

B I PROSPECT

Dvacátý ročník
Číslo 2/2010

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMB CZTPP

BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)

a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)

Redakční rada

Ing. Petra Lipová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Prof. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Ivax, Ostravská 29, 747 70 Opava

Ing. Jan Kopečný, DrSc.
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.
(Endokrinologický ústav, Praha)

BIOPROSPECT

20th Volume
No. 2/2010

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, PhD. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

ve dnech 17. – 19. března 2010, naše střešní organizace, Český svaz vědeckotechnických společností (ČSVTS), jejíž jsme zakládajícím členem, pořádala oslavy 20. výročí založení spojené s 3. mezinárodní konferencí „Proměny Evropy 2010“ ve svém sídle na Novotného lávce 5 v Praze na Starém Městě. Při této příležitosti obdrželi předsedové jednotlivých společností „Čestný odznak ČSVTS“ za významnou činnost konanou ve prospěch komunity inženýrů, techniků, vědeckých či odborných pracovníků. Beru toto ocenění jako uznání za prospěšnou činnost celé naší společnosti v rámci svazu. Jarní valná hromada ČSVTS se konala 20. května 2010 a tentokrát se na ní volilo nové vedení svazu, tj. předsednictvo a revizní komise. Nové zvolené vedení naleznete na webových stránkách ČSVTS. Zde bych Vás jen rád informoval, že za naší společnost byl nominován a zvolen do dozorčí rady p. RNDr. Tomáš Vaněk, CSc. Přejeme mu, aby byl ve své nové funkci stejně úspěšný jako náš dřívější reprezentant p. RNDr. Tomislav Barth, DrSc.

Dne 18. května 2010 na VŠCHT v Praze úspěšně proběhl již tradiční seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací“. Pokud se o tuto problematiku zajímáte a nemohli jste se semináře zúčastnit, pak stále ještě máme k dispozici sborník přednášek, a to jak v tištěné formě, tak i ve formátu CD. Na požádání Vám sborníček v požadovaném formátu zašleme. Pro případné Vaše zahraniční známé máme též volně publikaci Ministerstva zemědělství ČR o zkušenostech s pěstováním geneticky modifikované kukuřice v anglickém jazyce. Jedná se o překlad publikace, o které jsme Vás informovali v minulém čísle Bioprospectu.

Pokračují i přípravy mezinárodního biotechnologického symposia BIOT 2011 spojeného s 5. Česko-švýcarským symposiem, které se uskuteční 15. – 17. června 2011 v Národní technické knihovně v Praze 6

a bude následováno symposiem „Plant Biotechnology“ ve dnech 20. a 21. 6. 2011 v Olomouci. Webové stránky pro obě akce jsou v přípravě.

V úvodníku letošního prvního čísla jsme Vás informovali o „Global Forum on Genetically modified Wheat“, které se má uskutečnit v říjnu. K dnešnímu dni zatím datum konání nebylo stanoveno, a proto zájemci nechtě konzultují následující webovou stránku: <http://www.bastiaanse-communication.com/>

S potěšením Vám přinášíme řadu pozitivních informací o biotechnologiích v naší republice. Najdete zde oficiální tiskovou zprávu o založení „Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum“, informaci o založení klastru „MedChemBio“, který byl založen počátkem roku 2009 s cílem pomáhat rozvoji oborů **medicínální chemie** a **chemické biologie** v České republice, a to jak v základním výzkumu, tak ve fázi přechodu ze základního výzkumu do technologického a komerčního uplatnění. Informace je prezentována jeho ředitelem a členem naší Rady p. Doc. Ing. Fuskem, CSc. Jistě Vás zaujme i informace o vědeckém programu Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i. od jeho ředitelky pí. Doc. RNDr. Jany Pěkníkové, CSc. Uvádíme i recenzi zajímavé knihy a pár zajímavostí.

I tentokrát jsme pro Vás v tomto čísle vybrali články z různých oblastí biotechnologií. Neváhejte a posílejte nám zajímavé zprávy, noticky o novinkách, které Vás v literatuře zaujaly, stručné zprávy z konferencí a samozřejmě i krátké přehledné články. Další číslo vyjde v podzimním období.

Srdečně Vás zdraví

Váš

Jan Káš

BIOTECHNOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, V. V. I.

K 1. lednu 2008 založila Akademie věd České republiky novou veřejnou výzkumnou instituci, Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., se sídlem v areálu Akademie věd v Praze – Krči. Činnost Biotechnologického ústavu AV ČR, v. v. i. (BTÚ) je soustředěna na rozvoj špičkového základního a orientovaného výzkumu a vývoje se zaměřením na praktické využití výsledků v diagnostických a terapeutických aplikacích v humánní medicíně.

Ústav má 7 skupin, které svou činností pokrývají dva odborné směry:

- (A) Proteinové inženýrství a strukturní biologie
- (B) Patologie buňky, příčiny, diagnostika, léčba

A. Proteinové inženýrství a strukturní biologie:

Laboratoř inženýrství vazebných proteinů (vedoucí: Peter Šebo) se zabývá designem a zlepšováním vlastností vysoce afinních vazebných proteinových ligandů zejména pro aplikace, ve kterých byly do současnosti neúspěšně používány monoklonální protilátky.

Laboratoř strukturní biologie (vedoucí: Cyril Bařínka) je směřována do oblasti strukturní biologie a vztahů mezi strukturou a funkcí medicínsky relevantních proteinů. Výsledky výzkumu jsou využitelné pro návrh a optimalizaci sloučenin sloužících k detekci pevných nádorů, zejména pak nádorů rakoviny prostaty.

B. Patologie buňky, příčiny, diagnostika, léčba:

Laboratoř diagnostiky pro reprodukční medicínu (vedoucí: Jana Pěkníková) se zabývá charakterizací procesů a molekulárních faktorů během oplodnění vajíčka a rozvíjením nástrojů (monoklonální protilátky) pro detekci mužské neplodnosti a pro detekci vybraných faktorů znečišťujících životní prostředí majících negativní dopad na reprodukci savců.

Laboratoř diagnostiky autoimunitních onemocnění (vedoucí: Šárka Růžičková) je zaměřena na humorální a genetické aspekty autoimunitních nemocí, na identifikaci cílových molekul využitelných v terapii autoimunitních chorob a na vývoj nových nástrojů pro diagnostiku autoimunitních onemocnění.

Laboratoř molekulární terapie (vedoucí: Jiří Neužil) se zaměřuje na vývoj nových protirakovinných látek, zejména analogů vitamínu E, které efektivně a selektivně působí proti maligně transformovaným buňkám tím, že destabilizují jejich mitochondrie a tak vyvolají programovanou smrt nádorových buněk.

Laboratoř genové exprese (vedoucí: Mikael Kubišta) rozvíjí nástroje pro profilovou analýzu exprese genů pomocí vysokapacitní qRT-PCR na tkáňové, jednobuněčné a sub-buněčné úrovni, včetně analýzy multidimenzionálních dat.

Laboratoř molekulární patogenetiky (vedoucí: Gabriela Pavlínková) identifikuje klíčové molekuly v patogenním embryonálním vývoji pomocí zvířecích modelů a profiluje genovou expresi, a umožňuje tak vypracovat nové postupy pro prevenci a diagnózu diabetické embryopatie.

Činnost vědeckých skupin je zajištěna grantovou podporou od různých poskytovatelů včetně zahraničních. V současné době jsou na ústavu skupiny zapojené do projektů 7. rámcového programu EK, ústav je nositelem projektu Nanotechnologie pro společnost, dále "Výzkumného centra" programu MŠMT 1M a spoluřešitelem projektu NPVII.

Na ústavu se školí doktorandi a diplomanti, 5 pracovníků přednáší na vysokých školách.

Biotechnologický ústav úzce spolupracuje s TATAA Biocenter Prague, společně organizují kurzy analýzy genové exprese pomocí qRT-PCR.

Ústav slouží jako vědomostní základna pro vznikající a rozvíjející se biotechnologický průmysl v České republice, z tohoto důvodu je zapojen do Biotechnologického klastru (CzechBio) – asociace biotechnologických společností ČR, z.s.p.o.

Ve Vestci u Prahy by měl být realizován projekt BIOCEV v rámci programu Výzkum a vývoj pro inovace, na jehož přípravě se BTÚ podílí s dalšími ústavu AV ČR a Univerzitou Karlovou. Více informací na webové adrese www.ibt.cas.cz

Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.
Ředitelka ústavu

Klaster MedChemBio byl založen počátkem roku 2009. Tento klaster vznikl s cílem pomáhat rozvoji oborů **medicinální chemie** a **chemické biologie** v České republice, a to jak v základním výzkumu, tak ve fázi přechodu ze základního výzkumu do technologického a komerčního uplatnění. Hlavním oborem činnosti jsou „malé“, syntetické molekuly, tedy látky, které mohou být použity pro humánní a veterinární medicínu a diagnostiku a také jako nástroje chemické biologie.

Klaster je unikátní z několika aspektů. Jedním z nich je velmi těsné propojení akademických pracovišť (členy klasteru jsou Univerzita Palackého v Olomouci, Ústav organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i. a Vysoká škola chemicko-technologická) s malými a středními podniky (Farmak, Quinta Analytica, BioTest, BioApex, BioPatterns, Circle Line Associates, Mendel Therapeutics, MD Pharma, AB Pharma, IntellMed, Scitech, Olchemim, Apigenex, Inventia, Mendel Therapeutics, STAR Czech, Life Sciences Capital), dodavatelskou sférou (Merck) a odbornými společnostmi (ČSCH, ČSBMB, Nadace pro výzkum rakoviny). Jednotlivé firmy a subjekty spolupracují na společných projektech, které využívají synergie zájmů a cílů. Klaster má nyní celkem 24 členů a je otevřen pro další subjekty, které o spolupráci na rozvoji uvedených oborů mají zájem.

Klaster obdržel na podzim roku 2009 podporu od agentury CzechInvest ve výši vyšší než 18 milionů korun, která je určena k podpoře čtyř konkrétních vědecko-výzkumných projektů v dané oblasti a také umožní základní fungování klasteru a jeho spolkovou činnost.

Prvním projektem je **Systém pro řízení projektů výzkumu a vývoje léčiv v režimech GMP GLP, GCP**. Cílem projektu je podpořit výzkumné, vývojové, výrobní a kontrolní aktivity členů klasteru v oblasti vývoje léčiv v „post-discovery fázi“. Členové, kteří se tohoto projektu účastní, vytvořili společnou jednotku – centrum pro systém řízení jakosti GMP/GLP, služby Regulatory Affairs a poradenství/řízení projektů v předklinické a rané klinické fázi. Součástí projektu je také vybavení a certifikace vzorových laboratoří UP, a především se jedná o techniky, které jsou v GMP/GLP režimech obtížně dostupné (NMR, XRD). Ostatní členové klasteru mohou (po dokončení tohoto projektu) za výhodných podmínek využívat jak poradenských služeb při zavádění systému jakosti, tak i řízení svých projektů, zpracování GMP dokumentace a poradenství pro předklinické a rané klinické fáze vývoje. Kromě toho budou moci využívat služby laboratoří certifikovaných v rámci projektu.

Druhým projektem je **Pracoviště pro molekulární diagnostiku**. Tento projekt je zaměřen na výzkumné aktivity některých členů klasteru při výzkumu a vývoji molekulárních diagnostik, a to především na bázi polymerázové řetězové reakce v reálném čase (Q-RT-PCR)

a v proteomických analýzách. Diagnostika využívající tyto metody nyní velmi razantně nastupují do rutinní diagnostické praxe v oblasti nádorových, infekčních a dalších onemocnění. Vedle toho se trh s diagnostikou stává zajímavou oblastí „biotech“ průmyslu i pro menší firmy, protože je regulačně výrazně jednodušší než oblast farmaceutik. Pracoviště vybudovaná v rámci tohoto projektu se zaměří na studium, výzkum a vývoj molekulárních diagnostik, zejména v oblasti nádorových onemocnění. Součástí projektu je zavedení příslušných metod počínaje přípravou vzorků a konče kvalitativním nebo kvantitativním vyhodnocením amplifikační reakce a hmotnostně spektrometrické analýzy technikou LC-MALDI.

Třetím hlavním projektem je **Pracoviště pro syntézu, izolaci a výrobu chemických sloučenin**. Projekt bude zaměřen na výzkum nových syntetických postupů pro přípravu a izolaci komerčně zajímavých chemických sloučenin a postupů umožňujících převod laboratorní syntézy do poloprovozního měřítka, a zároveň bude nabízet služby týkající se předpovídání vlastností látek a návrhem struktur vhodných pro požadované aplikace. V oblasti syntézy jde především o laboratorní přípravu nových produktů, které v sobě skrývají komerční potenciál, dále látek již na trhu existujících, u kterých je současný způsob přípravy komplikovaný, neekonomický či z hlediska regulačních nařízení silně omezující. Projekt zahrnuje také nabídku syntézy organických sloučenin ve čtvrt-provozním měřítku. To je jeden z klíčových problémů při rozvoji projektů nových molekul, které směřují do praktických aplikací a v současné době je pro řadu vědeckých institucí nebo malých firem prakticky neřešitelný z ekonomického a organizačního hlediska. Záměrem je také uvést do provozu moderní vybavení pro separaci látek z nejrůznějších směsí, jejich izolaci, identifikaci a stanovení zastoupení jednotlivých složek. Na projektu se budou podílet instituce, které mají dlouholeté zkušenosti v oblasti syntézy organických látek v laboratorním i provozním měřítku, jakož i v obchodní činnosti. Řešení projektu má za cíl poskytnout členům Klasteru kvalitní a cenově dostupné zázemí pro syntézu, izolaci a komercializaci organických sloučenin.

