

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**IZOLACE PROTEINŮ Z OVIDUKTÁLNÍ TEKUTINY PRASNICE
AFINITNÍ CHROMATOGRafiÍ NA DNA-CELULOSE**

Isolation of proteins from sow oviductal fluid
by affinity chromatography on DNA-cellulose

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Řešitel: Tereza Černá

Školitel: RNDr. Jiří Liberda, Ph.D.

PRAHA 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat mému školiteli RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D. za vedení, poskytnutí cenných rad a pomoc při psaní mé bakalářské práce. Paní prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. děkuji za ochotu poradit a za vytvoření přátelské atmosféry. Mé díky patří i kolegyním z laboratoře za jejich pomoc, spolupráci a stále dobrou náladu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za vypracování metody MALDI-TOF.

V neposlední řadě děkuji rodině a blízkým, kterým vděčím za dlouhodobou podporu, pochopení a trpělivost na mé cestě za vzděláním.

Obsah

Poděkování.....	3
Obsah	4
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
Seznam použitých zkratk	9
1 Úvod.....	10
1.1 Pohlavní rozmnožování.....	10
1.2 Pohlavní ústrojí prasnice	10
1.2.1 Vaječník (<i>ovarium</i>)	11
1.2.2 Vejcovod (<i>tuba uterina, oviductus</i>)	11
1.2.3 Děloha (<i>uterus</i>)	12
1.2.4 Pochva (<i>vagina</i>)	12
1.2.5 Estrální cyklus.....	12
1.3 Pohlavní buňky.....	13
1.3.1 Samičí pohlavní buňky	13
1.3.2 Samčí pohlavní buňky	14
1.4 Fertilizace	15
1.5 Oviduktální tekutina.....	17
1.6 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny.....	18
1.7 Cíl práce	19
2 Materiál a metody	20

2.1	Materiál	20
2.1.1	Biologický materiál.....	20
2.1.2	Chemikálie	20
2.1.3	Další materiál.....	21
2.2	Metody	21
2.2.1	Izolace oviduktální tekutiny.....	21
2.2.2	Precipitace bílkovin síranem amonným.....	21
2.2.3	Afinitní chromatografie na DNA-celulose – sloupcové provedení	22
2.2.4	Afinitní chromatografie na DNA-celulose – vsádkové provedení	22
2.2.5	Afinitní chromatografie na heparinovém sloupci	23
2.2.6	SDS-elektroforéza dle Laemmliho	23
2.2.7	Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny	25
2.2.8	Stanovení antimikrobiální aktivity oviduktální tekutiny	25
2.2.9	Stanovení glykosidasové aktivity oviduktální tekutiny	26
2.2.10	Identifikace proteinů oviduktální tekutiny pomocí MALDI-TOF analýzy ...	26
2.2.11	Izolace DNA z jater prasnice	27
2.2.12	Příprava polyakrylamid-allyl-aminové matrice	28
2.2.13	Příprava afinitního nosiče: DNA – divynylsulfonem aktivovaný polyakrylamid-allyl-aminový kopolymer	28
3	Výsledky	29
3.1	Izolace oviduktální tekutiny	29
3.2	Afinitní chromatografie na DNA-celulose – sloupcové provedení.....	29
3.3	Afinitní chromatografie na DNA-celulose – vsádkové provedení.....	30

3.4	Afinitní chromatografie na heparinovém sloupci	31
3.5	Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny	33
3.6	Stanovení antimikrobiální aktivity oviduktální tekutiny.....	35
3.7	Stanovení glykosidasové aktivity oviduktální tekutiny	36
3.8	Identifikace proteinů oviduktální tekutiny pomocí MALDI-TOF analýzy.....	37
3.9	Příprava afinitního nosiče: DNA – divinylsulfonem aktivovaný polyakrylamid-allyl-aminový kopolymer.....	38
4	Diskuze	39
5	Závěr	41
	Literatura.....	42

Abstrakt

Oviduktální tekutina byla izolována z vejcovodů prasnice, tekutina byla zmražena a lyofilizována pro následnou chromatografickou separaci na DNA-celulose a pro stanovení antimikrobiální a glykosidasové aktivity.

Afinitní chromatografií na DNA-celulose byly separovány dvě frakce – proteklá a vázající. SDS-elektroforézou byly detekovány čtyři zóny - tři zóny o relativních molekulových hmotnostech 15 000 – 21 000, odpovídající relativní molekulovou hmotností histonům, a čtvrtá zóna o $M_r \sim 33\,500$. Tyto zóny jsou odeslány na identifikaci pomocí analýzy MALDI-TOF.

Byla prokázána antimikrobiální aktivita ve frakci izolované na DNA-celulose, a to ve frakci, která se nevázala; a v celkové oviduktální tekutině. Ve vázající frakci nebyla sledována antimikrobiální aktivita, neboť afinitní chromatografie neposkytla dostatečné množství proteinů pro relevantní stanovení.

Byla potvrzena přítomnost glykosidasové aktivity v celkové oviduktální tekutině.

Klíčová slova: afinitní chromatografie, antimikrobiální aktivita, glykosidasová aktivita, oviduktální tekutina, prasnice, proteiny podobné histonům

Abstract

Oviductal fluid was isolated from sow oviduct and then frozen and lyophilized. The obtained material was separated by affinity chromatography on DNA-cellulose and used as well for determination of antimicrobial and glycosidases activity.

Two fractions – non-binding and bound - were obtained by affinity chromatography on DNA-cellulose. Four protein zones were detected on the SDS-electrophoreogram in the binding fraction of chromatographic separation – three zones with relative molecular weight 15 000 – 21 000. These zones correspond by their relative molecular weights to relative molecular weight of histones. The last zone was corresponding to $M_r \sim 33\ 500$. All of these zones were sent for identification using MALDI-TOF analysis.

The antimicrobial activity was detected in the non-binding fraction and in oviductal fluid. Contrary to this, the antimicrobial activity was not present in the bound fraction, due to the fact that in this case only an insignificant amount of proteins was found in the bound fraction.

The presence of the glycosidases activity was shown in oviductal fluid.

(In Czech)

Keywords: affinity chromatography, antimicrobial activity, glycosidases activity, histone-like proteins, oviductal fluid, sow

Seznam použitých zkratek

AA	- Akrylamid
ACN	- Acetonitril
APS	- Persíran amonný
BIS	- N,N'-methylenbisakrylamid
CBB	- Coomasie Brilliant Blue R - 250
EDTA	- Kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. „ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> “)
IMAC	- z angl. „ <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i> “
MALDI	- z angl. „ <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> “
M _r	- Relativní molekulová hmotnost
MS	- Hmotová spektrometrie (z angl. „ <i>Mass Spectrometry</i> “)
SDS	- Dodecylsulfát sodný (z angl. „ <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> “)
TEMED	- N,N,N',N'-Di(dimethylamino)ethan
TFA	- Kyselina trifluoroctová (z angl. „ <i>trifluoroacetic acid</i> “)
TOF	- z angl. „ <i>Time of Flight</i> “
Tris	- Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris.HCl	- Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid

1 Úvod

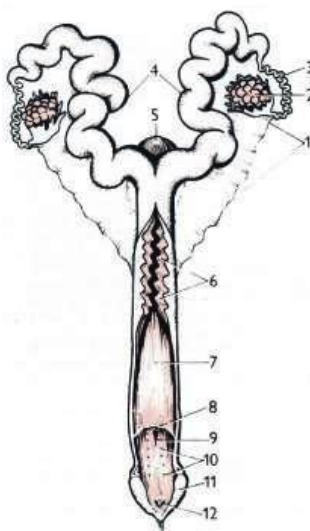
Reprodukce je základní charakteristickou vlastností všech živých organismů. Schopností rozmnožovat se, vytvářet nové jedince, zajišťují organismy předávání života z pokolení na pokolení, a tím zachování druhu [1]. Rozmnožování může probíhat pohlavně nebo nepohlavně.

1.1 Pohlavní rozmnožování

Pohlavně se rozmnožují všichni vyšší mnohobuněční živočichové [2]. Základním rysem tohoto rozmnožování je produkce pohlavních buněk – gamet, a jejich splynutí. Zralé gamety, tedy samičí vajíčko a samčí spermie, jsou vždy haploidní, jejich splynutím vzniká diploidní zygota, která je základem nového jedince [2]. Pohlavní buňky se vyvíjejí v pohlavních žlázách, které jsou součástí pohlavního ústrojí.

1.2 Pohlavní ústrojí prasnice

Pohlavní orgány nejsou bezpodmínečně nutné pro život, protože neslouží k zachování jedince, ale k zachování druhu [3]. Jejich funkcí je nejen produkce pohlavních buněk, ale i zprostředkování oplození a poskytnutí prostředí pro ochranu a výživu vyvíjejícímu se zárodku a plodu [1,3]. K reprodukčním orgánům samice (Obr. 1) patří párové vaječníky a vejcovody, děloha, pochva a vulva [4].

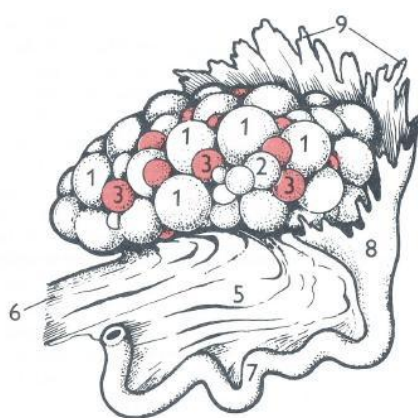


Obr. 1 – Pohlavní orgány prasnice [1]

1 – široký děložní vaz, 2 – vaječník, 3 – vejcovod, 4 – děložní rohy, 5 – vrchol močového měchýře, 6 – sliznice krčkového kanálu, 7 – pochva, 8 – panenská blána, 9 – vyústění močové trubice, 10 – ústí vývodu předsíňových žláz, 11 – stydký pysk, 12 - poštváček

1.2.1 Vaječník (*ovarium*)

Vaječníky (Obr. 2) jsou párové žlázy uložené v pánevní dutině, skládají se z kůry a dřene [4]. Vaječníky prasnice mají nerovný, hrbatý povrch v důsledku většího počtu vystupujících folikulů a žlutých tělísek, takže vzhledem připomínají malinu či hrozen [1,5]. Ve vaječnících se tvoří a vyvíjejí samičí pohlavní buňky, vajíčka, a pohlavní hormony estrogen a progesteron. Obě tyto funkce jsou zajištěny folikuly vyskytujícími se v kůře vaječnίκů. V pubertě pod vlivem pohlavních hormonů dochází ke spuštění estrálního cyklu, v rámci kterého na vaječnících periodicky rostou folikuly, uvolňují se z nich vajíčka a sekretují se pohlavní hormony [4].



Obr. 2 – Vaječník prasnice [1]

1 – dozrávající měchýřkovitý folikul, 2 – rostoucí folikuly v různém stádiu vývoje, 3 – žlutá tělíska ve stadiu regrese, 5 – vejcovodové okruží, 6 – vlastní vaječnickový vaz, 7 – vejcovod, 8 – nálevka vejcovodu, 9 – třásně nálevky vejcovodu

1.2.2 Vejcovod (*tuba uterina, oviductus*)

Vejcovod je párová zvlněná trubice z hladké svaloviny, v níž dokončuje svůj vývoj ovulovaná vaječná buňka. Ve vejcovodu též dochází k oplození vajíčka a již oplozené vajíčko se vejcovodem dostává do dělohy [4, 5]. Vejcovod se dělí na tři anatomicky i funkčně odlišné části – nálevka (*infundibulum*), rozšířený úsek (*ampulla*) a zúžený úsek (*istmus*) [10]. K zachycení ovulovaného vajíčka slouží nálevka, která přiléhá k ovariu [3], dále je vajíčko posouváno do *ampulle*, kde probíhá fertilizace. *Istmus* funguje jako rezervoár spermií [10]. Vejcovod probíhá klikatě v řase spojující vaječník s děložním rohem.

Epitel vejcovodu se skládá z jedné vrstvy cylindrických buněk dvou typů. Jeden typ představují vyšší cylindrické buňky s kynocíliemi a druhým typem jsou kolem nich přítomné sekreční buňky [3]. Sekreční buňky se podílejí na kapacitaci spermií, oplození a zajišťují vývoj časného embrya před uhnízděním v děloze. Řasinky cylindrických buněk se pohybují směrem k děloze a napomáhají pohybu ovulovaného oocytu směrem k děložnímu rohu a kontaktu spermií s oocytem [4]. Vzájemný poměr obou druhů buněk je různý v různých úsecích vejcovodu a mění se také v závislosti na průběhu estrálního cyklu [3].

