Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra:
Rostlinné výroby a agroekologie

Studijní obor:
Rostlinné biotechnologie

Téma diplomové práce:

SEPARACE VYBRANÝCH FRAKCÍ KYSELÝCH PROTEINŮ Z HLÍZ BRAMBORU (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) POMOCÍ CHROMATOGRAFICKÝCH TECHNIK

Vedoucí diplomové práce:
doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. František Lorenc

Konzultant diplomové práce:
Ing. Andrea Kamenová

2013

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. František LORENC**
Osobní číslo:	**Z11681**
Studijní program:	**N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor:	**Rostlinné biotechnologie**
Název tématu:	**Separace vybraných frakcí kyselých proteinů z hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) pomocí chromatografických technik**
Zadávající katedra:	**Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce (DP) bude separace kyselých proteinů z hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) pomocí chromatografických technik. Jako primární experimentální materiál budou použity hlízy dvou vybraných odrůd kulturního bramboru hlíznatého. Pro vlastní separaci bude použita chromatografie, zejména na principu iontovýměnných technik, v uspořádání na sloupci nebo pomocí FPLC. Řešení DP bude probíhat podle následujícího schématu:
1. výběr odrůd (hlízy budou k dispozici z pokusné činnosti řešitelského pracoviště);
2. příprava hlízové šťávy (omytí hlíz, extrakce pomocí odšťavovače, centrifugace, filtrace, zakoncentrování supernatantu, zamrazení);
3. provedení chromatografie na sloupci: a) aniontové (pro odstranění bazických proteinů) a následně b) afinitní (pro odstranění frakce patatinových proteinů);
4. separace proteinové frakce "nezachycené" na afinitní chromatografii na FPLC systému na principu iontovýměnné chromatografie s využitím gradientové eluce;
5. analýza chromatograficky separovaných frakcí na gelové elektroforese (SDS-PAGE) a popis získaných frakcí.

Výsledky budou v práci prezentovány v podobě tabulek, grafických záznamů z chromatografické separace, digitalizovaných elektroforetických gelů, případně v podobě fotodokumentace. Součástí DP bude podrobný literární přehled o dosavadním stavu řešené problematiky a výsledky budou podrobeny diskuzi.

Rozsah grafických prací: **10-15 stran**

Rozsah pracovní zprávy: **30-40 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Bárta J., Čurn V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (Solanum tuberosum L.) - klasifikace, charakteristika, význam. Chemické listy 98: 373-378.
Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996): Protein Methods. Wiley-Liss, Inc. New York, 415 p.
Pouvreau L. (2004): Occurence of physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tubers (Solanum tuberosum). Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 157 p.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Andrea Kamenová**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: **16. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2013**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICICH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice

L.S.

Ing. Karel Suchý, Ph.D.
proděkan pověřený vedením ZF

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 16. února 2012

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury, uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění,
souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

26. dubna 2013 …….....

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za rady, doporučení a spolupráci při vytváření této práce. Dále děkuji za spolupráci, doporučení a rady své konzultantce Ing. Andreje Kamenové a také Ing. Adéle Brabcové. Za provedení hmotnostní spektrometrie vybraných vzorků a poskytnutí výsledků těchto analýz bych také rád poděkoval kolektivu pracovníků oddělení Centrální laboratoře Proteomika, který je součástí Středoevropského technologické institutu Ceitec v Brně pod vedením doc. RNDr. Zbyňka Zdráhala, Dr.

Abstrakt

Tato diplomová práce pojednává o kyselých proteinech obsažených v hlízách bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.), respektive jejich separaci pomocí chromatografických technik. Jako materiál byly zvoleny hlízy dvou odrůd kulturních brambor, Adéla a Westamyl. Ze získané a zakoncentrované hlízové šťávy byly pomocí chromatografie na gravitačních kolonách odstraněny bazické a většina proteinů patatinového komplexu. V následujícím kroku byla provedena chromatografie na aniontové a hydroxyapatitové koloně na systému vysokorychlostní kapalinové chromatografie (FPLC). Na aniontové koloně se podařilo separovat proteinové frakce zahrnující proteiny v rozsahu 15-60 kDa u odrůdy Adéla a 15-100 kDa u odrůdy Westamyl. V největší míře byly u obou odrůd zachyceny proteiny o velikosti 15 kDa a 20 kDa. V posledním kroku byla provedena hmotnostní spektrometrie, pomocí které se podařilo identifikovat vybrané proteinové frakce.

Klíčová slova: *Solanum tuberosum* L., inhibitory proteas, chromatografie, FPLC

Abstract

This diploma thesis deals with acidic proteins contained in the potato (*Solanum tuberosum*) tubers, or rather about their separation with chromatography techniques. For the analysis were chosen tubers of two czech potato varieties, Adéla and Westamyl. From the concentrated potato juice were eliminated basic and most of the patatin proteins with the gravity column chromatography. In the next step were applied the chromatography techniques on the anion and hydroxyapatite columns by the fast protein liquid chromatography (FPLC) system. On the anion column were separated protein fractions which contained proteins of molecular weight in the range of 15 kDa to 60 kDa (Adéla) and 15 kDa to 100 kDa (Westamyl). The most abundant were the proteins with molecular weight 15 kDa a 20 kDa. In the last step was used the mass spectrometry for the identification of chosen protein fractions.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., protease inhibitors, chromatography, FPLC

OBSAH

1. ÚVOD 10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 11
2.1 Proteiny hlíz bramboru 11
2.1.1 Dělení hlízových proteinů 11
2.1.2 Inhibitory proteas 11
2.1.2 Patatin 17
2.1.3 Ostatní proteiny 18
2.2 Chromatografie 19
2.2.1 Historie a obecné principy chromatografie 19
2.2.2 Rozdělení chromatografických metod 20
2.2.3 Plynová chromatografie 21
2.2.4 Kapalinová chromatografie 22
2.2.5 Moderní systémy kolonové kapalinové chromatografie 23
2.2.6 Metody kolonové kapalinové chromatografie 24
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE 29
4. MATERIÁL A METODY 30
4.1 Příprava materiálu pro chromatografickou separaci 30
4.1.1 Příprava vzorků pro stanovení obsahu sušiny a získání šťávy 30
4.1.2 Stanovení obsahu sušiny 30
4.1.3 Zakoncentrování hlízové šťávy 30
4.2 Chromatografická purifikace 31
4.2.1 Purifikace pomocí kolony DEAE 52-Cellulose 31
4.2.2 Purifikace pomocí kolony Con A Sepharose 4B 31
4.2.3 Zakoncentrování frakce Con A D 32
4.2.4 Odsolení proteinových frakcí 32
4.2.5 Chromatografie na systému FPLC pomocí kolony UNO Q6 33
4.2.6 Chromatografie na systému FPLC pomocí kolony CHT5-I 34
4.3 SDS-PAGE elektroforéza 35
4.4 Hmotnostní spektrometrie 36
5. VÝSLEDKY 37
5.1 Hmotnost hlíz a obsah sušiny 37

5.2 Elektroforetické vyhodnocení proteinové skladby po ... 37
5.3 Odsolení proteinových frakcí ... 38
5.4 Chromatografická separace na koloně UNO Q6 ... 39
5.5 Elektroforetické vyhodnocení proteinové skladby po separaci na UNO Q6 ... 41
5.6 Chromatografická separace na koloně CHT5-I ... 42
5.7 Hmotnostní spektrometrie ... 44
6. DISKUSE ... 46
6.1 Obsah sušiny ... 46
6.2 Chromatografické purifikace ... 46
6.3 Chromatografická separace na koloně UNO Q6 ... 46
6.4 Chromatografická separace na koloně CHT5-I ... 47
6.5 Hodnocení identifikovaných proteinů a jejich potencionální využití ... 48
7. ZÁVĚR ... 49
8. POUŽITÁ LITERATURA ... 51
9. PŘÍLOHY ... 55
9.1 Složení pufrů použitých při chromatografických technikách ... 55
9.2 Složení jednotlivých pufrů a komponentů pro barvení, odbarvení a fixaci ... 56

1. ÚVOD

Lilek brambor či brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je rostlina patřící do čeledi lilkovitých. Tato plodina pochází z horských a podhorských oblastí And v oblasti dnešních států Peru, Chile a Bolívie v Jižní Americe odkud se s kolonisty dostala v 16. století do Evropy. Na našem území je zaznamenán první výskyt brambor v druhé polovině 17. století. K většímu rozšíření pěstování však došlo přibližně až na přelomu 18. a 19. století. Brambory patří v současnosti celosvětově k nejdůležitějším plodinám v lidské výživě. Jsou bohatým zdrojem minerálních látek a některých vitamínů a proteiny obsažené v bramborových hlízách jsou díky skladbě aminokyselin, zejména díky vysokému obsahu lysinu, považovány za velmi kvalitní. Po pšenici, sóje a kukuřici mají také ze všech plodin nejvyšší výnos. Kromě potravinářského využití se bramborové hlízy ve velké míře uplatňují také ve zpracovatelském průmyslu, zejména pro extrakci škrobu.

Hlízy brambor jsou přibližně ze tří čtvrtin tvořeny vodou. Zbývající sušinu představují z více než poloviny polysacharidy – škroby. Necelých 10% celkového obsahu sušiny tvoří dusíkaté látky, v nichž poměrně proměnlivý obsah zaujímají proteiny, přičemž nejvíce zastoupenými skupinami proteinů je patatinový komplex a inhibitory proteas, které společně tvoří přibližně dvě třetiny celkového obsahu proteinů. Inhibitory proteas, patřící svou velkou částí mezi kyselé hlízové proteiny, představují velmi důležitou součást obranných mechanismů bramboru hlíznatého. Byla prokázána zejména jejich aktivita proti mikrobiálním a hmyzím patogenům a proto by tyto proteiny mohly nalézt uplatnění v oblasti rostlinolékařství. Kromě toho se u inhibitorů proteas prokázaly specifické mechanismy působení, které by mohly pomoci při léčbě nádorových a kožních onemocnění.

Hlízové proteiny brambor jsou všeobecně hojně studované. Současný výzkum se však soustřeďuje zejména na nejběžnější zásobní a nejvíce zastoupený hlízový protein - patatin. Cílem této práce je zejména separace kyselých hlízových proteinů pomocí chromatografických technik, jejich analýza na gelové elektroforéze a popis získaných frakcí, avšak s výjimkou patatinu, který rovněž vykazuje kyselé pH.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Proteiny hlíz bramboru

Jak již bylo uvedeno v úvodu, hlízy bramboru hlíznatého jsou tvořeny průměrně ze75% vodou a zbytek hmoty představuje sušina zahrnující především polysacharidy, jež tvoří podíl 13-24% celkového objemu hlíz. Obsahy dusíkatých látek v hlízách bramboru se pohybují okolo 2%, v samotné sušině poté přibližně kolem 10%. Obsah vlastních proteinů v rámci dusíkatých látek kolísá v poměrně velkém rozpětí od 34 do 70 % (Bárta and Čurn, 2004).

2.1.1 Dělení hlízových proteinů

Dříve se hlízové proteiny klasifikovaly podle rozpustnosti na albuminové, globulinové, glutelinové, a prolaminové frakce přičemž se na počátku 80. let minulého století zjistilo, že hlavní podíl tvoří z 60% albuminová frakce, z 20% globulinová a zbývajících 20% ostatní frakce. V současné době se proteinové spektrum u hlíz bramboru nejčastěji klasifikuje podle molekulové hmotnosti, přičemž se dělí do 3 hlavních skupin. Tyto skupiny tvoří patatin či patatinový komplex, bramborové inhibitory proteas a ostatní proteiny, převážně s enzymovou účastí na syntéze škrobu (glykoproteiny). Právě patatinový komplex spolu s inhibitory proteas představují dvě nejvýznamnější skupiny a zaujímají přibližně dvě třetiny celkového obsahu proteinů v hlízách bramboru (Bárta and Čurn, 2004).

2.1.2 Inhibitory proteas

Proteasy neboli proteolytické enzymy jsou velmi důležitou a širokou skupinou proteinů. Jejich hlavním úkolem je štěpení proteinů. Ve vyšších organismech jsou proteasy kódovány přibližně 2% všech genů. Přestože jsou ve většině organismů nepostradatelnou skupinou, jejich přílišná koncentrace může být naopak poškozující. Z tohoto důvodu musí být aktivita proteas striktně regulována (Habib and Fazilli, 2007).

Jedním z mechanismů regulace proteasové aktivity je působení inhibitorů proteas (PI's). Tyto proteiny s inhibiční aktivitou byly izolovány z mikroorganismů, živočichů a rostlin. První zmínka o roli PI's v obraně rostlin se objevila již v roce 1947 kdy Mickel a Standish pozorovali narušení vývoje larev u hmyzu, které byly udržovány na extraktech sóji,

kde se právě tyto proteiny vyskytovaly. Většinu PI's zapojených do obranných mechanismů tvoří inhibitory serinových proteas. Méně zastoupené jsou inhibitory cysteinových proteas. Nejméně časté jsou inhibitory aspartátových proteas a metalloproteas (Hanusová and Čurn, 2007).

Inhibitory proteas se mohou v rostlinném těle vyskytovat v různých částech, například semenech a hlízách ale i v nadzemních orgánech. Zatímco v zásobních orgánech, zejména hlízách působí spíše jako zásobní proteiny, v nadzemních částech, především v listech sehrávají velkou roli v ochraně před mikrobiálními patogeny, hmyzími škůdci a háďátky (Habib and Fazilli, 2007; Bárta and Čurn, 2004).

U některých škůdců byla prokázána inhibice aktivity trávicích enzymů, což má za následek snížení množství strávených proteinů. Inhibice proteas zároveň vede k nadprodukci trávicích enzymů, což způsobuje vyčerpávání zejména sirných aminokyselin. V krajním případě dochází k narušení vývoje, až smrti patogena (Rohrer *et al*., 2011).

Inhibitory proteas obsažené v bramborové šťávě tvoří často více než 30 % z celkového množství proteinů, u odrůdy *Elkana* může jejich obsah dosahovat až hodnoty 50%. Zastoupení a poměry jednotlivých skupin proteinů v hlízách bramboru však nejsou dodnes přesně známy. Každá odrůda také obsahuje různé spektrum frakcí PI's. Ukázalo se však, že přibližně 70% inhibitorů proteas patří mezi inhibitory Kunitzova typu (Hanusová and Čurn, 2007; Pouvreau, 2004).

Klasifikace inhibitorů proteas

Inhibitory proteas obecně rozdělujeme nejčastěji podle aminokyselinového zbytku v aktivním místě. Podle toho kriteria rozlišujeme 4 hlavní skupiny: Serinové inhibitory proteas (serin či histidin v aktivním místě), cysteinové inhibitory proteas (cystein v aktivním místě), aspartátové inhibitory proteas (aspartát v aktivním místě) a metaloproteasové inhibitory (kovové ionty v aktivním místě), (Bártová *et al.*, 2012).

