

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Enzymové metody | 8 |
| 1A Stanovení aktivity enzymů a kinetických charakteristik | 17 |
| a) Stanovení enzymových aktivit extracelulárních hydroláz z mikroorganismů..... | 17 |
| b) indukce tvorby extracelulárních hydroláz pomocí komplexních substrátů | 20 |
| c) stanovení pH optima a teplotního optima složek pankreatinu | 21 |
| d) Substrátová specifita glykosidáz – amylázy a sacharázy | 25 |
| e) stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce z kinetické křivky a analýza základních kinetických parametrů (K_m , V_{max}) alkoholdehydrogenázy | 27 |
| f) Stanovení aktivity enzymu antioxidačních enzymů v rostlinném materiálu..... | 32 |
| 1B Charakterizace a částečná purifikace vybraných enzymů | 34 |
| a) Izolace aminoxidázy z klíčků hrachu a purifikace frakcionovaným srážením síranem amonným..... | 34 |
| b) Dialýza a ultrafiltrace preparátu diaminoxidázy..... | 37 |
| c) Odsolení preparátu DAO metodou gelové filtrace | 39 |
| d) Stanovení čistoty získaného preparátu a efektivnosti purifikačních procedur | 40 |
| e) Charakterizace plísňových hydrolytických enzymů pomocí gelové filtrace | 41 |
| 2. Kvantifikace a analýza proteinů..... | 46 |
| 2A) Stanovení celkových proteinů | 46 |
| a) Stanovení celkových proteinů biuretovou metodou | 49 |
| b) Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou..... | 50 |
| c) Stanovení proteinů metodou Bradfordové (vazba Coomassie Blue G250)..... | 50 |
| d) Stanovení proteinů měřením absorbance v UV oblasti | 51 |
| e) Stanovení koncentrace bílkovin z UV spektra..... | 52 |
| 2B Separace a analýza proteinů metodou PAGE-SDS..... | 53 |
| a) Příprava polyakralamidového gelu pro vertikální elektroforézu: | 57 |
| b) Příprava a aplikace vzorků při diskontinuální PAGE-SDS | 60 |
| c) Barvení proteinů v gelu pomocí Coomassie Blue..... | 61 |
| d) Barvení gelu pomocí stříbra | 61 |
| 2C Separace proteinů pomocí mikročipové elektroforézy s využitím systému Experion (BioRad) | 62 |
| 3. Separace a analýza lipidů..... | 68 |
| 3A Preparace a charakterizace lipidových frakcí z vaječného žloutku | 69 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 3B | Enzymové stanovení glycerolu a triacylglycerolů..... | 75 |
| 3C | Stanovení frakcí lipidů metodou tenkovrstvé chromatografie..... | 77 |
| 3D | Analýza cholesterolu metodou RP/HPLC s UV detekcí | 79 |
| 4. | Izolace a analýza nukleových kyselin..... | 83 |
| 4A | Izolace nukleových kyselin z různých zdrojů..... | 85 |
| | a) Izolace RNA z kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 85 |
| | b) Izolace DNA z kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fenol-chloroformovou extrakcí..... | 85 |
| | c) Izolace DNA z rybího mlíčí srážením | 86 |
| | d) Izolace genomové DNA z buněk bukání sliznice extrakcí a kitem Epicentre Biotechnologie | 87 |
| | e) Izolace plazmidové DNA z bakterie - přirozeného plazmidu z buněk bakterie <i>E. carotovora</i> | 88 |
| 4B | Analýza DNA spektrofotometricky | 89 |
| | a) Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty preparátů izolované DNA | 89 |
| | b) Sledování tepelné denaturace DNA pomocí UV absorpce..... | 90 |
| 4C | Analýza DNA pomocí horizontální elektroforézy v agaróze | 91 |
| | a) Horizontální elektroforéza DNA v agarózovém gelu | 92 |
| | b) Stanovení velikosti plazmidu linearizací pomocí restričních endonukleáz..... | 93 |
| 4D | Analýza DNA pomocí specializovaných elektroforetických technik..... | 94 |
| | a) Pulsní gelová elektroforéza..... | 94 |
| 5. | Analýza sacharidů..... | 100 |
| 5A) | Stanovení celkových sacharidů | 106 |
| | a) stanovení celkových sacharidů v cereáliích metodou dle Duboise..... | 106 |
| 5B) | Stanovení redukujících sacharidů..... | 107 |
| | a) Stanovení redukujících sacharidů v medu podle Somogyi-Neslona | 107 |
| 5C | Stanovení sacharidů chromatografickými metodami..... | 108 |
| | a) Stanovení mono- a oligosacharidů v medu metodou HPLC s refraktometrickou detekcí | 111 |
| | b) Chromatografie mono- a oligosacharidů na tenké vrstvě | 113 |
| 6. | Chromatografické metody – analýza nízkomolekulárních látek různými typy chromatografie s různým typem detekce..... | 117 |
| 6A | Extrakce a analýza lipofilních pigmentů | 119 |
| | a) Adsorpční chromatografie lipofilních barviv..... | 119 |
| | b) Fotometrické stanovení lipofilních barviv..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| c) Analýza lipofilních pigmentů (karotenoidů) metodou RP/HPLC | 123 |
| 6B Extrakce a analýza směsi fenolických látek metodou HPLC/MS | 127 |
| 7. Antioxidační systémy | 138 |
| 7A Skupinové parametry – stanovení antioxidační aktivity | 142 |
| a) stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu | 142 |
| b) Stanovení celkové antioxidační aktivity rostlinného materiálu pomocí ABTS* | 142 |
| 7B Skupinové parametry – celková koncentrace vybraných skupin antioxidantů | 143 |
| a) Stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky | 143 |
| b) stanovení celkových flavonoidů | 144 |
| c) stanovení celkových anthokyanů | 144 |
| d) stanovení celkových hořkých látek a izosloučenin v pivu | 145 |
| e) obsah vitamínu C | 145 |
| f) Extrakce a hydrolýza glykosylovaných fenolických antioxidantů z rostlinného materiálu | 146 |
| 8. Příprava mikro- a nanočástic, enkapsulace aktivních látek a analýza stability částic | 148 |
| 8A Liposomy | 150 |
| a) Teoretický úvod | 150 |
| b) Praktická část – příprava liposomů různými postupy | 155 |
| c) Charakterizace liposomů pomocí metody DLS (Dynamic Light Scattering) | 158 |
| 8B Polysacharidové částice | 158 |
| a) Přehled různých typů polysacharidových částic | 158 |
| b) Enkapsulace kyseliny gallové do chitosanových částic | 160 |
| c) Enkapsulace kyseliny gallové do chitosan-alginátových částic | 160 |
| 9. Průtoková cytometrie | 162 |
| a) Praktická část - stanovení viability mikrobiálních buněk metodou FC | 164 |