



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Využití imunoafinitní chromatografie pro hormonální
profilování**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Ondřej Juřena**

Studijní program: N1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Ondřej Juřena

Název práce: Využití imunoafinitní chromatografie pro hormonální profilování

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů, PŘF UP & ÚEB AVČR

Vedoucí práce: Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Cílem diplomové práce byla příprava a otestování směsného imunoafinitního gelu založeného na monoklonálních protilátkách proti různým rostlinným hormonům (kyselina abscisová, auxiny a cytokininy).

Takto připravený gel může značně urychlit a zjednodušit proces purifikace těchto skupin fytohormonů z rostlinného materiálu, jelikož všechny tyto látky mohou být izolovány současně pomocí jedнокrokové imunoafinitní chromatografie.

Klíčová slova: Abscisová kyselina, *Arabidopsis thaliana*, auxiny, cytokininy, hmotnostní spektrometrie, imunoafinitní chromatografie, protilátky, ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie.

Počet slov: 8565

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical Identification

Author's first name and surname: Bc. Ondřej Juřena

Title of thesis: Utilization of immunoaffinity chromatography for hormonal profiling

Department: Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & IEB AS CR

Supervisor: Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract:

The aim of the thesis was to prepare and test the mixed immunoaffinity gel based on monoclonal antibodies against various plant hormones (abscisic acid, auxins and cytokinins).

The prepared gel can greatly accelerate and simplify purification of these phytohormones from plant material, since all of these compounds may be isolated simultaneously by using the single-step immunoaffinity chromatography .

Keywords: Abscisic acid, *Arabidopsis thaliana*, auxins, antibodies, cytokinins, immunoaffinity chromatography, mass spectrometry, ultra-high performance liquid chromatography.

Number of words: 8565

Number of appendices: 0

Language: Czech

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval své vedoucí diplomové práce, Mgr. Janě Oklešťkové, Ph.D., za odbornou pomoc, trvalý zájem a trpělivost při vypracování a následném sepsání této diplomové práce.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za seznámení s technikou analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie a za následnou pomoc při analytickém vyhodnocování získaných výsledků.

Poděkování patří také vedení a všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za vytvoření vhodných podmínek pro provedení experimentální části této diplomové práce i pro její literární zpracování.

Obsah

1.	Úvod a cíl diplomové práce	9
2.	Teoretický úvod	10
2.1.	Imunitní systém a protilátky	10
2.1.1.	Imunitní systém a jeho základní komponenty	10
2.1.2.	Protilátky a jejich vlastnosti.....	10
2.1.3.	Monoklonální protilátky a jejich příprava.....	12
2.2.	Imunochemické metody.....	15
2.3.	Imunoafinitní chromatografie	16
2.3.1.	Imunosorbent	17
2.3.2.	Eluce a její typy	18
2.3.3.	Využití imunoafinitní chromatografie.....	19
2.4.	Rostlinné hormony.....	20
2.4.1.	Auxiny.....	21
2.4.2.	Cytokininy	22
2.4.3.	Kyselina abscisová (ABA)	23
3.	Materiál a metody	24
3.1.	Chemikálie, přístroje a rostlinný materiál.....	24
3.2.	Metody práce.....	26
3.2.1.	Příprava a testování imunoafinitního gelu pro stanovení cytokininů ..	26
3.2.2.	Příprava a testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti kyselině abscisové (ABA) a kyselině Indol-3-(yl)-octové (IAA)	28
3.2.3.	Multiimunoafinitní chromatografie.....	30
3.2.4.	Testování multiimunoafinitního a imunoafinitních gelů pomocí rostlinného materiálu <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.2.5.	Analýza vzorků	33

4.	Výsledky	35
4.1.	Příprava monoklonálních protilátek proti cytokininům.....	35
4.2.	Příprava a testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti cytokininům .	35
4.3.	Příprava monoklonálních protilátek proti kyselině abscisové (ABA) a kyselině Indol-3-(yl)-octové (IAA).....	36
4.4.	Příprava a testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti kyselině abscisové (ABA) a kyselině Indol-3-(yl)-octové (IAA)	36
4.5.	Příprava multiimunoafinitního gelu a testování jeho kapacity pomocí standardů rostlinných hormonů	37
4.6.	Testování účinnosti multiimunoafinitního gelu pomocí rostlinného materiálu <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
4.7.	Testování účinnosti samostatných imunoafinitních gelů s protilátkami proti ABA, IAA a cytokininům pomocí rostlinného materiálu <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
5.	Diskuze	41
6.	Závěr	43
7.	Seznam literatury.....	44

Seznam použitých zkratk:

CDR (doména) - Complementarity Determining Region

mAbs - Monoklonální protilátky

HPRT - Hypoxanthin-guanin-fosforibosyl-transferáza

HAT médium - Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin médium

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

EIA - Enzymová imunoanalýza

Fc - fragment - Fragment crystallizable

IAC - Imunoafinitní chromatografie

HPLC - Vysoce účinná kapalinová chromatografie

CG - Plynová chromatografie

CE - Kapilární elektroforéza

PBS - Fosfátový pufr

SPE - Extrakce na pevné fázi

UHPLC - Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie

HPIAC - Vysoce účinná imunoafinitní chromatografie

IAA - Kyselina indol-3(yl)-octová

CK(s) - Cytokinin(y)

ABA - Kyselina abscisová

UV detekce - Ultrafialová detekce

MOPS - Kyselina 3-morfolinopropansulfanová

MeOH - Methanol

MS médium - Murasmige and Skoog médium

TRITON - ([4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-deca(ethylen glycol)ether)

1. Úvod a cíl diplomové práce

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou makromolekulární látky bílkovinné povahy, hrající důležitou roli v imunitní odpovědi člověka. Polyklonální protilátky tvoří heterogenní směs namířenou proti více epitopům jednoho antigenu nebo proti směsi antigenů. Tento typ protilátek se získává přímo z krevního séra imunizovaných zvířat. Oproti tomu monoklonální protilátky jsou chemická individua, namířená pouze proti jednomu konkrétnímu epitopu antigenu. Jejich příprava je finančně i časově náročnější. V *in vitro* podmínkách jsou produkovány hybridomy, které vznikají fúzí B-lymfocytů a myelomových buněk.

Polyklonální i monoklonální protilátky mají v dnešní laboratorní praxi nezastupitelné postavení. Jsou součástí mnoha purifikačních metod, jejich schopnosti specificky vázat antigen je využíváno v mnoha analytických procesech. Jednou z významných metod je imunoafinitní chromatografie. Umožňuje selektivní extrakci nebo obohacení zájmových sloučenin nebo skupin látek. Po tomto kroku může následovat analýza získaných látek pomocí kapalinové nebo plynové chromatografie s detekcí často pomocí hmotnostní spektrometrie.

Cílem diplomové práce byla příprava imunoafinitního gelu vhodného k cílenému získání několika skupin rostlinných hormonů. V prvním kroku byly pomocí purifikačních technik získány čisté monoklonální protilátky proti kyselině abscisové, kyselině indol-3(yl)-octové a směsi cytokininů. Tyto protilátky byly navázány na afinitní gely, které byly později smíchány. Vlastnosti a kapacity jednotlivých gelů i směsného gelu byly testovány pomocí standardů rostlinných hormonů a pomocí rostlinného materiálu pocházejícího z 12 denních semenáčku *Arabidopsis thaliana* (L.). Posledním krokem byla kvantifikace rostlinných hormonů pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie.

2. Teoretický úvod

2.1. Imunitní systém a protilátky

2.1.1. Imunitní systém a jeho základní komponenty

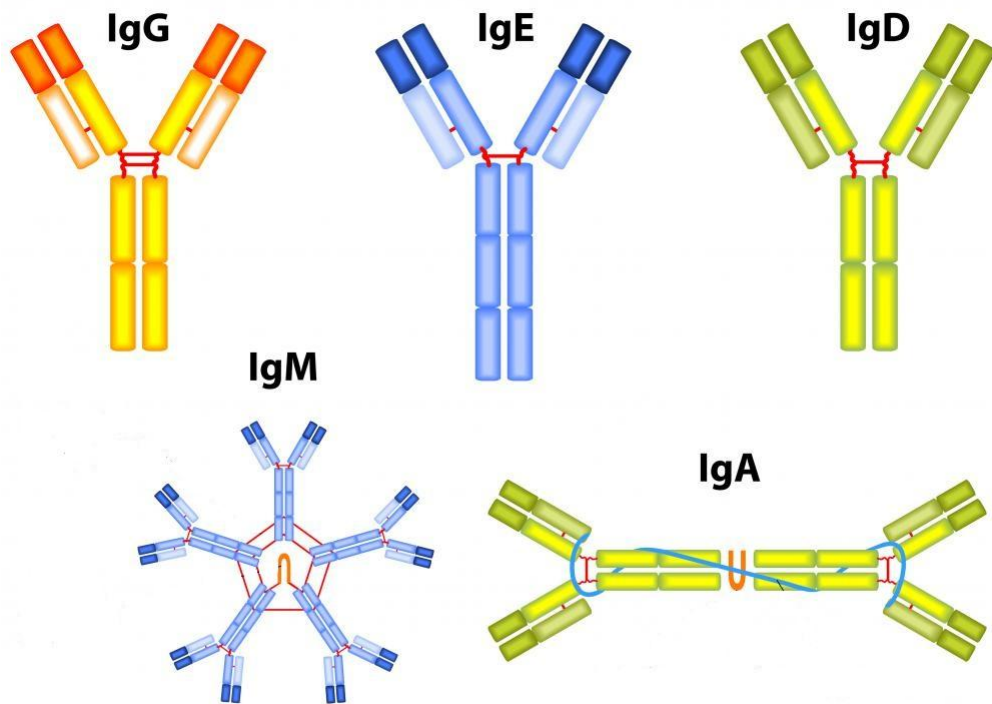
Imunitní systém člověka je souborem složitých procesů, jejichž hlavním úkolem je udržení homeostatické rovnováhy a integrity vlastního organismu. Součástí imunitního systému je velká řada buněk a struktur, které dohromady tvoří systémy lymfoidních tkání a orgánů. Primární lymfoidní orgány, mezi které patří kostní dřeň a brzlík, jsou zodpovědné za vznik, diferenciaci a zrání imunokompetentních buněk. Sekundárními lymfoidní orgány jsou pak především slezina, kde probíhá syntéza protilátek, a lymfatické uzliny, mezi které řadíme mandle a slepé střevo.

