

OBSAH

1.	ÚVOD	9
1.1.	Charakter současného biochemického výzkumu	9
1.2.	Práce s literaturou	10
2.	IZOLACE A CHARAKTERIZACE BIOLOGICKÝCH MAKROMOLEKUL A JEJICH SLOŽEK . .	13
2.1.	Základní principy izolace biologicky důležitých látek	13
2.1.1.	Úvod	13
2.1.2.	Základní kroky izolace a purifikace biopolymerů	16
	Příprava buněčných extraktů	16
	Rozdělení subcelulárních struktur a buněk	17
	První frakcionační kroky /hrubá frakcionace/, tepelná denaturace . . .	18
	Vsolování a vysolování	18
	Srážení biopolymerů jinými látkami	19
2.2.	Metody k další izolaci a charakterizaci biopolymerů a jejich složek .	20
2.2.1.	Metody založené na dělení podle různé velikosti částic	20
	Dialýza a ultrafiltrace	20
	Centrifugace	22
2.2.2.	Chromatografické metody	38
	Úvod a rozdělení chromatografických metod	38
	Teoretické aspekty chromatografie	39
	Jednotlivé typy kapalinové chromatografie	42
	Rozdělovací chromatografie	43
	Adsorpční chromatografie	43
	Hydrofobní chromatografie /HIC/	45
	Chromatografie na iontoměničích	46
	Chromatofokusace /CF/	48
	Gelová chromatografie	49
	Afinní chromatografie	55
	Praktické aspekty chromatografie	58
	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	64
	Plynová chromatografie	66
2.2.3.	Elektromigrační metody	69
	Úvod	69
	Elektroforéza	70
	Zónová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu /PAGE/	74
	Izotachoforéza	77
	Izoelektrická fokusace	78
2.2.4.	Srovnání elektromigračních metod a vyvíjecích technik v kolonové chromatografii	80
2.2.5.	Příklady izolace biopolymerů	82
2.3.	Určování relativní molekulové hmotnosti a tvaru biopolymerů	85
2.3.1.	Úvod	85
2.3.2.	Relativní molekulová hmotnost biopolymerů	87
2.3.3.	Tvar molekul biopolymerů	89

3.	METODY KE ZJIŠŤOVÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY BIOPOLYMERŮ	95
3.1.	Úvod	95
3.2.	Analýza bílkovin	95
3.2.1.	Určení N- a C- koncových aminokyselin	96
3.2.2.	Separace peptidických řetězců	97
3.2.3.	Stanovení aminokyselin	97
	Přímá sekvenční analýza	98
	Stanovení dalších sekvencí	100
	Rekonstrukce pořadí aminokyselin	102
3.3.	Chemická syntéza polypeptidů a bílkovin	103
3.4.	Analýza nukleových kyselin	107
3.4.1.	Analýza nukleotidového složení	107
3.4.2.	Analýza koncových nukleotidů	107
3.4.3.	Sekvenční analýza polynukleotidového řetězce	108
3.5.	Chemická syntéza polynukleotidů	110
3.6.	Analýza polysacharidů	112
3.7.	Hmotnostní spektroskopie	113
4.	METODY KE ZJIŠŤOVÁNÍ PROSTOROVÉ STRUKTURY BIOMOLEKUL A JEJICH ZMĚN	116
4.1.	Úvod do optických metod	116
4.2.	Spektrofotometrické metody	119
4.2.1.	Princip	119
4.2.2.	Zařízení	121
4.2.3.	Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti	128
4.2.4.	Spektrofotometrie v infračervené oblasti	133
4.3.	Atomová absorpční spektroskopie	136
4.4.	Mössbauerova spektroskopie	137
4.5.	Nukleární magnetická rezonance a elektronová spinová rezonance	140
4.5.1.	Spektra NMR	143
4.5.2.	Použití spekter NMR	148
4.5.3.	Spektra ESR /EPR/	152
4.6.	Fluorescenční spektroskopie	153
4.6.1.	Úvod do metod studujících emitované záření	153
4.6.2.	Fluorescenční metody při výzkumu biopolymerů	154
	Fluorescence a konformace bílkovin	158
	Fluorescenční sondy /značky/	160
4.7.	Ramanova spektroskopie	161
4.7.1.	Podstata vzniku Ramanových spekter	161
4.7.2.	Měření Ramanových spekter	163
4.7.3.	Ramanova spektra biologických makromolekul	164
	Bílkoviny	164
	Nukleové kyseliny	166
	Další použití Ramanovy spektroskopie	167
	Rezonanční Ramanova spektra	167
4.8.	Další metody studia struktury	169
4.8.1.	Chiroptické metody/optická rotační disperze, ORD a cirkulární dichroismus, CD/	169
	ORD a CD bílkovin	173
	ORD a CD nukleových kyselin	175
4.8.2.	Rentgenostrukturní analýza	176
4.8.3.	Izotopová výměna	179

5.	NĚKTERÉ METODY STUDIA DĚJŮ A ROVNOVÁH	180
5.1.	Úvod	180
5.2.	Studium dějů po dosažení rovnováhy	180
	Acidobazické děje a redox procesy. Elektrometrické metody	180
	Konformační změny. Použití polarografie a voltametrie	183
	Tepelná denaturace. Kalorimetrie	190
	Interakce makromolekul	192
5.3.	Studium rychlých procesů	193
	Kontinuální tok /continuous flow/	193
	Zastavený tok /stopped flow/	194
	Relaxační metody	198