Posledním plánovaným projektem pro první období je **Elektronická terminologická databáze a systém zpracovávání překladů**. Během tří let vytvoří klaster specializovanou jazykovou databázi a zformuje skupinu odborných konzultantů. Vypracuje a zavede systém pro řízení efektivitu a kvalitu zpracovávané dokumentace (autor > manager > překladatel > korektor > konzultant/validátor > DTP). Databázi hodlá Klaster MedChemBio v různých formách uplatnit na trhu. Jednotliví členové klasteru budou moci databázi i softwarové vybavení využívat pro překlady vlastními silami i pro zadání závazné terminologie pro externě

zpracovávané překlady. Budou to překlady grantových aplikací, výrobní dokumentace, produktové dokumentace (data sheets), odborných článků a sdělení, webových stránek, reklamních materiálů a dalších odborných publikací vydávaných s podporou Klastru. Efektivně spolupracující validátoři, konzultanti a překladatelé využívající software specializovaný na správu terminologie a udržení konzistentnosti překladu docílí nesrovnatelně vyšší kvality překladů oproti překladům zpracovávaným běžným způsobem.

Strategie klastru podporuje celé odvětví, které v České republice nemá nyní společnou platformu pro kontakty a spolupráci. Strategicky se klastř snaží vybudovat strukturu, která by nabízela kontinuální podporu jak členům klastru, tak i novým subjektům a celkově by

umožnila nový rozvoj dané vědecko-technické oblasti a v regionu.

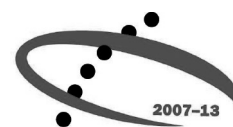
MedChemBio bude především pomáhat začínajícím firmám v daném oboru v úspěšném rozvoji jejich projektů. Díky soustředění jak přístrojového vybavení, tak lidského potenciálu je možné provádět výzkum daleko efektivněji, než v izolovaných laboratořích. Důležitou součástí práce klastru bude výměna informací a propagace oboru v České republice.

Více informací o klastru MedChemBio naleznete na www.medchembio.cz

Doc. Ing. Martin Fusek, CSc.
Ředitel klastru



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace

CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM

ul. Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, tel.: +420 585 634 970 – 71

TISKOVÁ ZPRÁVA PŘF UP OLOMOUC

8. dubna 2010

Centrum regionu Haná – budoucnost zemědělství a pěstitelství v regionu

OLOMOUC – Obnova tradice a dobrého jména šlechtitelství a zemědělství, které bylo po staletí na střední Moravě zdrojem bohatství a obživy. To je klíčový cíl, který si vytkl tým projektu Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Za poměrně složitým názvem se skrývá řada aktivit připravovaných Přírodovědeckou fakultou UP a jejími partnery, které do Olomouce v nejbližších letech přinesou špičkové technologie v nových výzkumných provozech, desítky vysoce kvalifikovaných míst či úzké propojení vědy a výzkumu s praxí.

„Vznik centra přinese do tohoto odvětví zcela nové metody a postupy, zejména v oblasti molekulární genetiky a biotechnologie. Soustředíme zde nejlepší vědecké kapacity z regionu v tomto oboru,“ řekl koordinátor projektu a proděkan PŘF UP Ivo Frébort. Podle něj tak budou mít absolventi řady oborů na PŘF velkou motivaci pro to, aby mohli pracovat doma, a nemuseli za špičkovým výzkumem do zahraničí.

Výsledky výzkumu jsou aplikovatelné například při vývoji moderních metodik šlechtění a nových odrůd plodin (s vyššími výnosy, odolností vůči vlivům počasí a škůdcům a šetrnější k životnímu prostředí), získávání nových zdrojů surovin pro potravinářský

a farmaceutický průmysl, zlepšení kvality potravin a jejich kontroly apod.

Projekt, který odstartoval před několika týdny, sdružuje pět výzkumných programů – od práce se zkumavkami po pěstování rostlin na polích a ve sklenících. Univerzitní areál v ulici Šlechtitelů se rozroste o čtyři nové budovy se špičkovým vybavením či nové plochy a skleníky pro pěstitelství. Na realizaci projektu se budou podílet kromě UP také Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR a Výzkumný ústav rostlinné výroby.

Projekt je financován z evropského Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace s příspěvkem českého státu. Příspěvek EU činí 708 997 497 korun, příspěvek státu 124 940 734 korun. Projekt je také součástí integrovaného plánu rozvoje města „Atraktivní a konkurenceschopná Olomouc“.

Více informací najdete na www.cr-hana.eu.

Pavel Vysloužil, mluvčí PŘF – tel. 777 071 170

Bližší informace:

Ivo Frébort – koordinátor projektu – 585 634 970

SOUČASNÁ A BUDOUCÍ GENERACE KARDIÁLNÍCH MARKERŮ A JEJICH STANOVENÍ POMOCÍ TECHNOLOGIE PROTEINOVÝCH BIOČIPŮ

Dita Šetinová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

V současné době spadá velká část úmrtí v dospělé populaci na vrub srdečně cévním onemocněním. Stěžejním představitelem této skupiny onemocnění je akutní infarkt myokardu (AIM). Biochemické indikátory detekující vedle AIM i ischemické poškození myokardu, srdeční nekrotické změny a hemodynamická poškození srdce jsou souhrnně řazeny pod pojem kardiální markery. Do této skupiny patří nejen molekuly lokalizované přirozeně v srdeční tkáni (v kardiomyocytech, srdečních cévách, intersticiu), ale i běžně orgánově se vyskytující komponenty či specifické produkty jako následky patologického procesu. Cílem stanovení kardiálních markerů je vedle detekce koronárního onemocnění také zjištění prognostického výhledu na průběh nemoci a predikce rizika vzniku srdečních onemocnění u pacienta. Škála kardiálních markerů se neustále rozšiřuje. Předmětem výzkumu jsou především takové, které disponují vysokou specifitou a senzitivitou a též markery spadající do skupiny časných ukazatelů AIM. Mezi nyní rutinně vyšetřované markery v klinické praxi patří kreatinkinasa, myoglobin a srdeční troponiny. Dříve byly hojně využívané testy aspartátaminotransferasy a laktátdehydrogenasy. Do skupiny hlavních představitelů budoucí generace kardiálních markerů, zatím většinou pouze ve výzkumných laboratořích, patří srdeční protein vázající mastné kyseliny h-FABP a isoenzym glykogenfosforylasy GPBB^{1, 2, 3}.

Soudobé diagnosticky využívané kardiomarkery

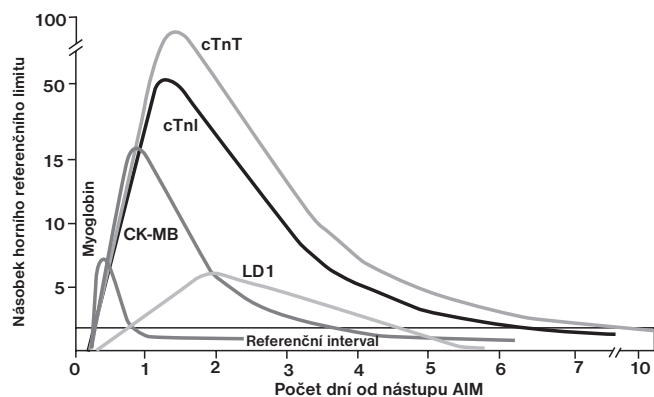
Myoglobin je nízkomolekulární protein tvořený jedním polypeptidem obsahující hemovou strukturu. Tkáňově se vyskytuje především v kosterních svalích. Stejně formy hemoproteinu lze v menší míře nalézt i v srdečním a hladkém svalstvu. Lokalizován je v cytoplasmě. Jeho hlavní funkci plní koordinačně kovalentní vazba molekuly kyslíku v buňce. Při AIM je myoglobin rychle uvolňován z poškozených buněk do krevního oběhu (již po 1 – 2 hodinách). Maxima koncentrace dosahuje po 6 – 7 hodinách a do jednoho dne po koronární příhodě se hodnoty vrací k normálu. Diagnosticky tak splňuje funkci časného markeru pro AIM. Je řazen mezi faktory predikce AIM, pokud se jeho hodnota nezvýší do deseti hodin po pacientově subjektivních příznacích AIM, lze toto s vysokou pravděpodobností vyloučit. Nevýhodou myoglobinu je jeho nespecifičnost. Příčiny jeho zvýšených hodnot v krvi lze hledat i v porušení buněk

kosterní svaloviny nebo zhoršeném vylučování při renálních insuficiencích. Pro tyto nedostatky se dnes v klinické praxi od stanovování myoglobinu jako kardiálního markeru pomalu upouští^{2, 3}.

Enzym **kreatinkinasa** (EC 2.7.3.2, CK) spadá do třídy transferáz a katalyzuje přenos fosfátové skupiny mezi kreatinem a kreatinfosfátem, kde donorem fosfátu je ATP. Reakce je vratná, závisí na momentální hotovosti makroergické molekuly kreatinfosfátu ve svalích. Má orgánově nízkou specifitu. Majoritně se vyskytuje v buňkách kosterních svalů, méně v srdečním a hladkém svalstvu, nervové soustavě, ledvinách. Lokalizace v buňce je v cytosolu nebo v mitochondriích. Cytosolová forma enzymu lze rozlišit na tři isoenzymy – CK-BB, CK-MB a CK-MM – podle kombinace dvou podjednotek B (brain) a M (muscle). Na pozici časného kardiálního markeru AIM se isoforma kreatinkinasy CK-MB drží již téměř půl století. Její hladina stoupá již 5 – 7 hodin po srdeční příhodě, maxima dosahuje zhruba po jednom dni a ve vyšší koncentraci přetrvává ještě 3 – 6 dní. Příčinou zvýšení vedle srdečních onemocnění mohou být postižení kosterních svalů. Progresivní nemoci jako jsou svalové dystrofie, mechanická poškození svalu (úrazy, operační zákroky) či toxická poškození (ischemie). Dle řádové hodnoty nárůstu hladiny kreatinkinasy CK-MB oproti normálu lze předběžně určit typ svalového poškození, při AIM se zvýší cca 25krát, při poškození kosterních svalů až 1000krát. Pro zpřesnění diagnózy a zvýšení specifity se využívá výpočtu poměru kreatinkinasy CK-MB ku celkové hodnotě kreatinkinasy (všech jejích isoform). CK-MB má ceněnou hodnotu i jako prognostický faktor. Podle doby, kdy dosáhla její koncentrace maxima, je možné usuzovat na míru snížení průtoku krve postiženým místem⁴.

První volbou při podezření na koronární syndrom je, ve srovnání s v současné době stanovovanými kardiálními markery myoglobinem a kreatinkinasou, stanovení srdečních **troponinů**. Vděčí za to své kardiospecifitě. Troponiny jsou malé nízkomolekulární proteiny, které se formou troponinového komplexu podílejí velkou měrou na kontrakci svalových vláken. Jsou známy tři typy – T, I a C. Troponin T propojuje troponinový komplex s dvěma molekulami tropomyosinu. U zdravého dospělého člověka se vyskytuje pouze v srdeční isoformě (cTnT) a je díky této absolutní orgánové specifitě hojně využíván jako kardiální mar-

ker. Za normálních okolností je hladina troponinů v krvi téměř nedetekovatelná. Při AIM se nárůst koncentrace cTnT projeví již po 3 – 4 hodinách, maxima dosáhne po 1 – 2 dnech a do normálu se vrací až po 2 týdnech. Slouží tedy zároveň jako časný i pozdní marker AIM. Troponin I zabraňuje v nepřítomnosti vápenatých iontů kontrakci svalu zamezením vazebného spojení mezi aktinem a myosinem. Odlišují se dvě kosterní svalové isoformy a jedna srdeční (cTnI). Koncentrační křivka v čase má podobný charakter jako u cTnT s tím rozdílem, že se rychleji navrácí k normálu. Fysiologické hodnoty lze naměřit opět do jednoho týdne od prvotních kardiálních symptomů. U obou typů troponinů je možné pravidelným měřením sledovat prognostiku AIM. Pouze lehce zvýšené hodnoty poukazují na nestabilní anginu pectoris. V klinické praxi se stanovují běžně oba typy troponinů, z hlediska lepší standardizace je doporučováno stanovování cTnT. Na troponinu C se nacházejí vazebná místa pro vápník, jenž je nutný pro aktivaci svalové kontrakce. Jeho kosterní i srdeční isoforma jsou totožné a proto nevhodné pro kardiální diagnostiku^{5, 8}.



