

Příprava konjugovaných biomolekul s polystyrenovými mikročásticemi pro mikromanipulaci metodami optické pinzety

Pavλίna Adolfová

Bakalářská práce
2018

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavína Adolfová**

Osobní číslo: **T15664**

Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Materiálové inženýrství**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava konjugovaných biomolekul s polystyrenovými mikročásticemi pro mikromanipulaci metodami optické pinzety - experimentální práce.**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na téma principu a použití optické pastí (pinzety).
2. V rešerši popište rovněž biokonjugační chemické reakce sloužící k navazování fluorescenčních značek a polystyrenových mikročástic k biomolekulám.
3. Navrhněte experimentální postup navázání zvolené biomolekuly ke konjugačním partnerům (fluorescenčním značkám nebo mikročásticím).
4. Experimentálně proveďte zvolenou biokonjugační reakci, charakterizujte produkt a popište postup práce tak, aby mohl být nadále rutinně využíván.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Peterman, E.J.G. (Ed.) *Single Molecule Analysis, Methods and Protocols, Second edition, Humana Press, New York, 2018.*
2. Kubitschek, U. (Ed.) *Fluorescence Microscopy, From Principles to Biological Applications, Second edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2017.*
3. Andersson, M., *Construction of force measuring optical tweezers instrumentation and investigations of biophysical properties of bacterial adhesion organelles, First edition, Print & Media, Umea, 2007.*
4. Hermanson, T. G., *Biokonjugate techniques, Third edition, Academic Press, London, 2013.*

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

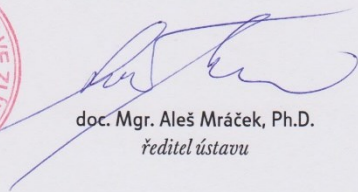
Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 12. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Adalfova' Pavlína

Obor: Materiálové inženýrství

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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ 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, považují 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 15.2.18

Adalfova'

¹⁾ 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 nevdělečně 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.

²⁾ 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 výuce 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).

³⁾ 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). Odpírá-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 užit 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Biokonjugční reakce jsou dlouhodobě používané k značení biomolekul pomocí fluorescenčních značek, které spojují různé biomolekuly k sobě za vzniku různých povrchů nebo mikroskopických korálek. Během několika desetiletí výzkumu byly vyvinuty metody, které nám umožňují konjugovat různé funkční skupiny různých molekul při mírných změnách reakčních podmínek. Cílem této práce je představit některé z těchto technik a optimalizovat obecně používané metody pro naše specifické účely. Proto jsme zvolili dvě fluorescenční barviva, eosin Y a fluorescein, a pokusili se optimalizovat podmínky jejich konjugace k ethylendiaminu a N-hydroxylsukcimidu za použití moderního karbodiimidu, kondenzační reakcí s N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride jako kondenzačním činidlem. Reakce byly sledovány pomocí separace agarózovou elektroforézou s následnou fluorescenční detekcí. Tato metoda ukázala očekávaný průběh obou reakcí. Pokus o prokázání reakčního produktu hmotnostní spektrometrií (MS) však selhal, nejspíše z technických důvodů, které je třeba v budoucnu vyřešit. V případě pozdějšího potvrzení syntetizovaného produktu MS, jak produkty, tak optimalizované metody budou použity pro fluorescenční značení biomolekul, které jsou v našem zájmu, a jejich konjugace s polystyrénovými mikročásticemi za účelem manipulace pomocí optických pinzet.

Klíčová slova: elektroforéza, hmotnostní spektrometr, optická pinzeta, eosin, fluorescein

ABSTRACT

Bioconjugation reactions have been long time used to labeling the biomolecules By fluorescent marks, connecting different biomolecules to each other, attaching them to various surfaces or microscopic beads. During several decades of research manifold of methods have been developed that allow us to conjugate various functional groups of different molecules at mild reaction conditions with higher or lower specificity. The aim of this thesis is to introduce several of these techniques to our laboratory and to optimize the generally used methods for our specific purposes. Therefore, we chose two fluorescent dyes, eosin Y and fluorescein, and tried to optimize the conditions of their conjugation to ethylendiamine and N-hydroxysuccimide using the carbodiimide moderated condenzetion reaction with N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride as the condensation agent. The reactions were monitored by means of the separation by agarose electrophoresis with fluorescent detection. This method showed the expected performance of both the reactions. However, the attempt to prove the reaction product by mass spectrometry (MS) failed, most likely due to the technical reasons that have to be solved in the future. In case of later confirmation of the synthesized product by MS both the products and the optimized methods will be used for fluorescent labeling of biomolecules of our interest and their conjugation to polystyrene microparticles for the purpose of manipulation by optical tweezers.

Keywords: electrophoresis, mass spectrometer, optical tweezers, eosin, fluorescein

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Marku Ingrovi, Ph. D. a konzultantům Ing. Josefu Hrnčířkovi, CSc. a Ing. Michalovi Rouchalovi, Ph. D. za vedení metodiky práce, odborné rady týkající se tématu mé bakalářské práce a pomoc při zpracování naměřených dat ve specifických počítačových programech. Dále děkuji Ing. Marcele Havlové za základní rady pro použití přístrojů a pomoc při orientaci v laboratořích, kde byla měření prováděna.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIODONJUGAČNÍ REAKCE	13
1.1 PŘÍMÉ SPOJENÍ.....	13
1.2 SPOJENÍ POMOCÍ MŮSTKU	14
1.2.1 Homobifunkční síťující činidla	14
1.2.2 Heterobifunkční síťující činidla	15
1.3 MODIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN	16
1.3.1 Pyrimidinové báze.....	17
1.3.2 Reakce cytosinu s hydrogen-siřičitanem.....	18
1.3.3 Halogenace cytosinu	19
1.3.4 Modifikace DNA.....	20
1.3.5 Značení v průběhu PCR	20
1.3.6 Fosforamidová metoda.....	21
1.3.7 Modifikace RNA	22
1.3.8 Vnášení reaktivních skupin	22
1.4 MODIFIKACE KARBOXYLU.....	23
1.5 REAKTIVNÍ SKUPINY.....	25
1.6 FLUORESCENČNÍ ZNAČKY	25
1.6.1 Fluorescein	26
1.6.2 Rhodaminy	27
1.6.3 Kvantové tečky.....	27
1.7 VYUŽITÍ	27
1.7.1 Fluorescenční metody	27
1.7.1.1 Bio analytické metody	27
1.7.1.2 Biomedicína	27
2 ELEKTROFORÉZA	28
3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	31
3.1 POPIS FUNKČNÍCH ČÁSTÍ HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU	32
3.1.1 Iontový zdroj	32
3.1.2 Hmotnostní analyzátor	33
3.1.3 Detektor.....	33
3.2 TANDEMOVÁ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	34
4 OPTICKÁ PAST	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
5 POUŽITÉ METODY, PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	38
5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE PRO PŘÍPRAVU VZORKŮ	38
5.2 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ	40
5.3 BIO KONJUGAČNÍ REAKCE	40
5.4 ELEKTROFORÉZA.....	41
5.4.1 Příprava gelu pro elektroforézu.....	41
5.4.2 Průběh elektroforézy	41

5.5	SEPARACE VZORKŮ Z AGARU	41
5.6	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR.....	41
6	VÝSLEDKY	42
6.1	VÝSLEDKY REAKCÍ.....	42
6.2	OPTICKÉ POZOROVÁNÍ ROZTOKŮ.....	46
6.3	VÝSLEDKY ANALÝZY HMOTNOSTNÍCH SPEKTER	47
	DISKUZE	50
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	55
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
	SEZNAM GRAFŮ	60

ÚVOD

Cílem práce bylo zavedení metody konjugace proteinových molekul s polystyrenovými mikročásticemi a fluorescenčními značkami do praxe v laboratorních podmínkách naší fakulty. Prvním krokem byla zvolena tvorba amidových a fosforamidových vazeb v přítomnosti karbodiimidů (EDC), z důvodu jejich využitelnosti pro modifikace proteinů i nukleových kyselin. Na počátku byla za modelový systém použita reakce eosinu nebo fluoresceinu s ethylendiaminem. Produkt této reakce se dá dále využít jako meziprodukt pro fluorescenční značení. Díky fluorescenci lze tento produkt snadno detekovat elektroforeticky. V první fázi celého experimentu bylo postupováno přímo. Prováděné spojení pomocí EDC přímo s karboxylovou skupinou eosinu nebo fluoresceinu s aminoskupinou ethylendiaminu. Byl použit nadbytek ethylendiaminu aby se zamezilo spojení současně na obou reaktivních koncích. Jelikož reakce má mít za následek změnu náboje byl tento produkt testován elektroforeticky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIONKONJUGAČNÍ REAKCE

Biokonjugace je obecné označení pro spojení biomolekul s jinými molekulami, které nesou na svém konci požadovanou skupinu pro cílové využití. Biokonjugace se dělí na dva následné kroky. Během prvního kroku se jedná o vhodné navázání reaktivní skupiny. Následuje druhý krok přidáním zvolené biomolekuly pro vznik biokonjugátu. Rozlišujeme sloučeniny s jedním aktivním centrem pro vazbu a sloučeniny s více aktivními centry. U sloučenin s více aktivními centry je třeba zjistit, která centra reagují přednostně. Toho se dosahuje analýzou biokonjugátu pomocí hmotnostního spektrometru, díky rozdílům v molekulových hmotnostech vzniklých sloučenin. Toto není nutné u sloučenin s pouze jedním aktivním místem pro vazbu. K samotnému spojení dvou biomolekul jsou zapotřebí činidla, která dokáží spojit povrchové skupiny na dvou různých biomolekulách [23].

1.1 Přímé spojení

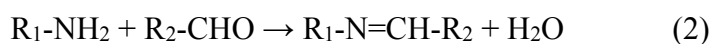
Spojení biomolekul bez můstkové spojovací skupiny se nazývá zero length crosslinkers. Konkrétněji se jedná o spojení karbodiimidu, karbonyldiimidazolu nebo aldehydu s aminoskupinou [23].



Obrázek 1: Zjednodušená ukázka přímého spojení [23]



Rovnice (1) znázorňuje reakci aldehydu s amoniakem za vzniku nestálé aminohydroxysloučeniny, kterou je nutno následně stabilizovat v závislosti na použité zásadě. R značí uhlíkatý řetězec aldehydu.



Rovnice (2) znázorňuje reakci aldehydu s primárním aminem za vzniku sloučenin nazývaných Schiffovy zásady. R₁ značí substituent u primárních aminů. R₂ značí uhlíkatý řetězec aldehydu.

1.2 Spojení pomocí můstku

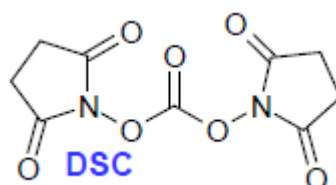
Spojení biomolekul spojovacím můstkem lze provádět pomocí molekul s požadovanou definovanou délkou. Můstky jsou tvořeny bifunkčními činidly, nazývanými linker [23].



Obrázek 2: Zjednodušená ukázka spojení pomocí můstku [23]

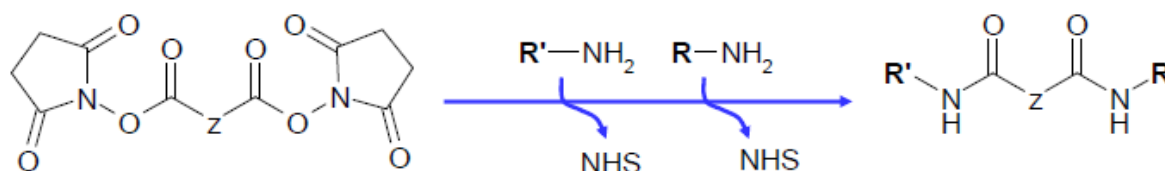
1.2.1 Homobifunkční síťující činidla

Jedná se o symetrická činidla se dvěma shodnými funkčními skupinami. Jedním koncem se spojují s biomolekulou A a druhým koncem s biomolekulou B. Požadovaný je vznik pouze A-B konjugátů. Reakce mohou být prováděné jednokrokově. Všechny složky se smíchají dohromady s častým vznikem oligomerních produktů. Druhým způsobem je postupné provádění reakce. Biomolekula A se smíchá s konjugačním činidlem, nechá se proběhnout modifikace a až poté se přidá biomolekula B. Komplikací těchto reakcí je nestabilita reaktivních skupin ve vodném prostředí. I přes nedostatky se v praxi úspěšně používají. Nejkratší spojení, řádově pod 1 nm, tvoří N,N'-disukcinimidylkarbonát (DSC).



Obrázek 3: N,N'-disukcinimidylkarbonát (DSC) [23]

Karboxylové skupiny, které jsou aktivované N-hydroxysukcinimidovou skupinou (NHS) jsou velmi reaktivní k nukleofilním $-NH_2$ skupinám [23].

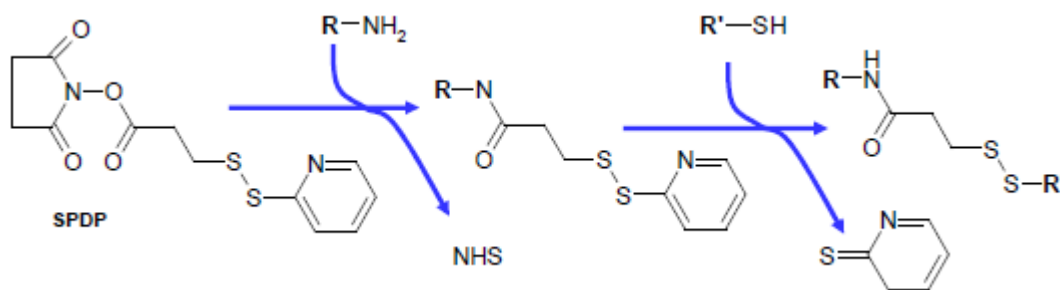


Obrázek 4: Obecná struktura vzniku spojení molekul pomocí homobifunkčního činidla, kde Z značí toto činidlo [23]

1.2.2 Heterobifunkční síťující činidla

Jedná se o činidla s odlišnými funkčními skupinami na obou koncích. Dochází ke spojení s různými funkčními skupinami konjugovaných biomolekul. Použití bývá realizováno ve dvou až třech krocích, tím se výrazně omezí vznik oligomerních produktů.

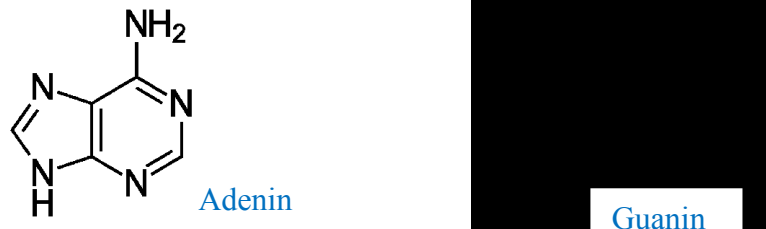
Činidlo je smícháno s první biomolekulou, kterou derivatizuje svou reaktivnější skupinou. Odstranění nadbytku činidla je prováděno např.: gelovou filtrací. Následně je přidána druhá biomolekula, která reaguje s druhou funkční skupinou, obvykle stabilnější, síťovacího činidla. Díky variabilitě reaktivních skupin lze lépe vybrat cílové místo. Pro aminoskupiny se používají látky s přítomností NHS skupiny v kombinaci pro více možností s SH skupinami [23].



