

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

IZOLACE A STANOVENÍ LAKTOFERINU Z LIDSKÝCH SLIN

SYLVIE SKALIČKOVÁ^a, ONDŘEJ ZÍTKA^a,
SOŇA KRÍŽKOVÁ^a, MARCELA VLKOVÁ^c,
JIŘÍ SOCHOR^{a,b}, VOJTĚCH ADAM^{a,b}
a RENÉ KIZEK^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, ^c Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 Brno
kizek@sci.muni.cz

Došlo 22.3.12, přepracováno 11.2.13, přijato 24.2.13.

Klíčová slova: laktoferin, sliny, iontově-výměnná kapalinová chromatografie, fotometrická detekce

Úvod

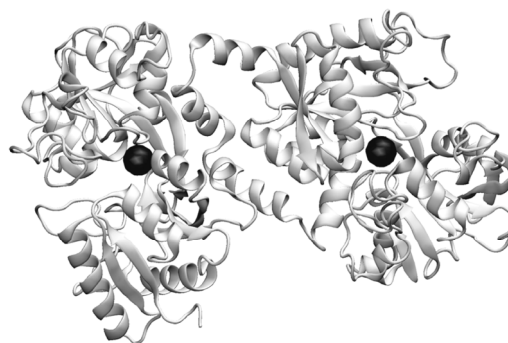
Sliny jsou směsí biologicky významných glykoproteinů, proteinů, enzymů, hormonů, minerálů a elektrolytů rozpuštěných ve vodě a jsou produkovány především párovými velkými slinnými žlázami^{1,2}. Obsah vody a v ní rozpuštěných látek kolísá v závislosti na momentálním fyziologickém stavu organismu, přičemž jsou tyto procesy řízené vegetativním nervovým systémem na základě podmíněných a nepodmíněných reflexů². Sliny se podílejí na přenosu chuti k chuťovým pohárkům, zvlhčují dutinu ústní, štěpí sacharidy a tuky na jednodušší sloučeniny, mají antimikrobní, desinfekční a ochranné účinky³.

Jednou z významných složek slin je laktoferin. Tento glykosylovaný protein o molekulové hmotnosti 80 kDa je složený z 692 aminokyselin^{4,5} a jeho isoelektrický bod (pI) byl stanoven na 8–8,5 (cit.^{6,7}). Struktura laktoferinu je uspořádána do jednoduchého polypeptidového řetězce strukturovaného do dvou domén (obr. 1, převzato z databáze Expasy). Ty jsou pak schopny vázat ionty kovů, nejčastěji Fe²⁺ nebo Fe³⁺, ale také i ionty Cu²⁺, Zn²⁺ a Mn²⁺ (cit.^{6,7}). Výskyt tohoto proteinu byl zaznamenán v sekretech několika sliznic (mateřském mléce, slzách, krevní plazmě, slinách, potu spermatu či vaginálním výtoku)⁶. V organismu plní důležitou funkci v nespecifickém imunitním systému díky jeho antimikrobní, fungicidní a antivirové aktivitě, která je podmíněná schopností vázat kovy ionty, které většina bakterií vyžaduje pro svůj růst⁸.

Zvýšení hladiny laktoferinu v krvi je často spojené se závažnými procesy probíhajícími v organismu⁹.

Ze vzorku lze laktoferin izolovat díky podstatně odlišnému isoelektrickému bodu v porovnání s dalšími proteiny přítomnými ve vzorku pomocí iontově-výměnné chromatografie^{10–14}. Další využívané metody pro izolaci a přečištění laktoferinu jsou enzymově značená imunoanalýza¹⁵, afinitní membránová chromatografie¹⁶ či nověji pseudoafinitní chromatografie¹⁷. Kvantitativní stanovení se nejčastěji provádí imunoseparačními metodami, jako je enzymově značená imunoanalýza (ELISA)^{18–20}, radioimunoanalýza (RIA)^{21,22}, či luminiscenčně založená imunoanalýza (LSA)²³. Pro tyto metody se limity detekce pohybují v rozmezí 10 ng ml⁻¹–0,2 mg ml⁻¹. Literatura se však také zmiňuje o stanovení laktoferinu vysoce účinnou kapalinovou chromatografií s detektorem diodového pole (DAD) s limitem detekce 4,5 µg ml⁻¹ (cit.²⁴). Vzhledem k vhodnosti metod kapilární elektroforézy pro stanovení proteinů²⁵ byl laktoferin studován i čipovou gelovou elektroforézou²⁶. Pro detekci laktoferinu jsou vzhledem k snadné možnosti miniaturizace detekčního zařízení²⁷ do budoucna použitelné i amperometrické metody (limit detekce (LOD) 35 nM)²⁸. Jako další elektrochemické metody vhodné pro stanovení proteinů lze uvést Brdičkovu reakci²⁹ nebo chronopotentiometrickou rozpouštěcí analýzu, kde je možné pro proteiny či enzymy dosáhnout výrazně nízkých limitů detekce^{30,31}.

