

1. Laboratorní postupy a zařízení	5
1.1 Zařízení laboratoře	5
1.2 Chladicí technika	5
1.3 Zařízení k mletí a homogenizaci	5
1.4 Zahušťování roztoků a odpařování kapalin	7
1.4.1 Mrazová sublimace (lyofilizace/	7
1.4.2 Vakuové rotační odparky	8
1.5 Antiseptika a konzervovadla	8
1.6 Rozdělování látek ze směsí	8
1.6.1 Filtrace a ultrafiltrace -	8
1.6.2 Dialýza	9
1.6.3 Centrifugace	10
1.6.4 Chromatografické metody	15
1.6.4.1 Obecné principy a rozdělení	15
1.6.4.2 Využití kapalinové chromatografie	16
1.6.4.3 Plynová chromatografie	20
1.6.4.4 Vyhodnocování chromatografického dělení	21
1.6.5. Elektroforetické metody v biochemii	21
1.6.5.1 Obecné principy	21
1.6.5.2 Základní pojmy	21
1.6.5.3 Aparatury na elektroforezu	22
1.6.5.4 Elektroforeza na škrobovém gelu	24
Úkol 1. Rozdělení isoperoxidas rostlin na škrobovém gelu	25
1.6.5.5 Elektroforeza na polyakrylamidovém gelu	25
Úkol 2. Rozdělování bílkovin aniontovou diskovou elektroforezou	26
Úkol 3. Kationtová disková elektroforeza	27
Úkol 4. Elektrofokusování bílkovin (enzymů)	28
Úkol 5. Rozdělení isoperoxidas rostlin diskovou elektroforezou	29
Úkol 6. Vybarvování amylofosforylas na elektroforeogramech	29
Úkol 7. Rozdělení a vybarvení isoenzymů dehydrogenas diskovou elektroforezou	29
1.6.5.6 Elektroforeza na agarovém gelu	30
Úkol 8. Elektroforeza bílkovin na agarovém gelu	30
1.7 Mikrodifuzní technika	30
1.7.1 Mikrodifuzní technika Conwayova	30
Úkol 9. Mikrodifuze a kontinuální mikrotitrace	32
Úkol 10. Mikrodifuze a kolorimetrická stanovení	32
Úkol 11. Práce s mikrodifuzními nádobkami typu Tompknise a Kirka	33
1.8 Přehled analytických metod používaných v biochemii	33
2. Sledování enzymů	34
2.1 Obecné principy práce s enzymy	34
2.2 Sledování aktivity enzymů in vivo a in vitro	34
2.3 Sledování aktivity enzymů in vivo	35
2.3.1 Vakuová infiltrace Kursanova	35
2.3.2 Kořenové podávání látek	36
Úkol 12. Vakuová infiltrace	36
Úkol 13. Indukce tryptofansyntasy L-prolinem a kyselinou β -indolyloctovou	36
2.3.3 Podávání látek transpiračním proudem	36
2.3.4 Postřik rostliny	36
2.3.5 Injekce, vsypávání látek do orgánů	36
2.3.6 Používání izotopových sloučenin	36
2.4 Technika sledování enzymů in vitro	36
2.4.1 Schema čištění enzymů	37
2.4.2 Charakteristika a použitelnost enzymových preparátů	37

2.4.3 Acetonové prášky	38
Úkol 14. Příprava acetonových prášků	38
2.4.4 Vysolování enzymů (bílkovin)	38
Úkol 15. Vysolování síranem amonným	38
2.4.5 Používání antiseptik při práci s enzymy	39
2.4.6 Stanovení molekulárních hmotností bílkovin	39
Úkol 16. Stanovení molekulárních hmotností enzymů gelovou filtrací	40
2.5 Sledování kinetiky enzymových reakcí	41
2.5.1 Obecné pojmy	41
2.5.2 Měření rychlosti enzymových reakcí	42
2.5.3 Jednotky aktivity enzymů	42
2.5.4 Význam a využití řádu reakce v kinetice enzymových reakcí	43