Obranné imunitní mechanismy se rozdělují na specifické a nespecifické. Nespecifické mechanismy jsou vrozené a evolučně starší. Buněčnou složku nespecifické imunitní odpovědi tvoří fagocytující buňky jako makrofágy nebo dendritické buňky. Humorální složkou nespecifické imunitní odpovědi jsou složky komplementu, které jsou tvořeny sérovými a membránovými proteiny. Specifické imunitní mechanismy se spouštějí při setkání s antigenem, jsou evolučně mladší a je pro ně typická imunologická paměť. Buněčnou složkou specifické imunitní odpovědi jsou úzce spolupracující B- a T-lymfocyty, humorální složkou jsou cytokiny a především protilátky, kterými se následující práce bude z velké části zabývat (*Ferenčík a kol., 2004*).

2.1.2. Protilátky a jejich vlastnosti

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou makromolekuly hrající nezastupitelnou roli ve specifické látkové obraně člověka. Každá molekula imunoglobulinu je tvořena dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci, které jsou mezi sebou spojeny disulfidickými vazbami. Podle typu těžkého řetězce rozdělujeme

protilátky do několika tříd, které se navzájem liší jak chemickým složením, tak svou funkcí v obranných mechanismech organismu. Patří sem protilátky typu IgG, IgE, IgA, IgM a IgD, jejich struktura je zobrazena na obrázku č. 1. Jak těžké, tak lehké řetězce imunoglobulinů jsou tvořeny doménami, což jsou proteinové úseky čítající asi 110 aminokyselin. Tyto domény jsou tvořeny konstantními a variabilními úseky. Součástí variabilních části řetězců jsou hypervariabilní úseky (CDR domény), které jsou svou rozmanitostí zodpovědné za vazbu protilátky na antigen.



Obrázek č. 1: Jednotlivé třídy lidských imunoglobulinů.

Zdroj: <http://www.wisegeekhealth.com/what-is-the-difference-between-antigens-and-antibodies.htm>

Tvorba protilátek je proces iniciovaný interakcí antigenu s antigen senzitivními buňkami. Součástí procesu je přeměna B-lymfocytů na plazmatické buňky, které jsou poté schopny produkovat konkrétní typ protilátek. V organismu, potažmo v krevním séru, se většinou setkáváme se

směsí polyklonálních protilátek namířených proti mnoha antigenům. Existují však také protilátky monoklonální, které vznikají v *in vivo* podmínkách při některých patologických stavech a připravují se *in vitro* laboratorními metodami (Wood, 2011).

Z molekulárně-genetického hlediska se na tvorbě protilátek, konkrétně jejich konstantních a variabilních řetězců, podílí řada subgenů situovaných na chromozomech 2, 14 a 22. Tyto subgeny podléhají V(D)JC rekombinaci a tvoří funkční geny, které odpovídají za tvorbu až 10^8 různých řetězců imunoglobulinů (Buc a Ferenčík, 1994).

2.1.3. Monoklonální protilátky a jejich příprava

Monoklonální protilátky (mAbs) jsou homogenní struktury namířené pouze proti jednomu konkrétnímu epitopu antigenu. V organismu se za fyziologických podmínek vyskytují pouze ve velmi malé koncentraci. Výjimkou mohou být některé patologické stavy, jako nádorové onemocnění plazmatických buněk - plasmocytom. Tento nádor je schopný produkovat mAbs, obvykle však neznámé specifity (Hořejší a Bartůňková, 2009).

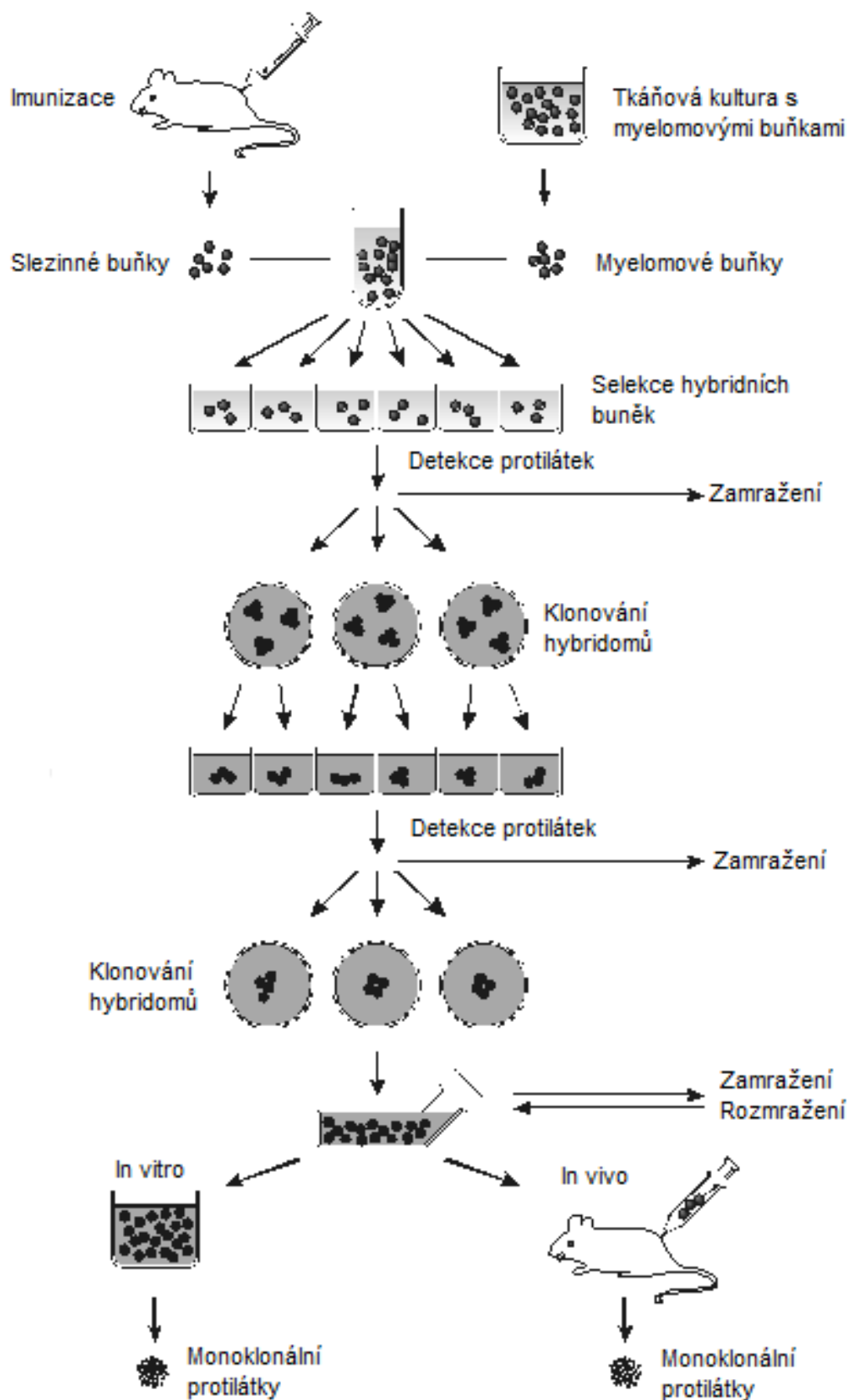
K produkci monoklonálních protilátek se používají metody založené na fúzi myelomových buněk a B-lymfocytů. Samotné B-lymfocyty jsou sice schopné produkovat protilátky, ovšem jejich limitujícím faktorem je neschopnost přežít v tkáňových kulturách. Řešením tohoto problému je právě fúze s myelomovými nádorovými buňkami, které v tkáňových kulturách dokážou přežít neomezeně dlouho (Kohler a Milstein, 1975).

Samotná produkce mAbs je dlouhým a náročným procesem. B-lymfocyty, které se získávají ze sleziny imunizované myši, jsou v prvním kroku podrobeny fúzi s myelomovými buňkami. Jelikož fúze za normálních podmínek téměř neprobíhá, musí být tento proces podpořen přidáním speciálních činidel, nazývaných fúzogeny. Nejčastěji používaným fúzogenem je polyethylenglykol. V dalším kroku jsou selektovány schopné hybridomové buňky. Nezfúzované myelomové buňky neobsahují enzym hypoxanthin fosforibosyl transferázu (HPRT), proto nejsou schopny růst na selekčním HAT (hypoxanthin,

aminopterin a thymidin) médiu a rychle hynou. Stejně tak na médiu nejsou schopny přežít slezinné buňky. Jediným typem buněk, který přežívá selekci, jsou právě hybridomy (*Pohanka, 2009*).

Charakteristika protilátek produkovaných jednotlivými hybridomy je testována pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA). Následuje klonování pozitivních hybridomů, před nímž je vždy polovina buněk zamrzána k případnému opakování experimentu. Po naklonování jsou hybridomy přeneseny do vhodného systému pro jejich produkci (*Letchworth a Appleton, 1984*). K tomuto účelu se využívají například myší *in vivo* systémy. Hybridomy jsou v tomto případě injektovány do břišní dutiny jedince, mAbs jsou poté získávány z ascitu zvířete. V dnešní době, kdy je kladen důraz na snižování počtu pokusných zvířat, se používají především speciální *in vitro* kultivační systémy. V těchto systémech jsou díky polopropustné membráně odděleny dva prostory, kdy jeden zajišťuje kultivaci hybridomů a produkci protilátek a druhý slouží jako zásobárna živin pro hybridomy. Tyto živiny mohou díky polopropustné membráně volně putovat k hybridomům, stejně jako odpadní látky druhým směrem (*Eyer a Fránek, 2012*). Schéma přípravy a produkce monoklonálních protilátek je zachyceno na obrázku č. 2.

Monoklonální protilátky mají v dnešní laboratorní praxi celou řadu využití. Mají nezastupitelnou roli v mnoha medicínských oblastech, například při cílené terapii lymfomů a solidních nádorů (*Scott a kol., 2012*). MAbs jsou také nedílnou součástí některých purifikačních a analytických procesů, například při čištění různých biologických materiálů.



Obrázek č. 2: Schéma přípravy a produkce monoklonálních protilátek.

Zdroj: O. Blahoušek, LRR, 2001

2.2. Imunochemické metody

Principem imunochemických metod je vazba mezi protilátkou a antigenem, popřípadě haptenem. Tato vazba je zprostředkována několika typy interakcí nekovalentního charakteru, a to vodíkovými můstky, hydrofóbními interakcemi, Coulombovými silami, Van der waalsovými silami a iontovými silami. Celková síla vazby mezi protilátkou a antigenem se charakterizuje jako afinita. Jde o termodynamické vyjádření primární vazebné energie pro jednu konkrétní antigenní determinantu (*Ferenčík, 1989*).

