

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza bílkovin pomocí moderních analytických metod
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Romana Kohoutková**
Osobní číslo: **C18090**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Analýza bílkovin pomocí moderních analytických metod**
Téma práce anglicky: **Protein analysis using recent analytical methods**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V první části bakalářské práce stručně charakterizujte bílkoviny, zaměřte se zejména na jejich význam v potravinách.
2. Vypracujte přehled metod (spolu s jejich stručnými principy), které se v dnešní době využívají pro analýzu bílkovin. Věnujte se především moderním metodám, např. hmotnostní spektrometrii.
3. Samostatnou kapitolu věnujte proteomice.
4. Závěrem přehledně shrňte dosažené poznatky a pokuste se formulovat perspektivu tohoto vědního oboru.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Blanka Švecová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza bílkovin pomocí moderních analytických metod 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 06. 06. 2022

Romana Kohoutková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Blance Švecové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady, ochotu, zpětnou vazbu, poskytnutí podkladů vztahujících se k tomuto tématu a také za čas věnovaný mé bakalářské práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu při vypracovávání bakalářské práce a po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením bílkovin pomocí moderních analytických metod. V práci jsou charakterizovány vlastnosti, složení, význam, vznik a výskyt bílkovin. Dále jsou v práci popsány analytické metody využívající se ke stanovení bílkovin spolu s jejich stručnými principy. Pro každou analytickou metodu jsou také popsány aplikace na reálné vzorky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bílkoviny, ELISA, elektromigrační metody, chromatografické metody, hmotnostní spektrometrie, proteomika

TITLE

Protein analysis using recent analytical methods

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the determination of proteins using modern analytical methods. The properties, composition, significance, origin and occurrence of proteins are characterized in this work. Furthermore, the methods used to determine analytical proteins together with their brief principles are described here, too. For each analytical method, applications of real samples are also described.

KEYWORDS

Proteins, ELISA, electromigration methods, chromatographic methods, mass spectrometry, proteomics

Obsah

1	Charakteristika bílkovin	10
2	Imunochemické metody	18
2.1	Enzymová metoda ELISA.....	18
2.1.1	Příklady využití metody ELISA v praxi	19
3	Separační metody	21
3.1	Elektromigrační metody.....	21
3.1.1	Využití elektromigračních metod pro analýzu bílkovin	22
3.2	Chromatografické metody.....	24
3.2.1	Využití chromatografických metod k analýze bílkovin.....	25
4	Ostatní metody využívající se k analýze bílkovin.....	27
4.1	Hmotnostní spektrometrie	27
4.2	Čipy sloužící ke stanovení proteinů	28
4.2.1	Stanovení bílkovin pomocí elektroforézy na čipu	29
5	Proteomika.....	30
5.1	Analytické postupy užívané v proteomice	31
6	Závěr.....	33

Seznam obrázků

Obrázek 1: Kondenzace aminokyselin	10
Obrázek 2: Obecný vzorec aminokyseliny	10
Obrázek 3: Struktura bílkovin.....	12
Obrázek 4: Zastoupení bílkovin v potravinách.....	13
Obrázek 5: Struktura albuminu nesoucí šest molekul kyseliny palmitové.....	14
Obrázek 6: Struktura globulinu.....	14
Obrázek 7: Struktura hemoglobinu.....	14
Obrázek 8: Struktura aktinu.....	15
Obrázek 9: Struktura myosinu	15
Obrázek 10: Struktura lysozymu	16
Obrázek 11: Struktura gliadinu a gluteninu.....	16
Obrázek 12: Struktura ovalbuminu.....	16
Obrázek 13: Struktura konalbuminu.....	17
Obrázek 14: Sendvičová metoda	19
Obrázek 15: Schéma postupu analýzy bílkovin pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.....	25
Obrázek 16: Schéma hmotnostní spektrometrie	27

Úvod

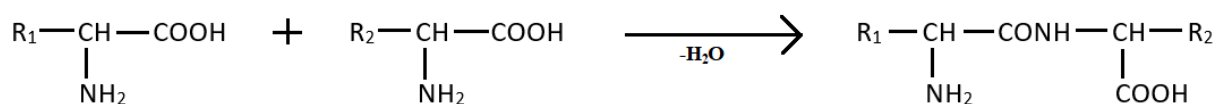
Bílkoviny neboli proteiny jsou důležitou součástí svalů, orgánů, kůže i hormonů v lidském těle. Bílkoviny se vyskytují v živočišné i rostlinné stravě jako například v mase, masných výrobcích, mléce, mléčných výrobcích, vejcích, luštěninách, obilovinách, ořechích, ale také v ovoci a zelenině. Proteiny jsou důležité pro správné fungování všech organismů, plní funkci stavební, obrannou, zásobní, transportní i pohybovou. Mezi nejznámější bílkoviny patří: albumin, globulin, aktin, myosin, lysozym, hemoglobin, myoglobin, glutenin, glyadin, ovalbumin a další.

Cílem této práce je sepsání rešerše, která se zabývá charakteristikou a stanovením bílkovin pomocí moderních analytických metod jako například imunochemické a separační metody, ale také pomocí vědního oboru, který se nazývá proteomika.

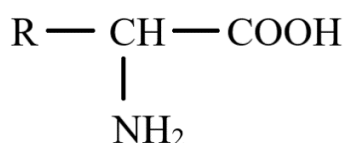
Metody stanovení bílkovin ve vzorku jsou většinou založené na stanovení obsahu dusíkatých látek. Stanovení bílkovin v potravinách je důležité z důvodu odhalení alergenů, posouzení nutričních hodnot i určování původu potravin. Dříve se ke stanovení bílkovin využívaly metody jako například Kjeldahlova nebo Dumasova, které byly velmi pracné a časově i finančně náročné. Dnes se tyto metody využívají spíše jako referenční a jsou nahrazeny modernějšími a citlivějšími metodami, které jsou popsány v této práci.

1 Charakteristika bílkovin

Bílkoviny neboli proteiny jsou vysokomolekulární látky, které tvoří značnou část tkání rostlin i živočichů. Rostliny si je vytváří z dusíkatých látek, zatímco živočichové je přijímají potravou. Jsou to velké makromolekuly (5-100 nm) s vysokou molární hmotností. Vznikají kondenzací 100 a více aminokyselin viz obrázek 1. Spojením méně než 100 aminokyselin vznikají peptidy (2-10 oligopeptidy a 10-100 polypeptidy). Kondenzace je spojení karboxylové skupiny a aminové skupiny dvou aminokyselin za odštěpení vody (vznik peptidové vazby a následně peptidového řetězce). Takto kombinací různých počtů a různých aminokyselin může vznikat velké množství peptidů a bílkovin, které se skládají hlavně z uhlíku, kyslíku, dusíku, vodíku a většinou i síry. [1]



Obrázek 1: Kondenzace aminokyselin



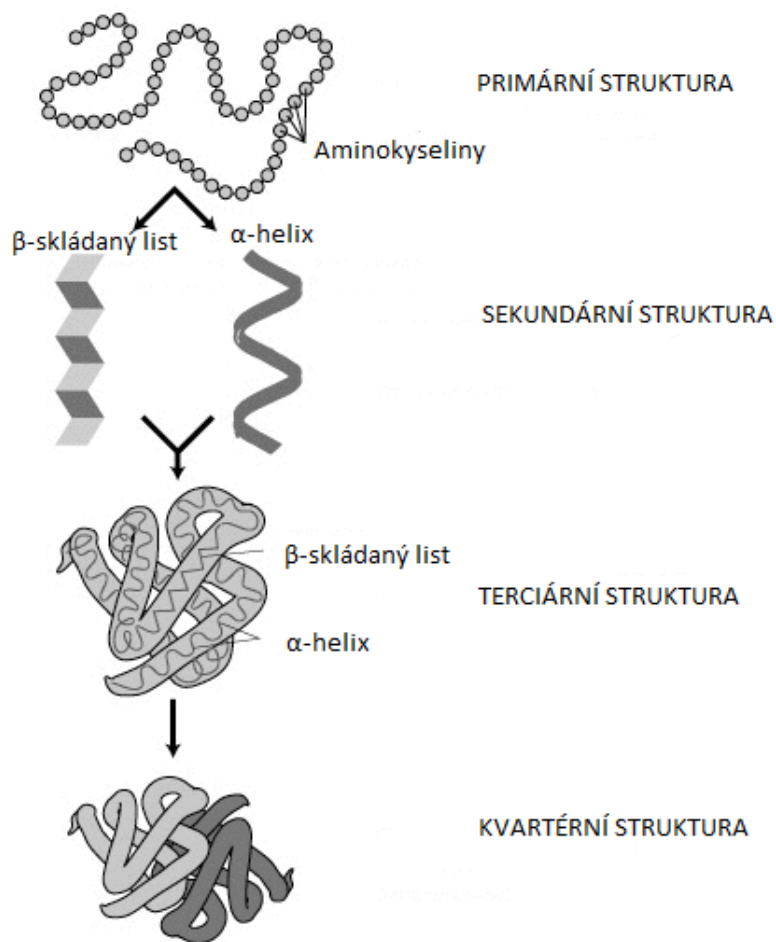
Obrázek 2: Obecný vzorec aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami bílkovin. Známe jich mnoho, ale jen 21 z nich se podílí na tvorbě bílkovin, říká se jim kódované aminokyseliny. Každá kódovaná aminokyselina obsahuje karboxylovou skupinu a aminovou skupinu viz obrázek 2. Jsou to amfoterní sloučeniny, což znamená, že se mohou chovat jako kyseliny i jako zásady v závislosti na okolním prostředí. Může také vzniknout amfion (obojetný ion, který se chová neutrálně), když pH okolního prostředí je stejné jako pH izoelektrického bodu pro sledovanou aminokyselinu. Z obrázku 2 pro obecný vzorec aminokyseliny je zřejmé, že aminokyseliny (kromě glycinu) obsahují chirální atom uhlíku. To je takový uhlík, který na sobě má navázány 4 různé substituenty. Některé aminokyseliny si organismus dokáže syntetizovat (neesenciální) jiné musí přijímat v potravě (esenciální). Většina esenciálních aminokyselin se vyskytuje v živočišné stravě. Obsahují hlavně heterocyklické zbytky a aromatické nebo rozvětvené řetězce. [1] Podmíněně esenciální aminokyseliny si zdravé tělo nasyntetizovat dokáže, jedinec s nějakou poruchou metabolismu musí tyto aminokyseliny přijímat potravou. Konkrétní příklady neesenciálních, esenciálních a podmíněně esenciálních aminokyselin jsou uvedeny v tabulce 1. [2]

Tabulka 1: Rozdělení aminokyselin [2]

Neesenciální	Esenciální	Podmíněně esenciální
Alanin	Arginin	Histidin
Asparagin	Cystein	Isoleucin
Kyselina asparagová	Glutamin	Leucin
Kyselina glutamová	Glycin	Lysin
Serin	Prolin	Methionin
	Tyrosin	Fenylalanin
		Threonin
		Tryptofan
		Valin