2.5.5 Stanovení vlivu koncentrace enzymu na rychlost reakce	43
Úkol 17. Orientační stanovení vlivu koncentrace amylasy rostlin na rychlost reakce	43
Úkol 18. Stanovení vlivu koncentrace ureasy na rychlost rozkladu močoviny	44
2.5.6 Vliv pH na aktivitu enzymů	45
Úkol 19. Orientační stanovení vlivu pH na aktivitu amylasy rostlin	45
Úkol 20. Vliv koncentrace ligand (substrátů, koenzymů) na aktivitu enzymů. Stanovení K_m a V	45
Úkol 21. Stanovení aktivity, K_m a V jednosubstrátového enzymu, ureasy	48
2.5.8 Regulace aktivity enzymů inhibitory a aktivátory. Příklady stanovení enzymů..	49
Úkol 22. Orientační stanovení regulace α -amylasy NaCl a Cu^{2+}	50
Úkol 23. Stanovení aktivity dvojsubstrátového enzymu, tryptofansyntasy, její K_m a V a inhibice α -aminokyselinami	50
Úkol 24. Stanovení K_m a V tryptofansyntasy k serinu	52
Úkol 25. Stanovení K_m tryptofansyntasy k indolu	53
Úkol 26. Stanovení typu a stupně inhibice tryptofansyntasy L-treoninem vůči L-serinu	54
Úkol 27. Příprava hrubého preparátu arginasy z vikevovitých rostlin	55
Úkol 28. Stanovení aktivity arginasy a její aktivace Mn^{2+} a Mg^{2+} a inhibice L-prolinem	55
Úkol 30. Stanovení arginasy v rostlinách	56
Úkol 31. Preparace krystalické ureasy frakcionací acetonem	56
Úkol 32. Příprava hrubého preparátu ureasy ze semen a orgánů vikevovitých rostlin	57
Úkol 33. Stanovení aktivity ureasy v mikrodifuzních nádobkách	57
Úkol 34. Stanovení aktivity lipasy kontinuální titrací	58
Úkol 35. Stanovení aktivity lipasy rostlin při optimálním pH	59
Úkol 36. Stanovení aktivity ribonukleasy v rostlinách	59
Úkol 37. Stanovení aktivity adenosintrifosfatasy v homogenátech a subcelulárních částech kořenů rostlin	60
Úkol 38. Stanovení aktivity glukoso-6-fosfátdehydrogenasy	60
Úkol 39. Stanovení aktivity askorbátoxidasy	61
Úkol 40. Stanovení aktivity malátdehydrogenasy	62
Úkol 41. Stanovení aktivity dehydrogenas rostlinných materiálů methylenovou modří	63
Úkol 42. Stanovení aktivity katalasy	64
Úkol 43. Stanovení aktivity nitrátreduktasy	64
Úkol 44. Vliv molybdenu na aktivitu nitrátreduktasy v listech rostlin (indukce výživy Mo)	65
Úkol 45. Preparace nitrátreduktasy rostlin	65
Úkol 46. Stanovení aktivity nitritreduktasy	66
Úkol 47. Příprava acetonového prášku nitrátreduktasy	66
Úkol 48. Preparace nitrát- a nitritreduktas	67
Úkol 49. Stanovení aktivity oxidasy kyseliny β -indolyloctové v rostlinách	67
Úkol 50. Stanovení aktivity aminotransferas v rostlinách	68
Úkol 51. Stanovení aktivity enzymů disimilace argininu jako ukazatel stupně výživy draslíkem	69

2.5.9 Vlastnosti a regulace oligomerních enzymů	70
Úkol 52. Regulace tryptofansyntasy nízkou teplotou	70
Úkol 53. Regulace tryptofansyntasy iontovou silou	71
Úkol 54. Preparace glutamátkinasy rostlin	72
Úkol 55. Stanovení aktivity glutamátkinasy	73
