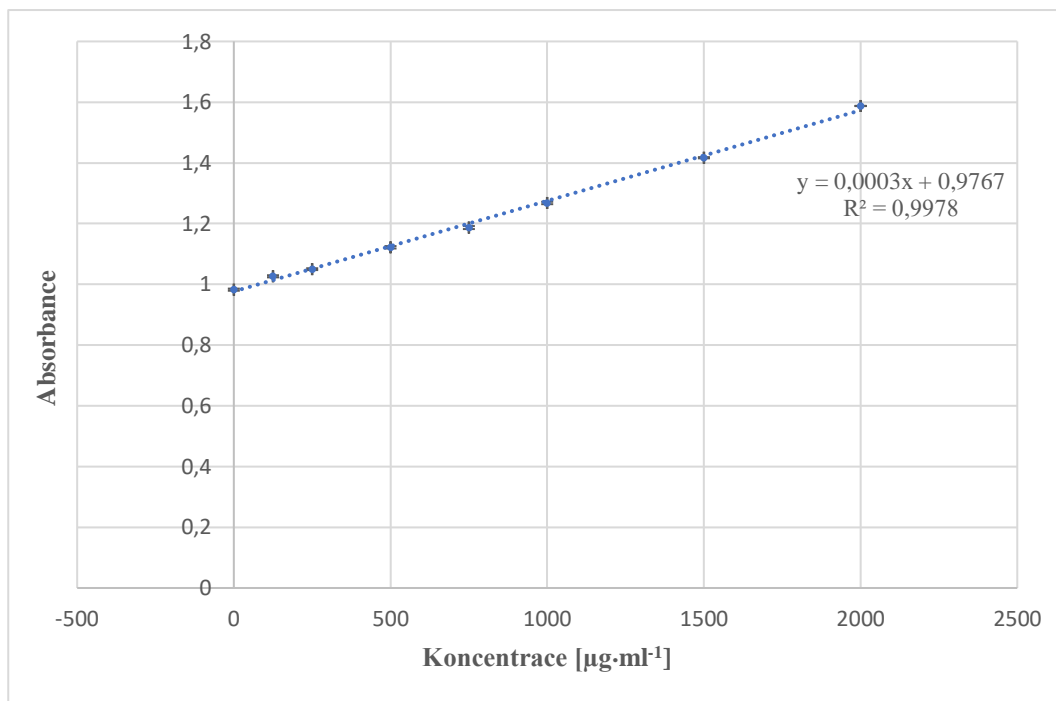
Z důvodu začínající saturace nebyly do grafu vneseny hodnoty nad 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V tomto experimentu bylo zároveň využito činidlo kompatibilní s ionogenními detergenty Pierce™ 660 nm, a to z důvodu přítomných interferujících látek v pufru. Díky tomuto zdokonalení nebylo nutno vzorek příliš ředit. Jednotlivé hodnoty koncentrací byly stanoveny na 644 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 2; 944 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 10; 1 674 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 12 a 1 934 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro vzorek č. 14 (viz Tabulka 4 a Obrázek 13).



Obrázek 13: Kalibrační křivka metody Pierce 660 nm získaná měřením absorbance standardů BSA ($0\text{--}750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 660 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

5.2.5 Metoda měření v UV spektru

Výsledky měření v UV spektru byly pravděpodobně zkresleny u vzorků č. 10, 12 i 14, a to kontaminací DNA. Pravděpodobně z tohoto důvodu byly naměřeny níže uvedené hodnoty (viz Tabulka 4). Kalibrační křivka a rovnice regrese byly získány měřením standardů BSA od 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Obrázek 14).



Obrázek 14: Kalibrační křivka získaná měřením absorbance standardů BSA (0–2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) při 280 nm pro modelový systém cervikálního hlenu.

5.2.6 Měření v IČ spektru

Výsledky měření jednotlivých vzorků v IČ spektru byly velice rozptýlené. U vzorků č. 10 a vzorku č. 12 nebylo možno koncentrace změřit, jelikož se pravděpodobně nacházely pod detekčním limitem přístroje (viz Tabulka 3 a 4).

Tabulka 3: Hodnoty koncentrací neřaděných vzorků získaných měřením v IČ spektru.

