

# Možnosti stanovení proteinového profilu bakterií.

Jana Mantlová

---

Bakalářská práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana MANTLOVÁ**  
Osobní číslo: **T06223**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Možnosti stanovení proteinového profilu bakterií.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika a význam v živých organismech.
2. Proteiny bakterií.
3. Metody stanovení proteinového profilu bakterií.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Základy buněčné biologie . úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero publishing, 1998.

[2] Rosypal, S. a kol.: Nový přehled biologie. Praha: Scientia, 2003.

[3] Šilhánková, L., Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha: Academia, 2002.

[4] <http://www.cell-biology.com/>

[5] <http://www.cellsalive.com/>

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Iva Doležálková**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

**11. února 2010**

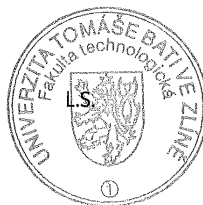
Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: MANTLOVA JANA

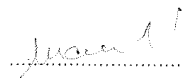
Obor: GTFP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1/</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2/</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3/</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3/</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 27. 05. 2010

  
.....

<sup>11</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávající zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>12</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k vyučovací nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>13</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá stanovením proteinového profilu bakterií. V práci je popsána charakteristika proteinů v živých organizmech, proteiny v bakteriální buňce a metody stanovení proteinového profilu bakterií. Jsou zde popsány metody izolace proteinů z bakterií a jejich stanovení.

Klíčová slova: Protein, bakterie, chromatografie, elektroforéza

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with determination of protein profile of bacteria. The paper describes the characterization of proteins in living organisms, proteins in bacterial cells and methods provided the protein profile of bacteria. There are described the method of isolation of proteins from bacteria and their determination.

Keywords: Protein, Bacteria, chromatography, electrophoresis

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí bakalářské práce, Mgr. Ivě Doležálkové, za odborné vedení, velkou trpělivost a věnovaný čas.

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1 CHARAKTERISTIKA PROTEINŮ A VÝZNAM V ŽIVÝCH ORGANIZMECH</b> .....      | <b>11</b> |
| 1.1 STRUKTURA PROTEINŮ .....   | 11        |
| 1.1.1 Primární struktura.....  | 12        |
| 1.1.2 Sekundární struktura .....   | 12        |
| 1.1.3 Terciární struktura .....  | 13        |
| 1.1.4 Kvartérní struktura .....  | 13        |
| 1.2 PROTEOSYNTÉZA.....   | 14        |
| 1.2.1 Význam a funkce DNA a RNA.....                                       | 14        |
| 1.2.2 Ribozomy .....   | 15        |
| 1.2.3 Transkripce.....   | 15        |
| 1.2.4 Translace .....  | 16        |
| 1.3 VÝZNAM PROTEINŮ V ŽIVÝCH ORGANIZMECH.....                              | 16        |
| <b>2 PROTEINY BAKTERIÍ</b> .....   | <b>18</b> |
| 2.1 BAKTERIÁLNÍ BUŇKA .....  | 18        |
| 2.2 STRUKTURA BUŇKY BAKTERIÍ.....  | 18        |
| 2.2.1 Cytoplazma .....   | 18        |
| 2.2.2 Jádro .....  | 18        |
| 2.2.3 Ribozomy .....   | 19        |
| 2.2.4 Inkluze – granula zásobních látek .....                              | 19        |
| 2.2.5 Cytoplazmatická membrána.....  | 19        |
| 2.2.6 Buněčná stěna.....   | 20        |
| 2.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ BAKTERIÁLNÍ BUŇKY.....                                | 21        |
| 2.4 BÍLKOVINY BAKTERIÍ .....   | 22        |
| 2.5 REGULACE PRODUKCE BÍLKOVIN V BAKTERIÁLNÍ BUŇCE.....                    | 23        |
| <b>3 METODY STANOVENÍ PROTEINOVÉHO PROFILU BAKTERIÍ</b> .....              | <b>25</b> |
| 3.1 IZOLACE BÍLKOVIN Z BUŇKY .....   | 25        |
| 3.1.1 Rozbití buněk a tkání .....  | 25        |
| 3.1.2 Separace buněčného homogenátu na různé frakce.....                   | 25        |
| 3.2 DĚLENÍ PROTEINŮ .....  | 26        |
| 3.3 DĚLENÍ PROTEINŮ – CHROMATOGRAFICKÝMI METODAMI .....                    | 26        |
| 3.3.1 Sloupcová chromatografie .....                                       | 26        |
| 3.3.2 Iontoměničová chromatografie .....                                   | 27        |
| 3.3.3 Gelová chromatografie.....   | 27        |
| 3.3.4 Afinitní chromatografie.....   | 28        |
| 3.4 DĚLENÍ PROTEINŮ – ELEKTROFORETICKÝMI METODAMI.....                     | 28        |
| 3.4.1 SDS – polyakrylamidová elektroforéza (SDS - PAGE) .....              | 28        |
| 3.4.2 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza.....                   | 30        |
| 3.4.3 Izoelektrická fokusace – IEF.....                                    | 30        |
| 3.4.4 Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2-D PAGE) ..... | 31        |
| <b>4 IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE PROTEINŮ</b> .....                      | <b>32</b> |



|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.1      | SELEKTIVNÍ ŠTĚPENÍ PROTEINU .....                          | 32        |
| 4.2      | IDENTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE..... | 32        |
| 4.3      | SEKVENCE AMINOKYSELIN V PROTEINECH .....                   | 33        |
| 4.4      | TROJROZMĚRNÁ STRUKTURA MOLEKUL PROTEINŮ.....               | 33        |
| <b>5</b> | <b>VYUŽITÍ PROTEINOVÝCH PROFILŮ BAKTERIÍ.....</b>          | <b>35</b> |
|          | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>37</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>                      | <b>38</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>             | <b>42</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK.....</b>                                 | <b>43</b> |

## ÚVOD

Proteiny jsou nejhojnější a funkčně nejrozmanitější molekuly v živých systémech, všechny životní projevy a procesy probíhající v buňce jsou na proteinech úzce závislé. Neobyčejná diverzita buněčných aktivit je možná pouze díky proteinům, které jsou dokonale přizpůsobeny své konkrétní biologické funkci.

Proteiny hrají nezastupitelnou roli ve všech bakteriích. Z proteinů si syntetizují další potřebné látky a energii. Proteiny zastávají funkce enzymů, tudíž řídí veškeré biochemické děje, které v buňce probíhají. Musí být i neustále obnovovány. Jsou výjimečné v tom, že jako jediné obsahují ve svých molekulách dusík a síru. Poskytují základní materiál pro růst a vývoj, pro zachování a stálou obnovu všech buněčných struktur. Podílí se na tvorbě hormonů, enzymů a barviv. Pomáhají udržovat stálý osmotický tlak ve vnitřním prostředí a tím i rovnováhu vody v buňce. Mají přepravní (transportní) funkci při přenosu některých látek (např. tuků); jsou zdrojem imunobiologických látek, a v neposlední řadě pomáhají udržovat správnou chemickou reakci ve vnitřním prostředí.

Tato práce je zaměřena na metody studia bakteriálních proteinů, popisuje zejména možnosti stanovení proteinového profilu různými chromatografickými a elektroforetickými metodami. Dále popisuje způsoby identifikace a bližší charakterizace bakteriálních proteinů.

Výsledky těchto postupů a metod mají široké uplatnění, a to zejména v bakteriální taxonomii, identifikaci, srovnávacích analýzách nebo epidemiologických studiích. Otevírají také možnosti rychlé a přesné diagnostiky v klinické mikrobiologii.

# 1 CHARAKTERISTIKA PROTEINŮ A VÝZNAM V ŽIVÝCH ORGANIZMECH

Proteiny čili bílkoviny tvoří většinu suché hmotnosti buňky a hrají primární roli v její stavbě a činnosti [1]. Bílkoviny jsou makromolekuly velmi rozmanité hmotnosti. Jejich relativní molekulová hmotnost sahá asi od 5000 do více než 2 000 000. Tvar bílkovinné molekuly je dvojitý: přibližně kulovitý (globulární) o průměru 3 – 15nm nebo lineární (fibrilární) o délce až 160 nm [2].

V buňce bílkoviny nehrají pouze roli stavebních kamenů, ale také obstarávají většinu buněčných funkcí. Bílkoviny s enzymatickou funkcí poskytují složité molekulární povrchy, které uvádějí do pohybu řadu chemických reakcí buňky. Proteiny zanořené v plazmatické membráně tvoří kanály a pumpy, které řídí průchod malých molekul do buňky a z buňky. Některé proteiny přenášejí zprávy od jedné buňky k druhé, jiné slouží jako integrátoři signálu schopné předávat soubory signálů z plazmatické membrány do jádra jednotlivých buněk. Další proteiny slouží jako drobné molekulové stroje s pohyblivými částmi: například *kinezin* posouvá organely cytoplazmou, zatímco *topoizomeráza* umí rozmotat zauzlované molekuly DNA. Jiné specializované proteiny fungují jako protilátky, jedy, hormony, elastická vlákna, provazy či zdroje luminiscence [3].

