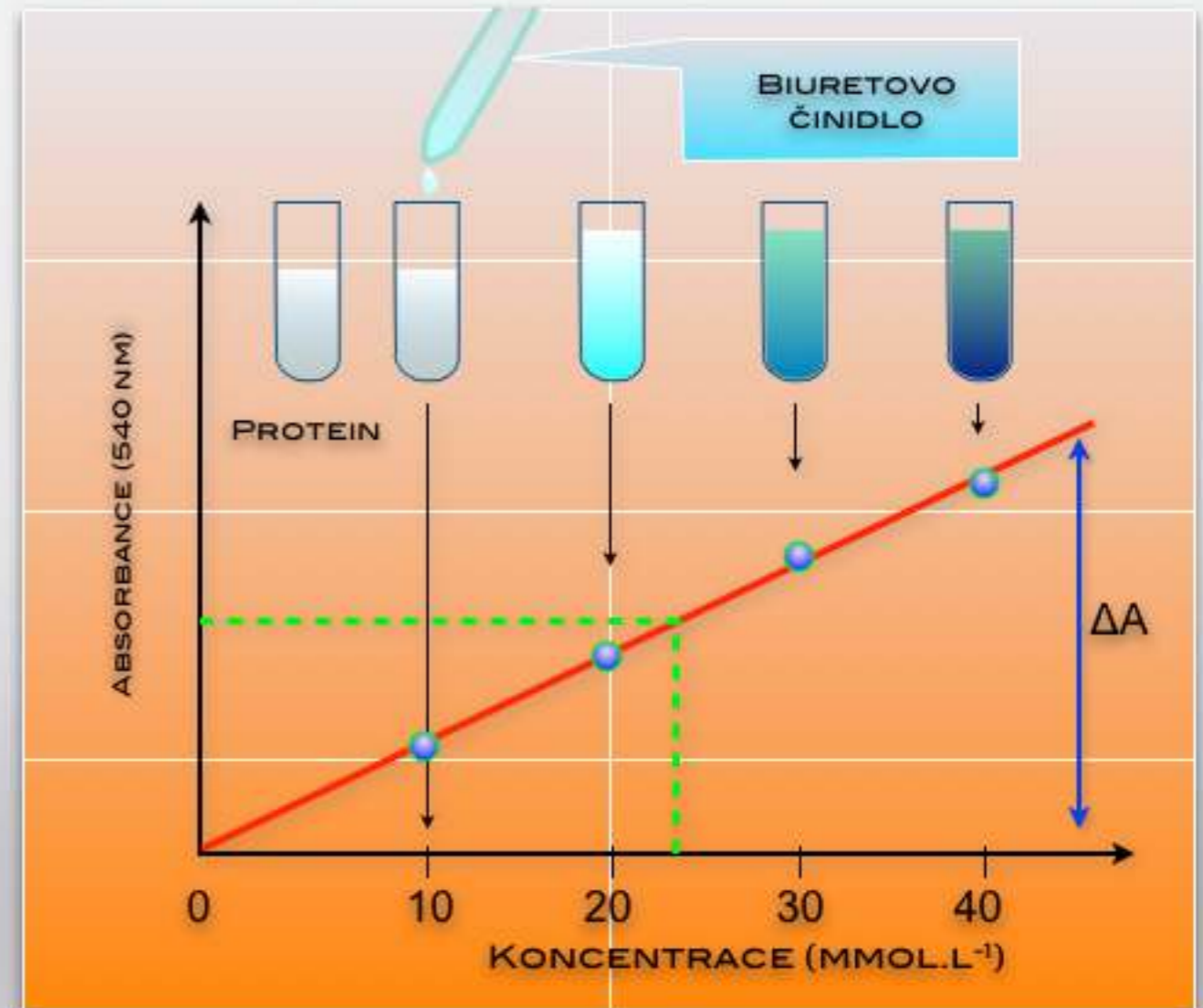


BAREVNÉ REAKCE PROTEINŮ

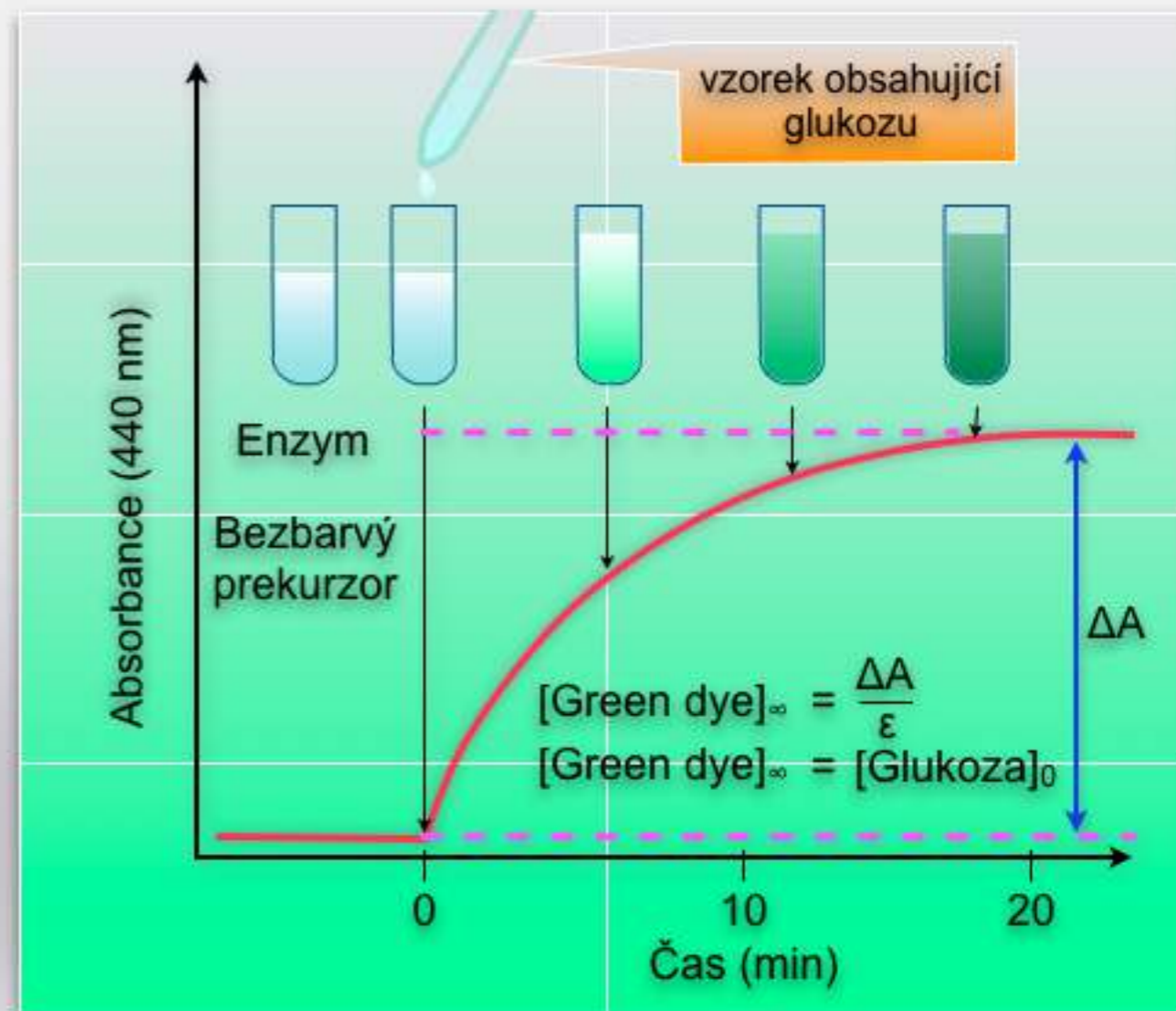
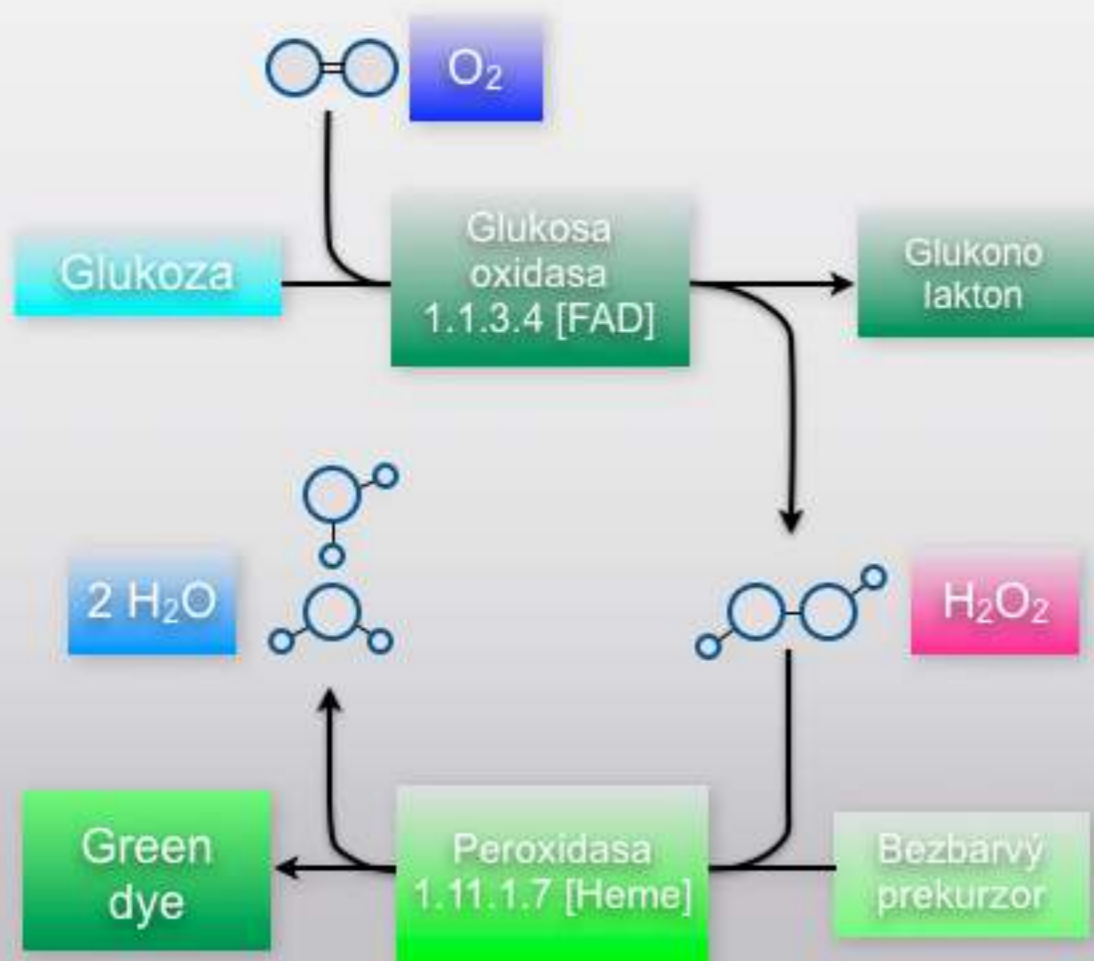
BIURETOVA REAKCE

BIURETOVA REAKCE SPOČÍVÁ VE TVORBĚ FIALOVĚ ZBARVENÝCH MĚDNATÝCH KOMPLEXŮ V ALKALICKÉM PROSTŘEDÍ. NÁZEV REAKCE JE ODVOZEN OD SLOUČENINY BIURET, COŽ JE PRODUKT KONDENZACE DVOU MOLEKUL MOČOVINY ZA ODŠTĚPENÍ AMONIAKU (TAVENÍ MOČOVINY). VZNIKLÉ SESKUPENÍ $H_2N-CO-NH-CO-NH_2$ JE MODELEM DVOU PEPTIDOVÝCH VAZEB. VLASTNÍ FIALOVÉ ZBARVENÍ KOMPLEXU ($\lambda_{MAX}=540NM$) VZNIKÁ INTERAKCÍ CU^{2+} A ČTYŘ DUSÍKOVÝCH ATOMŮ PEPTIDOVÝCH VAZEB. CITLIVOST SE POHYBUJE V ROZMEZÍ OD 200 DO 2000 $MG.ML^{-1}$ PROTEINU. REAKCI POSKYTUJÍ VŠECHNY SLOUČENINY MAJÍCÍ ALESPŮŇ DVĚ PEPTIDOVÉ VAZBY. Z AMINOKYSELIN REAGUJÍ POZITIVNĚ V KONCENTROVANÝCH ROZTOCÍCH HISTIDIN (HIS) A ASPARAGIN (ASN)

