

Instrumentální biochemické metody

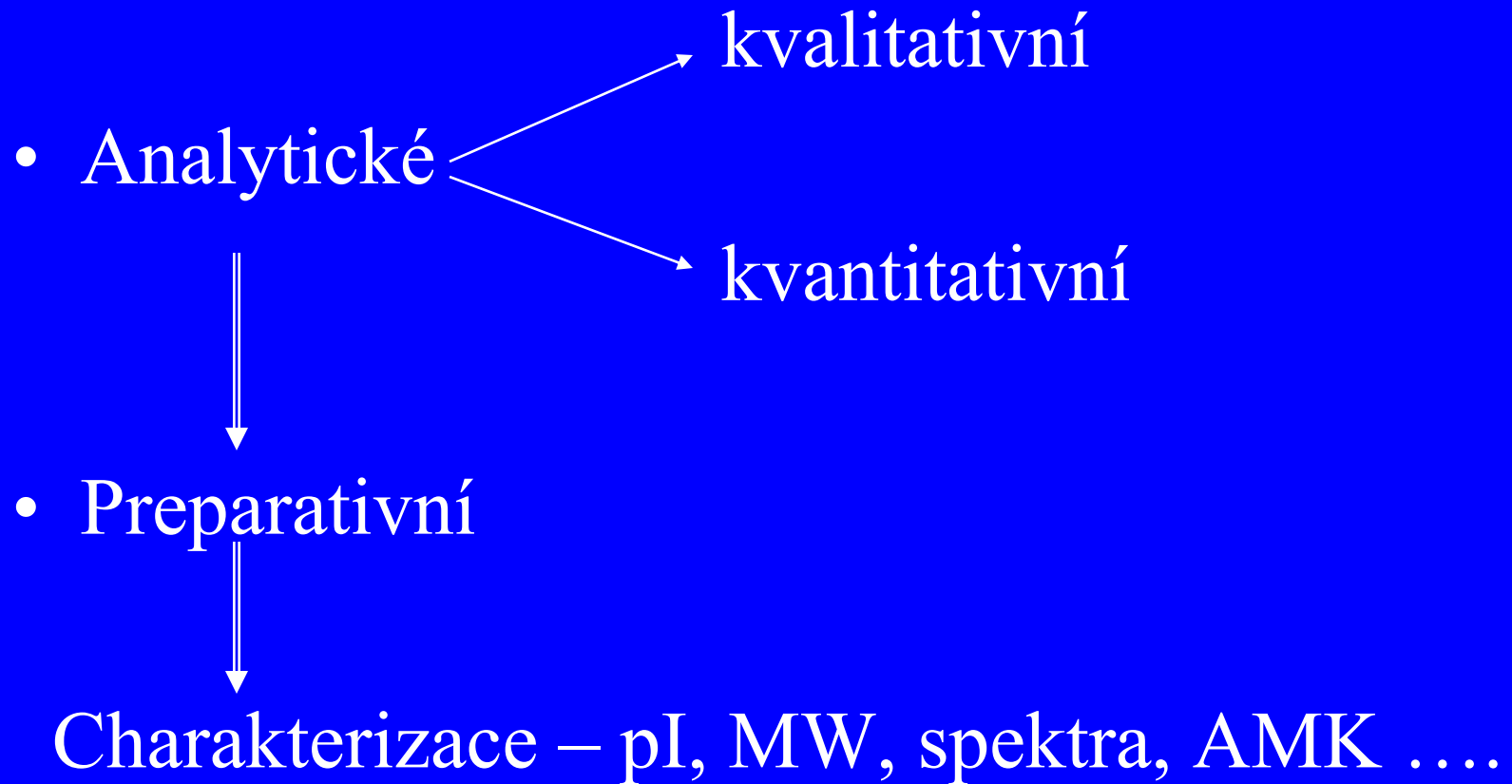
Literatura

- *Anzenbacher, Kovář* : Metody chemického výzkumu pro biochemiky
- *Ferenčík* : Biochemická laboratorní technika
- *Morris, Morris* : Separation Methods in Biochemistry

Instrumentální biochemické metody

- Vychází z klasických metod chemické analýzy
- Uplatňují se zde i speciální metody

Separace



Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

Zásady pro práci s biologickým materiálem

1. Teplota
2. pH + iontová síla
3. Koncentrace bílkoviny
4. Pěnění
5. Lokální přebytky
6. Proteázy

Plánování separace bílkovin

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota



Závěr : získat vzorek o patřičné
čistotě s vynaložením
patřičného úsilí

Volba vstupního materiálu

- Preparát z daného organismu
- Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- Preparát s nejmenším obsahem nečistot

Volba a kombinace separačních metod

- Rozlišovací schopnost
- Selektivita
- Kapacita
- Zpětný výtěžek
- Náklady – materiál, přístroje, člověk
- Stupeň zředování a koncentrace
- Slučitelnost mezi metodami

Základní zásady

- Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením
malé množství levného vstupního materiálu
- Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná
malé množství vzorku již investovaná práce

- Pořadí volit tak, aby metody na sebe vhodně navazovaly
- Metody zřetřovací kombinovat s metodami koncentrujícími
- Metody nepoužívat opakovaně

Sledování průběhu separace

Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Přečištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	1.5	75 %

Stanovení koncentrace bílkoviny



Kjeldahlova metoda – stanovení



- Mineralizace vzorku – převedení organického dusíku na NH_4^+
- Stanovení NH_4^+ - titrace, fotometrie, selektivní elektrody

UV spektrofotometrie

- 280 nm – aromatické AMK
interference nukleotidů
- 180 - 230 nm – peptidická vazba

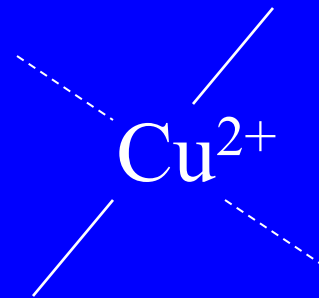
Výhody - nedestruktivní metoda
- není třeba kalibrace

VIS spektrofotometrie

- Přídavek činidla ■■■■ barevný derivát
- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

Biuretová metoda

Princip : Cu^{2+} vytváří v alkalickém prostředí komplex se 4 N peptidické vazby



Měření : 540 – 560 nm
310 nm

Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany na molybdenovou modř

Měření : 725 nm

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

Metoda dle Bradfordové

Princip : při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm.


Meření : 595 nm

Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na bílkovinu 
měření vzniklé fluorescence

- zhášení fluorescence přidavkem
bílkoviny

Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny
bílkoviny vstupují v přítomnosti
 Co^{2+} katalytické reakce na Hg
elektrodě roud

Nejčastěji používané metody

Metoda	Rozsah (ng)	Poznámka
Biuretová	0.5 - 5	okamžitý vývoj
Lowryho	0.05 - 0.5	pomalý vývoj
UV - 280 nm	0.05 - 2	interference
UV – 205 nm	0.01 - 0.05	interference
Bradfordové	0.01 - 0.05	sorpce barviva

Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,
hormonální receptorové atd.

Vlastní separace

Obecné schéma

Získání vstupního materiálu



Rozrušení buněk



Separace

Vstupní materiál

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

- Výhody - lze je snadno získat v dostatečné množství
- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
 - genetické inženýrství
 - termofilní organismy

Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

Živočišné tkáně

- Laboratorní zvířata – myši, krysy, králíci
- Jateční zvířata – orgány
- Člověk – tělní tekutiny

Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách

Nevýhoda – problematický růst za
definovaných podmínek

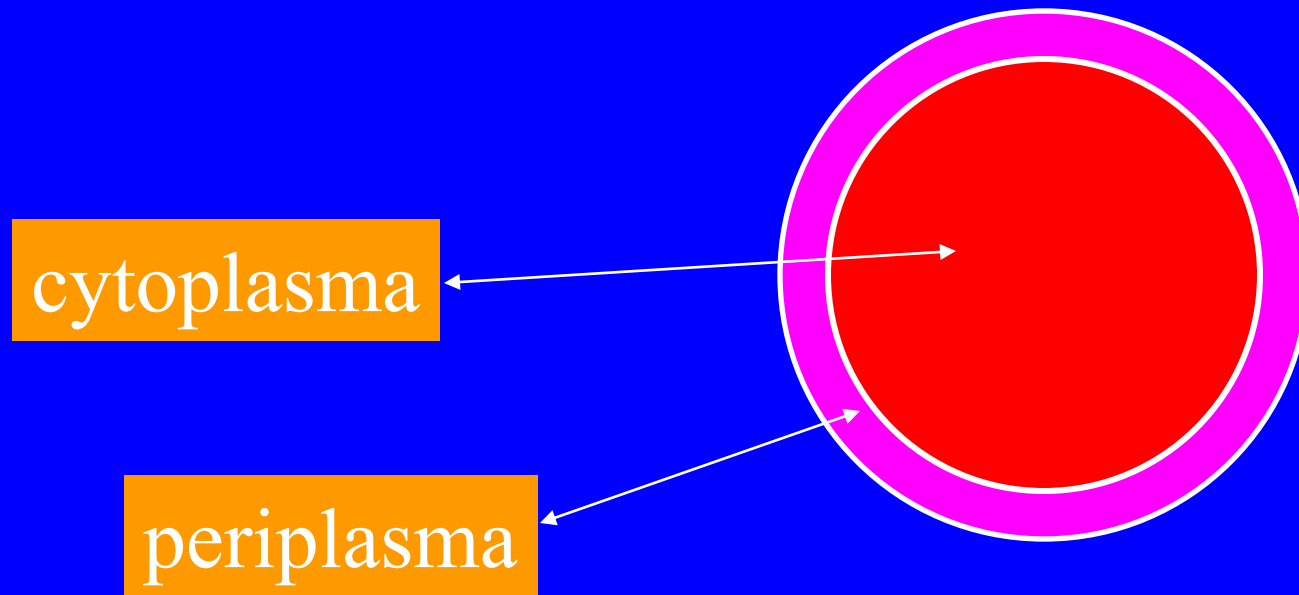
Manipulace s biologickým materiálem

- Pokud možno zpracovat co nejdříve
- Zmražení – při – 60 - 80 °C
- Rozmrazování – co nejrychleji

Rozbití a extrakce

Bakterie

- Záleží na lokalizaci

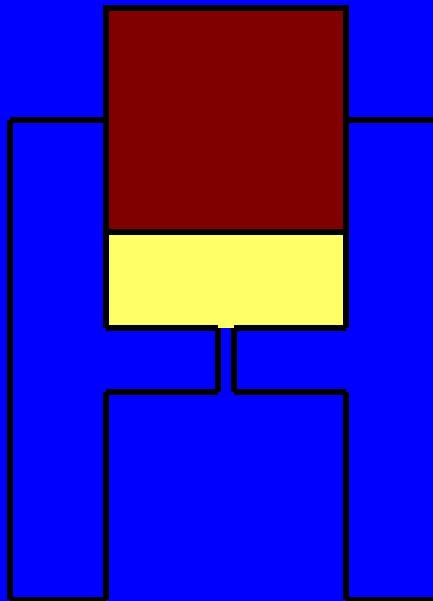


Balotina

Princip – jemné skleněné kuličky přidány do bakteriální suspenze a rychle třepány nebo míchány – nutno chladit

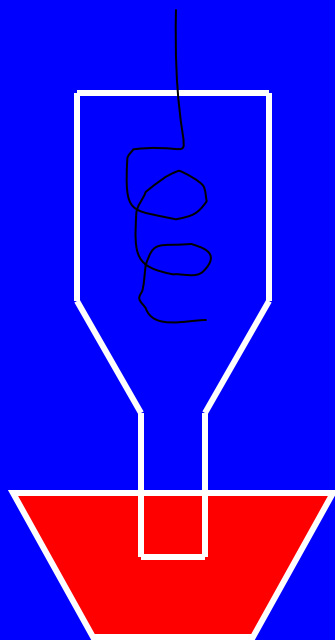
French (X) press

Princip – zmražená bakteriální suspenze
protlačována malým otvorem,
přičemž dochází k rekrystalizaci a
rozrušení buněk



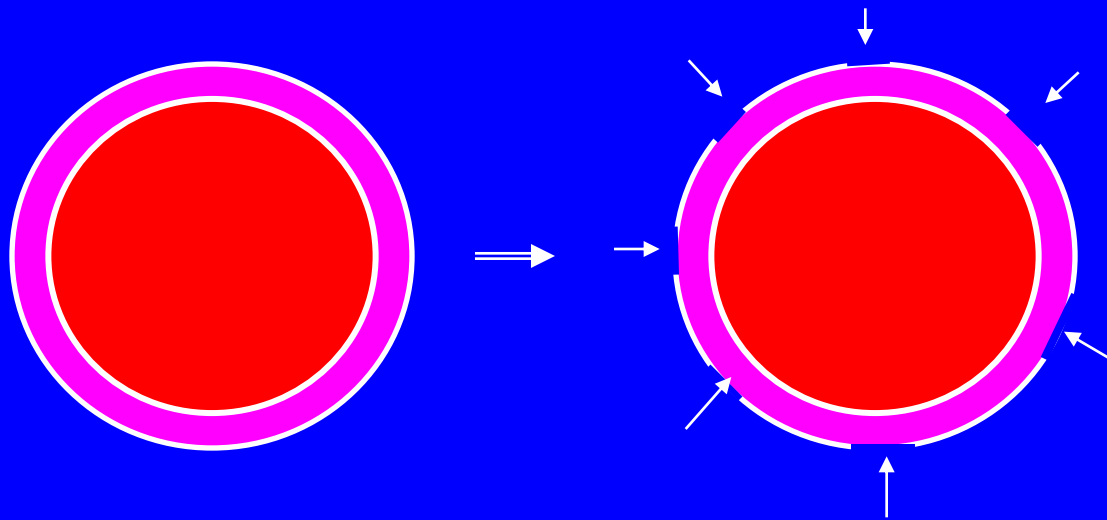
Ultrazvuk

Princip – ultrazvuk (> 20 kHz) v roztoku
vyvolává střižní síly – nutno chladit



Lysozym + osmotický šok (mírný osmotický šok)