## 1.1 Struktura proteinů

Struktura a chemie jednotlivých proteinů se vyvinula a doladila během miliard let evoluce. Proto snad není překvapením, že z chemického hlediska jsou proteiny nejsložitější a funkčně nejdůmyslnější známé molekuly [2].

V proteinech existuje 21 různých aminokyselin, z nichž každá má jiné chemické vlastnosti. Molekula proteinu je tvořena dlouhým řetězcem těchto aminokyselin vzájemně propojených kovalentní peptidovou vazbou. Opakující se pořadí atomů podél řetězce se nazývá polypeptidová kostra. K tomuto řetězci jsou připojeny postranní řetězce různých aminokyselin, které se neúčastní peptidové vazby, zato však propůjčují každé aminokyselině její jedinečné vlastnosti. Některé z těchto postranních řetězců jsou nepolární a hydrofobní, jiné jsou záporné či kladně nabitě, některé jsou reaktivní a jiné spíše netečné atd. [2].

Mnoho kovalentních vazeb v dlouhém řetězci aminokyselin umožňuje volné otáčení atomů kolem těchto vazeb, takže se polypeptidová kostra může v podstatě skládat nekonečně mnoha způsoby. Každý poskládaný řetězec je stabilizován mnoha různými soubory neko-

valentních vazeb a interakcí, jak mezi atomy polypeptidové kostry tak mezi atomy postranních řetězců aminokyselin. Stabilita každého poskládaného tvaru proto závisí na celkové síle velkého počtu takových vazeb. [3].

Důležitým faktorem určujícím skládání každého proteinu je rozložení jeho polárních a nepolárních aminokyselin. Nepolární postranní řetězce v proteinu mají tendence se shlukovat uvnitř molekuly a vyhnout se tak kontaktu s vodou, která je uvnitř buňky obklopuje. Naopak polární řetězce se zadržují na povrchu molekuly, kde mohou vytvářet vodíkové můstky s molekulami vody a dalšími polárními látkami. Aminokyseliny skryté uvnitř proteinu obvykle vytvářejí vodíkové můstky s ostatními polárními aminokyselinami nebo s polypeptidovou kóstrou [4].

Chemickou stavbu molekul proteinů popisuje tzv. kovalentní struktura proteinu. Zahrnuje sekvenci aminokyselinových zbytků (primární strukturu) i všechna jiná kovalentní spojení (disulfidové a ostatní kovalentní můstky) a kovalentně připojené další skupiny (prostetické skupiny). Složitě prostorové uspořádání molekul proteinů je zahrnuto v pojmu konformace [3].

### 1.1.1 Primární struktura

Pod pojmem primární struktura proteinu se rozumí údaje o kovalentní struktuře molekuly. Popisuje počet a pořadí aminokyselinových zbytků v řetězcích. Sekvence aminokyselin se uvádí vždy od N-konce k C-konci hlavního řetězce, v souladu se směrem proteosyntézy. Pořadí aminokyselinových zbytků v molekule proteinu, je specificky kódováno pořadím nukleotidů v DNA a nemění se ani s denaturací příslušného proteinu. Primární struktura představuje veškerou informaci nutnou pro vytvoření trojrozměrné podoby proteinů.

Charakteristické pořadí kovalentně vázaných aminokyselin je ve všech molekulách téhož druhu identické [3].

### 1.1.2 Sekundární struktura

Sekundární strukturou proteinu se rozumí prostorové uspořádání atomů (konformace) v hlavním polypeptidovém řetězci. Aminokyseliny s hydrofobním postranním řetězcem se uplatňují v hydrofobních interakcích, aminokyseliny s elektrickým nábojem v postranním řetězci se podílejí na elektrostatických interakcích, ostatní hydrofilní a amfifilní aminokyseliny mohou tvořit vodíkové vazby prostřednictvím svých funkčních skupin [3].

Typické jsou dva typy sekundární struktury:

- A)  **$\alpha$ -helix**, v němž je polypeptidový řetězec šroubovitě stočen, a vodíkové vazby propojují jednotlivé závitů šroubovice.
- B)  **$\beta$ -struktura**, zvaná též **skládání list**, kde jsou vodíkovými vazbami propojeny dva vedle sebe ležící přímé úseky polyetidového řetězce [11].

### 1.1.3 Terciární struktura

Celkovou konformaci polypeptidového řetězce a prostorové uspořádání postranních řetězců určuje terciární struktura. Terciární struktura je výsledkem stabilizujících interakcí mezi postranními řetězci úseku s různou sekundární strukturou. Vzniká díky interakcím mezi vzdálenými úseky polypeptidového řetězce. U některých proteinů je běžné, že v jejich molekulách existují relativně samostatné kompaktní části, označované jako strukturální domény. Domény jsou určité strukturální motivy, které se navzájem stabilizují a skládají ze supersekundárních struktur. Pojem funkční doména se používá pro určité úseky struktury proteinu, které mají určitou nezávislou biologickou funkci (např. katalytickou apod.). Funkční doménu tvoří jedna nebo více domén strukturálních.

Na spojení jednotlivých úseků a celkové fixaci terciární struktury se podílejí různé typy kovalentních vazeb (př. disulfidové můstky) a nevazebné interakce (nekovalentní interakce, nekovalentní vazby) funkčních skupin aminokyselin (hydrofobní a elektrostatické interakce) [3].

### 1.1.4 Kvartérní struktura

Jen některé molekuly proteinů mohou tvořit i kvartérní strukturu. Jsou složeny z několika nezávislých podjednotek tzv. protomerů. Tyto podjednotky mohou být různé nebo zcela identické, jejich počet bývá zpravidla sudý. Podjednotky samy o sobě jsou globulární proteiny s charakteristickou sekundární a terciární strukturou. Výrazným strukturálním rysem je uspořádání funkčních skupin na povrchu podjednotek, umožňující spojení mezi nimi a asociaci komplexní stabilní molekuly. Vlivem vnějšího prostředí se může konformace a prostorové uspořádání podjednotek do určité míry měnit, což se může projevit změnou jejich biologické aktivity (funkce). Mnoho regulovatelných pochodů v buňkách je založeno na změně prostorového uspořádání podjednotek proteinů s kvartérní strukturou (enzymy, receptory, transportní proteiny). Z hlediska celkového tvaru molekuly a její funkce mají podjednotky obdobný význam jako domény terciární struktury; protože jsou však spojeny jen nekovalentními interakcemi, snadněji disociují. Lze říci, že prakticky všechny proteiny o

$M_r > 5 \cdot 10^4$  mají kvartérní strukturu. Podjednotky proteinů označujeme zpravidla řeckými písmeny [3].

## 1.2 Proteosyntéza

Buňka si vyrábí několik tisíc proteinů. Vlastnosti a funkce proteinu jsou dány sekvencí aminokyselin, která určuje, jak bude daný protein sbalen do funkční konformace [5].

**Proteosyntéza** je proces, ve kterém se tvoří bílkoviny. Proteosyntéza se skládá ze dvou kroků. V prvním dochází k přepisu (transkripci) genetického kódu DNA do RNA. V druhém dochází k překladu (translaci) kódu z RNA a k tvorbě bílkovin. Transkripce probíhá v buněčném jádru a translace na ribozomech [7] a [8].

### 1.2.1 Význam a funkce DNA a RNA

DNA (deoxyribonukleová kyselina) je chemickým podkladem dědičnosti a řídí vznik proteinů. Je to lineární polymer podjednotek - nukleotidů, které jsou spojeny v polymerní formu pomocí 3'-5'-fosfodiesterových můstků [5]. Každý nukleotid je tvořen cukrem (deoxyribóza v DNA, ribóza v RNA), zbytkem kyseliny fosforečné a dusíkatou bází. Podle typu báze (adenin, guanin, thymin, cytozin) rozlišujeme v DNA 4 různé nukleotidy. Informační obsah DNA je dán pořadím těchto nukleotidů, které určuje aminokyselinovou sekvenci proteinu [8].

DNA však neřídí syntézu bílkovin sama. Jestliže buňka potřebuje nějaký konkrétní protein, je nukleotidová sekvence v patřičné oblasti dlouhé molekuly DNA v chromosomu nejprve zkopírována do jiného druhu nukleové kyseliny RNA (ribonukleová kyselina). Tato RNA je přímo využívána jako templát pro tvorbu proteinů. Genetická informace je tedy předávána z DNA do RNA a následně z RNA do proteinu [6]. Obecnou funkcí RNA je přenos genetické informace z pořadí deoxyribonukleotidů DNA do pořadí aminokyselin v bílkovinném řetězci. Do RNA je tato informace přepisována z určitého úseku molekuly DNA, úseky DNA nesoucí informaci o syntéze proteinu se označují jako strukturální geny. [6].

RNA je molekula, která je zpravidla tvořena jen jedním polynukleotidovým vláknem. Dusíkaté báze nukleotidů jsou adenin, guanin, cytozin a uracil (zařazován místo thyminu).

Vyskytují se tři základní typy RNA:

- a) mRNA – mediátorová (informační) RNA. Přenáší informaci z jádra k místu proteosyntézy.

- b) tRNA – transferová RNA. Přenáší aminokyseliny na proteosyntetický aparát buňky.
- c) rRNA – ribozomální RNA. Tvoří stavební složku ribozomálních podjednotek [1].

