

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jan Bílek

SEPARACE PROTEINŮ GRADIENTOVOU  
CHROMATOFOKUSACÍ

Gradient chromatofocusing for separation of proteins

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Květa Kalíková Ph.D.

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom 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 25. 5. 2015

.....

Podpis

## Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na separaci čtyř modelových proteinů – konalbuminu, hovězího sérového albuminu a beta-laktoglobulinů A a B – metodou gradientové chromatofokusace v uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie na dvou komerčních aniontově-výměnných kolonách. Jedna kolona obsahovala jako stacionární fázi silný anex (Agilent Bio SAX) a druhá slabý anex (Agilent Bio WAX). Pro separaci proteinů gradientovou chromatofokusací byly optimalizovány celkem tři různé pH gradienty mobilní fáze, jeden šedesátiminutový a dva třicetiminutové. Při použití všech tří testovaných gradientů došlo k separaci směsi konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B na základní linii na silném i slabém anexu při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Ve všech testovaných systémech se silným anexem jako stacionární fází bylo dosaženo separace všech tří izoform hovězího sérového albuminu. Nejvyšších hodnot rozlišení pík při separaci směsi konalbuminu a beta-laktoglobulinů A a B bylo dosaženo za třicet minut na koloně obsahující silný anex jako stacionární fázi. Nejvyšších hodnot rozlišení pík izoform hovězího sérového albuminu bylo dosaženo za šedesát minut na koloně obsahující silný anex jako stacionární fázi.

Klíčová slova: gradientová chromatofokusace, separace proteinů, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## **Abstract**

This bachelor thesis is focused on separation of four model proteins – conalbumin, bovine serum albumin, beta-lactoglobulin A and beta-lactoglobulin B – by gradient chromatofocusing high-performance liquid chromatography with two commercial anion-exchange columns. The first column contained a strong anion exchanger (Agilent Bio SAX) and the second one contained a weak anion exchanger (Agilent Bio WAX). Three different mobile phase pH gradients were optimized, one-hour gradient and two half-an-hour gradients. The baseline separation of mixture containing conalbumin and beta-lactoglobulines A and B was achieved on both anion-exchange columns using each of the three optimized gradients and with flow rate 1 ml/min. Three bovine serum albumin isoforms were resolved in all tested systems using a strong anion exchanger as the stationary phase. The highest resolution of mixture containing conalbumin and beta-lactoglobulines A and B was obtained with a strong anion exchanger as the stationary phase in thirty minutes. The highest resolution of bovine serum albumin isoforms was achieved with a strong anion exchanger as the stationary phase in sixty minutes.

Key words: gradient chromatofocusing, protein separation, high performance liquid chromatography

1	Úvod.....	8
2	Proteiny .....	9
2.1	Studované proteiny .....	10
2.1.1	Konalbumin .....	11
2.1.2	Hovězí sérový albumin.....	11
2.1.3	Beta-laktoglobulin A a B.....	12
3	Metody separace proteinů .....	13
3.1	Elektromigrační metody .....	13
3.2	Chromatografické metody .....	14
3.2.1	Gelová permeační chromatografie.....	14
3.2.2	Afinitní chromatografie .....	15
3.2.3	Ionexová chromatografie.....	15
3.2.3.1	Stacionární fáze pro ionexovou chromatografii.....	16
3.2.4	Chromatofokusace .....	17
3.2.4.1	Mobilní fáze v chromatofokusaci.....	18
3.2.5	Gradientová chromatofokusace .....	19
4	Experimentální část.....	21
4.1	Použité přístroje a pomůcky.....	21
4.2	Použité chemikálie .....	22
4.3	Příprava mobilní fáze.....	22
4.4	Příprava vzorků.....	23
4.5	Podmínky separace .....	24
4.6	Výpočet chromatografických parametrů .....	24
5	Výsledky a diskuze.....	26
5.1	Separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 1.....	26
5.2	Separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 2.....	33
5.3	Separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 3.....	38
6	Závěr.....	43
7	Použité internetové zdroje a literatura.....	44

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce RNDr. Květě Kalíkové Ph.D. za její rady a připomínky, odborné vedení, vstřícný přístup a nabídnuté téma. Dále bych velice rád poděkoval své konzultantce Mgr. Tereze Šlechtové za její trpělivost, rady a pomoc. Poděkování patří také mé rodině za podporu při studiu.

Děkuji firmě Agilent Technologies za zapůjčení kapalinového chromatografu a kolon.

## Seznam použitých zkratek a symbolů

Zkratka	Legenda
BSA	hovězí sérový albumin
DAD	detektor s diodovým polem
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	kyselina deoxyribonukleová
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	ionexová chromatografie
MF	mobilní fáze
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
pI	izoelektrický bod
SAX	silný anex
SCX	silný katex
SDS	dodecylsulfát sodný
SF	stacionární fáze
UV	ultrafialová oblast spektra
WCX	slabý katex
WAX	slabý anex
$\lambda$	vlnová délka
$f$	šířka vzestupné části píku v 5 % výšky
$R$	rozlišení
$T_f$	faktor chvostování píku
$t_R$	retenční čas
$w_h$	šířka píku v polovině výšky
$w_{0.05}$	šířka píku v 5 % výšky

# 1 Úvod

Klasická chromatofokusace byla jako varianta ionexové chromatografie (IEC), kombinovaná s principy izoelektrické fokusace, poprvé navržena a vyzkoušena L. A. Sluytermanem v roce 1978 [1,2]. Chromatofokusace byla používána zejména k preparativním účelům [1]. Mobilní fáze (MF) byly složeny ze syntetických vysokomolekulárních pufrů a interní pH gradient MF byl tvořen uvnitř chromatografické kolony pomocí pufráčnicích kapacit daných ionexových stacionárních fází (SF) [1,2].

O téměř dvacet let později byla L. Shanem a D. J. Andersonem vyvinuta metoda gradientové chromatofokusace [3]. Tato zdokonalená metoda, využívající jednodušší nízkomolekulární pufrů a externí pH gradient MF, přinesla pro analýzy a purifikace amfolytických sloučenin (především proteinů a oligonukleotidů) nesporné výhody, a to jak oproti klasické IEC, tak oproti klasické chromatofokusaci. [2,3] Potenciál této metody spočívá ve vysokém rozlišení a selektivitě, ale také v její rychlosti a jednoduchosti. Gradientové chromatofokusování proteinů umožňuje prekoncentrovat a oddělit i takové proteiny, které se jen nepatrně odlišují svou primární strukturou a izoelektrickým bodem (pI). [4]

Hlavní uplatnění nachází gradientová chromatofokusace v analýzách a purifikacích proteinů včetně jejich izoform [4]. Dělení proteinů má velký význam pro objasnění jejich struktury a vlastností a také pro aplikace ve farmaceutických biotechnologiích [5], biomedicíně [5] či potravinářství [6].

Cílem této práce je separovat čtyři vybrané proteiny na jednom silném anexu (SAX) a jednom slabém anexu (WAX) jako SF za podmínek gradientové chromatofokusace. Separace byly provedeny v uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a pro gradientovou eluci byly optimalizovány tři různé pH gradienty MF.



## 2 Proteiny

Proteiny neboli bílkoviny jsou významné biomakromolekuly hojně se vyskytující ve všech buňkách a jejich částech. Všechny proteiny, ať už pochází z prastarých bakterií nebo z nejkomplexnějších organizmů, jsou složeny z dvaceti základních proteinogenních alfa-aminokyselin, které se spojují peptidovou vazbou za odštěpení molekuly vody. Pořadí a počet jednotlivých aminokyselin, a tím i příslušných funkčních skupin v (poly)peptidovém řetězci, udává primární strukturu a funkci proteinu. Primární struktura je geneticky určena pořadím nukleotidových bází v řetězci DNA a má lineární charakter. Většina proteinů tvoří vyšší struktury. Prostřednictvím slabých interakcí (např. vodíkové můstky, hydrofobní interakce) se sbalují do sekundárních, terciárních, popřípadě kvartérních struktur. [7,8]

Aminokyseliny i proteiny jsou sloučeniny amfolytické povahy, obsahují slabě kyselé karboxylové skupiny a slabě bazické aminoskupiny. Tyto kyselé, respektive bazické skupiny jsou ionizovatelné a ve vodných roztocích disociují, respektive protonizují. Molekuly aminokyselin či proteinů pak tvoří dipolární ion. Mohou nést kladný náboj, záporný náboj, nebo mohou být bez náboje. Výsledný celkový náboj je závislý na pH okolního prostředí. Hodnota pH, při které se daná aminokyselina či protein jeví navenek jako neutrální a má výsledný celkový náboj nulový, se nazývá izoelektrický bod – pI. Je-li pH okolního roztoku nižší než pI daného proteinu, je protein kladně nabitý, neboť v roztoku je více dostupných hydroxoniových iontů  $H_3O^+$ , které se vážou na záporně nabitá místa proteinu. Je-li naopak pH roztoku vyšší než pI daného proteinu, iontů  $H_3O^+$  je v roztoku méně a protein se stává záporně nabitým. Velikost proteinů je různá, od poměrně malých molekul polypeptidů o relativních molekulových hmotnostech ( $M_r$ ) v řádech tisíců, po velké polymery o  $M_r$  v řádech milionů. [7,8]

Biologické funkce proteinů hrají klíčové role ve většině biochemických procesů živých organizmů. Proteiny jsou strukturními, funkčními, stavebními a regulačními jednotkami buněk živých organizmů. Dle biologické funkce se proteiny dělí na strukturní, pohybové, transportní, zásobní, signální, receptorové a regulační proteiny, enzymy a protilátky. [8,9] Patří sem i další biologicky aktivní látky, např. některé obranné látky, jedy, antibiotika [7].

Pro podrobnější studium jednotlivých proteinů a pochopení jejich funkce,

struktury, či fyzikálně-chemických a biochemických vlastností je nezbytné je nejprve izolovat a purifikovat (separovat od dalších buněčných komponent, proteinů, atd.) a získat tak konečný produkt o požadované čistotě a v požadovaném množství [7,8]. Výsledná čistota a množství proteinu závisí na účelu purifikace. Pokud má být výsledný produkt využitelný pro terapeutické či výzkumné účely „in vivo“, jeho vysoká čistota, zachování nativní struktury a biologické aktivity bývají nezbytné. Na druhou stranu, pro biotechnologické průmyslové užití a zpracování se purifikace obvykle provádí ve větším měřítku a požadavky na čistotu výsledného produktu mohou být nižší. [8,10]

Buňky kromě daného proteinu obsahují další stovky až tisíce proteinů, nukleové kyseliny, polysacharidy, lipidy a další menší molekuly [7,8]. Výsledkem purifikace a izolace by měl být jeden protein, jehož množství může být jen zlomek množství výchozího materiálu. [8]

Při purifikaci a izolaci proteinů se využívá jejich rozdílných chemických struktur a s tím souvisejících vlastností. Na základě těchto vlastností, které zahrnují velikost, náboj, pI, hydrofobicitu, rozpustnost nebo specifickou vazebnou schopnost molekuly (ligandovou afinitu), se volí vhodná separační metoda. [7,8,10] Z výše zmíněného vyplývá, že purifikační a izolační strategie mohou být pro každý protein odlišné. Kromě základních kroků (např. homogenizace, centrifugace, vysolování, dialýza) se pro tyto účely hojně využívá metod kolonové chromatografie. Kolonová chromatografie je spolu s elektromigračními metodami jednou z nejpoužívanějších separačních technik pro purifikaci a izolaci biomolekul. [7]

Volba vhodných biochemických, analytických či preparativních separačních metod a postupů je nezbytná pro úspěšnou purifikaci proteinu s nejvyšším možným výtěžkem, dostatečnou účinností, požadovanou čistotou a přiměřeným ekonomickým řešením [8,10].

## **2.1 Studované proteiny**

Jako modelové sloučeniny byly pro tuto práci vybrány čtyři proteiny: konalbumin ze slepičího vaječného bílku, hovězí sérový albumin a beta-laktoglobuliny A a B z kravského mléka.

### 2.1.1 Konalbumin

Konalbumin, nověji nazýván ovotransferin, je metaloprotein schopný reverzibilně vázat a přenášet ionty železa. Stejně jako (lidský) sérový transferin či laktoferin patří do rodiny proteinů zvaných transferiny. Struktura i funkce transferinů je obdobná. Sbalují se do dvou globulárních laloků, z nichž každý obsahuje vazebné místo pro ionty železa. [11]

Konalbumin je monomerní globulární glykoprotein o  $M_r = 76\ 000$  obsahující 686 aminokyselin [11–13]. Izoelektrický bod konalbuminu je závislý na formě, ve které se nachází. Existují dvě hlavní formy konalbuminu, apoforma a holoforma [12]. Apoforma neobsahuje navázané ionty železa a její pI je 7,17. Holoforma obsahuje buď jeden navázaný ion železa (pI 6,68), nebo dva navázané ionty železa (pI 6,24). [14,15] Holoforma konalbuminu je fyzikálně i chemicky stabilnější než apoforma [12].

