

ABSTRAKT

Fluorescenční značení je velmi často používanou metodou určenou k vizualizaci všech typů biomolekul včetně proteinů a proteinových komplexů. Dosud však nebylo zkoumáno, jakým způsobem a v jakém rozsahu toto značení ovlivňuje jejich strukturu a funkci. Tato diplomová práce se tedy zabývá vlivem vazby NHS-fluoresceinu na modelový protein lidské karbonát dehydratasy (hCA-I).

Cílem této práce byla příprava rekombinantní ^{15}N -hCA-I, studium její struktury pomocí NMR spektroskopie po značení fluoresceinem, studium ovlivnění relativní enzymové aktivity hCA-I v závislosti na míře fluorescenčního značení a v neposlední řadě také analýza produktů pomocí ESI FT-ICR MS vzniklých po vazbě karbonát dehydratasy NHS-fluoresceinem. Využitím těchto metod byly stanoveny obecné experimentální podmínky pro použití fluorescenčního značení s minimálním efektem na strukturu proteinu a jeho funkci.

Z výsledků této práce vyplývá, že při výpočtech molárních nadbytků přidávaného NHS-fluoresceinu k proteinům nelze použít dosavadního jednoduchého postupu, ale je více než nutné zohlednit vliv relativní enzymové aktivity proteinu, která klesá se zvyšujícím se molárním nadbytkem fluorescenční značky, a že výpočet molárních nadbytků neodpovídá skutečnému stupni značení.

V budoucím výzkumu bude nutné provést optimalizaci pro další proteiny za použití jiných fluorescenčních značek.

Klíčová slova: karbonát dehydratasa (karboanhydratasa), NHS-fluorescein, NMR, ESI FT-ICR MS, relativní enzymová aktivita, fluorescenční značení