

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

Název: **METODY SEPARACE PEPTIDŮ A ODBĚR REÁLNÝCH VZORKŮ**

Vypracovala: **Zuzana Lacková**

Datum: **7. 2. 2014**

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu

---

---

---

---

---

---

---

---

## ODBĚR-PŘEDÁNÍ VZORKŮ

**MĚLI BYCHOM ZNÁT:**

- informace, které má analýza poskytnout (př. AMK)
- analyty a jejich předpokládané obsahy (koncentrace)
- další složky materiálu a jejich obsahy (obsah proteinu)
- požadavky a parametry analytické metody (způsob úpravy vzorku, přesnost)
- skupenství vzorku (u tuhých vzorků velikost částic, mechanické vlastnosti) a stabilita vzorku

**VZOREK:**

- nesmí být degradovaný, plesnivý, zkažený či jinak poškozený

---

---

---

---

---

---

---

---

**záleží na tom, co chceme dělat**

**1) METHALOTIONEIN**

**2) GFP**

---

---

---

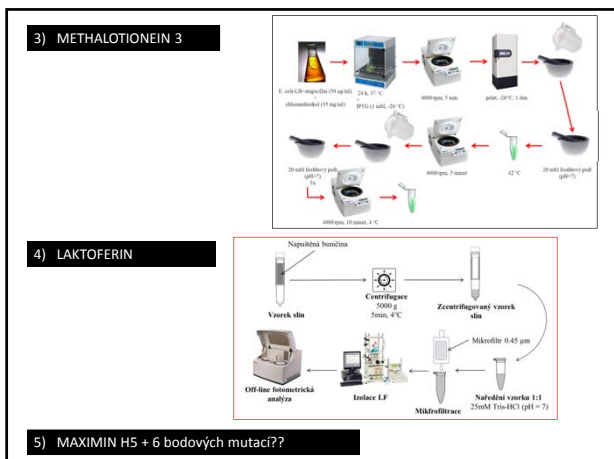
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## SEPARACE

- rozdělení složek vzorku na základě jeho fyzikálních a chemických vlastností
- separace peptidů vyžaduje vysokou separační účinnost, protože jsou složité a mají vysoký počet komponent

## CHROMATOGRRAFIE

- založená na rozdílné pohyblivosti částic unášených mobilní fází při průchodu stacionární fází

---

---

---

---

---

---

---

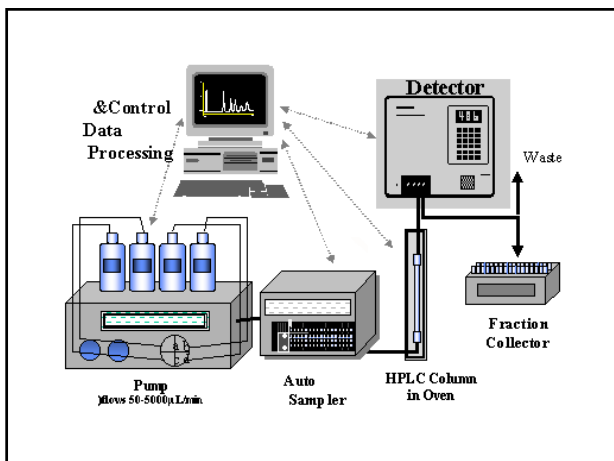
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

## RP-HPLC

CHROMATOGRÁFIE NA REVERZNÍCH (OBRÁCENÝCH) FÁZÍCH

- interakce molekul solutu **podle jejich polarit** (hydrofobní interakce se stacionární fází)
- s klesající polaritou látek vzrůstá jejich retence (zadrženi) v koloně
- polární mobilní fáze (směs vody a zředěných kyselin či zásad)
- nepolární stacionární fáze (silikagel-C řetězce), sorbent či oxidy kovu)
- separace peptidů, léčiv či biochemických sloučenin

---

---

---

---

---

---

---

---

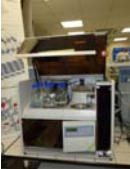
---

---

## IEC

IONTOVÉ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRÁFIE

- výměna iontů mezi mobilní a stacionární fází na základě **rozdílných nábojů** (silné elektrostatické interakce-přitahování opačných nábojů)
- analyt v průběhu separace prostupuje směrem k měničci iontů, poté prochází měničcem a dochází k vlastní výměně iontů
- stacionární fáze je tvořena ionexem (měničci iontů)
  - ↙ **anex-kladný náboj** (-NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>)
  - ↘ **katex-záporný náboj** (-OH, -COOH, -PO(OH)<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H)
- mobilní fáze -vodné roztoky (vzorek či eluční činidlo)
- interakce iontu s ionexem **stoupá s jeho nábojem** (polaritou) a **klesá s jeho velikostí**
- chování aminokyselin, peptidů, bílkovin



---

---

---

---

---

---

---

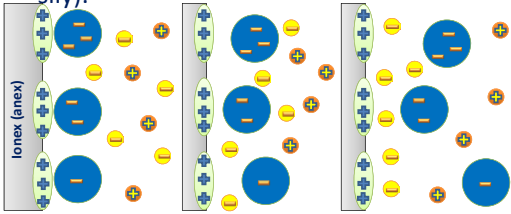
---

---

---

Způsoby uvolňování iontů z kolony:

a) Eluce vytěsněním (gradientem iontové síly):