### 1.2.2 Ribozomy

Místem syntézy proteinů jsou ribozomy. Jsou to tělíška složená z rRNA a proteinů v hmotnostním poměru asi 1:1. Jsou přítomny v cytoplasmě a v matrix mitochondrií a ve stromatu chloroplastů. Prokaryontní ribozom má molekulovou hmotnost  $2,8 \times 10^6$  a sedimentační koeficient 70S. Jeho větší podjednotka má mol. hmotnost  $1,8 \times 10^6$  a sedimentuje při 50S, menší podjednotka má mol. hmotnost  $1,0 \times 10^6$  a sedimentuje při 30S.

Na ribozomu jsou čtyři specifická místa, která mají zásadní důležitost pro translaci. Je to jedno místo pro vazbu mRNA a tři místa pro vazbu tRNA: místo A (aminoacylové) pro vazbu tRNA nesoucí aminokyselinu, místo P (peptidylové), kam se váže peptidyl-tRNA a místo E (exit, výstupní), kde tRNA opouští ribozom.

Podstatou funkce ribozomů je organizování syntézy proteinové molekuly: ribozom umožňuje přesnou prostorovou orientaci mRNA a aminoacyl-tRNA (jejich kodonu a antikodonu) a dvou aktivovaných aminokyselin tak, že je genetická informace plynule čtena a překládána do polypeptidů. Všechna zúčastněná vazebná místa na povrchu ribozomu jsou tedy ve zcela určitém stereospecifickém postavení vůči procházející molekule mRNA i molekule tRNA [4].

### 1.2.3 Transkripce

Transkripce je proces přepisu genetické informace z DNA-sekvence do RNA-sekvence, přičemž jsou obě sekvence navzájem komplementární. Transkripcí vzniklá sekvence je označována jako primární transkript.

Transkripce probíhá ve třech fázích:

- 1. Iniciace transkripce**, dochází při ní k navázání enzymu RNA-polymerázy na promotor (specifické sekvence na transkripční jednotce, od kterých transkripce začíná) a zahájení syntézy RNA-řetězce.
- 2. Elongace RNA-řetězce**, při které jsou ke 3' konci řetězce připojovány nové nukleotidy.
- 3. Terminace transkripce** zahrnuje pochody zastavující elongaci DNA-řetězce na terminátoru (specifické sekvence, které signalizují ukončení transkripce) a jeho uvolnění z matricového řetězce za účasti specifického proteinu.

Transkripcí vzniká u prokaryot mediátorová RNA, která ihned v cytoplazmě podléhá translaci [7].

Terminace transkripce u eukaryotních buněk je poněkud odlišná, a to podle typu RNA polymerázy. I když vlastní ukončení transkripce je dáno specifickými sekvencemi v DNA, vlastním terminačním signálem jsou koncové sekvence transkribované RNA [4].

#### 1.2.4 Translace

Procesem translace je genetická informace překládána z mRNA do primární struktury proteinu podle určitého kódu, který je nazýván genetický kód. Výchozími látkami pro tento proces je 21 standardních aminokyselin obsažených volně v cytoplazmě. Podle informace v mRNA se z nich za účasti transferové RNA tvoří polypeptidový řetězec.

Jednotlivé fáze translace jsou:

- 1. Iniciace translace.** Zahájení reakce za vzniku iniciačního komplexu, který je složen z ribozomu 70S, molekuly mRNA a iniciační tRNA, tzn. tRNA, která se jako první váže antikodonem na iniciační kodon mRNA. Reakce probíhá na ribozomech za účasti proteinů označovaných jako iniciační faktory.
- 2. Elongace polypeptidového řetězce.** Podle informace v mRNA při ní na ribozomech dochází k prodlužování polypeptidového řetězce kondenzací aminokyselin. Reakci katalyzují dva proteiny, které se označují jako elongační faktory.
- 3. Terminace translace** je signalizována terminačním kodonem a uvolněním polypeptidového řetězce z ribozomu za účasti terminačních faktorů [7].

### 1.3 Význam proteinů v živých organizmech

Podle biologické funkce, kterou vykonávají, se proteiny dělí na:

**Strukturní:** Proteiny jsou složkami všech živých buněčných struktur – cytoskeletu, buněčných organel a biomembrán. Poskytují mechanickou oporu buňkám a tkáním.

**Katalytické:** Mezi katalytické proteiny patří zejména enzymy a hormony. Bývají katalyzátory velmi specifickými pro dané úkony a jejich aktivita je regulovatelná.

**Transportní:** Souhra jednotlivých dějů v organismu je podmíněna membránovými proteiny, umožňujícími specifický transport látek přes membrány. V jednotlivých částech buněk



a v extracelulárních tekutinách jsou malé hydrofobní molekuly a některé ionty přenášeny navázáním na specifické či nespecifické transportní proteiny.

**Pohybové:** Proteinová filamenta umožňují např. pohyb chromozomu během mitózy.

**Obranné:** Specifické proteiny mohou plnit i funkci signálních molekul. Patří k nim proteiny vázané v cytoplazmatických membránách buněk. Mají především význam ochranný. Vazbou specifického imunoglobulinu na antigen buněčného povrchu nebo na jiný antigen jsou zahájeny děje vedoucí k jeho zneškodnění.

Dále to jsou funkce: **zásobní, sensorické, regulační, a výživové** [1] a [2].

## 2 PROTEINY BAKTERIÍ

### 2.1 Bakteriální buňka

Bakterie je jednobuněčný mikroorganismus bez jádra, saprofytický, symbiotický, nebo patogenní, účastníci se přeměny látek v přírodě, působící onemocnění rostlin, zvířat a lidí, využívány v průmyslu apod. [9].

Bakterie jsou nejjednodušší a nejmenší buňky. Svým tvarem (obvykle kulové, okrouhlé nebo spirálovité buňky velké několik mikrometrů) se bakterie mohou zdát omezené, ale po chemické stránce představují nejrozmanitější a nejdůmyslnější třídu buněk [1].

### 2.2 Struktura buňky bakterií

Bakteriální buňka se liší od buňky rostlinné a živočišné podstatně jednodušší strukturou. Kromě rozpustné cytoplazmy má vlastně jen 4 struktury: jádro, ribozomy, cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu. Je tvořena jediným, membránami dále neděleným prostorem. Je nazývána buňkou prokaryontní [15].

#### 2.2.1 Cytoplazma

Cytoplazma vyplňuje vnitřní prostor bakteriální buňky. Je to koncentrovaný koloidní roztok biomolekul. Jsou zde zastoupeny aminokyseliny, vitaminy, nukleové kyseliny, bílkoviny, meziprodukty metabolismu buňky, soli organických i anorganických kyselin atd. Cytoplazma obsahuje více než 50 % všech proteinů buňky a téměř všechny mají enzymatickou funkci. Především se jedná o enzymové systémy uplatňující se při biosyntéze aminokyselin, nukleotidů, polysacharidů, DNA, RNA a dalších produktů. V cytoplazmě se také nachází 3 druhy strukturních útvarů: chromozom, ribozomy a granula zásobních látek [10] a [15].

#### 2.2.2 Jádro

Jádro bakteriální buňky nese genetický materiál, který není soustředěn do pravého jádra, tedy útvaru, který je diferencován jako samostatná organela. Jádro nemá stálý tvar a představuje jednu molekulu dvoušroubovicové DNA (bakteriální chromozom). Na rozdíl od eukaryotických buněk neobsahuje histony, avšak na molekulu DNA jsou navázány 4 druhy proteinů, které jsou histonům podobné. Chromozom je napojen na vnitřní stranu cytoplazmatické membrány většinou prostřednictvím mezozomu.

Nerostoucí bakteriální buňka má pouze jedno jádro, je tedy haploidní a nedělí se mitózou.

Řada bakterií obsahuje v buňce kromě chromozomální DNA ještě několik menších samostatných molekul DNA, které se nazývají plazmidy. Plazmidy nejsou pro buňku úplně nezbytné, ale za nepříznivých podmínek tato informace poskytuje řadu zvýhodnění pro přežití. Plazmidů se využívá v genovém inženýrství při jejich záměrném zavádění do buněk bakterií a změně požadovaných vlastností [10].

Význam a funkce DNA byly popsány v kapitole 1.2.1

### **2.2.3 Ribozomy**

Ribozomy byly popsány v kapitole 1.2.2

### **2.2.4 Inkluze – granula zásobních látek**

Inkluze představují zásobní látky – rezervní materiál. Jako každý organismus tak i bakterie potřebuje rezervní vnitřní zdroj energie pro období, kdy není k dispozici zdroj vnější. U bakterií je to nejčastěji glykogen a poly- $\beta$ -hydroxymáselná kyselina [15]. Jejich množství je závislé především na metabolické aktivitě buňky, hromadí se v buňce tehdy, když buňka roste v nadbytku zdroje uhlíku nebo v nedostatku zdroje dusíku či jiné živiny a naopak mizí v případě, kdy je zdroj uhlíku a energie živinou limitující [10].

