



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Příprava polyklonálních protilátek proti progesteronu
a jejich využití v imunoafinitní chromatografii**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Ondřej Juřena**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2013

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Ondřej Juřena

Název práce: Příprava polyklonálních protilátek proti progesteronu a jejich využití v imunoafinitní chromatografii

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů, PřF UP & ÚEB AVČR

Vedoucí práce: Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou jednou z nejdůležitějších součástí imunity člověka. Jde o látky bílkovinné povahy, které specificky interagují s antigenem. Tohoto faktu se využívá v řadě imunochemických metod, které mají široké uplatnění jak v medicínské praxi, tak v oblasti výzkumu. Jednou z nejpoužívanějších imunochemických metod je imunoafinitní chromatografie, která nachází své využití především při velké řadě purifikačních procesů.

Cílem této bakalářské práce byla příprava polyklonálních protilátek namířených proti progesteronu. Z krevního séra imunizovaných králíků byly po několika úpravách získány relativně čisté protilátky. Vlastnosti těchto protilátek, především pak jejich křížová reaktivita, byly testovány pomocí přímé enzymové imunoanalýzy. Protilátky byly dále navázány na afinitní gel a v budoucnosti mohou být využity v imunoafinitní chromatografii při čištění rostlinného materiálu za účelem stanovení steroidních hormonů.

Klíčová slova: Enzymová imunoanalýza (ELISA), imunoafinitní chromatografie, progesteron, protilátky.

Počet slov: 6671

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Ondřej Juřena

Title of thesis: Preparation of polyclonal antibodies against progesterone and their use in the immunoaffinity chromatography

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & IEB AS CR

Supervisor: Mgr. Jana Okleštková, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

Antibodies or immunoglobulins are one of the most important parts of human immunity. These protein substances interact specifically with the antigen. This fact is utilized in a number of immunochemical methods that have wide application in medical practice and research. One of the most used immunochemical methods, immunoaffinity chromatography, which finds its use in especially when a large number of purification processes.

The aim of this work was to prepare polyclonal antibodies against progesterone. The blood serum of the immunized rabbits were obtained after a few adjustments to the relatively pure antibodies. The properties of these antibodies, especially their cross-reactivity, were tested by direct enzyme immunoassay. Antibodies were then bound to the affinity gel and will be used for determination of steroid hormones in plant material by immunoaffinity purification.

Keywords: Antibodies, immunoaffinity chromatography, enzyme immunoassay, progesterone.

Number of pages: 6671

Number of appendices: 0

Language: Czech

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Janě Oklešťkové PhD., za odbornou pomoc, trvalý zájem a trpělivost při vypracování a následném sepsání této bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval vedení i všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za vytvoření vhodným podmínek při provedení experimentální části této bakalářské práce a při jejím literárním zpracování.

Obsah

1. Úvod a cíl bakalářské práce	8
2. Teoretická část	9
2.1. Protilátky a jejich význam	9
2.1.1. Polyklonální x Monoklonální protilátky	11
3. Příprava protilátek	11
3.1.1. Imunizace	11
3.1.2. Příprava čistých protilátek	13
3.2. Steroidní hormony	14
3.2.1. Progesteron	15
3.3. Imunoafinitní chromatografie	16
3.4. ELISA testy	18
4. Materiál a metody	20
4.1. Chemikálie a přístroje	20
4.2. Metody práce	22
4.2.1. Příprava konjugátů pro imunizaci a enzymovou imunoanalýzu	22
4.2.2. Imunizace	22
4.2.3. Srážecí reakce	23
4.2.4. Rozpuštění a dialýza protilátek	24
4.2.5. Optimalizace ELISA metody	24
4.2.6. Křížová reaktivita	25
4.2.7. Příprava imunoafinitního gelu	26
4.2.8. Testování kapacity imunoafinitního gelu	26
5. Výsledky	28
5.1. Příprava polyklonálních protilátek	28
5.2. Křížová reaktivita	28
5.3. Další charakteristiky protilátky	30
5.4. Kapacita imunoafinitního gelu	32
6. Diskuze	34
7. Závěr	36
8. Seznam literatury	37

Seznam použitých zkratek:

ELISA – Enzymová imunoanalýza

EIA – Enzymová imunoanalýza

Fab–fragment - Fragment antigen binding

Fc–fragment - Fragment crystallizable

CDR (doména) – Complementarity Determining Region

RIA – Radioimunoanalýza

MSBP1 - Membrane Steroid Binding Protein 1

SBP - Steroid Binding Protein

UPLC-MS/MS – Spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie

GC – Plynová chromatografie

LC – Kapalinová chromatografie

IAC – Imunoafinitní chromatografie

2OH3MeOBAPR – 2-hydroxy-3-metoxybenzylaminopurinribosid

DMSO – Dimethylsulfoxid

DCC – N,N-dicyclohexylkarbodiimid

BSA – Hovězí sérový albumin

HRP – Křenová peroxidáza

PBS – Fosfátový pufr

MOPS - Kyselina 3–morfolinopropansulfanová

NHS - N–hydroxysukcinimid

FIA – Freudovo nekompletní adjuvans

FCA – Freudovo kompletní adjuvans

1. Úvod a cíl bakalářské práce

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou látky bílkovinné povahy, hrající důležitou roli v imunitě člověka. Strukturně jsou protilátky tvořeny dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci, které jsou mezi sebou spojeny pomocí disulfidických vazeb. Vazebná místa imunoglobulinů jsou schopna specificky interagovat s antigenem, čehož se využívá v širokém spektru imunochemických metod, jako je například imunoafinitní chromatografie.

Protilátky můžeme rozdělit na polyklonální a monoklonální. Polyklonální protilátky jsou pro laboratorní účely produkovány laboratorními zvířaty, nejčastěji pak králíkem. Vznik specifických protilátek je velmi dlouhý a sofistikovaný proces, který zahrnuje několik důležitých fází. Patří sem příprava imunogenu, imunizace zvířete, získání protilátek a jejich následná úprava do námi požadované podoby. Samotné vlastnosti protilátek se poté testují například pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA).

Steroidní hormony jsou esenciální látky vyskytující se jak v rostlinné, tak v živočišné říši. Základní chemickou strukturou steroidních hormonů je steranový skelet, který pak podléhá různým modifikacím. Významným zástupcem steroidních hormonů je progesteron. Jde o látku se strukturním označením pregn-4-en-3,20-dion, která se klasicky vyskytuje ve všech částech rostlinného těla. Jak v jednotlivých částech rostlin, tak mezi jednotlivými druhy rostlin se však význam a koncentrace progesteronu liší. Příkladem funkce progesteronu v rostlinných buňkách může být například vliv na adaptaci rostliny proti biotickému a abiotickému stresu.

Cílem bakalářské práce byla příprava polyklonálních protilátek namířených proti progesteronu. Následovalo testování vlastností těchto protilátek pomocí ELISA testu. Protilátky budou v budoucnosti využity v imunoafinitní chromatografii za účelem usnadnění a zpřesnění extrakce a purifikace progesteronu z rostlinného materiálu.

2. Teoretická část

2.1. Protilátky a jejich význam

Protilátky patří mezi nejdůležitější komponenty imunitního systému. Jsou to látky bílkovinné povahy, které mají nezastupitelnou funkci v látkové obraně člověka. V těle jsou protilátky produkovány plazmatickými buňkami, což jsou diferenciované B–lymfocyty. Imunoglobuliny, které se v těle nacházejí především v krevním séru, se specificky váží na antigen, této reakci říkáme imunitní odpověď (*Wood, 2011*).

