

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**VYUŽITÍ CHELATOVANÝCH IONTŮ KOBALTU
PRO IMOBILIZACI A SEPARACI PROTEINŮ**

2006

Mgr. Eva Zatloukalová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav patologické fyziologie

**VYUŽITÍ CHELATOVANÝCH IONTŮ KOBALTU
PRO IMOBILIZACI A SEPARACI PROTEINŮ**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Obor studia: Biochemie a patobiochemie

Mgr. Eva Zatloukalová

Školitel: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny uvádím v seznamu citované literatury.

V Praze, dne 30. 5. 2006

Eva Zatloukalová

Předně bych chtěla poděkovat své školitelce Ing. Zdence Kučerové, CSc. za cenné rady a profesionální přístup, se kterým mne během celého postgraduálního studia vedla.

Mé díky patří i všem členům Ústavu patologické fyziologie, obzvláště Prof. MUDr. Emanuelu Nečasovi, DrSc., dále Mgr. Lence Novotné, Mgr. Janě Frýdlové, Mgr. Petru Přikrylovi a paní laborantce Haně Muselové za ochotu a pohotovost kdykoliv pomoci.

Dále děkuji RNDr. Janu Rohovcovi, Ph.D. z Katedry anorganické chemie PřF UK za změření NMR spekter a za konzultace týkající se chelatovaných iontů kobaltu.

V neposlední řadě děkuji i všem svým blízkým za to, že při mně po celou dobu mého studia stáli.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH	11
2.1.1 Vazebná místa bílkovin	12
2.1.2 Kovové ionty	12
2.1.3 Chelatující ligandy	13
2.1.4 Vliv chromatografických podmínek	14
2.1.5 Aplikace a výhody afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech	15
2.2 PROTILÁTKY	18
2.2.1 Struktura protilátek	19
2.2.2 Vazebné interakce antigenu s protilátkou	20
2.2.3 Význam protilátek	20
2.2.4 Typy imunoglobulinů	21
2.2.5 Ptačí imunoglobuliny	22
2.3 IMOBILIZACE PROTEINŮ	24
2.3.1 Bioafinitní chromatografie	25
3. CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE	31
4. METODY	32
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	32
4.2 PŘÍPRAVA MYŠÍCH JATERNÍCH HOMOGENÁTŮ	32
4.3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	33
4.3.1 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE MYŠÍCH JATERNÍCH HOMOGENÁTŮ	33
4.3.2 ODSTRANĚNÍ KOVOVÝCH IONTŮ Z MYŠÍCH JATERNÍCH	

HOMOGENÁTŮ	33
4.3.3 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH	33
4.3.4 IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE	34
4.3.4.1 Imobilizace protilátek na Co ³⁺ -IDA-Agarosu	34
4.3.4.2 Afinitní chromatografie vaječného bílku na nosiči s anti-OVA IgG	34
4.3.4.3 Studium nespecifických interakcí vaječného bílku s Co ²⁺ -IDA-Agarosou a s Co ³⁺ -IDA-Agarosou	35
4.3.4.4 Stanovení kapacity imunosorbentů	35
4.3.4.5 Stanovení výtěžku ovalbuminu	35
4.3.4.6 Afinitní purifikace slepičí anti-BSA IgY	36
4.3.4.7 Imunoafinitní chromatografie BSA na nosiči se slepičí anti-BSA IgY	37
4.3.4.8 Vliv peroxidu vodíku na imobilizované protilátky	37
4.3.4.9 Porovnání imunoafinitních nosičů oxidovaných před a po vazbě protilátky	37
4.3.4.10 Vliv pH vazebného pufru na imobilizaci protilátek	38
4.3.4.11 Vliv kompetičního činidla na imobilizaci protilátek	38
4.3.4.12 Vliv chelatačního činidla na imobilizaci protilátek	38
4.3.4.13 Studium vlivu Co ²⁺ iontů na interakci mezi molekulami protilátek a Co ³⁺ -IDA-Agarosou	39
4.4 IMUNOCHEMICKÉ METODY	39
4.4.1 Stanovení aktivity afinitně purifikované anti-BSA IgY ELISA testem	39
4.5 ELEKTROFORETICKÉ METODY	40
4.5.1 Polyakrylamidová SDS elektroforéza	40
4.5.2 Dvourozměrná elektroforéza	40
4.6 ANALYTICKÉ METODY	41
4.6.1 Stanovení koncentrace proteinů	41
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	42
5.1 SEPARACE MYŠÍCH JATERNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH	42
5.1.1 PŘEDČIŠTĚNÍ MYŠÍCH JATERNÍCH PROTEINŮ	42

5.1.2 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH (IMAC-Co ²⁺).....	42
5.1.3 CHARAKTERIZACE SEPAROVANÝCH PROTEINŮ POMOCÍ ELEKTROFORETICKÝCH METOD.....	43
5.1.3.1 Charakterizace separovaných proteinů pomocí SDS-elektroforézy.....	43
5.1.3.2 Charakterizace separovaných proteinů dvourozměrnou elektroforézou.....	46
5.2 PŘÍPRAVA IMUNOAFINITNÍCH NOSIČŮ VYUŽÍVAJÍCÍ CHELATOVANÝCH IONTŮ KOBALTU.....	47
5.2.1 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE IMUNOAFINITNÍCH NOSIČŮ.....	47
5.2.1.1 Imobilizace protilátek na Co ³⁺ -IDA-Agarosu.....	47
5.2.1.2 Afinitní chromatografie vaječného bílku na nosiči s anti-OVA IgG.....	49
5.2.1.3 Stanovení kapacity imunosorbentů a výtěžku ovalbuminu.....	51
5.2.1.4 Afinitní purifikace slepičí anti-BSA IgY.....	57
5.2.1.5 Stanovení aktivity afinitně purifikované anti-BSA IgY ELISA testem.....	59
5.2.1.6 Imunoafinitní chromatografie BSA na nosiči se slepičí anti-BSA IgY.....	61
5.2.2 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI MOLEKULAMI PROTILÁTEK A CHELATOVANÝMI IONTY KOBALTU.....	68
5.2.2.1 Vliv peroxidu vodíku na imobilizované protilátky.....	68
5.2.2.2 Porovnání imunoafinitních nosičů oxidovaných před nebo po vazbě protilátky.....	70
5.2.2.3 Vliv pH vazebního pufru na imobilizaci protilátek.....	72
5.2.2.4 Vliv kompetičního činidla na imobilizaci protilátek.....	73
5.2.2.5 Vliv chelatačního činidla na imobilizaci protilátek.....	74
5.2.2.6 Vliv nechelatovaných Co ²⁺ iontů na interakci mezi molekulami protilátek a Co ³⁺ -IDA-Agarosou.....	78
6. ZÁVĚR.....	81
7. DODATEK.....	82
8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	83

SEZNAM ZKRATEK

- Anti-OVA IgG**, polyklonální králičí protilátka proti ovalbuminu;
- BCA**, bicinchoninová kyselina;
- BSA**, hovězí sérový albumin;
- C-konec**, konec peptidového nebo proteinového řetězce nesoucí na poslední aminokyselině volnou alfa karboxylovou skupinu;
- CNBr-activ.**, aktivovaný bromkyanem;
- DNA**, deoxyribonukleová kyselina;
- DTT**, dithiotreitol;
- EDTA**, sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové;
- ELISA**, enzymová imunoanalýza;
- Fc**, část protilátky obsahující pouze konstantní domény těžkých řetězců;
- HPLC**, vysokotlaká kapalinová chromatografie;
- H řetězce**, těžké řetězce protilátek;
- CHAPS**, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonát;
- IEF**, isoelektrická fokusace;
- IDA**, iminodioctová kyselina;
- IgY**, slepičí protilátka separovaná z vaječných žloutků;
- IMAC**, afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech,
- L řetězce**, lehké řetězce protilátek;
- NMR**, jaderná magnetická rezonance;
- OVA**, ovalbumin;
- PBS**, fosfátový pufr s obsahem chloridu sodného (0.15 M NaCl, 1.8 mM Na₂HPO₄ a 1.0 mM NaH₂PO₄, pH 7.2);

PNPP, *para*-nitrofenylfosfát;

RIA, radioimunostanovení;

SELDI, „surface-enhanced laser desorption ionization“ hmotnostní spektrometrie ionizující zkoumanou látku za účasti specifického povrchu nosiče;

SDS-PAGE, polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného

1. ÚVOD

Kovové ionty mají důležitou úlohu v živé buňce. Některé jsou pro živý organismus nezbytné, jiné naopak toxické. Máme-li porozumět úloze kovových iontů v lidském organismu, je nezbytné pochopit interakce mezi kovovými ionty a bílkovinami. Afinitu kovových iontů k bílkovinám je možno studovat např. pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech.

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC) je metoda umožňující detekci, separaci a imobilizaci molekul, dále odstranění nežádoucích kontaminant a enzymovou modifikaci biomolekul [1]. IMAC je pseudobioafinitní (nebo též chemoselektivní či skupinově selektivní) typ chromatografie [2–5]. Chromatografické nosiče pro IMAC obsahují kovové ionty imobilizované na pevnou matici prostřednictvím chelatujících ligandů (např. kyseliny iminodíoctové) [6, 7]. Chelatované ionty přechodných kovů (př. Cu^{2+} , Co^{2+} nebo Fe^{3+}) umožňují vazbu proteinů schopných poskytnout elektrony prostřednictvím svých nukleofilních skupin [5, 6, 8]. V závislosti na konkrétním použitém kovovém iontu, interagují nosiče s různými nukleofilními skupinami proteinů [6, 9].

Nosiče s chelatovanými Co^{2+} ionty váží proteiny zejména přes atomy dusíku [10]. Na základě výsledků vědeckých studií bylo určeno, že nosiče s chelatovanými Co^{2+} ionty interagují hlavně s imidazolovými skupinami histidinových zbytků proteinů [6, 9, 11, 12]. Takto navázané proteiny jsou k chelatovaným Co^{2+} iontům poutány především koordinačně kovalentní vazbou [5, 6]. Navázané proteiny lze z nosiče snadno uvolnit např. elučními pufrů o nízkém pH či pufrů s obsahem kompetujících činidel [5, 6, 9]. Šetrné podmínky eluce tudíž předurčují použití metody IMAC- Co^{2+} . IMAC- Co^{2+} se nejvíce používá pro separace proteinů z komplexních vzorků [7, 13, 14]. Kromě separace přirozeně se vyskytujících proteinů má velký význam i pro purifikaci rekombinantních proteinů s histidinovou značkou [5, 6, 15].

Má-li být princip metody IMAC- Co^{2+} využit pro imobilizaci proteinů, je vhodné zvýšit stabilitu vazby mezi chelatovanými ionty kobaltu a proteiny. Kineticky stabilní komplexy chelatovaných iontů kobaltu s proteiny lze vytvořit prostřednictvím změny oxidačního stavu chelatovaných iontů z Co^{2+} na Co^{3+} [16]. Pokud se touto kineticky stabilní vazbou imobilizuje např. protilátka, vznikne všestranně použitelný imunoafinitní nosič.

Jelikož vazebné místo pro kovové ionty je u protilátek lokalizováno na Fc fragmentu, jsou na imunoafinitním nosiči protilátky imobilizovány orientovaně [17]. Další výhodou je, že prostřednictvím chelatovaných iontů kobaltu lze imobilizovat i některé třídy protilátek, které nereagují s proteiny A a G.

Předložená dizertační práce se zabývá možnostmi využití chelatovaných iontů kobaltu pro imobilizaci a separaci proteinů. Pomocí IMAC-Co²⁺ je studována afinita myších jaterních proteinů k chelatovaným Co²⁺ iontům. Jsou porovnány rozdíly mezi proteiny separovanými z kontrolních myší a z myší premedikovaných chloridem kobaltnatým. Chelatované ionty kobaltu jsou dále využity pro imobilizaci protilátek. Pozornost je věnována přípravě imunosorbentu tak, aby se zamezilo oxidačnímu poškození protilátky během imobilizace. Důraz je kladen zejména na stálost vazby protilátky k nosiči a na imobilizaci různých podtříd protilátek. Interakce mezi protilátkami a chelatovanými ionty kobaltu jsou vyhodnoceny na základě experimentů při různých vazebných podmínkách (pH, přítomnost kompetujících a chelatujících činidel).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH

Afinitní chromatografie je metoda, při níž afinitní ligand (afinant) vázaný na matici specificky a reversibilně reaguje s určitým biopolymerem, respektive specifickým místem tohoto biopolymeru.

Afinitní sorbenty mohou obsahovat buď afinity biospecifické, tj. takové, u nichž je interakce založena na biologické aktivitě bílkoviny (protilátky, inhibitory, receptory, lektiny), nebo ligandy skupinově specifické, které interagují s určitým seskupením aminokyselin na povrchu bílkoviny (hydrofobní sorbenty, barviva, ionty kovů). Na vazbě biopolymeru k imobilizovanému afinitnímu ligandu se podílejí různé molekulární síly a interakce (iontové síly, hydrofobní interakce, vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, Londonovy dispersní interakce, dipólové interakce). Sorpce zpravidla zahrnuje několik typů interakcí [1].

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech je metoda založená na specifických interakcích biopolymerů v roztoku s ionty kovů, které jsou vázány na stacionární fázi. Podmínkou separace je, aby bílkovina byla schopna tvořit s iontem dostatečně stabilní komplex. Účinnost metody je srovnatelná s biospecifickými sorbenty [10].

Původně byl pro tuto metodu používán název "Metal chelate affinity chromatography". Vzhledem k tomu, že nejde jen o cheláty, byl název v roce 1983 změněn na "Immobilized metal ion affinity chromatography". Vžila se zkratka IMAC [18].

Kovové ionty jsou na nerozpustnou matici imobilizovány pomocí chelatujících ligandů. Separovaný biopolymer se pak k iontu kovu váže přes vhodnou reaktivní skupinu. Kovové ionty jako akceptory elektronů interagují se skupinami, které elektrony mohou naopak poskytnout. Takovými donory elektronů jsou v biomolekulách některé atomy dusíku, síry a kyslíku, případně fosforu. K vazbě bílkovin dochází vytěsněním některých slabě vázaných molekul ligandů (vody) z komplexů a jejich nahrazením molekulami bílkovin.

2.1.1 Vazebná místa bílkovin

K vazbě bílkovin na kov dochází přes povrchové aminokyseliny jako histidin, cystein, tryptofan, kyselina glutamová, kyselina asparagová, tyrosin, lysin, arginin, případně fosfátové skupiny fosfoproteinů [19, 20]. U metaloproteinů je možná i interakce přes jejich vazebné místo pro kov. Skupiny na povrchu bílkoviny interagují s různými ionty kovů kvantitativně i kvalitativně odlišně.

Dvojmocné ionty jako Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} preferují vazbu k dusíku. K vazbě bílkovin na IMAC- Co^{2+} dochází převážně prostřednictvím imidazolových skupin histidinů přítomných na povrchu proteinu. Skutečnost, že histidinu jsou v průměrné molekule bílkovin jen asi 2 %, umožňuje bílkoviny dělit dle počtu histidinových zbytků přítomných na povrchu [21].

V roce 1989 Sulkowski definoval minimální vazebné požadavky pro imobilizované kovové ionty. Podle této definice imobilizované Cu^{2+} ionty mohou vázat protein obsahující alespoň jeden povrchový histidin. Ni^{2+} a Zn^{2+} ionty potřebují pro vazbu proteinu dva vicinální histidiny a imobilizované Co^{2+} ionty vyžadují přítomnost alespoň dvou histidinů, které jsou na povrchu bílkoviny blízko sebe [12]. Asociační konstanta komplexu Cu^{2+} -protein bude tedy v průměru vyšší než u komplexu Co^{2+} -protein [5]. Díky tomu je IMAC- Co^{2+} účinným nástrojem pro studium topografie proteinů [11].

Pro izolaci rekombinantních bílkovin se používá tzv. histidinová značka (His-tag). Histidinová značka umožňuje úspěšnou separaci rekombinantních proteinů pomocí IMAC- Co^{2+} [5, 15, 22–24].

2.1.2 Kovové ionty

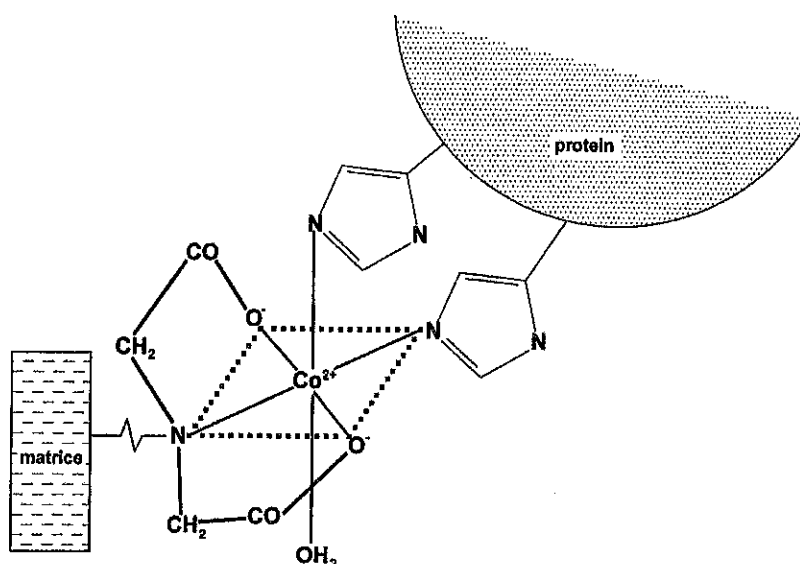
Vazebné vlastnosti komplexu imobilizovaný kov – protein se liší podle typu použitého kovu. Kovové ionty můžeme rozdělit podle míry jejich polarizovatelnosti na tvrdé a měkké. Povaha kovů, jakožto tvrdých či měkkých Lewisových kyselin, určuje jejich afinitu k nukleofilním skupinám biopolymerů. Ionty kovů s vlastnostmi tvrdých Lewisových kyselin (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} a In^{3+}) mají nejvyšší afinitu ke kyslíku (tvrdé Lewisově bázi). Ionty kovů chovající se jako měkké Lewisovy kyseliny (Cd^{2+} , Hg^{2+} a Tl^{3+}) jsou polarizovatelné mnohem snadněji než kovy tvrdé a preferují interakci se sírou, jako měkkou Lewisovou bázi. Ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} patří ke kovům středního typu a přednostně interagují s dusíkem, ale v menší míře i s kyslíkem a sírou [25]. Vazby mezi biopolymery a tvrdými ionty kovů mají iontový charakter, vazby s měkkými ionty kovů mají především kovalentní povahu a se středními ionty kovů se tvoří hlavně vazby

koordinací. Vedle těchto typů vazeb se na interakci podílejí i slabší, ale často početnější, coulombické a hydrofobní interakce [7].

2.1.3 Chelatující ligandy

Afinita komplexu kov-protein je také značně ovlivněna typem chelatujícího ligandu. Imobilizace kovového iontu na nosič prostřednictvím vhodného chelatujícího ligandu umožňuje ponechat kovovému iontu právě takový počet stupňů volnosti, aby mohl definovaně vázat molekulu proteinu. Pokud bude kovový ion na nosič imobilizován příliš silně, nezbyde kovovému iontu dost afinity pro vazbu proteinu a interakce kov – protein bude nedostačující. Naopak, bude-li kovový ion vázán k nosiči příliš slabě, mohl by jeden kovový ion vázat několik molekul proteinů a tvořit agregáty se změněnými vlastnostmi. Slabě navázané kovové ionty se také mohou uvolnit z nosiče do roztoku [10].

Seřadíme-li chelatující ligandy podle vzrůstajícího počtu vazeb, kterými k sobě poutají kovový ion, zjistíme, že zároveň klesá počet vazeb, kterými může kovový ion poutat molekulu proteinu. Pro kovové ionty středního typu, tedy i pro Co^{2+} , je nejpoužívanějším chelatujícím ligandem kyselina iminodiacetová (IDA). Na obr. 1 je schématická vazba matrice s chelatovaným kobaltnatým iontem a adsorbovaným proteinem. Ve schématu je ponechána slabě navázaná molekula vody.



Obr. 1: Domnělá struktura hexakoordinovaného kobaltnatého komplexu

2.1.4 Vliv chromatografických podmínek

Adsorpci bílkovin ovlivňuje nejen typ kovu a chelatujícího ligandu, vlastností matrice a raménka, ale i další faktory, jako množství kovu imobilizovaného na nosiči, složení a pH mobilní fáze, koncentrace solí, případně přítomnost různých aditiv.

Matrice pro IMAC musí splňovat stejné podmínky jako pro ostatní chromatografické metody. Ze studovaných materiálů se nejlépe osvědčují agarosové gely [18]. Lepší sterickou přístupností molekul bílkovin k imobilizovaným kovovým iontům umožňuje použití raménka, které tvoří můstek mezi matricí a chelatujícím ligandem.

Chování sorbentů před a po imobilizaci kovových iontů se může výrazně lišit. Vliv imobilizace kovového iontu na afinitu bílkovin k danému sorbentu nelze předem předpovědět.

Vlastnosti chromatografického nosiče ovlivňuje i množství navázaných kovových iontů. Se vzrůstajícím množstvím imobilizovaného kovu adsorpce bílkovin i selektivita vazby roste [7, 26].

Po nasycení sorbentu kovovým iontem je nutné nenavázané kovové ionty ze sloupce odstranit promýváním. Hrozí-li nebezpečí uvolňování kovového iontu do mobilní fáze, je vhodné zařadit sloupec se sorbentem bez kovového iontu. Tento sorbent uvolněný kovový ion zachytí. V některých případech se pro tento účel používá i sloupec chelatujícího sorbentu, který s danými kovovými ionty tvoří pevnější komplex než použitý sorbent. Výhodné je použití kovových iontů, které jsou barevné nebo tvoří zbarvené komplexy. Takové kovové ionty je možné snadno detegovat v eluátu [4].

Průběh chromatografie dále závisí na vlastnostech mobilní fáze. Eluční síla mobilní fáze je ovlivněna jejím složením. Pro IMAC-Co²⁺ platí, že eluční síla roste v řadě acetát < fosfát < chlorid [27].

Adsorpce proteinů obecně roste s klesajícím pH a s klesající iontovou silou. U IMAC naopak vyšší iontová síla potlačuje nespecifický ionexový charakter nosiče a adsorpce proteinů roste s iontovou silou a s pH [28, 29]. Vliv pH na adsorpci proteinů lze vysvětlit tím, že při IMAC-Co²⁺ se proteiny váží hlavně přes své histidinové zbytky. Ty jsou při nízkém pH protonizovány a vzájemně se s kovovými ionty odpuzují [7].

Faktory ovlivňující retenci biopolymerů ovlivňují také jejich uvolnění. Eluce může být nespecifická, např. snížením koncentrace solí, změnou (snížením) pH, zvýšením teploty nebo přidáním detergentů či denaturačních činidel (SDS, Tween 80, močovina), nebo specifická přidáním látek soutěžících o vazebná místa (pufry obsahující imidazol, histidin

či histamin) [30]. Také lze použít pufr s kovovými ionty, pro které má bílkovina vyšší afinitu, než pro ionty imobilizované [7].

2.1.5 Aplikace a výhody afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

Využití metody je shrnuto v tabulce 1.

Aplikace IMAC-Co ²⁺	Biopolymer	Experimentální podmínky / Vazebné vlastnosti	Lit.
Separace bílkovin	interferon β	vazba přes thiolovou skupinu Cys na pozici číslo 17	31
	transferin	při izolaci ze séra či plazmy je transferin eluován v druhém vrcholu; afinita k Co ²⁺ iontům klesá s rostoucí saturací transferinu železem	32, 33
	albumin	IDA-Co ²⁺ navázána na 1,4-butanediol diglycidyl Sepharosu 6B nebo na Sephacryl S-300	32
	imunoglobulin (Ig)	dtto; modifikace histidinových zbytků Ig diethylpyrouhličitanem poruší vazebné vlastnosti	32
	perforin	izolace v přítomnosti 1 M NaCl a 10% betainu; IMAC-Co ²⁺ na rozdíl od IMAC-Cu ²⁺ neváže současně i granzymy	34
	jednořetězcové fragmenty protilátky proti glutathion-S-2,4 dinitrofenyl t-butylesteru	izolace v přítomnosti 8 M močoviny; po skončení IMAC-Co ²⁺ renaturace <i>in vitro</i> gelovou filtrací	35
	přenašeč kyseliny γ -aminomáselné	izolace v přítomnosti inhibitorů proteáz a 1% dodecylmaltosidu; k eluovanému proteinu přidána 0,5 mM EDTA minimalizující proteolýzu	36
	granzym B (histidinem značený)	izolace neaktivního zymogenu; odstranění nespecificky navázaných proteinů 0,1 M NaCl, eluce 0,5 M imidazolem; po IMAC-Co ²⁺ aktivace enterokinasou	37
	virová B4 ATPasa (histidinem značená)	izolace v přítomnosti 2% modifikovaného Eaglova media (Dulbecco), k navázání proteinu použita vsádková metoda	38
	genový vektor viru herpes simplex	Co ²⁺ ionty reagují s peptidy přítomnými v obalu viru	39
myoglobinu podobný kyslíkový přenašeč (histidinem značený)	izolace při nízké (0,5 mM imidazol) i vysoké (4 M KCl) iontové síle, FPLC uspořádání	22	

	lecitin:cholesterol acyltransferasa (LCAT) (histidinem značená)	k navázání proteinu použita vsádková metoda, eluce pufrem s 50 mM imidazolem a 10% glycerolem	40
	organofosfáthydrolasa (histidinem značená)	makroporézní polyakrylamidová monolitická kolona s IDA-Co ²⁺	41
	transkripční faktor HIF 2 α (hypoxia inducible factor)	vazba HIF 2 α na Co ²⁺ ionty přes vysoce konzervovanou degradační doménu; izolace v přítomnosti 0,5% Tritonu X-100;	42
	selenoprotein P	FPLC uspořádání; ze studovaných kovových iontů (Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ a Cd ²⁺) poskytuje IMAC-Co ²⁺ nejvyšší selektivitu	43
	laktátdehydrogenasa (LDH)	studium vazebných vlastností peptidů (štěpeno CNBr), vazba přes 32. aminokyselinový zbytek; izolace v přítomnosti 9 mM imidazolu, eluce 75 mM imidazolem	44
	N-terminální ektodoména receptoru pro tyreotropní hormon (histidinem značená)	navázání receptoru vsádkovou metodou; izolace v přítomnosti 5 mM imidazolu, eluce gradientem imidazolu (10 -500 mM)	45
	β - glukuronidasa (histidinem značená)	IMAC-Co ²⁺ poskytuje vyšší selektivitu než IMAC na jiných kovových iontech (Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺)	46
	ATPasa přenášející měď	vazba přes Cys; izolace ve formě fúzního proteinu s glutathion S-transferasou	47
Imunoafinitní nosiče	antigeny	izolace proteinů pomocí protilátek navázaných na imobilizované Co ³⁺ ionty (protilátky se nejprve reverzibilně naváží na imobilizované Co ²⁺ ionty, tyto ionty se pak oxidují H ₂ O ₂ , čímž se vazba protilátek stane ireverzibilní)	16
	glukosaoxidasa	dto; metoda využita k vícevrstvé imobilizaci enzymu přes protilátku či její fragmenty F(ab) ₂ ; takto imobilizovaný enzym je stabilnější vůči denaturačním podmínkám (vysoká iontová síla, teplota, organická rozpouštědla)	48
Negativní adsorpce	jednotlivé isoformy enzymů, kompetující proteiny	požadovaný protein se neváže na nosič a protéká kolonou, zatímco konkurenční látky jsou zadržovány	5
	laktózový (Lac) represor	separace Lac represoru (hlavní kontaminantna histidinem značených proteinů z buněk nesoucích lacI ^q gen); izolace na nosiči TALON, vymytí pufry o pH 5–6 a pufrem s 15 mM imidazolem	49
Diagnostické účely	PMSA (specifický prostatický	izolace a stanovení markeru pro karcinom prostaty; vsádková inkubace	50

	membránový antigen)	nosiče (TALON-Co ²⁺) s buněčným lyzátem, eluce gradientem imidazolu (10–200 mM)	
Separace DNA a oligonukleotidů	DNA, oligonukleotidy	vazba přes histidinové zbytky vnesené genovým inženýrstvím	5
Studium struktury a funkce metaloproteinů	apokarboxypeptidasa A	enzym deaktivovaný chelatujícími činidly lze reaktivovat průtokem přes tandemové kolony IDA-Zn ²⁺ , IDA-Co ²⁺ a IDA-Ni ²⁺	7
Studium topografie bílkovin	modelové proteiny (thioredoxin, ubiquitin, calmodulin, lysozym, cytochrom c, myoglobin)	Stanovení počtu a distribuce His, jejich přístupnost koordinaci, zda jsou sousední či vzdálené a určení vlivu okolních aminokyselin	11
	receptor pro estradiol (ER)	zjištěna vazebná místa pro Co ²⁺ ionty; interakce ER s imobilizovanými Co ²⁺ ionty inhibuje vazbu ER k estradiolu, možnost podobných vlastností i u receptorů pro ostatní steroidní hormony	51
Katalýza	enzymy	kolona slouží jako reaktor pro katalytické reakce	10
Imobilizace biopolymerů	enzymy (alkalická fosfatasa, maltosadehydrogenasa, laktátdehydrogenasa)	vazba na IDA-Co ²⁺ (IDA-Cu ²⁺ , IDA-Zn ²⁺), zvýšení stability proteinů, možnost jejich opětovného uvolnění (pomocí EDTA)	52

Tabulka 1: Použití afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech

Parametry IMAC dovolují různé typy jejího uspořádání, počínaje nízkotlakou chromatografií, přes HPLC, až po tandemové kolony. V současné době se IMAC uplatňuje také v mikročipovém uspořádání ve spojení s hmotnostní spektrometrií (SELDI) [53, 54].