V této práci byla provedena separace proteinu laktoferinu z lidských slin za využití iontově-výměnné kapalinové chromatografie s monolitickou kolonou a následně byla optimalizována metoda off-line fotometrického stanovení, kde byly porovnány parametry metody stanovení s běžně používanými metodami barvení proteinů pomocí biuretového činidla, pyrogalové červeně a Bradfordova činidla³². Nejvhodnější metoda byla využita pro off-line stanovení



Obr. 1. 3D struktura lidského laktoferinu obsahujícího dva ionty Fe²⁺ vázané v každé z jeho dvou domén (zdroj:www.expasy.org)

laktoferinu v lidských slinách po přečištění kapalinovou chromatografií.

Experimentální část

Chemikálie

Laktoferin a ostatní chemikálie (Trizma base, HCl, NaCl, Etanol, H₃PO₄, ACS voda, Coomassie brilliant blue) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Destilovaná voda byla připravena v laboratoři na zařízení AquaOsmotic 02 (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika) a následně přečištěna na zařízení Millipore RG (MilliporeCorp., USA, 18 MΩ) na deionizovanou (MiliQ) vodu.

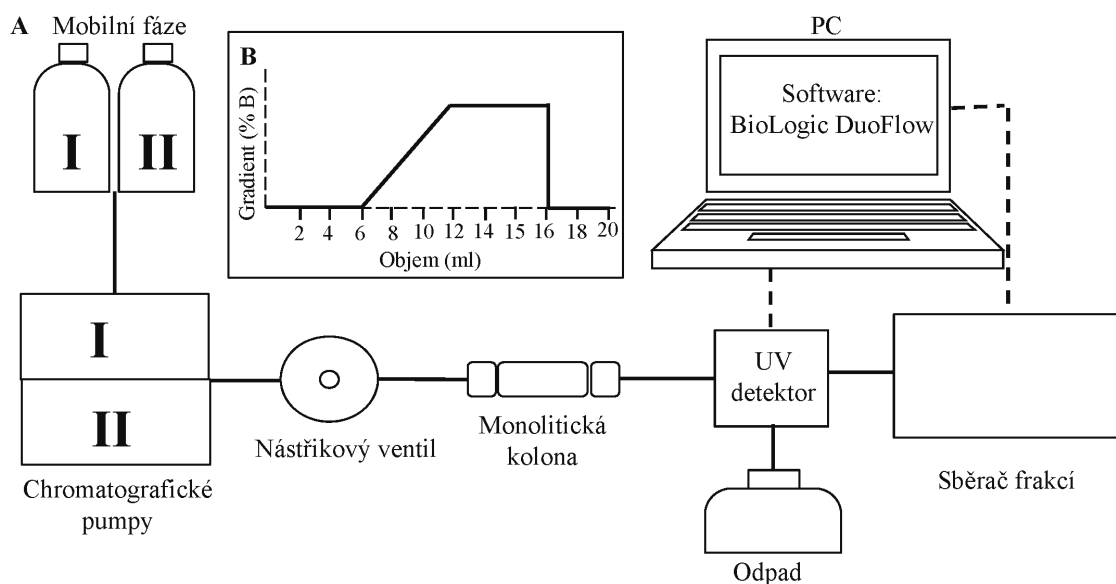
Odběr a příprava vzorků

K experimentu bylo vybráno 9 zdravých osob ve věku 23–28 let (7 žen a 2 muži) a 1 osoba trpící celiakií (vzorek č. 10, žena). Vzorky slin byly odebírány do odběrových zkumavek Salivette (Sarstedt, Německo). Přiložená buničina byla žvýkána po dobu 2 min. Následovala centrifugace vzorků v Salivette zkumavce při 3000 rpm po dobu 5 min (Universal 320, Hettich Zentrifugen, Německo). Odebraný vzorek byl naředěn 1:1 s 25 mM Tris-HCl pufr (pH 7) a přefiltrován přes mikrofiltr (microStar 0,45 μm CA,

Costar Cambridge). Takto připravený vzorek byl analyzován iontově výměnnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí a separované frakce byly off-line fotometricky analyzovány automatickým spektrofotometrem.

Iontově-výměnná kapalinová chromatografie s UV detekcí

Systém kapalinového chromatografu Biologic Duo-Flow (Biorad, USA) byl složen ze dvou chromatografických pump pro dopravu elučních pufrů, monolitické kolony s jedním CIM diskem, který byl modifikován -SO₃⁻ funkčními skupinami (Bia Separations, Slovinsko), dávkovacího ventilu s 2 μl dávkovací smyčkou, UV-VIS detektoru a automatického sběrače frakcí (obr. 2A). Kapalina byla na CIM kolonu dopravována dvěma pumpami za pomoci vysokotlakého gradientu. Výstup z kolony byl napojen na UV detektor, který sloužil pro úpravu nastavení sběru frakcí. Jako mobilní fáze I (MFI) byl použit 25 mM Tris-HCl pufr o pH 7, mobilní fáze II (MFII) byla tvořena 2M NaCl v MFI. Průtok mobilní fáze byl 4 ml min⁻¹. Laktoferin byl eluován lineárně se zvyšujícím gradientem NaCl: 0–6 ml (0 % II), 6 → 12 ml (100 % II), 12→16 ml (100 % II), 16→17 ml, (0 % II), 17 → 21 ml (0 % II) (obr. 2B). Detektor byl nastaven na 280 nm (maximum při absorpci aromatických aminokyselin). Frakce laktoferinu o objemu 1 ml byla sbírána v elučním objemu 10,62–11,62 ml automatickým sběračem frakcí (Biorad, USA).