1.2.3 Děloha (*uterus*)

Děloha je silnostěnný dutinový orgán sloužící pro vývoj oplozeného vajíčka v embryo a plod. U prasnic se vyskytuje dvourohá děloha, pro kterou je charakteristické jedno tělo, jeden krček a dva rohy [1, 4, 5]. Děloha je zavěšena na širokých děložních vazech, přičemž tělo a krček jsou uloženy v pánevní dutině a děložní rohy částečně zasahují do dutiny břišní [5].

Děložní stěna je tvořena serózou, hladkou svalovinou (*myometrium*) a sliznicí (*endometrium*) [4]. Na povrchu *endometria* se u prasnic nachází víceřadý cylindrický epitel a uvnitř vrstva slizničního vaziva se značným množstvím žláz, jejichž sekrety pomáhají při uhnízdění embrya a při jeho výživě před vytvořením placenty [1,4]. Estrální cyklus ovlivňuje sekreci žláz, ale i aktivitu *myometria* [4].

1.2.4 Pochva (*vagina*)

Pochva je široká svalová trubice vystlaná sliznicí, je uložena na spodině dutiny pánevní a spojuje dělohu s vulvou [4,5]. Pochva plní funkci kopulačního orgánu pro zasouvání penisu během pohlavního aktu [4].

Stěna pochvy je velmi pružná, je vystlaná bezžlaznatou sliznicí, jejíž povrch je krytý vrstevnatým dlaždicovým epitelem [1, 3, 4]. Charakter epitelu se mění v závislosti na estrálním cyklu [4].

Kaudálním pokračováním pochvy je poševní předsíň a vulva [1, 3, 4].

1.2.5 Estrální cyklus

Od puberty až do zániku pohlavní činnosti dochází na pohlavních orgánech a v celém organismu samic k periodicky se opakujícím změnám, které se souhrnně nazývají pohlavní, sexuální nebo reprodukční cyklus. Nejvýraznějším rysem v tomto procesu je u zvířat říje – *estrus*, proto se tento cyklus nazývá estrální [1]. Estrální cyklus je zodpovědný

za vytváření podmínek příznivých pro oplození vajíčka a vývoj zárodku a plodu. Prasnice patří k polyestrickým zvířatům, což znamená, že se u nich pohlavní cyklus opakuje několikrát do roka v poměrně krátkých intervalech [5].

Podle morfologických změn na pohlavních orgánech samic lze pohlavní cyklus rozdělit na 5 stádií:

Proestrus je období před začátkem říje [3]. Na vaječnicku narůstá měchýřkovitý Graafův folikul, na děloze nastává proliferace *endometria* a v pochvě se zvyšuje vrstva krycího epitelu [1].

Estrus je období říje, kdy vnější části samičích pohlavních orgánů jsou prokrvené, v děloze končí proliferace a epitel pochvy rohovatí. Ve vaječnicku dozrávají folikuly a nastává ovulace [3].

Postestrus představuje období, kdy se na vaječnicku vyvíjí žluté tělísko. V této době děložní žlázy intenzivně vyměšují řídký, mléčně zakalený sekret [5].

Metestrus nastupuje v případě, že nedošlo k oplození vajíčka [5]. Ve vaječnicku postupně zaniká žluté tělísko, na děloze se zastaví sekrece žláz, ustupuje překrvení děložní sliznice [3].

Diestrus neboli meziříjová fáze je u polyestrických zvířat velmi krátká a prakticky chybí [5].

1.3 Pohlavní buňky

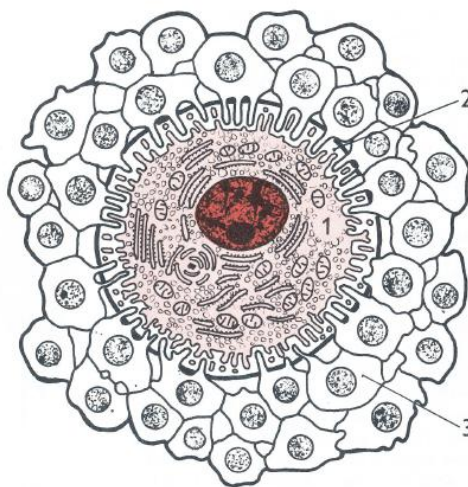
U většiny živočichů se složitější tělesnou stavbou se již v počátku vývoje zárodku odlišují od somatických buněk buňky prapohlavní (gonocyty). Prapohlavních buněk bývá malé množství a během zárodečného vývoje se dostávají do gonády vlastním pohybem nebo krevním oběhem a tvoří základní soubor buněk pro vývoj gamet [2].

1.3.1 Samičí pohlavní buňky

Vývoj vajíčka – oogeneze – probíhá ve vaječnicku [2]. Diploidní oogonie vzniklé z prapohlavních buněk se mitoticky množí, čímž vznikají oocyty I. řádu [2, 4]. Tyto oocyty mají dvě sady chromozomů a jsou uloženy v primárních folikulech. Ještě před narozením samice zahájí tyto oocyty první meiotické dělení, avšak v profázi I se jejich vývoj dočasně zastaví, což trvá až do puberty, kdy se spouští estrální cyklus. V té době začnou oocyty růst až do dosažení potřebné velikosti k ukončení meiózy [4]. Nevznikají však dvě rovnocenné buňky, ale velký sekundární oocyt, v němž zůstává prakticky celá cytoplazma, a malá pólová buňka, kam se vydělí přebytečné chromozomy [2, 4]. Meióza pokračuje druhým

meiotickým dělením a u většiny savců se znovu zastavuje v druhé metafázi. V této fázi jsou oocyty ovulovány a k úplnému dokončení meiotického dělení dojde až po oplození [4].

Samičí pohlavní buňka – vajíčko (Obr. 3) – patří k největším buňkám v těle. Její tvar je kulovitý a obsah tvoří zrnitá cytoplazma. Na blánu vajíčka se přikládá jako sekundární obal silná *Zona pellucida* sestávající ze tří glykoproteinů (ZP1, ZP2 a ZP3) [7], *Zona pellucida* je produktem folikulárních buněk ve vaječnickovém folikulu. Při ovulaci opouští vajíčko vaječník ještě s vrstvou folikulárních buněk, které se podle uspořádání nazývají *Corona radiata* [1].



Obr. 3 – Vajíčko [1]

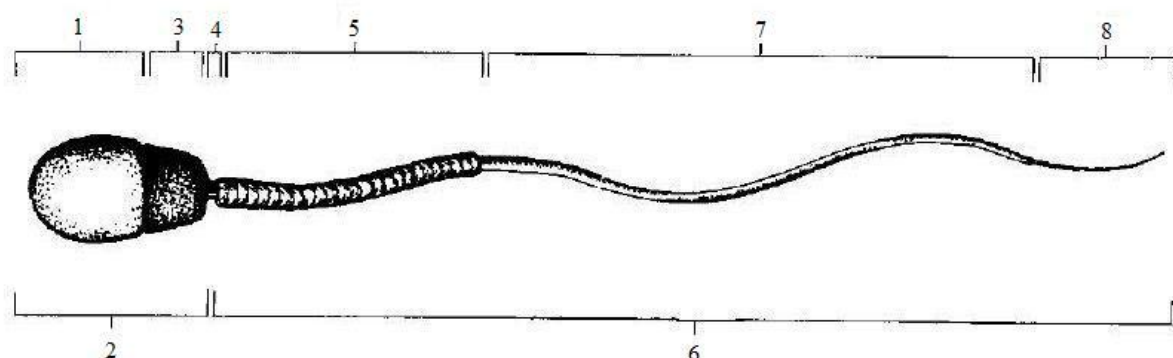
1 – vaječná buňka s jádrem, 2 - *Zona pellucida*, 3 - *Corona radiata*

1.3.2 Samčí pohlavní buňky

Proces vývoje samčích pohlavních buněk se nazývá spermatogeneze a probíhá v semenných kanálcích varlete. Prapohlavní buňky se zde mění ve spermatogonie, které se mitoticky množí a posléze se přemění v primární spermatocyty. Ty procházejí redukčním dělením – meiózou, z každé buňky tak vznikají dva sekundární spermatocyty a z těch čtyři spermatidy. Spermatidy se mění na spermie (Obr. 4 na str. 15) procesem, při němž ztrácí většinu cytoplazmy a naopak vytváří struktury, které se uplatňují při oplození [2].

Samčí pohlavní buňka – spermie – je dlouhá, štíhlá, pohyblivá buňka. Skládá se z hlavičky a bičíku. Hlavička je složená z jádra a z akrosomu, celá je pokrytá buněčnou membránou, která přechází na bičík. Jádro má haploidní počet chromozomů. Akrosom je

membránový vak pokrývající přední část jádra, obsahuje hydrolytické enzymy. Bičík je pohybovým orgánem spermie. Skládá se z krčku, středního oddílu, hlavního oddílu a koncového oddílu [3].



Obr. 4 – Spermie [3]

1 – akrosom, 2 – hlavička, 3 – postakrosomová oblast, 4 – krček,
5 – střední oddíl, 6 – bičík, 7 – hlavní oddíl, 8 – koncový oddíl

1.4 Fertilizace

Fertilizace (Obr. 5 na str. 16) neboli oplození je proces splynutí samčí a samičí pohlavní buňky a vytvoření jedné buňky zvané zygota. K oplození obvykle dochází v *ampulle* vejcovodu [4].

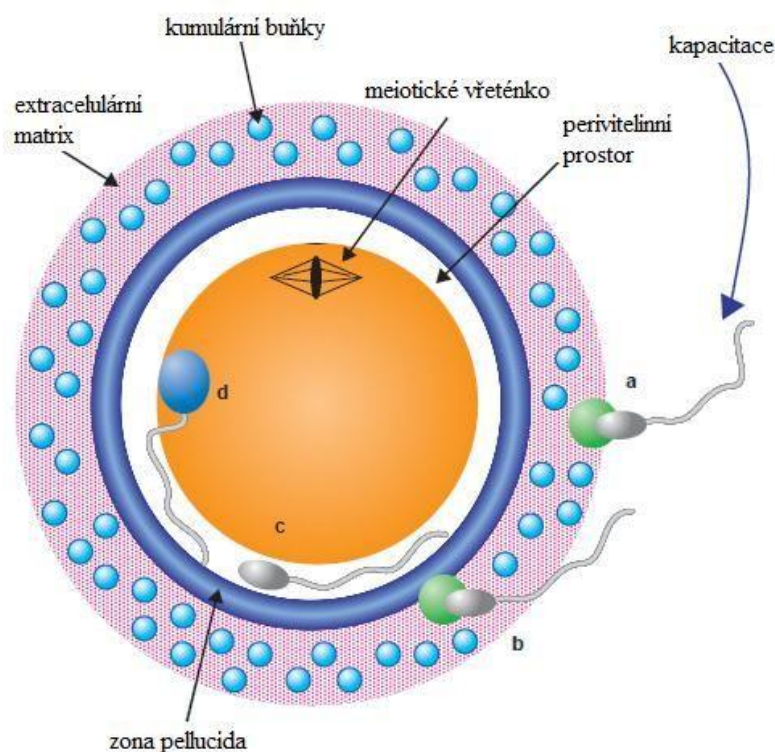
Spermie, které projdou dělohou a překonají bariéru spoje dělohy a vejcovodu, se váží na epitel v istmické části oviduktu prasnice – tato část funguje jako rezervoár spermií mezi inseminací a ovulací, spermie jsou zde udržovány v životaschopném stavu několik hodin až dní, přičemž je omezena jejich pohyblivost a regulována kapacitace [11, 12, 13]. Spermie se váží k epiteliálním buňkám vejcovodu pomocí spermadhesinů [14].

Procesem kapacitace získává spermie schopnost oplození vajíčka. Ke kapacitaci dochází díky interakci spermií se složkami ovidukální tekutiny [9]. Kapacitace je v podstatě souhrn dějů a změn nejen v metabolismu, ale i ve vlastnostech cytoplazmatické membrány. Zahrnuje změnu fosforylace proteinů, zvýšení intracelulárního pH a množství vápníku, efflux cholesterolu a v neposlední řadě hyperpolarizaci membránového potenciálu [7] (právě tyto procesy jsou inhibovány u spermií navázaných na epiteliální buňky oviduktu [13]). Hyperaktivace spermií je charakterizována změnou rychlosti bičíku a jeho pohybu [8].

