

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Proteiny a možnosti jejich stanovení
Bakalářská práce

2023

Karolína Cívínová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Proteins and Their Determination Possibilities
Bachelor thesis

2023

Karolína Cívínová

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína Cívínová**
Osobní číslo: **C20177**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Proteiny a možnosti jejich stanovení**
Téma práce anglicky: **Proteins and Their Determination Possibilities**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se proteinů a možností stanovení jejich koncentrace a určení struktury
2. V úvodních kapitolách popsat strukturu proteinů, jejich dělení a biologické funkce
3. Další kapitoly věnovat vybraným spektrometrickým, separačním a imunochemickým metodám
4. V závěru popsat metodu proteinové krystalografie

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Mgr. Roman Kandář, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Proteiny a možnosti jejich stanovení 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 30.6.2023

Karolína Cívínová v.r.

Anotace

První část této bakalářské práce se zabývá obecným popisem proteinů, jejich strukturou a funkcí. Ve druhé části práce jsou blíže popsány některé významné proteiny a možnosti jejich stanovení v různých biologických materiálech. Jsou zde popsány principy a postupy spektrofotometrických, elektrochemických i imunochemických metod, které se k analýze proteinů využívají. Závěr práce se zabývá metodami strukturní analýzy bílkovin.

Klíčová slova

Bílkoviny, celková bílkovina, strukturní analýza, plazmatické bílkoviny, bílkoviny akutní fáze

Annotation

The first part of this bachelor thesis deals with a general description of proteins, their structure and function. In the second part of the thesis some important proteins and the possibilities of their determination in various biological materials are described in more detail. The principles and procedures of spectrophotometric, electrochemical, and immunochemical methods used for protein analysis are described. The conclusion of the thesis deals with methods of structural analysis of proteins.

Keywords

Protein, total protein, structural analysis, plasma proteins, acute phase proteins

Obsah

Seznam obrázků a tabulek	8
Seznam zkratk	9
Úvod.....	11
1 Proteiny.....	12
1.1 Aminokyseliny	12
1.1.1 Poruchy metabolismu aminokyselin.....	16
1.2 Peptidy.....	18
1.3 Struktura proteinů.....	18
2 Stanovení proteinů.....	20
2.1 Bílkoviny v moči.....	20
2.2 Bílkoviny v krvi	21
2.2.1 Plazmatické bílkoviny.....	21
2.2.1.1 Elektroforéza bílkovin	24
2.2.1.2 Imunochemické metody	25
2.2.2 Bílkoviny akutní fáze.....	29
2.3 Stanovení celkové bílkoviny	30
2.3.1 Biuretová metoda.....	30
2.3.2 Lowryho metoda	31
2.3.3 Kjeldahlova metoda	31
2.3.4 Metoda dle Bradfordové	31
2.3.5 Pierce 660 nm	32
2.3.6 BCA metoda	32
2.4 Stanovení struktury bílkovin.....	33
2.4.1 Edmanovo odbourávání	33
2.4.2 Rentgenová krystalografie	34
2.4.3 Nukleární magnetická rezonance.....	36
2.4.4 Kryoelektronová mikroskopie	37
2.4.5 Cirkulární dichroismus	39
Závěr	42
Zdroje.....	43

Seznam obrázků

Obrázek 1 Pravotočivá a levotočivá konfigurace AMK.....	13
Obrázek 2 Reakční schéma reakce ninhydridu s aminokyselinou	16
Obrázek 3 Reakční schéma reakce Sangerova činidla s aminokyselinou	16
Obrázek 4 Reakční schéma vzniku peptidu	18
Obrázek 5 Schematické znázornění přímé ELISA metody	26
Obrázek 6 Schematické znázornění nepřímé ELISA metody	27
Obrázek 7 Schematické znázornění sandwichové ELISA metody	28
Obrázek 8 Schematické znázornění kompetitivní ELISA metody	28
Obrázek 9 Biuret	31
Obrázek 10 Coomassie Brilliant Blue G-250	31
Obrázek 11 Schematické znázornění BCA metody	33
Obrázek 12 Schematické znázornění Edmanova odbourávání	33
Obrázek 13 Příklad zobrazení molekuly hemoglobinu pomocí rentgenové krystalografie, NMR a kryoelektronové mikroskopie	39

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled všech proteinogenních aminokyselin	14
Tabulka 2 Shrnutí referenčních hodnot, funkcí a patologických hodnot vybraných globulinů	23

Seznam zkratek

AMK	aminokyselina
APP	bílkoviny akutní fáze (acute protein phase)
APR	reakce akutní fáze (acute phase reaction)
BCA	bicinchoninová kyselina (bicinchoninic acid)
BCKD	dehydrogenázy pro větvené aminokyseliny (branched chain keto-acid dehydrogenase)
CBS	cystathionin β -syntáza (cystathionine β -synthase)
CCD	zařízení citlivé na elektrický náboj (charged coupled device)
CD	cirkulární dichroismus
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CRP	C-reaktivní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymově vázaná imunosorpční analýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
HCU	klasická homocystinurie (classic homocystinuria)
IRMA	imunoradiometrie (immunoradiometric assay)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MSUD	nemoc javorového sirupu (maple syrup urine disease)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
PAH	fenylalaninhydroxyláza (phenylalanine hydroxylase)
PDB	proteinová databáze (protein data bank)
PITC	fenylisothiokyanát (phenylisothiocyanate)
PKU	fenylketonurie (phenylketonuria)
pRIA	proteinová radioimunoanalýza (protein radioimmunoassay)

PTH	fenylthiohydantoinový derivát (phenylthiohydantoin derivative)
RBP	retinol vázající protein (retinol-binding protein)
RIA	radioimunoanalýza (radioimmunoassay)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina (transfer ribonucleic acid)

Úvod

Proteiny neboli bílkoviny jsou organické makromolekuly, které se skládají z jednoho nebo více polypeptidových řetězců. Bílkoviny jsou základním stavebním kamenem lidského těla. Mají pro nás mnoho různých nepostradatelných funkcí. Jsou součástí několika významných skupin látek jako jsou například enzymy, hormony, transportní látky nebo látky zajišťující imunitu. V buňkách se bílkoviny účastní prakticky všech procesů.

Proteiny vznikají v procesu zvaném proteosyntéza. Celý proces probíhá ve dvou fázích. První fáze (transkripce) probíhá v jádře a zajišťuje přepis genetické informace z DNA do mediátorové RNA (mRNA). V mRNA jsou nukleotidy seřazeny do trojic, kterým říkáme kodony. Každý kodon kóduje jednu proteinogenní aminokyselinu. Po kompletním přepisu genetické informace do mRNA se celá molekula mRNA odpojí a putuje na ribozom, kde nastává druhá fáze proteosyntézy. Ve druhé fázi (translace) dochází k překlada genetické informace z mRNA do proteinu. Ribozom přečte vlákno mRNA a každému kodonu přiřadí příslušnou aminokyselinu, kterou dodá transferová RNA (tRNA). Tím dochází k syntéze proteinu.

Z klinického hlediska jsou pro nás proteiny důležitým ukazatelem fungování organismu. Jsou pomocníkem při diagnostice onemocnění a následně ukazatelem úspěšnosti léčby.

Cílem této bakalářské práce je zjednodušit a sjednotit informace spojené s bílkovinami, jejich funkcí, stavbou a složením. Dále bych chtěla shrnout, jaké možnosti stanovení proteinů existují, a které se využívají v klinické praxi.

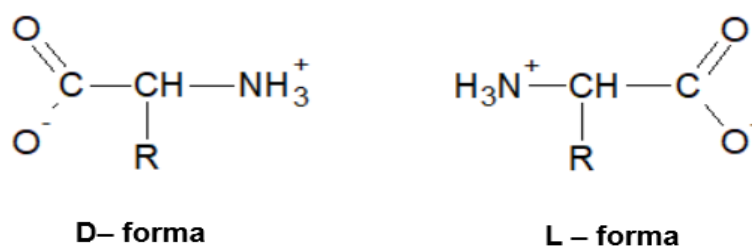
1 Proteiny

Jak už bylo řečeno v úvodu, bílkoviny mají v organismu mnoho nenahraditelných funkcí. Jejich velmi významnou funkcí je funkce strukturní. Proteiny se podílejí na výstavbě buněk i celých organismů. Dále se proteiny účastní katalytických (enzymy) i naopak regulačních pochodů (hormony). Bílkoviny plní v organismu i funkci transportérů látek, příkladem je například hemoglobin. Neméně důležitou roli hrají i v obraně organismu před cizorodými látkami. [1, 2]

Podle chemického uspořádání můžeme bílkoviny rozdělit na jednoduché a složené. Složené bílkoviny jsou obohaceny o nepeptidové složky. Podle charakteru těchto složek rozeznáváme například glykoproteiny, které kromě bílkovinné složky navíc obsahují sacharidovou složku. Dále sem můžeme zařadit fosfoproteiny, které jsou obohaceny o zbytek kyseliny fosforečné, metaloproteiny s obsahem kovů nebo například lipoproteiny obohacené o lipidy. [1, 2]

1.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou molekuly obsahující karboxylovou ($-\text{COOH}$) a aminovou ($-\text{NH}_2$) funkční skupinu. Jedná se o základní stavební jednotky bílkovin. Běžně se v proteinech vyskytuje dvacet aminokyselin, které označujeme jako proteinogenní. Pro jejich pojmenování se využívají triviální názvy a jejich zápis zjednodušíme využitím třípísmenových zkratk nebo jednopísmenovým symbolem. Proteinogenní aminokyseliny (kromě glycinu) obsahují chirální uhlík v α pozici. Vzhledem k tomu že se jedná o chirální molekuly, mohou se vyskytovat ve dvou stereoizomerech, které se odlišují prostorovou orientací skupin připojených na α atom uhlíku. Podle toho se poté aminokyseliny označují jako pravotočivé (D) a levotočivé (L) (viz Obrázek 1). V bílkovinách se ale vyskytují pouze levotočivé konfigurace. Aminokyseliny se mohou v závislosti na pH prostředí chovat jako slabé kyseliny nebo zásady. Obsahují kyselé i bazické skupiny, mohou být tedy dárcem i příjemcem protonů. Díky tomu jsou zařazovány do látek s amfoterní povahou (amfolyty). Za určitých podmínek mohou vytvářet obojetné ionty (amfiony). Hodnotu pH prostředí, kdy se aminokyselina nachází v podobě amfionu, nazýváme izoelektrický bod (pI). V tomto bodě se amfion nepohybuje ve stejnosměrném elektrickém poli. [1, 3, 4]



Obrázek 1 Pravotočivá a levotočivá konfigurace AMK [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

Proteinogenní aminokyseliny dělíme do čtyř skupin. První skupinou jsou nepolární aminokyseliny. Tato skupina aminokyselin je nejpočetnější a řadí se mezi ně glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenylalanin, methionin a tryptofan. Druhou skupinou jsou polární aminokyseliny. Do této skupiny řadíme tyrosin, serin, threonin, cystein, asparagin a glutamin. Do třetí skupiny řadíme pouze dvě aminokyseliny, a to kyselinu glutamovou (glutamát) a kyselinu asparagovou (aspartát). Jedná se o kyselé aminokyseliny, které mají v postranním řetězci na posledním uhlíku další karboxylovou skupinu. Poslední skupinou jsou bazické aminokyseliny. Do této skupiny řadíme lysin, arginin a histidin. Tyto aminokyseliny obsahují v postranním řetězci bazickou skupinu. Přehled všech proteinogenních aminokyselin spolu s jejich zkratkami a strukturními vzorci je v Tabulce 1. [1]

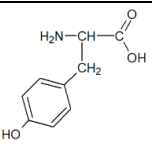
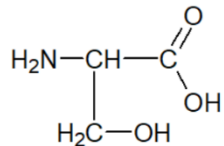
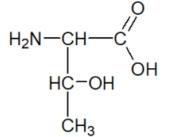
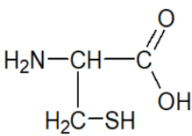
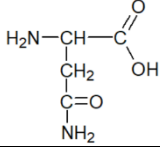
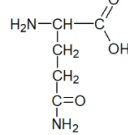
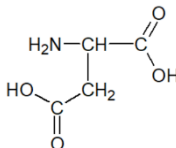
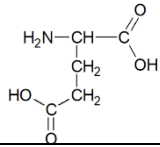
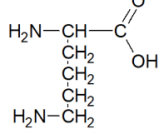
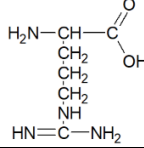
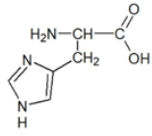
Selenocystein (Sec, U) je označován za 21. proteinogenní aminokyselinu. Je nezbytnou složkou některých důležitých enzymů (např. glutathionoxidáza). Má podobnou strukturu jako cystein, kde byla síra v thiolové skupině nahrazena selenem. Selen patří mezi stopové prvky. Má antioxidační účinky a zlepšuje imunitu. Může být pro organismus toxický při dávkách větších než 1 mg/den. Jako 22. proteinogenní aminokyselinou je označován pyrrolysin (Pyl, O). Obě aminokyseliny jsou kódovány stop kodony. To je možné kvůli speciálně modifikované tRNA. [5–7]