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]				
Metoda	Vzorek č. 2	Vzorek č. 10	Vzorek č. 12	Vzorek č. 14
DirectDetect	2 480,00	0,00	0,00	224,00

5.2.7 Porovnání použitých metod pro modelový systém cervikálního hlenu

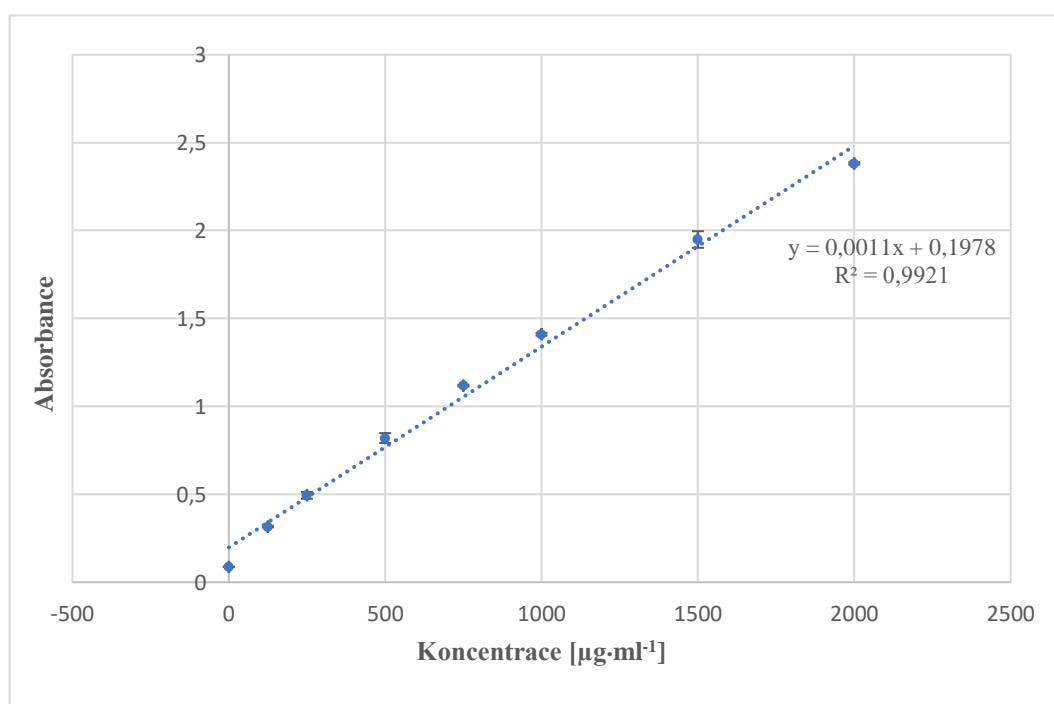
Tabulka 4: Souhrn výsledků jednotlivých výše popsaných metod měření.

Metoda	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]			
	Vzorek č. 2	Vzorek č. 10	Vzorek č. 12	Vzorek č. 14
BCA	-7 363,64	2 909,09	1 954,54	-4 500
Bradfordova	4 630,00	4 580,00	4 980,00	6 430,00
Fluorescence	2017,68	-644,50	-509,24	-292,95
BSA				
Fluorescence	4 664,37	-1 162,28	-866,24	-392,84
Trp				
Pierce 660 nm	644,00	944,00	1 674,00	1 934,00
UV	4 255,33	29 868,67	29 868,67	29 868,66
Direct Detect	2 480,00	0,00	0,00	224,00

5.2.8 Měření koncentrace proteinového obsahu ve vzorku po provedení metody FASP.

Po provedení FASP metody bylo potřeba změřit koncentraci získaných peptidů ve vzorcích pro jejich následné přečištění a analýzu hmotnostní spektrometrií. Hodnoty koncentrací (viz Tabulka 5) byly získány metodou BCA, jelikož se jedná o metodu kompatibilní s řadou detergentů, které jsou často používány v proteinových analýzách, a je vhodná pro většinu typů studovaných vzorků.

Byla vytvořena kalibrační křivka a s využitím rovnice regrese (viz Obrázek 15) byly vypočítány koncentrace.



Obrázek 15: Kalibrační křivka metody BCA získaná měřením absorbance standardů BSA (0–2 000 µg·ml⁻¹) při 560 nm po provedení FASP.

Tabulka 5: Koncentrace vzorků proteinů po digesci získané metodou BCA.