Bílkoviny se dělí podle uspořádání (struktury) do čtyř skupin viz obrázek 3. Primární struktura je dána pořadím aminokyselin v řetězci. Udává vlastnosti, funkci a prostorové uspořádání molekuly bílkoviny. Je odrazem genetického kódu a každá změna v pořadí aminokyselin může u daného jedince vyvolat nějakou chorobu. Sekundární struktura udává prostorové uspořádání polypeptidického řetězce. Uspořádání mohou být dvě, a to skládaný list (β -hřeben) nebo pravotočivá dvoušroubovice (α -helix). Tyto struktury vznikají díky vodíkovým vazbám, které působí mezi C=O a N-H skupinou a v jedné molekule bílkoviny jich může být několik. Terciární struktura je konečné uspořádání pravotočivé dvoušroubovice nebo skládaného listu. Neuplatňují se zde jen vodíkové vazby, ale i iontové, disulfidické a Van der Waalovy síly. [1] Rozlišujeme dvě terciární struktury: globulární (klubko), která se podílí na transportních procesech v buňce a jsou obvykle rozpustné ve vodě, protože hydrofobní aminokyseliny se shromažďují spíše uvnitř klubka a fibrilární (vlákno), která obsahuje kolagen a vyskytuje se v kůži, nehtech, šlachách, chrupavkách a kostech. [3] Kvartérní struktura určuje prostorové uspořádání podjednotek tvořících bílkovinu. Tuto strukturu vykazují jen složitější bílkoviny. [1]



Obrázek 3: Struktura bílkovin [4]

Bílkoviny se mohou dělit podle chemického složení nebo rozpustnosti. Podle chemického složení se dělí na jednoduché a složené. Jednoduché se skládají pouze z aminokyselin. Složené obsahují aminokyseliny i nebílkovinnou složku a dále se dělí na: lipoproteiny (AMK + lipidová složka), fosfoproteiny (AMK + zbytek kyseliny fosforečné), glykoproteiny (AMK + sacharidová složka), nukleoproteiny (AMK + část nukleové kyseliny) a metaloproteiny (AMK + kationty kovů). Podle rozpustnosti se bílkoviny dělí na albuminy, ty jsou rozpustné ve vodě a globuliny, rozpustné ve slabých kyselinách, zásadách nebo solích. [1]

Bílkoviny jsou důležitými složkami pro správnou funkčnost všech organismů. [1] Plní funkci biochemickou, strukturální i kinetickou. Biochemické funkce umožňují enzymové proteiny sloužící jako katalyzátory biochemických reakcí. Specifické aminokyseliny mají místo, na které se váže enzym a tzv: „aktivní místo“, kde se váže substrát. Může také dojít k žádoucí či nežádoucí mutaci aktivního místa aminokyselin. Substrát se na takto změněné aktivního místo nemusí navázat a tím způsobí i nefunkčnost enzymu. Strukturální funkci plní

proteiny aktin a tubulin, jsou to strukturní prvky buněk a tkání. Tvoří aktinová vlákna a mikrotubuly. Kinetickou funkci plní proteiny způsobující pohyb molekul uvnitř buňky, tekutin v lidském organismu (krve a potravy) a nakonec i pohyb celého těla. Tuto funkci plní myosin, dokáže se připojit i oddělit od aktinových vláken. [2] Bílkoviny slouží i jako záložní zdroj energie, když organismu dojdou lipidy a sacharidy. Podílí se také na syntéze alkaloidů, lipidové dvojvrstvy i nukleotidů. [1]

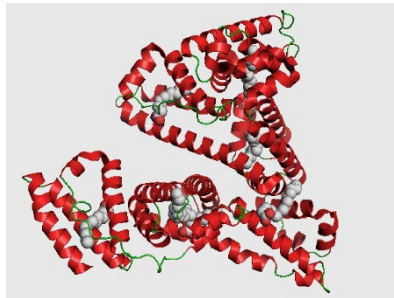
Bílkoviny jsou důležitou součástí živočišné stravy. [2] Vyskytují se v potravinách rostlinného i živočišného původu jako například: vejce, mléčné výrobky, maso, luštěniny, ořechy, semena, mořské plody, a další viz obrázek 4.



Obrázek 4: Zastoupení bílkovin v potravinách [5]

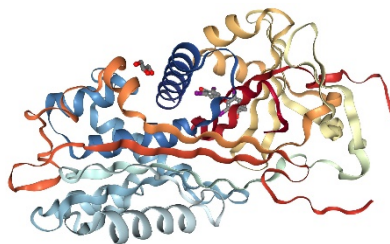
Přijaté bílkoviny se v organismu rozloží a plní své funkce: stavební, obrannou, zásobní, transportní či pohybovou. [1] Mezi nejznámější bílkoviny patří: albumin, globulin, aktin, myosin, lysozym, hemoglobin, myoglobin, glutenin, glyadin, prolamin, konalbumin, ovalbumin.

Albumin je sérová bílkovina nejvíce zastoupená v plazmě. Podílí se na udržování onkotického tlaku v plazmě, který reguluje průchod vody. Slouží jako hlavní nosič mastných kyselin, zneškodňuje toxické láky a ovlivňuje farmakokinetiku léčiv v lidském těle. Albumin se rozkládá na aminokyseliny, které jsou dále využívány. [6; 7] Jeho struktura je znázorněna na obrázku 5. [8]



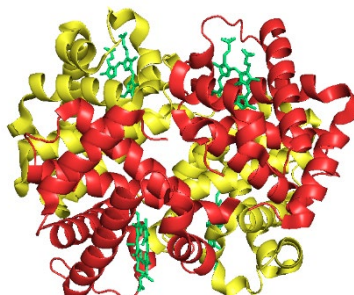
Obrázek 5: Struktura albuminu nesoucí šest molekul kyseliny palmitové [8]

Globuliny jsou nejvíce zastoupené proteiny v sójových bobech, jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné ve zředěných roztocích solí. Nejvíce se vyskytují v olejninách a luštěninách. [9] Globuliny lze rozdělit na 4 frakce a to α_1 , α_2 , β a γ , z nichž γ -globuliny jsou imunoglobuliny. [7] Struktura globulinu je znázorněna na obrázku 6. [10]



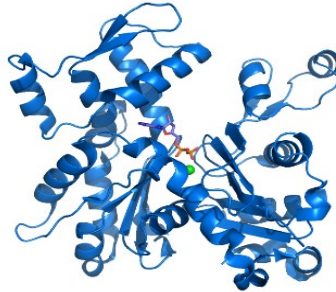
Obrázek 6: Struktura globulinu [10]

Hemoglobin se skládá ze dvou podjednotek (řetězců) α (α_1 a α_2) a dvou podjednotek β (β_1 a β_2), které jsou si strukturálně i velikostně podobné. Každý řetězec má na sobě navázanou hemovou skupinu, která slouží jako vazebné místo pro kyslík, oxid uhelnatý nebo oxid dusnatý. Hlavní funkce hemoglobinu je transport kyslíku z plic do tkání. [11; 12] Příbuzný protein hemoglobinu je myoglobin, který slouží jako zásobní protein kyslíku ve svalech. [13] Struktura hemoglobinu je znázorněna na obrázku 7. [14]



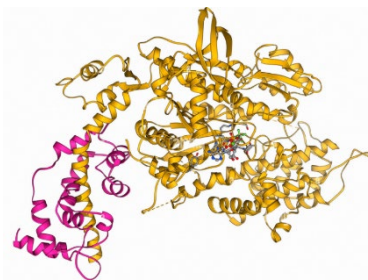
Obrázek 7: Struktura hemoglobinu [14]

Aktin je nejvíce vyskytující se protein v eukaryotických buňkách, udržuje jejich tvar a polaritu. Má schopnost přecházet na monomerní (G-aktin) a vláknitý (F-aktin) stav. Interakce vláknitého aktinu s myosinem způsobuje zkrácení svalů. [15] Struktura aktinu je znázorněna na obrázku 8. [16]



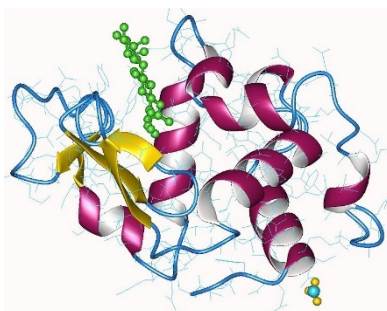
Obrázek 8: Struktura aktinu [16]

Myosin je protein, který hydrolyzuje ATP, interaguje s aktinem a společně s ním tvoří strukturu svalu. Myosiny jsou složeny ze tří částí: motorická (interaguje s aktinem a váže ATP), krční a ocasní (slouží k ukotvení motorické části, aby mohla interagovat s aktinem). Dělí se do 15 tříd, z nichž nejznámější je třída č. 2 zahrnující myosiny, které se nacházejí ve svalech a v cytoplazmě živočišných buněk. [17] Struktura myosinu je znázorněna na obrázku 9. [18]



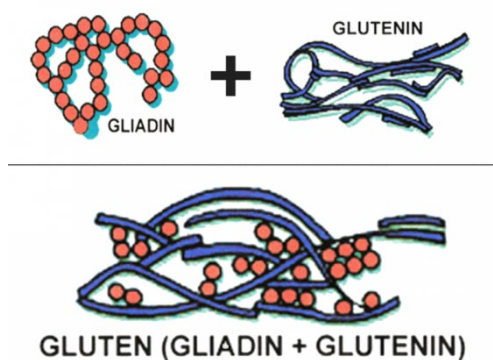
Obrázek 9: Struktura myosinu [18]

Lysozym se nachází ve vaječném bílku, lidských slinách, slzách, nosních sekretech, mateřském mléce nebo v rýži. Lidský a rýžový lysozym si jsou velmi podobné na rozdíl od vaječného, který se liší ve složení aminokyselin, izoelektrických bodech a specifické aktivitě. Ve světě je nejvíce využíván lysozym z bílků slepičích vajec díky jeho cenové dostupnosti. Vaječný lysozym se využívá ve farmaceutickém průmyslu, ke kontrole růstu bakterií v potravinách, jako antibakteriální činidlo v krmivech, konzervační prostředek v sýrařském průmyslu místo dusičnanů a také jako náhražka síranů při výrobě vína. Lidský lysozym se přidává do kojenecké stravy ke snížení infekcí gastrointestinálního traktu, působí proti orálním infekcím a slouží jako činidlo pro lýzu buněk. [19] Struktura lysozymu je znázorněna na obrázku 10. [20]



Obrázek 10: Struktura lysozymu [20]

Lepek (gluten) je bílkovina obsažená v pšeničných zrnech. Hraje hlavní roli při určování reologických vlastností těsta. Skládá se ze dvou bílkovin (gliadinu a gluteninu), které jsou nerozpustné ve vodě, ale extrahovatelné do ethanolu. [21] Glutenin a gliadin jsou obsaženy v pšeničné mouce, po přidání vody a následném hnětení se tyto bílkoviny spojí, vznikne lepek, díky kterému je hmota pružná. [22] Struktura gliadinu, gluteninu a lepku je znázorněna na obrázku 11. [22]