Konalbumin se nachází v ptačím séru a vejcích, kde tvoří přibližně 12–15 % z celkových proteinů slepičího vaječného bílku [11,13]. Konalbumin vykazuje silnou antimikrobiální, antivirovou, antioxidační, fungicidní a protirakovinovou aktivitu [11–13]. Tyto vlastnosti mají potenciální využití v potravinářství a farmacii [11,12].

Kromě iontů železa je konalbumin také schopen vázat i další dvojmocné a trojmocné ionty kovů, například ionty měďnaté, zinečnaté, manganaté či hlinité [13].

### 2.1.2 Hovězí sérový albumin

Hovězí sérový albumin (BSA) je jednořetězcový globulární protein obsahující přes 580 aminokyselin [16–18]. Obsahuje sedmáct disulfidických můstků a jednu volnou thiolovou skupinu. Řetězec je tvořen třemi homologními doménami, které se skládají z devíti helikálních záhybů propojených disulfidickými můstky. Tato terciární struktura tvoří hydrofobní kapsy, jež umožňují přenášet nepolární molekuly. [16,17] Hovězí sérový albumin má tři známé izoformy s pI 5,40; 5,50 a 5,60 [19,20]. Hodnoty pI jsou závislé na koncentraci chloridových aniontů a mastných kyselin vázaných na protein. Průměrná  $M_r$  BSA je 66 430 [17,21].

Stejně jako lidský sérový albumin je BSA kyselý protein (má nízkou hodnotu pI a záporný náboj při fyziologickém pH) charakterizovaný vysokým obsahem asparagové a glutamové kyseliny, cysteinu, lysinu a argininu a zároveň nízkým obsahem tryptofanu

a methioninu [16].

Sérové albuminy obecně patří k proteinům hojně se vyskytujícím v tělních tekutinách savců [16,17]. Například v krevní plazmě tvoří až 60 % přítomných proteinů [17]. Vážou na sebe hydrofilní látky, vodu, ionty sodné, draselné, vápenaté a další. Také se uplatňují jako přenašeči hydrofobních látek (např. mastných kyselin, bilirubinu) a různých farmak (např. barbiturátů a antibiotik) v krevní plazmě. [16–19] Dále je fyziologickou úlohou albuminů regulace krevního koloidně-osmotického (onkotického) tlaku a udržování stálé hodnoty pH krevní plazmy [16,17].

V biochemických laboratořích nachází BSA uplatnění jako standard pro kalibrace a stanovení  $M_r$  proteinů [17].

### **2.1.3 Beta-laktoglobulin A a B**

Beta-laktoglobuliny A a B jsou genetickými variantami malého globulárního glykoproteinu beta-laktoglobulinu [22]. Jejich průměrná  $M_r$  je 18 400 a obsahují 162 aminokyselin, dva disulfidické můstky a jednu volnou thiolovou skupinu. [22–25] Beta-laktoglobuliny A a B jsou nejhojnějšími mléčnými syrovátkovými proteiny přežvýkavců a některých dalších savců. V lidském mateřském mléce se nenacházejí. [23,24] V kravském mléce tvoří 56–60 % syrovátkových proteinů, což je asi 7–12 % z celkových proteinů mléka [25,26]. Při neutrálním pH tvoří homodimery o  $M_r = 36\ 800$  [22–25]. V kyselém prostředí disociují na dvě monomerní podjednotky, ale jsou velmi stabilní a zachovávají si svou nativní strukturu [22,24]. Hodnota pI beta-laktoglobulinu A je 5,10 [26] a beta-laktoglobulinu B 5,20 [26]. Svou primární strukturou se odlišují pouze ve dvou aminokyselinách. Beta-laktoglobulin A má ve svém řetězci v pozici 64 kyselinu asparagovou a v pozici 118 valin, zatímco beta-laktoglobulin B má v těchto pozicích glycin a alanin. [22,23,25]

Biologická funkce beta-laktoglobulinů zatím není zcela jasná. Předpokládá se, že se podílejí na vazbě a přenosu některých hydrofobních ligandů, např. retinolu nebo mastných kyselin [22–24] a na metabolismu fosfátů v mléčných žlázách [22]. Beta-laktoglobuliny jsou považovány za jedny z hlavních alergenů kravského mléka [23,24,26].

### 3 Metody separace proteinů

Nejpoužívanějšími metodami pro separace proteinů jsou metody elektromigrační a chromatografické [7]. Obě skupiny metod mají své výhody a nevýhody. Některé jsou levné a jednoduché, jiné jsou nákladné a instrumentálně náročné. Liší se zejména fyzikálně-chemickým principem a rozsahem použití. Některé metody jsou vhodné pro analytické aplikace, jiné spíše pro preparativní a purifikační účely.

#### 3.1 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli, tzv. elektromigraci. Nabité molekuly se dělí na základě různých elektroforetických pohyblivostí, hnací silou pro molekulu je její náboj. [7,27] Elektromigrační metody se obvykle nepoužívají pro purifikace proteinů v takovém rozsahu jako metody chromatografické.

Elektromigrační metody nacházejí uplatnění v různých analytických aplikacích, např. při stanovení  $M_r$  proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE) v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo při stanovení pI proteinů izoelektrickou fokusací [1,7,27].

SDS-PAGE elektroforéza se používá zejména k určení  $M_r$  proteinů a peptidů. Analýza probíhá v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu SDS, který obaluje proteiny a tvoří s nimi komplex o uniformním záporném náboji. Proteiny se separují především podle velikosti molekuly. Přítomnost SDS a dalších činidel (např. merkaptoethanolu) způsobuje denaturaci proteinu. Menší peptidy putují gelem v elektrickém poli rychleji než velké proteiny a liší se tak vzdáleností, kterou v gelu urazí. Vzniklé zóny analytů se následně analyzují různými způsoby, např. spektrofotometricky nebo hmotnostní spektrometrií. [1,8,27]

Izoelektrická fokusace je elektromigrační metoda sloužící k separaci biomolekul amfolytické povahy podle jejich pI nebo ke stanovení hodnot pI. Elektromigrace analytů probíhá v prostředí s lineárním gradientem pH. Tento pH gradient vzniká mezi dvěma elektrodami působením elektrického pole na pufrů složené z nízkomolekulárních organických kyselin a bází o různých hodnotách  $pK_a$  a pI. Tyto amfolytické pufrů

pokrývají zvolený interval pH. Když separovaná látka doputuje do místa, kde je pH rovno jejímu pI, dále se nepohybuje, koncentruje se a tvoří tzv. zónu. [1,27,28]

Izoelektrická fokusace se provádí v plošném gelovém uspořádání s imobilizovaným pH gradientem nebo v kapiláře (tzv. kapilární izoelektrická fokusace), kde je následně nutné fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány, např. spektrofotometricky. [28]

### 3.2 Chromatografické metody

Chromatografie je analytická separační technika založená na rozdílné distribuci analytů mezi dvě fáze, pohyblivou MF a nepohyblivou SF. V chromatografii jsou analyty rozdělovány mezi tyto fáze na základě svých rozdílných vlastností a afinit. [29,30] Metody kapalinové kolonové chromatografie pro separace proteinů je možné rozdělit podle mechanismu separace, jak uvádí Tab. 1 [8,10].

**Tab. 1** Základní chromatografické metody pro separace proteinů

<b>Vlastnost proteinu</b>	<b>Chromatografická metoda</b>
Velikost/ $M_r$	Gelová permeační chromatografie
Vazebná (ligandová) specifita	Afinitní chromatografie
Náboj	Ionexová chromatografie
Izoelektrický bod	Chromatofokusace, gradientová chromatofokusace
Hydrofobicita	Hydrofobně interakční chromatografie

#### 3.2.1 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie (GPC) je metodou kapalinové kolonové chromatografie, ve které se uplatňuje efekt molekulárního síta. Principem je separace molekul na základě jejich rozdílných velikostí a rozdílných  $M_r$ . V GPC se používají kolony naplněné fyzikálně odolným a chemicky inertním polymerním gelem o různé velikosti pórů. Během separace se menší molekuly zachytávají v pórech gelu a jejich eluce je zpomalena. Jako první eluují velké molekuly, které vůbec nepronikají do pórů. Eluát je rozdělen do frakcí podle velikostí jednotlivých separovaných složek. Na rozdíl od ionexové nebo afinitní chromatografie molekuly neinteragují se SF. Nedochází

k ustavení termodynamické rovnováhy mezi MF a SF, takže složením MF nelze přímo ovlivnit separaci. [7,27,30]

Tato metoda je vhodná pro purifikaci biomolekul, které mohou být citlivé k výkyvům pH, koncentraci iontů kovů a podobně [10].

### 3.2.2 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie rozděluje biologicky aktivní látky (např. proteiny, hormony, nukleové kyseliny) na základě jejich reverzibilní interakce se specifickým ligandem, kovalentně navázaným na polymerní inertní matrici SF. Ligandy mohou být specifické pro konkrétní látku, anebo skupinu látek. Během separace se na koloně zachytávají pouze molekuly s dostatečnou afinitou ke specifickému ligandu. Eluce analytu je dosaženo buď specificky, přidáním kompetitivního ligandu (např. inhibitor, substrát), anebo nespécificky, změnou iontové síly, pH či polarit y MF .

Výhodou této metody je vysoká selektivita, a tím i rozlišení. Afinitní chromatografií mohou být prekoncentrována a separována malá množství cílových látek z komplexních biologických matric. Také lze oddělit nativní formy proteinu od jeho denaturovaných částí za současného zachování biologické aktivity. [10,27,30]

### 3.2.3 Ionexová chromatografie

Ionexová neboli iontově výměnná chromatografie je separační metoda založená především na elektrostatických interakcích analytu se SF a MF. Na SF (tzv. ionexu) jsou kovalentně navázány iontové funkční skupiny, které interagují s analytem a s opačně nabitými ionty v MF. [27,29,30] Aby se látka iontového charakteru na ionex zachytila, je třeba, aby s ním interagovala silněji než s elučním systémem. Významným kritériem úspěšné separace je dostatečná schopnost separovaných látek pronikat do nitra ionexových částic. [27] Rozhodující úlohu mají při elektrostatických interakcích iontová síla, velikost, náboj a koncentrace iontu, relativní permitivita prostředí a disociační konstanta iontových skupin ionexu a analytu (a tím pH MF) [29].

Retenci, respektive eluci dělené látky lze ovlivnit teplotou, koncentrací solí (iontovou silou) či hodnotou pH roztoku MF [29,30]. Jako MF se používají různé vodné

pufry, jejichž ionty jsou v dynamické rovnováze s iontovými skupinami ionexu [29]. Eluce v IEC je gradientová. Využívá se lineárního či stupňovitého koncentračního gradientu soli (klasická IEC) nebo gradientu pH (chromatofokuse). [27,30]

### 3.2.3.1 Stacionární fáze pro ionexovou chromatografii

Stacionární fáze pro IEC lze rozdělit podle mnoha kritérií, např. dle skupenství, původu, chemického složení. Nejčastěji jsou rozdělovány podle struktury nosiče (matrice) a druhu výměnné funkční skupiny. [30,31] Dle struktury matrice se ionexy dělí do tří skupin:

- 1) Povrchově porézní SF s chemicky vázanou vrstvou ionexu na danou pórovitou matici [30,31].
- 2) Mikropartikulární SF s organickou syntetickou maticí (tzv. ionexové pryskyřice). Mohou být styrenového typu (obsahují zesíťovaný polystyren-divinylbenzenový kopolymer) nebo akrylátového typu (obsahují methakrylátové estery zesítěné divinylbenzenem či ethylendimethakrylátem) [30,31]. Další variantou jsou ionexy s přírodní maticí na bázi polysacharidů, např. celulózové, agarózové nebo dextranové [27].
- 3) Chemicky vázané ionexové fáze na silikagelové matici [30,31].

Organické polymerní matrice mají obvykle větší výměnnou kapacitu a často i selektivitu, ale nižší separační účinnost než silikagelové matrice [30,31].