Obrázek 5: N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylditiopropionát) (SPDP) poskytuje amidovou vazbu s biomolekulou nesoucí $-NH_2$ skupinu a disulfidovou vazbu s molekulou nesoucí $-SH$ skupinu [23]

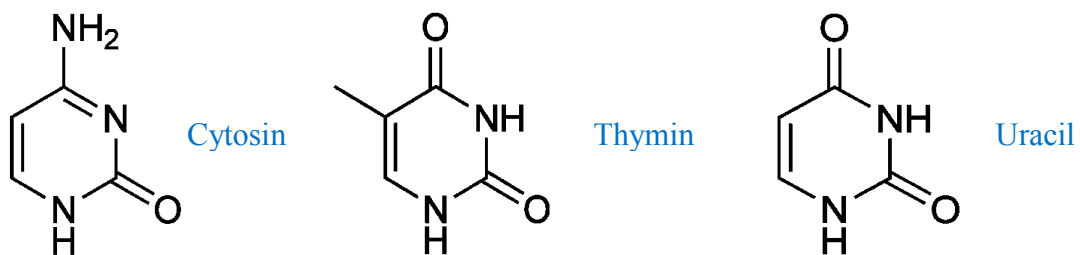
1.3 Modifikace nukleových kyselin

Nukleové kyseliny (DNA a RNA) jsou tvořeny jednotlivými nukleotidy spojenými fosfodiesterovou vazbou mezi zbytky sacharidových kruhů. Základní složku tvoří purinové a pyrimidinové báze. Purinovými jsou adenin a guanin.



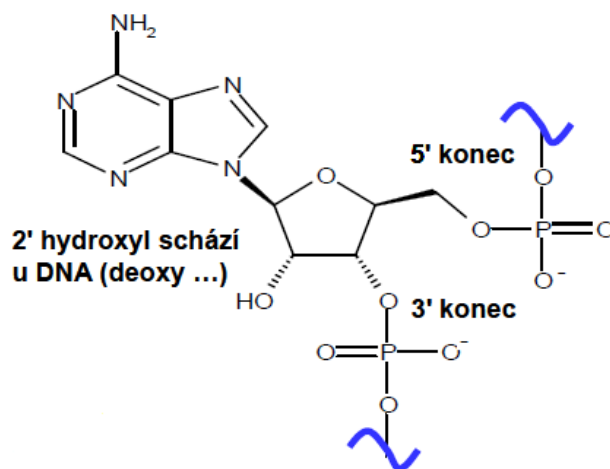
Obrázek 6: Purinové báze

Pyrimidinovými bázemi jsou cytosin, thymin a uracil.



Obrázek 7: Pyrimidinové báze

Spojením s molekulou sacharidu, ribózou nebo deoxyribózou, vznikají nukleosidy. Připojením fosfátu vznikají nukleotidy, například adenosin monofosfát. Méně časté je využití sacharidové části 2' hydroxyl u RNA.

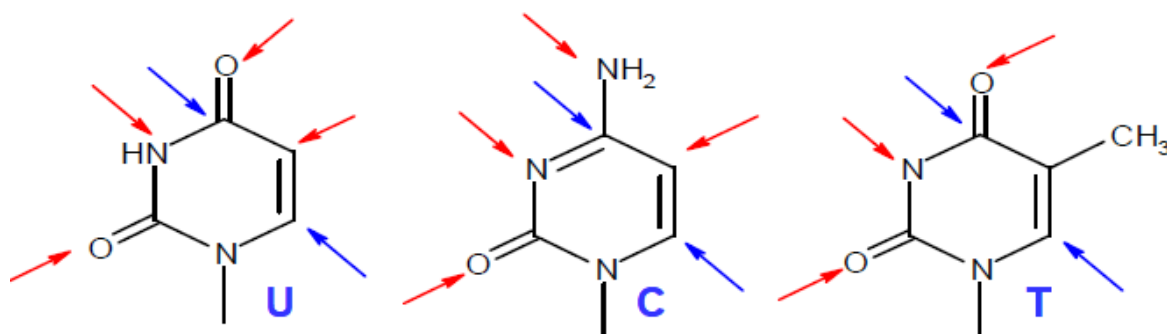


Obrázek 8: Modifikační reakce RNA na části řetězce obsahující 2' hydroxyl. Modré vlnovky značí pokračování řetězce molekuly RNA přes zbytky kyseliny trihydrogenfosforečné [23].

1.3.1 Pyrimidinové báze

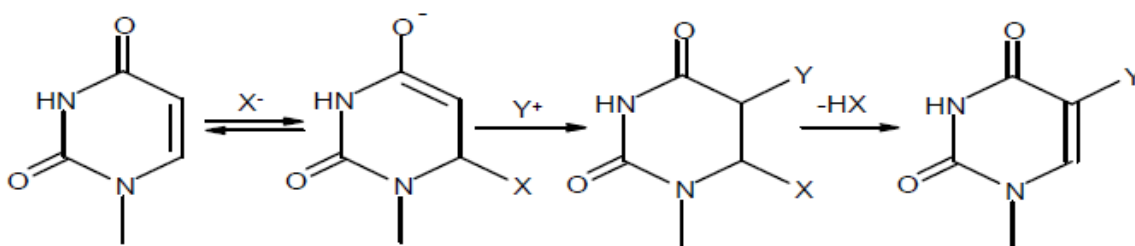
Části molekul se mohou stát cílem ataku elektrofilních nebo nukleofilních činidel.

Elektrofilními činidly označujeme látky nesoucí částečný nebo celý kladný náboj např. HCl , NH_4^+ . Nukleofilními činidly označujeme látky nesoucí nevazebné elektronové páry nebo obsahující π elektrony např. H_2O , CN^- . V následujícím schématu jsou pozice atakované elektrofilními činidly značeny pomocí červených šipek. Naproti tomu pozice atakované nukleofilními činidly značeny pomocí modrých šipek.



Obrázek 9: Atak částí molekul elektrofilními (červenými šipkami) a nukleofilními (modrými šipkami) činidly [23].

Konkrétnějším příkladem může být provedená nukleofilní substituce v pozici C6 u molekuly uracilu, která aktivuje C5 pozici pro elektrofilní atak.

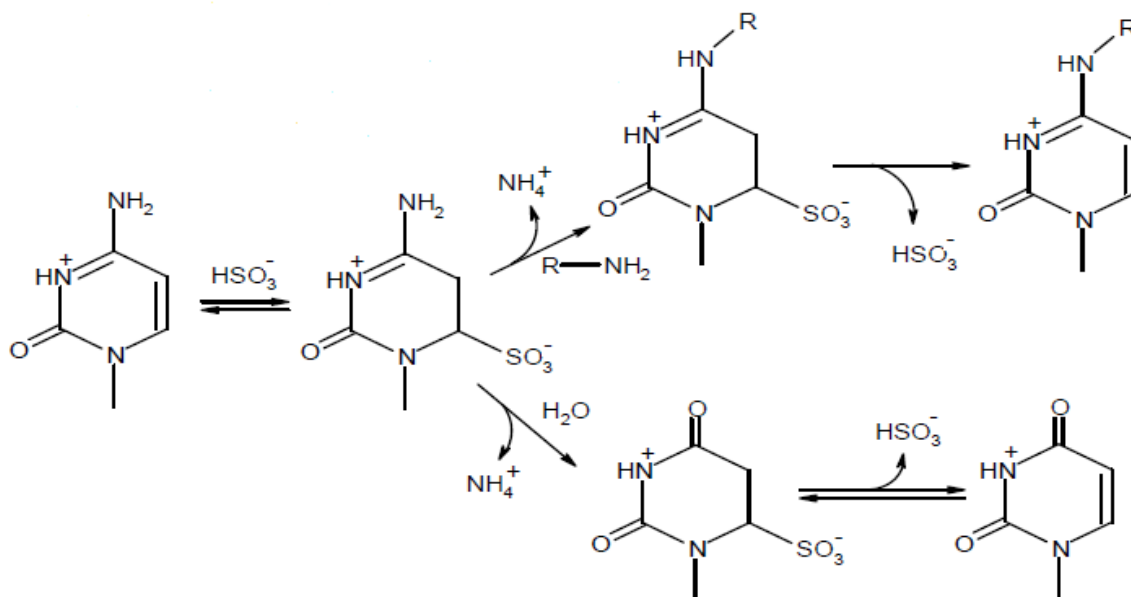


Obrázek 10: Nukleofilní substituce v C6 pozici u uracilu s následným atakem C5 pozice pro elektrofilní atak [23].

1.3.2 Reakce cytosinu s hydrogen-siřičitanem

Reakcí cytosinu s hydrogen siřičitanem dochází ke vzniku sulfonovaného derivátu.

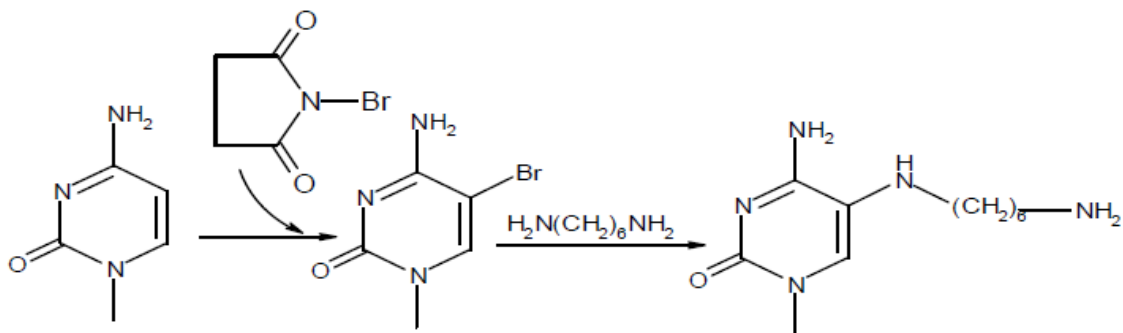
V přítomnosti nukleofilu (aminu) dochází k transaminaci, zároveň vzniká možnost zavést funkční skupiny. Naproti tomu v slabě kyselém prostředí dojde k hydrolyze aminoskupiny na C4 pozici a následně po alkalizaci k odštěpení hydrogen siřičitanu. Celý proces můžeme souhrnně nazvat konverzí na uracil.



Obrázek II: Ke vzniku sulfonovaného derivátu v přítomnosti nukleofilu (aminu) dochází pomocí transaminace. V slabě kyselém prostředí dojde k hydrolyze aminoskupiny na C4 a následně po alkalizaci se odštěpí hydrogen siřičitan. Proběhne konverze na uracil [23].

1.3.3 Halogenace cytosinu

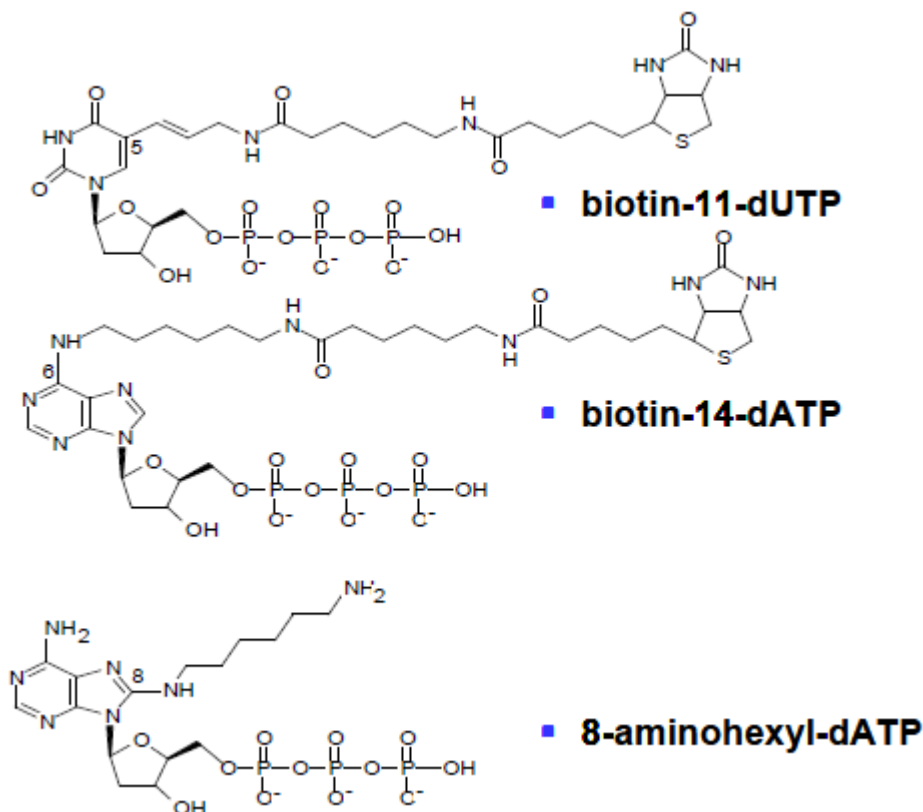
Jednou z možností vpravení reaktivní aminoskupiny v postranním řetězci je halogenace. Provádí se ve vodném roztoku jodu nebo bromu. Posledním krokem je zde substituce diaminem.



Obrázek 12: Substituce diaminu jako poslední reakce při halogenaci cytosinu [23].

1.3.4 Modifikace DNA

In vitro enzymová syntéza DNA polymerázou se provádí pomocí komplementárního templátového vlákna. Do reakční směsi jsou přidávány pozměněné nukleotidy, schopné párování, které do struktury DNA vnáší žádané funkční skupiny. Pokud je vyžadováno správné párování je stupeň substituce maximálně 30-40 modifikovaných míst na tisíc bází. Příliš velké včlenění značených bází bývá nevýhodné pro hybridizační reakci.



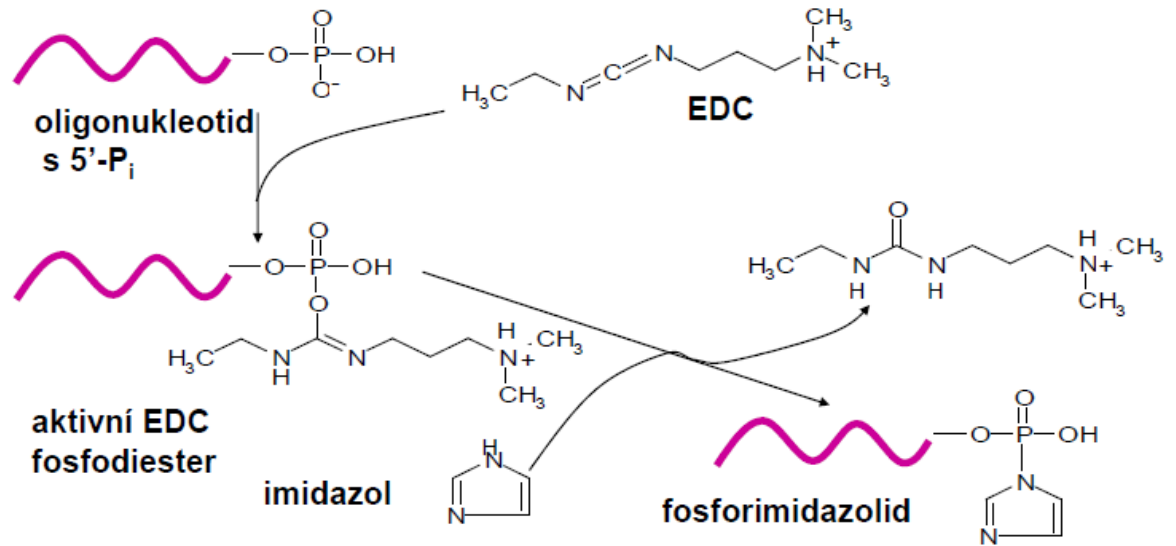
Obrázek 13: Derivatizované báze [23]

1.3.5 Značení v průběhu PCR

Polymerázová řetězová reakce je nejúčinnější metodou pro značení DNA, za současného množení původní DNA. Do reakční směsi se buď přidají značené nukleotidy, nebo pouze značené primery, počáteční konce řetězců DNA. V průběhu koncového značení je snahou zamezit modifikaci uprostřed řetězce. Využívá se i pro radioaktivní značení.