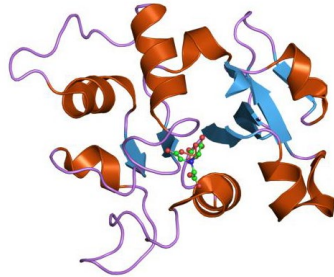
Obrázek 11: Struktura gliadinu a gluteninu [22]

Ovalbumin je protein nacházející se ve vaječném bílku, kde tvoří 55 % ze všech bílkovin. Způsobuje pěnivost, emulgovatelnost a gelovatění vaječného bílku. Ovalbumin má také výjimečné tepelné a povrchové vlastnosti. [23] Struktura ovalbuminu je znázorněna na obrázku 12. [24]



Obrázek 12: Struktura ovalbuminu [24]

Konalbumin je protein s antibakteriálními a antivirovými vlastnostmi (protein akutní fáze). Při výskytu bakterií nebo virů v těle zvířat a lidí se jeho koncentrace zvyšuje. Konalbumin obsahuje D-manózu a D-galaktózu a podílí se na přenosu Fe^{3+} ve vejcích. [25; 26] Struktura konalbuminu je znázorněna na obrázku 13. [27]



Obrázek 13: Struktura konalbuminu [27]

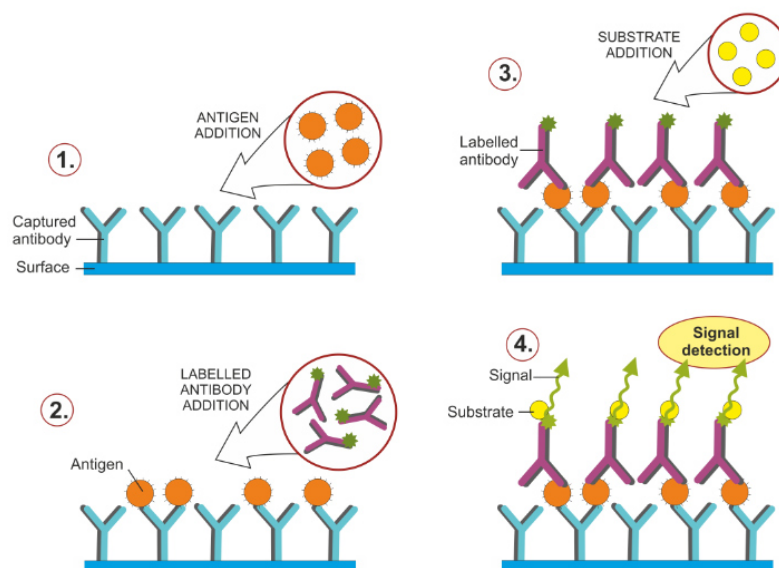
2 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. [28] Jedná se o nejpoužívanější metody ke stanovení alergenních proteinů v potravinách. K detekci se využívají protilátky, které alergenní protein zbarví a ten následně jde vyhodnotit. [29]

2.1 Enzymová metoda ELISA

ELISA je zkratka z anglického Enzyme Linked Immunosorbent Assays. V překladu se jedná o enzymové imunosorbentní testy. Rozeznáváme 4 základní typy těchto testů: přímé, nepřímé, sendvičové a kompetitivní. V přímé metodě je vzorek nebo antigen imobilizován přímo na destičce a konjugovaná detekční protilátka se váže přímo na cílový protein. Pro detekci signálu se přidá substrát, úměrný množství analytu ve vzorku. Tato metoda je rychlá ale málo citlivá, protože se zde používá pouze jedna protilátka. Nepřímá metoda je podobná přímé, pouze navíc zahrnuje krok zesílení detekce. K imobilizovanému antigenu na destičce se přidá nekonjugovaná primární detekční protilátka, která se váže na specifický antigen. Na tuto protilátku se naváže konjugovaná sekundární protilátka. Takto vytvořený substrát produkuje signál úměrný koncentraci antigenu ve vzorku. Sendvičová metoda je nejpoužívanější a velice citlivá viz obrázek 14. K detekci antigenu se používají dvě specifické párové protilátky. Každá z nich je specifická pro jinou část molekuly antigenu. První protilátka (záchytná) se nanese do jamek, po přidání vzorku se zachytí na molekule antigenu. Přidá se druhá protilátka (detekční), která se zachytí na jiné části molekuly antigenu než první protilátka. Po přidání substrátu se produkuje signál, který je úměrný koncentraci analytu. Kompetitivní metoda se používá pro malé molekuly bílkovin, které nejdou stanovit sendvičovou metodou. Do jamek se nanese záchytná protilátka a vzorek jako u sendvičové metody. Místo detekční protilátky se použije konjugovaný antigen, který se naváže na antigen ze vzorku se záchytnou protilátkou. Čím více antigenu ve vzorku je, tím méně se konjugovaný antigen bude vázat na antigen se záchytnou protilátkou. Po přidání substrátu se produkuje signál, který je nepřímo úměrný množství proteinu ve vzorku. [28; 30]

U metody ELISA se ke stanovení využívají 96 - jamkové mikrotitrační polystyrenové destičky potažené specifickou protilátkou pro sledovanou látku. Do destiček se nadávkuje vzorek nebo standard a po inkubaci se cílový analyt zachytí specifickou protilátkou. Následně se použije detekční protilátka (alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza) a substrát zvolený v závislosti na použitém přístroji pro detekci signálu (spektrofotometr, fluorimetr). [28; 30]



Obrázek 14: Sendvičová metoda [31]

2.1.1 Příklady využití metody ELISA v praxi

Metoda ELISA je velice často využívána ke stanovení bílkovin v celé řadě potravin (matric). Takto například lze stanovit kasein a ovalbumin ve víně. V tomto případě se víno před analýzou musí upravit dialýzou nebo vysrážením bílkovin pomocí ethanolu a suspenzí. Následuje klasické provedení metody ELISA v mikrotitračních destičkách s příslušnou protilátkou a kvantifikace sledovaných látek. Dále lze ve víně také stanovit arašídové proteiny (specifické protilátky byly získány z dárcovského séra pacienta alergického na arašíd). Alergenní látky se do vína dostanou buď jako čiridla nebo pomocné látky. Například třísloviny se z červeného vína odstraňují vaječným bílkem (ovalbuminem) a fenolické nebo taninové sloučeniny se z bílého vína odstraňují mléčnými bílkoviny (kaseinem). [32]

Nepřímou kompetitivní metodou ELISA lze například stanovit prolaminovou frakci bílkovin pšenice (gliadin), ječmene (hordein) a žita (secalin). Vymenované bílkoviny působí toxicky u osob s onemocněním celiakie (intolerance vůči lepku). Před stanovením se ze vzorku musí odstranit extrakcí lipidová složka a také albuminová a globulinová frakce. Přechištěný materiál je dále extrahován 60 % ethanolom, ve kterém je prolaminová frakce rozpustná. Takto upravený vzorek je imobilizován na povrch mikrotitrační destičky a následuje standartní postup pro nepřímou metodu ELISA. [33]

Sendvičovou metodou ELISA lze také stanovit svalová bílkovina ryb (parvalbumin), která je v rybách nejčastější alergen. Vzorek se před analýzou naváží do pufru obsahující hovězí sérový albumin. Směs se vytřepe, přefiltruje a nanese na mikrotitrační destičku potaženou

polyklonální protilátkou proti parvalbuminu. Po inkubaci se přidá polyklonální protilátka značená křenovou peroxidázou a následně se pomocí kyseliny sírové zastaví enzymatická reakce. Nakonec se změří absorbance při 450 nm a vypočítá koncentrace parvalbuminu. [34]

Z důvodu narůstajících počtů pacientů s alergiemi na bílkoviny vajec a mléka vědci v Japonsku vyvinuli dvě nové sendvičové soupravy ELISA využívající monoklonální protilátky k detekci těchto proteinů. Soupravy se nazývají Allergeneve ELISA Egg a Allergeneve ELISA Milk. Dokážou odhalit alergenní proteiny i v komerčně zpracovaných potravinách jako například: chléb, pudink, těstoviny, zmrzlina, atd. [35]

Jako další příklad alergenního proteinu je možné uvést 2S albumin z vlašských ořechů. Vzorek ořechů se musí před analýzou zbavit tuku, následně se z ořechové mouky vysráží proteiny, které se zfiltrují a resuspendují do pufru obsahující síran amonný. Následuje klasické provedení sendvičové metody ELISA s použitím specifické polyklonální protilátky proti 2S albuminu. [36]

Metodou ELISA lze také stanovit přítomnost tau proteinu v mozkomíšním moku, jehož zvýšená koncentrace je ukazatel výskytu Alzheimerovy choroby nebo se také vyskytuje při poranění mozku. Stanovení tau proteinu je založeno na principu sendvičové metody ELISA. Do mikrotitračních destiček s navázanou monoklonální protilátkou proti lidskému tau proteinu se nanese vzorek s konjugátem a nechá se inkubovat. [37]

3 Separční metody

Separční metody dokáží rozdělovat látky na základě jejich fyzikálních nebo chemických vlastností. Tyto metody se mohou aplikovat na široké spektrum analýz. Dělí se na dvě základní skupiny: elektromigrační metody a metody chromatografické. Elektromigrační metody se využívají častěji pro jejich rychlost, přesnost, nízké náklady, jednoduchou instrumentaci a spotřebě malého množství organických činidel. Chromatografické metody jsou vhodné spíše pro analýzu malých molekul. Jejich nevýhoda spočívá ve velké spotřebě organických rozpouštědel. [38; 39; 40]

3.1 Elektromigrační metody

Elektromigrační separační metody separují analyty působením elektrického pole. Nejčastěji se uskutečňuje separace látek v kapilárách, kde ionty migrují různými rychlostmi díky působení elektrického pole. Výhoda elektromigračních metod spočívá v jednoduché instrumentaci a nízké spotřebě vzorku a použitých činidel. Dnes jsou nejčastěji využívány elektromigrační separační techniky, jako například kapilární elektroforéza, zónová elektroforéza, kapilární izotachoforéza nebo izoelektrická fokusace. **Elektroforéza** je metoda založená na rozdílné rychlosti migrace nabitých částic v elektrickém poli. Kapilární elektroforéza je rychlá a přesná separace, při které stačí aplikace velmi malých objemů v řádech nl. Pro separaci se využívají kapiláry z křemenného skla o vnitřním průměru 20-100 μm a délce 20-100 cm. K detekci látek se využívají spektrofotometrické, fluorescenční, hmotnostní a vodivostní detektory. [38; 39]