Vedle klasické vazby protilátky a antigenu existuje také velká řada nespecifických interakcí volných nebo vázaných imunoglobulinů s komplementem, Fc–receptory buněk nebo speciálními typy proteinů, jako jsou proteiny A a G. Protein typu A je produkován několika kmeny *Staphylococcus aureus* (*Bjork a kol., 1972*). Využívá se především v procesech purifikace protilátek typu IgG. Každá molekula proteinu A obsahuje čtyři vazebná místa o vysoké afinitě k Fc-fragmentům imunoglobulinů, další výhodou molekuly je její tepelná stabilita a odolnost vůči denaturačním činidlům (*Hjelm a kol., 1975, Sjolholm, 1975*).

Jednotlivé imunochemické metody se liší jak způsobem provedení, tak typem prostředí, ve kterém probíhají. Velkou skupinou imunochemických metod jsou metody sérologické, které se provádí v kapalném prostředí. Patří sem precipitační reakce, aglutinační reakce, imunonefelometrie nebo imunoturbidimetrie. Druhou velkou skupinou jsou imunodifúzní metody, které neprobíhají v kapalném prostředí, ale většinou ve speciálně upraveném agaru. Další metodou je imunoenzymová analýza (EIA). Jde o široce rozšířenou metodu, používanou k detekci protilátek i antigenu, kdy po přidání substrátu pro daný enzym, vzniká barevný komplex, jehož intenzita se měří spektrofotometricky (*Ferenčík, 1989*).

2.3. Imunoafinitní chromatografie

Chromatografické metody jsou fyzikálně-chemické separační metody, během nichž jsou složky směsi rozděleny na pomezí dvou nemísitelných fází. První fáze se nazývá nepohyblivá neboli stacionární. Podle jejího uspořádání rozdělujeme chromatografii na několik typů: kolonová, kapilární, tenkovrstvá nebo chromatografie na papíře. Druhá fáze, mobilní, bývá tvořena plynem, kapalinou nebo kapalinou v superkritickém stavu. V praxi je analyt pomocí mobilní fáze unášen soustavou a je různou měrou zadržován sorbentem stacionární fáze. Podle principu dělení látek, rozdělujeme chromatografické metody na několik typů (tabulka č. 1).

Typ chromatografie	Princip rozdělení látek
Adsorpční chromatografie	Rozdílná adsorpce látek na povrch sorbentu
Rozdělovací chromatografie	Rozdílná rozpustnost dvou látek ve dvou různých kapalinách
Iontově výměnná chromatografie	Sorbent zachycuje určitý typ iontů výměnou za jiný iont
Gelová chromatografie	Rozdílná průchodnost látek přes póry stacionární fáze na základě rozdílné velikosti látek
Afinitní chromatografie	Biospecifická vazba mezi ligandem a biologicky aktivní látkou

Tabulka č. 1: Základní typy chromatografií podle principu rozdělení látek.

V afinitní chromatografii se využívá biospecifických vazeb mezi ligandem, který je imobilizován na pevné fázi a biologicky aktivní látkou, která je přítomna ve směsi. Mezi nejčastěji vyskytující se biospecifické vazby, které se v afinitní chromatografii využívají, patří interakce enzym-substrát, enzym-inhibitor, avidin-biotin, hormon-receptor či protilátka-antigen.

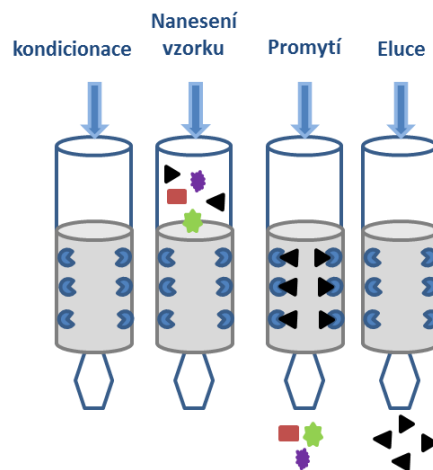
Imunoafinitní chromatografie (IAC) je založena na specifické nekovalentní vazbě protilátky a antigenu. Součástí stacionární fáze IAC jsou imobilizované monoklonální nebo polyklonální protilátky. Tyto protilátky specificky váží antigen, který je společně s mobilní fází unášen stacionární fází. Zájmový antigen je poté získán elucí specifickým činidlem. IAC umožňuje selektivní extrakci či obohacení zájmových sloučenin nebo skupin látek před následnou analýzou pomocí HPLC, CG, CE nebo ELISY (*Zhang a kol., 2010*).

2.3.1. Imunosorbent

Důležitými vlastnostmi stacionární fáze ovlivňující její efektivitu jsou vedle její schopnosti vázat protilátky, také mechanická, biologická, chemická odolnost, či velikost pórů. Nejčastěji používanými materiály stacionární fáze jsou chemické látky odvozené od sacharidů (agaróza, celulóza, dextran) a syntetické organické látky (polymery akrylamidu či deriváty polyethersulfonu) (*Jackson a kol., 2012*).

Protilátky mohou být ke stacionární fázi vázány mnoha technikami. Principem té nejběžnější je kovalentní vazba zprostředkovaná volnými amino skupinami protilátky a stacionární fází aktivovanou činidly karbonyldiimidazolem nebo N-hydroxysuccinimidem. Ač jde o jednoduchou techniku, nevýhodou takové vazby je různá orientace volných amino skupin jednotlivých protilátek, což může vést k blokaci vazebného místa a následné ztrátě aktivity protilátky (*Kortt a kol., 1997*). Příkladem nekovalentní vazby protilátky ke stacionární fázi je využití imobilizovaných proteinů A či G, které jsou schopny specificky interagovat s Fc-fragmenty protilátky (*Hage a Phillips, 2006*).

Při klasickém uspořádání experimentu je imunosorbent nejčastěji součástí plastových kolon. Imunoafinitní extrakce na těchto kolonách může probíhat opakovaně, ovšem u některých typů protilátek se s počtem opakování může snižovat účinnost extrakce (*Watanabe a kol., 2011*). Před samotným použitím musí být imunosorbent vhodně aktivován. Poté je nanesen v několika opakováních vzorek. Nenavázané látky jsou odmyty a následuje eluce zájmového analytu. Před dalším opakováním experimentu musí být imunosorbent opět zregenerován. Imunosorbent se před dalším použitím uchovává v lednici (4°C) a PBS s přísadkou azidu sodného. Obecný princip IAC je zobrazen na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Princip imunoafinitní chromatografie.

2.3.2. Eluce a její typy

Vazba protilátek, které jsou součástí stacionární fáze a antigenu, je zprostředkována několika typy nekovalentních vazeb. Aby bylo možno zájmový antigen z protilátek zpětně získat, musí dojít k porušení vazby antigen-protilátka, tzv. elucí. Při eluci se mění podmínky v koloně tak, aby bylo možné analyt získat co nejrychlejším způsobem, který navíc není destruktivní pro imunosorbent. Pro jednotlivé analyty a imunosorbenty existuje velká řada postupů. Mezi ty nejčastější patří změna pH prostředí uvnitř kolony, přidání

chaotropního činidla, přidání organických rozpouštědel nebo kombinace některých z uvedených postupů (*Hennion a Pichon, 2003*).

Analyt se k protilátkám imunosorbentu váže nejlépe za fyziologického pH. Změnou pH lze tedy docílit porušení imunospesifické vazby. Častějším postupem je přidání kyselého činidla, o pH většinou v rozmezí 1-3. Možná je také alkalická eluce, ovšem vysoké pH může mít pro některé proteiny denaturující účinky (*Ibarra a kol., 1999*).

Eluce pomocí chaotropních činidel se provádí nejčastěji v případě, kdy změna pH může způsobit denuraci. Chaotropní činidla jsou schopna narušovat strukturu hydrofilních interakcí mezi molekulami vody tak, že samy s vodou tvoří vodíkové můstky. Mezi chaotropní činidla patří thiokyanát (SCN^-), trifluoracetát (CF_3COO^-) nebo chlorid (Cl^-). Pro eluci cílového analytu je také možné použít organická rozpouštědla, nejčastěji methanol. Nevýhodou tohoto postupu jsou denaturační vlastnosti methanolu, který může poškodit také samotné protilátky (*Jackson a kol., 2012*). Příkladem kombinace činidel je použití roztoku aceton-methanol (50:50, v/v) (*Maurer a kol., 2000*) nebo kombinace organického rozpouštědla s kyselým činidlem (*Bouzige, 2000*).

2.3.3. Využití imunoafinitní chromatografie

Jak už bylo řečeno, imunoafinitní chromatografie má v dnešní laboratorní praxi velkou řadu využití. Ve spojení s extrakcí na pevné fázi (SPE) je součástí mnoha extrakčních procesů. Výhodou je její možnost off-line či on-line propojení s rozličnými analytickými technikami jako HPLC nebo GC s následnou detekcí často pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

Novák a kol. (2008) optimalizovali metodu využívající imunoafinitní chromatografii v propojení s UHPLC a detekcí MS/MS k extrakci a analýze cytokininů z rostlinných vzorků. Tato metoda je využitelná pro rychlou, přesnou a citlivou kvalitativní i kvantitativní analýzu více než 50 cytokininů. IAC bylo využito také k imunoextrakci melatoninu z lidského krevního séra. V porovnání s SPE pomocí C18 kolon se imunoextrakční metoda ukázala účinnější, a to

díky značně menšímu obsahu nečistot v eluátu v porovnání se samotnou SPE (Rolčík a kol., 2002).

Speciálním typem IAC je vysoce účinná imunoafinitní chromatografie (HPIAC). Tato metoda využívá imobilizovaných protilátek ve spojení s průtokovými systémy o vysokých tlacích (Pfaunmiller a kol., 2012). Zimmerli a Dick (1995) využili HPIAC s fluorescenční detekcí ke stanovení ochratoxinu A v lidské krvi, krevním séru, mléku a některých potravinách.