Prvním krokem fertilizace je penetrace spermie přes kumulární buňky oocyty a přes *Zonu pellucidu* [4]. To je zajištěno hydrolytickými enzymy akrosomu a bičíkem [4]. Při

kontaktu spermie s vajíčkem dochází k tzv. akrosomální reakci [6], kdy hyaluronidasa akrosomu rozruší mezibuněčné spoje kumulárních buněk *Corony radiaty* a akrosin rozpustí *Zonu pellucidu*. Vzniklým otvorem pronikne spermie až k plazmatické membráně vajíčka a později do cytoplazmy [4]. Adheze spermie na *Zonu pellucidu* je zprostředkována glykoproteinem ZP3, který je zodpovědný za správné navázání spermie a který funguje též jako kompetitivní inhibitor adheze (ZP1 a ZP2 tyto funkce nemají) [7]. V místech specifických glykoproteinových receptorů membrány vajíčka a druhově specifických polysacharidových složek membrány spermie dochází k fúzi membrán, která je provázána lipolytickou aktivitou spermie [6].

Fúze membrán vede k aktivaci vajíčka a iniciuje vývoj embrya. Ve vajíčku vzroste koncentrace vápníku v cytosolu, což indukuje dokončení II. meiotického dělení [7]. Aktivací vajíčka se dále spustí procesy, které brání průniku dalších spermií, polyspermii. Dojde k uvolnění kortikálních granulí do perivitelinního prostoru a ke ztvrdnutí *Zony pellucidy* [4].



Obr. 5 – Fertilizace vajíčka [7]

a – interakce a průnik spermie kumulárními buňkami, b – kontakt spermie se *Zonou pellucidou*, akrosomová reakce, c – průnik spermie skrz *Zonu pellucidu* do perivitelinního prostoru, d – fúze membrán spermie a vajíčka

1.5 Oviduktální tekutina

Získávání oviduktální tekutiny je poněkud složitější, a proto její složení není příliš známé, neboť se liší jak individuálně, tak i v průběhu pohlavního cyklu prasnice. Není ani příliš prozkoumána funkce již identifikovaných proteinů [15].

Oviduktální tekutina je směs látek pocházejících z krevní plazmy a specifických proteinů produkovaných epitelem oviduktu [16, 17]. Sekreční aktivita oviduktu závisí na poměru estrogenu a progesteronu v krvi, a tedy na fázi estrálního cyklu samice [16]. Estrogen sekreci stimuluje, zatímco progesteron inhibuje, tedy největší sekrece nastává v období ovulace či krátce po ní, minimální sekrece je zaznamenána v polovině diestrální fáze nebo během těhotenství [16, 18].

Koncentrace iontů v oviduktální tekutině bývá s několika výjimkami stejná jako v krevní plazmě [18]. Vyšší koncentraci v oviduktální tekutině obvykle mají draselné a chloridové ionty, vápenaté ionty nižší [17, 18]. Hodnota pH oviduktální tekutiny bývá v rozsahu 7,5 - 8 díky vysoké koncentraci hydrogenuhličitanu. Mechanismus transportu iontů doposud není znám, částečně však může být za transport zodpovědná nejdůležitější složka oviduktální tekutiny – voda, díky osmotickému gradientu [17].

Důležitými látkami oviduktální tekutiny zejména pro výživu gamet a embrya jsou glukosa, sacharosa, pyruvát a laktát [18, 19]. Nejvyšší koncentrace glukosy v oviduktální tekutině je první den po *estru*, nejnižší v pre- až poovulačním období [19]. Glukosa, laktát a pyruvát mohou být transportovány do lumen oviduktu z krve, laktát navíc může být produkován buňkami stěny oviduktu. Stejně tak pyruvát může být syntetizován z laktátu či glukosy [16].

V oviduktální tekutině prasnic nalezneme 20 kodogéních a 5 metabolických aminokyselin [20]. Zdá se, že volné aminokyseliny jsou důležité pro správnou funkci gamet a přežití embrya [18].

I když plazmatické bílkoviny tvoří většinu obsahu bílkovin oviduktální tekutiny, jejich koncentrace v tekutině je oproti séru 5-10% [17]. Nejhojněji vyskytujícími se proteiny jsou sérový albumin a imunoglobulin G (IgG), které představují asi 95 % celkového obsahu proteinů v oviduktální tekutině [21]. Díky IgG by oviduktální tekutina mohla mít antimikrobiální aktivitu. Nejen u prasat, ale i u dalších druhů byly identifikovány OGP (ovidukt-specific glykoproteins) produkované sekrečními buňkami

oviduktu. Zatím nebyla zjištěna jejich funkce, ale je známo, že mají spojitost se *Zonou pellucidou*, cytoplazmou vajíčka nebo raným embryem [18, 22].

V oviduktální tekutině se nalézají růstové faktory (growth factors). Růstové faktory jsou multifunkční regulátory buněčné proliferace a diferenciaci [23]. Koncentrace IGF-I a II (insulin-like growth factors) a EGF (epidermal growth factor) je závislá na fázi estrálního cyklu a nejvyšší je při ovulaci [18, 23, 24, 25].

Na povrchu epiteliálních buněk a v intraluminální tekutině je lokalizován glykosaminoglykan hyaluronan (kyselina hyaluronová). Zdá se, že hyaluronan je biologicky aktivní díky své vazbě na specifický buněčný receptor CD44. Fyziologická funkce hyaluronanu zatím není známa, ale jeho lokalizace (rezervoár spermií) naznačuje možnou roli během kapacitace spermií či fertilizace [26].

Oviduktální tekutina vykazuje proteasovou aktivitu, byla prokázána aktivita serinových proteas a metaloproteas [27].

1.6 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny

Samičí reprodukční trakt je významným místem nejen pro oplození, ale i pro zachování plodnosti a pro úspěšné donošení plodu. Fertilizace je přesně koordinovaný proces, který by mohl být narušen nespecifickou imunitní reakcí, proto je zde rozhodující vrozená imunitní obrana proti mikroorganismům.

Antimikrobiální peptidy jsou proteiny malé molekulové hmotnosti se širokým spektrem antimikrobiální aktivity. Tyto evolučně konzervované peptidy jsou většinou pozitivně nabitě a ve svém řetězci obsahují hydrofilní i hydrofobní části [28]. Histony, proteiny od histonů odvozené či proteiny tvořené proteolytickým štěpením histonů představují významnou skupinu látek, které se mimo jiné podílejí na vrozené obraně různých druhů organismů [29].

V lidské placentě byly identifikovány histony H2A a H2B s antimikrobiální a endotoxin-neutralizační aktivitou [30]. Přítomnost histonů H1 a H2B se širokým spektrem antimikrobiální aktivity byla popsána i v kuřecích vejcovodech [31]. V kravské oviduktální tekutině byly též identifikovány histony H2A, H2B, H3.3 a H4 s důkazem antimikrobiální aktivity [29].

Doposud bylo velmi málo pozornosti věnováno histonům, proteinům podobným histonům (histone-like proteins) nebo proteinům s antimikrobiální aktivitou v savčím oviduktu či oviduktální tekutině [29].

1.7 Cíl práce

O proteinech v savčích oviduktech a oviduktální tekutině není příliš známo. Doposud byly identifikovány histony a jím podobné proteiny hlavně v lidském rozmnožovacím ústrojí, dále pak v kravské oviduktální tekutině, kde byla prokázána jejich antimikrobiální aktivita.

Cílem předkládané práce bylo izolovat histony z oviduktální tekutiny prasnice afinitní chromatografií na DNA-celulose, optimalizovat tuto metodu, dále charakterizovat získaný preparát pomocí SDS-elektroforézy a MALDI-TOF. V neposlední řadě byla věnována pozornost studiu antimikrobiální aktivity získaného preparátu.

2 Materiál a metody

2.1 Materiál

2.1.1 Biologický materiál

Urogenitální trakty prasnic byly získány na jatkách v Českém Brodě. Byly použity čerstvé.

Buňky kmene *Escherichia coli* serotypu K-12 byly darovány laboratoří č. 216 na katedře biochemie PřF UK.

Prasečí játra byla zakoupena v řeznictví.

2.1.2 Chemikálie

4-Nitrofenyl- α -D-glukopyranosid	- Serva, Heidelberg, Německo
4-Nitrofenyl- β -D-glukopyranosid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Akrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Allylamin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Bisakrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Citrát sodný	- Lachema, Brno, ČR
Coomasie Brilliant Blue R - 250	- Serva, Heidelberg, Německo
Divinylsulfon	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
DNA-celulosa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dodecylsulfát sodný	- BDH Chemicals Ltd., Poole, England
Ethanol	- Lachema, Brno, ČR
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Serva, Heidelberg, Německo
Heparinový sloupec	- Připraven na katedře biochemie PřF UK
Hydrogenuhlíčan amonný	- Penta, Chrudim, ČR
Hydrogenuhlíčan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydroxid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid draselný	- Lachema, Brno, ČR

Chlorid sodný	- Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR
Isopropylalkohol	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina octová	- Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR
LBA medium	- Dar (laboratoř č. 216 na katedře biochemie PřF UK)
Lysin	- Serva, Heidelberg, Německo
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
Na ₂ EDTA	- Lachema, Brno, ČR
N,N,N',N'-Di(dimethylamino)ethan	- Serva, Heidelberg, Německo
N,N'-methylenbisakrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
Persíran amonný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Polymer lysosomu	- Připraven na katedře biochemie PřF UK
Síran amonný	- Penta, Chrudim, ČR
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	- Lachema, Brno, ČR
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko

2.1.3 Další materiál

Mikrotitrační polystyrenová destička	- NUNC, Dánsko
--------------------------------------	----------------

2.2 Metody

2.2.1 Izolace oviduktální tekutiny

Z urogenitálního traktu prasnice byly nůžkami odděleny ovidukty od rohu dělohy a vaječníku. Každý z oddělených oviduktů byl dvakrát promyt 0,2M NH₄HCO₃ pomocí injekční stříkačky a tekutina byla jímána do kádinky. Tekutina získaná z oviduktů byla zmrazena a lyofilizována.

2.2.2 Precipitace bílkovin síranem amonným

200 mg lyofilizovaného vzorku oviduktálních tekutin bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Bylo přidáno 1,76 g síranu amonného (30% saturace). Poté byl roztok centrifugován 10 minut při 14 000 x g na přístroji Eppendorf MiniSpin plus. K supernatantu bylo přidáno 5,46 g síranu amonného (100% saturace) a roztok byl 20

minut centrifugován při 14 000 x g. Pelety byly rozpuštěny v minimálním množství destilované vody a vzniklý roztok byl následně dialyzován, zmražen a lyofilizován.

2.2.3 Afinitní chromatografie na DNA-celulose – sloupcové provedení

Složení roztoků:

Nanášecí pufr: 2 ml 0,5M Tris + 5 ml 2M KCl do 100 ml H₂O

Eluční pufr: 2 ml 0,5M Tris + 50 ml 2M KCl do 100 ml H₂O

Vlastní chromatografie:

Sloupec byl promyt 15 ml nanášecího pufru.

Na sloupec bylo naneseno 20 - 100 mg lyofilizovaného vzorku ovidutálních tekutin rozpuštěných ve 2 ml nanášecího pufru.

Nejprve byla kolona promývána nanášecím pufrem, dokud absorbance při 280 nm neklesla pod 0,1 – proteklá frakce. Následně byla kolona promývána elučním pufrem, dokud byla detekována přítomnost proteinů měřením absorbance při 280 nm – vázající frakce.

Frakce byly jímány po 3 ml. Absorbance byly měřeny na přístroji Helios γ (Thermo Electron Corporation).

Sebrané odpovídající frakce byly spojeny a poté byly dialyzovány, zmrazeny a lyofilizovány pro následnou separaci SDS-elektroforézou.

2.2.4 Afinitní chromatografie na DNA-celulose – vsádkové provedení

Složení roztoků:

Nanášecí pufr: 2 ml 0,5M Tris + 5 ml 2M KCl do 100 ml H₂O

Eluční pufr: 2 ml 0,5M Tris + 50 ml 2M KCl do 100 ml H₂O

Vlastní chromatografie:

DNA-celulosa byla promyta 6 ml nanášecího pufru a centrifugována 10 minut při 14 000 x g.

Na DNA-celulosu bylo naneseno 90 mg lyofilizovaného vzorku ovidutálních tekutin rozpuštěných ve 12 ml nanášecího pufru (vzorek byl naředěn tak, aby absorbance roztoku byla přibližně 2 při 280 nm).