Dle funkčních výměnných skupin dělíme ionexy na bazické anexy (obsahují kationtové funkční skupiny a vyměňují anionty) a kyselé katexy (obsahují aniontové funkční skupiny a vyměňují kationty). Tyto ionexy mohou být silné, slabé, popřípadě středně silné (dle hodnot  $pK_a$ ). [30,31] Funkční skupiny silných ionexů na rozdíl od slabých zcela disociují v celém pracovním rozsahu pH [4], který závisí na vlastnostech ionexové matrice.

Nejčastěji používané funkční skupiny pro ionexovou chromatografii jsou uvedeny v Tab. 2 [2,29,30]. Jako silné anexy (SAX) se používají hlavně kvartérní amoniové skupiny a jako slabé anexy (WAX) se používají různé primární, sekundární či



terciární aminy. Silnými katexy (SCX) jsou nejčastěji sulfoskupiny a slabými katexy (WCX) alkykarboxylové skupiny, seleničitanové skupiny, nebo fosfoskupiny. [2,29,30]

**Tab. 2** Nejčastěji používané funkční skupiny v ionexové chromatografii

<b>Funkční skupina</b>	<b>Vzorec</b>	<b>Typ ionexu</b>
Kvartérní amin (tetramethylamoniový kation)	$-(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$	SAX
Kvartérní amin	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})^+$	SAX
Diethylamin	$-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	WAX
Diethylaminoethyl (DEAE)	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	WAX
Dimethylaminoethanol	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$	WAX
Polyethylenimin	$-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n-\text{NH}_3^+$	WAX
Kyselina sulfonová (sulfoskupina)	$-\text{SO}_3^-$	SCX
Karboxymethyl	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	WCX
Kyselina fosforitá (fosfoskupina)	$-\text{PO}_3-\text{H}^-$	WCX
Kyselina seleničitá	$-\text{SeO}_3^-$	WCX

SAX – silný anex, WAX – slabý anex, SCX – silný katex, WCX – slabý katex

### 3.2.4 Chromatofokusace

Chromatofokusace je variantou IEC a ve své podstatě její kombinací s izoelektrickou fokusací [32,33]. Zatímco v klasické IEC se pro eluci separovaných látek využívá koncentračního gradientu soli (iontové síly), v chromatofokusaci hraje klíčovou roli gradient pH [33]. Tento pH gradient je vytvářen uvnitř chromatografické kolony pomocí pufrujících schopností nabitých skupin ionexu a MF. Tímto se chromatofokusace zásadně liší od ostatních ionexových metod.

V chromatofokusaci se používají dva pufrы o různém pH, tzv. startovací a eluční. Kolona se nejprve ekvilibruje startovacím pufrem o zvoleném pH. Vzorek je pak nadávkován za současné aplikace elučního pufru o jiném pH. Eluční pufr protéká kolonou a postupně dochází k titraci nabitých výměnných skupin ionexu a funkčních skupin analytů. Uvnitř kolony se činností tohoto pufrujícího systému vytváří pH gradient, který vymývá analyty amfolytické povahy (nejčastěji proteiny) podle hodnot jejich pI. Jakmile pH dosáhne hodnoty pI daného proteinu, elektrostatické interakce

mezi výměnnými skupinami ionexu a iontovými skupinami proteinu se přeruší, protein je unášen MF a následně eluován a detekován. [3,27,33–35] Většina proteinů eluuje při hodnotě pH MF, které je rovno jejich  $pI \pm 1$  [2].

Gradient bývá téměř lineární v rozmezí až pěti jednotek pH a je buď klesající, v případě anexů, anebo stoupající, v případě katexů [36,37]. Při použití anexu má startovací pufr vyšší pH, než jsou hodnoty  $pI$  separovaných proteinů. Proteiny mají při  $pH > pI$  záporný náboj, a proto dochází k interakci s anexem (záporně nabitě proteiny interagují s kladně nabitými skupinami anexu). Při aplikaci elučního pufru, který má nižší pH než startovací pufr, se titrací funkčních skupin pH MF postupně snižuje a tvoří se sestupný gradient. Při použití katexu je pH startovacího a elučního pufru nastaveno opačně (startovací pufr má nižší pH než je pH elučního pufru a  $pI$  separovaných proteinů).

Chromatofokusace je jedinou metodou IEC, která generuje téměř lineární pH gradient MF [3]. Během eluce se uplatňuje stejný fokusační efekt jako při izoelektrické fokusaci. Výsledkem fokusačního efektu je zaostřování zón analytů a s ním spojené vysoké rozlišení separace oproti klasické IEC. [3,33,36,37] Uvádí se, že chromatofokusací je možné separovat proteiny, jejichž  $pI$  se liší o více než 0,02 jednotky pH [4,35], čehož se využívá zejména pro separaci izoform proteinů [4,33,35].

Vzhledem k vysokému rozlišení, rychlosti a jednoduchosti nachází chromatofokusace uplatnění v analytické i preparativní chromatografii, především pro separace a purifikace proteinů [36,37].

#### **3.2.4.1 Mobilní fáze v chromatofokusaci**

V chromatofokusaci se jako MF používají roztoky komerčních syntetických vysokomolekulárních pufrů, tzv. polypufrů [36,37]. Tyto pufrы obvykle obsahují směs alifatických polyaminokarboxylových sloučenin s velkým počtem různých kyselých skupin (karboxylové skupiny, fosfoskupiny) a bazických skupin (primární, sekundární a terciární aminoskupiny). Hodnoty  $pI$  a  $pK_a$  jsou v těchto polyamfolytech rovnoměrně distribuovány a pokrývají určitý rozsah pH. [38]

Polypufrы představují pro metodu chromatofokusace značná omezení [3,34]. Syntéza těchto pufrů je náročná, finančně nákladná a snadno dochází k jejich degradaci

bakteriemi [36,37]. Dalším významným omezením je fakt, že tyto pufrů absorbují v UV oblasti, což komplikuje detekci analytů, především nearomatických peptidů při vlnových délkách pod 254 nm [36]. Použití polypufrů není vhodné pro preparativní účely [34]. S proteiny mohou tvořit komplexy, ze kterých se pak obtížně separují [2,32]. Dalším purifikačním krokem v takových případech bývá GPC [10,34].

Nahrazení polypufrů mnohasložkovými pufrů (až třicet složek) obsahujícími slabé kyseliny a báze sice může poskytovat téměř lineární gradient, ale navržení tolika-složkového systému je náročné a ekonomicky nevýhodné [36,37].

Kontrola a manipulace se sklonem, tvarem a rozsahem gradientu je v případě obou zmíněných typů pufrů obtížná a omezená [3,34,39]. Problém představuje také nízká reprodukovatelnost gradientů [32,40].

### **3.2.5 Gradientová chromatofokusace**

V gradientové chromatofokusaci je pH gradient po aplikaci vzorku generován mícháním startovacího pufrů s postupně navyšovaným množstvím elučního pufrů [39-41]. Na rozdíl od běžné chromatofokusace se gradient tvoří nejprve externě před vstupem na kolonu a následně se přenáší na interní gradient vznikající uvnitř kolony (pufrováním mezi MF a ionexem) [3,40]. Kolona se stejně jako v klasické chromatofokusaci ekvilibruje startovacím pufrů o daném pH. Po aplikaci vzorku se startovací pufr začne míchat s elučním pufrů v předem určeném poměru, který se mění s časem. [2] Vzniklý pH gradient může být lineární nebo jiný (konvexní, konkávní). Princip separace je stejný jako při klasické chromatofokusaci.

Jako MF se v gradientové chromatofokusaci používá směs vícesložkových nízkomolekulárních pufrů amfolytické povahy [39–41]. Složky pufrů se volí dle hodnot  $pK_a$  na základě toho, jaký rozsah pH je potřebný k separaci daných proteinů. Pracovní rozsah pH MF musí zahrnovat pI separovaného proteinu, při kterém je očekávána jeho eluce. [30]

Tato metoda přináší významné výhody oproti běžné chromatofokusaci a značně rozšiřuje její možnosti. Mezi hlavní výhody gradientové chromatofokusace patří nižší náklady na pořízení pufrů a možnost úpravy profilu pH gradientu, dále eliminace kontaminace vzorku polypufrů a odstranění interferencí při spektrofotometrické UV

detekci. Gradient pH lze sestavit individuálně pro konkrétní směs proteinů, lze ho časově naplánovat a dosáhnout více lineární křivky i ve větším rozsahu pH. [39–41]

Snadno ovladatelný a reprodukovatelný gradient, vysoké rozlišení a selektivita, rychlost, jednoduchost, ekonomická nenáročnost a zachování nativní struktury proteinu [32,33] dělá z gradientové chromatofokusace ideální metodu pro analýzy a purifikace proteinů včetně izoform a dalších amfolytických sloučenin. [2,3,39–41]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

Vysokoučinný kapalinový chromatograf, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo  
Pumpa Agilent Technologies 1260 Infinity (Bio Quat Pump), Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Autosampler Agilent Technologies 1260 Infinity, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Kolonový termostat Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Detektor Agilent Technologies 1200 Series (DAD), Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

#### *Kolony:*

Agilent Bio SAX, rozměry 4,6 × 250 mm, velikost částic 5 μm, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Agilent Bio WAX, rozměry 4,6 × 250 mm, velikost částic 5 μm, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Výše zmíněné kolony obsahují matrici na bázi neporézního polystyren-divinylbenzenového kopolymeru, který je potažen vrstvou uniformních silně aniontově-výměnných skupin  $-N(CH_3)_3$  (trimethylamin) v případě SAX SF a vrstvou slabě aniontově-výměnných skupin  $-N(C_2H_5)_2$  (diethylamin) v případě WAX SF. Kolony jsou stabilní v rozmezí hodnot pH 2–12 a při teplotě do 80°C.

#### *Další pomůcky:*

Ultrazvuková lázeň Elma E30H Elmasonic (Elma Ultrasonic Cleaner), ELMA, New Jersey, USA

pH metr Agilent Technologies 3200P, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Analytické váhy METTLER AE 240, METTLER, Greifensee, Švýcarsko

Pro ovládání chromatografu a vyhodnocení dat byl použit počítačový program OpenLab, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo.

Pro grafické zpracování chromatogramů byl použit počítačový program Origin 6.1, OriginLab Corporation, Friedrichsdorf, Německo.

Pro kontinuální měření hodnot pH mobilní fáze byl použit počítačový program Serial Monitor 1.0, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo.

## 4.2 Použité chemikálie

Deionizovaná voda, úprava pomocí zařízení Rowapur 100 a Ultrapur pro přípravu ultračisté vody deionizací, výrobce Watrex<sup>®</sup>, Praha, Česká republika

Bis-tris propan,  $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Piperazin, 99 %, ReagentPlus<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Kyselina octová,  $\geq 99$  %, ReagentPlus<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Kyselina chloroctová, 99 %, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Kyselina mléčná, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Kyselina chlorovodíková, 35 %, LACHEMA, a.s., Neratovice, Česká republika

Hovězí sérový albumin, lyofilizovaný prášek,  $\geq 96$  %, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Konalbumin (ze slepičího vaječného bílku, zbaven iontů železa), Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Beta-laktoglobulin A (z kravského mléka),  $\geq 90$  %, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

Beta-laktoglobulin B (z kravského mléka),  $\geq 90$  %, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, USA

## 4.3 Příprava mobilní fáze

Dle literatury [39] byl připraven startovací a eluční pufr. Startovací pufr (pufr A) se skládal z 15mM bis-tris-propanu ( $pK_a$  6,80) a 25mM piperazinu ( $pK_a$  5,68). Hodnota pH pufru A byla upravena okyselením pomocí koncentrované HCl na pH 7,60. Eluční pufr (pufr B) obsahoval kyselinu octovou ( $pK_a$  4,76), kyselinu mléčnou ( $pK_a$  3,81) a kyselinu chloroctovou ( $pK_a$  2,87), všechny o koncentraci 25mM. Hodnota pH pufru B byla 2,26. Z literatury [39] bylo převzato složení šedesátiminutového pH gradientu MF č. 1 (Tab. 3).

Následně bylo s ohledem na tvar a sklon gradientu navrženo a vyzkoušeno několik dalších šedesátiminutových pH gradientů MF. Tyto pH gradienty MF nebyly

použity pro separaci proteinů, neboť nedošlo ke zlepšení oproti pH gradientu MF č. 1.

Pro zkrácení doby analýzy bylo testováno také několik třicetiminutových pH gradientů MF, ze kterých byly pro separaci proteinů použity gradient č. 2 (Tab. 4) a gradient č. 3 (Tab. 5).