Tabulka 1 Přehled všech proteinogenních aminokyselin

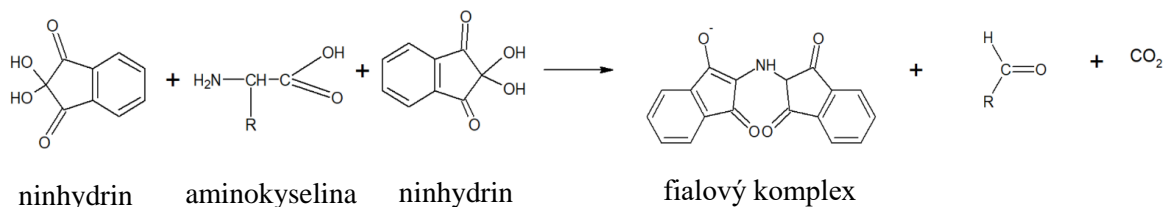
Název	Strukturní vzorec	Zkratka	
		Třípísmenná	Jednopísmenná
Glycin		Gly	G
Alanin		Ala	A
Valin		Val	V
Leucin		Leu	L
Izoleucin		Ile	I
Prolin		Pro	P
Fenylalanin		Phe	F
Methionin		Met	M
Tryptofan		Trp	W

Nepolární aminokyseliny

Tabulka 1 Přehled všech proteinogenních aminokyselin (pokračování)

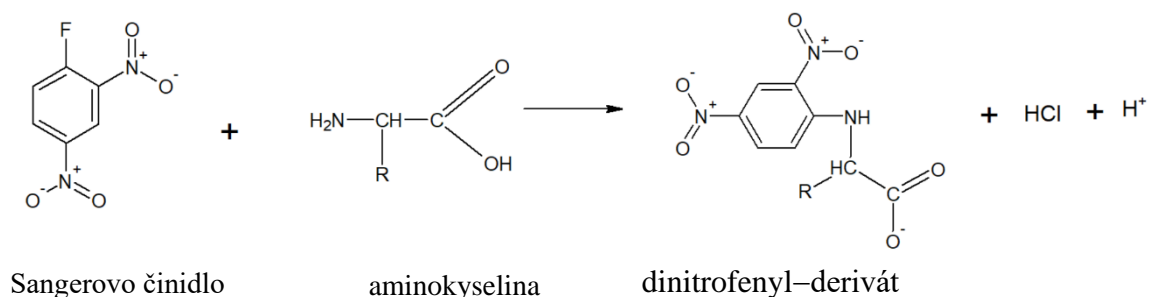
Název	Strukturní vzorec	Zkratka		Polární aminokyseliny	
		Třípísmenná	Jednopísmenná		
Tyrosin		Tyr	Y		
Serin		Ser	S		
Threonin		Thr	T		
Cystein		Cys	C		
Asparagin		Asn	N		
Glutamin		Gln	Q		
Kyselina asparagová		Asp	D		Kyselé aminokyseliny
Kyselina glutamová		Glu	E		
Lysin		Lys	K	Bazické aminokyseliny	
Arginin		Arg	R		
Histidin		His	H		

Aminokyseliny můžeme nejčastěji stanovovat reakcí s ninhydridem (2,2-dihydroxyindan-1,3-dion, viz Obrázek 2). Vzniká tmavě fialový produkt, který lze spektrofotometricky proměřit při vlnové délce 570 nm. Výjimkou je stanovení prolinu a hydroxyprolinu, kdy tyto AMK reagují s ninhydridem za vzniku žlutého produktu s jinou strukturou. [1]



Obrázek 2 Reakční schéma reakce ninhydridu s aminokyselinou [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

Další možností stanovení je Sangerova reakce (viz Obrázek 3). Využívá se 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (Sangerovo činidlo). Ten reaguje s volnou aminoskupinou za vzniku dinitrofenyl-derivátu, který je žlutě zbarvený, proto ho můžeme spektrofotometricky stanovit. [1]



Obrázek 3 Reakční schéma reakce Sangerova činidla s aminokyselinou [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

1.1.1 Poruchy metabolismu aminokyselin

V metabolismu aminokyselin se mohou vyskytnout poruchy, které způsobují celou řadu vrozených onemocnění. Některé z nich jsou podrobněji popsány níže. Jejich diagnostika se provádí novorozeneckým screeningem.

Fenylketonurie

Fenylketonurie (PKU) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění způsobené v důsledku mutace v enzymu fenylalaninhydroxyláza (PAH). Tento enzym normálně katalyzuje přeměnu fenylalaninu na tyrosin. V případě fenylketonurie dochází ke snížení aktivity tohoto enzymu nebo k jeho úplné absenci. Dochází tedy k hromadění fenylalaninu v organismu a ke snížení

hladiny tyrosinu. Fenylalanin se ukládá zejména v mozku a způsobuje jeho nenávratné poškození. Nedostatek tyrosinu vede k nedostatečné tvorbě neurotransmiterů jako je adrenalin, noradrenalin nebo dopamin. Léčba tohoto onemocnění spočívá v dietním omezení. Pacienti jsou odkázáni ke konzumaci potravin se sníženým obsahem bílkovin, zejména fenylalaninu. [8]

Homocystinurie

Homocystinurie (HCU) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění. Příčinou tohoto onemocnění je deficit enzymu cystathionin β -syntáza (CBS), který katalyzuje přeměnu aminokyseliny methionin na cystein. Při homocystinurii dochází k akumulaci homocysteinu a methioninu a ke snížení hladiny cysteinu v krvi i moči. U pacientů s tímto onemocněním dochází k postižení očí, cév, centrální nervové soustavy a rozvoji mentální retardace. Léčba spočívá v podávání pyridoxinu (vitamin B₆). Pokud tato léčba není dostatečná, je doplněná o dietu s nízkým obsahem bílkovin, zejména methioninu. [9–11]

Leucinóza

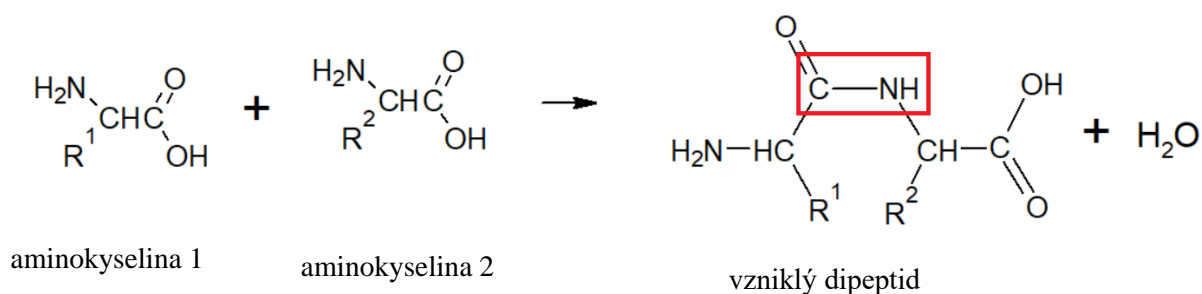
Leucinóza neboli nemoc javorového sirupu (MSUD) je vrozené autozomálně recesivní onemocnění. Onemocnění spočívá v poruše metabolismu větvených aminokyselin – leucinu, izoleucinu a valinu. Je to způsobeno deficitem dehydrogenáz pro větvené aminokyseliny (BCKD). Léčba pacientů spočívá v dodržování striktní celoživotní diety se sníženým obsahem bílkovin. Při zanedbání léčby se větvené aminokyseliny hromadí v organismu a způsobují silný zápach moči po javorovém sirupu, u dětí způsobuje neurologické a vývojové opoždění, záchvatovitá onemocnění, encefalopatie až smrt. [12, 13]

Novorozenecký screening

Jedná se o celoplošné vyhledávání chorob v jejich časném stádiu. Novorozenci se po narození odebírá vzorek kapilární krve z paty. Vyšetření se provádí na speciální kartičce se šesti terčíky. Do předtištěných terčků se obtiskne kapka krve tak, aby byl celý prostor terčíku zaplněný a aby byl filtrační papír viditelně prosáknutý z obou stran. Test se provádí v prvních 48–72 hodinách života, aby došlo k co nejdřívější diagnostice onemocnění a včasnému zahájení léčby. Dříve se testem dalo prokázat 18 vrozených onemocnění. Od 1.1.2022 se k doposud vyšetřovaným chorobám přidala ještě spinální svalová atrofie a těžká kombinovaná imunodeficience. [14, 15]

1.2 Peptidy

Peptidy jsou látky organického původu, které vznikají spojením dvou a více aminokyselin. Jednotlivé aminokyseliny jsou v peptidech spojeny peptidovou vazbou. Peptidová vazba vzniká mezi dvěma aminokyselinami, kdy jedna z nich poskytne do vazby svou karboxylovou skupinu a ta druhá aminoskupinu (viz Obrázek 4). Podle počtu spojených aminokyselin, dělíme peptidy na oligopeptidy (2–10 AMK) a polypeptidy (10–100 AMK). Pokud peptid obsahuje více než 100 AMK, jedná se o protein. [1, 16]



Obrázek 4 Reakční schéma vzniku peptidu. V rámečku je vyznačena nově vzniklá peptidová vazba. [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

1.3 Struktura proteinů

U bílkovin je možné rozlišit až 4 úrovně struktury, a to primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární struktura popisuje přesný počet a pořadí aminokyselin v řetězci. Vychází z konkrétních nukleotidů v DNA. Aminokyseliny jsou kódovány sekvencí tří nukleotidů. Tento triplet se nazývá kodon. Jednotlivé aminokyseliny jsou v řetězci spojeny peptidovými vazbami. [1, 7]

Sekundární struktura udává prostorové uspořádání aminokyselin v řetězci, které jsou stabilizovány vodíkovými vazbami. Toto uspořádání přidává proteinu nové vlastnosti v podobě pevnosti a pružnosti. Můžeme rozlišit dva typy sekundární struktury – α -helix a β -skládaný list. [1, 7] Více než 30 % sekundárních struktur tvoří konformace α -helix. α -helix neboli pravotočivá šroubovice je stabilizována vodíkovými vazbami, které spojují jednotlivá patra šroubovice. Šroubovici tvoří bílkovinná kostra a zbytky aminokyselin směřují ven. V proteinech se vyskytují ohnuté helixy s různými stupni ohybu. Ohyb oslabuje sílu vodíkových vazeb, pokud je tedy ohyb moc velký, dojde k rozpadu molekuly. [1, 17] U β -skládaného listu je peptidový řetězec téměř lineární, ale postranní aminokyselinové řetězce směřují nad a pod rovinu listu tak, aby si vzájemně nepřekážely. [1, 2]

Terciární struktura vystihuje celkový tvar proteinu v trojrozměrném měřítku. Výsledná konformace popisuje interakce mezi postranními řetězci. Podle uspořádání se dělí na globulární a fibrilární. Terciální uspořádání proteinu ovlivňuje funkční, fyzikální i chemické vlastnosti proteinu. [1, 7]

Kvartérní struktura představuje tvar bílkoviny, která je výsledkem interakce více bílkovinných podjednotek. Konformace je stabilizována nekovalentními vazbami. Při zničení sekundárních, terciárních a kvartérních struktur, protein ztratí své typické vlastnosti. Tento proces je označován jako denaturace. Denaturace může být způsobena vlivem vysokých teplot, silných kyselin a zásad nebo ultrafialovým zářením. [1, 7]

2 Stanovení proteinů

2.1 Bílkoviny v moči

Moč je zdrojem mnoha informací o pacientově zdravotním stavu. Za normálních okolností se do moče nedostávají téměř žádné bílkoviny. Fyziologicky se v ní vyskytuje převážně albumin ve velmi malých koncentracích. [18, 19]

