

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233218492

2008

Zuzana Koubková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE

**Využití chromatografických metod při purifikaci
NADPH-dependentní fenolhydroxylasy kvasinky
*Candida tropicalis***

Zuzana Koubková

Bakalářská práce

2008

Školitel:

Ing. Jan Páca, Ph.D

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy

Praha 2008

**Využití chromatografických metod při purifikaci NADPH-dependentní
fenolhydroxylasy kvasinky *Candida tropicalis***

Vypracovala: Zuzana Koubková

Školitel: Ing. Jan Páca, Ph.D

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Ing. Jana Pácy, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze 25.4.2008



.....

Podpis

1. ÚVOD.....	7
1.1. XENOBIOTIKA A ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ.....	7
1.2. METABOLISMUS XENOBIOTIK.....	8
1.2.1. Penetrace xenobiotika do organismu.....	8
1.2.2. Biotransformace xenobiotik v živém organismu.....	8
1.3. FENOLICKÉ LÁTKY, JEJICH VYUŽITÍ A TOXICITA.....	10
1.3.1. Charakterizace a využití fenolických látek.....	10
1.3.2. Toxicita fenolu vůči lidskému organismu.....	12
1.4. CHAREKTERISTIKA UŽITÉHO MIKROORGANISMU – KVASINKY	
<i>CANDIDA TROPICALIS</i>	12
1.4.1. Charakteristika kvasinek rodu <i>Candida</i>	12
1.4.2. Vlastnosti kvasinky <i>C. tropicalis</i>	13
1.4.3. Využití kvasinky <i>Candida tropicalis</i> pro biodegradaci fenolu.....	14
1.4.4. NADPH-dependentní fenolhydroxylasa.....	15
2. CÍL PŘEDKLÁDANÉ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	16
3. MATERIÁL A METODY.....	17
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE.....	17
3.1.1. Použité chemikálie.....	17
3.1.2. Použité přístroje.....	18
3.2. IZOLACE CYTOSOLÁRNÍ FRAKCE.....	20
3.2.1. Desintegrace a homogenizace.....	20
3.2.2. Frakční centrifugace.....	20
3.2.3. Lyofilizace.....	21
3.3. ANALYTICKÉ METODY.....	21
3.3.1 Stanovení koncentrace bílkovin Lowryho metodou.....	21
3.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	22
3.3.3. Stanovení fenolhydroxylasové aktivity.....	22
3.3.4. Elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS).....	23
3.4. METODY POUŽITÉ PRO PURIFIKACI ENZYMŮ.....	24
3.4.1. Chromatografie na iontoměničích.....	24
3.4.2. Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy.....	25
3.4.3. Gelová permeační chromatografie.....	26

3.4.4. Materiály používané pro gelovou permeační chromatografii.....	28
3.4.4.1. <i>Chromatografie na sloupci Sepharosy 4B</i>	29
3.4.4.2. <i>Chromatografie na sloupci Sephadexu G-75</i>	30
3.4.4.3. <i>Chromatografie na sloupci Sephadexu G-100</i>	30
3.4.4.4. <i>Chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300</i>	31
3.4.5. Chromatografie s hydrofobní interakcí.....	31
3.4.6. Afinity chromatografie.....	32
4. VÝSLEDKY	
4.1. PURIFIKAČNÍ KROKY PŘI IZOLACI	
NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY.....	34
4.1.1. IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	34
4.1.1.1 <i>Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy</i>	34
4.1.2. GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE.....	34
4.2.1. <i>Chromatografie na sloupci Sepharosy 4B</i>	35
4.2.2 <i>Chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300</i>	36
4.2.3. <i>Chromatografie na sloupci Sephadexu G-100</i>	37
4.2.4. <i>Chromatografie na sloupci Sephadexu G-75</i>	39
4.1.3. CHROMATOGRRAFIE S HYDROFOBNI INTERAKCÍ.....	42
4.1.4. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE.....	42
5. DISKUZE.....	43
6. ZÁVĚR.....	46
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	47
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	48

1. ÚVOD

1.1. XENOBIOTIKA A ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

V důsledku rozvoje civilizace, především průmyslu a dopravy rychle a neustále přibývá v biosféře nežádoucích a pro organismy cizorodých látek (tzv. xenobiotik), které jsou rozptýleny v atmosféře a ovlivňují ekosystémy tím, že se rozpouštějí ve vodách a jsou obsaženy v půdě. Nejde však jen o odpadní látky průmyslových výroby, ale i jednotlivé výrobky se s časem přeměňují na odpad. Navíc sama společnost produkuje škodlivé odpady jako odpadní vody apod. [1]

Lidská populace je ve vzrůstající míře vystavována nejrůznějším cizorodým chemikáliím (xenobiotikům), ať už jsou to léky, potravinářské chemikálie, nebo jiné látky znečišťující životní prostředí. [2] Všeobecně se jedná o látky, které jsou organismům cizí a se kterými se v průběhu evoluce nesetkaly.

Znečištění chemickými látkami můžeme podle původu rozdělit do tří hlavních skupin:

- **Přírodní látky**, mezi které patří hlavně oxidy dusíku, nitráty, nitridy, těžké kovy, azbest, uhlovodíky a jejich deriváty (tedy mimo jiné i fenoly).
- **Transformované a nakoncentrované látky**, jako spalné produkty SO₂ a CO, také HF, HCl, těžké kovy, petrochemikálie, radionuklidy, zemědělské, komunální a průmyslové splašky.
- **Uměle vyrobené látky**, především hnojiva, pesticidy a povrchově aktivní látky a syntetické polymery.

Z plynných polutantů jsou nejškodlivější SO₂, NO a CO. Vedle pohonných hmot jsou zdrojem znečištění také usazeniny z odpadních kanálů, důlní kaly a pesticidy, především ty obsahující Cu, Zn, Cd, As a hlavně Hg. V poslední době jsou velkým nebezpečím také polychlorované bifenyly, hojně používané při výrobě nerozpustných materiálů, adhesiv a plastů, které způsobují rozrušení imunitního systému, proto hovoříme o tzv. „chemickém AIDS“. [1]

Řetězec znečištění pokračuje přechodem výše uvedených toxických látek do vodních toků. K nim přistupuje ještě velké množství odpadů z celého životního prostředí. Složení škodlivých látek ve sladkých vodách je proto mimořádně pestré.

Chemické znečištění životního prostředí a zneužívání přírodních zdrojů ohrožuje přežití všech biologických druhů. Tento problém je jeden z nejzávažnějších, jež je třeba v současné době řešit. Pokud se o to nepokusíme, nebude v dohledné budoucnosti žádná biochemie kterou by bylo možné se zabývat. [2]

1.2. METABOLISMUS XENOBIOTIK

1.2.1. Penetrace xenobiotika do organismu

Cesty vstupu cizorodých látek do organismu jsou různé. Nejčastější je vstup zažívacím traktem (vstup xenobiotika ústy, čili perorálně), méně častý je vstup pokožkou (dermální vstup) popř. sliznicí. Plynné látky a aerosoly vstupují do organismu respiračním systémem (inhalace). Ve výjimečných případech, např. při zraněních nebo některých aplikacích léků, může dojít k průniku podkožnímu, nitrosvalovému či nitrožilnímu. [11]

1.2.2. Biotransformace xenobiotik v živém organismu

1) Derivatizační fáze

V této fázi probíhají především reakce oxidační, při kterých jsou do skeletu xenobiotika zavedeny polární funkční skupiny (např. hydroxylové nebo oxoskupiny).

Často také dochází k odkrývání polárních funkčních skupin např. hydrolysou esteru, amidu apod.

Oxidaci cizorodé látky realizují většinou enzymy povahy monooxygenas, mezi něž patří systém cytochromu P-450 nebo flavinové monooxygenasy. Látky, které se nemohou přímo přeměnit jinými reakcemi na polární sloučeniny nebo na látky schopné konjugace, jsou hydroxylovány podle následujícího schématu:



RH..... xenobiotikum

ROH... hydroxyderivát

Tuto reakci katalyzuje mikrosomální enzymový systém – tzv. MFO systém (z angl. **mixed function oxidases system**), tedy oxygenasy se smíšenou funkcí. Tento systém je v eukaryotických buňkách lokalizován v membráně hladkého endoplazmatického retikula a skládá se ze tří až čtyř složek :

- Cytochrom P450 (CYP) (EC 1.14.15.1)
- NADPH:CYP oxidoreduktasa (EC 1.6.2.4)
- Membránové lipidy
- Fakultativně je důležitá NADH:cytochrom b5 reduktasa (EC 1.6.6.2) [20]

Cytochrom P-450 reaguje s kyslíkem za vzniku nestabilního komplexu, přenášejícího kyslík na cizorodou látku. [1]

Flavinové monooxygenasy katalyzují monohydroxylaci aromatického kruhu xenobiotik. Do této skupiny enzymů řadíme fenolhydroxylasu hydroxylující fenol na katechol.

2) *Konjugační fáze*

Účelem této druhé fáze metabolismu xenobiotik je biotransformovat sloučeniny, které byly hydroxylovány nebo jinak změněny v první (derivatizační) fázi, pomocí specifických enzymů, což vede k dalšímu zvýšení polaritě metabolitů xenobiotik. Jedná se zejména o konjugaci s kyselinou glukuronovou, fosfoadenosinfosulfátem (PAPS), acetátem, glutathionem, některými aminokyselinami, popř. může dojít také k methylovaní xenobiotika.

V konjugační fázi dochází k tvorbě tzv. konjugátu, v nichž se spojuje endogenní polární látka (konjugační složka) s metabolitem xenobiotika, který vznikl v první fázi biotransformace.

Účelem obou fází metabolismu xenobiotik je maximální zvýšení rozpustnosti metabolitů xenobiotika ve vodě, a tím usnadnění jejich vyloučení z organismu.[2]

Reakce konjugační fáze probíhají v mikroorganismech jen ve velmi malé míře nebo chybí úplně. Většina mikroorganismů metabolity xenobiotik využívají především jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Cizorodá látka je u těchto mikroorganismů po derivatizační fázi biotransformace začleněna do jejich intermediárního metabolismu. [4]

V metabolismu xenobiotik může ještě figurovat tzv. **druhá konjugace**. Tato fáze není přítomna ve všech typech organismů. Je rozšířena především v rostlinných organismech. Konjugát z první konjugací fáze zde reaguje s dalšími endogenními molekulami.

1.3. FENOLICKÉ LÁTKY, JEJICH VYUŽITÍ A TOXICITA

1.3.1. Charakterizace a využití fenolických látek

Fenoly patří do třídy organických sloučenin obsahujících jednu či více hydroxylových skupin (-OH) vázaných na aromatickém kruhu. Zcela běžně a ve velké míře se vyskytují v přírodě. Vzhledem k tomu, že fenoly jako skupina látek byly objeveny poměrně brzy (1834 první izolace z kamenouhelného dehtu), většina z nich má triviální názvy. Typickým příkladem nám mohou sloužit methylofenoly, které se nazývají kresoly podle názvu uhelného nebo dřevěného dehtu, z kterých byly izolovány.[3]

Nízkomolekulární fenoly jsou obvykle rozpustné ve vodě a mají velmi vysoký bod varu. To je způsobeno tím, že molekuly fenolů mohou mezi sebou tvořit vodíkové vazby. Vazba O-H je silně polarizovaná díky značné elektronegativitě kyslíkového atomu. Dochází tedy ke vzniku parciálního kladného náboje na vodíkovém atomu. [1]

Fenoly jsou slabé kyseliny podobně jako voda, protože obsahují hydroxylovou skupinu, která může fungovat jako donor protonu a disociují tedy také podobně jako voda:



Na druhou stranu je fenol mnohokrát silnější kyselina než například ethanol. To je způsobeno rozdíly ve strukturách příslušných sloučenin. Hlavní důvod větší kyselosti fenolů oproti alkoholům je v tom, že fenoxidový ion je stabilizovaný rezonancí. Negativní náboj fenoxidového iontu bývá delokalizován rezonancí především v polohách *ortho* a *para* benzenového kruhu. Vzhledem k tomu že tímto krokem dochází ke stabilizaci, je rovnováha reakce jejich vzniku z fenolu mnohem příznivější než rovnováha vzniku alkoxidových iontů z alkoholů. Proto jsou fenoly mnohem kyslejší než alkoholy. [5]

Fenol C₆H₆O (hydroxybenzen) je v čistém stavu bezbarvá až bílá látka, která má nasládlý zápach, je hořlavá, rozpustná ve vodě, etherech, ethanolu, acetonu, glycerolu, benzenu. [6]

Důležité fyzikální vlastnosti fenolu [12]: $M_r = 94,114$

$T_i = 40,90^\circ\text{C}$

$T_v = 181,84^\circ\text{C}$

$T_{vzplanutí} = 75,79^\circ\text{C}$

$\rho_{25} = 1,132 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

$\text{pK}_a = 10,0$

$\text{pH} (50\text{g/l vody, } 20^\circ\text{C}) = \text{cca } 5,0$

Fenol má hygroskopické vlastnosti a také snadno podléhá oxidaci, proto je nutné ho uchovávat pod ochrannou atmosférou dusíku, v chladu a ve tmě. [12]

Fenoly nepůsobí pouze jako kyseliny, ale také jako báze, protože mají nesdílený elektronový pár na kyslíku a jsou tudíž „Lewisovskými“ bázemi.

