



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta Biomedicínského inženýrství  
Katedra přírodovědných oborů

**Extracelulární aktivita xylanáz bakterií rodu *Butyrivibrio***

**The extracellular activity of the xylanase of the bacterial genus  
*Butyrivibrio***

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Vedoucí práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.  
Konzultant: MVDr. Jiří Šimůnek CSc.

**Bc. Kateřina Žambochová**

---

**Kladno 2016**

Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2015/2016

## Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Kateřina Žambochová**  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu  
Téma: **Extracelulární aktivita xylanáz bakterií rodu *Butyrivibrio***  
Téma anglicky: The extracellular activity of the xylanase of the bacterial genus *Butyrivibrio*

### Zásady pro vypracování:

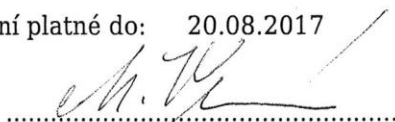
1. Vypracujte literární přehled k diplomové práci o anaerobních bakteriích trávicího traktu býložravců a člověka schopných degradovat xylan.
2. Seznamte se s přístrojovým vybavením Laboratoře anaerobní mikrobiologie zejména PROTEAN II (Biorad), denzitometrickými přístroji, Protean IEF a s mikrobiologickými a proteomickými metodikami.
3. Kultivací anaerobních xylanolytických bakterií r. *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio* se známou xylanolytickou aktivitou získajte metodou ultracentrifugace a ultrafiltrace hrubý enzymový preparát, a metodou sloupcové gelové chromatografie proveďte separaci proteinů.
4. V získaných frakcích enzymové aktivity xylanolytických enzymů. Metodou 2D elektroforézy proveďte mapování přítomných proteinů. Pomocí zymografie vizualizujte enzymy s xylanolytickou aktivitou.
5. U vybraných aktivních proteinů se pokuste pomocí PMS (peptidového fingerprintingu) metodou MALDI-TOF identifikovat enzymy s výraznou aktivitou, jež budou dostupné v proteinových databázích a taxonomicky zařadte.

### Seznam odborné literatury:

- [1] Flint H. J., Zhang J. X. and Martin., J., Multiplicity and expression of xylanase in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavescens*, *Curr. Microbiol.*, Vol. 29, 1994, 129-134 s.
- [2] Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Battallar, G., Contreras, S., del Carmen Vargas, M. and Mora, J., Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes, *Biol. Proced.*, Vol. 7, No. 1, 2005, 117-135 s.
- [3] Dalrymple, B.P., Swadling, Y., Layton, I., Gobius, K.S. and Xue, G.P., Distribution and evolution of the xylanase genes *xynA* and *xynB* and their homologues in strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Appl Environ Microbiol.*, No. 65, 1999, 3660-3667 s.
- [4] Dune, J. C., Dong, L., Kelly, W. J., Bond, J. J., Attwood, G. T., Jordan, T. W., Extracellular polysaccharide-degrading proteome of *Butyrivibrio proteoclasticus*, *J. Proteome Res.*, Vol. 11, No. 1, 2012, 131-142 s.

Vedoucí: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.  
Konzultant: MVDr. Jiří Šimůnek, CSc. – Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR

Zadání platné do: 20.08.2017

  
vedoucí katedry / pracoviště

  
děkan

V Kladně dne 02.02.2016

## **Název diplomové práce:**

Extracelulární aktivita xylanáz bakterií rodu *Butyrivibrio*

## **Abstrakt:**

Xylanázy spolu s ostatními fibrolytickými enzymy hrají klíčovou roli při degradaci celulózy v trávicím traktu býložravců i člověka a v dalších procesech anaerobní degradace biomasy v biotechnologiích a průmyslu. Tato diplomová práce se zaměřuje na charakterizaci xylanolytických enzymů bakterií rodu *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio*. Purifikované aktivní frakce xylanáz byly elektroforeticky separovány na přístroji Protean II (BioRad) pomocí SDS-PAGE a vizualizovány metodou zymografie s přidavkem CM xylanu v polyakrylamidovém gelu. Bandy s výraznou aktivitou byly použity pro hmotnostní analýzu peptidových fragmentů (MALDI-TOF/TOF MS). Další charakterizace byla provedena metodou 2D-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu s izoelektrofokusací prováděnou pomocí přístroje Protean IEF. Významná aktivita extracelulárních xylanolytických enzymů byla detekována u bakterií *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* a *Butyrivibrio fibrisolvens*.

## **Klíčová slova:**

Xylanázy, xylanolytické bakterie, proteomika, elektroforéza, zymografie, hmotnostní spektrometrie

**Diploma thesis title:**

The extracellular activity of the xylanase of the bacterial genus *Butyrivibrio*

**Abstract:**

Xylanases and other fibrolytic enzymes play a crucial role in cellulose degradation important in ruminants or human gut and other processes of anaerobic degradation of biomass in biotechnology or industry. The aim of this diploma thesis is to identify and characterize xylanolytic enzymes of their significant producers of bacterial genus *Butyrivibrio* and *Pseudobutyrvibrio*. Purified active fractions of xylanases were electrophoretically separated on Protean II (BioRad) by SDS-PAGE and visualized by zymography with addition of CM xylan in polyacrylamid gel. Bands with significant activity were used for mass analysis of peptide fragment (MALDI-TOF/TOF MS). Further characterisation was carried out through 2D electrophoresis on polyacrylamid gel with isoelectrofocustion on Protean IEF (BioRad). Significant enzyme activity was detected in extracellular enzymes of *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* and *Butyrivibrio fibrisolvens*.

**Key words:**

Xylanases, xylanolytic bacteria, proteomics, electrophoresis, zymography, mass spectrometry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Extracelulární aktivita xylanáz bakterií rodu *Butyrivibrio* vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V ..... dne .....

.....

podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala RNDr. Tat'áně Jarošíkové CSc. za umožnění vypracování zajímavého tématu diplomové práce v laboratoři anaerobní mikrobiologie na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., za podporu, přínosné rady a vedení při psaní práce.

Velice děkuji MVDr. Jiřímu Šimůnkovi CSc. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji Ing. Mgr. Haně Sechovcové za spolupráci, ochotu a všestrannou pomoc.

Tato práce byla vypracována v rámci projektu GAČR 16-12431S: Struktura a synergie fibrolytických enzymů v bachoru, řešitel Ing. Jan Kopečný, DrSc.

## Seznam zkratek

- 1D .....jednorozměrný (z angl. one dimensional)
- 2D .....dvourozměrný (z angl. two dimensional)
- 3D .....trojrozměrný (z angl. three dimensional)
- AV ČR.....Akademie věd České republiky
- BCA.....kyselina bicinchoninová (z angl. bicinchoninic acid)
- Bf 3071 .....označení kmene bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*
- BSA .....hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
- C5 .....monosacharid s pěti uhlíky, pentóza
- C6 .....monosacharid se šesti uhlíky, hexóza
- CAZy.....enzymy rozkládající sacharidy (z angl. Carbohydrate-Active Enzyme)
- CCD.....zařízení reagující na elektrický náboj (z angl. charge-coupled device)
- CM .....karboxymethyl (z angl. carboxymethyl)
- dpi.....počet bodů (pixelů) na palec (z angl. pixels per inch)
- DTT .....dithiotreitol
- ESI.....elektrosprejová ionizace (z angl. electrospray ionization)
- GH.....glykosidické hydrolázy
- HPLC.....vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
- CHAPS .....3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonate
- IAA.....iodacetamid
- IEF.....izoelektrofokusaci
- IPG .....imobilizovaný pH gradient (z angl. immobilized pH gradient)
- JK 170 .....označení pro bakterii *Pseudobutyrovibrio xylanivorans*
- MALDI.....matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
- MS .....hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
- PAHBAH .....hydrazid kyseliny 4-hydroxybenzoové
- PBS.....fosfátový pufr (z angl. phosphate-buffered saline)
- PCR .....polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
- PMS.....peptidový fingerprinting (z angl. peptide mass searching)
- R<sub>f</sub>.....relativní vzdálenost bandu v rámci gelu (z angl. relative front)
- RPM .....počet otáček za minutu (z angl. revolutions per minute)

SDS.....dodecylsírán sodný  
SDS-PAGE....gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsíránu sodného (z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)  
TCA.....kyselina trichloroctová (z angl. Trichloroacetic acid)  
TEMED .....N-tetramethylethylendiamin  
TGS .....Tris-glycin-SDS  
TOF .....analyzátor doby letu (z angl. time of flight)  
TRIS .....trisaminomethan  
UC 142 .....označení pro bakterii *Butyrivibrio proteoclasticus*  
UV .....ultrafialový (z angl. ultraviolet)  
VFA.....těkavé mastné kyseliny (z angl. volatile fatty acids)



## Seznam veličin a jednotek

$\varepsilon$	$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	absorpční koeficient
$\lambda$	nm	vlnová délka
$\tau$	s	čas
A	-	absorbance
a	$\mu\text{g/ml/h}$	enzymová aktivita
c	mol/l (M)	molární koncentrace (molarita)
$c_m$	$\mu\text{g/ml}$	hmotnostní koncentrace (molalita)
$c_N$	eq/l (N)	normalita
F	m	ohnisková vzdálenost
f	Hz	frekvence
F/d	-	Clonové číslo
$f_r$	RPM	frekvence rotace
I	A	proud
k	-	směrnice kalibrační křivky
l	m	délka absorpční dráhy (šířka kyvety se vzorkem)
M	kDa	molekulová hmotnost
m	g	hmotnost
m/z	-	hmotnost iontu / nábojové číslo (počet elementárních nábojů)
p	Pa	tlak
pH	-	pH
pI	-	izoelektrický bod
$M_r$	-	relativní molekulová hmotnost
S	$\text{m}^2$	plocha
T	-	transmitance
t	$^{\circ}\text{C}$	teplota
$t_e$	s	eluční čas
U	V	napětí
V	ml	objem
$V_e$	ml	eluční objem
x	-	ředění roztoku

# Obsah

Úvod.....	1
1 Teoretická východiska.....	2
1.1 Xylan .....	2
1.2 Xylanolytické bakterie v trávicím traktu živočichů .....	3
1.2.1 Bachorový mikrobiom .....	3
1.3 Xylanolytické enzymy .....	4
1.3.1 Xylanázy- klasifikace a vlastnosti .....	4
1.3.2 Enzymatický rozklad xylanu .....	6
1.3.3 Využití xylanáz .....	7
1.4 Mikrobiologické a proteomické metody.....	9
1.4.1 Gelová chromatografie .....	10
1.4.2 Elektroforéza.....	11
1.4.3 Stanovení bílkovin .....	12
1.4.4 Stanovení enzymových aktivit.....	14
1.4.5 Hmotnostní spektrometrie .....	16
2 Cíle a hypotézy.....	17
3 Přístrojové vybavení.....	18
3.1 Protean II Cell.....	18
3.2 Protean IEF .....	20
3.3 Molecular imager Gel Doc XR+ .....	22
3.3.1 CCD kamera .....	23
3.3.2 Zdroje záření.....	23
3.3.3 Software Image Lab.....	24
3.4 Imaging Densitometer Model GS-700 .....	25
3.5 Thermo Spectronic Biomate .....	26
4 Metody.....	28
4.1 Kultivace bakterií .....	28
4.1.1 Příprava kultivačního média .....	28
4.2 Izolace extracelulárních enzymů .....	30
4.3 Frakcionace a purifikace.....	31
4.3.1 Chromatografická gelová filtrace .....	31
4.4 Stanovení koncentrace bílkovin.....	33

4.4.1 Stanovení bílkovin metodou Bradford.....	33
4.5 Stanovení enzymových aktivit.....	34
4.5.1 Stanovení xylanázové aktivity – PAHBAH .....	35
4.6 1D elektroforetická separace .....	36
4.6.1 SDS PAGE, Zymografie.....	37
4.6.2 Barvení zymogramu.....	40
4.6.3 Detekce bílkovin pomocí Coomassie Blue.....	41
4.6.4 Detekce bílkovin stříbrem.....	41
4.7 2D elektroforetická separace .....	42
4.7.1 Příprava vzorků pro 2D elektroforézu a zymogram vysrážením TCA.....	43
4.7.2 Dvourozměrné elektroforéza .....	44
4.8 Vyhodnocení elektroforetických metod .....	47
4.9 Hmotnostní spektrometrie .....	47
4.9.1 MALDI-TOF .....	47
5 Výsledky.....	48
5.1 Koncentrace bílkovin.....	48
5.2 Stanovení enzymových aktivit.....	50
5.3 1D elektroforéza, zymografie .....	53
5.3.1 Barvení stříbrem .....	53
5.3.2 Barvení coomassie blue .....	54
5.3.3 Zymografie.....	55
5.3.4 Denzitometrie.....	56
5.3.5 Porovnání elektroforézy a zymografie.....	57
5.4 2D elektroforéza .....	58
5.5 Hmotnostní spektrometrie .....	60
5.5.1 Sekvence na MALDI TOF/TOF .....	60
5.5.2 Taxonomické zařazení – fylogenetický strom .....	62
6 Diskuse .....	63
6.1 Obsah proteinů.....	63
6.2 Enzymové aktivity .....	64
6.3 Elektroforetická separace proteinů a zymografická vizualizace xylanáz.....	65
6.4 Hmotnostní spektrometrie .....	67
Závěr.....	68
Reference.....	69

Seznam obrázků .....	74
Seznam tabulek .....	75
Přílohy .....	76

## ÚVOD

Význam, velká rozmanitost a značný biotechnologický potenciál jsou hlavními důvody, proč se orientujeme právě na xylanázy. V posledních třiceti letech značně vzrostla potřeba a zájem o využití biomasy jako obnovitelného zdroje paliv a řady chemických látek pro chemický, potravinářský, papírenský či textilní průmysl [1]. Xylanázy jsou právě jedny z enzymů, které umožňují rozklad biomasy pro tyto účely. Lignocelulózy, jejichž součástí je xylan, představují významný obnovitelný zdroj energie. Lesnictví, zemědělství, bioodpad či zbytky jídla tvoří v tomto ohledu obrovský zdroj lignocelulózních materiálů. Hydrolýzou polysacharidových složek na lignocelulózní frakce lze rozložit dřevo, komunální odpad nebo zemědělské zbytky na fermentovatelné cukry. Tento proces konverze lze uskutečnit termochemicky nebo biologicky. Vzniklé rozpustné cukry mohou být pak fermentovány na požadovaný konečný produkt. [1] Tyto konečné produkty mohou tvořit analogie k produktům získaných z neobnovitelných fosilních zdrojů. Mohou tedy neobnovitelné zdroje nahradit a tím napomoci vyřešit i současné problémy s jejich omezeným množstvím ale také s nimi spojené globální oteplování, znečištění apod. [2]

Biodegradace rostlinných polysacharidů je důležitou součástí koloběhu uhlíku. V přírodě spolupracuje velká řada organismů na recyklaci uhlíku z lignocelulózy. Výzkum se v současnosti zaměřil na biochemii a genetiku enzymových systémů, což vedlo ke snadnějšímu zvládnutí degradace ligninu, celulózy a hemicelulózy a to kombinací metod molekulární genetiky, biochemie a strukturní biologie. [1]

Tato práce se zabývá použitím metod biomedicínského výzkumu při identifikaci xylanolytických enzymů bakterií rodu *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrovibrio*. K identifikaci a popisu enzymového aparátu byla použita řada proteomických metod, kterými jsou chromatografická gelová filtrace a separace, stanovení obsahu proteinů metodou podle Bradfordové, spektrometrické měření enzymových aktivit, elektroforéza, zymografie, denzitometrie a hmotnostní spektrometrie.

Cílem této práce je charakterizovat xylanolytický enzymový aparát za pomoci zmíněných metod u vybraných významných zástupců bakterií rodu *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrovibrio*.

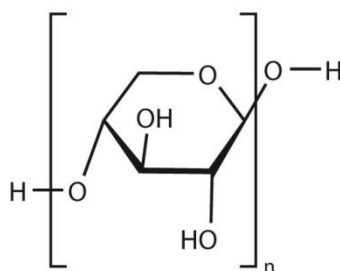
# 1 TEORETICKÁ VÝCHODISKA

Lignocelulózní materiály se nachází v buněčné stěně rostlinných buněk a tvoří přibližně 50 % biomasy, jejíž roční produkce je odhadována na  $10 - 50 \cdot 10^{12}$  tun. Lignocelulózní materiály tvoří z 20 – 35 % hemicelulózy, jsou tedy druhý nejrozšířenější polysacharidový materiál po celulóze a chitinu. V přírodě umí degradovat buněčnou stěnu rostlinných buněk pouze houby a bakterie, které vylučují širokou škálu enzymů k úplnému rozkladu celulózy, hemicelulózy a ligninu. [2]

## 1.1 Xylan

Xylan je hemicelulóza, která je společně s celulózou a ligninem obsažená v lignocelulózních materiálech. Svým zastoupením v buněčné stěně rostlin je zodpovědný za růst a rozvoj rostliny a dále zvyšuje odolnost a pevnost buněčné stěny a tím i napomáhá obraně před patogeny. [3]

Xylan je polysacharid, jehož složení se u jednotlivých druhů rostlin liší. Jeho kostru tvoří lineární polymer  $\beta$ -D-xylopyranosylových jednotek vázaných k sobě 1 $\rightarrow$ 4 glykosidovou vazbou. Na tuto základní kostru se pak vážou jednotky acetylové, glukuronopyranosylové, 4-O-metyl-D-glukuronopyranosylové,  $\alpha$ -L-arabinofuranosylové a feruloylové v různém poměru zastoupení. [4,5] Počet jednotek polysacharidu se pohybuje v řádu desítek až stovek podle druhu rostliny, například tvrdší dřevo obsahuje delší řetězce xylanu než měkké dřevo. [4]



Obrázek 1: Základní jednotka kostry xylanu [6]

Na základě různého procenta zastoupení postranních skupin se xylan dělí do několika kategorií: lineární homoxylan, arabinoxylan, glukuronoxylan a glukuronoarabinoxylan. Zastoupení postranních skupin určuje vlastnosti xylanu, jako je jeho rozpustnost, prostorová konformace a reaktivita xylanu s dalšími komponenty lignocelulózy a tím značně ovlivňuje náchylnost k enzymatickému štěpení. [4]

## 1.2 Xylanolytické bakterie v trávicím traktu živočichů

Mikrobiom trávicího traktu člověka či přežvýkavců je vysoce komplexní a obsahuje stovky druhů bakterií [7]. Složení mikrobiomu trávicího traktu a změny četnosti jednotlivých mikrobiálních komponent je silně ovlivněno mnoha faktory, jako především kdo je hostitelem, jaká je jeho genetická výbava, imunologické faktory, užívání antibiotik, složení stravy [7] (přítomnost xenobiotických látek), stravovací návyky a další. Strava má vliv na složení mikroorganismů ale také na samotné prostředí trávicího ústrojí jako je jeho průchodnost nebo pH [7]. Nejdůležitější je poměr příjmu tří hlavních složek stravy, kterými jsou sacharidy, bílkoviny a tuky. Především pak když si hostitel nedokáže sám syntetizovat všechny potřebné enzymy k trávení těchto složek, hlavně rostlinných polysacharidů, připadá tato úloha mikroorganismům žijícím v jeho trávicím traktu. [7]

U člověka rozlišujeme stravitelnou a nestravitelnou část rostlinné stravy. V lidském střevě žije  $10^{11}$  bakterií v gramu obsahu. V trávení lignocelulóz jsou významné druhy *Ruminococcus champanellensis*, který je hlavním producentem celuláz v lidském střevě a *Ruminococcus bromii*, který hraje klíčovou roli při štěpení nefermentovatelných polysacharidů. Pouze u dětí afrických vesničanů byly nalezeny ve střevní mikroflóře xylanolytické bakterie rodu *Prevotella* a *Xylanibacter*, což se opět odráží ve složení jejich stravy. [7]

Vzhledem ke složení stravy jsou přežvýkavci a termiti nejvýznamnějšími hostiteli xylanolytických bakterií. V této práci se soustředíme především na xylanolytické bakterie žijící v batoru přežvýkavců.

### 1.2.1 Batorový mikrobiom

Bator hostí řadu mikroorganismů a většina z nich se aktivně podílí na degradaci buněčné stěny rostlinných buněk. Štěpení lignocelulózních materiálů je pro přežvýkavce zásadní k získání energie ze stravy [8]. Prostřednictvím mikrobiálních enzymů mají schopnost zprostředkovaně a velmi efektivně strávit i tu nejpevnější formu lignocelulóz, která je pro jiné živočichy nestravitelnou. Na štěpení lignocelulóz se podílejí prvoci, anaerobní mikroskopické houby a největší mírou bakterie produkcí štěpících enzymů [8]. Tyto mikroorganismy se vyskytují v batoru buďto jako trvale přichycené k epitelu žaludku nebo jako putující s potravou [9]. Největší zastoupení mají bakterie štěpící lignocelulózní materiály. Dále se v batoru nachází i organismy zpracovávající kyselinu mléčnou, škroby a acetogenní bakterie [9]. Navzdory tomu, jak složité a různorodé struktury musí štěpit, existuje relativně málo

druhů, které to dokážou [8]. Na trávení celulózy se podílejí jen dva rody bakterií a to bakterie rodu *Fibrobacter* a *Ruminococcus* [10]. *Fibrobacter succinogenes* je dominantní producent celuláz v bacheru. Dalšími hojně zastoupenými jsou *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavesciens* [1]. Bakterie štěpící necelulózní materiály jsou pak například *Clostridium proteoclasticum* produkující více než 100 štěpících enzymů nebo *Prevotella ruminicola* produkující kolem 80 enzymů [8].

Hlavními producenty xylanáz jsou bakterie rodu *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Clostridium* a *Prevotella* [11]. Také již výše zmíněné rody *Ruminococcus* a *Fibrobacter* a navíc r. *Bacillus* a *Bacteroides* produkují mimo jiné i xylanolytické enzymy [12,1]. S ohledem na vysokou aktivitu a velkou variabilitu produkovaných enzymů jsou tyto mikroorganismy považovány za klíčové pro bacherový mikrobiom.

### 1.3 Xylanolytické enzymy

Xylanolytické enzymy neboli xylanázy jsou hydrolytické enzymy štěpící xylan, čímž se podílí na degradaci lignocelulózních materiálů.



Obrázek 2: 3D struktura xylanáz [13]

#### 1.3.1 Xylanázy – klasifikace a vlastnosti

Xylanázy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu glykosidických vazeb ( $\beta$ -1,4) v základní kostře xylanu [12], jsou to tzv. glykosidické hydrolázy (GH). Xylanázy jsou klasifikovány



různými způsoby především na základě jejich vlastností. Když byla objevena souvislost mezi molekulární hmotností a izoelektrickým bodem (pI) [14], vzniklo dělení xylanáz podle těchto fyzikálně-chemických vlastností na typ F s vysokou molekulovou hmotností (>30 kDa) a kyselým pI a typ G s nízkou molekulovou hmotností (<30 kDa) a zásaditým pI [2]. Tento systém však nebyl dokonalý, protože se našly i výjimky, které nebylo možno zařadit ani do jedné ze zmíněných skupin. Jako více ucelený klasifikační systém vzniklo dělení založené na primární struktuře a podobnostech sekvencí aminokyselin katalytických domén [15], které zohledňuje jak strukturu, tak mechanické vlastnosti [16]. Celý klasifikační systém lze najít v databázi enzymů štěpící karbohydráty CAZy (Carbohydrate-Active Enzyme), která shromažďuje sekvence známých enzymů a klasifikaci do rodin enzymů [2]. Podle CAZy databáze (<http://www.cazy.org/>) se xylanázy řadí do rodin GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 a 62. Rodiny 16,51 a 62 jsou enzymy s více funkcemi a rodiny 9, 12, 26, 30 a 44 mají xylanolytickou aktivitu jako vedlejší nebo sekundární funkci. Enzymy s významnou katalytickou doménou s endo-1,4- $\beta$ -xylanázovou aktivitou jsou rodiny 5, 7, 8, 10, 11 a 43 [16]. Tyto rodiny se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi, strukturou, způsobem činnosti a substrátovou specifitou [16]. Endoxylanázy jsou zatím nejlépe prozkoumány z xylanolytických enzymů [1].

### Rodiny GH10 a GH11

Xylanázy rodiny GH10 mohou být díky svým vlastnostem také označovány jako rodina G a rodina GH11 může být ze stejného důvodu také nazývána rodina F. [17,18]

Zástupci GH10 jsou endo-1,4- $\beta$ -xylanázy a endo-1,3- $\beta$ -xylanázy [19]. Jsou katalyticky přízpůsobiví a mají menší substrátovou specifitu než zástupci GH11 [20,21]. Rodina GH11 se skládá čistě z xylanáz a má tak vysokou substrátovou specifitu a vysokou katalytickou účinnost. Dalšími vlastnostmi GH11 jsou relativně velké rozmezí optimálních hodnot pH a teploty, což je činní vhodnými pro použití v různých podmínkách a široké škále aplikací. [2]

GH10 enzymy jsou také schopny hydrolyzovat vazby mezi xylózy blíže k postranním řetězcům [22], GH11 naopak štěpí spíše oblasti základní kostry s žádnými nebo málo připojenými postranními jednotkami [20]. Xylanázy dokážou rozpoznat navázané postranní řetězce a jejich množství tak ovlivňuje vznik různých produktů štěpení [22].

### Rodiny GH 5, 7, 8 a 43

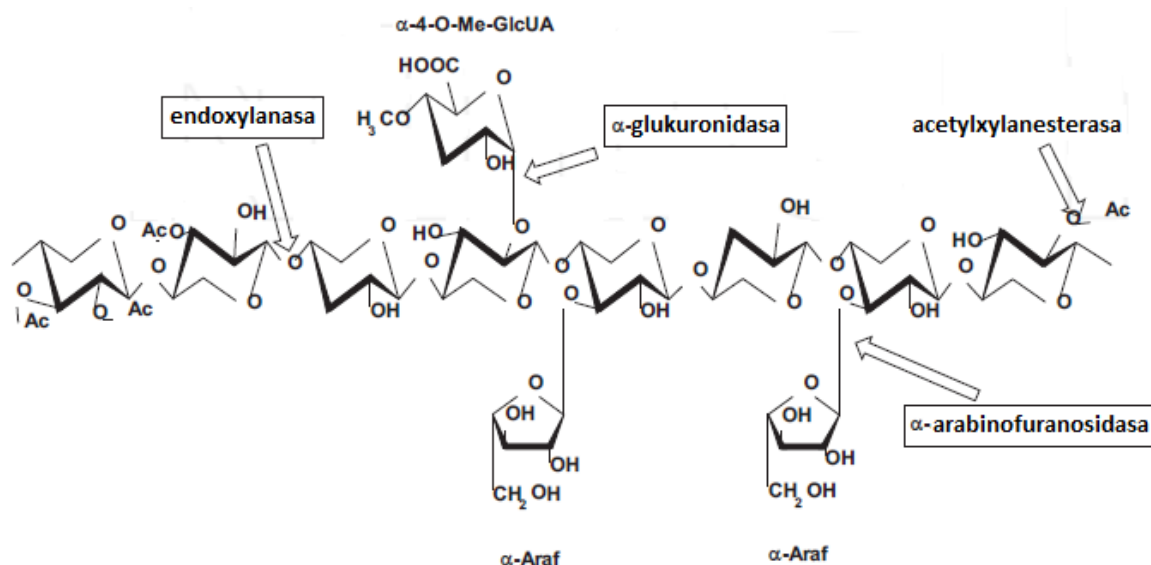
Rodina GH5, také označována písmenem A, je největší z GH rodin [16]. Rodina GH8, také označována písmenem D, je složena převážně z celuláz a dále se tam řadí i chitinázy,

lichenázy a endo-1,4- $\beta$ -xylanázy [12]. Rodiny GH7 a GH43 obsahují jen pár enzymů s xylanázovou aktivitou. Zástupci rodiny GH7 mají vysokou molekulovou hmotnost, nízké pI a nižší substrátovou specifitu [16]. Zástupci rodiny GH43 nebyli doposud příliš prozkoumáni, určena byla struktura pouze u jednoho zástupce této rodiny [12].

### 1.3.2 Enzymatický rozklad xylanu

K degradaci xylanu je kvůli jeho heterogenitě a také složitosti chemické struktury lignocelulóz potřeba celý komplex několika hydrolytických enzymů s různými specifickými a vlastnostmi [12]. Xylanolytický enzymový systém se běžně skládá z endoxylanáz,  $\beta$ -xylosidáz,  $\alpha$ -glukuronidáz,  $\alpha$ -arabinofuranosidáz a acetylxylanesteráz [23]. Všechny tyto enzymy spolupracují na rozložení xylanu na jednodušší cukry. Nejdůležitějšími v tomto komplexu enzymů jsou endoxylanázy (endo-1,4- $\beta$ -xylanázy) díky jejich schopnosti přímo štěpit glykosidové vazby základní kostry xylanu a tak uvolňovat krátké xylooligosacharidy [24].

Postupně se uvolňující malé množství enzymů nejdříve odštěpuje z polymeru xylanu nízkomolekulární fragmenty, mezi něž patří xylóza, xylobióza, xylooligosacharidy, heterodisacharidy xylózy a glukózy a jejich prostorové izomery [4]. Endoxylanáza pak katalyzuje náhodně hydrolýzu xylanu na xylooligosacharidy a  $\beta$ -xylosidáza přitom uvolňuje zbytky xylosy z neredukujících konců xylooligosacharidů. Kompletní rozklad završuje acetylexeráza, která odštěpuje acetylové skupiny od základní kostry xylanu [25,26].



Obrázek 3: Struktura a enzymatický rozklad xylanu. Ac: acetylová jednotka;  $\alpha$ -Araf:  $\alpha$ -arabinofuranosa;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA:  $\alpha$ -4-O-metylglukuronová kyselina. Převzato z [27]

### 1.3.3 Využití xylanáz

Xylan je významným zdrojem mnoha molekul jako například fermentovatelných monosacharidů (C5 a C6), oligosacharidů a fenolových složek a tyto molekuly mohou být dál zpracovány na požadovaný konečný produkt [28]. K rozkladu xylanu je potřeba enzymů xylanáz. Rozmanitost a složitost struktury xylanu také vznikla velké škály xylanáz s různými vlastnostmi, nabízí se tedy široký rozsah jejich využití a aplikací. Xylanázy již našly uplatnění v biotechnologiích, farmaceutickém průmyslu, přípravě biopaliv, papírenském průmyslu, potravinářském průmyslu, výrobě krmiv a textilním průmyslu. Využití také našly jako nástroj v molekulární biologii jako sondy pro in situ zkoumání buněčné stěny rostlinných buněk [2].

#### Papírenství a zpracování buničiny

Jedna z nejvýznamnějších biotechnologických aplikací xylanáz je bělení buničiny [29]. Použití enzymů při zpracování papíru strhlo velký zájem díky finančním úspoře a řadě výhod při bělení papíru [30]. Xylanázy společně s dalšími enzymy redukuje obsah ligninu a zvyšují jas při bělení buničiny [27,29]. Obsah ligninu v buničině zapříčiňuje její nahnědlou barvu [31]. Odstraněním tohoto ligninu lze dosáhnout různých stupňů bělení až i čistě bílého papíru [32]. Odpadá tak potřeba použití chemických bělidel jako jsou chlor nebo dithioničitan sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), které jsou toxické a mohou tvořit též toxické, mutagenní a životnímu prostředí nebezpečné organické sloučeniny chloru [12].

Štěpení hemicelulóz je jednodušší než štěpení ligninu, proto se xylanázy osvědčily jako účinnější než samotné enzymy štěpící lignin. Degradace hemicelulózy napomáhá rozložit celou strukturu lignocelulózy, což usnadní odstranění ligninu pomocí slabých oxidantů. [31,33] Xylanázy pro tyto účely musí mít jisté vlastnosti. Hlavním kritériem je, aby šlo o enzymy, které neštěpí zároveň i celulózu, jež tvoří základ buničiny [34]. Dále by měly být stabilní při vysokých teplotách [35] a mít optimální pH v zásadité oblasti [36].

#### Příprava biopaliv

Současné biopaliva jsou primárními produkty biokonverze lignocelulózních materiálů z biomasy. Nejvhodnější alternativa k fosilním palivům je ethanol. Lignocelulózní materiály lze rozložit pomocí xylanáz a dalších hydrolytických enzymů na ethanol. Prvním krokem je uvolnění hemicelulózy a celulózy z komplexu od ligninu. Druhým krokem je rozložení těchto polysacharidů na monosacharidy (pentosy a hexosy), ze kterých se pak vyrábí ethanol. [12]

Druhá generace biopaliv by měla být přínosem pro životní prostředí, ekonomiku a jejich výrobu [37].

#### Potravinářský průmysl a produkce krmiv pro zvířata

Xylanázy společně s pektinázami, celulózami a amylázami se používají v potravinářském průmyslu k čištění džusů [12,2]. Mohou také usnadnit extrakci kávy, rostlinných olejů a škrobů [25]. Lze jimi také vylepšit konzistenci piva [14]. Některé obilniny obsahují arabinoxylany, které jsou částečně rozpustné ve vodě a vytváří viskózní hmotu, které může působit problémy při filtraci piva a tvorbě zákalu [12]. Pomocí xylanáz se však arabinoxylan může z obilnin odstranit.

Při depolymerizaci xylanu vzniká xylóza, z níž lze vyrobit xylitol, který slouží jako náhradní sladidlo. V pekařství se používají xylanázy a amylázy ke zlepšení kvality chleba, jeho struktury (křupavost, menší lepivost těsta), objemu (za daných podmínek až 24 %) a trvanlivosti [2]. Pro tyto účely jsou vhodné psychrofilní enzymy aktivní při teplotách pod 35 °C, tedy teplotách při přípravě těsta [12]. Podobně se používají i při výrobě těstovin. [2]

Xylanázy jsou také používány k vylepšení nutričních hodnot zemědělské siláže a zrní ke krmení. Zejména jde o zvýšení výživnosti a stravitelnosti. [12] Při chovu drůbeže se tak dá dosáhnout větší hmotnosti drůbeže a zlepšení střevní mikroflóry a imunity [2]. Také se používají do krmiv pro skot a prasata [1].

#### Farmaceutický průmysl

Xylooligosacharidy, které jsou produktem štěpení xylanu mohou být použity ve farmaceutickém průmyslu nebo krmivech pro zvířata díky jejich prebiotickému účinku [12] a jejich chemické stabilitě v těle. V trávicím traktu selektivně podporují růst či aktivitu mikroorganismů degradujících polysacharidy, tedy těch, které jsou obecně považovány za prospěšné a stabilizující komplexní mikrobiom, což koresponduje s pozitivním dietetickým hodnocením přítomnosti vlákniny v dietě. Xylooligosacharidy přispívají k redukci cholesterolu, přispívají ke gastrointestinálnímu zdraví, zvýšení dostupnosti vápníku z potravy, zlepšení vstřebávání složek potravy a snižuje retrogradaci škrobu [38], tedy přechod škrobu z gelovité struktury zpět do původní podoby.

#### Chemický a textilní průmysl

Xylanázy se často používají při výrobě hedvábí, celofánu a dalších chemikálií jako estery celulózy (acetáty, nitráty, propionáty, butyráty) a etherů celulózy

(karboxymethylcelulóza a methyl či ethylcelulóza). Tyto látky jsou vyráběny rozpouštěním buničiny (dřevoviny) a odstraňováním jiných karbohydrátů z jejich vláken. [31]

Podobně jako při zpracování papíru se xylanázy používají i při výrobě pytloviny a plátna, kdy opět odpadá potřeba použití bělidla. [39]

## 1.4 Mikrobiologické a proteomické metody

Mikrobiologii lze považovat za jeden ze základních pilířů biologických věd. Mikrobiologie se zabývá studiem mikroorganismů, zejména jejich identifikací, popisem jejich vlastností, původem, vývojem [40] interakcemi a mikrobiálními společenstvy, která jsou pro život zásadní.

