

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Klinická a toxikologická analýza



Jana Červinková

Vývoj metody kapilární elektroforézy pro stanovení fosforylovaných složek bakteriálních buněčných membrán

Development of capillary electrophoretic method for determination of phosphorylated components of bacterial cell membranes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce/Školitel: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha, 2011

Poděkování

Touto cestou si dovoluji poděkovat svému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za ochotu, praktické rady a připomínky a také za odborné vedení v průběhu práce. Mé velké poděkování dále patří RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, dále za trpělivost a ochotu, s jakými mě provázela během mé práce na Katedře genetiky a mikrobiologie, a také jí velmi děkuji, že jsem mohla poznat nové prostředí a naučit se novým technikám.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením příslušného vedoucího bakalářské práce a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu, které jsem správně a úplně citovala. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
podpis

Název práce: Vývoj metody kapilární elektroforézy pro stanovení fosforylovaných složek bakteriálních buněčných membrán

Autor: Jana Červinková

Katedra (ústav): Katedra analytické chemie

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Abstrakt: Obsahem práce je provedení úvodní literární rešerše o metodách analýzy a stanovení fosforylovaných látek přítomných v cytoplazmatické membráně bakterií. Jedná se především o majoritní fosfatidylglycerol, kardiolipin a fosfatidylethanolamin a minoritní fosfatidylserin, kyselinu fosfatidovou a lysylfosfatidylglycerol. Tyto látky jsou spolu s mastnými kyselinami hlavní stavební součástí buněčných membrán a lze je do určité míry používat buď na identifikaci druhů bakterií, nebo na studium chování bakterií za různých podmínek. Pro jejich stanovení bude vyvinuta analytická metoda založená na částečně či zcela nevodné kapilární elektroforéze se spektrofotometrickou detekcí. V rámci bakalářské práce by měly být nalezeny optimální experimentální podmínky separace standardů vybraných látek.

Klíčová slova: fosforylované látky, bakteriální cytoplazmatická membrána, kapilární elektroforéza, tenkovrstvá chromatografie, *Bacillus subtilis*.

Title: Development of capillary electrophoretic method for determination of phosphorylated components of bacterial cell membranes

Author: Jana Červinková

Department: Department of analytical chemistry

Supervisor: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Abstract: The bachelor work reviews the present state of knowledge of the analyses and determination of phosphorylated compounds present in the bacterial cell membranes. This group of compounds is represented mainly by phosphatidylglycerol, cardiolipine, and phosphatidylethanolamine and minority phosphatidylserine, phosphatidic acid and lysylphosphatidylglycerol. Together with fatty acids these substances are the main components of cell membranes and they could be, to a certain degree, applied to either identification of bacteria or the study of bacterial behaviour at different conditions. Partially or fully non-aqueous capillary electrophoresis analytical method with spectrophotometric detection would be developed for their determination. Optimum experimental conditions for the separation of standards of selected compounds should be found within the framework of the bachelor thesis.

Keywords: phosphorylated compounds, bacterial cytoplasmic membrane, capillary electrophoresis, thin layer chromatography, *Bacillus subtilis*.

OBSAH

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.2 Cytoplazmatická membrána	10
2.2.1 Chemické složení cytoplazmatické membrány	11
2.2.2 Fosfolipidy bakteriální membrány <i>B. subtilis</i>	11
2.2.3 Struktura fosfolipidů	11
2.2.4 Mastné kyseliny bakteriálních fosfolipidů	12
2.2.5 Biosyntéza fosfolipidů.....	13
2.2.6 Faktory ovlivňující složení cytoplazmatické membrány	15
2.3 Metody analýzy fosfolipidů a jejich polárních částí	16
2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie	16
2.3.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	17
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Tenkovrstvá chromatografie	20
3.1.1 Materiál a metody.....	20
3.1.2 Kultivace <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	20
3.1.2.1 Příprava inokula a vlastní kultivace.....	21
3.1.3 Izolace lipidové frakce	21
3.1.4 Analýza lipidových extraktů chromatografií na tenké vrstvě	22
3.1.4.1 Chromatografie na tenké vrstvě.....	22
3.1.4.2 Kvalitativní a kvantitativní stanovení lipidického fosforu	22
3.2 Kapilární zónová elektroforéza	23
3.2.1 Materiál, metody a přístroje	23
3.2.2 Vlastní měření	24
3.2.2.1 UV/VIS spektra.....	24
3.2.2.2 CZE.....	24
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	26
4.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	26
4.1.1 Kvalitativní analýza.....	26

4.1.2	Kvantitativní analýza.....	28
4.2	Kapilární elektroforéza.....	30
4.2.1	UV/VIS spektra.....	30
4.2.2	CZE	31
5	ZÁVĚR.....	33

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AG3PAT	1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferáza
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozintrifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CDP-diglycerid	cytidin-5-fosfát-diglycerid
CL	kardiolipin
CTP	cytidintrifosfát
CZE	kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
DAD	diodový detektor (Diode-Array Detektor)
DAG	diacylglycerol
E	intenzita elektrického pole
EOF	elektroosmotický tok (Electroosmotic Flow)
G3P	glycerol-3-fosfát
G3PAT	glycerol-3-fosfát acetyltransferáza
G3PD	glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
OD	optická denzita
PA	kyselina fosfatidová
PE	fosfatidylethanolamin
PG	fosfatidylglycerol
PGP	fosfatidylglycerolfosfát
PS	fosfatidylserin
PS dekarboxyláza	fosfatidylserin dekarboxyláza
PS syntetáza	fosfatidylserin syntetáza
Q_i	celkový náboj částice i
r_i	poloměr látky i
R_f	retenční faktor
Rpm	počet otáček za minutu (rounds per minute)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast záření

v_{ef}	elektroforetická rychlost
μ_{ef}	elektroforetická pohyblivost
η	dynamická viskozita
ϵ_r	relativní permitivita roztoku
ξ	zeta-potenciál (elektrokinetický potenciál)
λ	vlnová délka

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Biomembrány, nepostradatelné komponenty buněk, jsou organizované shluky fosfolipidů a proteinů s malým množstvím vázaných cukrů. Udělují buňkám tvar a regulují složení vnitrobuněčného prostředí tím, že řídí transport látek (živin, odpadních látek, iontů) dovnitř a ven z buňky, s čímž se pojí i její ochrana. Na membránách se odehrává i mnoho základních procesů: transport elektronů a oxidační fosforylace, oxidace živin za současné tvorby ATP, uskutečňuje se zde syntéza a hydrolýza fosfolipidů atd. Díky membránám s navázanými specifickými receptory dochází ke zpracování informací a mezibuněčné komunikaci.

Fosfolipidy, nepostradatelné složky cytoplazmatických membrán, tvoří fosfolipidové dvojvrstvy, a jinde se prakticky nevyskytují. Skládají se z polární a nepolární části. Nepochopitelná část je tvořena dvěma dlouhými uhlovodíkovými řetězci zbytků mastných kyselin a polární část v poloze C_3 *sn*-glycerolu, tzv. hlava fosfolipidu, je odvozena od alkoholu.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá buněčnou membránou prokaryotních buněk, konkrétně pak fosfolipidovým složením bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Tuto bakterii jsem si zvolila, protože je to modelová nepatogenní bakterie běžně využívaná v laboratořích. *Bacillus subtilis* je grampozitivní sporulující tyčinkovitá bakterie, která se vyskytuje v půdě. Pro cytoplazmatickou membránu této bakterie je typické následující fosfolipidové složení: fosfatidylglycerol, kardiolipin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, kyselina fosfatidová a lysofosfolipidy. Zastoupení jednotlivých fosfolipidů se mění se změnou environmentálních podmínek. Nejvýznamnějšími faktory ovlivňujícími složení membrány jsou: pH média, kultivační teplota a fáze růstu. Protože se fosfolipidové složení mění v závislosti na druhu bakterií a také v závislosti na již zmíněných podmínkách prostředí, lze tímto způsobem buď identifikovat jednotlivé druhy bakterií, nebo studovat chování bakterií za různých podmínek, k čemuž jsou zapotřebí vhodné analytické metody.

Pro mikrobiologické účely se ke kvalitativní i kvantitativní analýze běžně využívá chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC). TLC má dost široké využití, neboť se jedná o jednoduchou a lacinou techniku, která vyžaduje minimální instrumentaci a běžně se používá pro separace jednoduchých směsí a identifikaci či semikvantitativní vizuální analýzu vzorků.

Metoda je založená na dělení fosfolipidů na styku dvou fází – mobilní a stacionární. Jako stacionární fáze slouží silikagel a mobilní fáze je směsí rozpouštědel o různé polaritě. Kvalitativní analýza spočívá ve stanovení celých fosfolipidových molekul (polárních i nepolárních částí) a následné detekci skvrn těchto látek vhodným činidlem. Kvantitativní analýza je ovšem trochu složitější záležitostí, jenž spočívá ve vyškrábání skvrny analyzovaného fosfolipidu z tenké vrstvy silikagelu, následuje mineralizace vhodným rozpouštědlem, čímž dojde k převedení organického fosfátu na anorganický (zůstane pouze polární hlava fosfolipidu) a nakonec se spektrofotometricky určí koncentrace analytu.

Jak již bylo uvedeno, jednoduchost, minimální instrumentace a další vlastnosti patří k pozitivům této běžně využívané metody. V klasickém uspořádání TLC navíc může být na

jedné desce rozlišeno i více než 10 složek. Ovšem i TLC má stejně jako ostatní analytické metody své nevýhody. Mezi ně můžeme řadit např. obtížné určení reprodukovatelných hodnot retenčních faktorů (R_f) při kvalitativní analýze, zejména pokud stacionární fáze, mobilní fáze a její páry nejsou v rovnováze. Neméně důležitou roli hrají kapilární síly, které jsou hnací silou mobilní fáze. Další nevýhodou metody při stanovení fosforylovaných látek, může být nepřímá kvantitativní analýza, která spočívá ve vyškrábání skvrny z tenké vrstvy silikagelu. Celá metoda je navíc časově náročná a také závislá na pečlivosti a zručnosti pracovníka.

Náplní mé bakalářské práce je vyvinout vhodnou analytickou metodu, kterou by bylo možné jednoduše stanovit právě tyto polární části fosfolipidů, zvané fosforylované sloučeniny (např. z fosfolipidu fosfatidylethanolaminu stanovit fosfoethanolamin). Jako vhodná metoda se jeví kapilární elektroforéza, protože je to vysoce selektivní a účinná metoda, kterou lze analyzovat látky iontové povahy v komplikovaných maticích. Mezi další výhody této metody se mohou řadit: dobrá účinnost separace, rychlost analýzy a malá spotřeba vzorků a činidel. Nevýhodami jsou menší reprodukovatelnost a nižší citlivost.

Obecným cílem práce je tedy produkce dostatečného množství fosfolipidů pro analýzu, izolace lipidových extraktů z bakteriální biomasy *Bacillus subtilis* ATCC 21332, kvalitativní stanovení fosfolipidů metodou tenkovrstvé chromatografie (TLC), kvantitativní analýza fosforylovaných látek a také příprava biologických vzorků. Dalším cílem je nalezení vhodných experimentálních podmínek pro kapilární elektroforézu pomocí vybraných standardů: fosfoserinu, fosfoethanolaminu a fosfocholinu. Tato metoda by měla do budoucna sloužit jako univerzální metoda pro stanovení jakýchkoliv fosforylovaných látek. Poté by měla následovat analýza reálných vzorků fosforylovaných složek získaných izolací z membrány *B. subtilis* metodou kapilární elektroforézy a porovnání výsledků s hodnotami získanými z TLC. A posledním cílem je snaha o stanovení celých fosfolipidů, tj. jejich polárních i nepolárních částí, právě metodou kapilární elektroforézy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je sporulující aerobní tyčinkovitá bakterie, běžně se vyskytující v přírodě, zejména v půdě. Jakožto zástupce grampozitivních bakterií patří mezi nejlépe prostudované organismy s osekvenovaným genomem. Proto slouží jako modelová bakterie, podobně jako u gramnegativních bakterií *Escherichia coli* [1]. Bakterie je poměrně velká o délce 1,8 – 4,8 μm a šířce 0,9 – 1,1 μm [2]. Důležitým znakem této bakterie je schopnost za nepříznivých podmínek vytvářet velmi odolná klidová stádia - endospory elipsoidního tvaru, které jsou vysoce rezistentní. Při sporulaci buňka získává energii především oxidací zásobních lipidů z cytoplazmy (kyselina poly- β -hydroxymáselná) [3]. Endospory vznikají uvnitř mateřské buňky, vždy jen jedna spora v jedné buňce. Po vytvoření endospory se původní mateřská buňka rozpustí a zůstane volná spora [2]. Tvorba endospor je důležitá, neboť zajišťuje přežití bakterie za nepříznivých podmínek životního prostředí (teplo, radiace, dezinfekční činidla) [4]. Pokud má buňka vhodné podmínky pro růst, je schopná se zpět diferencovat na vegetativní buňku [2].