### **2.2.5 Cytoplazmatická membrána**

Stavba cytoplazmatické membrány bakterie je shodná se stavbou ostatních biologických membrán: dvojitá vrstva fosfolipidů uvnitř hydrofobní, zevně polární, a v ní jsou ponořeny a hydrofobní silou poutány molekuly bílkovin. Membrána je tekutá, molekuly fosfolipidů i bílkovin mají volnost rotačního i laterálního pohybu. Cytoplazmatická membrána bakterie je stavebně i funkčně asymetrická. Biologicky i evolučně je primární funkcí bakteriální cytoplazmatické membrány izolace vnitřního vodného prostředí od vnějšího vodného prostředí. Nositel této vlastnosti je vnitřní hydrofobní zóna membrány, neboť je pro polární molekuly nepropustná. Selektivní průchodnost membrány pro polární molekuly (živiny) zajišťují specifické transportní proteiny.

Jednou z hlavních životních funkcí bakteriální buňky lokalizovaných na cytoplazmatické membráně je transformace energie [15]. Cytoplazmatická membrána je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů. V membráně fototrofních bakterií je přítomen

také bakteriochlorofyl, nezbytný pro přeměnu světelné energie v energii chemickou, a celý systém uskutečňující tuto přeměnu. V cytoplazmatické membráně jsou dále přítomny bílkovinné přenašeče, nutné pro transport látek do buňky a z buňky [26].

### 2.2.6 Buněčná stěna

Buněčná stěna se nachází nad cytoplazmatickou membránou bakterie. Je to jediný pevný útvar v bakteriální buňce. Hraje roli buněčného skeletu, uděluje buňce tvar a jako tuhý obal ji mechanicky chrání. Stěna uděluje bakterii i odolnost chemickou, proti záření, proti vyschnutí, proti nepříznivým osmotickým podmínkám atd. Současně kompenzuje poměrně značný osmotický přetlak panující uvnitř buňky: 500 kPa (5 atm) u gramnegativních bakterií a až 2500 kPa (25 atm) u grampozitivních. Buněčná stěna není pro molekuly nepropustná a má charakter síta [15].

Buněčná stěna je struktura rozmanité stavby a různého stupně složitosti u různých bakterií. Základní složkou buněčné stěny bakterií je peptidoglykan (murein). Je tvořen z vrstev polysacharidových řetězců pospojovaných napříč krátkými peptidy. Peptidoglykan obsahuje střídavě dva cukry, kyselinu N-acetylmuramovou a N-acetylglukozamin. Ze zbytků N-acetylmuramové kyseliny vycházejí tetrapeptidy a reakcí zvanou transpeptidace se navzájem vážou peptidickými můstky. Další struktura stěny se ale u bakterií grampozitivních a gramnegativních významně liší [32].

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je jednodušší, tvoří ji silná vrstva peptidoglykanu skrz kterou probíhají řetězce teichoových kyselin, tloušťka stěny dosahuje 20 nm.

Stěna gramnegativních bakterií je stavěna daleko složitěji, i když je tenčí (kolem 15 nm). Skládá se z vnější membrány obsahující fosfolipidy, polysacharidy a proteiny, a z tenké vrstvy peptidoglykanu [32]. Vnější membrána je spojena s peptidoglykanem molekulami lipoproteinu, na povrchu vnější membrány jsou lokalizovány lipopolysacharidy udávající buňce antigenní vlastnosti. Mezi vnější membránou a peptidoglykanem je tzv. periplazmatický prostor, který obsahuje mnoho molekul, např. metabolitů nebo hydrolytických enzymů. Proteiny vnější membrány jsou odlišné od proteinů cytoplazmatické membrány [10]. Rozdíly ve složení buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1. Hlavní komponenty buněčné stěny bakterií

| Komponenta         | Bakterie      |               |
|--------------------|---------------|---------------|
|                    | grampozitivní | gramnegativní |
| Peptidoglykan      | +             | +             |
| Teichoové kyseliny | +             | –             |
| Lipidy             | –             | +             |
| Bílkoviny          | –             | +             |
| Lipoproteiny       | –             | +             |
| Lipopolysacharidy  | –             | +             |

[15].

### 2.3 Chemické složení bakteriální buňky

Biogenní prvky tvoří asi 97 % bakteriální sušiny, z toho C ~ 50 %, O ~ 20 %, N ~ 15 %, H ~ 8 %, P ~ 3 %, a S ~ 1 %. Sušina obsahuje bílkoviny, aminokyseliny, purinové a pyrimidinové látky, nukleové kyseliny, polysacharidy, tuky a lipidové látky.

Obsah vody v bakteriích se pohybuje mezi 75 – 90 % celkové hmotnosti buňky. Část vody je v bakteriální buňce přítomna jako voda vázaná, která je součástí buněčných struktur. Funkci rozpouštědla plní voda volná, která je zároveň prostředím pro koloidní látky. Pro své vhodné fyzikálně chemické vlastnosti představuje voda optimální prostředí pro biochemické reakce a životní pochody buňky.

Základní molekuly nacházející se v bakteriální buňce se vyznačují určitou hierarchií:

**Malé molekuly** (molekulová hmotnost řádově  $10^1$ ;  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  aj.) jsou obvykle přijímány z prostředí jako živiny a mohou se stát součástí molekul organických látek následujících kategorií.

**Metabolické meziproducty a stavební bloky makromolekul** (glycerol, glukóza, ribóza, pyruvát, kyselina citronová, aminokyseliny, nukleotidy, monosacharidy, mastné kyseliny) o molekulové hmotnosti řádově  $10^2$ .

**Makromolekuly** o molekulové hmotnosti  $10^3$  a více; bílkoviny, nukleové kyseliny, polysacharidy, a lipidy.

**Supramolekulární útvary** (lipoproteiny, enzymové komplexy, ribozomy, aj.) vznikající spojením makromolekul (i za účasti iontů a malých molekul) a tvořící stavební a funkční části buňky [10].

## 2.4 Bílkoviny bakterií

Bílkoviny tvoří většinu hmotnosti bakterie (asi 50 %). V bakteriální buňce se předpokládá existence asi 3000 různých bílkovin. Každý biologický druh má svou vlastní sadu proteinových molekul. Biologické funkce bílkovinné molekuly jsou dány specifickým uspořádáním v prostoru, tvarem molekuly a její konformací, tedy sekundární, terciární nebo kvartérní strukturou. Bílkoviny určují základní biochemické vlastnosti bakterií [10].

Buněčné bílkoviny bývají klasifikovány na skupinu bílkovin strukturních a skupinu bílkovin funkčních. Mezi stavební bílkoviny jsou řazeny ty, které jsou součástí různých celulárních útvarů (např. biomembrán nebo ribozomů). Mezi funkční bílkoviny jsou řazeny ty, které v buňce plní nějaké funkce (enzymatické, mechanicko-chemické, transportní, depotní, regulační, rozpoznávací apod.). Toto dělení bílkovin má spíše didaktický význam, protože i strukturní bílkoviny nejsou zcela bezfunkční a naopak funkční bílkoviny jsou součástí nějakých struktur (byť dočasně) [16].

Většina bílkovinných molekul má funkci katalytickou, jsou to enzymy. Ve fungování a ve výrobě živé hmoty hrají enzymy roli operačních nástrojů. Jejich prostřednictvím je specifická genetická informace přeložena ve specifickou činnost buňky. Přítomnost či nepřítomnost specifického enzymu určuje, zda daná reakce bude nebo nebude probíhat, a jak rychle bude probíhat. Enzymy určují, co buňka umí, a co neumí. Bílkoviny jsou v buňce nositelem fyziologie i morfologie, řádu i organizace [15]. Ačkoli jsou enzymy podřízeny stejným přírodním zákonům jako ostatní sloučeniny, liší se od běžných katalyzátorů v několika důležitých bodech:

- Enzymy vykazují značnou specifitu, jak co do typu katalyzované reakce (reakční specifita), tak co do struktury přeměňovaných substrátů (substrátová specifita). Specifita enzymům umožňuje vykonávat kontrolní funkce, předurčuje tok jednotlivých substrátů po definovaných metabolických drahách. Z toho vyplývá, že enzymové reakce mají málokdy vedlejší produkty. Například enzymová syntéza na ribozomech je schopna bezchybně spojit přes 1 000 aminokyselin do molekuly proteinu.

- Pracují za mírných podmínek (většinou mezi 20 až 40°C), za mírného tlaku (0,1 Mpa) a pH kolem 7. Naproti tomu účinné chemické katalyzátory vyžadují často zvýšené teploty, tlaky a extrémní hodnoty pH.
- Enzymy se vyznačují vysokou účinností. Jedniná molekula enzymu je schopna za 1s přeměnit až 5.104 molekul substrátu. Rychlost enzymově katalyzovaných reakcí jsou vyšší až o 12 řádů než rychlosti odpovídající reakce katalyzované chemicky. Podstata spočívá v tom, že enzymy snižují aktivační energii reakce daleko více než umělé katalyzátory [28].
- Asi 10 % bakteriálních proteinů je součástí cytoplazmatické membrány. Hydrofilní části molekul těchto proteinů vyčnívají z membrány, zatímco hydrofobní oblasti bílkovinné molekuly jsou hydrofóbními silami poutány do střední části cytoplazmatické membrány. Tyto bílkoviny nabývají správné konformace tak, že vznikající polypeptidový řetězec se z ribozomu uvolňuje přímo do prostředí membrány [2].