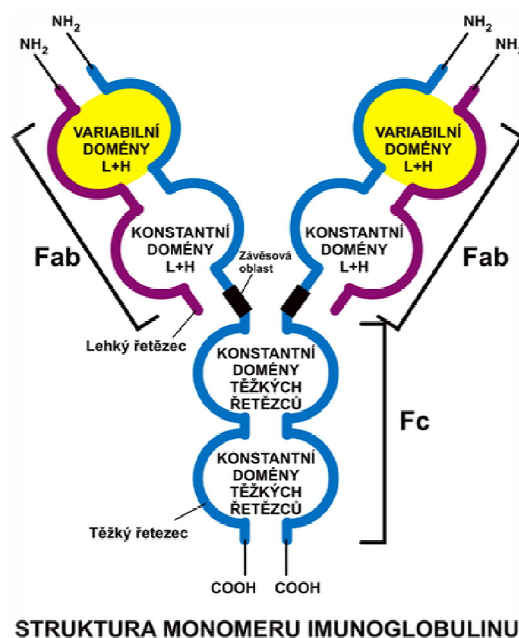
Chemická struktura protilátek byla objevena až po popsání jejich biologické aktivity. Zasloužili se o to A. Tiselius a E. A. Kabat, kteří v rozmezí let 1930 až 1935 rozdělili krevní sérum pomocí jednosměrného elektrického proudu na několik frakcí. Tento experiment dokázal, že protilátky (imunoglobuliny) jsou sérové proteiny globulárního typu (*Ferenčík, 1989*). Později bylo zjištěno, že protilátky jsou tvořeny dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci. Tyto řetězce spolu tvoří tetramer, který je propojen disulfidickými vazbami. Oba dva typy řetězců se liší jak v primární struktuře tvořené aminokyselinami, tak v molekulové hmotnosti. Lehký řetězec, který označujeme symbolem L, je tvořen variabilní a konstantní doménou. Podle typu konstantní části rozdělujeme lehké řetězce na λ a κ . Variabilní část lehkého řetězce je důležitá pro vazbu na antigen. Těžký řetězec, označovaný symbolem H, tvoří jedna variabilní část a několik částí konstantních. Variabilní části jsou stejně jako u lehkých řetězců důležité pro vazbu antigenu na protilátku. Podle konstantní části těžkých řetězců pak lidské protilátky klasicky rozdělujeme do pěti základních skupin. Rozlišujeme typy IgG, IgA, IgE, IgM a IgD, tyto podtřídy protilátek se kromě chemického složení liší také ve své specifické roli v obraně organismu či v místě výskytu v organismu (*Fučíková, 2002*).

Imunoglobuliny strukturou připomínají písmeno Y. Asi v polovině řetězce H se nachází pantová oblast, v které může být molekula imunoglobulinu enzymaticky nebo chemicky rozdělena na dvě části. Těmito částmi jsou Fab–fragment (Fragment antigen binding) a Fc–fragment (Fragment crystallizable).

Fab–fragment je zakončen amino skupinou, Fc–fragment je zakončen karboxylovou skupinou (Wood, 2011). Chemická struktura protilátky je zobrazena na obrázku č.1.

Je známo, že antigen s protilátkou nereaguje celým svým povrchem, ale pouze určitou částí, která se nazývá epitop neboli antigenní determinanta. Stejně tak protilátka nereaguje s antigenem celým svým povrchem, pro vazbu jsou důležité variabilní konce těžkého a lehkého řetězce. Na těchto koncích se nachází hypervariabilní úseky označované jako CDR domény, které tvoří vazebné místo pro antigen.

Protilátky vznikají z velké řady subgenů, je odhadováno, že lidský organismus může vytvářet až 10^8 různých molekul protilátek, což stačí na pokrytí všech druhů epitopů i když s rozdílnou silou afinity. Afinitou protilátek se s termodynamického hlediska rozumí síla (energie) nekovalentní vazby mezi receptorem (protilátkou) a ligandem (determinantou). Jelikož protilátky obsahují obvykle více vazebných míst, rozeznáváme také pojem avidita, což je síla vazby mezi celou protilátkou a antigenem (Catty, 1990).



Obr. č. 1: Chemická struktura protilátky.

Zdroj: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Genov%C3%A1_kontrola_tvorby_protil%C3%A1tek

2.1.1. Polyklonální x Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou chemická individua, namířená proti jednomu konkrétnímu epitopu antigenu. Jsou produkovány hybridomy, což jsou speciální buňky, které v laboratorních podmínkách vznikají fúzí myelomových nádorových buněk a lymfocytů typu B. Tento hybridom získává důležité vlastnosti obou dvou typů rodičovských buněk. Díky nádorovým buňkám se hybridom může neustále dělit a je téměř nesmrtelný, díky B–lymfocytům produkuje námi požadovanou monoklonální protilátku. Protilátky monoklonálního typu jsou využívány jak v medicíně (imunoterapie), tak při různých laboratorních metodách, například při enzymové imunoanalýze (*Krejsek a Kopecký, 2004*).

Druhým typem protilátek jsou protilátky polyklonální. Tyto imunoglobuliny jsou produkovány mnoha typy plazmatických buněk. Jedná se o heterogenní směs protilátek s různými vlastnostmi, které jsou namířeny proti více epitopům jednoho antigenu či proti směsi antigenů. Polyklonální protilátky jsou získávány z krevní plazmy imunizovaných zvířat, nejčastěji králíků. Jedním z problémů produkce polyklonálních protilátek je fakt, že každé zvíře musí být pro získání protilátek usmrceno. Další nevýhodou je subjektivní imunitní odpověď zvířete, každý jedinec tedy produkuje rozdílnou směs protilátek. Naopak výhodou polyklonálních protilátek spočívá v jejich schopnosti tvořit velké nerozpustné imunokomplexy s antigenem či snadno aglutinovat tak, že reakce může být viditelná, vizuálně měřitelná nebo fotometricky určitelná (*Catty, 1990*).

3. Příprava protilátek

3.1.1. Imunizace

Produkce protilátek *in vivo* je složitý proces závislý na humorální odpovědi imunizovaného zvířete. Zahrnuje několik důležitých kroků, mezi které patří příprava imunogenu, injekční zavedení imunogenu do zvířete, metody

odebrání vzniklých protilátek a také zvýšení samotné imunitní odpovědi zvířete na přijmutý imunogen.

Důležitým pojmem spojeným se samotnou imunizací je imunogenicita. Jde o schopnost imunogenu vyvolat imunitní odpověď. Tento fakt je závislý jak na chemické struktuře injektované molekuly, tak na schopnosti zvířete odpovědět na samotný imunogen. Imunogenem může být jak látka proteinové povahy, tak i nukleová kyselina nebo lipid. Stejně tak zvířeti může být podán celý antigen nebo pouze jeho část – haptén (*Harlow a Lane, 1988*).

Pro produkci polyklonálních protilátek *in vivo* se jako laboratorní zvíře obvykle používá králík. Obecně se při výběru laboratorního zvířete hledí na několik parametrů. Výběr zvířete určuje především původ a druh antigenu. V případě, že jde o živočišný antigen, měl by se použít fylogeneticky co nejvzdálenější druh.

Samotný imunogen se může do laboratorního zvířete aplikovat několika způsoby. Mezi ty nejčastější řadíme imunizaci intravenózní, intraperitoneální, intradermální, subkutánní a intramuskulární. Pro zvýšení imunitní odpovědi zvířete, se imunizace provádí v několika opakováních, antisérum obsahující protilátky pak nazýváme hyperimunní, toto antisérum má vysoký titr protilátek.

Pro zvýšení imunitní odpovědi jsou společně se zájmovým imunogenem podány zvířeti také adjuvantní látky (adjuvans). Vedle zvýšení afinity antigenu k buňkám lymfatického systému, spočívá jejich význam také v ochraně antigenu před jeho degradací. Vůbec nejpoužívanější adjuvantní látkou je Freundovo adjuvans, což je emulze vodného roztoku antigenu s minerálním olejem, za současného použití emulgátoru. Mezi další často používané adjuvantní látky patří hydroxid hlinitý nebo síran hlinitodraselný (*Ferenčík, 1989*).

Samotné protilátky se z imunizovaného zvířete získávají v podobě antiséra. Ideální čas odběru antiséra je mezi sedmým a čtrnáctým dnem uplynulým od poslední imunizace.

3.1.2. Příprava čistých protilátek

Cílem purifikace je získání co možná nejčistší směsi námi požadovaných protilátek. Samotné metody purifikace můžeme rozdělit na nespecifické, kam řadíme běžné biochemické metody a na metody specifické, založené na interakci antigenu a protilátky. Přehled nejpoužívanějších metod pro izolaci protilátek je v tabulce č.1.

