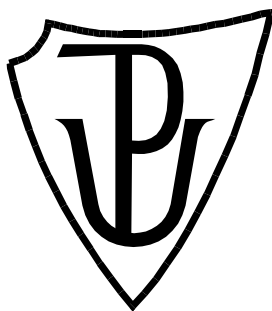


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Imunochemické metódy umožňujúce štúdium
včelieho vitellogenínu**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Ivana Rošková
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Denná
Vedúci práce:	Mgr. Jana Biová
Rok:	2021

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som poučená, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 28.07.2021

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Ivana Rošková
Názov práce	Imunochemické metódy umožňujúce štúdium včelieho vitellogenínu
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Jana Biová
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Vitellogeníny sú proteíny vyskytujúce sa u rôznych druhov živočíchov ako sú cicavce, vajcorodé živočíchy, ryby a hmyz. Z hmyzu sa výrazne uplatňuje u sociálneho hmyzu, u ktorého zastáva niekoľko významných funkcií. Vyskytuje sa aj u včely medonosnej, ktorá je chápaná ako dôležitý hmyz z ekonomického a hospodárskeho hľadiska. Mnohé výskumy doposiaľ potvrdili, že vitellogenín u včely medonosnej zohráva úlohu aj v jej imunitnom systéme, takže súvisí s celkovým zdravím nielen včely samotnej, ale je považovaný za indikátor zdravia aj včelstva ako celku. Táto práca sa zaoberá detekciou vitellogenínu vo vzorkách tukového telesa včely medonosnej imunochemickými metódami, ktoré sú známe svojou vysokou citlivosťou, ktorá je zaistená špecifickou väzbou antigén-protilátka. Metódy zvolené v tejto práci sú metódy ELISA a Western Blot. Boli otestované jednotlivé optimalizačné kroky oboch metód a boli vyhodnotené výsledky. Následne boli stanovené aj ďalšie kroky vzhľadom na dostupnú literatúru pre budúce experimenty.
Kľúčové slová	Vitellogenín, <i>A. mellifera</i> , včela medonosná, ELISA, Western Blot, imunochemické metódy, protilátky
Počet strán	51

Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Ivana Rošková
Title	Immunochemical methods providing the study of bee vitellogenin
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Biová
The year of presentation	2021
Abstract	Vitellogenins are group of proteins, which are present in various species of animals such as mammals, oviparous animals, fish and insects. In insects they significantly appear in social insects, in which they have several important functions. This also occurs in honey bees, which are considered as an important insect in agricultural and economic point of view. Many studies have confirmed that vitellogenin in honey bees also plays role in their immune system. It is related not only to the overall health of the bee itself, but it is also considered as an indicator of the health of the bee colony. The thesis deals with the detection of vitellogenin in the samples of the fat body of the honey bee by immunochemical methods which are known for their high sensitivity, which is ensured by specific antigen-antibody binding. The methods selected in the thesis are Western Blot and ELISA. The individual optimization steps of both methods were tested and the results were evaluated. Consequently, further steps were determined due to the available literature for future experiments.
Keywords	Vitellogenin, <i>A. mellifera</i> , honey bee, ELISA, Western Blot, immunochemical methods, antibodies
Number of pages	51

Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

Ciele práce	9
1 Úvod	10
2 Súčasný stav problematiky	11
2.1 Vitellogenín	11
2.1.1 Vitellogenín u včely medonosnej (<i>Apis mellifera</i>).....	12
2.1.1.1 Štruktúra včelieho vitellogenínu a detekované fragmenty vitellogenínu.....	13
2.1.1.2 Úloha vitellogenínu v imunitnom systéme včely medonosnej	14
2.1.1.3 Vitellogenínu a dlhovekosť u včely medonosnej.....	15
2.2 Imunologické a imunochemické metódy	18
2.2.1 Protilátky	18
2.2.1.1 Monoklonálne a polyklonálne protilátky	19
2.2.2 Western Blot.....	20
2.2.2.1 Primárne a sekundárne protilátky	20
2.2.2.2 Elektroforetická separácia proteínov	21
2.2.2.3 Blotovanie a blokovanie membrány	22
2.2.2.4 Inkubácia membrány s protilátkami a vizualizácia.....	23
2.2.2.5 Výhody, nevýhody a problémy metódy.....	25
2.2.3 ELISA.....	25
2.2.3.1 Varianty metódy ELISA	26
2.2.3.1.1 Priama a nepriama ELISA	26
2.2.3.1.2 Kompetitívna a nekompetitívna ELISA	26
2.2.3.2 Vizualizácia – premena substrátov enzýmami.....	27
2.2.3.3 Podmienky a problémy metódy	28
3 Experimentálna časť	29
3.1 Materiál	29
3.1.1 Chemikálie	29
3.1.2 Biologický materiál	29
3.1.3 Prístroje a vybavenie	29
3.1.4 Použité roztoky.....	30
3.2 Metódy	31
3.2.1 Stanovenie celkových proteínov	31
3.2.1.1 Stanovenie proteínov metódou podľa Bradforda.....	31
3.2.2 Western Blot.....	31

3.2.2.1	Príprava vzoriek tukového telesa	31
3.2.2.2	Detekcia vitellogenínu	31
3.2.2.2.1	Príprava gélov a SDS-PAGE - separácia proteínov	32
3.2.2.2.2	Blotovanie a blokovanie membrány	32
3.2.2.2.3	Farbenie membrány obsahujúcej Protein Ladder	33
3.2.2.2.4	Inkubácia membrány s protilátkami a vizualizácia vitellogenínu 33	
3.2.3	ELISA.....	34
3.2.3.1	Príprava vzoriek tukového telesa	34
3.2.3.2	Určenie vhodnej koncentrácie celkových proteínov	34
3.2.3.3	Detekcia vitellogenínu	35
4	Výsledky a diskusia.....	36
4.1	Detekcia vitellogenínu metódou Western Blot	36
4.1.1	Príprava vzoriek a stanovenie celkových proteínov vo vzorkách metódou podľa Bradforda	36
4.1.2	Detekcia a výsledky prvej analýzy.....	36
4.2	Detekcia vitellogenínu metódou ELISA	40
4.2.1	Príprava vzoriek a stanovenie celkových proteínov vo vzorkách metódou podľa Bradforda	40
4.2.2	Detekcia výsledky prvej analýzy	42
5	Záver.....	45
6	Literatúra	46
7	Zoznam použitých skratiek	51

Ciele práce

- Spracovanie literárnej rešerše s kľúčovými slovami vitellogenín, ELISA, Western Blot
- Otestovanie možností optimalizačných krokov v metóde Western Blot pre vzorky včely medonosnej
- Otestovanie možností optimalizačných krokov v metóde ELISA pre vzorky včely medonosnej

1 Úvod

Včela medonosná je dnes chápaná ako veľmi dôležitý hmyz a to z ekonomického a hospodárskeho hľadiska. Celé včelstvá sú čím ďalej, tým viac ohrozované nie len ľudskou činnosťou (používanie pesticídov, výrub lesov, premeny lúk a zelene na obytné zóny), ale aj bakteriálnymi a vírusovými ochoreniami. Mnohé štúdie sa práve z tohto dôvodu zamerali na celkové zdravie včely ako jednotlivca, ale aj včelstva ako celok.

Vitellogeníny sú proteíny vyskytujúce sa u rôznych druhov živočíchov, ako napríklad u cicavcov, vajcorodých živočíchov, rýb a hmyzu vrátane včely medonosnej (*A. mellifera*). Vitellogenín je považovaný za jedným markerom zdravia včely. Zohráva dôležitú úlohu v imunitnom systéme, v hormonálnej regulácii a pôsobí aj na starnutie a oxidačný stres. Svoju úlohu zohráva aj pri vyživovaní a bola potvrdená aj jeho transportná funkcia.

Pre detekciu a kvantifikáciu vitellogenínu je možné využiť rôzne metódy používané na stanovenie a detekciu proteínov. Konkrétne boli vybraté imunochemické metódy Western Blot a ELISA.

2 Súčasný stav problematiky

2.1 Vitellogenín

Vitellogeníny sú veľké (200 - 700 kDa) homológne fosfoglykolipoproteíny, ktoré sú často oligoméne v ich prirodzenej podobe (Sappington, 1998). Svoju úlohu zohrávajú ako u cicavcov, vajcorodých živočíchov, rýb, tak aj u hmyzu (Romano *et al.*, 2004). Sú exprimované v somatických tkanivách, ako je napríklad pečeň u stavovcov alebo tukové teleso u hmyzu (Romano *et al.*, 2004). Sú hlavné proteíny vaječného žĺtku, prostredníctvom ktorých vajcorodé zvieratá dodávajú živiny na podporu rozvoja potomstva (Romano *et al.*, 2004). Vitellogeníny sú typické hlavne pre dospelé jedince predovšetkým pre samičie pohlavie (Hayward *et al.*, 2010).

Vitellogeníny viažu lipidy a ostatné živiny pred tým ako sú sekretované do obehovej sústavy (krv u stavovcov, hemolymfa u hmyzu) následne sú prijímané oocytmi prostredníctvom receptorom sprostredkovanej endocytózy (Raikhel and Dhadialla, 1992). U stavovcov sú vitellogeníny po absorpcii dodatočne štiepené katepsínmi za vzniku lipovitelinov a fosvitínov (Raikhel and Dhadialla, 1992). Lipovitelíny sú väčšie hydrofóbne jednotky, ktoré pozostávajú z lipidov, zatiaľ čo fosvitíny sú menšie podjednotky s vysokým stupňom fosforylácie (Raikhel and Dhadialla, 1992). U hmyzu sú molekuly vitellogenínu podrobené proteolytickému štiepeniu po syntéze v tukovom telese a sú kotranslačne a posttranslačne modifikované. Tieto posttranslačné modifikácie umožňujú vitellogenínom transportovať sacharidy, lipidy a ostatné živiny do oocytov (Raikhel and Dhadialla, 1992).

Vitellogeníny boli najviac preskúmané (mechanizmy ich pôsobenia a tvorba) u niektorých druhov rýb. V roku 1914 bol imunologicky detekovaný špecifický antigén v sére samičky kapra obyčajného (*Cyprinus carpio*) počas rastu oocytov a bol pomenovaný ako ovumín (Uhlenhuth and Kodama, 1914) a až v roku 1969 po mnohých štúdiách proteínov telových tekutín hmyzu bol proteín špecifický pre samičky v období oogenézie nazvaný ako vitellogenín (*vitelline* + *genin*, čo znamená tvorba vaječného žĺtku) (Pan *et al.*, 1969). U mnohých druhov rýb bolo preukázané, že tento lipoproteín má okrem vyživovacej funkcie aj širokú škálu ďalších účinkov. Medzi účinky vitellogenínu u rýb patria aj napríklad antibakteriálne, antivírusové a antimykotické účinky (Ding *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011).

Vitellogenín je vývojovo starý proteín, ktorý sa bol nájdený aj u mnohých predkov zvierat (Hayward *et al.*, 2010). Nedávne štúdie u korálu *Euphyllia ancora* naznačujú, že imunologická funkcia vitellogenínu je pôvodná vlastnosť u zvierat, ktorá sa objavila súčasne s funkciou proteínov formujúcich vaječný žltok (Du *et al.*, 2017). Živočích, ktoré nie sú vajcorodé majú homológne proteíny, ktoré sa podieľajú na metabolizme lipidov a imunity, aj keď nie je spojená s reprodukciou (Hayward *et al.*, 2010; Baker, 1988).

Nedávno boli identifikované proteíny podobné vitellogenínu u niektorých druhov blanokřídeľného hmyzu a bolo dokázané, že minimálne jeden z týchto proteínov má ochrannú funkciu podobnú vitellogenínu v včely medonosnej (Heli *et al.*, 2017).

2.1.1 Vitellogenín u včely medonosnej (*Apis mellifera*)

Včelie vitellogeníny (180 kDa) nie sú u včely medonosnej exprimované len u reprodukčnej kasty včelstva – včelej matky, ale aj u trúdov a sterilných robotníč (Trenczek *et al.*, 1989) podobne ako u iných druhov sociálneho hmyzu (Arrese and Soulages, 2010). Vitellogenín cirkuluje v hemolymfe a je ukladaný v mieste jeho syntézy – v tukovom telese (Arrese and Soulages, 2010).

Koncentrácia vitellogenínov sa líši v závislosti od člena včelej kolónie a veku jedince. Koncentrácia sa pohybuje od nedetekovateľného množstva až po 40 – 70 % frakcie proteínov v hemolymfe. Obsah 40 % frakcie vitellogenínu z proteínov hemolymfy bol detekovaný u sterilných robotníč a obsah až 70 % bol detekovaný u včelích matiek znášajúcich vajíčka (Amdam *et al.* 2010).

U včelích robotníč počas života koncentrácia vitellogenínu v hemolymfe a v tukovom telese klesá a ovplyvňuje rôzne aspekty ich života (Munch and Amdam, 2010). V sedemdesiatych rokoch bolo zistené, že robotnice v zimnom období majú v hemolymfe vitellogenín v extrémnej miere (Fluri *et al.*, 1977). Na jeseň sa v miernom podnebnom pásme objaví prezimujúci fenotyp včelích robotníč s vysokým obsahom vitellogenínu v čase, kedy je nedostatok potravy a včelia kráľovná prestane klásť vajíčka a to aj napriek tomu, že dovtedy sa predpokladalo, že tento proteín produkujú hlavne reprodukčné kasty (Ratnieks, 1993). V lete a na jar je koncentrácia vitellogenínu u včelích robotníč podstatne nižšia (Ratnieks, 1993).

Štúdie predpokladajú, že vitellogeníny ovplyvňujú taktiež sociálne správanie, rezistenciu k oxidačnému stresu a tvárnosť dĺžky života (Amdam *et al.*, 2003, Nelson *et al.*, 2007, Seehus *et al.*, 2006). Je považovaný za všeobecný marker zdravia včely medonosnej (Amdam *et al.*, 2003).