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu, následně je bakteriální suspenze zředěna destilovanou H_2O – bakterie popraskají



Další

- Alumina Al_2O_3 – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování

Kvasinky

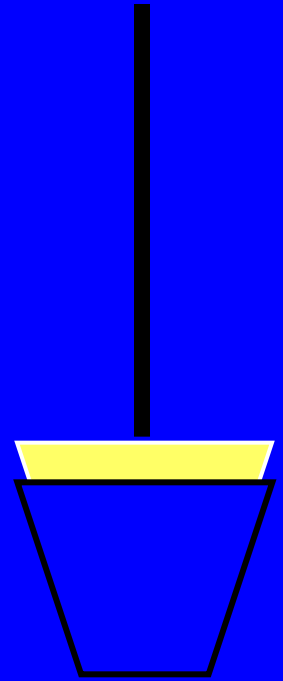
Toluenová autolýza

Princip – toluen extrahuje při 35 –40 °C
fosfolipidy buněčné stěny
osmotický šok enzymová
autolýza

Balotina, French press,

Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem
- Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův
- Mixery
- Osmotická lyse - erytrocyty



Rostlinné tkáně

- Rozrušení buněčné stěny pomocí celulas,
- Obsahují hodně fenolických látek, které mohou být oxidovány na chinony – melaniny, které mohou modifikovat bílkoviny

Optimalizace extrakce

- Teplota – 4 - 6 °C chlazení
- pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrech
- I – v prostředí o definované iontové síle
- Přídavky látek – EDTA, ■merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteas

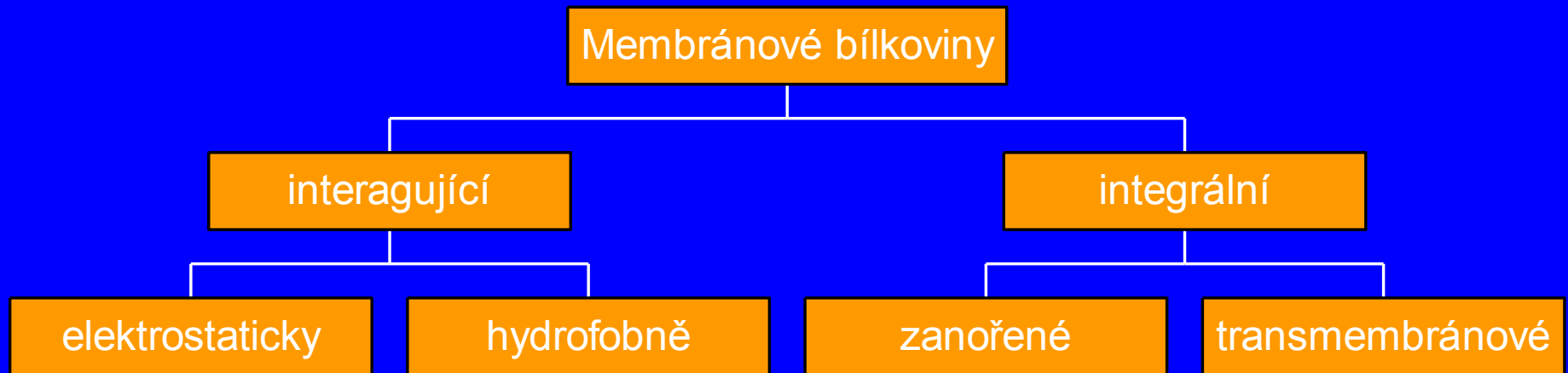
Separace subcelulárních organel

Organela	Tíhové zrychlení	Čas
Eukar.buňky	1 000 g	5'
Jádra, chloroplasty	4 000 g	10'
Mitochondrie, bakterie	15 000 g	20'
Lysozomy, membrány	30 000 g	30'
Ribozomy, fragmenty end.retikula a Gold.systém	100 000 g	60'

Enzymy - markery

Organela	Enzym
Cytoplasma	LDH
Endoplazmatické retikulum	Glukosa-6-fosfatasa
Goldiho systém	galaktosyltransferasa
Peroxisom	katalasa
Lysozom	Kyselá fosfatasa
Mitochondrie in	cytochromoxidasa
Mitochondrie out	monoaminoxidasa

Membránově vázané bílkoviny



Izolace membránových bílkovin

- *Chemicky* – detergenty, chaotropní soli, organická rozpouštědla, nízká iontová síla,
- *Fyzikálně* - homogenizace, sonikace
- *Enzymaticky* – fosfolipasy, lipasy, proteasy

Centrifugace

- Odstranění hrubých částic z roztoku
Sediment (pelet) – supernatant
- Izolace organel nebo biomakromolekul
- Stanovení základních parametrů – MW, hustota, sedimentační koeficient

Použití

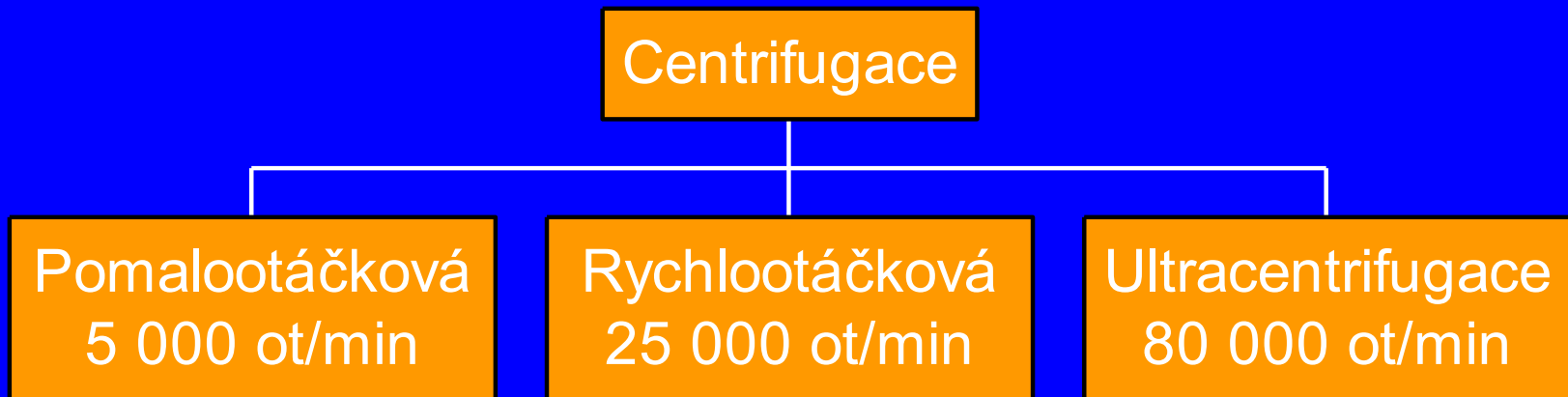
Centrifugace

```
graph TD; A[Centrifugace] --> B[Preparativní]; A --> C[Analytická]
```

Preparativní

Analytická

Rozdělení centrifug



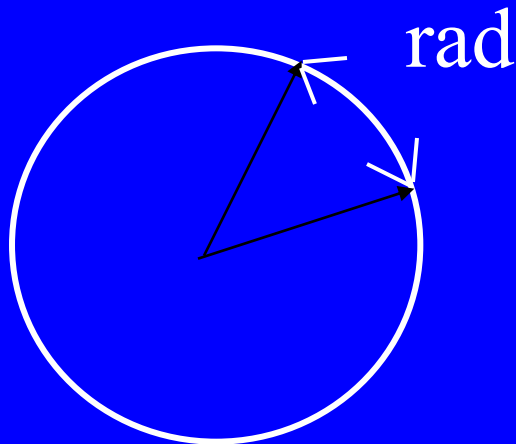
Otáčky \rightarrow g

$$g = \vartheta \cdot r$$

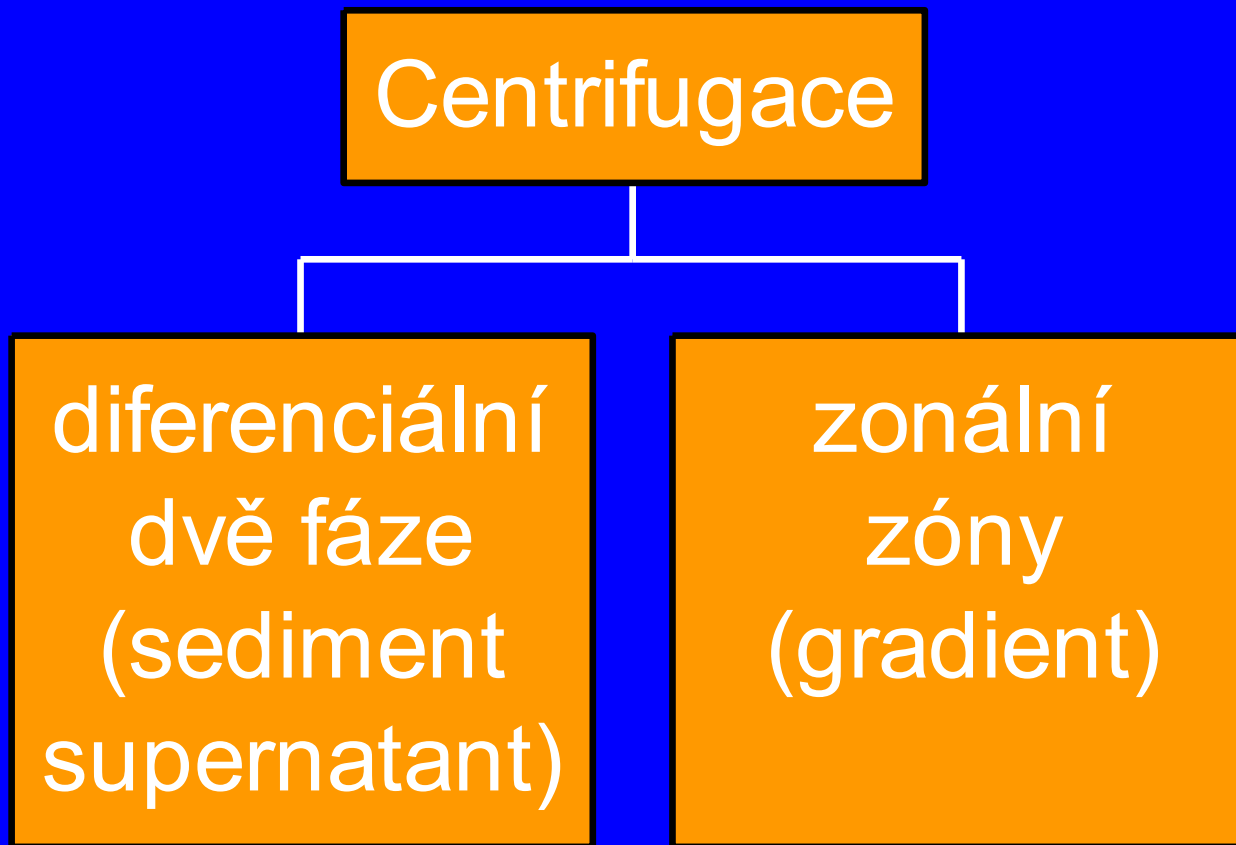
ϑ – uhlová rychlost
(rad/s)