Pro klasifikaci inhibitorů proteas u brambor se v současnosti používají 2 klasifikační systémy. Podle staršího a méně detailního systému dělíme PI's u brambor do 3 hlavních skupin: První skupinou je potato inhibitor I o velikosti 8 kDa, který je pentemarickým inhibitorem serinu, potato inhibitor II, dimerický serinový inhibitor a třetí skupinou jsou proteiny o velikosti 20-22 kDa, které se nadále dělí do 4 dalších podskupin, které tvoří inhibitory proteas Kunitzova typu, inhibitory cysteinových proteas, inhibitory aspartátových proteas a inhibitor karboxipeptidasy.

Podle modernějšího způsobu využíváme dělení bramborových PI's přímo do sedmi tříd podle jejich molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu disulfidických můstků v molekule (Bártová, 2012).

Tab. 1: Rozdělení bramborových inhibitorů proteas podle jejich specifických vlastností (upraveno podle Bártová, 2012).

Skupina	**Molekulová hmotnost**	**pI (pH)**	**Klasifikace**	**Inhibované enzymy**
Bramborový inhibitor proteas I (PI-1; Potato inhibitor I)	7,7-7,9 kDa	5,1-7,8	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor proteas II (PI-2; Potato inhibitor II)	10,2 kDa	5,5-6,9	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový cysteinový inhibitor proteas (PCPI, Potato Cystein Protease Inhibitor)	20,1-22,8 kDa	5,8-9,0	cysteinový inhibitor	papain trypsin chymotrypsin
Bramborový aspartátový inhibitor proteas (PAPI, Potato Aspartyl Protease Inhibitor)	19,9-22,0 kDa	6,2-8,7	aspartátový inhibitor	cathepsin D trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor Kunitzova typu (PKPI, Potato Kunitz Protease Inhibitor	20,2 kDa	8,0-9,0	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Ostatní serinové inhibitory (OSPI, Other Serine Protease Inhibitor)	21,0-21,8 kDa	7,5-8,8	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový karboxipeptidasový inhibitor proteas (PCI, Potato Carboxypeptidase Inhibitor)	4,3 kDa	pH	metalloproteasový inhibitor	karboxipeptidasa A

Inhibitory proteas mohou být děleny také do dvou skupin podle způsobu interakce s enzymy. U první skupiny dochází k interakci inhibitoru přímo s katalytickým centrem enzymu, čímž daný enzym inaktivuje. PI's z druhé skupiny se na rozdíl od inhibitorů z první skupiny nevážou přímo na katalytické centrum, ale obklopují katalytický aparát enzymu a zamezují tak spojení a interakci katalytického centra se substrátem. První skupinu tvoří převážná část PI's o velikosti od 30 do 200 aminokyselin. Jedná se především o serinové

inhibitory proteas, např. bramborový serinový inhibitor proteas (PSPI, *Potato Serine Protease Inhibitor*) což je zároveň nejčastěji zastoupený inhibitor proteas u brambor. Zahrnuje stabilní, převážně kyselé frakce s neměnnou sekundární a terciální strukturou v rozmezí pH od hodnoty 3 do 7,5. Kromě PSPI může první skupina zahrnovat také některé cysteinové inhibitory, např. bramborový cysteinový inhibitor proteas (PCPI, *Potato Cysteine Protease Inhibitor*). Druhá skupina se skládá především z PI's, které patří mezi cysteinové inhibitory proteas a například také skupina hirudinů, patřící mezi živočišné inhibitory proteas, které byly izolovány ze slin pijavic (Pouvreau, 2004).

Frakcionace inhibitorů proteas

Proteiny ze skupiny inhibitorů proteas vytváří jednotlivé frakce v rámci každé odrůdy. Pouvreau (2004) popisuje proces frakcionace pomocí chromatografických technik bramborových inhibitorů proteas u odrůdy *Elkana* následujícím způsobem: Zakoncentrovaná bramborová šťáva se nechá nejprve frakcionovat na koloně v rámci gelové permeační chromatografie. Tím je získáno rozdělení do frakce I, frakce II a souboru frakcí III a IV.

Frakce I se zahřeje a následně se nechá separovat na aniontové koloně pomocí iontovýměnných interakcí. V rámci vazebných proteinů se zachytávají frakce od IA do IF. Proteiny z frakcí INα a INβ se zachytí v dalším kroku na kationtové koloně.

Frakce II se nejprve rozdělí na aniontové koloně. Tím jsou zachyceny vazebné proteiny z frakcí od IIA do IIE. Z nevazebných proteinů se jedná o frakce IIN. V dalším kroku na anexové koloně dojde k rozdělení frakcí v rozptylu od IINA do IINH. Vazebné i nevazebné frakce se následně využijí pro frakcionaci v rámci afinitní chromatografie. Při této separaci jsou zachytávány zejména frakce od IIA1 do IIE2 a frakce v rozptylu od IINA1 do IINH2.

Frakce III a IV jsou společně zachytávány pomocí kolony gelové permeační chromatografie, přičemž se jedná o frakce v rozptylu od IIIA do IIID a od IVA do IVE. Jednotlivé frakce inhibitorů proteas v bramborových hlízách separované v rámci odrůdy *Elkana* jsou uvedeny v následující tabulce (Pouvreau, 2004).

Tab. 2: Charakteristika a aktivita jednotlivých proteinů a frakcí inhibitorů proteas izolovaných z hlízové šťávy bramboru hlíznatého odrůdy *Elkana* (upraveno podle Pouvreau, 2004)

Název	Frakce	MW (± 5 Da)	PI (pH)	Počet pj.	Tryp	Chym	Pap	CathD	HLE	CarboA
	I	7,683-7,873	5.1-6.3	5	+	+	-	-	+	-
PI-1	IN	7,683-7,873	7.2, 7.8	5	+	+	-	-	+	-
	IIC2, IIC3	7,683-7,873	5.1, 6.3	5	+	+	-	-	+	-
	IIA2, IIB1	20,279	6.5	2	+	+	-	-	+	-
	IIB2	20,023	6.0	2	+	+	-	-	-	-
	IIC3, IID3	20,273	6.1	2	+	+	-	-	+	-
PI-2	IIC4	20,674	5.8	2	-	+	-	-	+	-
	IID2	20,676	5.5	2	+	+	-	-	+	-
	IIE2	20,315	5.9	2	+	+	-	-	+	-
	IINA2, IINA3	20,265	6.9	2	+	+	-	-	+	-
PIG	IIC4	19,987	6.2	1	-	+	-	+	+	-
NID	IINB2	20,039	8.4	1	+	+	-	+	+	-
PDI	IIND2, IINE2	22,025	8.6	1	+	+	-	+	+	-
PI-13	IINC1	19,878	8.7	1	+	-	-	+	+	-
PI-8	IINC2	20,141	7.5	1	+	+	-	+	-	-
PAPI-8.2	IINA3	19,883	8.2	1	+	+	-	+	-	-
PCPI-23 kDa	IIA1	22,755	6.7	1	-	+	+	-	+	-
PCPI-6.6	IIC1	22,769	6.6	1	-	+	+	-	-	-
PCPI-5.9	IID1	22,674	5.8	1	+	+	+	-	-	-
PCPI-7.1	IINA1	22,773	7.1	1	+	+	+	-	-	-
PCPI-8.0	IINB2	20,096	8.0	1	+	+	+	-	+	-
PCPI-8.6	IIND1, IINE1	20,127	8.6	1	+	-	+	-	-	-
PCPI-9.4	IINF1, IING1	20,134	>9.0	1	+	-	+	-	+	-
PCPI-8.3	IINF2, IING2, IIG3	20,433	8.3	1	+	+	+	-	-	-
PKPI-9.0	IINH1	20,237	>9.0	1	+	-	-	-	-	-
PKPI-8.0	IINH2, IING2	20,194	8.0	1	+	+	-	-	-	-
HLE inh.	IINE2	21,025	8.8	2	+	+	-	-	+	-
22 kDa inh.	IINA2, IINA3	21,804	7.5	1	+	+	-	-	+	-
PCI	IIIB	4,274	n.	1	-	-	-	-	-	+

Počet pj: počet podjednotek proteinu, Tryp: trypsin, Chym: chymotrypsin, Pap: papain, CathD: katepsin D, HLE: lidská leukocytová elastasa, CarboA: karboxypeptidasa, PI-1: bramborový inhibitor I, PI-2: bramborový inhibitor II, PAPI: bramborový aspartátový inhibitor proteas, PCPI: bramborový cysteinový inhibitor proteas, PKPI: bramborový inhibitor proteas Kunitzova typu, PCI: bramborový karboxypeptidový inhibitor.

+ : prokázána inhibiční aktivita, - : neprokázaná inhibiční aktivity, n. - neurčeno

Možnosti využití inhibitorů proteas

Inhibitory proteas se díky svým vlastnostem řadí mezi multifunkční proteiny. Řada jejich vlastností a mechanismů působení může vytvářet prostor pro jejich využití v budoucnosti, ať už se jedná o oblasti lékařství, rostlinolékařství případně jiné, například průmyslové, oblasti.

Z hlediska uplatnění v lékařství by inhibitory proteas mohly být potencionálně využity například při léčbě nádorových onemocnění. PI's mohou blokovat aktivaci promotoru tumoru v savčích buňkách tím, že eliminují aktivátor proteinu AP-1, který působí jako transkripční faktor. Mohou také soutěžit o vazebné místo na receptoru EGFR, na který se navazuje EGF, což je antagonista lidského epidermálního růstového faktoru. PI's jsou také aktivní proti oxidativnímu působení některých bakterií, které může být karcinogenní nebo mutagenní. Kromě toho se prokázala účinnost PI's proti dermatitidě a jiným kožním onemocněním. Inhibitory proteas mohou mít potenciál i v léčbě obezity, kdy umožňují udržování vyšší hladiny enzymu cholecystokininu (CCK), který zvyšuje u člověka pocit nasycení a tím pádem redukuje příjem potravy. Tato aktivita byla již prokázána u inhibitorů proteas vyskytující se v bramborových hlízách, například PI-1, PI-2 nebo PCI. (Hanusová and Čurn, 2007)

Inhibitory proteas by mohly najít uplatnění také v oblasti ochrany rostlin. Vzhledem k tomu, že geny podmiňující expresi těchto proteinů jsou poměrně lehce přenositelné, je možné vytvořit transgenní rostliny umožňující produkci nebo zvýšení produkce těchto proteinů v rostlinách. Jako první proběhl přenos genu kódující protein CpTi do rostlin tabáku. Později byla provedena transgenose bramborového inhibitoru PI-I2 do rostlin rýže. Ukázalo se, že některé PI's indukují také rezistenci k některým virům, například cystein proteasový inhibitor oryzacystatin indukoval specifickou rezistenci ke dvěma významným poliovirům: *Tobacco etch virus* (TEV) a *Potato virus Y* (PVY). U transgenního hrachu prokázal fazolový inhibitor alfa-amylasy rezistenci k zrnokazu hrachovému (Hraška *et al.*, 2006).

Praktickému využití PI's v rostlinolékařství však zatím brání některé jejich vlastnosti doprovodné jevy. Problematické může být například jejich specifické působení, které vzhledem k velké variabilitě trávicích proteas v zažívacím traktu hmyzu znesnadňuje konkrétní využití PI's při ochraně rostlin a často by se v rámci technik transgenose muselo přenášet více genů pro produkci více PI's. Kromě toho, při obranných reakcích hmyzu může docházet k výměně trávicích enzymů, které PI's neovlivňují nebo rovnou vedou k produkci jiných trávicích enzymů, které jsou k PI's přímo necitlivé. Působení PI's může také paradoxně způsobit větší poškození rostlin v důsledku zvýšené konzumace rostlinné hmoty z důvodu

inhibice trávicích enzmů. Tyto proteiny také často nezpůsobují přímo smrt hmyzích patogenů, ale pouze zpomalení jejich vývoje či snížení plodnosti (Hraška *et al.*, 2006).

I přes některé, výše uvedené problémy, může být potenciál využití inhibitorů proteas v budoucnosti poměrně vysoký, proto je důležité nadále provádět jejich výzkum a studium využitelných vlastností.

2.1.2 Patatin

Patatin představuje přibližně 40% celkového množství rozpustných proteinů v hlízách brambor. Jeho velikost kolísá mezi 40 až 43 kDa. Aminokyselinová sekvence monomeru čítá 366 aminokyselin. Podíl sacharidové části makromolekuly patatinu je asi 4%. Nativně se vyskytuje ve formě dimeru. Poprvé byl izolován v roce 1980 Racusenem a Footem pomocí chromatografických technik. (Ralet *et al.*, 2000).Patatin kóduje 2 třídy genů, přičemž Multigenová rodina třídy I je exprimována pouze v hlízách a Multigenová rodina třídy II je exprimována v nízkých hladinách v celé rostlině (Bárta, 2004).

Na rozdíl od inhibitorů proteas představuje patatinový komplex homologní skupinu proteinů. Jeho nejdůležitější funkce je zásobní a v hlízách brambor představuje hlavní zásobní protein. Patatin může kromě zásobní funkce vykazovat také lipid acylhydrolasovou aktivitu (LAH), která umožňuje tvorbu voskových esterů a deacylaci lipidů. Patatinu byla připsána navíc aktivita enzymu acyl transferasy a kyselé 1,3-beta-glukanasy. Ta přispívá k obraně před houbovými patogeny. Bylo také zjištěno, že enzym cytosolová fosfolipasa A_2 katalyzující hydrolýzu esterových vazeb mastných kyselin má stejné vlastnosti jako patatin a proto někteří autoři považují přímo tento enzym za patatin. Na základě srovnání specifických enzymových a inhibičních vlastností patatinových frakcí se dospělo k závěru, že patatin může působit svým vlivem na metabolismus lipidů jako obrana proti hmyzím škůdcům (Hanusová and Čurn, 2007; Bárta, 2004)

Izolace patatinu se dá provádět více způsoby. Jako nejefektivnější se ukázala metoda precipitace ethanolem z hlízové vody, která vzniká jako odpad při zpracování bramborových hlíz na škrob. Další účinné metody izolace, zejména v laboratorním prostředí, jsou některé separační techniky, například adsorpční chromatografie.

Komplex patatinových bílkovin bude moci díky svým vlastnostem nabídnout široké využití v oblastech krmivářství, potravinářství a díky enzymovým vlastnostem také v oblasti biotechnologií.

2.1.3 Ostatní proteiny

Méně zastoupenou skupinou proteinů v hlízách bramboru jsou například lektiny. Jedná se o proteiny s molekulovou hmotností větší než 40 kDa. Patří mezi poměrně důležitou skupinu proteinů, protože se mimo jiné zapojují do obranného mechanismu rostlin tím, že indukují shlukování (aglutinaci) buněk. Jsou schopny nepecificky interferovat v metabolismu vitamínů, aminokyselin, tuků a glukózy s následkem zpomalení růstu organismu (Čtvrtníčková, 2009). Některé lektiny však mohou být toxické i pro savce. Procházejí gastrointestinálním ústrojím téměř nezměněny a dokážou proto způsobit řadu poruch trávicího traktu (Hanusová and Čurn, 2007).

Lektiny mají také schopnost rozpoznávat a vázat cukry. Rostlinné lektiny se vyznačují vyšší citlivostí k vyšším teplotám a také odolností k trávení. Kromě brambor se nachází i v jiných plodinách, jako jsou například obilniny, kukuřice, rajčata a luštěniny. Vyskytují se zejména ve vegetativních částech rostlin, například v listech, stoncích, kůře, hlízách a oddencích (De Mejía and Prisecaru, 2005). Mezi nejdůležitější rostlinné lektiny patří zejména jacalin, konkanavalin A, fytohemaglutinin A, sojový lektin a ricin (Čtvrtníčková, 2009).

