

OBSAH

Obsah	3
1 Úvod	7
2 Enzymové analytické metody	9
2.1 Enzymy - struktura a funkce	9
2.1.1 Základní informace o enzimech	9
2.1.2 Kinetika enzymových reakcí	13
2.1.3 Jednotky enzymové aktivity	21
2.1.4 Stabilizace enzymů	22
2.1.5 Imobilizované (nerozpustné) enzymy	23
2.2 Enzymy jako analytická činidla	33
2.3 Experimentální technika enzymových analytických metod	34
2.4 Fyzikální a fyzikálně-chemické metody používané v enzymové analýze	47
2.5 Mechanizace a automatizace enzymových metod	54
2.6 Imobilizované enzymy v analytice	58
2.6.1 Analytické využití imobilizovaných enzymů v kolonovém uspořádání	59
2.6.2 Enzymové termistory	59
2.6.3 Biosenzory	60
2.7 Literatura	73
3 Imunochemické metody	74
3.1 Antigeny	74
3.2 Protilátky	75
3.2.1 Struktura imunoglobulinů	76
3.2.2 Imunoglobuliny IgG	76
3.2.3 Strukturní rozdíly mezi hlavními třídami Ig	78
3.2.4 Oligosacharidy v molekule imunoglobulinů	81
3.2.5 Vazebné místo	81
3.2.6 Proteolytické štěpení molekuly IgG	82
3.2.7 Rozdíl mezi imunoglobuliny savců a ptáků	83
3.3 Příprava protilátek	83
3.3.1 Polyklonální protilátky	83
3.3.2 Monoklonální protilátky	85
3.3.3 Produkce imunoglobulinů IgY	88

3.3.4	Rekombinantní protilátky	89
3.4	Konjugáty v imunochemii	91
3.4.1	Příprava hapténových imunogenů a potahovacích konjugátů.....	91
3.4.2	Značení pomocí radionuklidů	97
3.4.3	Značení enzymem	98
3.5	Interakce protilátky s antigenem	105
3.5.1	Rovnovážné konstanty	105
3.5.2	Rovnovážná asociační konstanta při ELISA.....	108
3.5.3	Vazebná heterogenita.....	109
3.5.4	Afinita, avidita	110
3.5.5	Specifita interakce PL – AG	112
3.5.6	Kinetika interakce protilátky s antigenem	115
3.5.7	Kinetika neprecipitačních imunoanalýz se značeným reaktantem	115
3.6	Imunochemické metody.....	117
3.6.1	Precipitační imunochemické metody	118
3.6.2	Neprecipitační imunochemické metody se značkou.....	125
3.6.3	Neprecipitační imunochemické metody bez značky.....	146
3.6.4	Porovnání imunochemických metod s konvenčními metodami	150
3.6.5	Využití imunochemických metod v analytice.....	151
3.7	Literatura.....	153
4	Radionuklidy v analytice, biochemii a potravinářství	154
4.1	Základy stopovacích metod.....	155
4.2	Využití radionuklidů v biochemickém a potravinářském výzkumu	155
4.3	Příprava sloučenin značených radionuklidy	157
4.4	Stabilita sloučenin značených radionuklidy	160
4.5	Radiometrie	162
4.6	Příprava vzorku pro měření radioaktivity	171
4.7	Dekontaminace skla, povrchu nástrojů a pracovních ploch.....	173
4.8	Zásady pro práci s radionuklidy.....	174
4.9	Literatura.....	175
5	Afinitní chromatografie	176
5.1	Chromatografické metody	176
5.2	Bioafinitní chromatografie.....	178
5.2.1	Princip bioafinitní chromatografie.....	178
5.2.2	Imunoafinitní chromatografie	188

5.3	Nespecifická afinitní chromatografie	189
5.3.1	Chromatografie na sorbentech s vázanými barvivy	189
5.3.2	Chromatografie na sorbentech s kovy	191
5.3.3	Chromatografie s přenosem náboje	192
5.3.4	Kovalentní chromatografie	193
5.3.5	Chromatografie s heterobifunkčními afinitními ligandy	196
5.3.6	Chromatografie s hydrofobní interakcí	197
5.4	Další separační techniky využívající afinitní vztahy	202
5.4.1	Afinitní dělení mezi dvě fáze	202
5.4.2	Afinitní ultrafiltrace	203
5.4.3	Afinitní precipitace	204
5.4.4	Bioselektivní (afinitní) eluce	205
5.4.5	Ostatní afinitní metody	208
5.5	Literatura	209
6	Elektromigrační (elektroforetické) metody	210
6.1	Princip elektromigračních metod	210
6.2	Elektrofóza s pohyblivým rozhraním - volná elektroforéza	211
6.3	Zonová elektroforéza	211
6.3.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	212
6.3.2	Elektroforéza v gradientovém gelu	215
6.3.3	Pulzní gelová elektroforéza	215
6.3.4	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE)	216
6.3.5	Hannigova kontinuální elektroforéza	217
6.4	Rovnovážná elektroforéza	218
6.4.1	Izoelektrická fokusace (IEF)	218
6.4.2	Izotachoforéza (ITP)	219
6.5	Afinitní elektroforéza	220
6.6	Dvojrozměrná elektroforéza	220
6.7	Uvolnění separovaných látek z gelové matrice	220
6.8	Vizualizace separovaných látek	221
6.9	Kapilární elektroforéza	224
6.9.1	Princip kapilární elektroforézy	224
6.9.2	Způsoby provedení kapilární elektroforézy	228
6.10	Analytické aplikace elektroforetických metod	233
6.10.1	Elektroforéza jako kritérium čistoty preparátu	233
6.10.2	Stanovení molekulové hmotnosti makromolekul	234
6.10.3	Stanovení izoelektrického bodu	234

6.11 Literatura.....	234
7 Amplifikace DNA in vitro pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR).....	235
7.1 Úvod.....	235
7.2 DNA - templát pro PCR.....	236
7.2.1 Funkce a struktura DNA.....	236
7.2.2 Stabilita a denaturace DNA.....	238
7.3 Syntéza DNA <i>in vitro</i>	239
7.3.1 Primery.....	239
7.3.2 Termostabilní DNA polymerasy.....	240
7.3.3 Termocyklér.....	241
7.3.4 Kroky PCR.....	241
7.4 Detekce produktu PCR.....	245
7.4.1 Elektroforéza v agarosovém gelu.....	245
7.4.2 Detekce specifických sekvencí produktu <i>in situ</i>	247
7.4.3 Biočipy.....	247
7.5 PCR-ELISA.....	249
7.6 Průkaz geneticky modifikovaných organismů pomocí PCR.....	250
8 Biologické a mikrobiologické analytické metody.....	253
8.1 Princip a význam biologických a mikrobiologických analytických metod.....	253
8.2 Biologické metody.....	253
8.3 Mikrobiologické metody.....	254