Proteinurie se v praxi dělí podle toho, zda se jedná o fyziologický nebo patologický stav. Nadměrné vylučování proteinů do moče může být příznakem mnoha zdravotních komplikací. V některých případech se ale může jednat o fyziologický stav. Fyziologická proteinurie může být způsobena horečkou, zvýšenou fyzickou zátěží nebo z ortostatických důvodů. V těchto případech je proteinurie pouze přechodná, neměla by se proto vyskytovat ve vzorcích odebraných po zotavení se z febrilních stavů nebo po regeneraci po velké fyzické zátěži. Patologická proteinurie může být důsledkem dvou hlavních patofyziologických mechanismů nebo jejich kombinací. Na základě těchto mechanismů proteinurie můžeme ještě podrobněji rozdělit na glomerulární, kdy je glomerulární membrána více permeabilní, a na tubulární, při kterých dochází ke zhoršené reabsorpci proteinů o malé molekulové hmotnosti v proximálním tubulu. [18–20]

K vyšetřování se využívá vzorek první ranní moče. Odběr moči je pro pacienta neinvazivní. Proteinurie se nejčastěji prokazuje pomocí testačních diagnostických proužků. Jedná se tedy o kvalitativní kalorimetrickou analýzu, která je založena na změně pH v prostředí aniontových proteinů (albumin, transferin), zatímco většina ostatních proteinů má mnohem menší afinitu k protonu. Proto se limity detekce u různých proteinů značně liší. Tato metoda je velmi citlivá i pro stanovení mikroalbuminurie, při které dochází k vylučování albuminu v množství od 30 do 300 mg/24hod. Mikroalbuminurie může být známkou mnoha závažných stavů (diabetická nefropatie, chronické onemocnění ledvin). Při stanovení proteinurií může docházet ke zkreslování výsledků některými vlivy. Výrazně koncentrovaná moč, krvácení (i menstruační), alkalické pH moči nebo některé léky mohou falešně zvyšovat výsledky. Proteiny se mohou stanovovat i semikvantitativně. Při této technice se využívá poměru koncentrace bílkoviny v moči ku koncentraci kreatininu v moči. Normální hodnoty se pohybují do 20 mg/mmol. [18–20]

2.2 Bílkoviny v krvi

Krev je červená, vazká cirkulující tekutina, která se skládá ze dvou složek – krevní plazmy a buněčných elementů. Celkový objem krve u člověka je 4,5–6 litrů. Mezi její hlavní funkce patří transport plynů a živin, udržování stálého vnitřního prostředí a ochrana před vniknutím cizorodých částic do těla. Krev je nejčastější biologický materiál využívaný k laboratorní diagnostice. Využívá se právě i ke stanovování bílkovin. [2]

Sérum se získává po odběru plné krve, která se nechá srazit a poté se centrifuguje. Díky centrifugaci se odstraní fibrinové sraženiny, krevní buňky a koagulační faktory. Je důležité nechat krev dostatečně srazit (20–30 minut), jinak může dojít k hemolýze, což může vést k chybnému výsledku. Zpracování séra má řadu nevýhod. Tou nejvýznamnější je právě dlouhé čekání na sražení krve po odběru. Kvůli tomu se při analýze vzorků od pacientů při akutních stavech volí spíše plazma. Další nevýhodou při zpracování séra je interference fibrinu, který vzniká během srážení. Při získání séra je menší výtěžek materiálu než u plazmy, což může být v některých případech také bráno jako nedostatek. Naopak výhodou je, že většina testů se provádí ze séra, které je oproti plazmě i stabilnější. [21–23]

2.2.1 Plazmatické bílkoviny

Jsou to bílkoviny krevní plazmy. Většinu z nich tvoří játra a následně jsou produkovány do krve. Mohou se stanovovat buď elektroforeticky, nebo imunochemickými metodami. Liší se od sebe koncentrací, velikostí molekul a funkcí. Na základě toho je dělíme do dvou skupin na albumin a globuliny, ty se ještě mohou dělit na α_1 , α_2 , β a γ globuliny. Toto dělení je nejlépe viditelné po elektroforetické separaci. [21, 24]

Albumin

Albumin je nejzastoupenější bílkovinou v séru (referenční hodnoty: 35–55 g/l), představuje více než polovinu veškerých plazmatických proteinů. Je syntetizován jaterními buňkami hepatocyty a jeho nejdůležitější funkcí v těle je transport látek. Přenáší některé minerály, bilirubin, hormony a další látky nerozpustné ve vodě. Toho se využívá ve farmaceutickém průmyslu, kde se tato funkce využívá k vazbě a transportu velkého množství léků, například penicilinů. Dále se v těle využívá jako antioxidant. Neméně důležitou funkcí je udržování onkotického tlaku plazmy. [2, 21]

Hypoalbuminémie je stav, kdy dochází k poklesu hladiny albuminu pod fyziologické hodnoty. Tento stav může mít mnoho příčin jako například podvýživu, těžké hepatopatie, akutní záněty, nádory. Fyziologicky je koncentrace albuminu snížena u těhotných žen. [2]

Velmi vzácně se může u pacientů vyskytovat i úplná ztráta tvorby albuminu nebo je produkován v koncentracích do 2 g/l. Tento stav se nazývá analbuminémie. [21, 24, 25]

Jako jediný z plazmatických bílkovin se stanovuje spektrofotometricky reakcí s bromkresolovou zelení. Reakce je založená na vazbě barviva na albumin a následné změně absorpčního maxima. [2]

Kromě albuminu se také v některých případech stanovuje prealbumin (transthyretin). Vzniká v játrech a jeho hlavní funkcí je transport hormonů štítné žlázy. Prealbumin vytváří komplex s retinol vázajícím proteinem (RBP – retinol binding protein) a díky tomu brání ztrátám vitamínu A do moči. [21]

Globuliny

Globuliny jsou skupina proteinů skládající se z α_1 , α_2 , β a γ frakce. Každá z těchto frakcí se skládá z několika bílkovin, které mají odlišné vlastnosti. Vybraní zástupci bílkovin z jednotlivých frakcí, jejich základní funkce, referenční hodnoty a patologické hodnoty jsou podrobněji shrnuty v Tabulce 2. [7]

Specifickým typem globulinů jsou imunoglobuliny, které jsou součástí γ frakce. Jsou produkovány plazmatickými buňkami a jejich sekrece je považována za imunitní odpověď organismu na cizorodé částice nebo mikroorganismy. Imunoglobuliny se skládají ze dvou těžkých (H, heavy) a dvou lehkých řetězců (L, light), které jsou spojeny disulfidovou vazbou. Celá molekula tedy vypadá jako písmeno Y. V séru je 5 hlavních tříd imunoglobulinů: A, M, G, D a E. Na konci řetězců jsou místa, které se nazývají variabilní oblasti. Tyto oblasti jsou zodpovědné za specifickou vazbu na antigen a každá makromolekula má toto místo odlišné. Lehké řetězce jsou ještě děleny na kappa (κ) a lambda (λ). Tyto řetězce se znázorňují imunofixací. [2, 21]

Tabulka 2 Shrnutí referenčních hodnot, funkcí a patologických hodnot vybraných globulinů [2, 21]

Zóna	Název	Referenční meze	Funkce	Zvýšené koncentrace	Snížené koncentrace
α_1	Antitrypsin	2–4 g/l	inhibitor proteolytických enzymů	akutní záněty, fyziologicky v těhotenství	těžké hepatopatie
	Kyselý glykoprotein	0,55–1,2 g/l	zatím není známá	akutní stavy	porucha proteosyntézy v játrech
α_2	Haptoglobin	1–2,8 g/l	váže hemoglobin	akutní stavy	porucha proteosyntézy v játrech, novorozenci
	Ceruloplazmin	0,1–0,6 g/l	transport mědi, katalyzuje $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$	záněty, nádory, těhotenství	Wilsonova choroba, Menkesův syndrom
β	Transferin	2–4 g/l	transport železa	nedostatek železa	nadbytek železa, alkoholismus
	C-reaktivní protein	0–10 mg/l	imunitní obrana organismu	akutní stavy	nevyskytuje se
	Fibrinogen	2,8–4,5 g/l	srážení krve	zánětlivé stavy	diseminovaná intravaskulární koagulopatie
γ	IgG	8–18 g/l	neutralizace toxinů ve tkáních	chronické záněty, autoimunitní choroby	fyziologicky u novorozenců, nefrotický syndrom, dědičné nebo získané poruchy syntézy při nádorových onemocnění
	IgA	0,9–4,5 g/l	ochrana sliznic před infekcí		
	IgM	0,6–2,5 g/l	reakce na virovou i bakteriální infekci		
	IgD	velmi malé koncentrace	neznámá		
	IgE		jejich komplex s alergenem vyvolá alergickou reakci		

2.2.1.1 Elektroforéza bílkovin

Elektroforéza je analytická separační technika založená na rozdělení iontů v roztoku vlivem působení stejnosměrného elektrického proudu. Tato metoda je jednoduchá, spolehlivá a levná. Z těchto důvodů se v dnešní době elektroforetické dělení bílkovin řadí mezi rutinně prováděná vyšetření. Elektroforézu můžeme na základě uspořádání rozdělit na několik typů. [26]

Zonální elektroforéza (= elektroforéza na nosiči)

Během zonální elektroforézy jsou proteiny rozdělovány na základě velikosti jejich povrchového náboje, velikosti molekuly a vlivu prostředí. V tomto typu elektroforézy hraje důležitou roli stacionární nosič (nosné médium), na kterém separace probíhá. Nosič je porézní, hydrofilní látka, která je elektroforeticky inertní. Dříve se jako nosiče využívaly filtrační papíry. V současnosti se využívají spíše agarózové, acetátcelulózové nebo polyakrylamidové gely, které s sebou přináší mnoho výhod. Používání agarózových gelů oproti filtračním papírům výrazně urychlilo dobu separace. Další výhodou využívání gelů spočívá v jejich transparentnosti. Po ukončení elektroforetické separace dochází k fixaci bílkovin na gel (nejčastěji jejich denaturací organickou látkou) a následnému obarvení. Tím, že jsou gely průhledné, dochází k lepšímu stanovení intenzity zbarvení (koncentrace) jednotlivých proteinových frakcí. Intenzita jejich zbarvení se stanovuje denzitometricky. [27, 28]

V praxi se využívá mnoha modifikací této metody. Jednou z nich je například SDS-PAGE elektroforéza, při které dochází k blokaci náboje proteinu a k separaci pouze na základě molekulových hmotností analyzovaných látek. Další možností modifikace je imunoeléktroforéza. Tento typ probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku se provádí klasická elektroforetická separace bez fixace a obarvení výsledného gelu. Poté následuje imunodifuze, při které dochází k napipetování antiséra do gelu vedle jednotlivých frakcí a po inkubaci se vytvoří precipitační linie, která se následně zvýrazní obarvením. [26, 29, 30]

Kapilární elektroforéza

V posledních letech zaznamenává velký vzestup kapilární elektroforéza (CE). Důležitými parametry jsou pohyblivost a elektroosmotický tok. Pohyblivost je dána velikostí náboje a molekuly. Separace probíhá v kapilárách, které mají vnitřní průměr v oblasti 25–75 μm a na délku měří 30–100 cm. Vnitřek kapiláry je z oxidu křemičitého. Před každou separací je kapilára naplněna roztokem elektrolytu, který obvykle stačí pro separaci malých molekul. K separaci velkých molekul je vhodná modifikace klasické kapilární elektroforézy, kdy se místo elektrolytu využívá gel, který má trochu odlišné vlastnosti oproti gelům, které se využívají v zonálních elektroforézách. Jedná se většinou o lineární polyakrylamid, dextran nebo polyethylenglykol, které při určitých prahových koncentracích vytvářejí dočasnou nestabilní pórovitou síť. [26, 29, 31]

Výhodou kapilární elektroforézy oproti zonální je práce v menších objemech chemikálií. Dalším pozitivem je detekce pomocí UV. Signály jednotlivých rozdělených frakcí jsou online snímány přímo v kapiláře. Odpadne díky tomu krok fixace a barvení. [26]

2.2.1.2 Imunochemické metody

Koncentrace plazmatických bílkovin lze měřit pomocí imunochemických metod, které využívají reakce bílkoviny se specifickou protilátkou. Pro většinu hlavních plazmatických bílkovin lze použít metodu imunoturbidimetrie nebo imunonefelometrie. Pro stanovení koncentrace bílkovin, které jsou ve vzorku přítomné ve velmi nízkých koncentracích se používají metody se značenými reaktanty (ELISA, RIA, IRMA). [2]