**Tab. 3** Složení mobilní fáze pH gradientu MF č. 1 [39]

<i>t/min</i>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	100	0
16	94	6
30	84	16
60	50,5	49,5

A – startovací pufr (15mM bis-tris-propan, 25mM piperazin, pH upraveno HCl na 7,60)

B – eluční pufr (25mM k. chloroctová, 25mM k. mléčná, 25mM k. octová, pH 2,26)

**Tab. 4** Složení mobilní fáze pH gradientu MF č. 2

<i>t/min</i>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	100	0
30	50	50

A – startovací pufr (15mM bis-tris-propan, 25mM piperazin, pH upraveno HCl na 7,60)

B – eluční pufr (25mM k. chloroctová, 25mM k. mléčná, 25mM k. octová, pH 2,26)

**Tab. 5** Složení mobilní fáze pH gradientu MF č. 3

<i>t/min</i>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	100	0
4	90	10
30	50	50

A – startovací pufr (15mM bis-tris-propan, 25mM piperazin, pH upraveno HCl na 7,60)

B – eluční pufr (25mM k. chloroctová, 25mM k. mléčná, 25mM k. octová, pH 2,26)

#### 4.4 Příprava vzorků

Zásobní roztoky proteinů o koncentraci 2 mg/ml byly připraveny rozpuštěním navážených množství standardů v pufru A. Pro přípravu směsí byly zásobní roztoky použity nejprve v jednotkovém objemovém poměru a následně, z důvodu nedostatečné odezvy konalbuminu, v objemovém poměru 4:2:1:1 pro směs všech čtyř proteinů (konalbumin:BSA:beta-laktoglobulin A:beta-laktoglobulin B) a v objemovém poměru

4:1:1 pro směs konalbuminu a beta-laktoglobulinů A a B (konalbumin:beta-laktoglobulin A:beta-laktoglobulin B).

#### 4.5 Podmínky separace

Separace čtyř studovaných proteinů byla prováděna gradientovou chromatofokusací v uspořádání HPLC za gradientové eluce. Složení mobilní fáze a profily tří testovaných pH gradientů MF jsou uvedeny v tabulkách 3–5. Teplota kolony byla konstantní, 25°C, průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a byla použita spektrofotometrická detekce při vlnových délkách 220, 254 a 280 nm. Dávkovaný objem byl různý, pro porovnání separací na SAX a WAX SF byl zvolen nástřik 50 a 60 µl vzorku směsi proteinů.

#### 4.6 Výpočet chromatografických parametrů

Pro vyhodnocení a porovnání separace proteinů byly počítačovým programem OpenLab vypočteny dva chromatografické parametry: rozlišení ( $R$ ) a faktor chvostování píku ( $T_f$ ).

Rozlišení ( $R$ ) charakterizuje míru relativní separace dvou sousedních píků a bylo vypočteno dle rovnice 1:

$$R = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \quad (1)$$

za podmínky, že  $t_{R2} > t_{R1}$ ;  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy a  $w_{h1}$  a  $w_{h2}$  jsou šířky píků v polovině výšky. Hodnota rozlišení vyšší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedená rovnice vhodná. [30]

Faktor chvostování píku ( $T_f$ ) slouží k posouzení tvaru píku a byl vypočten dle rovnice 2:

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}, \quad (2)$$



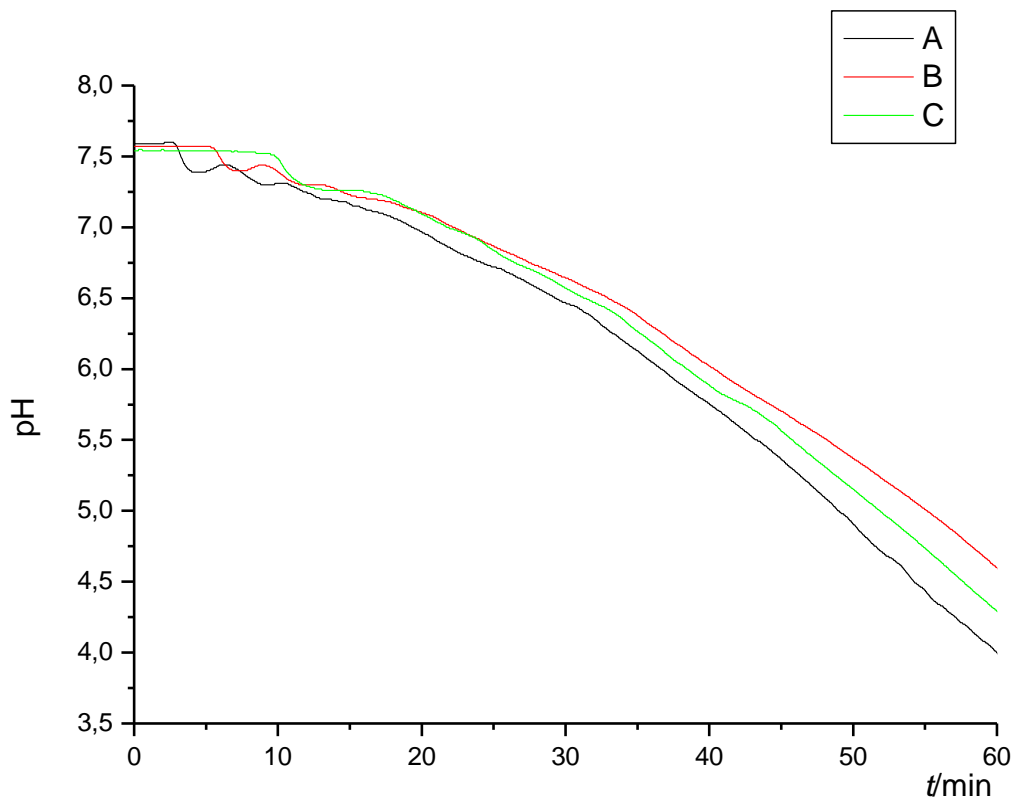
kde  $w_{0,05}$  je šířka píku v 5 % výšky a  $f$  je šířka vzestupné části píku v 5 % výšky. Hodnota faktoru chvostování píku 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku. Výpočet tohoto faktoru má smysl pouze pokud je rozlišení píků vyšší než 1. Jestliže  $T_f > 1$ , dochází k chvostování píku a pokud  $T_f < 1$ , dochází k frontování píku. [30]

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 1

Nejprve byl testován šedesátiminutový pH gradient MF č. 1 (Tab. 3), který byl převzat z literatury [39]. Nejdříve byl změřen pH gradient MF před vstupem na kolonu a následně pH gradienty MF na kolonách se SAX a WAX SF, aby bylo zjištěno, jak bude ovlivněn sklon gradientu v důsledku pufrčních schopností těchto anexů.

Obr. 1 znázorňuje pH profil gradientu před vstupem na kolonu a na obou anexových SF. Z obrázku je patrné, že hodnoty pH klesají po interakci MF se SF pomaleji v důsledku pufrčních schopností použitých kolon. Nejvíce pozvolného poklesu pH bylo dosaženo při použití SAX SF. Pro dosažení lineární křivky pH gradientu MF v prvních patnácti minutách bylo vyzkoušeno několik dalších šedesátiminutových pH gradientů MF. Profil pH gradientu byl upraven tak, aby byl gradient v prvních patnácti minutách zrychlen, a následně i tak, aby byl v tomto časovém úseku zpomalen. Takto upravené pH gradienty MF však nepředstavovaly významné zlepšení (nebylo dosaženo lineární křivky).



**Obr. 1** Časová změna pH pro pH gradient MF č. 1. A) pH gradient MF měřený před vstupem na kolonu, B) pH gradient měřený na SAX SF, C) pH gradient měřený na WAX SF

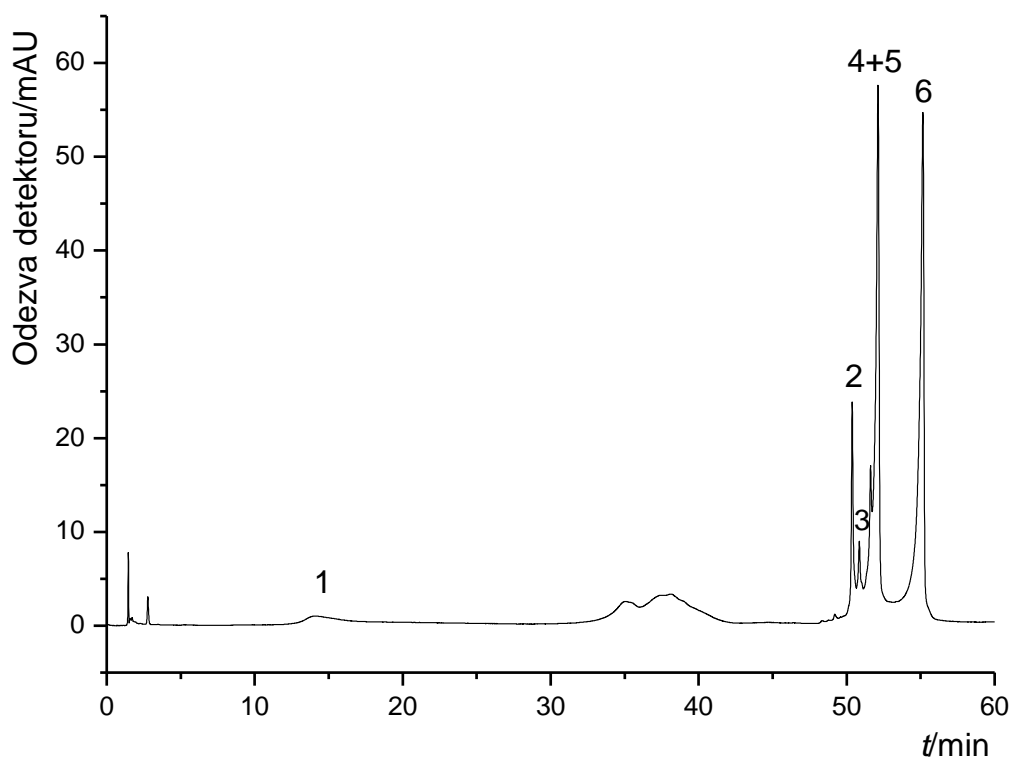
Nejprve bylo pro separaci při použití pH gradientu MF č. 1 nadávkováno 60  $\mu$ l směsi všech čtyř proteinů v jednotkovém objemovém poměru na kolonu obsahující SAX SF. Pořadí separovaných proteinů bylo ověřeno nadávkováním jednotlivých standardů proteinů a porovnáním retenčních časů.

Jako první eluoval konalbumin (Obr. 2). Z tohoto obrázku je patrné, že odezva detektoru nebyla dostatečná a pík konalbuminu byl rozmytý. Pravděpodobně během analýzy došlo k separaci konalbuminu a nějaké nečistoty (píky mezi 32. a 40. minutou). Pro zvýšení odezvy detektoru pro konalbumin byla při dalších měřeních zvýšena jeho koncentrace ve směsi. Pro separaci směsi všech čtyř proteinů byl jejich objemový poměr ve směsi upraven z jednotkového na 4:2:1:1 (konalbumin:BSA:beta-laktoglobulin B:beta-laktoglobulin A).

Jako druhý eluoval BSA, kdy se ukázala vysoká selektivita SAX i WAX

stacionární fáze, která umožnila gradientovou chromatofokusací separovat jeho jednotlivé izoformy. Na Obr. 2 jsou vidět dva píky BSA a u třetího píku BSA došlo k částečné koeluci s píkem beta-laktoglobulinu B. Tři píky BSA odpovídaly třem jeho popsaným izoformám [19,20]. Koeluce píku třetí izoformy BSA s píkem beta-laktoglobulinu B byla pozorována při použití všech dalších testovaných pH gradientů MF na obou anexových SF. Z tohoto důvodu byla další měření prováděna zvlášť pro směs čtyř proteinů, směs konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B a pro samotný BSA. Jako poslední eluoval beta-laktoglobulin A.

Vyhodnoceny a porovnány byly chromatogramy snímané při vlnové délce 280 nm, kdy absorbují především aromatické kruhy tyrosinu a tryptofanu, neboť píky měly nejvyšší odezvu detektoru a nejrovnější základní linii.