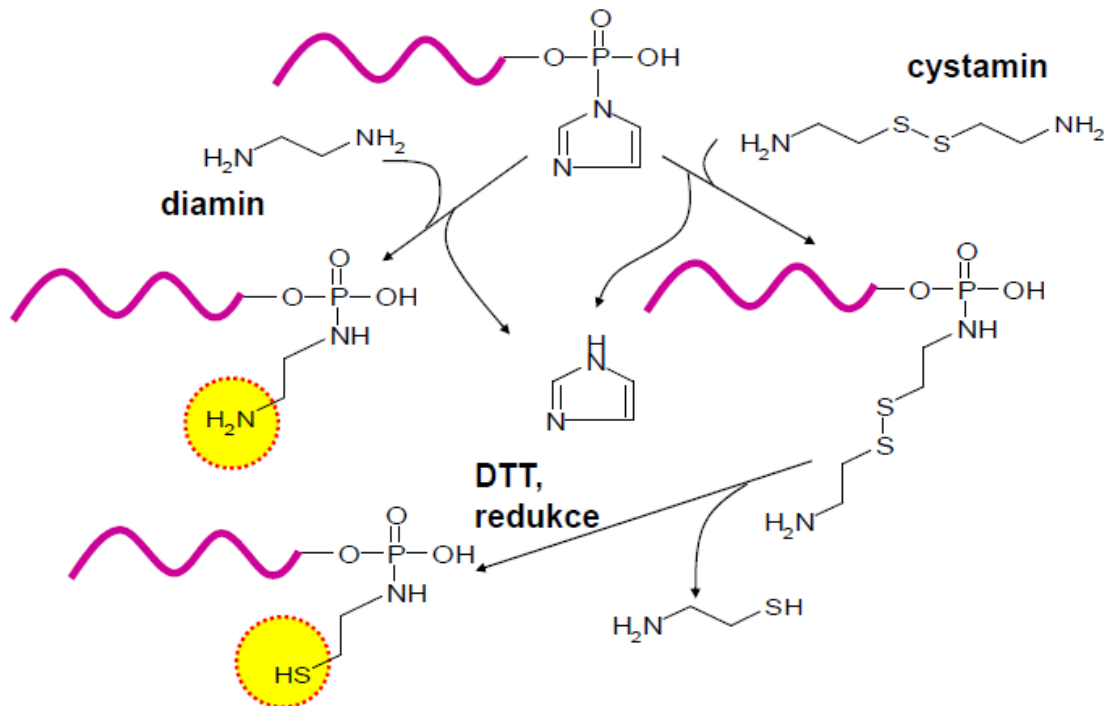
1.3.6 Fosforamidová metoda

Aminy spolu s aktivací fosfátu EDC vedou ke vzniku fosforamidů. Fosforamidy vykazují prodlouženou životnost ve vodném prostředí a dobrou reaktivnost s aminy.



Obrázek 14: Průběh fosforamidové metody [23]

Reakci lze provést také s imidazolem, což vede ke vzniku fosforimidazolidového produktu.



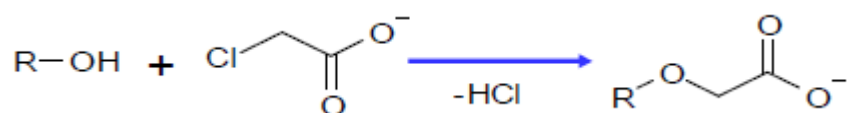
Obrázek 15: Vnášení amino nebo thioskupiny na konec DNA [23]

1.3.7 Modifikace RNA

Molekuly RNA jsou primárně jedno řetězcové s krátkými vzájemně propletenými komplementárními sekvencemi. Díky párování mohou vznikat třídimenzionální struktury (smyčky a vlásenky). Na rozdíl od molekuly DNA má diolové uskupení v molekule ribózy, umožňující specifické oxidace jodistanem, na reaktivní aldehydové skupiny. Vhodná orientace struktury umožňuje vytvářet vazebná místa, komplementární k jiným molekulám. Tyto sekvence nazýváme aptamery. Využívá se již především v průběhu očkování díky možnosti výměny protilátek. Nejvýznamnější je aptamer s navázaným trombinem.

1.3.8 Vnášení reaktivních skupin

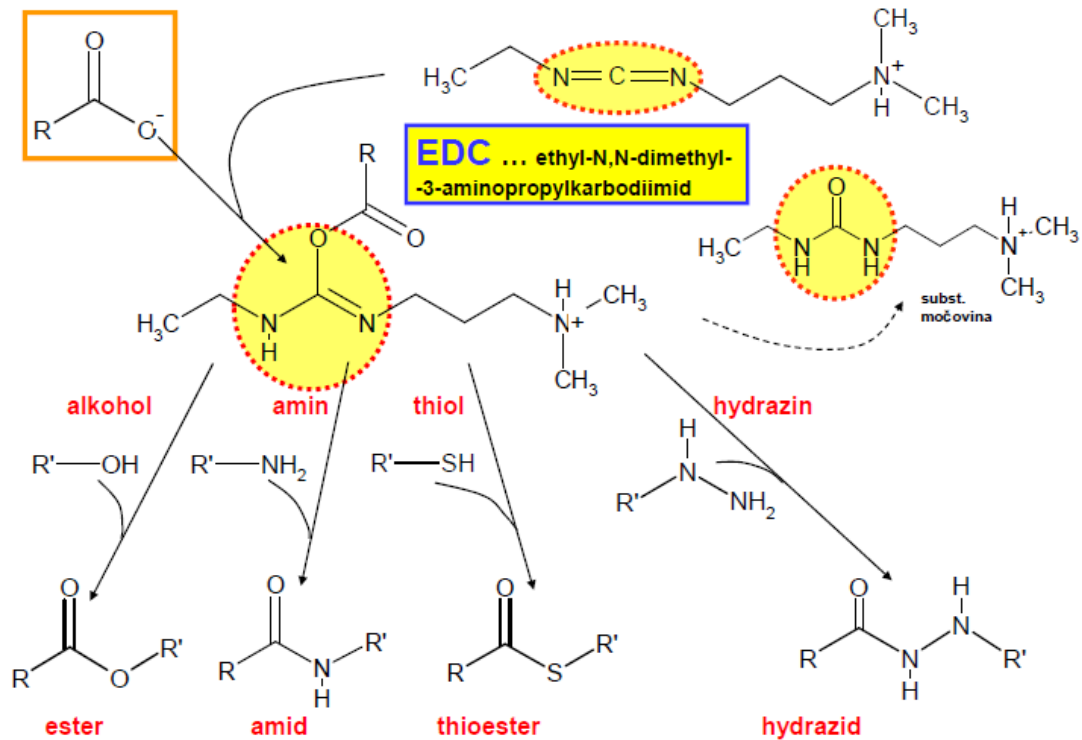
V průběhu konjugace bílkovin se využívají heterobifunkční činidla, která vyžadují rozdílné koncové skupiny obou reaktantů. Jedna z molekul v reakci je předem vhodně upravena. Thiolace neboli zavádění –SH skupiny. Pro derivatizaci hydroxylových skupin v polysacharidových maticích je využívána kyselina chlor-octová, tím vznikne molekula obsahující dvě rozdílné koncové skupiny, které jsou schopné dál reagovat cíleným mechanismem.



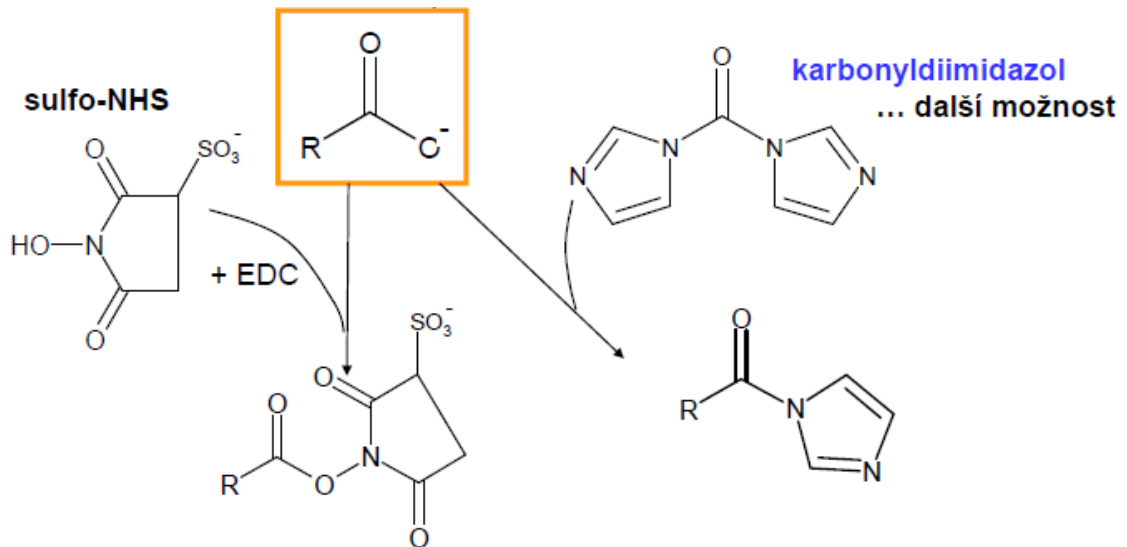
Obrázek 16: Derivatizace hydroxylových skupin pomocí kyseliny chlor octové [23].

1.4 Modifikace karboxylu

Reakce probíhající s karbodiimidy jsou velmi rychlé. Současně s nimi probíhá i hydrolýza. Bohužel nejsme schopni dostatečně řídit průběh, vzhledem k rychlosti. Z tohoto důvodu se konjugace provádějí přes stabilnější meziprodukty, především s molekulami NHS [23].

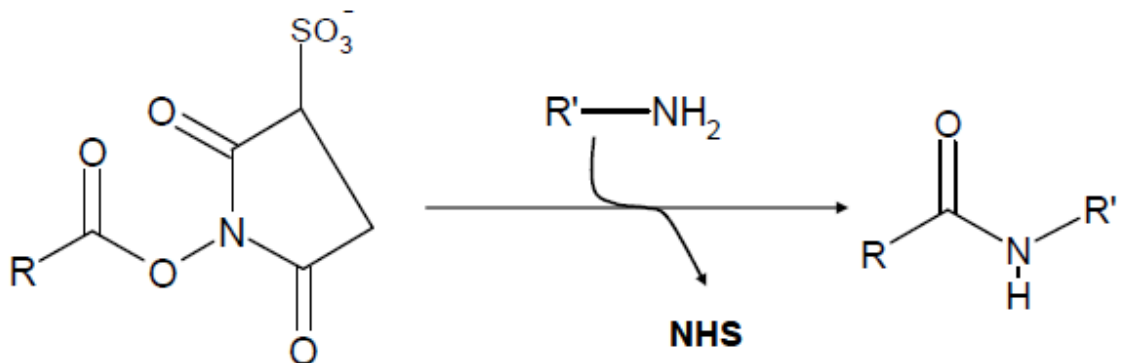


Obrázek 17: Aktivace karboxylu karbodiimidem [23]



Obrázek 18: Vznik NHS derivátů [23]

Vznikající NHS-deriváty nebo imidazolové deriváty vykazují velmi dobrou stabilitu ve vodném prostředí a ochotu reagovat např. s aminoskupinou za vzniku aminů. Na trhu je dostupná celá řada NHS-aktivovaných molekul, které se dají velmi jednoduše konjugovat s cílovou biomolekulou ($\text{R}'\text{-NH}_2$) [23].



Obrázek 19: Reakce NHS s biomolekulou [23]

1.5 Reaktivní skupiny

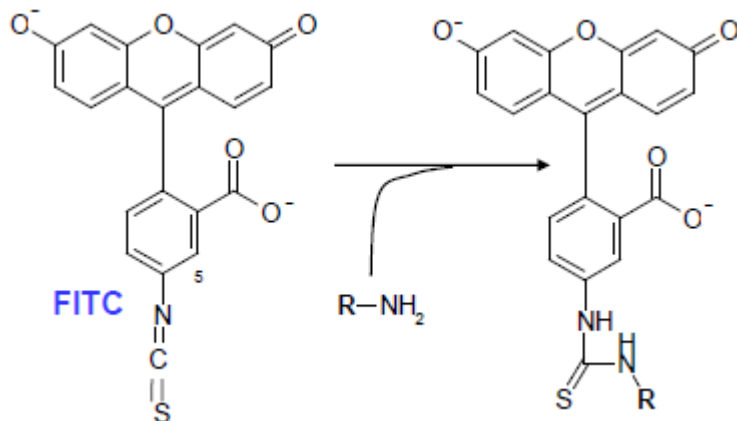
Vnášení reaktivních skupin může probíhat přirozeně. Reaktivní skupiny biomolekuly nemusí dostačovat pro zamýšlené syntetické postupy. V případě konjugace bílkovin se často jedná o heterobifunkční činidla, která vyžadují různé koncové skupiny obou partnerů. U jednoho z reakčních partnerů se předem provede zavedení potřebné skupiny. Nejběžnější konverze karboxylu se provádí pomocí diaminů v přítomnosti karbodiimidu. Dochází ke vzniku amidové vazby. Druhá koncová skupina zůstává volně k dispozici. Konverze karboxylové skupiny na aminoskupiny výrazně ovlivňuje celkový náboj biomolekuly, což bývá zamýšleným účelem modifikace [23].

1.6 Fluorescenční značky

Navazování fluorescenčních značek se provádí kovalentně. Klasicky používanými jsou organická barviva, fluorescenční bílkoviny či cheláty lanthanoidů. Jsou dobře rozpustné ve vodě. Mají snadné použití, mnoho existujících protokolů a aktivovaných forem. Nevýhodou jsou široké spektrální pásy a snadná fotolýza. Dále se dají použít moderní fluorescenční značky, kam řadíme polovodičové kvantové tečky, anorganické nanočástice upravené lanthanoidy, nanočástice latexu a křemičitanů s navázanými fluorofory. Moderní fluorescenční značky jsou využívány zejména díky pokroku v oblasti materiálových věd. Nejčastěji se uplatňují k fluorescenčnímu značení proteinů, ke kterým jsou navázány pomocí kovalentní vazby.

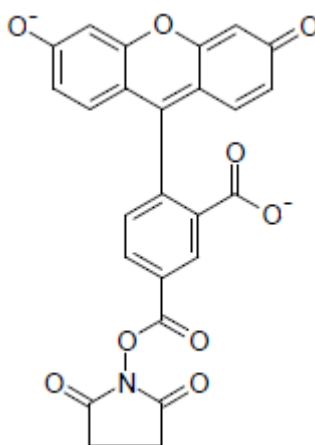
1.6.1 Fluorescein

Fluorescein je nejčastěji používaným fluoroforem. Hlavními výhodami jsou vysoká absorpance a nízká cena. Fluorescein-5-isothiokyanát spolu s $-NH_2$ skupinou tvoří thioamocovinové uskupení.



Obrázek 20: Vznik thioamocovinového uskupení [23]

Výhodnější je využití NHS-fluoresceinu s rychlejším průběhem reakcí a stabilnějším produktem.



Obrázek 21: NHS-fluorescein [23]

Na aldehydové nebo oxoskupiny se navazuje fluorescein-5-thiosemikarbazit za vzniku hydrazinové vazby. Je použitelný pro značení DNA nebo RNA po jejich aktivaci hydrogen siřičitanem. Fluorescein podléhá fotolýze v rozmezí několika minut. Dochází k výraznému poklesu signálu pod hodnotou $pH = 7$. Isomery mohou komplikovat geometrii vazby k proteinům, s následkem prodloužení času v průběhu migrace gelem. Fluorescein není příliš vhodný pro velmi citlivé aplikace.

1.6.2 Rhodaminy

Na rozdíl od fluoresceinu mohou nést místo kyslíkových atomů na postranním cyklu atomy dusíku. Díky možnostem různých substituentů je dostupná velká škála variant. Ve srovnání s fluoresceinem probíhá emise na delších vlnových délkách. Jsou použitelné pro techniky s dvojným značením. Vykazují vyšší stabilitu než fluorescein. Fluoreskují v infračervené oblasti.