Vzorek	Koncentrace vzorku [µg·ml ⁻¹]
č. 2	644,72
č. 10	161,09
č. 12	242,00
č. 14	433,81

6 DISKUZE

Biomedicínský výzkum obecně napomáhá porozumění životním procesům, ale také pochopení vzniku patologických stavů při onemocněních. Validita rutinních i výzkumných prací je závislá na reprodukovatelnosti výsledků publikovaných v literatuře, například farmaceutický i biotechnologický průmysl je závislý na odborných pracích, které tvoří základ pro vývoj nových terapií a hledání biomarkerů (Freedman *et al.*, 2017; Knudtson *et al.*, 2019)

Ačkoliv je reprodukovatelnost klíčová pro vědeckou činnost (vývoj léčiv, doprovodná diagnostika), tak jsou nereprodukovatelná data (především z preklinických testů) velmi rozšířeným problémem (Begley *et al.*, 2012). Preklinická data jsou důležitá nejen pro pacienty, kteří čekají na vývoj v léčbě onemocnění, ale také se z nich vychází při snaze identifikovat úplně nová léčiva nebo biomarkery (Mobley *et al.*, 2013). Reprodukovatelnost je základním předpokladem vědeckého výzkumu, a proto se touto problematikou neustále zabývá mnoho vědeckých pracovišť. Bylo zjištěno, že u velké většiny vědeckých prací je její hodnota velice nízká (Begley *et al.*, 2012; Freedman *et al.*, 2017).

National Institute of Health (NIH) vydal na toto téma směrnici „Rigor and Reproducibility“, jejíž snahou je poukázat na nízké standardy pro podávání výsledných zpráv a na nutnost řešení faktorů, které brání úspěšnému opakování studií („Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research,” 2015). Nedostatečně kvalitní zprávy a informace o použitých technických postupech jsou právě důvody vyvolávajícími nízkou reprodukovatelnost (Freedman *et al.*, 2015). Publikace takových dat již vedla k zneplatnění či odvolání několika průlomových prací nebo klinických testů (Freedman *et al.*, 2015). Nejsou-li totiž preklinické výsledky spolehlivé, existuje vysoká pravděpodobnost, že klinické testy nebudou úspěšné (Mobley *et al.*, 2013).

Nejlepším způsobem kontroly, zda jsou metody získávání dat schopny poskytovat reprodukovatelné výsledky, jsou mezilaboratorní studie (Collins *et al.*, 2017). Aby bylo možno určitý experiment opakovat, je potřeba kontrol a dokumentace procesu, při kterém jsou používány pouze validované chemikálie (Freedman *et al.*, 2017; Knudtson *et al.*, 2019). V USA je každým rokem proinvestováno okolo 28 miliard dolarů za nereprodukovatelné výzkumy (Freedman *et al.*, 2015). Také bylo zjištěno, že více než polovina vědců má nejméně jednu zkušenost s neschopností ověřit už publikovaná data. Tento fakt je velice

znepokojivý, jelikož vědecký pokrok a znalosti jsou založeny na recenzovaných publikacích (Mobley *et al.*, 2013).

Při publikování dat musí být autoři plně zodpovědní za jejich celistvost (integritu dat) a musí být schopni o datech diskutovat a být nápomocni ostatním, kteří se snaží jejich práci opakovat (Mobley *et al.*, 2013). Nereprodukovatelnost je způsobována například návrhem studie, používanými reagensy a referenčními materiály, protokoly laboratoří nebo také analýzou dat a podáváním zpráv (Collins *et al.*, 2017; Freedman *et al.*, 2014).

Nutnost porovnávání výsledků mezi laboratořemi zdůrazňuje i proteomika jakožto odvětví, které produkuje velká množství heterogenních dat. Při kontrolách je nejprve třeba zhodnotit přípravu vzorku a přístroje odděleně a následně i dohromady. Základem pro vnitřní kontroly kvality jsou robustní a ověřené protokoly. Při kontrolách kvality se mohou využívat standardy, které jsou do experimentu v několika fázích procesu přidávány a pomáhají zvýrazňovat různé anomálie (Bourmaud *et al.*, 2015). Kvalita a reprodukovatelnost proteomických dat jsou zásadní pro přesnost a platnost sledovaných proměnných a pro vyvození závěru proteomických studií (Beasley-Green *et al.*, 2012). V praxi se využívá proces normalizace, který má zajistit porovnatelnější výsledky a spolehlivost analýz, které následují (Chawade *et al.*, 2014; Välikangas *et al.*, 2016). Často jsou proteomické výzkumy soustředěny spíše na optimalizaci metod jako LC-MS, než na základní otázky typu: „Jak účinná byla extrakce proteinu? Budou mít různé metody měření koncentrace proteinů odlišné výsledky?“ Jelikož je potřeba proteiny získat z buněčných membrán, cytoplazmy nebo z jiných organel, byly vyvinuty různé postupy extrakce a purifikace. Z teoretického hlediska by měly být analyzovány všechny proteiny ze vzorku, což v praxi není pravda. A protože není možné vybrat jednu metodu a ostatní přestat využívat, vyslovili Gu *et al.* (2014) hypotézu, zda by nebylo vhodné nastavit jakousi standardní konverzi různých metod měření koncentrace proteinu tak, aby intermetodologické výsledky bylo možné porovnat a posuzovat.

