

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Vývoj lektinového nosiče pro izolaci sérových IgG
ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání**

Bc. Monika Šimonková

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Šimonková**
Osobní číslo: **C15628**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Vývoj lektinového nosiče pro izolaci sérových IgG ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část

1. Princip bioafinitní chromatografie - princip, její provedení (kolonové, vsádkové, zaměřit se na mikrofluidní aplikace) a oblasti použití ve výzkumu, v biotechnologiích
2. Lektiny význam, funkce, struktura
3. Lektinová chromatografie a využití lektinů pro aplikace in vitro
4. Glykosylace proteinů v eukaryotních buňkách za fyziologických podmínek (fce, význam)
5. Změny ve struktuře oligosacharidových motivů u nádorových onemocnění (se zaměřením na karcinom ovaria) - příklady, vztah glykosylace k prognóze a predikci onemocnění, rezistence na terapii.
6. WOS, PubMed, Scholar, Science direct - čerpat z cizojazyčných odborných článků a monografií.

Experimentální část - přehled metod

Vazba vybraných ligandů na magnetické částice s využitím metod kovalentní vazby

Metody ověření účinnosti vazby ligandu na magnetické částice

Optimalizace podmínek interakce analytu - glykoproteinů s lektinovými ligandy - práce s modelovými biospecifickými páry

Podmínky eluce izolovaných glykoproteinů vhodné pro následné MS analýzy

Podmínky integrace lektinového nosiče do mikrofluidního systému

Afinitní izolace vybraných glykoproteinů v mikrofl. systému a porovnání se vsádkovým systémem

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti: **Mgr. Michaela Černá**

Katedra biologických a biochemických věd

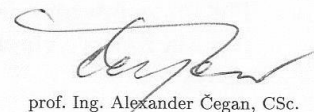
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

.....

Monika Šimonková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Michaele Černé za odborné vedení a ochotu při vypracování experimentální části diplomové práce, prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady a konzultace při vypracování teoretické části diplomové práce a RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za závěrečné zhodnocení této práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům laboratoře za vstřícnost a jakoukoli pomoc. A nakonec bych ráda poděkovala svým přátelům a blízkým za podporu v průběhu studia a svým rodičům, kteří mě nejen podporovali, ale dali mi možnost studovat na univerzitě.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá vývojem lektinového nosiče pro izolaci sérových IgG ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání. Pro tento účel byla zvolena metoda lektinové afinitní chromatografie. Jelikož je při této metodě jako pevná fáze využíván povrch superparamagnetických částic, byl nejprve optimalizován postup přípravy magnetického nosiče (tj. imobilizace konkanavalinu A). Dále byl optimalizován postup samotné izolace IgG ze séra pomocí nosiče s imobilizovaným konkanavalinem A, nejprve ve vsádkovém uspořádání a poté i mikrofluidním uspořádání, kde byly prováděny další úpravy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Afinitní chromatografie, lektiny, lektinová chromatografie, glykoproteiny, imunoglobulin G, mikrofluidní separační systémy

TITLE

Development of lectin carrier for the isolation of serum IgG in batch and microfluidics arrangement

ANNOTATION

This thesis deals with development of lectin carrier for isolation of serum IgG in batch and microfluidic arrangement. For this purpose, the lectin affinity chromatography method has been selected. Since the surface of the superparamagnetic particles is being used as the solid phase in this method, the process of magnetic carrier preparation (i.e., the immobilization of concanavalin A) was optimized first. Furthermore, the procedure of serum IgG isolation alone has been optimized by means of a carrier with immobilized concanavalin A, first in the batch arrangement and subsequently the microfluidic arrangement where further adjustments were made.

KEYWORDS

Affinity chromatography, lectins, lectin chromatography, glycoproteins, immunoglobulin G, microfluidic separation systems

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
1. TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Bioafinitní chromatografie	17
1.1.1 Princip a uspořádání bioafinitní chromatografie	17
1.1.2 Používané nosiče a typy ligandů v bioafinitní chromatografii	21
1.2 Lektiny	33
1.2.1 Vlastnosti a struktura	33
1.2.2 Význam a funkce lektinů v organismech.....	36
1.2.3 Biospecifické interakce lektinů.....	38
1.3 Lektinová afinitní chromatografie.....	39
1.3.1 Historie objevování lektinů a jejich vlastností.....	45
1.3.2 Příklady lektinové afinitní chromatografie využívané v klinické praxi a ve výzkumu.....	46
1.3.3 Komerční nosiče pro lektinovou afinitní chromatografii	47
1.3.4 Konkanavalin A	48
1.4 Posttranslační modifikace proteinů – glykozylace.....	51
1.4.1 Glykozylace proteinů za fyziologických podmínek	51
1.4.2 Glykozylace proteinů za patologických podmínek.....	56
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	61
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	62
3.1 Přístroje a pomůcky.....	62
3.2 Metody	63
3.2.1 Imobilizace Con A na magnetické částice	63
3.2.2 Stanovení množství imobilizovaného konkanavalinu A na magnetických částicích pomocí BCA testu	64
3.2.3 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	65
3.2.4 Izolace IgG na nosiči s Con A ve vsádkovém uspořádání.....	67
3.2.5 Izolace IgG na nosiči s Con A v mikrofluidním uspořádání	68
3.2.6 Přечиštění lektinem izolovaných IgG na nosiči s Proteinem A.....	69

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	70
4.1 Imobilizace konkanavalinu A na částice Sera-Mag Speed Beads	70
4.1.1 Volba vhodné koncentrace konkanavalinu A a vazebného pufru pro imobilizaci konkanavalinu A na povrch magnetických částic	70
4.1.2 Volba optimálního počtu promývacích kroků při imobilizaci konkanavalinu A na povrch magnetických částic	73
4.2 Lektinová afinitní chromatografie ve vsádkovém uspořádání – Sera-Mag Speed Beads	74
4.2.1 Volba separačních podmínek – podmínky pro vazbu.....	74
4.2.2 Volba separačních podmínek – fáze inkubace.....	75
4.2.3 Volba separačních podmínek – fáze promytí	78
4.2.4 Volba separačních podmínek – fáze eluce.....	79
4.2.5 Porovnání magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag	80
4.3 Lektinová afinitní chromatografie v mikrofluidním uspořádání.....	86
4.3.1 Využití systému kontrolující průtok mobilní fáze firmy Fluigent.....	86
4.3.2 Využití systému pro kontrolu průtoku mobilní fáze značky KD Scientific („Syringe“ pumpa).....	90
4.3.3 Spojení obou systému pro kontrolu průtoku mobilní fáze.....	92
4.3.4 Porovnání chování částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag v mikrofluidním systému	95
4.3.5 Volba separačních podmínek v mikrofluidním systému – promývací fáze.....	96
4.3.6 Zvýšení účinnosti izolace IgG ze séra pomocí nosiče s Proteinem A	99
5. ZÁVĚR.....	107
LITERATURA.....	109

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Příklad interakce lektinu s komplementárním glykoproteinem.....	18
Obr. 2. Schematické znázornění principu bioafinitní chromatografie.....	19
Obr. 3. Schéma fixace magnetických částic v mikrofluidním systému.....	20
Obr. 4. Schéma magneticky stabilizovaného fluidního lože v mikrofluidním systému.....	20
Obr. 5. Magnetizace ferro a superparamagnetických částic	23
Obr. 6. Hysterezní křivka zobrazující závislost magnetizace magneticky aktivovaných částic na intenzitě magnetického pole.....	23
Obr. 7. Schéma magnetických částic připravovaných jádro-plát' technologií.....	24
Obr. 8. Struktura grafenu	26
Obr. 9. Povrchová plasmonová resonance zlatých nanočástic	26
Obr. 10. Možné orientace ligandu na nosiči vázaného kovalentní vazbou.....	28
Obr. 11. Struktura lidského imunoglobulinu G	30
Obr. 12. Schematické znázornění vybraných lektinů s různými sacharidy rozeznávajícími doménami.....	34
Obr. 13. Schematické znázornění vybraných selektinů	34
Obr. 14. Lektinová dráha aktivace komplementu	37
Obr. 15. Struktura aglutininu pšeničných klíčků (rentgenová krystalografie).....	39
Obr. 16. Struktura jacalinu (rentgenová krystalografie).....	40
Obr. 17. Struktura sójového lektinu (rentgenová krystalografie)	40
Obr. 18. Struktura lektinu izolovaného z <i>Pisum sativum</i> (rentgenová krystalografie).....	41
Obr. 19. Srovnání záznamů lektinové chromatografie izoenzymů alkalické fosfatázy.....	47
Obr. 20. Struktura konkanavalinu A (rentgenová krystalografie)	49
Obr. 21. Lokalizace glykanů v membráně, cytosolu a jádře buňky.....	52
Obr. 22. Schematické znázornění N-glykosidické vazby	53
Obr. 23. Příklady typických N-glykanů v lidských buňkách.....	54
Obr. 24. Schematické znázornění O-glykosidické vazby	54
Obr. 25. Příklady typických O-glykanů v lidských buňkách.....	55
Obr. 26. Příklad N-glykanu v bakteriální buňce <i>Campylobacter jejuni</i>	56
Obr. 27. Příklady abnormálních glykanů identifikovaných v lidském organismu	57
Obr. 28. Dopad změn v glykozylnaci na buňky	58
Obr. 29. Nejčastější struktury s nádorem spjatých epitopů rakovinných buněk.....	59

Obr. 30. Schéma imobilizace Con A přes svou aminoskupinu na magnetické částice s karboxylovou skupinou na povrchu	70
Obr. 31. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při imobilizaci 100 µg Con A v TRIS pufru s ionty (zkouška vhodného zředění pro aplikaci vzorků na gel).....	71
Obr. 32. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při vazbě 30 µg Con A na 1 mg magnetických částic (TRIS a MES pufru s ionty při pH 6)	73
Obr. 33. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při imobilizaci 30 µg Con A na 1 mg magnetických částic (testování počtu promývacích kroků).....	74
Obr. 34. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (TRIS a MES pufr s ionty při pH 6)	75
Obr. 35. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (inkubace 30 minut a 1 hodina)	76
Obr. 36. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (inkubace 30 minut a 1 hodina)	77
Obr. 37. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (inkubace 15 a 30 minut)	77
Obr. 38. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (volba optimálního počtu promývacích kroků)	78
Obr. 39. Kontrola nespecifické sorpce proteinů na stěny zkumavky	79
Obr. 40. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (různé eluční pufrů)	80
Obr. 41. Snímek magnetických částic Sera-Mag Speed Beads pozorovaných pod elektronovým mikroskopem (SEM)	81
Obr. 42. snímek magnetických částic ProMag pozorovaných pod elektronovým mikroskopem (SEM).....	81
Obr. 43. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při imobilizaci 30 µg Con A na 1 mg magnetických částic ProMag	83
Obr. 44. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (porovnání magnetických částic ProMag a Sera-Mag)	84
Obr. 45. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (porovnání magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag)	84
Obr. 46. MFCS-Fluigent	86
Obr. 47. „Syringe“ pumpa	86
Obr. 48. Magnetické míchadlo ChipGenie	87

Obr. 49. Aparatura pro izolaci IgG v mikrofluidním uspořádání se zapojeným Fluigentem určeným k promývání magnetických částic umístěných v čipu	88
Obr. 50. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (promývání s vypnutým míchadlem).....	89
Obr. 51. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (promývání se zapnutým míchadlem).....	89
Obr. 52. Aparatura pro izolaci IgG v mikrofluidním uspořádání se zapojenou „Syringe“ pumpou určenou k promývání částic umístěných v čipu.....	90
Obr. 53. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (plnění do prázdného čipu)	91
Obr. 54. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (vytlačování kapaliny kapalinou).....	92
Obr. 55. Schématické znázornění zapojení čipu (první varianta).....	93
Obr. 56. Schématické znázornění zapojení čipu (druhá varianta)	93
Obr. 57. Schématické znázornění zapojení čipu (třetí varianta).....	94
Obr. 58. Schématické znázornění zapojení čipu (konečná varianta)	94
Obr. 59. Sera-Mag Speed Beads (1 mg) v čipu o objemu komůrky 100 µl	95
Obr. 60. ProMag (1 mg) v čipu o objemu komůrky 100 µl.....	95
Obr. 61. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (volba optimálního počtu promývacích kroků společně s volbou vhodného pufru (promytí))	97
Obr. 62. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (volba optimálního počtu promývacích kroků společně s volbou vhodného pufru (eluce))	97
Obr. 63. Kontrola nespecifické sorpce proteinů na stěny mikrofluidního čipu.....	98
Obr. 64. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (předem promytí 2x isopropanolem, 2x vodou a 1x promývacím pufrem).....	99
Obr. 65. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí pomocí amicon ultra 0,5 ml 100K (jednou)).....	100
Obr. 66. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí pomocí amicon ultra 0,5 ml 100K (dvakrát)).....	100
Obr. 67. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 100 µl – promytí))	101
Obr. 68. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 100 µl – eluce)) ..	102

Obr. 69. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 120 μ l – promytí))	103
Obr. 70. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 120 μ l – eluce))	103
Obr. 71. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí Proteinem A (čip o objemu komůrky 100 μ l))	104
Obr. 72. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí Proteinem A (čip o objemu komůrky 120 μ l))	105

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Typy chromatografických metod	17
Tab. 2. Přehled vybraných komerčně dostupných superparamagnetických částic	25
Tab. 3. Příklady nejčastěji využívaných biospecifických párů v bioafinitní chromatografii	29
Tab. 4. Přehled interakcí imunoglobulinů G různých organismů s Proteinem A a G	31
Tab. 5. Přehled základních živočišných lektinů	35
Tab. 6. Přehled lektinů běžně používaných v lektinové afinitní chromatografii	41
Tab. 7. Příprava kalibrační řady Con A pro kvantifikaci BCA testem	65
Tab. 8. Příprava gelů pro gelovou elektroforézu	66
Tab. 9. Množství navázaného Con A na povrch magnetických částic stanovená BCA testem a SDS-PAGE	72
Tab. 11. Porovnání charakteristik magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag	82
Tab. 12. Množství navázaného Con A na povrch magnetických částic stanovená BCA testem a SDS-PAGE	82

SEZNAM ZKRATEK

Arg – arginin

Asn – asparagin

CA-125 – sacharidový antigen 125 (Carbohydrate Antigen 125)

CEA – karcinoembryonální antigen (CarcinoEmbryonic Antigen)

Con A – konkanavalin A (Concanavalin A)

CRD – sacharidy rozeznávající doména (Carbohydrate Recognition Domain)

ER – endoplazmatické retikulum

GA – Golgiho aparát

GLC – plynová rozdělovací chromatografie (Gas Liquid Chromatography)

Gly – glycin

GPC – gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography)

GSC – plynová adsorpční chromatografie (Gas Solid Chromatography)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

HPIAC – vysokoúčinná imunoafinitní chromatografie (High-Performance ImmunoAffinity Chromatography)

IMAC – afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)

LLC – kapalinová rozdělovací chromatografie (Liquid Liquid Chromatography)

LSC – kapalinová adsorpční chromatografie (Liquid Solid Chromatography)

MASP – MBL asociovaná serinová proteáza (MBL Associated Serine Protease)

MBL – lektin vázající manózu (Mannose Binding Lectin)

MS – hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

MSFB – magneticky stabilizované fluidní lože (Magnetically Stabilized Fluidized Bed)

PHA – fytohemagglutinin (Phytohemagglutinin)

PSA – lektin izolovaný z *Pisum sativum* (*Pisum sativum* Agglutinin)

SBA – sójový lektin (SoyBean Agglutinin)

SEC – chromatografie stérické výluky (Size Exclusion Chromatography)

Ser – serin

SLe – sialyl Lewis

SPR – excitace povrchových plasmonů (Surface Plasmon Resonance).

Thr – threonin

TPA – tkáňový aktivátor plazminogenu (Tissue Plasminogen Activator)

UDP – uridindifosfát

WGA – aglutinin pšeničných klíčků (Wheat Germ Agglutinin)

ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou stále častěji diskutovaným problémem. Počet pacientů s nádorovým onemocněním neustále roste, a to díky zvyšujícímu se věku populace a nezdravému životnímu stylu. Vzhledem k faktu, že jsou nádorová onemocnění většinou diagnostikována v pozdějších (hůře léčitelných či neléčitelných) stádiích, je včasná diagnostika nezbytnou součástí úspěšné léčby. Z tohoto důvodu je věnováno velké úsilí hledání nových diagnostických markerů, které by napomáhaly diagnostikovat nádorová onemocnění již v ranných, dobře léčitelných stádiích.

Jako možné markery různých nádorových onemocnění mohou být použity glykoproteiny. Glykoproteiny vznikají v procesu glykozylace (jedná se o posttranslační modifikaci proteinů). U nádorově zvrhlých buněk dochází ke změně exprese enzymů přímo se účastnících procesu glykozylace proteinů. Proto nádorově zvrhlé buňky produkují abnormální glykany, čímž vznikají patologické proteiny, které mohou být identifikovány u různých nádorových onemocnění.

Tato práce je zaměřena na vývoj lektinového nosiče pro izolaci sérových IgG ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání. Právě IgG jsou při nádorovém onemocnění, např. u ovariálního karcinomu, poznamenány patologickou glykozylací. Pro izolaci sérových IgG byla využívána metoda afinitní chromatografie, při které byl jako stacionární fáze použit povrch superparamagnetických částic s imobilizovaným konkanavalinem A (Con A). Tento lektin vychytává ze séra specificky glukózové a manózové terminální monosacharidy glykanů, které se vyskytují na různých glykoproteinech, včetně IgG (manózové terminální monosacharidy).

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Bioafinitní chromatografie

Chromatografie je separační metoda využívající fyzikálně-chemické principy, konkrétně dělení složek směsi mezi dvě fáze – stacionární a mobilní. Mezi stacionární a mobilní fází dochází k neustálému ustavování rovnováhy. Pokud je mobilní fází plyn, jedná se o plynovou chromatografii, která se může dále dělit podle použité stacionární fáze na plynovou adsorpční chromatografii (stacionární fáze je pevná) a plynovou rozdělovací chromatografii (stacionární fáze je kapalná). Naopak pokud je mobilní fází kapalina, jedná se o kapalinovou chromatografii, která může být také dělena podle použité stacionární fáze na kapalinovou adsorpční chromatografii (stacionární fáze je pevná) a kapalinovou rozdělovací chromatografii (stacionární fáze je kapalná). Přehled základních chromatografických metod je uveden v tabulce č. 1. Do skupiny kapalinové adsorpční chromatografie patří i afinitní chromatografie. Je-li metoda založena na interakci bioaktivních látek, pak se technika nazývá bioafinitní případně imunoafinitní chromatografie. Jedná se o techniku vhodnou pro izolaci a charakterizaci specifických biomakromolekul (např. glykoproteinů) z vysoce komplexních a strukturně heterogenních biologických materiálů [1-5].

Tab. 1. Typy chromatografických metod, převzato a modifikováno z [6]

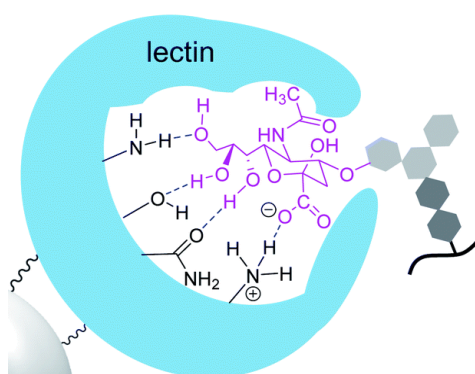
Mobilní fáze	Stacionární fáze	Typ chromatografie
plynná	pevná	plynová adsorpční chromatografie (GSC)
plynná	kapalná	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
kapalná	pevná	kapalinová chromatografie (LSC) (např. adsorpční, iontově výměnná)
kapalná	kapalná	kapalinová chromatografie (LLC) (např. rozdělovací, gelová permeační)

1.1.1 Princip a uspořádání bioafinitní chromatografie

Princip

Základní princip bioafinitní chromatografie spočívá ve využívání biologicky aktivních látek, které se specificky a reversibilně vážou na komplementární látky (nazývané ligandy) a tvoří spolu komplexy (např. lektin-glykoprotein), tzv. bioafinitní pár. Pevná fáze s kovalentně navázaným ligandem je použita jako stacionární fáze. Komplexní směs (kapalný vzorek) obsahující mj. analyt (např. glykoproteiny, proteiny, glykolipidy, biomarkery, toxiny, viry, bakterie, buňky) spolu s dalšími sloučeninami prochází kolonou. Látky, které nemají k ligandu afinitu, nejsou v koloně zadržovány a prochází. Zadržovány jsou na nosiči pouze látky mající k ligandu afinitu, tedy obsahující vazebné místo strukturně komplementární k ligandu.

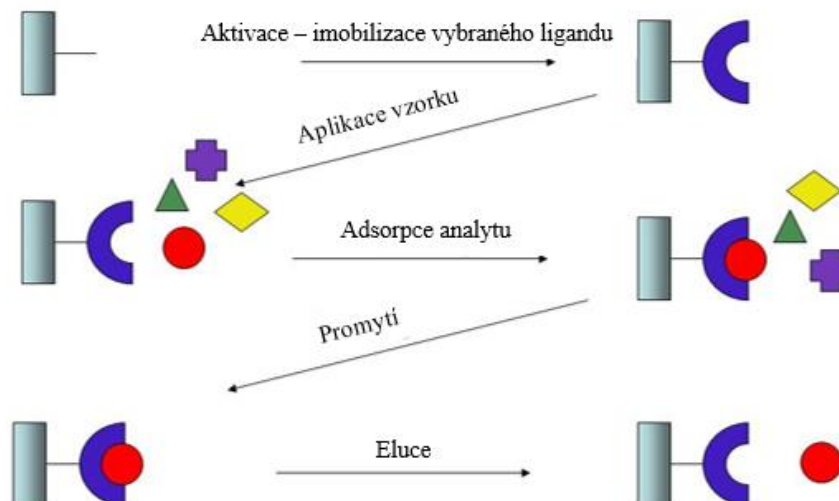
Vazba mezi biologicky aktivní látkou a ligandem je realizována nekovalentními silami, jako jsou např. iontové síly, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly, dipólové interakce, vodíkové můstky atd. Současné a vzájemné působení těchto sil, spolu s krátkou vzdáleností a komplementaritou interagujících povrchů, tvoří základ vysoké specifčnosti a účinnosti biospecifické vazby [3, 7]. Tato skutečnost je zobrazena na obrázku č. 1.



Obr. 1. Příklad interakce lektinu s komplementárním glykoproteinem, převzato a upraveno z [8]

Takto zadržené látky na koloně mohou být z biospecifické vazby uvolněny různými způsoby, například roztokem volného afinního ligandu, kompeticí cílové molekuly s jejím analogem nebo změnou složení mobilní fáze (změna pH, iontové síly, teploty, disociační a chaotropní činidla např. močovina, thiokyanát amonný apod.). Po eluci je analyt v čisté a koncentrované podobě a kolona se může v mnoha případech po regeneraci znovu použít. Na obrázku č. 2 je schematicky znázorněn princip bioafinitní chromatografie [3]. Ze schématu je patrné, že se technika skládá ze tří hlavních kroků:

1. krok – adsorpce požadovaného analytu
2. krok – vymytí nečistot ze vzorku
3. krok – eluce požadovaného analytu buď pomocí solubilního afinního ligandu, nebo pomocí elučního pufru [3, 7].



Obr. 2. Schematické znázornění principu bioafinitní chromatografie, převzato z [9]

Uspořádání

Bioafinitní chromatografie může být dělena na základě několika kritérií:

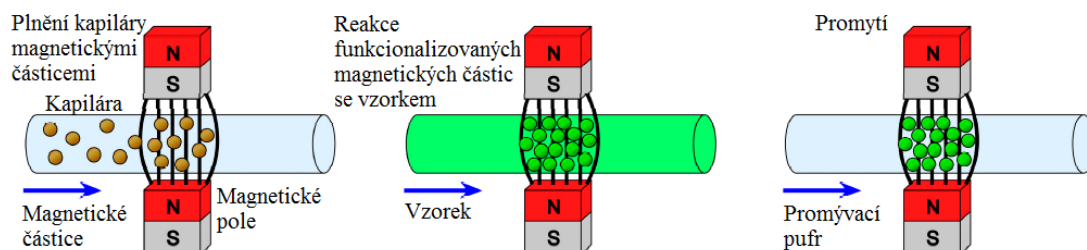
a) Podle účelu použití na:

- *Preparativní* – při níž je vzorek připravován pro vlastní analýzu, např. přečištění séra Proteinem A, který je specifický pro izolaci IgG. Většinou se jedná o nízkotlaké uspořádání [10].
- *Analytickou* – kde je hledaná látka v kapalném vzorku prokazována nebo kvantifikována, tato technika je prováděna za vyššího tlaku, např. HPIAC (vysokoúčinná imunoafinitní chromatografie, z angl. High-Performance Immunoaffinity Chromatography) pro analýzu analytů obsažených např. v séru, mozkomíšním moku apod. [11].

b) Podle uspořádání stacionární fáze na:

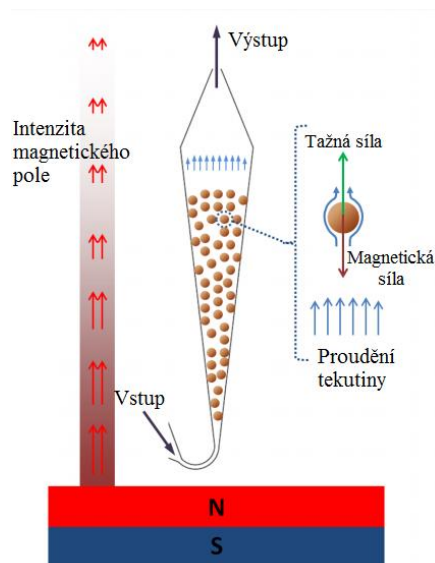
- *Kolonovou* (neboli na sloupci) – kolona z různých materiálů (skleněná, plastová, nerez) je naplněna stacionární fází [12].
- *Vsádkovou* – dělené látky z roztoku se naadsorbují na stacionární fázi resuspendované v ekvilibračním pufru (provedení např. v kádince, ve zkumavce), následně se po promývacích krocích analyzované látky z povrchu pevné fáze uvolní [12]. Při vsádkovém uspořádání je výhodné použít magnetické částice, které lze účinně oddělit od kapaliny magnetickým polem.
- *Mikrofluidní* – miniaturizace techniky provedení bioafinitní chromatografie. V poslední době je toto uspořádání upřednostňováno díky vyšší účinnosti separace, nižším nákladům pro jednu analýzu vzhledem k minimální spotřebě reagentů, nosiče

i separačních médií [13]. Toto uspořádání je nejčastěji využíváno pro analytické účely, a i zde je možné použít superparamagnetické částice. Magnetické částice zde mohou být použity ve formě kompaktního „plugu“ (zátky) nebo mohou být magneticky stabilizovány ve fluidním loži, tzv. MSFB (Magnetically Stabilized Fluidized Bed). V případě použití magnetické zátky, jsou po aplikaci do kapiláry magnetické částice drženy mezi dvěma magnety magnetickým polem v určité části kapiláry a poté je k takto zachyceným částicím aplikován vzorek. Následně dochází k promytí a eluci požadovaného analytu [14]. Tento postup je zobrazen na obrázku č. 3.



Obr. 3. Schéma fixace magnetických částic v mikrofluidním systému, převzato a upraveno z [14]

V případě použití tzv. MSFB jsou magnetické částice udržovány v mikrofluidní komůrce za pomoci magnetických sil, které jsou v rovnováze se silami protékající tekutiny, které působí opačně na magnetické pole [15]. Schematicky znázorněný princip MSFB je na obrázku č. 4.



Obr. 4. Schéma magneticky stabilizovaného fluidního lože v mikrofluidním systému, převzato a upraveno z [15]

1. 1. 2 Používané nosiče a typy ligandů v bioafinitní chromatografii

Nosiče

Matrice neboli materiál pro výrobu nosiče, hraje důležitou roli v přípravě afinitních sorbentů. Ideální matrice pro vodné roztoky a biologický materiál by měla být makroporézní, maximálně hydrofilní a inertní, stabilní při skladování a při provozních podmínkách a měla by obsahovat funkční skupiny, které umožňují nejlépe kovalentní imobilizaci afinitních ligandů [16].

Nosiče neboli stacionární fáze jsou děleny na několik kategorií:

a) Nemagnetické nosiče

- *Porézní nosiče* – jsou vyrobeny z kuliček o různé pórovitosti a vyznačují se tak různě velkou aktivní plochou. Mezi porézní nosiče můžeme také zařadit monolitické nosiče, které budou zmíněny níže. Na základě různé pórovitosti mohou být tyto nosiče děleny na mikroporézní, semimikroporézní a makroporézní. Makroporézní nosiče poskytují velkou aktivní plochu a jsou vhodné pro separace velkých molekul. Mikroporézní nosiče poskytují vysokou vazebnou kapacitu [17]. Mezi nejčastěji použité materiály pro přípravu porézních nosičů patří např. agaróza [18], celulóza [16], oxid křemičitý, polymethylmetakrylát [4, 19]. Porézní nosiče jsou nejčastěji využívány pro separace molekul na základě jejich velikosti (SEC/GPC – chromatografie stérické výluky/gelová permeační chromatografie, z angl. Size Exclusion Chromatography/Gel Permeation Chromatography) [20].
- *Neporézní nosiče* – tyto nosiče se vyznačují menší aktivní plochou oproti porézním nosičům. Skládají se z neporézních kuliček o průměru 1-3 μm , které jsou nejčastěji vyrobeny z oxidu křemičitého, pryskyřice nebo polystyrenu. Neporézní sorbenty jsou s výhodou využívány pro HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. High-Performance Liquid Chromatography), jelikož poskytují nízký vnitřní odpor při vysoké rychlosti proudění mobilní fáze [21].
- *Monolitické nosiče* – jsou chromatografická média vyrobená z jednoho kusu porézního materiálu. Monolitické nosiče mohou mít různou pórovitost, od malých pórů (mikroporézní monolitické nosiče), které poskytují větší povrchovou plochu, přes střední velikost pórů (mezoporézní monolitické nosiče) až po velké póry (makroporézní monolitické nosiče), které poskytují nízký odpor při vysokém průtoku mobilní fáze. Proto mohou být makroporézní monolitické nosiče s výhodou používány při vyšším průtoku mobilní fáze, aniž by byla ohrožena dynamická kapacita a permeabilita nosiče. Monolitické kolony mohou být vyráběny v různých velikostech (0,34 ml až 8 l), tvarech

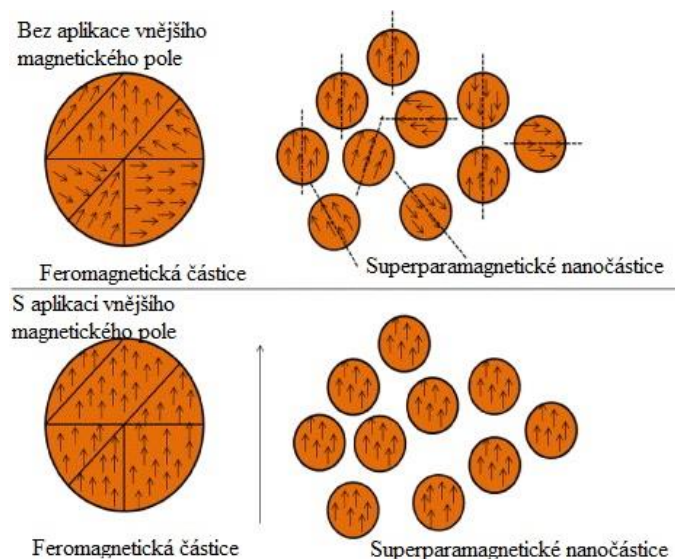
(disky, tenké membrány, kolony, trubky, kapiláry, mikročipy atd.) a s různými povrchovými úpravami, které jsou vhodné pro různé aplikace. Monolitické nosiče mohou být děleny do dvou hlavních skupin na základě materiálu, ze kterého jsou vyrobeny, a to na organické a anorganické. Organické monolitické nosiče jsou ideální pro separaci makromolekul, jako jsou proteiny, konjugáty, velké peptidy, plazmidy, syntetické polymery, nukleové kyseliny, protilátky, léčiva, vakcíny, viry, bakteriofágy, imunoglobuliny, polysacharidy a buňky. Zatímco anorganické monolitické nosiče na bázi oxidu křemičitého jsou ideální pro separaci malých a středních biomolekul, včetně nízkomolekulárních molekul, jako jsou malé peptidy, nukleotidy, anorganické anionty, polutanty nebo ionty ve vodě, potravinářská aditiva a enantiomery [22].

- *Membrány* – se vyznačují stejně velkou aktivní plochou jako neporézní nosiče a stejně jako neporézní nosiče jsou membrány využívány v afinitní chromatografii pro separaci látek za zvýšeného tlaku (HPLC). Běžnými materiály pro výrobu membrán využívaných v afinitní chromatografii jsou celulóza, polysulfon, polyamid [23].

b) Magnetické nosiče

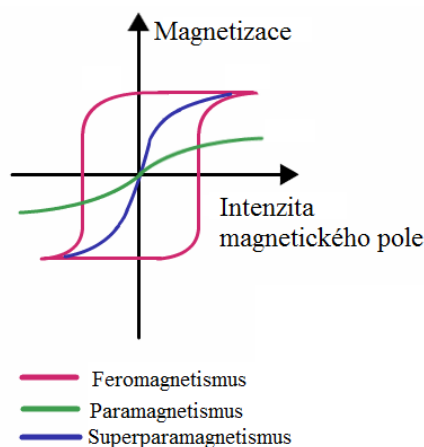
Magnetické částice se vyznačují řadou výhod jako je např. snadná manipulace, rychlost provedení izolace, dochází k menšímu naředění vzorku a může docházet k rychlé změně složení mobilní fáze. Dalšími výhodami jsou nízká pořizovací cena a možnost opakovaného použití [3].

Magnetické částice používané v afinitní chromatografii musí mít superparamagnetické vlastnosti. Superparamagnetismus je jednou z forem magnetismu vyskytující se v souboru malých feromagnetických a ferimagnetických nanočástic. Každá z nanočástic má nenulovou magnetizaci, jejíž hodnota může být ovlivněna teplotními změnami. Bez vnějšího magnetického pole má soubor nanočástic průměrně nulovou magnetizaci. V přítomnosti magnetického pole se dipólové momenty zorientují ve směru pole a magnetizace celého objemu nanočástic je nenulová, jak je patrné na obrázku č. 5 [24].



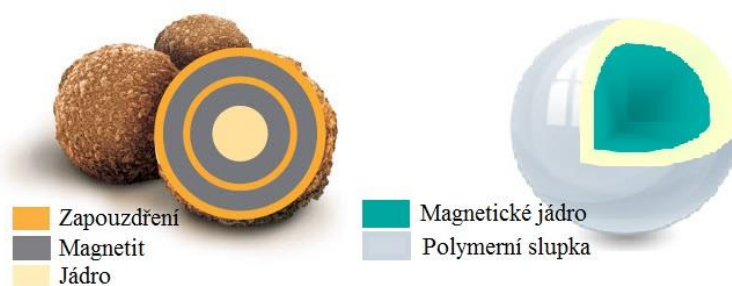
Obr. 5. Magnetizace ferro a superparamagnetických částic, převzato a upraveno z [25]

Rozdílné chování feromagnetických, superparamagnetických a paramagnetických částic zobrazuje také hysterezní křivka na obrázku č. 6, která vyjadřuje závislost magnetizace M na intenzitě magnetického pole H [26].



Obr. 6. Hysterezní křivka zobrazující závislost magnetizace magneticky aktivovaných částic na intenzitě magnetického pole, převzato a upraveno z [26]

Superparamagnetické částice jsou nejčastěji vyráběny z oxidu železa a jsou potaženy vrstvou silanových derivátů, které zabezpečují chemickou stabilitu a poskytují tak konkrétní funkční skupiny, potřebné k navázání ligandu na nosič [20]. Jedná se o tzv. core-shell (jádro-plášť) technologii, kdy je buď magnetické jádro potaženo vrstvou polymeru, na kterém jsou následně zaváděny různé funkční skupiny [27], nebo je polymerní jádro potaženo vrstvou magnetitu, který je blokován další vrstvou, na které jsou obsaženy různé funkční skupiny [28]. Rozdílné uspořádání ve složení magnetických částic je zobrazeno na obrázku č. 7.



Obr. 7. Schéma magnetických částic připravovaných jádro-plát' technologií (vpravo – magnetické částice Sera-Mag Speed Beads; vlevo – superparamagnetické hybridní částice MagP), převzato a upraveno z [28, 29]

Superparamagnetické částice mají na svém povrchu zaváděny různé funkční skupiny, např. karboxylové, amino skupiny [28], hydrofobní alkylové skupiny (C4, C8, C18), diethylaminoethylové skupiny, β -cyklodextrinové [30] a další.