Mezi vnější membránou a peptidoglykenem je tzv. periplazmatický prostor, který obsahuje mnoho molekul, např. metabolitů nebo hydrolytických enzymů. Proteiny vnější membrány jsou odlišné od proteinů cytoplazmatické membrány. Je tu několik druhů hlavních proteinů a několik druhů proteinů minoritních. Významné jsou tzv. poriny, které pronikají celou vnější membránou až k peptidoglykanu, na který jsou vázány. Jejich prostorové uspořádání vytváří hydrofilní pór (tunel) umožňující neselektivní průnik malých hydrofilních molekul (živin) přes vnější membránu až k membráně cytoplazmatické. Další významné proteiny vnější membrány jsou specifické receptory fágů nebo tzv. Omp proteiny (omp – outer membránový protein) [10].

## 2.5 Regulace produkce bílkovin v bakteriální buňce

Bílkoviny bakteriální buňky podléhají neustálému koloběhu, s poločasem v rozmezí minut až týdnů: jsou stále tvořeny, přeměňovány a odbourávány. Jejich právě potřebné množství zaručují koordinované regulace syntézy a odbourávání.

Organizmy jsou stále vystavovány měnícím se podmínkám. Vedle bílkovin, které buňky potřebují za všech okolností (konstitutivní (základní) bílkoviny), jsou jiné syntetizovány jen v určitých situacích (indukovatelné nebo adaptivní bílkoviny).

Například chromozom *E. coli* kóduje asi 3 000 bílkovin a molekuly rRNA a tRNA. Avšak asi jen 1 000 z těchto bílkovin se vyrábí stále, ostatní jen jako odpověď na specifické podmínky.

V každé buňce se proto musí neustále rozhodovat, které geny budou exprimovány a kdy. Slouží k tomu řada regulačních mechanismů. V posledních letech je jim věnována velká pozornost.

Význam těchto regulací spočívá v tom, že umožňují organismu přizpůsobit se změnám životních podmínek. Tato schopnost je extrémně výhodná s ohledem na ekonomiku metabolismu.

Regulace produkce bílkovin v buňce neboli exprese genetické informace, může principiálně nastávat na různých úrovních, na úrovni:

- Regulace genů (replikace, reparace)
- Regulace transkripce (ovládáním její iniciace a terminace)
- Posttranskripční regulace (sestřih, modifikace, řízení transportu mRNA)
- Regulace translace (řízení její iniciace a terminace)
- Posttranslační regulace (modifikační úpravy)

Živé systémy určitě využívají všechny tyto možnosti ve vzájemné kooperaci. Mechanizmy řady z nich však zatím přesně neznáme a chybí nám též znalosti stupně jejich uplatnění a jejich vzájemné vazby.

Pro udržování určitých hladin bílkovin je ovšem nezbytné řídit nejen jejich produkci, ale i jejich inaktivaci a odbourávání. Dnes se předpokládá, že sekvence aminokyselinových zbytků v molekulách bílkovin zahrnuje nejen informaci o její funkci a o transportu na místo určení, ale i o typu a časovém okamžiku inaktivace proteolytického odbourávání [18].



### 3 METODY STANOVENÍ PROTEINOVÉHO PROFILU BAKTERIÍ

Stanovení proteinového profilu má velký význam zejména pro klasifikaci a identifikaci bakterií. Proteiny jsou prvním produktem genové exprese a jejich složení a zastoupení je pro daný kmen v daných kultivačních podmínkách konstantní. Klasifikace bakterií na základě proteinových profilů je většinou v dobré shodě s výsledky hybridizace DNA. Geneticky příbuzné organizmy mají obvykle velmi podobné profily bílkovin. Pro klasifikaci a identifikaci bakterií se nejčastěji používají elektroforetické metody v různých modifikacích, nejčastěji SDS-PAGE v jednorozměrném či dvourozměrném uspořádání a izoelektrická fokusace. Tyto metody jsou typickými fingerprintovými metodami, charakter profilů závisí jak na způsobu izolace proteinů, tak na použité metodice dělení. K vyhodnocení a porovnávání profilů jsou nejčastěji využívány počítačové programy [21]. Bližší charakterizace složek je možná např. pomocí analýzy aminokyselinových sekvencí nebo hmotnostní spektrometrie [33].

#### 3.1 Izolace bílkovin z buňky

##### 3.1.1 Rozbití buněk a tkání

Prvním krokem izolace většiny proteinů je rozbití buněk. K rozbití dochází použitím jemných mechanických postupů, zvaných homogenizace, lze perforovat plazmatické membrány buněk, takže se z buněk uvolní jejich obsah. Používané jsou čtyři metody perforace:

- a) Rozbití buněk ultrazvukem
- b) Použití mírného detergentu na perforaci plazmatické membrány
- c) Protlačení buněk malým otvorem
- d) Rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné nádobce

Tímto vzniká hustý homogenát, extrakt obsahující větší i menší molekuly, jako jsou enzymy, ribozomy a různé metabolity, ale také membránou uzavřené organely. Při opatrné práci lze při perforaci buněčné stěny získat téměř všechny organely v neporušeném stavu [1].

##### 3.1.2 Separace buněčného homogenátu na různé frakce

Pro separaci buněčného homogenitu na jednotlivé frakce se nejčastěji využívá centrifugace. Homogenát je vložen do centrifugačních kyvet a centrifuguje se při vysoké rychlosti ve

speciální rychloběžné centrifuge nebo ultracentrifuge. Současné ultracentrifugy dosahují až 100 000 otáček za minutu a zrychlení až 600 000 násobku zemské gravitace.

Při takových rychlostech je třeba prostor centrifugy chladit a evakuovat, aby se homogénát nezahříval třením o vzduch [1].

## 3.2 Dělení proteinů

Izolované bílkoviny lze blíže charakterizovat pomocí separačních metod, nejčastěji chromatografických či elektroforetických. Proteiny jsou velmi rozmanité co do velikosti, tvaru, náboje, hydrofobnosti a afinity k dalším molekulám. Všechny těchto vlastností lze využít k jejich rozdělení, aby bylo možno je studovat izolovaně. Typický postup purifikace proteinu může kombinovat různé metody a postupy, o nichž je řeč níže, takže se dosáhne například 10000-násobného přečištění [1].

## 3.3 Dělení proteinů – chromatografickými metodami

Chromatografické separační metody využívají k dělení složek směsi opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěma fyzikálně odlišnými fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární), druhá fáze je pohyblivá (mobilní). Rovnovážné stavy se vytvářejí díky různým fyzikálně-chemickým interakcím mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází a také mezi mobilní a stacionární fází. Podstatou těchto interakcí může být adsorpce, chemisorpce, srážení, tvorba komplexů nebo síťový efekt, velmi často kombinace uvedených procesů. Podle převažujícího mechanismu interakcí lze chromatografické metody rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou permeační a afinitní chromatografii. Podle typu mobilní fáze pak na chromatografii kapalinovou a plynovou [19].

### 3.3.1 Sloupcová chromatografie

Proteiny se většinou dělí sloupcovou chromatografií. Směs proteinů v roztoku se pomalu nalévá na horní část válcové kolony naplněné propustnou pevnou maticí ponořenou do rozpouštědla. Pak se větší množství rozpouštědla nechá protékat sloupcem. Protože jsou různé proteiny různě zadržovány interakcí s náplní kolony, lze je odděleně sbírat při výtoku z kolony. Pro sloupcovou chromatografii lze použít různých náplní, které jsou uloženy v koloně ve formě malých kuliček či korálků. Podle typu náplně můžeme proteiny dělit podle velikosti nebo podle schopnosti vázat se na určité chemické skupiny náplně [1].

### 3.3.2 Iontoměničová chromatografie

Kolony jsou naplněny iontoměničem s navázanými kladnými nebo zápornými náboji tak, aby zadržovaly proteiny s opačnou polaritou. Vazba mezi proteinem a náplní kolony závisí na pH a iontové síle roztoku, který kolonou protéká. Ty lze regulovat tak, aby se dosáhlo účinné separace [1].

Chromatografii na měničích iontů můžeme definovat jako vratnou výměnu iontů mezi fází vodnou a stacionární, kterou tvoří kovalentně vázané ionogenní skupiny sorbentu. Dělení látek je způsobeno rozdílem ve velikosti náboje. Ten závisí na oxidačním čísle iontů a na disociační konstantě ionogenních skupin, přičemž disociační konstanta je ovlivněna i hodnotou pH prostředí [11].

Výběr vhodného ionexu pro chromatografii bílkovin závisí na stabilitě bílkoviny a na jejím izoelektrickém bodě pI. Při tomto pH je bílkovina elektroneutrální a na ionexu se nebude prakticky zachytávat. Ideální pH se tedy liší od pI asi o jednu jednotku pH. Při nižším pH se bílkovina chová jako kationt, při vyšším jako aniont [12].

### 3.3.3 Gelová chromatografie

Při gelové filtraci se dělí proteiny podle velikosti. Náplň se tedy skládá z porézních zrněk, kdy malé molekuly proteinů mohou vstupovat do pórů, a jsou tak zadržovány v postupu kolonou. Proteiny, které jsou větší a nemohou pronikat do porézních zrněk, procházejí kolonou rychleji [1].

