



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ MIKROPREPARATIVNÍ IZOELEKTRICKÉ
FOKUSACE PŘI ANALÝZE BIOLOGICKÝCH VZORKŮ**

UTILIZATION OF MICROPREPARATIVE ISOELECTRIC FOCUSING IN THE ANALYSIS OF BIOLOGICAL
SAMPLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Vlčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1072/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Zuzana Vlčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Využití mikropreparativní izoelektrické fokusace při analýze biologických vzorků

Zadání diplomové práce zadání:

Teoretická část:

- 1) Analýza biologických vzorků – obecný úvod
- 2) Popis izoelektrické fokusace
- 3) Charakteristika bílkovin
- 4) Rešerše izoelektrické fokusace bílkovin

Experimentální část:

- 1) Navržení a ověření mikropreparativní izoelektrické fokusace na barevných pl markerech
- 2) Ověření navrženého separačního systému na standardních bílkovinách
- 3) Aplikace navrženého systému na reálné biologické vzorky
- 4) Vyhodnocení získaných dat formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Zuzana Vlčková
student(ka)

Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací a ověřením podmínek separace proteinů z biologického materiálu. K separaci je využívána nově se rozvíjející technika nazvaná mikropreparativní izoelektrická fokusace.

Teoretická část popisuje obecnou analýzu biologického materiálu se zaměřením na proteiny, na nichž byla provedena optimalizace systému. Tato část diplomové práce současně blíže představuje tuto vyvíjenou metodu. Dále jsou zde popsány ostatní techniky využití ke kontrole účinnosti mikropreparativní izoelektrická fokusace.

V experimentální části jsou popsány jednotlivé kroky optimalizace mikropreparativní izoelektrické fokusace. Hledání ideálního postupu separace bylo prováděno na samostatných standardních proteinech, následně na jejich směsi a poté byla optimalizace aplikována na reálný biologický vzorek. Účinnost mikropreparativní izoelektrické fokusace byla ověřena pomocí metod SDS-PAGE a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

ABSTRACT

The aim of this Master Thesis is the optimization and verification of conditions of separation of proteins from biological materials. For the separation a developed technique called micropreparative isoelectric focusing is being used.

The theoretical part describes analytical methods of biological materials with a focus on proteins which were used for the optimization of the developing system in general. This part of the Master Thesis also presents this method itself. Furthermore, basic characteristics of other techniques used to control the efficiency of the micropreparative isoelectric focusing are introduced.

The experimental part depicts the individual steps of optimization of the micropreparative isoelectric focusing. The ideal separation procedure was firstly found out on the individual standard proteins, secondly on their mixture and lastly the optimised procedure was applied to a real biological sample. The efficiency of the micropreparative isoelectric focusing was verified by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikropreparativní izoelektrická fokusace, optimalizace, proteiny

KEYWORDS

micropreparative isoelectric focusing, method optimization, proteins

VLČKOVÁ, Z. *Využití mikropreparativní izoelektrické fokusace při analýze biologických vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 53 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a plně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jiřímu Šalplachtovi, Ph.D. za ochotu, cenné rady a věcné připomínky při vytváření této diplomové práce a také za čas, který mi věnoval během měření experimentální části a následně konzultacím během zpracování této diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat všem, se kterými jsem se setkala v laboratoři Chemického ústavu Akademie věd v Brně za jejich pomoc a vstřícnost. V neposlední řadě mé poděkování patří mé celé rodině a mým nejbližším, kteří mě trpělivě podporovali v průběhu celého magisterského studia na Vysokém učení technickém v Brně.

OBSAH

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD..... | 7 |
| 1.1 | Cíle práce..... | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST..... | 8 |
| 2.1 | Analýza biologických vzorků..... | 8 |
| 2.2 | Proteiny..... | 9 |
| 2.2.1 | Struktura proteinů..... | 9 |
| 2.2.2 | Denaturace proteinů | 10 |
| 2.2.3 | Rozdělení proteinů | 11 |
| 2.2.4 | Izolace proteinů | 12 |
| 2.3 | Techniky použité v práci..... | 12 |
| 2.3.1 | Elektromigrační metody..... | 12 |
| 2.3.1.1 | Izoelektrická fokusace | 13 |
| 2.3.1.2 | Mikropreparativní izoelektrická fokusace | 15 |
| 2.3.1.3 | SDS-PAGE | 17 |
| 2.3.2 | MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie..... | 20 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 22 |
| 3.1 | Použité přístroje, chemikálie, proteiny a roztoky..... | 22 |
| 3.1.1 | Přístroje a zařízení..... | 22 |
| 3.1.2 | Chemikálie | 22 |
| 3.1.3 | Pomůcky..... | 23 |
| 3.1.4 | Roztoky pro mikropreparativní izoelektrickou fokusaci..... | 23 |
| 3.1.5 | Roztoky pro SDS-PAGE..... | 24 |
| 3.2 | Mikropreparativní izoelektrická fokusace..... | 24 |
| 3.3 | SDS-PAGE | 26 |
| 3.4 | MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie..... | 27 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 28 |
| 4.1 | Vývoj metody mikropreparativní izoelektrické fokusace proteinů | 28 |
| 4.1.1 | Optimalizace doby separace proteinů | 28 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1.2 | Vliv koncentrace separovaných proteinů na průběh mikropreparativní izoelektrické fokusace | 34 |
| 4.1.3 | Optimalizace extrakce proteinů ze separačního média | 37 |
| 4.1.4 | Separace směsi proteinů | 38 |
| 4.2 | Analýza reálného vzorku | 42 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 45 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 46 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 53 |

1 ÚVOD

V současnosti se pro analýzu látek v biologických vzorcích používají moderní analytické metody, které jsou vysoce citlivé, ale zpravidla vyžadují zpracování vzorku před vlastní analýzou. Jedna z možností je metoda mikropreparativní izoelektrická fokusace, před kterou není potřeba zdlouhavého zpracování vzorků. Tato metoda umožňuje separaci a zakoncentrování amfolytů, zejména proteinů, odpařovací diskontinuální izoelektrickou fokusací.

Izoelektrická fokusace umožňuje separaci amfoterních látek, jako jsou aminokyseliny, peptidy nebo proteiny, podle jejich izoelektrického bodu. Při této metodě se jako nosný elektrolyt využívá směs amfoterních sloučenin. Působením elektrického pole na tuto směs amfolytů se vytvoří gradient pH, v němž probíhá fokusace. Separované látky (amfoterní molekuly nesoucí náboj) v tomto prostředí migrují tak dlouho, dokud se nedostanou do části separačního prostředí, kde je pH rovno jejich izoelektrickému bodu.

Základem nově vyvinutého separačního média je celulóza, která se suspenduje ve vodném roztoku obsahující jednoduché pufrů, ethylenglykol, glycerol, neionogenní povrchově aktivní látky a barevné pI markery. Díky barevným nízkomolekulárním pI markerům přidávaných do separačního celulózového média lze průběh separace a odhad pH gradientu sledovat okem. Analyzovaný vzorek rozpuštěný v roztoku chloridu sodného se nanese do separačního média rozprostřeného na korytu a poté vlivem vloženého stejnosměrného napětí mezi dvěma elektrodami umístěnými na konci koryta dochází k separaci amfolytů (proteinů).

Mikropreparativní izoelektrická fokusace je kompatibilní se širokou škálou technik, proto lze získané frakce dále analyzovat pomocí různých analytických technik. V této diplomové práci byla další analýza vzorků provedena pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce byla optimalizace mikropreparativní izoelektrické fokusace pro analýzu biologických vzorků. Nejprve byl tento separační systém ověřen na standardních proteinech, poté byl optimalizovaný systém aplikován na reálný biologický vzorek, konkrétně na komerčně dostupných tabletách sinice rodu *Spirulina* od společnosti Iswari Superfood, s.r.o. Účinnost separace mikropreparativní izoelektrické fokusace byla ověřena pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Analýza biologických vzorků

Biologické vzorky představují komplexní směsi látek. Příkladem biologického materiálu může být sinice rodu *Spirulina* (Obrázek 1). Pro analýzu takovýchto materiálů se využívá celá řada metod. V současnosti se pro analýzu látek v biologických vzorcích používají moderní analytické metody, které jsou vysoce citlivé, ale zpravidla vyžadují zpracování vzorku před vlastní analýzou. Metody zpracování vzorku jsou voleny v závislosti na tom, zda chceme charakterizovat pouze jednu složku vzorku (např. vitamín, protein, sacharid apod.), skupinu látek, sledovat určitý proces, atd. [1, 2]. Má-li být z biologického materiálu stanoven konkrétní analyt, je nezbytné nejen využít vhodné analytické techniky a postupy z hlediska vhodnosti dosažení stanovených cílů [2, 3].



Obrázek 1: Sinice rodu *Spirulina* [4]

Analýza biologických vzorků se skládá ze čtyř hlavních kroků:

1. příprava vzorku
2. analýza
3. detekce
4. analýza dat.

Příprava vzorku je prvotní a velmi důležitou fází při analýze biologických materiálů, která zahrnuje různé metody, jejichž konkrétní volba závisí na výchozím vzorku a analyzované látce. Obecně se příprava vzorků skládá z několika kroků, jejichž cílem je připravit vzorek pro vlastní analýzu.

Prvním krokem je zpravidla izolace látky nebo látek, které mají být dále analyzovány. Dalším krokem je tzv. přečištění (purifikace) vzorku a případně zakoncentrování zkoumané látky. Při vlastní purifikaci připravovaného vzorku se využívá několik postupů, jejichž cílem je odstranění nežádoucích látek, které by mohly negativně ovlivňovat výsledky analýzy

zkoumané látky. Volba vhodné purifikační metody je závislá na fyzikálních a chemických vlastnostech analyzované látky. Kromě požadované čistoty by také při purifikaci měla být zachována biologická aktivita biologického materiálu [3, 5]. U některých purifikačních metod může dojít ke snížení koncentrace zkoumané látky, proto se jako další krok zpravidla provádí zakoncentrování dané látky [6].

Hojně využívaná izolační technika je extrakce. Extrakce je separační metoda, kdy přechází složka ze směsi látek v kapalnou nebo tuhou fázi do jiné kapalnou fázi [6, 7, 8]. Někdy je také nutné provést homogenizaci. Ta spočívá v důkladném rozmělnění biologického materiálu za přítomnosti vody nebo jiných vhodných roztoků jako např. fyziologického roztoku či pufru o přesně daném pH [6].

Jedny z nejdůležitějších biologických látek jsou proteiny, které jsou podstatou všech živých organismů. Proteiny zajišťují anebo se podílejí na spoustě významných funkcí a procesech. Jejich role při utváření a řízení života na Zemi je nezastupitelná, proto jsou častým předmětem výzkumu [9].

2.2 Proteiny

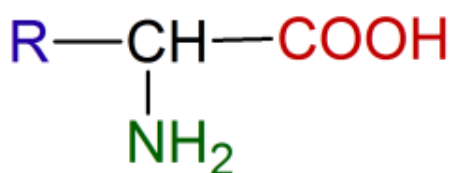
Proteiny jsou vysokomolekulární přírodní látky, které vznikají spojením sto a více molekul různých aminokyselin peptidickou vazbou. Název protein pochází z řeckého *protos*, což znamená první, český název bílkovina je odvozen od slova *bílek*. Pojmy protein a bílkovina jsou synonymy [9, 10].

2.2.1 Struktura proteinů

Chemicky jsou proteiny polyamidy, jejichž základ tvoří polypeptidové řetězce. Amidové vazby spojují aminokyseliny v proteinu pomocí karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$) jedné a aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) další aminokyseliny (Obrázek 2). Pokud je takto spojených dvě až přibližně sto aminokyselinových zbytků, vzniklé sloučeniny nazýváme peptidy, je-li struktura komplikovanější a v molekule je více aminokyselin, mluvíme o proteinech [11]. Proteiny mohou kromě aminokyselinových zbytků obsahovat i jiné látky jako např. síru, fosfor nebo jód [12].

V organismech se vyskytuje několik set různých aminokyselin. Z hlediska složení proteinů je nejdůležitějších 20 z nich, které se podílejí na jejich stavbě. O těchto aminokyselinách pak hovoříme jako o kódovaných či základních aminokyselinách [11].

Základní vlastnosti proteinů a struktura jejich molekul jsou utvářeny zejména přítomnými druhy aminokyselinových zbytků, ale i pořadím, ve kterém jsou jednotlivé aminokyselinové zbytky spojovány v polypeptidové řetězce. Svoji roli hrají také vzájemné vztahy aminokyselinových zbytků, které se mohou při svém prostorovém uspořádání navzájem ovlivňovat [11, 12].



Obrázek 2: Základní vzorec aminokyselin [13]

Aby molekula proteinu mohla být aktivní a vykonávat tak svoji biologickou funkci, musí zaujmout určité prostorové uspořádání, které označujeme jako nativní konformace. Toto uspořádání odpovídá minimu Gibbsovy energie a je určeno nekovalentními interakcemi, které stabilizují trojrozměrnou strukturu molekuly proteinu [10].

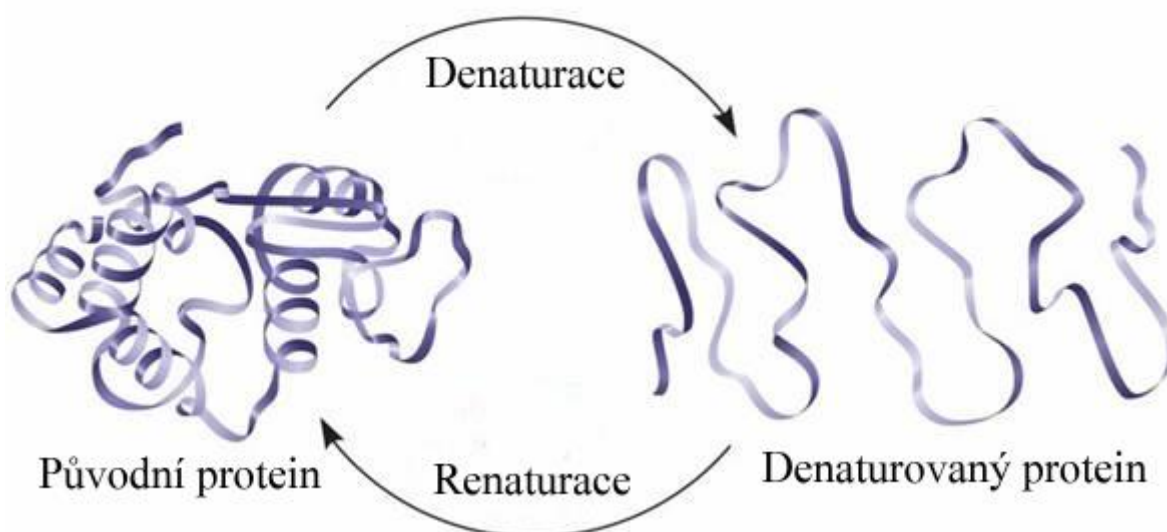
Strukturu proteinu dělíme na čtyři základní úrovně – primární, sekundární, terciární a kvarterní.

- **Primární struktura** představuje pořadí jednotlivých aminokyselin v řetězci proteinu [10]. Určuje tedy vlastnosti proteinů a jejich biologickou funkci. Primární struktura také vytváří základní předpoklad pro vznik prostorového uspořádání celé makromolekuly [14].
- **Sekundární struktura** vypovídá o prostorovém uspořádání peptidových vazeb. Tato struktura vzniká díky možnosti v řetězci vytvořit vodíkové můstky mezi vodíkem na dusíku peptidové vazby a kyslíkem karbonylu na čtvrtém následujícím aminokyselinovém zbytku [10, 14]. Existují dvě struktury – α -helix (peptidový řetězec je stočený do pravotočivé šroubovice) a β -hřeben (struktura skládaného listu se zcela roztaženým a mírně zprohýbaným řetězcem) [12, 15].
- **Terciární struktura** určuje prostorové uspořádání vzdálených částí řetězce, tím celkový vztah molekuly. Na této struktuře se podílí vodíkové vazby, iontové vazby, disulfidické vazby nebo Van der Waalsovy síly [10, 13].
- **Kvarterní struktura** udává vzájemné uspořádání jednotlivých podjednotek (polypeptidových řetězců) bílkovinné molekuly [14].

2.2.2 Denaturace proteinů

Protein v původní struktuře je nativní protein, jehož struktura je málo stabilní, ale naopak vykazuje vysokou citlivost na změny v prostředí [11]. Proteiny jsou často vystaveny silně kolísavým podmínkám okolního prostředí, které poté vedou ke změně jejich vlastností [16]. Jednou z přeměn může být změna sekundární a terciární struktury, čímž dochází k porušení slabých vazebných interakcí a rozvinutí proteinu [17]. Této ztrátě charakteristické nativní struktury, kde nedochází ke změně chemické stavby proteinu, říkáme denaturace [12]. K denuraci dochází působením již mírných fyzikálních vlivů (např. zvýšená teplota, mechanické a povrchové síly, pronikavé záření, ultrazvuk apod.) a chemických faktorů (extrémy pH, nepolární rozpouštědla, působením silných kyselin, močovina, tenzidy a další).

Rozsáhlé konformační změny mohou být buď vratné (reverzibilní), nebo nevratné (ireverzibilní) [12, 13]. Při reverzibilní denuraci může po odstranění denaturačního prostředí (např. močoviny) dojít ke spontánní renaturaci proteinu, a tím k obnově jeho původní funkce (Obrázek 3) [11]. Ireverzibilní změna je doprovázena ztrátou biologické aktivity daného proteinu [10, 13].



Obrázek 3: Denaturace a renaturace proteinu [18]

2.2.3 Rozdělení proteinů

Proteiny lze rozdělit podle několika kritérií, podle chemického složení je rozdělujeme na jednoduché (složené pouze z aminokyselinových jednotek) a složené neboli konjugované (obsahující i nebílkovinnou složku). Složené proteiny lze rozdělit na několik typů [10, 14]:

- Glykoproteiny – obsahují kovalentně vázané monosacharidy nebo oligosacharidy
- Fosfoproteiny – obsahují esterově vázané zbytky kyseliny fosforečné
- Metaloproteiny – obsahují ionty kovů
- Lipoproteiny – obsahují lipidovou složku, vyskytují se např. v krevní plazmě
- Hemoproteiny – obsahují krevní barvivo hem
- Nukleoproteiny – obsahují části nukleových kyselin, které se elektrostatickými silami vážou na bílkovinnou složku

Proteiny je dále možné dělit na základě jejich funkce. Jak již bylo zmíněno, podílejí se na velkém množství různých procesů ve všech živých organismech. Jejich stavební jednotky - aminokyseliny - slouží jako zdroj dusíku, který je nepostradatelným biogenním prvkem. Mezi nejčastější funkce proteinů patří [13, 14]:

- Funkce stavební a podpůrná (skleroproteiny, např. kolagen)
- Funkce katalytická (biokatalyzátory – enzymy)
- Regulace metabolických procesů (hormony, např. inzulin)
- Imunitní obrana (protilátky, např. imunoglobulin)
- Transport (např. hemoglobin)
- Vznik a přenos nervového vzruchu (lipoproteinové komplexy)
- Ukládání látek (např. ferritin)
- Zásobní (např. ovalbumin)
- Pohybovou (např. myozin)

Proteiny se také vyznačují různým tvarem a rozpustností. Na základě těchto kritérií je lze rozlišit na:

- Globulární (sféroproteiny) – tyto proteiny mají nepravidelný kulovitý či protáhle elipsoidní tvar a jsou rozpustné ve vodě nebo ve zředěných roztocích neutrálních solí. Jejich molekula se podobá micelle, má tedy nepolární jádro a polární obal.
- Fibrilární (skleroproteiny) – jsou skupinou proteinů vláknitého tvaru a většinou jsou nerozpustné ve vodě nebo v ředěných roztocích solí. Pro fibrilární proteiny je typický častý výskyt pravidelností v pořadí aminokyselinových zbytků [10, 12].