Kapilární izotachoforéza k separaci využívá dva různé elektrolyty (vedoucí a koncový) s rozdílnou pohyblivostí, mezi které se vnáší vzorek. Touto metodou lze v jednom kroku oddělit buď pouze kationty nebo pouze anionty. Složky ze vzorku se dělí podle pohyblivosti po připojení stejnosměrného napětí a udržování konstantního proudu. K separaci se využívá křemenné kapiláry (o vnitřním průměru asi 100 μm a délce většinou 30 cm), k detekci lze využít např. vodivostní nebo spektrofotometrický detektor. [38; 40; 41; 42]

Kapilární izoelektrická fokusace se využívá pro separaci amfoterních sloučenin. Separace se provádí v kapiláře naplněné velkým množstvím vzorku spolu s pH gradientem, což je roztok mnoha amfolytů s různými izoelektrickými body. Poté je kapilára ponořena na jednom konci do kyselého roztoku a na druhém konci do zásaditého roztoku. Do systému je přivedeno napětí. To způsobí migraci amfoterních sloučenin do oblastí pH, které je rovno jejich

izoelektrickému bodu. Po zaostření jsou rozdělené zóny posunuty k detektoru, který je vyhodnotí. [38; 40; 41]

3.1.1 Využití elektromigračních metod pro analýzu bílkovin

Jako příklad stanovení bílkovin lze uvést např. stanovení lysozymu pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí. Lysozym je bílkovina, která se vyskytuje např. ve vaječných bílcích, rýži, mateřském mléce, lidských slinách a slzách. Lysozym také může být přidán do masa nebo vína, kde by primárně neměl být přítomen. Do kvalitního vína se lysozym přidává jako náhražka oxidu siřičitého a slouží ke správnému růstu a aktivitě bakterií při kvašení. Do masa se lysozym přidává z ekonomických důvodů (zlepšení struktury) a také omezuje růst bakterií. [43; 44; 45]

Dalším příkladem je stanovení proteinů ve vaječném bílku. Proteiny byly rozděleny pomocí elektroforézy v běžné kapiláře s oxidem křemičitým v boritanovém pufru o vysokém pH. Pro detekci byla využita laserem indukovaná fluorescence. Tímto způsobem se mohou separovat proteiny jako lysozym, konalbumin, ovalbumin a globulin. [46]

Zónová elektroforéza se využívá k detekci falšovaného mléka a mléčných výrobků jiným druhem mléka. Nejčastěji falšované mléko je kozí, ovčí nebo bývolí přidáním malého množství kravského. To se přidává za účelem vyšší tržní ceny, jelikož je levnější. Pro separaci kravského mléka z bývolího, ovčího i kozího mléka byla využita methyl silanizovaná kapilára a boritanový pufr. Tato metoda byla založena na stanovení rozdílných poměrů mezi syrovátkovými proteiny přítomnými ve frakci rozpustné v kyselině. [46]

Zónová elektroforéza byla využita i pro stanovení svalových bílkovin. Ty se dělí na základě jejich rozdílné rozpustnosti: sarkoplazmatické (rozpustné ve vodě), myofibrilární (rozpustné ve slané vodě) a stromální, které jsou nerozpustné. Nejjednodušší je stanovení proteinů z rybího svalu, jelikož obsahuje hlavně sarkoplazmatické proteiny a ty jsou rozpustné ve vodě. Vodný extrakt ze svaloviny byl separován pomocí nepotažené kapiláry naplněné fosfátovým pufrem. Tímto způsobem se dá stanovit i vliv skladování na kvalitu masa. [46]

Kapilární zónová elektroforéza s UV detekcí může být také využívána k odhalení geneticky modifikované kukuřice. Využívá se křemenné kapiláry naplněné pufrem o vysokém pH a albuminové frakce získané z kukuřice. Albuminová frakce z geneticky modifikované a nemodifikované kukuřice má odlišný proteinový profil. GMO (geneticky modifikované organismy) mají změněnou sekvenci DNA v genomu za účelem zlepšení vlastností plodiny

např. odolnost vůči hmyzu a tolerance k herbicidům. Používání GMO je regulováno z důvodu bezpečnosti potravin a krmiv. [47; 48]

Kapilární zónová elektroforéza s UV detekcí (při 200 nm) může být využita ke stanovení zásobních proteinů (gliadinu, gluteninu a prolaminu) v pšenici, ovsu, rýži, ječmenu, žitu, kukuřici a čiroku. Zmíněné zásobní proteiny obilovin tvoří významnou funkční i nutriční roli v potravinářských produktech a krmivech pro zvířata. Z rozemletých vzorků se stanovované proteiny extrahují do příslušných rozpouštědel a následně jsou separovány v kapiláře o průměru 25 nebo 50 μm a délce 20 cm. [49; 50]

Kapilární gelovou elektroforézou s UV detekcí při 214 nm lze v kuřecím maso stanovit hemoglobin, myoglobin, aktin a myosin. Vzorek masa se vyextrahuje do dodecylsulfátu sodného. Separace se provádí v kapiláře z taveného oxidu křemičitého o vnitřním průměru 75 μm a délce 40 cm. Lze takto od sebe odlišit mechanicky a ručně vykoštěné maso podle rozdílné plochy píku, která je nejvíce zřetelná u hemoglobinu. [51]

Kapilární gelovou elektroforézou lze stanovit proteiny také v olivách. Nejznámější proteiny oliv jsou oleosiny a zásobní proteiny vyskytující se hlavně v olivové pecce. Ze vzorku oliv jsou bílkoviny vysráženy a následně separovány v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a délce 23 cm. K separaci lze použít gelový separační pufr dodecylsulfát sodný a rozdělené bílkoviny lze detekovat spektrofotometricky při 210, 254 a 280 nm. Ze získaných proteinových profilů se mohou od sebe odlišit různé odrůdy oliv. [52]

Kapilární gelovou elektroforézu můžeme dále využít pro stanovení proteinů ve víně. Bílkoviny jsou důležitým ukazatelem kvality vína (aroma, zákal, pěnivost). Gelová elektroforéza je pro separaci bílkovin výhodná díky rychlosti, spotřebě malého množství vzorku a automatickém vyhodnocení separovaných proteinových píků. U vzorku vína se provede dialýza a lyofilizace. Pro separaci se využívá kapilára z křemenného skla o vnitřním průměru 100 μm a délce 40 cm, detekce probíhá při 214 nm. [53]

Metodou SDS-PAGE lze stanovit proteiny v membráně kuliček mléčného tuku (MFGM) u másla a podmásli. [54] Proteiny MFGM se vyvíjí z buněk mléčné žlázy a pochází z plazmatické membrány, mají antibakteriální účinky mohou zpomalit průběh rakoviny. Tato metoda je založená na chemické reakci mezi tryptofanovými zbytky proteinů a trichlorethanolem, které společně fluoreskují pod UV světlem. Trichlorethanol je začleněn do gelů v jamce. Vzorek se zředí redukčním puffrem a nanese se do jamek s gelem. Následně se vzorky elektroforeticky separují po dobu 30 minut a detekují pomocí fluorescence.

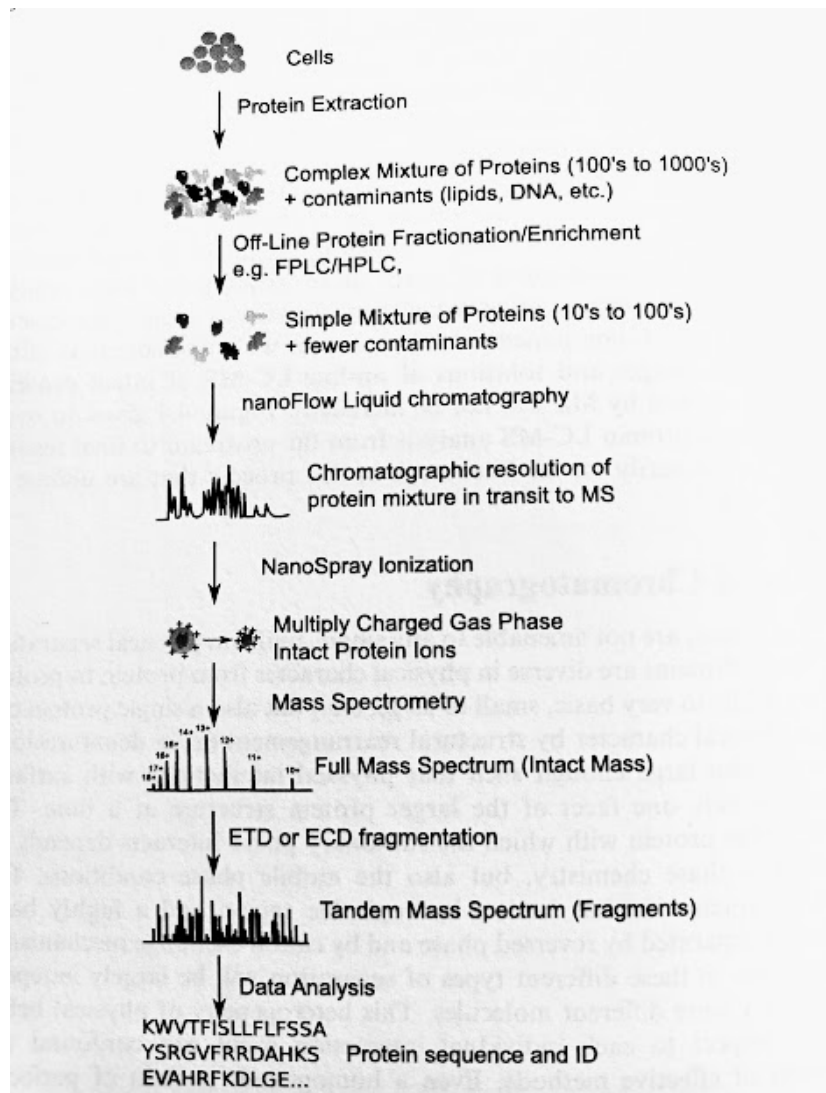
Dalším příkladem využití metody SDS-PAGE je identifikace původu škrobů pomocí proteinů spojených se škrobovými zrny. [55] Stanovení původu škrobů je vyžadováno při kontrole kvality škrobových výrobků a také při nahrazování škrobu jiným druhem. Například takto lze stanovit škrob ze škrobových nudlí, které mají být vyrobeny ze škrobu z mungo fazolí. Škrobové nudle se musí rozemlít a rozpustit v extrakčním pufru. Připravená suspenze se uvaří, odstředí a přefiltruje. Filtrát se nanese do jamky s gelem a obarví dusičnanem stříbrným. Následuje klasické provedení gelové elektroforézy.