Obr. 1: Koncentrační křivky vybraných kardiálních markerů v závislosti na čase
(zdroj: <http://okbh.centromed.cz/metody/Troponin.htm>)

Kardiomarkery blízké budoucnosti

Srdeční forma **proteinu vázajícího v buňce mastné kyseliny** (fatty acid binding protein, h-FABP) patří mezi nízkomolekulární cytoplasmatické proteiny, kde plní transportní funkci pro mastné kyseliny s dlouhým řetězcem mezi buněčnou membránou a mitochondriemi. Vyskytuje se především v tkáních s vyšší nutností oxidace mastných kyselin s poločasem 2 – 3 dny. Při srdečním poškození se uvolňuje do krevního oběhu velmi rychle a slouží proto jako časný marker AIM. S výhodou ho lze využít i jako marker anginy pectoris a prognostický ukazatel u AIM. h-FABP disponuje velmi podobnou křivkou závislosti rychlosti uvolňování z buňky na čase jako myoglobin. Maximální koncentrace po AIM dosahuje po 6 – 8 hodinách a k normálu se vrací do 24 – 30 hodin. Oproti myoglobinu se v kardiomyocytech a následně po jejich poškození i v krvi vyskytuje ve větších koncentracích a má také mnohem vyšší specifitu. Ačkoli je stejně orgánově

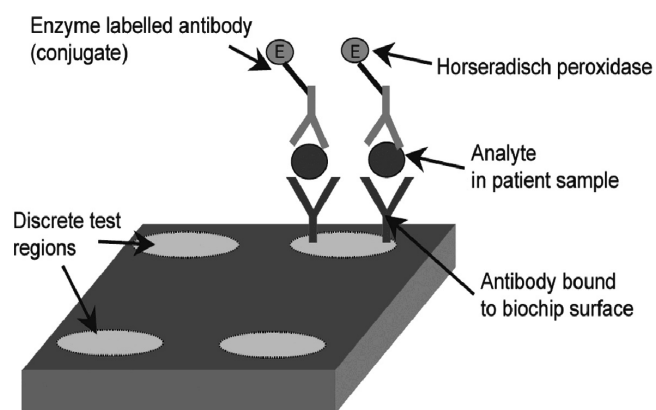
nespecifický jako myoglobin, jeho zastoupení v kosterních svaích je výrazně nižší. Tyto aspekty činí z h-FABP diagnosticky výhodnější časný marker. K odlišení poškození srdce od poškození svalového se užívá výpočet poměru myoglobin/ h-FABP⁶.

Enzym **glykogenfosforylase** se v lidském organismu vyskytuje ve třech isoformách – MM (muscle), LL (liver) a BB. Isoenzym BB je lokalizován především v mozku a myokardu (EC 2.4.1.1, GPBB). Podílí se na glykogenolytické dráze cukrů. Fysiologicky je vázán v komplexu s glykogenem na endoplasmatické retikulum. Při ischemických stavech se ve zvýšené míře uvolňuje do cytosolu a odtud do krevního oběhu. Hladina GPBB stoupá po 2 – 4 hodinách, maxima dosahuje za 6 – 20 hodin a normální hodnoty se objeví po 1 – 2 dnech. Možné uplatnění má jako velmi časný marker AIM^{2, 8}.

Pro úplnost jsou krátce zmíněny i některé další z mnoha dalších možných budoucích rutinně využívaných markerů. Na jiném principu než bylo dosud uvedeno lze využít charakteristik Karboanhydrasy III. Tento protein se vyskytuje pouze v kosterním svalstvu a nikoli v myokardu. Společným stanovením a porovnáním s hladinou myoglobinu se zvyšuje specifita a senzitivita. Pro cílené snížení tělního objemu krve při stavech zvýšeného napětí srdečního svalu se uvolňuje více tkáňového hormonu B-natriuretického peptidu, který stimuluje zvýšení vylučování sodných iontů a vody z organismu. Při destabilizaci aterosklerotického plátu dochází k aktivaci fosfolipasy D, která katalyzuje rozpad fosfolipidů v buněčné membráně. Produktem reakce je další možný marker – cholin. V posledních několika letech se studie kardiomarkerů dále věnují ischemicky modifikovanému albuminu, zánětlivým markerům (C-reaktivní protein), placentárnímu růstovému faktoru, CD40 ligandu a mnoha dalším^{7, 8}.

Stanovení kardiálních markerů pomocí biočipové technologie

Využití technologie proteinových biočipů oproti technikám klasické imunochemie přináší mnoho výhod. Primárně je to možnost stanovit simultánně více analytů z jediného vzorku. Pro diagnostiku koronárních



Obr. 2: Princip imunochemického stanovení na biočipech
(zdroj: Evidence investigator operation manual, Randox company)

onemocnění je důležitý komplexní pohled s využitím porovnání více vstupních hodnot – kardiomarkerů. Nespornou výhodou je kratší doba analýzy a nižší spotřeba analytů i reagentů. Základní princip tvoří nekompetitivní enzymová imunoanalýza. Protilátky proti zkoumaným analytům jsou imobilizovány na definovaných pozicích biočipu. Po imunospesifické vazbě analytu ve vzorku krevního séra na protilátku je přidána sekundární enzymově značená protilátka vázající se na analyt (s navázanou křenovou peroxidasou). Po opětovném promytí je přidán substrát (peroxid vodíku a luminol). Na chemiluminiscenčním principu dochází k enzymové reakci za vzniku barevného produktu. Vyzářená lumi-

niscence je kvantitativně snímána z jednotlivých pozic na biočipu pomocí CCD kamer. Příslušný vyhodnocovací program vykalkuluje hledané koncentrace analytů ve vzorku^{9,10}.

Pro správnou diagnostiku srdečních onemocnění se ukázal jako důležitý aspekt komplexnější pohled při vyhodnocování biochemických markerů, tzv. multimarke-rová strategie. Využití technologie proteinových biočipů s touto ideou koresponduje. Stále probíhají výzkumy s cílem nalezení dalších kardiomarkerů, pokud možno s co nejvyšší specifitou a senzitivitou. A dále také disponující vysokou prognostickou a predikční hodnotou.

Literatura:

1. Tichý M, Friedecký B, Palička V, et al.: *Vojenské zdravotnické listy* 73(4), 124 (2004).
2. Schneiderka P: *Klin. Biochem. Metab.* 14(35), 161 (2006).
3. Biomarkers of acute coronary syndrome and heart failure 2004 ([www: http://www.nacb.org](http://www.nacb.org))
4. Shell WE, Kjekshus JK, Sobel BE: *J. Clin. Invest.*, 50, 2614 (1971).
5. Tucker JF, Collins RA, Anderson AJ, et al.: *Acad. Emerg. Med.* 4, 13 (1997).
6. Pelsers MM, Hermes WT, Blaty JFC: *Clin. Chem. Acta*, 352, 15 (2005).
7. Apple F, Wu A, Mair J: *Clin. Chem.*, 51, 810 (2005).
8. Pudil R, Tichý M, Vojáček J: *Interv. Akut. Kardiol.* 6, 20 (2007).
9. Ulrychová M, Horáková L, Tichý M, et al.: *Klin. Biochem. Metab.* 16(37), 248 (2008).
10. Ulrychová M, Tichý M, Horáček JM, et al.: *Bulletin FONS* 2 (2009).

Souhrn

Šetinová D.: Současná a budoucí generace kardiálních markerů a jejich stanovení pomocí technologie proteinových biočipů

Článek podává obecný přehled biomarkerů využívaných k průkazu akutního srdečního onemocnění a selhání srdce zahrnujících infarkt myokardu, ischemii a myokardiální nekrózu. První část se zabývá v rutinní praxi obecně užívanými kardiálními markery jako jsou myoglobin, kreatinkinasa a oba typy troponinů T a I. Následující text je věnován popisu a charakteristikám markerů potenciálně využitelných během blízké budoucnosti v klinické praxi. Velmi diskutovanými předměty kardiálního výzkumu jsou protein vázající mastné kyseliny a isoenzym BB glykogenfosforylasy. V závěrečné části je představena inovovaná technologie imunochemického stanovení kardiálních markerů pomocí proteinových biočipů.

Klíčová slova: kardiální markery, proteinové biočipy, myoglobin, kreatinkinasa, troponiny, akutní infarkt myokardu

Summary

Šetinová D.: Simultaneous and incoming generation of cardiac markers and its determination with utilization of protein biochips

The article offers global overview of biomarkers used to disproving of acute coronary disease and heart failure involving myocardial infarction, ischemia and myocardial necrosis. Part one deals with commonly used cardiac markers in routine practice like myoglobin, creatinkinase and both troponins T and I. Following text is dedicated to specification and characteristics of biomarkers with potential utility in clinical practice in near future. These objects of cardiac research are lot discussed: fatty acid binding protein and glycogen phosphorylase isoenzyme BB. Last part introduces innovated technology for immunochemical determination of cardiac markers by protein biochips.

Key words: cardiac markers, protein biochips, myoglobin, creatinkinase, troponins, glycogen phosphorylase, acute myocardial infarction

BUDEME SI MOCI PROHLÉDNOUT TVAR BÍLKOVIN PŘÍMO V BUŇCE?

Lukáš Krásný

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Drtivá většina pokusů studujících trojrozměrnou strukturu, strukturní změny, dynamiku nebo interakce proteinů je prováděna *in vitro*. Důvodem jsou požadavky na vysokou čistotu vzorku, ať už v případě Roentgenové krystalografie nebo elektronové mikroskopie. Tento fakt však vede k výsledkům, které nemusejí zcela odpovídat realitě v buňce. Během purifikace může například docházet k denaturaci proteinu, podmínky *in vitro* se zcela jistě liší od těch *in vivo*, proto je velmi žádoucí studovat proteiny v jejich přirozeném prostředí. Jediná metoda, která nám v této chvíli nabízí možnost měřit vzorek ve složitějších směsích nebo dokonce přímo v buňce, je nukleární magnetická rezonance. Tato metoda těží ze své schopnosti změřit NMR-aktivní jádra na pozadí jader NMR-inaktivních.¹

Do začátku tohoto tisíciletí bylo možné přímo v buňce sledovat pouze distribuci proteinů s využitím fluorescenčních značek. V roce 2001 však Z. Serber a V. Dötsch^{2,3} uveřejnili první práce využívající metodu NMR k určení konformačních stavů biomakromolekul uvnitř buňky. Zavedení této metody tak otevřelo široké pole pro možnosti dalšího bádání ať už v oblasti biochemie, molekulární biologie či medicíny.

Princip metody a její aplikace

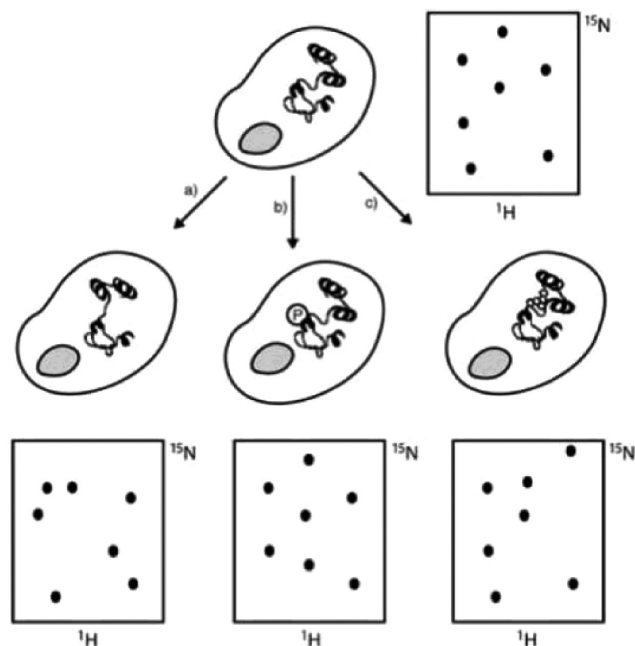
V současné době se pro určení struktury menších bílkovinných molekul nukleární magnetická rezonance zcela běžně používá.

Metoda in-cell NMR však obvykle není schopna určit přímo strukturu molekuly v buňce. Dvojdimenzionální spektra změřená *in vivo* je však možné porovnat se spektry měřenými *in vitro*. Konfirmací spekter jsme poté schopni zjistit, zda se struktura proteinu uvnitř buňky shoduje se strukturou změřenou *in vitro*, nebo zda dochází k nějakým změnám. Tyto změny, například posttranslační modifikace, změna konformace nebo vazba ligandu, se ve spektrech projevují jinou rezonanční frekvencí jádra atomu, tedy jiným chemickým posunem (viz obr. 1).

Pro úspěšné zavedení metody in-cell NMR bylo třeba vyřešit několik zásadních problémů.

První z nich je obsažen ve vlastním principu metody. Jak bylo již výše zmíněno, metoda NMR měří pouze jádra, která jsou pro ni aktivní (jejich spinové kvantové číslo je nenulové). Většina jader v buňce (vyjma ^1H) jsou však NMR-inaktivní (např. ^{12}C , ^{14}N atd.). Řešením je používání NMR-aktivních izotopů (^{15}N , ^{13}C) pro výživu buněk, ve kterých má být protein studován. Nejčastěji jsou využívány izotopově značené metabolické prekursorů (^{15}N -chlorid amonný a ^{13}C -glukosa).

Pro vlastní experiment se pak užívá dvojdimenzionální měření dvou spřažených jader, obvykle ^1H a ^{15}N , případně ^1H a ^{13}C , která se v běžném prostředí vyskytují jen ve velmi malém zastoupení, a proto nijak významně nezkreslují naměřená data.¹



Obr. 1: Změny chemického posunu odpovídají změnám chemického prostředí jader studované molekuly. Mohou být způsobeny například a) změnou konformace proteinu b) posttranslační modifikací c) vazbou ligandu, substrátu (schema převzato z práce S. Reckel – 2005)

Aby bylo možné objekt našeho zájmu studovat v přítomnosti mnoha dalších buněčných proteinů, je zapotřebí jej vyprodukovat v dostatečném množství. K tomuto účelu je využívána nadprodukce proteinu (overexprese). Obvyklý postup využívá vnesení genu pro studovaný protein do buňky, přičemž gen je řízený velice silným (často virovým) promotorem. Buňka tedy exprimuje téměř výhradně tento gen a ve výsledku je doslova „napěchována“ proteinem našeho zájmu. Tím je potlačeno pozadí ostatních buněčných proteinů. Ideálním postupem je vnesení genu do buňky pěstované na normálním mediu následované převedením buňky do media s izotopy ^{15}N , ^{13}C . Ty jsou pak inkorporovány převážně do struktury požadovaného proteinu, takže je buňka „napěchována“ požadovaným izotopově značeným proteinem, přičemž ostatní proteiny v buňce značeny nejsou.

