

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Metoda izolace His-Tag proteinů pomocí $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ s důrazem na čistotu
finálního produktu
Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Hemalová**
Osobní číslo: **C18486**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Metoda izolace His-tag proteinů pomocí $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ s důrazem na čistotu finálního produktu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Stručně popište výrobu rekombinantních proteinů. Při studiu odborné literatury se zaměřte na metody, kde jsou výsledné produkty modifikovány tzv. afinitní kotvou („affinity tag“) pro usnadněnou izolaci a purifikaci proteinů. Nejvíce se věnujte problematice výroby a metodám izolace His-tagovaných rekombinantních proteinů (IMAC).
- 2) Prostudujte recentní literaturu popisující princip všech dnes dostupných separačních technik vhodných pro izolaci His-tag proteinů. Popište i možné kontaminace výsledného produktu, největší pozornost věnujte lipopolysacharidům bakteriálních buněk. Uveďte, jaká rizika jsou s touto kontaminací spjatá v případě použití rekombinantního proteinu v rámci biologické léčby.
- 3) Popište materiály používané v praxi pro izolaci His-tag proteinů.
- 4) Vypracujte teoretickou část na dané téma v délce 30 – 40 normovaných stran včetně obrázků a schémat. Při vyhledávání literárních údajů využijte všech dostupných databází NCBI, PubMed, Scopus, WOS a další dle pokynů školitele.

Experimentální část:

- 1) Naučte se IMAC techniku pro izolaci His-tag proteinů, k analýze elučních frakcí použijte elektroforetické metody pro analýzu proteinů.
- 2) K izolaci His-tag proteinů použijte i nové materiály, konkrétně magneticky aktivní TiO_2 nanotrubičky.
- 3) Pro optimalizaci separačních podmínek použijte modelových směsí proteinů s His-tag proteinem.
- 4) Zaveďte metodu pro detekci lipopolysacharidů a tuto použijte pro kontrolu čistoty izolovaných His-tag proteinů.
- 5) Vlastní výsledky porovnejte s komerčními nosiči, s technikou IMAC a zhodnoťte v kontextu dostupných literárních zdrojů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

Bc. Kateřina Hemalová

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Rudolfu Kupčikovi, Ph.D. za cenné rady, vedení a pomoc při práci v laboratoři a při zpracování celé diplomové práce. Další poděkování patří mé rodině, která mě při psaní práce i během celého studia podporovala.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřená na izolaci rekombinantních proteinů s polyhistidinovou kotvou ze směsi proteinů pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů a na TiO₂ nanotrubicích pokrytých Fe₃O₄ nanočásticemi (TiO₂NTs@Fe₃O₄NPs). Cílem práce bylo optimalizovat protokol izolace pomocí nanotrubic za standardních i denaturačních podmínek. Úspěšnost izolace byla vždy ověřena pomocí gelové elektroforézy.

Další klíčovou součástí práce bylo zavedení metody detekce lipopolysacharidů v elučních frakcích z izolací a ověření, zda je možné lipopolysacharidy efektivně odstranit již při obohacení rekombinantních proteinů. Pro vlastní stanovení byl použit a optimalizován komerčně dodávaný LAL test.

Podařilo se dokázat, že TiO₂ nanotrubičky jsou při izolacích selektivnějším nosičem než IMAC nosič. To bohužel neplatí při odstranění LPS, kdy IMAC nosiče LPS neváží za standardních ani denaturačních podmínek. TiO₂ nanotrubičky neváží LPS pouze za denaturačních podmínek.

KLÍČOVÁ SLOVA: Rekombinantní protein, afinitní kotva, magnetické nanočástice, lipopolysacharidy, LAL test

TITLE

Method of isolation His-tagged proteins by TiO₂/Fe₃O₄ with the impact to the purity of final product.

ANNOTATION

This thesis is focused on isolation of proteins with polyhistidine tag from a mixture of proteins with immobilized metal affinity chromatography and TiO₂ nanoparticles decorated with Fe₃O₄ nanoparticles (TiO₂NTs@Fe₃O₄NPs). Target of this thesis was to optimize protocol of isolation with TiO₂ nanoparticles under standard and denaturing conditions. Success of isolation was always verified by gel electrophoresis.

Next important part of this thesis was implementation of method to detect lipopolysaccharides in elution fractions from isolations and verification if it is possible to effectively remove lipopolysaccharides during the enrichment of recombinant proteins. A commercially available LAL test was used and optimized for the determination.

TiO₂ nanotubes have been shown to be a more selective carrier than IMAC carriers in isolations. Unfortunately, this does not apply to LPS removal, where IMAC carriers does not bind LPS under standard or denaturing conditions. TiO₂ nanotubes do not bind LPS only under denaturing conditions.

KEYWORDS: Recombinant protein, affinity tag, magnetic nanoparticles, lipopolysaccharides, LAL test

Obsah

0.	ÚVOD.....	17
1.	TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1.1.	Rekombinantní proteiny.....	18
1.1.1.	Tvorba rekombinantních proteinů v bakteriální buňce	19
1.1.1.1.	<i>Escherichia coli</i>	19
1.1.1.2.	<i>Lactococcus lactis</i>	20
1.1.1.3.	<i>Bacillus subtilis</i>	20
1.1.1.4.	Inkluzní tělíska.....	21
1.1.2.	Tvorba rekombinantních proteinů v kvasinkové buňce	22
1.1.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.1.2.2.	<i>Pichia pastoris</i>	22
1.1.3.	Tvorba rekombinantních proteinů v savčí buňce.....	23
1.1.4.	Tvorba rekombinantních proteinů v hmyzí buňce.....	23
1.1.5.	Tvorba rekombinantních proteinů v rostlinné buňce	24
1.2.	Purifikační kotvy	25
1.2.1.	Glutathion-S-transferáza	27
1.2.2.	Maltózu vázající protein	27
1.2.3.	FLAG	28
1.2.4.	Polyargininová kotva.....	29
1.2.5.	Polyhistidinová kotva.....	30
1.3.	Preparativní purifikace rekombinantních proteinů	31
1.3.1.	Iontově výměnná chromatografie	31
1.3.2.	Hydrofobní interakční chromatografie.....	31
1.3.3.	Chromatografie stérické vyluky.....	32
1.3.4.	Afinitní chromatografie.....	32
1.4.	Nosiče pro purifikace proteinů s polyhistidinovou kotvou.....	34
1.4.1.	IMAC nosiče	34
1.4.2.	Nanočástice.....	36
1.4.2.1.	Magnetické nanočástice	37
1.4.2.2.	Magnetické nanočástice oxidů železa.....	38
1.4.2.3.	Nemagnetické nanočástice oxidu křemičitého.....	39
1.4.2.4.	Nanočástice oxidu titaničitého	39
1.4.2.5.	Nové nanomateriály pro izolaci His-tag proteinu	40
1.5.	Kontaminace rekombinantních proteinů.....	43

1.5.1.	Kontaminace rekombinantních proteinů DNA.....	43
1.5.2.	Kontaminace proteiny hostitelské buňky	43
1.5.3.	Kontaminace rekombinantních proteinů lipopolysacharidy.....	44
1.5.3.1.	Stavba lipopolysacharidů.....	44
1.5.3.2.	Odstranění lipopolysacharidů.....	45
1.5.3.3.	Metody detekce lipopolysacharidů.....	45
2.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	49
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
3.1.	Laboratorní přístroje a pomůcky	50
3.2.	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v Tris-tricin pufrovém systému	51
3.3.	Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue	52
3.4.	Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosičů	53
3.5.	Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosičů za denaturačních podmínek	54
3.6.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic – původní protokol	55
3.7.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic za denaturačních podmínek – původní protokol.....	56
3.8.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic – finální protokol.....	58
3.9.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic za denaturačních podmínek – finální protokol (8M urea)	59
3.10.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic za denaturačních podmínek (4M urea)	60
3.11.	Protokol stanovení LPS, návod od výrobce	61
3.12.	Protokol stanovení LPS, optimalizace protokolu	62
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	64
4.1.	Sestavení modelové směsi proteinů.....	64
4.2.	Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosiče.....	66
4.3.	Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosiče za denaturačních podmínek	67
4.4.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic.....	68
4.5.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic, úprava promývacího roztoku ...	69
4.6.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic, úprava elučního roztoku	73
4.7.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic, finální protokol.....	75
4.8.	Izolace His-tag proteinu pomocí TiO ₂ nanotrubic, finální protokol za denaturačních podmínek	76
4.9.	Zavedení metody pro detekci lipopolysacharidů.....	80
4.10.	Stanovení LPS pomocí komerční soupravy s 3x naředěnými reagensy	82

4.11. Stanovení LPS pomocí komerční soupravy s 2x nařazenými reagensy	82
4.12. Stanovení LPS pomocí komerční soupravy s úpravami odsolení	83
4.13. Stanovení LPS v elucích z izolací His-tag ubikvitinu	85
5. ZÁVĚR.....	90
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	91

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tvorba rekombinantního proteinu v <i>E. coli</i> . Převzato a upraveno z: [10].	20
Obrázek 2: Tvorba inkluzního tělíska. Tělísko obsahuje: nativní konformaci (červená), funkční izoformy (zelená) a nefunkční, chybně složené formy (modrá). Převzato a upraveno z: [18].	22
Obrázek 3: Produkce rekombinantního proteinu v rostlinné buňce. Převzato a upraveno z: [30].	24
Obrázek 4: Imobilizace GST proteinu. Převzato a upraveno z: [39].	27
Obrázek 5: Fúzní kotva FLAG. Zdroj obrázku: [40].	28
Obrázek 6: Izolace rekombinantního proteinu s polyargininovou kotvou. Převzato a upraveno z: [41].	29
Obrázek 7: Princip afinitní chromatografie. Převzato a upraveno z: [49].	32
Obrázek 8: Model interakce mezi polyhistidinovou kotvou, kovovým iontem a IMAC matricí. A: Ni-IDA; B: Ni-NTA. Převzato z: [57].	35
Obrázek 9: Struktura kompozitních nanočástic. A. jednoduché hybridní, b. strukturované jádro/plášť, c. multifunkční kvantové tečky. Převzato z: [63].	37
Obrázek 10: Schéma magnetické separace. Převzato a upraveno z: [66].	38
Obrázek 11: Fe ₃ O ₄ nanočástice (vlevo) a Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ nanočástice (vpravo). Převzato z: [80].	40
Obrázek 12: Magnetické nanočástice (nahore) a magnetické nanočástice s polydopaminovým filmem (dole). Převzato z: [82].	41
Obrázek 13: Izolace histidinem značeného proteinu pomocí TiO ₂ NTs@Fe ₃ O ₄ NPs. Převzato z: [83].	42
Obrázek 14: Struktura lipopolysacharidu. Převzato a upraveno z: [95].	45
Obrázek 15: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření čistoty a molekulové hmotnosti proteinů (gel č.1). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Jamky: 2. molekulový marker; 4. ubikvitin; 5. His-tag ubikvitin; 6. cytochrom c; 7. myoglobin; 9. modelová směs proteinů (proteiny uvedené v tabulce č. 5).	65
Obrázek 16: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření čistoty a molekulové hmotnosti proteinů (gel č.2). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Jamky: 2. molekulový marker; 3. β-kasein; 4. karbonická anhydráza I.; 5. konkanavalin; 6. ovalbumin; 7. bovinní sérový albumin; 9. modelová směs proteinů (proteiny uvedené v tabulce č. 5).	65
Obrázek 17: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí IMAC nosiče. Nosič HisPur Ni-NTA (Thermo scientific).	

Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) a eluční frakce 1 a 2 (E1 a E1).	66
Obrázek 18: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí IMAC nosiče za denaturačních podmínek. Nosič HisPur Ni-NTA (Thermo scientific). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) a eluce 1 a 2 (E1 a E2).	67
Obrázek 19: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PV), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2 ₁ a E2 ₂).	68
Obrázek 20: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic za denaturačních podmínek. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PV), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2 ₁ a E2 ₂).	69
Obrázek 21: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Promývací roztok s 20 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2 ₁ a E2 ₂).	70
Obrázek 22: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Promývací roztok s 50 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2 ₁ a E2 ₂).	71
Obrázek 23: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Promývací roztok se 100 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený	

vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E ₁ a E ₂).....	71
Obrázek 24: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Promývací roztok s 200 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E ₁ a E ₂).....	72
Obrázek 25: Porovnání účinnosti Tris-tricin SDS-PAGE analýzy (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Promývací roztok s 50 mM a 200 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Modře označeny kontaminující proteiny (cytochrom c a β-kasein). Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 elučním roztokem č. 2 (E ₁).....	72
Obrázek 26: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Optimalizace elučního roztoku. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce elučním roztokem č. 2 (E2), eluce elučním roztokem č. 3 (E3), eluce elučním roztokem č. 4 (E4) a eluce elučním roztokem č. 5 (E5)....	74
Obrázek 27: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Výsledky finálního protokolu. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).	75
Obrázek 28: Porovnání elučních frakcí původního a finálního protokolu pro izolaci His-tag ubikvitinu pomocí TiO ₂ nanotrubic. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Původní protokol: eluce elučním roztokem č.1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E ₁ a E ₂). Finální protokol: eluce 1 a eluce 2 (E1 a E2).....	76
Obrázek 29: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Denaturační podmínky (8 M urea).	

Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).....	77
Obrázek 30: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO ₂ nanotrubic. Denaturační podmínky (4 M urea). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).....	78
Obrázek 31: Porovnání původního a finálního protokolu izolace pomocí TiO ₂ nanotrubic za denaturačních podmínek (8 M urea). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Původní protokol: molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) eluce elučním roztokem č.1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2 ₁ a E2 ₂). Finální protokol: molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).	78
Obrázek 32: Porovnání izolací za denaturačních podmínek v přítomnosti 4 M močoviny a 8 M močoviny dle finálního protokolu. Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).	79
Obrázek 33: Porovnání izolací za standardních podmínek a za denaturačních podmínek (v přítomnosti 4 M močoviny) dle finálního protokolu. Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).....	79
Obrázek 34: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolací His-tag ubikvitinu z modelových směsí proteinů. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebné frakce (VF).....	88
Obrázek 35: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolací his-tag ubikvitinu z modelových směsí proteinů. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV) a eluční frakce (E). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně vyizolovaný His-tag ubikvitin.....	88

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Porovnání parametrů hostitelů pro expresi rekombinantních proteinů. Převzato a upraveno z: [5].....	18
Tabulka 2: Přehled bakteriálních hostitelů pro produkci rekombinantních proteinů. Převzato a upraveno z: [13].....	21
Tabulka 3: Běžné fúzní kotvy používané pro výrobu rekombinantních proteinů. Převzato a upraveno z: [33].....	26
Tabulka 4: Příprava dělicího a zaostřovacího gelu pro Tris-tricin SDS-PAGE elektroforézu.	52
Tabulka 5: Přehled použitých proteinů a jejich molekulová hmotnost.....	64
Tabulka 6: Absorbance standardů a vzorků při stanovení koncentrace LPS.	81
Tabulka 7: Tabulka absorbcí standardů a vzorků s použitím vody ze stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific).....	84
Tabulka 8: Tabulka výsledných koncentrací LPS po úpravě odsolení.	85
Tabulka 9: Absorbance standardů a vzorků při stanovení koncentrace LPS v elučních frakcích.	86
Tabulka 10: Tabulka výsledných koncentrací LPS v elučních frakcích z izolací.	87

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardu endotoxinu. 81	
Graf 2: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Upravené podmínky: 3x naředěné reagentie.	82
Graf 3: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Upravené podmínky: 2x naředěné reagentie.	83
Graf 4: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Upravené odsolení.	84
Graf 5: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Stanovení elučních frakcí z izolací.....	86

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	acetonitril
CMA	karboxymethylaspartát (z angl. CarboxyMethylAspartate)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
E1	eluce 1
E2	eluce 2
E2 ₁	1. eluce elučním roztokem č. 2
E2 ₂	2. eluce elučním roztokem č. 2
GST	glutathion-S-transferáza
His-tag protein	protein s polyhistidinovou kotvou
IDA	iminodioctová kyselina
IL	interleukin
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (z angl. Immobilized Metal Affinity Chromatography)
LAL	lyzát amébcytů ostrorepa (z angl. Limulus Amebocyte Lysate)
LPS	lipopolysacharid
MBP	maltózu vázající protein (z angl. Maltose-Binding Protein)
MM	molekulový marker
MNPs	magnetické nanočástice (z angl. Magnetic Nanoparticles)
NTA	nitriltrioctová kyselina
PF	promývací frakce
PV	původní vzorek
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TEMED	N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin
TFA	trifluorooctová kyselina
VF	vazebná frakce

0. ÚVOD

Lidské tělo obsahuje velké množství proteinů. Pokud proteiny chybí nebo jsou nefunkční, může dojít k vážným onemocněním. Léčebný postup, který byl umožněn díky moderním biotechnologiím, spočívá v náhradě chybějícího nebo nefunkčního proteinu uměle vytvořeným proteinem.

Na počátku 80. let byl představen rekombinantní lidský inzulin jako první bioterapeutikum. Od té doby bylo vytvořeno a schváleno pro medicínské využití velké množství dalších rekombinantních proteinů. V současnosti jsou dostupné různé třídy bioterapeutik, například enzymy, hormony, cytokiny, protilátky atd. Mnoho nedávno vyvinutých a schválených léčiv obsahuje rekombinantní monoklonální protilátky, které se využívají například při onkologickém onemocnění [1, 2].

Pokud jde o přípravu proteinů rekombinantní cestou, existuje celá řada hostitelů (eukaryotních i prokaryotních), ve kterých mohou být proteiny vytvářeny. Ve většině případů jsou rekombinantní proteiny vytvářeny molekulárním klonováním. Gen kódující požadovaný protein je vložen do expresního vektoru a ten je poté vložen do hostitelské buňky, kde dojde k syntéze daného proteinu.

Proteiny určené pro medicínu musejí splňovat přísná kritéria čistoty, aby nedocházelo po podání proteinu jako léku pacientovi k nežádoucím imunitním reakcím. Proto je na purifikaci proteinů kladen velký důraz. Nežádoucí imunitní reakce může být vyvolána přítomností kontaminujících látek. Kontaminanty mohou být například jiné proteiny, složky buněčné stěny, lipopolysacharidy nebo cizorodá DNA.

Pro zlepšení purifikace byly vyvinuty afinitní kotvy pro snadnou izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie. Afinitní kotvy se připojují na C- nebo N- konec proteinu a při afinitní chromatografii se specificky vážou k afinitním ligandům. Mezi nejčastěji používanou metodu purifikace patří použití polyhistidinové kotvy ve spojení s afinitní chromatografií na imobilizovaných iontech kovů.

Díky těmto metodám se podařilo snížit kontaminaci výsledného produktu, nicméně mírná kontaminace se při výrobě rekombinantních proteinů s použitím afinitní kotvy objevuje stále. Proto se hledají stále nové přístupy, které by pomohly problém s kontaminací vyřešit [3, 4].

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Rekombinantní proteiny

V lidských buňkách dochází k tvorbě velkého množství proteinů. Nefunkčnost těchto proteinů může vést k vážným onemocněním. K léčbě těchto onemocnění se často používají bioterapeutika spočívající v náhradě nefunkčního nebo chybějícího proteinu proteinem uměle vytvořeným, tzv. rekombinantním proteinem [5].

V současnosti se rekombinantní proteiny využívají nejen v biomedicíně nebo v oblastech biotechnologie, ale jsou hojně používány i v mnoha vědecko-výzkumných projektech. Snahou výrobců a prodejců těchto látek je dosáhnout vysokých výtěžků solubilního a funkčního rekombinantního proteinu. K dosažení cíle je nutné optimalizovat několik podmínek: volbu vhodného expresního systému, design vektoru, složení kultivačního média a podmínky produkce proteinu, volba purifikační značky a tomu odpovídající purifikační metody [6, 7].

Rekombinantní proteiny se vytvářejí vložením kódující sekvence DNA pro konkrétní protein do vhodného expresního vektoru, který je vložen do buněk produkčního organismu. Výběr vhodné hostitelské buňky závisí mimo jiné i na těchto faktorech: rychlost růstu a kultivační podmínky, úroveň exprese cílového genu nebo požadavky na typy posttranslačních modifikací získaného proteinu. Hostitelskou buňkou může být buňka eukaryotní (rostlinná, hmyzí, savčí, kvasinková) nebo prokaryotická (bakteriální). Získaný protein se též nazývá heterologní, protože nebyl vytvořen v původním organismu [8, 9].

Tabulka 1: Porovnání parametrů hostitelů pro expresi rekombinantních proteinů. Převzato a upraveno z: [5].

Host	Celkové náklady	Čas produkce	Množení	Výtěžek	Kvalita produktu	Riziko kontaminace	Náklady na purifikaci
Rostliny	Velmi nízké	Střední	Snadné	Velký	Vysoká	Nízké	Vysoké
Bakterie	Nízké	Nízký	Snadné	Střední	Nízká	Střední	Vysoké
Kvasinky	Střední	Střední	Snadné	Velký	Střední	Nízké	Střední
Savci	Vysoké	Velký	Obtížné	Středně velký	Vysoká	Velmi velké	Vysoké
Hmyz	Střední	Střední	Možné	Velký	Střední	Velmi nízké	Střední

1.1.1. Tvorba rekombinantních proteinů v bakteriální buňce

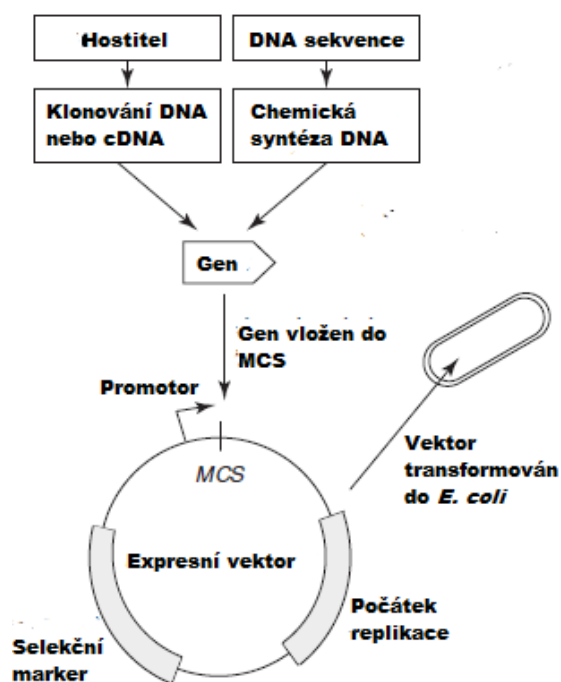
Bakteriální buňky jsou jako hostitel pro produkci rekombinantních proteinů využívány především z těchto důvodů: rychlý růst, nízké náklady a dobrá produktivita. Jsou vhodné pro produkci proteinů, u kterých nejsou vyžadovány posttranslační modifikace (např. glykozylace nebo fosforylace), protože bakteriální buňka nemá endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Právě na těchto organelách posttranslační modifikace proteinu probíhají [7, 10, 11].

Mezi nejčastěji používané bakteriální buňky k výrobě rekombinantních proteinů patří bakterie *Escherichia coli* [7, 10, 11].

1.1.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli byla průkopnickým hostitelem v produkci rekombinantních proteinů. V současnosti je stále nejvyhledávanějším hostitelem. Důvodem pro výběr *E. coli* je snadná manipulace, zmapovaný genom, krátká doba zdvojení a nízké náklady na produkci proteinů. Během produkce rekombinantního proteinu se mohou objevit překážky jako například žádná nebo špatná sekrece, kontaminace endotoxinem nebo tvorba inkluzních tělísek (viz kapitola 1.1.1.4.) [12, 13].

Vlastní postup výroby rekombinantního proteinu spočívá v několika základních krocích (viz obrázek 1). Nejdříve je gen kódující požadovaný protein vložen do mnohočetného klonovacího místa (MCS – Multiple Cloning Site) expresního vektoru. Expresní vektor by měl obsahovat mimo MCS také počátek replikace, promotor a selekční marker. Selekční marker zvýhodňuje buňky, které mají vložený expresní vektor nad těmi, které ho nemají. Výhoda, kterou selekční marker přináší je například rezistence k antibiotiku (ampicilin, tetracyklin, chloramfenikol a další). Vložení genu do MCS kontroluje promotor, který bude regulovat expresi genu. Poté je plazmidový vektor transformován do kmene *E. coli*, který je schopný produkovat daný rekombinantní protein. Během růstu je ve specifickém stádiu přidán chemický induktor, který spustí produkci rekombinantního proteinu aktivací promotoru. Rekombinantní gen je tímto exprimován a dle transkriptu mRNA se syntetizuje polypeptidový řetězec, který se poté skládá do konformace funkčního proteinu. Poslední fází produkce je uvolnění proteinu z buňky a vyčištění [7, 10].



Obrázek 1: Tvorba rekombinantního proteinu v *E. coli*. Převzato a upraveno z: [10].

Prvním rekombinantním proteinem vytvořeným v *E. coli* byl somatostatin (v roce 1977) a dalším byl inzulin (v roce 1982). Od té doby bylo vytvořeno velké množství rekombinantních proteinů. V současnosti se nejvíce produkují interferony, lidský růstový hormon, faktor nádorové nekrózy nebo interleukiny [5, 10].

1.1.1.2. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis je Gram-pozitivní bakterie, která se řadí mezi bakterie mléčného kvašení. Patří mezi GRAS organismy a výhodou proti *E. Coli* je absence endotoxinů, což je důležité pro terapeutické i potravinové aplikace. *Lactococcus lactis* má jen jednu membránu, a to usnadňuje tvorbu konkrétních proteinů, jejich zpracování a menší náchylnost k tvorbě inkluzních tělísek (více viz kapitola 1.1.1.4). Geneticky modifikovaný *L. lactis* se používá jako producent rekombinantních proteinů pro prevenci a léčbu idiopatických střevních zánětů (IBD – Inflammatory Bowel Disease), mezi která patří například Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida. V roce 2000 Steidler a kolektiv [14] prokázali účinnost protizánětlivého cytokinu interleukinu 10 (IL-10), který byl vytvořen v *L. lactis*, pro léčbu IBD. Příkladem dalších produkovaných proteinů je fibronectin vázající protein A nebo internalin A [10, 13–15].

1.1.1.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je sporotvorná Gram-pozitivní tyčinkovitá bakterie. Benefity využití této bakterie pro tvorbu rekombinantních proteinů jsou: rychlá a snadná kultivace,

extracelulární sekrece proteinů do kultivačních médií a nižší tvorba inkluzních tělísek (viz kapitola 1.1.1.4). Nejvíce produkovaným rekombinantním proteinem v tomto typu bakteriálních buněk je β -galaktosidáza [15, 16].