Některé komerčně dostupné nosiče již mohou obsahovat nejen volné reaktivní funkční skupiny, ale mohou obsahovat kovalentně vázanou funkční molekulu jako je např. avidin/biotin, Protein A, Protein G [28].

Příkladem magnetických částic, které mohou být použity v bioafinitní chromatografii jsou magnetické mikročástice Sera-Mag SpeedBeads, které jsou použity v experimentální části této diplomové práce. Tyto částice o velikosti 0,816 μm mající polystyrenové jádro obalené dvěma vrstvami magnetitu (jak je zobrazeno na obrázku č. 7) mají makroporézní povrch, čímž je zajištěna větší plocha pro vazbu ligandu a obsahují karboxylové funkční skupiny pro navázání ligandu (Con A) [28].

Dalšími použitými magnetickými částicemi v této diplomové práci jsou magnetické částice ProMag o velikosti 0,87 μm vyrobené z polymerního materiálu, které stejně jako magnetické částice Sera-Mag Speed Beads obsahují na svém povrchu karboxylové funkční skupiny pro navázání ligandu (Con A) [31].

Jak bylo již řečeno výše, existuje celá řada magnetických částic použitelných jako nosiče ligandů pro afinitní chromatografii. V tabulce č. 2 je přehled vybraných komerčně dostupných magnetických částic na současném trhu.

Tab. 2. Přehled vybraných komerčně dostupných superparamagnetických částic

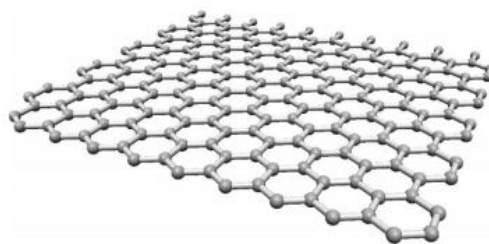
Výrobce	Název	Velikost	Funkční skupiny	Materiál
Sigma-Aldrich [32]	Sera-Mag™	1 μm	COOH, Streptavidin, Oligo(dT)	Polystyrenové jádro potažené jednou vrstvou magnetitu a polymerem
	Sera-Mag Speed Beads	1 μm	Protein A/G, COOH, Streptavidin, NeutrAvidin,	Polystyrenové jádro potažené dvěma vrstvy magnetitu a polymerem
	TurboBeads™	≤ 50 nm	NH ₂ , Azid, COOH, oxid křemičitý, TEMPO, Vinyl	Neuvedeno
Bangs Laboratories [33]	ProMag®	1-3 μm	COOH, Streptavidin, Bind- IT, Protein G	Polymer
	ProMag®HP	3 μm	COOH, Streptavidin	Polymer
	BioMag®Plus	~ 1,5 μm	Biotin, Streptavidin, NH ₂ , COOH	Silanizovaný oxid železitý
ThermoFisher Scientific [34]	Dynabeads®	2,8 μm	Protein A, Protein G, Oligo(dT), Streptavidin,	Jádro z oxidu železitého potažené polymerem
Micromod [35]	nanomag®-D	130, 250 a 500 nm	NH ₂ , COOH, avidin, streptavidin, Protein A, albumin, biotin, glutathion	Jádro z magnetitu potažené dextrans
	micromer®-M	1-12 μm	NH ₂ , PEG-NH ₂ , COOH, PEG-COOH, avidin, streptavidin, Protein A, albumin, polyethylenimin	Jádro z kopolymeru styren-maleinové kyseliny obalené magnetitem a polymerem
	sicastar®-M	350 nm-1,5 μm	NH ₂ , COOH, N-hydroxysukcimid, avidin, streptavidin, Protein A, albumin, biotin	Vyrobena hydrolyzou orthosilikátů s magnetitem, hydrofilní povrch s koncovými Si-OH vazbami

c) Nanomateriály nové generace

Nové objevy na poli materiálového inženýrství nesou nové poznatky a nové materiály využívané při analytických měřeních. Dobrým příkladem je rostoucí využití nanočástic jako stacionární fáze v různých typech chromatografických metod, které se vyznačují velkou plochou s malým objemem. Dále se vyznačují svou různou morfologií, která zlepšuje separaci z hlediska účinnosti a selektivity. Mezi tyto nanomateriály nové generace patří např. uhlíkové materiály jako je grafen [36], zlaté nanočástice [37], nanočástice z oxidu křemičitého [38]

a nanomateriály na bázi oxidu kovů [39]. Tyto nanomateriály jsou v dnešní době nejčastěji používány pro miniaturizaci separačních technik jako je právě afinitní chromatografie [40].

Prvním z výše zmíněných nanomateriálů nové generace je grafen. Grafen je alotropem uhlíku a je složen z jedné vrstvy grafitu, jehož struktura byla popsána již v roce 1962 Hansem-Peterem Boehmem [36]. Grafen tvoří dvourozměrnou strukturu skládající se z jedné vrstvy atomů uhlíku složených do šestiúhelníkové krystalové struktury podobné včelím plástvím [36]. Na obrázku č. 8 je zobrazena struktura grafenu.



Obr. 8. Struktura grafenu, převzato z [36]

Grafen je využíván např. v IMAC (afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, z angl. Immobilized Metal Affinity Chromatography), kdy je grafen potažen polydomaminem a funkcionizován titanovými ionty. Tato metoda slouží k analýze fosforylovaných proteinů a peptidů [41]. Dále může být grafen využit v kapalinové kapilární chromatografii a v kapilární elektrochromatografii na potažení vnitřního povrchu kapilár [42]. Další aplikací je modifikace monolitů oxidem grafenu pro chirální separace látek [40].

Dalším hojně využívaným nanomateriálem nové generace jsou zlaté nanočástice. Nanočástice z koloidního zlata byly již po staletí využívány umělci kvůli zářivým barvám, které poskytují při styku s viditelným světlem. Tento jev způsobuje tzv. povrchová plasmonová rezonance, která je závislá na prostředí, ve kterém se zlaté nanočástice vyskytují a na jejich velikosti. Na obrázku č. 9 jsou zobrazeny různě barevné monodisperzní zlaté nanočástice [37].



Obr. 9. Povrchová plasmonová rezonance zlatých nanočástic, převzato z [43]

Zlaté nanočástice jsou využívány v řadě oblastí, např. v elektronice (jako vodiče v čípech), ve fotodynamické terapii (kde produkují teplo po excitaci v blízké infračervené oblasti; využití v protinádorové terapii, kdy zlaté nanočástice produkují teplo, které zabíjí nádorové buňky – hypertermická terapie), v senzorech a sondách, diagnostice (pro detekci biomarkerů v diagnostice srdečních onemocnění, nádorových onemocnění, infekčním agens; využití v imunochemických testech, např. domácí těhotenský test), dále jsou využívány pro transport léčiv v lidském organismu a mohou být použity jako katalyzátory při mnoha chemických reakcích [37].

Dalším ve výčtu nanomateriálů nové generace jsou nanočástice vyrobené z oxidu křemičitého. Polymerní oxid křemičitý je za běžných podmínek hydrofilní, inertní a biokompatibilní materiál. Vzhledem k tomu, že povrch těchto nanočástic může být snadno modifikován potřebnými funkčními skupinami, jsou jiné druhy částic silanizovány. Nejčastěji bývají silanizovány superparamagnetické částice [44] a zlaté nanočástice [45]. Jak bylo již zmíněno v části týkající se superparamagnetických částic, tak mezi funkční skupiny často používané k modifikaci povrchu částic patří např. amino skupiny, karboxylové, aldehydové, epoxidové, thiolové skupiny a další [46]. Velikost vyráběných nanočástic z oxidu křemičitého se pohybuje v rozmezí desítek a stovek nanometrů [47].

Posledním zmíněným nanomateriálem jsou nanomateriály na bázi oxidu kovů. Tyto nanočástice mohou být vyrobeny například z Fe_3O_4 , TiO_2 , CuO , ZnO atd. [48]. Nanočástice na bázi oxidu kovů jsou využívány v mnoha oblastech např. pro extrakci proteinů a peptidů z vodného roztoku před MS analýzou (hmotnostní spektrometrie, z angl. Mass Spektrometry) [49], dále mohou být použity při výrobě mikroelektronických obvodů, senzorů, palivových článků nebo mohou být využity jako katalyzátory [48].

Příprava nosiče pro bioafinitní chromatografii

Vazba ligandu na nosič

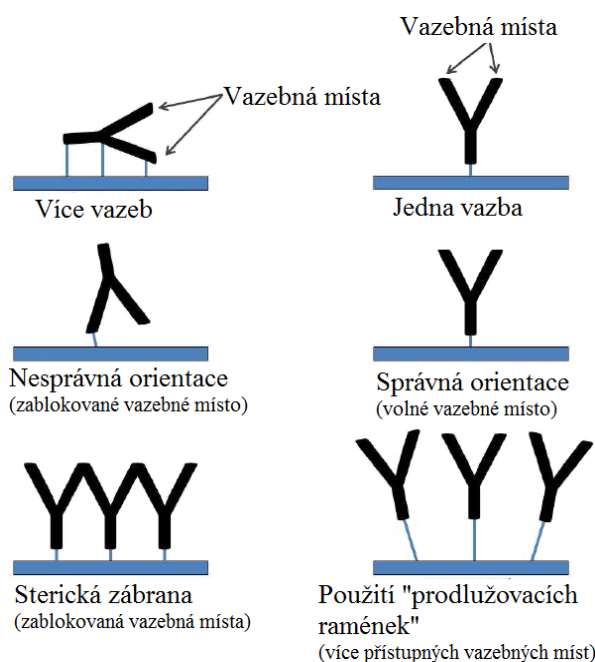
Ligandy mohou být na povrch nosiče navázány kovalentními vazbami, adsorbovány na povrch prostřednictvím nesespecifických a specifických interakcí, zachyceny uvnitř pórů nebo mohou koordinovat s ionty kovů, jako např. v IMAC [4].

Nejčastěji je pro imobilizaci ligandu na nosič využívána kovalentní vazba. K tvorbě kovalentní vazby mezi ligandem a nosičem jsou využívány aminové, sulfhydrylové, hydroxylové, aldehydové a karboxylové funkční skupiny. Využití kovalentní vazby při imobilizaci ligandu na nosič je selektivnější než jiné metody imobilizace, které obecně vyžadují více kroků a chemických činidel. I když by se mohlo zdát, že tato metoda je finančně náročnější

než jiné metody imobilizace ligandu na povrch nosiče, v dlouhodobém horizontu je tato metoda finančně výhodnější, jelikož je stabilita takto připravených nosičů vyšší a nevyžaduje častou regeneraci nosiče, jako tomu bývá např. při použití adsorpčních technik [50].

Provedení tzv. biofunkcionalizace, to je kovalentní vazby molekul na nosič, spočívá ve více krocích – aktivace funkčních skupin na povrchu nosiče, případně na povrchu molekul ligandu, odmytí nezreagovaných molekul a blokace zbylých nezreagovaných funkčních skupin [51].

Při imobilizaci ligandu na nosič je třeba dbát na to, aby ligand mohl i po vazbě aktivně vázat požadovaný analyt ze vzorku. Vazebná aktivita ligandu může být ovlivněna špatnou orientací ligandu k nosiči, např. vazba ligandu na nosič jeho vazebným místem. Dále může dojít k imobilizaci více ligandů blízko u sebe, čímž dojde k nepřístupnosti vazebného místa ligandu pro analyt nebo může dojít k navázání ligandu více než jednou vazbou k nosiči, což opět způsobí nepřístupnost vazebného místa ligandu pro analyt ze vzorku. Při imobilizaci ligandů na nosiče jsou s výhodou využívána tzv. prodlužovací raménka, která umožňují imobilizaci více ligandů poblíž sebe, aniž by došlo ke sterické blokaci vazebných míst ligandů [4]. Schematicky je tato problematika znázorněna na obrázku č. 10.



Obr. 10. Možné orientace ligandu na nosiči vázaného kovalentní vazbou, převzato a upraveno z [4]

Další již zmíněnou metodou imobilizace je adsorpce ligandu na povrch nosiče. Adsorpce může být buď nespecifická, nebo specifická. Při nespecifické adsorpci jsou využívány Coulombické interakce, vodíkové můstky a hydrofobní interakce.

Specifická adsorpce se běžně provádí za přítomnosti avidinu nebo streptavidinu pro adsorpci biotinu, který obsahuje afinitní ligandy, Protein A, nebo Protein G [4].

Typy ligandů používaných v bioafinitní chromatografii

Jako ligandy mohou být použity různé biologicky aktivní látky, např. imunoglobulin vázající proteiny, enzymy, substráty nebo inhibitory enzymů, lektiny, specifické protilátky aj. [7] se schopností vytvářet pomocí nekovalentních vazeb tzv. biospecifický pár. V tabulce č. 3 jsou uvedeny příklady biospecifických párů využívané v bioafinitní chromatografii. Výhodou je, že tvorbu biospecifického páru lze využít v obou směrech, jedna ze dvou vzájemně reagujících látek může být látkou izolovanou i ligandem [5, 7].

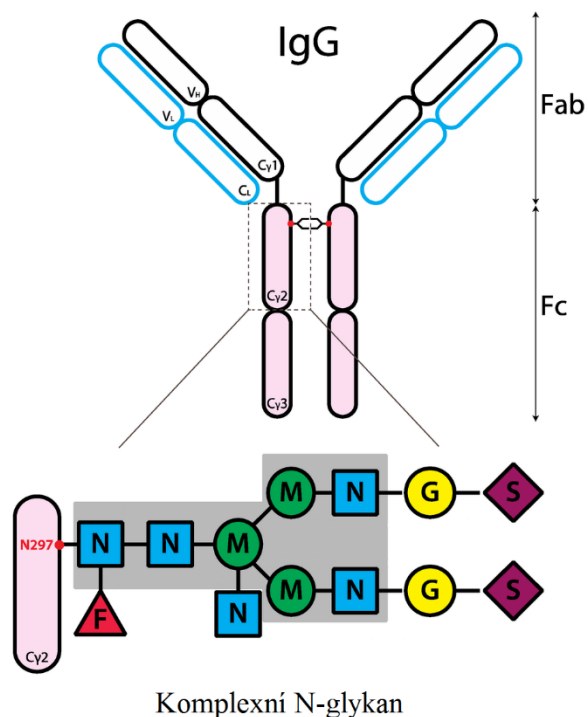
Tab. 3. Příklady nejčastěji využívaných biospecifických párů v bioafinitní chromatografii, převzato a modifikováno z [7]

	Biospecifické páry	
Bioafinitní chromatografie	Protein A a G	Protilátky
	Lektiny	Karbohydráty (sacharidy), glykoproteiny a glykolipidy
	Karbohydráty (sacharidy)	Lektiny
	Enzymy (př. trypsin [52], LDH, ADH [53])	Enzymy, substráty, analoga substrátů, inhibitory enzymů, kofaktory (př. Gly-Gly-Arg-Sepharosa [52], oxalát, pyrazol [53])
	Protilátky	Antigeny (př. proteiny, léky, peptidy, viry, buněčné komponenty)
	Proteiny jako lidský sérový albumin, hovězí sérový albumin a alfa-1-kyselý glykoprotein	Enantiomery nízkomolekulárních molekul (př. chirální separace léků)

Protein A, Protein G

Pokud jsou použity protilátky jako ligandy pro izolaci a purifikaci látek, tzv. antigenů, jedná se o imunoafinitní chromatografii [4, 7].

Pro izolaci a purifikaci molekul IgG z tělních tekutin nebo živného média jsou nejčastěji používanými ligandy imunoglobulin vázající proteiny (Protein A produkovaný mikroorganismem *Staphylococcus aureus* [5, 7] a Protein G produkovaný streptokoky skupiny C a G, např. *Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis* [54]). Tyto imunoglobulin vázající proteiny vyvazují přednostně Fc část IgG molekul, konkrétně jejich glykozylované části, jak je zobrazeno na obrázku č. 11 [7].



Obr. 11. Struktura lidského imunoglobulinu G, převzato a upraveno z [55]

Tyto proteiny vyvazují nejen IgG, ale i jejich podtřídy avšak s různou hodnotou afinitní konstanty. Např. Protein A vyvazuje IgG, IgM, IgA a IgD, Protein G vyvazuje převážně IgG (IgG1-4) [7]. Silou vazby k jednotlivým třídám a podtřídám se tyto proteiny liší. Dokonce jsou rozdíly i mezi imunoglobuliny určité třídy pocházející z různých organismů [5] (např. myší, lidské, beraní, koňské [56]). Tato skutečnost je znázorněna v tabulce č. 4. Rozdíly v silách biospecifické interakce jsou zvýrazněny barevně.

Tab. 4. Přehled interakcí imunoglobulinů G různých organismů s Proteinem A a G (- žádná interakce, ++ slabá interakce, +++ střední interakce, ++++ silná interakce), převzato a upraveno z [57]

Živočišný druh	Protilátka	Síla interakce		Živočišný druh	Protilátka	Síla interakce		
		Protein A	Protein G			Protein A	Protein G	
Myš	IgG 1	++	+++	Ovce	IgG 1	++	++++	
	IgG 3	++++	++++		IgG 2	++++	++++	
	IgG 2a	++++	++++		celkové IgG	++	++++	
	IgG 2b	++++	++++	Kůň	IgG (ab)	++	-	
	IgM	-	-		IgG (c)	++	-	
	celkové IgG	++++	++++		IgG (T)	-	++++	
Člověk	IgG 1	++++	++++	Koza	celkové IgG	++	++++	
	IgG 2	++++	++++		IgG 1	++	++++	
	IgG 3	++	++++		IgG 2	++++	++++	
	IgG 4	++++	++++		celkové IgG	++	++++	
	IgA	++	-	Kráva	IgG 1	++	++++	
	IgD	-	-		IgG 2	++++	++++	
	IgM	++	-		celkové IgG	++	++++	
	Fab	++	++	Králík	celkové IgG	++++	++++	
	scFv	++	-	Morče	celkové IgG	++++	++	
	celkové IgG	++++	++++	Prase	celkové IgG	++++	++	
Krysa	IgG 1	++	+++	Kočka	celkové IgG	++++	++	
	IgG 2a	-	++++	Pes	celkové IgG	++++	++	
	IgG 2b	-	++					
	IgG 2c	++++	++++					
	celkové IgG	++	+++					

Enzymy a jejich substráty

Další skupinou biomolekul, které mohou být použity jako ligandy, jsou enzymy se svými substráty, analogy substrátů, inhibitory nebo kofaktory [5]. Například již v tabulce zmíněná dvojice trypsin a Gly-Gly-Arg-Sepharosa. Ligandem je aminokyselinová sekvence Gly-Gly-Arg, která je vázána na nosič (Sepharosa). Tato aminokyselinová sekvence je substrátem pro enzym trypsin [52]. Trypsin (EC 3. 4. 21. 4) patří do skupiny hydroláz, přesněji proteáz. Enzym se vyskytuje ve dvanáctníku a jeho maximální enzymatická aktivita je při mírně alkalickém prostředí odpovídající pH 8. Trypsin štěpí peptidovou vazbu za lysinem a argininem, pokud po nich nenásleduje prolin [58]. Trypsin takto můžeme nejen izolovat a purifikovat, ale i kvantifikovat. Roztok enzymu o nízké koncentraci je kontinuálně vnášen na

kolonu, přičemž se část enzymu váže na imobilizovaný ligand. Pozorujeme určité zadržování enzymu v koloně, které odpovídá množství navázaného enzymu na imobilizovaný ligand [52].

Enzymy a jejich inhibitory

Další dvojicí, která je využívána v enzymové afinitní chromatografii, je dvojice enzym a jeho inhibitor. Například laktátdehydrogenáza (EC 1. 1. 1. 27), přesněji její izoenzymy LDH₁ a LDH₂ a jejich společný inhibitor oxalát. Isoenzymy LDH₁ a LDH₂ se v organismu vyskytují především v orgánech, kde převládá aerobní glykolýza, např. myokard, erytrocyty a ledviny [59].

Enzymy a jejich kofaktory a analoga substrátů

Příkladem použití kofaktoru a zároveň analoga substrátu je použití NAD⁺. Kdy může být použita kolona NAD⁺-Sepharosa nebo AMP-Sepharosa, přičemž jsou zadržovány enzymy závislé na NAD⁺. Při použití směsi obsahující hovězí sérový albumin, laktátdehydrogenázu a glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (EC 1. 2. 1. 12), jsou zadržovány zmíněné enzymy. Pro eluci glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy je použit NAD⁺ a pro eluci laktátdehydrogenázy je použit analog NAD⁺, tedy redukovaný kofaktor NADH [60]. Laktátdehydrogenáza katalyzuje reakci oxidace laktátu na pyruvát [61] a glycerinaldehyd-3-fosfát se účastní glykolýzy [62].

Nízkomolekulární látky

Dále mohou být použity jako ligandy různé nízkomolekulární látky (např. NAD⁺ [63], glutathion [64], polymyxin [65], biotin [66], histidin [67]), které zachycují vysokomolekulární látky (např. lektiny, imunoglobuliny, enzymy) [4, 7].

Vzhledem k náplni diplomové práce se bude následující kapitola věnovat pouze lektinům a tzv. lektinové chromatografii.

1. 2 Lektiny

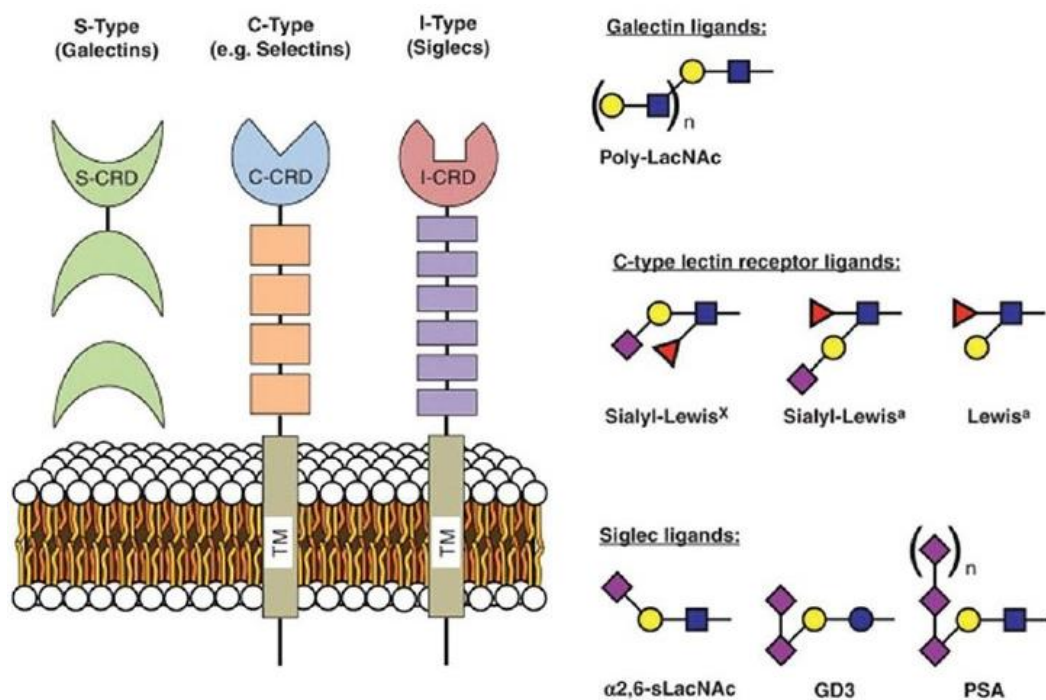
1. 2. 1 Vlastnosti a struktura

Lektiny jsou adhezivní proteiny, které vážou sacharidy a další glykozylované molekuly (např. glykoproteiny, glykolipidy) [68, 69]. Lektiny se hojně vyskytují u rostlin, ale též i u živočichů a mikroorganismů [70]. V lidském organismu hrají lektiny roli ve vzájemném rozpoznávání buněk, při tvorbě metastáz nádorů a také při tzv. „homingu“ lymfocytů, což je řízená migrace lymfocytů do určitých tkání imunitního systému za pomoci adhezivních molekul označovaných jako „homingové“ receptory, které se vyskytují na lymfocytech; na endoteliích cílových tkání jsou produkovány ligandy pro tyto receptory, nazývané adresiny [7].

Lektiny hrají také významnou roli při interakci imunokompetentních a dalších krevních, případně tkáňových buněk mezi sebou. Z funkčního hlediska mohou být lektiny děleny na solubilní nebo membránově vázané, ale ačkoli se jejich struktura liší, doména rozpoznávající sacharidy (CRD, z angl. Carbohydrate Recognition Domain) je jim společná [70, 71].

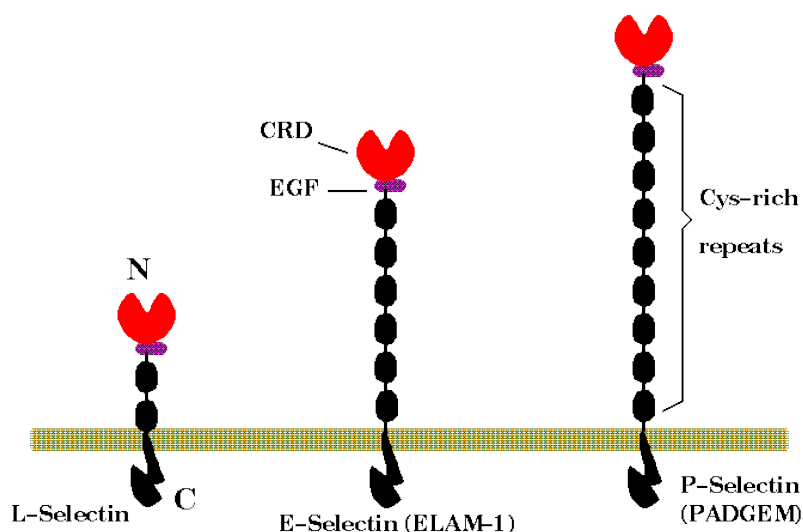
Membránově vázané lektiny jsou lokalizovány v místě jejich syntézy a pravděpodobně se podílejí na endocytóze nebo buněčné adhezi. Na rozdíl, od membránově vázaných lektinů, jsou solubilní lektiny schopné difundovat lokálně do tkání nebo jsou schopny vstupu do krevního řečiště [72].

Lektiny mohou být tříděny také podle struktury rozpoznávající domény pro sacharidy (CRD) na lektiny typu C, I, S (obrázek č. 12) a selektiny typu L, P, E (obrázek č. 13) [69]. Lektiny typu C mají CRD závislou na Ca^{2+} iontech [69]. Tento typ lektinů se podílí na třídění glykoproteinů a na rozpoznávání různých sacharidů, jsou to N-koncové části selektinů [68]. Mezi lektiny C-typu patří např. manózoové nebo galaktózoové receptory fagocytů, nízkofinální receptor pro IgE (CD23), skupina povrchových receptorů NK-buněk (CD94, NKG2), povrchový receptor aktivovaných lymfocytů (CD69) a některé další [69]. Lektiny typu I (sialoadheriny) obsahují dvě nebo více domén [68]. Tento typ lektinů rozpoznává koncové zbytky kyseliny sialové [68]. Lektiny typu S, též zvané galektiny, váží galaktosylové zbytky [73]. Aktivita lektinů typu S je závislá na thiolových (-SH-) skupinách. Důležitý je galektin 3, který je exprimován na makrofázích a Langerhansových buňkách a váže molekuly IgE [69].



Obr. 12. Schematické znázornění vybraných lektinů s různými sacharidy rozeznávajícími doménami (TM – transmembránový region, vpravo zobrazeny ligandy pro jednotlivé typy CRD), převzato a upraveno z [74]

Selektiny jsou membránově vázané a stejně jako lektiny obsahují také lektinovou doménu. Nacházejí se na všech typech leukocytů. Skládají se z dlouhého flexibilního „stonku“ a N-terminálního lektinu, který obsahuje CRD. Tyto molekuly patří k C-typu živočišných lektinů, které jsou závislé na Ca^{2+} iontech [68]. Selektiny jsou označovány podle typu buněk, na kterých se vyskytují: L- (leukocytární), P- (trombocytární) a E- (endoteliální) (obrázek č. 13) [69].



Obr. 13. Schematické znázornění vybraných selektinů, převzato a upraveno z [75]

Díky selektinům mohou leukocyty migrovat z krevních cév do tkání. Tato adheze je zprostředkována L-selektiny pro lymfocyty a zprostředkovává tzv. „homing“ lymfocytů, který byl popsán na začátku této kapitoly [68]. V tabulce č. 5 jsou uvedeny živočišné lektiny s uvedením jejich lokalizace v buňce, typickým ligandem a příkladem funkce daného lektinu.

Tab. 5. Přehled základních živočišných lektinů, převzato a modifikováno z [76]

Podskupina	Typické ligandy	Lokalizace	Příklady funkcí
C-typ	Různé	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Buněčná adheze (selektiny), vrozená imunita (collectiny)
I-typ	Sialové kyseliny	Plazmatická membrána	Buněčná adheze
S-typ (galektiny)	β -D-Galaktóza	Cytoplazma, extracelulární prostor	Regulace cytoplazmatických dějů (např. apoptóza)
L-typ	Různé	ER, GA	Třídění proteinů
P-typ	Manóza-6-fosfát, různé	Sekreční cesta (ER, GA, sekreční granula, lysosom)	Třídění glykoproteinů z GA, degradace glykoproteinů v ER
M-typ	Oligomanóza (Man ₈)	ER	Degradace glykoproteinů asociovaná s ER
R-typ	Různé	GA, plazmatická membrána	Třídění enzymů, regulace glykoproteinových hormonů
F-typ	Oligosacharidy zakončené fruktózou	extracelulární	Vrozená imunita
Calnexiny	Glc ₁ Man ₉	ER	Kontrola správného sbalení glykoproteinů v ER
F-box lektiny	N, N'-diacetylchitobióza (GlcNAc) ₂	Cytoplazma	Degradace špatně sbalených proteinů
Fikoliny	N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita
Chitináze podobné lektiny	Chito-oligosacharidy	extracelulární	Metabolismus kolagenu
Intelektiny	Galaktóza, galaktofuranóza, pentózy	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita, oplodnění, embryogeneze

Biosyntéza, transport a regulace lektinů

Některé geny kódující lektiny jsou exprimovány konstitutivně, zatímco jiné geny mohou být aktivovány za specifických biologických podmínek. Biosyntéza membránově vázaných lektinů a některých solubilních lektinů probíhá v drsném endoplazmatickém retikulu (ER). Po syntéze se z ER přesouvají do Golgiho komplexu (též Golgiho aparát, GA) a odtud jsou transportovány do extracelulárního prostoru [77].

Značná podmnožina solubilních lektinů (např. galektiny, heparin vázající růstové faktory) jsou syntetizovány na volných ribozomech. Obcházením klasické dráhy sekrece se mohou tyto molekuly vyhnout nežádoucím předčasným interakcím s potencionálními ligandy, které jsou

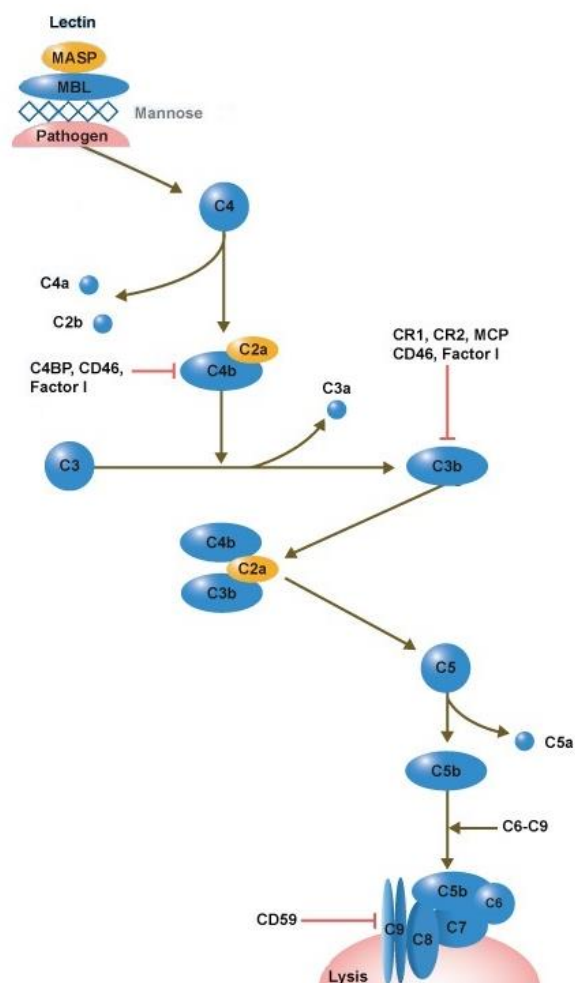
syntetizovány ve stejné buňce. Kromě toho jsou některé z těchto lektinů (např. galektiny) citlivé na redoxní stav uvnitř buňky a mohou zůstat aktivní pouze v redukčním prostředí cytosolu. Při vstupu do oxidačního prostředí extracelulárního prostoru proto musí okamžitě vázat ligandy nebo se postupně inaktivují. K další formě regulace dochází, když se lektin váže na příbuzné řetězce sacharidů přítomné na stejné molekule nebo na stejném buněčném povrchu, tím se stává funkčně neaktivní [77].

Membránově vázané lektiny jsou po navázání analytu transportovány do vnitřních prostor, dochází k interakci s endosomy, kde dojde k jejich uvolnění a poté mohou být některé z těchto lektinových receptorů recyklovány zpět na buněčný povrch [77].

1. 2. 2 Význam a funkce lektinů v organismech

Přítomnost lektinů v organismu je důležitá pro normální průběh imunitní reakce, kde je nutný vzájemný kontakt mezi jednotlivými buňkami imunitního systému nebo kontakt mezi endoteliemi, epitelii a mezibuněčnou hmotou [69]. Bylo prokázáno, že interakce lektinů se sacharidy a jinými molekulami s cukernými motivy se podílejí na takových činnostech, jako je opsonizace mikroorganismů, fagocytóza, buněčná adheze a migrace, aktivace a diferenciací buněk a apoptóza [70]. V savčím organismu lektiny opsonizující mikroorganismy aktivují komplement, který následně takto označený mikroorganismus „zneškodní“ [78].

Komplement je soubor cca 30 sérových a membránových proteinů (označovaných C1-C30) a může být aktivován třemi způsoby: klasickou, alternativní a lektinovou dráhou. Lektinová dráha aktivace komplementu doplňuje klasickou dráhu. Aktivace komplementu je iniciována sérovým lektinem MBL (lektin vázající manózu, z angl. Mannose Binding Lectin), který se váže na sacharidové struktury na povrchu mikroorganismu. MBL působí podobně jako molekula C1, tzn., že po vazbě na povrch mikroorganismu štěpí C4 a C2 na fragmenty C4a, C4b a C2a, C2b. Fragmenty C4b a C2a se vážou na povrch mikroorganismu a tvoří tzv. C3-konvertázu (C4bC2a). Takto vzniklá konvertáza štěpí velké množství C3 na C3a (chemotaxin) a C3b (opsonin). Poté se vytvoří C5-konvertáza (C4bC2aC3b), která štěpí C5 na C5a (chemotaxin) a C5b. Následuje lytická fáze komplementové kaskády, která se vyznačuje tvorbou komplexu C5b-C9. Tento komplex vytvoří v membráně póry a dochází tak k osmotické lýze buňky (mikroorganismu) [78]. Tento proces aktivace komplementu lektinovou dráhou je schematicky znázorněn na obrázku č. 14.



Obr. 14. Lektinová dráha aktivace komplementu, (MBL – lektin vázající manózu; MASP – MBL asociovaná serinová proteáza), převzato z [79]

Schopnost specifické interakce lektinů se sacharidy je dána trojrozměrnou strukturou vazebných míst lektinů. Vazebná místa lektinů vykazují konzervativní aminokyselinový profil v rámci jednotlivých rodin lektinů, které budou popsány níže. Koordinace lektinů s kovovými ionty zajišťuje integritu lektinových podjednotek a správnou orientaci podjednotek pro vazbu sacharidů [73, 80].

Strukturální rozdíly jednotlivých typů lektinů jsou dány jejich aminokyselinovou sekvencí, počtem podjednotek a chemickou povahou polypeptidů [73, 80].

Počet nově identifikovaných lektinů v lidském organismu se rychlým tempem zvyšuje, a díky tomuto se zvyšujícímu se počtu vývoj v oblasti studia lektinů otevřel nový směr při studiu funkce imunitního systému a studiu nových terapeutických postupů při léčbě a prevenci závažných onemocnění [73].