Nejprve byla DNA-celulosa promývána nanášecím pufrem a centrifugována 10 minut při 14 000 x g, dokud absorbance supernatantu při 280 nm neklesla pod 0,1 –

proteklý supernatant. Následně byla DNA-celulosa promývána elučním pufrem a centrifugována 10 minut při 14 000 x g, dokud byla detekována přítomnost proteinů měřením absorbance při 280 nm – vázající supernatant. Centrifugace byla provedena na přístroji Eppendorf MiniSpin plus.

Supernatanty byly sbírány po 1 ml. Absorbance byly měřeny na přístroji Helios γ .

Sebrané supernatanty odpovídajících frakcí byly spojeny a poté byly dialyzovány, zmraženy a lyofilizovány pro následnou separaci SDS-elektroforézou.

2.2.5 Afinity chromatografie na heparinovém sloupci

Složení roztoků:

Nanášecí pufr: 2 ml 0,5M Tris + 5 ml 2M KCl do 100 ml H₂O

Eluční pufr: 2 ml 0,5M Tris + 50 ml 2M KCl do 100 ml H₂O

Vlastní chromatografie:

Heparinový sloupec byl promyt 15 ml nanášecího pufru.

Na sloupec bylo nanášeno 100 mg lyofilizovaného vzorku oviduktálních tekutin rozpuštěných ve 2 ml nanášecího pufru.

Nejprve byla kolona promývána nanášecím pufrem, dokud absorbance eluátu při 280 nm neklesla pod 0,1 – proteklá frakce. Následně byla kolona promývána elučním pufrem, dokud byla detekována přítomnost proteinů měřením absorbance při 280 nm – vázající frakce. Při prvním stanovení byla kolona navíc promyta 3M roztokem NaCl, díky kterému došlo k ujištění, že v koloně nezůstaly žádné bílkoviny.

Frakce byly jímány po 3 ml. Absorbance byly měřeny na přístroji Helios γ .

Sebrané korespondující frakce byly spojeny a poté byly dialyzovány, zmraženy a lyofilizovány pro následnou separaci SDS-elektroforézou.

Analogickým způsobem byla provedena chromatografie se vzorkem oviduktálních tekutin precipitovaným síranem amonným (kapitola 2.2.2 na str. 21). Na sloupec bylo nanášeno 0,9 mg vzorku rozpuštěných ve 2 ml nanášecího pufru.

2.2.6 SDS-elektroforéza dle Laemmliho

SDS-elektroforéza byla provedena dle Laemmliho [32].

Složení roztoků:

A. Roztok akrylamidu: 29,2 g AA + 0,8 g bis-AA + 70 ml H₂O

B. 1,5M Tris.HCl o pH 8,3: 18,5 g Tris + 100 ml H₂O, pH upraveno pomocí HCl

C. 0,5M Tris.HCl o pH 6,8: 6 g Tris + 100 ml H₂O, pH upraveno pomocí HCl

10% SDS: 10 g SDS + 90 ml H₂O

Vzorkový pufr neredukující: 7 ml H₂O + 2 ml 0,5M Tris.HCl o pH 6,8 + 4,28 g glycerolu + 3 ml 10% SDS + 0,4 ml 0,1% bromfenolové modři

Elektrodový pufr: 9 g Tris + 43,2 g glycinu + 3 g SDS do 600 ml H₂O, před použitím ředěno 60 ml zásobního roztoku do 240 ml H₂O

10% APS: 0,1 g APS + 0,9 ml H₂O

15% separační gel: 2,5 ml roztoku B + 5 ml roztoku A + 2,4 ml H₂O + 0,1 ml 10% SDS. Těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 µl TEMEDu a 40 µl 10% APS.

4% zaostřovací gel: 1500 µl H₂O + 625 µl roztoku C + 25 µl 10% SDS + 325 µl roztoku A + 40 µl bromfenolové modři. Těsně před aplikací bylo přidáno 3,8 µl TEMEDu a 35 µl 10% APS.

Barvení gelu: 0,5 g CBB + 450 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 450 ml H₂O

Odbarvení gelu: 250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O

Fixace gelu: 3,6 ml ethanolu + 4 ml glycerolu + 10,4 ml H₂O

Standard: polymer lysosymu 1 mg/ml

Postup:

Pro elektroforézu byl použit přístroj firmy Bio-Rad. Separací gel byl nalit mezi dvě vertikální skla upevněná do stojanu pro nalévání gelů, převrstven vodou a ponechán polymerovat.

Po vysušení vody filtračním papírem byla nalita vrstva 4% zaostřovacího gelu, do níž byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek.

Po ukončení polymerace byla sestavena aparatura pro provedení elektroforézy. Do katodového i anodového prostoru byl nalit elektrodový pufr.

Vzorky proteklé a vázající frakce o koncentraci 1 mg proteinů na 100 µl vzorkového neredukujícího pufru byly před nanesením inkubovány 5 minut ve vroucí vodní lázni

Po odstranění hřebenů byly do jamek nanášeny vzorky o objemu 2 - 20 μl pomocí automatické pipety.

Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí. Jako zdroj napětí byl použit přístroj Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150 firmy Pharmacia. Elektroforéza probíhala zpočátku při napětí 80 V, po překročení rozhraní gelů bylo nastaveno napětí 130 V. Elektroforéza trvala 90 minut.

Po skončení elektroforézy byl gel barven přes noc v roztoku pro barvení gelu. Poté byl odbarven v odbarvovacím roztoku, inkubován 25 minut ve fixačním roztoku a fixován v celofánu.

2.2.7 Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny

Z důvodu velmi malého množství získaných proteinů z proteklé a vázající frakce (2.2.3 na str. 22) bylo 4,5 mg proteklé frakce proteinů rozpuštěno v 250 μl LBA media a lyofilizační baňka s vázající frakcí byla vymyta 250 μl LBA media. Do jamek s nejvyšší požadovanou koncentrací proteinu bylo aplikováno 100 μl proteklé frakce, následující jamky byly postupným dvojnásobným ředěním původní koncentrace. Obdobně bylo aplikováno 100 μl vázající frakce. Do posledních – kontrolních jamek nebyly aplikovány proteinové frakce.

Do každé jamky mikrotitační destičky bylo aplikováno 100 μl roztoku buněk *Escherichia coli* v LBA mediu (absorbance přibližně 0,1 při 405 nm na přístroji Helios γ).

Destička byla inkubována při 37°C v přístroji GALLENKAMP, každou hodinu byla měřena absorbance při 405 nm na přístroji Sunrise TECAN.

Stanovení bylo provedeno minimálně dvakrát.

2.2.8 Stanovení antimikrobiální aktivity oviduktální tekutiny

Vzorek připravený dle kapitoly 2.2.1 (str. 21) byl rozpuštěn v LBA mediu tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 100 mg/ml. Do jamek s nejvyšší požadovanou koncentrací proteinu bylo aplikováno 100 μl takto naředěného vzorku proteinu, následující jamky byly postupným dvojnásobným ředěním původní koncentrace (výsledné koncentrace v jamkách byly 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8 a 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Do posledních – kontrolních jamek nebyl aplikován vzorek proteinu.

Do každé jamky mikrotitační destičky bylo aplikováno 100 μl roztoku buněk *Escherichia coli* v LBA mediu (absorbance přibližně 0,1 při 405 nm na přístroji Helios γ).

Destička byla inkubována při 37°C v přístroji GALLENKAMP, každou hodinu byla měřena absorbance při 405 nm na přístroji Sunrise TECAN.

Stanovení bylo provedeno minimálně dvakrát.

2.2.9 Stanovení glykosidasové aktivity oviduktální tekutiny

Do jedné sady jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno po 100 µl citrát-acetátového pufru o pH 4,8, do druhé sady jamek bylo aplikováno po 100 µl roztoku citrát-acetátového pufru o pH 7,2.

Do jamek s nejvyšší požadovanou koncentrací substrátu bylo aplikováno 100 µl 10mM roztoku 4-Nitrofenyl- α -D-glukopyranosidu, následující jamky byly postupným dvojnásobným ředěním původní koncentrace (výsledné koncentrace v jamkách byly 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08 a 0,04 mM). Do posledních – kontrolních jamek nebyl aplikován roztoku 4-Nitrofenyl- α -D-glukopyranosidu.

Byl připraven roztok proteinu (ze vzorku získaného dle kapitoly 2.2.1 na str. 21) o koncentraci 1 mg/ml, bylo aplikováno 100 µl tohoto roztoku do každé jamky mikrotitrační destičky (včetně posledních – kontrolních jamek).

Destička byla inkubována 3 hodiny při 37°C v přístroji GALLENKAMP.

Do každé jamky bylo aplikováno 50 µl 1M NaOH a byla proměřena absorbance při 405 nm na přístroji Sunrise TECAN.

Analogicky byla provedena glykosidasová aktivita s 10mM 4-Nitrofenyl- β -D-glukopyranosidem.

Obě stanovení byla provedena minimálně dvakrát.

2.2.10 Identifikace proteinů oviduktální tekutiny pomocí MALDI-TOF analýzy

MALDI-TOF analýza byla provedena RNDr. Petrem Přikrylem Ph.D. z Ústavu patologické fyziologie a CEH, 1. lékařské fakulty UK v Praze.

Postup:

Frakce proteinů oviduktální tekutiny prasnice byly separovány na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS a gel byl obarven pomocí 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250. Proužky proteinů, určené k MALDI-TOF MS analýze, byly z obarveného gelu vyříznuty skalpelem, odbarveny v 50% ACN v 25mM NH₄HCO₃ a vzorky byly vysušeny. Po redukci a alkylaci byly vzorky štěpeny trypsinem podle postupu popsaného Emmerovou [33].

Peptidy byly následně purifikovány z okyselené reakční směsi na špičkách s C18 fází a podrobeny MALDI-TOF/TOF MS analýze. Analýza peptidů po IMAC byla provedena na MALDI-TOF/TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time-of-flight/time-of-flight) hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Brémy, Německo). Tento přístroj je vybaven dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm a FlexControl softwarem. Pro zpracování dat byl použit software FlexControl. Přístroj byl před měřením externě kalibrován peptidovým kalibračním standardem (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) obsahujícími angiotensin I, angiotensin II, substanci P, bombesin, ACTH (1-17), ACTH (18-39) a somatostatin 28.

Na AnchorChip terčík (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) bylo napipetováno 0,5 µl roztoku matrice (5 mg 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny rozpuštěné v 1 ml 0,1% TFA obsahující 1% kyselinu fosforečnou a 30% ACN) a ponecháno při pokojové teplotě odpařit do sucha. Poté bylo přidáno 0,5 µl vzorku nebo standardu a také bylo ponecháno odpařit do sucha při pokojové teplotě. Terčík byl následně vložen do hmotnostního spektrometru a peptidy byly podrobeny MS/MS analýze.

Programy FlexAnalysis a BioTools (Bruker Daltonics, Germany) spolu s databází Swiss-Prot (SIB, Geneva, Švýcarsko) byly použity k identifikaci peptidů z naměřených MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF spekter. Byly použity následující vyhledávací parametry: tolerance hmotnosti peptidu - 150 ppm a tandemová tolerance hmotnosti – 0,7 Da, enzym-trypsin, „missed cleavage“ -3.

2.2.11 Izolace DNA z jater prasnice

Bylo nařezáno a rozmixováno 0,5 kg jater s 500 ml izolačního roztoku (0,05M Na₂EDTA, 0,5M NaCl a 0,05% SDS). Směs byla inkubována 20 minut při 60°C, následně ochlazená a centrifugována 15 minut při 6 000 x g v přístroji Janetzki K-23.

K odebranému supernatantu byl přidán přibližně stejný objem studeného (-20°C) isopropylalkoholu, roztok byl promíchán a ponechán stát na ledu 5 minut.

Vysrážená DNA byla namotána na špachtli a přenesena do 20 ml vychlazeného 75% ethanolu. Roztok byl promíchán a centrifugován 15 minut při 6 000 x g v přístroji Janetzki K-23. Peleta byla rozpuštěna v 50 ml destilované vody, zmrazena a lyofilizována.

2.2.12 Příprava polyakrylamid-allyl-aminové matrice

Bylo smícháno 10 ml 30% roztoku akrylamidu/bisakrylamidu (29,2 g AA + 0,8 g bis-AA + 70 ml H₂O) s 200 µl allylaminu, 70 ml destilované vody, 100 µl 10% APS a 10 µl TEMEDu. Roztok byl nechán polymerovat, následně byl vzniklý gel mechanicky rozdrcen na částice o průměru 250 µm pasážíváním skrz síto. Vzniklý gel byl promyt 2 l destilované vody a uchován v Erlenmeyerově baňce v lednici.