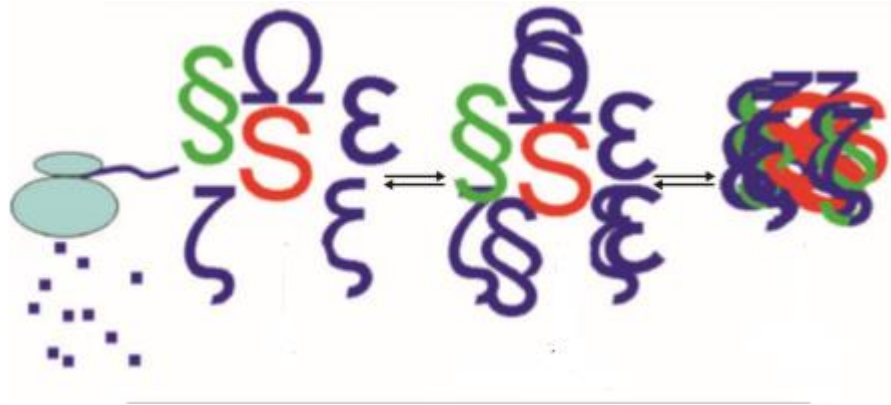
Další používání bakteriální hostitelé a jejich produkty jsou uvedeni v následující tabulce.

Tabulka 2: Přehled bakteriálních hostitelů pro produkci rekombinantních proteinů. Převzato a upraveno z: [13].

Hostitel	Hlavní funkce	Bakteriální druh	Produkt
Fototrofní bakterie	Vysoká produkce membránových proteinů	<i>Rodhobacter sphaeroides</i>	Membránové proteiny
Pseudomonády	Efektivní sekrece	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lidský granulocytární kolonie stimulující faktor
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Penicilin G acyláza
Halofilní bakterie	Zvýhodněná rozpustnost	<i>Halomonas elongata</i>	β -laktamáza
Streptomyceta	Efektivní sekrece	<i>Streptomyces lividans</i>	Antigeny M. Tuberculosis
		<i>Streptomyces griseus</i>	Trypsin

1.1.1.4. Inkluzní tělíska

Inkluzní tělíska jsou agregáty proteinů, které se vytvářejí v cytoplazmě i periplazmě bakteriálních buněk při expresi heterologních genů. Jedná se o nežádoucí vedlejší produkt, který vzniká při výrobě rekombinantních proteinů, protože u některých proteinů není možné získat solubilní nebo správně složenou formu. Obecně jsou to tělíska kulovitěho tvaru s průměrem 0,5 až 1,3 μm , s vysokou hustotou, což umožňuje jejich snadné oddělení od ostatních buněčných složek při vysokorychlostní centrifugaci. Jsou převážně tvořena daným rekombinantním proteinem (v různých formách), proto je možné je použít jako zdroj proteinu pro opětovné složení a obnovu. Prvním krokem pro znovusložení proteinu z inkluzního tělíska je solubilizace agregovaného proteinu a druhým krokem je opětovné složení solubilizovaného proteinu. Pro solubilizaci inkluzních tělísek se používají vysoké koncentrace denaturačních činidel (například močovina) za přítomnosti redukčních činidel (například β -merkptoethanol). Poté se proteiny nově skládají s pomalým odstraňováním denaturačního činidla v přítomnosti oxidačních činidel [17–19].



Obrázek 2: Tvorba inkluzního tělíska. Tělísko obsahuje: nativní konformaci (červená), funkční izoformy (zelená) a nefunkční, chybně složené formy (modrá). Převzato a upraveno z: [18].

1.1.2. Tvorba rekombinantních proteinů v kvasinkové buňce

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní organismy. Výhody použití kvasinek pro produkci heterologních proteinů jsou: rychlý růst na jednoduchých médiích, snadné přizpůsobení genetickým modifikacím, specifické eukaryotní posttranslační modifikace a nepřítomnost pyrogenů, patogenů a virových inkluzí. Nevýhodou však může být, že kvasinky mohou podléhat konformačnímu stresu, což vede k vadné konformaci výsledného produktu. [20–22].

1.1.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je nejpoužívanější kvasinkou pro expresi rekombinantních proteinů. Její genom byl plně osekvenován a jeho konstrukce umožňuje expresi mnoha různých proteinů. Důvodem pro výběr této kvasinky je tolerance vůči stresu v životním prostředí, jako je např. nízká hladina kyslíku. Proteiny pro přípravu první vakcíny proti hepatitidě B (lidskému virovému onemocnění) byly produkovány intracelulárně v *S. cerevisiae*. Dnes se mimo proteiny pro tuto vakcínu produkuje v *S. cerevisiae* i inzulin, glukagon a mnoho dalších proteinů [20, 22].

1.1.2.2. *Pichia pastoris*

Pichia pastoris je obligátně aerobní kvasinka, která využívá methanol jako zdroj energie a uhlíku. Díky tomu je možné exprimovat proteiny na základě indukovatelného AOX1 promotoru. AOX1 promotor je odvozen od genu pro alkoholoxidázu, což je enzym v metabolismu methanolu. První terapeutický polypeptid produkováný v této kvasince byl

ekalantid pro léčbu hereditárního angioedému. Další produkované proteiny jsou například: insulin, lidský sérový albumin, interferon α nebo vakcína proti hepatitidě typu B [20, 22, 23].

Další používané druhy kvasinek pro produkci bioterapeutik jsou například *Hansenula polymorpha* (vakcína proti hepatitidě B, insulin, hirudin), *Yarrowia lipolytica* (pankreatická lipáza) nebo *Kluyveromyces lactis* (hovězí chymosin) [20, 21].

1.1.3. Tvorba rekombinantních proteinů v savčí buňce

Savčí buňky jsou vhodným expresním systémem pro produkci terapeutických rekombinantních proteinů pro klinické aplikace, protože mohou provádět stejné posttranslační modifikace jako lidské buňky. Další výhodou těchto buněk je vysoká tolerance ke změnám pH, teploty nebo tlaku během výroby proteinu. Nevýhodou tohoto systému je riziko infekce živočišnými viry, pomalejší růst a větší nároky na kultivační média oproti bakteriím a kvasinkám. Savčí buňky často vyžadují obohacení médií o aminokyseliny, růstové hormony, vitamíny nebo redukční činidla. Mezi produkty syntetizované v savčích buňkách patří např. různé enzymy, hormony, cytokiny, nebo srážecí faktory. Nejvíce používané buněčné linie pocházejí z myších myelomů nebo z vaječníků čínské křečka. Existuje několik způsobů zavedení cizorodé DNA do savčí buňky. Jedním z nich je například použití promotorů (virový nebo buněčný), který řídí expresi genu, nebo zavedení DNA přímo do buňky pomocí mikroinjekční nebo elektroporační techniky [5, 8, 24–27].

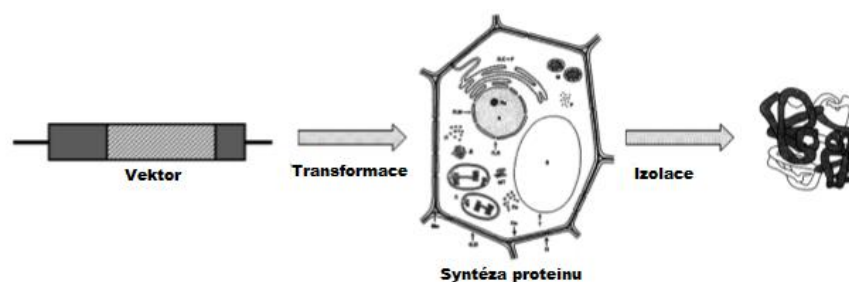
1.1.4. Tvorba rekombinantních proteinů v hmyzí buňce

Hmyzí buňky jsou kompromisem mezi bakteriálním a savčím expresním systémem. Hmyzí buněčné linie rychle rostou, nehrozí kontaminace priony nebo onkogenní DNA a zajišťují vysoký výnos proteinu. Hmyzí buňky také provádějí podobné posttranslační modifikace jako savčí buňky. Ovšem velkou nevýhodou tohoto systému jsou vysoké náklady na kultivační média. Produkce rekombinantního proteinu v hmyzí buňce probíhá pomocí bakulovirového expresního vektorového systému (BEVS). Proces má dvě fáze. V první fázi se buňky namnoží na požadovanou denzitu, a v druhé fázi dojde k jejich infikování modifikovaným bakulovirem, který obsahuje gen pro požadovaný protein. Používané hmyzí buňky jsou náchylné k infekci bakulovirem. Hmyzí druhy, z kterých se buňky pro produkci rekombinantních proteinů získávají, jsou například *Spodoptera frugiperda* (blýskavka kukuřičná), *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná) nebo *Bombyx mori* (bourec

morušový). S použitím BEVS byly produkovány mimo jiné i tyto proteiny: tkáňový aktivátor plazminogenu nebo dekarboxyláza kyseliny glutamové [5, 8, 28, 29].

1.1.5. Tvorba rekombinantních proteinů v rostlinné buňce

Produkce rekombinantních proteinů v rostlinné buňce má ve srovnání s bakteriálním nebo kvasinkovým expresním systémem několik výhod. Rostlinné systémy se vyznačují plasticitou a různorodostí. Patogeny, nebezpečné pro savce a toxiny přítomné v bakteriích, v rostlinách chybí a je tak sníženo riziko kontaminace výsledného proteinu. Předností těchto systémů je také stabilita zděděné exprese cizího genu transformací jaderné DNA a rychlá a vysoce efektivní produkce požadovaného proteinu extrachromozomálními amplikony. Rostlinné buňky pro expresi rekombinantních proteinů je možné použít ve farmaceutickém průmyslu. Množství proteinů, které lze použít ve farmacii se neustále zvyšuje. Nevýhodou při produkci rekombinantních proteinů pro farmaceutický průmysl je, že při syntéze proteinu je třeba optimalizovat velké množství parametrů. Obvyklým postupem výroby rekombinantního proteinu je vytvoření stabilní transgenní linie rostliny. Poté je cílový transgen vložen do rostlinného genomu a daný protein je možné produkovat i v následujících generacích [30–32].



Obrázek 3: Produkce rekombinantního proteinu v rostlinné buňce. Převzato a upraveno z: [30].

1.2. Purifikační kotvy

Vhodným nástrojem při řešení problémů s izolací produkovaných rekombinantních proteinů, se staly purifikační kotvy, kterými je značen cílový protein pro dosažení vyšší čistoty a výtěžku. Purifikační kotvy pomáhají izolovat daný protein, umožňují jednokrokovou purifikaci, je možné je použít na různé proteiny, snadno se odstraňují za účelem zisku nativního proteinu a mají minimální vliv na terciální strukturu [33, 34].

Jednotlivé purifikační kotvy (nazývané též fúzní kotvy) můžeme rozdělit např. podle velikosti, purifikační kotvy se pohybují v rozmezí od jedné nebo několika aminokyselin (poly-His, poly-Arg, FLAG, Strep-tag) až po kompletní proteiny dosahující velikosti až 40 kDa (glutathion-S-transferáza, maltózu vázající protein). Kotvy mohou být připojeny k C- nebo N- konci požadovaného proteinu, případně k oběma koncům [35, 36].

V některých případech není nutné malé kotvy z rekombinantního proteinu odstraňovat, protože neovlivňují terciální strukturu molekuly a její biologické vlastnosti. Ve skutečnosti může v některých případech zavedení purifikační kotvy pozitivně ovlivnit biochemické vlastnosti výsledného produktu (například: zvýšení úrovně exprese a solubility, zjednodušení sbalování proteinů, nebo zabránění proteolýze). Malé kotvy jsou méně imunogenní než velké kotvy a je možné použít je přímo jako antigen při přípravě protilátek. Velké kotvy se častěji používají ke zvýšení rozpustnosti požadovaných proteinů, ale pro některé aplikace je nutné je odstranit (např. krystalografie nebo produkce protilátek). Pro snadné odstranění se mezi kotvu a protein vkládají specifické sekvence, které jsou následně štěpeny proteázami (například enterokináza, faktor Xa, trombin a další) [33, 35, 37].

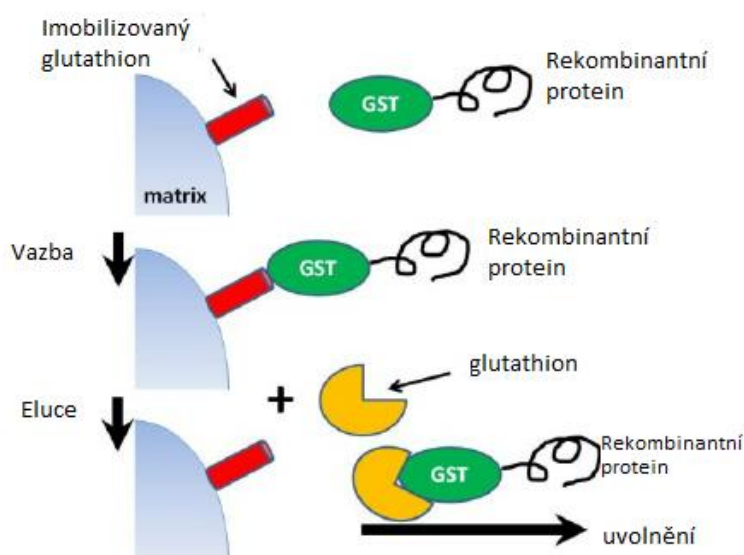
Mezi nejvíce využívané purifikační kotvy patří glutathion-S-transferáza, maltózu vázající protein, polyargininová kotva, polyhistidinová kotva, FLAG nebo Strep-tag. Kotvy mají odlišné vlastnosti, proto se odlišují i jejich postupy čištění. Pro každý protein je vhodná jiná kotva, záleží na vlastnostech cílového proteinu (například stabilita nebo hydrofobicita), na expresním systému a konečné aplikaci proteinu. Proto je důležité výběr vhodné kotvy předem promyslet [34–36].

Tabulka 3: Běžné fúzní kotvy používané pro výrobu rekombinantních proteinů. Převzato a upraveno z: [33].

Typ fúzní kotvy	Velikost	C- nebo N- konec
A) Enzymy		
β -galaktosidáza	116 kDa	N, C
Glutathion-S-transferáza	26 kDa	N
Chloramfenikol acetyl transferáza	24 kDa	N
TrpE	27 kDa	N
B) Polypeptidy vázající proteiny		
IgG vázající doména stafylokokového proteinu A	14–31 kDa	N
IgG/albumin vázající doména streptokokového proteinu G	28 kDa	C
C) Uhlohydráty vázající domény		
Maltózu vázající protein	40 kDa	N
Škrob vázající protein	119 AMK	C
Celulózu vázající protein	111 AMK	N
D) Biotin vázající doména		
	8 kDa	N
E) Antigenní epitopy		
recA	114 AMK	C
FLAG TM	8 AMK	N
F) Nabité aminokyseliny		
Poly (Arg)	5-15 AMK	C
Poly (Asp)	5-16 AMK	C
Glutamát	1 AMK	N
G) Poly (His) konce		
	1-9 AMK	N,C
H) Ostatní poly (aminokyselinové) konce		
Poly (Phe)	11 AMK	N
Poly (Cis)	4 AMK	N

1.2.1. Glutathion-S-transferáza

První zmínka o kotvě Glutathion-S-transferáza (GST) je z roku 1988. V tomto roce byla GST, která pocházela ze *Schistosoma japonicum* (krevnička jaterní), klonována do expresního vektoru *E. coli*. GST je skupina cytozolických proteinů přítomná v eukaryotních buňkách. Nepřítomnost GST u prokaryontních buněk je důvodem častého využití této kotvy při prokaryontní expresi. Kotva pomáhá chránit proteiny před intracelulárními proteázami a stabilizuje je. Použití GST kotvy není výhodné v případech, že cílový protein je větší než 100 kDa, má mnoho nabitých zbytků nebo hydrofobních oblastí. Pak jsou získané proteiny zcela nebo částečně nerozpustné. Fúzní proteiny GST mohou být purifikovány díky afinitě k imobilizovanému glutathionu (viz obrázek č. 4). Eluce probíhá při nedenačnických podmínkách 10mM redukovaným glutathionem. Pro detekci GST je možné použít enzymatický test nebo imunotest [35–38].



Obrázek 4: Imobilizace GST proteinu. Převzato a upraveno z: [39].

1.2.2. Maltózu vázající protein

Maltózu vázající protein (MBP) je poměrně velká periplazmatická purifikační kotva s molekulovou hmotností přibližně 40 kDa. Má schopnost zvýšit expresi i rozpustnost získaného rekombinantního proteinu. Protein fúzovaný s MBP může být exprimován v periplazmatickém prostoru nebo v cytoplazmě. Vazba MBP kotvy na N- konec proteinu je účinnější než vazba na C- konec. Nevýhodou je její velikost a imunogenicita, která komplikuje následné využití. Po odstranění kotvy zůstává často cílový protein nerozpustný nebo agreguje. MBP se převážně používá v bakteriálních expresních systémech při expresi eukaryotních

proteinů. Purifikace proteinu s MBP může být provedena jedнокrokově pomocí afinitní chromatografie s imobilizovanou amylozou. Eluce může být provedena 10mM maltózou ve fyziologickém roztoku při neutrálním pH za nedenačních podmínek. V posledních letech byla MBP kotva více než samostatně používána ve spojení s malou afinitní kotvou (hybridní konstrukty), např. His6-MBP nebo MBP-SUMO [35–38].

1.2.3. FLAG

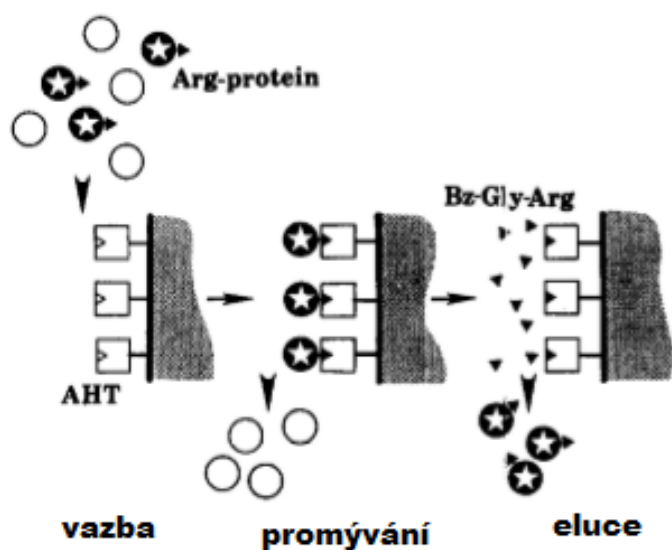
Fúzní kotva FLAG se skládá z 8 aminokyselin (AspTyrLysAspAspAspAspLys). Kotva je malá a hydrofilní. Může být umístěna na C- i N- konec proteinu, ale vazba na N- konci má několik výhod (správně zpracovaný produkt, stabilita kotvy - není odstraněna proteázami). Nevýhodou této kotvy je nutnost jejího odstranění z proteinu, který je určen pro terapeutickou léčbu, dále nízká vazebná kapacita (i přes vysokou selektivitu kotvy) a vysoká cena. I přes tyto nedostatky je kotva využívána pro různé výzkumy díky snadné purifikaci FLAG proteinu pomocí ELISA, nebo jiné imunochemické metody. Je možné ji použít v různých typech buněk: savčí, bakteriální nebo kvasinková. Kotva byla navržena pro imunoafinitní chromatografii. FLAG se váže na několik specifických anti-FLAG monoklonálních protilátek (např. M1 na vápníku závislá nebo nezávislá, M2 nebo M3). Purifikace proteinů se provádí za použití imobilizované anti-FLAG protilátky a elucí chelatačními činidly (EDTA) nebo snížením pH (glycinový pufr) za nedenačních podmínek [33, 36–38].



Obrázek 5: Fúzní kotva FLAG. Zdroj obrázku: [40].

1.2.4. Polyargininová kotva

Argininová kotva se obvykle skládá z 5 nebo 6 argininů, které se váží na C- konec rekombinantního proteinu. Nejvyšší účinnost izolace a purifikace rekombinantních proteinů v porovnání s ostatními expresními systémy, poskytuje polyargininová kotva s bakulovirovým systémem. Nevýhodné je použití u proteinů, které mají hydrofobní C- konec, protože kotva může ovlivnit terciární strukturu. Izolace takto značeného proteinu (viz obrázek č. 6) se provádí pomocí imobilizovaného anhydrotrypsinu (enzymaticky neaktivní derivát trypsinu) a následně je eluován specifickým inhibitorem anhydrotrypsinu: benzoglycyl-argininem (Bz-Gly-Arg). Dalším způsobem izolace je použití iontově výměnné chromatografie, protože argininový konec dodává proteinu pozitivně nabitý konec s afinitou k negativnímu sorbentu (například katexová pryskyřice SP-Sephadex). Eluce probíhá pomocí gradientu NaCl při alkalickém pH. Pro oba způsoby izolace platí, že zbytky argininu mohou být následně odstraněny karboxypeptidázou B. Z důvodu, že během iontové výměnné chromatografie dochází ke ztrátám požadovaného produktu, je tato kotva oproti ostatním využívána méně [35, 36, 41].



Obrázek 6: Izolace rekombinantního proteinu s polyargininovou kotvou.

Převzato a upraveno z: [41].

1.2.5. Polyhistidinová kotva

Polyhistidinová fúzní kotva se skládá z několika histidinových zbytků (nejčastěji 6, ale může být méně nebo i více) a je jednou z nejvíce používaných afinitních kotev pro obohacení rekombinantních proteinů. Tato krátká sekvence neovlivňuje celkový náboj proteinu, skládání v buňce a zpravidla ani strukturu a funkci izolovaného proteinu. Výhodnou vlastností je nízká úroveň toxicity a imunogenicity. Díky těmto vlastnostem nemusí být kotva většinou z proteinu odstraněna. Pokud je to potřeba, může být odstraněna vložением štěpného místa pro specifickou proteázu mezi kotvu a protein. Izolace proteinů pomocí polyhistidinové kotvy byla úspěšně provedena s použitím různých expresních systémů, například *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, savčích nebo hmyzích buněk [35, 38, 42].

Kotva může být umístěna na N- nebo C- konci rekombinantního proteinu. Optimální umístění kotvy je pro každý protein specifické. Může se objevit komplikace, že kotva je uzavřena ve složeném proteinu a nemá přístup k imobilizovanému ligandu. V takovém případě je řešením přesun kotvy na druhý konec, nebo purifikace za denaturačních podmínek. K purifikaci proteinů s polyhistidinovou kotvou se používá afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (více viz kapitola 1.4.1). Histidinové zbytky mají vysokou afinitu k některým iontům kovů, například mědi, niklu, zinku a kobaltu, které vytváří komplex s imobilizovaným chelatačním činidlem. Specifita vazby umožňuje purifikaci za nativních i denaturačních podmínek. Nevýhodou při použití polyhistidinové kotvy je nespecifická vazba nezačleněných proteinů na afinitní matici při purifikaci. Některé proteiny obsahují 2 nebo více histidinových zbytků vedle sebe a mohou být koizolovány spolu s cílovým proteinem, což vede ke kontaminaci finálního produktu [5, 42–44].

1.3. Preparativní purifikace rekombinantních proteinů

Proteiny vytvářené pro terapeutické účely by neměly obsahovat nadbytečné proteiny, endotoxiny ani jiné kontaminanty (o kontaminaci viz. Kapitola 1.5). Proto je kladen velký důraz na purifikaci cílového proteinu, aby byl co nejčistší a zachoval si svou chemickou strukturu a biologickou aktivitu. Při vývoji purifikační metody je důležité, aby metoda byla rychlá, nákladově efektivní, a reprodukovatelná. Pro splnění kritérií čistoty výsledného produktu (u některých léčiv až 99 %) jsou specifické izolace pomocí afinitní chromatografie obvykle doplněny o další chromatografické metody, kdy jsou proteiny separovány na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, jako například velikost molekul, náboj nebo hydrofobicita [5, 45].

1.3.1. Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie se provádí často jako počáteční krok při purifikaci proteinů, kdy se proteiny separují dle svého náboje. Cílový protein se při průchodu kolonou naváže na ionex a ostatní proteiny projdou. Ionex je makromolekulární matrice, která se obvykle vyrábí z agarózy, celulózy nebo dextranu, s kyselou nebo bazickou skupinou. Katex obsahuje kyselou funkční skupinu, která nese záporný náboj (například karboxymethyl) a anex nese bazickou funkční skupinu (například diethyl-aminoethyl). Následná eluce se provádí změnou pH nebo iontové síly roztoku (ionty v roztoku vytěsní protein z vazby) [45, 46].

1.3.2. Hydrofobní interakční chromatografie

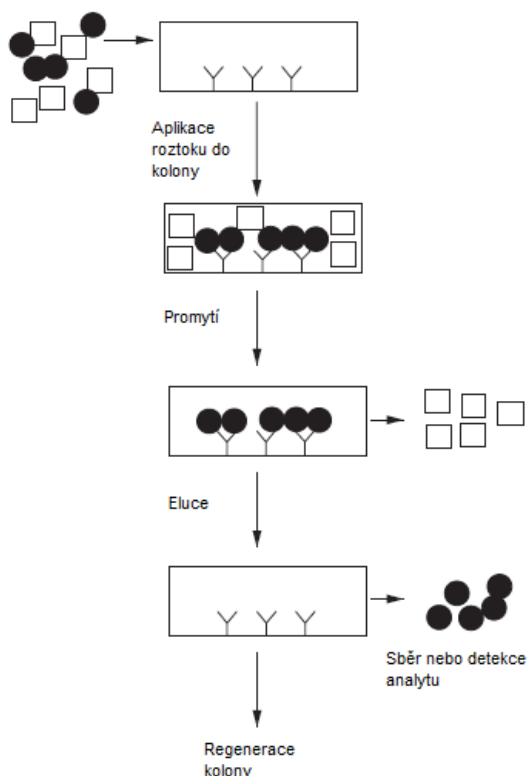
Při hydrofobní interakční chromatografii se proteiny separují na základě své hydrofobicity. Při separaci dochází k hydrofobním interakcím mezi povrchovými nepolárními oblastmi proteinu a imobilizovaným hydrofobním ligandem. Molekuly vody obklopují hydrofobní oblasti proteinů a zabraňují jim vázat se na hydrofobní ligandy na chromatografickém médiu. Z tohoto důvodu jsou při vazbě proteinu důležité vysoké koncentrace soli (například síran amonný) v mobilní fázi, které odhalují povrchové hydrofobní oblasti proteinu a umožňují tak jeho vazbu na kolonu. Eluce daného proteinu se provádí snížením koncentrace soli [45, 47].

1.3.3. Chromatografie stérické vyluky

Chromatografie stérické vyluky dělí molekuly na základě jejich velikosti. Stacionární fáze umístěná v koloně se skládá z porézních částic, mezi které difundují proteiny z mobilní fáze na základě své velikosti. Velké proteiny nemají možnost vniknout do pórů, a proto procházejí kolonou rychle. Malé proteiny naopak do pórů proniknou a kolonu opouštějí později. Tento druh separace není vhodný pro směs proteinů s podobnou velikostí [45, 48].