Při tandemovém uspořádání jsou kolony obsahující různé sorbenty řazeny do série a jsou používány pro současnou separaci více bílkovin. Další možností je využití kaskádových kolon, kdy po eluci z jedné kolony následuje sorpce na jiném nosiči, založená na odlišném sorpčním principu. Vzorek protéká postupně více kolonami, které se liší např. typem kovového iontu či chelatujícího ligandu [10].

IMAC-Co²⁺ je metodou, při níž má vysoká iontová síla příznivý vliv na pevnost sorpce, a proto může být výhodně kombinována s metodami jako ionexová, hydrofobní nebo thiofilní chromatografie [7].

IMAC je charakteristická vysokou kapacitou (až 200 mg bílkoviny na 1 ml nosiče).

Další výhodou IMAC je vysoká selektivita dělení určována zejména chelatujícím ligandem a kovovým iontem. Nezanedbatelný je i stabilizační efekt používaného prostředí (vysoká iontová síla, přítomnost kovových iontů) na molekuly bílkovin. Kovovými ionty neobsazené chelatující skupiny nosiče váží kationty přítomné v roztoku. V IMAC kolonách proto nerostou mikroorganismy a eluované roztoky jsou zpravidla sterilní [10].

Ionty kovů mohou být ze sloupce snadno odstraněny, např. roztokem EDTA. Nosič proto může být regenerován až několikrát bez ztráty chelatujících schopností. Po odstranění předchozího kovového iontu lze na tentýž nosič navázat jiný kovový ion.

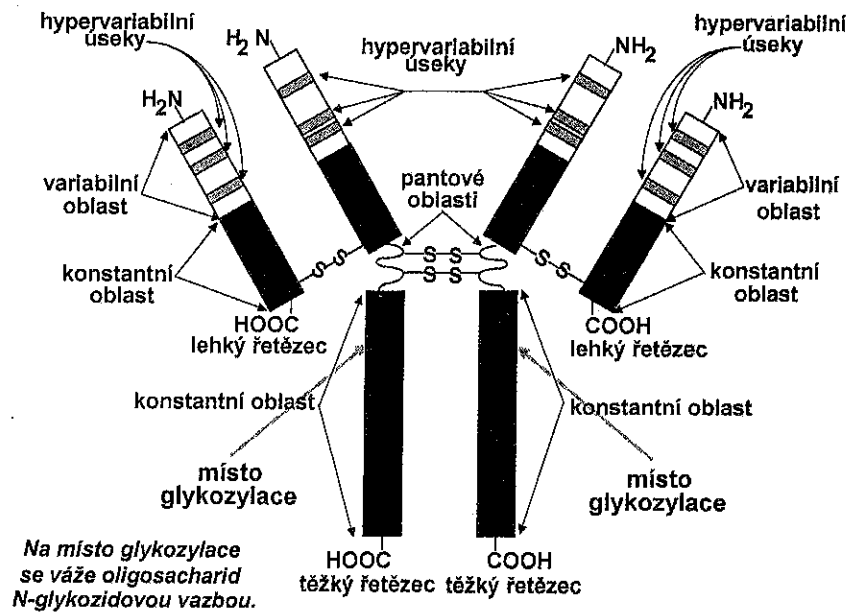
2.2 PROTILÁTKY

Jedním z projevů života každého živého organismu je snaha o udržení homeostázy. Stálost vnitřního prostředí si organismy mimo jiné zajišťují obrannými mechanismy, které je chrání před napadením viry, bakteriemi, před působením cizorodých makromolekulárních látek a konečně i před vlastními poškozenými či infikovanými buňkami. Existují dva mechanismy této obrany:

- Evolučně starší, nespecifická, neadaptivní ochrana zajišťovaná fagocyty, NK (z angl. natural killer – „přirození zabíječi“) buňkami, systémem komplementu, interferony a lektiny. Tato obrana je přítomna u všech mnohobuněčných organismů. Buňky a molekuly zajišťující nespecifickou obranu jsou v organismu připraveny předem, a proto reagují na přítomnost škodlivin rychle. Na rozdíl od specifických složek nemají tzv. imunologickou paměť. Velmi důležitou úlohu má i kožní a slizniční bariéra se svými mechanickými, chemickými a mikrobiálními obrannými mechanismy.
- Evolučně mladší, specifická adaptivní ochrana je zajišťovaná protilátkami (humorální imunita) a T-lymfocyty (buněčná imunita). Vyskytuje se až u obratlovců. Odpověď je pomalejší, ale disponuje imunologickou pamětí.

Humorální imunitní reakce je charakteristická tvorbou sérových imunoglobulinů, zvaných protilátky. Protilátky jsou produkovány B-lymfocyty v kostní dřeni, u ptáků i ve Fabriciově burse.

2.2.1 Struktura protilátek



Obrázek 2: Struktura imunoglobulinů

Typická struktura protilátek je znázorněna na obrázku 2. Protilátky jsou tvořeny dvěma těžkými (H) a dvěma lehkými (L) řetězci, které jsou vzájemně kovalentně propojeny cystinovými můstky. Těžký řetězec (50 000-75 000) obsahuje tři nebo čtyři konstantní domény a jednu variabilní doménu. Lehký řetězec (20 000-25 000) se skládá z jedné konstantní domény a jedné domény variabilní. Domény, tvořené sekvencí asi 110–120 aminokyselin, jsou propojeny krátkými spojovacími úseky polypeptidového řetězce. Domény nacházející se na N-konci těžkých i lehkých řetězců se nazývají variabilní. Jejich struktura se liší v závislosti na tom, kterým klonem B-lymfocytů byly vyprodukovány. Zbývající imunoglobulinové domény (tj. směrem k C-konci molekul) se nazývají konstantní. Jejich struktura je stejná u všech protilátek shodného typu. Spojením variabilních úseků obou řetězců (H i L) vzniká vazebné místo pro antigen. Těžké řetězce jsou vzájemně spojeny tzv. pantovou oblastí, která dodává molekule větší flexibilitu [55]. Některé typy imunoglobulinů však pantovou oblast nemají [56]. Imunoglobuliny jsou glykoproteiny a jejich těžké řetězce jsou posttranslační modifikací glykosilovány na Fc fragmentu [57].

Pokud je molekula protilátky podrobena proteolytickému štěpení, vznikají za vhodných podmínek určité fragmenty. K proteolytickému štěpení protilátek se používají např.

enzymy papain, pepsin, plasmin a trypsin. Štěpí-li papain molekuly „nad“ pantovou oblastí, vznikají dva identické fragmenty Fab a jeden fragment Fc. Pokud jsou savčí protilátky štěpeny „pod“ pantovou oblastí pepsinem, vzniká jeden $F(ab)_2$ a jeden Fc fragment. Vzhledem k tomu, že ptačí protilátky nemají pantovou oblast, jsou pepsinem štěpeny na dva Fab a jeden Fc fragment [58]. Kontrolovaným štěpením Fab fragmentu lze získat Fv fragment. Ten se skládá z nekovalentně asociovaných variabilních domén H a L řetězců. Předpokládá se, že úseky protilátky odpovídající Fab, $F(ab)_2$ a Fv fragmentům jsou zodpovědné za vazbu antigenu [59–61]. Na druhou stranu, oblast protilátky odpovídající Fc fragmentu má jiné biologické funkce (vazba na Fc-receptory fagocytů a spouštění systému komplementu). Bylo prokázáno, že po navázání antigenu dochází k allosterickým konformačním změnám celé molekuly protilátky, včetně Fc fragmentu [62].

2.2.2 Vazebné interakce antigenu s protilátkou

Vazebná místa protilátek, tvořená variabilními doménami H a L řetězců, váží molekuly antigenu nekovalentními vazbami. Při tom se uplatňují zejména iontové, hydrofóbní, vodíkové a van der Waalsovy interakce. Jde o reverzibilní vazby více či méně komplementárních struktur. Rovnovážná asociační konstanta K_{as} vyjadřuje poměr rychlostních konstant vzniku a rozpadu imunokomplexu (běžně $K_{as} \sim 10^6 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$). Čím vyšší je K_{as} , tím vyšší je afinita protilátky k antigenu.

Je známo, že organismus je schopen vyprodukovat protilátky proti libovolnému antigenu. V B-lymfocytech totiž může vzniknout nepředstavitelně mnoho typů vazebných míst pro antigen. Diverzita vazebných míst je dána mnoha faktory [63]:

- kombinací různých genových segmentů {V(D)J přeskupení}
- kombinací určitých typů H řetězců s κ či λ L řetězcem
- přeskupováním genových segmentů dochází k „nepřesnostem“ spojení
- prodloužením o tzv. N-sekvence
- somatickými mutacemi genů pro variabilní domény (po styku s antigenem)
- izotypovým přesmykem

2.2.3 Význam protilátek

Schopnost obratlovců produkovat specifické protilátky se široce využívá. V humánní i veterinární medicíně se užívá aktivní imunizace pro zvýšení či navození imunity. Při

aktivní imunizaci dochází v organismu po aplikaci antigenu k produkci vlastních protilátek. Další možností, jak do organismu dodat potřebné protilátky, je pasivní imunizace. Požadované protilátky proti danému antigenu se získávají po imunizaci experimentálního zvířete. Protilátka se pak izoluje z krve či kolostra savců a nebo z vaječných žloutků.

Takto získané protilátky jsou polyklonální, neboť jsou produkovány mnoha různými klony B-lymfocytů. Jelikož reagují s mnoha antigenními epitopy, označují se tyto protilátky jako polyspecifické. Reaguje-li protilátka jen s jedním antigenním epitopem, je monospecifická. Monospecifická protilátka však může být mono- i polyklonální.

Naproti tomu monoklonální protilátky jsou produkovány jen jedním klonem B-lymfocytů. Monoklonální protilátky se získávají z tzv. hybridomů *in vitro*. Hybridom vzniká fúzí určitého klonu B-lymfocytů s myelomovou buněčnou linií. Vzniklý hybridom produkuje daný typ monoklonálních protilátek a je „nesmrtelný“. Hybridomové protilátky se hojně využívají ve vědeckém výzkumu i v klinické praxi jako diagnostika a terapeutika [63, 64]. Možností pro využití monoklonálních i polyklonálních protilátek je nepřehledně. Protilátky jsou nepostradatelné pro:

- stanovení a detekci nízko- i vysokomolekulárních biomolekul [65]
- studium aktivity enzymů nebo studium interakcí receptorových makromolekul se svými ligandy (protilátka může svoji vazbou na makromolekulu inhibovat enzymovou aktivitu či vazbu ligandu) [66, 67]
- po imobilizaci na nosič lze protilátky využít k separaci antigenů ze směsi [68]

V klinické praxi se pomocí RIA či ELISA testů stanovují:

- vlastní protilátky (př. proti HIV, IgE při atopii)
- proteiny vypovídající o patologickém stavu (nádorové markery)
- nízkomolekulární látky (progesteron)

Neméně důležité jsou:

- použití protilátky jako antidota (proti hadímu jedu, botulotoxinu či tetanotoxinu)
- pasivní imunizace (proti hepatitidě A, vzteklině, tetanu)
- substituční léčba imunoglobuliny (u pacientů s poruchou tvorby protilátek)

2.2.4 Typy imunoglobulinů

Dle typu těžkého řetězce (μ , δ , γ , α , ϵ) dělíme imunoglobuliny do pěti tříd (IgM, IgD, IgG, IgA a IgE). Každý z pěti typů H řetězce se může kombinovat s jedním ze dvou typů L

řetězce (κ , λ). Majoritní zastoupení v krvi savců má IgG. V krvi ptáků (ale i plazů a obojživelníků) a ve vaječném žloutku se nachází IgY (z angl. yolk – žloutek). Ptačí protilátky IgY jsou funkčně analogické savčím IgG [57, 56].

V lidském séru se nachází čtyři subtypy IgG (IgG 1 až IgG 4) a dva subtypy IgA (IgA 1 a IgA 2). Subtypy (podtřídy) IgG se liší počtem disulfidových vazeb v pantové oblasti a přesnou strukturou jednotlivých domén. Jednotlivé typy IgG se dobře váží na Fc-receptory fagocytů, ale liší se ve schopnosti spouštět systém komplementu.

Molekuly IgA 1 a IgA 2 se liší zejména místem svého vzniku. IgA 1 je produkováno B-lymfocyty na sliznici a IgA 2 v kostní dřeni. IgA se vyskytují jako mono-, di- či trimery, s jednotlivými molekulami spojenými J řetězcem.

Secernované molekuly IgM jsou pentamery. Monomerní IgM jsou (společně s IgD) přítomné na povrchu B-lymfocytů jako receptory pro antigen. V pentameru IgM jsou jednotlivé molekuly vzájemně spojeny disulfidovými vazbami a jedním J řetězcem. IgM je první podtřídou imunoglobulinů, která se tvoří po setkání s antigenem. Ostatní podtřídy imunoglobulinů (IgG, IgA a IgE) jsou secernovány později.

Protilátky typu IgE se vyskytují pouze u savců. Jejich koncentrace v séru je za normálních okolností velmi nízká (řádově 10^{-4} g/l, oproti 10 g/l IgG) [63]. Těžké řetězce IgE jsou produktem jediného genu. Druhý gen byl během evoluce inaktivován, patrně kvůli vyššímu riziku vývoje imunopatologických reakcí [69]. Fyziologickou funkcí IgE je zejména obrana proti mnohobuněčným parazitům. Pokud však IgE neadekvátně reaguje na přítomnost neškodných antigenů, může dojít k přecitlivělosti a vývoji alergické reakce. Antigeny, spouštějící alergickou reakci, se nachází např. v pylu, zvířecí srsti, roztočích, některých potravinách a lécích [70, 71].

2.2.5 Ptačí imunoglobuliny

Ptáci zvolili pro imunitní obranu trochu jinou strategii než savci. Než slepice snese vajíčko, sekretuje krevní imunoglobuliny IgY (funkčně obdobné savčímu IgG) do vaječného žloutku. Imunoglobuliny IgA a IgM jsou spolu s dalšími proteiny přeneseny do vaječného bílku. Koncentrace protilátek ve žloutku je dokonce 1,3–1,9 x vyšší než v krvi slepice [72]. Po vylíhnutí kuřete přejdou IgY ze žloutku do jeho krve, zatímco IgA a IgM z bílku zajišťují pasivní imunizaci trávicího traktu.

U ptáků byly nalezeny jen tři třídy imunoglobulinů (IgY, IgA a IgM). Byla vyslovena domněnka, že ptačí IgY je vývojovým předchůdcem savčí IgG a IgE [56, 57, 73]. Ptačí IgY a IgA mají o jednu konstantní doménu těžkého řetězce více než savčí IgG a IgA. Ptačí

protilátky ale nemají pantovou oblast. Tyto dvě skutečnosti mají za následek menší míru precipitace komplexů antigen-IgY než u imunokomplexů se savčími protilátkami. S vyšším počtem konstantních domén u IgY souvisí i poměrně vysoký obsah sacharidů, zejména mannosy, na těžkém řetězci [57]. Díky tomu IgY silně reaguje s rostlinným lektinem Concavalinem A [74].

Ptačí imunoglobuliny mají oproti savčím protilátkám určité výhody. První výhodou je menší stres experimentálního zvířete. Slepici se totiž jen odebere snesené vajíčko, kdežto u savců se protilátky získávají odběry krve či dokonce srdeční punkcí. Druhou výhodou je až 30 x vyšší výtěžnost slepičích imunoglobulinů ve srovnání se získáváním protilátek z krve králíka [75]. Přestože je koncentrace IgY ve vaječném žloutku menší než v krvi savců, je slepice schopna sekretovat do vaječných žloutků ročně až 25 g protilátek. Dále, vzhledem k velké fylogenetické vzdálenosti ptáků a savců, slepice mnohem citlivěji reaguje na podaný savčí antigen produkcí protilátek. Klinicky významnou skutečností je nereaktivnost IgY s rheumatoidním faktorem, s Fc receptory a systémem komplementu savců [76]. Při použití savčích protilátek se v klinických testech objevují falešně pozitivní výsledky, čemuž se použitím IgY předejde [77].

Ptačí imunoglobuliny jsou proti savčím protilátkám poněkud labilnější. IgY mají asi o 3°C nižší termální stabilitu než savčí IgG. Rovněž stálost v kyselém prostředí je u IgY nižší. To zřejmě souvisí s hodnotou pI, která je, ve srovnání s IgG, posunuta o jednotku do kyselé oblasti. IgY rovněž nereagují s proteiny A a G [78]. To na jedné straně omezuje jejich purifikaci na nosičích s těmito ligandy, na straně druhé se tato vlastnost IgY využívá v klinické praxi.

Důvodem, proč se použití slepičích protilátek zatím příliš nerozšířilo, je zřejmě náročnější postup izolace IgY ze žloutku ve srovnání s izolací IgG ze séra. IgY jsou spolu s ostatními složkami žloutku součástí komplexní emulze žloutkových lipidů. V separovaných žloutcích je nutno oddělit lipidní frakci od rozpustných proteinů. K oddělení obou frakcí se využívá např. extrakce organickými rozpouštědly, vymrazení či hydrofóbní chromatografie. Protilátky jsou pak z frakce rozpustných proteinů precipitovány frakčním srážením, nebo jsou odděleny od zbylých hydrofilních proteinů ionexovou nebo gelovou permeační chromatografií [79–81]. Získané protilátky lze afinitně purifikovat na nosiči s imobilizovaným antigenem. Specifické IgY se z imunosorbentu eluují např. kyselým či bazickým puřem [76, 82]. Pokud jsou takto purifikované protilátky vhodně skladovány (4°C), zachovávají si svoji aktivitu i po dobu 10 let [83].

Savčím protilátkám mohou IgY konkurovat díky vysoké výtěžnosti a poměrně levné produkci. Ideální je použití IgY tam, kde je nutno aplikovat vysoké dávky protilátek. Příkladem může být preventivní pasivní imunizace proti původci zubního kazu (*Streptococcus mutans*) [84], nebo proti rotaviru způsobujícímu vysokou úmrtnost telat [85]. Příkladem akutní pasivní imunizace je aplikace IgY proti hadímu nebo bakteriálnímu jedu [86]. Pro pacienty, kteří byli opakovaně imunizováni savčím antisérem, nebo kteří jsou na některé složky savčího antiséra alergičtí, je použití ptačích protilátek jedinou variantou. Použitím slepičího antiséra se tak sníží riziko anafylaktického šoku či sérové nemoci. Neopomenutelný je význam IgY v imunodiagnostice. IgY lze (stejně jako IgG) využít jako primární i sekundární protilátky při imunohistochemických vyšetřeních, pro ELISA či Western blotting.

IgY se, podobně jako IgG, používá také k přípravě sorbentu pro imunoafinitní chromatografii [87]. Imunoafinitní nosiče s IgY lze využít jak pro separaci či zakoncentrování požadovaných látek, tak i k odstranění látek nežádoucích [88, 89]. Odstraňování nežádoucích látek (př. albuminu, imunoglobulinů) ze séra má v současné době velký význam při proteomické analýze biomarkerů a jiných málo zastoupených látek [90, 91].

2.3 IMOBILIZACE PROTEINŮ

Proteiny se v živých organismech vyskytují nejen rozpuštěné ve formě roztoků, ale i imobilizované na pevné povrchy. Imobilizované proteiny jsou *in vivo* nejčastěji fixovány na různé buněčné struktury (zejména membrány). Vazba proteinů na pevný povrch má velký význam pro metabolismus buňky. Imobilizované proteiny si obvykle zachovávají svoji biologickou aktivitu a často bývají za určitých podmínek stabilnější než proteiny v roztoku. Fixace proteinů na pevný povrch je mnohdy nezbytná pro tvorbu proteinových (př. mutienzymových) komplexů a pro správný průběh chemické reakce.

Pro své výhodné vlastnosti se imobilizované proteiny používají také *in vitro*. Molekuly navázané na nosič jsou v prostředí fyziologicky bližším, než jsou molekuly rozpuštěné ve vodném roztoku. Imobilizace proteinů umožňuje napodobit *in vivo* prostředí, používá se k přípravě bioafinitních chromatografických nosičů, enzymových reaktorů a pro uchování labilních proteinů.

Mezi nepoužívanější metody vazby patří: adsorpce či kovalentní vazba proteinů na nosič, zesítnění proteinů nebo jejich zachycení (např. v mřížce gelu či opouzdrněním).

Proteiny lze imobilizovat nejen v jejich izolované podobě, ale také jako buněčné organely či celé buňky.

Při imobilizaci proteinů (př. enzymů a protilátek) je nutno postupovat tak, aby skupiny, zodpovědné za biologické vlastnosti proteinů, zůstaly aktivní a dobře stericky přístupné [92, 93]. Pro úspěšnou vazbu proteinů na nosič je důležitá: znalost vazebného místa, povaha nerozpustného nosiče a použití podmínek, za kterých nedochází k denaturaci vázaného proteinu [94]. Povaha nerozpustného nosiče je dána zejména jeho mechanickou odolností, porozitou a koncentrací vazebných skupin.

Hlavní výhoda imobilizovaných proteinů spočívá ve vytvoření specifického heterogenního reaktoru [67, 95–99]. Heterogenní reaktor umožňuje po skončení požadované reakce snadno a efektivně oddělit navázané proteiny z roztoku. Na rozdíl od proteinů v roztoku nezůstanou imobilizované proteiny po proběhnutí chemické reakce přítomny jako kontaminující složka. K dalším výhodám imobilizovaných proteinů patří jejich obvykle vyšší chemická a tepelná stabilita a možnost opakovaného použití [48, 100].

Při přípravě proteinového reaktoru se požadovaný protein váže na nerozpustný nosič nejčastěji kovalentně. Po aktivaci nosiče lze proteiny navázat i na nosič, který ve své nativní podobě neobsahuje potřebné reaktivní skupiny. K nejběžněji používaným patří aktivace bromkyanem, hydrazidem, glutardialdehydem, jodistanem, bisoxirany, izokyanáty, izothiokyanáty a karbodiimidy [1].

2.3.1 Bioafinitní chromatografie

Výhody proteinů imobilizovaných na heterogenních nosičích jsou plně využity při bioafinitní chromatografii. Principem bioafinitní chromatografie je schopnost biologicky aktivních látek (tzv. afinitních ligandů) specificky a reverzibilně vázat látky, jejichž vlastnosti se vzájemně doplňují [1]. Příkladem látek, které spolu takto interagují, mohou být dvojice: protilátky s antigeny (popř. hapteny); enzymy se substráty, respektive s kofaktory či inhibitory; lektiny s glykoproteiny; DNA s transkripčními faktory, DNA-vazebnými proteiny či histony; avidin s biotinem nebo receptory s příslušnými hormony a toxiny. Na tvorbě takových biospecifických komplexů se podílejí iontové síly, hydrofóbní vazby, vodíkové můstky, van der Waalsovy interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce [1, 101]. Tyto interakce jsou sice slabé a nekovalentní, ale jejich velký počet zajišťuje dostatečně silnou vazbu. Rovnovážná asociační konstanta (K_{as}) se většinou pohybuje v rozmezí 10^4 až 10^{12} M^{-1} . Nejsilnější vazbou se vyznačuje dvojice avidin-biotin (10^{15} M^{-1}). Pro potřeby bioafinitní chromatografie má být K_{as} dostatečná pro

kompletní vazbu, zároveň však K_{as} nesmí být příliš vysoká, aby bylo možné látky z komplexu opět uvolnit [102]. Za optimální je často považována hodnota K_{as} 10^7 až 10^8 M^{-1} [103].

Jelikož se na biospecifických komplexech podílejí nekovalentní interakce, je tvorba těchto komplexů značně ovlivňována změnami vnějšího prostředí [4]. K významným vnějším faktorům patří např. hodnota pH a iontové síly, teplota a přítomnost specifických látek (kofaktorů, kovových iontů).

Afinitní ligandy, imobilizované na heterogenních nosičích, umožňují dělení látek mezi pevnou a pohyblivou fází. U bioafinitní chromatografie je pevná fáze tvořena nerozpustným nosičem s imobilizovaným afinitním ligandem a pohyblivou fází tvoří kapalina. Separovaná látka pak opakovaně přechází z roztoku na pevnou fázi a zase zpět. Postupně dochází k ustalování rovnováhy rozpuštěné látky mezi oběma fázemi.

Pro bezproblémový průběh bioafinitní chromatografie je důležitá také povaha nerozpustného nosiče [104]. Ideální nosič je:

- nerozpustný
- dostatečně propustný s vysokým specifickým povrchem a požadovanou adsorpční kapacitou
- mechanicky odolný s vhodnou velikostí částic
- dostatečně reaktivní (pro vazbu ligandu)
- chemicky stálý při adsorpci, eluci i regeneraci
- rezistentní vůči bakteriím
- hydrofilní
- levný a snadno dostupný

Nosič, který by splňoval všechny tyto podmínky prakticky neexistuje. Proto je při výběru nosiče nutné zohlednit zejména jeho zamýšlené použití.