Bacillus subtilis se též využívá ve farmaceutickém průmyslu jako producent antibiotik polypeptidové povahy (např. bacitracin, gramicidin a polymyxin) a je považován za nízcce patogenní bakterii. Přestože může kontaminovat potraviny, je jen zřídka zodpovědný za otravu. Svými toxiny může vyvolat enterotoxikózu (akutní otrava z potravin), ale spíše se uplatňuje u lidí se sníženou imunitou. Dalším onemocněním typickým pro tuto bakterii je tzv. farmářská plíce (alergická reakce projevující se kašlem a dušností) [3].

2.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je tenká struktura na povrchu cytoplazmy, která ohraničuje buňku a udává tak její tvar [5]. Představuje 10-20 % suché hmotnosti bakterie a její tloušťka činí asi 8 nm [2]. Je také vysoce selektivní semipermeabilní osmotickou bariérou, umožňující regulaci transportu látek mezi vnitřním a vnějším prostředím, s čímž se pojí i ochrana buňky [5]. Protože se jedná o jedinečnou strukturu svého druhu v buňce, zajišťuje veškeré membránově vázané funkce a děje, které jinde probíhat nemohou [6]. Dochází na ní k tvorbě protonového gradientu. Za vznik gradientů jsou zodpovědné membránové proteiny. Na membráně je situován aparát fotosyntézy, respirační řetězec, ATP-asa i transportní proteiny, v membráně je zakotven bičík. Uskutečňuje se zde syntéza a hydrolýza fosfolipidů, dále poslední fáze syntézy buněčné stěny, resp. jejích složek: peptidoglykanu, teichoových kyselin, lipopolysacharidů i pouzdrových polysacharidů [2]. Vnější povrch cytoplazmatické membrány se mění v závislosti na druhu bakterie a také na působení environmentálních podmínek na buňku.

2.2.1 Chemické složení cytoplazmatické membrány

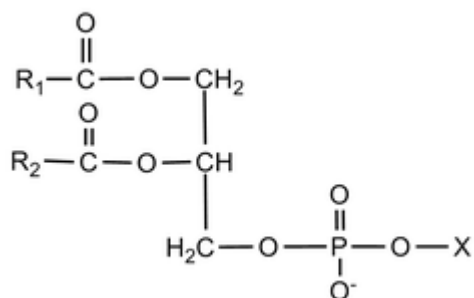
Cytoplazmatickou membránu tvoří proteiny a tekuté kontinuum dvojvrstvy fosfolipidů [2,5]. Jednotlivé molekuly lipidů se fosfolipidovou dvojvrstvou pohybují příčně, což se projevuje pružností a nepropustností dvojvrstvy pro vysoce polární molekuly. Z obou stran této dvojvrstvy mohou vstupovat proteiny globulární povahy [7]. Existují dva typy proteinů vázajících se na lipidovou dvojvrstvu, ke které jsou poutány různými silami: proteiny integrální (činí asi 70 až 80 % bílkovin membrány [2]), které prostupují lipidovou dvojvrstvou a jsou v ní vázány hydrofobními silami, a proteiny periferní, které se vážou k hydrofilní části povrchu buněčné membrány prostřednictvím slabých elektrostatických sil. Tyto periferní proteiny lze na rozdíl od integrálních uvolnit z membrány, aniž by došlo k poškození fosfolipidové dvojvrstvy, a to např. zvýšením iontové síly či nízkou koncentrací neiontových detergentů nebo chelátů [8]. Takovéto proteiny procházející dvojvrstvou buď částečně, nebo úplně vytvářejí mozaikovitou strukturu v tekuté dvojvrstvě fosfolipidů. Tato mozaika není statická, neboť proteiny mohou volně v obou směrech laterálně difundovat. Do jaké míry daný protein proniká do lipidové fáze, je podmíněno sekvencí aminokyselin a rozmístěním nepolárních aminokyselinových zbytků na jeho povrchu [7]. Většina membránových proteinů se nachází na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a bakteriální cytoplazmatická membrána je tedy stavebně i funkčně asymetrická [2].

2.2.2 Fosfolipidy bakteriální membrány *B. subtilis*

Fosfolipidy jsou charakteristickou a dominantní komponentou všech biologických membrán a jinde se prakticky nevyskytují [2]. U bakterie *Bacillus subtilis* jsou nejvíce se vyskytujícími fosfolipidy zejména: fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylethanolamin (PE) a kardiolipin (CL). V menší míře se pak vyskytují: fosfatidylserin (PS), kyselina fosfatidová (PA) a lysofosfolipidy [9].

2.2.3 Struktura fosfolipidů

Fosfolipidy (též fosfoglyceridy) jsou amfipatické molekuly s nepolárními alifatickými konci mastných kyselin a s polární fosforylovou hlavičkou v poloze C_3 *sn*-glycerolu (**Obr. 2-1**). Polární hlavičky jsou odvozeny od alkoholů. Nejjednodušší fosfoglyceridy jsou fosfatidové kyseliny. Další polární funkční skupinou je např. ethanolamin (PE), serin (PS), glycerol (PG) či difosfatidylglycerol (CL). U fosfoglyceridů je pravidlem, že se v poloze C_1 vyskytují nasycené mastné kyseliny, zatímco poloha C_2 je často obsazena nenasycenými mastnými kyselinami [10].

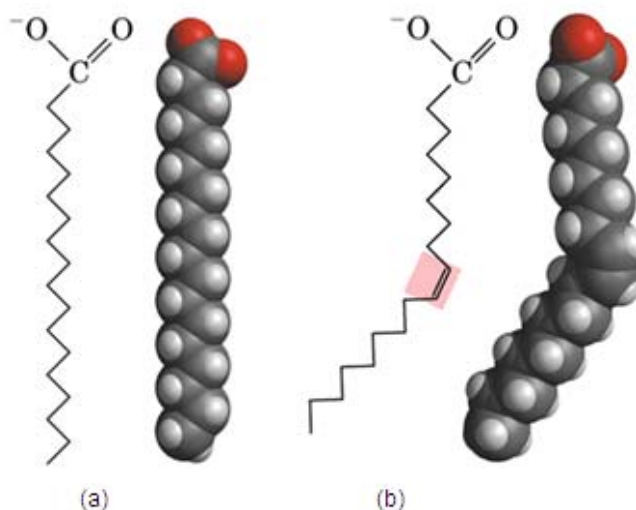


Obrázek 2-1 Obecný vzorec fosfolipidu¹ [11]

2.2.4 Mastné kyseliny bakteriálních fosfolipidů

Mastné kyseliny jsou nepostradatelnou součástí fosfolipidů, ve kterých tvoří nepolární část jejich molekuly. Díky polární hlavičce v poloze C_3 *sn*-glycerolu získává molekula amfipatický charakter, který ovlivňuje její funkci [10]. Pro bakterie je charakteristické, že u nich převládají nasycené mastné kyseliny nad nenasycenými (**Obr. 2-2**) [2].

Pro *B. subtilis* je typické, že se v jeho cytoplazmatické membráně hojně nacházejí rozvětvené mastné kyseliny v *iso*- a *anteiso*- konformaci, které se liší polohou methylové skupiny (CH_3), která se váže na místo vodíku na uhlíkovém atomu alifatického řetězce [12]. V případě *iso*- konformace CH_3 skupina substituuje vodíkový atom na předposledním uhlíku, zatímco při *anteiso*- konformaci se CH_3 skupina nachází na jiném než předposledním uhlíkovém atomu řetězce [10]. Majoritními mastnými kyselinami cytoplazmatické membrány *B. subtilis* jsou: *anteiso*- $C_{15:0}$, *iso*- $C_{15:0}$ a *anteiso*- $C_{17:0}$ [13].



Obrázek 2-2 Nasycená (a) a nenasycená (b) mastná kyselina [16]

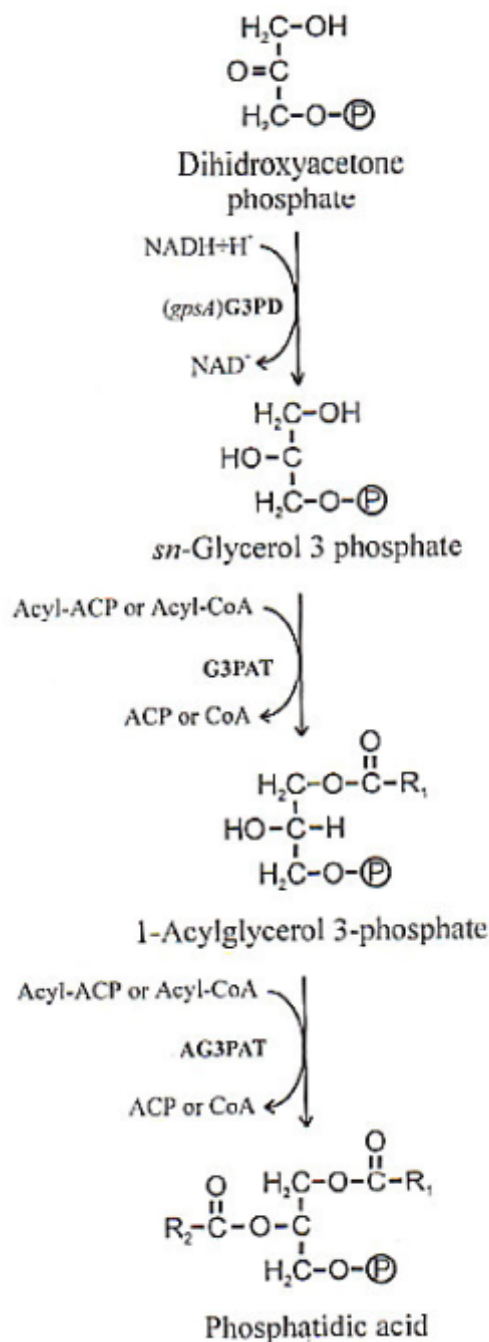
¹ R_1 a R_2 jsou dlouhé uhlovodíkové řetězce zbytků mastných kyselin a X tvoří polární hlavičku fosfolipidu.

Poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin je velmi proměnlivý. Jejich obsah se mění v závislosti na podmínkách kultivace a fázi růstu [14]. S tím souvisí to, že má-li cytoplazmatická membrána plnit četné životní funkce, musí mít určitý stupeň tekutosti, resp. tuhosti, který je ovlivňován charakterem membránových lipidů [2,15].

2.2.5 Biosyntéza fosfolipidů

Fosfolipidy bakteriální buňky jsou syntetizovány v cytoplazmatické membráně díky enzymům s katalytickou funkcí, které jsou ve většině případů integrálními membránovými proteiny orientovanými do cytoplazmy [17].

Biosyntéza fosfolipidů začíná vznikem kyseliny fosfatidové (PA). Syntéza PA vychází z dihydroxyaceton fosfátu a zahrnuje dvě acylace (**Obr. 2-3**). *Sn*-glycerol-3-fosfát je syntetizován pomocí enzymu glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (G3PD) a dále podléhá první acylaci za vzniku 1-acylglycerol-3-fosfátu. Acylace spočívá v zabudování karboxylové skupiny do polohy C_1 *sn*-glycerolu. Reakci katalyzuje enzym glycerol-3-fosfát acetyltransferáza (G3PAT). Následující reakcí dochází k druhé acylaci, která je katalyzována enzymem 1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferázou (AG3PAT). Během této reakce dochází k zabudování karboxylové skupiny do polohy C_2 *sn*-glycerolu. Touto reakcí vzniká kyselina fosfatidová, která slouží jako prekurzor pro všechny syntetizované fosfolipidy [1].