2.4. Rostlinné hormony

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou endogenní signální molekuly, které jsou zodpovědné za přenos informací mezi pletivy a orgány (Kamlar a kol., 2010). Jedná se o látky různé chemické struktury, které mají nezastupitelnou roli v regulaci růstu a vývoje rostliny. V rostlinném těle většinou nepůsobí samostatně, ale velmi často společně s dalšími látkami. Mezi nejvýznamnější skupiny rostlinných hormonů řadíme auxiny, cytokininy, gibbereliny, etylen, kyselinu abscisovou a brassinosteroidy (Podlešáková a kol., 2012).

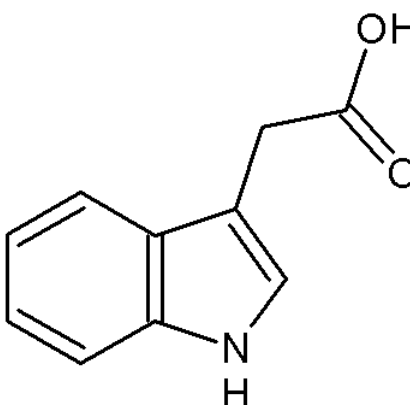
Fytohormony se obvykle v rostlinných vzorcích vyskytují ve velmi nízké koncentraci (pg/g čerstvé hmoty). Z tohoto důvodu jsou k přesnému stanovení hormonů ve vzorku nutné extrakční a purifikační kroky, sloužící k odstranění nežádoucí matrice (Tarkovská a kol., 2014). K analýze fytohormonů se v dnešní době využívají především metody spojující chromatografické dělení látek, například UHPLC a detekci pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Dalším přístupem k analýze rostlinných hormonů je spojení kapilární elektroforézy (CE) a opět hmotnostní detekce (Podlešáková a kol., 2012).

2.4.1. Auxiny

Auxiny jsou vůbec první objevenou skupinou rostlinných hormonů (Procházka a kol., 2003). Mezi jejich funkce patří stimulace dlouhivého růstu stonků, ovlivnění procesů buněčného dělení, senescence nebo apikální dominance. Z chemického hlediska jde o aromatické sloučeniny, obsahující karboxylovou skupinu v postranním řetězci (Woodward a Bartel, 2005). Nejvýznamnějším zástupcem auxinů je kyselina indol-3(yl)-octová (IAA), jejíž struktura je zobrazena na obrázku č. 4.

Kyselina indol-3(yl)-octová se v rostlinném materiálu vyskytuje také ve formě konjugátů s aminokyselinami. Kowalczyk a Sandberg (2001) na modelu *Arabidopsis thaliana* popsali a pomocí HPLC-MS/MS analyzovali výskyt čtyř druhů konjugátů IAA s aminokyselinami, a to s kyselinou asparagovou, kyselinou glutamovou, leucinem a alaninem. Bylo také zjištěno, že koncentrace těchto konjugátů je v rostlinách nižší než koncentrace volné IAA.

Protokol získání IAA z rostlinných vzorků zahrnuje obvykle kroky extrakce, SPE purifikace a analýzu pomocí GC-MS nebo HPLC-MS/MS. Tento postup je ovšem vhodný především k získání volné IAA, ne jejich konjugátů. K tomuto účelu Pěňčík a kol. (2009) vyvinuli metodu spojující vysoce účinnou imunoafinitní chromatografii (HPIAC) a citlivou LC-MS/MS analýzu, pomocí které stanovili a kvantifikovali čistou IAA a sedm amino konjugátů v semenech druhu *Helleborus niger*.

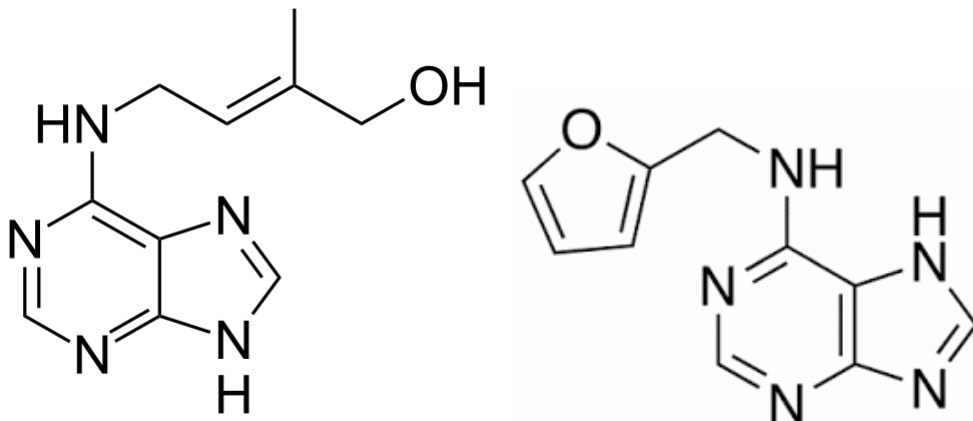


Obrázek č. 4: Chemická struktura kyseliny indol-3(yl)-octové.

2.4.2. Cytokininy

Cytokininy (CKs) jsou endogenní N6 deriváty adeninu. Vedle schopnosti indukovat buněčné dělení, jsou také nezbytné pro buněčnou diferenciaci (*Mok a Mok, 2001*). V rostlinném těle se vyskytují jako volné báze, nukleosidy, nukleotidy a glykosidy, vždy ve velmi malých koncentracích. Některé ze struktur odvozených od cytokininů se používají jako specifické inhibitory cyklin-dependentních kináz při léčbě některých typů rakoviny (*Hauserová a kol., 2005*). Mezi nejvýznamnější cytokininy se řadí zeatin a kinetin, jejichž struktura je na obrázku č. 5.

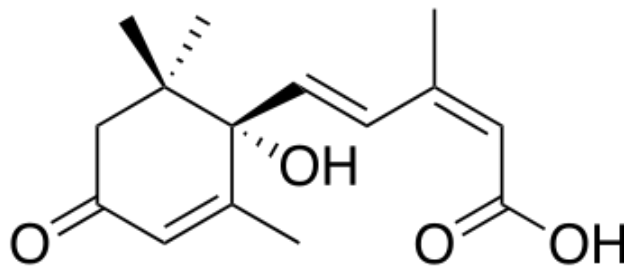
Klasický postup izolace cytokininů z rostlinných vzorků zahrnuje extrakci pomocí organického činidla, SPE purifikaci, čištění pomocí imunoafinitní chromatografie a analýzu pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním výstupem. *Svačinová a kol. (2012)* vyvinuli metodu spojující jednokrokovou mikro-SPE purifikaci a ultra vysoce účinnou kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Tato metoda se v praxi ukazuje jako vysoce efektivní, levná a rychlá, navíc může být modifikována do podoby vhodné také pro ostatní rostlinné hormony.



Obrázek č. 5: Chemická struktura zeatinu (vlevo) a kinetinu.

2.4.3. Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný hormon ovlivňující především opad listů (abscisi) a dormanci. Důležitou funkci zastává také při regulaci stresové odpovědi, kdy za nepříznivých podmínek jako je sucho nebo chlad, jeho koncentrace v rostlině několikanásobně vzrůstá (*Outlaw, 2003*). Z chemického hlediska se jedná o izoprenoidní hormon, který se vyskytuje v mnoha izomerních formách o různé fyziologické aktivitě. Struktura kyseliny abscisové je na obrázku č. 6. Kyselina abscisová i její metabolity mohou být poměrně jednoduše detekovány a kvantifikovány pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA), HPLC s UV detekcí nebo pomocí UHPLC-MS/MS (*Turečková a kol., 2009*).



Obrázek č. 6: Chemická struktura kyseliny abscisové.

3. Materiál a metody

3.1. Chemikálie, přístroje a rostlinný materiál

Chemikálie:

Síran amonný ((NH₄)₂SO₄, Lach-Ner, ČR), hydroxid amonný (NaOH, Lach-Ner, ČR), ethanol (Merck KGaA, Německo), kyselina 3-morfolinopropasulfonová (MOPS, Sigma-Aldrich, USA), chlorid sodný (NaCl, Lach-Ner, ČR), 1M ethanolamin (Sigma-Aldrich, USA), NaH₂PO₄·2H₂O (Lach-Ner, ČR), azid sodný (NaN₃, Sigma-Aldrich, USA), destilovaná H₂O, Affigel 10 (BioRad, Německo), methanol (Merck KGaA, Německo), Protein A IgG Purification Kit (Thermo Scientific, USA), Murashige and Skoog médium (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), sacharóza (Lach-Ner, ČR), agar (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), TWEEN (Sigma-Aldrich, USA), TRITON (Sigma-Aldrich, USA), acetonitril (C₂H₃N, Merck KGaA, Německo), diazomethan (CH₂N₂), kyselina octová (CH₃COOH), mravenčan amonný (NH₄HCOO).

Roztoky a jejich složení:

Pufr pro dialýzu: 18 g NaCl, 35,8 g Na₂HPO₄ · 12H₂O na 1 litr destilované H₂O, pH 7,2

Pufr pro ředění rostlinných hormonů a pro použití v imunoafinitní chromatografii: 7,8 g NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0,87 g NaCl na 1 litr destilované H₂O, pH 7,2

MOPS pufr: 20,93 g MOPS (kyselina 3-morfolinopropansulfanová), 17,5 g NaCl na 1 litr destilované H₂O, pH 7,2

Médium pro kultivaci semenáčků Arabidopsis thaliana: 4,4 g MS (Murashige and Skoog) média, 10 g sacharózy na 1 litr destilované H₂O, pH 5,7

Použité interní standardy rostlinných hormonů:

IAA, IAA-Me (IAA methyl ester), d₅ IAA, d₅ IAA-Me, ABA, ABA-Me (ABA methyl ester), d₆ ABA, d₆ ABA-Me, směs značených a neznačených cytokininů

Všechny z výše uvedených standardů byly získány z firmy Olchemim, ČR.

Rostlinný materiál:

Semenáčky *Arabidopsis thaliana* (postup a podmínky kultivace jsou uvedeny v podkapitolách 3.2.4.1 a 3.2.4.2. metodické části této diplomové práce).