Úkol 56. Vliv Mg^{2+} a Mn^{2+} na aktivitu glutamátkinasy	73
Úkol 57. Závislost v_0 /L-Glu/ glutamátkinasy	74
Úkol 58. Alosterické regulace glutamátkinasy L-prolinem	75
Úkol 59. Vypínání inhibice zpětnou vazbou nízkou teplotou	76
Úkol 60. Vypínání inhibice prolinové glutamátkinasy rostlin zpětnou vazbou	76
2.6 Příklady preparací buněčných organel	77
Úkol 62. Preparace chloroplastů v sacharosovém hustotním gradientu	78
Úkol 63. Preparace intaktních chloroplastů neznečištěných jinými částmi buněk	78
Úkol 64. Preparace ribosomů rostlin	78
3. Sledování látek v rostlinách	79
3.1 Obecné principy	79
3.2 Odběr vzorků	79
3.3 Inaktivace enzymů materiálu	79
3.3.1 Inaktivace varem v etanolu	79
3.3.2 Inaktivace vodní parou	80
3.3.3 Inaktivace vodní parou v termostatu	80
3.3.4 Inaktivace materiálu extrémním pH	80
3.3.5 Inaktivace enzymů srážedky bílkovin	80
3.4 Útlum činnosti enzymů v rostlinném materiálu	80
3.4.1 Mrazová sublimace	80
3.4.2 Zmrazování rostlinného materiálu	80
3.4.3 Útlum činnosti enzymů sníženými teplotami	80
3.4.4 Útlum činnosti mikroorganismů antiseptiky	81
3.5 Desintegrace rostlinného materiálu	81
3.6 Stanovení sušiny a vody v rostlinném materiálu	81
Úkol 64a Stanovení sušiny	81
3.7 Sledování dusíkatých látek	81
3.7.1 Mikroanalýza základních forem dusíku	81
Úkol 65. Mineralizace rostlinného materiálu k analýzám dusíku	82
Úkol 66. Mikrodifuze a kontinuální mikrotitrace	83
Úkol 67. Mikrostanovení celkového dusíku v rostlinném materiálu	83
Úkol 68. Mikrostanovení veškerých volných dusíkatých látek a bílkovin v rostlinách	83
Úkol 69. Kolorimetrické stanovení amoniaku	84
Úkol 70. Stanovení amoniových iontů kolorimetrií s Nesslerovým činidlem	85
Úkol 71. Stanovení bílkovin Folinovým činidlem /Lowry a spol./	85
3.7.2 Analýza aminokyselin	86
Úkol 72. Příprava a čištění extraktů volných látek	86
3.7.3 Hydrolyza bílkovin	87
Úkol 73. Kyselá hydrolyza bílkovin	87
Úkol 74. Alkalická hydrolyza bílkovin	88
Úkol 75. Stanovení veškerých aminokyselin a amoniových iontů	88
Úkol 76. Formolová titrace aminokyselin	88
Úkol 77. Chromatografické dělení aminokyselin a cukrů na tenké vrstvě	89
Úkol 78. Rozdělení směsi aminokyselin dvojrozměrnou chromatografií na tenké vrstvě celulosy	90
Úkol 79. Rychlé rozdělení skupin aminokyselin chromatografií na tenké vrstvě ve zkumavkách	91
3.7.4 Stanovení aminokyselin na automatickém analyzátoru	91
Úkol 80. Stanovení vázaných aminokyselin v bílkovinách	91
Úkol 81. Stanovení volných aminokyselin v rostlinném materiálu dle Vrátného	93

Úkol 82. Zrychlené stanovení prolinu v rostlinném materiálu	95
3.7.5 Stanovení jednotlivých aminokyselin a j. dusíkatých látek	95
Úkol 83. Stanovení argininu Sakaguchiho reakcí	95
Úkol 84. Stanovení agmatinu v rostlinném materiálu	96
Úkol 85. Stanovení močoviny s PDMAB	97