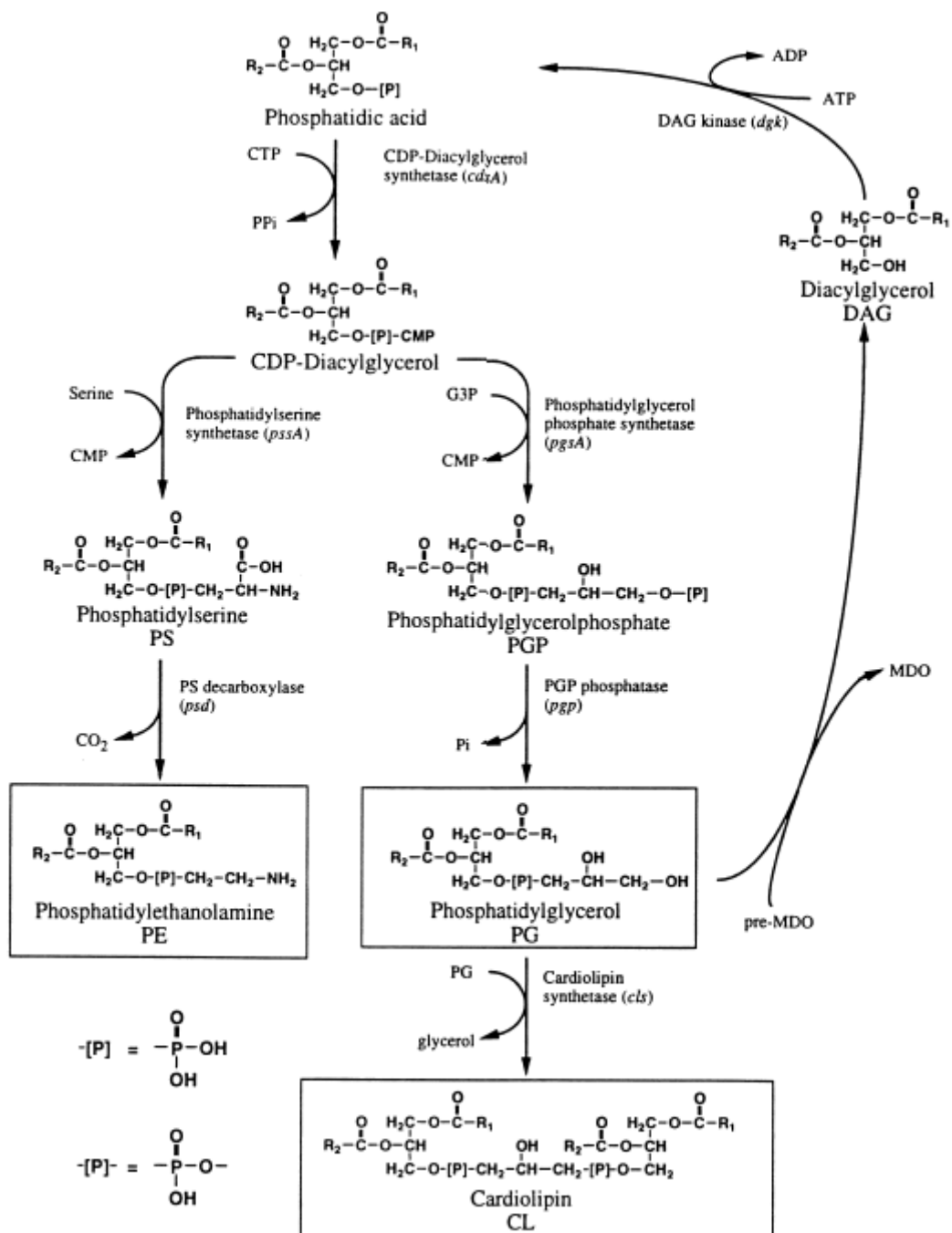


Obrázek 2-3
Biosyntéza kyseliny fosfatidové (PA) [1]

U *Bacillus subtilis* se PA vyskytuje ve stopovém množství, protože enzym CDP-diglyceridsyntetáza účinně přeměňuje PA na CDP-diglycerid za současné spotřeby CTP (cytidintrifosfát, CTP) (**Obr. 2-4**) [18,19]. Meziprodukt CDP-diglycerid dále podléhá dvěma různým reakcím, které vedou ke vzniku nejdůležitějších membránových fosfolipidů *B. subtilis*, k aminofosfolipidu fosfatidylethanolaminu (PE) a ke kyselým fosfolipidům fosfatidylglycerolu (PG) a kardiolipinu (CL). Při fyziologickém pH nese PE obojetný iont (kladný i záporný náboj), zatímco PG a CL nesou záporný náboj.

Syntéza PE v první fázi začíná vznikem intermediátu fosfatidylserinu (PS) z CDP-diglyceridu a serinu. Reakci katalyzuje enzym fosfatidylserin syntetáza [20], který musí být navázán na membránu, aby byl aktivní [21]. U grampozitivních bakterií je k cytoplazmatické membráně enzym PS syntetáza vázán velmi silně [22]. Po jeho syntéze je fosfatidylserin téměř okamžitě dekarboxylován specifickým enzymem PS dekarboxylázou za vzniku konečného produktu fosfatidylethanolaminu (PE) [23].

Prvním krokem při tvorbě kyselých fosfolipidů je syntéza fosfatidylglycerolfosfátu (PGP). Tento meziprodukt vzniká ze substrátů CDP-diglyceridu a glycerol-3-fosfátu (G3P) za současné katalýzy enzymem fosfatidylglycerol fosfát syntetázou [24]. Po jeho syntéze následuje okamžitá defosforylace na fosfatidylglycerol (PG) za účasti enzymu fosfatidylglycerolfosfát fosfatázy [25]. Kardiolipin (CL) poté vzniká kondenzací dvou molekul PG enzymem kardiolipin syntetázou [26]. Předěšlá reakce končí tvorbou diacylglycerolu (DAG), který je recyklován fosfolipidovou metabolickou drahou díky jeho konverzi na PA enzymem diacylglycerol kinázou [27].



Obrázek 2-4 Biosynetické dráhy vedoucí k hlavním fosfolipidovým třídám *E. coli* [18]

2.2.6 Faktory ovlivňující složení cytoplazmatické membrány

Fosfolipidové složení cytoplazmatické membrány je velmi proměnlivé a ovlivňuje především její tekutost, resp. tuhost tak, aby byla zajištěna správná funkce membrány v široké škále podmínek prostředí.

U *Bacillus subtilis* ovlivňují fosfolipidové složení kultivační podmínky, např. acidita média v průběhu růstu [28]. Také změna teploty má velký vliv na složení fosfolipidů uvnitř membrány. Velmi zásadně ovlivňuje poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin [14]. Kultivační teplotě tedy odpovídá její stupeň fluidity. Při nízkých teplotách fosfolipidy

obsahují větší podíl nasycených mastných kyselin, při teplotách vysokých je tomu naopak. *Anteiso*- větvené mastné kyseliny mají nižší bod tání než *iso*- větvené mastné kyseliny [2,12]. Buňky *Bacillus subtilis* reagují na pokles okolní teploty desaturací mastných kyselin a jejich membránových lipidů a zvýšením podílu *anteiso*- větvených mastných kyselin [12,14,29].

Při kvalitativní a kvantitativní analýze fosfolipidů je třeba dbát na již zmíněné faktory, které je ovlivňují.

2.3 Metody analýzy fosfolipidů a jejich polárních částí

2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) je analytická separační metoda, která spočívá v separaci látek na styku dvou fází – mobilní a stacionární.

Při stanovení fosfolipidů se jako stacionární fáze používá silikagel (gel kyseliny křemičité, $SiO_2 \cdot xH_2O$) obsahující na svém povrchu volné –OH skupiny, který je ve formě suspenze rovnoměrně nanesen na skleněnou desku o rozměrech 20 x 20 cm a jehož tloušťka činí 0,25 mm. Vlivem polárních –OH skupin silikagelu jsou vzorky fosfolipidů vázány především vodíkovou vazbou a díky kyselosti povrchu adsorbentu jsou přednostně zadržovány zásadité složky. Jako mobilní fáze zde slouží směs rozpouštědel chloroform – methanol - voda 65 : 25 : 4 (v/v/v).

Vzorek fosfolipidu se nanáší na start (startovací linii) mikrostříkačkou asi dva centimetry od okraje desky. Musí být nanesen jako co nejmenší pravidelná kruhová skvrna či pás a musí být nanášeny malé podíly vzorku, aby docházelo k průběžnému odpařování rozpouštědla. Po nasycení vyvíjecí komory parami mobilní fáze a po následném vložení chromatografické desky s nanesenými vzorky fosfolipidů do komory tak, aby bylo vyvíjení uspořádáno vzestupně (do rozpouštědla se ponoří spodní okraj desky), vzlíná mobilní fáze póry stacionární fáze, čímž vzniká další, tzv. kotvená fáze, obohacená o polární složky ze vzlínající směsi (methanol a voda). V okamžiku, kdy směs dosáhne místa, kde je nanesen vzorek fosfolipidů, fosfolipidy se okamžitě rozpustí do mobilní fáze a putují se vzlínající směsí. Protože nejméně polární fosfolipidy mají větší tendenci zůstat v mobilní fázi, budou putovat s čelem rozpouštědla a tím dojde k jejich vzájemné separaci. Naopak ty nejvíce polární se budou rozpouštět i v kotvené fázi, čímž budou zaostávat. Než čelo mobilní fáze dosáhne konce desky, ukončí se analýza. Deska se vysuší, označí se místo nanesení vzorků (start), polohy skvrn a čelo rozpouštědla (cíl). Pokud nejsou jednotlivé skvrny tvořeny barvenými analyty, provede se jejich detekce (vizualizace). K detekci skvrn se používají např. páry jódu a roztok ninhydrinu, čímž dojde k reakci na barevné produkty.

Kvantitativní vyhodnocení je prováděno nepřímou. U nepřímé metody se skvrna obsahující příslušný fosfolipid opatrně vyškrábe z tenké vrstvy silikagelu a extrahuje se vhodným rozpouštědlem. Koncentrace jednotlivých fosfolipidů v extraktu se poté stanovuje spektrofotometricky.

Pro dosažení přesných výsledků je třeba pracovat s tenkými vrstvami vysoké kvality a dbát na chromatografické vlastnosti silikagelu – porozitu a obsah vody. Právě obsah vody je

možné zmenšovat tzv. aktivací desky (sušení při teplotě vyšší než 100 °C), protože nedostatečně definovaný obsah vody ovlivňovaný vzdušnou vlhkostí může velmi nepříznivě ovlivňovat kvalitu a reprodukovatelnost dělení [28, 30-33].

2.3.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je elektromigrační separační metoda založená na migraci iontů v elektrickém poli. Je vhodná pro separaci a stanovení organických a anorganických látek, jejichž molekuly nesou v homogenním elektrickém poli kladný či záporný náboj. Při separaci nabitých částic se uplatňují dva transportní jevy: **elektroforetická pohyblivost** a **elektroosmotický tok** (electroosmotic flow, EOF).