3.2 Chromatografické metody

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nejvyužívanější chromatografická metoda pro separaci bílkovin. Principem je rozdělení látek mezi vhodnou stacionární a mobilní fází. Mobilní fází je zde kapalina, která společně se stacionární fází rozhoduje o separaci složek ze vzorku. Jsou zde využitelné různé mechanismy separace jako například adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, síťový efekt i iontová výměna. Pro pohyb mobilní fáze kolonou se využívá čerpadlo, vzorek se dávkuje do kolony pomocí dávkovače (dnes již většinou automatického) a vlastní chromatografický proces se uskutečňuje v koloně naplněné stacionární fází. Látky jsou po separaci detekovány na základě svých chemických nebo fyzikálních vlastností celou řadou principiálně odlišných detektorů. Mezi nejběžnější patří spektrofotometrický nebo hmotnostní detektor. [38; 56; 57]

Gelovou chromatografií se molekuly separují podle velikosti. Tato metoda je založena na rozdělování látek mezi pohyblivou mobilní fází v prostoru mezi zrny gelu a nepohyblivou částí mobilní fáze, která se nachází v pórech zrn gelu. Po nadávkování vzorku se jednotlivé složky dělí na základě zadržování v pórech gelu naplněných mobilní fází. Malé molekuly pronikají hlouběji než větší, proto jsou u menších molekul vyšší retenční objemy než u molekul větších. Gelová chromatografie se využívá pro analyty o velké relativní molekulové hmotnosti. Jako gel se využívá např. agaróza nebo polyakrylamid. [38; 58; 59]

Na obrázku 15 je schematicky znázorněn postup při analýze bílkovin pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.



Obrázek 15: Schéma postupu analýzy bílkovin pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií [58]

3.2.1 Využití chromatografických metod k analýze bílkovin

Pomocí dvourozměrné kapalinové chromatografie můžeme stanovit alergenní proteiny (globuliny) např. v sójové mouce. Ze vzorku mouky jsou proteiny nejprve extrahovány do 25 % vodného roztoku apolyethylenglykolu 200 a přefiltrovány. Separace vzorku probíhá pomocí 2D HPLC systému se spektrofotometrickým detektorem. Mobilní fáze je složena z fosfátového pufru obsahující chlorid sodný (pro separaci prvního rozměru), kyseliny trifluoroctové zředěné vodou (pro krok promývání) a kyseliny trifluoroctové zředěné acetonitrilem (pro separaci druhého rozměru). Detekce proteinu byla provedena při vlnové délce 214 nm. Podobně lze také stanovit alergenní proteiny ve vejcích (ovalbumin, vitellogenin, ovotransferin, apovitellenin a ovomukoid). Vzorek lyofilizovaného vejce je nejprve zbaven tuku extrakcí do hexanu, následně byl extrahován do vody, kyseliny a zásady. [60; 61]

Kombinací vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií můžeme stanovit alergenní proteiny v mléce a mléčných výrobcích jako je α -kasein, β -kasein, α -laktalbumin a β -laktoglobulin. Proteiny ze vzorku jsou nejprve extrahovány a následně resuspendovány v pufru (např. hydrogenuhličitan amonný obsahující močovinu). Aby došlo k proteolytickému štěpení proteinů na peptidy, přidává se k pufru roztok trypsinu. Peptidy ze vzorku jsou následně separovány pomocí HPLC s gradientem mobilní fáze složené z vodného acetonitrilu obsahující octan sodný. Touto metodou lze také zjistit nepovolený přídavek koňského a vepřového masa do masa hovězího. Vzorky byly před stanovením zmrazeny v tekutém dusíku a umlety. Zvážený vzorek byl extrahován do pufru a následně usušen. Suchý vzorek byl rozpuštěn v roztoku močoviny a podroben tryptickému štěpení jako u vzorků mléka v předchozím případě. Nakonec byla provedena chromatografická separace. [62; 63; 64]

Pomocí HPLC-UV můžeme stanovit syrovátkové proteiny v buvolím mléce jako jsou sérový albumin, α -laktalbumin a β -laktoglobulin. Sывátka je ze vzorku získána po odstředění a vhodně naředěná je chromatograficky separována. Tato metoda je pro stanovení syrovátkových proteinů velice přesná, ale ve srovnání s mikročipovou elektroforézou je pomalá. [65]

Pomocí HPLC-MS lze stanovit hlavní proteiny z mateří kašičky, díky kterým můžeme odhalit pravost medu. Med obsahuje 0,1 – 0,5 % těchto proteinů a vylučují je včelí dělnice hltnavými žlázami. Ke vzorku medu ve zkumavce je přidána voda, wolframan sodný a kyselina sírová. Zkumavka se ponoří do vodní lázně o teplotě 80 °C, kde se začnou tvořit vločky proteinu. Následně se protein odstředí, usuší, rozpustí v hydrogenuhličitanu amonném a trypsinem je štěpen na peptidy. Takto upravený vzorek lze podrobit chromatografické separaci, kde jako mobilní fáze slouží 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě a acetonitrilu. [66]

4 Ostatní metody využívající se k analýze bílkovin

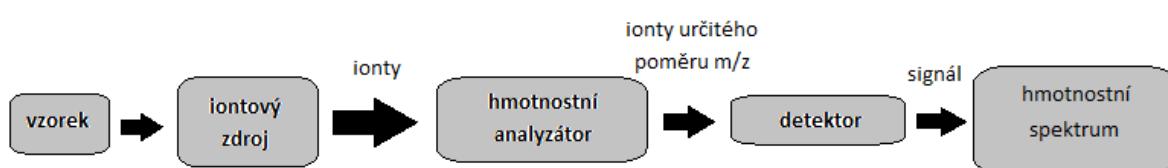
Pro analýzu bílkovin lze využít také další analytické metody, jako např. spektrofotometrii v UV/VIS oblasti nebo infračervenou spektrofotometrii. Tyto metody se využívají zejména pro určení některých doplňkových parametrů nebo k identifikaci bílkovin.

V praxi se pomocí UV/VIS spektrofotometrie stanovují bílkoviny jako např. hovězí sérový albumin, γ -globulin z hovězí plazmy, hemoglobin z hovězí krve, ale také myoglobin a trypsin. Pomocí IČ spektrofotometrie se může stanovit např. hemoglobin nebo globulin z hovězí krve. Dalšími příklady stanovení bílkovin pomocí IČ spektrometrie jsou: myosin, aktin a kolagen v hovězím mase, lektin v čočce, sojové globuliny v ovsu a rýži, gliadin a globulin v pšenici nebo β -laktoglobulin a α -laktalbumin v syrovátce. [67; 68; 69]

4.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je separační metoda, která složky vzorku převádí na plynné ionty. Vzniklé ionty se od sebe dělí na základě jejich rozdílného poměru náboje ku hmotnosti (m/z). Pro hmotnostní spektrometr je charakteristický vakuový systém, který vytváří nízké tlaky v okolí iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. [38]

Při vlastním stanovení dojde k odpaření vzorku a jeho páry se převedou do iontového zdroje. Vzorek je zde bombardován elektrony, fotony nebo molekulami za vzniku plyných iontů (většinou kationtů). Ionty jsou následně v akcelerační komoře urychleny a putují do hmotnostního analyzátoru, kde se oddělí v závislosti na poměru hmotnosti ku náboji. Dále se v detektoru převádí proud iontů na elektrický signál a získá se hmotnostní spektrum. Zde popsaný princip je znázorněn na obrázku 16. [38]



Obrázek 16: Schéma hmotnostní spektrometrie

Iontový zdroj slouží k rozpadu vzorku na ionty. Dělí se podle množství dodané energie na tvrdé a měkké zdroje. Při tvrdé (elektronové) ionizaci se molekulám analytu předává energie z letících elektronů. Využívá se hlavně u plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Při měkké (chemické) ionizaci ionty vznikají díky probíhající chemické reakci. Další ionizační techniky mohou být elektrosprejové nebo laserové. [70] Pro stanovení bílkovin

je nejvíce využívaný iontový zdroj MALDI. MALDI je ionizační metoda, díky které získáme přesnou molekulovou hmotnost stanovované látky. Vzorek o nízké koncentraci analytu se smísí s pevnou nebo kapalnou maticí a nanese se na konec sondy. Ta se následně umístí do vakuové komory a na vzorek začne působit laserový paprsek, který způsobí ionizaci a desorpci analytu a matrice. [38; 58]

Hmotnostní analyzátor je důležitá součást hmotnostního spektrometru. Dochází v něm k separaci iontů na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Většina analyzátorů využívá elektrické, magnetické nebo dynamické pole. Skenující analyzátor separují ionty podle jejich hodnoty m/z a posílají je k detektoru. Nejznámějším a nejvyužívanějším analyzátozem je kvadrupólový analyzátor. Další může být průletový analyzátor a iontová past. Kvadrupólový analyzátor je nejrozšířenější a cenově dostupný. Skládá se ze 4 rovnoběžných tyčových elektrod, na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Ionty s odlišnou hodnotou m/z se pohybují podél tyčových elektrod směrem k detektoru a oddělují se na základě rozdílné frekvence střídavého napětí a velikosti stejnosměrného napětí. Průletový analyzátor využívá vakuové trubice, do které jsou ionty přiváděny v pulzech pomocí elektrického pole. Separace iontů je založena na základě rozdílné doby letu trubicí pro různé poměry m/z . [38; 70]

Detektor slouží k zaznamenávání iontů prošlých hmotnostním analyzátozem a vydává signál, který se převede do digitální formy. Nejběžnější typ detektoru je elektronový násobič. [38; 70]

4.2 Čipy sloužící ke stanovení proteinů

Analýza proteinů na čipu je rychlejší metoda analýzy bílkovin než předchozí dvě popisované a nemusí se provádět v laboratoři. Využívá se hlavně k ověření bezpečnosti potravin, protože díky proteinovým čipům získáme rychle informace o přítomnosti bílkovinných alergenů v potravině. Metoda využívá principu kapilární elektroforézy. Hlavním zařízením je čip o velikosti okolo 5cm^2 . Jsou v něm mikro jamky, které mají speciálně upravený povrch podle toho, jaký protein chceme stanovit. Na čipu zůstanou navázány pouze ty proteiny, které na sebe vážou odpovídající protilátky, ty jsou následně přímo na čipu detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. V současnosti existují dva typy čipů. Prvním typem jsou čipy sloužící ke stanovení funkce proteinů a druhým čipy detekující proteiny s navázanými specifickými proteinovými ligandy. [71; 72]

Jako čip lze také použít destičku vyrobenou ze skla, silikonu, teflonu nebo plastu, ve které jsou mikro jamky se substrátem s modifikovaným povrchem, kde jsou proteiny imobilizovány pomocí kovalentní vazby nebo fyzikální sorpcí. Na povrch substrátu bývá často nanášena vrstva zlata nebo hliníku a organický film (agaróza, dextranové gely nebo jiné hydrofilní polymery). Organický film omezuje dehydrataci proteinů na povrchu čipu. [73]