Protonací fenolické hydroxy skupiny fenolu a následnou ztrátou molekuly vody by došlo k vytvoření fenylového kationtu, to je ale velmi obtížné vzhledem ke struktuře molekuly benzenu, neboť podmínka linearit je nesplnitelná. [1]

Fenoly snadno oxidují. Na vzduchu získávají různobarevný nádech způsobený vznikem oxidačních produktů. Oxidace hydrochinonu dává benzen-1,4-chinon, obvykle nazývaný chinon. Oxidace hydrochinonů je reverzibilní a tento oxidačně-redukční proces má velmi významnou roli v mnoha biologických pochodech.

Fenolické substance se často používají jako antioxidanty. Přednostně se oxidují místo látek, do kterých byly přidány. Jsou používány jako stabilizátory (např. butylovaný hydroxytoluen-BHT, nebo butylovaný hydroxyanisol-BHA) v potravinách, jedlých olejích, krmných směsích, ale též v chemickém průmyslu pro výrobu syntetických olejů, gumy a plastických hmot. [3]

1.3.2.Toxicita fenolu vůči lidskému organismu

Fenoly se velmi dobře vstřebávají. Díky své kyselosti leptají a dráždí pokožku a sliznice. Jsou především neurotoxické, ale také hepatotoxické a nefrotoxické. Intoxikace probíhá inhalací, nebo transdermálně. Po vstřebání fenolu dochází k jeho oxidaci a biotransformaci a následně k rychlému vyloučení xenobiotika z organismu. Akutní intoxikace vyvolá prudké bolesti v dutině ústní, bříše a často končí smrtelně. Chronická

intoxikace je vzácná. Projevuje se bolestmi hlavy, ochablostí organismu, nechutenstvím, nebo ekzémy. [5]

Dvojsytné fenoly, jako např. pyrokatechol jsou akutně toxičtější než fenol, při chronické intoxikaci vyvolávají dermatitidy.

Jako smrtelná dávka pro dospělého člověka je uváděno 5 až 12 g fenolu [5]. Při uvolnění velkého množství fenolu do vzduchu, půdy nebo vody, nebo pokud je do prostředí fenol uvolňován dlouhou dobu v menších dávkách, přetrvává i po velmi dlouhou dobu. .

Malá množství fenolu však nepřetrvávají ve vzduchu déle než jeden den, z půdy jsou odstraněna do pěti dnů a ve vodách zůstávají nejdéle devět dní [7].

1.4. CHAREKTERISTIKA UŽITÉHO MIKROORGANISMU – KVASINKY *CANDIDA TROPICALIS*

1.4.1. Charakteristika kvasinek rodu *Candida*

Kvasinky jsou chemoheterotrofní, eukaryotní, jednobuněčné mikroorganismy (nižší houby), které se rozmnožují téměř výhradně nepohlavně, tzv. pučením. Při rozmnožování dochází k tvorbě mycelia, kdy je mateřská buňka spojena s dceřinou úzkým kanálkem, kterým do ní přichází nově vytvořené jádro a buněčný materiál.

Kvasinky rodu *Candida* mají schopnost odbourávat monosacharidy a některé vícečetné sacharidy na ethanol a oxid uhličitý.

Z hlediska morfologie mají kvasinky většinou oválný tvar, který se u různých druhů pohybuje velikostně v rozmezí 3 až 13 μm . [1] Struktura buněk kvasinek je „similární“ se strukturou ostatních eukaryotních buněk. Rozdíl spočívá v silné a pevné buněčné stěně, kterou jsou buňky kvasinek obaleny stejně jako buňky bakterií. Tato stěna chrání kvasinku před vnějšími vlivy a zajišťuje její tvar. Stavebním materiálem buněčných stěn kvasinek jsou polysacharidy, většinou glukany a mannany, často ve formě fosforečných esterů, které mají strukturu vláken tvořících hustou, pevnou spleť, vyplněnou bílkoviny.

Pod buněčnou stěnou je tenká cytoplasmatická membrána, která obklopuje cytoplasmu s diferencovaným jádrem. Cytoplasmu dále obsahuje ribosomy, mitochondrie, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, zrníčka rezervních látek a také vakuoly, podobně jako u rostlinných buněk.

V současnosti známe více než 500 druhů kvasinek, které tvoří 37 rodů. Mezi kvasinky rodu *Candida* patří především *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*. [1]

1.4.2. Vlastnosti kvasinky *C. tropicalis*

Kvasinka *Candida tropicalis* je aerobní eukaryotní mikroorganismus. Aerobní respirační řetězec je tvořen „baterií“ oxidoreduktas, analogicky jako mitochondriální dýchací řetězec vyšších organismů, sestává však z jiných enzymů. *Candida tropicalis* také dokáže, stejně jako jiné kvasinky využít cukry, např. glukosu, sacharosu, maltosu. [8] Tento mikroorganismus také dokáže využít fenol, ale například i formaldehyd jako svůj hlavní zdroj uhlíku a energie.[6]

Candida tropicalis patří mezi oportunní patogeny. To znamená, že za normálních okolností je pro člověka zcela neškodná a je součástí mikroflóry na sliznicích v lidském organismu. U oslabených jedinců může ovšem vyvolat „candidosu“, což je infekce ohrožující zdraví a v některých případech i život pacienta.

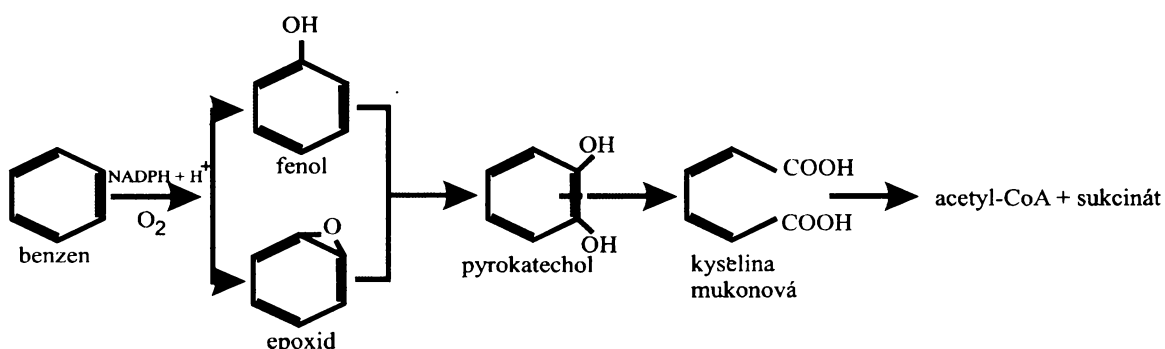
Candida tropicalis vytváří dlouhá, místy zaškrčená vlákna, na kterých se tvoří svazky kratších kulovitých buněk (blastospor).

Technikou barvení chromozomů a elektronovou mikroskopií se rozlišuje pět stádií životního cyklu *Candida tropicalis*. Sexuálně (1) aktivní haplofáze, která mutuje přímo na sexuálně (2) inaktivní haplofázi, anebo se mění na (3) diplofázi (autodiploidizace). Nestabilní diplofáze se mění na sexuálně inaktivní haplofázi, která je stabilní. Tento proces změny fáze představuje určitý typ (4) meiózy. U *C. tropicalis* se vyskytují chlamydospor, jako velké kulaté buňky, které se mitoticky štěpí na (5) filamenty. Během této specifické meiózy se může v diplofázi tvořit i vícejaderné buňky. [15]

1.4.3. Využití kvasinky *Candida tropicalis* pro biodegradaci fenolu

Obtížněji než hydroxylace alifatických řetězců probíhá hydroxylace benzenového jádra. Benzen se hydroxyluje na fenoly přímo, nebo cestou přes epoxidy, což jsou meziprodukty, z nichž se pak tvoří pyrokatechol. Pyrokatechol při otevření kruhu přechází v kyselinu mukonovou, která se dále oxiduje [1] až na acetyl-CoA a sukcinát. [9]

Tyto konečné produkty biodegradace fenolu jsou dále začleněny do intermediárního metabolismu buňky.



Obr 2: Hydroxylace benzenového jádra s otevřením aromatického kruhu

Enzymy schopné degradovat fenol jsou u *C. tropicalis* lokalizovány v cytoplasmě a mikrosomech.

V první fázi biodegradace fenolu používá kvasinka *C. tropicalis* pro katalýzu hydroxylace fenolu na katechol cytoplasmatickou NADPH-dependentní fenolhydroxylasu.

K tomuto účelu ovšem slouží kvasince *C. tropicalis* také mikrosomální systém oxygenas se smíšenou funkcí (s cytochromem P-450 jako terminální oxidasou), který bude předmětem našeho výzkumu v dohledné době.

Jedná se tedy o asimilaci fenolických látek katecholovou (*ortho*) cestou, během které je do aromatického kruhu zabudována molekula kyslíku. Nejprve dochází k oxidaci fenolu za vzniku 1,2-epoxidu zabudováním atomu kyslíku do aromátové struktury, další oxidací poté vzniká katechol. [9]

Katechol je ve druhé fázi ihned dále oxidován katechol-1,2-dioxygenasou na kyselinu *cis, cis*-mukonovou. Při této oxidaci dochází k otevření aromatického kruhu katecholu v poloze 1,2, mezi dvěma atomy nesoucími hydroxylové skupiny.

1.4.4. NADPH-dependentní fenolhydroxylasa

NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je řazena mezi flavinové enzymy (flavinové monooxygenasy), neboť prosthetickou skupinou fenolhydroxylasy u *Candida tropicalis* je FAD. [19]

FAD může být lokalizován ve dvou pozicích podle toho, v jaké fázi hydroxylace substrátu se enzym právě nalézá:

- FAD v poloze „out“: může se na něj navázat NADPH.
- FAD v poloze „in“: FAD je zanořený dovnitř proteinu, což umožňuje ochranu dalšího navázaného substrátu (fenolu) před účinky rozpouštědla. Zároveň jsou chráněny i vznikající intermediáty reakce [10].

Jedná se o enzym se širokou substrátovou aktivitou. Dokáže katalyzovat biodegradaci fenolu, ale i jeho monohalogen-, monomethyl-, či monoamino- derivátů.

U kvasinky *Candida tropicalis* je enzym pravděpodobně tetramer složený ze čtyř podjednotek o molekulové hmotnosti pohybující se okolo 60 kDa [14].

2. CÍL PŘEDKLÁDANÉ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo srovnání efektivnosti chromatografických metod, které se užívají pro izolaci a purifikaci enzymů podílejících se na biodegradaci fenolu kvasinkou *Candida tropicalis*.