$$\omega = \pi f$$

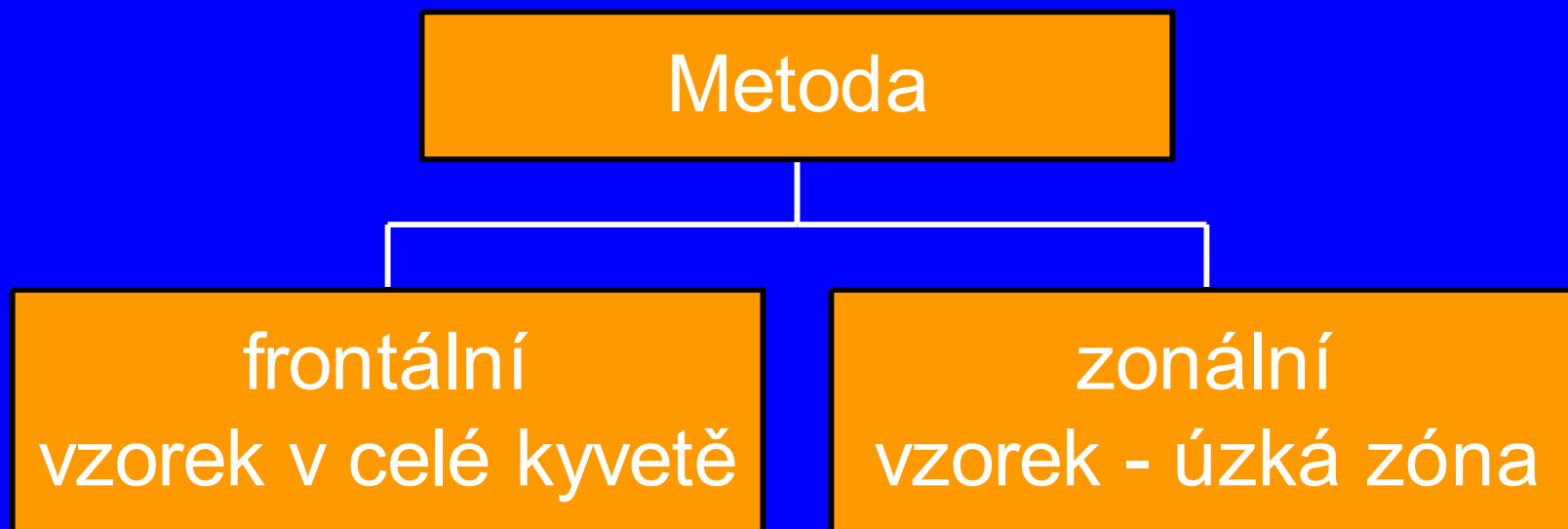
f – otáčky/min



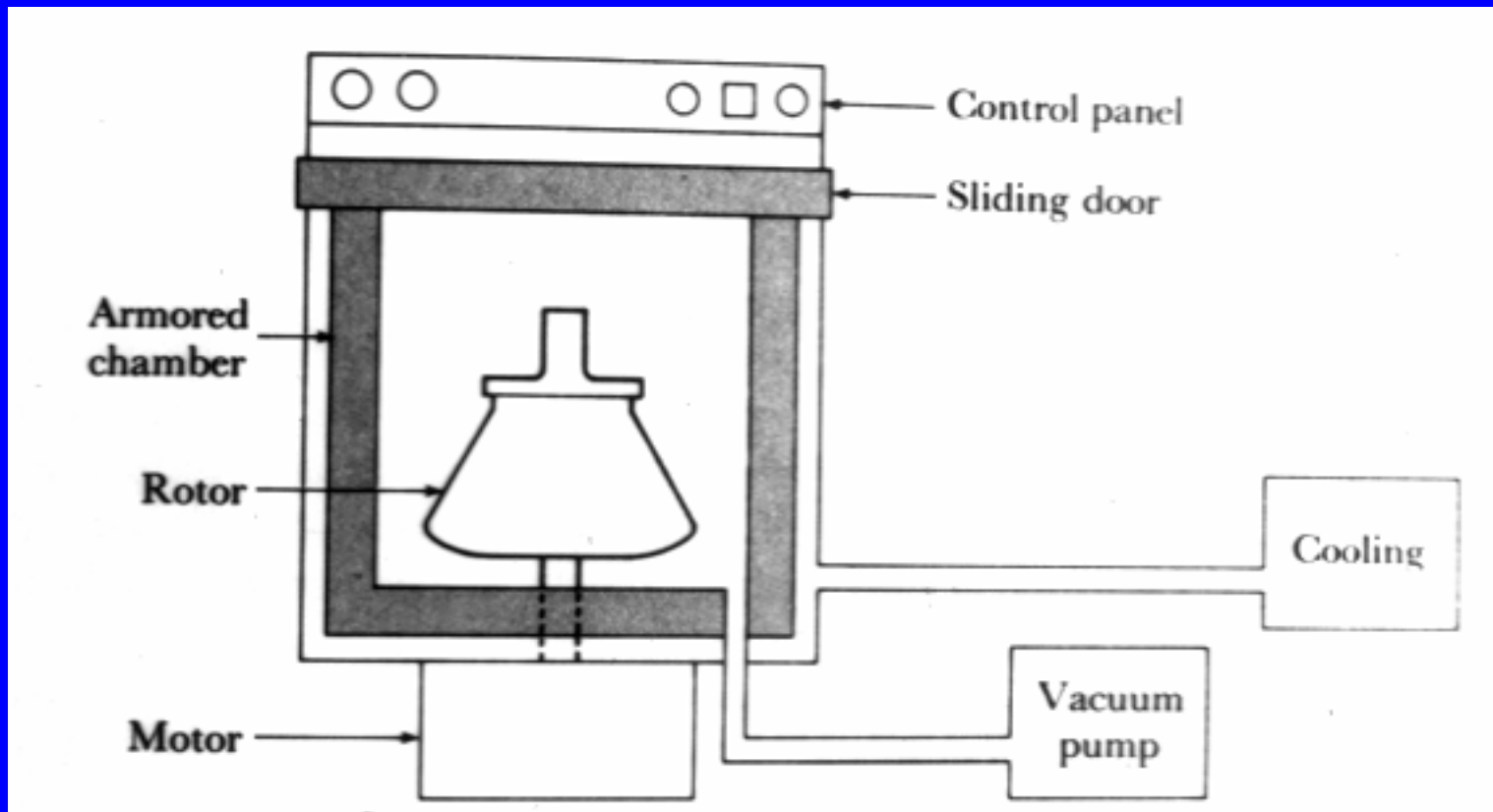
Preparativní centrifugace



Metody nanášení vzorku



Preparativní centrifuga



Preparativní centrifuga



Preparativní ultracentrifuga



Rotory

- Úhlový – diferenciální centrifugace
- Výkyvné – zonální centrifugace
- Zonální – bez kyvet, vzorek je uvnitř rotoru

Úhlový rotor

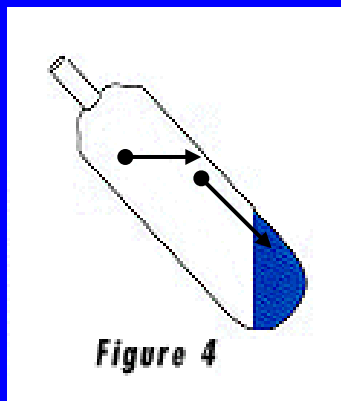
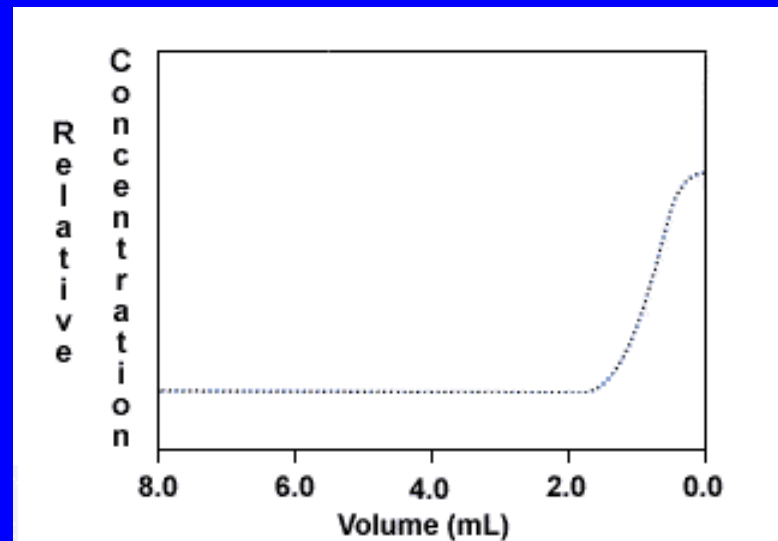
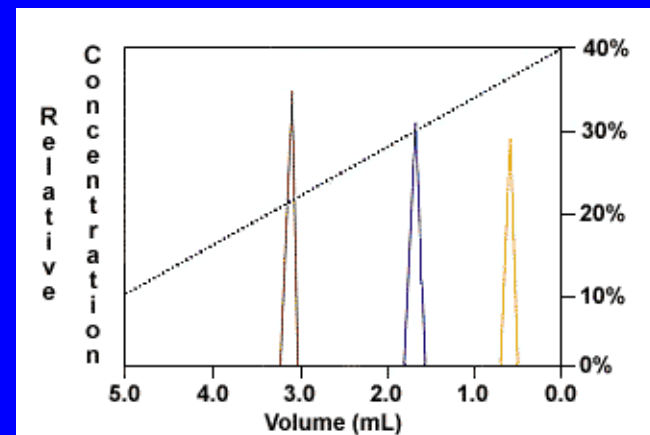
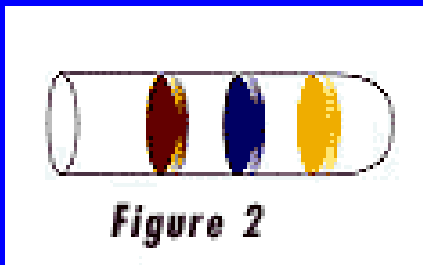