2.2.4 Izolace proteinů

Cílem izolace proteinů je získat protein v co nejvyšší čistotě a v co nejvyšší koncentraci. Častým počátečním krokem při izolaci proteinů z biologických materiálů je extrakce [19]. Způsob extrakce závisí na vlastnostech výchozího materiálu, např. eukaryotní buňky pěstované v živném médiu stačí suspendovat v hypotonickém roztoku. Při extrakci proteinů z živočišného a rostlinného materiálu se velmi často využívají pufry. U některých vzorků se využívají pufry s obsahem různých detergentů mající za cíl zvýšit extrakční výtěžek. Pufry by měly vykazovat dostatečně velkou pufovací kapacitu a samotná extrakce by měla probíhat při takovém pH, při kterém je izolovaný protein stabilní. U většiny proteinů je vhodné pracovat za snížené teploty (4 °C) případně s přidavkem inhibitorů proteáz aby se zamezilo degradaci izolovaných proteinů.

Při extrakci proteinů z rostlinných tkání je potřeba také počítat s pevnou buněčnou stěnou rostlinných buněk, která může být rozrušena buď mechanickou nebo chemickou cestou. K chemickému odbourání buněčné stěny je možné použít detergenty, organická rozpouštědla (např. aceton, toluen) nebo enzymy (např. celulázy, hemicelulázy) [20]. Mechanicky lze buňky rozbít např. mletím, pískem, oxidem hlinitým, použitím mixeru, využitím Frenchova lisu. Po rozbítí buněk se surový lyzát přefiltruje nebo odstředí a protein, který izolujeme, zůstane v roztoku. Izolovaný protein může být opět ovlivněn pH, teplotou, enzymy, koncentrací roztoku proteinu a dalšími faktory, které mají vliv na jeho stabilitu.

Každý biologický materiál obsahuje velké množství nejrůznějších látek (nízkomolekulární látky, soli, nukleové kyseliny aj.) a některé se dokonce svými vlastnostmi podobají, což je při analýze nežádoucí [19]. Aby byl izolovaný protein získán v co nejčistším stavu, je v průběhu izolace potřeba odstranit co nejvíce kontaminujících sloučenin. Proto se využívají různé separační techniky, které využívají rozdílné vlastnosti látek, např. rozdíly molekulových hmotností mezi proteiny, polypeptidy a malými molekulami [21]. Nejčastěji využívané separační metody s využitím diferencí v molekulové hmotnosti jsou např. gelová filtrační chromatografie nebo membránové procesy jako např. dialýza [22].

2.3 Techniky použité v práci

2.3.1 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou techniky určené především k separaci a následné detekci látek nesoucí elektrický náboj, který mají buď vlastní, nebo získaný interakcí s jinou látkou [23]. Jejich základem je migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli [24].

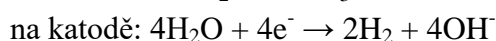
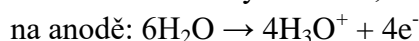
Lze je rozdělit podle průběhu vlastní separace, např. zónová elektroforéza, izotachoforéza nebo izoelektrická fokusace. Další rozdělení je podle prostředí, v němž separace probíhá, např. na papíře, v gelu nebo ve volném elektrolytu. Každá z technik má své uplatnění a každá má výhody pro určitý typ analýz [23].

2.3.1.1 *Izoelektrická fokusace*

Izoelektrická fokusace (IEF), z angl. isoelectric focusing patří do kategorie rovnovážné elektroforézy umožňující separaci amfoterních látek, jako jsou aminokyseliny, peptidy nebo proteiny, podle jejich izoelektrického bodu (pI) [6, 25, 26]. Jak již název vypovídá, IEF k zafokusu molekuly v definované zóně využívá jejich elektrický náboj, tzn. distribuci kladných a záporných nábojů v molekulách. V závislosti na pH prostředí, mají amfoterní molekuly kladný, záporný nebo nulový celkový náboj [26]. Celkový náboj každého proteinu je dán součtem všech jeho kladných a záporných nábojů. Ty jsou určeny ionizovatelnými kyselými a zásaditými postranními řetězci konstitutivních aminokyselin a prostetických skupin proteinů. Pokud počet kyselých skupin v proteinu převyšuje počet zásaditých skupin, hodnota pI tohoto proteinu bude nízká a protein bude klasifikován jako kyselý. Pokud je v proteinu více zásaditých skupin, hodnota pI bude vysoká a protein bude klasifikován jako zásaditý. Proteiny vykazují značné rozdíly hodnot pI, které se obvykle pohybují v rozmezí pH 3–12 a navíc mnoho z nich má pH mezi 4 a 7 [27].

Při izoelektrické fokusaci se jako nosný elektrolyt využívá směs amfoterních sloučenin. Působením elektrického pole na tuto směs amfolytů se vytvoří gradient pH, v němž probíhá fokusace. Separované látky (amfoterní molekuly nesoucí náboj) v tomto prostředí migrují tak dlouho, dokud se nedostanou do části separačního prostřední, kde je pH rovno jejich izoelektrickému bodu [20]. Proteiny jsou pozitivně nabitě v roztocích s pH nižším než je jejich pI a naopak záporně nabitě v roztocích s vyšším pH než je jejich pI. Proto platí, že pokud má separační roztok pH nižší, než je pI proteinu, bude molekula proteinu v průběhu fokusace migrovat ke katodě. Pokud je hodnota pH roztoku vyšší než hodnota pI proteinu, protein bude migrovat k anodě. Pokud je protein v místě svého izoelektrického bodu, dále se v elektrickém poli pohybovat nebude [27]. Jestliže molekula pronikne pryč ze své zóny pI, vstupem do oblasti s jiným pH dojde ke změně jejího výsledného náboje a elektroforetický pohyb ji vrátí zpět do místa jejího izoelektrického bodu. Každá molekula je zaostřena do úzké zóny kolem svého izoelektrického bodu. Takto lze od sebe oddělit molekuly, jejichž hodnota pI se liší o 0,001 jednotky pH [6, 28].

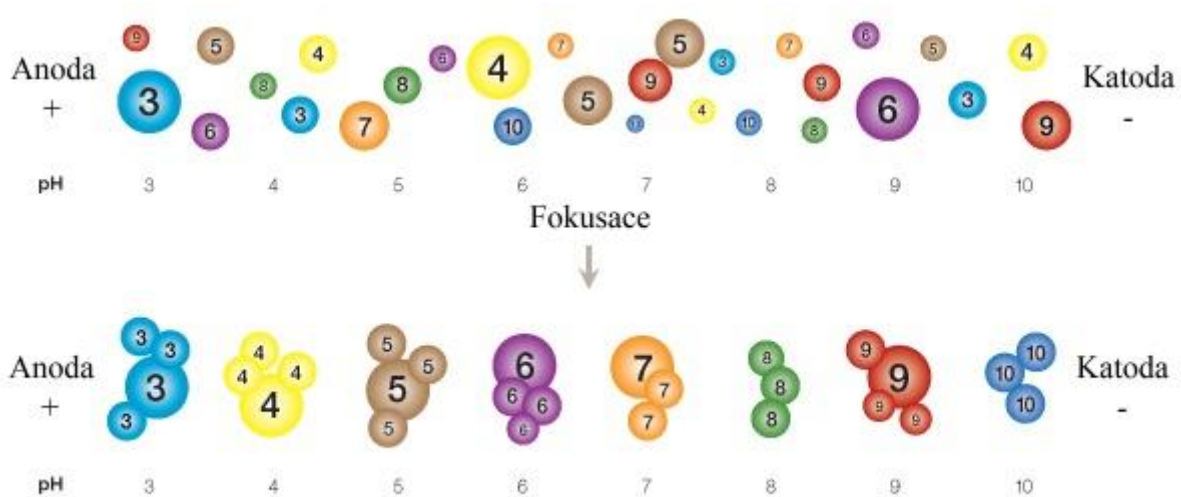
Gradient pH vzniká na základě elektrochemických reakcí, které probíhají na elektrodách:



Pro vznik stabilních gradientů pH se většinou využívá směs nízkomolekulárních oligomerů, které obsahují disociované skupiny, především karboxylové skupiny a aminoskupiny. Jejich izoelektrické body se pohybují v určeném rozmezí. Polyakrylamidový nebo dextranový gel jsou antikonvekčním médiem a pod vlivem elektrického pole se směs těchto polyamfolytů formuje podle svých izoelektrických bodů. Nejkyselejší se shromáždí u anody a směrem ke katodě se rozmísťují amfolyty se stoupající zásaditostí. Elektrolytické pochody, které

probíhají u elektrod, poskytují amfolytům vodíkové a hydroxylové protiionty. Díky tomuto pochodu dojde k vytvoření gradientu pH a v němž probíhá izoelektrická fokusace.

Interval pH, tvar a vlastnosti vzniklého gradientu jsou určeny počtem a vlastnostmi jednotlivých amfolytů. Gradient se vytváří fokusací složek amfolytů při jejich izoelektrickém bodu, proto amfolyty musí disponovat dostatečnou pufrovací kapacitou v oblasti svých pI, aby byl gradient jednoznačně určen i v přítomnosti amfoterních látek ze vzorku. Pokud v roztoku existuje více amfoterních substancí s pufrovací kapacitou, které se od sebe liší svými pI, vytvoří se gradient pH. Je-li v roztoku dostatečné množství amfolytických substancí s vhodně rozmístěnými pI a s pufrovacími kapacitami, dojde k jejich vzájemným překryvům a vytváří se tak kontinuální gradient pH. Nízkomolekulární látky, které se využívají pro tvorbu amfolytových pufrovacích systémů, tzv. amfolytové nosiče, v elektrickém poli nelze zcela oddělit, protože velmi rychle difundují a zóny jejich působení se překrývají. Tím se liší od vysokomolekulárních látek, které se nejčastěji separují izoelektrickou fokusací [6].



Obrázek 4: Schéma izoelektrické fokusace [29]

Druhy izoelektrické fokusace:

- Gelová IEF
 - S nosnými amfolyty
 - S imobilizovaným gradientem
- Kapilární IEF
- Preparativní IEF
 - Free flow
 - Komorová

2.3.1.2 Mikropreparativní izoelektrická fokusace

Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, v. v. i., Brno vyvinul novou metodu, ke které také vlastní patent s názvem „Způsob separace a zkoncentrování amfolytů isoelektrickou fokusací a zařízení pro provádění tohoto způsobu“. Tento patent byl udělen 1. 2. 2013 a jeho autorem je doc. RNDr. Karel Šlais, DrSc. Tato metoda umožňuje separaci a zkoncentrování amfolytů, zejména proteinů, odpařovací diskontinuální izoelektrickou fokusací [30].

Separace v mikropreparativní izoelektrické fokusaci původně probíhala na proužku netkané textilie, který byl napuštěn separačním médiem. Proužek byl umístěn v horizontální pozici v otevřeném plastovém systému tvaru „V“, který můžeme nazývat jako tzv. koryto [31, 32]. Při následném zpracování frakcí se s netkanou textilií špatně pracovalo, a proto se pokračovalo na vývoji vhodnějšího systému, který by umožňoval pohodlnější zpracování separovaného vzorku. Základem nově vyvinutého separačního média je celulóza, která se suspenduje ve vodném roztoku obsahující jednoduché pufrů, ethylenglykol, glycerol, neionogenní povrchově aktivní látky a barevné pI markery. Ethylenglykol a glycerol dostatečně zvyšují viskozitu a zabraňují médiu během separace zcela vyschnout [33]. Separací médium je nadávkováno do koryta, kde se rozlije po jeho celé délce. Následně se do koryta nanese vzorek rozpuštěný v roztoku chloridu sodného a poté vlivem vloženého stejnosměrného napětí mezi dvěma elektrodami umístěnými na konci koryta dochází k separaci amfolytů (proteinů). Voda se během fokusace částečně odpařuje a separace probíhá ve vytvořené vrstvě celulózy, která má na konci analýzy gelovitý vzhled. Rychlost odpařování vody z koryta je možné zvýšit např. proudem vzduchu z větráku nebo naopak zpomalit překrytím koryta. Odpařování lze také regulovat teplotou a výběrem přidané kapaliny, přičemž tyto kapaliny jsou výhodné i pro zlepšení stability proteinů v roztocích [30].

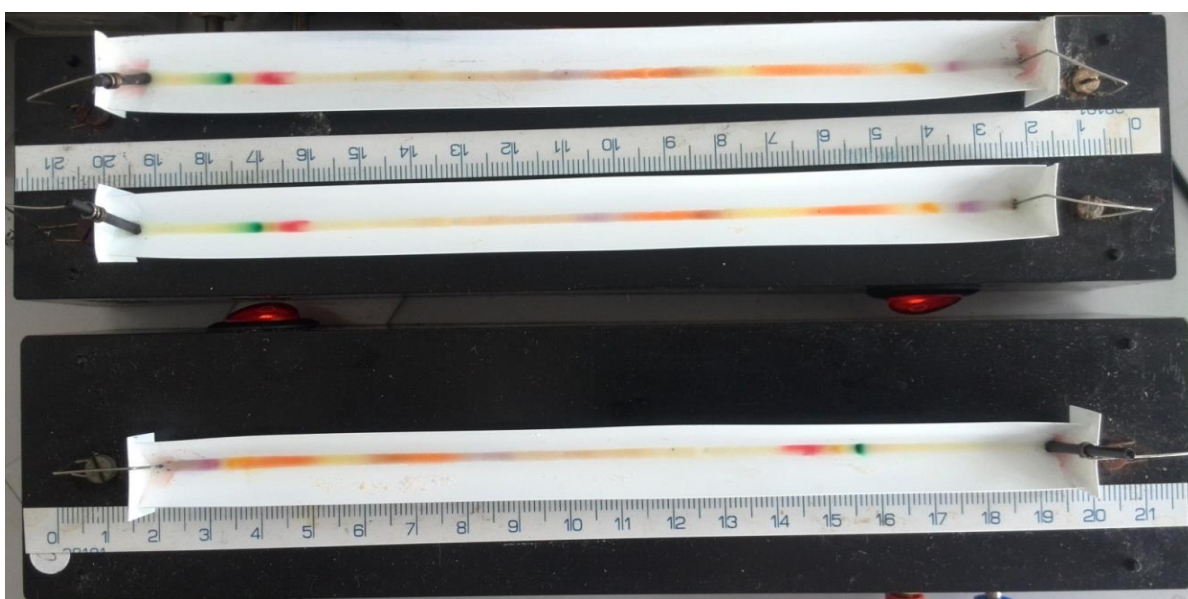
Průběh separace a odhad pH gradientu lze okem sledovat a to díky barevným nízkomolekulárním pI markerům přidávaných do suspenze (Tabulka 1). To umožňuje optimalizaci procesu fokusace, a protože konečné pozice analytů jsou označeny zónami zafokusovaných pI markerů, je možné uskutečnit následný sběr jednotlivých frakcí v požadovaném rozmezí pH [31, 32]. Po ukončení separace lze separační suspenzi s analyty jednoduše rozdělit na jednotlivé frakce a poté jej špachtlí vyjmout z koryta. Frakce je možné uchovat, nebo ihned zpracovat. A protože je mikropreparativní izoelektrická fokusace kompatibilní se širokou škálou technik, frakce lze dále analyzovat pomocí různých analytických technik. Následným zpracováním může být extrakce vodou nebo jinými vodnými roztoky [30].

Tabulka 1: Přehled barevných pI markerů [31]

| Číslo | Název | pI | Barva |
|-------|---|------|-------------|
| 1 | Patentní modř V | 2,0 | Zelená |
| 2 | Kyselina 2-({4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]fenyl}tereftalová | 2,8 | Červená |
| 3 | Kyselina 5-(dimethylamino)-2-[(3-pyridyl)azo]benzoová | 3,9 | Oranžová |
| 4 | 3',3''bis(4-morfolinomethyl)-5',5''-dichlorfenol-sulfoftalein | 5,3 | Levandulová |
| 5 | Kyselina 2-{{3,5-bis(4-morfolinomethyl)-4-hydroxyfenyl}azo}benzoová | 5,7 | Žlutá |
| 6 | 3',3''-bis(4-morfolinomethyl)-o-kresolsulfoftalein | 6,2 | Červená |
| 7 | 4-methyl-6-nitro-2-(4-morfolinomethyl)fenol | 7,2 | Žlutá |
| 8 | 2,6-bis[4-morfolinomethyl]-4-[2-(thiazoyl)azo]fenol | 8,0 | Červená |
| 9 | 4-methyl-6-nitro-2-[(3-dimethylamino)propylaminomethyl]fenol | 9,0 | Žlutá |
| 10 | 3',5',3''-tri(N, N-dimethylaminomethyl)fenolftalein | 10,0 | Fialová |
| 11 | 3',5',3'',5''-tetrakis(N, N-dimethylaminomethyl)fenolftalein | 11,0 | Levandulová |



Obrázek 5: Schéma systému mikropreparativní izoelektrické fokusace [31]



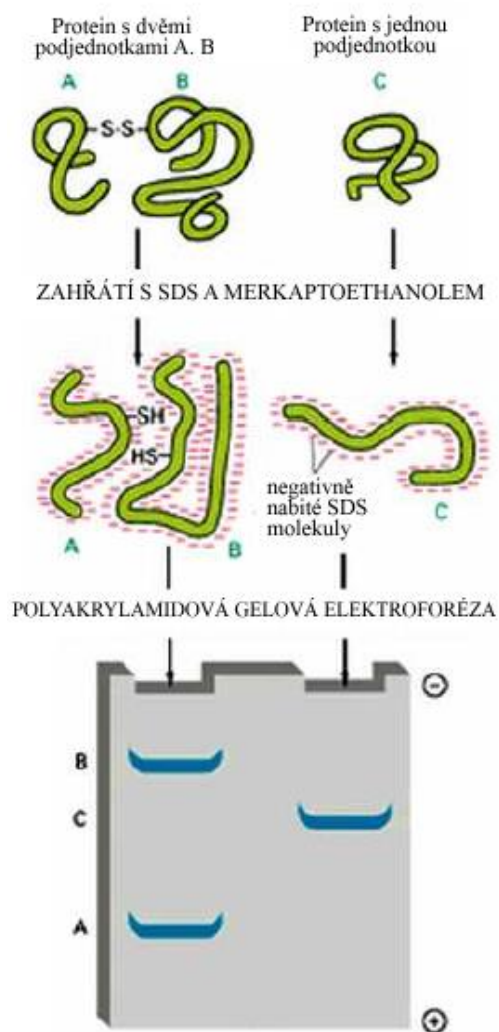
Obrázek 6: Systém mikropreparativní izoelektrické fokusace při separaci

2.3.1.3 SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je jednou ze zónových technik a jedná se o elektroforetický způsob separace látek na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Je to jednoduchá, levná a rychlá technika nejčastěji využívaná pro stanovení molekulové hmotnosti, analýzu čistoty proteinů, sledování purifikačního procesu cílového proteinu, odhad relativní a absolutní koncentrace sledovaných proteinů v proteinové směsi, pro detekci proteinových modifikací, při studiu kvarterní struktury protein, ale i dalších aplikacích [34, 35, 36, 37]. Polyakrylamidový gel vytváří polymerní síť s póry, jimiž se molekuly pohybují různou rychlostí v závislosti na své velikosti. Malé částice se pohybují rychleji, velké pomaleji [34, 38]. Principem separace látek v gelové elektroforéze je právě jejich různě rychlá migrace v elektrickém poli na nosiči. Výhoda polyakrylamidového gelu spočívá v jeho mechanické pevnosti, průhlednosti, inertnosti a vysoké rozlišovací schopnosti [35, 36].