1. 2. 3 Biospecifické interakce lektinů

Na mělkých prohlubních nacházejících se na povrchu lektinu jsou tvořena relativně nízkoafinní místa pro monosacharidy. Selektivita vazby mezi lektinem a vázající se molekulou je dána kombinací většího množství nekovalentních sil, např. vodíkových vazeb a van der Waalsových sil. Vyšší selektivita se dosahuje těsnějším kontaktem mezi lektinem a sacharidovým zbytkem. Ke zvýšení afinity vazby dochází shlukováním jednotlivých vazebných míst na polypeptidu [68].

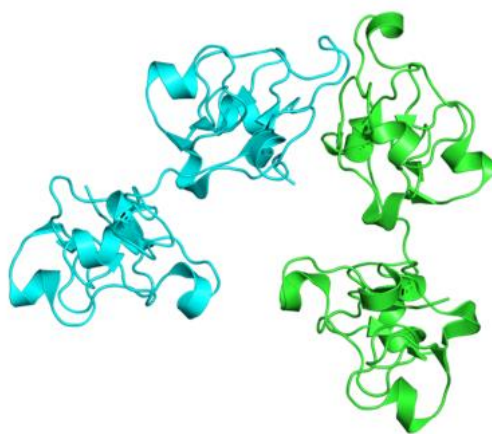
Vzhledem ke schopnosti lektinů vázat sacharidové struktury, jsou imobilizované lektiny (převážně rostlinného původu) mocné nástroje používané hlavně pro separaci a izolaci glykoproteinů a glykolipidů (tyto molekuly obsahují specifické glykosidické motivy) [7]. Pro separaci a izolaci glykoproteinů lze použít i specifické protilátky, jak polyklonální, tak monoklonální protilátky. Je jisté, že vhodně připravené polyklonální nebo monoklonální protilátky mají vyšší afinitu k (oligo)sacharidům než lektiny, což znamená, že při použití protilátek pro izolaci jsou v některých aplikacích získány vyšší výtěžky než u lektinových nosičů. Vzhledem ke slabším vazebným afinitám jsou lektinové nosiče upřednostňovány k izolaci látek, které lze šetrně z nosiče uvolnit. Také cena lektinů je ve srovnání se specifickými protilátkami nižší. Další výhodou lektinů je jejich univerzálnost vzhledem k rozmanitosti glykosidických motivů vyskytujících se v rostlinných nebo živočišných tkáních [7].

1.3 Lektinová afinitní chromatografie

Jak bylo již dříve zmíněno, lektiny mohou být použity jako ligandy pro specifickou vazbu sacharidů obsažených v polysacharidech, glykoproteinech nebo glykolipidech. Tato bioafinitní chromatografie, s lektinovým ligandem vázaným ve stacionární fázi, je také známá pod názvem lektinová afinitní chromatografie [18, 81]. Obecný princip této techniky je popsán v kapitole o bioafinitní chromatografii.

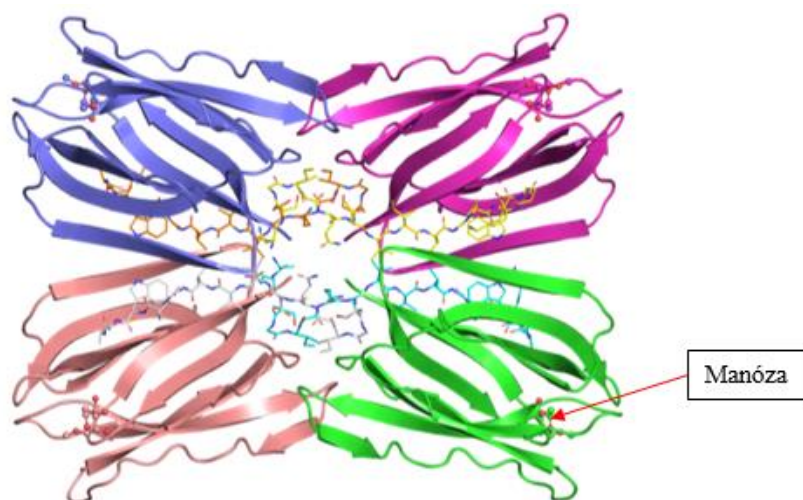
Ve výzkumu a vývoji, v klinické praxi nebo v biotechnologiích je nejběžněji používaným lektinem konkanavalin A (Con A). Jedná se o hemaglutinin produkovaný fazolemi *Canavalia ensiformis* [5, 18, 81]. Tento lektin byl využíván v experimentální části této diplomové práce, a tudíž bude blíže popsán v samostatné kapitole.

Mezi další často používané lektiny se řadí také aglutinin pšeničných klíčků (WGA, z angl. Wheat-Germ Agglutinin) a jacalin [5]. WGA se získává z pšeničných klíčků (*Triticum vulgare*) a skládá se ze dvou identických podjednotek (celková molekulová hmotnost je 36 kDa) [18]. WGA specificky váže zbytky N-acetylglukosaminů [5]. Na obrázku č. 15 je zobrazena struktura WGA.



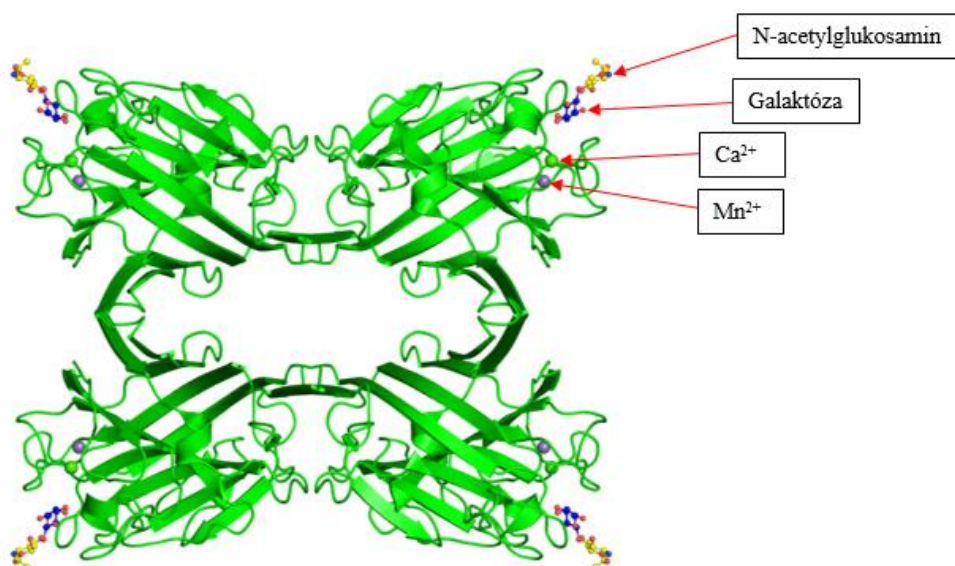
Obr. 15. Struktura aglutininu pšeničných klíčků (rentgenová krystalografie), převzato a upraveno z [82]

Jacalin se získává ze semen *Artocarpus integrifolia*. Skládá se ze čtyř podjednotek, z toho dvě mají molekulovou hmotnost 10 kDa a dvě mají molekulovou hmotnost 16 kDa [18]. Jacalin váže galaktózové nebo manózoové zbytky [5]. Nejčastěji se používá kombinace těchto lektinů (WGA a jacalinu) pro separaci glykoproteinů ze vzorků plasmy k diagnostice vybraných nemocí (např. nádorů) [5]. Struktura jacalinu je zobrazena na obrázku č. 16.



Obr. 16. Struktura jacalinu (rentgenová krystalografie), převzato a upraveno z [83]

Mezi další lektiny používané v lektinové afinitní chromatografii patří sójový lektin (SBA, z angl. SoyBean Agglutinin) izolovaný z *Glycine max* (sója) [84]. SBA je lektin o velikosti 120 kDa [85] a váže převážně N-acetylgalaktosaminové zbytky a v menší míře zbytky galaktózové [86]. Struktura sojového lektinu je znázorněna na obrázku č. 17.



Obr. 17. Struktura sójového lektinu (rentgenová krystalografie), převzato a upraveno z [87]

Lektin izolovaný z *Pisum sativum* (PSA, z angl. *Pisum sativum* Agglutinin) neboli z hrachu setého je dalším zástupcem lektinů využívaných *in vitro* [88]. Tento lektin se skládá ze čtyř podjednotek o celkové molekulové hmotnosti 49 kDa. PSA váže glukózové a manózové zbytky a je mitogenní, stejně jako Con A PSA aglutinuje lidské erythrocyty, ale není specifický pro určitou krevní skupinu. *In vitro* je PSA využíván při aglutinačních testech a jako modelový

system, který znázorňuje, jak proteiny rozpoznávají sacharidy [89]. Obrázek č. 18 znázorňuje strukturu PSA.



Obr. 18. Struktura lektinu izolovaného z *Pisum sativum* (rentgenová krystalografie), převzato a upraveno z [90]

V následující tabulce (tabulka č. 6) je shrnutí výše uvedených lektinů a dalších lektinů využívaných v lektinové afinitní chromatografii s uvedenými zdroji, ze kterých se lektiny získávají, s jejich specifitou k určitým sacharidovým zbytkům s uvedením elučních podmínek.

Tab. 6. Přehled lektinů běžně používaných v lektinové afinitní chromatografii, převzato a modifikováno z [88]

Lektin	Zdroj	Specifita	Eluční cukry
Konkanavalin A (Con A)	Jack bean (fazole)	Manóza, glukóza	Methyl manóza
Aglutinin pšeničných klíčků (WGA)	Pšeničné klíčky	N-acetylglukosamin	N-acetylglukosamin
Jacalin	Jackfruit	Galaktóza, manóza	Galaktóza
Sójový lektin (SBA)	Sója	N-acetylgalaktosamin, galaktóza	N-acetylgalaktosamin
<i>Pisum sativum</i> agglutinin (PSA)	Hrách setý	Manóza	Methyl manóza
<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin (LEL)	Rajčata	N-acetylglukosamin	N-acetylglukosamin
<i>Solanum tuberosum</i> lectin (STL)	Lilek brambor	N-acetylglukosamin	N-acetylglukosamin
Fytohemagglutinin (PHA)	Fazole červená ledvina	N-acetylgalaktosamin	N-acetylgalaktosamin
<i>Sambucus nigra</i> lectin (SNA)	Bez černý	Sialová kyselina, N-acetylgalaktosamin	Laktóza
<i>Galantus nivalis</i> lectin (GNL)	Sněžěnka podsněžník	1 → 3 manóza	Methyl manóza
<i>Anguilla anguilla</i> agglutinin (AAA)	Úhoř říční	Fukóza	Fukóza

Nosiče

Ideálním materiálem pro výrobu nosiče využívaného v lektinové afinitní chromatografii je materiál hydrofilní povahy. Tyto hydrofilní materiály jsou považovány za optimální pro reakce probíhající ve vodném prostředí. Volbou vhodného složení mobilní fáze lze účinně potlačit nescifické interakce povrchu nosiče s cílovými molekulami a rovněž lze zajistit koloidální stabilitu nosiče v prostředí [91].

Nejběžněji používanými materiály pro výrobu nosičů využívaných v lektinové afinitní chromatografii jsou např. povrch polymixinu B, který je vázán na povrch kovového nosiče [91, 92], agaróza [91], oxid křemičitý [93], různé polymerní materiály [91] a celulóza [94]. V následující podkapitole jsou uvedeny metody imobilizace lektinů na nosiče vyrobené ze zmíněných materiálů.

Příprava nosičů pro lektinovou afinitní chromatografii

Při imobilizaci lektinů na povrch nosiče jsou využívány jak nekovalentní, tak kovalentní vazby [91].

a) Nekovalentní imobilizace lektinu na povrch nosiče

Dobrým příkladem nekovalentní metody imobilizace lektinu na povrch kovového nosiče je reverzibilní vazba Con A na povrch polymixinu B. Polymixin B je dekaeptid, který je kovalentně navázán svou primární aminovou skupinou na povrch kovové desky. Tato kovová deska je součástí optického senzoru založeného na excitaci povrchových plasmonů (SPR, z angl. Surface Plasmon Resonance). Tento refraktometrický senzor měří změny indexu lomu v poli evanescentní elektromagnetické vlny. SPR senzor umožňuje studovat biomolekulární interakce v reálném čase s vysokou citlivostí bez nutnosti značení sledovaných molekul. Con A je imobilizován pomocí hydrofobních interakcí k polymixinu B. Zajímavostí je, že výsledný nosič má vyšší vazebnou kapacitu pro kvasinkové manany ve srovnání s lektinem, který je imobilizován na povrch nosiče pomocí kovalentní vazby [91, 92].

b) Kovalentní imobilizace lektinu na povrch nosiče

Více využívanou metodou je kovalentní imobilizace lektinů na povrch nosiče. Nejčastěji používaným materiálem pro výrobu nosiče, který je využíván pro kovalentní imobilizaci lektinů, je agaróza. V průběhu vývoje imobilizačních technik byly testovány různé reaktivní skupiny a chemikálie k dosažení účinné vazby lektinů na povrch nosiče. Výsledkem tohoto testování je, že v současné době existuje celá řada vhodných a spolehlivých materiálů pro výrobu nosičů a imobilizačních metod. Nejčastěji je pro imobilizaci lektinu na

povrch nosiče využívána amino skupina přítomná na lektinech. Vazba lektinu na povrch nosiče může být provedena třemi různými způsoby:

1. reakcí imidokarbonátového zbytku přítomného na nosiči s amino skupinou lektinu, přičemž vše probíhá v přítomnosti heptózy kvůli ochraně CRD (sacharidy rozeznávající doména) [95]
2. reakcí N-hydrosukcimidových esterů s amino skupinou lektinu [95]
3. tvorbou Schiffovy báze [96].

V dnešní době je již většina běžně používaných lektinových nosičů z agarózy připravena výrobcem ihned k použití [91].

Oxid křemičitý je dalším vhodným materiálem pro výrobu lektinového nosiče. V roce 1980 byla vyvinuta aktivace nosiče z oxidu křemičitého pomocí treslu [93]. Tato metoda je hojně používaná dodnes pro vazbu lektinů na povrch nosičů z oxidu křemičitého. Nejprve jsou částice oxidu křemičitého sialylovány a teprve poté dochází k imobilizaci lektinu na tresylem aktivovaný oxid křemičitý. Pro získání stabilní kolony jsou nakonec blokovány zbývající reaktivní tresylové skupiny Tris-HCl pufrem (pH 8) [91].

Modifikací oxidu křemičitého můžeme získat např. karbodiimidazol-křemičité deriváty, které jsou také hojně využívány pro výrobu nosičů používaných v lektinové afinitní chromatografii. Při využití těchto křemičitých derivátů jsou vícestupňovými reakcemi začleněny do povrchu nosiče primární hydroxylové skupiny, které reagují s amino skupinami na povrchu lektinů za vzniku kovalentní peptidové vazby [97].

Mezi další často používané nosiče pro imobilizaci lektinů patří různé polymerní materiály. Komerčně dostupné polymery již obsahují tresylovou skupinu, která je potřebná pro vazbu lektinů na povrch polymerního nosiče. Polymerní materiály mohou být dále úspěšně derivatizovány, čímž jsou získány dostatečně stabilní nosiče pro vysokoúčinnou lektinovou afinitní chromatografii [91]. Např. Con A a WGA mohou být imobilizovány na glycidyl-metakrylátové monolitické kolony [98].

Posledním zmíněným materiálem pro výrobu nosiče využívaného v lektinové afinitní chromatografii je celulóza. Celulóza je hodnocena jako vhodný nosič pro imobilizaci Con A a WGA. Na celulózu jsou lektiny vázány prostřednictvím tvorby Schiffovy báze, a to buď přímou kovalentní vazbou, nebo přes prodlužovací raménko, které je vhodné zvláště pro lektiny o vysoké molekulové hmotnosti, jako je Con A [94].

Provedení lektinové afinitní chromatografie

Vhodně zvolenými podmínkami sorpce, promytí a eluce lze získat izolovanou látku v dostatečném množství i aktivitě. Vazba, ale i eluce probíhají v prostředí (neutrální pH, laboratorní teplota, atmosférický tlak), které je šetrné a přirozené pro izolované bioaktivní látky [99].

Ekvilibrace nosiče

Ekvilibrace nosiče, tj. nasycení nosiče tzv. ekvilibračním pufrem, jehož složení podporuje tvorbu požadovaného biospecifického páru. Například při použití Con A Sepharose 4B je kolona ekvilibrována 20 mM TRIS-HCl pufrem s obsahem 0,5M NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ při pH 7,4 [100].

Sorpce – podmínky vhodné pro biospecifické párování

Po aplikaci vzorku obsahující požadovaný analyt dochází k biospecifickému párování mezi analytem a ligandem imobilizovaným na vhodném nosiči. Intenzita a povaha těchto interakcí závisí na použitém médiu (pufri, nosiči) a fyzikálně-chemických vlastnostech vzorku, ze kterého má být analyt izolován [101]. Jak bylo již řečeno v úvodu kapitoly o bioafinitní chromatografii, biospecifické párování ligandu a požadovaného analytu je způsobeno nekovalentními vazbami, jako jsou hydrofobní interakce, iontové síly, Londonovi disperzní síly, dipólové interakce atd. Dalším předpokladem pro úspěšnou tvorbu biospecifického páru je krátká vzdálenost mezi molekulami ligandu a analytu a také vzájemná komplementarita povrchů vazebných míst [3, 7].

Promytí

Promytí nosiče u lektinové afinitní chromatografie je většinou také prováděno pomocí vazebného pufri, stejně jako u ekvilibrace nosiče. Dochází-li v určité míře k nespecifickým interakcím mezi povrchem nosiče a dalšími látkami obsaženými ve vzorku, pak lze vhodným složením promývacího pufri, např. mírným zvýšením molarity, tyto nespecificky sorbované kontaminující látky uvolnit [100].

Eluce

Výhodou lektinové afinitní chromatografie je, že celý proces (sorpce, promytí a eluce) může probíhat za stejné hodnoty pH, která je blízká přirozenému prostředí izolovaných látek. Princip eluce u lektinové afinitní chromatografie je založen na kompetici sacharidů obsažených

v elučním pufru v nadbytku se sacharidy, které jsou přítomné na izolovaných látkách. Tento způsob eluce umožňuje jemné uvolnění molekuly z imobilizovaného ligandu. Některé lektiny např. Con A, vyžaduje pro svou správnou funkci přítomnost dvojmocných kationtů, proto jsou tyto dvojmocné kationty přidávány do použitých pufrů. Účinnost eluce může být zvýšena změnou molarity nebo pH elučního pufru. Dále může být uvolněna izolovaná látka z imobilizovaného lektinu pomocí tzv. nespecifické eluce, která je založená na použití elučního pufru při kyselém pH [18].

Regenerace nosiče

U některých druhů nosičů je po jejich použití možná regenerace, která umožňuje opakované použití nosiče. Regenerace nosiče se většinou provádí pufrům o extrémním pH (silně kyselý nebo zásaditý pufr). Např. při regeneraci komerční kolony Lentil Lectin Sepharose 4B může být regenerace prováděna pomocí pufrů o pH 8,5 nebo 5,5 s obsahem 0,5M NaCl. Objem promývacího pufru odpovídá dvou až tří násobku objemu kolony a tento cyklus promývání se opakuje alespoň 3krát a poté se provádí reekvilibrace kolony pomocí vazebného pufru. Alternativní metoda regenerace tohoto nosiče je promytí média roztokem detergentu, jako je např. 0,1% Triton X-100 při 37°C po dobu jedné minuty. Reekvilibrace se provádí opět vazebným pufrům, kdy použitý objem pufru odpovídá minimálně pětinasobku objemu kolony, a to okamžitě po promytí detergentem [102].

1. 3. 1 Historie objevování lektinů a jejich vlastností

Con A je lektin vyskytující se ve fazolích („Jackbean“). Tento lektin byl poprvé izolován Sumnerem a jeho týmem v roce 1919, který tento lektin i pojmenoval – konkanavalin frakce A, později jen konkanavalin A (Con A) [103, 104]. Nicméně téměř dvě desetiletí (1936) trvalo než Sumner a Howell popsali, že Con A aglutinuje buňky, jako jsou erytrocyty, kvasinky a také že precipituje glykogen z roztoku. Také dokázali, že hemaglutinace, kterou způsobuje Con A je inhibována přidávkem sacharózy, což demonstruje afinitu lektinů k mono- a polysacharidům. Dále navrhli, že hemaglutinace vyvolaná Con A by mohla být důsledkem reakce rostlinných lektinů se sacharidy na povrchu červených krvinek [71].

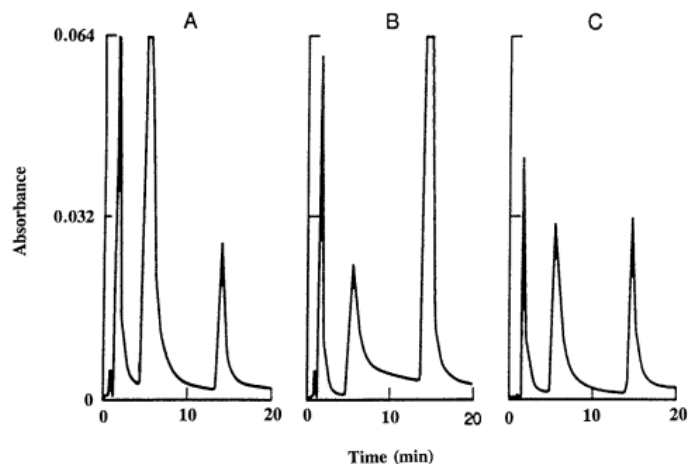
Stillmark již na počátku svého bádání pozoroval selektivitu při aglutinaci červených krvinek ricinem u různých zvířat [71]. Ricin je přirozeně se vyskytující látka obsažená v semenech skočce obecného (*Ricinus communis*). Tato látka působí na buňky lidského těla tak, že inhibuje proteosyntézu, která je pro fungování buňky a organismu nezbytná [105]. Stillmarkovo pozorování bylo potvrzeno a dále bylo toto pozorování rozšířeno Landsteinerem,

objevitelem krevních skupin A, B a 0 (1900). Téměř o deset let později (1907) Landsteiner prohlásil, že hemaglutinační aktivita různých extraktů semen byla zcela odlišná při testování s červenými krvinkami různých zvířat. Vzhledem k této specifičnosti Landsteiner dospěl k závěru, že reakce rostlinných hemaglutininů se podobá reakci protilátek ve všech náležitostech. Proto použil tyto proteiny v úvodu své knihy (*The Specificity of Serological Reaction* [106]) pro znázornění konceptu specifity. Hemaglutininy specifické pro určitý typ krevní skupiny hrály klíčovou roli v časném vyšetřování specifičnosti antigenů ve spojitosti s krevně skupinovým systémem AB0 [71]. V roce 1950 Morgan a Watkins došli k závěru, že α -N-acetyl-D-galaktosamin a α -L-fukóza jsou sacharidové struktury, které jsou základem specifičnosti krevních skupin A a H(0). Schopnost rostlinných aglutininů rozlišovat erythrocyty různých krevních skupin vedla Boyda a Shapleigha k návrhu názvu pro tyto aglutininy, lektiny, z latinského *Legere*, vybrat nebo zvolit. Tento termín byl zobecněn pro všechny aglutininy specifické pro sacharidy, neimunního původu a bez ohledu na zdroj a specifitu pro určitou krevní skupinu [71, 107].

Rok 1970 byl svědkem intenzivního studia vlastností jednotlivých lektinů na molekulární úrovni, což bylo předpokladem pro hlubší pochopení jejich fungování. Tyto studie lektinů počínaly na stanovení jejich fyzikálně-chemických vlastností, pokračovaly přes stanovení jejich primární struktury a posléze zjištění jejich 3D struktury. Prvním lektinem, u kterého byla stanovena primární struktura, byl právě Con A (obrázek č. 20, kapitola 1. 3. 4). Jeho 3D struktura byla zobrazena pomocí rentgenové krystalografie [71, 108].

1. 3. 2 Příklady lektinové afinitní chromatografie využívané v klinické praxi a ve výzkumu

Lektinová afinitní chromatografie může být využita v klinické praxi např. pro separaci a analýzu izoenzymů. Příkladem je HPLC s kolonou obsahující WGA, který rozlišuje kostní a jaterní izoenzymy alkalické fosfatázy v lidském séru [109]. Tato metoda se vyznačuje lepší rozlišovací schopností izoenzymů oproti použití afinitní kolony používané za atmosférického tlaku. Dále tato metoda koreluje s výsledky, které poskytuje imunoanalýza pro rozlišení izoenzymů alkalické fosfatázy [110]. Na obrázku č. 19 jsou patrné rozdíly ve výsledných chromatogramech pro izoenzymy alkalické fosfatázy.



Obr. 19. Srovnání záznamů lektinové chromatografie izoenzymů alkalické fosfatázy. A – sérum pacienta s jaterním onemocněním, B – sérum pacienta s kostním onemocněním, C – sérum zdravého jedince, převzato z [110]

Dalším příkladem využití lektinové afinitní chromatografie v klinické praxi je použití imobilizovaného lektinu z *Euonymus europaeus*, který slouží jako účinný afinitní ligand pro purifikaci lidského chřipkového viru (influenza virus A) odvozeného z MDCK buněk (buňky odvozené z normálních psích ledvin) [111].

Ve stádiu výzkumu je lektinová afinitní chromatografie za použití lektinu izolovaného z *Aleuria alantia* pro purifikaci biomarkerů získaných z moči pacientů s karcinomem močového měchýře. Bylo zjištěno, že při spojení této techniky s MS analýzou může dojít k identifikaci potřebných biomarkerů karcinomu močového měchýře [112].

Pro selektivní frakcionaci vzorků séra a izolaci glykoproteinů nesoucích Sialyl Tn (struktura vyskytující se na nádorových buňkách) byla na poli výzkumu použita lektinová afinitní chromatografie s imobilizovaným lektinem izolovaným ze *Sambucus nigra* [113].

1. 3. 3 Komerční nosiče pro lektinovou afinitní chromatografii

Na současném trhu jsou nabízeny různé nosiče určené pro lektinovou afinitní chromatografii. Příkladem je společnost GE Healthcare Life Science, která nabízí kolony s již imobilizovanými lektiny, např. Con A Sepharose 4B s imobilizovaným Con A pro izolaci a purifikaci glykoproteinů obsahující manózu a glukózu; Lentil Lektin Sepharose 4B pro purifikaci glykoproteinů, včetně membránových glykoproteinů a virových glykoproteinů [114].

EY Laboratories nabízí celé sady určené pro lektinovou afinitní chromatografii, např. kolony s imobilizovaným lektinem společně s elučním puforem a návodem k použití [115].

Dalším dostupným nosičem na trhu je např. TSKgel Tresyl-5PW, na který mohou být následně imobilizovány lektiny prostřednictvím amino skupiny [116].

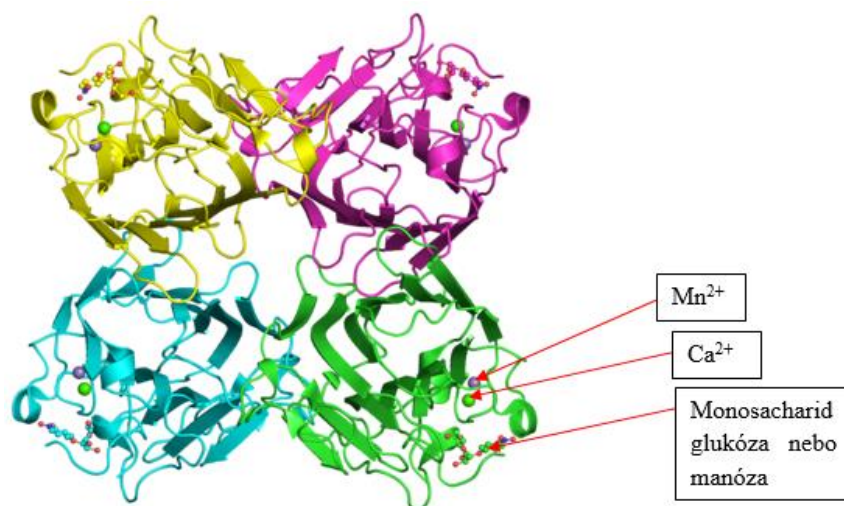
Současným trendem v bioanalýze, tudíž i v lektinové afinitní chromatografii, je využití magnetických částic jako stacionární fáze pro navázání vhodného lektinu. Příkladem mohou být magnetické částice využívané v experimentální části diplomové práce, Sera-Mag Speed Beads od firmy Sigma-Aldrich s karboxylovými skupinami na povrchu umožňujícími kovalentní navázání lektinu [117]. Dalšími magnetickými částicemi využívanými v experimentální části diplomové práce jsou magnetické částice ProMag od firmy Bangs Laboratories, rovněž s karboxylovými funkčními skupinami [31].

1. 3. 4 Konkanavalin A

Sumner s Howellem byli první, kdo v roce 1919 izolovali Con A [103, 104, 118] pomocí dialýzy extraktu z fazolí s 5% NaCl proti destilované vodě, čímž získaly Con A, avšak jejich produkt byl kontaminován samotnými sacharidy. Con A byl prvním lektinem, který byl izolován pomocí afinitní chromatografie. Con A se snadno váže na zesítěný dextranový gel (Sephadex G-50, 100, 150) a může být snadno eluován roztokem glukózy nebo kyselinou octovou [118].

Struktura

Celkově může být Con A tvořen až čtyřmi podjednotkami, přičemž jedna podjednotka Con A je tvořena 237 aminokyselinovými zbytky neobsahující cystein. Třírozměrná struktura – konformace – Con A je závislá na pH prostředí, ve kterém se vyskytuje. V neutrálním pH se vyskytuje v podobě tetrameru se čtyřmi identickými podjednotkami (molekulová hmotnost každé podjednotky je 25,5 kDa). Nicméně při pH 5,6 a nižším se vyskytuje jako aktivní dimer s celkovou molekulovou hmotností 52 kDa. Con A váže manózo- a glukózo- zbytky [81]. S nízkou afinitou váže i N-acetylglukosaminové zbytky [119]. Pro optimální vazbu vyžaduje přítomnost Ca^{2+} nebo Mg^{2+} iontů [18]. Každý monomer váže jeden Ca^{2+} iont, jeden Mg^{2+} iont a jednu molekulu sacharidu [120]. Struktura Con A je zobrazena na obrázku č. 20.



Obr. 20. Struktura konkanavalinu A (rentgenová krystalografie), převzato a upraveno z [120]

Funkce a význam

Rostlinné lektiny hrají významnou roli při obraně rostlin proti hmyzu a proti dalším patogenům [121]. Kromě fungicidních vlastností plní lektiny funkci zásobních látek v semenech. Dále jsou lektiny schopny se vázat na hydrolytické enzymy (glykosidázy, fosfatázy), a tak ovlivňovat jejich aktivitu [122, 123].

Biologické funkce Con A jsou založeny na jeho interakci s molekulami obsahujícími sacharidové zbytky glukózy a manózy. Con A přednostně aglutinuje transformované nádorové buňky a vykazuje tak protinádorové účinky na lidské buňky karcinomu prsu *in vitro* a *in vivo*. To je považováno za nové potencionální protinádorové léčivo, cílené na apoptózu, autofagii buněk a na blokování tkáňové angiogeneze v preklinických a klinických studiích léčby rakoviny, která se stala poslední dobou předmětem intenzivního studia [124].

Con A působí na lymfocyty jako mitogen a na rozdíl od fytohemagglutininů (PHA, z angl. Phytohemagglutinin), může být funkce Con A potlačena malými koncentracemi monosacharidů, např. manózy [104].

Při allotransplantacích kůže byly provedeny experimenty, kdy byly podávány nízké dávky Con A, který měl imunopresivní účinky, což mělo za následek prodloužení přežití štěpu [104].

Příklady lektinové afinitní chromatografie s využitím konkanavalinu A

Lektinová afinitní chromatografie s využitím Con A může být využita v klinické praxi např. pro separaci apolipoproteinu A od apolipoproteinu B obsažených v lipoproteinech v lidské plazmě [125]. Tato separace se využívá ke studiu mikroheterogenity sérového transferinu při poškození jater způsobené alkoholem [126], pro charakterizaci sacharidové struktury folikul stimulujícího hormonu a luteinizačního hormonu u různých klinických stavů [127].

Použití kombinace Con A a WGA může být využito pro identifikaci změn vyskytujících se na asparagin vázané sacharidy lidské kyselé fosfatázy při karcinomech prostaty [128].

1. 4 Posttranslační modifikace proteinů – glykozylace

Posttranslační modifikace proteinů jsou významné pro jejich funkci, aktivitu, lokalizaci v rámci buňky, tkání, celého organismu. Tyto úpravy zahrnují fosforylaci, glykozylaci, ubikvitinaci, nitrosylaci, metylaci, acetylaci, lipidaci a proteolýzu. Posttranslační modifikace proteinů ovlivňují téměř všechny patofyziologické děje probíhající v buňkách [129].

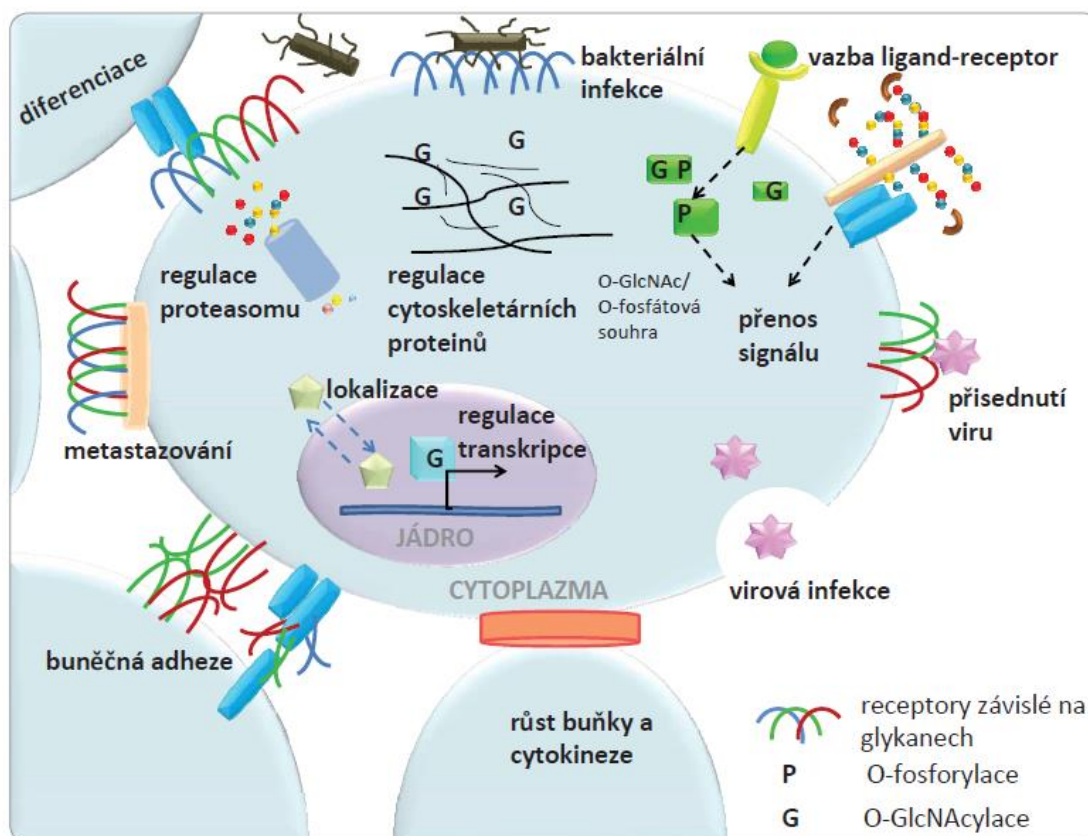
Jsou také zodpovědné za interakci proteinů s jinými molekulami, jako jsou jiné proteiny, nukleové kyseliny, lipidy apod. [129].

Glykozylace proteinů byla poprvé popsána v roce 1938, ale až do 50. let dvacátého století se přítomnost sacharidů považovala při analýzách proteinů jen za nechtěnou kontaminaci vzorku [130]. Pro funkci proteinů má glykozylace zásadní význam, ovlivňují jejich stabilitu, rozpustnost, enzymovou aktivitu, transport do organel, schopnost vázat ligandy či schopnost účastnit se přenosu signálu. Glykozylace plní v organismu také ochrannou funkci, kdy brání nadměrné proteolýze, chrání proteiny před působením nízkých či vysokých hodnot pH a chrání proteiny před působením volných radikálů apod. [131].

Glykomika je vědní obor popisující proces glykozylace cílových molekul a její význam pro fungování buňky, organismu [131].

1. 4. 1 Glykozylace proteinů za fyziologických podmínek

Glykozylované proteiny, tzv. glykoproteiny, mají četné biologické funkce v různých buňkách. Glykoproteiny vznikají v již zmíněném procesu glykozylace, kdy dochází k připojování oligosacharidových struktur, tzv. glykanů, k proteinům. Membránově lokalizované glykany se podílejí na buněčném rozpoznávání a adhezi, zatímco glykany lokalizované uvnitř buňky se zapojují v kaskádách signálních drah [72, 132]. Tyto hlavní funkce glykanů jsou znázorněny na obrázku č. 21.