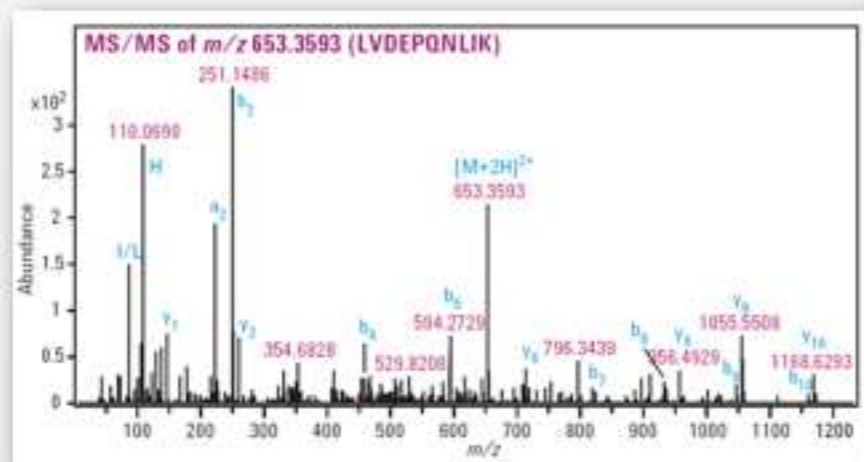


ENZYMATICKÉ STANOVENÍ GLUKÓZY

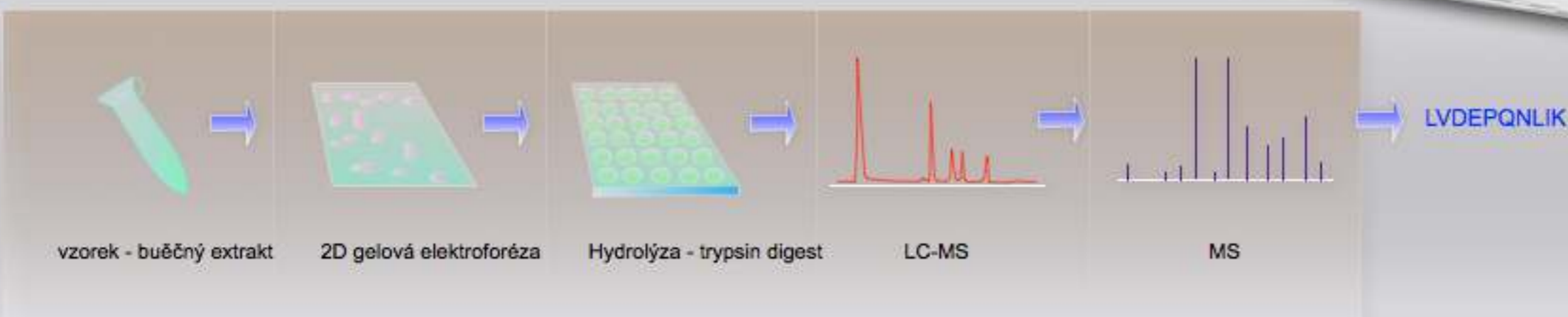
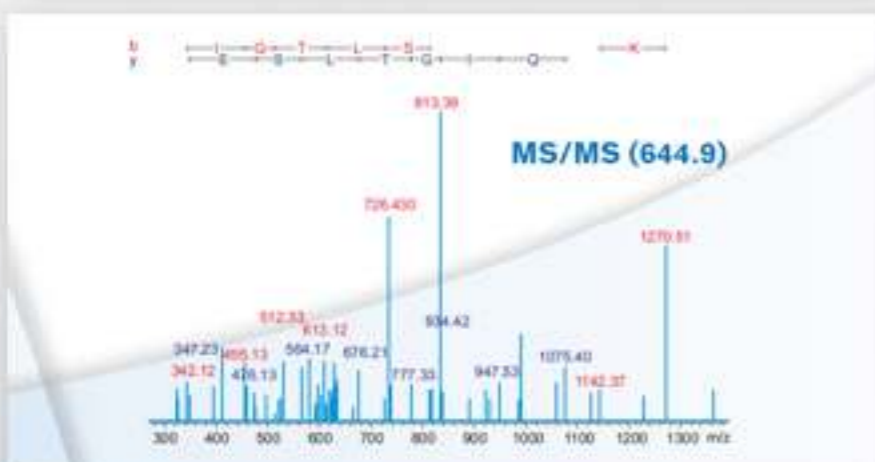
VĚTŠINA BIOMOLEKUL NEABSORBUJE V ULTRAFIALOVÉ OBLASTI SVĚTLA. Z TOHOTO DŮVODU SE POUŽÍVÁ REAKCÍ S URČITÝMI TYPY CHEMICKÝCH SLOUČENIN, KTERÉ TVOŘÍ Z DANÝMI BIOMOLEKULAMI BAREVNÉ KOMPLEXY. TĚCHTO REAKCÍ SE VYUŽÍVÁ PRO NÁSLEDNÁ MĚŘENÍ BIOMOLEKUL.



IDENTIFIKACE PROTEINŮ - HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE



Q-TOF - Q TIME OF FLIGHT
TOF - TIME OF FLIGHT
MALDI TOF

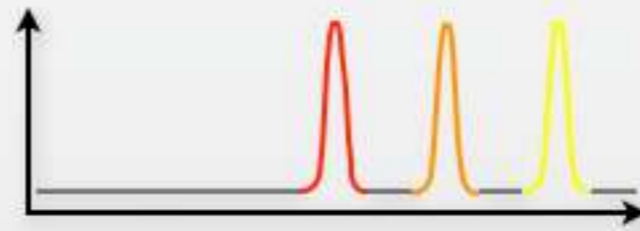


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

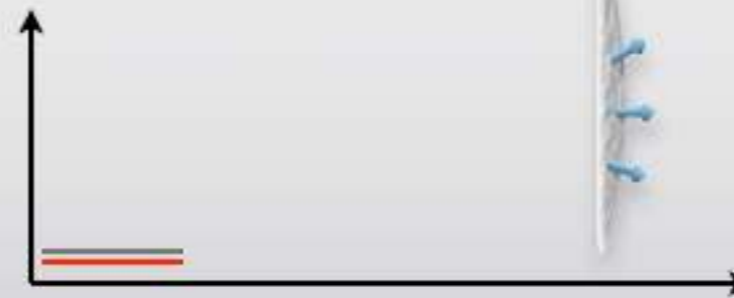
Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.
Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezilaborové integrace.

IZOLACE A SEPARACE PROTEINŮ - CHROMATOGRAFICKÉ METODY

GELOVÁ CHROMATOGRAFIE



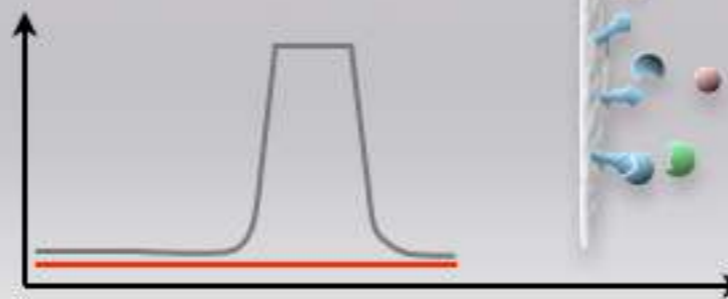
EKVILIBRACE KOLONY



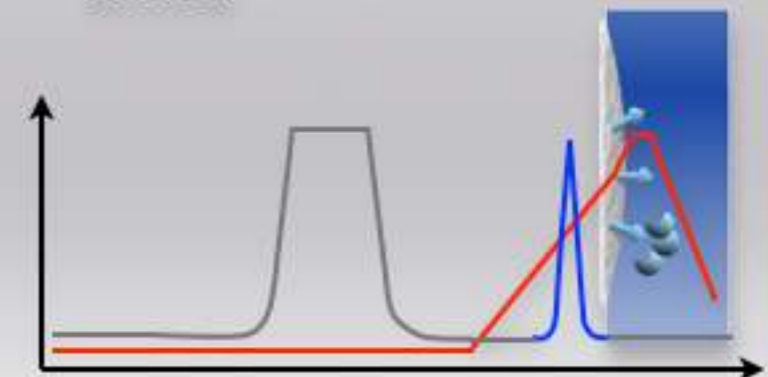
AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE



NANESENÍ VZORKU



ELUCE



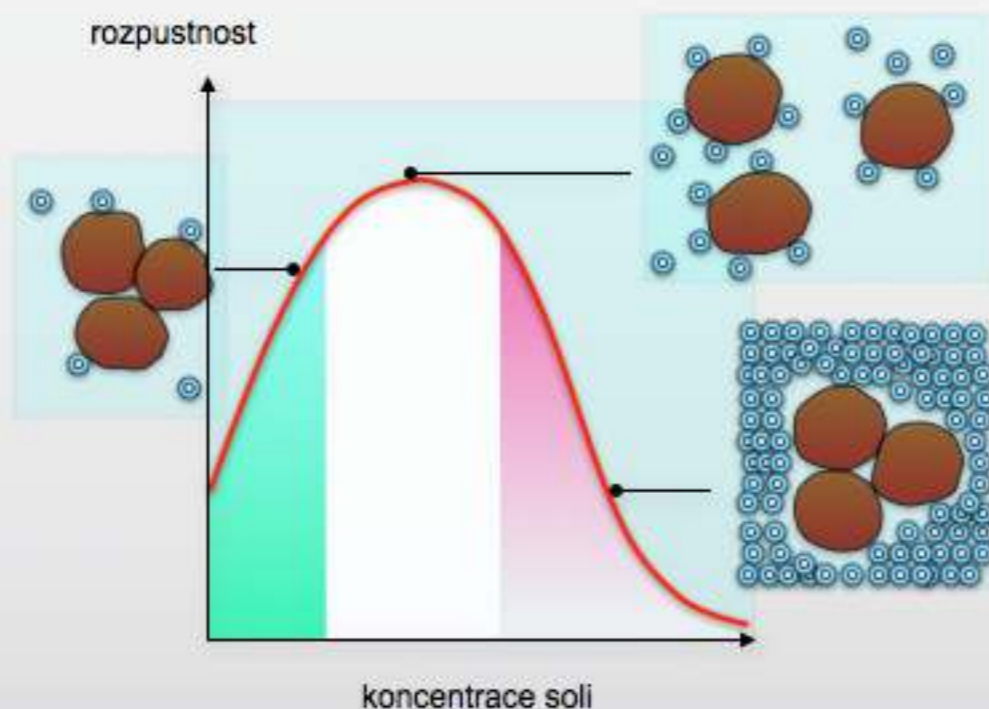
NÁZEV	KDA
SEPHADEX G-10	0,05-0,07
SEPHADEX G-25	1-5
SEPHADEX G-50	1-30
SEPHADEX G-100	4-150
SEPHADEX G-200	5-600
BIO-GEL P-2	0,1-1,8
BIO-GEL P-6	1-6
BIO-GEL P-10	1,5-20
BIO-GEL P-30	2,4-40
BIO-GEL P-100	5-100
BIO-GEL P-300	60-400
SEPHAROSE 6B	10-4000
SEPHAROSE 4B	60-20000
SEPHAROSE 2B	70-40000



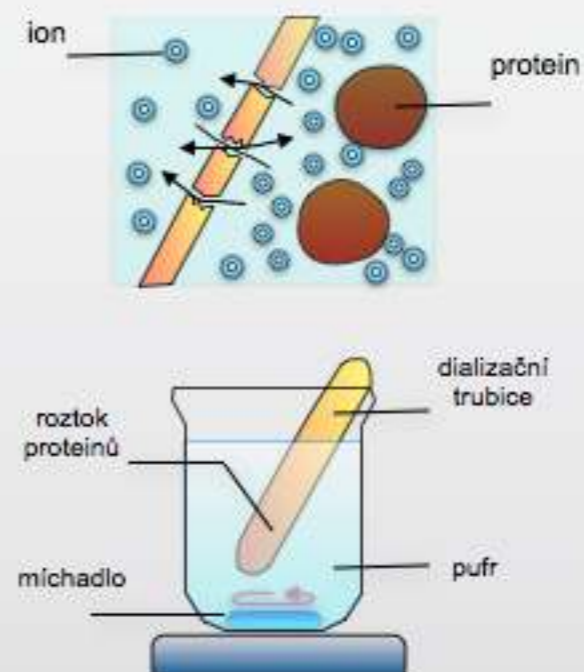
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

IZOLACE A SEPARACE PROTEINŮ

VYSOLOVÁNÍ



DIALÝZA



Vysolování je metoda separace proteinů (bílkovin) založená na skutečnosti, že bílkoviny jsou v prostředí vysokých koncentrací solí méně rozpustné. Koncentrace soli nezbytná pro vysrážení proteinu z roztoku závisí na druhu proteinu. Uvedená metoda se používá také k zakoncentrování roztoků proteinů (v případě potřeby lze použitou sůl následně odstranit pomocí dialýzy).

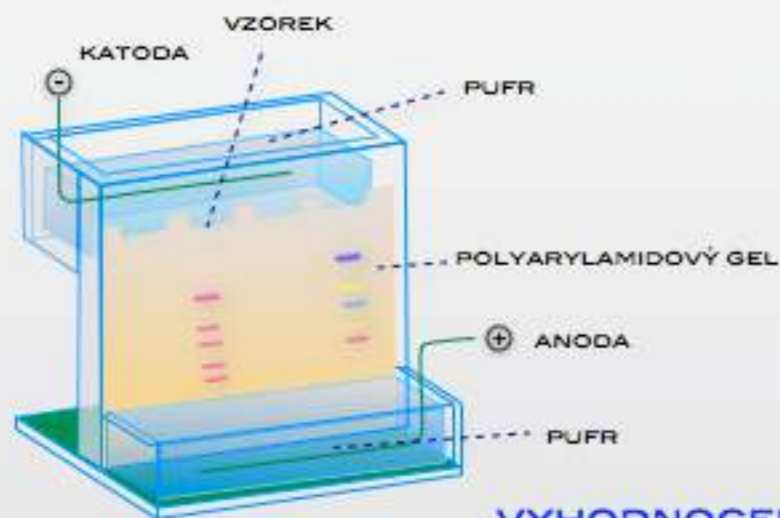
Když vzroste koncentrace soli v roztoku, část molekuly vody je přitahována k iontům soli místo k elektricky nabitým oblastem v molekule proteinu. V důsledku jsou oslabeny interakce protein-voda a převládnu interakce protein-protein, které vedou ke koagulaci proteinu. Tento proces je označován vysolování.

Protože různé proteiny mají různé aminokyselinové složení, srážejí se při odlišných koncentracích solí. Pokud známe rozpustnost proteinů dané směsi při různých koncentracích solí, můžeme nežádané proteiny vysolením z roztoku odstranit. Po odstranění sraženiny (pomocí filtrace nebo centrifugace) můžeme z filtrátu získat žádanou bílkovinu dalším zvýšením koncentrace soli.

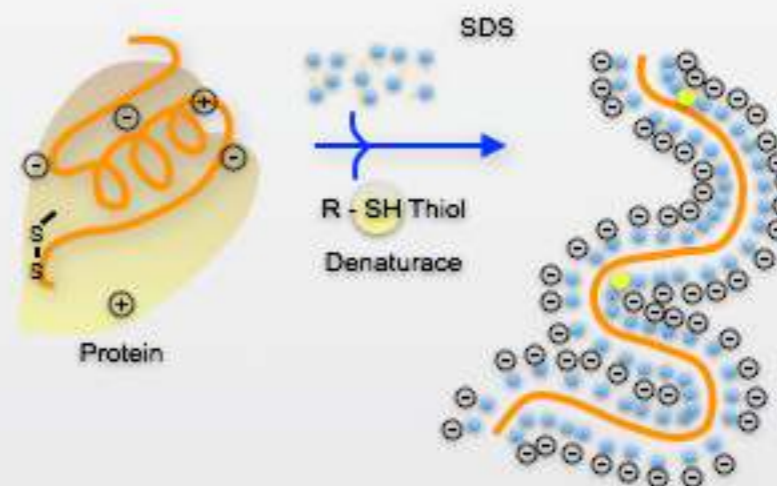


IZOLACE A SEPARACE PROTEINŮ - SDS GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