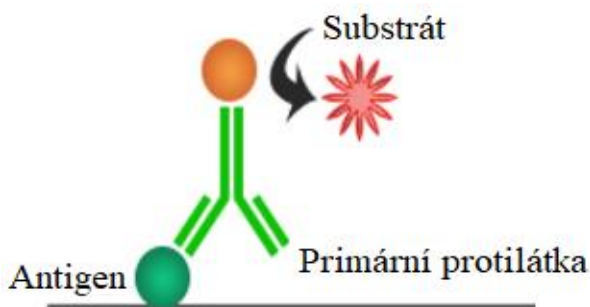
Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie

Jedná se o zákalové metody, které jsou založeny na interakci proteinu se specifickou protilátkou. Jsou to optické metody, které se využívají zejména pro analýzu plazmatických proteinů, a to hlavně pro všechny třídy imunoglobulinů. Při imunoturbidimetrii je proměřována intenzita světla ve směru jeho dopadu. Rozptyl záření má za následek pokles intenzity světla. Oproti tomu při imunonefelometrii je měřeno rozptýlené záření. Detektor se tedy nachází v úhlu 0 až 90° ve směru dopadajícího světla. Imunoturbidimetrie se využívá spíše pro analýzu koncentrovanějších roztoků. Imunonefelometrické měření je řádově citlivější, proto je vhodné například pro stanovení třídy IgM protilátek. [26, 32]

ELISA

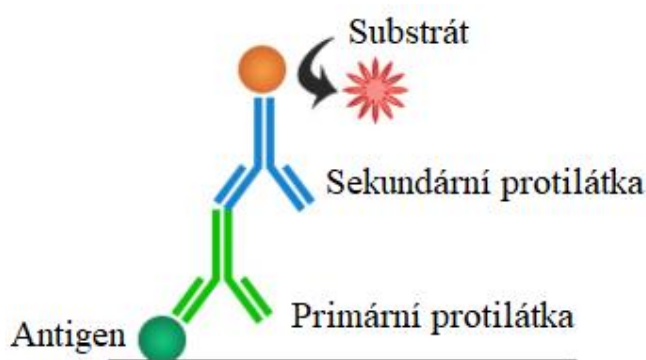
Tato metoda je opět založena na vysoce specifické reakci antigenu s protilátkou. Je navržena pro detekci látek, které se v organismu nachází ve velmi nízkých koncentracích (peptidy, proteiny, protilátky, hormony a vitamíny). Ani u těchto látek neexistuje téměř žádné riziko interference. Je to z důvodu vysoké specifity proti protilátce nebo antigenu, který je vyvinutý přímo pro ně. Je proto skoro nemožné, aby se protilátka navázala na jinou molekulu než vlastní antigen. Metoda probíhá na destičkách, které obsahují 96 nebo 384 jamek. V každé jamce musí být imobilizován jeden reaktant (buď antigen nebo protilátka). Reaktant se na destičku může navázat buď přímou adsorpcí nebo nepřímo pomocí vazby na protilátku nebo antigen. Díky imobilizaci reaktantu na destičku je snadné oddělit během testu vázané analyty od nevázaných. Na protilátku, která se nazývá detekční, se naváže enzym (nejčastěji alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza, glukózooxidáza), který reaguje s navázaným substrátem za vzniku měřitelného barevného produktu. Detekce se provádí nejčastěji spektrofotometricky při 400–600 nm v závislosti na použitém substrátu, detekci je možné provést i fluorimetricky nebo luminometricky. Reakce enzym–substrát obvykle trvá kolem 30–60 minut. Lze ji ale zastavit přidáním hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové (tedy drastickou změnou pH). Během procesu je důležité dodržovat promývací kroky, aby nedocházelo k nespecifickým interakcím. Lze rozeznat několik typů modifikací této metody. [33, 34]

Přímá ELISA je nejjednodušším typem metody ELISA. Na jamky v destičce je navázaný antigen. Váže se na něj enzymaticky značená specifická protilátka, která je následně detekována. Po inkubaci následuje promytí, které odstraní nenavázané protilátky z jamky. Poté se do jamky přidá vhodný substrát. Enzym vázaný na protilátku následně reaguje s přidaným substrátem za vzniku měřitelné barevné změny, která je detekována (viz Obrázek 5). [33, 34]



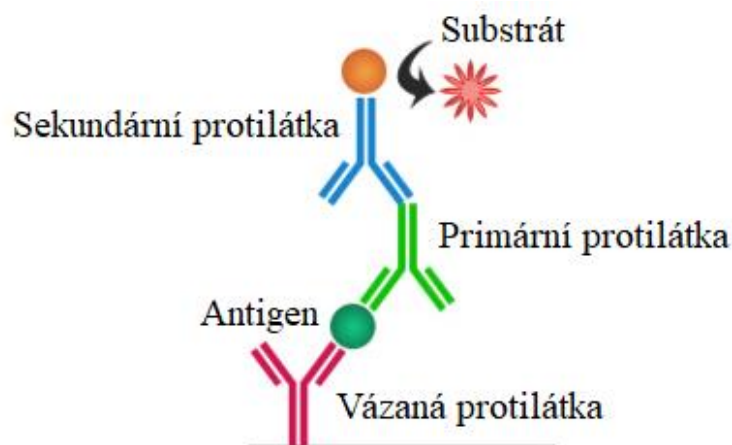
Obrázek 5 Schematické znázornění přímé ELISA metody. Obrázek byl přeložen a upraven. [34]

Nepřímá ELISA je velmi podobná té přímé. Na jamky v destičce je navázaný antigen. Nejprve se aplikuje primární (detekční) protilátka, která ale není značená. V dalším kroku je přidána ještě sekundární protilátka, která už je označena enzymatickou značkou. Z toho důvodu je metoda označována jako nepřímá. Následný proces je už stejný jako v přímé metodě. Přidá se substrát, který reaguje s enzymem vázaným na sekundární protilátce za vzniku měřitelné barevné změny, která je detekována (viz Obrázek 6). Výhodou nepřímé metody je vyšší citlivost reakce, protože se na primární protilátku může vázat více než jedna značená sekundární protilátka. Jako nevýhodu lze vnímat větší časovou náročnost, protože reakce oproti přímé metodě obsahuje jednu inkubační dobu navíc. [33, 34]



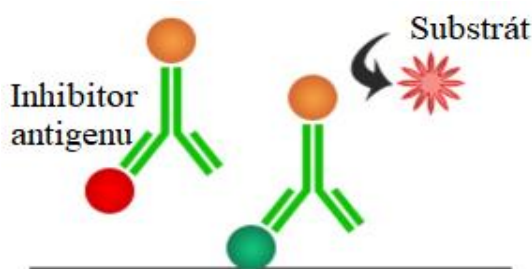
Obrázek 6 Schematické znázornění nepřímé ELISA metody. Obrázek byl přeložen a upraven. [34]

Sandwichová ELISA je další možné uspořádání metody ELISA. Využívají se dvě protilátky, kdy každá je specifická pro jinou část epitopu molekuly antigenu. Jedna protilátka je vázaná na jamku, následně se přidá vzorek, který obsahuje antigeny a destička se nechá inkubovat. Po navázání veškerých antigenů na primární protilátku je důležité jamku důkladně promýt, aby se všechny nenavázané antigeny dostaly z jamky a nedošlo tak ke vzniku nespecifických interakcí. Poté se přidá enzymaticky značená sekundární protilátka a následuje opět inkubace a promývací krok. V poslední fázi dojde k reakci enzymu se substrátem, která se projeví barevnou změnou, která je detekována. Tato ELISA je 2–5krát citlivější než ostatní uspořádání metody ELISA. Sandwichová se nazývá proto, že antigen je ukotven mezi dvě protilátky, což připomíná sandwich (viz Obrázek 7). [33, 34]



Obrázek 7 Schematické znázornění sandwichové ELISA metody. Obrázek byl přeložen a upraven. [34]

Kompetitivní ELISA je poslední významná modifikace této metody. Na jamky v destičce je navázaný antigen. Protilátka je přidána do vzorku ještě před nanesením na destičku a až poté je směs vnesena do jamky, kde se po inkubaci destička důkladně promyje. Poté je do jamky přidána druhá enzymaticky značená protilátka, která reaguje se substrátem za vzniku barevné změny, která je detekována (viz Obrázek 8). Čím více bude primární protilátka vyvázána antigenem, tím slabší bude výsledný signál. [33, 34]



Obrázek 8 Schematické znázornění kompetitivní ELISA metody. Obrázek byl přeložen a upraven. [34]

Radioimunoanalýza a imunoradiometrie

Základem radioimunoanalýzy (RIA) je reakce specifické protilátky s nezačleným a značeným antigenem za vzniku imunokomplexu antigen-protilátka. Do reakce je přidáváno přesné množství antigenu značeného radioaktivním izotopem ^{125}I . Reakce funguje na principu soutěže mezi značeným antigenem a antigenem, který se přirozeně vyskytuje v testovaném vzorku o vazbu s protilátkou. Protože je ve vzorku pouze omezené množství specifické protilátky, není všechen antigen (ať značený nebo nezačlený) vyvázána a zůstane volně ve vzorku. Čím více je přirozeně se vyskytujícího antigenu přítomno ve vzorku, tím méně značeného antigenu je schopno se vázat na protilátka. Po ukončení vazebné interakce je nezbytné oddělit volné a na protilátka vázané antigeny. K oddělení obou forem je možné

využit například centrifugaci. Komplex antigen-protilátka je hustší než volné antigeny, proto odstředění umožní separaci směsi. Další možností separace volných a vázaných antigenů je využití adsorpčních materiálů (iontoměniče, silikagel), filtrace nebo denaturace proteinů organickými rozpouštědly. Měří se radioaktivita značených antigenů. Z toho se poté vypočítá koncentrace přirozeně se vyskytujícího se antigenu ve vzorku. [26, 28, 35]

Radioimunoanalýza se využívá i například ve forenzní, antropologické nebo archeologické analýze. V roce 1980 profesor Lowenstein uvedl, že některé proteiny (albumin, kolagen) jsou druhově specifické a lze je identifikovat proteinovou radioimunoanalýzou (pRIA). Tuto analýzu lze provádět i u vzorků starých několik milionů let. V praxi se tato metoda využívá spíše k odlišení lidských kostí od zvířecích. [36, 37]

Imunoradiometrická analýza (IRMA) funguje na podobném principu jako RIA. Rozdíl je ve značení. U imunoradiometrie je radioizotopem ^{125}I značená protilátka, která je do reakce přidávána v nadbytku, proto se jedná o nekompetitivní metodu. Nevýhodou těchto metod je vysoká cena, nestabilita radioizotopů a dnes již překonaná citlivost. Další významnou nevýhodou jsou rizika spojená s prací s radioaktivní látkou. [26, 28]

2.2.2 Bílkoviny akutní fáze

Jedná se o specifické bílkoviny, jejichž koncentrace výrazně vzroste při akutním stavu organismu (infekce, zánět, trauma). Tento stav v organismu hostitele spustí kaskádu různých reakcí, které jsou souhrnně označovány jako reakce akutní fáze (APR). Jednou z těchto systémových reakcí na akutní stav je zvýšení produkce řady plazmatických bílkovin, které se obecně nazývají bílkoviny akutní fáze (APP). Reakce akutní fáze jsou spuštěny hormony označovanými jako cytokiny. Příkladem cytokinů je například interleukin 6, interleukin 1 nebo interferony. Cytokiny jsou uvolňovány z monocytů a makrofágů buněk zánětu v místě infekce. Fungují jako poslové mezi lokálním poraněním a hepatocyty, které následně začnou produkovat bílkoviny akutní fáze. Nejvyšší koncentrace APP v séru je obvykle dosaženo 24–48 hodin po zahájení syntézy. Následuje pokles koncentrace, který odpovídá procesu zotavení organismu. APR je regulována zpětnou vazbou, která vede k vyřešení akutní fáze během 4–7 dnů po prvotním stimulu, v případě že se neobjeví žádný další stimul. Pokud se dokola neustále opakují další a další stimuly, může APR přejít v chronickou formu. V takovém případě je nárůst koncentrace APP nižší než během akutních zánětlivých procesů nebo infekcí. Na základě koncentrace APP jsou děleny na negativní a pozitivní proteiny akutní fáze. Koncentrace negativních APP při akutních stavech klesá, naopak koncentrace

pozitivních APP stoupá. Játra přednostně syntetizují proteiny, které napomohou ke zvládnutí akutního stavu. Mezi negativní APP patří například albumin nebo transferin. Naopak mezi pozitivní APP patří C–reaktivní protein (CRP), haptoglobin nebo ceruloplazmin. [38]