Konkrétně se jednalo o následující dílčí cíle:

- a) **Srovnání účinnosti iontoměničové, afinitní, hydrofobní a gelové permeační chromatografie.**

- b) **Srovnání účinnosti jednotlivých materiálů, používaných pro gelovou permeační chromatografii.**

Konkrétně se jednalo o tyto materiály: Sepharosa 4B, Sephacryl S-300, Sephadex G-100 a Sephadex G-75.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

3.1.1. Použité chemikálie

Lachema (Brno)

bromfenolová modř

dihydrogenfosforečnan sodný

ethanol

hydrogenfosforečnan sodný

hydroxid sodný

chlorid sodný

kyselina octová

methanol

persíran amonný

uhličitan sodný

vínan sodnodraselný

Serva (SRN)

Comassie Brilliant Blue

Seavapharma (Praha)

hovězí sérový albumin (BSA)

Folinovo činidlo

Fluka, Buchs (Švýcarsko)

akrylamid

dodecylsíran sodný (SDS)

fenol

katechol

methanol

TEMED

Linde (SRN)

plynný a kapalný dusík

Sigma (USA)

cytochrom c

deoxycholát sodný

dialyzační trubice

hovězí sérový albumin (BSA)

NADPH

„Wide Range“ – standardy proteinu pro SDS-PAGE

Pharmacia Biotech. (Švédsko)

DEAE Sepharose CL 6B

Sephacryl S-300

Sephadex G-100

Sephadex G-75

Sepharosa CL 4B

3.1.2. Použité přístroje

Centrifugy:

Janetzki K-24 (NDR), úhlový rotor 6x35 ml

Sanyo MicroCentaur MSE (Schoeller Instruments, U.K.), úhlový rotor
12x2 ml

Ultracentrifuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter, USA), úhlový rotor
Ti 45, 6x70 ml

Spektrofotometry:

SPEKTROMOM 195 D (MOM Budapest, Hungary)

Váhy:

předvážky EW600-2M (KERN, SRN)

analytické váhy PESA 40SM-200A (PESA, Švýcarsko)

Sestava HPLC:

pumpa P580 HPG (Dionex-Softron, SRN)

autosampler ASI-100 (Dionex-Softron, SRN)

UV-VIS detektor LCD 2563 (Laboratorní přístroje, Praha, CR)

kolona Nucleosil 100-5 C18 4x250 mm (Merck, SRN)

software:

Chromeleon verze 6.01

Sestava pro elektroforesu:

zdroj napětí Electrophoresis Power Supply-EPS 301

(Amersham Biosciences, USA)

Další:

automatické mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japan)

homogenisátor dle Pottera a Elvehjema

chromatografické kolony C 1,5x35

C 1x30

C 1,5x40

C 2,5x40

(Pharmacia Biotech, Švédsko)

inkubátor Thermomixer compact (Eppendorf)

mikrostřikačka Hamilton (Hamilton Company, USA)

pH-metr model 370 (ATI Orion, USA)

sběrač frakcí BioLogic BioFrac (BIO-RAD, USA)

sonikátor (Ultrasonic compact cleaner, Teson1, Tesla, CR)

vortex MS 1 Minishaker (Scholler Pharma Praha, CR)

vortex MS 2 (IKA, USA)

hlubokomrazicí box -80°C (Sanyo Ultra Low, Japan)

3.2. IZOLACE CYTOSOLÁRNÍ FRAKCE

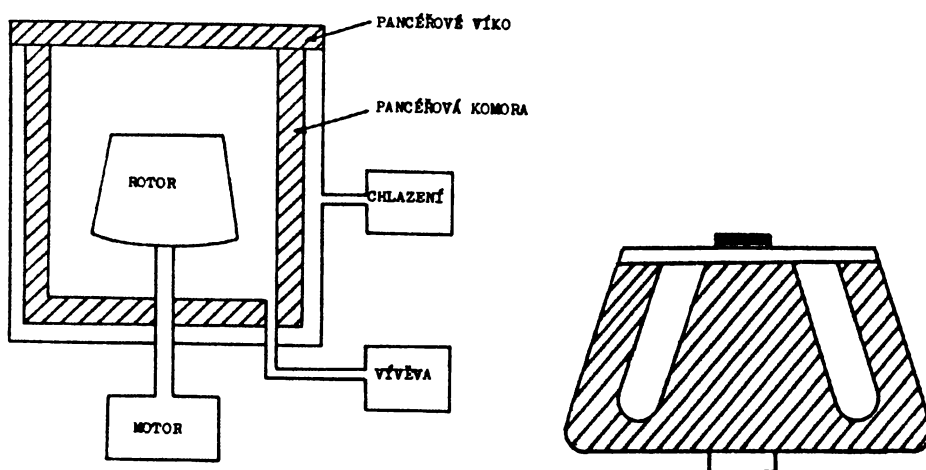
Izolace cytosolární frakce z buněk kvasinky *C. tropicalis* zahrnovala tři dílčí kroky: desintegraci, homogenizaci a centrifugaci. Všechny tyto kroky probíhaly při teplotě 5 °C, a to buď v chladicí místnosti, nebo v centrifugačních přístrojích (odstředivkách) chlazených na tuto teplotu.

3.2.1. Desintegrace a homogenizace

Desintegrováno bylo (nejednou- vždy cca 200-300 g zmražených buněk. Ty byly za podchlazení kapalným dusíkem po částech rozbíjeny a následně roztírány najemno ve třecí misce. Rozbité buňky *C. tropicalis* byly dále homogenizovány společně se 150 ml 50 mM Na-fosfátového pufru o pH 7,6 v homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema. Pro homogenizaci bylo použito nejdříve volněji a následně i těsněji přiléhající homogenizátor.

3.2.2. Frakční centrifugace

Homogenát získaný z buněk *C. tropicalis* byl centrifugován při 15 000 g po dobu 20 minut (K-24, úhlový rotor 6x35ml, 13 500 RPM). Dále byl supernatant oddělen od pelety a centrifugován ve vakuu při 105 000 g 65 minut (Ultracentrifuga Optima TM LE-80K, úhlový rotor Ti-45, 6x70 ml, 35 000 RPM).



Obr.3. Schéma preparativní centrifugy a rotoru s fixním úhlem [16]

3.2.3. Lyofilizace

Mrazová sublimace (lyofilizace) je jednou z nejšetrnějších metod pro přípravu suchých preparátů biologických materiálů citlivých na zvýšenou teplotu.

Podstatou této metody je sublimace rozpouštědla ze zmrazeného vzorku, která probíhá za vakua. Při odpařování kolem 0 °C prakticky neprobíhají enzymové reakce, roztoky nepění, bílkoviny nenedaturují, látka se neoxiduje vzdušným kyslíkem a je omezena možnost mikrobiálního znečištění. Lyofilizované preparáty stále obsahují určité malé množství vody. Díky tomu si lépe uchovávají své biologické vlastnosti a jsou bez větších problémů skladovatelné po značně dlouhou dobu bez větší ztráty své biologické (resp. enzymové) aktivity.

Lyofilizace se ovšem nedá použít obecně pro jakékoliv roztoky, například roztoky nízkomolekulárních látek při ní tají. Bod tuhnutí dále snižuje přítomnost solí v roztocích, proto je žádoucí soli z roztoku před lyofilizací nejprve odstranit, např. ultrafiltrací, gelovou chromatografií nebo dialýzou. Pro zabránění přetlaku a znehodnocení olejové výplně vývěvy je také nutno předem odstranit těkavá organická rozpouštědla.

Částečně purifikovaný enzymový preparát byl po lyofilizaci zmrazen (-80 °C) a dále použit pro izolaci fenolhydroxylasy.

3.3. ANALYTICKÉ METODY

3.3.1 Stanovení koncentrace bílkovin Lowryho metodou [21]

Princip: Bílkoviny obsažené ve vzorku jsou rozpuštěny v alkalickém roztoku deoxycholátu sodného a po přidání Folinova činidla (roztok fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny) reagují za vzniku modré rozpustné sloučeniny.

Postup: Do mikrozkuvek bylo pipetováno po řadě 20, 50, 100 µl vzorku a doplněno na 0,5 ml destilovanou vodou. Poté bylo přidáno 0,15 ml 2% deoxycholátu sodného a 0,15 ml 2 M NaOH. Po promíchání byl roztok nechán 10 minut stát. Po následném přidání 0,3 ml Folinova činidla byl roztok znovu promíchán a nechán stát 30min. Byla změřena absorbance při 550 nm na spektrofotometru SPEKTROMOM.

Jako standard byl použit 0,5 ml roztoku BSA (hovězího sérového albuminu) o koncentraci 25mg/100ml, jako slepý vzorek bylo použito 0,5 ml destilované vody.

Výpočet: $c_{\text{proteinů}} \text{ (mg/ml)} = A_{\text{vz}}/A_{\text{BSA}} \cdot 0,125/ \text{objem vzorku}(\mu\text{l})$

3.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato metoda byla použita ke stanovení fenolhydroxylasové a katecholdioxygenasové aktivity enzymů zodpovědných za metabolismus fenolu na katechol. Aktivita enzymů je úměrná úbytku substrátu (fenolu) respektive přírůstku produktu (katecholu) a byla měřena na koloně NUCLEOSIL 100-5 C18 4x250mm (Merck SRN). Jako mobilní fáze byl použit 40% roztok methanolu v destilované vodě. K detekci při 275 nm bylo použito UV-VIS detektoru (LCD 2563, Laboratorní přístroje Praha). Kolona byla temperována na 35 °C, dávkovací smyčka naplněna vzorky o objemu 20 μl , rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5ml/min (Pumpa P580, Dionex).

3.3.3. Stanovení fenolhydroxylasové aktivity

Enzymové (fenolhydroxylasové) aktivity byly měřeny v cytosolu a ve frakcích proteinů z něj získaných. [14] Tyto frakce byly eluovány na sloupcích chromatografických kolon, a to iontoměničovou, hydrofobní, afinitní, nebo gelovou permeační chromatografií. Objem vzorku byl vždy 140 μl . Celkový objem pak činil vždy 175 μl a složení reakční směsi bylo následující: 140 μl vzorku, 17,5 μl NADPH, 17,5 μl fenolu. Koncentrace NADPH a fenolu byla 1 mM. Inkubace probíhala v otevřených mikrozkuvkách na třepačce, při teplotě 37°C. Z reakční směsi bylo odebráno vždy 50 μl a reakce byla ukončena přidávkem 10 μl 0,6M HClO₄ v časech 0, 10, 35 minut. Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací při 13 000 RPM (Sanyo MicroCentaur MSE, úhlový rotor), po dobu 3 min.

Obdobně byla stanovována enzymová aktivita katechol-1,2-dioxygenasy pro níž bylo složení reakční směsi následující: 140 μl vzorku, 17,5 μl Na-fosfátového pufru, 17,5 μl katecholu.

3.3.4. Elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) [22]

Princip: Dodecylsulfát sodný uděluje všem molekulám stejně velký záporný náboj překrývající jejich vlastní náboj. SDS diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) v redukujícím prostředí tedy umožňuje rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.

Použité roztoky a pufry:

Pufř A: 0,375M TRIS/HCl, 0,1% SDS (w/v), pH 8,8

Polymerační roztok A: 30% akrylamid (w/v), 0,8% BIS v pufřu A (w/v)

Pufř B: 0,125M TRIS/HCl, 0,1% SDS (w/v), 0,0006% bromfenolová modř (w/v), pH 6,8

Polymerační roztok B: 30% akrylamid (w/v), 0,8% BIS v pufřu A (v/v)

Elektrodový pufř: 25mM TRIS, 0,25M glycin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,3

Vzorkový pufř: 0,063M TRIS/HCl, 2% SDS (w/v), 10% glycerol (v/v),

5% 2-merkaptoethanol (v/v), 0,003% bromfenolová modř (w/v), pH 6,8

Barvicí lázeň: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% ethanol (v/v),

9,2% kyselina octová (v/v)

Odbarvovací lázeň: 25% ethanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v)

Postup: Všechny části aparatury určené k přípravě gelů jsme pečlivě omyli, odmastili ethanolem a osušili. Mezi skla byl nalit nejprve 10% separační gel (8 ml pufřu A, 4 ml polymeračního roztoku A, 10 μ l TEMED, 3 mg persíranu amonného), který byl po dobu polymerace převrstven destilovanou vodou. Poté byla voda vysušena filtračním papírem a separační gel převrstven 3% velkoporovým rozdělovacím gelem (6,75 ml pufřu B, 0,75 ml polymerační roztok B, 7,5 μ l TEMED, 3 mg persíranu amonného). Ihned po nalití gelu do něj byl vložen hřeben pro vytvoření aplikačních jamek. Tento plastový hřeben byl po dokončení polymerace opatrně vyjmut a skla s gelem byla umístěna do aparatury. Dále byl do horní i spodní části nalit elektrodový pufř.