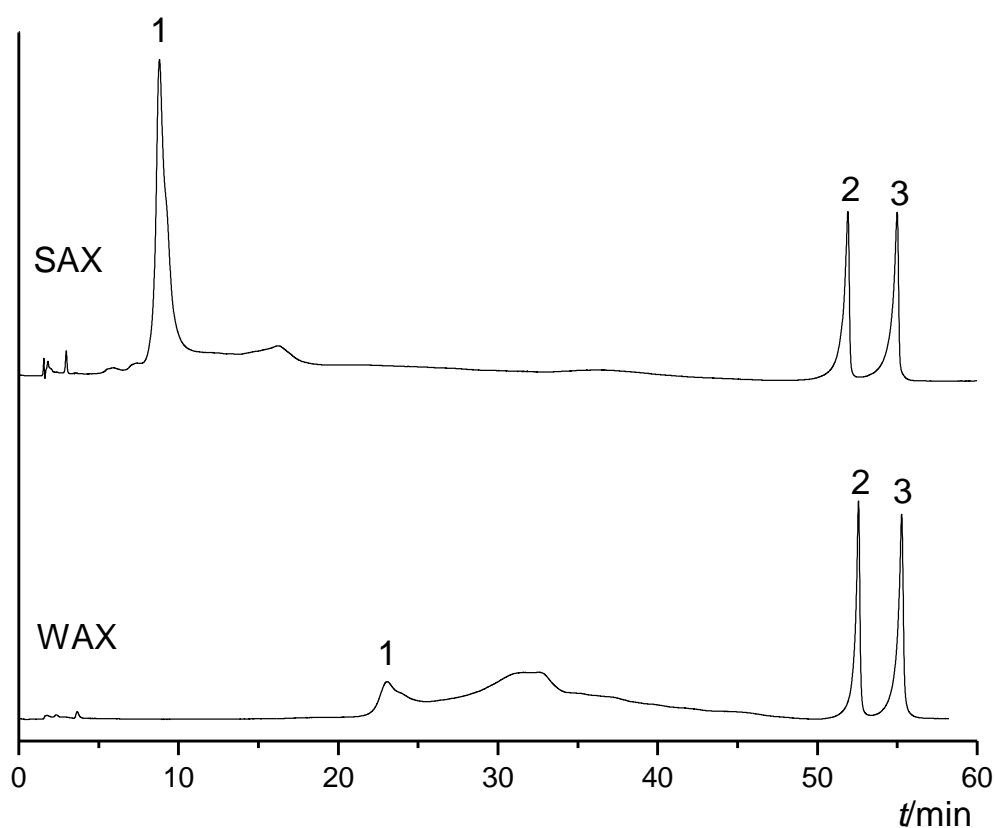
**Obr. 2** Chromatogram separace čtyř proteinů na SAX SF při použití pH gradientu MF č. 1,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 60  $\mu$ l, poměr analytů 1:1:1:1 (v:v:v:v), konalbumin:BSA:beta-laktoglobulin B:beta-laktoglobulin A, separační pořadí 1 – konalbumin, 2,3 – BSA izoformy, 4+5 – koelující píky izoformy BSA a beta-laktoglobulinu B, 6 – beta-laktoglobulin A.

Následně byla při použití pH gradientu MF č. 1 provedena separace směsi konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B na SAX a následně WAX SF. Chromatogramy separací jsou znázorněny na Obr. 3. Z důvodu nízké odezvy detektoru pro konalbumin byla navýšena jeho koncentrace ve směsi s beta-laktoglobuliny A a B. Objemový poměr konalbumin:beta-laktoglobulin B:beta-laktoglobulin A byl zvolen 4:1:1. K výraznému zlepšení odezvy detektoru a tvaru píku konalbuminu došlo na SAX SF. Na WAX SF také došlo k mírnému zlepšení, avšak odezva detektoru byla stále poměrně nízká a pík byl rozmytý. Konalbumin na SAX i WAX SF eluoval jako první. Jeho retenční čas se na WAX SF prodloužil o více než 14 minut oproti SAX SF. Retenční časy ani hodnoty rozlišení píků beta-laktoglobulinů se při použití tohoto pH gradientu MF na SAX a WAX SF významně nelišily (Tab. 6).

Počítačovým programem vypočtené hodnoty  $T_f$  píků konalbuminu se na SAX a WAX SF výrazně nelišily (Tab. 6). Z Obr. 3 je patrné, že při separaci na obou SF dochází pravděpodobně k separaci konalbuminu a nějaké nečistoty. Píky obou beta-laktoglobulinů vykazovaly lepší symetrii při separaci na SAX SF.

V literatuře [39] byl použit tento pH gradient MF na DEAE WAX SF k separaci konalbuminu, beta-laktoglobulinů A a B, BSA a ovalbuminu. Při použití DEAE WAX SF nedocházelo k retenci konalbuminu [39], zatímco na obou testovaných anexech v této práci byl konalbumin zadržován. K separaci beta-laktoglobulinů A a B na DEAE WAX SF v uvedené literatuře došlo s hodnotou rozlišení píků 2,33. Tato hodnota rozlišení je více než o tři jednotky nižší v porovnání s rozlišením píků beta-laktoglobulinů při separaci na obou použitých SF v této práci (Tab. 6).

Při použití DEAE WAX SF [39] byla hodnota pH MF při eluci beta-laktoglobulinu B 5,34 a při eluci beta-laktoglobulinu A 5,00. Hodnoty pH MF při eluci beta-laktoglobulinů A a B se v této práci na SAX SF více přibližovaly hodnotám jejich pI (Tab. 6) v porovnání s pH při eluci na DEAE WAX SF [39], zatímco hodnoty pH MF při eluci beta-laktoglobulinů A a B na DEAE WAX SF se více blížily jejich hodnotám pI ve srovnání s použitou WAX SF v této práci.



**Obr. 3** Chromatogram separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 1 na obou SF,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 50  $\mu$ l, poměr analytů 4:1:1 (v:v:v), konalbumin:beta-laktoglobulin B:beta-laktoglobulin A, separační pořadí 1 – konalbumin, 2 – beta-laktoglobulin B, 3 – beta-laktoglobulin A, SAX – silný anex, WAX – slabý anex.

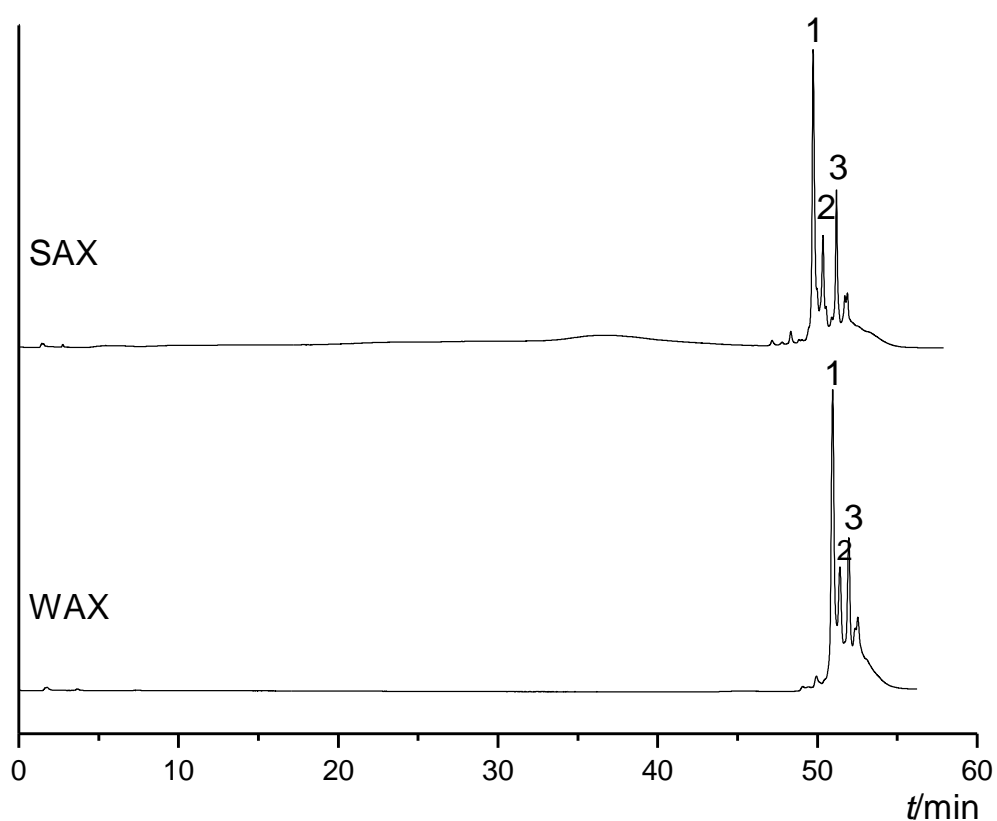
**Tab. 6** Retenční časy ( $t_r$ ), rozlišení ( $R$ ), faktory chvostování píku ( $T_f$ ), pH MF při eluci a pI konalbuminu [14,15] a beta-laktoglobulinů [26] při použití pH gradientu MF č. 1 na SAX i WAX SF

PROTEIN	$t_r/min$		$R$		$T_f$		pH MF při pI eluci		
	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	WAX
Konalbumin	8,80	23,05	–	–	0,49	0,51	7,44	6,95	7,17
Beta-laktoglobulin B	51,91	52,57	49,79	18,20	3,34	2,29	5,23	4,94	5,20
Beta-laktoglobulin A	54,99	55,27	5,56	5,55	3,26	2,34	5,01	4,71	5,10

Následně bylo při použití pH gradientu MF č. 1 na SAX a následně WAX SF nadávkováno 50 µl standardu BSA (Obr. 4) z důvodu koeluce píku jedné jeho izoformy s píkem beta-laktoglobulinu B během předchozí separace (Obr. 2). Z Obr. 4 jsou patrné tři hlavní píky představující izoformy BSA. Retenční časy izoform BSA se při separaci při použití pH gradientu MF č. 1 na SAX a WAX SF výrazně nelišily. Píky izoform separovaných na SAX SF měly vyšší hodnoty rozlišení než při separaci na WAX SF (Tab. 7). Symetrie píků nebyla porovnáвана z důvodu nedostatečného rozlišení píků na WAX SF.

V literatuře [39] byl použit stejný pH gradient MF (Tab. 3) pro analýzu BSA na DEAE WAX SF. Během této analýzy se nepodařilo separovat jednotlivé izoformy. Pík BSA vykazoval malou odezvu a byl rozmytý při použití DEAE WAX SF. V této práci došlo při použití tohoto pH gradientu MF k separaci tří izoform BSA (Obr. 4) na obou testovaných SF.

Při separaci na DEAE WAX SF v experimentu z uvedené literatury [39] při použití stejného šedesátiminutového pH gradientu MF bylo pH MF při eluci BSA 5,69; zatímco v této práci eluovaly tři izoformy na SAX SF při pH 5,39; 5,35 a 5,29 a na WAX SF při pH 5,07; 5,04 a 4,99, (Tab. 7). Všechny izoformy BSA eluovaly při nižším pH než jsou jejich udávané hodnoty pI [19,20].



**Obr. 4** Chromatogram separace izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 1,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 50  $\mu$ l, 1, 2, 3 – izoformy BSA, SAX – silný anex, WAX – slabý anex.

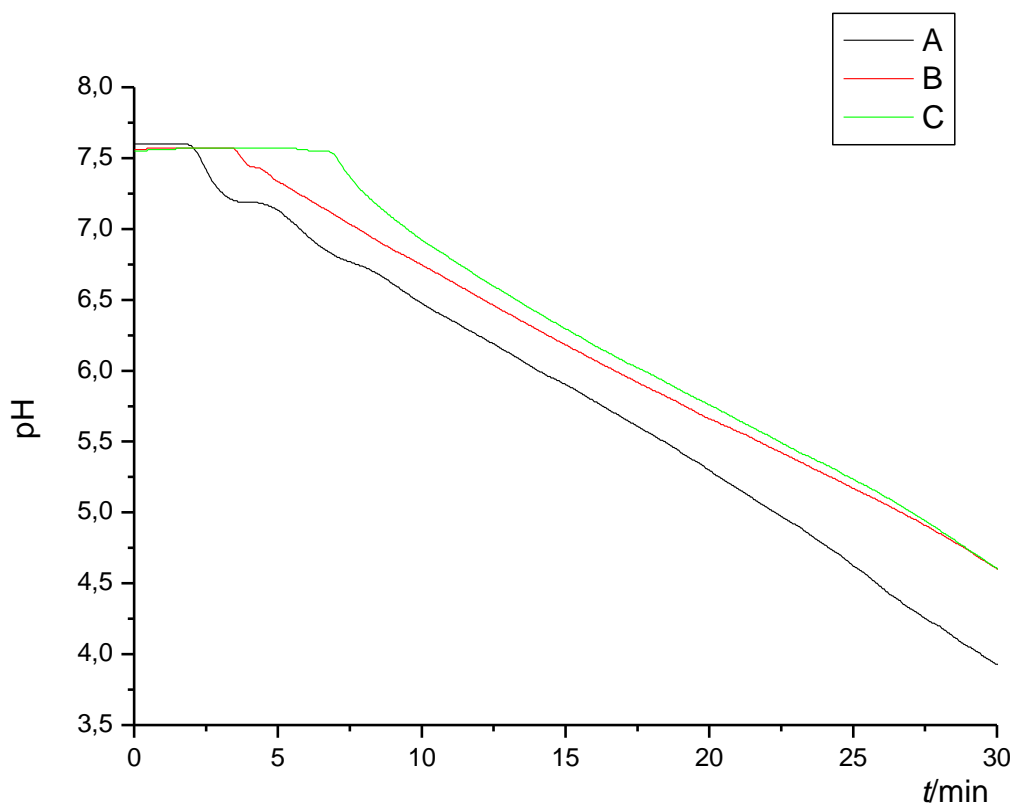
**Tab. 7** Retenční časy ( $t_r$ ), rozlišení ( $R$ ), pH MF při eluci a pI izoform BSA [19,20] při použití pH gradientu MF č. 1 na SAX i WAX SF