1.3.4. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je metoda založená na specifických interakcích mezi biomolekulami (například interakce protilátky a antigenu nebo hormonu a jeho receptoru). Cílový analyt se reverzibilně váže na ligand (komplementární molekulu), který je kovalentně navázaný na nosič. Základní separační kroky jsou uvedeny na obrázku č. 7. Roztok obsahující cílový analyt prochází kolonou, která obsahuje navázaný (imobilizovaný) ligand. Analyt se specificky naváže na ligand za vzniku tzv. biospecifického páru. Následuje promytí, kdy jsou ostatní látky roztoku vymyty z kolony. Po promytí je cílový analyt eluován a následně sbírán nebo detekován. Posledním krokem je regenerace kolony pro další použití [49, 50].



Obrázek 7: Princip afinitní chromatografie. Převzato a upraveno z: [49].

Ligand

Ligand hraje důležitou roli v purifikačním protokolu. Kromě specifity, by měl být ligand i stabilní, aby nedocházelo k jeho vymývání a ekonomicky výhodný. Při výběru ligandu se zohledňují 2 hlavní kritéria: ligand musí mít funkční skupinu, která může být modifikována pro navázání na pevný nosič, aniž by to ovlivnilo jeho rozpoznání komplementární molekulou a ligand by měl mít dostatečnou afinitu pro purifikaci. Ligandy se při vazbě k cílové molekule účastní několika interakcí. Mezi tyto interakce patří mimo jiné i vodíkové můstky, elektrostatické síly, dipól-dipólové interakce nebo Van der Waalovy síly. Kombinace těchto interakcí umožňuje specifické rozpoznávání mezi ligandem a cílovým analytem. Ligandem může být přírodní látka biologická (například nukleotidy, lektiny, protein A, protein G, hormony a protilátky) i nebiologická (například ionty kovů) nebo syntetická látka [49, 51, 52].

Nosiče

Nosič slouží jako podpora ligandu a umožňuje jeho zadržení v koloně či jeho separaci od v roztoku v případě vsádkového uspořádání. Mezi vlastnosti, které by měl nosič mít patří: chemická a fyzikální odolnost, nízká nespecifická vazba, nerozpustnost, dostatečná propustnost a velká specifická plocha a snadná modifikovatelnost pro připojení ligandu. Nosiče se dle svého původu dělí na: organické (přírodní polymery, například agaróza, celulóza nebo dextran), anorganické (například sklo, křemičité nosiče, anorganické oxidy jako Al_2O_3 , TiO_2 a ZrO_2), syntetické (například polyakrylamid, Trisacryl nebo Sephacryl) a složené (skládají se ze dvou nebo více materiálů, například polyhydroxyethylmethakrylát) [49, 53].

1.4. Nosiče pro purifikace proteinů s polyhistidinovou kotvou

Běžnou metodou pro purifikaci rekombinantních proteinů se stala afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů ve spojení s His-tag kotvou. Principem je interakce mezi ionty přechodných kovů (například Co^{2+} a Ni^{2+}), které jsou imobilizované na matici, a histidinovými zbytky. Běžně používanou maticí je kyselina iminodioctová nebo nitriltrioctová. V nedávné době byly publikovány inovace, které pomáhají vylepšit čištění proteinu s polyhistidinovou značkou. Jedním z nich byl vývoj nanočástic, které pomáhají magneticky oddělit polyhistidinem značené proteiny ze směsí buněčných lyzátů se zanedbatelnou specifickou adsorpcí (více o nanočásticích v kapitole 1.4.2). Dalším novějším způsobem čištění je vývoj afinitní iontové kapaliny pro extrakci kapalina – kapalina. Proteiny s polyhistidinovou kotvou jsou extrahovány a purifikovány pomocí afinitní iontové kapaliny. Tyto způsoby purifikace naznačují vývoj a rozšíření purifikace rekombinantních proteinů s polyhistidinovou kotvou [54].

1.4.1. IMAC nosiče

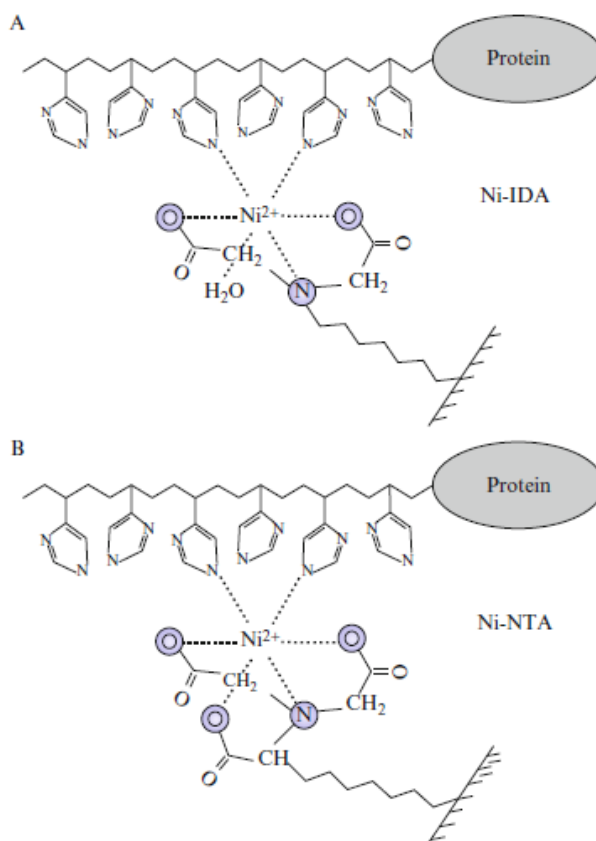
Afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (IMAC) je účinná metoda pro čištění rekombinantních proteinů, které mají krátkou afinitní kotvu z histidinových zbytků. Principem je interakce mezi ionty kovů (Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+}) imobilizovanými na matici a specifickými postranními řetězci aminokyselin. Histidin vykazuje nejsilnější interakci s imobilizovanými ionty kovů, protože snadno vytváří koordinační vazbu [42, 45, 55].

IMAC pro čištění proteinu pomocí polyhistidinové kotvy je možné použít za nativních i denaturačních podmínek. Rozpustné proteiny nebo ty, které se vylučují lze obvykle purifikovat za nativních podmínek. Denaturační podmínky jsou vhodné pro použití v případě, že daný protein je nerozpustný nebo se agreguje v inkluzních tělískách. Jako denaturační činidla se používají 6M guanidin hydrochlorid nebo 8M močovina. Z důvodu, že guanidin hydrochlorid se v přítomnosti SDS vysráží a tím narušuje následnou SDS-PAGE analýzu, která je obvykle prováděna, je preferovanějším činidlem močovina [42, 56].

Pro imobilizaci kovů na nosič při technice IMAC je možné použít několik chelatačních ligandů. Na počátku byla nejvíce používána iminodioctová kyselina (IDA) s 3 koordinačními místy pro vazbu kovových iontů a 3 vazebnými místy pro imidazolový kruh histidinu. Problémem této kyseliny je, že kovové ionty jsou k ní vázány slabě, a proto dochází během purifikace proteinu k jejich uvolnění z vazby. Přítomnost těchto vyluhovaných kovových iontů

snižuje čistotu výsledného produktu a zvyšuje riziko toxicity, což je při přípravě terapeutických proteinů nežádoucí. Purifikace proteinů byla usnadněna a vylepšena vývojem matrice z kyseliny nitriltriocetové (NTA) a z karboxymethylaspartátu (CMA). Tyto látky mají 4 koordinační místa pro vazbu kovů a dále 2 vazebná místa pro interakci s imidazolovým kruhem histidinu. Kovové ionty jsou tak navázány stabilněji, což vede k jejich sníženému vyluhování a vyšší čistotě získaného proteinu ve srovnání s IDA [42, 57, 58].

Eluce značeného proteinu může probíhat snížením pH na 5,3 až 4,5 pro NTA a na 6,0 pro CMA. Snížením pH dochází k protonaci atomu dusíku uvnitř imidazolového kruhu a tím se naruší koordinační vazba mezi histidinem a iontem kovu. Další možností eluce je použití histidinového analogu imidazolu v koncentracích 50 až 500 mM, který vytěsňuje histidin z vazby na iont kovu. Obě tyto metody jsou účinné, ale použití imidazolu je výhodnější, protože snížení pH může poškodit cílový protein. Silná chelatační činidla, jako například EDTA mohou být použita pouze v malých koncentracích (100 mM), protože nejsou plně kompatibilní s matricí. Může docházet k eluci iontů kovů z matrice a tím ke kontaminaci výsledného produktu [42, 55, 58].



Obrázek 8: Model interakce mezi polyhistidinovou kotvou, kovovým iontem a IMAC matricí. A: Ni-IDA; B: Ni-NTA. Převzato z: [57].

1.4.2. Nanočástice

Nanočástice jsou částice o velikosti od 1 do 100 nm. Využívají se v biosenzorech, v zobrazovacích metodách (například magnetická rezonance), v dopravě a monitoringu léků atd [59, 60].

Většinu současně používaných nanočástic je možné rozdělit do 4 kategorií:

a) Nanočástice na bázi uhlíku

Nanočástice na bázi uhlíku obsahují uhlík v různých morfologiích, jako například trubice, elipsoidy nebo koule. Do této kategorie patří fullereny (jedna molekula obsahuje 60 atomů uhlíku, které jsou uspořádány ve tvaru fotbalového míče), nanotrubice, nanovláčna nebo grafen.

b) Anorganické nanočástice

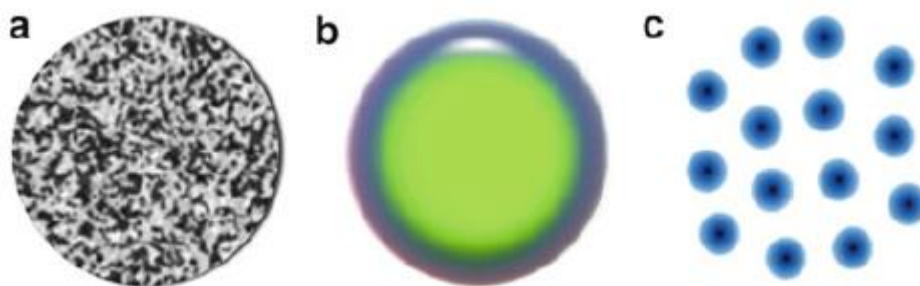
Do této kategorie patří nanočástice tvořené vzácnými kovy a jejich oxidy (například zlato nebo stříbro), přechodnými kovy a jejich oxidy (například: TiO_2 , Cr_2O_3 , Mn_2O_3 , Fe_2O_3 , NiO , CuO) a polovodiči (křemík a keramika).

c) Organické nanočástice

Nanomateriály z organické hmoty využívají slabých (nekovalentních) interakcí pro transformaci do požadovaných struktur. Mezi organické nanomateriály patří struktury jako dendrimery, micely, lipozomy a polymery.

d) Kompozitní nanočástice

Kompozitní nanočástice jsou nanomateriály se složenou strukturou. Skládají se ze dvou nebo více složek nanočástic se speciálními vlastnostmi. Dle struktury se dělí na: jednoduché hybridní, strukturované jádro/plášť a multifunkční kvantové tečky (viz obrázek č. 9). Kompozitní nanočástice mají vlastnost superparamagnetismu. Superparamagnetismus je typ magnetismu, kdy jednodoménové nanočástice vykazují v nepřítomnosti vnějšího magnetického pole nulový magnetický moment. Když je přítomno vnější magnetické pole, magnetické momenty nanočástic se snaží vyrovnat podél vnějšího pole, a to má za následek nenulovou magnetizaci [59, 61–63].



Obrázek 9: Struktura kompozitních nanočástic. A. jednoduché hybridní, b. strukturované jádro/plášť, c. multifunkční kvantové tečky. Převzato z: [63].

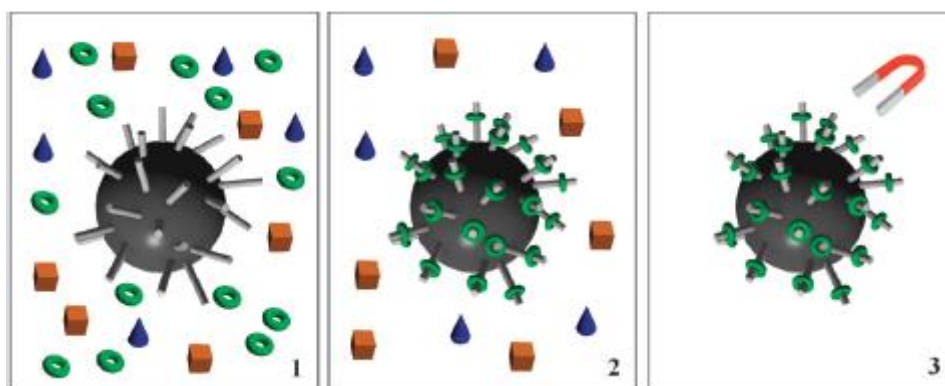
1.4.2.1. Magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice se dostávají stále více do centra zájmu díky svým optickým, magnetickým, elektronickým a fyzikálně-chemickým vlastnostem. Jsou využívány v mnoha zařízeních, jako například motory, senzory, videokazety nebo pevné disky. S povrchovými modifikacemi je možné použít magnetické nanočástice v řadě aplikací, jako je například monitorování a doprava léčiv, zobrazovací metody nebo v posledních letech zkoumaný potenciál pro léčbu rakoviny. V současné době je mnoho aplikací v raných stádiích klinických studií. Pro výrobu magnetických nanočástic existuje mnoho vhodných materiálů: příkladem mohou být čisté kovy (železo, kobalt, nikl), slitiny (FeCo, permalloy – slitina niklu a železa, AlNiCo) a oxidy železa (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, CoFe_2O_4). Čisté kovy mohou poskytnout vyšší saturační magnetizaci, ale nejsou vhodné pro klinické účely, kvůli vysoké toxicitě a oxidačním vlastnostem. Oxidy železa mají vysokou chemickou a koloidní stabilitu, biokompatibilitu a nízké náklady, a proto jsou pro výrobu magnetických nanočástic nejvyužívanější. V biomedicině se využívají jednojaderné i vícejaderné nanočástice. Jednojaderné nanočástice jsou tvořeny jedním magnetickým jádrem (tvořené oxidem kovu, například Fe_3O_4), které je obalené jiným oxidem kovu (například SiO_2). Vícejaderné nanočástice mají několik magnetických jader zabalených do matrice. Pochopení teoretických aspektů magnetických nanočástic umožnilo jejich využití pro magnetické separace [64–68].

Magnetická separace

Magnetická separace je vhodná metoda pro selektivní a spolehlivé zachycení proteinů. V současnosti jsou magnetické částice využívány také pro separace látek v celé řadě oblastí, jako je například ochrana životního prostředí, analytická chemie, farmaceutický a zdravotnický průmysl. Lze je použít pro separaci buněk a buněčných organel, nukleových kyselin, enzymů, proteinů, protilátek a mnoha dalších analytů. Proti afinitní chromatografii přinášejí magnetické částice několik výhod: rychlá separace v několika krocích, kompatibilita částic s ligandy, které

se běžně v afinitní chromatografii používají, nižší náklady a minimalizace degradace proteinu. Separace probíhá v několika základních krocích (viz obrázek č. 10) [64, 66, 69].



Obrázek 10: Schéma magnetické separace. Převzato a upraveno z: [66].

1. Magnetické nanočástice smíchané s roztokem, který obsahuje protein zájmu (zelené kroužky) a další složky.
2. Daný protein se naváže na magnetickou částici.
3. Aplikací magnetického pole se magnetické částice (spolu s navázaným proteinem) separují od ostatních složek z roztoku. A roztok se zbylými složkami je odebrán. Následují promývací kroky a eluce [66].

1.4.2.2. Magnetické nanočástice oxidů železa

Magnetické nanočástice oxidů železa (MION) jsou částice tvořené převážně z magnetitu (Fe_3O_4) nebo maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o velikosti od 1 do 100 nm. Tyto nanočástice mají superparamagnetické chování, biokompatibilitu a nízkou toxicitu. Možným způsobem přípravy je chemická syntéza, fyzikální syntéza nebo i biosyntéza. Nejčastěji používanou cestou je chemická syntéza, protože bývá jednodušší a výsledné částice jsou čistší a mají vhodnou velikost a morfologii. Příkladem chemické syntézy je pulzní laserová ablace, katodická elektrochemická depozice, metoda sol-gel nebo rozklad vysokou teplotou. MION na vzduchu snadno oxidují, proto se provádí povrchová modifikace anorganickými oxidy (oxid křemičitý nebo vzácné kovy), malými organickými molekulami (kyselina citronová nebo olejová) nebo organickými polymery (chitozan, nebo polyethylenglykol). Nanočástice oxidů železa se používají jako kontrastní látky pro biologické zobrazování (magnetická resonance), cílené dodávání léčiv a magnetickou hypertermii. Nové uplatnění nalézají v biosenzorech nebo v detekci a terapii bakterií [70–72].

1.4.2.3. Nemagnetické nanočástice oxidu křemičitého

Oxid křemičitý patří mezi první materiály pro výrobu nanočástic. Jsou využívány jako inertní pevná látka pro přenos nebo zachycení matrice. V nanotechnologiích hrají významnou roli například díky optickým vlastnostem, nízké hustotě, adsorpční kapacitě, biokompatibilitě nebo nízké toxicitě. SiO₂ nanočástice našly uplatnění jako biosenzory, podpora enzymů, dodávání a řízené uvolňování léčiv a absorpce buněk pro diagnostiku a sledování průběhu nemocí, rozpoznání a nápravu genetických poruch a pro zvýšení životnosti. Další, nově rozšířené uplatnění je v adsorpci a separaci proteinů, monitoringu a dodávání léčiv a genů a v detekci a purifikaci nukleových kyselin. Standardním postupem výroby je Stöberova metoda. Principem je hydrolyza silanů v alkoholovém roztoku za přítomnosti amoniaku. Silany jsou zdrojem oxidovaného křemíku. Amoniak působí jako činidlo pro polymeraci silanů (-O-Si-O-) jejich stabilizaci a pro definování velikosti a morfologie vzniklých nanočástic. Proteiny značené polyhistidinovou kotvou je možné purifikovat pomocí SiO₂ nanočástic s funkcionalizovaným povrchem pomocí APTES (3-aminopropyltriethoxysilan), který snadno reaguje s povrchem přes primární amin, nebo chloru. Na APTES nebo chlor je zavedeno chelatační činidlo – iminodioxetová kyselina v komplexu s měďnatými ionty, s kterým tvoří histidinový konec stabilní konjugát. Pro rychlou separaci His-tag proteinů je možné použít kompozitní částice s magnetickým jádrem z oxidu železa potaženého vrstvou oxidu křemičitého [73–75].

1.4.2.4. Nanočástice oxidu titaničitého

TiO₂ nanočástice se využívají v řadě různých odvětví. V domácnosti v řadě výrobků (pigmenty, opalovací krémy a řada dalších kosmetických produktů), v solárních článcích jako fotoaktivní prvky a jako fotokatalyzátory, které se aktivují UV zářením. V biomedicíně odvětví nejsou příliš využívány kvůli obavám o jejich bezpečném použití a potenciálních účincích po dlouhodobé expozici. I přes to byly jejich fotokatalytické vlastnosti využity při fotodynamické a sonodynamické léčbě rakoviny nebo při vývoji baktericidních kompozitů. Fosfáty a fosfonáty mohou s povrchem TiO₂ nanočástic tvořit stabilní komplexy, což bylo využito pro zavedení gadoliniových chelátů jako sond při magnetické rezonanci. Nejčastěji jsou TiO₂ nanočástice připravovány sol-gel metodou. Principem je hydrolyza anorganického prekurzoru (například tetraizopropoxid titaničitý nebo alkoxid titaničitý), která vede k polymeraci a tvorbě řetězců. V nedávné době byl TiO₂ připraven ve formě prášků, krystalů nebo nanotrubic zpracováním kapalně fáze. Tento způsob zpracování umožňuje tvorbu

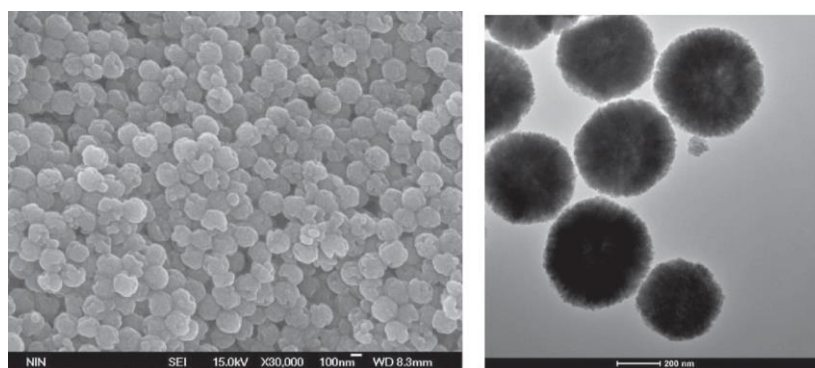
složitých tvarů a kompozitních nanočástic díky možnosti kontroly stechiometrie a homogenních produktů [75–77].

1.4.2.5. Nové nanomateriály pro izolaci His-tag proteinu

Cílem současných studií je vyvinout rychlý, jednoduchý a levný způsob izolace proteinů s polyhistidinovou značkou při zachování vysoké afinity. Tyto nosiče musí poskytovat vysokou účinnost purifikace rekombinantních proteinů, obzvlášť pro aplikace, kde je vyžadována jejich vysoká čistota. Je známá afinita polyhistidinové kotvy ke dvojmocným kovům jako je Ni^{2+} nebo Co^{2+} , proto je u nanočástic povrch často upraven pomocí těchto kovů a NTA nebo IDA. Byla také prokázána i afinita polyhistidinové kotvy k NiO a tak jsou některé částice tvořeny přímo tímto oxidem [78, 79].

Ni^{2+} -funkcionalizované $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanočástice

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ (jádro/obal) nanočástice byly otestovány v roce 2015 na rekombinantním proteinu Homer 1a s polyhistidinovou kotvou. Částice byly připraveny sol-gel metodou a na jejich povrch byla imobilizována IDA (Ni-IDA). Tímto se zabývali ve studii Ni a spol. [80].



Obrázek 11: Fe_3O_4 nanočástice (vlevo) a $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanočástice (vpravo). Převzato z: [80].

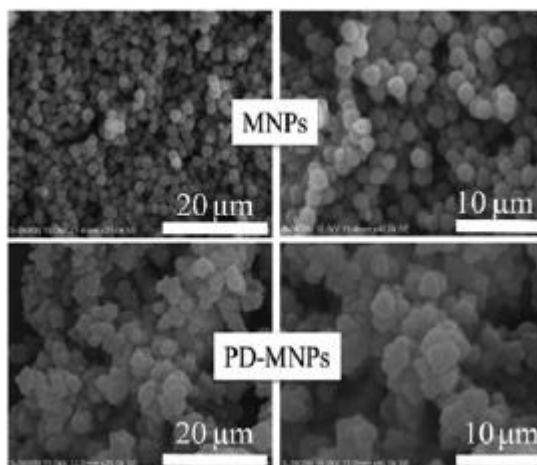
Ni/NiO nanočástice

Hyeon a spol. v roce 2006 [81] připravili Ni/NiO (jádro/obal) nanočástice a otestovali je na zeleném fluorescenčním proteinu značeném histidinem (HGFP). Během experimentu došlo k snížení fluorescence v roztoku po vazbě HGFP na magnetické nanočástice, po eluci imidazolem se fluorescence opět zvýšila. Bylo tedy prokázáno, že histidin se navázal na ionty niklu v NiO obalu [81].

Ni^{2+} -funkcionalizované Fe_3O_4 @polydopaminové nanočástice

V roce 2015 syntetizovali Yang a spol. [82] Ni^{2+} -funkcionalizované Fe_3O_4 @polydopaminové nanočástice (Ni^{2+} -PD-MNPs). Částice byly připraveny *in situ* potažením magnetických

nanočástic polydopaminem. Na polydopaminový film byly konjugovány Ni^{2+} ionty. Částice byly testovány při purifikaci červeného fluorescenčního proteinu značeného polyhistidinovou kotvou. Čistota izolovaného proteinu byla ověřena pomocí elektroforézy (SDS-PAGE) [82].

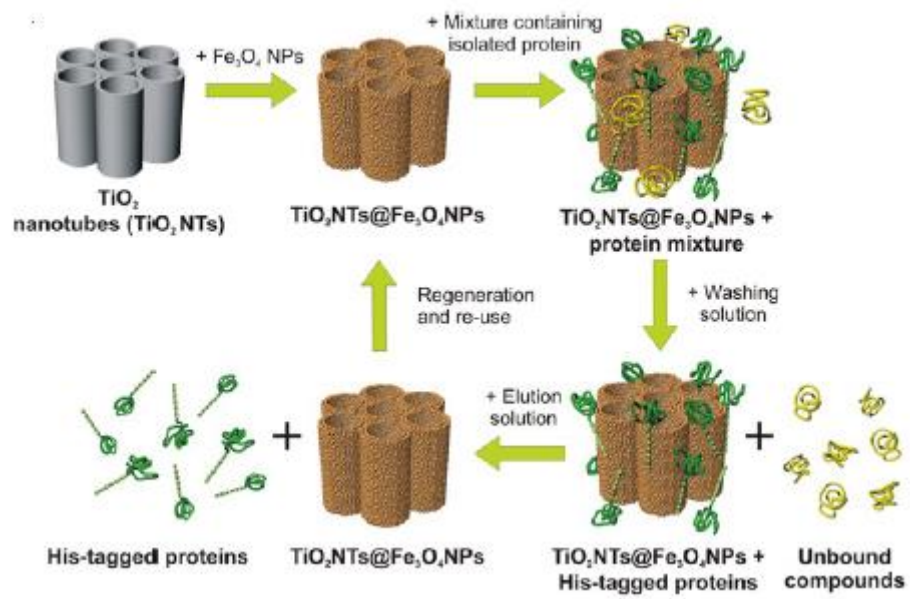


Obrázek 12: Magnetické nanočástice (nahore) a magnetické nanočástice s polydopaminovým filmem (dole). Převzato z: [82].

Bylo navrženo velké množství dalších nanočástic pro selektivní purifikaci histidinem značených proteinů, jako jsou například NiFe_2O_4 nanočástice. Nevýhodou většiny těchto nosičů je fakt, jsou založeny na využití niklu a kobaltu, což jsou toxické kovy. Bylo by tak vhodné tyto kovy/oxidy kovů nahradit materiálem který bude mít zachován vysokou purifikační účinnost, ale zároveň bude netoxický. Za tímto účelem byly v nedávné době představen netoxický materiál tvořený TiO_2 nanotrubicemi s povrchem modifikovaným Fe_3O_4 nanočásticemi [83, 84].