Obr. 2. (A) Schéma iontově výměnné kapalinové chromatografie využívající monolitickou CIM kolonu s UV detektorem a sběračem frakcí. Kapalina byla na CIM kolonu dopravována dvěma pumpami za pomoci vysokotlakého gradientu. Výstup z kolony byl napojen na čtyřkanálový UV detektor, který sloužil pro úpravu nastavení sběru frakcí. Jako mobilní fáze I byl použit 25mM Tris-HCl (pH 7), mobilní fáze II se skládala z 2M NaCl v mobilní fázi A. Průtok mobilní fáze činil 4 ml min⁻¹ a detekce probíhala při 280 nm. (B) Známkování časového průběhu gradientu – koncentrace mobilní fáze B v závislosti na objemu

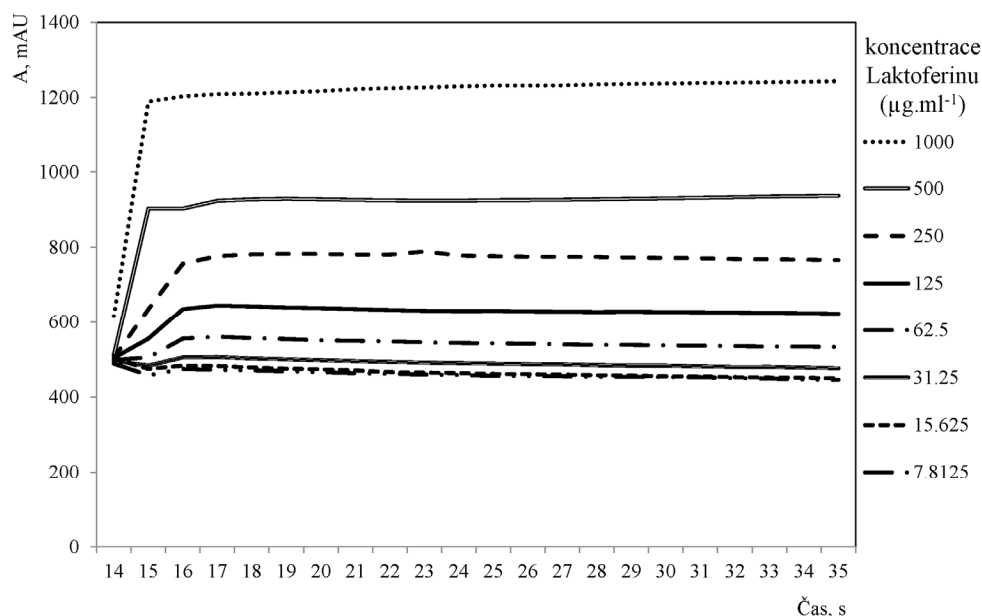
Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Vyseparované frakce laktoferinu byly analyzovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Pro studium laktoferinu byl použit 7,5% separační gel a koncentrace zaostřovacího gelu byla 5 %. SDS-PAGE probíhala na aparatuře Maxigel od firmy Biometra (Německo). Separace probíhala při napětí 150 V, dokud čelo proteinů nedosáhlo dolního konce gelu (~ 1 h). Během separace byl gel chlazen vodou. SDS-PAGE a detekce proteinů stříbrem byly provedeny podle klasických protokolů³³. Gel byl inkubován 1 hodinu v roztoku 1 (1,14 % kyseliny octové, 6,4 % methanolu, 0,1 % formaldehydu) s následným propláchnutím 3×15 min v roztoku 2 (methanol s MiliQ vodou v poměru 1:1). Poté byl opět inkubován 1 min v roztoku 3 (0,02 % thiosíranu sodného) a propláchnut 2×20 min destilovanou vodou. Následovala další inkubace 20 min v roztoku 4 (0,02 % AgNO₃, 0,076 % formaldehydu) a propláchnutí 20 min destilovanou vodou. Na závěr byl gel inkubován v roztoku 5 (6 % Na₂CO₃, 0,0004 % Na₂S₂O₃, 0,05 % formaldehydu) a byl pozorován vznik zbarvení. Po získání optimálního zbarvení (~ 3 min) byl gel ihned propláchnut 2×2 min destilovanou vodou. Pro zafixování byl hotový gel inkubován v roztoku 6 (6,4 % methanolu a 1,14 % kyseliny octové).