---

---

---

---

---

---

---

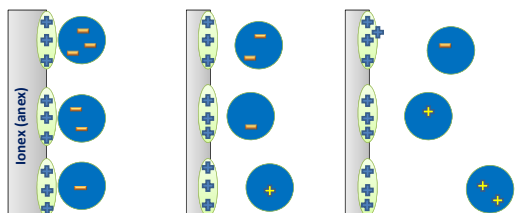
---

---

---

Způsoby uvolňování iontů z kolony:

b) Eluce přenábojováním (gradientem pH):




---

---

---

---

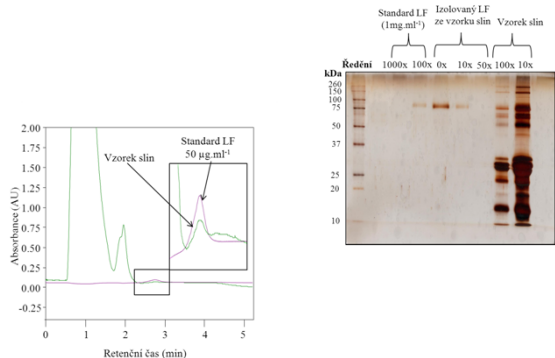
---

---

---

---

LAKTOFERIN




---

---

---

---

---

---

---

---

SEC

VYLUČOVACÍ (GELOVÁ) CHROMATOGRÁFIE

- ❑ rozdělování molekul **podle jejich velikosti a tvaru** ve svislé koloně, která je naplněna pórovitým polymerním gelem
- ❑ stacionární fáze-gel (složený z dextrinů zesítěných epichlorhydrinem)
- ❑ gel slouží jako molekulové síto-kolonou protéká konstantní rychlostí mobilní fáze stejného složení jako má roztok v pórech gelu a látky procházejí kolonou různou rychlostí
- ❑ dělení makromolekulárních látek, proteinů, enzymů, polysacharidů apod.




---

---

---

---

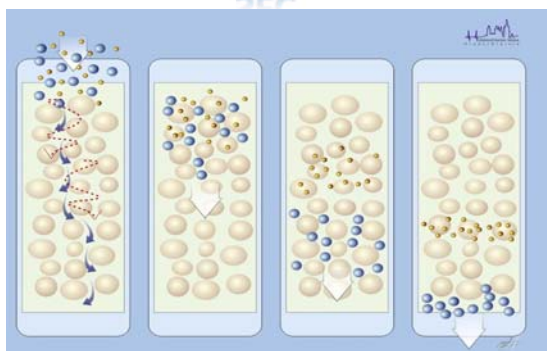
---

---

---

---

## SEC




---

---

---

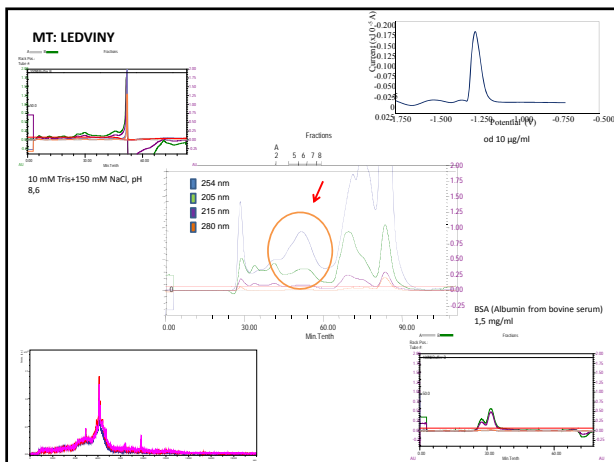
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## AC

### AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

- specifické interakce vhodných partnerů:
  - enzym - inhibitor, substrát
  - protilátka - antigen
  - receptor - hormon
- stacionární fáze** je tvořena nosičem (agarosa), na který je chemicky navázán jeden z partnerů
- mobilní fáze**
  - navazovací pufr
  - promývací pufr
  - eluční činidlo
- separace bioaktivních látek, oddělení proteinu z komplexní směsi
- aplikace v lékařství a proteomice, analýza látek

---

---

---

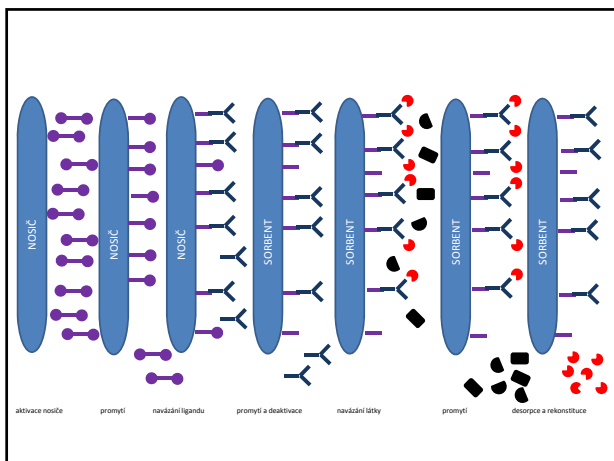
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