1.6.3 Kvantové tečky

Jedná se o moderní fluoreskující polovodičové nanokrystaly. Jsou menší než 10 nm a svým kvantovým chováním se nachází mezi polovodiči a izolovanými atomy [23]. U polovodičů pozorujeme valenční a vodivostní pás oddělené energetickou dírou (E_g). Vlivem excitace elektronu dojde k jeho přechodu z valenčního do vodivostního pásu, spolu se vznikem kladně nabitých děr ve valenčním pásu. Výhodami nanoteček oproti klasickým fluorescenčním značkám jsou vysoký jas, úzké emisní pásy pod 30 nm, jsou stabilní a nepodléhají fotodegradaci. Pro konjugaci s biomolekulami se nanášejí reaktivní vrstvy např.: hexadecylamin.

1.7 Využití

1.7.1 Fluorescenční metody

V současnosti mají široké využití v oblasti výzkumu i praktické aplikace [23].

1.7.1.1 *Bio analytické metody*

V klinické chemii se jedná o fluorogenní substráty při stanovení enzymů. Imunochemickými metodami jsou ELISA a FIA fluorescenční imunoanalýza. Genetická analýza, DNA biočipy a monitorování prostředí pomocí fluorescenčních barviv [23].

1.7.1.2 *Biomedicína*

Identifikace a separace buněk v průtokové cytometrii. Zobrazování buněčných komponent ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu. Konformace a dynamika buněčných systémů [23].

2 ELEKTROFORÉZA

Poprvé tuto metodu publikoval v roce 1937 švédský chemik Arne Tiselius. Následně v roce 1948 získal Nobelovu cenu za práci o separaci proteinů pomocí elektroforézy. Jedná se o pohyb molekul vlivem elektrického pole. Rychlost jejich pohybu závisí na velikosti náboje a velikosti částice. Používá se k separaci velkých molekul (proteiny, nukleové kyseliny) a malých nabitých molekul (cukry, peptidy, nukleotidy). V oblasti separace proteinů se jedná o nenahraditelnou metodu. Pro výpočet rychlosti pohybu lze použít vztah především pro koloidní částice:

$$u = \frac{v}{E} = c \cdot \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0}{\eta} \cdot \zeta \quad (3) [3]$$

Kde: u -pohyblivost iontu

v -lineární rychlost pohybu částice [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

E -intenzita elektrického pole [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$]

c -konstanta závislá na tvaru částic a na tloušťce elektrické dvojvrstvy

ϵ_r -relativní permitivita kapaliny = $\frac{\epsilon}{\epsilon_0}$

ϵ_0 -permitivita vakua [$8,8 \cdot 10^{-12} \text{ F}\cdot\text{m}^{-1}$]

η -viskozita prostředí [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]

ζ -elektrokinetický potenciál [V]

Pro molekulové ionty s jednoznačně daným nábojem lze pohyblivost vyjádřit vztahem:

$$u = \frac{|z|F}{f} \quad (4) [21]$$

Kde: z - je nábojové číslo iontu [-]

F - Faradayova konstanta [$96\,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$]

f -frikční koeficient vztažený na 1 mol iontů

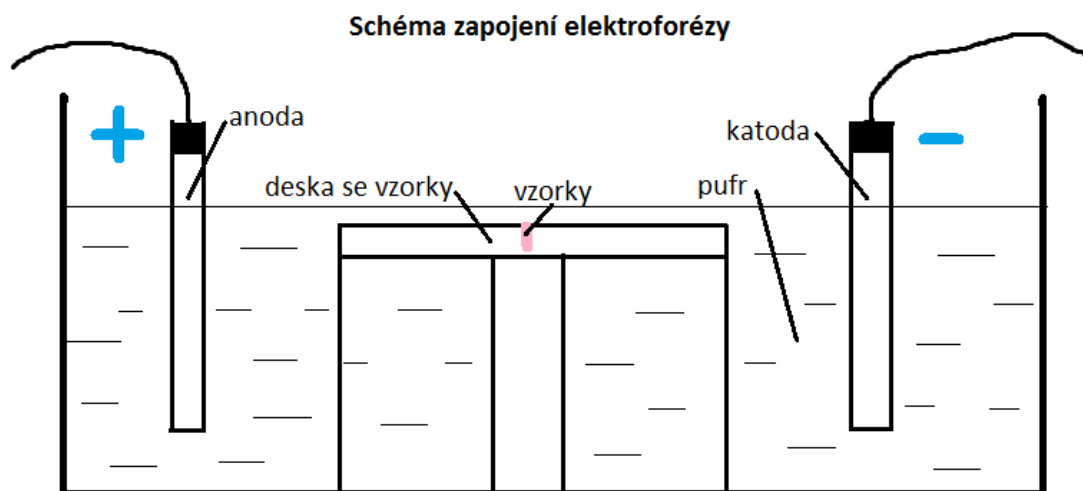
Pro ionty kulovitého tvaru lze s využitím Stokesova vzorce pro frikční koeficient převést vztah (4) do tvaru:

$$u = \frac{|z|F}{6\pi\eta r N_A} \quad (5) [21]$$

Kde: r -je poloměr iontu [m]

N_A -Avogadrova konstanta [$6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$]

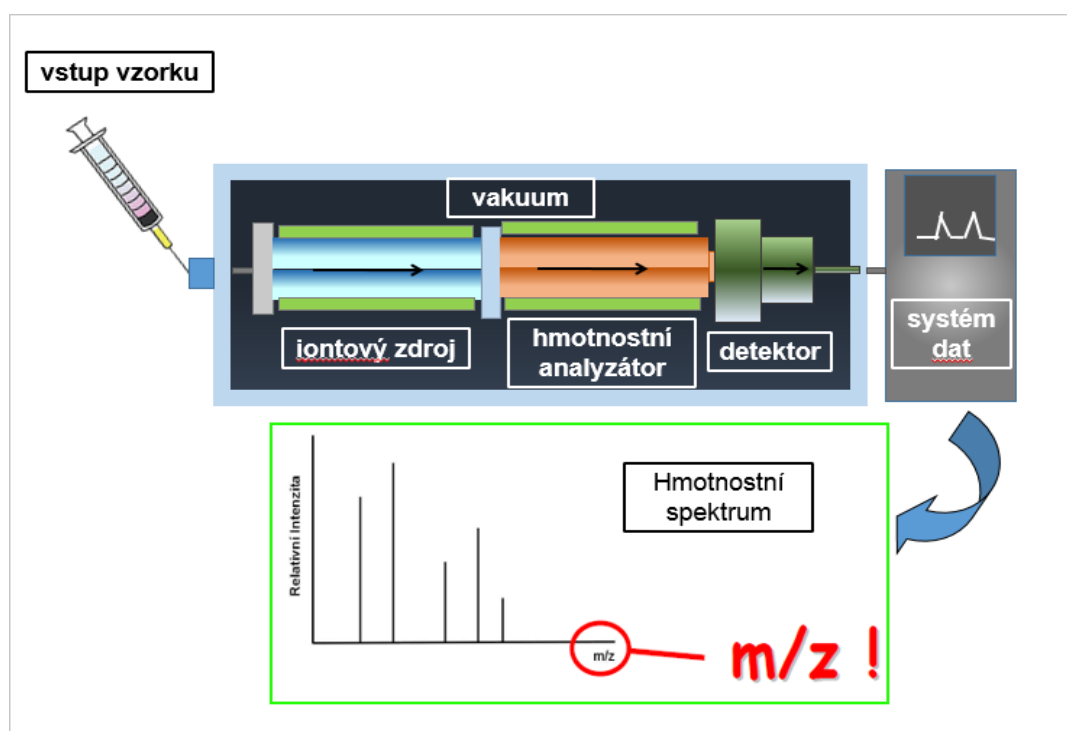
Elektroforetické metody se dělí na několik dílčích typů. V našem případě se jedná o gelovou elektroforézu řazenou mezi elektroforézu na nosiči. Je prováděna na agarosovém gelu. Agarosový gel je tvořen nataženými cukernými polymery, které jsou navzájem spojeny nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofobními vazbami. V takto vytvořené síti se nachází propustné póry pro umožnění přesunu vzorků v gelu, jehož hlavní složkou je voda (99 %), menšinovou složkou síť z agarosy. Při migraci molekul skrz gel se uplatňují vodíkové můstky a hydrofobní vazby. Dochází k separaci makromolekulárních komplexů migrací k opačně nabitým elektrodám. Gelová elektroforéza se dá dále dělit do dvou typů. Nativní gelová elektroforéza je metoda bez použití denaturačních činidel. Pohyblivost proteinů zde závisí na jejich celkovém náboji, velikosti, tvaru a velikosti pórů v gelu. Naproti ní se dá použít SDS gelová elektroforéza kde dochází k denuraci dodecylsíránem sodným a β -merkaptóetanolem, v důsledku jeho působení zanikají disulfidické vazby. Pohyblivost proteinů zde závisí na molekulové hmotnosti polypeptidových řetězců. Tato metoda je vhodná pro analýzu makromolekulárních komplexů. V našem případě se jedná o metodu nejbližší agarosové elektroforéze DNA, kde dochází k migraci záporně nabitých iontů směrem k anodě. Další metodou elektroforézy je kapilární elektroforéza. Opět se jedná o pohyb elektricky nabitých látek vlivem přivedení elektrického proudu. Avšak tentokrát jsou zkoumané látky umístěny ve vodivém médiu, kapiláře naplněné elektrolytem nebo gelem. Jevem doprovázejícím reakci je osmotický tok. Na vnitřním povrchu kapiláry v místě styku s vodivým roztokem vzniká elektrická dvojvrstva. Na stěně kapiláry se nachází nepohyblivý plošný záporný elektrický náboj. Kladné ionty se připojí ke stěně kapiláry, čímž vytvoří druhou vrstvu dvojvrstvy na povrchu kapiláry. Vzniklá pohyblivá vrstvička prochází kapilárou a bere sebou celý průřez kapaliny v kapiláře. Dochází k putování celého roztoku z kapiláry. Na rozdíl od ostatních metod elektroforézy, kde putují pouze ionty [3].



Obrázek 22: Schéma zapojení elektroforézy

3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Je to metoda fyzikálně-chemická k určení hmotnosti molekul a atomů jejich převedením na ionty. K produkci iontů dochází v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Následně reagují vzniklé ionty s jinými ionty či elektrickým nebo magnetickým polem. Přístroj je určen k separaci iontů na základě jejich efektivní hmotnosti. Hodnota efektivní hmotnosti se skládá z podílu hmotnosti iontu k protonovému číslu. Po určení této hodnoty jsou veškeré ionty identifikovány a pomocí vhodného počítačového programu převedeny na grafický výstup. Ve výsledném grafu hmotnostního spektra jsou na svislou osu zaznamenány hodnoty relativní intenzity v procentech a na vodorovnou osu hodnoty efektivní hmotnosti. Uvnitř spektrometru je po celou dobu měření udržováno vakuum pomocí kontinuálně pracujících pump. Celý přístroj se skládá z několika částí, jak je uvedeno na obrázku 23: Schéma hmotnostního spektrometru.



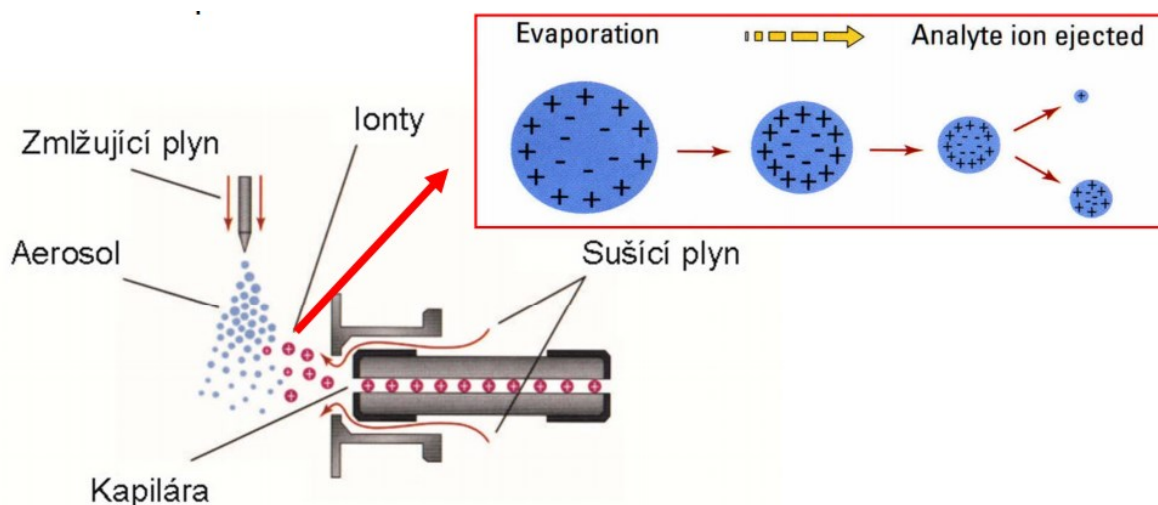
Obrázek 23: Schéma hmotnostního spektrometru [6]

3.1 Popis funkčních částí hmotnostního spektrometru

3.1.1 Iontový zdroj

Zde dochází k přeměně molekul na ionty. Ionizaci lze provádět několika způsoby: nárazem elektronů, působením elektrostatického pole, chemickou ionizací, nárazem rychlými atomy nebo ionty, elektrosprejem, termosprejem, ionizací laserem za přítomnosti matrice.

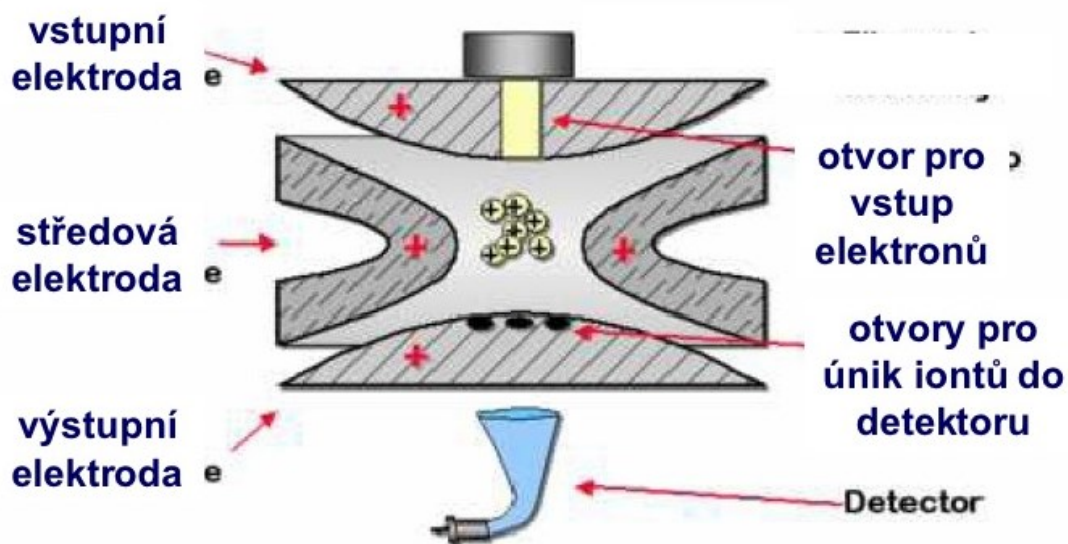
V případě našeho měření je používána ionizace elektrosprejem. Využívá se pro látky středně polárního až iontového charakteru s hodnotou molekulové hmotnosti řádově ve stotisících. Dochází k tvorbě vícenásobně nabitých iontů. Jedná se o velmi šetrnou ionizační techniku. Díky tomu ji lze využít u biologických sloučenin (proteiny, nukleové kyseliny, peptidy, sacharidy). Rozpuštěný analyt se přivádí na kovovou kapiláru, na kterou se přivádí napětí 3 – 5 kV. Vznikají kapičky nesoucí na povrchu velké množství nábojů. Odpařením rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje, při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakováním uvedeného procesu dochází k uvolnění iontů [10].



