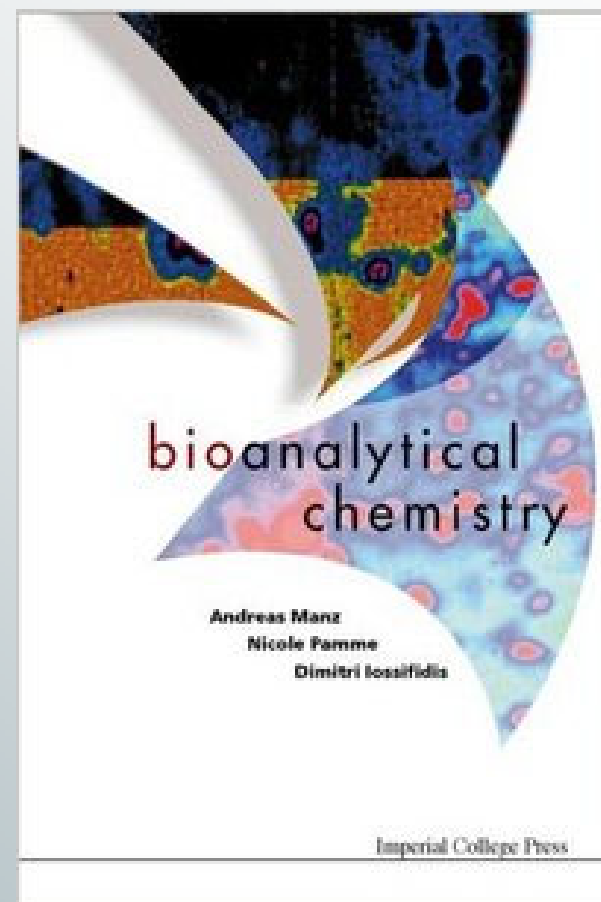
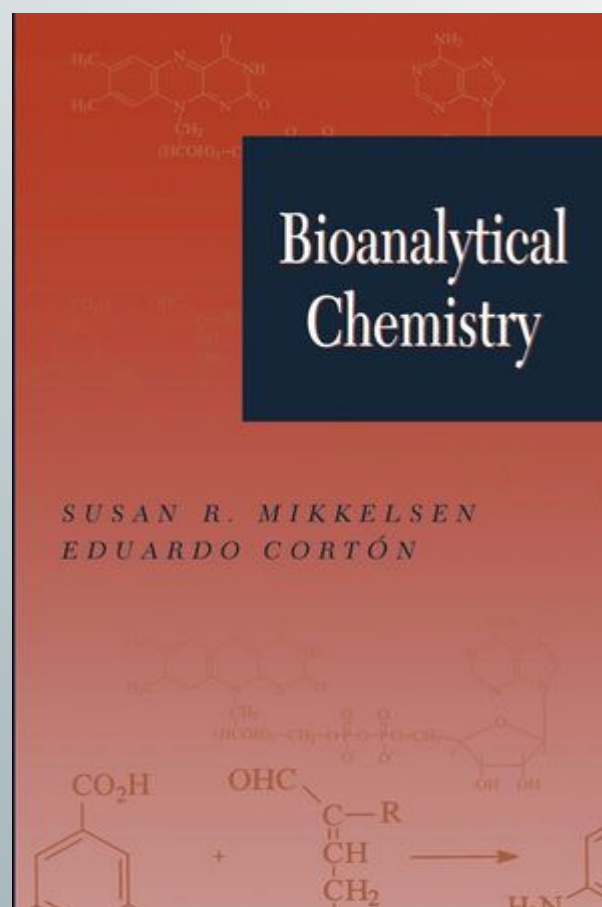
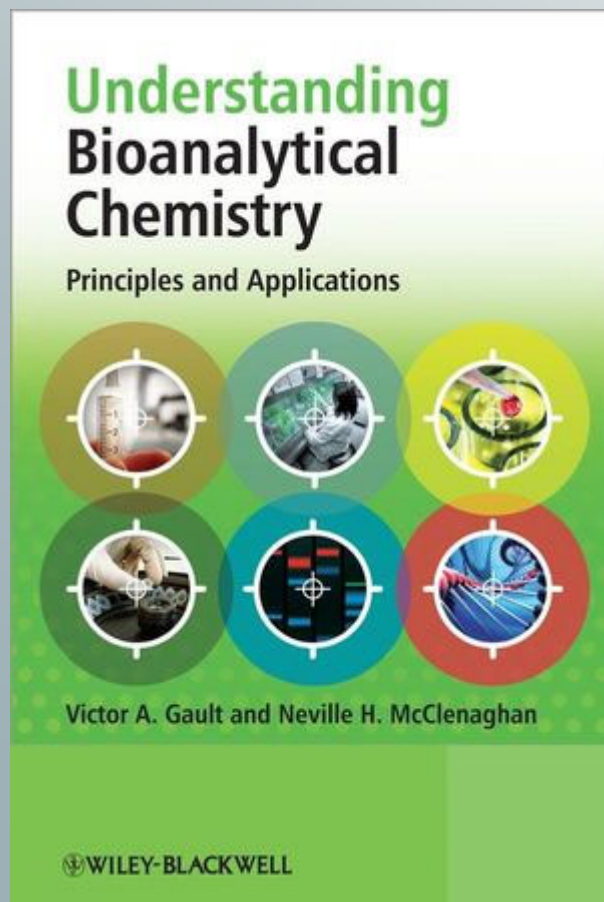