Off-line fotometrická analýza

Pro spektrofotometrické analýzy byl použit automatický spektrofotometr BS-200 (Mindray, Čína), který se

skládá z kyvetového prostoru (temperovaného na 37±0,1 °C), reagenčního prostoru s karuselem pro reagentie a přípravu vzorků (temperovaného na 4±1 °C) a optického detektoru³⁴. Zdrojem světla byla halogeno-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagentů zabezpečovalo robotické rameno s dávkovací jehlou (chyba dávkování do 1 % objemu). Kontaminace byla minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla MilliQ vodou. Ke stanovení laktoferinu pyrogalovou červeň bylo ke 200 µl činidla (50 mM sukcinová kyselina, 3,47 mM benzoát sodný, 0,06 mM molybdenát sodný, 1,05 mM oxalát sodný a 0,07 mM pyrogalová červeň)^{35–37} (Skalab-kit, Svitavy Česká republika) přidáno 4 µl vzorku. U metody dle Bradfordové^{38–40} bylo k 190 µl činidla (0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % ethanol, 8,5 % kyselina fosforečná v destilované vodě) přidáno 10 µl vzorku⁴¹. Detekce u obou metod probíhala při 578 nm a doba reakce byla 10 min. Pro stanovení proteinů biuretovým činidlem bylo do kyvety napipetováno 150 µl biuretového činidla (100 mM vinan sodno-draselný, 100 mM NaOH, 15 mM KI, 6 mM CuSO₄) a následně 3 µl vzorku. Po 10 min inkubace při 37 °C byla změřena absorbance při vlnové délce 546 nm. Obsah kyvet po nadávkování vzorku byl ihned promíchán automatickým míchadlem a analyzován. Typické záznamy v podobě kinetických křivek získaných z automatického fotometru BS-200 znázorňující časově závislé měření absorbance různých koncentrací laktoferinu jsou uvedeny na obr. 3. Absorbance byla odečítána v čase 18 sekund, kde byla zaznamenána maximální absorbance pro všechny body kalibrace.



Obr. 3. Kinetické křivky získané z automatického fotometru BS-200 znázorňující časově závislé měření různých koncentrací laktoferinu metodou dle Bradfordové. Na obrázku je znázorněna osmibodová kalibrační křivka v rozmezí 7,81 až 1000 µg ml⁻¹