Aby se tato situace zlepšovala, tak National Institute of Health (NIH) začalo poskytovat školení o zvyšování reprodukovatelnosti a transparentnosti výsledků výzkumů s důrazem na správné navržení průběhu experimentu (Collins *et al.*, 2014).

Cílem experimentální části této uvedené bakalářské práce bylo porovnat vybrané metody měření koncentrace proteinů, a to u modelového kontrolního systému BSA a vzorků cervikálního hlenu, a následně určit nejvhodnější metodu. U modelu BSA byly použity

vzorky o známé koncentraci a vzorky po digesci. Z výsledků (viz Tabulka 2) vyplývá, že nejpřesnějších hodnot (pro vzorky před digescí) bylo dosaženo Bradfordovou metodou a metodou DirectDetect. Naopak měření fluorescence se standardem Trp a Pierce 660 nm vykazovaly největší odchylky. Pro vzorky po digesci si nejvíce odpovídaly metody DirectDetect, měření fluorescence Trp a Bradfordova metoda. Z výsledků měření vzorků cervikálních hlenů (viz Tabulka 4) je zřejmé, že si jednotlivé metody neodpovídají. Tento fakt však není velmi překvapivý, jelikož se jedná o složitější, více komplexní systém, než je BSA. K práci bylo vybráno 5 vzorků hlenu, přičemž použity byly 4. Jeden vzorek byl silně hemolytický a nebylo možné jej používat.

Srovnávání různých metod kvantifikace proteinů bylo testováno již v roce 1992 Michaelem Fountoulakisem a jeho spolupracovníky. Jako standardní metodu použili analýzu aminokyselin, ke které byly další metody vztaženy. Bylo zjištěno, že i přes jednoduchost Bradfordovy metody je vazba Coomassie barviva silně závislá na hydrofobnosti jednotlivých proteinů. Pro neglykosylované polypeptidy byla určena jako nejspolehlivější BCA metoda. Nesrovnalosti mezi kolorimetricky stanovenými hodnotami mohou být ovlivněny i vybraným proteinovým standardem, ke kterému bývají výsledky vztahovány. Výsledkem této práce bylo zjištění, že kolorimetrické metody jsou spolehlivější, pokud jsou používány pro neglykosylované proteiny (Fountoulakis *et al.*, 1992). Burcu Okutucu *et al.*, (2007) taktéž srovnávali několik metod na vzorcích plazmatických proteinů, k výpočtu koncentrací proteinů použili dva způsoby. Prvním byl výpočet z rovnice regrese kalibrační křivky, stejně jako v této bakalářské práci. Druhým způsobem byl výpočet z rovnice (s využitím informací o použitém standardu) ve tvaru:

$$\text{Koncentrace proteinu (mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = \left(\frac{A_u}{A_s}\right) \cdot SC \cdot DF,$$

kde A_u a A_s jsou hodnoty absorbancí známého vzorku a známého standardu, SC je koncentrace standardu a DF představuje faktor ředění.

V práci jsem pro výpočet koncentrace proteinů ve vzorku používala rovnice regrese kalibrační křivky získané měřením standardů BSA a Trp. Na oba modelové systémy jsem se pokusila použít i výše uvedenou rovnici. Hodnoty z grafu i z rovnice si byly u modelového systému BSA velice podobné (viz Tabulka 6), pro modelový systém cervikálního hlenu si hodnoty z grafu a rovnice neodpovídaly (viz Tabulka 7).

Tabulka 6: Srovnání hodnot koncentrací BSA ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) získané výpočtem z grafu a výpočtem z rovnice.

Metoda	Graf [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Rovnice [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
BCA	616,69	555,00
Bradfordova	548,44	536,00
Pierce 660 nm	925,33	1 130,00
Fluorescence BSA	449,57	331,00
Fluorescence Trp	1 268,82	15,00
DirectDetect *	-	-

* Pro metodu DirectDetect nebyl výpočet proveden, jelikož se principem odlišuje od ostatních metod.