Mezi další skupiny řadíme také například polyfenoloxidasy, které se podílí na tvorbě škrobu. Byly nalezeny ve vyšších koncentracích v hlízách, stolonech a kořenech, přičemž v listech a stoncích byl jejich obsah nižší. Nejvyšší aktivita byla zjištěna v epidermis, případně kůře rostliny (Thygesen *et al*., 2005).

2.2 Chromatografie

2.2.1 Historie a obecné principy chromatografie

Metody chromatografie patří mezi nejvýznamnější analytické separační metody. Umožňují dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek. Základy chromatografie položil na počátku 20. století botanik rusko-italského původu Cvět. Podařilo se mu rozdělit chloroplastové pigmenty z rostlinných extraktů na sloupci uhličitanu vápenatého. Pro separaci těchto látek byly využité rozdílné absorpční schopnosti jednotlivých složek směsi rostlinných barviv. Po tomto období se chromatografie ve velmi omezené míře začala používat až od 30. let. Přelom však nastal až po 2. světové válce, kdy Martin a Synge dostali za výzkum v této oblasti Nobelovu cenu a tím započali éru moderní plynové a kapalinové chromatografie. Od té doby se chromatografické techniky velmi rozšířily a stále se vyvíjí nové postupy. Po metodách vážení a měření pH se tak chromatografie stala nejrozšířenější technikou analytické chemie (Drbal and Křížek, 1999; Káš, 2006).

Moderní metody chromatografie však slouží nejen k účelům analytickým, ale také preparativním. Využívají se zejména v biomedicíně, bioanalytice, farmaceutickém a potravinářském průmyslu nebo ve forenzních vědách, například kriminalistice. Kromě separace a následného určení složení směsí lze podle současných metod také měřit koncentraci jednotlivých látek. Pro dokonalou identifikaci se chromatografické techniky spojují také s mnohými metodami analytické chemie, například hmotností spektrometrií, UV-VIS spektrometrií a dalšími (Káš, 2006).

Principem samotné chromatografie je dělení a distribuce látek mezi dvěma fázemi, z nichž pohyblivá fáze se označuje jako mobilní a nepohyblivá stacionární. Dělení je založeno na rozdílné afinitě složek ve směsi k mobilní a stacionární fázi. Mobilní fází tvoří kapalina či plyn, stacionární fáze (sorbent) může mít velmi rozdílnou formu. Například ji mohou tvořit částečky tuhé fáze, tenká vrstva kapaliny na pevných částicích nebo film kapaliny na vnitřní straně kapiláry (Drbal and Křížek, 1999).

Při chromatografii dochází k přesunu látek do fáze stacionární a zpět do fáze mobilní. Každá molekula přejde mnohokrát z mobilní fáze do sorbentu a zpět, přičemž doba, po níž separovaná látka setrvá v koloně, závisí na četnosti a síle interakcí a určuje pořadí, v němž složka opouští kolonu. Čím větší jsou tyto interakce ve stacionární fázi, tím vyšší je hodnota elučního času. (Káš, 2006).

2.2.2 Rozdělení chromatografických metod

Jak již bylo uvedeno, v současnosti existuje mnoho technik chromatografie a jejich rozdělení je možné provést na základě několika kriterií. Nejjednodušeji chromatografické techniky rozdělujeme podle skupenství a vlastností mobilní a stacionární fáze a také podle separačních mechanismů jednotlivých technik, tak jak je to uvedeno v následující tabulce.

Tab. 3: Rozdělení základních technik chromatografie podle daných vlastností

Skupenství mobilní fáze	**Skupenství stacionární fáze**	**Separační mechanismus**	**Jednotlivé metody**
Plynová chromatografie	Pevná látka	Adsorpční	Plynová adsorpční chromatografie (GSC)
		Sítový efekt	Plynová chromatografie na molekulových sítech (GSC)
	Kapalina	Rozdělovací	Plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
Kapalinová chromatografie	Pevná látka	Adsorpční	Adsorpční kapalinová chromatografie (LSC)
			Tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC)
		Biospecifické interakce	Afinitní chromatografie (AC)
		Výměna iontů	Iontově výměnná chromatografie (IEX)
	Kapalina	Rozdělovací	Kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)
		Sítový efekt	Gelová permeační chromatografie (GPC)
Kapalina v superkritickém stavu	Pevná látka	Rozdělovací	Superkritická fluidní chromatografie (SFC)

Podle skupenství fází se dělí chromatografie na plynnou a kapalinovou, případně superkritickou-fluidní. U plynové chromatografie tvoří fáze plyn-pevná látka nebo plyn-kapalina, kapalinová chromatografie tvoří fáze kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka. Techniky kapalinové chromatografie lze dělit podle způsobu zavádění vzorku na kolonu a podle eluční síly mobilní fáze. Dnes se v praxi takřka výlučně používá eluční vyvíjení, kdy se vzorek zavede na kolonu na začátku analýzy a jeho složky jsou na koloně silněji sorbovány než složky mobilní fáze. Jednotlivé komponenty vzorku jsou eluovány z kolony v pořadí podle velikosti sorpce na stacionární fázi a jsou odděleny čistou mobilní fází. Mění-li se polarita mobilní fáze během analýzy s časem, jde o tzv. gradientovou eluci. Podle uložení stacionární fáze lze rozdělovat chromatografii na sloupcovou, papírovou a tenkovrstvou (Drbal and Křížek, 1999). Detailní způsob dělení technik chromatografie je založený na separačním mechanismu neboli charakteru interakce separované látky se stacionární fází. Podle tohoto kriteria rozlišujeme například chromatografii afinitní, iontově výměnnou, adsorpční, rozdělovací, gelovou permeační a další konkrétní chromatografické techniky.

2.2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, *Gas chromatography*) je separační metoda, která využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce a rozpouštění přičemž předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. (Šťulík *et al.*, 2005) Jedná se o metodu určenou k dělení a stanovení plynů, kapalin i látek s pevným bodem varu do cca 400 ºC. Pro správné fungování této metody však nesmí docházet k nežádoucímu vypařování látek. Složky jsou separovány v mobilní fázi, kterou tvoří nosný plyn, přičemž všechny analyzované látky musí být vypařeny definovaným způsobem. Stacionární fáze je umístěná v chromatografické koloně a může být tvořena pevnou fází (např. aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý, polymerní sorbenty apod.) nebo vysokovroucí kapalina nanesená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. GC je také vhodná pro analýzu těkavých anorganických sloučenin (Krofta *et al.*, 2001).

Separace při plynové chromatografii probíhá tak, že se vzorek vnese do nástřikové komory, kde se odpaří a ve formě par je unášen nosným plynem do kolony. Složky kolony se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn poté unáší vzorky ke konci kolony a celý proces se znovu opakuje. Látky postupně vycházejí z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do

detektoru, pomocí kterého jsou vyhodnocovány jednotlivé signály. Záznam signálů je poté zpracováván ve formě chromatogramu. (Krofta *et al.*, 2001).

2.2.4 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, *Liquid chromatography*) se na rozdíl od plynové chromatografie vyvíjela o něco pomaleji a to zejména z důvodů složitějšího mechanismu separačního děje v kapalné fázi oproti plynné fázi a nutností využívat vhodné aparatury pro rychlou a účinnou analýzu. (Sobotníková *et al.*, 2010).

Na přelomu 30. a 40. let 20. století vyvinuli vědci Martin a Synge formu chromatografie s kapalinovou mobilní i stacionární fází, která byla využitelná pro separaci acetylovaných aminokyselin. V roce 1941 navrhli ve své publikaci využití malých částic ve stacionární fázi a zvýšení tlaků pro vylepšení separace. Tím iniciovali vytvoření základních prvků vedoucí k vývoji vysokotlaké kapalinové chromatografie (Scott, 2012).

Výrazný pokrok proběhl v 70. letech díky vědcům Horvathovi a Guiochonovi a jejich kolektivu, kteří jako stacionární fázi použili vysoce porézní silici - oxid křemičitý. Tyto materiály, které jsou stabilní i do vysokých tlaků kolem 30 MPa vedli k vytvoření metody vysokotlaké kapalinové chromatografie. Kapalinová chromatografie se nejčastěji používá k separaci polárních látek a látek s vysokou molekulovou hmotností, které nemohou být rozdělovány pomocí plynové chromatografie. (Kříženecká, 2007; Raymond and Scott, 2012)

Stacionární fázi kapalinové chromatografie tvoří v současnosti nejčastěji silikagel ve formě nepravidelných částic nebo malých kuliček. Silikagel je často modifikovaný a jeho vazba tvoří formu Si – O – Si. Takto vázané silikonové polymery jsou velmi odolné vůči hydrolýze a vysokým teplotám. Mobilní fázi tvoří kapalina, přičemž nejvíce využívané jsou zejména alkoholy, nitrily nebo ethery. Tyto kapaliny mají příliš velkou eluční sílu a proto se používají ve směsi s vodou, která má nejmenší eluční sílu. Pro ideální hodnotu eluce se tedy využívá mísení dvou nebo tří rozpouštědel o různé eluční síle. Doba průchodu jednoho vzorku kolonou, respektive doba mezi vložením a detekcí vzorku, se nazývá retenční čas a značí se t_r. Retence (zachytávání) separovaných složek při kapalinové chromatografii roste úměrně s jejich zvyšující se molekulovou hmotností. Pořadí snižující se retence separovaných složek je následující: Alkany, aromáty, uhlovodíky, ethery, nitrosloučeniny, estery, aminy, amidy, kyseliny a sulfokyseliny. Retence polárních složek je malá a zcela disociované složky v mobilní fázi nejsou zachytávány vůbec. Retenční čas můžeme ovlivnit také úpravou

hodnoty pH mobilní fáze. Zvýšením pH se zvýší eluční objemy bazických složek a naopak snížením pH dochází k opačnému efektu. (Kříženecká, 2007).

2.2.5 Moderní systémy kolonové kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, *High performance liquid chromatography*) je v současnosti rozšířeným systémem kapalinové chromatografie. Vyvinula se z plynové chromatografie na počátku 70. let. Pro separaci využívá kapalinovou mobilní fázi. Jedná o sloupcový neboli kolonový typ chromatografie. Stacionární fáze vyskytující se na stěnách kolony obsahuje malé částice nepravidelného tvaru a jednotné velikosti (Šťulík *et al.*, 2005).

Systém HPLC využívá vysokých tlaků pro průchod mobilní fáze kolonou, protože stacionární fázi tvoří těsně vázané malé částice, které při působení nízkých tlaků mobilní fáze hůře adsorbují. HPLC využívá nejčastěji 2 módy. Při chromatografii s polárními fázemi se využívá polárních interakcí, kdy je stacionární fáze polárnější než mobilní. Při reverzní fázi je naopak stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. V současnosti je reverzní chromatografie mnohem využívanější než chromatografie s normálními fázemi (Šťulík *et al.*, 2005).

Tento systém chromatografie se využívá například pro analýzu čistoty proteinů. Výhodou je vysoká rychlost analýzy, vysoká přesnost a citlivost, možnost automatizace a dostupnost přístrojů pro tento typ chromatografie. Menší nevýhodu představují vysoké tlaky, které mohou v krajních případech poškozovat proteinové frakce (Fusek, 2008).

Základní instrumentaci pro HPLC tvoří čerpadlo, zařízení na dávkování vzorku, kolony, detektory a vyhodnocovací zařízení (Kříženecká, 2007). Pro analýzu vzorků lze využít několik druhů detekčních přístrojů. Je třeba si také uvědomit, že změna konkrétního programu HPLC může mít vliv na retenční čas i přesnost identifikace.

Vysokorychlostní kapalinová chromatografie (FPLC)

Vysokorychlostní kapalinová chromatografie (FPLC, *Fast protein liquid chromatography*) je vysoce účinný chromatografický systém s vysokou rozlišovací

schopností. Tento systém zahrnuje v rámci svojí instrumentace automatické dávkovače, program gradientové kontroly a vizualizace chromatografických vln (píků) pomocí počítačového programu. Jedná se o střednětlakou metodu kapalinové chromatografie, čímž se liší od HPLC. Využívá tlaky maximálně do 5 MPa a tím pádem je, například k proteinovým frakcím, citlivější než HPLC. Díky nižším tlakům mohou být také jednotlivé komponenty vyrobeny z plastů nebo skla (Madadlou *et al.*, 2011; Brůnová, 2008).

Systém FPLC se využívá nejčastěji při práci s biopolymery. Jeho výhodou jsou také menší finanční náklady za provoz a komponenty než v případě HPLC. Za 1 test v rámci FPLC může být cena až třicetkrát nižší než u HPLC a cena za 1 FPLC kolonu až desetkrát menší. FPLC poskytuje široký rozsah chromatografických módů, jako je výměna iontů, *chromatofocusing*, gelová filtrace a hydrofobní interakce. Nejvyužívanější režimy představuje zejména výměna iontů a gelová filtrace. (Madadlou *et al.*, 2011).

Systém FPLC byl vytvořen v roce 1982 ve Švédsku jako upravený HPLC chromatografie. Umožňuje pracovat ve vodných mobilních fázích s vysokým podílem solí a organických rozpouštědel za nižších tlaků (Tesařík, 2007). Rychlost rozpouštění a konstantní průtok u FPLC je kontrolován pomocí pump. Vzorky jsou vpraveny pomocí injekční stříkačky do nasávací smyčky nebo peristaltickou pumpou do „supersmyčky“. Ze smyčky je poté vzorek přenesen do kolony, kde přichází do styku se stacionární fází. Stacionární fáze má velkou příjmovou kapacitu. Obě fáze přitom dobře pracují s pufry a solemi běžně užívanými při bioseparaci. FPLC využívá písty řízených pump, které pracují proti sobě, při napouštění jedné se druhá vypouští. Podle chromatografických módů a principů separace lze využívat různé typy kolon. Po přenosu vzorku do kolony se jednotlivé složky navážou na stacionární fázi. Díky automatickým pístům a jednoduchému sestavení, lze přístroj jednoduše upravit dle účelu použití. Konkrétní metody mohou být jednoduše synchronizovány s dodaným softwarovým programem a rozsah jeho nastavení umožňuje již zmíněný vysoký stupeň automatizace a tím pádem také vysokou rychlost a opakovatelnost (Sheehan, 2009).