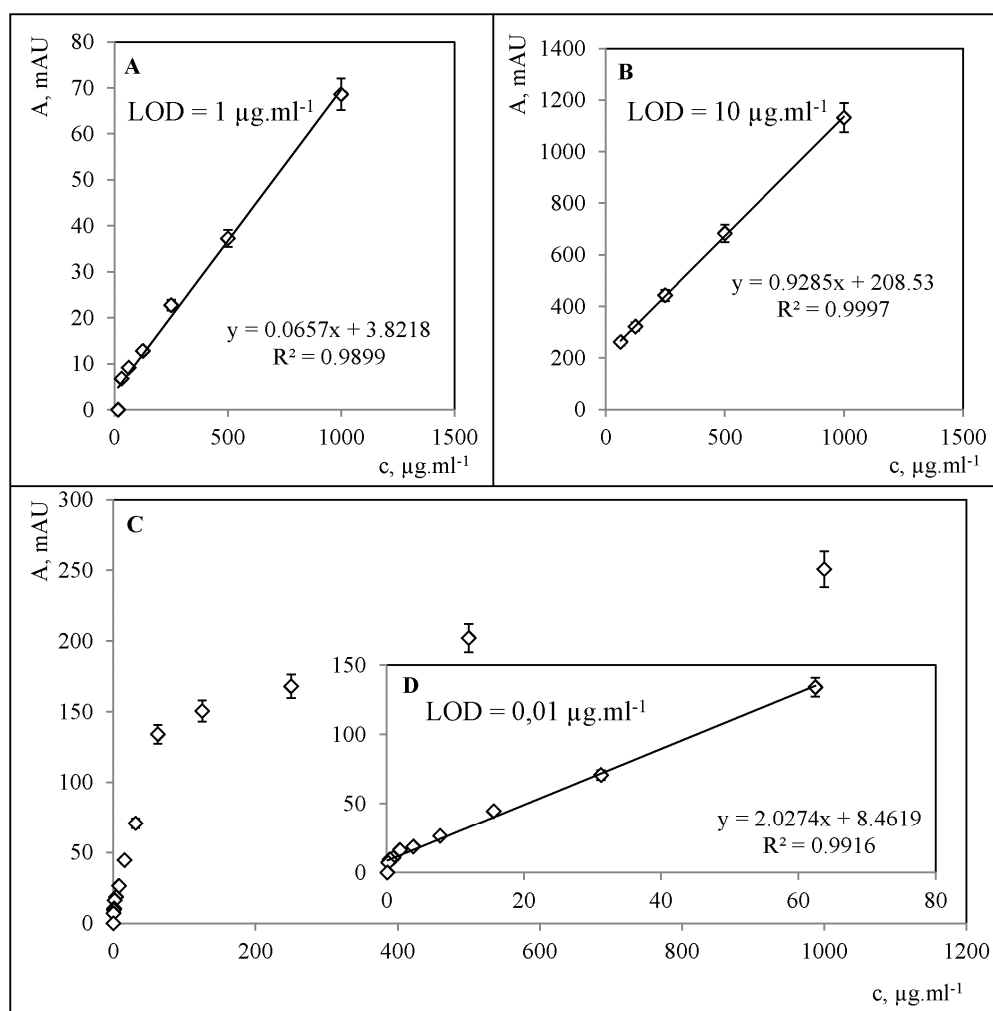
Výsledky a diskuse

Pro separaci laktoferinu jsme využili kapalinový chromatograf, ke kterému byla připojena monolitická kolona. Tato kolona je díky své konstrukci šetrná ke struktuře proteinu, neboť lze separaci provádět při vysokém průtoku a přitom při velmi nízkém tlaku, aniž by došlo k poškození struktury proteinu^{26,42}. Strukturální změny proteinů v závislosti na tlaku v koloně byly již v minulosti studovány^{43–45}. Pro separaci byl využit postup, jehož parametry byly optimalizovány v práci⁴², přičemž byla provedena optimalizace postupu pro izolaci laktoferinu ze slin, kdy jsme pozornost zaměřili na rychlost průtoku mobilní fáze a koncentrace solí obsažených v elučním pufru, a dále

jsme se zaměřili na výběr nejvhodnější fotometrické detekce.

Off-line fotometrická detekce

Nejprve jsme se zaměřili na výběr vhodné off-line fotometrické detekce pomocí různých typů barvení. Pro fotometrické stanovení koncentrace laktoferinu z izolovaných frakcí byly vybrány tři metody, které se používají ke stanovení proteinů, a to metoda s pyrogalovou červení^{35–37}, metoda dle Bradfordové^{38–40} a metoda s biuretovým činidlem⁴⁶. Ke zjištění limitu detekce ($3 \cdot S/N$)⁴⁷ metod byla proměřena 15 bodová kalibrační závislost laktoferinu v roztoku 2M NaCl v koncentračním rozmezí od 1



Obr. 4. Graf závislosti absorbance na koncentraci laktoferinu v získaných frakcích pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie analyzovaných v off-line provedení pomocí (A) pyrogalové červeně, (B) biuretového činidla a (C) metody dle Bradfordové v koncentračním rozmezí 0,061–1000 µg ml⁻¹. (D) Lineární část kalibrační křivky laktoferinu detegovaného metodou dle Bradfordové od 0,2 do 62,5 µg ml⁻¹

Tabulka I
Fotometrické stanovení proteinů

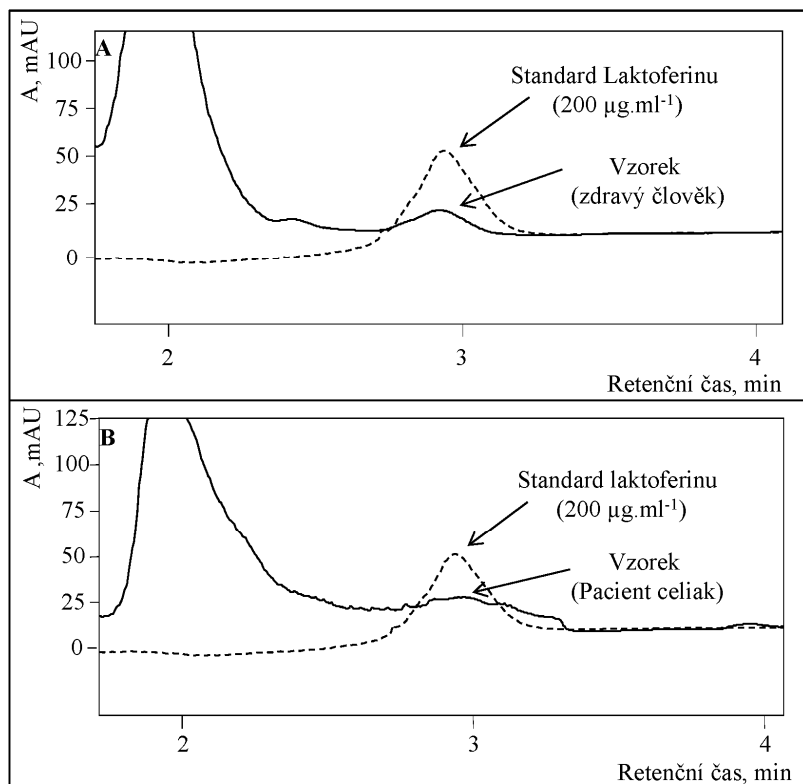
Metoda	Rovnice regrese	Lineární dynamický rozsah [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	R^2	LOD ^a [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	LOQ ^b [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	RSD ^c [%]
Pyrogalová červeň	$y = 0,0650x + 3,81$	16–1000	0,990	1	3	6
Biuretové činidlo	$y = 0,928x + 208$	62,5–1000	0,999	10	30	5
dle Bradfordové	$y = 2,03x + 8,46$	0,1–62,5	0,992	0,01	0,03	4

^a Limit detekce, ^b limit kvantifikace, ^c relativní směrodatná odchylka

do $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. V případě metody využívající pyrogalovou červeň (obr. 4A) byla linearita $R^2 = 0,9899$ v koncentračním rozmezí $15\text{--}1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ s limitem detekce $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (RSD = 6 %, $n = 3$, tab. I). Linearita kalibrační křivky biuretové metody (obr. 4B) byla $R^2 = 0,999$ v koncentračním rozmezí $62,5\text{--}1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Limit detekce 3S/N činil $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (RSD = 5 %, $n = 3$, tab. I). Kalibrace laktoferinu metodou dle Bradfordové (obr. 4C a D) vykazovala linearitu $R^2 = 0,9916$ v koncentračním rozmezí

1 do $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Limit detekce této metody (3 S/N byl $0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$ (RSD = 4 %, $n = 3$, tab. I).