Obrázek 24: Schéma iontového zdroje [10]

3.1.2 Hmotnostní analyzátor

Slouží k rozdělování iontů vzniklých v iontovém zdroji v různém čase a prostoru. Může se jednat o průletový analyzátor, kvadrupólový analyzátor či iontovou past. V případě našeho měření je používána iontová past. Dochází k zadržování iontů na elektrodách pomocí napětí a jejich následné analýze. Získáváme strukturní informace o sledované látce.



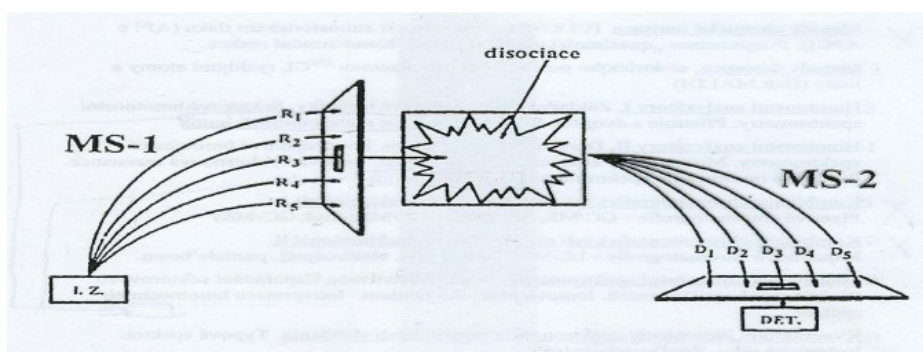
Obrázek 25: Schéma iontové pasti [6]

3.1.3 Detektor

Zachycuje výsledný analogový signál přímo úměrný počtu dopadajících iontů. Dříve byla používána fotografická destička. V dnešní době se využívá Faradayova klíčka nebo elektronový násobič (nejpoužívanější).

3.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

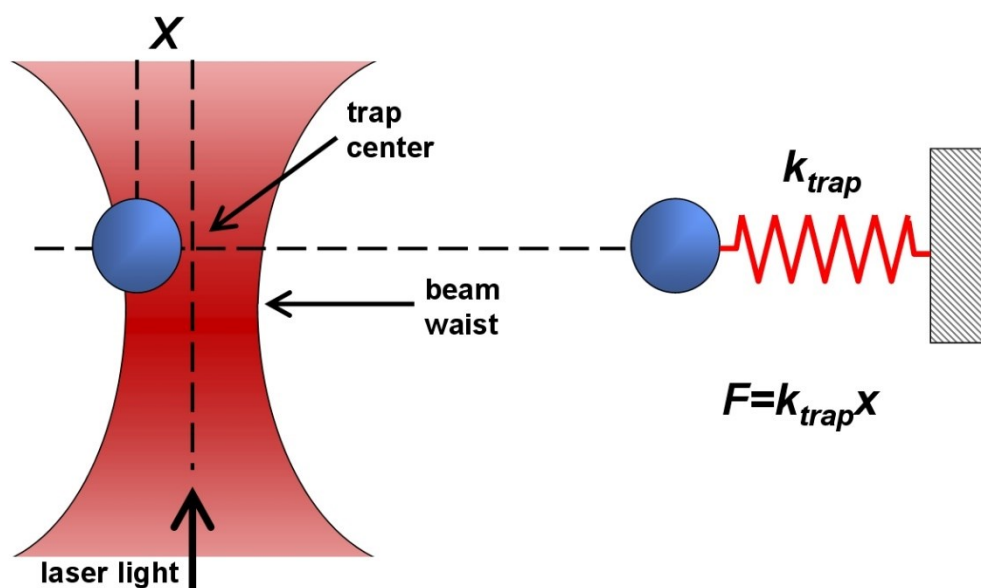
Jedná se o dva hmotnostní spektrometry spojené do série pomocí kolizní cely. Celý systém se poté označuje jako MS/MS nebo MS^2 . Slouží k bližší specifikaci analyzované látky. Nejprve dojde k rozdělení mateřských (prekurzorových) iontů a výběru jednoho z nich. Zvolený mateřský iont je dále podroben fragmentaci v kolizní cele. Fragmentace mateřského iontu je nejčastěji realizována pomocí kolizního plynu. Takto vzniklé dceřiné ionty jsou rozdělovány v druhém analyzátoru. Výsledné spektrum obsahuje dceřiné ionty pouze z jednoho mateřského iontu. V případě použití iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru, což je i případ experimentů prováděných v rámci našich měření, je možné provádět i vícenásobnou fragmentaci a tedy měřit spektra MS^3 , MS^4 , atd.



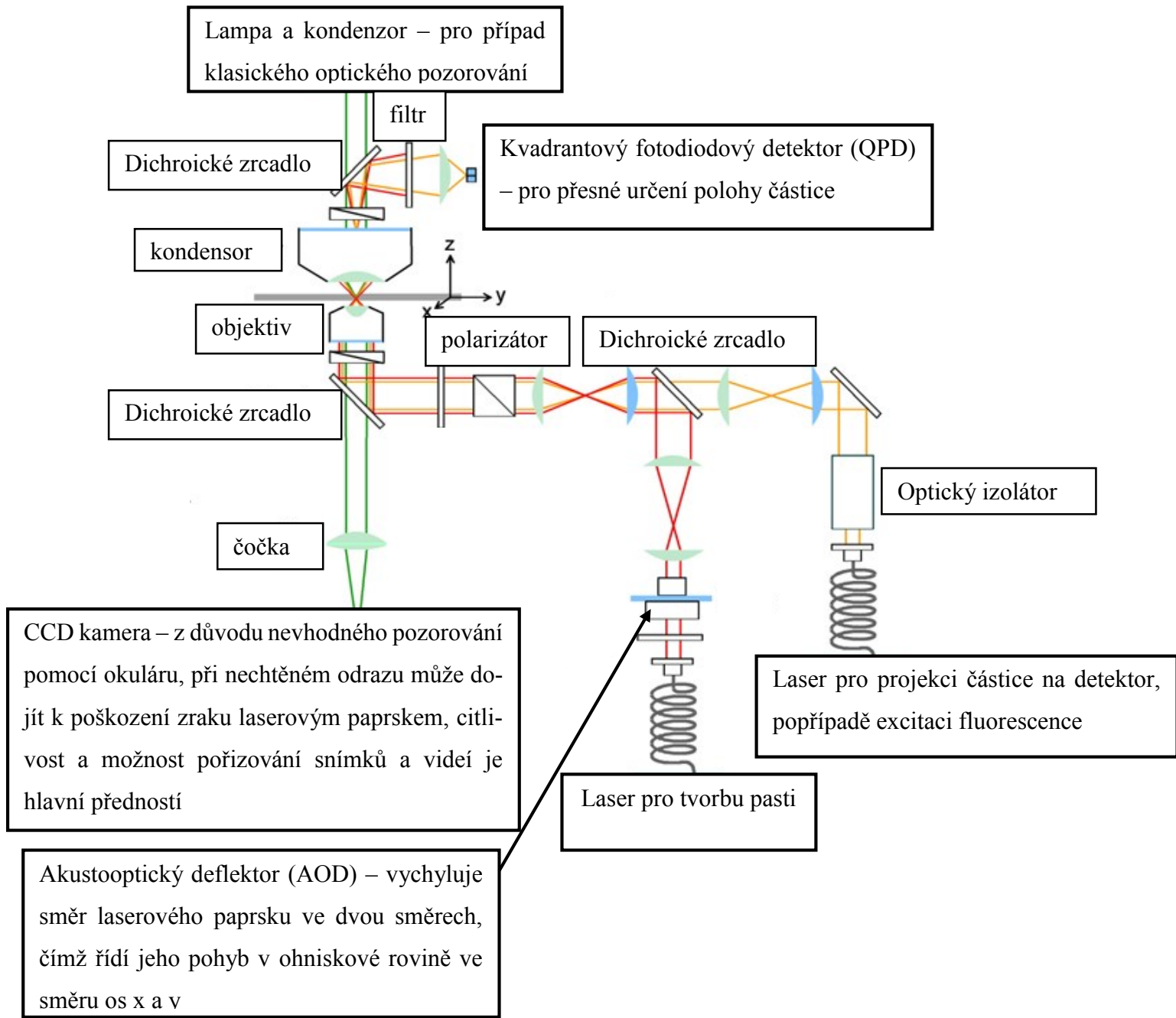
Obrázek 26: Zjednodušené schéma tandemového hmotnostního spektrometru [22]

4 OPTICKÁ PAST

V základním principu se jedná o cílené zaměření jediného laserového paprsku Do konkrétního místa v optické pasti rozměrově v řádech nano- až mikrometrů. Toto zaměření je možné i skrz opticky neprůhledné prostředí. O opticky neprůhledném prostředí mluvíme ve chvíli, kdy objekty světelné vlnění pohlcují nebo ho odráží od povrchu zpět do prostředí. Dochází k zachycení objektů s vyšším indexem lomu, než má okolní médium. Z tohoto důvodu jsou k fokusaci využívané objektivy s vysokou numerickou aperturou. Velká část experimentů je prováděna olejovými imerzními objektivy s numerickou aperturou 1,2 – 1,5 a zvětšením 60x až 100x. Prostorové manipulace s živými i neživými mikro objekty se dosahuje změnou polohy ohniska svazku např. systémem vychylovacích zrcátek, akustooptickými deflektory nebo fázovými maskami. Aparaturu lze snadno kombinovat s pozorováním vzorku pomocí optického mikroskopu. Lze pozorovat přímo zkoumaný objekt bez dodatečných úprav [19]. Bohužel většina biomolekul je optickým mikroskopem velmi špatně pozorovatelná, z tohoto důvodu se provádí jejich značení fluorescenčními sloučeninami. Získáme tak výrazně snadnější vizualizaci, což má za následek kvalitnější zhodnocení celého pozorovaného děje. V naší laboratoři v současné době probíhají dokončovací práce na sestavení tohoto zařízení. Konjugáty syntetizované v rámci této práce budou použity v experimentech na něm prováděných.



Obrázek 27: Princip zachycení částic v optické pasti [25]



Obrázek 28: Schéma optické pasti [24]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 POUŽITÉ METODY, PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

5.1 Použité přístroje a chemikálie pro přípravu vzorků

Elektroforéza: CONSORT 400V-400Ma e844

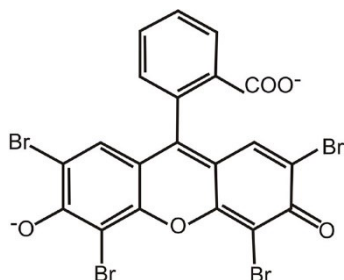
pHmetr: JENWAY, pH meter 3305

Transluminátor: VILBER LOURMAT, TCP-20.M

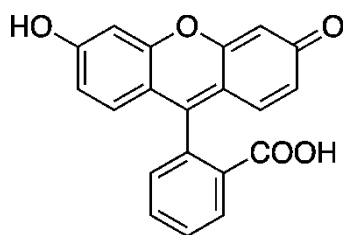
Centrifuga: Hettich ZENTRIFUGEN, ROTANTA 460R

Hmotnostní spektrometr: Bruker Daltonics, AMAZON

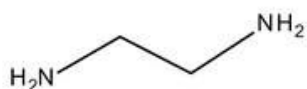
Eosin Y: Molární hmotnost $M = 332,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sumární vzorec $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Výrobce LACHEMA N. P. BRNO. V celém textu je označován pouze eosin.



Fluorescein: Způsobuje vážné podráždění očí. Rozpustný ve vodě. Molární hmotnost $M = 724,132 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sumární vzorec $\text{C}_{20}\text{H}_{8}\text{Br}_4\text{O}_5$.



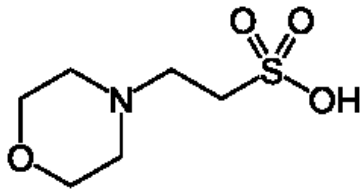
Ethylendiamin: Použit 99%. Molární hmotnost $M = 60,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sumární vzorec $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$.



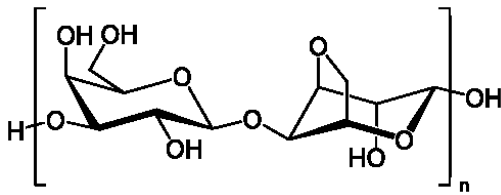
EDC: N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride. Molární hmotnost $M = 191,70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sumární vzorec krystalické formy $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$. Výrobce SIGMA-ALDRICH.

NHS: N-Hydroxysuccinimide. Molární hmotnost $M = 115,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sumární vzorec $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$.

MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid. Molární hmotnost $M = 195,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sumární vzorec $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$. Výrobce SIGMA.



Agarosa: Výrobce Lonza.



5.2 Příprava zásobních roztoků

Výchozí roztok eosinu a fluoresceinu byl míchán v poměru 10 mg chemikálie na 1 ml destilované vody.

Pufir 0,1 MES byl míchán v následujícím poměru chemikálií 100 ml destilované vody, 50 ml 50% glycerolu a 1,952 g MES. Následně bylo vloženo magnetické míchadlo a hodnota pH upravena na požadovanou hodnotu (4,7; 6) přidáním 1 mol NaOH (hydroxidu sodného) za současného měření pH pomocí pH metru.

5.3 Bio konjugační reakce

Vzorky byly míchány v následujícím poměru: 10 μ l připraveného roztoku eosinu nebo fluoresceinu, 4 μ l etylendiaminu, 2 mg EDC (pro správný průběh experimentu je potřeba mít čerstvé EDC) a 86 μ l pufru pH = 4,7. Celkový objem tvořil 100 μ l. Dále byly vzorky míchány v poměru: 10 μ l připraveného roztoku eosinu nebo fluoresceinu,

0,4 μ l etylendiaminu, 2 mg EDC (pro správný průběh experimentu je potřeba mít čerstvé EDC) a 90 μ l pufru pH = 4,7. Celkový objem tvořil 100 μ l. Analogicky byly vzorky míchány v poměru: 10 μ l připraveného roztoku eosinu nebo fluoresceinu, 0,4 μ l etylendiaminu, 2 mg EDC (pro správný průběh experimentu je potřeba mít čerstvé EDC) a 390 μ l pufru pH = 4,7.

Při výměře reakčního prostředí, pufru, za vodu byly použity následující poměry:

10 μ l připraveného roztoku eosinu nebo fluoresceinu, 4 μ l etylendiaminu, 2 mg EDC (pro správný průběh experimentu je potřeba mít čerstvé EDC) a 86 μ l vody. Etylendiamin byl přidáván v nadbytku vzhledem k roztoku eosinu nebo fluoresceinu. Pro kontrolu byly připraveny slepé pokusy ve stejném poměru jako u vzorků s vynecháním EDC. Po smíchání byly vzorky nechány dvě hodiny reagovat. Výsledné reaktanty jsou reprezentovány obrázkem 29: Výsledek elektroforézy facený na transluminátoru. Kromě předchozích reakcí byla použita i metoda obsahující stabilní meziproduct, ve které se nejprve naváže NHS na karboxyl. Hlavní výhodou této metody je možnost izolace meziproductu před navázáním druhé molekuly. Díky této možnosti lze tento meziproduct zbavit zbytků nežádoucích chemikálií, především EDC. Vzorky byly míchány v následujícím poměru: 10 μ l připraveného roztoku eosinu nebo fluoresceinu, 4 μ l etylendiaminu, 2 mg EDC (pro správný průběh experimentu je potřeba mít čerstvé EDC) a 90 μ l pufru pH = 6. Celkový objem tvořil 100 μ l. Etylendiamin byl přidáván v nadbytku vzhledem k roztoku eosinu nebo fluoresceinu, zároveň byl do roztoků přidáván s 15 minutovým spožděním oproti ostatním reaktantům. Pro kontrolu byly

připraveny slepé pokusy ve stejném poměru jako u vzorků s vynecháním EDC. Po smíchání byly vzorky nechány dvě hodiny reagovat.