Přístroje a vybavení:

Ultrafiltrační membrána (materiál – Polyétersulfon, Biomax (PB) and PM Series, Amicon Bioseparations Millipore, USA)

Kolony pro IAC (3 ml, Applied Separations, USA)

Centrifuga (Thermo Scientific, USA)

Spektrofotometr (UV-1601, Shimadzu, Japonsko)

Dialyzační hadice (Sigma-Aldrich, USA)

Autokláv (Sanyo, Schoeller, ČR)

Flowbox (Holten-Lamin Air, Thermo Scientific, USA)

HLB kolony (3 ml, Oasis, USA)

Dusíková odparka (Turbo Vap, LV, Caliper Life Sciences, USA)

Vortex (Velp scientifica, Chemos, ČR)

Ultrazvuk (VWR, ČR)

Acquity UPLCTM System (Waters, Milford, MA, USA)

Hmotnostní analyzátor (XevoTM TQ-STM Waters MS Technologies, Manchester, UK)

MassLynxTM software (version 4.0, Waters, Milford, MA, USA)

3.2. Metody práce

3.2.1. Příprava a testování imunoafinitního gelu pro stanovení cytokininů

Hybridomy produkující monoklonální protilátky, které byly použity v rámci této diplomové práce, byly připraveny v Laboratoři růstových regulátorů v rámci dřívějších pracovních projektů. Rovněž byla stanovena specifita produkovaných protilátek.

3.2.1.1. Ultrafiltrace

Ultrafiltrace je tlakový separační proces sloužící k oddělení jednotlivých složek směsi na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Separace je dosaženo pomocí speciální semipermeabilní membrány, která propouští látky o molekulové hmotnosti v rozsahu 10^3 - 10^5 Da, což odpovídá například virům, menším bílkovinám či polysacharidům. Látky o vyšší molekulové hmotnosti membránou neprocházejí. Požadovaný tlakový rozdíl se pohybuje mezi 5 až 10 bary (<http://www.membrain.cz/ultrafiltrace.html>).

Před ultrafiltrací byla připravená polyethersulfonová membrána promyta 50 ml destilované H_2O . Do sestavené ultrafiltrační cely s membránovým filtrem bylo přidáno 50 ml kultivačního média, které obsahovalo požadované monoklonální protilátky proti cytokininům. Protilátky jsou makromolekulární látky, které membránou neprocházejí a jsou tedy koncentrovány v retentátu. Po připojení hnacího plynu (dusík) a za stálého míchání pomocí magnetické míchačky byl původní objem 50 ml média zakoncentrován asi na polovinu. Tento objem (retentát) byl odsát pomocí Pasteurovy pipety a uchován v zásobní lahvi. Polyethersulfonová membrána byla po použití promyta v destilované vodě a 0,1 M NaOH a uchována v 10% ethanolu.

3.2.1.2. Srážecí reakce a dialýza

Dalším použitým purifikačním procesem byla srážecí reakce s následnou dialýzou. K 7 ml kultivačního média s monoklonálními protilátkami zakoncentrovaného pomocí ultrafiltrace byly přidány 3 ml PBS. Za stálého míchání bylo opatrně přikapáváno 10 ml srážecího činidla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o pH 7,2. Roztok byl za občasného promíchání ponechán 20 minut při laboratorní teplotě. V dalším kroku byl roztok zcentrifugován při 4500xg, teplotě 4°C a době 15 minut.

Z centrifugační zkumavky byl odsát vzniklý supernatant. Pelet, obsahující požadované monoklonální protilátky, byl rozpuštěn v malém množství PBS pufru. Dialýza protilátek byla provedena proti dialyzačnímu pufru. Po 24 hodinách byl dialyzační roztok vyměněn a po dalších 24 hodinách byl odebrán relativně čistý roztok s protilátkami. Tento roztok byl následně uskladněn v -20°C s přídavkem azidu sodného. Koncentrace čisté protilátky byla změřena pomocí absorpčního spektrofotometru při vlnové délce 280 nm.

3.2.1.3. Příprava imunoafinitního gelu

Před navázáním protilátek na afinitní gel, byly tyto protilátky znovu dialyzovány, tentokrát proti MOPS pufru. Poté byly monoklonální protilátky navázány na afinitní gel (Affigel 10 – BIO-RAD). Gel byl nanesen do 6 ml sloupcových kolon a promyt 15 ml H_2O a 15 ml MOPSu. Ke gelu byla přidána protilátka v koncentraci 20 mg IgG/ml gelu. Tato směs byla míchána 4 hodiny při 4°C. K zablokování nespecifických vazebných míst byl použit 1M ethanolamin, který byl přidán v objemové koncentraci 0,1ml/ml gelu. Vzniklý imunoafinitní gel byl přenesen do kolon s fritou a promyt 15 ml destilované H_2O a 15 ml PBS. Imunoafinitní gel byl uschován v PBS pufru s přídavkem azidu sodného při 4°C.

3.2.1.4. Testování kapacity imunoafinitního gelu

Kapacita imunoafinitního gelu byla testována pomocí standardu obsahujícího směs cytokininů (báze). Imunoafinitní gel byl rozdělen po asi 500 μ l gelu na jednu 3 ml plastovou kolonu. Poté byl gel zregenerován přidáním 3 ml PBS, 3 ml destilované H₂O, 3 ml methanolu (MeOH), 3 ml destilované H₂O a 3 ml PBS. Připravený roztok standardu byl v sedmi opakováních nanesen na kolony s imunoafinitním gelem. Následně byly kolony promyty 9 ml destilované H₂O. Eluce byla provedena pomocí 3 ml 100% MeOH. Eluát byl v celém objemu odpařen na dusíkové odparce a uschován v -20°C pro následnou analýzu.

3.2.2. Příprava a testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti kyselině abscisové (ABA) a kyselině Indol-3-(yl)-octové (IAA)

Monoklonální protilátky proti kyselině abscisové a kyselině indol-3-(yl)-octové byly získány a ocharakterizovány ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně. Tyto protilátky byly izolovány z ascitové břišní tekutiny pokusných myší.

Purifikace protilátek proti kyselině abscisové a kyselině indol-3-yl octové i následná příprava imunoafinitního gelu byla pro oba typy protilátek provedena shodně. K čištění obou typů monoklonálních protilátek byl nejdříve použit postup purifikace pomocí proteinu A (*Brichta a Fránek, 2003*). Tento typ purifikace se však pro tyto mAbs ukázal jako neefektivní, proto byly protilátky čištěny pomocí srážecí reakce.

3.2.2.1. Srážecí reakce a dialýza

K 1,5 ml roztoku protilátky proti ABA bylo přidáno 1,5 ml PBS pufru. Za stálého míchání byly opatrně přikapávány 3 ml srážecího činidla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o pH 7,2. Roztok byl za občasného promíchání ponechán 30 minut při laboratorní teplotě. V následném kroku byla provedena centrifugace (15 minut, 4500xg, 4°C).

Supernatant byl poté odpipetován a pelet byl rozpuštěn v malém množství PBS pufru. Dialýza protilátek proběhla proti dialyzačnímu pufru. Po 24 hodinách byl dialyzační pufr vyměněn a po dalších 24 hodinách byl odebrán relativně čistý roztok s protilátkami. Tento roztok byl pro následné použití uskladněn v -20°C s přísadkem azidu sodného. Koncentrace čisté protilátky byla změřena pomocí absorpčního spektrofotometru při vlnové délce 280 nm. Totožný postup byl zopakován také při purifikaci protilátek proti IAA.

3.2.2.2. Příprava imunoafinitního gelu

Následně byly protilátky proti ABA navázány na afinitní gel (Affigel 10 - BIO-RAD). Gel byl nejdříve promyt 15 ml destilované H_2O a 15 ml MOPSu. Ke gelu byla přidána protilátka v koncentraci 20 mg IgG/ml gelu. Tato směs byla míchána 4 hodiny při 4°C. K zablokování nespecifických vazebných míst byl použit 1M ethanolamin, který byl přidán v objemové koncentraci 0,1ml/ml gelu. Vzniklý imunoafinitní gel byl přenesen do kolon s fritou a promyt 15 ml destilované H_2O a 15 ml PBS. Imunoafinitní gel byl uschován v PBS pufru s přísadkem azidu sodného v 4°C. Totožný postup byl použit také při přípravě imunoafinitního gelu s protilátkami proti IAA.

3.2.2.3. Testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti ABA a IAA

Imunoafinitní gel byl nejdříve zregenerován pomocí 3 ml PBS, 3 ml destilované H₂O, 3 ml MeOH, 3 ml destilované H₂O a 3 ml PBS. Následně byly vytvořeny koncentrační řady standardů IAA-Me a ABA-Me.

Takto připravené roztoky byly v sedmi opakováních naneseny na imunoafinitní gel. Poté byl gel promyt 9 ml destilované H₂O. Eluce byla provedena pomocí 3 ml 100% MeOH. Eluáty byly odpařeny v celém objemu na dusíkové odparce a následně uschovány pro analýzu v -20°C.

3.2.3. Multiimunoafinitní chromatografie

Imunoafinitní gely proti jednotlivým rostlinným hormonům byly smíchány v následujícím poměru: 200 µl imunoafinitního gelu s protilátkami proti ABA, 200 µl imunoafinitního gelu s protilátkami proti IAA a 200 µl imunoafinitního gelu s protilátkami proti cytokininům. Byly tedy připraveny tři kolony se směsí imunoafinitních gelů o objemu 600 µl. Kolony byly aktivovány pomocí 3 ml PBS, 3 ml destilované H₂O, 3 ml MeOH, 3 ml destilované H₂O a 3 ml PBS. Kapacita tohoto multiimunoafinitního gelu byla testována pomocí směsi standardů o následujících složeních:

- 1) 5 pmol ABA-Me + 5 pmol IAA-Me + 0,25 pmol směsi cytokininů + 982,5 µl PBS
- 2) 10 pmol ABA-Me + 10 pmol IAA-Me + 0,5 pmol směsi cytokininů + 965 µl PBS
- 3) 50 pmol ABA-Me + 50 pmol IAA-Me + 5 pmol směsi cytokininů + 982,5 µl PBS
- 4) 100 pmol ABA-Me + 100 pmol IAA-Me + 10 pmol směsi cytokininů + 965 µl PBS

Vzorky byly naneseny v sedmi opakováních, po prokapání byl gel promyt 9 ml destilované H₂O. Eluce byla provedena pomocí 3 ml 100% MeOH. Eluáty byly odpařeny v celém objemu na dusíkové odparce a následně uschovány pro analýzu v -20°C.

3.2.4. Testování multiimunoafinitního a imunoafinitních gelů pomocí rostlinného materiálu *Arabidopsis thaliana*

3.2.4.1. Příprava média a kultivačních desek

V prvním kroku bylo připraveno vhodné médium k pěstování semenáčků *Arabidopsis thaliana*. K 3,52 g Murashige and Skoog (MS) média bylo přidáno 8 g sacharózy. Objem byl destilovanou vodou doplněn na 0,8 l. Pomocí 0,1M NaOH bylo upraveno pH na 5,7. V posledním kroku přípravy média bylo přidáno 8 g agaru. Takto připravené médium bylo společně s dalšími pomůckami nezbytnými pro výsev (párátka, pipetovací špičky, filtrační papír, destilovaná voda) vyautoklávováno. Po zchladnutí bylo médium rozlito do 12 kultivačních desek.