Má-li být zachována biologická aktivita afinitního ligandu, musí být jeho molekuly na nosiči vhodně prostorově orientovány. Jsou-li molekuly imobilizovány přes své aktivní místo nebo místo v jeho blízkosti, dochází ke snížení či ztrátě jejich aktivity [67]. Vazba afinitního ligandu přes náhodné reaktivní skupiny vede k nahodilé orientaci navázaných molekul. Pokud se vazby účastní zároveň různé reaktivní skupiny ($-NH_2$, $-COOH$, $-SH$), vzniká nosič s neorientovaně imobilizovanými afinitními ligandy. Neorientovaně navázaný ligand mívá různě přístupné své aktivní místo. Funkčnost aktivního místa je dále ovlivněna jeho odlišným mikrookolím daným nestejnými vazebnými poměry.

Jak je patrné, existuje mnoho způsobů, jak navázat afinitní ligandy na nerozpustný nosič. Při výběru nejvhodnějšího způsobu imobilizace je nutné řídit se zejména vlastnostmi imobilizované biomolekuly, typem nosiče a zamýšleným použitím biosorbentu, popř. cenou. Příklady bioafinitních nosičů jsou uvedeny v tabulce 2.

Vazba	Vazba na nosič zprostředkována	Vázaná biomolekula	Lit.
Nekovalentní	Fyzikální adsorpcí (př. vodíkové, hydrofóbní a van der Waalsovy interakce)	Různé funkční skupiny biomolekul	93
Kovalentní - neorientovaná	Rozpustnými aktivátory (N-hydroxysukcinimidy, karbodiimidy, bromkyany)	Aminoskupiny proteinů	93
	Rozpustnými bifunkčními raménky (glutardialdehydy, heterobifunkčními a fotoaktivními raménky)	Aminoskupiny proteinů	93
	Vnesenými aktivními skupinami (epoxidové a hydrazidové skup., N-hydroxysukcinimidy, bromkyany, toluensulfonylchloridy a divinylsulfony)	-NH ₂ , -OH, -SH skupiny proteinů	93
Kovalentní - orientovaná	Proteiny A a G; syntetickými peptidy napodobujícími protein A	Aminoskupiny v Fc fragmentu protilátky	100, 105, 106
	Aminy, hydrazidy či dihydrazidy kyseliny šťavelové či adipové	Jodistanem či enzymově oxidované sacharidové složky glykoproteinů	107, 97, 98
	Silanizovanými skleněnými vlákny	Jodistanem oxidované sacharidové složky glykoproteinů	93
	Conkavalinem A	Sacharidové složky glykoproteinů	100
	Boronáty	-OH skupiny uhlovodíků, glykoproteinů, nukleotidů, katecholaminů, kyselin a amidů	100

Biotinem (vyvinuta biotinylace membrán, nukleových kyselin, protilátek a různých proteinů)	Avidin nebo streptavidin	100
Specifickou protilátkou	Antigen nebo haptén	100
Chelatovanými kovovými ionty (př. Co^{2+} , respektive Fe^{3+})	Donory elektronů (př. rekombinantní proteiny značené histidinem, respektive fosfoproteiny)	22-24, 8
Chelatovanými ionty kobaltu; stabilní vazba umožněna oxidací kovových iontů	Histidinové zbytky v Fc fragmentu protilátky	16
Thiofilními skupinami (tzv. T gely)	Proteiny obsahující aminokyseliny s aromatickými skupinami	108
Organortuťnatými či thiopropylovými skupinami	Rekombinantní proteiny s cysteinovým zbytkem vloženým cílenou mutací	100

Tabulka 2: Typy bioafinitních nosičů

Hlavní nevýhodou imobilizace prostřednictvím nekovalentních vazeb je nahodilá orientace biomolekul a riziko jejich uvolňování při eluci. Naopak biomolekuly navázané pomocí kovalentních vazeb se při eluci z nosiče obvykle neuvolňují. Kovalentní vazby ligandů mohou být buď neorientované, a nebo orientované, což je kvůli sterické přístupnosti ligandů výhodnější.

Rozsáhlé uplatnění nacházejí zejména imobilizované protilátky a enzymy. Na obrázku 3 jsou uvedeny příklady použití nosičů s imobilizovanými protilátkami.

Nosiče s navázanými protilátkami (nebo F(ab)_2 fragmenty) mohou být použity pro stabilizaci proteinů [48]. Ve vodném roztoku může docházet k postupnému rozvolňování molekul proteinů. Hydrofóbní úseky molekul, které jsou v nativním proteinu sbaleny uvnitř molekuly, jsou po rozvolnění proteinu snadno přístupné pro molekuly rozpouštědla. Změna poměru polárních a nepolárních úseků pak může způsobit destabilizaci proteinu. Pokud se ale protein naváže prostřednictvím protilátky na nosič, dojde (díky tvorbě biospecifického komplexu) ke snížení výskytu hydrofóbních úseků na povrchu molekuly, a tím i ke stabilizaci proteinu.

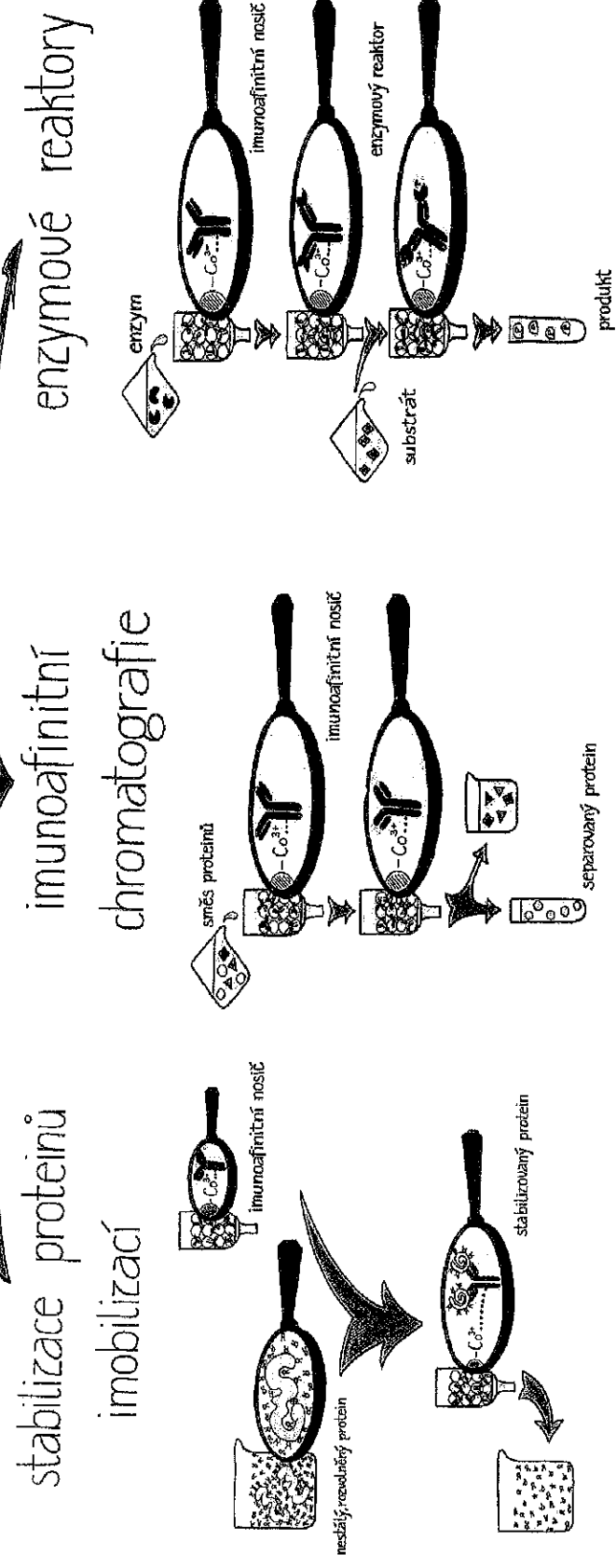
Imobilizované protilátky nachází také uplatnění při přípravě enzymových reaktorů. Enzymový reaktor má oproti enzymu v roztoku několik výhod:

- má výhodnější kinetické vlastnosti
- enzym je stabilnější, u proteolytických enzymů je omezena jejich autodigestce
- po ukončení reakce lze enzym snadno a rychle odstranit
- je opakovatelně použitelný

Příkladem může být reaktor s imobilizovaným chymotrypsinem, který je možné využít pro štěpení proteinů na jejich fragmenty [67].

Nosiče s navázanými protilátkami (či antigeny) jsou ale nejčastěji využívány při imunoafinitní chromatografii. Imunoafinitní chromatografii lze uspořádat dvěma různými způsoby. V prvním případě jsou separovány protilátky na nosiči s imobilizovanými antigeny. V druhém, častějším případě slouží nosič s imobilizovanými specifickými protilátkami k identifikaci, kvantifikaci nebo purifikaci antigenů. Imunosorbenty jsou, díky své specifitě, schopné separovat požadované biomolekuly z komplexních vzorků jakými jsou např. buněčné extrakty či krevní sérum. V jednom purifikačním kroku tak lze zvýšit obsah separované látky až 10^4 krát. Purifikace biomolekul (př. peptidů) pomocí imunoafinitní chromatografie bývá často předřazena hmotnostní spektrometrii. Separace látek pomocí imunosorbentů a jejich následná identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie jsou v současné době velmi rozšířené techniky [68, 91, 96, 109–112].

IMUNOAFINITNÍ NOSIČE VYUŽITÍ



Obr. 3: Příklad použití imunoafinitních nosičů

3. CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE

Tato práce je součástí výzkumu, který je zaměřen na úlohu kovových iontů v živém organismu. Cílem dizertační práce byla imobilizace a separace proteinů na nosičích s chelatovanými ionty kobaltu. Byly použity následující chromatografické systémy: afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech a imunoafinitní chromatografie s protilátkami imobilizovanými přes chelatované ionty kobaltu.

I. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH (IMAC-Co²⁺)

- Separace myších jaterních proteinů indukovaných podáním chloridu kobaltnatého. Vyhodnocení separovaných proteinů pomocí elektroforetických metod.

II. IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE S PROTILÁTKAMI IMOBILIZOVANÝMI PŘES CHELATOVANÉ IONTY KOBALTU

- Nalezení metodiky vhodné pro imobilizaci protilátek na chelatované ionty kobaltu. Zaměření na imobilizaci protilátek různých tříd.
- Ověření schopnosti imobilizovaných protilátek vázat příslušný antigen.
- Popsání vazebných interakcí mezi protilátkami a chelatovanými ionty kobaltu.

4. METODY

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

IDA-Agarosa, IDA-Sepharosa, akrylamid, amfolyt pH 3–10, chlorid kobaltnatý hexahydrát, DTT, imidazol, jodacetamid, králičí anti-(chicken IgY) IgG s konjugovanou alkalickou fosfatázou, Sephadex G-25, PNPP a prázdné chromatografické kolony byly od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). BCA™ Protein Assay Reagent A – Perbio Science France (Brebïetes, France). Imobilizovaný gradient pH (IPG) a CHAPS – Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko). Adsorpční desky Maxisorp – Nunc (Roskilde, Dánsko). Odtučněné sušené mléko – Amresco (Solon, Ohio, USA). Polyspecifická slepičí anti-BSA IgY – HENA (Praha, Česká republika). Standard relativních molekulových hmotností (250 000, 150 000, 100 000, 75 000, 50 000, 37 000, 25 000, 20 000, 15 000, 10 000) – BioRad (Hercules, CA, USA). Denzitometrický program ElfoMan2,5 – Ing. Semecký (Praha, Česká republika). Ultrafiltrační cely – (Sartorius AG, Goettingen, Germany). Myši C57B1/6 (samice, 8 – 12 týdnů staré) – Anlab (Praha, Česká republika). Polyklonální králičí anti-OVA IgG byla připravena v naší laboratoři, slepičí protilátka z vaječného žloutku (IgY) a lyofilisovaný vaječný bílek byly darovány Dr. Petrem Hodkem (Universita Karlova, Praha, Česká republika).

Elektroforetický zdroj a přístroj pro izoelektrickou fokuzaci Multiphor II – Amersham Biosciences (Uppsala, Švédsko). Mini PROTEAN® 3 Cell – BioRad (Hercules, CA, USA). Průtokový UV detektor Opal (Ecom, Praha, Česká republika). Digitální pH-metr – Jenway (Essex, Velká Británie).

4.2 PŘÍPRAVA MYŠÍCH JATERNÍCH HOMOGENÁTŮ

Myši byly premedikovány roztokem chloridu kobaltnatého (10 mg/ml, aplikováno 0,1 ml/10 g živé váhy, intraperitoneálně, 5 hodin před usmrcením). Jaterní tkáň byla homogenizována v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3 (1 g v 2 ml) a zcentrifugována (15 000 g, 60 minut, 4°C).

4.3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY

4.3.1 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE MYŠÍCH JATERNÍCH HOMOGENÁTŮ

Roztoky

- *Ekvilibrační pufr (0,1 M fosfátový pufr, pH 7,3)*

Supernatant myších jaterních homogenátů byl nanesen na ekvilibrovaný Sephadex G-25 (kolona 50 x 10 mm I. D.). Proteiny (3 frakce po 0,25 ml, průtoková rychlost 0,25 ml/min.) byly vymyty ekvilibračním pufrem. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl stanoven pomocí BCA [113] a měřením absorbance při 280 nm. Kolona byla promyta 50 ml ekvilibračního pufru.

4.3.2 ODSTRANĚNÍ KOVOVÝCH IONTŮ Z MYŠÍCH JATERNÍCH HOMOGENÁTŮ

Roztoky

- *Ekvilibrační pufr (0,1 M fosfátový pufr, pH 7,3)*

Kolona IDA-Sepharosy (65 x 10 mm I. D.) byla promyta 10 ml 0,2 M EDTA a 10 ml ekvilibračního pufru. Vzorky získané po gelové permeační chromatografii byly nanesený na kolonu. Proteiny (10 frakcí po 2 ml, průtoková rychlost 0,25 ml/min.) byly vymyty ekvilibračním pufrem. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl stanoven pomocí BCA [113] a měřením absorbance při 280 nm. Kolona byla promyta 70 ml ekvilibračního pufru.

4.3.3 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH

Roztoky

- *Ekvilibrační pufr (0,1 M fosfátový pufr, pH 7,3)*

Kolona IDA-Sepharosy (65 x 10 mm I. D.) byla promyta 10 ml vody, nasycena 20 ml 0,2 M CoCl_2 a znovu promyta 10 ml vody. Získaná Co^{2+} -IDA-Sepharosa byla promyta 10 ml ekvilibračního pufru. Vzorky získané elucí z kolony IDA-Sepharosy (viz kapitola 4.3.2) byly nanesený na ekvilibrovanou kolonu. Po promytí ekvilibračním pufrem byly adsorbované proteiny eluovány 60 mM imidazolem v ekvilibračním pufrem. Obsah proteinů

v jednotlivých frakcích (objem 1 ml, průtoková rychlost 0,25 ml/minutu) byl stanoven pomocí BCA [113] a měřením absorbance při 280 nm.

4.3.4 IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

4.3.4.1 Imobilizace protilátek na Co³⁺-IDA-Agarosu

Roztoky

- *PBS (0,15 M NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄ a 1,0 mM NaH₂PO₄, pH 7,2)*
- *Eluční roztok A (0,2 M NaCl, pH upraveno na 2,8 pomocí 0,5 M HCl)*

IDA-Agarosa byla naplněna do kolony (20 x 10 mm I. D., asi 1 ml nosiče), promyta destilovanou vodou, nasycena 10 ml 0,2 M CoCl₂, znovu promyta 10 ml vody a 10 ml PBS. Vzniklá Co²⁺-IDA-Agarosa byla oxidována na Co³⁺-IDA-Agarosu roztokem peroxidu vodíku (0,05% H₂O₂ v PBS, 10 ml, 90 min., laboratorní teplota). Po oxidaci byl nosič promyt 10 ml PBS. Na promytou Co³⁺-IDA-Agarosu byl nanesen roztok protilátky (1,2 mg králičí anti-OVA IgG nebo 1,4 mg slepičí IgY a nebo 1,3 mg lidské IgE v 1 ml PBS). Co³⁺-IDA-Agarosa byla s roztokem protilátky míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě a po ukončení inkubace byly imunosorbenty promyty následujícími roztoky: 20 ml PBS, 20 ml 1 M NaCl v PBS, 10 ml 120 mM imidazolu v PBS, 10 ml 50 mM EDTA v PBS, 10 ml elučního roztoku A, 10 ml 4–6 M močoviny ve vodě a 10 ml PBS obsahujícího 0,02 % NaN₃. Imunosorbenty byly skladovány při 4°C.

4.3.4.2 Afinitní chromatografie vaječného bílku na nosiči s anti-OVA IgG

Roztoky

- *Eluční roztok A (0,2 M NaCl, pH upraveno na 2,8 pomocí 0,5 M HCl)*

Kolona (20 x 10 mm I. D.) s imobilizovanou králičí anti-OVA IgG byla ekvilibrována PBS. Roztok lyofilisovaného vaječného bílku (1 mg v 1 ml PBS) byl nanesen na kolonu. Po vsáknutí roztoku antigenu byl průtok kolonou zastaven a nosič byl 1 hodinu inkubován při laboratorní teplotě. Nenavázané proteiny byly vymyty PBS, 1 M NaCl v PBS, 120 mM imidazolem v PBS a opět PBS. Adsorbované proteiny byly eluovány roztokem A. Jednotlivé frakce (10 x 1 ml, průtoková rychlost 0,2 ml/min) byly upraveny (1 M Tris/HCl, pH 9,5) na pH 7. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl stanoven pomocí BCA [113] a měřením absorbance při 280 nm. Frakce obsahující proteiny byly spojeny, dialyzovány

proti PBS (2 x 500 ml, přes noc) a zakoncentrovány v ultrafiltrační cele. Po eluci byl nosič promyt PBS a regenerován 4–6 M močovinou ve vodě.

4.3.4.3 Studium nescifických interakcí vaječného bílku s Co^{2+} -IDA-Agarosou a s Co^{3+} -IDA-Agarosou

IDA-Agarosa byla naplněna paralelně do dvou kolon (10 x 10 mm I. D.). Postupem popsaným v kapitole 4.3.4.1 byla z jedné kolony IDA-Agarosy připravena Co^{2+} -IDA-Agarosa a z druhé kolony Co^{3+} -IDA-Agarosa. Kolona Co^{3+} -IDA-Agarosy byla dále promyta následujícími roztoky: 10 ml PBS, 10 ml 1 M NaCl v PBS, 5 ml 120 mM imidazolu v PBS, 5 ml 50 mM EDTA v PBS, 5 ml 4–6 M močoviny ve vodě a 5 ml PBS. Poté byl na obě kolony (Co^{2+} -IDA-Agarosu i Co^{3+} -IDA-Agarosu) nanesen roztok bílku (0,5 mg v 0,5 ml PBS) a oba nosiče byly inkubovány 3 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly nosiče promyty PBS a 120 mM imidazolem v PBS. Frakce (5 x 1 ml) eluované roztokem imidazolu byly dialyzovány proti PBS (2 x 500 ml, přes noc) a zakoncentrovány v ultrafiltrační cele. Nakonec byly nosiče promyty PBS obsahujícím 0,02 % NaN_3 a uskladněny při 4°C.

4.3.4.4 Stanovení kapacity imunosorbentů

IDA-Agarosa byla naplněna paralelně do tří kolon (25 x 12 mm I. D., asi 2 ml). Postupem popsaným v kapitole 4.3.4.1 byly připraveny kolony Co^{3+} -IDA-Agarosy. Na kolony Co^{3+} -IDA-Agarosy, ekvilibrované PBS, byly nanесeny roztoky protilátek (4 mg, 8 mg a 16 mg králičí anti-OVA IgG ve 4 ml PBS). Dále příprava imunosorbentů probíhala, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.4.1.

Na nosič s asi 4 mg (respektive 8 mg či 16 mg) králičí anti-OVA IgG byl nanесen roztok ovalbuminu (1 mg v 2,5 ml). Afinitní chromatografie ovalbuminu probíhaly analogicky afinitní chromatografii bílku popsané v kapitole 4.3.4.2.

4.3.4.5 Stanovení výtěžku ovalbuminu

Na imunoafinitní nosič s 16 mg králičí anti-OVA IgG (viz kapitola 4.3.4.4) byl nanесen roztok ovalbuminu (0,1 mg v 2,5 ml). Afinitní chromatografie ovalbuminu probíhala analogicky afinitní chromatografii bílku popsané v kapitole 4.3.4.2.

4.3.4.6 Afinitní purifikace slepičí anti-BSA IgY

Roztoky

- *Vazebný pufr (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3)*

CNBr-aktivovaná Sepharosa 4B (4,5 g ~ 16 ml gelu) byla na skleněné fritě 15 minut promývána 900 ml 1 mM HCl. Ihned po promytí bylo na CNBr-aktiv. Sepharosu 4 B vsádkově přidáno BSA (20 mg ~ 300 nmolů v 23 ml vazebného pufru). Vazba BSA na CNBr-aktiv. Sepharosu 4 B probíhala za mírného otáčení 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byla suspenze převedena do kolony (90 x 15 mm I. D.) a nenavázané proteiny byly vymyty 50 ml vazebného pufru. Pak byl nosič promyt 200 ml PBS a zbylá vazebná místa nosiče byla blokována přídatkem 1 M ethanolaminu (přes noc při 4°C). Po ukončení inkubace byl nosič promyt následujícími roztoky:

- 200 ml PBS
- střídavě 5 dávkami: 0,5 M NaCl v 0,1 M acetátovém pufru, pH 4,0 (200 ml)
0,5 M NaCl v 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 (200 ml)
- 200 ml 0,2 M glycinového pufru, pH 2,8
- 200 ml PBS obsahujícího 0,02 % NaN₃

Na CNBr-aktiv. Sepharosu s navázaným BSA byla nanesena polyspecifická slepičí anti-BSA IgY (258 mg ~ 1,5 μmolů v 36 ml PBS) a nosič byl za mírného otáčení inkubován 3 hodiny při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly nenavázané proteiny vymyty 200 ml PBS a 80 ml 1 M NaCl v PBS. Monospecifická anti-BSA IgY byla z nosiče eluována 0,2 M glycinovým pufrům, pH 2,8. Jednotlivé frakce (30 x 1,5 ml, průtoková rychlost 0,4 ml/min) byly upraveny (1 M Tris/HCl, pH 9,5) na pH 7. Po eluci byl nosič promyt PBS a regenerován 4 M guanidin hydrochloridem. Regenerovaný nosič byl promyt PBS s obsahem 0,02 % NaN₃ a uskladněn při 4°C. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl stanoven pomocí BCA [113] a měřením absorbance při 280 nm. Frakce obsahující proteiny byly spojeny, dialyzovány proti PBS (2 x 2 l, přes noc) a zakoncentrovány v ultrafiltračních celách.

Procesem afinitní purifikace na CNBr-aktiv. Sepharose s navázaným BSA (300 nmolů) prošla i kontrolní slepičí IgY K (1,1 μmolů) separovaná z vaječných žloutků získaných před imunizací zvířete.

4.3.4.7 Imunoafinitní chromatografie BSA na nosiči se slepičí anti-BSA IgY

Postupem popsaným v kapitole 4.3.4.1 byly připraveny dvě kolony Co^{3+} -IDA-Agarosy (50 x 12 mm I. D.). Na kolony Co^{3+} -IDA-Agarosy, ekvilibrované PBS, byly nanесeny roztoky protilátek (3,7 mg afinitně purifikované slepičí anti-BSA IgY a nebo 3,9 mg kontrolní slepičí IgY K v 7 ml PBS). Dále příprava imunosorbentů probíhala, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.4.1. Na připravené imunosorbenty byl nanесen roztok BSA (1 mg v 5 ml PBS). Afinitní chromatografie BSA probíhaly analogicky afinitní chromatografii bílku popsané v kapitole 4.3.4.2.

4.3.4.8 Vliv peroxidu vodíku na imobilizované protilátky

Kolona (20 x 10 mm I. D.) byla naplněna IDA-Agarosou. Postupem popsaným v kapitole 4.3.4.1 byla připravena Co^{2+} -IDA-Agarosa. Slepičí protilátka z vaječného žloutku (IgY) byla naředěna PBS pufrem (1 mg/ml, 3 ml) a nanесena na Co^{2+} -IDA-Agarosu. Vazba IgY na nosič probíhala 3 hodiny při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byl nosič promyt PBS, rozdělen na tři části po 250 μl a převeden do kolon. Zbytek imunosorbentu (IgY- Co^{2+} -IDA-Agarosy) byl uschován pro vyhodnocení pomocí SDS-PAGE. Tři kolony s imunosorbentem (IgY- Co^{2+} -IDA-Agarosou) byly vystaveny třem různým koncentracím peroxidu vodíku (0,01%, 0,03% a 0,05% H_2O_2 v PBS). Po ukončení oxidace (90 min. při laboratorní teplotě) byly nosiče promyty 10 ml PBS s obsahem 0,02 % NaN_3 a uskladněny při 4°C.

4.3.4.9 Porovnání imunoafinitních nosičů oxidovaných před a po vazbě protilátky

Postupem popsaným v kapitole 4.3.4.1 byly připraveny dvě kolony Co^{2+} -IDA-Agarosy (10 x 10 mm I. D.).

První kolona Co^{2+} -IDA-Agarosy byla oxidována 5 ml 0,05% peroxidu vodíku v PBS (90 minut při laboratorní teplotě). Po oxidaci byla kolona se vzniklou Co^{3+} -IDA-Agarosou promyta PBS a inkubována s roztokem protilátky (0,7 mg polyklonální králičí anti-OVA IgG v 0,5 ml PBS, 3 hodiny při laboratorní teplotě). Po ukončení inkubace byl nosič promyt PBS a 1 M NaCl v PBS.

Druhá kolona Co^{2+} -IDA-Agarosy byla nejprve inkubována s polyklonální králičí anti-OVA IgG (0,7 mg v 0,5 ml PBS, 3 hodiny při laboratorní teplotě) a nenavázaná protilátka byla vymyta PBS a 1 M NaCl v PBS. Nosič s navázanou protilátkou (IgG- Co^{2+} -IDA-Agarosa) byl oxidován 5 ml 0,05% peroxidu vodíku v PBS (90 minut při laboratorní teplotě). Oxidace byla ukončena promytím kolony PBS pufrem.

Dále byly oba nosiče promyty následujícími roztoky: 5 ml 120 mM imidazolu v PBS, 5 ml 50 mM EDTA v PBS, 5 ml 6 M močoviny ve vodě a 5 ml PBS obsahujícího 0,02 % NaN_3 . Na ekvilibrované imunisorbenty byl nanesen roztok vaječného bílku (0,5 mg v 0,5 ml PBS). Afinitní chromatografie probíhala analogicky afinitní chromatografii bílku popsané v kapitole 4.3.4.2.

4.3.4.10 Vliv pH vazebního pufru na imobilizaci protilátek

Roztoky

- *McIlvaineovy pufrы pH 4,4; 6,0 a 8,0 o konstantní (0,5 M) iontové síle [114, 115]*

Tři kolony (10 x 10 mm I. D., asi 0,5 ml) Co^{3+} -IDA-Agarosy (viz kapitola 4.3.4.1) byly ekvilibrovány 5 ml McIlvaineova pufru o pH 4,4 nebo 6,0 nebo 8,0. Protilátka (0,7 mg slepičí IgY v 1 ml McIlvaineova pufru příslušného pH) byla nanesená na kolony a směs 3 hodiny míchána při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly kolony promyty následujícími roztoky: 10 ml McIlvaineova pufru příslušného pH, 10 ml vody, 5 ml 50 mM EDTA a 5 ml PBS s 0,02 % NaN_3 .

