

OBSAH	3
1 ÚVOD	5
2 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	6
2.1 TEORIE CHROMATOGRAFIE	7
2.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	12
2.2.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová kolonová chromatografie</i>	17
2.2.2 <i>Instrumentace sloupcových chromatografických metod</i>	18
2.2.3 <i>Detekce separovaných látek</i>	19
2.2.4 <i>Aplikace HPLC</i>	21
2.3 NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ CHROMATOGRAFICKÉ METODY	22
2.3.1 <i>Gelová permeační chromatografie</i>	22
2.3.2 <i>Chromatografie na měničích iontů</i>	29
2.3.3 <i>Chromatofokusace</i>	34
2.3.4 <i>Chromatografie s reverzní fází</i>	37
2.3.5 <i>Chromatografie s hydrofobní interakcí</i>	38
2.3.6 <i>Bioafinitní chromatografie</i>	42
2.3.7 <i>Nespecifická afinitní chromatografie</i>	49
3 ELEKTROFORETICKÉ METODY	56
3.1 PRINCIP ELEKTROFORETICKÝCH METOD	56
3.2 ELEKTROFORÉZA S POHYBLIVÝM ROZHŘÁNÍM - VOLNÁ ELEKTROFORÉZA	57
3.3 ZONOVÁ ELEKTROFORÉZA	57
3.3.1 <i>Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu</i>	57
3.3.2 <i>Elektroforéza v gradientovém gelu</i>	61
3.3.3 <i>Pulzní gelová elektroforéza</i>	61
3.3.4 <i>Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE)</i>	62
3.3.5 <i>Hannigova kontinuální elektroforéza</i>	63
3.4 ROVNOVÁŽNÁ ELEKTROFORÉZA.....	63
3.4.1 <i>Izoelektrická fokusace (IEF)</i>	63
3.4.2 <i>Izotachoforéza (ITP)</i>	65
3.5 AFINITNÍ ELEKTROFORÉZA.....	65
3.6 DVOJROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA	66
3.7 ÚVOLNĚNÍ SEPAROVANÝCH LÁTEK Z GELOVÉ MATRICE.....	66
3.8 VIZUALIZACE SEPAROVANÝCH LÁTEK	67
3.9 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA.....	70
3.9.1 <i>Princip kapilární elektroforézy</i>	70
3.9.2 <i>Způsoby provedení kapilární elektroforézy</i>	75
3.10 APLIKACE ELEKTROFORÉZY V BIOCHEMII, BIOTECHNOLOGII A DALŠÍCH OBLASTECH	79
3.11 ANALYTICKÉ APLIKACE ELEKTROFORETICKÝCH METOD.....	80
3.11.1 <i>Elektroforéza jako kritérium čistoty preparátu</i>	80
3.11.2 <i>Stanovení molekulové hmotnosti makromolekul</i>	81
3.11.3 <i>Stanovení izoelektrického bodu</i>	82
4 ENZYMOVÉ ANALYTICKÉ METODY	83
4.1 ENZYMY - STRUKTURA A FUNKCE.....	83
4.2 KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ.....	87
4.3 STABILIZACE ENZYMŮ	95
4.4 IMOBILIZOVANÉ (NEROZPUSTNÉ) ENZYMY.....	97
4.5 ENZYMY JAKO ANALYTICKÁ ČINIDLA	105
4.5.1 <i>Experimentální technika enzymových analytických metod</i>	107
4.5.2 <i>Metody měření enzymových reakcí</i>	115
4.5.3 <i>Fyzikální a fyzikálně-chemické metody používané v enzymové analýze</i>	119
4.5.4 <i>Mechanizace a automatizace enzymových metod</i>	126
4.6 IMOBILIZOVANÉ ENZYM V ANALYTICE.....	129
4.7 LITERATURA	142

5	APLIKACE RADIONUKLIDŮ V BIOLOGICKÝCH VĚDÁCH.....	143
5.1	PŘÍPRAVA SLOUČENIN ZNAČENÝCH RADIONUKLIDY	144