4.2.1 Stanovení bílkovin pomocí elektroforézy na čipu

Mikročipovou elektroforézou můžeme identifikovat odrůdu a stanovit jakostní typ pšenice stanovením molekulové hmotnosti gluteninu. Glutenin je hlavní zásobní protein pšenice a je zodpovědný za kvalitu těsta. Rozemletý vzorek je extrahován do roztoku dodecylsulfátu sodného a extrakt je nanášen do každé z 10 jamek určené ke stanovení na čipu Protein 200 Plus v bioanalyzátoru Agilent 2100. K vyhodnocení se využívá počítačově řízený software. Stejná metoda se může použít i pro stanovení proteinů z luštěnin nebo jiných zrn. [74; 75]

Mikročipovou elektroforetickou analýzu lze také aplikovat na stanovení syrovátkových proteinů (sérový albumin, α -laktalbumin a β -laktoglobulin) v buvolím mléce, které se využívá při výrobě sýru Mozzarella. Sывátka ze vzorku mléka je získána odstředěním. Analýzu lze provést pomocí Agilent 2100 Expert Bioanalyzer ve spojení s Agilent Protein 80 series II. Tato metoda umožňuje velmi rychlou separaci hlavních syrovátkových proteinů, ale ve srovnání s HPLC je málo přesná. [65]

5 Proteomika

Proteomika je vědní obor zabývající se funkcí, vlastnostmi a identifikací proteinu jako celku v buňkách, tkáních i organismu za správně určených podmínek v daném okamžiku. Zakladatel tohoto vědního oboru je australský vědec Mark Wilkins, který v roce 1994 na konferenci v Sieně poprvé vyslovil slovo proteom. Proteomika je složitější obor než genomika (studium nukleových kyselin), protože v proteomice se mění určitý proteom během růstu a vlivu vnějšího prostředí na rozdíl od genomiky, kde genom zůstává stejný. Proteom je soubor všech bílkovin (proteinů), které tvoří převážnou část buněčných struktur. Proteiny vykonávají také téměř všechny buněčné funkce jako například: transport a zpracování biologické informace, výměnu látek a energie. Proteomika se zaměřuje přímo na genové produkty, a tím je schopna identifikovat různé modifikace proteinů, které nepoznáme z pořadí nukleotidů v DNA. Genetická informace v organismu je vyjádřena pomocí proteinů. Přeměna na protein probíhá v různých vývojových stádiích organismu i v různých buňkách za odlišných podmínek, které jsou dány prostředím. Proces syntézy proteinu je regulován od počáteční transkripce, přes translaci až po post-translační modifikace. Mezi hlavní cíle proteomiky patří získání proteomické mapy. Proteomická mapa je dvourozměrný obraz, který buněčné proteiny znázorňuje jako skvrny, ze kterých lze získat i jejich koncentraci. [76; 71; 77; 78]

Existuje několik podskupin proteomiky, a to analytická, strukturní, funkční a srovnávací. **Analytická proteomika** je založena na separaci bílkovin ze složitých směsí, jejich následné charakterizaci pomocí hmotnostní spektrometrie a bioinformatickém vyhodnocení získaných dat. Cílem analytické proteomiky je identifikace bílkovin, stanovení molekulové hmotnosti, určení pořadí aminokyselin a jejich modifikací po syntéze ribozomem. **Strukturní proteomika** určuje za použití krystalografie, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetické rezonance a dalších technik strukturu bílkovin. Snaží se o pochopení strukturního chování bílkovin a uplatnění těchto poznatků na jejich modifikace využívané pro jiné účely jako je například výroba léků. **Funkční proteomika** se zabývá studiem funkcí a životních pochodů bílkovin. Má veliký význam pro studium mechanismu a vývoje organismu. **Srovnávací proteomika** se zabývá studiem složitých směsí bílkovin. Sleduje změny ve složení bílkovin při různých transformacích. [79]

5.1 Analytické postupy užívané v proteomice

K analýze proteomu se využívají citlivé metody pro dělení proteinů, jako je kapalinová chromatografie nebo dvourozměrná gelová elektroforéza v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. [76; 79]

Dvourozměrná gelová elektroforéza má význam v proteomice při separaci proteinů z připraveného vzorku. Nejčastěji se kombinuje polyakrylamidová gelová elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (2D PAGE–MS). Tato technika slouží k separaci proteinů a využívá se i k jejich identifikaci [71; 78]

Proteomickou analýzu můžeme rozdělit do několika kroků: příprava vzorku, isoelektrická fokusace, SDS-PAGE, analýza a identifikace proteinů. [78]

Důležitým krokem je příprava vzorku, ta má zásadní vliv na obraz proteinové mapy. Postup přípravy se liší v závislosti na typu vzorku. Většinou se proteiny snažíme převést do rozpustného stavu, zamezit jejich vzájemným interakcím a vedlejším účinkům použitých činidel. Musí být zajištěna účinná extrakce proteinů ze vzorku a odstranění látek, které by mohly rušit detekci nebo dělení vzorku. Všechny tyto kroky musí být co nejvíce urychleny, aby nedošlo k degradaci proteinů. Další velmi důležitou částí přípravy vzorku je solubilizace. Slouží ke zlepšení rozpustnosti proteinů a tím ke zvýšení počtu rozlišitelných proteinových skvrn. Solubilizovaný vzorek se skládá z bílkovin a vzorkového pufru. Bílkoviny se rozdělí v elektrickém poli podle svých isoelektrických bodů pomocí isoelektrické fokusace. Toto většinou probíhá na komerčních prouzcích gelů s imobilizovanými pH gradienty. Dobře se s nimi manipuluje, umožňují stanovení větších objemů a zachycují hydrofobní a málo koncentrované proteiny. [77; 78]

Následujícím krokem je SDS-PAGE. Na proužku, kde jsou bílkoviny rozděleny na základě svých isoelektrických bodů, je provedena ekvilibrace pomocí ekvilibračního pufru. Takto upravený proužek se přendá na vrch deskového gelu, který obsahuje SDS a akrylamid. SDS dodá proteinům náboj, který je vztažen na jednotku relativní molekulové hmotnosti. Tímto způsobem se proteiny v gelu rozdělí podle své velikosti. Dále se takto rozdělené proteiny musí identifikovat. Dříve se k identifikaci využívalo tzv. Edmanovo odbourávání za pomoci odbarvení bílkovin barvivem CBB (Coomassie Brilliant Blue), stříbrem nebo fluorescenčním barvivem. Tato metoda byla však časově náročná, drahá a komplikovaná různými modifikacemi, proto je dnes nahrazena hmotnostní spektrometrií. Zde se obarvené proteiny vyříznou a štěpí na peptidy pomocí specifických proteáz, jako je například trypsin. Enzymy

jsou identifikovány hmotnostní spektrometrií buď s ionizací elektrosprejem nebo laserovou desorpcí za přítomnosti matrice. Po zpracování dat vznikne proteinová mapa, která se porovná s databázemi proteinů, a provede se identifikace proteinů a zjištění jejich případné modifikace. [71; 77; 78; 80]

Použití kapalinové chromatografie k separaci proteinů spíše jen doplňuje nedostatky dvourozměrné gelové elektroforézy, mezi které patří nedostatečná solubilizace membránových proteinů, špatné dělení hydrofobních proteinů a proteinů o velké velikosti nebo náboji. Nejvíce se využívá dvourozměrná kapalinová chromatografie, kde jsou proteiny separovány podle svého isoelektrického bodu a následně podle hydrofobicity. Dělení proteinů podle náboje se provádí pomocí silného kationu sulfonylové skupiny. Dále se proteiny dělí podle hydrofobicity pomocí chromatografie na reverzních fázích. [80; 81]

6 Závěr

Tato bakalářská práce je zaměřena na bílkoviny a jejich stanovení pomocí moderních analytických metod. Bílkoviny jsou značně zastoupeny v živočišné stravě, kde se mohou vyskytovat také jako alergenní složka, a proto je pro spotřebitele důležitá jejich identifikace. Pro různé matrice jsou vhodné jiné metody stanovení.

V této práci jsou nejprve popsány bílkoviny a jejich vznik kondenzací aminokyselin za tvorby peptidového řetězce. Bílkoviny jsou zde rozděleny podle uspořádání, chemického složení a také podle rozpustnosti. Dále jsou vyjmenovány konkrétní příklady bílkovin s jejich charakteristikou a strukturou znázorněnou na obrázku.

Hlavní náplní práce je přehled a popis metod, které slouží ke stanovení bílkovin. Nejčastěji jsou ke stanovení alergenních bílkovin v potravinách využívány imunochemické metody. Enzymová metoda ELISA je z těchto metod nejběžnější. Pomocí ní lze například stanovit kasein a ovalbumin ve vlně; gliadin, horeidin a secalin v obilí; parvalbumin z ryb; bílkoviny vajec a mléka nebo také tau protein v mozkomíšním moku.

Dnes jsou v laboratořích velice využívané separační metody jako elektroforéza nebo kapalinová chromatografie. Takto lze například stanovit: lysozym, konalbumin, ovalbumin, a globulin ve vaječném bílku; syrovátkové proteiny v mléce; svalové bílkoviny v mase; gliadin, glutenin a prolamin v obilovinách; alergenní proteiny ve vejcích i mléce nebo také proteiny v mateří kašičce, díky kterým můžeme odhalit pravost medu.

Spektrofotometrie v UV/VIS oblasti a infračervená spektrofotometrie se využívají ke stanovení doplňkových parametrů nebo k identifikaci bílkovin. Analýza proteinů na čipu se využívá hlavně k získání rychlých informací o přítomnosti bílkovinných alergenů v potravine.

V poslední kapitole této práce jsou popsány základy proteomiky. Pro proteomiku je klíčové stanovení proteomu, a to většinou pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy v kombinaci s hmotnostní spektrometrií.