TiO_2 nanotrubičky modifikované Fe_3O_4 nanočásticemi ($\text{TiO}_2\text{NTs}@\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)

V roce 2017 [83] byl představen nový materiál pro izolaci histidinem značených proteinů: TiO_2 nanotrubičky modifikované Fe_3O_4 nanočásticemi. Fe_3O_4 nanočástice jsou biokompatibilní a netoxické. Díky těmto vlastnostem jsou Fe_3O_4 nanočástice lepší než materiály na bázi niklu a kobaltu. Ve spojení s TiO_2 nanotrubicemi tvoří vhodný materiál pro purifikaci biomolekul pro využití v biomedicíně. Tento materiál splňuje požadavky na vysokou specifitu a díky vnitřnímu magnetismu může být snadno oddělen od roztoku a zároveň nabízí možnost jej snadno fotokatalyticky regenerovat. Modelovým proteinem byl v této studii zvolen lidský ubikvitin značený histidinem, který byl úspěšně vyizolován ze směsi proteinů i z buněčného lyzátu [83].



Obrázek 13: Izolace histidinem značeného proteinu pomocí $\text{TiO}_2\text{NTs@Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$. Převzato z: [83].

1.5. Kontaminace rekombinantních proteinů

Při výrobě rekombinantních proteinů pro terapeutické účely je důležitá jejich čistota, protože jsou systémově podávány lidem nebo zvířatům. Při expresi proteinů v *E. coli* se mohou objevit kontaminanty, například proteiny hostitelské buňky, složky buněčné stěny včetně lipopolysacharidů, DNA, afinitní ligandy proteinu A nebo proteinu G a proteiny kultivačního média. Kontaminanty mohou způsobit při podání léku nežádoucí imunitní odpověď. K počáteční separaci proteinů od kontaminantů se nejčastěji používají 3 metody: sekrece proteinu do periplazmy, tvorba inkluzních tělísek nebo připojení purifikační značky k proteinu a jeho následná separace afinitní chromatografií. První dvě metody odstraňují kontaminanty *in vivo* a třetí metoda je odstraňuje *in vitro* až po lýze buněk. Každá metoda má ale své omezení: sekrece do periplazmy není možná pro všechny proteiny, inkluzní tělíska není vždy možné vždy znovu složit do nativních proteinů a některé purifikační značky musí být z proteinu odstraněny [85–88].

1.5.1. Kontaminace rekombinantních proteinů DNA

Kontaminující DNA může být buď DNA odvozená od expresního vektoru, nebo genomová DNA hostitele. Důvodem pro obavy z kontaminující DNA je možnost přítomnosti onkogenu, schopnost aktivovat onkogen nebo deaktivace tumor inhibujícího genu. Oficiálně neexistuje žádný hraniční limit, proto je důležité udržovat kontaminaci DNA na minimum. Množství kontaminující DNA v proteinu jsou velmi nízká (v řádech pikogramů DNA na miligram proteinu). Kvantifikace může být provedena pomocí radioaktivních hybridizačních testů nebo kolorimetrických technik, které mají ale omezenou citlivost. Citlivější metody, jako například fluorescenční korelační spektroskopie nebo Ramanova spektroskopie vyžadují specializované vybavení [89, 90].

1.5.2. Kontaminace proteiny hostitelské buňky

Přítomnost proteinů hostitelské buňky v biofarmaceutických přípravcích může způsobit nežádoucí imunitní odpověď. Následkem může být anafylaktický šok případně i autoimunitní onemocnění. Minimální imunogenní dávku je těžké předem odhadnout. Závisí to na konkrétním proteinu a jeho příjemci. Detekce přítomnosti kontaminujících proteinů je možná pomocí elektroforézy nebo imunoblotu. Kvantitativní stanovení umožňují specifické protilátky proti konkrétním proteinům, které se používají v testovacích metodách typu ELISA [86, 89, 91].

1.5.3. Kontaminace rekombinantních proteinů lipopolysacharidy

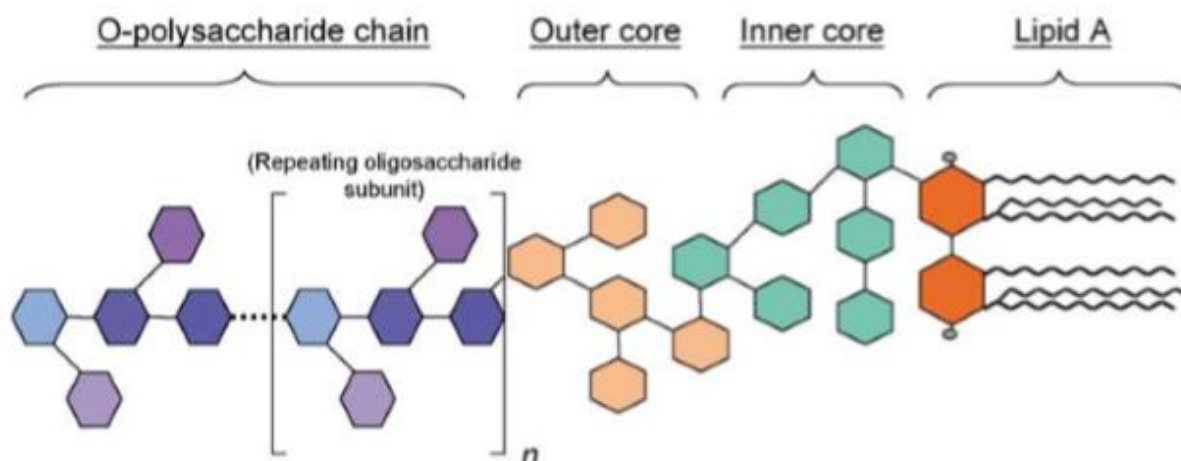
Lipopolysacharidy jsou hlavní složkou vnější membrány Gramnegativních bakterií. Jsou to endotoxiny, které stimulují imunitní systém a jsou vhodným analytem pro brzkou detekci patogenů v organismu. Pojmenování endotoxin představuje kategorii biomolekul, které se uvolní po smrti bakteriální buňky a jsou toxické. Přítomnost lipopolysacharidů při přípravě rekombinantních proteinů pro terapeutické účely představuje pro pacienty problém. Endotoxiny mohou způsobit v lidském těle horečku, septický šok nebo intravaskulární koagulaci stimulací syntézy zánětlivých cytokinů (IL-1b, IL-6, IL-10 nebo TNF-alfa) [92, 93].

1.5.3.1. Stavba lipopolysacharidů

LPS je prototyp lipoglykanu s celkovým negativním nábojem. Je součástí vnější membrány Gram-negativních bakterií a skládá se ze 3 částí (viz obrázek č. 14). Lipid A je hydrofilní membránová kotva molekul LPS. Skládá se z šesti nebo sedmi zbytků mastných kyselin. Je zodpovědný za biologickou funkci LPS. V lidském těle se LPS váže pomocí lipidu A na imunitní receptor TLR4 (Toll-Like Receptor 4). Tento receptor patří do skupiny Toll-Like receptorů exprimovaných buňkami přirozené imunity, které rozpoznávají charakteristické strukturální motivy molekulárních vzorů asociovaných s patogenem [92–94].

Druhou částí LPS je polysacharidové jádro (tvořeno především z heptóz), které má 2 subdomény. Vnitřní subdoména je kovalentně spojena s lipidem A a vnější subdoména poskytuje místo pro vazbu O-antigenu. O-antigen je polysacharidový řetězec. Skládá se z opakujících se podjednotek, z nichž se každá skládá z jednoho až sedmi glykozylových zbytků. Díky tomu je O-antigen mezi bakteriemi velmi variabilní a určuje jejich sérotyp [95, 96].

Existují dvě formy LPS – hladká (S-forma) a drsná (R-forma). U hladké formy je řetězec O-antigenu dlouhý a kompletní a způsobuje hladký vzhled kolonií při kultivaci. Drsná forma je způsobena krátkým nebo chybějícím řetězcem O-antigenu a vzhled kolonií při kultivaci je drsný [96].



Obrázek 14: Struktura lipopolysacharidu. Převzato a upraveno z: [95].

1.5.3.2. Odstranění lipopolysacharidů

Pro odstranění LPS z rekombinantních proteinů byly použity různé postupy, například ultrafiltrace, iontově výměnná chromatografie, membránová chromatografie nebo imobilizovaný polymyxin B na Sepharose 4B. Dalšími zvažovanými postupy bylo použití mikrofiltračních membrán z aktivního uhlí, modifikované celulózy nebo z chitozanu. V současnosti není žádná univerzální metoda, kterou by bylo možné použít pro všechny exprimované proteiny. V metodách, které se používají k odstranění endotoxinu, se často využívají detergenty spolu s fázovou separací a afinitní chromatografií. Tyto metody však musí být upraveny dle vlastností daného proteinu [92, 93].

1.5.3.3. Metody detekce lipopolysacharidů

Testování lipopolysacharidů ve finálních produktech (biologické produkty, zdravotnické prostředky, léky) je důležité z hlediska bezpečnosti a sterility. Stromberg et al. ([96]) rozdělují detekční metody do 6 překrývajících se kategorií: *in vitro* a *in vivo* testy, imunotesty a jejich deriváty, biologické, chemické a buněčné senzory. Rozsah citlivosti těchto metod je široký, ale u některých chybí schopnost rozlišovat sérotyp [94, 96].

Test pyrogenity u králíků

Test pyrogenity u králíků (RPT) byl první povolenou metodou pro detekci endotoxinů. Principem byl nárůst teploty po intravenózní injekci testovacího roztoku. Problémem tohoto testu byla vyšší cena a doba stanovení, proto byl postupně téměř nahrazen LAL testem. Dnes se používá spíše jako doplněk pro LAL test nebo při detekci endotoxinu v některých vakcínách (například proti hepatidě B) [94, 97, 98].

LAL test (Limulus Amebocyte Lysate Assay)

LAL test je současnou alternativou RPT. Při tomto testu se využívá krev ostrorepa amerického (*Limulus polyphemus*), konkrétně amébocytový lyzát, který obsahuje protein koagulogen, který se v přítomnosti endotoxinu sráží. Tato reakce je enzymatické povahy a vykazuje vysokou citlivost. Reakce začíná aktivací faktoru C lipopolysacharidem. Aktivovaný faktor C aktivuje faktor B, který přemění prokoagulační enzym na koagulační enzym. Koagulační enzym katalyticky štěpí 2 peptidové vazby koagulogenu za vzniku koagulinového gelu [94, 99, 100].

LAL test může mít 3 provedení: gelová sraženina, turbidimetrický LAL nebo chromogenní LAL. Turbidimetrické a chromogenní provedení jsou přesnější a citlivější metody než gelová sraženina. U gelové sraženiny se pozoruje tvorba gelu v čase. Jedná se tak spíše o kvalitativní metodu. Intenzita srážení je přímo úměrná koncentraci gelu. Turbidimetrické provedení je kvantitativní metoda a principem je měření změny zákalu na základě tvorby gelu. Chromogenní stanovení je kvantitativní metoda, u které se používá chromogenní substrát (p-nitroanilinový) ze kterého je koagulačním enzymem štěpen žlutý chromogen. Poté je absorbance tohoto chromogenu měřena spektrofotometricky (při 405 nm) [100–102].

Nevýhodou LAL testu je snížená citlivost testu v případě přítomnosti volných kovových iontů ve vzorku. Možným řešením je minimální ředění vzorku 1000x pro snížení inhibičního nebo zesilovacího účinku kovových iontů na LAL test bez snížení citlivosti na endotoxin a přidání 5mM EDTA pro snížení interakce mezi endotoxinem a kovovým iontem. Dalším problémem je snížení populace ostrorepa amerického z důvodu odebírání jeho krve. I přes to, že jsou po odběru vráceni do moře, přežije z nich přibližně pouze 20 % [100].

ELISA

ELISA je test založený na biospecifické reakci mezi antigenem a protilátkou. Pro stanovení LPS jsou 2 základní typy: detekce LPS antigenu nebo detekce anti-LPS protilátek. Při detekci LPS antigenu je povrch destičky potažen specifickou protilátkou, na kterou se antigen naváže. Protilátka může být přímo značena enzymem, nebo se použije sekundární protilátka také se specifitou k LPS značená enzymem pro kolorimetrickou detekci. Druhý typ ELISA pro detekci protilátek využívá destičku, která má na svém povrchu lipopolysacharidový antigen. Tento antigen na sebe váže protilátky ze séra (IgA, IgG a IgM). Detekce protilátek není vhodná pro zjištění akutní infekce, ale spíše pro sledování zdravotního stavu populace a epidemiologie infekce, protože mezi počáteční expozicí antigenu a zvýšenými titry protilátek dochází ke zpoždění. Problémem nejen u ELISA metod je, že může docházet k falešně pozitivním výsledkům v důsledku možné přítomnosti endotoxinů v reagentech, na skle nebo plastu [96, 103].

Test aktivace monocytů

Test aktivace monocytů (MAT) je podobný RPT, z důvodu podobné reakce lidského a králičího těla na setkání s pyrogeny – vyvolání horečky. MAT je kvantitativní test a je vhodnou alternativou k RPT. Principem testu aktivace monocytů je detekce IL-6 nebo IL-1 β , které jsou produkovány monocyty. Tyto interleukiny mají důležitou roli ve vyvolání horečkové reakce. Produkci těchto interleukinů stimuluje setkání monocytu s lipopolysacharidem. Při testu je vzorek inkubován s čerstvou nebo kryokonzervovanou lidskou plnou krví (zdroj monocytů) a poté se pomocí ELISA metody měří množství vytvořeného IL-1 β [100, 104, 105].

Biosenzory

Biosenzory jsou miniaturizované analytické nástroje poskytující vysokou selektivitu a citlivost. Přítomnost cílového analytu detekují pomocí biologického rozpoznávacího prvku a následně monitorují změny signálu. Biosenzory pro detekci endotoxinu se rozdělují do 3 hlavních tříd: optické, elektrochemické a hmotnostní [94, 106].

Optické biosenzory

Optické biosenzory umožňují přímou nebo nepřímou detekci bakterií a jejich toxinů. Existují různé varianty optických biosenzorů, které jsou schopné detekovat malé změny spektrofotometrických parametrů (např. index lomu). K těmto změnám dochází během vazby endotoxinu na receptory, které jsou imobilizované na povrchu snímače. Detekční metody optických biosenzorů jsou fluorescence, elektrochemiluminiscence, bioluminiscence nebo povrchová plazmonová rezonance [100, 106].

Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory se používají pro identifikaci, monitoring a kvantifikaci endotoxinu. Základním principem je změna na úrovni elektronů a iontů v důsledku chemické reakce, která ovlivňuje elektrické parametry roztoků. Do této skupiny patří amperometrické, potenciometrické a impedanční biosenzory [100, 106].

Hmotnostní biosenzory

Biosenzory endotoxinů založené na hmotnosti jsou méně zkoumány než optické a elektrochemické. Principem je zaznamenávání malých změn rezonančních frekvencí krystalů. Ke změnám rezonančních frekvencí dochází změnou hmotnosti v důsledku vazby chemikálií na povrch krystalků, které jsou na povrchu sondy. Mezi hmotnostní biosenzory patří piezoelektrické a magnetoelastické biosenzory [100, 106].

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro izolaci His-tag ubikvitinu z modelové směsi proteinů pomocí nanomateriálu na bázi $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ a zavedení metody pro detekci lipopolysacharidů.

Jednotlivé úkoly byly:

- 1) Izolace His-tag ubikvitinu pomocí 2 komerčně dodávaných IMAC nosičů a porovnání jejich účinnosti. Izolace His-tag ubikvitinu pomocí TiO_2 nanotrubiček.
- 2) Izolace His-tag ubikvitinu pomocí 2 komerčně dodávaných IMAC nosičů za denaturačních podmínek a porovnání jejich účinnosti. Izolace His-tag ubikvitinu pomocí TiO_2 nanotrubiček za denaturačních podmínek.
- 3) Optimalizace protokolu pro izolaci His-tag ubikvitinu pomocí TiO_2 nanočástic z modelových směsí proteinů. Optimalizace promývacího a elučního pufu.
- 4) Zavedení metody a optimalizace protokolu pro detekci lipopolysacharidů pomocí komerčně dodávaných testů a její použití při kontrole čistoty izolovaného His-tag ubikvitinu.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)

Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

Stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Vortex (Grant-bio, Cambrige, Velká Británie)

pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)

Automatické mikropipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Mikrozkumavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Koncentrátor Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Magnetický separátor Dynal – MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)

Blokový termostat TS-100C (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Mikrostríkačka (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)

Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc™ XRS+ System s ImageLab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Odsolovací kolonky AMICON Ultra-0,5 ml, 10 K (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts)

Mikrotitrační destička

Spektrofotometr Labsystems Miltiscan RC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

3.2. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v Tris-tricin pufrovém systému

Chemikálie:

Akrylamid (Fluka, Buchs, švýcarsko)

N,N'-Methylenbisakrylamid 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

SDS - dodecylsulfát sodný (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Persíran amonný (Lachema, Neratovice, CZ)

N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tricin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Precision Plus Protein™ nebarvený standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Roztoky a pufry:

Roztok A: 48% akrylamid a 1,5% bisakrylamid

Roztok B: 3,0 M Tris-HCl pH 8,45 s 0,3% SDS

Roztok C: 10% persíran amonný

Roztok D: TEMED (N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin)

Tris-Tricin pufr pro vzorky (Bio-Rad, Hercules, CA, USA): 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glycerol, 2% SDS, 0,04% Coomassie Blue G250

Elektrodový pufr: 0,1 M Tris, 0,1 M tricín, 0,1% SDS

Pracovní postup:

- 1) Sestavení aparatury: Očištěná skla lihem byla vložena do stojánku tak, aby mezi nimi vznikla mezera pro vytvoření gelu a stojánek byl uzavřen. Spodní část skel byla překryta parafilmem.
- 2) Příprava dělicího gelu (16,5% T, 3% C): Dle tabulky č. 4 byla do zkumavky napipetována voda, roztoky A, B a D. Na závěr byl přidán roztok C. Směs byla lehce promíchána, napipetována mezi skla a převrstvena destilovanou vodou. Po 20-30 minutách dělicí gel zpolymeroval.

- 3) Příprava zaostřovacího gelu: Podle tabulky č. 4 byla do zkumavky napipetována voda, roztoky A, B a D. Na závěr byl přidán roztok C. Směs byla lehce promíchána, napipetována mezi skla a do gelu byla umístěna šablona s 10 nebo 15 jamkami. Po 20-30 minutách zaostřovací gel zpolymeroval.

Tabulka 4: Příprava dělicího a zaostřovacího gelu pro Tris-tricin SDS-PAGE elektroforézu.

	dělicí gel (ml)	zaostřovací gel (ml)
Destilovaná voda	2,1	1,666
Roztok A	0,25	1,666
Roztok B	0,775	1,666
Roztok C	0,025	0,025
Roztok D	0,0025	0,0025

- 4) Po zpolymerování byla skla vyjmuta ze stojanu a umístěna do držáku a do elektroforetické vany. Mezi skla a do elektroforetické vany byl po rysku nalit elektrodotový pufr. Po nalití pufru byla vyndána šablona na jamky a jamky byly propláchnuty elektrodotovým pufrům.
- 5) Příprava vzorků: K 15 μ l vzorku bylo přidáno 15 μ l pufru pro vzorky. Směs byla promíchána a povařena 3 minuty v blokovém termostatu.
- 6) Aplikace vzorků: Do každé jamky bylo napipetováno 15 μ l vzorku pro deseti jamkové gely (pro patnácti jamkové gely 10 μ l vzorku). Do jedné jamky na každém gelu bylo napipetováno 5-7 μ l standardu pro následné barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue.
- 7) Elektroforetické dělení: Bylo nastaveno konstantní napětí 30 V a proud 30 mA na jeden gel. Za těchto podmínek probíhalo dělení 30 min. Poté byla aparatura vložena do lednice (4 °C), kde dělení pokračovalo při napětí 100 V a proudu 30 mA na jeden gel, dokud čelo nedoputovalo k dolnímu okraji skel (cca 1-2 hodiny).

3.3. Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue

Chemikálie:

Kyselina octová 99% (Penta, Chudim, CZ)

Ethanol 96% (Lachner, Neratovice, ČR)

Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Roztoky:

fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol

roztok pro barvení gelu: Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Pracovní postup:

Gel po elektroforetickém dělení byl vložen do Petriho misky, propláchnut destilovanou vodou a převrstven na 1 hodinu fixačním roztokem. Po fixaci byl gen rehydratován v destilované vodě 30 minut a poté 1x promyt destilovanou vodou. Po promytí bylo ke gelu nalito na 1 hodinu 30-50 ml Bio-Safe™ Coomassie Stain při laboratorní teplotě. Poté byl barvicí roztok vylit do odpadu a gel byl odbarvován po dobu 1 hodiny destilovanou vodou.

Hodnocení výsledků SDS-PAGE

Gel byl po obarvení vyfocen pomocí přístroje ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Snímek gelu byl vyhodnocen programem ImageLab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.4. Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosičů**Chemikálie:**

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NaCl (Lachner, Neratovice, ČR)

Imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Voda bez endotoxinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Vazebný a promývací pufr: 50mM Tris-HCl pH 7,5 + 150mM NaCl

Eluční pufr: 50mM Tris-HCl pH 7,5 + 150mM NaCl + 300mM imidazol

Nosiče:

HisPur™ Ni-NTA (Thermo Scientific)

HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Pracovní postup:

1. 50 µl suspenze nosiče bylo centrifugováno při 1000 g po dobu 60 s. Po odebrání konzervačního roztoku byl sedimentovaný nosič promyt 3x 300 µl vazebného a promývacího pufru. Mezi každým promytím byla provedena centrifugace při 1000 g po dobu 60 s.
2. Směs proteinů byla rozpuštěna v 300 µl vazebného a promývacího pufru a inkubována za mírného otáčení po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 1000 g po dobu 60 s a supernatant byl odebrán na elektroforézu.
3. Poté byl vzorek 5x promyt 300 µl vazebného a promývacího pufru. První promývací frakce byla odebrána na elektroforézu.
4. Po promytí byly provedeny 2 eluce elučním pufrem. Inkubace za mírného třepání po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 1000 g po dobu 60 s. Supernatant byl odebrán na elektroforézu.

Pro přípravu roztoků na izolaci pro následné stanovení LPS v eluční frakci (viz kapitola 4.13) byly roztoky připraveny z vody bez endotoxinů.

3.5. Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosičů za denaturačních podmínek

Chemikálie:

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NaCl (Lachner, Neratovice, ČR)

Imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

močovina (Lachner, Neratovice, ČR)

Voda bez endotoxinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Vazebný a promývací pufr: 50mM Tris-HCl pH 7,5 + 150mM NaCl + 8M močovina

Eluční pufr: 50mM Tris-HCl pH 7,5 + 150mM NaCl + 300mM imidazol + 8M močovina

Nosiče:

HisPur™ Ni-NTA (Thermo Scientific)

HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Pracovní postup:

Pracovní postup byl stejný jako v kapitole 3.4 pouze s výše uvedenými roztoky.

Pro přípravu roztoků na izolaci pro následné stanovení LPS v eluční frakci (viz kapitola 4.13) byly roztoky připraveny z vody bez endotoxinů.

3.6. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic – původní protokol

Chemikálie:

Bis-Tris HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hydrogenfosforečnan disodný (Lachner, Neratovice, ČR)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NH₄OH 29% (Merck, Darmstadt, Německo)

Roztoky:

Vazebný pufr: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5

Promývací roztok: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM imidazol

Eluční roztok 1: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 300 mM imidazol

Eluční roztok 2: 10 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 s + 200 mM Na₂HPO₄ s 100 mM imidazolem

Roztoky pro regeneraci nosiče: 80% ACN/0,1% TFA, 1% NH₄OH

Nosič:

TiO₂ nanotrubičky Fe₃O₄ (5 mg)

Postup:

1. Nosič byl 2x promyt 300 µl 80% ACN/0,1% TFA. Mezi každým krokem byla provedena separace na magnetickém separátoru. Poté byl nosič 3x promyt 300 µl vazebného pufru.
2. Směs proteinů byla rozpuštěna v 300 µl vazebného pufru a inkubována za mírného otáčení po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Vzorek byl separován na magnetickém separátoru a supernatant byl odebrán na elektroforézu.
3. Poté byl vzorek 5x promyt 300 µl promývacího pufru. Mezi každým promytím byla provedena separace na magnetickém separátoru a první promývací frakce byla odebrána na elektroforézu.
4. Po promytí byla provedena 1x eluce 150 µl elučního pufru 1 a 2x eluce 150 µl elučního pufru 2. Vždy inkubace za mírného otáčení po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala separace na magnetickém separátoru a odebrání supernatantu na elektroforézu.
5. Po eluci následovala regenerace nosiče: nosič byl 1x promyt 300 µl vazebného pufru. Po separaci a odebrání supernatantu bylo k nosiči přidáno 300 µl 1% NH₄OH a inkubováno za mírného otáčení po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po separaci a odebrání supernatantu byl nosič 2x promyt 300 µl 80% ACN/0,1% TFA a v tomto roztoku byl nosič uchováván.

3.7. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek – původní protokol

Chemikálie:

Bis-Tris HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Na₂HPO₄ (Lachner, Neratovice, ČR)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NH₄OH 29% (Merck, Darmstadt, Německo)

Močovina (Lachner, Neratovice, ČR)

Roztoky:

Vazebný pufr: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 8 M močovina

Promývací roztok: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM imidazol + 8M močovina

Eluční roztok 1: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 300 mM imidazol + 8M močovina

Eluční roztok 2: 10 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 s + 200 mM Na₂HPO₄ s 100 mM imidazolem + 8 M močovina

Roztoky pro regeneraci nosiče: 80% ACN/0,1% TFA, 1% NH₄OH

Nosič:

TiO₂ nanotrubičky Fe₃O₄ (5 mg)

Postup:

1. Nosič byl 2x promyt 300 μ l 80% ACN/0,1% TFA. Mezi každým krokem byla provedena separace na magnetickém separátoru. Poté byl nosič 3x promyt 300 μ l vazebného pufru.
2. Směs proteinů byla rozpuštěna v 300 μ l vazebného pufru a inkubována za mírného otáčení po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Vzorek byl separován na magnetickém separátoru a supernatant byl odebrán na elektroforézu.
3. Poté byl vzorek 5x promyt 300 μ l promývacího pufru. Mezi každým promytím byla provedena separace na magnetickém separátoru a první promývací frakce byla odebrána na elektroforézu.
4. Po promytí byla provedena 1x eluce 150 μ l elučního pufru 1 a 2x eluce 150 μ l elučního pufru 2. Vždy inkubace za mírného otáčení po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala separace na magnetickém separátoru a odebrání supernatantu na elektroforézu.
5. Po eluci následovala regenerace nosiče: nosič byl 1x promyt 300 μ l vazebného pufru bez močoviny. Po separaci a odebrání supernatantu bylo k nosiči přidáno 300 μ l 1% NH₄OH a inkubováno za mírného otáčení po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po

separaci a odebrání supernatantu byl nosič 2x promyt 300 μ l 80% ACN/0,1% TFA a v tomto roztoku byl nosič uchováván.

