

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

**Izolace a předúprava bílkovin
pro jejich identifikaci**

Bakalářská práce
studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Martin Franc

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli panu Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi Ph.D. za odborné vedení a poskytnuté rady. Dále bych chtěl poděkovat Bc. Tomáši Křížkovi za pomoc s experimentální částí mé práce.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Předmětová hesla:

analytická chemie, identifikace proteinů, nanokapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Klíčová slova:

proteomika, trypsinové štěpení, kasein, ovalbumin

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	6
1 Úvod	7
1.1 Izolace bílkovin	7
1.2 Enzymatické štěpení bílkovin	8
1.2.1 Úprava bílkoviny před štěpením	8
1.2.2 Trypsin	9
1.3 Separace technikou kapalinové chromatografie na čipu	10
1.4 Identifikace bílkovin hmotnostní spektrometrií	10
1.5 Cíl práce	11
2 Experimentální část	12
2.1 Použité chemikálie	12
2.2 Použité přístroje	12
2.3 Zpracování vzorků	12
2.3.1 Extrakce	13
2.3.2 Srážení	13
2.3.3 Štěpení trypsinem	14
2.3.4 Separace a identifikace	14
3 Výsledky a diskuse	16
3.1 Vzorky sýrů	16
3.1.1 Kozí sýr Polder	17
3.1.2 Ovčí sýr Polder	19
3.1.3 Eidam 30 %	21
3.2 Vzorek vejce	24
3.2.1 Žloutek	25
3.2.2 Bílek	25
3.3 Tofu	26
4 Závěr	27
Literatura	28

Seznam zkratk a symbolů

°C	stupeň Celsia, jednotka teploty
DTT	D,L-dithiothreitol
g	gram, jednotka hmotnosti
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAA	jodacetamid
l	litr, jednotka objemu
l/min	litr za minutu, jednotka průtoku
LC	kapalinová chromatografie
M	mol/l, jednotka molární koncentrace
m/z	poměr molekulové hmotnosti a náboje
min	minuta, jednotka času
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
ot./min	otáčka za minutu, jednotka frekvence otáčení centrifugy
pI	hodnota izoelektrického bodu
TFA	kyselina trifluoroctová

1 Úvod

Jedna z mnoha definic proteomiky říká, že proteomika se zabývá systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí [1]. Jejím cílem je obvykle prozkoumání úlohy bílkovin v procesech probíhajících v organismu. Je využívána pro diagnózu a odhalení příčin nemocí, výrobu léčiv, nebo tvorbu specifických enzymů v potravinářství a průmyslu. Protože bílkoviny jsou způsobem exprese genetické informace, používá se proteomika také ke studiu genů.

Bílkoviny ale má smysl zkoumat i z mnohem prozaičtějších důvodů. V historii se do malířských barev či barevných inkoustů pro správnou hustotu někdy přidávaly vaječné bílky. Dnes při restaurování maleb je potřeba zjistit, zda tomu tak v konkrétních případech bylo. Cestou může být například nalezení ovalbuminu v barvě. Identifikace bílkovin je také jedna z možností, jak odhalit použití kravského mléka při výrobě kozích nebo ovčích sýrů.

1.1 Izolace bílkovin

Pokud chceme zkoumat buněčné bílkoviny, je prvním krokem jejich uvolnění z buněk. U živočišných buněk lze obvykle použít osmotický tlak. Buňky jsou suspendovány v hypotonickém roztoku. Rozdílem koncentrací rozpuštěných látek v tomto roztoku a uvnitř buňky vznikají osmotické síly, které se snaží koncentrace vyrovnat. Protože látky zevnitř buňky většinou nemohou projít přes membránu ven, proniká voda zvnějšku do buňky. Tím buňka zvětšuje svůj objem až praskne. Pro bakteriální a rostlinné buňky s buněčnou stěnou tento postup nelze použít. Nejprve je nutno buněčnou stěnu odstranit, například enzymaticky. Jiná možnost rozbití buněk je použitím detergentů nebo organických rozpouštědel, je však nutno postupovat opatrně, protože by mohlo dojít k denaturaci izolovaných bílkovin. Často se také používají ultrazvukové vibrace, mechanické drcení či mletí s pískem nebo oxidem hlinitým [2].

Dalším krokem je extrakce. V této práci byly k extrakci použity dva roztoky, a sice roztok močoviny o koncentraci 8 mol/l a roztok obsahující močovinu o koncentraci 8 mol/l a hydrogenuhličitan amonný o koncentraci 0,4 mol/l. Ze

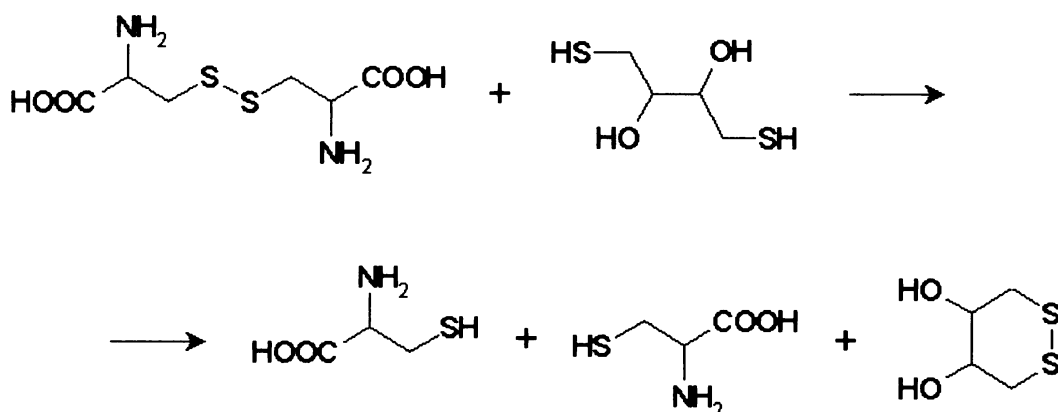
získaného roztoku proteinů se odstraňují nerozbité buňky a jejich zbytky, případně další látky (v této práci například tuk) centrifugací nebo filtrací. Vyextrahované bílkoviny pak mohou být vratně vysoleny, nejčastěji síranem amonným [2]. Jinou možností je vysrážení a zároveň denaturace kyselinou trifluoroctovou (TFA). V takovém případě po vysrážení následuje odstranění zbytkové TFA propláchnutím sraženiny acetonem [3].