Seznam použité literatury

- [1] BŘÍŽŤDALA, Jan. Bílkoviny. *E-chembook.eu* [online]. Copyright, 2020 [cit. 2020-12-15]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/bilkoviny?fbclid=IwAR3xiViDliUG2pGvzkb2j6ssX8WzFUy6AE2N6j2ycQ6ksyrWyXbEIsGQyV4>
- [2] LAPELUSA, Andrew a Ravi KAUSHIK. *Physiology, Proteins* [online]. In: . USA: National Library of Medicine, 2020 [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555990/?fbclid=IwAR20PFixDHo29S0ylXEsTb9KH0IxyD4P0wuw4A5Lf3Mh8ZJBM30q3EyupcM#article-27886.s1>
- [3] PHILLIPS, G. a P. WILLIAMS. *Handbook of Food Proteins: Introduction to food proteins* [online]. Velká Británie: Woodhead Publishing, 2011 [cit. 2020-12-17]. ISBN 978-0-85-709363-9. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpHFP00021/viewerType:toc//root_slug:handbook-food-proteins/url_slug:handbook-food-proteins?q=handbook%20of%20food%20proteins&sort_on=default&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no
- [4] Predikce struktury proteinu. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structure_prediction#/media/File:Protein-structure.png
- [5] MARIENKA, Ondřej. Velký souhrn informací o bílkovinách. In: *Kulturistika* [online]. Borek: Fitness Trade s.r.o., 2002 [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: <https://www.kulturistika.com/vyziva/vyziva/vyzivove-tipy/kratky-prehled-bilkovin-obsazenych-jak-v-rostlinnych-tak-v-zivocisnych-potravinach>
- [6] FANALI, Gabriella, Alessandra DI MASI, Viviana TREZZO, Maria MARINO, Mauro FASANO a Paolo ASCENZI. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2012, **33**(3), 209-290 [cit. 2021-11-19]. ISSN 0098-2997. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>

- [7] BUSHER, Janice T. Serum albumin and globulin. *Klinické metody: Anamnéza, fyzikální a laboratorní vyšetření* [online]. 1990, (3) [cit. 2021-11-19]. Dostupné z: <http://www.reboundhealth.com/cms/images/pdf/serumalbuminandglobulin%20id%2014563.pdf>
- [8] MITEV, Borislav. Lidský albumin, nesoucí šest molekul kyseliny palmitové. In: *Wikipedie: Albumin* [online]. 2006 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Albumin#/media/Soubor:ALB_structure.png
- [9] NISHINARI, Katsuyoshi, Y. FANG, S. GUO a G.O. PHILIPS. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids* [online]. ELSEVIER, 2014, **39**, 301-318 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2014.01.013
- [10] ZHOU, A., Z. WEI, R.J. READ a R.W. CARRELL. Globulinový komplex vázající tyroxin s tyroxinem. In: *Sino Biological* [online]. 2006 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X14002756>
- [11] AHMED, Mostafa H., Mohini S. GHATGE a Martin K. SAFO. *Hemoglobin: Structure, Function and Allostery* [online]. 2020, **94**, 345–382 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-41769-7_14
- [12] YUAN, Yue, Ming F. TAM, Virgil SIMPLACEANU a Chien HO. *A New Look at Hemoglobin Allostery* [online]. In: . s. 1702–1724 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1021/cr500495x
- [13] ORDWAY, George A. a Daniel J. GARRY. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *Experimental Biology* [online]. 2004, **207**(20), 3441–3446 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.01172
- [14] SOMAN, J. a JS OLSON. Fetální hemoglobin. In: *Wikiwand* [online]. [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: https://www.wikiwand.com/en/Fetal_hemoglobin
- [15] DOMINGUEZ, Roberto a Kenneth C. HOLMES. *Actin Structure and Function* [online]. , 169-186 [cit. 2021-11-19]. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359

- [16] SPLETTSTOESSER, Thomas. Aktin. In: *Wikipedie* [online]. [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Aktin#/media/Soubor:Actin_with_ADP_highlighted.png
- [17] SELLERS, James R. Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. Nizozemsko: ELSEVIER, 2000, **1**(1496), 3-22 [cit. 2021-11-28]. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4889(00)00005-7
- [18] Molekula myosinu. In: *Alamy* [online]. [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: <https://www.alamy.com/myosin-molecule-image65203315.html>
- [19] WILKEN, Lisa R. a Zivko L. NIKOLOV. Process Evaluations and Economic Analyses of Recombinant Human Lysozyme and Hen Egg-White Lysozyme Purifications. *Biotechnology progress* [online]. WILEY, 2011, **27**(3), 733-743 [cit. 2021-11-28]. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.593
- [20] MURAKI, M., K. HARATA, N. SUGITA a K. SATO. Lysozyme: Lysozyme humain avec N-acétylglucosamine et mannose en vert. In: *Wikipédia* [online]. [cit. 2021-12-27]. Dostupné z: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Lysozyme#/media/Fichier:1rem.jpg>
- [21] BIESIEKIERSKI, Jessica R. What is gluten. *J Gastroenterol Hepatol.* [online]. 2017 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: doi:10.1111/jgh.13703
- [22] *Kansaswheat: G is for Gluten* [online]. 2014 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://kswheat.com/news/g-is-for-gluten>
- [23] DLOUHÝ, Sheng, Mengjie HUANG, Jing WANG, Qi XU, H.HM HAMMAD a Meihu MA. A study of storage impact on ovalbumin structure of chicken egg. *Journal of Food Engineering* [online]. 2018, **219**, 1-7 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.08.028
- [24] Ovalbumin. In: *Proteinové portréty* [online]. 2010 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: http://osu-wams-blogs-uploads.s3.amazonaws.com/blogs.dir/150/files/2010/04/1vac_bio_r_500.jpg

- [25] VAHID KHAN, Mohsin, Gulam RABBANI, Ejaz AHMAD a Rizwan HASAN KHAN. Fluoroalcohols-induced modulation and amyloid formation in conalbumin. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. ELSEVIER, 2014, **70**, 606-614 [cit. 2021-12-28]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.027
- [26] VAHID KHAN, Mohsin, Gulam RABBANI, Mohd ISHTIKHAR, Shariqua KHAN, Gajender SAINI a Rizwan HASAN KHAN. Non-fluorinated cosolvents: A potent amorphous aggregate inducer of metalloproteinase-conalbumin (ovotransferrin). *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. ELSEVIER, 2015, **78**, 417-428 [cit. 2021-12-29]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.021
- [27] SWAMINATHAN, Jawahar. Kreslené znázornění molekulární struktury proteinu registrované s 1gvc kódem. In: *Wikipedie: Ovotransferin* [online]. [cit. 2022-01-01]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Ovotransferrin#/media/File:PDB_1gvc_EBI.jpg
- [28] *Aplikační list k metodě ELISA: společnost biotechne*. USA: Minneapolis, Minnesota, 2019.
- [29] PICÓ, a YOLANDA. *Chemical Analysis of Food - Techniques and Applications* [online]. Itálie: Elsevier, 2012 [cit. 2020-12-28]. ISBN 978-0-12-384863-5. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpCAFTA002/viewerType:toc//root_slug:chemical-analysis-food/url_slug:chemical-analysis-food?q=Chemical%20Analysis%20of%20Food%20-%20Techniques%20and%20Applications&sort_on=default&b-subscription=true&b-group-by=true&b-sort-on=default&b-content-type=all_references&include_synonyms=no
- [30] ELISA principle. *Boster antibody and ELISA experts* [online]. USA [cit. 2021-01-01]. Dostupné z: https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle?fbclid=IwAR1fdYQ2WrHjXhXqEZw4XJJVxXyLtdv4STnNhPuuu67zDzLD2mCZxI_e2oQ

- [31] ELISA 20. In: *BioTek Instruments* [online]. Winooski, VT, USA: BioTek, 2021 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://www.biotekinstrument.com.br/images/applications/ELISA20.jpg>
- [32] ROLLAND, Jennifer, Effie APOSTOLOU, Maria DE LEON a Creina STOCKLEY. *Specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for analysis of residual allergenic food proteins in commercial bottled wine fined with egg white, milk, and nongrape-derived tannins* [online]. , 349-352 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: doi:10.1021 / jf073330c
- [33] HULÍN, Petr, Pavel DOSTÁLEK a Igor HOCHÉL. STANOVENÍ PROLAMINŮ JEČMENE V PIVU A PIVOVARSKÝCH MATERIÁLECH. *Kvasný průmysl* [online]. Praha, 2007, **53**(9), 273-276 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2007/09/02.pdf>
- [34] SHIBAHARA, Yusuke, Yoshihiko UESAKA, Jun WANG, Shoichi YAMADA a Kazuo SHIOMI. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fish protein in processed foods. *Food Chemistry* [online]. 2013, **136**(2), 675-681 [cit. 2022-01-29]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.066>
- [35] KATO, Shigeki, Takahiro YAGI, Ayako KATO, Shunsuke YAMAMOTO a Masanobu AKIMOTO. Interlaboratory Study of ELISA Kits for the Detection of Egg and Milk Protein in Processed Foods. *FOOD COMPOSITION AND ADDITIVES* [online]. Japonsko, 2015, **98**(3), 810-816 [cit. 2022-01-29].
- [36] DOI, Hirotoši, Yuki TOUHATA, Haruki SHIBATA, Shinobu SAKAI, Atsuo URISU, Hiroši AKIYAMA a Reiko TESHIMA. Reliable Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Walnut Proteins in Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. American Chemical Society, 2008, **56**(17), 7625–7630 [cit. 2022-01-29]. ISSN 1520-5118. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/jf801550h>
- [37] FIALOVÁ, L., A. BARTOŠ, J. ŠVARCOVÁ, D. DOLEŽIL a I. MALBOHAN. Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma soupravami ELISA. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2011,

- 19(40)**, 113–118 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-2/KBM-2-11-113-Fialova.pdf>
- [38] SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007. ISBN 978-0-495-01201-6.
- [39] LANDERS, James P. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 3. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 978-0-8493-3329-3.
- [40] OLIVEIRA, Marcone A. L. de, Brenda L. S. PORTO, Carina de A. BASTOS, Céphora M. SABARENSE a Fernando A. S. VAZ. Analysis of amino acids, proteins, carbohydrates and lipids in food by capillary electromigration methods: a review. *Analytical Methods* [online]. 2016, **8(18)**, 3649-3680 [cit. 2021-11-21]. Dostupné z: doi:DOI <https://doi.org/10.1039/C5AY02736E>
- [41] KAŠIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. Praha, 1997, **91**, 320-329. Dostupné z: doi:http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf
- [42] MALÁ, Zdena, Petr GEBAUER a Petr BOČEK. Analytical capillary isotachopheresis after 50 years of development: Recent progress 2014–2016. *ELECTROPHORESIS* [online]. WILEY, 2016, (38), 9-19 [cit. 2021-12-10]. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/elps.201600289>
- [43] GABROVSKÁ, Dana, Milan HOUŠKA, Eva MAŠKOVÁ, Jitka PINKROVÁ, Jana RYSOVÁ, Pavel SKŘIVAN, Zuzana ŠMÍDOVÁ a Renata WINTEROVÁ. *Současné trendy výzkumu a vývoje potravin pro skupiny obyvatel se zvláštními požadavky na výživu: Nesnášenlivost laktózy a kaseinu, ostatní významné alergeny v potravinách, fenylketonurie, strava s nízkým obsahem bílkovin, sodíku, sacharidů: Část 2*. Praha: Výzkumný ústav potravinářský Praha, 2017.
- [44] MAKAROV, Alexander, Christian MÜNCH a Thomas MOEHRING. *Electrophoresis: Capillary electrophoresis-mass spectrometry of basic proteins using*

a new physically adsorbed polymer coating. Some applications in food analysis [online]. Weinheim: WILEY, 2004, (25), 2056-2064 [cit. 2021-03-01].

