

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Optimalizace použití trypsinu imobilizovaného na magnetických
mikročástečích pro proteomické účely**

Bc. Kateřina Netušilová

Diplomová práce
2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina NETUŠILOVÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Optimalizace použití trypsinu imobilizovaného na magnetických mikročásticích pro proteomické účely**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Proteolýza a její využití v proteomice
 - b) Imobilizace enzymů
 - c) Magnetické mikročástice
 - i. Aplikace v biochemii a biomedicině
 - d) Metody vyhodnocení efektivity štěpení
 - i. Hmotnostní spektrometrie
 - ii. Kapalinová chromatografie
- 2) Praktická část:
 - a) Imobilizace trypsinu na magnetických mikročásticích
 - b) Stanovení aktivity imobilizovaného trypsinu
 - c) Štěpení standardních proteinů imobilizovaným trypsinem
 - d) Kvalitativní a kvantitativní analýza produktů štěpení imobilizovaného trypsinu
 - e) Porovnání efektivity štěpení proteinů imobilizovaným trypsinem a trypsinu v roztoku
 - f) Testování možností zvýšené efektivity štěpení proteinů

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.**
FVZ UO Hradec Králové
Konzultant diplomové práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Kateřina Netušilová

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mojí diplomové práce Mgr. Martinu Hubálkovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a připomínky při vypracování této práce.

Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Ústavu molekulární patologie v Hradci Králové za jejich vstřícnost a ochotu při řešení problémů.

Nakonec bych ráda poděkovala své rodině za jejich trpělivost, pochopení a podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Trypsin štěpí proteiny s vysokou specifikou proteinové řetězce v místech peptidové vazby na C-konci argininu a lysinu. Vznikající peptidy jsou vhodné svojí délkou a svým složením pro analýzu hmotnostní spektrometrií. Z tohoto důvodu je trypsin jedním z nejvyužívanějších proteolytických enzymů v proteomice.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat účinnost štěpení trypsinu imobilizovaného na magnetické mikročástice v porovnání s účinností trypsinu v roztoku. Současně byly hledány optimální podmínky k efektivnímu rozštěpení proteinů s ohledem na reakční dobu.

Trypsin byl imobilizován na magnetické mikročástice a použit pro štěpení vzorků obsahujících standardní proteiny – cytochrom C, α -casein, hovězí sérový albumin a jejich směs. Efektivita štěpení imobilizovaným trypsinem byla sledována v závislosti na různém poměru enzymu a proteinu, různé reakční době a na změnách složení štěpícího pufru.

Výsledky byly porovnávány se štěpením pomocí nevázaného trypsinu. Produkty štěpení byly v obou případech kvantitativně a kvalitativně analyzovány technikami MALDI-TOF a RP-HPLC.

Vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že štěpení imobilizovaným trypsinem v krátkých časových je efektivnější než trypsinem nevázaným. Ovšem např. v případě štěpení hovězího sérového albuminu výsledky svědčí o větší efektivitě štěpení nevázaným trypsinem, a to i v krátkých časových intervalech.

Klíčová slova:

Magnetické mikročástice, imobilizace enzymu, trypsin, proteiny, hmotnostní spektrometrie

SUMMARY

Trypsin cleaves proteins with high specificity at position of C-terminus of Lysine and arginine. Resulting peptides are well suitable for analysis by mass spectrometry in regards of the length and their composition. This is the reason why trypsin is applied very often in proteomics.

The aim of this thesis was to compare the efficiency of trypsin immobilized on magnetic microparticles with standard trypsin in solution. Optimal conditions of digest especially in regards of reaction time were sought. .

Trypsin was immobilized on magnetic microparticles and used for the cleavage of standard proteins – cytochrom C, α -casein, bovine serum albumin and their mixture. Efficiency of the digest of immobilized trypsin was tested in the different protein/enzyme ratio, different reaction time and composition of cleavage buffer.

The results were compared with the outcome of cleavage by trypsin in solution. Cleavage products were qualitatively and quantitatively analysed by MALDI-TOF and RP-HPLC.

In conclusion, we found that cleavage by immobilized trypsin is more effective than onbound enzyme especially in short cleavage period. However, at least in case of bovine serum albumin we found the unbound trypsin superior even for the short cleavage period.

Keywords:

Magnetic microparticles, immobilized enzyme, trypsin, proteins, mass spectrometry

CÍL

Testování účinnosti štěpení trypsinu imobilizovaného na magnetické mikročástice v porovnání s účinností trypsinu v roztoku, a to především s ohledem na reakční dobu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2D	- dvourozměrný gel
ACN	- <u>A</u> cet <u>o</u> n <u>i</u> tril
APCI	- <u>A</u> tmospheric <u>P</u> ressure <u>C</u> hemical <u>I</u> onization - chemická ionizace při atmosférickém tlaku
Arg	- <u>A</u> rginin, aminokyselina
Asn	- <u>A</u> sparagin, aminokyselina
BAPNA	- N- α - <u>b</u> enzoyl-DL- <u>a</u> rginin- <u>p</u> - <u>n</u> itroanilid
BNPS-skatol	- 3-brom-3-methyl-2-[(2-nitrofenyl)merkaptol]-3H-indolu
BSA	- <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin – hovězí sérový albumin
CHCA	- α - <u>C</u> yano-4- <u>h</u> ydroxy <u>c</u> innamic acid - kyselina α -kyan-hydroxyskořicová
Da	- 1 Dalton = jednotka relativní molekulové hmotnosti
DEAE	- <u>D</u> iethyl <u>a</u> minoethyl
DHB	- 2,5- <u>D</u> i <u>h</u> ydroxy <u>b</u> enzoic acid - 2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DNA	- <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
E.C.	- <u>E</u> nzyme <u>C</u> ommission - symbol užívaný pro označení čtyřmístného katalogového čísla enzymů
EDC	- 1- <u>E</u> thyl-3-(3- <u>d</u> imethylaminopropyl) <u>c</u> arbodiimide - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
Er-YAG	- <u>E</u> rbium substituted: <u>Y</u> trium <u>A</u> luminium <u>G</u> arnet, typ laseru
ESI	- <u>E</u> lectrospray <u>I</u> onization - ionizace elektrosprejem
GC	- <u>G</u> as <u>C</u> hromatography - plynová chromatografie
Glu	- kyselina <u>g</u> lutamová, aminokyselina
IEC	- <u>I</u> on <u>E</u> xchange <u>C</u> hromatography - iontově – výměnná chromatografie
Ig	- imunoglobulin
LC	- <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography - kapalinová chromatografie
Lys	- <u>L</u> ysin, aminokyselina
MALDI	- <u>M</u> atrix – <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption / <u>I</u> onization - desorpce / ionizace laserem za účasti matrice
MCP	- <u>M</u> icro <u>c</u> hannel <u>P</u> late - mikrokanálová destička

MM	- magnetické mikročástice
NCS	- <u>N</u> - <u>chloro</u> sukcinimid
Nd-YAG	- <u>N</u> eodymium-doped: <u>Y</u> ttrium <u>A</u> luminium <u>G</u> arnet, typ laseru
Pa	- 1 <u>P</u> ascal = základní jednotka tlaku
pH	- <u>p</u> otential of <u>H</u> ydrogen,
pI	- izoelektrický bod
RP-HPLC	- <u>R</u> eversed <u>P</u> hase - <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography - vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
rpm	- <u>R</u> evolutions <u>P</u> er <u>M</u> inute, otáčky za minutu
SA	- Sinapic Acid, kyselina sinapová
SDS	- <u>S</u> odium Dodecyl <u>S</u> ulphate, dodecylsíran sodný
SEC	- <u>S</u> ize <u>E</u> xclusion <u>C</u> hromatography, - gelová permeační chromatografie
SiMAG	- magnetická mikročástice s křemenného povrchu s karboxylovoufunkční skupinou
S-NHS	- N-hydroxysulfosukciimid sodný
TCEP	- tris-(2-karboxyethyl)fosfin
TFA	- <u>T</u> ri <u>f</u> luoro <u>a</u> cetic Acid, kyselina trifluoroctová
TOF	- <u>T</u> ime- <u>O</u> f- <u>F</u> light, průletový analyzátor

OBSAH

1. ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 Proteiny.....	13
2.1.1 Složení proteinů.....	13
2.1.2 Vlastnosti proteinů.....	13
2.1.2.1 Chemické vazby v proteinech.....	13
2.1.2.2 Denaturace.....	14
2.1.2.3 Izoelektrický bod.....	14
2.1.3 Struktura proteinů.....	15
2.1.4 Klasifikace a význam proteinů.....	16
2.2 Enzymy.....	16
2.2.1 Aktivní centrum.....	17
2.2.2 Složení enzymů.....	17
2.2.3 Názvosloví enzymů.....	17
2.2.4 Specifita enzymů.....	17
2.2.5 Enzymová kinetika.....	18
2.2.5.1 Rovnice Michaelise – Mentenové.....	18
2.2.6 Aktivita enzymů.....	19
2.2.7 Proteolytické enzymy.....	20
2.3 Štěpení proteinů.....	20
2.3.1 Enzymatické štěpení proteinů.....	21
2.3.2 Chemické štěpení proteinů.....	22
2.4 Imobilizace enzymů.....	23
2.4.1 Adsorpční imobilizace.....	24
2.4.2 Kovalentní imobilizace.....	24
2.4.3 Imobilizace iontovou vazbou.....	25
2.5 Magnetické mikročástice.....	26
2.5.1 Syntéza a modifikace povrchu magnetických mikročástic.....	26
2.5.2 Aplikace magnetických mikročástic.....	27
2.6 Proteomická analýza.....	28
2.6.1 Proteomika.....	28

2.6.2 Hmotnostní spektrometrie.....	29
2.6.2.1 Hmotnostní spektrometr.....	29
2.6.2.1.1 Způsoby ionizace.....	30
2.6.2.1.2 Hmotnostní analyzátor.....	32
2.6.2.1.3 Detektory iontů.....	35
2.6.3 Kapalinová chromatografie.....	35
2.6.3.1 Chromatografie obecně.....	35
2.6.3.2 Typy kapalinová chromatografie.....	36
2.6.3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	36
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
3.1 Přístroje a pomůcky.....	39
3.2 Purifikace trypsinu.....	38
3.3 Příprava kalibrační křivky trypsinu.....	40
3.4 Odsolení frakcí trypsinu.....	41
3.5 Imobilizace trypsinu.....	42
3.6 Stanovení aktivity imobilizovaného trypsinu.....	43
3.7 Příprava roztoků standardních proteinů, redukce a alkylace.....	43
3.8 Štěpení standardních proteinů imobilizovaným trypsinem.....	44
3.9. Štěpení standardních proteinů trypsinem v roztoku.....	45
3.10 Analýza naštěpených proteinů pomocí MALDI-TOF.....	46
3.11 Analýza naštěpených proteinů pomocí RP-HPLC.....	48
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50
4.1 Změřené absorbance trypsinu.....	50
4.2 Stanovení aktivity trypsinu imobilizovaného na magnetických mikročástečkách.....	50
4.3 Vyhodnocení analýzy MALDI-TOF.....	52
4.4 Vyhodnocení analýzy RP-HPLC.....	70
5. ZÁVĚR.....	87
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88

1. ÚVOD

Jedním z důležitých kroků proteomické analýzy je štěpení proteinů na peptidy, které jsou vhodné pro separaci a analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Důležitým faktorem pro efektivní štěpení je reakční doba. Standardně se používá v reakční směsi poměr protein/enzym (w/w) 1:30 – 50 a doba štěpení v rozmezí 6 – 18 hodin. Jsou aplikace ve kterých čas hraje důležitou roli. Tuto dobu je možné zkrátit a existuje několik různých studií zabývajících se touto problematikou. Využívají působení infračervených nebo ultrazvukových vln na vzorek, zahřátí roztoku proteinů v mikrovlnné troubě, aplikace mikročipů obsahující imobilizovaným proteolytický enzym apod. V této diplomové práci bylo k urychlení doby štěpení testováno použití imobilizovaného enzymu.

Jedním z nejčastějších enzymů používaných ke štěpení proteinů je endopeptidáza trypsin. V proteomice je využíván pro svojí schopnost hydrolyzovat peptidové vazby obsahující karboxylové skupiny silných bazických aminokyselin (arginin a lysin), které štěpí na jejich C-konci.

Pro tuto práci byly zvoleny pro štěpení standardní proteiny – cytochrom C, α -casein a hovězí sérový albumin a jejich směs. Ke kvantitativnímu a kvalitativnímu vyhodnocení výsledků byly využity analytické metody MALDI-TOF a RP-HPLC.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Proteiny

Název protein pochází z řeckých slov *protes* = první a *ein* = být, tedy prvořadý [1]. Proteiny jsou nejsložitější funkční molekuly v organismu, mají důležitou úlohu ve všech fázích života spojených s chemickou či fyzikální aktivitou. Mezi jejich funkce patří například přenos kyslíku, oxidu uhličitého, vitamínů, katalytické, signální a strukturní role [5].

2.1.1 Složení proteinů

Proteiny jsou tvořeny jednotlivými aminokyselinami, které jsou navzájem spojeny peptidovou vazbou. Řetězí se jich za sebou až několik tisíc, tvoří tak makromolekuly o molární hmotnosti několik milionů.

Všechny proteiny obsahují uhlík, dusík, vodík a kyslík, dále mohou obsahovat i síru a selen. Kromě základních prvků mohou složitější proteiny vázat také železo, jód, měď, stopově i kobalt, zinek, mangan, hořčík a jiné kovy [6].

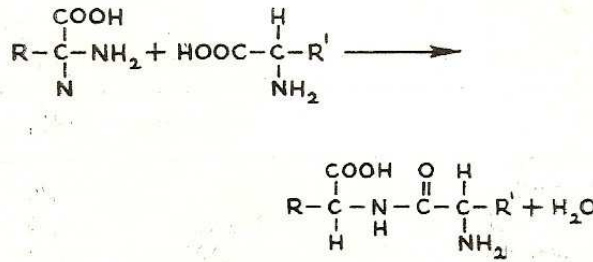
Proteiny získané z biologických materiálů, které mají charakteristické biologické, chemické a fyzikální vlastnosti se nazývají nativní proteiny. Opakem je protein denaturovaný, který tyto původní vlastnosti ztratil.

2.1.2 Vlastnosti proteinů

2.1.2.1 Chemické vazby v proteinech

- peptidová vazba

Vazba vzniká při reakci N-konce jedné s C-koncem druhé aminokyseliny za současného odštěpení vody. Peptidovou vazbu je možné hydrolyzovat varem se silnou kyselinou či zásadou nebo také vlivem proteolytických enzymů [3].



Obr.2.1. Vznik peptidové vazby [10]

- disulfidová vazba

Důležitou vazbou v postranním řetězci aminokyselin jsou disulfidové můstky. Vznikají dehydrogenací mezi dvěma SH-skupinami cysteinů [2]. Vazba je kovalentní, nelze ji rozštěpit kyselou hydrolyzou, ale pouze redukcí [3].

- vazby vodíkových můstků

Tyto vazby udržují konformaci v proteinové molekule. Vyskytují se mezi elektronegativními atomy vodíku a kyslíku [2].

- iontové vazby

Vznikají mezi kyselými a bazickými skupinami vlivem elektrostatické přitažlivosti [3].

2.1.2.2 Denaturace

Složitá prostorová struktura proteinů může být snadno porušena a proteiny pak ztrácejí svoje původní vlastnosti. Vlivem denaturace se snižuje rozpustnost, mění se optická aktivita, ztrácí se biologická aktivita, mění se rozměr proteinu [3]. Denuraci může vyvolat zvýšená teplota, působení ultrazvuku, změna pH, organická rozpouštědla, chemikálie jako dodecylsulfát sodný nebo močovina a guanidin. Při denuraci jsou porušeny všechny úrovně proteinové struktury kromě primární [6]. Za určitých podmínek může být denaturace dějem reverzním, většinou je ale nevratná.

2.1.2.3 Izoelektrický bod

Izoelektrický bod je charakteristická vlastnost proteinů, je dána funkčními skupinami se záporným i kladným nábojem uvnitř proteinů. Proto se chovají jako ionty a putují v elektrickém poli. Náboj proteinů je závislý především na hodnotě pH [1]. Dosáhne-li protein neutrálního náboje mluvíme o izoelektrickém

bodě pl. Tato vlastnost se využívá při dělení proteinů pomocí izoelektrické fokuse.

2.1.3 Struktura proteinů

Proteiny mají složitou strukturu, která má čtyři úrovně:

- primární struktura

Primární struktura proteinového řetězce je dána pořadím aminokyselin, zahrnuje také polohu disulfidových vazeb .

- sekundární struktura

Sekundární struktura proteinů popisuje uspořádání řetězce aminokyselin v prostoru. Struktura závisí na tvorbě vodíkových můstků mezi skupinami CO-NH a ostatních nekovalentních vazeb. Tak se makromolekuly stabilizují a vytvářejí prostorová uspořádání [6].

- α – šroubovice: je nejstabilnější struktura polypeptidového řetězce s nejnižší energií. Vyskytuje se často u globulárních proteinů a svojí konformaci zaujímá spontánně [5].
- skládaný list: zde jsou vodíkové můstky mezi dvěma řetězci peptidů umístěny paralelně i antiparalelně .

Sekundární struktury někdy tvoří i supersekundární motiv složením dohromady α a β struktury. Výsledkem je β -meander, klíč nebo β - α - β struktura [1].

- terciární struktura

Tato struktura je prostorovým uspořádáním sekundární struktury. Je tvořena hlavně interakcemi mezi postranními řetězci aminokyselin. Terciární struktura je schopna vytvořit domény, které představují v molekule biologicky aktivní místo, jako je například Ig-doména [6].

- kvarterní struktura

Struktura vzniká spojením několika peptidových řetězců tzv. podjednotek. Ty mohou být stejné nebo funkčně i strukturálně odlišné. Podjednotky nejsou navzájem spojené peptidovými vazbami. Uplatňují se zde především disulfidické, vodíkové můstky a iontové vazby [2].

2.1.4 Klasifikace a význam proteinů

Existuje mnoho způsobů rozdělení proteinů:

- podle tvaru: globulární, fibrilární
- podle rozpustnosti
- podle složení: jednoduché, složené
- podle výskytu

Vzhledem k velké rozmanitosti a specifitě plní proteiny mnoho funkcí

[6, 7]:

- enzymy a inhibitory enzymů
- složky výživy
- transport a ukládání látek
- pohyb
- podpůrné funkce
- obrana proti infekci
- hemokoagulace a fibrinolýza
- transformace energie
- regulační funkce
- vznik a přenos nervového signálu
- kontrola růstu a diferenciací
- udržení osmotického tlaku
- speciální funkce: například ochrana před volnými radikály

2.2 Enzymy

Enzymy jsou proteiny biologického původu syntetizované všemi organismy se specifickou funkcí. V živých systémech slouží jako biokatalyzátory, které regulují rychlost chemických reakcí a tím ovlivňují fyziologické procesy organismu. Pro průběh reakce je důležitá přítomnost substrátu, který musí přijít do kontaktu s enzymem. Molekuly účastníci se reakce musí mít vyhovující orientaci a dostatečnou aktivační energii [8]. Část molekuly, která je nezbytná pro zahájení reakcí, se nazývá aktivní centrum enzymu.

2.2.1 Aktivní centrum

Aktivní centrum obsahuje jednu nebo několik funkčních skupin, které jsou přizpůsobeny k reakci se substrátem. V některých případech může mít makromolekula i několik aktivních center na sobě nezávisle působících [1].

V aktivních centrech lze rozlišit dvě části. Zaprvé vazebné místo, ve kterém jsou v přímém kontaktu se substrátem aminokyselinové zbytky. A zadruhé katalytické místo, které obsahuje skupiny přímo se účastnící katalýzy.

2.2.2 Složení enzymů

Molekula enzymu je často složená, kromě bílkovinné části obsahují i část nebílkovinnou. Nebílkovinná součást enzymu, organická molekula, je nazývána koenzymem. Je-li koenzym pevně vázán kovalentní vazbou na bílkoviny, mluví se o prostetické skupině. Bílkovinná část je nazývána apoenzym [6].

2.2.3 Názvosloví enzymů

Názvy enzymů jsou trojího typu. Zaprvé je to historické nebo též triviální pojmenování enzymů, jako je trypsin či pepsin. Zadruhé jsou to obecné názvy, které obvykle obsahují jméno substrátu či typ reakce a koncovku -asa: kreatinkináza, amylasa. Posledním typem je vědecký název, který definuje přesně substrát i produkt, typ přeměny či potřebný koenzym. Podle Mezinárodní biochemické unie má každý enzym po zkratce E.C. (Enzyme Commission) čtyřmístný kód, kde první číslo zařazuje enzym do jedné ze tříd: oxydoreduktázy, transfezázy, hydroxylázy, lyázy, ligázy a izomerázy [6, 7].

2.2.4 Specifita enzymů

Specifita je nejvýznamnější vlastností enzymů. Je to schopnost katalyzovat jednu specifickou reakci a žádnou jinou [5], tedy působí na určitou látku a katalyzuje její určitou přeměnu [3]. Enzymy působí pouze na specifickou chemickou skupinu, např. pepsin a trypsin na peptidové vazby, glykosidázy na glykosidy, esterázy na estery. Proteiny katalyzují též hydrolyzu esterů, peptidů nebo polysacharidů. Například ureáza, která působí jen na močovinu a nikoliv na její deriváty [1]. Naopak např. chymotrypsin hydrolyzuje peptidové vazby, ve kterých karboxylová skupina patří aromatické aminokyselině [5].

Specifita se dá dělit do několika tříd:

- specifita účinku

Specifita účinku závisí na přítomném koenzymu. Daný enzym katalyzuje pouze jednu přeměnu substrátu ze všech možných přeměn [1].

- specifita substrátová

Enzymy mohou přeměňovat jen jeden nebo skupinu substrátů, které se mohou lišit K_m (Michaelisova konstanta) [6]. Zvláštními typem této specifity jsou stereospecifita. Může se týkat jen části nebo celé molekuly, např. enantiomery [5]. Např. maltáza může katalyzovat hydrolýzu α -glykosidů nikoliv však β -glykosidů [10].

2.2.5 Enzymová kinetika

Enzymová kinetika popisuje reakční rychlosti. Enzymy, obecně jako katalyzátory, urychlují specificky určené reakce. Do reakce vstupují v nepatrném množství, v porovnání s množstvím substrátu, které katalyzují přeměnu na produkty. Reakční rychlost je definována jako přeměna určitého množství látky za časovou jednotku [2].

2.2.5.1 Rovnice Michaelise – Mentenové

Koncentrace substrátu, při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti, se nazývá hodnota K_m nebo-li Michaelisova konstanta. K_m má rozměr molární koncentrace mol/l. Experimentálně se vynáší do grafu jako závislost V_i na $[S]$, kde $[S]$ je koncentrace substrátu a V_i je počáteční rychlost.

K_m je taková koncentrace substrátu, při níž probíhá enzymová reakce rychlostí rovnající se polovině maximální možné rychlosti (V_{max}). Čím je K_m menší, tím je substrát rychleji přeměňován. Katalyzuje-li jeden enzym přeměnu více různých substrátů, je substrát s nejmenší hodnotou K_m obvykle považován za hlavní [7].

Rovnice Michaelise - Mentenové popisuje chování enzymů při změně koncentrace substrátu [5].

V_i – počáteční rychlost

K_m – Michaelisova konstanta

$[S]$ – koncentrace substrátu

V_{max} – maximální rychlost

$$V_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Z rovnice také vyplývá, že reakční rychlost je přímo úměrná koncentraci enzymu [4].

2.2.6 Aktivita enzymů

Aktivita enzymů, neboli rychlost reakce přeměny substrátu na produkt, je závislá na mnoha faktorech.

- teplota

S rostoucí teplotou se rychlost enzymově katalyzovaných reakcí obvykle zvyšuje. Existuje tzv. teplotní optimum. Po jeho dosažení rychlost reakce klesá. Vzhledem k tomu, že enzymy jsou bílkoviny, tak při vyšších teplotách denaturují a ztrácejí svojí katalytickou rychlost [1].

- pH

Hodnota pH silně ovlivňuje aktivitu enzymů. Většina z nich působí katalyticky pouze v určité oblasti pH. Na pH závisí jak ionizace funkčních skupin aktivačního centra, tak jeho okolí [7]. pH optimum většiny enzymů je 7 – 8, ale existují výjimky.

- aktivátory

Aktivátory jsou látky, které umožňují či urychlují enzymovou reakci. Často to jsou ionty dvojmocných kovů, ale i enzymy bránící před inaktivací metaloproteiny [7].

- inhibitory

Inhibitory jsou látky, které zpomalují či zastavují enzymovou reakci, aniž by jej denaturovaly. Zjednodušeně se dají rozdělit na inhibitory kompetitivní a nekompetitivní.

Kompetitivní inhibitory jsou svojí strukturou podobný substrátu. Váží se na aktivní centrum místo substrátu, tedy soutěží o vazebné místa a tím zpomalují další průběh reakce. Účinek inhibitoru je závislý na poměru koncentrace inhibitor/substrát v reakční směsi. Tato inhibice je reverzibilní.

Inhibice nekompetitivní je založena na úplné odlišnosti substrátu a inhibitoru. Inhibitor se váže irreverzibilně mimo aktivní centrum a tím mění strukturu enzymu [7, 8].

- koncentrace substrátu

Při změně koncentrace substrátu v reakci se mění také rychlost reakce. Při zvyšování koncentrace substrátu a koncentrace ostatních složek reakce počáteční rychlost V_i roste k maximální rychlosti V_{max} . Po dosažení „nasyčenosti“ enzymu se počáteční rychlost již nezvyšuje [5].

2.2.7 Proteolytické enzymy

Proteinazy patří mezi hydrolytické enzymy. Při jejich reakci musí být v reakčním prostředí voda. Hydrolyzují peptidové vazby a uvolňují tak peptidy, které mohou být dále štěpeny peptidázami.

Peptidázy jsou podskupinou proteináz. Peptidázy vyžadují pro možnost štěpení přítomnost volných konců substrátu, zatímco proteinázy nikoliv [14].

- dělení peptidázy

- exo-peptidázy

Jsou charakteristické tím, že peptidový řetězec štěpí od C nebo N konce a odštěpují koncovou aminokyselinu. Podle toho se dělí na aminopeptidázy a karboxypeptidázy [2].

- endo-peptidázy

Tyto enzymy štěpí převážně bílkoviny či polypeptidy uprostřed, C-N konce nenapadají. Patří sem např. trypsin, pepsin a chymotrypsin [2].

- specifita peptidáz

Peptidázy nejsou přesně specifické k bílkovině, ale ke struktuře řetězce. Tyto enzymy štěpí všechny bílkoviny v denaturovaném stavu snáze než ve stavu nativním. Peptidový řetězec štěpí jen na určitých místech, před či za určitým aminokyselinovým zbytkem [2].

2.3 Štěpení proteinů

Pro identifikaci proteinů, např. pomocí hmotnostní spektrometrie, je důležité jejich rozštěpení na peptidy. Štěpení lze provést dvěma způsoby, a to buď enzymaticky, nebo chemicky [11].

2.3.1 Enzymatické štěpení proteinů

Enzymy se pro štěpení proteinů využívají především pro jejich vysokou specifitu [12]. Další z výhod je minimální množství vedlejších reakcí a dobrá účinnost štěpení. Ovšem pro splnění těchto výhod je důležité optimální složení reakčního pufru. Důraz je kladen především na pH, teplotu, dobu inkubace [11] a poměru enzym/substrát. Při vysoké koncentraci enzymů může dojít k autoproteolýze, což je jev nežádoucí [13].

Pro získání peptidů se používají proteolytické enzymy, hlavně endoproteinázy [11].

- trypsin

Trypsin je vylučován pankreatem ve formě neaktivního proenzymu nazývaného trypsinogen. Jeho aktivace je uskutečněna až ve střevě pomocí enteropeptidázy [9]. Trypsinogen může být aktivován také samotným trypsinem autokatalyticky. Při aktivaci vzniká trypsin a hexapeptid [3].

Tento enzym je v proteomice jedním z nejpoužívanějších [12]. Pro štěpení se používá izolovaný z hovězího nebo vepřového pankreatu. Ve své krystalické podobě má molekulovou hmotnost 24000 Da, optimální aktivitu má při pH 7 – 9, tedy ve slabě alkalickém prostředí [4].

Trypsin jako endopeptidáza specificky hydrolyzuje peptidové vazby, které obsahují karboxylovou skupinu silných bazických aminokyselin. Štěpí tedy za argininem a lysinem. Řetězec neštěpí pouze v případě, že se za lysinem nebo argininem nachází prolin [11].

Během štěpení toleruje malé množství močoviny, propanolu nebo acetonitrilu. Naopak je inhibován SDS (dodecylsírán sodný) a hydrochloridem guanidinu [11].

Štěpení určitého proteinu probíhá nejčastěji při 37°C a při pH 7 – 9 po dobu několika hodin [14].