Z těchto výsledků jasně vyplývá, že pro stanovení laktoferinu je nejvhodnější z pohledu limitu detekce metoda dle Bradfordové. Vzhledem k tomu, že v publikovaných studiích byly naměřené koncentrace laktoferinu ve slinách v rozmezí $10,54 \mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁴⁸) až $47 \mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁴⁹), byla pro off-line detekci zvolena fotometrická metoda dle Bradfordové. Pro ověření detekce i v off-line pro-



Obr. 5. (A) Chromatografický záznam vzorku slin zdravého člověka a standardu laktoferinu ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$). (B) Chromatografický záznam vzorku slin pacienta trpícího celiakií v proložení se standardem laktoferinu ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$)

vedení byla 15 bodová kalibrační závislost připravena také v pufru, který je součástí mobilní fáze A pro separaci laktoferinu, a kterým jsou sliny ředěny. Tato kalibrační řada laktoferinu byla analyzována iontově výměnnou kapalinovou chromatografií s následnou fotometrickou detekcí izolovaných frakcí metodou dle Bradfordové. Zjištěné hodnoty absorbance byly při porovnání stejné jako u kalibrace laktoferinu připraveného v prostředí eluentu, tedy mobilní fáze B. V porovnání s ostatními autory (Adam a spol.⁴² 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Yoshise a spol.²⁰ 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sykes a spol.²¹ 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a Drackova a spol.²⁴ 4,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) vykazuje námi optimalizovaná metoda nižší limity detekce.

Analýza reálných vzorků

Návratnost

Sliny jsou komplexem mnoha látek, které spolu mohou interferovat a tím zkreslovat získané výsledky. Byla tedy studována návratnost stanovení laktoferinu metodou standardního přidávku o koncentraci 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, kde analýza probíhala dle optimalizované metodiky. Z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná návratnost 53 \pm 5 % ($n=3$). Pomocí provedení gelové elektroforézy metodou SDS-PAGE^{45,50} byla potvrzeno, že izolovaná frakce obsahovala pouze protein o molekulové hmotnosti 80 kDa, která odpovídá laktoferinu.

Analýza reálných vzorků slin

Před izolací laktoferinu iontově-výměnnou kapalinovou chromatografií byly připravené vzorky slin podrobeny fotometrické analýze metodou dle Bradfordové pro určení celkové koncentrace proteinů. Naměřené absorbance byly přepočítány pomocí následující kalibrační přímky ($y =$

$4,8658x + 7204,7$) a zjištěná koncentrace se ve slinách pohybovala v rozmezí 490 až 860 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Stanovené koncentrace korespondují s literaturou, která udává celkové množství proteinů ve slinách od 720 do 2450 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.^{51,52}). Pro stanovení laktoferinu ze slin byly vzorky izolovány iontově výměnnou kapalinovou chromatografií. Optimalizované podmínky separace byly: průtok mobilní fáze 4 ml min^{-1} a koncentrace NaCl v mobilní fázi B pro vysolení proteinu z kolony 2 M. V elučním objemu 5,26–6,26 ml byla sbírána frakce o objemu 1 ml. Chromatogramy laktoferinu ze vzorku slin pacienta a zdravého člověka jsou uvedeny na obr. 5A a 5B. Odebrané frakce obsahující laktoferin byly následně off-line fotometricky analyzovány metodou dle Bradfordové. Koncentrace laktoferinu se u studovaných zdravých lidí (muži a ženy ve věku 18 až 23 let) po přepočtu na celkový obsah proteinů (hodnoty jsou uvedené jako μg laktoferinu na mg celkových proteinů) pohybovala v rozmezí 32 \pm 2 až 100 \pm 3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ s průměrným obsahem laktoferinu ve slinách 42 \pm 4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ ($n=3$). V ostatních publikovaných studiích byly zjištěny koncentrace laktoferinu ve slinách v rozmezí 10,54 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁴⁸) až 47 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁴⁹), což odpovídá našim výsledkům, které byly v rozmezí 20–35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (tab. II). U osoby trpící celiakií (vzorek č. 10) byla zjištěna 2,5 \times vyšší hladina laktoferinu než u průměrných hodnot u zdravých jedinců (tab. II). Vyšší hladinu laktoferinu u celiaků dokládají i další studie^{53,54}, kde byla zjištěna vyšší koncentrace laktoferinu ve střevní mukóze. U kontrol byl test na laktoferin negativní. Vzhledem k tomu, že se u jedinců trpící touto chorobou po styku nebo požití lepku vytváří imunitní reakce s následnou tvorbou zánětu střevní sliznice, může tento patologický stav vést ke zvýšené koncentraci laktoferinu v organismu⁵⁵.