1.2 Enzymatické štěpení bílkovin

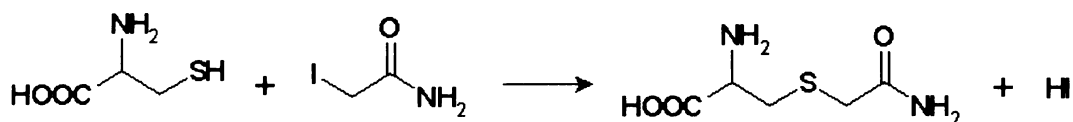
Většina metod identifikace bílkovin hmotnostní spektrometrií vyžaduje naštěpení bílkoviny enzymem s danou specifíčností. Vzniklé peptidy jsou pro tuto bílkovinu charakteristické a na jejich základě je možné bílkovinu vyhledat v databázi.

1.2.1 Úprava bílkoviny před štěpením

Před štěpením bílkoviny je nutno rozrušit její terciální strukturu, aby měl enzym dobrý přístup k řetězci. Je nutno především rozbít disulfidické můstky mezi postranními řetězci cysteinu a zajistit, aby nedošlo k jejich obnovení. K rozbití se obvykle používá redukce dithiothreitem, následně se vzniklé thiolové skupiny alkylují například jodacetamidem, jak je ukázáno v chemických rovnicích na obrázcích 1.1 a 1.2.



Obr. 1.1 Redukce disulfidického můstku dithiothreitem.



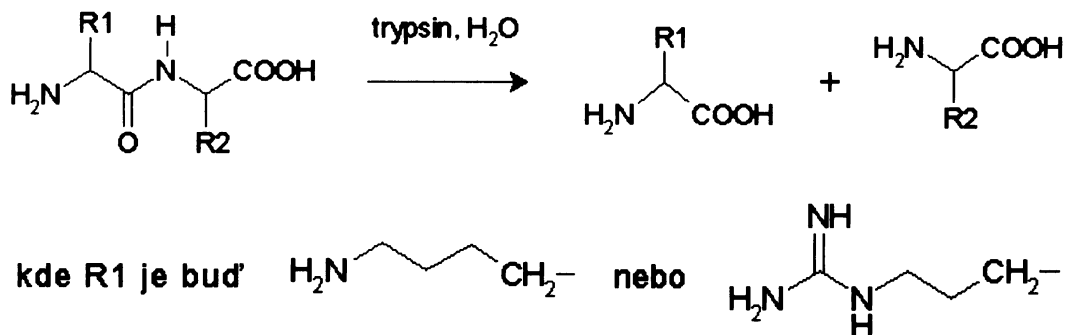
Obr. 1.2 Alkylace thiolové skupiny jodacetamidem.

Alkylací je zabráněno opětovnému vzniku disulfidických můstků. Získaný řetězec proteinu je vhodný k enzymatickému štěpení.

1.2.2 Trypsin

Jedním z nejpoužívanějších enzymů je trypsin. Vzniká z neaktivního trypsinogenu produkovaného slinivkou břišní. Trypsinogen je ze slinivky vylučován do dvanáctníku, kde je přeměněn na trypsin. Přeměna spočívá v odštěpení hexapeptidu na N-konci aminokyselinového řetězce. Štěpné místo je mezi lysinem a isoleucinem, což odpovídá specifitě trypsinu. Nejprve je z trypsinogenu pomocí enzymu enteropeptidázy vytvořeno malé množství trypsinu, které poté začne fungovat jako katalyzátor přeměny. Proto je trypsin označován jako autokatalytický enzym [2].

Trypsin je využíván pro svou velmi vysokou specifitu, štěpí peptidické vazby na C-konci lysinu a argininu, pokud následující aminokyselinou není prolin. Chemická rovnice štěpení je uvedena na obrázku 1.3.



Obr. 1.3 Štěpení dipeptidu trypsinem.

Protože průměrný výskyt lysinu v bílkovinách je přibližně 5,7 % a argininu přibližně 5,4 %, mají trypsinem naštěpené peptidy průměrnou délku devět aminokyselin. Druhou výhodou trypsinu oproti jiným enzymům je to, že trypsin je schopen štěpit i špatně rozpuštěné bílkoviny [3]. Teplotní optimum trypsinu je 37 °C, pH optimum je 8. Štěpení lze zastavit ochlazením vzorku na teplotu kolem 0 °C, okyselením (například TFA) nebo nadávkováním do HPLC kolony.

1.3 Separace technikou nanokapalinové chromatografie na čipu

Před vlastní detekcí hmotnostním spektrometrem jsou získané peptidy separovány čipovou LC. Čip je vytvořen z polyimidu, obsahuje prekoncentrační a separační kolonu. Na výstupu ze separační kolony je pokovený hrot nanoelektrospreje. Obě kolony obsahují stejnou stacionární fázi. V této práci byly použity dva čipy, jeden s náplní z grafitizovaného uhlíku, druhý s náplní silikagelu modifikovaného oktadecylovými řetězci (C18).