3.2.4.2. Sterilizace semen a jejich výsev

K semenům *Arabidopsis thaliana* bylo přidáno 600 µl roztoku 70% ethanolu v TWEENu pro jejich sterilizaci. Semínka se 10 minut protřepávala, poté byl pufr odpipetován. Dále bylo přidáno 300 µl roztoku TRITONu v 70% ethanolu. Takto ošetřená semena byla v předem připraveném a vysterilizovaném flowboxu přenesena na filtrační papír.

Semena *Arabidopsis thaliana* byla za sterilních podmínek vysázena na desky s médiem ve 3 řadách asi po 25 semenech. Desky byly poté uloženy ve tmě a v 4°C na 48 hodin. Poté byly desky přeneseny do kultivační komory (16 hodin světlo/8 hodin tma, 23°C), kde byly uloženy ve vertikální poloze.

Po dvanácti dnech byly narostlé semenáčky rozváženy asi po 25 mg. Tento rostlinný materiál byl uložen do kapalného dusíku a přenesen do hlubokomrazícího boxu (-80°C).

3.2.4.3. Extrakce, SPE purifikace a imunoafinitní chromatografie rostlinného materiálu

K rostlinnému materiálu o hmotnosti 50 ± 4 mg byl přidán 1 ml 60% acetonitrilu a extrakční kuličky. Po promíchání byl rostlinný materiál zhomogenizován na kulovém mlýnku při 27 kmitech za sekundu, po dobu 12 minut. Extrakce rostlinných hormonů probíhala za stálého míchání po dobu 30 minut při 4°C. Ke vzorkům byly následně přidány interní standardy:

- 1) $10 \mu\text{l } 10^{-6} \text{ M d}_6 \text{ ABA}$
- 2) $10 \mu\text{l } 10^{-6} \text{ M d}_5 \text{ IAA}$
- 3) $5 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$ směsi 16 značených cytokininů (báze)

Po přidání interních standardů byly vzorky zcentrifugovány 15 minut, při 15000 rpm a teplotě 4°C. Vzniklý supernatant byl poté purifikován na HLB kolonách.

Kolony byly nejdříve zapojeny do vakuového systému s možností korekce tlaku. Poté byly aktivovány pomocí 3 ml 100% MeOH a 3 ml 60% acetonitrilu. Vzorek byl nanesen, jeho frakce byly po nanesení okamžitě jímány. Kolony byly následně promyty 1 ml 60% acetonitrilu, frakce byly jímány a přidány ke vzorkům. Každý vzorek byl rozdělen na dvě objemově shodné části. Oba objemy byly odpařeny do sucha na dusíkové odparce, jedna z částí byla ještě následně nametylována. Vzorky určené pro metylaci byly nejdříve rozpuštěny ve 100 μl okyseleného MeOH. Následně bylo přidáno 300 μl metylačního činidla diazomethanu, celý objem byl poté odpařen v plném objemu na dusíkové odparce. Před následnou imunoafinitní chromatografií vzorku byly opět oba podíly vzorku spojeny.

Spojené a odpařené vzorky byly rozpuštěny v roztoku 50 µl 100% MeOH + 950 µl PBS. Multiimunoafinitní kolony se směsí gelů s protilátkami proti rostlinným hormonům byly regenerovány pomocí 3 ml PBS, 3 ml destilované H₂O, 3 ml MeOH, 3 ml destilované H₂O a 3 ml PBS. Vzorky byly nanесeny v sedmi opakováních, po prokapání byl gel promyt 9 ml destilované H₂O. Eluce byla provedena pomocí 3 ml 100% MeOH. Eluáty byly odpařeny v celém objemu na dusíkové odparce a následně uschovány pro analýzu v -20°C.

Pomocí rostlinného materiálu pocházejícího z 12 denních semenáčků *Arabidopsis thaliana* byly také testovány jednotlivé imunoafinitní gely s protilátkami proti ABA, IAA a cytokininům. Homogenizace, extrakce a HLB purifikace rostlinného materiálu probíhala shodně jako v případě testování multiimunoafinitního gelu, avšak s rozdílným přidáním interních standardů:

- 1) 10 pmol d₆ABA – pro vzorky určené k testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti ABA
- 2) 10 pmol d₅IAA – pro vzorky určené k testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti IAA
- 3) 0,5 pmol značené cytokininy (báze) – pro vzorky určené k testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti cytokininům

Vzorky určené pro imunopurifikaci pomocí gelu s protilátkami proti ABA a IAA byly z poloviny opět nametylovány. Po imunoafinitní chromatografii byly vzorky odpařeny na dusíkové odparce a ponechány v -20°C pro následnou analýzu.

3.2.5. Analýza vzorků

Všechny eluáty pocházejí z testování imunoafinitních gelů s protilátkami proti ABA, IAA a cytokininům i z testování gelu multiimunoafinitního, byly analyzovány a kvantifikovány pomocí systému UHPLC-MS/MS. Před analýzou byly odpařené vzorky rozpuštěny v 50 µl 10% MeOH. Následně byly vzorky 3 minuty sonifikovány a jemně promíchány. Takto připravené vzorky byly pro analýzu přeneseny do skleněných inzertů a vialek.

Pro chromatografické dělení metylovaných forem IAA a ABA byla použita chromatografická kolona s C18 sorbentem (KINETEX 1,7 μm C18, 50 x 2,1 mm, Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byl použit metanol (A) a redestilovaná voda (B), obojí s přidavkem 0,1% kyseliny octové. Jednotlivé vzorky byly nastříkovány v objemu 10 μl , celkový čas chromatografické separace byl 15 minut. Kolona byla temperována na 30°C. Po gradientové eluci následovala analýza pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Typem ionizace byla ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+). Parametry hmotnostního spektrometru byly nastaveny následovně- teplota zdroje: 150°C, desolvatační teplota: 600°C, průtok desolvatačního plynu (dusík): 1000 l/h, napětí na kapiláře: 1 kV, napětí na štěrbině: 30 V/24 V, průtok kolizního plynu (argon): 0,21 ml/min a kolizní napětí: 16 V/13 V.

Pro chromatografickou separaci isoprenoidních a aromatických cytokininů (báze) byla použita kolona C18 (Aquicity UPLC, BEH C18, 1,7 μm , 2,1 x 50 mm, Waters, USA). Vzorek byl nastříknut v objemu 10 μl a eluován v 8 minutovém lineárním gradientu 90:10 A:B k 50:50 A:B (v)/(v), kde A byl 15 mM mravenčan amonný a B byl methanol. Průtok byl 0,25 ml/min a teplota kolony 40°C. Pro ionizaci analytu byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+). Parametry hmotnostního spektrometru byly nastaveny následovně- teplota zdroje: 100°C, desolvatační teplota: 350°C, průtok desolvatačního plynu (dusík): 550 l/h, napětí na kapiláře: 0,6 kV. Hodnoty kolizní energie se mezi jednotlivými zástupci cytokininů lišily.

Hladiny jednotlivých analytů (ABA, IAA, cytokininy) byly následně pomocí programu MassLynx kvantifikovány, a to porovnáním poměru endogenních hormonů a standardů o známé koncentraci.

4. Výsledky

4.1. Příprava monoklonálních protilátek proti cytokininům

Monoklonální protilátky proti cytokininům byly získány z hybridomů připravených v Laboratoři růstových regulátorů v rámci dřívějších pracovních projektů. Vyprodukované protilátky byly v prvním kroku separovány z kultivačního média pomocí ultrafiltrace. Následně byly protilátky vysráženy pomocí síranu amonného. Po centrifugaci a zpětném rozpuštění v PBS pufru byla směs protilátek podrobena dialýze.

Koncentrace připravených protilátek byla změřena pomocí dvoupraskové spektrofotometrie při vlnové délce 280 nm. Koncentrace protilátek proti cytokininům byla stanovena na 12 mg na 1 ml roztoku.

4.2. Příprava a testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti cytokininům

Monoklonální protilátky proti cytokininům byly navázány na afinitní gel v koncentraci 20 mg protilátky na 1 ml afinitního gelu. Kapacita imunoafinitního gelu byla testována pomocí standardů směsí isoprenoidních a aromatických cytokininů a následně analyzována pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Kapacita imunoafinitního gelu byla stanovena pro *trans* Zeatin, jako zástupce isoprenoidních cytokininů, na $0,6 \pm 0,04$ nmol na 1 ml gelu a pro *meta* topolin ribosid, jako zástupce aromatických cytokininů, na $2 \pm 0,1$ nmol na 1 ml gelu.

4.3. Příprava monoklonálních protilátek proti kyselině abscisové (ABA) a kyselině Indol-3-(yl)-octové (IAA)

Monoklonální protilátky proti kyselině abscisové a kyselině indol-3-(yl)-octové byly izolovány z ascitové břišní tekutiny pokusných myší ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně. Oba typy protilátek byly čištěny pomocí srážecí reakce za použití síranu amonného. Následovala centrifugace a zpětné rozpuštění v PBS pufru. Posledním krokem purifikace monoklonálních protilátek byla jejich dialýza.