2.2.6 Metody kolonové kapalinové chromatografie

Kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)

Podstatou kapalinové rozdělovací chromatografie (LLC, *Liquid-liquid chromatography*) je distribuce složek mezi kapalnou mobilní fází a kapalnou stacionární fází mechanicky přichycenou na pevném podkladu na základě jejich rozpustnosti, přičemž obě kapaliny musí

být pro správnou separaci nemísitelné. Tento kapalinové mobilní i stacionární fáze je poměrně nestabilní a proto je důležité správné fixace kapalinové stacionární fáze na pevném podkladu. V normální fázi LLC je stacionární fáze nepolární a tím pádem mobilní fáze je polární. Normální fáze se využívá pro oddělení polárnějších ve vodě rozpustných látek. (Snyder and Kirkland, 1979)

Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)

U metody kapalinové adsorpční chromatografie (LSC, *Liquid-solid chromatography*) je využívána interakce mezi složkami vzorku a tuhou fází – adsorbentem. Na začátek kolony naplněné adsorbentem se nanese vzorek, v něm se poté jednotlivé složky pohybují ve směru eluentu a vážou se na adsorbent. Čím rychleji se pohybují, tím méně jsou adsorbovány. Různé složky se pohybují v koloně odlišnou rychlostí, která závisí na jejich adsorpční a distribuční konstantě. Předpokládá se, že malé kulovité částice adsorbentu jsou na počátku ve styku pouze s mobilní fází – eluentem. Ten se uchytí na celém povrchu adsorbentu, kde je držen silou odpovídající jeho adsorbční energii. Poté se v mobilní fázi objeví analyt. Pokud je jeho adsorpční energie větší než adsorbční energie eluentu, vytěsní molekuly eluentu a stejným počtem molekul, které vytěsnil, obsadí dané místo na adsorbentu. Z toho vyplývá, že pokud by adsorpční energie analytu byla menší než u eluentu, projde vzorek kolonou bez zachycení. (Kříženecká, 2007).

Iontově výměnná chromatografie (IEX)

Iontově výměnná chromatografie (IEX, *Ion-exchange chromatography*) slouží k separaci biopolymerů, například proteinů, polypeptidů, nukleových kyselin, nabitých karbohydrátů a polysacharidů, které se od sebe liší svým nábojem. IEX může být v mnoha případech vysoce selektivní metodou, která dokáže od sebe odlišit skupiny proteinů jenom podle jedné odlišně nabité skupiny ve struktuře. Princip této metody spočívá v navázání jednotlivých skupin s určitým nábojem na iontoměnič stacionární fáze, které mají opačný náboj. Molekuly jsou zachycené a eluované pomocí pufru s vyšší iontovou silou. Biomolekuly, které nejsou iontově nabité nebo molekuly se stejným nábojem jako částice stacionární fáze jsou vyloučeny. Kromě elektrostatických interakcí se mohou pro navázání látek v menší míře uplatňovat také difůze iontoměniči, adsorpční síly, případně i hydrofobní interakce (Aguilar, 2004; Šťulík *et al.*, 2005).

Mezi výhody IEX patří například: Vyšší separační síla, rychlejší separace složek a více získaného materiálu. Nedochází k denaturaci složek pufru, a proto je možné jich nadále využít při dalších chromatografických analýzách. Lze používat zakoncentrované roztoky se vzorkem a následně provádět snadnější izolaci proteinů než z původního zředěného roztoku. Nevýhody této metody naopak mohou být následující: Vzorek musí splňovat podmínky nižší iontové síly a příslušné hodnoty pH, což může vyžadovat změnu pufrů. Je nutné využívat instrumentaci odolnou ke korozi způsobenou vyšší koncentrací solí. Příliš zasolený roztok, bez předchozího odsolení, může znesnadňovat zachytávání proteinů a tím pádem snižuje účinnost separace jednotlivých proteinových frakcí a zkresluje výsledky analýzy. IEX může mít široké využité od analytické separace látek v laboratořích až po separace látek v průmyslovém sektoru (Aguilar, 2004).

Stacionární fázi tvoří nejčastěji organické polymery či materiály na bázi silikagelu. Matrice látek tvořící stacionární fází jsou přitom modifikovány iontovýměnnými skupinami. Iontové měniče (ionexy) se dělí podle svého náboje na kationtové (katexy) nebo aniontové (anexy). Aniontový měnič obsahuje pozitivně nabité skupiny, například tetraalkylamoniovoun nebo aminoskupinu, které na sebe navazují negativně nabité nabité ionty – anionty. Oproti tomu kationtový měnič má negativně nabité imobilizované skupiny, například karboxylovou nebo sulfoskupinu, na které se navazují pozitivně nabité ionty – kationty. Síla vazby závisí na velikosti rozdílu v nábojích mezi ionexem a danou látkou. Při separaci proteinů hraje velkou roli hodnota pH. Náboj proteinu závisí na pH a jeho isoelektrickém bodu. Pokud jsou hodnoty pH a isoelektrického bodu stejné, celkový náboj je nulový. (Šťulík *et al.*, 2005; Monincová, 2006)

Gelová permeační chromatografie (GPC)

Pomocí metody gelové permeační chromatografie (GPC, *Gel permeation chromatography*) lze separovat jednotlivé složky podle jejich molekulární hmotnosti a velikosti. Prostřednictvím GPC je možné separovat jakékoli molekuly lišící se svými rozměry, ať už se jedná o vysokomolekulární nebo nízkomolekulární látky. Stacionární fázi při této metodě tvoří gelové partikule. Malé molekuly se zachycují na stacionární fázi a pronikají do pórů gelové stacionární fáze. Molekuly ve zředěném roztoku prochází kolonou, přičemž velké molekuly nemohou projít póry a tím pádem dochází k jejich rychlejší eluci. Z toho vyvozujeme, že se vzrůstající molekulovou hmotností klesá difuze a zachycování molekul.

Velké molekuly opouští kolonu nejdříve a postupně dochází k eluci menších molekul s menší molární hmotností (Churáček, 1990).

Využití této metody můžeme rozdělit do dvou kategorií. Do první kategorie patří frakcionace a do druhé kategorie skupinová separace. Při frakcionaci jsou látky rozdělovány podle malých rozdílů ve velikosti, zejména pro účely purifikace. Oproti tomu při skupinové separaci jsou látky rozdělovány do dvou velkých skupin, přičemž první skupinu tvoří všechny látky s malou molekulovou hmotností a druhou skupinu všechny látky s velkou molekulovou hmotností. Hlavní výhodou GPC je, že lze s její pomocí separovat molekuly ve velmi malém i velkém množství v nativní nedenaturující podobě. Naopak nevýhodami této metody je poměrně malá rozlišovací schopnost, nemožnost analyzovat více než jeden vzorek v jednom okamžiku a snížení koncentrace separovaných látek po analýze. (Aguilar, 2004).

Afinitní chromatografie (AC)

Afinitní chromatografie (AC, *Affinity chromatography*) je metoda, při níž se k izolaci látek ze směsi využívá jejich rozdílné funkce (aktivity, afinity). Jedná se o separační metodu, která je založená na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami dvou látek, například mezi enzymem a substrátem, receptorem a ligandem nebo protilátkou a antigenem (Kamlar *et al.*, 2010; Urh *et al.*, 2009).

Stacionární fáze je tvořena nosičem s navázaným ligandem, kterým je naplněna kolona. Na této matrici jsou zadrženy v zásadě takové biomolekuly, které mají dostatečnou afinitu k ligandu a ostatní sloupcem projdou. Jako nosiče se nejčastěji využívají materiály jako je například agarosa, sepharosa, organické polymery nebo nosiče na bázi silikagelu. Ligandy navázané na nosiči bývají nejčastěji různé substráty, proteasy, nukleové kyseliny, nukleotidy, enzymy a kofaktory, antibiotika, hormony a analogy všech těchto látek. (Šťulík *et al.*, 2005; Afinitní chromatografie, 1979; Lowe, 1979).

Při tomto typu chromatografie je důležité, aby použité experimentální podmínky byly obdobné podmínkám, za jakých dochází k interakci mezi ligandem a biomolekulou ve volném roztoku. Pro adsorpci cílených makromolekul je tedy nutné, aby v místě připojení ligandu na matrici vzniknul účinný afinitní adsorbent. Připojení ligandu v jiném místě vede k tomu, že adsorbent bude pouze částečně aktivní nebo zcela neúčinný. Dalšími důležitými faktory, které mohou ovlivnit interakci je zejména vzdálenost ligandu od struktury nosiče, ohebnost skupiny umístěné mezi ligandem a matricí a účinky imobilizace na stereochemii ligandu. Po odstranění neadsorbovaných látek lze specificky vázanou látku vymýt například volným

ligandem. Díky výše zmíněným vlastnostem a principům afinitní chromatografie, lze využít této metody kromě separace také při zkoumání složitých biologických interakcí – kinetické sekvence a mechanismy, k purifikaci proteinů, koncentraci zředěných roztoků a proteinů nebo skladování nestabilních proteinů v imobilizované formě. (Lowe, 1979).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle této diplomové práce byly podle zadání rozděleny do čtyř okruhů:

1) Výběr odrůd, příprava hlízové šťávy a zjištění obsahu sušiny
2) Provedení chromatografické purifikace na koloně: a) aniontové (pro odstranění bazických proteinů) a následně b) afinitní (pro odstranění frakce patatinových proteinů)
3) Separace proteinové frakce „nezachycené“ na afinitní chromatografii na FPLC systému na principu iontově výměnné chromatografie s využitím gradientové eluce
4) Analýza chromatograficky separovaných frakcí na gelové elektroforese (SDS-PAGE), hmotnostní spektrometrii a následný popis získaných frakcí

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Příprava materiálu pro chromatografickou separaci

4.1.1 Příprava vzorků pro stanovení obsahu sušiny a získání šťávy

Jako materiál pro tuto diplomovou práci byly vybrány hlízy dvou odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.). Zvoleny byly odrůdy Adéla, která patří mezi konzumní odrůdy a průmyslová odrůda Westamyl, která se používá pro zpracování na škrob. Hlízy, uskladněné v krechtu byly pečlivě omyty a zbaveny nečistot. Po omytí a usušení byly naváženy vybrané hlízy obou odrůd. Hlízy byly zváženy a poté byly vybrány od každé odrůdy 3 hlízy, jejichž část byla nakrájena na plátky a vložena do dóz, ve kterých byl obsah lyofilizován pro následné zjištění obsahu sušiny. Následně byla zvážena hmotnost plátků ve všech dózách. Po zvážení byly plátky v dózách lyofilizovány. Poté byla pomocí odšťavňovače získána šťáva z brambor obou hlíz. Šťáva byla přelita do chlazených kádin, poté do kyvet a následně centrifugována po dobu 30 min při 4500 rpm. Po centrifugaci byla šťáva obou odrůd přelita do plastové lahve a zmražena pro uchování.

4.1.2 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny v hlízách daných odrůd byl stanoven gravimetricky. Vzorky byly zváženy za čerstvého stavu a poté po lyofilizaci, což umožnilo stanovení obsahu sušiny ve vzorcích.

4.1.3 Zakoncentrování hlízové šťávy

Po rozmražení bramborové šťávy bylo odlito od každé odrůdy celkem 80 ml do tří centrifugačních tub Fischer o objemech 50 ml, tedy přibližně 27 ml do každé z nich. Do dvou mikrocentrifugačních zkumavek bylo napipetováno 400 µl šťávy od obou odrůd pro kontrolu na elektroforézu. Mikrocentrifugační kyvety se šťávou byly následně centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 10 min při 4 ºC. Po centrifugaci byl supernatant z mikrocentrifugačních kyvet u obou odrůd přenesen do jedné kádinky a u obou vzorků bylo upraveno pH na 7,4 pomocí Tris-HCl. Po úpravě pH bylo připraveno pro každý vzorek celkem 6 centrifugačních koncetrátorů Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit Ultracel-3 membrane (Milipore,

Německo). Následně byly zkumavky centrifugovány po dobu 60 min při 4500 rpm. Po centrifugaci byl obsah všech zkumavek přenesen do jedné společné pro každou odrůdu a následně byl zmražen.

4.2 Chromatografická purifikace

4.2.1 Purifikace pomocí kolony DEAE 52-Cellulose

Pro první krok chromatografie byl jako substrát v rámci iontově výměnné chromatografie zvolen aniontový měnič DEAE 52-Cellulose SERVACEL (SERVA). V rámci této práce byl využit tento měnič k odstranění bazických proteinů z hlízové šťávy, jejichž přítomnost by byla v dalších krocích nežádoucí.

Po rozmrazení zakokoncentrované hlízové šťávy byla centrifugována po dobu 20 min při 9000 rpm. Mezitím byly kolony prokapávány 50 ml startovacího pufru (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4; složení všech pufrů je uvedeno v příloze) při 6 C v lednici dokud nebylo pH výtoku 7,4 z důvodu neutralizace NaOH složky navázané na koloně. Po dosažení žádaného pH byla naneseny na kolony vzorky. Pro každou odrůdu bylo vybráno 5 vzorků po 3 ml a nechaly prokapávat kolonu do připravených dóz s označením **frakce „B“**. Poté bylo na kolony naneseno 15 ml každého vzorku, které byly zachytávány do dóz frakce B. Následně byly kolony promyty 4x 15 ml (celkem 60 ml) startovacího pufru pro vymytí navázaných složek. Poté bylo na kolony naneseno 2x 15 ml elučního pufru pro isokratickou eluci navázaných složek. Eluát byl zachytáván do dóz s označením **frakce „C“**. Taktéž bylo odebráno 200 ul pro kontrolu na elektroforézu. Vzorek frakce „C“ byl později nanášen na kolonu s náplní Con A. Nakonec byla provedena regenerace kolony 2x 15 ml 2M NaOH a I. ekvilibrace kolony pomocí 100 ml startovacího pufru pro opětovné obnovení pH výtoku pod kolonami na hodnotu 7,4.

4.2.2 Purifikace pomocí kolony Con A Sepharose 4B

Con A Sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences) představuje substrát, jehož hlavní složkou je protein ze skupiny lektinů konkanavalin A. Tento substrát se využívá při afinitní chromatografii, kdy vytváří účinný adsorbent stacionární fáze. V této práci byl využit tento adsorbent zejména k zachycení a odstranění patatinových proteinových frakcí. Nejprve byla

provedena I. ekvilibrace kolony a kontrola pH pomocí 25 ml startovacího pufru. Poté II. ekvilibrace pomocí 35 ml startovacího pufru. Po ekvilibraci bylo naneseno na kolonu 15 ml vzorku s upraveným pH. Při nanesení vzorku byly nejprve uzavřeny kohouty kolony na 10 minut a medium se vzorkem bylo řádně promícháno skleněnou tyčinkou. Poté byly frakce sbírány do dóz s označením **frakce „D“**. Následně proběhlo I. promývání kolony a vymytí nenavázaných složek pomocí 25 ml startovacího pufru. Prvních 15 ml se ještě zachytávalo do dóz a bylo z nich odebráno 200 μl pro kontrolu na elektroforézu. Pro II. promývání bylo použito 25 ml startovacího pufru, který se nechal volně protéct. Po promývání bylo použito 3x 10 ml elučního pufru a následně 25 ml startovacího pufru. Při 1. aplikaci objemu elučního pufru byl zavřen kohout kolony na 10 minut a medium bylo promícháno se vzorkem pomocí skleněné tyčinky. Poté byly frakce sbírány do dóz s označením **„frakce E“**. Po sběru do dóz bylo přistoupeno k regeneraci kolony. Regenerace proběhla pomocí 20 ml bazického pufru a 20 ml kyselého pufru, které se nechaly volně protéct. Promytí bazickým a kyselým pufrem bylo provedeno celkem třikrát (I., II. a III. regenerace).