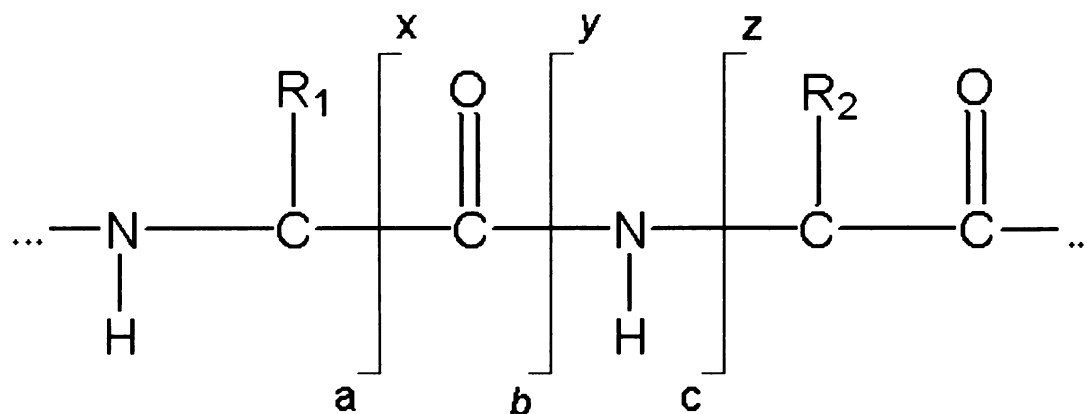
Vzorek peptidů je kapilární pumpou transportován přes prekoncentrační kolonu, kde jsou peptidy zachycovány, a zbylý roztok prochází do odpadu. Nanopumpa po zakoncentrování peptidy vymývá přes separační kolonu do hrotu elektrospreje. Zde dochází k jejich ionizaci a přechodu do hmotnostního analyzátoru. Tím bývá průletový analyzátor (TOF), kvadrupól, nebo, jako v této práci, iontová past.

1.4 Identifikace bílkovin hmotnostní spektrometrií

Existuje několik způsobů provedení. „Peptide mass fingerprinting“, tedy peptidové mapování, porovnává přesně změřené molekulové hmotnosti peptidů a molekulové hmotnosti peptidů teoreticky naštěpených z bílkovin v databázi. Sekvenci aminokyselin je možno určit zpětně přiřazením experimentálně změřené molekulové hmotnosti k odpovídajícímu peptidu nalezenému v databázi.

Možností použitou v této práci je získání sekvence aminokyselin peptidu z fragmentačního spektra a její porovnání s bílkovinami v databázi. Peptidy jsou v hmotnostním spektrometru rozštěpeny srážkami s neutrálními molekulami (He, Ar)

a jsou zaznamenány molekulové hmotnosti (resp. m/z) iontů vzniklých fragmentů. Ke štěpení dochází nejčastěji na peptidovém řetězci, převažují fragmenty b-ionty a y-ionty. Tyto fragmenty jsou znázorněny na obrázku 1.4.



Obr. 1.4 Typy fragmentů vzniklých rozštěpením peptidu na peptidovém řetězci. Převzato z [4].

Porovnáním molekulových hmotností iontů a jednotlivých aminokyselin je získána sekvence aminokyselin v peptidu.

Kombinací těchto dvou metod je identifikace využívající krátké a snadno identifikovatelné sekvence ve spektru. Tato sekvence, označovaná jako „TAG“, dělí peptid na tři části. U krajních známe přesnou molekulovou hmotnost, prostřední část tvoří TAG se známou sekvencí aminokyselin. Peptid lze zapsat jako m_1TAGm_3 , kde m_1 a m_3 jsou molekulové hmotnosti krajních částí peptidu. V databázi jsou vyhledávány peptidy naštěpené daným enzymem a obsahující TAG na pozici dané molekulovými hmotnostmi m_1 a m_3 . [4]

1.5 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit vhodnost čipové techniky nano-LC-MS/MS pro určení druhu mléka použitého při výrobě sýrů a pro odhalení použití vaječného bílku při výrobě historických barev.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Aceton (p. a.) byl zakoupen u firmy Lachema, Brno, ČR. Acetonitril (pro HPLC, gradient grade), D,L-dithiothreitol (99 %) a kyselina mravenčí (98 – 100 %) byly zakoupeny u firmy Sigma, St. Louis, USA. Hydrogenuhlíčitán amonný (99,5 %), jodacetamid (98 %), kyselina trifluoroctová (98 %) a močovina (99,5 %) byly zakoupeny u firmy Fluka, Buchs, Švýcarsko. Trypsin z vepřového pankreatu (lyofylizovaný, čištěný afinitní chromatografií) byl zakoupen u firmy Merck, Darmstadt, Německo.

2.2 Použité přístroje

Centrifuga Minispin Plus byla od firmy Eppendorf, Německo. Digitální bloková lázeň Grant byla od firmy Grant Industries, Cambridge, UK. LC-MS systém byl zapůjčen od firmy Agilent Technologies, Waldbronn, Německo a sestával z následujících částí: kapilární pumpa a nanopumpa série 1100, HPLC čip s náplní z grafitizovaného uhlíku (velikost částic stacionární fáze 5 μm , objem prekoncentrační kolony 40 nl, délka separační kolony 43 mm, průřez separační kolonou čtvercový o straně 75 μm), HPLC čip s náplní ZORBAX 300SB-C18 (velikost částic stacionární fáze 5 μm , objem prekoncentrační kolony 40 nl, délka separační kolony 43 mm, průřez separační kolonou čtvercový o straně 75 μm), hmotnostní spektrometr iontová past XCT.

2.3 Zpracování vzorků

Všechny vzorky byly zpracovány stejným způsobem. Rozdíly byly pouze při extrakci bílkovin ze vzorků.