Vzorky byly smíchány 1:1 se 4x koncentrovaným vzorkovým pufřem a vařeny po dobu 5 minut ve vodní lázni. Po vychladnutí byly vzorky a standard „Wide Range“ (připravený obdobně jako vzorky) aplikovány do jednotlivých jamek v gelu Hamiltonovou mikropipetou.

Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 180 V po dobu cca 45 min a dalších 45 min probíhala elektroforéza při napětí 240 V. Následně byl gel oddělen od skel a přesunut do barvicí lázně, kde byl ponechán 45 min. Poté byl gel přenesen do odbarvovací lázně a tam ponechán přes noc. Další den byl gel vysušen v celofánové fólii.

3.4. METODY POUŽITÉ PRO PURIFIKACI ENZYMŮ

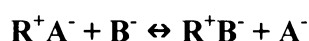
Pro purifikaci enzymů byly použity chromatografické metody, a to především celá série gelových chromatografií, které budou dále v textu srovnány podle své účinnosti při purifikaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasa kvasinky *Candida tropicalis*.

Při purifikaci byl používán 50mM Na-fosfátový pufr s 1 mM EDTANa₂ a 1μM FAD o pH 7,6.

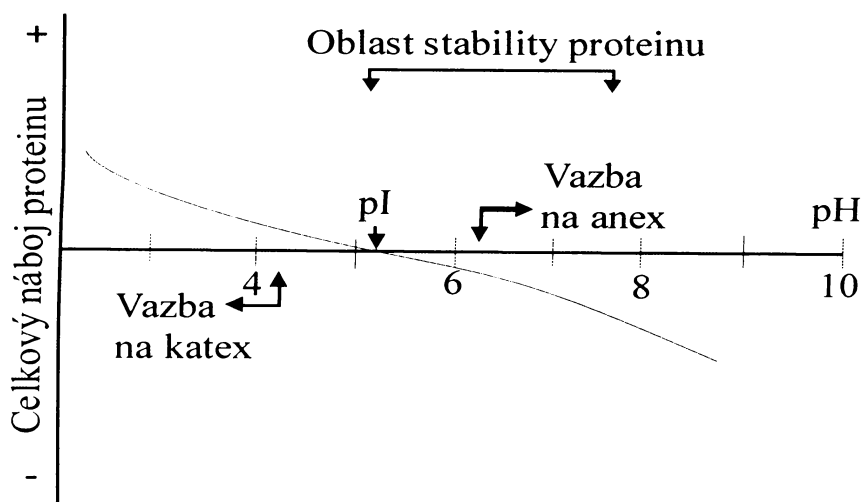
3.4.1.Chromatografie na iontoměničích

Ionexová chromatografie nebo též chromatografie na měničích iontů je založena na iontových interakcích mezi iontoměničem a separovanou látkou, která nese opačný náboj. (9)

Při výměně iontů se ionty, které jsou elektrostaticky vázány k pevnému a chemicky inertnímu podkladu, reversibilně vyměňují za ionty z roztoku:



$\mathbf{R^+A^-}$ je měnič iontů s navázaným aniontem $\mathbf{A^-}$ (anex) a $\mathbf{B^-}$ odpovídá anionům v roztoku. Měnič kationů (katex) obsahuje záporně nabitě skupiny, které reversibilně váží kationty. Afinita iontů k ionexu není stejná, ale závisí na velikosti náboje a na poloměru hydratovaného iontu. Tento fakt je základem separace látek ionexovou chromatografií. Při vazbě iontu na ionex je ovšem třeba počítat i s dalšími vlivy, a to zejména s van der Waalsovými a polárními interakcemi. Síla vazby je také ovlivněna iontovou silou a pH prostředí. Platí pravidlo, že protein se naváže na katex, pokud je pH pufru nižší než isoelektrický bod proteinu. Na anex se protein váže, je-li pH pufru vyšší než isoelektrický bod proteinu. (Viz Obr.4.)



Obr.4. Znáznornění podmínek vazby proteinu na ionex [17]

Provedení chromatografie je buď statické (vsádkové) nebo dynamické (na koloně). Ve většině případů se používá dynamické uspořádání, při kterém se kolona plní nabobtnalým nosičem. Charakter funkčních skupin iontoměniče udává sílu ionexu, jejich celkové množství pak určuje kapacitu ionexu.

Elektrostatická vazba iontů na iontoměniče je tak silná, že pro eluci zachycených iontů je nutné měnit složení eluentu. Proto se používají gradienty pH nebo iontové síly.

3.4.2. Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy

Princip: DEAE Sepharosa je slabý anex, záporný náboj zde nese skupina DEAE (diethylaminoethyl).

Příprava a regenerace nosiče: DEAE Sepharosa (100 ml, ve 20% ethanolu) byla před použitím promyta 3x250 ml destilované vody, rozmíchána v 200 ml cyklizačního pufru (1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,6) a nechána přes noc při teplotě 5 °C. Po opětovném promytí nosiče 3x250 ml destilované vody a 3x250 ml ekvilibračního pufru (50mM Na-fosfátový pufr, pH 7,6) druhý den, byl nosič resuspendován v ekvilibračním pufru a za nulového průtoku nalit na kolonu C 2,5x40 Pharmacia Biotech. Po sedimentaci byl nosič dále ekvilibrován přímo na koloně.

Po použití byl nosič čištěn promýváním (1x250 ml 1M NaCl, 1x250 ml 1M octanu sodného (pH 3,0), 1x250 ml destilované vody, 1x250 ml 0,5M NaOH, 1x250 ml

destilované vody, 1x250 ml 1M octanu sodného (pH 3,0), 2x250 ml 20% ethanolu). Poté byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20% ethanolu a uchováván v polyethylenové lahvičce při 5° C pro další upotřebení.

Postup: Na ekvilibrovanou kolonu DEAE Sepharosy byl aplikován cytosol o objemu 260 ml rychlostí 0,8 ml/min. Pomocí automatického sběrače byly zároveň jímány frakce, u kterých byla měřena absorbance při vlnové délce 280 nm. Po aplikaci vzorku byla kolona promývána 50mM Na-fosfátovým pufrům o pH 7,6 až do poklesu absorbance, který značí vymytí nezachycených proteinů.

Pro eluci fenolhydroxylasy bylo použito lineárního gradientu iontové síly (2x350 ml 50mM Na-fosfátového pufru pH 7,6 s přidavkem 0-0,35M NaCl). Znovu byla měřena absorbance jednotlivých frakcí při 280 nm. Přítomnost NAPH- dependentní fenolhydroxylasy byla detekována pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (SDS-PAGE) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Eluované frakce s (detekovanou) fenolhydroxylasovou aktivitou byly spojeny, přes noc dialysovány proti 8 l 50mM Na-fosfátového pufru (odsolení) a dále purifikovány.

Druhý den byla provedena rechromatografie na DEAE Sepharose s použitím 50 ml nosiče v koloně 1,6x30 (Pharmacia Biotech). Objem vzorků činil 115 ml. Fenolhydroxylasa byla eluována pomocí lineárního gradientu (2x150ml 50mM Na-fosfátového pufru pH 7,6 s přidavkem 0-0,35M NaCl). Stejným způsobem uvedeným výše byla detekována fenolhydroxylasa v eluovaných frakcích a tyto frakce byly poté spojeny a dialysovány proti 4 l 50mM Na-fosfátového pufru o pH 7,6 přes noc.

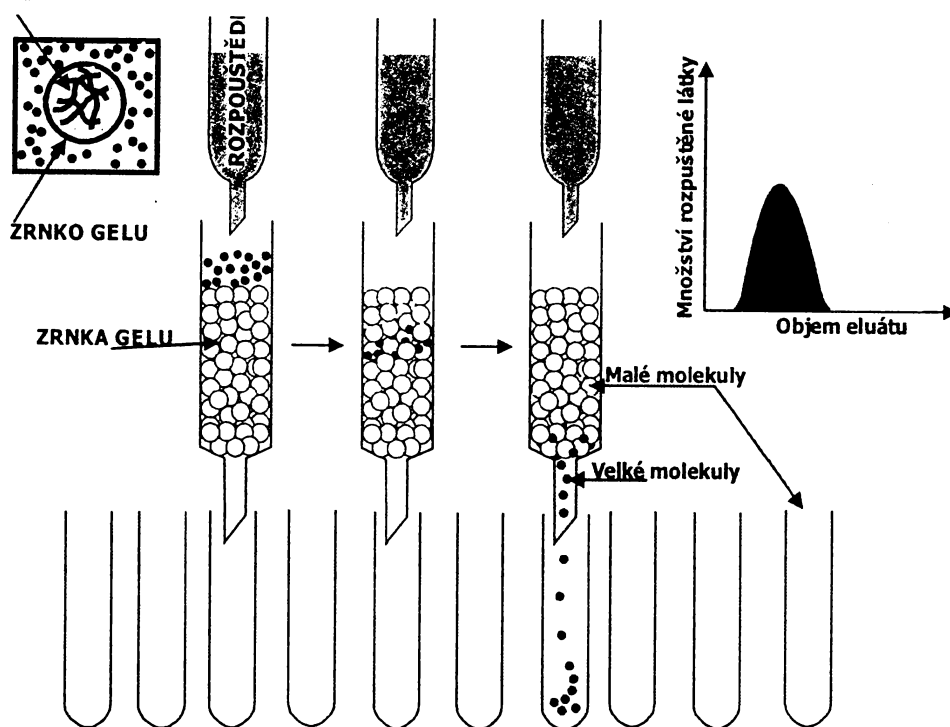
3.4.3. Gelová permeační chromatografie

Tato metoda se v současné době stala jednou z nejdůležitějších metod v preparativní i analytické chemii. Gelová permeační chromatografie je metoda, při níž se separují molekuly na základě své velikosti a tvaru. Typově se jedná o rozdělovací chromatografii v systému kapalina – kapalina, kde je stacionární fází kapalina zakotvená v inertním polymerním nosiči, čímž je zajištěna nemísitelnost s mobilní fází. Stejná kapalina tvoří mobilní fází protékající mezi částicemi gelu, které mají kulovitý tvar a známou průměrnou velikost pórů.

Současné představy předpokládají, že rozhodujícím kritériem není objem pórů, ale dostupnost částí jednotlivých, poměrně nepravidelných pórů. Molekuly tak velké, že neprojdou póry gelu, zůstávají v intersticiální kapalině a současně s ní se eluují z gelu.

Malé molekuly mohou difundovat do gelových částic, kde neproudí mobilní fáze. Jakmile však difúzí proniknou vně, jsou opět neseny proudem kapaliny do jiné gelové částice. Difúzí do a z gelových částic postupují malé molekuly chromatografickou náplní, avšak nižší rychlostí, než velké molekuly. V důsledku toho se jednotlivé složky uvolňují ze sloupce v pořadí podle klesající velikosti (resp. relativní molekulové hmotnosti) molekuly.

Pochod je řízen difúzní konstantou, která je u velkých molekul nízká, proto je aktuální koncentrace velkých molekul v gelu menší, než by byla koncentrace rovnovážná. Znázornění gelové filtrace viz Obr.5.



Obr.5. Schématické znázornění gelové filtrace. [17]

3.4.4. Materiály používané pro gelovou permeační chromatografii

Sephadexy

Materiály vyráběné z fragmentů dextranu, což je polysacharid o vysoké relativní molekulové hmotnosti ($10^7 - 10^8$), který vzniká působením bakterie *Leuconostoc mesenteroides* na sacharosu. Dextranová vlákna jsou zesíťována příčnými vazbami působením epichlorhydrinu. Stupeň zesíťování a tím i velikost pórů lze ovlivnit změnou poměru dextran : epichlorhydrin. Sephadexy základní řady G jsou podle velikostí pórů vhodné pro odsolování bílkovin (malé póry) nebo separaci bílkovin (větší póry).