- [45] SIMÓ, Carolina, Carlos ELVIRA, Nieves GONZÁLEZ, J. San ROMÁN, Coral BARBAS a Alejandro CIFUENTES. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of basic proteins using a new physically adsorbed polymer coating. Some applications in food analysis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2004, **25**(13), 2056-2064 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/elps.200305790>
- [46] MAKAROV, Alexander, Christian MÜNCH a Thomas MOEHRING. *Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin* [online]. Weinheim, 2001, (22), 1489–1502 [cit. 2021-03-01].
- [47] POBOZY, Ewa, Aleksandra SENTKOWSKÁ a Anna PISKOR. Comparison of three modifications of fused-silica capillaries and untreated capillaries for protein profiling of maize extracts by capillary electrophoresis†. *Journal of Separation Science* [online]. Varšava; Polsko, 2014, **37**(17), 2388–2394 [cit. 2022-01-21]. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jssc.201301236>
- [48] SÁZELOVÁ, Petra, Václav KAŠIČKA, Elena IBÁÑEZ a Alejandro CIFUENTES. Extraction and separation of water-soluble proteins from *Bacillus thuringiensis*-transgenic and non-transgenic maize species by CZE. *Journal of Separation Science: Food Analysis* [online]. Varšava; Polsko, 2009, **32**(21), 3801-3808 [cit. 2022-01-21]. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jssc.200900448>
- [49] BEAN, S. R. a G. L. LOOKHART. Ultrafast Capillary Electrophoretic Analysis of Cereal Storage Proteins and Its Applications to Protein Characterization and Cultivar Differentiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. American Chemical Society, 2000, **48**(2), 344353 [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/jf990962t>
- [50] BEAN, S. R., G. L. LOOKHART a J. A. BIETZ. Acetonitrile as a Buffer Additive for Free Zone Capillary Electrophoresis Separation and Characterization of Maize (*Zea mays* L.) and Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Storage Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. American Chemical Society, 2000, **48**(2),

318327 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1520-5118. Dostupné z:
doi:<https://doi.org/10.1021/jf990786o>

- [51] DAY, Li a Helen BROWN. Detection of mechanically recovered chicken meat using capillary gel electrophoresis. *Meat Science* [online]. 2001, **58**(1), 31-37 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0309-1740. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00127-3)
- [52] MONTEALEGRE, Cristina, Maria Concepción GARCÍA, Carmendel RÍO, Maria Luisa MARINA a Carmen GARCÍA-RUIZ. Separation of olive proteins by capillary gel electrophoresis. *Talanta* [online]. 2012, **97**(15), 420-424 [cit. 2022-02-01]. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.055>
- [53] RODRÍGUEZ-DELGADO, Miguel A., Sabina MALOVANÁ, Francisco J. MONTELONGO a Alejandro CIFUENTES. Fast analysis of proteins in wines by capillary gel electrophoresis. *Evropský potravinářský výzkum a technologie* [online]. Španělsko, 2002, **214**, 536–540 [cit. 2022-02-01]. ISSN 1438-2385. Dostupné z: doi:[10.1007/s00217-002-0514-1](https://doi.org/10.1007/s00217-002-0514-1)
- [54] HOLZMÜLLER, Wolfgang a Ulrich KULOZIK. Quantification of MFGM proteins in buttermilk and butter serum by means of a stain free SDS-PAGE method. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. Německo, 2016, **49**, 102-109 [cit. 2022-05-14]. ISSN 0889-1575. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.04.003>
- [55] YOON, Jae-Wook, Jae-Yeon JUNG, Hyun-Jung CHUNG, Mi-Ryung KIM, Chan-Wha KIM a Seung-Taik LIM. Identification of botanical origin of starches by SDS-PAGE analysis of starch granule-associated proteins. *Journal of Cereal Science* [online]. 2010, **52**(2), 321-326 [cit. 2022-05-16]. ISSN 0733-5210. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.015>
- [56] PANČÍK, Peter. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC). In: *Biopedia: Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)* [online]. Biopedia.sk, 2021 [cit. 2021-02-24]. Dostupné z:
<https://biopedia.sk/images/7b9fc4028479faff1be551296385fe15.jpg>

- [57] CVAČKA, Josef. *Instrumentace pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii* [online]. In: . [cit. 2021-02-24]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
- [58] LETZEL, Thomas. *Protein and Peptide Analysis by LC-MS*. UK: The Royal Society of Chemistry, 2011. ISBN 978-1-84973-182-9.
- [59] Ó'FÁGÁIN, Ciarán, Philip M. CUMMINS a Brentan F. O'CONNOR. Gel-Filtration Chromatography. WALLS, Dermot a Sinéad T. LOUGHRAN. *Protein Chromatography: Methods and Protocols* [online]. 1485. Humana Press, New York, NY, 2017 [cit. 2021-12-27]. ISBN 978-1-4939-6412-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_2
- [60] NARDIELLO, Donatella, Maria Teresa MELFI, Carla PIGNATELLI a Diego CENTONZE. Enhancing online protein isolation as intact species from soy flour samples by actively modulated two-dimensional liquid chromatography (2D-LC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. Itálie, 2020, (179) [cit. 2022-01-29]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112976](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112976)
- [61] MELFI, Maria Teresa, Donatella NARDIELLO, Anna NATALE, Maurizio QUINTO a Diego CENTONZE. An automated food protein isolation approach on preparative scale by two-dimensional liquid chromatography with active modulation interface. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2019, **40**(7), 1096-1106 [cit. 2022-01-31]. ISSN 1522-2683. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1002/elps.201800500](https://doi.org/10.1002/elps.201800500)
- [62] ANSARI, Parisa, Norbert STOPPACHER, Judith RUDOLF, Rainer SCHUHMACHER a Sabine BAUMGARTNER. Selection of possible marker peptides for the detection of major ruminant milk proteins in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, **399**, 1105–1115 [cit. 2022-01-31]. ISSN 1618-2650. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-010-4422-0](https://doi.org/10.1007/s00216-010-4422-0)
- [63] BARGEN, Christoph von, Jörg DOJAHN, Dietmar WAIDELICH, Hans-Ulrich HUMPF a Jens BROCKMEYER. New Sensitive High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Horse and

- Pork in Halal Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(49), 11986–11994 [cit. 2022-01-31]. ISSN 1520-5118. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/jf404121b>
- [64] BARGEN, Christoph von, Jens BROCKMEYER a Hans-Ulrich HUMPF. Meat Authentication: A New HPLC–MS/MS Based Method for the Fast and Sensitive Detection of Horse and Pork in Highly Processed Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(39), 9428–9435 [cit. 2022-01-31]. ISSN 1520-5118. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/jf503468t>
- [65] BUFFONI, Joanna Natalia, Ivan BONIZZI, Alfredo PAUCIULLO, Luigi RAMUNNO a Maria FELIGINI. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Food Chemistry* [online]. 2011, **127**(4), 1515-1520 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.008>
- [66] JIANGA, Weijian, Meirong YING, Jinjie ZHANG et al. Quantification of major royal jelly proteins using ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and application in honey authenticity. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2021, **97** [cit. 2022-01-31]. ISSN 0889-1575. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103801>
- [67] KAWAMURA, Kunio, Hiroki NAGAYOSHI a Toshio YAO. In situ analysis of proteins at high temperatures mediated by capillary-flow hydrothermal UV–vis spectrophotometer with a water-soluble chromogenic reagent. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, **667**(1-2), 88-95 [cit. 2022-01-02]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.013>
- [68] AKHGAR, Christopher K., Georg RAMER, Mateusz ŻBIK, Artur TRAJNEROWICZ, Jarosław PAWLUCZYK, Andreas SCHWAIGHOFER a Bernhard LENDL. The Next Generation of IR Spectroscopy: EC-QCL-Based Mid-IR Transmission Spectroscopy of Proteins with Balanced Detection. *Analytical Chemistry* [online]. 2020, **92**(14), 9901–9907 [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: doi:[10.1021/acs.analchem.0c01406](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01406)

- [69] CARBONARO, M. a A. NUCARA. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids* [online]. Rakousko, 2010, **38**, 679-690 [cit. 2022-01-02]. ISSN 1438-2199. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s00726-009-0274-3>
- [70] FRIDECKÝ, David a K LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. Praha: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2012, **20**(3), 152-157 [cit. 2021-03-08]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <http://www.digitalniknihovna.cz/nlk/view/uuid:c03f9d62-2fb0-42d7-9758-c1701a6d98e2?page=uuid:4ed0d835-f7c7-4a8a-99b1-757215e79ce3>
- [71] COLLINSOVÁ, Michaela a Jiří JIRÁČEK. Současný vývoj v proteomice. *Chemické listy* [online]. Praha, 2004, **98**(12), 1112-1118 [cit. 2021-03-25]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2089/2089>
- [72] NAZZARO, Filomena, Pierangelo ORLANDO, Florinda FRATIANNI, Aldo DI LUCCIA a Raffaele COPPOLA. Protein Analysis-on-Chip Systems in Foodomics. *Nutrients* [online]. Itálie, 2012, (4), 1475-1489 [cit. 2021-03-29]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu4101475
- [73] *Klinická biochemie a metabolismus: Proteinové čipy v moderní klinické biochemii*. Brno, 2006, . ISSN 1210-7921.
- [74] UTHAYAKUMARAN, S., Y. LISTIOHADI, M. BARATTAI, L. BATEY a C. W. WRIGLEY. Rapid identification and quantitation of high-molecular-weight glutenin subunits. *Journal of Cereal Science* [online]. 2006, **44**(1), 34-39 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0733-5210. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.01.001>
- [75] UTHAYAKUMARANI, S., L. BATEY a C.W. WRIGLEY. On-the-spot identification of grain variety and wheat-quality type by Lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Journal of Cereal Science* [online]. Austrálie: ELSEVIER, 2005, **41**(3), 371-374 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0733-5210. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.12.001>

- [76] KOVÁŘOVÁ, Hana. Proteomika v postgenomové době. *Chemické listy* [online]. Liběchov, 2005, **99**(12), 886-889 [cit. 2021-03-21]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1964/1964>
- [77] VÁŇA, Petr a Jan ŠMARDA. Laboratorní přístroje a postupy: Optimalizace přípravy vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu. *Chemické listy* [online]. Brno, 2004, **98**(12), 1130-1134 [cit. 2021-03-26]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2091/2091>
- [78] BOUCHAL, Pavel a Igor KUČERA. Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chemické listy* [online]. Brno, 2003, **97**(1), 29-36 [cit. 2021-03-25]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2259/2259>
- [79] CHMELÍK, Josef. Proteomický průvodce. *Chemické listy* [online]. Brno, 2005, **99**(12), 883-885 [cit. 2021-03-21]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1963/1963>
- [80] PISCHETSRIEDER, Monika a Rainer BAEUERLEIN. Proteome research in food science. *Chemical Society Reviews* [online]. Německo: Royal Society of Chemistry, 2009, (38), 2600-2608 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1460-4744. Dostupné z: [doi:10.1039/b817898b](https://doi.org/10.1039/b817898b)
- [81] SKALNÍKOVÁ, Helena, Hana KOVÁŘOVÁ, Jiří MOOS, Vanda FILOVÁ a Petr HALADA. Laboratorní přístroje a postupy: Systém pracující na principu dvojrozměrné kapalinové chromatografie proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze. *Chemické listy* [online]. Praha, 2005, **99**(12), 952-956 [cit. 2021-03-27]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1973/1973>