V dalším kroku byl imunisorbent s protilátkou imobilizovanou na Co^{3+} -IDA-Agarosu v prostředí McIlvaineova pufru pH 8,0 promyt 5 ml McIlvaineova pufru pH 4,4. Eluát byl dialyzován proti PBS a zakoncentrován v ultrafiltrační cele. Nosič byl promyt 5 ml PBS s 0,02 % NaN_3 .

4.3.4.11 Vliv kompetičního činidla na imobilizaci protilátek

Kolona (10 x 10 mm I. D.) Co^{3+} -IDA-Agarosy (viz kapitola 4.3.4.1) byla ekvilibrována 5 ml 0,12 M imidazolu v PBS. Protilátka (0,7 mg slepičí IgY v 1 ml 0,12 M imidazolu v PBS) byla nanesená na kolonu a směs 3 hodiny míchána při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla kolona promyta následujícími roztoky: 5 ml 0,12 M imidazolu v PBS, 5 ml vody a 5 ml PBS s 0,02 % NaN_3 .

4.3.4.12 Vliv chelatačního činidla na imobilizaci protilátek

Byly připraveny dvě kolony (10 x 10 mm I. D.) Co^{3+} -IDA-Agarosy (viz kapitola 4.3.4.1). První kolona byla promyta 10 ml PBS a druhá kolona 5 ml 50 mM EDTA v PBS a 5 ml PBS. Protilátka (0,3 mg králičí anti-OVA IgG v 1 ml PBS) byla nanesená na kolony a směs 3 hodiny míchána při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly kolony promyty následujícími roztoky: 10 ml PBS, 10 ml 1 M NaCl v PBS, 5 ml 0,12 M imidazolu v PBS, 5 ml 50 mM EDTA, 5 ml 6 M močoviny a 5 ml PBS s 0,02 % NaN_3 .

4.3.4.13 Studium vlivu Co^{2+} iontů na interakci mezi molekulami protilátek a Co^{3+} -IDA-Agarosou

Kolona (10 x 10 mm I. D.) Co^{3+} -IDA-Agarosy (viz kapitola 4.3.4.1) byla promyta 5 ml 50 mM EDTA v PBS, 5 ml PBS a 2 ml vody. Dále byl na nosič nanesen 1 ml 5 mM CoCl_2 ve vodě a směs byla míchána 45 minut při laboratorní teplotě. Na promytý a ekvilibrovaný nosič (2 ml vody, respektive 5 ml PBS) byla nanesena králičí anti-OVA IgG (0,9 mg v 1 ml PBS). Dále imobilizace protilátky probíhala, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.4.12.

4.4 IMUNOCHEMICKÉ METODY

4.4.1 Stanovení aktivity afinitně purifikované anti-BSA IgY pomocí ELISA testu

Roztoky

- *PBS Tween pufr (0,15 M NaCl, 1,8 mM Na_2HPO_4 , 1,0 mM NaH_2PO_4 a 0,05 % Tween® 20, pH 7,2)*
- *Vazebný pufr (5,6 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9,6)*
- *Vyvolávací roztok (28 mM NaHCO_3 , 22 mM Na_2CO_3 , 1 mM MgCl_2 , 1 mg/ml PNPP)*
- *Blokující pufr (1% m/v sušené netučné mléko v pufru PBS Tween)*

Antigen (BSA) byl aplikován do jednotlivých komůrek desky Nunc Maxisorp (100 μl roztoku BSA ve vazebném pufru, 4 pmol/ml). Adsorpce antigenu probíhala přes noc při 4°C. Po ukončení inkubace byla každá komůrka 5x promyta 200 μl pufru PBS Tween. Zbylá vazebná místa na adsorpčním povrchu komůrek byla blokována 150 μl blokujícího pufru (1 hodinu při 37°C). Pak byly komůrky opět 5x promyty 200 μl pufru PBS Tween. Do promytých komůrek byla aplikována primární protilátka (100 μl anti-BSA IgY v PBS, 0,06–160 $\mu\text{g/ml}$ podle předpokládaného obsahu specifické protilátky, 2 hodiny, 37°C). Vedle anti-BSA IgY byla jedna sada komůrek inkubována s kontrolní slepičí IgY K, získanou ze žloutků před imunizací. Pak byly komůrky opět 5x promyty 200 μl pufru PBS Tween. Do promytých komůrek byla aplikována sekundární protilátka (anti-(chicken IgY) IgG s konjugovanou alkalickou fosfatázou, 5 μl v 10 ml PBS, 100 μl , 1 hodina, 37°C). Nenavázaná sekundární protilátka byla vymyta 5 dávkami PBS Tween pufru. Do komůrek bylo napipetováno 100 μl vyvolávacího roztoku. Vyvolávací reakce byla zastavena přidávkem 100 μl 3 M NaOH. Z hodnot absorbance při 405 nm pak byla určena aktivita primární protilátky [116].

4.5 ELEKTROFORETICKÉ METODY

4.5.1 Polyakrylamidová SDS elektroforéza

Roztoky

- *4x koncentrovaný redukující vzorkový pufr (0,126 M Tris/HCl, 4 % m/v SDS, 20 % v/v glycerol, 10 % v/v 2-mercaptoetanol, 0,006 % m/v bromfenolová modř, pH 6,8)*
- *Elektrodový pufr (0,025 M Tris/HCl, 0,192 M glycin, 0,1 % m/v SDS, pH 8,3)*

Příprava vzorků pro SDS elektroforézu [117]: vzorky byly smíchány se 4x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem (3:1 v/v). Protilátky (případně navázané antigeny) byly z imunoafinitních nosičů (asi 30 μ l) extrahovány 4x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem (1:1 v/v). Vzorky byly 3 minuty zahřívány na vroucí vodní lázni a zchladlé supernatanty nanášeny na elektroforézu.

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% T, 2,6% C separační gel; 3,1% T a 2,6% C zaostřovací gel; 25 μ l vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; Mini PROTEAN[®] 3 Cell.

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250, případně denzitometricky vyhodnoceny pomocí programu ElfoMan2,5.

4.5.2 Dvourozměrná elektroforéza

Roztoky

- *Rehydratační roztok (8 M močovina, 3 % m/v CHAPS, 0,2 % m/v DTT, 2 % v/v amfolyt pH 3–10 a 0,002 % m/v bromfenolová modř)*
- *Ekvilibrační roztok (2 % m/v SDS, 50 mM Tris/HCl, 6 M močovina, 30 % v/v glycerol a 0,002 % m/v bromfenolová modř, pH 8,8)*
- *Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (0,025 M Tris/HCl, 0,192 M glycin, 0,1 % m/v SDS, pH 8,3)*

Dialyzované vzorky (5 mM fosfátový pufr, pH 7,3) byly smíchány s rehydratačním roztokem (100 μ g proteinů do výsledného objemu 350 μ l) a nanášeny na gelové proužky s imobilizovaným pH gradientem (pH 3–10, nelineární, 18 cm) [118, 119]. Rehydratace gelových proužků probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Rehydratovaný gelový proužek byl umístěn na temperovanou desku přístroje Multiphor II. Isoelektrická fokusace (IEF) probíhala při 20°C ve 4 krocích (350 V 60 min., 500V 60 min., 1000V 60min. a

3500V 21 hodin), proud byl menší než 1 mA. Dále byly gelové proužky 2x po 15 minutách inkubovány ve směsi 10 ml ekvilibračního roztoku se 100 mg DTT, respektive 250 mg jodacetamidu. Ekvilibrované gelové proužky byly aplikovány na SDS-PAGE [117] (12,8% T, 2,6% C separační gel, 15 mA/gel 60 min, 45 mA/gel 4–5 hodin, 10°C). Na levou stranu separačního gelu byly aplikovány i vzorky nedělené pomocí IEF. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly barveny stříbrem [120].

4.6 ANALYTICKÉ METODY

4.6.1 Stanovení koncentrace proteinů

Roztoky

- *Reakční roztok AB – roztoky A a B smíchané v poměru 50:1*
- *Roztok A (BCA™ Protein Assay Reagent A)*
- *Roztok B (4% m/v CuSO₄ · 5 H₂O)*

Koncentrace proteinů v roztoku byla určena pomocí BCA stanovení [113]. V mikrotitrační destičce bylo smícháno 20 µl vzorku s 200 µl reakčního roztoku AB. Roztok byl promíchán a inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při 540 nm. Metoda byla kalibrována roztoky BSA o známé koncentraci.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 SEPARACE MYŠÍCH JATERNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH

5.1.1 PŘEDČIŠTĚNÍ MYŠÍCH JATERNÍCH PROTEINŮ

Pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Sephadexu G-25 byly ze supernatantu myších jaterních homogenátů odstraněny nízkomolekulární látky. Takto předčištěný vzorek byl nanesen na kolonu IDA-Sepharosy. Na koloně IDA-Sepharosy byly ze vzorku odstraněny kovové ionty. Kovové ionty mohou kompetičně inhibovat následnou vazbu jaterních proteinů na nosič s imobilizovanými kobaltnatými ionty (Co^{2+} -IDA-Sepharosu). Nežádoucí kovové ionty (zejména Co^{2+}) mohou být obsaženy jako ionty vázané na proteiny především ve vzorcích získaných z myši premedikovaných chloridem kobaltnatým. IDA-Sepharosa byla jako matrice použita i pro afinitní chromatografii na imobilizovaných kobaltnatých iontech (IMAC- Co^{2+}). Předčištění proteinů na koloně IDA-Sepharosy proto omezilo i následné nespecifické interakce mezi jaterními proteiny a Co^{2+} -IDA-Sepharosou.

5.1.2 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH (IMAC- Co^{2+})

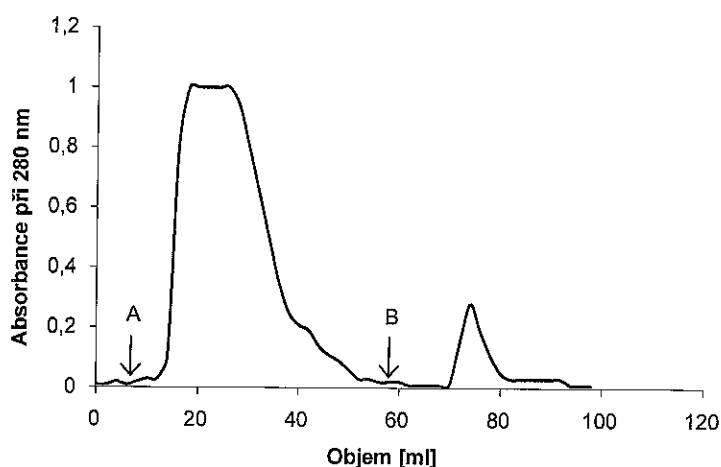
Předčištěné myší jaterní proteiny byly dále separovány na koloně Co^{2+} -IDA-Sepharosy. Záznam chromatografie je na obrázku 4. Lze předpokládat, že proteiny se na Co^{2+} -IDA-Sepharosu adsorbovaly v závislosti na obsahu aminokyselinových zbytků vhodných pro vazbu na kovové ionty [19]. Jak ve své práci uvedl E. Sulkowski [12], chromatografické nosiče s chelatovanými Co^{2+} ionty vyžadují pro vazbu proteinu přítomnost alespoň dvou histidinových zbytků, které jsou na povrchu proteinu blízko sebe.

Proteiny adsorbované na Co^{2+} -IDA-Sepharosu tvořily pouze malou část z proteinů vnesených na afinitní nosič. Tento fakt lze vysvětlit tím, že histidinu je průměrně v molekule proteinů relativně málo (jen asi 2 %, z toho jen část na povrchu) [21].

Proteiny adsorbované na Co^{2+} -IDA-Sepharosu nebyly z nosiče uvolněny snížením pH (6,2) či snížením iontové síly elučních pufrů (0,01 M). Adsorpce proteinů na chromatografické nosiče obecně roste s klesajícím pH a s klesající iontovou silou. U IMAC naopak vyšší iontová síla potlačuje nespecifický ionexový charakter nosiče a adsorpce

proteinů roste s rostoucí iontovou silou a pH [28, 29]. Uvolnění proteinů při snížení pH se obvykle vysvětluje protonizací histidinových zbytků, které se vzájemně odpuzují s chelatovanými kovovými ionty [7]. Námi použité snížení pH elučního pufru na pH 6,2 nebylo pro uvolnění adsorbovaných proteinů dostatečné. To odpovídá skutečnosti, že hodnoty pK imidazolových skupin histidinu se, v závislosti na okolních skupinách, pohybují kolem hodnoty 7 [121].

Vedle nespécifické eluce (př. snížení pH) byla použita i eluce specifická (pufr obsahující imidazol). Během specifické eluce dochází k soutěžení o vazebná místa na nosiči a k vytěsnění molekul biopolymeru [5, 9, 40, 44, 45]. Po optimalizaci elučních podmínek (gradient 50 mM až 1 M imidazolu) byl k uvolnění adsorbovaných proteinů použit pufr obsahující 60 mM imidazol.



Obrázek 4: Chromatogram jaterních proteinů separovaných pomocí IMAC-Co²⁺.

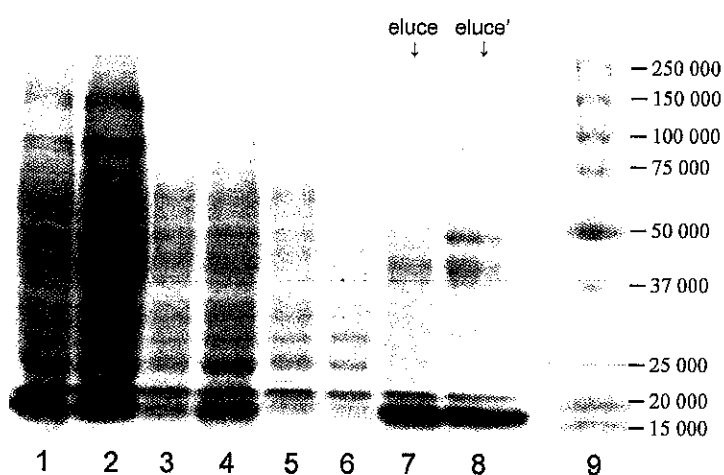
Podmínky chromatografie: Proteiny získané elucí z kolony IDA-Sepharosy naneseny v ekvilibračním pufru (A) na kolonu Co²⁺-IDA-Sepharosy (65 x 10 mm I. D.). Eluce puftrem s 60 mM imidazolem (B). Obsah proteinů stanoven pomocí BCA [113] a měřením absorbance při 280 nm. Objem frakcí 1 ml, průtoková rychlost 0,25 ml/minutu.

5.1.3 CHARAKTERIZACE SEPAROVANÝCH PROTEINŮ POMOCÍ ELEKTROFORETICKÝCH METOD

5.1.3.1 Charakterizace separovaných proteinů pomocí SDS-elektroforézy

Průběh separace myších jaterních proteinů byl vyhodnocen pomocí SDS-elektroforézy [117]. Koncentrace proteinů nanesených na SDS-elektroforézu byla různá v závislosti na stupni separace proteinů. Byly porovnány vzorky získané z myší premedikovaných

chloridem kobaltnatým se vzorky kontrolními (viz obrázek 5). Linie s lichým číslem ukazují vzorky z myši premedikovaných chloridem kobaltnatým, linie se sudým číslem ukazují vzorky kontrolní. Linie 1 a 2 obsahují supernatanty myších jaterních homogenátů, linie 3 a 4 obsahují vzorky předčištěné na kolonách Sephadexu G-25 a IDA-Sepharosy, linie 5 a 6 obsahují proteiny nenavázané na Co^{2+} -IDA-Sepharosu a linie 7 a 8 ukazují proteiny eluované z Co^{2+} -IDA-Sepharosy pufrém obsahujícím 60 mM imidazol. Podle standardu relativních molekulových hmotností (linie 9) bylo určeno, že oblast na elektroforetickém gelu, kde se ve vzorku z premedikovaných myši objevují, oproti vzorku kontrolnímu, další proteiny, odpovídá relativní molekulové hmotnosti asi 25 000 až 37 000.



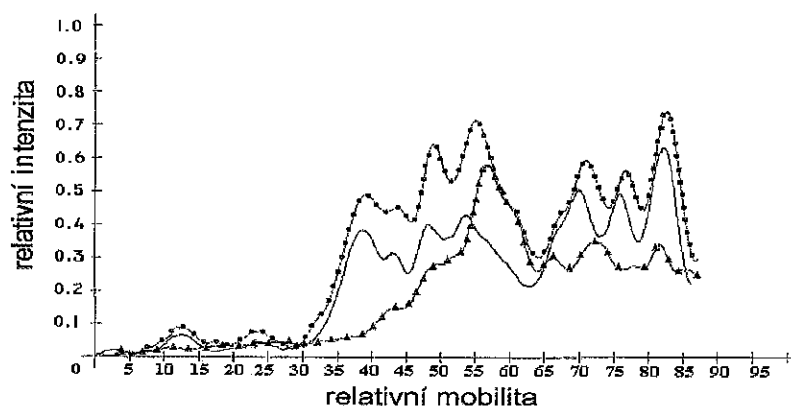
Obrázek 5: SDS-PAGE myších jaterních proteinů separovaných pomocí IMAC- Co^{2+} .

Linie s lichým číslem ukazují vzorky z myši premedikovaných chloridem kobaltnatým, linie se sudým číslem ukazují vzorky kontrolní. 1) a 2) supernatanty myších jaterních homogenátů, 3) a 4) vzorky předčištěné na kolonách Sephadexu G-25 a IDA-Sepharosy, 5) a 6) proteiny nenavázané na Co^{2+} -IDA-Sepharosu při IMAC- Co^{2+} , 7) a 8) proteiny eluované z Co^{2+} -IDA-Sepharosy pufrém obsahujícím 60 mM imidazol, 9) standard relativních molekulových hmotností

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8 % separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Elektroforetické zóny proteinů byly dále denzitometricky vyhodnoceny pomocí programu ElfoMan2,5. Obrázek 6 znázorňuje zastoupení proteinů ve frakcích získaných v průběhu afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech. Pro denzitometrické vyhodnocení byly použity elektroforetické zóny proteinů získané z myši premedikovaných chloridem kobaltnatým. Denzitometricky určené hodnoty relativní mobility (43, 49, 57, 66, 72, 81 a 91 jednotek) byly pomocí standardu relativní molekulové

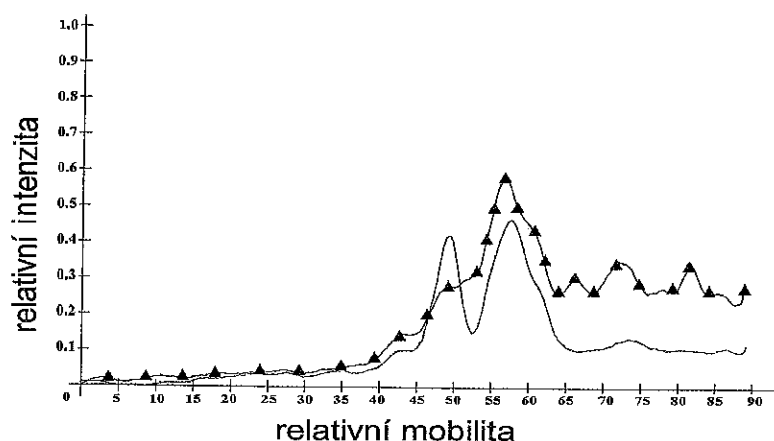
hmotnosti převedeny na hodnoty relativní molekulové hmotnosti (61 000, 53 000, 45 000, 37 000, 32 000, 26 000 a 21 000).



Obrázek 6: Denzitometrické vyhodnocení elektroforetických zón proteinů.

Myší jaterní proteiny indukované chloridem kobaltnatým byly separovány pomocí IMAC- Co^{2+} : (●) proteiny nanesené na Co^{2+} -IDA-Sepharosu, (-) proteiny nenávané na Co^{2+} -IDA-Sepharosu, (▲) proteiny eluované pufrém s obsahem imidazolu. Jednotlivé frakce proteinů byly nanesený na SDS-PAGE .

Na obrázku 7 je porovnána adsorpce proteinů z premedikovaných a kontrolních myší na Co^{2+} -IDA-Sepharosu. Pásky proteinů s relativní mobilitou 66, 72 a 81 jednotek byly nalezeny pouze ve vzorcích z myší premedikovaných chloridem kobaltnatým. Relativní molekulová hmotnost myších jaterních proteinů, které byly indukovány chloridem kobaltnatým a zároveň separovány pomocí Co^{2+} -IDA-Sepharosy, je přibližně 37 000, 32 000 a 26 000.

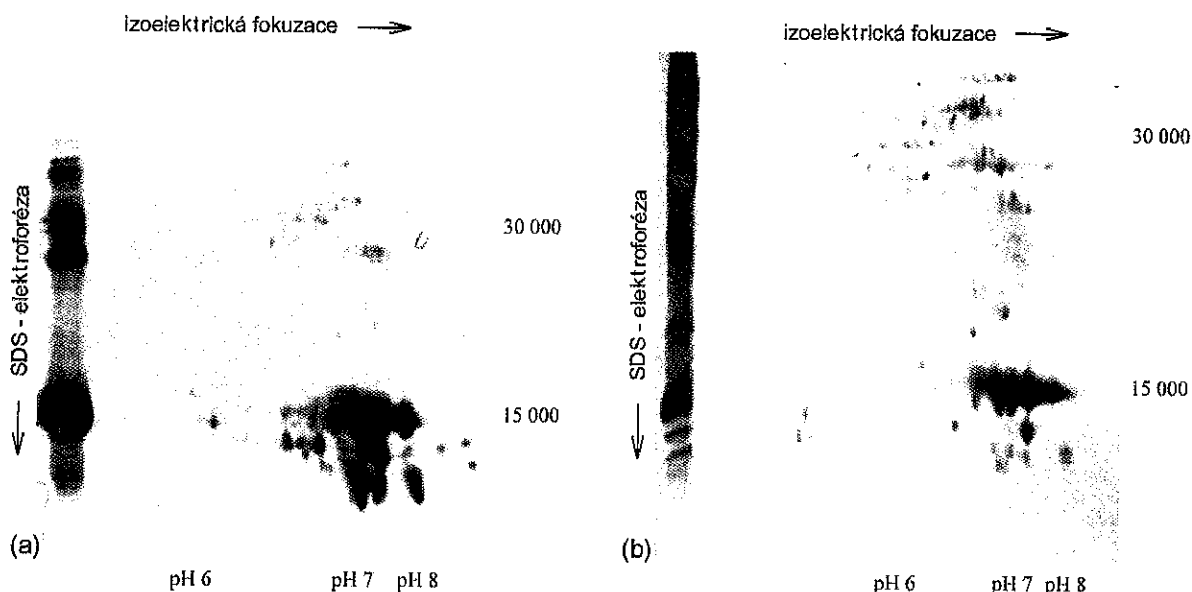


Obrázek 7: Denzitometrické vyhodnocení elektroforetických zón proteinů.

Porovnání frakcí proteinů eluovaných během IMAC- Co^{2+} z Co^{2+} -IDA-Sepharosy pufrém s obsahem imidazolu. Eluované proteiny z kontrolních myší (-) a z myší premedikovaných chloridem kobaltnatým (▲) byly nanesený na SDS-PAGE.

5.1.3.2 Charakterizace separovaných proteinů dvourozměrnou elektroforézou

Rozdíly mezi vzorky z kontrolních a premedikovaných myší byly porovnány také pomocí dvourozměrné elektroforézy (obr. 8). Elektroforéza vzorku z myší premedikovaných chloridem kobaltnatým obsahuje větší počet elektroforetických zón, a to zejména v oblasti relativní molekulové hmotnosti okolo 30 000 a v oblasti pH 6,5 až 7,5. Různě intenzivní elektroforetické zóny v oblasti relativní molekulové hmotnosti okolo 15 000 a v oblasti pH 7,5 až 8,0 jsou způsobeny nestejným množstvím hemoglobinu (respektive jeho podjednotek) ve vzorcích z kontrolních a premedikovaných myší.



Obrázek 8: Dvourozměrná elektroforéza myších jaterních proteinů eluovaných z Co^{2+} -IDA-Sepharosy puřem obsahujícím imidazol.

Porovnání kontrolních vzorků (a) a vzorků z myší premedikovaných chloridem kobaltnatým (b). První rozměr: IEF proteinů (~ 100 μg) na gelových proužcích s imobilizovaným pH gradientem (pH 3–10, nelineární pH gradient, 18 cm); 350 V 60 min., 500V 60 min., 1000V 60min. a 3500V 21 hodin; 20°C. Druhý rozměr: SDS-PAGE v 12,8% separačním gelu; 15 mA/gel 60 min a 45 mA/gel 4–5 hodin; 10°C; barveno stříbrem. Na levou stranu separačního gelu byly aplikovány vzorky nedělené pomocí IEF.

5.2 PŘÍPRAVA IMUNOAFINITNÍCH NOSIČŮ VYUŽÍVAJÍCÍ CHELATOVANÝCH IONTŮ KOBALTU

5.2.1 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE IMUNOAFINITNÍCH NOSIČŮ

5.2.1.1 Imobilizace protilátek na Co³⁺-IDA-Agarosu

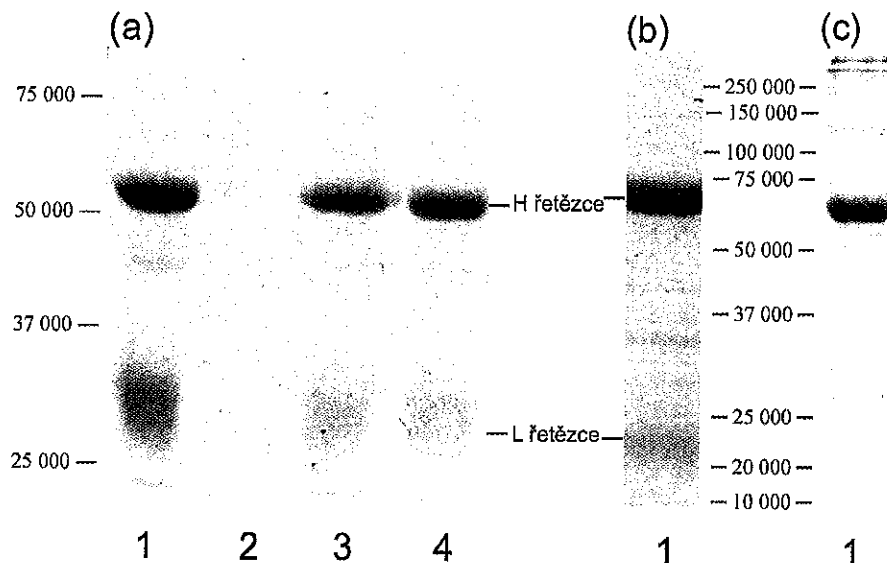
Co³⁺-IDA-Agarosa byla připravena oxidací Co²⁺-IDA-Agarosu postupem popsáním v kapitole 4.3.4.1. Měřením ¹H-NMR spekter byla prokázána kompletní oxidace chelatovaných iontů kobaltu připravené Co³⁺-IDA-Agarosu (J. Rohovec, nepublikované výsledky, konkrétní data viz dodatek na straně 82). Na připravenou Co³⁺-IDA-Agarosu byly imobilizovány protilátky třídy IgG, IgY a IgE. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

Třída protilátky	anti-OVA IgG	nespec. IgY	nespec. IgE
Zdroj	králík	slepice (vaječný žloutek)	člověk
Množství protilátky vnesené na Co ³⁺ -IDA-Agarosu	1,2 mg	1,4 mg	1,3 mg
Množství protilátky navázané na Co ³⁺ -IDA-Agarosu	90 %	76 %	59 %

Tabulka 3: Imobilizace protilátek na Co³⁺-IDA-Agarosu

Poznámka: Množství imobilizované protilátky bylo určeno pomocí BCA stanovení [113] z množství protilátky nenavázané.