5.4 Elektroforéza

5.4.1 Příprava gelu pro elektroforézu

Pro vlastní elektroforézu byl připraven agar, smícháním 0,48 g agaru se 40 ml pufru. Po smíchání byla směs nechána jednu minutu rozpouštět v mikrovlnné troubě na 800 W. Následně byla na předvážkách doplněna vodou do shodné hmotnosti jako před ohřevem. Směs byla nalita do upevněného stojanu na vzorky a vložen hřeben. Takto byla sestava ponechána 15 minut zchladnout.

5.4.2 Průběh elektroforézy

Vlastní elektroforéza byla spuštěna na 30 minut. Elektrický zdroj napojený na elektroforetickou vanu byl nastaven na napětí 400 V a proud 10 mA. Po zchladnutí agaru byly vzorky v objemu 10 μ l spolu s 50% glycerolem 10 μ l vpraveny do vzniklých jamek, následně byla celá soustava vzorků vložena do elektroforetické vany a provedena vlastní elektroforéza. Po doběhnutí elektroforézy byly vzorky vyjmuty i s agarem vloženy na transluminátor a pořízeny fotografie se záznamem migrace vzorků.

5.5 Separace vzorků z agaru

Po pořízení fotografií na transluminátoru byly vzorky pomocí čepele vyříznuty z agaru. Pro odstranění zbytků agaru z vyříznutých částic byly použita metoda extrakce do vody. Vzorky s byly vpraveny do zkumavek a zality vodou. Takto připravené zkumavky byly Nejprve vloženy na třepačku. Po ukončení třepání byly ze zkumavek pomocí pinzety vyjmuty zbytky agaru.

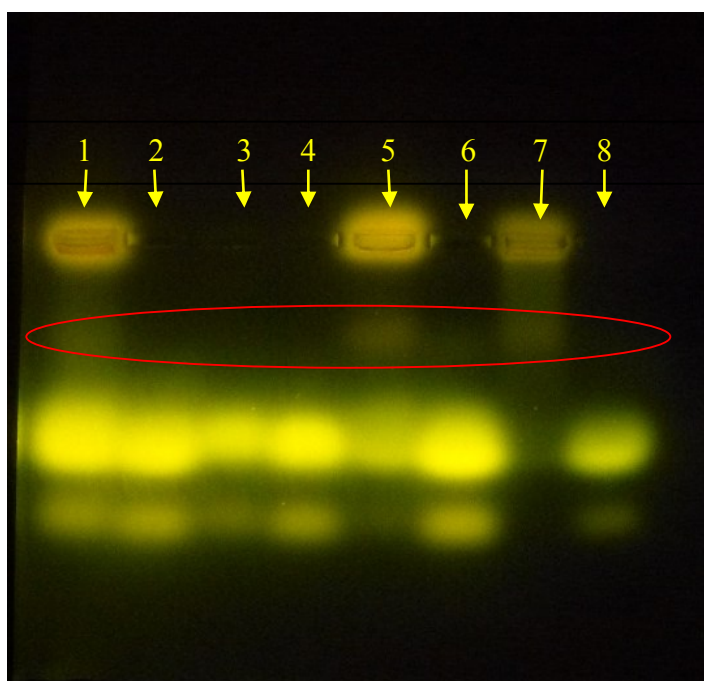
5.6 Hmotnostní spektrometr

Extrahované vzorky byly následně analyzovány na hmotnostním spektrometru. Před nástřikem do hmotnostního spektrometru byly naředěny na koncentraci 500 ng. ml⁻¹ a smíchány s metanolem v objemovém poměru 1:1. Ve spektrech byly identifikovány píky patřící reagujícím látkám a bylo posouzeno, zda reakce proběhla podle očekávání.

6 VÝSLEDKY

6.1 Výsledky reakcí

Z počátku provádění experimentu jsme se pokusili o celou biokonjugační reakci. Přesněji řečeno provedení všech dílčích reakcí zároveň. Z posunu konjugátů skrz gel, jak je reprezentováno na obrázku 30: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru se tento pokus jevil jako zdárný.

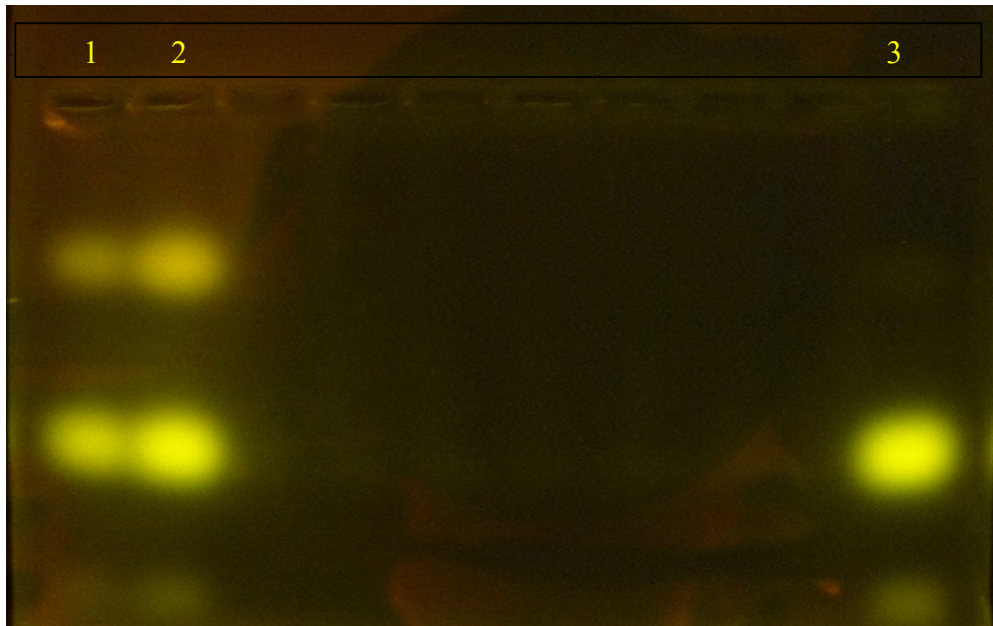


Obrázek 29: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru

Vzorky řazený z leva doprava

1. 86 μ l pufr pH = 4,7 + 10 μ l roztoku eosinu + 2 mg EDC 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu
2. 86 μ l pufr pH = 4,7 + 10 μ l roztoku eosinu 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu
3. 86 μ l voda + 10 μ l roztoku eosinu + 2 mg EDC 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu
4. 86 μ l voda + 10 μ l roztoku eosinu 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu
5. 90 μ l pufr pH = 4,7 + 10 μ l roztoku eosinu + 2 mg EDC 15 min reakce + 0,4 μ l ethylendiaminu
6. 90 μ l pufr pH = 4,7 + 10 μ l roztoku eosinu 15 min reakce + 0,4 μ l ethylendiaminu
7. 390 μ l pufr pH = 4,7 + 10 μ l roztoku eosinu + 2 mg EDC 15 min reakce + 0,4 μ l ethylendiaminu
8. 390 μ l pufr pH = 4,7 + 10 μ l roztoku eosinu 15 min reakce + 0,4 μ l ethylendiaminu

Obrázek 29: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru reprezentuje reakce prováděné v počátečních měření, kdy jsme se pokoušeli o provedení celé biokonjugace v jednom kroku. Z obrázku je znatelný posun molekul ze základních poloh směrem k anodě. U roztoků obsahujících EDC část objemu je elektricky neutrální a tím pádem nemigruje z výchozích poloh. Zároveň jsou zde znatelné i produkty zhruba uprostřed vyznačené červeným oválem. Původní nezreagované molekuly v důsledku svého záporného migrují nejrychleji, nejvzdálenější polohy. Malá část molekul zreagovala jen z části, což zmenšilo její náboj a zpomalilo migraci. Molekuly, u nichž proběhla reakce zcela ztratily náboj a ze základních poloh nemigrují. Zároveň je z obrázku patrné, že v čisté vodě reakce neprobíhá, třebaže pro jiné molekuly je tato možnost v literatuře popsána. Schéma reakce je zahrnuto v obrázku 17. Z důvodu eliminace průběhu reakce na obou aminoskupinách ethylendiaminu, byl ethylendiamin přidáván ve všech pokusech ve výrazném nadbytku oproti eosinu. Vzorky podrobené elektroforéze byly následně podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru. Výsledky z pokusů reprezentované obrázky 29. a 30. nám neposkytly průkazné výsledky. Byly zde znát charakteristické píky pro eosin a fluorescein, ale veškeré ostatní neodpovídaly požadovaným konjugátům, které měly vzniknout v důsledku přidávaných chemikálií. K tomuto výsledku jsme došli porovnáním s předem vypočtenými hodnotami i s uvážením různých izotopů u prvků. Příklady jsou uvedeny přímo u grafů 1. – 5. pro základní roztoky, které jako jediné rozumně vyšly. Protože hmotnostní spektrometrie nepotvrdila vznik očekávaných produktů, rozhodli jsme se reakci rozdělit do mezikroků a postupně se ujišťovat o správném průběhu.



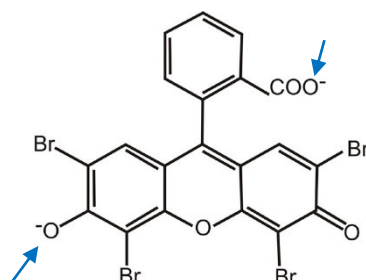
Obrázek 30: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru

Vzorky řazeny z leva doprava

1. 90 μ l pufr pH = 6 + 10 μ l roztoku eosinu + 2 mg EDC 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu + 5 μ l NHS
2. 90 μ l pufr pH = 6 + 10 μ l roztoku eosinu + 2 mg EDC 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu + 4 μ l NHS
3. 90 μ l pufr pH = 6 + 10 μ l roztoku eosinu 15 min reakce + 4 μ l ethylendiaminu

Na obrázku 30: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru je uveden první z mezikroků pro reakci eosinu s molekulou NHS. Molekuly NHS svým navázáním ruší náboj COO^- , na molekule zůstane pouze O^- náboj. Ke vzniku zcela neutrálních molekul zde nedochází. Obecné schéma této reakce je reprezentováno obrázkem 19: Reakce NHS s biomolekulou [23].

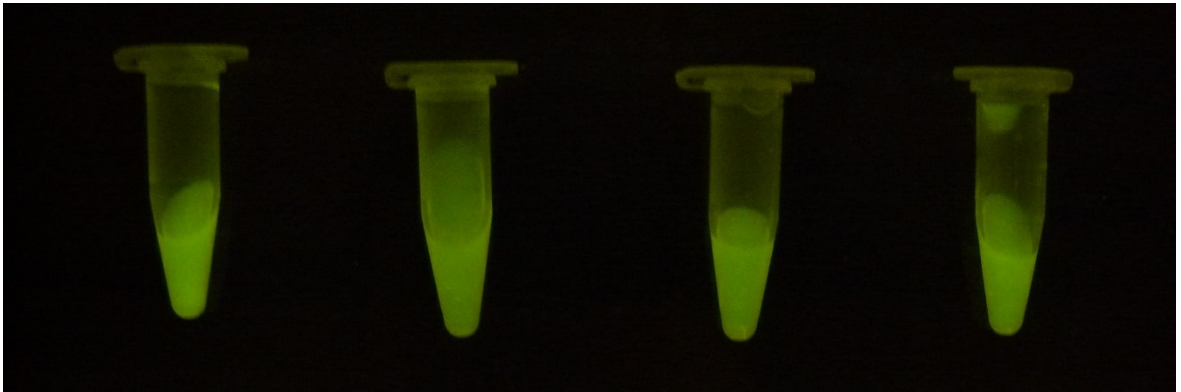
Pro bližší představu uvedeme ještě obrázek 31: Molekula eosinu s vyznačením míst se zápornými náboji.



Obrázek 31: Molekula eosinu s vyznačením míst se zápornými náboji

Obrázek 31: Molekula eosinu s vyznačením míst se zápornými náboji zobrazuje umístění jednoho záporného náboje na karboxylu a druhého na disociované OH skupině. Navázáním ethylendiaminu dochází k eliminaci jednoho záporného náboje za současného dodání kladného náboje na protonované skupině NH_3^+ , tím pádem je sloučenina elektricky neutrální. Sloučeniny označené červeným oválem by mohly být např. bifunkční konjugáty ve kterých je na každém konci EDA jeden eosin. Takové sloučeniny mají náboj 2-, ale objemnější což může zpomalit migraci skrz gel. Pokud dojde pouze k navázání NHS dojde k zrušení náboje karboxylu a zbyde náboj 1-. V drahách 1 a 2 je jasně patrný posun zreagovaných i nezreagovaných molekul. Nezreagované molekuly se nachází ve vodorovné přímce spolu se všemi nezreagovanými molekulami z dráhy 3. V dráze číslo 3 neproběhla reakce z důvodu absence EDC, tato slouží jako negativní kontrola.

6.2 Optické pozorování roztoků

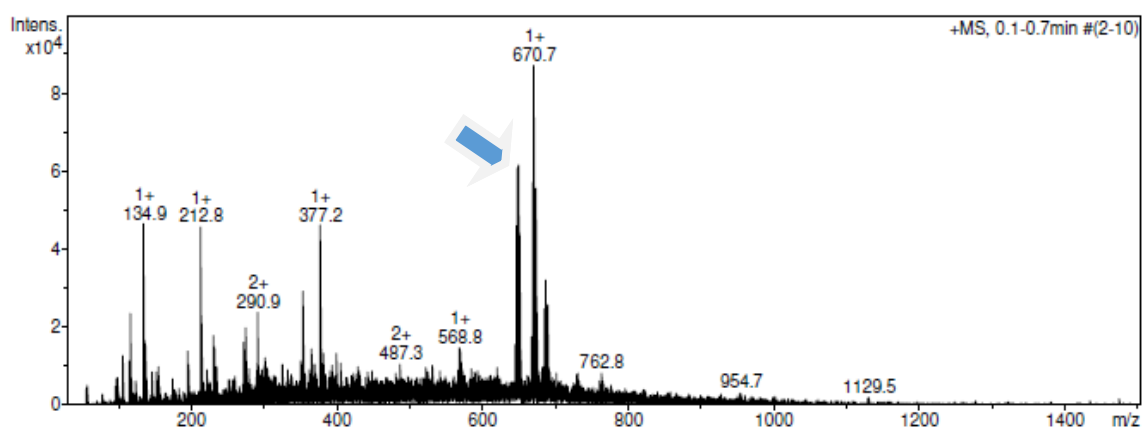


Obrázek 32: Zkumavky s roztokem eosinu po reakci s NHS a následné extrakci do vody před analýzou na hmotnostním spektrometru.

Zde je názorně vidět extrahovaný eosin po průběhu reakce s NHS. Tyto vzorky byly následně vloženy na analýzu do hmotnostního spektrometru. Fluorescence roztoků prokazuje přítomnost molekul eosinu v extraktu, byť sama neprokazuje správný reakční produkt. Tento postup extrakce vzorků z agarů po elektroforéze byl prováděn u všech reakcí v průběhu provádění experimentu.