2.3.1 Extrakce

K extrakci byly použity dva roztoky. Jedním byla směs močoviny o koncentraci 8 M a hydrogenuhličitanu amonného o koncentraci 0,4 M (extrakční roztok 1). Druhým byl pouze roztok močoviny o koncentraci 8 M (extrakční roztok 2).

Všechny vzorky sýrů a tofu o hmotnosti přibližně 3 g byly vloženy do zkumavek s přibližně 5 ml extrakčního roztoku 1 nebo 2. Vzorek tofu v extrakčním roztoku 2 byl poté vařen na vodní lázni po dobu 20 minut. Vzorek tofu v extrakčním roztoku 1 a oba vzorky kozího sýra byly na vodní lázni pouze přivedeny k varu. Vzorky eidamu a ovčího sýra vařeny nebyly. Všechny vzorky se dále uložily na 9 dní při laboratorní teplotě.

Při zpracování vzorku vejce byl nejprve oddělen bílek od žloutku. Byl podniknut pokus rozpustit močovinu přímo ve vzorcích. V bílku o objemu přibližně 30 ml bylo rozpuštěno 19 g močoviny. Ve žloutku o objemu přibližně 15 ml bylo rozpuštěno 8 g močoviny. Ve žloutku se močovina rozpouštěla velmi špatně, protože rychle tuhnul. Oba vzorky poté byly uloženy při laboratorní teplotě. Po devíti dnech bílek i žloutek ztuhly, proto byly jejich části o přibližném objemu 3 ml vloženy do přibližně 5 ml extrakčního roztoku 2 a uloženy na dalších 7 dní.

2.3.2 Srážení

Z každého vzorku byl injekční stříkačkou odebrán roztok vyextrahovaných bílkovin. Centrifugací byl odstraněn tuk a pevné zbytky nečistot. Poté bylo do mikrozkušavky odebráno 900 μ l roztoku, přidáno 100 μ l TFA, promícháno a mikrozkušavka byla uložena na ledu po dobu 30 minut. Vzorek byl dále centrifugován při 10 000 ot./min po dobu 15 minut. Sraženina bílkovin se vytvořila pouze u obou vzorků tofu, u vzorku žloutku a u vzorku eidamu v extrakčním roztoku 1. Ostatní vzorky proto byly centrifugovány ještě jednou, tentokrát při 14 500 ot./min po dobu 10 minut. Po vytvoření sraženiny bílkovin byl supernatant odstraněn, sraženina byla promyta studeným acetonem a vysušena na vzduchu.

2.3.3 Štěpení trypsinem

Na analytických vahách byl odvážen 1 mg sraženiny a rozpuštěn v 1 ml extrakčního roztoku 1 tak, aby koncentrace bílkovin v roztoku byla 1 mg/ml. Pro redukci disulfidických můstků bylo do mikrozkušavky napipetováno 113 μ l roztoku bílkovin (odpovídá 113 μ g bílkovin) a 28 μ l 45 mM roztoku DTT (objemový poměr roztok bílkovin/DTT byl 4/1, roztok DTT o této koncentraci byl v laboratoři připraven dříve). Vzorek byl poté inkubován při 50 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo pro alkylaci přidáno 28 μ l 100 mM roztoku IAA (objemový poměr roztok bílkovin/IAA byl 4/1, roztok IAA o této koncentraci byl v laboratoři připraven dříve). Alkylace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.

50 mg trypsinu bylo rozředěno v 660 μ l 1 mM HCl. Do mikrozkušavky s roztokem alkylovaných bílkovin bylo napipetováno 60 μ l roztoku trypsinu, což odpovídá 4,5 μ g trypsinu (hmotnostní poměr bílkoviny/trypsin byl 25/1). Dále bylo napipetováno 220 μ l destilované vody, čímž byla upravena koncentrace močoviny na 2 M a koncentrace hydrogenuhličitanu amonného na 0,1 M [3]. Štěpení bílkovin trypsinem probíhalo po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a bylo ukončeno zmrazením vzorků v mrazničce.

2.3.4 Separace a identifikace

Koncentrace bílkovin ve vzorcích před separací byla 250 ng/ μ l. Na kolonu s náplní C18 bylo autosamplerem dávkováno 1, 2 a 4 μ l vzorků vaječných bílkovin a 0,5, 0,8 a 1 μ l ostatních vzorků. Každá analýza byla provedena dvakrát. Bylo tedy zkoumáno 250, 500 a 1000 ng vaječných bílkovin a 125, 200 a 250 ng bílkovin ze sýrů a tofu. Průtok nosné kapaliny prekoncentrační kolonou byl 4 μ l/min. Průtok mobilní fáze separační kolonou byl 0,3 μ l/min.

Na kolonu s náplní z grafitizovaného uhlíku bylo autosamplerem dávkováno 2 a 4 μ l vzorků vaječných bílkovin a 0,5 a 1 μ l ostatních vzorků. To odpovídá 500 a

1000 ng vaječných bílkovin a 125 a 250 ng bílkovin ze sýrů a tofu. Průtok nosné kapaliny prekoncentrační kolonou byl 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Průtok mobilní fáze separační kolonou byl 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$.

V obou případech byl mobilní fází roztok acetonitrilu ve vodě s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Byla použita gradientová eluce se složením mobilní fáze uvedeným v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1 Složení mobilní fáze (acetonitril/voda s přidavkem 0,1 % HCOOH) během gradientové eluce.

Složení je vyjádřeno v % acetonitrilu obsažených v mobilní fázi.

