

OBSAH

1	ČÁST OBECNÁ	1
1.1	Bezpečnost práce v biochemické laboratoři	1
1.2	Pomocné laboratorní činnosti	3
1.2.1	Mytí laboratorního skla	3
1.2.2	Příprava vody pro biochemické pokusy	4
1.2.3	Měření pH v biochemické laboratoři	4
1.2.4	Výběr pufrů a jejich příprava	6
1.2.5	Fyziologická media	8
1.3	Základní operace	9
1.3.1	Úprava biologického materiálu	9
1.3.2	Extrakce	12
1.3.3	Odstředování	13
1.3.4	Mrazová sublimace	14
1.4	Biochemické separační techniky	15
1.4.1	Precipitační metody	15
1.4.2	Membránové separační metody	17
1.4.3	Chromatografie	18
1.4.4	Elektromigrační metody	32
1.4.5	Detekce látek po elektroforese	37
1.5	Imunochemické metody	38
1.5.1	Antigeny a protilátky	38
1.5.2	Imunoprecipitační metody	39
1.5.3	Citlivé neprecipitační imunochemické metody	44
1.5.4	Další imunochemické techniky	47
1.6	Využití spektrálních metod v biochemii	47
1.6.1	Měření a interpretace absorpčních spekter v UV-VIS oblasti	48
1.6.2	Fluorimetrie	52
1.6.3	Metoda cirkulárního dichroismu	57
1.7	Hmotnostní spektrometrie při studiu biomakromolekul	64
1.7.1	Základní principy měření molekulových hmotností	65
1.7.2	Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování	66
1.7.3	Sekvenování bílkovin a peptidů	67
1.7.4	Studium posttranslačních modifikací bílkovin	70
1.7.5	Studium prostorového uspořádání bílkovin	70
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	72
2.1	Aminokyseliny a bílkoviny	72
2.1.1	Dělení směsi aminokyselin chromatografickými metodami	72
2.1.2	Stanovení sekvence tripeptidu	75
2.1.3	Elektroforetická separace aminokyselin na papírovém nosiči	79
2.1.4	Izolace kaseinu z mléka	81
2.1.5	Příprava ovalbuminu z vaječného bílku	81
2.1.6	Izolace ovomukoidu z vaječného bílku	82
2.1.7	Izolace a vlastností cytochromu c	83

2.1.8	Frakcionace bílkovin semen hrachu, stanovení hemaglutinační aktivity	86
2.1.9	Chemické reakce aminokyselin, peptidů a bílkovin	87
2.1.10	Chemické modifikace proteinů	91
2.1.11	Stanovení molekulové hmotnosti bílkovin elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného	95
2.1.12	Stanovení relativní molekulové hmotnosti bílkovin pomocí elektroforézy v polyakrylamidových gelech různé koncentrace	98
2.1.13	Studium membránových proteinů erythrocytů	101
2.1.14	Gelová chromatografie barevného derivátu albuminu	102
2.1.15	Dělení makromolekulárních látek gelovou chromatografií	104
2.1.16	Izoelektrická fokusace bílkovin	105
2.1.17	Stanovení aminokyselin reakcí s ninhydrinem	108
2.1.18	Formolová titrace aminokyselin	109
2.1.19	Titrační křivky aminokyselin	110
2.1.20	Stanovení bílkovin Kjeldahlovou metodou	112
2.1.21	Stanovení koncentrace proteinů v roztoku	113
2.1.22	Studium isothermní denaturace bílkovin	121
2.1.23	Dvourozměrná elektroforéza lyzátu <i>Escherichia coli</i>	125
2.1.24	Identifikace bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie	129
2.1.25	Identifikace proteinu pomocí MALDI-TOF PSD	131
2.2	Sacharidy	133
2.2.1	Chemické vlastnosti sacharidů	133
2.2.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Schoorla	137
2.2.3	Stanovení redukujících sacharidů Somogyiho metodou	138
2.2.4	Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise	139
2.2.5	Mikrostanovení glukosy titrací podle Hagedorna a Jensena	139
2.2.6	Stanovení glykogenu ve tkáních anthronovým činidlem	140
2.2.7	Chromatografie sacharidů na tenké vrstvě	142
2.3	Nukleové kyseliny a jejich součásti	143
2.3.1	Izolace a stanovení DNA ze sleziny a RNA z kvasnic	143
2.3.2	Izolace deoxyribonukleové kyseliny ze sleziny	145
2.3.3	Izolace a vlastnosti nukleových kyselin	147
2.3.4	Izolace plasmidové DNA z <i>Escherichia coli</i> a její elektroforéza v agarosovém gelu	150
2.3.5	Stanovení DNA na základě reakce deoxyribosy s cysteinem	153
2.3.6	Stanovení DNA na základě reakce deoxyribosy s difenylaminem	153
2.3.7	Stanovení RNA na základě reakce ribosy s orcinem	154
2.3.8	Spektrofotometrické stanovení bílkovin a DNA vedle sebe	155
2.4	Další biologicky významné látky	156
2.4.1	Preparace lipidových frakcí z vaječného žloutku	156
2.4.2	Vlastnosti lipidových složek vaječného žloutku	158
2.4.3	Enzymová hydrolýza lecithinu fosfolipasou D	159
2.4.4	Frakcionace chlorofylů a karotenoidů na LH-Sephadexu	161
2.4.5	Dělení rostlinných barviv adsorpční chromatografií	162
2.4.6	Stanovení lipofilních listových barviv a jejich rozdělení adsorpční chromatografií na tenké vrstvě	162
2.4.7	Stanovení kyseliny L-askorbové titrací s 2,6-dichlorfenolindofenolem	164
2.4.8	Stanovení anorganického fosfátu modifikovanou metodou Fiske-Subbarowa podle Clarka	165
2.5	Enzymy	166
2.5.1	Izolace enzymů a stanovení jejich katalytické aktivity	166
2.5.2	Enzymová kinetika	197
2.5.3	Využití enzymů pro analytické účely	216

2.6	Imunochemické metody	223
2.6.1	Dvojitá radiální imunodifuze podle Ouchterlonyho	223
2.6.2	Střetná (protisměrná) imuno elektroforéza	225
2.6.3	Raketová imuno elektroforéza	227
2.6.4	Sledování imunoprecipitační reakce v roztoku	229
2.6.5	Stanovení koncentrace mléčných bílkovin pomocí nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA)	230
2.6.6	Western blotting s imunodetekcí	233
2.7	Studium metabolických dějů	236
2.7.1	Světlem indukovaný transport protonů a fosforylace v chloroplastech	236
2.7.2	Kinetika Hillovy reakce	239
2.7.3	Respirační řetězec aerobních organismů	241
2.7.4	Izolace a metabolická charakterizace mitochondrií z brambor	243
3	PŘÍLOHY	245
3.1	Příprava některých důležitých pufrů	245
3.2	Nomogram pro přepočet počtu otáček centrifugy a odstředivého zrychlení	248
3.3	Příprava roztoků síranu amonného	249
3.4	Některé charakteristiky nasyceného roztoku síranu amonného	250
3.5	Pufry doporučené pro ionexovou chromatografii	250
3.5.1	Chromatografie na katexech	250
3.5.2	Chromatografie na anexech	250
3.6	Směsi pro přípravu polyakrylamidových gelů	251
3.7	Kvantitativní problémy v biochemické laboratoři	252
3.7.1	Slabé elektrolyty v roztoku, pufry	252
3.7.2	Spektrofotometrie	253
3.7.3	Využití spektrofotometrie při sledování enzymových reakcí	255
3.7.4	Chromatografické a elektroforetické metody	257