6.3 Výsledky analýzy hmotnostních spekter

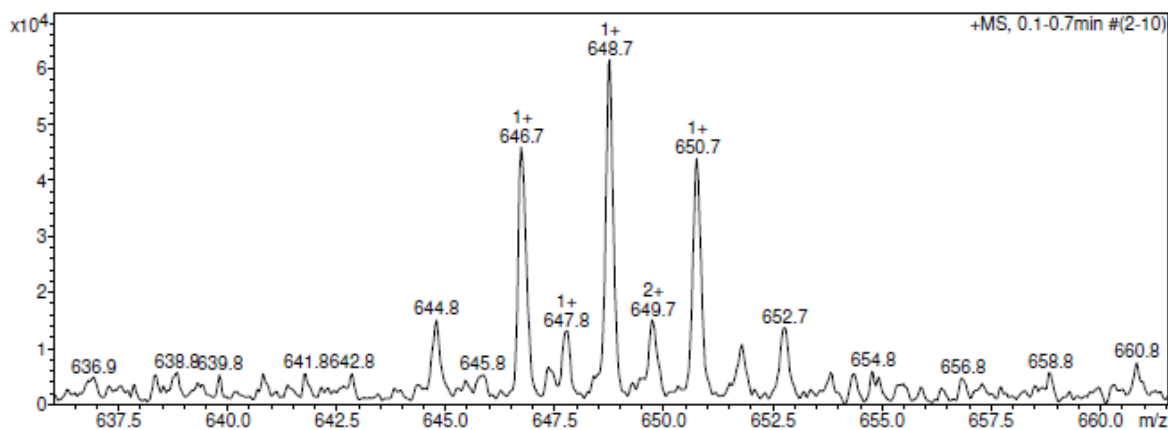
Provedená elektroforéza u pokusů nám říká, zda molekula nese náboj či ne, ale už nám neříká nic o molární hmotnosti a tím pádem o vzniklých produktech reakcí. V našich pokusech se provedlo prokázat snížení záporného náboje u fluorescenčních sloučen, u některých dokonce vznikly elektricky neutrální molekuly. V žádném z prováděných pokusů nám nepřevážil kladný náboj. Abychom získaly hodnotu molekulových hmotností vzniklých produktů a následně mohli zhodnotit porovnáním s výpočty, jaké konjugáty skutečně vznikly. Bylo nutné provést analýzu pomocí hmotnostního spektrometru. Tyto výsledky jsou reprezentovány grafy 1. - 5.



Graf 1: Zásobní roztok eosinu s charakteristickými píky mezi hodnotami 600 a 700 na ose m/z

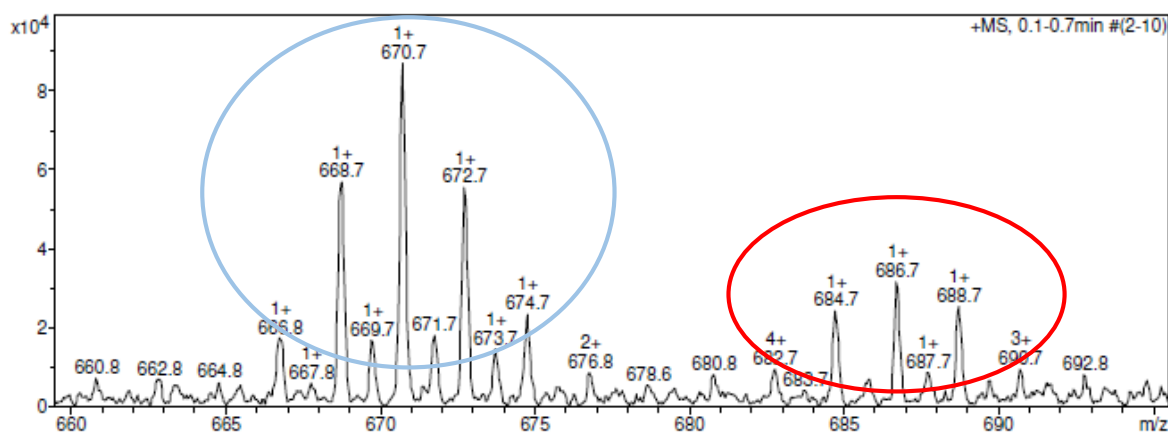
Pík zobrazující charakteristické hodnoty eosinu je vyznačen modrou šipkou.

V roztoku čistého eosinu byl identifikován pík odpovídající jeho molekulové hmotnosti, který byl následně jednoznačně identifikován díky charakteristické izotopové struktuře. S využitím této struktury jsme chtěly identifikovat produkty reakce, ale v žádném spektru se nevyskytovala. Z tohoto důvodu se nepodařilo reakční produkty dokázat.



Graf 2: Zásobní roztok eosinu s větším rozlišením před základním píkem v pozitivním módu

Rozložení píků nám vyznačuje zastoupení molekul eosinu s různým zastoupením izotopů bromu (Br). Br se vyskytuje ve formě několika izotopů, z nichž dva v přírodní izotopové směsi výrazně dominují. Budeme uvažovat pouze stabilní ^{79}Br (lehký Br) zastoupený z 51% a ^{81}Br (těžký Br) zastoupený z 49%. Rozdíl v počtu navázaných lehkých a těžkých izotopů Br má za následek rozložení viditelné v Grafu 2. Molární hmotnosti vzniklých sloučenin mohou nabývat hodnot: 644, 646, 648, 650 a 652. V následujících poměrech (lehký Br : těžký Br): 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 a 0:4. Měření bylo provedeno v pozitivním módu, v němž je náboj molekule dodán navázáním jednoho či několika H^+ , případně dalších, nejčastěji Na^+ či K^+ .

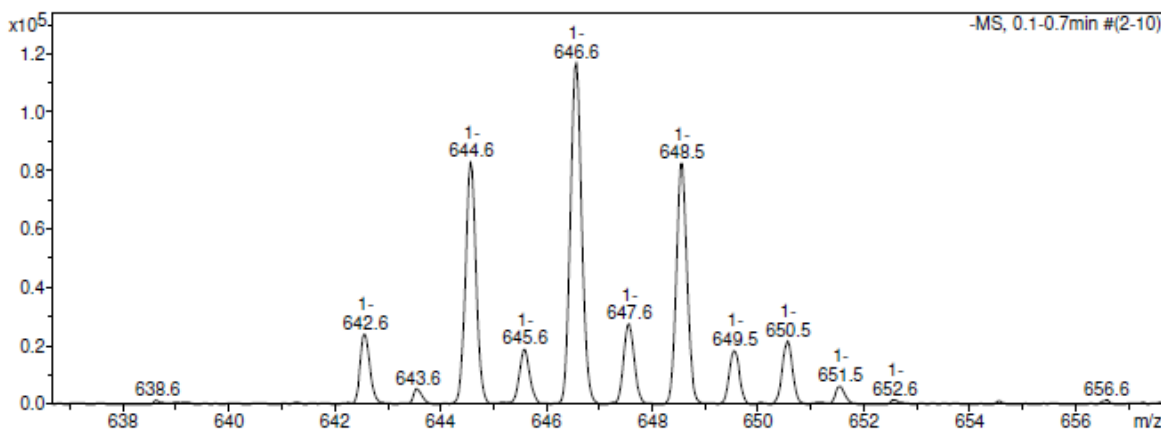


Graf 3: Zásobní roztok eosinu s větším rozlišením za základním píkem

Píky v modrém kruhu značí eosin s izotopy sodíku (Na). Relativní atomová hmotnost

$M_{\text{Na}} = 23$. Atomy sodíku nahradily protony v molekule eosinu. Píky v červeném kruhu značí eosin s izotopy draslíku

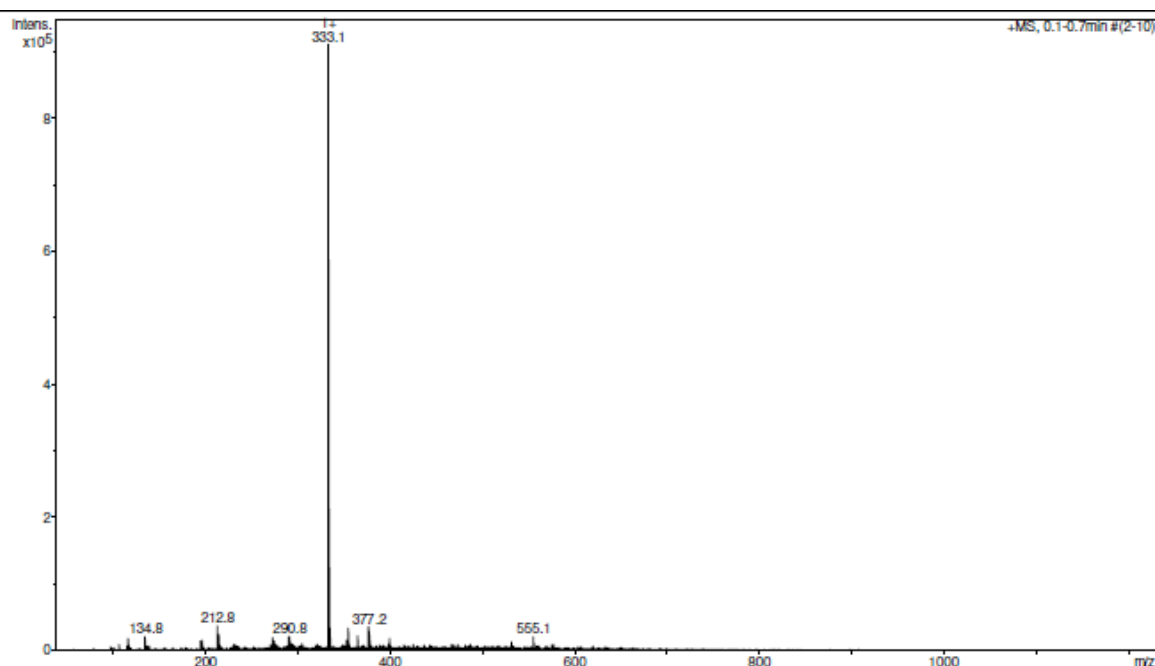
(K). Relativní atomová hmotnost $M_{\text{K}} = 39$.



Graf 4: Zásobní roztok eosinu s charakteristickým píkem ve velkém rozlišení v negativním módu

Měření bylo provedeno v negativním módu, což je patrné z čísla 1- zapsaného nad naměřenými hodnotami. Tímto způsobem se značí ztráta protonů.

Shodně jako eosin byly podrobeny analýze hmotnostních spekter i roztoky obsahující fluorescein. Jeho přítomnost byla opět prokázána pomocí světlování roztoků na transluminátoru.



Graf 5: Zásobní roztok fluoresceinu

V porovnání s předchozími grafy pro eosin se u fluoresceinu nevyskytuje struktura nýbrž pouze jeden charakteristický pík, jelikož fluorescein neobsahuje prvky mající více izotopů srovnatelně zastoupených v přírodní izotopové směsi. Bohužel ani v případě fluoresceinu se nepodařilo prokázat přítomnost reakčních produktů v roztocích.

DISKUZE

Cílem práce bylo získání vhodných biokonjugátů pro manipulaci optickou pinzetou. Protože jde o úkol poměrně rozsáhlý, bylo cílem této práce zavést některé užitečné reakce konjugační chemie a optimalizovat podmínky jejich provedení. S ohledem na snadnost analýzy produktů a meziproductů byly pro úvodní pokusy zvoleny fluorescein a eosin, tedy látky, které vykazují fluorescenci, a navíc mění během reakce mění svůj nábojový stav. To umožňuje jejich separaci pomocí gelové elektroforézy a fluorescenční detekci UV zářením. Eosin díky přítomnosti čtyř atomů Br v molekule rovněž vykazuje zcela charakteristickou strukturu v hmotnostním spektru. Jako konjugační partner byla zvolena molekula ethylendiaminu, která při vazbě na karboxylovou skupinu eosinu nejen mění náboj molekuly, ale výsledný produkt může být použit pro konjugace s dalšími biomolekulami. Kondenzační reakce byla prováděna s využitím karbodiimidové chemie, jako kondenzační činidlo bylo použito EDC. Při přímé reakci fluoresceinu s ethylendiaminem za přítomnosti EDC byly optimalizovány reakční podmínky a s pomocí elektroforézy bylo zjištěno, že látka, která vykazuje vlastnosti předpokládaného produktu nejlépe vzniká za nadbytku EDA, použití čerstvého EDC a v reakčním pufru o $\text{pH} = 6$. U roztoků obsahujících EDC je část objemu elektricky neutrální a tím pádem nemigruje z výchozích poloh. Původní nezreagované molekuly v důsledku svého záporného migrují nejrychleji, nejlépe znatelné ve slepých pokusech bez EDC, které slouží zejména pro kontrolu. Molekuly, u nichž proběhla reakce zcela ztratily náboj a ze základních poloh nemigrují. V čisté vodě reakce neprobíhá, třebaže pro jiné molekuly je tato možnost v literatuře popsána. Schéma reakce je zahrnuto v obrázku 17. Z důvodu eliminace průběhu reakce na obou aminoskupinách ethylendiaminu, byl ethylendiamin přidáván ve všech pokusech ve výrazném nadbytku oproti eosinu. Jako významný faktor se ukázalo i stáří použitého EDC. Požadovaných výsledků se dosahovalo pouze při použití čerstvého. Obdobná reakce s podobnými výsledky byla provedena také s fluoresceinem. Produkt reakce byl dále extrahován z gelu po elektroforéze a testován na přítomnost předpokládaného konjugátu metodou hmotnostní spektrometrie. V naměřených spektrech však struktura eozinových píků nebyla detekována, stejně jako ani pík odpovídající konjugátu s fluoresceinem v druhém případě. Toto pozorování je v rozporu s přímým optickým pozorováním intenzivní fluorescence extraktu, který byl pro hmotnostní analýzu použit. To totiž svědčí o tom, že molekula eosinu je ve vzorku nutně přítomna, byť nemusí tvořit správný reakční produkt. Proto by měla být ve spektru detekována. Je tedy pravděpodobné, že příčinou tohoto nesouladu je nějaký technický problém

v hmotnostní spektrometrii, který bude muset být identifikován a odstraněn (viz též níže). Jelikož požadovaný produkt nebyl prokázán, byla zvolena varianta reakce s reaktivním meziproduktem, který vzniká vazbou NHS na karboxylovou skupinu v přítomnosti EDC. Tento meziprodukt se podařilo připravit a prokázat metodou gelové elektroforézy a byly opět nalezeny podmínky jeho přípravy. Následné ověření hmotnostní spektrometrií po extrakci z gelu však opět neposkytlo předpokládaný výsledek, produkt opět ne byl ve spektru nalezen, jakož ani nesprávně zreagovaná nebo nezreagovaná molekula eosinu. Fluorescence vzorků přitom pozorována byla. Vysvětlení nezdařilých hmotnostních analýz není zcela zřejmé, je ale pravděpodobné, že došlo k potlačení signálu sledovaných molekul kontaminujícími látkami. K tomuto jevu může v hmotnostní spektrometrii docházet, pokud je ve vzorku přítomna látka, která má výrazně vyšší signál, přístroj se totiž přizpůsobí jeho intenzitě a nižší signály zaniknou v šumu. Toto znečištění mohlo být přítomno v samotném přístroji (v druhém případě opravdu ke znečištění krátce před naším pokusem došlo), pravděpodobnější je ale nežádoucí vliv některé ze složek našeho extraktu. V budoucnu tedy bude nezbytné podrobit extrakt detailnější analýze a pokusit se zjistit, která látka je pro analýzu nevhodná a jak by bylo třeba postupovat, aby výsledku bylo dosaženo. Jednou z možností je např. spřažení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií (LC-MS), protože v tomto případě jsou složky původní analyzované směsi před vstupem do spektrometru rozděleny, takže s danou látkou je nastříkáváno jen velmi malé množství nečistot. Jiným možným vysvětlením se v případě první reakce jevila možnost, že v důsledku přítomnosti zbytku nezreagovaného EDC v okamžiku dávkování na elektroforézu mohlo dojít k navázání eosinu/fluoresceinu na kratší fragmenty agarosy, které potom byly nastříknuty do spektrometru. Tyto látky by jednak mohly mít hmotnost mimo předpokládaný rozsah, jednak by šlo o více látek s nejednoznačným signálem. Tuto hypotézu podporuje i okolnost, že látky v elektroforéze nemigrovaly (což ale neměly ani z důvodu nulového náboje). Na druhou stranu se však tato teorie jeví nepravděpodobná proto, že stejný problém nastal i v druhém případě, kdy bylo EDC po reakci inaktivováno a látka v gelu migrovala. Identifikaci látek pomocí hmotnostní spektrometrie bude tedy ještě třeba lépe propracovat, aby byla spolehlivě použitelná a dávala možnost optimalizovat podmínky biokonjugačních reakcí pro další použití. Tyto výsledky vycházely v celku přesvědčivě při elektroforéze, bohužel velmi záhadně při analýze hmotnostním spektrometrem.