Doba analýzy [min]	0	20	25	30	40
Obsah acetonitrilu [%]	3	55	80	80	3

Pro ionizaci bylo na elektrodu elektrospreje vloženo napětí -1800 V . Páry eluentu byly od vstupní kapiláry hmotnostního spektrometru odstraňovány omýváním dusíkem o teplotě $325\text{ }^\circ\text{C}$ a průtoku 3 l/min . Po detekci hmotnostního spektra byly bílkoviny vyhledávány v databázi Swiss-Prot [5] pomocí vyhledávače Mascot MS/MS Ions Search (Matrix Science, Londýn, UK) [6].

3 Výsledky a diskuse

3.1 Vzorky sýrů

Ve všech druzích sýrů byly identifikovány prekurzory β -laktoglobulinu, α -S1-kaseinu, α -S2-kaseinu, β -kaseinu a κ -kaseinu. β -laktoglobulin váže retinol, hraje také roli při jeho transportu a je základní složkou syrovátky. Kasein je heterogenní fosfoprotein tvořící až 80% proteinů v mléce. Tvoří micely, které mají řetězce κ -kaseinu na povrchu a řetězce ostatních typů uvnitř. Slouží k transportu vápníku a fosforečnanů [7]. Oba druhy bílkovin mohou u člověka vyvolat alergickou reakci. Jedná se o poměrně krátké řetězce. Jejich vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1 Vlastnosti bílkovin nalezených ve vzorcích sýrů.

pI – vypočtená hodnota izoelektrického bodu, *Mr* – relativní molekulová hmotnost, *délka řetězce* – počet aminokyselin tvořících bílkovinu, všechny údaje byly převzaty z databáze Swiss-Prot [5].

Bílkovina	Živočišný druh	pI	Mr	Délka řetězce
prekurzor α -S1-kaseinu	tur domácí (bos taurus)	4,98	24 571	214
	koza domácí (capra hircus)	5,32	24 332	214
	ovce domácí (ovis aries)	5,32	24 348	214
prekurzor α -S2-kaseinu	tur domácí (bos taurus)	8,54	26 176	222
	koza domácí (capra hircus)	8,24	26 546	223
	ovce domácí (ovis aries)	7,66	26 489	223
prekurzor β -kaseinu	tur domácí (bos taurus)	5,26	25 149	224
	koza domácí (capra hircus)	5,26	24 907	222
	ovce domácí (ovis aries)	5,26	24 917	222
prekurzor κ -kaseinu	tur domácí (bos taurus)	6,30	21 372	190
	koza domácí (capra hircus)	5,53	21 602	192
	ovce domácí (ovis aries)	5,78	21 599	192
prekurzor β -laktoglobulinu	tur domácí (bos taurus)	4,93	20 276	178
	koza domácí (capra hircus)	5,50	20 369	180
	ovce domácí (ovis aries)	5,44	20 314	180
	muflon (ovis orientalis musimon)	5,26	18 429	162
karnitin o-palmitoyltransferáza I	tur domácí (bos taurus)	9,02	89 035	771

3.1.1 Kozí sýr Polder

Jak ukazují tabulky 3.2 až 3.5, ve vzorku kozího sýra byl kromě kozích mléčných proteinů nalezen také hovězí β -kasein a hovězí a mufloní β -laktoglobulin. Všechny peptidy, podle kterých byl identifikován mufloní β -laktoglobulin, jsou obsaženy i v kozím β -laktoglobulinu. Jeden z nich se však v kozím β -laktoglobulinu nachází uvnitř řetězce, svým N-koncem je navázán na alanin a není tedy možné jej trypsinem odštěpit. V mufloním β -laktoglobulinu se nachází na začátku, N-konec má volný a odštěpit jej lze.

Proteiny, podle kterých byl identifikován hovězí β -kasein, odpovídají některým peptidům identifikujícím kozí β -kasein. Proto je pokrytí sekvence hovězího β -kaseinu vždy menší než kozího β -kaseinu (viz tabulky 3.2 až 3.5). Tyto proteiny byly rozlišeny díky peptidu jež ukončuje sekvenci na C-konci proteinů. Předposlední aminokyselinou kozího β -kaseinu je leucin, hovězího β -kaseinu isoleucin. V případě, že tento koncový peptid nebyl ve vzorku nalezen, nebyl identifikován ani hovězí β -kasein. Peptidy, podle nichž byl identifikován hovězí β -laktoglobulin, se od analogických kozích lišily pouze v jedné aminokyselině jednoho peptidu.

Sekvence kozího a ovčího α -S1-kaseinu se liší v šesti, α -S2-kaseinu ve čtyřech a β -kaseinu pouze ve dvou aminokyselinách. Proto téměř všechny peptidy, podle nichž byly tyto proteiny identifikovány, odpovídají také ovčímu kaseinu. Ve třech případech peptidy odpovídají kozím, ovčím i hovězím proteinům. κ -kasein byl jediným identifikovaným proteinem, který ve všech případech patřil jednoznačně mezi kozí mléčné proteiny.

Všechny čtyři metody identifikace poskytly srovnatelné výsledky. Nejvhodnější se zdá být extrakce 8 M roztokem močoviny s následnou separací na stacionární fázi C18. Tato metoda poskytla nejlepší identifikaci kozího κ -kaseinu a neidentifikovala žádné bílkoviny jiných živočišných druhů.