Tabulka 7: Srovnání hodnot koncentrací vzorků cervikálních hlenů získané výpočtem z grafu (a) a výpočtem z rovnice (b).

a)

Metoda	Graf [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]			
	č. 2	č. 10	č. 12	č. 14
Vzorky				
BCA	-7 363,64	2 909,09	1 954,54	-4 500,00
Bradfordova	4 630,00	4 580,00	4 980,00	6 430,00
Pierce 660 nm	644,00	944,00	1 774,00	1 934,00
Fluorescence BSA	2 017,68	-644,50	-509,24	-292,95
Fluorescence Trp	4 664,37	-1 162,28	-866,24	-392,84
DirectDetect *	-	-	-	-

b)

Metoda	Rovnice [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]			
	č. 2	č. 10	č. 12	č. 14
Vzorky				
BCA	4719,00	9 523,00	9 077,00	6 050,00
Bradfordova	4 618,00	4 612,00	4 662,00	4 843,00
Pierce 660 nm	321,00	374,00	502,00	521,00
Fluorescence BSA	2 071,00	16,00	43,00	98,00
Fluorescence Trp	60,00	1,00	5,00	1,20
DirectDetect *	-	-	-	-

* Pro metodu DirectDetect nebyl výpočet proveden, jelikož se principem odlišuje od ostatních metod.

U modelového systému cervikálního hleny bylo bližších hodnot dosaženo pouze u Bradfordovy metody. Důvodem odlišností výsledků mohou být velice nízké hodnoty koncentrací a absorbancí vzorků, které byly nižší než hodnoty nejnižšího použitého standardu pro měření ($125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Somchai Chutipongtanate *et al.*, (2012) ve své práci také testovali několik spektrofotometrických a kolorimetrických metod pro měření koncentrací proteinů, peptidů a aminokyselin (ve vzorcích hovězího sérového albuminu, extraktu z prasečích ledvin, trypsinem naštěpených peptidů z hovězího sérového albuminu a ve vzorku glycinu). Za nejpresnější metodu pro měření koncentrace vzorků BSA a komplexních vzorků (extrakt z prasečích ledvin) byla určena Bradfordova metoda. Tento závěr odpovídá i výsledkům u našeho kontrolního modelu BSA.

Ačkoliv mají kolorimetrické metody mnoho výhod (rychlost, jednoduchost provedení a automatizace), jejich výsledky jsou často ovlivňovány různými interferencemi (Okutucu *et al.*, 2007). Ty mohou nastat jako důsledek přítomnosti mnohých chemických látek v lyzačních a extrakčních pufrech. Podle charakteru látek mohou buď zvyšovat, nebo snižovat získané hodnoty koncentrací proteinů, peptidů nebo aminokyselin (Chutipongtanate *et al.*, 2012).

Nejčastěji používanými pufrů jsou 2-D pufr a Laemlliho pufr. Bylo prokázáno, že oba pufrů mají velmi silný negativní efekt na většinu běžně používaných metod kvantifikace proteinů, přičemž při měření purifikovaného BSA a extraktu z prasečích ledvin byla nejvíce ovlivněna Biuretova reakce a nejméně Bradfordova metoda. Je striktně doporučováno, aby vzorky a standardy byly rozpouštěny stejnými rozpouštědly a aby rozpouštědlo sloužilo i jako

blank. Tento přístup je považován za nejlepší a pravděpodobně nejjednodušší cestu, jak zamezit interferencím (Okutucu *et al.*, 2007).

Bylo zjištěno, že na Bradfordovu metodu nemají vliv látky jako chlorid hořečnatý (draselný, nebo sodný), ethanol ani síran amonný. Mírnou interferenci ale způsobují Tris, kyselina octová, 2–merkapt ethanol, EDTA, glycerol a také stopová množství detergentů. Detergenty jsou hojně využívány při přípravách vzorků a obsahují látky jako Triton X–100 nebo SDS (Bradford, 1976). Pravděpodobnost naměření příliš vysokých nebo nízkých hodnot lze snížit používáním řádných kontrol (Compton *et Jones*, 1985). Metoda BCA je k interferujícím látkám tolerantnější v porovnání s Lowryho metodou, jelikož detergenty, stejně jako soli obsažené v pufrch, mohou metodu zkreslovat tvorbou nerozpustných sraženin s Folin–Ciocalteu činidlem. BCA metoda není příliš citlivá k běžně používaným detergentům a ani k denaturujícím činidlům (4,0 mol·l⁻¹ guanidin–HCl nebo 3 mol·l⁻¹ močovina). Nevýhodou metody je citlivost k redukujícím sacharidům (redukce Cu²⁺ iontů na Cu⁺ ionty), k chelatačním (EDTA) a redukčním činidlům (DTT) (Smith *et al.*, 1985). Pokud je před použitím BCA metody provedena selektivní precipitace proteinů deoxycholátem a kyselinou trichloroctovou, může být interference snížena až o 90 % (Brown *et al.*, 1989). Metoda Pierce 660 nm vykazuje kompatibilitu s vysokou koncentrací většiny detergentů, redukčních činidel i dalšími běžně používanými chemikáliemi. Po přidání IDCR je metoda tolerantní i k Lammeliho SDS pufru. IDCR zvyšuje toleranci metody pro SDS z 0,0125 na 5 % (Antharavally *et al.*, 2009).