Metoda je založena na rozdělování látky mezi pohyblivou částí eluentu (v prostoru mezi zrny) a nepohyblivou část eluentu (vyplňující póry zrn). Podle teorie sterické exkluze má náplň takovou strukturu, že část pórů není přístupná velkým molekulám vzorku. Velikost molekuly souvisí s molekulovou hmotností, ale lépe ji vystihuje hydrodynamický průměr molekuly. Pro největší molekuly nejsou póry přístupné vůbec a tyto molekuly zůstávají v prostoru mezi částicemi náplně. Eluční objem těchto molekul je potom roven mrtvému objemu kolony. Naopak pro dostatečně malé molekuly jsou snadno přístupné veškeré prostory v pórech nebo v síťovité struktuře gelu a tyto molekuly jsou eluovány objemem, který je ekvivalentní celkovému objemu eluentu v koloně, tj. mrtvému objemu kolony a objemu eluentu v pórech zrn a v gelové matici [11].

Fracionace směsí látek s blízkou relativní molekulovou hmotností je komplikovanější případ gelové chromatografie. Hlavním problémem je zde výběr vhodného gelu (dělené látky musí být ve frakcionačním rozmezí) [13].

### 3.3.4 Afinitní chromatografie

Kolony pro afinitní chromatografii obsahují náplň, která je kovalentně vázána k molekulám, jež specificky reagují se studovaným proteinem (např. protilátkou nebo substrátem enzymu). Proteiny specificky navázané v koloně lze pak uvolnit změnou pH nebo koncentrace solného roztoku, kterým se kolona promývá. Proteiny pak získáme zcela čisté [1].

## 3.4 Dělení proteinů – elektroforetickými metodami

Elektroforéza je separační metoda, založena na rozdílech v pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli. Elektroforéza probíhá v příslušném pufru v elektroforetické komůrce. Pufur vede elektrický proud a udržuje optimální teplotu a pH reakce. Elektroforetická mobilita je významným a charakteristickým znakem nabitých částic nebo molekul [20]. Jestliže aplikujeme elektrické pole na roztok obsahující molekuly proteinů, tyto molekuly se budou v poli pohybovat směrem a rychlostí, určenými jejich nábojem a velikostí [1]. Rychlost pohybu resp. dráha, kterou urazí molekula za určitý čas, jsou přímo úměrné intenzitě vloženého elektrického pole a celkovému náboji molekuly, který je v případě amfolytických biopolymerů závislý zejména na pH roztoku. Proti pohybu molekuly působí frikční síla daná Stokesovým zákonem [21]. Pohyblivost částic a molekul je dále ovlivněna jejich tvarem a viskozitou prostředí [19].

Při gelové elektroforéze slouží jako nosiče různé gely (škrob, agaróza, polyakrylamidové gely), tedy porézní média s různou velikostí pórů. Při dělení se pak neuplatňují pouze elektrostatické síly, ale i tzv. síťový efekt. Díky tomu lze rozdělit látky podle velikosti molekuly resp. molekulové hmotnosti. Škrob se jako nosič používá zejména pro dělení izoenzymů, agaróza pro bílkovinné komplexy s velkou molekulovou hmotností, nukleové kyseliny a nukleoproteiny. Polyakrylamidové gely jsou vhodné především pro dělení proteinů [21].

### 3.4.1 SDS – polyakrylamidová elektroforéza (SDS - PAGE)

Nosič pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (PAGE) se připravuje kopolymerací akrylamidu  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$  a N, N'-metylenbisakrylamidu  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$

$\text{NH-CO-CH=CH}_2$ . Výsledkem reakce je trojrozměrná síť tvořená základními řetězci lineárního polyakrylamidu, propojená bisakrylamidovými můstky [22].

Při přípravě gelu s definovanými vlastnostmi má klíčovou roli obsah pevných látek v gelu %T, tj. součet váhy  $W$  (g) akrylamidu a bisakrylamidu ve 100 ml gelu:

$$\%T = \frac{W_{\text{akrylamid}} + W_{\text{bisakrylamid}}}{100 \text{ ml}} \cdot 100$$

Hodnotou %T je řízena velikost pórů a tím i rozsah molekulové hmotnosti v němž se bude uplatňovat síťový efekt. Velikost pórů ale i další vlastnosti gelu (mechanická pevnost, křehkost, rozptyl světla, botnání apod.) závisí ovšem i na koncentraci síťovacího činidla (bisakrylamidu) a jeho procentuálním zastoupení ve směsi %C:

$$\%C = \frac{W_{\text{bisakrylamid}}}{W_{\text{akrylamid}} + W_{\text{bisakrylamid}}} \cdot 100 \quad [21].$$

Polymerace akrylamidu a bisakrylamidu je urychlena katalytickým působením vhodných redoxních systémů, např. persíranu amonného s N, N, N', N'- tetramethyldiaminem (TEMED) nebo dimethylaminopropionitrilem (DMPN) [22].

Aby mohly být proteiny separovány pouze na základě své molekulové hmotnosti, musí mít všechny proteiny ve studované směsi stejně velký záporný náboj. Při SDS-PAGE je směs proteinů denaturována zahřátím na 100 °C v přítomnosti aniontového detergentu SDS (dodecylsulfát sodný) a redukčního činidla merkaptoethanolu, který štěpí disulfidové vazby uvnitř bílkovinné molekuly. Za těchto podmínek všechny redukované polypeptidy vážou stejné množství SDS (1,4 g SDS na gram proteinu) nezávisle na aminokyselinovém složení a sekvenci proteinu. Jednotlivé polypeptidové řetězce tvoří komplex se záporně nabitými molekulami SDS, a proto se v elektrickém poli pohybují ve formě záporně nabitého komplexu SDS – protein stejným směrem [23].

Merkaptoethanol a SDS jsou součástí tzv. vzorkového pufru, kromě těchto komponent pufr obsahuje i barvivo bromfenolovou modř, které umožňuje sledovat průběh elektroforézy. Po skončení elektroforézy jsou gely barveny barvicím roztokem Coomassie brilliant blue a poté odbarvovány v metanolu a kyselině octové. Výsledkem jsou obarvené bandy (proužky) proteinů na odbarveném světlém pozadí.

Nevýhodou metody je toxicita monomeru, ze kterého se gel připravuje. Vzhledem k této toxicitě dává většina pracovišť přednost již hotovým komerčně vyráběným gelům, které jsou sice nákladnější, ale bez zdravotního rizika [25].

### 3.4.2 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

SDS-PAGE je asi nejpoužívanější elektroforetickou metodou analýzy proteinů. Nicméně je třeba zdůraznit, že při této metodě jsou separovány denaturované proteiny. Někdy je však nutné analyzovat nativní nedenaturované bílkoviny, např. pokud chceme identifikovat protein na gelu pomocí jeho biologické aktivity. Pro zachování biologické aktivity proteinu, ať už se jedná o aktivitu enzymatickou či o specifickou vazbu na receptor či protilátku, je nutné použít nedenaturující systém.

Na rozdíl od SDS-PAGE se při této metodě vzorky nezahřívají na 100°C a vzorkový pufr neobsahuje SDS ani merkaptoethanol. Zatímco při SDS-PAGE jsou proteiny rozdělovány pouze na základě své molekulové hmotnosti, v nedenaturujícím systému je migrace proteinů gelem řízena jak molekulovou hmotností tak velikostí náboje nativní bílkoviny. Protože by zahřívání gelu při elektroforéze mohlo vést k denuraci proteinů, je důležité kontrolovat teplotu a případně systém chladit [24].

### 3.4.3 Izoelektrická fokusace – IEF

Každý protein je charakterizován svým izoelektrickým bodem, což je pH, při kterém protein nenes žádný výsledný elektrický náboj. V tomto bodě se nebude pohybovat v elektrickém poli. Každý protein se pohybuje až do vzdálenosti, která odpovídá jeho izoelektrickému bodu, a tam setrvá [1].

IEF může probíhat ve volném roztoku v koloně s gradientem sacharózy, glycerolu nebo etylenglykolu, jakož i v nosiči, např. polyakrylamidovém gelu. Pro tenkovrstvé uspořádání IEF v gelu existují hotové destičky. Pro analytické účely je výhodná kapilární modifikace IEF [29].

Vlastní dělení probíhá po vložení elektrického napětí, v němž složky putují vytvořeným gradientem až do místa kde se lokální pH rovná jejich pI, a kde v důsledku fokusačního efektu vytvoří úzkou, ostře ohraničenou zónu. Při volné IEF se po skončení dělení obsah kolony vypouští, složky se fotometricky zaznamenávají a jímají. Detekce a vyhodnocení gelové IEF se provádí podobně jako při PAGE. Při kapilární IEF jsou fokusované zóny

proteinů transportovány do detektoru buď po přidání iontů k systému, nebo v povrchově deaktivovaných kapilárách [30].

#### **3.4.4 Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2-D PAGE)**

Pomocí SDS-PAGE v jednorozměrném uspořádání lze studovat proteinové směsi obsahující maximálně 100 různých proteinů. Pro komplexní směsi, jako jsou například lyzáty bakteriálních buněk však tato metoda není dostačující [34].