In-cell NMR lze s úspěchem aplikovat jak v prokaryotních, tak v eukaryotních buňkách. První studie použití a možnosti této techniky proběhly již tro-

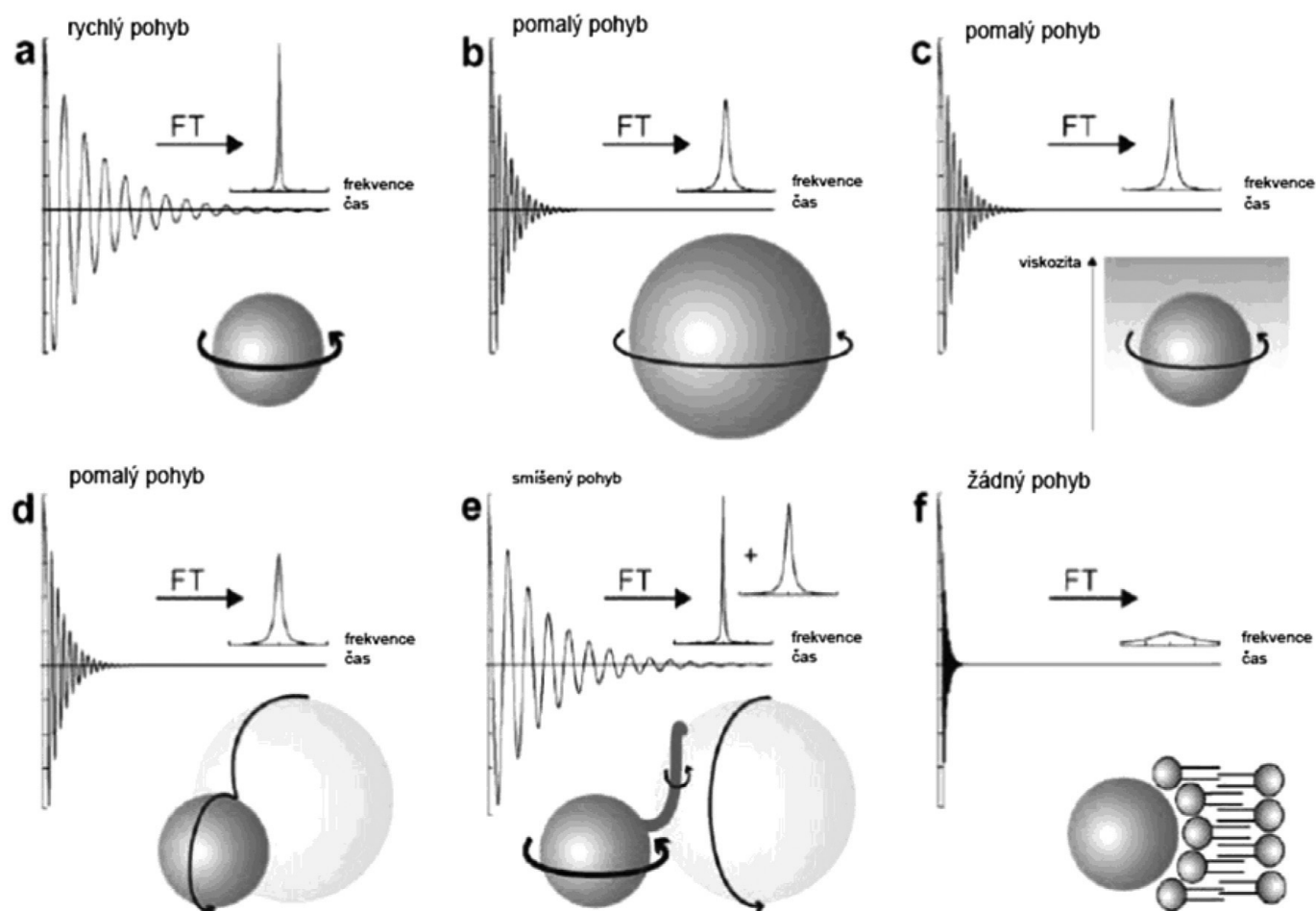
chu tradičně v *E. coli* a v tomto modelovém organismu je i nadále prováděna drtivá většina pokusů. Dalšími použitými systémy byly například oocyty *Xenopus laevis*^{1,4} nebo buňky kvasinek.

Možné komplikace a limity metody

Nejvýznamnějším limitujícím parametrem je citlivost. Stejně jako Rentgenová krystalografie nebo elektronová mikroskopie i tato metoda vyžaduje vysoké koncentrace studovaného analytu. Bylo proto nutné hledat pomoc v genovém inženýrství, které nabízí možnost vnesení genu se silnými promotory (viz výše), které zajišťují dostatečně velkou produkci proteinu, jež je k provedení samotného měření vyžadována. Tento způsob je však vhodný pouze pro studium proteinů v prokaryotech. Pro studium v eukaryotních organismech je isotopově značený protein nejdříve výše popsaným způsobem vyprodukován v prokaryotních buňkách a následně je, po purifikaci z lyzátu, přenesen do buňky eukaryotní. K aplikaci se používá například mikroinjekce.⁵

Druhým z problémů je vysoká viskozita uvnitř buňky. Viskozita je jedním z hlavních parametrů, který ovliv-

ňuje pohyb molekuly. Vyšší viskozita prostředí uvnitř buňky snižuje schopnost molekuly volně rotovat, „vrtět se“, což se ve spektrech projevuje širokými píky, které se mohou vzájemně překrývat. Výsledkem jsou špatně čitelná, nekvalitní spektra (viz obr. 2). Velmi často se v těchto případech používá methylových značek, které až třikrát zvyšují citlivost⁶. Zajistě k možnostem pohybu svou měrou přispívá i velikost studované molekuly. Čím větší molekula, tím méně je ochotna se pohybovat a tím širší jsou naměřené píky. Proteiny nad 100 kD jsou proto měřitelné již velmi obtížně. Takto velké molekuly jsou obvykle rozděleny na domény, které jsou studovány zvlášť, případně se do primárního řetězce zavádí řízená mutace, která buď znemožní některé funkční aktivity (například sbalení části molekuly), nebo slouží jako rozlišovací prvek od ostatních buněčných proteinů.¹ V posledních letech se také využívá techniky TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy), která značně zvýšila citlivost i rozlišení NMR, a tím rozšířila možnosti studia velkých biomakromolekul a jejich komplexů.⁷



Obr. 2: a) Malé molekuly vykazují rychlý rotační pohyb – „vrtění“, tím dochází k pomalému zániku NMR signálu. Po Fourierově transformaci (FT) tak získáváme úzké a ostré píky. b) Velké molekuly se pohybují pomaleji, signál pro NMR proto zaniká mnohem rychleji a výsledné píky po transformaci jsou proto širší. c) Zvýšení viskozity prostředí se projeví pomalejší rotací molekuly a tedy i méně kvalitním spektrem. d) Interakce s většími molekulami vede ke snížení rotačního pohybu. Ten odpovídá rotaci celého komplexu. e) Interakce s jinými molekulami mohou také vést ke spojení rotačních pohybů. Výsledkem jsou pak různé stupně rozšíření píků. f) Interakce s nepohyblivými strukturami (např. membránami) může znemožnit jakýkoliv rotační pohyb, NMR spektrum je pak prakticky neměřitelné (převzato z práce P. Selenka – 2007).

Přežití buněk při měření spekter je jedním z klíčových bodů metody NMR. Při dostatečné úrovni exprese proteinu lze potřebná spektra získat během jedné hodiny měření. Pokud je ale produkce proteinu nízká nebo jsou studovány například vazby „protein – ligand“ a jejich relaxace, doba měření se významným způsobem prodlužuje. Je proto nutné zajistit buňce dostatečný přísun živin i během jejího pobytu v kyvetě. Řešením jsou speciální kyvety, které umožňují výměnu živního média v průběhu měření. Kontinuální výměna živin s sebou však nese komplikace v podobě zachycení buněk v měřicím prostoru, odkud by byly jinak odplaveny. Velmi vhodnou technikou se zde ukazuje zachycení buněk v agarosovém gelu, ve kterém jsou buňky, ať už prokaryotní či eukaryotní, schopny přežít velmi dlouhou dobu. Enkapsulace do gelu navíc řeší problém sedimentace buněk. Bylo ověřeno, že agarosový gel poskytuje dostatečnou magnetickou homogenitu, změřená spektra tedy nejsou použitím gelu nijak ovlivněna.⁷

Výzvy pro budoucnost

Alfou a omegou nukleární magnetické rezonance je stále její citlivost. Z toho důvodu je potřeba exprimovat studovaný protein v dostatečném množství pro měření, ovšem v nadbytečném množství vzhledem k normálním podmínkám. Za normálního stavu je koncentrace proteinu uvnitř buňky o jeden až dva řády nižší. Pro dosažení takové citlivosti však bude potřeba ještě mnoho zásadních vylepšení metody in-cell NMR. Jedním z nich je například používání kyslíkové sondy, která již v dnešní době značně rozšířila spektrum NMR-možností. Dostatečnou sensitivitu však zatím stále ještě neposkytuje.

Druhou a mnohem významnější výzvou však bude odclonění signálů ostatních proteinů v buňce. Prozatím je tato překážka paradoxně vyřešena právě citlivostí

metody. Studovaný protein je nutno exprimovat na určitou hladinu, která je měřitelná, což znamená, že vše ostatní pod touto hranicí je naopak neměřitelné a projevuje se pouze jako pozadí. Ovšem ve chvíli, kdy bude dosaženo dostatečné citlivosti, která umožní studium proteinu při jeho fyziologických koncentracích, bude otázka pozadí ostatních proteinů zcela zásadní. Již v této chvíli se nabízejí některé postupy, jak tuto překážku překonat. Jedním z nich je potlačení exprese ostatních proteinů pomocí rifampicinu nebo mRNA-interferasy. Rifampicin v buňce inhibuje RNA-polymerasu, čímž zabraňuje jakékoliv expresi genu. Jedinou výjimkou jsou plasmidy pod kontrolou virového promotoru z bakteriofága T7⁸. Interferasa blokuje translaci rozštěpením každé mRNA, která obsahuje sekvenci ACA⁹.

Jiným způsobem, jak obejít interference pozadí, je inkorporace specificky značených aminokyselin do struktury studovaného proteinu. Nevýhodou však je neobvyklost těchto struktur, které mohou způsobit například špatné sbalení proteinu.¹⁰

V každém případě nám metoda in-cell NMR už v této chvíli nabízí široké pole nezorané badatelské půdy. Nedávným velkým úspěchem této metody bylo zjištění struktury proteinu výhradně na základě měření v živých buňkách. Jednalo se o protein TTHA1718 vázající těžké kovy z organismu *Thermus thermophilus* HB8.¹¹

Očekává se, že se v blízké době rozšíří její využití v eukaryotech ke studiu posttranslačních modifikací *in situ*. Velké naděje jsou vkládány i do studia tzv. vnitřně neuspořádaných proteinů (IDP – intrinsically disordered protein)¹². Tyto proteiny se *in vitro* vyznačují značným množstvím neuspořádaných struktur. Je však tato neuspořádanost způsobena procesem purifikace nebo se takto vyskytují i v buňce? In-cell NMR nám snad poskytne dostatečné množství odpovědí.

Literatura:

1. Selenko P, Wagner G: *J. Structur. Biol.* 158, 244 (2007).
2. Serber Z, Keatinge-Clay AT, Ledwidge R, et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2446 (2001).
3. Serber Z, Dötsch V: *Biochemistry* 40, 48 (2001).
4. Sakai T, Tochio H, Tenno T: *J. Biomol. NMR* 36, 179 (2006).
5. Reckel S, Löhr F, Dötsch V: *ChemBioChem* 6, 1601 (2005).
6. Serber Z, Straub W, Corsini L: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 7119 (2004).
7. McElroy C, Manfredi A, Wendt A, et al.: *J. Mol. Biol.* 323, 463 (2002).
8. Campbell EC, Korzheva N, Mustaev A: *Cell* 104, 901 (2001).
9. Zhang Y, Zhu L, Zhang J: *J. Biol. Chem.* 280, 26080 (2005).
10. Chin JW, Cropp TA, Anderson JC: *Science* 301, 964 (2003).
11. Sakakibara D, Sasaki A, Ikeya T: *Nature* 458, 102 (2009).
12. Garza AS, Ahmad N, Kumar R: *Life Sciences* 84, 189 (2009).

Souhrn

Krásný L.: Budeme si moci prohlédnout tvar bílkovin přímo v buňce?

Většina pokusů studujících strukturu či dynamiku biomakromolekul je prováděna *in vitro* z důvodu vysokých požadavků na čistotu a koncentraci vzorku. Metoda in-cell NMR ve spojení se izotopovým značením a molekulární genetikou nabízí nástroj, jak studovat biomakromolekuly v jejich přirozeném prostředí – v buňce. Jsme tak schopni získat informace o posttranslačních modifikacích, o fyziologických či patologických konformacích proteinu na atomární úrovni, nebo o dynamice vazby ligandů. Otevírá se tak značné množství nových badatelských oblastí pro molekulární biologii, biochemii či medicínu a farmakologii.

Klíčová slova: in-cell NMR, struktura proteinu, *in vivo* techniky, izotopové značení

Summary

Krásný L.: Would be possible to see protein shape directly in the cell?