Polyakrylamidový gel vzniká polymerizací akrylamidu, který vytváří dlouhé lineární řetězce. Zesíťování akrylamidových podjednotek způsobuje tzv. crosslinker, kterým je nejčastěji N,N'-metylenbisakrylamid. Reakce probíhá jako radikálová polymerizace, kde je iniciátor obvykle peroxodisíran amonný (APS), který způsobuje štěpení vazby O–O. K urychlení polymerizace akrylamidu se využívá volná zásada N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED), který katalyzuje tvorbu volných radikálů APS [38, 39].

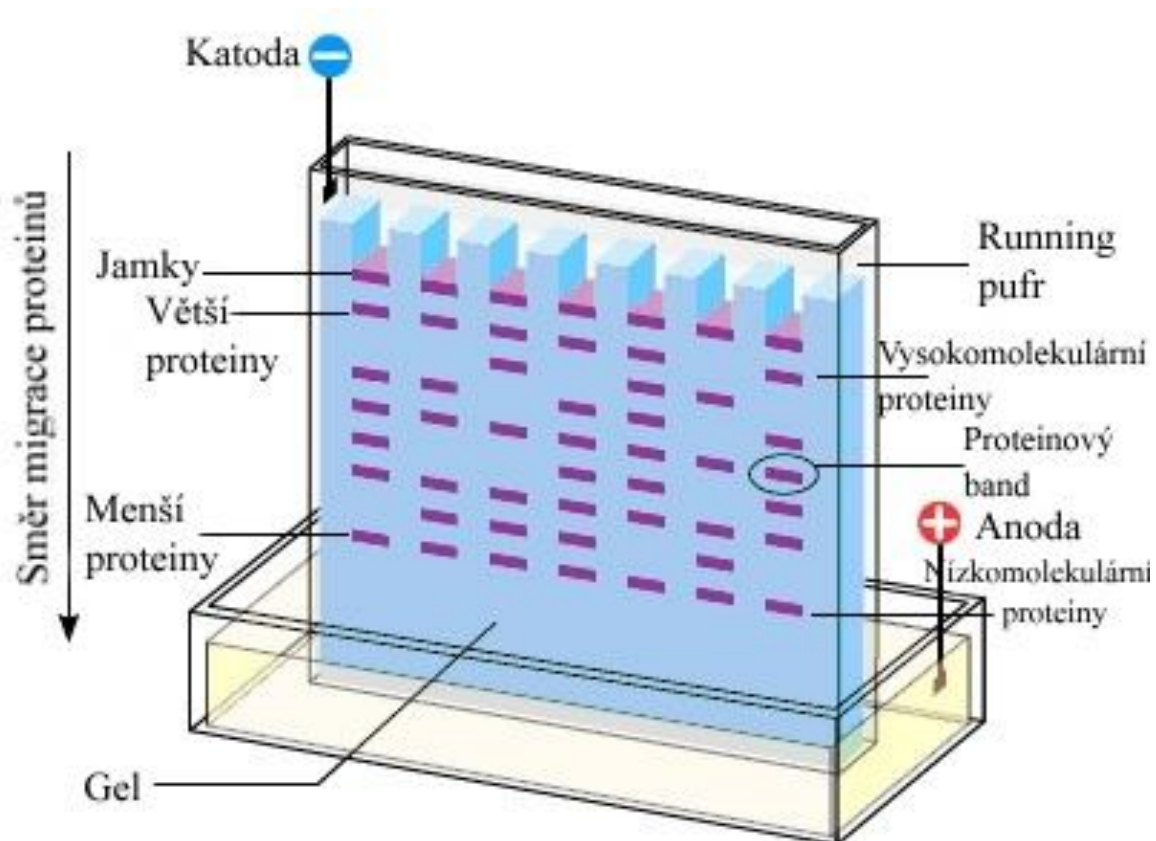
Dodecylsulfát sodný (SDS) je anionaktivní detergent, který udělí proteinu vysoký negativní náboj úměrný jeho hmotnosti. Díky SDS také dochází k denaturaci proteinu [34]. Proteiny SDS absorbují v poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu. To znamená, že poměr náboje a velikosti je pro všechny proteiny stejný a separace lze dosáhnout pouze na základě velikosti [35, 36]. Po nanesení separované směsi na gel a vložení gelu do elektrického pole, migrují proteiny ke kladně nabitě elektrodě (anodě) [40, 41].



Obrázek 7: Princip SDS-PAGE elektroforézy [40]

Gelová elektroforéza může probíhat buď v kontinuálním, nebo diskontinuálním uspořádání. V kontinuálním uspořádání je složení pufru, který je využit pro přípravu gelu shodné s elektrodoým pufrém. Kontinuální gely jsou jednoduché na přípravu, ale výsledkem separace mohou být širší proužky separovaných proteinů a horší rozlišení.

Diskontinuální elektroforéza využívá systém, ve kterém se rozlišují pufrы pro přípravu gelu a pufr sloužící jako elektrolyt. Diskontinuální systém se skládá z gelu zaostřovacího a separačního [42, 43]. Tyto dva gely se odlišují velikostí pórů a hodnotou pH pufru použitého k přípravě gelu. Hodnota pH se nejčastěji liší přibližně o dvě jednotky. Zaostřovací gel má díky nižší koncentraci akrylamidu velké póry a nebrání tak proteinům v pohybu [40]. Jeho hodnota pH je nižší, cca 6,8 a dochází v něm k zakoncentrování proteinů do úzkých zón před vstupem do separačního gelu. Separační gel má menší póry než gel zaostřovací, jeho pH je cca 8,8 a v tomto gelu probíhá separace na základě velikosti proteinů. Separace může probíhat buď při konstantním proudu, napětí nebo výkonu [34, 44].



Obrázek 8: SDS-PAGE proteinů [29]

Většina proteinů je bezbarvá, proto po ukončení elektroforetické separace musí být jejich pozice v gelu detekována barvením. Vizualizace se provádí pomocí nejrůznějších technik, z nichž nejběžnější je barvení amidočerní (amido black), coomassie brilliant blue (CBB), stříbrem nebo fluorescenčními barvivy. Jednotlivé barvicí metody se od sebe liší svou citlivostí, např. barvení stříbrem je citlivější než např. amidočerní a často se proto používá pro barvení polyakrylamidových gelů [23].

Ideální metoda vizualizace by měla být:

- dostatečně citlivá,
- umožňující kvantitativní analýzu,
- mající širokou linearitu,
- kompatibilní s hmotnostní spektrometrií,
- netoxická a šetrná k životnímu prostředí,
- cenově dostupná.

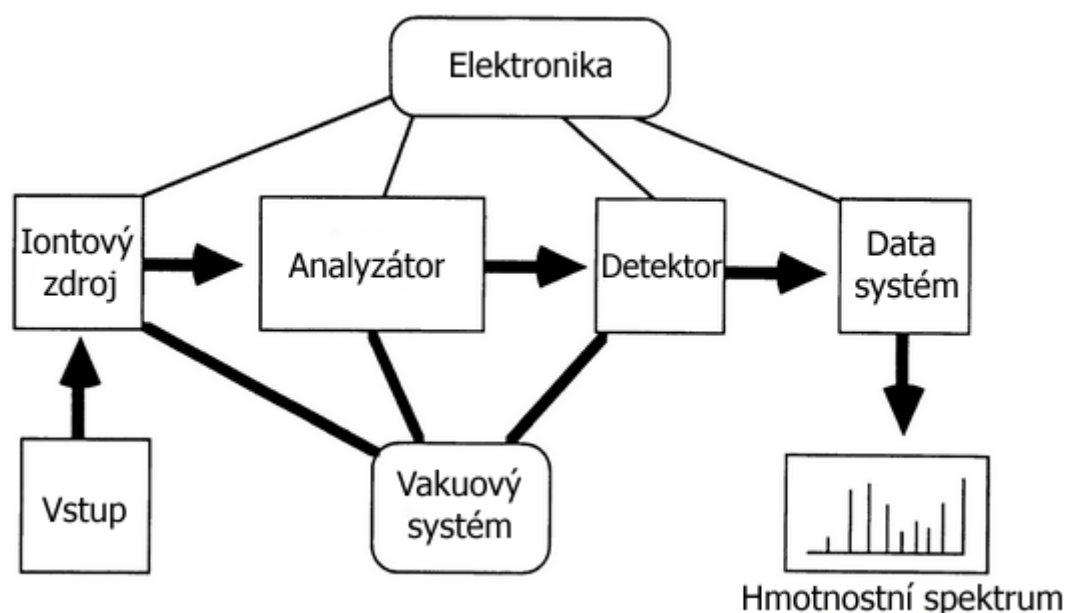
Bohužel je těžké najít metodu, která splňuje všechny požadavky. V praxi se nejčastěji využívá CBB, stříbro a fluorescenční barvení [36]. Proteiny se ale liší v aminokyselinovém složení a také prostorovou strukturou, což ovlivňuje stupeň vázání barviva. Například CBB se lépe váže na proteiny bohaté na bazické aminokyseliny (histidin, lysin, arginin), naopak sacharidové skupiny glykoproteinů snižují vázání CBB, což vede ke špatnému nabarvení. Je tedy potřeba znát vlastnosti proteinu a podle toho vybrat správnou metodu barvení gelu [45].

Velkou nevýhodou SDS-PAGE je to, že akrylamid a TEMED jsou látky s neurotoxickými účinky a kumulují se v organismu, proto je potřeba dbát při práci s těmito látkami zvýšené opatrnosti a používat ochranné prostředky (např. rukavice) [46].

2.3.2 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS), z angl. mass spectrometry, je fyzikálně-chemická metoda určující hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty [47]. V současnosti je to nejrychleji se rozvíjející analytická metoda, která poskytuje cenné údaje o identitě a struktuře analyzovaných látek [48]. Tato metoda je v současnosti rozšířena snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii, chemii k biologii, k analýze životního prostředí, do farmacie a medicíny [49].

Hmotnostní spektrometr se skládá z 5 hlavních částí, tj. iontový zdroj, analyzátor, detektor, vakuový systém a datasystém (viz obrázek 6) [48].

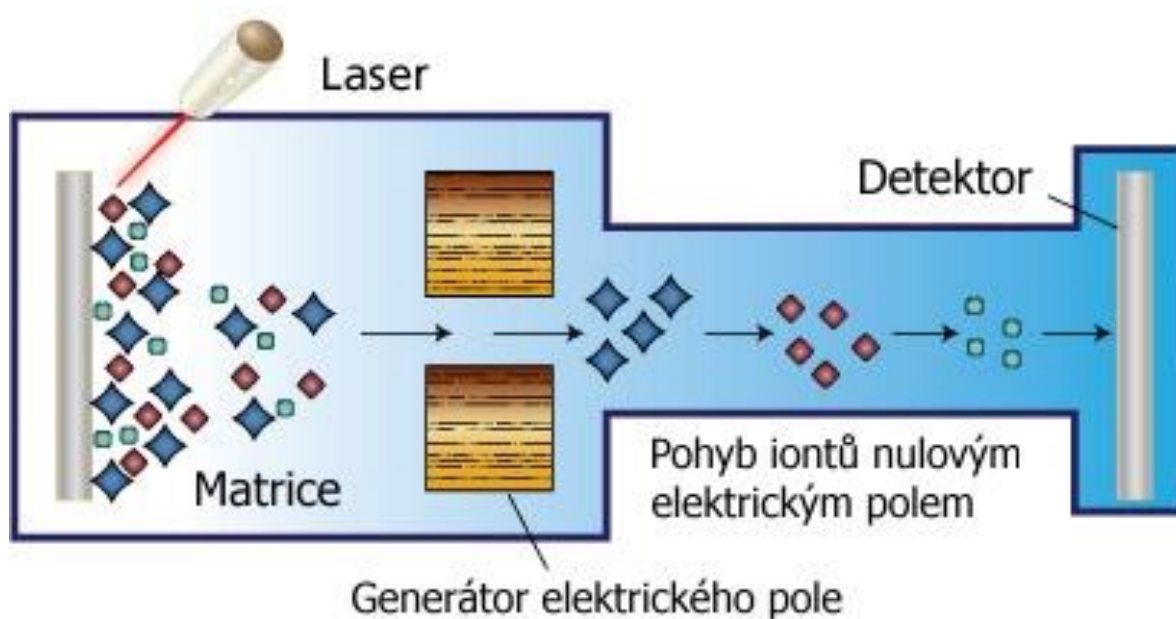


Obrázek 9: Schéma hmotnostního spektrometru [50]

Iontový zdroj slouží k převedení molekul vzorku na ionty. Existuje několik ionizačních technik, které se volí podle vlastností daného analytu. Podle množství dodané energie při ionizaci, je můžeme dělit do dvou základních skupin, tzv. „měkké“ a „tvrdé“ [51]. U tvrdé ionizační techniky dochází k rozkladu látek a vznikají bohatá fragmentační spektra umožňující identifikaci analyzované sloučeniny. Do této skupiny patří např. elektronová ionizace. Naopak mezi měkké ionizační techniky se řadí např. chemická ionizace za atmosférického tlaku, ionizace elektrosprejem nebo MALDI (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization) [52, 53].

Pro analýzu proteinů a jiných makromolekul se velmi často využívá desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice. Před samotnou ionizací je vzorek nanesen na MALDI destičku, kde je smíchán s matricí, která v této technice hraje klíčovou roli, protože absorbuje energii laseru. [52, 59]. Současně dochází k ionizaci matrice, která předává náboj analytu.

Proces ionizace zahrnuje krátký intenzivní puls laseru, který zahřeje a desorbuje matici a analyty [51, 55]. I když tuto ionizaci lze realizovat za atmosférického tlaku, celý proces probíhá ve vakuu [59]. Vzniklé ionty analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem (25–30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do analyzátoru [55, 56]. U techniky MALDI se většinou používá analyzátor doby letu, tzv. TOF (z angl. time-of-flight) kde se ionty pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Měří se doba letu částice, z níž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice. Těžší ionty dosáhnou detektoru za delší čas než lehčí ionty [57, 58]. Detektor je umístěn na konci analyzátoru, kde dochází ke generaci signálu po dopadu iontů [57, 60]. Jako detektory se nejčastěji používají elektronásobiče [38, 48]. Důležitou součástí každého hmotnostního spektrometru je software pro kontrolu a řízení celého systému a dále pro sběr a zpracování naměřených dat [23, 48].



Obrázek 10: Schéma hmotnostního spektrometru MALDI-TOF [62]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje, chemikálie, proteiny a roztoky

3.1.1 Přístroje a zařízení

- Aparatura pro SDS-PAGE Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell, *Bio-Rad, USA*
- Centrifuga MiniSpin plus, *Eppendorf, Německo*
- Třepačka Thermomixer comfort, *Eppendorf, Německo*
- Vortex MS1 Minishaker, *Maneko, Česká republika*
- Míchačka, Mini Gyro Rocker SSM3, *Stuart, Spojené království*
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF[™] 5800 System, *AB Sciex, USA*
- Analytické váhy 925M-202A, *Precisa, Švýcarsko*
- Předvážky, HF-200G, *And, Spojené království*
- Aparatura pro mikropreparativní separaci, připravil doc. RNDr. Karel Šlais, DrSc., *Ústav analytické chemie AV ČR, Česká republika*
- Lednice kombinovaná s mrazicím boxem, *AEG, Švédsko*
- pH metr WTW pH 3210 s pH elektrodou SenTix 41, *WTW, Česká republika*

3.1.2 Chemikálie

- Cytochrom c z koňského srdce, typ VI, čistota $\geq 99\%$, *Sigma-Aldrich, USA*
- Hovězí sérový albumin, Frakce V (BSA, bovine serum albumin), čistota $\geq 99\%$, *Sigma-Aldrich, USA*
- Chlorid sodný (NaCl), *Sigma-Aldrich, USA*
- Akrylamid ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$), *Sigma-Aldrich, USA*
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), *Sigma-Aldrich, USA*
- Kyselina chlorovodíková (HCl), *Penta, Česká republika*
- Dodecylsírán sodný (SDS), *Bio-Rad, USA*
- Peroxodisírán amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, *Bio-Rad, USA*
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin), *Bio-Rad, USA*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R250), *Bio-Rad, USA*
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G250), *Bio-Rad, USA*
- Kyselina octová (CH_3COOH), *Penta, Česká republika*
- Isopropanol ($\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, *Fisher Scientific, Česká republika*
- α -celulóza, čistota $> 95\%$, *Sigma-Aldrich, USA*
- Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), *Sigma-Aldrich, USA*
- Ethylenglykol $\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$, *Penta, Česká republika*
- Triton X-100, *Sigma-Aldrich, USA*
- Butanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$), *Lach-Ner, Česká republika*
- β -merkptoethanol, *Sigma-Aldrich, USA*
- Laemmlí vzorkový pufr, *Bio-Rad, USA*
- Proteinové markery pro SDS-PAGE „Low Range“, *Bio-Rad, USA*

- Tris/glycin/SDS pufr, *Sigma-Aldrich, USA*
- Ethanol 96 % p.a. (CH₃CH₂OH), *Lachner, Česká republika*
- Acetonitril (CH₃CN), *Fluka, Německo*
- Kyselina trifluoroctová (CF₃COOH, TFA), *Fluka, Německo*
- Kyselina sinapová (kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová, C₁₁H₁₂O₅, SA), *Bruker, Německo*

3.1.3 Pomůcky

- Kádinky, odměrné válce, MALDI destička, lžičky, stojan na zkumavky, hmoždíř,
- špachtle, mikropipety, špičky, mikrozkušavky, plastové misky, fotoaparát.