Figure 4



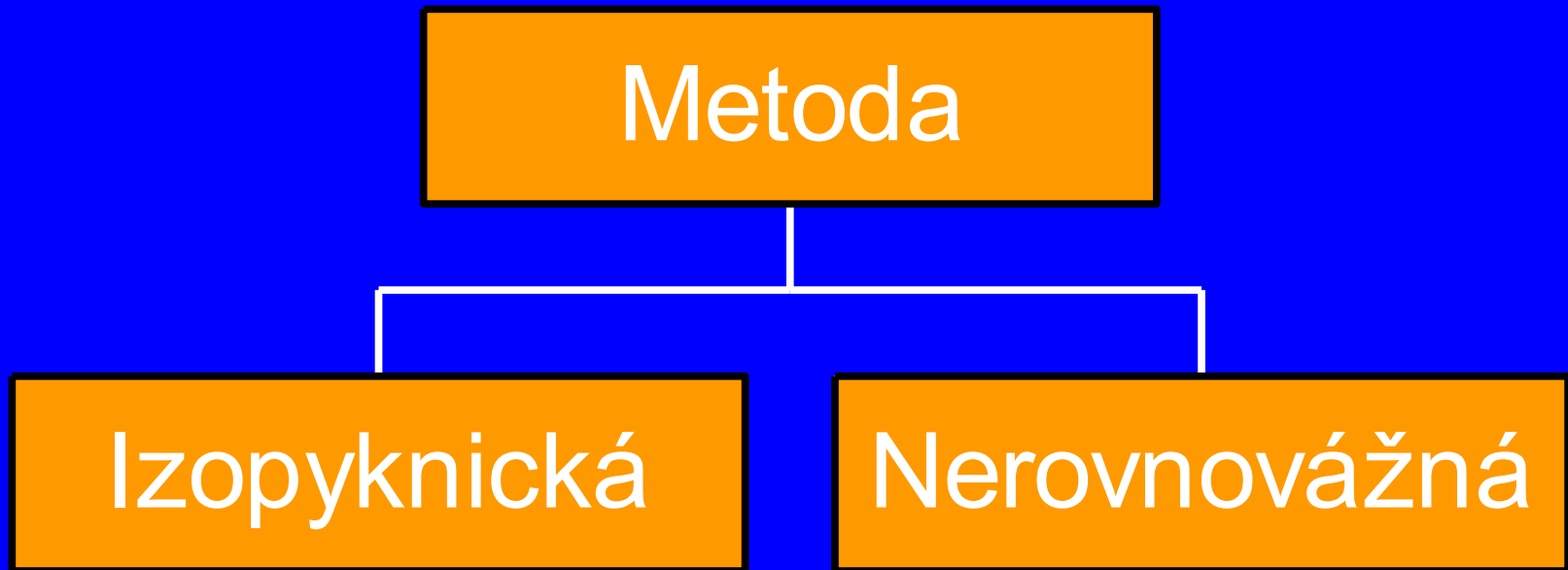
Výkyvný rotor



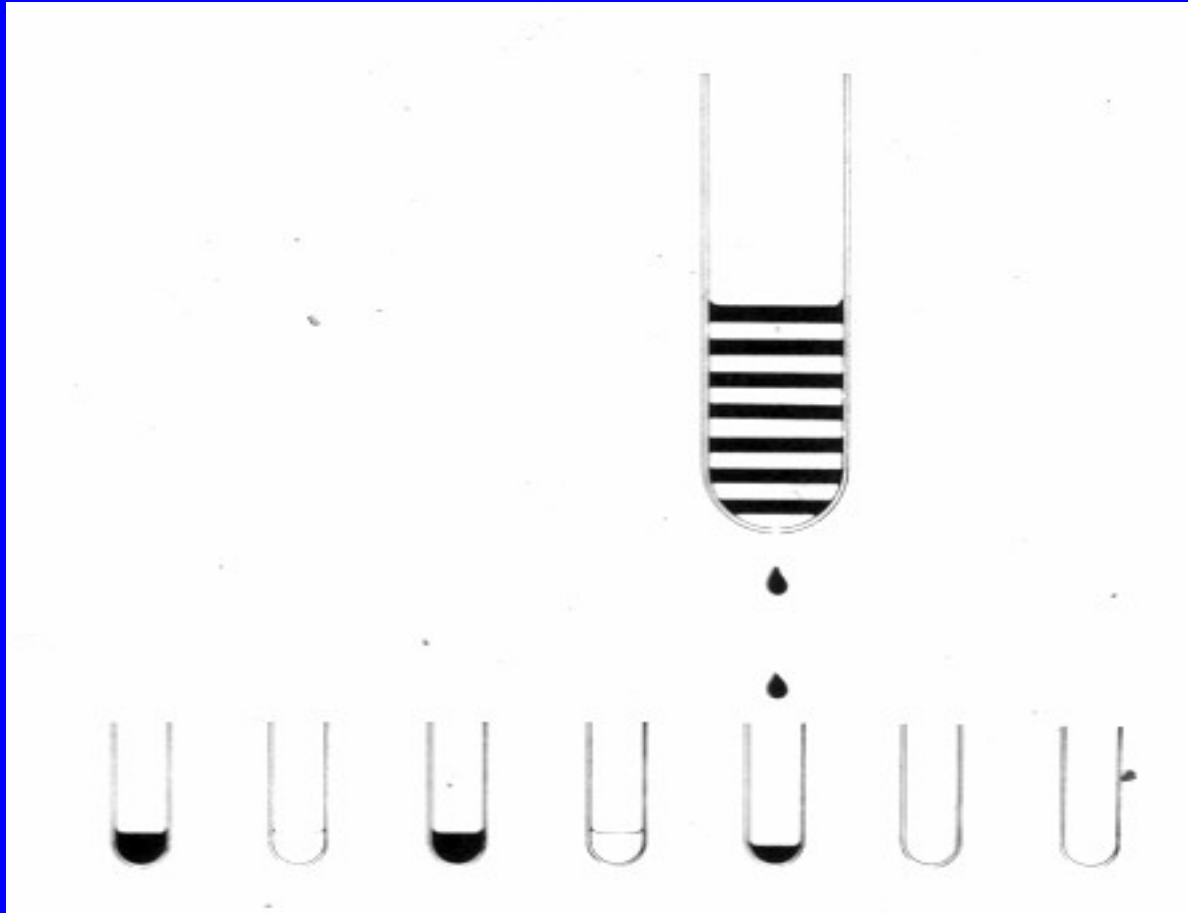
Gradientová centrifugace médiá

- Sacharosa
 - Glycerol
 - Ficoll - dextran
 - Percoll – SiO₂
 - CsCl
- Hypertonické prostředí
- Nutno připravit gradient
- Gradient vzniká během centrifugace