3.8. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic – finální protokol

Chemikálie:

Bis-Tris HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hydrogenfosforečnan disodný (Lachner, Neratovice, ČR)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NH₄OH (Merck, Darmstadt, Německo)

Voda bez endotoxinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Vazebný pufr: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5

Promývací roztok: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM Na₂HPO₄

Eluční roztok: 100 mM Na₂HPO₄

Roztoky pro regeneraci nosiče: 80%ACN/0,1% TFA, 1% NH₄OH

Nosič:

TiO₂ nanotrubic Fe₃O₄ (5 mg)

Postup:

Postup stejný jako v kapitole 3.6. s rozdílem v kroku č. 4: Po promytí byla provedena 2x eluce 150 μ l elučního pufru. Vždy inkubace za mírného otáčení po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala separace na magnetickém separátoru a odebrání supernatantu na elektroforézu.

Pro přípravu roztoků na izolaci pro následné stanovení LPS v eluční frakci (viz kapitola 4.13) byly roztoky připraveny z vody bez endotoxinů.

3.9. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek – finální protokol (8M urea)

Chemikálie:

Bis-Tris HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Na₂HPO₄ (Lachner, Neratovice, ČR)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NH₄OH 29% (Merck, Darmstadt, Německo)

Močovina (Lachner, Neratovice, ČR)

Voda bez endotoxinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Vazebný pufr: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 8 M močovina

Promývací roztok: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM Na₂HPO₄ + 8M močovina

Eluční roztok: 100 mM Na₂HPO₄ + 8 M močovina

Roztoky pro regeneraci nosiče: 80% ACN/0,1% TFA, 1% NH₄OH

Nosič:

TiO₂ nanotrubic Fe₃O₄ (5 mg)

Postup:

Postup stejný jako v kapitole 3.7. s rozdílem v kroku č. 4: Po promytí byla provedena 2x eluce 150 µl elučního pufru. Vždy inkubace za mírného otáčení po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala separace na magnetickém separátoru a odebrání supernatantu na elektroforézu.

Pro přípravu roztoků na izolaci pro následné stanovení LPS v eluční frakci (viz kapitola 4.13) byly roztoky připraveny z vody bez endotoxinů.

3.10. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek (4M urea)

Chemikálie:

Bis-Tris HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Na₂HPO₄ (Lachner, Neratovice, ČR)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NH₄OH 29% (Merck, Darmstadt, Německo)

Močovina (Lachner, Neratovice, ČR)

Voda bez endotoxinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Vazebný pufr: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 4 M močovina

Promývací roztok: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM Na₂HPO₄ + 4 M močovina

Eluční roztok: 100 mM Na₂HPO₄ + 4 M močovina

Roztoky pro regeneraci nosiče: 80% ACN/0,1% TFA, 1% NH₄OH

Nosič:

TiO₂ nanotrubic Fe₃O₄ (5 mg)

Postup:

Postup stejný jako v kapitole 3.7. s rozdílem v kroku č. 4: Po promytí byla provedena 2x eluce 150 µl elučního pufru. Vždy inkubace za mírného otáčení po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala separace na magnetickém separátoru a odebrání supernatantu na elektroforézu.

Pro přípravu roztoků na izolaci pro následné stanovení LPS v eluční frakci (viz kapitola 4.13) byly roztoky připraveny z vody bez endotoxinů.

3.11. Protokol stanovení LPS, návod od výrobce

Diagnostická komerční souprava: PierceTM LAL Chromogenic - Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, katalogové č. produktu 88282)

Chemikálie:

Lyofilizovaný endotoxin z *Escherichia coli* v koncentraci 27 EU/ml (součástí komerční soupravy), rozpuštěn v 1350 µl vody bez endotoxinů → výsledná koncentrace 20 EU/ml

Voda bez endotoxinů (součástí komerční soupravy)

Lyzát amoebocytů ostrorepa – LAL (součástí komerční soupravy)

Chromogenní substrát (součástí komerční soupravy)

kyselina octová 99% (Penta, Chrudim, Česká republika)

Standardy:

A – koncentrace endotoxinu 1 EU/ml

B – koncentrace endotoxinu 0,50 EU/ml

C – koncentrace endotoxinu 0,25 EU/ml

D – koncentrace endotoxinu 0,10 EU/ml

Příprava standardů

A: 50 µl výchozího standardu + 950 µl vody bez endotoxinů

B: 250 µl z A + 250 µl vody bez endotoxinů

C: 250 µl z A + 750 µl vody bez endotoxinů

D: 100 µl z A + 900 µl vody bez endotoxinů

Postup stanovení:

1. Do vytemperované mikrozkušavky na 37 °C (přibližně 5 minut) bylo napipetováno 35 µl od každého standardu nebo vzorku.
2. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 35 µl LAL. Promícháno pomocí pipety. Inkubace probíhala 10 min při 37 °C, 900 otáček.
3. Po inkubaci bylo přidáno 70 µl chromogenního substrátu (předehřátý na 37 °C) a opět promícháno pomocí pipety. Inkubace probíhala 6 min při 37 °C, 900 otáček.

- Po 6 minutách byl přidáno do každé zkumavky 70 μ l zastavujícího roztoku (25% kyselina octová) a směs byla promíchána pomocí pipety. Inkubační doba byla přibližně 1–2 min při 37 °C, 900 otáček.
- Ze zkumavky do mikrotitrační destičky bylo převedeno 200 μ l od každého standardu nebo vzorku. Poté byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance (při 405 nm).

3.12. Protokol stanovení LPS, optimalizace protokolu

Diagnostická komerční souprava: PierceTM LAL Chromogenic - Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, katalogové č. produktu 88282)

Chemikálie:

Lyofilizovaný endotoxin z *Escherichia coli* v koncentraci 27 EU/ml (součástí komerční soupravy), rozpuštěn v 1350 μ l vody bez endotoxinů \rightarrow výsledná koncentrace 20 EU/ml

Voda bez endotoxinů (součástí komerční soupravy)

Voda bez endotoxinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Lyzát amoebocytů ostrorepa – LAL (součástí komerční soupravy)

Chromogenní substrát (součástí komerční soupravy)

kyselina octová 99% (Penta, Chrudim, Česká republika)

Standardy:

A – koncentrace endotoxinu 1 EU/ml

B – koncentrace endotoxinu 0,50 EU/ml

C – koncentrace endotoxinu 0,25 EU/ml

D – koncentrace endotoxinu 0,10 EU/ml

Příprava standardů

A: 50 μ l výchozího standardu + 950 μ l vody bez endotoxinů

B: 250 μ l z A + 250 μ l vody bez endotoxinů

C: 250 µl z A + 750 µl vody bez endotoxinů

D: 100 µl z A + 900 µl vody bez endotoxinů

Postup stanovení:

1. Do vytemperované mikrozkušavky na 37 °C (přibližně 5 minut) bylo napipetováno 35 µl od každého standardu nebo vzorku.
2. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 35 µl LAL (2x naředěného) předeštěného na 37 °C. Promícháno na vortexu a stočeno v centrifuze (45 sekund při 3000 otáčkách) a vráceno do blokové třepačky. Inkubace probíhala 15 min při 37 °C, 900 otáček.
3. Po inkubaci bylo přidáno 70 µl chromogenního substrátu (2x naředěný a předeštěný na 37 °C). Promícháno na vortexu a stočeno v centrifuze (45 sekund při 3000 otáčkách) a vráceno do blokové třepačky. Inkubace probíhala 9 min při 37 °C, 900 otáček.
4. Po 9 minutách byl přidáno do každé zkumavky 70 µl zastavujícího roztoku (25% kyselina octová) a směs byla promíchána na vortexu a stočena v centrifuze (45 sekund při 3000 otáčkách).
5. Ze zkumavky do mikrotitrační destičky bylo převedeno 200 µl od každého standardu nebo vzorku. Poté byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance (při 405 nm).

Stanovení byla prováděna v duplikátu. Vzorky byly získávány izolacemi ubiquitinu s polyhistidinovou značkou z modelové směsi proteinů pomocí IMAC nosičů u TiO₂ nanotrubic Fe₃O₄ (více viz výsledky a diskuze).

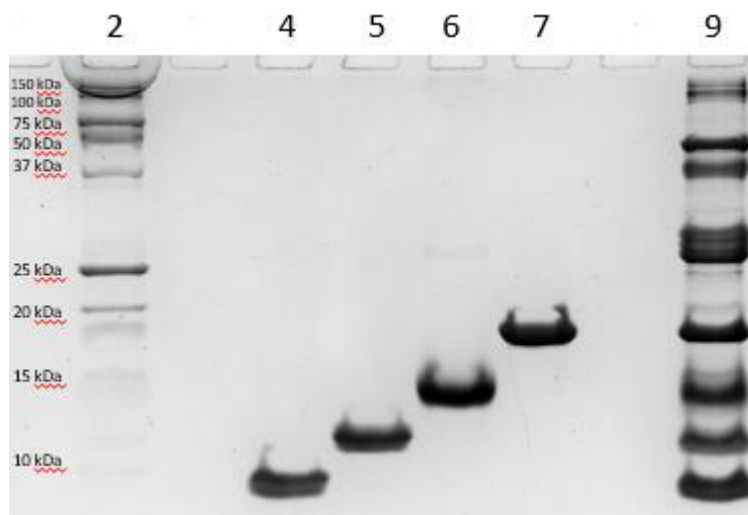
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Sestavení modelové směsi proteinů

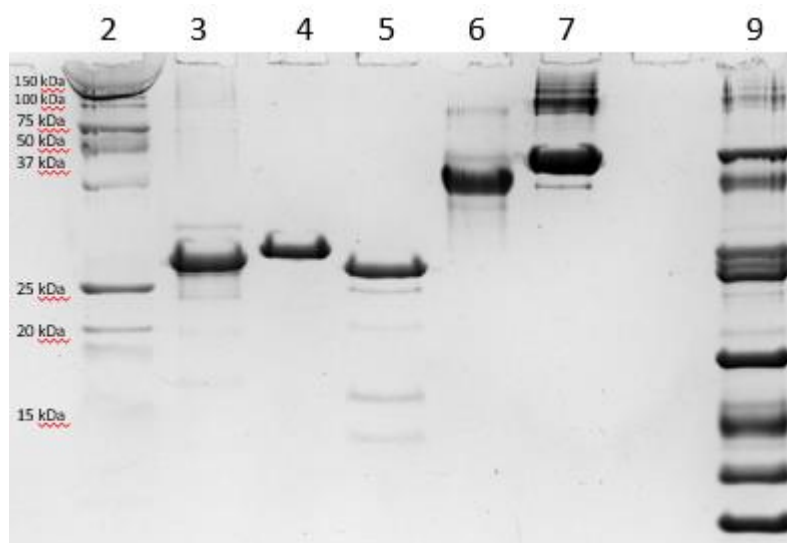
Cílem tohoto úkolu bylo ověřit čistotu a molekulovou hmotnost jednotlivých proteinů uvedených v tabulce č. 5 pro jejich využití do modelové směsi pro izolaci ubikvitinu s polyhistidinovou značkou. Byly zvoleny proteiny v rozmezí od 8 do 67 kDa, aby byl rozsah molekulové hmotnosti co největší a bylo možné sledovat případný vliv na vazbu. Je důležité, aby ve směsi bylo možné rozeznat His-tag ubikvitin. Molekulová hmotnost proteinů byla definována pomocí Tris-tricin SDS-PAGE. Vzorky byly připraveny rozpuštěním proteinu v redestilované vodě a výsledná koncentrace pro analýzu byla 4 µg na jamku. Jedním ze vzorků byla směs těchto proteinů, která byla připravena tak, aby koncentrace každého proteinu byla 2 µg na jamku. Výsledek ověření je na obrázcích č. 15 a 16.

Tabulka 5: Přehled použitých proteinů a jejich molekulová hmotnost.

Název proteinu	Molekulová hmotnost (kDa)
Ubikvitin (lidský)	8,6
His-tag ubikvitin (lidský)	10,7
Cytochrom C (koňský)	12,4
Myoglobin (koňský)	17,1
β-kasein (bovinní)	25,1
Karbonická anhydráza I. (lidská)	28,9
Konkanavalin A (kanvália)	31,5
Ovalbumin (slepičí)	42,7
Sérový albumin (hovězí)	66,5



Obrázek 15: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření čistoty a molekulové hmotnosti proteinů (gel č.1). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Jamky: 2. molekulový marker; 4. ubikvitin; 5. His-tag ubikvitin; 6. cytochrom c; 7. myoglobin; 9. modelová směs proteinů (proteiny uvedené v tabulce č. 5).

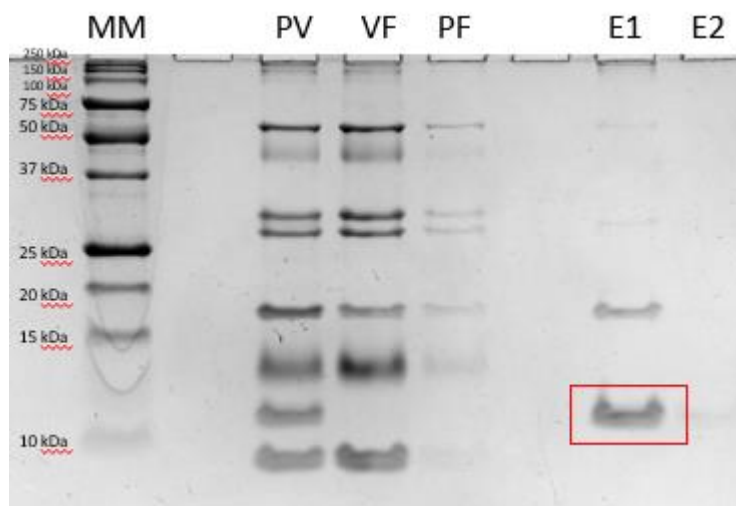


Obrázek 16: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření čistoty a molekulové hmotnosti proteinů (gel č.2). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Jamky: 2. molekulový marker; 3. β-kasein; 4. karbonická anhydráza I.; 5. konkanavalin; 6. ovalbumin; 7. bovinní sérový albumin; 9. modelová směs proteinů (proteiny uvedené v tabulce č. 5).

Všechny proteiny na obou gelech odpovídají své molekulové hmotnosti a je možné je rozpoznat, pouze konkanavalin (5. jamka na obrázku č. 19) vykazoval nižší molekulovou hmotnost (přibližně 27,6 kDa místo 31,5 kDa). Všechny tyto proteiny mohou být použity do modelové směsi proteinů, ze které bude izolován His-tag ubikvitin.

4.2. Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosiče

Účelem tohoto experimentu bylo izolovat His-tag ubikvitin ze směsi proteinů pomocí IMAC nosičů. Byl použit standardní IMAC nosič: HisPur Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific) který byl vybrán jako referenční pro následně testované nosiče. Izolace probíhala pomocí postupu uvedeného v kapitole 3.4. s těmito roztoky: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 + 150 mM NaCl (vazebný a promývací roztok) a 50 mM Tris-HCl pH 7,5 + 150 mM NaCl + 300 mM imidazol (eluční roztok). Vzorkem pro izolaci polyhistidinem značeného ubikvitinu byla směs proteinů použitá v předchozím experimentu (10 µg od každého proteinu rozpuštěno ve 300 µl vazebného a promývacího pufru). Získané frakce byly: původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) a dvě eluční frakce E1 a E2). Tyto frakce byly 2x zakoncentrovány a ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným obarvením gelů pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledek izolace pomocí IMAC nosiče je uveden na obrázku č. 17.

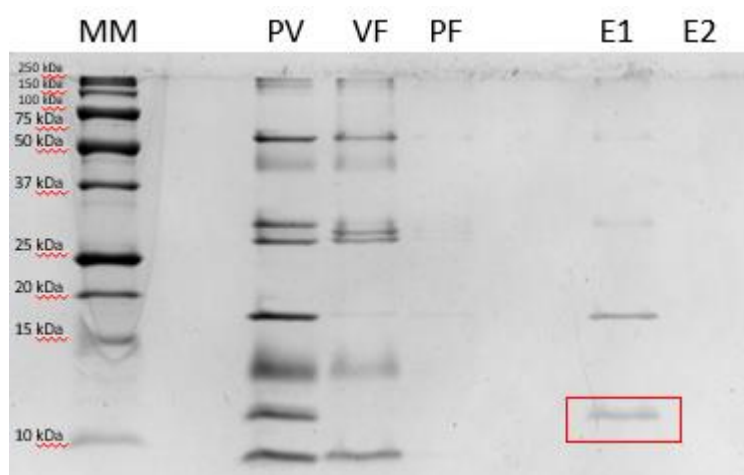


Obrázek 17: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí IMAC nosiče. Nosič HisPur Ni-NTA (Thermo scientific). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) a eluční frakce 1 a 2 (E1 a E1).

Výsledky elektroforézy ukázaly, že His-tag ubikvitin byl úspěšně ze směsi vyizolován již první elucí, ale v eluční frakci byly přítomny mimo izolovaného His-tag ubikvitinu i jiné proteiny. Mezi hlavní kontaminující proteiny patřily myoglobin, β-kasein a ovalbumin.

4.3. Izolace His-tag proteinu pomocí IMAC nosiče za denaturačních podmínek

Účinnost standardního IMAC nosiče (viz předchozí experiment) pro izolaci His-tag ubikvitinu byla testována i za denaturačních podmínek v přítomnosti 8 M močoviny která byla součástí všech roztoků. Při tvorbě rekombinantních proteinů v *E. coli* se mohou tvořit inkluzní tělíška. Tato tělíška obsahují cílový protein a je možné je solubilizovat právě za denaturačních podmínek (více v kapitole 1.1.1.4), ovšem ne všechny proteiny je možné plně solubilizovat. Další důvod pro izolaci za denaturačních podmínek je, že některé proteiny je nutné udržovat v denaturačních podmínkách, aby nedocházelo k jejich agregaci. Izolace probíhala pomocí postupu uvedeného v kapitole 3.5. Použité roztoky byly stejné jako u předchozí izolace, jediný rozdíl byl, že do nich byla přidána 8 M močovina. Vzorkem pro izolaci His-tag ubikvitinu byla modelová směs proteinů (viz tabulka č. 5). Izolace probíhala v přítomnosti 8 M močoviny, která byla součástí všech roztoků. Po izolaci byly získány frakce pro další analýzu: původní vzorek, vazebná frakce, promývací frakce a dvě eluční frakce, kdy eluce probíhala 2x za stejných elučních podmínek. Tyto frakce byly ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným obarvením gelů pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledek ověření viz obrázek č. 18.



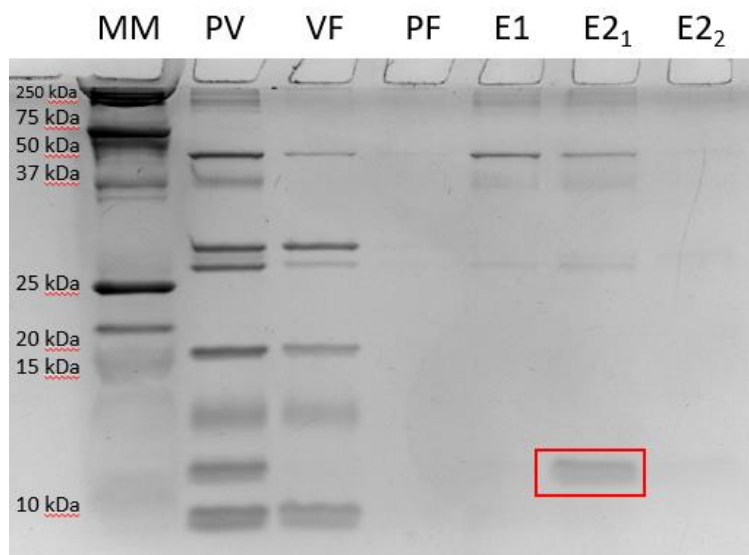
Obrázek 18: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí IMAC nosiče za denaturačních podmínek. Nosič HisPur Ni-NTA (Thermo scientific). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) a eluce 1 a 2 (E1 a E2).

Výsledky elektroforézy ukázaly, že i za denaturačních podmínek byl His-tag ubikvitin úspěšně ze směsi vyizolován a z nosiče byl uvolněn již první elucí. I v tomto případě byly

v eluční frakci přítomny mimo izolovaného His-tag ubikvitinu i jiné proteiny. Mezi hlavní kontaminující proteiny patřily myoglobin, β -kasein a ovalbumin.

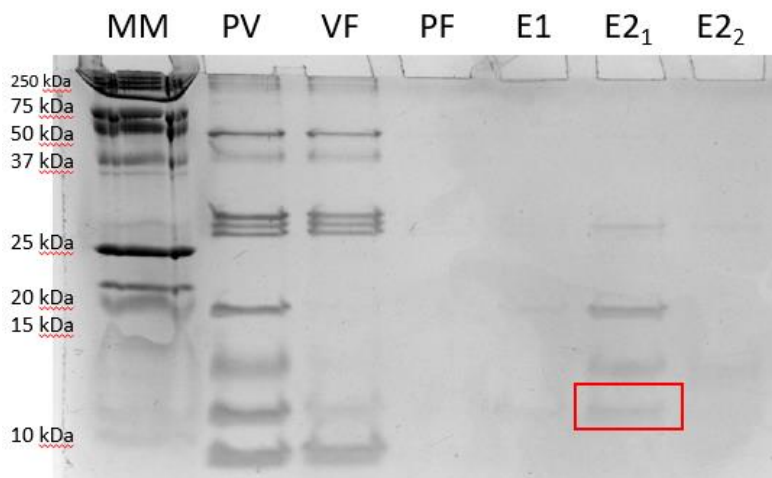
4.4. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic

V tomto experimentu bylo cílem porovnat účinnost izolace His-tag ubikvitinu z modelové směsi proteinů pomocí TiO₂ nanotrubic za standardních i denaturačních podmínek. Použité roztoky za standardních podmínek byly: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 (vazebný pufr), 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM imidazol (promývací roztok), 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 300 mM imidazol (eluční roztok č. 1), 10 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 s + 200 mM Na₂HPO₄ + 100 mM imidazol (eluční roztok č.2). Roztoky za denaturačních podmínek byly stejné jako za standardních, navíc do nich byla přidána 8 M močovina. Izolace probíhala pomocí postupů uvedených v kapitolách 3.6. a 3.7. Vzorkem pro izolaci His-tag ubikvitinu byla modelová směs proteinů. Získané frakce u každé izolace byly: původní vzorek, vazebná frakce, promývací frakce a tři eluční frakce (1 elučním roztokem č.1 a 2 elučním roztokem č.2). Tyto frakce byly ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným obarvením gelů pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledek izolace His-tag ubikvitinu pomocí TiO₂ nanotrubic za standardních podmínek je uveden na obrázku č. 19 a za denaturačních podmínek na obrázku č. 20.



Obrázek 19: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO₂ nanotrubic. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV),

vazebná frakce (VF), promývací frakce (PV), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E₁ a E₂).



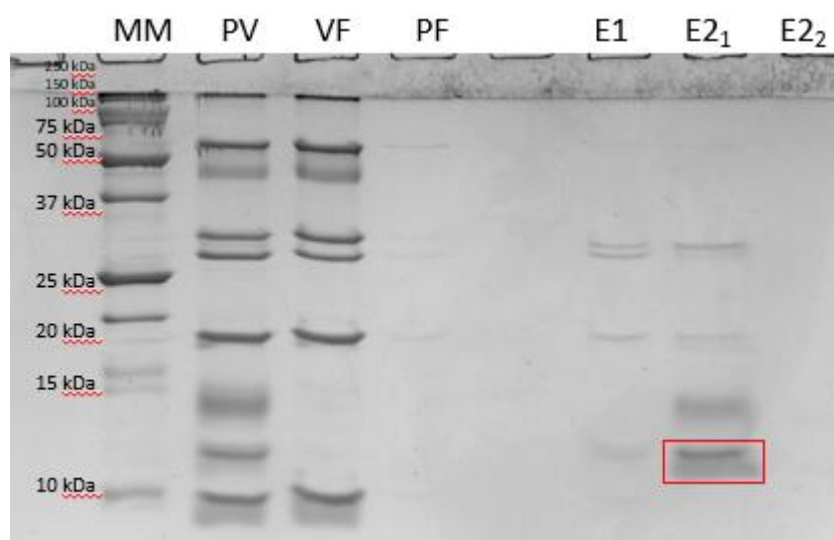
Obrázek 20: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PV), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E₁ a E₂).

Z výsledků elektroforézy je možné vidět, že His-tag ubikvitin byl za standardních i denaturačních podmínek ze směsi vyizolován a bylo jej možné vyeluovat již první elucí s použitím elučního roztoku č. 2, který obsahoval navíc oproti elučnímu roztoku č. 1 200 mM Na₂HPO₄, ale v eluční frakci byly spolu s His-tag ubikvitinem i jiné proteiny. V přítomnosti 8 M močoviny byl His-tag ubikvitin vyeluován pouze v malém množství. Část His-tag ubikvitinu zůstala ve vazebné frakci. Přítomnost dalších proteinů v eluční frakci svědčí o nižší selektivitě nosiče za uvedených podmínek, proto bude nutné upravit protokol izolace.