Co³⁺-IDA-Agarosa s navázanou protilátkou byla promyta 50 mM EDTA; 6 M močovinou; 3 M NaCl; 20% v/v dioxanem; 0,12 M imidazolem a pufrů o pH 2,5 a pH 11,0. Po promytí imunosorbentů uvedenými roztoky nebylo pozorováno snížení obsahu protilátek na nosičích. Na druhou stranu, protilátky bylo možno v případě potřeby z nosičů uvolnit. K uvolnění imobilizovaných protilátek bylo potřeba redukovat chelatované Co³⁺ ionty pomocí redukčních činidel (např. DTT či 2-mercaptoethanol). Možnost zpětně uvolnit imobilizované protilátky lze využít např. při přípravě vzorků pro SDS-PAGE nebo při regeneraci nosiče. Průběh imobilizace protilátek na Co³⁺-IDA-Agarosu byl vyhodnocen pomocí SDS-PAGE (viz obrázek 9).



Obrázek 9: SDS-PAGE. Průběh imobilizace protilátek na Co^{3+} -IDA-Agarosu.

a) králičí anti-OVA IgG: 1) IgG použité pro imobilizaci, 2) IgG nenavázané na Co^{3+} -IDA-Agarosu, 3) IgG extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosu, 4) IgG extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosu po promytí nosiče roztoky imidazolu, EDTA a močoviny; b) slepičí IgY z vaječného žloutku: 1) IgY extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosu po promytí nosiče roztoky imidazolu, EDTA a močoviny; c) lidské IgE: 1) IgE extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosu po promytí nosiče roztoky imidazolu, EDTA a močoviny

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Lze předpokládat, že protilátky imobilizované na chelatované ionty kobaltu (např. během IMAC- Co^{2+}) jsou orientovány vazebnými místy pro antigen do mobilní fáze. Pro vazbu protilátky na chelatované ionty kobaltu jsou klíčové molekuly histidinu přítomné v Fc fragmentu protilátky [14, 17, 122]. J. E. Hale a D. E. Beidler ve své práci ukázali, že se u C-konce lidské, králičí, myší a morčecí IgG nachází endogenní vazebná doména pro kovové ionty [17]. Bylo prokázáno, že tato vazebná doména pro kov je evolučně konzervována u různých podtříd protilátek z odlišných organismů.

Z výsledků našich experimentů vyplývá, že na chelatované ionty kobaltu lze imobilizovat také slepičí IgY a lidskou IgE. Tento fakt je zajímavý zejména proto, že ptačí IgY a lidské IgE se od dříve zkoumaných savčích IgG v mnoha ohledech liší. Ptačí IgY a savčí IgE se naopak v některých svých vlastnostech podobají. Předpokládá se, že ptačí IgY je vývojový předchůdce savčí IgG a IgE.

Slepičí IgY má podobnou relativní molekulovou hmotnost a stejný počet konstantních domén těžkého řetězce jako IgE [56, 57, 73]. Molekuly IgY a IgE mají také podobně uspořádané disulfidové vazby na imunoglobulinových doménách a mezi jednotlivými

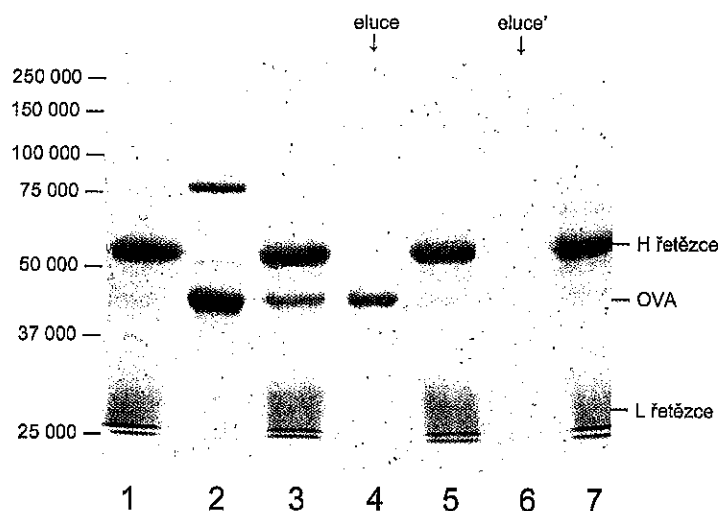
řetězci. IgY a IgE dále nemají tzv. pantovou oblast, omezeně precipitují a jsou schopny zprostředkovat anafylaktickou reakci. Obě molekuly mají také velmi podobné uspořádání N-glykosilačních míst [57].

Ptačí IgY a lidskou IgE spojuje i jejich rostoucí význam. Ptačí protilátky mají oproti savcím IgG několik výhod [123]. Hlavní výhodou je evoluční vzdálenost ptáků a savců, která umožňuje lepší imunitní odpověď na evolučně konzervované savčí proteiny [89]. Dalšími výhodami jsou vysoká výtěžnost při produkci IgY z vaječných žloutků, nižší cena a v neposlední řadě i menší stres experimentálního zvířete [75, 87]. Molekuly IgE zase v současné době podléhají intenzivnímu výzkumu díky jejich spojitosti s alergickými reakcemi [70, 71, 124].

V našich experimentech byly použity modelové protilátky. Lze předpokládat, že popsanou technikou je možno připravit imunosorbenty i pro jiné systémy protilátka-antigen.

5.2.1.2 Afinitní chromatografie vaječného bílku na nosiči s anti-OVA IgG

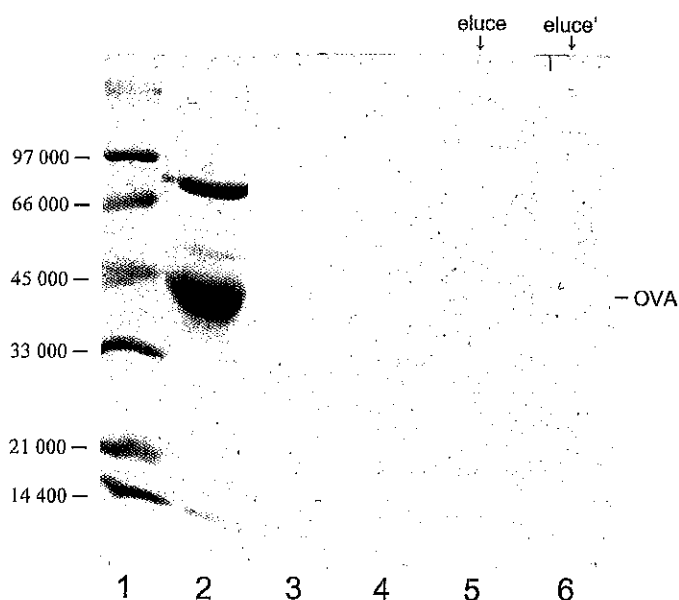
Schopnost připraveného imunosorbentu (s anti-OVA IgG, viz kap. 4.3.4.1) vázat příslušný antigen (ovalbumin) byla ověřena afinitní chromatografií vaječného bílku. Pomocí SDS-PAGE (obr. 10) bylo vyhodnoceno navázání antigenu na protilátku a následná eluce antigenu z nosiče. Ovalbumin adsorbovaný na imunoafinitní nosič byl eluován roztokem A (0,2 M NaCl, pH upraveno na 2,8 pomocí 0,5 M HCl). Eluovaný ovalbumin nebyl kontaminován dalšími proteiny vaječného bílku (obr. 10, linie 4). Po eluci roztokem A byl imunoafinitní nosič regenerován 4–6 M močovinou. Jelikož eluát získaný po regeneraci nosiče močovinou neobsahoval žádný ovalbumin, lze eluci ovalbuminu elučním roztokem A považovat za kompletní (obr. 10, linie 6). Během opakovaného použití připraveného imunoafinitního nosiče (4-5x) nebyl zaznamenán pokles vazebných schopností navázané protilátky. Případné nespecifické interakce vaječného bílku s nosičem byly studovány po inkubaci vaječného bílku na Co^{3+} -IDA-Agarose s imobilizovanou kontrolní nespecifickou protilátkou a na Co^{3+} -IDA-Agarose bez specifické protilátky (obr. 11).



Obrázek 10: SDS-PAGE. Afinitní chromatografie vaječného bílku na nosiči s anti-OVA IgG.

1) anti-OVA IgG, 2) proteiny vaječného bílku, 3) IgG a OVA extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosy, 4) OVA uvolněný z imunosorbentu elučním pufrém A (pH 2,8), 5) IgG extrahované z nosiče po eluci OVA elučním pufrém A, 6) frakce eluovaná z imunosorbentu 6 M močovinou, 7) IgG extrahované z nosiče po regeneraci močovinou

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.



Obrázek 11: SDS-PAGE. Průkaz specifické vazby vaječného bílku na nosič.

1) standard relativních molekulových hmotností, 2) proteiny vaječného bílku, 3) proteiny vaječného bílku extrahované z Co^{2+} -IDA-Agarosy, 4) proteiny vaječného bílku extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosy, 5) frakce eluovaná z Co^{2+} -IDA-Agarosy roztokem imidazolu, 6) frakce eluovaná z Co^{3+} -IDA-Agarosy roztokem imidazolu

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μ l vzorku (1-10 mg proteinu) na komůrku; 180 V, 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

5.2.1.3 Stanovení kapacity imunosorbentů a výtěžku ovalbuminu

Postupem popsáním v kapitole 4.3.4.4 byly připraveny imunoafinitní nosiče s přibližně 4 mg, 8 mg a 16 mg imobilizované anti-OVA IgG. Kapacita jednotlivých imunosorbentů byla stanovena z množství eluovaného ovalbuminu (viz kapitola 4.3.4.4). Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

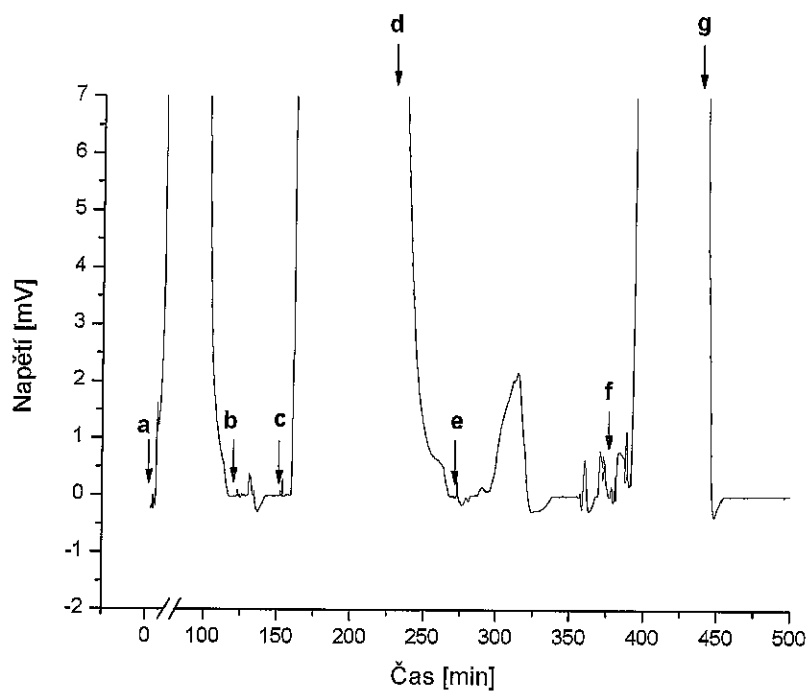
Výtěžek ovalbuminu byl stanoven z rozdílného množství ovalbuminu vneseného a eluovaného v průběhu afinitní chromatografie (viz kapitola 4.3.4.5). Z imunoafinitního nosiče bylo eluováno 97 % vneseného ovalbuminu.

IMOBILIZACE PROTILÁTEK			
Množství anti-OVA IgG vnesené na Co^{3+} -IDA-Agarosu	4 mg	8 mg	16 mg
Množství anti-OVA IgG navázané na Co^{3+} -IDA-Agarosu	89 %	92 %	79 %
STANOVENÍ KAPACITY IMUNOSORBENTŮ			
Množství ovalbuminu vneseného na imunoafinitní nosič	1 mg	1 mg	1 mg
Množství ovalbuminu eluovaného z imunoafinitního nosiče	0,06 mg	0,15 mg	0,25 mg

Tabulka 4: Stanovení kapacity imunosorbentů.

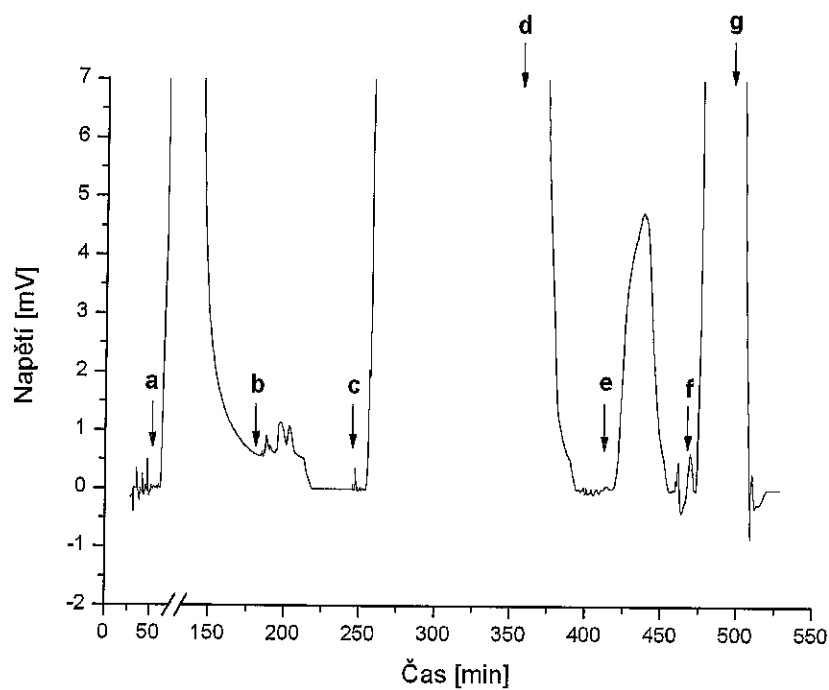
Poznámka: Množství imobilizované protilátky bylo vypočteno z množství protilátky nenavázané na nosič. Koncentrace proteinů byla určena pomocí BCA stanovení [113]. Eluce: 0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8.

Množství ovalbuminu eluované při měření kapacity z jednotlivých imunosorbentů dobře koreluje s množstvím protilátky přítomné na nosiči. Na obrázcích 12 až 14 jsou chromatogramy získané v průběhu měření kapacity imunoafinitních nosičů. Jednotlivé frakce proteinů byly vyhodnoceny také pomocí SDS-PAGE (viz obrázek 15).



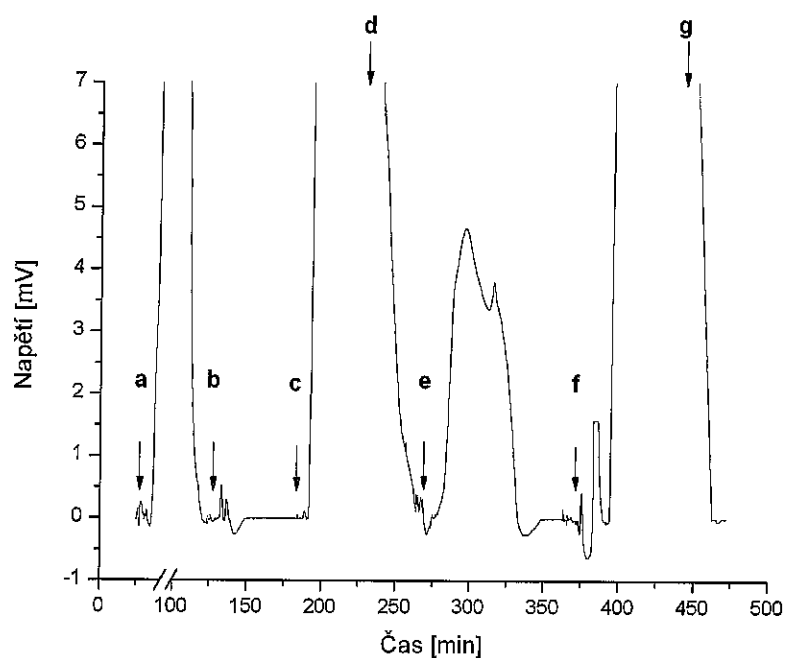
Obrázek 12: Stanovení kapacity imunosorbentu (4 mg IgG).

Podmínky chromatografie: 1 mg OVA aplikován na 2 ml imunosorbentu (4 mg IgG) v pufru **a** (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem OVA 1 hodinu. Eluce roztoky: **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (0,12 M imidazol v PBS), **d** (PBS), **e** (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), **f** (4–6 M močovina) a **g** (PBS). Roztoky **c** a **f** absorbují při 280 nm. Podle výsledků SDS-PAGE není absorpce roztoků **c** a **f** způsobena přítomností proteinů.



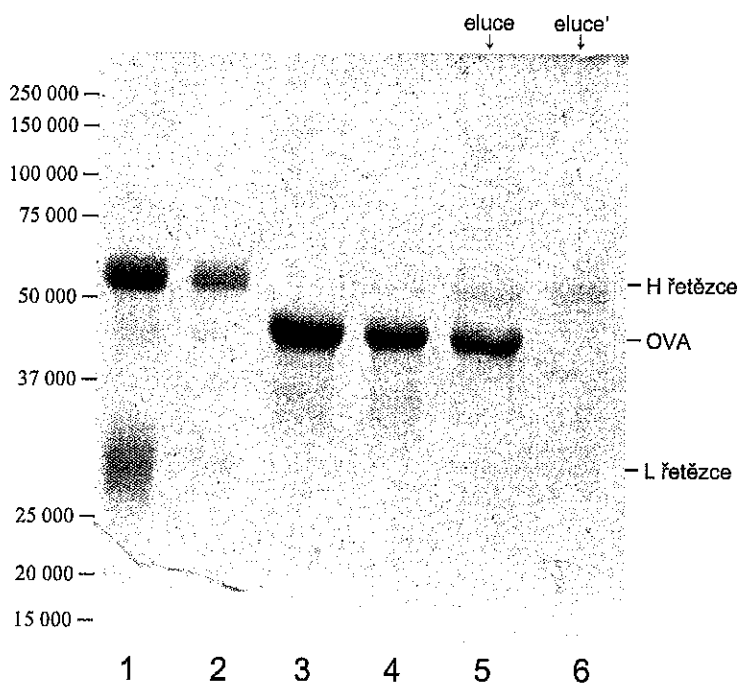
Obrázek 13: Stanovení kapacity imunosorbentu (7 mg IgG)

Podmínky chromatografie: 1 mg OVA aplikován na 2 ml imunosorbentu (7 mg IgG) v pufru **a** (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem OVA 1 hodinu. Eluce roztoky: **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (0,12 M imidazol v PBS), **d** (PBS), **e** (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), **f** (4–6 M močovina) a **g** (PBS). Roztoky **c** a **f** absorbují při 280 nm. Podle výsledků SDS-PAGE není absorpce roztoků **c** a **f** způsobena přítomností proteinů.



Obrázek 14: Stanovení kapacity imunosorbentu (13 mg IgG).

Podmínky chromatografie: 1 mg OVA aplikován na 2 ml imunosorbentu (13 mg IgG) v pufru **a** (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem OVA 1 hodinu. Eluce roztoky: **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (0,12 M imidazol v PBS), **d** (PBS), **e** (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), **f** (4–6 M močovina) a **g** (PBS). Roztoky **c** a **f** absorbují při 280 nm. Podle výsledků SDS-PAGE není absorpce roztoků **c** a **f** způsobena přítomností proteinů.

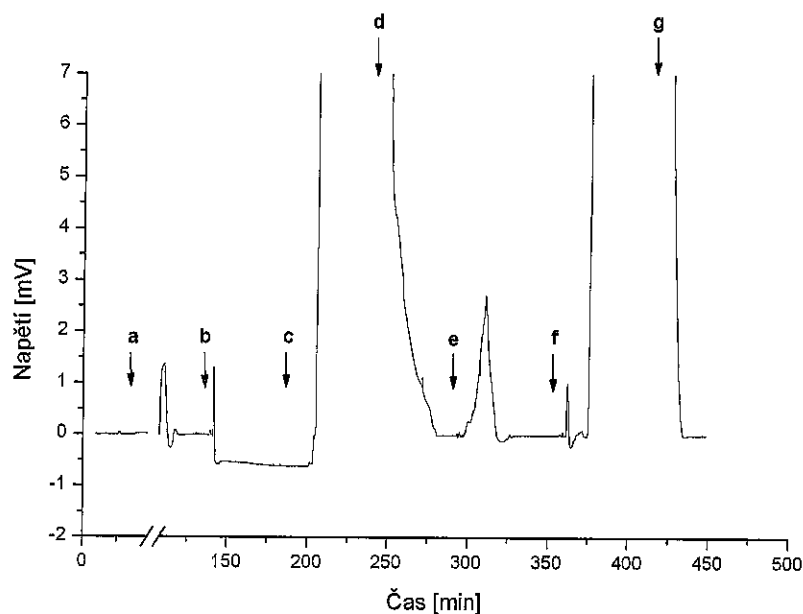


Obrázek 15: SDS-PAGE. Stanovení kapacity imunosorbentu (s 13 mg IgG).

1) anti-OVA IgG použité pro imobilizaci, 2) anti-OVA IgG nenavázané na imunosorbent, 3) OVA nanesený na na imunosorbent, 4) OVA nenavázaný na imunosorbent, 5) OVA uvolněný z imunosorbentu elučním pufrem A (pH 2,8), 6) frakce eluovaná z imunosorbentu 6 M močovinou

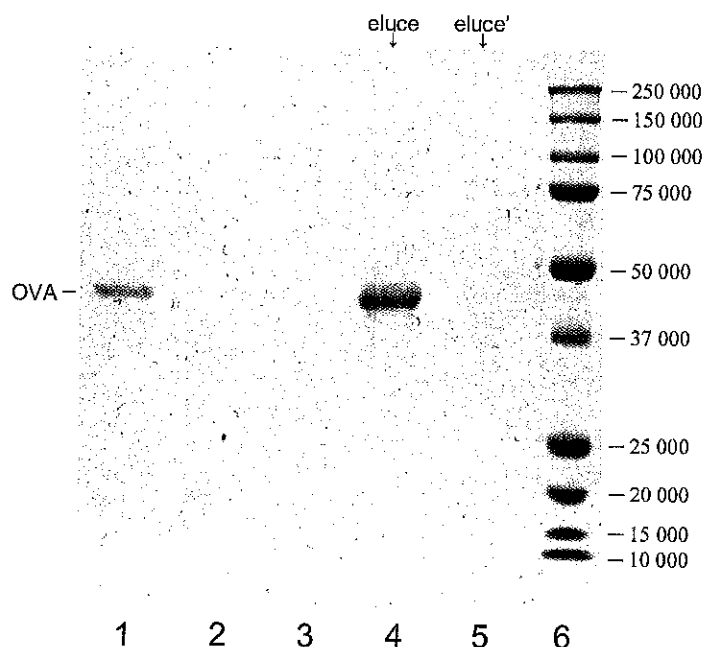
Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μ l vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Obrázek 16 ukazuje chromatogram získaný při stanovení výtěžku ovalbuminu a na obrázku 17 je SDS-PAGE jednotlivých frakcí proteinů. Vzhledem k dosaženému výtěžku (97 %) lze eluci adsorbovaného ovalbuminu považovat za kompletní.



Obrázek 16: Průběh afinitní chromatografie při stanovení výtěžku ovalbuminu.

Podmínky chromatografie: 0,1 mg OVA aplikováno na 2 ml imunosorbentu (13 mg IgG) v pufru a (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem OVA 1 hodinu. Eluce roztoky: b (1 M NaCl v PBS), c (0,12 M imidazol v PBS), d (PBS), e (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), f (4–6 M močovina) a g (PBS). Roztoky c a f absorbují při 280 nm. Podle výsledků SDS-PAGE není absorpce roztoků c a f způsobena přítomností proteinů.



Obrázek 17: SDS-PAGE. Stanovení výtěžku ovalbuminu.

1) OVA nanesený na na imunosorbent, 2) OVA nenavázaný na imunosorbent, 3) frakce uvolněná z imunosorbentu promytím roztokem imidazolu, 4) OVA uvolněný z imunosorbentu elučním pufrům A (pH 2,8), 5) frakce eluovaná z imunosorbentu 6 M močovinou, 6) standard relativních molekulových hmotností

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μ l vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

5.2.1.4 Afinitní purifikace slepičí anti-BSA IgY

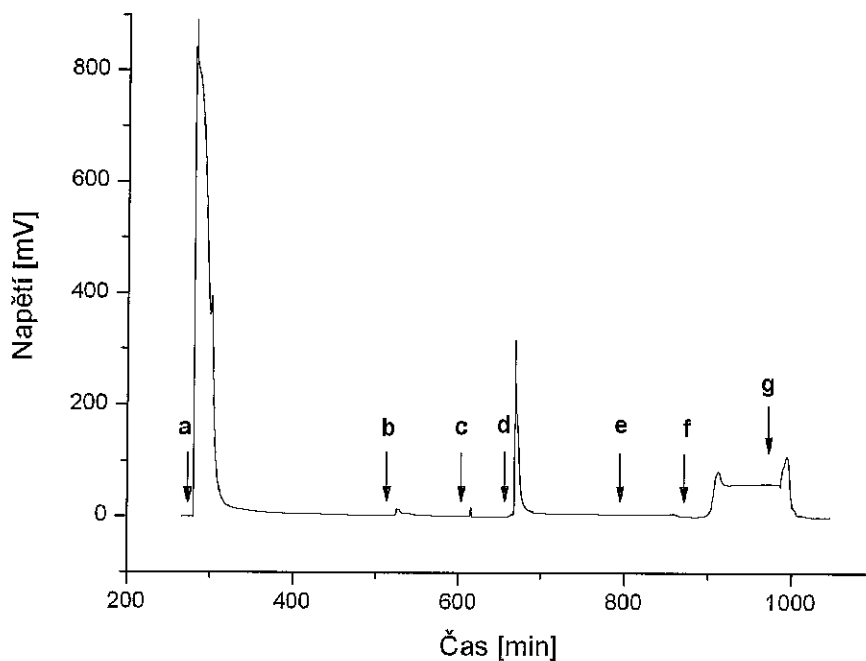
Pomocí afinitní purifikace byla separována frakce protilátek, která byla následně použita pro přípravu imunosorbentu. Z polyspecifické slepičí anti-BSA IgY byla na nosiči s imobilizovaným BSA (kapitola 4.3.4.6) separována monospecifická frakce anti-BSA IgY. Průběh afinitní purifikace je shrnut v tabulce 5 a na obrázcích 18 a 19.