Most experiments studying the structure and dynamics of biomacromolecules are performed *in vitro* because of high requirements for purity and concentration. In-cell NMR in connection to isotope labeling and molecular genetics offers a great tool for study of biomacromolecules in their natural environment – in the cell. Thus, we are able to obtain informations about post-translational modifications, about physiological or pathological conformations of protein, or dynamic binding of the ligands, all at the atomic level. Large number of new area is opened for molecular biology, biochemistry, medicine and pharmacology research.

Keywords: in-cell NMR, protein structure, *in vivo* techniques, isotope labeling

TRANSGENNÍ RYBY JAKO POTRAVINY I ZÁBAVA

Markéta Jančíková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

Transgenní ryby se velmi pravděpodobně stanou součástí naší budoucnosti. Jsou možným řešením potíží s rybolovem, devastací vodních ekosystémů, představují levný a kvalitní zdroj potravy, mohou ale být i neobvyklou dekorací do bytu. Je opravdu možné, aby tito sta miliony let staří obratlovci splnili všechna naše očekávání?

Existují různé metody pro vnášení genů do genomů ryb: mikroinjekce, elektroporace, retrovirové vektory atd. Na rozdíl od vyšších obratlovců mají ryby pro genetické inženýry několik velkých výhod. Jikry jsou relativně velké, jsou přirozeně produkovány ve velkých množstvích a oplodnění probíhá vně organismu. Manipulace s nimi je tedy podstatně snazší. Vzniklá embrya jsou navíc většinou průhledná a lze je snadno pozorovat během celého vývoje.⁴

Chov ryb jako způsob obživy se datuje již od 12. století.⁴ Pro komerční chov byly vždy vybírány ryby s vlastnostmi jako je rychlý růst, odolnost vůči nemocem a nenáročnost. Biotechnologie umožňují tyto vlastnosti přivést na vyšší úroveň vložením nových genů do genomů známých druhů ryb. Nejčastěji se jedná o kapra obecného (*Cyprinus carpio*), piskoře pruhovaného (*Misgurnus anguillicaudatus*), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), lososa obecného (*Salmo salar*) a tilapii nilskou (*Oreochromis niloticus*). Cílem je hlavně zrychlení růstu a zvýšení odolnosti vůči nemocem nebo rezistence vůči nízké teplotě.⁵

Vkládané geny

Při vkládání genu do organismu nezáleží pouze na informaci, kterou gen nese. Velmi důležitý je také promotor s genem spojený. Ten určuje kdy a v jaké intenzitě bude daný gen exprimován, tedy jak moc se

v organismu projeví. První úspěšné vnesení bylo provedeno s genem lidského růstového hormonu navázaného na promotor myšího metalothioneinu. Po tomto úspěchu nastal jakýsi boom transgenních ryb.⁴

Gen pro růstový hormon zůstal genem vnášeným nejčastěji. Posun ale nastal ve výběru promotorů a genů. Jejich původ již nebývá tak „exotický“. Daleko častěji pocházejí pouze z jiného druhu ryby nebo dokonce jde o gen v organismu původní pouze se zesílenou expresí.¹ U takovýchto genů je větší pravděpodobnost jejich správné funkce v organismu, ale také daleko méně etických protestů. Promotor mohl v myši zajišťovat vysokou expresi genu, ale u ryb bude jen velmi slabý. Tuto nejistotu lze zmenšit použitím promotoru, který pochází z ryb. Těmito postupy se genetické inženýrství de facto přibližuje pouhému vylepšenému šlechtění. Nespolehá se však na náhodný přenos žádoucích genů mezi jedinci, ale zprostředkovává ho samo.

Například obří transgenní piskoř vznikl pouhým připojením jeho genu růstového hormonu k promotoru aktinu, který mu zajistil silnější expresi. Nové ryby tedy vlastně neobsahují cizí geny, pouze je mají na rozdíl od původních piskořů jinak poskládané.⁶ A už zde vyvstává několik otázek. Jde stále o transgenní rybu? Měl by být její chov kontrolován? Platí pro ni zákony o geneticky modifikovaných organismech?

Zvyšování velikosti ryb patří k největším úspěchům genového inženýrství. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u lososa a tilapie. Lososi s vloženým genem byli desetkrát větší než kontrolní ryby. Velikost tilapií se zvýšila dvakrát až třikrát. (Obr. 1.) Oproti tomu například transgenní kapr nevykazoval žádný výrazný nárůst. Může to být tím, že gen byl inkorporován do oblasti genomu, kde byl inhibován.¹

Větší a rychleji rostoucí ryby nejsou ovšem jediným požadavkem trhu. Dalšími důležitými faktory je účinnost se kterou ryby mění potravu na svalstvo (konverze potravy) a samozřejmě výsledná chuť masa. Biotechnologie tedy s rybami v tomto ohledu zdaleka neskončila!



Obr. 1: Vlevo kontrolní ryby, vpravo transgenní tilapie

Velmi významná je také větší odolnost chovaných ryb. Pokusy mířily buď k celkovému posílení imunity proti bakteriím, nebo k rezistenci na specifický virus.

Posílení produkce antibakteriálního enzymu lysozymu u lososa však nevedlo k předpokládaným výsledkům. Pro pstruha se podařilo vyvinout DNA vakcínu, která ho chrání proti infekci velmi rozšířeným hematopoetickým virem způsobujícím virovou hemorhagickou septikémií lososovitých. Tento virus je velmi nebezpečný a způsobuje nemalé ztráty především v raných stádiích vývoje ryb. Nevýhodou je, že vakcína je vpichována do svalů potěru což je samo o sobě náročné a není zaručen přenos imunity i na potomstvo.¹ Praktický význam těchto pokusů je tedy zatím sporný.

Nebezpečí transgenních ryb

I kdyby transgenní ryby byly díky svým lepším vlastnostem výrazně vhodnější, mezi lidmi stále přetrvává tolik obav z jejich konzumace, že by se zřejmě nevyplatilo je chovat. Největší obavy se týkají nově vnesených genů. Nemohou být jimi kódované proteiny pro člověka nebezpečné? To je velmi nepravděpodobné. Geny jsou s tímto ohledem vybírány již před vložením do cílového organismu. Jedná se o geny, které jsou expimovány v jiných běžných organismech, které člověk konzumuje a nezpůsobují mu žádné obtíže. Růstové hormony produkované v transgenních rybách nejsou steroidy, ale polypeptidy, které se deaktivují již v žaludku. Vždy samozřejmě existuje riziko, že v novém organismu dojde k neočekávané přeměně proteinu.¹ Všechny transgenní ryby proto musí být pečlivě prostudovány než budou moci být vpuštěny na trh. Švédští vědci, kteří pro Evropskou unii vypracovali studii k této problematice, naznačují, že nebezpečí, které by mohlo hrozit, je odlišná akumulace toxinů v tělech transgenních ryb. Pro důkaz takovýchto tvrzení je ale zapotřebí dalšího výzkumu.⁷

Větší nebezpečí než pro lidské zdraví zřejmě transgenní ryby představují pro ekosystém. Riziko úniku geneticky modifikovaných ryb při běžném chovu je velmi vysoké. Vědci a odborníci stále nemají jasno, jaké by byly následky křížení těchto ryb s jejich volně žijícími příbuznými. Možnosti sahají od úplného vymření původní populace a jejího nahrazení transgenní variantou až po neschopnost transgenních ryb přežít ve volné přírodě. Velmi by záleželo na druhu ryby, prostředí, do kterého by unikla a samozřejmě na typu genetické modifikace, který by v sobě nesla.¹ Řešením by mohl být chov pouze neplodných samic. Existuje několik způsobů sterilizace, žádný z nich však není stoprocentní.⁶ Realita komerčního chovu ryb je taková, že úniku chovných kusů se nedá zabránit. Dopady na životní prostředí by bylo dobré znát dříve, než dojde k povolení chovu transgenních ryb v jednotlivých státech.

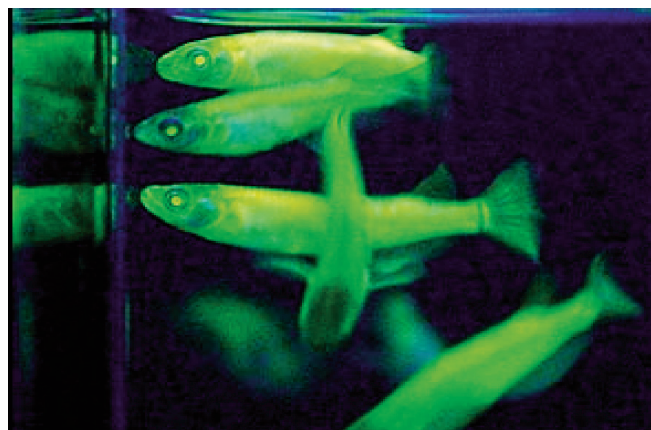
Studie švédské univerzity v Gothenburgu se vyjadřuje obezřetně. Nedoporučuje zatím povolit chov transgenních ryb jinde než v uzavřených zařízeních.⁷ Ve světě ovšem takovéto ryby pravděpodobně již žijí i volně. Na Kubě tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) a v Číně kapři s genem pro tvorbu růstového hormonu.⁶ Dopad transgenních ryb na ekosystém může být tedy znám velmi brzy!

Transgenní ryby jako domácí mazlíčci

Dánio pruhované (*Danio rerio*) je běžným modelovým organismem. Figuruje také ve výzkumu funkce určitých tkáňově specifických proteinů. Při těchto stu-



Obr.2: Transgenní Dánio pruhované (*Danio rerio*)



Obr. 3: Transgenní medeka japonská (*Oryzias latipes*)

díích se jako marker používá GFP (green fluorescent protein). GFP byl původně izolován z medúzy a slouží ke zviditelnění sledovaných proteinů v organismu. Tato vědci často využívaná metoda ale našla neočekávané uplatnění.³ Z nenápadné rybičky udělala světový obchodní trhák a prvního volně prodejného geneticky modifikovaného živočicha na světě.

V roce 2004 byl povolen volný prodej „svítící“ rybky v USA. Žádný z úřadů dohlížejících na nakládání s geneticky modifikovanými organismy nevyjádřil znepokojení z tohoto kroku. Zebřičky nejsou prodávány jako potraviny, nebyl tedy zkoumán jejich dopad na zdraví člověka. Prodávané kusy by pouze měly být sterilizovány, aby nedocházelo k dalšímu šíření vloženého genu. Jejich neobvyklé „zbarvení“ by jim totiž v přírodě mohlo za určitých světelných podmínek poskytovat ochranu před predátory.⁹

Zebřičky nezůstaly jedinými „svítícími“ rybami. Na Taiwanu společnost Taikong chová a prodává podobně geneticky modifikované rybky medeky japonské (*Oryzias latipes*). Dnes již oba druhy existují v několika barevných provedeních a jsou oblíbené nejen u akvaristů.³

Evropa se ke „svítícím“ rybám nepostavila s takovým nadšením jako Amerika a Asie. Zakořeněnou nedůvěrou a opatrností ke geneticky modifikovaným organismům rybky nepřekonalý. V České republice není dovolen chov

transgenních ryb, a to ani pro akvaristické účely. Česká inspekce životního prostředí upozorňuje na výskyt této akvarijní ryby a připomíná, že za neoprávněné nakládání s nepovoleným geneticky modifikovaným organismem hrozí podle zákona vysoká pokuta.² Pokud vás tedy „svítící“ rybka nadchla tak jako spoustu lidí po celém světě, musí vám zatím postačit obrázky. (Obr 2,3)

Závěr

Využití transgenních ryb může být mnohem širší než potencionální potrava nebo neobvyklá dekorace. Mohou sloužit také k produkci léků. Vložením lidského genu pro koagulační faktor do rybího genomu získáme rybu, které v krvi proudí látka pro léčbu hemofilie. Firma Aquagene využívá k produkci léku na srážení krve transgenní tilapie. Díky jejich rychlému růstu a nenáročnosti představují ideální zdroj potřebného proteinu. Dalším zdrojem koagulačního faktoru je pouze lidská krev nebo speciální linie křeččích zárodečných buněk. Obě tyto metody jsou nákladné a mají určitá rizika alergických reakcí nebo přenosu nemocí na pacienta. Naproti tomu není známa žádná nemoc přenosná z ryby na člověka. Potenciál používání transgenních ryb k takovýmto účelům je velký. Nevýhodou jsou ovšem přísná nařízení, která je třeba při chovu těchto ryb dodržovat.⁸

Literatura:

1. Maclean N, Laight RJ: *Fish and Fisheries* 1, 146 (2000) <http://www.akvachovleo.estranky.cz/clanky/rozmnazene-ryby/danio-rerio> (27. 11. 2009).
2. Dean J: *The Wall Street Journal*, 2003 http://www.glowingpets.com/tk-1_fish.htm (2. 12. 2009).
3. Yan ZZ, Sun YH: *Cell Research* 10, 17 (2000).
4. Dunham RA: *Biotechnol Ann Rev* 2, 205 (1996) <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/GMtopic2.pdf> (27. 11. 2009).
5. Novotný M: Tajemství chovu ryb. 21. století, 2004. <http://www.21stoleti.cz/view.php?cislocclanku=2004012138> (29. 11. 2009).
6. Suková I: Transgenní ryby v mnohém předčí konvenční formy. *Agronavigátor*, 2009. <http://www.agronavigator.cz/default.asp?typ=1&val=95198> (2. 12. 2009).
7. <http://www.osel.cz/index.php?clanek=927> (1. 12. 2009).
8. Cummins J: Transgenic fish coming. *Institute of science in society*, 2003. <http://www.i-sis.org.uk/TFC.php> (27. 11. 2009).