Při analýze spekter byly znatelné píky pro nezreagované fluorescenční látky, ale žádné píky pro vzniklé konjugáty i s uvážením izotopů přítomných prvků. Nacházely se zde píky o nižší molární hmotnosti než pozorované sloučeniny. Ty nás samozřejmě nezajímaly, ukazovaly pouze přítomnost přítomnost přidávaných látek a jejich reakce mezi sebou. Zarážející byly především píky s hodnotami výrazně vyššími než vypočtené možnosti, objevily se zde píky s téměř trojnásobnou hodnotou oproti eosinu. Z těchto důvodů jsme se pro další pokusy rozhodly proces bio konjugace rozdělit do dílčích kroků, které se budou analyzovat ihned po jejich provedení. Dále pro citlivější kontrolu výsledků z hlediska pozorovatele byl používán pouze eosin. První dílčí reakcí byla reakce eosinu s NHS. Po jejím proběhnutí byly znatelné požadované výsledky po proběhnutí elektroforézy a pořízení fotografií na transluminátoru, což reprezentuje obrázek 31. Následně byly tyto vzorky připraveny pro analýzu na hmotnostním spektrometru, kde se bohužel nepodařilo prokázat ani přítomnost fluoreskujícího eosinu. Eosin tam být musel, jelikož tyto vzorky po umístění na transluminátor fluoreskují, jak je zaznamenáno na obrázku 32. Obrázek 32. byl pořízen před jednou z analýz na hmotnostním spektrometru, aby byla přítomnost eosinu jasně prokázána. Ukázalo se, že neuspokojivé výsledky dává v posledních měsících hmotností spektrometr i pro ostatní měření na něm prováděná. Tento nepříjemný fakt je pracovníky fakulty intenzivně řešen. Bohužel pro naše pokusy to znamená nemožnost postoupit dál. Potřebujeme mít jistotu správného průběhu veškerých dílčích reakcí. Nicméně u pokusů kde se dá říct, že hmotnostní spektrometr nebyl zanesen či znečištěn, nám nevyšly řádné výsledky. To může být způsobeno reakcí s nízkomolekulárními zbytky agarózy nebo nepředpokládaným navazováním reaktantů. Pro vylepšení této charakteristiky je možné zařadit chromatografii před hmotnostní spektrometr. Chromatografie nám předem rozdělí jednotlivé molekuly. Analýze hmotnostním spektrometrem budou rozdělené molekuly přesněji analyzovány z hlediska zastoupení izotopů prvků účastnících se reakce. V každém případě je nutné provést ještě analýzu hmotnostním spektrometrem u všech dosud provedených pokusů, čehož z časových důvodů nebylo dosaženo.

ZÁVĚR

V průběhu provádění experimentu byly nalezeny optimální podmínky pro přípravu vybraných konjugátů metodou karbodiimidivé chemie. Jednalo se zejména o navázání molekul fluoresceinu a eosinu na molekuly ethylendiaminu nebo NHS. Všechny dílčí kroky prováděné v průběhu syntéz byly dovedeny do podmínek, kdy získáme sloučeniny vykazující předpokládané vlastnosti při analýze gelovou elektroforézou s fluorescenční detekcí. Bohužel se nepodařilo tyto molekuly prokázat pomocí hmotnostní spektrometrie, a to z důvodů technických problémů, na jejichž odstranění bude třeba dále pracovat.

V případě potvrzení identity reakčních produktů budou jak tyto látky, tak i optimalizované postupy, použity v dalších konjugačních reakcích k fluorescenčnímu značení biomolekul a jejich navazování na mikročástice za účelem experimentů v optické pasti

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Z. Vodrážka, Biochemie 1, Československá akademie věd, Praha, 1992, ISBN 80-200-0438-6
- [2] J. Dostál, P. Kaplan a kolektiv, Lékařská chemie 2. Bio organická chemie, Masarykova univerzita v Brně, Brno-Kraví Hora, 2003, ISBN 80-210-2731-2
- [3] Wikiskripta [online] dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za> [cit. 31. 10. 2017]
- [4] D. Patel, Gel electrophoresis, Oxford, 1. Title 2. Series, John Wiley&Sons Ltd, 1994, 137, ISBN: 0471943061
- [5] B. D. Hames, D. Rickwood, Gel electrophoresis of proteins a practical approach, Oxford, second edition 3. Series, Informaion Press Ltd, 1994, 383, ISBN: 0199630747(Hbk), ISBN: 0199630755(Pbk)
- [6] I. Kuřitka, Aplikovaná spektroskopie, přednášky, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín, 2017
- [7] P. Slobodian, Termická analýza materiálů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín, 2014, ISBN: 978-80-7454-403-3
- [8] L. Hernychová, Základy hmotnostní spektrometrie, přednášky, Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany Hradec Králové, Hradec Králové, dostupné z <http://docplayer.cz/7306126-Zaklady-hmotnostni-spektrometrie.html> [cit. 2. 12. 2017]
- [9] P. Praus, J. Vontorová, Analytická chemie II, Vysoká škola báňská, Technická univerzita Ostrava, Ostrava, 2015, ISBN: 978-80-248-3734-5
- [10] M. Holčápek, J. Fischer, Molekulová spektrometrie, přednášky, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice, 2017
- [11] M. Andersson, Construction of force measuring optical tweezers instrumentation and investigations of biophysical properties of bacterial adhesion organelles, Umeå, Department of physics, Umeå University, 2007, 91, ISBN: 978-91-7264-435-9
- [12] I. Heller, T. P. Hoekstra, G. A. King, E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, Chemical reviews, 2014, 21, 114, 3087, DOI: 10.1021/cr4003006

- [13] J. E. Molloy, M. J. Padgett, *Contemporary Physics*, 2002, 43, 4, 241,
DOI: 10.1080/0010751011605 1
- [14] J. B. Lambert, et al., *Organic Structural Spectroscopy*, New Jersey : Prentice Hall, sixth edition, John Wiley&Sons, 2001, 1148, ISBN 13: 978-0-471-72091-1
- [15] B. Stanislav, S. Voltrová, *Strukturální analýza organických sloučenin*, Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005, 152 str.
- [16] T. W. G. Solomons, C. B. Fryhle, S. A. Snyder, *Organic Chemistry*, USA, 11th edition, Wiley, 2013, 2014, ISBN: 978-1-118-32379-3
- [17] E. de Hoffman, V. Stroobant, *Mass spectrometry*, USA, third edition, Wiley, 2007, 502, ISBN: 978-0-470-03310-4
- [18] G. Montaudo, R. P. Lattimer, *Mass spektrometry of polymers*, CRC Press, 2001, 600, ISBN: 9781420037753
- [19] P. Zemánek, P. Jákl, *Čs. čas. fyz.*, 2012, 62, 2, 85
- [20] P. Zemánek, P. Jákl, *Čs. čas. fyz.*, 2012, 62, 2, 86
- [21] ústní sdělení RNDr. Marek Ingr, Ph.D.
- [22] Tandemová hmotnostní spektrometrie [online] dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C6790/um/MS_prednaska_10-12_bile_pozadi.pdf
[cit. 24. 4. 2018]
- [23] P. Skládal, *Metody značení a imobilizace biomolekul, přednášky*, Ústav biochemie PřF MU, Brno, 2007
- [24] Optical tweezers [online] dostupné z: https://blocklab.stanford.edu/optical_tweezers.html [cit. 12.5.2018]
- [25] Optical tweezers [online] dostupné z: <http://enacademic.com/dic.nsf/enwiki/180823>
[cit. 12.5.2018]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

u	pohyblivost iontu
v	lineární rychlost pohybu částice [m.s ⁻¹]
E	intenzita elektrického pole [V.m ⁻¹]
c	konstanta závislá na tvaru částic a na tloušťce elektrické dvojvrstvy
ϵ_r	relativní permitivita kapaliny = $\frac{\epsilon}{\epsilon_0}$
ϵ_0	permitivita vakua [8,8.10 ⁻¹² F.m ⁻¹]
D	viskozita prostředí [Pa.s]
ζ	elektrokinetický potenciál [V]
z	je nábojové číslo iontu [-]
F	Faradayova konstanta [96 485 C.mol ⁻¹]
f	frikční koeficient vztažený na 1 mol iontů
r	je poloměr iontu [m]
N_A	Avogadrova konstanta [6,022.10 ²³ mol ⁻¹]
%	procenta
M	molární hmotnost [g.mol ⁻¹]
NaOH	hydroxid sodný
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
NHS	N-Hydroxysuccinimide
DSC	N,N'-disukcinimidylkarbonát
SPDP	N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylditiopropionát)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
E_g	energetická díra
Br	brom
Na	sodík
K	draslík

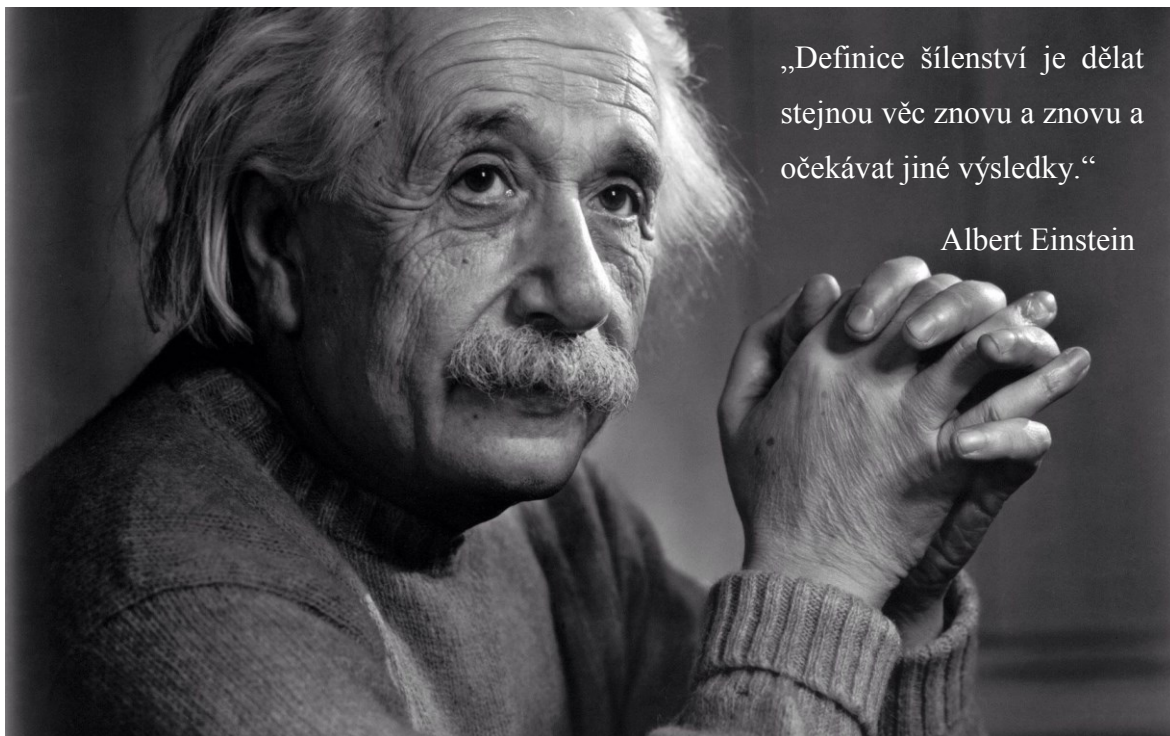
SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Zjednodušená ukázka přímého spojení [23].....	13
Obrázek 2: Zjednodušená ukázka spojení pomocí můstku [23].....	14
Obrázek 3: N,N'-disukcinimidylkarbonát (DSC) [23]	14
Obrázek 4: Obecná struktura vzniku spojení molekul pomocí homobifunkčního činidla, kde z značí toto činidlo [23]	14
Obrázek 5: N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylditiopropionát) (SPDP) poskytuje amidovou vazbu s biomolekulou nesoucí -NH ₂ skupinu a disulfidovou vazbu s molekulou nesoucí -SH skupinu [23]	15
Obrázek 6: Purinové báze.....	16
Obrázek 7: Pyrimidinové báze.....	16
Obrázek 8: Modifikační reakce RNA na části řetězce obsahující 2' hydroxyl. Modré vlnovky značí	16
Obrázek 9: Atak částí molekul elektrofilními (červenými šipkami) a nukleofilními (modrými šipkami)	17
Obrázek 10: Nukleofilní substituce v C6 pozici u uracilu s následným atakem C5 pozice pro elektrofilní atak [23].....	17
Obrázek 11: Ke vzniku sulfonovaného derivátu v přítomnosti nukleofilu (aminu) dochází pomocí transaminace. V slabě kyselé hydrolyze aminoskupiny na C4 a následně po alkalizaci se odštěpí hydrogen siřičitan. Proběhne konverze	18
Obrázek 12: Substituce diaminu jako poslední reakce při halogenaci cytosinu [23].	19
Obrázek 13: Derivatizované báze [23]	20
Obrázek 14: Průběh fosforamidové metody [23]	21
Obrázek 15: Vnášení amino nebo thioskupiny na konec DNA [23].....	21
Obrázek 16: Derivatizace hydroxylových skupin pomocí kyseliny chlor octové [23].	22
Obrázek 17: Aktivace karboxylu karbodiimidem [23].....	23
Obrázek 18: Vznik NHS derivátů [23].....	24
Obrázek 19: Reakce NHS s biomolekulou [23].....	24
Obrázek 20: Vznik thioamočovinového uskupení [23]	26
Obrázek 21: NHS-fluorescein [23].....	26
Obrázek 22: Schéma zapojení elektroforézy	30
Obrázek 23: Schéma hmotnostního spektrometru [6]	31
Obrázek 24: Schéma iontového zdroje [10].....	32
Obrázek 25: Schéma iontové pasti [6]	33

Obrázek 26: Zjednodušené schéma tandemového hmotnostního spektrometru [22]	34
Obrázek 27: Princip zachycení částic v optické pasti [25]	35
Obrázek 28: Schéma optické pasti [24].....	36
Obrázek 29: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru.....	42
Obrázek 30: Výsledek elektroforézy focený na transluminátoru.....	44
Obrázek 31: Molekula eosinu s vyznačením míst se zápornými náboji.....	45
Obrázek 32: Zkumavky s roztokem eosinu po reakci s NHS a následné extrakci do vody před analýzou na hmotnostním spektrometru.....	46
Obrázek 37: Citát.....	62

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zásobní roztok eosinu s charakteristickými píky mezi hodnotami 600 a 700 na ose m/z	47
Graf 2: Zásobní roztok eosinu s větším rozlišením před základním píkem v pozitivním modu	48
Graf 3: Zásobní roztok eosinu s větším rozlišením za základním píkem	48
Graf 4: Zásobní roztok eosinu s charakteristickým píkem ve velkém rozlišení v negativním modu	49
Graf 5: Zásobní roztok fluoresceinu	49



„Definice šílenství je dělat
stejnou věc znovu a znovu a
očekávat jiné výsledky.“

Albert Einstein

Obrázek 31: Citát