5.2	RADIOMETRIE	148
6	IMUNOCHEMICKÉ METODY, IMUNOSENZORY, IMUNOČIPY.....	163
6.1	ANTIGENY	164
6.2	PROTILÁTKY	166
6.2.1	<i>Struktura imunoglobulinů.....</i>	<i>166</i>
6.3	PŘÍPRAVA PROTILÁTEK	173
6.3.1	<i>Polyklonální protilátky</i>	<i>173</i>
6.3.2	<i>Monoklonální protilátky</i>	<i>176</i>
6.3.3	<i>Rekombinantní protilátky.....</i>	<i>179</i>
6.3.4	<i>Fragmenty a konstrukty molekuly imunoglobulinu.....</i>	<i>183</i>
6.4	INTERAKCE PROTILÁTKY S ANTIGENEM	184
6.4.1	<i>Specifita interakce protilátky s antigenem.....</i>	<i>191</i>
6.4.2	<i>Kinetika interakce protilátky s antigenem</i>	<i>194</i>
6.5	IMUNOCHEMICKÉ METODY	197
6.5.1	<i>Precipitační imunochemické metody</i>	<i>197</i>
6.5.2	<i>Neprecipitační imunochemické metody se značkou.....</i>	<i>204</i>
6.5.3	<i>Radioimunoanalýza.....</i>	<i>206</i>
6.5.4	<i>Enzymová imunoanalýza.....</i>	<i>209</i>
6.5.5	<i>Fluorescenční imunoanalýza (FIA)</i>	<i>220</i>
6.5.6	<i>DNA jako značka a finální znásobení počtu jejich molekul technikou PCR.....</i>	<i>223</i>
6.5.7	<i>Možnosti zesílení signálu značky pro dosažení lepší citlivosti.....</i>	<i>226</i>
6.5.8	<i>Robustní a jednoduché uživatelsky přívětivé formáty.....</i>	<i>232</i>
6.6	PROTILÁTKOVÝ MIKROARRAY, IMUNOARRAY (IMUNOČIP)	234
6.7	IMUNOSENZORY, PROTILÁTKOVÉ ELEKTRODY	249
6.8	MIKROFLUIDNÍ IMUNOANALYTICKÉ SYSTÉMY	255
6.9	KOMBINACE NEPRECIPITAČNÍ IMUNOANALÝZY S KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU	260
6.10	IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE	263
6.11	KONJUGÁTY V IMUNOCHEMII	264
6.11.1	<i>Příprava haptenových imunogenů a potahovacích konjugátů.....</i>	<i>264</i>
6.11.2	<i>Značení pomocí radionuklidů.....</i>	<i>270</i>
6.11.3	<i>Značení enzymem.....</i>	<i>271</i>
6.12	LITERATURA	278
7	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	279
7.1	CO JE TO PCR?.....	279
7.1.1	<i>Molekula DNA a replikace</i>	<i>279</i>
7.1.2	<i>Amplifikace DNA in vitro.....</i>	<i>281</i>
7.2	INSTRUMENTACE, REAGENCIE A PŘÍPRAVA PCR.....	283
7.2.1	<i>Thermocykléry</i>	<i>284</i>
7.2.2	<i>Thermostabilní DNA polymerasy.....</i>	<i>285</i>
7.2.3	<i>Primery.....</i>	<i>286</i>
7.2.4	<i>Další reakční komponenty</i>	<i>287</i>
7.3	EFEKTIVNÍ AMPLIFIKACE SPRÁVNÉHO PRODUKTU	288
7.4	KVANTITATIVNÍ PCR.....	290
7.5	PŘÍPRAVA DNA Z RNA POMOCÍ REVERZNÍ TRANSKRIPCE S NÁSLEDNÝM PCR (RT-PCR)	291
7.6	INVERZNÍ PCR	293
7.7	PCR S PŘESAHUJÍCÍMI KONCI	295
7.8	PCR MUTAGENEZE.....	295
7.9	PCR V KOMBINACI S METODOU ELISA (PCR-ELISA)	298
7.10	KOMPETITIVNÍ PCR	299
7.11	DETEKCE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ POMOCÍ PCR.....	301
7.12	PCR V MEDICÍNĚ A PŘÁVU	303
7.13	ANALÝZA POLYMORFISMU DNA	304
7.14	VYUŽITÍ PCR PŘI PŘÍPRAVĚ SPECIFICKÝCH BIOSENSORŮ	308