Souhrn

Jančíková M.: Transgenní ryby jako potraviny i zábava

V současné době již existuje několik druhů transgenních ryb. Každý z nich se vyznačuje určitou výhodou oproti svým divoce žijícím příbuzným. Především rychlejší růst a velikost transgenních ryb z nich dělají velké lákadlo pro chovatele. Legislativa komerčního chovu takovýchto ryb ve většině zemí zatím zakazuje. Možný dopad transgenních ryb na jejich konzumenty a celý ekosystém je předmětem studií. Přesto je v Americe již povolen prodej a chov transgenních „svítících“ ryb.

Klíčová slova: transgenní ryby

Summary

Jančíková M.: Transgenic fish as food and entertainment

Currently, there are already several species of transgenic fish available. Each of the transgenic species has some specific advantage in comparison to its wild living peer. Particularly faster growth and larger size make transgenic fish attractive for fish farmers. However, commercial breeding of these species is legislatively forbidden in the majority of countries. Potential impact of transgenic fish on their consumers and the whole ecosystem is a subject of studies. Nevertheless, the breeding and the sale of transgenic GloFish (glowing fish) is already allowed in America.

Key words: transgenic fish

BIOSENZORY PRO STANOVENÍ IONTŮ TĚŽKÝCH KOVŮ

Jáchym Šuman

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

Současné klasické instrumentální metody stanovení těžkých kovů sice poskytují dostatečně přesné výsledky, mají však mnoho omezení. Těmi je především metodická náročnost, vazba na laboratorní prostředí, potřeba sofistikovaných a často finančně náročných přístrojů, délka trvání analýz, a často i potřeba použití agresivní nebo toxické chemikálie. V současné době jsou proto hledány alternativní metody, které by umožňovaly rychlé stanovení aktuálních koncentrací iontů těžkých kovů včetně přímých stanovení v terénu (*in situ*). Za atraktivní přístup je považováno použití biosenzorů.

Biosenzor lze definovat jako analytické zařízení využívající specifické biochemické interakce zprostředkované biomakromolekulami, organelami, živými buňkami a tkáněmi nebo jejich částmi s analytem. Tato interakce je převáděna na elektrický, tepelný nebo optický signál, který je následně detekován vhodným fyzikálně-chemickým snímačem¹. Interagující biologický prvek je zodpovědný za rozpoznání analytu a tedy za specifitu biosenzoru. Citlivost biosenzoru je pak dána jak povahou biochemické interakce, tak způsobem snímání signálu.

Detekční prvky biosenzoru (biomakromolekuly, organismy nebo jejich části) je třeba imobilizovat. Výběr imobilizační procedury závisí na původu biologického prvku senzoru, na použitém snímači, na fyzikálně – chemických vlastnostech analytu a na podmínkách prostředí, ve kterém bude senzor používán².

Pro konstrukce biosenzorů se využívá několika typů snímačů. Mezi nejpopulárnější patří snímače elektrochemické (ampérometrické a potenciometrické), kalorimetrické, polarimetrické, piezoelektrické a optické². Hlavní kritéria pro hodnocení „vhodnosti“ biosenzoru pro daný analyt a podmínky stanovení jsou jeho specifita, rychlost odezvy, možnost použití v zakalených roztocích a samozřejmě i spolehlivost a mobilita celého zařízení³.

Enzymové biosenzory

Stanovení těžkých kovů pomocí enzymů je založeno na aktivaci nebo inhibici enzymové aktivity stanovenými ionty. Aktivace lze použít v případě, kdy je daný iont integrální součástí nativní struktury enzymu, kde se nejčastěji účastní katalyzované reakce jako kofaktor. Na tomto principu je například založen kalorimetrický systém pro stanovení Zn^{2+} využívající imobilizované alkalické fosfatasy a tepelného zabarvení katalyzované reakce. Tento biosenzor umožňoval selektivní stanovení Zn^{2+} v dynamickém rozsahu 10 μM –1 mM, s rychlostí odezvy 3 min a dlouhou operační stabilitou (až 2 měsíce)⁴.

Častěji jsou popisovány biosenzory využívající inhibice enzymové aktivity po expozici iontům těžkých kovů. K inhibici dochází převážně v důsledku interakce iontů kovu s thiolovými a methylthiolovými skupinami aminokyselinových zbytků polypeptidového řetězce⁵. Nevýhodou těchto interakcí je jejich nepříliš vysoká specifita vůči interagujícímu iontu kovu, což značně omezuje jejich využití při analýze komplexnějších matic⁶.

Inhibiční působení různých iontů kovů na oxidasy a dehydrogenasy využili pro konstrukce zajímavých biosenzorů Gayet a kol. (1993)⁷. Detekčním prvkem byly enzymy imobilizované v želatinovém filmu nebo kovalentní vazbou na membráně. Snímačem byla Clarkova kyslíková elektroda. Koncentrace HgCl_2 , která inhibovala 50% enzymové aktivity (I_{50}), byla 50 μM pro L-glycerolfosfát oxidasu. Elektroda mohla být regenerována v roztoku obsahujícím chelatační činidlo EDTA a redukční činidlo dithiothreitol. Citlivější byla pyruvát oxidasa, u které docházelo k 50% inhibici po 2 min inkubaci v 50 nM HgCl_2 . Enzym bylo možno regenerovat v přítomnosti Mg^{2+} a thiaminpyrrofosfátu. Stejní autoři popisují i biosenzor využívající spřažený enzymový systém L-laktát dehydrogenasy a L-laktát oxidasy. Tento biosenzor vykazoval po 5 min inkubaci I_{50} 1 μM pro HgCl_2 , 0,1 μM pro AgNO_3 , 10 μM pro CdCl_2 , 1m μM pro ZnCl_2 , 50 μM pro $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ a 250 μM pro CuSO_4 . Použití různých enzymů v různých typech pufrů umožňovalo specifická stanovení určitých iontů těžkých kovů⁷.

Byla též konstruována řada enzymových biosenzorů využívajících inhibici ureasy, enzymu katalyzujícího hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak. Příkladem je biosenzor s ureasou imobilizovanou na porézním skle se spektrofotometrickou detekcí vznikajícího amoniaku. Dynamické rozmezí biosenzoru bylo 1 – 10 μM Hg^{2+} , rychlost odezvy 10 – 12 min^{lit.} 4. Dalším přístupem bylo využití iontové selektivní optody obsahující non-aktin, ionofor selektivní pro NH_3 . Pro toto uspořádání byla demonstrována inhibice ureasy ionty Ag^+ ($I_{50} = 0,18 \mu\text{M}$), Hg^{2+} ($I_{50} = 0,35 \mu\text{M}$) a Cu^{2+} ($I_{50} = 3,94 \mu\text{M}$)⁸.

Biosenzory založené na neenzymových proteinech

Při vývoji biosenzorů pro těžké kovy lze využít i mnohé neenzymové metaloproteiny a peptidy. Příkladem může být biosenzor využívající metalothionein SmtA z cyanobakterie *Synechococcus* PCC 7942 ve fúzi s glutathion-S-transferasou. Tento biologický prvek vykazoval selektivitu vůči Zn^{2+} , Cd^{2+} a Hg^{2+} s vysokou citlivostí v řádu fM. Převod signálu byl zalo-

žen na měření kapacitance, biosenzor mohl být regenerován v roztoku EDTA a byl stabilní po 16 dní⁹. Dalšími představiteli neenzymových proteinů použitých při konstrukci biosenzorů jsou regulační protein MerR (stanovení Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}) a syntetický fytochelatin EC20 (stanovení Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} a Pb^{2+}). Příslušné biosenzory byly poměrně stabilní (okolo dvou týdnů) a opět mohly být regenerovány v roztoku EDTA. Biosenzor využívající syntetický fytochelatin EC20 umožňoval stanovení iontů v detekčním rozmezí 100 fM–10 mM^{9, 10}.

Budoucí trendy ve vývoji biosenzorů využívajících neenzymové proteiny je možno prezentovat na případě mutované varianty zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) BFPms1. V důsledku odlišných koordinačních nároků iontů Zn^{2+} a Cu^{2+} vazba Zn^{2+} zvyšuje a vazba Cu^{2+} zhasí fluorescenci¹¹. Dalším přístup využívá interakce transkripčního faktoru CueR z rodiny transkripčních regulátorů MerR. CueR-dependentní regulace transkripce promotoru PcopA nastává *in vitro* již při zeptomolární (10^{-21} M) koncentraci Cu^{+12} .

Biosenzory založené na protilátkách

Biosenzory založené na využití protilátek proti komplexům iontů kovů s vhodným chelatačním činidlem obecně vykazují vysokou citlivost, selektivitu a specifitu¹³. Významnou výhodou je časté použití v populárním formátu ELISA. Byly vyvinuty imunologické testy využívající monoklonální protilátky proti komplexům EDTA s ionty Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} a Ag^{+} , mnohé z nich jsou dnes i komerčně nabízeny^{14, 15}. Byly popsány i protilátky proti komplexu Zn^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+} s diethylenetriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA) a proti komplexu Pb^{2+} a cyklohexyldiethylenetriaminpentaoctové kyseliny (CHXDPTA)¹⁶.

Biosenzory založené na nukleových kyselinách

Poměrně novým trendem je použití nukleových kyselin jako biologického prvku biosenzoru. Aptamery jsou molekuly DNA nebo RNA schopné, podobně jako protilátky, s vysokou specifikou vázat určitý ligand (ion kovů). Aptazymy navíc po vazbě ligandu vykazují fosfoesterasovou aktivitu. Jde o uměle vytvořené molekuly získávané procesem tzv. *in vitro* selekce^{17, 18, 19}.

Jednu z aplikací aptazymů popisuje práce autorů Liu a Lu (2003)²⁰. Biosenzor pro selektivní stanovení Pb^{2+} se skládá z aptazymu a jeho substrátu – krátkých úseků DNA hybridizujících s komplementárními řetězci imobilizovanými na nanočásticích zlata. Hybridizací dochází ke shlukování nanočástic a ke vzniku modrého zabarvení roztoku. V přítomnosti iontů Pb^{2+} aptazym katalyzuje specifické štěpení substrátu, čímž zabrání hybridizaci a výsledkem je červené zabarvení roztoku. Tímto biosenzorem bylo možné stanovit Pb^{2+} v dynamickém rozmezí 100 nM–4,0 μM ²¹.

Celobuněčné biosenzory

Vlastnosti celobuněčných mikrobiálních biosenzorů jsou srovnatelné s vlastnostmi enzymových elektrod,

oproti nim však mohou poskytovat další výhody. Produkce dostatečného množství mikrobiální biomasy je totiž podstatně levnější a jednodušší než často komplikovaná izolace konkrétních biomakromolekul z velkého množství biologického materiálu. Navíc intracelulárním enzymům není třeba dodávat kofaktory a často ani substráty. Díky fyziologickému prostředí v buňce je zpravidla vyšší i stabilita využívaného enzymu^{21, 22}. Další výhodou celobuněčných biosenzorů je možnost testování biologické dostupnosti, celkové toxicity a genotoxicity analytu, což jsou parametry s mnohem vyšší vypovídací hodnotou o škodlivosti daného polutantu než jen informace o jeho celkovém obsahu²³. Celobuněčné biosenzory též nabízejí možnost využití celých metabolických drah a komplexních molekulárně-biologických pochodů, což umožňuje selektivní analýzu sloučenin, které je jednoduchým enzymovým systémem jen obtížné měřit, např. aromatické sloučeniny a ionty těžkých kovů²⁴.

Jako biologického prvku biosenzorů lze využít mikroorganismy, jejichž přirozený fenotypový projev poskytuje měřitelný signál. Příkladem je luminiscenční bakterie *Photobacterium phosphoreum* MT 10204. Tento kmen tvoří součást mikrobiálního biosenzoru pro stanovení chromanů založeného na inhibici bioluminiscence. I_{50} tohoto systému byla 0,85 nM Cr^{6+} (lit. ²⁵). Dalším příkladem je biosenzor využívající kvantifikaci inhibice bakteriálního růstu po expozici Cu^{2+} pomocí piezoelektrického snímače. Inhibiční efekt Cu^{2+} na nárůst biomasy byl dynamický v rozmezí 0,28–0,39 mM²⁶.

Jinou možnost nabízí cílené genetické modifikace biosenzorových mikroorganismů. Ty jsou dnes realizovány především zaváděním genetických fúzí reportérových genů s regulačními elementy systémů rezistence vůči těžkým kovům. Tento princip využívá biosenzor založený na *Staphylococcus aureus* RN 4220 jako hostitele senzorového plasmidu pT0024. Součástí senzorového plasmidu je reportérový gen pro luciferasu (*lucF*) pod kontrolou promotoru *cadA* a odpovídajícího transkripčního regulátoru CadA ze *Staphylococcus aureus* NCTC 50581. V důsledku aktivace exprese *lucF* ionty těžkých kovů umožnil kmen *S. aureus* RN 4220 (pT0024) stanovení Pb^{2+} a Cd^{2+} s detekčními limity 10 nM a 33 nM, v uvedeném pořadí²⁷. Obdobný princip využívají i biosenzory pro stanovení biologické dostupnosti iontů těžkých kovů založené na rekombinantních kmenech půdní bakterie *Cupriavidus metallidurans* (dříve klasifikovány jako *Alcaligenes eutrophus*), kde je reportérovým prvkem operon *luxCDABE*. Biosenzor založený na kmeni *A. eutrophus* AE1239 vykazoval dynamické rozmezí detekce Cu^{2+} 1–200 μM , kmen AE2440 poskytoval odezvu na Cr^{6+} v rozmezí 1–40 μM a kmen CH34 na Pb^{2+} v rozmezí 0,5–8,0 μM ⁵.