4.2.3 Zakoncentrování frakce Con A D

Nejprve bylo přeneseno do 5 mikrocentrifugačních kyvet 12 ml Con A D frakce, které byly zcentrifugovány po dobu 60 min při 4500 rpm. Poté byl přenesen obsah do 10 centrifugačních koncentrátorů. Po centrifugaci byly vyndány filtry, ze kterých bylo přeneseno pomocí injekční stříkačky 1,5 ml zakoncentrovaného vzorku Con A D u každého opakování pro chromatografickou analýzu. Pufry pro zakoncentrování a následnou chromatografii měly stejné složení jako DEAE startovací a eluční pufry.

4.2.4 Odsolení proteinových frakcí

Před vlastní chromatografickou separací proteinových frakcí bylo nejdříve nutné provést odsolení zakoncentrované frakce „D“ na systému FPLC. Odsolení bylo nutno provést z důvodu zvýšeného zasolení po předchozí purifikaci a promývání pufry, které obsahují NaCl. K odsolení byly vybrány vzorky Adéla 2, Adéla 3, Adéla 3, Westamyl 4 a Westamyl 5. Odsolení bylo prováděno pomocí kolony Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 cartridge naplněnou substrátem Bio-Gel P-6 (GE Healthcare Life Sciences, Bio-Rad, USA) v rámci gelové permeační chromatografie pomocí protokolu uvedeného níže.

Tab. 4: Protokol odsolování pomocí kolony Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 cartridge naplněnou substrátem Bio-Gel P-6 na systému FPLC

Fáze	**Objem v dané fázi**	**Popis průběhu dané fáze**	**Prováděcí komponenty**	**Objemy pufru a průtoky**
1.	0 ml	Vynulování základní čáry	QuadTec	
2.	0 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 4.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
3.	4 ml	Vynulování základní čáry	QuadTec	
4.	4 ml	Vložení vzorku	Vzorek	Objem: 4.0 ml
			Statická smyčka	Průtok: 4.0 ml/min
5.	5 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 16.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
6.	21 ml	Konec protokolu		

4.2.5 Chromatografie na systému FPLC pomocí kolony UNO Q6

Při tomto kroku chromatografie byla použita aniontová kolona UNO Q6 (GE Healthcare Life Sciences, Bio-Rad, USA). Tato kolona v rámci iontově výměnné chromatografie obsahuje silně pozitivně nabité aminoskupiny a používá se zejména k separaci peptidů, proteinů a polynukleotidů. Pro tuto separaci byly vybrány vzorky Adéla 2 a Westamyl 4 (dále jen „Adéla“ a „Westamyl“), které byly ještě před samotnou separací zakoncentrovány. Jednotlivé kroky separace na systému FPLC jsou uvedeny v následujícím protokolu.

Tab. 5: Protokol k chromatografické separaci na systému FPLC pomocí aniontové kolony UNO Q6

Fáze	Objem v dané fázi	Popis průběhu dané fáze	Prováděcí komponenty	Objemy pufru a průtoky
1.	0 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 4.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
2.	4 ml	Vynulování základní čáry	QuadTec	
3.	4 ml	Vložení vzorku	Vzorek	Objem: 1.0 ml
			Statická smyčka	Průtok: 4.0 ml/min
4.	5 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 6.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
5.	11 ml	Gradientová eluce	A: Pufr A1	Objem: 60.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
6.	71 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 8.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
7.	79 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 36.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
8.	115 ml	Konec protokolu		

Frakce byly sbírány při obou separacích do 20 dóz při objemu 4 ml. Podle analýzy výsledných chromatogramů byly k dalšímu kroku chromatografické separace vybrány následující frakce: Adéla fr. 7-9, Adéla fr. 10, Adéla fr. 11-15, Westamyl fr. 7-8, Westamyl fr. 9-12 a Westamyl fr. 13-15.

4.2.6 Chromatografie na systému FPLC pomocí kolony CHT5-I

Hlavní složku kolony CHT5-I (GE Healthcare Life Sciences, Bio-Rad, USA) představuje biokeramický minerál hydroxyapatit, který lze možno díky svým vlastnostem využít k separaci látek při smíšené iontově výměnné chromatografie, protože je díky svému složení schopen vázat kationty i anionty. Zároveň je hydroxyapatit díky svým hydrofobním interakcím využíván v režimu afinitní chromatografie.

K separaci na této koloně byly vybrány výše uvedené frakce. Před samotnou separací byly ještě frakce promyty 50 mM Na-fosfátovým pufrem o pH 6,8.

Tab. 6: Protokol k chromatografické separaci na systému FPLC pomocí hydroxyapatitové kolony CHT5-I

Fáze	**Objem v dané fázi**	**Popis průběhu dané fáze**	**Prováděcí komponenty**	**Objemy pufru a průtoky**
1.	0 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 4.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
2.	4 ml	Vynulování základní čáry	QuadTec	
3.	4 ml	Vložení vzorku	Vzorek	Objem: 1.0 ml
			Statická smyčka	Průtok: 4.0 ml/min
4.	5 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 16.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
5.	21 ml	Gradientová eluce	A: Pufr A1	Objem: 50.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
6.	71 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 25.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
7.	96 ml	Isokratická eluce	A: Pufr A1	Objem: 25.0 ml
			B: Pufr B1	Průtok: 4.0 ml/min
8.	121 ml	Konec protokolu		

4.3 SDS-PAGE elektroforéza

Pro zjištění zastoupení proteinových spekter po Con A purifikaci a chromatografické separaci na systému FPLC byla využita elektroforetická analýza na SDS-PAGE na vertikální elektroforéze (model SE 600, Hoeffer). Vzorky byly separované na 10% gelu – neředěné. 40 μl vzorku se promíchalo s 10 μl nanášecího pufru (*loading buffer*), přičemž samotná nanáška činila 40 μl. U vzorků z FPLC představovala nanáška 50 μl. Nanášeny byly také hmotnostní markery SigmaMarker, 6,5-200 kDa (při elektroforéze po Con A purifikaci) a ColorBurst Electrophoresis marker, 8-220 kDa (při elektroforéze po separaci na koloně UNO Q6). Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 4 hodin ve vanovém pufru. Poté byl gel

umístěn přes noc na třepačku pro obarvení do pufru s obsahem Coomassie Blue barviva a poté byl na 4 hodiny vložen do odbarvovacího roztoku. Následně byl gel ponechán přes noc ve vodě a následně 2 hodiny ve fixačním roztoku. Složení samotného elektroforetického gelu je uvedeno v následující tabulce a složení jednotlivých pufrů a komponentů pro barvení, odbarvení a fixaci je uvedeno v příloze.

Tab. 7: Složení separačního gelu pro SDS-PAGE (10x)

Komponenty	H_2O	AC/BIS	Pufr A	SDS	Siřičitan sodný	Persíran amonný	TEMED
Množství	42 ml	26,6 ml	10 ml	800 µl	60 µl	400 µl	40 µl

AC/BIS – akrylamid, SDS – dodeacylsíran sodný, TEMED - tetramelthylethylendiamin

Složení jednotlivých pufrů a komponentů pro barvení, odbarvení a fixaci je uvedeno v příloze.

4.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie byla provedena v rámci spolupráce s pracovištěm Ceitec, Přírodovědecké fakulty Masarykovi univerzity v Brně v Centrální laboratoři Proteomika pod vedením doc. RNDr. Zbyňka Zdráhala, Dr. Nejprve byly vyříznuté jednotlivé pruhy z gelu, následně bylo provedeno štěpení daných frakcí enzymem trypsinem přímo ve vyříznutém gelu a získané peptidy se analyzovaly pomocí LC-MS/MS techniky, která kombinuje kapalinovou chromatografii a tandemovou hmotnostní spektrometrii. Pomocí této komplexní metody došlo určení aminokyselinových sekvencí daných proteinů v rámci vybraných frakcí. Frakce byly nejdříve separovány na kapalinové chromatografii a následně analyzovány na tandemové hmotnostní spektrometrii. V rámci tandemové spektrometrie bylo využito dvou analyzátorů. U prvního analyzátoru byly rozlišeny prekurzorové ionty, které následně byly fragmentovány v kolizní cele a vzniklé produktové ionty byly rozlišeny v druhém analyzátoru.

5. VÝSLEDKY

5.1 Hmotnost hlíz a obsah sušiny

Hmotnost vybraných hlíz odrůdy Adéla tvořila 5,766 kg a hmotnost hlíz odrůdy Westamyl byla 7,115 kg. Pro měření obsahu sušiny byly od každé odrůdy vybrány 3 vzorky, které se skládaly ze 3 vybraných hlíz obou odrůd. Výsledné obsahy sušiny jsou uvedeneny v následující tabulce.

Tab. 8: Hmotnost a obsah sušiny jednotlivých vzorků

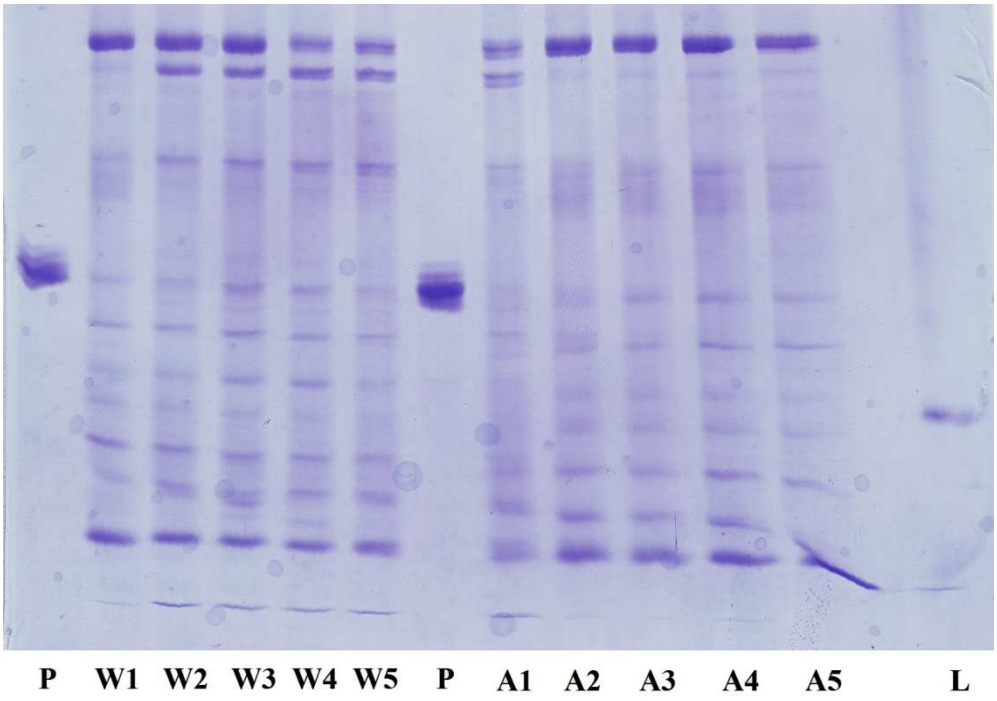
Vzorek/opakování	Hmotnost čerstvého vzorku	Hmotnost vzorku po lyofilizaci	Obsah sušiny	Průměrný obsah sušiny
Westamyl 1	11,11 g	3,14 g	28,26 %	27,61 %
Westamyl 2	12,91 g	3,61 g	27,96 %	
Westamyl 3	11,46 g	3,05 g	26, 61 %	
Adéla 1	30,19 g	6,45 g	21,36 %	18,54 %
Adéla 2	28,56 g	5,42 g	18,98 %	
Adéla 3	22,2 g	3,39 g	15,27 %	

Z uvedené tabulky jsou patrné poměrně výrazné rozdíly obsahu sušiny mezi oběma odrůdami. V rámci odrůdy jsou rozdíly u jednotlivých opakování způsobeny zejména velikostí hlíz.

5.2 Elektroforetické vyhodnocení proteinové skladby po chromatografických purifikacích

V prvním kroku purifikace pomocí kolony DEAE 52 - Cellulose Servacel bylo provedeno zachycení většiny bazických proteinů ve vzorku a následný výběr frakcí C bez obsahu většiny bazických proteinů. V druhém kroku purifikace pomocí Con A Sepharose došlo k odstranění většiny patatinových proteinů a byly získány frakce C, u nichž bylo pomocí SDS-PAGE elektroforézy vyhodnoceno zastoupení proteinových frakcí.

Obr. 1: Spektrum proteinových frakcí vyhodnocené pomocí SDS-PAGE elektroforézy po separaci na gravitační koloně Con A Sepharose



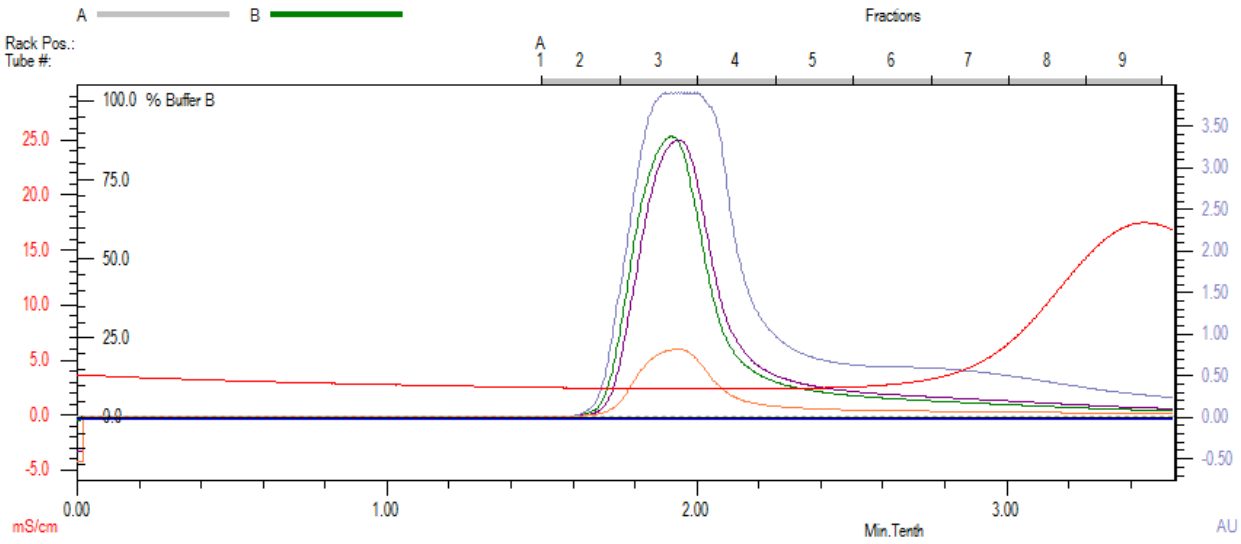
P – patatin, W – frakce odrůdy Westamyl, A – frakce odrůdy Adéla, L - hmotnostní marker

Z uvedené analýzy je patrné, že vzorky po purifikaci na kolonách DEAE 52 a Con A Sepharose obsahovaly poměrně zřetelně frakcionovaná spektra s velmi širokým rozsahem hodnot molekulové hmotnosti. V zobrazeném spektru se jednalo dle použitého hmotnostního markeru o hodnoty jednotlivých frakcí v rozsahu 6,5-200 kDa.

5.3 Odsolení proteinových frakcí

Odsolení vzorků vybraných v rámci „frakcí D“ pomocí výše uvedené kolony a její náplně na systému FPLC bylo účinné. V případě všech pěti vzorků (Adéla 2, Adéla 3, Adéla 3, Westamyl 4 a Westamyl 5) došlo k zachycení jedné společné frakce, což dokládá vytvoření jedné společné chromatografické vlny (píku). Odsolené frakce byly dále použity pro další kroky chromatografické separace. V následujícím obrázku je uveden průběh odsolení vzorku Adéla 2 formou chromatogramu. Chromatogramy ostatních vzorků jsou uvedeny v příloze.

Obr. 2: Znázornění průběhu odsolení vzorku Adéla 2 pomocí chromatografické kolony Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 cartridge naplněné substrátem Bio-Gel P-6 pomocí FPLC systému BioLogic DuoFlow



osa x – časová osa (čísla - minuty)

osa y_1 (červená b.) – konduktivita (mS/cm, miliSiemens/centimetr)

osa y_2 (modrá b.) – absorbance zachytávaných frakcí při 214 nm

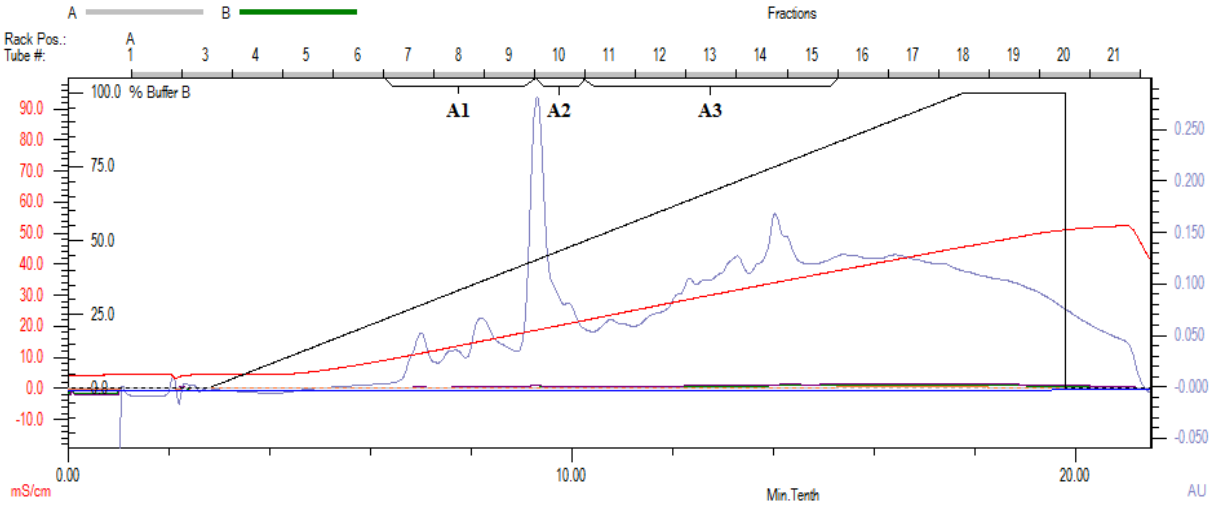
(AU, *Absorbance units* – jednotky absorbance)

5.4 Chromatografická separace na koloně UNO Q6

Pro separaci na koloně UNO Q6 v rámci iontově výměnné chromatografie byly vybrány v rámci frakcí D vzorky Adéla 2 a Westamyl 4. Tyto vzorky byly také poté analyzovány na SDS-PAGE elektroforéze.

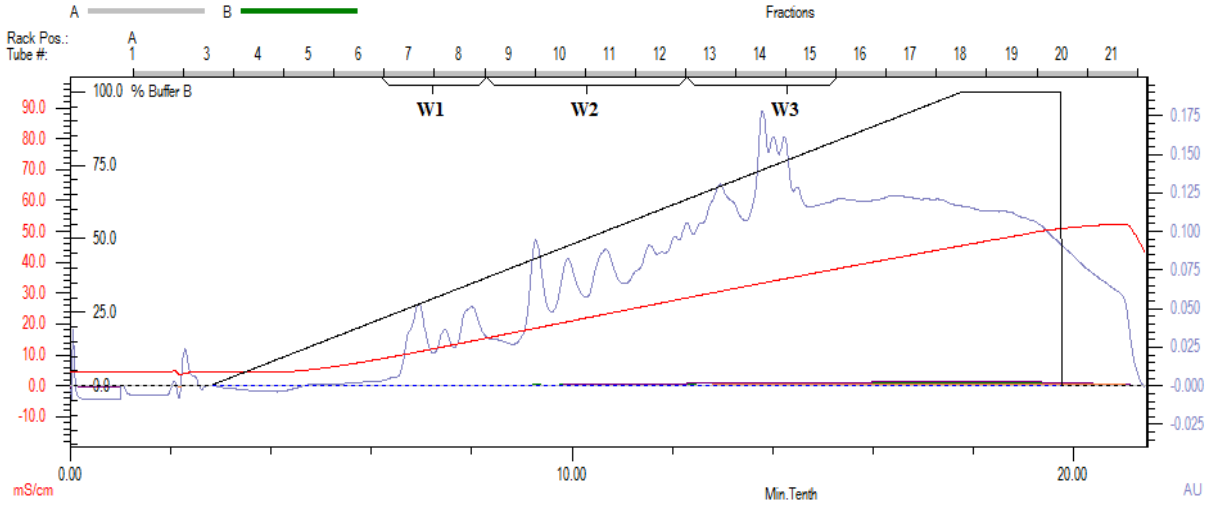
Ze vzorku Adéla 2 byly podle výsledného chromatogramu vybrány 3 frakce pro následující chromatografickou separaci na hydroxyapatitové koloně CHT5-I. U vzorku Adéla 2 se jednalo o frakce 7-9. frakce 10 a frakce 11-15. U vzorku Westamyl 4 byly vybrány také 3 frakce, přičemž to byly frakce 7-8, frakce 9-12 a frakce 13-15.

Obr. 3: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí u odrůdy Adéla



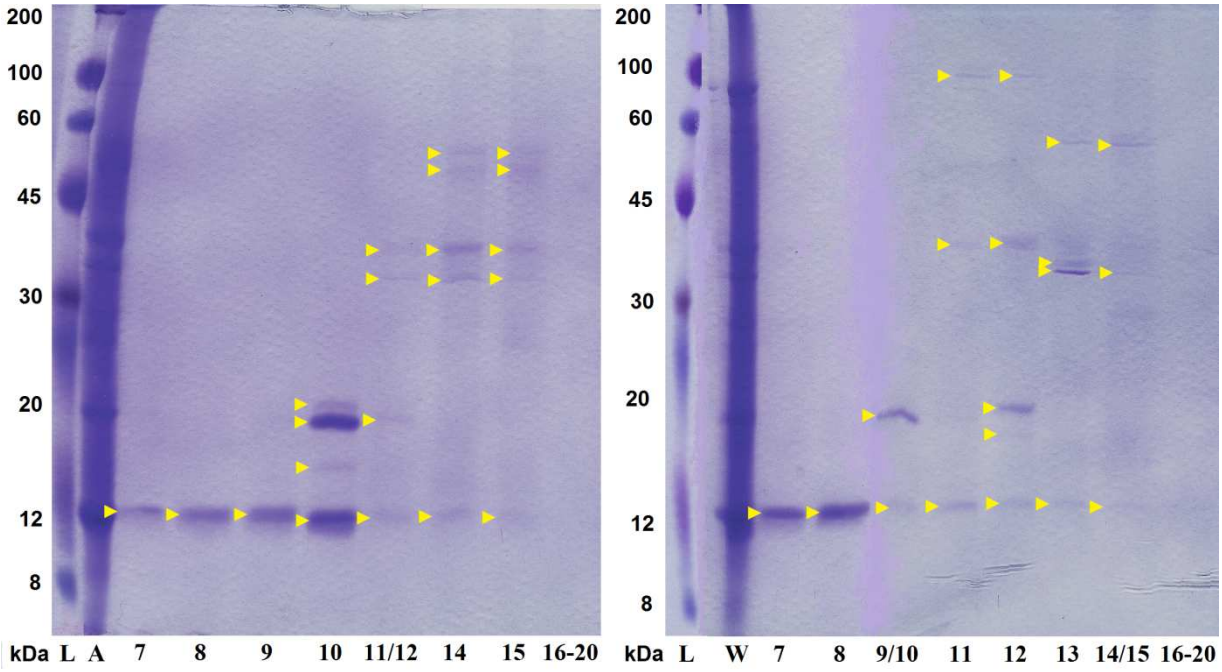
pozn. Popisky jednotlivých os u tohoto chromatogramu a u všech následujících chromatogramů jsou shodné s popisky os chromatogramu u Obr.2

Obr. 4: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí u odrůdy Westamyl



5.5 Elektroforetické vyhodnocení proteinové skladby po separaci na koloně UNO Q6

Obr. 5: SDS-PAGE analýza proteinových frakcí (nenavázaných na kolonu s náplní Con A) u vzorků Adéla (vlevo) a Westamyl (vpravo) separovaných na FPLC pomocí kolony UNO Q6



L – ladder - hmotnostní marker ColorBurst Electrophoresis marker, 8-220 kDa

A – Adéla – původní vzorek zakoncentrované hlízové šťávy před separací na kolonách DEAE 52 a Con A Sepharose

W - Westamyl- původní vzorek zakoncentrované hlízové šťávy před separací na kolonách DEAE 52 a Con A Sepharose

Podle výsledků elektroforézy lze vyvodit, že oba vzorky zahrnují v rámci výše uvedených společných frakcí stejné nebo podobné proteinové profily, což odpovídá výsledkům chromatografické analýzy. Přibližné molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů a proteinových frakcí jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tab. 9: Přibližné molekulové hmotnosti frakcí vzorku Adéla 2 získaných po SDS-PAGE elektroforéze

Číslo frakce	7	8	9	10	11/12	14	15
Molekulové hmotnosti [kDa]	15	15	**15**	**15**	15	**15**	15
				17	20	**35**	35
				20	35	**40**	40
				22	40	55	55
						60	60

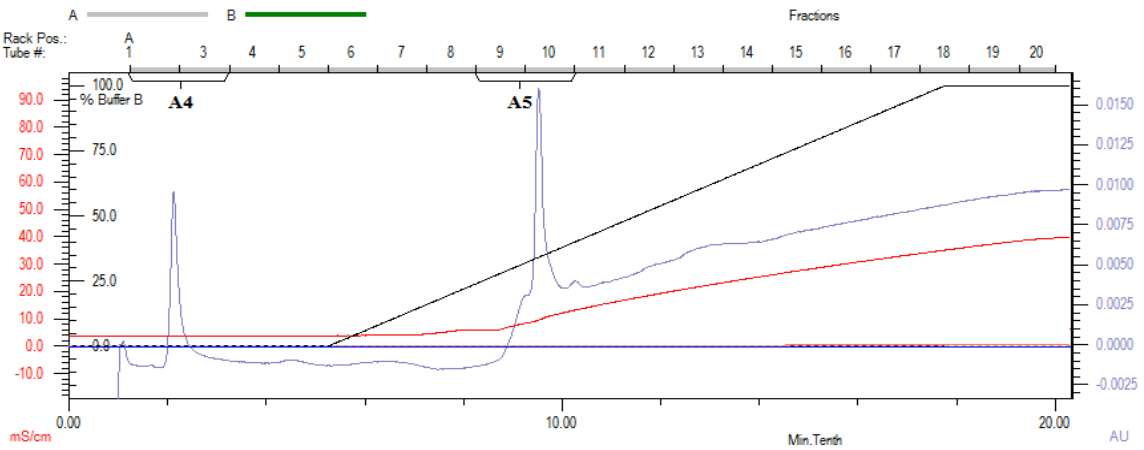
Tab. 10: Přibližné molekulové hmotnosti frakcí vzorku Westamyl 4 získaných po SDS-PAGE elektroforéze

Číslo frakce	7	8	9/10	11	12	13	14/15
Molekulové hmotnosti [kDa]	15	15	15	15	**15**	**15**	15
			20	40	**18**	**35**	35
				100	**20**	**36**	60
					40	**60**	
					100		

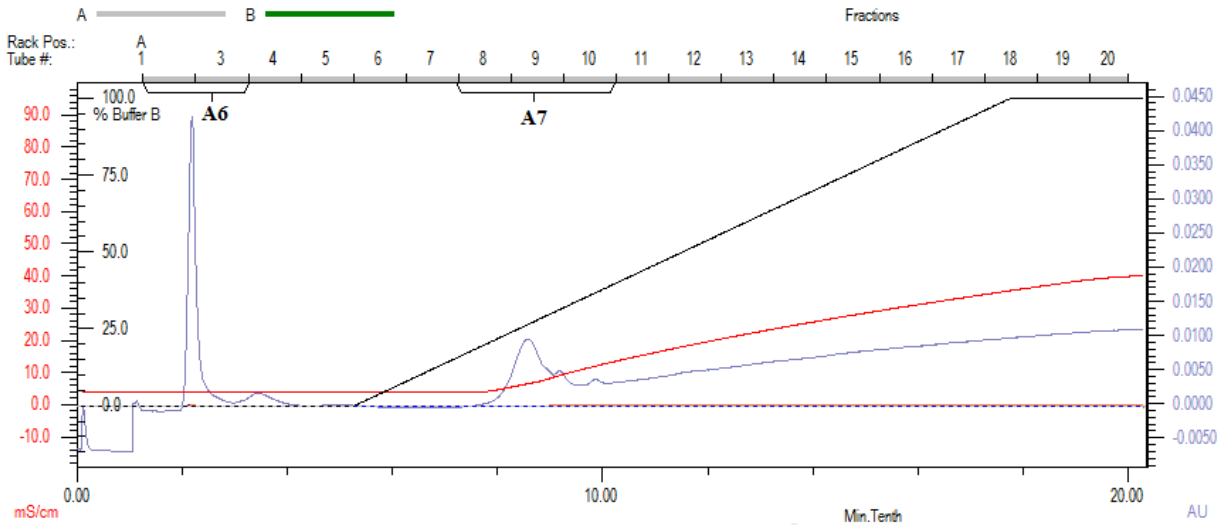
5.6 Chromatografická separace na koloně CHT5-I

Pro separaci na této koloně byly vybrané výše zmíněné soubory frakcí. Zachycené byly ve všech případech frakce 1-3 a frakce 9-10 což dokládá zvýšenou přítomnost určitých proteinových frakcí. Konkrétní chromatogramy všech provedených separací jsou uvedeny níže.