Tabulka 3.2 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku koziho sýra. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	125	125	200	200	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (koza domácí)	9 ^a	-	-	9 ^a	4 ^a	4 ^a
prekurzor α -S2-kaseinu (koza domácí)	22	18	13 ^a	16 ^a	-	17 ^a
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	-	10 ^b	-	5 ^b	13 ^a	13 ^a
prekurzor κ -kaseinu (koza domácí)	10	10	10	10	10	10
prekurzor β -laktoglobulinu (koza domácí)	-	13	-	13	13	13

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

^b identifikované peptidy odpovídají také živočišným druhům ovce domácí a tur domácí

Tabulka 3.3 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku koziho sýra. Extrakce roztokem 8 M močoviny a 0,4 M hydrogenuhličitanu amonného, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	125	125	200	200	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (koza domácí)	4	4 ^a	4 ^a	9 ^a	4 ^a	9 ^a
prekurzor α -S2-kaseinu (koza domácí)	-	23	14 ^a	19	-	13 ^a
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	17	17 ^a	17 ^a	17 ^a	16 ^a	17 ^a
prekurzor κ -kaseinu (koza domácí)	10	-	15	5	-	5
prekurzor β -laktoglobulinu (koza domácí)	-	13	13	-	-	-
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	13	13	13	13	-	13

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.4 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku koziho sýra. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	125	250	250
prekurzor α -S2-kaseinu (koza domácí)	14 ^a	11 ^a	10 ^a
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	21 ^a	12 ^a	27 ^a
prekurzor κ -kaseinu (koza domácí)	8	5	8
prekurzor β -laktoglobulinu (koza domácí)	-	10	21
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	8	-	21
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	-	-	15
prekurzor β -laktoglobulinu (muflon)	-	9	22

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.5 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku kozího sýra. Extrakce roztokem 8 M močoviny a 0,4 M hydrogenuhličitanu amonného, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	125	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (koza domácí)	-	-	13 ^a
prekurzor α -S2-kaseinu (koza domácí)	10 ^b	9 ^a	17 ^a
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	27 ^a	27 ^a	24 ^a
prekurzor κ -kaseinu (koza domácí)	8	8	8
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	13	13	-
prekurzor β -laktoglobulinu (muflon)	-	9	9

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

^b identifikované peptidy odpovídají také živočišným druhům ovce domácí a tur domácí

3.1.2 Ovčí sýr Polder

Jak je patrné z tabulek 3.6 až 3.9, kromě ovčích mléčných proteinů byly ve vzorku nalezeny hovězí α -S1-kasein a β -kasein, hovězí a mufloní β -laktoglobulin a kozí α -S1-kasein. Peptidy, podle kterých byl identifikován kozí α -S1-kasein, odpovídaly s výjimkou jediné aminokyseliny i ovčímu kaseinu.

Podobnost sekvence ovčího a mufloního β -laktoglobulinu způsobuje, že nalezené peptidy odpovídají oběma proteinům. U vzorků, kde byl identifikován pouze mufloní β -laktoglobulin, nastala stejná situace jako u vzorku kozího sýra (viz kapitola 3.1.1). Byl nalezen peptid, který má v ovčím β -laktoglobulinu na svém N-konci alanin, a není z něj tedy trypsinem odštěpitelný.

Také identifikace hovězího β -kaseinu byla stejná jako u vzorku kozího sýra. Peptidy identifikující hovězí β -kasein odpovídají i ovčímu kaseinu, s rozdílem v jediné aminokyselině. Některé nalezené peptidy ale odpovídají pouze ovčímu β -kaseinu, proto má obvykle větší pokrytí. Hovězí β -laktoglobulin se v identifikovaných peptidech od ovčího lišil ve dvou aminokyselinách.

Díky podobnosti sekvencí opět často nelze určit, zda byl nalezen ovčí nebo kozí α -S1-kasein, α -S2-kasein nebo β -kasein. K tomuto překryvu ale došlo v méně případech než u vzorku kozího sýra. V pěti případech odpovídaly peptidy ovčím, kozím i hovězím proteinům. κ -kasein byl opět jediný protein vždy jednoznačně určený jako ovčí bílkovina.

Opět byly všemi čtyřmi metodami získány srovnatelné výsledky. Extrakce směsí 8 M močoviny a 0,4 M uhličitanu amonného a následná separace na grafitizovaném uhlíku poskytla nejlepší pokrytí sekvence κ -kaseinu. Stejná extrakce s následnou separací na stacionární fázi C18 identifikovala nejmenší počet bílkovin jiných živočišných druhů. Dobré výsledky byly dosaženy i po extrakci 8 M močovinou a separací na stacionární fázi C18, což je metoda nejvhodnější pro kozí sýr i eidam (viz kapitoly 3.1.1 a 3.1.3).

Tabulka 3.6 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku ovčího sýra. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	125	125	200	200	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (ovce domácí)	7	4 ^a	-	7	-	-
prekurzor α -S2-kaseinu (ovce domácí)	-	18	18	17	18	18
prekurzor β -kaseinu (ovce domácí)	18 ^a	9 ^a	17 ^a	9 ^a	17 ^a	17 ^a
prekurzor κ -kaseinu (ovce domácí)	10	10	10	10	5	8
prekurzor β -laktoglobulinu (muflon)	31 ^b	41 ^b	29	32	16 ^b	41 ^b
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	14	-	13	-	-	13
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	20	19	25	25	14	30

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu koza domácí

^b identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.7 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku ovčího sýra. Extrakce roztokem 8 M močoviny a 0,4 M hydrogenuhličitanu amonného, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	125	125	200	200	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (ovce domácí)	16	9 ^a	9 ^a	22	22	21
prekurzor α -S2-kaseinu (ovce domácí)	4 ^b	8 ^a	19	23	22 ^a	9 ^a
prekurzor β -kaseinu (ovce domácí)	-	12 ^b	9 ^a	16 ^a	9 ^a	16 ^a
prekurzor κ -kaseinu (ovce domácí)	10	10	10	10	20	10
prekurzor β -laktoglobulinu (muflon)	15 ^c	27 ^c	15 ^c	20	19 ^c	17 ^c
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	-	-	8	16	-	-
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	-	-	-	-	17	-
prekurzor α -S1-kaseinu (koza domácí)	16	-	-	-	-	21