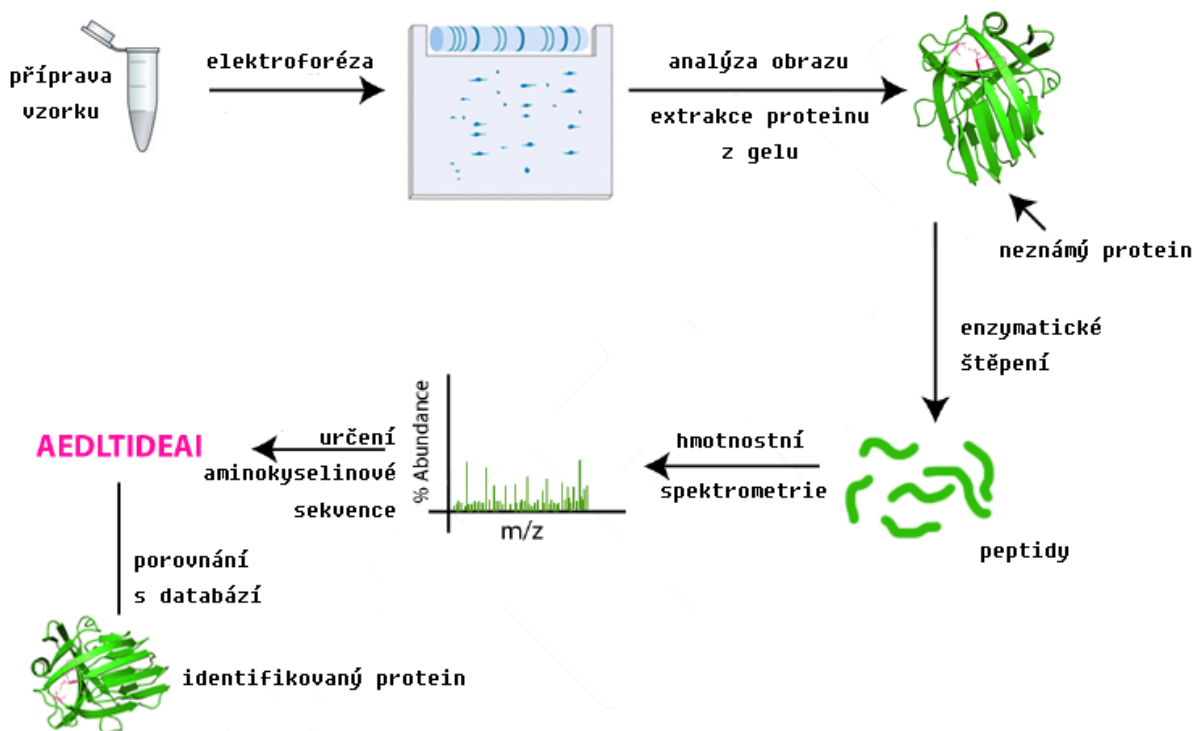
Proteomika je již novějším vědním oborem zabývajícím se studiem proteinů, jejich strukturou, vlastnostmi a proměnami v biologických systémech a rovněž jejich identifikací [41]. Proteomika studuje takzvaný proteom, což je soubor všech proteinů vyprodukovaných a modifikovaných jedním organismem, buňkou či nějakým systémem za daných podmínek [42, 43]. Proteom je mnohonásobně širší než genom, protože jeden gen dokáže kódovat více než jeden protein [44] a počet těchto proteinů se ještě navyšuje díky posttranslačním modifikacím. Složení proteomu pak závisí na individuálním vývoji a okolních podmínkách [43]. V dnešní době umožňuje proteomika nejenom identifikaci proteinů ale i detailní popis jejich primární a sekundární struktury, vzájemných interakcí a funkcí [40]. Pomáhá porozumět expresi bílkovin během jednotlivých fází života buňky či organismu a jejich chování v různých podmínkách. Díky proteomice lze odhalit poruchy při expresi bílkovin nebo i minimální vady v jejich struktuře [45].

V praxi má proteomika velký význam v klinické medicíně. Příkladem může být časná diagnostika celé řady onemocnění. Časnou diagnózu lze provést analýzou složení proteinů v tělních tekutinách, kde se mimo velkou řadu jiných proteinů nachází i rakovinné biomarkery. Proteomické metody nabízí dostatečně citlivé metody k identifikaci těchto biomarkerů. [46]

Proteomika využívá různé metody a techniky. Současně se používají kombinace purifikačních, separačních a imunologických metod a hmotnostní spektrometrie. Následující kroky nastiňují obecný postup při analýze proteomu:

1. Příprava vzorků: je důležitá pro dobrou reprodukovatelnost výsledků [44]. Příprava zahrnuje extrakci proteinů z buněk, tkání či nějakého média a následně jejich

- purifikaci neboli očištění od ostatních látek použitím centrifugace v hustotním gradientu nebo chromatografických technik [45].
2. Separace proteinů: pro separaci se používají elektroforetické metody. Proteiny jsou separovány na základě hmotnosti při 1D elektroforéze a případně ještě podle jejich isoelektrického bodu ve druhém rozměru při 2D elektroforéze [45].
  3. Určení sekvence aminokyselin: Jednotlivé separované proteiny v matici gelu se z gelu vyříznou, pomocí působení proteolytických enzymů (např. trypsin) se rozštěpí na menší peptidy. Pomocí technik hmotnostní spektrometrie se určí aminokyselinová sekvence proteinu. [44]
  4. Identifikace proteinu: za použití metod bioinformatiky se sledovaný protein identifikuje na základě aminokyselinové sekvence pomocí proteinových databází.



Obrázek 4: Obecný postup v proteomice

### 1.4.1 Gelová chromatografie

Gelová filtrace neboli velikostně vylučovací chromatografie je technika založená na principu odlišné rychlosti průchodu molekul mezi částicemi gelu v závislosti na jejich velikosti. Používá se k separaci proteinů, peptidů a oligonukleotidů na základě jejich velikosti popřípadě jejich prostorové struktury [47]. Gel formují polymerní částice, které díky své

prostorové struktury utváří pórovitou matici pro prostup molekul separovaného vzorku [48]. Příkladem těchto polymerů jsou Sephadex, Superdex, Sephacryl, Sepharose nebo Toyopearl [47]. Podle výběru mohou tyto polymery tvořit matici s póry o dané velikosti a jejich výhodou je, že jsou chemicky a fyzikálně stabilní a inertní [48].

Při klasickém uspořádání se připravený gel plní do chromatografické kolony a tvoří tak pevnou fázi. Mobilní fázi je pak pufr, který protéká kolonou, obtéká částice gelu (pevnou fázi) a nese sebou separovaný vzorek. Největší molekuly projdou gelem nejnáze, neboť gelovou maticí obtečou, jsou tedy nejrychlejší a kolonu opouštějí jako první, menší molekuly se zdržují ve skulinách mezi částicemi gelu a průchod jim tak trvá déle. Platí vztah mezi velikostí molekul a jejich dobou průchodu chromatografickou kolonou. Čím je molekula menší tím jí trvá déle kolonou projít. Na základě toho lze separovat molekuly vzorku podle jejich velikosti.

Parametry chromatografické kolony jsou eluční objem a eluční čas. Eluční objem odpovídá objemu mobilní fáze ve chromatografické koloně a eluční čas odpovídá době, za kterou z kolony vyteče jeden eluční objem. [48]

Gelová chromatografie se nejčastěji používá k analýze velikosti molekul, k separaci komponent ve směsi, purifikaci (především odsolování) a promytí vzorku v požadovaném pufru, čehož se využívá k přípravě vzorků pro další analýzu. [47]

### 1.4.2 Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda umožňující v proteomice rozlišit skupiny proteinů či přímo jednotlivé proteiny ve směsi. Rovněž ji lze použít jako metodu preparativní pro získání jednotlivých komponent vzorku. Základním principem je pohyb částic médiem v elektrickém poli [49] a dostáváme tak informaci o velikosti molekul, jejich náboji, případně prostorové struktury [50]. Pro separaci proteinů je vhodná denaturační gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přidávkem dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE) [50]. Proteiny jsou rozpuštěny a denaturovány v dodecylsiranu sodném (SDS) [51], čímž získají záporný náboj úměrný jejich velikosti, prostorová konformace se sbalí a v podobě shluků putují polypeptidové řetězce gelem [50]. Kvůli denaturaci dostáváme informaci pouze o hmotnosti separovaných molekul [50]. Před samotnou elektroforézou je vhodné vzorky purifikovat [51].

Důležitou součástí separace je gel, kterým molekuly putují a po skončení elektroforézy jsou v něm zakotveny na místě. Gel tvoří matici pro prostup molekul, kde platí, že menší molekuly putují rychleji než větší molekuly. Polyakrylamidový gel je vhodný pro separaci

molekul menších než 500 kDa. Pro větší molekuly se používá agarózový gel. Velikost pórů gelu lze ovlivnit podmínkami polymerace a koncentrací akrylamidového monomeru. Aby gel zpolymeroval, přidávají se do roztoku při jeho přípravě persíran amonný a N-tetramethylethylendiamin (TEMED). [50] Poměrem těchto komponent lze ovlivnit rychlosti polymerace a velikost síťování gelu.

Pro detailnější separaci lze použít dvourozměrnou elektroforézu, která umožňuje rozlišit až 10 000 proteinů ve směsi [51]. 2D elektroforéza separuje proteiny na základě dvou různých vlastností a to podle jejich izoelektrického bodu a dále podle velikosti. Nejprve se rozdělují proteiny v gelu s imobilizovaným pH gradientem podle svého izoelektrického bodu [52]. Izoelektrický bod odpovídá takové hodnotě pH, kdy na základě disociace je povrchový náboj molekuly neutrální a přestane se pohybovat v elektrickém poli [53]. Izoelektrická fokusace tak tvoří první rozměr. Jako druhý rozměr se provede rozdělení molekul podle jejich velikosti pomocí SDS-PAGE [52], jak je popsáno výše.

### 1.4.3 Stanovení bílkovin

V současnosti existuje řada různých metod detekce bílkovin. K získání co nejlepšího výsledku je důležité zvolit vždy nejvhodnější detekční metodu. Metody by měly mít ideálně co nejnižší detekční limit, široký dynamický rozsah a lineární vztah mezi množstvím proteinu a intenzitou barvení. Dále by měli být snadné, rychlé, levné, netoxické a vhodné pro následnou analýzu vzorku na hmotnostní spektrometrii. Všechny tyto požadavky najednou nesplňuje žádná ze současných metod, proto je nutno vybírat techniky na základě typu vzorku, zvolené metodice a toho, co chceme zjistit. Bílkoviny a peptidy lze detekovat díky jejich vlastní fluorescenci nebo pomocí činidel. [54]

Bílkoviny jsou biopolymery se schopností vlastní fluorescence díky aromatickým aminokyselinám fenylalaninu, tyrozinu a tryptofanu [55]. Tyto tři aminokyseliny však nejsou v proteinech úplně běžné [55]. Nejčastěji zastoupený tryptofan činí v proteinech obecně jedno molární procento [55], takže fluorescence bývá slabá, ale stále detekovatelná. Vlastní fluorescence bílkovin se měří v UV oblasti při 280 nm [55].

Řada dalších metod pak využívá různá činidla ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení bílkovin, jako jsou barvení pomocí Coomassie blue, stříbra, mědi, fluorescenčních barviv nebo značení radioaktivními sondami ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ) [54].



## Coomassie Brilliant Blue

Často využívanou metodou je barvení pomocí organického barviva trifenylmetanu nazývaného Coomassie Brilliant Blue. Toto barvivo je známo ve dvou modifikacích. Coomassie R-250 má červenou barvu a Coomassie G-250 má barvu zelenou díky dvěma dalším methylovým skupinám ve své struktuře. V kyselém prostředí se pak tyto barviva naváží na aminoskupiny proteinů pomocí elektrostatických a hydrofobních interakcí. [54]

Barviva Coomassie Blue se hojně využívá při vyhodnocení elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Coomassie Blue R-250 se rozpustí v roztoku metanolu či etanolu, vodě a kyselině octové a tímto roztokem se gel barví. Odbarvování se pak provádí stejným roztokem bez rozpuštěného barviva. Tento postup však není úplně vhodný ke kvantitativnímu vyhodnocení obsahu proteinů, protože v přítomnosti alkoholu se některé proteiny mohou odbarvovat společně s gelem (např. kolagen). [54]

Ke kvantitativní analýze bílkovin se Coomassie Blue využívá při stanovení podle Bradfordové. Výhodou této metody je, že rychlá a jednoduchá a dává stabilní kolorimetrickou odpověď. Při vysokých koncentracích proteinů se však stává prudce nelineární. Zbarvení roztoku je také závislé na složení proteinu, proto je při každém měření nutné změřit standardní řadu roztoků. Pro stanovení podle Bradfordové se používá Coomassie Blue G-250. [56] Spektrometricky se poté změří absorbance na vlnové délce 595 nm, z níž je možno vypočítat koncentrace proteinů.

Výhodou metod využívající Coomassie blue je možnost kvantitativního stanovení, nízká cena a reprodukovatelnost. Vzorky barvené Coomassie Blue je možné použít dále na hmotnostní spektrometrii. Nevýhodami jsou časová náročnost barvení, relativně nízká senzitivita a malý dynamický rozsah. [54]

## Barvení stříbrem

Další často používanou technikou je barvení stříbrem. Tato metoda má velkou citlivost v řádech méně než nanogramů [57]. Citlivější je už jen radioaktivní značení [57]. Cena reagensů je relativně nízká a navzdory většímu počtu kroků je tato metoda relativně rychlá [54]. Barvení stříbrem agarosových gelů podle Kerényi a Gallyase [58] je sice nejméně citlivé ale, kompatibilní s hmotnostní spektrometrií. Nejvyšší citlivosti dosahuje barvení stříbrem podle Bluma a kol [57] a Heukeshovena a Dernika [59][54].

Postup všech protokolů pro barvení stříbrem je obdobný: Proteiny jsou nejdříve fixovány v gelu nejčastěji roztokem etanolu a kyseliny octové a z gelu je vymýván detergent (SDS) a pufr [54]. Před barvením se provádí zcitlivění pomocí thiosíranu sodného, který

rapidně zvyšuje citlivost metody a zabraňuje tvorbě nerozpustných solí stříbra [57]. Gel se poté vloží do roztoku dusičnanu stříbrného s malým množstvím formaldehydu, kde se stříbrné ionty navazují s funkčními skupinami proteinů [60], formaldehyd slouží jako fixátor. Následně je gel vyvíjen roztokem uhličitanu sodného opět s malým množstvím formaldehydu, kdy dojde k zčernání [54]. Vyvíjení je zastaveno roztokem kyseliny octové [54]. Na gelu by se měly objevit hnědé až černé bandy v místě přítomnosti proteinů na světlém pozadí [54].

### Fluorescenční barvení

Fluorescenční barviva nabízejí vysokou senzitivitu a spolehlivou kvantifikaci v širokém lineárním dynamickém rozsahu. Výsledky jsou také snadno reprodukovatelné. Existuje velký výběr fluorescenčních barviv s velkým rozsahem senzitivit a vlastností. Barviva Sypro Orange, Sypro Red a Sypro Tangerine jsou svou citlivostí srovnatelné s Coomassie Blue, Sypro ruby pak dokáže rozlišit proteiny i v nanogramech. Ještě citlivějším barvivem je Deep Purple. [54]

#### *1.4.4 Stanovení enzymových aktivit*

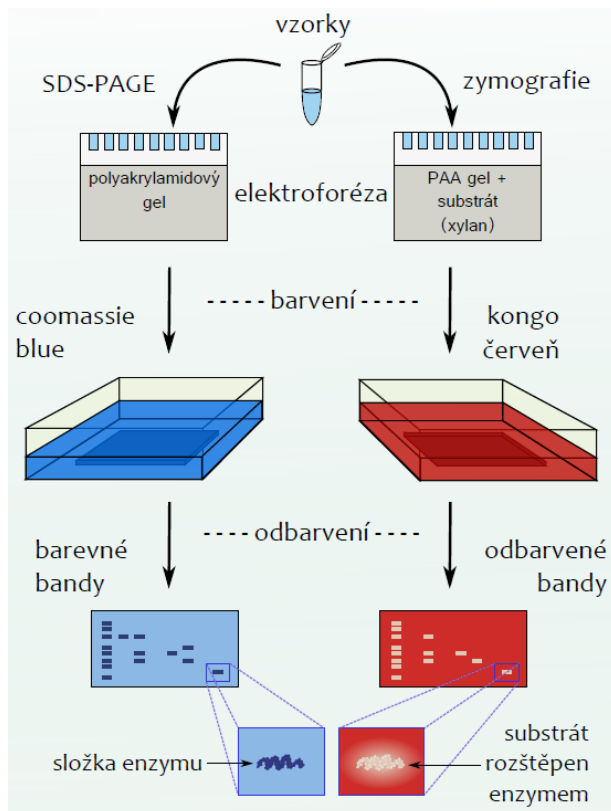
Metody určování enzymových aktivit jsou většinou založeny na enzymatickém rozkladu příslušného substrátu [12].

### Spektrometrické stanovení

Při rozkladu substrátu vznikají typické produkty, které lze detekovat a kvantitativně měřit. Po přidání vhodných reagensů k roztoku enzymu a substrátu vzniká barevná reakce nebo jsou produkty již barevné samy o sobě. Spektrometricky pak lze změřit absorbanci vzorku. Měření vyžaduje kalibraci. Aktivita je pak přímo úměrná absorbanci roztoku, respektive množství rozloženého substrátu. Při stanovení aktivity xylanáz, celuláz, endochitináz, endoglukanáz, laminarináz, pektinhydroláz, a  $\alpha$ -glukuronidáz se měří přírůstek redukujících cukrů, které vznikají jako produkt při hydrolýze polysacharidu [39]. Při měření aktivity xylosidáz, glukosidáz, mannosidáz, cellobiohydroláz, acetylxylanesteráz, arabináz a  $\beta$ -galaktosidáz se stanovuje přírůstek žlutého p-nitrofenolu a o-nitrofenolu [39]. Žlutý p-nitrofenol se také stanovuje při měření aktivit exochitináz [39]. U deacetyláz se stanovují N-acetylglukosamidové jednotky, u aktivity proteáz se detekují barevně značené aminokyseliny z azokaseinu [39]. V případě lipáz se ke stanovení koncentrace používá kapalinová chromatografie HPLC a měří se úbytek tributyrinu [39].

## Zymografie

Jiným přístupem je zymografie. Zymografie je nástroj ke studiu hydrolytických enzymů na základě rozkladu substrátu. Tímto způsobem jsou enzymové aktivity přímo vizualizovány. Biochemická reakce je měřena na základě detekčních metod založených buď na vyobrazení produktu enzymatického rozkladu nebo na vyobrazení úbytku substrátu. Tyto metody jsou pak vhodné pro všechny typy hydroláz reagujících na biologické substráty, jako jsou peptidy, proteiny, oligosacharidy, polysacharidy, lipidy i nukleové kyseliny. Zymografie může podávat kvalitativní nebo kvantitativní informaci např. o aktivitě enzymů, molekulových hmotnostech a přítomnosti a počtu různých forem enzymů v enzymovém komplexu zkoumaného vzorku. Současně nejvyužívanějším typem zymografie je gelová zymografie. Hydrolytické enzymy jsou separovány podle své molekulové hmotnosti v SDS polyakrylamidovém gelu, do něhož byl přidán příslušný substrát. Hydrolázy jsou pak detekovány na základě jejich schopnosti degradovat substrát v gelu. Gelovou zymografií nelze vždy použít pro přesné kvantitativní stanovení enzymových aktivit, protože některé enzymy z celého komplexu se nemusí jevit jako aktivní nebo naopak neaktivní se mohou jevit jako aktivní. [61]



Obrázek 5: Porovnání postupů a výsledků elektroforézy a zymografie [62]

### 1.4.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) umožňuje získat informace o struktuře proteinu, jako jsou hmotnost peptidu nebo aminokyselinová sekvence. Provedení se sestává z ionizace vzorku a hmotnostní analýzy. [51] Peptidy jsou analyzovány na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), kde je malá pravděpodobnost, že dva proteiny v databázi dají stejný výsledek [40].

Vzorek určený k analýze na MS bývá většinou ukotven v gelu po elektroforetické separaci. Separovaný protein v podobě bandu nebo spotu v gelu, je vymýván z gelu a rozkládán na menší peptidy pomocí proteáz. [51, 63]. Následuje ionizace vzorku. Vzorek je převeden na ionty pomocí ionizačních technik MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace) nebo ESI (elektrosprejová ionizace). V případě MALDI jsou peptidy odpařeny z matrice krátkým laserovým pulzem a v případě ESI je přiváděn vzorek kapilárou, ze které je rozprašován pomocí elektrického pole a tvoří se malé nabitě kapičky, z nichž je odpařena tekutina a vznikají samotné ionty v podobě plynu [63].

Nabitě ionty vletí do hmotnostního analyzátoru, který je rozliší podle hmotnosti a náboje. Nejpoužívanější hmotnostní analyzátor je kvadrupólový analyzátor, kvadrupólová iontová past a TOF (time of flight = analyzátor doby letu). Kvadrupól představují čtyři paralelně postavené kovové tyče na které je přivedeno střídavé napětí a tak mezi sebou vytvářejí elektrické pole. Ionty se v tomto poli pohybují po daných trajektoriích a při zvyšování napětí (a frekvence střídavého napětí) na tyčích se tyto trajektorie mění, až ionty opouští oblast kvadrupólu. Tento děj je závislý na podílu hmotnosti a náboje iontu. Ionty, co opustí kvadrupól, jsou detekovány detektorem. Kvadrupólová iontová past zachytává ionty v trojrozměrném elektrickém poli. Ionty jsou v pasti fokusovány a jejich pohyb je uvnitř pasti stabilizován díky kruhové elektrodě, na kterou je přiveden oscilující potenciál o frekvenci  $10^6$  Hz. Změnami potenciálu v pasti jsou ionty nuceny měnit trajektorii a vylítávat ven k detektoru opět v závislosti na poměru  $m/z$ . Výhodou iontové pasti oproti klasickému kvadrupólu je, že lze lépe kontrolovat, kdy budou ionty v pasti a kdy vyletí. Hmotnostní analyzátor TOF je jeden z nejjednodušších analyzátorů. Poměr  $m/z$  je určován podle času, který je potřeba k průletu elektrickým polem v trubici dané délky. Pokud mají ionty stejný náboj, pak iont s menší hmotností doletí k detektoru dříve. [63]

## 2 CÍLE A HYPOTÉZY

Tato práce se zabývá extracelulárními xylanolytickými enzymy anaerobních bakterií rodu *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio*. Cílem je popis enzymového aparátu vybraných významných producentů xylanáz, jmenovitě *Butyrivibrio proteoclasticus* (UC 142), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Bf 3071) a *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (JK 170), a jeho případná identifikace prostřednictvím proteomických metod včetně stanovení enzymové aktivity jednotlivých proteinů vylučovaných do kultivačního média. Diplomová práce by měla poskytnout přehled o dosavadních poznatcích o xylanolytických bakteriích a enzimech a tyto poznatky prohlubovat za využití všech dostupných prostředků a přístrojového vybavení laboratoře.

- 1) Kultivací čistých sbírkových kultur anaerobních bakterií r. *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio* se známou xylanolytickou aktivitou získat metodou ultracentrifugace a ultrafiltrace hrubý enzymový preparát a metodou sloupcové chromatografie provést separaci proteinů.
- 2) V získaných frakcích stanovit obsah proteinů a enzymové aktivity xylanolytických enzymů.
- 3) Metodou dvourozměrné elektroforézy provést mapování proteinů.
- 4) Pomocí elektroforézy a zymografie vizualizovat enzymy s xylanolytickou aktivitou a provést denzitometrické vyhodnocení.
- 5) U vybraných aktivních proteinů se pokusit pomocí PMF (peptidového fingerprintingu) metodou MALDI-TOF osekvenovat enzymy s výraznou aktivitou a v případě že budou dostupné v proteinových databázích, identifikovat je a provést jejich taxonomické zařazení.

Anaerobní bakterie osidlující bacher přežvýkavců a tlusté střevo člověka, jež jsou schopny růst na mediu s přídavkem xylanu, produkují do extracelulárního prostoru spektrum proteinů – enzymů s rozdílnou aktivitou, kterou lze různými proteomickými metodami vizualizovat a měřit.

Předpokládáme, že u zmíněných druhů bakterií *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio* bude nalezena xylanázová aktivita a zviditelněny aktivní složky enzymového komplexu pomocí elektroforetických technik. Tyto aktivní složky enzymového komplexu podrobené analýze na hmotnostní spektrometrii mohou a nemusí být nalezeny v proteinových databázích.

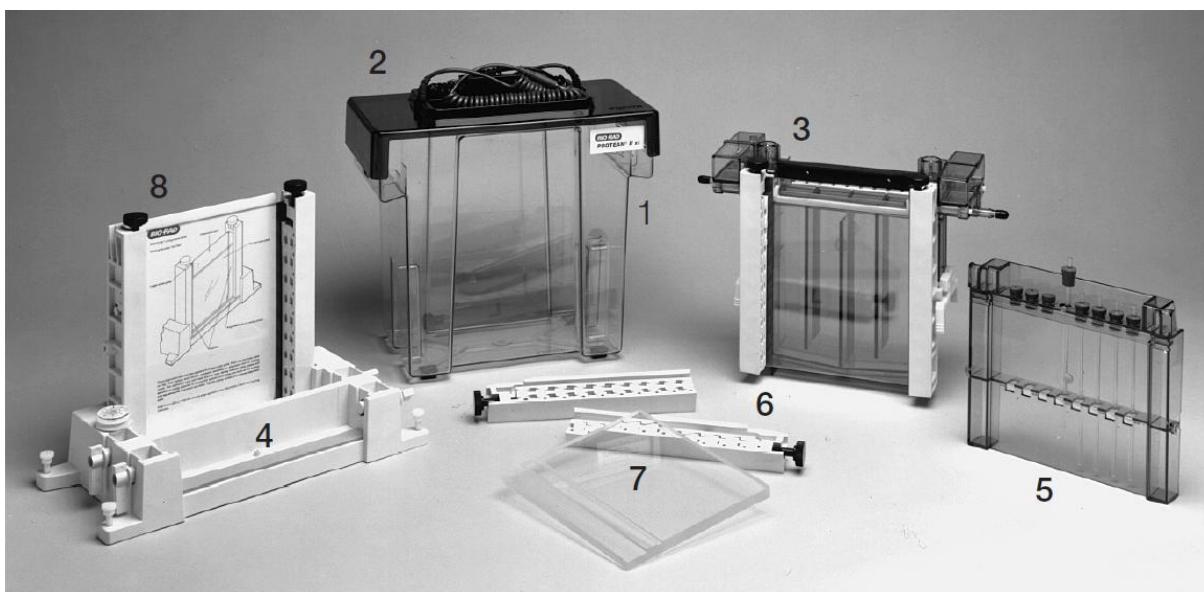
### 3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Všechna měření byla provedena v Laboratoři anaerobní biologie Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky. Mezi přístrojové vybavení laboratoře nezbytné k vypracování této práce patří ultracentrifuga Optima L-90K (Beckman Coulter), fotometr microplate reader (Tecan Sunrise), spektrofotometr Biomate5 (Thermo Spectronic), vodní lázeň TW12 (Julabo), vortex, sestava pro elektroforézu PROTEAN II Cell (Bio-Rad) nebo Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad), sestava pro izoelektrofokusaci Protean IEF Cell (Bio-Rad), laboratorní zdroje Powerpac 1000 (Bio-Rad) a Powerpac Basic Power supply (Bio-Rad), třepačka Mini Rocker MR-1 (Biosan), zobrazovací zařízení Molecular imager Gel Doc XR+ a denzitometr Model GS-700 (Bio-Rad), analytické váhy HA-120M (A&D), centrifuga MIKRO 22R (Hettich), sonikátor Vibra cell (Sonics & Materials) a na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Laboratoři charakterizace molekulární struktury hmotnostní spektrometr Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics).

#### 3.1 PROTEAN II Cell

PROTEAN II Cell je produkt od firmy Bio-Rad. Je to nástroj vhodný k provedení řady elektroforetických technik jako jsou SDS-PAGE, dvourozměrná elektroforéza, nativní (nedenaturační) elektroforéza a agarózová elektroforéza, [64] přičemž jde vždy o jejich vertikální uspořádání. Gely se připravují o velikostech 16x16 cm nebo 16x20 cm [64]. Větší gely (20 cm) nabízejí lepší rozlišení. Najednou lze spustit separaci na dvou plošných gelech či na 16 trubicovitých gelech. [64]

Sestava PROTEAN II obsahuje stojan se dvěma většími a dvěma menšími skleněnými deskami, čtyřmi svorkami, čtyřmi spacersy (vymezují kraje gelu), hřebínky a kartu k zarovnání spacerů, chladicí jádro, nádobu na pufr a k ní víko s vodiči pro připojení ke zdroji.



Obrázek 6: Sestava PROTEAN II Cell (Bio-Rad): 1. nádoba na pufr, 2. víko s připojenými vodiči, 3. chladicí jádro s připojenou "sendvičovou" formou na plošný gel, 4. stojan držící formou na gel (skládající se ze skel, spacerů a svorek), 5. stojan na trubicové gely, 6. Svorky, 7. Skla, 8. karta k zarovnání spacerů [64]

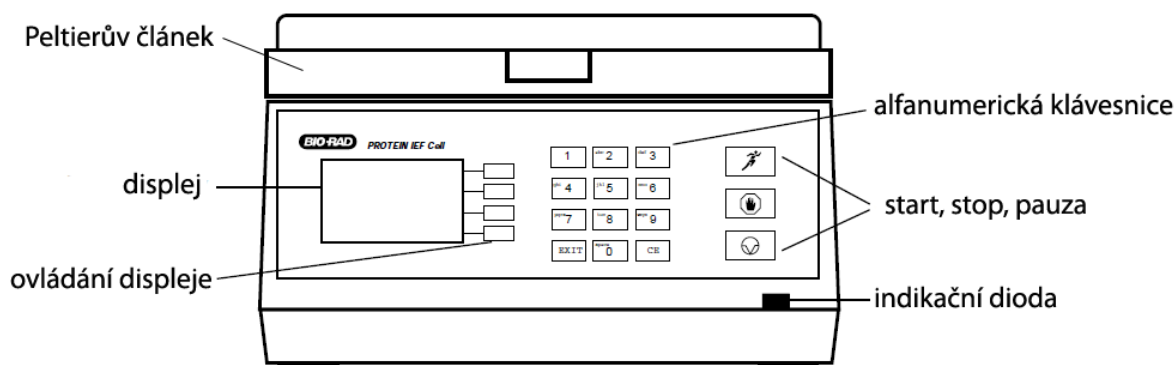
Při provádění elektroforézy se nejdříve připraví gely. K přípravě gelů slouží stojan, do něhož se usadí a šrouby upevní forma na gely. Forma se složí ze dvou skel (menší vnější a větší vnitřní pro usnadnění přípravy gelu) mezi které se na pravý a levý okraj vloží spacers pro vymezení okrajů a tloušťky gelu (až 1,5 mm [64]). Takto připravená skla se k sobě přitáhnou a zajistí pomocí svorek s utahovacím šroubem, nezpolymerizovaný gel pak nemůže vytéct. Před úplným utáhnutím skel k sobě se pomocí karty vyrovnají pozice spacerů. Takto připravená forma se naplní gelem a mezi skla se vsunou hřebínky k vytvoření jamek navrchu gelu, kam se poté pipetují vzorky. Když gel zpolymerizuje, upevní se s celou formou k chladicímu jádru. Chladicí jádro chrání před tepelnými fluktuacemi během elektroforetické separace [64]. Jádro je připojeno k nádobě s cirkulující chladicí kapalinou nebo jen naplněno kapalinou bez cirkulace. Jako chladicí kapalina je doporučen roztok glykol:voda v poměru 20:80 nebo jen voda, soustava PROTEAN II nesmí přijít do styku s organickými rozpouštědly [64]. Chladicí jádro s připevněnými formami s gely se vloží do nádoby s pufrem a taktéž se zalije pufrem. Celá sestava se uzavře víkem a tak se uzavře elektrický obvod. Vodiče se musí připojit k laboratornímu zdroji, na němž se nastaví čas a hodnota napětí podle typu a velikosti gelu [64].

### 3.2 PROTEAN IEF

PROTEAN IEF Cell je produkt od firmy Bio-Rad. Provádí izoelektrofokusaci proteinů jako první rozměr 2D elektroforézy. Izelektrofokusace (IEF) probíhá na prouzcích s imobilizovaným pH gradientem (IPG proužky). Lze předdefinovat průběh separace. Separace může být rozdělena do 10 kroků, kde každý krok má nadefinovanou hodnotu napětí, tendenci změny napětí a trvání časového úseku.[65] Nadefinování vlastní metody umožňuje optimalizovat každé izoelektrofokusační dělení.

Systém PROTEAN IEF se skládá ze zdroje (rozsah napětí 50 V - 10 kV) s Peltierovým článkem pro kontrolu teploty, dvanáctidrážkových rehydratačních/ekvilibračních destiček a dvanáctidrážkových fokusačních destiček. [65] IPG proužky se nejdříve rehydratují v rehydratačních/ekvilibračních destičkách pomocí pufru se vzorkem. Poté se přenesou do fokusačních destiček, destička se uzavře a připojí se ke zdroji s nastaveným příslušným programem izoelektrofokusace.

Během izoelektrofokusaci prochází gelem s nanesenými vzorky elektrický proud. Procházející proud by mohl zapříčinit kolísání teploty a zahřívání během fokusace, což by mělo negativní vliv na výsledek. Stálou teplotu udržuje proto Peltierův článek umístěn přímo pod fokusačními destičkami.

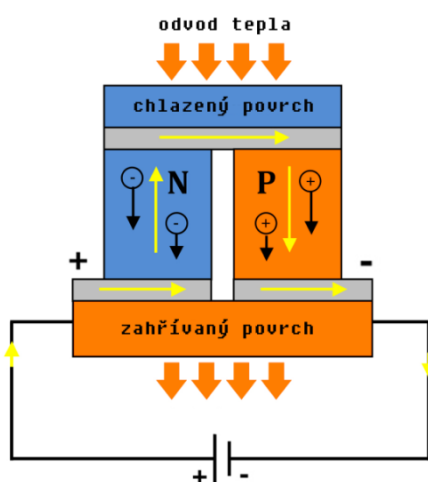


Obrázek 7: PROTEAN IEF přední panel s displejem, v horní části je Peltierův článek s konektory pro elektrody. Převzato z [65]

Peltierův článek pracuje na základě Peltierova jevu. Základní jednotka tohoto článku je tvořena dvěma různými typy polovodičů, jeden typu N a druhý typu P, propojenými spojovacím můstkem. Pokud tímto článkem protéká elektrický proud aplikovaný na spojovací můstek, dochází k přesouvání nosičů náboje a následně jejich nerovnoměrnému rozmístění a vytvoření napětí na článku. U polovodičů typu N jsou nositeli náboje volné elektrony a u

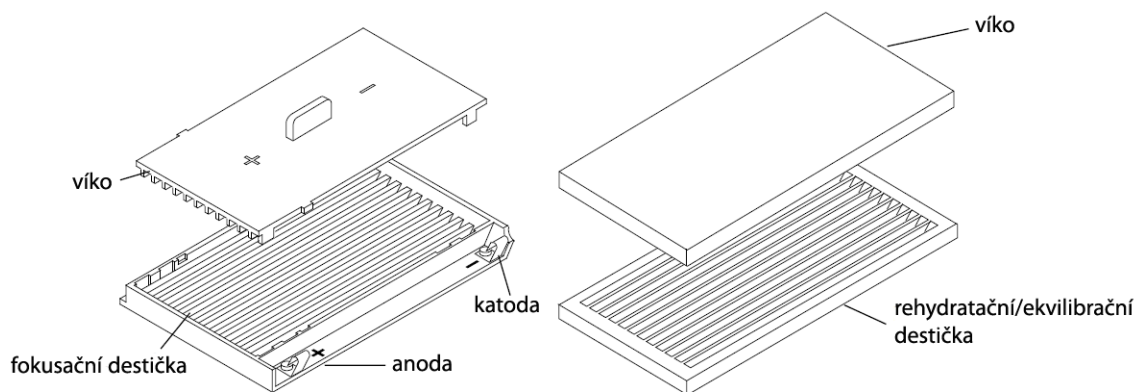


polovodičů typu P jsou nositeli náboje díry. V obou případech tyto nosiče náboje putují směrem ke zdroji napětí. Důležité jsou poté změny napětí na obou koncích polovodičů, kde vzniká tzv. kontaktní napětí. Odvedením elektronů a děr od spojovacího můstku klesá v místě kontaktu polovodičů a spojovacího můstku počet volných nosičů náboje a tím se tam snižuje kontaktní napětí a tak klesá teplota spojovacího můstku. Na druhém konci polovodičů dochází k opačnému jevu a tato část se zahřívá. Peltierův článek tedy z jedné strany chladí a z druhé se zahřívá. [66]



Obrázek 8: Schéma Peltierova článku. Schéma převzato a upraveno z [67]

IPG proužky (SERVA IPG BlueStrips) tvoří podpurný film (GEL-FIX<sup>TM</sup>), na němž je kovalentně navázán akrylamidový gel s imobilizovaným pH gradientem. Proužky jsou dehydratovány a před použitím se musí rehydratovat příslušným pufrům, jehož složení závisí na použité metodě (IEF nebo 2D elektroforéza) a také na aplikovaném vzorku. Rozmezí pH gradientu je natisknuto na proužku a lze vybírat z několika možností, s lineárním gradientem pH jsou to 3-10; 4-7; 6-10; 3-6 a s nelineárním gradientem pH 3-10, kde v rozmezí pH 5-7 je plató s vyšším rozlišením. [65] PROTEAN IEF umožňuje použít dva rozměry IPG proužků s délkou 7 cm nebo 17 cm. Délka proužku a gradient pH se vybírá podle množství vzorku, typu vzorku a požadovaného rozlišení metody. IPG proužky mají svou dobu expirace a skladují se při -20 °C pro zachování svých vlastností [65]. Každý IPG proužek má na sobě natištěný svůj jedinečný číselný kód, proto je snadné je odlišit i při pokusech prováděných ve větších množstvích.