Obr. 21. Lokalizace glykanů v membráně, cytosolu a jádře buňky, převzato z [133]

Mezi glykoproteiny patří např. enzymy, plasmatické bílkoviny, bílkovinné hormony a většina integrálních membránových bílkovin [134].

Glykozylace proteinů v eukaryotické buňce

Glykozylace proteinů v eukaryotické buňce probíhá ve dvou krocích. Nejprve je na ribozomu syntetizována peptidová část molekuly a poté jsou k této bílkovinné části připojovány mono- až oligosacharidy kotranslačními a posttranslačními modifikacemi. Tyto kotranslační a posttranslační modifikace probíhají v endoplazmatickém retikulu (ER) a Golgiho komplexu/aparátu (GA) [134]. V ER slouží glykozylace jako kontrolní mechanismus při procesu skládání proteinů, který zajistí, že pouze správně složené proteiny mohou být transportovány do GA [132].

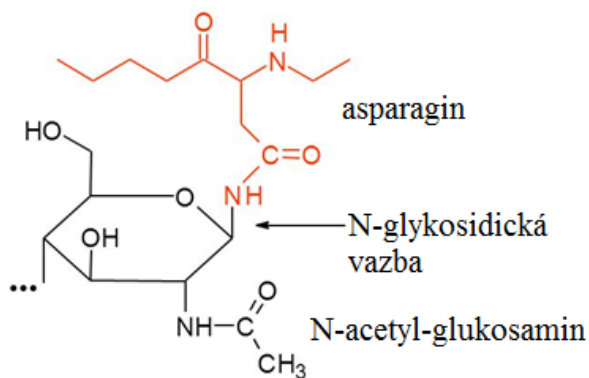
Glykozylace proteinů zahrnuje kroky připojování monosacharidů do struktury oligosacharidů, přenos monosacharidů z jednoho substrátu na druhý a tzv. „ořezávání“ sacharidů z glykanové struktury. Tyto procesy zabezpečují enzymy označované jako glykozylyltransferázy a glykosidázy. Vzhledem k tomu, že se procesu glykozylace účastní celá řada enzymů, je celý proces glykozylace proteinů vysoce uspořádaný a to tak, že jedna určitá

enzymatická reakce začne až po ukončení předcházející enzymatické reakce. Aktivita enzymů se liší podle typu buněk a podle lokalizace v buňce [72, 132].

Glykozyltransferázy přenášejí mono- nebo oligosacharidy z „dárcovských“ molekul na rostoucí oligosacharidové řetězce nebo proteiny. Každá glykozyltransferáza má specifitu pro přenos konkrétního sacharidu od donora na substrát a působí nezávisle na ostatních glykosyltransferázách. Donorem mono- nebo oligosacharidu může být sacharid nukleotidu nebo dolichol [72, 132]. Příkladem je galaktosyltransferáza, která přenáší galaktózu z UDP- α -Gal (UDP – uridindifosfát) na nově syntetizovaný glykoprotein za vzniku produktu obsahující β 1,4 vázanou galaktózu [135].

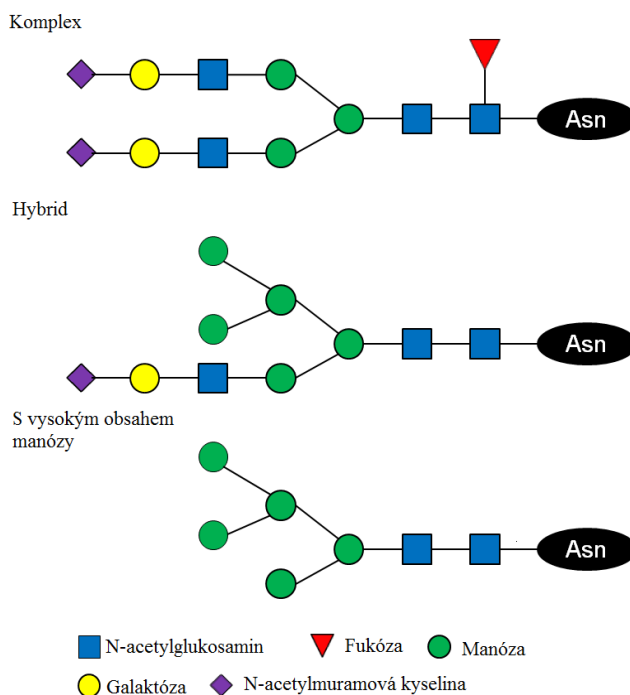
Opačný účinek než glykozyltransferázy, mají glykosidázy, které katalyzují hydrolýzu glykosidických vazeb k odstranění sacharidů z povrchu proteinů. Působení těchto enzymů je rozhodující pro zpracování glykanů v ER a GA a každý enzym vykazuje specifitu pro vyjmutí konkrétního sacharidu (např. manosidázy) [72, 132]. Některé glykosidázy se účastní vlastní biosyntézy nových glykoproteinů, a to tak, že odštěpí z určité molekuly monosacharid za vzniku meziprojektu, na který poté působí glykozyltransferáza [135].

Při tvorbě nového glykoproteinu je sacharidová část k bílkovinné části připojena buď N-glykosidickou, nebo O-glykosidickou vazbou (obě vazby jsou kovalentní). Glykan s N-glykosidickou vazbou je připojen na amidový dusík asparaginu (Asn), přičemž glykozylovaný asparagin je součástí tzv. glykozylačního motivu, ten se skládá ze sekvence tří aminokyselin Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx je jakákoli aminokyselina s výjimkou prolinu) [72]. Obrázek č. 22 schematicky znázorňuje chemickou vazbu mezi asparaginem a sacharidem (N-acetyl-glukosaminem), který se váže N-glykosidickou vazbou na asparagin. Na N-acetyl-glukosamin se váže glykosidickou vazbou další sacharid.



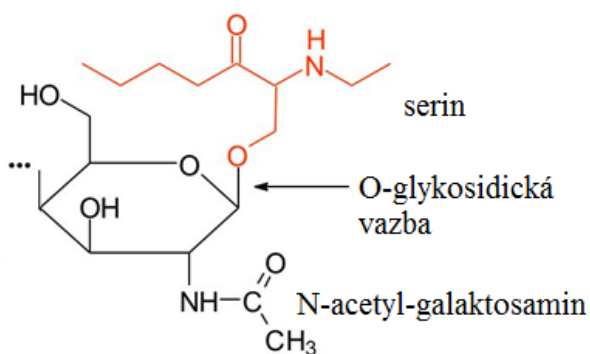
Obr. 22. Schematické znázornění N-glykosidické vazby, (tři tečky naznačují vazbu s dalším sacharidem), převzato a upraveno z [136]

Mezi typické N-glykany produkované v lidských buňkách patří N-glykany komplexního a hybridního typu a N-glykany s vysokým obsahem manózy, které jsou zobrazeny na obrázku č. 23.



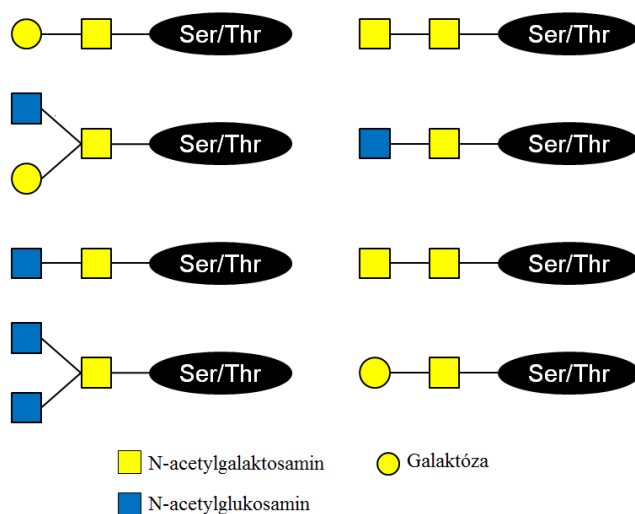
Obr. 23. Příklady typických N-glykanů v lidských buňkách, převzato a upraveno z [137]

Glykan s O-glykosidickou vazbou je připojen přes hydroxylovou skupinu k aminokyselině serinu (Ser) nebo threoninu (Thr). Glykozylační motiv u O-glykozylace nebyl popsán, což znamená, že prakticky každý Ser/Thr může být potenciálně glykozylovaný [132]. Obrázek č. 24 zobrazuje O-glykosidickou vazbu mezi serinem a N-acetyl-galaktosaminem, na který jsou následně vázány další sacharidy glykosidickou vazbou.



Obr. 24. Schematické znázornění O-glykosidické vazby, (tři tečky naznačují vazbu s dalším sacharidem), převzato a upraveno z [138]

Příklady typických O-glykanů produkovaných v lidských buňkách jsou zobrazeny na obrázku č. 25.



Obr. 25. Příklady typických O-glykanů v lidských buňkách, převzato a upraveno z [137]

Glykany eukaryotního původu jsou výhradně tvořeny kombinací glukózy, galaktózy, manózy, N-acetyl-glukosaminu, N-acetyl-galaktosaminu, N-acetyl-neuraminové kyseliny a fruktózy [137]. Rozmanitost glykoproteinů je dána především typem glykosidické vazby (N-, O-glykosidická vazba), složením glykanů (typy sacharidů), strukturou glykanů (rozvětvené nebo nerozvětvené řetězce) a délkou glykanového řetězce (oligosacharidy s krátkým nebo dlouhým řetězcem) [132]. Proteiny mohou být glykozylovány na více místech s použitím N- nebo O-glykosidických vazeb, což závisí na různých faktorech, jako je např. enzymová dostupnost, glykozylační motiv a prostorová konformace proteinu [72, 132].

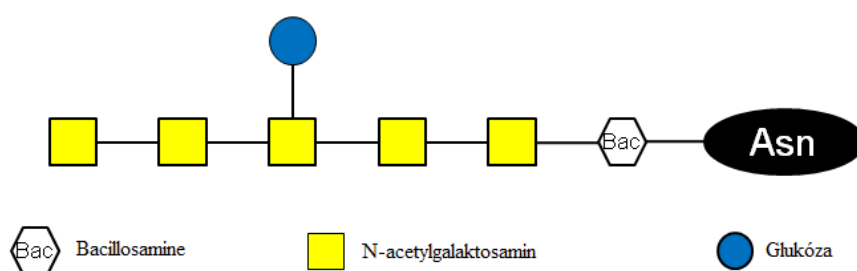
Glykozylace proteinů v prokaryotické buňce

Jelikož bakterie nemají ER nebo GA jsou proteiny syntetizovány v inkluzních tělískách, které jsou dále potřebné k sekreci proteinů na povrch buňky [137]. Bakteriální buňky provádějí většinu glykozylačních reakcí na vnitřní straně cytoplazmatické membrány (popřípadě v periplazmě u Gram negativních bakterií) za použití prekurzorů obsažených v cytoplazmě [72]. Glykany dále podléhají dalším úpravám jako je např. sulfatace a methylace [139].

U bakterií se nejčastěji vyskytuje O-glykozylace. Stejně jako u eukaryot je O-glykozylace na Ser/Thr a u bakterií navíc u tyrosinu. Mezi nejčastější monosacharidy podílející se na tvorbě glykanů a následně glykoproteinů patří např. galaktóza, glukóza, manóza, rhamnóza,

N-acetyl-glukosamin a N-acetyl-galaktosamin [139]. Bakteriální glykany navíc zahrnují i mnoho neobvyklých sacharidů, které se nevyskytují u savců, jsou to například 3-deoxy-D-manno-oktulosová kyselina (KDO), heptózy a různé modifikované hexózy, které mohou hrát důležitou roli v patogenitě bakterií [139].

Glykanové struktury specifické pro prokaryotické buňky jsou u bakterií obsaženy např. u peptidoglykanů, periplazmatických glukanů, lipopolysacharidů, glykanů na proteinech vnější membrány (S layer) a extracelulárních polysacharidů, které tvoří biofilm [139]. Příklad glykanu vyskytujícího se u *Campylobacter jejuni* je na obrázku č. 26. Bacillosamine je vzácný amino sacharid prvně objevený u *Bacillus subtilis* [140].

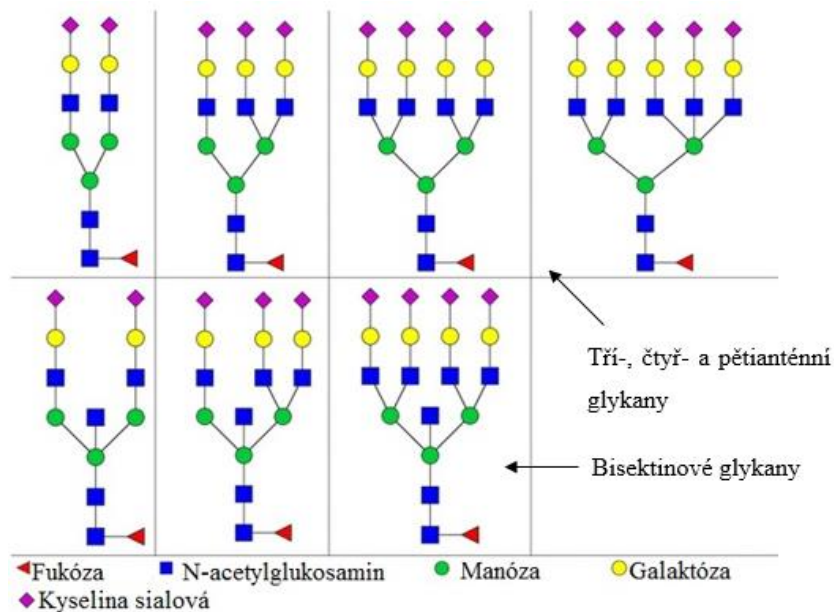


Obr. 26. Příklad N-glykanu v bakteriální buňce *Campylobacter jejuni*, převzato a upraveno z [137]

1. 4. 2 Glykozylace proteinů za patologických podmínek

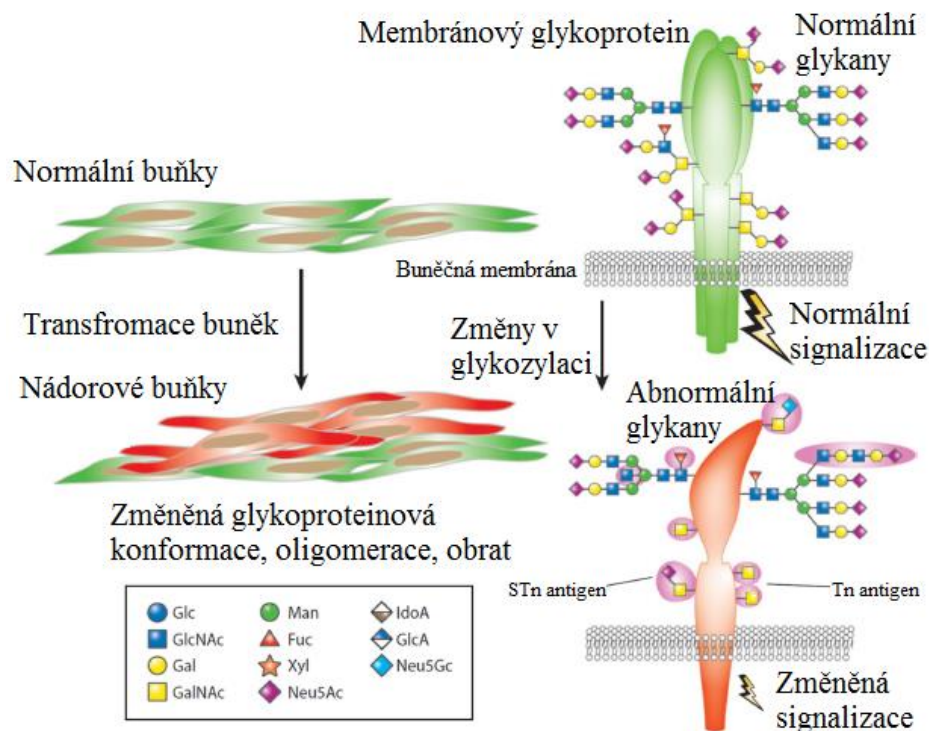
Epigenetické změny, což jsou změny na úrovni genu, které se projeví změnou fenotypu, mohou působit stejně silně na růst nádorů jako mutace v DNA. Jedním z klasických příkladů epigenetických změn, ke kterým dochází v průběhu nádorové transformace, je posttranslační glykozylace. Glykozylace odráží koordinované úsilí řady enzymů, organel a dalších faktorů, které jsou nezbytné k úspěšnému generování glykoproteinů. I nepatrné změny v sacharidové struktuře mohou mít významný dopad na biologické funkce jak proteinů, tak i celých buněk [141].

U nádorově zvrhlých buněk dochází ke změně exprese glykozylntransferáz. Tato změna týkající se enzymů může mít nejen významný dopad na produkci glykanů, ale tyto enzymy také řídí stupeň větvení glykanů, které mohou následně měnit celkovou strukturu glykanu a tím i jeho funkci [141]. Proto nádorově zvrhlé buňky produkují abnormální motivy glykanů, např. tří- a čtyř-anténní glykany, bisektinové glykany, fukosylované glykany atd. [142]. Na obrázku č. 27 jsou zobrazeny příklady těchto abnormálních motivů glykanů.



Obr. 27. Příklady abnormálních glykanů identifikovaných v lidském organismu, převzato a upraveno z [142]

Tyto změny v glykozylaci proteinů zahrnují změny jak v O-glykanech, tak v N-glykanech a mohou se vyskytovat jak na začátku, tak na konci nádorového bujení a tvorby metastáz. Dopad změn v glykozylaci je znázorněn na obrázku č. 28, který zobrazuje změnu v chování glykoproteinů, které mají patologicky změněné glykany. Změny v glykozylaci proteinů mohou mít za následek změnu konformace glykoproteinu, změnu oligomerace, změnu v biologickém obratu glykoproteinů (syntéza a biodegradace) a mohou být také spojeny se změnami signálních drah v buňce [141].



Obr. 28. Dopad změn v glykozylaci na buňky, (Fuc – fukóza; Gal – galaktóza; GalNAc – N-acetyl-galaktosamin; Glc – glukóza; GlcA – glukuronová kyselina; GlcNAc – N-acetyl-glukosamin; IdoA – iduronová kyselina; Man – manóza; Neu5Ac – 5-N-acetylneuramová kyselina (kyselina sialová); Neu5Gc – 5-N-glykolyneuramová kyselina; STn – sialyl Tn; Xyl – xylóza), převzato a upraveno z [141]

Patologická glykozylace proteinů u pacientek s ovariálním karcinomem

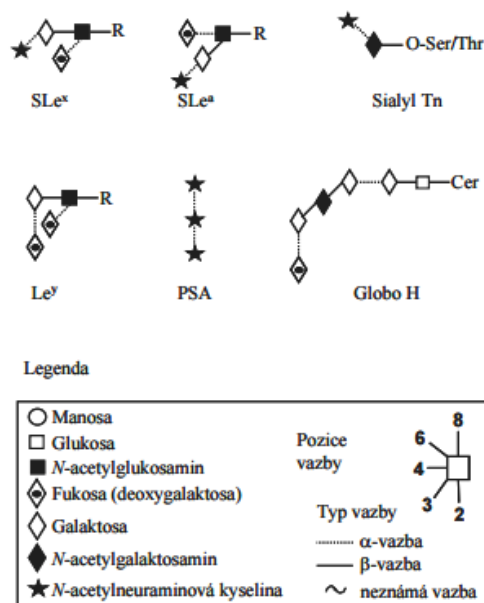
Ovariální karcinom

Ovariální karcinom neboli rakovina vaječníků, je jednou z nejčasnějších příčin úmrtí mezi gynekologickými malignitami. Většina pacientek je diagnostikována v pozdním stádiu onemocnění, čímž se šance na přežití po dobu delší než 5 let snižuje na 30 %. Zatímco pacientky diagnostikované v raném stádiu onemocnění mají šanci na přežití 5 let až 90 %. Proto je včasná diagnostika tohoto onemocnění velice důležitá [143, 144].

Příčina vzniku tohoto onemocnění není přesně známá. Rizikovými faktory pro vznik ovariálního karcinomu jsou vysoký věk pacientky (většina pacientek je již po menopauze), záněty v oblasti pohlavních orgánů a neméně důležitá je rodinná historie rakoviny vaječníků, prsu nebo jiné nádory reprodukčních orgánů. Dalšími možnými rizikovými faktory jsou nádory střev a hormonální terapie při neplodnosti nebo při menopauze trvající déle než 10 let [145].

Patologická glykozylace u nádorových onemocnění

Při nádorovém onemocnění vznikají často patologické epitopy, přičemž nejčastější struktury takových s nádorem spjatých epitopů rakovinných buněk jsou zobrazeny na obrázku č. 29, a jsou to: Sialyl Lewis x (SLe^x), Sialyl Lewis a (SLe^a), Sialyl Tn, Globo H, Lewis y a polysialová kyselina (PSA) [146].



Obr. 29. Nejčastější struktury s nádorem spjatých epitopů rakovinných buněk (R indikuje, kde je sacharid připojen k polypeptidu); převzato z [147]

Nádorové buňky pocházející z karcinomu ovaria produkují cytokiny, které mohou ovlivňovat posttranslační modifikaci proteinů, tím pádem i glykozylaci, jak v nádorových buňkách, tak v buňkách okolních tkání. Tyto cytokiny produkované nádorovými buňkami mohou také ovlivňovat glykozylační procesy v játrech a způsobit tak změnu v glykozylaci sérových proteinů [148].

Změny v glykozylaci proteinů byly u pacientek s ovariálním karcinomem také prokázány [147]. Nejčastěji dochází ke změně v glykozylaci proteinů akutní fáze, kterými jsou haptoglobin, α_1 -antitrypsin [149], α_2 -makroglobulin, transferin [150] a dále dochází také ke změně v glykozylaci IgG [151]. Konkrétně se jedná o vyšší počet větvení glykanů a vyšší obsah sialových kyselin u sérových glykoproteinů. Nejvýraznější změny v glykozylaci proteinů u pacientek s ovariálním karcinomem zahrnují zvýšení množství sacharidů se dvěma anténami bez obsahu galaktózy (pochází z IgG) a SLe^x epitopu (z β -řetězce haptoglobinu) [152]. Tyto glykozylační změny pravděpodobně ukazují na chronický zánět, který je pozorován u nádoru, přičemž tento chronický zánět zvyšuje metastatický potenciál nádorových

buněk [153]. Pravidelné měření koncentrace SLe^x se ukazuje jako užitečné pro dlouhodobé monitorování průběhu nemoci [154].

V klinické praxi je využívaným biomarkerem pro diagnostiku karcinomu ovaria sérový biomarker CA-125 (sacharidový antigen, z angl. Carbohydrate Antigen 125) [155]. Jedná se o protein, který se často vyskytuje na povrchu buněk karcinomu ovaria, ale i některých normálních tkání [156]. Obdobně jako u většiny nádorových markerů, tak ani CA-125 není orgánově ani nádorově specifický. Tento biomarker bývá spojován také s karcinomem dělohy, endometria, pankreatu, trávicího ústrojí, bronhogenního karcinomu a karcinomu prsu. Zvýšené hladiny CA-125 mohou být nalezeny také v těhotenství, při menstruaci a při zánětlivém onemocnění v pánevní oblasti [155].

CA-125 se používá pro monitorování úspěšnosti léčby karcinomu ovaria. Dále se používá pro sledování vysoce rizikových žen, které mají v rodinné anamnéze výskyt karcinomu ovaria, ale doposud neonemocněly [156]. Vyšetření je vhodné vždy doplnit o současné stanovení CEA (karcinoembryonální antigen, z angl. CarcinoEmbryonic Antigen), popř. TPA (tkáňový aktivátor plazminogenu, z angl. Tissue Plasminogen Activator). Kombinace těchto vyšetření (stanovení CA-125, CEA a TPA) výrazně zvyšuje specifitu a senzitivitu [155].

Primární terapie ovariálního karcinomu v současné době zahrnuje spojení cytoredukční chirurgie a chemoterapie. Nejčastěji používaným chemoterapeutikem je kombinace paklitaxelu a karboplatiny [157]. V literatuře je uváděna úspěšnost primární léčby 60-80 %. Průměrná doba do progresu onemocnění je uváděna mezi 16-22 měsíci. Až 85 % pacientek diagnostikovaných v pozdějším stádiu onemocnění v průběhu jednoho až dvou let recidivuje [158]. S recidivou onemocnění se pak často objevuje i rezistence k chemoterapii. Rezistence k platinovým derivátům a paklitaxelu je považována za hlavní důvod neúspěšné terapie a smrti více než 90 % pacientek s metastatickým ovariálním karcinomem [159].

Obecně je léková rezistence způsobena farmakokinetikou daného léčiva, mikroprostředím nádoru a biologickými mechanismy, které jsou specifické pro nádor. Předpokládá se, že společné působení zmíněných faktorů přispívá k rezistenci na chemoterapeutickou léčbu karcinomu ovaria. Bylo provedeno jen několik málo studií, které se pokusily za použití proteomických technik testovat lékovou rezistenci karcinomu ovaria [157]. Těmito studiemi se zabývali např. Yan a kol. [160], Dai a kol. [161], Li a kol. [162] a další.

Podstatnou část proteomického výzkumu ovariálního karcinomu tvoří vyhledávání optimálních biomarkerů pro screening a včasné zachycení onemocnění. Dále je výzkum zaměřen na mechanismus progresu onemocnění a předpověď rezistence na chemoterapeutickou léčbu [157].

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce byla příprava nosiče na bázi magnetických částic s vázaným Con A a optimalizace lektinové afinitní chromatografie ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání pro izolaci IgG ze séra.

Imobilizace Con A na povrch magnetických částic zahrnovala optimalizaci podmínek vazby – vazebný pufr, množství imobilizovaného Con A, promytí.

Izolace IgG pomocí nosiče s imobilizovaným Con A ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání zahrnovala optimalizaci separačních podmínek – složení ekvilibračního pufru, inkubační doba, podmínky promývacího kroku, elučního kroku.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

- pH metr model Boeco BT-600 (Boeco Germany, Hamburg, Německo)
- Magnetický separátor Dynal MPC-S (Dynal, Carlsbad, CA, USA)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Fotometr pro mikrotitrační destičky Multiskan RC, typ 351 (Labsystems, Helsinky, Finsko)
- Elektroforetická aparatura (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)
- Mikrostříkačka Hamilton – 100 μ l (Hamilton AG, Bonaduz, Švýcarsko)
- Termostat Biological Thermostat BT 120 M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- Stanice pro focení gelů (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)
- Magnetické míchadlo ChipGenie II (Microfluidic ChipShop, Jena, Německo)
- MFCS-SC Fluigent (Fluigent GmbH, Jena, Německo)
- „Syringe“ pumpa (KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA)
- Mikrofluidní čip o objemu komůrky 100 μ l (polymethylmetakrylát, hydrofilizovaný, Microfluidic ChipShop, Jena, Německo)
- Mikrofluidní čip o objemu komůrky 120 μ l (polymethylmetakrylát, Microfluidic ChipShop, Jena, Německo)
- Mikrozkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf, Hamburg, Německo)

3. 2 Metody

3. 2. 1 Imobilizace Con A na magnetické částice

Částice:

- Sera-Mag Speed Beads, COOH, průměr 0,816 μm (Sera-Mag, Fremont, CA, USA)
- ProMag, COOH, průměr 0,87 μm (Bangs Laboratories, Indiana, USA)

Protein:

- Con A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), typ IV, čistota 90 – 100 %, purifikován pomocí specifické afinitní chromatografie

Chemikálie:

- 1-ethyl-3-(3-dimethylamonipropyl)karbodiimid (EDAC, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-(N-Morfolin-4-yl)-ethansulfonová kyselina (MES, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukciimid sodný (Sulfo-NHS, $\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amine-Poly-(ethyleneglycol)-carboxymethyl (NH_2 -PEG-CM) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)

Roztoky:

- Promývací roztok I: 0,1M MES pH 6
- Promývací roztok II: 0,01M MES pH 6
- Skladovací a vazebný roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 1mM MnCl_2 , pH 6

Postup:

10 mg magnetických částic bylo promyto 5 x 1 ml 0,1M MES pH 6 pomocí magnetického separátoru. Supernatant byl odebrán pipetou a k částicím bylo přidáno 15 mg EDAC v 500 μl 0,01M MES pH 6 a 2,5 mg Sulfo-NHS v 500 μl 0,01M MES pH 6. Následovala inkubace 5 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Po odebrání supernatantu, bylo k částicím přidáno 30 μg Con A/ 1 mg částic ve vazebném roztoku. Následovala inkubace přes noc na rotátoru při 4°C. Po odebrání supernatantu, bylo k částicím přidáno 3,4 mg NH_2 -PEG-CM v 950 μl 0,01M MES pH 6. Následovala inkubace 1 hodinu na rotátoru při 4°C. Po inkubaci byly částice promyty: 2 x 1 ml 0,1M MES pH 6; 1 x 1 ml 0,01M MES s 1M NaCl pH 6; 1 x 1 ml 0,01M MES pH 6.

Následně byl k částicím přidán skladovací roztok (10 mg magnetických částic v 1 ml skladovacího pufu). Skladování při 4°C.

3. 2. 2 Stanovení množství imobilizovaného konkanavalinu A na magnetických částicích pomocí BCA testu

Chemikálie:

- 2-(N-Morfolin-4-yl-)ethansulfonová kyselina (MES, C₆H₁₃NO₄S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Součástí kitu MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockfor, IL, USA)

- Roztok A: uhličitán sodný, hydrogenuhličitán sodný, vinan sodný v 0,2M NaOH
- Roztok B: 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
- Roztok C: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě
- Promývací roztok: 0,01M MES pH 6

Postup:

Roztoky A, B a C byly smíchány v poměru 25:24:1, dále pracovní roztok BCA. Podle tabulky č. 7 byla připravena ze zásobního roztoku Con A o koncentraci 1 mg/ml kalibrační řada. Ze suspenze částic bylo odebráno 0,1 mg částic v triplikátu. Supernatant byl odebrán pipetou a k částicím bylo přidáno 150 µl 0,01M MES pH 6. K suspenzi bylo přidáno 150 µl pracovního roztoku BCA. Kalibrační roztoky byly smíchány v poměru 1:1 (150 µl každého kalibračního roztoku se 150 µl pracovního roztoku BCA). Jako slepé roztoky byly použity triplikáty destilované vody a 0,01M MES pH 6 a čistých částic smíchané s pracovním roztokem BCA v poměru 1:1. Následovala inkubace 2 hodiny na rotátoru při 37°C. Po inkubaci bylo odebráno 200 µl do jamek mikrotitrační destičky, která byla proměřena při 570 nm na spektrofotometru.

Tab. 7. Příprava kalibrační řady Con A pro kvantifikaci BCA testem

Roztok	Destilovaná voda [μl]	Con A [μl]	Výsledná koncentrace [μg/ml]
1	720	160 (ze zásobního roztoku)	200
2	200	600 ze zkumavky č. 1	150
3	267	533 ze zkumavky č. 2	100
4	400	400 ze zkumavky č. 3	50
5	400	400 ze zkumavky č. 4	25
6	480	320 ze zkumavky č. 5	10
7	400	400 ze zkumavky č. 6	5
8	400	400 ze zkumavky č. 7	2,5
9	480	320 ze zkumavky č. 8	1
10	400	400 ze zkumavky č. 9	0,5

3. 2. 3 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Roztoky:

- Roztok A: 30% směs akrylamidu a N, N-methylenbisakrylamidu
- Roztok B: 1,5M Tris-HCl pufr pH 8,8
- Roztok C: 1M Tris-HCl pufr pH 6,8
- Roztok D: 10% roztok SDS
- Roztok E: 10% roztok persíranu amonného
- TEMED (N, N, N, N-tetramethylenethylendiamin)
- Roztok G: 100mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří
- Elektrodový pufr: 0,025M Tris, 0,192M glycin s 0,1% SDS pH 8,3-8,6

Postup:

Nejdříve byla sestavena aparatura a skla pro nalití gelu. Poté byl podle tabulky č. 8 připraven 12% rozdělovací gel. Gel byl napipetován mezi skla, převrstven destilovanou vodou a 30 minut se nechal zpolymerizovat. Po zpolymerizování gelu byla destilovaná voda opatrně odsáta filtračním papírem. Poté byl připraven 5% zaostřovací gel podle tabulky č. 8. Gel byl napipetován až k okraji skel a mezi skla byla vložena šablona s 15 jamkami. Během 15 minut gel zpolymerizoval.

Tab. 8. Příprava gelů pro gelovou elektroforézu

	5% zaostřovací gel [ml]	12% rozdělovací gel [ml]
Destilovaná voda	1,4	1,68
Roztok A	0,33	2,0
Roztok B	-	1,25
Roztok C	0,25	-
Roztok D	0,02	0,05
Roztok E	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

Poté byla skla opatrně vyjmuta ze stojánku a přemístěna do speciálního držáku. Z gelu byla odstraněna šablona a vytvořené jamky byly propláchnuty 3x elektrodo­vým pu­frem. Do elektroforetické vany byl nalit elektrodo­vý pu­fir po vyznačené rysky.

Příprava a aplikace vzorků pro elektroforetickou separaci:

K 10 μ l vzorku bylo napipetováno 10 μ l roztoku G. Směs byla promíchána a 3 minuty při 98°C povařena v blokovém termostatu. Do každé jamky bylo napipetováno 10 μ l připravených vzorků pro 15-ti jamkový gel. Standardu bylo napipetováno 3 μ l pro barvení amoniakálním stříbrem nebo 7 μ l pro barvení pomocí Comassie Brilliant Blue. Vzorky byly nanášeny mezi skla Hamiltonovou pipetou. Po použití byla pipeta vždy propláchnuta 5x ethanolem a 5x destilovanou vodou.

Vlastní elektroforetické dělení:

Elektrodo­vá nádo­ba byla uzavřena víkem tak, aby anoda na elektroforetické aparatuře (označena červeně) byla spojena s červeným konektorem víka. Bylo nastaveno konstantní napětí na hodnotu 180 V a max. 30 mA na jeden gel. Elektroforetické dělení probíhá tak dlouho, dokud čelo s bromfenolovou modří nedoputuje téměř na úroveň dolního okraje skel (cca 45 minut). Po skončení elektroforetického dělení byl vypnut zdroj napětí, sundáno víko a vyndána aparatura z nádoby. Skla byla vyjmuta a gel byl opatrně přendán do Petriho misky.

Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra

Roztoky:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová s 50% ethanolem
- 10% roztok glutaraldehydu
- Roztok amoniakálního stříbra: 20% dusičnan stříbrný je přikapáván k roztoku (21 ml destilované vody, 1,4 ml vodného roztoku amoniaku a 239 μ l 9M NaOH) až do vzniku světle hnědého zákalu. Roztok je doplněn na 100 ml destilovanou vodou

- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citrónová s 0,04% formaldehydem
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová

Postup:

Po elektroforetickém dělení byl gel propláchnut destilovanou vodou a následovala fixace při 4°C ve fixačním roztoku přes noc. Poté následovala 30ti minutová rehydratace gelu v destilované vodě. Následně byl gel inkubován 30 minut s 10% glutaraldehydem při laboratorní teplotě. Poté byl gel propláchnut destilovanou vodou (6 x 10 minut). Gel byl inkubován 12 minut v roztoku amoniakálního stříbra. Poté byl gel promyt v destilované vodě a vyvolán ve vyvolávacím roztoku. Gel byl následně dán do ustalovacího roztoku, ve kterém může být i skladován.

Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant blue

Chemikálie a roztoky:

- Roztok pro barvení gelu Coomassie Brilliant blue
- Roztok pro odbarvení gelu: destilovaná voda

Postup:

Gel v Petriho misce byl 3x propláchnut destilovanou vodou a převrstven barvicím roztokem. Následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl gel opláchnut destilovanou vodou a odbarvován.

3. 2. 4 Izolace IgG na nosiči s Con A ve vsádkovém uspořádání

Částice:

- Sera-Mag Speed Beads, COOH, průměr 0,816 µm (Sera-Mag, Fremont, CA, USA)
- ProMag, COOH, průměr 0,87 µm (Bangs Laboratories, Indiana, USA)

Roztoky:

- Skladovací roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, pH 6
- Promývací roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween 20, pH 6
- Eluční roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,2M methyl α-D-glukopyranosid, 0,2M methyl α-D-manopyranosid, pH 6

Postup:

K 1 mg magnetických částic s imobilizovaným Con A bylo přidáno 30 µg IgG/ředěné sérum. Následovala inkubace 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci došlo k zachycení magnetických částic separátorem. Supernatant byl odebrán a uchován pro gelovou

elektroforézu. Částice byly promyty 9 x 1 ml promývacího roztoku (třetí promytí obsahovalo 1M NaCl v 0,01M MES pH 6, u izolace IgG ze séra obsahovalo třetí, páté a sedmé promytí 1M NaCl v 0,01M MES pH6). Po promytí bylo k částicím přidáno 100 µl elučního roztoku. Následovala 20ti minutová inkubace na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci došlo k zachycení magnetických částic separátorem a eluční roztok byl odebrán. Přidání elučního roztoku, inkubace a odebrání roztoku bylo opakováno 3x. Následovala detekce izolovaného IgG gelovou elektroforézou.