2.3 Stanovení celkové bílkoviny

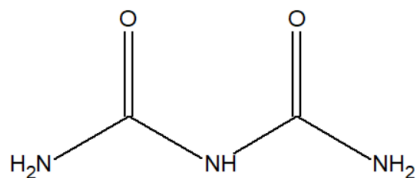
Vyšetření hladiny celkové bílkoviny má v klinické diagnostice velký význam. Můžeme díky těmto stanovením sledovat zdravotní stav pacienta nebo nám výsledky mohou pomoc při určování diagnózy. Z toho důvodu se toto stanovení řadí mezi rutinně prováděná laboratorní vyšetření. Ke zpracování celkové bílkoviny se obvykle využívá vzorek séra a fyziologická hladina se pohybuje v rozmezí 62–82 g/l. Zvýšené hodnoty mohou značit dehydrataci pacienta. Naopak snížená koncentrace celkové bílkoviny může poukazovat na hyperhydrataci nebo podvýživu pacienta. Fyziologicky může být koncentrace snížena v těhotenství. Chylózní nebo ikterické sérum může u některých metod způsobovat interference. Další změny v koncentraci celkové bílkoviny mohou značit sníženou nebo zvýšenou hladinu jedné nebo více konkrétních bílkovin. [7, 21, 39]

2.3.1 Biuretová metoda

Biuretová metoda je nejpoužívanější metodou stanovení koncentrace celkových bílkovin v séru. Nazývá se podle nejjednodušší látky, která dává pozitivní reakci – biuret (viz Obrázek 9). Vzniká kondenzací dvou molekul močoviny. Díky snadnému provedení, přesnosti metody a malých interferencích je uznána jako referenční metoda. Stanovení je založeno na reakci měďnatých kationtů s peptidovou vazbou za vzniku červenofialového komplexu, jehož intenzita je následně spektrofotometricky proměřována při vlnové délce 540 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb. Reakce probíhá pouze v silně alkalickém prostředí. Měďnaté ionty a alkalizující složka jsou do reakce dodávány biuretovým činidlem, které obsahuje síran měďnatý (CuSO_4) jako zdroj měďnatých iontů, hydroxid sodný (NaOH) jako zdroj alkalického prostředí, vinan sodno-draselný ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), který zabraňuje vzniku hydroxidu měďnatého a jodid draselný (KI), který brání autoredukci měďnatých iontů. Aby biuretové činidlo reagovalo se stanovovanou látkou, musí látka obsahovat alespoň dvě peptidové vazby. Aminokyseliny ani dipeptidy s činidlem tedy nereagují. [2, 7, 39, 40]

Metoda má určitá omezení. Je citlivá pouze pro látky s minimálním obsahem 1 g/l bílkovin. Z toho důvodu není vhodná pro stanovení bílkovin v moči nebo mozkomíšním moku, kde je

koncentrace bílkovin nižší. Zároveň chylózní, hemolytická i ikterická séra falešně zvyšují hodnoty. Naopak falešně negativní koncentrace bílkovin vychází v sérech, kde je zvýšená koncentrace amoniaku, protože amonné kationty konkurují měďnatým. [2]



Obrázek 9 Biuret [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

2.3.2 Lowryho metoda

Tato metoda je velmi podobná biuretové metodě. Metoda probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku proběhne klasická biuretová reakce. Ve druhém kroku je ke vzorku přidáno Folin–Ciocalteuovo činidlo, které obsahuje směs kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny fosfowolframové. Folin–Ciocalteuovo činidlo se redukuje v přítomnosti tyrosinu a tryptofanu za vzniku modrého komplexu, jehož intenzita zbarvení se spektrofotometricky proměřuje při 750 nm. Lowryho metoda je oproti biuretové metodě citlivější, bohužel ale interferuje s některými látkami ve vzorku. [39, 41–44]

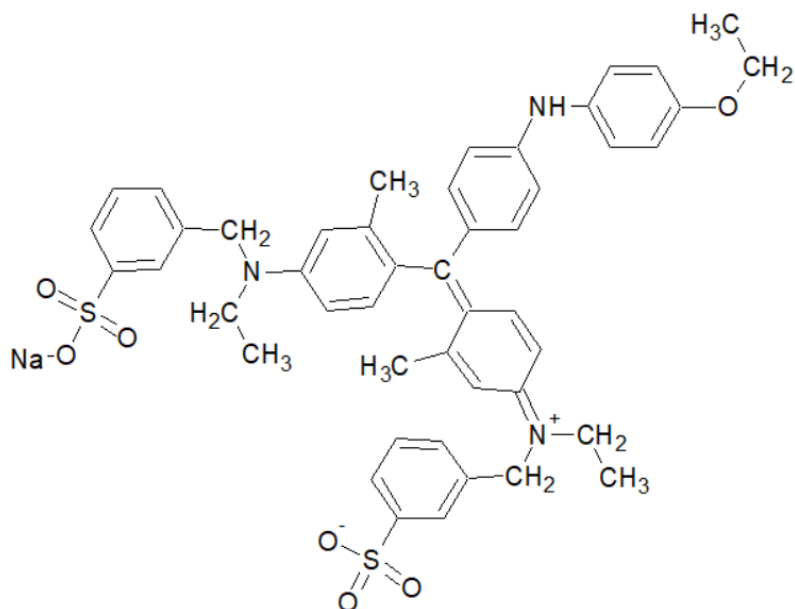
2.3.3 Kjeldahlova metoda

Je to analytická metoda, která funguje na principu stanovení dusíku v bílkovinách. V běžných klinických laboratořích se tato metoda nevyužívá, protože je náročná a pro rutinní stanovení zdlouhavá. V této metodě se nejprve stanoví celkový dusík ve vzorku. Následně se bílkoviny vysráží kyselinou trichloroctovou a ze supernatantu jsou odebrány dusíkaté látky nebílkovinné povahy. Organický dusík se převede působením kyseliny sírové na síran amonný. Do reakce se přidává ještě katalyzátor (síran měďnatý), který urychluje reakci. Zároveň celá reakce probíhá za velmi vysoké teploty (340–360 °C). Tento proces se nazývá mineralizace. Následnou alkalizací je ze síranu amonného uvolněn amoniak, který se poté vydestiluje a jeho koncentrace se stanoví titrací. [7, 39, 45]

2.3.4 Metoda dle Bradfordové

Reakce funguje na principu nekovalentní vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (viz Obrázek 10) na proteiny v kyselém prostředí. Díky interakci dochází ke vzniku modrého

komplexu, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná množství proteinu ve stanovovaném vzorku. Vazba způsobí posun absorpčního maxima z 465 nm na 595 nm. Barevný komplex vzniká do dvou minut po přidání Coomassie Brilliant Blue G-250 ke vzorku a je stabilní zhruba hodinu při pokojové teplotě. Výhodou metody dle Bradfordové je tedy rychlost stanovení a vysoká citlivost. [41, 44]



Obrázek 11 Coomassie Brilliant Blue G-250 [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

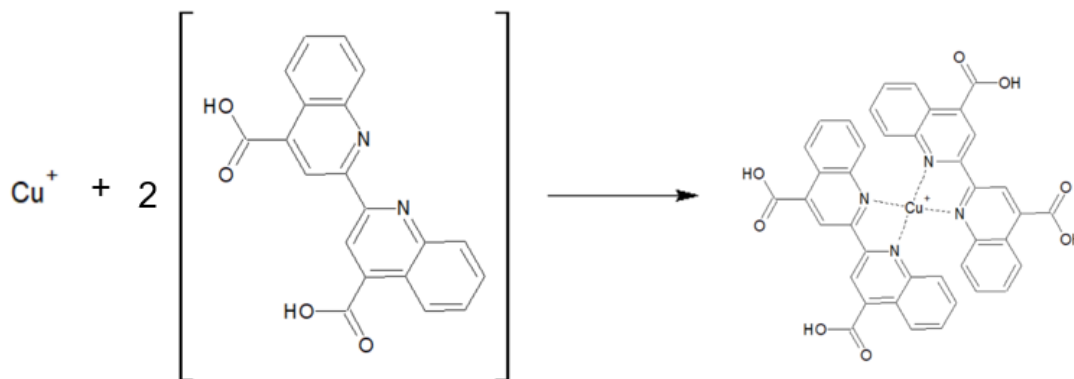
2.3.5 Pierce 660 nm

Tato metoda patří k novějším metodám stanovování koncentrace bílkovin. Je to rychlá a citlivá metoda, která není rušena detergenty ani jinými činidly. Funguje na principu vazby přechodného kovu s komplexem polyhydroxybenzensulfonftaleinového barviva v kyselém prostředí. Tato vazba způsobí posun absorpčního maxima z 450 nm na 660 nm. Samotné zbarvení komplexu barviva s kovem je červenohnědé. Po vazbě na bílkovinu komplex zezelená. Takto zbarvený roztok vydrží stabilní zhruba hodinu při pokojové teplotě. Změna barvy komplexu je způsobená deprotonací barviva při nízkém pH, to usnadní interakci mezi proteinem se kladně nabitými aminokyselinami a záporně nabitým komplexem barvivo-kov. [46]

2.3.6 BCA metoda

Princip metody spočívá v reakci měďnatých iontů s peptidovými vazbami analyzovaných proteinů. Následně dojde k alkalické redukci měďnatých iontů na měďné, které poté reagují

s kyselinou bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku fialového komplexu (viz Obrázek 11), který je spektrofotometricky proměřován při vlnové délce 562 nm. Volná BCA má zelenou barvu. [41]

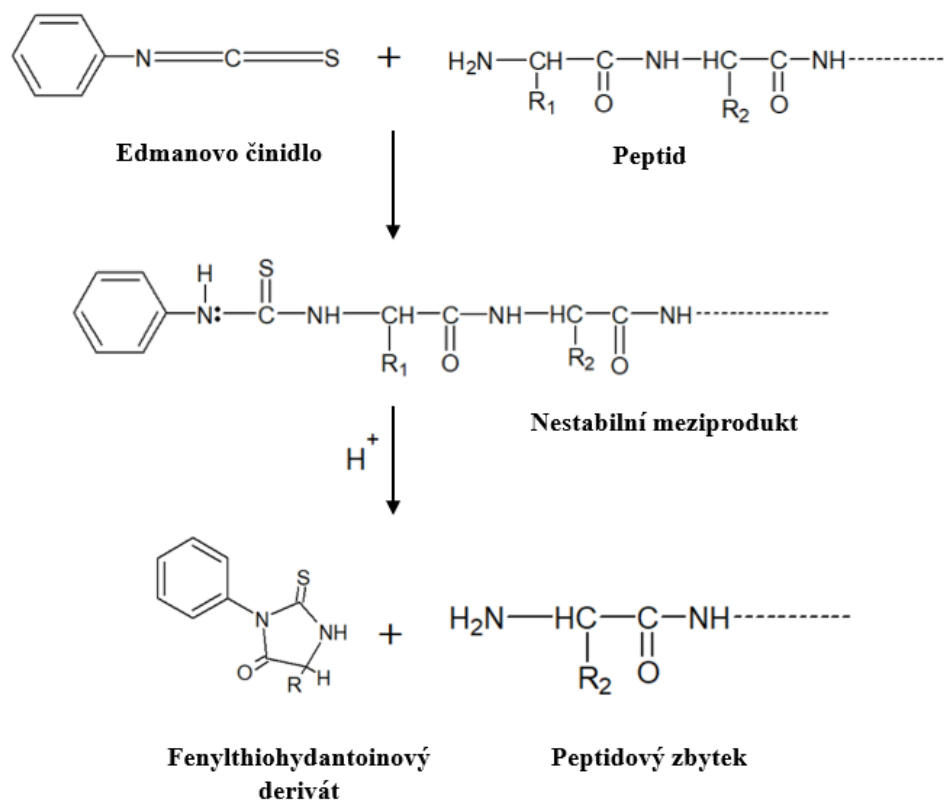


Obrázek 11 Schematické znázornění BCA metody [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