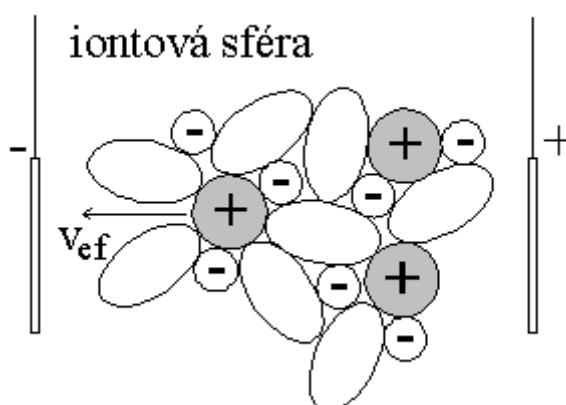
K elektroforetické pohyblivosti iontů dochází v elektrickém poli vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě (**Obr. 2-5**). Konstantní elektroforetická rychlost, v_{ef} (rozměr $m \cdot s^{-1}$), je přímo úměrná intenzitě elektrického pole, E (rozměr $V \cdot m^{-1}$), a elektroforetické pohyblivosti, μ_{ef} (rozměr $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$):

$$v_{ef} = \mu_{ef} \cdot E$$

Elektroforetická pohyblivost závisí především na náboji částice, Q_i (rozměr C), dynamické viskozitě, η (rozměr $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$), a dále pak na velikosti, hmotnosti a tvaru částice.

$$\mu_{ef,i} = \frac{Q_i}{6\pi \cdot \eta \cdot r_i}$$

Ze vztahu vyplývá, že čím mají nabitě částice větší náboj a čím jsou menší, tím v elektrickém poli migrují rychleji. Elektroforetická pohyblivost však závisí i na experimentálních podmínkách: teplotě, viskozitě, iontové síle a pH elektrolytu.

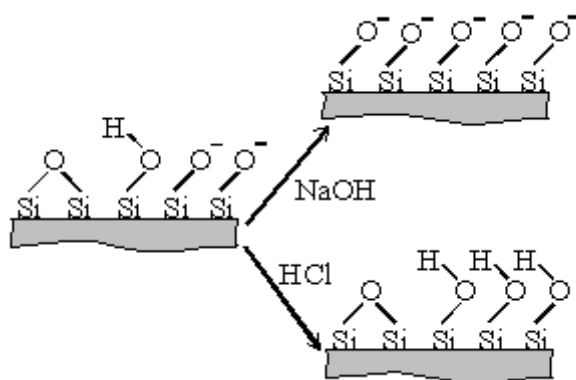
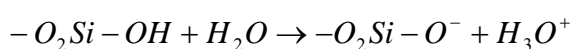


Obrázek 2-5 Elektroforetická migrace kationtu ke katodě [34]

Kladné i záporné ionty se v kapiláře s tlumivým roztokem (pufrem) pohybují nejen díky vlastní, již zmíněné elektroforetické pohyblivosti, ale také vlivem elektroosmotického toku.

Velikost elektroosmotického toku závisí na vlastnostech pufru a charakteru použité kapiláry. Nejčastěji se používá křemenná či teflonová kapilára.

Křemenná kapilára bývá na svém vnějším povrchu pokryta polyimidem, který zajišťuje pružnost kapiláry a zároveň odstraňuje její křehkost, čímž lze kapiláru ohýbat, aniž by došlo k jejímu poškození. Naopak vnitřek kapiláry je tvořen siloxanovými skupinami (Si-O-Si), které při styku s vodným roztokem elektrolytu hydrolyzují, čímž vznikají skupiny silanolové (Si-OH), jež jsou následně disociovány v závislosti na pH roztoku a způsobují, že při nepříliš nízkých hodnotách pH je vnitřní povrch kapiláry pokryt záporně nabitými disociovanými křemičitanovými skupinami (Si-O⁻) (**Obr. 2-6**). Vnitřní povrch kapiláry tedy tvoří záporně nabitě ionty, které k sobě přitahují opačně nabitě kationty z elektrolytu a dohromady tak vytváří difúzní elektrickou dvojrstvu.



Obrázek 2-6 Disociace silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenné kapiláry [34]

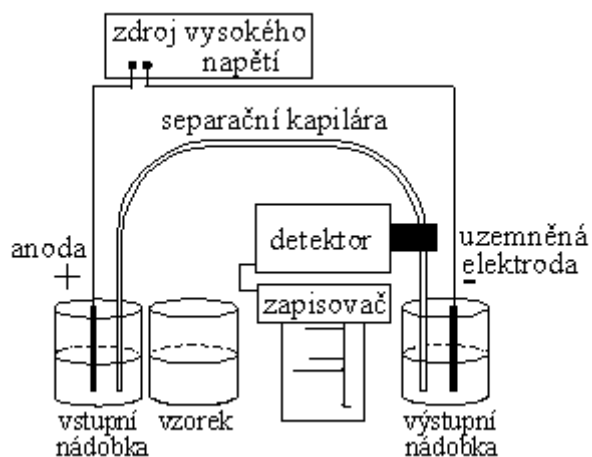
Po vložení napětí na elektrody dochází vlivem elektrického pole k pohybu těchto hydratovaných kationtů směrem ke katodě, čímž s sebou strhávají veškerý roztok v kapiláře a dochází tak ke vzniku elektroosmotického toku (EOF), jehož rychlost je dána vztahem:

$$v_{EOF} = -\frac{\epsilon_{rel} \cdot \xi}{\eta} \cdot E,$$

kde v_{EOF} představuje rychlost elektroosmotického toku (rozměr $m \cdot s^{-1}$), ϵ_{rel} představuje relativní permitivitu roztoku, ξ představuje zeta-potenciál (též elektrokinetický potenciál), je to potenciálový rozdíl mezi vnitřní a vnější hranicí difúzní vrstvy (rozměr V), E představuje intenzitu elektrického pole (rozměr $V \cdot m^{-1}$) a η je dynamická viskozita roztoku (rozměr $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$).

Existují dva faktory ovlivňující rychlost EOF: pH tlumivého roztoku a jeho koncentrace. Čím vyšší bude pH roztoku elektrolytu, tím větší negativní náboj bude rozprostřen na kapiláře a tím bude větší EOF. V případě koncentrace bude ovšem jev zcela opačný. Budeme-li zvyšovat koncentraci elektrolytu, dojde ke snížení ξ -potenciálu elektrické dvojrstvy, což povede ke snížení rychlosti EOF.

Před započítím analýzy vzorku se nejprve naplní vhodným pufrem vstupní vialka (inlet), výstupní vialka (outlet) a kapilára. Poté se na platinové elektrody vloží napětí několika desítek kilovoltů podobu několika minut, aby se stabilizoval EOF v kapiláře. Při vlastní analýze se nejprve do kapiláry nadávkuje (hydrodynamicky či elektrokineticky) úzká zóna analyzovaného vzorku a poté se vialka se vzorkem vymění zpět za vialku s pufrem (inlet). Připojením napětí na elektrody se spustí vlastní analýza vzorku (**Obr. 2-7**).



Obrázek 2-7 Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu [34]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Tenkovrstvá chromatografie

3.1.1 Materiál a metody

➤ Bakterie

Pro experimentální práci byla použita bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Jedná se o grampozitivní, aerobní a nepatogenní půdní bakterii. S ohledem na kultivační teplotu patří druh *Bacillus subtilis* mezi mezofilní bakterie, teplotní optimum používaného kmene je 30 °C, kratší generační doby je však dosahováno při 40 °C.

➤ Použité chemikálie

Bactopepton, Bacto yeast extract a Lab-Lemco powder (výrobce Oxoid), chlorid sodný, kyselina askorbová, kyselina chloristá, kyselina octová, methanol, molybdenan amonný (výrobce Lach-Ner, vše p.a.), hydrogenfosforečnan draselný (výrobce Fluka, p.a.), butanol, hexan, chloroform, izopropanol (výrobce PENTA, vše p.a.), ninhydrin (výrobce Lachema, p.a.), silikagel G (výrobce Merck, pro TLC).

➤ Použité roztoky

Při přípravě kultivačního média (živný bujón Oxoid) byly naváženy tyto chemikálie: Lab-Lemco powder, 1 g, Bacto yeast extract, 2 g, Bactopepton, 5 g a NaCl, 5 g. Všechny složky byly společně rozpuštěny v 1 l destilované vody, poté následovala úprava roztoku na pH 7,0 pomocí 1 M KOH či 1 M HCl a nakonec byla provedena sterilizace.

Při izolaci lipidové frakce byla použita směs hexan-izopropanol 3 : 2 (v/v). Mobilní fáze byla připravena ze směsi rozpouštědel o různé polaritě: chloroform - methanol – voda 65 : 25 : 4 (v/v/v). Pro vizualizaci skvrn na tenké vrstvě silikagelu byl použit 0,2 % roztok ninhydrinu, připraven rozpuštěním 0,2 g ninhydrinu v 95 ml butanolu a 5 ml kyseliny octové. Pro kvantitativní stanovení lipidického fosforu byly využity: 70 % kyselina chloristá, 10 % (w/v) kyselina askorbová, 2,5 % (w/v) molybdenan amonný a 0,2 mmol/l zásobní roztok fosfátu (K_2HPO_4).

➤ Sterilizace

Sterilizace použitého laboratorního skla probíhala v horkovzdušné sušárně při 180 °C po dobu 60 min a sterilizace kultivačního média probíhala v autoklávu 20 minut při 121 °C a přetlaku vodní páry 0,15 MPa.

3.1.2 Kultivace *B. subtilis* ATCC 21332

Kultura *Bacillus subtilis* byla kultivována v Erlenmayerových baňkách, umístěných do třepačky vytemperované na stálou teplotu 40°C, aby se zajistilo dobré vzdušnění a kultivace probíhala aerobně. Při kultivaci byly používány 250 ml Erlenmayerovy baňky se 30 ml média a 2 l Erlenmayerovy baňky s 350 ml média. K tomuto účelu byla používána jak rotační třepačka s vytemperovanou vodní lázní značky Elpan (na menší objemy),

tak horkovzdušná třepačka značky Gallenkamp, Schoeller Instruments (pro větší objemy). Z důvodu dostatečného vzdušnění byla rychlost třepání u obou typů třepaček zvolena na hodnotu 175 rpm (rounds per minute, rpm). Růst bakteriální kultury byl sledován měřením optické denzity bakteriální suspenze na spektrofotometru Helios γ (10 mm kyvety) při vlnové délce 420 nm.

3.1.2.1 Příprava inokula a vlastní kultivace

Biomasa *B.subtilis* ATCC 21332 z agarem zpevněného média byla pomocí bakteriologické kličky asepticky přenesena do Erlenmayerovy baňky s 30 ml kultivačního média. Kultivace probíhala v horkovzdušné třepačce vytemperované na 40 °C po dobu 16 h (přes noc).

Ráno byla bakteriální kultura přeočkována do další tekuté pasáže. V průběhu kultivace byla sledována optická denzita při vlnové délce 420 nm, dokud nedosáhla hodnoty $OD_{420nm} \cong 0,500$. Jako blank sloužila destilovaná voda. V momentu, kdy kultura dosáhla $OD_{420nm} \cong 0,500$, byla kultura přeočkována na vlastní pokus do Erlenmayerových baněk s 350 ml média (dvě paralely po dvou baňkách). Větší objem média byl zvolen proto, aby bylo při izolaci lipidové frakce zajištěno velké množství buněk a tedy dostatečné množství fosfolipidů.

Vlastní kultivace probíhala v horkovzdušné třepačce při 40 °C a odběry kultury byly prováděny po 15 minutách.

3.1.3 Izolace lipidové frakce

Kultivace byla ukončena filtrací bakteriální kultury přes membránové filtry (Synpor č. 5, velikost pórů 0,6 μm) za použití vodní vývěvy. Po promytí vytemperovanou destilovanou vodou byla biomasa zachycená na filtru pomocí sklíčka a nerezového kopí převedena do teflonových centrifugačních zkumavek (Oak Ridge) s 30 ml vychlazené (4 °C) extrakční směsi hexan-izopropanol 3 : 2 (v/v) a okamžitě resuspendována na vortexu na jemně dispergovanou suspenzi. Přes noc následovala extrakce při 4 °C.

Po extrakci následovala centrifugace (5 min, 3000 g, 4 °C, centrifuga CL3R), aby došlo k lepšímu oddělení lipidového extraktu (supernatantu) od sedimentu (peletu). Extrakt byl převeden do srdcové baňky a směs hexan-izopropanolu byla odpařena na rotační vakuové odparce s vodní lázní vytemperovanou na 40 °C. Poté byl vzorek lipidů s nečistotami rozpuštěn v 2 x 5 ml chloroformu a přefiltrován přes fritu se skleněným filtrem (filtry Whatman GF/C o průměru 25 mm). Na filtru zůstaly zachyceny složky nelipidové povahy nerozpustné v chloroformu. Filtrát byl jímán do srdcové baňky a opět odpařen na vakuové odparce s vytemperovanou vodní lázní. Po odpaření chloroformu zůstalo na dně srdcové baňky nepatrné množství již čisté lipidové frakce, která měla medové zabarvení. Tato lipidová frakce byla rozpuštěna a promyta 2 x 0,5 ml chloroformu a skleněným kapátkem převedena do skleněné zkumavky. Suchá lipidová frakce byla získána odpařením rozpouštědla pod proudem dusíku.