PROTEIN	$t_r/min$		$R$		pH MF při pI eluci		
	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	
<b>BSA Izoforma 1</b>	49,73	50,96	–	–	5,39	5,07	5,60
<b>BSA Izoforma 2</b>	50,35	51,41	2,35	1,39	5,35	5,04	5,50
<b>BSA Izoforma 3</b>	51,19	51,96	3,68	1,83	5,29	4,99	5,40



## 5.2 Separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 2

Pro zkrácení doby separace bylo následně navrženo několik třicetiminutových pH gradientů MF. Z těchto pH gradientů MF byly pro separaci vybrány dva, které se nejvíce blížily lineární křivce – gradient č. 2 (Tab. 4) a gradient č. 3 (Tab. 5). Nejprve byl pro separaci proteinů testován pH gradient MF č. 2, který byl oproti pH gradientu MF č. 1 o třicet minut zkrácen. Sklon a linearita pH gradientu MF č. 2 byly porovnány změřením pH gradientu MF před vstupem na kolonu a následně na SAX a WAX SF (Obr. 5). Stejně jako při použití pH gradientu MF č. 1 vykazují kolony s anexovou SF při použití pH gradientu MF č. 2 pozvolnější pokles pH než pH gradient MF před vstupem na kolonu v důsledku svých pufracních schopností. Nejvíce pozvolného poklesu pH bylo dosaženo při použití WAX SF.



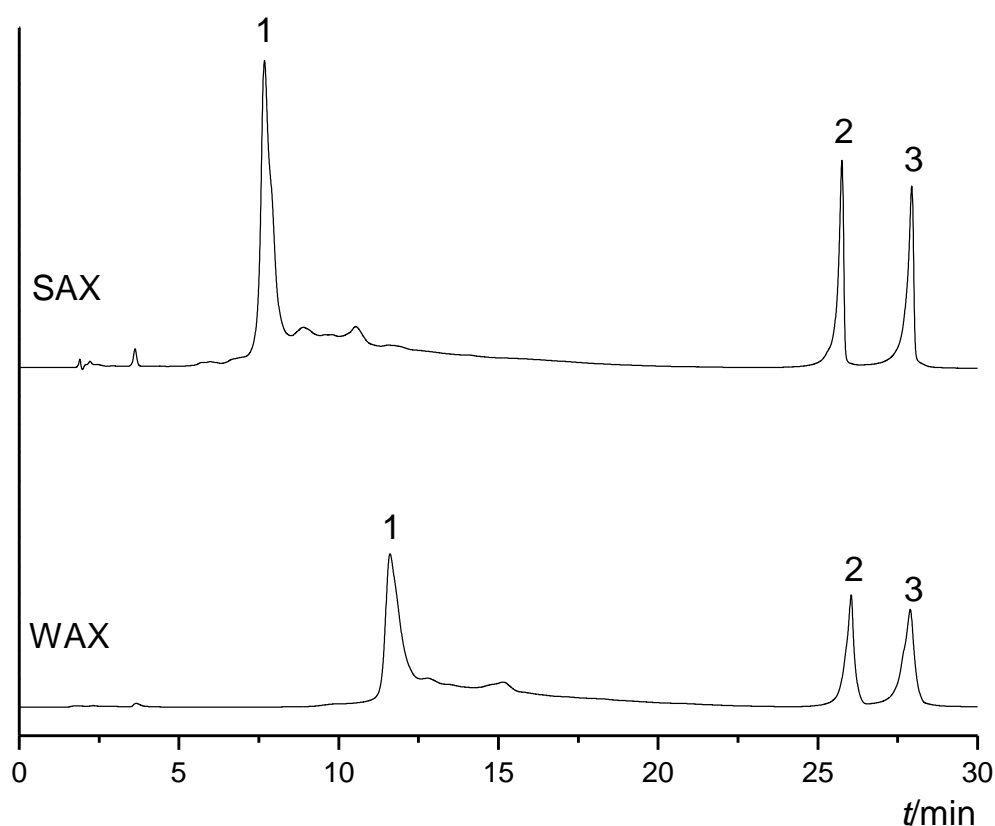
**Obr. 5** Časová změna pH pro pH gradient MF č. 2. A) pH gradient MF měřený před vstupem na kolonu, B) pH gradient měřený na SAX SF, C) pH gradient měřený na WAX SF

Následně byla provedena separace směsi konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B (objemový poměr 4:1:1) při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX i WAX SF. Chromatogramy separací jsou znázorněny na Obr. 6. Oproti pH gradientu MF č. 1 se doba analýzy při použití pH gradientu MF č. 2 zkrátila o třicet minut a současně hodnoty rozlišení a symetrie píků byly srovnatelné. Při separaci proteinů v pH gradientu MF č. 2 se retenční čas konalbuminu na WAX SF prodloužil téměř o čtyři minuty oproti separaci na SAX SF. Retenční časy beta-laktoglobulinů A a B se na SAX a WAX SF výrazně nelišily. Rozlišení beta-laktoglobulinů A a B bylo vyšší na SAX SF, hodnoty rozlišení na WAX SF byly nižší, ale dostačující. Symetrie píků konalbuminu byla na SAX i WAX SF srovnatelná. Lepší symetrii píků beta-laktoglobulinů A a B poskytovala WAX SF (Tab. 8).

Hodnoty pH MF při eluci konalbuminu byly při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX SF 7,01 a na WAX SF 6,71 (Tab. 8), tudíž v porovnání s pH při eluci konalbuminu při použití pH gradientu MF č. 1 došlo ke snížení hodnot pH. Tyto hodnoty pH jsou nižší než je hodnota pI konalbuminu zbaveného iontů železa (7,17) [14,15].

Hodnoty pH MF při eluci beta-laktoglobulinu B při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX SF byly 5,10 a na WAX SF 5,12 (Tab. 8). V porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo v případě SAX SF ke snížení hodnoty pH a v případě WAX SF ke zvýšení hodnoty pH. Tyto hodnoty pH MF při eluci se liší od hodnoty pI beta-laktoglobulinu B (5,20) [26] přibližně o desetinu hodnoty pH.

Hodnoty pH MF při eluci beta-laktoglobulinu A při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX SF byly 4,86 a na WAX SF 4,89 (Tab. 8). V porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo v případě SAX SF ke snížení hodnoty pH a v případě WAX SF ke zvýšení hodnoty pH. Tyto hodnoty pH MF při eluci se liší od hodnoty pI beta-laktoglobulinu B (5,10) [26] přibližně o dvě desetiny hodnoty pH.



**Obr. 6** Chromatogram separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 2,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 60  $\mu$ l, poměr analytů 4:1:1 (v:v:v), konalbumin:beta-laktoglobulin B:beta-laktoglobulin A, separační pořadí 1 – konalbumin, 2 – beta-laktoglobulin B, 3 – beta-laktoglobulin A, SAX – silný anex, WAX – slabý anex.

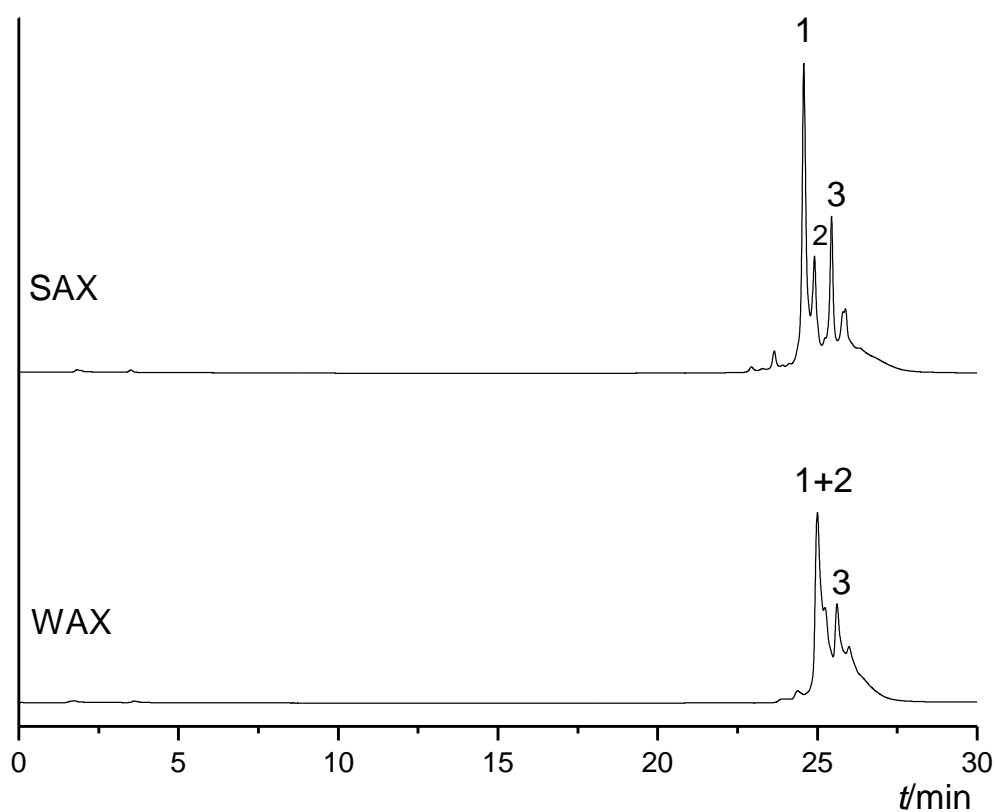
**Tab. 8** Retenční časy ( $t_r$ ), rozlišení ( $R$ ), faktory chvostování píku ( $T_f$ ), pH MF při eluci a pI konalbuminu [14,15] a beta-laktoglobulinů [26] při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX i WAX SF

PROTEIN	$t_r/min$		$R$		$T_f$		pH MF při pI eluci		
	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	WAX
<b>Konalbumin</b>	7,68	11,61	–	–	0,52	0,48	7,01	6,71	7,17
<b>Beta-laktoglobulin B</b>	25,75	26,04	39,86	23,45	2,61	1,72	5,10	5,12	5,20
<b>Beta-laktoglobulin A</b>	27,94	27,90	7,29	3,42	2,77	1,77	4,86	4,89	5,10

Dále bylo při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX SF a následně WAX SF nadávkováno 50  $\mu$ l standardu BSA. Retenční časy izoform BSA se při použití tohoto pH gradientu MF na SAX a WAX SF výrazně nelišily. Rozlišení pík izoform bylo výrazně lepší na SAX SF. Na chromatogramu získaném při separaci na SAX jsou pozorovatelné tři píky, zatímco při separaci na WAX SF při použití tohoto gradientu byla hodnota rozlišení nižší a došlo ke koeluci pík izoform 1 a 2 (Obr. 7). Z tohoto důvodu nebyla symetrie pík izoform BSA porovnávána.

Po srovnání hodnot rozlišení při separaci izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 1 a pH gradientu MF č. 2 je zřejmé, že k lepší separaci došlo v pH gradientu MF č. 1 na SAX i WAX SF.

Hodnoty pH MF při eluci izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 2 na SAX SF byly 5,22; 5,18 a 5,13 a na WAX SF 5,24 a 5,17 (Tab. 9). V porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo v případě SAX SF k snížení hodnot pH u všech tří izoform a v případě WAX SF ke zvýšení hodnot pH. Všechny tyto hodnoty pH MF při eluci izoform BSA jsou nižší než jejich udávané hodnoty pI (5,60; 5,50; 5,40) [19,20].



**Obr. 7** Chromatogram separace izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 2,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 50  $\mu$ l, 1, 2, 3 – izoformy BSA (SAX), 1+2 – koeluce izoform 1 a 2, 3 – izoforma 3 (WAX), SAX – silný anex, WAX – slabý anex.