2.4 Stanovení struktury bílkovin

2.4.1 Edmanovo odbourávání

Jedná se o metodu, která slouží k sekvenování aminokyselin v proteinu. Funguje na principu postupného odštěpování jednotlivých aminokyselin z N-konce peptidu. První aminokyselina z N-konce peptidového řetězce reaguje s fenylisothiokyanátem (Edmanovo činidlo; PITC) za vzniku nestabilního thiazolinu, který je následně převáděn na fenylthiohydantoinový derivát (PTH) v prostředí bezkyslíkaté kyseliny, který může být následně identifikován například pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo pomocí chromatografie na tenké vrstvě (viz Obrázek 12). Protože je zbylý peptid nedotčen, může se postup opakovat do té doby, než bude osekvenován celý peptid. Vzhledem k tomu, že stanovujeme přesné pořadí aminokyselin v řetězci, určujeme tedy primární strukturu peptidu. Doba analýzy jedné aminokyseliny trvá zhruba 40 minut. Reakci je komplikované provést, například pokud je N-konec peptidu acetylován. [41, 47–49]



Obrázek 12 Schematické znázornění Edmanova odbourávání [obrázek byl vytvořen pomocí programu ChemSketch]

2.4.2 Rentgenová krystalografie

Rentgenová krystalografie patří mezi hlavní metody využívané pro stanovení molekulární a krystalové struktury krystalických materiálů přírodního i syntetického původu. Cílem této metody je získat trojrozměrnou molekulární strukturu z krystalu. Ke stanovení je tedy potřeba mít čistý vzorek stanovované makromolekuly o vysoké koncentraci, který poskytne kvalitní a homogenní krystal. Důležitá je i velikost vzniklého krystalu, která by měla být minimálně 0,1 mm, aby krystal poskytl dostatečně velkou krystalovou mřížku, která je poté vystavena rentgenovému paprsku. Vznik a charakter krystalů můžeme ovlivnit například volbou precipitační látky, její koncentrací, hodnotou pH, teploty nebo použitou krystalizační technikou. Před samotnou analýzou je možné ověřit čistotu krystalu elektroforézou. [50, 51]

Cílem rentgenové strukturní analýzy je získat kompletní krystalovou strukturu. Krystalová struktura je periodicky se opakující atomový motiv v trojrozměrně uspořádaném ideálním

krystalu. Ke stanovení krystalové struktury potřebujeme určit atomové parametry (určit souřadnice a parametry teplotních pohybů všech atomů v buňce), mřížkové parametry a prostorovou grupu symetrie. [52]

K určení krystalové struktury je nejprve potřeba krystal ozářit monochromatickým rentgenovým svazkem. Rentgenové paprsky mohou být generovány buď ze zrychlujících se elektronů (synchrotronový rentgenový svazek) nebo z elektronů narážejících na měděnou anodu (generátory rentgenového záření). Pro proteinové struktury je lepší využít první možnost generování rentgenových svazků. Vybudí totiž více měřitelných difrakcí a získané soubory difrakčních dat jsou poté kvalitnější. Jednotlivé paprsky musí poté být soustředěny stejným směrem pomocí nastavitelných štěrbin. Pouze zlomek energie vyvolané elektrony se přemění na rentgenové záření. Zbytek energie se rozptýlí ve formě tepla. Krystaly mohou být poté působením tohoto tepla nebo tvorbou volných radikálů poškozeny, proto je v systému přítomný ještě dusík, který celý systém ochlazuje. Primární (dopadající) rentgenový svazek se rozptýlí na elektronech měřeného krystalu a tím vzniká sekundární (difraktované) záření. Tento jev popisuje Braggova interpretace. Ta popisuje tento jev jako difrakci primárního svazku na rovinách, které lze prokládat krystalovou strukturou. Difrakční roviny krystalu se rozlišují hodnotami Millerových indexů, kdy každé umístění elektronu může být definováno třemi indexy – h , k a l . [50, 52, 53]

Ke stanovení výsledné atomové struktury lze využít prolínání vln, které jsou rozptýleny jednotlivými atomy v krystalu. Protože neexistují čočky, které by zvládly zaostřit rozptýlené rentgenové záření, zajímají nás intenzity rozptýlených vln (pro stanovení pozic atomů a jejich teplotních parametrů) a jejich úhly (pro určení rozměrů elementární buňky). Intenzita je v každém difraktovaném bodě určena amplitudou difraktovaných vln a fázovým rozdílem vyjádřeným jako úhel mezi nimi. Amplitudy jsou vypočítány pomocí různých počítačových programů. Zároveň mohou difrakce systematicky vyhasínat. Z tohoto vyhasínání se následně stanoví již zmiňovaná prostorová grupa symetrie. Pro upřesnění pozice atomů je potřeba vypočítat mapu distribuce elektronové hustoty asymetrické části elementární buňky. Pro výpočet těchto map je kromě intenzity difrakčních obrazců ještě potřeba znát fázové úhly difraktovaných paprsků. Tyto údaje ale nelze získat z experimentu. Pro zjištění správného modelu struktury je důležitější znát fázové úhly než intenzitu difrakčních obrazců. Prvotní neznalost hodnot fází se nazývá fázový problém. V proteinové krystalografii se využívají tři skupiny metod, které pomůžou blíže určit fázi. První skupina metod nese souhrnný název „metody molekulového nahrazení“. Tyto metody jsou založené na porovnávání Pattersonovy

funkce (funkce meziatomových vektorů). Druhou skupinou jsou experimentální metody, kam řadíme například metodu využívající anomální rozptyl, jehož míra závisí na velikosti atomu a použité vlnové délce dopadajícího rentgenového svazku. Do poslední skupiny patří přímé metody stanovení fází, které jsou založené na statistických metodách. Bez ohledu na to, která metoda pro řešení fázového problému byla použita, se všechny metody potýkají s komplikací, že fázové hodnoty jsou pouze odhady a mají tím pádem větší náchylnost k chybovosti. [52, 53]

Původní detektory difrakčních obrazců byly filmové. V novějších dobách jsou rentgenové difrakční snímky zaznamenávány na zobrazovací destičky, ze kterých se po působení paprsků odečte digitalizovaný obraz. Tyto destičky jsou dnes již nahrazovány detektory s technologií CCD (charged coupled device), které mají kratší dobu čtení. To je výhodou, protože působením rentgenového záření dochází k zahřívání a tvorbě volných radikálů, což poškozuje analyzované krystaly. Ke zpracování pořízených dat se využívají počítačové programy. [50]

2.4.3 Nukleární magnetická rezonance

Každý atom má jádro složené z protonů a neutronů, souhrnně je nazýváme jako nukleony. Tyto elementární částice jsou neustále v rotačním pohybu, který označujeme jako vnitřní moment hybnosti neboli spin. Moment hybnosti spinu je popsán kvantovým spinovým číslem I a může nabývat celočíselných nebo poločíselných hodnot. Všechna jádra mají kladný náboj. Díky kladnému náboji a rotačnímu pohybu kolem sebe protony vytváří magnetické pole. [41]

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je tedy fyzikálně chemická metoda zabývající se interakcí atomových jader s magnetickým polem. Je důležité zmínit, že pro NMR stanovení je potřeba, aby atomové jádro mělo lichý počet nukleonů, tedy aby mělo nenulový spin. V opačném případě nelze atomová jádra pomocí NMR zobrazit. Proto se pro analýzu využívají například jádra ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F a ^{31}P . Metoda spočívá v umístění rotujícího atomového jádra do statického magnetického pole označovaného jako B_0 . Magnetická pole protonů, která byla do této doby náhodně orientována, se v tomto prostředí budou nyní orientovat buď paralelně (ve směru) nebo antiparalelně (proti směru) vůči statickému magnetickému poli. Větší množství protonů bude podléhat paralelnímu uspořádání, protože je méně energeticky náročné, tedy pro jádro výhodnější. Změna orientace magnetických polí protonů je označována jako precese jader. Frekvence tohoto pohybu je pro každý atom charakteristická a nazývá se Larmorova frekvence. V tomto momentu je do vzorku dodávána energie ve formě radiofrekvenčních impulzů (ve frekvenci stejné jako Larmorova frekvence).

Tato energie zajistí vyexcitování atomových jader do vyšších energetických hladin. Tento jev je známý pod pojmem rezonance. Po skončení působení radiofrekvenčních impulzů se atomová jádra vracejí zpátky do základního energetického stavu. Současně s tím je uvolňována energie ve formě elektromagnetické vlnění ve frekvenci, která je charakteristická pro každý atom. Výsledkem NMR analýzy jsou grafy, do kterých je zaznamenáván výsledný uvolňovaný signál. [41, 54, 55]

NMR přístroje měří energetické rozdíly mezi spinovými stavy. V současné době přístroje udržují konstantní radiovou frekvenci a vyvolávají malé změny v magnetickém poli, dokud není dosaženo bodu rezonance. Tento bod je důležitý pro získání informací o struktuře vzorku. Zároveň je důležité získat z měření informace o chemických posuvech jader, které určují spektrální polohu rezonance vzhledem ke standardnímu signálu, a o spin-spin interakci, při které dochází ke štěpení NMR signálu interakcemi mezi sousedními protony, což nám pomáhá určit polohu protonů. [41, 54, 55]

Dříve byla tato analýza využívána pouze pro určení struktur jednodušších a menších molekul. Grafy tedy stačilo uvádět pouze v jednorozměrném rozlišení. S příchodem nové počítačové techniky a lepšího přístrojového vybavení bylo možné začít stanovovat i složitější látky jako například proteiny. Výsledná spektra těchto makromolekul v jednorozměrném rozlišení ale byla přeplněná, píky se překrývaly a nebylo možné dostatečně kvalitně určit strukturu. Z tohoto důvodu se dnes využívá dvou až čtyř rozměrných rozlišení, při kterých jsou výsledné píky rozloženy do více os, což zlepšuje celkové rozlišení. Takto vzniklá spektra jsou následně porovnávána s databázemi. Výhodou NMR analýzy je, že lze látky pozorovat v prostředí, které je velmi podobné prostředí živé buňky. Další výhodou je, že lze analyzovat i nekrystalizující vzorky. Naopak nevýhodou je, že ke stanovení je potřeba mít vzorek v poměrně vysoké koncentraci. [41, 54, 55]

2.4.4 Kryoelektronová mikroskopie

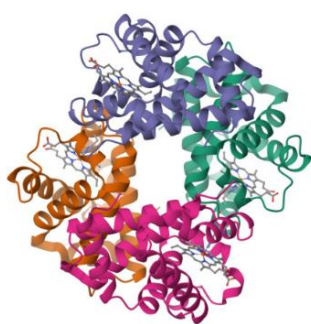
Kryoelektronová mikroskopie je metoda sloužící k určování struktury látek (například proteinů) na atomární úrovni. Jedná se o modifikaci klasické elektronové mikroskopie. Obecně jsou v elektronové mikroskopii jako zdroj záření elektrony emitované zdrojem a urychlené napětím. Zdroj je umístěn ve vysokém vakuu. Rozptýlené elektrony jsou po průchodu vzorkem zaostřeny elektromagnetickými čočkami mikroskopu. Výhoda elektronového mikroskopu oproti klasickému světelnému spočívá v lepším rozlišení, což je dáno možností sledování v širším spektru vlnových délek. [56–58]

V průběhu let analyzování organických makromolekul se ukázalo, že vysoké dávky elektronů poškozují vnitřní struktury stanovovaných látek, což je způsobeno interakcí elektronů s organickou molekulou. Prvním řešením tohoto problému bylo snížení elektronové dávky, což se ukázalo jako neefektivní, protože výsledné záznamy vykazovaly velké množství nežádoucích šumů. Dalším řešením tohoto problému bylo využívání takzvaného negativního barvení, které spočívá v aplikaci barviva s obsahem těžkých kovů (molybdenan amonný, octan uranylu) na vzorek. Tento proces účinně dehydratuje vzorek, který poté může být skladován při pokojové teplotě. Tento způsob úpravy vzorku sebou nese řadu nevýhod. Jednou z nich je ta, že těžké kovy obklopují molekuly vzorku a vytváří tedy pouze obrys stanovované molekuly. Informace o vnitřní struktuře molekul jsou tedy nenávratně ztraceny. Další nevýhodou je postupné zplošťování analyzovaných objektů. To je způsobeno postupným vysušováním vzorku. Ukázalo se, že ideálním řešením problému interakce elektronů s organickými látkami je využití kryoelektronové mikroskopie. V podstatě se jedná o zobrazování struktur pomocí zmrazených vzorků udržovaných při teplotách kapalného dusíku. [56–59]