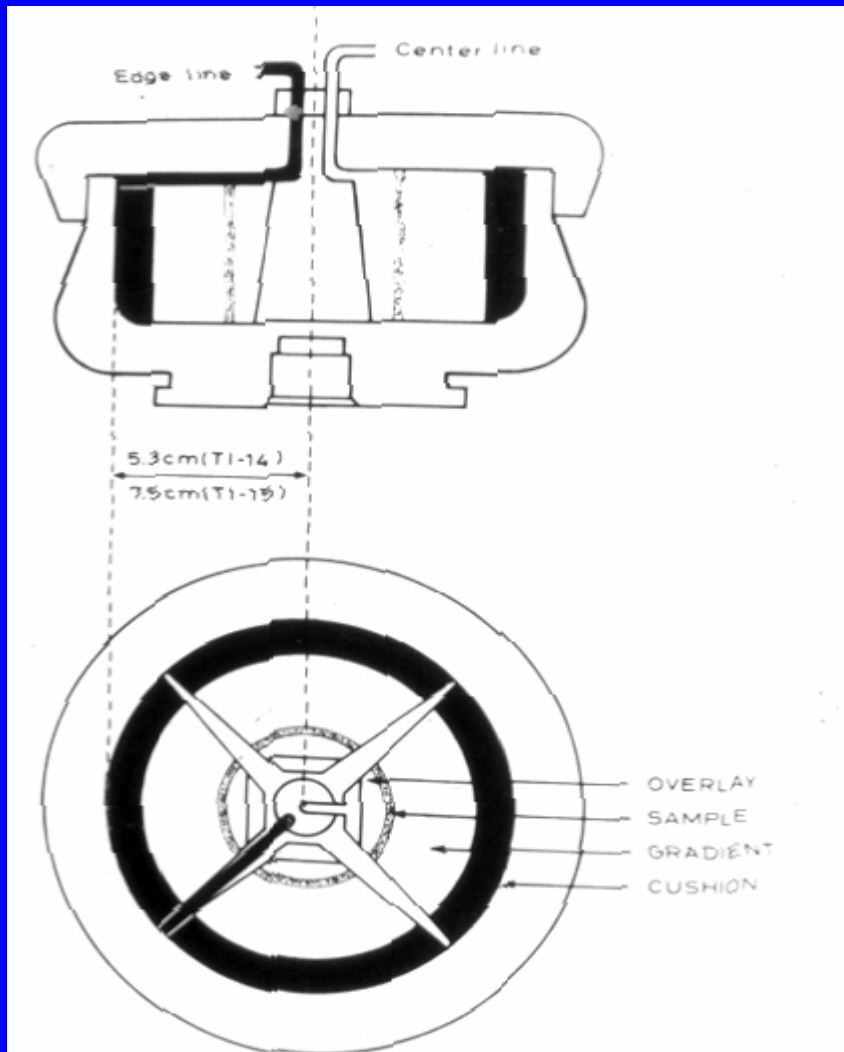
Gradientová centrifugace



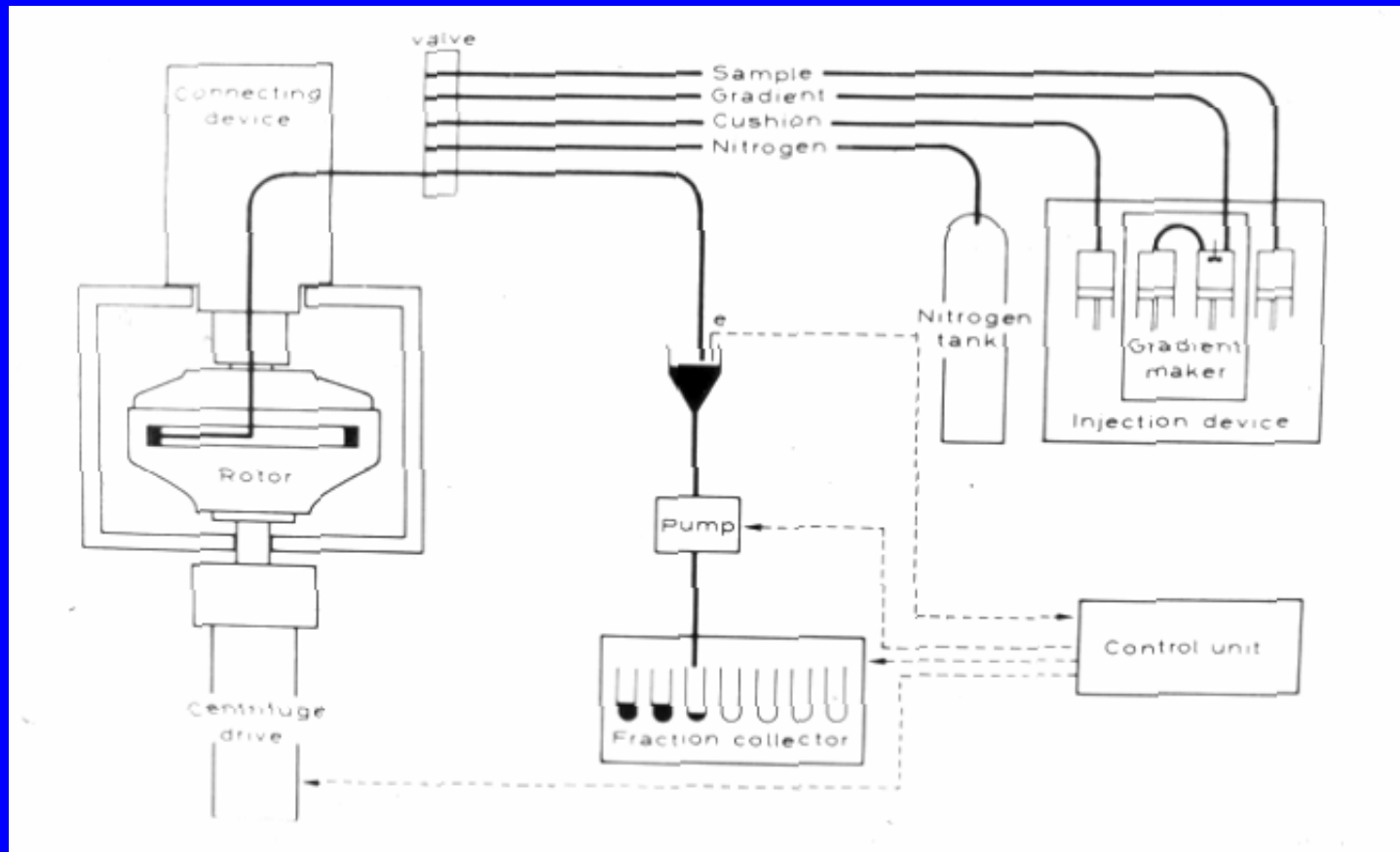
Gradientová centrifugace



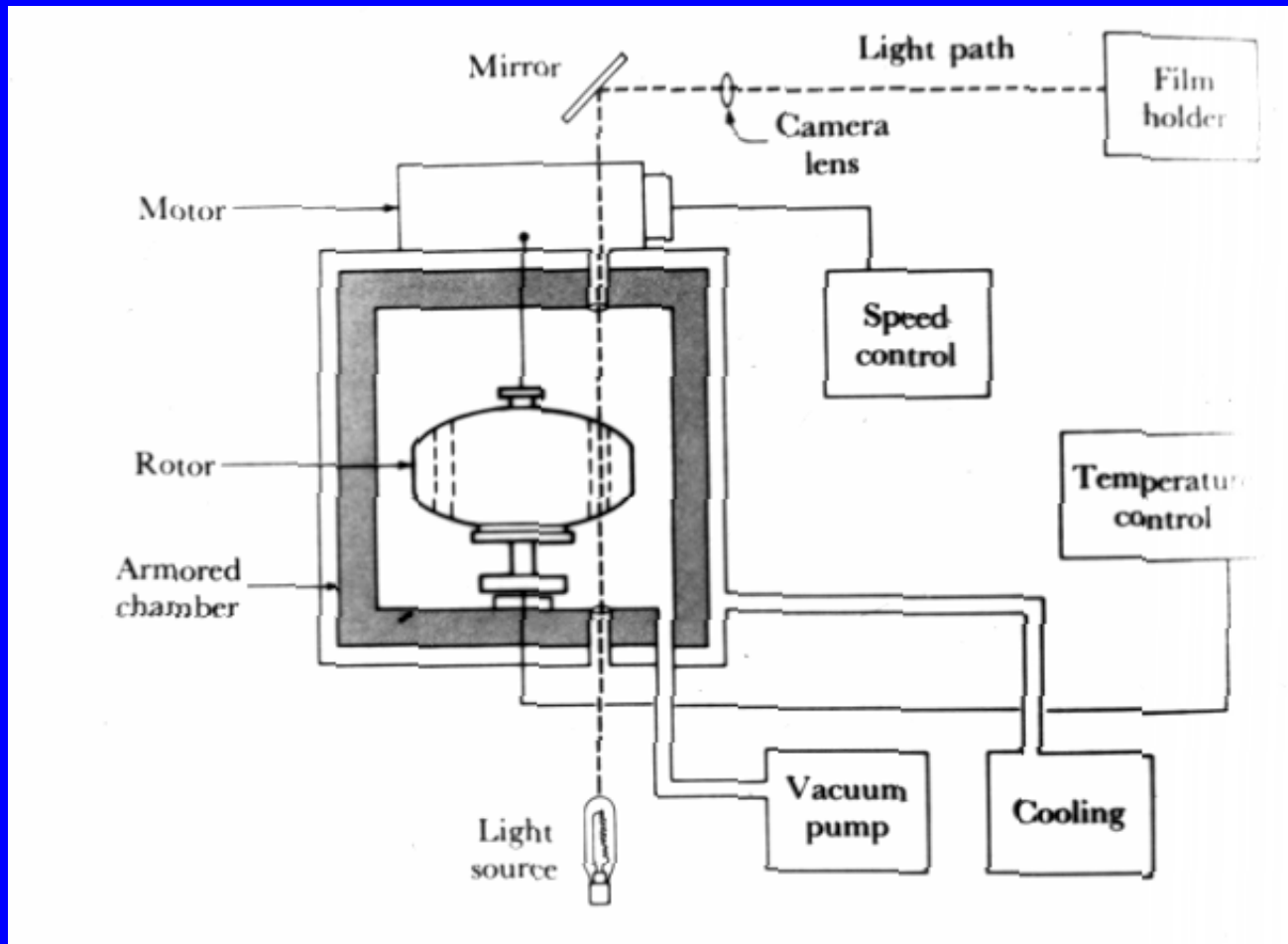
Zonální rotor



Centrifugace se zonálním rotorem



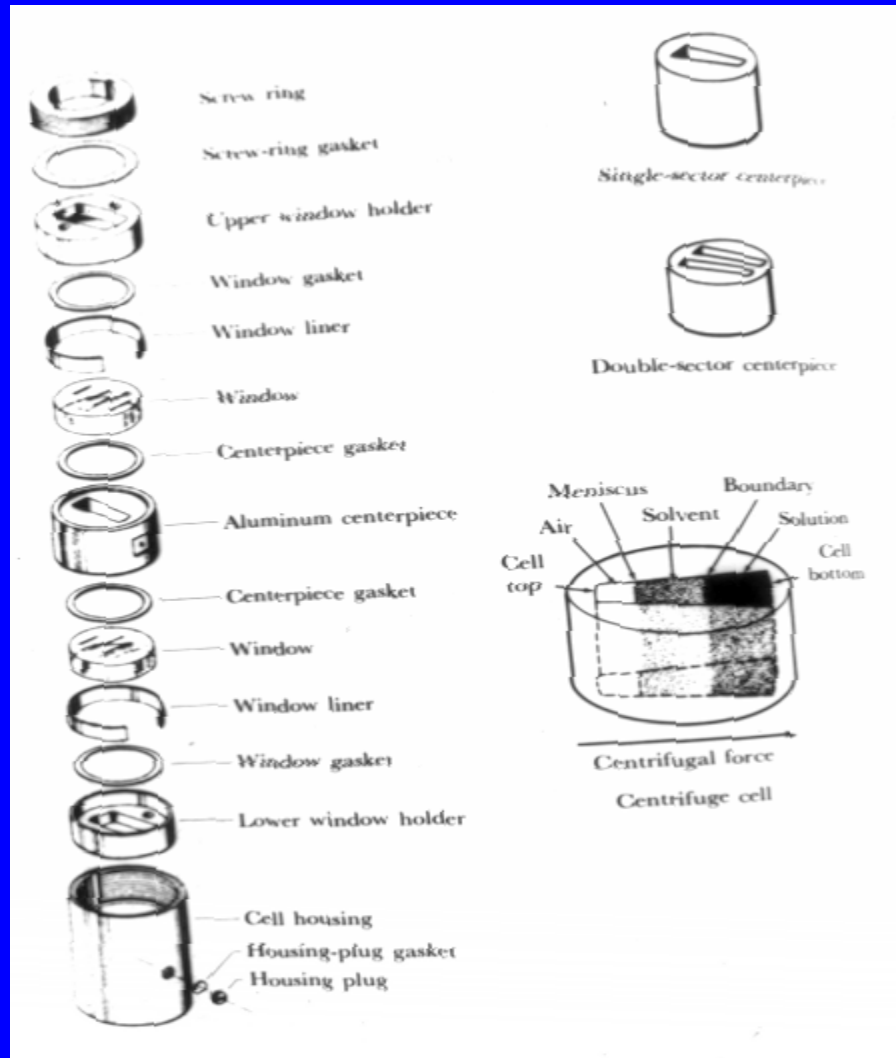
Analytická ultracentrifuga



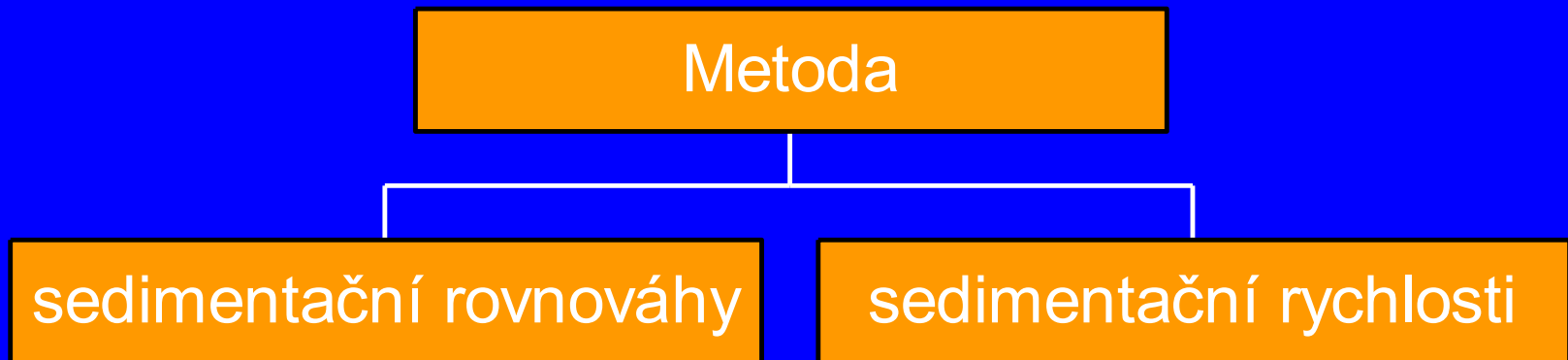
Analytická ultracentrifuga



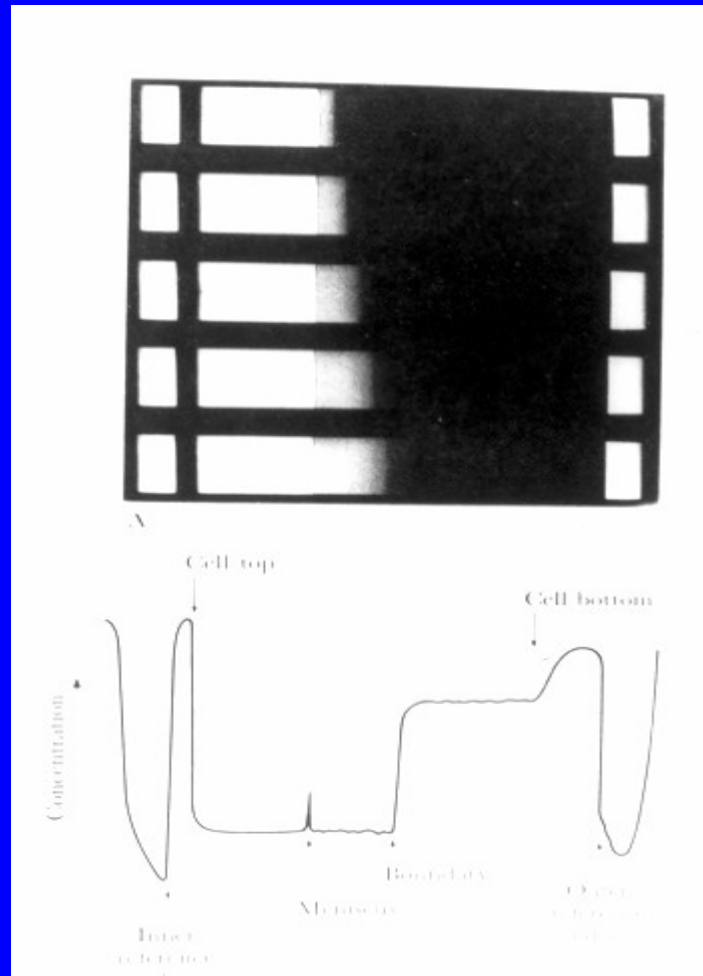
Kyveta



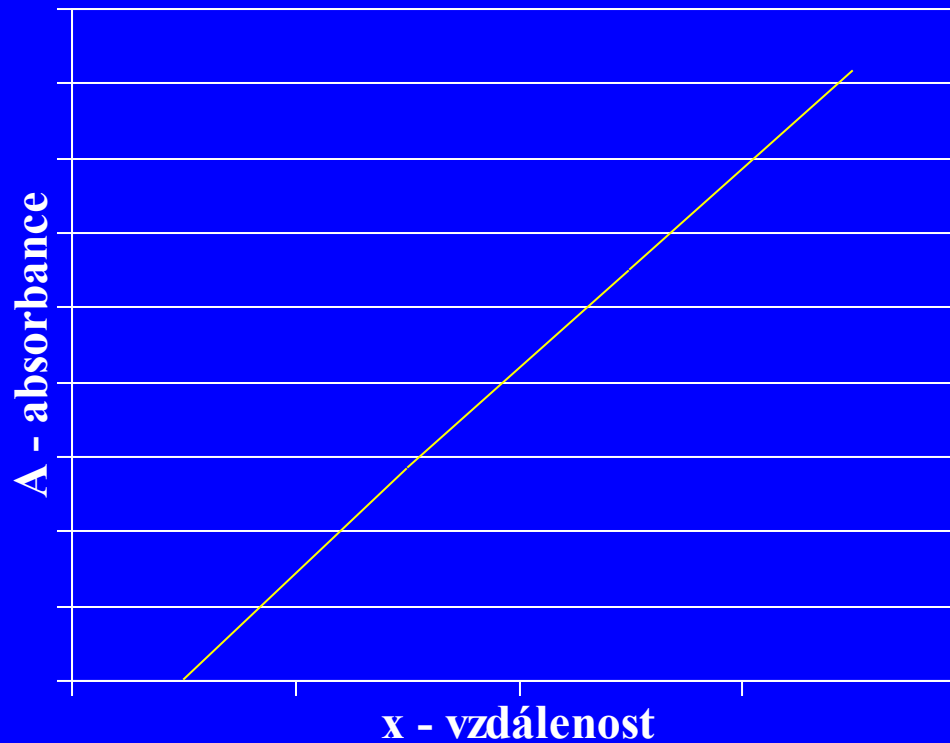
Analytická ultracentrifugace



Analytická centrifugace

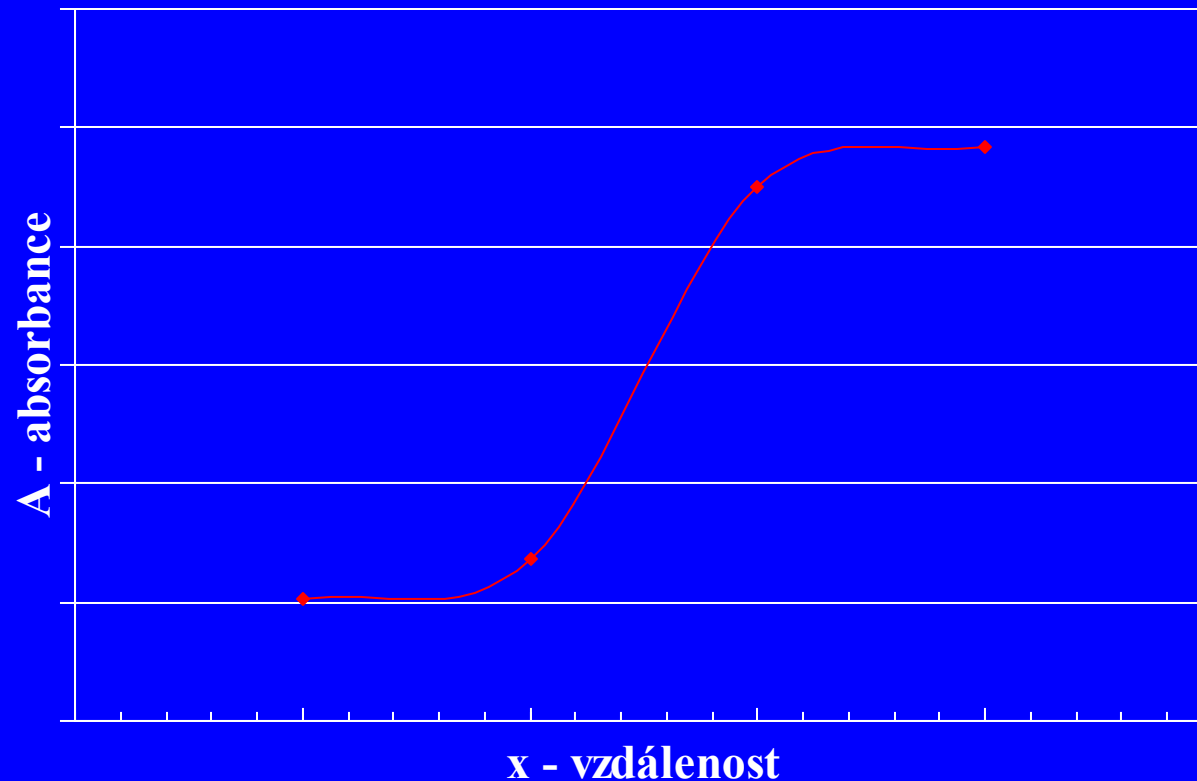


Metoda sedimentační rovnováhy