3. 2. 5 Izolace IgG na nosiči s Con A v mikrofluidním uspořádání

Charakteristika mikrofluidního čipu

- Mikrofluidní čip o objemu komůrky 100 µl
(polymethylmetakrylát, hydrofilizovaný, Microfluidic ChipShop, Jena, Německo)
- Mikrofluidní čip o objemu komůrky 120 µl
(polymethylmetakrylát, Microfluidic ChipShop, Jena, Německo)

Částice

- ProMag, COOH, průměr 0,87 µm (Bangs Laboratories, Indiana, USA)

Roztoky:

- Skladovací roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, pH 6
- Promývací roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween 20, pH 6
- Eluční roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,2M methyl α-D-glukopyranosid, 0,2M methyl α-D-manopyranosid, pH 6

Postup:

Mikrofluidní čip o objemu komůrky 100 µl/120 µl byl umístěn na magnetické míchadlo ChipGenie II. Nejprve byla komůrka čipu propláchnuta 2 x 1 ml 20% isopropanolem, poté 2 x 1 ml deionizovanou vodou a nakonec 1 ml promývacího pufru. Do čipu byl aplikován 1 mg magnetických částic ProMag s imobilizovaným Con A. Částice byly promyty 1 ml promývacího pufru. Roztok byl z čipu odstraněn a bylo aplikováno 10x ředěné sérum. Následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě se zapnutým magnetickým míchadlem. Po inkubaci bylo míchadlo zastaveno. Supernatant byl odebrán a uchován pro gelovou elektroforézu. Částice byly promyty za pomoci „Syringe“ pumpy 3 x 1 ml 1M NaCl v 0,01M MES pH 6 a poté 6 x 1 ml promývacím pufrům. Po promytí bylo k částicím přidáno 100 µl elučního roztoku. Následovala 20ti minutová inkubace při laboratorní teplotě se zapnutým magnetickým míchadlem. Po inkubaci bylo míchání zastaveno a eluční roztok byl odebrán.

Přidání elučního roztoku, inkubace a odebrání roztoku bylo opakováno 3x. Následovala detekce izolovaného IgG gelovou elektroforézou.

3. 2. 6 Přečištění lektinem izolovaných IgG na nosiči s Proteinem A

Pozn. jednalo se o vsádkové uspořádání

Částice

- PureProteome, Protein A Magnetic Beads System (Merck Millipore, Darmstadt, Německo)

Roztoky:

- Promývací roztok: 0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween 20, pH 6
- Eluční roztok: 0,05% TFA

Postup:

Po provedení izolace IgG Con A v mikrofluidním uspořádání bylo provedeno přečištění získaných elucí Proteinem A imobilizovaným na magnetických částicích PureProteome. Všechny tři získané eluce byly smíchány dohromady (vzorek byl uchován pro gelovou elektroforézu) a aplikovány k magnetickým částicím s navázaným Proteinem A. Po hodinové inkubaci na rotátoru byl pomocí magnetického separátoru odebrán supernatant, částice byly promyty 3 x 1 ml promývacím pufrům a poté byl přidán eluční pufr (0,05% TFA). Následovala 20ti minutová inkubace na rotátoru. Poté byl pomocí magnetického separátoru odebrán supernatant, který byl po úpravě pH na hodnotu 6 uchován pro gelovou elektroforézu. Následovala detekce izolovaného IgG gelovou elektroforézou.

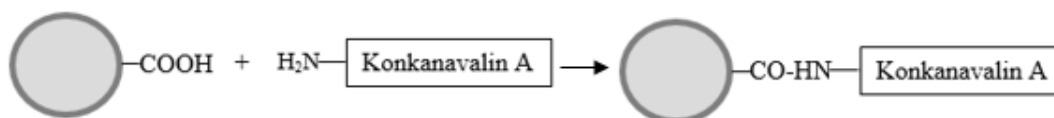
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Imobilizace konkanavalinu A na částice Sera-Mag Speed Beads

Při lektinové afinitní chromatografii s použitím magnetických částic je první fází příprava magnetického nosiče. Tato příprava zahrnuje imobilizaci používaného lektinu, konkanavalinu A (Con A), s následným navázáním PEGu na volná místa magnetického nosiče.

Existuje řada magnetických částic s různými povrchovými skupinami. V našem případě byly zvoleny magnetické částice Sera-Mag Speed Beads (průměr 0,816 μm) s karboxylovou skupinou vhodnou k navázání Con A.

K iniciaci tvorby kovalentní vazby mezi karboxylovou skupinou s aminoskupinou Con A je používán EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamonipropyl)karbodiimid). Ke zvýšení účinnosti vazby se do reakce přidává Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosukciimid sodný) [163]. Nejprve jsou tedy magnetické částice inkubovány s těmito látkami a následně je po jejich odebrání k magnetickým částicím přidán v roztoku Con A. Schéma imobilizace Con A na povrch magnetických částic je zobrazen na obrázku č. 30.



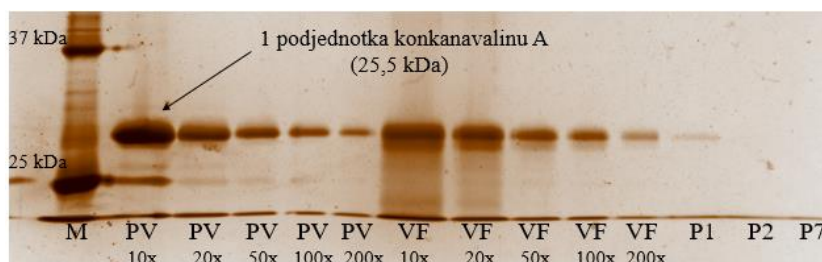
Obr. 30. Schéma imobilizace Con A přes svou aminoskupinu na magnetické částice s karboxylovou skupinou na povrchu

4.1.1 Volba vhodné koncentrace konkanavalinu A a vazebného pufru pro imobilizaci konkanavalinu A na povrch magnetických částic

Prvním krokem při imobilizaci Con A na povrch magnetických částic byl výběr vhodného pufru, ve kterém dochází k vazbě lektinu na povrch magnetických částic a výběr optimálního množství navazovaného Con A. Byla tedy vybrána vhodná koncentrace Con A tak, aby byla co nejmenší spotřeba lektinu s co největší účinností vazby. Pufr byl vybírán na základě stejného kritéria, tedy co nejvyšší účinnost vazby Con A na povrch magnetických částic. Bylo rozhodováno mezi dvěma pufrů: TRIS s ionty (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2), které jsou nutné pro správnou funkci Con A, a MES se stejnými ionty, oba pufrů při pH 6.

Stanovení množství navázaného Con A na povrch magnetických částic bylo prováděno dvěma metodami a to: BCA testem a elektroforeticky (SDS-PAGE). Bylo provedeno i spektrofotometrické měření, které ovšem poskytovalo neinterpretovatelné výsledky vlivem interference iontů ve vazebném roztoku.

Při navazování 100 µg Con A na 1 mg magnetických částic Sera-Mag Speed Beads o průměru 0,816 µm byla účinnost vazby stanovená BCA testem na 31 %. Za stejných podmínek byla účinnost vazby stanovená denzitometrickým vyhodnocením elektroforeogramů na 36 %. Na obrázku č. 31 zobrazena SDS-PAGE analýza frakcí mobilních fází získaných při vazbě 100 µg Con A na 1 mg magnetických částic v TRIS pufru s ionty při pH 6 a dále je na elektroforeogramu patrná zkouška vhodného ředění pro aplikaci vzorků na gel.



Obr. 31. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při imobilizaci 100 µg Con A v TRIS pufru s ionty (zkouška vhodného zředění pro aplikaci vzorků na gel), SDS-PAGE, 12 % gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; 10x, 20x, 50x, 100x, 200x: použité ředění; P1, P2, P7: promytí 1, 2 a 7)

Z elektroforeogramu je patrné, že nejvhodnější ředění vzorků (roztok Con A po vazbě) pro analýzu pomocí SDS-PAGE je 50 – 200x, kdy nedochází k přesycení gelů a lze z něho denzitometricky odečítat vazebnou frakci.

Po zjištění, že koncentrace 100 µg Con A na 1 mg částic je zbytečně vysoká (tato skutečnost byla zjištěna pomocí denzitometrického vyhodnocení elektroforeogramů frakcí mobilních fází při navazování 100 µg Con A/1 mg částic), byla následně testována účinnost vazby při koncentracích 50, 40, 30 a 20 µg Con A na 1 mg magnetických částic. Navazování bylo prováděno zároveň v obou vybraných pufrách: v TRIS pufru s ionty a v MES pufru s ionty (oba pufrы měly pH 6). Jako nejvýhodnější pufr pro vazbu Con A byl vyhodnocen MES pufr s ionty (NaCl, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂) při pH 6, protože poskytoval reprodukovatelné výsledky při opakovaných gelových elektroforézách. TRIS pufr s ionty byl vyhodnocen jako méně vhodný pufr, jelikož při stejné metodě vyhodnocení (denzitometricky) poskytoval méně reprodukovatelné výsledky, tzn. opakovaně se nepodařilo navázat stejné množství Con A na magnetické částice. Navíc se tento pufr běžně připravuje při vyšším pH (pH 7 – 9). BCA test poskytoval vyšší výsledky účinnosti vazby než denzitometrické vyhodnocení gelů, což bylo stejně jako u spektrofotometrického stanovení způsobeno interferencí iontů přítomných v obou pufrách. Jako ověřovací a přesnější metoda pro monitorování účinnosti vazby Con A na magnetické částice byla vybrána SDS-PAGE. Tabulka č. 9 zobrazuje průměrné hodnoty účinnosti vazby při různých koncentracích Con A. Tabulka také zobrazuje

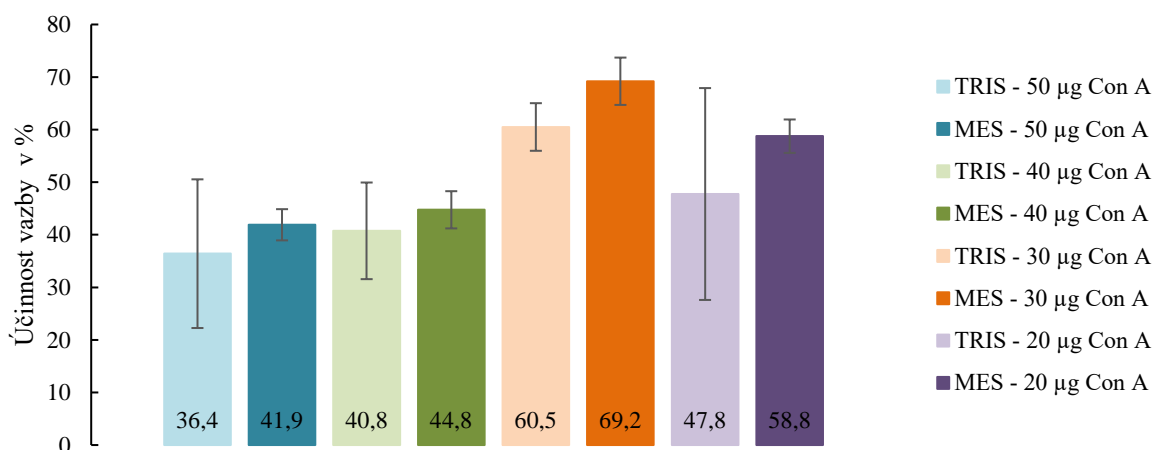
vyhodnocení účinnosti vazby jak BCA testem, tak SDS-PAGE, a to jak v TRIS pufru s ionty, tak v MES pufru s ionty.

Všechny testy byly prováděné na částicích bez použití PEGu, ten byl přidán až do skladovacích roztoků. Tento postup byl zvolen proto, že by mohl PEG případně interferovat u zvolených metod stanovení.

Tab. 9. Množství navázaného Con A na povrch magnetických částic stanovená BCA testem a SDS-PAGE

		BCA				SDS-PAGE			
		1.		2.		1.		2.	
	Con A (µg)	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%	µg/mg	%
TRIS	100	33,6	33,6	30,6	30,6	48,7	48,7	25,0	25,0
	50	24,5	49,0	16,9	33,8	13,2	26,4	23,2	46,4
	40	20,2	50,6	20,9	52,2	13,7	34,3	18,9	47,3
	30	35,1	116,8	14,6	48,6	19,1	63,7	17,2	57,3
	20	26,3	131,3	15,0	75,2	6,7	33,5	12,4	62,0
MES	50	20,0	40,1	34,7	69,4	22,0	44,0	19,9	39,8
	40	18,6	46,5	30,5	76,3	16,9	42,3	18,9	47,3
	30	19,6	65,3	32,7	109,1	19,2	64,0	21,6 21,5	72,0 71,7
	20	28,3	141,6	33,9	169,5	11,3	56,5	12,2	61,0

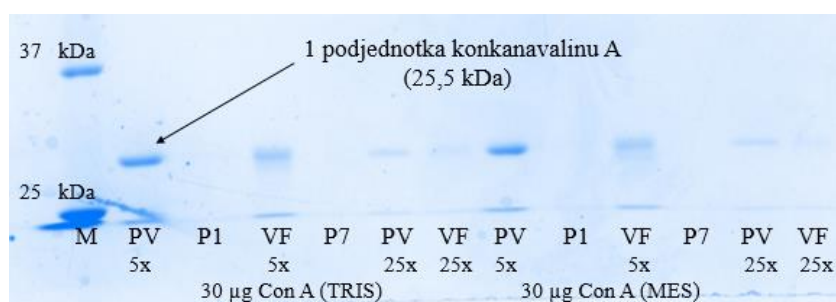
Z tabulky je patrné, že stabilnější výsledky jsou při použití vazebného pufru MES s ionty, kdy směrodatná odchylka nepřesahuje hodnotu 4,5 %. Tato skutečnost je patrná i na následujícím grafu č. 1, který shrnuje účinnost vazby jednotlivých koncentrací Con A v obou pufrech s vyznačenými směrodatnými odchylkami.



Graf 1. Porovnání účinnosti vazby Con A na magnetické částice v různých typech pufru (denzitometrické vyhodnocení)

Z výše uvedených výsledků tedy vyplývá, že nejvhodnější koncentrace Con A pro vazbu je 20 až 30 µg na 1 mg magnetických částic. Což je oproti počáteční koncentraci 100 µg Con A úspora materiálu o 70-80 %. Nakonec bylo přistoupeno k používání 30 µg Con A/1 mg magnetických částic, protože se toto množství jeví jako nejúčinnější při vazbě na magnetické částice.

Na obrázku č. 32 je zobrazena SDS-PAGE analýza frakcí mobilních fází získaných při imobilizaci zvolených 30 µg Con A na povrch 1 mg magnetických částic v TRIS a MES pufru s ionty.

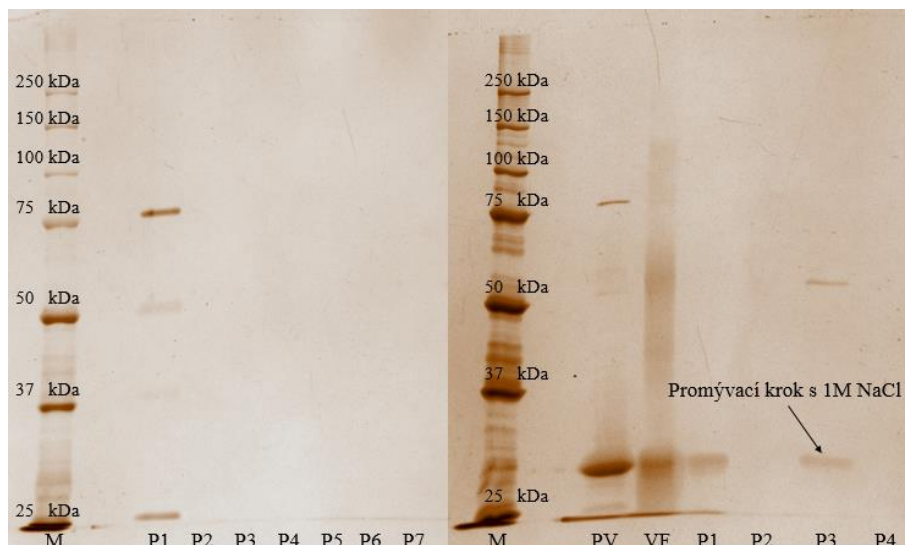


Obr. 32. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při vazbě 30 µg Con A na 1 mg magnetických částic (TRIS a MES pufru s ionty při pH 6), SDS-PAGE, 12% gel, barvení Coomassie Brilliant blue. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; 5x, 25x: použité ředění; P1, P7: promytí 1 a 7)

4. 1. 2 Volba optimálního počtu promývacích kroků při imobilizaci konkanavalinu A na povrch magnetických částic

Dalším optimalizačním krokem imobilizace Con A na povrch magnetických částic bylo zkrácení počtu promývacích kroků po vazbě Con A. Z původních sedmi promývacích kroků bylo promývání zkráceno na čtyři kroky, přičemž třetí promývací krok se provádí se zvýšeným

obsahem NaCl (1M NaCl v 0,01M MES). To, že skutečně postačují čtyři promývací kroky, je patrné z následujícího elektroforeogramu na obrázku č. 33 a tato skutečnost byla dále ověřena BCA testem.



Obr. 33. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při immobilizaci 30 μ g Con A na 1 mg magnetických částic (testování počtu promývacích kroků – vlevo původní počet promývacích kroků – 7; vpravo nový počet promývacích kroků – 4), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1, P2, P3 a P4: promytí 1, 2, 3 a 4)

Na základě výše provedených testů bylo rozhodnuto, že optimální immobilizace Con A na povrch magnetických částic probíhá v MES pufru s ionty při pH 6 s koncentrací Con A 30 μ g/1 mg magnetických částic. Dále bylo zjištěno, že pro dostatečné promytí částic stačí čtyři promývací kroky po vazbě Con A.

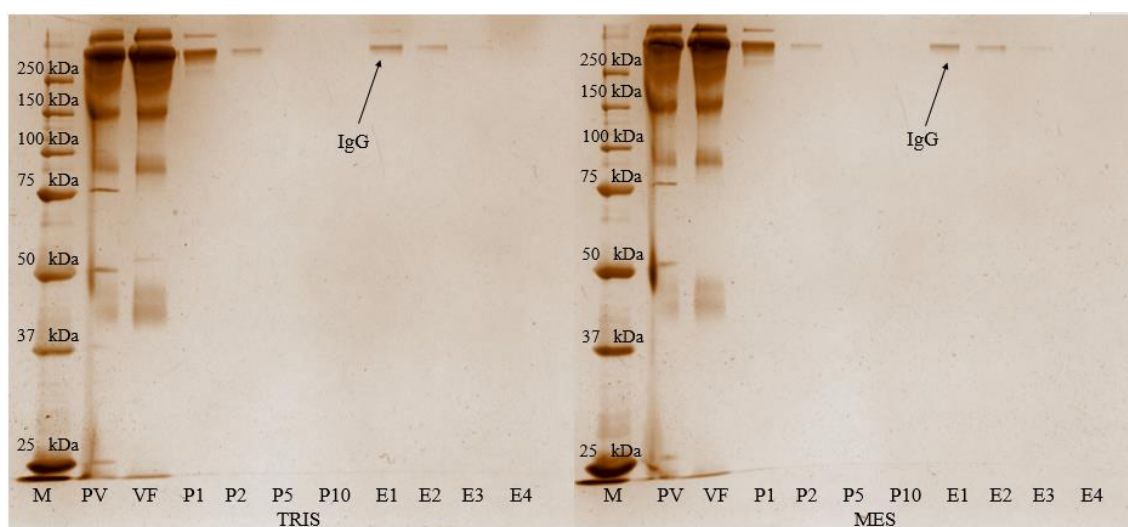
4.2 Lektinová afinitní chromatografie ve vsádkovém uspořádání – Sera-Mag Speed Beads

4.2.1 Volba separačních podmínek – podmínky pro vazbu

Prvním krokem při izolaci sérového IgG pomocí magnetických částic s imobilizovaným Con A ve vsádkovém uspořádání bylo porovnání účinnosti izolace IgG v různých pufrách. Použitými puframi byly TRIS pufr s ionty při pH 6 a MES pufr s ionty při pH 6. Původně používaný TRIS pufr s ionty byl nakonec nahrazen MES pufr s ionty. Hlavním důvodem bylo, že je TRIS pufr běžně připravován při vyšším pH a také TRIS pufr s ionty neposkytoval tak reprodukovatelné výsledky jako MES pufr s ionty. Dále nebyl na základě získaných výsledků z denzitometrického vyhodnocení elektroforeogramů pozorován zásadní rozdíl v použitých pufrách na účinnost izolace sérového IgG. Izolace byla prováděna 1 hodinu

(krok vazby IgG na Con A), promývání bylo prováděno 10x, a to příslušnými promývacími pufrů (tedy promývací TRIS pufr s ionty při pH 6 a 0,05% Tweenem 20 a promývací MES pufr s ionty při pH 6 a 0,05% Tweenem 20). Eluce byly provedeny 4x po 15ti minutách (uvolnění IgG z vazby s Con A) elučním pufrům s 0,2M cukry o pH 6.

Obrázek č. 34 zobrazuje SDS-PAGE analýzu frakcí mobilních fází při izolaci sérového IgG za použití výše zmíněných pufrů. Jak bylo již zmíněno, tak denzitometrické vyhodnocení níže uvedených elektroforeogramů izolace IgG za použití rozdílných pufrů neukázalo zásadní rozdíl v účinnosti izolace. Proto byl vybrán k izolaci IgG MES pufr s ionty o pH 6, který je používán i k samotné imobilizaci Con A na povrch magnetických částic.



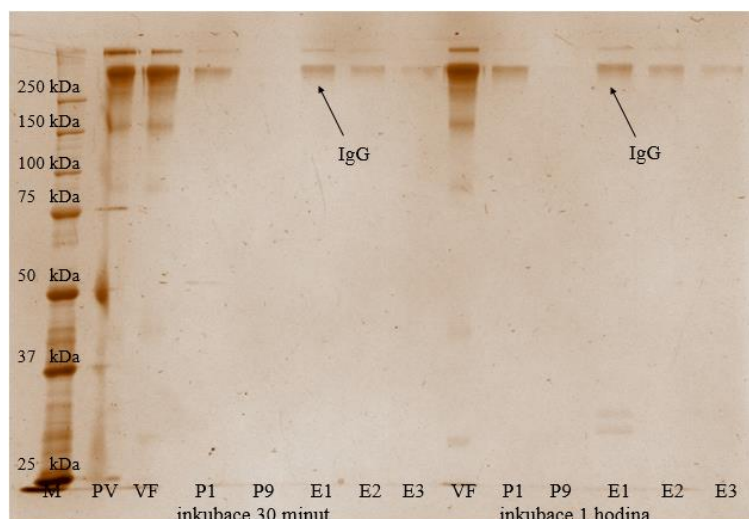
Obr. 34. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (TRIS a MES pufr s ionty při pH 6), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1, P2, P5, P10: promytí 1, 2, 5 a 10; E1-E4: eluce 1, 2, 3 a 4)

Jak je patrné z výše zobrazených elektroforeogramů, tak IgG má na gelu vyšší molekulovou hmotnost, než je udávaných 150 kDa (pro celé IgG). To je způsobeno tím, že IgG tvoří dimery, které na gelu s vysokou hustotou téměř neprocházejí póry a zůstávají ve vrchní části gelu.

4. 2. 2 Volba separačních podmínek – fáze inkubace

Na základě zvolené koncentrace Con A, 30 $\mu\text{g}/1 \text{ mg}$ magnetických částic, byla vybrána koncentrace modelového lyofilizovaného lidského sérového IgG také 30 μg . Tato koncentrace IgG byla zvolena proto, že Con A je složen ze čtyř podjednotek, jednou podjednotkou se váže na magnetické částice, a tudíž zbydou tři podjednotky pro izolaci IgG. Teoreticky je vlastně Con A v nadbytku a může tak pohodlně docházet k vazbě všech molekul IgG na Con A. Při této izolaci byly zkoušeny dvě délky inkubační doby: 30 minut a 1 hodina. Eluce byly prováděny

3x po 20ti minutách a to ve vsádkovém uspořádání. Na základě denzitometrického vyhodnocení elektroforeogramů frakcí mobilních fází získaných při izolaci IgG bylo zjištěno, že není rozdíl v účinnosti izolace IgG při různých inkubačních časech a mohlo být tedy přistoupeno k provádění kratší inkubace. Tato skutečnost je patrná na následujícím elektroforeogramu č. 35, který zobrazuje SDS-PAGE analýzu frakcí mobilních fází získaných při izolaci sérového IgG při různě dlouhé inkubační době.

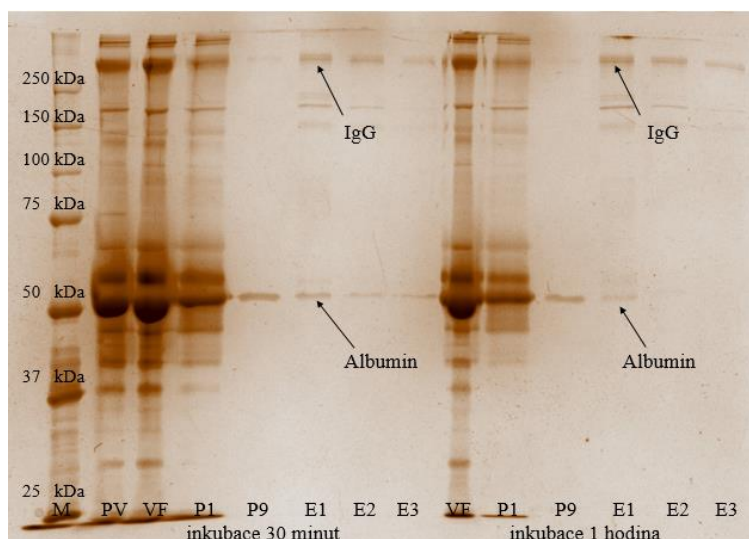


Obr. 35. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (inkubace 30 minut a 1 hodina), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1, P9: promytí 1 a 9; E1-E3: eluce 1, 2 a 3; šipky zobrazují izolované molekuly IgG)

Předpokládali jsme, že kapacita nosiče byla dostatečná, aby vyvázala veškeré molekuly IgG z modelového roztoku, ale ve skutečnosti tomu tak nebylo, jak je patrné z vazebné frakce zobrazené na elektroforeogramu č. 37.

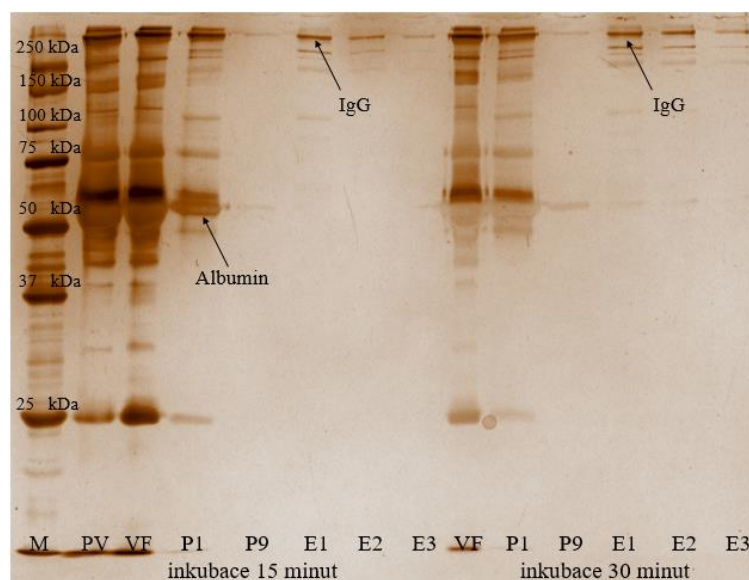
Izolace IgG z lidského séra

Stejně tak u izolace IgG z lidského séra byla nejprve volena vhodná inkubační doba. Zde byly porovnávány inkubační časy: 60, 45, 30 a 15 minut. Bylo zjištěno, že s rostoucí délkou inkubační doby dochází k vazbě dalších glykozylovaných molekul ze séra (nespecifická vazba), které jsou nežádoucí. Z denzitometrického vyhodnocení gelu je patrné, že dochází k vazbě glykozylovaných proteinů i při zkrácení inkubační doby na 30 minut. Na obrázku č. 36 je zobrazen elektroforeogram této afinitní izolace IgG ze séra.



Obr. 36. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (inkubace 30 minut a 1 hodina), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1 a P9: promytí 1 a 9; E1-E3: eluce 1, 2 a 3)

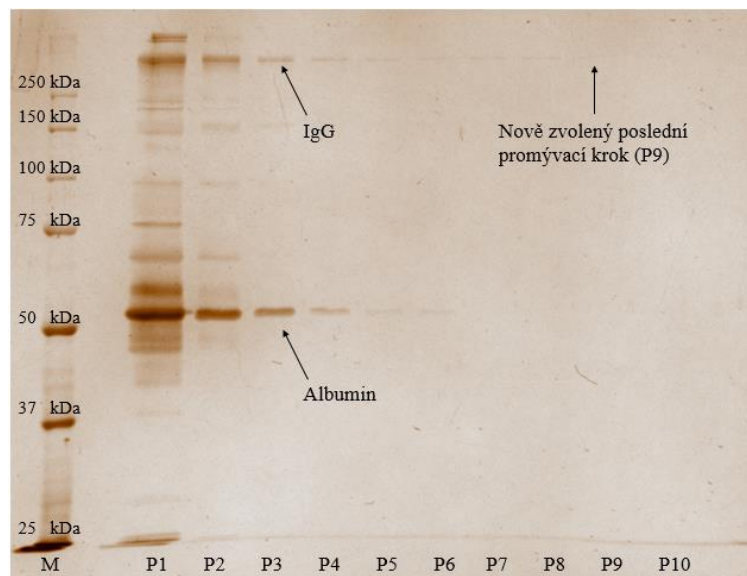
Dále byly porovnávány inkubační časy 15 a 30 minut. Při této izolaci bylo zařazeno více promývacích kroků s 1M NaCl (třetí, páté a sedmé promytí) z důvodů lepšího promytí. Eluce byly prováděny 3x po 15ti minutách. Jak je patrné z elektroforeogramu č. 37, není pozorován zásadní rozdíl v účinnosti izolace IgG při různých inkubačních časech, proto by mohlo být přistoupeno ke kratší inkubační době se zachováním účinnosti izolace.



Obr. 37. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (inkubace 15 a 30 minut), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1 a P9: promytí 1 a 9; E1-E3: eluce 1 až 3)

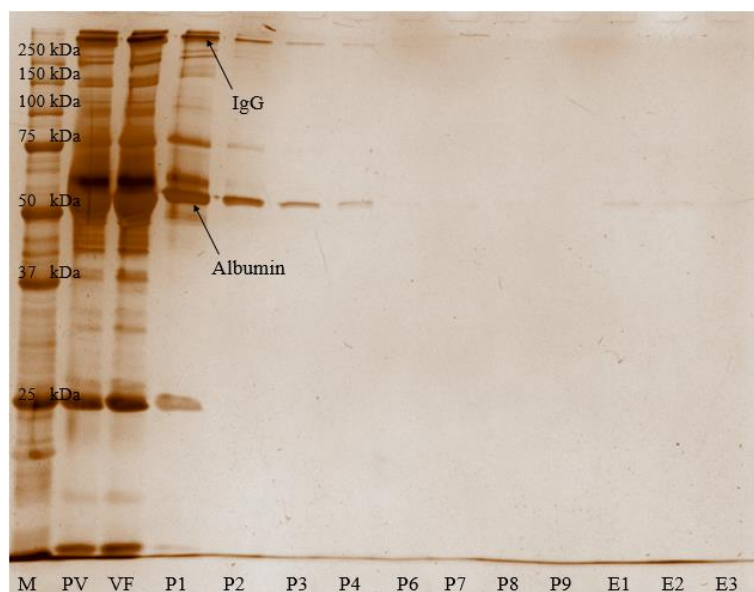
4. 2. 3 Volba separačních podmínek – fáze promytí

Při izolaci IgG Con A vázaným na magnetické částice Sera-Mag Speed Beads byla provedena optimalizace počtu promývacích kroků. Z původních deseti promývacích kroků bylo promývání ve vsádkovém uspořádání zkráceno na devět promývacích kroků (celkový objem 9 ml), přičemž bylo zařazeno promývání s 1M NaCl (při izolaci IgG bylo zařazeno toto promývání na třetí krok; při izolaci IgG ze séra bylo zařazeno promývání 1M NaCl ve třech krocích a to: ve třetím, pátém a sedmém kroku), který lépe promyje nežádoucí nečistoty. Zvolený počet promývacích kroků ilustruje obrázek č. 38, který zobrazuje deset promývacích kroků u izolace IgG ze séra. Při izolaci samotného IgG by byl dostačující i nižší počet promývacích kroků, ale při izolaci ze séra jsou přítomny proteiny, které se špatně vymývají, např. albumin. Proto bylo přistoupeno i k použití 1M NaCl.



Obr. 38. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (volba optimálního počtu promývacích kroků), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; P1-P10: promytí 1 až 10)

Při této optimalizaci byla provedena i kontrola nescifické sorpce proteinů na stěny zkumavky. Přičemž byl celý postup prováděn stejně jako při izolaci IgG ze séra ve vsádkovém uspořádání, ale s tím rozdílem, že vše bylo prováděno bez magnetických částic. Jak je patrné z následujícího elektroforeogramu (obrázek č. 39), tak především albumin zůstává na stěně zkumavky déle, ale zvoleným počtem promývacích kroků dochází k jeho vymytí.