Veškeré použité sklo bylo před samotnou izolací lipidové frakce řádně omyto rozpouštědly (hexan-izopropanol, chloroform), aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Všechna použitá organická rozpouštědla (hexan, izopropanol, chloroform a methanol) byla před použitím redestilována.

3.1.4 Analýza lipidových extraktů chromatografií na tenké vrstvě

3.1.4.1 Chromatografie na tenké vrstvě

Pro stanovení fosfolipidů byla použita skleněná deska o rozměrech 20 x 20 x 0,4 cm s nanesenou slabou vrstvou Silikagelu G (Merck), o tloušťce 0,25 mm. Před započítím analýzy byla deska aktivována v horkovzdušné sušárně při 110 °C po dobu 1 hodiny a poté ihned umístěna do exsikátoru. Před nanášením vzorků fosfolipidů na chromatografickou desku byla připravena mobilní fáze z rozpouštědel o různé polaritě: chloroform-methanol-voda 65 : 25 : 4 (v/v/v), která byla přelita do vyvíjecí skleněné komory a přikryta víkem, aby došlo k jejímu řádnému prosycení parami. Dále byly připraveny vzorky lipidů. Suchá lipidová frakce byla rozpuštěna v 80 µl chloroformu. Před nanášením vzorků byly na chromatografické desce řádně označeny tzv. stopy, start a cíl mobilní fáze. Vzorky fosfolipidů byly na tenkou vrstvu Silikagelu G nanášeny mikrostříkačkou Hamilton. Veškerý vzorek fosfolipidu byl nanesen na vyznačenou stopu, tzv. pás, a vždy byly nanášeny malé podíly vzorku, aby průběžně docházelo k odpařování chloroformu. Vlastní vyvíjení bylo uspořádáno vzestupně. Spodní okraj desky s označeným startem a nanesenými vzorky byl ponořen do mobilní fáze, která vzlínala vrstvou silikagelu po dráze o délce 16 cm. Vyvíjení bylo ukončeno po dosažení cíle mobilní fází, poté byla deska z chromatografické komory vyňata a vložena do digestoře, aby oschla. Separace fosfolipidů trvala asi 68 minut.

3.1.4.2 Kvalitativní a kvantitativní stanovení lipidického fosforu

Kvalitativní analýza fosfolipidů byla provedena parami jódu, které slouží jako nespecifické činidlo pro téměř všechny organické látky. Páry jódu reagovaly v místě výskytu mastných kyselin za vzniku žlutého zbarvení o různé intenzitě. Poté byla deska nastříkána 0,2% roztokem ninhydrinu a vložena na 30 min do horkovzdušné sušárny vytemperované na 105 °C, čímž došlo k vizualizaci a lokalizaci fosfolipidů, které obsahovaly ve svých polárních částech aminoskupiny. Skvrny měly růžové až oranžové zbarvení.

Kvantitativní analýza spočívala ve vyškrábání detekovaných skvrn fosfolipidů a kvantitativním převedení do zkumavek. Všechny použité zkumavky byly předem několikrát vypláchnuty vodou z vodovodu a destilovanou vodou a poté byly vysušeny v horkovzdušné sušárně. Protože bylo zapotřebí převést organický fosfát na anorganický, byly vzorky fosfolipidů mineralizovány přídatkem 0,5 ml koncentrované $HClO_4$ (70%) a inkubovány 20 min při 180 °C. Po mineralizaci bylo ke vzorkům přidáno 3,5 ml destilované vody, 0,5 ml 2,5% (w/v) molybdenanu amonného a směs byla řádně promíchána. Dále bylo přidáno 0,5 ml 10% (w/v) kyseliny askorbové a opět promícháno. Stejným způsobem byly připraveny roztoky standardů o různých koncentracích ze zásobního roztoku 0,2 mmol/l K_2HPO_4 .

Všechny zkumavky se vzorky i standardy byly považeny při 100 °C po dobu 5 min a poté ponechány do druhého dne, z důvodu sedimentace silikagelu.

Absorbance všech barevných roztoků (fosfomolybdenová modř) byla měřena na spektrofotometru Helios γ (10 mm kyvety) při vlnové délce 820 nm. Jako slepý vzorek sloužil standardní roztok bez přídavku anorganického fosfátu. Ze standardních roztoků byla sestavena kalibrační závislost. Skutečné množství fosforylovaných látek ve vzorcích bylo vypočítáno z příslušné rovnice kalibrační přímky. Jako 100 % bylo vzato celkové množství fosforu přítomné ve všech skvrnách vzniklých dělením příslušného vzorku.

3.2 Kapilární zónová elektroforéza

3.2.1 Materiál, metody a přístroje

➤ Použité chemikálie

Dekahydrát tetraboritanu disodného, kyselina mravenčí (výrobce Lachema, vše p.a.), hydroxid sodný a mohohydrát kyseliny citronové (výrobce PENTA, vše p.a.), fosfocholin, fosfoserin, fosfoglycerol (výrobce SIGMA-Aldrich, všechny > 99 %), Tris (výrobce SIGMA, p.a.), vodný roztok thiomocoviny (1 mg/ml), kyselina pyromelitová, kyselina benzoová, kyselina ftalová a kyselina p-hydroxybenzoová (výrobce SIGMA-Aldrich, vše p.a.).

Pro přípravu všech vodných roztoků a k promývání byla použita deionizovaná voda.

➤ Příprava pufrů

Pro stanovení standardů fosforylovaných složek byly připraveny pufrы, jejichž přehled je uveden v **Tab. 3-1**.

Tabulka 3-1 Seznam připravených pufrů použitých k analýzám vzorků fosforylovaných sloučenin

Pufr	Složka	c/mol.l ⁻¹	V/ml	Mr	Navážka/g	pH
Mravenčanový	kys. mravenčí	0,01	100	46,026	0,046	3,5
Acetátový	kys. octová			60,053	0,060	4,7
Citrátový	kys. citronová			192,121	0,192	6,0
Tris	tris(hydroxymethyl)methylamin			121,14	0,121	8,0
Borátový	tetraboritan sodný			201,219	0,201	9,1
NaOH	hydroxid sodný			39,997	0,040	11,5

Všechny složky byly rozpuštěny v deionizované vodě a následně sonifikovány na ultrazvukové lázni, aby došlo k řádnému rozpuštění a zabránilo se tak neprůchodnosti kapiláry. Poté následovala úprava pH pomocí 1 M NaOH či 1 M HCl.

➤ Příprava zásobních roztoků vzorků

Zásobní roztoky analytů byly připraveny rozpuštěním 18,9 mg pevného vzorku fosfoserinu, 32,9 mg pevného fosfocholinu a 14,1 mg pevného fosfoethanolaminu v pufrách uvedených v **tab. 3-1** a doplněných na objem 10 ml. Poté následovala sonifikace na ultrazvukové lázni. Pevné vzorky fosforylovaných sloučenin byly uchovávány při -20 °C a roztoky vzorků při 4 °C.

➤ Použité přístroje

K úpravě pH používaných pufrů byl použit pH metr (3510 pH Meter) značky JENWAY se skleněnou kombinovanou elektrodou také značky JENWAY.

K sonifikaci špatně rozpustných složek byla použita ultrazvuková lázeň SONOREX RK 100.

Protože byl k detekci v CZE používán detektor s diodovým polem (Diode Array Detector, DAD), který měří v UV/VIS oblasti spektra, byla proměřena UV spektra jednotlivých roztoků analytů. Spektra vodných roztoků analytů byla měřena na UV/VIS spektrofotometru značky AGILENT 8453 v rozsahu vlnových délek 190 – 500 nm s rozlišením 1 nm (10 mm kyvety). K vyhodnocení dat byl použit program UV-Visible ChemStation, ver. 9.01.

K vlastním analýzám vzorků byla využita kapilární zónová elektroforéza značky AGILENT Technologies 7100 (Capillary Electrophoresis System) s vyhodnocovacím programem Instrument 1 (offline): Data Analysis. K detekci byl používán UV/VIS spektrofotometrický DAD detektor (Diode-Array Detektor, DAD).

Měření byla provedena na hrubostěnné křemenné kapiláře firmy Polymicro Technology typu TWC-S75 (USA) pokryté na vnějším povrchu vrstvou polyimidu o parametrech: vnitřní průměr $d_i=75 \mu\text{m}$, délka kapiláry k detekčnímu okénku $L_D=54,5 \text{ cm}$ a celková délka kapiláry $L_C=62,5 \text{ cm}$.

3.2.2 Vlastní měření

3.2.2.1 UV/VIS spektra

Aby bylo v průběhu analýzy na kapilární elektroforéze dosaženo maximální citlivosti, byla proměřena UV/VIS spektra vzorků. K proměření absorpčních spekter byly použity připravené zásobní roztoky analytů ve vybraných pufrech o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$. Absorpční spektra jednotlivých analytů byla proměřena v rozsahu vlnových délek 190 – 500 nm (10 mm kyvety) a jako blank sloužil roztok pufru bez přídavku analytu.

3.2.2.2 CZE

➤ Promývání

Na začátku všech měření byla kapilára po vložení napětí na elektrody vždy několikrát promývána, aby se stabilizoval EOF. Promývání se skládalo z následujících částí. Nejprve byla promývána deionizovanou vodou, poté roztokem NaOH (1 mol.dm^{-3}), opět deionizovanou vodou a nakonec použitým pufrem. Každý krok probíhal 5 minut. Poté následovalo vlastní nadávkování úzké zóny analytu při tlaku 50 mbar po dobu 5 s a vložení napětí na elektrody 25 kV následovala samotná analýza (princip dávkování je popsán v kapitole 2.3.2). Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára vždy promývána používaným pufrem po dobu 3 minut. Dávkování úzké zóny vzorku do vstupní nádoby bylo prováděno hydrodynamicky, vždy 5 s. Hydrodynamické dávkování má oproti

elektrokinetickému dávkování tu výhodu, že nadávkovaný vzorek má v kapiláře vždy stejné složení jako vzorek v nádobce a nedochází tak vlivem elektroforetických rychlostí ke zvýhodnění kationtů oproti aniontům.

➤ **Analýza vzorků fosforylovaných sloučenin**

K identifikaci fosforylovaných sloučenin byla použita kapilární elektroforéza spojená s detekcí v UV/VIS oblasti. Na začátku měření byla zvolena metoda přímé absorpční detekce, která byla vyzkoušena na vzorcích fosforylovaných sloučenin v připravených puffrech. Při přímé absorpční detekci analyzované látky absorbovaly mnohem více, než separační puffry, v nichž byly rozpuštěny. Při průchodu zóny analytu detekčním okénkem vzrostla absorbance a vyhodnocovací program tuto změnu v elektroferogramu zaznamenal jako kladný pík. Kvůli špatným a nereprodukovatelným výsledkům byla zvolena metoda nepřímé detekce, která spočívala v přidavku chromoforu do každého měřeného separačního puffru se vzorkem. Jako chromofory byly použity: kyselina pyromelitová, kyselina ftalová, kyselina benzoová a kyselina p-hydroxybenzoová, které díky obsahu aromatického jádra absorbují v UV/VIS oblasti. Protože separační pufr s chromoforem absorboval detekční záření mnohem více než analyty, zaznamenaly se zóny těchto analytů v elektroferogramu jako negativní píky, které byly po úpravě vyhodnocovacím programem převedeny na pozitivní píky.

K určení elektroosmotického toku byl použit vodný roztok thiomčoviny (1 mg/ml). Protože je tato sloučenina neutrální, nevykazuje vlastní elektroforetickou migraci uvnitř puffru a je unášena elektroosmotickým tokem. Funguje tedy jako značkovač EOF (EOF marker).