Sepharosy

Tyto materiály jsou vyrobeny na bázi agarosy. Agarosa je součástí agaru, což je směs polysacharidů produkovaná některými mořskými řasami. Při přípravě Sepharosy je především nutno odstranit agaropektin, který je také součástí agaru. Sepharosy se liší od jiných typů molekulových sítí tím, že jednotlivé řetězce nejsou vázány kovalentně, ale pouze slabými silami a také tím, že mají velmi velké póry a do jisté míry kyselý charakter.

Jsou vhodné pro separaci biopolymerů s relativní molekulovou hmotností nad 200 000.

Bio-Gely P

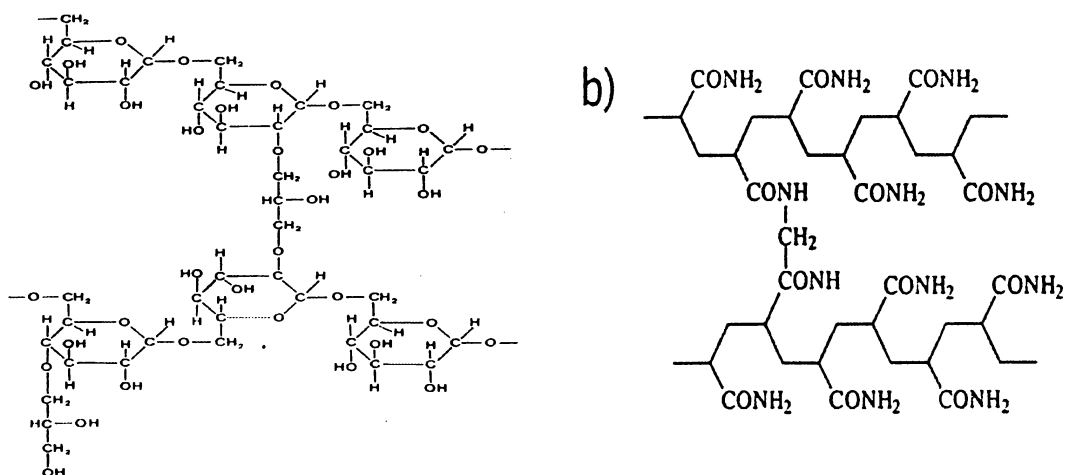
Vznikají polymerizací akrylamidu a methylenbisakrylamidu. Zesíťování závisí na poměru obou složek. Mají vyšší rozsah frakcionace, nižší cenu a lepší průtok než Sephadexy. Oproti nim mají ovšem nižší rozlišovací schopnost.

Sephacryly

Vznikají kovalentními vazbami mezi molekulami dextranu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Mají velkou mechanickou odolnost. Sephacryl vydrží teplotu až 100 °C při pH 7, aniž by byly narušeny jeho chromatografické vlastnosti.

Ostatní materiály

Mezi ostatní používané materiály patří například, Styragel, Merckogel, Spheron P, nebo Separon. Někdy se používají také porézní skleněné náplně. [16] Některé konkrétní materiály používané pro gelovou chromatografii jsou zobrazeny v Tab.1.



Obr.6. Schéma struktury gelů: a) prokřížený dextran (Sephadex,13), b) prokřížený polyakrylamid (Bio Gel P,[17]).

Tab.1. Některé materiály, používané pro gelovou chromatografií. [17]

Některé materiály pro gelovou chromatografií

Obchodní název	Frakcionační rozsah kDa	Obchodní název	Frakcionační rozsah kDa
Sephadex G-10	- 0,07	Bio-Gel P-2	0,1 – 0,8
Sephadex G-25	1 – 5	Bio-Gel P-6	1 – 6
Sephadex G-50	1 – 30	Bio-Gel P-10	1,5 – 20
Sephadex G-100	4 – 150	Bio-Gel P-30	2,4 – 40
Sephadex G-200	5 – 600	Bio-Gel P-100	5 – 100
		Bio-Gel P-300	60 – 400
Sepharose 6B	10 - 4 000		
Sepharose 4B	60 - 20 000		

3.4.4.1. Chromatografie na sloupci Sepharosy 4B

Princip: Sepharosy 4B se používá k separaci biomolekul. Její frakcionační rozsah je 60 – 20 000kDa.

Příprava a regenerace nosiče: Sepharosa 4B (ve 20% ethanolu) byla před použitím promyta 2 x 250 ml destilované vody, rozmíchána v 50mM Na-fosfátovém pufru (pH 7,6) a nalita do chromatografické kolony (Pharmacia Biotech C 1,5 x 30). Po skončení sedimentace byl sloupec nosiče promýván mobilní fází o průtoku 0,6 ml za minutu.

Po použití byl nosič promýván postupně 2 x 250 ml destilované vody a 2 x 250 ml 20% ethanolu. Nakonec byl nosič resuspendován ve 120 ml 20% ethanolu a převeden do polyethylenové lahvičky. Nosič byl uchováván při 5 °C.

Postup: Na připravenou kolonu bylo nanášeno 0,01 g lyofilizátu rozpuštěného ve 150 µl Na-fosfátového pufru při nulovém průtoku. Bílkoviny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6) a průtoková rychlost byla nastavena na 0,6 ml za minutu. Byly jímány eluované frakce a měřena jejich absorbance při 280 nm ($A_{280\text{nm}}$). Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita pomocí HPLC. Frakce vykazující aktivitu byly spojeny, zmrazeny v mikrozkuřavkách a následně skladovány při -80 °C.

3.4.4.2. Chromatografie na sloupci Sephadexu G-75

Princip: Sephadex G-75 se používá k separaci biomolekul. Jeho frakcionační rozsah je 10 – 75 000 kDa.

Příprava a regenerace nosiče: Příprava a regenerace nosiče, viz. příprava a regenerace Sepharosy 4B.

Postup: Na připravenou kolonu bylo nanášeno 0,01 g lyofilizátu rozpuštěného ve 150 µl pufru při nulovém průtoku. Bílkoviny byly vymývány 50mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6) a průtoková rychlost byla nastavena na 0,67 ml za minutu. Byly jímány eluované frakce a měřena jejich absorbance při 280 nm ($A_{280\text{nm}}$). Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita pomocí HPLC. Frakce vykazující aktivitu byly spojeny, zmrazeny v mikrozkuřavkách a následně skladovány při -80 °C.

3.4.4.3. Chromatografie na sloupci Sephadexu G-100

Princip: Sephadex G-100 se používá k separaci biomolekul. Jeho frakcionační rozsah je 4 – 150 000 kDa.

Příprava a regenerace nosiče: Příprava a regenerace nosiče, viz. příprava a regenerace Sepharosy 4B.

Postup: Na připravenou kolonu bylo nanášeno 0,01 g lyofilizátu rozpuštěného ve 100 μ l pufru při nulovém průtoku. Bílkoviny byly vymývány 50mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) a průtoková rychlost byla nastavena na 0,67 ml za minutu. Byly jímány eluované frakce a měřena jejich absorbance při 280 nm ($A_{280\text{nm}}$). Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita pomocí HPLC. Frakce vykazující aktivitu byly spojeny, zmrazeny v mikrozkuřavkách a následně skladovány při -80 °C.

3.4.4.4. Chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300

Princip: Sephacryl S-300 se používá k separaci biomolekul. Jeho frakcionační rozsah je 10 000 – 1,5x10⁵ kDa.

Příprava a regenerace nosiče: Příprava a regenerace nosiče, viz. příprava a regenerace Sepharosy 4B.

Postup: Na připravenou kolonu (40x1,5 cm, 20 ml nosiče) bylo nanášeno 0,01 g lyofilizátu rozpuštěného ve 150 μ l pufru při nulovém průtoku. Bílkoviny byly vymývány 50mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) a průtoková rychlost byla nastavena na 0,13 ml za minutu. Byly jímány eluované frakce a měřena jejich absorbance při 280 nm ($A_{280\text{nm}}$). Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita pomocí HPLC. Frakce vykazující aktivitu byly spojeny, zamrazeny v mikrozkuřavkách a následně skladovány při -80 °C.

3.4.5. Chromatografie s hydrofobní interakcí

Molekuly, které mají na svém povrchu hydrofobní skupiny lze separovat na základě různě silných hydrofobních interakcí s chromatografickým sorbentem nesoucím hydrofobní skupiny. Pokud jistá část hydrofobních skupin na povrchu molekul přichází do styku s vodným rozpouštědlem, interagují proteiny s nepolárními skupinami navázanými na pevný nosič. Hydrofobní interakce jsou tedy základem chromatografie s obrácenými

fázemi. Při hydrofobní chromatografii (HIC) se používá hydrofilní matrice (např. agarosa) modifikovaná hydrofobními oktylovými nebo fenylovými skupinami.

Hydrofobní interakce uplatňující se při HIC jsou poměrně slabé, takže proteiny si ve většině případů zachovávají svoji nativní konformaci. Pro eluci se používají gradienty látek, které postupně zeslabují hydrofobní interakce. Obvykle to bývají vodné pufrы s klesající koncentrací solí, nebo stoupající koncentrací detergentu, stoupajícím pH atd. Hydrofobní interakce jsou silnější při vysokých koncentracích solí – vysolovací efekt.

3.4.6. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je separační technika využívající schopnost řady látek, vyskytujících se v přírodě, specificky rozpoznat jiné molekuly. Tyto látky jsou tedy vzájemně biospecifické. Afinitní chromatografie je formou adsorpční chromatografie a je založena na specifických a reversibilních interakcích mezi dvěma biologicky aktivními látkami. Obecně lze využít páry enzym – substrát, enzym – inhibitor, enzym – kofaktor, antigen – protilátka, hormon – receptor, lektin – sacharid, nukleová kyselina – protein, interakce využívající principu párování bazí v nukleových kyselinách apod.

Příprava stacionární fáze pro afinitní chromatografii zahrnuje výběr vhodného nosiče, vhodného afinantu a výběr vhodného způsobu vazby nosiče na afinant.

Jako nosiče pro afinitní chromatografii se osvědčily hlavně polysacharidové gely (Sepharosy, Pharmacia), které mají velmi dobré průtokové vlastnosti, velký povrch, velké póry, jsou mechanicky a chemicky odolné a hydrofilní. Používají se i polyakrylamidové gely, celulosy, porézní skla, či glykolmethakrylátový gel (Spheron).

Afinantem může být substrát, koenzym, inhibitor, hormon, léčivo, oligosacharid, lektin, protilátky, antigeny, histony, DNA nebo syntetické polynukleotidy.

Jedna z dvojice biomolekul je imobilizována na povrchu inertního nosiče a označuje se jako bioligand. Protéká-li námi separovaná látka kolonou, v níž je imobilizovaný bioligand umístěn, bude separovaná látka na koloně zadržována vytvořením komplexu biomolekula – bioligand. Látky postrádající afinitu k bioligandu projdou kolonou bez zadržení. Navázaná molekula se uvolní z kolony elucí specifickou (kompetující molekulou), či nespecifickou (změnou pH) elucí, při níž komplex biomolekula – bioligand přestává být stabilní a biomolekula se desorbuje z kolony. Afinitní chromatografie má široké využití. Ovšem jen za předpokladu splnění několika jednoduchých požadavků:

-Musí existovat možnost navázat jednu z komponent na nerozpustnou matici bez porušení schopnosti tvořit ligand.

-Nespecifické interakce s maticí by měly být minimální nebo žádné.

-Musí existovat možnost eluovat adsorbovanou látku ze sloupce, aniž by došlo ke znehodnocení jednoho nebo druhého.

- Nosič by měl být nerozpustný, mechanicky pevný, s velkou porozitou, chemicky odolný a musí obsahovat funkční skupiny pro vazbu ligandu.