- chymotrypsin

Chymotrypsin je získáván z hovězího pankreatu [4]. Specificky hydrolyzuje vazby od C-konce za tryptofanem, tyrosinem, methioninem, leucinem a fenylalaninem. Jestliže se za některou z těchto aminokyselin nachází prolin, ke štěpení nedochází [12]. Optimální pH je mezi 7,5 – 8,5 [14].

- pepsin

Pepsin je vylučován žaludečními šťávami obratlovců [14]. Specificky štěpí vazbu za aromatickými aminokyselinami, leucinem a methioninem [4]. Enzym je aktivní při nízkém pH [11].

- další běžně používané proteolytické enzymy

- endoproteináza Glu-C (V8-DE)
- endoproteináza Lys-C
- endoproteináza Arg-C
- endoproteináza Asn-C
- elastáza
- subtilisin
- thermolysin [11, 12, 14]
- papain
- lysin specifická proteinasa z *Lysobacter enzymogenes*
- Staphylococcae proteinasa – strain V8 [12]

2.3.2 Chemické štěpení proteinů

Pomocí chemických činidel jsou štěpeny především ve vodě nerozpustné a membránové proteiny [14]. Tato metoda štěpení proteinů je využívána především jako doplňková.

- bromkyan – CNBr

Bromkyan specificky působí na methioninové zbytky na C-konci [14]. Ty jsou přeměněny na směs homocysteinů a homocysteinových laktonů [11]. Před zahájením reakce je nutné modifikovat cysteinové zbytky pomocí kyseliny jodisté. Methionin se v polypeptidech vyskytuje vzácně, proto štěpením CNBr vznikají fragmenty požadované délky [5].

Tato látka patří mezi nejužívanější chemická činidla i přesto, že je extrémně toxická.

- hydroxylamin

Štěpí vazbu, která se vyskytuje v polypeptidech velmi vzácně, vazbu mezi asparginem a glutaminem. Výtěžek štěpení není kvantitativní [5].

- N-chlorosukcinimid - NCS

NCS štěpí od C-konce tryptofanové zbytky. Může reagovat také s oxidovaným methioninem nebo s tyrosinovým zbytkem [11].

- BNPS-skatol, D-iodosobenzen

Využívá se pro štěpení tryptofanových vazeb [5, 11].

- mírně kyselá hydrolyza

Hydrolyza proteinů probíhá v prostředí zředěné kyseliny mravenčí [14]. Kyselina hydrolyzuje v místě zbytku kyseliny aspargové [5].

2.4 Imobilizace enzymů

V experimentální praxi se běžně používají enzymy v roztoku. Toto použití má ovšem vedle bezpočetných výhod i svá omezení, mezi které patří jednorázová aplikace či nízká stabilita rozpustného enzymu. Jedním z řešení těchto nevýhod je imobilizace enzymů.

Imobilizace je proces, při kterém je rozpustný enzym převeden na nerozpustnou nebo oddělenou formu tím, že jeho mobilita je snížena chemickými nebo fyzikálními prostředky. Mezi imobilizované enzymy nelze zařadit ty, které jsou fyziologicky navázány na buněčné struktury či membrány. Imobilizace musí být provedena zásahem lidského faktoru [8].

Enzym se často váže na sklo, membrány, polymery, gel, křemičitan nebo na porézní monolitický materiál. Imobilizací se zvyšuje stabilita enzymu. Odpadá také náročná izolace produktu od enzymu z reakční směsi. Takto upravený enzym je možné použít i opakovaně [18]. Z této charakteristiky vyplývá samotná definice imobilizovaného enzymu: Enzymy, které jsou fyzikálně uzavřeny v omezené oblasti za zachování jejich enzymové aktivity, mohou být použity opakovaně a kontinuálně [4].

Mezi dvě základní metody imobilizace patří fyzikální adsorpce a kovalentní vazba [15], využívá se i metoda iontové vazby.

2.4.1 Adsorpční imobilizace

Fyzikální adsorpce enzymu na nerozpustný nosič spočívá v nespecifické fyzikální interakci mezi enzymem a povrchem nosiče. K interakcím dochází po smíchání mobilní kapalně fáze na tuhou stacionární fázi.

Je to nejjednodušší způsob imobilizace. Vyžaduje pouze smíchání katalyzátoru s nosičem, zpravidla bez potřeby reakčních činidel. Vazebné síly při adsorpci zahrnují především vodíkové můstky, van der Waalsovy, iontové a biospecifické síly [15] a hydrofobní interakce [8].

Jako nosič se nejčastěji používají tuhé materiály, jako jsou aktivní uhlí, oxid hlinitý, celulóza, kaolin, silikagel, kolodium, fosforečnan vápenatý [4], sklo, křemičitany, ionexové pryskyřice, bentonit [8], kolagen [16] a hydroxyapatit [17].

Adsorpce je nejstarší metoda imobilizace, která má ale své nevýhody. Dochází zde ke značnému uvolňování z vazby v závislosti na změně teploty, pH, iontové síly, koncentrace substrátu a použitém rozpouštědle [8, 16].

2.4.2 Kovalentní imobilizace

Při této metodě dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi enzymem a nerozpustným nosičem. Pro volbu způsobu chemické modifikace je důležité znát informace o reaktivitě, frekvenci výskytu, přístupnost aminokyselinových zbytků, o vlivu chemické modifikace proteinů na jejich biologickou aktivitu. Používají se chemická činidla, která neovlivní aktivní místa enzymu [15].

Ke kovalentní vazbě v molekulách proteinů se využívají tyto funkční skupiny: α , ϵ -aminokyselinového řetězce lysinu a argininu, α , β , ϵ -karboxylové skupiny, fenylový kruh tyrosinu, imidazolový kruh histidinu, thiolová skupina cysteinu či hydroxylové skupiny serinu a threoninu.

Nosič nese funkční skupiny, které jsou aktivovány glutaraldehydem, a enzym se na ně váže přes aminoskupinu [4, 8, 17].

Způsoby imobilizace využívající kovalentní vazbu:

- zesíťení

Imobilizované enzymy je možné získat zesíťením molekul proteinů s jinými proteinovými molekulami nebo s funkčními skupinami nerozpustné matrice nosiče. Vytváří se zde intermolekulární vazby mezi funkčními skupinami aminokyselinových zbytků proteinu a bi - nebo polyfunkčním zesíťovacím činidlem. Jako bifunkční činidlo se využívá například glutaraldehyd, jako činidlo

polyfunkční, které má dvě různé funkční skupiny nebo skupiny o různé reaktivitě, se využívá například izokyanát. Touto metodou vznikají nerozpustné produkty [4, 15].

Výhodou je jednoduchost metody a stabilita daná kovalentní vazbou. Mezi nevýhody se řadí vysoká citlivost enzymů k používaným činidlům, která může způsobit jejich inaktivaci [8].

- zabudování enzymů do gelu

Enzymy jsou imobilizovány zachycením ve struktuře polymerovaných gelů. Těmito gely volně difundují nízkomolekulární substráty a reakční produkty. Narozdíl od vysokomolekulárních enzymů, které jimi neprojdou. Enzym je usazený do nerozpustné matrice, kterou může být polyakrylamid alginát, karrageenan, agarosa či želatina [4, 15].

- zabudování enzymů do membrán

Enzym je uzavřen do fyzikálně odděleného prostředí ze semipermeabilní membrány. Používají se dutá semipermeabilní vlákna či ultrafiltrační membrány, které jsou propustné pro reaktanty a produkty, ale nikoliv pro samotný enzym. Výhodou této imobilizace je, že enzym zůstává v nativním stavu. Je snadné ho také uvolnit z vazby a nahradit ho jiným enzymem [8, 15].

- imobilizace na magnetické nosiče

Magnetické nosiče jsou polymerní částice obsahující magnetické oxidy železa [32] a silanizovaný magnetovec. Imobilizace je podobná jako v předcházejících případech u nemagnetických nosičů. Výhodou je možnost práce v suspenzích, ze kterých lze po skončení enzymové reakce odstranit imobilizovaný enzym pomocí magnetického separátoru. Ostatní složky musí být diamagnetické [23, 24].

2.4.3 Imobilizace iontovou vazbou

Iontová vazba je podmíněna elektrostatickou přitažlivostí opačně nabitých skupin enzymu a nosiče. Nejčastěji se jako nosič používají komerční iontoměniče jako DEAE-celulosa (diethylaminoethyl) a DEAE-Sephadex. Negativně nabitě skupiny se navazují na anex, pro kladně nabitě skupiny se využívá katex.

Výhodou je snadné navázání enzymu na nosič a šetrné podmínky k tomu používané [8, 17].

2.5 Magnetické mikročástice

Magnetické mikročástice byly do biotechnologie a biologických věd zavedeny v 70. letech 20. století pro svojí širokou možnost využití [23, 24].

2.5.1 Syntéza a modifikace povrchu magnetických mikročástic

Částice jsou vyráběny z nejrůznějších materiálů, mají různou velikost a modifikaci povrchu, na kterém může být navázána funkční skupina nebo ligand.

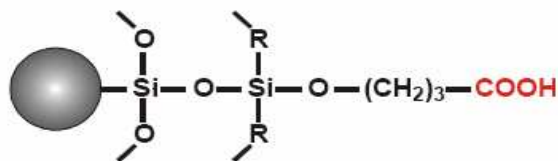
Magnetické mikročástice jsou tvořeny z magnetického jádra a obalu. Pro syntézu jádra se používají především oxidy železa Fe_2O_3 a Fe_3O_4 [22], čisté kovy jako železo a kobalt, sloučeniny obsahující železo, např. MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 , NiFe_2O_4 a CoFe_2O_4 , používají se také CoPt_3 , FePt [19] a FeAu [30].

Obal magnetického jádra je často tvořen přírodním polymerem jako jsou uhlovodíky nebo proteiny. Přírodní polymery se využívají především pro svoji biokompatibilitu, a proto jsou vhodné pro mikročástice aplikované v biomedicině. Jinými možnostmi jsou syntetické polymery, křemen, uhlík nebo vzácné kovy jako např. zlato [19, 30].

Vhodnými funkčními skupinami na povrchu mikročástic jsou amino ($-\text{NH}_2$) a karboxy ($-\text{COOH}$) skupiny. Tyto skupiny povolují specifické navázání ligandů pro zachycení cílových molekul [23].

Velikost mikročástic se zpravidla pohybuje od 10 do 300 nm. Záleží především na použití a výrobci mikročástic.

Mikročástice mohou mít vlastnost superparamagnetickou nebo ferromagnetickou. Je-li mikročástice superparamagnetická, znamená to, že v nulovém magnetickém poli je nemagnetická. S působením magnetického pole její magnetizace stoupá a po odstranění pole opět klesá k nule. Naopak látky ferromagnetické mají permanentní magnetický moment [18, 20].



Obr. 2.2. Magnetická mikročástice s křemenného povrchu s karboxylovou funkční skupinou [21]

Magnetické mikročástice je možné také získat z magnetotaktických bakterií. Jsou to gram-negativní prokaryota, které mají schopnost syntetizovat na intracelulární membráně sférické krystaly. Částice mohou mít různé tvary a složení. Nejčastěji jsou tvořené z Fe_3O_4 a Fe_3S_4 . Jejich velikost se pohybuje okolo 50 – 100 nm. Příkladem bakterie syntetizující tyto mikročástice může být např. *Magnetospirillum gryphiswaldense* [31].

2.5.2 Aplikace magnetických mikročástic

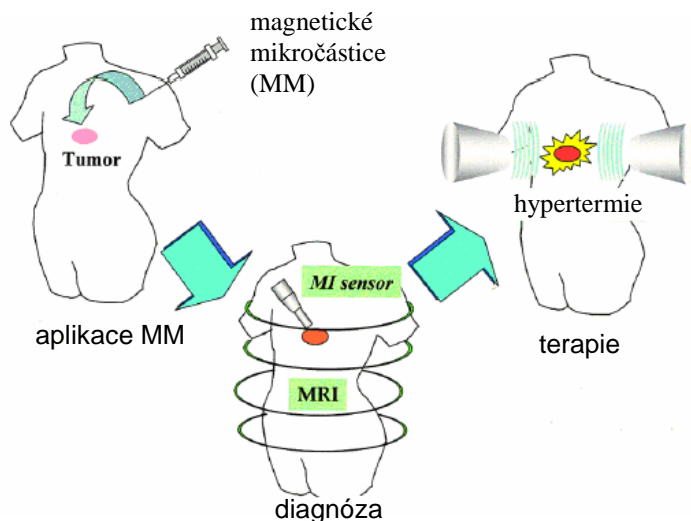
Magnetické mikročástice jsou stále ve větší míře aplikovány v biotechnologii a medicíně. Hlavní předností mikročástic je jejich rychlá separace z reakční směsi pomocí magnetického pole [23, 24]., vysoká vazebná kapacita, koloidní stabilita [25] rychlé obnovení disperze po ukončení aplikace magnetického pole [27]. Pro využití v medicíně je důležitou vlastností jejich netoxičita, biokompatibilita, možnost vnesení do organismu injekční stříkačkou a snadné ukládání v cílových tkáních a orgánech v dostatečném množství.

- zobrazení magnetickou rezonancí

Magnetická rezonance je zobrazovací technika jejíž podstatou je kontrastní odlišení mezi tkáněmi. Pro zvýšení kontrastu se využívají kontrastní látky jako paramagnetické chelátové ionty a v současné době také mikročástice o různých velikostech (10 – 500 nm) [26, 28, 29].

- hypertermie

Tato metoda se používá pro ničení nebo poškozování rakovinných buněk. Teplo je dodáváno v určitém množství po určitou časovou periodu. K těmto účelům je využívána např. horká voda, její nevýhodou ale je nemožnost aplikace přímo k diagnostikovanému nádoru. Použitím magnetických mikročástic tato nevýhoda mizí. Částice jsou aplikovány do cíleného místa a pomocí magnetického pole je lokálně zvyšována teplota mezi 42,5 – 44°C [26, 28, 29].



Obr. 2.3. Aplikace hypertermie [28]

- přenos léků

Na povrch magnetických mikročásteček je možné navázat molekuly terapeutických léčiv. Takto modifikované mikročástečky mohou být pomocí gradientu magnetického pole zavedeny na cílové místo. Tímto způsobem je možné do těla zavádět např. chemoterapeutické látky [22, 26, 29] či při infarktu myokardu látku rozpouštějící vzniklou sraženinu v srdeční cévě [32].

- další možná využití

Aplikace v molekulární biologii, buněčná separace [23], imunoeseje [29], extrakce DNA či purifikace nukleových kyselin [25].

2.6 Proteomická analýza

2.6.1 Proteomika

Proteomika je vědní obor zabývající se studiem proteinů především pomocí biochemických metod [38]. Nalezené proteiny v buňkách, tkáních nebo organismech identifikuje a kvantifikuje, charakterizuje jejich strukturu, funkci [44] a vlastnosti [41]. Objasňuje postranslační modifikace [28], fyziologické a patologické cesty proteinů [40].

Na významu začala proteomika nabývat již v 70. letech 20. století, kdy byly vytvořeny první databáze proteinů a vyvinuta technika 2D elektroforéza. V 90. letech 20. století bylo objeveno biologické využití analytické metody

hmotnostní spektrometrie, která odstranila velkou část limitujících podmínek v analýze proteinů [38, 40].

2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická separační metoda [45], při které dochází k destrukci analyzované látky. Pomocí této metody je možné měřit relativní molekulové hmotnosti látek a jejich fragmentů. Tyto látky je třeba nejprve ionizovat a převést je tak na kladně nebo záporně nabitě ionty. Vytvořené nabitě částice jsou následně děleny podle efektivní molekulové hmotnosti m/z , kde m je hmotnost a z náboj iontu [35].

Základními kroky techniky jsou odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontu do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem a detekce iontů [34].

Výsledkem analýzy látky je záznam, nazývaný hmotnostní spektrum. Označuje se tak závislost relativní intenzity iontového proudu na ose y a efektivní hmotnost iontů na ose x [35].

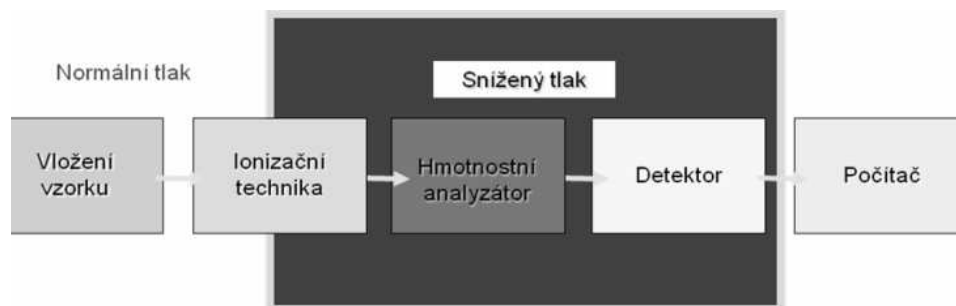
Hmotnostní spektrometr je využíván ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze. Napomáhá při identifikaci, určení struktury a relativní molekulové hmotnosti organických látek. Výhodou metody je její vysoká citlivost. Identifikace látek je možná v 10^{-9} g a méně, detekovatelnost od 10^{-15} g [35].

2.6.2.1 Hmotnostní spektrometr

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou:

- iontový zdroj – dochází zde k ionizaci molekul a jejich urychlení
- analyzátor – zde jsou ionty v plynném skupenství separovány podle jejich efektivní hmotnosti
- detektor – registruje separované ionty [42]

V celém zařízení je pomocí vakuové pumpy dosaženo nízkého pracovního tlaku $10^{-6} - 10^{-3}$ Pa. Tím je zabráněno vzájemným kolizím částic v plynné fázi [33].



Obr. 2.4. Základní části hmotnostního spektrometru [45]

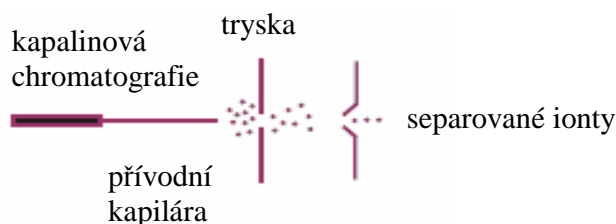
2.6.2.1.1 Způsoby ionizace

- ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization - ESI)

Ionizace elektrosprejem je zařazována do měkkých ionizačních technik. Elektrosprej je založen na principu přívodu roztoku vzorku ústím kapiláry do iontového zdroje. Na výstup kapiláry je přiváděno napětí o hodnotě 3-5 kV [34, 35], které zde vytváří silné elektrostatické pole. Na konci kapiláry tak vznikají malé nabitě kapky [42], které se přívodem sušícího plynu rychle vypařují. Následně dochází ke Coulombickému štěpení a vzniku iontů [35].

Tato technika má sklon k produkci vícenásobně nabitých molekulových iontů analytu [40]. Ve spektru se tak objevují píky s rozdílným nábojem z , ale o stejné molekulové hmotnosti M .

Elektrosprejová ionizace je využívána především v on-line spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií [40]



Obr. 2.5. Ionizace elektrosprejem [39]

- desorpce / ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

MALDI neboli Matrix – Assisted Laser Desorption / Ionization patří stejně jako ionizace elektrosprejem do měkkých ionizačních technik. Uplatňuje se především při studiu peptidů, proteinů, sacharidů, glykoproteinů a nukleových kyselin [36]. Z tohoto důvodu byla metoda MALDI použita pro kvalitativní analýzu vzorků pro diplomovou práci.

Během ionizace dochází k ozáření krátkým pulsem laseru směsi analytu s nadbytkem vhodné matrice [35]. Analyt je ve směsi v nízké koncentraci molekul $10^{-4} - 10^{-7}$, narozdíl od matrice, která je ve směsi ve vysoké koncentraci 10^{-1} molekul [43].

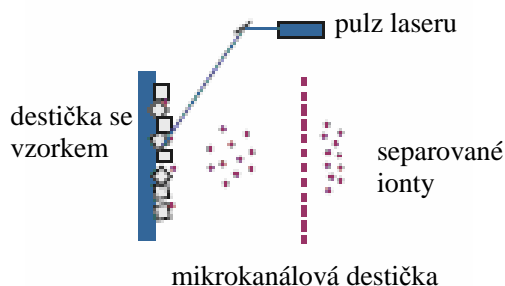
Pro desorpci a ionizaci se používají různé lasery emitující v ultrafialové oblasti. Prvotně to byly lasery o vlnové délce 300 nm. V současné době jsou to dusíkové lasery s vlnovou délkou 337 nm a Nd-YAG lasery s vlnovou délkou 266 a 355 nm. Používají se také lasery emitující v infračervené oblasti, jako např. CO₂ s vlnovou délkou 10 μm nebo Er-YAG laser s vlnovou délkou 2,94 μm [40, 41, 43].

Při použití této metody se nechá studovaná látka vykrystalizovat na kovové podložní destičce s matricí. Při dopadu paprsku laseru na terčičk, matrice absorbuje jeho energii a předá ji analytu, který je tak ionizován [34]. Samotné matrice nesmí reagovat se studovanou látkou. Pro samotný vznik iontů je důležitá –OH skupina obsažená v matrici [35].

Jako matrice se používají deriváty slabých nízkomolekulárních aromatických kyselin. Její volba závisí na analyzovaném vzorku. Pro identifikaci proteinů je vhodná 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina (SA). Pro detekci peptidů se nejčastěji používá kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) nebo 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Kyselina 3-hydroxypikolinová se využívá pro oligonukleotidy a glykoproteiny [40, 41, 43].

Ionizací MALDI vznikají především jednou nabitě ionty $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$. Hmotnostní spektrum může obsahovat i klastry, fragmenty analytu či vícenásobně nabitě ionty [35].

Pro MALDI je typické spojení s hmotnostním analyzátozem TOF.



Obr. 2.6. Ionizace na kovové MALDI destičce [34]

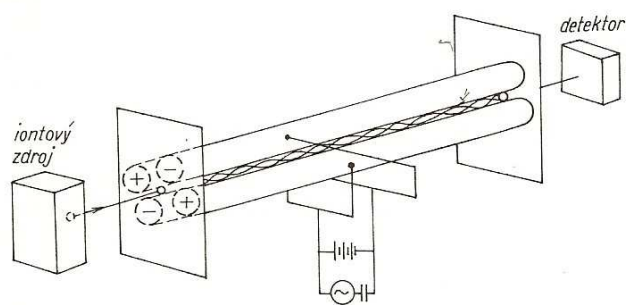
- další typy ionizace
 - elektronová ionizace
 - chemická ionizace
 - ionizace a desorpce elektrickým polem
 - chemická ionizace při atmosférickém tlaku (APCI)
 - ionizace urychlenými atomy či ionty
 - ionizace termosprejem
 - plamenová ionizace

2.6.2.1.2 Hmotnostní analyzátořy

Hmotnostní analyzátořy slouží k rozdělení iontů. Pomocí aplikace různých fyzikálních zákonů je možné ionty rozlišit podle jejich efektivní hmotnosti m/z . V dnešní době existuje celá řada analyzátořů s různými modifikacemi. Je možné je rozdělit do několika skupin:

- kvadrupólový analyzátoř

Tento analyzátoř patří mezi dynamické analyzátořy. Obsahuje čtyři kovové tyčové elektrody o kruhovém průřezu, které jsou paralelně rozmístěny na kružnici. Na protilehlé elektrody je vkládáno stejné napětí, buď stejnosměrné nebo střídavé. Tím je dána stabilní trajektorie charakteristických iontů o určité hodnotě m/z , podle které se ionty dělí a procházejí k detektoru [33, 34, 35].

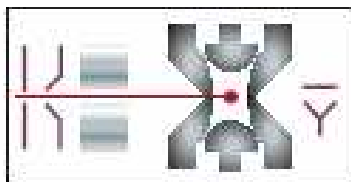


Obr. 2.7. Kvadrupólový analyzátoř [37]

- iontová past

Iontová past funguje na podobném principu jako kvadrupólový analyzátoř. Narozdíl od kvadrupólu se skládá ze tří elektrod s hyperbolickým profilem. Střední elektroda je prstencová a dvě vyklenuté do prostoru tvoří dno

a záklop iontové pasti. Na prsteneц je vloženо stejnosměrné a střídavé napětí, při kterém dochází ke shromáždění iontů o určitém m/z uvnitř pasti. Zde jsou udržovány inertním plynem a poté vypuzovány k detektoru [34, 35, 39].

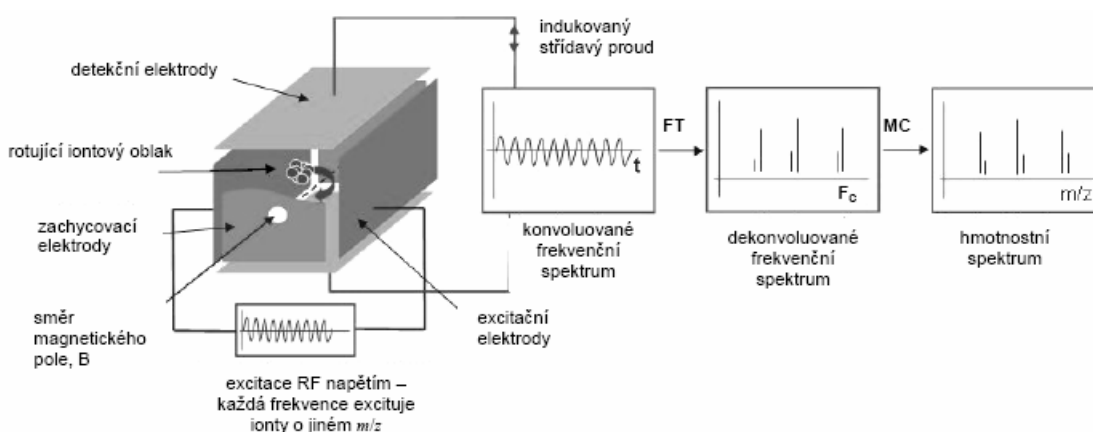


Obr. 2.8. Iontová past [39]

- cyklotronová rezonance iontů s Fourierovou transformací

Tento analyzátor je složen z modifikovaného průletového analyzátoru a z cely ve tvaru krychle. V cele působí na ionty magnetické a elektrické pole [39, 33], kterými jsou vybudeny. Dále se pohybují v cykloidálních drahách kolmo na směr vloženého magnetického pole. S ohledem na tvar dráhy letu iontu analyzátořem získáváme signály detektorem. Průběh celé analýzy je za podmínek vysokého vakua. Supravodivost prostředí je zajištěná vložením cely do kapalného helia [34, 46].

Analyzátor se vyznačuje vysokou citlivostí a rozlišovací schopností.



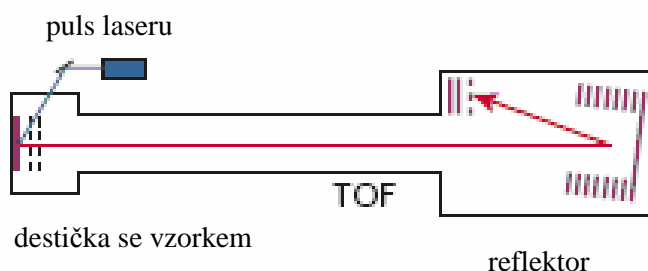
Obr. 2.9. Cyklotronová rezonance iontů [46]

- průletový analyzátor (TOF – Time-Of-Flight)

Principem rozdělení iontů je jejich rozdílná rychlost v průletové trubici po dodání definované kinetické energie. Ionty s nižším m/z se pohybují rychleji než

ionty s vyšší hodnotou m/z [35]. V letové trubici s nulovým elektrickým polem a vakuem ionty překonávají stejnou vzdálenost l , ale v rozdílném čase t .

Průletový analyzátor je možné nastavit pro měření proteinů, a to pomocí lineárního módu nebo na měření peptidů pomocí reflektornového módu. Tento hmotnostní analyzátor je nejjednodušší a nejrychlejší. Skládá se z iontového zdroje, akceleratoru, letové trubice a detektoru [35]. Je používán především ve spojení s MALDI nebo ESI.

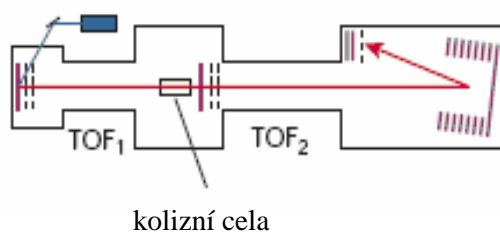


Obr. 2.10. Průletový analyzátor [34]

Spektrometr obsahující dva hmotnostní analyzátoři sériově spojené kolizní celou nazýváme tandemový hmotnostní spektrometr. V prvním analyzátoru je vybrán analyzovaný iont. V kolizní cele je rozfragmentován na dceřiné ionty a v druhém analyzátoru jsou dceřiné ionty rozlišeny. Je možné využívat spojení dvou průletových analyzátorů, tedy TOF – TOF, které jsou spojeny kolizní celou [34].

Tento postup je využíván k bližší charakterizaci analyzované látky, pro určení aminokyselinové sekvence či lokalizaci posttranslačních modifikací [34, 35, 42].