Protein	Frakce proteinů při afinitní purifikaci	Množství proteinů vnesených / eluovaných
BSA	BSA vnesené na CNBr-aktiv. Sepharosu	20 mg (100 %)
	BSA navázané na CNBr-aktiv. Sepharosu	19 mg (96 %)
Anti-BSA IgY	Polyspecifická anti-BSA IgY vnesená na nosič s imob. BSA	258 mg (100 %)
	Monospecifická anti-BSA IgY eluovaná z nosiče 0,2 M glycinem pH 2,8; fr. 12–16	2,6 mg (1 %)
	Monospecifická anti-BSA IgY eluovaná z nosiče 0,2 M glycinem pH 2,8; fr. 17–22	0,3 mg (0,1 %)
	Monospecifická anti-BSA IgY eluovaná z nosiče 4 M guanidin/HCl; fr. 10–13	0,7 mg (0,3 %)
Nespecifická kontrolní IgY	Nespecifická kontrolní IgY vnesená na nosič s imob. BSA	191 mg (100 %)
	Monospecifická anti-BSA IgY eluovaná z nosiče 0,2 M glycinem pH 2,8	pod detekčním limitem

Tabulka 5: Množství proteinů vnesených / eluovaných z nosiče při afinitní purifikaci.

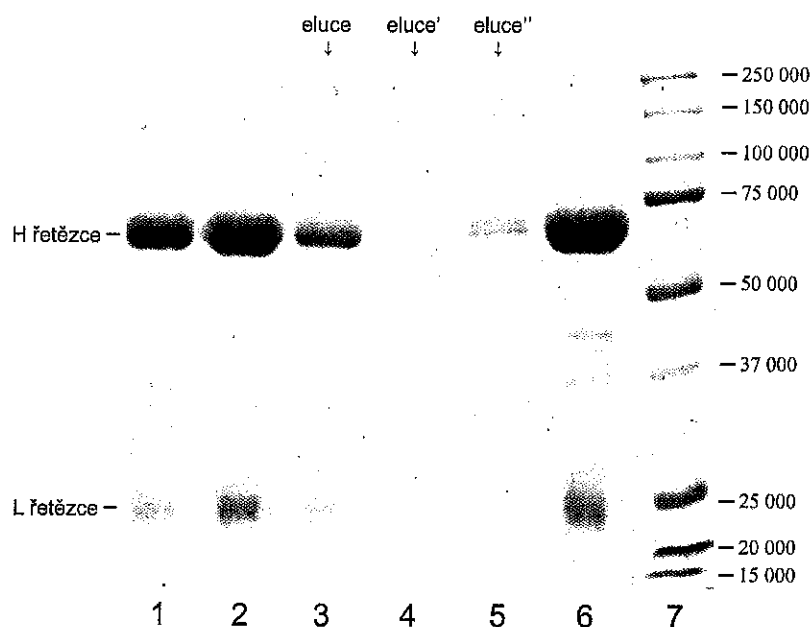
Poznámka: Množství imobilizovaného BSA bylo vypočteno z množství BSA nenavázaného na nosič. Koncentrace proteinů byla určena pomocí BCA stanovení [113]. Frakce anti-BSA IgY eluované glycinem byly podle hodnot $A_{280\text{ nm}}$ spojeny do dvou celků (fr. 12-16 a 17-22). Množství eluované monospecifické anti-BSA IgY bylo sledováno nejen u polyspecifické anti-BSA IgY ale i u nespecifické kontrolní IgY.

Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že obsah monospecifické anti-BSA IgY v původní polyspecifické protilátce byl asi 1–1,4 %. Tato hodnota se shoduje s hodnotou uváděnou i jinými autory [125, 126]. V kontrolní IgY, získané před imunizací slepice, nebyla monospecifická anti-BSA IgY nalezena. Obsah monospecifické protilátky v původní polyspecifické protilátce závisí nejen na použitém antigenu, na způsobu imunizace zvířete a na provedení izolace a afinitní purifikace protilátek, ale v neposlední řadě i na experimentálním zvířeti použitém pro produkci protilátek. U experimentálních zvířat závisí kvalita i kvantita produkovaných protilátek nejen na odlišnostech jedinců v rámci druhu, ale především na druhu imunizovaných zvířat. V poslední době se stále více prosazují protilátky slepičí, neboť slepice jsou schopny relativně levně produkovat velké množství specifických protilátek [75].



Obrázek 18: Chromatogram afinitní purifikace anti-BSA IgY.

Podmínky chromatografie: 258 mg *anti-BSA IgY* aplikováno na 16 ml CNBr-Sepharosy (s 20 mg BSA) v pufru **a** (PBS), inkubace nosiče s roztokem *anti-BSA IgY* 3 hodiny. Eluce roztoky: **a**, **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (PBS), **d** (0,2 M glycinový pufr, pH 2,8), **e** (PBS), **f** (4 M guanidin/HCl) a **g** (PBS). Roztok **g** absorbuje při 280 nm.



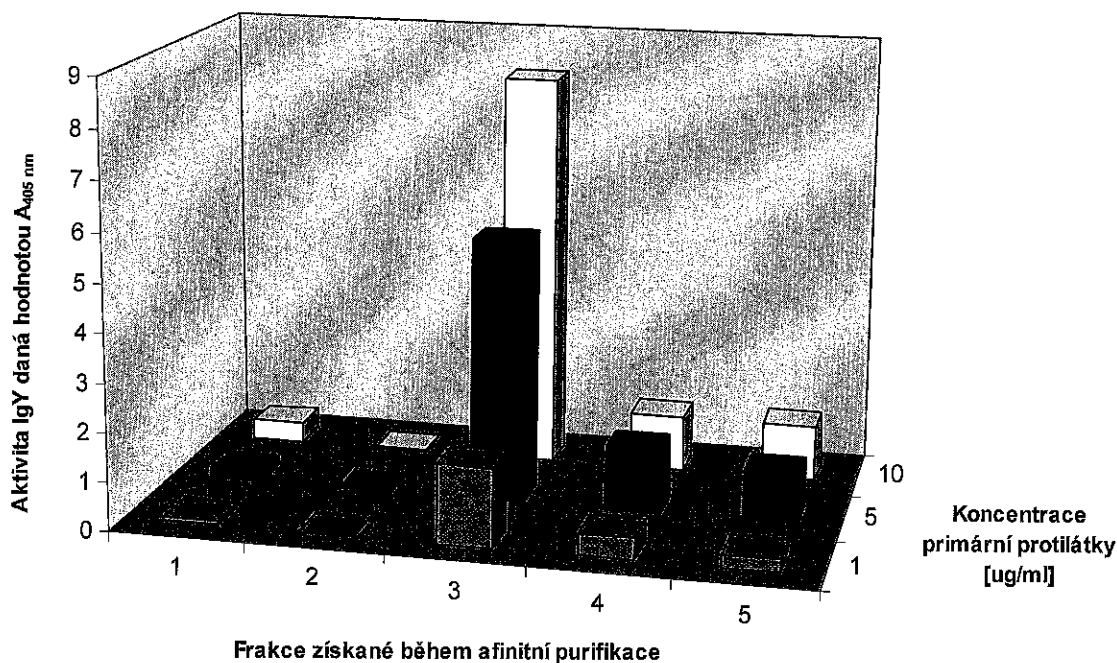
Obrázek 19: SDS-PAGE afinitní purifikace anti-BSA IgY.

1) slepičí anti-BSA IgY před afinitní purifikací, 2) anti-BSA IgY nenavázané na afinitní nosič, 3) anti-BSA IgY eluované z afinitního nosiče 0,2 M glycinem (fr. 12–16), 4) anti-BSA IgY eluované z afinitního nosiče 0,2 M glycinem (fr. 17–22), 5) anti-BSA IgY eluované z afinitního nosiče 4 M guanidiniu/HCl (fr. 10–13), 6) kontrolní slepičí anti-BSA IgY získaná před imunizací slepice, 7) standard relativních molekulových hmotností

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μ l vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

5.2.1.5 Stanovení aktivity afinitně purifikované anti-BSA IgY pomocí ELISA testu

ELISA testem (viz kapitola 4.4.1) byla orientačně určena aktivita specifické protilátky získané afinitní purifikací. Obrázek 20 ukazuje výsledky ELISA testu. Uvedené hodnoty $A_{405\text{nm}}$ jsou již po odečtení hodnot $A_{405\text{nm}}$ naměřených u kontrolní protilátky při odpovídající koncentraci proteinu.



Obrázek 20: ELISA test frakcí získaných během afinitní purifikace anti-BSA IgY.

1) IgY před afinitní purifikací, 2) IgY nenavázané na afinitní nosič, 3) IgY eluovaná 0,2 M glycinem, frakce 12–16, 4) IgY eluovaná 0,2 M glycinem, frakce 17–22, 5) IgY eluovaná 4 M guanidin hydrochloridem, frakce 10–13

Podmínky ELISA testu: antigen – BSA, 100 μl , 4 pmol/ml; primární protilátka – jednotlivé frakce získané během afinitní purifikace anti-BSA IgY; sekundární protilátka – králičí anti-(chicken IgY) IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou; chromogenní substrát – PNPP

Z výsledků ELISA testu vyplývá:

- Aktivita protilátky nenavázané na afinitní nosič je téměř nulová. Veškerá specifická IgY se tedy navázala na afinitní nosič. Kapacita afinitního nosiče s imobilizovaným BSA nebyla překročena.
- Porovnáním hodnot absorpance $A_{405\text{ nm}}$ protilátky před afinitní purifikací a protilátky eluované 0,2 M glycinem (fr. 12–16) bylo stanoveno, že aktivita frakcí 12–16 eluovaných glycinem se oproti původní protilátce zvýšila přibližně 23krát. Spojené frakce 12–16 byly dále použity pro přípravu imunosorbentu.
- Obdobně bylo stanoveno, že aktivita protilátky eluované 0,2 M glycinem (fr. 17–22) se zvýšila asi 6krát a aktivita protilátky eluované 4 M guanidin hydrochloridem (fr. 10–13) se zvýšila asi 4krát. Nízká aktivita frakcí 17–22 eluovaných glycinem byla způsobena spojením frakcí mimo hlavní eluční vrchol specifické protilátky. Nízká aktivita frakcí eluovaných 4 M guanidin hydrochloridem (fr. 10–13) byla pravděpodobně zapříčiněna denaturačním efektem guanidin hydrochloridu a

nedostatečnou zpětnou renaturací protilátky během dialýzy. Množství monospecifické protilátky ve frakcích 17–22 eluovaných glycinem a ve frakcích eluovaných 4 M guanidin hydrochloridem bylo relativně malé, a proto tyto frakce protilátky nebyly použity pro přípravu imunosorbentu.

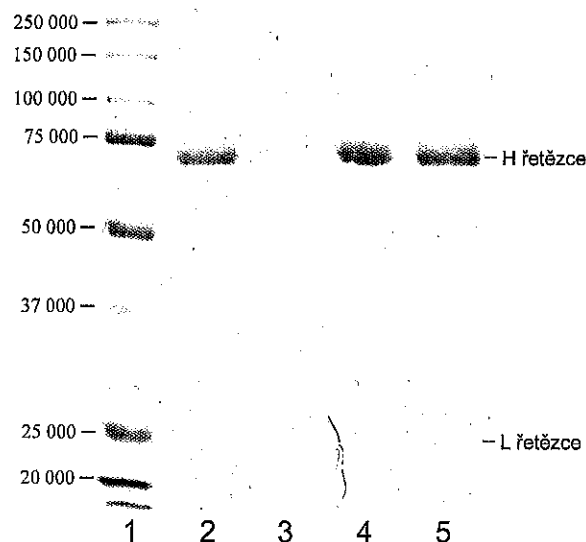
5.2.1.6 Imunoafinitní chromatografie BSA na nosiči se slepičí anti-BSA IgY

Postupem popsáním v kapitole 4.3.4.7 byl připraven imunosorbent s imobilizovanou slepičí anti-BSA IgY. Protilátky vnesené / nenavázané na Co^{3+} -IDA-Agarosu byly sledovány pomocí SDS-PAGE (viz obrázek 21). Schopnost připraveného imunosorbentu vázat příslušný antigen (BSA) byla studována pomocí afinitní chromatografie. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Třída protilátky	afinitně purifikovaná anti-BSA IgY	nespecifická kontrolní IgY
Zdroj	slepice (vaječný žloutek)	slepice (vaječný žloutek)
Množství protilátky vnesené na Co^{3+} -IDA-Agarosu	3,7 mg	3,9 mg
Množství protilátky navázané na Co^{3+} -IDA-Agarosu	2,6 mg (70 %)	1,5 mg (38 %)
Množství BSA vnesené na imunoafinitní nosič	1 mg	1 mg
Množství BSA eluované z imunoafinitního nosiče	pod detekčním limitem	pod detekčním limitem

Tabulka 6: Příprava imunosorbentu a afinitní chromatografie BSA.

Poznámka: Množství imobilizované protilátky bylo vypočteno z množství protilátky nenavázané na nosič. Koncentrace proteinů byla určena pomocí BCA stanovení [113]. Množství BSA nenavázané na imunoafinitní nosič ~ 1 mg. Eluční roztok: 0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8.



Obrázek 21: SDS-PAGE protilátek vnesených / nenavázaných na Co^{3+} -IDA-Agarosu.

1) standard relativních molekulových hmotností, 2) slepičí anti-BSA IgY použité pro imobilizaci, 3) anti-BSA IgY nenavázané na imunosorbent, 4) kontrolní slepičí IgY použité pro imobilizaci, 5) kontrolní slepičí IgY nenavázané na imunosorbent

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

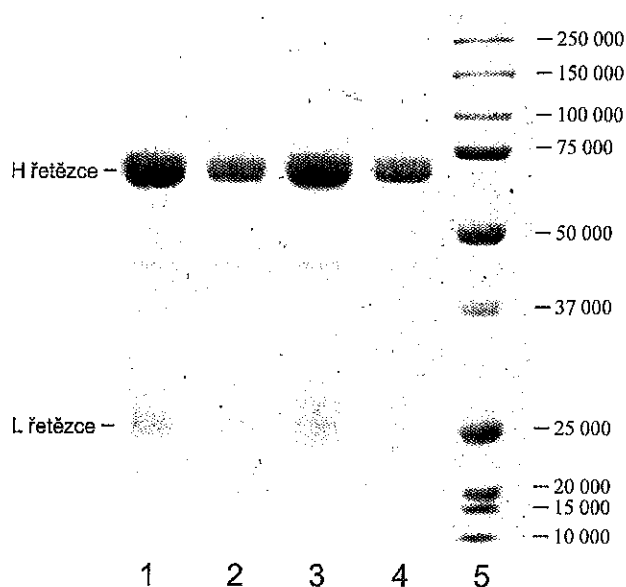
Afinitní chromatografie neposkytla detekovatelné množství eluovaného BSA. Příčinou mohly být:

- Imunitní odpověď laboratorního zvířete na hovězí sérový albumin nemusela být dostačující, neboť albumin je protein evolučně konzervovaný [127-129].
- Kromě evoluční blízkosti použitého antigenu mohla být funkčnost protilátek ovlivněna způsobem imunizace laboratorních zvířat, provedením izolace a afinitní purifikace protilátky, a v neposlední řadě i konkrétním experimentálním zvířetem použitým pro produkci protilátky. Konstanty stability imunokomplexů mohly být v důsledku výše uvedených faktorů pro stabilní vazbu antigenu příliš nízké [103, 130, 131]. Na druhou stranu, schopnost afinitně purifikované slepičí anti-BSA IgY rozpoznat antigen byla prokázána pomocí ELISA testu (viz kapitola 5.2.1.5). Rozdíly ve schopnosti protilátky rozpoznávat antigen při imunoafinitní chromatografii a při ELISA testu mohly být způsobeny různou sterickou přístupností antigenních míst na protilátce a vyšší citlivostí ELISA testu danou násobením signálu při vzniku ternárního imunokomplexu.

- Množství protilátky imobilizované na nosič mohlo být nedostatečné (2,6 mg slepičí anti-BSA IgY na 4 ml nosiče). Literatura však obecně uvádí spíše menší množství protilátky použité pro přípravu imunoafinitních nosičů [48, 87, 88, 103, 132, 133]. Běžně se setkáváme s množstvím 2 až 5 mg protilátky na 1 ml nosiče. Výjimečná však nejsou ani množství imobilizované protilátky menší než 1 mg na 1 ml nosiče [67]. S rostoucím množstvím imobilizované protilátky totiž vzrůstá riziko sterického bránění při vazbě antigenu na protilátku. Na sterické bránění má vliv i obsah specifické protilátky ve vzorku imobilizované protilátky, nepřítomnost pantové oblasti u slepičí IgY a velikost příslušného antigenu [56, 57, 73, 130, 134].

Aby mohlo být určeno, proč nosič (s afinitně purifikovanou anti-BSA IgY) nenavázal detekovatelné množství BSA, byl postupem popsáním v kapitole 4.3.4.7 připraven jiný imunoafinitní nosič (2 ml) s imobilizovanou polyspecifickou afinitně nepurifikovanou slepičí anti-BSA IgY

Protilátky vnesené / nenavázané na Co^{3+} -IDA-Agarosu byly sledovány pomocí SDS-PAGE (viz obrázek 22). Schopnost nově připraveného imunosorbentu vázat příslušný antigen (BSA) byla studována pomocí afinitní chromatografie. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.



Obrázek 22: SDS-PAGE protilátek vnesených / nenavázaných na Co^{3+} -IDA-Agarosu.

1) kontrolní slepičí IgY použité pro imobilizaci, 2) kontrolní slepičí IgY nenavázané na imunosorbent, 3) afinitně nepurifikované slepičí anti-BSA IgY použité pro imobilizaci, 4) afinitně nepurifikované anti-BSA IgY nenavázané na imunosorbent, 5) standard relativních molekulových hmotností.

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Třída protilátky	polyspecifická afinitně nepurifikovaná anti-BSA IgY	nespecifická kontrolní IgY
Zdroj	slepice (vaječný žloutek)	slepice (vaječný žloutek)
Množství protilátky vnesené na Co ³⁺ -IDA-Agarosu	13 mg	11 mg
Množství protilátky navázané na Co ³⁺ -IDA-Agarosu	7 mg (50 %)	3 mg (29 %)
Množství BSA vnesené na imunoafinitní nosič	1 mg	1 mg
Množství BSA eluované z imunoafinitního nosiče	pod detekčním limitem	pod detekčním limitem

Tabulka 7: Afinitní chromatografie na imunosorbentu s afinitně nepurifikovanou slepičí anti-BSA IgY.

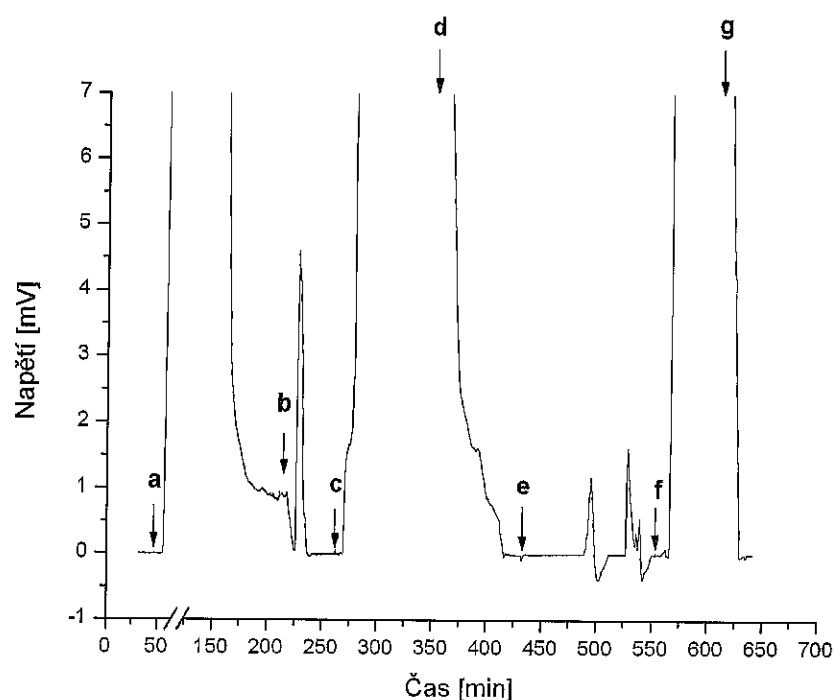
Poznámka: Množství imobilizované protilátky bylo vypočteno z množství protilátky nenavázané na nosič. Koncentrace proteinů byla určena pomocí BCA stanovení [113]. Množství BSA nenavázané na imunoafinitní nosič ~ 1 mg. Eluční roztok: 0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8.

Pomocí afinitní chromatografie na nosiči s polyspecifickou afinitně nepurifikovanou slepičí anti-BSA IgY bylo ověřeno, zda nedošlo k poškození vazebných schopností slepičí anti-BSA IgY během afinitní purifikace. Jelikož v eluátu z nosiče s afinitně nepurifikovanou slepičí anti-BSA IgY nebylo nalezeno BSA, lze se domnívat, že příčinou nedostatečné vazby BSA na IgY není poškození IgY během afinitní purifikace. Množství 7 mg afinitně nepurifikované slepičí anti-BSA IgY by mělo být postačující k adsorpci detekovatelného množství antigenu. Analogicky připravený imunoafinitní nosič s přibližně 7 mg imobilizované králičí anti-OVA IgG poskytl při eluci asi 0,15 mg antigenu (viz kapitola 5.2.13).

Jak již bylo zmíněno, slepičí IgY se od savčích IgG liší v mnoha ohledech. IgY například mají čtyři konstantní domény na těžkých řetězcích, ale na rozdíl od IgG postrádají pantovou oblast. To může být nejen příčinou nižší efektivity vazby IgY na Co³⁺-

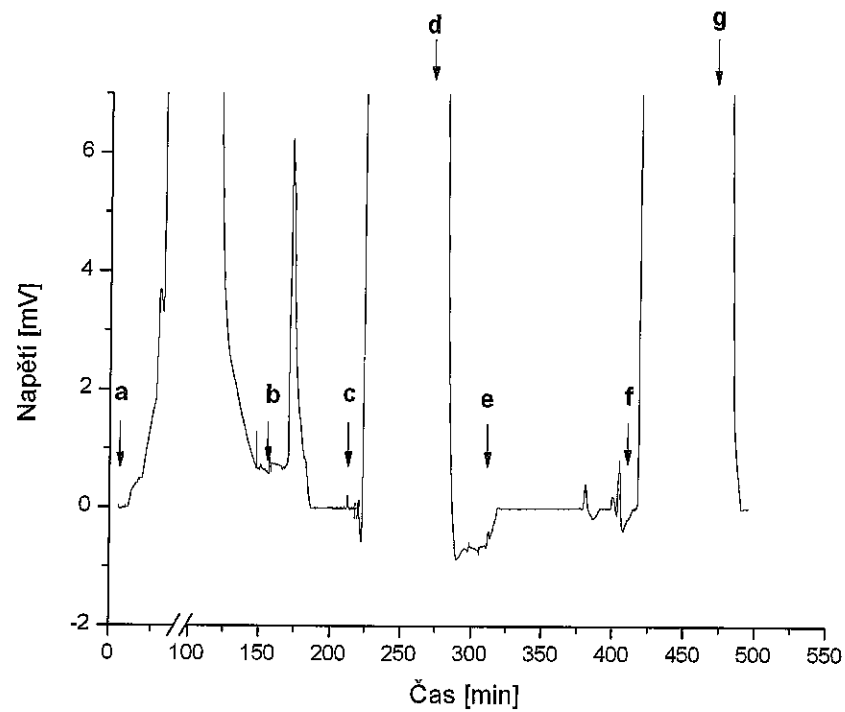
IDA-Agarosu, ale i příčinou nedostatečných vazebných vlastností připraveného imunosorbentu.

Chromatogramy získané při afinitní chromatografii daných imunosorbentů jsou na obrázcích 23 až 25. Afinitní chromatografie na jednotlivých imunosorbentech byly rovněž sledovány pomocí SDS-PAGE (viz obrázek 26).



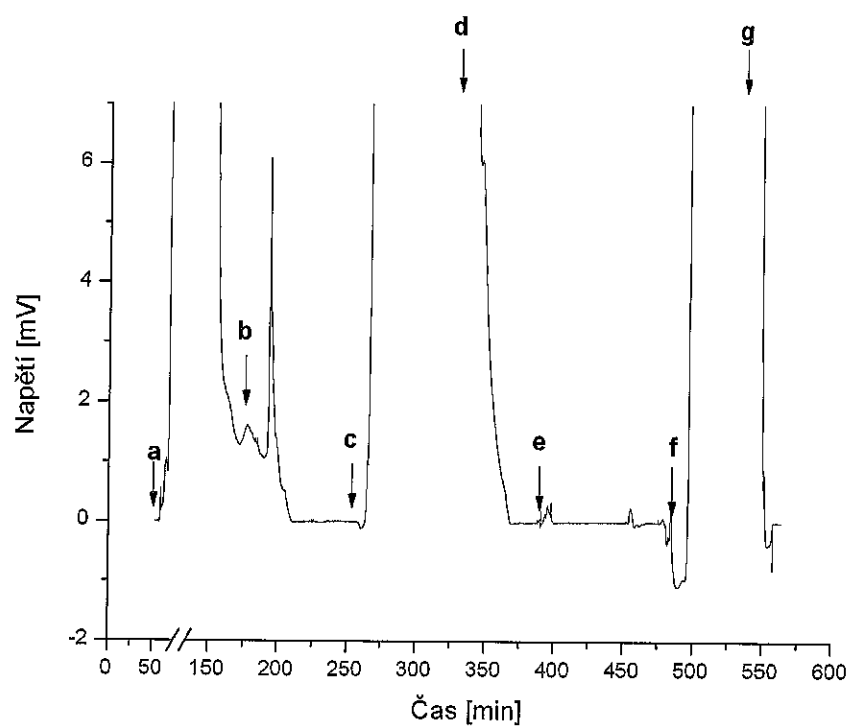
Obrázek 23: Průběh chromatografie na imunosorbentu se 3 mg slepičí afinitně purifikované anti-BSA IgY.

Podmínky chromatografie: 1 mg BSA aplikován na 4 ml imunosorbentu v pufru **a** (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem BSA 1 hodinu. Eluce roztoky: **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (0,12 M imidazol v PBS), **d** (PBS), **e** (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), **f** (4–6 M močovina) a **g** (PBS). Roztoky **c** a **f** absorbují při 280 nm. Pík viditelný při promývání nosiče roztokem **b** je způsoben příměsí neobsahující bílkovinu.



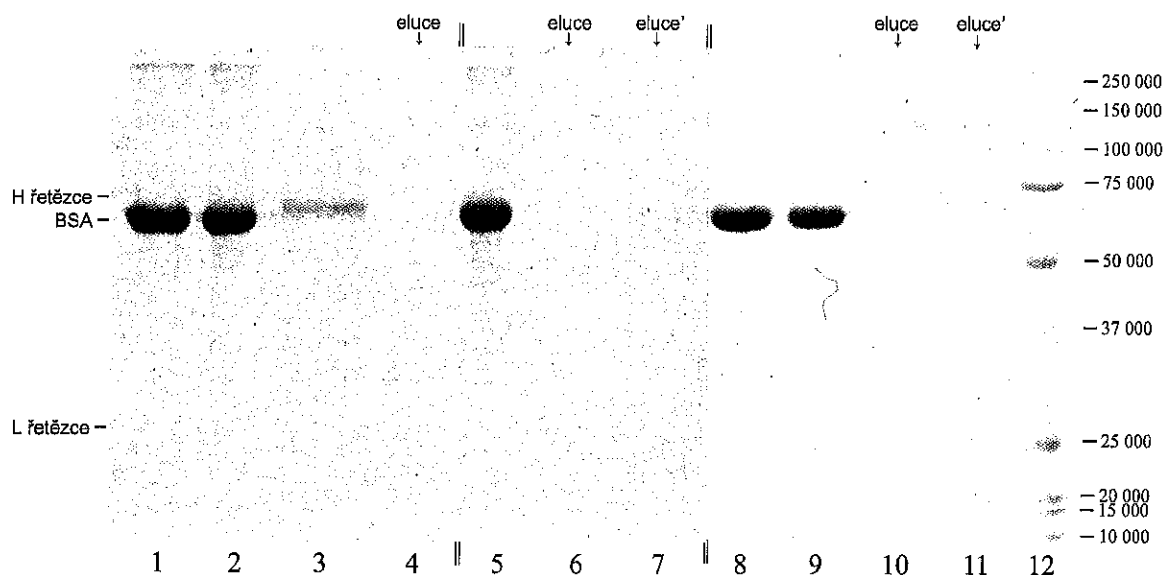
Obrázek 24: Průběh chromatografie na imunosorbentu se 3 mg slepičí nespecifické kontrolní IgY.