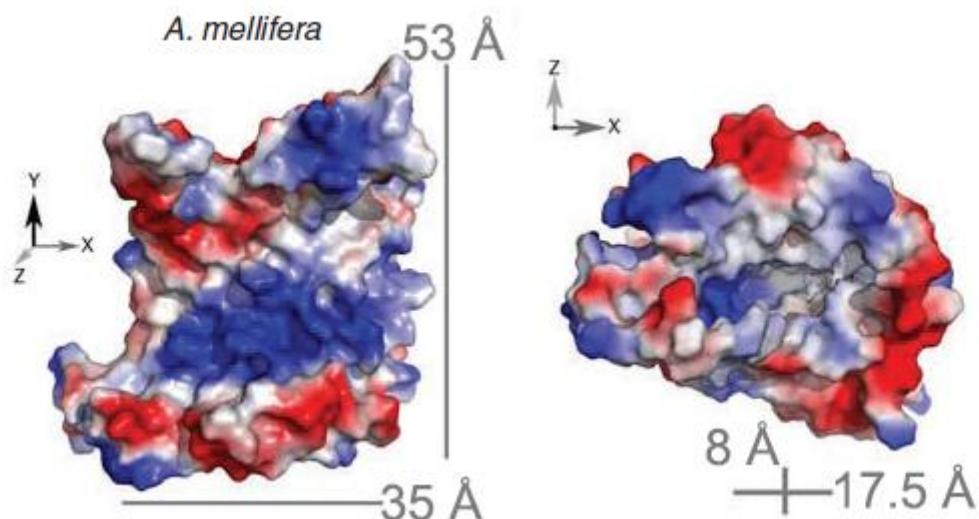
Mnohé štúdie naznačujú aj jeho úlohu vo fyziológii, v podpore vývoja embrya, vrátane rozlíšenia jednotlivých kasty (Guidugli *et al.*, 2005, Nelson *et al.*, 2007). U včely medonosnej (a u hmyzu) slúži aj ako receptor na rozpoznávanie určitých vzorových molekúl) a pre to predpokladané, že zohráva úlohu v imunitnom systéme hmyzu (Zhang *et al.*, 2011).

2.1.1.1 Štruktúra včelieho vitellogenínu a detekované fragmenty vitellogenínu

Jednotlivé hmyzie vitellogeníny sa líšia v špecifickej polohe polyserínových reťazcov a miesta štiepenia proteínu. Štiepenie celkovo vedie k rozdeleniu proteínu na jeden menší terminálny N – fragment a väčší terminálny C – fragment (Tufail and Takeda, 2008).

Včelí vitellogenín bol do roku 2010 pozorovaný v dvoch formách. Tieto formy sú: zrelá, kompletná 180 kDa forma proteínu detekovaná v hemolymfe a v tukovom telese a ľahší 150 kDa fragment detekovaný v reprodukčnom systéme včelej kráľovnej (Seehuus *et al.*, 2007) a v hypofaryngeálnych žľazách hlavy robotníc (Amdam *et al.*, 2003). Tu sú zložky vitellogenínu spracovávané ako potrava potrebná pre kŕmenie lariiev (Amdam *et al.*, 2003). 150 kDa jednotka vitellogenínu bola detekovaná už v roku 1990 v hemolymfe včelej matky počas purifikácie, avšak v tej dobe bol považovaný za produkt degradácie v tukovom telese (Wheeler and Kawooya, 1990).

Štúdia z roku 2010 ukázala, že vo vzorkách bol detekovaný ďalší fragment vitellogenínu. Tento fragment má molekulovú hmotnosť 40 kDa a bol detekovaný vo vysokej miere vo vzorkách tukového telesa (Havukainen *et al.*, 2011). V 40 kDa fragmente bol určený N – koniec pomocou hmotnostnej spektroskopie a bolo dokázané, že tento menší fragment je chýbajúca časť k väčšiemu 150 kDa fragmentu vitellogenínu (Havukainen *et al.*, 2011). Záverom tejto štúdie je, že včelie vitellogeníny sa štiepia na malý (40 kDa) fragment, zodpovedajúci N – terminálnej doméne vitellogenínu (Obr. 1) a na väčší (150 kDa) fragment, ktorý zodpovedá



Obr. 1 Priestorová štruktúra N – terminálnej domény vitellogenínu u včely medonosnej.
Prevzaté a upravené z Havukainen *et al.*, 2011

C - doméne vitellogenínu. Táto štúdia teda naznačila, že predtým detekovaný väčší fragment vitellogenínu teda nie je produkt degradácie v tukovom telese a oba fragmenty majú v tele včely svoju funkciu (Havukainen *et al.*, 2011). Ohľadom funkcie jednotlivých fragmentov stále prebieha diskusia a stále nie je známe, ktoré funkcie jednotlivé fragmenty majú (Havukainen *et al.*, 2011), existujú dohady, že práve funkcia týchto fragmetov súvisí práve s ich výskytom v tele včely (Havukainen *et al.*, 2011).

2.1.1.2 Úloha vitellogenínu v imunitnom systéme včely medonosnej

Včela medonosná je dnes chápaná ako ekonomicky a ekologicky dôležitý sociálny hmyz. Ako opel'ovač sa podieľa na globálnej ekologickej stabilite a poľnohospodárskej produkcii (Li *et al.*, 2019). Straty včelstiev spôsobené parazitmi a ochoreniami, ako je varroáza a klieštikom prenášané vírusové ochorenia alebo bakteriálne ochorenia ohrozujú poľnohospodársku výrobu a zásobovanie potravinami (Garibaldi *et al.*, 2011) indukovali množstvo výskumov zaoberajúcich sa imunitou včely ako jedinca, ale aj včelstva ako celok.

Vitellogenín sa viaže na baktérie a vzorové molekuly (LPS, PG, prípadne zymosan) (Salmela *et al.*, 2015). LPS je prítomný v bunkovej stene gram-negatívnych baktérií, PG v bunkovej stene gram-pozitívnych baktérií a zymosan je pôvodom z kvasiniek (Salmela *et al.*, 2015). Vitellogenín dominantne vykazuje schopnosť väzby s peptidoglykánom, následne s lipopolysacharidmi a najmenej so zymosanom. Táto

dominancia väzby s peptidoglykánom môže byť vysvetlená tým, že jeden z najväznejších patogénov včely medonosnej je práve *P. larvae*, ktorý je gram-pozitívna sporulujúca baktéria (Salmela *et al.*, 2015).

V tomto je podobnosť vitellogenínu s ľudskými lipoproteínmi, ktoré sa väžu okrem iného aj na povrchové štruktúry baktérií (Seong and Marzinger, 2004). Vitellogeníny sú taktiež považované za „predkov“ ľudského apoB, hlavnej zložky LDL na základe podobnosti homológnych častí (Baker, 1988). Predpoklad je, že kombinácia hydrofobicity a záporného náboja, vyvolá väzbu vitellogenínu so signálnymi molekulami PG a LPS (Salmela *et al.*, 2015).

Bola potvrdená aj úloha vitellogenínu ako transportného proteínu nie len na úrovni transportu živín v tele včelej matky, ale transportuje aj bakteriálne fragmenty do vajíčok, čím zvyšuje schopnosť vytvorenia rezistencie potomka voči danému patogénu (Salmela *et al.*, 2015). Bakteriálne fragmenty majú za úlohu vyvolať imunitnú odpoveď. To znamená, že sa podieľa aj na tzv. mechanizme TGIP (medzigeneračná imunitná aktivácia) a je schopný vysokej špecifity vo vyvolávaní imunitnej odpovede (Salmela *et al.*, 2015).

Vitellogenín je spájaný s imunitou včely medonosnej aj prostredníctvom priamej interakcie s imunitnými bunkami (Amdam *et al.*, 2004). Imunitné bunky hmyzu sa súhrne nazývajú hemocyty (Lowenberger, 2001). Reagujú na patogény ako sú baktérie tým, že ich fagocytujú, zapuzdria alebo vytvárajú okolo nich agregáty (Lavine and Strand, 2002). Vitellogenín a zdravé hemocyty sú spojené väzbou cez zinočnatý ión, ktorý je podľa predpokladu poskytnutý hemocytom vitellogenínom. Zinok hemocyty potrebujú pre svoju imunitnú funkciu (Amdam *et al.*, 2004). Štúdie naznačujú, že cirkulujúce imunitné bunky a hladiny lipoproteínov v krvi a hemolymfe sú vzájomne prepojené a súvisia so zápalom a zároveň aj so starnutím včiel (Inouye *et al.*, 2010). Za normálnych podmienok hlavne v lete bol zaznamenaný pokles počtu funkčných hemocytov u včelích robotníc a s vekom jedinca táto zmena koreluje so zníženou hladinou vitellogenínu a tým pádom aj so zníženou imunitnou spôsobilosťou (Amdam *et al.*, 2004; Amdam *et al.*, 2005, Schmid *et al.*, 2008).

2.1.1.3 Vitellogenínu a dlhovekosť u včely medonosnej

Včely medonosné poskytujú atraktívny model na identifikáciu molekulárnych mechanizmov regulujúce zmeny v dĺžke života. Robotnice a kráľovné sa vyvíjajú

z rovnakého genómu, avšak kráľovné žijú v priemere až 10-krát dlhšie (Page and Pang, 2001). Dlhovekosť včelej kráľovnej nie je na úkor reprodukcie. Kráľovné znášajú denne 2000 vajíec a žijú 1 – 3 roky a naopak robotnice s obmedzenou plodnosťou žijú 3 – 6 týždňov počas jari a leta v miernom podnebí (Page and Pang, 2001).

Posledné štúdie naznačujú, že vitellogenín je centrálna molekula regulujúca starnutie včely medonosnej (Munch and Amdam, 2010). Protistarnúci efekt lipoproteínu vitellogenín môže byť spôsobený jeho antioxidantnými vlastnosťami (Munch and Amdam, 2010). Podľa teórie voľných radikálov starnutia je jedným zo spôsobov ako potlačiť zápal a tým aj spomaliť fyziologické starnutie posilnenie antioxidantnej rovnováhy tela (Harman, 1956). Taktiež je vitellogenín najviac oxidovaný v porovnaní s ostatnými proteínmi hemolymfy počas oxidačného stresu u robotníc (Seehuus *et al.*, 2006). Vitellogenín má takú antioxidantnú funkciu, ktorou neutralizuje voľné radikály ako bolo preukázané u včely medonosnej *in vivo* a v bunkovej kultúre (Seehuus *et al.*, 2006, Havukainen *et al.*, 2013). To znamená, že extrémne koncentrácie vitellogenínu šírené v hemolymfe, v adipóznom tkanive, v mozoch a vo svaloch môžu prispievať k oneskoreniu starnutia a umožňujú pozoruhodnú dlhovekosť včelej kráľovnej oproti robotniciam (Havukainen *et al.*, 2013).

Najnovšie štúdie ukazujú, že vitellogenín sa podieľa na tvorbe zápalu u včely medonosnej aj iným mechanizmom než je jeho antioxidantná aktivita. Jeho génová expresia vzrastá pri zraneniach (Salmela *et al.*, 2016) a proteín sa následne viaže na nekrotické bunky. Vitellogenín má značnú afinitu k lipidovým časticiam prostredníctvom hydrofóbných interakcií a najmä k fosfatidylserínu, ktorý je vystavovaný na povrchu mrtvých a poškodených buniek (Havukainen *et al.*, 2013). Hmyzí vitellogenín sa viaže aj na lipozómy obsahujúce fosfatidylserín, do blistrov apoptických hmyzích buniek a na nekrotické bunky plné fosfatidylserínu, pričom má nízku schopnosť viazať sa na membránu zdravých hmyzích buniek alebo na lipozómy obsahujúce neutrálny fosfatidylcholín (Havukainen *et al.*, 2013). To dokazuje aj selektivitu väzby a α -helikálna doména má vyššiu afinitu k negatívne nabitým poškodeným bunkovým membránam (Havukainen *et al.*, 2013). V tomto vitellogenín vykazuje podobnosť aj s ľudskými protizápalovými proteínmi v krvi (Baker, 1988).

Štúdia z roku 2004 dokumentuje, že vitellogenín sa pravdepodobne podieľa na regulačnej ceste, ktorá riadi pozorovateľný pokles udržiavacej somatickej funkcie včelích robotníc (Amdam and Omholt, 2002). Robotnice sú funkčne sterilné a prostredníctvom juvenilného hormónu, ktorý je kľúčový gonotropný hormón u dospelého hmyzu, (Bownes, 1994) je hladina ich vitellogenínu ovplyvnená sociálnymi interakciami s ostatnými včelami. Výsledky štúdie naznačujú, že z hľadiska udržiavania bunkového imunitného systému je starnutie včelích robotníc pod sociálnou kontrolou (Amdam *et al.*, 2004).