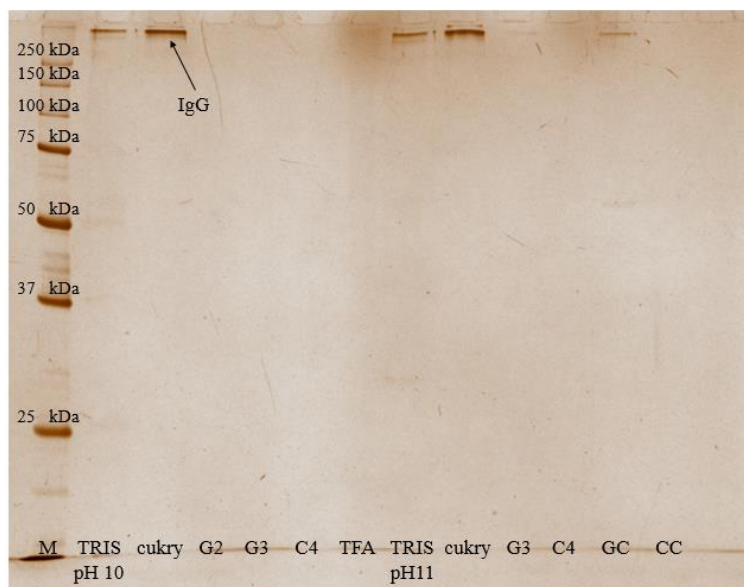


Obr. 39. Kontrola nespecifické sorpce proteinů na stěny zkumavky, SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1-9; E1-E3: eluce 1 až 3)

4. 2. 4 Volba separačních podmínek – fáze eluce

Dalším krokem optimalizace u izolace IgG ve vsádkovém uspořádání bylo vyzkoušení různých druhů a pH elučních roztoků. Tento pokus byl prováděn za použití sérového IgG, inkubační čas byl 30 minut. Byly vyzkoušeny různé pufrы: TRIS pufr při pH 10 a 1M TRIS pufr při pH 11; 0,2M glycinový pufr pH 2 a 0,2M glycinový pufr pH 3 s obsahem 0,05M cukrů a bez obsahu cukrů; 0,2M citrátový pufr pH 4 s obsahem 0,05M cukrů a bez obsahu cukrů, 0,05% TFA (kyselina trifluoroctová) a již zavedený eluční pufr (0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,2M methyl α-D-glukopyranosid, 0,2M methyl α-D-manopyranosid, pH 6) pro porovnání účinnosti eluce. Z následujícího elektroforeogramu na obrázku č. 40 je patrné, že nejlépe komplex IgG-Con A rozrušuje eluční pufr s cukry (0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,2M methyl α-D-glukopyranosid, 0,2M methyl α-D-manopyranosid, pH 6), jako druhý nejúčinnější pufr se jeví TRIS pufr při pH 10 a 1M TRIS pufr při pH 11; dále je patrná eluce u 0,05% TFA, nejslabší eluce jsou patrné u glycinových pufrů bez i s obsahem cukrů. Eluce u citrátového pufru při pH 4 nebyla patrná, ale byla pozorována minimální eluce u citrátového pufru pH 4 s obsahem 0,05M cukrů. Celkem byly provedeny čtyři eluce – u prvních dvou byla inkubační doba 20 minut a u druhých dvou 15 minut. Pokud by byly eluční frakce následně zpracovány dále, např. kapalinovým nebo hmotnostním spektrometrem, mohly by přidané cukerné struktury v analýze interferovat nebo vadit při interpretaci výsledků. Tyto cukerné struktury by musely být před vlastní MS analýzou odstraněny, tzn. prodloužení

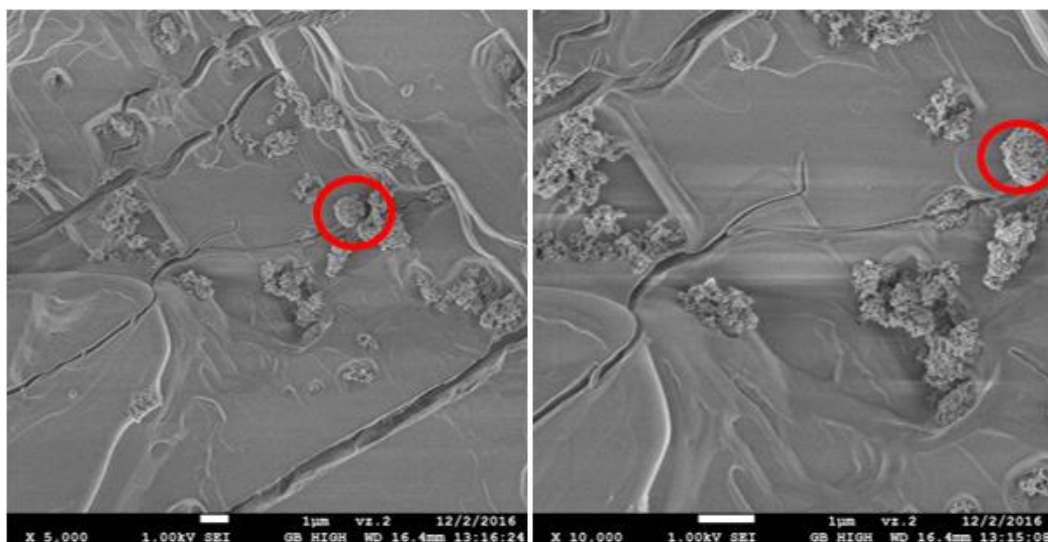
času analýzy. Pro tyto účely by bylo vhodné použití 0,05% kyseliny trifluoroctové nebo 0,2M glycinového pufru pH 3, i když se tyto pufrы vyznačují menší účinností než již zavedený eluční pufr s 0,2M cukry pH 6. TRIS pufr by nebyl vhodný vzhledem k tomu, že pro hmotností spektrometr jsou používány pufrы v kyselé oblasti pH a muselo by tedy dojít ke složitější úpravě vzorků před MS analýzou.



Obr. 40. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (různé eluční pufrы), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (pufrы – TRIS pH 10 a 1M TRIS pH 11; cukry: eluční pufr s 0,2M cukry pH 6; G2 a G3: 0,2M glycinový pufr pH 2 a 3; C4: 0,2M citrátový pufr pH 4; TFA: 0,05% kyselina trifluoroctová; GC: 0,2M glycinový pufr pH 3 s 0,05M cukry; CC: 0,2M citrátový pufr pH 4 s 0,05M cukry)

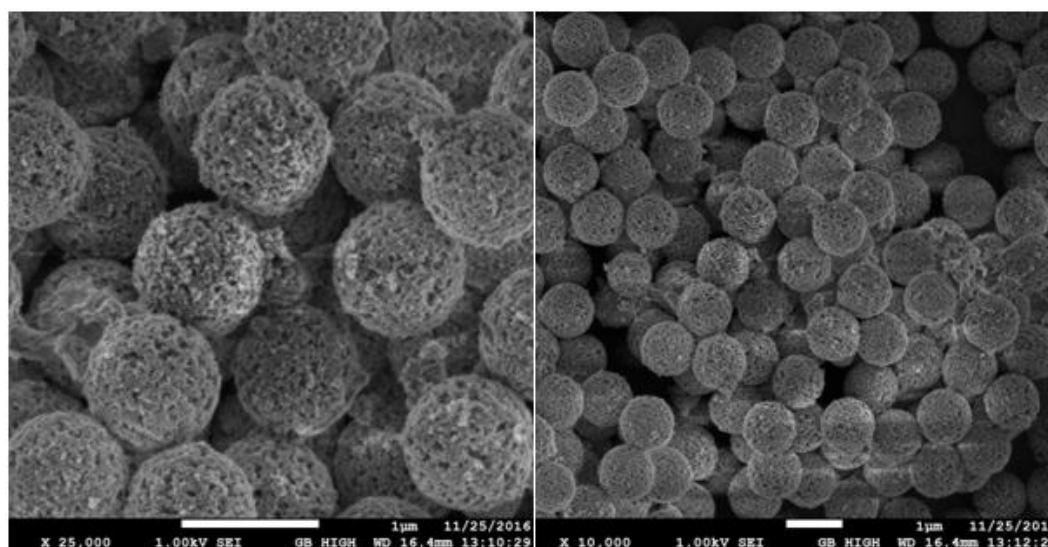
4. 2. 5 Porovnání magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag

Při opakování experimentů, byla pozorována změna v chování magnetických částic Sera-Mag Speed Beads. Možnou příčinou nereprodukovatelných výsledků mohl být rozpad magnetických částic Sera-Mag Speed Beads nebo jejich shlukování. Proto byly částice připraveny pro pozorování pod elektronovým mikroskopem. Na pořízených snímcích z elektronového mikroskopu (obrázek č. 41) je patrné, že magnetické částice Sera-Mag Speed Beads mají nepravidelný tvar a rozpadají se. Proto bylo přistoupeno k vyzkoušení dalších magnetických částic, a to magnetických částic ProMag (průměr 0,87 μm). Tyto částice mají stejně jako Sera-Mag Speed Beads karboxylové funkční skupiny na svém povrchu, tudíž byla imobilizace Con A prováděna pomocí stejného postupu.



Obr. 41. Snímek magnetických částic Sera-Mag Speed Beads pozorovaných pod elektronovým mikroskopem (SEM)

Na pořízených snímcích magnetických částic ProMag (obrázek č. 42) nejsou viditelné žádné shluky, agregáty nebo rozpadlé částice, jsou pozorovány jen stejně velké kulaté tvary magnetických částic.



Obr. 42. snímek magnetických částic ProMag pozorovaných pod elektronovým mikroskopem (SEM)

V následující tabulce č. 11 jsou porovnány charakteristiky používaných magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag.

Tab. 10. Porovnání charakteristik magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag

	Sera-Mag Speed Beads	ProMag
Velikost částic	0,816 µm	0,87 µm
Materiál:	Polystyrenové jádro potažené dvěma vrstvy magnetitu	Polymer
Funkční skupina:	COOH	COOH
Skladování a stabilita:	Skladování při chladničkové teplotě (2-8 °C), stabilní v širokém rozmezí hodnot pH	Skladování při chladničkové teplotě (2-8 °C)
Výrobce:	Sigma-Aldrich	Bangs Laboratories

Pro vzájemné porovnání účinnosti magnetických částic byla provedena imobilizace Con A na povrch magnetických částic ProMag ve stejné koncentraci jako u Sera-Mag Speed Beads, tedy 30 µg Con A/1 mg magnetických částic. Účinnost vazby Con A na povrch těchto částic byla stanovena BCA testem a SDS-PAGE. BCA testem byla účinnost vazby stanovena na 86 %, která ovšem byla ovlivněna interferencí iontů vazebného pufru. Densitometrickým vyhodnocením byla účinnost vazby stanovena na 59 %. Tabulka č. 13 shrnuje výsledná množství Con A imobilizovaného na povrch magnetických částic ProMag stanovená pomocí BCA testu a pomocí densitometrického vyhodnocení gelů získaných SDS-PAGE.

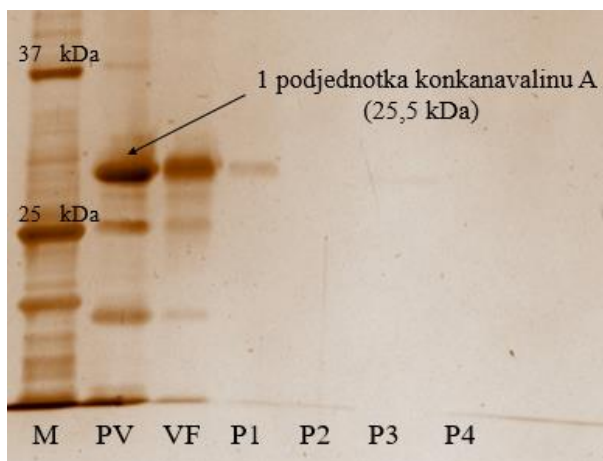
Tab. 11. Množství navázaného Con A na povrch magnetických částic stanovená BCA testem a SDS-PAGE

		BCA						SDS-PAGE					
		1.		2.				1.		2.			
	Con A (µg)	µg/mg	%	µg/mg	%	účinnost vazby v %	SD %	µg/mg	%	µg/mg	%	účinnost vazby v %	SD %
ProMag	30	27,7	92,4	23,9	79,7	86,0	9,0	18,4	61,3	17,2	57,3	59,3	2,8
Sera-Mag Speed Beads	30	19,6	65,3	32,7	109,1	87,2	30,9	19,2	64	21,6 21,5	72,0 71,7	69,2	4,5

Byly porovnány hodnoty (tabulka č. 13) účinnosti vazby Con A na povrch magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag. Účinnost vazby Con A na povrch magnetických částic Sera-Mag Speed Beads je vyšší než u magnetických částic ProMag. I když je účinnost vazby u magnetických částic ProMag nižší, směrodatná odchylka nepřekračuje hodnotu 2,8 %, na rozdíl od magnetických částic Sera-Mag Speed Beads, kdy směrodatná odchylka odpovídá hodnotě 4,5 %. Právě tato vyšší směrodatná odchylka v účinnosti vazby Con A na povrch magnetických částic Sera-Mag Speed Beads ukazuje na nižší reprodukovatelnost výsledků

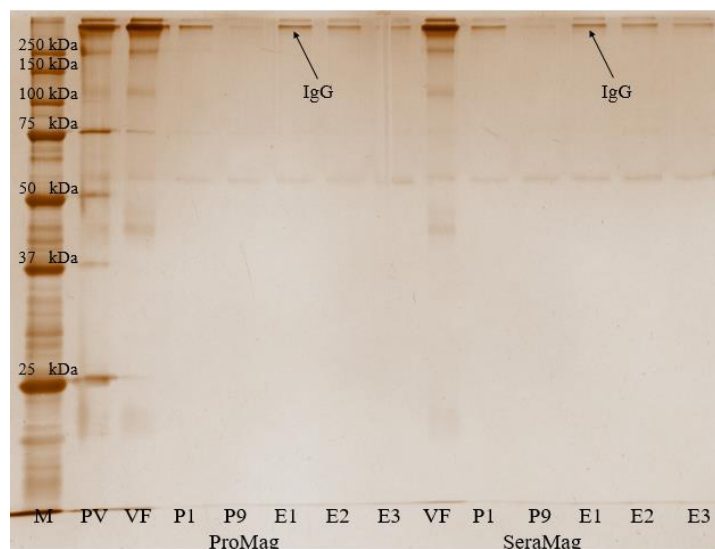
pravděpodobně v důsledku nekvality částic. Magnetické částice Sera-Mag Speed Beads byly pro další experimenty nahrazeny magnetickými částicemi ProMag.

Na obrázku č. 43 je SDS-PAGE analýza frakcí mobilních fází získaných při imobilizaci Con A na povrch magnetických částic ProMag. Imobilizace Con A probíhala za stejných již optimalizovaných podmínek jako imobilizace na povrch magnetických částic Sera-Mag Speed Beads.



Obr. 43. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při imobilizaci 30 μ g Con A na 1 mg magnetických částic ProMag, SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P4: promytí 1 až 4)

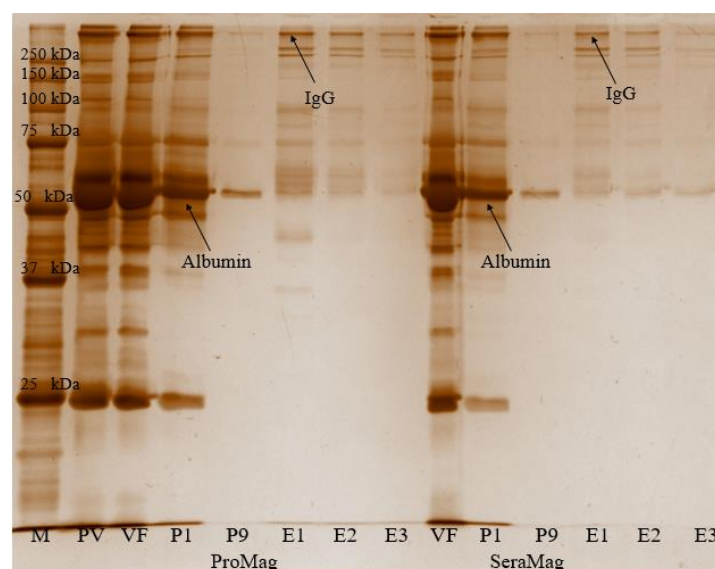
Dále byly částice porovnávány mezi sebou při izolaci IgG ve vsádkovém uspořádání. Byla použita koncentrace 30 μ g IgG na 1 mg magnetických částic s imobilizovaným Con A. Inkubace probíhala 30 minut. Po promytí byly prováděny eluce 3 x 20 minut. Z denzitometrického vyhodnocení elektroforeogramu izolace IgG je patrné, že magnetické částice ProMag mají srovnatelnou a vyšší účinnost vazby IgG a lze pro další experimenty použít pouze částice ProMag (viz. obrázek č. 44).



Obr. 44. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG na nosiči s Con A (porovnání magnetických částic ProMag a Sera-Mag), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1 a P9: promytí 1 a 9; E1-E3: eluce 1 až 3)

Izolace IgG z lidského séra

Dále bylo provedeno porovnání účinnosti izolace ze IgG séra u výše zmíněných 2 druhů magnetických částic (Sera-Mag Speed Beads a ProMag) s imobilizovaným Con A. Podmínky izolace byly stejné jako u izolace modelového sérového IgG (inkubace 30 minut, eluce 3 x 20 min). I zde byla po denzitometrickém vyhodnocení patrná vyšší účinnost magnetických částic ProMag. Tato skutečnost je znázorněna na obrázku č. 45.



Obr. 45. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (porovnání magnetických částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1 a P9: promytí 1 a 9; E1-E3: eluce 1 až 3)

Na základě výše uvedených výsledků bylo dospěno k následujícím závěrům, a to že:

- vhodným vazebným pufrům pro izolaci IgG je MES pufr s ionty při pH 6
- vhodná koncentrace sérového lyofilizovaného lidského IgG je 30 µg/1 mg magnetických částic (Con A složen ze čtyř podjednotek; jednou je vázán na povrch nosiče a tři podjednotky jsou volné pro vazbu IgG; Con A je tedy v nadbytku a může tak pohodlně docházet k vazbě všech molekul IgG na Con A)
- optimální inkubační doba pro izolaci sérového IgG a IgG ze séra je 30 minut
- optimální eluční časy jsou 3 x 20 minut
- dostatečný počet promývacích kroků je 9, přičemž došlo k zařazení 1M NaCl v 0,01M MES pH 6 z důvodů lepšího promytí
- kromě používaného elučního pufru lze použít i: 0,2M glycinový pufr pH 3 a 0,05% TFA
- magnetické částice ProMag jsou vhodné pro izolaci IgG ze séra ve vsádkovém i mikrofluidním uspořádání.

4. 3 Lektinová afinitní chromatografie v mikrofluidním uspořádání

4. 3. 1 Využití systému kontrolující průtok mobilní fáze firmy Fluigent

Prvním krokem při optimalizaci izolace IgG pomocí magnetických částic s imobilizovaným Con A v mikrofluidním uspořádání byla volba způsobu kontroly průtoku mobilní fáze mikrofluidním zařízením. Promývání magnetických částic umístěných v mikrofluidním čipu mohlo být provedeno za pomoci dvou přístrojů. Prvním z nich je MFCS-Fluigent (systém pro řízení mikrofluidního toku značky Fluigent, z angl. Microfluidic Flow Control System; obrázek č. 46). Tento přístroj umožňuje nastavení tlaku a průtoku, pod kterým je mobilní fáze vtlačována do mikrofluidního čipu [164].



Obr. 46. MFCS-Fluigent, převzato z [165]

Druhým přístrojem je „Syringe“ pumpa (obrázek č. 47), která je vhodná pro promývání magnetických částic umístěných v mikrofluidním čipu, ale i pro dávkování vzorku do čipu. „Syringe“ pumpa umožňuje nastavení rychlosti průtoku mobilní fáze, která je vtlačována do mikrofluidního čipu [166].



Obr. 47. „Syringe“ pumpa, převzato z [166]

Oba tyto přístroje dávkují kapalinu do mikrofluidního čipu, který je umístěn na magnetickém míchadle. V našem případě bylo použito magnetické míchadlo ChipGenie II (obrázek č. 48). Magnetické částice umístěné v mikrofluidním čipu jsou míchány pomocí permanentního pohybujícího se magnetu, který je umístěn uvnitř přístroje ChipGenie [167].



Obr. 48. Magnetické míchadlo ChipGenie, převzato a upraveno z [167]

Nejprve bylo vyzkoušeno zapojení s MFCS-Fluigent, kdy dávkování bylo umístěno vpravo a odpad s kamerou vlevo. Při tomto rozložení systému je manipulace s aparaturou jednodušší. Jak je vidět na obrázku č. 49 vpravo je MFCS-Fluigent určený pro promývání magnetických částic umístěných v čipu, následuje dávkovací injekční stříkačka určená pro dávkování magnetických částic a vzorku, uprostřed je magnetické míchadlo s čipem, který dále pokračuje odpadní hadičkou do odpadní kádinky umístěné vlevo od magnetického míchadla. Nad čipem je umístěna kamera pro záznam videí a pořizování fotografií magnetických částic umístěných v čipu. Všechny hadičky jsou zaškrceny kleštěmi, aby nedocházelo k zavzdušňování komůrky čipu a tím i k odstranění magnetických částic nebo vzorku.



Obr. 49. Aparatura pro izolaci IgG v mikrofluidním uspořádání se zapojeným MFCS-Fluigent určeným k promývání magnetických částic umístěných v čipu

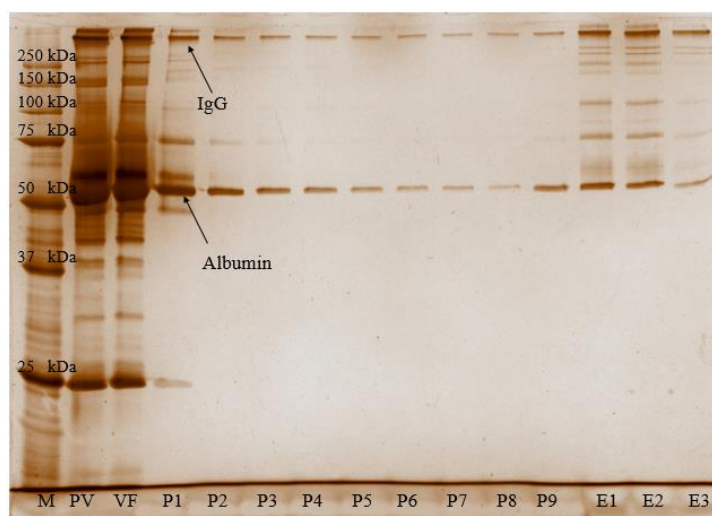
Při tomto uspořádání systému byla vyzkoušena vlastní izolace IgG ze séra, která byla nejprve optimalizována pro vsádkový systém uspořádání. Inkubace byla nastavena na 30 minut, promývacích kroků bylo 9, tzn. 9 ml promývacího pufru a eluce byly prováděny třikrát po 20ti minutách s již zavedeným elučním pufrém, který obsahuje 0,2M cukry. Byly vyzkoušeny dvě varianty promývání, a to s vypnutým míchadlem při promývání částic v čipu a se zapnutým míchadlem. Promývací kroky obsahovaly jen MES pufr s ionty a 0,05% Tweenem 20, jelikož nebylo možné měnit promývací pufr ve zkumavce MFCS-Fluigent. Avšak při zapojení MFCS-Fluigent do mikrofluidního čipu byl totiž jen jeden možný kanál a při výměně promývacího pufru by tak docházelo k zavzdušnění systému.

Při promývání částic s vypnutým míchadlem nebylo jisté, zda dochází k řádnému promývání částic, proto nebylo možné s jistotou tvrdit, že získané eluce obsahovaly pouze požadovaný analyt. Při tomto způsobu promývání nedocházelo k zásadnímu vymývání částic z čipu do odpadu. Tato metoda promývání byla následně ověřována gelovou elektroforézou.

Naopak při promývání částic se zapnutým míchadlem docházelo k razantnímu vymývání magnetických částic do odpadu.

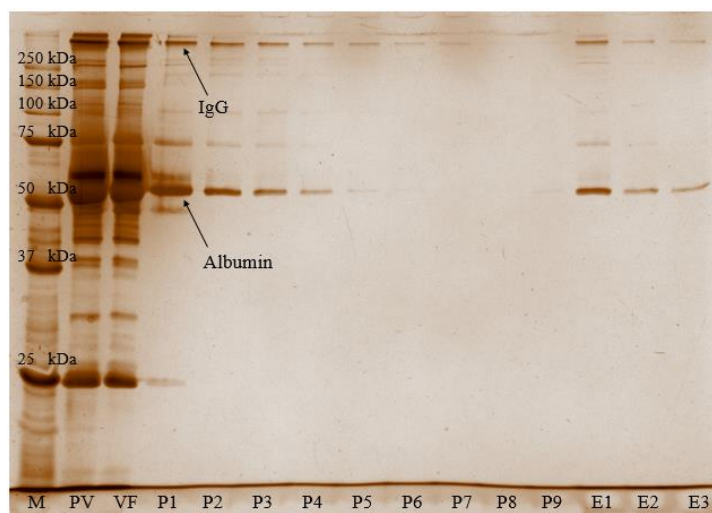
Izolace IgG ze séra byla vyhodnocována pomocí SDS-PAGE gelové elektroforézy s následnou denzitometrickou analýzou. Z obrázku č. 52 je patrné, že při vypnutém míchadle

nedochází k dostatečnému promytí částic, a tedy eluce obsahují jak IgG ze séra, tak ostatní proteiny, které nebyly vymyty (především albumin).



Obr. 50. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (promývání s vypnutým míchadlem), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1 až 9; E1-E3: eluce 1 až 3)

Na obrázku č. 53 je zobrazen elektroforeogram frakcí mobilních fází získaných při izolaci IgG ze séra se zapnutým míchadlem při promývání. Z obrázku patrné, že dochází k vymývání částic do odpadu, čímž dochází k velkým ztrátám částic, což má za následek malou výtěžnost cílové molekuly v elucích.

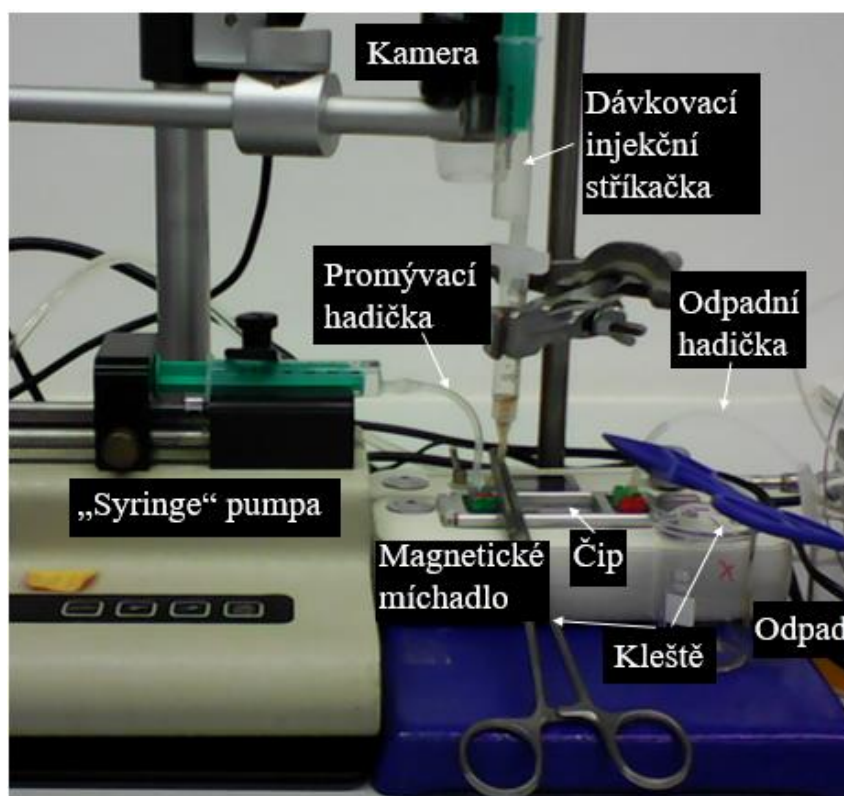


Obr. 51. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (promývání se zapnutým míchadlem), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1 až 9; E1-E3: eluce 1 až 3)

Z uvedeného pokusu je patrné, že zapojení MFCS-Fluigent za účelem promývání částic v čipu je nevhodné, protože buď nedochází k řádnému promytí částic, nebo jsou částice z čipu vymývány. Důvodem pro vymývání částic z čipu do odpadu byl nejspíše slabý permanentní magnet použitý v přístroji ChipGenie. Možným řešením problému s vymýváním částic do odpadu by bylo upravení magnetu v přístroji ChipGenie např. použitím elektromagnetu, kterým by se dala síla magnetického pole ovládat podle potřeby.

4. 3. 2 Využití systému pro kontrolu průtoku mobilní fáze značky KD Scientific („Syringe“ pumpa)

Možnou variantou namísto použití MFCS-Fluigent pro promývání magnetických částic umístěných v čipu je „Syringe“ pumpa. Uspořádání systému je zobrazeno na obrázku č. 54, kdy je „Syringe“ pumpa umístěna vlevo, uprostřed je umístěné magnetické míchadlo s čipem, který dále pokračuje odpadní hadičkou do odpadní kádinky umístěné vpravo od magnetického míchadla. Hadičky jsou zaškrceny kleštěmi, aby nedocházelo k nechtěnému zavzdušňování čipu nebo odtoku vzorku/částic do odpadu.

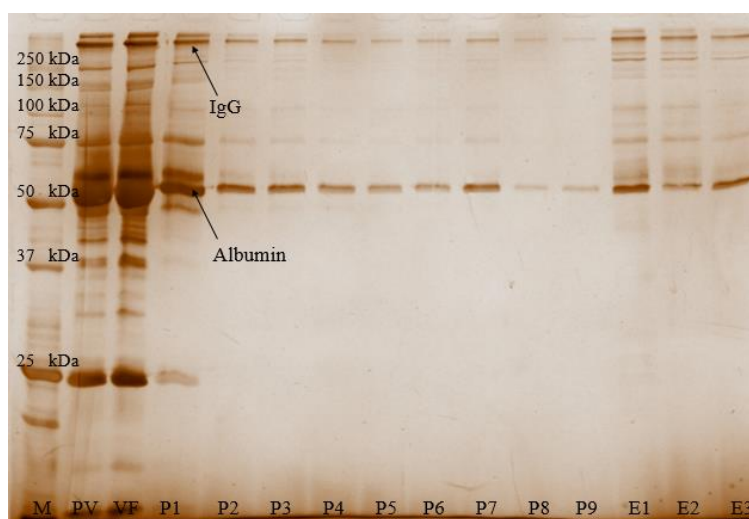


Obr. 52. Aparatura pro izolaci IgG v mikrofluidním uspořádání se zapojenou „Syringe“ pumpou určenou k promývání částic umístěných v čipu

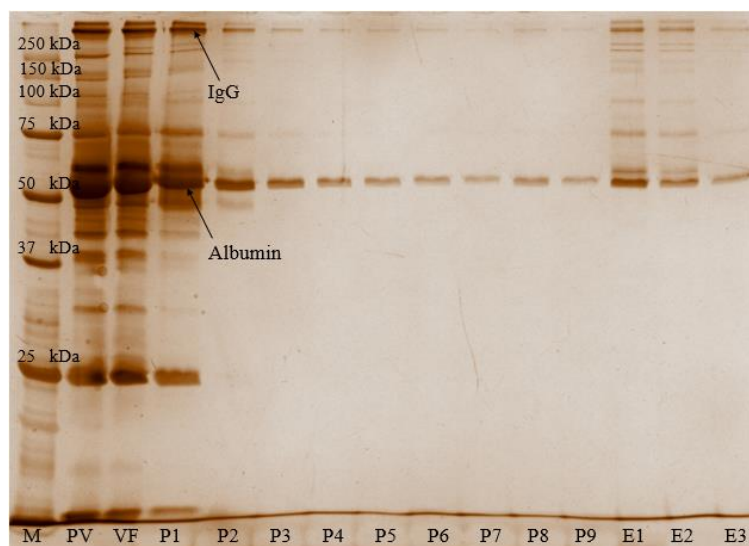
Při tomto uspořádání byla také provedena izolace IgG ze séra. Inkubační doba byla 30 minut, promývání 9x se zapnutým míchadlem, eluce 3 x 20 minut. Bylo hodnoceno, zda je „Syringe“ pumpa vhodnější pro promývání magnetických částic umístěných v čipu než MFCS-Fluigent. A dále bylo u tohoto pokusu zjišťováno, zda je výhodnější čip během izolace zcela vypouštět, tzn. dávkovat kapalinu do zavzdušněného/prázdného čipu, nebo zda je výhodnější vytlačovat kapalinu kapalinou.

Při promývání částic za pomoci „Syringe“ pumpy se zapnutým míchadlem nedocházelo k tak razantnímu vymývání částic do odpadu jako při použití MFCS-Fluigent. Proto byla „Syringe“ pumpa vyhodnocena jako přístroj vhodný k zajištění konstantního průtoku mobilní fáze mikrofluidním zařízením.

Izolace IgG ze séra byla vyhodnocována pomocí SDS-PAGE s následnou denzitometrickou analýzou. Bylo zjištěno, že za pomoci „Syringe“ pumpy dochází k lepšímu promytí magnetických částic než pomoci MFCS-Fluigent. Dále bylo zjištěno, že je lepší, když dochází k plnění kapalin do prázdného (vypuštěného) mikrofluidního čipu, protože při vytlačování kapalinou dochází k naředění vzorku. SDS-PAGE analýzy frakcí mobilních fází získaných při izolaci IgG ze séra za použití „Syringe“ pumpy pro promývání částic umístěných v čipu jsou zobrazeny na obrázcích č. 53 a 54.



Obr. 53. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (plnění do prázdného čipu), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1 až 9; E1-E3: eluce 1 až 3)



Obr. 54. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (vytlačování kapaliny kapalinou), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1 až 9; E1-E3: eluce 1 až 3)

Hlavní výhodou při použití metody vytlačování kapaliny kapalinou by bylo, že by nedocházelo k tak razantní tvorbě vzduchových bublinek, jako při plnění do vzduchem naplněných kanálků čipu. Tato nepříjemnost (zavzdušňování) může být odstraněna použitím hydrofilizovaného čipu (vnitřní povrch komůrek čipu je již upraven výrobcem) o objemu komůrky 100 μ l, kdy k tvorbě vzduchových bublinek dochází minimálně.

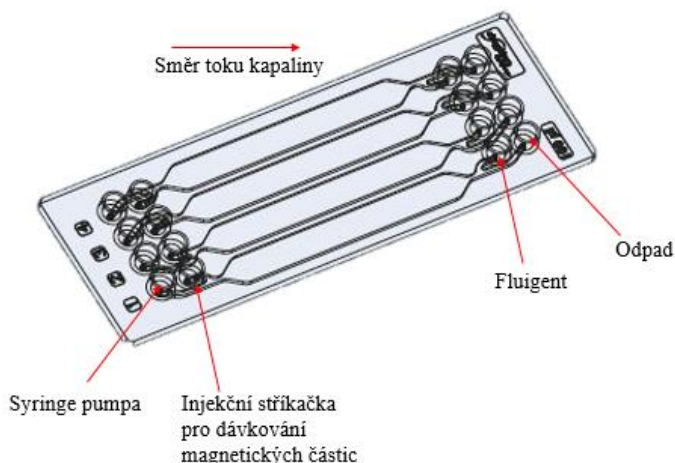
Vznikající vzduchové bublinky uvnitř čipu zabraňují kontaktu ligandu (Con A) na magnetických částicích s analytem (IgG) ze vzorku a výrazně snižují separační účinnost. Dále se magnetické částice nemohou v čipu bez kapaliny plynule pohybovat. Proto je důležité předcházet tvorbě vzduchových bublinek. Toho lze dosáhnout pomalým plněním čipu kapalinou a použitím zmíněného mikrofluidního čipu.

4. 3. 3 Spojení obou systému pro kontrolu průtoku mobilní fáze

V předchozích dvou podkapitolách byly popisovány různé možnosti dávkování promývacích roztoků dovnitř komůrky čipu za využití přístroje MFCS-Fluigent nebo „Syringe“ pumpy. Dále bylo navrženo, že by bylo výhodné zapojit oba přístroje současně, každý za jiným účelem. Dávkování vzorku by bylo prováděno „Syringe“ pumpou a promývání částic promývacím roztokem by umožňoval MFCS-Fluigent. Současné propojení obou přístrojů by bylo velice výhodné, a to z toho důvodu, že by došlo k částečné automatizaci procesu izolace IgG ze séra. Bohužel nebylo možné zapojit oba přístroje naráz.

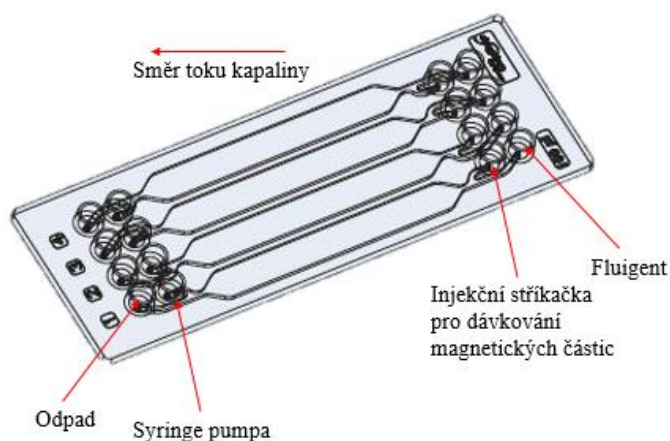
V případě, kdy byla „Syringe“ pumpa zapojena jako dávkovač vzorku do prvního kanálku, injekční stříkačka pro dávkování částic do druhého kanálku, MFCS-Fluigent do třetího kanálku

a odpad do čtvrtého kanálku, nedocházelo k promývání částic, protože odtékal všechen promývací pufr dávkovaný MFCS-Fluigent rovnou do odpadu. Názorné zapojení čipu je na obrázku č. 55.



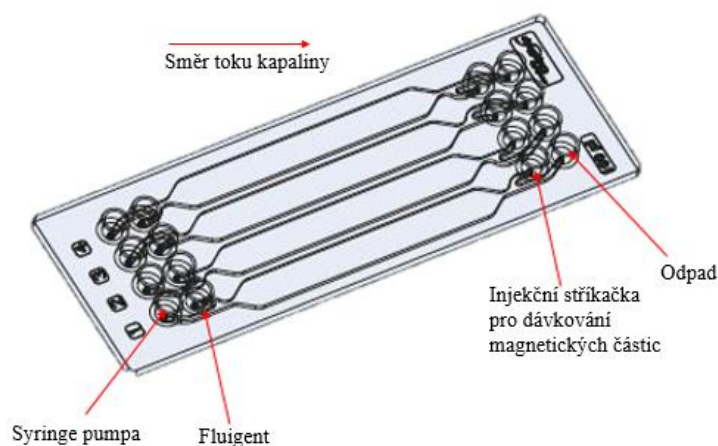
Obr. 55. Schématické znázornění zapojení čipu (první varianta), převzato a upraveno z [167]

Pokud byl odpad zapojen do prvního kanálku, „Syringe“ pumpa do druhého kanálku, injekční stříkačka pro dávkování částic do třetího kanálku a MFCS-Fluigent do čtvrtého kanálku, pak docházelo k vymývání částic z mikrofluidního čipu do odpadu, stejně jako u zapojení samotného MFCS-Fluigent. Schématické znázornění tohoto zapojení je na obrázku č. 56.