Užívá se proto varianty dvourozměrné, s poněkud odlišným uspořádáním v každém směru, čímž lze rozdělit přes tisíc proteinů na jediném gelu. Nejdříve se nativní proteiny dělí na úzkém pásu gelu na základě svého elektrického náboje izoelektrickou fokusací. V dalším postupu se pásek gelu umístí na desku gelu a zapojí se elektrické pole jako v SDS-PAGE ve směru kolmém na směr izoelektrické fokusace. Každý protein se pak pohybuje na své jedinečné místo na gelové ploše [1].

## 4 IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE PROTEINŮ

Identifikace proteinů je postavena na rozmanitosti peptidových sekvencí: většina těchto sekvencí o délce šest a více aminokyselin je do značné míry unikátních a specifických v rámci proteomu určitého organismu. Pokud tedy získáme sekvence většího počtu peptidů (nebo jejich molekulové hmotnosti), můžeme teoreticky identifikovat protein pomocí vyhledání shodné sekvence v databázi proteinových sekvencí. Identifikace proteinu bude tudíž zahrnovat proces štěpení proteinu na peptidy, získání aminokyselinových sekvencí těchto peptidů a vyhledáním shodných sekvencí v databázích [35].

### 4.1 Selektivní štěpení proteinu

Selektivní štěpení proteinu dává vzniknout sadě peptidových fragmentů. Proteolytické enzymy a chemická činidla dovolují štěpit protein mezi specifickými zbytky aminokyselin. Enzym trypsin štěpí na karboxylové straně zbytků lysinu nebo argininu, zatímco bromkyan štěpí peptidové vazby vedle metioninu. Působením těchto činidel většinou vzniká několik poměrně velkých peptidů. Ty se pak dají separovat různými technikami, a poskytují tak diagnostickou mapu toho kterého proteinu. Sekvence peptidů získaných různými technikami se překrývají a umožňují tak odvodit poměrně pracně celou sekvenci proteinu

Známe-li sekvenci pouhých dvaceti aminokyselinových zbytků, můžeme sestrojít odpovídající DNA, takže lze klonovat příslušný gen. Jakmile známe sekvenci genu nebo odpovídající cDNA, můžeme stanovit sekvenci zbývajících aminokyselin v proteinu podle genetického kódu [1].

### 4.2 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrum představuje záznam relativní četnosti jednotlivých druhů iontů v závislosti na poměru jejich hmotnosti  $m$  a neseného náboje  $z$ .

Pro analýzu je nutné směs peptidů nejprve ionizovat. Základní technikou ionizace je ionizace svazkem urychlených elektronů, tzv. *electron impact* (EI). Vzhledem k tomu, že některé typy analytů nelze touto cestou ionizovat, byly vyvinuty další techniky ionizace [19]. Pro analýzu proteinů nyní existují dva ionizační systémy MALDI využívající desorpci a ionizaci laserem a ESI - elektrosprejová ionizace.

Ionizované molekuly jsou pak urychleny v elektrickém poli a je zaznamenána doba jejich letu k detektoru. Tato doba je přímo úměrná náboji molekuly a nepřímo úměrná její mole-



kulové hmotnosti. Přesná molekulová hmotnost můžete být vypočtena pomocí doby letu molekul standardu. Směs peptidů po proteolytickém natrávení tedy poskytne profil molekulových hmotností charakteristický pro každý jednotlivý protein. Získaná data je možno přímo porovnávat s veřejně přístupnou databází. Není-li nalezen odpovídající protein, je většinou dalším krokem při identifikaci neznámého proteinu částečná sekvenace aminokyseliny sekvence zkoumaného proteinu [25].

### 4.3 Sekvence aminokyselin v proteinech

Stanovení sekvence aminokyselin proteinu či peptidu se provádí opakováním série chemických reakcí, kterým se určí N-koncová aminokyselina po svém odštěpení.

Peptidy delší než 50 aminokyselin však nelze sekvenovat dostatečně spolehlivě. Nadto často zjišťujeme, že N-terminální aminokyselina je chemicky blokována, takže analýzu nelze ani zahájit. K odstranění těchto nesnází je třeba polypeptid nejprve rozštěpit na menší fragmenty.

Každá uvolněná aminokyselina nebo spíše její derivát se určí porovnáním se sadou známých aminokyselin rozdělených běžnou sloupcovou chromatografií, pomocí standardů a retenčních časů [1].

### 4.4 Trojrozměrná struktura molekul proteinů

Hlavní technika, které se dnes užívá k objasnění trojrozměrné struktury molekul proteinu na atomové úrovni, je rentgenová krystalografie.

Rentgenové záření, stejně jako světlo, je druh elektromagnetického záření o velmi malé vlnové délce. Jestliže měříme svazek paralelních rentgenových paprsků na dobře vyvinutý krystal čistého proteinu, některé paprsky budou rozptýleny určitým způsobem atomy v krystalu. Rozptýlené paprsky se budou zesilovat v definovaných bodech a projeví se jako určitý obrazec difrakčních skvrn na vhodném detektoru.

Poloha a intenzita skvrn v obrazci obsahuje informaci o poloze atomu v krystalu proteinu, z kterého obrazec vznikl. Počítačem lze tuto informaci zpracovat do 3D mapy hustoty elektronů v proteinu, což spolu se známou sekvencí slouží k sestavení atomového modelu. Kompletní atomový model se často těžko interpretuje, a tak se často užívají zjednodušené verze, na nichž jsou znázorněny pouze významné strukturální vlastnosti [1].

Další metodou umožňující navržení trojrozměrné struktury proteinu je NMR - spektroskopie (nukleární magnetická rezonance). Metoda vyžaduje pouze malé množství koncentrovaného roztoku proteinu. Roztok se umístí do silného magnetického pole, kde je vystaven pulzům rádiové frekvence. Signály z atomových jader vodíku v různých aminokyselinách lze identifikovat a určit tak vzdálenosti mezi interagujícími páry vodíkových atomů. Tím poskytuje NMR – spektroskopie informace o vzdálenostech mezi různými částmi proteinové molekuly. Srovnáním této informace se znalostí sekvence aminokyselin lze odvodit trojrozměrnou strukturu proteinu. Tato metoda se však hodí pouze pro práci s proteiny do molekulové hmotnosti 20 kDa [1].

## 5 VYUŽITÍ PROTEINOVÝCH PROFILŮ BAKTERIÍ

SDS-PAGE se velmi často používá k charakterizaci bakterií, v jednorozměrném uspořádání je vhodná pro rutinní diferenciaci organismů na druhové i nižší úrovni. Příkladem taxonomických prací mohou být studie věnované klasifikaci mykoplazmat [36], a dále *Morganela morganii*, *Proteus* a *Providencia* spp., kterými se zabýval Costas et al [37] a [38].

Vhodnost SDS-PAGE pro identifikaci druhů čeledi *Enterobacteriaceae* prokázal Hantula et. al. [43], který našel vnitrodruhové variace, stanovil však také stupeň na němž mohou být taxonomicky divergentní jednotky spojovány; uvádí rovněž malou závislost profilů na kultivačních podmínkách.

Možností diferenciaci jednotlivých kmenů bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* se zabývali i Kustos et. al. [44]. Pomocí SDS-PAGE bylo možné studované kmeny spolehlivě rozlišit a identifikovat, metoda je však pro potřeby rychlé diagnostiky poměrně zdlouhavá. Autoři dosáhli uspokojivých výsledků pomocí kapilární elektroforézy, která je podstatně méně časově náročná a její rozlišovací schopnost by pro rutinní diagnostické účely byla dostatečná.

SDS-PAGE analýza proteinového profilu izolátů *Helicobacter pylori* od pacienta před a po léčbě umožňuje určit, zda u tohoto pacienta došlo reinfekci novým kmenem (profily by byly odlišné), nebo se jedná o recidivu onemocnění (shodné profily vedou k závěru že původcem onemocnění je stále tentýž kmen) [40].

Různé proteinové profily vykazují i různé druhy mykobakterií, například *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium intracellulare*, které jsou jinak velmi obtížně rozlišitelné [41].

Dobré rozlišení různých druhů legionel poskytuje i nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza [39].

Detekce enzymových aktivit v elektroforetických gelech je významná technika identifikace kmenů různých rodů [21]. Benoist a Schwencke [42] detegovali nanogramová množství rozpustných enzymů nativní elektroforézou v agaróza – polyakrylamidových gelech. Zjištěné zymogramy aminopeptidáz, dehydrogenáz a esteráz umožnily najít odpovídající enzymové markery pro diferenciaci kmenů frankií.

Metod hmotnostní spektrometrie je rovněž možné využít pro identifikaci a charakterizaci enterobakterií. Mott et. al prokázali vhodnost systému MALDI-TOF/MS pro identifikaci

potravinářsky významných patogenních kmenů *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* a *Shigella sonnei* [45].

## ZÁVĚR

První část bakalářské práce je věnována proteinům jako takovým, jejich struktuře, vlastnostem a funkcím v biologických systémech. Nebyly opomenuty ani biosyntetické pochody vzniku proteinů, tedy proteosyntéza zahrnující především dva kroky, a to transkripci a translaci.