Obrázek 9: Drážkové destičky na IPG proužky [65]

### 3.3 Molecular imager Gel Doc XR+

Molecular imager Gel Doc™ XR+ je zobrazovací zařízení pro laboratorní účely od firmy Bio-Rad. Je vhodný pro analýzu elektroforetických gelů, kde je schopen zobrazit obarvené struktury, detekovat fluorescenci vzorku a provádět kolorimetrii a denzitometrii [68]. Zařízení je nutno připojit k počítači s nainstalovaným softwarem Bio-Rad Image Lab, který umožňuje zobrazení, zpracování a analýzu obrazu a vkládání komentářů. Hlavní komponenty samotného zařízení jsou CCD (charge-coupled device) kamera, systém čoček, zdroje záření, emisní filtry, kryt a Image Lab software.



Obrázek 10: Molecular imager Gel Doc XR+(foto autor)

### 3.3.1 CCD kamera

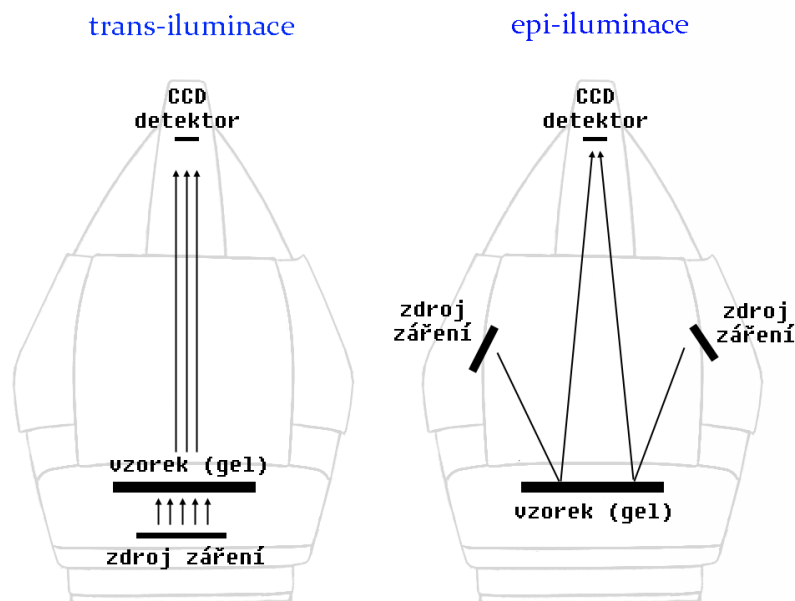
Pomocí CCD kamery je zachytáván obraz v reálném čase, což napomáhá přesně nasměrovat a zaostřit obraz [68]. Kamera je umístěna v horní části vně krytu přístroje, obraz je tak snímán přímo shora. Rozlišení CCD čipu je zde 1392 x 1040 pixelů, tedy 1,4 MPx.

Charge-coupled device (CCD) je jinak řečeno zařízení reagující na elektrický náboj. Elektrický náboj je zde vyvolán dopadajícím elektromagnetickým zářením na základě fotoefektu. Na křemíkový povrch dopadají fotony a z atomů křemíku se uvolňují elektrony. Elektrony pak putují směrem ke kladné elektrodě, která je oddělena izolační vrstvou křemene  $\text{SiO}_2$ , který volné elektrony zachycuje. Každá kladná elektroda vytváří jeden pixel. Signál se pak sbírá ze všech pixelů tak, že na elektrodách se posouvá kladný náboj a s ním se přesouvají i elektrony až do terminálu na konci čipu, kde se vytváří signál z přicházejících elektronů. [69]

Elektronicky ovladatelná pohyblivá čočka kamery umožňuje přiblížení, zaostření a nastavení velikosti clony. Gel Doc XR používá čočku s nastavitelnou ohniskovou vzdáleností 8,5 – 51 mm a clonovým číslem  $F/1,2$  [68] (ohnisková vzdálenost/průměr čočky). Clonové číslo neboli světelnost vyjadřuje vztah mezi světelným tokem čočkou a hloubkou ostrosti. Pokud je ohnisková vzdálenost malá, pak je i clonové číslo malé a objektivem prochází více světla na úkor malé hloubky ostrosti. Pokud je naopak ohnisková vzdálenost velká, clonové číslo je také velké a objektivem prochází méně světla, ale naopak získáme velkou hloubku ostrosti. Z toho vyplývá, že při zaostřování obrazu se vždy hledá kompromis mezi zmíněnými parametry pomocí změny ohniskové vzdálenosti.

### 3.3.2 Zdroje záření

Celé zařízení Gel Doc XR je uloženo v krytu Universal Hood II, který je světlotěsný a tak nahrazuje temnou komoru. Je tedy možné zachycovat i fluorescenci nebo chemiluminiscenci zobrazovaných vzorků. V krytu jsou zabudovány dva základní zdroje záření: epi-iluminační zdroj bílého světla a trans-iluminační zdroj ultrafialového (UV) záření. Zdroj UV záření se skládá ze šesti lamp vyzařujících záření o 302 nm, 254 nm nebo 365 nm. Volitelně se dají taky přidat trans-iluminační zdroj bílého světla nebo konverzní stínítko pro bílé světlo. [68] Konverzní stínítko slouží k převedení UV záření na bílé světlo. Dalšími doplňky mohou být emisní filtry pro různé typy vzorkových barviv.



Obrázek 11: Schéma iluminace v Gel Doc XR+

### 3.3.3 Software Image Lab

Image Lab je software pro dokumentaci, analýzu a zpracování obrazového záznamu z elektroforézy nebo blotování. Umožňuje analýzu molekulových hmotností a kvantifikaci vzorků. Software dokáže analyzovat širokou škálu biologických dat zviditelněných různými metodami barvení nebo fluorescenční vzorky. Pro jejich analýzu lze vybrat z přednastavených protokolů nebo vytvořit vlastní. Data jsou zobrazena jako šedotónový nebo barevný obrázek. Každý zobrazený pixel má tři souřadnice, X a Y vyjadřují polohu v obraze a souřadnice Z reprezentuje intenzitu pixelu. 2D obraz se pak dá zobrazit i jako 3D reliéf. [70]

Program pracuje v několika krocích. Nejdříve je potřeba získat obraz ze zobrazovacího zařízení (Molecular Imager Gel Doc XR). Získaný obraz poté většinou vyžaduje optimalizaci. Mezi základní nástroje úpravy obrazu patří změna velikosti a zakřivení, otočení a úprava barvy, kontrastu a světlosti. Dále jsou k dispozici funkce uzpůsobené přímo pro konkrétní metody analýzy vzorků. Na gelech z elektroforézy mohou být detekovány jednotlivé dráhy separace vzorků a v nich bandy s různou citlivostí detekce. Vše lze nastavit ručně nebo programem automaticky. Následně lze využít nabízené analytické nástroje, kterými jsou výpočet molekulové hmotnosti či isoelektrického bodu podle standardu, měření objemu, vzdálenost bandů od počátku, kvantifikace bandů [70]. Pomocí denzitometrie dokáže software měřit skutečné nebo relativní množství vzorku, určit jejich maximální, celkovou nebo

průměrnou hodnotu a zobrazit tyto hodnoty v grafu pro každou dráhu vzorku nebo samotný band. Množství neboli objemu vzorku se vypočte podle (1) [71]

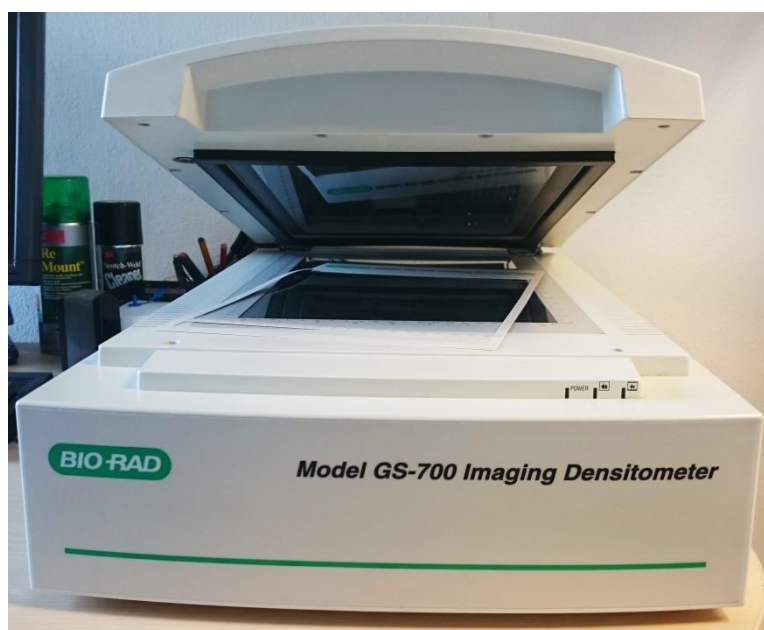
$$V = \sum_i I_i \cdot S_i , \quad (1)$$

kde  $V$  je objem vzorku v bandu,  $I_i$  je intenzita neboli hodnota souřadnice  $Z$   $i$ -tého pixelu, který je součástí bandu a  $S_i$  je plocha příslušného  $i$ -tého pixelu. Na základě intenzity pixelů a plochy bandu dostaneme tedy objem vzorku v daném bandu. V porovnání s ostatními bandy lze dostat relativní hodnoty, kde je větší nebo menší množství vzorku. Podle standardu může být spočteno i skutečné množství vzorku. [71]

Všechny výsledky pak lze uložit do jednoho textového souboru (report) a obrázky vyexportovat v různých obrazových formátech.

### 3.4 Imaging Densitometer Model GS-700

Imaging Densitometer Model GS-700 od firmy Bio-Rad je scanner pro zobrazování výsledků gelové elektroforézy za pomoci softwaru Quantity One. Zařízení nabízí dva způsoby zobrazování a to reflexní pro neprůhledné vzorky a transmisní pro průhledné vzorky. Rozlišení obrazu je nastavitelné v rozmezí 25 – 1200 dpi. Zdrojem záření je bílá fluorescenční lampa s třemi RGB filtry pro případné nastavení vlnové délky záření, které je detekováno CCD senzory. [72] Software Quantity one je nižší verze softwaru Image Lab zmíněného výše a nabízí obdobné funkce.

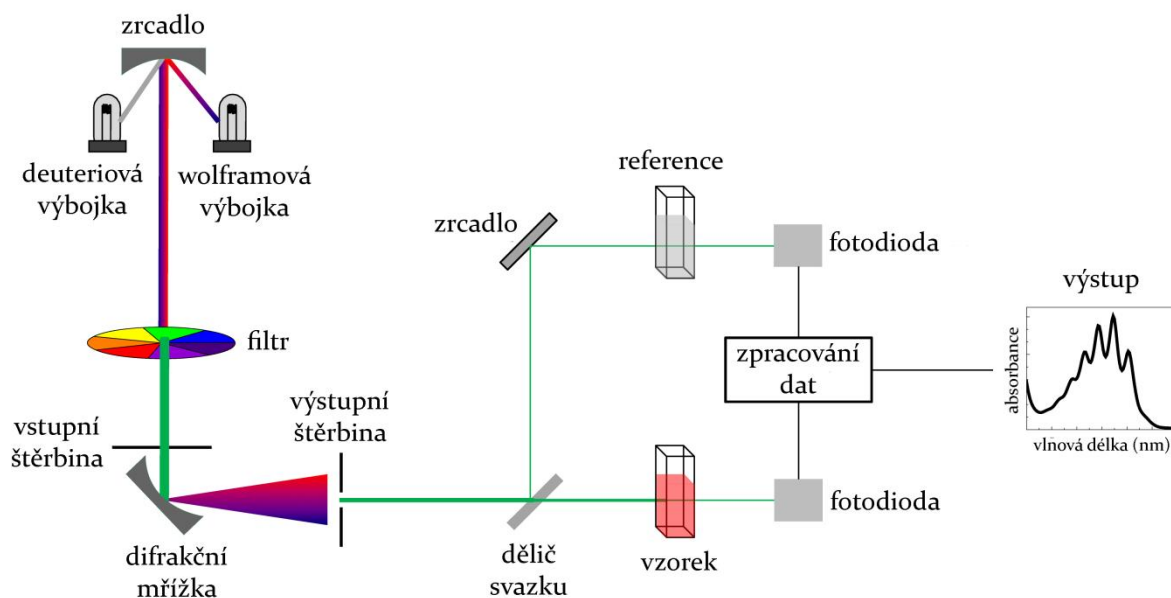


Obrázek 12: Imaging densitometer Model GS-700 (foto autor)

### 3.5 Thermo Spectronic Biomate 5

Spectronic Biomate 5 je zařízení od firmy Thermo Electron Corporation. Jde o mřížkový UV-VIS spektrofotometr vhodný k analýze nukleových kyselin, proteinů, kinetiky enzymových reakcí a měření s více vlnovými délkami. Přeprogramované metody nabízí výpočet koncentrace DNA, sestavení kalibrační křivky pro proteiny za použití různých reagensů (Bradford, Lowry, BCA (bicinchoninic acid) nebo Biuretová reakce), přímé měření koncentrace dsDNA, ssDNA, RNA a oligonukleotidů, sledování růstu buněk a určování molekulové hmotnosti nebo teoretické teploty tání (potřebná k provedení PCR) oligonukleotidů. Parametry těchto metod lze nastavit ručně či naprogramovat vlastní metodu měření. [73]

Spectronic Biomate 5 využívá dvoupraprskový optický systém, který zajišťuje dlouhodobě stabilní měření při použití referenčního vzorku měnícího se s časem. Jeden paprsek prochází měřeným vzorkem a druhý prochází slepým vzorkem, který slouží jako reference. Vzorek a reference jsou tak měřeny současně při každém dalším měření. Jako zdroj záření je použita deuteriová a wolframová výbojka s rozsahem vlnových délek 190 – 1100 nm. Pro různá měření jsou vybírány různé vlnové délky pomocí monochromátoru. Jako monochromátor zde slouží difrakční mřížka s přesností výběru vlnové délky až 1 nm. Ve vzorcích lze měřit absorbanci, transmitanci nebo koncentraci látek. Výsledky se poté zobrazují na grafickém displeji. [73]



Obrázek 13: Zjednodušené schéma spektrofotometru. Převzato z [74]

Princip měření absorbance, transmitance i koncentrace je založen na Lamber-Beerově zákoně. Jde o určení absorbance závislé na vlastnostech materiálu:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

kde  $A$  je absorbance materiálu,  $T$  je transmitance materiálu,  $\varepsilon$  je absorpční koeficient závislý na vlnové délce a daném materiálu,  $c$  je koncentrace absorbujících částic a  $l$  je délka absorpční dráhy.

## 4 METODY

Kultivací anaerobních bakterií rodu *Butyrivibrio* produkujících do vnějšího prostředí aktivní xylanolytické enzymy byl získán hrubý enzymový vzorek. Zahuštěný vzorek byl purifikován a separován na hmotnostní frakce pomocí gelové chromatografie na SEPHADEXu G-25 a SEPHADEXu G-75. U jednotlivých frakcí bylo stanoveno množství bílkovin metodou podle Bradfordové a stanovena xylanázová aktivita spektrofotometrickým měřením zbytkových sacharidů v hydrolyzátu substrátu s čidlem PAHBAH. Přečištěné frakce s obsahem proteinů byly poté elektroforeticky separovány pomocí 1D a 2D SDS-PAGE a proteiny vykazující xylanolytickou aktivitu byly vizualizovány metodou zymografie s přídatkem CM xylanu v polyakrylamidovém gelu. Výrazné hmotnostní a aktivní bandy z gelů elektroforézy a zymografie byly denzitometricky změřeny, vyřezány z gelů a použity pro hmotnostní analýzu peptidových fragmentů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF.

### 4.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány v prostředí co nejpodobnějším jejich přirozenému prostředí růstu. Tomu byly přizpůsobeny kultivační techniky. Kultivace v kultivačním médiu probíhala při 39°C. Kultivační médium pro xylanolytické bakterie žijící v trávicím traktu přežvýkavců by mělo napodobovat složení obsahu bachoru. Xylanolytické bakterie jsou anaerobní, proto je nutné zajistit, aby kultivační medium neobsahovalo kyslík. Nakultivované bakterie mohou být skladovány zmrazené několik měsíců.

#### 4.1.1 Příprava kultivačního média [75]

Na jeden litr média bylo smícháno:

- Kvasnicový extrakt            0,5 g
- Bacto-casein                    2 g
- Minerální roztok I            38 ml
- Minerální roztok II          38 ml
- VFA mix                        3,1 ml
- Resazurin (0,1 %)            0,5 ml
- Mikroelementy                0,5 ml
- Vitamíny                        2 ml
- Substrát                        4 g



- Voda 808 ml

Roztok byl přiveden k varu a po vychladnutí byly přidány:

- Hemin 10 ml
- Bachorová tekutina 100 ml

Pokud bylo třeba, pH bylo upraveno na hodnotu mezi 7,1 – 7,3. Jako poslední byly přidány:

- Cystein 0,5 g
- NaHCO<sub>3</sub> 4 g

Probubláváním dusíkem a oxidem uhličitým po dobu 1 hodiny byl odstraněn z roztoků kyslík. Poté bylo medium převedeno do lahví a ještě 20 minut probubláváno N<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>. Kulturační nádoby NTS byly vzduchotěsně uzavřeny a medium vysterilizováno v autoklávu.



Obrázek 14: Probublávání média dusíkem a oxidem uhličitým (foto autor)

#### Složení roztoků:

Hemin: 50 mg heminu, 1 ml 1N NaOH, zahřát a doplnit vodou na 100 ml

Minerální roztok I: 6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> na 1 l H<sub>2</sub>O

Minerální roztok II: 12 g NaCl; 12 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6 g KHSO<sub>4</sub>; 1,2 g CaCl<sub>2</sub>; 2,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
na 1 l H<sub>2</sub>O

Mikroelementy: 253 mg NiCl<sub>2</sub>; 333 mg H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 500 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 11 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;  
500 mg MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 500 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 253 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 253 mg

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 100 g chelatonu I; 100 mg  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 253 ml 5N NaOH; na 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ ; koncentrovanou HCl doladit pH na 7,0

Vitamíny: 200 mg pyridoxin (B6), 200 mg Riboflavin (B2), 200 mg Nikotinamid, 200 mg tiamin (B1), 200 mg kyselina pantotenová (B5), 1 mg kyselina p-aminobenzoová, 0,5 mg biotin, 0,5 mg kobaltin, 5 mg acidum folicum

Mix těkavých mastných kyselin (VFA): 10 ml metylbutyrátu, 170 ml kyseliny octové, 60 ml kyseliny propionové, 40 ml kyseliny máselné, 10 ml kyseliny valerové, 10 ml kyseliny isovalerové, 10 ml kyseliny izomáselné, 100 mg kyseliny fenylactové, 100 mg kyseliny fenylpropionové

## 4.2 Izolace extracelulárních enzymů

Po kultivaci bakterií jsou extracelulární enzymy součástí kultivačního média. Izolace enzymů z bakteriální kultury byla provedena pomocí ultracentrifugace a ultrafiltrace. Takto připravený vzorek je již vhodný ke zpracování a analýze.

Použité přístroje:

Ultracentrifuga      Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifuge

Separace buněk byla provedena odstředěním na ultracentrifuze v kyvetách o objemu 250 ml při 4°C rychlostí 15000 RPM po dobu 45 minut. Vzniklý supernatant byl poté převeden do ultrafiltrační cely a 20x zahuštěn pod tlakem helia 300 kPa na polyethersulfonové membráně s cut-off 10 kDa. Po celou dobu zahušťování byla cela chlazena ledem.

Ultrafiltrační cela model 8400 od firmy Amicon

Kapacita	400 ml
Minimální použitý objem	10 ml
Plocha membrány	41,8 cm <sup>2</sup>
Maximální použitelný tlak	530 kPa
Maximální diafiltrační tlak	390 kPa

Ultrafiltrační membrána firmy Amicon

Materiál      polyethersulfon

Průměr	76 mm
Cut-off	10 kDa

Membrána byla uchována v 0,02% roztoku azidu sodného. Při použití nové membrány bylo potřeba membránu opláchnout v destilované vodě a nechat po dobu 1 hodiny namočenou v průběžně vyměňované destilované vodě, neboť membrána je konzervována glycerinem a azidem sodným.

### 4.3 Frakcionace a purifikace

Izolovaný vzorek stále obsahuje kromě čistého bílkovinného enzymu také řadu nečistot, nejčastěji sacharidy nebo zbytky bachorové tekutiny. Čistý vzorek byl získán purifikací hrubého enzymového preparátu pomocí gelové filtrace na SEPHADEXu o dvou různých velikostech pórů matrice G-25 a G-75. Čistý vzorek byl sbírán do řady frakcí.

#### 4.3.1 Chromatografická gelová filtrace

Gel byl připraven ze SEPHADEXu, což je dextran s navázaným epichlorhydrinem v zásaditém prostředí [47]. Částice vzniklého gelu jsou malé krupičky, které tvoří matici s různě velkými póry podle své velikosti. SEPHADEX G-25 tvoří póry pro molekuly o maximální relativní molekulové hmotnosti 5000 a SEPHADEX G-75 je pro molekuly o maximální relativní molekulové hmotnosti 80000, menší molekuly jsou v gelu zpožděny a větší molekuly neprojdou. Nečistoty ve vzorku většinou bývají větší molekuly či částice, které gelem neprojdou, a na konci dostaneme čistý bílkovinný vzorek.

Potřebné chemikálie:

- SEPHADEX G-25 nebo G-75 v práškovém stavu
- Pracovní pufr: 50mM Tris HCl pH=8,0
- Blue Dextran
- 0,1 M NaOH

#### 1) Příprava SEPHADEXu a chromatografické kolony

Práškový SEPHADEX nabobtnal v pracovním pufru při 20°C po dobu 3 hodiny nebo při 90°C po dobu 1 hodiny. Množství pufru musí být mnohonásobně větší než je hmotnost prášku. Pro typ G-25 minimálně pětkrát větší množství pufru, pro typ G-75 minimálně desetkrát větší množství pufru. V závislosti na velikosti kolony bylo připraveno množství

gelového SEPHADEXu podle Tabulka 1. Zbylý SEPHADEX lze skladovat v dostatečném množství pufru při 4°C až několik týdnů.

*Tabulka 1: Objem vzniklého gelu při nabobtnání 1 g práškového SEPHADEXu*

<b>SEPHADEX</b>	<b>Hmotnost práškového</b>	<b>Objem gelového</b>
<b>G-25</b>	1g	4-6 ml
<b>G-75</b>	1g	12-15 ml

Kolona o požadovaném objemu (použita 15ml) byla promyta pracovním pufrům a upevněna na stojanu do svislé polohy. Poté byla plněna čistým gelovým SEPHADEXem. Gel je třeba nalít tak, aby byl zcela homogenní v celém objemu, dát pozor na nečistoty, lokální zhuštění, či bubliny. Kolona byla naplněna gelem cca 2 cm pod horní okraj, nad gelem musí zůstat minimálně jeden centimetr pufru. Poté byla uzavřena a nechala se promýt pufrům, který byl nasáván ze zásobní nádoby umístěné nad úrovní kolony.

#### *2) Eluční objem a čas*

Před samotnou separací byl změřen eluční objem a čas kolony, tedy čas za který opustí kolonu první proteiny. K tomuto účelu byl použit Blue Dextran, modrá látka která nijak neinteraguje s kuličkami SEPHADEXu a lehce je obteče. Pro změření elučního času byl zaznamenán čas, kdy je Blue Dextran aplikován do kolony a čas, kdy vyteče. Eluční objem byl určen obdobně změřením objemu od aplikace látky do jejího vyplavení. Podle typu SEPHADEXu a kvality nalitého gelu může být eluční čas 10 – 60 minut, eluční objem se zpravidla rovná objemu kolony.

#### *3) Gelová filtrace a separace*

Do kolony byl aplikován 1 ml vzorku. Dle elučního času bylo odhadnuto, kdy doputují nejrychlejší proteiny přibližně do poloviny objemu kolony. V ten moment se začaly sbírat frakce. Podle rychlosti vytékání kolony byly měněny zkumavky, do kterých se sbírali jednotlivé frakce. Zkumavky byly měněny ve stejných intervalech. Sbírány byly frakce o objemu 1 – 4 ml. Čím větší frakce jsou, tím méně může být vzorek separován. Sbíráno bylo 7 – 15 frakcí. Do poslední frakce byl sbírán větší objem, aby byly zachyceny i nejmenší proteiny, kterým trvá průchod kolonou mnohem déle.

#### *4) Ukončení separace*

Po skončení sbírání frakcí byla kolona promyta dvěma objemy 0,1M NaOH a opět ekvilibrována 2 – 3 objemy pracovního pufru. Tím byl gel v koloně pročištěn a připraven na další separaci.

#### 4.4 Stanovení koncentrace bílkovin

V sesbíraných frakcích z gelové filtrace bylo stanoveno množství bílkovin pomocí barevné reakce činidla Bradfordové s proteiny. Frakce bez obsahu bílkovin byly poté vyřazeny.

##### 4.4.1 Stanovení bílkovin metodou Bradford [56]

Metoda podle Bradfordové je založena na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s bílkovinami. Reakce Coomassie blue s bílkovinu má pak absorpční maximum při 595 nm. Změřením absorbance při této vlnové délce, lze pomocí kalibrační křivky určit koncentraci bílkovin v roztoku.

Použité přístroje:

fotometr                      Tecan Sunrise microplate reader

Potřebné roztoky:

- Bradfordovo činidlo: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuštěno v 50 ml metanolu s přídavkem 100 ml 85%  $H_3PO_4$  doplněno vodou do 200 ml (skladuje se v temnu při 4°C)
- Pracovní roztok: Bradfordovo činidlo naředěné vodou v poměru 1:4 (činidlo:voda)
- Standard BSA o koncentraci 2000  $\mu\text{g/ml}$

Do popsáných zkumavek příslušnou koncentrací byla připravena standardní koncentrační řada podle Tabulka 2. Standardní roztoky lze zmrazené uchovávat v mrazáku a před měřením vždy nechat jen úplně rozmrazit.

Podle počtu vzorků standardu a počtu neznámých vzorků bylo do jamek mikrotitrační destičky napipetováno 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku pro každý vzorek. Měření vzorků bylo provedeno v dubletu, každému vzorku byly tedy přiděleny dvě jamky. Do pracovního roztoku byly poté přidány 4  $\mu\text{l}$  vzorku. Nejdříve byla ve dvou řadách pipetována standardní řada od nejnižší koncentrace po nejvyšší a do dalších řad opět v dubletu zkoumané vzorky. Směs

pracovního roztoku se vzorky byla v mikrotitrační destičce dobře promíchá a nechala se pár minut (2 – 5 min) odstát. Poté byla na spektrometru změřena absorbance vzniklého modrého zbarvení roztoků při 595 nm.

Tabulka 2: Koncentrační řada standardního roztoku BSA

<b>Koncentrace [µg/ml]</b>	<b>0</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>1500</b>	<b>2000</b>
BSA [ml]	0	0,125	0,250	0,500	0,750	1
H <sub>2</sub> O [ml]	1	0,875	0,750	0,500	0,250	0

Naměřené hodnoty absorbancí byly dále zpracovány. Protože všechny vzorky byly měřeny v dubletu, bylo potřeba nejdříve vypočítat průměr vždy dvou čísel příslušejících jednomu vzorku a s těmito průměry se dále pracovalo. K vyhodnocení výsledků byla nejprve sestavena kalibrační křivka. Kalibrační křivka je závislost absorbance na koncentraci proteinu a k jejímu sestavení byly použity naměřené hodnoty absorbance příslušné koncentracím koncentrační řady BSA. Vynesené body v grafu byly proloženy lineární spojnicí trendu. Míra spolehlivosti křivky by se měla, co nejvíce blížit číslu jedna, čím menší bude hodnota spolehlivosti, tím menší bude přesnost výpočtu. Z rovnice regrese kalibrační křivky byly poté dopočítány koncentrace proteinů příslušející naměřeným absorbancím u zkoumaných vzorků. Pokud je výsledná koncentrace záporná či nulová, znamená to, že proteiny se ve vzorku nevyskytují. Kladná čísla udávají koncentraci proteinu ve vzorku v jednotkách µg/ml.

## 4.5 Stanovení enzymových aktivit

Ve frakcích byla změřena xylanázová aktivita pomocí reakce s činidlem PAHBAH. Na základě naměřených aktivit byly opět vyřazeny frakce, ve kterých se žádná enzymová aktivita neprokázala.

### 4.5.1 Stanovení xylanázové aktivity- PAHBAH [76]

Stanovení je založeno na spektrofotometrickém měření přírůstku koncentrace redukujících skupin v hydrolyzátu polysacharidu. Enzym štěpí substrát, jehož štěpné produkty

reagují s činidlem PAHBAH za vzniku barevné reakce. Aktivita enzymu je pak určena z absorbance těchto roztoků.

Použité přístroje:

Vortex	VELP Scientifica
Centrifuga	K23D
Vodní lázeň	Julabo TW12
Spektrofotometr	Thermo Spectronic Biomate5

Potřebné roztoky:

- Fosfátový pufr, 100 mM, pH=7
- 0,5% substrát- CM-xylan
- PAHBAH (hydrazid kyseliny 4-hydroxybenzoové) činidlo: 5g PAHBAHu ve 100 ml 0,5N HCl (skladuje se v temnu při 4 °C)
- Pracovní roztok (vždy čerstvý): 1 objem PAHBAH + 4 objemy 0,5N NaOH
- 0,3M ZnSO<sub>4</sub>
- 0,3M Ba(OH)<sub>2</sub>

Do všech zkumavek bylo napipetováno 0,14 ml fosfátového pufru, 0,07 ml substrátu a 0,07 ml enzymu. Slepé vzorky byly poté ihned zastaveny přidavkem 0,28 ml Ba(OH)<sub>2</sub> a 0,28 ml ZnSO<sub>4</sub>, dále byly zvortexovány a dali se stočit do ultracentrifugy na 10 min při 4000 RPM. Zbylé vzorky byly inkubovány ve vodní lázni po dobu 60 min při 40 °C. Po inkubaci byly vzorky obdobně zastaveny přidavkem 0,28 ml Ba(OH)<sub>2</sub> a 0,28 ml ZnSO<sub>4</sub>, vortexovány a daly se stočit do centrifugy na 10 min při 4000 RPM. Po stočení všech vzorků bylo odebráno 0,3 ml vzniklého supernatantu do nové sady zkumavek a do všech bylo přidáno 0,9 ml pracovního roztoku PAHBAHu. Vzorky byly zvortexovány a zahřívány ve vodní lázni po dobu 10 min při 100 °C. Pokud po zahřátí vznikla ve vzorcích sraženina či zákal, což by způsobilo chybu spektrometrického měření, byly vloženy na cca 2 minuty do centrifugy při 2500 RPM, aby se sraženina usadila. Takto připravené vzorky byly přelévány do kyvet (u vzorků se sraženinou pouze supernatant). Absorbance vzniklého zabarvení vzorků byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 410 nm.

Kalibrační řada byla připravena jako roztoky xylosy a pracovního roztoku PAHBAHu (10x naředěný vodou) o koncentracích cukru 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg/ml.

Určení enzymové aktivity je otázkou následného zpracování naměřených absorbancí roztoků. Naměřené hodnoty absorbance pro triplet každého vzorků byly zprůměrovány a stejně tak dublety slepých vzorků. Od každého vzorku byla odečtena hodnota absorbance slepého vzorku, abychom dostali hodnoty absorbancí odpovídající pouze aktivitě enzymů. Z těchto hodnot byla poté vypočtena dle daného vzorce (3) aktivita enzymu

$$aktivita = A(410) \cdot k \cdot x \cdot l/t, \quad (3)$$

Kde  $a$  je enzymová aktivita v tomto případě udávaná v jednotkách  $\mu\text{g/ml/h}$ ,  $A(410)$  je průměrná absorbance vzorku při 410 nm,  $k$  je směrnice kalibrační přímky ( $k = 0,0422$ ),  $x$  je ředění roztoku vzorku (12x),  $l$  je šířka kyvety v cm ( $l=1$  cm) a  $t$  je doba inkubace v hod ( $t = 1$  hod).

V případě záporného či nulového výsledku nejsou ve vzorku žádné aktivní enzymy. Za významnou aktivitu a spolehlivý výsledek se považuje, když absorbance daného neznámého vzorku převyšuje hodnotu absorbance nulového vzorku aspoň o 15 %.

## 4.6 1D elektroforetická separace

Vybrané frakce čistého enzymového preparátu byly dále separovány pomocí elektroforetických technik SDS PAGE a zymografie. Obě techniky byly nejdříve prováděny na polyakrylamidových gelech o malém rozměru (10 x 7 cm) pouze pro vizualizaci enzymů a jejich aktivit. Na základě těchto výsledků se pak použily vybrané vzorky pro elektroforetickou separaci na gelech o větším rozměru (16 x 20 cm). Menší rozměr gelu je výhodnější z pohledu časové náročnosti provedení elektroforézy, snadnější manipulace, menší spotřeby materiálu. Větší gely jsou naopak vhodné, pokud je potřeba se separovanými vzorky dále pracovat, jelikož se nanáší větší množství vzorku a jednotlivé separované části vzorku lze z gelu lépe extrahovat. K vizualizaci elektroforetické separace byly použity různé techniky barvení. Zymogram byl obarven pomocí barviva Congo Red a gel SDS PAGE byl barven jednak pomocí Coomassie Blue nebo zde vhodnější citlivější metodou pomocí dusičnanu stříbrného.

Pokud je elektroforetická separace zymogramu a klasické elektroforézy spuštěna zároveň se stejně nanesenými vzorky a za stejných podmínek separace, pak si tyto dva gely odpovídají a lze porovnávat, které bílkoviny vyobrazené na obarveném gelu z elektroforézy jsou aktivní na zymogramu.



#### 4.6.1 SDS PAGE, Zymografie [77]

Elektroforéza v polyakrylaamidovém gelu s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS PAGE) se používá k separaci denaturovaných proteinů podle velikosti a délky jejich řetězce. SDS PAGE je vhodná pro separaci bílkovin, např. enzymy. V případě zymografie se do polyakrylamidového gelu přidává substrát, se kterým separovaný enzym interaguje. V případě rozštěpení substrátu enzymem lze detekovat aktivní enzymy.

Použité přístroje:

Sestava pro elektroforézu	Bio-Rad PROTEAN II Cell Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell
Laboratorní zdroj	Bio-Rad Powerpac 1000 Bio-Rad Powerpac Basic Power supply

Vařič

Potřebné roztoky:

- **A** – 30 g akrylamidu, 0,8 g N,N-methylenbisakrylamidu, doplnit do 100 ml vodou
- **B** – 10 g dodecylsírany sodného (SDS) doplnit do 100 ml vodou
- **C** – 9,1 g TRIS rozpustit v 50 ml vody, dotitrovat koncentrovanou HCl na pH 8,8 (cca 0,97 ml), doplnit do 100 ml vodou
- **D** – 3 g TRIS rozpustit v 50 ml vody, dotitrovat HCl na pH 6,8 a doplnit do 100 ml vodou.
- **E** – 30,3 g TRIS, 144 g glycinu, 10g SDS, doplnit do 1 l vodou
- **F** – 10 mg bromfenolové modři rozpustit v 1 ml roztoku D
- **G** – 1 g persíranu amonného, doplnit do 10 ml vodou
- **H** – izobutanol nasycený roztokem C
- CM xylan
- TEMED
- Vzorkový pufr (redukující): 2,4 ml D; 2ml B; 1ml glycerolu; 4 ml H<sub>2</sub>O; 0,1 ml F a 0,5 ml merkaptoetanolu
- Ekvilibrační roztok: 25 ml C; 24,5 ml H<sub>2</sub>O; 0,5 ml B
- Elektrodový TGS (Tris-glycine-SDS) pufr: 100 ml E, doplnit do 1 l vodou

(roztoky A – E kromě B skladovat při 4°C, B a F při pokojové teplotě, ostatní připravit vždy čerstvě)

### 1) Příprava polyakrylamidových gelů

Nejprve byla sestavena aparatura na přípravu gelů. Gely byly připraveny podle Tabulka 3. Jako první byl naléván separační gel po vyznačenou rysku, aby zbyl prostor pro zaostřovací gel. Separáční gel byl ihned převrstven roztokem H (izobutanol nasycený roztokem C), aby se odstranily bublinky a vyrovnala se hladina separačního gelu. Ve vodorovné poloze se nechal gel zpolymerovat. U velkých gelů trvá polymerace 1 hodinu, u malých 30 minut. Po zpolymerování byl důkladně odsát roztok H a gel byl převrstven ekvilibračním roztokem na 30 minut u velkých gelů a na 15 minut u malých gelů. V této fázi lze gel uchovávat při 4°C až několik týdnů. Před elektroforézou byl z gelu odsát ekvilibrační roztok. Mezi skleněné desky, kde se nacházel gel, byly zasunuty hřebínky pro vymezení prostoru na nanášení vzorků a zbylý prostor byl zalit čerstvě připraveným zaostřovacím gelem. Gel se nechal zpolymerovat. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byly vyjmuty hřebínky a gel tak byl připraven na nanášení vzorků.