Nespecifické metody	Specifické metody
Frakční precipitace	Imunoafinitní chromatografie
Zónová elektroforéza	Imunoadsorbcce
Izoelektrická fokusace	
Ionexová chromatografie	
Ultracentrifugace	

Tabulka č.1: Přehled nejpoužívanějších izolačních metod pro získání protilátek.

Mezi nejpoužívanější a nejjednodušší metody izolace protilátek patří frakční precipitace. Z krevního séra se touto metodou nejdříve vysráží hledané protilátky, dále následuje jejich centrifugace a zpětné rozpuštění v pufru. Posledním krokem je pak dialýza nebo gelová filtrace získaných protilátek. Příkladem specifických metod je imunoafinitní chromatografie s proteinem G nebo A. Tyto proteiny, které jsou v imunoafinitních kolonách imobilizované, jsou klasicky součástí buněčné stěny bakterií. Proteiny G a A jsou schopny specificky reagovat s Fc-částmi imunoglobulinů a tím vychytávat námi požadovanou protilátku (*Harlow a Lane, 1988*).

3.2. Steroidní hormony

Steroidní hormony se vyskytují jak v živočišných, tak v rostlinných buňkách. Jde o látky lipofilní povahy, které vznikají procesem steroidogeneze z cholesterolu. Mezi nejznámější steroidní hormony patří estrogeny, androgeny nebo progesteron. V různých typech živočišných buněk se jejich funkce a výskyt liší, stejně tak se liší jejich role v živočišné a v rostlinné říši. Pro savce jsou steroidní hormony velmi důležitou komponentou, která ovlivňuje především ontogenezi a těhotenství (*Janeczko a Skoczowski, 2005*).

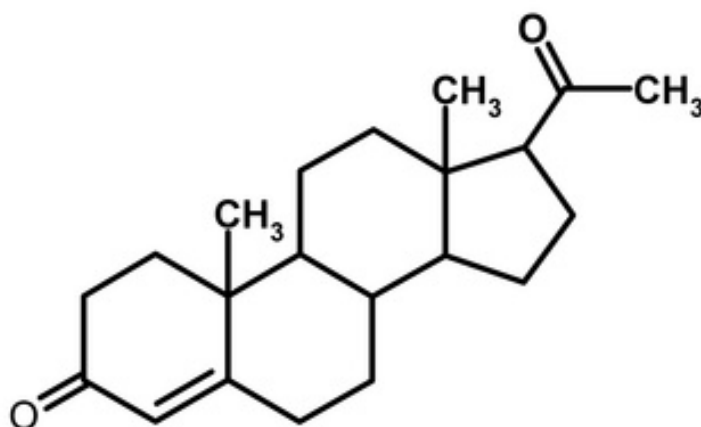
Steroidní hormony, konkrétně estrogeny, byly v rostlinách poprvé detekovány v roce 1926 (*Dohrn a kol., 1926*). Nicméně v této době byly výsledky experimentů pouze orientační, protože detekční metody nebyly příliš přesné. Značný průlom ve studii steroidních hormonů datujeme do roku 1989, kdy bylo pomocí metody RIA na přítomnost steroidních hormonů otestováno 128 druhů rostlin. Androsteron a progesteron byly prokázány u více než 80% zkoumaných druhů. (*Simmons a Grinwich, 1989*).

Pro řadu výzkumů, týkajících se výskytu a funkce steroidních hormonů, byl důležitým milníkem objev receptorů steroidních hormonů a následná studie jejich mechanismů. Membrane Steroid Binding protein 1 (MSBP1), který hraje důležitou roli v regulaci růstu, byl poprvé identifikován u *Arabidopsis thaliana*. Tento vazebný protein má vysokou afinitu především k progesteronu. (*Yang a kol., 2005*). Stejnými autory byl popsán také Steroid Binding Protein (SBP), který se zdá být pro rostliny specifický.

Příkladem steroidních hormonů hrajících důležitou roli v rostlinném životě jsou brassinosteroidy. Tyto hormony ovlivňují růst a diferenciaci orgánů, tvorbu biomasy, důležitou roli hrají v oddálení senescence (Bajguz, 2007). Druhou zajímavou skupinou jsou ekdysteroidy. Tyto látky byly nalezeny jak u živočichů (hmyz a někteří členovci), tak u rostlin (špenát a některé kapradiny) (*Jizba a kol., 1967*). Zatímco u hmyzu je jejich funkce zřejmá, u rostlin není jejich význam zcela jasný. Má se však za to, že ekdysteroidy v rostlině působí jako přírodní pesticidy (*Harmatha a Dinan, 2003*).

3.2.1. Progesteron

Progesteron, strukturním názvem pregn-4-en-3,20-dion (Obr. č.2), patří mezi nejvýznamnější steroidní hormony. Obsahuje 21 uhlíků, je tedy řazen mezi progestiny. Jeho význam pro živočišnou říši je enormní. Hraje důležitou roli v období těhotenství, kdy je produkován placentou, společně s estrogenem pak reguluje menstruaci (*Graham a Clarke, 1997*). U rostlin byl progesteron poprvé prokázán v semenech jablka (*Gawienowski a Gibbs, 1968*). Pomocí tenkovrstvé a plynové chromatografie byl progesteron kvantifikován v množství 500 ng.g^{-1} čerstvé hmoty. Bylo zjištěno, že hladina progesteronu je u rostlin rozdílná nejen mezi jednotlivými druhy, ale také mezi samotnými orgány. Koncentrace progesteronu závisí dokonce na fyziologických procesech a steroidních funkcích. Velice sofistikovanou metodu pro důkaz přítomnosti progesteronu v rostlinných vzorcích je použití imunoafinitní chromatografie, kdy jsou specifické protilátky proti progesteronu použity k purifikaci extraktu a následnému získání tohoto steroidního hormonu. Tato metoda byla ve spojení s UPLC-MS/MS použita pro kvantifikaci progesteronu z těchto druhů rostlin: *Nicotiana tabacum L*, *Digitalis purpurea* a *Inula helenium L* (*Simerský a kol., 2009*).



Obr. č. 2: Chemická struktura progesteronu.

Metabolické dráhy progesteronu byly zkoumány velkou řadou vědců hlavně v šedesátých letech dvacátého století. Z dostupných poznatků vyplývá, že prekurzory progesteronu v rostlině jsou cholesterol, campesterol, sitosterol a stigmasterol. Z těchto prekurzorů vzniká nejdříve pregnenolon (pregn-5-ene-3 β -al-20-on), který poté konvertuje na progesteron. Progesteron pak může být v rostlinných buňkách přeměněn na deriváty pregnanu a jeho konjugáty (mastné kyseliny a glykosidy) (Stohs a Roseneberg, 1975).

Po prokázání přítomnosti progesteronu v rostlinných vzorcích bylo dalším cílem vědců zkoumání účinků progesteronu na fyziologické procesy v rostlinných buňkách. Ylstra a kol.(1995) zjistili, že živočišné hormony včetně progesteronu stimulují klíčení a růst pylové láčky tabáku. Progesteron byl dále charakterizován jako jeden ze steroidních hormonů, který indukuje generativní vývoj u pšenice (Janeczko a Filek, 2002) a hůseníčku rolního (Janeczko a kol., 2003). Další významnou funkcí progesteronu je jeho schopnost zvyšovat množství minerálních prvků (P, S, Mg, Ca), které jsou nezbytné pro ontogenezi rostlin (Erdal a Dumlupinar, 2011a). Další studie prokázali stimulační účinek progesteronu na aktivitu anti-oxidativních enzymů, jako je kataláza. Tento účinek poukazuje na potencionální roli progesteronu v regulaci biotického a abiotického stresu rostlin (Erdal a Dumlupinar, 2011b).