2.2 Imunologické a imunochemické metódy

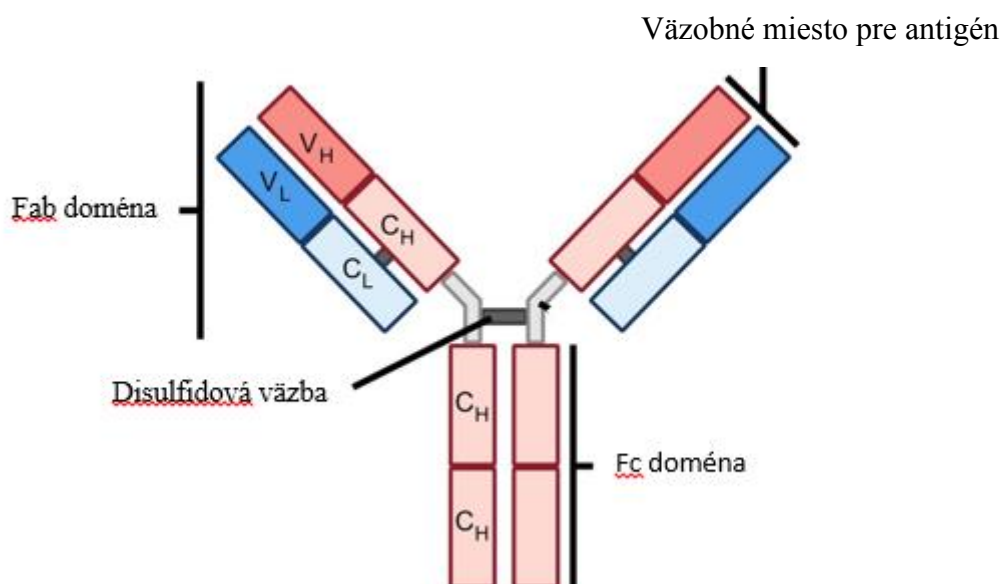
Imunochemické metódy sú založené na použití protilátok ako špecifických činidiel, pomocou ktorých je možné detekovať a stanoviť mnoho látok ako sú napríklad farmaká, toxické látky, hormóny a proteíny (Zajoncová, 2013). Imunologické metódy skúmajú rôzne interakcie medzi antigénom a protilátkou na základe špecifity ich väzby (Pingoud *et al.*, 2002). Ako príklad je možné uviesť metódy ELISA, EIA, RIA, EMIT a aglutinačné reakcie (Zajoncová, 2013).

Imunochemické metódy sú dnes využívané v mnohých odboroch. Sú súčasťou klinickej praxi v rámci lekárskeho a veterinárneho vyšetrenia. Využívajú sa na stanovenie vírusu HIV a hepatitídy (Xie *et al.*, 2007), špecifických imunoglobulínov pri alergiách (Ohashi *et al.*, 2009), patogénov špecifických infekcií ako je napríklad črevná infekcia (Walder and Forsgren, 1982), borelióza a mononukleóza (Zajoncová, 2013).

2.2.1 Protilátky

Protilátky sú proteíny, ktoré sú schopné rozpoznávať komponenty, ktoré sa nazývajú antigény. Antigény sú látky telu cudzie. Interakcia antigén-protilátka je vysoko špecifická a preto je využívaná v imunologických metódach (Pingoud *et al.*, 2002).

Protilátky sú produkované imunitným systémom cicavcov, tzv. B-bunkami. Svojou schopnosťou rozpoznávať určité komponenty sú schopné chrániť organizmus pred infekciami tým, že sa naviažu na vírusy, mikrobiálne toxíny a inaktivujú ich aktivitu (Alberts, 2002). Ich ochranný účinok nie je spôsobený len ich schopnosťou viazať sa na antigén, ale zúčastňujú sa ďalších reakcií, ktoré sú sprostredkované Fc doménou protilátky (Obr. 2) (Alberts, 2002).



Obr. 2 Štruktúra protilátky. C – konštantná doména, V – variabilná doména, H – ťažký reťazec, L – ľahký reťazec. Prevzaté a upravené z step1.medbullets.com/immunology

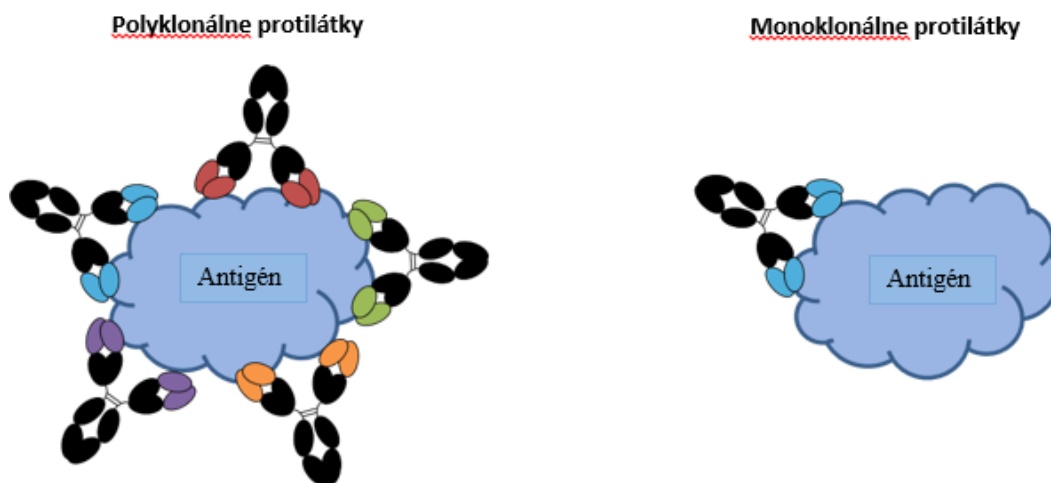
Najobvyklejšie protilátky sú molekuly tvaru písmena „Y“ (Obr. 2). Majú dve identické väzobné miesta pre antigén na konci každého ramena „Y“. Vďaka tým dvom väzobným miestam pre antigén sú protilátky označované ako bivalentné (Alberts, 2002).

Základná štruktúrna jednotka molekuly protilátky pozostáva zo štyroch polypeptidových reťazcov – dvoch identických ľahkých (light – L) reťazcov a dvoch identických ťažkých (heavy – H) reťazcov (Obr. 2). Tieto štyri reťazce sú držané pohromade kombináciou kovalentných a nekovalentných (disulfidových) väzieb (Alberts, 2002).

2.2.1.1 Monoklonálne a polyklonálne protilátky

Monoklonálne protilátky sú produkty jedného klonu plazmatických buniek. Majú unikátnu špecifitu, čiže sú monošpecifické (Obr. 3) proti jednému epitopu (Alberts, 2002).

Polyklonálne protilátky sú produktom normálnej imunitnej odpovedi. Pri polyklonálnej imunitnej odpovedi vzniká zmes mnohých rôznych imunoglobulínov a sú to produkty veľkého počtu klonov plazmocytov. Polyklonálne protilátky sú



Obr. 3 Rozdiely vo väzbe monoklonálnych a polyklonálnych protilátok. Prevzaté a upravené z absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibodies-as-tools/

polyšpecifické – špecifické k viacerým epitopom. (Obr. 3) Je to „zmes“ monoklonálnych protilátok (Alberts, 2002). Pri zámernej imunizácii zvierat'a je vznik polyklonálneho antiséra, ktorý reaguje s množstvom epitopom na určitom antigéne (Pingoud *et al.*, 2002).

2.2.2 Western Blot

Western Blot je jedna z najcitlivejších metód detekcie proteínov (Pingoud *et al.*, 2002). Umožňuje aj kvantifikáciu proteínov (Yang and Mahmood, 2012). Využitím Western Blotu je možné identifikovať špecifické proteíny z komplexnej zmesi proteínov. (Yang and Mahmood, 2012). Základná schéma metódy Western Blot sú obvykle nasledujúce kroky. Pri elektroforéze sú proteíny separované podľa veľkosti a následne prenesené blotovaním na membránu a potom sú ciele proteíny označené primárnou a sekundárnou protilátkou. Detekované a vizualizované sú enzymatickou reakciou (Yang and Mahmood, 2012).

2.2.2.1 Primárne a sekundárne protilátky

Primárna protilátka je špecifická k antigénu, ktorý je súčasťou molekuly separovaného proteínu, ktorý je potrebné detekovať. Variabilná oblasť primárnej protilátky (Obr. 2) rozpoznáva epitop na antigéne (Pingoud *et al.*, 2002). V organizme je primárna

protilátka produkovaná hostiteľským organizmom, ktorý je iného druhu než pôvodca antigénu. (Najafov and Hoxhaj, 2017).

Primárna protilátka nie je zvyčajne značená. Pre vizualizáciu sa používa sekundárna protilátka, ktorá interaguje s primárnou protilátkou taktiež na základe špecifity väzby (Najafov and Hoxhaj, 2017). Jedným z rozdielov medzi primárnou a sekundárnou protilátkou je aj ten, že sekundárna protilátka sa na rozdiel od primárnej obvykle neviaže na antigén, ale práve na primárnu protilátku. Sekundárne protilátky sú produkované organizmom, ktorý je odlišný od pôvodcu antigénu, ale aj od pôvodcu primárnej protilátky (Najafov and Hoxhaj, 2017).

2.2.2.2 Elektroforetická separácia proteínov

Elektroforéza je dôležitá separačná metóda. Využíva skutočnosť, že v elektrickom poli sa rozdielne pohybujú nabité častice (Pingoud *et al.*, 2002). Dnes sa v biochémií bežne využíva na analýzu biomolekúl proteínov a nukleových kyselín (Hames, 1998).

Na elektroforetickú separáciu proteínov sa pri metóde Western Blot najčastejšie využíva SDS-PAGE (Yang and Mahmood, 2012). Pri SDS-PAGE sú proteíny pred separáciou modifikované tvorbou komplexov s dodecylsírnanom sodným (sodium dodecyl sulphate – SDS) a vzniknuté komplexy majú prakticky rovnaký povrchový záporný náboj. Vďaka tomu sú v zónovom elektroforetickom usporiadaní proteíny separované podľa molekulovej hmotnosti a pohybujú sa smerom k pozitívnej elektróde (kolektív autorov, 2012, Yang and Mahmood, 2012). Táto elektroforéza je zvyčajne vykonávaná v usporiadaní na tenkej vrstve – medzi dvoma sklenenými doskami. Aby mohli komplexy SDS-proteíny vzniknúť, je nutné rozštiepiť disulfidové mostíky medzi proteínmi alebo vo vnútri reťazca proteínov redukujúcimi látkami, ako je napríklad merkaptoetanol alebo ditiotritol (kolektív autorov, 2012, Yang and Mahmood, 2012).

Pre získanie lepšieho výsledku pri delení proteínov je často využívaná diskontinuálna elektroforéza, ktorá umožňuje lepšie zaostrenie zón proteínov. (kolektív autorov, 2012). Systém diskontinuálnej elektroforézy musí mať niekoľko vlastností. Zaostrovací (koncentračný, horný) gél, v ktorom je vzorka koncentrovanejšia, je zložený polyakrylamidu o nižšej koncentrácii s veľkými pórmí. Tým je zaistený rovnaký pohyb proteínov bez separácie (Pingoud *et al.*, 2002). Deliaci gél (separačný, dolný) obsahuje polyakrylamid o vyššej koncentrácii a tým pádom

obsahuje menšie póry. Pri prechode proteínov deliacim gélom sú proteíny už separované na základe ich molekulovej hmotnosti a náboja (Pingoud *et al.*, 2002). Pri diskontinuálnej elektroforéze vzorka, zaostrovací a deliaci gél obsahujú obvykle chloridový anión, pričom elektródový tlmivý roztok obsahuje veľmi často glycínové ióny, prípadne ióny tricínové (Pingoud *et al.*, 2002).

Koncentrácia gélu sa volí od veľkosti separovaných proteínov, ktorá je vypočítaná podľa presne daného vzťahu (Yang and Mahmood, 2012). Zaostrovací gél a vzorkovací pufry obsahujú Tris-chloridový tlmivý roztok, ktorého pH je obvykle asi o dve jednotky nižší než má tlmivý roztok deliaceho gélu (kolektív autorov, 2012).

Gély sa pripravujú zmiešaním zložiek a polymerizácia sa štartuje pridaním najčastejšie TEMED a APS. Následne sa nalejú do medzi dve sklenené alebo plastové platne. Vzorky sú vložené do jamiek so vzorkovacím pufrom. Gél je následne pripojený k zdroju napätia a nechá sa prebiehať elektroforéza. Po prechode vzoriek zaostrovacím gélom sa v diskontinuálnom prevedení sa mení napätie (Yang and Mahmood, 2012).

2.2.2.3 Blotovanie a blokovanie membrány

Po separácii pomocou SDS-PAGE sú proteíny prenesené na membránu. Prenos je možné uskutočniť jednoduchou difúziou, kapilárne, vákuovo alebo účinkom elektrického poľa. Prenos účinkom elektrického poľa prebieha najčastejšie v sendvičovom usporiadaní v polosuchých alebo mokrých podmienkach. Membrána je umiestnená medzi povrch gélu a pozitívnu elektródu v sendviči (Obr. 4) (Yang and Mahmood, 2012).



Obr. 4 Sendvičové usporiadanie jednotlivých komponent pri prenose proteínov na membránu. Prevzaté a upravené z novusbio.com/application/western-blotting

Do sendviča patrí aj vláknitá podložka (špongia) namočená v blotovacom pufri, ktorá vlastne slúži ako zásobník pufru. Na každej strane a filtračné papiere chránia gél a membránu. Musí byť zabezpečený tesný kontakt gélu a membrány a membrána musí byť vždy umiestnená medzi gélom a pozitívnou elektródou. Ako membrány sa najčastejšie používajú nitrocelulózové alebo PVDF (polyvinylidén difluorid) membrány (Yang and Mahmood, 2012).

Prenos je možné uskutočniť v mokrých alebo polosuchých podmienkach. Pre porovnanie prenos v polosuchých podmienkach je rýchlejší a vyžaduje menšie množstvo pufru. Mokré podmienky zaisťujú spoľahlivosť a je využívaná hlavne pri prenose veľkých proteínov (Najafov and Hoxhaj, 2017). Rozdiel medzi polosuchými a mokrými podmienkami je v tom, že pri mokrých podmienkach je použitá špongia.

Blokovanie po prenose je v tomto procese dôležité. Membrána je inkubovaná s inertným proteínom ako je hovädzí sérový albumín (BSA), želatína alebo nízkoťučné mlieko. Je uskutočňované za účelom blokovania ostatných reakčných miest membrány, kde sa nenachádzajú žiadne zo separovaných proteínov. Tento krok je potrebné uskutočniť ešte pred inkubáciou s protilátkami (Pingoud *et al.*, 2002). Zabraňuje to nešpecifickej väzbe protilátok na membránu (Yang and Mahmood, 2012).

2.2.2.4 Inkubácia membrány s protilátkami a vizualizácia

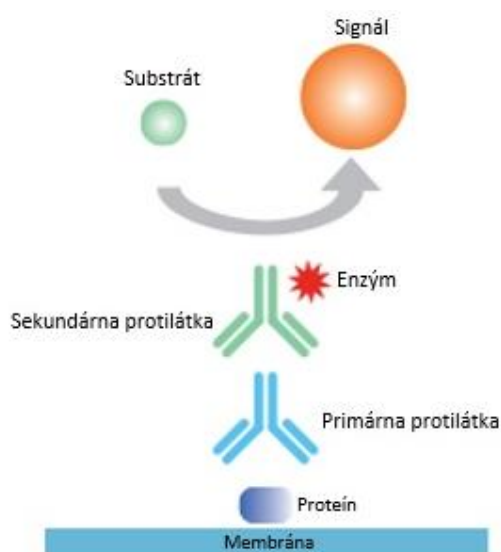
Membrána s proteínmi je inkubovaná v roztoku primárnej protilátky v pufri, aby sa primárna protilátka naviazala na cielený proteín. Po premytí je membrána inkubovaná v roztoku sekundárnej protilátky v pufri za účelom naviazania sekundárnej protilátky na primárnu protilátku. Po inkubácii je membrána premytá pufrom a následne je inkubovaná s roztokom substrátu za účelom vizualizácie cieleného proteínu (Yang and Mahmood, 2012).

Ideálne pre Western Blot sú monoklonálne protilátky z dôvodu ich vysokej špecifity. Polyklonálne protilátky sú často používané z dôvodu ich ceny a sú jednoduchšie na produkciu (Najafov and Hoxhaj, 2017). Koncentrácie protilátok sú volené podľa odporúčania od výrobcu a empirického overenia (Najafov and Hoxhaj, 2017). Protilátka je riedená v premývacom pufri ako je napríklad PBS alebo TBS-T. Po každej inkubácii je dôležité premývanie pufrom,

aby sa vymyli všetky nenaviazané protilátky, a aby nevzniklo pri vizualizácii sfarbenie na mieste, kde sa nenachádza meraný proteín (Yang and Mahmood, 2012).

Sekundárne protilátky pre Western Blot sú často konjugované s enzýmami, ktoré premieňajú chromogénny substrát, ako je napríklad alkalická fosfatáza (ALP, EC 3.1.3.1) alebo chrenová peroxidáza (HRP, EC 1.11.1.x) (Pingoud *et al.*, 2002).

Vizualizácia je možná s využitím premeny chromogénneho substrátu (Obr. 5) alebo chemiluminiscenčne (Pingoud *et al.*, 2002). Chromogénne substráty pre Western Blot sú iné ako pri metóde ELISA, pretože pri tejto vizualizácii musí byť zabezpečená stabilita a nerozpustnosť farby. Vhodné substráty pre chrenovú peroxidázu sú diaminobenzidín (hnedá farba) a 4-chlóro-1-naftol (fialová farba) a pre alkalickú fosfatázu 5-brómo-4-chlóroindoxyl fosfát v kombinácii s nitro-blue tetrazolium chloridom, ktoré po redukcii formujú modrú farbu. Použitie týchto farebných substrátov zaručuje citlivosť približne $1 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ (Pingoud *et al.*, 2002). Chemiluminiscenčná detekcia je citlivejšia (Pingoud *et al.*, 2002).



Obr. 5 Vizualizácia proteínov na membráne. Farbenie pomocou premeny chromogénneho substrátu konjugovaným enzýmom so sekundárnou protilátkou. Prevzaté a upravené z novusbio.com/application/western-blotting

2.2.2.5 Výhody, nevýhody a problémy metódy

Napriek tomu, že celá procedúra je jednoduchá, počas prevedenia sa môžu vyskytnúť rôzne problémy, ktoré môžu viesť k nečakaným výsledkom. Jedným z problémov

môžu byť nezvyčajné alebo neočakávané bandy, ktoré môžu nastať z dôvodu proteolytických reakcií (Yang and Mahmood, 2012).

Ďalšie problémy, ktoré môžu nastať – žiadne alebo veľmi slabé pásy, zlý kontrast s pozadím membrány a nerovnomerné pásy. Môžu byť spôsobené zlou voľbou pufru a napätia, vzduchovými bublinami pri blotovaní a nedostatočným premývaním. Taktiež je možné, že protilátky nie sú dostatočne špecifické pre typ detekovaného proteínu, prípadne sú v nedostatočnej alebo v príveľa koncentrovanej forme. Niektoré pufrý je možné používať aj viac krát a tie môžu byť kontaminované a celý proces rušia ako napríklad inaktiváciou konjugovaného enzýmu (Yang and Mahmood, 2012).

2.2.3 ELISA

Metóda ELISA už niekoľko rokov jednou z najbežnejších metód v biochemických a klinických laboratóriách (Crowther, 1995). Je to špecifická metóda, ktorá zaručuje porovnateľnú citlivosť s metódou RIA (Pingoud *et al.*, 2002). Používa sa na detekciu ako antigénov, tak aj protilátok (Zajoncová, 2013). Patrí k heterológnym testom. (Voller *et al.*, 1978)

Je uskutočňovaná vo viacerých variantách, ale jedným spoločným znakom je, že detekcia je založená na premene chromogénneho substrátu enzýmom. Ďalší spoločný znak je, že všetky varianty zahŕňajú krok separácie viazaného enzýmového konjugátu od voľného enzýmového konjugátu (Zajoncová, 2013).

Protilátky, ktoré sa používajú pre metódu ELISA sú podobne ako pre metódu Western Blot - monoklonálne alebo polyklonálne. Takisto môžu byť použité ako imobilizované na pevnom nosiči alebo vo forme roztoku. Dôležité je, aby protilátka alebo antigén boli naviazané na povrch nerozpustného nosiča bez straty imunoreaktivity. Taktiež je dôležité, aby imunologická reaktivita konjugátu, ale aj samotné enzýmy boli stabilné ako počas reakcie, tak aj počas skladovania (Zajoncová, 2013). Imobilizácia antigénov alebo protilátok na pevný nosič je na základe pasívnej adsorpcie (Voller *et al.*, 1978).

2.2.3.1 Varianty metódy ELISA

Hlavné prevedenia tejto metódy sú založené na charaktere kompetitívneho alebo nekompetitívneho charakteru (Obr. 6) (Zajoncová, 2013). Ďalšie dve varianty sú: priama a nepriama ELISA (Obr. 6) (Voller *et al.*, 1978).

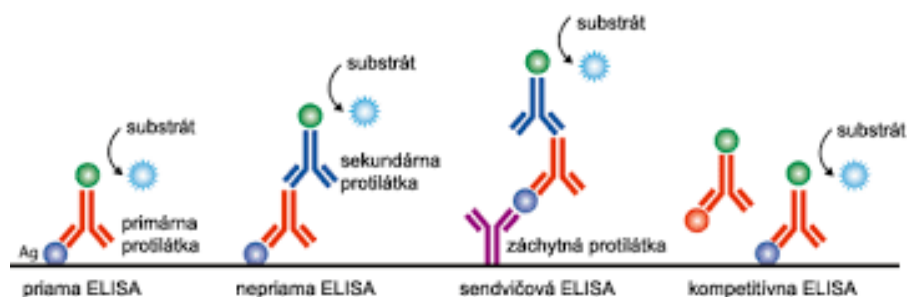
2.2.3.1.1 Priama a nepriama ELISA

Rozdiel medzi priamou a nepriamou ELISA technikou spočíva v tom, že pri priamej technike sa priamo na antigén naviaže po inkubácii enzýmom značená protilátka, prípadne na protilátku sa naviaže po inkubácii enzýmom značený antigén a následne je pridaný substrát. Pri nepriamom prevedení je na protilátku naviazaný na antigén ešte naviazaná značená sekundárna protilátka, čím sa zvyšuje citlivosť stanovenia (Voller *et al.*, 1978).

2.2.3.1.2 Kompetitívna a nekompetitívna ELISA

Nekompetitívna ELISA je vo všeobecnosti viac využívaná než jej kompetitívne prevedenie. Jedným z najbežnejších prevedení nekompetitívneho ELISA testu je sendvičová ELISA (Pingoud *et al.*, 2002).

Pri kompetitívnom prevedení antigén konjugovaný s enzýmom sa viaže na protilátku imobilizovanú na povrchu mikrotitračnej doštičky (povrch nerozpustného nosiča) a súperí o väzbu s neznačeným antigénom. Následne je doštička premytá pufrom a pridá sa chromogénny substrát. Vyvinutá farba je ďalej fotometricky kvantifikovaná na základe intenzity s použitím ELISA readeru. (Pingoud *et al.*, 2002). Pri tomto stanovení je možné zmiešať všetky komponenty naraz (simultánne) alebo postupne (Zajoncová, 2013). Kompetitívne stanovenie sa využíva hlavne na stanovenie protilátok, v tomto prípade súťažia neoznačené protilátky



Obr. 6 Porovnanie 4 prevedení metódy ELISA, prevzaté z kbg.fpv.ukf.sk

v analyzovanej vzorke s určitou danou koncentráciou o väzbu na obmedzené množstvo antigénu imobilizovaného na pevnom povrchu (Zajoncová, 2013).

Pri nekompetitívnom stanovení je potrebné na povrch pevného nosiča naviazať nadbytok protilátky špecifickej pre antigén. Po pridaní vzorky reaguje protilátka s antigénom a ostatné proteíny sú vymyté (Zajoncová, 2013). Druhou možnosťou je, že na povrch pevného nosiča je naviazaný antigén. Po pridaní vzorky alebo protilátky následne taktiež reagujú protilátky s naviazaným antigénom (Zajoncová, 2013). Komplex protilátka-antigén je premytý pufrom. Následne sa pridá sekundárna protilátka, ktorá je značená (Pingoud *et al.*, 2002). Sekundárna protilátka reaguje s naviazaným antigénom, ale cez druhý rozdielny epitop (Zajoncová, 2013). Prípadne sekundárna protilátka reaguje s primárnou protilátkou. Prítomnosť tohto komplexu je detekovaná spektrofotometricky po pridaní chromogénneho substrátu (Pingoud *et al.*, 2002).

2.2.3.2 Vizualizácia – premena substrátov enzýmami

Detekcia a vizualizácia je uskutočňovaná premenou chromogénneho substrátu enzýmom, ktorý je konjugovaný s protilátkou. (Pingoud *et al.*, 2002).

Je požadované, aby enzýmy použité na značenie a premenu substrátu musia mať vysoké číslo premeny a musia premieňať substrát, ktorý produkuje stabilný, rozpustný a ľahko merateľný produkt. Z ekonomických príčin musia byť enzýmy zároveň lacné a zároveň dostupné vo vysokej čistote (Voller *et al.*, 1978). Použité enzýmy musia mať vysokú špecifickú aktivitu, čo znamená, že premieňajú veľké množstvá substrátu na detekovaný produkt. Enzýmy, ktoré sú použité na značenie sa nesmú prirodzene vyskytovať v analyzovanej biologickej tekutine (Zajoncová, 2013).

Meraním katalytickej reakcie enzým-substrát je stanovené množstvo viazaného enzýmového konjugátu po pridaní substrátu. Jedna molekula enzýmu je schopná počas niekoľkých minút premeniť veľké množstvo molekúl substrátu na molekuly produktu. Táto zmena musí byť ľahko detekovateľná zmenou sfarbenia (Zajoncová, 2013).

Enzýmy používané pre metódu ELISA sú napríklad alkalická fosfatáza (ALP, EC 3.1.3.1) alebo chrenová peroxidáza (HRP, EC 1.11.1.x), ktoré sú konjugované s antigénom alebo protilátkou. Tento komplex antigén-protilátka je detekovaný

na imobilizovanom povrchu (Pingoud *et al.*, 2002). Ako ďalší enzým využívaný v metóde ELISA je β -D-galaktozidáza (EC 3.2.1.23) (Zajoncová, 2013).

Ako substrát je HRP je vhodný 3,3',5,5'-tetrametylbenzidín a pre ALP je to *p*-nitrofenyl fosfát (Pingoud *et al.*, 2002). Ako ďalší substrát sa pre peroxidázu používa peroxid vodíku v prítomnosti chromogénu 1,2-diaminobenzénu, ktorý poskytuje žltó-oranžový produkt. Ako substrát pre β -D-galaktozidázu sa používa *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozid. Táto reakcia poskytuje žltý produkt. Ako substrát pre alkalickú fosfatázu je možné použiť nitrofenylfosfát, ktorý po reakcii poskytuje farebný produkt – nitrofenolát (Zajoncová, 2013).

Na zastavenie reakcií premeny substrátu sa využívajú činidlá. Ako činidlo na zastavenie peroxidázovej reakcii sa používa 1 mol . l⁻¹ roztok kyseliny sírovej a v prípade alkalickéj fosfatázy, je týmto činidlom roztok hydroxidu sodného (Zajoncová, 2013). Samotné zafarbenie a miera zafarbenia je meraná spektrofotometricky pomocou readeru (Pingoud *et al.*, 2002).

2.2.3.3 Podmienky a problémy metódy

Je dôležité, aby boli presne dodržiavané podmienky. Jednou z nich je optimálna koncentrácia protilátky alebo antigénu používaných pre stanovenie. Optimálne inkubačné časy a inkubačné teploty pre vzorky, aby antigény a protilátky nedegradovali. Musí byť zvolený optimálny substrát a taktiež musí byť dodržaný čas reakcie premeny substrátu na produkt (Voller *et al.*, 1978). V prípade nedodržania týchto podmienok je možné, že stanovenie a detekcia budú nepresné.

3 Experimentálna časť

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- AppliChem: dodecylsírán sodný, hovädzí sérový albumín
- Bio-Rad: Laemmli vzorkový roztok
- Carl Roth: 3,3',5,5' - tetrametylbenzidín, hovädzí sérový albumín, tetrametyletyléndiamín
- Fisher Scientific: metanol
- Lach-Ner: hydrogénuhličitan sodný, hydroxid sodný, chlorid sodný, kyselina citrónová monohydrát, uhličitan sodný
- Lachema: chlorid horečnatý
- Penta: kyselina chlór vodíková
- Sigma Aldrich: β -merkaptóetanol, dihydrogénfosforečnan sodný hydrát, dimetylsulfoxid, glycín, hydrogénfosforečnan sodný dodekahydrát, kyselina sírová, peroxodisírán amónny, sekundárna protilátka (ELISA) konjugovaná s HRP, sekundárna protilátka (WB) konjugovaná s ALP, sušené mlieko, tris(hydroxymetyl)aminometán
- Primárna protilátka pre Vg – pripravená na pracovisku v Českých Budejoviciach

3.1.2 Biologický materiál

zimné včely (november 2019)

jarné včely (marec 2020)

3.1.3 Prístroje a vybavenie

Analytické váhy (Denver Instrument, USA)

Autokláv horizontálny (Tuttnauer, USA)

Digitálne predvážky (Radwag, Poľsko)

Elektroforetická aparatura (Bio-Rad, USA)

Elektromagnetické miešadlo so zahrievaním (Biosan, Lotyšsko)

Chladená centrifúga (Eppendorf, Nemecko)

Mikroskop (BEL Photonics, Taliansko)

Nitrocelulózová membrána (Merck Millipore, USA)

pH-meter so sklenenou elektródou (XS Instruments, Taliansko)

PVDF membrána, veľkosť pórov 0,45 μm (Millipore corporation, USA)
 Semi-dry transfer aparátúra (Bio-Rad, USA)
 Spektrofotometrický reader PowerWave XS (BioTek Instruments, USA)
 Termotrepačka (Biosan, Lotyšsko)
 Trepačka orbitálna (Biosan, Lotyšsko)
 Ultrazvukový homogenizátor (Kraintek, Česká republika)
 Vortex (Biosan, Lotyšsko)

3.1.4 Použité roztoky

- Coating tlmivý roztok pH 9,6: 4,24 g.l⁻¹ Na₂CO₃, 5,04 g.l⁻¹ NaHCO₃
- Premývací tlmivý roztok pH 7,5 10 x koncentrovaný: 87,64 g.l⁻¹ NaCl, 3,62 g.l⁻¹ NaH₂PO₄, 1,48 g.l⁻¹ Na₂HPO₄
- Premývací tlmivý roztok pre použitie: premývací tlmivý roztok 1x s 1 % objemu Tween 20
- Roztok mlieka: 5% roztok sušeného mlieka v premývacom pufri (premývací tlmivý roztok pre použitie)
- Fosfocitrátový tlmivý roztok s perborátom sodným pH 6,4: 24 ml 0,2 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄, 26 ml 0,1 mol.l⁻¹ kyselina citrónová, 0,4 g.l⁻¹ perborát sodný
- TMB: 100 mmol.l⁻¹
- ELISA substrát nekomerčný pre použitie: 1 ml fosfocitrátového pufru s perborátom sodným pH 6,4, 25 μl 100 mmol.l⁻¹ TMB
- Kyselina sírová: 0,5 mol.l⁻¹
- 10% APS
- AA/BIS 30%/0,8%
- Tris-HCl: 1,5 mol.l⁻¹, pH 8,8
- 10% SDS
- Tris-HCl: 0,5 mol.l⁻¹, pH 6,8
- 5% BSA v 1x TBS
- 10x elektródový roztok: 30,25 g.l⁻¹ Tris, 144,1 g.l⁻¹ glycín, 10 g.l⁻¹ SDS
- 8% kyselina octová
- 20% blotovací roztok: 3,025 g.l⁻¹ Tris, 14,41 g.l⁻¹ glycín, 20 % objemu metanolu
- 5% blotovací roztok: 3,025 g.l⁻¹ Tris, 14,41 g.l⁻¹ glycín, 5 % objemu metanolu
- 5x TBS roztok pH 7,5: 12,1 g.l⁻¹ Tris, 146,1 g.l⁻¹ NaCl
- TBS-T (0,1% Tween): 1x TBS roztok, 0,1% objemu Tween 20

- Tlmivý roztok pre alkalickú fosfatázu: 100 mmol.l⁻¹ NaCl, 50 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 9,5)
- Substrát pre alkalickú fosfatázu: 50 mg.ml⁻¹ BCIP v 100% DMFA, 50 mg.ml⁻¹ NBT v 70% DMFA

3.2 Metódy

3.2.1 Stanovenie celkových proteínov

3.2.1.1 Stanovenie proteínov metódou podľa Bradforda

Bola zostavená kalibračná rada zo štandardných roztokov BSA v pufrí totožnom so vzorkou (vzorky určené pre metódu ELISA v coating tlmivý roztok a pre vzorky určené pre metódu Western Blot v Tris-HCl pufrí o pH 6,8) o koncentráciách 1,2; 1; 0,8; 0,6; 0,4 a 0,2 mg.ml⁻¹. Reakčná zmes bola pripravená z 200 µl Bradfordového činidla (riedeného 1:4), 45 µl destilovanej vody a 5 µl štandardu/vzorky/pufri.

Zmes bola inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote a absorbancia roztokov bola odčítaná spektrofotometricky pomocou readeru pri vlnovej dĺžke 565 nm. Z absorbancie blanku a štandardných roztokov BSA bola zostavená kalibračná krivka a z rovnice grafu boli určené koncentrácie celkových proteínov vo vzorkách.

3.2.2 Western Blot

3.2.2.1 Príprava vzoriek tukového telesa

Tukové teleso včelích robotníc bolo naizolované z jednotlivých včiel. Celá izolácia bola uskutočnená na ľade v Ringem roztoku. Bol pridaný Tris-HCl tlmivý roztok pH 6,8 (50 µl pufru pre vzorky tukového telesa zimných včiel a 30 µl pufru pre vzorky tukového telesa jarých včiel) a vzorka bola 2 – 5 minút sonifikovaná za súčasného chladenia. Vzorka bola následne centrifugovaná 10 minút pri teplote 4 °C a otáčkach 12 000 g. Supernatant bol odobraný do čistej Eppendorfovej skúmavky a skladovaný v mrazničke pri – 30°C.

3.2.2.2 Detekcia vitellogenínu

Množstvo pridané do každej jamky 1,65– 6,41 mg.ml⁻¹ . Vzorky pred použitím boli zmiešané v pomere 1:1 s Laemmli vzorkovým pufrom, ktorý bol pred použitím zmiešaný s β-merkaptoetanolom podľa odporúčania výrobcu. Vzorky s Laemmli vzorkovým pufrom boli inkubované 5 minút pri teplote 95 °C.

3.2.2.2.1 Príprava gélov a SDS-PAGE - separácia proteínov

Pri príprave 7% deliaceho gélu boli pridané všetky roztoky (Tab. 1) a polymerizácia gélu bola naštartovaná prídavkom 10% roztoku APS. Roztok bol naliaty medzi sklíčka (0,75 mm) v nalievacej komôrke asi 1 cm pod okraj hrebienka a bol prevrstvený niekoľkými kvapkami n-butanolu. Po stuhnutí deliaceho gélu bol odstránený n-butanol, premytý vodou a opatrne vysušený. Následne bol pripravený 4% zaostrovací gél pridaním všetkých roztokov (Tab. 1) a polymerizácia gélu bola naštartovaná prídavkom 10% roztoku APS. Zaostrovací gél bol naliaty medzi sklíčka na gél deliaci. Po naliatí zaostrovacieho gélu bol zasunutý hrebienok a gél postupne tuhol.

Stuhnuté gély boli vybraté zo stojana a na sklíčka bola zaznamenaná hranica medzi deliacim a zaostrovacím gélom a poloha jamiek pred odstránením hrebienka. Sklíčka boli prenesené do elektroforetických komôrok. Do elektroforetickej komory boli pridaný elektródový roztok. Do jamiek bolo pridaných 10 μ l zmesi vzorky s Laemmli vzorkovým roztokom a do jednej jamky bolo pridaných 8 μ l roztoku Protein Ladder. Ako počiatočné napätie bolo použitých 100 V a po zaostrení vzoriek v géle boli napätie zvýšenie na 200 V pre prechod vzoriek deliacim gélom.

3.2.2.2.2 Blotovanie a blokovanie membrány

Gél bol po elektroforéze prenesený do blotovacieho pufru (gél s proteínmi pre prenos na PVDF membránu do 20% blotovacieho pufru a gél s proteínmi pre prenos na nitrocelulózovú membránu do 5% blotovacieho pufru).

Tab. 1 Objemy jednotlivých roztokov v mililitroch použitých na prípravu gélov (2 gély – 10 ml)

Typ gélu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5 mol.l ⁻¹ Tris-HCl (pH 8,8)	0,5 mol.l ⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8)	dH ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
7% deliaci gél	2,3	2,5	0	3,8	0,1	0,01	0,07
4% zaostrovací gél	1,3	0	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

PVDF membrána bola pred inkubáciou v blotovacom pufri namočená v metanole. Gél, filtračné papiere a membrána boli v blotovacom pufri inkubované 10-20 minút. Bol zostavený sendvič podľa návodu v poradí filtračný papier, membrána, gél a filtračný papier v transferovej komore prístroje Trans-Blot Semi Dry. Takto pripravený sendvič bol blotovaný 3 hodiny pri napätí 100 V.

Po blotovaní bola membrána rozdelená na časť s proteín laddrom a na časť s proteínmi. Časť membrány obsahujúcej proteíny bola v chladničke blokovaná 2 hodiny na trepačke (50 rpm) v roztoku 1xTBS 5% BSA.

3.2.2.2.3 Farbenie membrány obsahujúcej Protein Ladder

Časť membrány obsahujúcej Protein Ladder bola 8 minút namočená v roztoku amidočerni. Následne bola membrána ponorená 3x2 minúty v 8% roztoku kyseliny octovej. Po odstránení prebytočnej farby kyselinou octovou bola membrána vysušená na filtračnom papieri.

3.2.2.2.4 Inkubácia membrány s protilátkami a vizualizácia vitellogenínu

Membrána obsahujúca separované proteíny bola premytá 3x10 minút roztokom 1x TBS-T (0,1% Tween) na trepačke (50 rpm) v chladničke. Membrána bola následne cez noc inkubovaná v roztoku primárnej protilátky (primárna protilátka bola riedená 1:10 000 v roztoku 1x TBS-T (0,1% Tween)) na trepačke (50 rpm) v chladničke.

Membrána bola premytá 3x10 minút roztokom 1x TBS-T (0,1% Tween) na trepačke (50 rpm) v chladničke. Následne bola membrána 1 hodinu inkubovaná v roztoku sekundárnej protilátky konjugovanej s alkalickou fosfatázou (protilátka bola riedená 1:5 000 v roztoku 1x TBS-T (0,1% Tween)) na trepačke (50 rpm) v chladničke.

Membrána bola premytá 3x10 minút roztokom 1x TBS-T (0,1% Tween) na trepačke (50 rpm) v chladničke. Počas premývania membrány bol pripravený čerstvý roztok obsahujúci 10 ml pufru pre alkalickú fosfatázu, 16,5 µl NBT a 8,25 µl BCIP pre farbenie PVDF membrány. Pre farbenie nitrocelulózy membrány bol pripravený čerstvý roztok obsahujúci 10 ml pufru pre alkalickú fosfatázu, 24,75 µl NBT a 12,37 µl BCIP. Membrána bola vložená do roztoku na trepačke (50 rpm) a po zviditeľnení bandov bola membrána premytá v destilovanej vode a vysušená na filtračnom papieri.

3.2.3 ELISA

3.2.3.1 Príprava vzoriek tukového telesa

Tukové teleso včelích robotníc bolo naizolované z jednotlivých včiel. Celá izolácia bola uskutočnená na ľade v Ringem roztoku. Bol pridaný coating tlmivý roztok (50 µl pufru pre vzorky tukového telesa zimných včiel a 30 µl pufru pre vzorky tukového telesa jarých včiel) a vzorka bola 2 – 5 minút sonifikovaná za súčasného chladenia. Vzorka bola následne centrifugovaná 10 minút pri teplote 4 °C a otáčkach 12 000 g. Supernatant bol odobraný do čistej Eppendorfovej skúmavky a skladovaný v mrazničke pri -30 °C.

3.2.3.2 Určenie vhodnej koncentrácie celkových proteínov

Do prvej jamky ELISA doštičky bolo pridaných 100 µl Coating pufru so 100 µl zmesnej vzorky. Do každej ďalšej jamky bolo pridaných 100 µl z predošlej jamky a 100 µl pufru. Do blanku bolo pridaných len 100 µl Coating pufru. Doštička bola inkubovaná cez noc pri teplote 4 °C.

Nasledujúci deň boli všetky jamky ELISA doštičky premyté. Do každej jamky bolo pridaných 170 µl premývacieho pufru. Jamky bolo premyté takým spôsobom, že po pridaní premývacieho pufru bol tento roztok vždy aspoň 7-krát nasatý do pipety a vypustený naspäť do jamky. Na záver bol celý roztok odstránený vytrepaním z jamiek. Celý proces premývania bol uskutočnený 3-krát.

Povrch jamiek bol blokový 200 µl 5% roztoku mlieka a doštička bola inkubovaná 2 hodiny pri 37 °C a miernom trepaní (230 rpm). Premytie doštičky bolo totožné s premývaním v predchádzajúcom kroku. Do jamiek bola pridaná primárna protilátka o objeme 100 µl (primárna protilátka bola riedená v premývacom pufri 1:15 000). Doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri 37 °C a miernom trepaní (230 rpm).

Po premytí doštičky bolo do každej jamky pridaných 100 µl sekundárnej protilátky (sekundárna protilátka bola riedená v premývacom pufri 1:8 000). Doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri 37 °C a miernom trepaní (230 rpm). Po inkubácii doštičky so sekundárnou protilátkou bola doštička premytá minimálne 4-krát. Následne bolo pridaných 200 µl premývacieho roztoku, ale bez opätovného nasatia do pipety. Roztok bol ihneď odstránený vytrepaním. Pridanie premývacieho roztoku bez nasávania do pipety bolo zopakované minimálne 2-krát tak, aby v jamkách neostali žiadne bubliny.

Do jamiek bolo pridaných 100 μl ELISA substrátu a doštička bola inkubovaná 45 minút pri 37 °C a miernom trepaní (230 rpm) bez prístupu svetla. Reakcia bola po 45 minútach zastavená 50 μl 0,5 mol.l⁻¹ kyseliny sírovej. Intenzita sfarbenia (absorbancia) bola odčítaná spektrofotometricky pomocou readeru pri vlnovej dĺžke 450 nm.

Boli určené koncentrácie celkových proteínov v jednotlivých jamkách na základe riedenia. Po odčítaní absorbancie a farebného porovnania jamiek bol určený rozsah koncentrácie vhodnej na detekciu vitellogenínu vo vzorkách.

3.2.3.3 Detekcia vitellogenínu

Do každej jamky ELISA doštičky bolo pridaných 100 μl Coating pufru so 100 μl vzorky o koncentrácii 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ celkových proteínov. Do blanku bolo pridaných len 100 μl Coating pufru. Doštička bola inkubovaná cez noc pri teplote 4 °C. Nasledoval rovnaký postup ako v kapitole 3.2.3.2.

4 Výsledky a diskusia

4.1 Detekcia vitellogenínu metódou Western Blot

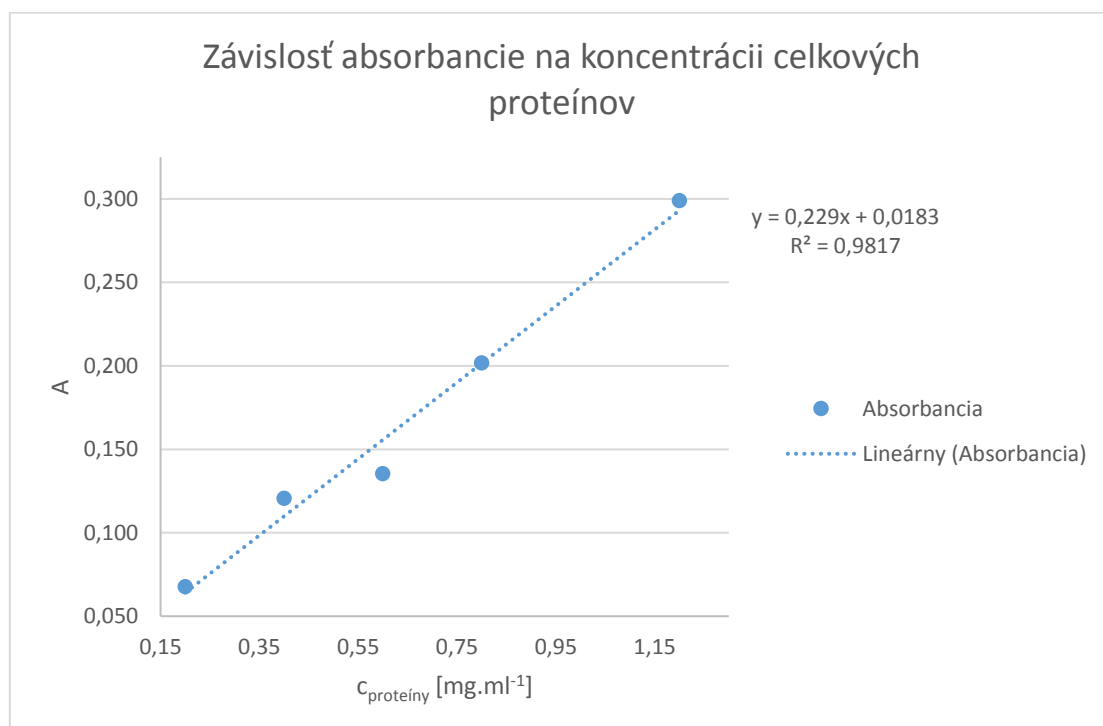
4.1.1 Príprava vzoriek a stanovenie celkových proteínov vo vzorkách metódou podľa Bradforda

Boli pripravených 6 vzoriek podľa postupu uvedeného v kapitole 3.2.2 (tri vzorky troch tukových telies zimných včiel a tri vzorky troch tukových telies jarých včiel).

Koncentrácia vzoriek bola vypočítaná (Tab. 2) na základe rovnice grafu–kalibračnej krivky závislosti absorbancie na koncentrácii celkových proteínov, podľa postupu v kapitole 3.2.1.1. Rovnica grafu bola $y = 0,229x + 0,0183$ (Obr. 7)

4.1.2 Detekcia a výsledky prvotnej analýzy

Namerané boli koncentrácie proteínov vo vzorkách v rozsahu $1,65 - 6,41 \text{ mg.ml}^{-1}$ (Tab.2) a jednotlivé vzorky neboli pred elektroforézou riedené.



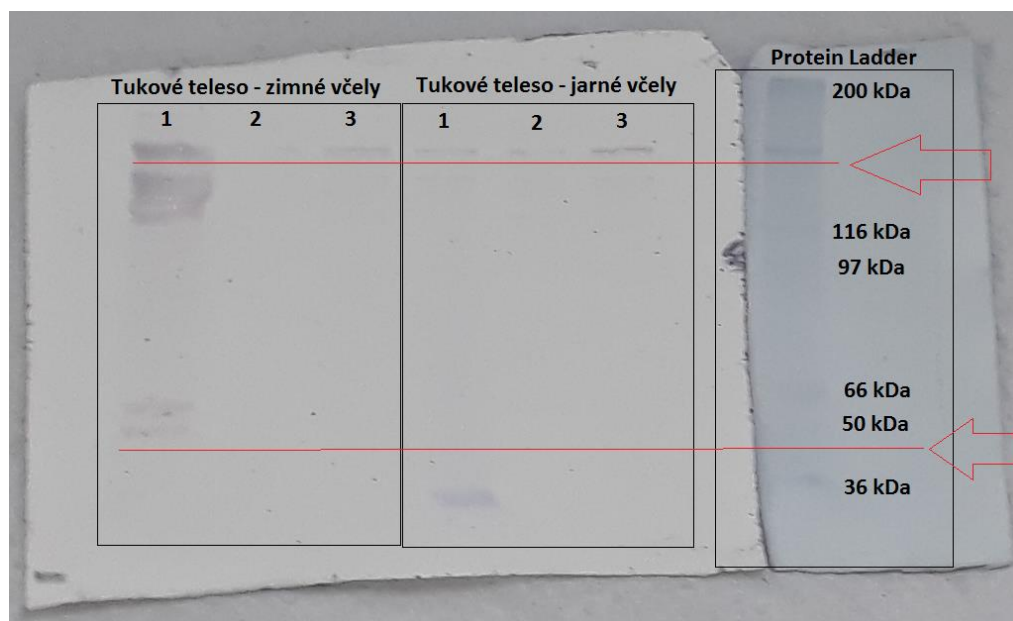
Obr. 7 Kalibračná krivka, závislosť absorbancie na koncentrácii celkových proteínov zostrojená na základe merania absorbancie jednotlivých štandardov albumínu pomocou mikrodosťčkového readeru

Tab. 2 Meranie absorbancie vzoriek a výpočet koncentrácie celkových proteínov vo vzorke na základe rovnice grafu (Obr. 7)

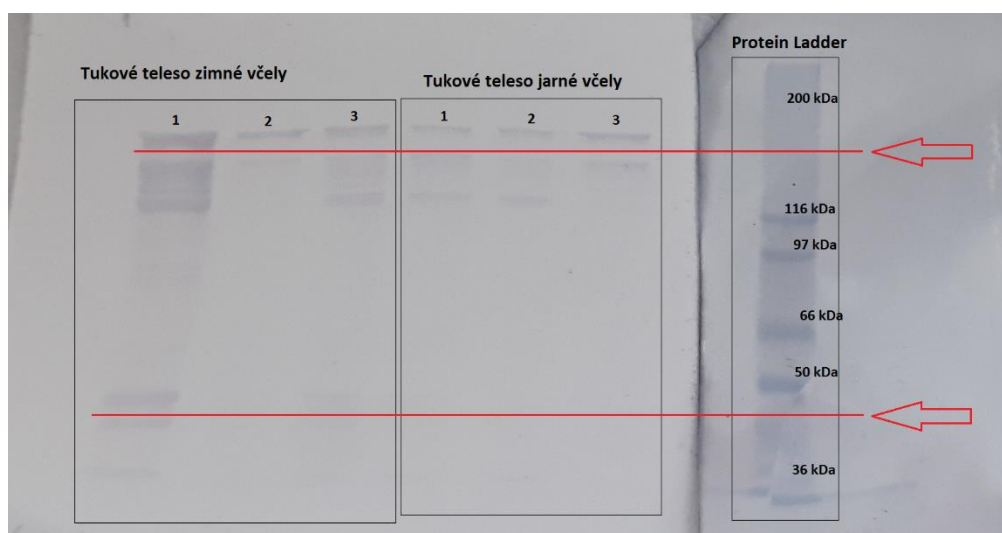
		A ₁	A ₂	A _{priemer}	C _{proteíny} [mg.ml ⁻¹]
Jarné včely	1	0,139	0,150	0,145	1,65
	2	0,446	0,011	0,229	2,75
	3	0,391	0,372	0,382	4,76
Zimné včely	4	0,196	0,174	0,185	2,18
	5	0,202	0,141	0,172	2,01
	6	0,457	0,558	0,508	6,41

Účelom metódy Western Blot bolo nájsť najvhodnejšie nastavenie metódy pre detekciu vitellogenínu a aj jeho fragmentov. Detekovaný vitellogenín vo svojej vo svojej plnej zrelej forme o molekulovej hmotnosti 180 kDa. Z fragmentov je známy fragment o veľkosti 40 kDa, ktorý bol objasnený počas výskumu v roku 2011 (Havukainen *et al.*, 2011). Tento fragment zodpovedá N – terminálnej doméne vitellogenínu (Havukainen *et al.*, 2011). V literatúre je ešte možné nájsť zmienky o 150 kDa fragmente vitellogenínu (Wheeler and Kawooya, 1990).

Pri porovnaní jednotlivých membrán je viditeľné, že nitrocelulózová membrána (Obr. 8) obsahuje menej bandov ako membrána PVDF. Na PVDF membráne (Obr.9) sú zjavné aj neočakávané bandy. Mohlo to byť spôsobené pufrom alebo koncentráciou protilátky (Yang and Mahmood, 2012). Avšak na PVDF membráne je možné vidieť vyšší šum pozadia a viac bandov. Práca s nitrocelulózovou membránou bola náročnejšia z dôvodu jej krehkosti. V dostupných zdrojoch na detekciu vitellogenínu bola používaná na prenos prevažne nitrocelulózová membrána, veľkosť pórov 0,2 μm (Azevedo *et al.*, 2016, Havukainen *et al.*, 2011, Salmela *et al.*, 2015). Avšak v niektorých zdrojoch bola na prenos použitá aj PVDF membrána – veľkosť pórov 0,22 μm (Zhang, *et al.*, 2017). V našom experimente sme použili PVDF a nitrocelulózovú membránu o veľkosti pórov 0,45 μm.



Obr. 8 Nitrocelulózová membrána s detekovaným vitellogenínom vo vzorkách tukového telesa zimných a jarných včiel. Koncentrácia celkových proteínov vo vzorkách zimných včiel 1 – 6,41 mg.ml⁻¹, 2 – 2,01 mg.ml⁻¹, 3 – 2,18 mg.ml⁻¹. Koncentrácia celkových proteínov vo vzorkách jarných včiel 1 – 4,76 mg.ml⁻¹, 2 – 2,75 mg.ml⁻¹, 3 – 1,65 mg.ml⁻¹.



Obr. 9 PVDF membrána s detekovaným vitellogenínom vo vzorkách tukového telesa zimných a jarných včiel. Koncentrácia celkových proteínov vo vzorkách zimných včiel 1 – 6,41 mg.ml⁻¹, 2 – 2,01 mg.ml⁻¹, 3 – 2,18 mg.ml⁻¹. Koncentrácia celkových proteínov vo vzorkách jarných včiel 1 - 4,76 mg.ml⁻¹, 2 – 2,75 mg.ml⁻¹, 3 – 1,65 mg.ml⁻¹.

Pre zníženie šumu pozadia by bola vyskúšaná nižšia koncentrácia protilátok a na premývanie membrány by som zvolila čerstvo pripravený roztok pufru. Premývanie by som uskutočnila vo viacerých krokoch než pri prvej analýze.

