

OBSAH

1. Část obecná	1
1.1 Bezpečnost práce v biochemické laboratoři	1
1.2 Pomocné laboratorní činnosti	
1.2.1 Mytí laboratorního skla	3
1.2.2 Příprava vody pro biochemické pokusy	3
1.2.3 Měření pH v biochemické laboratoři	3
1.2.4 Výběr pufrů a jejich příprava	6
1.2.5 Fyziologická media	7
1.3 Základní operace	
1.3.1 Úprava biologického materiálu	9
1.3.1.1 Mletí	9
1.3.1.2 Homogenizace	9
1.3.1.3 Příprava acetonové sušiny	10
Úprava biologického materiálu pro metabolická studia	10
1.3.2 Extrakce	11
1.3.3 Odstřed'ování	12
1.3.4 Mrazová sublimace	13
1.3.5 Měření a interpretace absorpčních spekter	14
1.3.5.1 Odvození Lambertova-Beerova zákona	14
1.3.5.2 Určování koncentrace pomocí absorpční spektrofotometrie	16
1.4 Biochemické separační techniky	
1.4.1 Precipitační metody	18
1.4.2 Membránové separační metody	19
1.4.2.1 Membránová filtrace	19
1.4.2.2 Dialýza	20
1.4.3 Chromatografie	
1.4.3.1 Princip chromatografie a některé základní pojmy	20
1.4.3.2 Gelová chromatografie	24
1.4.3.3 Ionexová chromatografie	29
1.4.3.4 Chromatofokuse	31
1.4.3.5 Afinitní chromatografie	32
1.4.3.6 Chromatografie s hydrofobní interakcí	33
1.4.3 Elektromigrační metody	33
1.5 Imunochemické metody	
1.5.1 Antigeny a protilátky	39
1.5.2 Imunoprecipitační metody	40
1.5.3 Citlivé imunochemické neprecipitační metody	44
1.5.4 Další techniky založené na interakci antigen – protilátka	47

2. Část experimentální

48

2.1 Aminokyseliny a bílkoviny

2.1.1	Dělení směsi aminokyselin chromatografickými metodami	48
2.1.2	Určení sekvence tripeptidu	51
2.1.3	Elektroforetická separace aminokyselin na papírovém nosiči	54
2.1.4	Izolace kaseinu z mléka	55
2.1.5	Izolace ovalbuminu z vaječného bílku	56
2.1.6	Izolace ovomukuidu z vaječného bílku	57
2.1.7	Izolace a vlastnosti cytochromu c	57
2.1.8	Frakcionace bílkovin ze semen hrachu a stanovení hemokoagulační aktivity	59
2.1.9	Chemické reakce peptidového řetězce a jednotlivých aminokyselin	61
2.1.10	Chemické modifikace proteinů	64
2.1.11	Stanovení relativní molekulové hmotnosti bílkovin pomocí SDS-PAGE	68
2.1.12	Stanovení relativní molekulové hmotnosti bílkovin pomocí elektroforézy v polyakrylamidových gelech různé koncentrace	70
2.1.13	Elektroforetické dělení bílkovin krevního séra	72
2.1.14	Gelová chromatografie barevného derivátu albuminu	74
2.1.15	Dělení makromolekulárních látek gelovou chromatografií	75
2.1.16	Izoelektrická fokusace bílkovin	77
2.1.17	Stanovení aminokyselin reakcí s ninhydrinem	79
2.1.18	Formolová titrace aminokyselin	80
2.1.19	Stanovení bílkovin Kjeldahlovou metodou	81
2.1.20	Stanovení koncentrace proteinů v roztoku (přehled metod)	82

2.2 Sacharidy

2.2.1	Chemické vlastnosti sacharidů	90
2.2.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Schoorla	93
2.2.3	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho a Nelsona	94
2.2.4	Stanovení neutrálních sacharidů podle Duboise	95
2.2.5	Mikrostanovení glukosy podle Hagedorna a Jensena	96
2.2.6	Spektrofotometrické stanovení glykogenu v tkáních antronovým činidlem	97
2.2.7	Papírová chromatografie sacharidů v kruhovém uspořádání	98
2.2.8	Chromatografie sacharidů na tenké vrstvě	99

2.3 Nukleové kyseliny a jejich součásti

2.3.1	Izolace DNA ze sleziny a RNA z kvasnic, stanovení jejich komponent	100
2.3.2	Izolace deoxyribonukleové kyseliny z telecího brzlíku	103
2.3.3	Izolace a vlastnosti nukleových kyselin	104
2.3.4	Izolace plasmidové DNA z <i>E.coli</i> a její elektroforesa v agarosovém gelu	107
2.3.5	Stanovení DNA na základě reakce deoxyribosy s cysteinem	109
2.3.6	Stanovení DNA na základě reakce deoxyribosy s difenylaminem	109
2.3.7	Stanovení RNA na základě reakce ribosy s orcinem	110
2.3.8	Spektrofotometrické stanovení bílkovin a DNA vedle sebe	111

2.4 Další biologicky významné látky

2.4.1	Preparace lipidových frakcí z vaječného žloutku	112
2.4.2	Vlastnosti lipidových složek vaječného žloutku	113
2.4.3	Enzymová hydrolysa lecithinu fosfolipasou D	115
2.4.4	Frakcionace chlorofylů a karotenoidů na LH-Sephadexu	116
2.4.5	Dělení rostlinných barviv adsorpční chromatografií na koloně	119