2.2.13 Příprava afinitního nosiče: DNA – divinylsulfonem aktivovaný polyakrylamid-allyl-aminový kopolymer

Bylo smícháno 100 ml připraveného polyakrylamid-allyl-aminového kopolymeru (dle kapitoly 2.2.12 na str. 28) s 200 ml 0,3M NaHCO₃. Ke směsi byl přidán 1 ml divinylsulfonu a směsí bylo mícháno 90 minut. Směs byla následně promyta na fritě 2 l destilované vody.

Ke směsi bylo přidáno 200 mg lyofilizovaného preparátu DNA z jater prasnice, směs byla promyta na fritě 2 l destilované vody.

Následně ke směsi bylo přidáno 1,8 g lysinu ve 20 ml 0,3M NaHCO₃ a bylo jí mícháno 2 hodiny. Vzniklá suspenze byla třikrát dekantována 250 ml 20% ethanolu a poté promyta 2 l destilované vody.

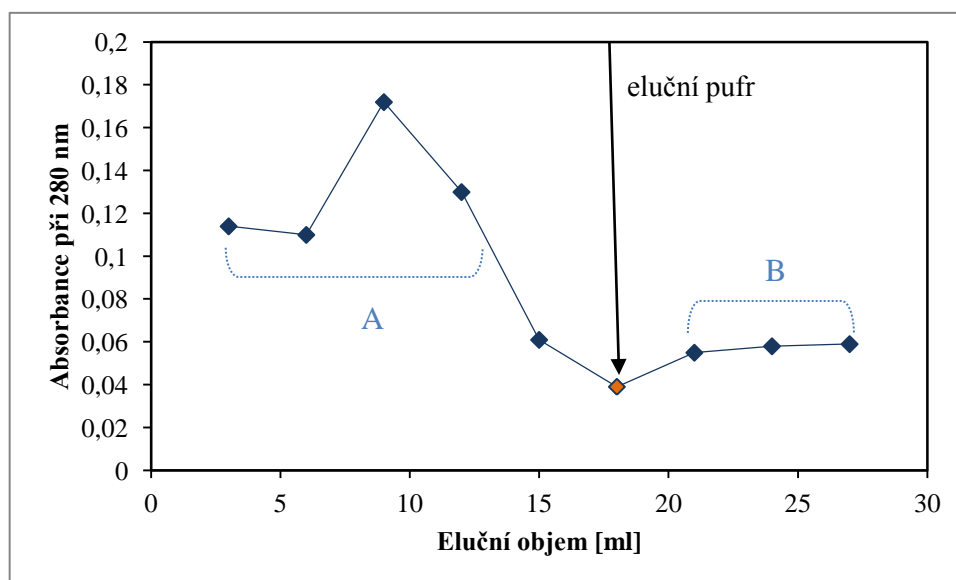
3 Výsledky

3.1 Izolace oviduktální tekutiny

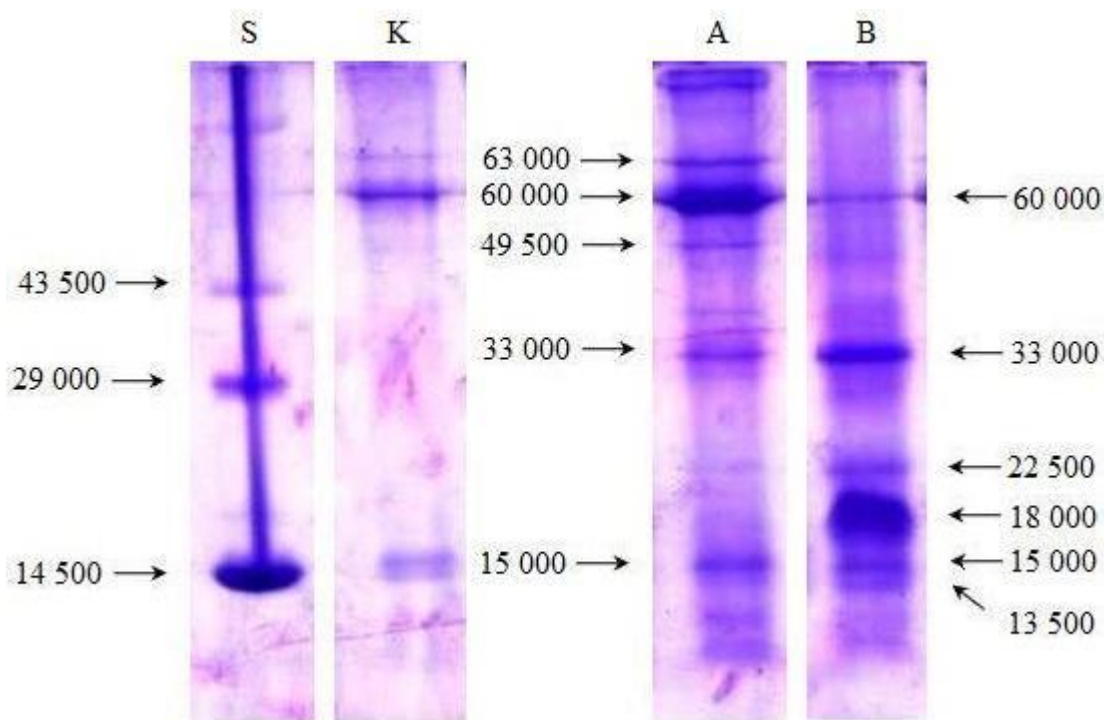
Každý z oviduktů byl dvakrát promyt 0,2 M NH_4HCO_3 pomocí injekční stříkačky a tekutina byla jímána do kádinky. Tekutina získaná z oviduktů byla zmrazena a lyofilizována.

3.2 Afinitní chromatografie na DNA-celulose – sloupcové provedení

Proteiny byly izolovány pomocí afinitní chromatografie na DNA-celulose. První frakce, která se nevázala, byla označena jako proteklá a druhá frakce, která byla adsorbována na DNA-celulosu, byla eluována elučním pufrem (2.2.3 na str. 21) a označena jako vázající. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm, eluční graf je znázorněn na Obr. 6. Získané proteinové frakce byly zmrazeny a lyofilizovány. Složení separovaných frakcí bylo analyzováno pomocí SDS-elektroforézy (Obr. 7 na str. 30). V obou frakcích byly detekovány proteiny o různé M_r v rozmezí 13 500 – 63 000, histonům odpovídají M_r v rozmezí 13 500 – 18 000.



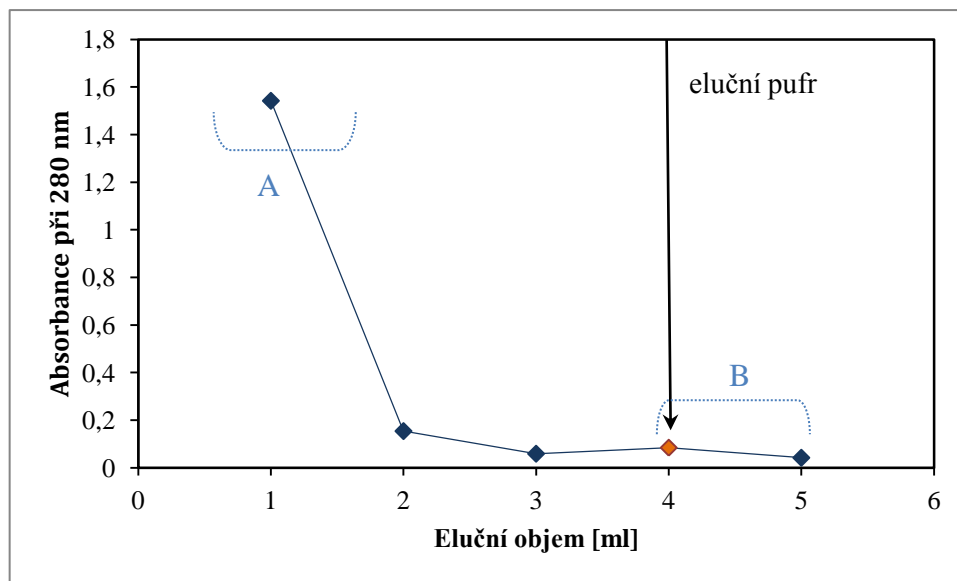
Obr. 6 – Afinitní chromatografie oviduktální tekutiny prasnice na DNA-celulose – sloupcové provedení
Chromatografie byla provedena dle kapitoly 2.2.3 (str. 22); proteiny adsorbované na afinitní nosič byly eluovány elučním pufrem (0,01M Tris a 1M KCl); A – proteklá frakce, B – vázající frakce.



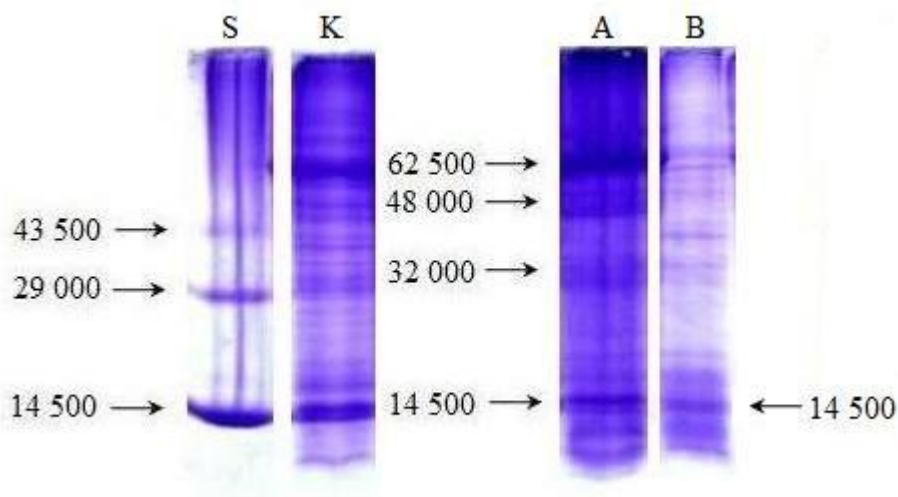
Obr. 7 – SDS-elektroforéza proteinových frakcí získaných afinitní chromatografií na DNA-celulose
 SDS-elektroforéza byla provedena dle kapitoly 2.2.6 (str. 23), jako standard byl použit polymer lysosomu;
 S – standard, K – vzorek nanášený na kolonu, A – proteklá frakce, B – vázející frakce.

3.3 Afinitní chromatografie na DNA-celulose – vsádkové provedení

Proteiny byly izolovány pomocí afinitní chromatografie na DNA-celulose. První frakce, která se nevázala, byla označena jako proteklá a druhá frakce, která byla adsorbována na DNA-celulosu, byla eluována elučním pufrem (2.2.4 na str. 22) a označena jako vázející. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm, eluční graf je znázorněn na Obr. 8. (str. 31). Získané proteinové frakce byly zmrazeny a lyofilizovány. Složení separovaných frakcí bylo analyzováno pomocí SDS-elektroforézy (Obr. 9 na str. 31). Proteklá frakce obsahovala hlavně proteiny o $M_r \sim 14\,500$, $32\,000$, $48\,000$ a $62\,000$, vázející frakce obsahovala proteiny o $M_r \sim 14\,500$ odpovídající histonům.



Obr. 8 – Afinitní chromatografie oviduktální tekutiny prasnice na DNA-celulose – vsádkové provedení
 Chromatografie byla provedena dle kapitoly 2.2.4 (str. 22); proteiny adsorbované na afinitní nosič byly eluovány elučním pufr (0,01M Tris a 1M KCl); A – proteklá frakce, B – vázající frakce.



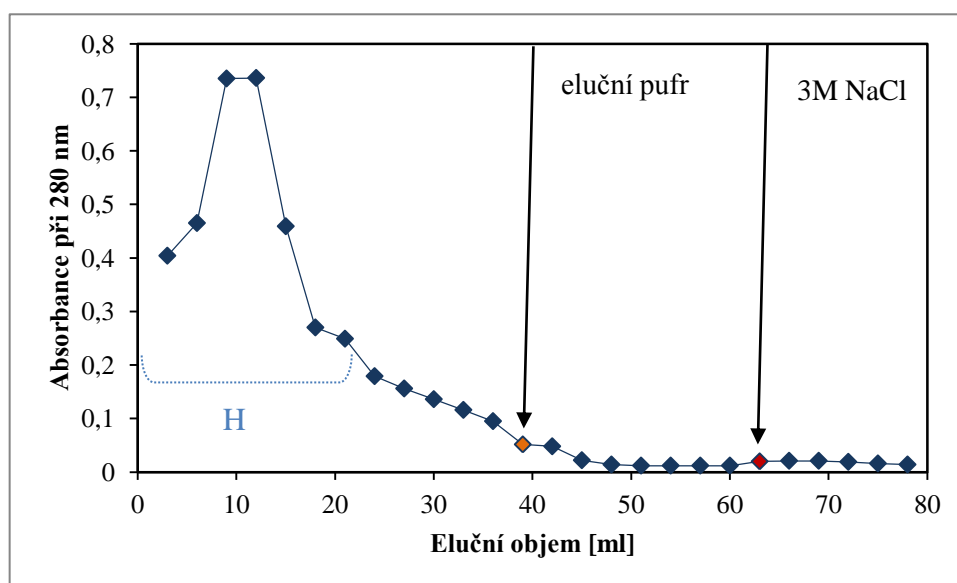
Obr. 9 – SDS-elektroforéza proteinových frakcí získaných afinitní chromatografií na DNA-celulose
 SDS-elektroforéza byla provedena dle kapitoly 2.2.6 (str. 23), jako standard byl použit polymer lysosymu; S – standard, K – vzorek nanášený na kolonu, A – proteklá frakce, B – vázající frakce.

3.4 Afinitní chromatografie na heparinovém sloupci

Proteiny byly izolovány pomocí afinitní chromatografie na heparinovém sloupci. První frakce, která se nevázala, byla označena jako proteklá a druhá frakce, která byla adsorbována na DNA-celulosu, byla eluována elučním pufr (2.2.5 na str. 23) a označena jako vázající, třetí frakce byla eluována 3M NaCl a označena jako kontrolní. Průběh

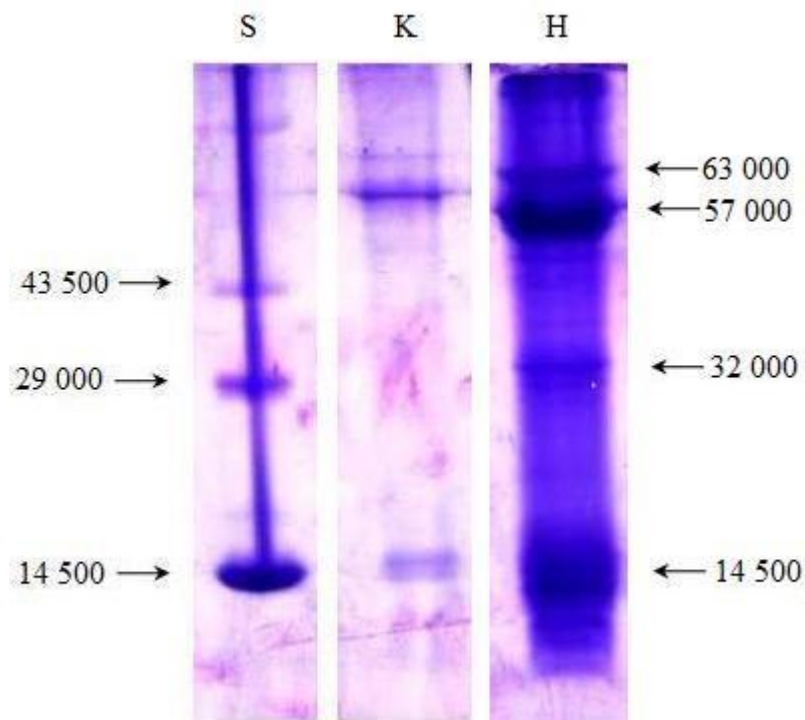
chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm, ve vázající a kontrolní frakci nebyla detekována přítomnost proteinů. Eluční graf je znázorněn na Obr. 10. Získaná proteinové frakce byla zmražena a lyofilizována. Složení separované frakce bylo analyzováno pomocí SDS-elektroforézy (Obr. 11 na str. 33). V proteklé frakci byly detekovány proteiny o různé M_r v rozmezí 14 500 – 63 000, histonům odpovídá $M_r \sim 14 500$.

Analogicky byla provedena chromatografie se vzorkem přečištěným síranem amonným dle kapitoly 2.2.2 (str. 21). Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm, v žádné frakci nebyla detekována přítomnost proteinů.



Obr. 10 – Afinitní chromatografie oviduktální tekutiny prasnice na heparinu – sloupcové provedení

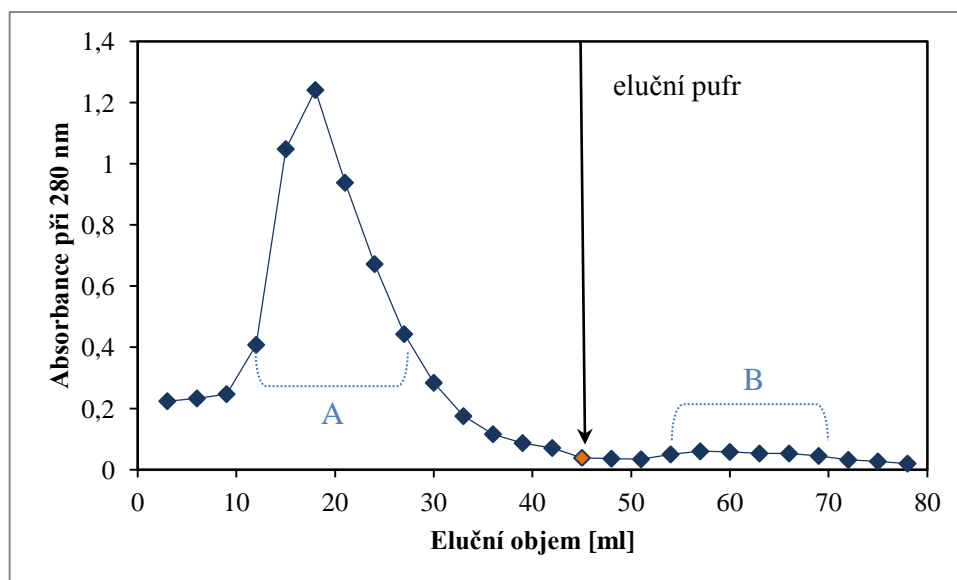
Chromatografie byla provedena dle kapitoly 2.2.5 (str. 23); proteiny adsorbované na afinitní nosič byly eluovány elučním pufr (0,01M Tris a 1M KCl), poté 3M NaCl; H – proteklá frakce.



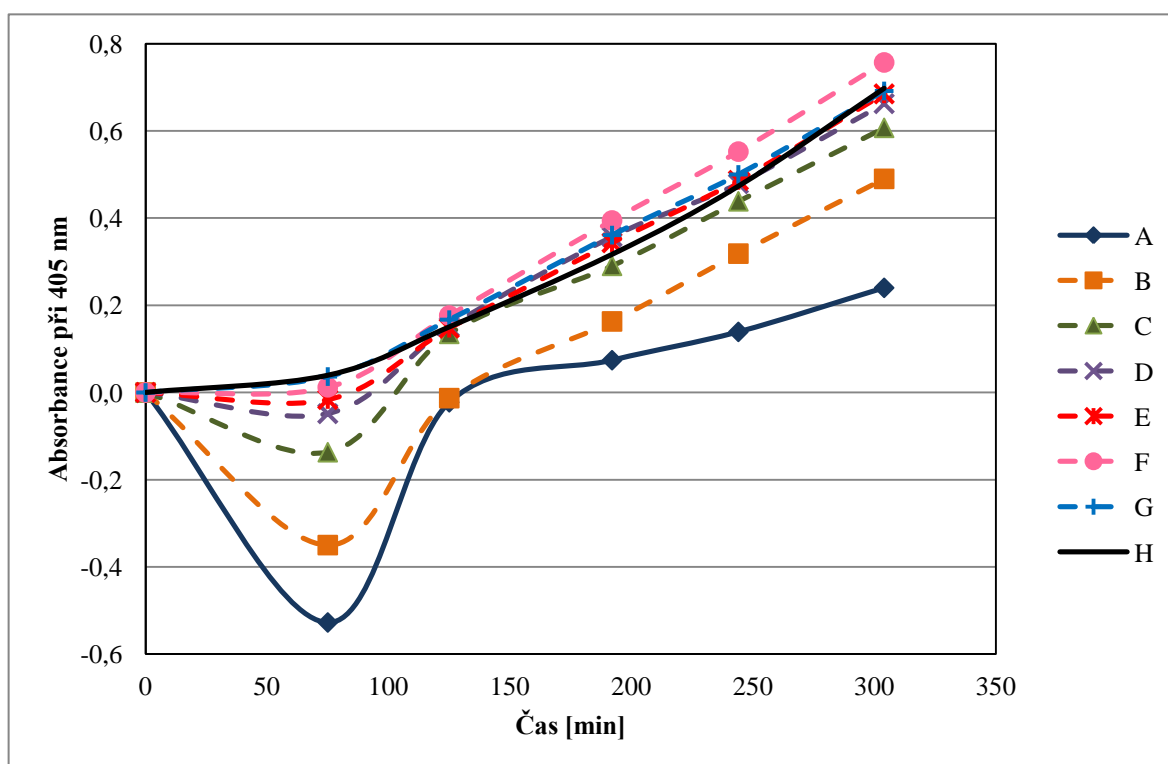
Obr. 11 – SDS-elektroforéza proteinových frakcí získaných afinitní chromatografií na heparinovém sloupci
 SDS-elektroforéza byla provedena dle kapitoly 2.2.6 (str. 23), jako standard byl použit polymer lysosomu;
 S – standard, K – vzorek nanášený na kolonu, H – proteklá frakce.

3.5 Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny

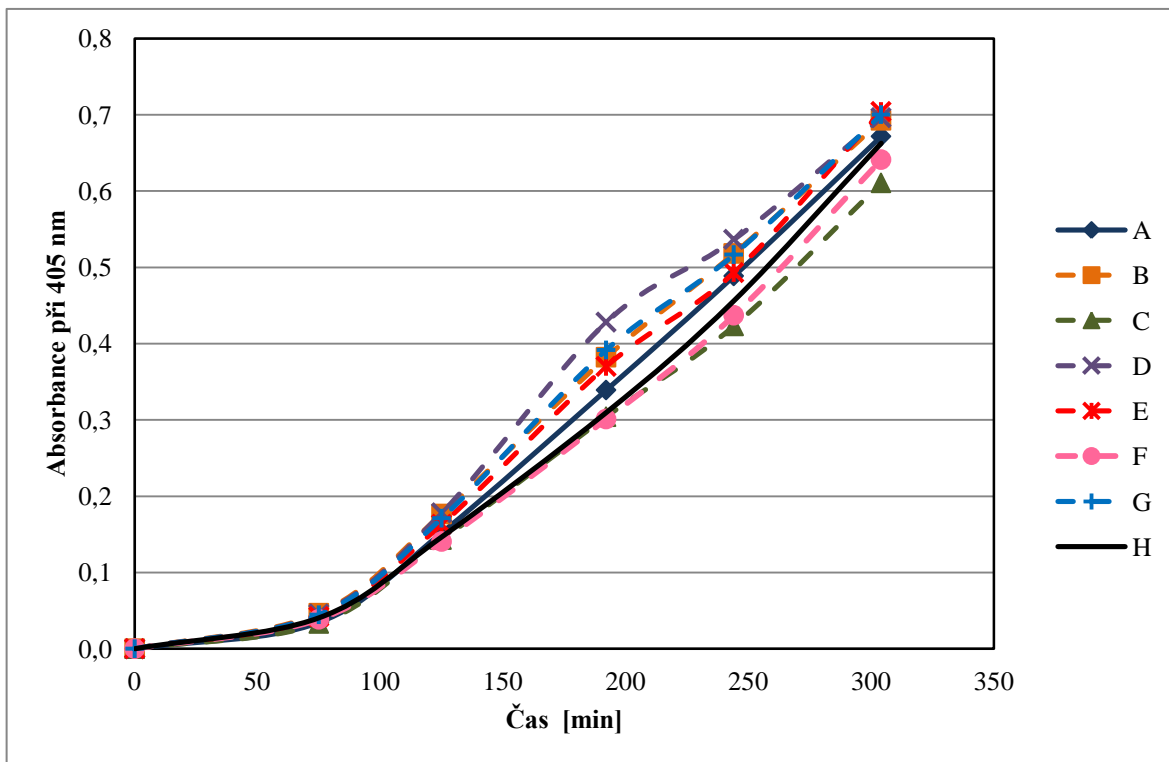
Kultury *Escherichia coli* serotypu K-12 byly použity pro sledování možné antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny prasnice po jejich separaci pomocí afinitní chromatografie na DNA-celulose dle kapitoly 2.2.3 (str. 22). Průběh afinitní chromatografie je zobrazen na Obr. 12 (str. 34). Grafy inhibice růstu jsou zobrazeny na Obr. 13 (str. 34) pro proteklou frakci a Obr. 14 (str. 35) pro vázající frakci. V případě proteklé frakce byla prokázána inhibice růstu buněk *E. coli*. U vázající frakce nebyla potvrzena její antimikrobiální aktivita z toho důvodu, že nebylo možné izolovat větší množství proteinu, do jamek mikrotitrační destičky byl tedy aplikován ve velmi malé koncentraci.



Obr. 12 – Afinitní chromatografie oviduktální tekutiny prasnice na DNA-celulose – sloupcové provedení
 Chromatografie byla provedena dle kapitoly 2.2.3 (str. 22); proteiny adsorbované na afinitní nosič byly eluovány elučním pufr (0,01M Tris a 1M KCl); A – proteklá frakce, B – vázající frakce.



Obr. 13 – Růstové křivky *E. coli* v závislosti na různé koncentraci proteinů oviduktální tekutiny – proteklá frakce
 Stanovení antimikrobiální aktivity bylo provedeno dle kapitoly 2.2.7 (str. 25); A – nejvyšší koncentrace aplikovaných proteinů, B-G – snižující se koncentrace aplikovaných proteinů dvojkovou ředící řadou, H – kontrola.

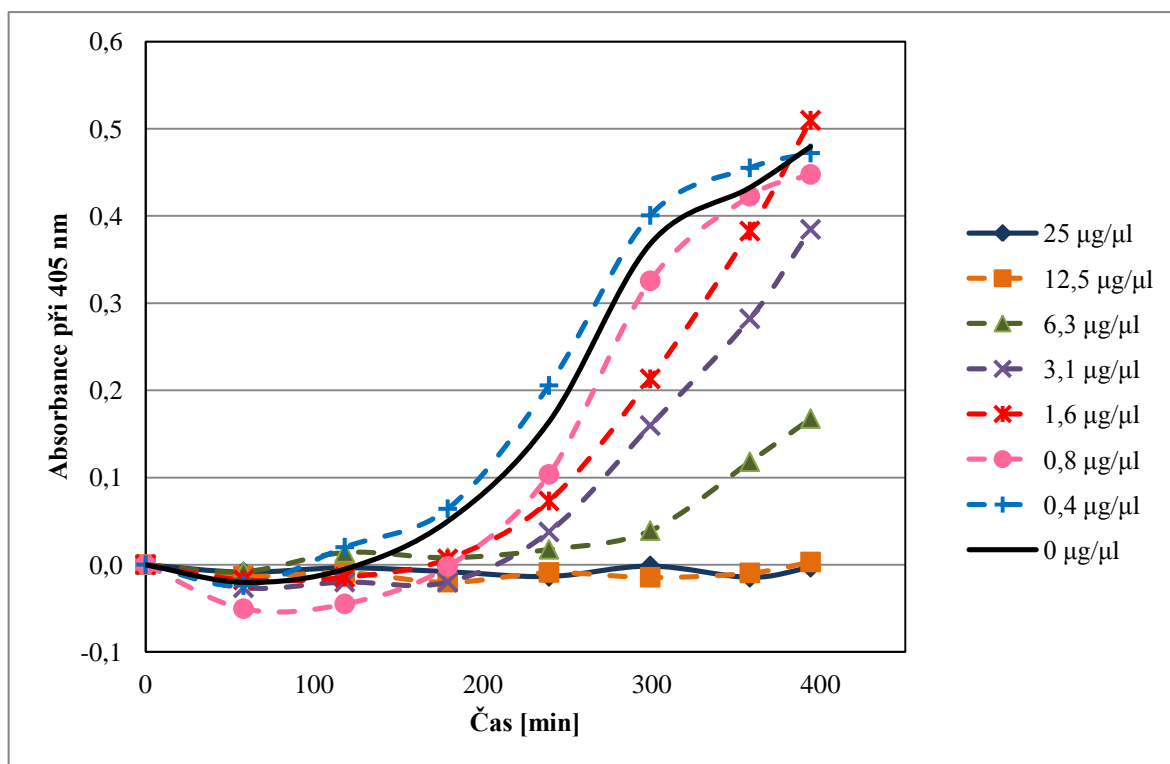


Obr. 14 – Růstové křivky *E. coli* v závislosti na různé koncentraci proteinů oviduktální tekutiny – vázající frakce
Stanovení antimikrobiální aktivity bylo provedeno dle kapitoly 2.2.7 (str. 25); A – nejvyšší koncentrace aplikovaných proteinů, B-G – snižující se koncentrace aplikovaných proteinů dvojkovou řadou, H – kontrola.

3.6 Stanovení antimikrobiální aktivity oviduktální tekutiny

Pro nedostatečnou koncentraci separovaných proteinů oviduktální tekutiny bylo provedeno stanovení antimikrobiální aktivity celkové oviduktální tekutiny.

Kultury *Escherichia coli* serotypu K-12 byly použity pro sledování možné antimikrobiální aktivity oviduktální tekutiny prasnice po její izolaci dle kapitoly 2.2.1 (str. 21). Graf inhibice růstu je zobrazen na Obr. 15 (str. 36). U kultury *E. coli* došlo se vzrůstající koncentrací naneseného proteinu k poklesu růstu buněk. Z výsledků analýzy antimikrobiální aktivity vyplývá, že tyto proteiny potlačují růst běžných prokaryotických patogenů.



Obr. 15 – Růstové křivky *E. coli* v závislosti na různé koncentraci proteinů oviduktální tekutiny

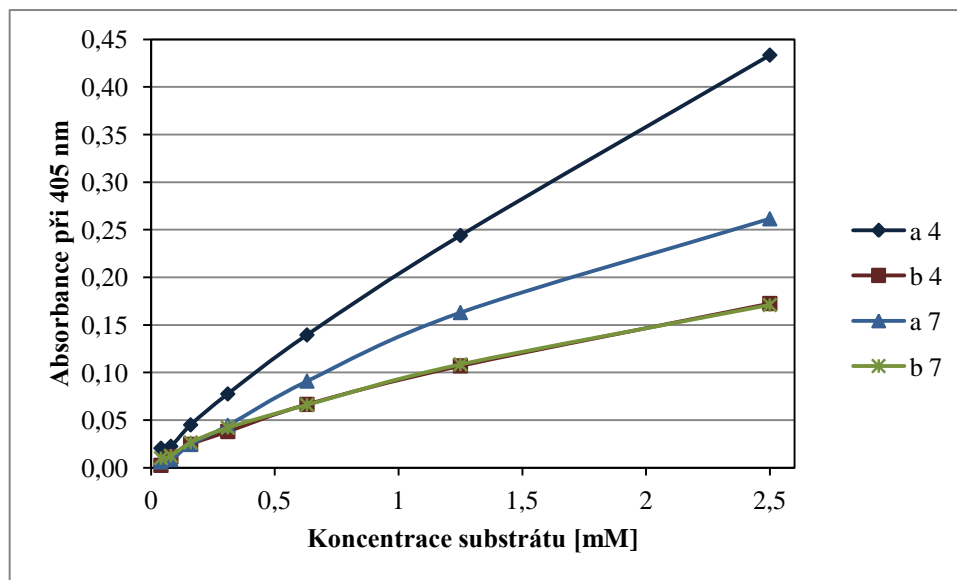
Stanovení antimikrobiální aktivity bylo provedeno dle kapitoly 2.2.8 (str. 25); v legendě jsou uvedeny koncentrace vzorku připraveného dle kapitoly 2.2.1 (str. 21) v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky.

3.7 Stanovení glykosidasové aktivity oviduktální tekutiny

Byla sledována glykosidasová aktivita vzorku připraveného dle kapitoly 2.2.1 (str. 21) v prostředí citrát-acetátového pufru o pH 4,8 a v prostředí citrátu-acetátového pufru o pH 7,2. Jako substrát byly použity roztoky 4-Nitrofenyl- α -D-glukopyranosidu a 4-Nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu ve výsledných koncentracích 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04 a 0 mM v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky.

Po tříhodinové inkubaci mikrotitrační destičky při 37°C v přístroji GALLENKAMP byla reakce ukončena přidáním 1M NaOH a proměřena absorbance při 405 nm na přístroji Sunrise TECAN. Graf závislosti absorbance na koncentraci substrátu zobrazený na Obr. 16 (str. 37) potvrzuje přítomnost glykosidasové aktivity proteinů oviduktální tekutiny. Největší aktivitu vykazuje α -glukosidasa při pH 4,8, dále pak při pH 7,2, β -glukosidasa vykazuje shodnou aktivitu při obou pH.

Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny vynesáním dle Hanese-Woolfa pro stanovení Michaelisových konstant (Tab. 1 na str. 37). Nejmenší afinitu k substrátu měla α -glukosidasa při pH 7,2, největší pak β -glukosidasa při pH 7,2.



Obr. 16 – Stanovení glykosidasové aktivity oviduktální tekutiny

Stanovení bylo provedeno dle kapitoly 2.2.9 (str. 26); **a 4** – substrát 4-Nitrofenyl- α -D-glukopyranosid v prostředí citrát-acetátového pufru o pH 4,8, **b 4** – substrát 4-Nitrofenyl- β -D-glukopyranosid v prostředí citrát-acetátového pufru o pH 4,8, **a 7** – substrát 4-Nitrofenyl- α -D-glukopyranosid v prostředí citrát-acetátového pufru o pH 7,2, **b 7** – substrát 4-Nitrofenyl- β -D-glukopyranosid v prostředí citrát-acetátového pufru o pH 7,2.

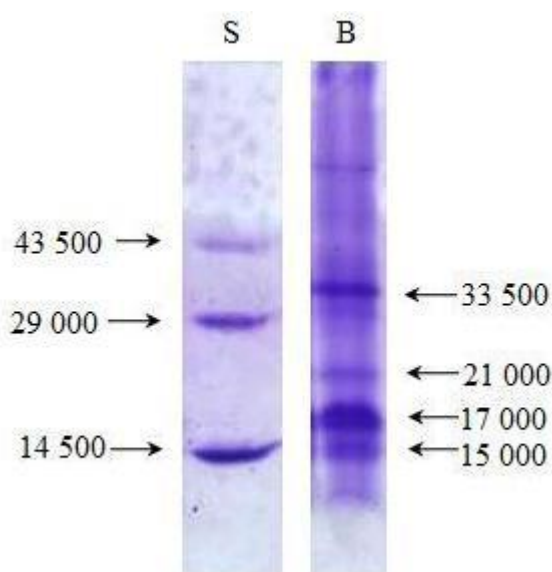
Tab. 1 – Hodnoty Michaelisových konstant α -glukosidasy a β -glukosidasy ze vzorku oviduktální tekutiny prasnice připraveného dle 2.2.1 (str. 21) při pH 4,8 a pH 7,2;
hodnoty Michaelisových konstant byly vypočítány z vynesení dle Hanese-Woolfa.

K_m [mM]			
α -glukosidasa		β -glukosidasa	
pH 4,8	pH 7,2	pH 4,8	pH 7,2
4,0	5,1	2,1	1,8

3.8 Identifikace proteinů oviduktální tekutiny pomocí MALDI-TOF analýzy

Proteiny byly izolovány pomocí afinitní chromatografie na DNA-celulose. První frakce, která se nevázala, byla označena jako proteklá a druhá frakce, která byla adsorbována na DNA-celulosu, byla eluována elučním puftrem (dle kapitoly 2.2.3 na str. 21) a označena jako vázající. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm, eluční graf je znázorněn na Obr. 6 (str. 29). Získané proteinové frakce byly zmrazeny a lyofilizovány. Složení vázající frakce bylo analyzováno pomocí SDS-elektroforézy (Obr. 17 na str. 38). V této frakce byla pozornost věnována hlavně zónám proteinů odpovídajícím $M_r \sim 15\ 000$, $17\ 000$, $21\ 000$ a $33\ 500$.

Tyto zóny odpovídající $M_r \sim 15\ 000$, $17\ 000$, $21\ 000$ a $33\ 500$ byly z gelu vyříznuty a proteiny proteolyticky štěpeny pomocí trypsinu. Poté byly směsi proteinů podrobeny MALDI-TOF MS/MS analýze. Programy FlexAnalysis a BioTools (Bruker Daltonics, Germany) spolu s databází Swiss-Prot (SIB, Geneva, Švýcarsko) byly použity k identifikaci peptidů. Proteolytické štěpení separovaných proteinových zón a MALDI-TOF MS/MS analýza byly provedeny RNDr. Petrem Prikrylem, Ph.D. z Ústavu patologické fyziologie a CEH, 1. lékařské fakulty UK v Praze. Grafy spekter získaných MALDI-TOF MS/MS analýzou budou k dispozici v době obhajoby.



Obr. 17 – SDS-elektroforéza proteinových frakcí získaných afinitní chromatografií na DNA-celulose
 SDS-elektroforéza byla provedena dle kapitoly 2.2.6 (str. 23), jako standard byl použit polymer lysosomu; S – standard, B – vázající frakce.

3.9 Příprava afinitního nosiče: DNA – divinylsulfonem aktivovaný polyakrylamid-allyl-aminový kopolymer

Z izolované DNA z jater prasnice (dle kapitoly 2.2.11 na str. 27) a připravené polyakrylamid-allyl-aminové matrice (dle kapitoly 2.2.12 na str. 28) byl připraven sloupec s DNA na divinylsulfonem aktivovaném polyakrylamid-allyl-aminovém kopolymeru.

4 Diskuze

Nespecifická imunita je jedním ze základních kamenů obranyschopnosti celého organismu, má podstatný význam i v reprodukčním traktu. Reprodukce a ferilizace jsou přesně řízené děje, při nichž všechny složky a komponenty (buněčné či proteinové) mají svou roli. Je zde velmi důležité zajistit nejen kontakt a splynutí gamet, ale i aseptičnost celého prostředí, což je v imunologicky potlačené tkáni reprodukčního traktu obtížné.

Ve své práci jsem se zabývala izolací oviduktálních proteinů prasnice, jež by potenciálně mohly mít antimikrobiální aktivitu. Předpokládala jsem, že antimikrobiální aktivita bude stejně jako v jiných případech vázána na histony a histonům podobné proteiny [29, 30, 31], proto jsem se zaměřila na izolaci právě těchto proteinů. Jako metodu první volby jsem použila afinitní chromatografii na DNA-celulose, a to ve dvou provedeních – kolonovém a vsádkovém. Výsledkem kolonového provedení byly dvě frakce. V proteklé frakci se nacházela většina proteinů, ve frakci vázající a eluované zvýšenou koncentrací chloridu draselného se po elektroforetické kontrole preparátu nacházely čtyři zóny. Předpokládala jsem, že ve spodních třech zónách o relativních molekulových hmotnostech 15 000 – 21 000, se nacházejí histony, což jsem chtěla potvrdit analýzou MALDI-TOF. Obsah čtvrté zóny o $M_r \sim 33\,500$ byl také odeslán na MALDI-TOF.

Při mé práci viditelně docházelo k degradaci sloupce a snižování průtoku chromatografickou kolonou po každé separaci, proto jsem sloupcové provedení převedla na vsádkové. Rozdíl v separaci mezi oběma uspořádáními nebyl výrazný, v obou případech byly v eluované frakci nalezeny stejné proteiny. Účinnost vsádkové chromatografie byla nižší, což mohlo být způsobeno separací na již částečně degradované DNA-celulose. Abych zjistila možnou příčinu degradace DNA-celulosity, provedla jsem stanovení glykosidasové aktivity, konkrétně α - a β -glukosidas. Stanovení bylo provedeno ve dvou pH, tedy v pH neutrálním, kdy jsou aktivní především sekretované formy glykosidas, a v pH 4,8, kdy jsou aktivní zejména lysosomální glykosidasy. Byla naměřena významná aktivita α - i β -glukosidas v prostředí o pH 4,8 a pH 7,2, stanovení tedy hypotézu o možné degradaci sloupce potvrdilo.

Dále jsem provedla separaci oviduktální tekutiny na heparinovém sloupci, neboť jsem vycházela z poznatku, že histony se váží na CM-Sephadex jakožto katex. Histony však nečekaně na heparinový sloupec nebyly navázány a to ani po odstranění

nízkomolekulárních látek srážením síranem amonným. Metodu izolace histonů z oviduktální tekutiny na heparinovém sloupci jsem tedy zavrhl.

Z důvodu glykosidasové aktivity preparátu a nízké efektivity separace na sloupci DNA-celulose byl pro další experimentální práci navržen sloupec s DNA na divinylsulfonem aktivovaném polyakrylamid-allyl-aminovém kopolymeru. Separaci na takto navrženém sloupci bych se chtěla věnovat ve své diplomové práci.

Ve své práci jsem se dále věnovala stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny na buněčné kultuře *Escherichia coli* serotypu K-12. Aktivitu jsem měřila v proteklé a vázající frakci. Z výše uvedených důvodů (neefektivita separace a degradace sloupce DNA-celulose) nebylo možné izolovat dostatečné množství proteinů pro relevantní stanovení. Potvrdila jsem však antimikrobiální aktivitu proteklé frakce získané afinitní chromatografií, dále také celkové oviduktální tekutiny prasnice.

Nejnižší koncentrace proteinů, při kterých ještě byla naměřena antimikrobiální aktivita, jsou menší než fyziologické. Z toho důvodu předpokládám, že proteiny s antimikrobiální aktivitou za fyziologických podmínek hrají důležitou roli v obraně reprodukčního traktu, gamet a zárodku před patogenními mikroorganismy. Identifikaci proteinů podílejících se na antimikrobiální aktivitě v reprodukčním traktu a jejich další studium považuji za přínosné pro pochopení dějů probíhajících při fertilizaci, stejně tak i dějů vedoucích k aborci či infertilitě.

5 Závěr

Z prasečích oviduktů byla izolována oviduktální tekutina. Tekutina byla zmražena a lyofilizována.

S tekutinami oviduktu byla provedena kolonová a vsádková afinitní chromatografie na DNA-celulose, proteklá i vázající frakce obsahující proteinové složky byly jímány a detekované proteiny byly charakterizovány SDS-elektroforézou.

Ve vázající frakci získané kolonovou afinitní chromatografií na DNA-celulose byly detekovány po elektroforetické separaci 4 proteinové zóny o M_r 15 000, 17 000, 21 000 a 33 500, které byly následně odeslány na identifikaci pomocí MALDI-TOF MS/MS.

U oviduktálních proteinů byla sledována jejich možná antimikrobiální aktivita. V přítomnosti proteinů proteklé frakce došlo k inhibici růstu prokaryotických patogenů (*Escherichia coli*), ve vázající frakci nebyla potvrzena antimikrobiální aktivita, neboť afinitní chromatografie neposkytla dostatečné množství proteinů. Z toho důvodu bylo provedeno stanovení antimikrobiální aktivity celé oviduktální tekutiny, antimikrobiální aktivita byla potvrzena.

S tekutinami oviduktu bylo provedeno stanovení glykosidasové aktivity. Tato aktivita byla potvrzena pro α -glukosidasu i β -glukosidasu v pH 4,8 a pH 7,2.

S tekutinami oviduktu byla provedena afinitní chromatografie na heparinovém sloupci. Proteinové složky nebyly na heparinový sloupec navázány, proto byla provedena charakterizace pomocí SDS-elektroforézy pouze pro vázající frakci.

Tekutiny oviduktu byly přečištěny síranem amonným a následně s nimi byla provedena afinitní chromatografie na heparinovém sloupci. Nebyla potvrzena přítomnost proteinů v žádné frakci.

Literatura

1. Marvan, F. a kol.: Morfologie hospodářských zvířat, Česká zemědělská univerzita v Praze v Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha, 2003 (Obr. 1 na str. 10 byl upraven)
2. Rosypal, S. a kol.: Přehled biologie, Scientia s.r.o. Pedagogické nakladatelství, Praha, 1998
3. Belák, M. a kol.: Veterinárna histológia, PRÍRODA Bratislava, 1990 (Obr. 4 na str. 15 byl upraven)
4. Cibulka, J. a kol.: Základy fyziologie hospodářských zvířat, Česká zemědělská univerzita v Praze, 2004
5. Komárek, V. a kol.: Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat, 2. vydání, SZN Praha, 1971
6. Sládeček, F.: Rozmnožování a vývoj živočichů, 2. vydání, Academia Praha, 1986
7. Evans, J.P., Florman, H.M.: Nat. Cel. Biol. 4, 57-63 (2002) (Obr. 5 na str. 16 byl upraven)
8. Garcia Herreros, M., Aparicio, I.M., Nunez I., Garcia-Marin, L.J., Gil, M.C., Pena Vega FJ: Theriogenology. 63, 795-805 (2005)
9. Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S.: J. Androl. 19, 242-248 (1998)
10. Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Kouba, A.J.: Cells Tissues Organs 166 (2), 165-179 (2000)
11. Töpfer -Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsołova, M.: Int. J. Dev. Biol. 52, 717-736 (2008)
12. Wagner, A., Ekhlesi-Hundrieser, M., Hettel, C., Petrunkina, A., Waberski, D., Nimtz, M., Töpfer-Petersen, E.: Mol. Reprod. Dev. 61, 249-257 (2002)
13. Petrunkina, A., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E.: Reproduction 122, 469-480 (2001)
14. Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsołová, M., Petrunkina, A., Töpfer -Petersen, E.: Biol. Reprod. 73, 536-545 (2005)
15. Hanzlíková, E.: Studium vazby spermie na ovidukální epitel prasnice: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2007)
16. Nichol, R., Hunter, R.H., Gardner, D.K., Leese, H.J., Cooke, G.M.: J. Reprod. Fertil. 96, 699-707 (1992)
17. Leese, H.J.: J. Reprod. Fertil. 82, 843-856 (1988)
18. Aguilar, J., Reyley, M.: Anim. Reprod., v.2, n.2, 91-105 (2005)

19. Nichol, R., Hunter, R.H., Gardner, D.K., Partridge, R., Leese, H.J., Cooke, G.M.: *Res. Vet. Sci.* 65, 263-264 (1998)
20. Guerin, P., Gallois, E., Croteau, S., Revol, N., Maurin, F., Guillaud, J., Menezo, Y.: *Rev. Med. Vet.* 146, 805-814 (1995b)
21. Oliphant, G., Bowling, A., Eng, L.A., Keens, S., Randall, P.A.: *Biol. Reprod.* 18, 516-520 (1978)
22. Buhi, W.C., Vallet, J.L., Bazer, F.V.: *J. Exp. Zool.* 252, 79-88 (1989)
23. Simmen, F.A., Simmen, R.C.M.: *Biol. Reprod.* 44, 1-5 (1991)
24. Swanchara, K.V., Henricks, D.M., Birrenkott, G.P., Bodine, A.B., Richardson, M.E.: *Biol. Reprod.* 53, 911-922 (1995)
25. Wiseman, D.I., Henricks, D.M., Eberhardt, D.M., Bridges, W.C.: *Biol. Reprod.* 47, 126-132 (1992)
26. Tenthai, P., Yokoo, M., Kimura, N., Heldin, P., Sato, E., Rodriguez-Martinez, H.: *Reproduction* 125, 119-132 (2003)
27. Prelovská L.: Protein-sacharidové interakce podílející se na tvorbě oviduktálního reservoáru spermií u prasnice: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2006)
28. Izadpanah, A., Gallo, R.L.: *J. Am. Acad. Dermatol.* 52, 381-392 (2005)
29. Kračmerová, J., Dráb, T., Hanzlíková, E., Tichá, M., Příkryl, P., Liberda, J.: Antimikrobiální aktivita v boviním oviduktu a oviduktuálním tekutině: charakterizace histon-like antimikrobiálních proteinů; připravováno k publikaci (2012)
30. Andersson, E., Sorensen, O.E., Frohm, B., Borregaard, M., Egesten, A., Malm, J.: *Hum. Reprod.* 17(10), 2529-2534 (2002)
31. Silphaduang, U., Hincke, M.T., Nys, Y., Mine, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340(2), 648-655 (2006)
32. Laemmli, U.K.: *Nature* 227, 680-685 (1970)
33. Emmerová, T.: Nové typy magnetických sorbentů pro analýzu fosfoproteinů: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2010)