Pro konstrukci biosenzoru pro stanovení Cu^{2+} byl použit i rekombinantní kmen *Saccharomyces cerevisiae*. Jeho genetická modifikace spočívala v zavedení reportérového genu *lacZ* pod kontrolou kvasničného promotoru genu *CUP1*, který je indukovatelný Cu^{2+} .

Výsledný biosenzor s kalorimetrickou analytickou koncovkou vykazoval dynamický rozsah 0,5-2,0 mM Cu²⁺ lit. 28.

Závěr

Tento text měl čtenáři stručně nastínit současný stav vývoje biosenzorů pro stanovení iontů těžkých kovů

a potenciál jejich komerčního využití. Současný rozvoj molekulárně-biologických technik umožňuje další pokrok především ve využití mutantních variant proteinů a geneticky modifikovaných organismů v analýze iontů těžkých kovů.

Literatura:

1. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 64, 148 (1992).
2. Neelam V, Singh M: BioMetals 18, 121 (2005).
3. D'Souza SF: Biosens Bioelectron 16, 337 (2001).
4. Satoh I: Biosens Bioelectron 6, 375 (1991).
5. Corbisier P, Lelie D, Borremans B, et al.: Anal Chim Acta 387, 235 (1999).
6. Castro MDL, Herrera MC: Biosens Bioelectron 18, 279 (2003).
7. Gayet JC, Haouz A, Meyer A, et al.: Biosens Bioelectron 8, 177 (1993).
8. Andres RT, Narayanaswamy R: Analyst 120, 1549 (1995).
9. Bontidean I, Lloyd JR, Hobman JL, et al.: J Inorg Biochem 79, 225 (2000).
10. Bontidean I, Ahlqvist J, Mulchandani A, et al: Biosens Bioelectron 18, 547 (2003).
11. Barondeau DP, Kassmann CJ, Tainer JA, et al.: J Am Chem Soc 124, 3522 (2002).
12. Changela A, Chen K, Xue Y, et al.: Science 301, 1383 (2003).
13. Blake DA, Blake RC, Khosraviani M, et al.: Anal Chim Acta 376, 13 (1998).
14. Blake DA, Chakrabarti P, Khosraviani M, et al.: J Biol Chem 271, 27677 (1996).
15. Khosraviani M, Pavlov AR, Flowers GC, et al.: Environ Sci Tech 32, 137 (1998).
16. Blake DA, Jones RM, Blake RC, et al.: Biosens Bioelectron 16, 799 (2001).
17. Ellington AD, Szostak JW: Nature 346, 818 (1990).
18. Breaker RR, Joyce GF: Chem Biol, 655 (1995).
19. Breaker RR, Joyce GF: Chem Biol, 223 (1994).
20. Liu J, Lu Y: J Am Chem Soc 125, 6642 (2003).
21. Riedel K: Bioelectroch Bioener 25, 19 (1991).
22. Ramanathan S, Ensor M, Daunert S: Trends Biotechnol 15, 500 (1997).
23. Belkin S: Curr Opin Microbiol, 6, 206 (2003).
24. Riedel K, Kunze G, Konig A: Adv Biochem Engg Biotechnol 75, 81 (2002).
25. Lee S, Sode K, Nakanishi K, et al.: Biosens Bioelectron 7, 273 (1992).
26. Yamasaki A, Cunha MA, Oliveira JA, et al.: Biosens Bioelectron 19, 1203 (2004).
27. Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M: Biosens Bioelectron 13, 931 (1998).
28. Lehmann M, Riedel K, Adler K, Kunze G: Biosens Bioelectron 15, 211 (2000).

Souhrn

Šuman J: Biosenzory pro stanovení iontů těžkých kovů

Biosenzor je analytické zařízení, které v sobě integruje biologickou složku produkující po interakci s analytem měřitelný signál a odpovídající fyzikálně-chemický převodník. Tento souhrnný článek pojednává o využití biosenzorů pro stanovení iontů těžkých kovů. Biosenzory skýtají oproti klasickým metodám mnohé výhody, jako je vysoká specifita, rychlost stanovení, nízká cena, jednoduchost obsluhy a možnost měření v reálném čase. Diskutovány jsou biosenzory založené na enzymech, neenzymových proteinech, protilátkách, nukleových kyselinách a celobuněčné biosenzory.

Klíčová slova: biosenzor; těžké kovy; geneticky modifikované organismy

Summary

Šuman J.: Biosensors for determining of heavy metal ions

Biosensor is an analytical device employing a biological component capable to interact with analyte and produce specific signal which is then detected a converted by a physico-chemical transducer to an electrical signal. This review is focused on biosensors developed for analysis of heavy metal ions. Compared to conventional analytical techniques, biosensors offer many advantages, such as high specificity, fast analysis, low cost, they are easy to use and allow for real-time determination. The biosensors based on enzymes, nonenzymatic proteins, antibodies, nucleic acids, and whole-cells are discussed.

Key words: biosensor; heavy metals; genetically modified organisms

MIKROREAKTORY

Tomáš Vydareňý

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze

Úvod

Od počátků chemie se pro provádění experimentů používaly baňky. Reakce probíhaly obvykle v hmotnostním rozmezí několika miligramů až po několik gramů či objemech mililitrů až litrů. Pro optimalizaci chemických reakcí a hledání ideálních reakčních podmínek je často zapotřebí mnoho času a spotřeba množství energie. Po zjištění optimálních podmínek pro dosažení určité reakce v malých objemech je často zapotřebí zvětšit měřítko, což obvykle přináší další výzvy a požadavky na nastavení reakčních parametrů. Aby bylo možné překročit překážky optimalizace ve zkušebním měřítku, jsou v dnešní době populární různé průtokové mikroreaktory, nebo čipové mikroreaktory. Malé rozměry mikroreaktorů umožňují používat jen malá množství reaktantů za přesně regulovaných podmínek. Otevírá se možnost snadno zkoušet mnoho reakčních podmínek v rámci jednoho pokusu, může se tak ušetřit mnoho času, zároveň se zvýšenou bezpečností práce. Ať už je to kvůli bouřlivým podmínkám reakce, či toxicitě sloučenin. Rapidně se také sníží množství odpadu. Aby se získalo větší množství materiálu pro další práci, je možné nechat reakci probíhat delší dobu. Technologie mikroreaktorů se používá nejen v základním výzkumu, ale i průmyslově, pro produkce specifických sloučenin.^{1,2}

Vzhled mikroreaktorů

Obecně se mikroreaktory skládají z miniaturních kanálků, často zapuštěných v destičce s rovným povrchem – čip. V poslední době byly vyvinuty různé mikro-

reaktory, z nichž některé jsou i komerčně dostupné. Použitelnost reaktoru je dána jeho velikostí, chemickými a fyzikálními vlastnostmi materiálu použitého na jeho výrobu a typem reagentů a rozpouštědla. Často používanými materiály jsou sklo, silikon, ocel, kov a polymery (Tab. 1).

Sklo bylo tradičně nejvíce populárním materiálem pro práci v laboratoři, protože je chemicky inertní k většině reagentů a rozpouštědel. Díky jeho průhlednosti je možné vizuální pozorování reakce. Výhodné vlastnosti, jakými jsou dostupnost, snadná výroba a možné úpravy do konečné podoby (fotolitografie), udělaly z tohoto materiálu výbornou surovinu pro výrobu mikroreaktorů. Silikon si také našel široké uplatnění v konstrukci mikroreaktorů. V oxidované formě se chová velmi podobně sklu a je také chemicky inertní k většině reagentů a rozpouštědel. Díky skvělé tepelné vodivosti mohou mikroreaktory ze silikonu, na rozdíl od skla, výborně odvádět či přivádět teplo. Proto jsou silikonové mikroreaktory vhodné pro exotermní reakce stejně tak, jako pro reakce při velmi nízkých teplotách. Dále se do nich dá snadno zabudovat mikrosenzor založený na silikonu. Ocelové mikroreaktory se často používají v průmyslu. Obecně mají tyto mikroreaktory větší objemy. Mikroreaktory založené na polymerech jsou vyrobené z poly(dimethylsiloxan)u. Jsou relativně levné a nenáročné na výrobu. Jejich nevýhodou je, že netolerují některá rozpouštědla a nemohou být použité pro některé organické reakce. Jejich tepelná vodivost je poměrně nízká a mají limitovanou mechanickou stabilitu. Nejčastěji se používají pro reakce ve vodě při atmosférickém tlaku a laboratorní teplotě.¹

Tab. 1: Porovnání vybraných mikroreaktorových systémů¹

materiál	systém	tok	vnitřní objem	poznámka
sklo	Haswell-Watts	elektroosmotický tok, hydrodynamické pumpování	rozmezí nl – μ l	možná světelná detekce
sklo	SYRRIS	hydrodynamické pumpování	60 μ l, 250 μ l, 1 ml	automatizovaný systém
silikon	Jensen-Seeberger	hydrodynamické pumpování	80 μ l	jednoduchý, možné pokrývání stěny kanálků
ocel	Ehrfeld	hydrodynamické pumpování	0,5 – 11 ml	větší objem
ocel	CPC	hydrodynamické pumpování	100 μ l, 1,1 ml	automatizovaný systém
plast	různé	osmóza, pumpování	rozmezí nl – ml	levná a rychlá výroba, nestabilní při použití organických rozpouštědel

Zajištění průtoku

Tekutiny se mohou pohybovat skrz kanálky mikroreaktorů pomocí různých metod jakými jsou hydrodynamické pumpování, elektrokinetické pumpování nebo kapilární tok. Nejčastějším přístupem, jak dosáhnout pohybu látek a ovládat mikroreaktor, je hydrodynamické pumpování, které využívá pro svou činnost dynamických sil, jako jsou síly odstředivé a principy dynamického převodu energie rychlostní na tlakovou. Lze u něj dosáhnout širokého rozmezí průtokových rychlostí ($\mu\text{l}/\text{min}$ – l/min). Používají se buď stříkačky nebo HPLC pumpy. Elektrokinetické pumpování lze velmi dobře miniaturizovat a snadno ovládat pomocí počítače. Je třeba dát pozor na polaritu sloučenin a na nechtěné elektrochemické transformace. Nejčastěji se používá tzv. kapilární elektroforéza.

Míchání reaktantů uvnitř kanálku se děje difúzí a průtokem. Díky malým rozměrům mikroreaktoru je difúze obecně velmi účinná, smíchání proběhne v průběhu milisekund. Malé rozměry spolu s vysokým poměrem povrchu ku objemu způsobují účinnější transport tepla a hmoty uvnitř mikroreaktoru než v běžné baňce. Lze tak docílit homogenních podmínek po celém objemu reaktoru a parametry mohou být přesně regulované. Vysoce exotermní nebo i explosivní reakce mohou být snadno mírněné. Přesným řízením podmínek reakce můžeme zvýšit výtěžek reakce a čistotu produktu.¹

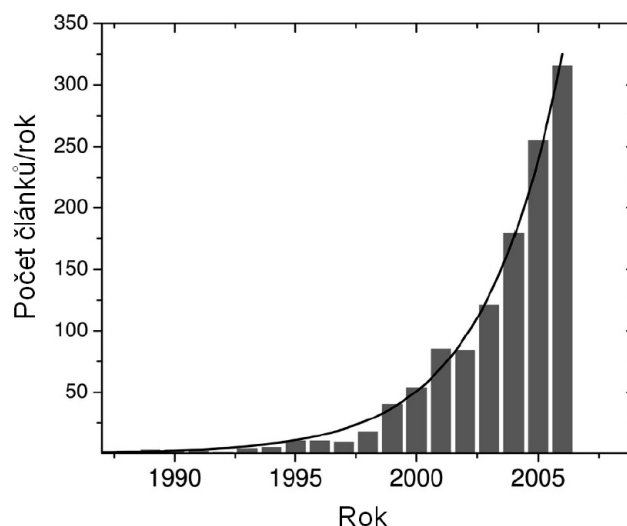
Jednotlivé molekuly

V poslední době se stává populární zkoumat jednotlivé molekuly. Lze tak pozorovat individuální chování biologického systému nezatížené průměrováním. Je zřejmé, že informace o chování jednotlivých molekul je mnohem cennější než pouze průměrná hodnota. Může tak být pozorována heterogenita jednotlivých případů. První studie jednotlivých molekul se objevily v devadesátých letech. Následovaly různé experimenty s molekulami DNA, RNA, nebo proteiny (Obr. 1.).³ Vyvíjí se techniky pro detekci jednotlivých virových částic, což může mít v budoucnu prospěch např. v diagnostice HIV.⁴

Pro detekci jednotlivých molekul je často použito měření fluorescenčního záření, nebo principu FRET (fluorescence resonance energy transfer). Mocným nástrojem jsou molekuly s přirozenou autofluorescencí. Velmi citlivou metodou je také hmotnostní spektrometrie s elektronovým záchytem, která dokáže detekovat i pouhé desítky zeptomolů.^{3,4,5}

Například byly zkoumány enzymy upravující DNA a dynamika molekul DNA tak, že byla označena molekula DNA a molekula enzymu, každý jedním partnerem pro FRET a podle měřeného signálu lze odvodit některé závěry ohledně pohybu enzymu po molekule DNA a o dynamice samotné DNA. Časté je sledování jednotlivých molekul na plasmatické membráně. Zajímavostí může být také detekce emise záření z čerstvě translatovaného GFP.