Tabulka 3: Příprava SDS polyakrylamidových gelů pro elektroforézu a zymografii

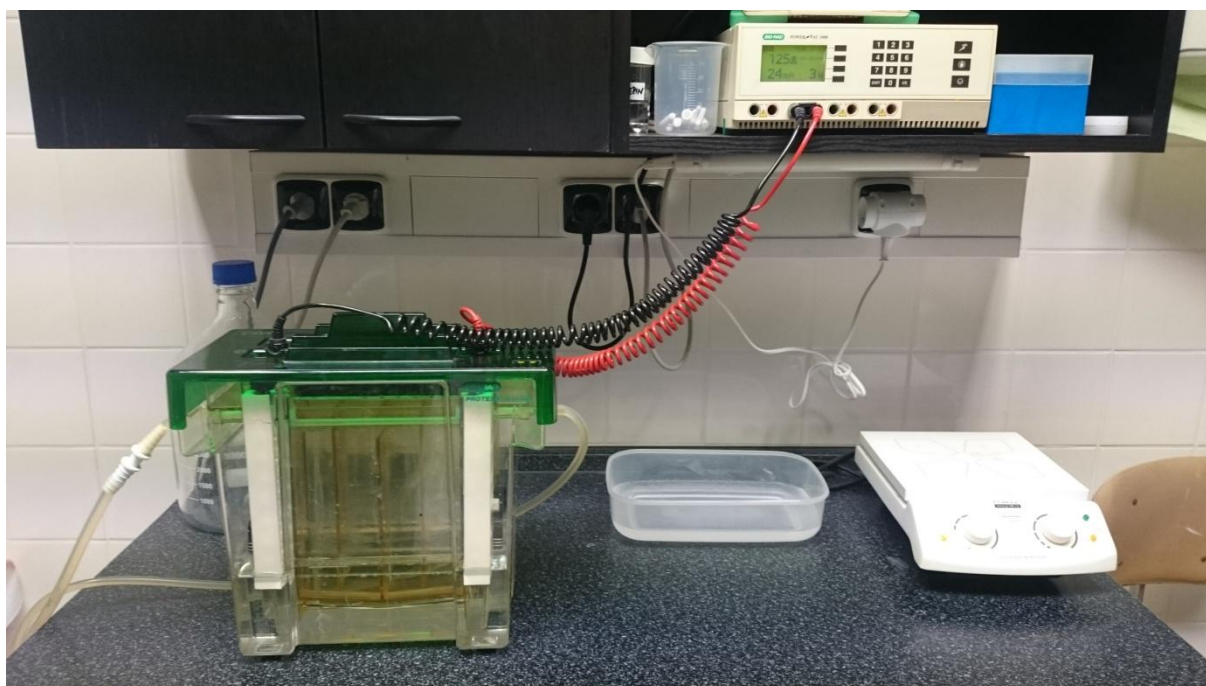
Roztok	Separáční gel (10%) <b>Elektroforéza</b> [ml]	Separáční gel (10%) <b>Zymografie</b> [ml]	Zaostřovací gel elfo + zymo [ml]
<b>A</b> – akrylamid	10	10	1
<b>B</b> – SDS	0,3	0,3	0,1
<b>C</b> – TRIS pH 8,8	15	15	0
<b>D</b> – TRIS pH 6,8	0	0	5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,4	2,4	3,8
<b>Substrát</b> – xylan	0	2	0
<b>TEMED</b>	0,02	0,02	0,005
<b>G</b> – persíran	0,3	0,3	0,15

## 2) Příprava vzorků

Vzorky byly napipetovány v poměru 1:1 se vzorkovým redukcujícím pufrům, tj. 20  $\mu$ l vzorku a 20  $\mu$ l pufru. Rozpuštěné vzorky v pufru byly povařeny ve vroucí vodě po dobu 1 minuty. Po vychladnutí byly vzorky připraveny k nanášení.

## 3) Provedení elektroforézy

Skla držící gely byla vsazena do nádoby s pufrům. Prostor mezi deskami s gely (anodová nádoba) byl zalit čerstvým elektrodovým pufrům a spodní katodová nádoba byla naplněna elektrodovým pufrům. Do jamek gelů byly nanášeny vzorky o objemu 10 – 40  $\mu$ l podle koncentrace proteinů ve vzorku a podle velikosti gelu. K aparatuře byly připojeny vodiče ke zdroji a chlazení. Na zdroji byla nastavena hodnota napětí 10 – 20 V na 1 cm délky gelu, při které elektroforéza probíhala. V průběhu elektroforézy byl sledován postup čela elektroforézy, tedy postupu nejrychlejších vzorků, a při dosažení čela blízko konce gelu byla aparatura odpojena od zdroje napětí. Trvání separace záviselo na velikosti gelu a trvalo v řádech hodin. Po dokončení separace byla aparatura rozebrána a gely vyjmuty ze skleněných desek.



Obrázek 15: Elektroforetická separace na přístroji Protean II Cell (foto autor)

#### 4) Zobrazení proteinů a enzymových aktivit

Separované proteiny byly zviditelněny barvením gelů. Gely z elektroforézy byly obarveny pomocí barviva Coomassie Blue nebo citlivější metodou pomocí stříbra. Gely ze zymografie byly obarveny barvivem Congo Red. Separované frakce proteinů jsou v gelu viditelné jako krátké proužky, tzv. bandy.

#### 4.6.2 Barvení zymogramu [77]

Zymogram zobrazuje aktivní složky enzymu díky degradaci přidaného substrátu v gelu aktivním enzymem. Při obarvení gelu barvivem, které se váže na substrát, zůstanou místa s méně substrátem či žádným substrátem světlá. V těchto místech se nachází tedy aktivní enzym, který substrát rozložil.

Použité přístroje:

Třepačka	Biosan Mini Rocker MR-1
Zobrazovací zařízení	Molecular imager Gel Doc XR+

Potřebné roztoky:

- Triton 1%
- Fosfátový pufr (PBS), 25 mM, pH= 6,65 – 6,68
- Congo červeně
- 1M NaCl

Po provedení elektroforézy byl gel vložen do misky na třepačku. Gel byl nejdříve renaturován promýváním v 1% tritonu po dobu 30 minut a dále ve fosfátovém pufru třikrát po dobu 25 minut. Následně byl gel inkubován 30 – 40 minut v termostatu při 40°C opět ponořený ve fosfátovém pufru. Po vyjmutí z termostatu byl gel obarven Congo červení po dobu 15 minut. Congo červeně byla poté vymývána 1M roztokem NaCl minimálně třikrát po dobu 20 minut, dokud nebyly na oranžovočerveném gelu dobře viditelné světlé bandy. V roztoku 1M NaCl se může dál gel uchovávat při 4°C.

Doby jednotlivých kroků jsou uvedeny pro velký gel (šířka 16 cm), podle velikosti gelu bylo možno je úměrně zkrátit.

#### 4.6.3 Detekce bílkovin pomocí Coomassie Blue [77]

Coomassie Blue je modré barvivo, které se váže na bílkoviny a tím zviditelní, kde se elektroforeticky separované skupiny bílkovin nacházejí.

Použité přístroje:

Třepačka	Biosan Mini Rocker MR-1
Zobrazovací zařízení	Molecular imager Gel Doc XR+

Potřebné roztoky:

- Barvicí roztok: 450 ml etanolu; 100 ml kyseliny octové; 450 ml H<sub>2</sub>O; 0,5 g Coomassie Blue R-250; 2,5 ml formaldehydu
- Odbarvovací roztok: 250 ml etanolu, 100 ml kyseliny octové, 650 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml formaldehyd

Po provedení elektroforézy byl gel vložen do misky na třepačku. Gel byl barven barvicím roztokem Coomassie Blue po dobu 1,5 – 2 hodiny. Obarvený gel byl poté vymýván v odbarvovacím roztoku. Odbarvovací roztok byl během odbarvování průběžně vyměňován, dokud nebyly dobře zřetelné tmavě modré bandy na světlém pozadí.

#### 4.6.4 Detekce bílkovin stříbrem [57]

Detekce bílkovin stříbrem je velice citlivá metoda schopná detekovat malé množství proteinu v rádech nanogramů [57, 78]. Metoda je založena na vytvoření vazby mezi proteiny a ionty stříbra [78].

Použité přístroje:

Třepačka	Biosan Mini Rocker MR-1
Zobrazovací zařízení	Molecular imager Gel Doc XR+
Analytické váhy	A&D HA-120M

Potřebné roztoky:

- Fixační roztok: 200 ml etanolu (40%), 50 ml kyseliny octové (10%), 250 ml H<sub>2</sub>O
- 30% etanol
- Deionizovaná voda

- 0,02% thiosíran: 0,05 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- 0,1% dusičnan stříbrný: 0,25 g  $\text{AgNO}_3$ ; 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0,15 ml formaldehydu
- 3% uhličitan sodný: 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0,375 ml formaldehydu
- 5% kyselina octová

Roztoky  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a roztok thiosíranu byly připravovány vždy čerstvé. Roztoky  $\text{AgNO}_3$  a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  byly poté před použitím skladovány při 4°C.

Na třepačku byla připravena miska, ve které poté probíhalo za stálého míchání promývání gelu v následujících roztocích. Objem každého roztoku by měl být vždy minimálně pětkrát větší než je objem gelu. Po provedení elektroforézy byl gel vložen do misky na třepačku s fixačním roztokem. Gel byl fixován 60 minut.

Dalším krokem bylo vymývání a zcitlivění gelu. Nejdříve byl gel dvakrát promyt ve 30% etanolu po 20 minutách. Dalších 20 minut byl gel promýván v deionizované vodě. Následně byl gel zcitlivěn 0,02% roztokem thiosíranu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) po dobu 1 minuty a poté byl třikrát propláchnut deionizovanou vodou po 30 sekundách.

Následovalo barvení gelu. Gel byl inkubován ve vychlazeném 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ) po dobu 20 minut. Poté byl vymyt deionizovanou vodou čtyřikrát po 30 sekundách. V dalším kroku bylo zviditelněno barvení pomocí 3% roztoku uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Působením uhličitanu sodného získal gel žlutou barvu s hnědými bandy. Ihned po viditelném zabarvení bandů muselo být barvení zastaveno, aby nedošlo k přebarvení a ztrátě informace.

Nejdříve byl gel vymyt deionizovanou vodou po 30 sekund a poté byla reakce zastavena inkubací v 5% kyselině octové po dobu 5 minut. Nakonec byl gel promyt deionizovanou vodou minimálně třikrát po 10 minutách. Gel je možné skladovat ve vodě při 4°C delší dobu.

#### **4.7 2D elektroforetická separace**

Pro dosažení jemnější separace a podrobnější vizualizace vzorku byla provedena dvourozměrná elektroforéza. Pro isoelektrickou fokusaci byly použity IPG proužky o délce 7 cm s rozmezím pH 3-6 nebo 3-10. Následná elektroforetická separace byla spuštěna na gelech o velikosti 10x7 cm (šířka x délka). Separované proteiny byly nakonec obarveny barvivem Coomassie blue R-250. Provedení 2D elektroforézy zahrnovalo šest navazujících kroků, přípravu vzorků, dehydrataci IPG proužků, izoelektrickou separaci, ekvilibraci IPG proužků,

elektroforetickou separaci a barvení. První den byly připraveny vzorky pro 2D elektroforézu a byly rehydratovány IPG proužky s nanesenými vzorky. Rehydratace trvala do druhého dne, kdy byla provedena izoelektrická fokusace vzorků. Po fokusaci byly IPG proužky zamrazeny do dalšího dne. Třetí den byla provedena ekvilibrace IPG stripů s následnou elektroforetickou separací a na závěr byly vizualizovány proteiny barvením.

#### *4.7.1 Příprava vzorků pro 2D elektroforézu a zymogram vysrážením TCA*

Příprava vzorků pro dvourozměrnou elektroforézu se liší od přípravy vzorků pro jednorozměrnou elektroforézu. Nejběžnější technikou získání čistých proteinů je jejich vysrážení pomocí kyseliny trichloroctové (TCA) a acetonu. Díky lepším výsledkům byl aceton nahrazen acetonitrilem a sníženo množství TCA.

Použité přístroje:

Centrifuga Hettich MIKRO 22R

Sonikátor Sonics & Materials Vibra cell

Potřebné roztoky:

- kyselina trichloroctová (TCA)
- Acetonitril, ledový- uchovávat v mrazáku
- Solubilizační pufr: do 10 ml- 4,8048 g pevné močoviny; 0,4 g CHAPS; 0,2 g DTT

Do Eppendorfových zkumavek byl napipetován 1 ml vzorku a k němu 100  $\mu$ l TCA k precipitaci proteinů. Eppendorfky se potom nechaly stát na ledu po dobu 60 minut. Vysrážené proteiny byly poté odděleny pomocí centrifugace při 6000 RPM po dobu 15 minut. Ze zkumavek byl odstraněn supernatant. K peletu tvořenému proteiny byl přidán 1 ml ledového acetonitrilu a směs byla inkubována na ledu po dobu 30 minut. Následně byla opět provedena centrifugace 6000 RPM na 15 minut a supernatant byl slit. Vzniklý pelet byl sušen na vzduchu odpařením. K vysušenému peletu bylo přidáno 150  $\mu$ l solubilizačního pufru a pelet se nechal rozpouštět při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Rozpuštění bílkovin je nezbytné pro získání výsledků při 2D elektroforéze a lze mu napomoci sonikací peletu. Sonikátor pomocí ultrazvukových rázů rozbíjí pelet. Přitlačením sondy ke zkumavce bylo aplikováno čtyři až pět sérií ultrazvukových rázů za stálého chlazení sondy a vzorku ledem.

#### *4.7.2 Dvourozměrná elektroforéza*

Při 2D elektroforéze dochází k dělení vzorků podle izoelektrického bodu v jednom směru a podle velikosti v druhém kolmém směru. Výsledkem je velice citlivé dělení až na jednotlivé bílkoviny.

Použití přístroje:

Sestava pro izoelektrofokusaci	Bio-Rad Protean IEF Cell
Sestava pro elektroforézu	Bio-Rad PROTEAN II Cell
Laboratorní zdroj	Bio-Rad Powerpac 1000 Bio-Rad Powerpac Basic Power supply
Třepačka	Biosan Mini Rocker MR-1

Potřebné roztoky:

- Vzorkový rehydratační pufr: do 10 ml- 4,8048 g pevné močoviny (8M); 0,2 g CHAPS (2%); 77,125 mg DTT (50mM); 0,1 ml bromfenolové modři
- Parafínový olej
- Nanopure water
- Ekvilibrační pufr I: 7,2072 g močoviny (6M); 0,8 g SDS (2%); 1,182 g tris-HCl (0,375 M, pH=8); 13,35 ml glycerol (30%) → těsně před použitím rozpustit ve 2 ml roztoku 0,04 g DTT (dithiothreitol)
- Ekvilibrační pufr II: 7,2072 g močoviny (6M); 0,8 g SDS (2%); 1,182 g tris-HCl (0,375 M, pH=8); 13,35 ml glycerol (30%) → těsně před použitím rozpustit ve 2 ml roztoku 0,05 g IAA (jodacetamid)
- Elektrodový TGS pufr: 100 ml roztoku TGS (3,03 g TRIS; 14,4 g glycinu; 1g SDS; doplnit do 100 ml vodou), doplnit do 1 l vodou
- Agarosový gel: 50 ml agarosy s nízkou teplotou tání v 25 mM Tris, 192 mM glycinu, 0,1% SDS a kapkou bromfenolové modři
- Barvicí roztok: 400 ml metanolu; 100 ml kyseliny octové; 500 ml H<sub>2</sub>O; 1 g Coomassie Blue R-250
- Odbarvovací roztok: 400 ml etanolu, 100 ml kyseliny octové, 500 ml H<sub>2</sub>O



### 1) Rehydratace IPG stripu

Nejdříve byla připravena destička pro dehydrataci IPG proužků dlouhých 7 cm. Do prázdných drážek bylo podle koncentrace bílkovin ve vzorku napipetováno 70 – 100  $\mu$ l vzorku spolu se 70 – 100  $\mu$ l rehydratačního vzorkového pufru pro příslušné rozmezí pH. (Pro 17 cm dlouhé proužky bylo použito 150  $\mu$ l vzorku a 150  $\mu$ l pufru.) Do drážek se směs vzorku a pufru byl vložen IPG proužek s odpovídajícím rozmezím pH. Z proužku byla nejprve sejmuta ochranná fólie a poté byl proužek přikládán gelem dolů (na vzorek). Drážky s IPG proužky byly převrstveny 1 ml parafínového oleje a destička byla uzavřena víkem. V tomto stavu byly IPG proužky rehydratovány minimálně 12 hodin.



Obrázek 16: Rehydratace IPG proužků v rehydratační destičce

### 2) Izoelektrická fokusace

Dále byly připraveny fokusační destičky (s elektrodami) pro danou délku proužku. Na elektrody v destičce byl pro dobrý kontakt přiložen filtrační papír, na který bylo kápnuto 7  $\mu$ l nanopure water. Z rehydratační destičky byly vyjmuty IPG proužky a nechali se okapat od oleje. Poté byly IPG proužky položeny do drážek fokusační destičky opět gelem dolů a ve správné orientaci podle značení na proužku i destičce (+ na +). Každý IPG proužek byl přelit 700  $\mu$ l parafínového oleje. Destička byla uzavřena víkem a umístěna se na Protean IEF Cell. Na Proteanu IEF Cell byl nastaven vhodný program pro fokusaci- 6 fází s postupně se zvyšující hodnotou napětí a proudu od 50 do 200  $\mu$ A/proužek. Po ukončení fokusace byly proužky vyjmuty z fokusačních destiček a nechali se opět okapat. V tomto stavu byly proužky zamrazeny a skladovány.

### 3) *Ekvilibrace*

Po izoelektrické fokusaci byly IPG proužky vloženy po jednom do drážek ekvilibrační destičky. Pokud byly IPG proužky předtím zmrazeny, pak byly před ekvilibrací 15-20 min rozmrazovány. Proužky byly vkládány gelem vzhůru, aby byl gel v kontaktu s pufrem. Nejdříve byl připraven ekvilibrační pufr I. Při přípravě se nesměl roztok ohřát na více než 30 °C. Každá drážka s IPG proužkem byla zalita 2 ml ekvilibračního pufru I a destička byla vložena na třepačku na 10 minut. Během této doby byl připraven ekvilibrační pufr II. Roztok se opět nesmí zahřát na více než 30 °C. Pro rychlejší rozpouštění iodacetamidu byla použita vodní lázeň o teplotě nižší než 30 °C. Po uplynutí 10 min byl ekvilibrační pufr I důkladně odsát pipetou a IPG proužky byly převrstveny 2 ml ekvilibračního pufru II. Opět byly IPG proužky omývány pufrem 10 min na třepačce. Poté byl gel opět důkladně odsát a IPG proužky byla několikrát krátce ponořeny do elektrodového TGS pufru.

### 4) *SDS PAGE*

IPG proužek byl zasunut opatrně mezi skla s SDS polyakrylamidovým gelem tak, aby se nepoškodil gel proužku. Pinzetou byl proužek zasunut těsně k gelu. Zbýlý prázdný prostor mezi skly byl zalit rozehřátým agarosovým gelem s bromfenolovou modří. Po ztuhnutí agarosového gelu byla skla vložena do sestavy pro elektroforézu. Nádoba s celou sestavou byla zalita elektrodovým pufrem a byla spuštěna se elektroforetická separace. V první fázi bylo aplikováno napětí 60 V, dokud bromfenolová modř nepřecestovala z agarosového gelu do polyakrylamidového. Poté bylo napětí zvýšeno na 200 V. Separace na malém gelu, tj. délka dráhy vzorku cca 7 cm, trvala přibližně 45 min.

### 5) *Barvení*

Při barvení pomocí Coomassie blue bylo postupováno stejně jako u barvení gelů 1D elektroforézy. Odlišné bylo pouze složení barvicího a odbarvovacího roztoku. Po provedení elektroforetické separace byl gel umístěn do misky na třepačku s barvicím roztokem. Nechal se barvit po dobu 60 minut. Po obarvení byl barvicí roztok vylit a nahrazen odbarvovacím roztokem. Odbarvovací roztok byl vyměňován v přibližně 20 min intervalech, dokud nebyly na gelu zřetelné obarvené struktury.

## 4.8 Vyhodnocení elektroforetických metod

Obarvené gely ze všech elektroforetických technik byly vyhodnoceny nejdříve pohledem. V případě že separace proteinů a jejich obarvení proběhly úspěšně, byly gely podrobeny detailnější analýze pomocí Gel Doc XR+ nebo denzitometru Model GS-700.

## 4.9 Hmotnostní spektrometrie

Analýza hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla provedena ve spolupráci s Laboratoří charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu AV ČR. Pro analýzu byly použity bandy z jednorozměrné elektroforézy dělané na gelu barveném pomocí Coomassie blue nebo analogické aktivní bandy ze zymogramu.

### 4.9.1 MALDI-TOF

Použité přístroje:

Hmotnostní spektrometr MALDI TOF/TOF                      Bruker Daltonics Ultraflex III TOF/TOF  
s pevnolátkovým laserem SmartBeam

Potřebné roztoky:

- 0,1 M 4-ethylmorfolinacetát, pH=8,1
- 50% acetonitril
- 50 mM tris(2-karboxyethyl)fosfan

Vybrané dobře viditelné bandy na gelu z elektroforézy byly vyříznuty z gelu, dále nasekány na menší kousky a několikrát vymyty v 0,1 M roztoku 4-ethylmorfolinacetátu a 50% acetonitrilu. Po úplném vymytí byl ke kouskům gelu přidán 50 mM roztok tris(2-karboxyethyl)fosfanu a směs byla inkubována po dobu 15 min při 80°C. Při 37°C byl pak vzorek ponechán přes noc, aby se rozložil na krátké peptidy. Peptidy byly extrahovány z gelu pomocí acetonitrilu. Peptidy byly podrobeny analýze na přístroji MALDI TOF/TOF a data analyzována pomocí softwaru Mascot, který porovnává obdržený výsledek s databází proteinů.

## 5 VÝSLEDKY

Vzorky:

UC 142 – *Butyrivibrio proteoclasticus*, kultivace 3 dny

JK 170 – *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, kultivace 3 dny

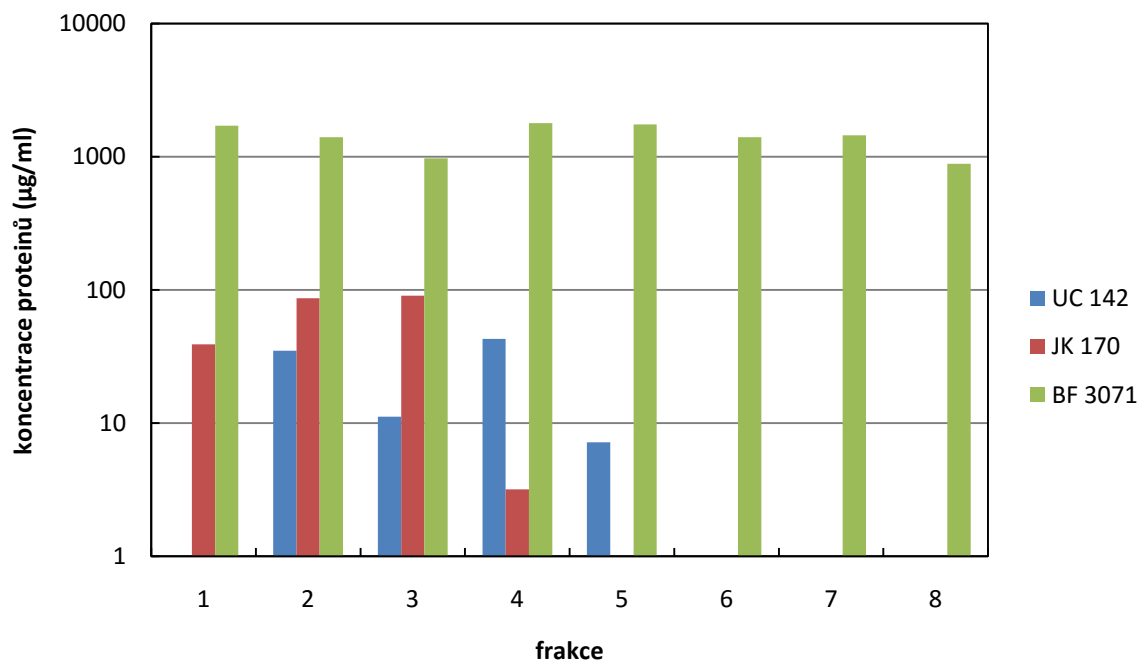
BF 3071 – *Butyrivibrio fibrisolvens*, kultivace 4 dny

### 5.1 Koncentrace bílkovin

#### První stanovení

Tabulka 4: Koncentrace bílkovin v první sadě frakcí z gelové filtrace na SEPHADEXU G-25

Číslo frakce	Koncentrace proteinů (µg/ml)		
	UC 142	JK 170	BF 3071
1	0,00	38,98	1711,04
2	35,00	86,71	1399,33
3	11,14	90,69	973,88
4	42,96	3,18	1791,07
5	7,16	0,00	1744,74
6	0,00	0,00	1403,54
7	0,00	0,00	1449,87
8	0,00	0,00	885,43

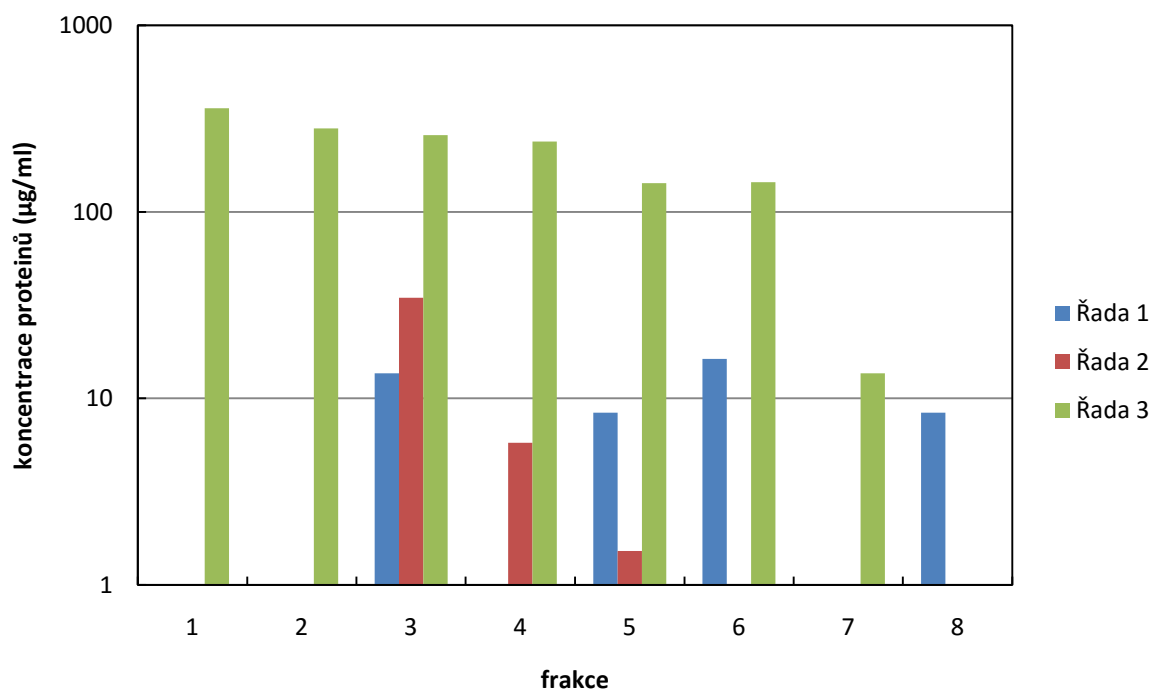


Graf 1: Porovnání koncentrací bílkovin v jednotlivých vzorcích první sady frakcí z gelové filtrace

## Druhé stanovení

Tabulka 5: Koncentrace bílkovin v druhé sadě frakcí z gelové filtrace na SEPHADEXU G-25

Číslo frakce	Koncentrace proteinů (μg/ml)		
	UC 142	JK 170	BF 3071
1	0,00	0,00	359,44
2	0,00	0,00	280,28
3	13,64	34,63	258,06
4	0,00	5,77	238,61
5	8,39	1,52	142,78
6	16,26	0,00	144,17
7	0,00	0,00	13,61
8	8,39	0,00	0,00



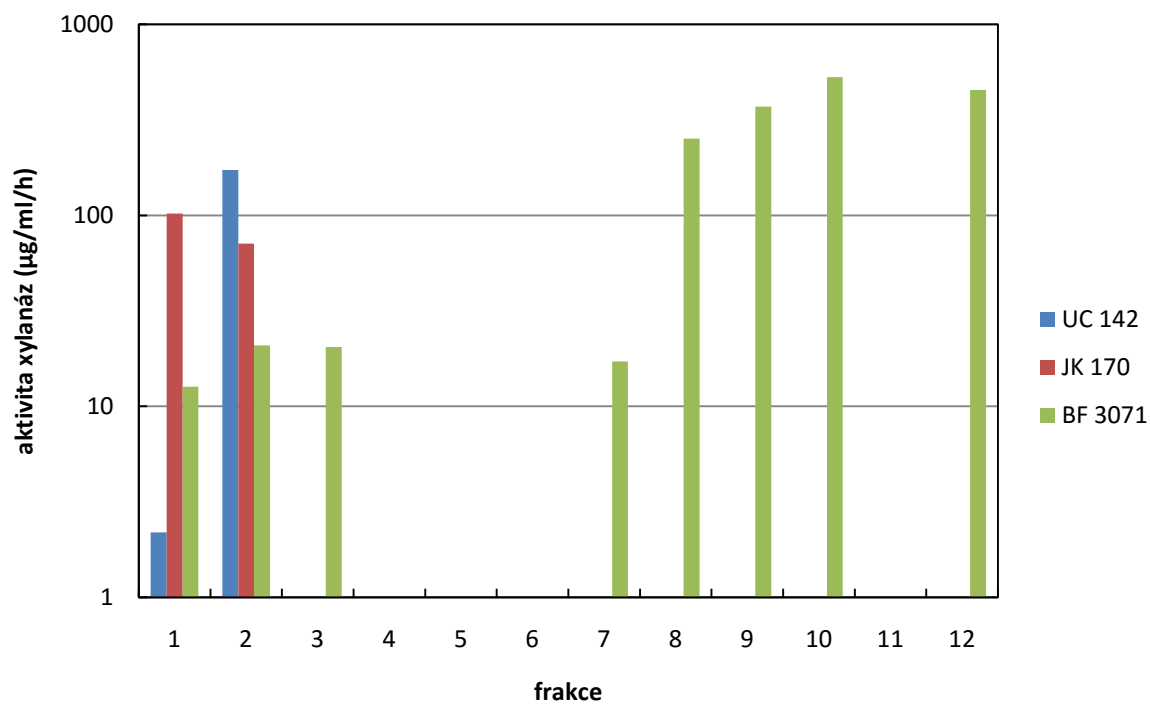
Graf 2: Porovnání koncentrací bílkovin v jednotlivých vzorcích druhé sady frakcí gelové filtrace

## 5.2 Stanovení enzymových aktivit

### První stanovení

Tabulka 6: Xylanázové aktivity první sady vzorků

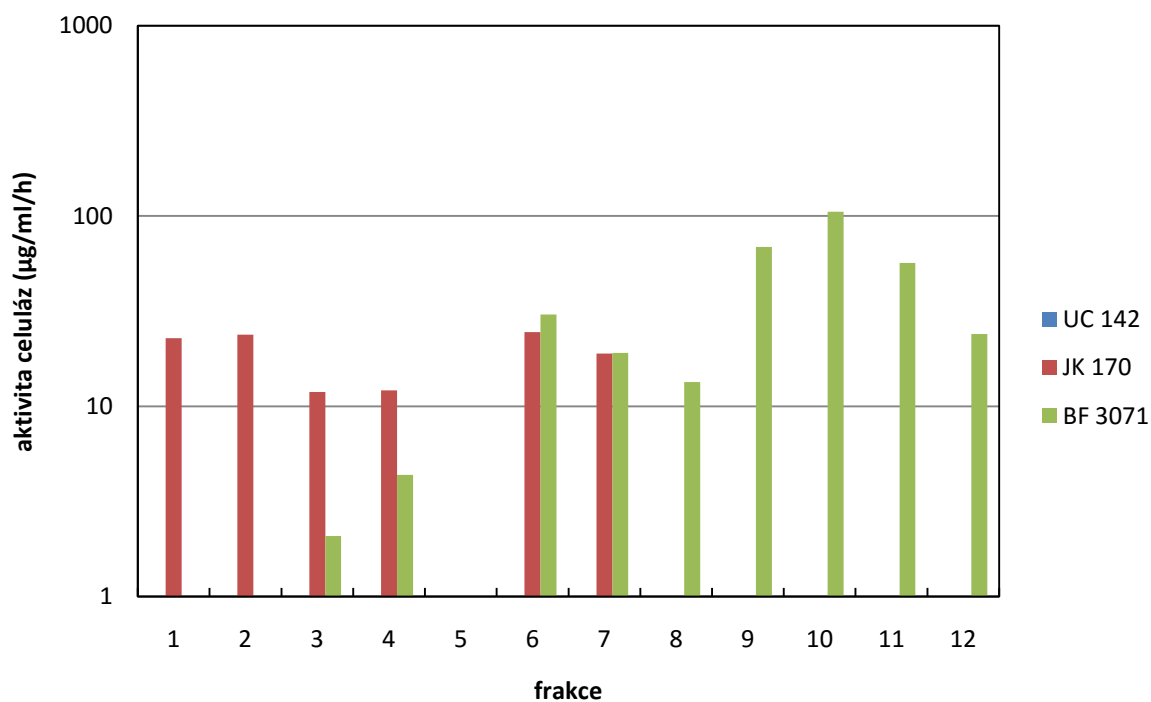
Číslo frakce	Aktivita xylanáz ( $\mu\text{g/ml/h}$ )		
	UC 142	JK 170	BF 3071
1	2,19	102,38	12,660
2	173,02	70,98	20,847
3	0,00	0,00	20,425
4	0,00	0,00	0,000
5	0,00	0,00	0,000
6	0,00	0,00	0,000
7	0,00	0,00	17,218
8	0,00	0,00	251,681
9	-	-	371,444
10	-	-	528,766
11	-	-	-
12	-	-	453,819



Graf 3: Porovnání xylanázových aktivit první sady vzorků, na ose y vynesena aktivita N-acetylglukosaminu

Tabulka 7: Celulázové aktivity první sady vzorků

Číslo frakce	Aktivita celuláz ( $\mu\text{g/ml/h}$ )		
	UC 142	JK 170	BF 3071
1	0,00	22,83	0,000
2	0,00	23,80	0,000
3	0,00	11,90	2,081
4	0,00	12,10	4,357
5	0,00	0,00	0,000
6	0,00	24,58	30,369
7	0,00	18,92	19,054
8	0,00	0,00	13,396
9	-	-	68,867
10	-	-	105,154
11	-	-	56,576
12	-	-	23,996