$$Mr = \frac{2RT}{(1 - \rho)} \frac{d \ln c}{dx^2}$$

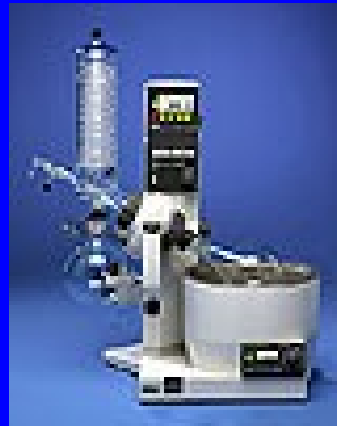
Metoda sedimentační rychlosti



$$v = \frac{\omega x M_r (1 - \rho)}{f}$$

Fázové separace

Odstranění H₂O rotační vakuová odparka



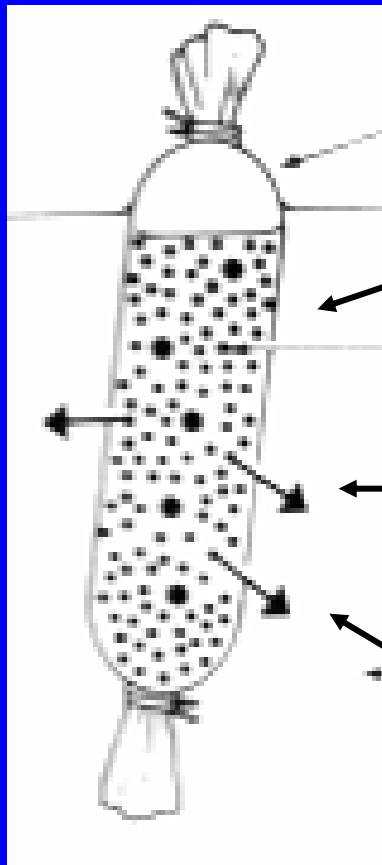
Odstranění H₂O lyofilizace

- Namražení
- Mrazová sublimace



Odstranění H₂O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



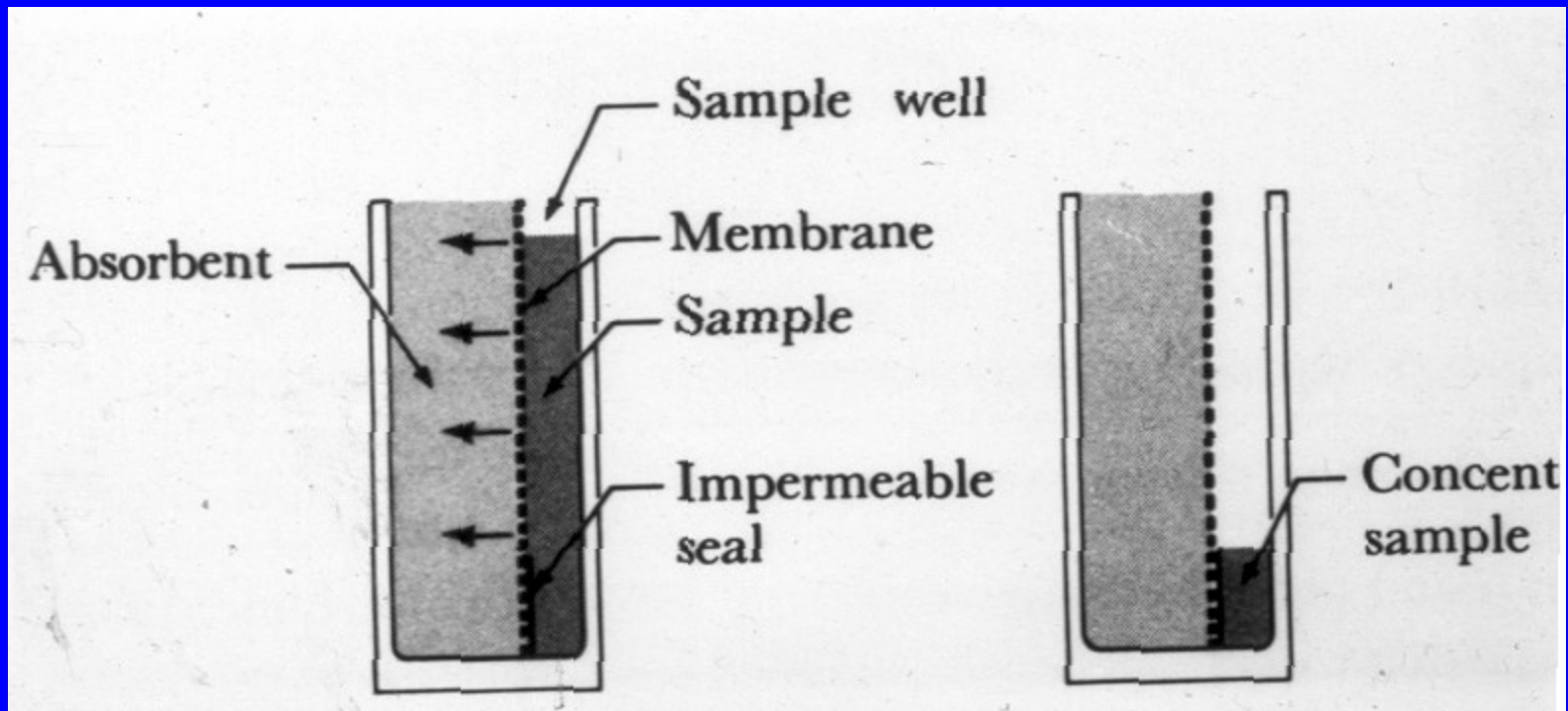
Vzduch - pervaporace

xerogely

Látky s afinitou k H₂O

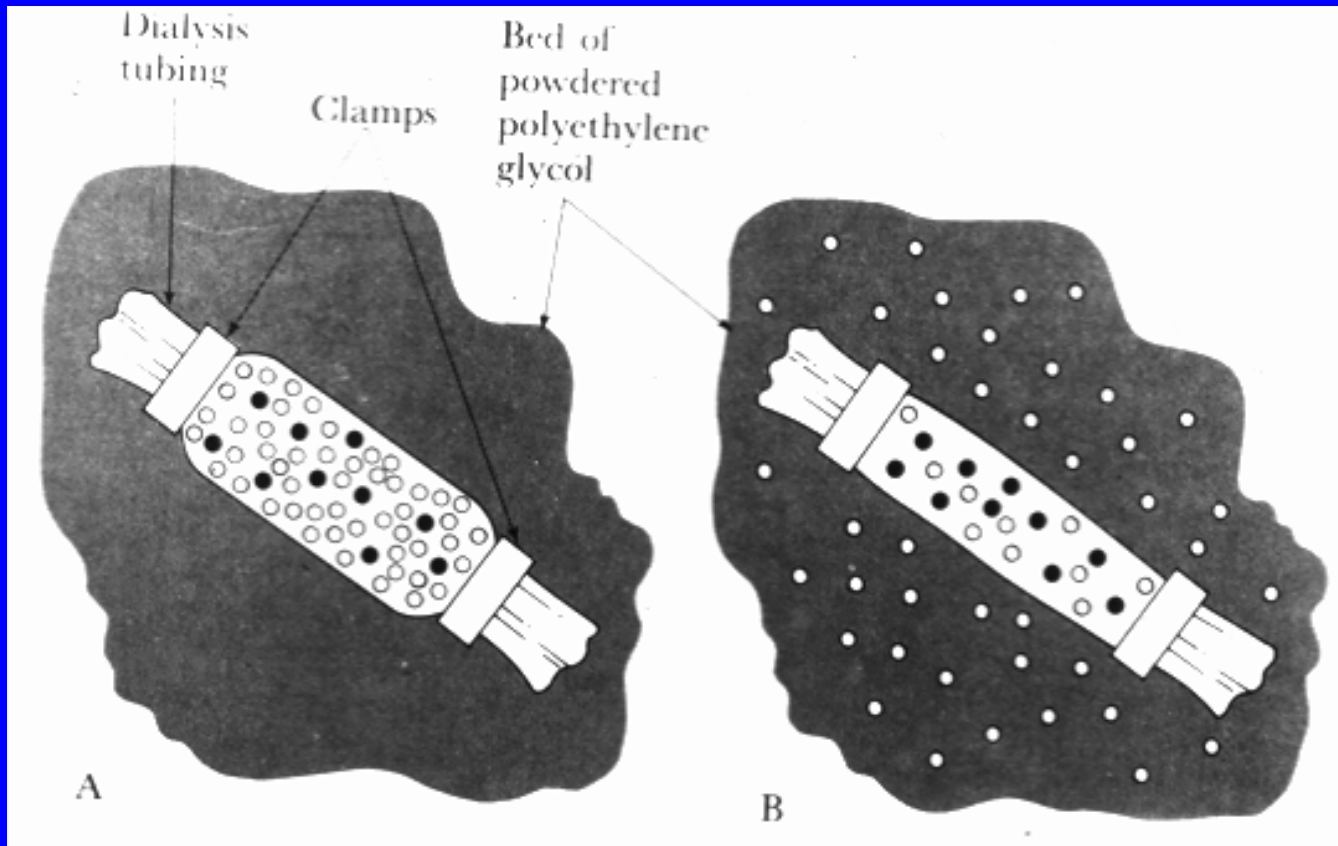
Odstranění H₂O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