V pokusech s jednotlivými molekulami je někdy žádoucí pozorovat molekulu co nejdéle, aby se dalo extrahovat co nejvíce informací. Pak je potřeba, aby byla pozorovaná molekula znehybněná. V pevných vzorcích samozřejmě takové potíže nejsou, v roztocích ano. Velký vliv při pokojových teplotách má Brownův pohyb. K imobilizaci lze použít povrch průhledného skla nebo enkapsulaci v gelu. Je třeba ale dávat pozor na interakce, které ruší přirozené chování molekuly. Dalšími přístupy může být nepřímé zachycení molekuly laserem (laser-tweezer), uzavření molekuly do vesikulu nebo metoda pro potlačení Brownova pohybu (anti-Brownian electrokinetic trap).³



Obr. 1: Počet publikovaných článků registrovaných v databázi PubMed s názvem obsahujícím "single molecule" ³

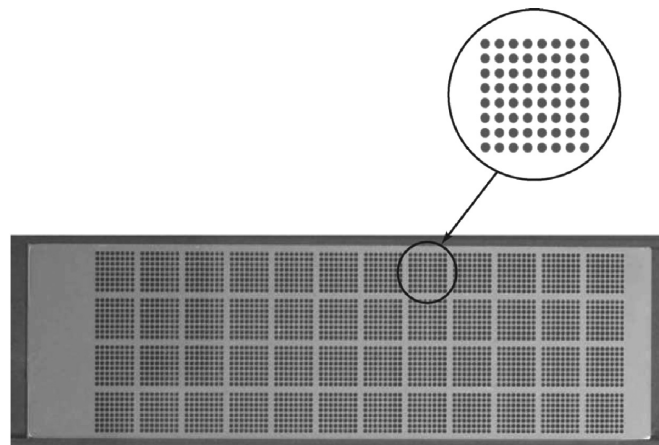
Zajímavé molekulárně biologické příklady

Byla popsána metoda sekvenování jediné molekuly DNA. Jednořetězcová DNA slouží jako templát pro polymerasovou syntézu komplementárního vlákna s použitím primeru označeného biotinem. Místo přirozených nukleotidů jsou použita jejich fluorescenční analoga. Komplementární vlákno je pak pomocí biotinu imobilizováno. Poté je přidána exonukleasa, která postupně odštěpuje jednotlivé nukleotidy. Reakce probíhá v kanálku mikroreaktoru. Jednotlivé nukleotidy jsou unášeny elektrokinetickými silami do detekční zóny, kde jsou postupně detekovány. Tato metoda slibuje možnost sekvenovat delší úseky než jaké umožňují standardní metody. Je třeba však stále optimalizovat a vyřešit některé potíže. Například DNA nemůže být syntetizována pouze z analogů nukleotidů, proto se uvažuje o paralelních reakcích, kde v každé bude jiný nukleotid nahrazen svým fluorescenčním analogem. Jednotlivá měření pak budou synchronizována.⁶

Pro měření míry exprese jednotlivých genů v buňkách se běžně používají metody tzv. microarray nebo tzv. real-timePCR. Microarray je vhodná pro screeningové pokusy, kde se testuje najednou velké množství genů. Pracuje na principu hybridizace navázané sondy (ssDNA) s cDNA ze vzorku a cDNA standardem, které kompetují o navázání na sondu. Obě jsou

fluorescenčně značené, každá jinou značkou. Pro každý sledovaný gen je na čipu sonda (pikomoly). Po navázání se měří fluorescence jednotlivých oblastí se sondami a porovnává se, která z cDNA se navázala ve větší míře. PCR (polymerase chain reaction) je metoda pro amplifikaci templátové DNA s pomocí polymerasy. Amplifikovaný úsek je vymezen kombinací oligonukleotidů, které slouží jako primery. Reakce probíhá v teplotních cyklech. Každý cyklus má tyto fáze: cca. 90 °C pro denaturaci templátové DNA, cca. 40 – 65 °C pro nasednutí primerů, cca. 72 °C pro aktivaci polymerasy a dosyntetizování komplementárního vlákna. Po každém cyklu se exponenciálně zvyšuje počet kopií, čehož lze využít pro měření původního množství templátu. K tomu se používají systémy SYBR GreenTM nebo TaqmanTM, pomocí nichž lze měřit množství produktu v jednotlivých cyklech, z čehož lze odvodit množství původního templátu (cDNA) pro zjištění míry exprese. Tento speciální typ PCR je označován jako real-timePCR. Reakce obvykle probíhají v objemu několika μl . Obě metody byly zkombinovány a lze použít real-timePCR na čipu v objemu 33 nl. Používá se destička s 3072 jamkami (OpenArrayTM, Obr. 2) a měří se fluorescenčně množství amplifikovaného produktu v jednotlivých cyklech (Obr. 3) (Tab. II)⁷.

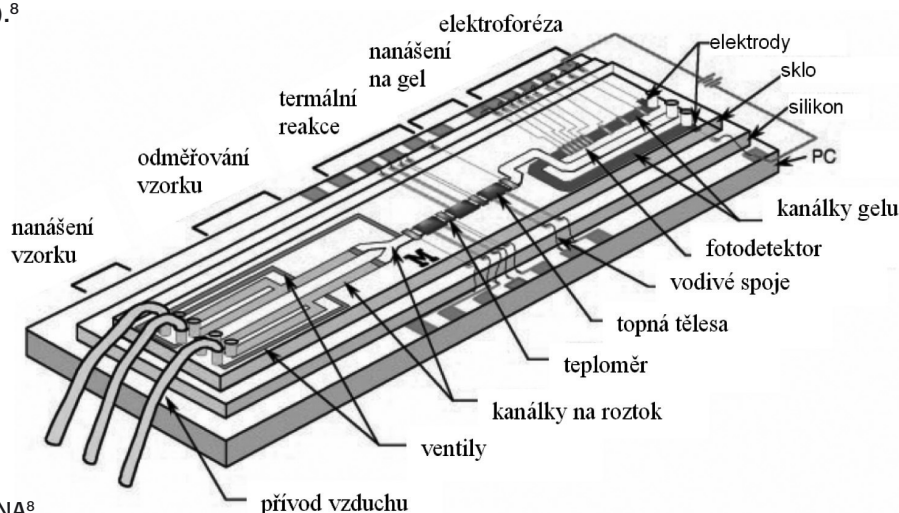
Pro další analýzy DNA (např. štěpení restriční endonukleasou) byly vyvinuty složitější čipy rozdělené na různé funkční oddíly (Obr. 4).⁸



Obr. 2: Struktura destičky OpenArrayTM ⁷



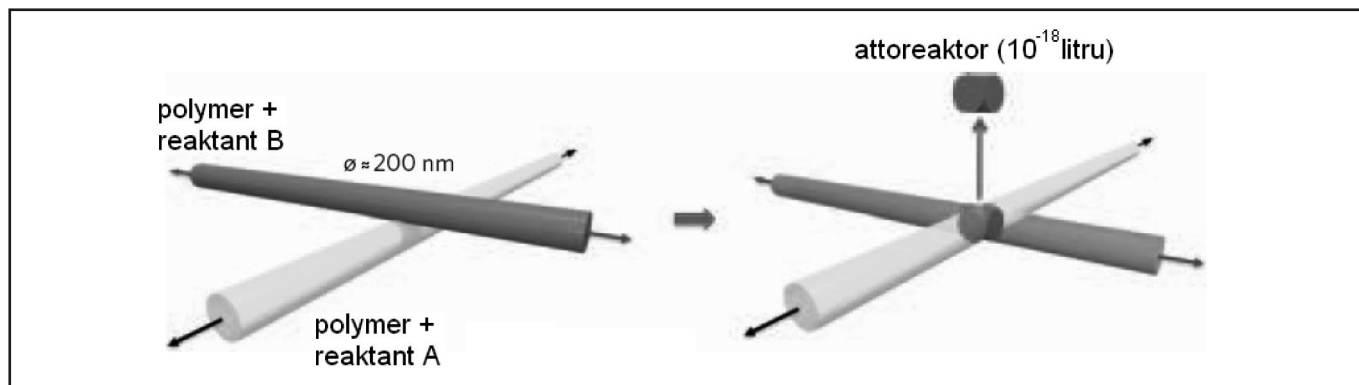
Obr. 3: Zobrazení fluorescence v jednotlivých jamkách (27. cyklus micro real-timePCR)⁷



Obr. 4: Mikroreaktor pro analýzu DNA⁸

Tab. II: Porovnání metod pro měření exprese genů⁷

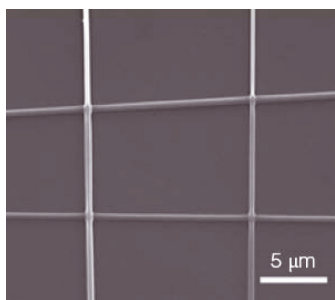
technologie	microarray	real-timePCR	micro real-timePCR
výhody	velké množství genů najednou, nízká cena jednoho datového údaje	vysoká přesnost, dynamické rozmezí, nízká spotřeba vzorku, krátká příprava vzorku	velké množství genů najednou, vysoká přesnost, dynamické rozmezí, krátká příprava vzorku, nízká cena jednoho datového údaje
nevýhody	vysoká spotřeba vzorku, dlouhá příprava vzorku	vysoká cena jednoho datového údaje, malé množství genů	střední spotřeba vzorku



Obr. 5: Prokřížení dvou nanovláken za vzniku attoreaktoru²

Attoreaktory

Nejnovější poznatky ukazují, že je možné sestavit reaktory s velikostí zlomku mikrometru. Jejich objem se měří v attolitrech (attolitr, zkr. al; 1×10^{-18} L). Jsou připraveny pomocí spojení dvou vláken, z nichž v každé je jeden z reaktantů (Obr. 5). Tato nanovlákná jsou z polyuretanu Tecoflex. Prokřížením mnoha vláken vznikne matrice s mnoha samostatnými spojeními



Obr. 6: Snímek ze skenovací elektronové mikroskopie: spojená nanovlákná²

v malém prostoru. Metoda byla nejprve testována s fluorescenčními sloučeninami pro snadné studium reakce. Spojení nanovláken bylo také sledováno skenovací elektronovou mikroskopií (Obr. 6).²

V rámci práce na attoreaktorech se vyvíjí metody izolace produktů z reaktoru tak, aby nebyly smíchány s nezreagovaným obsahem nanovláken v místech mimo překřížení.²

Závěr

Od počátku miniaturizování chemických procesů a vyvíjení mikroreaktorů bylo již uděláno mnoho kroků, které vedly až k experimentům na úrovni jednotlivých molekul. Výzkum pokračuje dál s rostoucí tendencí. Lidská zvědavost a potřeba vyvíjet nové průmyslové technologie nás stále vyzývají k dalšímu bádání. Doufejme, že miniaturizace bude pokračovat a budeme moci stále více využívat jejích výhod jak v aplikacích základního výzkumu, tak v medicínských a dalších odvětvích.

Literatura:

1. Geyer K, et al.: *Chemistry A European Journal* 12, 8434 (2006).
2. Anzenbacher P Jr, Palacios MA: *Nature Chemistry* 1, 80 (2009).
3. Moerner WE: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 12596 (2007).
4. Lee J, et al.: *Journal of Chromatography A* 1053, 173 (2004).
5. Wang P, et al.: *Journal of Chromatography A*, 721, 289 (1996).
6. Sauer Mm et al.: *Journal of Biotechnology* 86, 181 (2000).
7. Brenan C, Morrison T: *Drug Discovery Today: Technologies* 2, 247 (2005).
8. Burns MA, et al.: *Science* 282, 484 (1998)

Souhrn

Vydarený T.: Mikroreaktory

Miniaturizace je jedním z velkých témat současnosti a v chemii se také uplatňuje. Z chemických reakcí ve větších měřítkách, v baňkách, se přechází na miniaturizované systémy mikroreaktorů. Postupným vývojem byly optimalizovány materiály i techniky pro práci v mikroměřítku. Mnohé studie se zabývají rozбором dokonce jednotlivých molekul, často se jedná o makromolekuly typu DNA, nebo proteinu. Je možné vytvářet reaktory s objemem attolitru. Některé experimenty slibují do budoucna užitečnou aplikaci v medicíně, ale i dalších oborech.

Klíčová slova: mikroreaktor, jednotlivá molekula, attoreaktor

Summary

Vydarený T.: Microreactors

Today, miniaturization is one of the top topics and chemistry undergoes it as well. Chemical reactions were usually performed in flasks but at the present time, there are many endeavours to miniaturize them to microreactor systems. Used methods and materials are still being optimised to be able to work in this micro and nano-scale volume. There are many experiments studying even single molecules (often macromolecules like DNA or proteins). It is possible to create reactors even of attoliter volume. Therefore applications in medicine and other disciplines can be expected in the future.

Key words: microreactor, single-molecule, attoreactor

O B S A H

Úvodem	23
Šetinová D.: Současná a budoucí generace kardiálních markerů a jejich stanovení pomocí technologie proteinových biočipů	27
Krásný L.: Budeme si moci prohlédnout tvar bílkovin přímo v buňce?	30
Jančíková M.: Transgenní ryby jako potraviny i zábava	33
Šuman J.: Biosenzory pro stanovení iontů těžkých kovů	36
Vydarený T.: Mikroreaktory	39

C O N T E N T S

Editorial	23
Šetinová D.: Simultaneous and incoming generation of cardiac markers and its determination with utilization of protein biochips	27
Krásný L.: Would be possible to see protein shape directly in the cell?	30
Jančíková M.: Transgenic fish as food and entertainment	33
Šuman J.: Biosensors for determining of heavy metal ions	36
Vydarený T.: Microreactors	39

POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

Článek má tyto části: název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr (příp. poděkování), citace literatury, český souhrn, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowenstein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.

**BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST**
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994