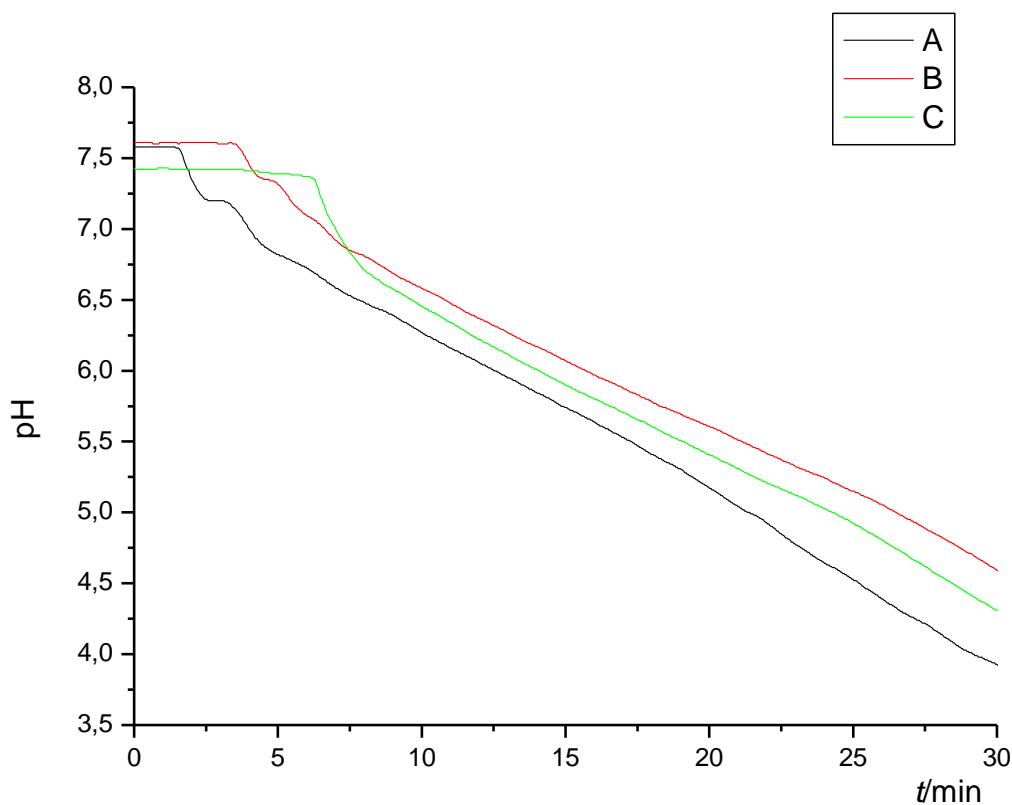
**Tab. 9** Retenční časy ( $t_r$ ), rozlišení ( $R$ ), pH MF při eluci a pI izoform BSA [19,20] při použití gradientu č. 2 na SAX i WAX SF

PROTEIN	$t_r/min$		$R$		pH MF při pI eluci		
	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	
BSA Izoforma 1	24,57	25,00	–	–	5,22	5,24	5,60
BSA Izoforma 2	24,91	*	1,57	*	5,18	*	5,50
BSA Izoforma 3	25,44	25,61	2,70	0,85	5,13	5,17	5,40

\* koeluce izoform 1 a 2

### 5.3 Separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 3

Jako poslední byl testován druhý navržený třicetiminutový pH gradient MF – pH gradient MF č. 3 (Tab. 5, Obr. 8). Tento pH gradient MF byl v prvních čtyřech minutách zrychlen oproti pH gradientu MF č. 2, aby došlo k odstranění počáteční nelinearity jeho křivky. Tuto nelinearitu se nepodařilo odstranit, přesto byl takto zrychlený pH gradient MF následně vyzkoušen pro separaci proteinů. Stejně jako u dvou předešlých pH gradientů MF, i zde byl změřen nejprve pH gradient MF před vstupem na kolonu a následně pH gradienty MF na SAX a WAX SF. Sklon pH gradientů MF na anexových SF je oproti pH gradientu MF měřenému před vstupem na kolonu pozvolnější a pH klesá pomaleji v důsledku pufracních schopností kolon. Nejvíce pozvolného poklesu pH bylo dosaženo na SAX SF.



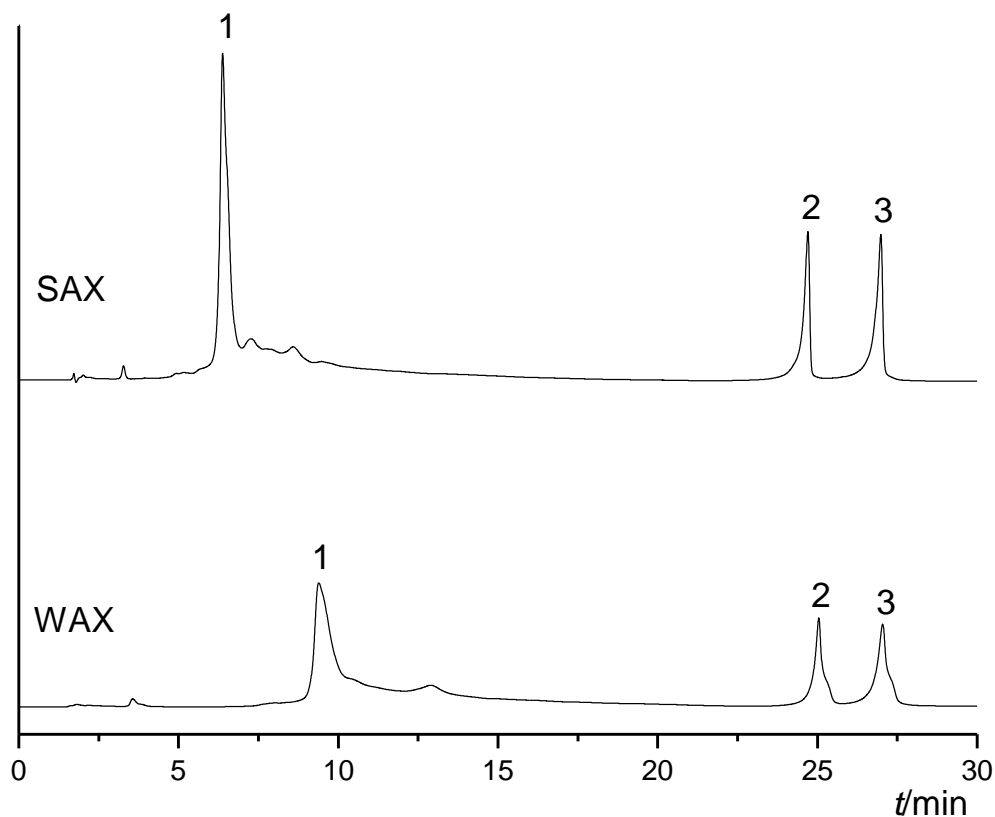
**Obr. 8** Časová změna pH pro pH gradient MF č. 3. A) pH gradient měřený před vstupem na kolonu, B) pH gradient měřený na SAX SF, c) pH gradient měřený na WAX SF

Nejdříve byla při použití pH gradientu MF č. 3 testována separace směsi konalbuminu a beta-laktoglobulinů A a B (objemový poměr 4:1:1). Chromatogramy separací jsou znázorněny na Obr. 9. Retenční čas konalbuminu se při separaci na WAX SF prodloužil o 3 minuty oproti separaci na SAX SF. Retenční časy beta-laktoglobulinů A a B se na SAX a WAX SF výrazně nelišily. Hodnoty rozlišení separovaných proteinů byly lepší na SAX SF. Symetrie píku konalbuminu byla lepší na SAX SF. Lepší symetrie píků obou beta-laktoglobulinů bylo dosaženo na WAX SF. Z Obr. 9 to není vizuálně patrné, neboť počítačový program OpenLab, ve kterém byly píky integrovány, počítá faktor chvostování píku v 5 % jeho výšky.

Hodnoty pH MF při eluci konalbuminu byly při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX SF 7,04 a na WAX SF 6,53 (Tab. 10), tudíž v porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo k výraznějšímu snížení hodnot pH na SAX i WAX SF. V porovnání s pH gradientem MF č. 2 došlo k nepatrnému zvýšení hodnot pH MF při eluci na SAX SF a ke snížení hodnot pH MF při eluci na WAX SF. Tyto hodnoty pH MF při eluci jsou nižší než udávaná hodnota pI konalbuminu zbaveného iontů železa (7,17) [14,15].

Hodnoty pH MF při eluci beta-laktoglobulinu B při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX SF byly 5,17 a na WAX SF 4,92 (Tab. 10). V porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo v případě SAX i WAX SF ke snížení hodnot pH MF při eluci. V porovnání s pH gradientem MF č. 2 došlo na SAX SF ke zvýšení hodnot pH MF při eluci a na WAX SF ke snížení hodnot pH MF při eluci. Všechny tyto hodnoty pH MF při eluci se liší od hodnoty pI beta-laktoglobulinu B (5,20) [26] maximálně o tři desetiny hodnoty pH.

Hodnoty pH MF při eluci beta-laktoglobulinu A při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX SF byly 4,95 a na WAX SF 4,67 (Tab. 10). V porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo v případě SAX i WAX SF ke snížení hodnot pH MF při eluci. V porovnání s pH gradientem MF č. 2 došlo na SAX SF ke zvýšení hodnot pH MF při eluci a na WAX SF ke snížení hodnot pH MF při eluci. Všechny tyto hodnoty pH MF při eluci se liší od hodnoty pI beta-laktoglobulinu B (5,10) [26] maximálně o pět desetin hodnoty pH.



**Obr. 9** Chromatogram separace proteinů při použití pH gradientu MF č. 3,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 60  $\mu$ l, poměr analytů 4:1:1 (v:v:v), konalbumin:beta-laktoglobulin B:beta-laktoglobulin A, separační pořadí 1 – konalbumin, 2 – beta-laktoglobulin B, 3 – beta-laktoglobulin A. SAX – silný anex, WAX – slabý anex.

**Tab. 10** Retenční časy ( $t_r$ ), rozlišení ( $R$ ), faktory chvostování píku ( $T_f$ ), pH MF při eluci a pI konalbuminu [14,15] a beta-laktoglobulinů [26] při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX i WAX SF

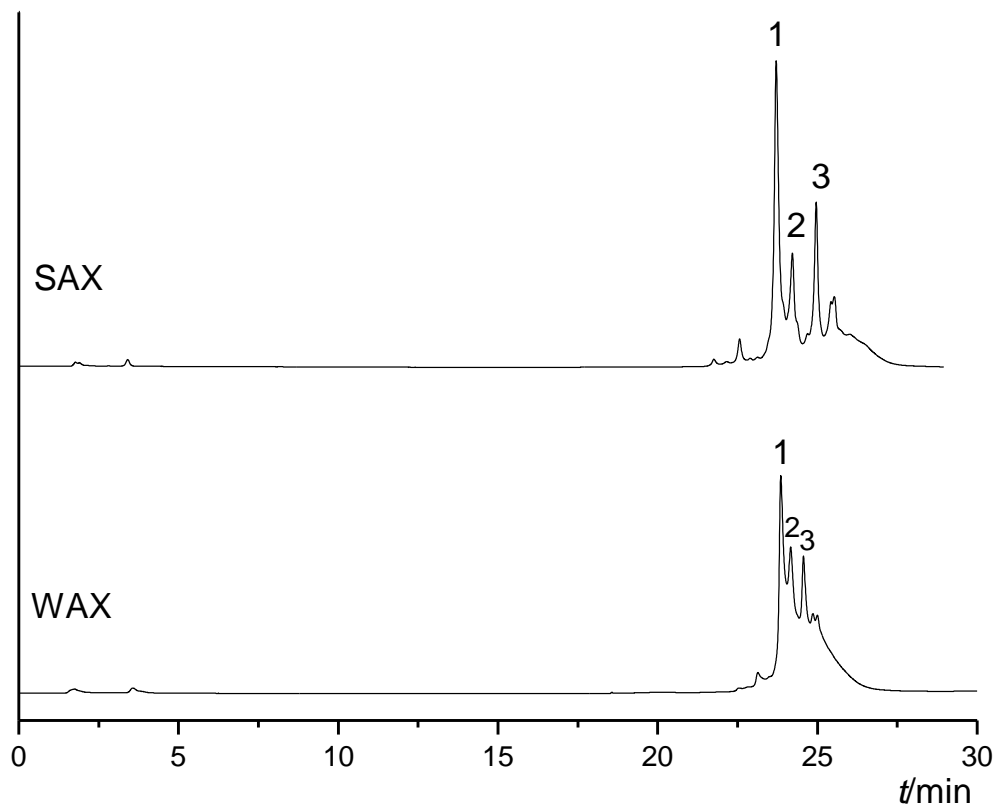
PROTEIN	$t_r/min$		$R$		$T_f$		pH MF při pI eluci		
	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	
Konalbumin	6,38	9,39	–	–	0,53	0,30	7,04	6,53	7,17
Beta-laktoglobulin B	24,70	25,04	46,69	23,89	2,86	1,12	5,17	4,92	5,20
Beta-laktoglobulin A	26,98	27,04	6,81	4,58	2,93	1,20	4,95	4,67	5,10



Následně byl při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX i WAX SF nadávkován standard BSA. Chromatogramy separací jsou znázorněny na Obr. 10. Retenční časy izoform BSA se na SAX a WAX SF při použití pH gradientu MF č. 3 výrazně nelišily. Hodnoty rozlišení píků na SAX SF byly lepší než na WAX SF (Tab. 11). Vzhledem k nedostatečnému rozlišení píků BSA na WAX SF nebyla vyhodnocena symetrie píků izoform BSA.