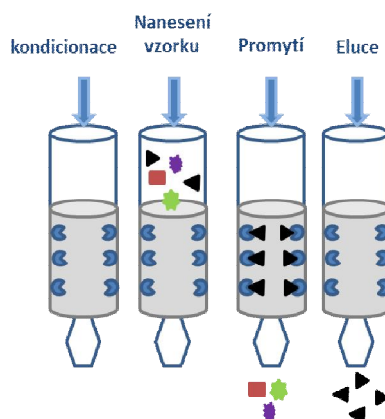
3.3. Imunoafinitní chromatografie

Chromatografie je bezesporu jednou z nejpoužívanějších separačních metod v biochemii. Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu, při které jsou složky směsi rozděleny na rozmezí dvou fází. Tyto fáze se nazývají stacionární a mobilní. Pomocí chromatografie můžeme provést jak identifikaci složek směsi, tak kvantifikaci jednotlivých analytů. V praxi to pak probíhá tak, že společně s mobilní fází prostupuje sorbentem také vzorek, jehož složky díky některé z fyzikálně - chemických vlastností interagují v různé míře se stacionární fází. Chromatografie se pak podle mnoha kritérií dělí do různých skupin. Rozlišujeme například chromatografii na tenké vrstvě, plynovou

chromatografii (GC) či kapalinovou chromatografií (LC) (http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm).

Imunoafinitní chromatografie (IAC) je speciálním příkladem afinitní chromatografie. Jde o typ sloupcové chromatografie založené stejně jako všechny imunochemické metody na interakci protilátky s antigenem. Afinitní chromatografie patří mezi velice účinné metody purifikace, které jsou charakteristické vysokou specifitou k námi požadovanému analytu (*Hennion a kol.*, 2003). Na vazbě protilátka – antigen se podílí několik rozdílných typů nekovalentních vazeb. Jde o iontové interakce, vodíkové můstky, Van der Waalsovi síly a hydrofobní interakce (*Fitzgerald a kol.*, 2011). Specifická protilátka je v IAC navázána na stacionární fázi. Směs látek, jejichž složkou je námi požadovaný antigen, je pomocí kapalně fáze prohnána stacionární fází. Námi požadovaný antigen se dle specifické vazby protilátka – antigen zachytí, ostatní zbytky směsi jsou z kolon odstraněny (*Chase*, 1983). Antigen přichycený specifickou vazbou na protilátce pak získáme elucí. Jde o specifické porušení vazby určitým činidlem (často metanol), výsledkem je pak čistý produkt obsahující námi požadované látky (*Velander*, 1989). Princip IAC na obrázku č.3.

V dnešní době má imunoafinitní chromatografie důležitou roli především při purifikačních metodách. *E. Hauserová a kol.* (2005) využili IAC pro získání 2OH3MeOBAPR z myších krevních vzorků. Pomocí monoklonálních protilátek navázaných na sorbentu, byla získána výše zmíněná látka, která je velice zajímavá pro své antiproliferační vlastnosti. *Simerský a kol.* (2009) použili IAC ve spojení s polyklonálními protilátkami proti 4-androsten-3-keto-steroidu. Tato metoda se ve spojení s UPLC-MS/MS ukázala jako velice účinná a rychlá při stanovení steroidních látek z několika druhů rostlinných vzorků (*Digitalis purpurea L. Nicotiana tabacum L.*).



Obr. č. 3: Princip imunoafinitní chromatografie.

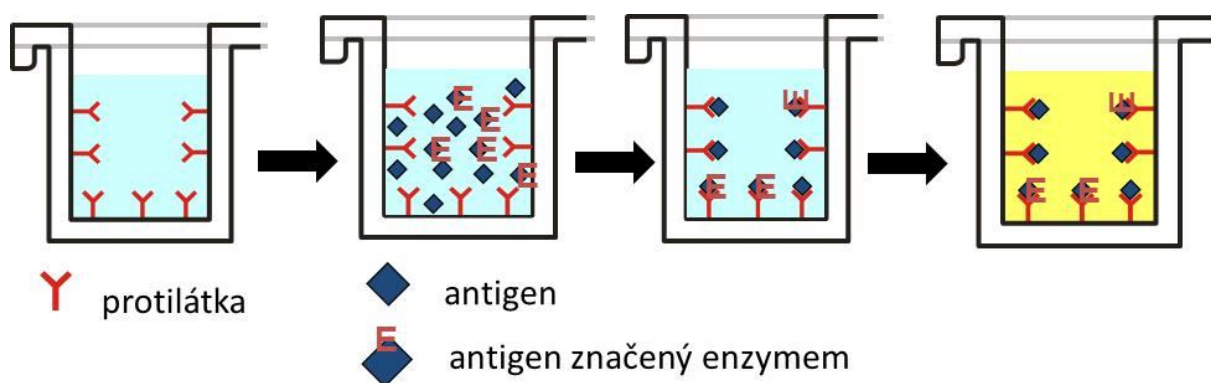
3.4. ELISA testy

ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), označovaná také jako EIA (Enzyme Immunoassay) je jednou z nejpoužívanějších imunochemických metod sloužících k detekci jak protilátek, tak antigenů. Stejně jako u ostatních imunochemických metod využíváme i u ELISA testů speciální vazby protilátky s antigenem. Při testech ELISA se navíc využívá dvou dalších vlastností protilátek. Za prvé je to schopnost těchto imunoglobulinů vázat se na povrch některých plastů, například polystyrenu. Druhou funkcí imunoglobulinů důležitou pro testy ELISA je jejich schopnost vázat pomocí Fc-fragmentů na svůj povrch enzymy (<http://www.pragostem.cz/elisa-kity.html>). Nejčastěji používanými enzymy jsou alkalická fosfatáza a křenuvá peroxidáza. K testům se využívá speciálních ELISA desek, které obsahují různé počty jamek. Jednotlivé desky se liší také typem plastového materiálu.

Rozlišujeme několik typů ELISA testů. Základními typy jsou přímá ELISA, nepřímá ELISA a sandwichová ELISA. V případě sandwichové EIA nejdříve navážeme do jamky protilátku. Poté přidáme náš zájmový antigen. Dalším krokem je navázání enzymaticky značené protilátky, která je specifická pro daný antigen. Nakonec je přidán substrát, který nám navázáním na enzym poskytuje barevnou reakci. Intenzita barevné reakce je pak změřena pomocí spektrofotometrických metod (Wood, 2011). Dalším typem ELISY, který byl využit také v experimentální části této bakalářské práce, je ELISA přímá. Tato

metoda se klasicky využívá ke kvantitativní detekci antigenu. Do jednotlivých jamek jsou nejprve navázány protilátky. Poté je přidáno známé množství zájmového antigenu a také známé množství antigenu, který je značen enzymaticky. Oba dva komponenty soutěží o vazebné místo protilátky. Lehce můžeme odvodit, že čím více bylo v reakční směsi neznačeného antigenu, tím méně označeného antigenu se nachází v komplexu s protilátkou. Nakonec je stejně jako u sandwichové ELISA metody přidán substrát, který nám poskytuje barevnou reakci. Intenzitu barevné reakce, prakticky absorbanci, poté měříme spektrofotometricky (Ferenčík, 1989). Celkový princip enzymové imunoanalýzy je popsán na obrázku č.4.

Jak už bylo řečeno, EIA testy mají velké uplatnění při mnoha imunochemických experimentech. Strnad a kol. (1992) použili ELISA test ke kvantifikaci a identifikaci izoprenoidních a aromatických cytokininů pomocí polyklonálních protilátek. Samotný ELISA test byl také použit k změření množství progesteronu v kravském mléce. K tomuto účelu byly také připraveny polyklonální protilátky, tentokrát namířené proti 11 α -hydroxyprogesteronu (Simerský a kol., 2007).



Obr. č. 4: Princip přímého ELISA testu.

4. Materiál a metody

4.1. Chemikálie a přístroje

Chemikálie:

Síran amonný, 11 α –hydroxyprogesteron–hemisukcinát (Sigma-Aldrich- USA), dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich-USA), N–hydroxysukcinimid (NHS, Sigma-Aldrich-USA), N,N–dicyclohexylkarbodiimid (DCC, Sigma-Aldrich-USA), hovězí sérový albumin (BSA, Sigma-Aldrich-USA), křenová peroxidáza (HRP, Sigma-Aldrich-USA), Freudovo kompletní adjuvants, Freudovo nekompletní adjuvants, Affigel 10 (BioRad, Německo), 1M ethanolamin (pH 8), azid sodný (Lachema, ČR), metanol, 2M kyselina sírová, destilovaná voda, standardy steroidních hormonů (Sigma-Aldrich-USA).

Není-li uvedeno jinak, všechny ostatní chemikálie jsou od firmy Lachema ČR.

Složení roztoků:

Pufr pro izolaci protilátek: 0,87g NaCl, 7,8 g NaH₂PO₄ · 2H₂O na 1 litr dest. vody, pH 7,2

Pufr pro dialýzu: 18g NaCl, 35,8g NaH₂PO₄ · 12H₂O na 1 litr dest. vody, pH 7,2

Pufr na ředění steroidních hormonů (PBS): 8,5g NaCl, 0,34g NaH₂PO₄, 2,69 g Na₂HPO₄ na 1 litr destilované vody

Promývací pufr (PBST₂₀): 1g TWEEN₂₀ (Sigma-Aldrich-USA) na 1 litr PBS

Pufr pro tracer: 0,1% BSA v PBS

Koutovací pufr: 1,5g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ na 1 litr destilované vody, pH 9,6

Substrát pro enzymatickou reakci: 0,5 ml roztoku CH₃COONa (27,2 g CH₃COONa/100 ml H₂O, pH 5,8), 100 μ l TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin, 0,1 g TMB/10 ml DMSO), 10 μ l H₂O₂ (30%, 1:5) na 10 ml dest. vody

MOPS – 20,93g MOPS (kyselina 3–morfolinopropansulfanová), 17,53g NaCl na 1 litr destilované vody, pH 7,2

Přístroje a vybavení:

Labsystems Multiscan Plus, plate reader, Finsko

UV-1601, Shimadzu, Japonsko

Vortex – Velp scientifica, Chemos, CZ

Elisa desky – NUNC – Immuno Plat, Brand products

4.2. Metody práce

4.2.1. Příprava konjugátů pro imunizaci a enzymovou imunoanalýzu

Pro účely imunizace a enzymové imunoanalýzy byl připraven konjugát 11 α -Hydroxyprogesteron-hemisukcinát-BSA (HRP). Tento konjugát byl připraven modifikovanou karbodiimidovou metodou (O'Sullivan, 1979, Gross a Bilk 1968). 10 mg haptenu (11 α -Hydroxyprogesteron-hemisukcinát) bylo rozpuštěno ve 45 μ l dimethylsulfoxidu a poté smícháno s odpovídajícím množstvím N-hydroxysukcinimidu (NHS) a N,N-dicyclohexylkarbodiimidu (DCC), celkově v molárním poměru 1:1:1. Konjugační reakce proběhla ve tmě po dobu 12 hodin.

Pro účely imunizace byl nejdříve hovězí sérový albumin (BSA) rozpuštěn v 0,13M uhličitanovém pufru o pH 7,2. Za stálého míchání byl k tomuto pufru přidán aktivovaný hapten. Konjugace probíhala 3 hodiny při laboratorní teplotě. Posledním krokem byla dialýza konjugátu proti PBS (pH 7,2), a to po dobu 5 dnů. Při přípravě konjugátu pro enzymovou imunoanalýzu byl místo BSA použit enzym křenová peroxidáza (HRP). Při konjugaci bylo dodrženo shodného postupu a podmínek jako při konjugaci s BSA.

4.2.2. Imunizace

Prvním krokem přípravy polyklonálních protilátek byla imunizace dvou vybraných králíků. Imunizací byl do těla vpraven konjugát 11 α -Hydroxyprogesteron-hemisukcinát-BSA, který byl připraven v Laboratoři růstových regulátorů. Imunizace proběhla podle standardního protokolu, a to celkem ve čtyřech dávkách, v množství 0,25 mg až 0,5 mg na jednoho králíka. Před první imunizací byla králíkům pro zlepšení imunitní odpovědi injektována také adjuvantní látka. K tomuto účelu bylo použito Freudovo kompletní adjuvans (FCA). Stejný postup byl zachován i při následných imunizacích, pouze FCA bylo nahrazeno Freudovým nekompletním adjuvans (FIA). Ve

finále bylo z jednoho králíka získáno asi 80 ml krevního séra, které bylo následně použito v dalším postupu. Celkové schéma imunizace i s časovým rozvrhem:

1.den ... první imunizace, 0,5 mg antigenu/ml/králíka, přidáno FCA

14. den ... druhá imunizace, 0,25 mg antigenu/ml/králíka, přidáno FIA

44. den ... třetí imunizace, 0,25 mg antigenu/ml/králíka, přidáno FIA

74. den ... čtvrtá imunizace, 0,25 mg antigenu/ml/králíka, přidáno FIA

80. den ... odběr krevního séra

4.2.3. Srážecí reakce

Různé druhy proteinů se srážejí při různých koncentracích solí. Přidáním neutrální soli tedy snižujeme rozpustnost bílkoviny a při konkrétní koncentraci soli docílíme úplného vysrážení námi určeného proteinu z roztoku (*Ferenčík, 1989*).

K vysrážení imunoglobulinů jsem jako srážecí činidlo použil $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7,2). Prvním krokem této srážecí reakce bylo smíchání 5 ml krevního séra s 5 ml PBS. Za stálého míchání jsem opatrně přikapával 10 ml srážecího činidla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Takto vzniklý roztok jsem za občasného promíchání nechal stát asi 30 minut při laboratorní teplotě. Poté jsem provedl centrifugaci, a to po dobu 20 minut při teplotě 4°C a při 5000xg/min.

4.2.4. Rozpuštění a dialýza protilátek

Následně jsem z centrifugační zkumavky odstranil vzniklý supernatant a sediment, která obsahovala požadované protilátky, jsem rozpustil v PBS pufru. Tento roztok jsem přenesl do dialyzačního střeva.

Dialýza je biochemická metoda, při které jsou menší molekuly oddělovány od větších, a to přes polopropustnou membránu. Hnací silou tohoto přenosu je koncentrační gradient na obou stranách membrány, kdy menší molekuly putují ven z dialyzačního střeva až do vyrovnání koncentrací uvnitř a vně. Tímto způsobem se oddělují také lehčí proteiny od imunoglobulinů, které zůstávají uvnitř střeva (*Pingoud, Urbanke, 2002*).

Izolaci protilátek pomocí dialýzy jsem provedl proti dialyzačnímu PBS pufru. Samotná dialýza trvala 3 dny, relativně čistou směs protilátek jsem následně uskladnil za přítomnosti azidu sodného při - 20°C.

4.2.5. Optimalizace ELISA metody

Jelikož každá protilátka, která je namířena proti jinému antigenu, vykazuje rozdílnou chemicko-biologickou aktivitu, je potřeba pro každou konkrétní protilátku optimalizovat metodu ELISA. Toho docílíme hledáním správné koncentrace protilátky, antigenu či enzymaticky značeného antigenu. Správná koncentrace jednotlivých komponent ELISA testu je kromě ideální vaznosti protilátky s antigenem důležitá také pro spektrofotometrické určení absorbance, kdy jak příliš vysoká, tak příliš nízká hodnota absorbance poskytují nepřesný výsledek.

Samotné testování protilátek ELISA metodou zahrnuje několik důležitých kroků. V experimentální části mé bakalářské práce jsem použil typ přímé ELISA metody, tedy test, který je založen na kompetici antigenu a enzymaticky značeného antigenu, které spolu soutěží o vazebné místo protilátky. K EIA testu byly použity 96jamkové destičky rozdělené na dvanáct sloupců po osmi jamkách.