Jinou možností je spojení, např. tří kvadrupólů, dvou kvadrupólů nebo iontové pastí s průletovým analyzátořem.



Obr. 2.11. Tandemové spojení TOF/TOF [39]

2.6.2.1.3 Detektory iontů

Princip iontových detektorů je převedení dopadajícího proudu iontů na proud elektronů, v praxi se používá:

- mikrokanálová destička (microchannel plate MCP)

Mikrokanálová destička je plošný detektor vhodný především pro spojení s TOF analyzátory. Destička obsahuje malé kanálky přibližně o 2 – 30 μm průměru, které jsou pokryty polovodivým oxidem olovnatým [47, 48, 49]

- „Faraday cup“

„Faradayova miska“ je tvořena konverzní miskovitou elektrodou, která je pokryta BeO nebo GaP.

- elektronové násobiče

Tento typ detektoru obsahuje další elektrody, které dokáží zesílit proud elektronů 10^4 až 10^8 krát.

- detektor s konverzí dynodou a fotonásobičem

V detektoru je elektron měněn po dopadu na fosforenčí stínítko na foton, který je následně zachycen fotonásobičem [33].

2.6.3 Kapalinová chromatografie

2.6.3.1 Chromatografie obecně

Chromatografie je separační metoda, při které se od sebe oddělují složky obsažené ve vzorku. Základním principem každé chromatografie je opakované ustálení rovnováhy stanovované látky mezi dvěma fázemi. Stacionární a mobilní fáze musí být mezi sebou vzájemně nemísitelné. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je naopak pohyblivá.

Vzorek je nanesen na stacionární fázi a je unášen mobilní fází směrem k detektoru. Složky vzorku mají ke stacionární fázi rozdílnou afinitu, tím se od sebe postupně separují.

Chromatografických metod je velké množství, jsou rozdělovány do určitých skupin podle několika hledisek [33]:

- podle skupenství mobilní fáze
 - kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC)
 - mobilní fáze je kapalina

- plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC)
 - mobilní fáze je plyn
- podle uspořádání stacionární fáze
- podle povahy děje, který převládá při separaci

2.6.3.2 Typy kapalinová chromatografie

Do této metody jsou zahrnuty všechny druhy chromatografie, kde jako mobilní fáze slouží kapalina a jako stacionární fáze tuhá látka.

Podle uspořádání stacionární fáze se kapalinová chromatografie dělí na kolonovou, tenkovrstvou a papírovou [33].

V současné době byla kapalinová chromatografie nahrazena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pro vyšší účinnost separace stanovovaných látek.

2.6.3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

Základními částmi kapalinového chromatografu jsou: čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovací zařízení, kolona a detektor. Kolona je naplněna malými částicemi sorbentu 5 – 8 μm [52]. Ty kladou prostupující kapalině velký odpor, proto se musí pracovat za vysokého tlaku [50].

Pro HPLC jsou používány různé separační mechanizace:

- Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi RP-HPLC

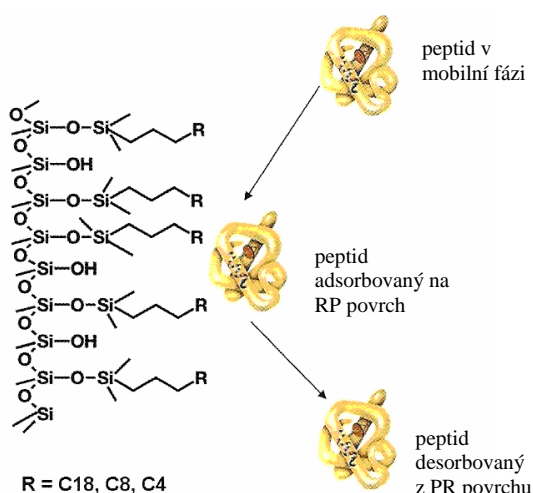
Tato metoda je často používaná pro mapování peptidů. Na rozdíl od normální fáze je zde mobilní fází polární a nepolární fází nosič [36].

Princip retence vzorku spočívá na hydrofobních interakcích s povrchem nosiče, který obsahuje hydrofobní skupiny [12]. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá kolona plněná modifikovaným silikagelem. Modifikace je prováděna alkyly o 4, 8 či 18 uhlících [51, 52]. Mobilní fáze je polární kapalina – vodný roztok methanolu či acetonitrilu, s přísadkou kyseliny trifluoroctové (TFA), mravenčí nebo octové. Ty mají vlastnost iontově párového činidla. Při jeho použití roste retence látky [53].

Často se pro eluci používá gradient acetonitrilu. Změnou složení mobilní fáze v čase dochází v průběhu separace ke zvyšování eluční síly [51, 52].

Citlivost i účinnost metody může být ovlivněna celou řadou faktorů. Především pak čistotou mobilní fáze a kolonou s různými rozlišovacími vlastnostmi [12].

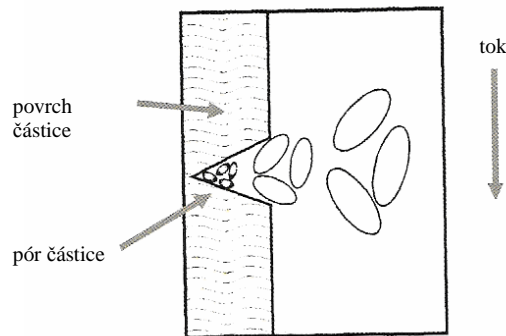
Separované peptidy jsou detekovány fluorescencí, UV absorbcí nebo pomocí indexu lomu. V současné době se využívá spojení RP-HPLC s hmotnostní spektrometrií. Hlavní výhodou je získání hmotnostních spekter analyzované látky a její následná možnost identifikace.



Obr. 2.12. Mechanismus interakce peptidu s HPLC-RP stacionární fází [53]

- Gelová permeační chromatografie (Size Exclusion Chromatography SEC)

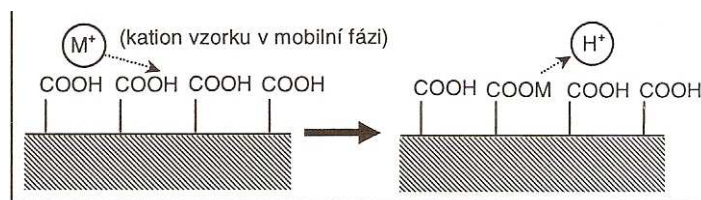
Při použití této metody jsou molekuly separovány podle velikosti. Při průchodu vzorku kolonou jsou jednotlivé molekuly zadržovány v pórech gelových zrn. Molekuly o nižší velikosti pronikají do pórů hlouběji, a proto mají vyšší hodnoty retenčních časů [52, 53].



Obr. 2.13. Schéma separace pomocí SEC [53]

- Iontově - výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography IEC)

Jako stacionární fáze je v této metodě používán měnič iontů. Kolona je plněna částicemi z polymerů nebo ze silikagelu s funkčními skupinami kyselé či zásadité povahy. Na funkční skupinu je iontovou vazbou navázán protiion, který je během chromatografie vyměňován iontem z mobilní fáze [52, 53].



Obr. 2.14. Výměna iontů na povrchu iontoměniče [33]

- Adsorpční kapalinová chromatografie

Adsorpční chromatografie, neboli chromatografie na normální fázi. Při této separaci se používají nepolární mobilní fáze a polární molekuly stacionární fáze [36].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

- spektrofotometr Biochrom Libra S22 (Biochrom Ltd., Cambridge, VB)
- křemenné kyvety (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- pH metr Orion model 420 A plus (Orion Research Inc., Beverly, USA)
- magnetický separátor (Dynal, Biotech, Oslo, Norsko)
- rotátor Grand – Bio PTR 30 (Wolf-Laboratories, VB)
- inkubátor (Biotech New Brunswick Scientific, C027)
- analytické váhy AX105 Delta-Range (METTLER TOLEDO)
- hmotnostní spektrometr MALDI - TOF (Voyager-DE™ STR)
(Biospectrometry Workstation, PerSeptive Biosystems)
- software Voyager Instrument Control Panel
- program Data Explorer verze 4.0.0.0
- HPLC UltiMate 3000 (LC Packing, DIONEX)
- program Chromeleon verze 6.70 (Dionex)
- chromatografická kolonka Atlantis dC18 3 μm , 75 μm x 150mm
- předkolonka C18 PepMap100, 5 μm , 300 μm x 5 mm,
- digestoř LAM 12D (LAMON, Brno)
- termomixer 5355 comfort, Eppendorf
- třepačka Minishaker MS2, IKA-WORKS, INC
- odstředivka MiniSpin, Eppendorf
- pipety, Eppendorf

3.2 Purifikace trypsinu

3.2.1 Použité chemikálie

- trypsin (EC 3.4.21.4) (CAS 9002-07-7) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- p-aminobenzamidin
- tris(hydroxymethyl)-amonimethan ($C_4H_{11}NO_3$), p. a., (Lachema a. s., Neratovice, ČR)
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema a. s., Neratovice, ČR)

3.2.2 Použité roztoky

- 0,05M Tris-HCl s 0,005M $CaCl_2$, pH 7,2
- 0,1M kyselina octová s 0,01M $CaCl_2$

3.2.3 Postup purifikace

K získání čistého trypsinu bylo nutné jeho přečištění, které probíhalo na kolonce plněné p-aminobenzamidinem. Celý proces chromatografie byl uskutečněn při 4°C, kdy používané roztoky byly skladovány v ledové lázni.

Pro purifikaci byl připraven roztok trypsinu o koncentraci 10 mg/ml. Trypsin byl rozpuštěn v 0,05M Tris-HCl pufru o pH 7,2 s 0,005M $CaCl_2$. Používaná kolonka byla ekvilibrována pomocí 7x 1 ml 0,05M Tris-HCl. Po ekvilibraci byl na kolonku nanesen 1 ml připraveného roztoku trypsinu. Kolonka s naneseným trypsinem byla 12x promyta 1 ml 0,05M Tris-HCl. Poté byl trypsin eluován 0,1M kyselinou octovou s 0,01M $CaCl_2$, kdy bylo jímáno 7 frakcí po 1 ml do eppendorfek. U frakcí byla změřena absorbance trypsinu. Tři frakce s nejvyšší absorbancí byly smíseny pro další použití.

3.3 Příprava kalibrační křivky trypsinu

3.3.1 Použité chemikálie

- trypsin (EC 3.4.21.4) (CAS 9002-07-7) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- purifikovaný trypsin

- N- α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) (EC 213-011-2) (CAS 911-77-3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

3.3.2 Použité roztoky

- 0,1M Tris-HCl s 0,0025M CaCl₂, pH 7,8
- 30% kyselina octová

3.3.3 Postup stanovení

Pro stanovení byl připraven zásobní roztok trypsinu o koncentraci 5 mg/ml. Enzym byl rozpuštěn v 0,1M Tris-HCl s 0,0025M CaCl₂, pH 7,8. Z něho byla vytvořena kalibrační řada s body o koncentraci enzymu 2,5, 7,5, 12,5, 15 a 20 μ g/100 μ l. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml 0,1M Tris-HCl a 20 μ l substrátového roztoku BAPNA. Po zamíchání následovala 15 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Poté byla reakce zastavena přidáním 200 μ l 30% kyseliny octové. Jednotlivé body kalibrační řady byly proměřeny při 405 nm na spektrofotometru proti slepému vzorku.

Stejným způsobem bylo připraveno a orientačně změřeno 7 frakcí purifikovaného trypsinu. Z porovnaných hodnot těchto měření a kalibrační řady byla získána hodnota aktivity v 7 frakcích.

3.4 Odsolení frakcí trypsinu

3.4.1 Použité chemikálie

- purifikovaný trypsin
- Sephadex G-25 (Lot No 2136) (Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko)
- benzamidin hydrochlorid (EC 219-795-4) (CAS 1670-14-0) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

3.4.2 Použité roztoky

- 0,1M fosfátový pufr, pH 7,2

3.4.3 Postup odsolení

Pro odsolení frakcí trypsinu byla připravena kolonka ze Sephadexu G-25. Kolonka byla navlhčena 1 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,2, následně byly přidány 2ml Sephadexu G-25. Takto připravená kolonka byla ekvilibrována 25 ml 0,1M fosfátového pufru. Po ekvilibraci byly naneseny frakce trypsinu. Kolonka byla promyta 0,1M fosfátovým puftrem, kdy bylo jímáno 5 frakcí po 1 ml do eppendorfek. U najímaných frakcí byla změřena absorbance trypsinu. Dvě frakce s nejvyšší absorbancí byly slity a k nim přidáno 0,65 mg benzamidinu. Tyto frakce byly použity pro imobilizaci na magnetické mikročástice.

3.5 Imobilizace trypsinu

3.5.1 Použité chemikálie

- purifikovaný trypsin
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukciimid sodný (S-NHS) (Fluka, Sigma-Aldrich Schweiz, Buchs SG, SUI)
- magnetické mikročástice – SiMAG (25 mg částic na 1 ml) (Chemicell GmbH, Berlin, Germany)

3.5.2 Použité roztoky

- 0,1M fosfátový pufr, pH 7,2

3.5.3 Postup imobilizace

3 mg magnetických mikročástic (120 μ l) s karboxylovou skupinou byly 10x promyty 1 ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,2 na magnetickém separátoru. Promyté částice byly resuspendovány v 1,5 ml 0,1M fosfátového pufru a přidány k 2 ml přečištěného a odsoleného trypsinu. Směs byla 3-4 minuty promíchána kývavými pohyby. Následně bylo přidáno 15 mg EDC rozpuštěného ve 400 μ l destilované vody a 2,5 mg S-NHS rozpuštěného rovněž ve 400 μ l destilované vody. Tato reakční směs byla míchána 4 hodiny za laboratorní teploty.

Po ukončení imobilizace byl nosič odseparován magnetickým separátorem a 10x promyt 1 ml 0,1M fosfátového pufru. Po desátém promývacím kroku byla v odebraném supernatantu změřena absorbance trypsinu.

Promyté částice byly resuspendovány v 1,5 ml 0,1M fosfátového pufru. Pro změření aktivity trypsinu bylo odebráno 100 µl částic.

3.6 Stanovení aktivity imobilizovaného trypsinu

3.6.1 Použité chemikálie

- N- α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) (EC 213-011-2) (CAS 911-77-3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- imobilizovaný trypsin
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

3.6.2 Použité roztoky

- 0,1M fosfátový pufr, pH 7,2

3.6.3 Postup stanovení aktivity

Postup stanovení aktivity imobilizovaného trypsinu je stejný jako v případě stanovení aktivity purifikovaného trypsinu, postup 3.3. pouze na místo Tris-HCl pufru byl použit 0,1M fosfátový pufr o pH 7,2.

Aktivita imobilizovaného trypsinu byla vypočtena pomocí regresní rovnice kalibrační křivky.

3.7 Příprava roztoků standardních proteinů, redukce a alkylace

3.7.1 Použité chemikálie

- α -casein z hovězí mléka (EC 232-555-1) (CAS 9000-71-9) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- cytochrom C s hovězího srdce (EC 232-700-9) (CAS 9007-43-6) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hovězí sérový albumin (BSA) (EC 232-936-2) (CAS 9048-46-8)

(Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- iodoacetamid ($\text{ICH}_2\text{CONH}_2$) (IAA) (EC 205-630-1) (CAS 144-48-9)
(Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- tris-(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP-HCl) ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P} \cdot \text{HCl}$)
(CAS 51805-45-9) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.7.1 Použité roztoky

- 5mM TCEP-HCl (0,35 mg a 50 μl destilované vody)
- 15mM IAA (0,86mg a 186 μl destilované vody)

3.7.2 Postup přípravy

Pro štěpení byly připraveny zásobní roztoky používaných standardních proteinů o koncentraci 1 mg/ml. Proteiny byly rozpuštěny v destilované vodě.

BSA bylo nutné zredukovat a zalkylovat, neboť má ve svém řetězci 35 cysteinů, které by bránily ve štěpení na peptidy. α -casein obsahuje pouze 1 cystein a cytochrom C taktéž, proto je není nutné redukovat a alkylovat.

K 500 μl roztoku BSA bylo přidáno 50 μl 5mM TCEP-HCl, reakce redukce probíhala 45 minut při 55°C v termomixeru při 700 rpm. Redukcí byly přerušeny cysteinové můstky v BSA řetězci. Po inkubaci bylo přidáno 59 μl 15mM IAA. IAA je nutné připravit těsně před použitím. Reakce alkylace pro zablokování rozrušených cysteinových můstků probíhala při 30°C po 45 minut v temnu, v termomixeru při 700 rpm.

3.8 Štěpení standardních proteinu imobilizovaným trypsinem

3.8.1 Použité chemikálie

- imobilizovaný trypsin
- kyselina trifluoroctová (TFA) (EC 200-929-3) (CAS 76-05-1)
(Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ostatní chemikálie čistoty p.a.

3.8.2 Použité roztoky

- 0,1M fosfátový pufr, pH 7,2
- 50mM NH₄HCO₃
- 50mM NH₄HCO₃ s 5% ACN
- 50mM NH₄HCO₃ s 10% ACN
- roztoky standardních proteinů
- směs proteinů: 20 μl BSA + 20 μl cytochrom C + 20 μl α-casein
- 10% TFA

3.8.3 Postup štěpení

Před zahájením samotného štěpení byly používané magnetické mikročástice promyty 5x 0,1M fosfátovým pufrům o pH 7,2. Promyté částice byly resuspendovány v 90 μl štěpícího roztoku 50mM NH₄HCO₃, popřípadě v 50mM NH₄HCO₃ s 5 nebo 10% ACN. Množství mikročástic bylo určeno pomocí stanovení jejich aktivity, kapitola 4.2.

Pro štěpení byl použit poměr protein:imobilizovaný trypsin 1:5, 1:1 a 5:1. K suspenzi částic bylo přidáno 10 μl roztoku proteinu. Štěpení probíhalo při 37°C v inkubátoru při mírném otáčení na rotátoru. Všechny enzymy byly štěpeny 10, 20, 40 minut, kdy bylo vždy odebráno 10 μl vzorku a 18 hodin.

Pro ukončení štěpení byly ze vzorku odseparovány magnetické mikročástice a přidáno 2 μl 10% TFA na každých 10 μl odebraného vzorku.

3.9. Štěpení standardních proteinů trypsinem v roztoku

3.9.1 Použité chemikálie

- trypsin (EC 3.4.21.4) (CAS 9002-07-7) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- rekonstituční pufr (trypsin buffer) (22769103) (Promega)
- kyselina trifluoroctová (TFA) (EC 200-929-3) (CAS 76-05-1) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ostatní chemikálie čistoty p.a.

3.9.2 Použité roztoky

- roztoky standardních proteinů
- 50mM NH₄HCO₃
- 10% TFA

3.9.3 Postup štěpení

Pro štěpení byl používán standardní poměr protein:trypsin 50:1. Byl připraven roztok trypsinu o koncentraci 2,5 mg/ml, který byl následně 50x naředěn pomocí rekonstitučního pufru

K 89,5 µl štěpícího pufru 50mM NH₄HCO₃, popřípadě 50mM NH₄HCO₃ s 5 nebo 10% ACN, bylo přidáno 0,5 µl roztoku trypsinu a 10 µl vybraného standardního proteinu.

Reakce probíhala při 37°C v termomixeru za 700rpm po dobu 10, 20, 40 minut, kdy bylo vždy odebráno 10 µl vzorku a 18 hodin. Štěpení proteinu bylo ukončeno přidáním 2 µl 10% TFA na každých 10 µl odebraného vzorku.

3.10 Analýza naštěpených proteinů pomocí MALDI-TOF

3.10.1 Použité chemikálie

- kyselina sinapová – Matrix A, B (SA) (0412018) (Foster City, USA)
- kyselina 2,5 - dihydroxybenzoová (DHB) (EC 207-718-5) (LbL)
- ostatní chemikálie čistoty p.a.

3.10.2 Použité roztoky

- 50% ACN, 0,5% TFA

3.10.3 Postup analýzy

Před začátkem analýzy byla kovová MALDI destička očištěna vodným roztokem methanolu a osušena do sucha.

Pro analýzu byly připraveny nízkomolekulární matrice SA a DHB o koncentraci 5 mg/ml pomocí 50% ACN, 0,5% TFA, kde matrice SA byla použita k detekci nenaštěpeného proteinu a matrice DHB pro detekci peptidů. Vzorek

s připravenou maticí byl smíchán v poměru 1:4, tedy 1 μ l analyzovaného vzorku a 4 μ l připravené matrice. Z této směsi byl na kovovou destičku nanesen 1 μ l. Analyt s maticí vytvořily po zaschnutí při laboratorní teplotě na destičce homogenní film krystalů.

Destička byla vložena do přístroje MALDI-TOF, ve kterém docházelo k interakci krystalů s krátkými laserovými pulsy.

Byly proměřeny jednotlivé vzorky a výsledná spektra byla zpracována pomocí programu Data Explorer verze 4.0.0.0.

Tab. 3.1. Základní podmínky použité pro analýzu proteinů

lineární mód		pozitivní
Reflektor		+
kontrolní mód		manuální
napětí	urychlující napětí	25000 V
	Mřížka	93%
	vodící drát	0,15
	Zpoždění	320 nsec
nastavení spektra	počet pulsů laseru	200
	rozsah hmotnostního spektra (Da)	1000 to 25000
	nejnižší registrovaná hmota (Da)	4000
kalibrace	Matrice	kyselina sinapová

Tab. 3.2. Základní podmínky použité pro analýzu proteinů

lineární mód		pozitivní
Reflektor		+
kontrolní mód		manuální
napětí	urychlující napětí	20000 V
	Mřížka	76%
	vodící drát	0,01
	Zpoždění	320 nsec
nastavení spektra	počet pulsů laseru	100
	rozsah hmotnostního spektra (Da)	700 to 3500
	nejnižší registrovaná hmota (Da)	700
kalibrace	Matrice	2,5 – kyselina dihydroxybenzoová

3.11 Analýza naštěpených proteinů pomocí RP-HPLC

3.11.1 Použité chemikálie

- acetonitril (CAS 75-05-8) (MERCK, ČR)
- kyselina octová čistoty p.a.

3.11.2 Použité roztoky

- mobilní fáze: A – 5% ACN ve vodě s 0,1% TFA
B – 5% ACN ve vodě s 0,1% TFA

3.11.3 Postup analýzy

Pro analýzu byly použity naštěpené proteiny, ze kterých bylo přepipetováno 5 μ l do autosamplerové lahvičky. Vzorky byly naředěny 20 μ l roztoky mobilní fáze A. Takto připravené vzorky byly umístěny do autosamplerového stojánku HPLC do jednotlivých pozic.

Pozice, označení vzorku, ředění a množství vzorku nanášeného na kolonu byly zaznamenány do příslušného programu Chromeleon verze 6.70 (Dionex)

Vzorku BSA bylo na kolonu nanášeno 12 μ l, cytochromu C 4 μ l, α -caseinu a směsi proteinů 8 μ l. Naředění a nanášení vzorků pro analýzu bylo určeno podle jejich koncentrace (tab. 4.5).

Analýza probíhala při okolní teplotě 25°C za 50 minutového lineárního gradientu mobilní fáze B.

Detekce chromatograficky rozděleného vzorku proběhla na UV detektoru při 215 nm. Výsledná spektra byla vyhodnocena pomocí programu Chromeleon verze 6.70 (Dionex).

Tab. 3.3. Lineární gradient mobilní fáze B

minuty gradientu	% mobilní fáze B
0'	0 %
5'	0 %
21'	65 %
21,1'	95 %
25'	95 %
25,1'	0 %
50'	0 %

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Změřené absorbance trypsinu

Vzorky byly připraveny podle metody v kapitole 3.3.

a) absorbance trypsinu v purifikovaných frakcích

I. frakce 0,320	IV. frakce > +3
II. frakce > +3	V. frakce 0,910
III. frakce > +3	VI. frakce 0,651
	VII. frakce 0,117

Pro další postup byly vybrány tři frakce s nejvyšší hodnotou absorbance, tedy frakce II., III. a IV.

b) absorbance v odsoleném trypsinu

I. frakce > +3	IV. frakce 0,708
II. frakce > +3	V. frakce 0,117
III. frakce > +3	

Pro imobilizaci trypsinu byly vybrány tři frakce s nejvyšší naměřenou absorbancí, tedy frakce I., II. a III.

c) absorbance v supernatantu promytých mikročastic s imobilizovaným trypsinem

$$A = 0,002$$

Naměřená absorbance byla nulová, což znamená, že při promývání mikročastic se imobilizovaný trypsin neuvolňuje.

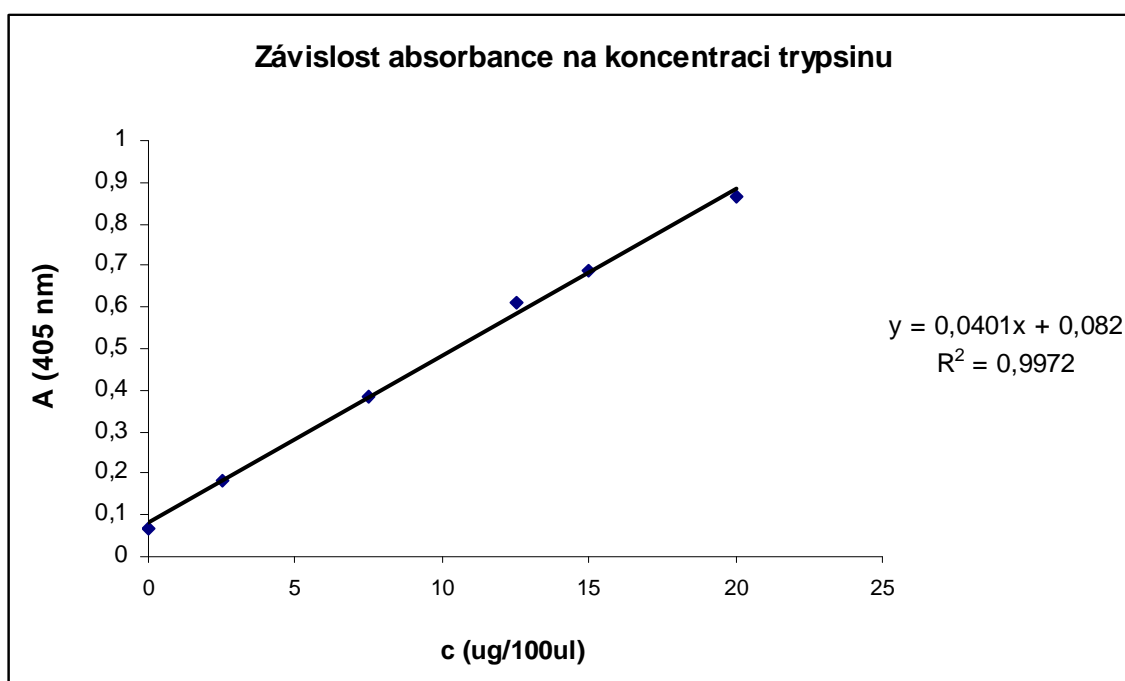
4.2 Stanovení aktivity trypsinu imobilizovaného na magnetických mikročasticích

Pro stanovení aktivity trypsinu pomocí substrátového roztoku BAPNA [59] byla připravena kalibrační řada podle metody popsané v kapitole 3.6. Stejným způsobem byl připraven i vzorek mikročastic. Regresní rovnice byla využita pro výpočet aktivity imobilizovaného trypsinu.

Tab. 4.1: Příprava kalibrační řady trypsinu

Koncentrace enzymu (μg/100μl)	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem ředícího pufru (μl)
2,5	2,0	398
7,5	3,0	197
12,5	5,0	195
15,0	6,0	194
20,0	8,0	192

Po změření byla sestavena lineární závislost s maximem 20 μg/100 μl s rovnicí $y = 0,0401x + 0,082$ ($R^2 = 0,9972$).



Obr. 4.1: Kalibrační křivka trypsinu

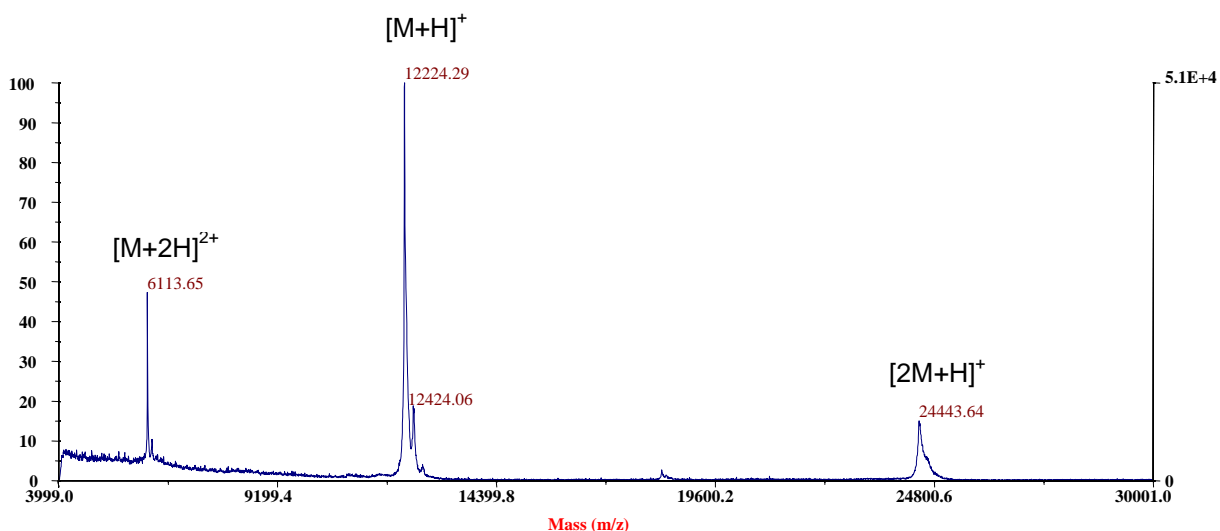
Z naměřené absorbance vzorku $A = 0,561$ byla pomocí regresní rovnice vypočtena aktivita imobilizovaného trypsinu. Výsledná aktivita imobilizovaného trypsinu vyšla 11,95 μg/100 μl.