4. VÝSLEDKY

4.1. PURIFIKAČNÍ KROKY PŘI IZOLACI NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY

4.1.1. Ionexová chromatografie

4.1.1.1. Chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy

Pro izolaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasy z cytosolární frakce kvasinky *Candida tropicalis* bylo nejprve použito kapalinové chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy. Poté jsme dialysovali frakce, ve kterých byla detekována fenolhydroxylasová aktivita, z důvodu odstranění NaCl, jehož gradient byl použit pro eluci proteinů (včetně fenolhydroxylasy) obsažených v cytosolu *C. tropicalis*.

Následovala rechromatografie na sloupci DEAE Sepharosy a frakce vykazující fenolhydroxylasovou aktivitou byly opět dialysovány.

Na základě výsledků metody HPLC (viz kapitola 3.3.2), z nichž je patrné, že množství oxidovaného fenolu neodpovídá množství vzniklého katecholu bylo zjištěno, že jen použitím chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy není možné získat čistý preparát NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, který by zároveň neobsahoval katechol-1,2-dioxygenasu, která vznikající katechol dále oxiduje.

Následně se tedy náš výzkum zaměřil na další purifikační kroky. Jeho cílem bylo posouzení, která metoda purifikace je nejúčinnější pro separaci výše zmíněných enzymů.

4.1.2. Gelová permeační chromatografie

Z důvodu neurčitosti stáří používaných nosičů stacionární fáze (gelů) bylo nejprve nutné jednotlivé kolony zkalibrovat. Tato kalibrace nám také umožní s větší přesností provést samotnou separaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasy od katechol-1,2-dioxygenasy a ostatních proteinů, obsažených v lyofilizátu.

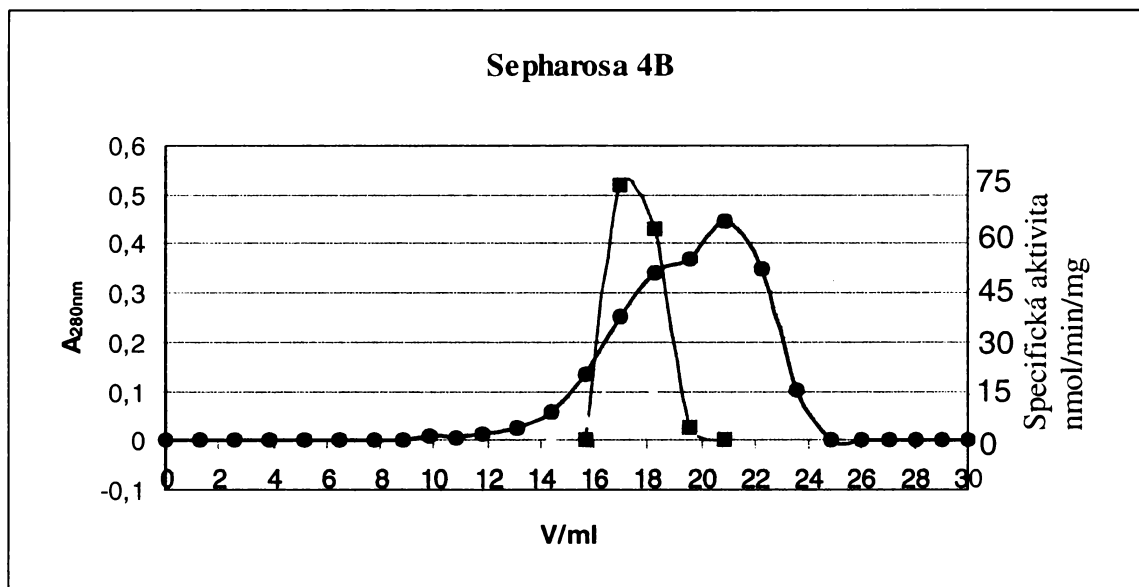
4.1.2.1. Chromatografie na sloupci Sepharosy 4B

Sepharosa 4B byla kalibrována pomocí katalasy ($M_r = 250\ 000$), roztokem glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (100 mg/4,59 ml, $M = 144\ 000$), křenovou peroxidasou ($M = 40\ 000$) a cytochromem c ($M = 12\ 500$).

Vzorky byly nanášeny na kolonu za nulového průtoku mobilní fáze. Aplikováno bylo vždy 5 mg vzorku rozpuštěného ve 100 μ l 50 mM Na-fosfátového pufru pH 7,6.

Proteiny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6) a průtok byl nastaven na 0,34 ml/min. Frakce byly jímány automatickým sběračem po 1 ml.

Na připravenou kolonu bylo nanášeno 0,01 g lyofilizátu (částečně purifikovaných proteinů, získaných z cytosolu *C. tropicalis*) rozpuštěného ve 150 μ l Na-fosfátového pufru při nulovém průtoku. Bílkoviny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6) a průtoková rychlost byla nastavena na 0,6 ml za minutu. Průběh gelové permeační chromatografie a specifickou aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylasy (katechol-1,2-dioxygenasy) v jednotlivých frakcích zachycuje Obr.7.



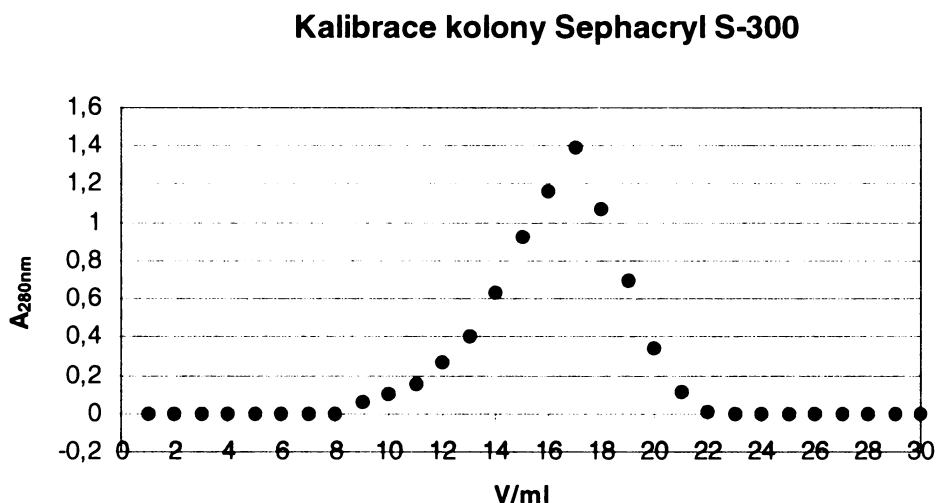
Obr.7. Chromatografie proteinů cytosolu kvasinky *C. tropicalis* na sloupci Sepharosy 4B a znázornění specifické aktivity enzymů NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy.

Ve frakcích obsahujících proteiny byla stanovena fenolhydroxylasová a katecholdioxygenasová aktivita pomocí HPLC. Frakce 14 až 21 vykazující fenolhydroxylasovou aktivitu byly spojeny, rozděleny do mikrozkušavek po 200 μ l a rychle zmrazeny v kapalném dusíku. Následně byly tyto enzymové preparáty skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další purifikaci a charakterizaci.

4.1.2.2 Chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300

Kolona se sloupcem Sephacrylu S-300 byla kalibrována pomocí katalasy ($M_r = 250\ 000$), roztoku glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (100 mg/ 4,59 ml, $M_r = 144\ 000$), křenové peroxidasy ($M_r = 40\ 000$) a cytochromu c ($M_r = 12\ 500$).

Vzorky byly aplikovány na kolonu za nulového průtoku mobilní fáze. Naneseno bylo vždy 5 mg proteinu rozpuštěného v 100 μ l 50 mM Na-fosfátového pufru pH 7,6. Proteiny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6) a průtok byl nastaven na 0,17 ml/min. Frakce byly jímány automatickým sběračem po 1 ml. Průběh kalibrace kolony zachycuje Obr.8.

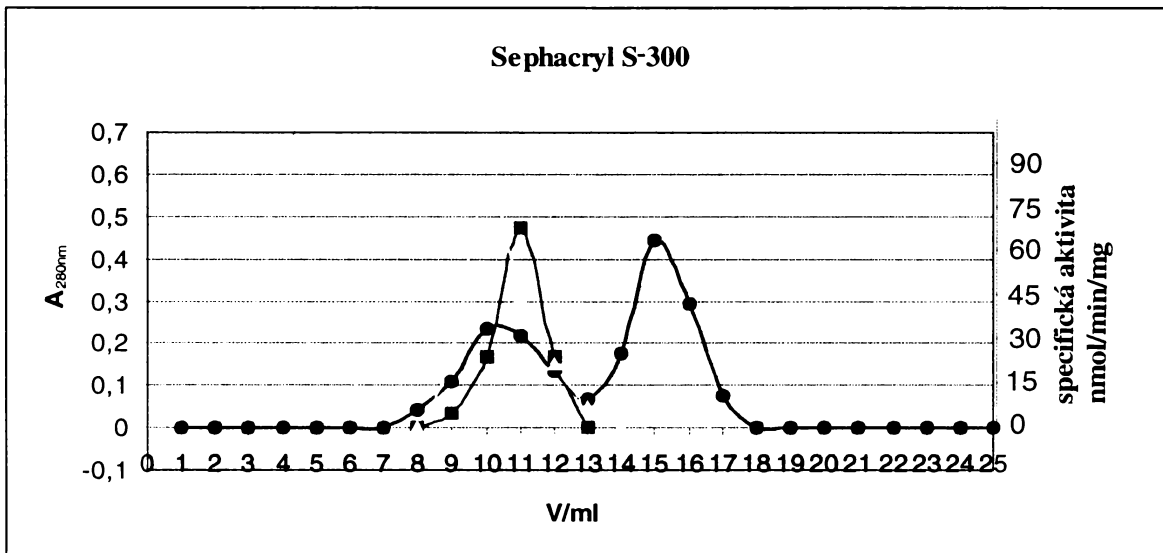


Obr.8. Kalibrace kolony Sephacryl S-300

Na připravenou a promytou kolonu jsme nanесли za nulového průtoku 0,01 g lyofilizátu (částečně purifikovaných proteinů, získaných z cytosolu *C. tropicalis*) rozpuštěného ve

150 μ l Na-fosfátového pufru. Průtok byl nastaven na 0,13 ml/min, bílkoviny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6). Ve frakcích obsahujících proteiny (frakce 8-17) byla stanovována fenolhydroxylasová aktivita pomocí metody HPLC.

Průběh gelové permeační chromatografie a specifickou aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylasy (resp. katechol-1,2-dioxygenasy) v jednotlivých frakcích zachycuje Obr.9.



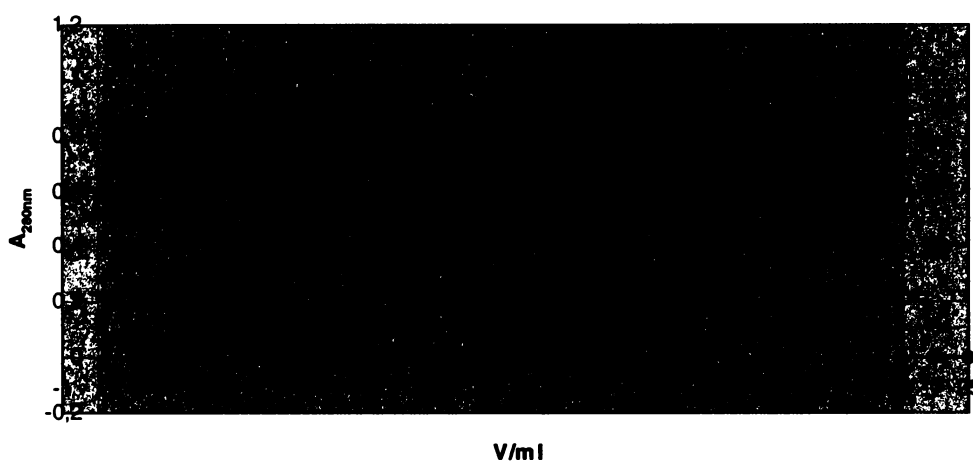
Obr.9 Chromatografie proteinů cytosolu kvasinky *C. tropicalis* na sloupci Sephacrylu S-300 a znázornění specifické aktivity enzymů NADPH-oxymenoloxidasy a katechol-1,2-dioxygenasy.