3.1.4 Roztoky pro mikropreparativní izoelektrickou fokusaci

Tabulka 2: Složení separačního média

| Složka | Množství |
|--------------------------|----------|
| α-celulóza | 0,8 g |
| Glycerol | 0,5 ml |
| Ethylenglykol | 3,0 ml |
| 0,5% triton | 1,0 ml |
| Komponenty gradientu* | 2,0 ml |
| pI indikátory 20x ředěné | 0,6 ml |
| Voda | 12,9 ml |

Tabulka 3: *Komponenty gradientu

| Látka | pK1 | pK2 | Koncentrace v roztoku [mmol·l ⁻¹] |
|--|-----|-----|---|
| Kyselina iminodioctová | 1,8 | 2,6 | 2 |
| Kyselina asparagová | 1,9 | 3,7 | 2 |
| Kyselina glutamová | 2,2 | 4,3 | 5 |
| 1-imidazolacetát | 2,8 | 6,8 | 2 |
| 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina (HEPES) | 3,1 | 7,5 | 2 |
| 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin propansulfonová kyselina (EPPS) | 3,8 | 7,9 | 15 |
| Glycyl-glycin (DIGLY) | 3,2 | 8,2 | 15 |
| Kreatinin | 4,8 | 9,2 | 10 |
| Histidin | 6,0 | 9,3 | 10 |
| 2,2-Bis(hydroxyethyl)-(iminotris)-hydroxymethyl-methan (BIS-TRIS) | 6,5 | – | 15 |
| Imidazol | 7,1 | – | 15 |
| Tris | 8,3 | – | 2 |
| Ammediol | 8,8 | – | 2 |

3.1.5 Roztoky pro SDS-PAGE

- Vzorkový pufr: 3,55 ml vody, 1,25 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, 2,5 ml glycerolu, 10% SDS, 0,5% bromfenolová modř
- Elektrodotový pufr: $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,3, $192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin, 0,1% SDS
- Fixační roztok: 25 % isopropanolu, 10 % kyseliny octové, 65 % vody
- Barvicí roztok Coomassie blue: 0,1 g CBB R250, 50 ml 95 % ethanolu, 100 ml 85 % kyseliny fosforečné, 850 ml vody
- Barvicí roztok Coomassie blue: 0,1 g CBB G250, 50 ml 95 % ethanolu, 100 ml 85 % kyseliny fosforečné, 850 ml vody

Tabulka 4: Složení 12% separačního gelu

| Složka | Objem |
|---|-------------------|
| Destilovaná voda | 3,4 ml |
| 30% akrylamid | 4,0 ml |
| $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr, pH 8,8 | 2,5 ml |
| 10% SDS | 100 μl |
| 10% peroxidisíran amonný | 50 μl |
| TEMED | 5 μl |

Tabulka 5: Složení 5% zaostřovacího gelu

| Složka | Objem |
|---|-------------------|
| Destilovaná voda | 5,7 ml |
| 30% akrylamid | 1,7 ml |
| $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl pufr, pH 6,8 | 2,5 ml |
| 10% SDS | 100 μl |
| 10% peroxidisíran amonný | 50 μl |
| TEMED | 10 μl |

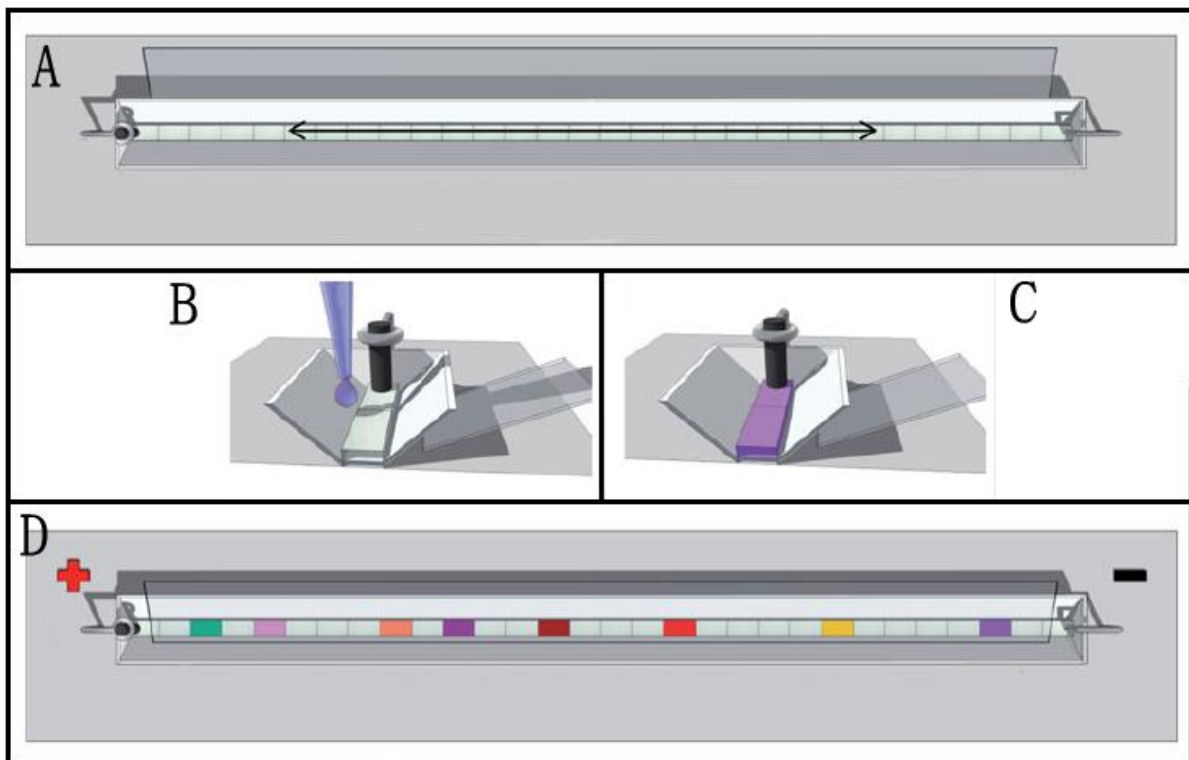
3.2 Mikropreparativní izoelektrická fokusace

Pro optimalizaci separace pomocí mikropreparativní izoelektrické fokusace byly použity standardní proteiny cytochrom c a albumin. Vzorky těchto proteinů byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml v 0,9% roztoku chloridu sodného. Tyto roztoky standardních proteinů byly při optimalizaci techniky nadávkovány do separačního média v korytě.

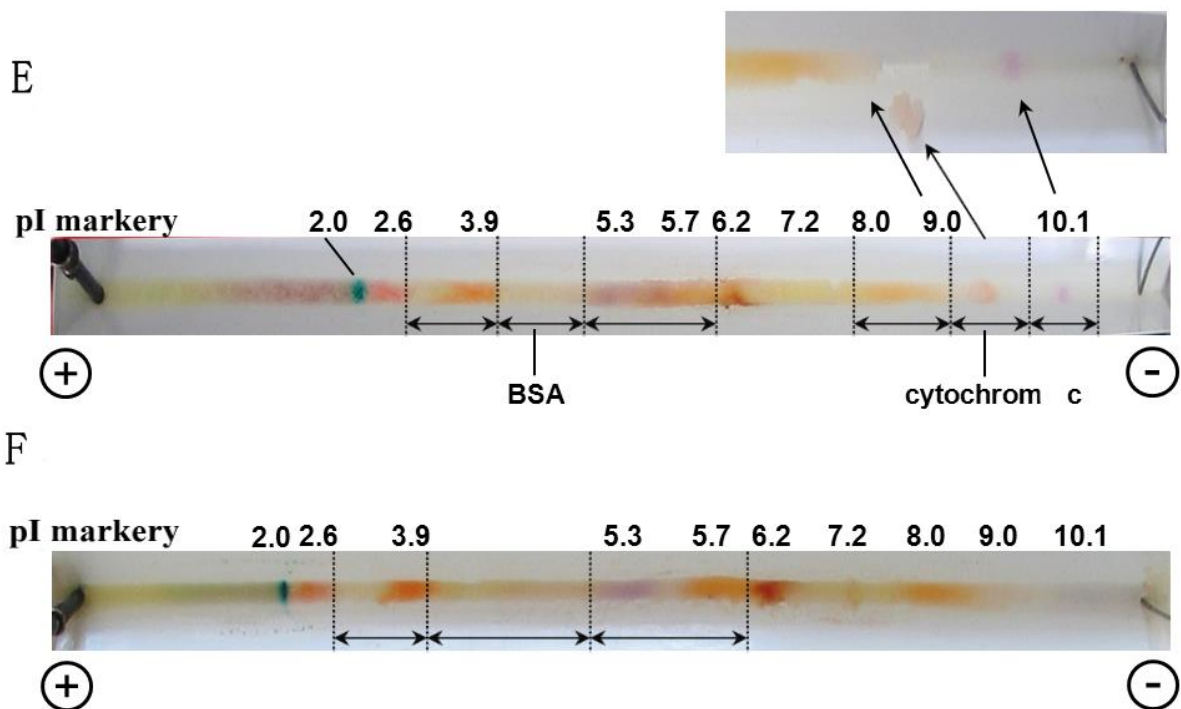
Pro experiment byla využita komerčně dostupná sinice rodu *Spirulina* od společnosti Iswari Superfood, s.r.o. (vzorek byl ve formě tablet). Tableta byla rozdrčena v hmoždíři a převedena do mikrozkuřavky. K prášku byl následně přidán 1 ml roztoku chloridu sodného. Vzorek byl promíchán na vortexu a třepače a poté byl umístěn do ultrazvukové lázně (10 min), čímž došlo k extrakci proteinů přítomných v sinici do roztoku chloridu sodného. Vzorek byl poté odstředěn na centrifuze (14 000 g po dobu 5 min). Supernatant obsahující vyextrahované

proteiny sinice *Spirulina* byl odebrán a separován pomocí mikropreparativní izoelektrické fokusace.

Separace byla provedena v kapalném separačním médiu nadávkovaném do plastových koryt, které byly vyrobeny z 0,25 mm silného polyvinylchloridu. Koryta byla ve tvaru „V“ o délce 175 mm. Do koryt horizontálně umístěných na elektrický zdroj bylo pipetou nadávkováno 700 μ l separačního celulóзовého média, které bylo připraveno podle tabulky 2. Médium bylo rovnoměrně rozprostřeno po celé délce koryta a do jeho prostřední části bylo nadávkováno 100 μ l roztoku vzorku (roztoku proteinu, směs proteinů nebo extrakt sinice *Spirulina*) a 50 μ l pH markerů (Tabulka 1). Poté byl zapnut zdroj přivádějící elektrický proud do koryta. Experimenty byly provedeny v různých časech. Po ukončení fokusace byly označeny frakce ohraničené pI markery a tyto frakce byly špachtlí převedeny do mikrozkušavek. Schéma mikropreparativní izoelektrické fokusace sběru frakcí je znázorněn na obrázku 11 a 12.



Obrázek 11: Schéma mikropreparativní izoelektrické fokusace. (A) koryto ve tvaru „V“, (B) nadávkování separačního média, (C) separační médium rozprostřené po celém korytě, (D) koryto po ukončení fokusace [31]

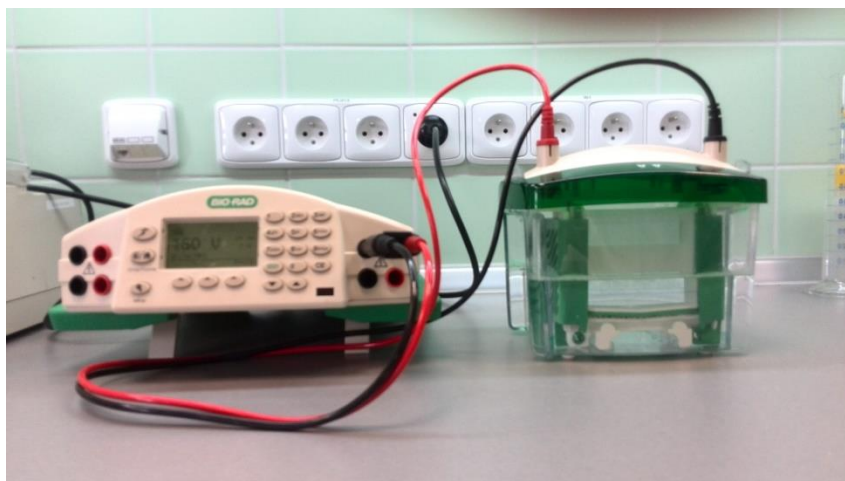


Obrázek 12: Koryta po ukončení izoelektrické fokusaci. (E) rozdělení jednotlivých frakcí podle pI markerů a sběr frakcí, (F) rozdělení jednotlivých frakcí podle pI markerů

3.3 SDS-PAGE

Pro analýzu pomocí SDS-PAGE byly nejdříve zpracovány frakce získané z mikropreparativní izoelektrické fokusace. Ke každé frakci odebrané z koryta bylo přidáno 100 μ l vzorkového pufru. Následně byly vzorky umístěny na třepačku a třepány po dobu 10 min a poté byly na 10 min vloženy do ultrazvukové lázně. Všechny vzorky poté byly povařením denaturovány (95 °C po dobu 5 min) a po povaření centrifugovány (14 000 g po dobu 5 min). Získaný supernatant byl v objemu 10 μ l nadávkován do jamek zaostřovacího gelu.

Gelová elektroforéza v polyakrylamidové gelu byla provedena ve vertikálním směru na aparatuře Mini Protean od společnosti Bio-Rad (Obrázek 13). Sestavení aparatury pro elektroforézu i příprava všech roztoků potřebných pro SDS-PAGE byla provedeno podle protokolu firmy Bio-Rad. Separační gel byl připraven podle tabulky 5 a polymeroval přibližně 40 min. Zaostřovací gel, do kterého byl umístěn hřebínek pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků byl připraven podle tabulky 6 a polymeroval asi 30 min. Jako proteinový standard byl zvolen komerčně dostupný proteinový standard Low Range pro SDS-PAGE od firmy Bio-Rad. Aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí, elektroforéza byla prováděna při konstantním napětí 160 V. Separace byla ukončena po doputování vodící barvy, kterou obsahovaly upravené vzorky (bromfenolová modř), ke spodní části separačního gelu. Gely byly po vyjmutí z aparatury vloženy na třepačku do fixačního roztoku (20 min) a poté byly 3x po dobu 10 min promývány vodou. Vizualizace proteinů byla provedena přes noc barvicím roztokem Coomassie blue.



Obrázek 13: Aparatura pro SDS-PAGE

3.4 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Pro analýzu vzorků pomocí MALDI-TOF MS byla jako matrice použita kyselina sinapová o koncentraci 20 mg/ml. Na přípravu 1 ml matrice bylo rozpuštěno 20 mg kyseliny sinapové v roztoku složeného z 600 μ l acetonitrilu a 400 μ l 0,1% kyseliny trifluoroctové.

Pro analýzu vzorků na hmotnostním spektrometru byly frakce odebrané z koryta upraveny tak, že ke každé frakci bylo přidáno 50 μ l acetonitrilu a 50 μ l 0,1% kyseliny trifluoroctové, vzorky byly promíchány na vortexu a poté vloženy do ultrazvukové lázně (5 min). Následně ke každému vzorku bylo přidáno 60 μ l matrice a směs byla dobře promíchána na vortexu. Poté bylo na MALDI destičku nanášeno 0,5 μ l matrice, po zaschnutí na ni bylo aplikováno 0,5 μ l vzorku, který byl po zaschnutí převrstven matricí v množství 0,5 μ l. MALDI destička s nanesenými vzorky byla vložena do přístroje hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. Měření bylo uskutečněno v pozitivním iontovém módu při lineárním uspořádání. Před vlastní analýzou vzorků byla provedena kalibrace s použitím kalibrační směsi proteinů obsahující cytochrom c (12 360 Da), myoglobin (16 951 Da) a trypsinogen (23 981 Da). Naměřená data byla vyhodnocena v programu Data Explorer (verze 4.6).



Obrázek 14: Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF™ 5800 System [63]

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

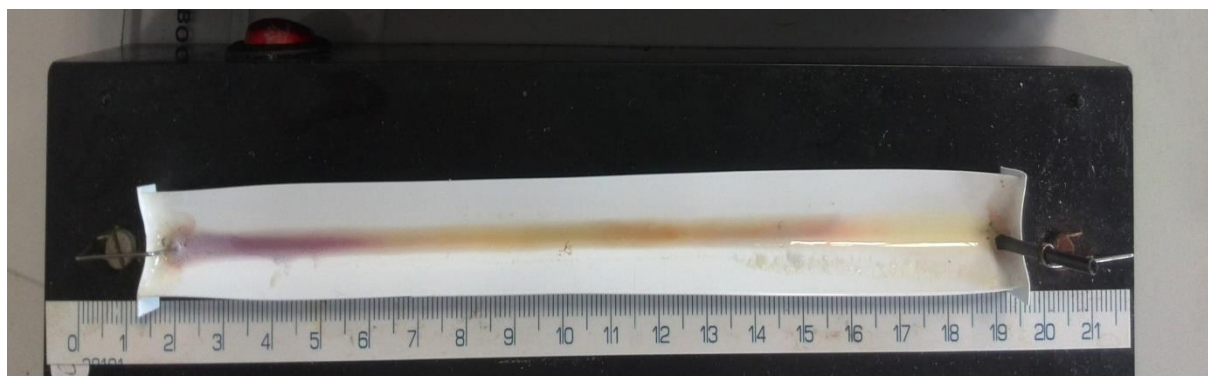
Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci mikropreparativní izoelektrické fokusace. Optimalizace byla nejdříve provedena s jednotlivými standardními proteiny cytochromem c a albuminem, následně byla testována směs těchto standardních proteinů a nakonec byla metoda otestována na reálném biologickém vzorku, tj. sinici *Spirulina* od společnosti Iswari Superfood, s.r.o. Účinnost mikropreparativní izoelektrické fokusace byla ověřena pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

4.1 Vývoj metody mikropreparativní izoelektrické fokusace proteinů

Při vývoji metody mikropreparativní izoelektrické fokusace byla nejdříve optimalizována doba separace proteinů, následovala optimalizace extrakce proteinů ze separačního média a nakonec byly testovány různé koncentrace vzorků dávkovaných na koryto. Při všech testovaných podmínkách byly provedeny minimálně 3 analýzy z důvodu ověření reprodukovatelnosti výsledků.

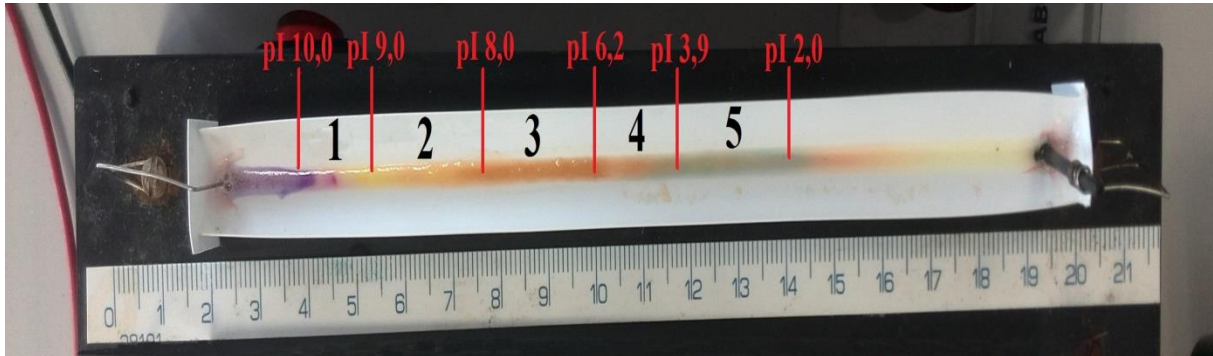
4.1.1 Optimalizace doby separace proteinů

Pro prvotní testování optimální doby separace proteinů pomocí mikropreparativní izoelektrické fokusace byly zvoleny následující podmínky: roztok cytochromu c o koncentraci 1 mg/ml nadávkován v množství 100 μ l do 700 μ l celulóзовého média a 100 μ l směsi pI markerů (viz. kapitola 3.2), separace probíhala při pokojové teplotě, doba fokusace 3 hod. Tato doba fokusace byla vyhodnocena jako nevhodná z důvodu nedostatečného zafokusování jak viditelných pI markerů, tak cytochromu c. V dalším experimentu se doba fokusace prodloužila na 6 hod. I tato doba se pro fokusaci ukázala jako nedostatečná, proto byl následně zvolen čas 24 hod. Za tuto dobu došlo k zafokusování pI markerů i proteinu, což bylo pozorovatelné okem a ověřeno pomocí SDS-PAGE.



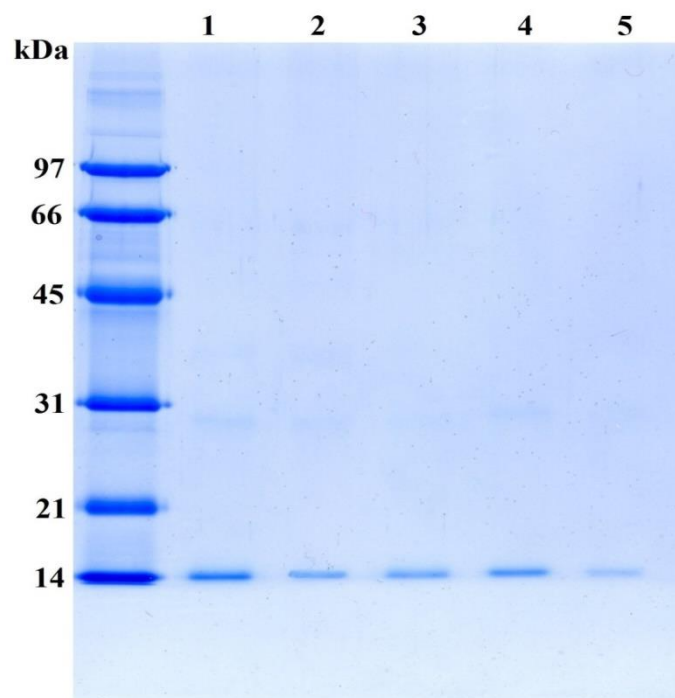
Obrázek 15: Koryto s nadávkovaným roztokem cytochromu c o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 3 hod fokusace

Na obrázku 15 je koryto po 3 hod separace. Obrázek ukazuje, že separační médium stále obsahuje značné množství vody a pI markery nejsou zafokusovány. Lze říci, že 3 hod nebyla postačující doba k odpaření dostatečného množství vody z tohoto separačního média, což vedlo k tomu, že amfolyty neměly ideální podmínky pro fokusaci, která probíhá ve vytvořené vrstvě celulózy.