4.3 Vyhodnocení analýzy MALDI-TOF

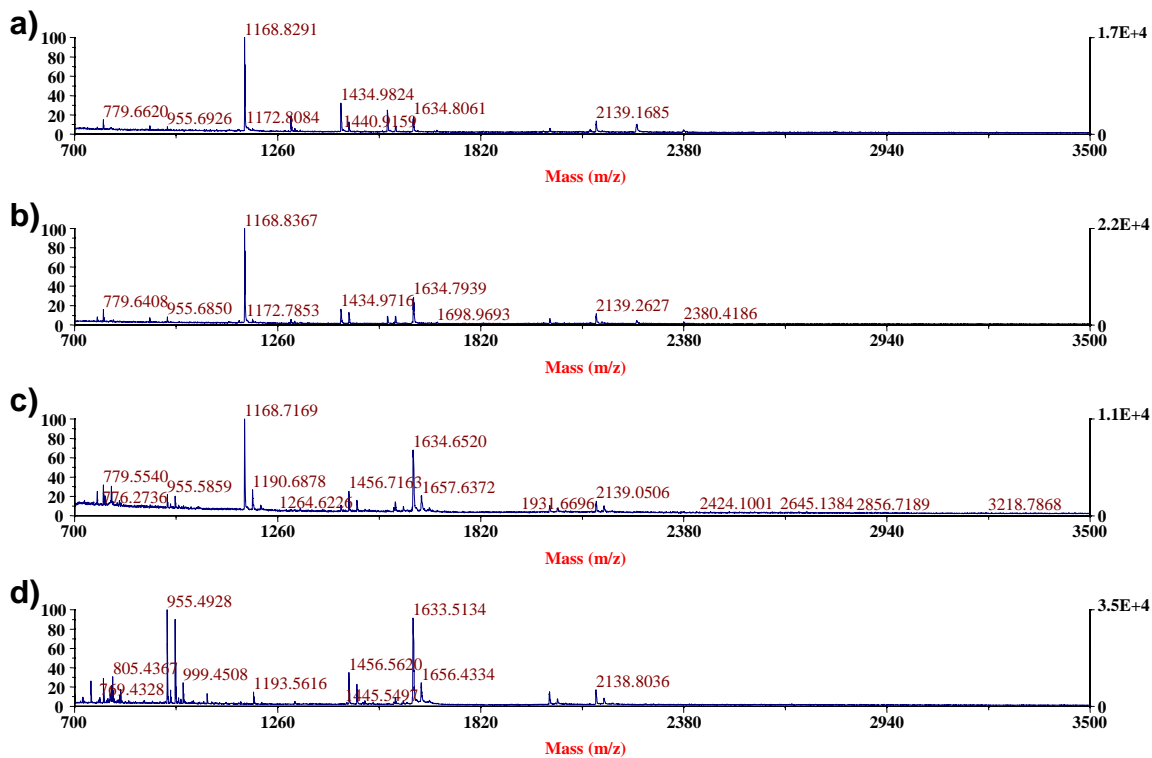
Pro kvalitativní porovnání štěpení imobilizovaným trypsinem a trypsinem v roztoku byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Byla použita matrice kyseliny sinapové pro detekci proteinů a kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové pro již naštěpené proteiny.

V prvním kroku byla vyhlazena base-line spektra a píky byly deizotopovány v programu Data Explorer. Následně byly efektivní hmotnosti m/z všech píků zkopírovány do programu ProteinProspector-MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/>). Identifikované peptidy v jednotlivých vzorcích ze všech použitých podmínek byly dány do tabulky.

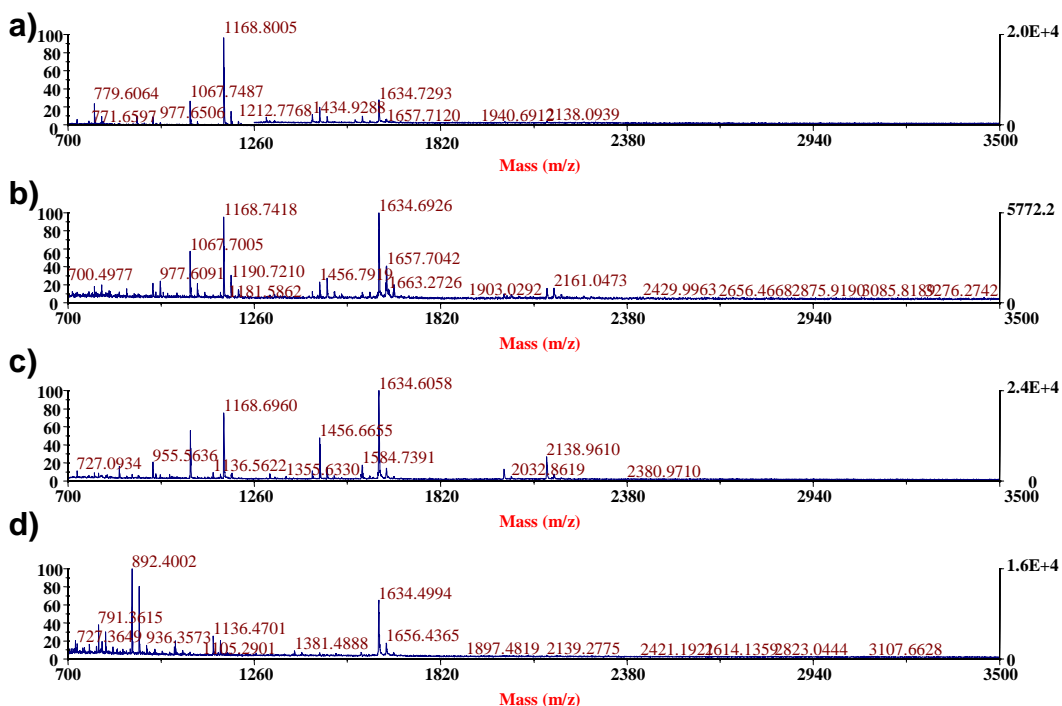
- **cytochrom C**



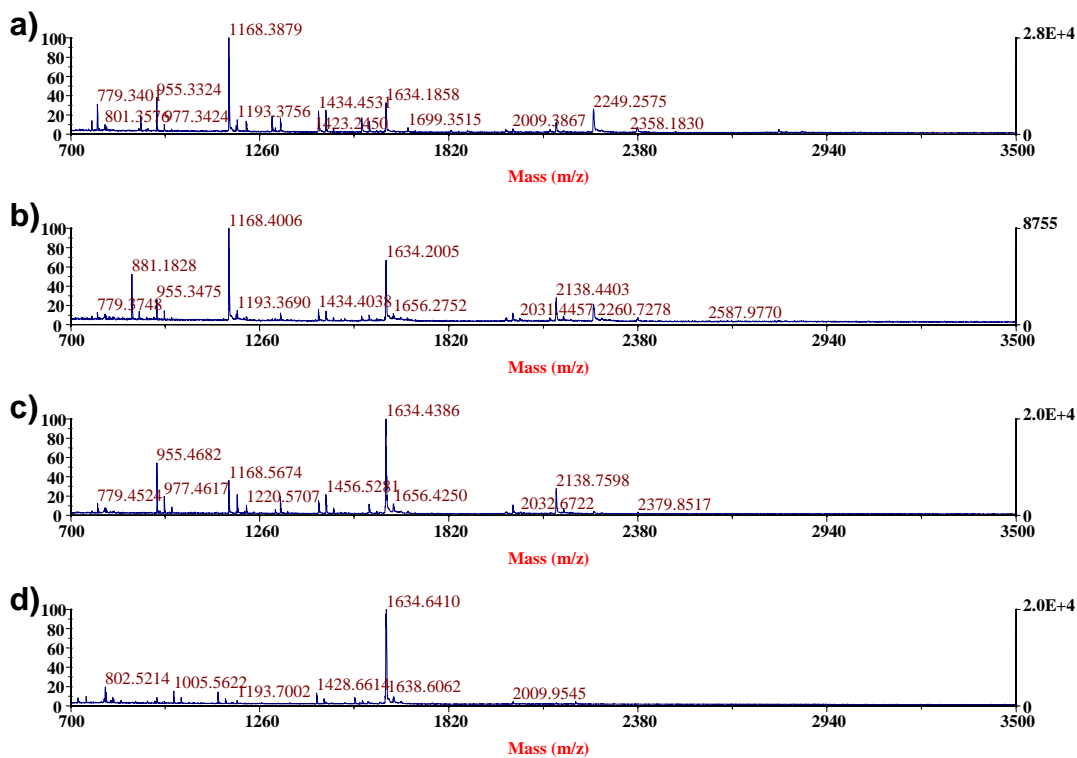
Obr. 4.2: Hmotnostní spektrum cytochromu C za použití matrice kyseliny sinapové



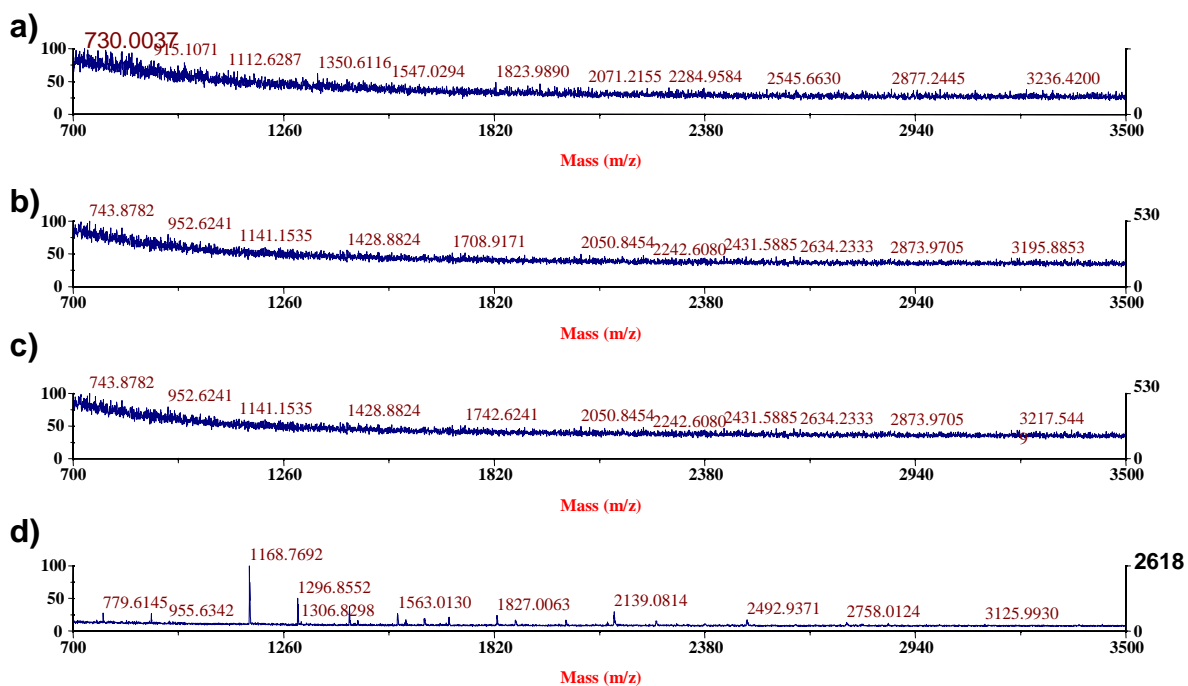
Obr. 4.3: Peptidy cytochromu C, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.4: Peptidy cytochromu C, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.5: Peptidy cytochromu C, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc

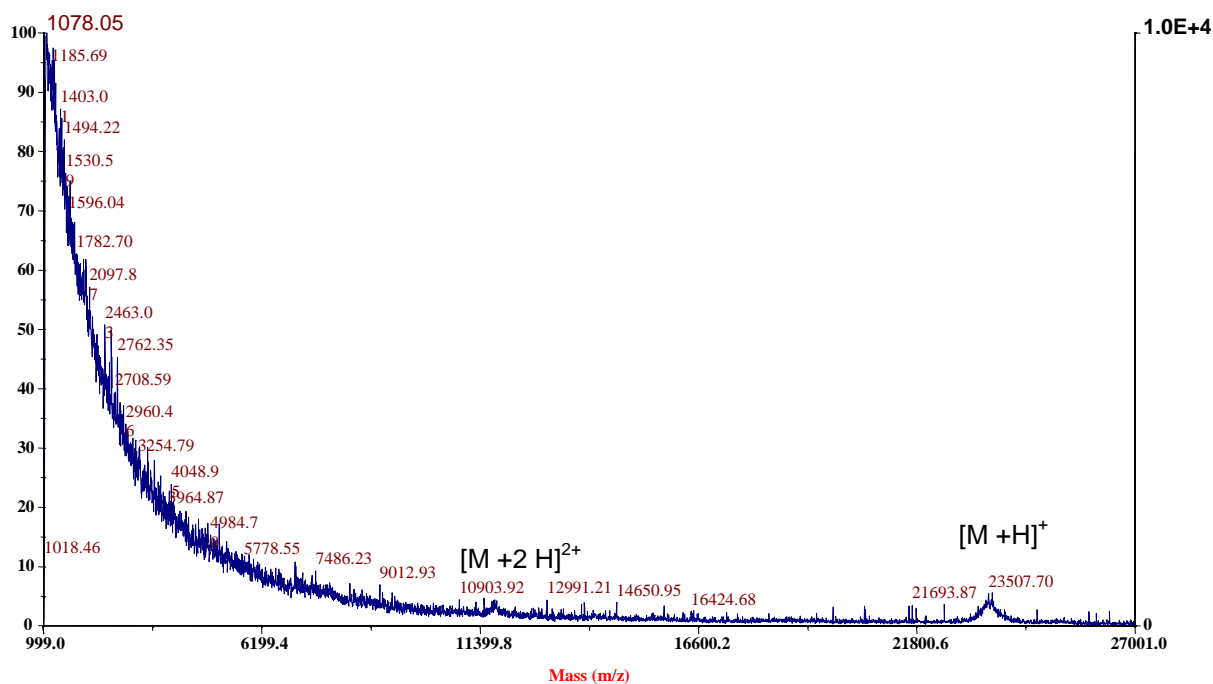


Obr. 4.6: Peptidy cytochromu C, podmínky štěpení protein/roztok trypsinu (w/w) 50:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc

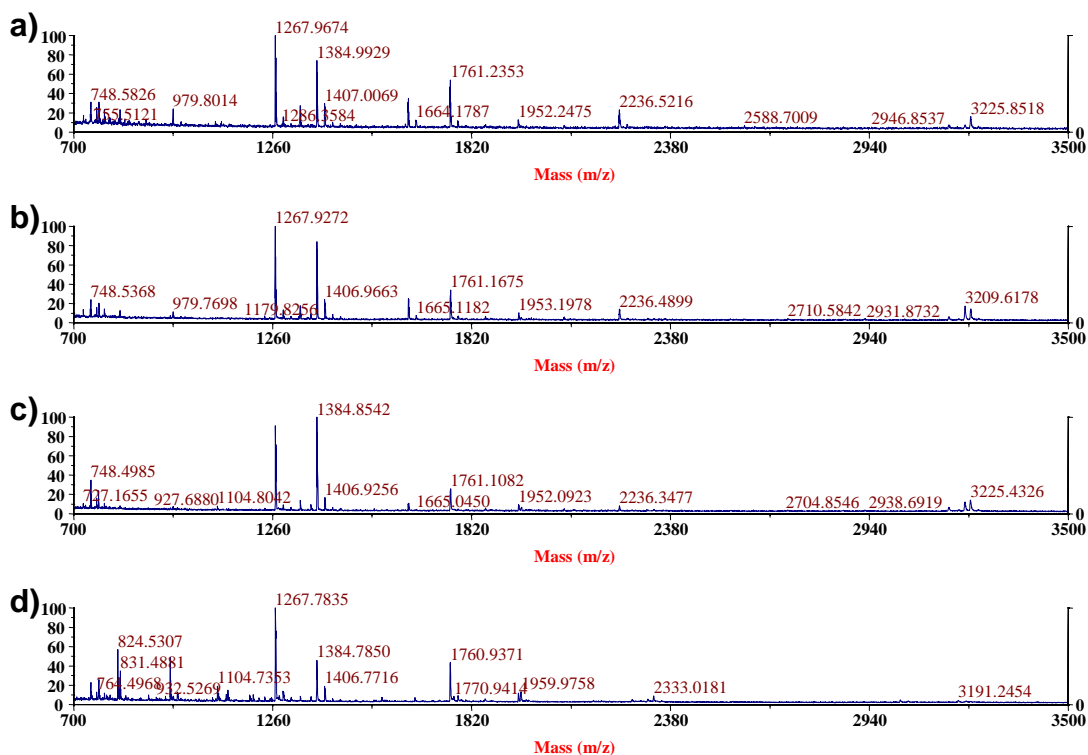
Tab. 4.2: Identifikované peptidy cytochromu C po štěpení imobilizovaným trypsinem o poměru protein/trypsin (w/w) 1:1, 1:5 a 5:1 a trypsinem v roztoku (w/w) 50:1 po 10, 20, 40 minutách a po noci.

m/z	Sekvence	1 : 1				1 : 5				5 : 1				50 : 1			
		10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N
762,48	KIFVQK			X					X	X			X				
779,45	MIFAGIK		X	X	X	X	X			X							X
907,54	MIFAGIKK					X			X	X			X				
1168,62	TGPNLHGLFGR	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X				X
1296,71	TGPNLHGLFGRK	X				X				X							X
1433,78	HKTGPNLHGLFGR	X	X		X					X	X	X	X				X
1456,67	TGQAPGFSYTDANK	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
1584,77	KTGQAPGFSYTDANK	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
1633,82	IFVQKCAQCHTVEK	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
2009,95	GITWGEETLMEYLENPK			X	X			X	X		X	X	X				X
2138,05	GITWGEETLMEYLENPKK	X	X	X	X		X	X			X	X					X
2250,15	NKGITWGEETLMEYLENPK										X						
		7	7	8	7	7	6	6	6	9	8	7	8	-	-	-	9

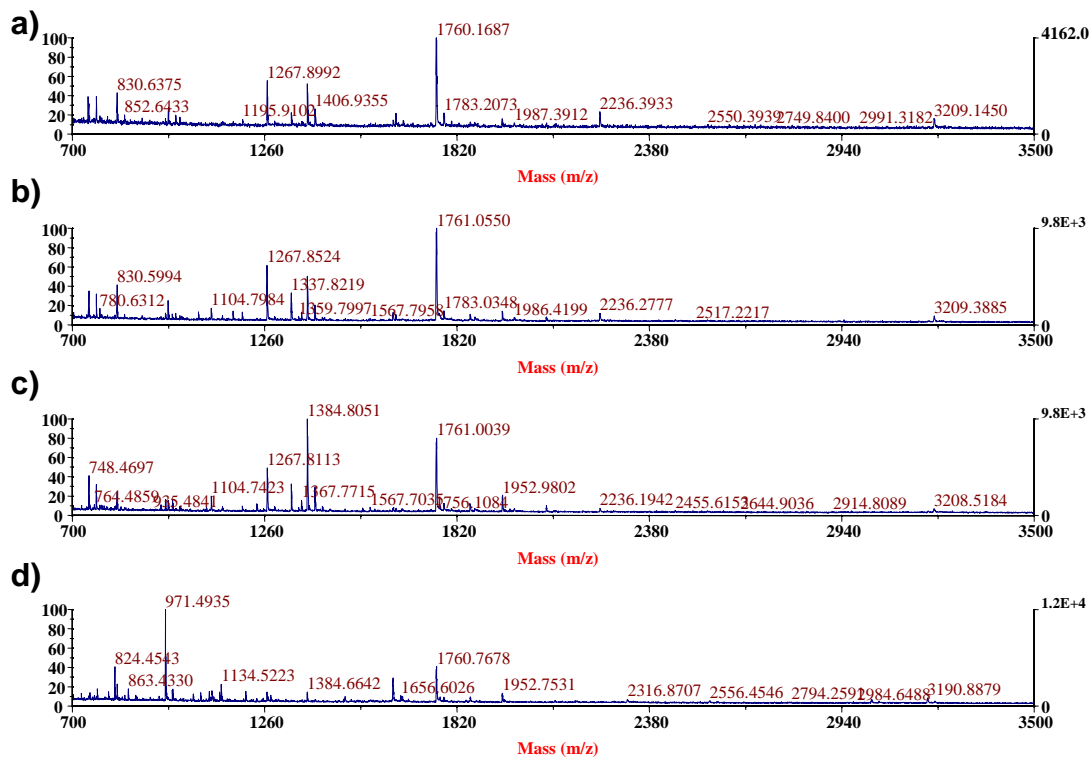
- α -casein



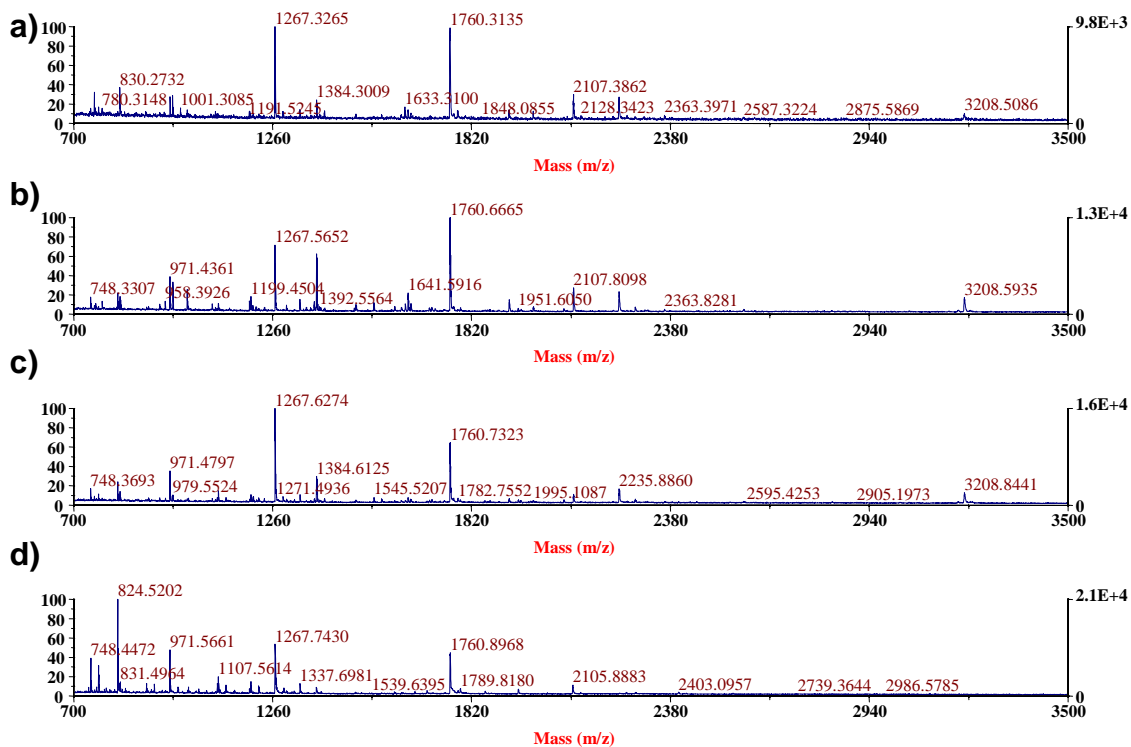
Obr. 4.7: Hmotnostní spektrum α -caseinu za použití matrice kyseliny sinapové



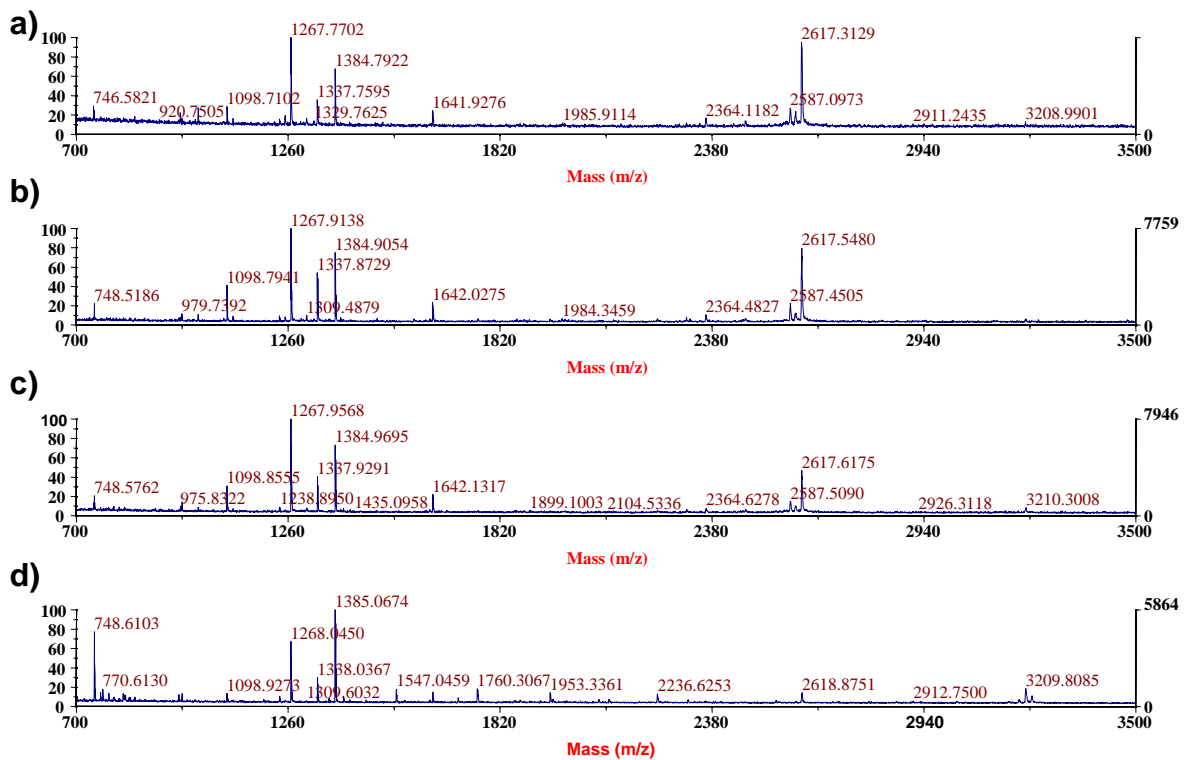
Obr. 4.8: Peptidy α -caseinu, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.9: Peptidy α -caseinu, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.10: Peptidy α -caseinu, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc

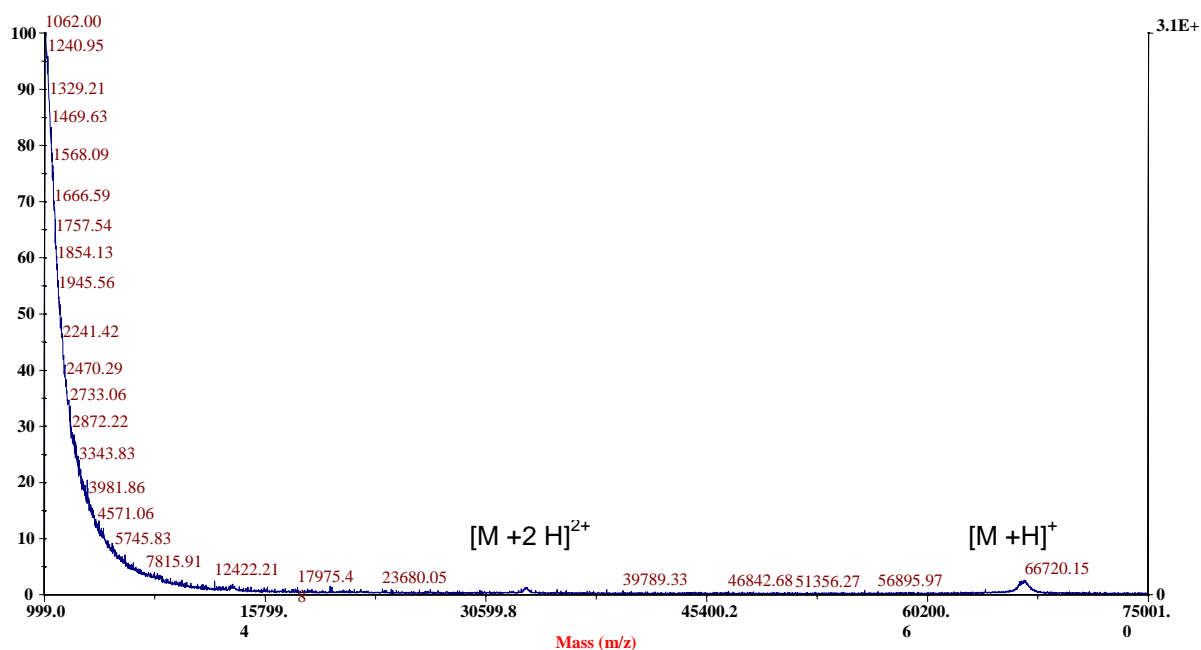


Obr. 4.11: Peptidy α -caseinu, podmínky štěpení protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc

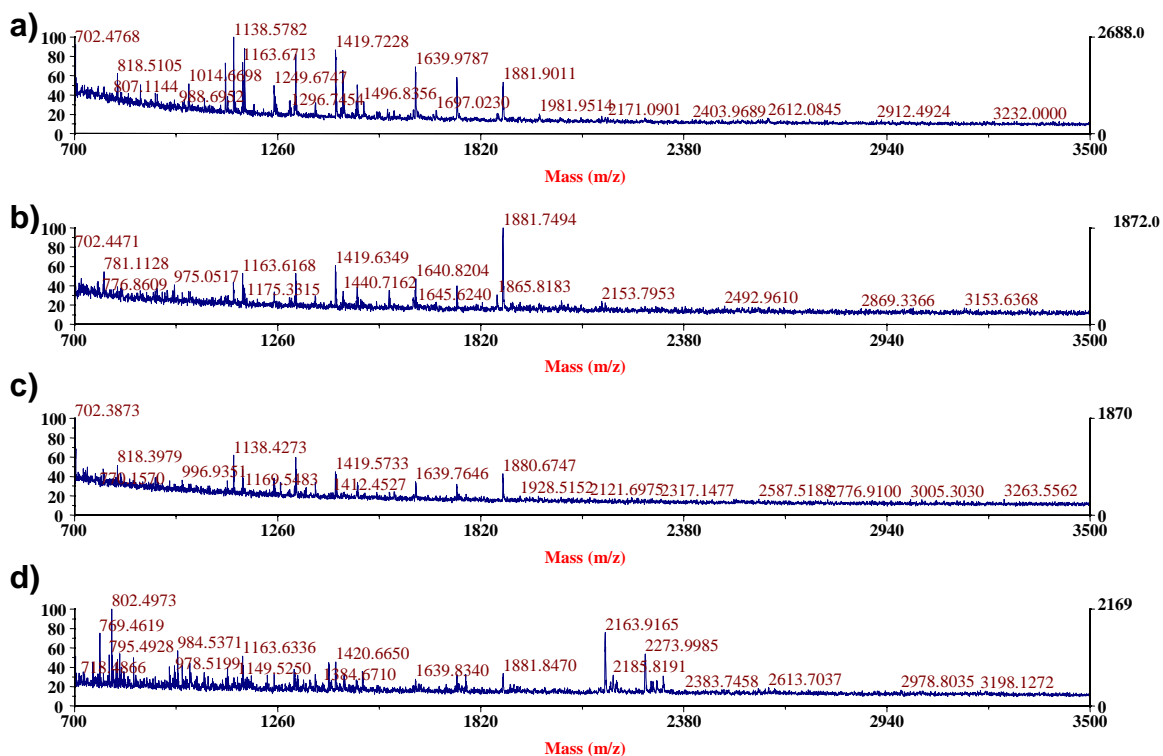
Tab. 4.3: Identifikované peptidy α -caseinu (S1) po štěpení imobilizovaným trypsinem o poměru protein/trypsin (w/w) 1:1, 1:5 a 5:1 a trypsinem v roztoku (w/w) 50:1 po 10, 20, 40 minutách a po noci.

m/z	Sekvence	1 : 1				1 : 5				5 : 1				50 : 1				
		10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	
748,97	TTMPLW	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
764,36	TTMPLW			X	X								X					X
830,55	EDVPSEK				X				X				X					
831,38	EDVPSEK				X								X					
1267,71	YLGYLEQLLR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1337,68	HIKEDVPSEK	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
1384,73	FFVAPFPEVFGK	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1641,87	FFVAPFPEVFGKEK	X	X	X		X	X			X	X	X		X	X	X	X	X
1695,39	LLILTCLVAVALARPK												X					
1759,95	HQGLPQEVLENENLLR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
1766,63	HQGLPQEVLENENLLR												X					
1781,91	DIGSESTEDQAMEDIK				X				X									
1951,86	MKLLILTCLVAVALARPK				X				X				X					
1953,21	MKLLILTCLVAVALARPK																	X
1995,22	MKLLILTCLVAVALARPK																	
2235,24	HPIKHQGLPQEVLENENLLR	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				X	X	
2317,21	EPMIGVNQELAYFYPELFR								X									
3207,59	EGIHQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR					X				X	X	X						X
3209,49	EGIHQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR							X	X	X	X	X		X	X	X		
3223,59	EGIHQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	X	X	X														X
		8	8	9	10	7	7	7	9	9	9	9	11	6	6	7	11	

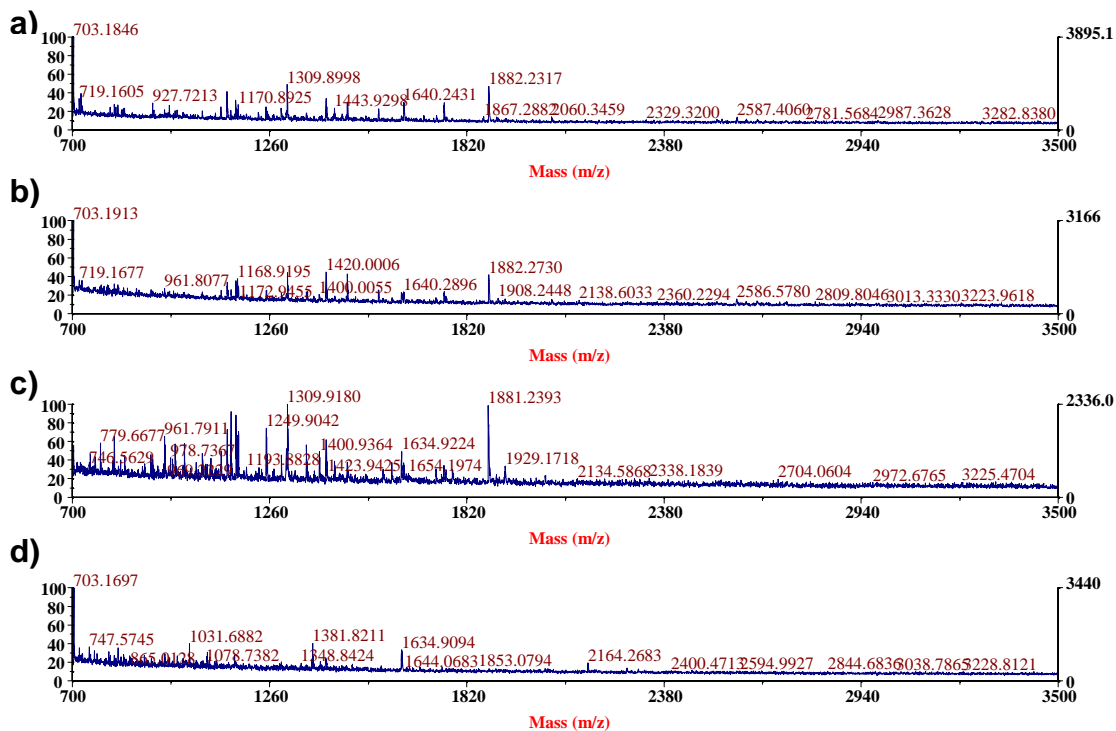
• BSA



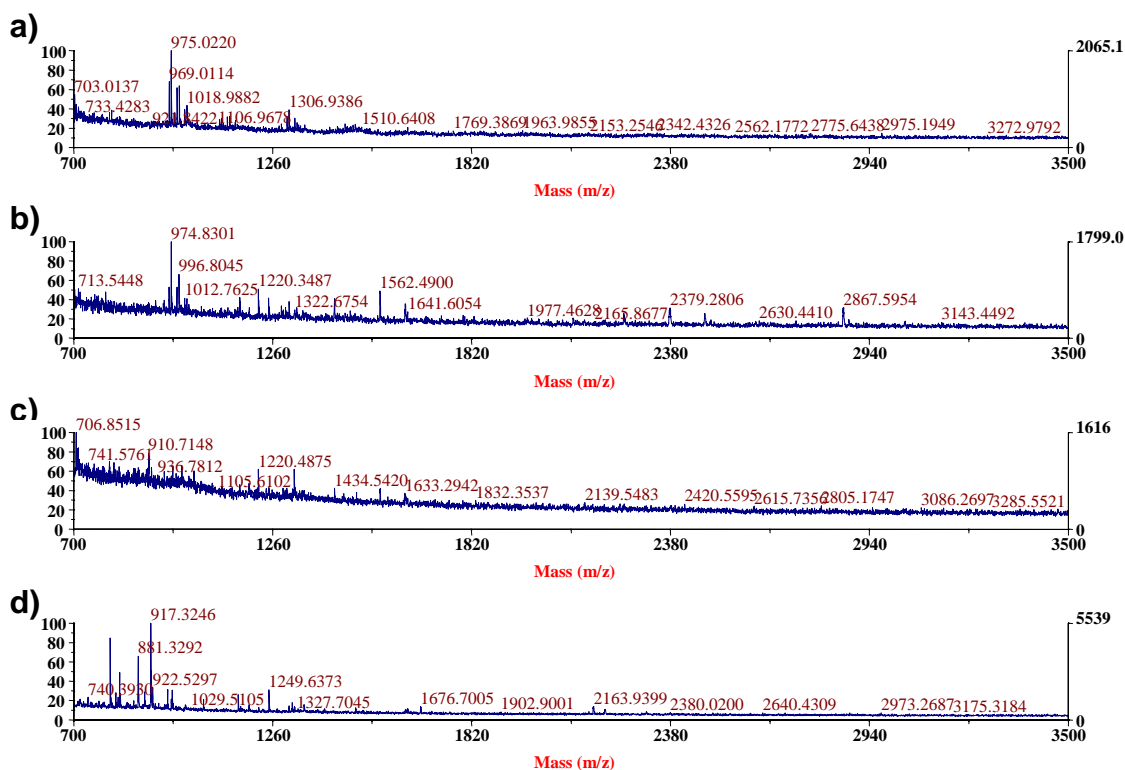
Obr. 4.12: Hmotnostní spektrum BSA za použití matrice kyseliny sinapové



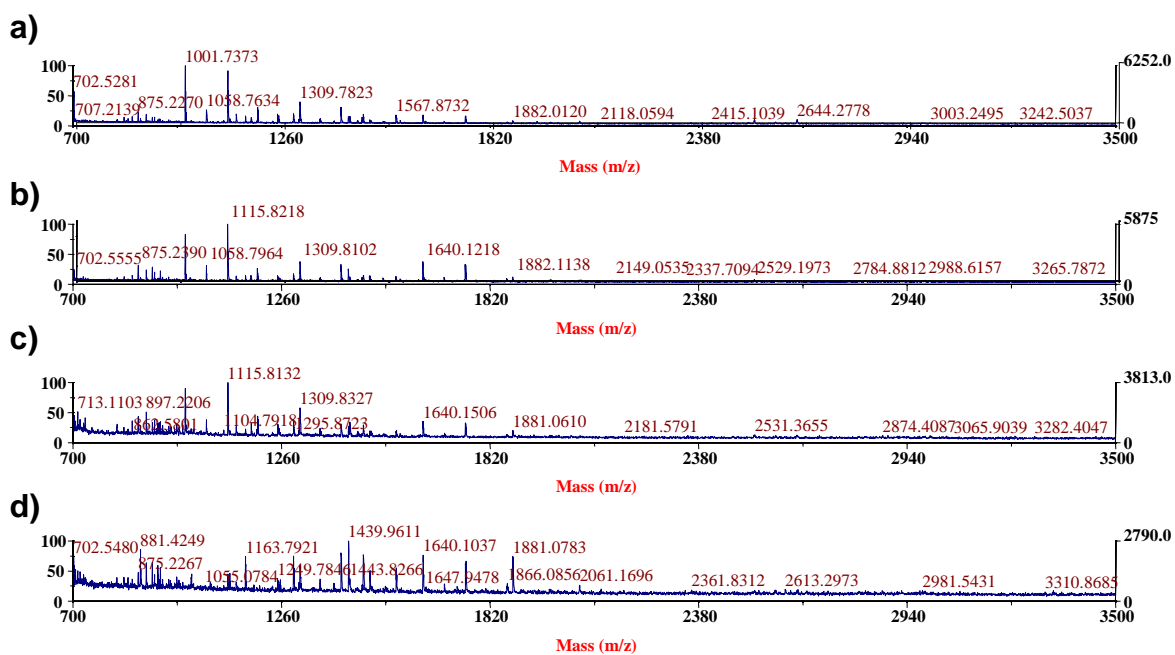
Obr. 4.13: Peptidy BSA, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.14: Peptidy BSA, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.15: Peptidy BSA, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.16: Peptidy BSA, podmínky štěpení protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc

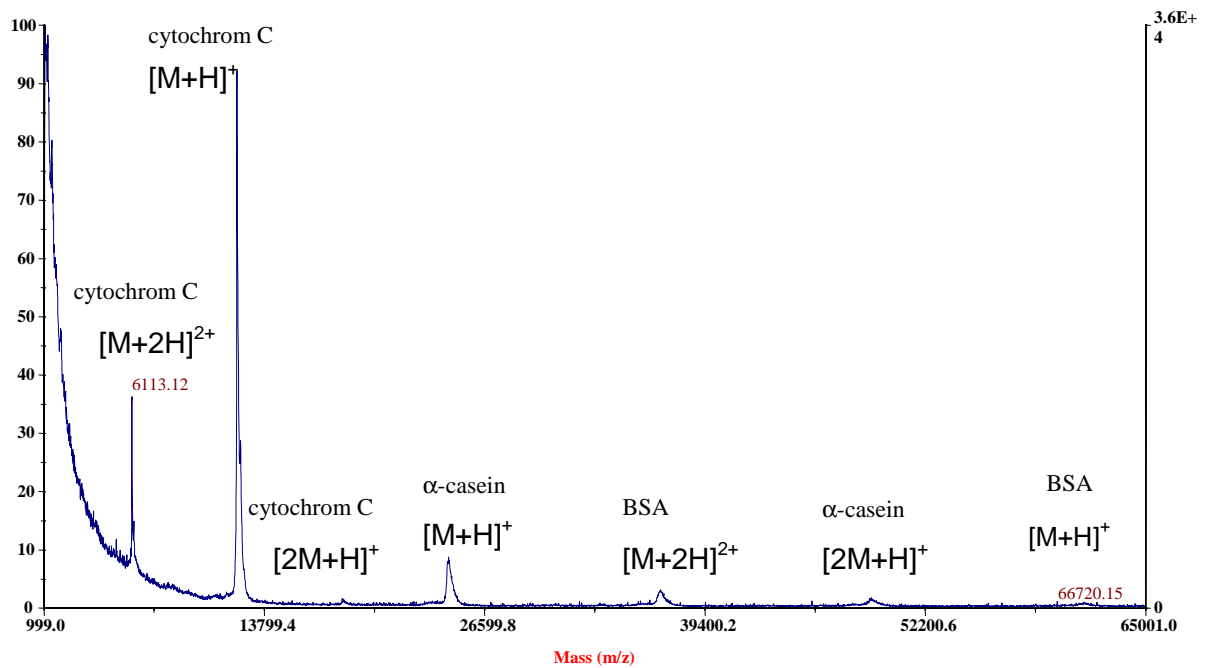
Tab. 4.4 a: Identifikované peptidy BSA po štěpení imobilizovaným trypsinem o poměru protein/trypsin (w/w) 1:1, 1:5 a 5:1 a trypsinem v roztoku (w/w) 50:1 po 10, 20, 40 minutách a po noci.

m/z	sekvence	1 : 1				1 : 5				5 : 1				50 : 1			
		10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N
702,55	VLISSAR		X	X										X	X	X	X
703,60	VLISSAR					X	X	X	X	X					X	X	X
712,50	SEIAHR				X		X	X	X			X				X	X
725,37	CCAADDK			X					X			X	X			X	X
789,69	LVTDLTK			X			X		X					X			
818,59	ATEEQLK	X		X	X	X	X	X	X			X		X		X	X
820,98	FGERALK			X										X			
841,76	LCVLHEK			X										X			X
847,60	LSQKFPK	X			X	X	X	X	X		X		X		X	X	X
918,21	LRCASIQK										X		X		X	X	X
922,21	AEFVEVTK			X			X	X	X								
927,98	YLYEIR		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X
974,65	DLGEEHFK		X	X	X				X		X	X	X			X	
977,41	NECFLSHK				X					X	X	X	X			X	
997,11	QTALVELLK	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X				
1001,05	ALKAWSVAR										X	X	X	X	X	X	X
1002,98	LVVSTQTALA	X										X	X			X	
1014,36	QTALVELLK	X	X		X	X	X	X	X						X		
1015,97	SHCIAEVEK												X		X		X
1024,03	CCTESLVNR				X	X			X	X	X	X	X			X	X
1052,32	CCTKPESER												X				
1138,47	CASIQKFGER	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
1150,80	EACFAVEGPK							X									
1142,15	KQTALVELLK	X	X	X	X			X									
1138,52	CASIQKFGER				X												
1163,98	LVNELTEFAK	X	X	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X
1177,11	ECCDKPLEK			X		X								X	X	X	X

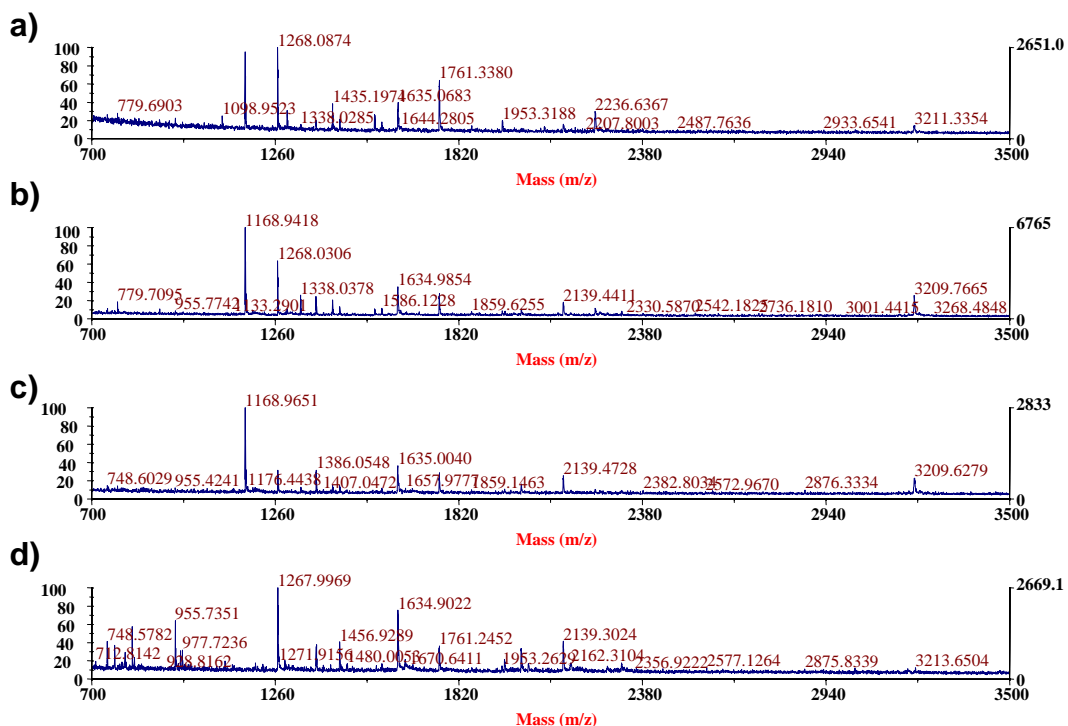
Tab. 4.4 b:

m/z	sekvence	1 : 1				1 : 5				5 : 1				50 : 1			
		10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N
1193,98	DTHKSEIAHR			X		X	X	X	X				X	X	X	X	X
1249,74	FKDLGEEHFK	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
1295,55	FPKAEFVEVTK	X									X		X		X	X	X
1306,46	HLVDEPQNLIK			X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X
1308,32	HKPKATEEQLK		X				X					X		X	X	X	X
1362,87	SLHTLFGDELCK				X	X							X	X		X	
1363,54	ETYGDMADCCEK					X	X	X	X					X	X		X
1385,41	YICDNQDTISSK					X		X	X								
1399,89	TVMENFVAFVDK				X	X	X	X			X						
1418,79	LKECCDKP LLEK		X	X	X				X				X	X	X		
1440,17	RHPEYAVSVLLR	X	X	X	X	X						X		X	X	X	X
1446,68	FWGKYLYE IAR						X								X		
1465,85	VGTRCCTKPESER					X			X			X				X	
1480,20	LGEYGFQNALIVR	X	X	X	X	X	X	X			X		X	X	X	X	X
1497,57	DDPHACYSTVFDK	X	X	X										X	X	X	X
1511,35	VPQVSTPTLVEVSR									X	X		X				
1568,98	DAFLGSFLYEYSR		X	X		X	X							X	X		X
1578,60	ECCHGDLLECADDR													X			X
1633,32	YNGVFQECCQAEDK	X	X			X	X	X	X		X		X				
1640,51	KVPQVSTPTLVEVSR	X	X	X	X	X	X	X			X			X	X	X	X
1756,12	CCAADDKEACFAVEGPK						X							X	X		X
1850,49	LFTFHADICTLPDTEK										X		X				
1884,88	ADLAKYICDNQDTISSK			X	X		X	X				X					X
1888,36	HPYFYAPELLYYANK										X		X				X
1891,98	VASLRETYGDMADCCEK					X											
2003,08	WVTFISLLLLFSSAYS R						X										X
2045,69	RHPYFYAPELLYYANK							X	X								
2105,10	TVMENFVAFVDKCCAADDK																
2494,63	LVNELTEFAKTCVADESHAGCEK		X		X						X		X			X	
2866,97	EYEATLEECCA KDDPHACYSTVFDK																
		15	17	24	22	24	25	22	24	6	18	18	25	22	24	29	31

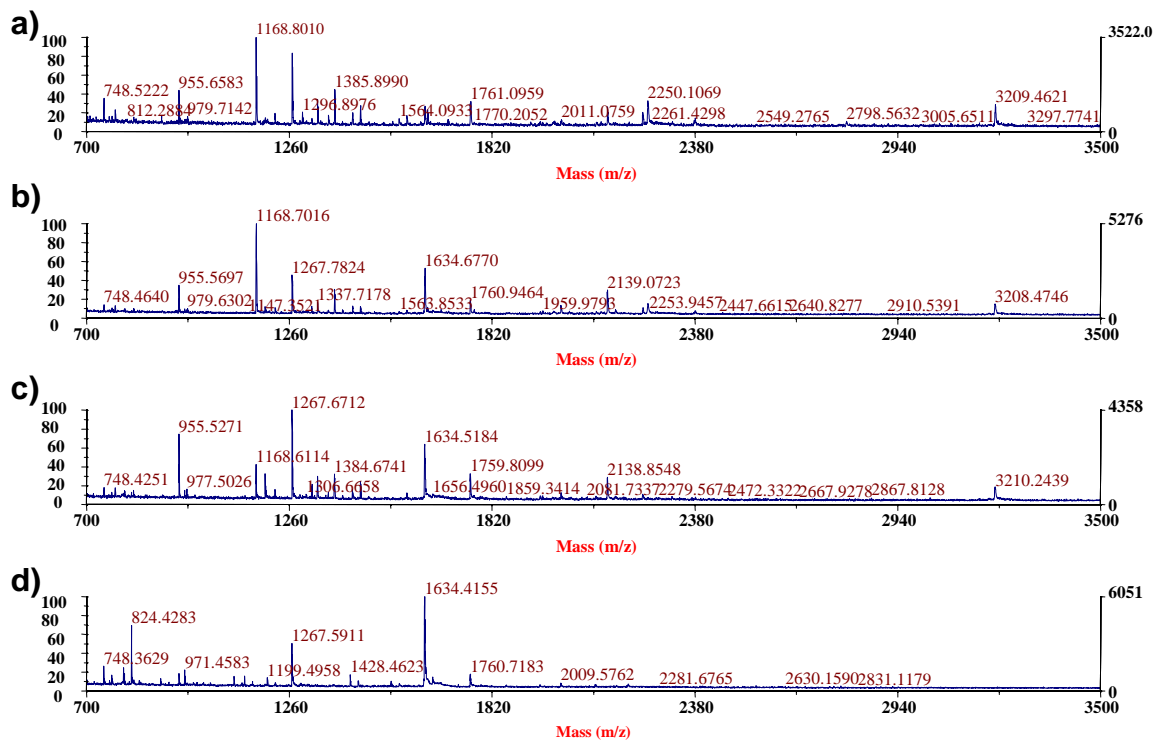
- Směs proteinů



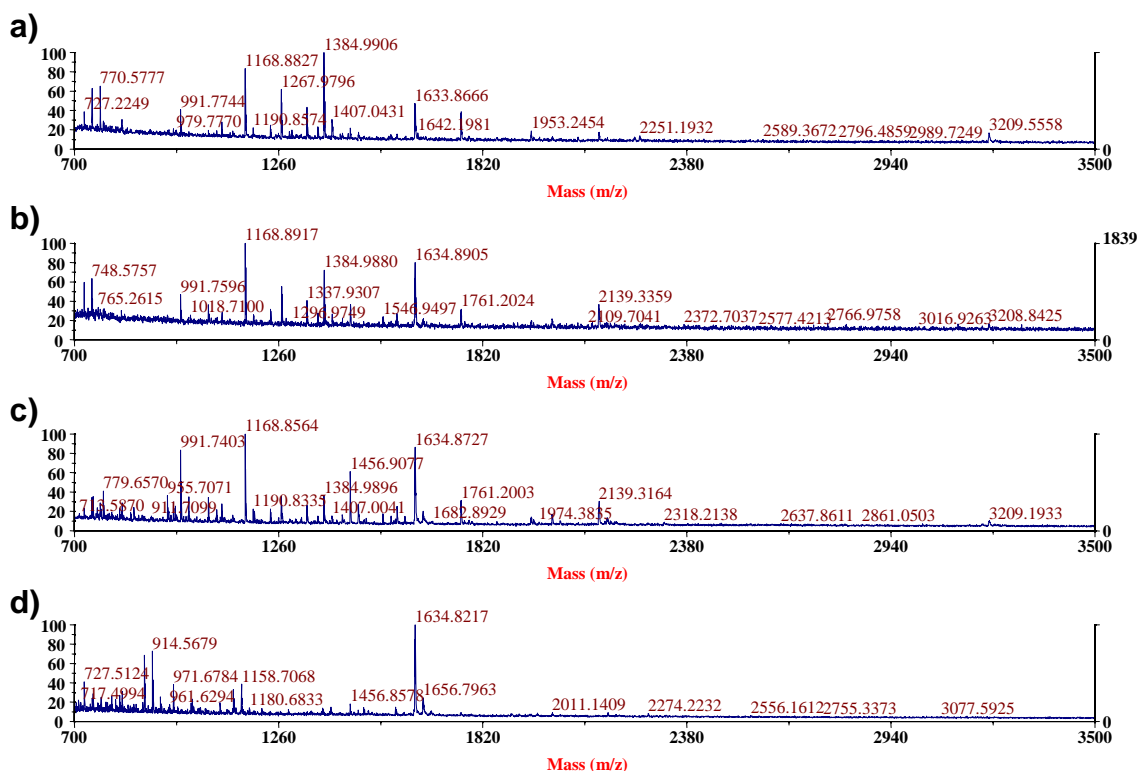
Obr. 4.17: Hmotnostní spektrum směsi proteinů za použití matrice kyseliny sinapové