Podmínky chromatografie: 1 mg BSA aplikován na 2 ml imunosorbentu v pufru **a** (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem BSA 1 hodinu. Eluce roztoky: **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (0,12 M imidazol v PBS), **d** (PBS), **e** (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), **f** (4–6 M močovina) a **g** (PBS). Roztoky **c** a **f** absorbují při 280 nm. Pík viditelný při promývání nosiče roztokem **b** je způsoben příměsí neobsahující bílkovinu.



Obrázek 25: Průběh chromatografie na imunosorbentu se 7 mg slepičí afinitně nepurifikované anti-BSA IgY.

Podmínky chromatografie: 1 mg BSA aplikován na 2 ml imunosorbentu v pufru **a** (PBS), inkubace imunosorbentu s roztokem BSA 1 hodinu. Eluce roztoky: **b** (1 M NaCl v PBS), **c** (0,12 M imidazol v PBS), **d** (PBS), **e** (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8), **f** (4–6 M močovina) a **g** (PBS). Roztoky **c** a **f** absorbují při 280 nm. Pík viditelný při promývání nosiče roztokem **b** je způsoben příměsí neobsahující bílkovinu.



Obrázek 26: SDS-PAGE frakcí získaných po afinitní chromatografii imunosorbentů.

Nosič s kontrolní slepičí IgY: 1) BSA nanesené na nosič, 2) BSA nenávané na nosič, 3) kontrolní slepičí IgY inkubované s BSA a extrahované z nosiče, 4) frakce eluovaná z nosiče elučním puřem A (pH 2,8); *Nosič se slepičí anti-BSA IgY:* 5) BSA nanesené na nosič, 6) frakce eluovaná z nosiče 1 M NaCl v PBS, 7) frakce eluovaná z nosiče elučním puřem A (pH 2,8); *Nosič s afinitně nepurifikovaným anti-BSA IgY:* 8) BSA nanesené na nosič, 9) BSA nenávané na nosič, 10) frakce eluovaná z nosiče elučním puřem A (pH 2,8), 11) frakce eluovaná z nosiče 6 M močovinou, 12) standard relativních molekulových hmotností

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μ l vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

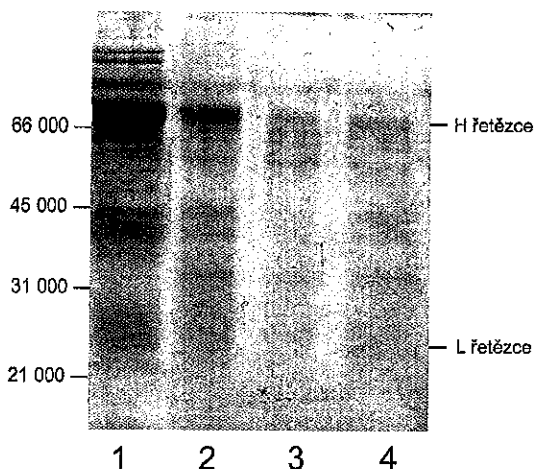
5.2.2 STUDIUM INTERAKCÍ MEZI MOLEKULAMI PROTILÁTEK A CHELATOVANÝMI IONTY KOBALTU

5.2.2.1 Vliv peroxidu vodíku na imobilizované protilátky

Připravě imunosorbentů a imunoafinitní chromatografii (viz 5.2.1) předcházely experimenty mající za cíl popsat vliv okolního prostředí na interakce mezi protilátkami a chelátovanými ionty kovů.

Předběžné pokusy při přípravě imunosorbentů podle metodiky popsané v literatuře [16] ukázaly, že po oxidaci imunosorbentu dochází k nežádoucímu uvolňování protilátky. Proto byl studován vliv používaného oxidačního činidla na imobilizované protilátky. Vliv peroxidu vodíku byl sledován na základě rozdílu v množství protilátky navázané na imunosorbent před / po oxidaci imunosorbentu peroxidem vodíku.

Slepičí protilátka byla imobilizována na Co^{2+} -IDA-Agarosu (viz kapitola 4.3.4.8). Navázalo se asi 88 % vnesené slepičí IgY (vypočteno na základě BCA stanovení [113] z množství protilátky nenavázané na nosič). Vzniklá IgY- Co^{2+} -IDA-Agarosa byla rozdělena na čtyři části. Jedna část byla ponechána jako vzorek imunosorbentu před oxidací, zbylé tři části IgY- Co^{2+} -IDA-Agarosy byly oxidovány na IgY- Co^{3+} -IDA-Agarosu pomocí peroxidu vodíku (0,01-0,05%). Z výsledků SDS-elektroforézy (viz obrázek 27) lze vyvodit, že množství protilátky na jednotlivých imunosorbentech klesá s rostoucí koncentrací H_2O_2 použitého k oxidaci. Vzhledem k rozsahu, v jakém došlo k uvolnění protilátky z imunosorbentu, nebyla pro oxidaci IgY- Co^{2+} -IDA-Agarosy použita ani nejnižší (0,01%) uvedená koncentrace H_2O_2 .



Obrázek 27: SDS-PAGE slepičí IgY imobilizované na Co^{2+} -IDA-Agarosu a ovlivněné rostoucí koncentrací H_2O_2 .

1) IgY extrahované z Co^{2+} -IDA-Agarosy před oxidací nosiče, 2) IgY extrahované z nosiče po oxidaci 0,01% H_2O_2 , 3) IgY extrahované z nosiče po oxidaci 0,03% H_2O_2 , 4) IgY extrahované z nosiče po oxidaci 0,05% H_2O_2

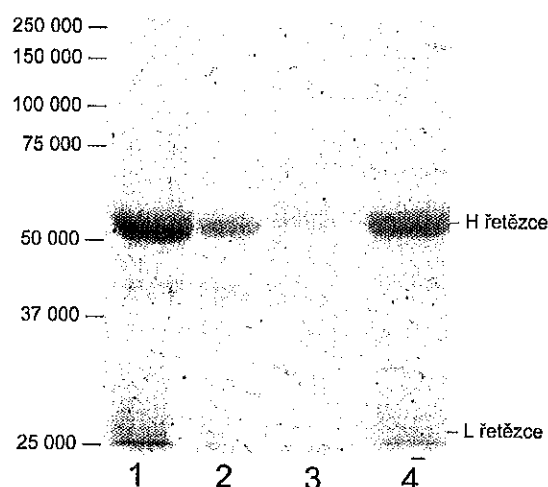
Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Abychom omezili oxidační působení H_2O_2 na imobilizované protilátky, byl v naší laboratoři modifikován postup přípravy imunosorbentu popsáný v literatuře [16]. Postup popsáný v literatuře [16, 48, 135, 136] využíval imobilizaci protilátek na nosič s chelatovanými Co^{2+} ionty a následnou oxidací imunosorbentu 0,03% peroxidem vodíku. Nový postup spočíval v oxidaci Co^{2+} -IDA-Agarosy na Co^{3+} -IDA-Agarosu ještě před aplikací protilátky (viz kapitola 4.3.4.1).

Pokud oxidace chelatovaných Co^{2+} iontů neproběhne kompletně, zvyšuje se při následné imunoafinitní chromatografii riziko nespecifické vazby proteinů. Proto byl k oxidaci Co^{2+} -IDA-Agarosy použit 0,05% roztok peroxidu vodíku. Měřením $^1\text{H-NMR}$ spekter bylo prokázáno, že použití 0,03% – 0,05% peroxidu vodíku poskytuje kompletní oxidaci chelatovaných iontů kobaltu (J. Rohovec, nepublikované výsledky, konkrétní data viz dodatek na straně 82). Nový postup přípravy imunosorbentu tedy umožnil úplnou oxidaci chelatovaných Co^{2+} iontů, společně s omezením oxidačního poškození protilátky.

5.2.2.2 Porovnání imunoafinitních nosičů oxidovaných před nebo po vazbě protilátky

Porovnáním imunoafinitních nosičů oxidovaných před nebo po vazbě protilátky byl sledován vliv peroxidu vodíku na imobilizované protilátky. Rozdíl v přípravě imunosorbentů podle popsané metodiky [16] a podle našeho postupu spočíval v opačném pořadí oxidace nosiče a imobilizace protilátky (viz kapitola 4.3.4.9). Příprava imunosorbentů byla vyhodnocena SDS-elektroforézou (obrázek 28).



Obrázek 28: SDS-elektroforéza IgG navázaného na nosič před nebo po oxidaci nosiče.

1) IgG použité pro imobilizaci, 2) IgG extrahované z Co^{2+} -IDA-Agarosy před oxidací nosiče, 3) IgG extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosy po oxidaci nosiče, 4) IgG extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosy neovlivněné oxidací nosiče

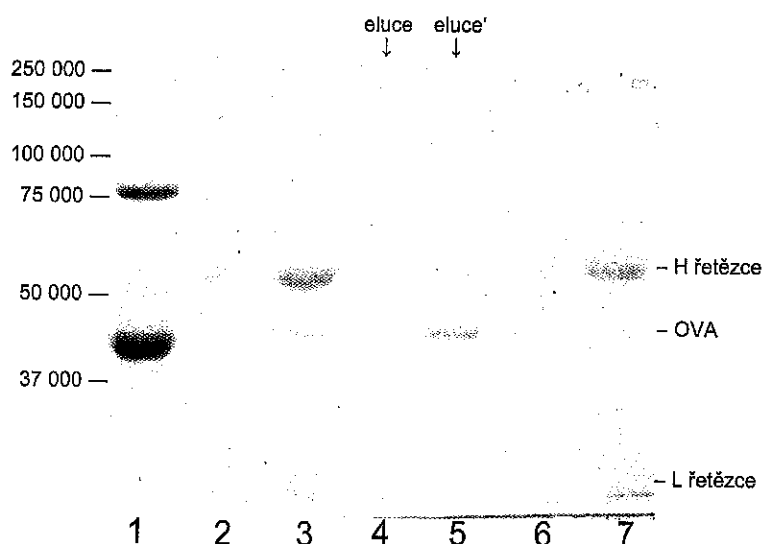
Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Množství imobilizované protilátky bylo určeno pomocí BCA stanovení z množství nenavázané protilátky.

Na Co^{3+} -IDA-Agarosu se navázalo 92 % aplikované anti-OVA IgG. Po promytí imunosorbentu roztoky imidazolu, EDTA a močoviny nebylo zaznamenáno snížení obsahu

IgG na nosiči (obr. 28, linie 4). Na Co^{2+} -IDA-Agarosu se navázalo 86 % aplikované anti-OVA IgG (obr. 28, linie 2). Po oxidaci na IgG- Co^{3+} -IDA-Agarosu byl nosič promyt roztoky imidazolu, EDTA a močoviny. Po oxidaci a promytí nosiče bylo zaznamenáno snížení obsahu IgG na nosiči (obr. 28, linie 3).

Schopnost připravených imunosorbentů vázat příslušný antigen (OVA) byla porovnána pomocí afinitní chromatografie vaječného bílku. Adsorbované proteiny byly uvolněny elučním roztokem A (0,2 M NaCl, pH upraveno 0,5 M HCl na 2,8). Frakce proteinů získané po chromatografii byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE (obrázek 29).



Obrázek 29: SDS-PAGE proteinů získaných po chromatografii vaječného bílku.

1) proteiny vaječného bílku, 2) IgG (ovlivněné oxidací nosiče) a OVA extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosu, 3) IgG (neovlivněné oxidací nosiče) a OVA extrahované z Co^{3+} -IDA-Agarosu, 4) OVA uvolněný z nosiče (s IgG ovlivněným oxidací) elučním pufrém A (pH 2,8), 5) OVA uvolněný z nosiče (s IgG neovlivněným oxidací) elučním pufrém A (pH 2,8), 6) IgG (ovlivněné oxidací) extrahované z nosiče po eluci OVA elučním pufrém A, 7) IgG (neovlivněné oxidací) extrahované z nosiče po eluci OVA elučním pufrém A

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

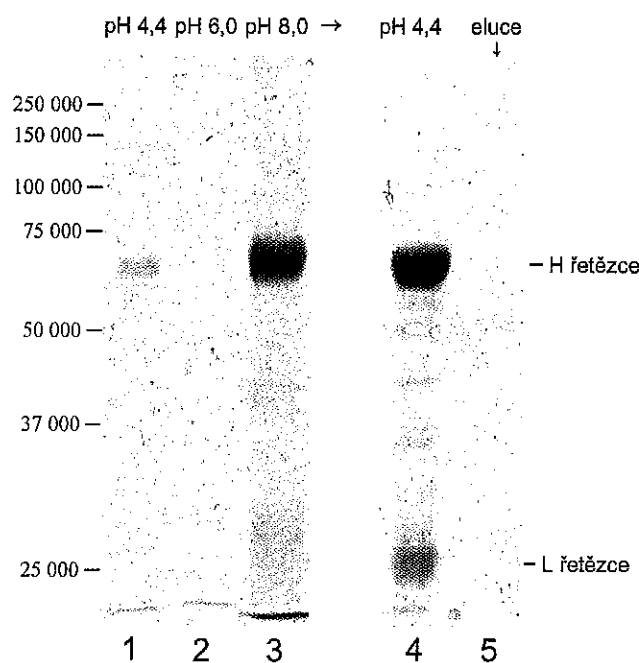
Z prvního imunosorbentu (anti-OVA IgG imobilizovaná po oxidaci nosiče) byl ovalbumin eluován elučním roztokem A (obr. 29, linie 5). Eluce ovalbuminu elučním roztokem A byla úplná, protože žádný ovalbumin nebyl nalezen po následné eluci 6 M močovinou. V eluovaných frakcích nebyly nalezeny kontaminující proteiny. První imunosorbent (s anti-OVA IgG imobilizovanou po oxidaci nosiče) byl úspěšně použit k separaci ovalbuminu.

Ve frakcích eluovaných z druhého imunosorbentu (anti-OVA IgG imobilizovaná před oxidací nosiče) nebylo nalezeno detekovatelné množství ovalbuminu (obr. 29, linie 4). Detekovatelné množství ovalbuminu nebylo z druhého imunosorbentu uvolněno ani 6 M močovinou.

Z uvedených výsledků plyne, že imunosorbent připravený podle našeho postupu rozpoznává, váže a následně i uvolňuje příslušný antigen.

5.2.2.3 Vliv pH vazebného pufru na imobilizaci protilátek

Je všeobecně uznáváno, že protilátky se na chelátované Co^{2+} ionty váží převážně koordinačně kovalentní vazbou [6]. Je však otázkou, jaký je charakter vazby mezi protilátkou a chelátovanými Co^{3+} ionty. Charakter vazby mezi slepičí IgY a Co^{3+} -IDA-Agarosou byl posuzován na základě vlivu pH. Vazba protilátky na Co^{3+} -IDA-Agarosu byla porovnána při pH 4,4; 6,0 a 8,0.



Obrázek 30: SDS-PAGE slepičí IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 4,4; 6,0 a 8,0.

1) IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 4,4 a extrahované z nosiče, 2) IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 6,0 a extrahované z nosiče, 3) IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 8,0 a extrahované z nosiče, 4) IgY (imobilizované při pH 8,0) po promytí Co^{3+} -IDA-Agarosu puftrem o pH 4,4 a extrakci z nosiče, 5) frakce uvolněná z nosiče promytím puftrem o pH 4,4

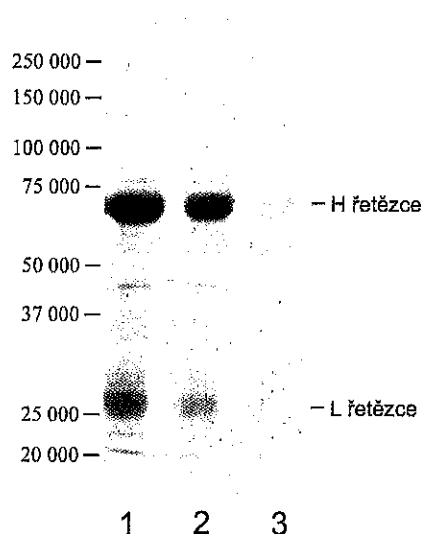
Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Z výsledků získaných pomocí SDS-elektroforézy (obr. 30) je patrné, že množství IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 8,0 je mnohonásobně vyšší než při pH 4,4 a 6,0. Minimální množství IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 4,4 a 6,0 je pravděpodobně důsledkem protonizace imidazolových skupin histidinových zbytků podílejících se na vazbě. Hodnoty pK imidazolových skupin histidinu se, v závislosti na okolních skupinách, pohybují v rozmezí hodnot 6 až 7 [121]. Postranní karboxylové skupiny (z Glu a Asp) mají hodnoty pK přibližně 4. Účast imidazolových skupin při vazbě IgY na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 8,0 nasvědčuje spíše koordinačnímu charakteru vazby, kdežto účast karboxylových skupin při pH 4,4 a 6,0 by nasvědčovala spíše iontovému charakteru vazby.

Významný podíl iontových interakcí při pH 8,0 byl vyloučen experimentem, kdy IgY navázaná na Co^{3+} -IDA-Agarosu při pH 8,0 byla vystavena pufru o pH 4,4 (viz kapitola 4.3.4.10). Jelikož působením pufru o pH 4,4 nedošlo k uvolnění navázané protilátky, lze usuzovat, že interakce mezi protilátkou a chelatovanými Co^{3+} ionty je spíše koordinačního charakteru.

5.2.2.4 Vliv kompetičního činidla na imobilizaci protilátek

Účast imidazolových skupin při vazbě slepičí IgY na Co^{3+} -IDA-Agarosu byla potvrzena kompetitivní inhibicí interakce. Interakce IgY s Co^{3+} -IDA-Agarosou probíhala v přítomnosti kompetujícího činidla (imidazolu). Výsledky vyhodnocené pomocí SDS-elektroforézy jsou prezentovány na obrázku 31. Vazba IgY na Co^{3+} -IDA-Agarosu byla v přítomnosti imidazolu minimální. To je v souladu s předpokladem, že k vazbě proteinů na chelatované ionty kobaltu dochází přes imidazolové skupiny histidinových zbytků [5-7, 9, 12, 14, 17, 19, 122].



Obrázek 31: SDS-PAGE slepičí IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti imidazolu.

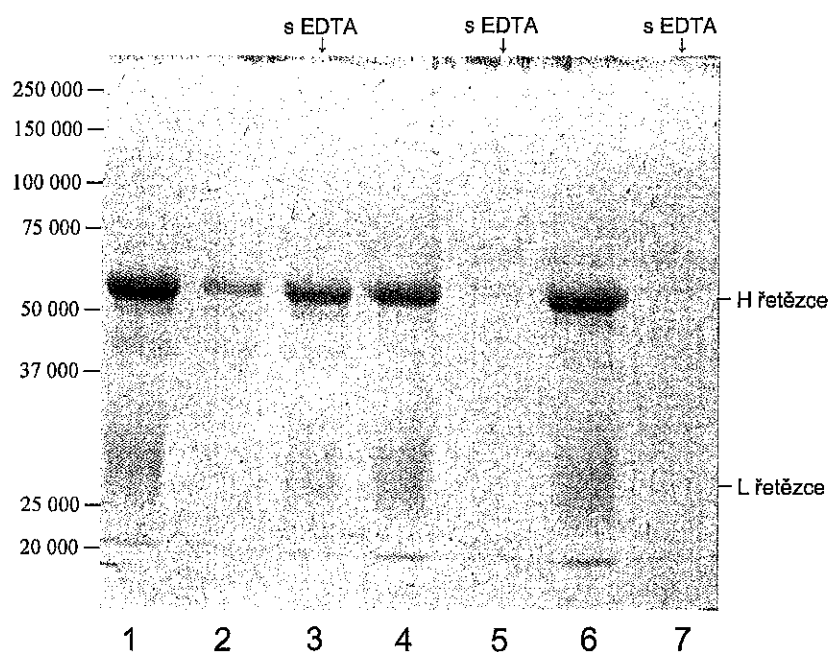
1) IgY použité pro imobilizaci, 2) IgY nenavázané na nosič v přítomnosti imidazolu, 3) IgY imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti imidazolu a extrahované z nosiče

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1-10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

5.2.2.5 Vliv chelatačního činidla na imobilizaci protilátek

Vliv chelatačního činidla ukázal, jak se molekuly Co^{3+} -IDA-Agarosu podílí na interakci s molekulami protilátek. Komplex Co^{3+} -IDA-Agarosu je totiž všeobecně považován za kineticky pomalý a k jeho interakci s molekulami protilátek by v reálné reakční době nemělo docházet. V dalších experimentech byl proto zkoumán vliv EDTA na interakci mezi IgG a Co^{3+} -IDA-Agarosou.

Nejprve byla porovnána vazba IgG na Co^{3+} -IDA-Agarosu v případě, kdy jeden z nosičů byl připraven jako obvykle a druhý byl před imobilizací protilátky promyt roztokem EDTA (viz kapitola 4.3.4.12). Výsledky (viz obrázek 32) jasně ukazují, že pokud bylo před imobilizací protilátky zařazeno promytí nosiče roztokem EDTA, žádná protilátka se na Co^{3+} -IDA-Agarosu nenavázala. Na kontrolní Co^{3+} -IDA-Agarosu, která nebyla před imobilizací IgG promyta roztokem EDTA, se navázalo 78 % aplikované IgG (určeno pomocí BCA stanovení [113]).



Obrázek 32: SDS-PAGE králičí IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti EDTA.

1) IgG použité pro imobilizace, 2) IgG nenavázané na nosič, 3) IgG nenavázané na nosič v přítomnosti EDTA, 4) IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu a extrahované z nosiče, 5) IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti EDTA a extrahované z nosiče, 6) IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu, po promytí imunosorbentu roztoky EDTA a močoviny a extrakci z nosiče, 7) IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti EDTA, po promytí imunosorbentu roztoky EDTA a močoviny a extrakci z nosiče
Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

Dále bylo studováno, jaký vliv má promytí komplexu IgG- Co^{3+} -IDA-Agarosu roztokem EDTA. Kontrolní nosič (s IgG imobilizovanou na Co^{3+} -IDA-Agarosu bez předchozího promytí roztokem EDTA) byl vystaven roztoku EDTA. Byl sledován případný úbytek IgG z nosiče. Jak je patrné z výsledků (obr. 32), IgG zůstala imobilizovaná na nosiči v obvyklém rozsahu. Zde bylo třeba najít vysvětlení, proč promytí Co^{3+} -IDA-Agarosu roztokem EDTA inhibovalo imobilizaci IgG, ale roztok EDTA neuvolnil z Co^{3+} -IDA-Agarosu již imobilizovanou IgG.

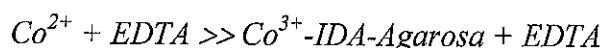
Vlastnosti Co^{3+} -IDA-Agarosu jsou shrnuty níže:

- oxidace Co^{2+} -IDA-Agarosu na Co^{3+} -IDA-Agarosu pomocí H_2O_2 proběhla kompletně (podle výsledků $^1\text{H-NMR}$)

- hodnota redox potenciálu reakce $Co^{3+} + e^- \rightarrow Co^{2+}$ byla řádově nižší, pokud ionty kobaltu byly chelátovány k IDA-Agarose, než pokud k IDA-Agarose chelátovány nebyly [137]

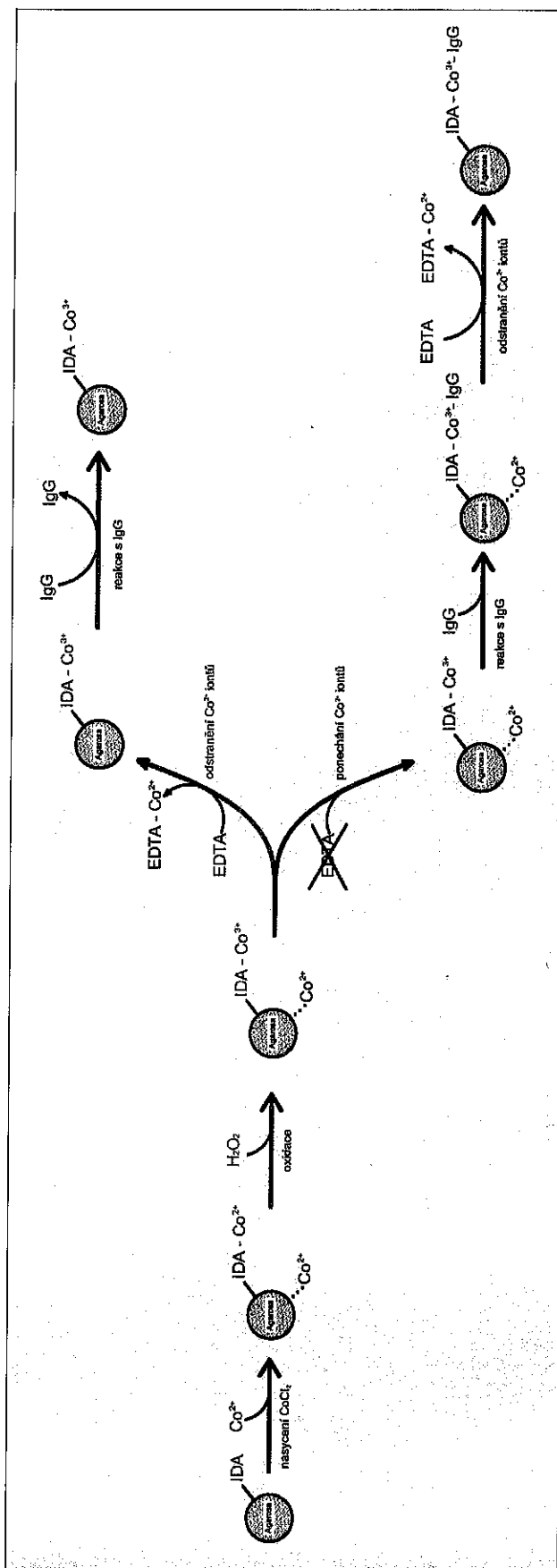


- ionty kobaltu byly roztokem EDTA z nosiče vymyty v řádově větším rozsahu, pokud byly přítomné jako nechelátované Co^{2+} ionty, než pokud byly přítomné jako oxidované Co^{3+} ionty chelátované k IDA-Agarose [115]



- IDA-Agarosa je nosič porézní, obsahující sacharidové skupiny. Lze předpokládat, že po nasycení IDA-Agarosy roztokem $CoCl_2$ došlo především k chelataci Co^{2+} iontů iminodioctovou kyselinou. Malé procento Co^{2+} iontů však nebylo chelátováno IDA-Agarosou. Tyto Co^{2+} ionty vnikly do pórů Agarosy, či se navázaly na hydroxylové skupiny sacharidových složek Agarosy, či v závislosti na pH, došlo k síťování mezi Co^{3+} -IDA-Agarosou a nechelátovanými Co^{2+} ionty.