Tabulka II

Analýza vzorků slin

Vzorek ^a	c (proteiny) ^b [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	c (laktoferin) [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	c (laktoferin/celkové proteiny) ^c [$\mu\text{g/mg}$ proteinů]
1	490 \pm 30	80 \pm 7	230 \pm 20
2	700 \pm 50	70 \pm 6	130 \pm 10
3	630 \pm 70	70 \pm 6	240 \pm 20
4	560 \pm 40	60 \pm 5	170 \pm 10
5	690 \pm 50	30 \pm 2	190 \pm 20
6	680 \pm 50	50 \pm 4	150 \pm 10
7	790 \pm 60	60 \pm 5	150 \pm 10
8	600 \pm 40	70 \pm 6	230 \pm 20
9	860 \pm 60	60 \pm 5	130 \pm 10
10	500 \pm 40	110 \pm 10	420 \pm 30

^a Vzorky č. 1–9 byly odebrány ($n = 3$) od zdravých osob ve věku 23–28 let, vzorek 10 pochází od ženy (28) trpící celiakií, ^b celková koncentrace proteinů byla stanovena pomocí fotometrické metody dle Bradfordové, ^c koncentrace laktoferinu se pohybovala v rozmezí 130 \pm 10 až 240 \pm 20 $\mu\text{g mg}^{-1}$ s průměrným obsahem laktoferinu ve slinách 170 \pm 10 $\mu\text{g mg}^{-1}$ ($n=3$)

Závěr

Metoda iontově výměnné kapalinové chromatografie s využitím monolitické kolony a následná off-line fotometrická detekce izolovaných frakcí s využitím metody dle Bradfordové je velmi vhodným a robustním postupem pro stanovení laktoferinu v lidských slinách. Kontrola izolovaného laktoferinu byla s pozitivním výsledkem provedena pomocí SDS-PAGE. Optimalizovanou metodou byla stanovena koncentrace laktoferinu u deseti zdravých subjektů. Průměrný obsah laktoferinu ve slinách zdravých osob byl $42 \pm 4 \mu\text{g mg}^{-1}$, u osoby trpící celiakií byla tato hodnota $2,5 \times$ vyšší. Výsledky této práce ukazují, že spojením separační techniky využívající monolitickou kolonu a klasické fotometrické metody dle Bradfordové implementované do automatického analyzátoru je tento postup snadno plně automatizovatelný a vhodný pro tyto typy studia.

Tato práce byla financována z projektu CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