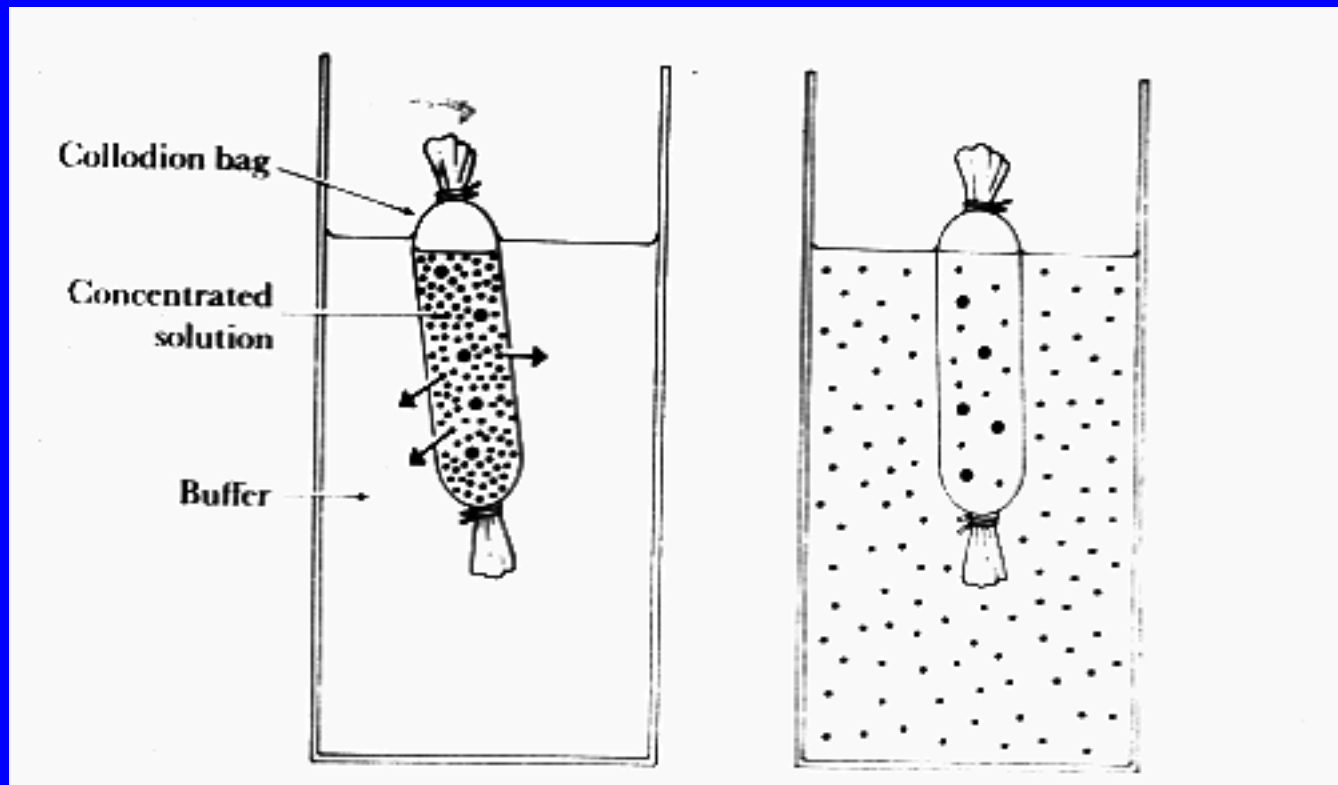
Odstranění H₂O zahuštění

Použití semipermeabilní membrány



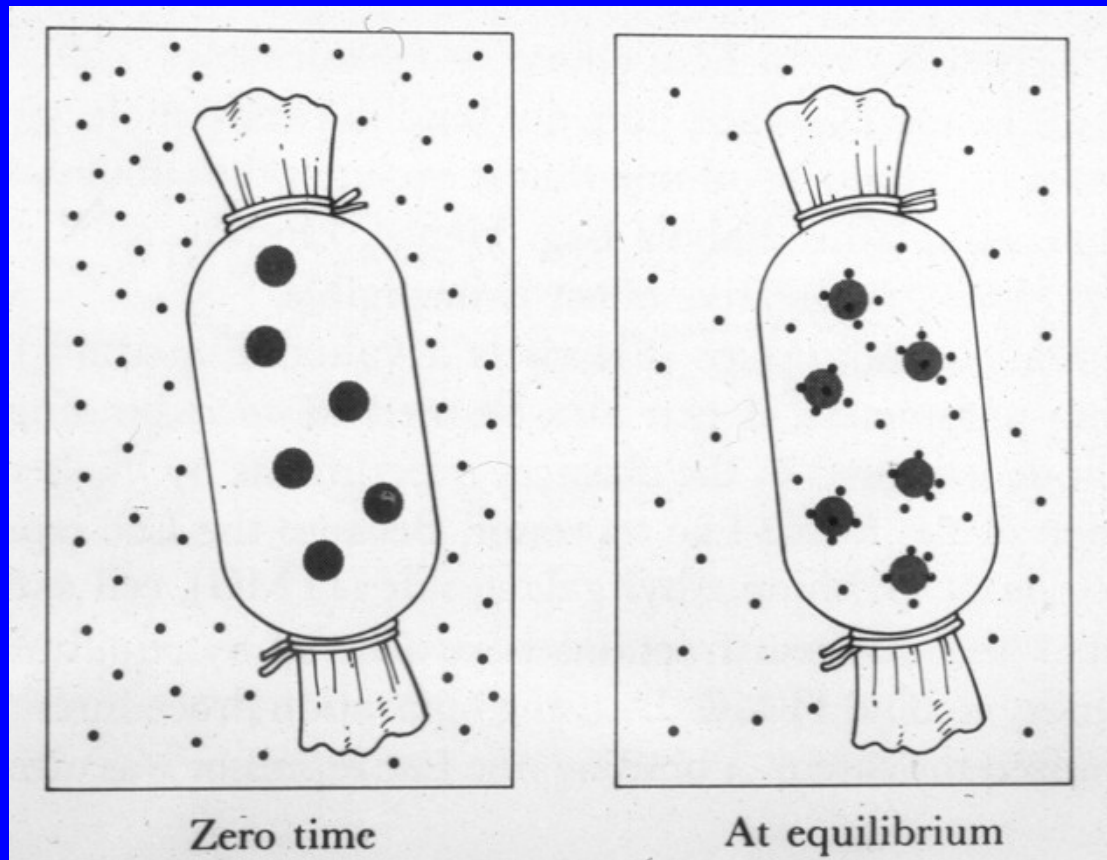
Odstranění nízkomolekulárních složek

Dialýza



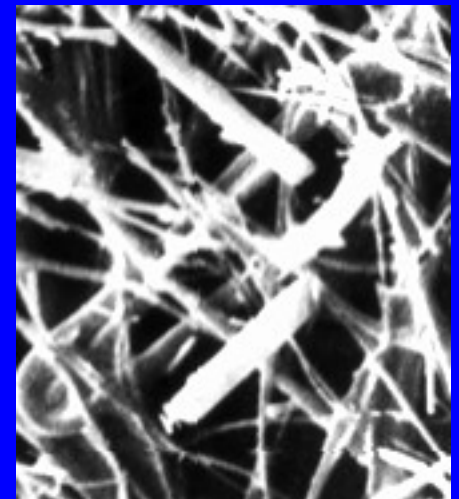
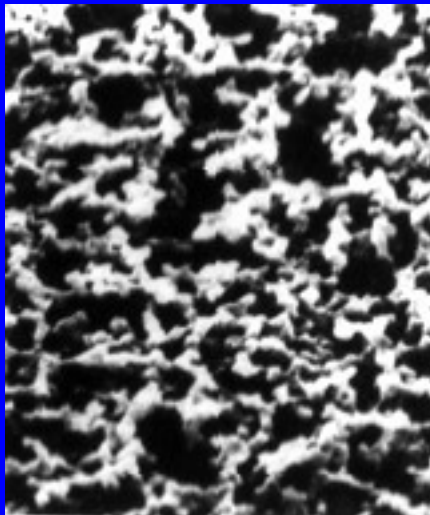
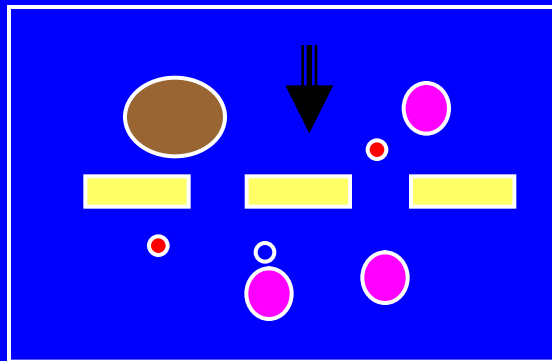
Stanovení interakčním konstant

Rovnovážná dialýza

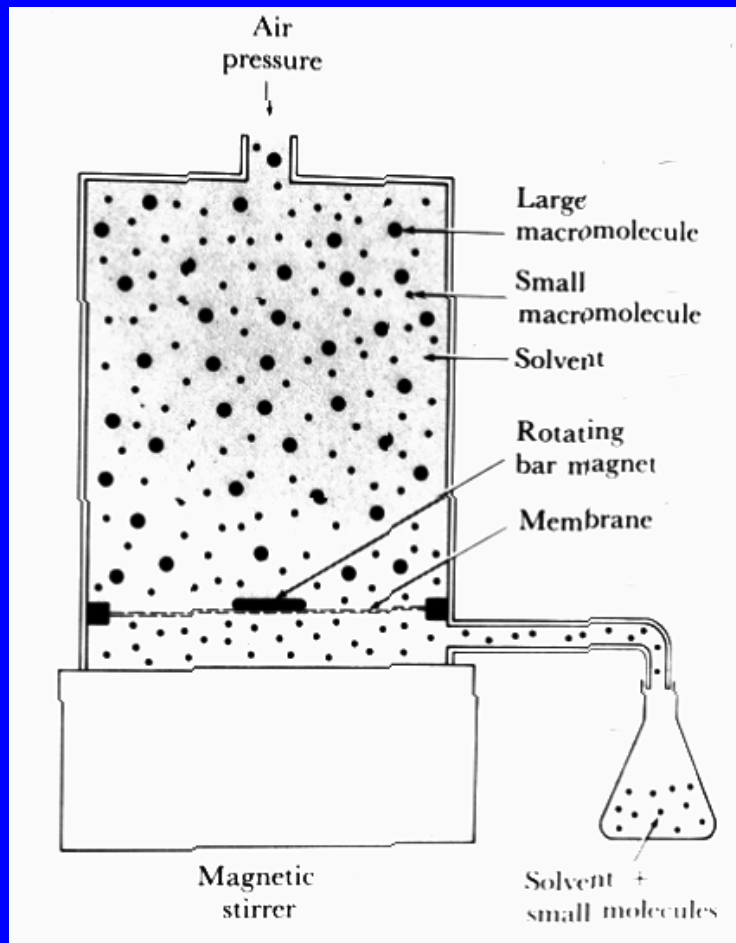


Ultrafiltrace

Použití speciálních membrán s definovanou velikostí pórů - tzv. cut-off limit



Ultrafiltrace míchané cely

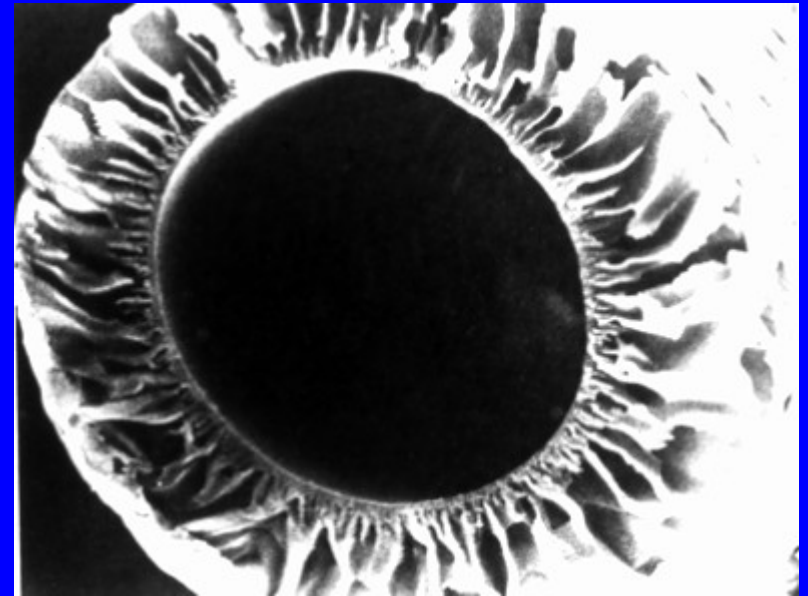
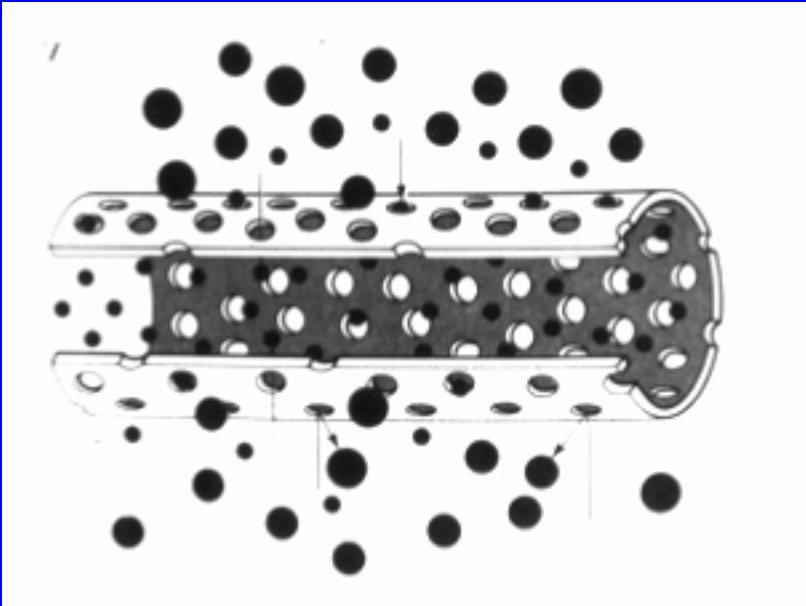


Ultrafiltrace centrifugační přípravky



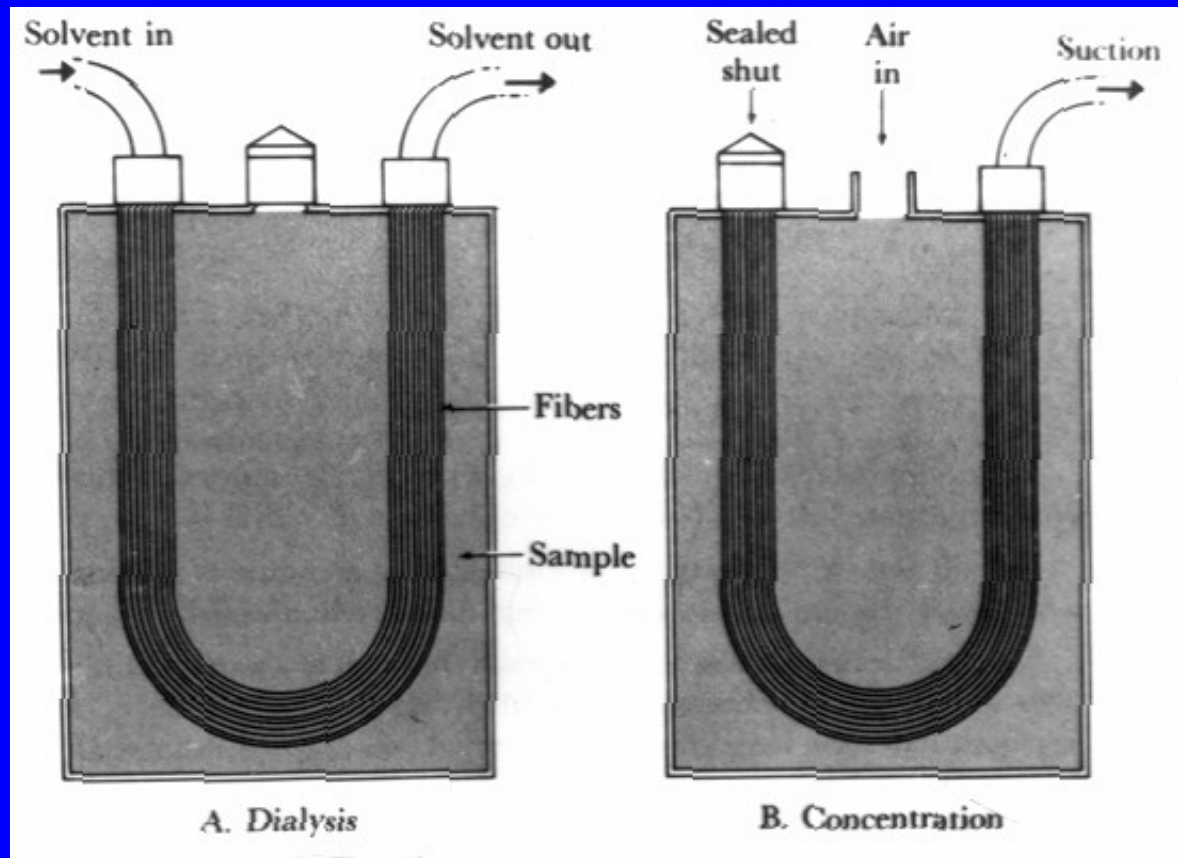
Ultrafiltrace

Hollow fiber – dutá vlákna



Ultrafiltrace

Hollow fiber – dutá vlákna



Příprava laboratorní vody

Nečistoty ve vodě

- Soli – těžké kovy - denaturace
- Organické látky – HPLC, GC
- Hrubší částice – mikroorganismy
- Koloidní částice - biomakromolekuly