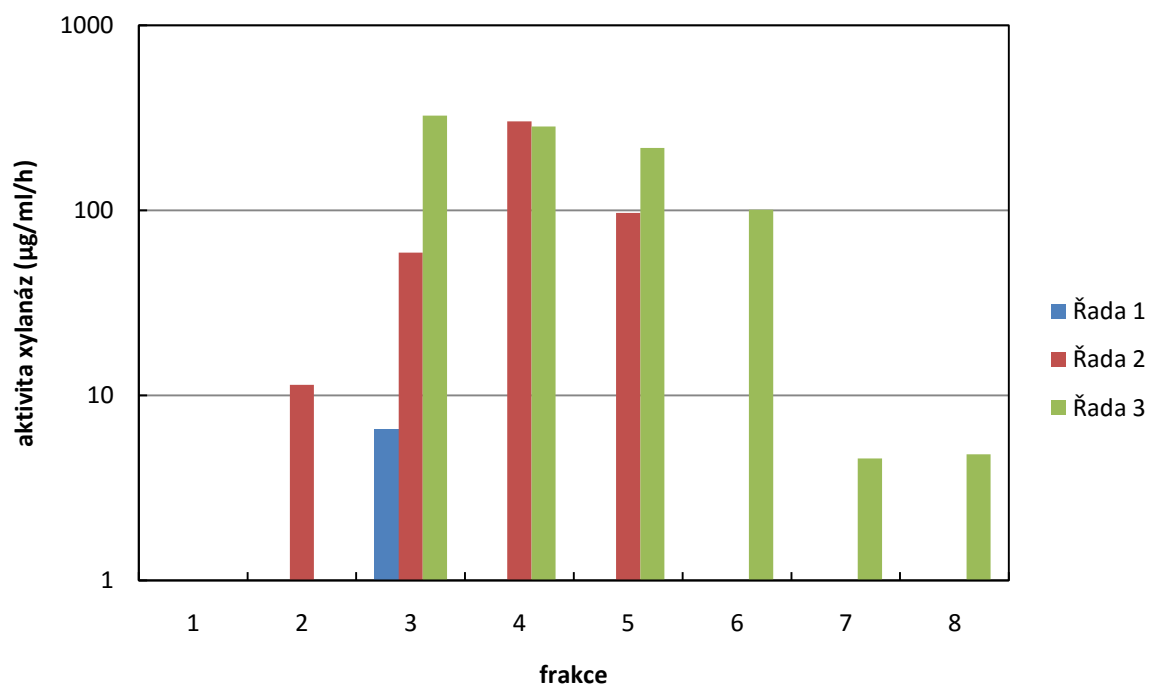


Graf 4: Porovnání celulázových aktivit první sady vzorků

## Druhé stanovení

Tabulka 8: Xylanázové aktivity druhé sady vzorků

Číslo frakce	Aktivita xylanáz ( $\mu\text{g/ml/h}$ )		
	UC 142	JK 170	BF 3071
1	0	0	0,00
2	0	11,394	0,00
3	6,583	58,996	325,11
4	0	302,574	283,84
5	0	96,976	217,50
6	0	0	100,77
7	0	0	4,56
8	0	0	4,81

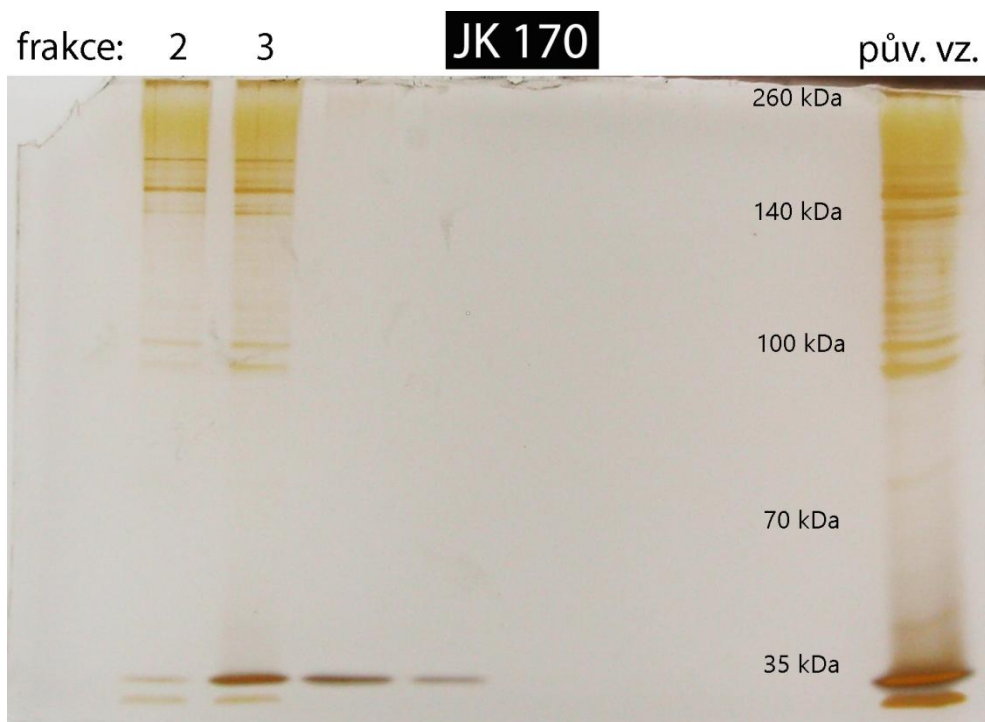


Graf 5: Porovnání celulázových aktivit druhé sady vzorků

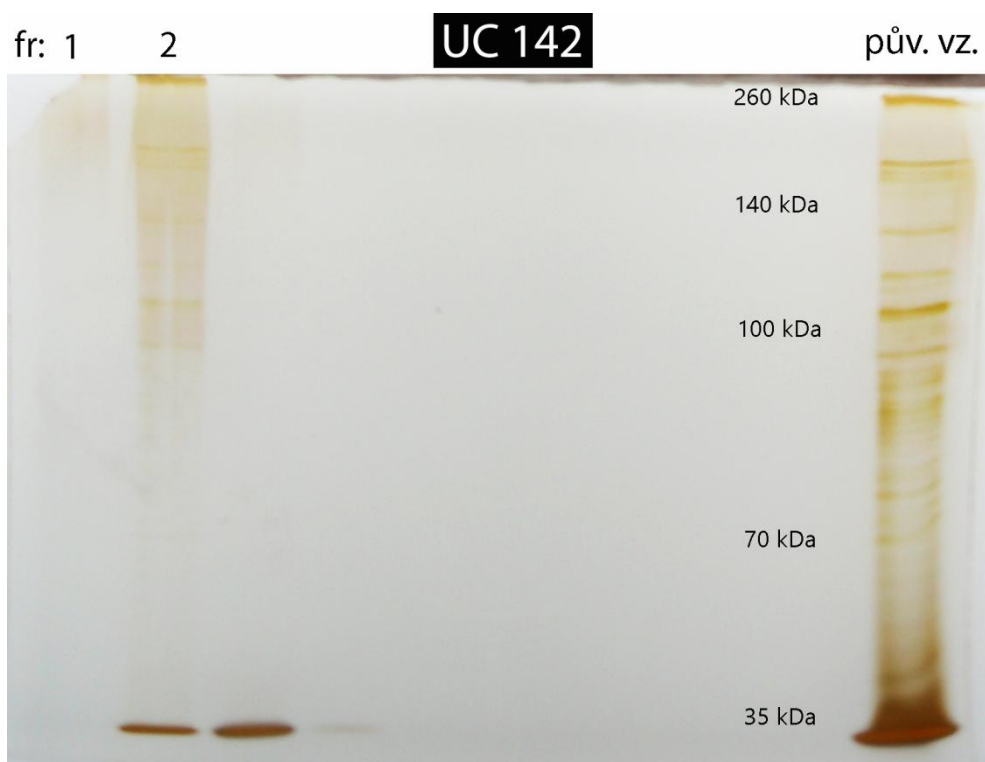


## 5.3 1D elektroforéza, zymografie

### 5.3.1 Barvení stříbrem

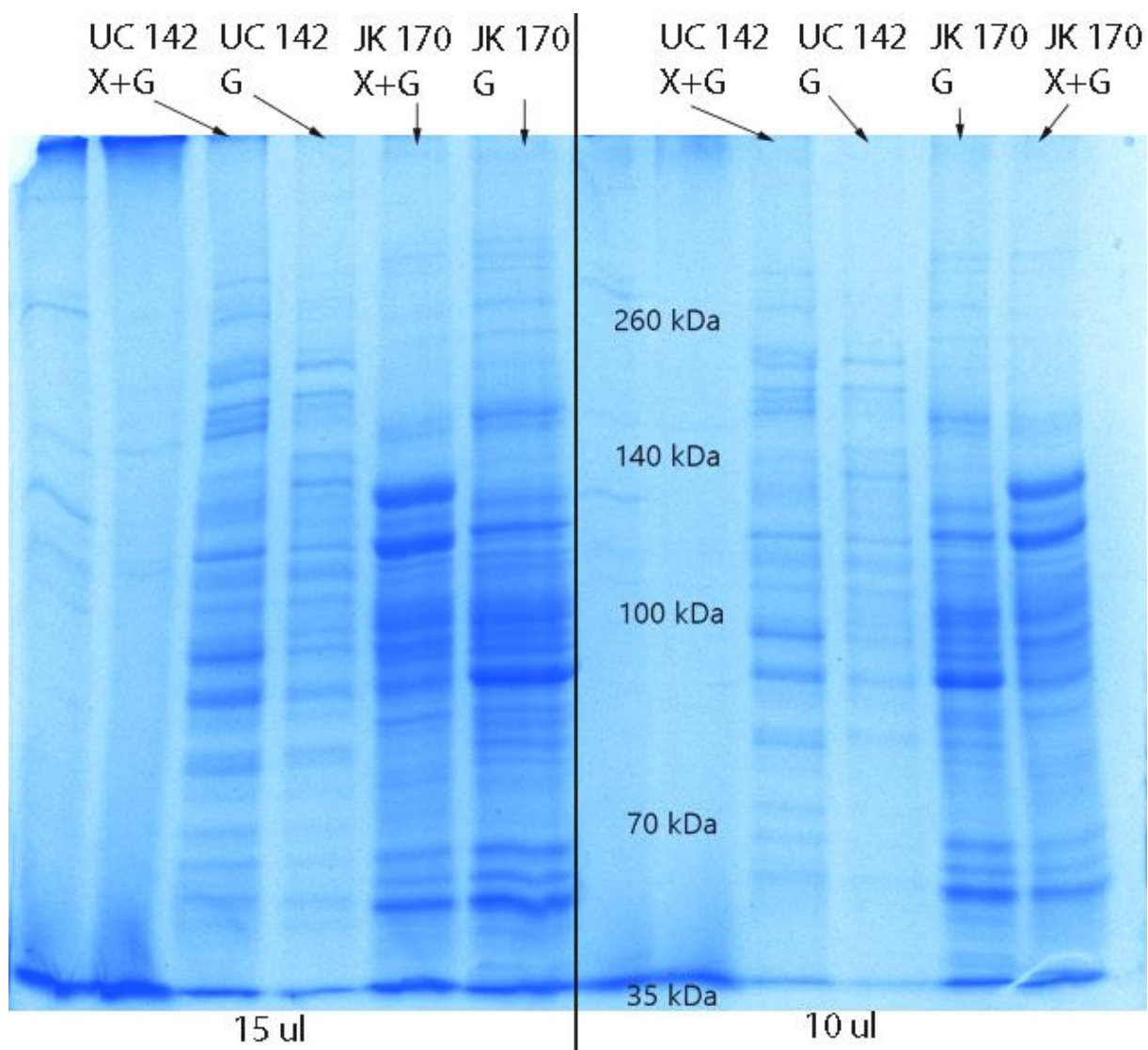


Obrázek 17: Elektroforéza osmi frakcí z gelové filtrace extracelulárních enzymů JK 170 a nepřečištěné kultury (pův. vz.), barveno stříbrem



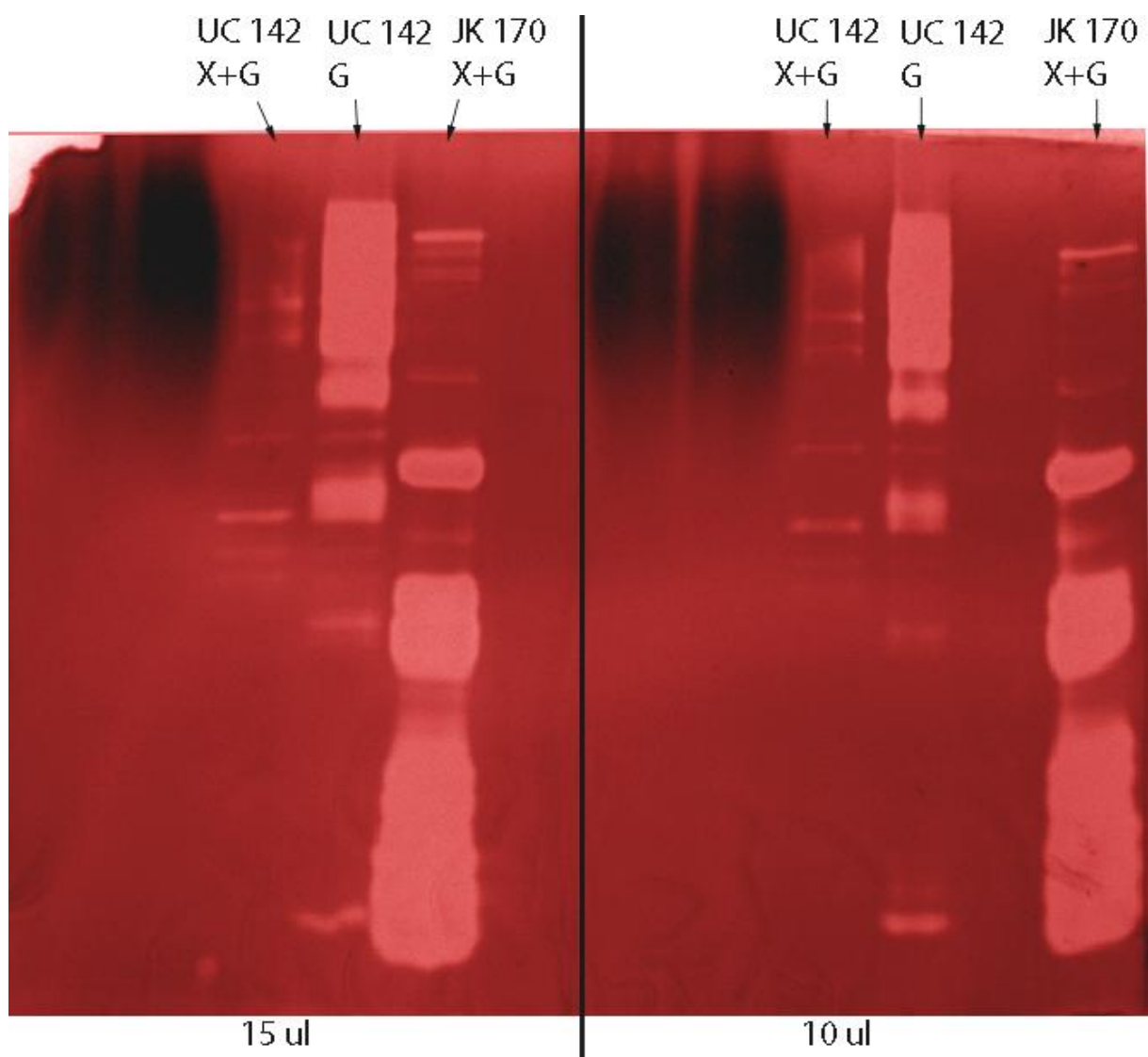
Obrázek 18: Elektroforéza osmi frakcí z gelové filtrace extracelulárních enzymů UC 142 a nepřečištěné kultury (pův. vz.), barveno stříbrem

### 5.3.2 Barvení Coomassie blue



Obrázek 19: Elektroforéza extracelulárních enzymů UC 142 a JK 170 s různými podmínkami kultivace: X+G - kultivováno na xylanu a glukóze, G - kultivováno pouze na glukóze + porovnání výsledku při nanesení různých množství vzorů (15 µl nebo 10 µl)

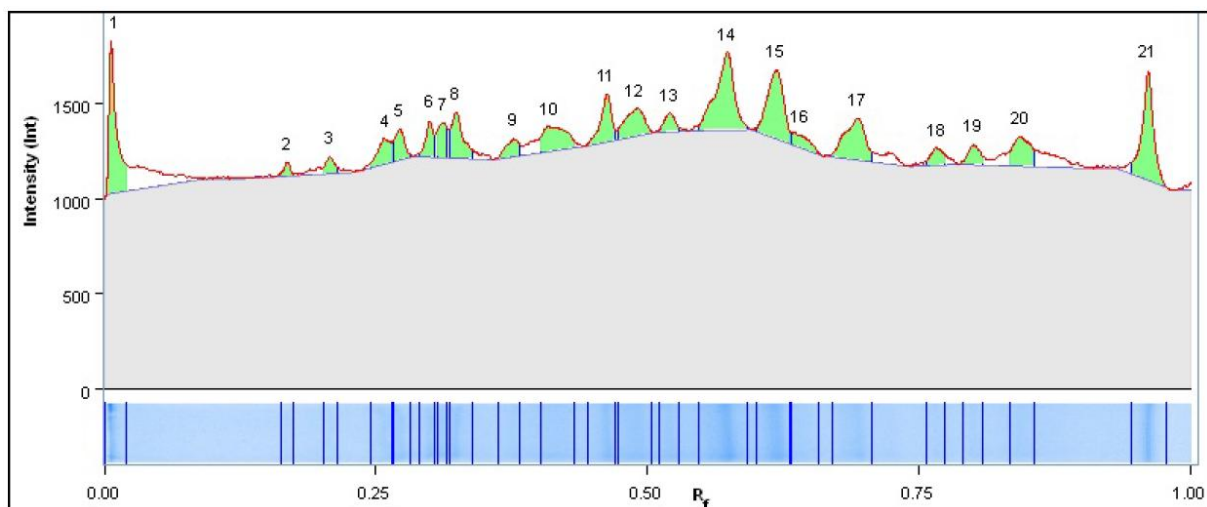
### 5.3.3 Zymografie



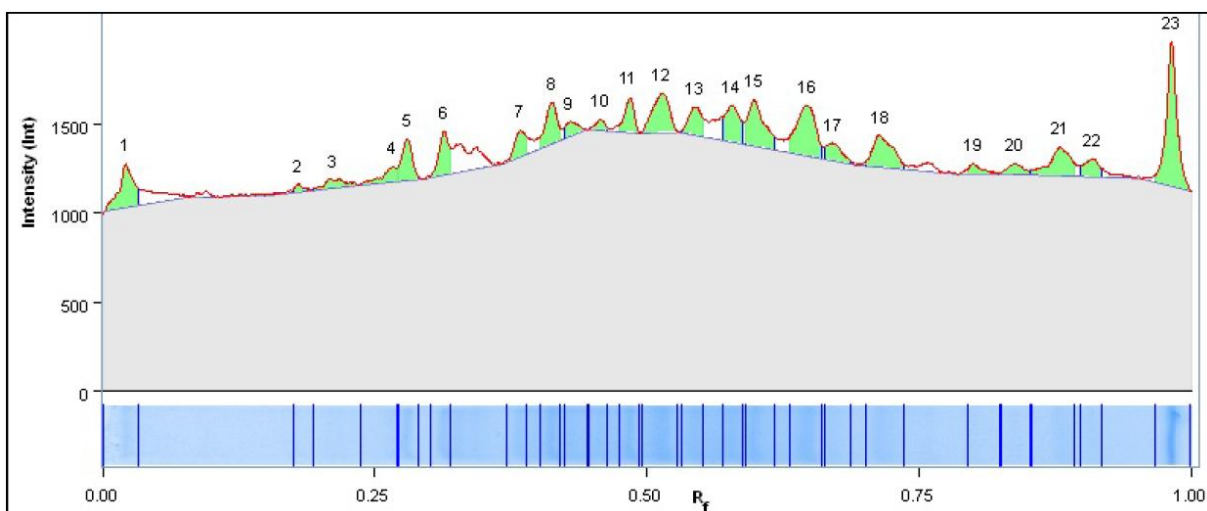
Obrázek 20: Zymogram extracelulárních enzymů UC 142 a JK 170 s různými podmínkami kultivace: X+G - kultivováno na xylanu a glukóze, G - kultivováno pouze na glukóze + porovnání výsledku při nanesení různých množství vzorů (15  $\mu$ l nebo 10  $\mu$ l)

### 5.3.4 Denzitometrie

Denzitometrická analýza gelů viz Obrázek 19 a 20

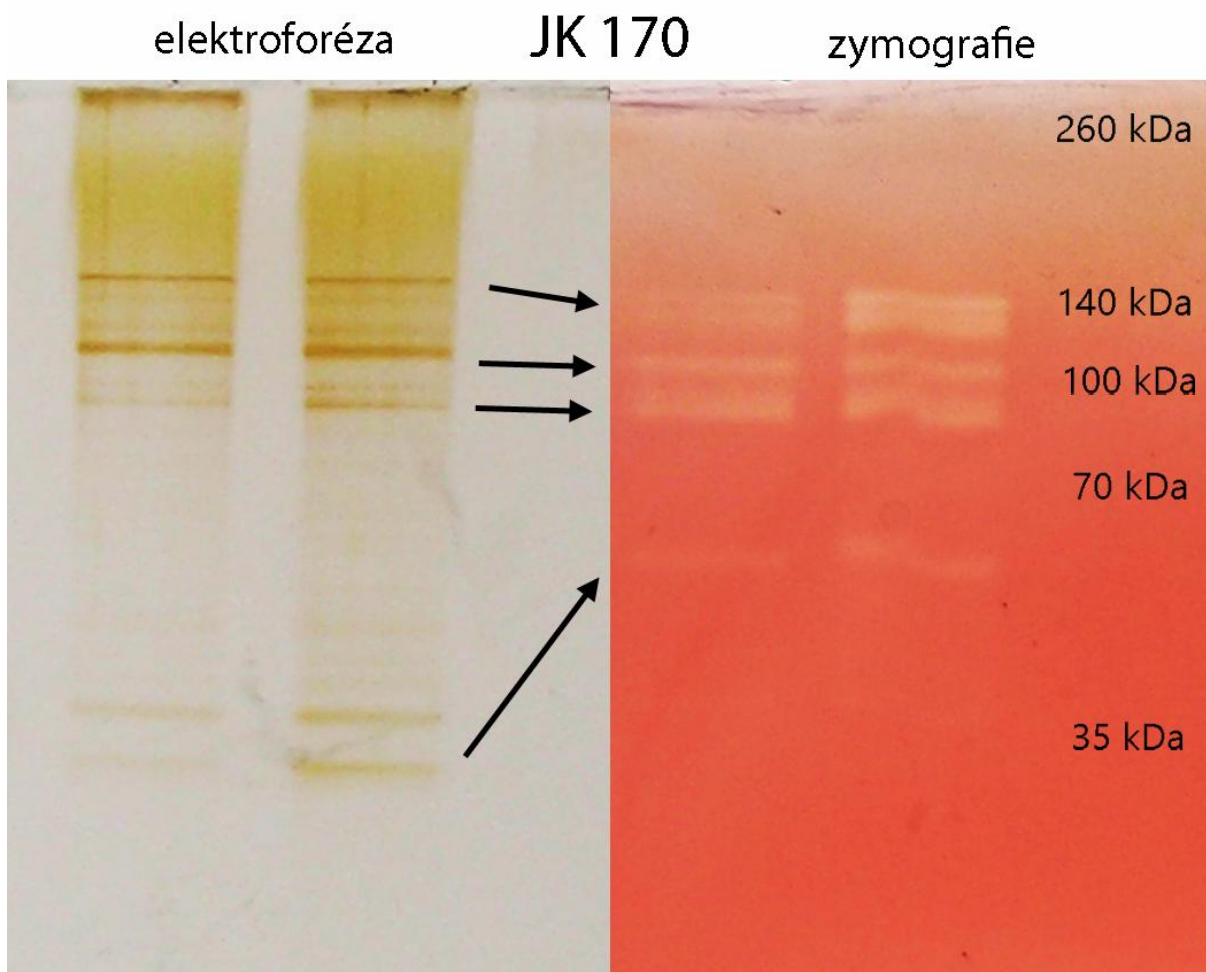


Obrázek 21: Denzitometrie gelu barveného coomassie blue, band UC 142- X+G, 10 ul, viz. Obrázek 19; osa x- relativní vzdálenost bandu v rámci gelu  $R_f$  (relative front); osa y- intenzita bandů



Obrázek 22: Denzitometrie zymografie, UC 142- X+G, 10 ul, viz. Obrázek 20; osa x- relativní vzdálenost bandu v rámci gelu  $R_f$  (relative front); osa y- intenzita bandů

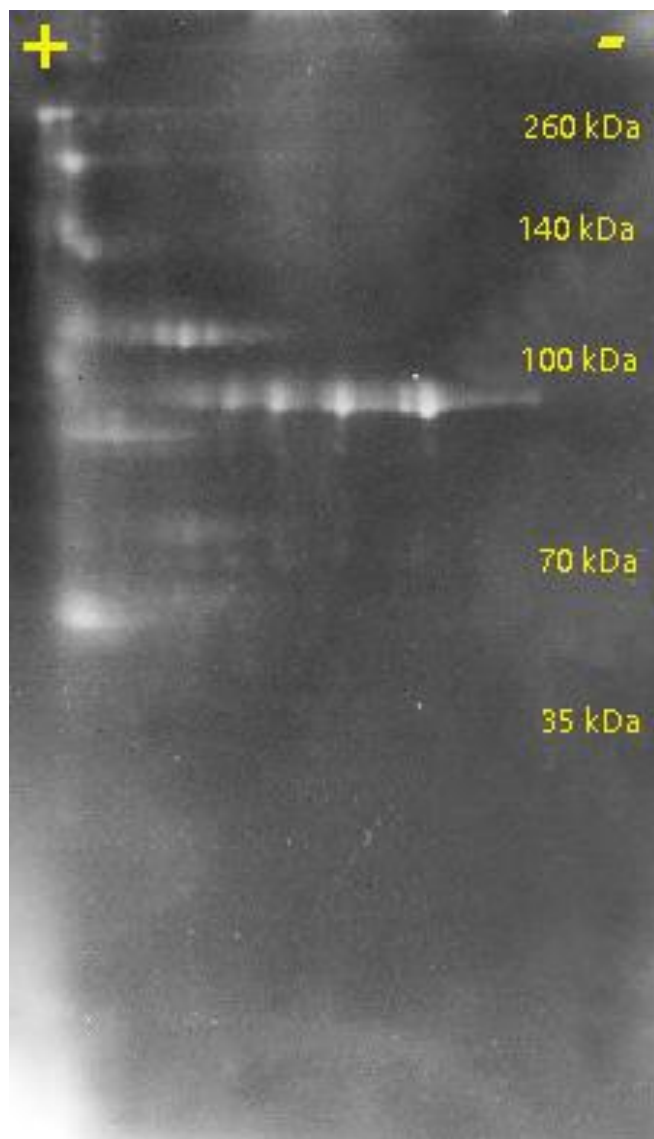
### 5.3.5 Porovnání elektroforézy a zymografie



Obrázek 23: Porovnání elektroforegramu a zymogramu od stejného vzorku s vyznačenými odpovídajícími bandy

## 5.4 2D elektroforéza

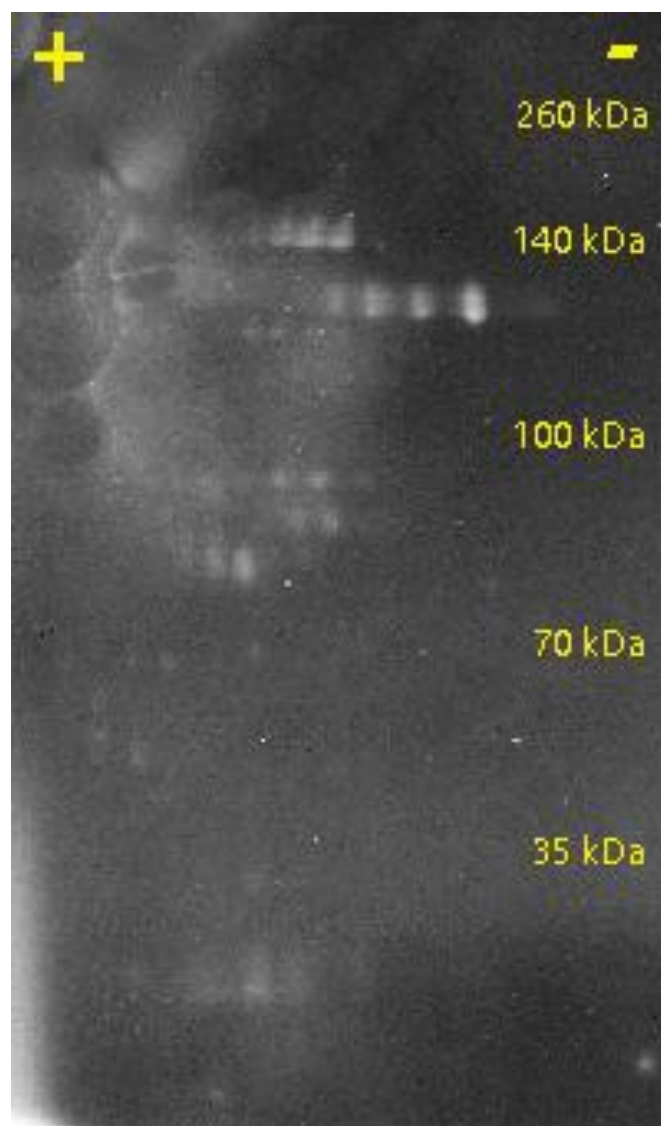
Extracelulární xylanolytické enzymy bakterie JK 170



Obrázek 24: 2D elektroforéza JK 170, orientace náboje při separaci vyznačena + a -



Extracelulární xylanolytické enzymy bakterie UC 142



*Obrázek 25: 2D elektroforéza UC 142, orientace náboje při separaci vyznačena + a -*

## 5.5 Hmotnostní spektrometrie

### 5.5.1 Sekvence na MALDI TOF/TOF

#### Protein 1

MTSGCKMTLVNLYELIRRKIKMAKTIKGADARTAMVEGVNKLADTVRVTIGPKGRN  
VVLDKSYGAPTITNDGVVIAKKIELEDAYENMGAQLVKEVATKTMDVAGDGTTTAT  
VLAQAMINEGVKMLAAGAMPVLRKGMKKATDAAVKXISKMATKVKGKKQIMKV  
AAVSSGDDKVGQMIADAMKKVSNMGVITIKKXXTMQTELDLVEGMQFDRGYISAY  
MATDMDKMEATLEDPFILITDKKISNIQDILPQIVKTGSKLLIAEDVEGEALTTLI  
VNKLRGTFNVVAVKAPGYGDRRKAMLEDIAILTGGKVISSDLGLELRDITMDDLGR  
AKSIKVERERTTIVDGLGNKDDIKARVAQIKKQIEDTTSDFDKEKLQERLAKLAGGVA  
VIRVGAATKETEMKEAKVRMEDALNATRAAVEEGIIIFGGGGAVINASKEVAKLVDA  
LEGDEKTGAKVVLKALEAPLFIANNAGLDGGVIVNKVKEGKQGVGFNAYTEEYVD  
MVKDGIIDPAKVTRSALQNATSVASSFLTTEAAVATVKEPVPPMPAGGAGMGMGM

#### Protein 2

MEKNRIRPVKAGKNLRMSYSRQKEVLEMPNLIEVQKDSYDWFVKDGLKEAFADISPI  
QDRCNQLELMFVDFTLCKDEVKYTIPQCKERDATYAAPLKVKVRLVNKESGDMQE  
MEIFMODLFLMTDTGTFVINGAEKVIVSQLVRSFGIXYAIGMDKIGKELYSCTVIFNK  
GAWLEYETDSNDVFYVRVDKNRKFVTVLIRALGLGTNQEIIDVFGEEPILATFAK  
DPAITEKNPGQS YEGGELLEVRRLRPGEPLAKDSAESLIHGMFFDPRRYDLAKVQRY  
KFNKKLMLKNRITGHVLEADVIDTTTGEIIAKAGDKVTLEMAEEIQNAAVTHVFIQTE  
TRNVKVLNMMVDITKFDVCDKALGITELVYYPVLERILEENTTKEDIEDAIARVA  
DLIFKMITVEDIFASINYNMMEY GIGKEDDIDMLGNRRIRAVGELLONROYRIGLSRLE  
KVVREEMTTRDLEDISFQNLINIKFVTA AIKEFFGSSQLSGFMVQNNPLSRLTHKRRLS  
ALQPGGLSRDRAGFKVRDVHYSYQRMCPPIETPEQPNIGLINS LASYARINEYQFVEA  
PVRRIDKSDPQNPRVTDEVVYMTADEEDNYRVAQANVKLDEEGMFMRKNVSGRFR  
EETQEYDKTMFDYMDVSPKMFVSVATASIPFLQNDPTRL MGSNMQRQAVPLLT  
EAPVVGTMPEPKTAVDSGVCVVAKRAGIVEMSETNRIIVKADEDGTRDEYTLFKFTR  
SNQSNQYQRFIVFKGDMVEAGEVIADGFSTKNGELALGRNFLIGFMTWEGYNYEPA  
VLLSEKLVQDDVYTRIHKEYKIDARDTKLGPEEITRDVAGVGDDALKDLKSGIIRIG  
AKVRAGDILVGKVTPKGETEKTPEERLLLAI FGEKAKEVRDTSLRVPHGAYGIVVDA  
KVFTRENGDELSPQVNKSVRTYIAQKRKIGVODKMAGRHRNKGVVSRVLPVEDMPY  
LPNQRPLDIVLNPLQVPSRMNIGQVLEIMLSLAAKAAALGFDIETPVFDGAKEIDIQDT



LELANDYVNMPFDKEEAENGEETFYDKYVDILREDVMEYLATNRAHRALWKGVPIS  
RDGKVQLRDGRTGQFFDGFVTIGHMMYSLKLMMLVDDKIMARSTGFYSLVTGGFL  
GGKAOFGGGORFGEMEVWALEAYGASYTLOEILTMKSDDVIGRVKTYEAIKGENIF  
EFGIPESFKVLLKELQSLGLDVRVLDENREEVELMETSEYGNTDLNIIAGSDRNFAFE  
DDNSFAQAGFSTKKFDTEGELVDDEEEQFEDEEDFSDIPTDFDEE

Protein 3

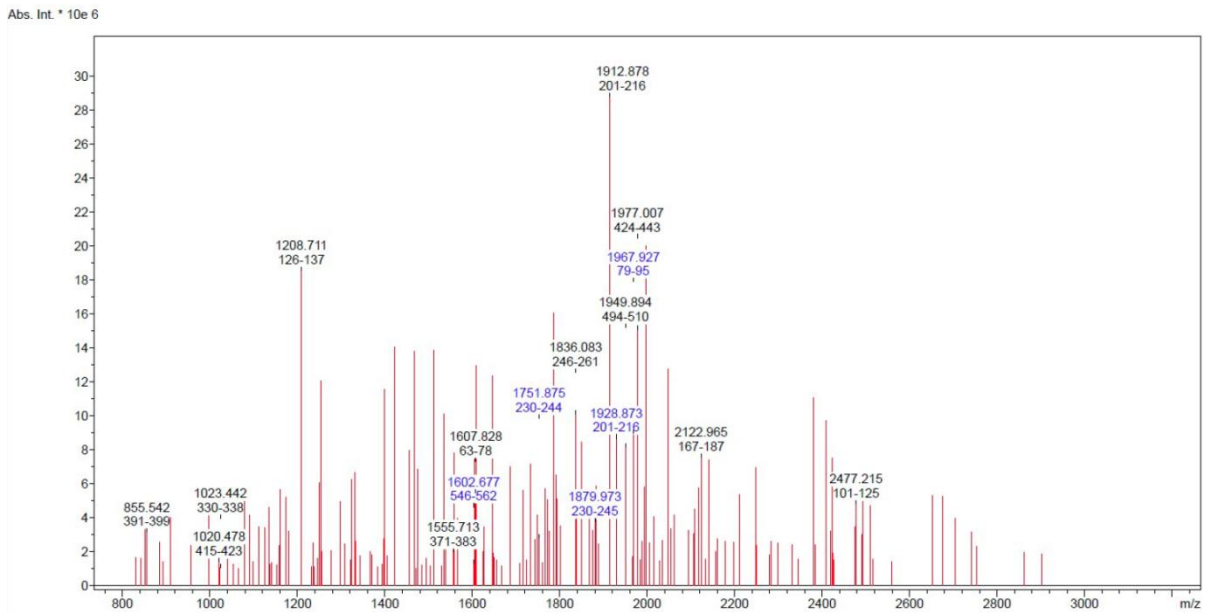
GPMMAADDVVITARNNGPYMIKGSFRIVTQGGRELRVEQGQAWLCRCGHSLNKPFCD  
GSMKRVEFDSNLD

Protein 4

MAKAKFDRSKPMVNIGTIGRVDMGKTTLTAAITAVLADRGFSPAVAFDQIDKAPEEK  
ERGITINSAMIEYETANRMYAMVDCFGMADYVKNMITGAAQMDGSILVVAATDGV  
MAGTKEMVLLAKQVGVFYIIVFMNKCDMVDDFELLDLYEMEIRDLLTEYEFFGDDT  
HIIRGSALKALEDPEKSEWGDKIIELMDTVDSYIPEPTRETDRPFLMPVEDVFTITGRGT  
VATGRVERGHLNLNDEIEVGIKEETSKSVCTGIEMFRKTMDYCEAGDNVGLLLRGVD  
RDGIQRGQVVTKPGTVTCHTKFTAEVYVLRDEGGRMTPFFFTNYRPQFYFRTTDVTG  
VCNLPDGVEMCMPGDMVTMSIELIMPIAMEQGLKFAIREGGRTVGSQKVAIVE

