

	str.
1. Vědecko-technické informace (J. Káš)	4
1.1. Základní údaje o informačních systémech	4
1.2. Základní informace o patentové literatuře	5
1.3. Základní informace o přístrojích	6
2. Metody stanovení bílkovin (J. Káš)	7
2.1. Stanovení bílkovin v mitochondriální suspenzi biuretovou reakcí	12
2.2. Stanovení bílkovin s Coomassie Brilliant Blue G-250	13
2.3. Stanovení bílkoviny navázané na nerozpustný nosič modifikovanou metodou Lowryho	13
2.4. Stanovení bílkoviny navázané na nerozpustný nosič na základě stanovení aminokyselin	14
2.5. Stanovení bílkovin v potravinách spektrofotometrií v UV-oblasti	14
3. Techniky separace bílkovin (B. Králová)	16
3.1. Úvod	16
3.2. Extrakce bílkovin	16
3.2.1. Extrakce enzymu glukosaisomerasy z mikroorganismu <i>Streptomyces nigrificans</i>	17
3.3. Klasické způsoby izolace bílkovin	19
3.3.1. Frakční vysolování síranem amonným	20
3.3.2. Frakcionace bílkovin krevního sera vysolováním síranem amonným	23
3.3.3. Odstranění kontaminující proteasové aktivity ze surového preparátu glukosaisomerasy využitím různé tepelné stability	24
3.3.4. Izolace mitochondriální ATP-asy	25
3.4. Moderní metody purifikace bílkovin	28
3.4.1. Ultrafiltrace na zařízení firmy Millipore	33
3.4.2. Frakcionace bílkovin	33
3.4.3. Odsolování pomocí ultrafiltrace	34
3.4.4. Purifikace surového preparátu glukosaisomerasy ionexovou chromatografií	34
3.4.5. Afinitní chromatografie trypsinu na tepelně upraveném kaseinu	35
4. Metody stanovení aktivity enzymů významných z potravinářského hlediska (J. Káš)	37
4.1. Oxidoreduktasy	37
4.1.1. Stanovení aktivity glukosaoxidasy	37
4.1.2. Stanovení aktivity malátdehydrogenasy	38
4.1.3. Stanovení aktivity glutamát dehydrogenasy	39
4.1.4. Stanovení aktivity sukcinát dehydrogenasy	39
4.1.5. Stanovení aktivity peroxidasy	39
4.2. Transferasy	40
4.2.1. Stanovení aktivity glutamát-oxalacetát transaminasy (aminotransferasy GOT)	40

	str.
4.3. Hydrolasy	41
4.3.1. Stanovení aktivity proteolytických enzymů	42
4.3.1.1. Příprava hemoglobinu	42
4.3.1.2. Stanovení proteolytické aktivity modifikovanou Ansonovou metodou (substrát hemoglobin)	42
4.3.1.3. Modifikace Ansonovy metody ke stanovení aktivit papaimu a jiných sulfhydriových proteas	43
4.3.1.4. Stanovení proteolytické aktivity s nerozpustným chromogenním bílkovinným substrátem	43
4.3.1.5. Stanovení proteolytické aktivity s nízkomolekulárním syntetickým chromogenním substrátem	44
4.3.2. Stanovení aktivity amylas s rozpustným škrobem jako substrátem	45
4.3.3. Stanovení aktivity amylasy s nerozpustným chromogenním substrátem	45
4.3.4. Stanovení aktivity lipas	46
4.3.4.1. Stanovení aktivity lipasy s emulgovanými substráty	46
4.3.4.2. Stanovení aktivity lipasy s rozpustnými substráty	46
4.3.5. Stanovení aktivity kyselých fosfatasy	47
4.3.6. Stanovení aktivity deoxyribonukleasy II	47
4.4. Lyasy	48
4.4.1. Stanovení aktivity L-lysin dekarboxylasy	48
4.5. Stanovení aktivity isomeras	49
4.5.1. Stanovení aktivity glukosaisomerasy	49
4.6. Ligasy (Synthetasy)	50
5. Vybrané imunochemické metody (J. Káš)	51
5.1. Metoda dvojité difuze ("Ouchterlonyho technika")	51
5.2. Elektroimunostanovení ("raketová elektroforesa" "Laurellova metoda")	53
6. Aplikace enzymů pro analytické účely (O. Valentová)	56
7. Imobilizované enzymové systémy (M. Marek)	61
7.1. Technika imobilizace enzymů a buněk	61
7.2. Hodnocení připravených biokatalysátorů	73
8. Histochemické metody v biochemii a potravinářství (V. Váňa)	74
8.1. Zpracování materiálu pro histochemické studium	74
8.1.1. Odběr vzorků a zpracování před inkubací	75
8.1.2. Histochemická reakce (inkubace)	77
8.1.3. Zpracování po inkubaci	78
8.2. Histochemie vybraných skupin chemických individuí	79
8.2.1. Bílkoviny	80
8.2.2. Nukleové kyseliny	82
8.2.3. Polysacharidy	83
8.2.4. Lipidy	85
8.2.5. Enzymy	86