Při stanovování koncentrace proteinů měřením fluorescence Trp je potřeba brát v úvahu citlivost metody k polaritě rozpouštědla, metoda je citlivá i k detergentům, které jsou součástí pufrů, intenzita fluorescence může být dále ovlivňována také hodnotou pH a teplotou. Tuto citlivost lze snížit, pokud je používám pufr s 8 mol·l⁻¹ močovinou a pokud je po dobu experimentu udržována konstantní teplota prostředí (Wiśniewski *et Gaugaz*, 2015). Dalším způsobem kvantifikace je měření v UV oblasti spektra. Tato metoda je velmi citlivá ke kontaminaci nukleovými kyselinami, které výrazně zkreslují výsledná data (Contreras-Martos *et al.*, 2018). Pokud je kvantifikace proteinů prováděna v IČ spektru, je možné využít podobnosti složení detergentů a lipidů, které jsou přítomny v buněčných membránách, podobnost umožňuje sledovat účinnost odstranění detergentů ze vzorků před samotnou analýzou. Kvantifikace je možná v přítomnosti až 50mmol·l⁻¹ DTT a β–merkapt ethanolu s koncentrací až 150 mmol·l⁻¹. Výsledky nejsou ovlivňovány

ani přítomností 5% Tween 20 nebo Tritonu X-100, avšak při obsahu amidu (CHAPS) v detergentu je vznik interference možný (Strug *et al.*, 2014).

Výsledky jsou závislé kromě látek používaných pro zpracování vzorku před analýzou i na správném zacházení s chemikáliemi a dodržování protokolů (Krohn, 2002).

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vybrané metody měření koncentrace proteinů u vzorků cervikálních hlenů a vybrat nejvhodnější metodu. Z výsledků experimentální části lze říci, že pro kontrolní systém BSA je nejvíce přesná Bradfordova metoda a měření přístrojem DirectDetect, přičemž metoda BCA vykazovala mírnou odchylku.

Experimentálnímu modelovému systému cervikálních hlenů nejvíce odpovídá Bradfordova metoda. Tento závěr byl vyvozen na základě experimentálně získaných hodnot koncentrací a výpočtem z grafu, přičemž byl následně potvrzen nezávislým výpočtem z rovnice (viz Diskuse). Výsledné hodnoty ostatních použitých metod byly velmi nízké.

8 LITERATURA

- Aebersold, R., Mann, M. (2016): Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347–355.
- Aebersold, R., Rist, B., Gygi, S.P. (2006): Quantitative Proteome Analysis: Methods and Applications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 919, 33–47.
- Anderson, R.J., Bendell, D.J., Groundwater, P.W. (2004): Organic spectroscopic analysis, Tutorial chemistry texts. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Antharavally, B.S., Mallia, K.A., Rangaraj, P., Haney, P., Bell, P.A. (2009): Quantitation of proteins using a dye–metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry* 385, 342–345.
- Avelino, K.Y.P.S., Silva, R.R., da Silva Junior, A.G., Oliveira, M.D.L., Andrade, C.A.S. (2017): Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia. *Journal of King Saud University - Science* 29, 413–423.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 1017–1031.
- Bateman, N.W., Goulding, S.P., Shulman, N.J., Gadok, A.K., Szumlinski, K.K., MacCoss, M.J., Wu, C.C. (2014): Maximizing Peptide Identification Events in Proteomic Workflows Using Data-Dependent Acquisition (DDA). *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 329–338.
- Beasley-Green, A., Bunk, D., Rudnick, P., Kilpatrick, L., Phinney, K. (2012): A proteomics performance standard to support measurement quality in proteomics. *Proteomics* 12, 923–931.
- Begley, C.G., Ellis, L.M. (2012): Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483, 531–533.
- Bourmaud, A., Gallien, S., Domon, B. (2015): A quality control of proteomic experiments based on multiple isotopologous internal standards. *EuPA Open Proteomics* 8, 16–21.
- Bradford, 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, 248–254.