Obrázek 16: Koryto s nadávkovaným roztokem cytochromu c o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 6 hod fokusace

Obrázek 16 ukazuje, že se voda ze separačního média stále neodpařila a zóny barevných pI markerů jsou již lépe rozeznatelné, ale stále široké a nezaostřené. Je tedy pravděpodobné, že ani u cytochromu c dosud nedošlo k úplnému zafokusování. To bylo ověřeno na SDS-PAGE elektroforéze, která byla provedena s vyznačenými frakcemi na obrázku 16. Hodnoty pI byly určeny pouze orientačně a to z důvodu nezřetelného rozhraní mezi jednotlivými pI markery. Na obrázku 17, který znázorňuje výsledky z SDS-PAGE je vidět, že je cytochrom c přítomen ve všech odebraných frakcích, čímž se potvrdilo, že fokusace není zcela dokončena. Na obrázku 17 vidíme, že nejvýraznější je proužek proteinu ve frakci 1, tato frakce byla odebrána v přibližném rozhraní pI 9,0–10,0. Hodnota pI cytochromu c je asi 9,3, proto tento protein po ukončení separace očekáváme právě v této frakci. Naopak nejméně výrazný proužek na gelu je ve frakci 5, což je frakce z kyselé oblasti (pI 2,0–3,9). Po analýze jednotlivých frakcí na SDS-PAGE bylo potvrzeno, že 6 hod pro mikropreparativní izoelektrickou fokusaci je nedostačujících.



Obrázek 17: SDS-PAGE, frakce odebrané po 6 hod fokusace (viz. Obrázek 16), (1) zóna pI 9,0–10,0; (2) zóna pI 9,0–9,0; (3) zóna pI 6,2–8,0; (4) zóna pI 3,9–6,2; (5) zóna pI 2,0–3,9

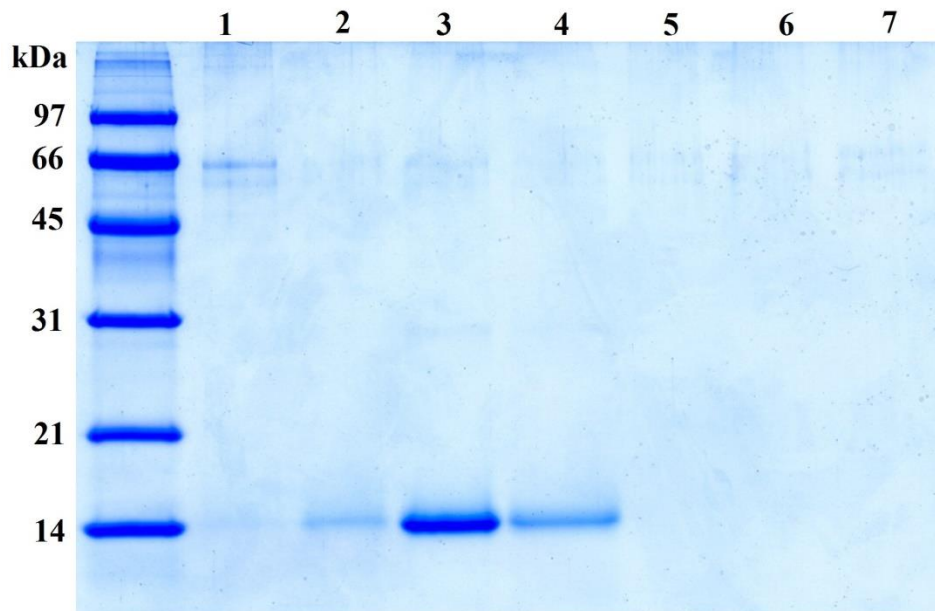


Obrázek 18: Koryta s nadávkovaným roztokem cytochromu c o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 24 hod fokusace

Z obrázku 18, který znázorňuje koryta po 24 hod izoelektrické fokusace je evidentní, že amfolyty nadávkované do celulózového separačního média jsou viditelně zaostřeny do úzkých zón. Zafokusovaný cytochrom c (pI 9,3), lze očekávat v oblasti mezi žlutým pI markerem, jehož hodnota je 9,0 a fialovým pI markerem, který má hodnotu pI 10.

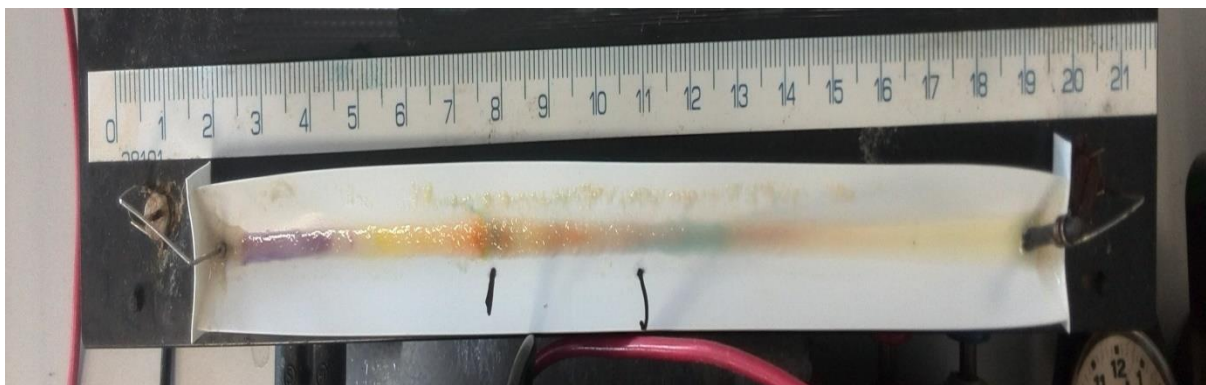
Účinnost fokusace byla ověřena pomocí SDS-PAGE, kde se potvrdilo, že majoritní část cytochromu c je ve frakci v rozmezí pI 9,0–10,0 (Obrázek 19). Na obrázku 19 je vidět,

že cytochrom c je také obsažen ve frakci 4 (pI 7,2–9,0) a frakci 2 (pI 10,0–10,5). Přítomnost tohoto proteinu v těchto frakcích pravděpodobně byla zapříčiněna nepřesným určením rozhraní frakcí a jejich následného sebrání z koryta. Jak ukazuje obrázek 19, v ostatních frakcích 1 (pI 10,5–11,0), 5 (pI 6,2–7,2), 6 (pI 2,8–6,2) a 7 (pI 2,0–2,8) nebyl detekován žádný protein, což potvrzuje dobré zafokusování proteinu v oblasti jeho pI (9,3).



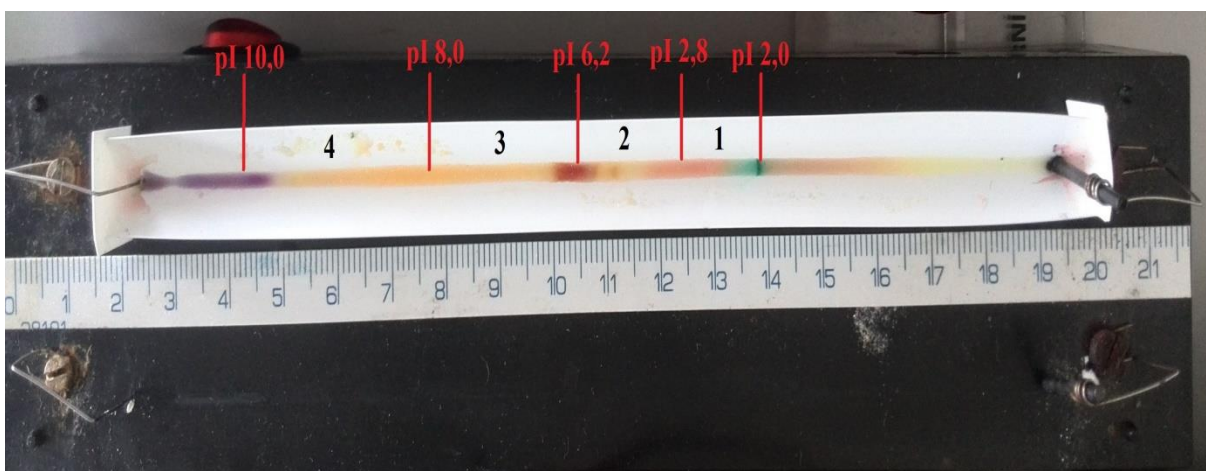
Obrázek 19: SDS-PAGE, frakce po 24 hod fokusace (viz. Obrázek 18), (1) zóna pI 10,5–11,0; (2) zóna pI 10,0–10,5; (3) pI zóna 9,0–10,0; (4) pI zóna 7,2–9,0; (5) zóna pI 6,2–7,2; (6) zóna pI 2,8–6,2; (7) zóna pI 2,0–2,8

Testování ideální doby separace bylo také provedeno se standardním proteinem albuminem. Pro tuto analýzu byly zvoleny obdobné podmínky jako při experimentech s cytochromem c: roztok albuminu o koncentraci 1 mg/ml byl nadávkován v množství 100 μ l do 700 μ l celulóзовého média společně s 50 μ l směsí pI markerů, separace probíhala při pokojové teplotě, doba fokusace 3, 6 a 24 hod. Z těchto experimentů rovněž bylo zřejmé, že doba 3 a 6 hod není dostatečná k odpaření vody ze separačního celulóзовého média a k zafokusování pI markerů a proteinu do zón odpovídajícím jejich pI. Stejně jako v případě cytochromu c se potvrdilo, že po 24 hod separace dojde k úplnému zafokusování všech pI markerů i proteinu.



Obrázek 20: Koryto s nadávkovaným roztokem albuminu o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 3 hod fokusace

Jak ukazuje obrázek 20, v korytu je po 3 hodinách separace velké množství vody, která se nestihla odpařit. Barevné pI markery jsou již rozeznatelné, ale jejich zóny jsou široké, a proto nelze určit jejich přesnou hodnotu a lze předpokládat, že se albumin ještě nezafokusoval na pozici své hodnoty pI.

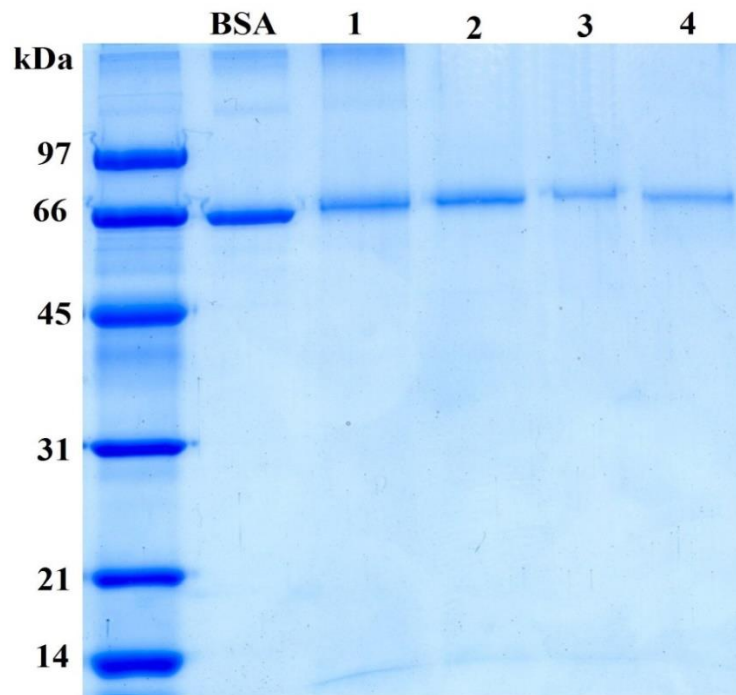


Obrázek 21: Koryto s nadávkovaným roztokem albuminu o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 6 hod fokusace

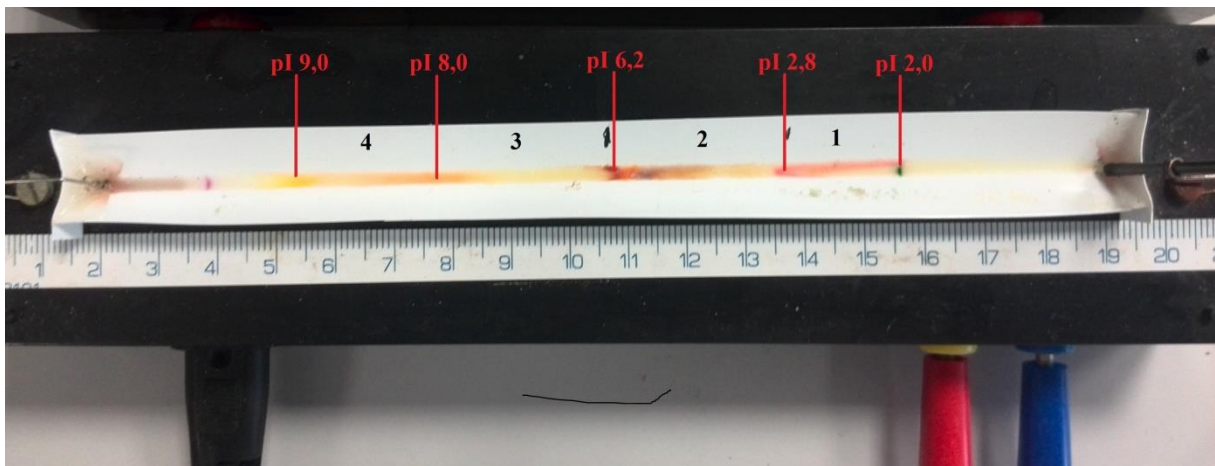
Po 6 hodinách mikropreparativní izoelektrické fokusace albuminu jsou již barevné pI markery v oblastech svého pI, ale jejich zóny jsou stále široké, což ukazuje obrázek 21. Z tohoto důvodu bylo obtížné určit rozhraní mezi jednotlivými barvami, což ztížilo následný sběr frakcí.

Pomocí gelové elektroforézy byla provedena kontrola účinnosti fokusace. Obrázek 22 ukazuje, že po 6 hodinách fokusace nedošlo k zaostření albuminu do jedné zóny. Z SDS-PAGE analýzy je patrné, že fokusace není dokončena, což potvrzuje obsah proteinu ve všech sebraných frakcích (obrázek 22). Na gelu je frakce 2 (zde se očekává zafokusovaný albumin) výraznější než frakce 1, 3 a 4. Po porovnání obrázku 21 a obrázku 22, můžeme říci, že pI markery se fokusují rychleji, než albumin, což může být způsobeno rozdílnou velikostí

jednotlivých amfolytů. Zatímco pI markery jsou nízkomolekulární látky, albumin patří k větším proteinům, jeho molekulová hmotnost je 66,4 kDa (Obrázek 22).



Obrázek 22: SDS-PAGE, frakce po 6 hod fokusace (viz. Obrázek 21), (BSA) kontrolní roztok albuminu o $c = 1$ mg/ml (1) zóna pI 2,0–2,8; (2) zóna pI 2,8–6,2; (3) pI zóna 6,2–8,0; (4) pI zóna 8,0–10

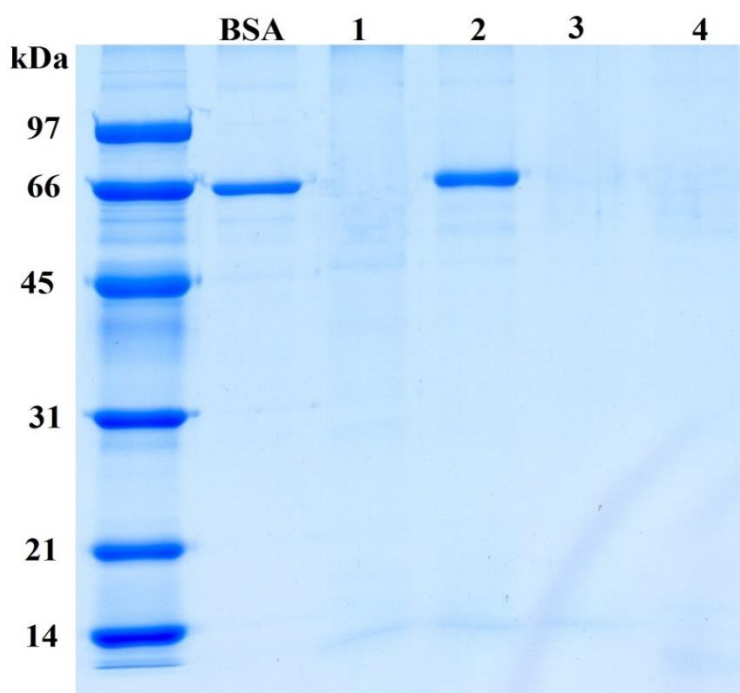


Obrázek 23: Koryto s nadávkovaným roztokem albuminu o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 24 hod fokusace

Další experiment byl prodloužen na 24 hod a jak ukazuje obrázek 23, pI markery jsou po této době zafokusovány do úzkých zón, podle kterých lze určit umístění zafokusovaného albuminu, jehož pI je 4,9. Tento protein je možné předpokládat mezi dvěma markery o hodnotách pI 2,8 a 6,2.

Vyznačené frakce na obrázku 23 byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Obrázek 24 znázorňuje gel po elektroforéze, kde je vidět, že po 24 hodinách došlo k úplnému zafokusování albuminu ve frakci v rozmezí pI 2,8–6,2. Ve frakci 1 (pI 2,0–2,8) a ve frakcích v neutrální až alkalické oblasti 3 (pI 6,2–8,0) a 4 (pI 8,0–9,0) nebyl protein detekován. Tento experiment s albuminem potvrdil pozitivní výsledky, kterých bylo dosaženo při testování systému s proteinem cytochromem c.

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že optimální doba separace proteinů pomocí mikropreparativní izoelektrické fokusace je 24 hod, a proto tento čas byl zvolen pro další optimalizace této techniky.