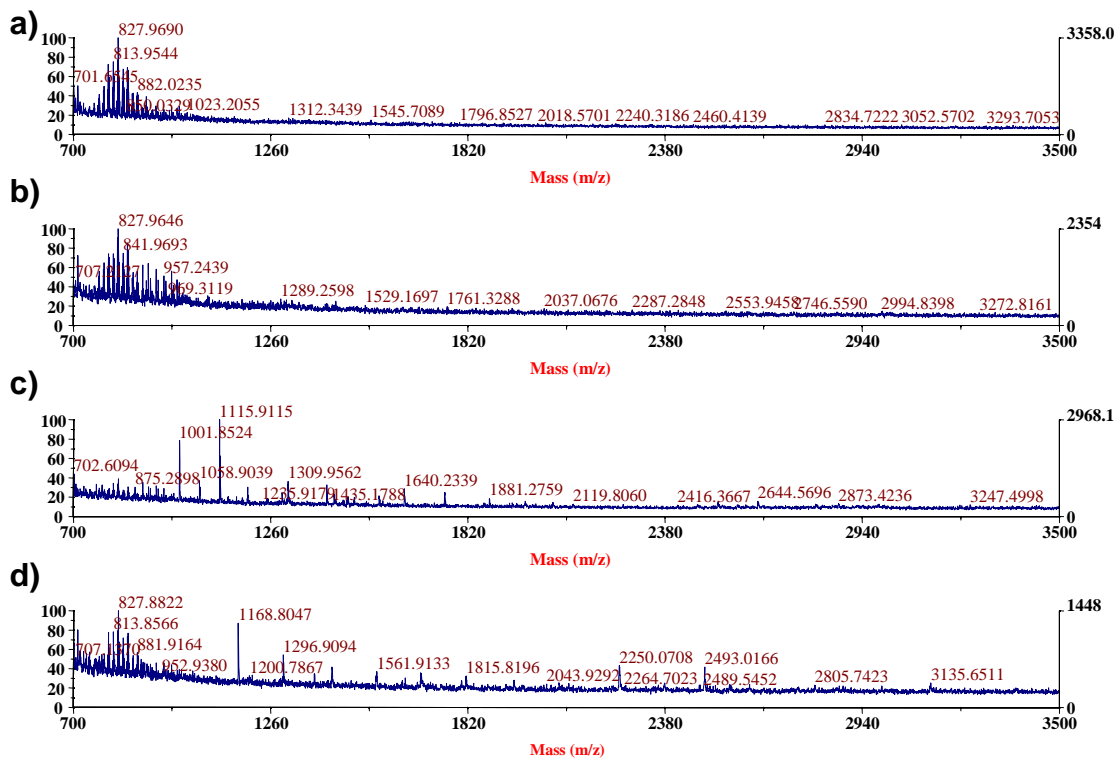
Obr. 4.18: Peptidy směsi proteinů, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.19: Peptidy směsi proteinů, podmínky štěpení protein/imobilizace trypsin (w/w) 1:5: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.20: Peptidy směsi proteinů, podmínky štěpení protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc



Obr. 4.21: Peptidy směsi proteinů, podmínky štěpení protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1: a) 10 minut, b) 20 minut, c) 40 minut, d) přes noc

Tab. 4.5a: Identifikované peptidy směsi proteinů po štěpení imobilizovaným trypsinem o poměru protein/trypsin (w/w) 1:1, 1:5 a 5:1 a trypsinem v roztoku (w/w) 50:1 po 10, 20, 40 minutách a po noci.

m/z	sekvence	1 : 1				1 : 5				5 : 1				50 : 1				
		10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	
727,51	CCAADDK								X									X
748,68	IDDMQK				X				X				X					
	TTMPLW	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
749,51	NYQEAK								X				X					
762,69	KIFVQK							X										
765,89	TTMPLW										X							
779,70	MIFAGIK	X	X					X		X	X	X						
831,66	EDVPSEK				X	X	X	X	X	X	X		X				X	X
863,64	MGDVEKGG							X										
1098,95	MLLEVLNPR												X					
1168,98	TGPNLHGLFGR	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X				X	X
1268,09	YLGYLEQLLR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
1297,10	NDLSLHPDETR																X	X
	TGPNLHGLFGRK	X	X															
1338,00	HIQEDVPSEK	X	X			X	X	X		X	X	X						
1385,10	GIIFNNNPALWK																	
1385,10	FFVAPFPEVFGK	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
1434,14	ALEDDVIDGYPK																	
	HKTGPNLHGLFGR	X	X						X	X		X	X					

Tab. 4.5b:

m/z	Sekvence	1 : 1				1 : 5				5 : 1				50 : 1			
		10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N	10	20	40	N
1457,09	TGQAPGFSYTDANK	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X				
1580,93	ECCHGDLLECADDR							X	X				X			X	X
1585,23	KTGQAPGFSYTDANK	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X				
1633,81	IFVQKCAQCHTVEK	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X				
1636,80	KVPQVSTPTLVEVSR								X				X				
1760,38	HQGLPQEVLENLLR	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X				
1952,41	MKLLILTCLVAVALARPK	X	X	X	X	X	X	X		X	X						
1954,31	YITMVMKVVLTLLR																
1954,31	MKLLILTCLVAVALARPK	X									X						
2010,43	GITWGEETLMEYLENPK		X	X	X		X	X	X		X	X	X				
	MKLLILTCLVAVALARPK		X	X	X			X	X		X	X	X				
2081,56	EDVPSERYLGYLEQLLR									X	X						
2138,15	GITWGEETLMEYLENPKK	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X					
	HPIKHQGLPQEVLENLLR	X	X	X	X				X	X		X					
2250,94	NKGITWGEETLMEYLENPK		X				X		X	X			X				X
2317,46	EPMIGVNQELAYFYPELFR			X					X			X					
3209,71	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR					X	X			X	X	X					
3211,17	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR			X	X												
		16	17	14	15	9	12	18	21	18	19	16	18	-	-	4	7

4.4 Vyhodnocení analýzy RP-HPLC

Ke kvantitativnímu vyhodnocení a pro srovnání efektivity štěpení pomocí imobilizovaného trypsinu a trypsinem v roztoku byla použita chromatografická metoda RP-HPLC.

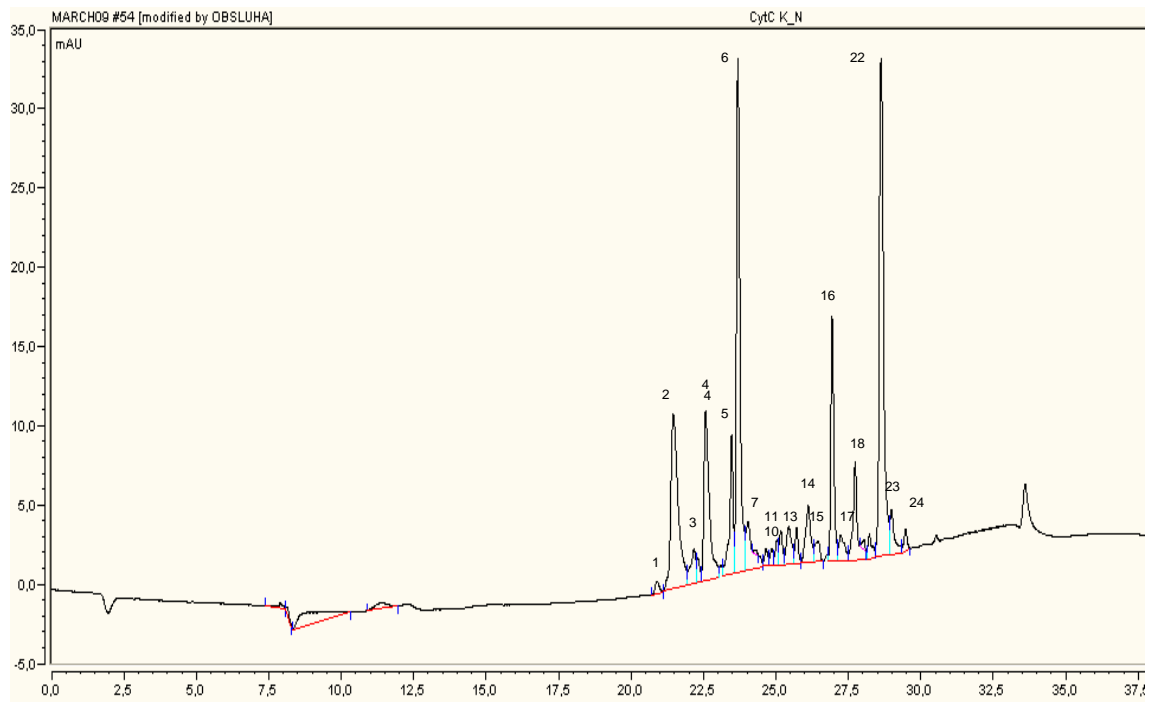
Chromatogramy analyzovaných vzorků byly vyhodnocovány a upravovány v programu Chromeleon. Celkové plochy spekter jednotlivých analýz naštěpených proteinů byly vyneseny do grafu o závislosti celkové plochy píků na čase štěpení. V dalším kroku byly vybrány píky vyskytující se ve všech časech štěpení proteinů o daném poměru proteinu a trypsinu. Plochy těchto píků byly normalizovány a vyneseny do grafu o závislosti normalizovaná plocha píku na době štěpení proteinu. Normalizace byla provedena tak, že píkem s nejvyšší hodnotou plochy dané podmínky, byly vyděleny píky ostatní téže podmínky.

Množství vzorků nanášených na chromatografickou kolonu bylo stanoveno podle koncentrace proteinů v roztoku vzorku.

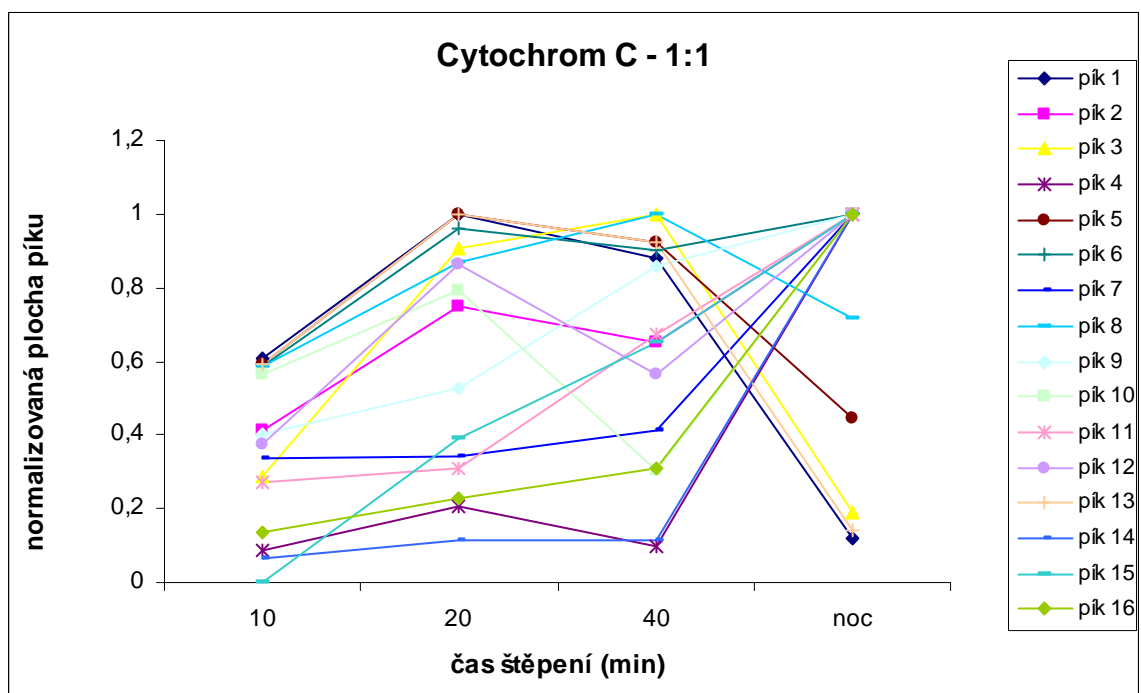
Tab. 4.5: Množství nanášeného vzorku na kolonu

protein	výsledná koncentrace	množství nanášeného vzorku
α -casein	0,8 pmol	8 μ l
cytochrom c	1,66 pmol	4 μ l
BSA	0,28 pmol	12 μ l
směs proteinů	0,91 pmol	8 μ l

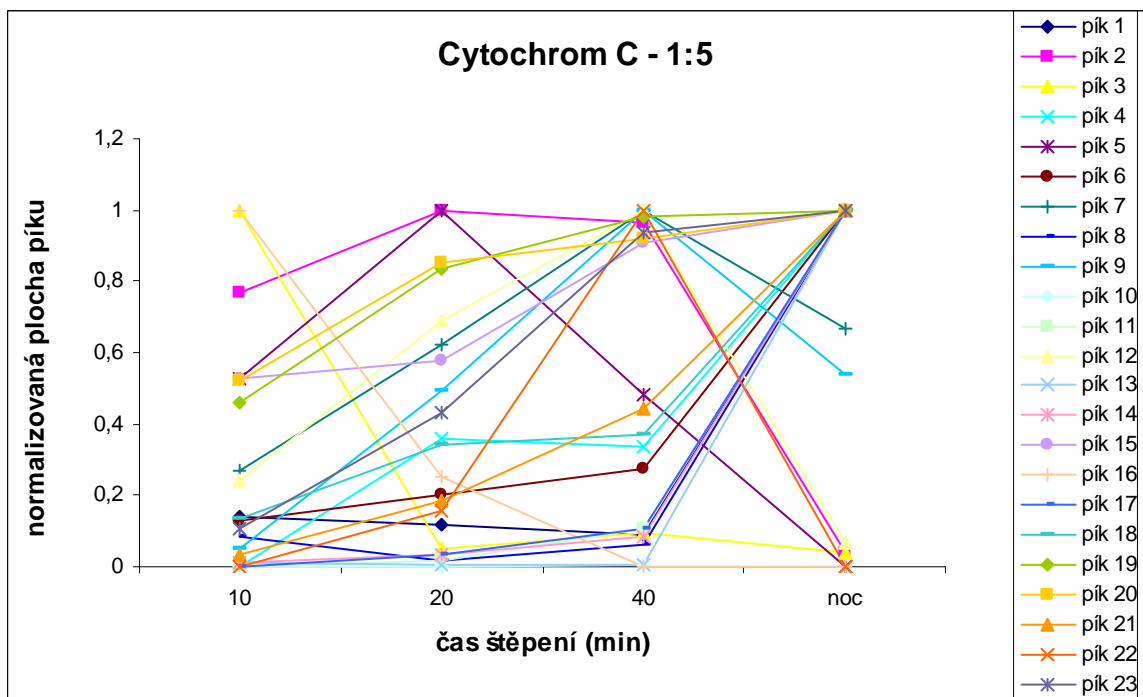
• **cytochrom C**



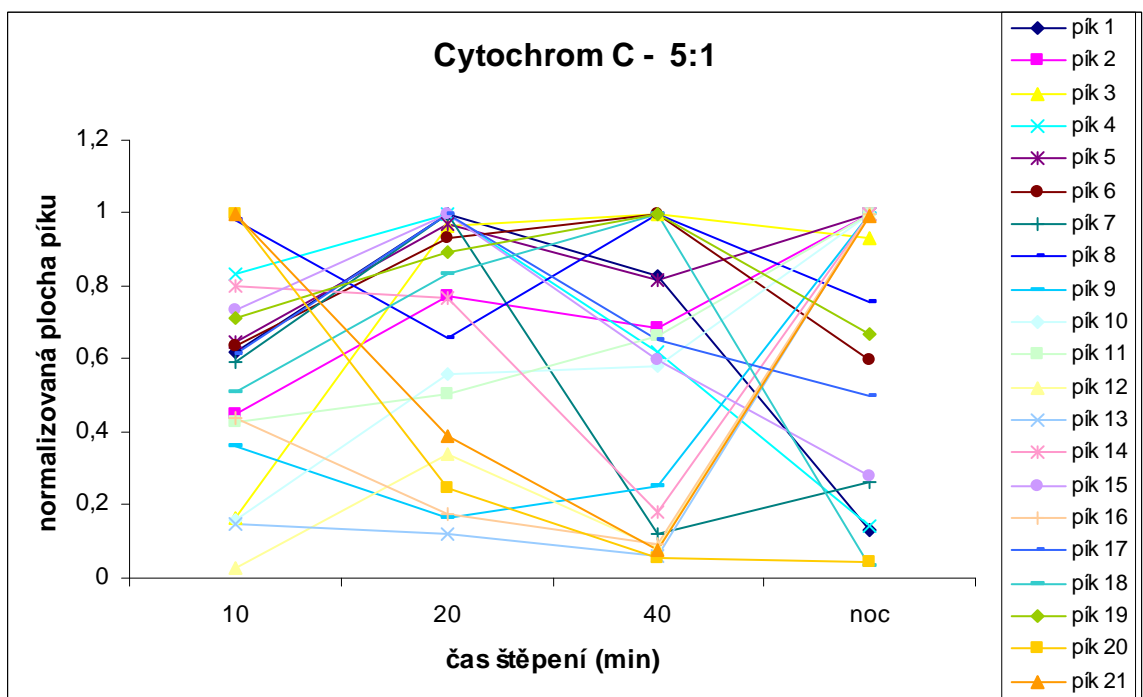
Obr. 4.22: Příklad chromatogram cytochromu C



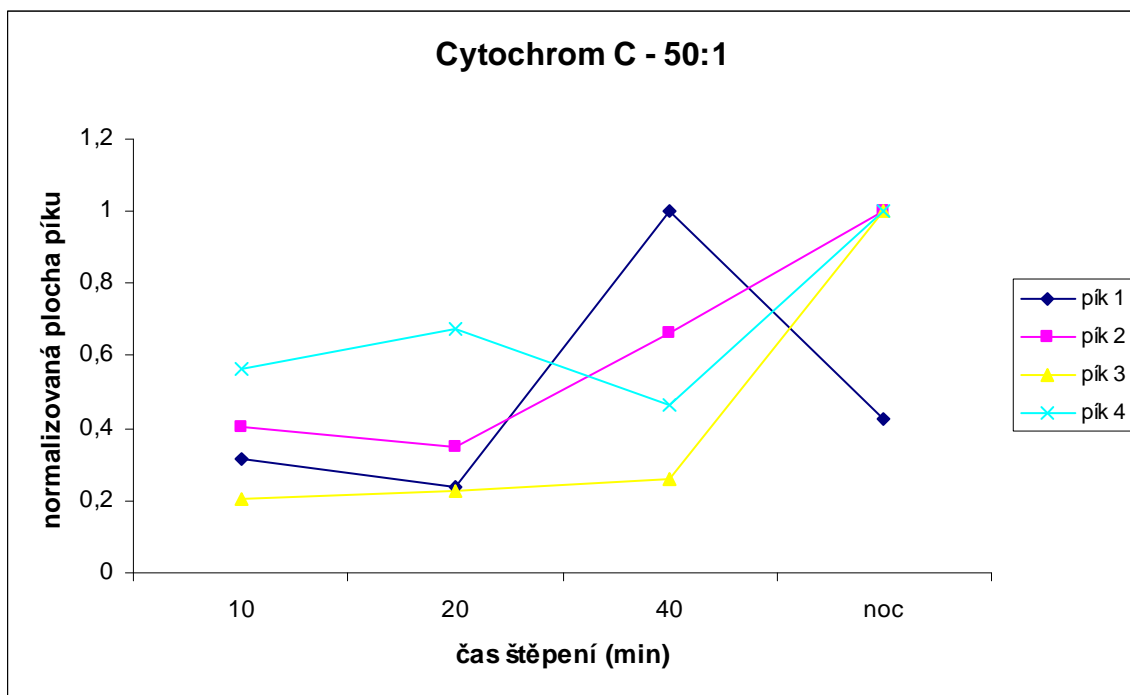
Obr. 4.23: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1



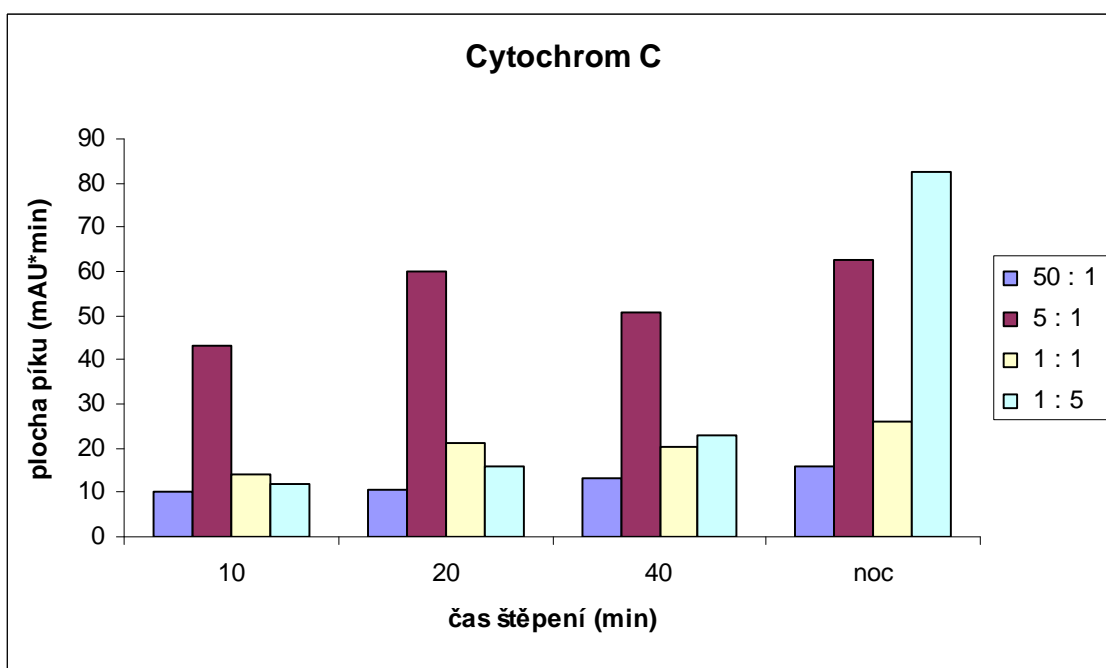
Obr. 4.24: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5



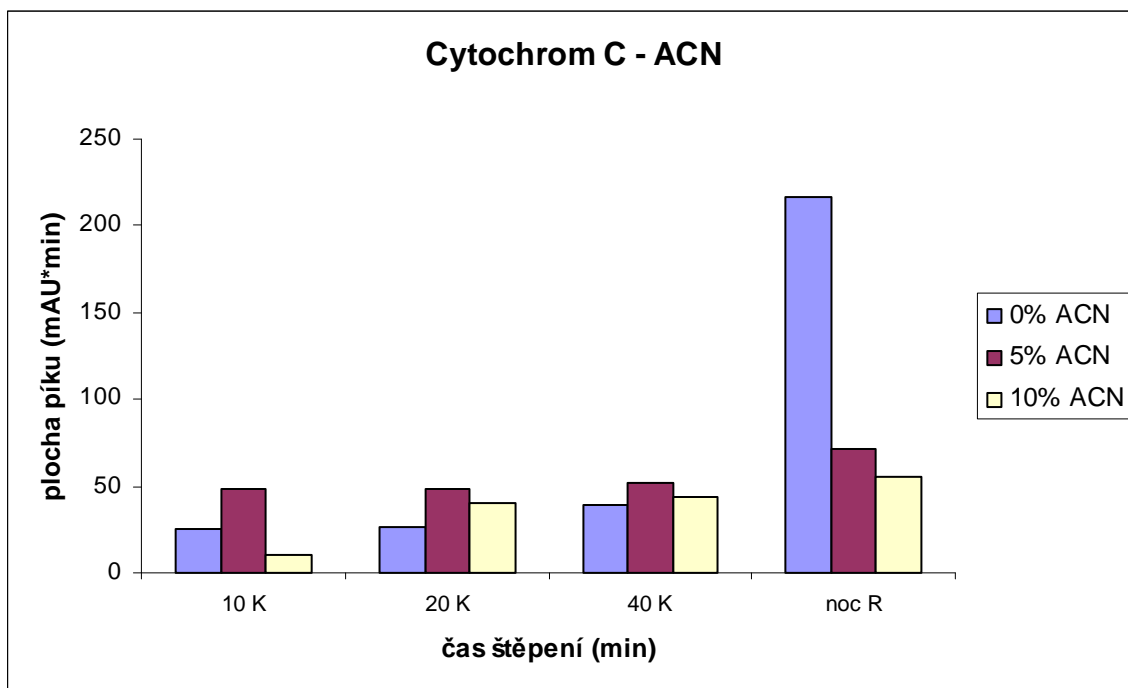
Obr. 4.25: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1



Obr. 4.26: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/ trypsin v roztoku (w/w) 50:1

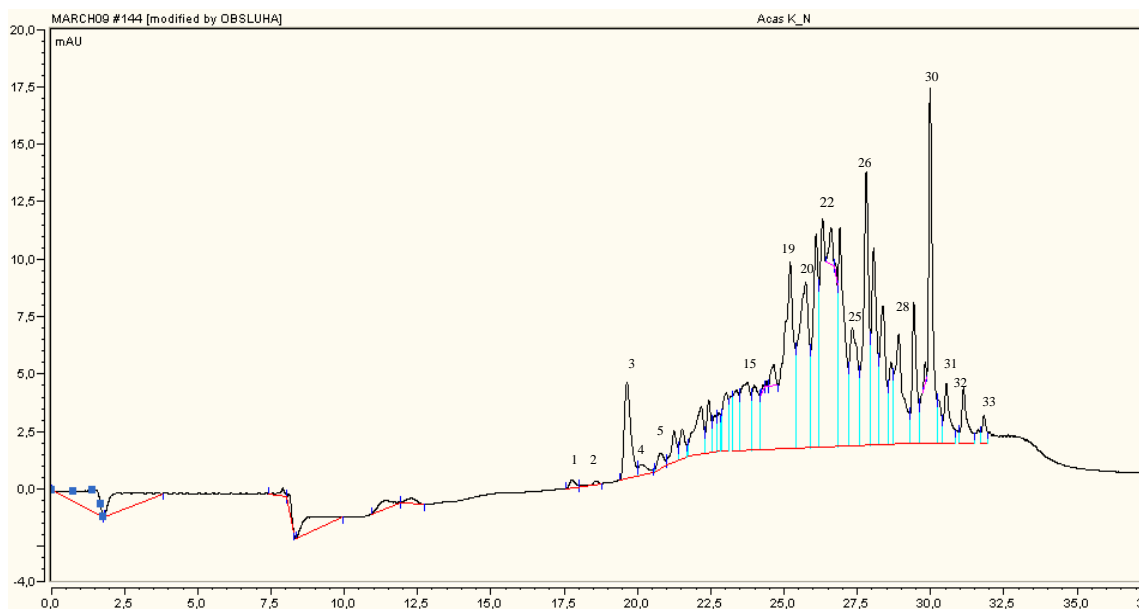


Obr. 4.27: Porovnání celkových ploch integrovaných píků peptidů cytochromu C za všech podmínek štěpení

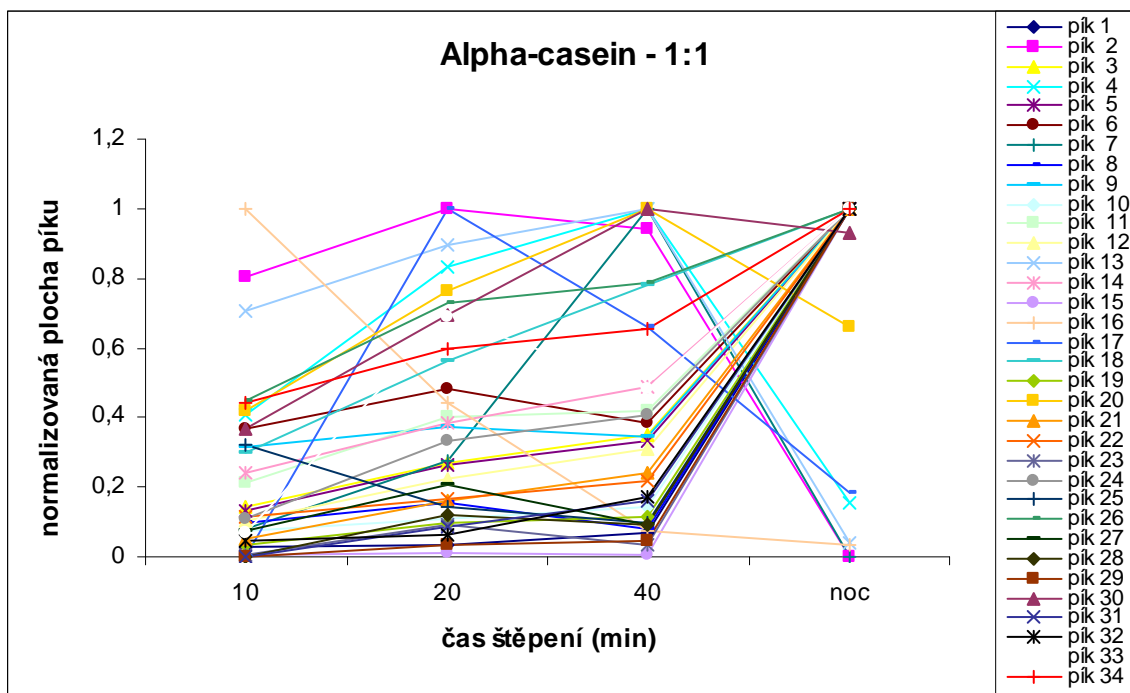


Obr. 4.28: Porovnání celkových ploch integrovaných píků peptidů cytochromu C při štěpení puřem obsahující 5 a 10% acetonitrilu. 10, 20 a 40 minut bylo štěpeno poměrem protein/imobilizovaný trypsinen (w/w) 1:1, štěpení přes noc protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1.