2.4.6 Stanovení lipofilních listových barviv a jejich rozdělení adsorpční chromatografií	117
2.4.7 Stanovení thiaminu thiochromovou metodou	119
2.4.8 Stanovení kyselina L-askorbové titrací s 2,6-dichlorfenolindofenolem	120
2.4.9 Stanovení anorganického fosfátu modifikovanou metodou Fiske-Subbarowa podle Clarka	121
2.5 Enzymy	122
2.5.1 Izolace enzymů a stanovení jejich katalytické aktivity	
2.5.1.1 Laktátdehydrogenasa ze srdečního svalu (izolace a aktivita)	122
2.5.1.2 Rostlinná alkoholdehydrogenasa (izolace a aktivita)	123
2.5.1.3 Aminoxidasa ze semenáčků hrachu (izolace a aktivita)	124
2.5.1.4 Katalasa (aktivita)	127
2.5.1.5 Peroxidasa (aktivita)	128
2.5.1.6 Gluksooxidasa (katalytická aktivita pomocí kyslíkového čidla)	128
2.5.1.7 Aspartátaminotransferasa (aktivita v krevním séru)	130
2.5.1.8 Subtilisin a trypsin (aktivita Ansonovou metodou a s použitím cytochromu c jako substrátu)	131
2.5.1.9 Trypsin (aktivita na základě hydrolýzy kaseinu)	133
2.5.1.10 Chymosin (aktivita)	134
2.5.1.11 α - a β -Amylasy ze sladu (izolace a aktivita)	135
2.5.1.12 Amylasy (aktivace a inhibice)	136
2.5.1.13 β -D-Glukosidasa z mandlí (izolace a aktivita)	138
2.5.1.14 Celulasy (aktivita)	138
2.5.1.15 Esterasy z klíčících semen hrachu (pH optimum a specifická aktivita)	139
2.5.1.16 Kyselé fosfatasy z klíčících semen hrachu (izolace, pH optimum a specifická aktivita)	140
2.5.1.17 Fosfolipasa D (aktivita)	141
2.5.1.18 Aldolasa (aktivita)	143
2.5.1.19 Separace enzymů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a detekce jejich aktivity v gelu	144
2.5.1.20 Separace trypsinu pomocí iontoměničové chromatografie	146
2.5.2 Enzymová kinetika	
2.5.2.1 Alkoholdehydrogenasa (K_m pro ethanol, propanol a NAD^+)	147
2.5.2.2 Laktátdehydrogenasa (K_m pro laktát a NAD^+);	148
2.5.2.3 Aminoxidasa z hrachu (K_m , inhibiční konstanty)	149
2.5.2.4 Katalasa (K_m)	152
2.5.2.5 Papain (vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce)	153
2.5.2.6 Štěpení želatiny trypsinem (časový průběh)	154
2.5.2.7 Štěpení kaseinu trypsinem (K_m)	155
2.5.2.8 Trypsin (inhibice ovomukoidem)	156
2.5.2.9 Štěpení chromogenního substrátu trypsinem (K_m , vliv pH a teploty)	156
2.5.2.10 Štěpení škrobu amylasou (časový průběh reakce)	159
2.5.2.11 α -Amylasy (vliv pH a teploty)	160
2.5.2.12 Substrátová specifita glykosidas	163
2.5.2.13 Štěpení sacharosy invertasou (K_m , katalytická aktivita, vliv pH, konc. enzymu)	164

2.5.3 Využití enzymů pro analytické účely	
2.5.3.1 Stanovení močoviny pomocí ureasy, stanovení ureasové aktivity	167
2.5.3.2 Stanovení glukosy enzymovou elektrodou s glukosaoxidasou	169
2.5.3.3 Chemiluminiscenční stanovení enzymově generovaného H_2O_2	171
2.6 Imunochemické metody	
2.6.1 Dvojitá radiální imunodifuze podle Ouchterlonyho	173
2.6.2 Střetná (protisměrná) imuno elektroforéza	175
2.6.3 Raketová elektroforéza	176
2.6.4 Imunoprecipitační reakce v roztoku	178
2.6.5 Western blotting (immunoblotting)	179
2.7 Studium metabolických dějů	
2.7.1 Světlem indukovaný transport protonů a fosforylace v chloroplastech	182
2.7.2 Kinetika Hillovovy reakce	184
2.7.3 Respirační řetězec bakterií - studium pomocí kyslíkové elektrody	186
2.7.4 Izolace a metabolická charakterizace mitochondrií z brambor	188

3. Přílohy

3.1 Příprava některých důležitých pufrů	190
3.2 Nomogram pro přepočet počtu otáček centrifugy na odstředivé zrychlení	193
3.3 Tabulka pro přípravu roztoků síranu amonného	194
3.4 Pufrы doporučené pro ionexovou chromatografii	195
3.5 Směsi pro přípravu polyakrylamidových gelů	196
3.6 Kvantitativní problémy v biochemické laboratoři	
3.6.1 Slabé elektrolyty v roztoku, pufrы	197
3.6.2 Spektrofotometrie	198
3.6.3 Využití spektrofotometrie při sledování enzymových reakcí	200
3.6.4 Chromatografické a elektroforetické metody	202