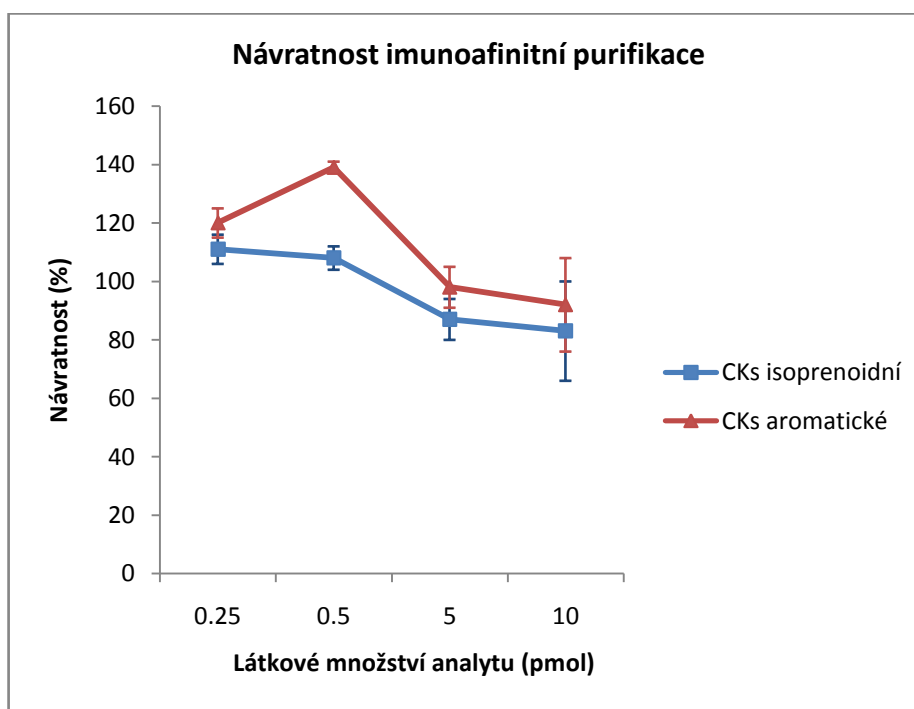
Koncentrace monoklonálních protilátek proti ABA a IAA byla změřena pomocí dvoupaprskové spektrofotometrie při vlnové délce 280 nm. Koncentrace protilátek proti kyselině abscisové byla stanovena na 10,25 mg na 1 ml roztoku, koncentrace protilátek proti kyselině Indol-3-(yl)-octové měla hodnotu 8,3 mg na 1 ml roztoku.

4.4. Příprava a testování imunoafinitního gelu s protilátkami proti kyselině abscisové (ABA) a kyselině Indol-3-(yl)-octové (IAA)

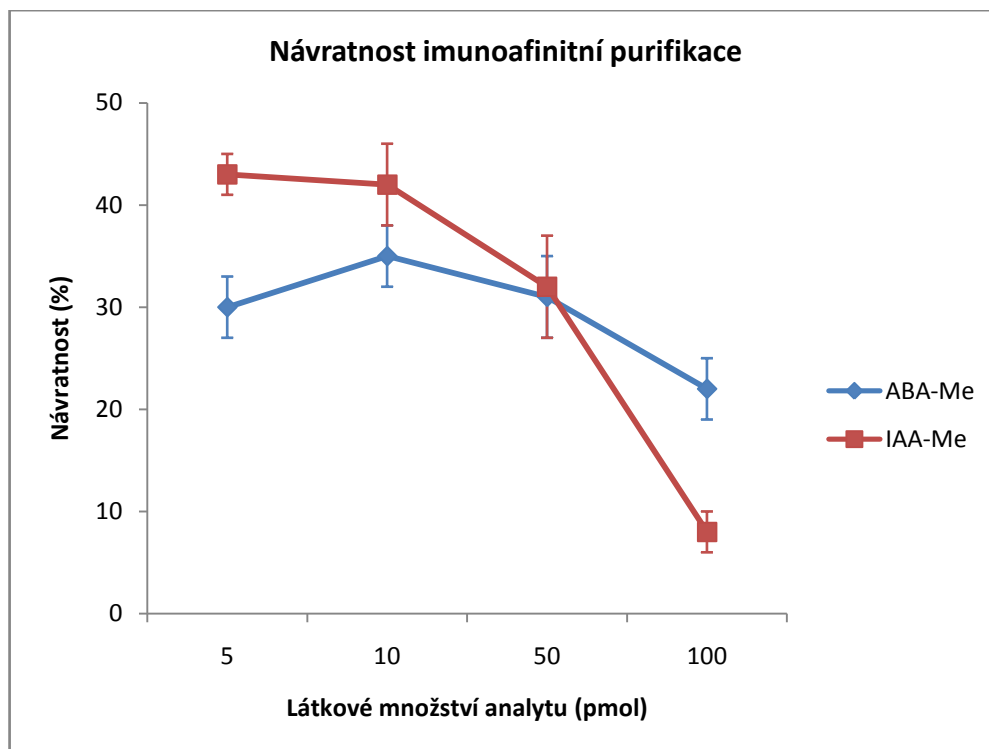
Monoklonální protilátky proti ABA a IAA byly navázány na afinitní gel v koncentraci 20 mg protilátky na 1 ml afinitního gelu. Kapacita obou imunoafinitních gelů byla testována pomocí izotopově značených a neznačených standardů jednotlivých hormonů a následně analyzována pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Kapacita imunoafinitního gelu proti ABA-Me byla stanovena na $2 \pm 0,02$ nmol na 1 ml gelu. Kapacita imunoafinitního gelu proti IAA-Me měla hodnotu $3,3 \pm 0,2$ nmol na 1 ml gelu.

4.5. Příprava multiimunoafinitního gelu a testování jeho kapacity pomocí standardů rostlinných hormonů

Imunoafinitní gely s protilátkami proti ABA, IAA a směsi cytokininů byly smíchány v poměru 1:1:1. Návratnost vzniklého multiimunoafinitního gelu byla testována pomocí směsi značených standardů kyseliny abscisové, kyseliny indol-3-(yl)-octové a směsi cytokininů. Získané vzorky byly analyzovány pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Pro stanovení účinnosti imunoafinitní purifikace byla určena závislost návratnosti imunoafinitní purifikace vzhledem k hladině látkového množství analytu. Návratnost imunoafinitní purifikace pro isoprenoidní a aromatické cytokininy je vyznačena na obrázku č. 7. Návratnost imunoafinitní purifikace pro IAA-Me a ABA-Me je pak na obrázku č.8.



Obrázek č. 7: Závislost návratnosti isoprenoidních a aromatických cytokininů na látkovém množství analytu.



Obrázek č. 8: Závislost návratnosti ABA-Me a IAA-Me na látkovém množství analytu.

4.6. Testování účinnosti multiimunoafinitního gelu pomocí rostlinného materiálu *Arabidopsis thaliana*

Účinnost multiimunoafinitního gelu vzniklého smícháním imunoafinitních gelů s protilátkami proti ABA, IAA a cytokininům byla testována také pomocí rostlinného materiálu pocházejícího z 12 denních semenáčků *Arabidopsis thaliana*. Semenáčky byly zhomogenizovány kulovým mlýnkem a extrahovány pomocí 60% acetonitrilu. Před následnou centrifugací byly přidány značené interní standardy všech tří hormonů. Rostlinný materiál byl purifikován pomocí HLB kolon, polovina vzorků byla před analýzou nametylována. Posledním krokem před následnou analýzou pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) byla imunoafinitní chromatografie vzorků. Hladiny změřených IAA (tabulka č. 2), ABA (tabulka č. 3) a isoprenoidních cytokininů (tabulka č. 4) byly

přepočítány na gram čerstvé váhy (FW). Experiment byl proveden v osmi opakováních.

Číslo vzorku	mg FW	pmol/g FW	pmol/g FW
1	49,3	269,32	410,52 ± 221,06*
2	49,9	359,20	
3	49,0	947,32	
4	48,7	207,26	
5	49,7	496,08	
6	50,1	342,63	
7	49,4	416,06	
8	48,7	246,32	

Tabulka č. 2: Hladina IAA v čerstvém rostlinném materiálu (* průměr ± směrodatná odchylka).

Číslo vzorku	mg FW	pmol/g FW	pmol/g FW
1	49,3	21,72	17,41 ± 9,96*
2	49,9	12,27	
3	49,0	13,62	
4	48,7	8,91	
5	49,7	34,37	
6	50,1	31,71	
7	49,4	10,12	
8	48,7	6,59	

Tabulka č. 3: Hladina ABA v čerstvém rostlinném materiálu (* průměr ± směrodatná odchylka).

Číslo vzorku	mg FW	pmol/g FW	pmol/g FW
1	49,3	102,79	127,07 ± 34,27*
2	49,9	168,20	
3	49,0	124,11	
4	48,7	173,76	
5	49,7	140,73	
6	50,1	144,93	
7	49,4	90,31	
8	48,7	71,69	

Tabulka č. 4: Hladina isoprenoidních cytokininů v čerstvém rostlinném materiálu (* průměr ± směrodatná odchylka).

4.7. Testování účinnosti samostatných imunoafinitních gelů s protilátkami proti ABA, IAA a cytokininům pomocí rostlinného materiálu *Arabidopsis thaliana*

Pro porovnání účinnosti imunopurifikace pomocí multiimunoafinitního gelu a jednotlivých afinitních gelů byly 12-denní semenáčky *Arabidopsis thaliana* využity také k testování jednotlivých imunoafinitních gelů s protilátkami proti ABA, IAA a cytokininům. Procesy homogenizace, extrakce a purifikace byly shodné jako v případě testování multiimunoafinitního gelu, ke vzorkům však nebyly současně přidány všechny tři typy interních standardů, ale každý standard byl přidán pouze k odpovídajícímu vzorku určenému k imunopurifikaci konkrétním gelem. Analýza vzorků proběhla pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Hladiny změřených isoprenoidních cytokininů, IAA a ABA byly přepočítány na gram čerstvé váhy (tabulka č. 5). Testování všech tří gelů proběhlo vždy ve třech opakováních.

Číslo vzorku	mg FW	pmol/g FW	pmol/g FW
1	49,2	84,31	65,60 ± 13,42*
2	48,0	55,31	
3	47,9	58,98	
4	46,3	63,51	75,96 ± 8,80*
5	46,9	82,11	
6	46,3	82,26	
7	48,0	301,31	300,82 ± 1,31*
8	47,4	299,02	
9	48,1	302,12	

Tabulka č. 5: Hladiny ABA (vzorky 1-3), IAA (vzorky 4-6) a isoprenoidních cytokininů (vzorky 7-9) v čerstvém rostlinném materiálu (* průměr ± směrodatná odchylka).

5. Diskuze

Cílem diplomové práce byla příprava a následné testování multiimunoafinitního gelu, obsahujícího monoklonální protilátky proti třem skupinám rostlinných hormonů: kyselině abscisové, kyselině indol-3(yl)-octové a cytokininům. K analýze a kvantifikaci rostlinných hormonů byl použit systém UHPLC-MS/MS. V případě kyseliny abscisové a kyseliny indol-3(yl)-octové byly stanoveny a vyhodnoceny metylované analyty, protože jsou příslušnými protilátky lépe vázány než analyty nemetylované. U aromatických cytokininů se výsledky nevyhodnocovaly z důvodu kontaminace.

K přípravě čistých protilátek, tedy k jejich purifikaci, se používají metody nespecifické (frakční precipitace, izoelektrická fokusace, ultracentrifugace) a metody specifické (imunoafinitní chromatografie, imunoadsorpce). V metodické části této diplomové práce bylo u všech tří typů monoklonálních protilátek použito čištění pomocí frakční precipitace. U protilátek proti kyselině abscisové a indol-3(yl)-octové byla původně použita purifikace pomocí proteinu A. Tento postup je běžně používán při purifikaci některých monoklonálních protilátek, například protilátek proti herbicidu kyselině 2,4-dichlorfenoxyoctové (*Brichta a Fránek, 2003*). V našem případě však byly výtěžky tohoto čištění velmi nízké a proto se jako vhodnější metoda ukázalo čištění pomocí frakční precipitace.

Podle předpokladu vycházejícího z dříve určených charakteristik protilátek, nejvyšší účinnost imunopurifikace dosahoval imunoafinitní gel s protilátkami proti cytokininům, což je vidět především v případě testování samostatného imunoafinitního gelu proti cytokininům. K analýze a kvantifikaci získaných cytokininů byla použita metoda UHPLC-MS/MS. *Novák a kol. (2003)* pomocí metody HPLC-MS analyzovali a kvantifikovali 20 volně se vyskytujících cytokininů. Metoda UHPLC-MS/MS se však v porovnání s výše uvedenou metodou analýzy ukazuje jako výrazně rychlejší, robustnější a je tedy vhodnější k analýze jak aromatických, tak isoprenoidních hormonů.

Z výsledků týkajících se stanovení IAA a ABA v rostlinném materiálu *Arabidopsis thaliana* vyplývají rozdílné hladiny obou hormonů při testování

samostatných imunoafinitních gelů a při testování multiimunoafinitního gelu. V případě hormonu ABA i v případě cytokininů, protilátky smíšeného gelu hůře vážaly analyt než jednotlivé imunoafinitní gely. *Lopéz-Carbonell a Jáuregi (2005)* analyzovali obsah kyseliny abscisové v listech *A. Thaliana* pomocí LC-ESI-MS-MS metody a naměřili hodnoty 12,3 pmol/g FW. K izolaci však použili pouze SPE purifikaci. Jak dokazují naše výsledky (65,6 pmol/gFW ABA), zařazení imunoafinitní chromatografie založené na monoklonálních protilátkách proti ABA vede k výraznému zvýšení citlivosti purifikační metody.

V případě IAA poskytla imunopurifikace pomocí smíšeného gelu ve výsledku vyšší hladinu stanovovaného analytu než za použití samostatného imunoafinitního gelu. Důvodem tohoto neočekávaného výsledku byla pravděpodobně kontaminace vzorku nebo gelu. *Novák a kol. (2012)* stanovili obsah IAA v *A. Thaliana* pomocí SPE purifikace na HLB kolonách bez použití imunoafinitní chromatografie na 300 pmol/g FW, což je výrazně více než v případě experimentu v rámci této diplomové práce ($75,96 \pm 8,80$ pmol/g). I z toho lze usuzovat na možnou kontaminaci imunoafinitního gelu proti IAA v průběhu experimentu.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce byly z kultivačního média a zápalové břišní tekutiny vyizolovány tři typy monoklonálních protilátek, a to proti kyselině abscisové, kyselině indol-3(yl)-octové a cytokininům. Po navázání jednotlivých protilátek na afinitní gel, byly tyto gely smíchány za vzniku multiimunoafinitního gelu, specifického pro všechny tři skupiny hormonů. Jednotlivé typy imunoafinitních gelů i multiimunoafinitní gel byly úspěšně otestovány pomocí standardů rostlinných hormonů a pomocí semenáčků *Arabidopsis thaliana*.

Připravený multiimunoafinitní gel se ukázal jako specifický a lze díky němu izolovat všechny tři třídy rostlinných hormonů (cytokininy, auxiny, kyselina abscisová). Tato metoda může v budoucnu značně urychlit a zjednodušit stanovení těchto hormonů v rostlinném materiálu, především pak v propojení s analýzou pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPL-MS/MS). Výsledky této diplomové práce představují pilotní studii, avšak v budoucnu bude tato metoda dále optimalizována, aby díky ní šlo stanovit i aromatické cytokininy a další metabolity IAA a ABA.

7. Seznam literatury

Bjork I, Petersson B, Sjoquist J (1972), Some physiochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*, European Journal of Biochemistry 29, 579-584.

Bouzige M (2000), PhD thesis, University of Paris VI.

Brichta J, Franek M (2003), Identification of monoclonal antibodies against 2,4-D herbicide by ELISA and DNA sequencing, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6091-6097.

Buc M, Ferencík M (1994), Imunogenetika, Alfa plus, Bratislava, Slovensko.

Eyer L, Franek M (2012), Production of antibodies for immunoanalytical methods, Antibodies application and New Developments, 29-47.

Ferencík M (1989), Imunochémia, Alfa, Bratislava, Slovensko.

Ferencík M, Rovenský J, Shoenfeld Y, Mat'ha V (2004), Imunitní systém, Grada Publishing, a.s., Praha 7, Česká republika.

Hage DS, Phillips TM (2006), Immunoaffinity Chromatography, Handbook of Affinity Chromatography, New York, Taylor and Francis, Chap. 6, 125.

Hauserová E, Swaczynová J, Doležal K, Lenobel R, Popa I, Hajdúch M, Vydra D, Fuksová K, Strnad M (2005), Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins, Journal of Chromatography A 1100, 116-125.

Hennion MC, Pichon V (2003), Immuno-based sample preparation for trace analysis, Journal of Chromatography A 1000, 29-52.

Hjelm H, Sjodahl J, Sjoquist J (1975), Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from *Staphylococcus aureus*, European Journal of Biochemistry 57, 395-403.

Hořejší V, Bartůňková J (2009), Základy imunologie, Triton, Praha 10, Česká republika.

Ibarra N, Caballero A, Gonzales E, Valdes R (1999) Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen, *Journal of Chromatography B* 735, 271-277.

Jackson AJ, Sobansky MR, Hage DS (2012), Principles and Applications of Immunoaffinity Chromatography, *Antibodies Applications and New Developments*, 156-174.

Kamlar M, Uhlík O, Kohout L, Harmatha J, Macek T (2010), Steroidní fytohormony: Funkce, mechanismus účinku a význam, *Chemické listy* 104, 93-99.

Kortt AS, Oddie GW, Iliades P, Gruen LC, Hudson PJ (1997), Nonspecific amine immobilization of ligand can be a potential source of error in BIAcore binding experiments and may reduce binding affinities, *Analytical Biochemistry* 253, 103-111.

Kohler G, Milstein C (1975), Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256, 495-497.

Kowalczyk M, Sandberg G (2001), Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 127, 1845-1853.

Letchworth GJ, Appleton JA (1984), Methods for production of monoclonal antibodies, *Agriculture, Handbook* 630.

Lopéz-Carbonell M, Jáuregi O (2005), A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode, *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 407-411.

Maurer HH, Schmitt CJ, Weber T, Kraemer J (2000), Validated electrospray liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the determination of the mushroom toxins alpha- and beta- amanitin in urine after immunoaffinity extraction, *Journal of Chromatography B* 748, 125-135.

Mok DWS, Mok MC (2001), Cytokinin metabolism and action, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 89-118.

Novák O, Hauserová E, Amakarová P, Doležal K, Strnad M (2008), Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Phytochemistry* 69, 2214-2224.

Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K (2012), Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome, *Plant Journal* 72: 3, 523-536.

Novák O, Tarkowski P, Tarkowská D, Doležal K, Lenobel R, Strnad M (2003), Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 480, 207-218.

Outlaw WH (2003), Integration of cellular and physiological functions of guard cells, *Critical Reviews in Plant Sciences* 22, 503-529.

Pěňčík A, Rolčík J, Novák O, Magnus V, Barták P, Buchtík R, Salopek-Sondi B, Strnad M (2009), Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction, *Talanta* 80, 651-655.

Pfaunmiller E, Moser AC, Hage DS (2012), Biointeraction analysis of immobilized antibodies and related agents by high-performance immunoaffinity Chromatography, *NIH:Methods* 56, 130-135.

Podlešáková K, Tarkowská D, Pěňčík A, Oklešťková J, Turečková V, Floková K, Tarkowski P (2012), Nové trendy v analýze fytohormonů, *Chemické listy* 106, 373-379.

Pohanka M (2009), Monoclonal and polyclonal antibodies-preparation of potent biorecognition element, *Journal of Applied Biomedicine* 7, 115-121.

Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J a kol (2003): *Fyziologie rostlin*, 240–245, Nakladatelství Academia, Praha, ČR.

Rolčík J, Lenobel R, Siglerová V, Strnad M (2002), Isolation of melatonin by immunoaffinity chromatography, *Journal of Chromatography B* 775, 9-15.

Sjoholm I (1975), Protein A from *Staphylococcus aureus*: Spectrometric and spectrophotometric studies, *European Journal of Biochemistry* 51, 55-61.

Scott AM, Allison JP, Wolchok JD (2012), Monoclonal antibodies in cancer therapy, *Cancer immunity* 12, 14.

Svačinová J, Novák O, Plačková L, Lenobel R, Holík J, Strnad M, Doležal K (2012), A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction, *Plant Methods* 17,8(1):17.

Tarkowská D, Novák O, Floková K, Tarkowski P, Turečková V, Grúz J, Rolčík J, Strnad M (2014), Quo vadis plant hormone analysis?, *Planta* 240, 55-76.

Turečková V, Novák O, Strnad M (2009), Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L, leaves by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Talanta* 80, 390-399.

Watanabe E, Yoshimura Y, Yuasa H, Nakazawa H (2001), Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits, *Analytica Chimica Acta* 433, 199-206.

Wood P (2011), *Understanding Immunology*, Third Edition, Pearson Education Limited, England.

Woodward AW, Bartel B (2005), Auxin: Regulation, action, and interactions, *Annals of Botany* 95, 707-735.

Zimmerli B, Dick R (1995), Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data, *Journal of Chromatography B* 666, 85-99.

Zhang S, Wang J, Li D, Huang J, Yang H, Deng A (2010), A novel antibody immobilization and its application in immunoaffinity chromatography, *Talanta* 82, 704-709.

Internetové zdroje:

<http://www.wisegeekhealth.com/what-is-the-difference-between-antigens-and-antibodies.htm>, staženo 8.12. 2014.

<http://www.membrain.cz/ultrafiltrace.html>, staženo 3.2. 2015.