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu koza domácí

^b identifikované peptidy odpovídají také živočišným druhům ovce domácí a tur domácí

^c identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.8 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku ovčího sýra. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	125	250	250
prekurzor α -S2-kaseinu (ovce domácí)	10 ^a	7 ^a	7 ^a
prekurzor β -kaseinu (ovce domácí)	22 ^b	19 ^b	22 ^b
prekurzor κ -kaseinu (ovce domácí)	-	12	-
prekurzor β -laktoglobulinu (muflon)	21 ^c	15 ^c	20
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	17	14	17
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	30	25	14

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišným druhům ovce domácí a tur domácí

^b identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu koza domácí

^c identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.9 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku ovčího sýra. Extrakce roztokem 8 M močoviny a 0,4 M hydrogenuhličitanu amonného, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	125	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (ovce domácí)	12 ^a	20	16 ^a
prekurzor α -S2-kaseinu (ovce domácí)	9 ^a	14 ^a	9 ^a
prekurzor β -kaseinu (ovce domácí)	20 ^a	27 ^a	20 ^a
prekurzor κ -kaseinu (ovce domácí)	12	21	17
prekurzor β -laktoglobulinu (muflon)	26	26	35
prekurzor α -S1-kaseinu (tur domácí)	7	7	7
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	-	21	14
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	-	32	21

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu koza domácí

3.1.3 Eidam 30%

Jak je zřejmé z tabulek 3.10 až 3.13, ve vzorku eidamu byla naprostá většina bílkovin identifikována jako hovězí. Pouze prekurzoru β -kaseinu byly nalezeny dva druhy, jeden hovězí a druhý kozí nebo ovčí; nalezené peptidy odpovídaly bezezbytku oběma živočišným druhům. Stejně jako u vzorků kozího a ovčího sýra je to patrně způsobeno podobností v sekvencích aminokyselin. V identifikovaných peptidech je rozdílná jediná aminokyselina, jak bylo popsáno v kapitole 3.1.1.

Nejméně vyhovující metodou identifikace bílkovin v sýru eidam je extrakce směsí 8 M močoviny a 0,4 M uhličitanu amonného s následnou separací na stacionární fázi C18. Ostatní metody poskytly srovnatelné výsledky. Nejlepší pokrytí sekvence κ -kaseinu bylo získáno extrakcí 8 M močovinou a separací na stacionární fázi C18. Tato metoda je tedy pro identifikaci bílkovin v sýru eidam nejvhodnější.

Tabulka 3.10 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku eidamu. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	125	125	200	200	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (tur domácí)	-	11	10	19	9	18
prekurzor α -S2-kaseinu (tur domácí)	34	34	20	34	18	23
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	-	9	13	-	9	13
prekurzor κ -kaseinu (tur domácí)	11	-	11	11	11	11
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	11	11	-	-	-	-
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	-	-	13 ^a	-	-	13 ^a

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.11 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku eidamu. Extrakce roztokem 8 M močoviny a 0,4 M hydrogenuhličitanu amonného, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	125	125	200	200	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (tur domácí)	10	21	-	-	-	-
prekurzor α -S2-kaseinu (tur domácí)	24	24	22	22	14	18
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	9	-	-	-	-	-
prekurzor κ -kaseinu (tur domácí)	-	-	5	-	-	-
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	12	-	8	-	-	-
karnitin o-palmitoyltransferáza I (tur domácí)	-	2	-	-	-	-

Tabulka 3.12 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku eidamu. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	125	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (tur domácí)	-	16	22
prekurzor α -S2-kaseinu (tur domácí)	26	25	25
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	18	-	12
prekurzor κ -kaseinu (tur domácí)	8	8	8
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	11	-	-
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	14 ^a	-	9 ^a

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišnému druhu ovce domácí

Tabulka 3.13 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku eidamu. Extrakce roztokem 8 M močoviny a 0,4 M hydrogenuhličitanu amonného, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	125	250	250
prekurzor α -S1-kaseinu (tur domácí)	7	-	6
prekurzor α -S2-kaseinu (tur domácí)	25	31	28
prekurzor β -kaseinu (tur domácí)	8	20	17
prekurzor κ -kaseinu (tur domácí)	5	5	15
prekurzor β -laktoglobulinu (tur domácí)	-	7 ^a	-
prekurzor β -kaseinu (koza domácí)	17	17	-

^a identifikované peptidy odpovídají také živočišným druhům koza domácí a ovce domácí

3.2 Vzorek vejce

V tabulce 3.14 jsou uvedeny bílkoviny nalezené ve vaječném žloutku a bílku a některé jejich vlastnosti.

Tabulka 3.14 Vlastnosti bílkovin nalezených ve vzorcích vejce.

pI – vypočtená hodnota izoelektrického bodu, *Mr* – relativní molekulová hmotnost, délka řetězce – počet aminokyselin tvořících bílkovinu, všechny údaje byly převzaty z databáze Swiss-Prot [5].

Bílkovina	Živočišný druh	pI	Mr	Délka řetězce
ovalbumin	kur domácí (gallus gallus)	5,19	43202	386
prekurzor apovitelleninu-1	kur domácí (gallus gallus)	9,17	12017	106
prekurzor lysosymu C	kur domácí (gallus gallus)	9,37	16750	147
	kachna domácí (anas platyrhynchos)	9,13	14962	129
	kachnička karolínská (aix sponsa)	9,24	14931	129
ovotransferrin	kur domácí (gallus gallus)	6,85	79583	705
	kachna domácí (anas platyrhynchos)	6,19	77325	686
prekurzor ovomukoidu	kur domácí (gallus gallus)	4,75	23678	210

3.2.1 Žloutek

Jak ukazují tabulky 3.15 a 3.16, ve vzorku slepičího žloutku byly identifikovány pouze prekurzor apovitelleninu-1 a ovalbumin. Apovitellenin-1 je jeden z vaječných alergenů. Ovalbumin je albumin vaječného bílku. Jeho přítomnost ve vzorku žloutku je patrně způsobena nedokonalým oddělením žloutku od bílku při přípravě vzorku. Tomu nasvědčuje i nízké pokrytí sekvence (viz tabulky 3.15 a 3.16). Separace na grafitizovaném uhlíku pro identifikaci bílkovin ve žloutku není vhodná, neboť nejsou identifikovány téměř žádné bílkoviny ve vzorku.