V další části bylo pojednáno o některých specifických rysech bakteriálních proteinů a o roli, kterou proteiny v mikrobiálních buňkách mohou hrát.

Třetí kapitola se zabývá metodami stanovení proteinového profilu bakterií, počínajíc izolací proteinů z buňky. Metody jsou členěny do dvou základních skupin, a to metody chromatografické a elektroforetické. Chromatografické metody využívají pro svá stanovení fyzikálně chemických interakcí. Především jsem se zabývala chromatografií sloupcovou, iontoměničovou a gelovou. Elektroforetické metody jsou založeny na rozdílech v pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli. Z metod založených na elektroforéze je nejčastěji využívanou metodou stanovení proteinového profilu jednorozměrná SDS-PAGE, dále pak nenedenaturující polyakrylamidová elektroforéza, izoelektrická fokusace a metoda 2-D PAGE, tedy dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza.

Následující kapitola je zaměřena na možnosti identifikace a charakterizace bílkovin pomocí metod hmotnostní spektrometrie, krystalové rentgenografie a nukleární magnetické rezonance.

Závěrečná kapitola již udává přímé příklady využití výše zmíněných metod pro stanovení proteinového profilu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ALBERTS, B., et al. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero publishing, 2005. 740 s. ISBN -10:80-902906-2-0.
- [2] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 608 s.
- [3] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie I*, Zlín: Univerzita Tomáše Bati Academia centrum, 2007 169 s.
- [4] NEČAS, O., et al. *Obecná biologie: pro lékařské fakulty*. Jinočany: H&H, 2000. 554 s. ISBN 80-86022-46-3.
- [5] ROBERT K., Murray, et al. *Harperova Biochemie*. Jinočany: H&H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [6] ŠÍCHO V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981. 360 s. ISBN 04-815-81.
- [7] ROSYPAL, S., *Úvod do molekulární biologie*, 1. díl, Brno, 1999.
- [8] CLARK, David P. *Molecular biology*. [s.l.] : [s.n.], 2005. 771 s. ISBN 0-12-175551-7.
- [9] BUCHETOVÁ, R., et al. *Akademický slovník cizích slov*. Vydání 1. (dotisk). Praha 2: Academia, 1998, 2000. 834 s. ISBN 80-200-0982-5.
- [10] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. Vydání 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. 190 s. ISBN 987-80-7318-516-9.
- [11] ROSYPAL, S., et al. *Nový přehled biologie*. Vydání 1. Praha 6: Scientia, spol. s. r. o., pedagogické nakladatelství, 2003. 797 s. ISBN 80-7183-286-5.
- [12] PROSSER, V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*. 1. vydání. Praha: Academia, 1989. 712 s. ISBN 80-200-0059-3
- [13] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1974. 402 s.
- [14] ČŮTA, F. a kol. *Instrumentální analýza*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1986. 295 s.
- [15] KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. 1. vydání. Praha 1: Karolinum, 1999. 241 s. ISBN 382-51-99.

- [16] ISPER, J. *Obecná biologie buňky*. 1. vydání. Ústí nad Labem: Univerzita J. E. Purkyně, 2005. 176 s.
- [17] VODRÁŽKA, Z. RAUCH, P. KÁŠ, J. *Enzymologie*. Vydání třetí - přepracované (dotisk 2001). Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. 171 s. ISBN 80-7080-330-4.
- [18] VODRÁŽKA, Z., RAUCH, P., KÁŠ, J. *Biochemie 3*. 3. vydání - přepracované (dotisk 2001). Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. 171 s. ISBN 80-200-0471-8.
- [19] SOMMER, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. 1. vydání, VUT Brno, 2000, 347 s.
- [20] WESTERMAIER, R.: *Electrophoresis in practise. A guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Wiley-VCh, Weinheim, Germany, 2005, 4. vydání, 406 s.
- [21] JULÁK J.: *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. Karolinum, Praha, 1997, 195 stran.
- [22] DEYL, Z., *Electrophoresis: a survey of techniques and applications*. Journal of chromatography library, vol. 18, Elsevier, New York, 1979..
- [23] HAMES, B. D., *Gel electrophoresis of proteins*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1998. 0-19-963641-9
- [24] WALKER, J. M. *Protein Protocols Handbook*. New Jersey: Humana Press Inc., 2002. 1146 s. ISBN 0-89603-941-2.
- [25] BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Avicenum, Praha, 2005, 184 stran
- [26] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydání. Praha: Akademie věd České republiky, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [27] KLOUDA, P. *Základfy biochemie*. 2. vydání. Praha: Pavel Klouda, 2005. 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [28] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie II*, Univerzita Tomáše Bati Academia centrum, 2007. 104s. ISBN 80-7318-395-1

- [29] HUANG, T.L.; SHIEH, P.C.H. ; COOKE, N. Isoelectric focusing of proteins in capillary electrophoresis with pressure-driven mobilization. *Chromatographia*. 1994, 39, s. 543-548.
- [30] YAO, X.W.; REGNIER, F.E. Polymer-and-surfactant-coated capillaries for isoelectric focusing. *Journal of Chromatography*. 1993, 632, s. 185-193.
- [31] KRAUS, I. *Úvod do strukturní rentgenografie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1985. 236 s. ISBN 21-014-85.
- [32] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přepracované vydání*. Brno : Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [33] PATTERSON, S.D. From electrophoretically separated proteins to identification : Strategies for sequence and mass analysis. *Analytical Biochemistry*. 1994, 221, s. 1-15.
- [34] PALZKILL, Timothy. *Proteomics. 2. vydání*. Norwell, USA : Kluwer Academic Publishers, 2002. 127 s. ISBN 0-7923-7565-3.
- [35] LIEBLER, D.C. *Introduction to proteomics : Tools for the new biology*. Totowa, USA : Humana Press, 2002. 198 s. ISBN 0-89603-991-9.
- [36] ANDERSEN, H.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Electrophoretic analysis of proteins from *Mycoplasma hominis* strains detected by SDS-PAGE, two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *Journal of General Microbiology*. 1987, 133, s. 181-191.
- [37] COSTAS, M.; HOLMES, B.; WOOD, A.C. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Morganella morganii* strains from faeces, wound, urine and other clinical sources. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990, 69, s. 426-438.
- [38] COSTAS, M.; HOLMES, B.; WOOD, A.C. Numerical analysis of electrophoretic patterns of *Providencia stuartii* strains from urine, wound and other clinical sources. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990, 68, s. 505-518.
- [39] FERGUSSON, D.A.; MAYBERRY, W.R. Differentiation of *Legionella* species by soluble protein patterns in polyacrylamide slab gels. *Microbios*. 1987, 52, s. 105-114.



- [40] COSTAS, M.; MORGAN, D.D.; OWEN, R.J; MORGAN, D.R. Differentiation of strains of *Helicobacter pylori* by numerical analysis of 1-D SDS-PAGE protein patterns : Evidence of posttreatment recrudescens. *Epidemiology and Infection*. 1991, 107, s. 607-617.
- [41] FOURCHE, J.; CAPDEPUY, M.; MAUGEN, J. Analysis of cellular fatty acids and proteins by capillary gas chromatography and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis to differentiate *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum* (MAIS) complex species. *Journal of Chromatography*. 1990, 532, s. 209-216.
- [42] BENOIST, P.; SCHWENCKE, J. Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase, and esterase activities at the nanogram level : Enzymatic patterns for some *Frankia* strains. *Analytical Biochemistry*. 1990, 187, s. 337-344.
- [43] HANTULA, J.; KORHONEN, T.H.; BAMFORD, D.H. Determination of taxonomic resolution capacity of conventional one-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins using *Enterobacteriaceae*.. *FEMS Microbiol. Lett.*. 1990, 70, s. 325-330.
- [44] KUSTOS, I.; KOCSIS, B.; KEREPESI, I. Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998, 19, s. 2317-2323.
- [45] MOTT, T.M.; EVERLEY, R.A.; WYATT, S.A.; TONEY, D.M.; CROLEY, T.M. Comparison of MALDI-TOF/MS and LC-QTOF/MS methods for the identification of enteric bacteria. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2010, 291, s. 24-32.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|          |  |
|----------|--|
| DNA      | Deoxyribonukleová kyselina.                          |
| RNA      | Ribonukleová kyselina.                               |
| mRNA     | Mediátorová ribonukleová kyselina.                   |
| tRNA     | Transférová ribonukleová kyselina.                   |
| rRNA     | Ribozomální ribonukleová kyselina.                   |
| SDS      | Dodecylsulfát sodný.                                 |
| PAGE     | Polyakrylamidová gelová elektroforéza.               |
| TEMED    | N, N, N', N'- Tetramethylendiamin.                   |
| DMPN     | Dimethylaminopropionitrilem.                         |
| IEF      | Izoelektrická fokusace.                              |
| 2-D PAGE | Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. |
| EI       | Electron impact.                                     |
| MALDI    | Matix assisted laser desorption/ionization.          |
| ESI      | Elektrosprejová ionizace.                            |
| omp      | Outer membránový protein.                            |
| NMR      | Nukleární magnetická rezonance.                      |

## SEZNAM TABULEK

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Tabulka 1. Hlavní komponenty buněčné stěny bakterií.....</i> | <i>20</i> |
|---|-----------|