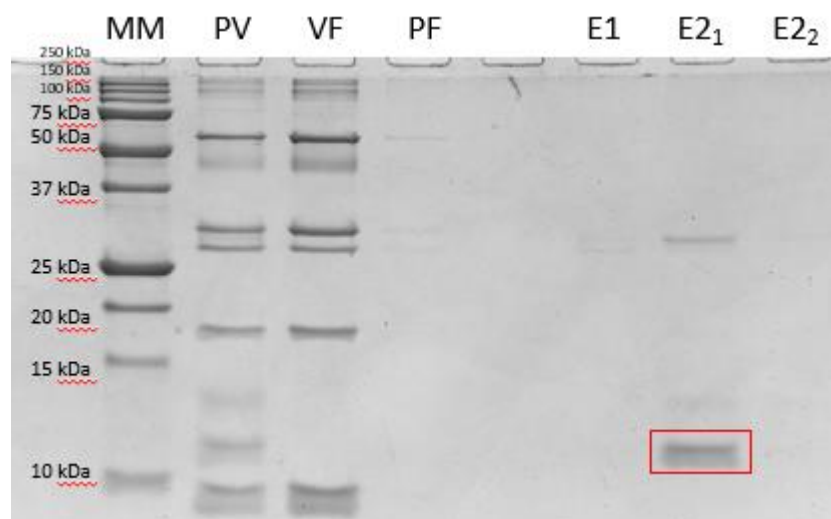
4.5. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic, úprava promývacího roztoku

První částí optimalizace protokolu byla úprava koncentrace imidazolu v promývacím roztoku. Promývacím roztokem v původním protokolu (uvedeném v kapitole 3.6.) je 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 s 20 mM imidazolem. Mimo tuto koncentraci imidazolu v původním protokolu byly testovány i další koncentrace: 50 mM imidazol, 100 mM imidazol a 200 mM

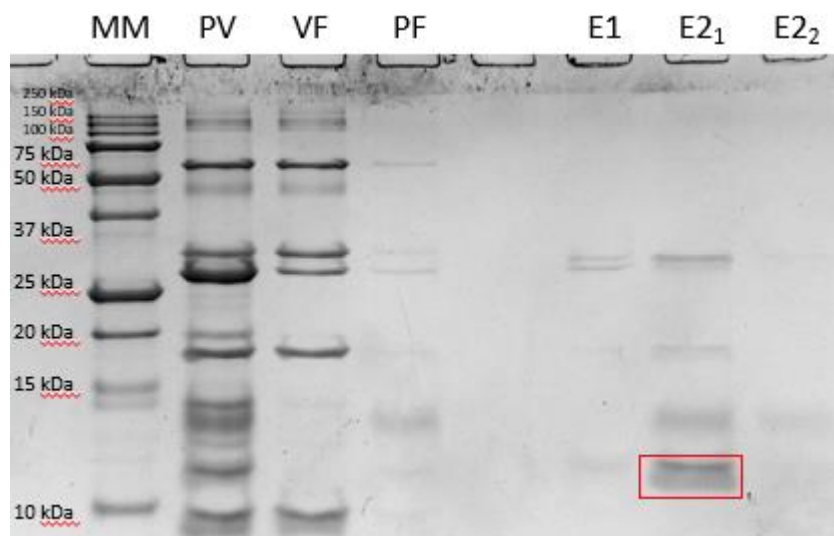
imidazol. Další změnou oproti původnímu protokolu byla úprava pH promývacího roztoku až po přidání navážky imidazolu do promývacího roztoku, aby nedocházelo ke změně pH. V původním protokolu bylo pH promývacího roztoku upraveno před přidáním imidazolu a tím se pH roztoku mohlo změnit. Izolace probíhala pomocí postupu uvedeného v kapitole 3.6. pouze s výše uvedenými roztoky. Vzorkem pro izolaci polyhistidinem značeného ubikvitinu byla modelová směs proteinů. Získané frakce u každé izolace byly: původní vzorek, vazebná frakce, promývací frakce a tři eluční frakce (1 elučním roztokem č.1 a 2 elučním roztokem č.2). Tyto frakce byly ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným obarvením gelů pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledky izolací s různou koncentrací imidazolu v promývacím roztoku jsou na obrázcích č. 21–24.



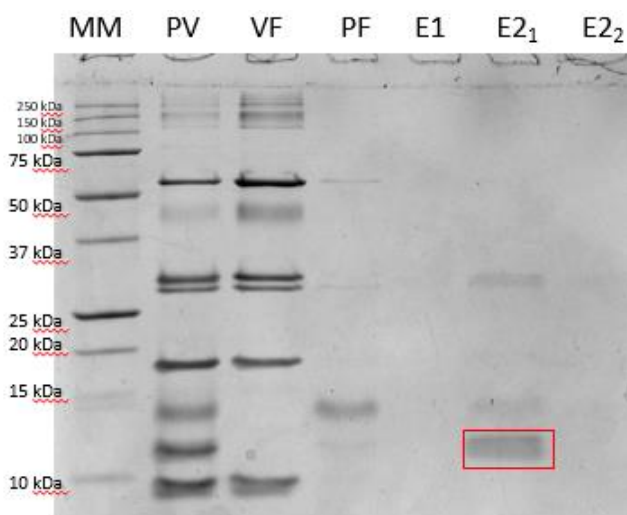
Obrázek 21: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO₂ nanotrubic. Promývací roztok s 20 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2₁ a E2₂).



Obrázek 22: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubiquitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Promývací roztok s 50 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubiquitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E₂₁ a E₂₂).

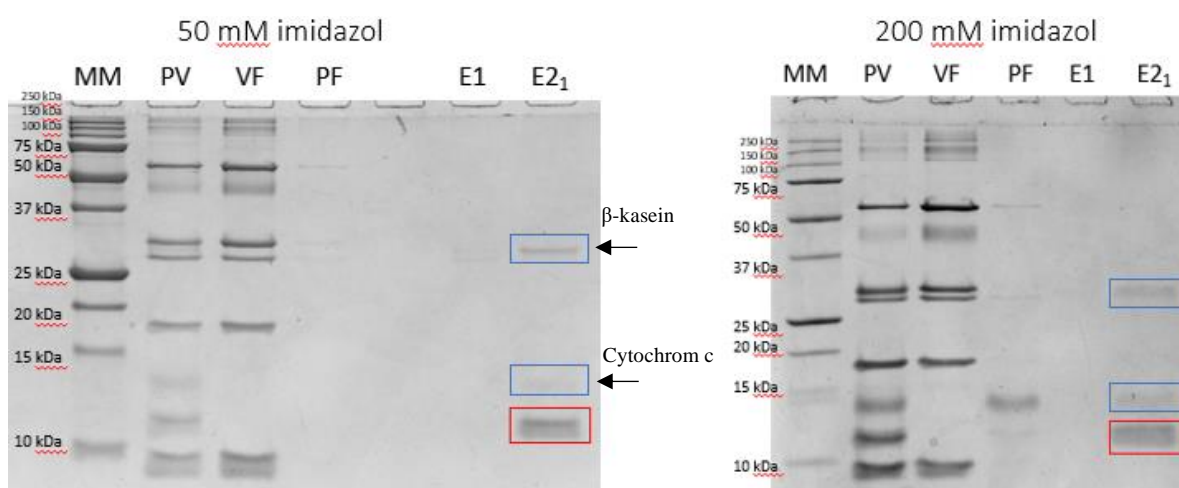


Obrázek 23: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubiquitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Promývací roztok se 100 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubiquitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E₂₁ a E₂₂).



Obrázek 24: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Promývací roztok s 200 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie briliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E₁ a E₂).

His-tag ubikvitin byl ve všech případech vyizolován a bylo jej možné vyeluovat použitím elučního roztoku č. 2. Byla testována koncentrace imidazolu v promývacím roztoku v rozmezí 20 až 200 mM, celý tento pokus byl zopakován 3x a z příkladů gelů je patrné, že kontaminace eluční frakce jinými proteiny je výrazně nižší u promývacího roztoku s koncentrací imidazolu 50 mM (obrázek č. 22) a promývacího roztoku s koncentrací imidazolu 200 mM (obrázek č. 24).



Obrázek 25: Porovnání účinnosti Tris-tricin SDS-PAGE analýzy (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Promývací roztok s 50 mM a 200 mM imidazolem. Barveno pomocí Coomassie briliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný

His-tag ubikvitin. Modře označeny kontaminující proteiny (cytochrom c a β -kasein). Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce 1 elučním roztokem č. 2 (E2₁).

Výsledky porovnání (viz obrázek č. 25) izolace s použitím těchto dvou koncentrací imidazolu (50 mM a 200 mM) v promývacím roztoku jsou téměř stejné, stále je zde kontaminace jiným proteinem (cytochrom c, a β -kasein), proto bude nutná další úprava protokolu. Zvýšení koncentrace imidazolu nepřineslo zlepšení a kontaminace výše uvedenými proteiny je srovnatelná. Proto byla pro další testování zvolena nižší koncentrace imidazolu (z těchto dvou porovnávaných).

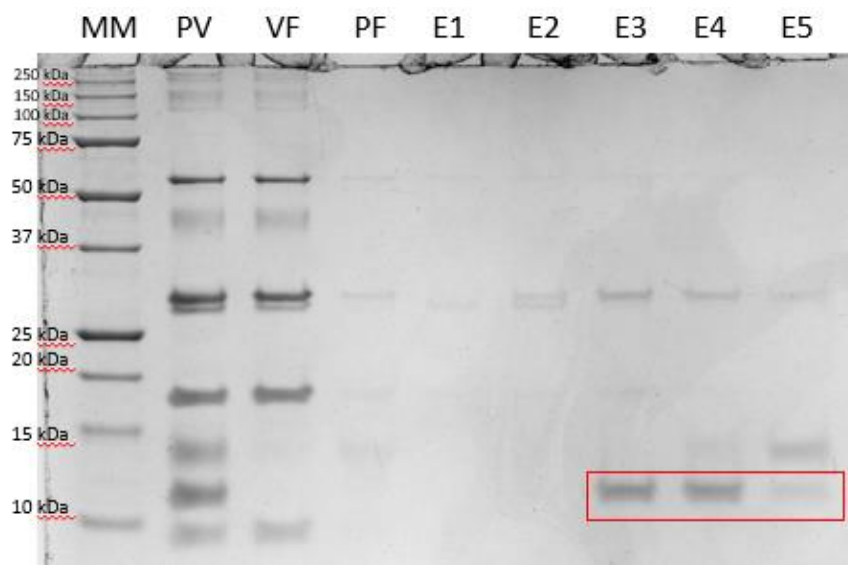
4.6. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic, úprava elučního roztoku

Dalším krokem optimalizace byla úprava elučního roztoku. Byly testovány různé eluční roztoky s různou koncentrací Na₂HPO₄ a eluční roztok č. 2 z původního protokolu (10 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 200 mM Na₂HPO₄ + 100 mM imidazol, viz kapitola 3.6). Na₂HPO₄ má větší afinitu k TiO₂ nosiči než imidazol. Cílem bylo zjistit, zda je vyšší koncentrace Na₂HPO₄ bez přidaného imidazolu efektivní pro eluci His-tag ubikvitinu. Fosfát soutěží o vazebné místo na povrchu nanotrubic, s postranním řetězcem histidinového zbytku a proto dochází k eluci proteinu s polyhistidinovou značkou [83].

Zároveň se testovalo, zda by nižší koncentrace fosfátu v promývacím roztoku mohla snížit nespecifickou vazbu (při promývání odstranit slabě navázané proteiny) a nahradit tak imidazol.

Celkem tedy bylo testováno 5 elučních roztoků: eluční roztok 1: 10 mM Na₂HPO₄, eluční roztok 2: 20mM Na₂HPO₄, eluční roztok 3: 50 mM Na₂HPO₄, eluční roztok 4: 100 mM Na₂HPO₄ a eluční roztok 5: 10 mM Bis-Tris-HCl, pH 6,5 + 200 mM Na₂HPO₄ + 100 mM imidazol. Vzorkem pro izolaci polyhistidinem značeného ubikvitinu byla modelová směs proteinů. Získané frakce u izolace byly: původní vzorek, vazebná frakce, promývací frakce a pět elučních frakcí. Tyto frakce byly ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným

obarvením gelů pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledek testování 5 elučních roztoků je uveden na obrázku č. 26.



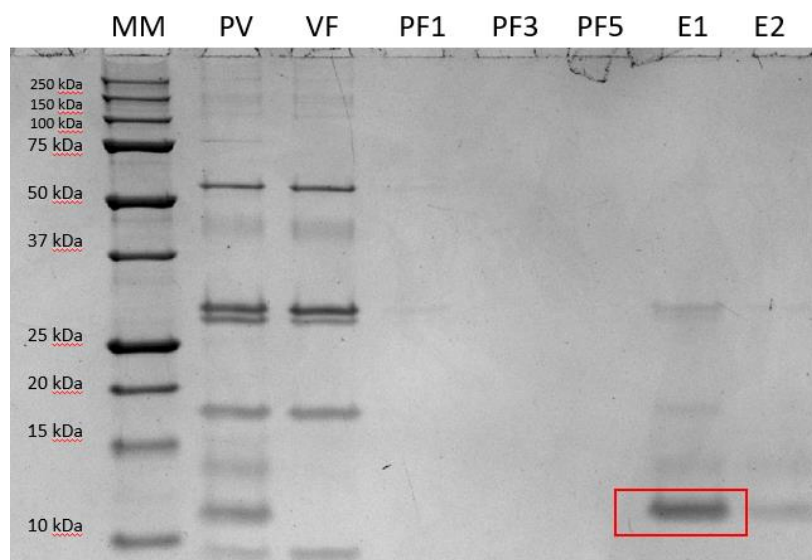
Obrázek 26: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Optimalizace elučního roztoku. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF), eluce elučním roztokem č. 1 (E1), eluce elučním roztokem č. 2 (E2), eluce elučním roztokem č. 3 (E3), eluce elučním roztokem č. 4 (E4) a eluce elučním roztokem č. 5 (E5).

Z výsledků elektroforézy můžeme vidět, že His-tag ubikvitin byl ze směsi vyeluován částečně již třetí elucí elučním roztokem 50 mM Na_2HPO_4 . Pro finální protokol byla vybrána efektivní koncentrace Na_2HPO_4 (100 mM), která efektivně His-tag protein eluuje. Dále se ukázalo, že při použití kombinace imidazolu s fosfátem v elučním roztoku se eluují další kontaminanty, a proto nebyl imidazol v elučním roztoku ve finálním protokolu použit.

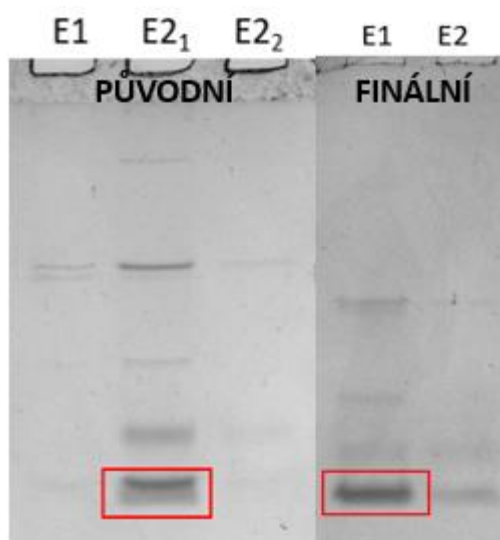
Při nižší koncentraci Na_2HPO_4 nedochází k eluci His-tag proteinu, ale eluují se částečně kontaminující proteiny. Z tohoto důvodu byl ve finálním protokolu imidazol v promývacím roztoku nahrazen nízkou koncentrací Na_2HPO_4 (20 mM), při které ještě nedochází k eluci polyhistidinem značeného proteinu.

4.7. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO₂ nanotrubic, finální protokol

Na základě výsledků z předchozího experimentu byl testován pozměněný promývací roztok, kde byl imidazol nahrazen nízkou koncentrací Na₂HPO₄ (20 mM). Izolace probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 3.8. s těmito roztoky: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 (vazebný pufr), 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM Na₂HPO₄ (promývací roztok) a 100 mM Na₂HPO₄ (eluční roztok). Vzorkem pro izolaci polyhistidinem značeného ubikvitinu byla modelová směs proteinů. Získané frakce u izolace byly: původní vzorek, vazebná frakce, 3 promývací frakce (první, třetí a pátá) a dvě eluční frakce. Tyto frakce byly ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným obarvením gelů pomocí Coomassie briliant blue. Výsledky izolace finálním protokolem pomocí TiO₂ nanotrubic jsou na obrázku č. 27.



Obrázek 27: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO₂ nanotrubic. Výsledky finálního protokolu. Barveno pomocí Coomassie briliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).



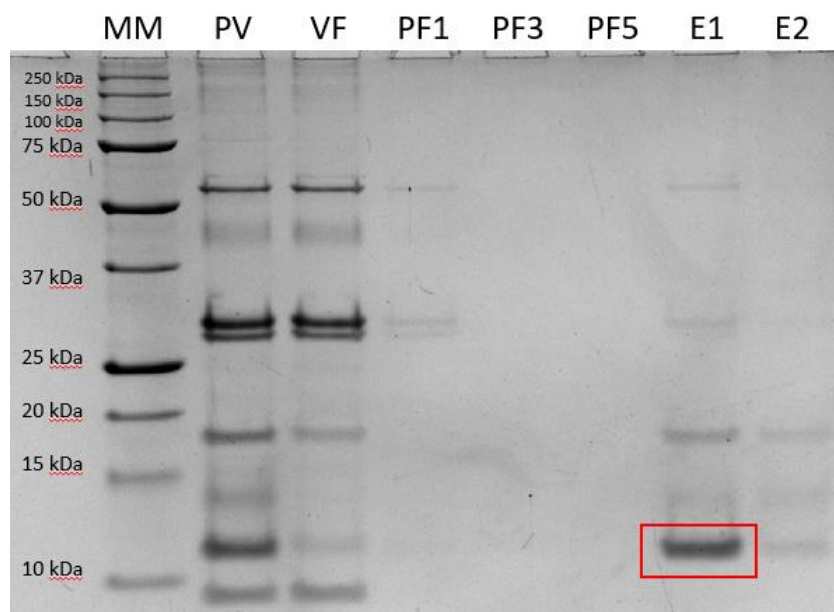
Obrázek 28: Porovnání elučních frakcí původního a finálního protokolu pro izolaci His-tag ubikvitinu pomocí TiO_2 nanotrubic. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Původní protokol: eluce elučním roztokem č.1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 (E2_1 a E2_2). Finální protokol: eluce 1 a eluce 2 (E1 a E2).

Z porovnání elučních frakcí (viz obrázek č. 28) původního a finálního protokolu pro izolaci ubikvitinu s polyhistidinovou kotvou je patrné, že kontaminace ostatními proteiny u finálního protokolu je nižší, stále zde ale kontaminanty přítomny jsou. Kontaminujícími proteiny u finálního protokolu jsou: cytochrom c, myoglobin a β -kasein. Společnou vlastností těchto proteinů je, že přirozeně váží železo [107–109]. Nanotrubic železo obsahují (ve formě Fe_3O_4), a proto se na ně váží s His-tag ubikvitinem i tyto kontaminující proteiny. Bylo dosaženo částečného snížení kontaminace ve finálním protokolu, ale jelikož nebylo očekáváno další zlepšení pouhou modifikací protokolu, přistoupili jsme tedy k dalšímu kroku a tím bylo otestovat tyto finální podmínky ve spojení s močovinou.

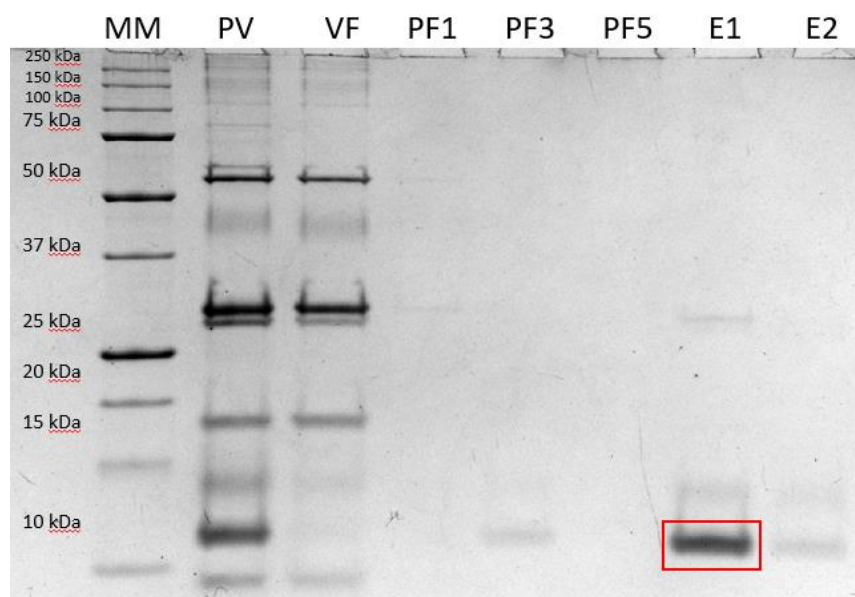
4.8. Izolace His-tag proteinu pomocí TiO_2 nanotrubic, finální protokol za denaturačních podmínek

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit účinnost optimalizovaného protokolu pro izolaci za denaturačních podmínek. Za tímto účelem byla testována standardní koncentrace močoviny využívána k solubilizaci inkluzních tělísek a to 8M. Tato koncentrace byla dále doplněna o poloviční koncentraci a to 4 M, kdy jsme očekávali nižší ovlivnění vlastností nosiče a vyšší selektivitu než v případě 8M močoviny. Snížená koncentrace močoviny by mohla být

dostatečná pro udržení proteinu v roztoku, jak bylo demonstrováno např. na L-asparagináze, která byla připravena ve formě inkluzních tělísek a následně rozpuštěna v roztoku s touto nižší koncentrací močoviny [110]. Izolace probíhala podle postupů uvedených v kapitolách 3.9. a 3.10. Vzorkem pro izolaci polyhistidinem značeného ubikvitinu byla modelová směs proteinů. Získané frakce u izolací byly: původní vzorek, vazebná frakce, 3 promývací frakce (první, třetí a pátá) a dvě eluční frakce. Tyto frakce byly ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE s následným obarvením gelů pomocí Coomassie brilliant blue. Výsledky izolací jsou uvedeny na obrázcích č. 29 a 30.

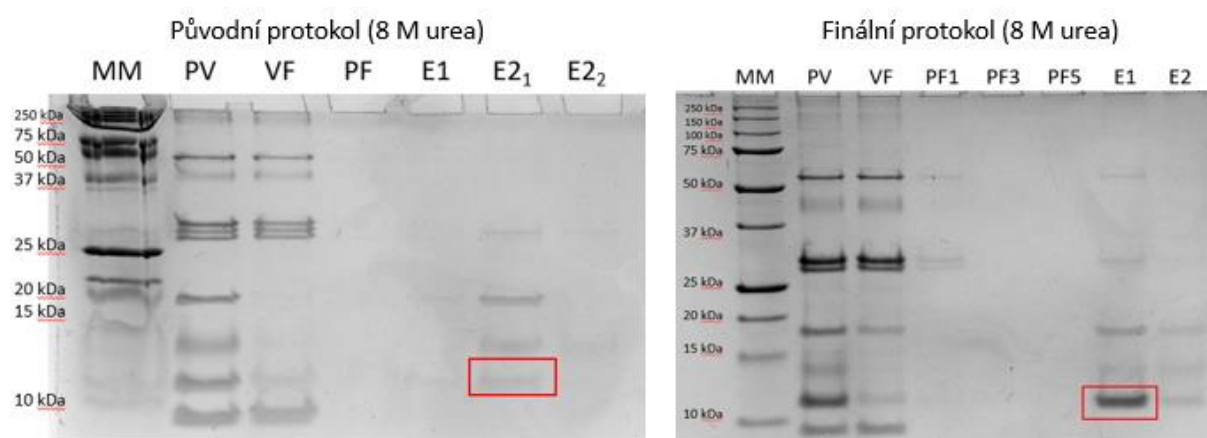


Obrázek 29: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Denaturační podmínky (8 M urea). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).

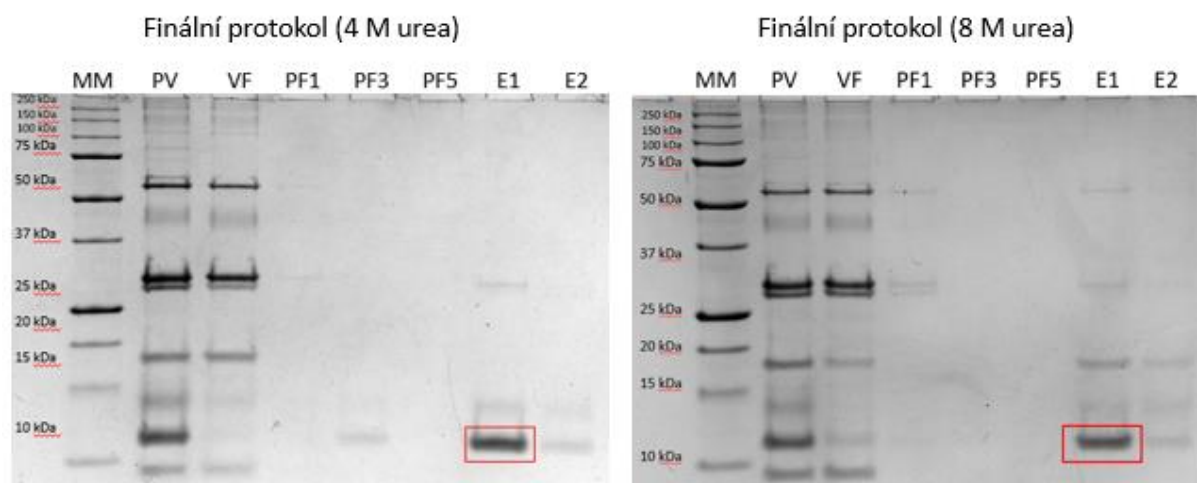


Obrázek 30: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolace His-tag ubikvitinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic. Denaturační podmínky (4 M urea). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).

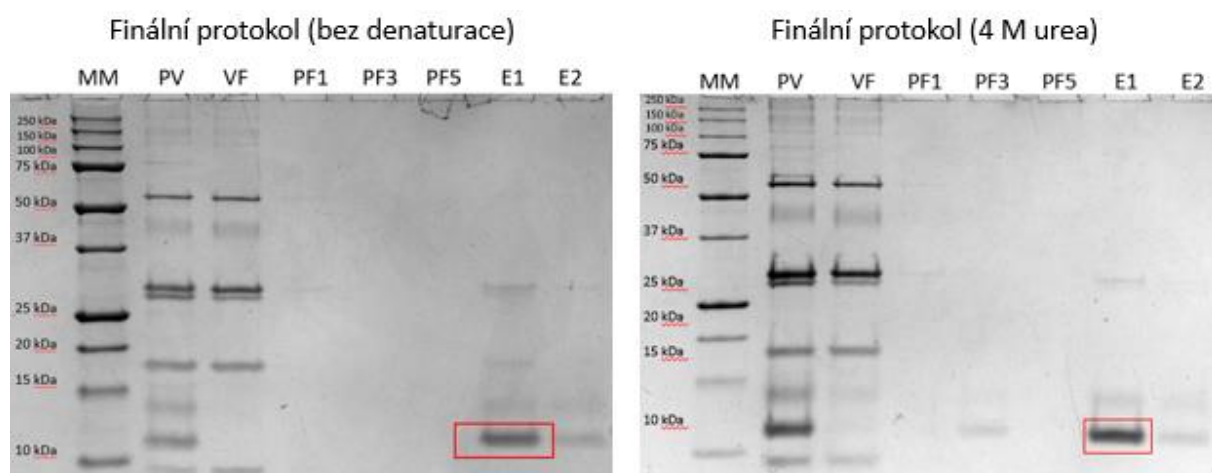
V obou izolacích byl His-tag ubikvitin vyeluován z modelové směsi proteinů převážně první elucí. U 4 M močoviny je kontaminace ostatními proteiny z modelové směsi výrazně nižší než u 8 M. To znamená, že za mírnějších denaturačních podmínek je izolace účinnější.