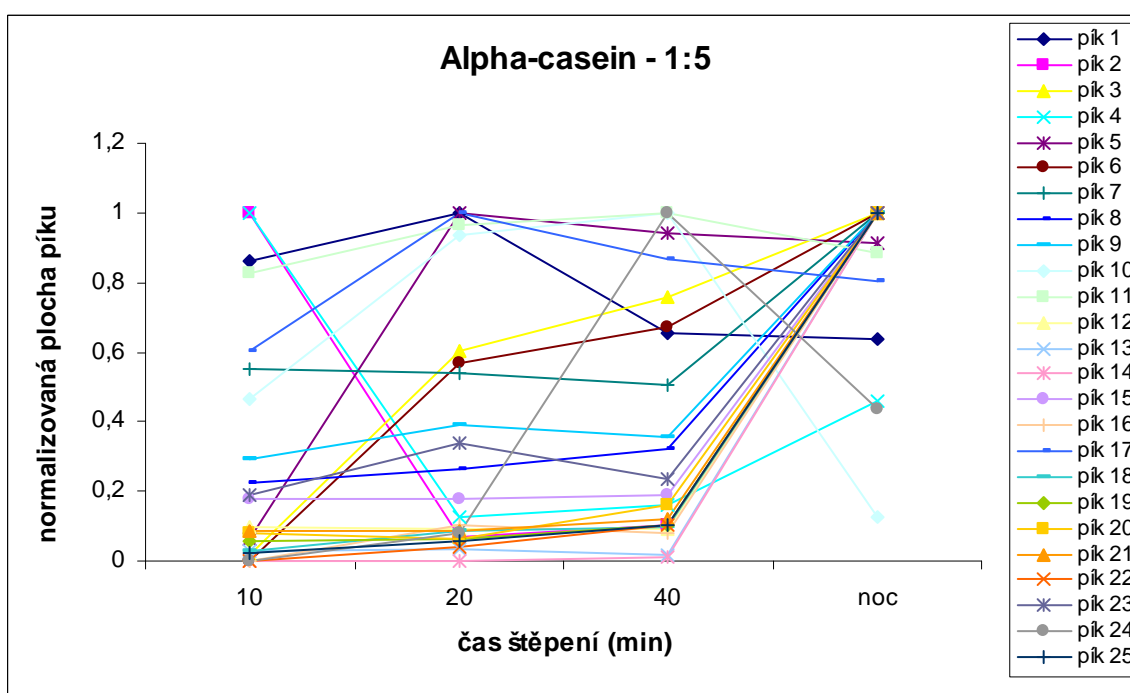
- **α -casein**



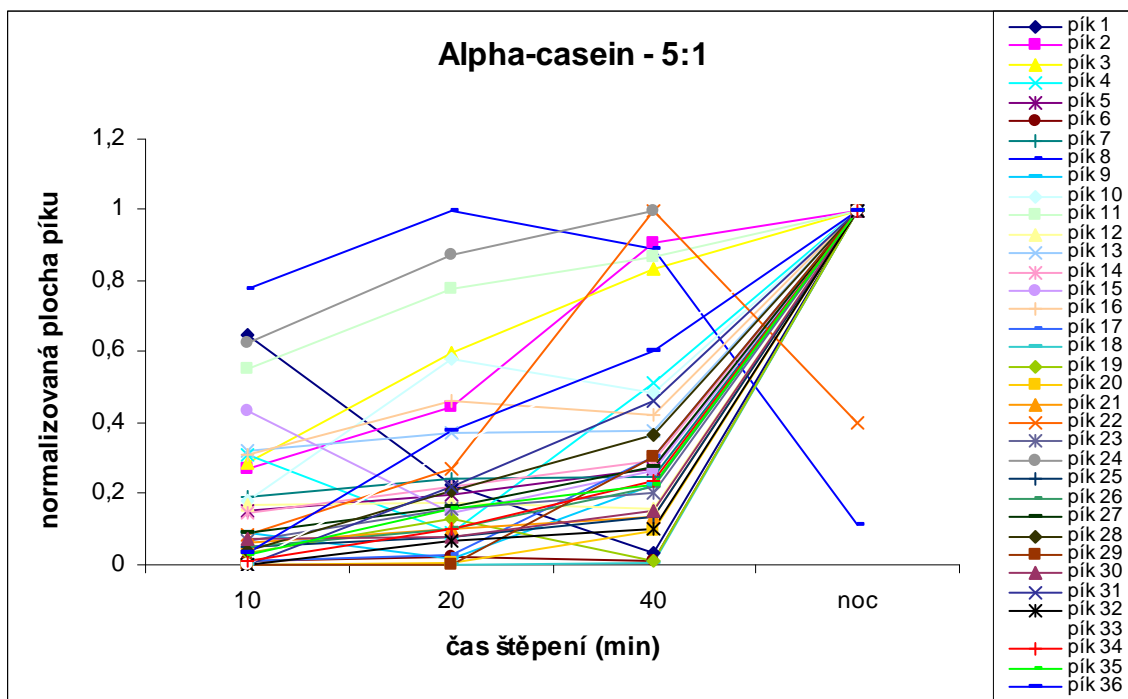
Obr. 4.29: Příklad chromatogramu α -caseinu



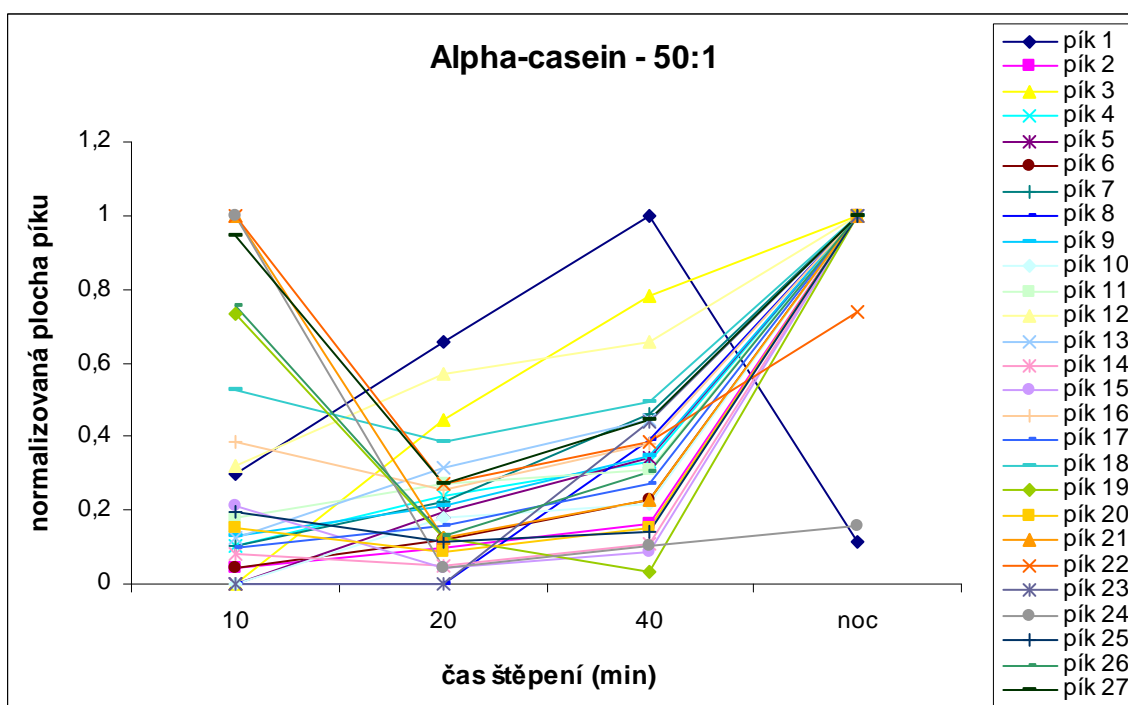
Obr. 4.30: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1



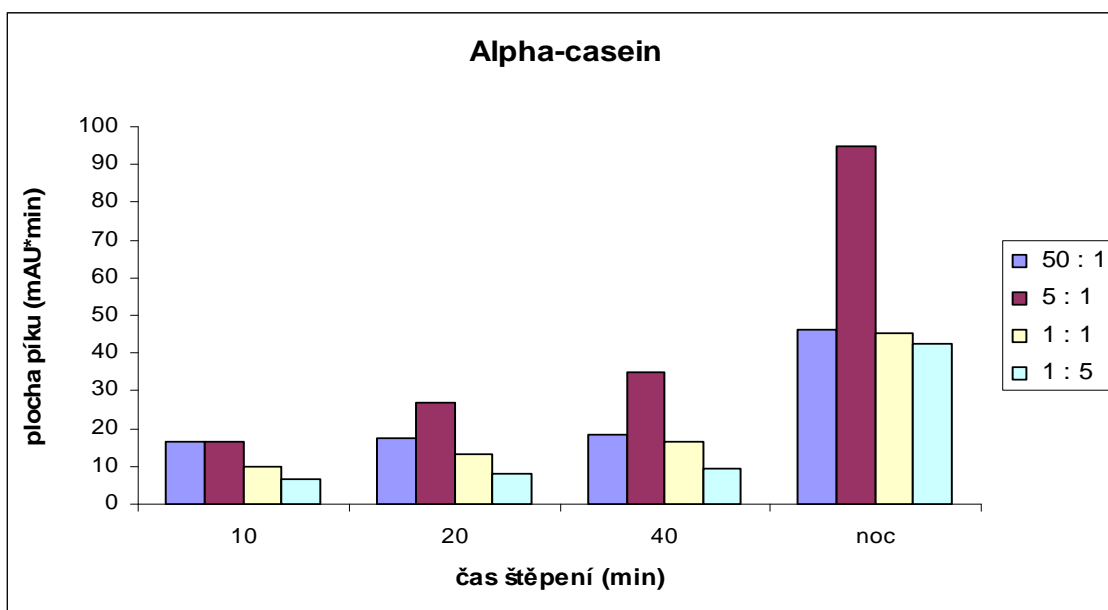
Obr. 4.31: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5



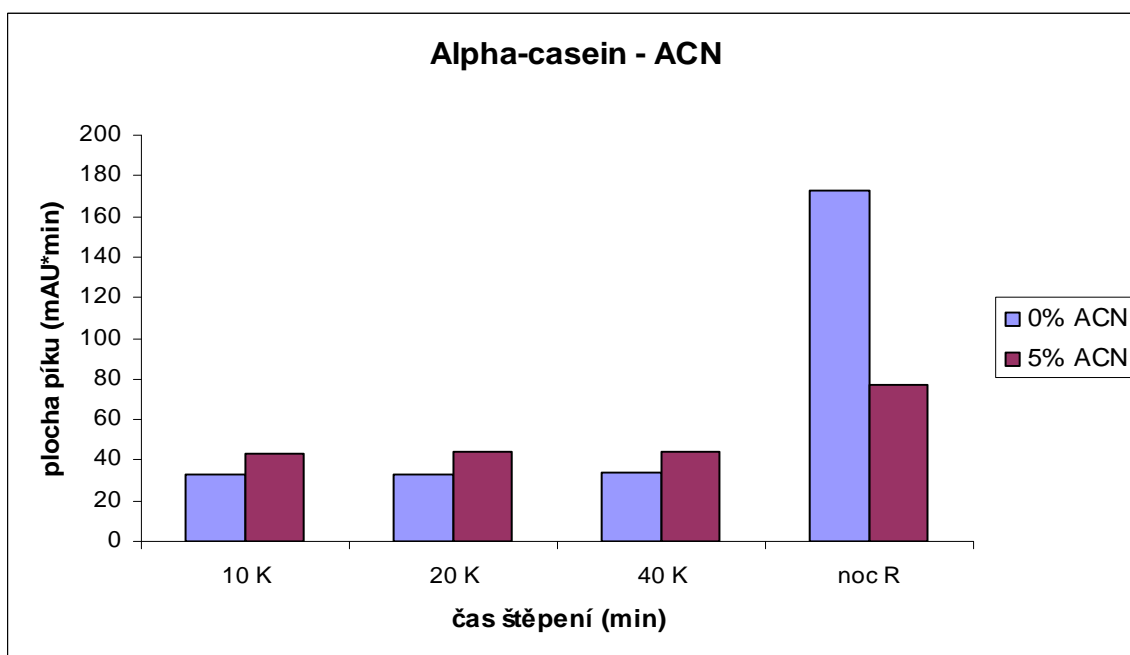
Obr. 4.32: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1



Obr. 4.33: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1

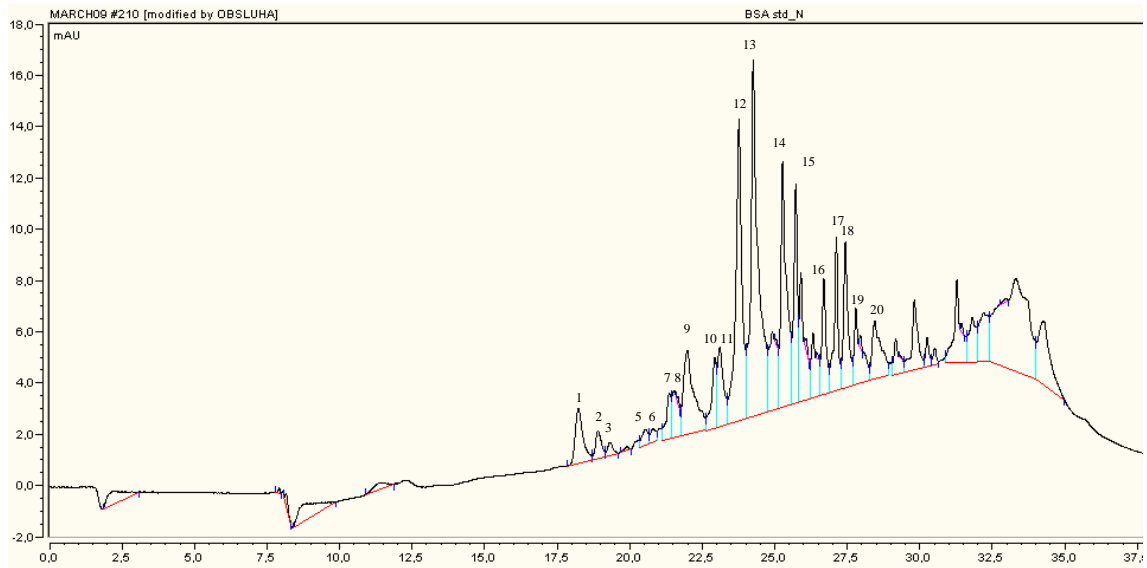


Obr. 4.34: Porovnání celkových ploch integrovaných píků peptidů α -caseinu za všech podmínek štěpení

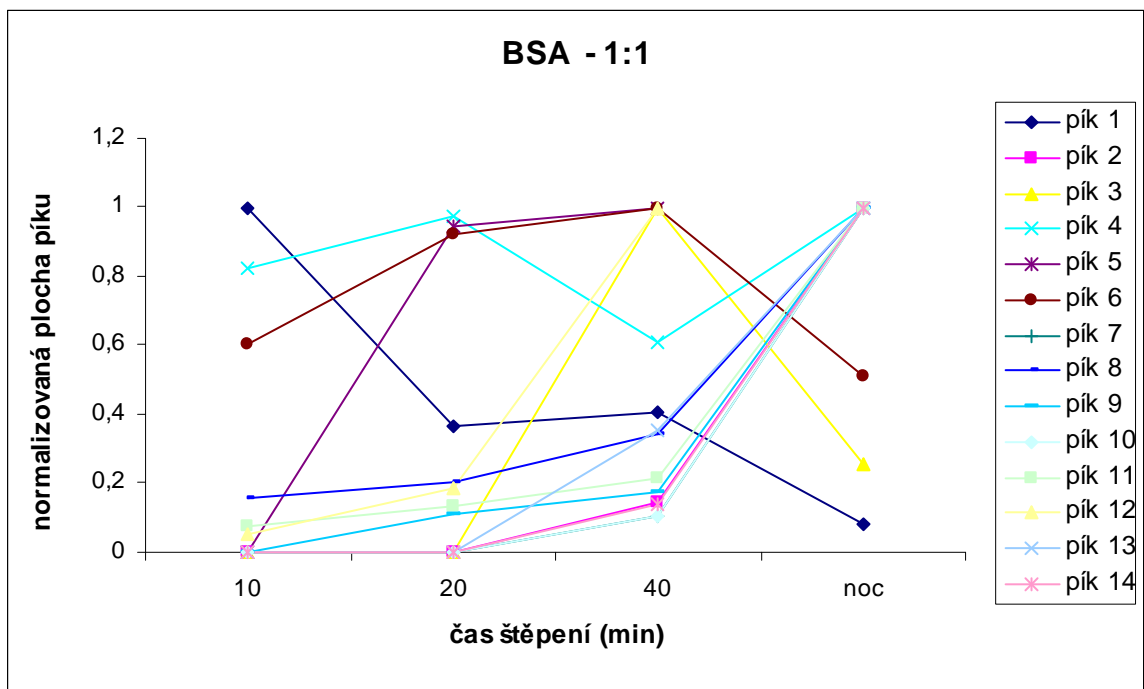


Obr. 4.35: Porovnání celkových ploch integrovaných píků peptidů α -caseinu při štěpení pufrům obsahující 5% acetonitrilu. 10, 20 a 40 minut bylo štěpeno poměrem protein/imobilizovaný trypsinen (w/w) 1:1, štěpení přes noc protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1.

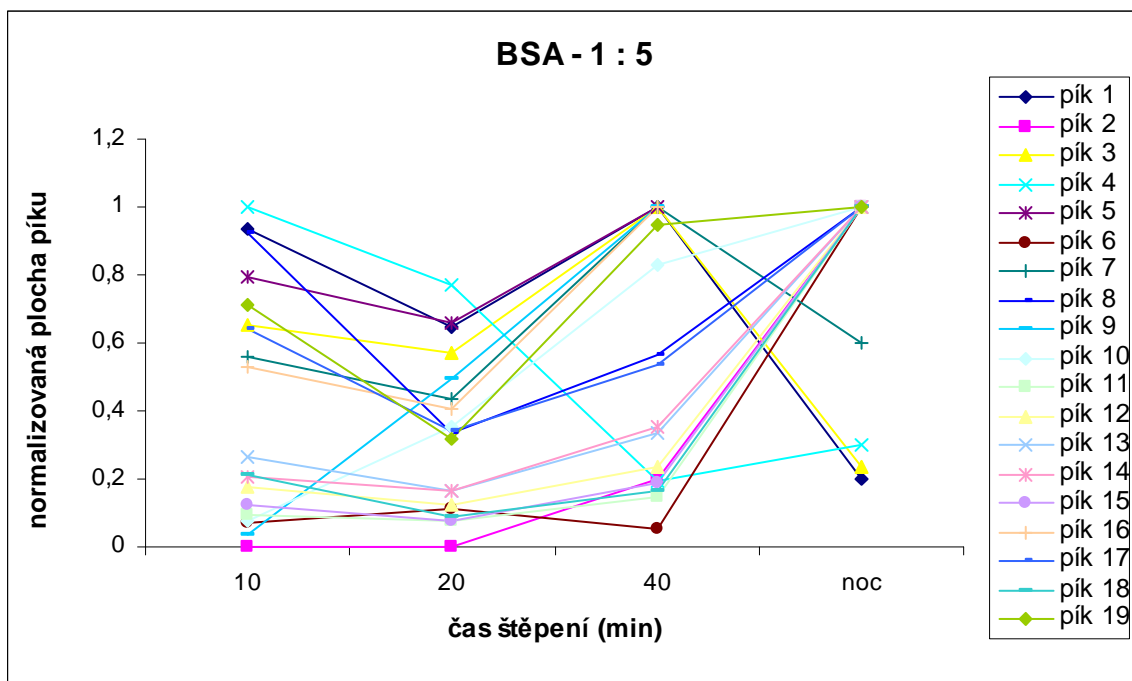
- **BSA**



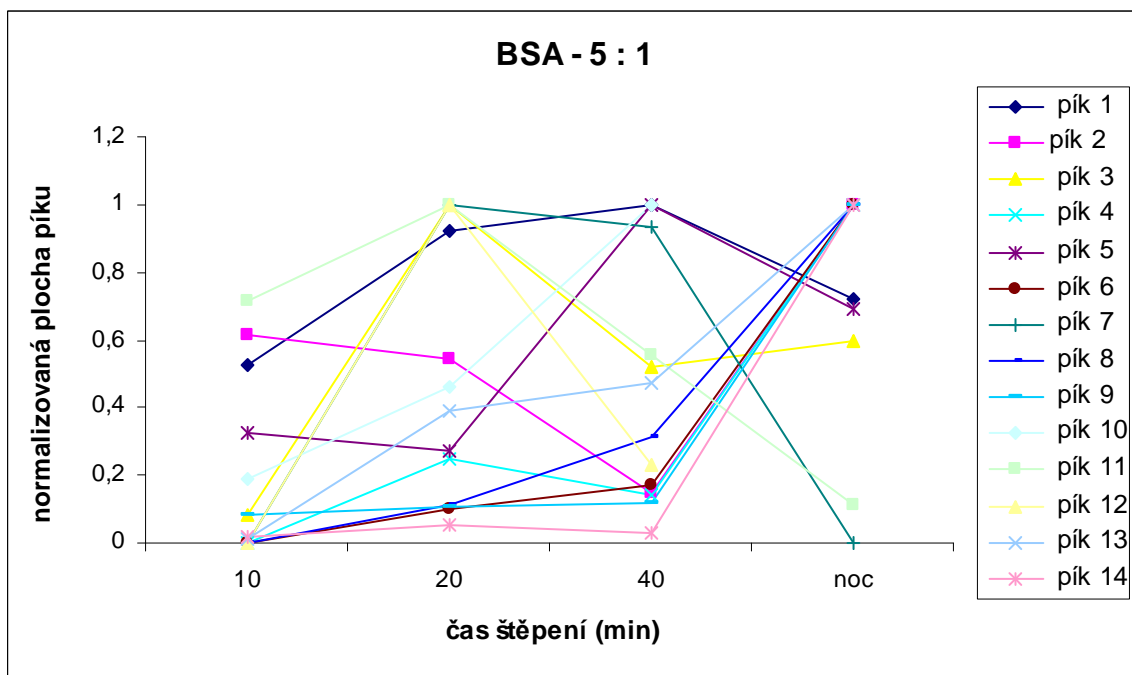
Obr. 4.36: Příklad chromatogramu BSA



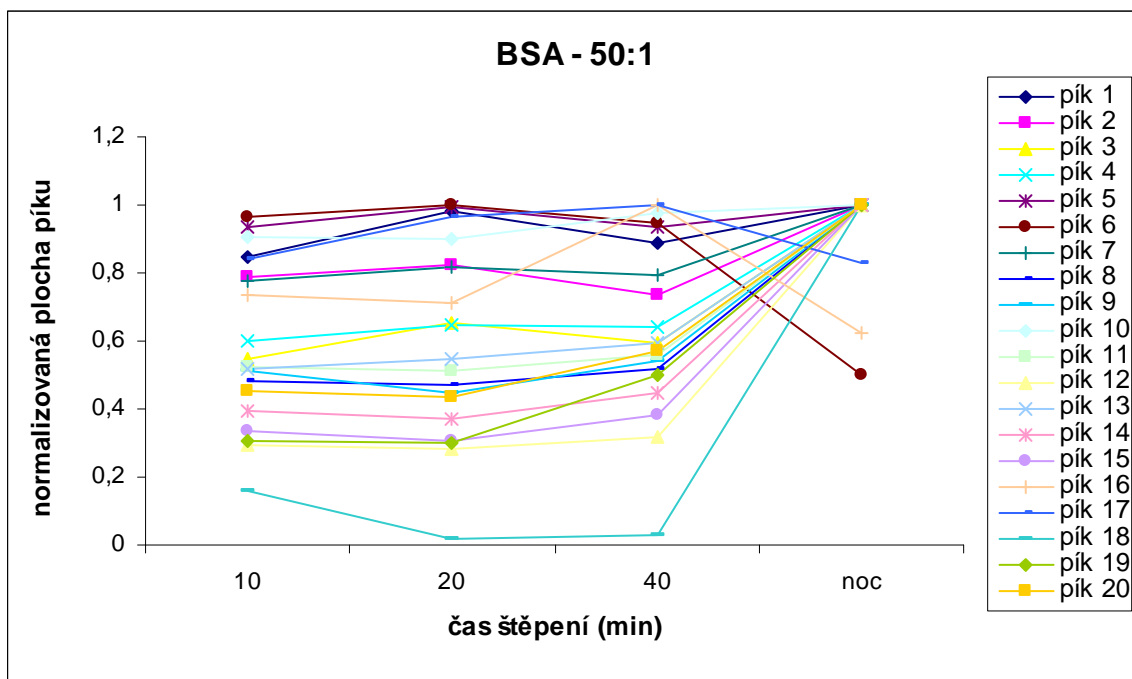
Obr. 4.37: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1



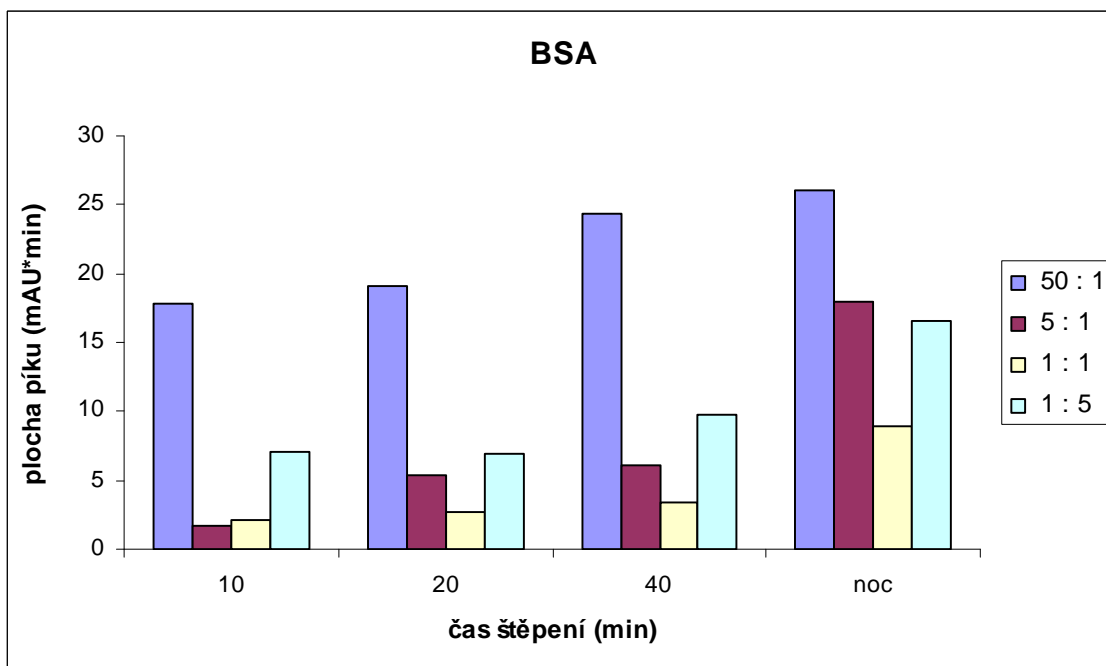
Obr. 4.38: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5