Při analýze se postupovalo v následujícím pořadí. Po promytí kapiláry separačním puffrem a ustavení EOF byla do vstupního konce kapiláry nadávkována úzká zóna thiomčoviny, aby byla prokázána průchodnost kapiláry a určen EOF. Poté byl do kapiláry nadávkován separační pufr se vzorkem bez přidavku thiomčoviny a až následně s thiomčovinou. Vše probíhalo v přítomnosti chromoforu. Nejprve byly detekovány vzorky fosforylovaných sloučenin samostatně a poté byla vyzkoušena směs dvou vzorků.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

První část práce je zaměřena na kvalitativním a kvantitativním stanovení fosfolipidů v cytoplazmatické membráně bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332, které předcházela kultivace tohoto kmenu a izolace fosfolipidové frakce. Relativní zastoupení fosfolipidových tříd cytoplazmatické membrány bylo stanoveno metodou tenkovrstvé chromatografie (TLC) a následovala spektrofotometrická detekce anorganického fosfátu.

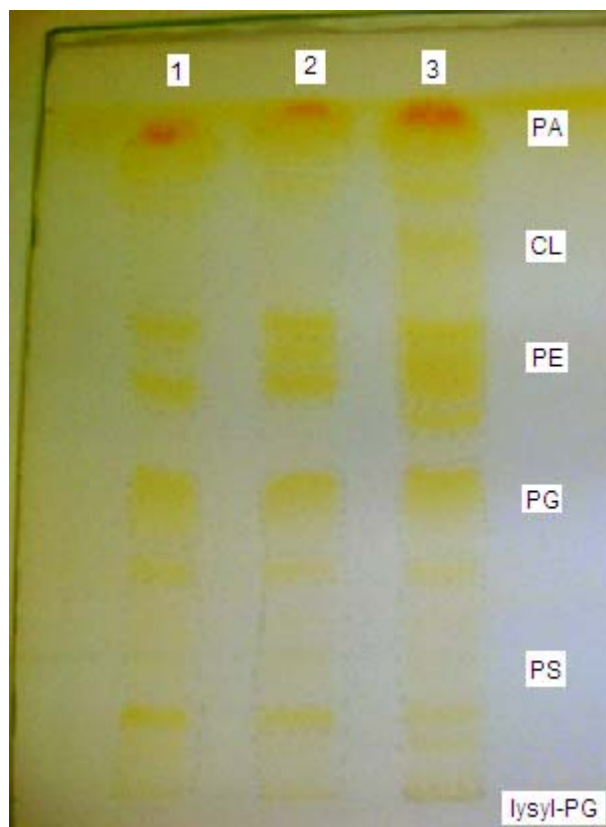
Druhá část zahrnuje stanovení fosforylovaných sloučenin v různých separačních pufrech metodou kapilární zónové elektroforézy, které předcházelo proměření absorpčních spekter v UV/VIS oblasti, aby bylo dosaženo maximální citlivosti během měření.

4.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

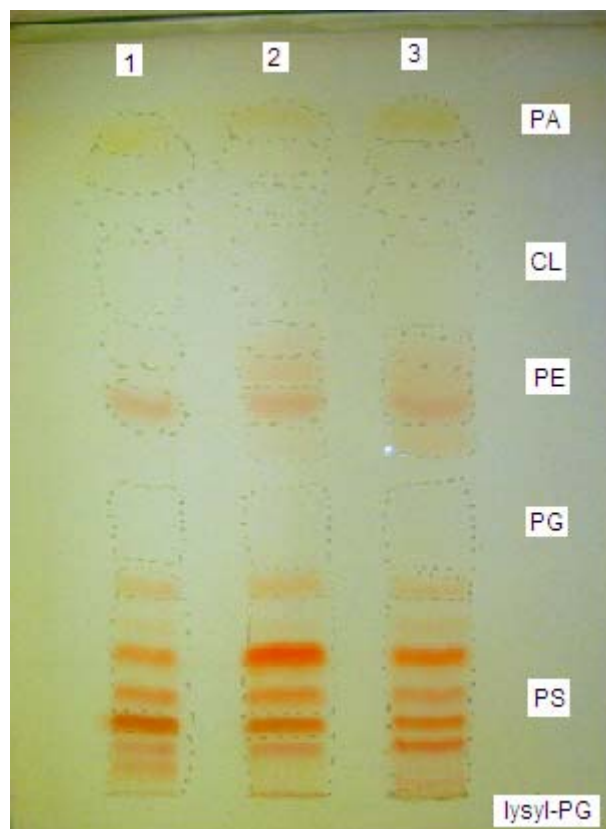
4.1.1 Kvalitativní analýza

Pro provedení kvalitativní analýzy bylo zapotřebí provést izolaci lipidové frakce z cytoplazmatické membrány *B. subtilis*. Lipidová frakce bakteriální kultury byla získána extrakcí směsí rozpouštědel hexan-izopropanol 3 : 2 (v/v) (viz. kapitola 3.1.3) Kvalitativní analýza izolované lipidové frakce buněk získaných z kultivace při 40 °C byla provedena metodou TLC (viz kapitola 3.1.4.).

Separace vzorků fosfolipidů byla provedena na skleněné chromatografické desce s ručně naneseným silikagelem (0,25 mm) v přítomnosti mobilní fáze, která se skládala ze směsi rozpouštědel chloroform-metanol-voda 65 : 25 : 4 (v/v/v). Po separaci následovala vizualizace skvrn fosfolipidů nejprve parami jódu, poté 0,2% roztokem ninhydrinu, který reagoval s $-NH_2$ skupinami vyskytujícími se v některých molekulách fosfolipidů. Protože je stanovení fosfolipidů metodou TLC v mikrobiologické praxi běžnou záležitostí a fosfolipidy izolované z *B. subtilis* byly již v minulosti metodou TLC stanovovány, je jejich pořadí na chromatografické desce známé [28,33]. Spolehlivost a reprodukovatelnost této metody byly ověřeny na stejném kmenu. Výsledky analýzy uvádí **Obr. 4-1** a **Obr. 4.2**.



Obrázek 4-1 Analýza fosfolipidů *B.subtilis* ATCC 21332 tenkovrstvou chromatografií
 Separace lipidových extraktů získaných kultivací v médiu Oxoid při 40 °C a otáčkách 175 rpm. Na obrázku jsou tři dráhy, z nichž dvě (dráha 1 a 2) představují čerstvě připravené vzorky lipidových extraktů a třetí dráha představuje vzorek kontrolního fosfolipidu, který byl izolován a stanovován již dříve. Vizualizací parami jódu došlo v místě výskytu fosfolipidu k barevné reakci lipidové skvrny v podobě žlutého zabarvení. **Lysyl-PG** – lysylfosfatidylglycerol, **PS** – fosfatidylserin, **PG** – fosfatidylglycerol, **PE** – fosfatidylethanolamin, **CL** – kardiolipin, **PA** – kyselina fosfatidová.



Obrázek 4-2 Analýza fosfolipidů *B.subtilis* ATCC 21332 tenkovrstvou chromatografií. Podmínky stanovení a vyhodnocení jsou stejné jako v předchozím případě u **Obr. 4-2**. Vizualizací 0,2% ninhydrinem – v místě výskytu fosfolipidů, které ve svých strukturách obsahují $-NH_2$ skupinu, došlo k pozitivní reakci v podobě narůžovělých, až sytě oranžových skvrn. **Lysyl-PG** – lysylfosfatidylglycerol, **PS** – fosfatidylserin, **PG** – fosfatidylglycerol, **PE** – fosfatidylethanolamin, **CL** – kardiolipin, **PA** – kyselina fosfatidová.

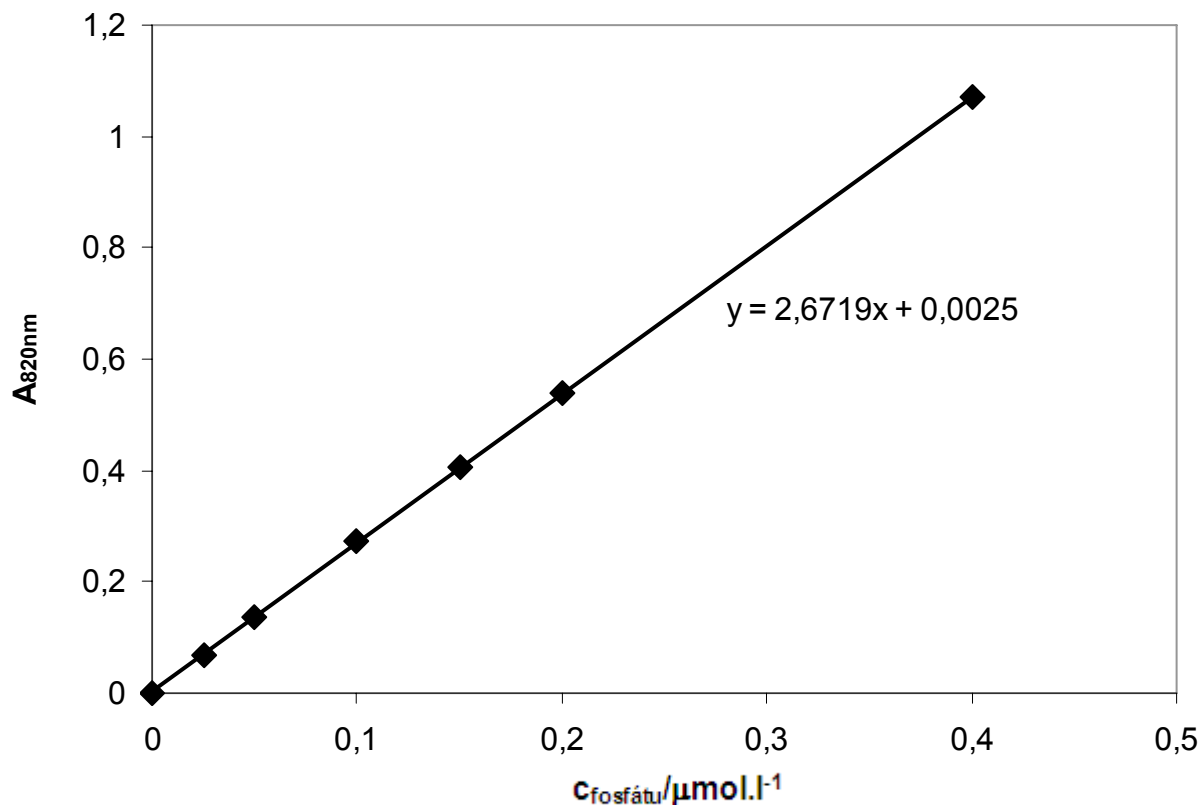
Z **Obr. 4-1** a **4.2** je patrné, že prvním zachyceným fosfolipidem je minoritní lysylfosfatidylglycerol (lysyl-PG). Protože je lysyl-PG obsažen pouze ve stopovém množství, nebyl v tomto případě stanovován. Po lysylfosfatidylglycerolu následuje fosfatidylserin (PS) rozdělený do 5 - 6 těsně přiléhajících skvrn. Dále následuje fosfatidylglycerol (PG), který patří k dominantním fosfolipidům obsaženým v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* podobně jako fosfatidylethanolamin (PE) a kardiolipin (CL), které následují ihned po PG. PE tvoří nad PG 2 – 4 těsně naléhající skvrny a CL nad PE 1 - 2 naléhající skvrny. Těsně pod cílem, kde bylo vyvíjení mobilní fáze zastaveno, se nachází poslední skvrna odpovídající kyselině fosfatidové (PA).

4.1.2 Kvantitativní analýza

Stanovení lipidického fosforu probíhalo podle metody, která je popsána v kapitole 3.1.4.2. Způsob vyhodnocení spočíval v proměření absorbancí připravených roztoků standardů z anorganického fosfátu o různých koncentracích a následném proměření absorbancí vzorků. Z naměřených dat byla sestavena kalibrační přímka (**Obr. 4-3**) a z rovnice regrese bylo vypočítáno skutečné množství fosforylovaných látek a přepočítáno na procentuální zastoupení anorganického fosfátu, který odpovídá obsahu fosfolipidů ve vzorku. Výjimku ovšem tvoří kardiolipin (též difosfatidylglycerol), který ve své struktuře

obsahuje dva atomy P, a proto je skutečný obsah tohoto fosfolipidu roven polovičnímu množství anorganického fosfátu ve skvrně. Při výpočtu procentuálního zastoupení bylo jako 100 % vzato celkové množství anorganického fosforu přítomné ve všech skvrnách vzniklých dělením příslušného vzorku (Tab. 4-1).