Obrázek 31: Porovnání původního a finálního protokolu izolace pomocí TiO_2 nanotrubic za denaturačních podmínek (8 M urea). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně označený vyizolovaný His-tag ubikvitin. Původní protokol: molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce (PF) eluce elučním roztokem č.1 (E1), eluce 1 a 2 elučním roztokem č. 2 ($E2_1$ a $E2_2$). Finální protokol: molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).



Obrázek 32: Porovnání izolací za denaturačních podmínek v přítomnosti 4 M močoviny a 8 M močoviny dle finálního protokolu. Červeně označený vyizolovaný His-tag ubiquitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).



Obrázek 33: Porovnání izolací za standardních podmínek a za denaturačních podmínek (v přítomnosti 4 M močoviny) dle finálního protokolu. Červeně označený vyizolovaný His-tag ubiquitin. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebná frakce (VF), promývací frakce 1, 3 a 5 (PF1, PF3 a PF5), eluce 1 a 2 (E1 a E2).

Porovnáním izolací původním a optimalizovaných protokolem za denaturačních podmínek (8 M urea) je možné vidět, že optimalizace protokolu zvýšila množství vyeluovaného His-tag ubiquitinu, ale vliv na snížení kontaminace eluce ostatními proteiny neměla (viz obrázek č. 31). Na obrázku č. 32 můžeme vidět porovnání finálního protokolu za denaturačních podmínek v 2 koncentracích močoviny (4 M a 8 M). Eluční frakce s 4 M močovinou obsahuje mnohem méně kontaminujících proteinů, to znamená, že nosič TiO_2 vykazuje vyšší selektivitu

k His-tag ubikvitinu v přítomnosti nižší koncentrace močoviny. Při porovnání finálního protokolu bez denaturace a finálního protokolu s denaturací v přítomnosti 4 M močoviny (viz obrázek č. 33) vykazují TiO₂ nanotrubičky vyšší selektivitu v přítomnosti 4 M močoviny, kdy byl His-tag ubikvitin efektivněji vyeluován a eluční frakce obsahovala méně kontaminujících proteinů.

Optimalizací protokolu jsme dosáhli nižší kontaminace eluční frakce ostatními proteiny z modelové směsi proteinů. Dále jsme prokázali, že nejvyšší selektivitu TiO₂ nosič vyazuje za denaturačních podmínek v přítomnosti 4 M močoviny, kdy je eluční frakce nejčistší a His-tag ubikvitin zcela vyeluován.

4.9. Zavedení metody pro detekci lipopolysacharidů

Při použití rekombinantních proteinů jako terapeutik je důležité, aby nebyly přítomny kontaminující látky, například lipopolysacharidy. Přítomnost LPS v léčivu může v organismu spustit nežádoucí imunitní odpověď (horečku, septický šok atd.).

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit prvotní hypotézu, že LPS se na TiO₂ nanotrubičky neváží vzhledem k jejich čistě anorganické povaze. Tímto způsobem by pak bylo možné získat čistý terapeutický protein bez kontaminujících LPS. Z tohoto důvodu byl hledán vhodný systém pro detekci LPS.

Pro jejich detekci existuje několik metod, a na základě rešerše (viz kapitola 1.5.3 o kontaminaci rekombinantních proteinů lipopolysacharidy) byl vybrán LAL test jako metoda pro detekci LPS. Konkrétně používanou komerční soupravou byla PierceTM LAL Chromogenic - Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific). Součástí experimentu bylo zjistit, zda je metoda kompatibilní s používanými nosiči (IMAC nosiče a TiO₂ nanotrubičky) a zda je možné LPS přítomné v původním vzorku během izolace odstranit.

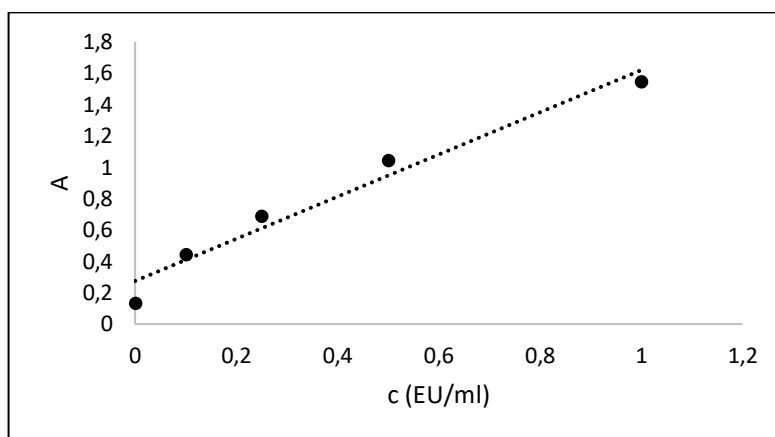
První testování bylo provedeno podle návodu od výrobce (viz kapitola 3.11). Stanovení bylo provedeno duplicitně a ke kalibraci byly přidány vzorky z izolace His-tag ubikvitinu z modelové směsi proteinů pomocí TiO₂ nanotrubic (izolace probíhala podle postupu uvedeného v kapitole 3.8). Testované vzorky z izolace byly: původní vzorek (modelová směs proteinů + endotoxin o koncentraci 0,9 EU/ml), promývací frakce a první eluční frakce.

Koncentrace 0,9 EU/ml byla volena ohledem na rozsah kalibrační řady v její horní polovině, tak aby bylo možné co nejefektivněji pozorovat snížení koncentrace LPS.

Tabulka 6: Absorbance standardů a vzorků při stanovení koncentrace LPS.

	Slepý vzorek	St D (0,1 EU/ml)	St C (0,25 EU/ml)	St B (0,5 EU/ml)	St A (1 EU/ml)	PV	VF	Eluce
Absorbance 1	0,127	0,448	0,705	1,026	1,636	2,497	2,453	2,112
Absorbance 2	0,14	0,443	0,672	1,066	1,456	2,351	2,319	2,143
Průměrná absorbance	0,134	0,446	0,689	1,046	1,546	2,424	2,386	2,128

Graf 1: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu.

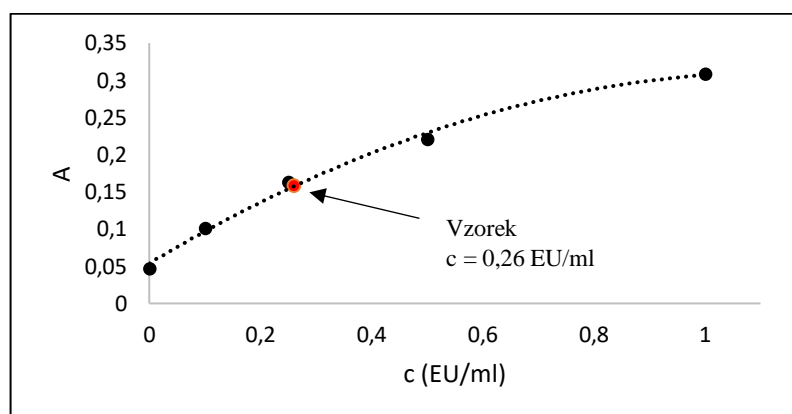


Při stanovení LPS ve vzorcích podle návodu od výrobce byla výsledná absorbance vzorků vysoká a mimo kalibraci. Vysoká byla i absorbance standardů. Signál standardů a vzorků nebyl příliš stabilní, stejný vzorek v duplikátu dával rozdílné výsledky. V laboratoři jsme neměli k dispozici vyhřívanou třepačku pro mikrotitrační destičky, a proto bylo stanovení prováděno ve zkumavkách s použitím blokové třepačky. Z těchto důvodů bylo provedeno další testování pro nalezení vhodných podmínek.

4.10. Stanovení LPS pomocí komerční soupravy s 3x naředěnými reagensii.

V tomto experimentu byla testována kalibrace s přidaným zkušebním vzorkem (voda s endotoxinem o koncentraci 0,3 EU/ml). Testování probíhalo s upravenými podmínkami: reagencie z komerční soupravy (LAL a chromogenní substrát) byly 3x naředěny pomocí vody bez endotoxinů, byl prodloužen čas inkubace u roztoku LAL se vzorkem z 10 na 15 minut a u chromogenního substrátu z 6 na 9 minut a před použitím byly všechny roztoky přehřáté na 37 °C.

Graf 2: Závislost absorpance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Upravené podmínky: 3x naředěné reagencie.



Výsledná koncentrace endotoxinu ve vzorku je 0,26 EU/ml, což je rozdíl proti teoretické koncentraci (0,3 EU/ml) přibližně 13 %. Absorbance standardů jsou při tomto naředění nízké, pro stanovení LPS ve frakcích z izolací je tento rozsah malý, a proto bude třeba upravit naředění roztoků. Komerční souprava je velmi citlivá na teplotu a čas. Přehřátí reagensii a prodloužení inkubačních časů pomohlo k zvýšení stability celého stanovení.

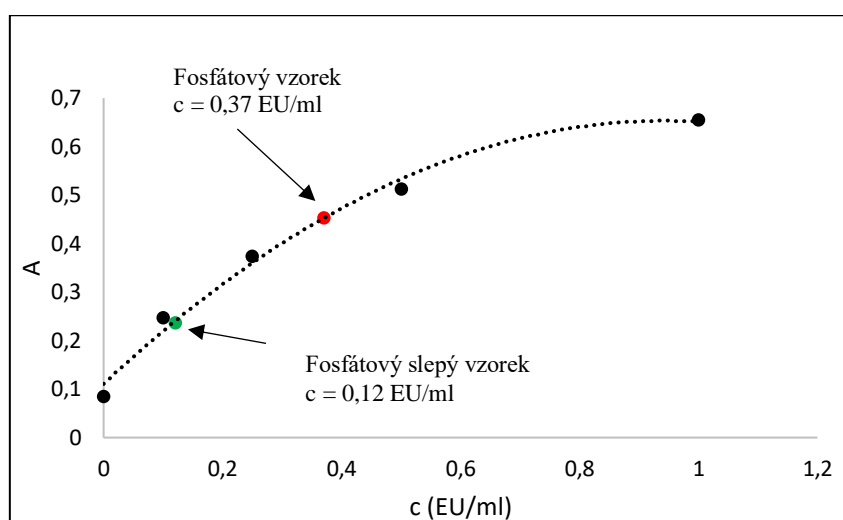
4.11. Stanovení LPS pomocí komerční soupravy s 2x naředěnými reagensii

V testovacím byly provedeny další úpravy. Reagencie z komerční soupravy (LAL a chromogenní substrát) byly naředěny pouze 2x. Další úpravou bylo přidání mezikroku odsolení vzorků před samotným stanovením z důvodu nekompatibility elučního roztoku izolace pomocí TiO₂ nanočástic (eluční roztok: 100 mM Na₂HPO₄) s komerční soupravou.

Diskutovanými metodami bylo použití ultrafiltračních kolonek, dále gelová filtrace a chromatografie s reverzními fázemi. Z důvodu nízkých ztrát byly ultrafiltrační kolonky vybrány jako vhodná metoda odstranění fosfátu.

V tomto experimentu byly stanoveny standardní roztoky a 2 vzorky: fosfátový slepý vzorek (100 mM Na₂HPO₄ + voda) a fosfátový vzorek (100 mM Na₂HPO₄ + endotoxin o koncentraci 0,3 EU/ml). Vzorky byly před stanovením odsoleny pomocí kolonek AMICON (Ultra-0,5 ml, 3 K, Merck Millipore) (stočení 3x 20 minut v centrifuze při 13 400 otáčkách).

Graf 3: Závislost absorpance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Upravené podmínky: 2x naředěné reagensie.



Výsledná koncentrace endotoxinu ve fosfátovém slepém vzorku je 0,12 EU/ml a v fosfátovém vzorku 0,37 EU/ml. Zdá se, že fosfát byl tedy z větší části odstraněn, ale ne zcela. Proto byl proveden další pokus s úpravami. Absorbance standardů při použití 2x naředěných reagensií z komerční soupravy mají dostatečný rozsah pro stanovení frakcí z izolací His-tag ubikvitinu.

4.12. Stanovení LPS pomocí komerční soupravy s úpravami odsolení

Na základě předchozího experimentu byla provedena úprava odsolení vzorků. Použité kolonky byly kolonky AMICON (Ultra-0,5 ml, 3 K, Merck Millipore) stočené 5x 20 minut v centrifuze při 13 400 otáčkách a kolonky AMICON (Ultra-0,5 ml, 10 K, Merck Millipore) stočené 4x 20 minut v centrifuze při 13 400 otáčkách. Byly stanoveny standardy a 4 vzorky:

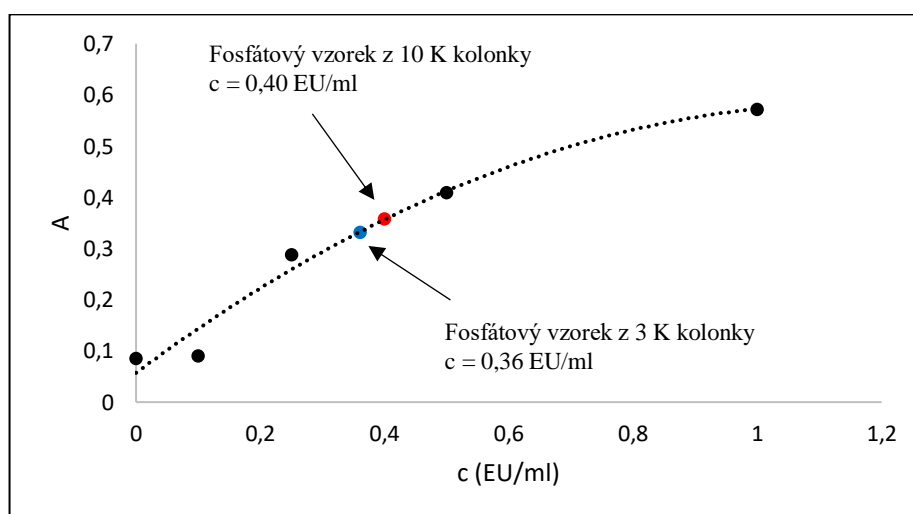
fosfátový slepý vzorek (100 mM Na₂HPO₄ + voda) a fosfátový vzorek (100 mM Na₂HPO₄ + endotoxin o koncentraci 0,5 EU/ml odsolené pomocí obou výše uvedených kolonek. Další úpravou celého protokolu bylo použití vody bez endotoxinů. Nejdříve byla používána voda bez endotoxinů, který byla součástí komerční soupravy. Poté byla otestována ultračistá voda ze stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific), ale ta výrazně zvýšila absorbanci standardů i vzorků (viz tabulka č. 7). Z tohoto důvodu byla pro další testování vhodně vybrána nová voda bez endotoxinů s definovanou koncentrací endotoxinu menší než 0,005 EU/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Výsledky viz tabulka č. 8.

Tabulka 7: Tabulka absorbancí standardů a vzorků s použitím vody ze stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific).

	Slepý vzorek	St D (0,1 EU/ml)	St C (0,25 EU/ml)	St B (0,5 EU/ml)	St A (1 EU/ml)	fosf. slepý vzorek (kolonka: 3 K)	fosf. vzorek c = 0,5 (kolonka a 3 K)	fosf. slepý vzorek (kolonka 10 K)	fosf. vzorek c = 0,5 (kolonka a 10 K)
A 1	0,192	0,273	0,28	0,276	0,399	0,268	0,267	0,262	0,317
A 2	0,281	0,196	0,199	0,271	0,279	0,221	0,209	0,127	0,119
Průměr	0,237	0,235	0,240	0,274	0,339	0,245	0,238	0,195	0,218

Z tohoto důvodu byl tento experiment zopakován s rozdílem, že všechny reagentie byly připraveny z vody bez endotoxinů (Sigma-Aldrich).

Graf 4: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Upravené odsolení.



Tabulka 8: Tabulka výsledných koncentrací LPS po úpravě odsolení.

	fosf. slepý vzorek (kolonky 3 K)	fosf. vzorek c = 0,5 EU/ml (kolonky 3 K)	fosf. slepý vzorek (kolonky 10 K)	fosf. vzorek c = 0,5 EU/ml (kolonky 10 K)
Výsledná c (EU/ml)	0,05	0,36	0,05	0,40

Výsledky ukazují, že koncentrace endotoxinu ve fosfátovém vzorku při použití 10 K kolonek se více blíží teoretické koncentraci. To znamená, že ztráty endotoxinu jsou u 10 K nižší než u 3 K kolonek. Téměř nulové koncentrace u slepých vzorků dokazují, že fosfát byl úspěšně odstraněn a je důležité používat pro přípravu všech roztoků vodu bez endotoxinů, protože ultračistá voda ze stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific) byla kontaminovaná a zvyšovala absorbanci. Na základě těchto výsledků byly veškeré roztoky pro následně testované odstranění LPS připraveny z vody bez endotoxinů. Nejednalo se pouze o roztoky, které slouží pro vlastní analýzu LPS, ale také o vazebný/promývací a eluční roztok, jak pro izolace s použitím TiO₂ nanotrubiček, tak IMAC nosiče. Tím byl minimalizován vliv kontaminované vody na analýzu.

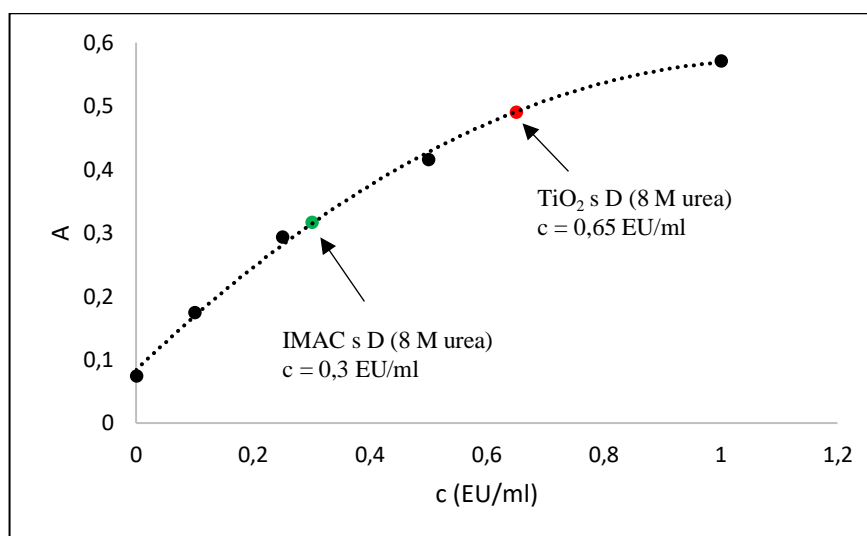
4.13. Stanovení LPS v elucích z izolací His-tag ubikvitinu

Po optimalizaci podmínek byla koncentrace LPS stanovena v elučních frakcích z izolací His-tag ubikvitinu. Cílem této části práce bylo dokázat nebo vyvrátit, že jsme schopni nejen vyzolovat His-tag ubikvitin ze směsi, ale také odstranit nežádoucí LPS. Vzhledem k povaze nosiče jako jsou TiO₂ nanotrubičky, který je vyroben výhradně z anorganických materiálů, jsme předpokládali, že tento nosič bude vhodnější než standardní IMAC nosiče vyrobené z materiálů organických polymerů. Za tímto účelem byl His-tag ubikvitin byl izolován z modelové směsi proteinů pomocí IMAC nosiče (HisPur™ Ni-NTA od firmy Thermo Scientific) za standardních (postup viz kapitola 3.4.) i denaturačních podmínek (8 M močovina, postup viz kapitola 3.5.) a TiO₂ nanotrubic za standardních (postup viz kapitola 3.8.) i denaturačních podmínek (8 M močovina, postup viz kapitola 3.9.). Při všech izolacích obsahoval původní vzorek (modelová směs proteinů) koncentraci endotoxinu 1 EU/ml. Celkem tedy byly stanoveny 4 vzorky (eluční frakce z výše uvedených izolací) a standardy. U všech vzorků bylo provedeno odsolení pomocí kolonek AMICON (Ultra-0,5 ml, 10 K, Merck Millipore) stočených 4x 20 minut v centrifuze při 13 400 otáčkách. Všechny roztoky pro izolace i samotné stanovení byly připraveny z vody bez endotoxinů.

Tabulka 9: Absorbance standardů a vzorků při stanovení koncentrace LPS v elučních frakcích.

	slepý vzorek	St D (0,1 EU/ml)	St C (0,25 EU/ml)	St B (0,5 EU/ml)	St A (1 EU/ml)	IMAC bez D	IMAC s D (8 M urea)	TiO ₂ bez D	TiO ₂ s D (8 M urea)
A 1	0,078	0,172	0,282	0,414	0,59	0,931	0,323	0,777	0,503
A 2	0,071	0,177	0,304	0,418	0,552	0,943	0,31	0,755	0,478
Průměr	0,075	0,175	0,293	0,416	0,571	0,937	0,317	0,766	0,491

Graf 5: Závislost absorbance (vlnová délka 405 nm) na koncentraci standardů endotoxinu. Stanovení elučních frakcí z izolací.



Výsledná koncentrace endotoxinu v eluční frakci z izolace pomocí IMAC nosiče za denaturačních podmínek (8 M urea) je 0,3 EU/ml a v eluční frakci z izolace pomocí TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek (8 M urea) je 0,65 EU/ml. Absorbance izolací bez denaturace byly vyšší než absorbance kalibračních standardů a z tohoto důvodu nebylo v těchto izolacích možné stanovit koncentraci LPS

Na základě předchozího pokusu, kdy eluční frakce z izolací bez denaturace měly vyšší absorbanci než standardní roztoky z komerční soupravy, byly stanoveny znovu 2x naředěné. Dále byla přidána negativní kontrola v podobě eluční frakce z modelové směsi proteinu bez přidaného endotoxinu, ze které byl izolovaný His-tag ubikvitin pomocí TiO₂ nanotrubic za standardních podmínek. Také byla přidána eluční frakce z izolace pomocí TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek (4 M urea, postup viz kapitola 3.10.). Při izolaci obsahoval původní vzorek (modelová směs proteinů) koncentraci endotoxinu 1 EU/ml. Celkem tedy byly stanoveny 4 vzorky (negativní kontrola a 2x naředěné eluční frakce z izolace pomocí IMAC nosiče i TiO₂ nanotrubic bez denaturace a 2x naředěná eluční frakce z izolace pomocí TiO₂ nanotrubic s deanturací – 4 M urea) a standardy. U všech vzorků bylo provedeno odsolení

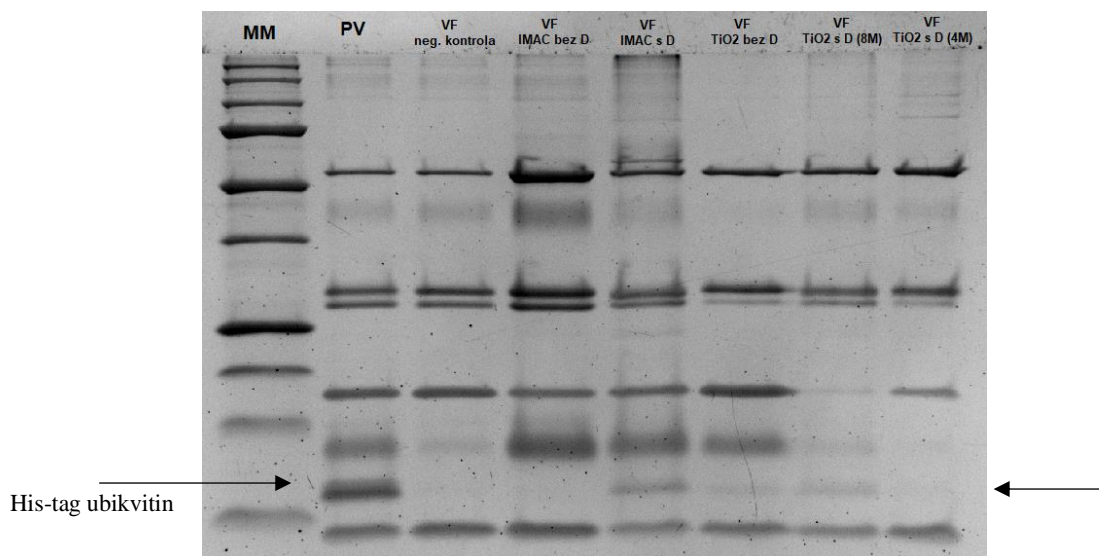
pomocí kolonek AMICON (Ultra-0,5 ml, 10 K, Merck Millipore) stočených 4x 20 minut v centrifuze při 13 400 otáčkách.

Tabulka 10: Tabulka výsledných koncentrací LPS v elučních frakcích z izolací.

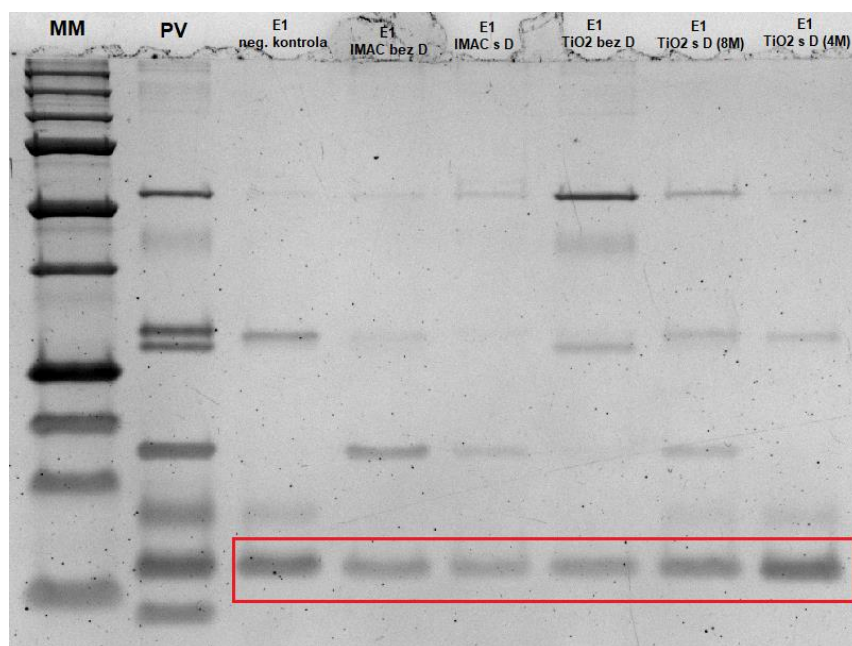
	neg. kontrola	IMAC bez D	TiO₂ bez D	TiO₂ s D (4 M urea)
Výsledná c (EU/ml)	0,85	0,84	1,53	0,80

Výsledky ukazují, že při stanovení LPS v elučních frakcích mají nižší koncentraci izolace za denaturačních podmínek. Výsledná koncentrace endotoxinu u IMAC nosičů bez denaturace je 0,84 EU/ml, zatímco s denaturací 0,3 EU/ml. U TiO₂ nanotrubic je koncentrace endotoxinu za standardních podmínek 1,53 EU/ml a za denaturačních podmínek 0,65 EU/ml s 8 M močovinou a 0,80 EU/ml s 4 M močovinou. Tyto výsledky ukazují, že IMAC nosiče váží LPS méně než TiO₂ nanotrubic. Dále výsledky ukazují, že za denaturačních podmínek se LPS vážou méně než za standardních podmínek. Přidaná negativní kontrola měla výslednou koncentraci endotoxinu 0,85 EU/ml. Při porovnání negativní kontroly s ostatními výsledky je výsledná koncentrace endotoxinu u IMAC nosičů i TiO₂ nanotrubic za denaturačních podmínek téměř nulová. Hypotézu, že TiO₂ nanotrubic za standardních podmínek LPS neváží se nepodařilo dokázat, výsledky ale ukazují, že tato hypotéza je platná za denaturačních podmínek. Zároveň se ale ukázalo, že podobného snížení koncentrace LPS ve vzorku dosahuje i IMAC nosič bez denaturačních podmínek.