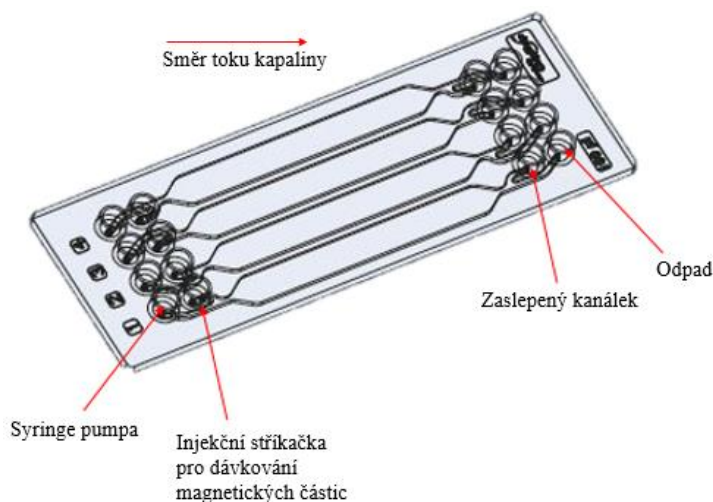
Obr. 56. Schématické znázornění zapojení čipu (druhá varianta), převzato a upraveno z [167]

Při variantě zapojení, kdy byla „Syringe“ pumpa a MFCS-Fluigent na stejné straně čipu a injekční stříkačka pro dávkování částic a odpad na opačné straně čipu, nedocházelo k plnění čipu částicemi. Tato varianta zapojení je zobrazena na obrázku č. 57.



Obr. 57. Schématické znázornění zapojení čipu (třetí varianta), převzato a upraveno z [167]

Na základě těchto pokusů o společné zapojení MFCS-Fluigent a „Syringe“ pumpy bylo rozhodnuto, že nejlepší možnou variantou je pouze použití „Syringe“ pumpy s mikrofluidním čipem a zařízením firmy ChipGenie. „Syringe“ pumpa byla nadále využívána pro promývání magnetických částic umístěných v čipu, kdy konečné zapojení systému bylo následující: „Syringe“ pumpa byla zapojena do prvního kanálku, injekční stříkačka pro dávkování částic do druhého kanálku, třetí kanálek byl zaslepen a odpad byl zapojen do čtvrtého kanálku. Toto konečné zapojení je schematicky zobrazeno na obrázku č. 58.



Obr. 58. Schématické znázornění zapojení čipu (konečná varianta), převzato a upraveno z [167]

4. 3. 4 Porovnání chování částic Sera-Mag Speed Beads a ProMag v mikrofluidním systému

Na základě pořízených snímků magnetických částic z elektronového mikroskopu, které byly diskutovány v předešlé kapitole (4. 2. 5), bylo provedeno porovnání dvou druhů magnetických částic: Sera-Mag Speed Beads a ProMag v prostředí mikrofluidního čipu. Vždy byl porovnáván 1 mg magnetických částic v promývacím pufru (MES pufr s ionty a 0,05% Tweenem 20). Magnetické míchadlo bylo nastaveno tak, aby se pohybovalo pouze v prostřední části čipu, aby zbytečně nedocházelo k odtoku magnetických částic do odpadu případně do dávkovací hadičky.

Částice Sera-Mag Speed Beads se k magnetu, který je umístěn uvnitř magnetického míchadla, přitahovaly rychle. Při míchání se pohybovaly za magnetickým míchadlem převážně v celém svém objemu. Při míchání se tedy netvořily jednotlivé shluky částic v různých místech komůrky čipu, jak je patrné z následujícího obrázku č. 59.



Obr. 59. Sera-Mag Speed Beads (1 mg) v čipu o objemu komůrky 100 µl

Magnetické částice ProMag byly k magnetu přitahovány o něco rychleji, než magnetické částice Sera-Mag Speed Beads. Při pohybu magnetického míchadla se magnetické částice ProMag mnohem více držely u sebe a nedocházelo tak k opožděnému přitahování částic k magnetu, což u magnetických částic Sera-Mag Speed Beads nastávalo. Na obrázku č. 60 jsou zobrazeny magnetické částice Promag v komůrce čipu o objemu 100 µl.



Obr. 60. ProMag (1 mg) v čipu o objemu komůrky 100 µl

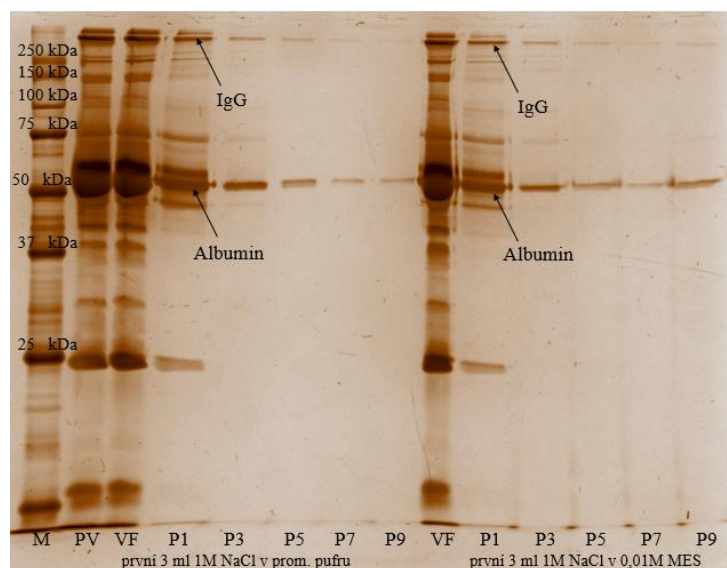
Z výše uvedených obrázků, a z pozorování částic umístěných v čipu, je na první pohled patrné, že magnetické částice se v mikrofluidním systému chovají podobně. K dalším experimentům byly zvoleny pouze magnetické částice ProMag.

4. 3. 5 Volba separačních podmínek v mikrofluidním systému – promývací fáze

Dalším krokem při izolaci IgG ze séra pomocí nosiče na bázi magnetických částic s imobilizovaným Con A v mikrofluidním uspořádání bylo zajištění optimálního počtu promývacích kroků. Při izolaci IgG ze séra ve vsádkovém uspořádání bylo zjištěno, že optimální počet promývacích kroků je devět, přičemž třetí, páté a sedmé promytí obsahovalo zvýšenou koncentraci NaCl, a to 1M NaCl v 0,01M MES při pH 6. Z této informace bylo nadále vycházeno.

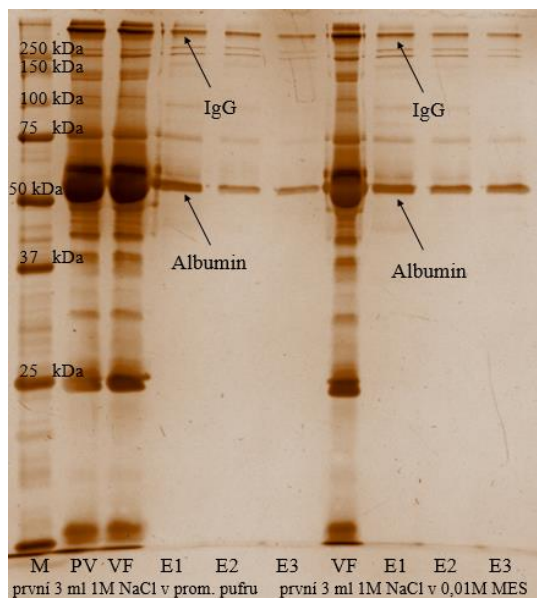
Pro zjištění optimálního počtu promývacích kroků byla provedena izolace IgG ze séra, kdy inkubace trvala 30 minut, promývání bylo prováděno „Syringe“ pumpou, kdy první 3 ml obsahovaly 1M NaCl buď v promývacím pufru, nebo v 0,01M MES. Zbýlých 6 ml obsahovalo již zavedený promývací pufr (0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween 20, pH 6). Eluce byly prováděny 3x po 20ti minutách elučním pufrem s 0,2M cukry.

Z denzitometrického vyhodnocení elektroforeogramů (obrázky č. 61 a 62) bylo patrné, že 1M NaCl v promývacím pufru je nepatrně účinnější při promytí magnetických částic než 1M NaCl v 0,01M MES, ale rozdíl mezi použitými pufrů nebyl tak radikální, aby nemohl být použit stejný promývací pufr jako při izolaci IgG ze séra ve vsádkovém uspořádání. Nadále tedy bylo přistoupeno k devíti promývacím krokům, přičemž první tři promývací kroky obsahovaly 1M NaCl v 0,01M MES a dalších šest kroků obsahovalo promývací pufr. Vzhledem k technickému uspořádání (pouze jeden dávkovací kanál) při promývání nemohlo být prováděno stejně řazené promývání jako u izolace IgG ze séra, tedy třetí, páté a sedmé promytí silnějším pufrem, ale silnější pufr byl zařazen na začátek promývání.



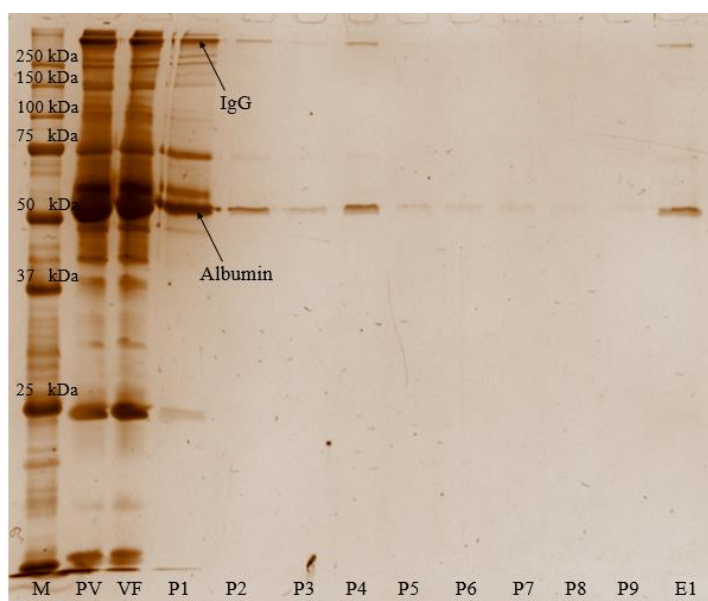
Obr. 61. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (volba optimálního počtu promývacích kroků společně s volbou vhodného pufru (promytí)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1, P3, P5, P7, P9: promytí 1, 3, 5, 7 a 9)

Z následujícího elektroforeogramu č. 62 je patrné, že stejně jako u promytí, tak i u eluce nemá složení pufru, ve kterém je rozpuštěn 1M NaCl, zásadní vliv na eluce. Proto bylo i zde na základě získaných výsledků rozhodnuto, že bude nadále používán stejný promývací pufr jako u izolace IgG ze séra, a to 1M NaCl v 0,01M MES pro první tři promývací kroky.



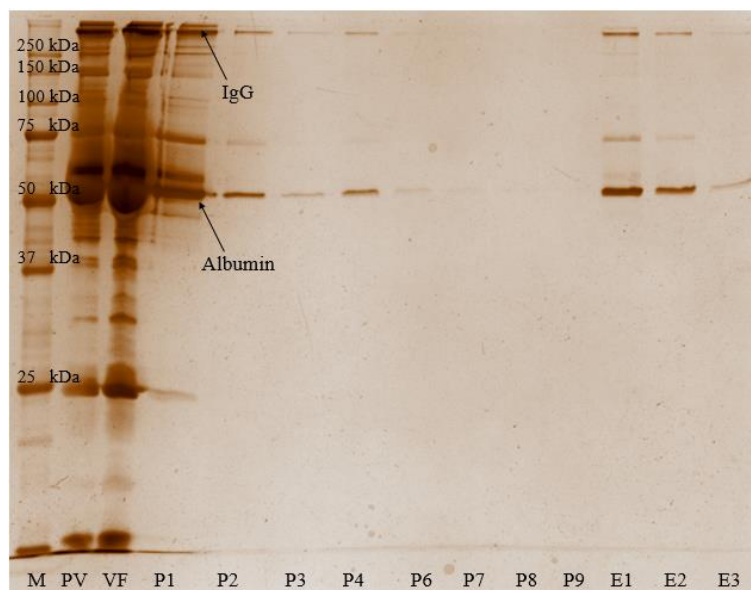
Obr. 62. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (volba optimálního počtu promývacích kroků společně s volbou vhodného pufru (eluce)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; E1-3: eluce 1 až 3)

Po provedení výběru vhodného počtu promývacích kroků a volby vhodného pufru s 1M NaCl, byla provedena kontrola nespecifické sorpce proteinů na stěny mikrofluidního čipu. Přičemž byl celý postup prováděn stejně jako při izolaci IgG ze séra v mikrofluidním uspořádání, ale s tím rozdílem, že vše bylo prováděno bez magnetických částic. Pomocí této kontroly nespecifické sorpce proteinů na stěny čipu bylo zjištěno, že dochází k ulpívání proteinů (především albuminu) na stěnu komůrky čipu, jak je patrné z následujícího elektroforeogramu č. 63.



Obr. 63. Kontrola nespecifické sorpce proteinů na stěny mikrofluidního čipu, SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1 až 9; E1: eluce 1)

Na základě získaných informací byla komůrka čipu promyta před vlastní izolací IgG ze séra v mikrofluidním uspořádání 2 x 1 ml 20% isopropanolem, 2 x 1 ml vodou, a nakonec 1 x 1 ml promývacím pufrem. Teprve poté byla prováděna izolace IgG ze séra podle protokolu. Tímto promývacím postupem před vlastní izolací IgG ze séra byly odstraněny nespecificky sorbované proteiny ze séra z předešlých izolací z komůrky čipu, jak je zobrazeno na obrázku č. 64.



Obr. 64. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (předem promytí 2x isopropanolem, 2x vodou a 1x promývacím pufrem), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1-P9: promytí 1 až 9; E1-E3: eluce 1-3)

4. 3. 6 Zvýšení účinnosti izolace IgG ze séra pomocí nosiče s Proteinem A

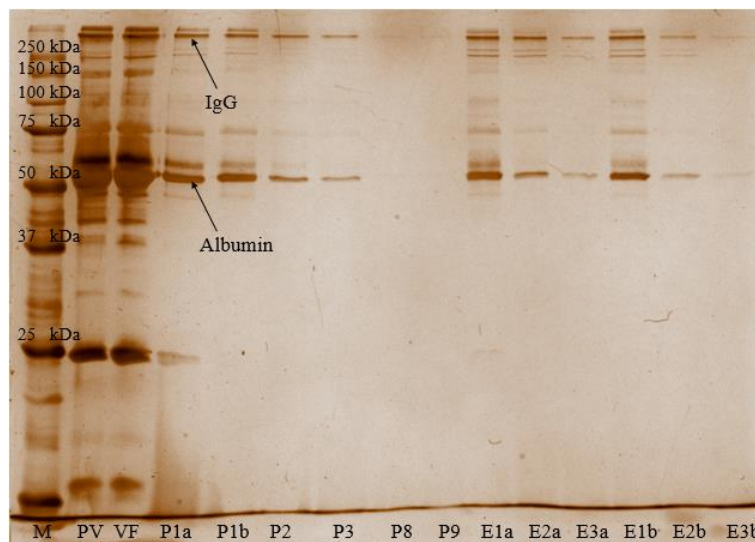
Cílem experimentální části této diplomové práce bylo získání eluce obsahující pouze molekuly IgG. Proto bylo na závěr po zavedení výše uvedených optimalizací provedeno přečištění lektinem izolovaných sérových IgG pomocí tří níže zmíněných postupů, a to z toho důvodu, že frakce elucí obsahovaly kromě izolovaného IgG také albumin, který je ve vysoké koncentraci přítomen v lidském séru. Navíc albumin patří mezi glykoproteiny (stejně jako IgG), které jsou Con A vyvazovány z roztoku vzorku, a to díky N-glykozylacii obsahující terminální monosacharid glukózu. Přečištění lektinem izolovaných sérových IgG bylo prováděno třemi různými způsoby:

1. přečištění lektinem izolovaných sérových IgG pomocí kolonek amicon ultra 0,5 ml 100K (kolonky pro odstranění albuminu, který se vyskytuje v lidském séru ve vysoké koncentraci a kontaminoval frakce s izolovaným IgG)
2. nabohacení sérových IgG pomocí nosiče s Proteinem A před lektinovou chromatografií
3. přečištění lektinem izolovaných sérových IgG na nosiči s Proteinem A

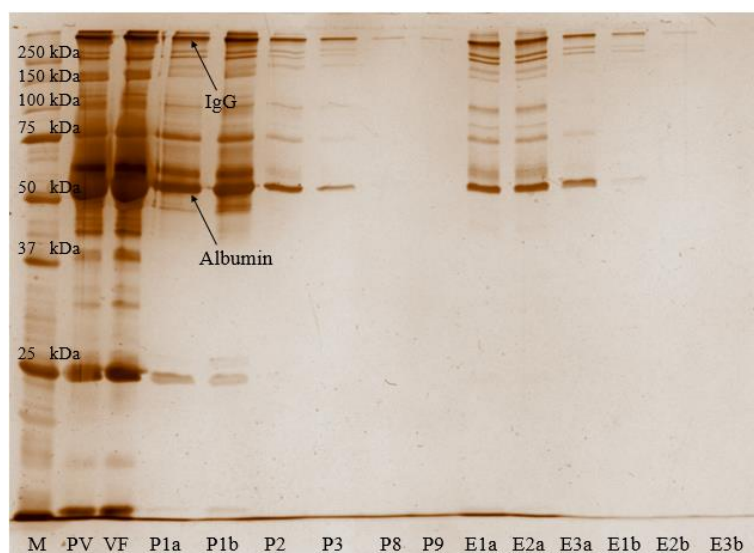
První uvedená možnost, tedy přečištění lektinem izolovaných sérových IgG pomocí kolonek amicon ultra 0,5 ml 100K byla vyhodnocena jako nevhodná metoda, jelikož při použití kolonek nedocházelo skoro k žádným změnám nebo naopak při použití kolonky amicon dvakrát,

docházelo ke kvantitativním ztrátám vzorku a navíc nedocházelo k přečištění elucí, jak je patrné na následujících elektroforeogramech č. 65 a 66.

Kolonky amicon ultra 0,5 ml 100K slouží k separaci proteinů a dalších biologických látek. Proteiny o molekulové hmotnosti 100 kDa a vyšší (IgG) těmito kolonkami neprocházejí, jsou tak separovány od ostatních (kontaminujících) proteinů.



Obr. 65. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí pomocí amicon ultra 0,5 ml 100K (jednou)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1a, P2, P3, P8, P9: promytí 1, 2, 3, 8, 9; P1b: použití kolonky amicon ultra 0,5 ml 100K na přečištění prvního promytí; E1a-E3a: eluce 1 až 3; E1b-E3b: použití kolonky amicon ultra 0,5 ml 100K na přečištění elucí 1, 2 a 3)

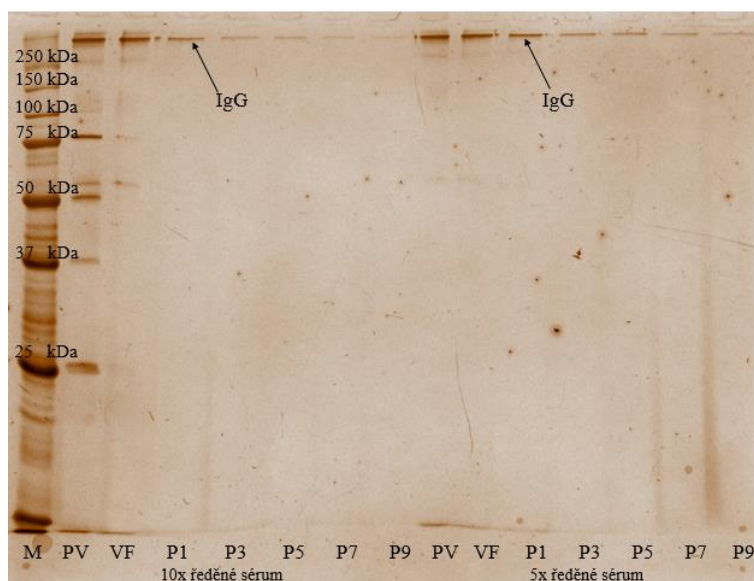


Obr. 66. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí pomocí amicon ultra 0,5 ml 100K (dvakrát)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1a, P2, P3, P8, P9: promytí 1, 2, 3, 8, 9; P1b: použití kolonky amicon ultra 0,5 ml 100K na přečištění prvního promytí; E1a-E3a: eluce 1 až 3; E1b-E3b: použití kolonky amicon ultra 0,5 ml 100K na přečištění elucí 1, 2 a 3)

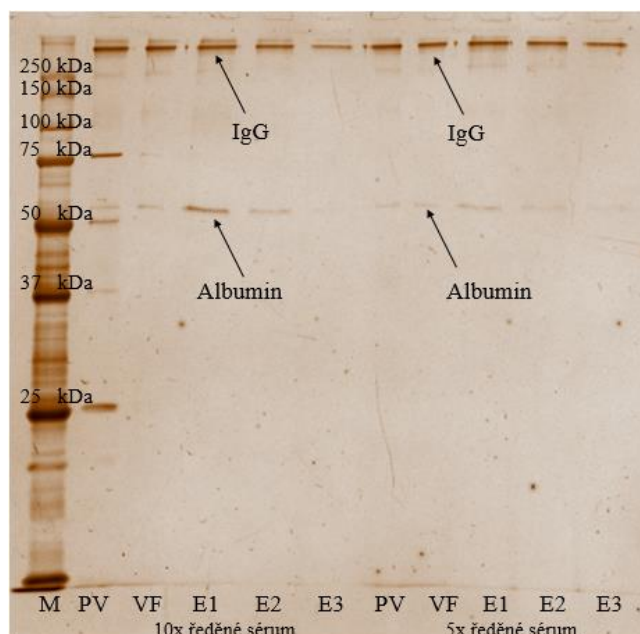
Druhou výše zmíněnou možností bylo použití Proteinu A navázaného na magnetické částice PureProteome. Protein A byl použit pro nabohacení molekul IgG před aplikací frakce s IgG do čipu s magnetickými částicemi s Con A.

Pro tento pokus bylo použito 10x a 5x ředěné sérum a izolace byla zkoušena jak v čipu o objemu komůrky 100 μ l, tak v čipu o objemu komůrky 120 μ l. Inkubace séra s magnetickými částicemi s navázaným Proteinem A probíhala 1 hodinu na rotátoru, poté byly částice 3x promyty 1 ml promývacího pufru a následně probíhala eluce pomocí 0,05% TFA po dobu 20 minut při otáčení na rotátoru. Tímto postupem byla získána kyselá eluce, které muselo být upraveno pH na hodnotu 6. Takto upravený vzorek byl dále použit pro izolaci IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s imobilizovaným Con A v mikrofluidním uspořádání.

Pomocí denzitometrického vyhodnocení elektroforeogramů na obrázcích č. 67 a 68, bylo rozhodnuto, že výhodnější je využití 10x ředěného séra z důvodů úspory materiálu a z důvodů lepšího promytí při izolaci. Jak je patrné na obrázku č. 68 albumin je stále přítomen v elucích, ale již v mnohem menší míře než v předešlých elucích. Proto by se dalo říci, že použití Proteinu A pro přečištění séra je krok správným směrem.

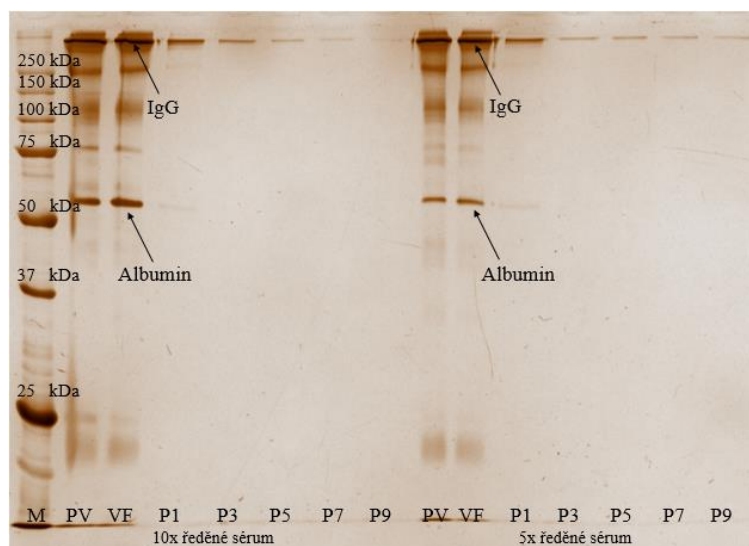


Obr. 67. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 100 μ l – promytí)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1, P3, P5, P7 a P9: promytí 1, 3, 5, 7 a 9)

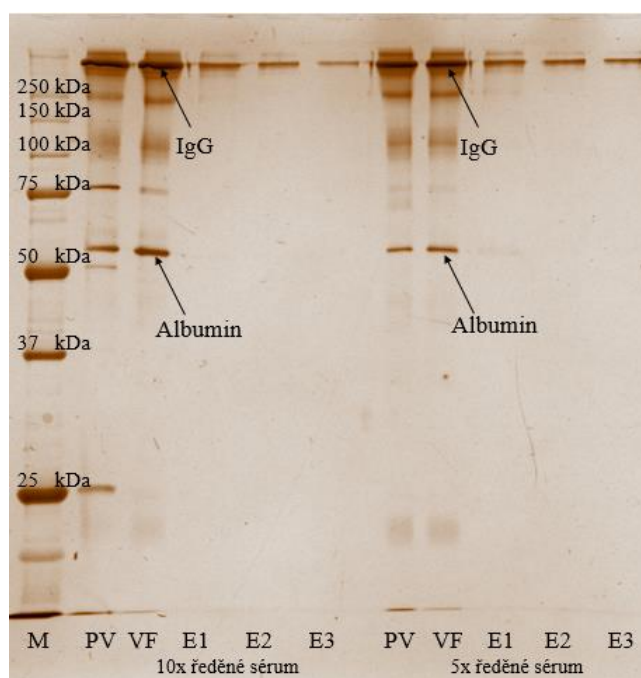


Obr. 68. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 100 μ l – eluce)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; E1, E2, E3: eluce 1, 2 a 3)

Jak bylo již zmíněno výše pokus s přečištěním séra za pomoci Proteinu A před aplikací do mikrofluidního čipu s umístěnými magnetickými částicemi s imobilizovaným Con A byl proveden i v čipu o objemu komůrky 120 μ l. Postup přečištění séra a izolace IgG ze séra byl shodný s výše uvedeným postupem (str. 101). Získané výsledky jsou téměř shodné s výše uvedenými výsledky. Z denzitometrického vyhodnocení následujících elektroforeogramů č. 69 a 70 je patrné, že při použití 10x ředěného séra dochází k lepšímu promytí než při použití 5x ředěného séra. Na elektroforeogramu č. 70 jsou viditelné eluční frakce, které obsahují pouze molekuly IgG, proto bychom mohli tvrdit, že došlo k úspěšné izolaci IgG ze séra v mikrofluidním uspořádání při použití 10x ředěného séra, které bylo přečištěné Proteinem A před lektinovou chromatografií.



Obr. 69. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 120 μ l – promytí)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P1, P3, P5, P7 a P9: promytí 1, 3, 5, 7 a 9)



Obr. 70. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění séra Proteinem A před vlastní izolací (čip o objemu komůrky 120 μ l – eluce)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (M: marker; PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; E1, E2, E3: eluce 1, 2 a 3)

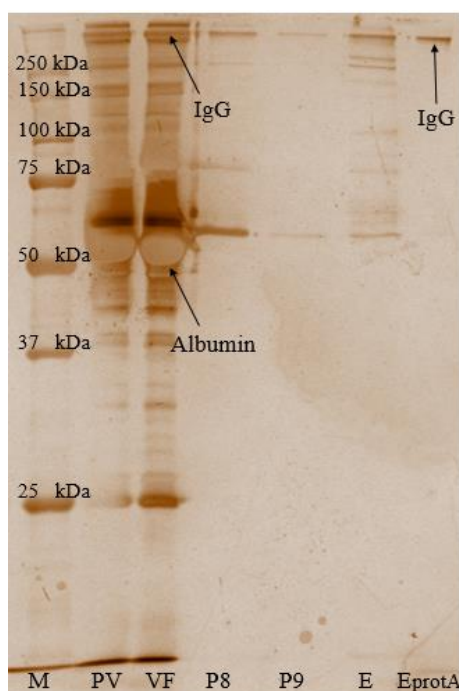
Posledním výše zmíněným postupem pro získání elucí pouze s obsahem molekul IgG bylo použití Proteinu A, který byl použit až po izolaci IgG ze séra Con A. Tento postup se zdá být nejlepší možností ze všech výše uvedených, jelikož dochází nejprve ke specifické izolaci glykozylovaných IgG ze séra pomocí Con A a teprve poté dochází k přečištění již získaných

elucí (odstranění navázaného albuminu). Tímto způsobem jsou izolovány pouze molekuly IgG jak je zobrazeno na obrázku č. 71.

I tento pokus byl prováděn jak v čipu o objemu komůrky 100 μ l, tak v čipu o objemu komůrky 120 μ l. Nejprve byla provedena izolace IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s imobilizovaným Con A v mikrofluidním uspořádání a poté byly všechny eluce smíchány dohromady a inkubovány 1 hodinu na rotátoru s magnetickými částicemi s navázaným Proteinem A. Poté byly částice promyty a následně byla provedena eluce pomocí 0,05% TFA. Takto byla získána kyselá eluce, které bylo upraveno pH na hodnotu 6.

Vhodné řazení separačních kroků je následující:

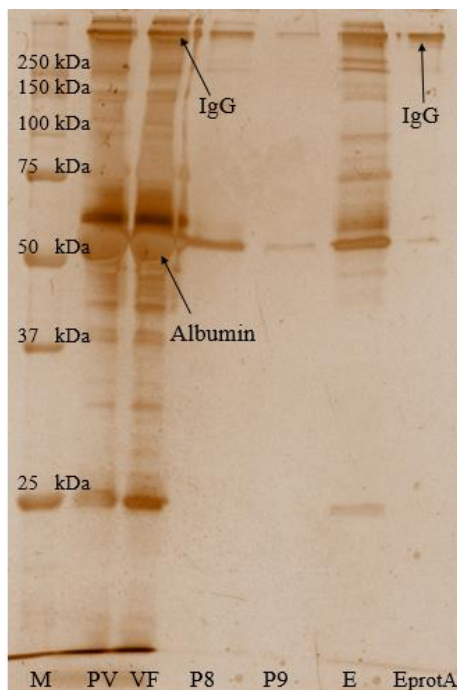
1. izolace IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s navázaným Con A
2. smíchání elučných frakcí získaných při izolaci pomocí nosiče s Con A
3. inkubace smíchaných elucí s magnetickým nosičem s imobilizovaným Proteinem A
4. uvolnění IgG z vazby s Proteinem A pomocí 0,05% TFA (s následnou úpravou pH na hodnotu 6)



Obr. 71. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí Proteinem A (čip o objemu komůrky 100 μ l)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P8 a P9: promytí 8 a 9; E1, E2, E3: eluce 1, 2 a 3; EprotA: eluce po přečištění Proteinem A)

Jak bylo již výše zmíněno, stejný postup izolace IgG ze séra byl vyzkoušen i v čipu o objemu komůrky 120 μ l. Jak je ale patrné na následujícím elektroforeogramu zobrazeném na

obrázku č. 72, v přečištěné eluci je stále nepatrné množství albuminu. To může být způsobeno tím, že čip o objemu komůrky 120 μ l, na rozdíl od malého čipu, není povrchově upravený, a proto se na něj albumin ze séra více sorbuje.



Obr. 72. Elektroforeogram frakcí mobilních fází při izolaci IgG ze séra na nosiči s Con A (přečištění elucí Proteinem A (čip o objemu komůrky 120 μ l)), SDS-PAGE, 12% gel, barvení dusičnanem stříbrným. (PV: původní vzorek; VF: vazebná frakce; P8 a P9: promytí 8 a 9; E: eluce; EprotA: eluce po přečištění Proteinem A)

Na základě výše popsaných optimalizací byla nakonec provedena úspěšná izolace IgG ze séra v mikrofluidním uspořádání a byly získány eluce pouze s obsahem IgG.

Optimalizacemi v postupu izolace IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s imobilizovaným Con A v mikrofluidním uspořádání jsme nakonec dospěli k následujícím závěrům, a to že:

- MFCS-Fluigent jako přístroj pro promývání magnetických částic umístěných v čipu je nevhodný, a to z toho důvodu, že vzhledem k nedostatečně silnému magnetu použitém v magnetickém míchadle, dochází k razantnímu vymývání magnetických částic z mikrofluidního čipu do odpadu
- vhodným přístrojem pro promývání magnetických částic umístěných mikrofluidním čipu je „Syringe“ pumpa
- současné zapojení MFCS-Fluigent a „Syringe“ pumpy není možné, alespoň ne při používání námi vybraného čipu a magnetického míchadla

- magnetické částice Sera-Mag Speed Beads mohou být nahrazeny magnetickými částicemi ProMag (rozhodnuto na základě provedeného porovnání chování magnetických částic v mikrofluidním čipu)
- optimální počet promývacích kroků je 9 (tzn. 9 ml), přičemž první 3 ml obsahují 1M NaCl v 0,01M MES pH 6 a dalších 6 promývacích kroků po 1 ml promývacího pufru (0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween 20, pH 6)
- před provedením vlastní izolace IgG ze séra je vhodné nejprve promýt komůrku čipu 2 x 1 ml 20% isopropanolem, 2 x 1 ml deionizovanou vodou a 1 x 1 ml promývacím pufrům, pro odstranění proteinů zbylých po předešlých izolacích
- samotný postup izolace IgG ze séra v mikrofluidním uspořádání je shodný s postupem izolace IgG ze séra ve vsádkovém uspořádání – použitý stejný vazebný, promývací a eluční pufr; stejné inkubační a eluční časy
- vhodné řazení separačních kroků je následující – nejprve izolace IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s navázaným Con A a poté použití magnetického nosiče s imobilizovaným Proteinem A pro získání elucí pouze s obsahem molekul IgG

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro izolaci IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s imobilizovaným Con A ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání.

Vzhledem k tomu, že při této metodě byl povrch magnetických částic využit pro vazbu ligandu (Con A), byla jako první provedena optimalizace přípravy magnetického nosiče. Na základě provedených experimentů jsme dospěli k závěru, že k nejúčinnější vazbě Con A na povrch nosiče dochází v MES pufru s ionty (NaCl, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂) při pH 6 s koncentrací Con A 30 µg/1 mg magnetických částic. Dále bylo zjištěno, že pro dostatečné promytí částic stačí čtyři promývací kroky po vazbě Con A.

Dalším krokem byla optimalizace podmínek samotné izolace IgG ze séra pomocí připraveného nosiče s imobilizovaným Con A. Nejprve byl optimalizován postup izolace IgG ze séra ve vsádkovém uspořádání a teprve poté byl tento optimalizovaný postup zaveden do mikrofluidního uspořádání.

Provedením optimalizace postupu izolace IgG ze séra ve vsádkovém uspořádání jsme dospěli k následujícím závěrům. Vhodným vazebným pufrům je MES pufr s ionty při pH 6, který je používán i pro imobilizaci Con A na povrch magnetických částic. Optimální koncentrace modelového lyofilizovaného lidského sérového IgG je 30 µg. Inkubační doba pro izolaci sérového IgG a IgG ze séra byla stanovena na 30 minut. Eluce byla prováděna 3x po 20ti minutách, pomocí elučního pufru (0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,2M methyl α-D-glukopyranosid, 0,2M methyl α-D-manopyranosid, pH 6). Dále jsme dospěli k závěru, že optimální počet promývacích kroků je 9 (tzn. 9 ml), přičemž byly zařazeny tři kroky s 1M NaCl v 0,01M MES pH 6 (třetí, páté a sedmé promytí, vždy po jednom mililitru) z důvodů lepšího promytí magnetických částic. Také bylo zjištěno, že kromě používaného elučního pufru lze použít pro eluci i 0,2M glycinový pufr pH 3 a 0,05% TFA. Na základě snímků magnetických částic Sera-Mag Speed Beads pořízených z elektronového mikroskopu bylo navrženo vyzkoušení dalších magnetických částic, a to magnetických částic ProMag. Vzhledem k tomu, že magnetické částice ProMag mají na svém povrchu, stejně jako magnetické částice Sera-Mag Speed Beads, karboxylové funkční skupiny, byla imobilizace Con A prováděna pomocí stejného postupu. Porovnáním těchto dvou druhů magnetických částic bylo dospěno k závěru, že magnetické částice ProMag mohou nahradit magnetické částice Sera-Mag Speed Beads v plném rozsahu.