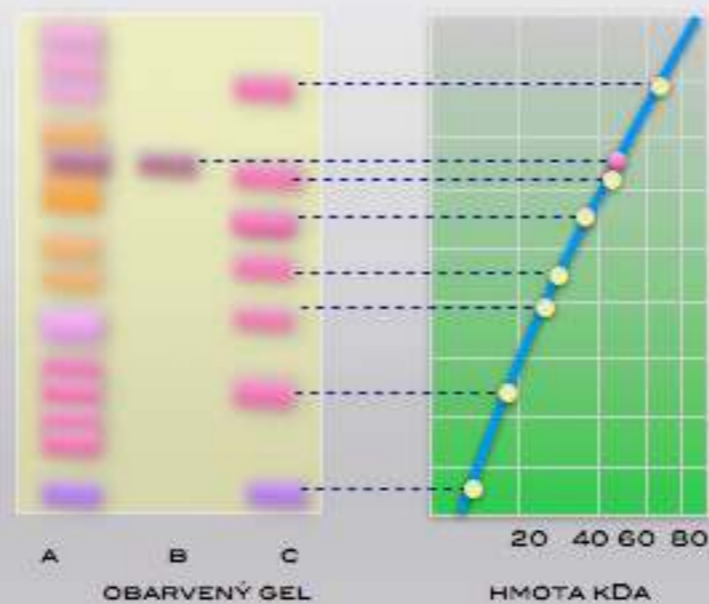
ELEKTROFORÉZA



DENATURACE PROTEINU

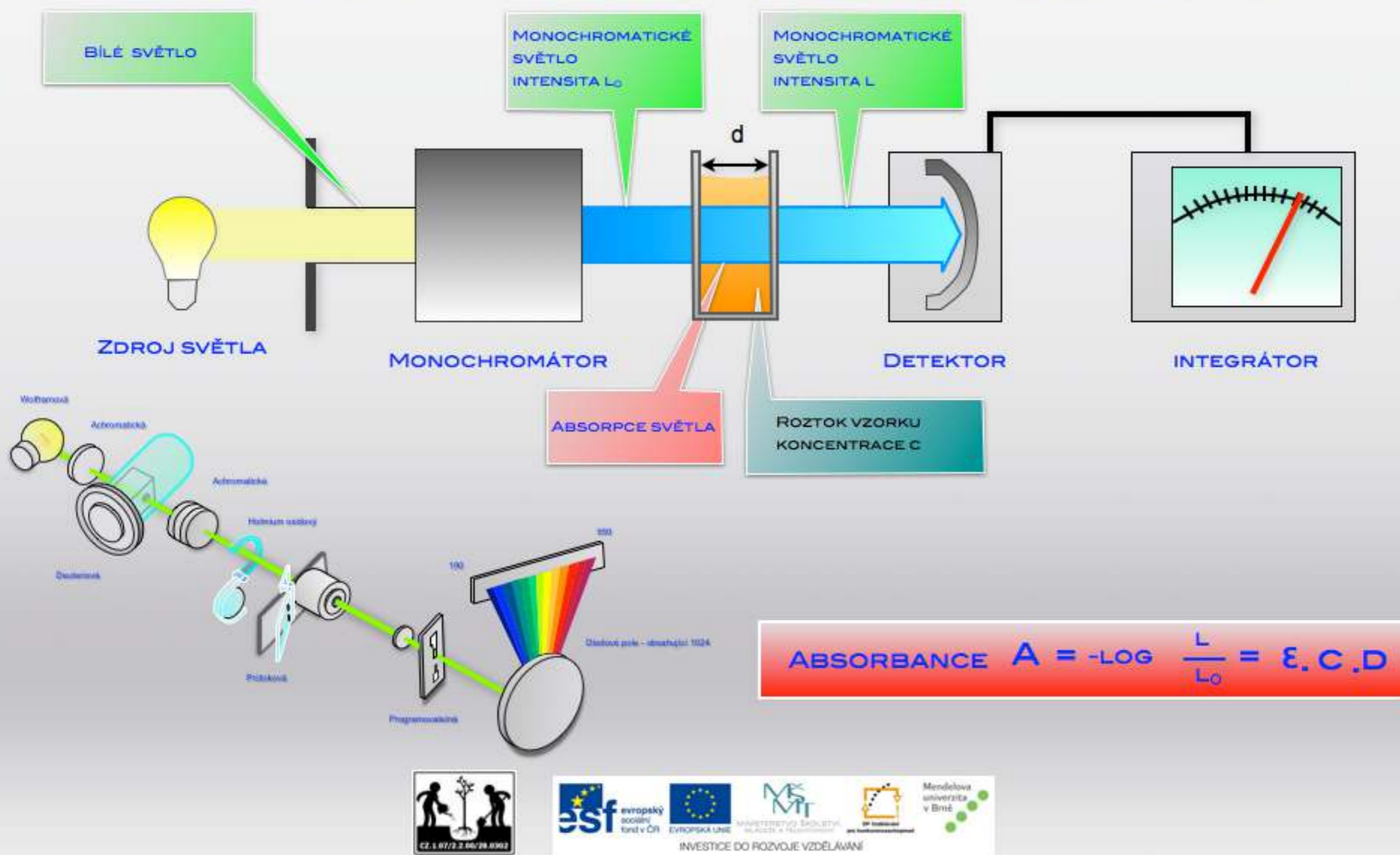


VYHODNOCENÍ ELEKTOFOREOGRAMU



ANALYTICKÉ METODY - STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ - LAMBERT-BEERŮV ZÁKON

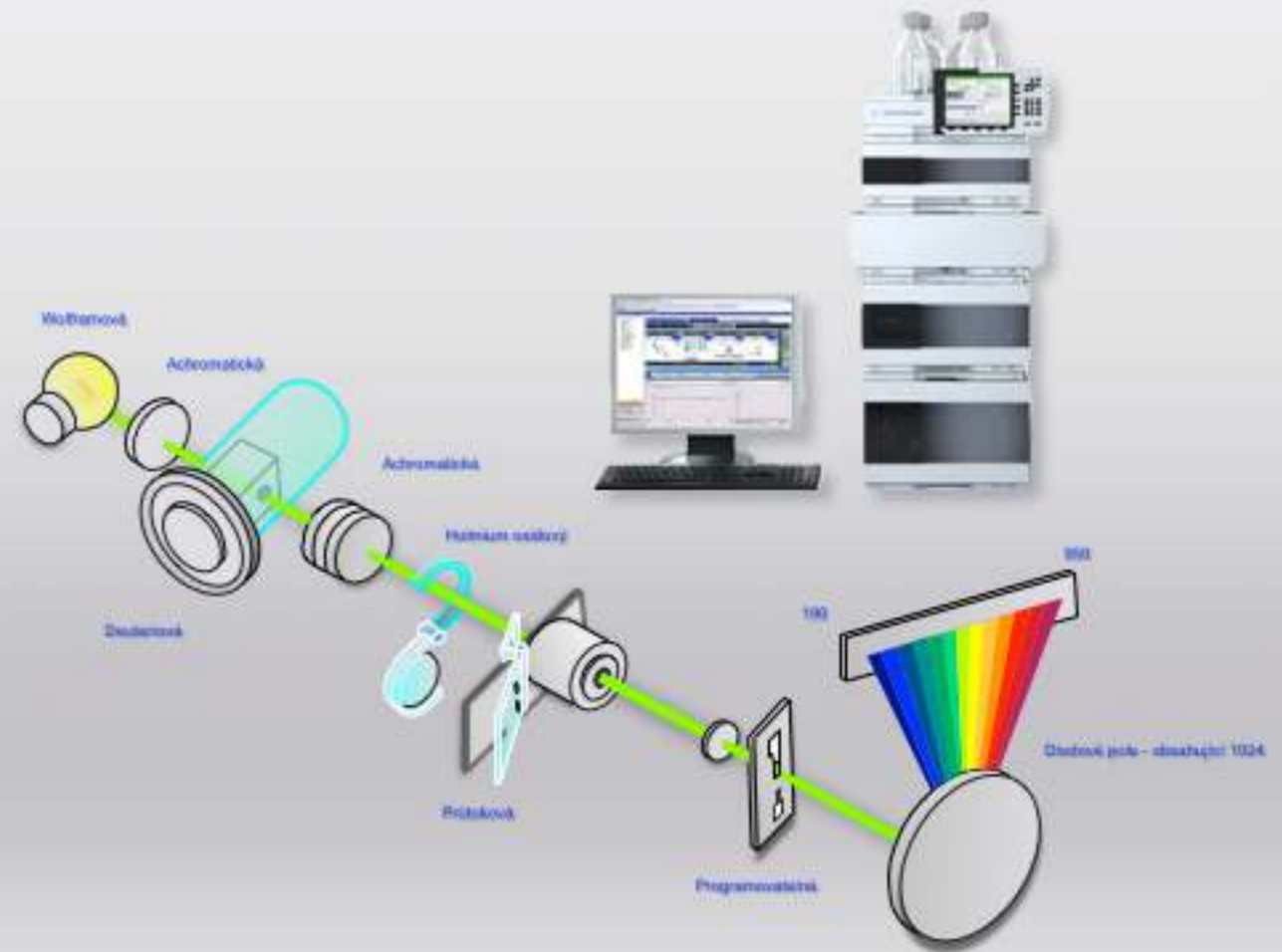
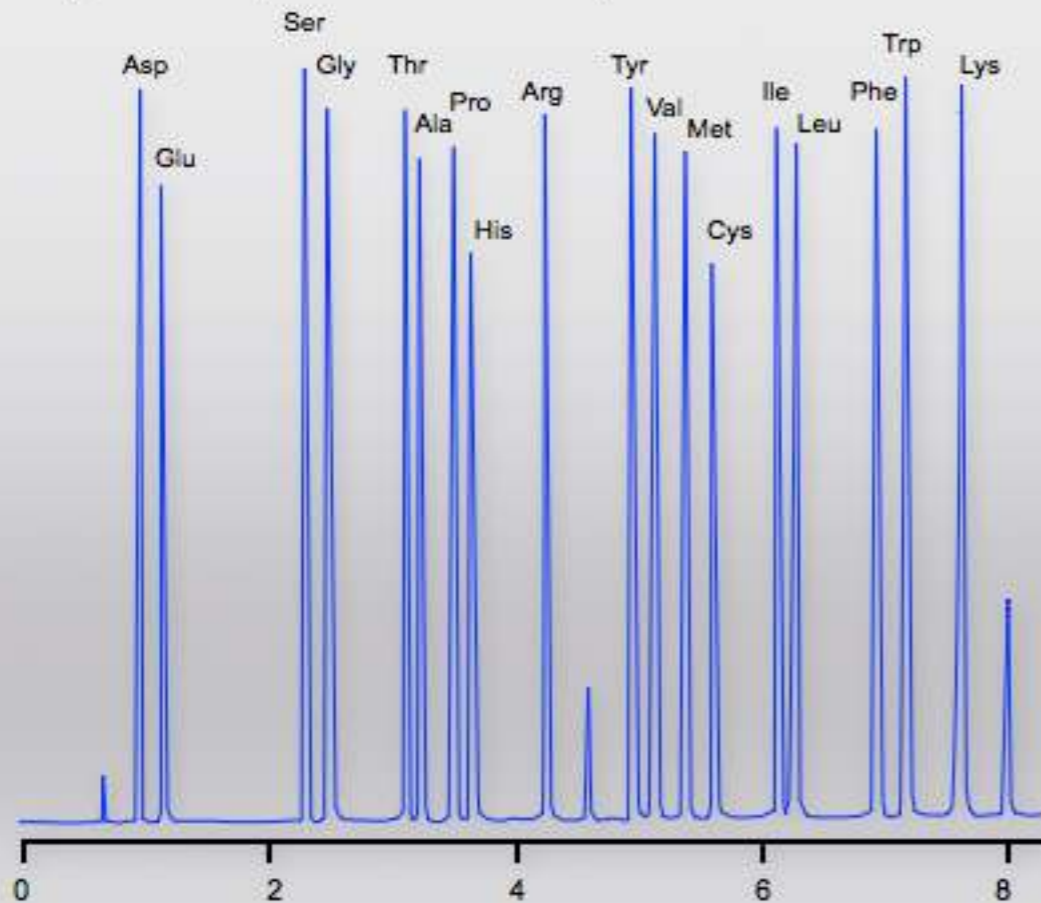


Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.
Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.

STANOVENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

K separaci a kvantifikaci aminokyselin používá výhradně vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) nebo střednětlaké kapalinové chromatografie na iontoměničích. K separaci aminokyselin se používá především ionexů. Vlastní kvantifikace aminokyselin není možná bez předchozího kroku jejich derivatizace.