Ďalšou oblasťou optimalizácie je množstvo vkladaneho vzoru. Na Western Blot boli použité vzorky tukového telesa, ktoré boli pripravené podľa postupu v kapitole 3.2.2.1. Boli to vzorky obsahujúce 1 tukové teleso na vzorku, obsahujúce 1,65 – 6,41 mg.ml⁻¹ celkových

proteínov (Obr. 9). Na samotnú elektroforézu boli použité vzorky z jednotlivých včiel bez riedenia, tzn. 8,25 – 32,05 µg celkových proteínov. V publikácii z roku 2016 bola použitá na detekciu vitellogenínu (konkrétne 156 kDa fragmentu) vzorka obsahujúca 20 µg celkových proteínov (Azevedo *et al.*, 2016). V metodickej časti udávajú, že pre vzorky organizmu *Ectatomma tuberculatum* bola použitá primárna protilátka v riedení 1:1000 a sekundárna protilátka v riedení 1:4000, konjugovaná s chrenovou peroxidázou (HRP, EC 1.11.1.x) (Azevedo *et al.*, 2016). V publikácii z roku 2007 bola na detekciu vitellogenínu použitá vzorka obsahujúca 2 µg celkových proteínov a na detekciu boli použité primárne protilátky v riedení 1:25000 a sekundárne protilátky konjugované s peroxidázou (HRP, EC 1.11.1.x) v riedení 1:10000. Jednalo sa o vitellogenín o molekulovej hmotnosti 180 - 190 kDa detekovaný vo vzorkách tukového telesa, bruška a reprodukčnej sústavy včelej kráľovnej a robotníc (Corona *et al.*, 2007).

Jednou z možností spracovania vzorky by bola príprava zmesnej vzorky obsahujúcej aspoň 5 tukových telies včiel. Po príprave vzorky a stanovení celkovej koncentrácie celkových proteínov, by boli vzorky pred samotnou SDS-PAGE nariadené na rovnakú koncentráciu, aby bolo možné porovnávať aj obsah vitellogenínu medzi zimnými a jarnými včelami. Otestovaná by bola aj možnosť použitia na analýzu vzorky obsahujúce 0,2 – 20 µg.µl⁻¹ celkových proteínov.

Pre separáciu proteínov by boli použité rôzne koncentrácie deliaceho gélu – 8% a 12%, ktoré boli použité pri separácii proteínov následne detekciu vitellogenínu vo vzorkách získaných z rýb *Danio rerio* (Rao *et al.*, 2010) a v publikácii z roku 2017 bola koncentrácia akrylamidového gélu použitá koncentrácia 7,5% (Zhang *et al.*,

2017). V publikácii z roku 2007 bol použitý 10% gél (Corona *et al.*, 2007). V našej práci sme použili 7% deliaci gél.

Pre elimináciu neočakávaných bandov, by bolo riešením použitie čerstvej vzorky, pri ktorej príprave by bol použitý aj inhibítor proteáz (Yang and Mahmood, 2012), aby počas izolácie tukového telesa nenastal rozklad proteínov proteázovými enzýmami. Na blokovanie membrány by som upravila aj koncentráciu albumínu, prípadne by na blokovanie bol určený dlhší čas, aby eliminovali nešpecifické väzby protilátok na membránu (Yang and Mahmood, 2012). Otestovala by som možnosť aj blokovania membrány iným roztokom. Blokovala by som pomocou roztoku 5% mlieka v TBS-T (0,1% Tween) pufri (Azevedo *et al.*, 2016) namiesto použitého roztoku albumínu.

Pre zaostrenie jednotlivých bandov by bolo možné znížiť napätie použité počas elektroforézy a zaistenie, že počas prenosu proteínov z gélu na membránu sa v sendviči nevyskytujú žiadne bubliny (Yang and Mahmood, 2012).

Farbenie membrány, ktoré bolo pri prvej analýze dlhšie než bolo potrebné (membrány sú prefarbené) by bolo dobré skrátiť len na čas potrebný na objavenie prvých bandov membrány a ako substrát by bol použitý rovnaký len o nižšej koncentrácii.

Kombináciou jednotlivých krokov by som očakávala dobre reprodukovateľné výsledky. Ideálne sú očakávané len bandy, ktoré indikujú prítomný vitellogenín a tieto bandy by mali byť ostre a dobre viditeľné, zároveň aj dobre detekovateľné.

4.2 Detekcia vitellogenínu metódou ELISA

4.2.1 Príprava vzoriek a stanovenie celkových proteínov vo vzorkách metódou podľa Bradforda

Bolo pripravených 12 vzoriek podľa postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. (šesť vzoriek šiestich tukových telies zimných včiel a šesť vzoriek šiestich tukových telies jarných včiel).

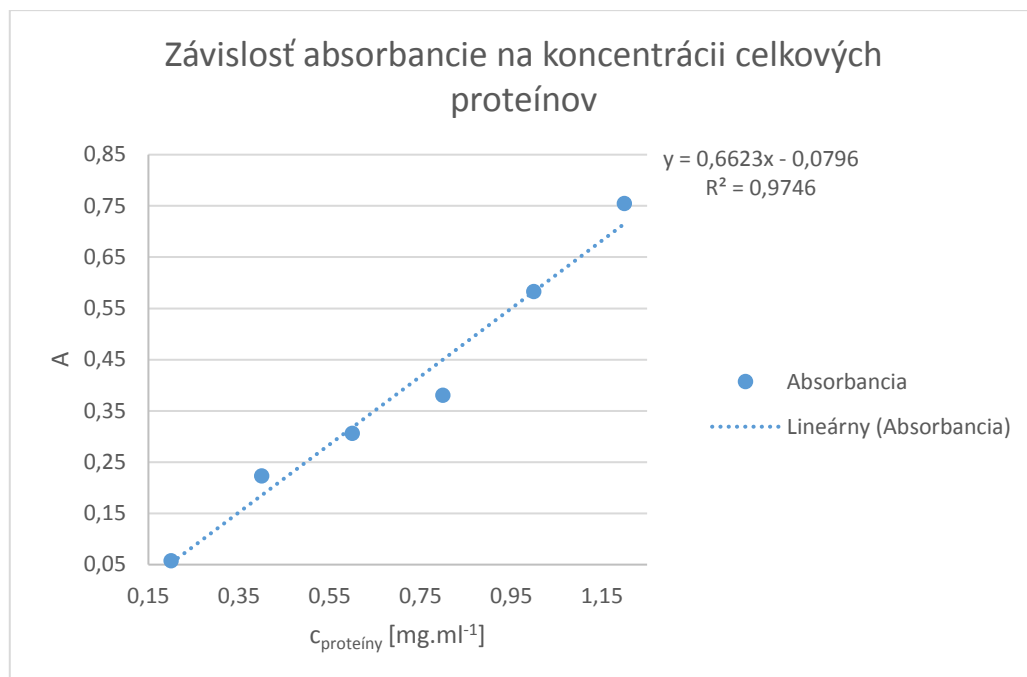
Následne bola ich koncentrácia vypočítaná na základe rovnice grafu (Tab. 3) – kalibračnej krivky závislosti absorbancie na koncentrácii celkových proteínov. Rovnica grafu bola $y = 0,6623x - 0,0796$ (Obr. 10).

Tab. 3 Meranie absorbancie vzoriek a výpočet koncentrácie celkových proteínov vo vzorke na základe rovnice grafu (Obr. 10)

		A_1	A_2	A_{priemer}	$C_{\text{proteíny}}$ [mg.ml ⁻¹]
Jarné včely	1	0,169	0,143	0,156	0,712
	2	0,283	0,205	0,244	0,978
	3	0,093	0,028	0,061	0,424
	4	0,053	0,118	0,086	0,500
	5	0,167	0,081	0,124	0,616
	6	0,413	0,310	0,362	1,333
Zimné včely	7	0,106	0,089	0,098	0,536
	8	0,111	0,495	0,303	1,156
	9	0,101	0,084	0,093	0,521
	10	0,068	0,184	0,126	0,622
	11	0,009	0,245	0,127	0,625
	12	-0,008	0,005	-0,001	0,237

Zmesná vzorka (12 včiel) bola použitá na určenie vhodnej koncentrácie celkových proteínov, použiteľnej na detekciu vitellogenínu metódou ELISA. Po vyhodnotení absorbancie bola určená koncentrácia 4 µg.ml⁻¹ celkových proteínov vo vzorke ako koncentrácia vhodná na použitie pre metódu ELISA.

Všetky vzorky boli pred prevedením metódy nariadené na koncentráciu 4 µg.ml⁻¹. Koncentrácia celkových proteínov vo vzorke bola vypočítaná (Tab. 3) na základe rovnice grafu – kalibračnej krivky závislosti absorbancie na koncentrácii celkových proteínov, na základe postupu v kapitole 3.2.1.1. Rovnica grafu bola $y = 0,6623x - 0,0796$ (Obr. 10)



Obr. 10 Kalibračná krivka, závislosť absorbancie na koncentrácii celkových proteínov zostrojená na základe merania absorbancie jednotlivých štandardov albumínu pomocou mikrodostičkového readeru

4.2.2 Detekcia výsledky prvotnej analýzy

Na prvý experiment boli vzorky nariadené na rovnakú koncentráciu – $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Bolo použitých 6 vzoriek tukového tela letných včiel a 6 vzoriek tukového tela zimných včiel. Po prevedení experimentu bol v niektorých prípadoch zaznamenaný signál, avšak v niektorých nie (Tab. 4). Očakávaná bola vyššia odozva pri vzorkách zimných včiel (Amdam *et al.* 2010), avšak v skutočnosti bola nameraná vyššia odozva pri vzorkách jarých včiel.

ELISA na detekciu vitellogenínu bola použitá už v roku 1995 u druhu *Anguilla japonica*. Do každej jamky bolo pridaných $150 \mu\text{l}$ vzorky a jednotlivé jamky ELISA doštičky boli 2-krát premývané a blokované 1% roztokom BSA v PBS. (Okumura *et al.*, 1995). V našom experimente boli jamky blokované 5% roztokom mlieka. Premývací roztok obsahoval PBS a jamky boli inkubované s α -lipovitellínom za účelom následnej vizualizácie (Okumura *et al.*, 1995). V tomto experimente bol použitý premývací roztok obsahujúci fosforečnany a chlorid sodný.

Tab. 4 Meranie absorbancie vzoriek jarných a letných včiel

		A
Jarné včely	1	0,045
	2	0,018
	3	0,002
	4	-0,017
	5	0,011
	6	0,11
Zimné včely	7	-0,038
	8	0,01
	9	-0,048
	10	-0,023
	11	-0,029
	12	-0,04

U druhu *Penaeus monodon* bol vitellogenín detekovaný taktiež pomocou metódy ELISA. Do jamky bolo pridaných 100 μl vzorky o koncentrácii celkových proteínov 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. ELISA doštička bola blokována 5% BSA v PBS. Použitá bola sekundárna protilátka v riedení 1:2000 konjugovaná s peroxidázou (HRP, EC 1.11.1.x). (Sukumaran *et al.*, 2017).

Vzhľadom na literatúru boli pre vzorky tukového telesa hmyzu *Ectatomma tuberculatum*, ktorý je tiež považovaný za sociálny hmyz ako včela medonosná, použité na analýzu vzorky obsahujúce až 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ celkových proteínov za použitia protilátok riedenými 1:5000 s použitím rovnakého substrátu (Azevedo *et al.*, 2016). V tejto publikácii sledovali vplyv juvenilného hormónu na množstvo vitellogenínu. Ako vzorky boli použité tukové telesá hmyzu *E. tuberculatum* (Azevedo *et al.*, 2016).

Počas analýzy boli dodržané všetky inkubačné časy. Riešením pre lepšie výsledky by bolo upravenie koncentrácie, ako izolovaného antigénu, tak aj substrátu a protilátok. Otestovaná by bola aj možnosť zmeny koncentrácie roztoku použitého na blokovanie. Otestované by boli možnosti 1 – 5% BSA a 5 – 10 % mlieka. Substrát použitý pre analýzu (TMB) bol od prípravy až po použitie chránený pred svetlom a teplom. Je vylúčená jeho degradácia svetlom. Použitý substrát bol v poriadky vzhľadom na to, že pri niektorých vzorkách bol merateľný signál, čo znamená, že nastala premena substrátu.

Pre ďalšiu analýzu by bola zvolená vyššia koncentrácia celkových proteínov, a zároveň rovnaká koncentrácia substrátu, tak ako počas prvej analýzy. Ak by bol znova pri niektorých vzorkách nedetekovateľný signál, bolo by možné použiť tú istú koncentráciu antigénu alebo znížiť riedenie protilátok. Prípadne použiť novo nariadené roztoky protilátok.

5 Záver

Teoretická časť tejto práce bola zameraná na vitellogenín, jeho funkcie a to hlavne funkcie, ktoré zohráva u včely medonosnej. Bola spracovaná literárna rešerš nielen o jeho štruktúre a výskyte, ale boli spracované aj kapitoly o jeho rôznych úlohách u včely. Taktiež bola spracovaná literárna rešerš o protilátkach, imunologických metódach a imunochemických, predovšetkým o používaných metódach Western Blot a ELISA.

Praktická časť bola zameraná hlavne na prípravu vzoriek tukového telesa včely medonosnej, stanovenie koncentrácie celkových proteínov v pripravených vzorkách metódou podľa Bradforda a na detekciu vitellogenínu v tukovom telese imunologickými metódami Western Blot a ELISA.

Metódou Western Blot boli otestované jednotlivé kroky pre stanovenie fragmentov vitellogenínu, ako na nitrocelulózovej membráne, tak aj na PVDF membráne. Následne boli určené ďalšie kroky, ktoré by boli otestované pri ďalšej detekcii.

Pri metóde ELISA boli otestované kroky pre detekciu a stanovenie vitellogenínu. Bola pripravená zmesná vzorka, v ktorej bol detekovaný vitellogenín a podobne aj v niektorých vzorkách tukového telesa jednotlivých včiel. Boli určené ďalšie možnosti krokov pre budúce experimenty vzhľadom na literatúru.