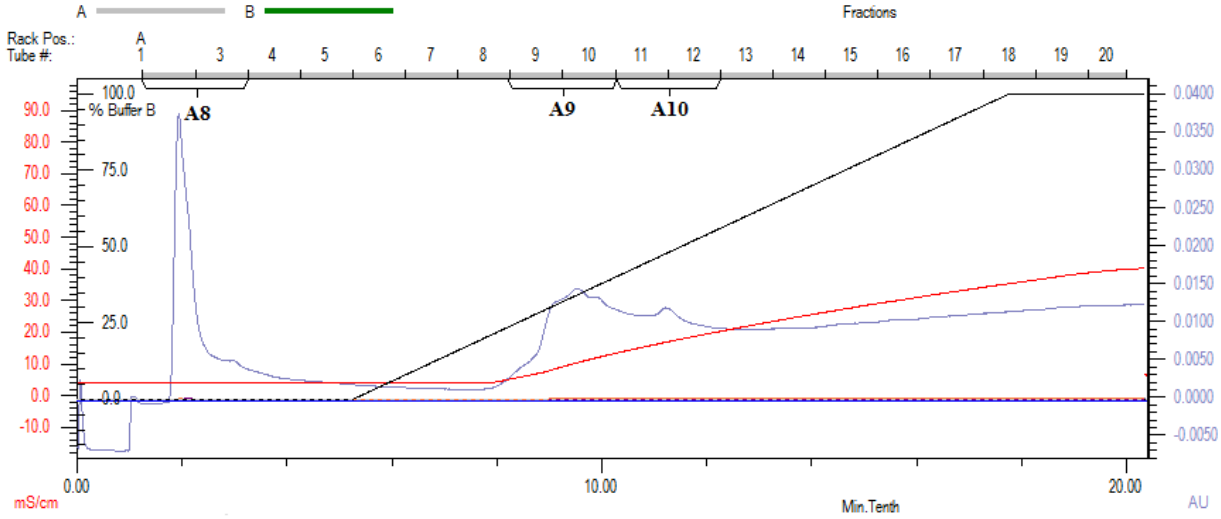
Obr. 5: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí vzorku Adéla 7-9



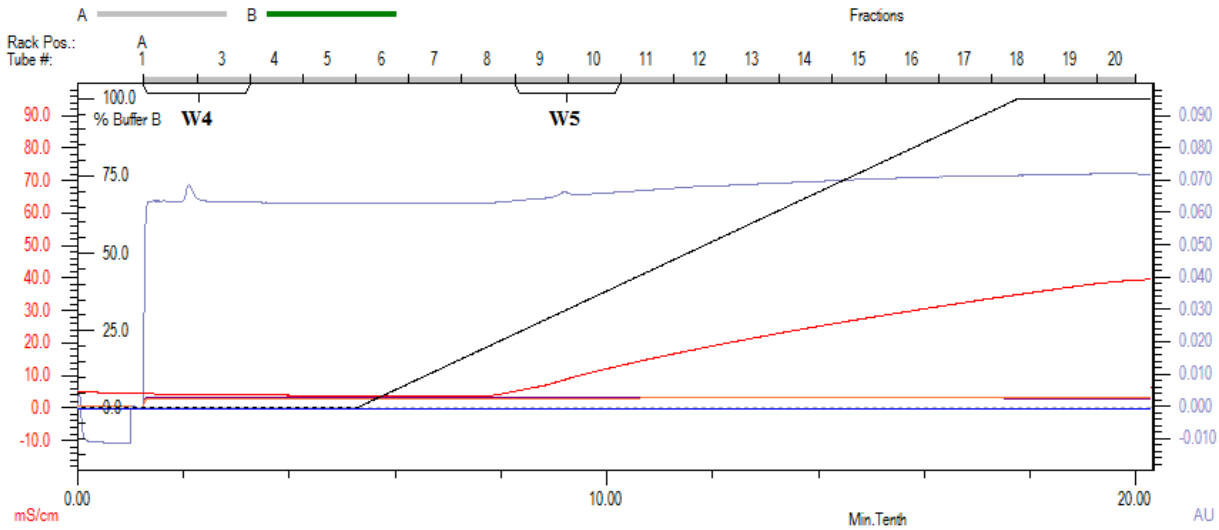
Obr. 6: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí vzorku Adéla 10



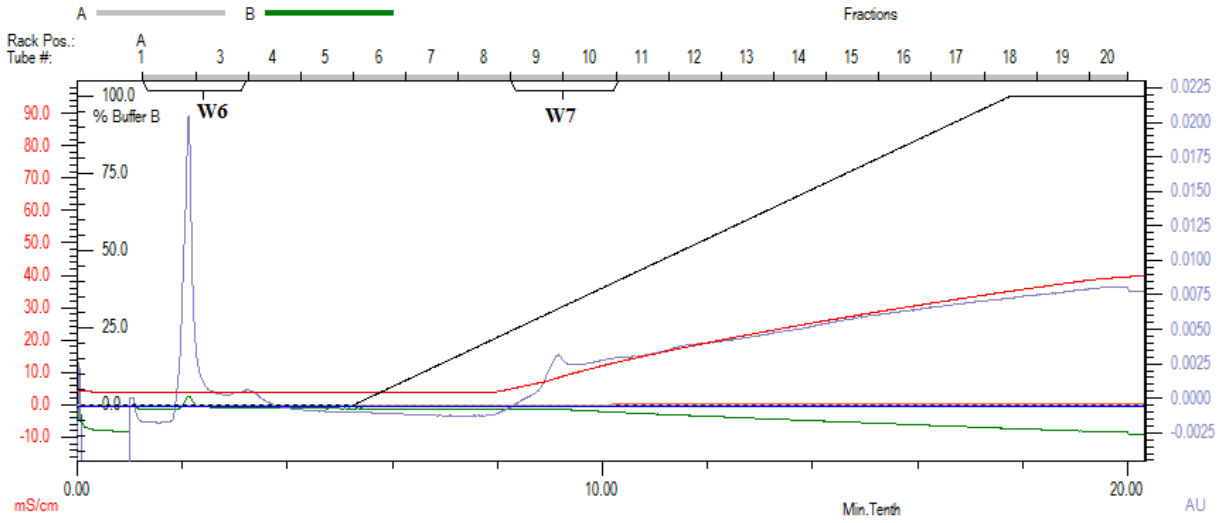
Obr. 7: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí vzorku Adéla 11-15



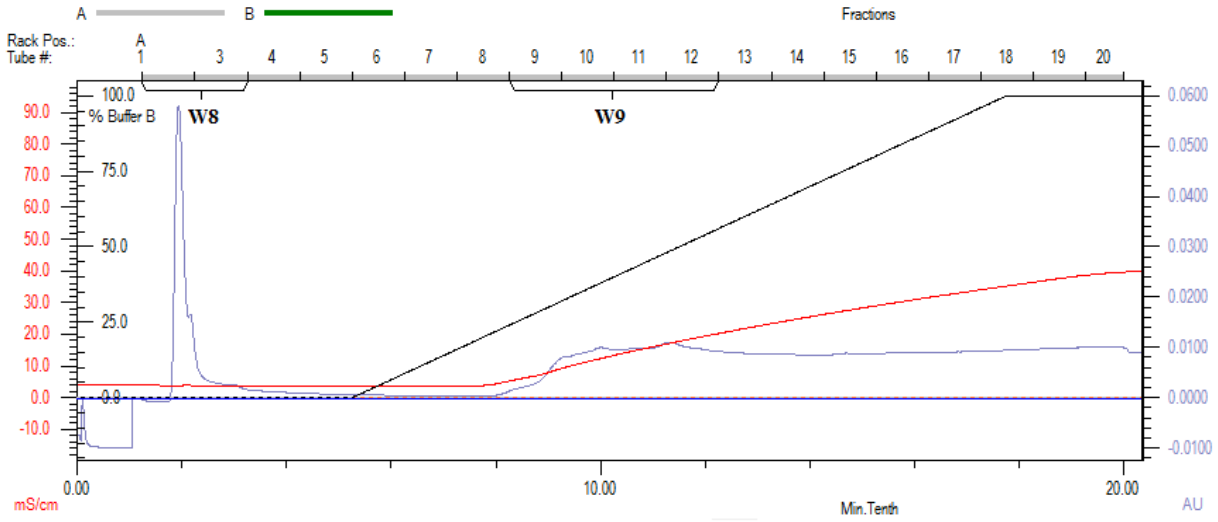
Obr. 8: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí vzorku Westamyl 7-8



Obr. 9: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí vzorku Westamyl 9-12



Obr. 10: Znázornění průběhu chromatografické separace frakcí vzorku Westamyl 13-15



5.7 Hmotnostní spektrometrie

Pomocí metody LC-MS/MS se podařilo změřit zastoupení a identifikovat jednotlivé proteiny v rámci vybraných frakcí. U většiny frakcí výrazně převažuje výskyt inhibitorů proteas, nejčastěji inhibitoru serinových proteas 2 (PSPI-21-5.2). Dalšími zastoupenými PI's jsou například ostatní inhibitory Kunitzova typu, PSPI a PCPI. Mezi proteiny, které nepatří mezi PI's jsou největší měrou zastoupeny annexiny, zejména annexin p34 a u některých frakcí také proteiny patatinového komplexu. Mezi zbývající proteiny patří zejména různé enzymy. Přehled zastoupených proteinů jednotlivých frakcí jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tab. 11: Vybrané frakce odrůdy Adéla analyzované na LC/MS-MS

Číslo frakce	Vybraný pruh frakce	Molekulová hmotnost pruhu [kDa]	Identifikované proteiny
9	1.	15	Inhibitor serinových proteas 2 + další inhibitory proteas
10	1.	22	Směs PI's – např. PSPI, PCPI, prekurzor inhibitoru Kunitzova typu,
	3.	17	Směs stop PI's – např. prekurzor inhibitoru Kunitzova typu, asparátový PI, cysteinový PI
	4.	15	Inhibitor serinových proteas 2 + stopa inhibitoru Kunitzova typu
11	3.	40	Převaha patatinu s minoritní přítomností ostatních proteinů
	4.	35	Směs proteinů - např. annexin p34, krystalová struktura PSPI, „malate dehydrogenase-like protein"
	5.	15	Inhibitor serinových proteas 2 + stopy ostatních inhibitorů proteas

Tab. 12: Vybrané frakce odrůdy Westamyl analyzované na LC/MS-MS

Číslo frakce	Vybraný pruh frakce	Molekulová hmotnost pruhu [kDa]	Identifikované proteiny
12	1.	40	Patatinové proteiny + ostatní proteiny, např. laktát dehydrogenasa
	2.	20	PI's – např. PSPI, aspartátový inhibitor proteas
	3.	18	Směs stop PI's – například PI Kunitzova typu, aspartátové inhibitory proteas, PSPI, PCPI
	4.	15	Inhibitor serinových proteas 2 + stopy dalších proteinů (hl. PSPI)
13	1.	60	Směs proteinů enzmů – např. Pspi, Rubisco, enolasa, fosfoglycerátmutasa
	2.	36	Annexin a patatin + směs proteinů
	3.	35	Směs proteinů se silnou převahou annexinu
	4.	15	inhibitor serinových proteas 2 + Směs dalších PI's a ostatních proteinů – např. PI's Kunitzova typu, β-kasein, superoxid dismutasa

6. Diskuse

6.1 Obsah sušiny

Průměrný obsah sušiny u odrůdy Adéla činil přibližně 18,5%. U odrůdy Westamyl byl zjištěný obsah sušiny přibližně 27,6 %. Zvýšený obsah sušiny u průmyslové odrůdy Westamyl oproti konzumní odrůdě Adéla je logicky způsobený zejména genotypem a typem odrůdy. U průmyslových odrůd pro zpracování na škrob je vyžadován především vysoký obsah škrobu, který je přímo úměrný obsahu sušiny. Podle Ese a Hartmanse (1987) je také důležitým faktorem ranost brambor, kdy dříve dozrávající odrůdy mají často nižší obsah sušiny než pozdní odrůdy (Es and Hartmans, 1987). Právě u odrůdy Westamyl, která patří mezi polopozdní odrůdy, byl zjištěný vyšší obsah sušiny než u odrůdy Adéla, která se řadí mezi rané odrůdy.

6.2 Chromatografické purifikace

Metody purifikací pomocí kolon DEAE 52 a Con A Sepharose vychází z původních metod izolace patatinu použitých Racusenem a Footem (Racusen and Foote, 1980). Pomocí, pro orientaci, provedené SDS-PAGE elektroforézy po daných purifikacích bylo vyhodnoceno zastoupení proteinových frakcí. Podle použitého hmotnostního markeru došlo k viditelné frakcionaci proteinů ve spektru 6,5-200 kDa. Podle srovnání intenzity a rozsahu elektroforetických pruhů u samostatné patatinové frakce a analyzovaných vzorků lze také konstatovat, že převážná část proteinů patatinového komplexu (40-43 kDa) byla ze vzorků odstraněna. Elektroforetické profily obou odrůd byly velmi podobné, z čehož lze usuzovat, že spektrum frakcí kyselých proteinů obou odrůd po provedených purifikacích na gravitačních kolonách se pravděpodobně od sebe významným způsobem neliší.

6.3 Chromatografická separace na koloně UNO Q6

Po provedené chromatografické separaci došlo u vzorků Adéla i Westamyl k výraznějšímu zachycení proteinů v rozpětí frakcí 7-15. Dle výsledného chromatogramu u vzorku Adéla došlo k vytvoření nejvýraznějšího píku na přelomu 9. a 10. frakce. Na

příslušném elektroforeogramu došlo u vzorků 9 a 10 k vytvoření velmi intenzivních pruhů proteinových frakcí o velikosti 15 a 20 kDa. Podle Pouvreau (2004) a podle provedené analýzy potvrzují frakce o velikosti 15 kDa převažující přítomnost inhibitorů serinových proteas, zejména inhibitoru serinových proteas 2 (PSPI-21-5.2), který patří do skupiny inhibitorů proteas I3 Kunitzova typu a je tvořený dvěma polypeptidovými řetězci o velikosti 16,5 a 4,5 kDa (Pouvreau, 2004; Bártová, 2012, UniProt). Tuto výraznou proteinovou frakci se u všech analyzovaných vzorků, například u frakcí A7, A8 a A9, podařilo potvrdit vytvoření píku při chromatografii na koloně UNO Q6. U frakce W13 a W14 došlo na příslušném chromatogramu k zachycení výraznějšího píku, kterému přísluší na SDS-PAGE výrazný pruh o velikosti 35 kDa. Tuto frakci zastupuje převážně protein annexin p34, který byl izolován v roce 1990 z rajčete a následně i v roce 1992 z brambor. Tento protein umožňuje vázat kyselé fosfolipidy a podílí se tak na celé řadě buněčných procesů (Smallwood *et al.*, 1990; Smallwood *et al.*, 1992).

U vzorku Westamyl také došlo k zachycení menších píků v celém rozsahu frakcí 7-15. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byly opět nejvýrazněji zachyceny frakce o velikosti 15 kDa odpovídající opět zejména inhibitoru serinových proteas 2 a u frakce 7 a 8 a 20 kDa pruhy u frakce 12, kterou zastupuje soubor několika inhibitorů proteas.