Obr. 4.39: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1

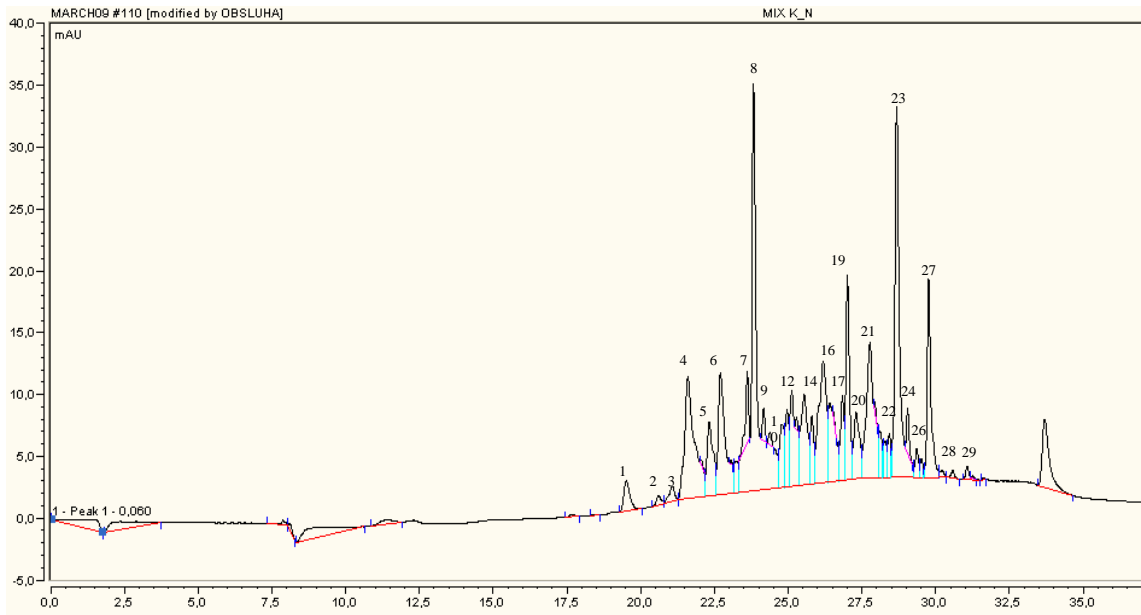


Obr. 4.40: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1

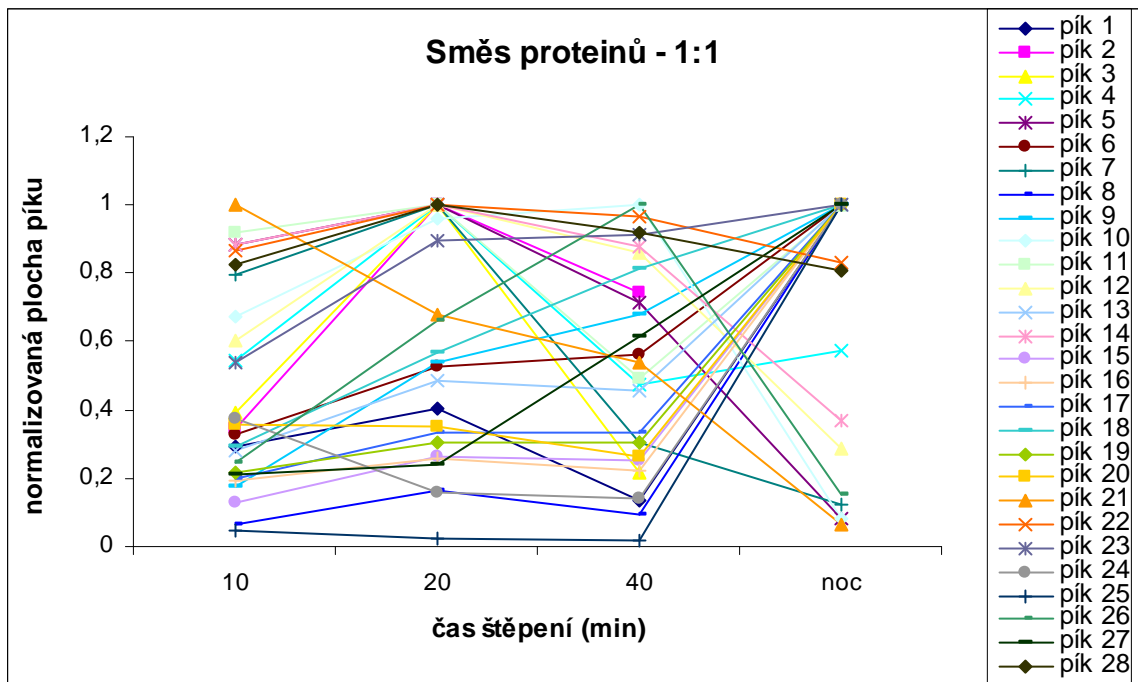


Obr. 4.41: Porovnání celkových ploch integrovaných píků peptidů BSA za všech podmínek štěpení

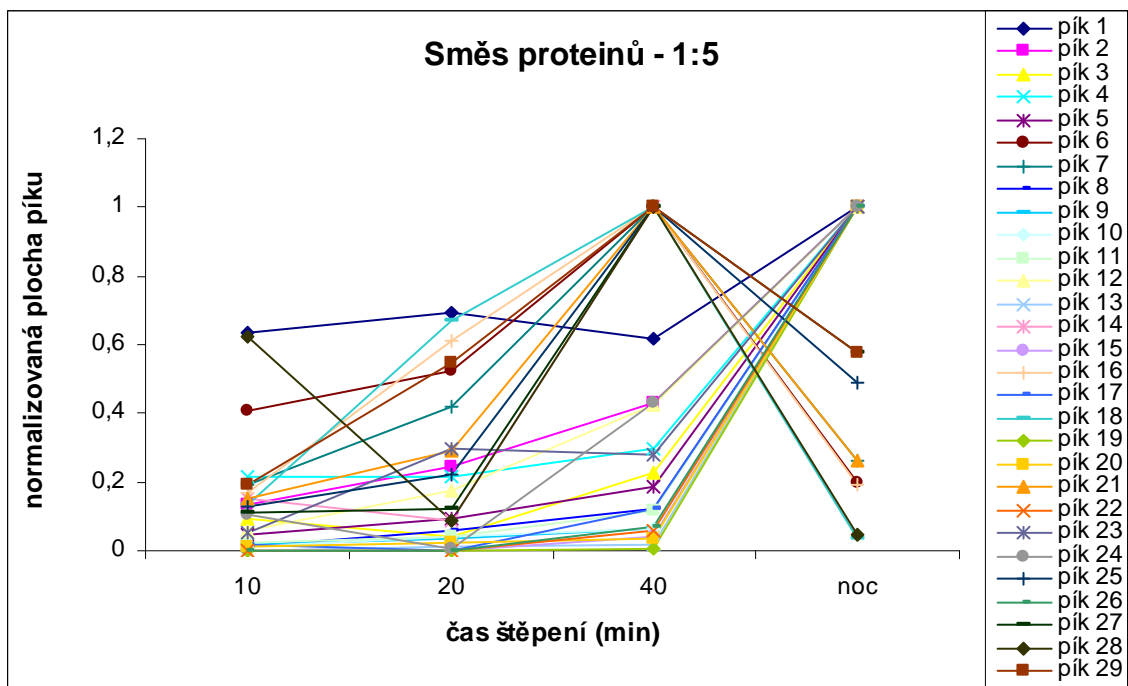
- směs proteinů



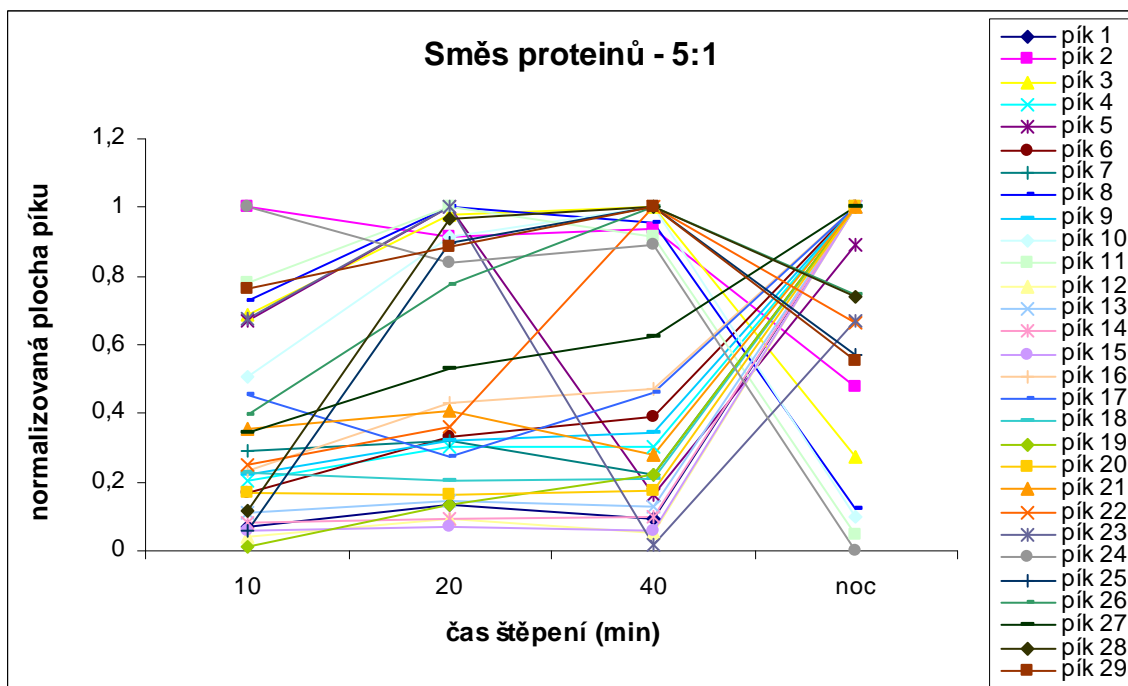
Obr. 4.42: Příklad chromatogramu směsi proteinu



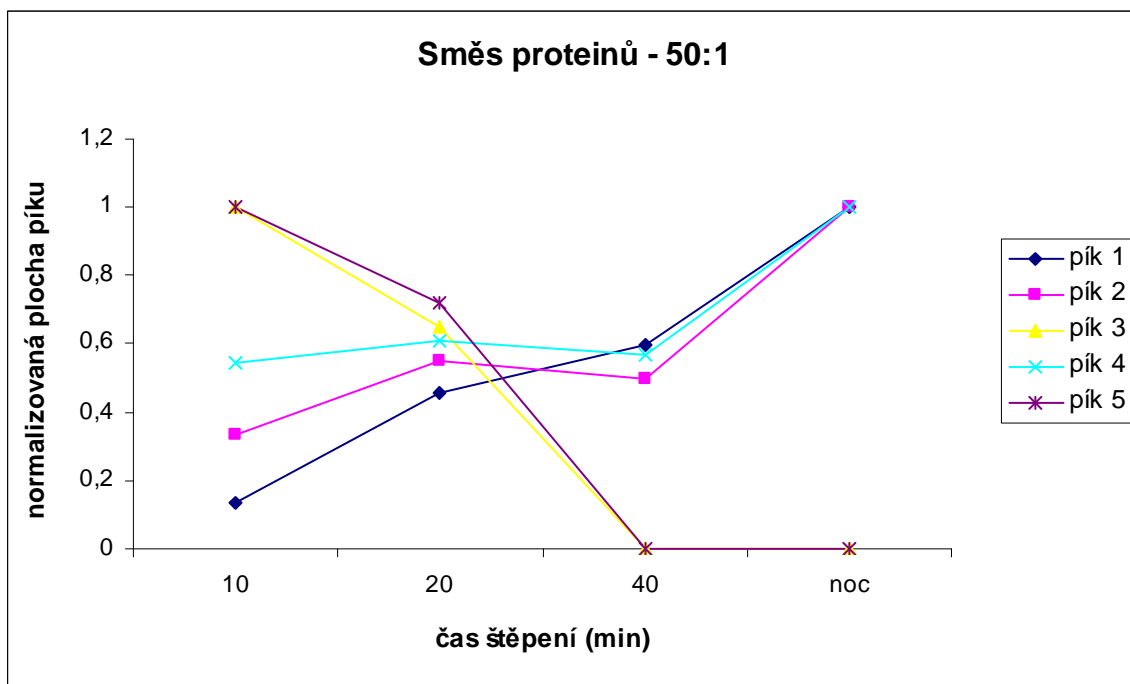
Obr. 4.43: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1



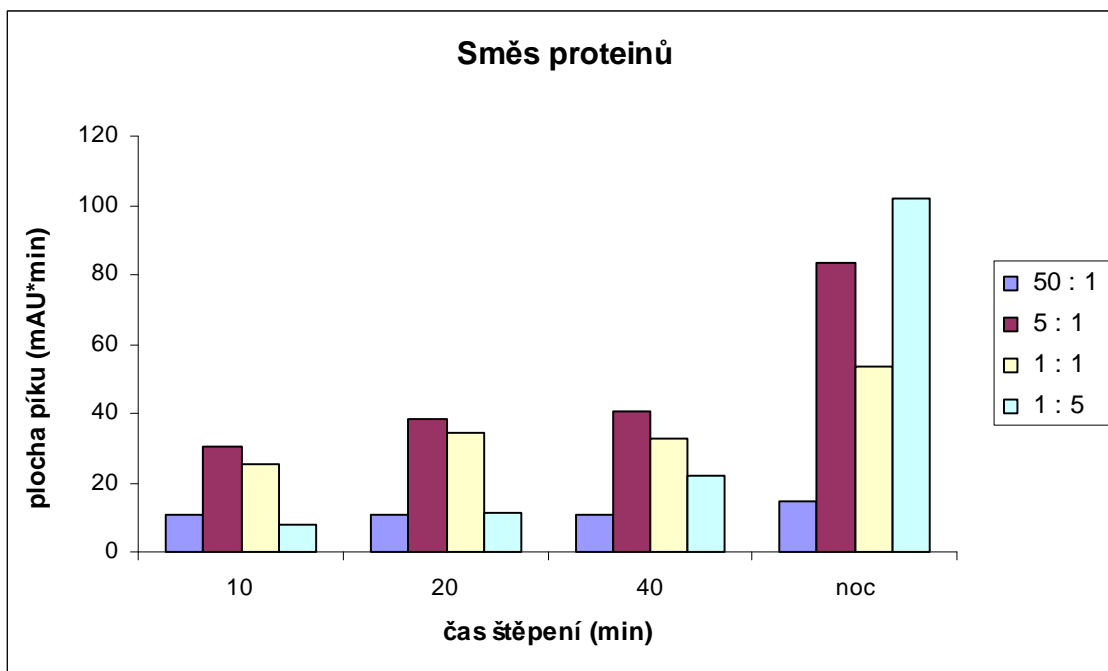
Obr. 4.44: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5



Obr. 4.45: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1



Obr. 4.46: Průběh změny plochy píku v čase štěpení za podmínky protein/trypsin v roztoku (w/w) 50:1



Obr. 4.47: Porovnání celkových ploch integrovaných píků peptidů směsi proteinů za všech podmínek štěpení

Tři standardní proteiny, cytochrom C (mol. hm. 12 384 Da), α -casein (mol. hm. 24 529 Da), hovězí sérový albumin (mol. hm. 69 293 Da) a jejich směs byly použity pro porovnání efektivity štěpení mezi imobilizovaným trypsinem na magnetických mikročasticích a v proteomice běžně využívaným trypsinem v roztoku.

Štěpícím pufrům byl zvolen 50mM NH_4HCO_3 [56, 58, 66] a teplota v průběhu reakce 37°C [54, 57, 59]. pro štěpení imobilizovaným trypsinem byly zvoleny poměry protein/enzym (w/w) 5:1, 1:1 a 1:5 [57, 59] a doba štěpení 10, 20, 40 minut a 18 hodin (štěpení přes noc) [60, 61]. Pro trypsin v roztoku byl použit poměr protein/trypsin (w/w) 50:1 [54, 63, 66]. V případě vyššího množství trypsinu ve štěpícím roztoku by mohlo docházet k jeho autolýze, což je nežádoucí jev projevující se snížením efektivity štěpení proteinů.

Ke kvantitativnímu porovnání naštěpených vzorků byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a pro kvantitativní vyhodnocení chromatografická metoda RP-HPLC.

Výsledky analýz obou metod pro jednotlivé proteiny a podmínky byly mezi sebou porovnány. Pro MALDI-TOF byly využito množství identifikovaných peptidů ve vzorku, pro RP-HPLC celkové plochy píků vyelovaných peptidů a jejich průběh během doby štěpení.

Pro cytochrom C z grafu obr. 4.27 je vidět, že pro tento protein byl nejúčinněji štěpen pomocí imobilizovaného trypsinu v poměru protein/trypsin 5:1. Mezi poměrem protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1 a 1:5 do 40 minuty štěpení není výrazný rozdíl. Přes noc byl cytochrom C nejefektivněji naštěpen za poměru protein/imobilizovaný (w/w) trypsin 1:5 a následně poměrem 5:1. Štěpení pomocí trypsinu v roztoku je u tohoto proteinu velmi málo účinné. Při porovnání těchto výsledků s tab. 4.2, je viditelné, že nejvíce peptidů bylo identifikováno také při použitém poměru protein/trypsin (w/w) 5:1. Je zřejmé, že efektivita jeho naštěpení tímto poměrem je vyrovnaná ve všech časech odebrání vzorku.

Cytochrom C byl také štěpen za podmínky změny složení štěpícího pufru. Pufr 50 mM NH_4HCO_3 nejprve obsahoval 5% acetonitrilu a následně 10% [57]. Tento experiment, byl ale z důvodu nedostatku času proveden za jiných podmínek než experimenty předešlé. Byly zde porovnávány pouze časy štěpení imobilizovaným trypsinem na magnetických mikročasticích o poměru

protein/trypsin (w/w) 1:1 po dobu 10, 20 a 40 minut. Trypsinem v roztoku bylo provedeno štěpení pouze přes noc o poměru protein/trypsin (w/w) 50:1.

Z grafu obr. 4.28 je viditelné, že přidavkem 5 a 10% acetonitrilu (ACN) do štěpícího pufru se účinnost štěpení imobilizovaným trypsinem zvyšuje oproti pufru bez ACN. Přidání 5% se zdá být účinnější než 10% ACN. Naopak pro štěpení roztokem trypsinu přes noc se účinnost přidavkem ACN do pufru snižuje.

Pro α -casein z grafu obr. 4.34 vyplývá, že nejúčinnější byl ve všech časech štěpení v poměr protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 5:1. Běžně používané štěpení roztokem trypsinu se ukazuje jako druhé nejefektivnější. Při porovnání s tabulkou 4.3 s výsledky z MALDI-TOF bylo také nejvíce peptidů identifikovaných při poměru protein/trypsin (w/w) 5:1.

U α -caseinu byl proveden také experiment se změnou složení štěpícího pufru. Z důvodu nedostatku času bylo porovnáno pouze štěpení s přidavkem 5% acetonitrilu do štěpícího pufru 50mM NH_4HCO_3 [57]. Protein byl štěpen po 10, 20 a 40 minut pomocí imobilizovaného trypsinu o poměru protein/trypsin (w/w) 1:1 a přes noc trypsinem v roztoku o poměru protein/trypsin (w/w) 50:1. Z grafu obr. 4.35 je viditelné, že přidavkem 5% ACN do štěpícího pufru se účinnost štěpení imobilizovaným trypsinem zvyšuje oproti pufru bez ACN. Naopak pro štěpení roztokem trypsinu přes noc se účinnost přidavkem ACN do pufru značně snižuje.

Protein BSA, největší protein používaný při experimentu, byl nejúčinněji naštěpen ve všech analyzovaných časech trypsinem v roztoku, obr 4.41. Z podmínek využívající imobilizovaný trypsin byl nejefektivnější poměr protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5. Při porovnání s tab. 4.4 je také nejvíce peptidů identifikovaných při štěpení trypsinem v roztoku. Srovnáním množství naštěpeného proteinu BSA s ostatními proteiny při všech použitých podmínkách je vidět, že byl nejméně naštěpen. Tento jev byl popsán i v odborných studiích [60, 62, 64, 66].

Pro směs proteinů cytochromu C, α -caseinu a BSA z grafu obr. 4.47 vyplývá, že nejefektivnější podmínkou pro štěpení byl imobilizovaný trypsin o poměru protein/trypsin (w/w) 5:1 pro prvních 40 minut štěpení. Přes noc byla směs nejvíce naštěpena za podmínky protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:5.

Jako druhá neúčinnější podmínka štěpení byla o poměru protein/imobilizovaný trypsin (w/w) 1:1. V praxi nejčastěji používaný trypsin v roztoku byl pro směs proteinů nejméně účinný. Také po identifikaci peptidů tab. 4.5 byl jako neúčinnější poměr protein/trypsin určen 5:1.

Pro analýzu byly na chromatografickou kolonu nanášeny vzorky naštěpených proteinů o výsledné koncentraci: cytochrom C 1,66 pmol/μl, α-casein 0,8 pmol/μl, BSA 0,28 pmol/μl a směs proteinů 0,91 pmol/μl. Stejně množství vzorku, které bylo nanášeno do přístroje, by se mělo objevit ve výsledném chromatogramu. Tato podmínka nemůže být splněna, neboť při odsolování a zakoncentrování vzorku na předkolonce, separaci a vyelování vzorku z kolony dochází ke ztrátě určitého množství vzorku. Vzorek zůstává zachycen ve stacionární fázi kolon.

U chromatogramu se vzorky štěpenými přes noc byla ztížena identifikace píků z důvodu jejich nedokonalého rozdělení. V grafech znázorňující průběh změny plochy píků v průběhu štěpení, se objevily peptidy u nichž maximální plocha píku není vždy po ukončení štěpení, ale naopak někdy v průběhu experimentu. Tímto způsobem by bylo možné vysvětlit, snižující se počet identifikovaných hmot píků ve spektrech MALDI-TOF v průběhu doby štěpení u některých podmínek.

Vzhledem k nedostatku času nemohly být vyzkoušeny jiné změny podmínek štěpení. Jako další možné úpravy by bylo možné aplikovat jiné poměry protein/imobilizovaný trypsin, různé přídavky procent acetonitrilu do štěpícího pufru.

Existují také studie, které k urychlení štěpení využívají zahřátí vzorku v mikrovlnné troubě [61, 62], působení infračervených [55] a ultrazvukových [67] vln nebo střídavé proudu [54]. Využívá se také aplikace mikročipů obsahují imobilizovaný proteolytický enzym [58, 60, 63, 65].

5. ZÁVĚR

Srovnáme-li účinnost štěpení imobilizovaným trypsinem a trypsinem v roztoku v závislosti na reakčním čase, pak z výsledků jak MALDI-TOF tak RP-HPLC vyplývá, že imobilizovaný trypsin je v časných intervalech štěpení účinnější než nevázaný trypsin. Toto neplatí pro BSA. Ovšem je patrné z porovnání celkového množství peptidů ve vzorcích, že nejefektivněji štěpí trypsin nezávisle na formě po 18 hodinovém intervalu.

Srovnáme-li účinnost štěpení v závislosti na poměru imobilizovaného trypsinu je z výsledků zřejmé, že pro cytochrom C a α -casein je nejvýhodnější štěpit v poměru 5:1 a to ve všech časových intervalech. Toto neplatí pro BSA a směs proteinů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Košťíř J., Biochemie, Avicenum, Praha (1974) 394 – 417.
- [2] Karlson P., Základy biochemie, Academia, Praha (1981) 26 – 71.
- [3] Straub F. B., Biochemie, Československá akademie věd, Praha (1962) 23 – 48.
- [4] Wiseman A., Příručka enzymové technologie, SNTL, Praha (1980) 113 – 118.
- [5] Murray R. K., Harperova biochemie, H & H, Jinočany (2001) 44 – 45.
- [6] Štern P., Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum, Praha (2005) 26.
- [7] Racek J., Klinická biochemie, Galén, Praha (2006) 65.
- [8] Králová B., Rauch P., Bioanalytické metody, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha (1995) 23 – 28.
- [9] Trojan S., Lékařská fyziologie, Grada, Praha (2003) 350 – 352.
- [10] Harper H. A., Přehled fyziologické chemie, Academia, Praha (1977) 155, 597.
- [11] Lee T. D, Shively J. E., Methods Enzymol. 193 (1990) 361 – 374.
- [12] Vaňková H, Peptidové mapy, Chem. Listy 93 (1999) 120 – 127.
- [13] Shuang L., Zhenxin L., Xiangmin Z, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 3910–3918.
- [14] Štosová T., Havliš J., Šebela M., Chem. Listy 99 (2005) 896 – 905.
- [15] Gemeiner P. a kol., Enzymové inženýrstvo, Alfa, Bratislava (1987) 128 – 133, 147 – 153.
- [16] Trevan M. D., Immobilized enzymes, An introduction and applications in Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd. (1980) 7 – 8.
- [17] Chibata I., Immobilized enzymes, Kodansha Ltd. (1978) 11 – 13.
- [18] Willard M. A., Kurihara L. K., Harris S., International Materials Reviews 49 (2004), 125 – 170.
- [19] Lu An-Hui, Salabas E. L., Schüth F., Angew. Chem. Int. Ed. 46 (2007) 1222 – 1244.
- [20] http://www.chemicell.com/products/magnetic_particles/magnetic_particle_separation.html, 29. 3. 2009.

- [21] <http://www.chemicell.com/products/protocols/docs/SiMAG-Carboxyl.pdf>, 29. 3. 2009.
- [22] Gould P., Nanoparticles probe biosystems, *Materialstoday* (2004) 36 – 41.
- [23] Gore M., Sethi K. K., Separating biomolecules & cells with magnetic particles, *International biotechnology laboratory* (2004) 8 – 11
- [24] Cao Y., Bai G., Yang W *Journal of Chromatography B*, 883 (2006) 236 – 244.
- [25] Osaka T., Matsunaga T, Iida H., *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 593 – 600.
- [26] Berry C. C., Curtis A. S. G., *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R198 - R206.
- [27] Pankhurst Q. A., Connolly J., Dobson J., *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R167 – R181.
- [28] Ito A., Shinkai M., Kobayashi T., *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2005) 1 – 11.
- [29] Shinkai M., *Journal of bioscience and bioengineering* 94 (2002) 606 – 613.
- [30] McBain S. C., Yiu H., Dobson J., *International Journal of Nanomedicine* 3 (2008) 169 – 180.
- [31] Šafařík I., Šafaříková M., *Monatshefte für Chemie* 133 (2002) 737 – 759.
- [32] Koneracka M., Kopčanský P, Upadhyay R. V, *J. Magnetism and Magn. Materials* 201 (1999) 427 – 430.
- [33] Klouda P., *Moderní analytické metody*, Ostrava (2003) 25 – 29, 50 – 52.
- [34] Jandera P., *Atomová a molekulová spektrometrie se zaměřením na stopovou analýzu. Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice (2006)165 – 182.
- [35] Kolektiv autorů, *Vybrané kapitoly z molekulární patologie*, (2008) 25 – 37.
- [36] Deyl Z., Uhrová M., *Chromatografické a elektromigrační metody pro analýzu biologických vzorků*, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice (1996) 68, 83, 84.
- [37] Čůta F., Popl M., *Instrumentální analýza*, SNTL, Praha (1986) 189.
- [38] Pandey A., Mann M., *Nature* 405 (2000) 837 – 846.
- [39] Aebersold R., Mann M., *Nature* 422 (2003) 198 – 207.

- [40] Aebersold R., Goodlett D. R., *Chem. Rev.* 101 (2001) 269 – 295.
- [41] Gygi S. P., Aebersold R., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4 (2000) 489 – 494.
- [42] Yates J. R., *TIG* 16 (2000) 5 – 8.
- [43] Gross J., Strupat K., *Trends in analytical chemistry* 17 (1998) 470 – 484.
- [44] Phizicky E., Bastiaens P. I. H, Fields S., *Nature* 422 (2003) 208 – 215.
- [45] Vidová V., Lemr K., Havlíček V., *Chem. Listy* 102 (2008) 957–959.
- [46] Boháč M., Ingendoh A., Witt M., *Chem. Listy* 99 (2005) 943 – 951.
- [47] Slavíček P., Ončák M., Fárník M., *Chem. Listy* 102 (2008) 467–473.
- [48] <http://www.jh-inst.cas.cz/~ftirlab/babankova>, 3. 4. 2009
- [49] http://www.tectra.de/MCP.htm?gclid=CPT-__Jeb1ZkCFRUFZgodQn5YVQ
3. 4. 2009
- [50] <http://www.hplc.cz>, 28. 3. 2009
- [51] *The handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*, Vydac Separations Group Third Editional (2002) 3 – 32.
- [52] Bradshaw T., *Introduction to Peptide and Protein HPLC*, Phenomenex 1 (2003) 15 – 37, 44 – 51.
- [53] *HPLC Analysis of Biomolecules Technical Guide*, ThermoScientific (2008) 6 – 32.
- [54] Wang S., Liu T., Pengyuan Y., *Journal of Proteomic* 72 (2009) 640 – 647.
- [55] Wang S., Zhang L., Chen G., *Proteomics* 8 (2008) 2579 – 2582.
- [56] Marangoni R., Chiarini R., Salerno M., *Proteomics* 8 (2008) 2165 – 2167.
- [57] Strander M. B., Tabb D. L., Hurst G. B., *Anal. Chem.* 78 (2006) 125 – 134.
- [58] Slováková M., Minc N., Viovy J.-L., *Lab Chip* 5 (2005) 935 – 942.
- [59] Bílková Z., Stefanescu R., Przybylski M., *Eur. J. Mass Spectrom.* 11 (2005) 1 – 7 .
- [60] Liu J., Lin S., Zhang X., *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 169 – 177.
- [61] Lin S., Lin Z., Zhang X., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3910 – 3918
- [62] Lin S., Yun D., Zhang X., *Journal of Proteome Research* 7 (2008) 1297 – 1307.
- [63] Bílková Z., Slováková M., Viovy J.-L., *Electrophoresis* 27 (2006) 1811 – 1824.

- [64] Li Y., Xu X., Zhang X., *Journal of Proteome Research* 6 (2007) 3849 – 3855.
- [65] Slováková M., Minc N., Viovy J.-V., *Lab Chip* 5 (2005) 935 – 942.
- [66] Wang S., Bao H., Chen G., *Analytica Chimica Acta* 612 (2008) 182 – 189.
- [67] Rial-Otero R., Carriera R. J., Vale G., *J. Chromatogr. A* 1666 (2007) 101 – 107.