Kriteria čistoty

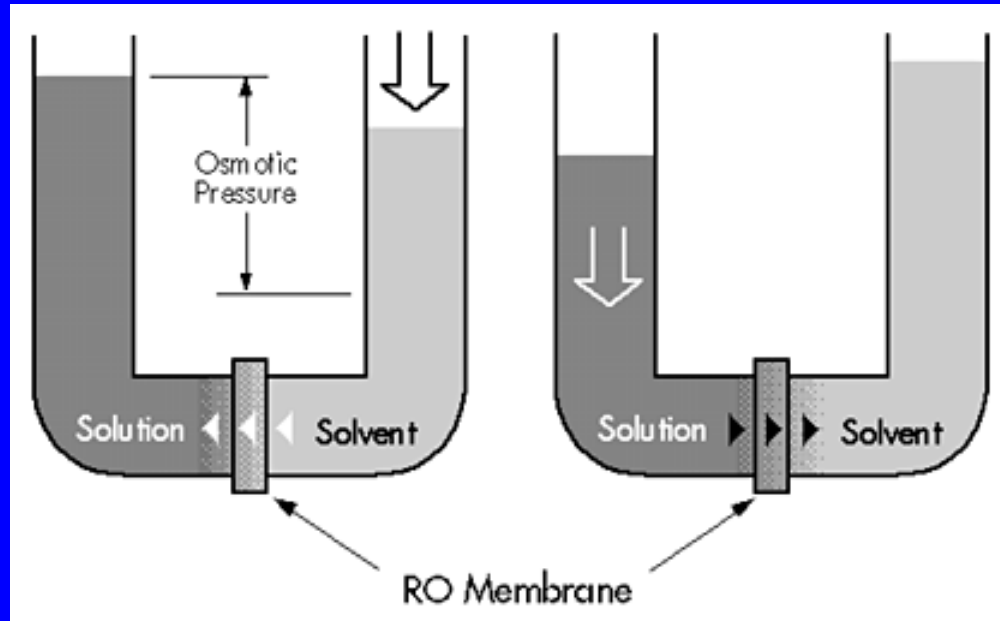
- Vodivost – 18 M Ω m
- Těžké kovy – AAS
- Pyrogenita

Postupy čištění destilace

- Destilace – teoreticky odstraní všechny složky, prakticky jsou strhávány těžké kovy z elektrod (Cu, Zn, Fe)
- Redestilace – křemenné aparatury

Nevýhoda – náklady na vodu a elektrickou energii

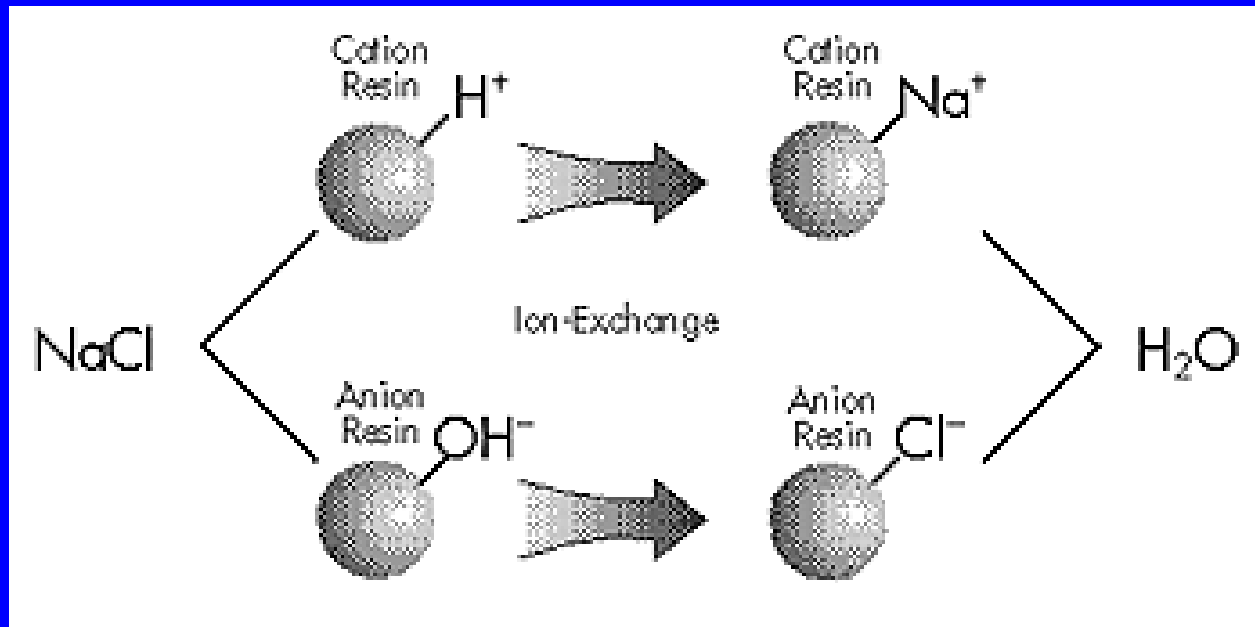
Postupy čištění reverzní osmoza



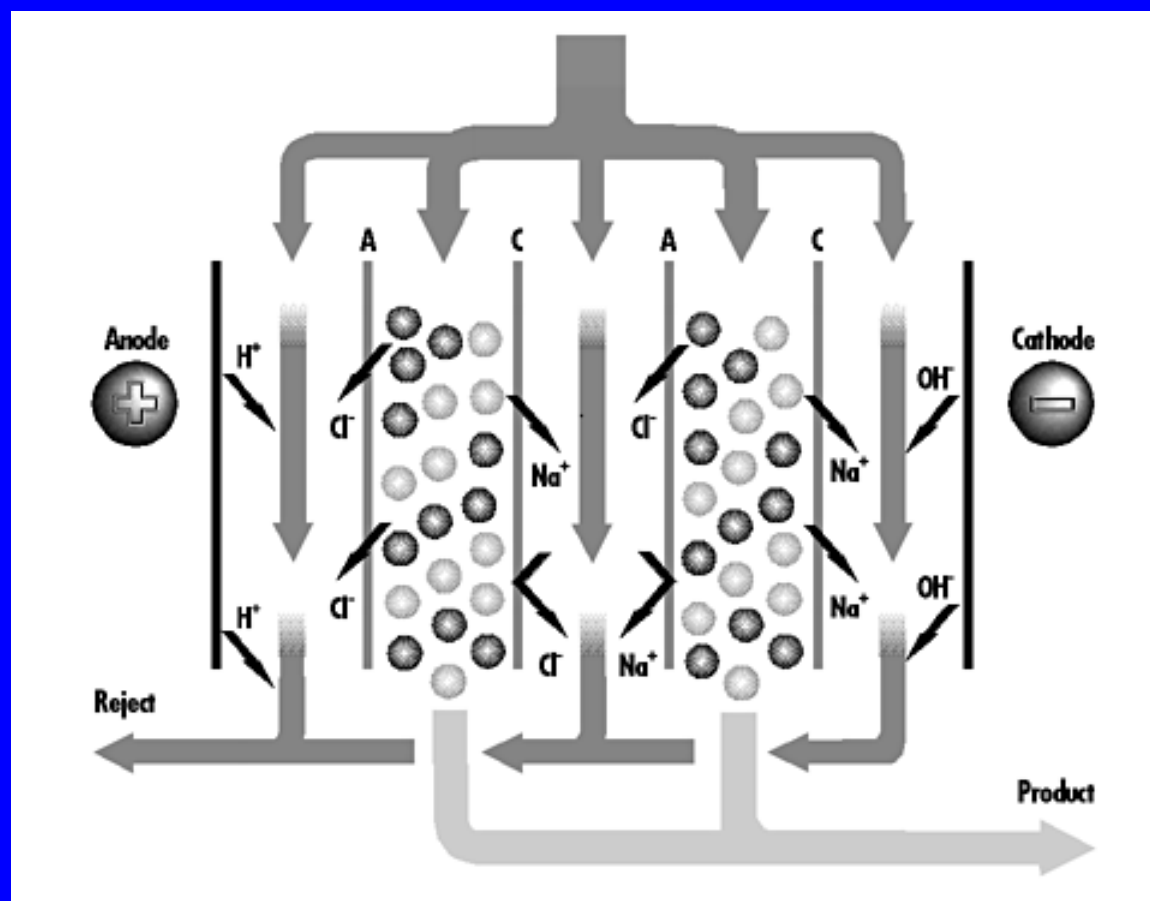
- Nevýhoda – malá kapacita, nevyčistí úplně

Postupy čišění deionizace

- Kolony se směsnými ionexy – katex + anex



Postupy čišťení elektrodeionizace

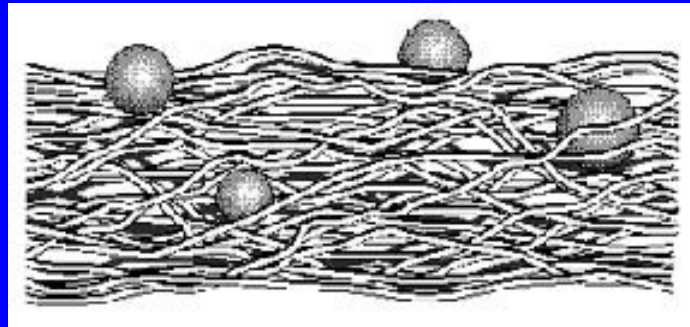


Postupy čištění odstraňování org. látek

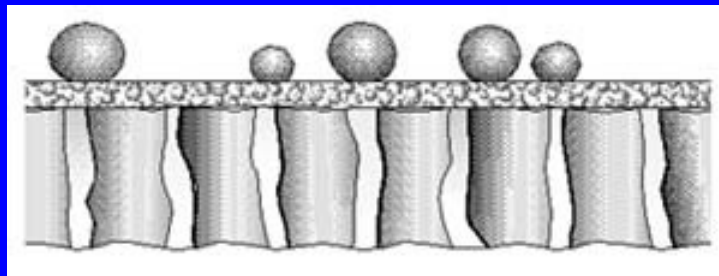
- Speciální patrony s aktivním uhlím a jinými sorbenty
- UV – 180 nm + 254 nm
 - oxidace org. látek,
 - likvidace bakterií

Postupy čištění filtrace

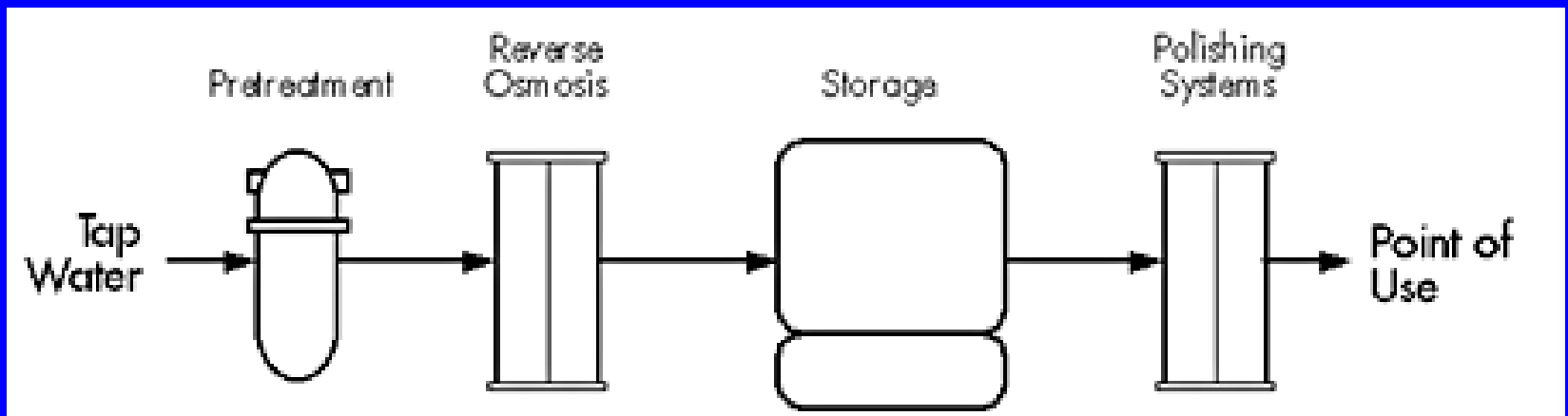
- Membránová – větší póry – bakterie



- Ultrafiltrace – malé póry - koloidní částice



Kaskádový systém kombinace



Kaskádový systém kombinace

Millipore

Direct-Q™ Ultrapure Water Systems

Purify tap water to Type I water
in a single, compact system

Find it Quick!

- ▶ Direct-Q Applications
- ▶ System Specifications
- ▶ Ordering Information