4.1.2.3. Chromatografie na sloupci Sephadexu G-100

Kolona se Sephadexem G-100 byla kalibrována pomocí katalasy ($M_r = 250\ 000$), roztoku glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (100 mg/ 4,59 ml, $M_r = 144\ 000$), křenové peroxidasy ($M_r = 40\ 000$) a cytochromu c ($M_r = 12\ 500$).

Vzorky byly nanášeny na kolonu za nulového průtoku. Aplikováno bylo vždy 5 mg vzorku rozpuštěného ve 100 μ l 50 mM Na-fosfátového pufru pH 7,6. Proteiny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým puftrem (pH 7,6) a průtok byl nastaven na 0,29 ml/min. Frakce byly jímány automatickým sběračem po 1ml. Průběh kalibrace kolony zachycuje Obr.10.

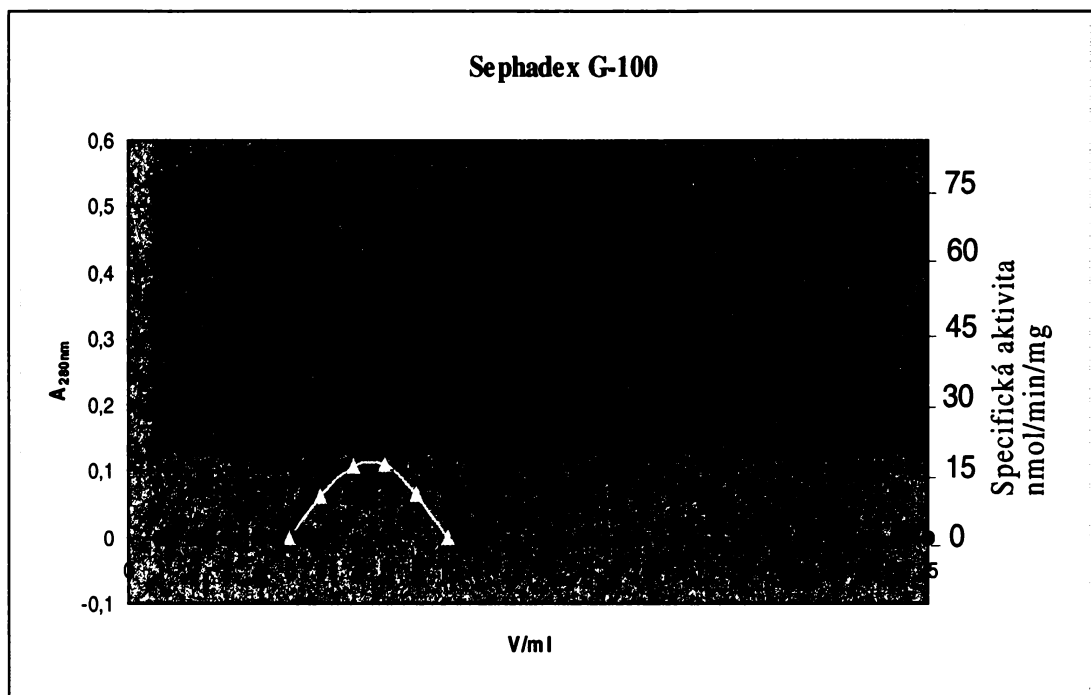
Kalibrace kolony Sephadex G-100



Obr.10. Kalibrace kolony Sephadex G-100

Na připravenou a promytou kolonu jsme nanесли za nulového průtoku mobilní fáze 0,01 g lyofilizátu rozpuštěného ve 100 μ l Na-fosfátového pufru. Průtok byl nastaven na 0,24 ml/min, bílkoviny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým pufrem (pH 7,6). Ve frakcích obsahujících proteiny (frakce 6-18) byla měřena fenolhydroxylasová aktivita pomocí metody HPLC.

Průběh gelové permeační chromatografie a specifickou aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylasy (resp. katechol-1,2-dioxygenasy) v jednotlivých frakcích zachycuje Obr.11.



Obr.11. Chromatografie proteinů cytosolu kvasinky *C. tropicalis* na sloupci Sephadexu G-100 a znázornění specifické aktivity enzymů NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy.

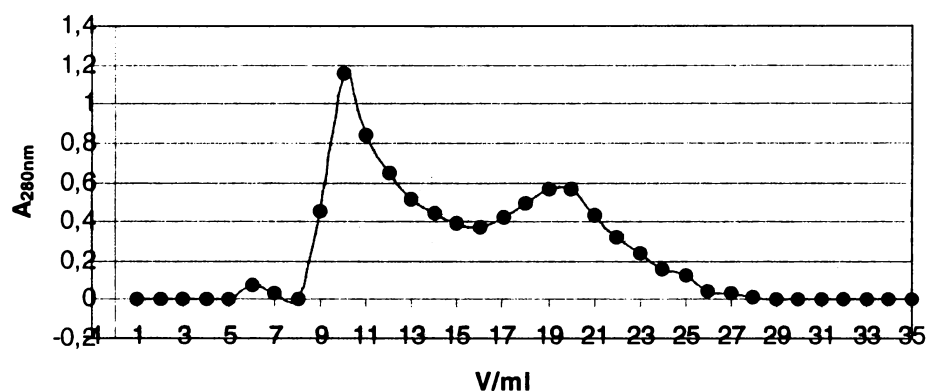
Vzorky získané gelovou permeační chromatografií na sloupci Sephadexu G-100 byly podrobeny SDS-PAGE elektroforéze. Výsledky jsou přehledně znázorněny na Obr.14.

4.1.2.4. Chromatografie na sloupci Sephadexu G-75

Kolona se Sephadexem G-75 byla kalibrována pomocí katalasy ($M_r = 250\ 000$), roztoku glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (100 mg/ 4,59 ml, $M_r = 144\ 000$), křenové peroxidasy ($M_r = 40\ 000$) a cytochromu c ($M_r = 12\ 500$).

Vzorky byly nanášeny na kolonu za nulového průtoku mobilní fáze. Bylo nanášeno vždy 5 mg proteinů rozpuštěných ve 100 μ l 50mM Na-fosfátového pufru pH 7,6. Proteiny byly eluovány 50 mM Na-fosfátovým puforem (pH 7,6) a průtok byl nastaven na 0,67 ml/min. Frakce byly jímány automatickým sběračem po 1 ml. Průběh kalibrace kolony zachycuje Obr.12.

Kalibrace kolony Sephadex G-75

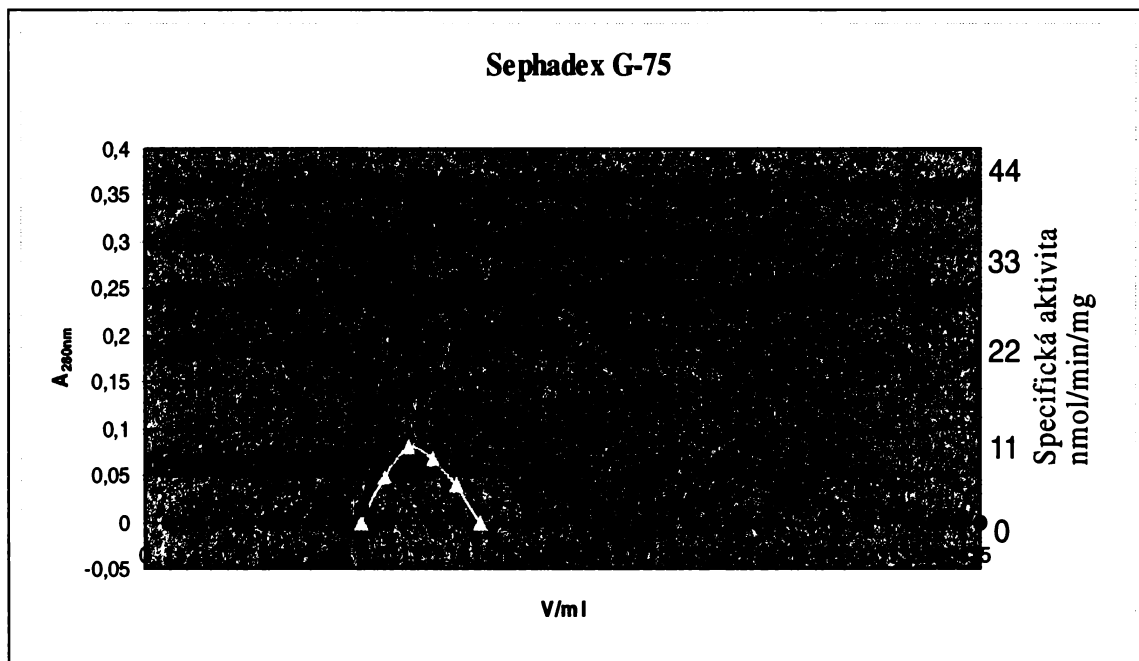


Obr.12. Kalibrace kolony Sephadex G-75

Na připravenou a promytou kolonu jsme nanесли za nulového průtoku mobilní fáze 0,01 g lyofilizátu (částečně purifikovaných proteinů, získaných z cytosolu *C. tropicalis*) rozpuštěného ve 100 μ l Na-fosfátového pufru.

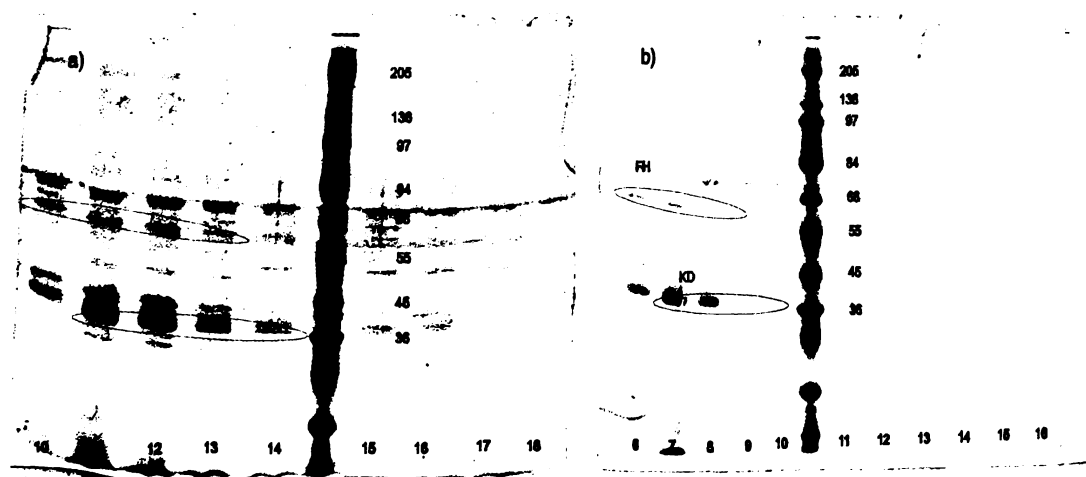
Průtok byl nastaven na 0,63 ml/min, bílkoviny byly vymývány 50 mM Na-fosfátovým pufrům (pH 7,6). Ve frakcích obsahujících proteiny (frakce 9-31) byla měřena fenolhydroxylasová aktivita pomocí metody HPLC.

Průběh gelové permeační chromatografie a specifickou aktivitu NADPH-dependentní fenolhydroxylasy (catechol-1,2-dioxygenasy) v jednotlivých frakcích zachycuje Obr.13.



Obr.13. Chromatografie proteinů cytosolu kvasinky *C. tropicalis* na sloupci Sephadexu G-75 a znázornění specifické aktivity enzymů NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy.

Vzorky získané gelovou permeační chromatografií na sloupci Sephadexu G-75 byly podrobeny SDS-PAGE elektroforéze. Výsledky jsou přehledně znázorněny na Obr.14.



Obr.14. Výsledky SDS-PAGE elektroforézy po gelové permeační chromatografii: a) na sloupci Sephadex G-75, b) na sloupci Sephadex G-100.