6 Literatúra

- Alberts, Bruce, 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science. ISBN 08-153-3218-1.
- Amdam, Gro V., Anne Lene T.O. Aase, Siri-Christine Seehuus, M. Kim Fondrk, Kari Norberg a Klaus Hartfelder, 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*. 40(12), 939-947. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2005.08.004
- Amdam, Gro V., Robert E. Page, M. Kim Fondrk a Colin S. Brent, 2010. *Hormone response to bidirectional selection on social behavior*. 12(5), 428-436. ISSN 1520541X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1525-142X.2010.00429.x
- Amdam, Gro V., Zilá L.P Simões, Arne Hagen, Kari Norberg, Knut Schröder, Øyvind Mikkelsen, Thomas B.L Kirkwood a Stig W Omholt, 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*. 39(5), 767-773. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2004.02.010
- Amdam, Gro V., K. Norberg, A. Hagen a S. W. Omholt, 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(4), 1799-1802. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0333979100
- Amdam, Gro Vang a Stig W. Omholt, 2002. The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology*. 216(2), 209-228. ISSN 00225193. Dostupné z: doi:10.1006/jtbi.2002.2545
- Arrese, Estela L. a Jose L. Soulages, 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*. 55(1), 207-225. ISSN 0066-4170. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356
- Azevedo, Dihego Oliveira, Sérgio Oliveira de Paula, José Cola Zanuncio, Luis Carlos Martinez a José Eduardo Serrão, 2016. Juvenile hormone downregulates vitellogenin production in *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) sterile workers. *Journal of Experimental Biology*. 219(1), 103-108. ISSN 1477-9145. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.127712
- Baker, M E, 1988. Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein lipase? *Biochemical Journal*. 255(3), 1057-1060. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2551057
- Bownes, Mary, 1994. The regulation of the yolk protein genes, a family of sex differentiation genes in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays*. 16(10), 745-752. ISSN 0265-9247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.950161009
- Corona, M., R. A. Velarde, S. Remolina, A. Moran-lauter, Y. Wang, K. A. Hughes a G. E. Robinson, 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(17), 7128-7133. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0701909104
- Crowther, John R., 1995. Basic Immunology. *ELISA*. New Jersey: Humana Press, 1(42), 1-34. ISBN 0-89603-279-5. Dostupné z: doi:10.1385/0-89603-279-5:1
- Crowther, John R., 1995. *ELISA Theory and Practice*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-1-59259-529-7.
- Deutscher, Murray P., 1990. *Methods in ENZYMOLOGY*. 182. USA: Usa: Academic Press. ISBN 978-0121820831.

- Ding, Yunchao, Xuemei Liu, Lingzhen Bu, Hongyan Li a Shicui Zhang, 2012. Antimicrobial–immunomodulatory activities of zebrafish phosvitin-derived peptide Pt5. *Peptides*. 37(2). ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2012.07.014
- Du, Xiaoyuan, Xia Wang, Su Wang, Yang Zhou, Yu Zhang a Shicui Zhang, 2017. *Functional characterization of Vitellogenin_N domain, domain of unknown function 1943, and von Willebrand factor type D domain in vitellogenin of the non-bilaterian coral Euphyllia ancora: Implications for emergence of immune activity of vitellogenin in basal metazoan*. 67, 485-494. ISSN 0145305X. Dostupné z: doi:10.1016/j.dci.2016.10.006
- Fluri, P., H. Wille, L. Gerig a M. Lüscher, 1977. Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*. 33(9), 1240-1241. ISSN 0014-4754. Dostupné z: doi:10.1007/BF01922354
- Garibaldi, L. A., M. A. Aizen, A. M. Klein, S. A. Cunningham a L. D. Harder, 2011. Global growth and stability of agricultural yield decrease with pollinator dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(14), 5909-5914. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1012431108
- Guidugli, Karina R., Adriana M. Nascimento, Gro V. Amdam, Angel R. Barchuk, Stig Omholt, Zilá L.P. Simões a Klaus Hartfelder, 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*. 579(22), 4961-4965. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2005.07.085
- Hames, B. D., 1998. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 3rd Edition. Oxford: Oxford University Press. ISBN 9780199636402.
- Harman, D., 1956. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*. 11(3), 298-300. ISSN 0022-1422. Dostupné z: doi:10.1093/geronj/11.3.298
- Havukainen, H., O. Halskau, L. Skjaerven, B. Smedal a G. V. Amdam, 2011. Deconstructing honeybee vitellogenin: novel 40 kDa fragment assigned to its N terminus. *Journal of Experimental Biology*. 214(4), 582-592. ISSN 0022-0949. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.048314
- Havukainen, Heli, Daniel Münch, Anne Baumann, Shi Zhong a Øyvind Halskau, 2013. Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*. 288(39). ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.465021
- Havukainen, Heli, Daniel Münch, Anne Baumann, Shi Zhong, Øyvind Halskau, Michelle Krogsgaard a Gro V. Amdam, 2013. Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*. 288(39), 28369-28381. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.465021
- Hayward, Alexander, Tokiharu Takahashi, William G. Bendena, Stephen S. Tobe a Jerome H.L. Hui, 2010. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans. *FEBS Letters*. 584(6), 1273-1278. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2010.02.056
- Inouye, Michael, Kaisa Silander, Eija Hamalainen, et al., 2010. *PLoS Genetics*. 6(9). ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1001113
- Kolektiv autorov, *Laboratorní cvičení z biochemie*, 2012. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3328-8.
- Lavine, M.D. a M.R. Strand, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(10), 1295-1309. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/S0965-1748(02)00092-9

- Li, Jianghong, Matthew C. Heerman, Jay D. Evans, et al., 2019. Pollen reverses decreased lifespan, altered nutritional metabolism and suppressed immunity in honey bees (*Apis mellifera*) treated with antibiotics. *The Journal of Experimental Biology*. 222(7). ISSN 0022-0949. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.202077
- Lowenberger, Carl, 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31(3), 219-229. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/S0965-1748(00)00141-7
- Münch, Daniel a Gro V. Amdam, 2010. The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters*. 584(12), 2496-2503. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2010.04.007
- Najafov, Ayaz a Gerta Hoxhaj, [2017]. *Western blotting guru*. London, United Kingdom: Elsevier/Academic Press, an imprint of Elsevier. ISBN 01-281-3537-9.
- Nelson, C. Mindy, Kate E Ihle, M. Kim Fondrk, Robert E Page, Gro V Amdam a Lars Chittka, 2007. The Gene vitellogenin Has Multiple Coordinating Effects on Social Organization. *PLoS Biology*. 5(3). ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.0050062
- Ohashi, Toshinori, Kazuma Mawatari, Kae Sato, Manabu Tokeshi a Takehiko Kitamori, 2009. A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis. *Lab on a Chip*. 9(7). ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/b815475a
- Okumura, Hiromi, Akihiko Hara, Fumihiko Saeki, Takashi Todo, Shinji Adachi a Kohei Yamauchi, 1995. Development of a Sensitive Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Vitellogenin in the Japanese Eel *Anguilla japonica* *Fisheries science*. 61(2), 283-289. ISSN 0919-9268. Dostupné z: doi:10.2331/fishsci.61.283
- Page, Robert E a Christine Y.-S Peng, 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*. 36(4-6), 695-711. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/S0531-5565(00)00236-9
- Pan, M. L., W. J. Bell a W. H. Telfer, 1969. Vitellogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body. *Science*. 165(3891), 393-394. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.165.3891.393
- Perez, Marcos Francisco a Ben Lehner, 2019. Vitellogenins - Yolk Gene Function and Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Physiology*. 10(10), 17. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2019.01067
- Pingoud, A., C. Urbanke, J. Hoggett a A. Jeltsch, c2002. *Biochemical methods: a concise guide for students and researchers*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 35-273-0299-9.
- Raikhel, A., 1992. Accumulation Of Yolk Proteins In Insect Oocytes. *Annual Review of Entomology*. 37(1), 217-251. ISSN 00664170. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ento.37.1.217
- Rao, Y, L Zhong, T liao, et al., 2010. Novel recombinant monoclonal antibodies for vitellogenin assays in cyprinid fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 93(1), 83-91. ISSN 0177-5103. Dostupné z: doi:10.3354/dao02268
- Ratnieks, Francis L. W., 1993. Egg-Laying, Egg-Removal, and Ovary Development by Workers in Queenright Honey Bee Colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 32(3), 191-198.
- Romano, Maurizio, Patrizia Rosanova, Chiara Anteo a Ermelinda Limatola, 2004. Vertebrate yolk proteins: A review. *Molecular Reproduction and Development*. 69(1), 109-116. ISSN 1040-452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.20146

- Salmela, Heli a Liselotte Sundström, 2017. Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. *Inflammation and Cell Signaling*. 1(2017), 1-7. ISSN 23307803. Dostupné z: doi:10.14800/ics.1506
- Salmela, Heli, Gro V. Amdam, Dalial Freitak a David S. Schneider, 2015. Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens*. 11(7). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1005015
- Salmela, Heli, Taina Stark, Dimitri Stucki, et al., 2016. Ancient Duplications Have Led to Functional Divergence of Vitellogenin-Like Genes Potentially Involved in Inflammation and Oxidative Stress in Honey Bees. *Genome Biology and Evolution*. 8(3), 495-506. ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evw014
- Sappington, Thomas W a Alexander S. Raikhel, 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28(5-6), 277-300. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/S0965-1748(97)00110-0
- Seehuus, S.-C., K. Norberg, U. Gimsa, T. Krekling a G. V. Amdam, 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(4), 962-967. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0502681103
- Seehuus, Siri-Christine, Kari Norberg, Trygve Krekling, Kim Fondrk a Gro V. Amdam, 2007. Immunogold Localization of Vitellogenin in the Ovaries, Hypopharyngeal Glands and Head Fat Bodies of Honeybee Workers, *Apis Mellifera*. *Journal of Insect Science*. 7(52), 1-14. ISSN 1536-2442. Dostupné z: doi:10.1673/031.007.5201
- Seong, Seung-Yong a Polly Matzinger, 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 4(6), 469-478. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1372
- Schmid, Martin R., Axel Brockmann, Christian W.W. Pirk, David W. Stanley a Jürgen Tautz, 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*. 54(2), 439-444. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2007.11.002
- Skipper, J. K. a T. H. Hamilton, 1977. Regulation by estrogen of the vitellogenin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(6), 2384-2388. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.74.6.2384
- Sukumaran, Vrinda, Seena Jose, Jasmin Chekidhenkuzhiyil, et al., 2017. ELISA detection of vitellogenin in the haemolymph of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) (Caridea: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology*. 37(4), 473-480. ISSN 0278-0372. Dostupné z: doi:10.1093/jcobiol/rux040
- Trenczek, Tina, Anne Zillikens, Wolf Engels, J. Cruz, Z.L.P. Simões a X. Bellés, 1989. Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*): structural analysis of the cDNA and expression studies. *Journal of Insect Physiology*. 35(6), 475-481. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1910(89)90054-1
- Tufail, Muhammad a Makio Takeda, 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*. 54(12), 1447-1458. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2008.08.007
- Uhlenhuth, P a T Kodama, 1914. Studien über die Geschlechtsdifferenzierung. *Kokka Igakkai Zashi*. 1(1), 385-405.

- Voller, A, A Bartlett a D E Bidwell, 1978. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*. 31(6), 507-520. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.31.6.507
- Walder, Mats a Arne Forsgren, 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for antibodies against campylobacter jejuni, and its clinical application. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*. 90B(1-6), 423-433. ISSN 01080180. Dostupné z: doi:10.1111/j.1699-0463.1982.tb00141.x
- Wheeler, Diana E. a John K. Kawooya, 1990. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 14(4), 253-267. ISSN 0739-4462. Dostupné z: doi:10.1002/arch.940140405
- Xie, Li, Xiao-dong Wu, De-zhuang Huang, Hai-lun Chen, Li-xiang He, Jian Wang a Da-kang Han, 2007. Clinical application and analysis of hepatitis C virus NS3 antigen detection by ELISA in human serum. *Chin Med J*. 120(4), 294-299.
- Yang, Ping-Chang a Tahrin Mahmood, 2012. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4(9). ISSN 1947-2714. Dostupné z: doi:10.4103/1947-2714.100998
- Zajoncová, Ludmila, 2013. *Praktická cvičení z klinické biochemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3431-5.
- Zhang, Shicui, Shaohui Wang, Hongyan Li a Li Li, 2011. *Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector*. 43(3), 303-305. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2010.11.003
- Zhang, Weixing, Zhenguo Liu, Ming Zhu, Lanting Ma, Ying Wang, Hongfang Wang, Xingqi Guo a Baohua Xu, 2017. Molecular cloning, expression and oxidative stress response of the vitellogenin Gene (AccVg) from *Apis cerana cerana*. *Apidologie*. 48(5), 599-611. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1007/s13592-017-0503-9

7 Zoznam použitých skratiek

AA/BIS – akrylamid/bisakrylamid

ALP – alkalická fosfatáza

apoB – apolipoproteín B

APS – persíran sodný

BCIP – 5-brómo-4-chlóro-3indoxylfosfát

BSA – hovädzí sérový albumín

DMFA - dimetylformamid

EMIT - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

HRP – chrenová peroxidáza

LDL – nízko hustotná lipidová častica

LPS – lipopolysacharidy

NBT - nitro-blue tetrazolium chlorid

PBS – fosfátový pufrovaný soľný roztok

PG – peptidoglykán

PVDF - polyvinylidénfluorid

RIA - Radioimmunoassay

TBS-T – zmes tris-pufrovaného soľného roztoku a polysorbátu 20

TEMED - Tetrametyletyléndiamín

TMB - 3,3',5,5' - tetrametylbenzidín

Vg - Vitellogenín

WB – Western Blot