Při použití HPLC metody se využívá separace aminokyselin na reverzní fázi oktadecyl (C_{18}). Vzhledem k rozdílným chemickým vlastnostem aminokyselin, které je nutno separovat se k jejich separaci používá výhradně binární nebo ternární gradientová eluce o různém složení mobilních fází. K detekci aminokyselin se používá různých činidel k derivatizaci před kolonou i za kolonou s použitím UV detekci i detekce fluorescenční. Předkolonová derivatizace aminokyselin je nejčastější derivatizací, postkolonová derivatizace se uplatnila pouze u OPA a fluorescaminu, ale vlivem zařazení reaktoru za analytickou kolonou dochází k rozšiřování chromatografické zóny a snížení účinnosti separace.



STANOVENÍ AMINOKYSELIN POMOCÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE (TLC) AMINOKYSELIN A PEPTIDŮ

ČELO CHROMATOGRAMU

RETENČNÍ FAKTOR

$$R_F = \frac{A}{B}$$

START CHROMATOGRAMU

B

A

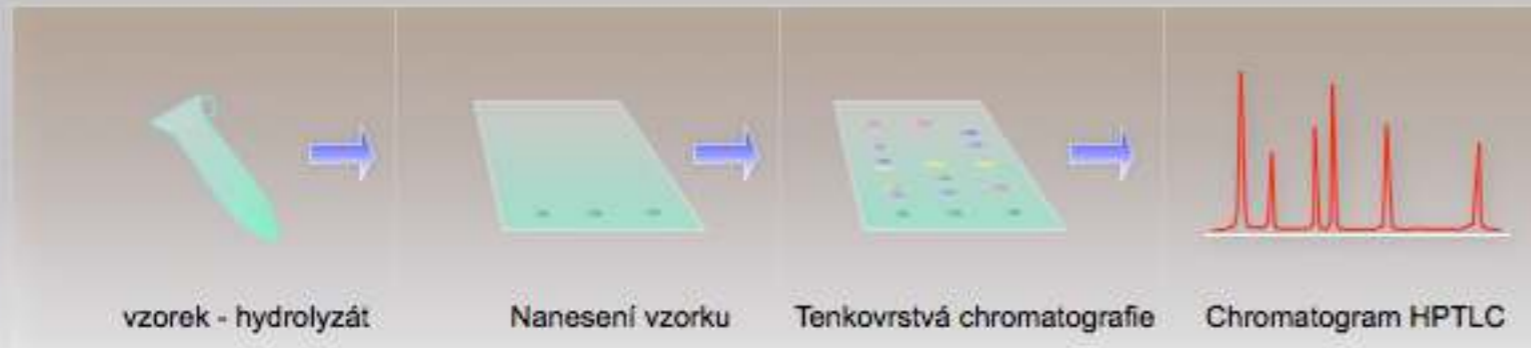
STANDARD

REÁLNÝ VZOREK (HYDROLYZÁT)