V prvním kroku testu jsem nejdříve do jamek navázal protilátku, jako správná koncentrace se ukázala koncentrace 5 μl protilátky na 15 ml koutovacího pufru, na jednu jamku pak připadlo 150 μl tohoto roztoku. Takto nakoutované desky byly ponechány po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C. Další den jsem z desky nejdříve pomocí promývacího pufru vymyl nenavázanou protilátku. Poté jsem do každé jamky přidal 100 μl PBS. V dalším kroku jsem postupným ředěním nanesl do ELISA desky standard progesteronu. Do jamek prvního sloupce jsem nanesl 50 μl progesteronu o koncentraci 10^{-5} M. Po promíchání jsem z první řady přenesl 50 μl naředěného roztoku do další řady, kde jsem celý proces opakoval. Postupně jsem tak ředěním zleva doprava snižoval koncentraci antigenu. Do poslední, dvanácté řady, jsem pak antigen vůbec nepřidal. Tato řada, v které neproběhla kompetice antigenu s enzymaticky značeným antigenem sloužila v testu jako kontrola. V rychlém časovém sledu jsem pak až na jamku 12A přidal do všech jamek 50 μl enzymaticky značeného antigenu. Jako enzym byla v konjugátu použita křenová peroxidáza. Konjugát jsem nanesl v koncentraci 3 $\mu\text{l}/5$ ml na jednu desku, tato koncentrace se ukázala pro tuto konkrétní protilátku jako nejlepší. Desku jsem poté nechal 1 hodinu inkubovat. Následně jsem zbytky antigenu, který se nenavázal, vymyl pomocí promývacího pufru. V dalším kroku jsem do každé jamky přidal 150 μl připraveného substrátu. Reakci jsem v době, kdy byla barevná reakce dostačující pro spektrofotometrické měření, zastavil pomocí 50 μl 2M H_2SO_4 . Celou desku jsem poté přenesl do spektrofotometrického zařízení a změřil jsem absorbanci při vlnové délce 450 nm.

4.2.6. Křížová reaktivita

Jednou z nejdůležitějších charakteristik polyklonálních protilátek je jejich křížová reaktivita. Jde o schopnost protilátky vázat i antigeny, které jsou strukturně podobné antigenu, proti kterému byla protilátka připravena. Křížovou reaktivitu mnou připravené protilátky jsem změřil pomocí přímého ELISA testu. Otestováno bylo 22 steroidních hormonů, a to v několika opakováních. Postup

byl obdobný jako při optimalizaci metody, nanášená koncentrace všech hormonů včetně progesteronu byla 10^{-5}M . Standardy byly nanášeny následovně: Osm řad jsem rozdělil na čtyři skupiny po dvou řadách. Poté jsem nejdříve do prvních dvou řad přidal standard progesteronu, do dalších tří skupin po dvou řadách jsem přidal standardy tří dalších steroidních hormonů, které byly testovány na křížovou reaktivitu. Na jedné desce jsem byl tedy najednou schopen změřit křížovou reaktivitu tří rozdílných steroidních hormonů. Křížová reaktivita byla určena z poměrů absorbance, kdy procentuální vyjádření bylo odvozeno od progesteronu, jehož hodnota křížové reaktivita byla 100 %.

4.2.7. Příprava imunoafinitního gelu

Připravené polyklonální protilátky proti progesteronu byly dále využity v imunoafinitní chromatografii. Protilátka byla nejdříve dialyzovaná proti MOPSu, a to jeden den při 4°C . Poté byly protilátky navázány na speciální afinitní gel (Affigel 10 – BioRad). Postupně jsem nejdříve 5 ml gelu přenesl do plastových kolonek. Gel byl poté promyt 10 ml H_2O a 10 ml MOPSu. Takto připravený gel jsem přenesl do centrifugačních zkumavek, přidal jsem 4 ml protilátky (25 mg protilátky v 1 ml). Tuto reakční směs jsem nechal míchat 4 hodiny při 4°C . Nespecifická vazebná místa byla zablokována přidavkem 1M ethanolaminu (0,1 ml/1ml gelu). Po další hodině jsem gel nanesl do kolonek s frytou, promyl jsem ho 10 ml H_2O a 10 ml PBS. Imunoafinitní gel byl poté uchováván s přidavkem azidu sodného při teplotě 4°C v PBS pufru.

4.2.8. Testování kapacity imunoafinitního gelu

Kapacita imunoafinitního gelu připraveného v kolonkách byla změřena pomocí standardu progesteronu, který se specificky váže na protilátku. Aby bylo antigen možné navázat, musel jsem kolonky s imunoafinitním gelem nejdříve zregenerovat. Postupně jsem gel promyl 3 ml imunoafinitního pufru, 3

ml destilované vody, 3 ml metanolu, 3 ml destilované vody a znovu 3 ml imunoafinitního pufru. Standard progesteronu jsem naředil pomocí metanolu a PBS pufru na požadovanou koncentraci. Roztok progesteronu jsem asi na 3 minuty uložil do ultrazvuku. Připravený vzorek jsem poté v sedmi opakováních nanesl na imunoafinitní gel, progesteron se v určité koncentraci navázal na protilátku. Zbytek nenavázaného antigenu jsem vymyl 9 ml destilované vody. Dalším důležitým krokem byla eluce antigenu. Tu jsem provedl pomocí 3 ml metanolu. Eluát jsem pak odpařil do sucha. Koncentrace progesteronu a s ní spojená kapacita protilátek pak byla změřena pomocí UPLC-MS/MS (*Simerský a kol., 2009*). Použitý imunoafinitní gel byl poté promyt 3 ml destilované vody, následně jsem provedl opět regeneraci. Kolonky byly uchovávány s malým přídatkem azidu sodného při teplotě 4°C.

5. Výsledky

5.1. Příprava polyklonálních protilátek

Králíkům určeným pro produkci polyklonálních protilátek byl nejdříve v několika opakováních injektován konjugát 11 α -Hydroxyprogesteron-hemisukcinát-BSA za současného přidání adjuvantní látky. Vytvořené protilátky byly poté z králíků odebrány v podobě krevního séra. Immunoglobuliny byly vysráženy pomocí síranu amonného. Následovala centrifugace a rozpuštění protilátek v PBS pufru. Posledním krokem čištění protilátek byla jejich dialýza.

Koncentrace protilátek v roztoku byla změřena pomocí dvoupraskové spektrofotometrie. Měření proběhlo při vlnové délce 280 nm a výsledná koncentrace protilátky měla hodnotu 31 mg na 1ml roztoku.

5.2. Křížová reaktivita

Křížová reaktivita, jako jedna ze základních charakteristik polyklonálních protilátek, byla v experimentální části bakalářské práce měřena pomocí přímé enzymové imunoanalýzy. Testování bylo podrobena celkem 22 steroidních hormonů s podobnou i s poměrně odlišnou strukturou vůči struktuře antigenu, proti kterému byly protilátky připraveny - progesteronu. Křížová reaktivita progesteronu byla 100 %. Přehled všech steroidních hormonů i s jejich křížovou reaktivitou je v tabulce č.2.

Steroidní hormon	Křížová reaktivita (%)
β – estradiol	< 0,01
Danasol	< 0,01
Norethindron	< 0,01
Estron	< 0,01
Hydrocortison	< 0,01
Estriol	< 0,01
Prednisolon	< 0,01
17 α – hydroxyprogesteron	1,5
17 α - hydroxypregnenolon	< 0,01
Kortexolon	< 0,01
Dehydroisoandrosteron	< 0,01
Kortikosteron	< 0,01
11 α –hydroxyprogesteron	54,2
4,16–pregnadien–3,20–dion	1,97
5 α –pregnan–3,20–dion	37,2
4–androsten–3,17–dion	1,1
5–pregnen–3 β –ol–3–on	35,6
4–pregnen–20 α –ol–3- on	< 0,01
Cholesterol	< 0,01
Kortison	< 0,01
Testosteron	< 0,01
Dihydroxytestosteron	< 0,01
Progesteron	100 %