Tabulka 3.15 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku slepičího žloutku. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	250	250	500	500	1000	1000
ovalbumin (kur domácí)	4	4	4	-	4	4
prekurzor apovitelleninu-1 (kur domácí)	23	41	41	41	41	41

Tabulka 3.16 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku slepičího žloutku. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	500	1000	1000
ovalbumin (kur domácí)	-	-	4

3.2.2 Bílek

Jak uvádějí tabulky 3.17 a 3.18, byly mimo slepičích bílkovin ve vzorku identifikovány také kachní prekurzory lysosymu C a kachní ovotransferrin. Stejně jako u vzorků sýrů je to způsobeno podobností sekvencí. Nalezené peptidy, podle nichž byly identifikovány slepičí a kachní ovotransferrin, se lišily v jedné aminokyselině. Ve slepičím ovotransferrinu byl leucin, v kachním ovotransferrinu isoleucin.

Peptidy identifikující slepičí lysosym C se od peptidů identifikujících kachní lysosym C liší v jedné (kachnička karolínská) nebo ve dvou (kachna domácí)

aminokyselinách. U slepičího lysosymu C je glutamin, u obou kachních lysosymů C je na odpovídajícím místě kyselina glutamová. Lysosym C kachny domácí se dále odlišuje kyselinou asparagovou na místě asparaginu u slepičího lysosymu C.

Po separaci na grafitizovaném uhlíku je identifikován pouze ovalbumin, navíc s mnohem menším pokrytím sekvence než po separaci na stacionární fázi C18. Pro identifikaci bílkovin ve žloutku je tedy vhodnější separace na stacionární fázi C18.

Tabulka 3.17 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku slepičího bílku. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi C18.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]					
	250	250	500	500	1000	1000
ovalbumin (kur domácí)	22	19	16	26	20	20
prekurzor lysosymu C (kur domácí)	13	-	19	29	24	19
ovotransferrin (kur domácí)	3	4	-	-	-	-
prekurzor ovomukoidu (kur domácí)	-	-	-	8	8	-
prekurzor lysosymu C (kachnička karolínská)	18	-	18	18	18	-
prekurzor lysosymu C (kachna domácí)	-	30	-	-	-	-
ovotransferrin (kachna domácí)	-	5	-	-	-	-

Tabulka 3.18 Pokrytí sekvence proteinů nalezených ve vzorku slepičího bílku. Extrakce 8 M roztokem močoviny, separace na stacionární fázi grafitizovaném uhlíku.

Hmotnost analyzovaného vzorku [ng]	Pokrytí sekvence [%]		
	500	1000	1000
ovalbumin (kur domácí)	9	7	7

3.3 Tofu

Ve vzorcích tofu nebyla ani jednou metodou identifikována žádná bílkovina, s výjimkou trypsinu v několika případech. Důvodem patrně je, že příslušné bílkoviny se v databázi Swiss-Prot nenacházejí.

4 Závěr

Bílkoviny izolované ze vzorků sýrů a vaječného žloutku a bílku byly naštěpeny trypsinem, dále úspěšně separovány čipovou LC a identifikovány hmotnostní spektrometrií pomocí vyhledávače Mascot v databázi Swiss-Prot. Ze vzorku tofu se bílkoviny identifikovat nepodařilo, protože se v použité databázi nenalézají.

Vzhledem k podobnosti sekvencí kozích, ovčích a hovězích bílkovin často dochází k nejednoznačnému či nesprávnému určení živočišného druhu. Jedinou bílkovinou, u které se tak nikdy nestalo, je κ -kasein. Druh mléka, z něž je sýr vyroben, lze tedy určit identifikací κ -kaseinu určením jeho původu z příslušného živočišného druhu. Nejvhodnější metodou identifikace je extrakce bílkovin roztokem 8 M močoviny s následnou separací na stacionární fázi C18. Tato metoda poskytuje dobré výsledky pro všechny druhy zkoumaných sýrů.

Ve vaječném bílku byl identifikován ovalbumin a prekurzor lysosymu C. Jejich nález ve vzorku historické barvy tedy bude důkazem použití vaječného bílku při její výrobě. Nejvhodnější metodou identifikace je také extrakce bílkovin roztokem 8 M močoviny a následná separace na stacionární fázi C18.

Literatura:

- [1] Chmelík, J.: Proteomický průvodce. *Chemické listy* 99, 883–885 (2005).
- [2] Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. Praha, Victoria Publishing, 1995.
- [3] Stone, K. L.; Williams, K. R.: Enzymatic Digestion of Proteins in Solution and in SDS polyacrylamide Gels. In: *The Protein Protocols Handbook*, druhé vydání; Walker J. M. (ed.); Totowa: Humana Press, 2002, p. 511–521.
- [4] Řehulka, P.; Řehulková, H.; Chmelík, J.: Měření proteomických dat hmotnostní spektrometrií a jejich bioinformatická interpretace. *Chemické listy* 101, 279–286 (2007).
- [5] www.expasy.org, 21.2.2007, 9:00.
- [6] www.matrixscience.com, 21.2.2007, 9:00.
- [7] Horne, D. S.: Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7, 456–461 (2002).