LITERATURA

- Schenkels L., Veerman E. C. I., Amerongen A. V. N.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 161 (1995).
- Humphrey S. P., Williamson R. T.: *J. Prosthet. Dent.* 85, 162 (2001).
- Amerongen A. V. N., Veerman E. C. I.: *Oral Dis.* 8, 12 (2002).
- Rey M. W., Woloshuk S. L., Deboer H. A., Pieper F. R.: *Nucleic Acids Res.* 18, 5288 (1990).
- Powell M. J., Ogden J. E.: *Nucleic Acids Res.* 18, 4013 (1990).
- Levay P. F., Viljoen M.: *Haematologica* 80, 252 (1995).
- Lonnerdal B., Iyer S.: *Annu. Rev. Nutr.* 15, 93 (1995).
- Arslan S. Y., Leung K. P., Wu C. D.: *Oral Microbiol. Immunol.* 24, 411 (2009).
- Sukharev A. Y., Yermolayeva T. N., Beda N. A., Krylov G. F.: *Klin. Lab. Diagnost.* 2009, 38.
- Hynek R.: *Chem. Listy* 89, 93 (1995).
- Recio I., Visser S.: *J. Chromatogr., A* 831, 191 (1999).
- Salmon V., Legrand D., Georges B., Slomianny M. C., Coddeville B., Spik G.: *Protein Expression Purif.* 9, 203 (1997).
- Ye X. Y., Yoshida S., Ng T. B.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1143 (2000).
- Uchida T., Dosako S., Sato K., Kawakami H.: *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* 58, 482 (2003).
- Hutchens T. W., Henry J. F., Yip T. T.: *Clin. Chem.* 35, 1928 (1989).
- Wolman F. J., Gonzalez Maglio D., Grasselli A., Cascone O.: *J. Membr. Sci.* 288, 132 (2007).
- Ng P. K., Yoshitake T.: *J. Chromatogr. B* 878, 976 (2010).
- Sato R., Ohki K., Syuto B., Sato J., Naito Y.: *International Congress Series; Lactoferrin: Structure, function and applications*, 1195, 111 (2000).
- Shimoto H., Kobori M., Tsushida T., Shinohara K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1044 (1997).
- Yoshise R. E., Matsumoto M., Chiji H., Kuwata H., Shin K., Yamauchi K., Tamura Y., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K.: *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* 62, 446 (2007).
- Sykes J. A. C., Thomas M. J., Goldie D. J., Turner G. M.: *Clin. Chim. Acta* 122, 385 (1982).
- Boxer L. A., Coates T. D., Haak R. A., Wolach J. B., Hoffstein S., Baehner R. L.: *N. Engl. J. Med.* 307, 404 (1982).
- Maacks S., Yuan H. Z., Wood W. G.: *J. Biolumin. Chemilumin.* 3, 221 (1989).
- Drackova M., Borkovcova I., Janstova B., Naiserova M., Pridalova H., Navratilova P., Vorlova L.: *Czech. J. Food Sci.* 27, S102 (2009).
- Ptacek P.: *Chem. Listy* 85, 515 (1991).
- Zitka O., Krizkova S., Adam V., Horna A., Kukacka J., Prusa R., Zizkova V., Kizek R.: *Chem. Listy* 104, 197 (2010).
- Peckova K., Mocko V., Opekar F., Swain G. M., Zima J., Berek J.: *Chem. Listy* 100, 124 (2006).
- Campanella L., Martini E., Pintore M., Tomassetti M.: *Sensors* 9, 2202 (2009).
- Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
- Huska D., Adam V., Zitka O., Kukacka J., Prusa R., Kizek R.: *Electroanalysis* 21, 536 (2009).
- Adam V., Petrlova J., Wang J., Eckschlager T., Trnkova L., Kizek R.: *PLoS One* 5, 1 (2010).
- M. B. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
- Krizkova S., Hrdinova V., Adam V., Burgess E. P. J., Kramer K. J., Masarik M., Kizek R.: *Chromatographia* 67, S75 (2008).
- Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Adam V., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., Kizek R.: *Molecules* 15, 8618 (2010).
- Yang J. Y., Chien T. I., Lu J. Y., Kao J. T.: *Clin. Chim. Acta* 408, 75 (2009).
- Pupkova V. I., Prasolova L. M.: *Klin. Lab. Diagnost.* 17 (2007).
- Silva A. S., Falkenberg M.: *Clin. Biochem.* 44, 1000 (2011).
- Seevaratnam R., Patel B. P., Hamadeh M. J.: *J. Biochem.* 145, 791 (2009).
- Field A., Field J.: *Food Chem.* 121, 912 (2010).
- Carlsson N., Borde A., Wolfel S., Akerman B., Larsson A.: *Anal. Biochem.* 411, 116 (2011).
- Zor T., Seliger Z.: *Anal. Biochem.* 236, 302 (1996).
- Adam V., Zitka O., Dolezal P., Zeman L., Horna A., Hubalek J., Sileny J., Krizkova S., Trnkova L., Kizek R.: *Sensors* 8, 464 (2008).
- Kukacka J., Zitka O., Horna A., Stejskal K., Zehnalek J., Adam V., Havel L., Zeman L., Prusa R., Trnkova L., Kizek R.: *Faseb J.* 21, A635 (2007).
- Zitka O., Horna A., Stejskal K., Zehnalek J., Adam V., Havel L., Zeman L., Kizek R.: *Acta Chim. Slov.*

- 54, 68 (2007).
45. Zítka O., Krizkova S., Skalickova S., Dospivova D., Adam V., Kizek R.: *Electrophoresis in press*, (2013).
 46. Ohnishi S. T., Barr J. K.: *Anal. Biochem.* 86, 193 (1978).
 47. Long G. L., Winefordner J. D.: *Anal. Chem.* 55, A712 (1983).
 48. Jentsch H., Sievert Y., Gocke R.: *J. Clin. Periodontol.* 31, 511 (2004).
 49. Rudney J. D., Smith Q. T.: *Infect. Immun.* 49, 469 (1985).
 50. Grunert T., Marchetti-Deschmann M., Miller I., Muller M., Allmaier G.: *Electrophoresis* 29, 4332 (2008).
 51. Bonilla C. A.: *J. Dent. Res.* 51, 664 (1972).
 52. Jenzano J., Legette Z., Featherstone G., Lundblad R.: *FASEB J.* 8, A389 (1994).
 53. Barresi G., Tuccari G.: *Pathol. Res. Pract.* 178, 111 (1983).
 54. Fine K. D., Ogunji F., George J., Niehaus M. D., Guerrant R. L.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 1300 (1998).
 55. Sollid L. M.: *Nat. Rev. Immunol.* 2, 647 (2002).

S. Skaličková^a, O. Zítka^a, S. Křížková^a, M. Vlková^c, J. Sochor^{a,b}, V. Adam^{a,b}, and R. Kizek^{a,b}
(^aDepartment of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno, ^bCentral European Institute of Technology, University of Technology, Brno, ^cDepartment of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital, Brno): **Isolation and Determination of Lactoferrin in Human Saliva**

Lactoferrin, a globular glycoprotein, is an important component of saliva. It shows an antibacterial, anticancerogenic and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to develop a method of isolation of lactoferrin from human saliva using ion exchange chromatography in a monolithic column and spectrometric detection with Pyrogallol Red by the Bradford and biuret methods. The calibration curve for lactoferrin was linear in the range 0.06–62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, limit of detection 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The lactoferrin concentration in saliva of healthy subjects was $42 \pm 4 \mu\text{g mg}^{-1}$. Patient with celiac disease showed 2.5× times higher concentration of lactoferrin compared with healthy subjects.