Po srovnání hodnot rozlišení při separaci izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 1, pH gradientu MF č. 2 a pH gradientu MF č. 3 je zřejmé, že nejlepší separace bylo dosaženo při použití pH gradientu MF č. 1 za šedesát minut na SAX SF.

Hodnoty pH MF při eluci izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX SF byly 5,27; 5,22 a 5,15 a na WAX SF 5,04; 5,01 a 4,97 (Tab. 11). V porovnání s hodnotami pH MF při eluci při použití pH gradientu MF č. 1 došlo v případě SAX i WAX SF ke snížení hodnot pH MF při eluci u všech tří izoform BSA. V porovnání s hodnotami pH MF při eluci izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 2 došlo na SAX SF ke zvýšení hodnot pH MF při eluci a na WAX SF ke snížení hodnot pH MF při eluci. Všechny tyto hodnoty pH MF při eluci izoform BSA jsou nižší než jejich udávané hodnoty pI (5,60; 5,50; 5,40) [19,20].



**Obr. 10** Chromatogram separace izoform BSA při použití pH gradientu MF č. 3,  $\lambda = 280$  nm, průtok = 1 ml/min, dávkovaný objem = 60  $\mu$ l, 1, 2, 3 – izoformy BSA. SAX – silný anex, WAX – slabý anex.

**Tab. 11** Retenční časy ( $t_r$ ), rozlišení ( $R$ ), pH MF při eluci a pI izoform BSA [19,20] při použití pH gradientu MF č. 3 na SAX i WAX SF

PROTEIN	$t_r/min$		$R$		pH MF při pI eluci		
	SAX	WAX	SAX	WAX	SAX	WAX	
BSA Izoforma 1	23,71	23,86	–	–	5,27	5,04	5,60
BSA Izoforma 2	24,22	24,16	1,91	0,91	5,22	5,01	5,50
BSA Izoforma 3	24,96	24,56	3,17	1,38	5,15	4,97	5,40

## 6 Závěr

Separace směsi čtyř proteinů (konalbumin, BSA, beta-laktoglobulin A a beta-laktoglobulin B) metodou gradientové chromatofokusace v uspořádání HPLC byla testována na jednom silném a jednom slabém anexu. Na obou kolonách byly vyzkoušeny různé gradienty pH mobilní fáze, z nichž tři byly vybrány pro separace směsi proteinů.

Při použití všech tří pH gradientů MF se podařilo separovat směs konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B na základní linii na obou testovaných kolonách. Vzhledem k vysoké selektivitě testované SAX SF a vysoké rozlišovací schopnosti metody gradientové chromatofokusace byly separovány tři izoformy BSA při použití všech testovaných pH gradientů MF.

Separace směsi všech čtyř proteinů, vzhledem ke koeluci píku jedné izoformy BSA s píkem beta-laktoglobulinu B, nebyla plně optimalizována. Separace směsi proteinů při použití všech tří pH gradientů MF obecně probíhala s vyšším rozlišením, ale s menší symetrií píků na SAX SF. Nejvyšších hodnot rozlišení píků při separaci směsi konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B bylo dosaženo na koloně obsahující SAX SF při použití pH gradientu MF č. 2. Nejvyšších hodnot rozlišení píků při separaci izoform BSA bylo dosaženo na koloně obsahující SAX SF při použití pH gradientu MF č. 1. Při separaci směsi konalbuminu s beta-laktoglobuliny A a B se podařilo dobu separace snížit z šedesáti minut na třicet při současném zachování separace na základní linii, a to na obou testovaných anexech.

Hodnoty pH MF při eluci jednotlivých proteinů odpovídaly jejich izoelektrickým bodům s maximální odchylkou sedmi desetín hodnoty pH.

Při porovnání získaných výsledků s výsledky z literatury [39] lze učinit následující závěry. Obě testované SF vykazují vyšší selektivitu než DEAE WAX SF použitá v literatuře [39] pro izoformy BSA. Vyšších hodnot rozlišení píků beta-laktoglobulinů A a B bylo dosaženo na SAX i WAX SF při shodných separačních podmínkách. Při použití WAX DEAE SF nedocházelo k retenci konalbuminu, zatímco tento protein byl zdržován na obou testovaných anexech v této práci. Obě testované SF jsou vhodnější pro separaci vybraných proteinů než DEAE WAX SF.

## 7 Použité internetové zdroje a literatura

1. Garfin, D., Ahuja, S., *Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics*, Amsterdam, Academic Press, 2005
2. Jogiraju, H., *Optimization of gradient chromatofocusing for the protein separation and LC-MS/MS determination of NGP1-01 in mouse serum, brain and retina*, Cleveland State University, College of Sciences and Health Professions, 2013
3. Liu, Y., Anderson, J. D., Gradient chromatofocusing high-performance liquid chromatography I. Practical aspects, *Journal of Chromatography A*, **762**:1–2, 207 – 217 (1997)
4. Kastner, M., *Protein Liquid Chromatography*, Amsterdam, Elsevier, 2000
5. Walsh, G., *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications*, Chichester, John Wiley & Sons, 2007
6. Yada, Y. R., *Proteins in Food Processing*, Boca Raton, CRC Press, 2004
7. Nelson, D. L., Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition*, Madison, W. H. Freeman, 2004
8. Mowery, J., Seidman, L., *PROTEIN PURIFICATION MANUAL. Purification of beta-galactosidase from E. Coli*, Madison, Madison Area Technical College, 2005
9. Alberts, B. a kol., *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*, Praha, Espero Publishing, s.r.o., 2005 dostupné z URL: <<http://lge.lf1.cuni.cz/heslo/priklady/files/genova%20exprese.htm>> [cit. 14.5. 2015]
10. Amersham Farmacia Biotech, *Protein purification: Handbook*, Piscataway, Amersham Farmacia Biotech AB, 1999
11. Wu, J., Acero-Lopez, A., Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation, *Food Research International* **46**:2, 480–487 (2012)

12. Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Ham, J. S., Ahn, D. U., Separation of ovotransferrin from chicken egg white without using organic solvents, *Poultry science* **92**:4, 1091–1097 (2013)
13. Bioseutica, B. V. Landbouwweg 83, 3899 BD Zeewolde, The Netherlands <<http://www.bioseutica.com/products/egg-proteins/ovotransferrin>> [cit. 14. 5. 2015],
14. Richards, M. P., Huang, T. L., Metalloprotein analysis by capillary isoelectric focusing, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **690**:1–2, 43–54 (1997)
15. Richards, M. P., Huang, T. L., Development of a high-performance capillary isoelectric focusing technique with application to studies of microheterogeneity in chicken conalbumin, *Journal of Chromatography A*, **757**:1-2, 247–253 (1997)
16. <<http://www.friedli.com/research/PhD/chapter5a.html>> [cit. 14. 5. 2015]
17. <[http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a7906pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a7906pis.pdf)> [cit. 14. 5. 2015]
18. Morrisett, J. D., Pownall, H. J., Gotto, A. M., Bovine serum albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids, *The Journal of Biological Chemistry*, **250**:7, 2487–2494 (1975)
19. Crescioni, V. G., *Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis Methodologies for the Analysis of Biological Samples*, Ann Arbor, ProQuest, 2007
20. Chang, W. W. P., Hobson Ch., Bomberger, D. C., Schneider, L. V., Rapid separation of protein isoforms by capillary zone electrophoresis with new dynamic coatings, *Electrophoresis*, **26**:11, 2179 – 2186 (2005)
21. National Institute of Standards & Technology, Certificate of Analysis Standard Reference Material 927d, dostupné z URL: <<https://www.nist.gov/srmors/certificates/927d.pdf?CFID=11628267&CFTOKEN=f682f88a759516bc-B4D66BFA-E23D-27B4-7C85AA1E5BC84277&jsessionid=b430384deb613141a202>> [cit. 14. 5. 2015]

22. Rachagani, S., Gupta, D. I., Gupta, N., Gupta, S. C., Genotyping of  $\beta$ -Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds, *BMC Genetics*, **7**:31, 1471–2156 (2006)
23. Valkonen K. H., Marttinen, N., Malinen H. - L., Jaakola V. - P., Alatossava, T., Purification and Characterization of beta-Lactoglobulin Genetic Variants A and B Using Preparative Electrophoresis and Isoelectric Focusing, *Preparative Electrophoresis*, tech note 2262
24. Yagi, M., Sakurai, K., Kalidas, C., Batt, C. A., Goto, Y., Reversible unfolding of bovine beta-lactoglobulin mutants without a free thiol group, *Journal of Biological Chemistry*, **278**:47, 9–15 (2003)
25. Cockburn, M. J., *The aggregation of beta-lactoglobulin and alfa-lactalbumin: Studies of compositional and temperature effects during the early stages of heating*, Ottawa, The University of Guelph, 2001
26. Ding, X., Yang, Y., Zhao, S., Li, Y., Wang, Z., *Analysis of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin A and B in whey protein powder, colostrum, raw milk, and infant formula by CE and LC. Dairy science & technology*, **91**:2, 213–225 (2011)
27. Anzenbacher, P., Kovář, J., *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, Praha, Ministerstvo školství ČSR, 1986
28. Kašička, V., Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, *Chemické listy*, **9**, 320–329 (1997)
29. Štulík, K. a kol., *Analytické separační metody*, Praha, Karolinum, 2005
30. Nováková, L., Douša, M. a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, Europrint, 2013
31. Churáček, J., Jandera, P., *Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie*, Praha, SNTL–Nakladatelství technické literatury, 1984

32. Bates, C. R., Frey, D. D., Quasi-linear pH gradients for chromatofocusing using simple buffer mixtures: local equilibrium theory and experimental verification, *Journal of Chromatography A*, **814**:1–2, 43–54 (1998)
33. Kang, X., Frey, D. D., High-performance cation-exchange chromatofocusing of proteins, *Journal of Chromatography A*, **991**:1, 117–128 (2003)
34. Tsonev, I. L., Hirsh, G. A., Theory and applications of a novel ion exchange chromatographic technology using controlled pH gradients for separating proteins on anionic and cationic stationary phases, *Journal of Chromatography A*, **1200**:2, 166–182 (2008)
35. *Ion Exchange chromatography & chromatofocusing. Principles and Methods*, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, 2004
36. Ivanov, A. V., Vakhstein, S. M., Simple eluents for the formation of ascending pH gradients in chromatofocusing of bipolar compounds, *Journal of Analytical Chemistry*, **62**:11, 1155–1161 (2007)
37. Ivanov, A. V., Kubyshev, S. S., One-Component eluents for chromatofocusing in weakly basic anionite columns, *Russian Journal of Physical Chemistry*, **80**:5, 902–907 (2006)
38. Nesterenko, N. P., Jones, P., Paull, B., *High Performance Chelation Ion Chromatography*, Royal Society of Chemistry, 2010
39. Shan, L., Anderson, J. D., Effect of buffer concentration on gradient chromatofocusing performance separating proteins on a high-performance DEAE column, *Journal of Chromatography A*, **909**:2, 191–205 (2001)
40. Shan, L., Anderson, J. D., Gradient chromatofocusing. versatile pH gradient separation of proteins in ion-exchange HPLC: characterization studies, *Analytical Chemistry*, **74**:21, 5641–9 (2002)

41. Ahamed, T., Nfor, K. B., Verhaert, D. E. M. P., Dedem van, G. W. K., Wielen van Der, L. A. M., Eppink, M. H. M., Sandt van de, E. J. A. X., Ottens, M., pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations, *Journal of Chromatography A*, **1164**:1–2, 181–188 (2007)