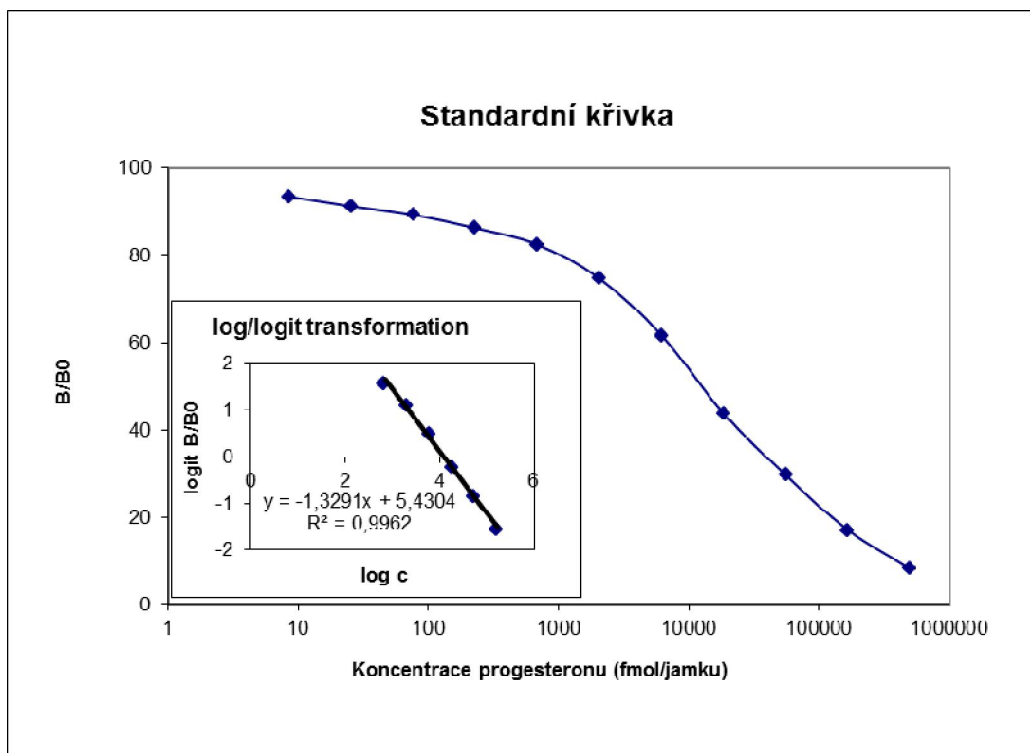
Tab. č.2: Přehled steroidních hormonů i s hodnotou křížové reaktivity.

Vysokou hodnotu křížové reaktivity vykazovali steroidní hormony 11 α -Hydroxyprogesteron, 5-pregnen-3 β -ol-3 on a 5 α -pregnan-3,20-dion. Polyklonální protilátky proti progesteronu tedy mohou být využity k získání těchto hormonů, které mají k protilátce relativně vysokou afinitu. Naopak velká řada steroidních hormonů vykazovala křížovou reaktivitu $< 0,01$, afinita protilátky k příslušným analytům je tedy skoro nulová.

5.3. Další charakteristiky protilátky

Charakterizace polyklonálních protilátek proti progesteronu byla provedena pomocí přímé ELISA metody. V této metodě spolu kompetují značený a neznačený antigen o vazebná místa protilátky. Čím nižší je koncentrace neznačeného antigenu v porovnání s antigenem značeným, tím vyšší je pochopitelně síla signálu, tedy intenzita enzymatické barevné reakce (absorbance). V grafu č.1 je vynesena závislost hodnot B/B_0 na koncentraci progesteronu. Hodnota B odpovídá absorbanci kompetice mezi značeným a neznačeným antigenem, hodnota B_0 pak odpovídá maximální absorbanci za nepřítomnosti značeného antigenu. Získanou kalibrační křivku jsem následně podrobil logaritmické transformaci podle vzorce:

$$\text{logit } B/B_0 = \ln [B/B_0 / (100 - B/B_0)].$$



Graf č.1: Závislost B/B_0 na koncentraci progesteronu.

Při koncentraci protilátky 31 $\mu\text{g/jamku}$ dostáváme hodnotu ideálního množství značeného antigenu potřebného na jednu jamku jako 8,3 ng. Za těchto podmínek odpovídá nespecifická vazba protilátky 0,81 %.

Lineární rozsah koncentrací použitelných pro naši ELISA metodu je dán tvarem kalibrační křivky. Tato číselná hodnota je závislá na koncentraci protilátky a enzymově značeného konjugátu. Po log-logit transformaci křivky dostáváme hodnotu lineárního rozsahu měření jako $13,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$ - $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$.

Jako detekční limit se uvádí nejnižší množství analytu, které ještě vyvolá odezvu odlišnou od slepého vzorku. Detekční limit pro enzymovou imunoanalýzu protilátek namířených proti progesteronu měl hodnotu $13,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$.

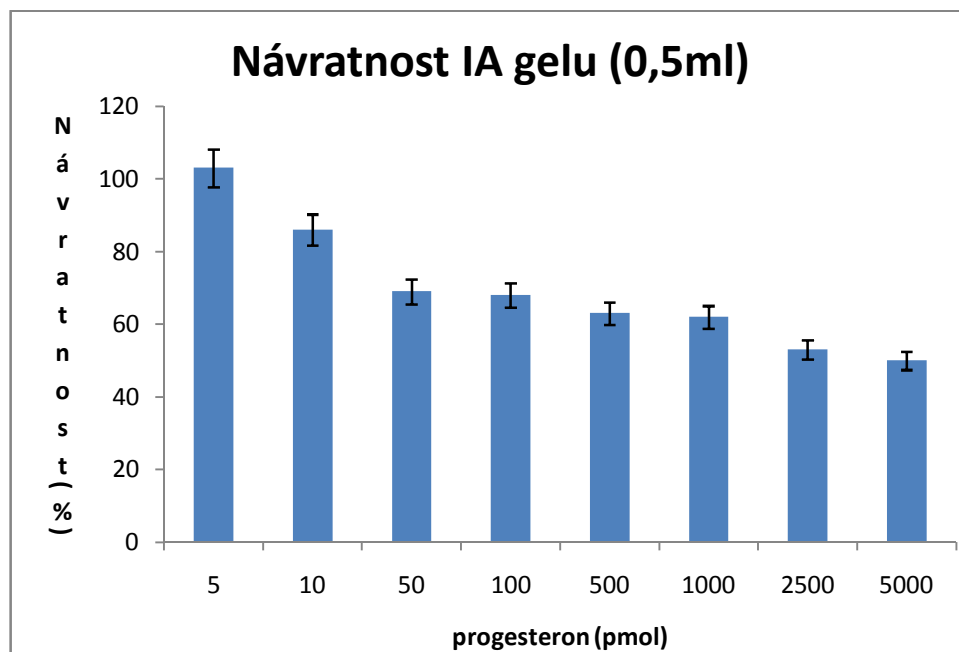
Ze sklonu kalibrační křivky byla odvozena hodnota polovičního vytěsnění ($0,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$), hodnota variability testu (4,5 %) a hodnota variability uvnitř testu (2,4 %). V tabulce č.3 jsou shrnuty všechny důležité charakteristiky protilátek.

Charakteristika protilátky	Prog 2
Lineární rozsah měření	$13,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$ - $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$
Množství značeného antigenu	8,3 ng
Detekční limit	$13,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$
Poloviční vytěsnění	$0,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$
Nespecifická vazba	0,81%
Variabilita testu	4,5%
Variabilita uvnitř testu	2,4%

Tab. č. 3: Přehled důležitých charakteristik protilátek namířených proti progesteronu.

5.4. Kapacita imunoafinitního gelu

Polyklonální protilátky připravené proti progesteronu našly své uplatnění v imunoafinitní chromatografii. Protilátky byly navázány na Affigel 10 v koncentraci 25 mg protilátky na 1 ml afinitního gelu. Kapacita tohoto imunoafinitního gelu byla testována pomocí standardu progesteronu. Kapacita gelu pro progesteron byla stanovena na hodnotu 2 nmol na 1 ml gelu. Závislost návratnosti imunoafinitního gelu na koncentraci progesteronu je v grafu č.2.



Graf č.2: Závislost návratnosti imunoafinitního gelu na koncentraci progesteronu.