➤ Kalibrační přímka



Obrázek 4-3 Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci fosfátu
Roztoky standardů byly připraveny vždy v tripletu a to ze zásobního roztoku K_2HPO_4 (0,02 mmol/l), který byl připraven stejným způsobem jako vzorky, pouze neproběhla mineralizace. Každý bod přímky je tedy výsledek aritmetického průměru tří hodnot. Jako slepý vzorek byla použita reakční směs bez fosfátu.

➤ Procentuální zastoupení fosforylovaných složek

Procentuální zastoupení fosforylovaných složek v jednotlivých vzorcích je uvedeno v Tab. 4-1. Vzorky 1 a 2 byly čerstvě připravené vzorky fosfolipidů, jejichž množství je v tabulce uvedeno. Aritmetický průměr a udává 100 % fosfolipidů obsažených v cytoplazmatické membráně bakterie *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Vzorek A představuje procentuální zastoupení fosfolipidů a sloužil k porovnání a ověření správnosti a reprodukovatelnosti metody.

Z porovnání vzorků vyplývá dobrá reprodukovatelnost a naměřené výsledky se shodují s předchozími stanoveními.

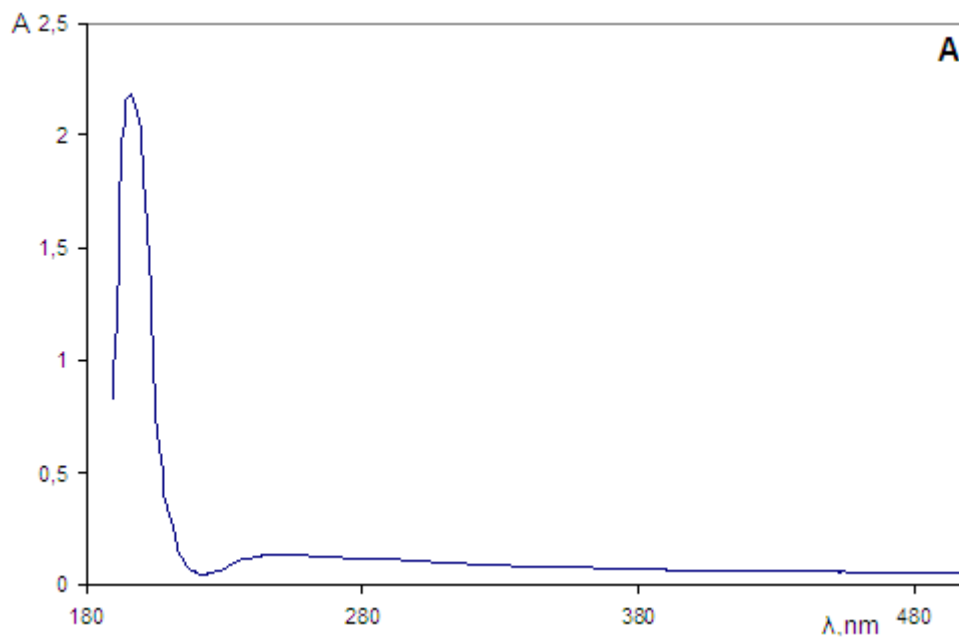
Tabulka 4-1 Kvantitativní stanovení fosfolipidů

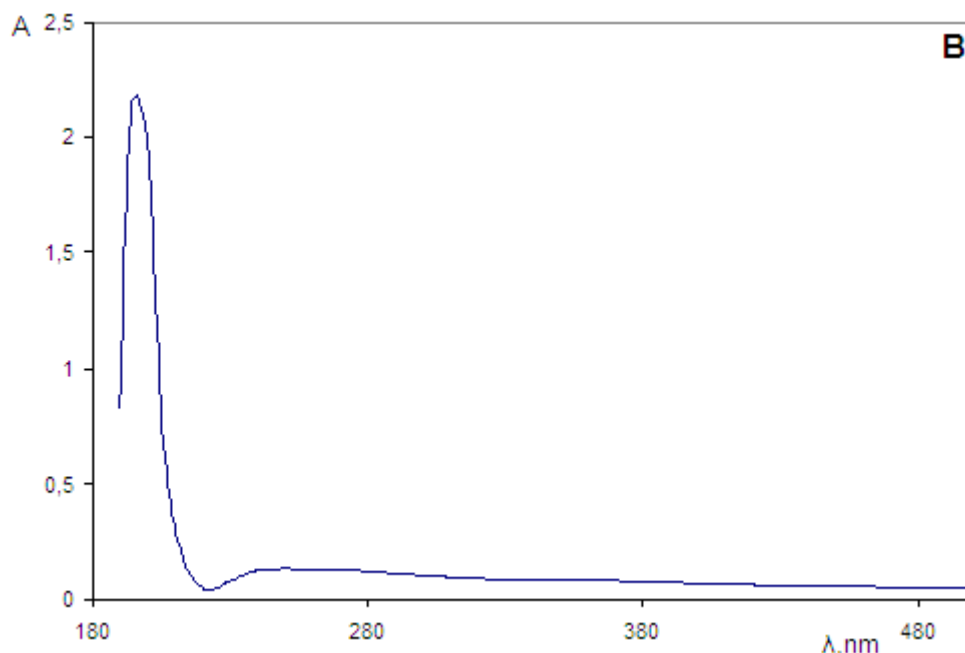
Pořadí	1	2	3	4	5
Fosfolipid	% PS	% PG	% PE	% CL	% PA
Vzorek 1	13,2	39,6	25,5	13,1	9,8
Vzorek 2	12,8	39,2	23,2	13,9	9,3
průměr	13	39,4	24,4	13,5	9,6
Vzorek A	13,6	41,3	22,1	14,2	9,5

4.2 Kapilární elektroforéza

4.2.1 UV/VIS spektra

Všechny proměřené analyty vykazovaly absorpční maxima v oblasti 196-211 nm, proto byly při měření kapilární elektroforézou detekovány při vlnových délkách odpovídajících lokálním maximům. Absorpční spektra vybraných analytů jsou na **Obr. 4-4**.



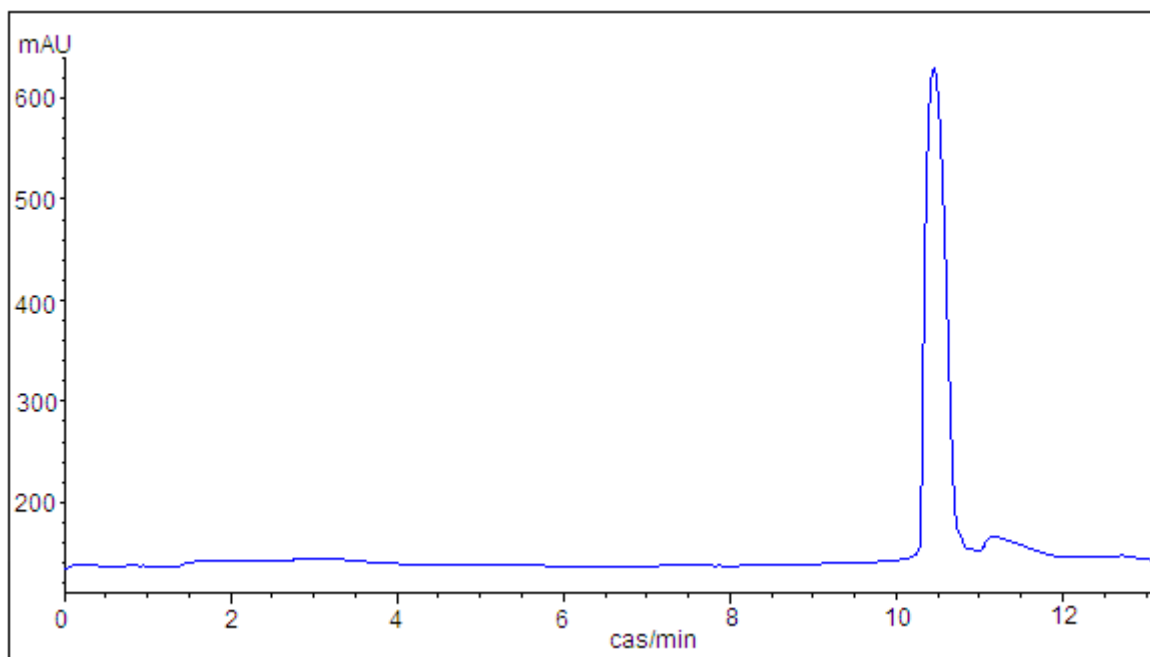


Obrázek 4-4 Absorpční spektra vybraných analytů.

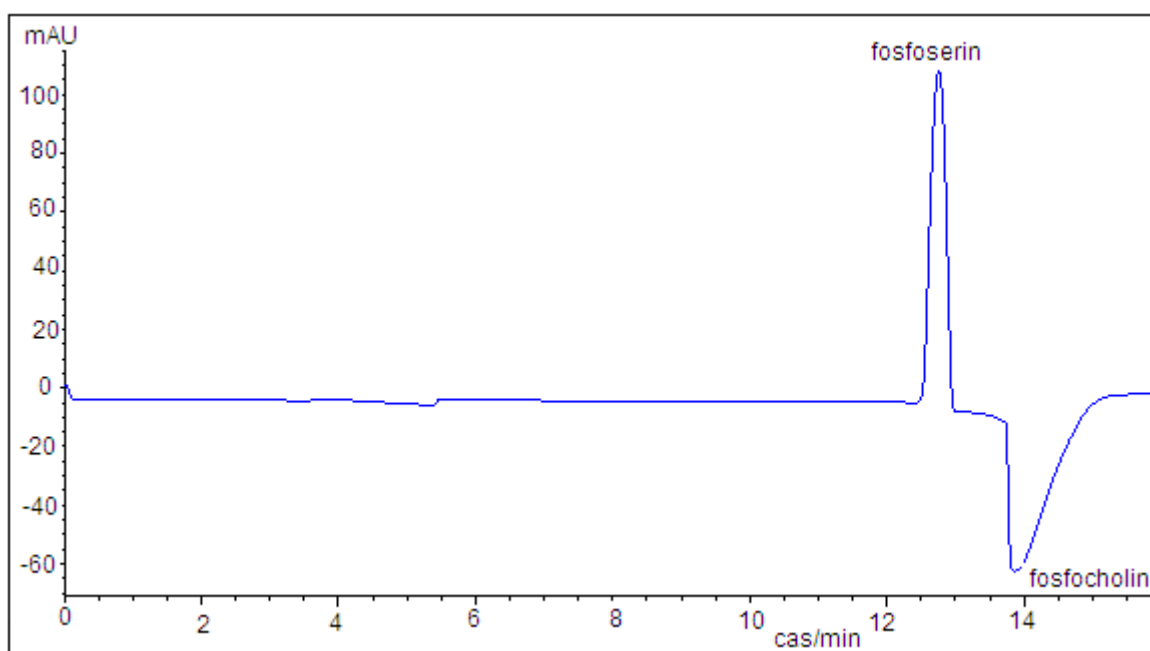
A. Absorpční spektrum fosfoserinu ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) v acetátovém pufru. Maximální absorbance při 197 nm.
B. Absorpční spektrum fosfocholínu ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) v mravenčanovém pufru. Maximální absorbance při 196 nm.