Analyzovaný vzorek je nejprve přečištěn například pomocí SDS–PAGE nebo nějaké chromatografické metody. Poté je aplikován do otvorů na speciální mřížce. Otvory jsou vyplněny uhlíkatým nebo zlatým nosným filmem. Přebytečný vzorek se odstraní filtračním papírem. Následuje proces vitrifikace, který spočívá v rychlém zmrazení vzorku. Voda ztuhne do skelného stavu bez toho, aby se vzniklý led krystalizoval, což by způsobilo narušení nativní buněčné architektury. Mřížka s naneseným vzorkem se ponoří do kryogenu, což obvykle bývá kapalný ethan. Vitrifikované mřížky je nutné udržovat pomocí chlazení kapalným dusíkem, takže sklovitý led nemůže rekrystalizovat. Zmražené vzorky jsou poté vysušeny, fixovány zality do plastu a vytvrzeny do podoby bloku, který se pomocí diamantového nože nařeže na menší části, které jsou následně obarveny. Vzorek by měl být dostatečně tenký (kolem 0,5 μm), aby jím dopadající elektronový paprsek prošel. Následuje sběr dat s vysokým rozlišením, které se provádí na výkonném poloautomatickém analyzátoru. V zásadě existují dvě možnosti vyhodnocování nasbíraných dat. První možností je kryoelektronová tomografie. Při vyhodnocení je pořizována série snímků. Každý snímek je pořízen s jiným sklonem paprsku vzhledem ke směru dopadajícího elektronového paprsku. Získané snímky jsou poté promítnuty do trojrozměrné struktury. Tato metoda vyhodnocení se používá zejména v buněčné biologii. Problémem tomografie bývá často malé rozlišení, které nestačí pro popis molekulární struktury. Nicméně tento problém lze vyřešit. V případě že

existuje více kopií sledované struktury, je možné zlepšit konečné rozlišení zprůměrováním více tomogramů. Velké využití má tomografie při sledování strukturních studií virových povrchových proteinů, které špatně krystalizují. Jedná se například o obalové glykoproteiny HIV, kdy znalost struktury napomáhá objasnit mechanismy vstupu viru do buňky. Druhou možností vyhodnocení nasbíraných dat je jednočásticová analýza. Při této technice jsou data z velkého počtu nasbíraných dvourozměrných snímků (obsahující identické kopie) kombinována tak, aby byla složena trojrozměrná rekonstrukce stanovované látky. Při analýze jsou pomocí počítačových programů pořízeny snímky jednotlivých polí podle určitých charakteristik. Tyto snímky jsou následně porovnávány s databází. Kryoelektronová mikroskopie vyplňuje mezeru analýzy malých proteinových souborů, které nelze studovat pomocí NMR ani rentgenové krystalografie. [56–59]

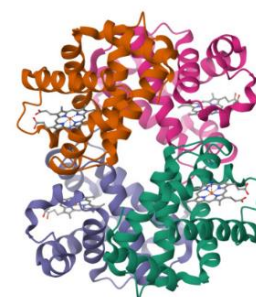
Jednou z nejvýznamnějších databází proteinových trojrozměrných struktur je Protein Data Bank (PDB). PDB je americké datové centrum trojrozměrných strukturních dat pro biologické makromolekuly, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Znalost trojrozměrné struktury biologické makromolekuly je zásadní pro pochopení její role v organismu. Pro příklad jsem z této databáze vybrala molekulu hemoglobinu zobrazenou pomocí rentgenové krystalografie, NMR a kryoelektronové mikroskopie (viz Obrázek 13). [60]



Rentgenová krystalografie



NMR



Kryoelektronová mikroskopie

Obrázek 13 Příklad zobrazení molekuly hemoglobinu pomocí rentgenové krystalografie, NMR a kryoelektronové mikroskopie [60]

2.4.5 Cirkulární dichroismus

Rovinné polarizované světlo je vytvořeno ze dvou kruhově polarizovaných složek stejné velikosti. Jedna z těchto složek se otáčí proti směru hodinových ručiček (levotočivá složka) a druhé se otáčí ve směru hodinových ručiček (pravotočivá složka). Cirkulární dichroismus

(CD) tedy funguje na principu rozdílné absorpce levotočivého a pravotočivého polarizovaného záření. Rozdíly v absorbancích jsou velmi malé (kolem 3×10^{-4}). Proto lze spektra hodnotit pouze kvalitativně. Aby látka mohla stáčet rovinu polarizovaného světla, musí být opticky aktivní (chirální). Za absorpci tohoto polarizovaného záření jsou zodpovědné chromofory. Pokud při průchodu vzorkem levotočivá a pravotočivá složka neabsorbují ve stejném rozsahu, tak výsledné záření má eliptickou polarizaci. V případě, že by obě složky při průchodu vzorkem neabsorbovaly vůbec nebo by absorbovaly ve stejném rozsahu, záření by bylo polarizováno v původní rovině. [61–63]

Cirkulárním dichroismem lze o proteinu získat informace o jejich sekundární a terciární struktuře, případně o nějakých konformačních změnách. Při určování sekundární struktury se využívá přítomnosti peptidových vazeb, které fungují jako chromofory při absorbanci menší než 240 nm. Stanovení vychází ze znalosti, že rozdílné typy sekundárních struktur vykazují rozdílná CD spektra v oblasti vzdáleného UV záření (180–240 nm). Abychom mohli spolehlivě analyzovat sekundární strukturu, je potřeba vycházet z údajů z širšího spektra vlnových délek. Naopak určování terciární struktury se provádí v blízké oblasti UV záření (260–320 nm). Jako chromofory se v této oblasti využívají aminokyseliny s aromatickým bočním řetězcem (tyrosin, tryptofan, fenylalanin). Tvar a velikost výsledného záznamu závisí na počtu a prostorovém rozmístění jednotlivých typů aromatických aminokyselin v proteinu, protože každá z nich má tendenci mít charakteristický profil v závislosti na absorpci při různých vlnových délkách. Například tryptofan má ve výsledném záznamu pík blízko vlnové délky 290 nm. Při analýze je potřeba znát přesnou koncentraci bílkoviny ve vzorku, aby spektropolarimetr mohl být správně nastaven a kalibrován. [61]

Cirkulární dichroismus se stanovuje pomocí přístrojů nazývaných spektropolarimetry. Výsledek CD analýzy se udává buď jako rozdíl absorbancí levotočivé a pravotočivé cirkulárně polarizované složky ($\Delta A = A_L - A_D$) nebo jako elipticita (h) ve stupních. Existuje několik metod, kterými lze CD efekt na spektropolarimetru změřit. Tou nejvyužívanější je modulace, při které dopadající světlo plynule přepíná mezi složkami levotočivými a pravotočivými. Složky jsou od sebe rozděleny průchodem přes modulátor, který se skládá z piezoelektrického křemenného krystalu a tenké desky vyrobené z izotropního materiálu (například tavný oxid křemičitý). Modulátor je umístěn ve střídavém elektrickém poli, které vyvolá strukturní změny v křemenném krystalu. Deska propouští kruhově polarizované světlo, které je postupně detekováno fotonásobičem. Druhou možností je přímé odečítání, kdy jsou absorbance obou složek měřené odděleně a následně se od sebe odečítají. Poslední

možností je metoda elipsometrická, při které se měří elipticita vysílaného záření. Oproti rentgenové krystalografii a NMR má CD menší rozlišení struktury (neumí stanovovat strukturu na atomární úrovni). Přesto se ale CD využívá častěji, protože je méně časově náročná a zároveň ani požadavky na úpravu vzorku před analýzou nejsou tak vysoké. [61, 62]

V současné době se k analýze nejčastěji využívají proteiny vyrobené pomocí nadměrné exprese genu kódující protein. Využívají se k tomu systémy jako například *E. coli*, nižší eukaryota (kvasinky) nebo hmyzí buňky. Výběr hostitelského systému je dán zejména velikostí vyráběného polypeptidu. Je potřeba vybrat hostitele tak, aby i následné posttranslační úpravy byly správně provedené. Požadavky na analyzovaný protein jsou poměrně vysoké. Je potřeba aby protein vykazoval alespoň 95% čistotu. To lze ověřit například pomocí SDS-PAGE. Protein by také měl obsahovat co nejméně nukleových kyselin. V opačném případě je nutné protein nejprve přechistit. Dalším požadavkem je, že proteinový roztok by měl být čirý bez nerozpustných sraženin, které by ovlivnily rozptyl světla. Případné sraženiny lze odstranit pomocí ultracentrifugace nebo přefiltrováním vzorku. [61]

Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout a zjednodušit informace týkající se bílkovin. V první části práce jsem popsala zejména složení, stavbu a obecnou strukturu bílkovin. V dalších částech práce jsem se zaměřila na spektrofotometrické metody stanovení koncentrace bílkovin v biologických materiálech a na metody strukturní analýzy bílkovin. U každé metody jsem popsala její princip, postup a možnosti využití. Spektrofotometrické metody obecně využívají reakce proteinu se specifickým činidlem za vzniku barevného komplexu, který je následně spektrofotometricky proměřován. Nejvyužívanější spektrofotometrickou metodou je biuretová metoda, která je dokonce uváděna jako referenční metoda. Stanovení struktury proteinu je důležité k porozumění jeho biologickým funkcím a jeho chování v organismu. Zároveň je znalost struktury proteinu klíčová ve farmaceutickém průmyslu při vývoji léčiv, kdy je potřeba sledovat vazbu léků na specifické proteiny a sledovat jejich účinnost. Ke stanovení struktury se standardně využívají metody jako rentgenová krystalografie využívající rentgenových svazků k ozáření zkrystalizovaných vzorků, nukleární magnetická rezonance, která funguje na principu interakce atomových jader s magnetickým polem nebo například kryoelektronová mikroskopie využívající nízkých teplot ke stabilizaci zkoumaných makromolekul. Stanovení proteinů má význam v mnoha dalších oblastech života. Jejich stanovení je důležité například k diagnostice některých metabolických onemocnění, jejichž přítomnost lze odhalit několik hodin po narození pomocí novorozeneckého screeningu.

Zdroje

- [1] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [2] RACEK, Jaroslav a Daniel RAJDL, ed. *Clinical Biochemistry* [online]. Karolinum Press, 2016 [cit. 2023-04-20]. ISBN 9788024634975. Dostupné z: doi:10.14712/9788024634975.
- [3] ČERVINKA, Ctirad a Michal FULEM. Cohesive properties of the crystalline phases of twenty proteinogenic α -aminoacids from first-principles calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2019, 21(34), 18501-18515 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/C9CP03102B.
- [4] YANG, Zheng, Yonggang ZUO, Linqing DAI, Libo ZHANG, Yusen YU a Liang ZHOU. Effect of ultrasonic-induced selenium crystallization behavior during selenium reduction. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2023, 95 [cit. 2023-04-08]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2023.106392.
- [5] CHUNG, Christina a Natalie KRAHN. The selenocysteine toolbox: A guide to studying the 21st amino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2022, 730 [cit. 2023-04-08]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2022.109421.
- [6] YANG, Zheng, Yonggang ZUO, Linqing DAI, Libo ZHANG, Yusen YU a Liang ZHOU. Effect of ultrasonic-induced selenium crystallization behavior during selenium reduction. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2023, 95 [cit. 2023-04-08]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2023.106392.
- [7] BISHOP, Michael, Edward FODY a Larry SCHOEFF, ed. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2010. ISBN 978-1-4511-0900-9.

- [8] RONDANELLI, Mariangela, Francesco PORTA, Clara GASPARRI et al. A food pyramid for adult patients with phenylketonuria and a systematic review on the current evidences regarding the optimal dietary treatment of adult patients with PKU. *Clinical Nutrition* [online]. 2023, **42**(5), 732-763 [cit. 2023-04-08]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1016/j.clnu.2023.03.007.
- [9] HAMA-KARIM, Diar, Yad OTHMAN, Zryan MAJEED, Razhan ALI, Arian MOHAMMED a Han MUHAMAD. Intracardiac amorphous tumor presenting in a patient with homocystinuria; a case report with literature review. *Radiology Case Reports* [online]. 2023, **18**(3), 1337-1341 [cit. 2023-04-19]. ISSN 19300433. Dostupné z: doi:10.1016/j.radcr.2022.12.040.
- [10] SULIMAN, Aasir, Mohamed ALAMIN a Maha HAMZA. Tracheobronchomegaly (Mounier-Kuhn syndrome) and Bronchiectasis as rare manifestations of Homocystinuria. *Respiratory Medicine Case Reports* [online]. 2023, **42** [cit. 2023-04-19]. ISSN 22130071. Dostupné z: doi:10.1016/j.rmcr.2023.101808.
- [11] SHERA, TahleelAltaf, NaseerAhmed CHOH, FaizAltaf SHERA a AzherMaqbool KHAN. Homocystinuria presenting as a calcified right atrial mass. *Annals of Pediatric Cardiology* [online]. 2018, **11**(2) [cit. 2023-04-19]. ISSN 0974-2069. Dostupné z: doi:10.4103/apc.APC_174_17.
- [12] TABBOUCHE, Omar, Amer SAKER a Harry MOUNTAIN. Identification of three novel mutations by studying the molecular genetics of Maple Syrup Urine Disease (MSUD) in the Lebanese population. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2014, **1**, 273-279 [cit. 2023-04-19]. ISSN 22144269. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgmr.2014.03.005.
- [13] DOUGLAS, Teresa, L. NEWBY, Julie ECKSTRAND, Douglas WIXTED a Rani SINGH. Lipid changes in the metabolome of a single case study with maple syrup urine disease (MSUD) after five days of improved diet adherence of controlled branched-chain amino acids (BCAA). *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2020, **25** [cit. 2023-04-19]. ISSN 22144269. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgmr.2020.100651.