6. Diskuze

Cílem této bakalářské práce byla příprava polyklonálních protilátek namířených proti progesteronu. Připravené protilátky byly navázány na afinitní gel a v budoucnosti mohou být využity v imunoafinitní chromatografii k čištění rostlinných vzorků.

Jako imunogen byl králíkům injektován konjugát 11 α -Hydroxyprogesteron-hemisukcinát-BSA. Tento konjugát byl připraven modifikovanou karbodiimidovou metodou (*O'Sullivan, 1979, Gross a Bilk 1968*). Značeným antigenem, použitým při charakterizaci polyklonálních protilátek pomocí přímé enzymové imunoanalýzy, byl konjugát 11 α -hydroxyprogesteron-hemisukcinát-HRP. *Simerský a kol. (2009)* připravili shodnou metodou polyklonální protilátky namířené proti 4-androsten-3-on-17-karboxymethyloximu. Jako metodu čištění použili imunoafinitní chromatografii s imobilizovaným proteinem G. V experimentální části mé bakalářské práce jsem jako izolační techniku použil nescifickou metodu - frakční precipitace. Tato metoda je oproti IAC s proteinem G, jednodušší, rychlejší, avšak méně specifická.

Testování křížové reaktivity bylo provedeno u 22 steroidních hormonů. Předpokládalo se, že nejvyšší hodnotu křížové reaktivity dostaneme u strukturně nejbližších látek v porovnání s progesteronem. Jelikož byl jako imunogen použit konjugát konjugát 11 α -hydroxyprogesteron-hemisukcinát-BSA, nejvyšší hodnotu křížové reaktivity vykazoval podle očekávání 11 α -hydroxyprogesteron, a to 54,2 %. Naopak 17 α -hydroxyprogesteron, který se ve struktuře liší pouze v poloze – OH skupiny vykazoval hodnotu křížové reaktivity pouze 1,5 %. *Simerský a kol. (2007)*, kteří připravili polyklonální protilátky proti progesteronu z kravského mléka, naměřili obdobné hodnoty křížových reaktivit, a to i v případě 17 α -hydroxyprogesteronu. Vysokou křížovou reaktivitu v obou dvou experimentech můžeme pozorovat u 5 α -pregnan-3,20-dionu, což je metabolit progesteronu.

Z hodnot křížových reaktivit naměřených v experimentální části mé bakalářské práce můžeme usoudit, že tyto protilátky jsou specifické

k progesteronu, naopak jejich afinita k ostatním steroidním hormonům je relativně nízká.

7. Závěr

V rámci mé bakalářské práce se podařilo připravit polyklonální protilátky namířené proti progesteronu. Tyto protilátky se ukázali jako specifické pro tento steroidní hormon. Protilátky se po vysrážení a následné dialýze nacházely v koncentraci 31 mg na 1 ml roztoku. Pomocí přímé enzymové imunoanalýzy pak byly určeny důležité charakteristiky protilátky, včetně křížové reaktivity.

Protilátky byly dále navázány na afinitní gel. Kapacita imunoafinitního gelu byla stanovena na 2 nmol na 1 ml gelu. Očekává se, že imunoafinitní chromatografie za použití imobilizovaných polyklonálních protilátek proti progesteronu značně usnadní čištění rostlinných vzorků za účelem získání progesteronu, jehož účinky na fylogenezi rostlin jsou i nadále v zájmu vědeckých pracovníků.

8. Seznam literatury

Bajguz A (2007), Metabolism of Brassinosteroids in plants, *Plant PhysiolBioch.* 45, 95-107.

Catty D (1990), *Antibodies: A practical approach*, Oxford Univerzity press, Oxford, UK.

Chase, HL (1983), Affinity separation utilizing immobilized monoclonal antibodies, *Chemical Engineering Science* 39(7/8), 1099-1125.

Dohrn M, Faure W, Poll H, Blotevogel W (1926), Tokokinine, Stoff mit sexualhormonartiger Wirkung aus Pflanzenzellen, *Med Klin* 22, 1417-1419.

Erdal S, Dumlupinar R (2011a), Exogenously treated mammalian sex hormones affect inorganic constituents of plants, *Biol Trace Elem Res* 143, 500-506.

Erdal S, Dumlupinar R (2011b), Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants, *Acta Physiol Plant* 33, 1011-1017.

Ferenčík M (1989), *Imunochémia*, Alfa, Bratislava, Slovensko.

Fitzgerald J, Leonard P, Darcy E, O'Kennedy R (2011), Immunoaffinity chromatography, *Methods Mol Biol*, Vol.681, Part1, 35-39.

Fučíková T (2002), *Imunologie*, Galén, Praha, Česká republika.

Gawienowski AM, Gibbs CC (1968), Identification of cholesterol and progesterone in apple seeds, *Steroids* 12, 545-550.

Graham JD, Clarke CL (1997), Physiological action of progesterone in target tissues, *Endocr Rev* 18, 502-519.

Gross H, Bilk L (1968), Zurektion von N-hydroxysuccinimide mitdicyklohexylcarbodiimid, *Tetrahedron* 24, 6935-6939.

Harlow E, Lane D (1988), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

Harmatha J, Dinan L (2003), Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interaction, *Phytochem. Rev.* 2, 321.

- Hauserová E, Swaczynová J, Doležal K, Lenobel R, Popa I, Hajdúch M, Vydra D, Fuksová K, Strand M (2005)**, Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins, *Journal of Chromatography A* 1100, 116-125
- Hennion MC, Pichon V (2003)**, Immuno-based sample preparation for trace analysis, *Journal of Chromatography A* 1000, 29.
- Janeczko A, Filek W (2002)**, Stimulation of generative development in partly vernalized winter wheat by animal sex hormones, *Acta Physiol. Plant.* 24, 291-295.
- Janeczko A, Filek W, Biesaga-Koscielniak J, Marcinska I, Janeczko Z (2003)**, The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24 – epibrassinolide, *Plant Cell Tiss Org Cult* 72, 147-151.
- Janeczko A, Skoczowski A (2005)**, Mammalian sex hormones in plants, *Folia histochemica et cytobiologica* Vol. 43 No. 2, 71-79.
- Jizba J, Herout V, Šorm F (1967)**, Isolation of ecdysterone (crustecdysone) from *Polypodium vulgare* L. rhizomes, *Tetrahedron Lett.* 18, 1689.
- Krejsek J, Kopecký O (2004)**, *Klinická imunologie* 1. vyd., Nucleus HK, Hradec Králové, Česká republika.
- O'Sullivan MJ (1979)**, Enzyme immunoassay: a review, *Anal Biochem* 2010, 145-154.
- Pingoud A, Urbanke J, Hoggett J, Jeltsch A (2002)**, *Biochemical methods*, Asiatech Publishers, New Delhi, Indie.
- Simerský R, Swaczynová J, Morris DA, Franěk M, Strnad M (2007)**, Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesteron in milk, *Veterinární medicína*, 52, 19-28.
- Simerský R, Novák O, Morris DA, Pouzar V, Strnad M (2009)**, Identification and Quantification of Several Mammalian Steroid Hormones in Plants by UPLC-MS/MS, *J Plant Growth Regul* 28, 125-136.

Simmons RG, Grinwich DL (1989), Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants, Can J Bot 67, 288-296.

Strnad M, Vereš K, Hanuš J, Siglerová V (1992), Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants, SPB Academic Publication, The Hague, 437-446.

Stohs SJ, Rosenberg H (1975), Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures, Lloydia, 181-194.

Velander WH (1989), Process implications of metal-dependent immunoaffinity chromatography, BioTechnology 5(3), 119-124.

Wood P (2011), Understanding Immunology, Pearson Education Limited, England.

Yang XH, Xu ZH, Xue HW (2005), Arabidopsis membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation, Plant Cell 17, 116-131.

Ylstra B, Touraev A, Brinkmann AO, Heberle-Bors E, Tunen A (1995), Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen, Plant Physiol 107, 639-643.

Internetové zdroje:

http://www.wikiskripta.eu/index.php/Genov%C3%A1_kontrola_tvorby_protil%C3%A1tek

http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm

<http://www.pragostem.cz/elisa-kity.html>