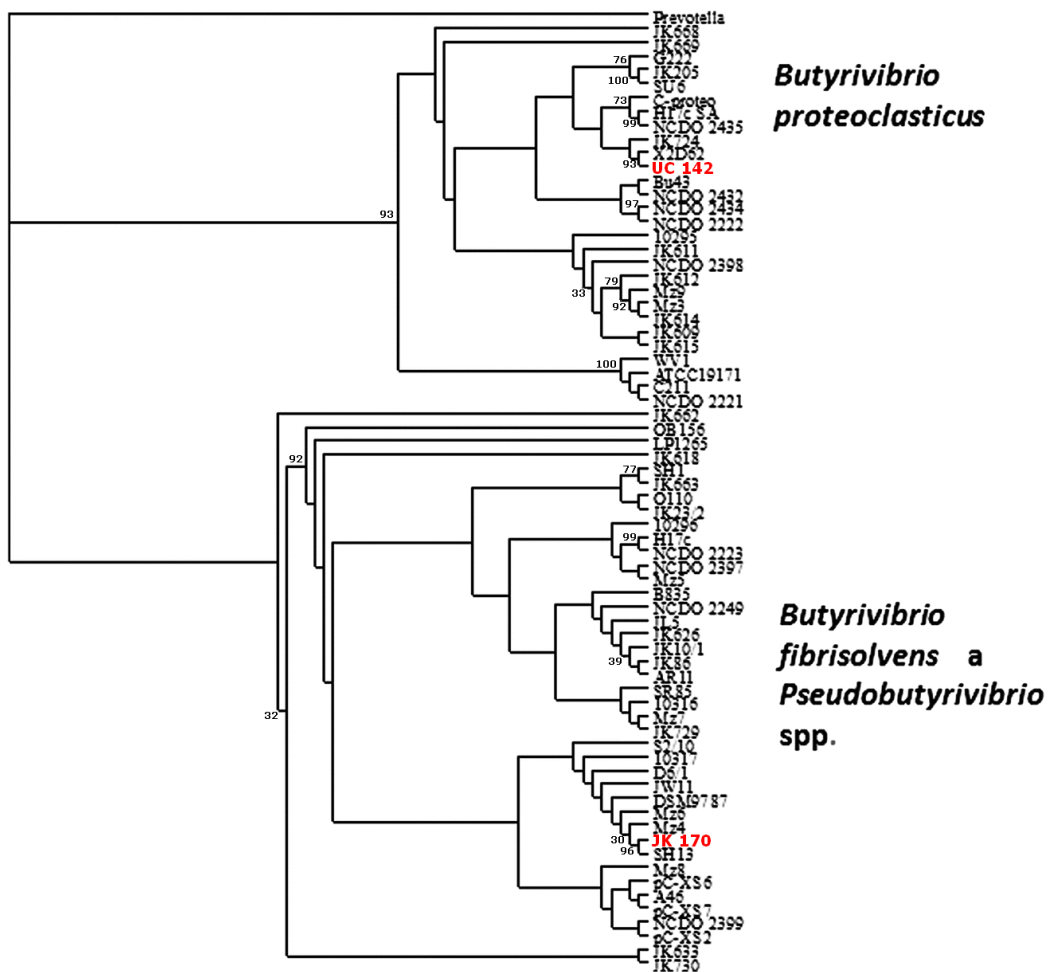
Protein 5

MSYKFETLGLMVGQEQDPATDARAVPIYQTTSYVFRNSQHAADRFGLADAGNIYGR  
LTNSTQDVLEKRLAALLEGGSAAALALASGAAAITYTIEALAANGGMIVAGKTTYGGSY  
NLLAMTLFQFGITTTTFVDAMNLAEVEGAIODNTRAIYLETLGNFNSDIFDIDAIAEIAM  
KHGLFLVIDNTFGTFYLIKPIEMGADIVVHSATKFIGGHGTTLGGIIVESGKFNWKESG  
NYPQIAAPNPSYHGVSFYDAVGPAAFVTYIRAILLRDTGATISPFNAFLLLQGVETLsL  
RLDRNAENTKKVVEFLKNNPRVEKVNHPSLSDHPDHALYEKYFPNGGASAFTFEIKG  
GKEAAWKFIDNLEIFSLLANVYDVKSLVINPASTTHSQLNDDELADQGKITQSTIRLSIG  
TEMIDDIIADLEKGFAAV



Obrázek 26: Hmotnostní spektrum proteinu 1

### 5.5.2 Taxonomické zařazení – fylogenetický strom



Obrázek 27: fylogenetický strom pro xylanolytické bakterie vyznačující genetickou příbuznost testovaných izolátů

## 6 DISKUSE

K analýze extracelulárního xylanolytického aparátu byly vybrány tři anaerobní bakterie s významnou xylanolytickou aktivitou- *Butyrivibrio proteoclasticus* (UC 142), *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (JK 170) a *Butyrivibrio fibrisolvens* (BF 3071). Kultivací bakterií a úpravou bakteriální kultury ultracentrifugací a ultrafiltrací byl získán hrubý enzymový vzorek. Vzorek byl dále purifikován a rozdělen do hmotnostních frakcí pomocí gelové chromatografie na SEPHADEXu G- 25 nebo G-75.

### 6.1 Obsah proteinů a aktivity enzymů

V jednotlivých frakcích každého vzorku jímáných při gelové chromatografii byla změřena koncentrace bílkovin citlivou metodou podle Bradfordové.

První separovaná série vzorků (první stanovení) viz. Tabulka 4 ukázala velkou odlišnost mezi koncentrací proteinů bakterií UC 142 a JK 170 a Bf 3071. Extracelulární enzymy bakterie UC 142 se objevily ve druhé až páté frakci a to v nejnižších koncentracích ze všech tří bakterií o hodnotách mezi 7 – 43  $\mu\text{g/ml}$ . Extracelulární enzymy bakterie JK 170 byly jímány v první až čtvrté frakci o vyšších koncentracích mezi 3 – 91  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentrace proteinů v kultuře BF 3071 značně převyšovala hodnoty ostatních vzorků. Proteiny byly nalezeny ve všech frakcích o vysokých koncentracích mezi 885 – 1791  $\mu\text{g/ml}$ . Rozdíly mezi jednotlivými vzorky ukazuje Graf 1, kde bylo kvůli velkým rozdílům hodnot koncentrací použito na příslušné ose logaritmické měřítko.

Druhá separovaná sada vzorků (druhé stanovení) viz. Tabulka 5 ukázala podobné výsledky jako první sada. Koncentrace bílkovin ve všech vzorcích byla však nižší než při první separaci. Enzymy bakterie UC 142 se opět objevily ve čtyřech frakcích o koncentracích 8 – 16  $\mu\text{g/ml}$ . Proteiny se tentokrát objevily ve 3, 5, 6 a 8 frakci, z čehož lze usuzovat, že separace frakcí probíhala pomaleji kvůli hustšímu sesazení gelu SEPHADEXu nebo kvůli defektům v gelu. Proteiny ve vzorku JK 170 se objevily ve třetí až páté frakci, kde pouze ve třetí frakci byla významná hodnota koncentrace 35  $\mu\text{g/ml}$ . V případě BF 3071 se proteiny objevily kromě poslední ve všech frakcích, tentokrát však o nižší, ale stále významné koncentraci mezi 14 – 359  $\mu\text{g/ml}$ . Názorné porovnání ukazuje Graf 2.

První a druhá sada vzorků zde reprezentují i následující měření s vypovídajícími výsledky. Koncentrace proteinů byly ve frakcích většinou relativně nízké. Pro získání vyšší koncentrace bylo jímáno více frakcí nebo větších objemů frakcí, protože malé proteiny putují gelem SEPHADEXu déle než velké molekuly. Další proteiny se však nepovedlo zachytit.

Dále byl použit SEPHADEX s většími mezerami v matici, protože proteiny mohly být příliš velké, že maticí ani neprošly. Místo SEPHADEXu G-25 byl tedy použit SEPHADEX G-75 a koncentrace proteinů ve sbíraných frakcích se zvýšila. Z toho vyplývá, že extracelulární enzymy xylanolytických bakterií UC 142 a JK 170 jsou větší molekuly, čemuž nasvědčuje i fakt, že proteiny prošly kolonou a byly jímány v prvních frakcích. U enzymů bakterie Bf 3071 se neprojevil tak velký rozdíl mezi frakcemi.

## 6.2 Enzymové aktivity

Po změření koncentrace bílkovin byly u stejných frakcí změřeny enzymové aktivity za pomoci činidla PAHBAH a spektrometrického měření.

U první sady vzorků byly změřeny aktivity xylanáz (Tabulka 6) a celuláz (Tabulka 7). Aktivita xylanáz bakterie UC 142 byla stanovena v první a druhé frakci. V první frakci byla aktivita však velmi nízká (2  $\mu\text{g/ml/h}$ ), což se nedá považovat za významný výsledek. V této první frakci nebyly ani detekovány žádné bílkoviny. Je ale možné, že koncentrace bílkovin byla nižší než detekční limit metody, ale obsažené enzymy byly natolik aktivní, že i přes malou koncentraci byla aktivita zaznamenána. Ve druhé frakci byla již naměřena vyšší aktivita xylanáz (173  $\mu\text{g/ml/h}$ ), což odpovídá i výskytu proteinů v této frakci. V následujících frakcích UC 142 byly také detekovány proteiny, ale nešlo už o xylanázy, jelikož v těchto frakcích byla xylanázová aktivita nulová. Ve frakcích enzymů bakterie JK 170 byly detekovány aktivity 102  $\mu\text{g/ml/h}$  v první frakci a 71  $\mu\text{g/ml/h}$  v druhé frakci, obě tyto hodnoty lze považovat za významné a také odpovídají přítomnosti bílkovin v prvních dvou frakcích JK 170. Vidíme, že neplatí, že čím více proteinů ve vzorku tím větší aktivita. Následující frakce opět obsahovaly proteiny, ale xylanázová aktivita byla v nich nulová. U bakterie BF 3071 bylo ve všech osmi měřených frakcích přítomno velké množství proteinů, xylanázové aktivity byly ale detekovány v prvních třech frakcích o nižší aktivitě kolem 20  $\mu\text{g/ml/h}$ , ve frakcích 4 – 6 byla xylanázová aktivita nulová a v následujících dvou frakcích začala výrazně stoupat na 252  $\mu\text{g/ml/h}$ . Ke vzorku BF 3071 byly proto pomocí gelové chromatografie separovány další frakce na celkový počet 12 frakcí. V nových frakcích BF 3071 byly pak změřeny vysoké aktivity mezi 371 – 529  $\mu\text{g/ml/h}$ . Opět se tedy potvrdilo, že ve vzorcích UC 142 a JK 170 jsou xylanázy zpravidla větší molekuly a ve vzorku BF 3071 jsou molekuly velké i malé. Názorné porovnání jednotlivých vzorků ukazuje Graf 3.

V první sadě vzorků byly pro srovnání také změřeny celulázové aktivity. U bakterie UC 142 nebyly detekovány žádné celulázové aktivity. U bakterie JK 170 pak byly nalezeny

celulázové aktivity téměř ve všech frakcích, jejich hodnoty však nebyly tak vysoké jako u xylanáz (kolem 20  $\mu\text{g/ml/h}$ ). Celulázy bakterie BF 3071 byly detekovány ve frakcích 3 – 12, přičemž aktivnější byly ve vyšších frakcích tedy u menších molekul. I v případě BF 3071 měly xylanázy aktivity vyšší než celulázy.

Druhá sada frakcí viz Tabulka 8 byla již změřena pouze na Xylanázy bakterie UC 142 byly tentokrát aktivní jen ve třetí frakci, což odpovídá výskytu proteinů v této frakci. Stejně jako v první sadě byly detekované bílkoviny i v následujících frakcích, ale již nešlo o aktivní xylanázy. Xylanázy bakterie JK 170 měli opět vyšší aktivitu než xylanázy UC 142. Proteiny byly u druhé sady frakcí JK 170 detekovány v třetí až páté frakci, ale aktivní xylanázy byly detekovány již o frakci dříve, tedy ve frakcích 2 – 5. Aktivity xylanáz BF 3071 byly detekovány od třetí frakce a až do šesté frakce se pohybovaly v rozmezí vysokých hodnot 101 – 325  $\mu\text{g/ml/h}$ . Porovnání xylanázových aktivit všech vzorků druhé sady frakcí zobrazuje Graf 5.

### **6.3 Elektroforetická separace proteinů a zymografická vizualizace xylanáz**

Obsah proteinů a enzymové aktivity byly dále vizualizovaný pomocí elektroforetických metod. Použité metody byly jednorozměrná elektroforéza, zymografie a dvourozměrná elektroforéza.

Výsledky jednorozměrné elektroforézy byly vizualizovány především barvením stříbrem, protože tato metoda je citlivější než barvení Coomassie blue a koncentrace proteinů ve vzorcích byla většinou nízká. Na Obrázcích 17 a 18 je vidět výsledek separace extracelulárních enzymů bakterií JK 170 a UC 142. Na oba gely bylo nanášeno osm frakcí přečištěných při gelové filtraci a poslední je pouze zahuštěný původní vzorek (nepřečištěný gelovou filtrací). Mezi purifikovanými vzorky a původním vzorkem je viditelný rozdíl. Filtrované vzorky mají jasně rozpoznatelné a ostřejší bandy. V původním nečištěném vzorku je viditelné množství jiných struktur a zabarvení dráhy vzorku a hledané bandy se zdají rozmazané. Některé bandy jsou však v nečištěném vzorku více viditelné nebo dokonce na pročištěném vzorku úplně zmizely. U elektroforegramu JK 170 na Obrázku 17 je zjevné, že první frakce gelové chromatografie obsahovali především velké molekuly, bandy jsou tedy viditelné nahoře, putují polyakrylamidovým gelem pomaleji. Podle velikostního standardu se hmotnosti bílkovin pohybovaly kolem 140 kDa a 100 kDa. Další frakce, jak bylo již dříve zmíněno, žádné proteiny o menších velikostech neobsahovaly.

Detekce bílkovin pomocí Coomassie Blue byla používána v případě vyššího obsahu proteinů ve vzorku nebo pro gely, z nichž se poté vyřezávaly bandy na hmotnostní spektrometrii, jelikož barvivo Coomassie blue je kompatibilní s MS analýzou. Gel obarvený Coomassie Blue je na Obrázku 19, kde jsou porovnávány vzorky s různými podmínkami kultivace a různé množství naneseného vzorku. Bakterie byly kultivovány na substrátu z xylanu a glukózy (X+G) nebo jen na glukóze (G), což způsobilo i nepatně odlišné složení enzymového komplexu vyprodukovaného bakterií. Na elektroforegramu jsou proto některé bandy od stejné bakterie jinak intenzivní, složení však zůstává pořád stejné, pouze se mění poměr zastoupení komponent. Tomuto elektroforegramu odpovídá zymogram na Obrázku 20. Zymogram zobrazuje, jaké bandy na elektroforegramu jsou aktivní a vzájemně si odpovídají (viz. Obrázek 23). Čím je oblast světlejší, tím je enzymová aktivita větší.

K elektroforegramu (Obrázek 19) a zymogramu (Obrázek 20) se vztahuje denzitometrická analýza na Obrázcích 21 a 22. Denzitometrická analýza byla provedena pro každou dráhu vzorku. Dráha vzorku s vyznačenými bandy je zobrazena ve spodní části pod grafem. V dráze vzorku je vyznačena relativní vzdálenost bandů v rámci délky gelu. Tyto bandy jsou pak vyneseny v grafu, který zobrazuje intenzitu daného bandu a také odděluje samotný band (separovaný vzorek, zeleně vyznačeno) od pozadí (gel, šedě vyznačeno). Tímto způsobem pak lze vizualizovat objem vzorku v jednotlivých bandech, případně spočítat jejich relativní objem. Jde o názornější vizualizaci elektroforegramů či zymogramů a jejich semikvantitativní analýzu.

Bakterie JK 170 (Obrázek 24) a UC 142 (Obrázek 25) byly dále separovány pomocí 2D elektroforézy. V horizontálním směru byly proteiny separovány pomocí izoelektrické fokusace a ve vertikálním směru byla provedena elektroforetická separace. Na Obrázcích 24 a 25 je zřejmé, že proteinů o stejné molekulové hmotnosti (elektroforéza) může být více, ale liší se svým izoelektrickým bodem (izoelektrická fokusace) a naopak. Proto je 2D elektroforéza citlivější detekční metodou než 1D elektroforéza. V případě 1D elektroforézy se může skrývat více proteinů v jednom bandu, u 2D elektroforézy se tento počet stejných proteinů na jednom místě minimalizuje nebo se dokonce separují jednotlivé proteiny. Opět se potvrdilo, že nejvíce bílkovin mělo hmotnost kolem 140 kDa a 100 kDa u obou bakterií.

## 6.4 Hmotnostní spektrometrie

Sekvenací vybraných pěti bandů ze zymogramu *Butyrivibrii* na hmotnostním spektrometru MALDI TOF/TOF byly získány sekvence krátkých peptidů. Tyto sekvence se neshodovaly s žádnými záznamy v databázi proteinů. Proteiny nemusely být nalezeny z několika důvodů. Na gelech z dvourozměrné elektroforézy je vidět, že více proteinů o různých izoelektrických bodech má stejnou hmotnost, a protože byly pro hmotnostní analýzu použity bandy z jednorozměrné elektroforézy, mohlo se stát, že band, který byl považován za jeden protein, mohl být ve skutečnosti směs více proteinů. V záznamu z hmotnostní spektrometrie je dále uvedeno, že se jedná o proteiny s různými funkcemi, což potvrzuje předpoklad, že mohlo být analyzováno více proteinů najednou. Nevyvrací to ale, že uvedené proteiny nejsou xylanázy, protože protein nebyl identifikován. Může se jednat o nově nalezené xylanázy, které se v databázi proteinů zatím nenachází.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat xylanolytické enzymy bakterií rodu *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio* pomocí proteomických metod. Gelovou filtrací kultur extracelulárních enzymů bakterií *Butyrivibrio proteoclasticus* (UC 142), *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (JK 170) a *Butyrivibrio fibrisolvens* (Bf 3071) byl získán čistý enzymový vzorek. V enzymovém preparátu byly stanoveny koncentrace bílkovin a enzymové aktivity xylanolytických enzymů. Enzymatický komplex byl poté analyzován pomocí jednorozměrné i dvourozměrné elektroforézy a xylanolytická aktivita byla vizualizována pomocí zymografie. Aktivní bandy ze zymogramů *Butyrivibrií* byly dále podrobeny analýze na hmotnostní spektrometrii MALDI TOF/TOF.

Výsledky ukázaly, že koncentrace proteinů v čistém enzymovém preparátu bakterií UC 142 a JK 170 nebyly příliš vysoké, v případě BF 3071 byly koncentrace vyšší. Navzdory nízkým koncentracím byla však naměřena významná xylanázová aktivita u všech zmíněných bakterií. Následná elektroforetická vizualizace proteinů a enzymových aktivit byla denzitometricky vyhodnocena. Z těchto dosažených výsledků lze říci, že aktivní xylanázy bakterií UC 142 a JK 170 jsou převážně molekuly o větší molekulové hmotnosti kolem 140 kDa a 100 kDa, v případě bakterie BF 3071 jsou aktivní xylanázy velké i malé molekuly. Nejvyšší aktivity byly naměřeny u xylanáz bakterií BF 3071 a JK 170, xylanázy bakterie UC 142 měly aktivity nižší. Analýzou pěti aktivních xylanáz ze zymogramu na hmotnostní spektrometrii byly získány krátké aminokyselinové sekvence. Při porovnání s proteinovou databází nebyla nalezena žádná shoda s již známými enzymy. Byly tedy nalezeny nové proteiny doposud nepopsané.

Získané výsledky dokazují, že všechny cíle práce byly splněny. Práce přispívá k rozšíření poznatků o xylanolytickém komplexu enzymů bakterií rodu *Butyrivibrio* a *Pseudobutyrvibrio*. Výzkum navazující na tuto práci se bude zaměřovat na popis vlastností nově nalezených proteinů.



## REFERENCE

1. SCHYNS, P. *Xylan degradation by anaerobic bacterium Bacteroides xylanolyticus*. Wageningen, 1997. Disertační práce. Wageningen University & Research Centre.
2. PAËS G., J.-G. BERRIN, J. BEAUGRAND. GH11 xylanases: Structure/ function/ properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(3): 564-592.
3. RENNIE A E., H.V. SCHELLER. Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 26: 100-107.
4. KULKARNI N., A. SHENDYE, M. RAO. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, 23(4): 411-456.
5. LI K., P. AYADI, R. COLLINS, J. TOLAN, J. KIM, K. ERIKSSON. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27: 89-94.
6. Xylan: xylan from beechwood. Iris: Biotech GMBH [online]. [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://www.iris-biotech.de/gbb1670>.
7. SCOTT K.P., S.W. GRATZ, P.O. SHERIDAN, H.J. FLINT, S. H. DUNCAN. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*. 2013, 69(1): 52-60.
8. WALLACE R.J.. Gut microbiology – broad genetic diversity, yet specific metabolic niches. *Animal*. 2008, 2(05).
9. CHOUDHURY P.K., A.Z.M . SALEM, R. JENA, S. KUMAR, R. SINGH, A.K. PUNIYA. Rumen Microbiology: An Overview. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. New Delhi: Springer India, 2015.
10. CHESSON A., C.W. FORSBERG. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. *The Rumen Microbial Ecosystem* (ed.P.N. Hobson a C.S. Stewart). 1997, 329-381.
11. DUNNE J.C., D. LI, W.J. KELLY, S.C. LEAHY, J.J. BOND, G.T. ATTWOOD, T.W. JORDAN. Extracellular Polysaccharide-Degrading Proteome of *Butyrivibrio proteoclasticus*. *Journal of Proteome Research*. 2012, 11(1): 131-142.
12. MOTTA L. F., C.C.P. ANDRADE, M.H.A. SANT. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, *Applications and Commercialization*. *InTech*, 2013.
13. Xylanase: Applying the toolbox. In: IGEM Team Heidelberg 14: The Ring of Fire [online]. [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://2014.igem.org/Team:Heidelberg/Project/Xylanase>.
14. WONG K.K.Y., L.U.L. TAN, J.N. SADDLER. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*. 1988, 52:305-317
15. HENRISSAT B., A. BAIROCH. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. 1993, 293:781-788.
16. COLLINS T., C. GERDAY, G. FELLER. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29(1): 3-23.
17. AHMED S., S. RIAZ, A. JAMIL. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84(1): 19-35 .

18. BUCHERT J., M. TENKANEN, A. KANTELINEN, L. VIIKARI. Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Bioresource Technology* 1995;50: 65–72.
19. COUTINHO P.M., B. HENRISSAT. Carbohydrate-active enzymes Server; 1999.
20. BIELY P., M. VRSANSKÁ, M. TENKANEN, D. KLUEPFEL. Endo-  $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology* 1997;57: 151–166.
21. FAULDS C.B., G. MANDALARI, R.B. LO CURTO, G. BISIGNANO, P. CHRISTAKOPOULOS, K.W. WALDRON. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006;71: 622–629.
22. DODD D., I.K.O. CANN. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*. 2009, 1(1): 2-17.
23. JUTURU V., J.C. WU. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(6): 1219-1227.
24. VERMA D., T. SATYANARAYANA. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology*. 2012, 117: 360-367.
25. WONG K.K.Y., J.N. SADDLER. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, in: *M.P. Coughlan, G.P. Hazlewood (Eds.), Hemicelluloses and Hemicellulases*, Portland Press, London; 1993.
26. COUGHLAN G.P., M.P. HAZELWOOD.  $\beta$ -1,4-D-xylan-degrading enzyme system: Biochemistry, molecular biology, and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993;17: 259-289.
27. SUNNA A., G. ANTRANIKIAN. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1997, 17(1): 39-67.
28. RAKOTOARIVONINA H., B. HERMANT, N. AUBRY, F. RABENOELINA, F. BAILLIEUL, C. RÉMOND. Dynamic study of how the bacterial breakdown of plant cell walls allows the reconstitution of efficient hemicellulasic cocktails. *Bioresource Technology*. 2014, 170: 331-341.
29. VIIKARI L., A. KANTELINEN, J. SUNDQUIST, M. LINKO. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews* 1994;13: 335–350.
30. BAJPAI P.. *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. Springer US, Boston, MA; 2012.
31. SUBRAMANIYAN S., P. PREMA. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2002, 22(1): 33-64.
32. BEG Q. K., M. KAPOOR, L. MAHAJAN, G.S. HOONDAL. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001-8-1, 56(3-4): 326-338.
33. SUBRAMANIYAN S., P. PREMA. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, 183(1): 1-7.
34. HALTRICH D., B. NIDETZKY, K.D. KULBE, W. STEINER, S. ŽUPANČIČ. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology* 1996;58: 137–161.

35. CHIDI S.B., B. GODANA, I. NCUBE, E.J.V. RENSBURG, E.K. ABOTSI. Production , purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209, *Journal of Biotechnology* 2008;7: 3939–3948.
36. PÉREZ J., J. MUÑOZ-DORADO, T. de la RUBIA, J. MARTÍNEZ. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview., *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 2002;5: 53–63.
37. VIIKARI L., J. VEHEMAANPERÄ, A. KOIVULA. Lignocellulosic ethanol: From science to industry, *Biomass and Bioenergy* 2012;1–12.
38. VORAGEN A.G.J.. Technological aspects of functional carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology* 1998;9: 328–335.
39. NOVOTNÁ Z. Enzymatický systém anaerobních hub. Praha, 2012. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
40. ARMENGAUD J. Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds!. *Environmental Microbiology*. 2013, **15**(1), 12-23.
41. VERBERKMOES N. C., H. M. CONNELLY, CH. PAN, R.L. HETTICH. Mass spectrometric approaches for characterizing bacterial proteomes. *Expert Review of Proteomics*. 2014, **1**(4), 433-447.
42. WILKINS M. R., CH. PASQUALI, R. D. APPEL, et al. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Bio/Technology*. 1996, **14**(1), 61-65.
43. CECILIANI F., D. ECKERSALL, R. BURCHMORE, C. LECCHI. Proteomics in Veterinary Medicine: Applications and Trends in Disease Pathogenesis and Diagnostics. *Veterinary Pathology*. 2014,**51**(2), 351-362.
44. KELLNER R. Proteomics. Concepts and perspectives. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 2000-3-30, **366**(6-7), 517-524.
45. DUBEY V. K. Lecture 1: Introduction and scope of proteomics. *National Program on Technology Enchanced Learning National Program on Technology Enchanced Learning- Phase II: Proteomics and Genomics*. Indian Institute of Technology Guwahati, Assam, India, s. 2-6.
46. PETRICOIN E.F., L.A. LIOTTA. Clinical Applications of Proteomics. *JN The Journal of Nutrition*. 2003, **133**(7), 2476S-2484S.
47. Protein chromatography: Gel filtration chromatography. *Sigma-Aldrich* [online]. 2016 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-chromatography/gel-filtration-chromatography.html>.
48. *Gel filtration: principles and methods*. 7th ed. Uppsala: Pharmacia Biotech, 1997. ISBN 91-970490-2-6.
49. MASLIYAH J. H., S. BHATTACHARJEE. Electrophoresis. *Electrokinetic and colloid transport phenomena*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006, 295-308. ISBN 9780471788829.
50. GARFIN D. E. Gel electrophoresis of proteins. *Essential cell biology: Cell structure, A practical approach*. New York: Oxford University Press, 2003, 197-268. Practical approach series, 262, etc. ISBN 0199638330.

51. GRAVES P. R., T.A.J. HAYSTEAD. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2002, **66**(1), 39-63.
52. RABILLOUD T., C. LELONG. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*[online]. 2011, **74**(10), 1829-1841.
53. ROSYPAL S. *Úvod do molekulární biologie*. 3. inovované vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1998.
54. WESTERMEIER R., R. MAROUGA. Protein Detection Methods in Proteomics Research. *Bioscience Reports*. 2005, **25**(1-2), 19-32.
55. Protein Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Boston, MA: Springer US, 2006, 529.
56. BRADFORD M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, **72**(1-2), 248-254.
57. BLUM H., H. BEIER, H.J. GROSS. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987, **8**(2), 93-99.
58. KERENYI L., F. GALLYAS. A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. *Clin Chim Acta*. 1972, **38**(2), 465–467.
59. HEUKESHOVEN J., R. DERNICK. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 1985, **6**, 103–112
60. Protein Gel Stains: Silver stains. Thermo Fisher scientific. 2015 [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-gel-stains.html>.
61. VANDOOREN J., N. GEURTS, E. MARTENS, P.E. VAN DEN STEEN, G. OPDENAKKER. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*. 2012, **10**, 211–220.
62. ŽAMBOCHOVÁ, K. Proteomic approach to extracellular enzymes of anaerobic xylanolytic bacteria. In: *Instruments and Methods for Biology and Medicine*. Kladno: FBMI ČVUT v Praze, 2015, s. 61-63.
63. YATES J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry*. USA, 1998,**33**(1), 1-19.
64. Bio-Rad: PROTEAN II xi Cell PROTEAN II xi 2-D Cell. Instruction manual.
65. Bio-Rad:PROTEAN IEF Cell. Instruction manual. Catalogue number 165-400.
66. Peltierův jev. Encyklopedie Fyziky [online]. Reichel J., Všetická M., [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/911-peltieruv-jev>.
67. PCR Troubleshooting and Optimization Figure. Caister Academic Press [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.horizonpress.com/hsp/supplementary/pcr-troubleshooting/c6f1.html>.
68. Bio-Rad: Molecular Imager Gel Doc XR Systém (170-8170) Molecular Imager ChemiDoc XRS Systém (170-8070, 170-8071). Hardware Instruction Manual.
69. CCD - základní princip. Encyklopedie Fyziky. Reichel J., Všetická M., [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/748-ccd-zakladni-princip>.

70. Bio-Rad: Gel Doc XR+ and ChemiDoc XRS+ Systems with Image Lab software. User guide. Verze 5.1. 2014.
71. Bio-Rad: Quantity One. User Guide for Version 4.2.1, Windows and Macintosh. 2000.
72. Bio-Rad: Model GS-700 Imaging Densitometer. Instruction manual (catalog numbers 170-7601, 170-7602).
73. Thermo: Electron Corporation: Spectronic BioMate 3 and Spectronic Biomate 5 UV-Visible Spectrophotometers. 2004. Dostupné z: [http://www.thermo.com.cn/Resources/200802/productPDF\\_2476.pdf](http://www.thermo.com.cn/Resources/200802/productPDF_2476.pdf).
74. Spectrophotometry, Ultraviolet: Ultraviolet Spectrophotometry. LookForDiagnosis [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Spectrophotometry%2C+Ultraviolet&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Spectrophotometry%2C+Ultraviolet&lang=1).
75. CALDWELL D. R., M. P. BRYANT. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl Microbiol.* 1966, 14(5), 794-801.
76. LEVER M., Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry.* 1977, 81:21 – 27.
77. FLINT H.J., J.-X. ZHANG, J. MARTIN. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Current Microbiology.* 1994, 29(3), 139-143.
78. CHEVALLET M., S. LUCHE, T. RABILLOUD. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006, 1(4), 1852-1858.