Na závěr experimentu byly izolace ověřeny pomocí Tris-tricin SDS-PAGE elektroforézy (postup viz kapitola 3.2).



Obrázek 34: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolací His-tag ubikvitinu z modelových směsí proteinů. Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV), vazebné frakce (VF)



Obrázek 35: Tris-tricin SDS-PAGE analýza (viz kapitola 3.2) pro ověření izolací his-tag ubikvitinu z modelových směsí proteinů. Molekulový marker (MM), původní vzorek (PV) a eluční frakce (E). Barveno pomocí Coomassie brilliant blue (viz kapitola 3.3). Červeně vyizolovaný His-tag ubikvitin.

Z výsledků elektroforézy je vidět, že His-tag ubikvitin byl z modelové směsi proteinů vyizolovaný při všech izolacích. Nejúspěšnější izolace byla pomocí TiO₂ nanotrubic s denaturací v přítomnosti 4 M močoviny. Na obrázku č. 34 je vidět, že His-tag ubikvitin se na TiO₂ nanotrubic navázal ze směsi prakticky úplně (ve vazebné frakci je téměř nedetekovatelný). Obrázek č. 35 dokazuje, že eluční frakce z této izolace obsahuje v porovnání s elučními frakcemi z ostatních izolací nejméně kontaminujících proteinů.

Během experimentální části se povedlo udělat řadu optimalizací. Byl optimalizován protokol izolace pomocí TiO₂ nanotrubic za standardních i denaturačních podmínek. Dále byl optimalizován protokol stanovení LPS, který byl zaveden do laboratoře a úspěšně použit v experimentech. Hypotéza, že TiO₂ nanotrubic jsou v porovnání s IMAC nosičem selektivnějším nosičem pro izolace His-tag proteinu se při izolacích potvrdila především za denaturačních podmínek se 4 M močovinou. Eluční frakce z izolací pomocí TiO₂ nanotrubic jsou čistší (obsahují méně kontaminujících proteinů) a obsahují více vyeluovaného His-tag ubikvitinu. Bohužel ale hypotéza o lepších vlastnostech TiO₂ nanotrubic neplatí zcela v případě stanovení LPS. Při porovnání výše zmíněných nosičů, je účinnější při odstranění LPS IMAC nosič. IMAC nosiče neváží LPS ani za standardních ani za denaturačních podmínek, zatímco TiO₂ nanotrubic LPS neváží pouze za denaturačních podmínek.

5. ZÁVĚR

Hlavní cíl diplomové práce byla optimalizace podmínek izolace His-tag proteinu ze směsi proteinů pomocí TiO_2 nanotrubic modifikovaných Fe_3O_4 nanočásticemi.

Nejdříve byla provedena izolace pomocí standardního IMAC nosiče: HisPur Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific). Účinnost tohoto nosiče byla testována za standardních i denaturačních podmínek (s 8 M močovinou).

Dalším krokem byla optimalizace izolace pomocí TiO_2 nanotrubic. Nejdříve byl otestován standardní protokol a poté byl postupně optimalizován. Byl upraven promývací i eluční roztok. Po optimalizaci se zdálo být nejlepší kombinace těchto roztoků: 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 (vazebný), 50 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 + 20 mM Na_2HPO_4 (promývací) a 100 mM Na_2HPO_4 (eluční), která byla použita v závěrečném protokolu. Optimalizovaný protokol byl poté otestován i za denaturačních podmínek. Byly testovány dvě koncentrace močoviny: 4 M a 8 M. Účinnější izolace byla v přítomnosti nižší koncentrace močoviny (4 M), kdy eluční frakce obsahovala méně kontaminujících proteinů a His-tag ubikvitin byl zcela vymyt.

Druhým cílem bylo zavedení metody detekce lipopolysacharidů do laboratoře a ověření, zda je možné pomocí výše uvedených nosičů LPS odstranit a za jakých podmínek. Byl použit komerčně dodávaný LAL test. Stanovili jsme koncentraci LPS v elučních frakcích z izolací pomocí IMAC nosičů i TiO_2 nanotrubic za standardních i denaturačních podmínek. Ukázalo se, že TiO_2 nanotrubic LPS při denuraci neváží, zatímco za nedenaturovaných podmínek ano. IMAC nosiče při standardních ani při denaturačních podmínkách LPS neváží. Porovnáním nosičů jsou při izolaci pomocí IMAC nosiče LPS odstraněny lépe než pomocí TiO_2 nanotrubic. TiO_2 nanotrubic LPS odstraňují pouze za denaturačních podmínek.

Dle výše uvedených výsledků můžeme říci, že se nám podařilo najít optimální podmínky pro izolaci His-tag proteinu pomocí TiO_2 nanotrubic. Dále byla zavedena metoda detekce LPS a tato metoda byla úspěšně použita při experimentu. Nejúspěšnější izolací se zdá být použití TiO_2 nanotrubic za denaturačních podmínek s 4 M močovinou, kdy LPS nejsou vázány (zatímco u standardních podmínek se LPS na TiO_2 nanotrubic váží) a eluční frakce jsou nejčistší (obsahují nejmenší množství kontaminujících proteinů). Tento způsob izolace je vhodné použít u rekombinantních proteinů, které vyžadují denuraci.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Ratanji, K. D., Derrick, J. P, Dearman, R. J. a Kimber, I.: Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *Journal of Immunotoxicology* [online]. 2014, 11(2), 99–109.
- [2] Johnson, D. E. Biotherapeutics: Challenges and Opportunities for Predictive Toxicology of Monoclonal Antibodies. *International journal of molecular sciences* [online]. 2018, 19(11), 3685.
- [3] Andersen, K. R., Leksa, N. C. a Schwartz, T. U.: Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. 2013, 81(11), 1857–1861.
- [4] Chen, Y., Li, Y., Liu, P., Sun, Q. a Liu, Z.: Optimized expression in *Pichia pastoris* eliminates common protein contaminants from subsequent His-tag purification. *Biotechnology Letters* [online]. 2014, 36(4), 711–718.
- [5] Owczarek, B, Gerszberg, A. a Hnatuszko-Konka, K.: A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *BioMed Research International* [online]. 2019, 2019, 13.
- [6] Uhoraningoga, A., Kinsella, G., Henahan, G. a Ryan B.: The Goldilocks Approach: A Review of Employing Design of Experiments in Prokaryotic Recombinant Protein Production. *Bioengineering* [online]. 2018, 5(4), 89.
- [7] Rosano, G. L., a Ceccarelli, E. A.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, 5, 172.
- [8] Ferrer-Mirallés, N., Saccardo, P., Corcheo, J. L, Xu, Z., a García-Fruitós, E.: General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. *Insoluble Proteins: Methods and Protocols* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 1–24.
- [9] Rosano, G. L., Morales E. S. a Ceccarelli, E.A.: New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science* [online]. 2019, 28(8), 1412–1422.
- [10] Overton, T. W.: Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today* [online]. 2014, 19(5), 590–601.
- [11] Gopal, G. J. a Kumar A.: Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal* [online]. 2013, 32(6), 419–425.
- [12] Sahdev, S., Khattar, S. K. a Saini, K. S.: Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2008, 307(1–2), 249–64.
- [13] Ferrer-Mirallés, N. a Villaverde, A.: Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microbial Cell Factories* [online]. 2013, 12, 113.

- [14] Steidler, L., Hans, W., Schotte L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. a Remaut, E.: Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10. *Science* [online]. 2000, **289**(5483), 1352–1355.
- [15] Tilburg, A. Y., Cao, H. van, Meulen, S. B. van der, Solopova, A. a Kuipers O. P.: Metabolic engineering and synthetic biology employing *Lactococcus lactis* and *Bacillus subtilis* cell factories. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2019, **59**, 1–7.
- [16] Fu, L. L., Xu, Z. R., Li, W. F., Shuai, J. B., Lu, P. a Hu, Ch. X.: Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances* [online]. 2007, **25**(1), 1–12.
- [17] De Groot, N. S., Espargaró, A., Morell, M. a Ventura, S.: Studies on bacterial inclusion bodies. *Future Microbiology* [online]. 2008, **3**(4), 423–35.
- [18] García-Fruitós, E., Vázquez, E., Díez-Gil, C., Corchero, J. L., Seras-Franzoso, J., Ratera, I., Veciana, J. a Villaverde, A.: Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(2), 65–70.
- [19] Villaverde, A. a Mar Carrió, M.: Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* [online]. 2003, **25**(17), 1385–95.
- [20] Çelik, E. a Çalik, P.: Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(5), 1108–1118.
- [21] Vieira Gomes, A. M., Carmo, T. S., Carvalho, L. S., Bahia, F. M. a Parachin, N. S.: Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganism* [online]. 2018, **6**(2).
- [22] Kim, H., Yoo, S. J. a Kang, H. A.: Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *Fems Yeast Research* [online]. 2015, **15**(1).
- [23] Theron, Ch. W., Berrios, J., Delvigne, F. a Fickers, P.: Integrating metabolic modeling and population heterogeneity analysis into optimizing recombinant protein production by *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **102**(1), 63–80.
- [24] Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* [online]. 2004, **22**(11), 1393–1398.
- [25] Asaoka, Y., Tanaka, T., Tsumoto, K., Tomita, M. a Ide, T.: Efficient expression of recombinant soluble human FcγRI in mammalian cells and its characterization. *Protein Expression and Purification* [online]. 2012, **82**(1), 155–161.
- [26] Agasid, M. T., Wang, X., Huang, Y., Janczak, C. M., Bränström, R., Saavedra, S. S. a Aspinwall, C. A.: Expression, purification, and electrophysiological characterization of a recombinant, fluorescent Kir6.2 in mammalian cells. *Protein Expression and Purification* [online]. 2018, **146**, 61–68.

- [27] Huang, H., Luo, Y., Baradei, H., Liu, S., Haenssen, K. K., Sanglikar, S., Kumar, S. a Cini, J.: A novel strategy to produce high level and high purity of bioactive IL15 fusion proteins from mammalian cells. *Protein Expression and Purification* [online]. 2018, **148**, 30–39.
- [28] Contreras-Gomez, A., Sanchez-Miron, A., Garcia-Camacho, F., Molina-Grima, E. a Chisti, Y.: Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology progress* [online]. 2014, **30**(1), 1–18.
- [29] Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M. a Avesani, L.: *A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems.* [online]. 23. březen 2015.
- [30] Gerasimova, S. V., Smirnova, O. G., Kochetov, A., V. a Shumnyi, V. K.: Production of recombinant proteins in plant cells. *Russian Journal of Plant Physiology* [online]. 2016, **63**(1), 26–37.
- [31] Chen, Q.: Expression and Purification of Pharmaceutical Proteins in Plants. *Biological Engineering* [online]. 2008, **1**(4), 291–321.
- [32] Qiang, Ch. a Huafang, L.: Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production [online]. nedatováno. Dostupné z: doi:10.1155/2015/932161
- [33] Einhauer, A. a Jungbauer, A.: The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2001, **49**(1), 455–465.
- [34] Esposito, D. a Chatterjee, D. K.: Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Protein technologies* [online]. 2006, **17**(4), 353–358.
- [35] Kosobokova, E. N., Skrypnik, K. A. a Kosorukov, V. S.: Overview of fusion tags for recombinant proteins. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2016, **81**(3), 187–200.
- [36] Terpe, K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, **60**(5), 523–533.
- [37] Young, C. L., Britton, Z. T. a Robinson, A. S.: Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal* [online]. 2012, **7**(5, SI), 620–634.
- [38] Zhao, X., Li, G. a Liang, S.: Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2013. Dostupné z: doi:10.1155/2013/581093
- [39] Magdeldin, S. a Moser, A.: Affinity Chromatography: Principles and Applications. In: [online]. 2012. Dostupné z: doi:10.5772/39087
- [40] Nonaka, H., Fujishima, S., Uchinomiya, S., Ojida, A. a Hamachi, I.: FLAG-tag selective covalent protein labeling via a binding-induced acyl-transfer reaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2009, **19**(23), 6696–6699.

- [41] Hirabayashi, J. a Kasai, K.: Arginine-tail method, an affinity tag procedure utilizing anhydrotrypsin agarose. *9th International Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognition* [online]. 1992, **597**(1), 181–187.
- [42] Bornhorst, J. A. a Falke, J. J.: [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*. 2000, **326**, 245–254.
- [43] Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. a Pedersen, J.: Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* [online]. 2006, **48**(1), 1–13.
- [44] Wood, D. W.: New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2014, **26**, 54–61.
- [45] Saraswat, M., Musante, L., Ravidá, A., Shortt, B., Byrne, B. a Holthoffer, H.: Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1–18.
- [46] Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. a Guillaume, D.: Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Review 2015* [online]. 2015, **113**, 43–55.
- [47] Queiroz, J. A., Tomaz, C. T. a Cabral, J.M.S.: Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, **87**(2), 143–159.
- [48] Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. a Guillaume, D.: Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *JPBA Reviews 2014* [online]. 2014, **101**, 161–173.
- [49] Hage, D. S.: Liquid Chromatography, Affinity Chromatography. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-409547-2.
- [50] Narayanan, S. R.: Preparative affinity chromatography of proteins. *Preparative Chromatography Including 10th International Symposium on Preparative Chromatography* [online]. 1994, **658**(2), 237–258.
- [51] Turková, J.: Chapter 4.7. Bioaffinity chromatography. In: Z. DEYL, ed. *New Comprehensive Biochemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 1984, s. 321–361. ISBN 0167-7306.
- [52] Hage, D. S. a Matsuda, R.. Affinity chromatography: a historical perspective. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2015, **1286**, 1–19.
- [53] Hermanson, G.: Immobilization of Ligands on Chromatography Supports. In: *Bioconjugate Techniques* [online]. 2013, s. 589–740.
- [54] Loughran, S. T., Bree, R. T. a Walls, D.: Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2017, **1485**, 275–303.
- [55] Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H. a Maertens, B.: Chapter One - Purification of His-Tagged Proteins. In: Lorsch, J. R., ed. *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, 2015, s. 1–15. ISBN 0076-6879.

- [56] Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stiiber, D. a Henco, K.: 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. In: *Protocols for Gene Analysis* [online]. B.m.: Springer, 1994 [vid. 2014-11-18], s. 371–387.
- [57] Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. a Schäfer, F.: Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, 2009 [vid. 2014-12-09], s. 439–473. ISBN 978-0-12-374536-1.
- [58] Kuo, W. K. a Chase, H. A.: Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnology Letters* [online]. 2011, **33**(6), 1075–84.
- [59] Singh, S. K., Kulkarni, P. P. a Dash, D.: Biomedical Applications of Nanomaterials: An Overview. In: *Bio-Nanotechnology* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2013, s. 1–32.
- [60] De, M., Ghosh, P. S. a Rotello, V. M.: Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials* [online]. 2008, **20**(22), 4225–4241.
- [61] Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. a Danquah, M. K.: Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology* [online]. 2018, **9**, 1050–1074.
- [62] Chusuei, Ch. C., Wu, Ch., Mallavarapu, S., Hou, F. Y. S., Hsu, Ch., Winiarz, J. G., Aronstam, R. S. a Huang, Y.: Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2013, **206**(2), 319–326.
- [63] Luo, G., Du, L., Wang, Y. a Wang, K.: Composite Nanoparticles. In: [online]. 2015, s. 453–460.
- [64] Lee, J., Lee, S. Y., Park, S. H., Lee, H. S., Lee, J. H., Jeong, B., Park, S. a Chang, J. H.: High throughput detection and selective enrichment of histidine-tagged enzymes with Ni-doped magnetic mesoporous silica. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2013, **1**(5), 610.
- [65] Wu, K., Su, D., Liu, J., Saha, R. a Wang, J.: Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology* [online]. 2019, **30**(50), 502003.
- [66] Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M. F., Gutiérrez, L., Morales, M. P., Böhm, I. B., Heverhagen, J. T., Prospero, D. a Parak, W. J.: Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* [online]. 2012, **41**(11), 4306–4334.
- [67] Avval, Z. M., Malekpour, L., Raeisi, F., Babapoor, A., Mousavi, S. M., Hashemi, S. A. a Salari, M.: Introduction of magnetic and supermagnetic nanoparticles in new approach of targeting drug delivery and cancer therapy application. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2019, 1–28.
- [68] Fu, Ch. a Ravindra, N.: Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and applications. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* [online]. 2012, **1**, 229–244.

- [69] Fields, C., Li, P., O'Mahony, J. J. a Lee, G. U.: Advances in affinity ligand-functionalized nanomaterials for biomagnetic separation. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2016, **113**(1), 11–25.
- [70] Ling, W., Wang, M., Xiong, Cj., Xie, D., Chen, Q., Chu, X., Qiu, X., Li, Y. a Xiao, X.: Synthesis, surface modification, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Materials Research* [online]. 2019, **34**(11), 1828–1844.
- [71] Xu, Ch., Akakuru, O. U., Zheng J. a Wu, A.: Applications of Iron Oxide-Based Magnetic Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2019, **7**.
- [72] Tong, S., Zhu, H. a Bao, G.: Magnetic iron oxide nanoparticles for disease detection and therapy. *Materials Today* [online]. 2019, **31**, 86–99.
- [73] Bitar, A., Ahmad, N. M., Fessi, H. a Elaissari, A.: Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2012, **17**(19), 1147–1154.
- [74] Reijnders, L.: The release of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles from nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2009, **94**(5), 873–876.
- [75] Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B.J., Oh, E., Stewart, M. H. a Medintz, I.L.: Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews* [online]. 2013, **113**(3), 1904–2074.
- [76] Çesmeli, S. a Biray Avci, C.: Application of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in cancer therapies. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2019, **27**(7), 762–766.
- [77] Gupta, S. M. a Tripathi, M.: A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin* [online]. 2011, **56**(16), 1639.
- [78] Fang, W., Chen, X. a Zheng, N.: Superparamagnetic core-shell polymer particles for efficient purification of his-tagged proteins. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2010, **20**(39), 8624–8630.
- [79] Sahu, S. K., Chakrabarty, A., Bhattacharya, D., Ghosh, S. K. a Pramanik, P.: Single step surface modification of highly stable magnetic nanoparticles for purification of His-tag proteins. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011, **13**(6), 2475–2484.
- [80] Ni, Q., Chen, B., Dong, S., Tian, L. a Bai, Q.: Preparation of core-shell structure Fe₃O₄@SiO₂ superparamagnetic microspheres immobilized with iminodiacetic acid as immobilized metal ion affinity adsorbents for His-tag protein purification. *Biomedical Chromatography* [online]. 2016, **30**(4), 566–573.
- [81] Lee, I. S., Lee, N., Park, J., Kim, B. H., Yi, Y., Kim, T., Kim, T. K., Lee, I. H., Paik, S. R. a Hyeon, T.: Ni/NiO Core/Shell Nanoparticles for Selective Binding and Magnetic Separation of Histidine-Tagged Proteins. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(33), 10658–10659.

- [82] Yang, J., Ni, K., Wei, D. a REN, Y.: One-step purification and immobilization of his-tagged protein via Ni²⁺-functionalized Fe₃O₄@polydopamine magnetic nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2015, **20**(5), 901–907.
- [83] Kupcik, R., Rehulka, P., Bilkova, Z., Sopha, H. a Macak, J. M.: New Interface for Purification of Proteins: One-Dimensional TiO₂ Nanotubes Decorated by Fe₃O₄ Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2017, **9**(34), 28233–28242.
- [84] Mirahmadi-Zare, S. Z., Allafchian, A., Aboutalebi, F., Shojaei, P., Khazaie, Y., Dormiani, K., Lachinani, L. a Nasr-Esfahani, M.: Supermagnetic nanoparticles NiFe₂O₄, coated with aluminum–nickel oxide sol-gel lattices to safe, sensitive and selective purification of his-tagged proteins. *Protein Expression and Purification* [online]. 2016, **121**, 52–60.
- [85] Wan, M., Wang, Y., Rabideau, S., Moreadith, R., Schrimsher, J. a Conn, G.: An enzyme-linked immunosorbent assay for host cell protein contaminants in recombinant PEGylated staphylokinase mutant SY161. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, **28**(5), 953–963.
- [86] Eaton, L. C.: Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceuticals. *Analytical Biotechnology* [online]. 1995, **705**(1), 105–114.
- [87] Johnson, B. H. a Hecht, M. H.: Recombinant Proteins Can Be Isolated from *E. coli* Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. *Bio/Technology* [online]. 1994, **12**(12), 1357–1360.
- [88] Leser, E.W. a Asenjo, J. A.: Rational design of purification processes for recombinant proteins. *Bio-chromatography and Molecular Biology* [online]. 1992, **584**(1), 43–57.
- [89] Briggs, J. a Panfili, P. R.: Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals. *Analytical Chemistry* [online]. 1991, **63**(9), 850–859.
- [90] Gregory, C. A, Rigg, G. P., Illide, Ch. M. a Matthews, R. C.: Quantification of *Escherichia coli* Genomic DNA Contamination in Recombinant Protein Preparations by Polymerase Chain Reaction and Affinity-Based Collection. *Analytical Biochemistry* [online]. 2001, **296**(1), 114–121.
- [91] Gooding, R. P. a Bristow, A. F.: Detection of host-derived contaminants in products of recombinant DNA technology in *E. coli*: a comparison of silver-staining and immunoblotting. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 1985, **37**(11), 781–786.
- [92] Wakelin, S. J., Sabroe, I., Gregory, Ch. D., Poxton, I. R., Forsythe, J. L. R., Garden, O. J. a Howie, S. E. M.: “Dirty little secrets”—Endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunology Letters* [online]. 2006, **106**(1), 1–7.
- [93] Mack, L., Brill, B., Delis, N. a Groner, B.: Endotoxin depletion of recombinant protein preparations through their preferential binding to histidine tags. *Analytical Biochemistry* [online]. 2014, **466**, 83–88.
- [94] Su, W. a Ding, X.: Methods of Endotoxin Detection. *Journal of laboratory automation* [online]. 2015, **20**.

- [95] Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. a Poxton, I. R.: Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* [online]. 2002, **4**(8), 837–851.
- [96] Stromberg, L. R., Mendez, H. M. a Mukundan, H.: Detection Methods for Lipopolysaccharides: Past and Present. In: *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications* [online]. 2017 [vid. 2020-02-04].
- [97] Park, Ch., Jung, S., Bak, J., Lee, S. a Rhee, D.: Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals* [online]. 2005, **33**(3), 145–151.
- [98] Vipond, C., Findlay, L., Feavers, I. a Care, R.: Limitations of the Rabbit Pyrogen Test for Assessing Meningococcal OMV Based Vaccines. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation* [online]. 2016, **33**(1), 47–53.
- [99] Jackie, J., Lau, W. K., Feng, H. a Li, S. F. Y.: Detection of Endotoxins: From Inferring the Responses of Biological Hosts to the Direct Chemical Analysis of Lipopolysaccharides. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **49**(2), 126–137.
- [100] Dullah, E. C. a Ongkudon, C. M.: Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin–protein interactions. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2017, **37**(2), 251–261.
- [101] Uchida, T., Kaku, Y., Hayasaka, H., Kofuji, M., Momose, N., Miyazawa, H., Ueda, Y., Ito, K., Ookawara, S. a Morishita, Y.: Utility Of An Automatic Limulus Amebocyte Lysate Kinetic Turbidimetric Test For Endotoxin Screening Of Dialysate Samples. *Medical Devices-Evidence and Research* [online]. 2019, **12**, 429–433.
- [102] Ostronoff, C. S. a Lourenco, F. R.: Measurement Uncertainty of Chromogenic LAL Assays: Reaction Time and Proportion of Endotoxin and LAL Reagent Affect Release of p-Nitroaniline. *Journal of AOAC International* [online]. 2015, **98**(1), 51–55.
- [103] Gaffin, S. L., Badsha, N., Brock-Utne, J. G., Vorster, B. J. a Conradie, J. D.: An ELISA Procedure for Detecting Human Anti-Endotoxin Antibodies in Serum. *Annals of Clinical Biochemistry* [online]. 1982, **19**(3), 191–194.
- [104] Silva, C. C. da, Presgrave, O. A. F, Hartung, T., Moraes, A. M. L. de a Delgado, I. F.: Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicology in Vitro* [online]. 2016, **32**, 70–75.
- [105] De Agostini Utescher, C. L., Buosi, K. L., Botosso, V. F. a Quintilio, W.: Monocyte Activation Test (MAT) as a possibility of replacement for the rabbit pyrogen test in hyperimmune sera. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, **54**(2).
- [106] Das, A.P., Kumar, P. S. a Swain, S.: Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2014, **51**, 62–75.
- [107] Baomy, J., Brule, J. a G.: Effect of pH and ionic strength on the binding of bivalent cations to β -casein. *Lait* [online]. 1988, **68**(4), 409–417.

- [108] Tuppy, H. a Kreil, G.: Cytochrome c. In: William J. Lennarz a M. Daniel Lane, ed. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* [online]. Waltham: Academic Press, 2013, s. 599–601. ISBN 978-0-12-378631-9.
- [109] Wilson, M.T. a Reeder, B. J.: Myoglobin. In: Geoffrey J. Laurent a Steven D. Shapiro, ed. *Encyclopedia of Respiratory Medicine* [online]. Oxford: Academic Press, 2006, s. 73–76. ISBN 978-0-12-370879-3.
- [110] Upadhyay, A. K., Singh, A., Mukherjee, K. J. a Panda, A. K.: Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, **5**, 486.