Z uvedených skutečností vyplývá, že pomocí gradientové eluce na systému FPLC, u které dochází ke změně složení mobilní fáze v průběhu separace, což umožňuje zvýšení eluční síly, bylo možné separovat a frakcionovat proteiny mnohem efektivněji než pouze v případě kapalinové chromatografie na gravitační koloně. Ke zvýšení účinnosti separace také přispěla použitá keramická matrice zvolených kolon. Díky vyššímu průtoku, který tyto kolony umožňují, bylo možné dosáhnout účinnější separace proteinových frakcí

6.4 Chromatografická separace na koloně CHT5-I

U všech vzorků došlo podle chromatogramů k vytvoření výrazných píků u frakce 1-2. U vzorku Adéla 7-9 byl stejně výrazný pík vytvořen u frakce 9-10, které pravděpodobně jako v předchozí separaci zachycují proteinové frakce o velikosti 15 a 20 kDa, což opět odpovídá nejspíše největší měrou inhibitorům proteas. U ostatních vzorků byly také frakce této oblasti zachyceny, akorát v menším rozsahu. Pomocí techniky založené na podobném principu - chromatografie hydrofobních interakcí (HIC) se podařilo Pouvreau (2004) izolovat proteiny o velikosti 22,7 kDa, což odpovídá bramborovému cysteinovému inhibitoru proteas (PCPI).

Pomocí hydroxyapatitové chromatografie bylo využito účinné kombinace iontově výměnné a afinitní chromatografie díky přítomnosti dvou vazebných míst tvořených pozitivně nabitým vápenatými ionty (afinita) a negativně nabitými fosfátovými skupinami (výměna iontů). Hydroxyapatit, tvořící v koloně zároveň matrici i ligand, má keramickou formu, díky čemuž poskytuje na rozdíl od krystalické formy vysokou pevnost a odolnost vůči chromatografickým procesům.

6.5 Hodnocení identifikovaných proteinů a jejich potencionální využití

Podle chromatografických analýz provedených Pouvreau (2004) se podařilo s přispěním chromatografických technik zjistit, že nejvíce zastoupenými skupinami v hlízách analyzované odrůdy Elkana jsou kromě patatinu inhibitory proteas, zejména bramborové inhibitory serinových proteas (PSPI) jejichž významnou součástí jsou také inhibiotory proteas Kunitzova typu, což potvrzují také výsledky této práce, kdy v rámci separovaných kyselých proteinových frakcí převažují s výjimkou patatinu právě serinové inhibitory proteas s největším zastoupením skupiny inhibitorů Kunitzova typu, zejména PSPI-21.

Inhibitor proteas 2 vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu, chymotrypsinu a elastase. Byla také prokázána jeho antifungální aktivita proti patogenu *Phytophthora infestans*. Ke kumulaci tohoto proteinu v bramborových hlízách dochází zejména při infekci patogenem *P. infestans*, což může z hlediska vysokého obsahu tohoto proteinu indikovat napadení zdrojových rostlin tímto patogenem. U PSPI-21 byl zjištěný průkazný inhibiční vliv na růst hyf a klíčení zoospor patogena *P. infestans* a také inhibiční účinky na růst mycelia klíčení konidií houby *Fusarium culmorum.* Protein PSPI-21 vykazuje svojí funkcí také podobnost se dvěma bramborovými inhibitory trypsinu – PKI-I a cathepsin D (Valueva *et al*., 1998).

Tato práce ukazuje, že díky účinným moderním postupům na systému FPLC je možné po předchozím odstranění bazických a patatinových proteinů získat relativně nenáročným způsobem široké spektrum kyselých proteinů, zejména ze skupiny inhibitorů proteas. Lze také porovnávat zastoupení těchto frakcí mezi jednotlivými odrůdami, případně jinými druhy rodu *Solanum* a jednotlivé proteinové frakce následně purifikovat a izolovat. Tyto inhibitory proteas by následně mohly být využity například v rostlinolékařství, kdy by po překonání problémů zmíněných v literárním přehledu bylo možné pomocí technik transgenoze exprimovat tyto proteiny v cílových rostlinách, které by se tak staly rezistentní vůči konkrétním patogenům.

7. ZÁVĚR

Podle výsledků získaných z řešení této diplomové práce lze vyvodit následující závěry:

1. Od každé odrůdy byly vybrány 3 vzorky pro měření relativního obsahu sušiny. U odrůdy Adéla činil průměrný relativní obsah sušiny přibližně 18,5 %, u odrůdy Westamyl 27,6 %. Rozdíl v relativním obsahu sušiny byl způsobený zejména genotypem, typem a raností obou odrůd.

2. Po chromatografické purifikaci na gravitačních kolonách DEAE 52 Cellulose a Con A Sepharose došlo podle výsledků SDS-PAGE elektroforézy k viditelné frakcionaci proteinů. Byly získány velmi podobné elektroforetické profily obou odrůd, z čehož lze usuzovat, že spektrum frakcí kyselých proteinů obou odrůd se pravděpodobně od sebe významným způsobem neliší. Došlo také k odstranění bazických proteinů a většiny proteinů patatinového komplexu.

3. Chromatografie na aniontové koloně UNO Q6 na systému FPLC zachytila u obou vzorků, podle vyhodnocení následně provedené SDS-PAGE elektroforézy, v největší míře frakce o velikosti 15 kDa odpovídající inhibitoru serinových proteas 2 a frakce o velikosti 20 kDa zastupující spektrum různých inhibitorů proteas. U frakce 13 vzorku Westamyl byla výrazně vizualizována frakce o velikosti přibližně 35 kDa jejíž hlavní součástí byl protein annexin p34. Dle výsledků SDS-PAGE lze také vyvodit, že jednotlivé frakce zahrnují v rámci uvedených společných frakcí, které byly vybrané pro následující chromatografickou separaci, stejné nebo podobné proteinové profily, což odpovídá výsledkům chromatografické analýzy.

4. Ze vzorku Adéla byly podle výsledného chromatogramu vybrány 3 frakce pro následující chromatografickou separaci na hydroxyapatitové koloně CHT5-I. U vzorku Adéla se jednalo o frakce 7-9. frakce 10 a frakce 11-15. U vzorku Westamyl byly vybrány také 3 frakce, přičemž to byly frakce 7-8, frakce 9-12 a frakce 13-15. Pomocí hydroxyapatitové kolony CHT5-I byly zachyceny ve všech případech frakce 1-3 a frakce 9-10, což dokládá zvýšenou přítomnost společných proteinových frakcí u všech

analyzovaných vzorků. Po chromatografii na CHT5-I byla taktéž provedena SDS-PAGE elektroforéza, ale její výsledky byly z důvodu příliš nízké koncentrace proteinových frakcí neprůkazné.

K dalším frakcionacím a popisu kyselých hlízových proteinů by při dostatečné koncentraci vzorků bylo možné přispět pomocí dalších chromatografických separací, například za využití gelové permeační nebo afinitní chromatografie, případně pomocí jiných chromatografických metod. Pro detailnější elektroforetickou separaci a proteomickou analýzu by kromě SDS-PAGE bylo možné využít i jiné elektroforetické metody, například čipovou nebo 2D elektroforézu.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Aguilar, M. I. (2004): HPLC of peptides and proteins: Mehods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc., ISBN 1-59259-742-4.

Bárta, J. a Čurn, V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum Tuberosum* L.) – Klasifikace, charakteristika, význam. Chemické listy 90: 373-378.

Bártová, V., Bárta, J., Kamenová, A., Staňková, A. a Čurn, V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Chemické listy 106: 365-372.

Bílková, K. a Králová, B. (1997): Izolace biomakromolekul. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.

Brůnová (2008): Proteinové inženýrství lektinů – cílená mutageneze patogenních lektinů. Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita.

Čtvrtníčková, L. (2009): Lektiny. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita.

De Mejía, E. G. and Prisecaru, V. I. (2005): Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45: 425-445.

Drbal, K. a Křížek, M. (1999): Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ISBN 80-7040-352-7.

Es, A. and Hartmans, K.J. (1987): Structure and chemical composition of the potato. In: Rastovski A., Es A. et al. (1987): Storage of Potatoes, Post Harvest Behaviour, Store Design, Storage Practice, Handling, Pudoc, Wageningen , 1. vyd. Wageningen: PUDOC. pp. 15–78, ISBN 9789022008973.

Habib, H. and Fazili K. M. (2007): Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. Biotechnology and Molecular Biology Review 2: 68-85

Hanusová, L. a Čurn, V. (2007): Inhibitory proteas v hlíze bramboru. Chemické listy 101: 536-541.

Hraška, M., Rakouský, S. a Čurn, V. (2006): Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozi rostlin. Chemické listy 100: 501-507.

Churáček, J. (1990): Analytická separace látek. Praha: Nakladatelství technické literatury, ISBN 80-03-00569-8.

Kamlar, M., Uhlík, O., Chlubnová, I., Kohout, L, Harmatha, J., Ježek, R., Šanda, M., Pišvejcová, A., Macek, T. (2010): Využití afinitní chromatografie pro studium působení vybraných oxysterolů u rostlin. 104: 215-222.

Káš, J., Kodíček, M. a Valentová, O. (2006): Laboratorní techniky biochemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, ISBN 80-7080-586-2.

Krofta, J., (ed.) (2001): Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, ISBN 8070804513.

Kříženecká, S. (2007): Základy analytické chemie. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem.

Lowe, C. R. (1979): Afinitní chromatografie. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.

Madadlou, A., O'Sullivan and Sheehan, D. (2011): Fast protein liquid chromatography. Methods in molecular biology 681: 439-447.

Pouvreau, L. (2004): Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber. Disseration. Wageningen: Wageningen University.

Richey, J. (1982): FPLC a comprehensive separation technique for biopolymers. American laboratory 14: 104-129

Rohrer, M., Břusková, H., Hanáček, P., Reinöhl, V. a Procházka, S. (2011): Induction of viral and insects resistance in pea through transgenesis. In: Mendelnet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students conference, 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011. pp. 698-705, ISBN 978-80-7375-563-8

Scott, R. P. W. (2012): Liquid chromatography, Chrom. Ed. Book Series, Book 3 [online, cit 19. 3. 2013]. Dostupné z: http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/LC_S.pdf

Scott, R. P. W. (2012): Principles and practice of chromatography, Chrom. Ed. Book Series, Book 1 [online, cit 19. 3. 2013]. Dostupné z: http://faculty.ksu.edu.sa/MFarouk/Mfarouk%20PDF%20Library/PRINCIPLES%20of%20Chromatography.pdf

Sheehan (2009): Physical biochemistry: Principles and applications, Second edition. London: John Willey & Sons Inc., ISBN 978-0-470-85602-4.

Smallwood, M. F., Gurr, S. J., McPherson, M. J., Roberts, K. and Bowles, D. J. (1992): The pattern of plant annexin gene expression. Biochemical Journal 281: 501-505.

Smallwood, M., Keen, J. N. and Bowles, D.J. (1990): Purification and partial sequence analysiss of plant annexins. Biochemical Journal 270: 157-161.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (1979): Introduction to modern liquid chromatography. New York: John Willey & Sons Inc., ISBN 0-471-03822-9.

Sobotníková, J., Bosáková, Z., Čabala, R., Coufal, P., Pacáková, V. a Šťulík K. (2010): Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Chemické listy 104: 1226-1231.

Šťulík, K., Bosáková, Z., Coufal, P., Jelínek, I., Pacáková, V. a Ševčík, J. (2005): Analytické separační metody. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, ISBN 80-246-0852-9.

Thygesen, P. W., Dry, I. B. and Robinson, S. P. (1995): Polyphenol oxidase in Potato. Plant Physiology 109: 525-531.

Urh, M., Simpson, D. and Zhao, K. (2009): Affinity chromatography: general methods. Methods in Enzymology 463: 417-438.

Valueva, T. A., Revina, T. A., Kladnitskaya, G. V. and Mosolov, V. V. (1998): Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora-infected potato tubers. FEBS Letters 426: 131-134.

Ostatní zdroje:

UniProt
URL: http://www.uniprot.org/contact (20.4. 2013)

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) - Protein
URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ (20.4. 2013)

.

9. PŘÍLOHY

9.1 Složení pufrů použitých při chromatografických technikách

Tab. 13: Složení pufrů pro dvoustupňovou chromatografickou proteinovou purifikaci pomocí Con A Sepharose 4B

komponenta	**Con A startovací**	**Con A eluční**
	25 mM Tris-HCl, ph 7.4 + 0.5 M NaCl [ml]	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl + 100 mM α-methyl-D-glukosid [ml]
1 M Tris-HCl	25	100
5 M NaCl	100	100
1 M α-methyl-D-glukosid	0	100
dH_2O	875	775
celkem	1000 ml	1000 ml

Tab. 14: Složení pufrů pro dvoustupňovou chromatografickou proteinovou purifikaci aniontovým měničem DEAE 52 Cellulose Servacel

komponenta	**DEAE startovací**	**DEAE eluční**	**DEAE uchovávací**
	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 [ml]	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 NaCl [ml]	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 NaCl + 20% etanol [ml]
1 M Tris-HCl, pH 7.4	25	25	25
5 M NaCl	0	100	0
20% etanol	0	0	200
dH_2O	975	875	775
celkem	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Tab. 15: Složení pufrů využívaných k regeneraci a uchovávání gravitační kolony Con A Sepharose 4B Amersham

komponenta	**Regenerační pufr KYSELÝ**	**Regenerační pufr BAZICKÝ**	**Uchovávací pufr**
	50 mM Na-acetát, pH 4.5 + 0,5 M NaCl + 1 mM $MnCl_2$ + 1 mM $CaCl_2$+1 mM $MgCl_2$ [ml]	50 mM Tris-HCl, pH 8.5 + 0,5 M NaCl + 1 mM $MnCl_2$ + 1 mM $CaCl_2$ + 1 mM $MgCl_2$ [ml]	100 mM Na-acetát, pH 6.0 + 1 M NaCl + 1 mM Mn Cl_2 + 1 mM $CaCl_2$ + 1 mM $MgCl_2$ + 20% etanol [ml]
1 M Na-acetát, pH 6.0	0	0	70
1 M Na-acetát, pH 4.5	35	0	0
1 M Tris-HCl, pH 8.5	0	35	0
5 M NaCl	70	70	140
1 M $MnCl_2$	0.7	0.7	0.7
1 M $CaCl_2$	0.7	0.7	0.7
1 M $MgCl_2$	0.7	0.7	0.7
d H_2O	592.9	592.9	487.9
celkem	700 ml	700 ml	700 ml

9.2 Složení jednotlivých pufrů a komponentů pro barvení, odbarvení a fixaci pro SDS-PAGE elektroforézu

Složení komponentů tvořící gel pro SDS-PAGE elektroforézu

Persíran amonný = 15% roztok, příprava - 0,75 g persíranu amonného + 5 ml H_2O

AC/BIS – Acrylamid (30%), 37,5:1, /AppliChem/

Pufr A: 36,3 g Tris/100 ml, pH= 8,8 - upravit HCl

Pufr B: 6 g Tris/100 ml, pH= 6,8 - upravit HCl

Složení vkládacího pufru (*loading buffer*) pro SDS-PAGE

500 µl + před použitím přidat 170 µl BME

Složení vanového pufru pro SDS-PAGE

192 mM glycin + 25 mM Tris + 0,1% SDS

tj. do 1 litru = 144 g glycinu + 30,3 g Tris + 10 g SDS

Složení komponentů pro barvení gelů, odbarvení a fixaci

barvivo *Coomassie Blue*:

1g CCB + 500 ml metanolu – rozpustit CCB + 100 ml k. octové + 400 ml H_2O

Odbarvovací roztok:

250 ml etanolu + 100 ml k. octové + 650 ml H_2O

Fixační roztok:

450 ml etanolu + 30 ml glycerolu + 500 ml H_2O