4.2.2 CZE

Na základě proměřených absorpčních spekter byly úzké zóny analytů detekovány v oblasti 196 – 211 nm odpovídající jejich absorpčním maximům. Na začátku experimentální práce byly metodou přímé detekce proměřeny vzorky standardů ve všech připravených pufrch s přidavkem neutrální thiomčoviny (1 mg/ml), kvůli identifikaci EOF. Bohužel se touto cestou nepodařilo najít vhodný separační pufr, ve kterém by byly stanoveny všechny vzorky fosforylovaných sloučenin. Dalšími problémy doprovázejícími tuto metodu byly velký šum základní linie a v mnohých případech velmi rozmyté a asymetrické píky. Proto byla zvolena metoda nepřímé detekce, která spočívala v přidavku slabé organické kyseliny jako chromoforu. Nejprve byla použita kyselina pyromelitová, poté kyselina ftalová, benzoová a nakonec kyselina p-hydroxybenzoová. Podobně jako v předchozím případě byly použity různé pufrы. Jediné pozitivní výsledky byly získány ve mravenčanovém pufru s přidavkem kyseliny p-hydroxybenzoové, ve kterém se částečně podařilo analyty stanovit. Snahou bylo také stanovit směsi dvou analytů.



Obrázek 4-5 Elektroferogram fosfoserinu: 0,01 mol.l⁻¹ roztok fosfoserinu v NaOH pufru (pH=11,5); dávkování při 50 mbar po dobu 5 s, napětí 25 kV, $\lambda=211$ nm.



Obrázek 4-6 Elektroferogram směsi fosfoserinu a fosfocholinu: 0,01 mol.l⁻¹ roztok fosfoserinu a 0,01 mol.l⁻¹ fosfocholinu v mravenčanovém pufru (pH 3,5); dávkování při 50 mbar po dobu 5 s, napětí 25 kV.

5 ZÁVĚR

První část práce byla zaměřena na kultivaci bakterie *Bacillus subtilis*, za účelem produkce a následné izolace lipidové frakce, která byla později analyzována metodou TLC. Tato bakterie byla zvolena, protože se jedná o modelovou nepatogenní bakterii běžně využívanou v laboratořích.

Po vypěstování bakteriální kultury byla izolována lipidová frakce. Izolace spočívala ve filtraci buněk, extrakci organickým rozpouštědlem, čímž došlo k rozbití buněk, a následovala centrifugace, při níž došlo k oddělení supernatantu od pelety. Vyčištěním supernatantu byly získány vzorky fosfolipidů, z nichž část byla použita jejich stanovení TLC a druhá část byla uchována při -20 °C jako reálné vzorky pro CZE.

Pro kvalitativní analýzu získaných vzorků fosfolipidů byla využita metoda TLC, kterou se podařilo identifikovat a lokalizovat jednotlivé druhy fosfolipidů obsažených v cytoplazmatické membráně *B. subtilis*. Prokazatelně identifikovány byly následující fosfolipidy v tomto pořadí na chromatografické desce: lysylfosfatidylglycerol, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, fosfatidylethanolamin, kardiolipin a kyselina fosfatidová.

Kvantitativní vyhodnocení identifikovaných fosfolipidů bylo také časově velmi náročné, protože bylo zapotřebí převést organický fosfát na anorganický. Toho bylo dosaženo mineralizací vzorků koncentrovanou kyselinou chloristou. Kvantitativní analýzou bylo zjištěno následující fosfolipidové složení: fosfatidylserin 13 %, fosfatidylglycerol 39,4 %, fosfatidylethanolamin 24,4 %, kardiolipin 13,5 % a kyselina fosfatidová 9,6 %. Uvedené hodnoty byly získány jako aritmetické průměry ze dvou vzorků a jejich součet udává 100 % fosfolipidů obsažených v cytoplazmatické membráně *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Spolehlivost naměřených dat byla ověřena porovnáním naměřených hodnot získaných z dřívějších měření na stejném kmenu při stejných experimentálních podmínkách. I přes náročnost této metody se stanovení podařilo.

V poslední části projektu byla věnována pozornost kapilární elektroforéze s DAD detektorem, konkrétně pak určení vhodných experimentálních podmínek pomocí vybraných standardů fosforylovaných sloučenin: fosfoserinu, fosfocholinu a fosfoethanolaminu. Na začátku měření byla zvolena metoda přímé detekce, během které byly proměřeny vzorky analytů ve všech připravených pufrech s přidavkem neutrální thiomocoviny, jako markeru EOF. Kvůli velkému šumu základní linie, rozmytým a asymetrickým píkům byla zvolena nepřímá metoda, která spočívala v přidavku chromoforu do separačního pufru. Jako chromofor byla nejprve použita kyselina pyromellitová, poté kyselina ftalová, benzoová a nakonec kyselina p-hydroxybenzoová. Jediné kladné výsledky byly zatím získány v mravenčanovém pufru s přidavkem kyseliny p-hydroxybenzoové při stanovení jednotlivých analytů a pozitivní výsledky byly též nalezeny při stanovení směsi dvou standardů.

Protože se doposud nepodařilo z důvodu vyšší časové náročnosti určit vhodné experimentální podmínky během nichž by byla možná analýza směsi fosforylovaných sloučenin, nebyla provedena analýza reálných vzorků izolovaných z *B.subtilis* a nedošlo ani

k porovnání hodnot naměřených oběma metodami. Proto se tyto nesplněné cíle stávají předmětem mých dalších měření.

LITERATURA

- [1] **Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R.** (2002): *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C.
- [2] **Kaprálek, F.** (1986): Fyziologie bakterií. Státní pedagogické nakladatelství, n.p., Praha, 1. vydání.
- [3] **Votava, M., a kol.** (2003): Lékařská mikrobiologie speciální, vydavatelství Neptun, Brno.
- [4] **Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.** (1996): Lékařská mikrobiologie. Marvil, 2. publikace, Praha.
- [5] **Madigan, M.T, Martinko, J.M., Parker, J.** (2003): Biology of microorganisms. Pearson Education, Inc., tenth edition.
- [6] **van den Boom, T., Cronan, J.E. Jr.** (1989): Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. *Annu Rev. Microbiol.* 43: 317-343.
- [7] **Rosypal, S. a kol.** (1981): Obecná bakteriologie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1. vydání.
- [8] **Signer, S.J., Nicolson, G.L.** (1972). Citováno podle Yeagle, P.L. (2005): The structure of biological membranes. Second Edition. CRC Press.
- [9] **Sohlenkamp, C., López – Lara, I.M., Geiger, O.** (2003): Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog. Lipid. Res.* 42: 115-162.
- [10] **Voet, D., Voetová, J.G.** (1995): Biochemie, Victoria publishing, Praha.
- [11] http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch_me/index.htm, cit. 7.4.2011.
- [12] **Klein, W., Weber, M.H., Marahiel, M.A.** (1999): Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine – dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* **181** (17): 5341-5349.
- [13] **de Mendoza, D., Schujman, G.E., and Aguilar, P.S.** (2002): Biosynthesis and function of membrane lipids: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell. A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick (eds): American Society for Microbiology Washington, D.C.
- [14] **de Mendoza, D., Grau, R., Cronan, J.E. Jr.** (1993): Biosynthesis and function of membrane lipids in *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular genetics. A.L. Sonstein, J.A. Hoch, R. Losick (eds): American Society for Microbiology Washington D.C., 411-421.
- [15] **Dowhan, W.** (1997): Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 199-232.
- [16] <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/LIPIDS/Lipids.html>, cyt. 7.4.2011.

- [17] **Cronan, J.E. Jr., Rock, C.O., Neidhardt, F.C.** (1996): *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C., 612-636.
- [18] **Huijbregts, R.P.H., de Kroon, A.I.P.M., de Kruijff, B.** (2000): Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 43-61.
- [19] **Sparrow, C.P., Raetz, C.R.** (1985): Purification and properties of the membrane – bound CDP-diglyceride synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260: 12084-12091.
- [20] **Kanfer, J., Kennedy, E.P.** (1964): Metabolism and function of bacterial lipids II. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239: 1720-1726.
- [21] **Saha, S.K., Nishijima, S., Matsuzaki, H., Shibuya, I., Matsumoto, K.** (1996): A regulatory mechanism for the balanced synthesis of membrane phospholipid species in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech, Biochem.* 60: 111-116.
- [22] **Matsumoto, K.** (1997): Phosphatidylserin synthetase from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1348: 214-227.
- [23] **Kanfer, J., Kennedy, E.P.** (1963): Metabolism and function of bacterial lipids I. Biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 238: 2919-2922.
- [24] **Hirabayashi, T., Larson, T.J., Dowhan, W.** (1976): *Biochemistry* 15: 5205-5211.
- [25] **Dillon, D.A., Wu, W.I., Riedel, B., Wissing, J.B., Dowhan, W., Carman, G.M.** (1996): *J. Biol. Chem.* 271: 30548-30553.
- [26] **Tunaitis, E., Cronan, J.E. Jr.** (1973): Characterization of the cardiolipin synthetase activity of *Escherichia coli* envelopes. *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 420-427.
- [27] **Raetz, C.R.H., Newman, K.F.** (1978), *J. Biol. Chem.* 253: 3882-3887.
- [28] **Op den Kamp, J.A.F., Redai, I., and van Deenen, L.L.M.** (1969): Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*. *American Society for Microbiology U.S.A.*, p. 298-303.
- [29] **Fujii, D.K., and Fulco, A.J.** (1977): Biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. Hyperinduction and modulation of desaturase synthesis. *J. Biol. Chem.* **252**: 3660-3670.
- [30] **Nováková, O., a kol.** (2004): *Návody k praktiku z biochemie pro mikrobiology*, 1. vydání, Praha, Nakladatelství Karolinum.
- [31] **Julák, J.** (1997): *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, 1. vydání, Nakladatelství Karolinum 1997.
- [32] **Bosáková, Z., Coufal, P., Jelínek, I., Pacáková, V., Ševčík, J.G.K., Štulík, K.** (2004): *Analytické separační metody*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, 1. vydání, Praha, Nakladatelství Karolinum 2004.
- [33] **Lindgren, V., Holmgren, E., Rutberg, L.** (1997): *Bacillus subtilis* mutant with temperature – sensitive net synthesis of phosphatidylethanolamine: *American Society for Microbiology U.S.A.*, p. 473-484.

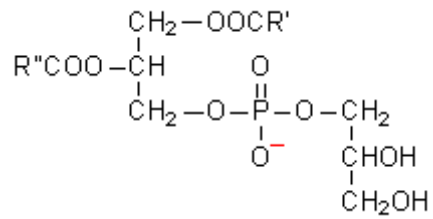
[34] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>, cit. 2.5.2011.

SEZNAM PŘÍLOH

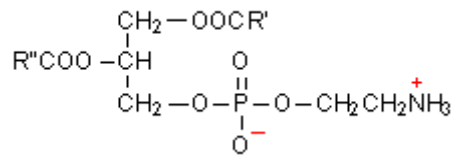
- PI. Chemický vzorec fosfatidylglycerolu (PG)
- PII. Chemický vzorec fosfatidylethanolaminu (PE)
- PIII. Chemický vzorec kardiolipin (CL)
- PIV. Chemický vzorec fosfatidylserin (PS)
- PV. Chemický vzorec kyseliny fosfatidové (PA)
- PVI. Chemický vzorec lysofosfolipidu

PŘÍLOHY

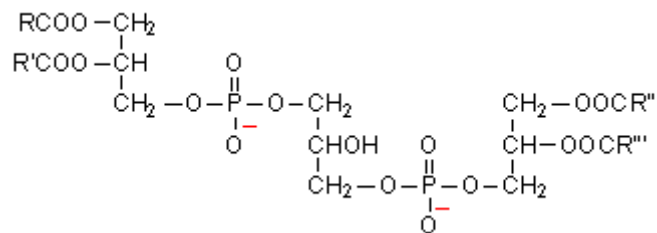
PI. Chemický vzorec fosfatidylglycerolu (PG)



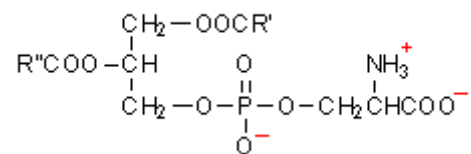
PII. Chemický vzorec fosfatidylethanolaminu (PE)



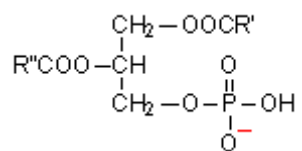
PIII. Chemický vzorec kardiolipinu (CL)



PIV. Chemický vzorec fosfatidylserin (PS)



PV. Chemický vzorec kyseliny fosfatidové (PA)



PIV. Chemický vzorec lysofosfolipidu