Úkol 86. Stanovení močoviny ureasovou metodou	97
3.7.6 Stanovení kofaktorů a jejich složek	97
Úkol 87. Bioluminescenční stanovení ATP	97
Úkol 88. Spektrofotometrické stanovení thiaminu	98
Úkol 89. Stanovení riboflavinu v rostlinném materiálu fluorimetrickou metodou	99
Úkol 90. Kolorimetrické stanovení kyseliny nikotinové	100
Úkol 91. Kolorimetrické stanovení biotinu a jeho analogů	101
3.7.7 Sledování nukleových kyselin a jejich složek	101
Úkol 92. Stanovení veškerých nukleových kyselin v rostlinném materiálu	101
Úkol 93. Stanovení obsahu DNK reakcí s indolem	102
Úkol 94. Stanovení DNK s p-nitrofenylhydrazinem	103
Úkol 95. Stanovení celkové DNK v materiálu spektrofotometrií basí	103
Úkol 96. Stanovení RNK v rostlinném materiálu reakcí ribosy s orcinem	104
Úkol 97. Preparace sumární RNK z rostlinného materiálu	104
Úkol 98. Dělení nukleotidů iontoměničovou chromatografií na tenké vrstvě	105
3.7.8 Sledování rostlinných hormonů	106
Úkol 99. Stanovení kyseliny 3-indolyloctové fluorimetrickou metodou	106
Úkol 100. Stanovení indolu ve směsích reakcí s PDMAB	107
Úkol 101. Spektrofotometrické stanovení gibberellinových látek v rostlinném materiálu	107
3.7.9 Sledování alkaloidů	108
Úkol 102. Stanovení veškerých alkaloidů v rostlinách	108
Úkol 103. Dělení opiátových alkaloidů chromatografií na tenké vrstvě	108
Úkol 104. Chromatografické dělení alkaloidů lupiny	109
3.8 Sledování cukrů v rostlinách	109
3.8.1 Volné cukry	110
Úkol 105. Stanovení redukujících cukrů dle Bertrana	110
Úkol 106. Stanovení redukujících cukrů dle Nelsona	111
Úkol 107. Stanovení redukujících cukrů v rostlinách	111
Úkol 108. Chromatografie volných cukrů	112
Úkol 109. Stanovení L-askorbátu v rostlinách	112
Úkol 110. Zrychlené stanovení L-askorbátu v rostlinách	113
3.8.2 Sledování polysacharidů	113
Úkol 111. Stanovení škrobu v rostlinném materiálu antronovým činidlem	113
Úkol 112. Stanovení škrobu po hydrolýze	114
3.9 Sledování tuků a lipidních látek	115
Úkol 113. Stanovení hrubého tuku v rostlinách	115
Úkol 114. Stanovení čísla kyselosti tuků	115
Úkol 115. Stanovení čísla zmydlnění oleje a esterového čísla tuku	116
Úkol 116. Stanovení jodového čísla dle Hanuše	116
Úkol 117. Stanovení indexu lomu olejů a jodového čísla	117
Úkol 118. Dělení tukových kyselin tenkovrstvou chromatografií	117
Úkol 119. Stanovení relativního % tukových kyselin v lipidech tenkovrstvou chromatografií	118
3.10 Sledování organických kyselin	118
Úkol 120. Stanovení celkové acidity extraktů rostlinných materiálů	119
Úkol 121. Spektrofotometrické stanovení citrátu	119
Úkol 122. Kolorimetrické stanovení cis-akonitátu	120
Úkol 123. Kolorimetrické stanovení oxokyselin hydrazonovou metodou	120
Úkol 124. Stanovení a důkaz těkavých kyselin plynovou chromatografií	121
3.11 Sledování rostlinných pigmentů	121