CHROMATOGRAFICKÁ KOMORA

MOBILNÍ FÁZE

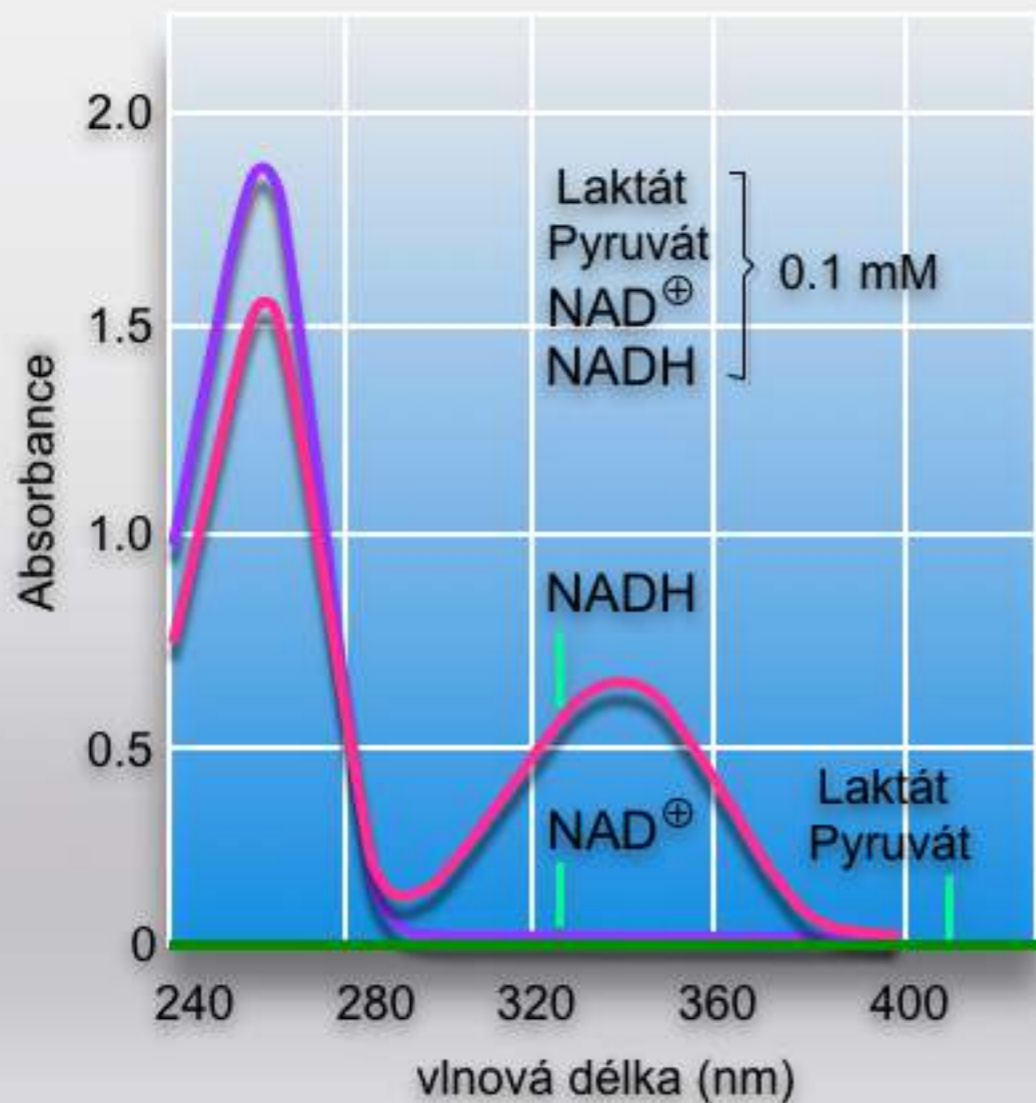
CHROMATOGRAFICKÁ DESKA



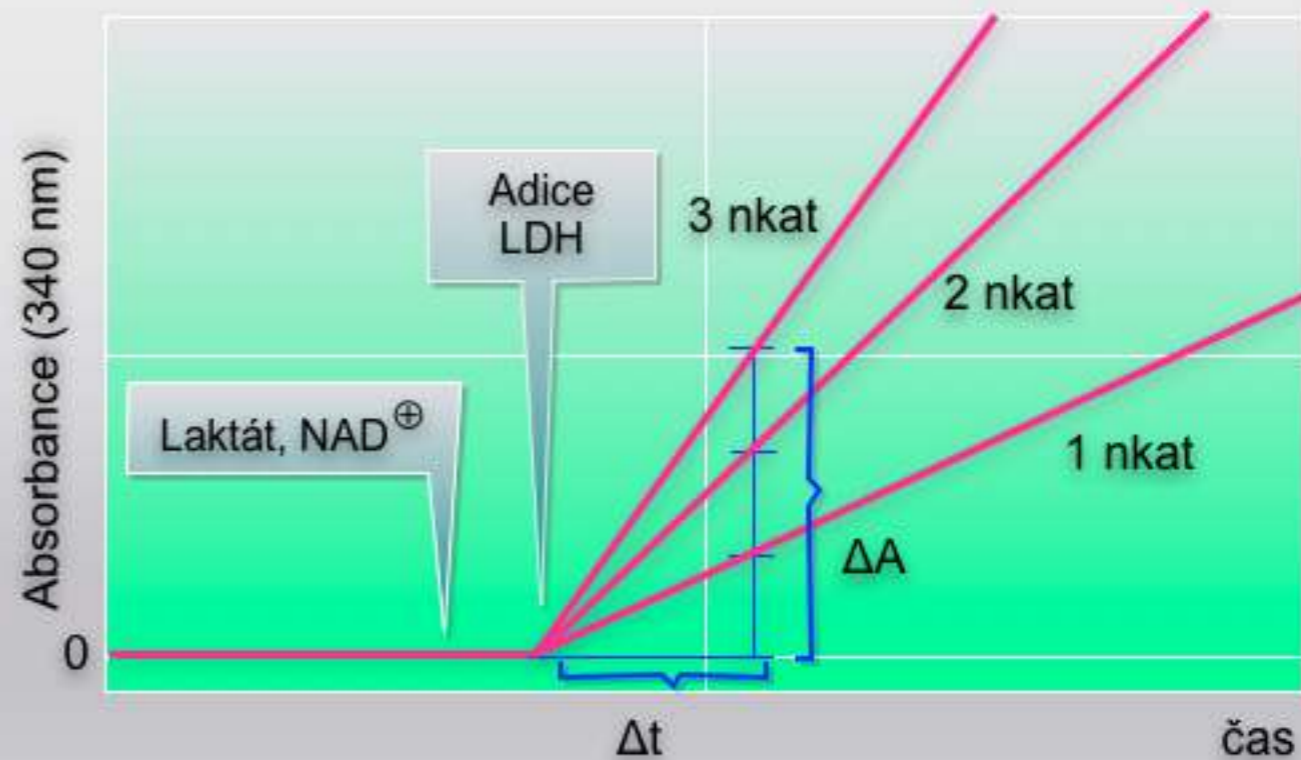
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANOVENÍ LAKTÁTDEHYDROGENÁSOVÉ AKTIVITY