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Základní jednotka kostry xylanu [6]	2
Obrázek 2: 3D struktura xylanáz [13]	4
Obrázek 3: Struktura a enzymatický rozklad xylanu. Ac: acetylová jednotka; $\alpha$ -Araf: $\alpha$ -arabinofuranosa; $\alpha$ -4-O-Me-GlcA: $\alpha$ -4-O-metylglukuronová kyselina. Převzato z [27]	6
Obrázek 4: Obecný postup v proteomice	10
Obrázek 5: Porovnání postupů a výsledků elektroforézy a zymografie [62]	15
Obrázek 6: Sestava PROTEAN II Cell (Bio-Rad): 1. nádoba na pufr, 2. víko s připojenými vodiči, 3. chladicí jádro s připojenou "sendvičovou" formou na plošný gel, 4. stojan držící formou na gel (skládající se ze skel, spacerů a svorek), 5. stojan na trubicové gely, 6. Svorky, 7. Skla, 8. karta k zarovnání spacerů [64]	19
Obrázek 7: PROTEAN IEF přední panel s displejem, v horní části je Peltierův článek s konektory pro elektrody. Převzato z [65]	20
Obrázek 8: Schéma Peltierova článku. Schéma převzato a upraveno z [67]	21
Obrázek 9: Drážkové destičky na IPG proužky [65]	22
Obrázek 10: Molecular imager Gel Doc XR+	22
Obrázek 11: Schéma iluminace v Gel Doc XR+	24
Obrázek 12: Imaging densitometer Model GS-700	25
Obrázek 13: Zjednodušené schéma spektrofotometru. Převzato z [74]	26
Obrázek 14: Probublávání média dusíkem a oxidem uhličitým	29
Obrázek 15: Elektroforetická separace na přístroji Protean II Cell	39
Obrázek 16: Rehydratace IPG proužků v rehydratační destičce	45
Obrázek 17: Elektroforéza osmi frakcí z gelové filtrace extracelulárních enzymů JK 170 a nepřečištěné kultury (pův. vz.), barveno stříbrem	53
Obrázek 18: Elektroforéza osmi frakcí z gelové filtrace extracelulárních enzymů UC 142 a nepřečištěné kultury (pův. vz.), barveno stříbrem	53
Obrázek 19: Elektroforéza extracelulárních enzymů UC 142 a JK 170 s různými podmínkami kultivace: X+G - kultivováno na xylanu a glukóze, G - kultivováno pouze na glukóze + porovnání výsledku při nanesení různých množství vzorů (15 $\mu$ l nebo 10 $\mu$ l)	54
Obrázek 20: Zymogram extracelulárních enzymů UC 142 a JK 170 s různými podmínkami kultivace: X+G - kultivováno na xylanu a glukóze, G - kultivováno pouze na glukóze + porovnání výsledku při nanesení různých množství vzorů (15 $\mu$ l nebo 10 $\mu$ l)	55
Obrázek 21: Denzitometrie gelu barveného coomassie blue, band UC 142- X+G, 10 $\mu$ l, viz. Obrázek 19; osa x- relativní vzdálenost bandu v rámci gelu $R_f$ (relative front); osa y- intenzita bandů	56
Obrázek 22: Denzitometrie zymografie, UC 142- X+G, 10 $\mu$ l, viz. Obrázek 20; osa x- relativní vzdálenost bandu v rámci gelu $R_f$ (relative front); osa y- intenzita bandů	56
Obrázek 23: Porovnání elektroforegramu a zymogramu od stejného vzorku s vyznačenými odpovídajícími bandy	57
Obrázek 24: 2D elektroforéza JK 170, orientace náboje při separaci vyznačena + a -	58
Obrázek 25: 2D elektroforéza UC 142, orientace náboje při separaci vyznačena + a -	59
Obrázek 26: Hmotnostní spektrum proteinu 1	62
Obrázek 27: fylogenetický strom pro xylanolytické bakterie vyznačující genetickou příbuznost testovaných izolátů	62

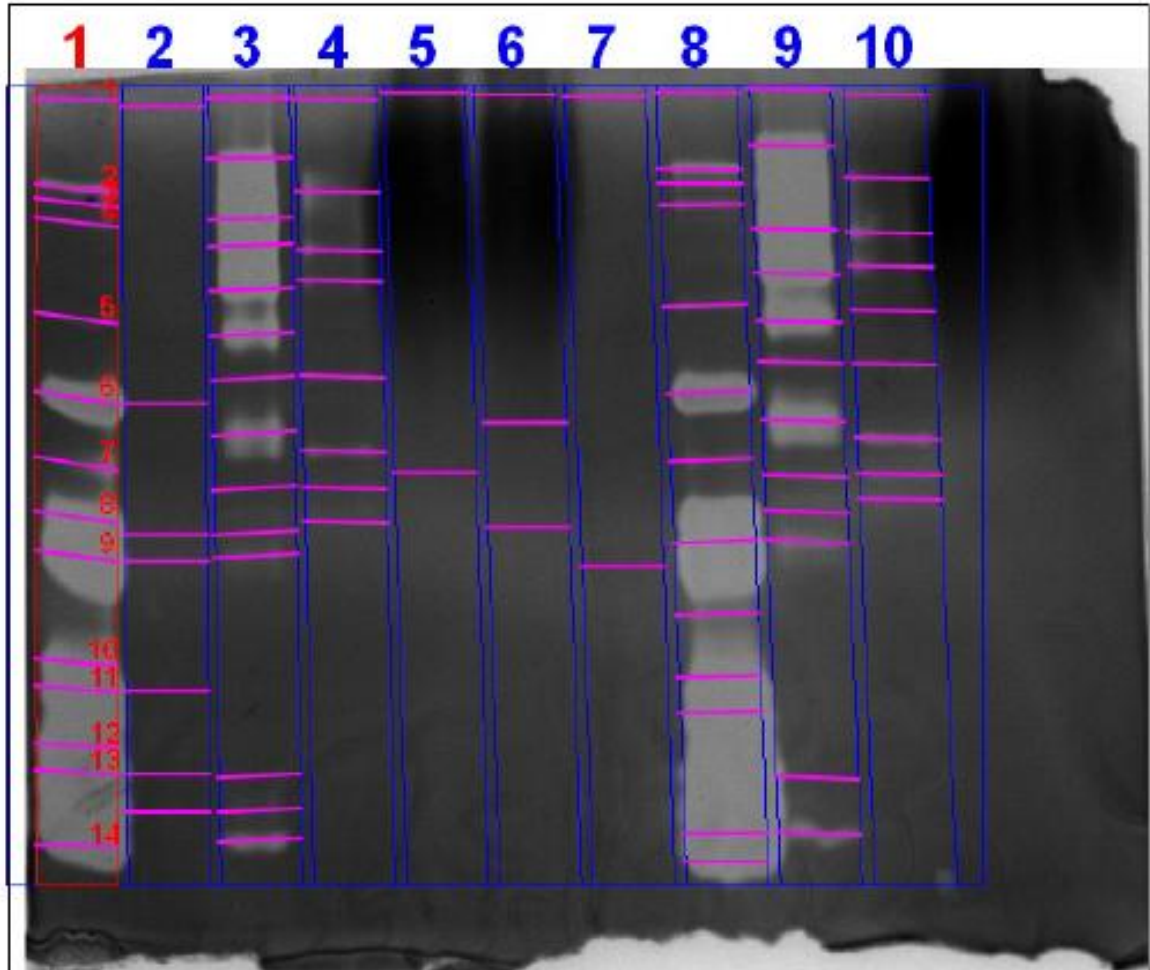
## Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Objem vzniklého gelu při nabobtnání 1 g práškového SEPHADEXu</i>	32
<i>Tabulka 2: Koncentrační řada standardního roztoku BSA</i>	34
<i>Tabulka 3: Příprava SDS polyakrylamidových gelů pro elektroforézu a zymografii</i>	38
<i>Tabulka 4: Koncentrace bílkovin v první sadě frakcí z gelové filtrace na SEPHADEXU G-25</i>	48
<i>Tabulka 5: Koncentrace bílkovin v druhé sadě frakcí z gelové filtrace na SEPHADEXU G-25</i>	49
<i>Tabulka 6: Xylanázové aktivity první sady vzorků</i>	50
<i>Tabulka 7: Celulázové aktivity první sady vzorků</i>	51
<i>Tabulka 8: Xylanázové aktivity druhé sady vzorků</i>	52

# Přílohy

## Denzitometrie – celý report

### Zymografie



C:/Documents and Settings/Jurášek/Dokumenty/Výsledky Gel Doc/SIMI/2015-05 18ZYMO.scn

#### Acquisition Information

Imager	Gel Doc XR+
Exposure Time (sec)	0.016 (Auto - Intense Bands)
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time (sec)	20
Flat Field	Applied (Lens)
Serial Number	721BR02322
Software Version	2.0.1
Application	SYPRO Ruby
Excitation Source	UV Trans Illumination
Emission Filter	Standard Filter



## Image Information

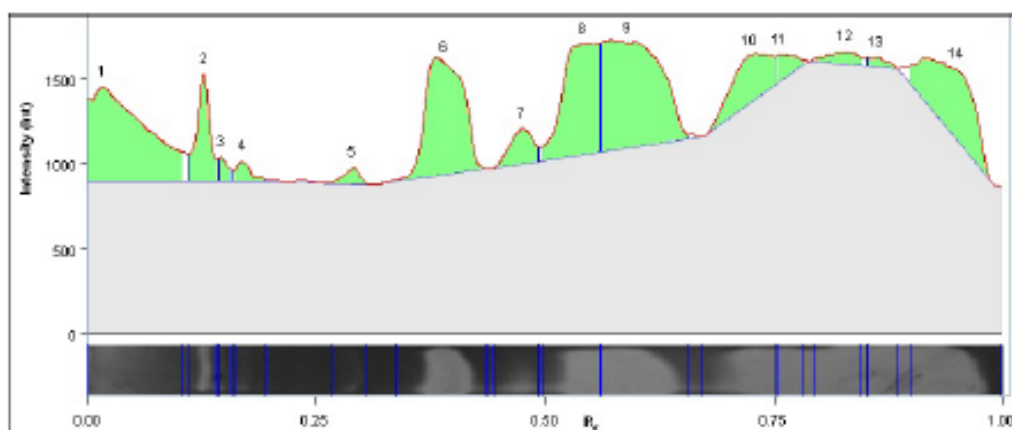
Acquisition Date	21.5.2015 13:29:31
User Name	Jurášek
Image Area (mm)	X: 87.3 Y: 70.2
Image Pixels	X: 633 Y: 509
Pixel Size (um)	X: 137.9 Y: 137.9
Data Range (Int)	381 - 3009

## Analysis Settings

Detection	<p>Lane detection: Automatically detected lanes</p> <p>Band detection: Automatically detected bands with custom sensitivity: 40</p> <p>Lane Background Subtraction: Lane background subtracted with disk size: 10</p>
-----------	---

## Lane And Band Analysis

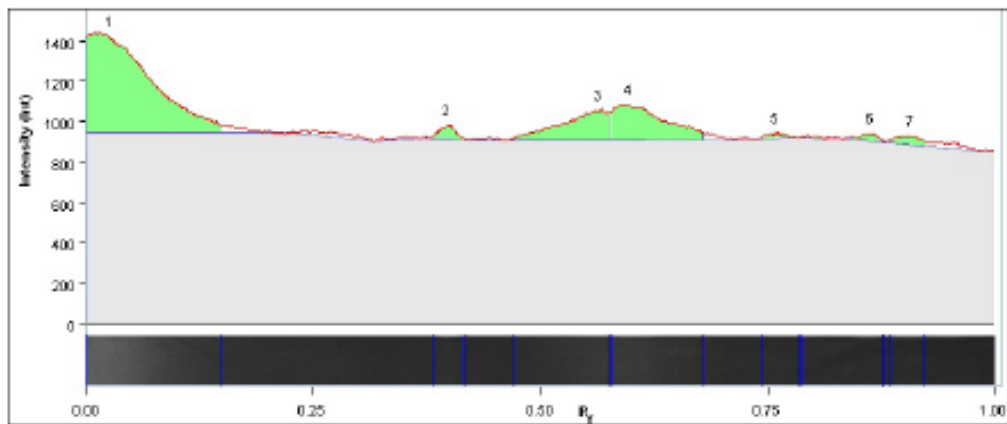
### Lane 1



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,018	824 192	N/A	N/A	17,8	17,6
2		N/A	0,129	229 877	N/A	N/A	5,0	4,9
3		N/A	0,147	37 318	N/A	N/A	0,8	0,8
4		N/A	0,171	49 538	N/A	N/A	1,1	1,1
5		N/A	0,292	40 420	N/A	N/A	0,9	0,9
6		N/A	0,392	704 060	N/A	N/A	15,2	15,0
7		N/A	0,474	129 250	N/A	N/A	2,8	2,8
8		N/A	0,541	628 954	N/A	N/A	13,6	13,4
9		N/A	0,590	989 961	N/A	N/A	21,4	21,2
10		N/A	0,724	297 557	N/A	N/A	6,4	6,4
11		N/A	0,757	65 283	N/A	N/A	1,4	1,4
12		N/A	0,829	58 186	N/A	N/A	1,3	1,2
13		N/A	0,862	28 764	N/A	N/A	0,6	0,6
14		N/A	0,951	537 351	N/A	N/A	11,6	11,5

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

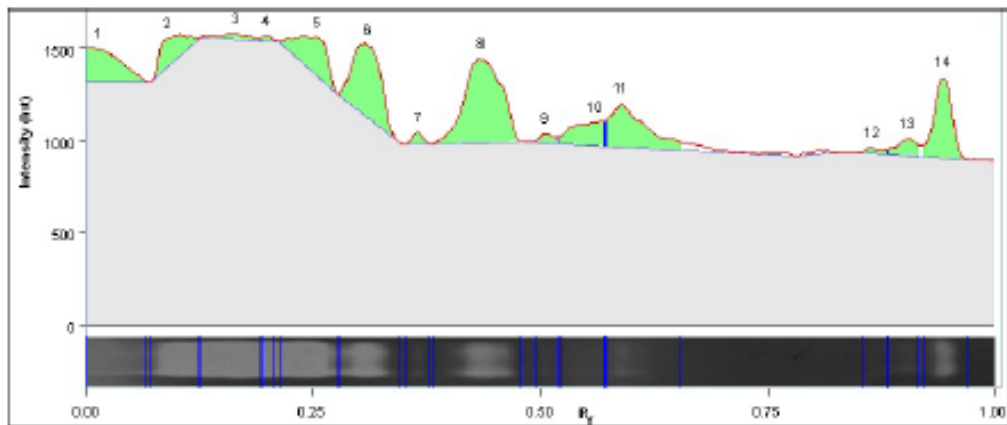
## Lane 2



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,027	848 162	N/A	N/A	61,0	56,3
2		N/A	0,399	31 349	N/A	N/A	2,3	2,1
3		N/A	0,563	196 648	N/A	N/A	14,1	13,1
4		N/A	0,597	245 387	N/A	N/A	17,6	16,3
5		N/A	0,759	13 254	N/A	N/A	1,0	0,9
6		N/A	0,864	26 649	N/A	N/A	1,9	1,8
7		N/A	0,909	29 328	N/A	N/A	2,1	1,9

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

## Lane 3

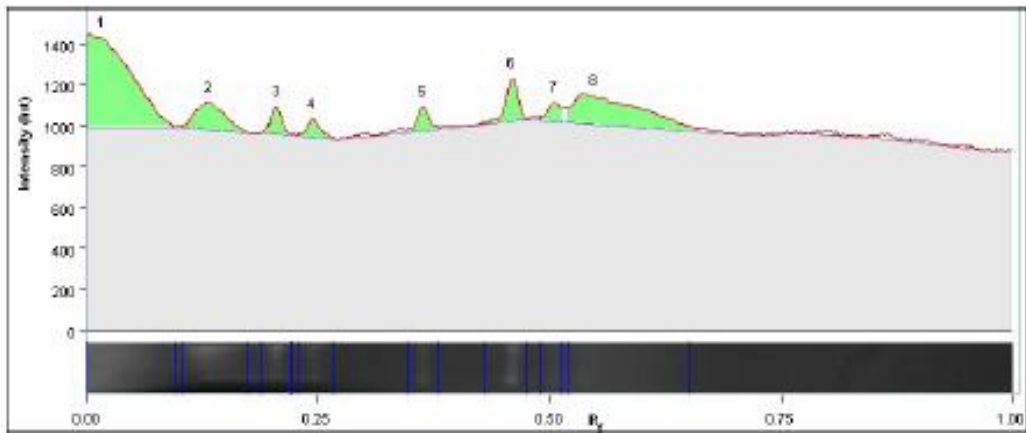


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,016	167 226	N/A	N/A	8,9	8,7
2		N/A	0,091	101 943	N/A	N/A	5,5	5,3
3		N/A	0,167	27 918	N/A	N/A	1,5	1,4
4		N/A	0,200	6 815	N/A	N/A	0,4	0,4
5		N/A	0,256	164 171	N/A	N/A	8,8	8,5
6		N/A	0,312	307 145	N/A	N/A	16,4	15,9
7		N/A	0,367	17 672	N/A	N/A	0,9	0,9
8		N/A	0,437	441 659	N/A	N/A	23,6	22,9
9		N/A	0,506	21 432	N/A	N/A	1,1	1,1
10		N/A	0,561	112 565	N/A	N/A	6,0	5,8

11		N/A	0,590	227 856	N/A	N/A	12,2	11,8
12		N/A	0,866	13 677	N/A	N/A	0,7	0,7
13		N/A	0,906	48 363	N/A	N/A	2,6	2,5
14		N/A	0,944	210 278	N/A	N/A	11,3	10,9

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

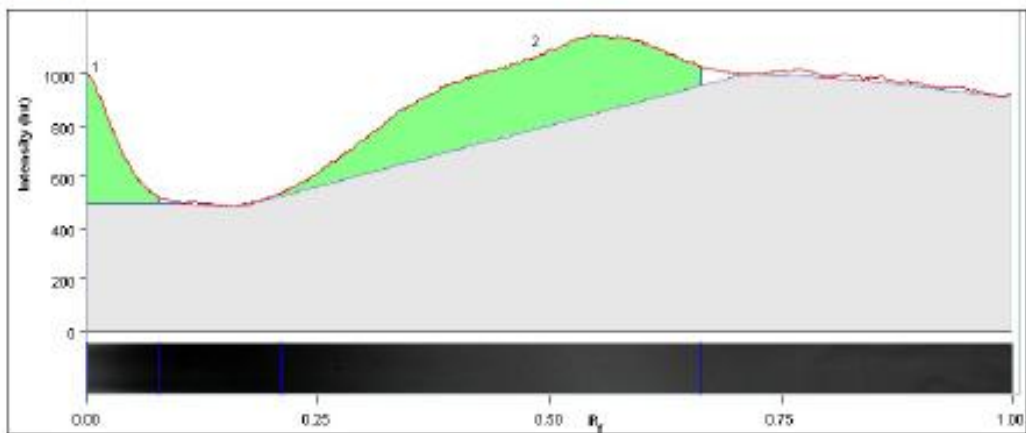
#### Lane 4



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,018	508 352	N/A	N/A	46,4	42,4
2		N/A	0,134	107 442	N/A	N/A	9,8	9,0
3		N/A	0,207	41 266	N/A	N/A	3,8	3,4
4		N/A	0,245	31 443	N/A	N/A	2,9	2,6
5		N/A	0,365	38 258	N/A	N/A	3,5	3,2
6		N/A	0,459	70 030	N/A	N/A	6,4	5,8
7		N/A	0,506	31 255	N/A	N/A	2,9	2,6
8		N/A	0,548	267 242	N/A	N/A	24,4	22,3

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

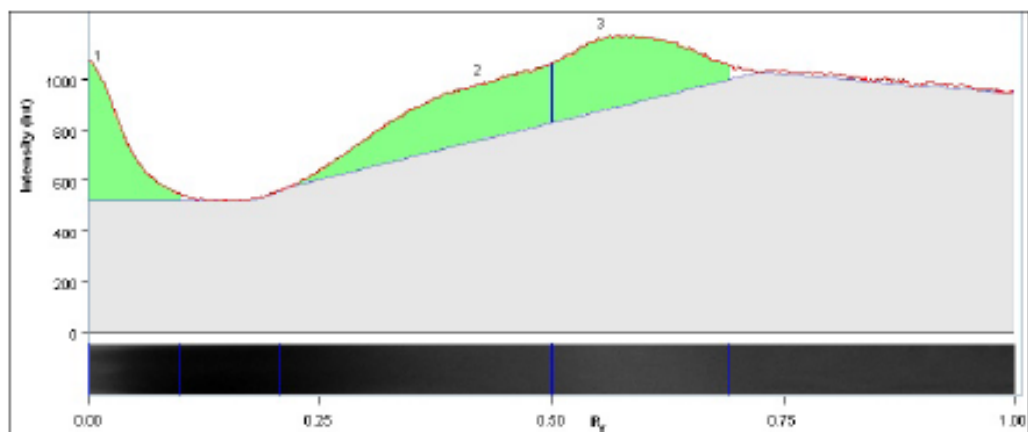
#### Lane 5



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,009	379 807	N/A	N/A	16,1	15,3
2		N/A	0,486	1 974 611	N/A	N/A	83,9	79,7

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

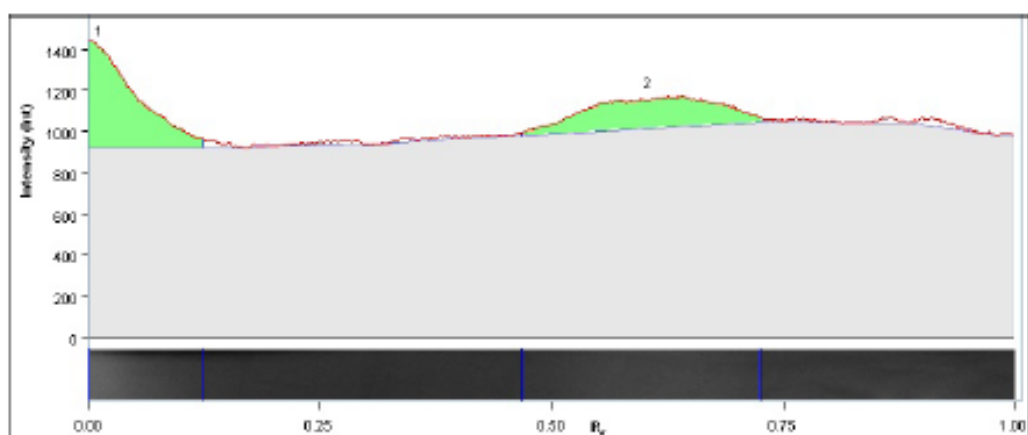
### Lane 6



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,011	492 043	N/A	N/A	21,0	20,3
2		N/A	0,423	953 818	N/A	N/A	40,8	39,3
3		N/A	0,555	891 778	N/A	N/A	38,1	36,7

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

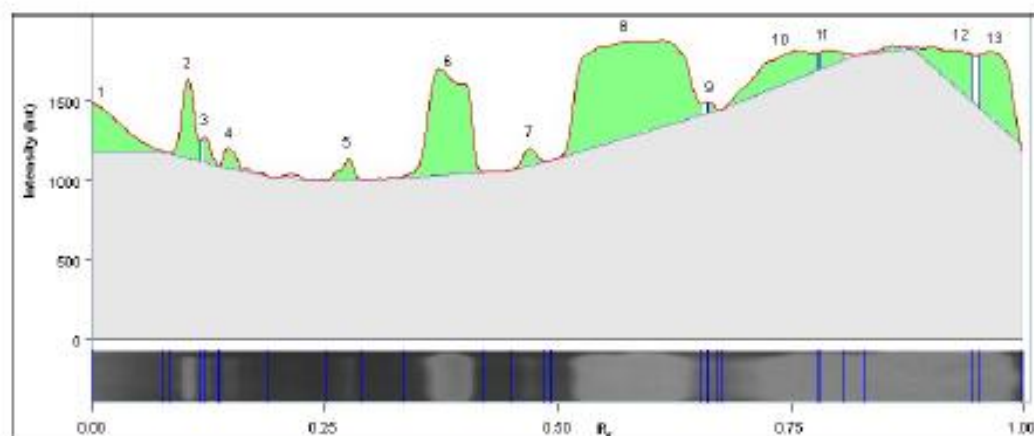
### Lane 7



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,013	640 187	N/A	N/A	53,2	47,4
2		N/A	0,604	562 684	N/A	N/A	46,8	41,7

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

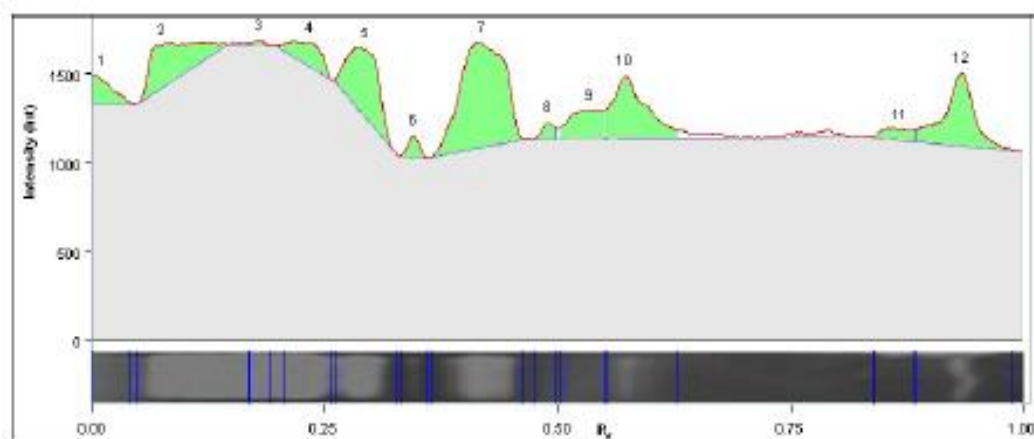
### Lane 8



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,009	242 097	N/A	N/A	6,6	6,4
2		N/A	0,105	168 025	N/A	N/A	4,6	4,5
3		N/A	0,122	34 592	N/A	N/A	0,9	0,9
4		N/A	0,149	43 663	N/A	N/A	1,2	1,2
5		N/A	0,276	46 154	N/A	N/A	1,3	1,2
6		N/A	0,385	656 214	N/A	N/A	17,9	17,5
7		N/A	0,470	36 472	N/A	N/A	1,0	1,0
8		N/A	0,572	1 539 250	N/A	N/A	41,9	40,9
9		N/A	0,664	11 515	N/A	N/A	0,3	0,3
10		N/A	0,742	283 786	N/A	N/A	7,7	7,5
11		N/A	0,786	52 217	N/A	N/A	1,4	1,4
12		N/A	0,935	234 201	N/A	N/A	6,4	6,2
13		N/A	0,971	324 911	N/A	N/A	8,8	8,6

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

### Lane 9



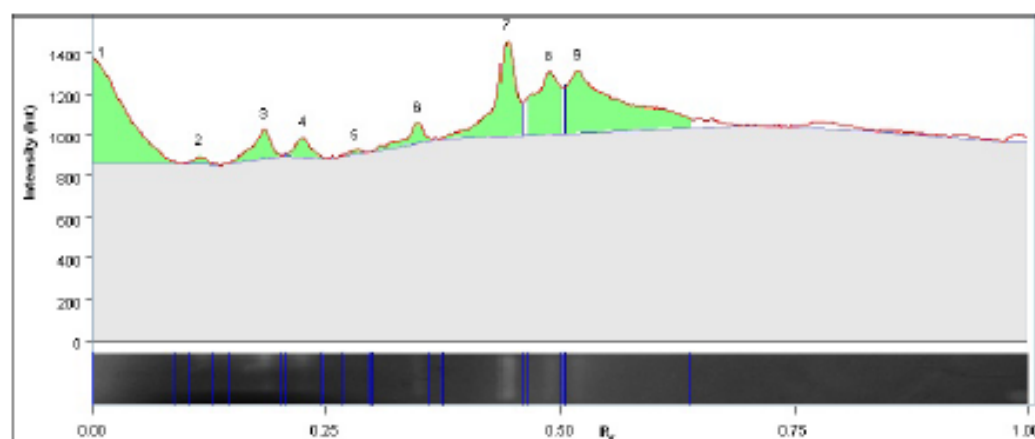
Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
----------	------------	----------------	----------------	--------------	-------------	-------------	--------	--------



1		N/A	0,004	81 404	N/A	N/A	3,4	3,3
2		N/A	0,076	285 995	N/A	N/A	12,0	11,5
3		N/A	0,180	8 977	N/A	N/A	0,4	0,4
4		N/A	0,236	104 951	N/A	N/A	4,4	4,2
5		N/A	0,296	319 271	N/A	N/A	13,4	12,9
6		N/A	0,347	34 498	N/A	N/A	1,4	1,4
7		N/A	0,421	689 443	N/A	N/A	28,8	27,8
8		N/A	0,490	29 986	N/A	N/A	1,3	1,2
9		N/A	0,535	148 332	N/A	N/A	6,2	6,0
10		N/A	0,572	311 704	N/A	N/A	13,0	12,6
11		N/A	0,869	52 969	N/A	N/A	2,2	2,1
12		N/A	0,935	322 984	N/A	N/A	13,5	13,0

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

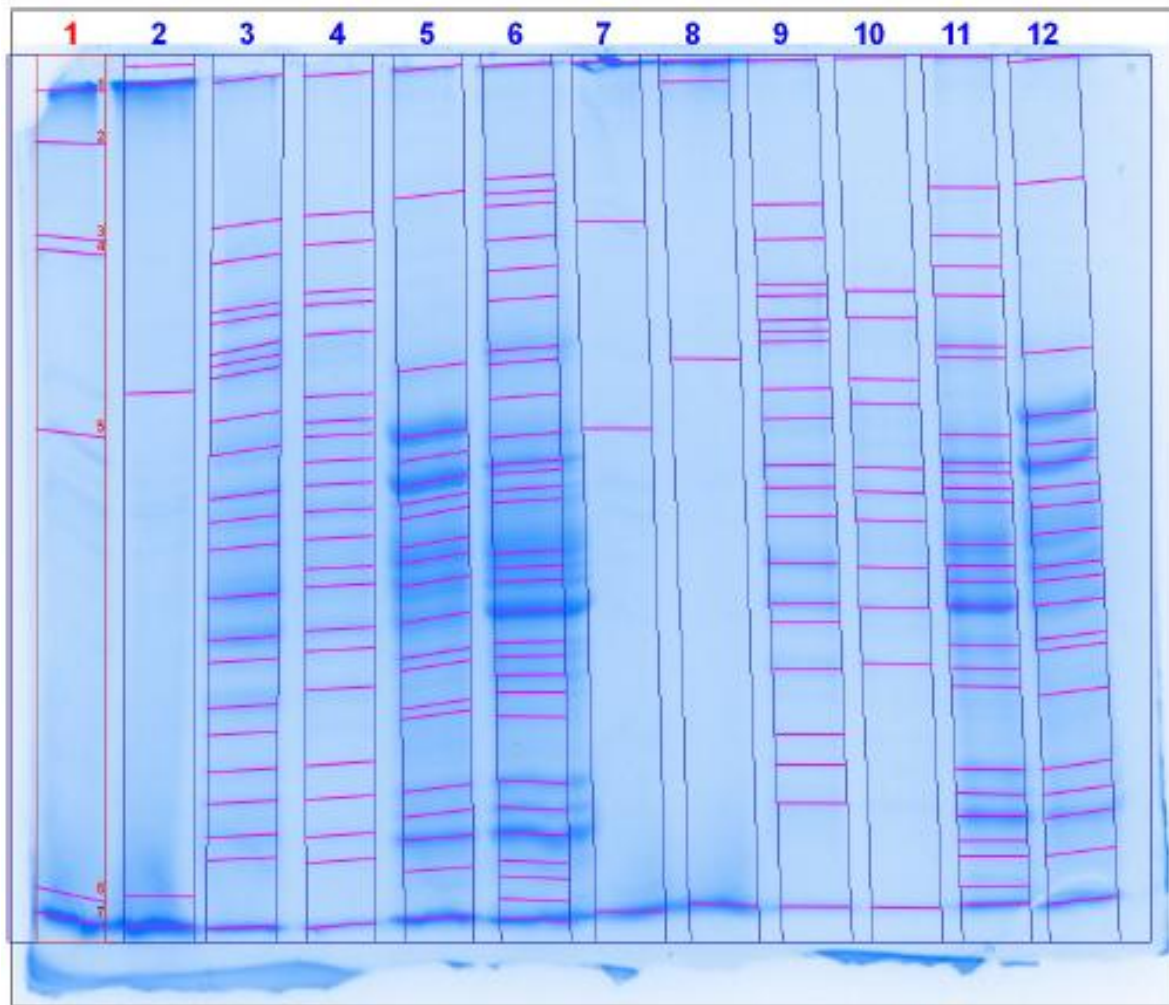
### Lane 10



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,011	422 812	N/A	N/A	28,2	25,6
2		N/A	0,116	12 690	N/A	N/A	0,8	0,8
3		N/A	0,185	70 406	N/A	N/A	4,7	4,3
4		N/A	0,227	39 621	N/A	N/A	2,6	2,4
5		N/A	0,283	8 554	N/A	N/A	0,6	0,5
6		N/A	0,350	52 123	N/A	N/A	3,5	3,2
7		N/A	0,443	252 108	N/A	N/A	16,8	15,3
8		N/A	0,488	194 157	N/A	N/A	13,0	11,8
9		N/A	0,519	445 231	N/A	N/A	29,7	27,0

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

## SDS-PAGE Coomassie Blue



C:/Documents and Settings/Jurášek/Dokumenty/Výsledky Gel Doc/SIMI/2015-05-18.scn

### Acquisition Information

Imager	Gel Doc XR+
Exposure Time (sec)	0.089 (Auto - Intense Bands)
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time (sec)	20
Flat Field	Applied (White)
Serial Number	721BR02322
Software Version	2.0.1
Application	Coomassie Blue
Excitation Source	White Trans Illumination
Emission Filter	Standard Filter

### Image Information

Acquisition Date	21.5.2015 13:18:43
User Name	Jurášek
Image Area (mm)	X: 84.1 Y: 69.7

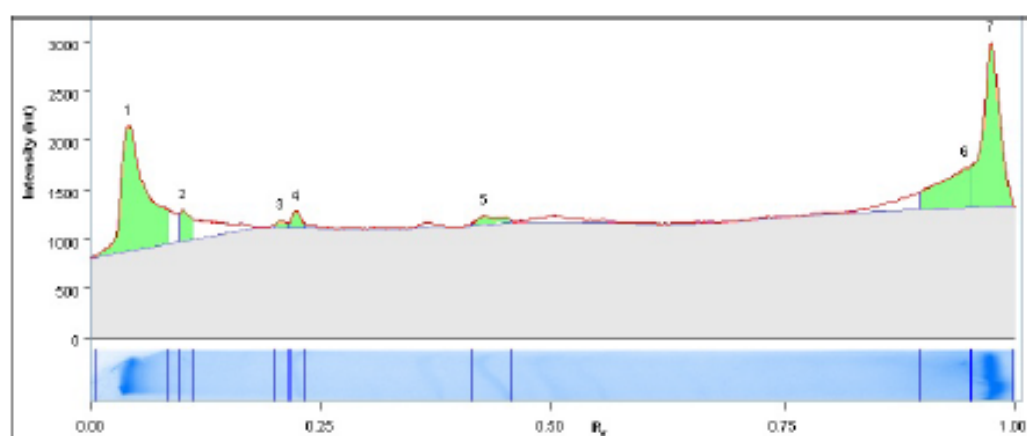
Image Pixels	X: 1233 Y: 1022
Pixel Size (um)	X: 68.2 Y: 68.2
Data Range (Int)	414 - 3688

## Analysis Settings

Detection	<p>Lane detection: Automatically detected lanes with manual adjustments</p> <p>Band detection: Automatically detected bands with custom sensitivity: 40</p> <p>Lane Background Subtraction: Lane background subtracted with disk size: 10</p>
-----------	---

## Lane And Band Analysis

### Lane 1



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,041	2 881 856	N/A	N/A	39,6	31,5
2		N/A	0,100	286 158	N/A	N/A	3,9	3,1
3		N/A	0,207	64 010	N/A	N/A	0,9	0,7
4		N/A	0,223	144 078	N/A	N/A	2,0	1,6
5		N/A	0,427	180 116	N/A	N/A	2,5	2,0
6		N/A	0,947	1 169 348	N/A	N/A	16,1	12,8
7		N/A	0,975	2 551 594	N/A	N/A	35,1	27,9

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10



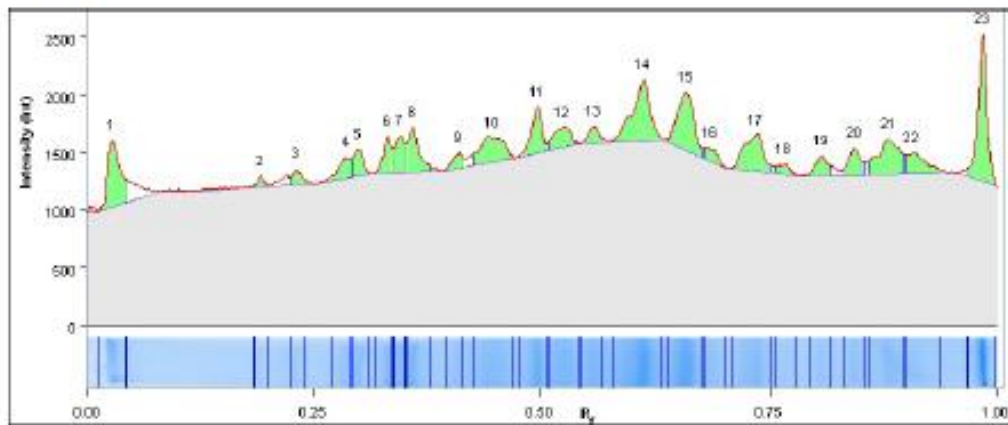
## Lane 2



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,013	33 078	N/A	N/A	0,5	0,4
2		N/A	0,033	3 509 450	N/A	N/A	51,7	45,8
3		N/A	0,381	56 314	N/A	N/A	0,8	0,7
4		N/A	0,949	909 460	N/A	N/A	13,4	11,9
5		N/A	0,982	2 276 610	N/A	N/A	33,6	29,7

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

## Lane 3

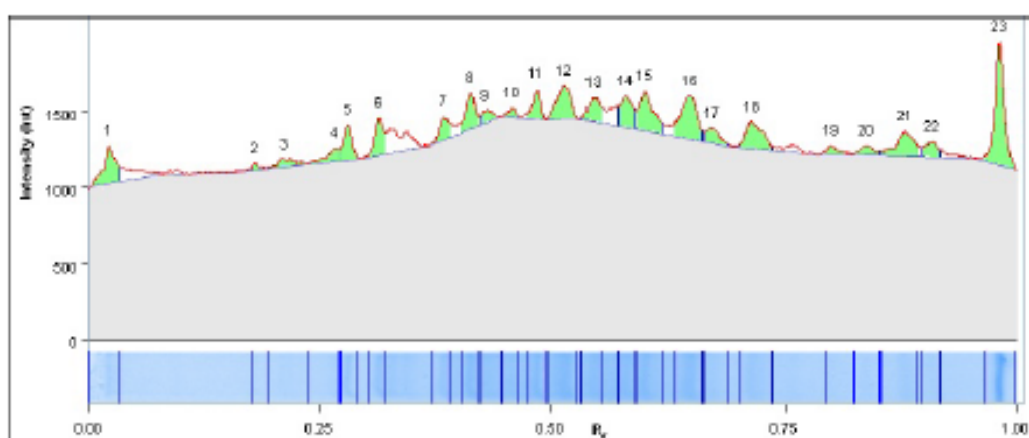


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,028	655 936	N/A	N/A	8,1	7,4
2		N/A	0,191	53 058	N/A	N/A	0,7	0,6
3		N/A	0,230	100 196	N/A	N/A	1,2	1,1
4		N/A	0,286	196 766	N/A	N/A	2,4	2,2
5		N/A	0,298	202 464	N/A	N/A	2,5	2,3
6		N/A	0,331	216 450	N/A	N/A	2,7	2,4
7		N/A	0,345	265 808	N/A	N/A	3,3	3,0
8		N/A	0,359	371 998	N/A	N/A	4,6	4,2
9		N/A	0,409	124 542	N/A	N/A	1,5	1,4
10		N/A	0,447	475 746	N/A	N/A	5,9	5,4
11		N/A	0,497	374 514	N/A	N/A	4,6	4,2
12		N/A	0,523	261 738	N/A	N/A	3,2	3,0

13		N/A	0,555	133 866	N/A	N/A	1,7	1,5
14		N/A	0,610	832 056	N/A	N/A	10,3	9,4
15		N/A	0,658	744 292	N/A	N/A	9,2	8,4
16		N/A	0,684	130 166	N/A	N/A	1,6	1,5
17		N/A	0,735	546 194	N/A	N/A	6,7	6,2
18		N/A	0,765	102 490	N/A	N/A	1,3	1,2
19		N/A	0,807	177 378	N/A	N/A	2,2	2,0
20		N/A	0,843	247 012	N/A	N/A	3,0	2,8
21		N/A	0,881	570 318	N/A	N/A	7,0	6,4
22		N/A	0,907	327 080	N/A	N/A	4,0	3,7
23		N/A	0,984	995 522	N/A	N/A	12,3	11,2