	str.
8.2.5.1. Hydrolasy	87
8.2.5.2. Oxidoreduktasy	91
8.2.5.3. Průkaz ostatních enzymů	93
9. Isolace buněčných organel a jejich charakteristika (P. Rauch, J. Káš)	97
9.1. Úvod	97
9.2. Homogenace tkáně	97
9.3. Frakcionace tkáňového homogenátu	100
9.3.1. Diferenciální centrifugace	100
9.3.2. Centrifugace v hustotním gradientu	101
9.4. Analýza získaných frakcí buněčných organel	101
9.4.1. Mitochondrie	102
9.4.2. Lysozomy	108
9.4.3. Měření enzymových aktivit typických pro buněčné organely (tzv. markery)	111
9.5. Úlohy	114
9.5.1. Izolace mitochondrií z jaterní tkáně krysy	114
9.5.2. Izolace mitochondrií z krysího srdce centrifugací k isopyknické hustotní rovnováze	116
9.5.3. Měření spotřeby kyslíku kyslíkovým článkem	116
9.5.4. Měření respirační kontroly mitochondrií	116
9.5.5. Měření ADP/O kvocientu	117
9.5.6. Inhibice enzymů aerobní fosforylace	118
9.5.7. Stanovení P/O kvocientu	118
9.5.8. Izolace lysozomů změnou jejich density	119
9.5.9. Izolace lysozomů změnou density mitochondrií	121
9.5.10. Stanovení latence lysozomů	121
9.5.11. Stanovení odbouratelnosti a rychlosti odbourávání látek v lysozomech	124
9.5.12. Izolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně krysy	125
9.5.13. Izolace jader z jaterní tkáně krysy	125
9.5.14. Návod k obsluze registračního dvoupaprskového spektrofotometru Unicam	125
9.5.15. Stanovení cytochrom c reduktasové aktivity	126
9.5.16. Stanovení obsahu cytochromů v izolovaných buněčných organelách	126
10. Radionuklidy v biochemické laboratorní technice (P. Rauch)	128
10.1. Metodické pokyny	128
10.1.1. Nové metody značení radionuklidem ¹²⁵ I. Značení bílkovin imobilizovanou laktoperoxidase	128
10.1.2. Stabilita sloučenin značených radionuklidy	129
10.1.3. Perorální aplikace značených sloučenin pokusným zvířatům	131
10.1.4. Zhotovení autoradiogramu	132
10.1.5. Příprava vzorků pro měření radioaktivity	134
10.1.6. Kapalné scintilátory	137
10.1.7. Dekontaminace skla, povrchu nástrojů a pracovních ploch	138

	str.
10.2. Úlohy	140
10.2.1. Příprava bílkovin (enzymů) značeným radionuklidem ^{125}I pro RIA	140
10.2.2. Radioimunostanovení papainu	142
10.2.3. Radioimunostanovení (RIA) aflatoxinu B ₁	142
10.2.4. Stanovení kyseliny listové (folacinu) radioisoto- povou metodou	143
10.2.5. Současné stanovení folacinu a kyanokobalaminu v biologických vzorcích radioisotopovou metodou	144
10.2.6. Radioenzymové stanovení některých významných metabolitů	144
10.2.7. Inkorporace ^{14}C -leucinu do jaterních bílkovin myši .	145
10.2.8. Stanovení biologického poločasu jaterních bílkovin .	146
10.2.9. Stanovení aktivity proteinas pomocí (Methyl- ^{14}C)- methylovaného hemoglobinu jako substrátu	146
10.2.10. Stanovení aktivity kolagenasy pomocí (^3H -methyl)- kolagenu jako substrátu	147
10.2.11. Návod k obsluze radiometrických přístrojů	147
10.3. Literatura	148
11. Vybrané metody hodnocení komponent krmných směsí (T. Ruml)	149
11.1. Stanovení aktivity trypsinového inhibitoru	151
11.2. Stanovení hemaglutinační aktivity	153
11.3. Stanovení proteolytické aktivity enzymů v krmných směsích ..	154
11.3.1. Hydrolysa kaseinu v agarových plotnách	155
11.3.2. Stanovení proteolytické aktivity s použitím barvivem značeného kolagenu (HPA)	155
12. Doplnkové úlohy	156
12.1. Buněčné protoplasty (T. Ruml)	156
12.2. Studium interakcí bílkovin s malými molekulami (I. Kalousek, Z. Vodrážka)	158
12.3. Měření kinetiky rychlých biochemických reakcí (Z. Vodrážka, J. Pristach)	160