Obrázek 24: SDS-PAGE, frakce po 24 hod fokusace (viz. Obrázek 23), (BSA) kontrolní roztok albuminu o $c = 1$ mg/ml (1) zóna pI 2,0–2,8; (2) zóna pI 2,8–6,2; (3) pI zóna 6,2–8,0; (4) pI zóna 8,0–9,0

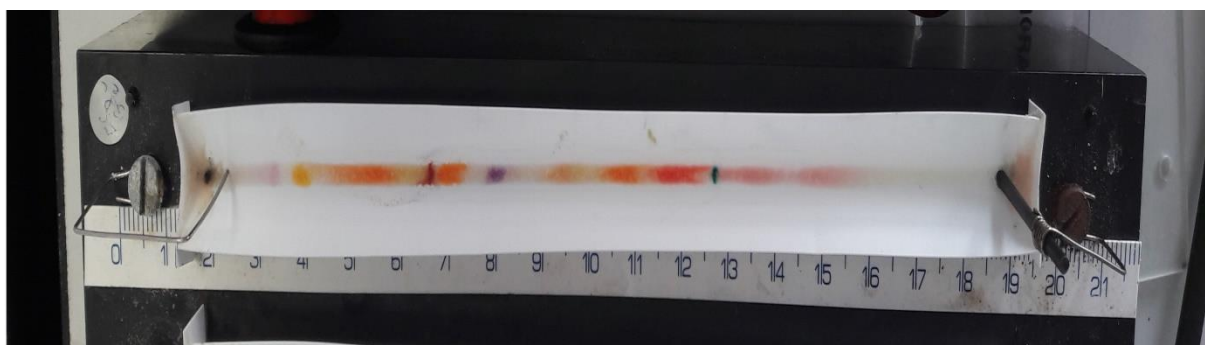
4.1.2 Vliv koncentrace separovaných proteinů na průběh mikropreparativní izoelektrické fokusace

Pro experiment testující jaké množství nadávkovaných proteinů je možné na systému separovat, byly zvoleny následující roztoky standardního proteinu cytochromu c o různých koncentracích:

- cytochrom c: $c = 0,5$ mg/ml
- cytochrom c: $c = 1,0$ mg/ml
- cytochrom c: $c = 1,5$ mg/ml
- cytochrom c: $c = 2,5$ mg/ml

Všechny roztoky proteinu byly vždy nadávkovány v objemu 100 μ l do 700 μ l separačního celulóзовého média rovnoměrně rozprostřeného v korytu a následně do suspenze bylo přidáno 100 μ l směsi pI markerů. Dále byly pro testování zvoleny tyto podmínky: pokojová

teplota, doba fokusace 24 hod. Po dokončení fokusace nebyl mezi jednotlivými koryty viditelný rozdíl, což potvrzuje obrázek 25 a 26, kde jsou znázorněna koryta s různou koncentrací roztoku cytochromu c. Pro ověření fokusace byla použita SDS-PAGE elektroforéza, kde se ukázalo, že se gely neliší pouze v intenzitě proužků proteinu, tzn. intenzita proužků stoupá s koncentrací cytochromu c ve vzorku, ale také se prokázalo, že koryta obsahující nižší koncentraci cytochromu c (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml a 1,5 mg/ml) jsou lépe zafokusovaná než koryto s roztokem o koncentraci 2,5 mg/ml. To pravděpodobně bylo způsobeno přesycením separačního celulóзовého média, ve kterém dochází k separaci a vrstva celulózy vznikající po odpaření vody ze separačního média nebyla dostatečná pro migraci příliš koncentrovaného vzorku.



Obrázek 25: Koryto s roztokem cytochromu c o koncentraci 1 mg/ml a pI markery po 24 hod fokusace



Obrázek 26: Koryto s roztokem cytochromu c o koncentraci 2,5 mg/ml a pI markery po 24 hod fokusace

Testování množství proteinů, které lze separovat bylo také ověřeno se standardním proteinem albuminem. Byly připraveny roztoky s následujícími koncentracemi:

- albumin: $c = 0,5$ mg/ml
- albumin: $c = 1,0$ mg/ml
- albumin: $c = 1,5$ mg/ml
- albumin: $c = 2,5$ mg/ml

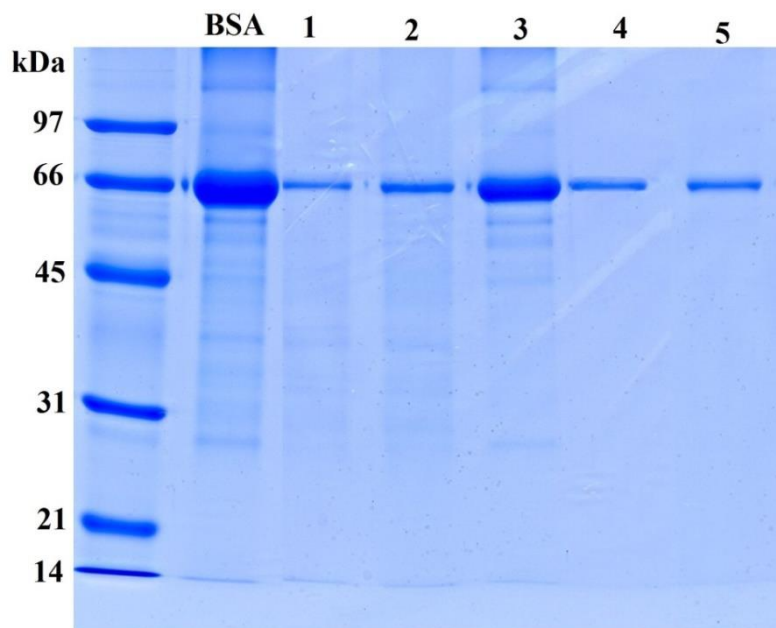
Všechny roztoky albuminu byly nadávkovány v objemu 100 μ l do 700 μ l celulóзовého média a poté do suspenze bylo přidáno 100 μ l směsi pI markerů. Experiment probíhal při pokojové teplotě po dobu 24 hod.

Po ukončení fokusace celulózová suspenze byla opět rozdělena na jednotlivé frakce a následně sebrána podle barevných pI markerů. Sebrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Bylo zjištěno, že koryta s nižší koncentrací albuminu (0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml a 1,5 mg/ml) byla zafokusována lépe než koryto s vyšší koncentrací proteinu (2,5 mg/ml). Tyto výsledky se shodují s výsledky předešlého experimentu s cytochromem c.

Na obrázku 25 vidíme příklad koryta po mikropreparativní izoelektrické fokusaci, kde byl nadávkován roztok albuminu o koncentraci 2,5 mg/ml a pI markery, u kterých došlo k dobrému zafokusování. Očekávalo se tedy, že došlo i k zafokusování albuminu a to ve frakci 3, která odpovídá jeho hodnotě pI. Červeně vyznačené frakce 1–5, které vidíme na obrázku 27, byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 28).



Obrázek 27: Koryto s nadávkovaným roztokem albuminu o koncentraci 2,5 mg/ml a pI markery po 24 hod fokusace



Obrázek 28: SDS-PAGE, frakce po 24 hod fokusace (viz. Obrázek 27), (BSA) kontrolní roztok albuminu o $c = 2,5$ mg/ml (1) zóna pI 6,2–7,2; (2) zóna pI 5,3–6,2; (3) pI zóna 3,9–5,3 (4) pI zóna 2,8–3,9 ; (5) zóna pI 2,0–2,8

Obrázek 28 ukazuje gel se sebranými frakcemi z koryta po elektroforéze. Na gelu je vidět největší podíl albuminu ve frakci 3 (rozmezí pI 3,9–5,3), kde se očekával. Obrázek 28 také ukazuje, že cytochrom c je také ve frakcích 1, 2, 4 a 5. Lze tedy tvrdit, že nedošlo k dobrému zafokusování vzorku z důvodu nedostatečné migrace v celulózovém médiu. Použije-li se vzorek s vysokou koncentrací proteinů, je vhodné ho před separací naředit.

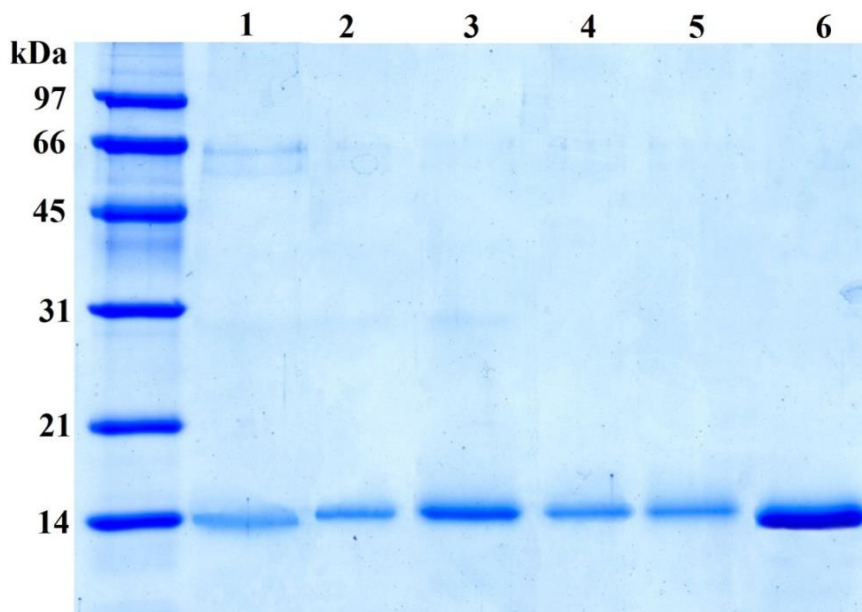
4.1.3 Optimalizace extrakce proteinů ze separačního média

Pro optimalizaci extrakce proteinů ze separačního média byl použit roztok standardního proteinu cytochromu c o koncentraci 1 mg/ml. Tento roztok byl v objemu 100 μ l nanesen do separačního média a do média také bylo přidáno 100 μ l směsi pI markerů. Pro separaci byla zvolena laboratorní teplota a doba fokusace 24 hod. Po ukončení separace k sebraným frakcím bylo přidáno 50 μ l vody a frakce byly 10 min protřepány na třepačce. Po extrakci byly mikrozkušavky s frakcemi odstředěny na centrifuze a povařeny ve vodě. Poté byly v množství 10 μ l nadávkovány na gel. Na SDS-PAGE se však ukázalo, že proužky proteinu na gelu jsou slabé a tato extrakce se vyhodnotila jako nevhodná.

Extrakce proteinů z frakcí (z celulózového média) byla změněna na extrakci vzorkovým pufrem. Ke každé frakci bylo přidáno 50 μ l vzorkového pufru a byly 10 min protřepány na třepačce. Po centrifugaci a povaření se opět byly nanесeny na gel. Gel po elektroforéze prokázal, že i tato extrakce je nedostatečná, protože proužky cytochromu c na gelu jsou slabé. Proužky proteinu ale byly výraznější než při předchozí extrakci vodou.

Jako další způsob extrakce byla zvolena extrakce 50 μ l vzorkového pufru na ultrazvukové lázni (po dobu 10 min). I tento způsob se však ukázal jako nevhodný, a proto pro další extrakci byl zvolen vzorkový pufr s následným protřepáním frakcí na třepačce (po dobu 10 min) a poté na ultrazvukové lázni. Cytochrom c po SDS-PAGE byl na gelu výrazný a lze říci, že tento způsob extrakce je účinný.

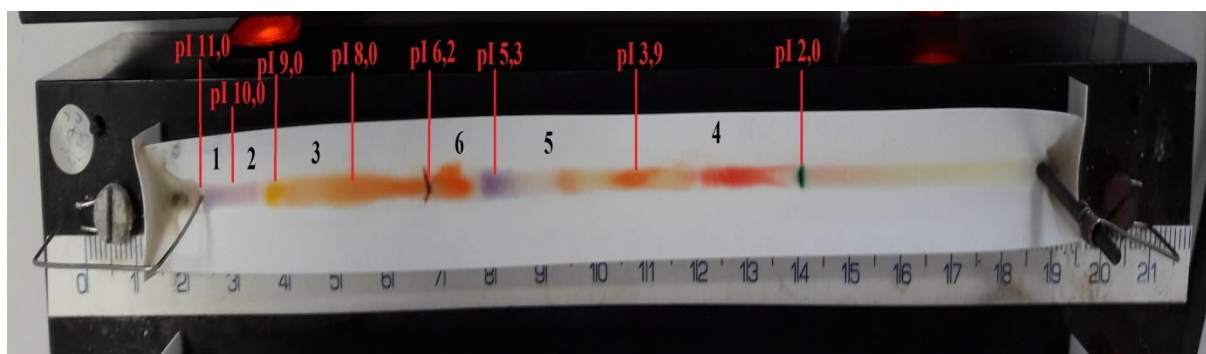
SDS-PAGE potvrdila (Obrázek 29), že extrakce vzorkovým pufrem je účinnější než extrakce vodou. A také se prokázalo, že protřepání frakcí na třepačce s jejich následným vložením do ultrazvukové lázně je více účinné, než samotná extrakce buď pouze třepáním, nebo pouze ultrazvukem, viz obrázek 29.



Obrázek 29: SDS-PAGE, (1) extrakce vodou + třepačka; (2) extrakce vodou + ultrazvuk; (3) extrakce vodou + třepačka + ultrazvuk; (4) extrakce vzorkovým pufrem + třepačka; (5) extrakce vzorkovým pufrem + ultrazvuk; (6) extrakce vzorkovým pufrem + třepačka + ultrazvuk

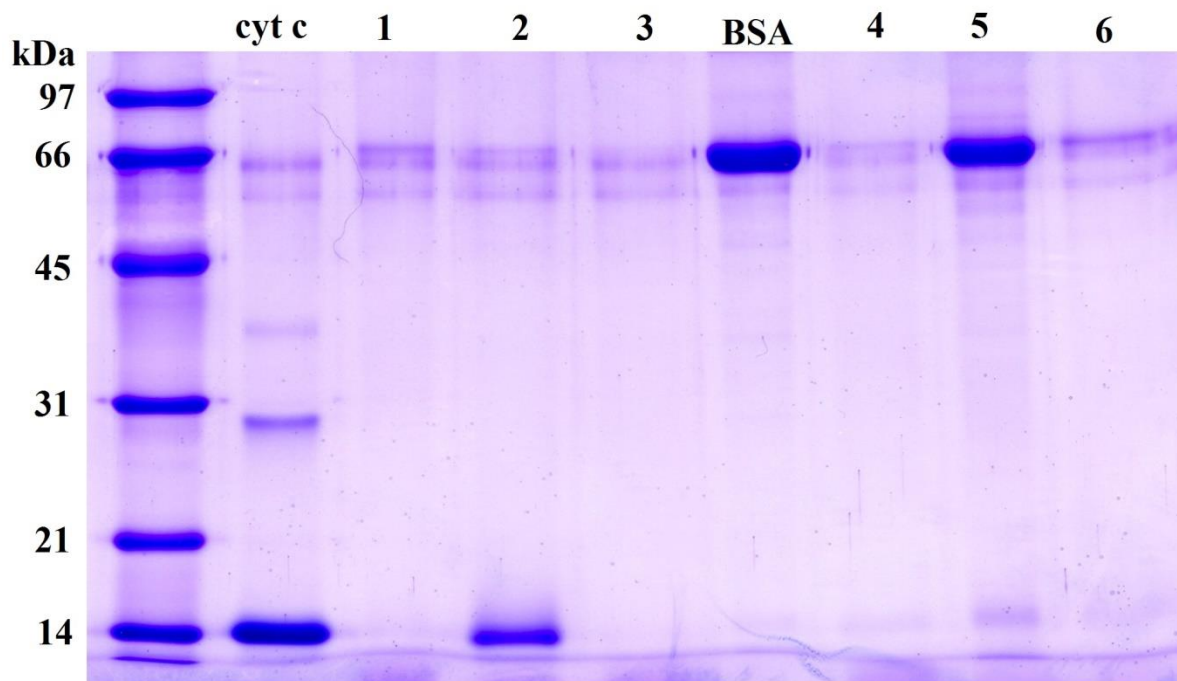
4.1.4 Separace směsi proteinů

Dále byla na mikropreparativní izoelektrické fokusaci testována směs standardních proteinů cytochromu c a albuminu. Pro experiment byly zvoleny následující podmínky: roztok cytochromu c o koncentraci 0,5 mg/ml a roztok albuminu o koncentraci 0,5 mg/ml. Tato směs byla nadávkována v množství 100 μ l do 700 μ l celulóзовého média a do separačního média také bylo přidáno 100 μ l směsi pI markerů. Separace probíhala při pokojové teplotě po dobu 24 hod. Po separaci byly frakce rozděleny a sebrány podle zafokusovaných pI markerů. Jak ukazuje obrázek 29, byly sebrány frakce 1–6.



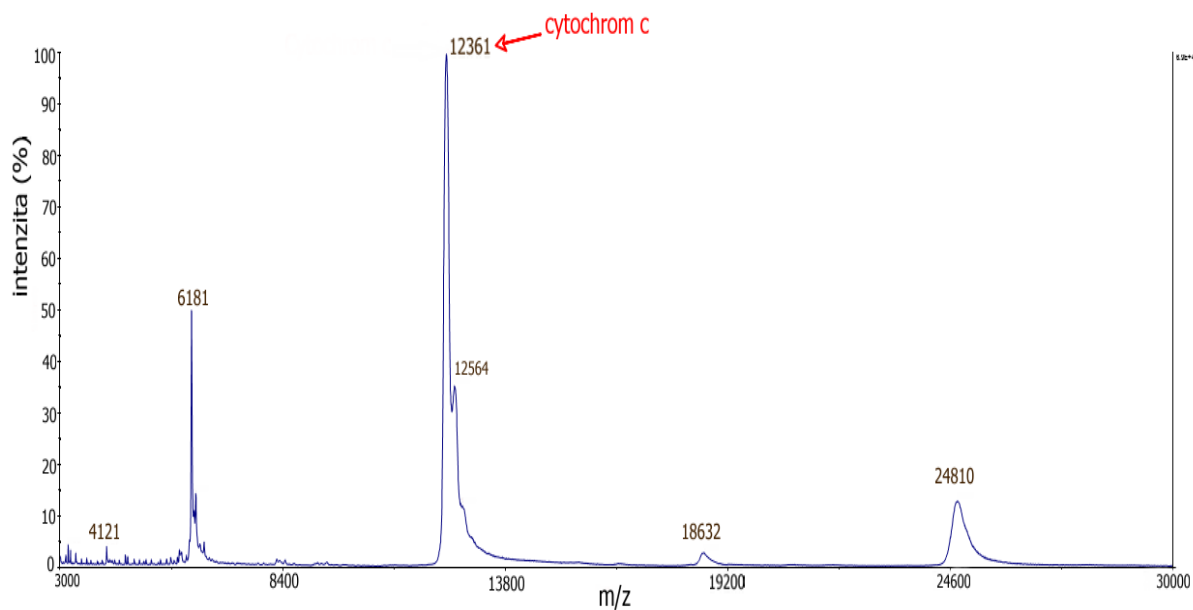
Obrázek 29: Koryto s nadávkovanou směsí roztoku cytochromu c o koncentraci 0,5 mg/ml a roztoku albuminu o koncentraci 0,5 mg/ml a pI markery po 24 hod fokusace

Proteiny ve frakcích byly ze separačního média extrahovány vzorkovým pufrům na třepačce a v ultrazvukové lázni, povařeny a odstředěny na centrifuze. Ze získaných supernatantů bylo na gel nadávkováno 10 μ l každého vzorku. Po SDS-PAGE (Obrázek 30) je zjevné, že zafokusování obou proteinů proběhlo ve frakcích odpovídajícím jejich hodnotám pI. Na obrázku 30 vidíme výrazný proužek ve frakci 2, kde byl zafokusován cytochrom c a proužek 5, který odpovídá albuminu. Obrázek 30 také ukazuje, že v ostatních frakcích 1, 3, 4 a 6 nebyl detekován žádný protein. Z těchto výsledků lze říci, že proteiny se zafokusovaly v oblasti odpovídající jejich pI.