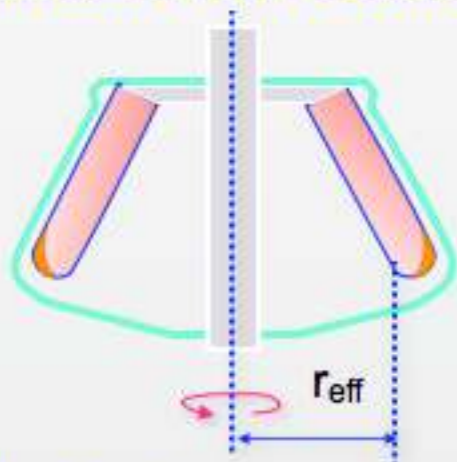
MĚŘENÍ LAKTÁTDEHYDROGENÁSOVÉ (LDH) AKTIVITY VYCHÁZÍ Z FAKTU, ŽE REDUKUJÍCÍ KOENZYM NADH+H⁺ ABSORBUJE PŘI VLNOVÉ DÉLCE 340 NM, OXIDOVANÁ FORMA NAD⁺ NEABSORBUJE.



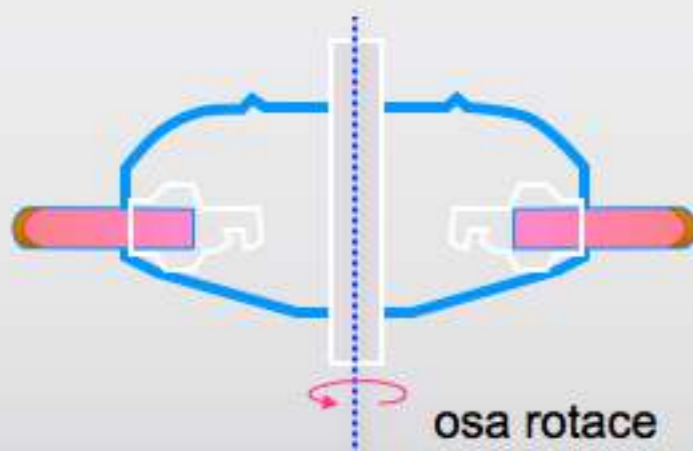
$$\frac{\Delta A}{\epsilon} = \Delta C ; \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot \epsilon} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = V ; V = \text{AKTIVITA}$$



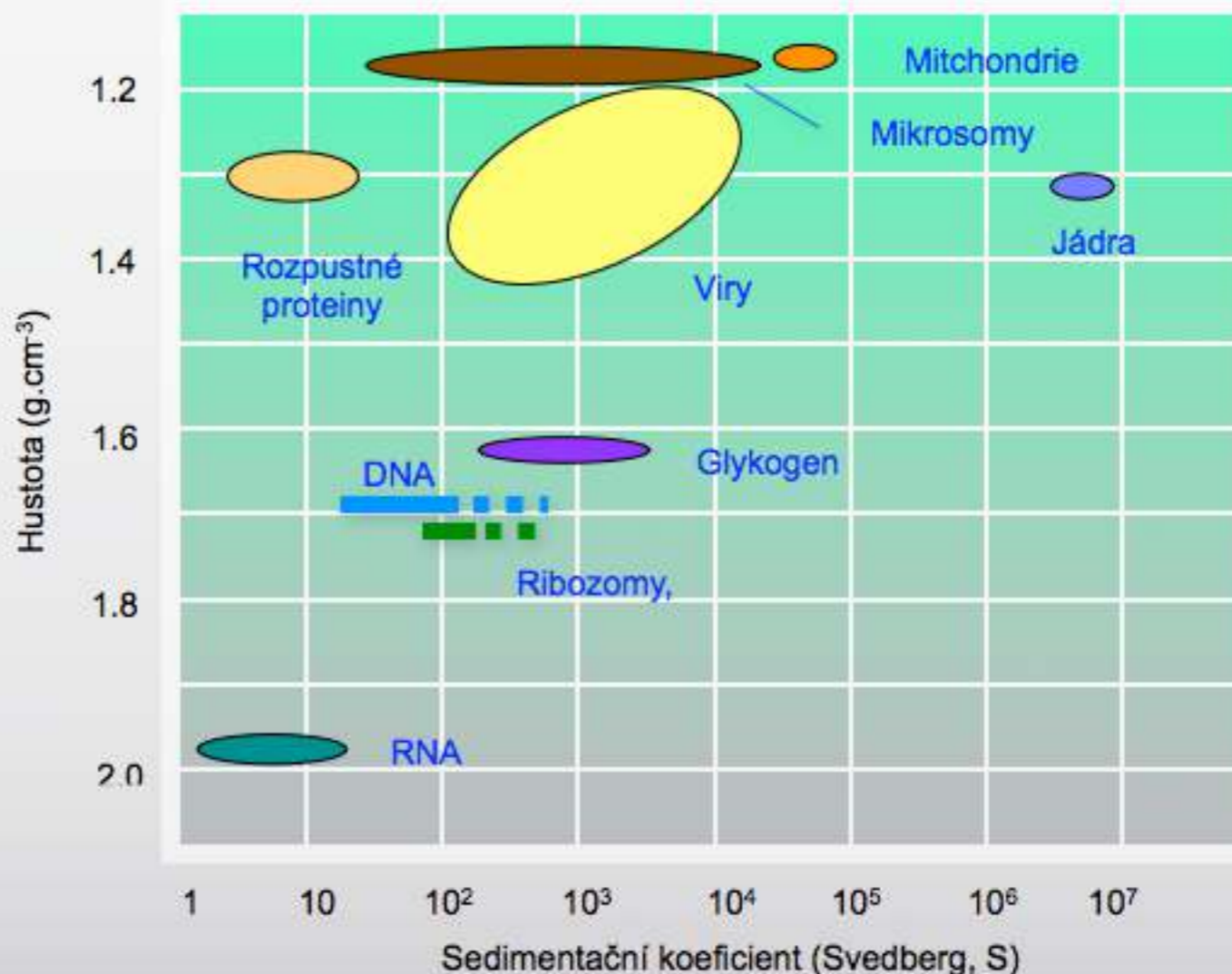
ULTRACENTRIFUGACE - STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI



Úhlový rotor



Výkyvný rotor



g: gravitační zrychlení
 v: sedimentační rychlost (cm.s⁻¹)
 ω: úhlová rychlost (rad.s⁻¹)
 r_{eff}: efektivní průměr (cm) (cm.s⁻¹)

$$g = \omega^2 \cdot r_{\text{eff}}$$

$$v = \omega^2 \cdot r_{\text{eff}} \cdot S$$

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{f}$$

s: sedimentační koeficient (S=10⁻¹³ s)
 M: molekulová hmotnost
 \bar{v} : parciální specifický objem (cm³.g⁻¹)
 ρ: hustota objemu (g.cm³)
 f: koeficient tření