Výše popsaný postup izolace IgG ze séra pomocí nosiče s imobilizovaným Con A byl aplikován do mikrofluidního uspořádání, ve kterém byl také optimalizován. Bylo vyhodnoceno, že „Syringe“ pumpa je vhodným přístrojem pro aplikaci promývacího roztoku dovnitř komůrky čipu a umožňuje dostatečné promývání magnetických částic v čipu umístěných. Současné zapojení „Syringe“ pumpy a MFCS-Fluigent není možné, alespoň ne při používání námi vybraného čipu a magnetického míchadla. Optimální počet promývacích kroků je 9, přičemž první 3 ml obsahují zvýšenou koncentraci NaCl (1M) v 0,01M MES pufru o pH 6 a zbylých 6 promývacích kroků obsahuje promývací pufr (0,1M MES, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween 20, pH 6). Dále bylo zjištěno, že před samotným provedením lektinové afinitní izolace IgG ze séra je vhodné nejprve promýt komůrku čipu 2 x 1 ml 20% isopropanolem, 2 x 1 ml deionizovanou vodou a 1 x 1 ml promývacím pufrem, pro odstranění proteinů zbylých po předešlých izolacích a ke snížení nespecifické sorpce sérových proteinů na stěny komůrky, kanálků a hadiček. Nakonec byly získány eluce obsahující pouze molekuly IgG pomocí jejich přečištění Proteinem A, který specificky vyvazuje molekuly IgG ze vzorku. Pořadí separačních kroků bylo následující – nejprve byla provedena izolace IgG ze séra pomocí magnetického nosiče s navázaným Con A a poté byl použit nosič s imobilizovaným Proteinem A.

Závěrem lze říci, že se podařilo optimalizovat metodu lektinové afinitní izolace IgG ze séra a že byly získány eluce pouze s obsahem molekul IgG. Podařilo se odstranit problémy a úskalí spojené s manipulací částic, nastavit optimální inkubační časy a nastavit vhodné promývací kroky.

Předmětem dalších experimentů by mohlo být provedení lektinové afinitní izolace IgG ze séra pacientek s ovariálním karcinomem. U těchto pacientek bývá přítomna patologická glykozylace IgG, a proto by této metody mohlo být využito k diagnostice ovariálního karcinomu. Dalším experimentem by mohlo být využití elektromagnetu a novějšího dávkovacího systému, který by zlepšil reprodukovatelnost separačních podmínek.

LITERATURA

- [1] LITTLEWOOD, A. B. *Gas Chromatography: Principles, Techniques, and Applications*. 2. přepracované vydání. Elsevier, 2013. ISBN 9781483260983.
- [2] LUNDANES, E., L. REUBSAET a T. GREIBROKK. *Chromatography: Basic principles, sample preparations and related methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2014. ISBN 35-273-3620-6.
- [3] TURKOVÁ, J. *Bioaffinity chromatography*. 2. vydání. Amsterdam: Elsevier, 1993. ISBN 978-008-0858-630.
- [4] MAGDELDIN, S. a A. MOSER. *Affinity chromatography*. 1. vydání. Rijeka: InTech, 2012. ISBN 978-953-5103-257.
- [5] FANALI, S. *Liquid Chromatography Applications*. 1. vydání. San Diego, CA, USA: Elsevier Science, 2013. ISBN 01-241-5866-8.
- [6] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [7] TETALA, K. K. R. a T. A. VAN BEEK. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *Journal of Separation Science*. 2010, **33**(3), s. 422-438.
DOI: 10.1002/jssc.200900635. ISSN 16159306.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900635>.
- [8] CHEN, C., W. SU, B. HUANG *et al.* Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. *The Analyst*. 2014, **139**(4), 688-704.
DOI: 10.1039/C3AN01813J. ISSN 0003-2654.
Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3AN01813J>
- [9] http://images.slideplayer.com/7/1669271/slides/slide_30.jpg [online].
[cit. 2016-10-16].
- [10] *Handbooks from GE Healthcare Life Sciences: Protein Sample Preparation* [online].
Švédsko: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2014 [cit. 2017-01-18].
Dostupné z:
http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/Protein_sample_preparation_handbook.pdf

- [11] EERTMANS, F., V. BOGAERT a B. PUYPE. Development and validation of a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of human serum albumin (HSA) in medical devices. *Analytical Methods*. 2011, **3**(6), 1296-. DOI: 10.1039/c1ay05148b. ISSN 1759-9660.
Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1ay05148b>
- [12] http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/chromatografie.html. [online]. [cit. 2016-02-01].
- [13] MAO, X., Y. LUO, Z. DAI *et al.* Integrated Lectin Affinity Microfluidic Chip for Glycoform Separation. *Analytical Chemistry*. 2004, **76**(23), s. 6941-6947.
- [14] PHURIMSAK, Ch., M. TARN a N. PAMME. Magnetic Particle Plug-Based Assays for Biomarker Analysis. *Micromachines*. 2016, **7**(5), 77. DOI: 10.3390/mi7050077. ISSN 2072-666x. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2072-666X/7/5/77>
- [15] TABNAOUI, S., I. PEREIRO a M. FERMIGIER *et al.* Magnetic fluidized bed in microfluidics: Hydrodynamic characterization and validation to immunocapture. *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Německo, 2013.
- [16] ANIULYTE, J., J. LIESIENE a B. NIEMEYER. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2006, **831**(1-2), 24-30. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.11.016. ISSN 15700232.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023205008421>
- [17] MARTIN, D. F. a B. B. MARTIN. *Column chromatography*. Rijeka, Croatia: Intech, 2013. ISBN 978-953-5110-743.
- [18] Handbook of affinity chromatography. 2. vydání. New York: Taylor, 2006. ISBN 08-247-5198-1.
- [19] FIELDS, D. Affinity Chromatography – How Does it Work? *News Medical: Life Sciences* [online]. 2016 [cit. 2017-01-18].
Dostupné z: <http://www.news-medical.net/life-sciences/Affinity-Chromatography-e28093-How-Does-it-Work.aspx>

- [20] Thermo Fisher Scientific Inc. [online]. USA, 2015 [cit. 2017-01-18].
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html>
- [21] CHEN, Ch. a W. LEE. Affinity chromatography of proteins on non-porous copolymerized particles of styrene, methyl methacrylate and glycidyl methacrylate. *Journal of Chromatography A*. 2001, **921**, 31-37.
- [22] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M., J. GONZÁLEZ-VALDEZ a K. MAYOLO-DELOISA. Monolithic chromatography: insights and practical perspectives. *Journal of Chemical Technology*. 2017, **92**(1), 9-13. DOI: 10.1002/jctb.5040. ISSN 02682575.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5040>
- [23] HAGE, D. S. a J. CAZES. *Handbook of affinity chromatography*. 2. vydání. New York: CRC Press, 2005. ISBN 0824751981.
- [24] *Aldebaran Group for Astrophysics* [online]. Praha, 2002 [cit. 2017-03-01].
Dostupné z: <http://www.aldebaran.cz/glossary/print.php?id=1382>
- [25] DEMAS, V. a T. J. LOWERY. Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New Journal of Physics*. 2011, **13**(2), 025005. DOI: 10.1088/1367-2630/13/2/025005. ISSN 1367-2630.
Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1367-2630/13/i=2/a=025005?key=crossref.b9d64469456131168e98e053d2015917>
- [26] *TutorVista.com* [online]. 2017 [cit. 2017-03-01].
Dostupné z: <http://physics.tutorvista.com/electricity-and-magnetism/paramagnetism.html>
- [27] ZHAO, H., L. LI a J. WANG. Spherical core-shell magnetic particles constructed by main-chain palladium N-heterocyclic carbenes. *Nanoscale*. 2015, **7**(8), 3532-3538. DOI: 10.1039/C4NR07330D. ISSN 2040-3364.
Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4NR07330D>
- [28] *Sigma-Aldrich* [online]. Freemont, 2014 [cit. 2016-12-27].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sera-mag-and-sera-mag-speedbeads-magnetic-particles.html#materials>

- [29] *NanoMyP* [online]. Španělsko [cit. 2017-03-02].
Dostupné z: <http://nanomyp.com/en/page.cfm?id=43&>
- [30] *Life Science* [online]. [cit. 2017-03-02].
Dostupné z: <http://lifescience.canvaxbiotech.com/wp-content/uploads/sites/2/2016/11/Magnetic-Particles.pdf>
- [31] *Bangs Laboratories, Inc.* [online]. Indiana [cit. 2017-02-08].
Dostupné z: <http://www.bangslabs.com/products/magnetic-microspheres-particles/promag-particle-line>
- [32] *Sigma-Aldrich* [online]. Freemont, 2014 [cit. 2016-03-03].
Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=magnetic+particles&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=CZ&focus=product>
- [33] *Bangs Laboratories, Inc.* [online]. Indiana [cit. 2017-03-03].
Dostupné z: <http://www.bangslabs.com/products/magnetic-microspheres-particles>
- [34] Thermo Fisher Scientific Inc. [online]. USA, 2015 [cit. 2016-03-03].
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/product-brand/dynal.html>
- [35] *Micromod Partikeltechnologie GmbH* [online]. Německo, 2017 [cit. 2017-03-03].
Dostupné z: <https://www.micromod.de/en/produkte-2-magnetic.html>
- [36] PRÁŠEK, J. *Uhlíkové nanočástice: grafen, nanotrubičky, fullereny*.
Brno: NanoTeam, 2011.
Dostupné také z:
<http://www.umel.feec.vutbr.cz/nanoteam/data/soubory/CTN,%20grafen,%20fullerenCNTs+grafen+fullereny.pdf>
- [37] *Sigma-Aldrich* [online]. Freemont, 2017 [cit. 2017-03-10].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>
- [38] LIBERMAN, A., N. MENDEZ a W. C. TROGLER *et al.* Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface Science Reports*. 2014, **69**(2-3), 132-158. DOI: 10.1016/j.surfrep.2014.07.001. ISSN 01675729.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167572914000107>

- [39] O'BRIEN, P. *Nanoscience. Kapitola: Metal oxide nanoparticles (CORR, S., A.)*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-184-9734-356.
- [40] HONG, T., X. CHEN a Y. XU *et al.* Preparation of graphene oxide-modified affinity capillary monoliths based on three types of amino donor for chiral separation and proteolysis. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1456**, 249-256. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.06.025. ISSN 00219673.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967316307841>
- [41] YAN, Y., Z. ZHENG a Ch. DENG *et al.* Hydrophilic polydopamine-coated graphene for metal ion immobilization as a novel immobilized metal ion affinity chromatography platform for phosphoproteome analysis. *Analytical chemistry*. 2013, **85**, 8483-8487.
- [42] QU, Q., Ch. GU a X. HU. Capillary Coated with Graphene and Graphene Oxide Sheets as Stationary Phase for Capillary Electrochromatography and Capillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2012, **84**(20), 8880-8890. DOI: 10.1021/ac3023636. ISSN 0003-2700.
Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac3023636>
- [43] *NanoComposix* [online]. [cit. 2017-03-10].
Dostupné z: <http://nanocomposix.eu/collections/gold-spheres>
- [44] KOBAYASHI, Y., M. HORIE a M. KONNO *et al.* Preparation and Properties of Silica-Coated Cobalt Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, **107**(30), 7420-7425. DOI: 10.1021/jp027759c. ISSN 1520-6106.
Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp027759c>
- [45] LIU, S. a M. HAN. Silica-Coated Metal Nanoparticles. *Chemistry - An Asian Journal*. 2009, **5**(1), 36-45. DOI: 10.1002/asia.200900228. ISSN 18614728.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/asia.200900228>
- [46] HAENSCH, C., S. HOEPPENER a U. S. SCHUBERT. Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(6), 2323-2334. DOI: 10.1039/b920491a. ISSN 0306-0012.
Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b920491a>

- [47] *Sigma-Aldrich* [online]. Freemont, 2017 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=silica+nanoparticles&interface=All&N=0&mode=partialmax&cm_re=Did%20You%20Mean-_-silica%20nanoparticles-_-silica%20nanoparticels&lang=en®ion=CZ&focus=product&cm_re=Did%20You%20Mean-_-silica%20nanoparticles-_-silica%20nanoparticels
- [48] FERNÁNDEZ-GARCIA, M. a J. A. RODRIGUEZ. Metal Oxide Nanoparticles. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley, 2006. DOI: 10.1002/0470862106.ia377. ISBN 0470860782. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470862106.ia377>
- [49] CHANG, S. Y., N. ZHENG a Ch. CHEN. Analysis of peptides and proteins affinity-bound to iron oxide nanoparticles by MALDI MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2007, **18**(5), 910-918. DOI: 10.1016/j.jasms.2007.01.011. ISSN 1044-0305. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1016/j.jasms.2007.01.011>
- [50] KIM, H. a HAGE, D. *Handbook of affinity chromatography: Immobilization methods for affinity chromatography*, Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 35-78.
- [51] KULLOLLI, M., W. S. HANCOCK a M. HINCAPIE. Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. *Journal of Separation Science*. 2008, **31**(14), 2733-2739. DOI: 10.1002/jssc.200800233. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200800233>
- [52] KASAI, K. a ISHII, S. Affinity Chromatography of Trypsin and Related Enzymes. *The Journal of Biochemistry*. 1978, **84**(5), s. 1051-1060.
- [53] ŠKODOVÁ, A. Afinitní chromatografie dehydrogenas. vyd. 1. 1983.
- [54] BRANDT, C. M. a B. SPELLERBERG. Human Infections Due to *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis*. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(5), 766-772. DOI: 10.1086/605085. ISSN 1058-4838. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/605085>
- [55] SHADE, K. a R. ANTHONY. Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies*. 2013, **2**(3), 392-414. DOI: 10.3390/antib2030392. ISSN 2073-4468. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4468/2/3/392/>

- [56] *EBioscience: Home / Immunoglobulin Structure* [online]. 2016 [cit. 2016-10-25].
Dostupné z: <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm>
- [57] *Bioclone* [online]. San Diego: Bioclone Inc, 2016 [cit. 2016-11-16].
Dostupné z: <http://www.bioclone.us/Protein-A-magnetic-beads-particle-resin-matrix.html>
- [58] *The Columbia Encyclopedia* [online]. Columbia: The Columbia University Press, 2016 [cit. 2016-12-27].
Dostupné z: <http://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biochemistry/biochemistry/trypsin>
- [59] *CEVA: Enzymy* [online]. [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: [http://www.ceva-edu.cz/pluginfile.php/7650/mod_resource/content/2/Enzymy_CEVA_v13%20\(3\).pdf](http://www.ceva-edu.cz/pluginfile.php/7650/mod_resource/content/2/Enzymy_CEVA_v13%20(3).pdf)
- [60] MOSBACH, K., H. GUILFORD a R. OHLSSON *et al.* General ligands in affinity chromatography. Cofactor-substrate elution of enzymes bound to the immobilized nucleotides adenosine 5'-monophosphate and nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem Journal*. 1972, **127**(4), 625-631.
- [61] *Aalto Scientific, Ltd.* [online]. [cit. 2016-12-27].
Dostupné z: <https://www.aaltoscientific.com/product/lactate-dehydrogenase/>
- [62] FÁBRYOVÁ, V. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. Grada Publishing, 2012. ISBN 9788024782478.
- [63] MULCAHY, P., O'FLAHERTY, M. a MCMAHON, M. *et al.* Effect of Accessible Immobilized NAD1 Concentration on the Bioaffinity Chromatographic Behavior of NAD1- Dependent Dehydrogenases Using the Kinetic Locking-on Strategy. *Protein Expression and Purification*. 1995, **16**, 261-275.
- [64] HUANG, Y., ZHANG, R. a LI, J. *et al.* A novel gigaporous GSH affinity medium for high-speed affinity chromatography of GST-tagged proteins. *Protein Expression and Purification*. 2014, **95**, 84-91. DOI: 10.1016/j.pep.2013.11.004. ISSN 10465928.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592813002416>

- [65] MCALLISTER, L. A., M. S. HIXON a R. SCHWARTZ *et al.* Synthesis and Application of a Novel Ligand for Affinity Chromatography Based Removal of Endotoxin from Antibodies. *Bioconjugate Chemistry*. 2007, **18**(2), 559-566. DOI: 10.1021/bc0602984. ISSN 1043-1802.
Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc0602984>
- [66] JIANG, L. a R. K. MARCUS. Biotin-functionalized poly(ethylene terephthalate) capillary-channeled polymer fibers as HPLC stationary phase for affinity chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(3), 939-951. DOI: 10.1007/s00216-014-8235-4. ISSN 1618-2642.
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-014-8235-4>
- [67] SAVANE, T. S., S. KUMAR a V. N. JANAKIRAMAN *et al.* Molecular insight in the purification of immunoglobulin by pseudobiospecific ligand l-histidine and histidyl moieties in histidine ligand affinity chromatography (HLAC) by molecular docking. *Journal of Chromatography B*. 2016, **1021**, 129-136. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.09.010. ISSN 15700232.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023215301859>
- [68] http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/emilia/Adh_mol.HTM#sel [online].[cit. 2016-05-20].
- [69] BARTŮŇKOVÁ, J., A. ŠEDIVÁ a A. JANDA. Imunodeficiency. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2007, 254 s., [4] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-1980-1.
- [70] NI, Y. a I. TIZARD. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996, **55**(1-3), s. 205-223. DOI: 10.1016/S0165-2427(96)05718-2. ISSN 01652427.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0>.
- [71] SHARON, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004, **14**(11), 53R-62R. DOI: 10.1093/glycob/cwh122. ISSN 1460-2423.
Dostupné také z: <http://www.glycob.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/glycob/cwh122>
- [72] VARKE, A. Essentials of glycobiology. 2. vydání. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, xvii, 653 s. 3. kapitola. ISBN 08-796-9560-9.

- [73] SANTOS, A. F. S., M. C. D. DA SILVA, T. H. NAPOLEÃO *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research*. 2014, (15), s. 41-62.
- [74] http://www.cci-j-online.org/viewimage.asp?img=ClinCancerInvestigJ_2014_3_6_472_142616_f3.jpg [online].[cit. 2016-12-28].
- [75] http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS95/course/10_interactions/sel_cart.gif [online]. [cit. 2016-12-28].
- [76] <http://www.imperial.ac.uk/research/animalllectins/ctld/lectins.html> [online]. [cit. 2016-10-16].
- [77] VARKI, A. *Essentials of glycobiology*. 2. vydání. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, xvii, 653 s. 22. kapitola. ISBN 08-796-9560-9.
- [78] FERENČÍK, M. *Imunitní systém*. 1. vydání. Praha: Grada, 2005. ISBN 978-802-4711-966.
- [79] *Sino Biological Inc.* [online]. Čína: Sino Biological Inc., 2015 [cit. 2016-10-25]. Dostupné z: <http://www.sinobiological.com/MBL-2-a-3698.html>
- [80] AMBROSI, M., N. R. CAMERON a B. G. DAVIS. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic*. 2005, **3**(9), 1593-1608. DOI: 10.1039/b414350g. ISSN 1477-0520. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b414350g>
- [81] HAGE, D. S., J. A. ANGUIZOLA, C. BI *et al.* Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, 69, s. 93-105.
- [82] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/9WGA> [online].[cit. 2017-03-19].
- [83] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1KUJ> [online].[cit. 2017-03-19].
- [84] LOTAN, R., H. W. SIEGELMAN a H. LIS *et al.* Subunit Structure of Soybean Agglutinin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1974, **249**(4), 1219-1224.
- [85] AGARWAL, V. K. a J. B. SINCLAIR. *Principles of seed pathology*. 2. vydání. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997. ISBN 08-737-1670-1.

- [86] RAO, V. S.R., K. LAM a P. K. QASBA. Three Dimensional Structure of the Soybean Agglutinin-Gal/GalNAc Complexes by Homology Modeling. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1998, **15**(5), 853-860.
DOI: 10.1080/07391102.1998.10508207. ISSN 0739-1102.
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.1998.10508207>
- [87] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1SBF> [online].[cit. 2017-03-19].
- [88] WALSH, G. *Proteins: biochemistry and biotechnology*. New York: J. Wiley, 2002. ISBN 04-718-9907-0.
- [89] *Aniara* [online]. [cit. 2017-01-29]. Dostupné z: <http://www.aniara.com/pdf/Pisum-sativum-eng.pdf>
- [90] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1HKD> [online].[cit. 2017-03-19].
- [91] MONZO, A., G. K. BONN a A. GUTTMAN. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007, **26**(5), 423-432. DOI: 10.1016/j.trac.2007.01.018. ISSN 01659936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993607000350>
- [92] MASÁROVÁ, J., E. S. DEY a J. CARLSSON *et al.* Novel peptide surface for reversible immobilization of concanavalin A. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2004, **60**(2), 163-170. DOI: 10.1016/j.jbbm.2004.05.005. ISSN 0165022x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X04001216>
- [93] NILSSON, K. a K. MOSBACH. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1981, **102**(1), 449-457. DOI: 10.1016/0006-291X(81)91541-2. ISSN 0006291x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X81915412>
- [94] ROSENFELD, H., J. ANIULYTE a H. HELMHOLZ *et al.* Comparison of modified supports on the base of glycoprotein interaction studies and of adsorption investigations. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1092**(1), 76-88. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.027. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305014536>

- [95] WILCHEK, M. a T. MIRON. Limitations of N-hydroxysuccinimide esters in affinity chromatography and protein immobilization. *Biochemistry*. 1987, **26**(8), 2155-2161. DOI: 10.1021/bi00382a014. ISSN 0006-2960. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00382a014>
- [96] ITO, Y., N. SENO a I. MATSUMOTO. Immobilization of Protein Ligands on New Formyl-Spacer-Carriers for the Preparation of Stable and High Capacity Affinity Adsorbents. *Journal of biochemistry*. 1985, **97**(6), 1689-1694.
- [97] ERNST-CABRERA, K. a M. WILCHEK. Silica containing primary hydroxyl groups for high-performance affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*. 1986, **159**(2), 267-272. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90342-8. ISSN 00032697. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269786903428>
- [98] BEDAIR, M. a Z. EL RASSI. Affinity chromatography with monolithic capillary columns. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1079**(1-2), 236-245. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.02.084. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305004218>
- [99] O'CONNOR, B. F., D. MONAGHAN a J. CAWLEY. *Lectin Affinity Chromatography (LAC)*. Springer New York, 2017, 411. DOI: 10.1007/978-1-4939-6412-3_23.
- [100] *Protocol for Concanavalin A lectin affinity chromatography* [online]. [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: http://www.khupo.org/down_data/com/1_2.pdf
- [101] SCOUTEN, W. H. *Affinity chromatography: bioselective adsorption on inert matrices*. New York: Wiley, 1981. ISBN 04-710-2649-2.
- [102] *Lentil Lectin Sepharose 4B: Regeneration*. 71-7079-00 Edition AC. Švédsko: Amersham Biosciences, 2002.
- [103] http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/lektiny.html [online]. [cit. 2016-05-20].
- [104] CHOWDHURY, T. *Concanavalin A*. 55. vydání. Boston, MA: Springer US, 2012. ISBN 978-146-8409-499.
- [105] *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. Atlanta: NCEH/ATSDR, 2013 [cit. 2016-12-26]. Dostupné z: <https://emergency.cdc.gov/agent/ricin/facts.asp>
- [106] LANDSTEINER, K. *The specificity of serological reactions*. Přepřacované vydání. New York: Constable, 1962. ISBN 978-048-6662-039.

- [107] MORGAN, W. T. a W. M. WATKINS. Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. *Glycoconjugate Journal*. 2000, **17**(7-9), 501-530.
- [108] EDELMAN, G. M., B. A. CUNNINGHAM a G. N. REEKE. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1972, **69**(9), 2580–2584.
- [109] ANDERSON, D., E. BRANUM a J. OBRIEN. Liver- and bone-derived isoenzymes of alkaline phosphatase in serum as determined by high-performance affinity chromatography. *Clinical chemistry*. 1990, **36**(2), 240-246. ISSN 0009-9147.
- [110] GONCHOROFF, D. G., E. L. BRANUM a S. L. CEDEL *et al.* Clinical evaluation of high-performance affinity chromatography for the separation of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinica Chimica Acta*. 1991, **199**(1), 43-50. DOI: 10.1016/0009-8981(91)90007-Y. ISSN 00098981.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000989819190007Y>
- [111] OPITZ, L., J. SALAKLANG a H. BÜTTNER *et al.* Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses. *Vaccine*. 2007, **25**(5), 939-947. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.08.043. ISSN 0264410x.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06009947>
- [112] AMBROSE, S., N. GORDON a J. GOLDSMITH *et al.* Use of Aleuria alantia Lectin Affinity Chromatography to Enrich Candidate Biomarkers from the Urine of Patients with Bladder Cancer. *Proteomes*. 2015, **3**(3), 266-282.
DOI: 10.3390/proteomes3030266. ISSN 2227-7382.
Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2227-7382/3/3/266/>
- [113] S SILVA, M. L., C. GOMES a M. B. QUINAZ GARCIA. Flow Lectin Affinity Chromatography—A Model with Sambucus nigra Agglutinin. *Journal of Glycobiology*. 2017, **06**(01), 1-8. DOI: 10.4172/2168-958X.1000121. ISSN 2168958x.
Dostupné také z: <https://www.omicsgroup.org/journals/flow-lectin-affinity-chromatography-a-model-with-sambucus-nigraagglutinin-2168-958X-1000121.php?aid=80866>

- [114] *GE Healthcare Life Science* [online]. General Electric, 2017 [cit. 2017-02-07].
Dostupné z:
http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/products/AlternativeProductStructure_17335/
- [115] *EY Laboratories, Inc.* [online]. Kalifornie, 2017 [cit. 2017-02-07].
Dostupné z: <http://eylabs.com/lectin-affinity-chromatography-kits/?distributor=true#.WJo6mDvhDIU>
- [116] *Sigma-Aldrich* [online]. Freemont, 2014 [cit. 2017-02-07].
Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/814455?lang=en&ion=CZ>
- [117] *Sigma-Aldrich* [online]. Freemont, 2017 [cit. 2017-02-08].
Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge45152105050250?lang=en&ion=CZ>
- [118] LIENER, I. *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Oxford: Elsevier Science, 2012. ISBN 978-032-3144-445.
- [119] VAN DAMME, E. J. M. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. Ilustrované vydání, dotisk. New York: Wiley, 1998. ISBN 04-719-6445-X.
- [120] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1VAM> [online]. [cit. 2016-09-16].
- [121] DE HOFF, P. L., L. M. BRILL a A. M. HIRSCH. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics and Genomics*. 2009, **282**(1), 1-15. DOI: 10.1007/s00438-009-0460-8. ISSN 1617-4615.
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-009-0460-8>
- [122] SHARON, N. *Lectins. ELS*. Chichester: John Wiley, 2001. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000708.pub2. ISBN 0470016175.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000708.pub2>
- [123] BERG, J. M., J. L. TYMOCZKO a L. STRYER. *Biochemistry*. 5. vydání. New York: W.H. Freeman, 2002. ISBN 07-167-3051-0.
- [124] BOGOEVA, V. P. New Activity of a Protein from *Canavalia ensiformis*. *Scientia Pharmaceutica*. 2014, **82**(4), 825-834. DOI: 10.3797/scipharm.1404-09. ISSN 00368709. Dostupné také z: www.mdpi.com/2218-0532/82/4/825

- [125] TAVELLA, M., P. ALAUPOVIC a C. KNIGHTGIBSON *et al.* Separation of ApoA- and ApoB-containing lipoproteins of human plasma by affinity chromatography on concanavalin A. *Progress in Lipid Research*. 1991, **30**(2-3), 181-187. DOI: 10.1016/0163-7827(91)90014-V. ISSN 01637827.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016378279190014V>
- [126] INOUE, T., M. YAMAUCHI a G. TODA *et al.* Microheterogeneity with Concanavalin A Affinity of Serum Transferrin in Patients with Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1996, **20**(9), 363A-365A. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb01809.x. ISSN 0145-6008.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1530-0277.1996.tb01809.x>
- [127] PAPANDREOU, M. J. Concanavalin A affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *Journal of Clinical Endocrinology*. 1993, **76**(4), 1008-1013. DOI: 10.1210/jc.76.4.1008. ISSN 0021-972x.
Dostupné také z: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jcem.76.4.8473374>
- [128] YOSHIDA, K., M. HONDA a K. ARAI *et al.* Serial lectin affinity chromatography with concanavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostatic acid phosphatase in human prostate carcinoma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997, **695**(2), 439-443. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00186-2. ISSN 03784347.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434797001862>
- [129] Thermo Fisher Scientific Inc. [online]. USA, 2015 [cit. 2017-01-17].
Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>
- [130] MACGREGOR, A., Barley: Chemistry and Technology, St. Paul Minn.: American Association of Cereal Chemists, 1993.
- [131] MAN, P. a K. BEZOUSKA. Recent Trends in Eukaryotic Proteomics: Glycomics and Lipidomics. *Chemické listy*. 2006, (100), s. 1084-1095.

- [132] Thermo Fisher Scientific Inc. [online]. USA, 2015 [cit. 2016-09-24].
Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-glycosylation.html>.
- [133] ZAHRADNÍKOVÁ, M., L. HERNYCHOVÁ, B. VOJTĚŠEK *et al.* Nové trendy ve studiu glykosylace proteinů u onkologických pacientů. *Klinická onkologie*. 2014, 27, s. 121-128.
- [134] http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/glykoproteiny.html [online]. [cit. 2016-08-15].
- [135] RINI, J, J. ESKO a A. VARKI. *Essentials of glycobiology*. 2. vydání. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, xvii, 653 s. 5. kapitola. ISBN 08-796-9560-9.
- [136] http://images.slideplayer.cz/2/5623148/slides/slide_62.jpg [online]. [cit. 2016-12-28].
- [137] NETTLESHIP, J. E. *Structural Biology of Glycoproteins: Glycosylation*. 1. vydání. InTech, 2012, 3. kapitola. ISBN 978-953-51-0771-2.
- [138] http://images.slideplayer.cz/2/5623148/slides/slide_63.jpg [online]. [cit. 2016-12-28].
- [139] JEFFREY, D. E. *Essentials of glycobiology*. 2. vydání. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, xvii, 653 s. 20. kapitola. ISBN 08-796-9560-9.
- [140] *World of Chemicals* [online]. India, 2016 [cit. 2016-12-29].
Dostupné z: <http://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/bacillosamine.html>
- [141] STOWELL, S. R., T. JU a R. D. CUMMINGS. Protein Glycosylation in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015, 10(1), 473-510. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040438. ISSN 1553-4006.
Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012414-040438>
- [142] LOMBARDI, A., C. ANDREOZZI, V. PAVONE *et al.* Evaluation of the oligosaccharide composition of commercial follicle stimulating hormone preparations. *ELECTROPHORESIS*. 2013, 34(16), 2394-2406. DOI: 10.1002/elps.201300045. ISSN 01730835.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201300045>

- [143] CIBULA, D. a L. PETRUŽELKA. *Onkogynekologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.
- [144] URBAN, N. Specific Keynote: Ovarian Cancer Risk Assessment and the Potential for Early Detection. *Gynecologic Oncology*. 2003, **88**, 75-79.
- [145] *Cancer Research UK* [online]. Oxford [cit. 2017-02-10].
Dostupné z: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/ovarian-cancer/>
- [146] BROOKS, S. A., M. V. DWEK a U. SCHUMACHER. *Functional and molecular glycobiology*. New York: Distributed exclusively in the United States of America, its dependent territories. by Springer-Verlag, 2002. ISBN 18-599-6022-7.
- [147] ŠALDOVÁ, R., P. M. RUDD a J. KÁŠ. Změna glykosylace na sérových glykoproteinech u pacientek s rakovinou vaječníku pravděpodobně přispívá k patogenezi nemoci. *Chemické listy*. 2009, **103**, 386-393.
- [148] HULEIHEL, M., E. MAYMON a B. PIURA *et al.* Distinct patterns of expression of interleukin-1 alpha and beta by normal and cancerous human ovarian tissues. *European Cytokine Network*. 1997, **8**(2), 179-187.
- [149] TURNER, G. A., M. T. GOODARZI a S. THOMPSON. Glycosylation of alpha-1-proteinase inhibitor and haptoglobin in ovarian cancer: evidence for two different mechanisms. *Glycoconjugate Journal*. 1995, **12**(3), 211-218.
- [150] KANIKOWSKA, D., R. MADRY a J. DROZDZ-GORSKA *et al.* Microheterogeneity of two acute phase proteins in patients with ovarian carcinoma. *Ginekologia Polska*. 2001, **72**(1), 17-21.
- [151] TAYLOR, D. D., C. GERCEL-TAYLOR a L. P. PARKER. Patient-derived tumor-reactive antibodies as diagnostic markers for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2009, **115**(1), 112-120. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.06.031. ISSN 00908258.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825809004995>
- [152] SALDOVA, R., L. ROYLE a C. M. RADCLIFFE *et al.* Ovarian Cancer is Associated with Changes in Glycosylation in Both Acute-Phase Proteins and IgG. *Glycobiology*. 2007, **17**(12), 1344-1356. DOI: 10.1093/glycob/cwm100. ISSN 0959-6658.
Dostupné také z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwm100>

- [153] ROBINSON-SMITH, T. M., I. ISAACSOHN a C. A. MERCER *et al.* Macrophages Mediate Inflammation-Enhanced Metastasis of Ovarian Tumors in Mice. *Cancer Research*. 2007, **67**(12), 5708-5716. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4375. ISSN 0008-5472.
Dostupné také z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-4375>
- [154] GORNIK, O., L. ROYLE, D. J HARVEY a G. LAUC *et al.* Changes of Serum Glycans During Sepsis and Acute Pancreatitis. *Glycobiology*. 2007, **17**(12), 1321-1332. DOI: 10.1093/glycob/cwm106. ISSN 0959-6658.
Dostupné také z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwm106>
- [155] *IMALAB s. r. o.* [online]. Zlín: Imalab, 2009 [cit. 2017-04-04].
Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/184-ca-125.aspx>
- [156] *MeDiLa s. r. o.* [online]. Pardubice [cit. 2017-04-04].
Dostupné z: <http://www.medila.cz/website/others/ca-125/>
- [157] ELZEK, M. A. a K. D. RODLAND. Proteomics of ovarian cancer: functional insights and clinical applications. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2015, **34**(1), 83-96. DOI: 10.1007/s10555-014-9547-8. ISSN 0167-7659.
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-014-9547-8>
- [158] VASEY, P. A., G. C. JAYSON a A. GORDON *et al.* Phase III Randomized Trial of Docetaxel-Carboplatin Versus Paclitaxel-Carboplatin as First-line Chemotherapy for Ovarian Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004, **96**(22), 1682-1691. DOI: 10.1093/jnci/djh323. ISSN 0027-8874.
Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djh323>
- [159] AGARWAL, R. a S. B. KAYE. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003, **3**(7), 502-516. DOI: 10.1038/nrc1123. ISSN 1474-175x.
Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1123>

- [160] YAN, X., L. PAN a Y. YUAN *et al.* Identification of Platinum-Resistance Associated Proteins through Proteomic Analysis of Human Ovarian Cancer Cells and Their Platinum-Resistant Sublines. *Journal of Proteome Research*. 2007, **6**(2), 772-780. DOI: 10.1021/pr060402r. ISSN 1535-3893.
Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr060402r>
- [161] DAI, Z., J. YIN a H. HE *et al.* Mitochondrial comparative proteomics of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines. *PROTEOMICS*. 2010, **10**(21), 3789-3799. DOI: 10.1002/pmic.200900685. ISSN 16159853.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900685>
- [162] LI, S., F. YE a W. CAI *et al.* Quantitative proteome analysis of multidrug resistance in human ovarian cancer cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010, **109**(4), 625-633. DOI: 10.1002/jcb.22413. ISSN 07302312.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.22413>
- [163] TN-027.02. *Particle Reagent Optimization - Recommended Adsorption and Covalent Coupling Procedures*. Holansko: Thermo Fisher Scientific, 2010.
- [164] *Fluigent* [online]. Jena, Německo, 2017 [cit. 2017-03-29].
Dostupné z: <http://www.fluigent.com/microfluidic-flow-control-system/>
- [165] <http://sms.crpp-bordeaux.cnrs.fr/Equipment/Fluigent-1.png> [online]. [cit. 2017-03-29].
- [166] *KD Scientific* [online]. Holliston, USA, 2017 [cit. 2017-03-29].
Dostupné z: <http://www.kdscientific.com/products/infusion-syringe-pumps.html>
- [167] *Microfluidic ChipShop* [online]. Jena, Německo, 2017 [cit. 2017-03-29].
Dostupné z: http://www.microfluidic-chipshop.com/index.php?pre_cat_open=2