4.1.3. Chromatografie s hydrofobní interakcí

Pro hydrofobní chromatografii byla jako nosič zvolena Phenyl Sepharosa, o níž jsme předpokládali, že díky obsahu fenylových zbytků naváže NADPH-dependentní fenolhydroxylasu. Tento enzym byl poté z nosiče vymýván, za použití opačného gradientu, 1,5 M roztokem NaCl v 50 mM Na-fosfátovém pufru.

K vymytí enzymu ovšem nedošlo, protože zde nemohou být výsledky hydrofobní chromatografie uvedeny.

4.1.4. Afinity chromatografie

Jako nosič pro afinitní chromatografii byla použita Sepharosa s navázaným kofaktorem NAD^+ . Proteiny byly vymývány 1,5 M roztokem NaCl v 50mM Na-fosfátovém pufru, ve kterém byla postupně snižována koncentrace chloridu sodného. Výsledky chromatografie zde nejsou uvedeny, neboť nedošlo k navázání NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, a ta byla eluována společně s ostatními proteiny v prvních eluovaných frakcích.

5. DISKUZE

V důsledku bouřlivého rozvoje průmyslu a dopravy v současné moderní a globalizované společnosti, v životním prostředí neustále přibývá nežádoucích látek, které jsou rozptýleny v atmosféře, vodách i půdě. Tyto látky pak nepříznivě ovlivňují ekosystémy. Nejde však jen o polutanty z dopravy a odpadní látky průmyslových výroby, ale i jednotlivé výrobky se s časem přeměňují na odpad. Navíc sama společnost produkuje škodlivé odpady, odpadní vody apod. [1] Lidé jsou ve vzrůstající míře vystavováni vlivu nejrůznějším cizorodým chemikáliím (xenobiotikům), ať už jsou to léky, potravinářské chemikálie, nebo jiné látky znečišťující životní prostředí. [2]

Mezi zásadní environmentální polutanty patří také fenolické látky, které jsou pro většinu organismů toxické, pro vyšší organismy i genotoxické. Zdroje kontaminace fenolickými látkami jsou rozmanité. Do životního prostředí se dostávají z odpadních vod petrochemického (koksárny, plynárny), farmaceutického či chemického průmyslu a z výroby fungicidů, výbušnin a izolačních materiálů, zpracování celulózy atd. V 19. století se fenol v hojné míře používal při sterilizačních technikách v medicíně.

U mnohých mikroorganismů (prokaryotních i eukaryotních) byla zjištěna schopnost metabolizovat cizorodé látky a využívat je jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Jedním z těchto mikroorganismů je také kvasinka *Candida tropicalis*, u níž byla prokázána schopnost oxidovat fenol. [18]

Laboratoř, ve které byla tato bakalářská práce vypracována se výzkumem možností biodegradace fenolu enzymovými systémy kvasinky *C. tropicalis*, zabývá již několik let. [15]

Z předchozích výsledků pracovníků této laboratoře vyplývá, že kvasinka *C. tropicalis* využívá k biodegradaci fenolu dvou rozdílných enzymových systémů obsažených v mikrosomech a cytosolu tohoto mikroorganismu. Prvním z těchto enzymů (lokalizovaný v mikrosomech) je systém oxygenas se smíšenou funkcí obsahující cytochrom P450 (CYP) a jeho reduktasu (NADPH:CYP reduktasu). [23] Tento enzymový systém bude předmětem našich dalších výzkumů v brzké době. Druhým enzymem je NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, která je lokalizována v cytosolu *C. tropicalis*. [24] Izolací a purifikací právě tohoto enzymu se zabývá předkládaná bakalářská práce.

V předchozích publikacích pracovníků této laboratoře byly pro gelovou permeační chromatografii testovány jen nosiče Sepharosa 4B a Sephacryl S-300, pomocí kterých byly získány výsledky uspokojivé, ne však zcela optimální. [14,15,22,23,24]

Cílem předkládané bakalářské práce proto bylo srovnání chromatografických metod, které se užívají pro izolaci a purifikaci enzymů (v našem případě NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy), podílejících se na biodegradaci fenolu kvasinkou *Candida tropicalis*. Konkrétně se jednalo zejména o nosiče Sephadex G-100, Sephadex G-75, Sepharosu 4B a Sephacryl S-300, používané při gelové permeační chromatografii.

Ve frakcích získaných z jednotlivých chromatografických metod byl stanovován obsah proteinů spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm a pomocí SDS-PAGE elektroforézy, kde bylo jako srovnávacího vzorku použito standardu „Wide Range“. Dále pak byla stanovována aktivita NADPH-dependentní fenolhydroxylasy (resp. katechol-1,2-dioxygenasy) úbytkem fenolu resp. tvorbou katecholu (u NADPH-dependentní fenolhydroxylasy) a úbytkem katecholu (u katechol-1,2-dioxygenasy) pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Jako základní krok purifikace těchto enzymů byla zvolena kapalinová iontoměničová chromatografie na sloupci DEAE Sepharosy. Tímto purifikačním krokem dochází ke značnému přečištění NADPH-dependentní fenolhydroxylasy. Rechromatografie na tomto nosiči pak dále významně zvýšila specifickou aktivitu izolované NADPH-dependentní fenolhydroxylasy. Oba tyto purifikační kroky však neřešily problém separace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy od katechol-1,2-dioxygenasy.

K další purifikaci byla použita hydrofóbní chromatografie na sloupci Phenyl Sepharosy. Tato metoda se ovšem pro purifikaci enzymů neosvědčila, neboť se nepodařilo zafixovaný enzym z kolony pomocí roztoku 1,5 M NaCl v 50mM Na-fosfátovém pufru vymýt. Příčina příliš pevné vazby k nosiči bude předmětem dalších výzkumů.

Pro afinitní chromatografii zřejmě nebyl zvolen vhodný nosič, neboť nedošlo k navázání NADPH-dependentní fenolhydroxylasy, a ta protekla společně s ostatními proteiny obsaženými ve vzorku v čele eluovaných frakcí.

Z gelových permeačních chromatografií se nejvíce osvědčila chromatografie na sloupci Sephadexu G-75. Z přiložených výsledků totiž vyplývá (a to i vzhledem k předchozím zkušenostem), že jako jediná dokáže separovat NADPH-dependentní fenolhydroxylasu od

katechol-1,2-dioxygenasy. Během našeho měření byla sice pouze v jedné frakci detekována čistá NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, to bylo ale pravděpodobně způsobeno nedostatečnou délkou použité chromatografické kolony.

Chomatografie na sloupci Sephacrylu S-300 se rovněž pro purifikaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasy osvědčila. Ze stanovení aktivit jednotlivých frakcí sice vyplývá, že v ani jedné měřené frakci nebyly oba enzymy od sebe úplně odseparovány, avšak byla zde zjištěna nejvyšší fenolhydroxylasová aktivita. Výsledky chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300 ovšem mohou být nepřesné, na což ukazuje kalibrační křivka tohoto sloupce, kde nedošlo k oddělení jednotlivých proteinů použitých ke kalibraci. To by mohlo být způsobeno přílišným stářím nosiče.

Sephadex G-100 odděluje oba enzymy výrazně hůře než Sephadex G-75. Ovšem i zde by příčina mohla být v nedostatečné délce použité kolony. Jeho účinnost by tedy mohla být srovnatelná s účinností Sephacrylu S-300.

Oproti prvním třem molekulovým sítům se efektivita dělení u Sepharosy 4B jeví vzhledem k dlouhodobým výsledkům jako nejméně vhodná.

Ani v jednom případě však nedošlo k úplnému oddělení enzymů NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy, z toho vyplývá že k plné purifikaci enzymů bude nutné užít ještě dalších purifikačních kroků.

6. ZÁVĚR

Cíl předkládané bakalářské práce byl splněn, neboť byly porovnány účinnosti jak jednotlivých chromatografických metod, tak i nosičů používaných pro gelovou permeační chromatografii. Dospěli jsme k poznatku, že použití gelové permeační chromatografie je pro purifikaci NADPH-dependentní fenolhydroxylasy a katechol-1,2-dioxygenasy nejvhodnější a to zejména při užití nosičů Sephadex G-100, Sephadex G-75 a Sephacryl S-300 jako nosičů.

K plné separaci námi sledovaných enzymů však bude nutné použití ještě dalších purifikačních metod, které budou nadále předmětem našeho výzkumu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Vodrážka Z., Biochemie [3], Academia, Praha 1993
- [2] Murray R. K., Granner D. K., Mayes P.A., Rodwell V.W., Harperova biochemie, 23.vydání, USA 2002
- [3] Trnka T., Klinotová E., Kotora M., Sejbal J., Organická chemie pro posluchače nechemických oborů, Universita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2003
- [4] Kolektiv autorů, Biochemie Základní kurz, Universita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2005
- [5] Tichý M., Toxikologie pro chemiky, Universita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2003
- [6] Mc Murry J., Organic chemistry, šesté vydání, USA 2003
- [7] www.nsc.org (National Safety Council)
- [8] Koturi G., Robinson C. V.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 539 (1991)
- [9] Hensel, Z., Straube G.: Ant. Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 57, 33 (1990)
- [10] Dong, X., Ballou, D. P., Masery, V.: Biochemistry 40, 12369 (2001)
- [11] Prokeš J., Základy toxikologie II, Karolinum, str. 7, 40 (1998)
- [12] Vohlídal, J., Chemické tabulky, Praha 1982
- [13] Gel filtration theory and praxis, Pharmacia fine chemicals, Pharmacia
- [14] Vilímková L., Diplomová práce, PřF UK (2005)
- [15] Páca J., Doktorská disertační práce, PřF UK (2005)
- [16] Anzerbacher P., Kovář J., Metody chemického výzkumu pro biochemiky, Ministerstvo školství ČSR, Praha 1986
- [17] Káš J., Kodíček M., Valentová O., Laboratorní cvičení z biochemie, Olomouc, s.r.o., Olomouc 2000
- [18] Krug, M., Straube, G.: J. Basic. Microbiol., 26, 271 (1986)
- [19] Estabrook, R. W., Cooper, D. Y. Rosenthal, O.: Biochem. Z. 388, 741-747 (1963)
- [20] Cooper, D. Y., Levin, S. S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., Estabrook, R. W.: Science 147, 400 (1965)
- [21] Barthová J., Sofrová D., Tichá M., Základní praktikum z biochemie, str.67, Karolinum, Praha 1984
- [22] Kremláčková V., Diplomová práce, PřF UK (2005)

- [23] Stiborová M., Suchá V., Mikšanová M., Páca J. Jr., Páca J., *Gen. Physiol. Biophys.* 22, 167, 184, 185, 197 (2003)
- [24] Páca J. Jr., Suchá V., Turek M., Vilímková L., Kremláčková V., Páca J., Halecký M., Stiborová M., *Enzyme Microb. technol.* 40, 919, 920, 923, 926 (2007)

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK & SYMBOLŮ:

SO₂: oxid siřičitý

CO: oxid uhelnatý

HF: fluorovodík

HCl: chlorovodík

NO: oxid dusnatý

Cu: měď

Zn: zinek

Cd: kadmium

As: arsen

Hg: rtuť

A_{280 nm}: absorbance při 280 nm

BIS: N, N'-methylen-bis-akrylamid

BSA: hovězí sérový albumin

CYP: cytochrom P450

cyt c: cytochrom c

DEAE Sepharosa: diethylaminoethyl Sepharosa

FAD: flavinadenindinukleotid

FMN: flavinmononukleotid

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)

kDa: kilodalton (násobek jednotky molekulové hmotnosti)

MFO: systém oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)

M_r: relativní molekulová hmotnost

NADPH: redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADH: redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

PEG: polyethylenglykol

PAPS: fosfoadenosinfosfosulfát

RH: obecné označení substrátu

ROH: obecné označení hydroxylovaného substrátu

RPM: otáčky za minutu

ρ₂₅: hustota při 25 °C

SDS: dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulphate)

SDS-PAGE: elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

TEMED: N, N, N', N'-tetramethyldiamin

T_t: teplota tání

T_v: teplota varu

TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethan

BHT: butylovaný hydroxytoluen

BHA: butylovaný hydroxyanisol

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno, Příjmení, Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------	----------	-----------------	----------