- [14] Pediatrie pro praxi. Solen, 2013, , 60-62 s. ISSN 1803-5264. Dostupné také z: <https://www.pediatriepropraxi.cz/magno/ped/2013/mn1.php>.
- [15] Pediatrie pro praxi. Solen, 2022, , 80-81 s. ISSN 1803-5264. Dostupné také z: <https://www.pediatriepropraxi.cz/magno/ped/2022/mn1.php>.
- [16] DEKIMPE, Sofie a Joleen MASSCHELEIN. Beyond peptide bond formation: the versatile role of condensation domains in natural product biosynthesis. Natural Product Reports [online]. 2021, 38(10), 1910-1937 [cit. 2023-06-14]. ISSN 0265-0568. Dostupné z: doi:10.1039/D0NP00098A.
- [17] KIM, Dong-in, Seong-jae HAN a Yong-beom LIM. Unique behaviour of the α -helix in bending deformation. Chemical Communications [online]. 2022, 58(27), 4368-4371 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi:10.1039/D2CC00008C.
- [18] DOLEŽEL, Zdeněk a Jiří ŠTARHA. Abnormální nálezy v moči - proteinurie a hematurie [online]. 2003, [cit. 2023-04-19]. ISSN 1213-0494.
- [19] AITEKENOV, Sultan, Alisher SULTANGAZIYEV, Aisha ILYAS, Aigerim DYUSSUPOVA, Aigerim BORANOVA, Abduzhappar GAIPOV a Rostislav BUKASOV. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for protein determination in human urine. Sensing and Bio-Sensing Research [online]. 2022, 38 [cit. 2023-01-24]. ISSN 22141804. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbsr.2022.100535.
- [20] BÖKENKAMP, Arend. Proteinuria—take a closer look!. Pediatric Nephrology [online]. 2020, 35(4), 533-541 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0931-041X. Dostupné z: doi:10.1007/s00467-019-04454-w.
- [21] RACEK, Jaroslav. Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- [22] GREEN, Sol. Improving the Preanalytical Process: The Focus on Specimen Quality. Journal of Medical Biochemistry [online]. 2008, 27(3), 343-347 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1452-8266. Dostupné z: doi:10.2478/v10011-008-0013-4.

- [23] VIGNOLI, Alessia, Leonardo TENORI, Cristina MORSIANI, Paola TURANO, Miriam CAPRI a Claudio LUCHINAT. Serum or Plasma (and Which Plasma), That Is the Question. *Journal of Proteome Research* [online]. 2022, 21(4), 1061-1072 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.1c00935.
- [24] O'CONNELL, Theodore, Timothy HORITA a Barsam KASRAVI. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *American family physician*. 2005, 71(1), 105-112.
- [25] HUTAPEA, Tri, Kartika MADURANI, Muhammad SYAHPUTRA, Moh. HUDHA, Andi ASRIANA, SUPRAPTO a Fredy KURNIAWAN. Albumin: Source, preparation, determination, applications, and prospects. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* [online]. 2023, 8(2) [cit. 2023-04-20]. ISSN 24682179. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsamd.2023.100549.
- [26] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [27] KEREN, David. *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis* [online]. CRC Press, 2003 [cit. 2023-04-20]. ISBN 9780429072918. Dostupné z: doi:10.1201/b13302.
- [28] STITES, Daniel a Abba TERR. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994. ISBN 80-85605-37-6.
- [29] LAMPREAVE, Fermín a Maria ALAVA. ELECTROPHORESIS | Immuno-electrophoresis. In: *Encyclopedia of Separation Science* [online]. Elsevier, 2000, s. 1257-1263 [cit. 2023-06-15]. ISBN 9780122267703.
- [30] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-7262-201-3.

- [31] BHIMWAL, Rijul, Richard RUSTANDI, Anne PAYNE a Mohamed DAWOD. Recent advances in capillary gel electrophoresis for the analysis of proteins. *Journal of Chromatography A* [online]. 2022, 1682 [cit. 2023-04-20]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2022.463453.
- [32] ETCHEPARE CASSOL, José, Rogério SCOLARI a Rafael MORESCO. Impact of albumin carbamylation on immunoturbidimetric measurement of urinary albumin. *Analytical Biochemistry* [online]. 2021, 614 [cit. 2023-05-20]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.114047.
- [33] AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, 72, 4-15 [cit. 2023-05-20]. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- [34] ELISA principle [online]. California, USA: Boster Bio, 1993 [cit. 2023-05-20]. Dostupné z: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>.
- [35] THOMPSON, Joel a David LAMBERT. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *British Journal of Anaesthesia* [online]. 2014, 112(2), 213-216 [cit. 2023-05-20]. ISSN 00070912. Dostupné z: doi:10.1093/bja/aet293.
- [36] LOWENSTEIN, Jerold, Joshua REUTHER, Darden HOOD, Gary SCHEUENSTUHL, S. GERLACH a Douglas UBELAKER. Identification of animal species by protein radioimmunoassay of bone fragments and bloodstained stone tools. *Forensic Science International* [online]. 2006, 159(2-3), 182-188 [cit. 2023-05-20]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2005.08.007.
- [37] POTTER, Ben, Joshua REUTHER, Jerold LOWENSTEIN a Gary SCHEUENSTUHL. Assessing the reliability of pRIA for identifying ancient proteins from archaeological contexts. *Journal of Archaeological Science* [online]. 2010, 37(5), 910-918 [cit. 2023-05-20]. ISSN 03054403. Dostupné z: doi:10.1016/j.jas.2009.11.024.

- [38] JAIN, Sachin, Vidhi GAUTAM a Sania NASEEM. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 2011, 3(1), 118–127 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.76489.
- [39] ZHANG, Weidong, Ying ZHANG, Ruya WANG, Pan ZHANG, Yanyan ZHANG, Edward RANDELL, Mengyuan ZHANG a Qiong JIA. A review: Development and application of surface molecularly imprinted polymers toward amino acids, peptides, and proteins. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2022, 1234 [cit. 2023-06-14]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2022.340319.
- [40] HOKAZONO, Eisaku, Eri OTA, Taiki GOTO, Saori FUKUMOTO, Yuzo KAYAMORI, Takeshi UCHIUMI a Susumu OSAWA. Development of a protein assay with copper chelator chromeazurol B, based on the biuret reaction. *Analytical Biochemistry* [online]. 2021, 630 [cit. 2023-06-01]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2021.114320.
- [41] BOYER, Rodney F. *Biochemistry laboratory: modern theory and techniques*. San Francisco: Benjamin/Cummings, 2006. ISBN 0-8053-4613-9.
- [42] BLAINSKI, Andressa, Gisely LOPES a João DE MELLO. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* [online]. 2013, 18(6), 6852-6865 [cit. 2023-06-02]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules18066852.
- [43] RAMIREZ-SANCHEZ, Israel, Lisandro MAYA, Guillermo CEBALLOS a Francisco VILLARREAL. Fluorescent detection of (–)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin–Ciocalteu method. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2010, 23(8), 790-793 [cit. 2023-06-02]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2010.03.014.

- [44] REDMILE-GORDON, Marc, Elena ARMENISE, Rodger Paul WHITE, Penny HIRSCH a Keith GOULDING. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2013, 67, 166-173 [cit. 2023-06-02]. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.017.
- [45] WALLACE, Jean a Patrick FOX. Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chemistry* [online]. 1998, 62(2), 217-224 [cit. 2023-05-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(97)00162-3.
- [46] ANTHARAVALLY, Babu, Krishna MALLIA, Priya RANGARAJ, Paul HANEY a Peter BELL. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry* [online]. 2009, 385(2), 342-345 [cit. 2023-06-02]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2008.11.024.
- [47] EDMAN, Pehr a Geoffrey BEGG. A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1967, 1(1), 80-91 [cit. 2023-06-08]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1967.tb00047.x.
- [48] EDMAN, Pehr, Erik HÖGFELDT, Lars SILLÉN a Per-Olof KINELL. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica* [online]. 1950, 4, 283-293 [cit. 2023-06-08]. ISSN 0904-213X. Dostupné z: doi:10.3891/acta.chem.scand.04-0283.
- [49] BOUCHAL, Pavel a Igor KUČERA. Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: Principy a aplikace. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2003, (1), 29-36. ISSN 0009-2770.
- [50] SMYTH, Michael X Ray crystallography. *Molecular Pathology* [online]. 53(1), 8-14 [cit. 2023-04-19]. ISSN 13668714. Dostupné z: doi:10.1136/mp.53.1.8.

- [51] POPOVIĆ, Stanko a Željko SKOKO. X-ray diffraction broadening analysis. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering [online]. 2015, (34), 39-49 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1857-5625. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/281690615_X-ray_diffraction_broadening_analysis/fulltext/5777d9e108ae4645d6100e4b/X-ray-diffraction-broadening-analysis.pdf.
- [52] KRATOCHVÍL, Bohumil, Michal HUŠÁK, Jiří BRYNDA a Juraj SEDLÁČEK. Co nabízí současná RTG strukturní analýza?. Chemické listy. 2008, 102, 889-901.
- [53] PARKER, Michael Protein Structure from X-Ray Diffraction. Journal of Biological Physics. 2003, 29, 341-362.
- [54] COBAS, Carlos, Michael BERNSTEIN, Manuel MARTÍN-PASTOR a Pablo García TAHOCES. A new general-purpose fully automatic baseline-correction procedure for 1D and 2D NMR data. Journal of Magnetic Resonance [online]. 2006, 183(1), 145-151 [cit. 2023-06-15]. ISSN 10907807. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmr.2006.07.013.
- [55] HELMS, Gunther. The principles of quantification applied to in vivo proton MR spectroscopy. European Journal of Radiology [online]. 2008, 67(2), 218-229 [cit. 2023-06-15]. ISSN 0720048X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejrad.2008.02.034.
- [56] MILNE, Jacqueline, Mario BORGNA, Alberto BARTESAGHI et al. Cryo-electron microscopy - a primer for the non-microscopist. FEBS Journal [online]. 2013, 280(1), 28-45 [cit. 2023-06-13]. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.12078.
- [57] SAIBIL, Helen R. Cryo-EM in molecular and cellular biology. Molecular Cell [online]. 2022, 82(2), 274-284 [cit. 2023-06-13]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2021.12.016.
- [58] GIRI, Nabin, Raj ROY a Jianlin CHENG. Deep learning for reconstructing protein structures from cryo-EM density maps: Recent advances and future directions. Current Opinion in Structural Biology [online]. 2023, 79 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2023.102536.

- [59] LYUMKIS, Dmitry. Challenges and opportunities in cryo-EM single-particle analysis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2019, 294(13), 5181-5197 [cit. 2023-06-13]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.REV118.005602.
- [60] RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) [online]. [cit. 2023-06-13]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/>.
- [61] KELLY, Sharon, Thomas JESS a Nicholas PRICE. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2005, 1751(2), 119-139 [cit. 2023-06-08]. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- [62] JONES, Christopher. Circular dichroism of biopharmaceutical proteins in a quality-regulated environment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2022, 219 [cit. 2023-06-08]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2022.114945.
- [63] RAMALLI, Sergio, Andrew MILES, Robert JANES a B.A. WALLACE. The PCDDDB (Protein Circular Dichroism Data Bank): A Bioinformatics Resource for Protein Characterisations and Methods Development. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2022, 434(11) [cit. 2023-06-08]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2022.167441.