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

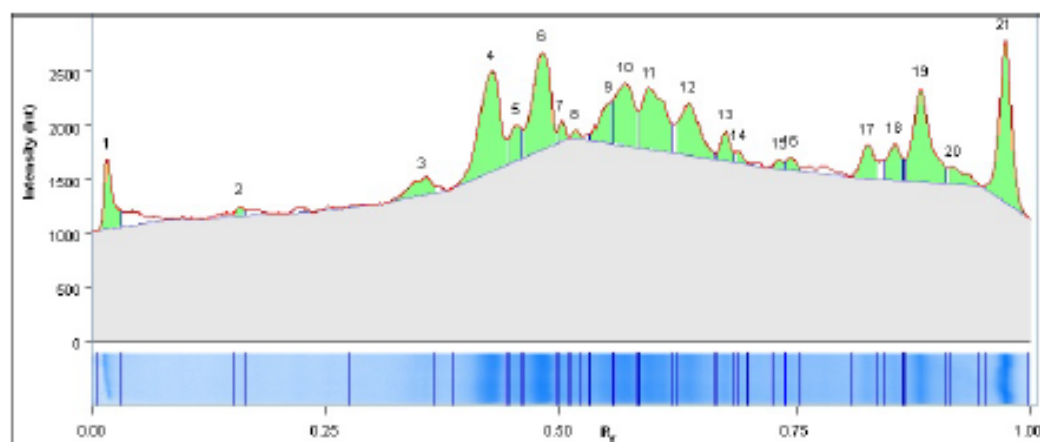
#### Lane 4



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,022	258 852	N/A	N/A	6,0	4,9
2		N/A	0,179	29 822	N/A	N/A	0,7	0,6
3		N/A	0,212	87 172	N/A	N/A	2,0	1,6
4		N/A	0,266	98 272	N/A	N/A	2,3	1,9
5		N/A	0,280	185 962	N/A	N/A	4,3	3,5
6		N/A	0,314	181 004	N/A	N/A	4,2	3,4
7		N/A	0,384	121 804	N/A	N/A	2,8	2,3
8		N/A	0,413	204 240	N/A	N/A	4,7	3,8
9		N/A	0,429	75 110	N/A	N/A	1,7	1,4
10		N/A	0,458	45 436	N/A	N/A	1,0	0,9
11		N/A	0,484	140 230	N/A	N/A	3,2	2,6
12		N/A	0,514	283 272	N/A	N/A	6,5	5,3
13		N/A	0,545	157 842	N/A	N/A	3,6	3,0
14		N/A	0,579	214 822	N/A	N/A	4,9	4,0
15		N/A	0,599	319 532	N/A	N/A	7,4	6,0
16		N/A	0,648	412 402	N/A	N/A	9,5	7,8
17		N/A	0,671	117 068	N/A	N/A	2,7	2,2
18		N/A	0,714	271 432	N/A	N/A	6,3	5,1
19		N/A	0,799	54 834	N/A	N/A	1,3	1,0
20		N/A	0,838	71 336	N/A	N/A	1,6	1,3
21		N/A	0,880	251 822	N/A	N/A	5,8	4,7
22		N/A	0,909	112 110	N/A	N/A	2,6	2,1
23		N/A	0,982	647 130	N/A	N/A	14,9	12,2

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

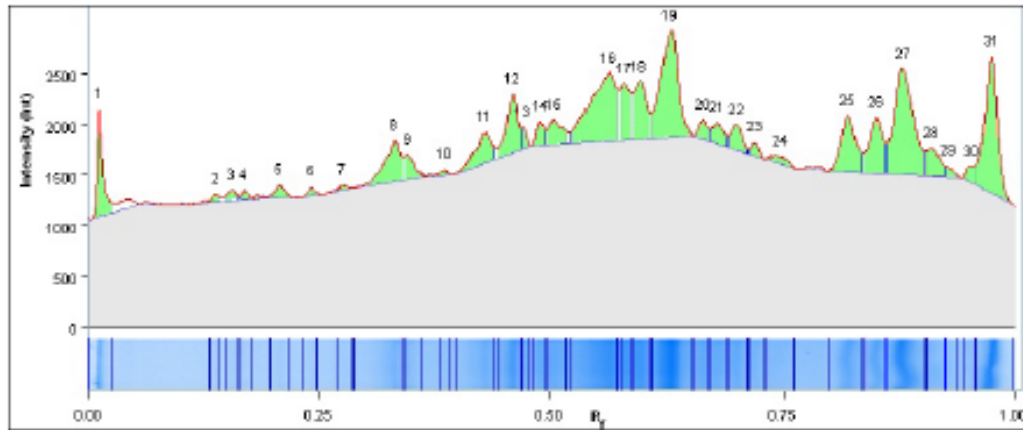
### Lane 5



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,016	493 802	N/A	N/A	4,0	3,7
2		N/A	0,158	55 500	N/A	N/A	0,5	0,4
3		N/A	0,352	352 758	N/A	N/A	2,9	2,6
4		N/A	0,427	1 698 892	N/A	N/A	13,9	12,8
5		N/A	0,453	310 208	N/A	N/A	2,5	2,3
6		N/A	0,481	1 422 280	N/A	N/A	11,7	10,7
7		N/A	0,501	104 118	N/A	N/A	0,9	0,8
8		N/A	0,517	45 214	N/A	N/A	0,4	0,3
9		N/A	0,550	428 016	N/A	N/A	3,5	3,2
10		N/A	0,568	892 144	N/A	N/A	7,3	6,7
11		N/A	0,594	1 163 724	N/A	N/A	9,5	8,7
12		N/A	0,635	837 976	N/A	N/A	6,9	6,3
13		N/A	0,675	235 838	N/A	N/A	1,9	1,8
14		N/A	0,689	59 274	N/A	N/A	0,5	0,4
15		N/A	0,732	66 822	N/A	N/A	0,5	0,5
16		N/A	0,744	99 900	N/A	N/A	0,8	0,7
17		N/A	0,827	353 942	N/A	N/A	2,9	2,7
18		N/A	0,856	368 742	N/A	N/A	3,0	2,8
19		N/A	0,883	1 342 508	N/A	N/A	11,0	10,1
20		N/A	0,918	238 132	N/A	N/A	2,0	1,8
21		N/A	0,973	1 634 142	N/A	N/A	13,4	12,3

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

## Lane 6



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,012	512 820	N/A	N/A	3,9	3,7
2		N/A	0,138	45 732	N/A	N/A	0,3	0,3
3		N/A	0,155	72 964	N/A	N/A	0,6	0,5
4		N/A	0,169	44 474	N/A	N/A	0,3	0,3
5		N/A	0,207	108 558	N/A	N/A	0,8	0,8
6		N/A	0,241	48 322	N/A	N/A	0,4	0,3
7		N/A	0,275	32 412	N/A	N/A	0,2	0,2
8		N/A	0,331	570 688	N/A	N/A	4,3	4,1
9		N/A	0,346	184 482	N/A	N/A	1,4	1,3
10		N/A	0,385	30 710	N/A	N/A	0,2	0,2
11		N/A	0,429	434 306	N/A	N/A	3,3	3,1
12		N/A	0,460	587 190	N/A	N/A	4,4	4,2
13		N/A	0,470	87 024	N/A	N/A	0,7	0,6
14		N/A	0,489	155 400	N/A	N/A	1,2	1,1
15		N/A	0,503	278 018	N/A	N/A	2,1	2,0
16		N/A	0,561	1 488 066	N/A	N/A	11,2	10,7
17		N/A	0,577	430 162	N/A	N/A	3,2	3,1
18		N/A	0,593	617 530	N/A	N/A	4,7	4,4
19		N/A	0,627	1 627 556	N/A	N/A	12,3	11,7
20		N/A	0,662	140 896	N/A	N/A	1,1	1,0
21		N/A	0,678	197 432	N/A	N/A	1,5	1,4
22		N/A	0,700	237 022	N/A	N/A	1,8	1,7
23		N/A	0,719	83 176	N/A	N/A	0,6	0,6
24		N/A	0,746	105 154	N/A	N/A	0,8	0,8
25		N/A	0,820	726 976	N/A	N/A	5,5	5,2
26		N/A	0,850	630 480	N/A	N/A	4,8	4,5
27		N/A	0,879	1 764 678	N/A	N/A	13,3	12,6
28		N/A	0,910	312 650	N/A	N/A	2,4	2,2
29		N/A	0,928	62 752	N/A	N/A	0,5	0,4
30		N/A	0,953	116 328	N/A	N/A	0,9	0,8
31		N/A	0,976	1 529 358	N/A	N/A	11,5	10,9

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

### Lane 7



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,010	1 169 200	N/A	N/A	33,3	21,3
2		N/A	0,188	98 198	N/A	N/A	2,8	1,8
3		N/A	0,421	81 918	N/A	N/A	2,3	1,5
4		N/A	0,966	2 164 130	N/A	N/A	61,6	39,5

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

### Lane 8

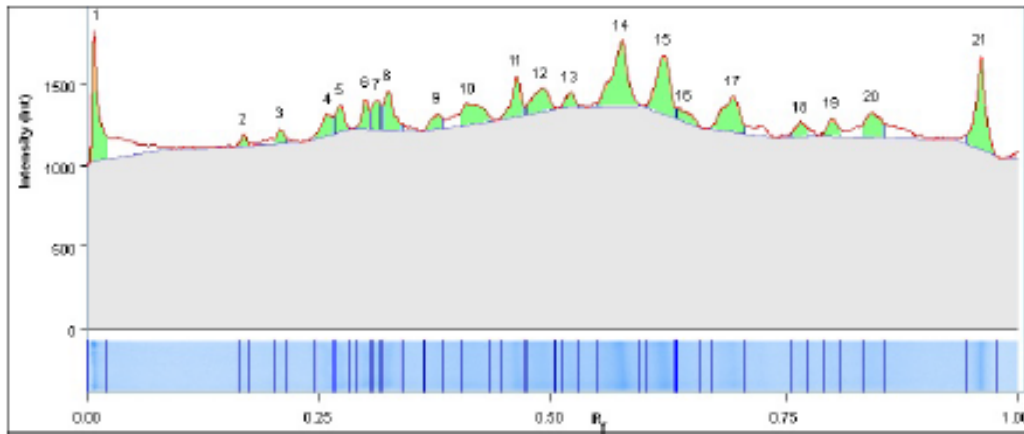


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,007	1 316 460	N/A	N/A	23,7	20,7
2		N/A	0,031	585 636	N/A	N/A	10,6	9,2
3		N/A	0,343	29 822	N/A	N/A	0,5	0,5
4		N/A	0,959	3 615 788	N/A	N/A	65,2	56,8

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10



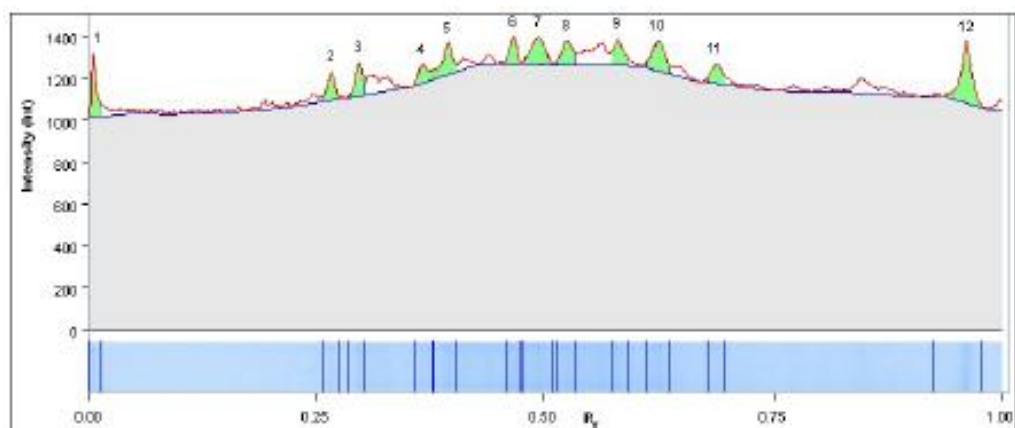
### Lane 9



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,006	454 804	N/A	N/A	10,5	8,5
2		N/A	0,169	35 446	N/A	N/A	0,8	0,7
3		N/A	0,208	59 422	N/A	N/A	1,4	1,1
4		N/A	0,259	135 716	N/A	N/A	3,1	2,5
5		N/A	0,272	117 512	N/A	N/A	2,7	2,2
6		N/A	0,299	105 598	N/A	N/A	2,4	2,0
7		N/A	0,312	113 812	N/A	N/A	2,6	2,1
8		N/A	0,324	208 754	N/A	N/A	4,8	3,9
9		N/A	0,377	88 652	N/A	N/A	2,0	1,6
10		N/A	0,411	231 768	N/A	N/A	5,3	4,3
11		N/A	0,463	207 496	N/A	N/A	4,8	3,9
12		N/A	0,488	212 380	N/A	N/A	4,9	3,9
13		N/A	0,520	80 068	N/A	N/A	1,8	1,5
14		N/A	0,573	562 696	N/A	N/A	12,9	10,5
15		N/A	0,619	446 664	N/A	N/A	10,3	8,3
16		N/A	0,640	94 498	N/A	N/A	2,2	1,8
17		N/A	0,693	333 074	N/A	N/A	7,7	6,2
18		N/A	0,766	83 916	N/A	N/A	1,9	1,6
19		N/A	0,800	94 794	N/A	N/A	2,2	1,8
20		N/A	0,844	202 020	N/A	N/A	4,6	3,8
21		N/A	0,961	481 074	N/A	N/A	11,1	8,9

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

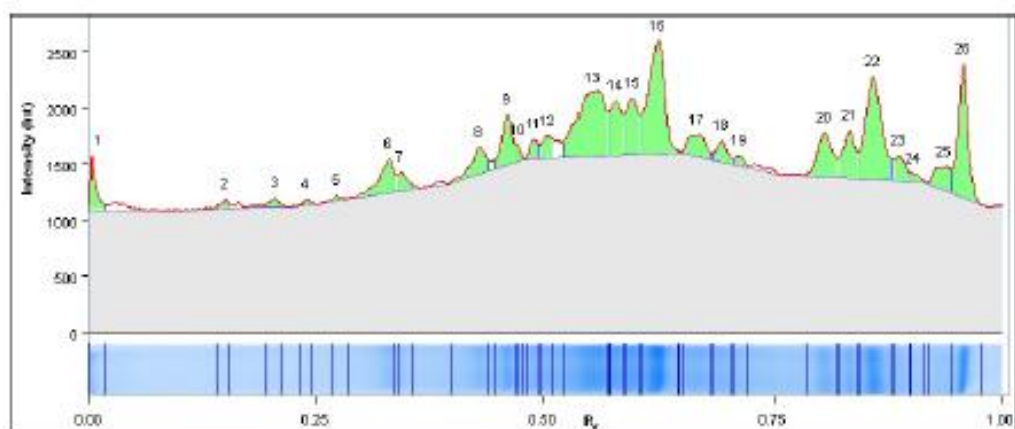
### Lane 10



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,004	131 202	N/A	N/A	8,4	4,9
2		N/A	0,266	90 280	N/A	N/A	5,8	3,4
3		N/A	0,297	105 746	N/A	N/A	6,7	4,0
4		N/A	0,366	80 882	N/A	N/A	5,2	3,0
5		N/A	0,394	144 670	N/A	N/A	9,2	5,4
6		N/A	0,466	81 992	N/A	N/A	5,2	3,1
7		N/A	0,494	160 802	N/A	N/A	10,2	6,1
8		N/A	0,525	112 628	N/A	N/A	7,2	4,2
9		N/A	0,579	107 078	N/A	N/A	6,8	4,0
10		N/A	0,623	165 316	N/A	N/A	10,5	6,2
11		N/A	0,687	87 542	N/A	N/A	5,6	3,3
12		N/A	0,962	301 032	N/A	N/A	19,2	11,3

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

### Lane 11

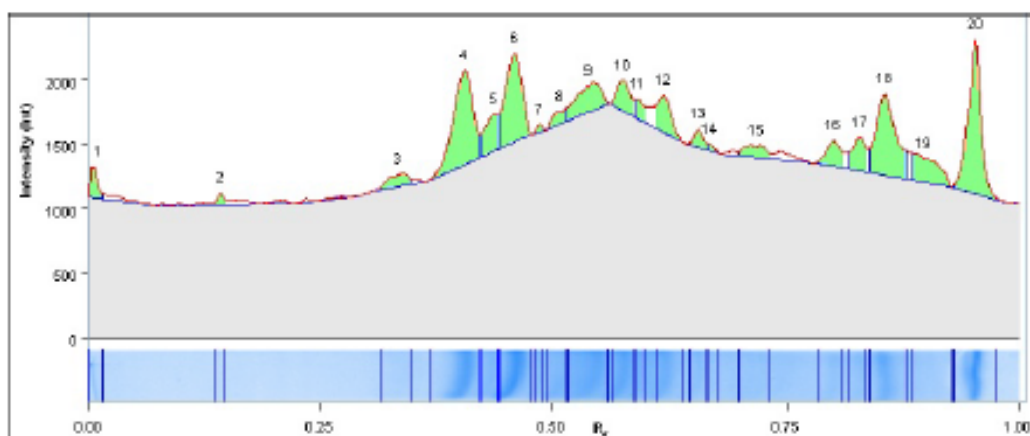


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,003	219 928	N/A	N/A	2,1	2,0
2		N/A	0,150	56 684	N/A	N/A	0,6	0,5
3		N/A	0,205	65 638	N/A	N/A	0,6	0,6
4		N/A	0,239	31 228	N/A	N/A	0,3	0,3
5		N/A	0,272	30 192	N/A	N/A	0,3	0,3

6		N/A	0,329	399 600	N/A	N/A	3,9	3,6
7		N/A	0,342	144 004	N/A	N/A	1,4	1,3
8		N/A	0,429	320 346	N/A	N/A	3,1	2,9
9		N/A	0,460	437 340	N/A	N/A	4,2	3,9
10		N/A	0,471	49 210	N/A	N/A	0,5	0,4
11		N/A	0,489	109 594	N/A	N/A	1,1	1,0
12		N/A	0,504	156 954	N/A	N/A	1,5	1,4
13		N/A	0,552	1 390 386	N/A	N/A	13,5	12,5
14		N/A	0,576	485 958	N/A	N/A	4,7	4,4
15		N/A	0,594	517 556	N/A	N/A	5,0	4,7
16		N/A	0,622	1 466 976	N/A	N/A	14,2	13,2
17		N/A	0,666	307 618	N/A	N/A	3,0	2,8
18		N/A	0,692	165 464	N/A	N/A	1,6	1,5
19		N/A	0,712	66 748	N/A	N/A	0,6	0,6
20		N/A	0,806	512 376	N/A	N/A	5,0	4,6
21		N/A	0,833	435 564	N/A	N/A	4,2	3,9
22		N/A	0,859	1 342 138	N/A	N/A	13,0	12,1
23		N/A	0,886	213 120	N/A	N/A	2,1	1,9
24		N/A	0,903	60 680	N/A	N/A	0,6	0,5
25		N/A	0,937	295 852	N/A	N/A	2,9	2,7
26		N/A	0,958	1 014 614	N/A	N/A	9,9	9,1

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

## Lane 12



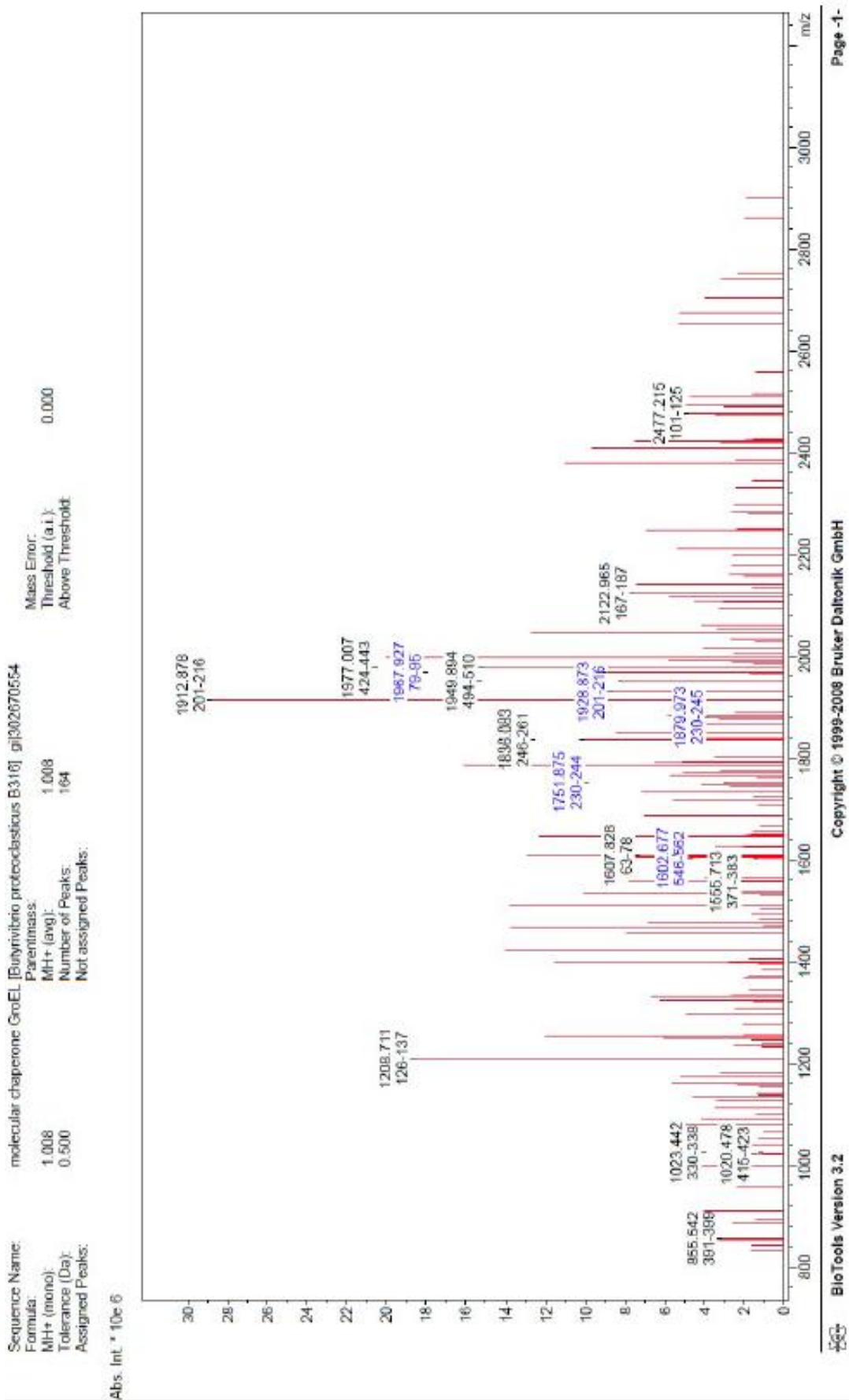
Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,005	144 522	N/A	N/A	1,8	1,6
2		N/A	0,142	46 176	N/A	N/A	0,6	0,5
3		N/A	0,333	168 720	N/A	N/A	2,1	1,9
4		N/A	0,404	1 286 490	N/A	N/A	16,1	14,7
5		N/A	0,436	333 962	N/A	N/A	4,2	3,8
6		N/A	0,459	1 018 314	N/A	N/A	12,8	11,6
7		N/A	0,486	32 412	N/A	N/A	0,4	0,4
8		N/A	0,507	121 508	N/A	N/A	1,5	1,4
9		N/A	0,537	444 074	N/A	N/A	5,6	5,1
10		N/A	0,574	270 544	N/A	N/A	3,4	3,1
11		N/A	0,590	94 720	N/A	N/A	1,2	1,1
12		N/A	0,617	340 252	N/A	N/A	4,3	3,9
13		N/A	0,655	115 292	N/A	N/A	1,4	1,3



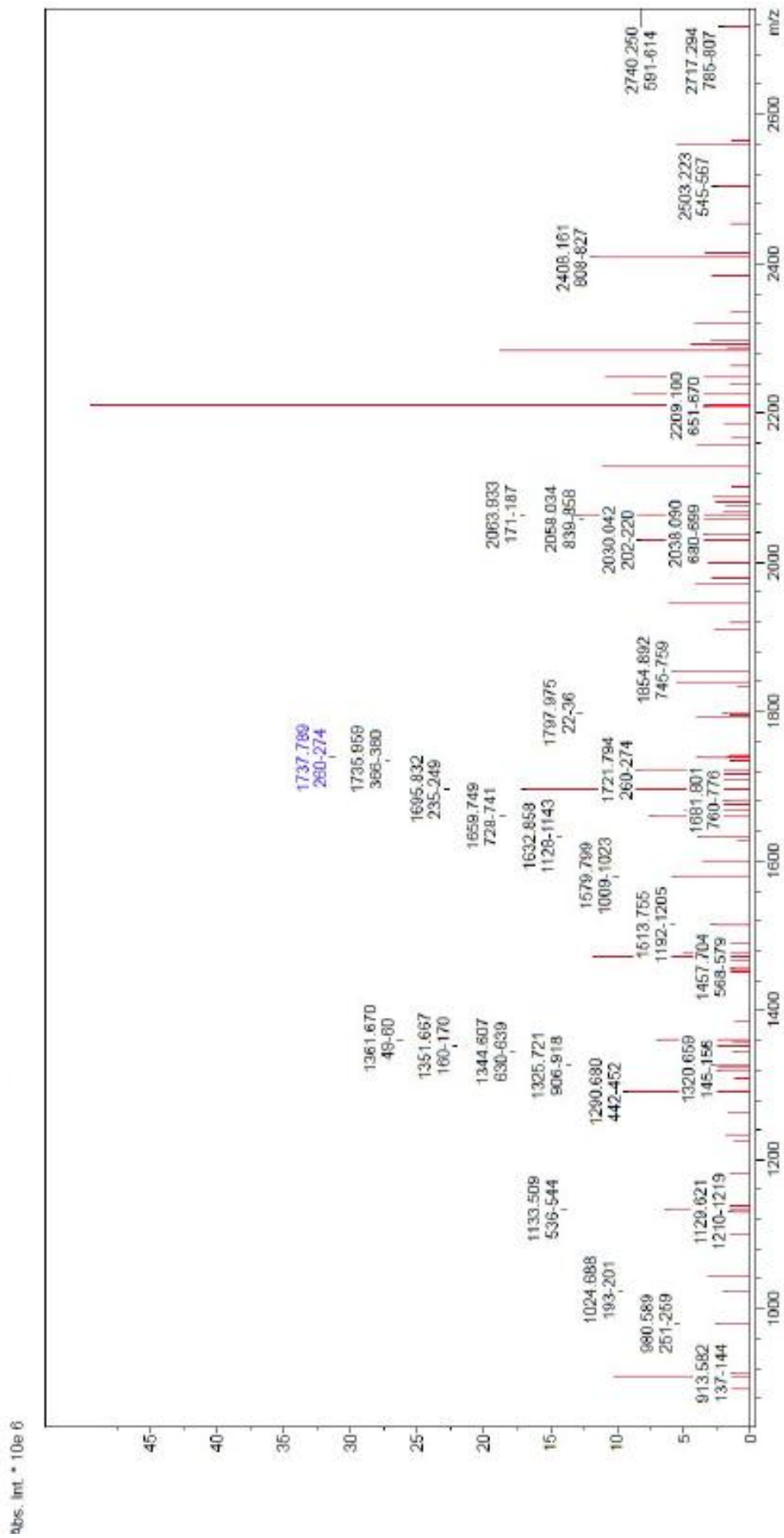
14		N/A	0,668	32 190	N/A	N/A	0,4	0,4
15		N/A	0,718	175 602	N/A	N/A	2,2	2,0
16		N/A	0,800	234 654	N/A	N/A	2,9	2,7
17		N/A	0,829	274 910	N/A	N/A	3,4	3,1
18		N/A	0,856	1 072 852	N/A	N/A	13,4	12,2
19		N/A	0,898	457 690	N/A	N/A	5,7	5,2
20		N/A	0,953	1 316 312	N/A	N/A	16,5	15,0

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 40
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10

# MALDI TOF/TOF – hmotnostní spektra



Sequence Name: DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Butyrivibrio fibrosolvens 16/4] gi|291518238  
 Formula:   
 MH+ (mono): 1.008 Parentmass:   
 Tolerance (Da): 0.500 MH+ (avg): 1.008 Mass Error:   
 Assigned Peaks: Not assigned Peaks: 97 Number of Peaks: 97 Threshold (a.i): 0.000  
 Above Threshold



Sequence Name:  
Formula:  
MH+ (mono):  
Tolerance (Da):  
Assigned Peaks:

Chain A, Crystal Structure Of A Type 4 Cdgh Iron-Sulfur Protein. gi|349587802  
Parentmass:  
MH+ (avg):  
Number of Peaks:  
Not assigned Peaks:

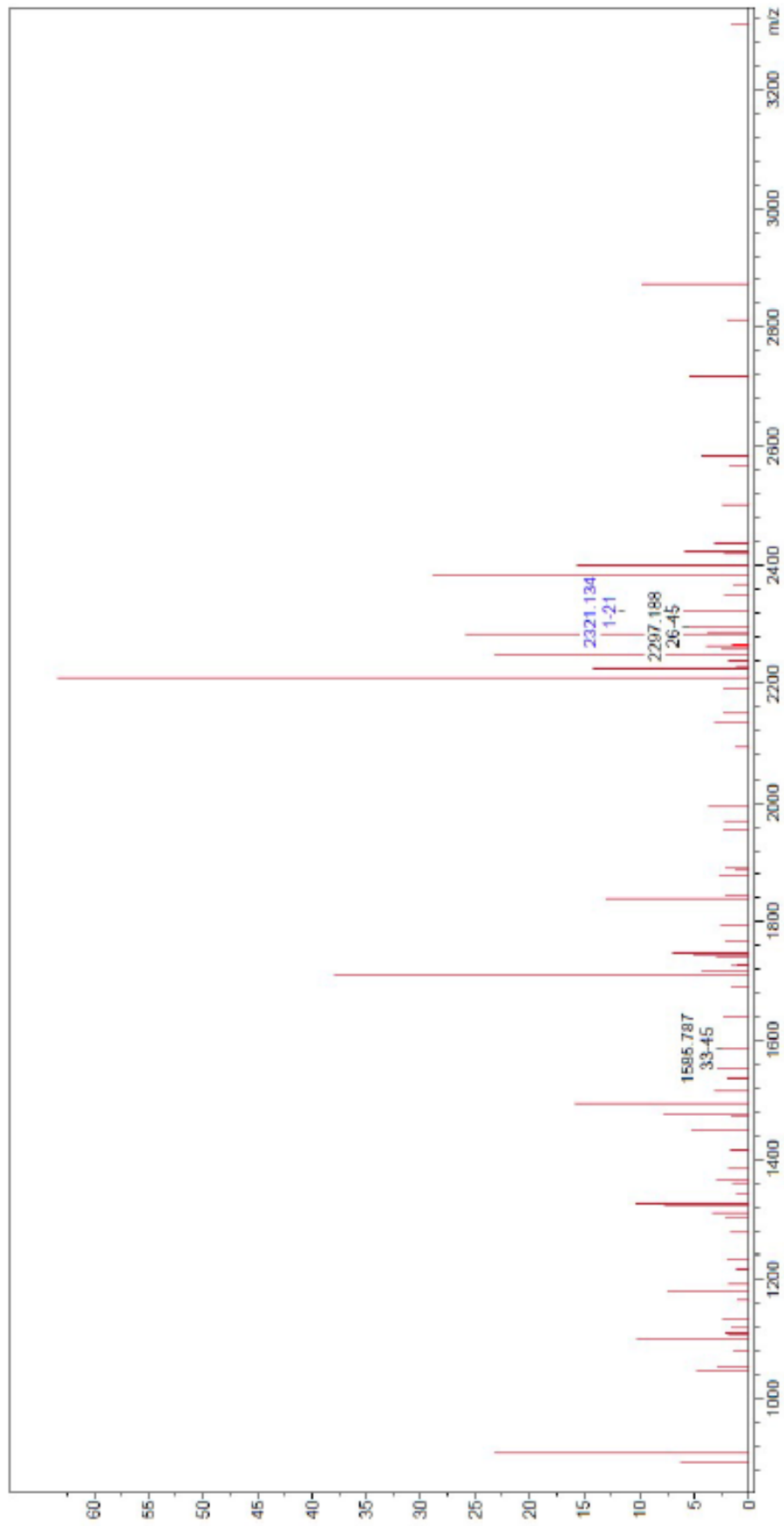
Mass Error:  
Threshold (a.i.):  
Above Threshold:

0.000

1.008

64

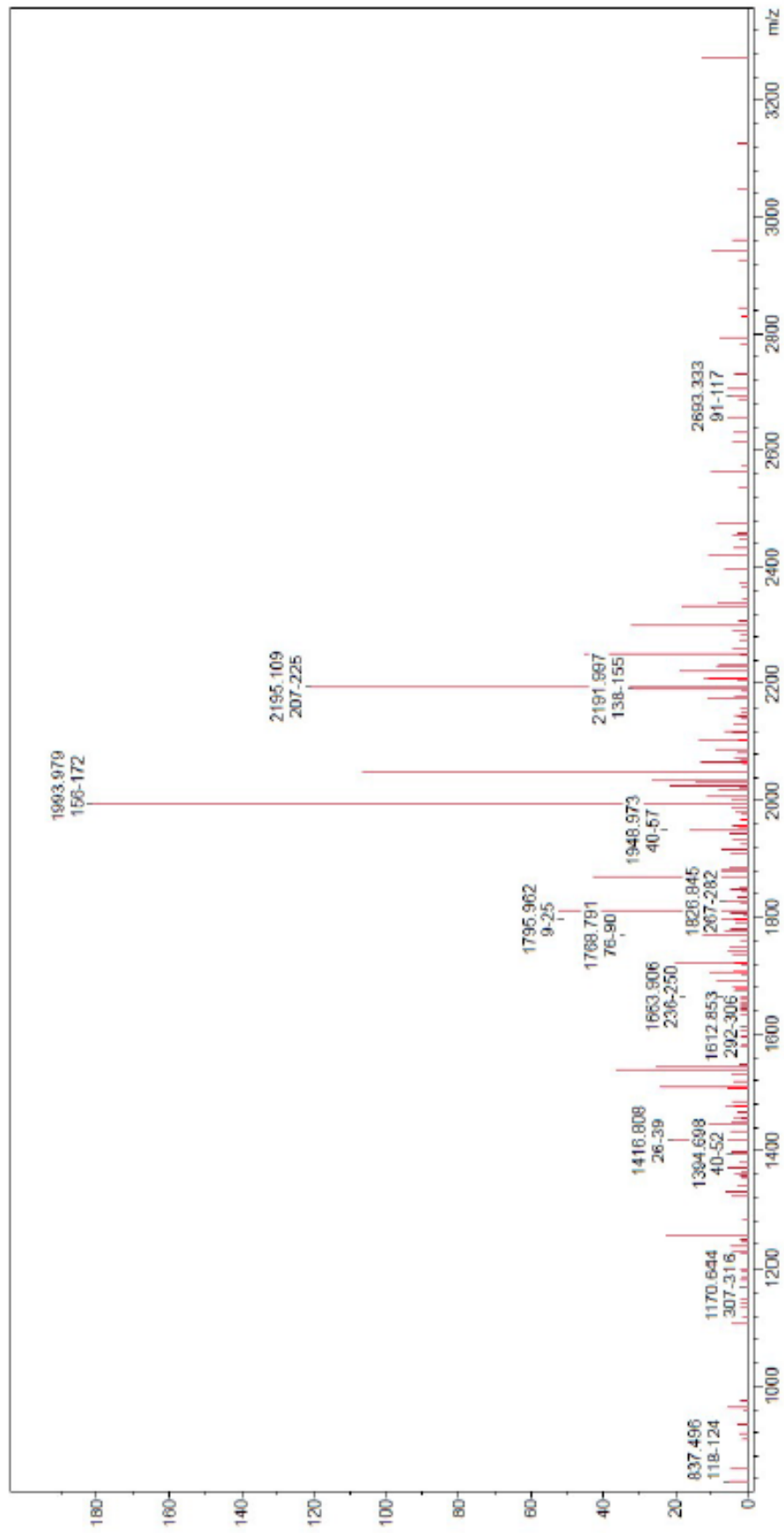
Abs. Int. \* 10e 6



Sequence Name: translation elongation factor Tu TufA [Bufrivibrio proteoelasticus B316] gj302671719  
 Formula:  
 MH+ (mono): 1.008  
 Tolerance (Da): 0.500  
 Assigned Peaks: Not assigned Peaks:

Parentmass: 1.008  
 MH+ (avg): 1.008  
 Number of Peaks: 202  
 Mass Error: 0.000  
 Threshold (a.i.): Above Threshold:

Abs. Int. \* 10e 6



Sequence Name: OAH10A5\_sulphydrylase [Butyrivibrio proteoelasticus B316] g|302671822  
 Formula:   
 MH+ (mono): 1.008  
 Tolerance (Da): 0.500  
 Assigned Peaks: Not assigned Peaks:

Parentmass: 1.008  
 Number of Peaks: 202  
 Mass Error: 0.000  
 Threshold (a.i.): Above Threshold:

