

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

Optimalizace podmínek separace fosfopeptidů pomocí kapilární zónové elektroforézy

Diplomová práce

Autor: Bc. Andrea Richterová
Vedoucí práce: Ing. Václav Staněk, Ph.D.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

Optimization of phosphopeptides separation conditions by capillary zone electrophoresis

Diploma thesis

Author: Bc. Andrea Richterová
Supervisor: Ing. Václav Staněk, Ph.D.

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Richterová**
Osobní číslo: **C10931**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Optimalizace podmínek separace fosfopeptidů pomocí kapilární zónové elektroforézy.**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

- o Princip kapilární zónové elektroforézy (CZE).
- o Využití kapilární zónové elektroforézy pro analýzu proteinů a peptidů.
- o Význam a funkce fosforylace u proteinů.

Praktická část:

- o Příprava pokrytých kapilár pro CZE a monitorování účinnosti jejich pokrytí.
- o Štěpení modelového fosfoproteinu alfa-kaseinu na peptidy pomocí proteolytického enzymu trypsinu.
- o Optimalizace podmínek separace fosfopeptidů modelového proteinu.
- o Separace peptidů před a po enzymové defosforylaci.
- o Ověření platnosti podmínek separace pro reálný vzorek, fosfopeptidy v komplexní směsi proteinů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Václav Staněk, Ph.D.
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2012

Andrea Richterová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala Ing. Václavu Staňkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za cenné rady během mé práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Pavlu Řehulkovi, Ph.D. za provedení a vyhodnocení MS analýz.

Ráda bych také poděkovala mé rodině, a především mému příteli, za psychickou a finanční podporu.

SOUHRN

Diplomová práce byla zaměřena na separaci fosforylovaných a defosforylovaných peptidů pomocí kapilární zónové elektroforézy ve spojení s UV detekcí. Jako modelový fosfoprotein byl vybrán hovězí α -kasein, který byl štěpen proteolytickým enzymem trypsinem. Vzorek peptidů α -kaseinu byl defosforylován solubilní i imobilizovanou alkalickou fosfatázou. Pro zjednodušení elektroforeogramu bylo použito obohacení fosfopeptidů pomocí TiO_2 částic. Jednotlivé kroky přípravy vzorku byly ověřeny MALDI-TOF-MS.

Klíčová slova: kapilární zónová elektroforéza, α -kasein, fosfopeptidy, trypsin, alkalická fosfatáza, MALDI-TOF-MS

SUMMARY

The diploma thesis was focused on separation of phosphorylated and dephosphorylated peptides by capillary zone electrophoresis in connection with UV detection. Bovine α -casein was chosen as a standard phosphoprotein, which was cleaved by proteolytic trypsin. The peptide sample of α -casein was dephosphorylated by soluble and immobilized alkaline phosphatase. The enrichment of phosphopeptides by TiO_2 particles was used for the simplification of electropherogram. All steps of sample preparation were verified using MALDI-TOF-MS.

Key words: capillary zone electrophoresis, α -casein, phosphopeptides, trypsin, alkaline phosphatase, MALDI-TOF-MS

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Kapilární zónová elektroforéza	11
2.1.1 Princip.....	11
2.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost	11
2.1.1.2 Elektroosmotický tok.....	12
2.1.1.3 Zdánlivá pohyblivost	15
2.1.1.4 Separační účinnost.....	15
2.1.2 Instrumentace.....	16
2.1.2.1 Dávkovací systém.....	16
2.1.2.2 Zdroj vysokého napětí	17
2.1.2.3 Separační kapilára.....	18
2.1.2.4 Elektrody	20
2.1.2.5 Detektor	20
2.2 Proteiny.....	22
2.2.1 Struktura proteinů	22
2.2.2 Vlastnosti proteinů.....	23
2.2.3 Význam a funkce proteinů.....	24
2.2.4 Rozdělení proteinů.....	24
2.2.5 Posttranslační modifikace.....	25
2.2.5.1 Fosforylace proteinů	26
2.2.6 Význam a funkce fosforylace u proteinů.....	27
2.2.6.1 Fosfotyrosin	28
2.2.6.2 Fosfoserin a fosfothreonin	29
2.2.6.3 Fosforylace v patofyziologii	29
2.3 Využití kapilární zónové elektroforézy pro analýzu proteinů a peptidů	32
2.3.1 Sérové proteiny	32
2.3.2 Peptidy	33
2.3.3 Enzymy	34
2.3.4 Proteiny a peptidy v potravinách	36
2.3.5 Kasein	36
3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	37
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1 Přístroje a pomůcky	38
4.2 Chemikálie.....	39
4.3 Částice	40
4.4 Metody přípravy vzorku	40
4.4.1 Imobilizace trypsinu na SiMAG-COOH magnetických částicích.....	40

4.4.2 Stanovení aktivity trypsinu pomocí nízkomolekulárního substrátu N- α -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilidu	41
4.4.3 Štěpení α -kaseinu v roztoku	43
4.4.4 Elektroforéza v gelu (Tricin-SDS-PAGE).....	44
4.4.5 Imobilizace alkalické fosfatázy na SiMAG-NH ₂ magnetických částicích	47
4.4.6 Stanovení aktivity alkalické fosfatázy pomocí p-nitrofenyl fosfátu.....	48
4.4.7 Defosforylace peptidů α -kaseinu pomocí alkalické fosfatázy	49
4.4.8 Obohacení fosfopeptidů pomocí komerčního kitu	50
4.4.9 Obohacení fosfopeptidů na TiO ₂ nosiči ve vsádkovém uspořádání.....	50
4.4.9.1 Odsolení štěpeného α -kaseinu trypsinem	51
4.4.9.2 Obohacení pomocí TiO ₂ částic	51
4.4.9.3 Odsolení obohaceného vzorku.....	52
4.4.10 Defosforylace vzorků obohacených fosfopeptidy solubilní alkalickou fosfatázou.....	52
4.4.11 Příprava vzorků a MALDI-TOF MS analýza.....	53
4.5 Pracovní postupy pro CZE	54
4.5.1 Pokrytí křemenné kapiláry polyakrylamidem	54
4.5.2 Příprava kapiláry.....	55
4.5.3 Měření EOF	55
4.5.3.1 Kovalentní pokrytí.....	55
4.5.3.2 Dynamické pokrytí	56
4.5.4 Separace standardního roztoku α -kaseinu	57
4.5.5 Separace modifikovaných vzorků α -kaseinu.....	58
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	59
5.1 Účinnost kovalentního pokrytí	59
5.2 Účinnost dynamického pokrytí.....	60
5.3 Separace standardního roztoku α -kaseinu	62
5.4 Stanovení proteolytické aktivity imobilizovaného trypsinu	63
5.5 Separace štěpeného α -kaseinu imobilizovaným trypsinem.....	65
5.6 Stanovení aktivity imobilizované alkalické fosfatázy	70
5.7 Separace defosforylovaných peptidů α -kaseinu	71
5.7.1 Defosforylace pomocí imobilizované alkalické fosfatázy.....	71
5.7.2 Defosforylace pomocí solubilní alkalické fosfatázy	74
5.8 Separace obohaceného vzorku štěpeného α -kaseinu	75
5.9 Defosforylace vzorků α -kaseinu obohacených fosfopeptidy a jejich separace	77
6 ZÁVĚR	80
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	81
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83

1 ÚVOD

Proteiny, které zastupují nespočtené množství důležitých funkcí ve všech organismech, mohou podléhat různým posttranslačním modifikacím (PTM). Nejvíce se vyskytující PTM je fosforylace, která hraje významnou roli v mnoha dějích v buňce. Fosfopeptidy vzniklé po chemickém nebo enzymatickém štěpení lze separovat chromatografickými a elektromigračními metodami.

Elektromigrační metody využívají pohybu nabitých částic v elektrickém poli po vložení stejnosměrného napětí. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je účinná separační technika, která vyniká především rychlostí a možností automatizace v porovnání s gelovou elektroforézou. Úzký průměr kapiláry umožňuje analýzu malého objemu vzorku v řádech desítek nanolitrů, který je důležitý především pro biologické vzorky. Nejvíce používaná je CZE ve spojení s UV detekcí, která je určena pro analyty absorbující světlo při vlnové délce 200 - 400 nm. Z tohoto důvodu našla široké uplatnění při analýze proteinů a peptidů, protože peptidové vazby silně absorbují při krátkých vlnových délkách, nejčastěji v rozmezí 210 - 220 nm. Pro látky neabsorbující v UV oblasti je možná nepřímá UV detekce.

Tato práce je zaměřena na separaci fosforylovaných a defosforylovaných peptidů modelového fosfoproteinu α -kaseinu (α -CN) metodou CZE s UV detekcí. Peptidy s navázanou fosfátovou skupinou mají jiné elektroforetické pohyblivosti než peptidy, které ji nemají. Z tohoto důvodu byla zvolena CZE jako rychlá metoda pro rozlišení fosforylované a defosforylované formy peptidu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

2.1.1 Princip

Kapilární zónová elektroforéza je nejvíce užívaná technika kapilární elektroforézy. Dochází při ní k dělení ionogenních látek na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí během elektromigrace v křemenné kapiláře naplněné pracovním elektrolytem působením vnějšího elektrického pole [1].

2.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Pro daný ion je v určitém prostředí jeho mobilita konstantní. Rychlost iontů v elektrickém poli je určena vztahem

$$v = \mu_e \cdot E \quad (2.1)$$

kde v je rychlost iontu, μ_e je elektroforetická pohyblivost a E je intenzita elektrického pole. Na nabitou částici v roztoku působí současně elektrická a třecí síla. Elektrická síla přivádí ion do pohybu a je úměrná náboji částice q a intenzitě elektrického pole E :

$$F_1 = q \cdot E \quad (2.2)$$

Proti této síle působí síla třecí, pro kterou platí vztah daný Stokesovým zákonem:

$$F_2 = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.3)$$

kde η je viskozita roztoku a r poloměr iontu.

Během elektroforézy je dosaženo ustáleného stavu, kdy obě síly jsou si rovné, ale mají opačný směr:

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.4)$$

Elektroforetická pohyblivost nabitě částice je v CZE významnou veličinou a je určena jako rychlost iontu v v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě E . Vztah pro výpočet elektroforetické pohyblivosti lze vyjádřit kombinací vztahů 2.1 a 2.4.:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2.5)$$

Malé nabitě částice s vysokým nábojem mají vysokou pohyblivost, avšak velké, minimálně nabitě látky mají pohyblivost nízkou [2, 3].

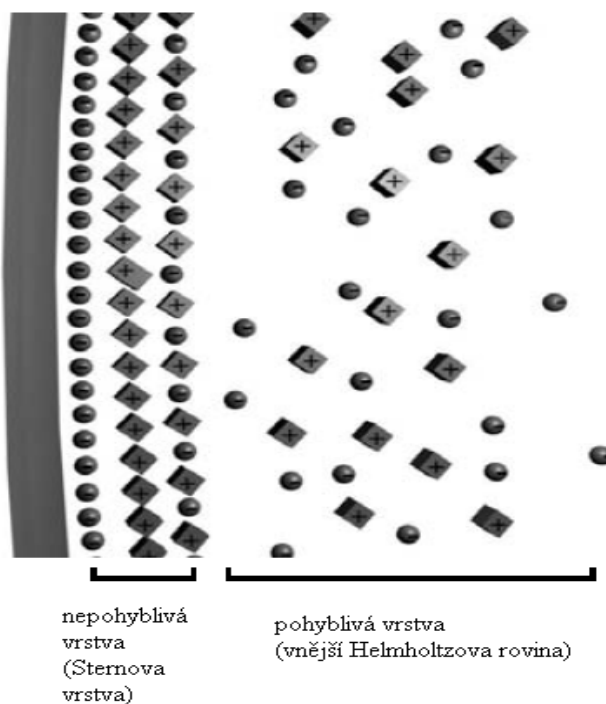
Elektroforetická mobilita iontu závisí nejen na jeho náboji a poloměru, jak je zřejmé ze vztahu 2.5, ale i na teplotě, stupni disociace a vlastnostech pufru – iontové síle, povaze iontů, viskozitě pufru, protiiontu prostředí [4].

V závislosti na vlastnostech elektrolytu se rozlišuje elektroforetická pohyblivost aktuální, limitní a efektivní. O aktuální pohyblivosti se mluví u silných elektrolytů, která je vztažena na iontovou sílu a teplotu. V nekonečném zředění se jedná o limitní pohyblivost, která je tabelována při teplotě 25°C. U slabých elektrolytů je pohyblivost závislá na pH a je nazývána jako efektivní, jenž je vztažena k iontové síle, teplotě a pH. Při analýze amfolytů, jako jsou peptidy a bílkoviny, se volí takové pH, při kterém je největší rozdíl v jejich efektivních pohyblivostech [3].

2.1.1.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) byl poprvé určen H. Helmholtzem na konci 18. století, který ve svém experimentu vložil napětí na horizontální skleněnou trubici naplněnou vodným roztokem soli [5].

V elektromigračních metodách je EOF transportním jevem. Jedná se o tok kapaliny v kapiláře po vložení elektrického napětí.



Obrázek 2.1 - Znáornění elektrické dvojvrstvy v nepokryté křemenné kapiláře [5]

V separační kapiláře je vodný roztok elektrolytu v kontaktu se stěnou kapiláry a dochází k rozdělení náboje mezi roztok a tuto stěnu. To je způsobeno ionizací na vnitřní stěně kapiláry, nejčastěji silanolových skupin u křemenné kapiláry, nebo adsorpcí iontů z roztoku. Na povrchu křemenných kapilár jsou silanolové skupiny při $\text{pH} > 1,5$ deprotonovány a nesou záporný náboj. Pro zachování elektroneutality se kladně nabitě ionty v roztoku nacházejí u stěny kapiláry, a dochází k elektrostatickým interakcím se záporně nabitou stěnou. Vzniká elektrická dvojvrstva a potenciálový rozdíl u stěny kapiláry se nazývá zeta potenciál. Elektrická dvojvrstva je tvořena Sternovou vrstvou a vnější Helmholtzovou rovinou, jak je zobrazeno na obrázku 2.1. Po vložení elektrického pole na kapiláru se kationty elektrolytu ve vnější Helmholtzově rovině začnou pohybovat směrem ke katodě a v důsledku vnitřního tření v kapalině se pohyb přenesou na celý její objem [2, 5, 6].

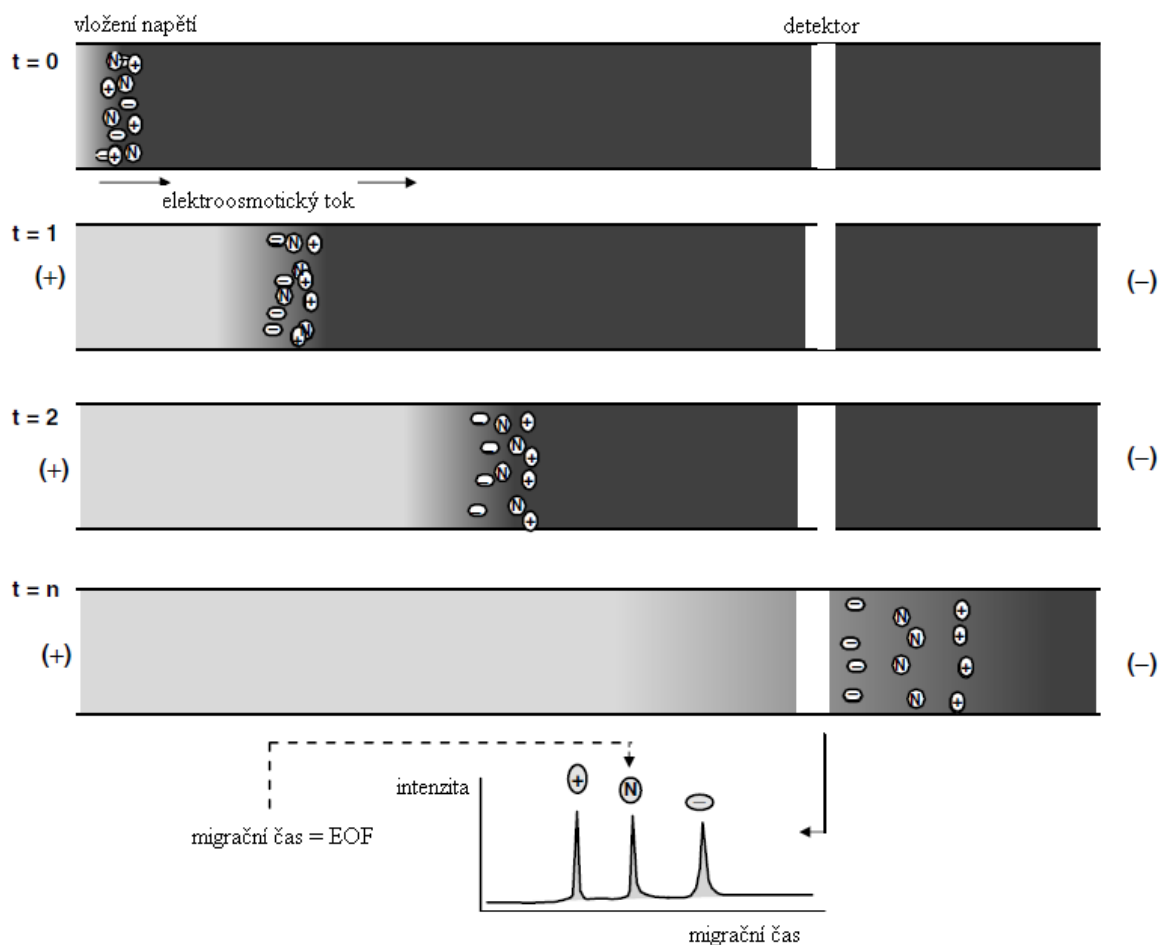
Velikost EOF je možné vyjádřit jako rychlost nebo pohyblivost:

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (2.6)$$

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (2.7)$$

kde v_{EOF} je rychlost EOF, μ_{EOF} je elektroosmotická mobilita, ε je dielektrická konstanta a ζ je zeta potenciál. Zeta potenciál je určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Tento náboj je silně podmíněn pH, a proto i velikost EOF je závislá na pH. Při vysokém pH jsou silanolové skupiny převážně deprotonovány a EOF je větší než při nízkém pH, kdy tyto skupiny jsou pouze částečně deprotonovány. Jako další důležitý faktor v ovlivnění zeta potenciálu, a tím i velikosti EOF, je iontová síla pracovního elektrolytu. Zvyšující se iontová síla vede k potlačení elektrické dvojvrstvy, snížení zeta potenciálu a tím i k redukci EOF [2].

EOF unáší všechny přítomné ionty stejným směrem, což umožňuje separovat kationty a anionty během jedné analýzy. Je-li vnitřní stěna kapiláry nabitá záporně, pracovní elektrolyt je čerpán od anody ke katodě a látky migrují v daném pořadí: kationty, elektroneutrální látky a anionty, jak je zobrazeno na obrázku 2.2. Jako první migrují nejmenší kationty s velkým nábojem, kdy elektroforetická přitažlivost kationtů ke katodě a EOF mají stejný směr. Po kationtech migrují všechny elektroneutrální látky, které se pohybují stejnou rychlostí jako EOF, přičemž tyto látky se používají jako markery k určení velikosti EOF a nejsou separovány. Jako poslední jsou anionty, protože jejich elektroforetická přitažlivost má opačný směr než EOF, ale elektroosmotická mobilita je větší než elektroforetická mobilita aniontu [2, 7].



Obrázek 2.2 - Znárodnění migrace nabitých a nenabitých molekul v elektrickém poli [5]

Jedinečnou vlastností EOF je plochý profil toku v kapiláře. Na nadbytek kladných iontů ve vnější vrstvě roztoku působí elektrostatické síly a téměř celý roztok, až na tenkou vrstvu při stěně kapiláry v řádu několik nm, se pohybuje stejnou rychlostí. Rychlost toku u stěny klesá, a to z důvodu tření. Tento profil toku je pro CZE separace užitečný, protože přímo nepřispívá k disperzi separovaných zón. Rychlost toku a jeho profil zpravidla nezávisí na průměru kapiláry, pokud její vnitřní průměr není příliš široký (≤ 200 až $300 \mu\text{m}$) [2, 6].

I přes užitečnost EOF se musí jeho velikost kontrolovat. Jak už bylo zmíněno, při vysokém pH EOF by mohl být natolik významný, že analyzované látky by byly eluovány dříve než separovány. Naopak při nízkém pH se kationty v roztoku mohou adsorbovat na záporně nabitou stěnu kapiláry pomocí coulombických interakcí. Ze vztahu 2.6 vyplývá, že rychlost EOF se dá snížit použitím menšího elektrického pole, což má mnoho nevýhod s ohledem na čas analýzy, rozlišení a účinnost. Vysoká koncentrace pufru limituje coulombické interakce a tím i EOF, ale způsobuje zahřátí uvnitř kapiláry. Dalšími

možnostmi je použití organických modifikátorů, surfaktantů, neutrálních hydrofilních polymerů nebo kovalentního pokrytí [2].

2.1.1.3 Zdánlivá pohyblivost

V přítomnosti EOF se analyzované látky pohybují rychlostí, která odpovídá zdánlivé pohyblivosti μ_{app} :

$$\mu_{app} = \mu_e + \mu_{eof} = \frac{l_t \cdot l_d}{t_m \cdot V} \quad (2.8)$$

kde l_t je celková délka kapiláry, l_d je délka kapiláry k detektoru, t_m je migrační čas látky a V je napětí na kapiláře. Elektroforetická přitažlivost kationtů má opačný směr než elektroforetická přitažlivost aniontů. Z tohoto důvodu se liší jejich elektroforetická pohyblivost, a tím i jejich zdánlivá pohyblivost. Elektroforetická přitažlivost u neutrálních látek se neprojevuje, jejich rychlost odpovídá velikosti EOF, a tak se zdánlivou mobilitou u těchto látek nesetkáváme [6, 7]:

$$\text{kationty: } v_i = (\mu_{eof} + \mu_e) \cdot E = \mu_{app} \cdot E \quad (2.9)$$

$$\text{anionty: } v_i = (\mu_{eof} - \mu_e) \cdot E = \mu_{app} \cdot E \quad (2.10)$$

$$\text{neutrální látky: } v_i = \mu_{eof} \cdot E \quad (2.11)$$

2.1.1.4 Separační účinnost

Separační účinnost v CZE je vyjádřena stejným parametrem jako v chromatografii, a to počtem teoretických pater:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_m}{w_{0,5}}\right)^2 \quad (2.12)$$

kde $w_{0,5}$ je šířka píku v polovině výšky. Účinnost separace je dále charakterizována rozlišením R píků dvou odlišných látek:

$$R = 2 \cdot \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} \quad (2.13)$$

kde t_1 , t_2 jsou migrační časy dvou látek, eluovaných za sebou a w_1 , w_2 jsou šířky odpovídajících píků v základně.

$$R = \frac{1}{4} \cdot N^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}}\right) \quad (2.14)$$

kde $\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$, $\bar{\mu} = \frac{\mu_1 + \mu_2}{2}$

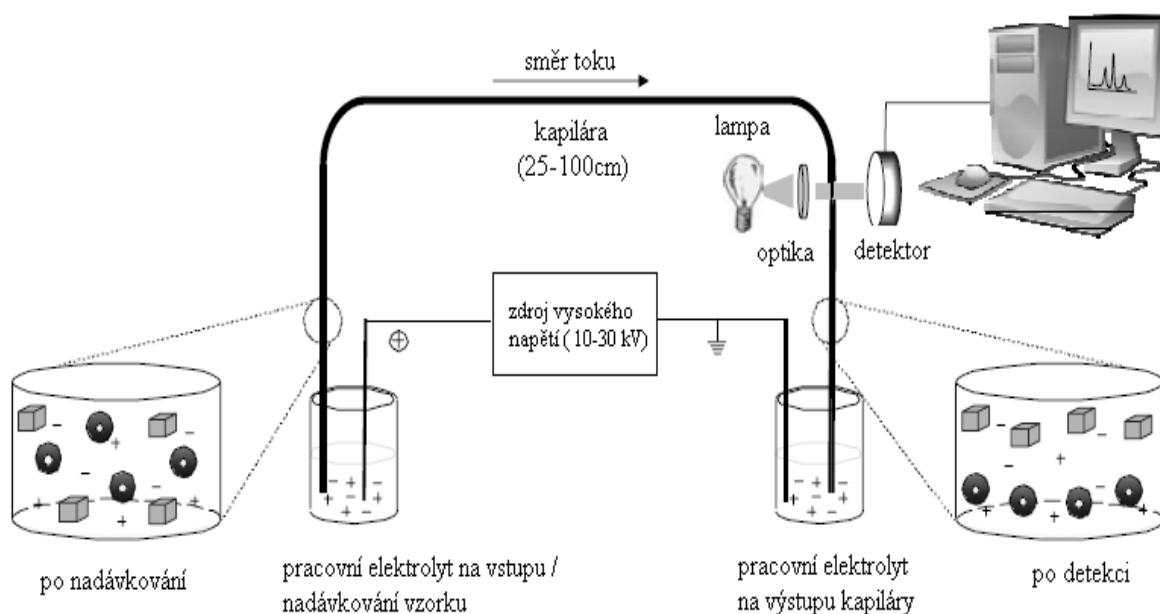
Rozlišení je závislé na účinnosti, jak je zřejmé ze vztahu 2.14, a na selektivitě. Za dostačující selektivitu α je považována hodnota větší nebo rovna 1,02:

$$\alpha = \frac{\mu_{e,1}}{\mu_{e,2}}, \mu_{e,1} > \mu_{e,2} \quad (2.15)$$

Selektivitu lze snadno upravit pomocí změny pH pracovního elektrolytu nebo přidávkem látek jako jsou surfaktanty nebo chirální selektory [2, 8].

2.1.2 Instrumentace

Mezi základní součásti přístrojového vybavení CZE, které je znázorněno na obrázku 2.3, patří dávkovací systém, zdroj vysokého stejnosměrného napětí, separační kapilára, elektrody a detektor.



Obrázek 2.3 - Schéma přístrojového vybavení CZE [5]

2.1.2.1 Dávkovací systém

Prvním krokem při CZE analýze je nadávkování vzorku do kapiláry. Vzorek se dávkuje do konce kapiláry, který je vzdálenější od detektoru, a to nejčastěji v objemu 1-50 nl. Používá se hydrodynamické, sifonové nebo elektrokinetické dávkování [1, 6].

Hydrodynamické dávkování

Jedna možnost při hydrodynamickém dávkování je aplikace tlaku na nádobku se vzorkem, ve kterém je ponořena kapilára, a vzorek se natlačí do kapiláry. Druhou možností je vytvoření vakua na nádobce na druhém konci kapiláry, s koncovým elektrolytem, a vzorek je čerpán do kapiláry. Obě tyto techniky, stejně jako sifonové dávkování, mají nižší přesnost než elektrokinetické dávkování. Délka zóny nadávkovaného vzorku závisí na viskozitě pracovního elektrolytu, a méně na viskozitě samotného vzorku, protože zabírá pouze krátký úsek kapiláry. Z tohoto důvodu, musí být pro dostatečnou reprodukovatelnost dávkování zajištěna konstantní teplota [1, 6].

Sifonové dávkování

Sifonové dávkování je jednoduché provedení hydrodynamického dávkování, kdy vstupní konec kapiláry ponořený do roztoku vzorku se zvedne do určité výšky vzhledem k výstupnímu konci a na principu sifonového efektu se nadávkuje určité množství vzorku. Tento způsob se běžně používá u nekomerčních systémů [5].

Elektrokinetické dávkování

Vstupní konec kapiláry je ponořen do roztoku vzorku a výstupní konec v roztoku pracovního elektrolytu. Je aplikováno nízké napětí (1 - 10 kV) po dobu 1 - 99 sekund, kde tyto parametry závisí na délce kapiláry a jejím vnitřním průměru. Pro zlepšení přesnosti je napětí při dávkování nižší než pracovní napětí. Vstup vzorku do kapiláry je ovlivněn EOF a elektroforetickou pohyblivostí. Jestliže pohyblivost analytu je ve stejném směru jako EOF, tento analyt bude zaujímat delší zónu než analyt s pohyblivostí v opačném směru. Toto dávkování je příznivé pro analyty, které jsou v minoritním množství a mají vyšší elektroforetickou pohyblivost než ostatní složky ve vzorku. Množství nadávkovaného analytu také souvisí s vodivostí pracovního elektrolytu a částečně i s vodivostí roztoku vzorku. Je-li koncentrace analytu nízká, vliv vodivosti vzorku může být zanedbán ve srovnání s vlivem pracovního elektrolytu [5, 6].

2.1.2.2 Zdroj vysokého napětí

Součástí komerčních přístrojů je zdroj napětí s maximálním limitem 30 kV. Obvykle je při separaci aplikováno konstantní napětí v rozmezí 10 - 30 kV. S narůstajícím napětím se zvyšuje rychlost EOF a migrace vzorku, doba analýzy je kratší, dochází ke

vzniku ostřejších píků a zlepšení rozlišení. Jestliže iontová síla matrice vzorku je mnohem větší než iontová síla pracovního elektrolytu, dochází ke zvyšující se produkci Joulova tepla, které má za následek snížení viskozity roztoku. Se snižující se viskozitou se zvyšuje EOF, pohyblivost iontů a difúze analytů, což může vést k rozšíření zón. U některých přístrojů se místo konstantního napětí aplikuje konstantní proud. Je to vhodné zejména, když není dostatečně regulována teplota kapiláry [5, 6].

Intenzitu elektrického pole lze vypočítat z celkové délky kapiláry l_t a vloženého napětí V na kapiláru [6]:

$$E = \frac{V}{l_t} \quad (2.16)$$

2.1.2.3 Separační kapilára

Pro CZE separace se běžně používá kapilára z taveného křemene. Její povrch je potažen tenkou ochrannou vrstvou polyimidu (10 - 30 μm), který zvyšuje její pružnost a současně snižuje křehkost. Vnitřní průměr kapiláry je nejčastěji v rozmezí 25 - 100 μm a celková délka 25 - 100 cm [2, 5]. Efektivní délka kapiláry je měřena k detektoru a je o 5 až 10 cm kratší než celková délka. Detekční „okénko“ je nejjednodušeji vytvořeno opálením vrstvy polyimidu a následným očištěním etanolem. Toto okénko je nejkřehčím místem na kapiláře. U pokrytých kapilár by neměl být použit plamen z důvodu možnosti poškození vnitřního pokrytí. V takovém případě je alternativou použití vroucí H_2SO_4 , horkého KOH nebo mechanického odstranění žiletkou [7].

Na vnitřní stěny kapiláry se mohou adsorbovat některé analyzované látky v roztoku, především proteiny. Vazba proteinů může probíhat pomocí iontových nebo hydrofobních interakcí [9]. Iontové interakce lze eliminovat pomocí extrémního pH, které je ovšem omezeno Joulovým teplem a může vést ke změně proteinové struktury. Adsorpce vysokomolekulárních látek na stěnu kapiláry vede k výraznému snížení účinnosti, rozmývání zón, nereprodukovatelnosti migračních časů a nepřesnostem v kvantifikaci [2]. Vnitřní povrch lze modifikovat a omezit tak adsorpci látek spolu s velikostí EOF. Modifikace kapiláry může být buď dynamická, nebo chemická. Dynamická modifikace spočívá v přidání surfaktantu k pracovnímu elektrolytu [10]. Kationický surfaktant cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) se váže elektrostatickými silami se záporně nabitými silanolovými skupinami, dochází k vytvoření vrstvy a potlačení EOF. Zvyšující se koncentrace surfaktantu vede k vytvoření druhé vrstvy pomocí hydrofobních interakcí a obrácení EOF. Jednou z nevýhod může být ztráta fyziologických podmínek ovlivněním

pracovního elektrolytu [2, 11]. Chemickou modifikací se rozumí kovalentně vázané pokrytí vnitřního povrchu kapiláry. Velmi rozšířená je silylace, kdy povrch kapiláry je deaktivován vhodnými skupinami, které jsou shrnuty v tabulce 2.1. I tato modifikace umožňuje snížit nebo obrátit EOF. Polyakrylamidem nebo polyethylenglykolem (PEG) dojde k potlačení EOF, efektivní náboj stěny se sníží a viskozita stěny se zvýší. Podobně jako u dynamické modifikace, kationické skupiny způsobí obrácení EOF. Amfoterní látky, jako proteiny nebo aminokyseliny, v závislosti na pI a pH pufru zajistí reverzibilní EOF. Toto pokrytí je méně stabilní než dynamická modifikace, protože při vysokém pH jsou silanové řetězce snadno hydrolyzovány a časem dochází k degradaci pokrývacího materiálu. Povrch kapiláry se často nepovede kompletně pokrýt a může docházet k adsorpci analytů [2, 6, 11].

Tabulka 2.1 - Přehled modifikátorů a jejich vlastností při chemickém pokrytí křemenné kapiláry [2]

Typ pokrytí	Modifikátor	Vlastnosti
<i>silylace</i>	polyakrylamid pentafluoryl protein aminokyseliny kyselina sulfonová maltóza PEG polyvinylpyrrolidin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ zpravidla jednoduchá příprava ▪ stabilní při pH 4-7 ▪ omezená dlouhodobá stabilita
<i>přímá Si-C vazba</i>	polyakrylamid (Grignard)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ obtížná příprava ▪ stabilní při pH 2-10
<i>adsorpce polymerů</i>	celulóza PEG polyvinylpyrrolidin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nízká ▪ dlouhodobá stabilita ▪ nízké rozmezí pH 2-4 ▪ poměrně hydrofobní
<i>adsorpce zesíťovaných polymerů</i>	polyethylenimin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ obrácení EOF ▪ vhodné pro bazické proteiny ▪ stabilní při fyziologickém pH

Z důvodu nereprodukovatelnosti EOF v křemenné kapiláře lze použít i alternativní materiály, jako například polymerní dutá vlákna. Elektroosmotická mobilita je pak méně závislá na pH roztoku než u křemenné kapiláry [6].

2.1.2.4 Elektrody

Průchod elektrického proudu roztokem je doprovázen elektrochemickými reakcemi na platinových elektrodách, obecně se jedná o rozklad vody. Reakce na elektrodách jsou odlišné a záleží na jejich náboji:

na kladné elektrodě probíhá reakce $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2(\text{g}) + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$

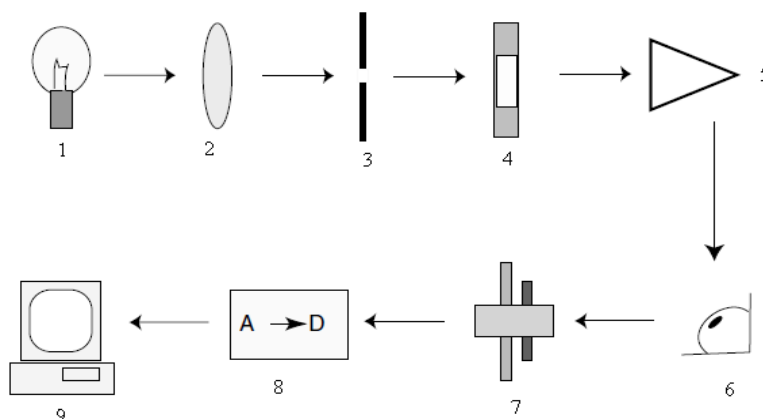
a na záporné elektrodě se odehrává reakce $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2(\text{g}) + 2\text{OH}^-$.

Jak je zřejmé z obou rovnic, na elektrodách vznikají plyny, které by mohly vést v důsledku nárůstu tlaku k toku roztoku v kapiláře z jedné strany na druhou. Proto jsou víčka pro nádobky s elektrolytem opatřeny otvorem, který zajišťuje únik vznikajících plynů, a tak se zabráňuje jejich nahromadění [6].

2.1.2.5 Detektor

Při výběru vhodného detektoru by měla být především zvážena selektivita, citlivost a detekovatelnost jednotlivých analytů. Mezi nejvíce používané detektory pro CZE patří UV-VIS a fluorescenční detektor. Přes 95 % běžných aplikací je realizováno s UV-VIS detektorem, jehož schéma je zobrazeno na obrázku 2.4. Přehled detektorů je uveden v tabulce 2.2 [5, 6].

UV-VIS detektor



Obrázek 2.4 - Schéma spektrofotometrického detektoru: 1 zdroj, 2 optika, 3 štěrba, 4 detekční okénko, 5 hranol, 6 fotodetektor, 7 elektronový filtr, 8 převodník signálu, 9 zapisující zařízení [5]

Absorbance analytů je nejčastěji měřena v rozmezí vlnových délek 200-325 nm. Ze vztahu 2.17 je zřejmé, že absorbance A závisí na délce dráhy procházejícího světla l , molárním absorpčním koeficientu ε a koncentraci absorbujících látek c , jak je dáno Lambert-Beerovým zákonem [5]:

$$A = l \cdot \varepsilon \cdot c \quad (2.17)$$

Tabulka 2.2 - Přehled detektorů používaných v CZE [2]

detektor	hmotnostní detekční limit (mol)	koncentrační detekční limit (mol/l) *	vlastnosti
<i>UV-VIS</i>	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$	univerzální
<i>fluorescenční</i>	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	citlivý, obvykle derivatizace vzorku
<i>laser indukovaná fluorescence</i>	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-14} - 10^{-16}$	velmi citlivý, derivatizace, nákladný
<i>amperometrický</i>	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	pro elektroaktivní látky, nutná modifikace kapiláry
<i>vodivostní</i>	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$	univerzální, modifikace kapiláry
<i>hmotnostní spektrometrie</i>	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	citlivý, informace o struktuře

* předpokládaný injekční objem 10 nl

Při vysoké koncentraci analytu vznikne odchylka od Lambert-Beerova zákona, která omezuje kvantitativní analýzu. Lineární detekční rozsah je hlavně limitován rozptylem světla, který je způsoben průchodem světla přes stěnu kapiláry [2, 5, 6].

Lineární detekční rozsah i citlivost může být zlepšena rostoucím vnitřním průměrem kapiláry, který má nevýhodu v následném zahřívání kapiláry. Vytvořením „bubliny“ v kapiláře je rozšířena optická dráha. Bublina je vytvořena pouze v oblasti detekce a tak nedochází ke vzrůstu proudu. V oblasti bubliny je sníženo elektrické pole a v důsledku zvětšení objemu i rychlost toku. Tímto je docíleno zvýšení citlivosti a rozšíření lineárního rozsahu [2, 12].

Ke spektrofotometrické detekci lze použít i detektor s diodovým polem (DAD). Tento způsob detekce umožňuje dosáhnout i vyššího detekčního limitu, citlivosti a lineárního rozsahu, než u jedno nebo vícevlňové detekce. Použitím DAD je možno určit

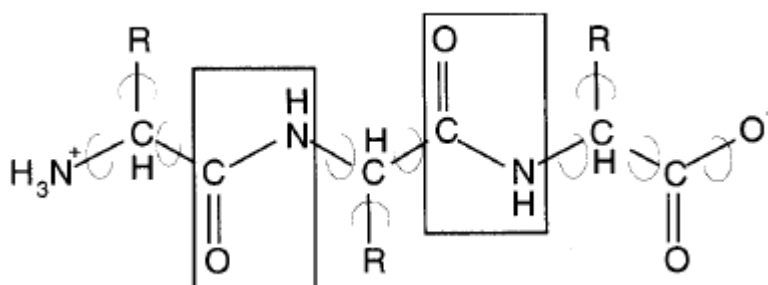
absorpční maxima analytů a monitorování vzorků při více než jedné vlnové délce. Data mohou být zpracována v třírozměrném zobrazení, a to migrační čas v závislosti na vlnové délce a absorbanci [2, 12].

2.2 Proteiny

Proteiny neboli bílkoviny jsou vysokomolekulární látky, jejichž základními stavebními jednotkami jsou aminokyseliny (AA). Proteiny jsou složeny z 20 L- α -aminokyselin. AA se v proteinech spojují v dlouhé řetězce kondenzační reakcí mezi α -aminoskupinou jedné a α -karboxylovou skupinou druhé aminokyseliny, tzv. peptidovou vazbou (viz obrázek 2.5).

2.2.1 Struktura proteinů

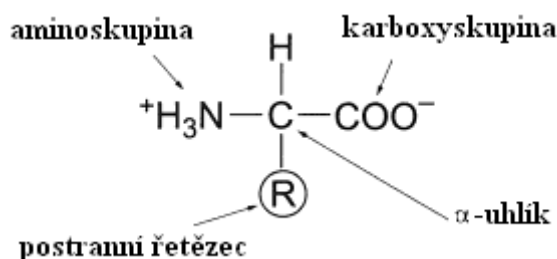
Polypeptidový řetězec se skládá z rovinných peptidových jednotek, které mají rigidní délky vazeb a hodnoty valenčních úhlů. Vazba mezi atomy uhlíku a dusíku má částečný charakter dvojné vazby, který zabraňuje její rotaci za fyziologické teploty. Proto všech šest atomů peptidové vazby (C, O, N, H, $C_{\alpha 1}$ a $C_{\alpha 2}$) je nuceno ležet v jedné rovině. Rigidita peptidové vazby ztužuje polypeptidový řetězec a tím přispívá ke stabilitě molekul bílkovin. Volná otáčivost vazeb C_{α} -N a C_{α} -CO umožňuje peptidovým jednotkám měnit vzájemnou polohu, kde volnost natáčení je omezena prostorovými nároky substituentů vázaných na atomech C_{α} a vznikem přitažlivých a odpudivých sil [13, 14].



Obrázek 2.5 - Znázornění rigidní peptidové vazby [13]

U bílkovin rozlišujeme strukturu primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární struktura je dána pořadím AA v polypeptidovém řetězci. Tato struktura podmiňuje vlastnosti bílkovin a jejich biologickou funkci. Sekundární struktura je prostorové uspořádání polypeptidového řetězce mezi několika po sobě jdoucími AA. Je určena chemickými interakcemi, hlavně vodíkovými vazbami, aminokyselinových zbytků s jinými aminokyselinami. Obvykle má formu α -helixu nebo β skládaného listu. Terciární struktura je trojrozměrná struktura celého polypeptidu. Jedná se o intramolekulární uspořádání sekundárních struktur pomocí van der Waalových interakcí, vodíkových můstků, iontových interakcí, disulfidických vazeb a především hydrofobních interakcí, které zajišťují stabilizaci této konformace. Kvartérní struktura je prostorové uspořádání dvou nebo více polypeptidů v komplexním proteinu, hlavně nekovalentními vazbami. V této konformaci se vyskytují pouze některé proteiny, jako např. hemoglobin [13 - 15].

Proteiny obsahují více jak 100 aminokyselinových zbytků. Pokud je jich obsaženo méně, mluvíme o peptidech. Peptidy lze rozdělit na polypeptidy, jestliže molekula obsahuje 11-100 AA, a oligopeptidy, které obsahují 2-10 AA.



Obrázek 2.6 - Obecné znázornění aminokyselin při fyziologickém pH, kde amino- i karboxyskupina je ionizována [15]

2.2.2 Vlastnosti proteinů

Proteiny jsou polyelektrolyty, které mohou nést kladný i záporný náboj. Za fyziologického pH jsou karboxylové skupiny i aminoskupiny ionizovány, a proto jsou AA v dipolárním stavu nazývány jako zwitterionty, neboli obojetné ionty (viz obrázek 2.6). Při nízkém pH (< 3) jsou aminoskupiny protonovány, jsou tedy nabitě kladně, zatímco karboxylové skupiny nenesou žádný náboj, a molekula má celkový náboj 2+. V opačném případě, kdy pH je značně vysoké (> 10) jsou aminoskupiny neutrální, zatímco

karboxylové skupiny jsou ionizovány, a molekula nese náboj 2-. Při pH, které se rovná izoelektrickému bodu molekuly, jsou náboje vyrovnány a molekula je elektroneutrální [15, 16].

2.2.3 Význam a funkce proteinů

Proteiny jsou pro život nepostradatelné a zastupují mnoho důležitých funkcí, jako transportní, strukturní, pohybové, zásobní a jiné. Transportní funkce spočívá v přenosu malých molekul a iontů. Příkladem může být hemoglobin, který přenáší kyslík, dále transferin přenášející Fe nebo membránové bílkoviny transportující ionty a molekuly přes membránu. Strukturní proteiny dávají buňkám a tkáním mechanickou oporu. Mezi strukturní proteiny patří např. kolagen a elastin. Pohybová funkce bílkovin umožňuje pohyb buněk a tkání, jako je tomu např. u myozinu v kosterním svalstvu. Zásobní proteiny skladují malé molekuly nebo ionty, např. ferritin váže železo a ukládá ho v játrech. Některé proteiny jsou schopné přenášet informační signály z buňky do buňky, např. inzulín, který reguluje hladinu glukózy v krvi. Proteiny ve funkci enzymů umožňují průběh řady biochemických reakcí. Například pepsin odbourává v žaludku proteiny z potravy nebo proteinkináza váže na protein fosfátovou skupinu. Receptorový protein detekuje chemické a fyzikální signály v buňce a předává je ke zpracování, příkladem může být adrenergní receptor v srdečním svalu, který zvyšuje tepovou frekvenci při navázání inzulínu [14, 16, 17].

2.2.4 Rozdělení proteinů

Proteiny lze rozdělit na základě mnoha charakteristik. Podle tvaru se dělí na fibrilární a globulární. Fibrilární proteiny mají silně protáhlý až vláknitý tvar, mají též název skleroproteiny. Globulární proteiny, neboli sféroproteiny, mají kulovitý tvar. Dále se podle biologické aktivity dělí na nativní a denaturované nebo podle složení na jednoduché a složené. Jednoduché proteiny obsahují pouze AA, na rozdíl od složených, které navíc obsahují prostetickou skupinu, jako např. nukleové kyseliny, cukry, lipidy, ionty kovů a fosfátové skupiny [14, 17].

2.2.5 Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace proteinů je definovaná jako chemická modifikace nebo štěpení po translaci. Během PTM dochází ke změně polypeptidového řetězce proteolytickým štěpením nebo kovalentním navázáním například fosfátů, sulfátů, lipidů a sacharidů. Možné PTM jsou uvedeny v tabulce 2.3. Posttranslační modifikací je ovlivněna struktura, stabilita, hydrofobicita, náboj, imunologické vlastnosti, lokalizace a aktivita proteinů. U proteinů je zaznamenáno přes 100 různých PTM [18, 19].

PTM mohou být reverzibilní nebo ireverzibilní. Kovalentní navázání fosfátové a acylové skupiny je reverzibilní modifikace. Takto modifikované proteiny jsou zapojeny do signalizační kaskády. Signální informace je poskytnuta fosforylovanou a acylovanou formou daného proteinu a zánik signálu je vyvolán vrácením do původního stavu. Do ireverzibilních PTM je řazeno proteolytické štěpení všech proteinů během jejich životního cyklu [19].

Tabulka 2.3 - Přehled možných PTM u různých aminokyselin [19]

aminokyselina	PTM	aminokyselina	PTM
<i>kyselina asparagová</i>	fosforylace izomerace	<i>lysin</i>	N-methylace N-acetylace
<i>glutamová kyselina</i>	methylace karbonylace polyglycinace polyglutamylace	<i>cystein</i>	S-hydroxylace fosforylace S-acetylace S-prenylace
<i>tryptofan</i>	C-manosylace	<i>methionin</i>	oxidace na sulfoxid
<i>threonin</i>	fosforylace	<i>glutamin</i>	transglutaminace
<i>tyrosin</i>	fosforylace sulfatace orto-nitrace	<i>histidin</i>	fosforylace aminokarboxypropylace N-methylace
<i>arginin</i>	N-methylace N-ADP-ribosylace	<i>serin</i>	fosforylace O-glykosylace
<i>prolin</i>	C-hydroxylace	<i>glycin</i>	C-hydroxylace

2.2.5.1 Fosforylace proteinů

Reverzibilní navázání fosfátové skupiny je nejvíce se vyskytující PTM proteinů. Fosfátová skupina je vázána proteinkinázou na aminokyselinový zbytek, a to nejčastěji na hydroxyskupinu serinu, threoninu nebo tyrosinu. Donor fosfátu je běžně adenosintrifosfát (ATP), ale zřídka je využit i guanosintrifosfát (GTP). ATP i GTP jsou také hlavním zdrojem energie. Defosforylace je zajištěna proteinfosfatázou [19, 20].

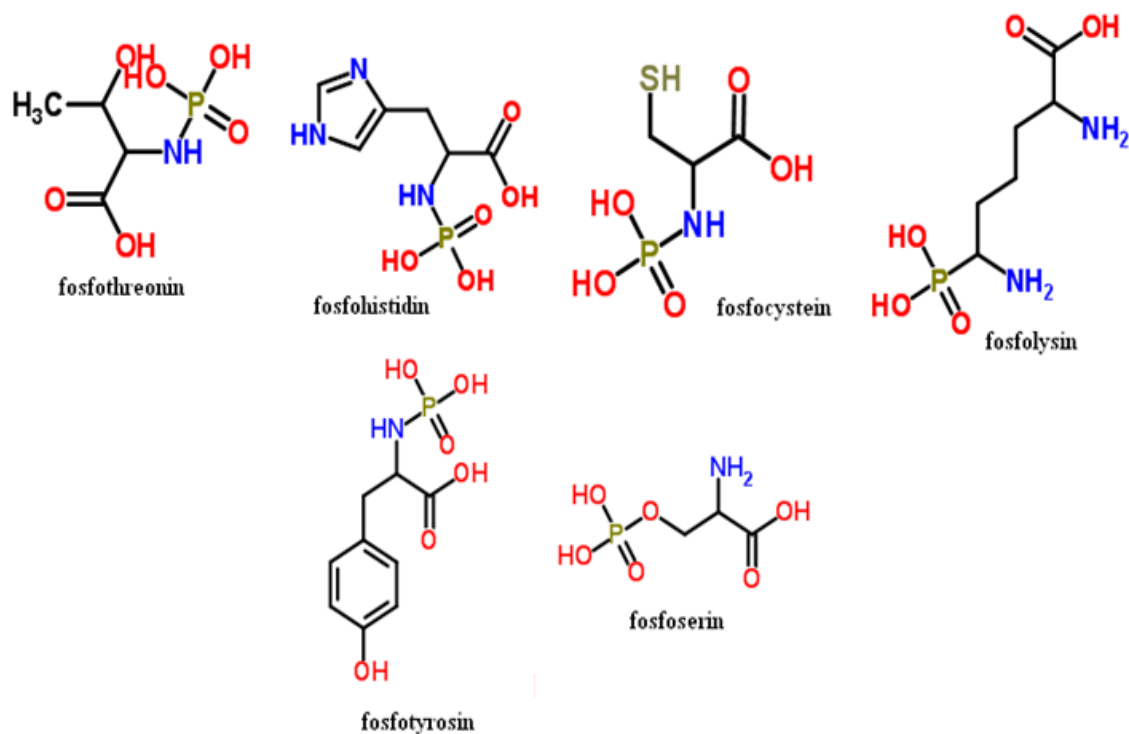
Prvními fosfoproteiny, objevenými na začátku 19. století, byly kasein a fosvitin. U těchto fosfoproteinů se uvádí obsah fosfátu v rozmezí 1 - 10 % a fosvitin je znám jako nejvíce fosforylovaný protein. Kasein je fosforylován za katalýzy kaseinkinázy, která je lokalizována v Golgiho aparátu buněk mléčné žlázy [21].

Ve všech organismech jsou fosforylací aktivovány cukry pro metabolismus. U důležitého kontrolního bodu glykolýzy, který je katalyzován fosfofruktokinázou, je fosforylace proteinu ireverzibilní [20].

Momentální fosforylace proteinu je určena poměrem kináz a fosfatáz. U eukaryotických organismů je předpokládáno, že téměř jedna třetina proteinů je fosforylovaných, a to s relativním výskytem v poměru fosfoserin ~90 %, fosfothreonin ~10 % a fosfotyrosin ~0,05 % [22]. Na základě genomového sekvenování bylo zjištěno, že 2 - 3 % eukaryotických genů jsou kódem pro proteinkinázy a počet proteinfosfatáz v lidském genomu je vyšší jak 1000 [23].

Fosforylace může probíhat na různých aminokyselinových zbytcích (viz obrázek 2.7). Připojením fosfátové skupiny na serin, threonin nebo tyrosin vznikají fosfomonoestery. Podobně vznikají fosforamidáty u histidinu, argininu a lysinu, případně acylfosfáty u aspartátu a glutamátu, nebo thiofosfáty u cysteinu. Odhaduje se, že okolo 6 % proteinových fosforylací probíhá na histidinu, což je více než v případě fosforylace na tyrosinu [24].

Fosforylovaný serin, threonin i tyrosin je stabilní v kyselém prostředí. K rozdělení fosfotyrosinu (pTyr) od fosfothreoninu (pThr) a fosfoserinu (pSer) se využívá stability pTyr v alkalickém prostředí, pThr a pSer jsou v alkalickém prostředí nestabilní. Fosforamidáty jsou v kyselém prostředí velmi labilní a v zásaditém prostředí naopak stálé, s výjimkou fosfoargininu, který i v zásaditém prostředí je nestálý [25].



Obrázek 2.7 - Strukturní vzorce vybraných fosforylovaných aminokyselin [26]

2.2.6 Význam a funkce fosforylace u proteinů

Fosforylace proteinů se uplatňuje při řízení mnoha buněčných procesů, jako například v metabolismu, homeostáze, buněčné komunikaci a signalizaci, proliferaci, diferenciaci a apoptóze [23].

Reverzibilní fosforylace je důležitý regulační mechanismus metabolismu a buněčné signální dráhy. Základní mechanismus přenosu signálu je uskutečněn pomocí proteinkináz, které jsou součástí cytoplazmatických domén mnoha receptorů (např. faktor stimuluje růst kolonií M-CSF, růstový faktor produkovaný destičkami PDGF, transformující růstový faktor TGF- β) nebo nekovalentně asociované s receptory (např. receptor T lymfocytů pro antigen TCR, receptor B-lymfocytů pro antigen BCR, Fc receptory) [27, 28].

Fosforylace proteinů je významná například při regulaci neuronálních funkcí, a je tedy nezbytná pro spouštění zásadních synaptických změn v učení a paměti. Proteinové kinázy, důležité pro aktivitu enzymu, byly dříve dávány do popředí na rozdíl od fosfatáz zajišťujících defosforylaci, tedy ztrátu aktivity. Dnes jsou fosfatázy považovány za důležité prvky v regulaci synaptické plasticity a spouštění formování paměti [29].

Fosforylací na serinu, threoninu a tyrosinu jsou vytvářena vazebná místa pro fosfoprotein-vazebné domény. Tyto domény jsou základem pro spojení molekul s jejich kinázou a efektoem k vytvoření multiproteinových komplexů, jež jsou schopny ovládat jejich aktivitu, buněčnou lokalizaci a vzájemného partnera [30]. Multiproteinovými komplexy jsou přenášeny informace ke kontrole iontového toku, přeskupení cytoskeletu, zákonitosti genetické exprese, průběhu buněčného cyklu a programované buněčné smrti [31].

2.2.6.1 Fosfotyrosin

Jako první byla objevena Src homologní doména SH2, která váže pTyr v proteinech. Tyto fosfotyrosinkinázy (PTK) obsahují N-terminální konec, který je posttranslačně modifikován připojením zbytků kyseliny myristové a palmitové. Na N-konec navazuje SH3 doména, která je schopna se spojit se sekvencí bohatou na prolin. Následuje SH2 doména, která váže sekvence s pTyr. V C-terminální části se nachází SH1 doména, neboli enzymově aktivní katalytická doména, a krátká regulační oblast enzymu. V lidském genu bylo nalezeno okolo 100 SH2 domén [27, 30, 32].

Výsledkem fosforylace jsou časté změny enzymové aktivity a signalizačních procesů proteinů [33]. Procesy fosforylace a defosforylace jsou spouštěny sekrecí růstových faktorů nebo hormonů, které aktivují tyrosinkinázy k navození specifické buněčné odpovědi [34]. Src homologní oblasti jsou obsaženy v celulórních faktorech, které jsou součástí signalizačních cest. SH2 domény váží s vysokou afinitou specificky fosforylované tyrosinové zbytky v závislosti na sekvenci AA, které jsou přilehlé k pTyr, a tím je spouštěna postupná intracelulární signalizační kaskáda. Další doména, která je schopna rozpoznat pTyr, je fosfotyrosin vázající (PTB) doména [30, 32].

Fosforylace probíhající na tyrosinu je součástí kontroly růstu a diferenciac normálních a nádorových buněk. Příkladem substrátu pro fosfotyrosinfosfatázy (PTP) je protein p34, jehož aktivita se velmi mění během buněčného cyklu, a to v závislosti na změnách fosforylovaných stavů a regulačních molekul [35]. pTyr je nejdříve detekován na počátku DNA syntézy a svého maxima dosáhne v G2 fázi. Pro přechod buňky z G2 fáze do M fáze je nutná defosforylace tyrosinových zbytků [36].

2.2.6.2 Fosfoserin a fosfothreonin

Fosforylace na serinových a threoninových zbytcích byla dříve považována za regulaci funkce proteinů převážně prostřednictvím alosterického řízení katalytické aktivity než přímým zprostředkováním protein-proteinových interakcí. Postupnou identifikací signálních molekul a modulárních domén, které se specificky váží ke krátkým úsekům obsahujících pSer a pThr, byla objasněna přítomnost těchto substrátů v protein-proteinových signálních komplexech jako odpověď na fosforylaci serin/threoninkinázami. Mezi pSer/pThr vázající jednotky patří například 14-3-3 proteiny a WW domény. První byly identifikovány 14-3-3 proteiny, které jsou přítomny ve vysokém množství ve všech eukaryotických buňkách. Savčí buňky obsahují sedm různých 14-3-3 genů. 14-3-3 vázající protein má důležitou roli v kontrole buněčných cyklů, aktivaci mitogen-aktivní proteinkinázy, apoptóze, transkripci genů a přestavbě chromozómů [31].

2.2.6.3 Fosforylace v patofyziologii

SH2 domény plní různé buněčné a molekulární funkce, kdy mutace, které se vyskytují na těchto doménách různých proteinů, mají za následek defekty v signalizačních cestách, které se mohou projevit jako onemocnění. Některé agamaglobulinémie jsou následkem bodové mutace v SH2 doméně Bruton tyrosinkinázy, zatímco porucha nebo bodová mutace v SH2 doméně proteinu 1A, jehož součástí je pouze jedna SH doména a krátký karboxyterminální konec, způsobuje lymfoproliferativní syndrom [30].

Nízkomolekulární proteintyrosinfosfatáza (LMPTP), neboli kyselá fosfatáza 1 (ACPI), je nezbytná pro normální funkci červených krvinek, imunitní systém, skladování lipidů v adipocytech, neurony a ostatní buňky [37]. LMPTP byla původně izolována z červených krvinek [38], a později byla objevena ve vysokých koncentracích v ostatních tkáních. Jsou známy její dvě izoformy, F (fast) a S (slow), které obsahují pouze 157 AA s molekulovou hmotností 18 kDA. Vysoká hodnota LMPTP aktivity slouží jako ochrana před alergiemi, astmatem a potraty [39], snižuje hladinu lipidů v krvi, ale zároveň může vést ke zvýšení cukru v krvi, snížení produkce haptoglobinu a podporuje hypertrofii myokardu. Nízké hodnoty LMPTP korelují s obezitou a její nízká hodnota v mozku může vést k rozvoji Alzheimerovy choroby [37].

Mnoho genetických mutací spojených s vývojem rakoviny ovlivňují geny kódující proteiny v signalizačních cestách. Několik typů rakoviny je ovlivněno činností PTK

v určitých cestách regulace nebo přenosu signálu, proto i nově vyvinuté léky, např. imatinib, sunitinib a dasatinib, působí jako přímé inhibitory příslušných PTK [40, 41].

Mutace v PKD1 a PKD2 genu, který kóduje polycystin 1 a polycystin 2, způsobuje autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin. Proteinové kinázy hrají důležitou roli v regulaci polycystinu 1 a 2, kdy negativní dopad má přetrvávající aktivace cyklické adenosinmonofosfát (cAMP) závislé kinázy [42].

X-vázaná Emeryho-Dreifussova svalová dystrofie je způsobena mutací genu kódujícího fosfoprotein emerin, který je součástí tkáňově specifické genové regulace, signalizační a jaderné struktury [43].

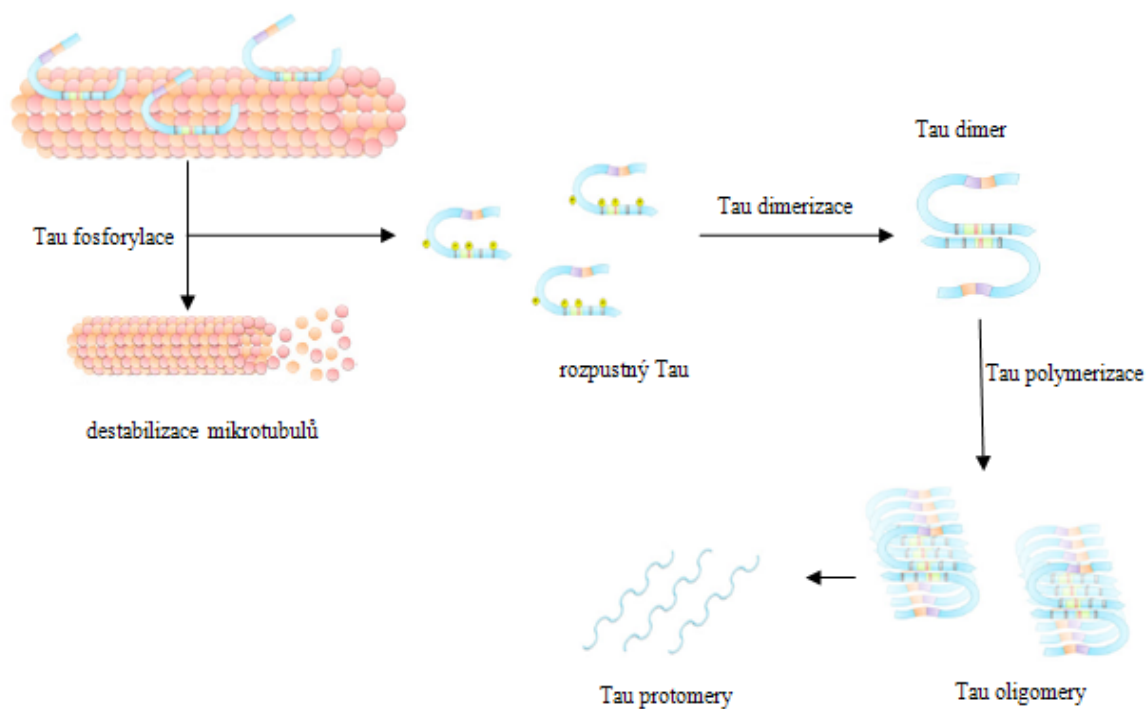
Noonanův syndrom je u více jak 50 % případů způsoben mutací genu, který kóduje PTP SHP-2, která se skládá ze dvou Scr homologních domén. Tato mutace způsobuje nadměrnou aktivitu SHP-2 [44].

K různým onemocněním mohou vést i odchylky fosforylace a defosforylace na histidinu, kdy například inhibice histidinkinázy i histidinfosfatázy vede k potlačení sekrece inzulínu. Defekty v histidinkináz-fosfatázové signalizační kaskádě mohou vést k sekrečním abnormalitám inzulínu a metabolické dysfunkci ostrůvků β -buněk [45].

Hyperfosforylace Tau proteinu v Alzheimerově chorobě

Tau protein je neuronální protein asociovaný s mikrotubuly, jehož hlavní biologickou funkcí je stabilizace mikrotubulárních struktur. Tau je fosfoprotein, jehož hyperfosforylace hraje významnou roli v patogenezi neurofibrilárních degenerací. [46]

Odloučení Tau od mikrotubulů, pravděpodobně fosforylací, vede k destabilizaci mikrotubulů. Se vzrůstající fosforylací Tau se snižuje afinita k mikrotubulům a výsledkem je destabilizace neuronového cytoskeletu. PTM mohou, přímo nebo nepřímo, podporovat Tau dimerizaci a tím měnit jeho konformaci. Stabilní Tau dimery tvoří oligomery, které pokračují v agregaci za vzniku Tau protomerů [47, 48]. Tento proces je zobrazen na obrázku 2.8. Fosforylace je nejvíce probíhající PTM Tau. Je předpokládáno 85 fosforylačních míst na Tau proteinu, kde 45 % připadá na serin, 35 % na threonin a pouze 5 % na tyrosin [47].



Obrázek 2.8 - Znáznornění uvolnění Tau a jeho dimerizace a polymerizace za vzniku protomer [47]

Hyperfosforylovaný Tau protein je neschopný se vázat k mikrotubulům, což vede k přerušení buněčného transportu a odumírání neuronů. Nahromadění intracelulárního Tau proteinu není pouze ve spojení s Alzheimerovou chorobou, ale vyskytuje se také u jiných neurodegenerativních onemocnění označovaných jako taupatie [49, 50].

Herpes simplex virus typ 1 (HSV-1) je neurotropní virus, který latentně přežívá v hostitelských buňkách a je schopen modifikovat fosforylovaný stav Tau proteinu. Infekce HSV-1 vede k nahromadění fosforylovaného Tau v replikačních místech v jádru. Tato akumulace je závislá na době infekce a virové dávce. Tau hyperfosforylace vyvolaná HSV-1 může ovlivnit Tau aktivitu ve prospěch podpoření transkripce a replikace viru v neuronech a vést tak k neurodegeneraci. Infekce HSV-1 je považována za rizikový faktor Alzheimerovy choroby [51, 52].

2.3 Využití kapilární zónové elektroforézy pro analýzu proteinů a peptidů

CZE je široce využívána pro analýzu proteinů a peptidů pro její vysoké rozlišení, univerzálnost, potřeby malého množství vzorků, které je obzvláště důležité při analýze biologických materiálů, a minimální produkce odpadů. Naopak nedostatek citlivosti, přesnosti a nízká reprodukovatelnost jsou tradiční nedostatky CZE [5].

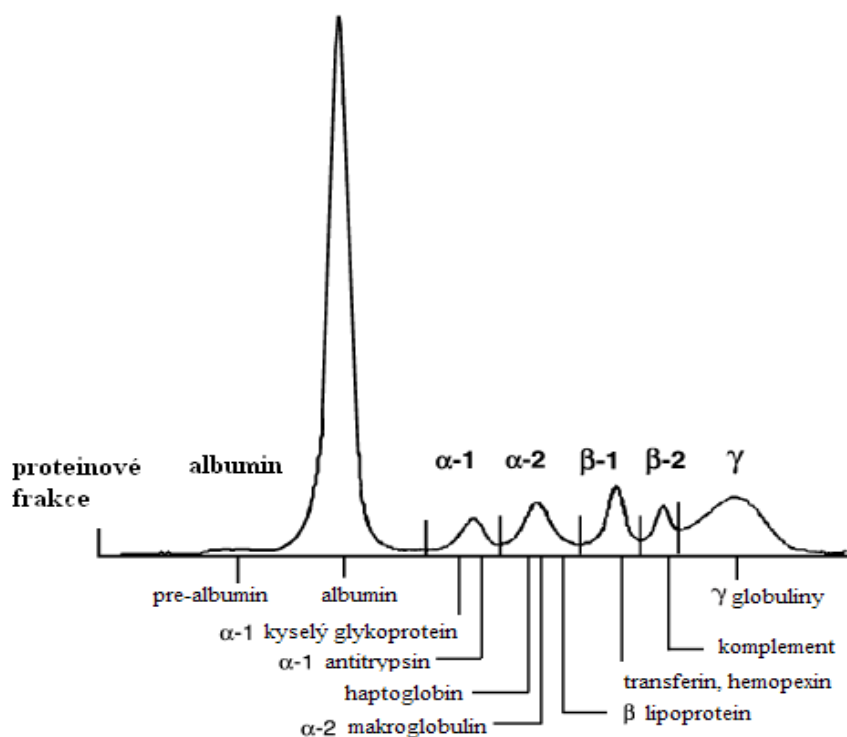
Touto metodou je možno analyzovat proteiny v biologickém materiálu, např. v krvi a moči, proteiny v zemědělských produktech a potravinách (cereální a mléčné proteiny), dále proteinová léčiva a rekombinantní proteiny [53].

2.3.1 Sérové proteiny

CZE je vhodná automatická metoda pro separaci sérových a monoklonálních proteinů od počátku 90. let. Díky přítomnosti peptidových vazeb je lze stanovit s využitím UV detekce při 214 nm. Nevýhodou je, že každá látka, která absorbuje při této vlnové délce a je v séru přítomna, může rušit analýzu. Mezi takové látky patří především antibiotika (např. piperacillin-tazobactam, sulfamethoxazol, ampicilin-sulbactam), ale také fibrinogen v nedostatečně vysráženém séru, C-reaktivní protein (> 300 mg/l) nebo degradační produkty v důsledku stárnutí vzorku [54 - 56].

Sérové proteiny mohou být pomocí CZE rozděleny do šesti zón: albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β_1 -globulin, β_2 -globulin a γ -globulin (viz obrázek 2.9). Změny v těchto zónách mohou korelovat se zdravotním stavem. Nejvíce sledované jsou zóny β -globulinů a γ -globulinů, ve kterých mohou být přítomny monoklonální proteiny. Detekce těchto monoklonálních proteinů je důležitá pro hodnocení pacientů s lymfoproliferativním onemocněním, jako je mnohočetný myelom, Waldenströmova nemoc, leukémie, amyloidóza a monoklonální gamapatie [57, 58].

Metody CZE byly také vyvinuty pro analýzu monoklonálních protilátek, které představují důležitou třídu bioterapeutik. Jedná se o komplexní molekuly, jejichž heterogenita je dána například deaminací, oxidací, glykosylací, agregací a proteolytickým štěpením. Lze určovat jejich identitu, náboj a disulfidické izomery [59 - 61].



Obrázek 2.9 - CZE separace sérových proteinů u zdravého jedince [62]

2.3.2 Peptidy

Podobně jako u proteinů lze CZE-UV využít pro separaci peptidů, a to jak vlastních, tak i získaných štěpením proteinů. Při UV detekci peptidů obsahujících AA tryptofan nebo tyrosin se používá vlnová délka 280 nm. Při CZE-LIF (laser indukovaná fluorescence) se využívá nativní fluorescence těchto AA. U peptidů, které neobsahují tryptofan a tyrosin, se využívá před vlastní separací derivatizace s použitím fluorescenčních látek, např. fluorescein, izothiokyanát a fluoreskamin [63 - 65].

CZE lze využít i ke sledování dynamických změn vzorků peptidů. Mohou to být chemické a enzymatické reakce (deaminace, oxidace, hydrolýza, redukce), ale také fyzikální změny (agregace, denaturace) [63, 66, 67].

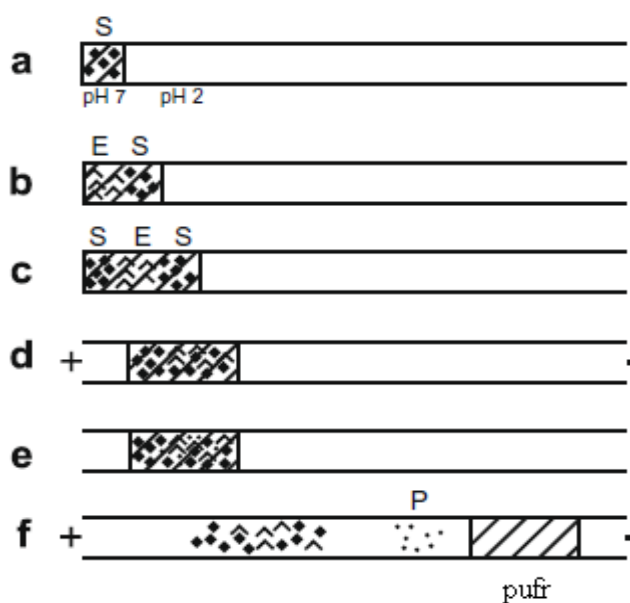
Degradační produkty hydrolýzy, izomerace a enantiomerace dvou tripeptidů byly studovány v kyselém a zásaditém prostředí. Při pH 2 byly pozorovány degradace peptidů cestou C-terminální deaminace a hydrolýzy, zatímco při pH 10 izomerace a enantiomerizace v kombinaci s deaminací. Další studie sledovala thiol-disulfidické výměnné reakce mezi oxytocinem a glutathionem [66, 68].

Pomocí CZE-UV lze stanovovat i thiolické peptidy obsažené v komplexních biologických maticích. K jejich stanovení je nutná derivatizace a následná SPE na kolonkách, aby došlo k odstranění inerferující matrice vzorku [69].

2.3.3 Enzymy

Enzymy katalyzují biochemické reakce důležité pro fyziologický růst, dozrávání a reprodukci. Stanovení aktivity enzymů je důležité v biochemii, molekulární biologii, medicíně pro klinickou analýzu a farmacii při vývoji nových léčiv [70].

Jejich stanovení je možné pouze nepřímo na základě jejich katalytické aktivity. K jejich stanovení se využívá celá řada metod, mezi které patří i CZE. Pomocí CZE lze stanovit aktivitu enzymů dvěma způsoby: klasickou metodou, kdy enzymová reakce probíhá v reakční nádobce a CZE je využita pouze pro separaci produktů a substrátů, nebo elektroforeticky zprostředkovanou mikroanalýzou (EMMA), kde CZE slouží navíc i jako reakční prostředí pro enzymatickou reakci [70, 71].

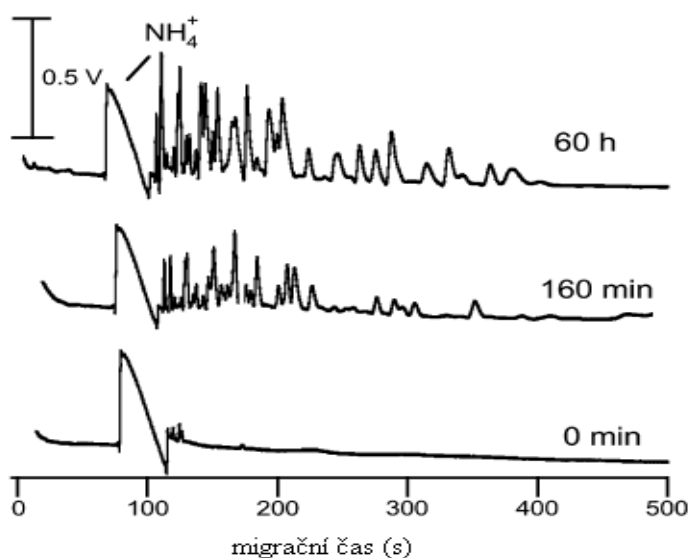


Obrázek 2.10 - Schématické znázornění principu elektroforeticky zprostředkované mikroanalýzy pro štěpení trypsinem. S – substrát, E-enzym, P-produkt, a) hydrodynamické nadávkování pufru se substrátem, b) hydrodynamické nadávkování pufru s enzymem, c) hydrodynamické nadávkování pufru se substrátem, d) aplikace napětí k promíchání enzymu se substrátem, e) štěpení a f) elektroforetická separace [72]

Jako první elektroforetickou enzymovou analýzu v kapiláře popsali Bao a Regnier [71]. Stanovovali přeměnu NADP na NADPH pomocí glukóza-6-fosfátdehydrogenázy při oxidaci glukózy-6-fosfát na 6-fosfoglukonát .

EMMA je metoda, při které je enzym a substrát nadávkován do kapiláry v oddělených zónách a vlivem napětí se zóny spojí v důsledku rozdílných elektroforetických mobilit. Po spojení zón začne probíhat štěpení substrátu a vzniklé produkty migrují směrem k detektoru. Princip EMMA je znázorněn na obrázku 2.10 [71, 72].

Schuchert-Shi a Hauser analyzovali enzymatické štěpení proteinů pomocí CZE s konduktometrickou detekcí. Proteiny cytochrom C, myoglobin, lidský sérový albumin, bovinní sérový albumin, gastrin o 17 AA byly štěpeny pepsinem a trypsinem klasickou metodou (viz obrázek 2.11) nebo EMMA metodou [72].



Obrázek 2.11 - CZE separace štěpeného cytochromu C trypsinem klasickou metodou, štěpení při 37 °C v 0.2 M NH₄HCO₃ a 2 M urea (pH 7.9), separace v 2.3 M CH₃COOH /0.05% Tween 20 (pH 2.1) [72]

Ke stanovení intracelulární aktivity proteinkinázy A, např. v buňkách vylučujících inzulin, byla vyvinuta elektroforetická metoda využívající značený substrát pomocí zeleného fluorescenčního proteinu [73, 74].

Bylo publikováno i stanovení produktů enzymatické reakce angiotensin-konvertujícího enzymu se substrátem hippuryl-L-histidyl-L-leucin a stanovení aktivity tohoto enzymu na základě kvantifikace hippurové kyseliny [75].

2.3.4 Proteiny a peptidy v potravinách

Proteiny a peptidy v potravinách ovlivňují jejich biologické vlastnosti. Uplatnění CZE v analýze potravin je například při stanovení proteinového profilu olivového oleje, určení frakcí kaseinu během různých stupňů zrání sýru a separaci peptidů v mléčných produktech [76 - 79].

2.3.5 Kasein

CZE má velké zastoupení v analýze mléčných proteinů, především kaseinů. Kasein je hlavním proteinem v savčím mléce a lze analyzovat jednotlivé varianty kaseinu – α_{s1} , α_{s2} , β , κ kasein, nebo jeho modifikované formy [80, 81].

Kasein je důležitý nejen v mléčném průmyslu, ale také v klinickém odvětví, kde se používá jako marker funkce mléčné žlázy a nebo byl použit i jako standard ke studiu vývoje a regulace mléčné žlázy [82, 83].

Separace kaseinů byla mnohokrát optimalizována pro různé účely. Počátečním problémem byla přítomnost kaseinu v mléce ve formě micel, kde k jejich rozrušení se používá redukční činidlo dithiotreitol. Aby nedošlo k obnově micel během elektroforetické separace, je používán přídavek 6 – 8 M močoviny do pracovního elektrolytu [80, 84 - 87].

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce byla příprava pokrytých kapilár pro kapilární zónovou elektroforézu, monitorování účinnosti pokrytí a určení vhodnosti pro následující separace.

Dalším cílem byla příprava vzorku fosfoproteinů α -CN, která zahrnovala proteolytické štěpení a defosforylaci.

V poslední řadě bylo nutné najít vhodné podmínky pro elektroforetickou separaci fosfopeptidů před a po enzymové defosforylaci s využitím kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

- P/ACE System MDQ Capillary Electrophoresis, 32 Karat Software Version 5.0, Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA)
- hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF-MS 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- MALDI destička Opti – TOF™ 384 Well Insert, 123 x 81 mm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- analytické váhy Scaltec SBC 32, s citlivostí 0,1 mg (Scaltec Instrument GmbH, Goettingen, Německo)
- analytické váhy Kern ABT 220-5DM, s citlivostí 0,01mg (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- předvážky Kern PCB 400-2, s citlivostí 0,01g (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- pH metr Orion model 420 A+ (Orion Research Inc., Beverly, MA, USA)
- pH elektroda Boeco BA 25 (Boeco, Hamburg, Německo)
- magnetické míchadlo MM4 (Lavata a.s., Chotutice, Radim u Kolína, ČR)
- ultrazvuková lázeň Bandelin (Bandelin GmbH, Berlín, Německo)
- topné hnízdo Block heater Grand-bio BTD (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- termostat Biological Thermostat BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- vertikální rotátor Grant-bio PTR-30 (Grant Instrument Ltd., Cambridge, UK)
- třepačka Minishaker MS 2 (IKA® Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Německo)
- rotační vakuový koncentrátor RVC 2-18 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Německo)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- magnetický separátor Dynal MPC-S (Dynal, Carlsbad, CA, USA)
- SPE kolonka (3M Empore™ High Performance Extraction Disk Cartridges, 4mm/1ml, kapacita 100 mg/1ml, Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- mikrostříkačka Hamilton - 50, 100 µl (Hamilton AG, Bonaduz, Švýcarsko)

- nepokrytá křemenná kapilára, vnitřní průměr 50 μm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)
- mikročerpadlo pro injekční stříkačky (KD Scientific, Holliston, MA, USA)
- čerpadlo mobilní fáze pro mikro-LC LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- mikrozkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- jednorázové PTFE filtry 0,22 a 0,45 μm , 13 a 25 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- injekční stříkačky Luer – 2, 5, 20 ml (Braun, Melsungen, Německo)
- špičky GeLoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- keramický nůž
- klasické laboratorní sklo a pomůcky

4.2 Chemikálie

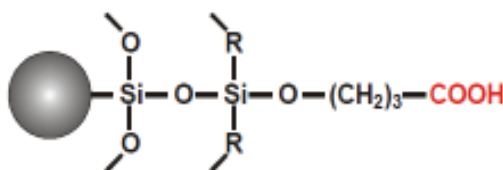
- α -kasein z kravského mléka, 70 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- glutaraldehyd, 50 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- hydrogenfosforečnan sodný, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- hydrogenuhličitan amonný (Lachema, Brno, ČR)
- hydroxid sodný, 1M roztok (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- hydroxypropylmethylcelulóza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- chlorid hořečnatý (Lachema, Brno, ČR)
- chlorid vápenatý (Penta, Chrudim, ČR)
- kyselina chlorovodíková, 37% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- kyselina octová (Lachema, Brno, ČR)
- kyselina fosforečná, 85% (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- močovina (Lachema, Brno, ČR)
- MES (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- thiomčovina (Lachema, Brno, ČR)
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

4.3 Částice

- titanové částice Titansphere, 10 μm (GL Science Inc, CA, USA)

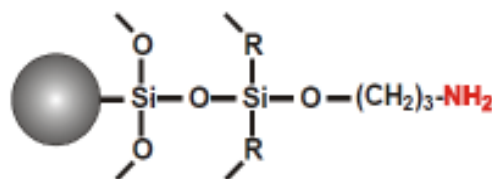
magnetické částice:

- magnetické částice SiMAG-COOH, velikost: 1 μm , hmotnost: 50 mg/ml, počet částic: $1,8 \times 10^{12}/\text{g}$, plocha povrchu: 50 m^2/g , hustota: 2,25 g/cm^3 (Chemicell, Berlín, Německo)



Obrázek 4.1 - Magnetické částice SiMAG - karboxyl (Chemicell, Berlín) [88]

- magnetické částice SiMAG-NH₂, velikost: 1 μm , hmotnost: 50 mg/ml, počet částic: $1,8 \times 10^{12}/\text{g}$, plocha povrchu: 50 m^2/g , hustota: 2,25 g/cm^3 (Chemicell, Berlín, Německo)



Obrázek 4.2 - Magnetické částice SiMAG-amino (Chemicell, Berlín) [88]

4.4 Metody přípravy vzorku

4.4.1 Imobilizace trypsinu na SiMAG-COOH magnetických částicích

Chemikálie:

- trypsin TPCCK (13 816 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- trypsin (8 300 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- N-hydroxysulfosuccinimid sodný (Sulfo-NHS), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- benzamidin hydrochlorid hydrát (BA), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

- promývací a vazebný pufr: 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- roztok benzamidinu: 5 mg/500 μ l 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 – čerstvě připravený

Postup:

Ve 470 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 bylo rozpuštěno 9 mg trypsinu a k tomuto roztoku bylo přidáno 30 μ l zásobního roztoku BA. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě a otáčení po dobu 10 minut. 3 mg magnetických částic byly promyté 3 x 1,5 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a k promytým částicím bylo přidáno 22,5 mg EDC ve 200 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3; 3,75 mg Sulfo-NHS ve 200 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3; 500 μ l roztoku trypsinu po inkubaci a 100 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 pro doplnění na objem 1 ml. Následovala imobilizace při otáčení a 4 °C přes noc.

Po imobilizaci byl nosič promyt 10 x 1,5 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Poté byla stanovena aktivita trypsinu s použitím 0,3 mg nosiče pomocí nízkomolekulárního substrátu N- α -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilidu. Imobilizovaný enzym byl skladován v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3 při 4 °C.

4.4.2 Stanovení aktivity trypsinu pomocí nízkomolekulárního substrátu N- α -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilidu

Chemikálie:

- trypsin TPCK (13 816 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- trypsin (8 300 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- N- α -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (BAPNA), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- N,N-dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

- substrátový roztok: 0,055 M BAPNA v N,N-dimethylformamidu – čerstvě připravený
- ředící a reakční roztok: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂

Kalibrace trypsinu:

- zásobní roztok trypsinu: 1 mg trypsinu/1 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂

Tabulka 4.1 - Kalibrační řada trypsinu

C trypsinu (µg/100 µl)	V zásobní roztok enzymu (µl)	V ředící roztok (µl)
1	2	198
3	6	194
5	10	190
7	14	186
9	18	182
11	22	178
13	26	174
15	30	170
slepý pokus	-	200

Postup:

K 1 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂ bylo přidáno 0,1 ml vzorku imobilizovaného (0,3 mg částic) nebo solubilního enzymu a 0,02 ml substrátového roztoku. Směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. V případě imobilizovaného enzymu byla inkubace provedena za mírného otáčení a po jejím skončení byl enzym oddělen pomocí magnetického separátoru. Reakce byla zastavena přidáním 0,2 ml 30 % CH₃COOH. Směs byla proměřena spektrofotometricky při 405 nm proti slepému vzorku, tj. reakční směsi bez vzorku enzymu.

4.4.3 Štěpení α -kaseinu v roztoku

Chemikálie:

- trypsin TPCK (13816 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- trypsin (8300 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- dithiotreitol (DTT), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- iodacetamid (IAA), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

- 50 mM NH_4HCO_3 pH 8 (neupravuje se)
- 200 mM DTT ve vodě – čerstvě připravený
- 400 mM IAA ve vodě – čerstvě připravený
- 1 mg/ml α -kaseinu v 50 mM NH_4HCO_3

Postup:

1 mg α -CN byl rozpuštěn v 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 . K tomuto roztoku bylo přidáno 50 μl 200 mM DTT a směs byla inkubována 60 minut při 37 °C. Potom ke směsi bylo přidáno 50 μl 400 mM IAA a směs byla inkubována v temnu 30 minut při laboratorní teplotě. Po této inkubaci byl přebytečný IAA ve směsi neutralizován přidáním 50 μl 200 mM DTT a směs byla redukována 15 minut při laboratorní teplotě. Poté ke směsi bylo přidáno 500 μl 50 mM NH_4HCO_3 a 50 μg imobilizovaného trypsinu (poměr protein : trypsin = 20 : 1). Směs byla inkubována přes noc při 37 °C.

Z důvodu dosažení požadované koncentrace 3 mg/ml bylo štěpení α -CN v roztoku provedeno třikrát současně vedle sebe. Ke štěpení 1 mg α -CN byl použit trypsin TPCK a ke 2 mg trypsin. Koncentrace α -CN byla tímto krokem snížena, a tak všechny 3 vzorky byly zakoncentrovány na objem přibližně 250 μl a následně smíchány v jeden roztok a doplněny redestilovanou vodou na objem 1 ml. Byl získán štěpený α -CN o koncentraci 3 mg/ml, který byl skladován při 4 °C.

4.4.4 Elektroforéza v gelu (Tricin-SDS-PAGE)

Chemikálie:

- akrylamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- N,N'-methylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- dodecylsulfát sodný (SDS), (Lachema, Brno, ČR)
- persíran amonný p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- tricín (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

a) pro přípravu gelů a vzorků:

- roztok A1: 46,5 % (w/v) akrylamid a 3 % (w/v) bisakrylamid
(4,65 g akrylamidu a 0,3 g bisakrylamidu → doplněno na 10 ml destilovanou vodou)
- roztok A2: 48 % (w/v) akrylamid a 1,5 % (w/v) bisakrylamid
(4,8 g akrylamidu a 0,15 g bisakrylamidu → doplněno na 10 ml destilovanou vodou)
- roztok B: 3,0 M Tris-HCl pH 8,45 s 0,3 % SDS (gelový pufr)
(10,9 g Tris/30 ml destilované vody, úprava pH pomocí HCl, přídavek 0,09 g SDS)
- roztok C: 10 % (w/v) persíran amonný
- roztok D: TEMED
- pufr pro vzorky (BIO-RAD): 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40 % glycerol, 2 % SDS, 0,04 % Coomassie Blue G250
- elektrodový pufr: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS
(6,057 g Tris, 8,95 g Tricin, 0,5 g SDS/500 ml destilované vody)

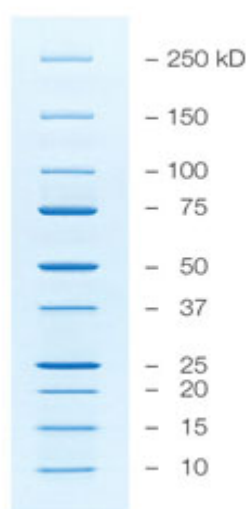
b) pro barvení amoniakálním stříbrem:

- fixační roztok: 5 % CH₃COOH a 50 % ethanol
- 10 % glutaraldehyd – čerstvě připravený

- roztok amoniakálního stříbra: 20 % AgNO_3 byl přikapáván ke směsi 1,4 ml amoniaku, 239 μl 9M NaOH a 21 ml destilované vody až do vzniku světle hnědého zákalu, poté byl roztok doplněn na 100 ml destilovanou vodou
- vyvolávací roztok: 0,05 % kyselina citrónová a 0,04 % formaldehyd
- ustalovací roztok: 5 % kyselina octová

Reagencie:

- proteinový marker 10 - 250 kDa obsahuje 10 rekombinantních proteinů v rozmezí 10 - 250 kDa (viz obrázek 4.3), kde proužky proteinů o M_r 25, 50 a 75 kDa jsou nejintenzivnější a slouží jako referenční markery (Bio-Rad, Berkley, CA, USA)
- polypeptidový marker obsahuje proteiny v rozmezí 1,3 - 26,6 kDa: triózafosfátizomeráza 26,625 kDa, myoglobin 16,950 kDa, α -laktalbumin 14,437 kDa, aprotinin 6,512 kDa, oxidovaný B řetězec inzulinu 3,496 kDa a bacitracin 1,423 kDa (viz obrázek 4.4), (Bio-Rad, Berkley, CA, USA)



Obrázek 4.3 - Proteinový molekulový marker použitý pro Tricin-SDS-PAGE elektroforézu [89]



Obrázek 4.4 - Polypeptidový molekulový marker použitý pro Tricin-SDS-PAGE elektroforézu [89]

Tabulka 4.2 - Příprava gelů s různou porozitou

	zaostřovací gel (ml)	dělicí gel (ml) (M _r 5 - 20 kDa)	dělicí gel (ml) (M _r 1 - 70 kDa)	dělicí gel (ml) (M _r 5 - 100 kDa)
destilovaná voda	2,1	1,666	1,666	2,316
roztok A1	-	1,666	-	-
roztok A2	0,25	-	1,666	1,016
roztok B	0,775	1,666	1,666	1,666
roztok C	0,025	0,025	0,025	0,025
roztok D	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025

Postup:

Ve zkumavce byl dělicí gel o požadované velikosti pórů připraven smícháním příslušného množství roztoku A1, A2, B, D a destilované vody podle tabulky 4.2 a následně odvzdušněn. Poté ke směsi bylo přidáno 0,025 ml roztoku C a obsah zkumavky byl opatrně promíchán. Takto připravený roztok byl napipetován do určité výšky mezi dvě skla určená pro přípravu gelu a převrstven destilovanou vodou pro ostré rozhraní. Následovala polymerace gelu.

Zaostřovací gel byl připraven stejným způsobem jako dělicí gel podle tabulky 4.2. Po polymerizaci dělicího gelu byla odsána destilovaná voda z prostoru nad ním a dělicí gel byl převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byla vložena šablona s 10 jamkami. Poté následovala opět polymerizace.

Vzorky určené pro elektroforézu byly připraveny smícháním se vzorkovým pufrům v poměru 1 : 2. Poté byly vzorky povařeny 3 min při 100 °C v topném hnízdě. Do startovacích jamek bylo nadávkováno předem vypočtené množství vzorku v závislosti na koncentraci. Maximální dávkované množství bylo 20 µl.

Podmínky dělení pro zatažení vzorků do zaostřovacího gelu byly nastaveny na konstantní napětí 30 V s proudem 0,06 A po dobu 30 minut. Pro vlastní elektroforetické dělení byly podmínky změněny, a to na konstantní napětí 100 V s proudem 0,06 A po dobu 60 - 120 minut podle porozity gelu.

Po dokončení separace byl gel opláchnut destilovanou vodou a fixován při 4 °C přes noc ve fixačním roztoku. Následující den byla nejdříve provedena rehydratace gelu v destilované vodě 30 minut. Pak byl gel 30 minut inkubován s 10 % glutaraldehydem a následně 6 x promyt v destilované vodě po dobu 10 minut. Promytý gel byl inkubován 15

minut v roztoku amoniakálního stříbra. Po promytí gelu v destilované vodě, vyvolání ve vyvolávacím roztoku byl ustálen a uskladněn v roztoku 5 % kyseliny octové. Gel byl poté skladován při 4 °C.

4.4.5 Imobilizace alkalické fosfatázy na SiMAG-NH₂ magnetických částicích

Chemikálie:

- alkalická fosfatáza z bovinní intestinální mukózy (ALP), (8407 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- EDC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- glycerol (Lachema, Brno, ČR)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

- promývací a vazebný pufr: 0,1 M MES pH 6
- promývací pufr po imobilizaci: 50 mM Tris-HCl pufr pH 8,5
- skladovací pufr: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 8,5/50 % glycerol

Postup:

1 mg magnetických částic byl promyt 10 x 1 ml 0,1 M MES pufru pH 6. Po promytí bylo k částicím postupně přidáno 25 mg EDC ve 400 µl 0,1 M MES pufru pH 6 a 2,5 mg Sulfo-NHS ve 400 µl 0,1 M MES pufru pH 6. Nakonec bylo přidáno 200 µl roztoku 0,1 M MES pufru pH 6, ve kterém bylo obsaženo 700 U ALP. Směs byla inkubována při otáčení přes noc při 4 °C.

Po imobilizaci byly částice 5 x promyty 50 mM Tris-HCl pufrům pH 8,5. Byla stanovena aktivita ALP s použitím 50 µg částic pomocí p-nitrofenyl fosfátu. Imobilizovaný enzym byl skladován v 0,1 M Tris-HCl pufru pH 8,5/50 % glycerol při 4 °C.

4.4.6 Stanovení aktivity alkalické fosfatázy pomocí p-nitrofenyl fosfátu

Chemikálie:

- alkalická fosfatáza z bovinní intestinální mukózy (ALP), (8407 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- p-nitrofenyl fosfát (PNPP), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

- substrátový roztok: 15,2 mM vodný roztok PNPP
- ředící a reakční roztok: 100 mM glycinový pufr pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂

Kalibrace ALP:

- zásobní roztok enzymu: 300 U ALP/1 ml 100 mM glycinový pufr pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂

Tabulka 4.3 - Roztoky ALP pro přípravu kalibrační řady

jednotky aktivity enzymu (U)	V zásobní roztok enzymu (μl)	V ředící roztok (μl)
0,5	1,67	498,33
1	3,33	496,67
1,5	5	495
2	6,67	493,33
2,5	8,33	491,67
3	10	490
slepý pokus	-	500

Postup:

Bylo smícháno 0,5 ml 100 mM glycinového pufru pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂ a 0,5 ml 15,2 mM substrátového roztoku PNPP. Směs byla inkubována 30 minut za otáčení při 37 °C. Potom bylo ke směsi přidáno 0,1 ml vzorku imobilizovaného (50 μg částic) nebo solubilního enzymu. Z připravených roztoků ALP (viz tabulka 4.3) bylo do reakce odebráno 100 μl, tzn., že výsledná kalibrační řada byla v rozmezí 0,1 - 0,6 U enzymu.

Směs byla inkubována 15 minut za otáčení při 37 °C. Imobilizovaný enzym byl odstraněn pomocí magnetického separátoru. Reakce byla ukončena přidáním 0,05 ml 9M NaOH a směs byla proměřena spektrofotometricky při 405 nm proti slepému vzorku.

4.4.7 Defosforylace peptidů α -kaseinu pomocí alkalické fosfatázy

Chemikálie:

- alkalická fosfatáza z bovinní intestinální mukózy (ALP), (8407 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- ostatní chemikálie

Roztoky:

- reakční pufr: 100 mM glycinový pufr pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂
- zásobní roztok enzymu: 300 U ALP/1ml 100 mM glycinový pufr pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂

Postup:

a) pomocí imobilizovaného ALP

Množství imobilizovaného enzymu odpovídající 0,4 U bylo promyto 5 x 100 mM glycinovým pufrem pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂. K částicím bylo přidáno 400 μ l roztoku obsahujícího 167 μ l štěpeného α -CN (0,5 mg) a 233 μ l 100 mM glycinového pufru pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂. Reakční směs byla inkubována při otáčení 2 hod při 37 °C. Reakce byla zastavena odebráním imobilizovaného enzymu. Tímto krokem došlo ke snížení koncentrace vzorku α -CN a tak bylo provedeno zakoncentrování na objem, který odpovídá koncentraci 3 mg/ml. Poté byl roztok defosforylovaných peptidů α -CN skladován při 4 °C.

b) pomocí solubilní ALP

Z roztoku štěpeného α -CN bylo odebráno 167 μ l, tj. množství, které odpovídá 0,5 mg peptidů, a doplněno na objem 400 μ l 100 mM glycinovým pufrem pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂. K tomuto roztoku bylo přidáno 6,67 μ l zásobního roztoku ALP, které odpovídalo 2 U enzymu. Směs byla inkubována při otáčení 2 hod při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 25 μ l 9 M NaOH. Tímto krokem došlo ke snížení koncentrace roztoku

vzorku α -CN a tak bylo provedeno zakoncentrování na objem, který odpovídá koncentraci 3 mg/ml. Roztok defosforylovaných peptidů α -CN byl skladován při 4 °C.

4.4.8 Obohacení fosfopeptidů pomocí komerčního kitu

Výchozí vzorek štěpeného α -CN imobilizovaným trypsinem pro obohacení byl o objemu 200 μ l a koncentraci 3 mg/ml.

Pomůcky: TiO₂ SpinTips Sample Prep Kit (obsah: Spin špičky, adaptér a komerční roztoky)

Komerční roztoky:

- roztok 1: rekonstituční a promývací roztok
- roztok 2: promývací roztok
- roztok 3: eluční roztok

Doporučený postup výrobce:

Výchozí vzorek o objemu 200 μ l byl odpařen do sucha, rozpuštěn ve 200 μ l roztoku 1 a pomocí ultrazvuku úplně rozpuštěn. K promytí nosiče i eluci byla použita centrifugace při 7400 rpm po dobu 5 minut. Špička byla vložena do adaptéru a nosič byl dvakrát promyt 100 μ l roztokem 1. Na nosič bylo nanášeno 200 μ l rozpuštěného vzorku. Nosič byl nejdříve promyt dvakrát 100 μ l roztoku 1 a poté následovalo promytí nosiče 100 μ l roztoku 2. Vzorek byl dvakrát eluován po 100 μ l roztokem 3 do čisté zkumavky.

4.4.9 Obohacení fosfopeptidů na TiO₂ nosiči ve vsádkovém uspořádání

Výchozí vzorek α -CN štěpený imobilizovaným trypsinem pro obohacení byl o objemu 300 μ l a koncentraci 3 mg/ml.

Chemikálie:

- acetonitril (ACN), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- trifluoroctová kyselina (TFA), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- mléčná kyselina, \geq 85 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- amoniak, 25 % (Merck, Darmstadt, Německo)

4.4.9.1 Odsolení štěpeného α -kaseinu trypsinem

Roztoky:

- ekvilibrační roztok: 60 % ACN/0,1 % TFA
- promývací roztok: 0,1 % TFA
- eluční roztok: 80 % ACN/ 5 % ACN

Postup:

SPE kolonka byla ekvilibrována 0,5 ml 60 % ACN/0,1 % TFA a promyta 0,5 ml 0,1 % TFA. Na promytou kolonku byl 2 x po sobě nanesen vzorek. Kolonka byla opět promyta 0,5 ml 0,1 % TFA. Eluce byla provedena 2 x 0,2 ml 80 % ACN/ 5 % ACN. Do eluátu byla přidána kyselina mléčná o výchozí koncentraci 1 mol/l a doplněno na reakční objem 0,5 ml.

4.4.9.2 Obohacení pomocí TiO_2 částic

Na 900 μg vzorku bylo použito 8 mg částic Titansphere 10 μm .

Roztoky:

- promývací roztok: 80 % ACN/5 % ACN
- eluční roztok: 2 % vodný roztok amoniaku

Postup:

Titanové částice byly 2 x promyty 0,5 ml 80 % ACN/5 % ACN. K sedimentaci částic byla použita centrifugace 0,8 rpm po dobu 90 s. Odsolený vzorek byl přidán k promyтым částicím a inkubován 30 minut při laboratorní teplotě za otáčení. Po inkubaci a odtažení supernatantu byly částice promyty 2 x 0,5 ml 80 % ACN/5 % ACN. Eluce byla provedena 2 x po sobě 150 μl 2 % vodného roztoku amoniaku při otáčení 5 minut. Nakonec byl obohacený vzorek okyselen pomocí TFA , aby bylo dosaženo neutrálního pH.

4.4.9.3 Odsolení obohaceného vzorku

Roztoky:

- ekvilibrační roztok: 60 % ACN/0,1 % TFA
- promývací roztok: 0,1 % TFA
- eluční roztok: 60 % ACN/0,1 % ACN

Postup:

Postup byl stejný jako v 4.4.9.1 s výjimkou eluce, která zde byla provedena 2 x 0,2 ml 60 % ACN/0,1 % ACN.

Výsledný objem obohaceného a odsoleného vzorku byl 400 μ l, který byl rozdělen na tři části (3 x přibližně 133 μ l): 1. MS analýza

2. defosforylace solubilní ALP

3. slepý pokus defosforylace .

Všechny tři části vzorku byly odpařeny do sucha. Vzorek na MS analýzu byl doplněn 40 μ l 100 mM glycinového pufru pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂. Vzorek na defosforylaci a na slepý pokus byl doplněn 400 μ l 100 mM glycinového pufru pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂, aby bylo dosaženo reakčního objemu kompatibilního s protokolem na defosforylaci.

4.4.10 Defosforylace vzorků obohacených fosfopeptidy solubilní alkalickou fosfatázou

Na výchozí množství 600 μ g peptidů před obohacením bylo použito 0,13 U ALP a na 900 μ g 0,2 U ALP.

Chemikálie:

- ALP (8407 U/mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Roztoky:

- reakční pufr: 100 mM glycinový pufr pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂
- zásobní roztok enzymu: 150 U ALP/1ml 100 mM glycinový pufr pH 8,8 při 37 °C s 1 mM MgCl₂

Postup:

K peptidům ve 400 μ l 100 mM glycinového pufru pH 8,8 při 37°C s 1 mM MgCl₂ bylo přidáno 1,33 μ l zásobního roztoku enzymu ALP (0,2 U) pro vzorek o výchozím množství 900 μ g peptidů před obohacením a 0,86 μ l zásobního roztoku enzymu ALP (0,13 U) pro vzorek o výchozím množství 600 μ g peptidů před obohacením. Směs byla inkubována při otáčení 30 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 25 μ l 9 M NaOH. Vzorky defosforylovaných peptidů α -CN byly okyseleny TFA na neutrální pH a skladovány při 4 °C.

4.4.11 Příprava vzorků a MALDI-TOF MS analýza**Chemikálie:**

- nosič: POROS Oligo R3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), (LaserBio Labs, Sophia Antipolis, Francie)
- ACN (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- TFA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- kyselina fosforečná (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Roztoky:

- 60 % ACN/0,1 % TFA
- 0,1 % TFA
- matrice: 5mg/ml DHB v 50 % ACN/0,1 % TFA/1,7 % H₃PO₄

Postup:

Tímto postupem byly analyzovány peptidové fragmenty vzniklé štěpením α -CN, obohacené a defosforylované peptidy.

Do špiček GeLoader bylo nadávkováno 10 μ l suspenze nosiče. Nosič byl promyt 10 μ l 60 % ACN/0,1 % TFA a 10 μ l 0,1 % TFA. Vzorek odpovídající 5 μ g byl odpařen do sucha doplněn na objem 20 μ l 0,1 % TFA a aplikován 2 x na nosič. Poté byl nosič promyt 20 μ l 0,1 % TFA. Eluce byla provedena 10 μ l 60 % ACN/0,1 % TFA.

Připravené vzorky byly naneseny v množství 0,7 μ l na destičku vždy dvakrát vedle sebe. Po zaschnutí byly všechny spoty převrstveny 0,7 μ l matrice.

MS spektra byla měřena v kladném reflektrotronovém módu v rozsahu m/z 800 - 4000. MS analýzy byly provedeny a vyhodnoceny na Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.) v Hradci Králové. Naměřená spektra byla vyhodnocována v programu MS Fit (ProteinProspektor) nebo porovnávána s databází UniProt (PeptideMass).

4.5 Pracovní postupy pro CZE

4.5.1 Pokrytí křemenné kapiláry polyakrylamidem

Chemikálie:

- TEMED pro GC (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- γ -methakryloxypropyl-trimethoxysilanu (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- ethanol pro UV spektroskopii (Penta, Chrudim, ČR)
- peroxidisíran draselný (Lachema, Brno, ČR)
- akrylamid pro CE (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Postup:

Křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm byla pokryta lineárním polyakrylamidem pomocí modifikovaného Hjertenova postupu [90].

Vnitřní povrch kapiláry byl aktivován propláchnutím 0,5 M roztokem NaOH po dobu 5 hod a následně byla kapilára promyta 30 min redestilovanou vodou a 20 min ethanolem. Poté byl vnitřní povrch kapiláry silanizován roztokem γ -methakryloxypropyl-trimethoxysilanu v ethanolu o koncentraci 4 $\mu\text{l/ml}$. Silanizace probíhala přes noc a v jejím průběhu byl výstupní konec kapiláry ponořen v ethanolu. Po ukončení silanizace byla kapilára propláchnuta 20 min ethanolem. Následně bylo v 25 ml čerstvě převařené redestilované vodě rozpuštěno 1,25 g polyakrylamidu a 25 mg peroxidisíranu draselného a připravený roztok byl přefiltrován přes jednorázový filtr o velikosti pórů 0,22 μm . Poté byl do roztoku přidán TEMED tak, aby jeho koncentrace v roztoku polyakrylamidu byla 1 mg/ μl . Připravený roztok byl důkladně promíchán pomocí ultramixeru a následně jím byla pomocí injekční stříkačky rychle naplněna pokrývaná kapilára. Oba konce kapiláry byly po naplnění ponořeny ve zbytku polymeračního roztoku, a byly v něm ponechány bez průtoku po dobu minimálně 6 hod. Na závěr byl přebytečný polyakrylamid z kapiláry vytlačen

pomocí mikročerpádky pro LC při nastaveném průtoku 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ a následně byl pokrytá kapilára promyta po dobu 20 min redestilovanou vodou.

4.5.2 Příprava kapiláry

Na kapiláře bylo vytvořeno detekční okénko opálením a očištěním ethanolem. Kapilára byla vložena do kazety a zkrácena na příslušnou délku.

Nová nepokrytá kapilára byla nejprve kondicionována 30 min při tlaku 10 psi (1 psi = 6895 Pa) vhodnými roztoky v tomto pořadí: 0,5 M HCl, redestilovaná voda, 0,5 M NaOH, redestilovaná voda a 25 mM fosfátový pufr pH 7. Každý den před prvním měřením byla kapilára promývána 10 min při tlaku 10 psi: 0,1 M NaOH, redestilovanou vodou a příslušným pufrem pro separaci. Na konci každého dne byla kapilára opět promyta 10 min 0,1 M NaOH a redestilovanou vodou a přes noc byly konce kapiláry ponořené v nádobce s vodou.

U nové pokryté kapiláry polyakrylamidem byla kondicionace provedena po dobu 120 min 25 mM fosfátovým pufrem pH 7. Ostatní postupy byly shodné s nepokrytou kapilárou.

4.5.3 Měření EOF

EOF byl měřen pomocí thiomocoviny o koncentraci 0,1 mg/ml při vlnové délce 230 nm a teplotě 25° C. Efektivní délka kapiláry byla 50 cm a celková délka 60,2 cm.

4.5.3.1 Kovalentní pokrytí

Pracovní elektrolyt:

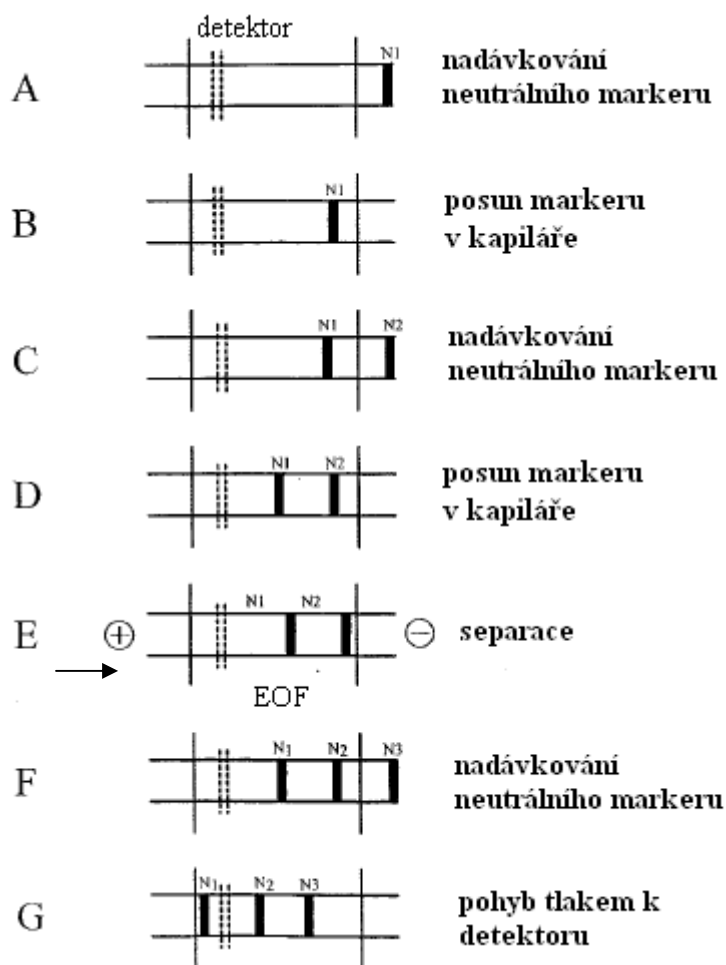
25 mM fosfátový pufr pH 7 byl připraven ze zásobního roztoku $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Připravený pufr byl přefiltrován přes jednorázový 0,45 μm filtr.

Postup:

Měření EOF bylo provedeno v nepokryté a polyakrylamidem pokryté kapiláře při 10 kV. V nepokryté kapiláře byl marker nadávkován pod tlakem 0,5 psi po dobu 5 s.

V pokryté kapiláře bylo předpokládáno potlačení EOF, a tak k jeho určení byla použita metoda podle [91], jejíž princip je ukázán na obrázku 4.5. Plnění kapiláry elektrolytem bylo při podmínkách 0,5 psi 60 s a nadávkování markeru při 0,5 psi 5 s.

Separace probíhala při napětí 10 kV po dobu 1 min. Posun třech zón nadávkovaného markeru byl uskutečněn pomocí tlaku o hodnotě 0,7 psi.



Obrázek 4.5 - Princip metody pro rychlé stanovení EOF podle [91]

4.5.3.2 Dynamické pokrytí

Pracovní elektrolyt:

20 mM fosfátový pufr pH 2,5 byl připraven rozpuštěním 156 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v dostatečném objemu. Pomocí 4 M H_3PO_4 bylo pH upraveno na hodnotu 2,5 a roztok byl doplněn na objem 50 ml redestilovanou vodou. Pufr byl následně přefiltrován přes jednorázový 0,45 μm filtr.

20 mM fosfátový pufr pH 2,5 s přídatkem 0,05 % HPMC a 6 M močoviny byl připraven rozpuštěním 156 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 25 mg HPMC ve 37,5 ml 8 M močoviny. Pomocí 4 M H_3PO_4 bylo pH upraveno na hodnotu 2,5 a roztok byl doplněn na objem 50 ml redestilovanou vodou. Pufr byl následně přefiltrován přes jednorázový 0,45 μm filtr.

Postup:

Analýza elektroneutrálního markeru byla provedena při napětí 20 kV. Při použití 20 mM fosfátového pufru pH 2,5 byl marker nadávkován pod tlakem 0,5 psi 5 s. U elektrolytu s HPMC a močovinou byla opět z důvodu potlačení EOF použita metoda rychlého stanovení EOF podle [91], kde podmínky byly následující: plnění kapiláry elektrolytem 0,5 psi 70 s, nadávkování markeru při 0,5 psi 5 s a separace při 20 kV po dobu 0,5 min. Posun třech zón nadávkovaného markeru byl uskutečněn pomocí tlaku o hodnotě 0,7 psi.

4.5.4 Separace standardního roztoku α -kaseinu

Redukční pufr:

Jako redukční pufr byl použit 0,25 M Tris s přídavkem 10 mM DTT a 6 M močoviny, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 8,8 přikapáváním koncentrované HCl. Tento pufr byl poté použit pro přípravu standardního roztoku α -CN podle [92].

Příprava standardního roztoku:

Standard α -CN byl rozpuštěn ve zředěném redukčním pufru s vodou v poměru 1 : 1. Před analýzou byl standardní roztok inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté přefiltrován přes jednorázový 0,45 μ m filtr [92].

Pro předběžné separace byl použit standardní roztok o koncentraci 6 mg/ml. Při analýzách s klesajícími koncentracemi standardního roztoku byla jako dostačující koncentrace zvolena 3 mg/ml.

Pracovní elektrolyt:

20 mM fosfátový pufr pH 2,5 s přídavkem 0,05 % HPMC a 6 M močoviny

Postup:

Standardní roztok α -CN byl dávkován pod tlakem 0,5 psi po dobu 5 s. Při jeho separaci bylo použito napětí 20 kV a byla zvolena detekce při 214 nm.

Mezi každou separací bylo nastaveno promývání 3 min 0,1 M NaOH, H₂O a 5 min pracovním elektrolytem.

4.5.5 Separace modifikovaných vzorků α -kaseinu

α -CN byl štěpen trypsinem imobilizovaným na SiMAG-COOH částicích, dále defosforylován ALP solubilní i imobilizovanou na SiMAG-NH₂ částicích, obohacen použitím TiO₂ pomocí komerčního kitu SpinTips a ve vsádkovém uspořádání.

Připravené roztoky modifikovaných vzorků byly separovány stejným postupem jako standardní roztok α -CN včetně použitého pracovního elektrolytu (viz kapitola 4.5.4).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Účinnost kovalentního pokrytí

Při separaci proteinů CZE nesmí být opomenuta jejich snadná adsorpce na vnitřní stěnu kapiláry. Z tohoto důvodu se povrch kapiláry pokrývá chemicky nebo dynamicky. Pro separaci vybraného fosfoproteinu α -CN bylo nejprve zvoleno kovalentní pokrytí kapiláry polyakrylamidem.

Důležitým krokem při separaci proteinů je určení velikosti EOF. K jeho stanovení se používá elektroneutrální látka, která má stejnou rychlost jako EOF. Při všech separacích byla jako marker EOF použita thiomočovina.

Po změření migračního času thiomočoviny v pokryté a nepokryté kapiláře byla vypočtena mobilita elektroosmotického toku z následujících vztahů:

pro nepokrytou kapiláru byl použit vztah 2.8

pro pokrytou kapiláru byly použity upravené vztahy [91]:

$$v_m = \frac{l_d}{t_{N_3} + \frac{t_{inj}}{2}} \quad (4.1)$$

$$l_{eof} = (t_{n_3} - t_{n_2}) - (t_{n_2} - t_{n_1}) \cdot v_m \quad (4.2)$$

$$\mu_{eof} = \frac{l_{eof} \cdot l_t}{t_m \cdot V} \quad (4.3)$$

kde v_m je rychlost migrace, kterou se pohybují jednotlivé zóny markeru (n_1, n_2, n_3), $\frac{t_{inj}}{2}$ vyjadřuje korekci pohybu poslední zóny neutrálního markeru, $t_{n_1}, t_{n_2}, t_{n_3}$ jsou migrační časy jednotlivých zón markeru, l_{eof} je vzdálenost, kterou urazí zóny neutrálního markeru během elektroforézy.

Tabulka 5.1 – Stanovení EOF na nepokryté kapiláře

	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření
t_{eof} (min)	11,975	11,985	12,142	12,187	12,354
μ_{eof} ($m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)	$4,189 \cdot 10^{-8}$	$4,186 \cdot 10^{-8}$	$4,132 \cdot 10^{-8}$	$4,116 \cdot 10^{-8}$	$4,061 \cdot 10^{-8}$

$$\bar{\mu}_{eof} = 4,129 \cdot 10^{-8} m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$$

Tabulka 5.2 – Stanovení EOF na pokryté kapiláře podle [91]

	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření
t_{n_1} (min)	8,648	8,800	8,589	8,379	8,496
t_{n_2} (min)	9,781	9,942	9,737	9,533	9,621
t_{n_3} (min)	11,358	11,517	11,331	11,146	11,200
v_m (m·s ⁻¹)	$7,310 \cdot 10^{-4}$	$7,210 \cdot 10^{-4}$	$7,328 \cdot 10^{-4}$	$7,449 \cdot 10^{-4}$	$7,413 \cdot 10^{-4}$
l_{eof} (m)	$1,947 \cdot 10^{-2}$	$1,873 \cdot 10^{-2}$	$1,961 \cdot 10^{-2}$	$2,051 \cdot 10^{-2}$	$2,019 \cdot 10^{-2}$
μ_{eof} (m ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹)	$1,954 \cdot 10^{-8}$	$1,879 \cdot 10^{-8}$	$1,967 \cdot 10^{-8}$	$2,058 \cdot 10^{-8}$	$2,026 \cdot 10^{-8}$

$$\bar{\mu}_{eof} = 1,977 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Porovnáním hodnot $\bar{\mu}_{eof}$ v nepokryté a pokryté kapiláře byla vypočtena účinnost kovalentního pokrytí 52,12 %. Vyhodnocená účinnost pokrytí byla pro další plánované separace nedostačující, a proto bylo přistoupeno k dynamickému pokrytí povrchu kapiláry.

5.2 Účinnost dynamického pokrytí

Na základě studia dostupné literatury za účelem výběru pracovního elektrolytu pro dynamické pokrytí pro elektroforetickou separaci kaseinů byly zjištěny následující podmínky složení pracovního elektrolytu [84 - 87, 92, 93]:

- volba pH v kyselém prostředí (nejčastěji pH 2-3) - při nízkém pH je vnitřní povrch nepokryté křemenné kapiláry slabě disociován a kladně nabitě proteiny nemohou být přitahovány k povrchu stěny kapiláry
- přítomnost 6 - 8 M močoviny k udržení rozvolněných micel kaseinu během separace
- polymerní aditivum 0,05 % HPMC k pokrytí vnitřního povrchu kapiláry.

Jako výsledný pracovní elektrolyt pro dynamické pokrytí při separaci standardního roztoku α -CN byl vybrán 20 mM fosfátový pufr s 0,05 % HPMC a 6 M močovinou podle [92].

K výpočtu velikosti EOF v samotném fosfátovém pufru byl použit vztah 2.8 a pro fosfátový pufr s 0,05 % HPMC a 6M močovinou byl použit vztah 4.3.

Tabulka 5.3 – Stanovení EOF ve 20 mM fosfátovém pufru na nepokryté kapiláře

	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření
t_{eof} (min)	29,346	29,315	29,479	29,842	30,087
μ_{eof} ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$8,547 \cdot 10^{-9}$	$8,556 \cdot 10^{-9}$	$8,509 \cdot 10^{-9}$	$8,405 \cdot 10^{-9}$	$8,337 \cdot 10^{-9}$

$$\bar{\mu}_{\text{eof}} = 8,471 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Tabulka 5.4 – Stanovení EOF ve 20 mM fosfátovém pufru s 0,05 % HPMC a 6 M močovinou na nepokryté kapiláře podle [91]

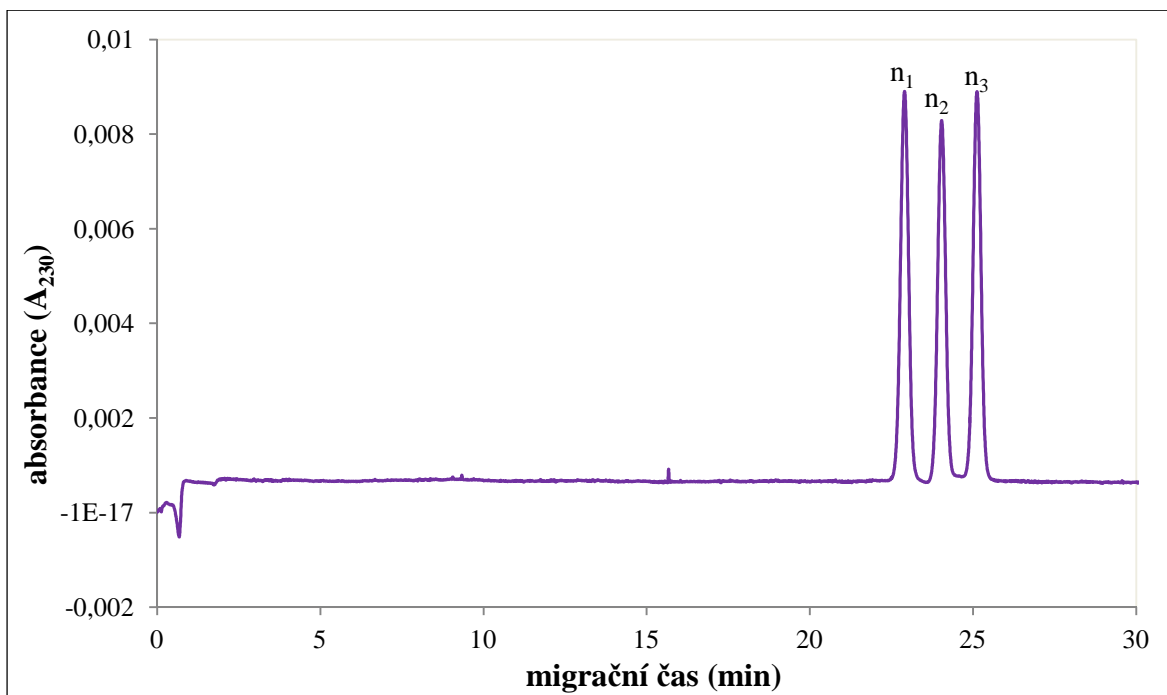
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření
t_{n_1} (min)	22,508	22,633	23,054	22,704	22,895
t_{n_2} (min)	23,646	23,788	24,063	23,842	23,998
t_{n_3} (min)	24,800	24,954	25,077	24,990	25,115
v_m ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	$3,355 \cdot 10^{-4}$	$3,334 \cdot 10^{-4}$	$3,318 \cdot 10^{-4}$	$3,329 \cdot 10^{-4}$	$3,313 \cdot 10^{-4}$
l_{eof} (m)	$3,220 \cdot 10^{-4}$	$2,200 \cdot 10^{-4}$	$9,953 \cdot 10^{-5}$	$1,997 \cdot 10^{-4}$	$2,783 \cdot 10^{-4}$
μ_{eof} ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$1,616 \cdot 10^{-10}$	$1,104 \cdot 10^{-10}$	$4,993 \cdot 10^{-11}$	$1,002 \cdot 10^{-10}$	$1,396 \cdot 10^{-10}$

$$\bar{\mu}_{\text{eof}} = 1,123 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Porovnáním $\bar{\mu}_{\text{eof}}$ v obou elektrolytech byla zjištěna účinnost dynamického pokrytí 98,67 %. Proto bylo ustoupeno od kovalentního pokrývání kapiláry, které bylo původně naplánováno, dynamické pokrytí je navíc i méně časově náročné.

Ve 20 mM fosfátovém pufru s 0,05 % HPMC a 6M močovinou tedy dochází k dostatečnému potlačení EOF, a proto byl tento pracovní elektrolyt dále používán k separacím α -CN, peptidů štěpeného α -CN, fosfopeptidů a defosforylovaných peptidů α -CN.

Na obrázku 5.1 je ukázán elektroforegram analýzy thiomčoviny při rychlém stanovení EOF v dynamickém pokrytí podle [91]. Zobrazení tří rozdělených píků svědčí o dobře nastavených experimentálních podmínkách a z příslušných migračních časů píků n_1, n_2 a n_3 thiomčoviny byla vypočtena velikost EOF.

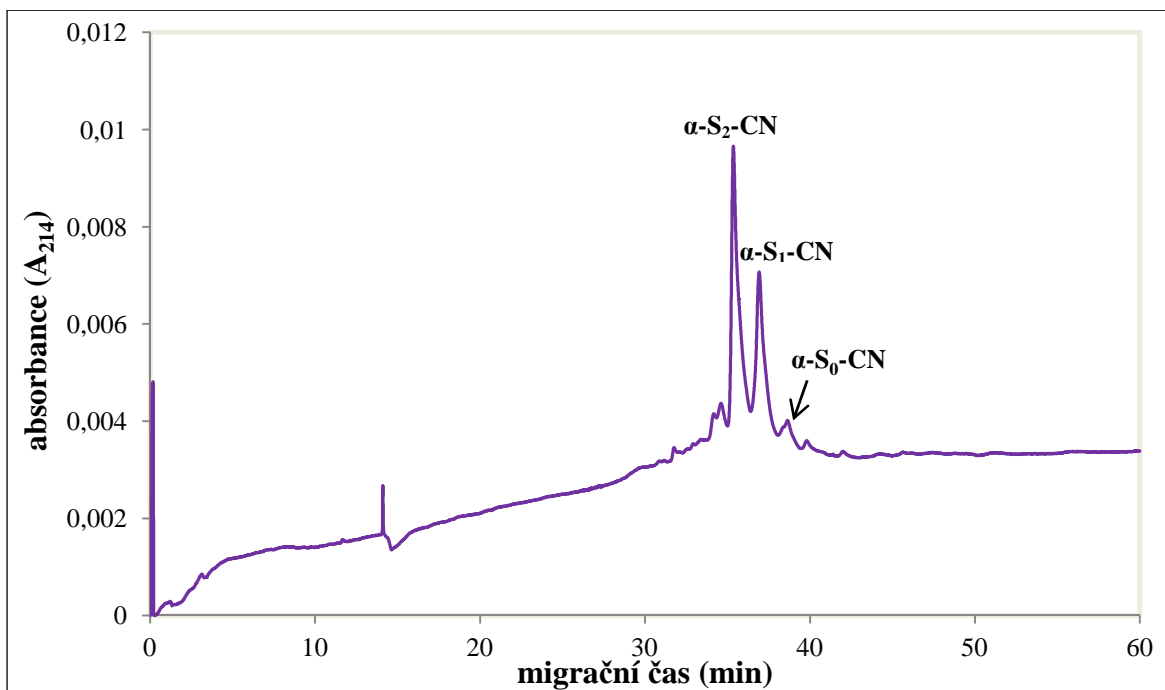


Obrázek 5.1- Elektroforegram CZE-UV thiomčoviny při stanovení EOF podle[91], n_1 , n_2 , n_3 jsou píky 1., 2. a 3. nástřiku thiomčoviny

5.3 Separace standardního roztoku α -kaseinu

Při separaci bovinního α -CN na CZE byly identifikovány tři píky podle dostupné literatury jako α -S₂-CN, α -S₁-CN a α -S₀-CN (viz obrázek 5.2). Jsou známy dva fosforylované stavy α -S₁-CN: α -S₁-8P a α -S₁-9P, který je označován jako α -S₀-CN. α -S₂-CN navíc obsahuje cystein a běžně se vyskytuje jako disulfidicky vázaný dimer [80, 86, 92 - 95].

Na obrázku 5.2 je zobrazen elektroforegram separace standardního roztoku α -CN. Zaznamenané píky α -CN jsou dobře identifikovatelné, ale nejsou úplně rozdělené, protože pro další postupy to nebylo nezbytně nutné. Pro úplné rozdělení všech píků by bylo nutné zvolit delší separační kapiláru.



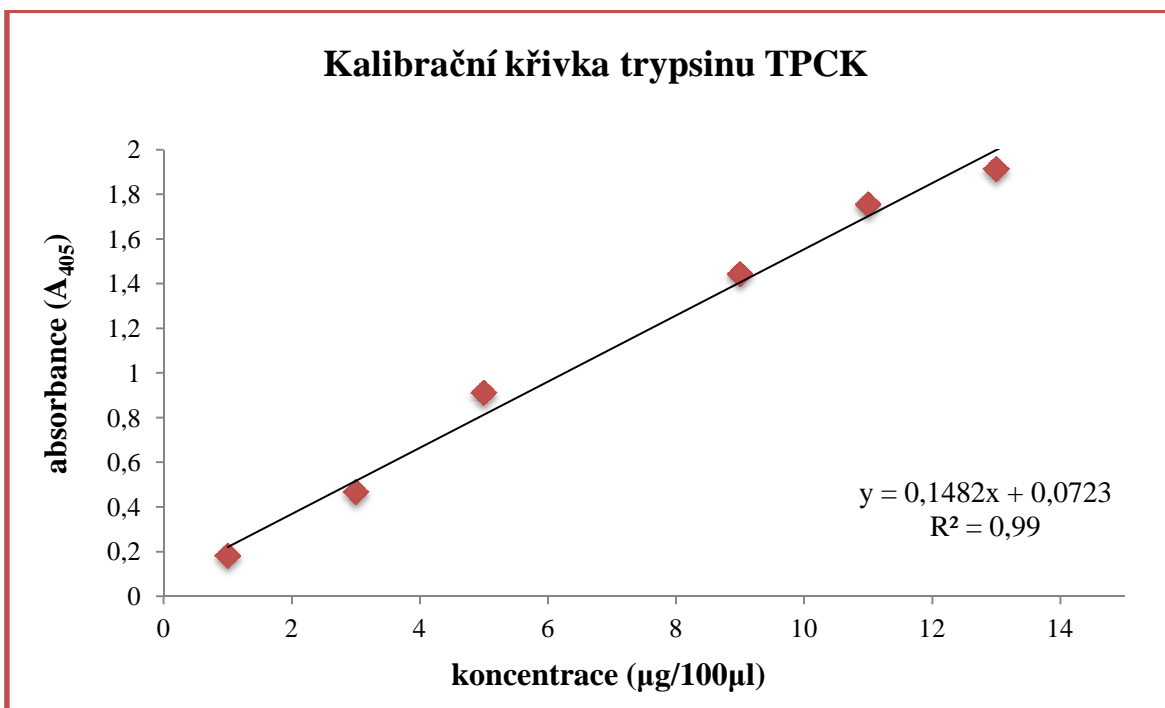
Obrázek 5.2 - Elektroforegram CZE-UV standardního roztoku α -CN o koncentraci 3 mg/ml

5.4 Stanovení proteolytické aktivity imobilizovaného trypsinu

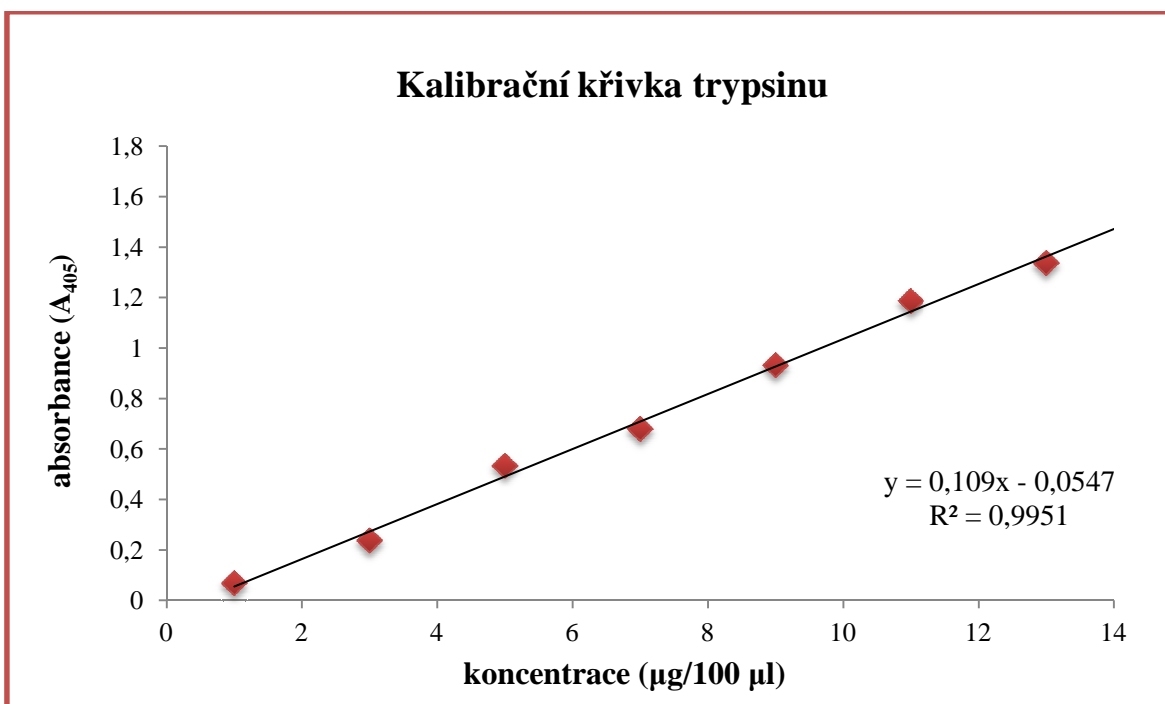
Ke štěpení α -CN byl zvolen specifický enzym trypsin štěpící proteiny na karboxylovém konci lysinu a argininu, jestliže po nich nenásleduje prolin. Trypsin byl imobilizován na SiMAG-COOH magnetických částicích (viz kapitola 4.4.1). Byly imobilizovány dva druhy trypsinu: trypsin TPCK (13 816 U/mg) a trypsin (8 300 U/mg). Po imobilizaci obou enzymů bylo nutné stanovit jejich aktivitu.

Aktivita imobilizovaných enzymů trypsin TPCK a trypsin byla stanovena pomocí nízkomolekulárního chromogenního substrátu BAPNA (viz kapitola 4.4.2). Nejprve byla připravena kalibrační řada enzymu trypsin TPCK a trypsin v rozmezí koncentrací 1 – 15 μ g/100 μ l (viz tabulka 4.1). V každém kalibračním roztoku a vzorku s imobilizovaným enzymem byla stanovena aktivita enzymu. Pro sestrojení kalibrační křivky byly použity hodnoty absorbance A_{405} po odečtení hodnot absorbance slepého vzorku.

Pro lepší proložení kalibrační závislosti byly odstraněny odlehlé body. Z kalibrační křivky trypsinu TPCK (viz graf 5.1) byl odstraněn bod odpovídající koncentraci enzymu 7 a 15 μ g/100 μ l. U kalibrační křivky trypsinu (viz graf 5.2) byl odstraněn bod náležící koncentraci enzymu 15 μ g/100 μ l.



Graf 5.1 – Kalibrační křivka proteolytické aktivity trypsinu TPCK



Graf 5.2 – Kalibrační křivka proteolytické aktivity trypsinu

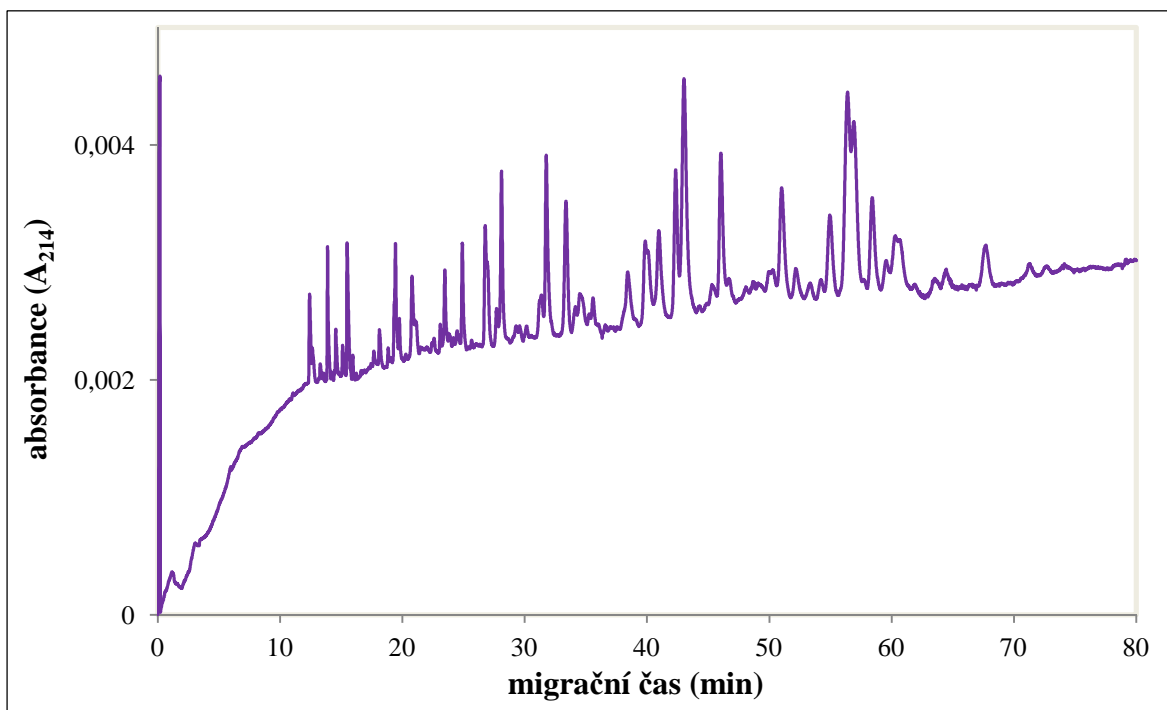
Z vyhodnocených rovnic lineární regrese bylo vypočteno množství enzymu navázaného na částicích. Na 3 mg částic, které bylo použito k imobilizaci každého enzymu, bylo navázáno 72,7 µg trypsinu TPCK a 120,08 µg trypsinu. Z těchto výsledků je patrné, že trypsin se navázal o 65 % více než trypsin TPCK. Vzhledem k původnímu

množství přidaného enzymu k částicím pro imobilizaci, tj. 9 mg, účinnost navázání byla velmi nízká, u trypsinu TPCK se navázalo 0,8 % a u trypsinu 1,33 %. I přes nízkou účinnost imobilizace bylo toto množství enzymu dostačující pro štěpení 3 mg α -CN (viz kapitola 4.4.3).

5.5 Separace štěpeného α -kaseinu imobilizovaným trypsinem

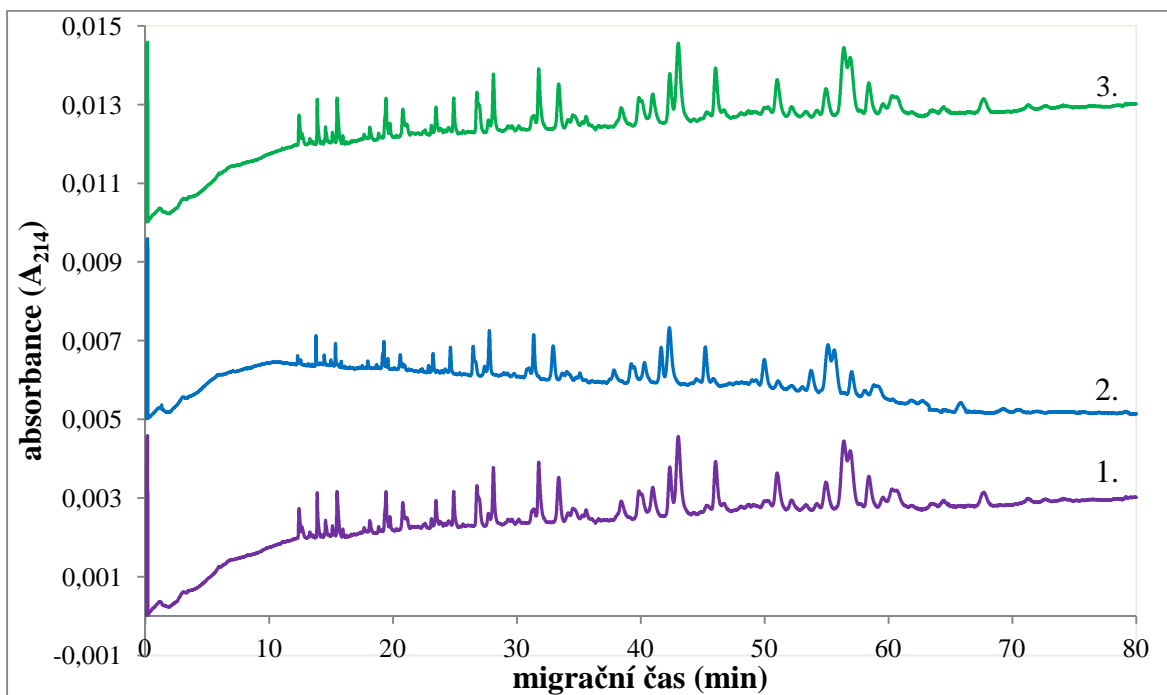
Bovinní α -CN se vyskytuje ve dvou variantách: α -S₁ a α -S₂. Tyto dvě formy se od sebe liší aminokyselinovou sekvencí a úrovní fosforylace. Pomocí proteomického serveru ExPASy, jehož součástí je program PeptideMass, lze získat teoretické peptidové fragmenty α -S₁-CN (214 AA) a α -S₂-CN (222 AA) po štěpení trypsinem za předem vybraných podmínek (viz tabulka 5.5) [96].

Elektroforegram CZE-UV štěpeného α -CN (viz obrázek 5.3) ukazuje na velké množství přítomných peptidů, které byly očekávány po získání teoretických fragmentů pomocí programu PeptideMass.



Obrázek 5.3 - Elektroforegram CZE-UV štěpeného α -CN trypsinem imobilizovaným na SiMAG-COOH částicích (3 mg/ml)

Pro zjištění opakovatelnosti byl vzorek štěpeného α -CN separován na CZE-UV třikrát po sobě s promýváním mezi jednotlivými analýzami a ve stejném pracovním elektrolytu bez výměny. Všechny tři záznamy jsou zobrazeny na souhrnném elektroforeogramu (viz obrázek 5.4), kde pro vhodné zobrazení k jejich porovnání byla u elektroforeogramu č. 2 a 3. hodnota absorbance zvýšena o 0,005. Jednotlivé separace se dají považovat za shodné.



Obrázek 5.4 - Elektroforegramy CZE-UV štěpeného α -CN trypsinem imobilizovaným na SiMAG-COOH částicích ve třech opakováních po sobě

Tabulka 5.5 - Přehled teoretických fragmentů vznikajících při štěpení α -CN trypsinem (program PeptideMass, missed cleavages (MC): 1, alkylace cysteinů iodacetamidem, monoizotopické hmoty $[M+H]^+$, peptidy > 500 Da) [96]

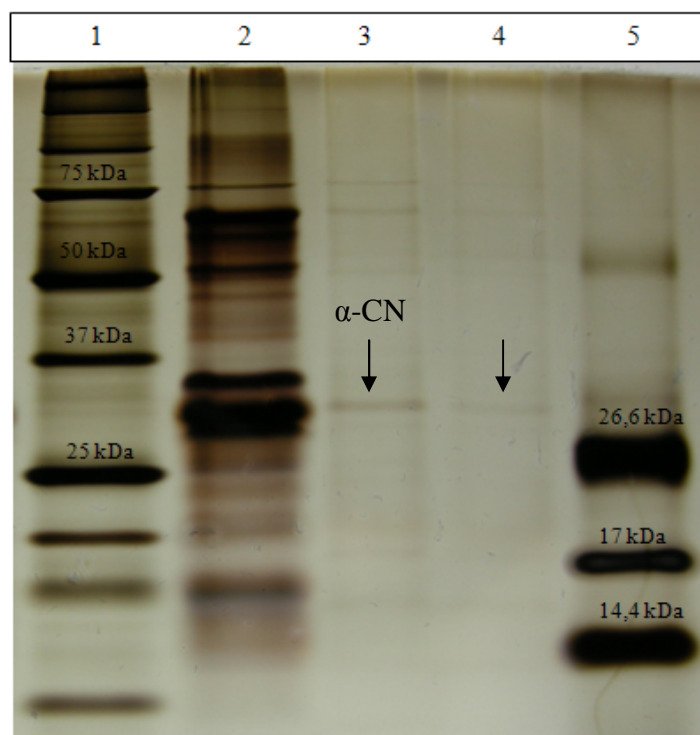
α -S ₁ -CN (M = 24,529 kDa)				
č.	peptidová sekvence	MC	$[M+H]^+$	fosforylace
1	EPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAW YYVPLGTQ YTDAPSFSDIPNPIGSENSE K	1	7013.29	
2	QFYQLDAYPSGAWYYYVPLGT QYTDAPSFSDIPNPIGSENS EKTMTPLW	1	5445.52	
3	QFYQLDAYPSGAWYYYVPLGT QYTDAPSFSDIPNPIGSENS EK	0	4716.17	
4	DIGSESTEDQAMEDIKQMEA ESISSSEEIVPNSVEQK	1	4069.82 (4629.58)	61, 63, 79, 81,82, 83, 90
5	EGIHAQQKEPMIGVNQELAY FYPELFR	1	3207.59	
6	HQGLPQEVLNENLLRFFVAP FPEVFGK	1	3125.66	
7	QMEAESISSSEEIVPNSVEQ KHIQK	1	2827.38 (3227.21)	79, 81, 82, 83, 90
8	VNELSKDIGSESTEDQAMED IK	1	2438.12 (2678.02)	56, 61, 63
9	QMEAESISSSEEIVPNSVEQ K	0	2321.08 (2720.91)	79, 81, 82,83, 90
10	EPMIGVNQELAYFYPELFR	0	2316.14	
11	HPIKHQGLPQEVLNENLLR	1	2235.23	
12	VPQLEIVPNSAEERLHSMK	1	2177.13 (2257.10)	130
13	EDVPSERYLGYLEQLLR	1	2080.07	
14	YKVPQLEIVPNSAEER	1	1871.99 (1951.95)	130
15	DIGSESTEDQAMEDIK	0	1767.76 (1927.69)	61, 63
16	HQGLPQEVLNENLLR	0	1759.94	
17	FFVAPFPEVFGKEK	1	1641.86	
18	VPQLEIVPNSAEER	0	1580.82 (1660.79)	130
19	YLGYLEQLLRK	1	1508.88	
20	LHSMKEGIHAQQK	1	1506.78	
21	FFVAPFPEVFGK	0	1384.73	
22	HIQKEDVPSEK	1	1337.68	
23	YLGYLEQLLR	0	1267.70	
24	EKVNELSK	1	946.52 (1026.49)	56
25	EGIHAQQK	0	910.47	
26	RPKHPIK	1	875.55	
27	EDVPSEK	0	831.38	
28	TTMTPLW	0	748.37	
29	VNELSK	0	689.38 (769.35)	56
30	LHSMK	0	615.33	
31	HIQK	0	525.31	

α -S ₂ -CN (M = 26,019 kDa)				
č.	peptidová sekvence	MC	$[M+H]^+$	fosforylace
32	ALNEINQFYQKFPQYLQYLY QGPIVLNPWDQVK	1	4058.08	
33	NANEEEYSIGSSSEESA EVA TEEVKITVDDK	1	3359.51 (3679.38)	71, 72,73,76
34	EVVRNANEEEYSIGSSSEES AEVATEEVK	1	3171.44 (3491.31)	71, 72,73,76
35	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQ VKR	1	2865.51	

č.	peptidová sekvence	MC	[M+H] ⁺	fosforylace
36	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQ VK	0	2709.41	
37	NANEEEEYSIGSSSEESA EVA TEEVK	0	2688.16 (3008.02)	71, 72, 73, 76
38	NTMEHVSSEESIISQETYK QEK	1	2684.24 (3004.10)	23, 24, 25, 31
39	NAVPIPTLNREQLSTSEEN SK	1	2428.23 (2588.16)	144, 146
40	KNTMEHVSSEESIISQETY K	1	2427.13 (2746.99)	23, 24, 25, 31
41	NTMEHVSSEESIISQETYK	0	2299.04 (2618.90)	23, 24, 25, 31
42	TVYQHQAAMKPWIQPK	1	1983.06	
43	HYQKALNEINQFYQK	1	1923.97	
44	NMAINPSKENLCSTFCK	1	1899.87 (1979.84)	46
45	FALPQYLKTVYQHQA	1	1864.01	
46	ENLCSTFCKEVVR	1	1527.73	
47	KTVDMESTEVEFTK	1	1514.74 (1594.71)	158
48	TVDMESTEVEFTKK		1514.74 (1594.70)	158
49	YQKFALPQYLK	1	1398.78	
50	TVDMESTEVEFTK	0	1386.65 (1466.61)	158
51	EQLSTSEENSKK	1	1379.66 (1539.59)	144, 146
52	ALNEINQFYQK	0	1367.69	
53	RNAVPIPTLNR	1	1351.78	
54	AMKPWIQPKTK	1	1327.75	
55	QEKNNMAINPSK	1	1259.64 (1339.61)	46
56	EQLSTSEENSK	0	1251.57 (1411.50)	144, 146
57	ITVDDKHQYK	1	1246.64	
58	NAVPIPTLNR	0	1195.68	
59	AMKPWIQPK	0	1098.61	
60	ENLCSTFCK	0	1044.45	
61	VIPYVRYL	1	1022.60	
62	LTEEEKNR	1	1018.52	
63	FALPQYLK	0	979.56	
64	TKLTREEK	1	977.51	
65	TKVIPYVR	1	975.59	
66	ISQRYQK	1	922.51	
67	NRLNFLK	1	904.54	
68	TVYQHQA	0	903.47	
69	NMAINPSK	0	874.44 (954.41)	46
70	LNFLKK	1	762.49	
71	LTEEEK	0	748.37	
72	VIPYVR	0	746.46	
73	ITVDDK	0	690.37	
74	LNFLK	0	634.39	
75	KISQR	1	631.39	
76	HYQK	0	575.29	
77	ISQR	0	503.29	
78	EVVR	0	502.29	

Pro ověření účinnosti proteolytického štěpení byla zvolena metoda Tricin-SDS-PAGE (viz kapitola 4.4.4) a MALDI-TOF-MS (viz kapitola 4.4.11).

Separace na Tricin-SDS-PAGE byly provedeny v gelech o velikosti pórů 5 - 20 kDa, 1 - 70 kDa a 5 - 100 kDa. Pro ověření účinnosti štěpení α -CN byl nejvhodnější gel o porozitě 5 – 100 kDa (viz obrázek 5.5). Použitý α -CN byl o čistotě ≥ 70 %. Proužek, který byl zvolen jako odpovídající α -CN, byl vybrán na základě molekulové hmotnosti a intenzity. Denzitometrickým vyhodnocením bylo zjištěno, že účinnost štěpení byla vyšší jak 99 % (viz tabulka 5.6).

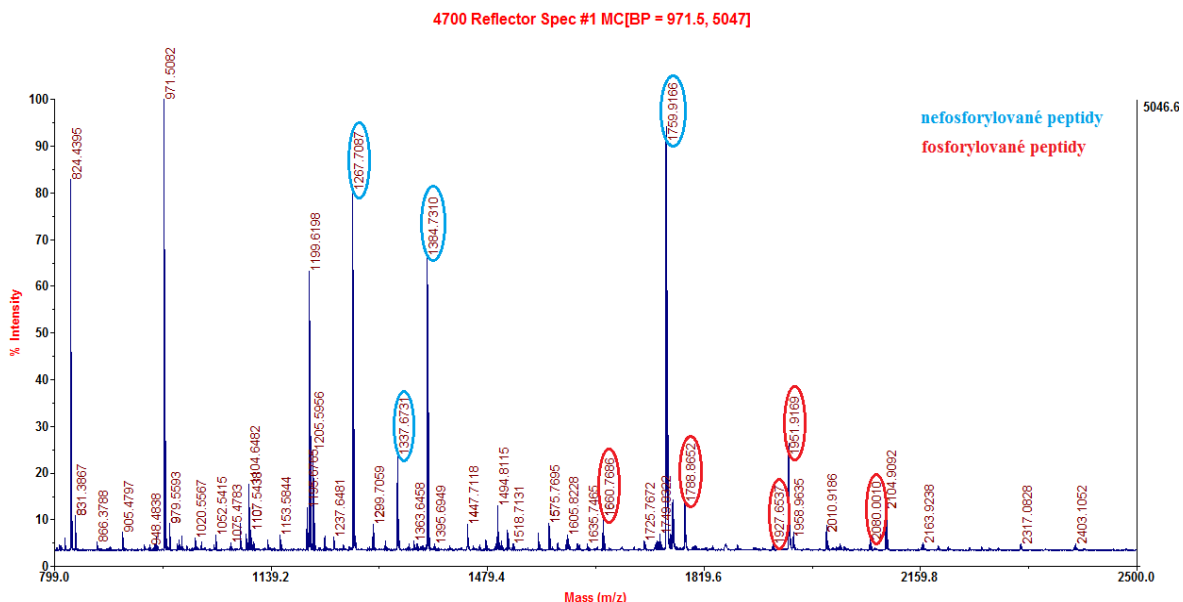


Obrázek 5.5 - Ověření účinnosti štěpení α -kaseinu trypsinem immobilizovaným na SiMAG-COOH částicích metodou Tricin-SDS-PAGE: gel o velikosti pórů 5 - 100 kDa, vzorky řaděné 1:2, barvení dusičnanem stříbrným, pozice: 1- proteinový marker (10 - 250 kDa, 3 μ l), 2 - původní α -CN (3 μ g), 3 - štěpený α -CN (20 μ g), 4 - štěpený α -CN (15 μ g), 5 - polypeptidový marker (1,3 - 26,6 kDa, 5 μ l)

Tabulka 5.6 - Denzitometrické vyhodnocení účinnosti štěpení α -CN immobilizovaným trypsinem na SiMAG-COOH částicích

α -kasein	množství	plocha	%	% štěpení
neštěpený	3 ug	33365,933	100	
štěpený	20 ug	1609,113	0,72	99,28
štěpený	15 ug	643,870	0,39	99,61

Vyhodnocením MALDI-TOF-MS spektra štěpeného α -CN (viz obrázek 5.6) bylo určeno 9 peptidů pocházejících z α -CN, z toho bylo 5 fosfopeptidů. I zde bylo potvrzeno úspěšné štěpení α -CN imobilizovaným trypsinem.

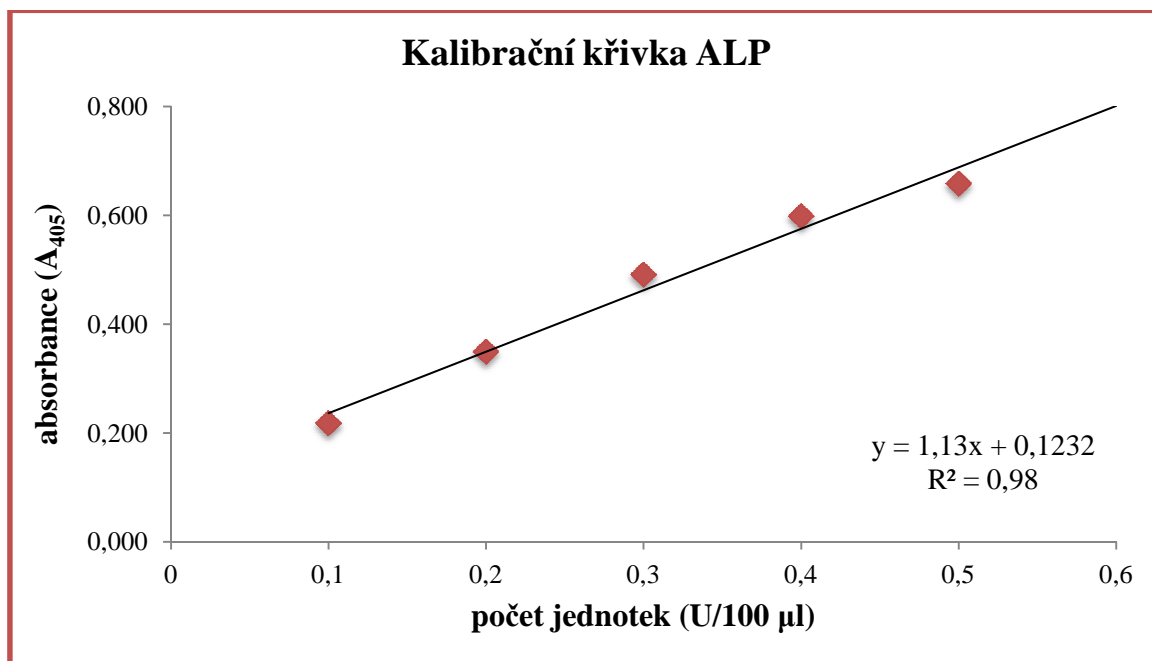


Obrázek 5.6 - MALDI-TOF-MS spektrum α -CN štěpeného trypsinem imobilizovaným na SiMAG-COOH částicích, zobrazený rozsah m/z 800-2500 (matrice DHB s 1,7 % H_3PO_4 , reflektorný mód, rozsah 800 - 4000)

5.6 Stanovení aktivity imobilizované alkalické fosfatázy

Pro defosforylaci vzorku štěpeného α -CN byla vybrána ALP, která byla nejdříve imobilizována na SiMAG-NH₂ magnetických částicích (viz kapitola 4.4.5). Aktivita imobilizované ALP byla stanovena pomocí substrátu PNPP. Byla připravena řada roztoků ALP v rozmezí 0,5 - 3 U enzymu o objemu 500 μ l (viz tabulka 4.3), z těchto připravených roztoků bylo odebráno do reakce 100 μ l, kalibrační křivka pro stanovení aktivity ALP byla tedy v rozmezí 0,1 - 0,6 U. V každém kalibračním roztoku a vzorku s imobilizovaným enzymem byla stanovena aktivita enzymu (viz kapitola 4.4.6). Pro sestavení kalibrační křivky byly použity hodnoty absorbance A_{405} po odečtení hodnot absorbance slepého vzorku.

Pro lepší proložení kalibrační závislosti byl z kalibrační křivky ALP (viz graf 5.3) odstraněn bod odpovídající 0,6 U enzymu. Z vyhodnocené rovnice lineární regrese bylo vypočteno, že na 1 mg částic bylo imobilizováno 5,36 U enzymu ALP, což odpovídá 0,77 %. I tato nízká účinnost imobilizace ALP byla dostačující pro následnou defosforylaci vzorku.



Graf 5.3 - Kalibrační křivka aktivity ALP

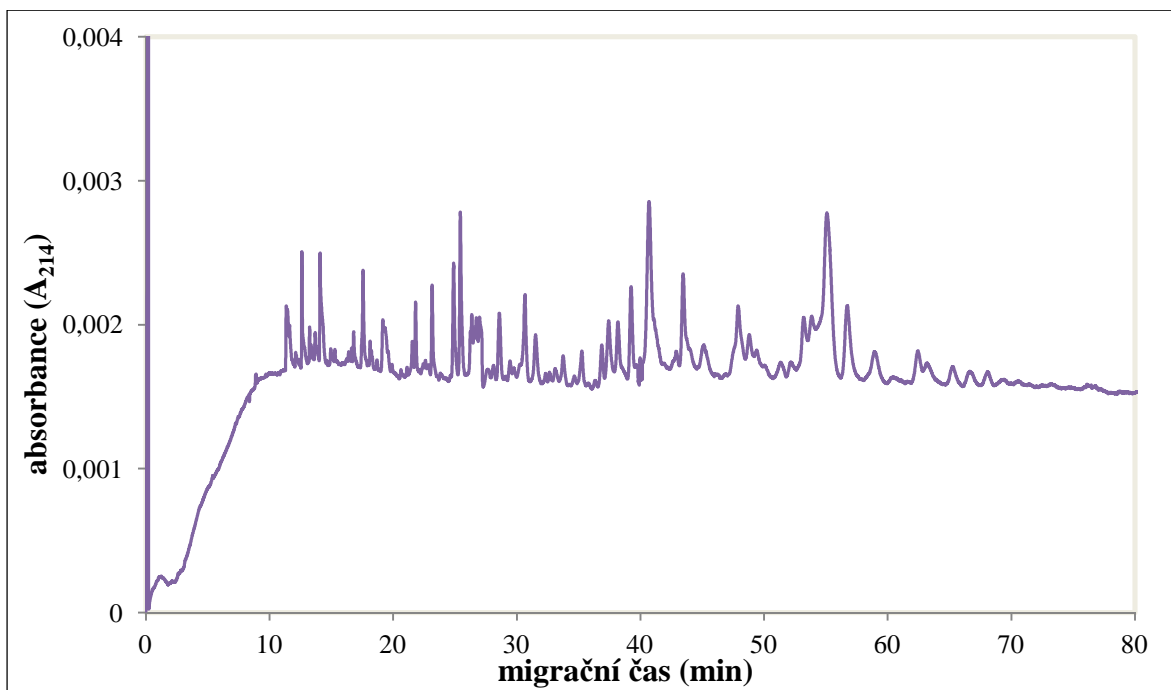
5.7 Separace defosforylovaných peptidů α -kaseinu

Defosforylace peptidů neboli odpojení fosfátové skupiny vede ke změně jejich náboje a molekulové hmotnosti, což má za následek změnu jejich elektroforetické pohyblivosti. Velikost změny molekulové hmotnosti závisí na počtu navázaných fosfátových skupin, které mohou být následně defosforylovány. Na základě tohoto předpokladu se očekávala změna migračních časů jednotlivých peptidů a posunu jejich pozice v záznamu CZE.

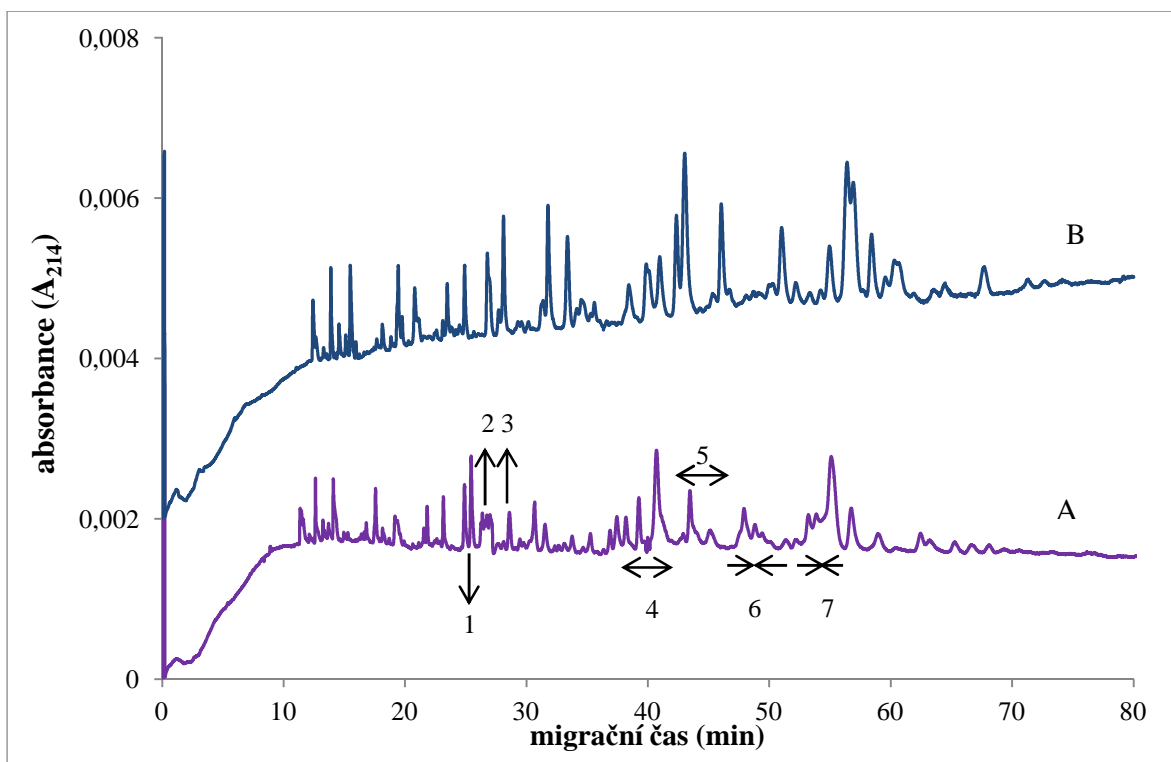
Při všech separacích na CZE-UV byla snaha o zachování původní koncentrace vzorku 3 mg/ml. Pokud během dalšího kroku přípravy vzorku došlo k naředění, vzorek byl zakonzentrován na výchozí objem.

5.7.1 Defosforylace pomocí imobilizované alkalické fosfatázy

Pro zjištění změn, které byly očekávány v důsledku defosforylace přítomných fosfopeptidů, byl elektroforeogram štěpeného α -CN po defosforylací (viz obrázek 5.7) porovnán se záznamem štěpeného α -CN.



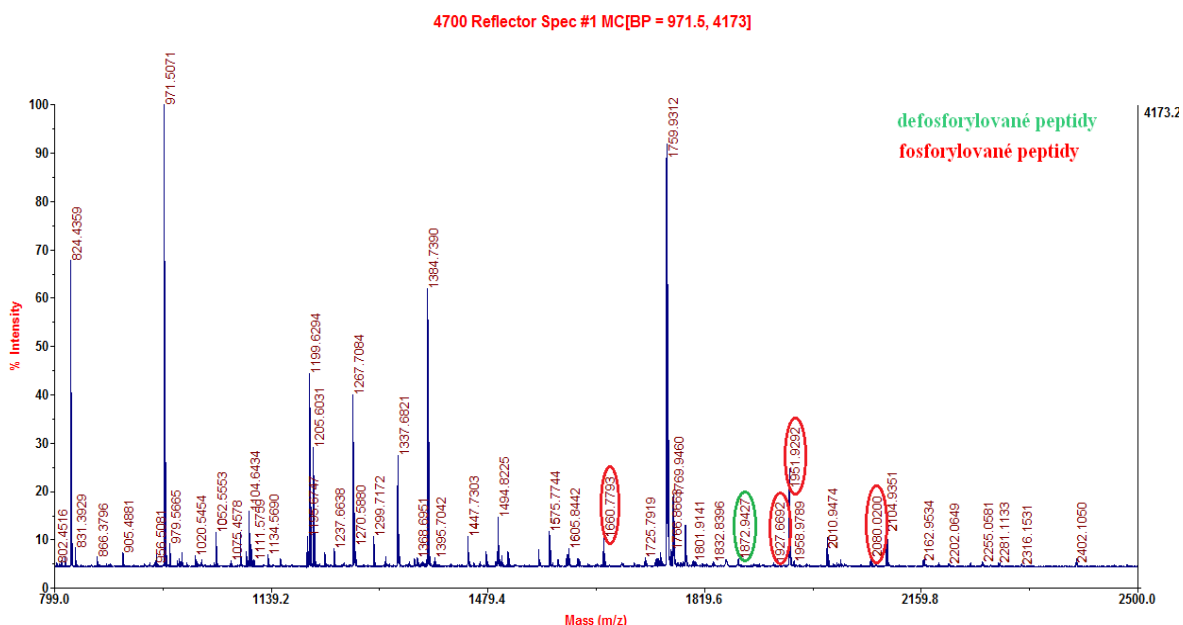
Obrázek 5.7 - Elektroforegram CZE-UV štěpeného α -CN po defosforylaci ALP imobilizovanou na SiMAG-NH₂ částicích (3 mg/ml)



Obrázek 5.8 - Porovnání dvou záznamů CZE-UV, A- elektroforegram štěpeného α -CN po defosforylaci ALP imobilizovanou na SiMAG-NH₂ částicích, B- elektroforegram štěpeného α -CN trypsinem imobilizovaným na SiMAG-COOH částicích.

Při porovnání obou záznamů (viz obrázek 5.8) bylo zjištěno, že u analýzy defosforylovaných peptidů α -CN pomocí imobilizované ALP došlo k mírnému posunu celého záznamu v čase, snížení intenzity absorpance a u některých píků byly pozorovány odlišnosti. K časovému posunu záznamu peptidů mohlo dojít na základě malé změny velikosti EOF. Intenzita absorpance mohla být snížena v důsledku naředění vzorku štěpeného α -CN glycinovým puforem s přidavkem hořčičných kationtů pro dosažení podmínek vhodných pro defosforylaci. Pro lepší orientaci při popisu změn byly lišící se píky označeny čísly od 1 - 7. Na záznamu A vymizel pík 1 a píky 2 a 3 se objevily nově. Na tomto záznamu se dále píky 4 a 5 od sebe lépe rozdělily a naopak separace píků 6 a 7 se zhoršila.

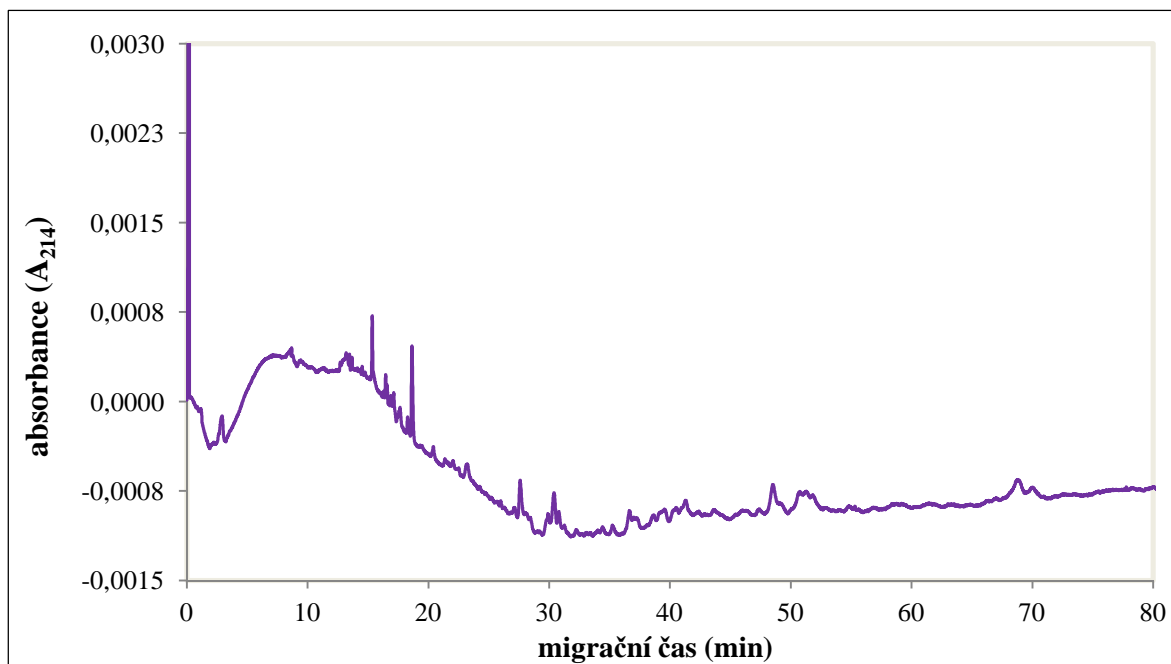
Metoda MALDI-TOF-MS byla použita k ověření účinnosti defosforylace pomocí imobilizované ALP v množství 0,4 U a ke zjištění, zda nepatrné změny v elektroforeogramu opravdu přísluší defosforylaci nebo jiným vlivům. Spektrum štěpeného α -CN po defosforylaci (viz obrázek 5.9) ukazuje na přítomnost 1 defosforylovaného peptidu a 4 fosfopeptidů, které se nepodařilo defosforylovat, tzn. že defosforylace pomocí imobilizované ALP nebyla dostatečně účinná. Změny, které byly pozorovány na elektroforeogramu CZE-UV nebyly v důsledku defosforylace, ale nejspíš v důsledku nadbytečné přítomnosti iontů, které mohli pozměnit výsledný záznam analýzy.



Obrázek 5.9 - MALDI-TOF-MS spektrum štěpeného α -CN po defosforylaci ALP imobilizovanou na SiMAG-NH₂ částicích, zobrazený rozsah m/z 800-2500 (matrice DHB s 1,7 % H₃PO₄, refletronový mód, měřený rozsah m/z 800-4000)

5.7.2 Defosforylace pomocí solubilní alkalické fosfatázy

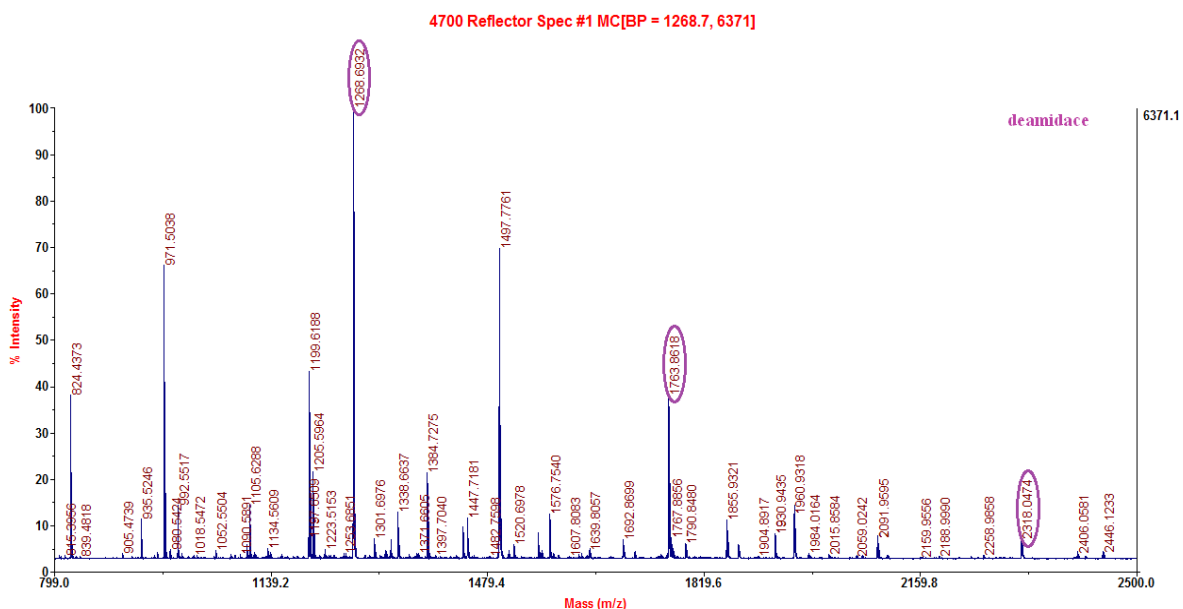
V důsledku neúspěšné defosforylace pomocí imobilizované ALP byla pro další defosforylaci zvolena solubilní ALP v množství 2 U (viz kapitola 4.4.7). Vzorek defosforylovaných peptidů po zakoncentrování na výchozí objem byl analyzován CZE-UV (viz obrázek 5.10), kde intenzita píků byla značně potlačena a základní linie má klesající charakter.



Obrázek 5.10 - Elektroforegram CZE-UV štěpeného α -CN po defosforylaci solubilní ALP (3 mg/ml)

Při ověření na MALDI-TOF-MS (viz obrázek 5.11) bylo zjištěno, že kromě defosforylace proběhla i nežádoucí deamidace. V MALDI-TOF-MS spektru byly vybrány 3 píky (1268,6875; 1763,8571; 2318,0422), na kterých proběhla deamidace. Pík 1268,6875 ve spektru má hodnotu m/z vyšší o 1 než je jeho teoretická hmotnost (1267,7045 - viz tabulka 5.5, peptidový fragment č. 23), to ukazuje na deamidaci 1 AA, a to glutaminu ($M = 128,0585$) za vzniku glutamové kyseliny ($M = 129,0425$). Pík 1763,8571 ve spektru má hodnotu m/z vyšší o 4 než jeho teoretická hmotnost (1759,9449 - viz tabulka 5.5, peptid č. 16), v tomto případě tedy proběhla deamidace celkem 4 AA - dvou glutaminů a dvou asparaginů. Glutamin se opět deamidoval na kyselinu glutamovou a deamidace asparaginu ($M = 114,0429$) proběhla za vzniku kyseliny asparagové ($M = 115,0269$). Pík 2318,0422 ve spektru se liší oproti teoretické hmotě o 2 (2316,1369 - viz tabulka 5.5, peptid č. 10), zde proběhla deamidace jednoho glutaminu a jednoho asparaginu. Deamidace peptidových

fragmentů může poukazovat na vedlejší aktivitu ALP, která může vznikat v důsledku nadměrného množství enzymu přidaného do reakce nebo delší doby defosforylace.



Obrázek 5.11 - MALDI-TOF-MS spektrum štěpeného α -CN po defosforylaci solubilní ALP, zobrazený rozsah m/z 800-2500 (matrice DHB s 1,7 % H_3PO_4 , reflektornový mód, měřený rozsah m/z 800-4000)

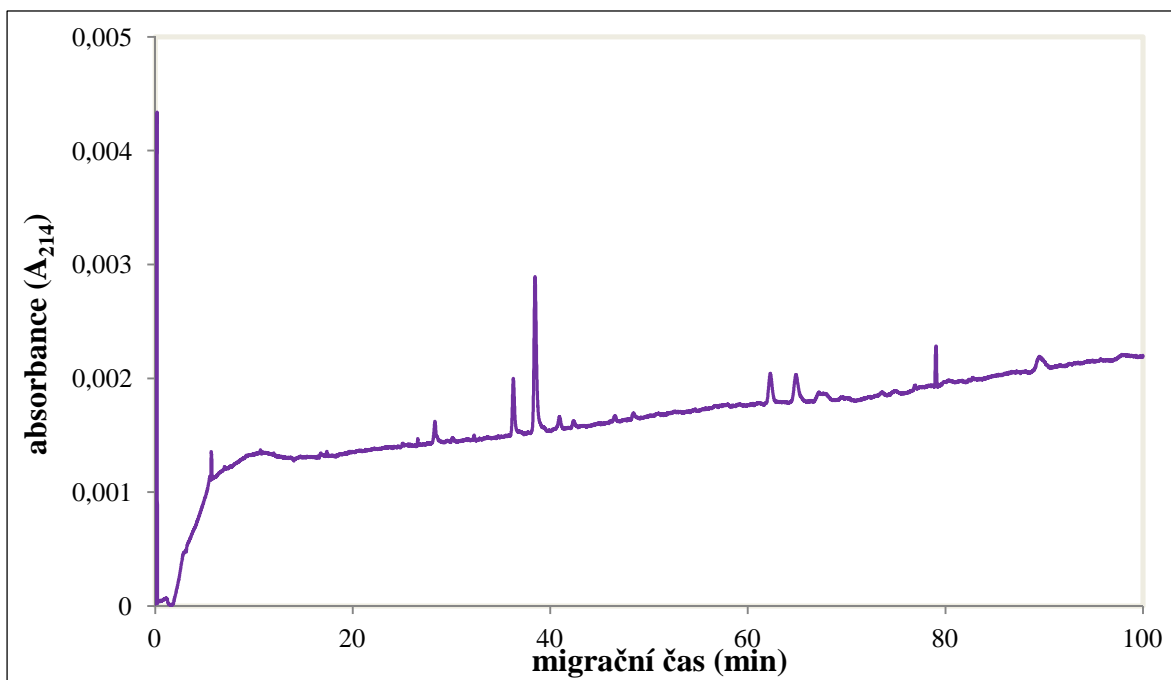
5.8 Separace obohaceného vzorku štěpeného α -kaseinu

Pro zjednodušení záznamu na CZE bylo použito obohacení na TiO_2 pomocí komerční kity SpinTips (viz kapitola 4.4.8) a ve vsádkovém uspořádání (viz kapitola 4.4.9).

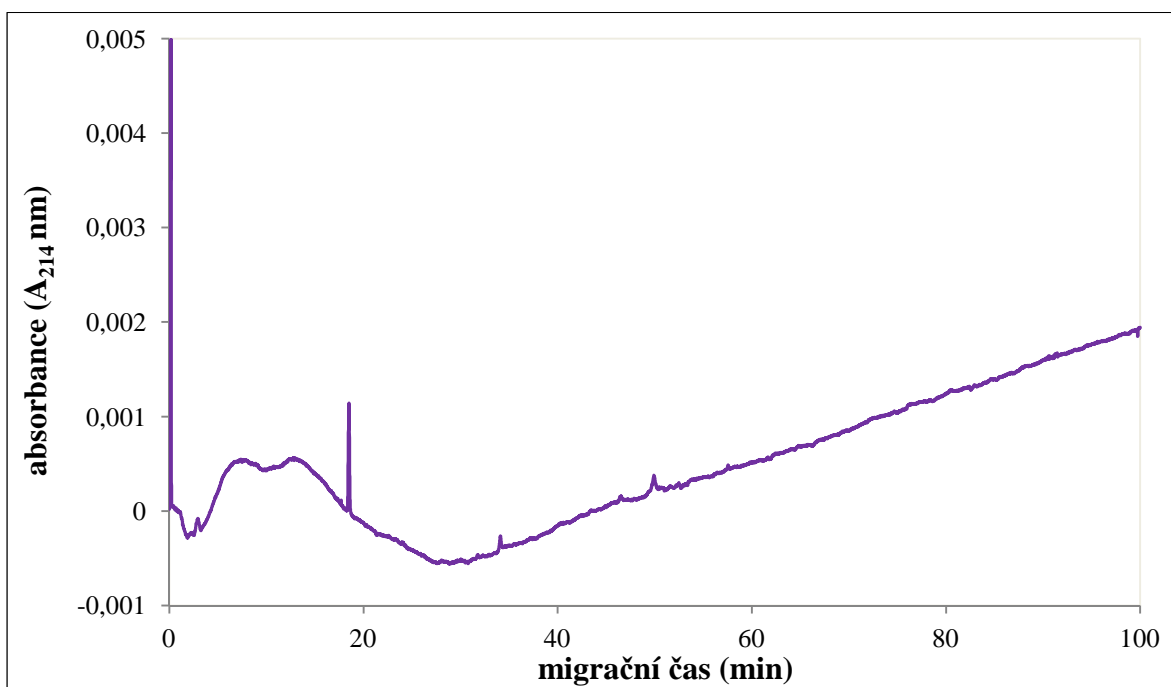
Vzorek obohacený fosfopeptidy pomocí komerčního kity SpinTips byl analyzován na CZE-UV v koncentraci odpovídající 3 mg/ml, kde intenzita píků byla velmi slabá. Po zakoncentrování byla předpokládána koncentrace 10 mg/ml a intenzita píků již byla dostatečná (viz obrázek 5.12). U píků zobrazených na elektroforeogramu je předpokládáno, že odpovídají přítomným fosfopeptidům α -CN. Jedná se o dva píky, které mají dostatečnou intenzitu absorbance a dále pět píků, u nichž je intenzita absorbance slabší a dá se předpokládat jejich nižší obsah ve vzorku.

CZE-UV analýza vzorku obohaceného fosfopeptidy pomocí TiO_2 částic ve vsádkovém uspořádání byla neúspěšná, a to i po zakoncentrování (viz obrázek 5.13). Na elektroforeogramu je zobrazen jeden pík, který není určen jako fosfopeptid, z důvodu nevyhovujícího průběhu základní linie. Před i po obohacení fosfopeptidů došlo k odsolení

pomocí SPE kolonky (viz kapitola 4.4.9). Tento krok způsobil ztrátu peptidů (fosfopeptidů) v takovém množství, které bylo pod mezí detekce CZE-UV.



Obrázek 5.12 - Elektroforegram CZE-UV vzorku štěpeného α -CN obohaceného fosfopeptidy pomocí komerčního kitu SpinTips (10 mg/ml)

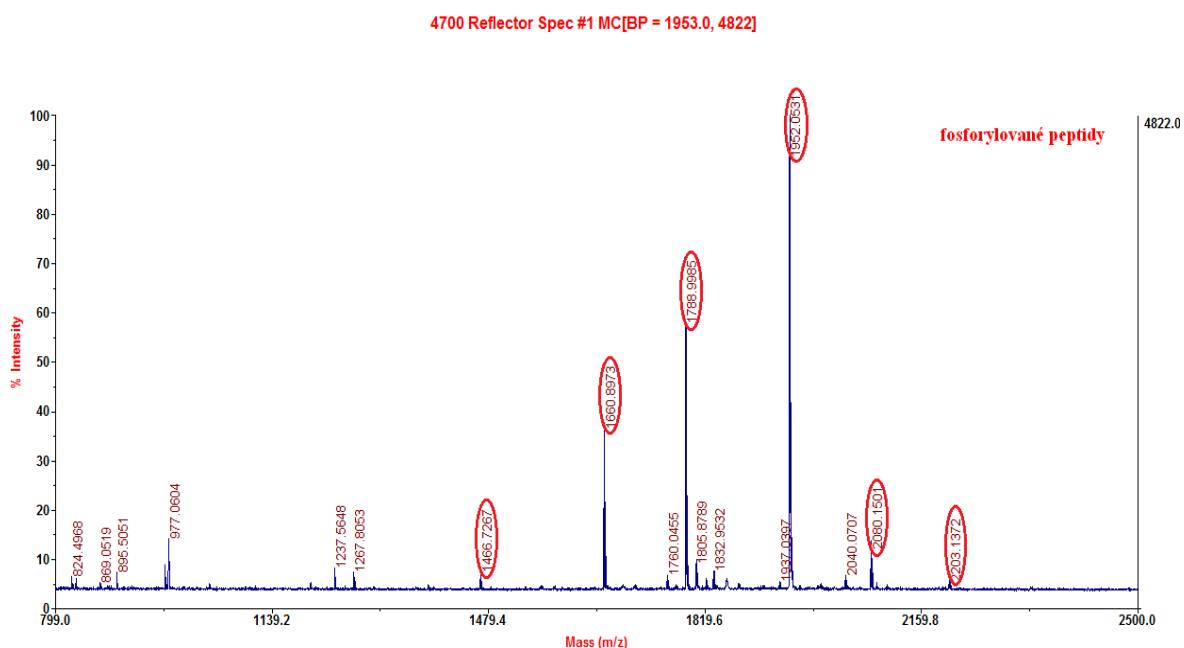


Obrázek 5.13 - Elektroforegram CZE-UV vzorku štěpeného α -CN obohaceného fosfopeptidy pomocí TiO_2 částic ve vsádkovém uspořádání (10 mg/ml)

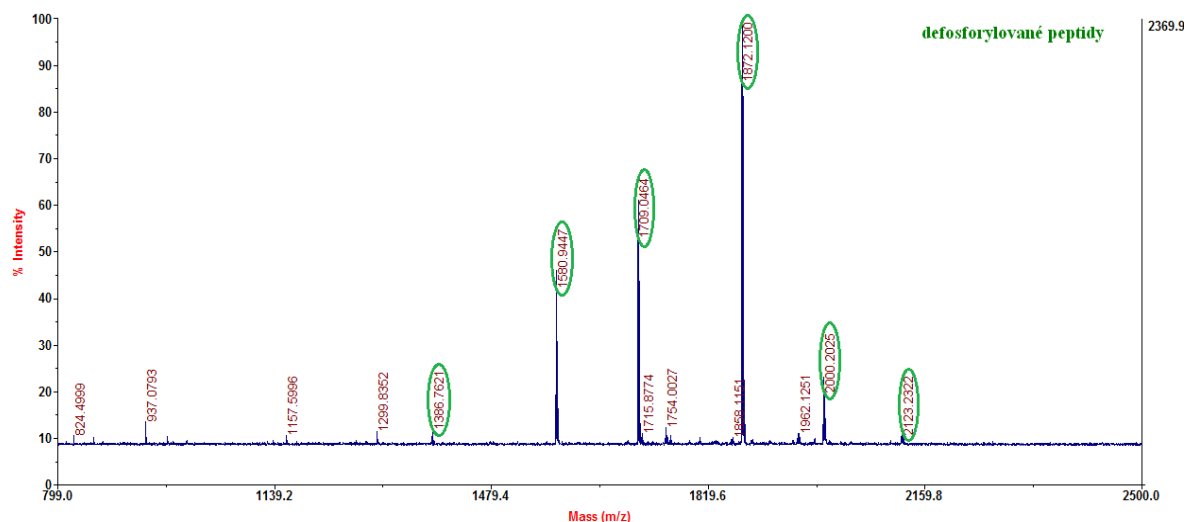
5.9 Defosforylace vzorků α - kaseinu obohacených fosfopeptidů a jejich separace

Po obohacení fosfopeptidů štěpeného α -CN TiO_2 oběma způsoby byly vzorky defosforylovány pomocí solubilní ALP. Pro zabránění nežádoucí deamidace byl postup defosforylace upraven tak, že bylo sníženo množství solubilního enzymu z 2 U/500 μg na 0,2 U/900 μg a zároveň byla zkrácena doby defosforylace ze 2 hod na 30 min.

Obohacení vzorku pomocí TiO_2 bylo účinné na základě vyhodnocení MALDI-TOF-MS spektra štěpeného α -CN obohaceného fosfopeptidy na TiO_2 částicích ve vsádkovém uspořádání (viz obrázek 5.14), kde je vyznačeno 6 fosfopeptidů, které pocházejí z α -CN. Po defosforylaci tohoto vzorku a vyhodnocení MALDI-TOF-MS spektra (viz obrázek 5.15) bylo zjištěno, že defosforylace byla úspěšná, protože hodnota m/z všech vyznačených píků se snížila o 80 Da.



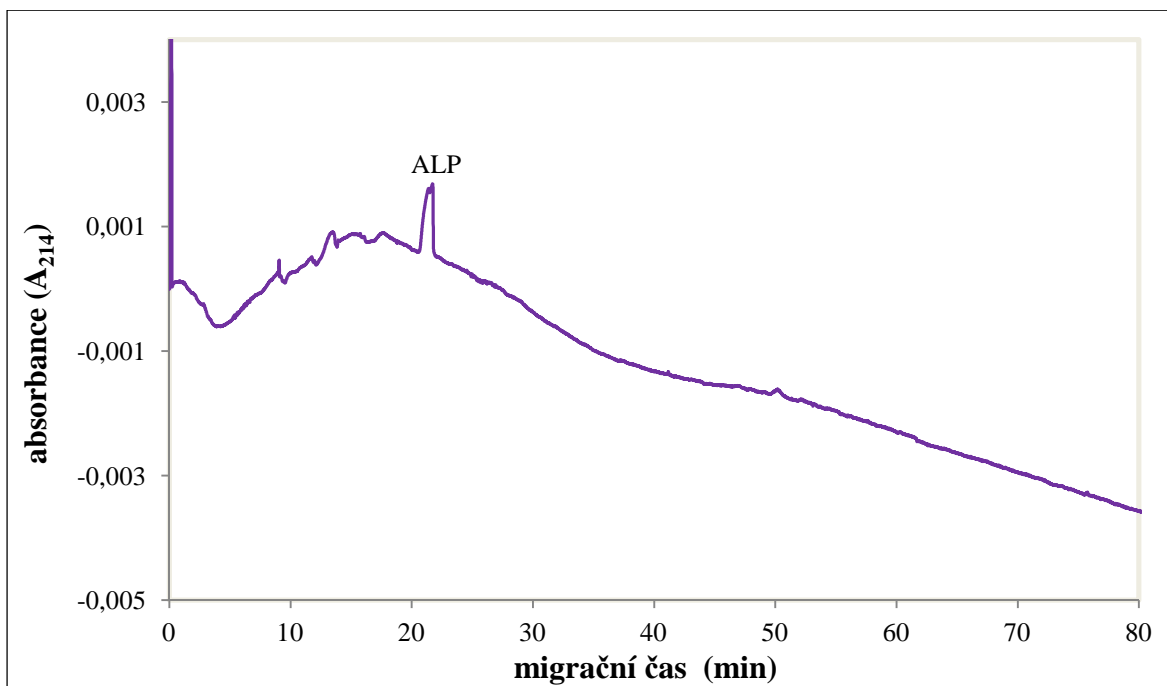
Obrázek 5.14 - MALDI-TOF-MS spektrum štěpeného α -CN obohaceného pomocí TiO_2 částic ve vsádkovém uspořádání, zobrazený rozsah m/z 800-2500 (matrice DHB s 1,7 % H_3PO_4 , refletronový mód, měřený rozsah m/z 800-4000)



Obrázek 5.15 - MALDI-TOF-MS spektrum obohaceného α -CN pomocí TiO_2 částic ve vsádkovém uspořádání po defosforylaci solubilní ALP, zobrazený rozsah m/z 800-2500 (matrice DHB s 1,7 % H_3PO_4 , refletronový mód, měřený rozsah m/z 800-4000)

I přes úspěšné překonání přípravné fáze vzorku, tj. potvrzení defosforylace pomocí MALDI-TOF-MS, záznamy CZE separací obou vzorků po defosforylaci byly nevyhovující.

Elektroforegram CZE-UV vzorku obohaceného fosfopeptidy pomocí komerčního kitu SpinTips po defosforylaci solubilní ALP je ukázán na obrázku 5.16. Na tomto elektroforegramu je zobrazen pouze jeden pík, který byl identifikován jako ALP na základě srovnání se záznamem slepého pokusu za stejných podmínek jako při defosforylaci tohoto vzorku. Záznam CZE-UV vzorku pouze po obohacení fosfopeptidů ukazoval na dobře vybrané podmínky separace CZE a po defosforylaci byl předpokládán posun těchto píků o určitý čas v důsledku změny jejich náboje a molekulové hmotnosti. Po defosforylaci tohoto vzorku došlo nejspíše z důvodu přítomnosti solubilní formy enzymu a iontů k potlačení signálu defosforylovaných peptidů.



Obrázek 5.16 - Elektroforegram CZE-UV obohaceného vzorku α -CN TiO₂ pomocí komerčního kitu SpinTips po defosforylaci solubilní ALP

U vzorku obohaceného pomocí TiO₂ částic ve vsádkovém uspořádání byla elektroforetická separace neúspěšná, nejspíše z důvodu odsolení vzorku. To zákonitě vedlo ke ztrátám peptidů, přičemž jejich koncentrace klesla pod limit detekce. Proto byl záznam po defosforylaci opět nevyhovující. Přitom analýzou MALDI-TOF-MS byly fosfopeptidy v tomto vzorku detekovány a byla potvrzena i jejich defosforylace.

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce byla optimalizace podmínek vhodných pro separaci fosfopeptidů a peptidů před a po defosforylaci modelového fosfoproteinu α -kaseinu pomocí kapilární zónové elektroforézy ve spojení s UV detekcí.

Při analýze proteinů a jejich fragmentů metodou CZE je nutné omezit jejich adsorpci na vnitřní stěny křemenné kapiláry. V této práci bylo nejdříve zvoleno kovalentní pokrytí separační kapiláry polyakrylamidem, jehož účinnost byla pouze 52,12 %. Pro časovou náročnost přípravy a nízkou účinnost tohoto pokrytí bylo vyzkoušeno dynamické pokrytí, u něhož byla účinnost 98,67 %. Z tohoto důvodu bylo ustoupeno od kovalentního pokrytí a jako vhodný a spolehlivý způsob omezení adsorpce proteinů na vnitřní stěny kapiláry bylo zvoleno dynamické pokrytí, které bylo využito při všech CZE separacích.

Pro zjednodušení elektroforegramu CZE-UV byly vzorky štěpeného α -CN obohaceny TiO_2 pomocí komerčního kitu SpinTips. Po obohacení vzorku pomocí komerčního kitu SpinTips bylo docíleno dobré separace, což bylo doloženo elektroforegramem s dostatečným rozlišením a intenzitou signálu. U obohacených vzorků jsme též testovali vliv odsolení vzorku, což ale vedlo k významné ztrátě peptidů a výsledný elektroforegram byl nevyhovující.

Vzorky štěpeného α -CN byly defosforylovány pomocí imobilizované nebo solubilní ALP. Při defosforylaci vzorku imobilizovanou ALP byla separace na CZE-UV úspěšná. Avšak v případě solubilní ALP nebyla separace na CZE-UV reprodukovatelná a měřený signál byl v záporných hodnotách. Domníváme se, že mohlo dojít ke kontaminaci vzorku látkami v roztoku ALP, které negativně ovlivnily jak separační podmínky, tak i detekci peptidů ve frakcích. Defosforylaci imobilizovanou ALP jsme vyhodnotili jako metodu vhodnou pro modifikaci peptidů před CZE-UV analýzou a podmínky defosforylace s následnou CZE separací budou následně optimalizovány.

Závěrem lze říct, že se podařilo vybrat vhodný pracovní elektrolyt pro dynamické pokrytí a zároveň pro analýzu fosfoproteinu α -CN, a po jeho štěpení i peptidů a fosfopeptidů. V dalších fázích optimalizace separace fosfopeptidů CZE-UV bude dynamické pokrytí přínosem pro jeho časovou nenáročnost. Metoda CZE-UV je vhodná pro určení fosforylace u proteinů. Interpretace elektroforeogramů je v přítomnosti všech peptidů včetně hledaných fosfopeptidů obtížná a proto doporučujeme jako preanalytické kroky vložit obohacení fosfopeptidů na TiO_2 a kontrolovanou defosforylaci provádět ALP imobilizovanou na pevnou fázi.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α -CN	α -kasein
AA	aminokyseliny (z angl. amino acid)
A	absorbance
ACN	acetonitril
ACP 1	kyselá fosfatáza 1 (z angl. acid phosphatase)
ALP	alkalická fosfatáza (z angl. alkaline phosphatase)
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzamidin hydrochlorid hydrát
BAPNA	N- α -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza (z angl. capillary zone electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (z angl. diode array detector)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
EMMA	elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (z angl. electrophoretically mediated microanalysis)
GTP	guanosintrifosfát
LIF	laser indukovaná fluorescence
LMPTP	nízkomolekulární proteintyrosinfosfatáza (z angl. low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase)
MALDI	desorpce a ionizace laserem za účasti matrice (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
MES	2-(N-Morfolin-4-yl)ethansulfonová kyselina
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PEG	polyethylenglykol
PNPP	p-nitrofenylfosfát
pSer	fosfoserin (z angl. phosphoserine)

psi	libra na čtvereční palec (z angl. pound per square inch)
PTB	fosfotyrosin-vázající doména (z angl. phosphotyrosine-binding domain)
pThr	fosfothreonin (z angl. phosphothreonine)
PTK	fosfotyrosinkináza (z angl. phosphotyrosine kinase)
PTM	postranlační modifikace
PTP	fosfotyrosinfosfatáza (z angl. phosphotyrosine phosphatase)
pTyr	fosfotyrosin (z angl. phosphotyrosine)
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce pevnou fází (z angl. solid phase extraction)
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	detektor doby letu (z angl. time of flight)
TPCK	L-1-tosylamido-2-fenylethyl chloromethyl keton
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LI, S. F. Y. *Capillary electrophoresis – principles, practice, and applications*. Amsterdam: Elsevier, 1992. 582 p. ISBN 0-444-89433-0.
- [2] HEIGER, D. N. *High performance capillary electrophoresis- an introduction, third edition*. Francie: Hewlett Packard Company, 1997. 136 p.
- [3] KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*, 1997, č. 5, s. 320 - 329.
- [4] WEINBERGER, R. *Practical capillary electrophoresis*. New York: Academic Press Inc., 1993. 312 p. ISBN 0-12-742355-9.
- [5] LANDERS, J. P. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques, third edition*. New York: CRC Press, 2008. 633 p. ISBN 978-0-8493-3329-3.
- [6] KOK, W. *Capillary electrophoresis; instrumentation and operation*. Germany: Vieweg Publishing. *Chromatographia*, 2000, vol. 51, 89 p. ISBN 3-528-06891-4.
- [7] ALTRIA, K. D. *Capillary electrophoresis guidebook; principles, operation and applications*. New Jersey: Humana Press. *Methods in molecular biology*, 1996, vol. 52, 384 p. ISBN 0-89603-315-5.
- [8] WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis - a high performance analytical separation technique. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 2003, vol. 41, p. 724 -738.
- [9] SCHMALZING, D.; PIGGEE, CH. A; FORET F.; CARRILHO, E.; KARGER, B. L. Characterization and performance of a neutral hydrophilic coating for the capillary electrophoretic separation of biopolymers. *Journal of Chromatography A*, 1993, vol. 652, p. 149 - 159.
- [10] NEHMÉ, R.; PERRIN, C.; COTTET, H.; BLANCHIN, M.; FABRE ,H. Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, p. 1888 - 1898.
- [11] MELANSON, J. E.; BARYLA, N. E.; LUCY, CH. A.: Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis. *Trends in analytical chemistry*, 2001, vol. 20, p. 365 - 374.
- [12] HEIGER, D. N.; KALTENBACH, P.; SIEVERT P. Diode array detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1994, vol. 15, p. 1234 - 1247.
- [13] HERMANSON, G. T. *Bioconjugate techniques, second edition*. New York: Academic Press Inc., 2008. 1199 p. ISBN 978-0-12-370501-3.
- [14] VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, CH. W. *Fundamentals of biochemistry, third edition*. USA: Wiley, 2008. 1099 p. ISBN 978-0470-12930-2.
- [15] ROSENBERG, I. M. *Protein analysis and purification: benchtop techniques*. Boston: Birkhäuser, 2005. 520 p. ISBN 0-8176-4340-0.

- [16] DOONAN, S. *Peptides and proteins*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2002. 192 p. ISBN 0-85404-692-5.
- [17] CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Biochemistry, six edition*. Canada: Thomson Brooks, 2009. 751 p. ISBN 978-0-495-39046-6.
- [18] WALSH, G.: *Post-translational modification of protein biopharmaceutical*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009. 390 p. ISBN 978-3-527-32074-5.
- [19] WALSH, C. T. *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*. Colorado: Roberts and Company Publishers, 2006. 490 p. ISBN 0-9747077-3-2.
- [20] LEITNER, A.; STURM, M.; LINDNER, W. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2011, vol. 703, p. 19 - 30.
- [21] MARKS, F. *Protein phosphorylation*. Weinheim: VCH, Weinheim, 1996. 404 p. ISBN 3-527-29241 - 1.
- [22] HALADA, P. Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy. *Chemické listy*, 2005, č. 99, s. 922 - 929.
- [23] TICHÝ, A.; SALOVSKÁ B.; ŘEHULKA, P.; KLIMENTOVÁ J.; VÁVROVÁ, J.; ŠTULÍK, J.; HERNYCHOVÁ, L. Phosphoproteomics: searching for a needle in a haystack. *Journal of Proteomics*, 2011, vol. 74, p. 2786 - 2797.
- [24] CIEŚLA, J.; FRĄCZYK, T.; RODE, W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochimica Polonica*, 2011, vol. 58, p. 137 - 147.
- [25] KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *European Journal of Biochemistry*, 2002, vol. 269, p. 1067 - 1071.
- [26] Fosforylované aminokyseliny (obrázek): The free chemical database [online, cit. 15.4.2012]. Dostupné na: www.chemspider.com.
- [27] MUIR, T. W.; ABELSON, J. N. *Methods in enzymology. Non-natural amino acids*. London: Academic Press. Elsevier, 2009, vol. 462, 264 p. ISBN 978-0-12-374310-7.
- [28] KUO, J. F. *Protein kinase C*. New York: Oxford University Press. Inc., 1994. 326 p. ISBN 0-19-508101-3.
- [29] SWEATT, J. D. Memory mechanisms: the yin and yang of protein phosphorylation. *Current Biology*, 2001, vol. 11, p. 391 - 394.
- [30] YAFFE, M. B. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nature reviews molecular cell biology*, 2002, vol. 3, p. 177 - 186.
- [31] YAFFE, M. B.; ELIA, A. E. Phosphoserine/threonine binding domains. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, vol. 13, p. 131 - 138.
- [32] KOCH, C. N.; ANDERSON, D.; MORAN, M. F.; ELLIS, CH.; PAWSON, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interaction of cytoplasmic signaling protein. *Science*, 1991, vol. 252, p. 668 - 674.

- [33] YOU J.; FITZGERALD, A.; COZZI, P. J.; ZHAO, Z.; GRAHAM, P.; RUSSELL, P. J.; WALSH, B. J.; WILLCOX, M.; ZHONG, L.; WASINGER, V.; LI, Y. L. Post-translation modification in tears. *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, p. 1853 - 1861.
- [34] VOGEL, W.; LAMMERS, R.; HUANG, J.; ULLRICH, A. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*, 1993, vol. 259, p. 1611 - 1614.
- [35] FISCHER, E. H.; CHARBONNEAU, H.; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*, 1991, vol. 253, p. 401 - 406.
- [36] MORLA, A. O.; DRAETTA, G.; BEACH, D.; WANG, J. Y. Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2 - dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*, 1989, vol. 58, p. 193 - 203.
- [37] BOTTINI, N.; BOTTINI E.; GLORIA-BOTTINI, F.; MUSTELIN T. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2002, vol. 50, p. 95 - 104.
- [38] DISSING, J.; SVENSMARK, O. Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B, and C isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, vol. 1041, p. 232 - 242. Převzato z [37].
- [39] GLORIA-BOTTINI, F.; NICOTRA, M.; LUCARINI, N.; BORGIANI, P.; LATORRE, M.; AMANTE, A.; GIMELFARB, A.; BOTTINI, E. Phosphotyrosine-protein-phosphatases and human reproduction: an association between low molecular weight acid phosphatase (ACP1) and spontaneous abortion. *Disease Markers*, 1996, vol. 12, p. 261 - 269. Převzato z [37].
- [40] SIMPSON, R. J.; DOROW, D. S. Cancer proteomics: from signaling networks to tumor markers. *Trends in Biotechnology*, 2001, vol. 19, p. 40 - 48.
- [41] COMBS, A. P. Recent advances in the discovery of competitive protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of diabetes, obesity, and cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, vol. 53, p. 2333 - 2344.
- [42] LI, X. Phosphorylation, protein kinases and ADPKD. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1812, p. 1219 - 1224.
- [43] TIFFT, K. E.; BRADBURY, K. A.; WILSON, K. L. Tyrosine phosphorylation of nuclear-membrane protein emerlin by Src, Abl and other kinases. *Journal of Cell Science*, 2009, vol. 122, p. 3780 - 3790.
- [44] TARTAGLIA, M.; Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 2001, vol. 29, p. 465 - 468.
- [45] KOWLURU, A.; KLUMPP S.; KRIEGLSTEIN, J. Protein histidine [de]phosphorylation in insulin secretion: abnormalities in models of impaired insulin secretion. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2011, vol. 384, p. 383 - 390.
- [46] GONG, C. X.; LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 2005, vol. 112, p. 813 - 838.

- [47] MARTIN, L.; LATYPOVA, X.; TERRO, F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 2011, vol. 58, p. 458 - 471.
- [48] FISCHER, D.; MUKRASCH, M. D.; BIERNAT, J.; BIBOW, S.; BLACKLEDGE, M.; GRIESINGER, CH.; MANDELKOW, E.; ZWECKSTETTER, M. Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of Tau to microtubules. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, p. 10047 – 10055.
- [49] WASIAK, T.; IONOV, M.; NIEZNANSKI, K.; NIEZNANSKA, H.; KLEMENTIEVA, O.; GRANELL, M.; CLADERA, J.; MAJORAL, J.; CAMINADE, A. M.; KLAJNERT, B. Phosphorus dendrimers affect Alzheimer's (A β 1–28) peptide and MAP-Tau protein aggregation. *Molecular Pharmaceutics*, 2012, vol. 9, p. 458 - 469.
- [50] FORMAN, M. S.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE V. M. Y. Neurodegenerative diseases: a decade of discovers paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, 2004, vol. 10, p. 1055 - 1063. Převzato z [49].
- [51] ÁLVAREZ, G.; ALDUDO, J.; ALONSO, M.; SANTANA, S.; VALDIVIESO, F. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated Tau in neuronal cells. *Journal of Neuroscience Research*, 2012, vol. 90, p. 1020 - 1029.
- [52] LIN, W. R.; WOZNIAK, M. A.; COOPER, R. J.; WILCOCK, G. K.; ITZHAKI, R. F. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *The Journal of pathology*, 2002, vol. 197, p. 395 - 402. Převzato z [51].
- [53] DOLNÍK, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis*, 2008, vol. 29, p. 143 - 156.
- [54] SIEDE, D.; MOELLER, H.; SIEDE, W. H.; REGENITER, A. Effect of ampicillin-sulbactam on clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2008, vol. 46, p. 1468 - 1469.
- [55] BOSSUYT, X.; PEETERMANS, W.E.: Effect of piperacillin-tazobactam on clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Clinical Chemistry*, 2002, vol. 48, p. 204 - 205.
- [56] BOSSUYT, X.; VERHAEGEN, J.; MARIEN, G.; BLANCKAERT, N. Effect of sulfamethoxazole on clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins. *Clinical Chemistry*, 2003, vol. 49, p. 340 - 341.
- [57] JABEEN, R.; PAYNE, D.; WIKTOROWICZ, J.; MOHAMMAD, A.; PETERSEN, J. Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, p. 2413 - 2438.
- [58] HENSKENS, Y. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 1998, vol. 44, p. 1184 - 1190.

- [59] HE, Y.; LACHER, N. A.; HOU, W.; QIAN, W.; ISELE, C.; STARKEY, J.; RUESCH, M. Analysis of identity, charge variants, and disulfide isomers of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in an uncoated capillary column. *Analytical Chemistry*, 2010, vol. 82, p. 3222 - 3230.
- [60] HE, Y.; ISELE, C.; HOU, W.; RUESCH, M. Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused silica capillary. *Journal of Separation Science*, 2011, vol. 34, p. 548 - 555.
- [61] DAI, H. J.; LI, G.; KRULL, I. S. Separation and quantitation of monoclonal antibodies in cell growth medium using capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 17, p. 1143 - 1153.
- [62] PETERSEN, J. R.; OKORODUDU, A. O.; MOHAMMAD, A.; PAYNE, D. A. Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 2003, vol. 330, p. 1 - 30.
- [63] RIGHETTI, P. G. Capillary electrophoretic analysis of proteins and peptides of biomedical and pharmacological interest. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2001, vol. 22, p. 337 - 351.
- [64] TIMPERMAN, A. T.; OLDENBURG, K. E.; SWEEDLER, J. V. Native fluorescence detection and spectral differentiation of peptides containing tryptophan and tyrosine in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1995, vol. 67, p. 3421 - 3426.
- [65] BARDELMEIJER, H. A.; WATERVAL, J. C. M.; LINGEMAN, H.; VAN'T HOF, R.; BULT, A.; UNDERBERG, W. J. M. Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, vol. 18, p. 2214 - 2227.
- [66] PETTER, CH. H.; HEIGL, N.; BACHMANN, S.; HUCK-PEZZEI, V. A. C.; NAJAM-UL-HAQ, M.; BAKRY, R.; BERNKOP-SCHNURERCH, A.; BONN, G. K.; HUCK, CH. W. Near infrared spectroscopy compared to liquid chromatography coupled to mass spectrometry and capillary electrophoresis as a detection tool for peptide reaction monitoring. *Amino Acids*, 2008, vol. 34, p. 605 - 616.
- [67] KAŠIČKA, V. Recent advances in CE and CEC of peptides (2007–2009). *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, p. 122 - 146.
- [68] BONY, S. D.; SCRIBA, G. K. E. Capillary electrophoresis analysis of hydrolysis, isomerization and enantiomerization of aspartyl model tripeptides in acidic and alkaline solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 43, p. 49 - 56.
- [69] PERÉZ-RAM, M.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; SUÁREZ C.; TORRES, E. A capillary zone electrophoresis for determination of thiolic peptides in biological samples. *Journal of Separation Science*, 2009, vol. 32, p. 2152 - 2158.
- [70] GLATZ, Z. Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 2006, vol. 841, p. 23 - 37.

- [71] BAO, J. M.; REGNIER, F. E. Ultramicro enzyme assays in a capillary electrophoretic system. *Journal Of Chromatography*, 1992, vol. 608, p. 217 – 224.
- [72] SCHUCHERT-SHI, A.; HAUSER, P. C. Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytical Biochemistry*, 2009, vol. 387, p. 202 – 207.
- [73] ZARRINE-AFSAR, A.; KRYLOV, S. N. Use of capillary electrophoresis and endogenous fluorescent substrate to monitor intracellular activation of protein kinase A. *Analytical Chemistry*, 2003, vol. 75, p. 3720 - 3724.
- [74] RAUF, F.; HUANG, Y.; MUHANDIRAMLAGE, T. P.; ASPINWALL, C. A. Analysis of protein kinase A activity in insulin-secreting cells using a cell-penetrating protein substrate and capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, vol. 397, p. 3359 - 3367.
- [75] ZHANG, R.; XU, X. H.; CHEN, T. B.; LI, L.; RAO, P. F. An assay for angiotensin-converting enzyme using capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 280, p. 286 - 290.
- [76] MONTEALEGRE, C.; LUISA MARINA M.; GARCIA-RUIZ, C. Separations proteins from olive oil by CE: An approximation to the differentiation of monovarietal olive oils. *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, p. 2218 - 2225.
- [77] DELGADO, F. J.; RODRIGUEZ-PINILLA, J.; GONZALEZ-CRESPO, J.; RAMIREZ, R.; ROA, I. Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese (Torta del Casar) manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 2010, vol. 45, p. 512 - 519.
- [78] ALBILLOS, S. M.; BUSTO, D. M.; PEREZ-MATEO, M.; ORTEGA, N. Prediction of the ripening times of ewe's milk cheese by multivariate regression analysis of capillary electrophoresis casein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, p. 8281 - 8287.
- [79] CATALÁ-CLARIANA, S.; BENAVENTE, F.; GIMENEZ, E.; BARBOSA, J.; SANZ-NEBOT, V. Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2010, vol. 683, p. 119 - 125.
- [80] JONG, N.; VISSER S.; OLIEMAN C. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1993, vol. 652, p. 207 - 213.
- [81] STEFFAN, W.; BALZER, H. H.; LIPPERT, F.; SAMBOR, B. C.; BRADBURY, A. G. W.; HENLE, T. Characterization of casein lactosylation by capillary electrophoresis and mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 2006, vol. 222, p. 467 - 471.
- [82] GINGER, M. R.; GRIGOR, M. R. Comparative aspect of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1999, vol. 124, p. 133 - 145.
- [83] ROSEN, J. M.; DALE, T.; GAVIGAN, S.; BUHLER, T. *Molecular biology of milk proteins. In: mechanisms regulating lactation and infant nutrient utilization*. Houston: Wiley-Liss, 1992. 1- 19 p. Převzato z [82].

- [84] OTTE, J.; ZAKORA, M.; KRISTIANSEN, K. R.; QVIST, K. B. Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Le Lait*, 1997, vol. 77, p. 241 - 257.
- [85] MOLINA, E.; MARTIN-ALVAREZ, P.J.; RAMOS, M. Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal*, 1999, vol. 9, p. 99 - 105.
- [86] ORTEGA, N.; ALBILLOS S. M.; BUSTO M. D. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*, 2003, vol. 14, p. 307 - 315.
- [87] MANSO, M. A.; MIGUEL, M.; LÓPEZ-FANDINO, R. Application of capillary zone electrophoresis to the characterisation of the human milk protein profile and its evolution throughout lactation. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1146, p. 110 - 117.
- [88] Magnetické mikročástice SiMAG-active: Chemicell [online, cit. 1.5.2012]. Dostupné na: <<http://www.chemicell.com/products/microparticles/simag-active/index.html>>
- [89] Molekulové markery použité při Tricin-SDS-PAGE (obrázek), [online, cit. 15. 3. 2012]. Dostupné na: [www. bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
- [90] HJERTÉN, S. High performance electrophoresis - elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal of Chromatography*, 1985, vol. 347, p. 191 - 198.
- [91] WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, p. 1174 - 1180.
- [92] Dvořáková, I.: *Analýza kaseinů kravského mléka kapilární elektroforézou*. Diplomová práce. Brno: VUT, FCH, 2010. 72 s.
- [93] MIRALLES, B.; ROTHBAUER, V.; MANSO, M. A.; AMIGO, L.; KRAUSE, I.; RAMOS, M.; Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 915, p. 225 - 230.
- [94] FARRELL, H. M.; JIMENEZ, F. R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 2004, vol. 87, p. 1641 - 1674.
- [95] HECK, J. M. L.; OLIEMAN, C.; SCHENNINK, A.; VALENBERG, H. J. F.; VISKER, M. H.; MEULDIJK, R. C. R., HOOIJDONK, A. C. M. Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 2008, vol. 18, p. 548 - 555.
- [96] Program PeptideMass [online, cit. 1. 3. 2012]. Dostupné na: <<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>>.