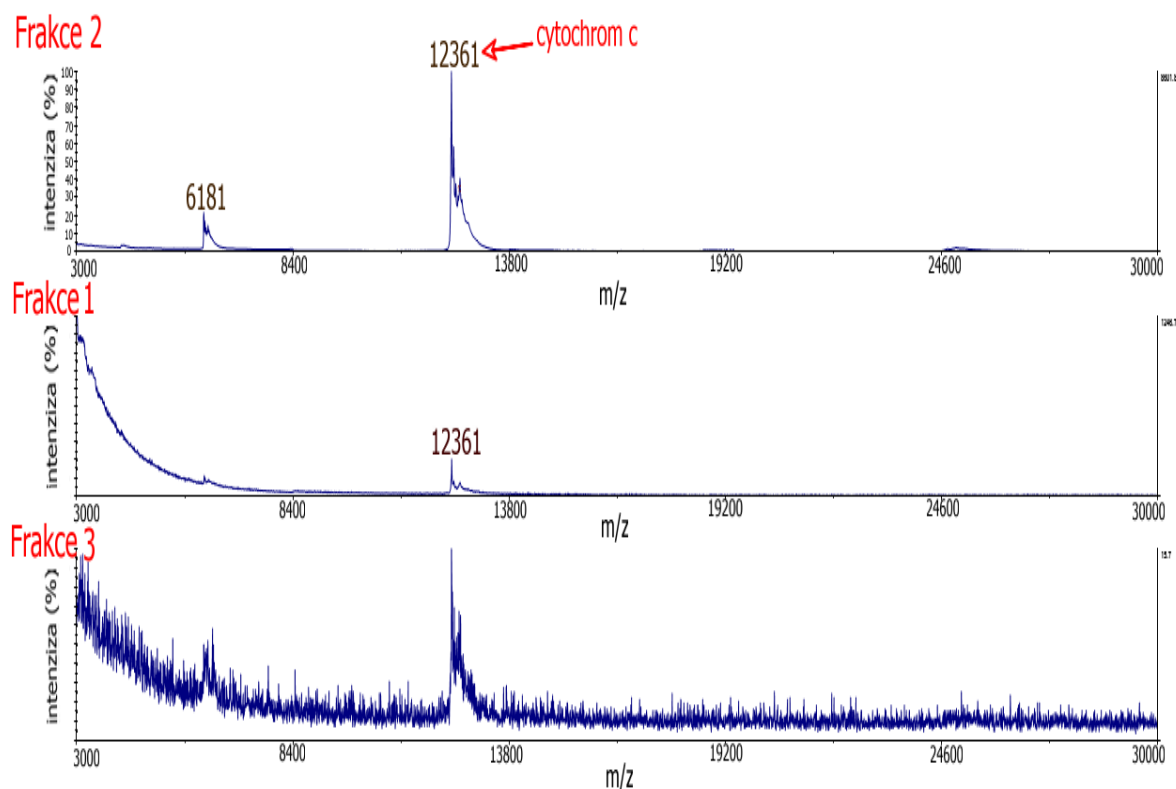
Obrázek 30: SDS-PAGE a barvení CBB R250, frakce po 24 hod fokusace (viz. Obrázek 29) (cyt c) kontrolní roztok cytochromu c o c = 0,5 mg/ml (1) zóna pI 8,0–9,0; (2) zóna pI 9,0–10,0; (3) pI zóna 10,0–11,0; (BSA) kontrolní roztok albuminu o c = 0,5 mg/ml; (4) pI zóna; 2,8–3,9 ; (5) zóna pI 3,9–5,3; (6) zóna pI 5,3–6,2

Účinnost mikropreparativní izoelektrické fokusace byla také ověřena pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. MALDI-TOF MS byly analyzovány jednotlivé frakce z koryta, které byly sebrány po fokusaci směsi standardních proteinů cytochromu c a albuminu. Pro následné porovnání chromatogramů, nejdříve byl proměřen standardní protein cytochrom c (Obrázek 31).



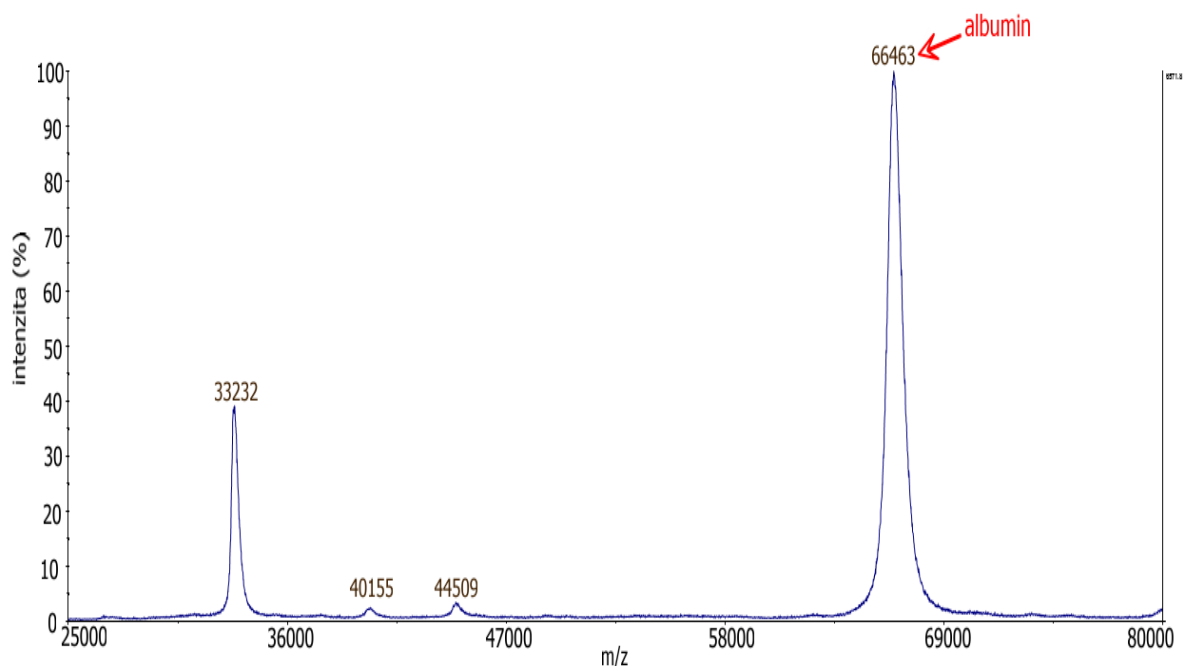
Obrázek 31: MALDI-TOF hmotnostní spektrum cytochromu c

Po proměření standardního proteinu byly analyzovány frakce 1, 2 a 3 z koryta na obrázku 29. Pomocí MALDI-TOF MS analýzy bylo potvrzeno, že hlavní frakce 2 (rozhraní pI 9,0–10,0) obsahuje majoritní část cytochromu c. Dále bylo detekováno, že frakce 1 (rozhraní pI 8,0–9,0) a 3 (rozhraní pI 10,0–11,0) obsahují minimální množství proteinu. Toto množství je tak nepatrné, že na SDS-PAGE elektroforéze nebylo zaznamenáno (Obrázek 30).



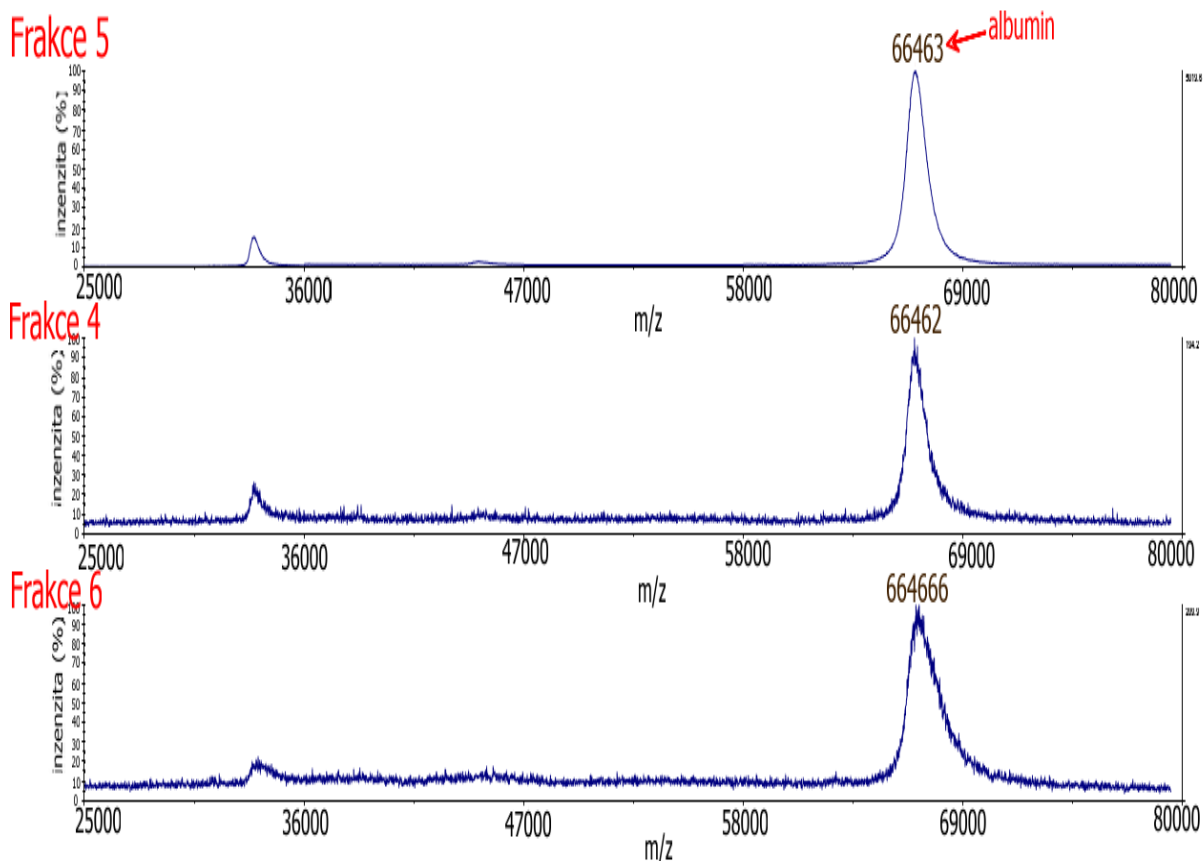
Obrázek 32: MALDI-TOF hmotnostní spektrum cytochromu c ve frakcích, frakce 2 (pI 9,0–10,0), frakce 1 (pI 8,0–9,0), frakce 3 (pI 10,0–11,0) (viz Obrázek 29)

Podobně byly experimenty provedeny také s albuminem. Nejprve byl analyzován standardní protein (Obrázek 33).



Obrázek 33: MALDI-TOF hmotnostní spektrum albuminu

V další analýze pomocí hmotnostního spektrometru byly proměřeny frakce 4, 5 a 6 z koryta na obrázku 29. Ze získaných hmotnostních spekter (Obrázek 34) je zřejmé, že frakce 5 (rozhraní pI 3,9–5,3), což je podle očekávání i podle SDS-PAGE hlavní frakce, obsahuje zafokusovaný albumin. Protože hmotnostní spektrometrie je citlivější než SDS-PAGE elektroforéza, ve vedlejších frakcích 4 (rozhraní pI 2,8–3,9) a 6 (rozhraní pI 5,3–6,2) byl rovněž detekován albumin.



Obrázek 34: MALDI-TOF hmotnostní spektrum albuminu ve frakcích, frakce 5 (pI 3,9–5,3), frakce 4 (pI 2,8–3,9), frakce 6 (pI 5,3–6,2) (viz Obrázek 29)

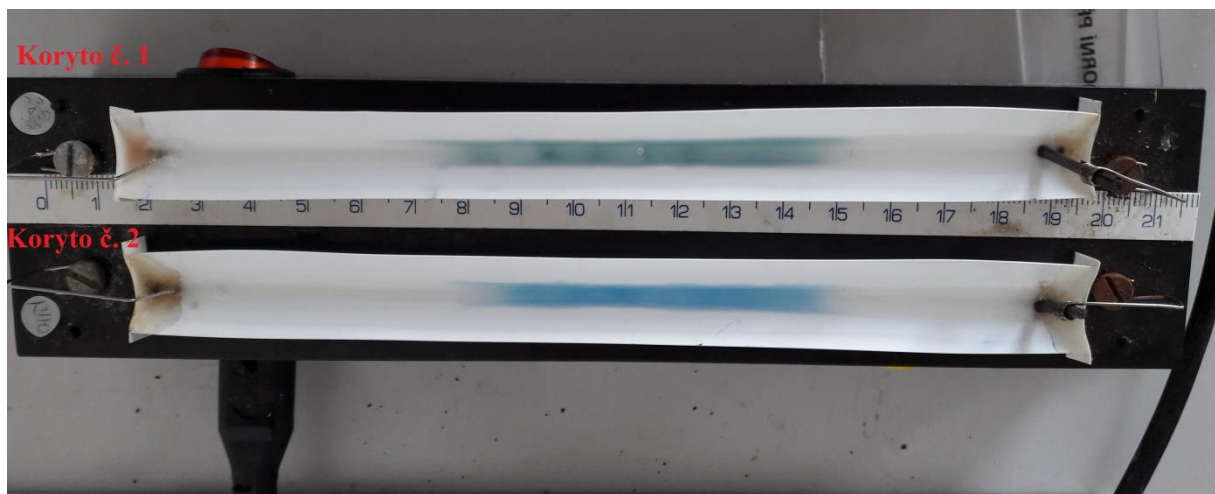
4.2 Analýza reálného vzorku

Experiment probíhal s komerčně dostupnou sinicí rodu *Spirulina* od společnosti Iswari Superfood, s.r.o. *Spirulina* patří do skupiny kyanobakterií. Obsahuje proteinové komplexy s lineárními tetrapyroly nazývané fykobiliproteiny, které se skládají z proteinové části (fykokyaniny) a lineárního tetrapyrolu (fykokyanobilin) [64, 65]. Fykobiliproteiny jsou fotosyntetizující barevné, ve vodě rozpustné proteiny, které lze rozdělit do 3 skupin – fykoerythiny (červeně zbarvené), fykokyaniny (modře zbarvené) a allofykokyaniny (modře zbarvené). Jejich molekulová hmotnost je mezi 15 a 20 kDa. Tyto proteiny se využívají např. v potravinářském a kosmetickém průmyslu jako přírodní barviva. Dále se používají v biochemickém výzkumu jako modelové proteiny se silně zbarvenými roztoky a mimo jiné se fykobiliproteiny využívají jako fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii při léčbě rakoviny [66].

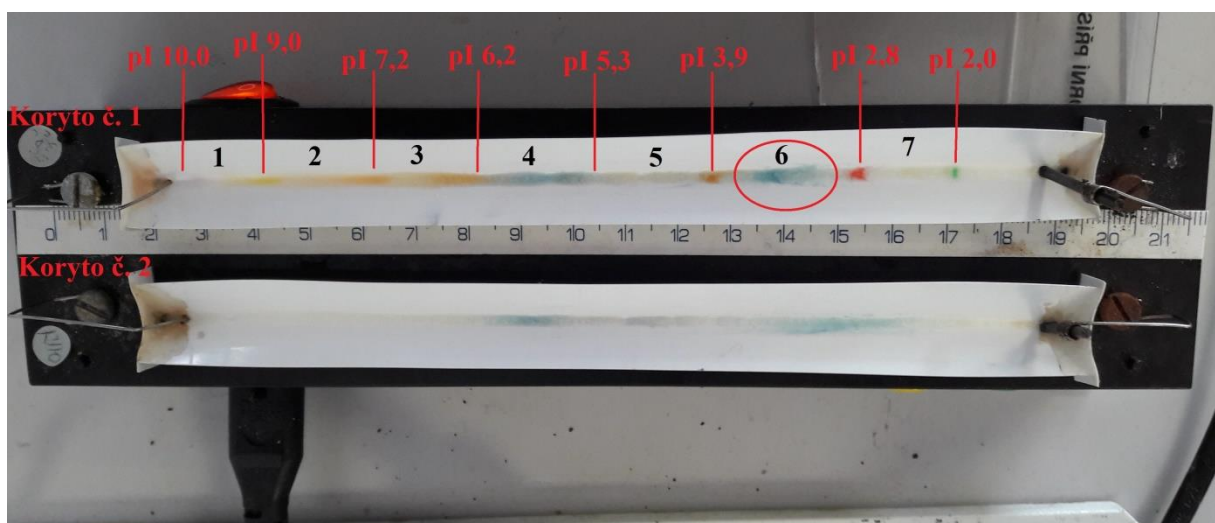
Experimenty probíhaly vždy na dvou paralelních korytech napájených jedním zdrojem, kdy na koryto č. 1 byl nadávkován roztok se vzorkem sinice a pI markery a na koryto č. 2 byl nadávkován samotný roztok se vzorkem sinice. Obrázek 35 znázorňuje systém před zahájením separace, naopak na obrázku 36 vidíme koryta po ukončení separace. Na obrázku 36 je také jasně viditelné, že červeně vyznačená sinice je modré barvy a průběh separace je okem viditelný. Barvené pI markery jsou v tomto případě využívány pouze pro orientaci pI hodnot v korytech.

Separace byla opět ověřena pomocí SDS-PAGE (Obrázek 37), kde se ukázalo, že ve frakci č. 6 se vyskytuje největší množství proteinů, které jsou obsažené v sinici.

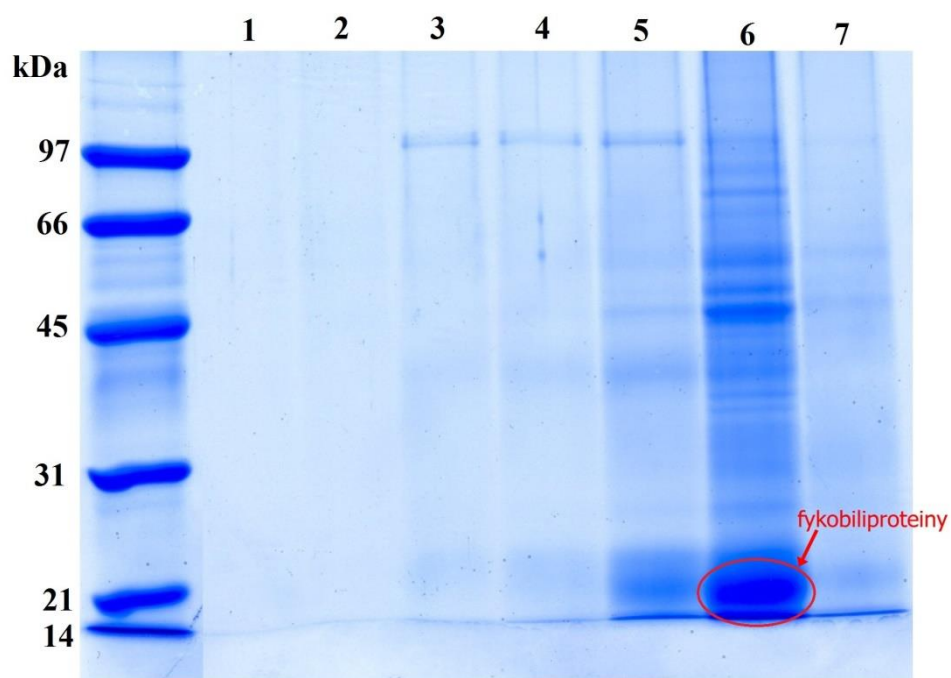
Ověření účinnosti fokusace sinice *Spirulina* byla rovněž provedena pomocí MALDI-TOF MS. Analýza byla provedena s hlavní frakcí 6 (rozhraní pI 2,8–3,9) a jejími okolními frakcemi 5 (rozhraní pI 3,9–5,3) a 7 (rozhraní pI 2,0–2,8). Obrázek 38 představuje hmotnostní spektrum těchto frakcí. Nejvýraznější pík (cca 18 260 Da) odpovídá nejvýraznějšímu proteinu na gelu. Z naměřených dat vyplývá, že analyzované frakce i po separaci pomocí mikropreparativní isoelektrické fokusace stále obsahovaly několik proteinů. To je dáno tím, že analyzovaný extrakt sinice je velice komplexní směs různých látek včetně proteinů a mikropreparativní isoelektrická fokusace nedokáže rozdělit všechny složky směsi, což ale nebylo účelem této techniky. Nicméně určité úrovně frakcionace vzorku bylo dosaženo a dá se tedy říct, že tato technika je vhodná ke předseparaci a předkoncentraci při analýze biologických vzorků.