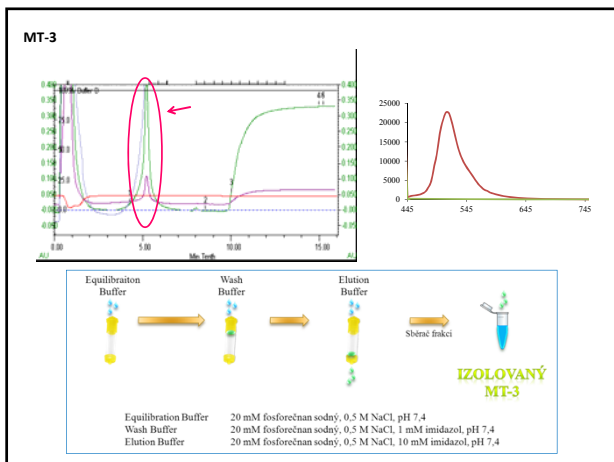
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## HIC

**HYDROFÓBNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRÁFIE**

- gradientová eluce se snižující se iontovou silou mobilní fáze
- retence solutů je ovlivňována přidavkem organických nebo anorganických solí do vody
- stacionární fáze
  - ➔ A. homogenní povrch (silikagel)
  - ➔ B. nízký obsah hydrofobních skupin (propyl, butyl)
- na selektivitu separace má vliv:
  - stacionární fáze
  - typ soli (sírán amonný, chlorid sodný, síran sodný)
  - teplota
  - pH
  - mobilní fáze
- zvýšení koncentrace soli v mobilní fázi → přechod solutu do stacionární fáze → zvýšení retence
- separace proteinů a velkých peptidů

---

---

---

---

---

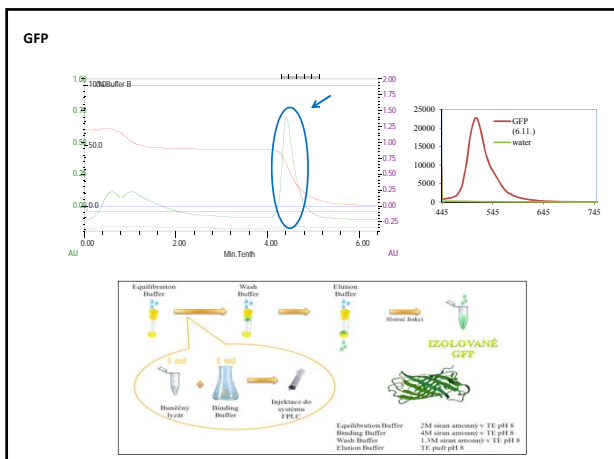
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**PODĚKOVÁNÍ**

Práce vznikla za podpory CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Prof. Ing. René Kizek, Ph.D.  
 Doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.  
 Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.  
 Mgr. et Bc. Markéta Komínková

Celému týmu laboratoře metalomiky a nanotechnologií

**NanoBioMetalNet**

Mendel University in Brno

esf evropský sociální fond v ČR EVROPSKÁ UNIE INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

esf evropský sociální fond v ČR EVROPSKÁ UNIE INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Děkuji Vám za pozornost**

Reg.č. projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023  
 Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu

**NanoBioMetalNet**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## LITERATURA

- 1) Future aspects in peptide chemistry: selected contributions presented at the Ringberg conferences. Editor Gunter Fischer, Wolfgang Voelter. Prague: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 1999, viii, 243 s. Collection symposium series. ISBN 80-862-4103-3.
- 2) ZOUHAR, Jan. AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE PROTEINU NA VÁZANÝCH KOVOVÝCH IONTECH. *Chemické listy* 93. 1999, s. 683-685.
- 3) ŠIMAN, Pavel. *Chromatografie*. Ústav lékařské biochemie, 2013, s. 38.
- 4) NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
- 5) MOTYKA, Kamil a Jan HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- 6) LEHOTAY, Jozef a Slovenská technická UNIVERZITA. *Separace metody v analytické chemii*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2009. ISBN 978-802-2730-365.
- 7) Ing. Dr. Otakar, MIKEŠ, DrSc., *LABORATORNÍ CHROMATOGRAFICKÉ METODY*. Praha: SNTL, 1980, 676 s.
- 8) Doc. Ing. Milan POPL a DrSc. Ing. Jaroslav KUBÁT, CSc. *Separace látek*. Praha: SNTL, 1986, 172 s.
- 9) VAŇKOVÁ, Hana. PEPTIDOVÉ MAPY. *Chemické listy* 93. 1999, s. 120-127.
- 10) Mezinárodní norma. [online]. [cit. 2014-01-29]. Dostupné z: [http://web.vscht.cz/~koplikr/1\\_Odb%C4%9Br\\_vzork%C5%AF.pdf](http://web.vscht.cz/~koplikr/1_Odb%C4%9Br_vzork%C5%AF.pdf)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---