- Brown, R.E., Jarvis, K.L., Hyland, K.J. (1989): Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry* 180, 136–139.
- Chawade, A., Alexandersson, E., Levander, F. (2014): Normalyzer: A Tool for Rapid Evaluation of Normalization Methods for Omics Data Sets. *Journal of Proteome Research* 13, 3114–3120.
- Chutipongtanate, S., Watcharatanyatip, K., Homvises, T., Jaturongkakul, K., Thongboonkerd, V. (2012): Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta* 98, 123–129.
- Collins, B.C., Hunter, C.L., Liu, Y., Schilling, B., Rosenberger, G., Bader, S.L., Chan, D.W., Gibson, B.W., Gingras, A.-C., Held, J.M., Hirayama-Kurogi, M., Hou, G., Krisp, C., Larsen, B., Lin, L., Liu, S., Molloy, M.P., Moritz, R.L., Ohtsuki, S., Schlapbach, R., Selevsek, N., Thomas, S.N., Tzeng, S.-C., Zhang, H., Aebersold, R. (2017): Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nature Communications* 8, 291.
- Collins, F.S., Tabak, L.A., 2014. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature* 505, 612–613.
- Compton, S.J., Jones, C.G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151, 369–374.
- Contreras-Martos, S., Nguyen, H.H., Nguyen, P.N., Hristozova, N., Macossay-Castillo, M., Kovacs, D., Bekesi, A., Oemig, J.S., Maes, D., Pauwels, K., Tompa, P., Lebrun, P. (2018): Quantification of Intrinsically Disordered Proteins: A Problem Not Fully Appreciated. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5, 83.
- Dremann, D.N., Chow, C.S. (2019): The use of electrospray ionization mass spectrometry to monitor RNA-ligand interactions, in: Hargrove, A.E. (ed.): *Methods in Enzymology*, pp. 315–337, Elsevier, Durham.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fountoulakis, M., Juranville, J.-F., Manneberg, M. (1992): Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24, 265–274.

- Freedman, L.P., Gibson, M. (2015): The Impact of Preclinical Irreproducibility on Drug Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 97, 16–18.
- Freedman, L.P., Cockburn, I.M., Simcoe, T.S. (2015): The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biology* 13, e1002165.
- Freedman, L.P., Inglese, J. (2014): The Increasing Urgency for Standards in Basic Biologic Research. *Cancer Research* 74, 4024–4029.
- Freedman, L.P., Venugopalan, G., Wisman, R. (2017): Reproducibility2020: Progress and priorities. *F1000Research* 6, 604.
- Ghisaidoobe, A., Chung, S. (2014): Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 22518–22538.
- Gu, Q., Yu, L.-R. (2014): Proteomics quality and standard: From a regulatory perspective. *Journal of Proteomics* 96, 353–359.
- Hansen, S.K., Skibsted, E., Staby, A., Hubbuch, J. (2011): A label-free methodology for selective protein quantification by means of absorption measurements. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2661–2669.
- He, B., Shi, J., Wang, X., Jiang, H., Zhu, H.-J. (2019): Label-free absolute protein quantification with data-independent acquisition. *Journal of Proteomics* 200, 51–59.
- Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007): *Mass spectrometry: principles and applications*, 3rd ed. J. Wiley, Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ.
- Imperlini, E., Santorelli, L., Orrù, S., Scolamiero, E., Ruoppolo, M., Caterino, M. (2016): Mass Spectrometry-Based Metabolomic and Proteomic Strategies in Organic Acidemias. *BioMed Research International* 2016, 1–13.
- Kisluk, J., Ciborowski, M., Niemira, M., Kretowski, A., Niklinski, J. (2014): Proteomics biomarkers for non-small cell lung cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 101, 40–49.
- Knudtson, K.L., Carnahan, R.H., Hegstad-Davies, R.L., Fisher, N.C., Hicks, B., Lopez, P.A., Meyn, S.M., Mische, S.M., Weis-Garcia, F., White, L.D., Sol-Church, K. (2019): Survey on Scientific Shared Resource Rigor and Reproducibility. *Journal of Biomolecular Techniques* 30, 36–44.
- Krohn, R.I. (2002): The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Cell Biology* 15, A.3H.1-A.3H.28.
- Li, Z., Adams, R.M., Chourey, K., Hurst, G.B., Hettich, R.L., Pan, C. (2012): Systematic Comparison of Label-Free, Metabolic Labeling, and Isobaric Chemical Labeling

- for Quantitative Proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *Journal of Proteome Research* 11, 1582–1590.
- Lovric, J. (2011): *Introducing proteomics: from concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Mahajan, N. (2015): Endometrial receptivity array: Clinical application. *Journal of Human Reproductive Sciences* 8, 121.
- Maia, T.M., Staes, A., Plasman, K., Pauwels, J., Boucher, K., Argentini, A., Martens, L., Montoye, T., Gevaert, K., Impens, F. (2020): Simple Peptide Quantification Approach for MS-Based Proteomics Quality Control. *ACS Omega* 5, 6754–6762.
- Matouš, B. (2010): *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén, Praha.
- Mobley, A., Linder, S.K., Braeuer, R., Ellis, L.M., Zwelling, L. (2013): A Survey on Data Reproducibility in Cancer Research Provides Insights into Our Limited Ability to Translate Findings from the Laboratory to the Clinic. *PLoS ONE* 8, e63221.
- Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J. (1950): Dating the Endometrial Biopsy. *Fertility and Sterility* 1, 3–25.
- Okutucu, B., Dinçer, A., Habib, Ö., Zihnioglu, F. (2007): Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 709–711.
- Olson, B.J. and Markwell, J. (2007): Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science* 48: 3.4.1-3.4.29
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002): Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 376–386.
- Parnis, J.M., Oldham, K.B. (2013): Beyond the Beer–Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 267, 6–10.
- Pereira, L., Reddy, A.P., Jacob, T., Thomas, A., Schneider, K.A., Dasari, S., Lapidus, J.A., Lu, X., Rodland, M., Roberts, Charles T., Gravett, M.G., Nagalla, S.R. (2007): Identification of Novel Protein Biomarkers of Preterm Birth in Human Cervical–Vaginal Fluid. *Journal of Proteome Research* 6, 1269–1276.

- Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research [online] [navštíveno 7.2.2020]
Dostupné z [_https://www.nih.gov/research-training/rigor-reproducibility/principles-guidelines-reporting-preclinical-research](https://www.nih.gov/research-training/rigor-reproducibility/principles-guidelines-reporting-preclinical-research)
- Sap, K.A., Demmers, J.A.A. (2012): Labeling Methods in Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics, in: Leung, H.C. (ed.): Integrative Proteomics, pp. 111–132, InTech, Rijeka.
- Sharma, N., Singh, A.N. (2016): Exploring Biomarkers for Alzheimer’s Disease. *Journal of clinical and diagnostic research* 10, KE01-06.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.
- Strug, I., Utzat, C., Cappione, A., Gutierrez, S., Amara, R., Lento, J., Capito, F., Skudas, R., Chernokalskaya, E., Nadler, T. (2014): Development of a Univariate Membrane-Based Mid-Infrared Method for Protein Quantitation and Total Lipid Content Analysis of Biological Samples. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2014, 1–12.
- Tuli, L., W. Resson, H. (2009): LC–MS Based Detection of Differential Protein Expression. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 02, 416–438.
- Välikangas, T., Suomi, T., Elo, L.L. (2016): A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Briefings in Bioinformatics* 19(1), 1–11.
- Wal, L. van der, Demmers, J.A.A. (2015): Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics, in: Magdeldin, S. (ed.): Recent Advances in Proteomics Research, pp 1–18, InTech, Rijeka.
- Wang, M., You, J., Bemis, K.G., Tegeler, T.J., Brown, D.P.G. (2008): Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Briefings in Functional Genomics* 7, 329–339.
- Wardah, W., Khan, M.G.M., Sharma, A., Rashid, M.A. (2019): Protein secondary structure prediction using neural networks and deep learning: A review. *Computational Biology and Chemistry* 81, 1–8.
- Wiśniewski, J.R., Gaugaz, F.Z. (2015): Fast and Sensitive Total Protein and Peptide Assays for Proteomic Analysis. *Analytical Chemistry* 87, 4110–4116.
- Yang, M., Xi, Q., Jia, W., Wang, X. (2019): Structure-based analysis and biological characterization of imatinib derivatives reveal insights towards the inhibition of wild-

type BCR-ABL and its mutants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 29, 126758.

Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., Yang, Y. (2017): Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement* 112, 16–21.

Zheng, W., Zhang, C., Bell, E.W., Zhang, Y. (2019): I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. *Future Generation Computer Systems* 99, 73–85.