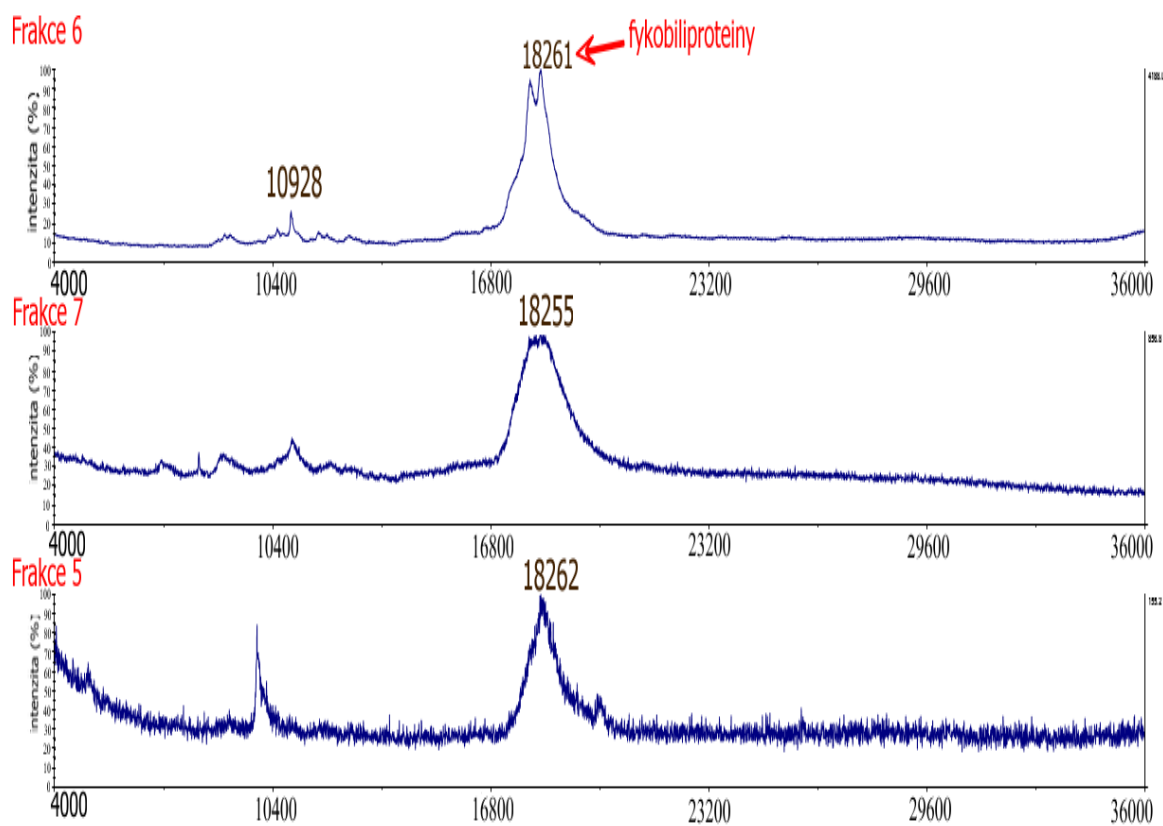
Obrázek 35: Nadávkovaná koryta před začátkem separace, Koryto č. 1: roztok sinice *Spirulina* s pI markery; Koryto č. 2: roztok sinice *Spirulina* bez pI markerů



Obrázek 36: Koryta po ukončení separace, Koryto č. 1: roztok sinice *Spirulina* s pI markery; Koryto č. 2: roztok sinice *Spirulina* bez pI markerů



Obrázek 37: SDS-PAGE, (1) zóna pI 9,0–10,0; (2) zóna pI 7,2–9,0; (3) pI zóna 6,2–7,2; (4) pI zóna 5,3–6,2; (5) zóna pI 3,9–5,3; (6) zóna pI 2,8–3,9; (7) zóna pI 2,0–2,8



Obrázek 38: MALDI-TOF hmotnostní spektrum albuminu ve frakcích, frakce 6 (pI 2,8–3,3), frakce 7 (pI 2,0–2,8), frakce 5 (pI 3,9–5,3) (viz Obrázek 36)

5 ZÁVĚR

Diplomová práce byla věnována optimalizaci mikropreparativní izoelektrické fokusace pro analýzu biologických vzorků. Po úspěšném ověření tohoto systému na standardních proteinech cytochromu c a albuminu, byl optimalizovaný systém aplikován na reálný biologický vzorek, sinici rodu *Spirulina*. Jako vzorek jsem použila komerčně dostupné tablety sinice rodu *Spirulina* od společnosti Iswari Superfood, s.r.o. Účinnost separace mikropreparativní izoelektrické fokusace byla ověřena pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Při hledání ideálních podmínek separace proteinů na mikropreparativní izoelektrické fokusaci byla nejprve určena optimální doba separace těchto látek, která je 24 hod. Dále byl testován vliv koncentrace separovaných proteinů na průběh mikropreparativní izoelektrické fokusace. Prokázalo se, že fokusace probíhá lépe s roztoky obsahující nižší koncentraci proteinu (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml a 1,5 mg/ml). U roztoků s vyšší koncentrací proteinů dochází k přesycení separačního celulózového média, ve kterém dochází k separaci a vrstva celulózy vznikající po odpaření vody ze separačního média nebyla dostačující pro migraci příliš koncentrovaného vzorku. Při separaci vzorků s vysokou koncentrací proteinů, je vhodné ho před separací naředit. Podle SDS-PAGE elektroforézy můžeme říci, že nejvhodnější extrakce proteinů ze separačního média je extrakce vzorkovým pufrům v kombinaci s vložení vzorků na třepačku a následně do ultrazvukové lázně.

Za těchto podmínek jsem provedla ověření techniky na separaci směsi standardních proteinů cytochromu c a albuminu. Výsledky z hmotnostního spektrometru MALDI-TOF prokázaly, že majoritní část proteinu, jak cytochromu c, tak albuminu, je v hlavní frakci odpovídající hodnotě pI těchto proteinů, ale malé množství bylo rovněž detekováno v okolních frakcích. Toto množství je však tak nepatrné, že na SDS-PAGE elektroforéze nebylo zaznamenáno.

Po separaci sinice rodu *Spirulina* jsem frakce analyzovala pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF MS, kde se mi podařilo detekovat, že i po separaci pomocí mikropreparativní izoelektrické fokusace frakce stále obsahovaly několik proteinů. Nicméně určitého stupně frakcionace vzorku bylo dosaženo a dá se tedy říct, že tato technika je vhodná ke předseparaci a předkoncentraci při analýze biologických vzorků.

V rámci zpracování této diplomové práce jsem potvrdila, že mikropreparativní izoelektrická fokusace je vhodná technika při analýze biologických vzorků. Navíc je kompatibilní s dalšími analytickými technikami. Tento způsob separace může být v budoucnu využitelný pro analýzu v potravinářství, biotechnologiích, farmacii, kde je potřeba izolovat proteiny nebo jiné amfolyty z biologických materiálů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MEYERS, Marc André, Po-Yu CHEN, Albert Yu-Min LIN a Yasuaki SEKI. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science* [online]. 2008, 53(1), 1-206 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2007.05.002. ISSN 00796425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642507000254>
- [2] BABJUK, Jaroslav, F. PERLÍK a Z. ŠIDLO. *Bioanalytika léků*. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-201-0083-0.
- [3] PENG, Jie, Fang TANG, Rui ZHOU, Xiang XIE, Sanwang LI, Feifan XIE, Peng YU a Lingli MU. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2016, 6(6), 540-551 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.05.016. ISSN 22113835. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383516300697>
- [4] Sea Spirulina. *Organic Irish Seaweed Products for Health and Beauty* [online]. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <http://www.seaweedproducts.ie/OrganicIrishSeaSpirulina2.html>
- [5] MADER, Pavel a Eva ČURDOVÁ. Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků. *Chemické listy* [online]. 1997 [cit. 2017-02-16], vol. 91, issue 5, s. 227–236. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_04_227-236.pdf
- [6] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0449-1.
- [7] TOYO'OKA, Toshimasa. *Modern derivatization methods for separation sciences*. New York: Wiley, c1999. ISBN 978-0471983644.
- [8] Extrakce. *Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta: Laboratorní technika* [online]. 2006 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni_metody/extrakce.pdf
- [9] FELLNEROVÁ, Ivana. Katedra zoologie PřF UP Olomouc. Proteiny, přehled pro fyziology. *Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. 2009 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: http://www.zoologie.upol.cz/osoby/fellnerova/pdf_nuevo/Proteinyprehled2010_9.pdf
- [10] KODÍČEK, Milan, O. VALENTOVÁ a R. HYNEK. *Biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.

- [11] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 3. vyd. Ostrava: Pavko, 2013. ISBN 978-80-86369-16-7.
- [12] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [13] BŘÍŽDALA, J.: *E-ChemBook: Multimediální učebnice chemie* [online]. [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/bilkoviny>
- [14] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [15] KOOLMAN, Jan a K. H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [16] RAHMAN, Safikur, Syed Ausaf ALI, Asimul ISLAM, Md. Imtaiyaz HASSAN a Faizan AHMAD. Testing the dependence of stabilizing effect of osmolytes on the fractional increase in the accessible surface area on thermal and chemical denaturations of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2016, **591**, 7-17 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1016/j.abb.2015.11.035. ISSN 00039861. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986115301065>
- [17] CAMPBELL, Mary K. a S. O. FARRELL. *Biochemistry*. 8th ed. Stamford: Cengage Learning, c2015. ISBN 978-1-285-42910-6.
- [18] Protein Denaturation by Heat. *Green Chemistry in Teaching Laboratory: Microwave Induced Reactions* [online]. [cit. 2017-04-03]. Dostupné z: https://web.njit.edu/~mitra/green_chemistry/EXP_3.htm
- [19] VOET, Donald a J. G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [20] KÁŠ, Jan, M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [21] BERG, Jeremy M., John L. TYMOCZKO a Lubert. STRYER. *Biochemistry*. 5th ed. Section 4.1, The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function [online]. New York: W.H. Freeman, 2002 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22410/>
- [22] COPELAND, Robert Allen. *Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols*. Boston, MA: Springer US, 1994. ISBN 9781475715057.

- [23] ČÁSLAVSKÝ, Josef a J. G. K. ŠEVČÍK. *Analyza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [24] *Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 Theta, 2001. Analytical standards and equipment. ISBN 80-86380-07-6.
- [25] KAŠIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* [online]. 1997 [cit. 2017-03-07], vol. 91, issue 5, s. 320–329. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf
- [26] GARFIN, David E., *Isoelectric Focusing, Courtesy of Bio-Rar laboratories. Volume 2: Separation science and technology*. 2000.
- [27] DAVEY, John a Mike LORD. *Essential cell biology. Volume 1: Cell structure, a partical approach*. New York: Oxford University Press, 2003. ISBN 978-019-9638-307.
- [28] KRISTL, Theresa, Hanno STUTZ, Christian WENZ a Gerard ROZING. Principles and applications of capillary isoelectric focusing. *Agilent Technologies* [online]. USA: Agilent Technologies, 2014 [cit. 2017-03-23]. 5991-1660EN. Dostupné z: <https://cn.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-1660EN.pdf>
- [29] Bio-Rad. *Bio-Rad* [online]. 2016 [cit. 2017-02-14]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods>
- [30] ÚSTAV ANALYTICKÉ CHEMIE AV ČR, V. V. I., CZ. Původce ŠLAIS, Karel. *Způsob separace a zakoncentrování amfolytů isoelektrickou fokusací a zařízení pro provádění tototo způsobu*. 2013. Česká republika. CZ 303688 B6. Přihlášeno 14.2.2012. Uděleno 1.2.2013. Zapsáno 13.3.2013.
- [31] DUŠA, Filip a Karel ŠLAIS. New solution IEF device for micropreparative separation of peptides and proteins. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2013, **34**(11), 1519-1525 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/elps.201200485. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201200485>
- [32] ŠLAIS, Karel a Miroslava ŠTASTNÁ. Electrolyte system for fast preparative focusing in wide pH range based on bidirectional isotachopheresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2014, **35**(17), 2438-2445 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/elps.201400057. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400057>

- [33] DUŠA, Filip a Karel ŠLAIS. Micropreparative solution isoelectric focusing of peptides and proteins in nonwoven strip. Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v. v. i., Czech Republic [online]. 2012 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://asep.lib.cas.cz/arl-cav/cs/csg/?repo=crep01&key=53460038767>
- [34] KRÁLOVÁ, Blanka, P. RAUCH, L. FUKAL a T. RUML. *Bioanalytické metody*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0234-0.
- [35] CHAWLA, H. S. *Introduction to plant biotechnology*. 3rd ed. Plymouth: NBN [distributor], c2009. ISBN 1578086361.
- [36] WESTERMAIER, R. and NAVEN, T. Expression Proteomics. Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis. *Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag* [online]. 2002, s. 11 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/3527600175.ch2. ISBN 3527303545. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600175.ch2>
- [37] BÁRTA, Jan, Veronika BÁRTOVÁ a Vladislav ČURN. Analýzy proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chemické listy* [online]. 2010 [cit. 2017-04-05], vol. 104, s. 33–34. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_33-40.pdf
- [38] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [39] KIM, Dong-Ho, Jin-Hee KIM, Ji-Hyun SEO, Ju-Woon LEE, Sang-Yong LIM, Ho-Joon LEE a Myung-Woo BYUN. Polymerization of SDS–PAGE gel by gamma irradiation and its use for characterization by electrophoresis of a protein. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 2005, **74**(5), 395-398 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2005.03.010. ISSN 0969806x. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X0500071X>
- [40] SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE). *Chemistry Department Faculty of Science Masaryk University: Metody chemického výzkumu - laboratorní cvičení* [online]. 2009, 17. 12. 2009, [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/EF/SDSPAGE%20kolecko.pdf
- [41] RIGHETTI, Pier Giorgio, Annalisa CASTAGNA, Ben HERBERT, Frederic REYMOND a Joël S. ROSSIER. Prefractionation techniques in proteome analysis. *PROTEOMICS* [online]. 2003, **3**(8), 1397-1407 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1002/pmic.200300472. ISSN 1615-9853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200300472>

- [42] Elektroforetická separace nukleových kyselin. *LabGuide: Průvodce laboratoří* [online]. [cit. 2017-04-03]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [43] Gel Preparation for SDS-PAGE. National Diagnostics: Průvodce laboratoří [online]. [cit.2017-04-03]. Dostupné z: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/gel-preparation-sds-page>
- [44] PAZOUREK, Jiří. *Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium*. Brno, 2003.
- [45] HOLZMÜLLER, Wolfgang a Ulrich KULOZIK. Protein quantification by means of a stain-free SDS-PAGE technology without the need for analytical standards: Verification and validation of the method. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2016, **48**, 128-134 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.03.003. ISSN 08891575. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157516300229>
- [46] ROBISIN, Ch.: *Sciencing, The Disadvantages of Gel Electrophoresis* [online]. [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://sciencing.com/disadvantages-gel-electrophoresis-8003362.html>
- [47] MILATA, Viktor, P. SEGLA. *Spektrálne metódy v chémii*. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2004. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 80-227-2049-6.
- [48] HELÁN, Václav. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu. 2., upr. a dopl. vyd.* Český Těšín: 2 Theta, 2005. ISBN 80-863-8029-7.
- [49] VEDA CZ: Průvodce informacemi o vědě a výzkumu. Mezinárodní konference o hmotnostní spektrometrii. *Ziskové zprávy AV ČR* [online]. 2006, 18.1.2012 [cit. 2017-03-30] Dostupné z: <http://www.veda.cz/article.do?articleId=13256>
- [50] DESIDERIO, Dominic M., ed. *Mass spectrometry: clinical and biomedical applications*. New York: Springer Science Business Media, 1994-. Modern analytical chemistry. ISBN 978-1-4899-1750-8.
- [51] FRIEDECKÝ, David a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinické biochemie a metabolismus* [online]. 2012 [cit. 2017-04-04], vol. 20 (41), issue 3, s. 152–157. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- [52] HOFFMANN, Edmond de a V. STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

- [53] HOLČAPEK, Michal, Robert JIRÁSKO a Miroslav LÍSA. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1259**, 3-15 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.072. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312013064>
- [54] NORDING, Pierre. MALDI Mass Spectrometry..... Unique, high purity ioniq MALDI matrices from Fluka. *Analytix. Advances in Analytical Chemistry* [online]. 2005 [cit. 2017-03-14], č. 5, s. 20. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/analytix-5-2005.pdf>
- [55] ŘEHULKA, Pavel. MALDI-Mass Spectrometry. *Analytix. Advances in Analytical Chemistry*. 2001, č. 6, s. 20.
- [56] DVOŘÁKOVÁ, P, L. HERNYCHOVÁ a B. VOJTĚŠEK. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie: Analysis of Protein Using Mass Spectrometry. *Klinická onkologie: The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies* [online]. 2014, 27(3), S104-S109 [cit. 2016-09-13]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4498.pdf>
- [57] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 6, - [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. ISSN 1664-302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00791/abstract>
- [58] CVAČKA, Josef. Hmotnostní analyzátory I. *Univerzita Karlova: Hmotnostní detekce v separačních metodách* [online]. 2016 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: http://www.mu-jweb.cz/MC230P75/files/05_MC230P75_2016.pdf
- [59] DINGLE, Tanis C. a Susan M. BUTLER-WU. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 2013, **33**(3), 589-609 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.cll.2013.03.001. ISSN 02722712. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271213000103>
- [60] HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* [online]. 1999 [cit. 2017-02-21], roč. 78, č. 8, s. 448. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>
- [61] HOLČAPEK, Michal. Mass Scetrometry Group @ University of Pardubice. *Mass Spectrometry Group* [online]. © 2006-2014 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/>

- [62] STEINKE, D.: *DNA Barcoding, MALDI-Tof-MS* [online]. 2013 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://dna-barcoding.blogspot.cz/2013/08/maldi-tof-ms.html>
- [63] TOF/TOF™ 5800 Systém. *Sciex: Answers for Science. Knowledge for Life.* [online]. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <https://sciex.com/products/mass-spectrometers/tof/tof-systems/tof/tof-5800-system>
- [64] PARIMI, Naga Sirisha, Manjinder SINGH, James R. KASTNER, Keshav C. DAS, Lennart S. FORSBERG a Parastoo AZADI. Optimization of Protein Extraction from *Spirulina platensis* to Generate a Potential Co-Product and a Biofuel Feedstock with Reduced Nitrogen Content. *Frontiers in Energy Research* [online]. 2015, **3**, - [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.3389/fenrg.2015.00030. ISSN 2296-598x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fenrg.2015.00030/abstract>
- [65] KHAN, Z., P. BHADOURIA a P. BIEN. Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2005, **6**(5), 373-379 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.2174/138920105774370607. ISSN 13892010. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [66] PROCHÁZKOVÁ, Barbora a Jiří ŠALPLACHTA. The Use of Carrier Ampholyte-Free Isoelectric Focusing for Proteomic Analysis. *Chromatographia* [online]. 2008, **67**(S1), 55-61 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1365/s10337-007-0463-8. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-007-0463-8>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|----------|---|
| ACN | acetonitril |
| AMK | aminokyselina |
| APS | peroxodisíran amonný |
| CBB | Coomassie Brilliant Blue |
| IEF | izoelektrická fokusace |
| MALDI | desorpce a ionizace laserem za účasti matrice |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| pI | izoelektrický bod |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin |
| TOF | průletový analyzátor (time-of-flight) |