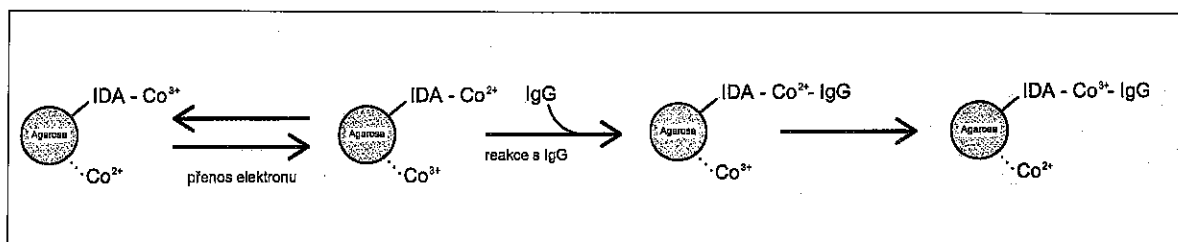
Výše uvedená fakta jsou shrnuta ve schématu (obrázek 33) znázorňujícím předpokládané interakce na Co^{3+} -IDA-Agarose. Z uvedených dat je zřejmé, že nechelátované Co^{2+} ionty, přítomné např. v pórech Agarosy či na jejich sacharidových složkách, mají klíčový význam při interakci protilátky s Co^{3+} -IDA-Agarosou.



Obrázek 33: Předpokládané interakce mezi molekulami protilátek, EDTA a Co^{3+} -IDA-Agarosou.

5.2.2.6 Vliv nechelatovaných Co^{2+} iontů na interakci mezi molekulami protilátek a Co^{3+} -IDA-Agarosou

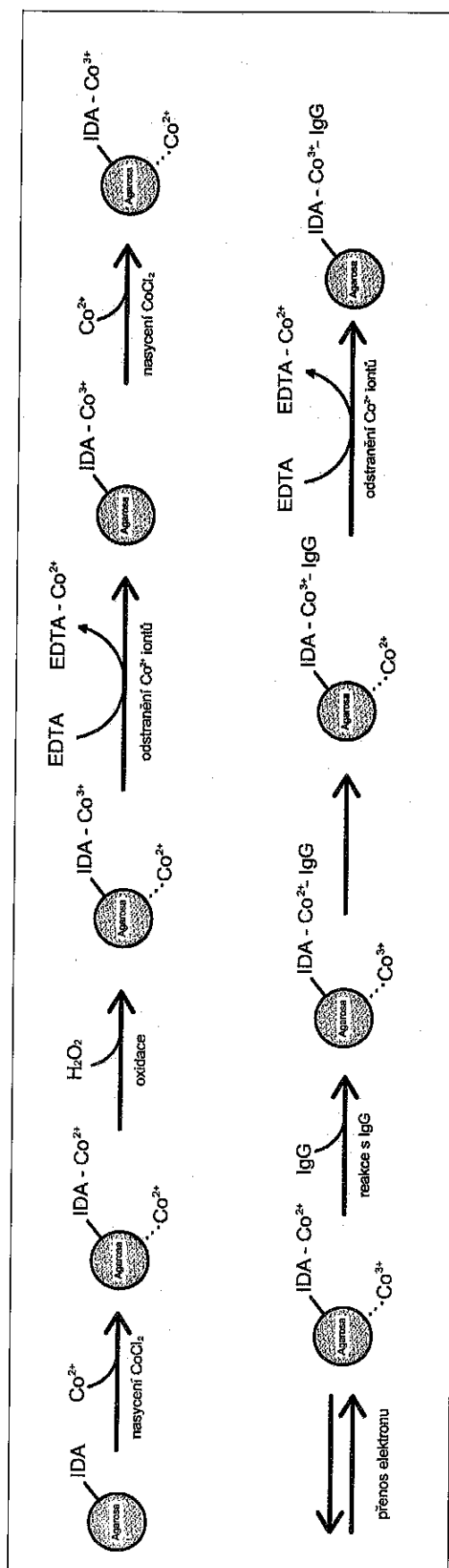
Lze předpokládat, že nechelatované Co^{2+} ionty katalyzují interakci mezi IgG a Co^{3+} -IDA-Agarosou. Co^{3+} -IDA-Agarosa (bez těchto iontů) je příliš kineticky pomalá a k interakci s IgG v reálném čase nedochází. Vzájemné interakce IgG s nechelatovanými Co^{2+} ionty a s Co^{3+} -IDA-Agarosou jsou schématicky znázorněny na obrázku 34. Podobný mechanismus katalytického přenosu elektronů byl již popsán v literatuře [138, 139].



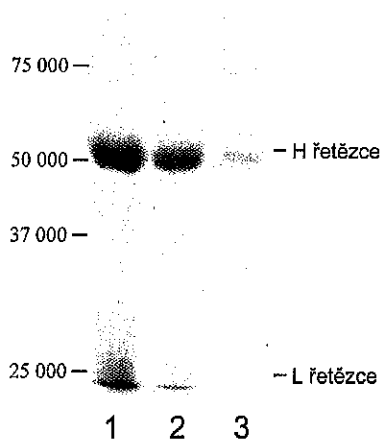
Obrázek 34: Předpokládané interakce mezi molekulami protilátek, nechelatovanými Co^{2+} ionty a Co^{3+} -IDA-Agarosou.

Nachelatované Co^{2+} ionty zprostředkují katalytický přenos elektronu ze svého elektronového obalu na Co^{3+} -IDA-Agarosu, čímž vznikají nechelatované Co^{3+} ionty a Co^{2+} -IDA-Agarosa, která je schopna vázat IgG. Po vazbě IgG na Co^{2+} -IDA-Agarosu opět dojde k přenosu elektronu. Vzniknou nechelatované Co^{2+} ionty a kineticky pomalý komplex IgG- Co^{3+} -IDA-Agarosy. Nachelatované Co^{2+} ionty pak katalyzují další reakci. Přenos elektronu probíhá pravděpodobně tzv. můstkovým mechanismem. Oba kovové ionty mohou být na okamžik spojeny ligandy (př. OH^- či Cl^-), které přechodně vytváří jakýsi můstek [140].

Katalytické vlastnosti nechelatovaných Co^{2+} iontů byly potvrzeny experimentem podle následujícího schématu (viz obrázek 35). Nachelatované ionty kobaltu byly z nosiče nejprve odstraněny roztokem EDTA. Vzápětí byly tyto ionty opět dodány pomocí roztoku CoCl_2 . Jak je patrné z výsledků SDS-PAGE (obr. 36) a ze stanovení koncentrace bílkovin [113], přítomnost nechelatovaných Co^{2+} iontů umožnila navázání IgG na Co^{3+} -IDA-Agarosu. Navázalo se 62 % protilátky aplikované na Co^{3+} -IDA-Agarosu. Menší množství takto imobilizované protilátky lze vysvětlit poměrně nízkou reakční rychlostí a rovnovážným mechanismem katalytické reakce mezi chelatovanými a nechelatovanými ionty kobaltu [140].



Obrázek 35: Schéma experimentu potvrzujícího katalytické vlastnosti nechelovaných Co^{2+} iontů.



Obrázek 36: SDS-PAGE králičí IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti nechelovaných Co^{2+} iontů.

1) IgG použité pro imobilizaci, 2) IgG nenavázané na nosič v přítomnosti nechelovaných Co^{2+} iontů, 3) IgG imobilizované na Co^{3+} -IDA-Agarosu v přítomnosti nechelovaných Co^{2+} iontů a extrahované z nosiče

Podmínky SDS-elektroforézy: 12,8% separační gel; 25 μl vzorku (1–10 mg proteinu) na komůrku; 180 V; 40–50 min.; laboratorní teplota; barveno Coomassie Brilliant Blue R-250.

6. ZÁVĚR

Pro imobilizaci a separaci proteinů byly použity dva systémy využívající chelatovaných iontů kobaltu:

I. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA IMOBILIZOVANÝCH KOBALTNATÝCH IONTECH (IMAC-Co²⁺)

- 1) Pomocí IMAC-Co²⁺ byly separovány myší jaterní proteiny indukované podáním chloridu kobaltnatého.
- 2) Separované proteiny byly charakterizovány pomocí SDS-PAGE a dvourozměrné elektroforézy. Elektroforetické zóny proteinů byly denzitometricky vyhodnoceny.
- 3) Relativní molekulová hmotnost proteinů, které byly indukovány chloridem kobaltnatým a zároveň separovány pomocí IMAC-Co²⁺, byla stanovena na 37 000, 32 000 a 26 000. Hodnota pI těchto proteinů se pohybovala v rozmezí 6,5 až 7,5.

II. IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE S PROTILÁTKAMI IMOBILIZOVANÝMI PŘES CHELATOVANÉ IONTY KOBALTU

- 1) Byl vypracován postup pro imobilizaci protilátek. Tento postup byl porovnán s postupem uvedeným v literatuře. Imunosorbent připravený naší technikou byl úspěšně použit k separaci antigenu.
- 2) Protilátky různých tříd (králíčí IgG, slepičí IgY a lidská IgE) byly imobilizovány na Co³⁺-IDA-Agarosu.
- 3) Králíčí anti-OVA IgG imobilizovaná na Co³⁺-IDA-Agarose rozpoznala a navázala ovalbumin. Ovalbumin byl při eluci úspěšně uvolněn.
- 4) Byla stanovena kapacita imunoafinitního nosiče a výtěžek ovalbuminu.
- 5) Protilátky nebyly z nosiče uvolněny roztoky EDTA, močoviny, dioxanu, imidazolu a pufrů o pH 2,5 a 11,0. Imunoafinitní nosič byl opakovaně použitelný.
- 6) Interakce mezi molekulami protilátek a chelatovanými ionty kobaltu byly vyhodnoceny jako převážně koordinačně kovalentní.
- 7) Bylo potvrzeno, že nechelatované Co²⁺ ionty, přítomné na nosiči, měly klíčový význam při interakci protilátky s Co³⁺-IDA-Agarosou.

7. DODATEK

Měřením ^1H -NMR spekter byla určena změna magnetické susceptibility nosičů před a po oxidaci (Co^{2+} -IDA-Agarosy a Co^{3+} -IDA-Agarosy) [J. Rohovec, nepublikované výsledky]. NMR spektra byla měřena pomocí upravené metody popsané v literatuře [141–143]. ^1H signál molekuly vody, která tvořila na nosiči solvatační obal, byl sledován na spektrometru Varian INOVA 400 (5 mm kyveta, 25°C). Chemický posun ^1H signálu naměřený pro Co^{2+} -IDA-Agarosu byl 6,593 ppm. Chemický posun ^1H signálu pro tentýž nosič po oxidaci byl 6,228 ppm. Z rozdílu chemických posunů $\Delta\delta (^1\text{H}) = 0,365$ byla spočtena změna magnetické susceptibility $\Delta\mu = 3$ BM. Hodnota $\Delta\mu$ byla vypočtena podle vzorců uvedených v literatuře [141–143]. Na základě získaných výsledků byl učiněn závěr, že oxidace Co^{2+} -IDA-Agarosy na Co^{3+} -IDA-Agarosu proběhla kompletně.

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. J. Turková, *Bioaffinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam **1993**.
2. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, 258, 598.
3. M.A. Vijayalakshmi, *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 71.
4. R.K. Scopes, *Protein Purification. Principles and Practise*. Springer-Verlag, New York **1994**.
5. G.S. Chaga, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1997**, 49, 313.
6. V. Gaberc-Porekar, V. Menart, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, 49, 335.
7. K.M. Gooding, Z. El Rassi, C. Horváth, *HPLC of Biological Makromolekules* (Gooding K. M., Regnier F. E., eds.), kap 6. Marcel Dekker, New York **2002**.
8. L.D. Holmes, M.R. Schiller, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **1997**, 20, 123.
9. J. Porath, *Trends Anal. Chem.* **1997**, 7, 254.
10. Z. Kučerová, *Chem. Listy* **1997**, 85, 526.
11. E.S. Hemdan, Y.J. Zhao, E. Sulkowski, J. Porath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 1811.
12. E. Sulkowski, *BioEssays* **1989**, 10, 170.
13. L. Anderson, E. Sulkowski, J. Porath, *J. Chromatogr.* **1992**, 604, 13.
14. D.Todorova-Balvay, O. Pitiot, M. Bourhim, T. Srikrishnan, M. Vijayalakshmi, *J. Chromatogr. B* **2004**, 808, 57.
15. M.C. Smith, T.C. Furman, T.D. Ingolia, C. Pidgeon, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 7211.
16. J.E. Hale, *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 46.
17. J.E. Hale, D.E. Beidler, *Anal. Biochem.* **1994**, 222, 29.
18. J. Porath, M. Belew, *Affinity Chromatography and Biological Recognition*, Academic Press, New York **1983**.
19. E.S. Hemdan, J. Porath, *J. Chromatogr.* **1985**, 323, 255.
20. G. Tishchenko, J. Dybal, K. Mészárosová, Z. Sedláková, M. Bleha, *J. Chromatogr. A* **2002**, 954, 115.
21. M.H. Klapper, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 78, 1018.
22. M. Piatibratov, S. Hou, A. Brooun, J. Yang, H. Chen, M. Alam, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1524, 149.
23. S.H. Hu, C.L. Gee, C.F. Latham, S.W. Rowlinson, U. Rova, A. Jones, J.A. Halliday, N.J. Bryant, D.E. James, J.L. Martin, *Protein Expr Purif.* **2003**, 31, 305.

24. C. Draveling, L. Ren, P. Haney, D. Zeisse, M.W. Qoronfleh, *Protein Expr Purif.* **2001**, 22, 359.
25. R.G. Pearson, *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3533.
26. L. Kagedal, *Protein Purification* (Janson J. C., Ryden L., eds.), str. 227 – 251. VCH, New York **1989**.
27. Z. El Rassi, M.D. Bacolod, *J. Chromatogr.* **1990**, 512, 237.
28. Z. El Rassi, C. Hotváth, *J. Chromatogr.* **1986**, 359, 241.
29. Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto, *J. Chromatogr.* **1986**, 354, 511.
30. J. Porath, B. Olin, *Biochemistry* **1983**, 22, 1621.
31. E. Sulkowski, K. Vastola, D. Oleszek, W. Von Muenchhausen, *Affinity Chromatography and Related Techniques*. Proc. 4th International Symposium, Veldhoven, 22 – 26 June 1981 (Gribnau T.C.J., Visser J. and Nivard R.J.F., eds.), str. 313. Elsevier Scientific Pub. Co., New York **1982**.
32. S.A. Al-Mashikhi, S. Nakai, *J. Dairy Sci.* **1988**, 71, 1756.
33. E. Sulkowski, *Frontiers in Bioprocessing* (Sikdar S. K., Bier M., Todd P., ed.), CRC Press, Boca Raton **1990**.
34. U. Winkler, T.M. Pickett, D. Hudig, *J. Immunol. Methods* **1996**, 191, 11.
35. X. Ren, S. Gao, D. You, H. Huang, Z. Liu, Y. Mu, J. Liu, Y. Zhang, G. Yan, G. Luo, T. Yang, J. Shen, *Biochem. J.* **2001**, 359, 369.
36. X. Li, A. Villa, C. Gownley, M.J. Kim, J. Song, M. Auer, D. Wang, *FEBS Letters* **2001**, 494, 165.
37. J. Sun, C.H. Bird, M.S. Buzza, K.E. McKee, J.C. Whisstock, P.I. Bird, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 261, 251.
38. T.A. Dang, X.R. Zhou, B. Graf, P.J. Christie, *Mol. Microbiol.* **1999**, 32, 1239.
39. C. Jiang, J.B. Wechuck, W.F. Goins, D.M. Krisky, D. Wolfe, M.M. Ataii, J.C. Glorioso, *J. Virol.* **2004**, 78, 8994.
40. J.W. Chisholm, A.K. Gebre, S.J. Parks, *J. Lipid. Res.* **1999**, 40, 1512.
41. E. Efremenko, Y. Votchitseva, F. Plieva, I. Galaev, B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 70, 558.
42. Y. Yuan, D. Beitner-Johnson, D.E. Millhorn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 288, 849.
43. U. Sidenius, O. Farver, O. Jons, B. Gammelgaard, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **1999**, 735, 85.
44. G. Chaga, J. Hopp, P. Nelson, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, 29, 19.

45. S. Cornelis, S. Uttenweiler-Joseph, V. Panneels, G. Vassart, S. Costagliola, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9860.
46. C.M. Zhang, S.A. Reslewic, C.E. Glatz, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 52.
47. M. DiDonato, S. Narindrasorasak, J.R. Forbes, D.W. Cox, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 33279.
48. U. Jan, Q. Husain, M. Saleemuddin, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2001**, *34*, 13.
49. R.M. Owens, A. Grant, N. Davies, C.D. O'Connor, *Protein Expr. Purif.* **2001**, *21*, 352.
50. Z. Xiao, X. Jiang, M.L. Beckett, G.L. Wright Jr., *Protein Expression Purif.* **2000**, *19*, 12.
51. N. Medici, S. Minucci, V. Nigro, C. Abbondanza, I. Armetta, A.M. Molinari, G.A. Puca, *Biochemistry* **1989**, *28*, 212.
52. P.R. Coulet, J. Carlsson, J. Porath, *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23*, 663.
53. V.E. Murphy, R.F. Johnson, Y.C. Wang, K. Akinsanya, P.G. Gibson, R. Smith, V.L. Clifton, *J Soc Gynecol Investig.* **2005**, *12*, :349.
54. L. Le, K. Chi, S. Tyldesley, S. Flibotte, D.L. Diamond, M.A. Kuzyk, M.D. Sadar, *Clin Chem.* **2005**; *51*, 695.
55. R. Huber, *Klin. Wochenschr.* **1980**, *58*, 1217.
56. G.W. Warr, K.E. Magor, D.A. Higgins, *Immunol Today* **1995**, *16*, 392.
57. N. Suzuki, Y.C. Lee, *Glycobiology* **2004**, *14*, 275.
58. S. Sun, W. Mo, Y. Ji, S. Liu, *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 708.
59. R.L. Stanfield, M. Takimoto-Kamimura, J.M. Rini, A.T. Profy, I.A. Wilson, *Structure* **1993**, *1*, 83.
60. D. Altschuh, *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 277.
61. E. Vargas-Madrado, E. Paz-García, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 113.
62. M. Oda, H. Kozono, H. Morii, T. Azuma, *Int. Immunol.* **2003**, *15*, 417.
63. V. Hořejší, J. Bartůňková, *Základy imunologie*, TRITON, Praha **1998**.
64. I. Amadeo, M. Oggero, M.L. Zenclussen, L. Robles, D. Pereira, R. Kratje, M. Etcheverrigaray, *J. Immunol. Methods* **2004**, *293*, 191.
65. W.G. Jaoko, M. Lund, E. Michael, P.E. Simonsen, *Acta Trop.* **2001**, *80*, 51.
66. E. Lutanie, J.C. Voegel, P. Schaaf, M. Freund, J.P. Cazenave, A. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9890.
67. Z. Bílková, J. Mazurová, J. Churáček, D. Horák, J. Turková, *J. Chromatogr. A* **1999**, *852*, 141.

68. E. Hauserová, J. Swaczynová, K. Doležal, R. Lenobel, I. Popa, M. Hajdúch, D. Vydra, K. Fuksová, M. Strnad, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 116.
69. M. Aveskogh, L. Hellman, *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 2738.
70. S.H. Sicherer, H.A. Sampson, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 470.
71. P.A. Greenberger, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 464.
72. H.H. Sunwoo, T. Nakano, W.T. Dixon, J.S. Sim, *Poultry Sci.* **1996**, *75*, 342.
73. R. Parvari, A. Avivi, F. Lentner, E. Ziv, S. Tel-Or, Y. Burstein, I. Schechter, *EMBO J.* **1988**, *7*, 739.
74. P. Hodek, nepublikované výsledky
75. H. Hatta, K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim, T. Yamamoto, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 450.
76. V. Ntakarutimana, P. Demedts, P. van Sande, S. Scharpé, *J. Immunol. Methods* **1992**, *153*, 133.
77. A. Larsson, A. Karlsson-Parra, J. Sjoquist, *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 411.
78. G. Kronvall, U.S. Seal, S. Svensson, R.C. Williams, *Acta Path. Microbiol. Scand. B* **1974**, *82*, 12.
79. A. Polson, M.B. von Wechmar, M.H. van Regenmortel, *Immunol. Comm.* **1980**, *9*, 475.
80. H. Hatta, M. Kim, T. Yamamoto, *Agric Biol Chem.* **1990**, *54*, :2531
81. C. Schwartzkopf, B. Thiele, *ALTEX* **1996**, *13*, 22.
82. I. Kuronen, H. Kokko, I. Mononen M. Parviainen, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1997**, *35*, 435.
83. A. Larsson, P. Wejaker, P. Forsberg, *Food Agric. Immunol.* **1999**, *11*, 43.
84. S. Hamada, T. Horikoshi, S. Kawabata, J. Hiraoka, T. Fujiwara T. Ooshima, *Infect. Immunol.* **1991**, *59*, 4161.
85. M. Kuroki, M. Otha, Y. Ikemori, R.C. Peralta, H. Yokoyama, Y. Kodama, *Arch. Virol.* **1994**, *138*, 143.
86. B.S. Thalley, S.B. Carroll, *Biotechnology* **1990**, *8*, 934.
87. E.M. Akita, E.C.Y. Li-Chan, *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 54.
88. L. Huang, G. Harvie, J.S. Feitelson, K. Gramatikoff, D.A. Herold, D.L. Allen, R. Amunngama, R.A. Hagler, M.R. Pisano, W. Zhang, X. Fang, *Proteomics* **2005**, *5*, 3314.
89. D. Hinerfeld, D. Innamorati, J. Pirro, S.W. Tam, *J. Biomol. Tech.* **2004**, *15*, 184.

90. T. Baussant, L. Bougueleret, A. Johnson, J. Rogers, L. Menin, M. Hall, P. Åberg, K. Rose, *Proteomics* **2005**, *5*, 973.
91. J.S. Hoos, H. Sudergat, J. Hoelck, M. Stahl, J.S.B. de Vlieger, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth, *J.Chromatogr. B* **2006**, *830*, 262.
92. W. Kusnezow, J.D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 165.
93. M. Nisnevitch, M.A. Firer, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2001**, *49*, 467.
94. N. Delaunay, V. Pichon, M. Hennion, *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 15.
95. Z. Bílková, A. Castagna, G. Zanusso, A. Farinazzo, S. Monaco, E. Damoc, M. Przybylski, M. Beneš, J. Lenfeld, J.L. Viovy, P.G. Righetti, *Proteomics* **2005**, *5*, 1.
96. Z. Bílková, R. Stefanescu, R. Cecal, L. Korecká, Š. Ouzká, J. Ježová, J.L. Viovy, M. Przybylski, *Eur. J. Mass Spectrom* **2005**, *11*, 489.
97. Z. Bílková, M. Slováková, D. Horák, J. Lenfeld, J. Churáček, *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 177.
98. Z. Bílková, M. Slováková, A. Lyčka, D. Horák, J. Lenfeld, J. Turková, J. Churáček, *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 25.
99. M. Farooqi, M. Saleemuddin, R. Ulber, P. Sosnitza, T. Scheper, *J. Biotechnol.* **1997**, *55*, 171.
100. J. Turková, *J. Chromatogr.* **1999**, *722*, 11.
101. V. Kašička, *Chem listy*, **1997**, *91*, 320.
102. Z. Glatz, *Chem. Listy*, **2002** *96*, 127.
103. P. Cutler, *Protein Purification Protocols*, Humana press, Totowa, New Jersey, USA, **2004**.
104. T. Vařilová, *Chem. Listy* **2005**, *99*, 570.
105. T.H. Sisson, C.W. Castor, *J. Immunol Methods* **1990**, *127*, 215.
106. S. Kabir, *Immunol. Invest.* **2002**, *31*, 263.
107. C.A.C. Wolfe, D.S.Hage, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 123.
108. J. Porath, M. Belew, *Trends Biotechnol.* **1987**, *5*, 225.
109. D. Tsikas, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 705.
110. E. Hedman, C. Widen, A. Asadi, I. Dinnetz, W.P. Schroder, J.A. Gustafsson, A.C. Wikstrom, *Proteomics* **2006**, *6*, 3114.
111. P. Degelmann, S. Egger, H. Jurling, J. Muller, R. Niessner, D. Knopp, *J Agric Food Chem.* **2006**, *54*, 2003.
112. L.Y. Luo, S.J. Shan, M.B. Elliott, A. Soosaipillai, E.P. Diamandis, *Clin Cancer Res.* **2006**, *12*, 742.

113. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M.D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Analyt. Biochem.* **1985**, *150*, 76.
114. T. C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* **1921**, *49*, 183.
115. J. Vohlídal, *Chemické tabulky pro střední průmyslové školy chemické a s chemickým zaměřením*, SNTL, Praha **1982**.
116. J.R. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry*, **1971**, *8*, 871.
117. U.K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680.
118. A. Görg, W. Postel, S. Gunther, *Electrophoresis* **1988**, *9*, 531.
119. A. Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1037.
120. R. Westermeier et al., *Electrophoresis in Practise*, Wiley-Vch, Weinheim, str. 257, **2001**.
121. M. Tanokura, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *742*, 576.
122. V. Boden, J.J. Winzerling, M. Vijayalakshmi, J. Porath, *J. Immunol. Methods* **1995**, *181*, 225.
123. P. Hodek, *Bulletin České společnosti pro biochemii a molekulární biologii* **2000**, *28*, 10.
124. C. Prussin, D.D. Metcalfe, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 540.
125. H. Kokko, S.O. Kärenlampi, *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 311.
126. P. Beranová, *Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie*, **1998**.
127. S. Ohno, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, *78*, 7657.
128. F. Yang, J.M. Bergeron, L.A. Linehan, P.A. Lalley, A.Y. Sakaguchi, B.H. Bowman *Genomics*. **1990**, *7*, :509.
129. D.N. Haefliger, J.E. Moskaitis, D.R. Schoenberg, W. Wahli, *J Mol Evol.* **1989**, *29*, 344.
130. T. A. Springer, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1996.
131. H.L. Lord, M. Rajabi, S. Safari, J. Pawliszyn, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 769.
132. Y. Osawa, T. Higashiyama, M. Fronckowiak, N. Yoshida, C. Yarborough, *J. Steroid Biochem.* **1987**, *27*, 781.
133. J.W. Eveleigh, D.E. Levy, *J. Solid-Phase Biochem.* **1977**, *2*, 45.
134. M. Oda, T. Azuma, *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 111.

135. J.H.W. Van der Heijden, T.W.A. De Bruin, K.A.F.M. Glaudemans, J. De Kruif, J.P.Banga, T. Logtenberg, *Clin. Exp. Immunol.* **1999**, *118*, 205.
136. L.D. Anderson, J.A. Cook, G.S. David, S.M. Hochschwender, M.S Kasher, M.C. Smith, W.P.C. Stemmer, *patent USA: US5439829*, **1995**.
137. N.N.Greenwood, A.Earnshaw, *Chemie prvku*, Informatorium, Praha **1993**.
138. F. Hein, *Z. Anorg Chem.* **1931**, *201*, 314.
139. G. Brauer, *Handbuch der präparativen anorganischen Chemie*, Enke, Stuttgart, **1954**.
140. J. Rohovec, ústní sdělení
141. D. F. Evans, *J. Chem. Soc.* **1959**, 2003.
142. J.L. Deutsch, S. M. Poling, *J. Chem. Educ.* **1979**, *46*, 167.
143. S. Braun, H. O. Kalinowski, S. Berger, *100 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course*, Wiley-VCH, Weinheim **1998**.