# **BIOCHEMICKÉ METODY**

**MUNI**  
**SCI**

# LITERATURA



# LITERATURA

- *Anzenbacher, Kovář :*

**Metody chemického výzkumu pro biochemiky. MŠ Praha, 1986.**

- *Kolektiv autorů – katedra biochemie, Univerzita Palackého Olomouc:*

**Laboratorní technika - skripta. Olomouc 2021.**

<https://www.prf.upol.cz/katedra-biochemie/studium/predmety-vyucovane-katedrou-biochemie/kbclabt/>

- *Ing. Jiří Henych, Ph.D. (UJEP)*

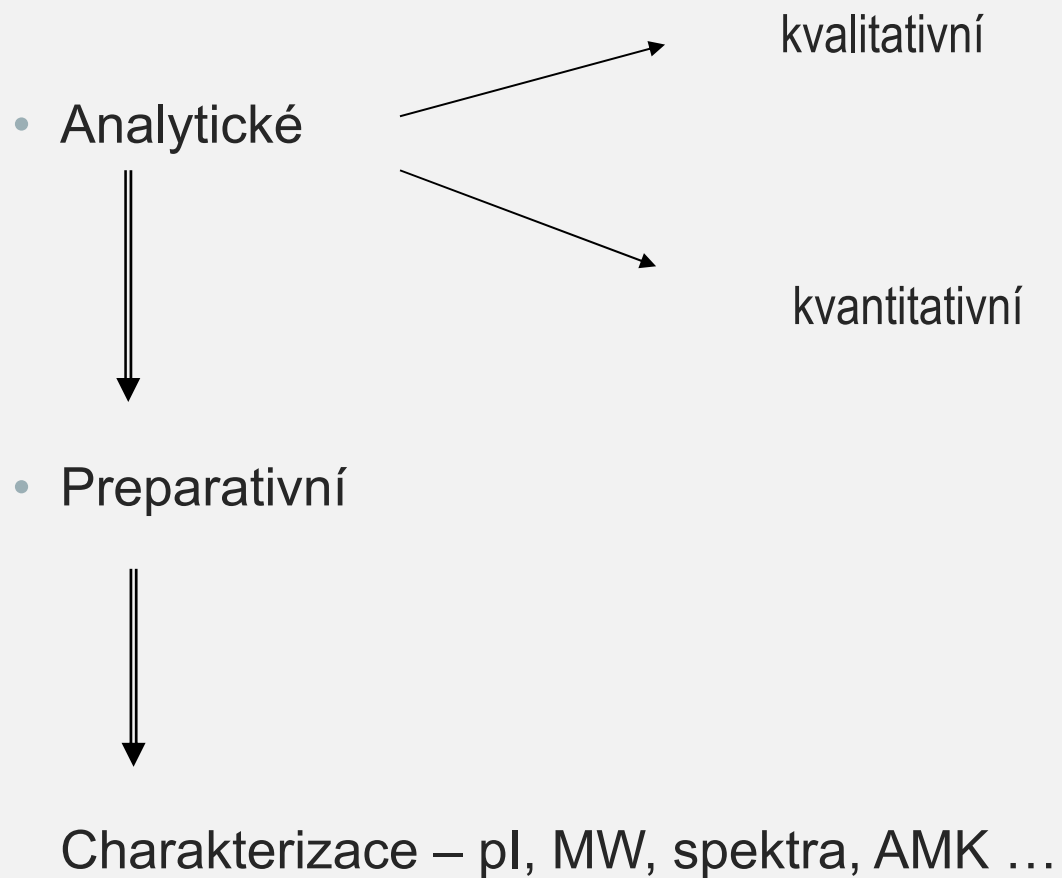
**Instrumentální metody - Studijní opora pro kombinované bakalářské studium**

[https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Instrumentalni\\_metody.pdf](https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Instrumentalni_metody.pdf)

# SEPARAČNÍ METODY

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

# SEPARACE



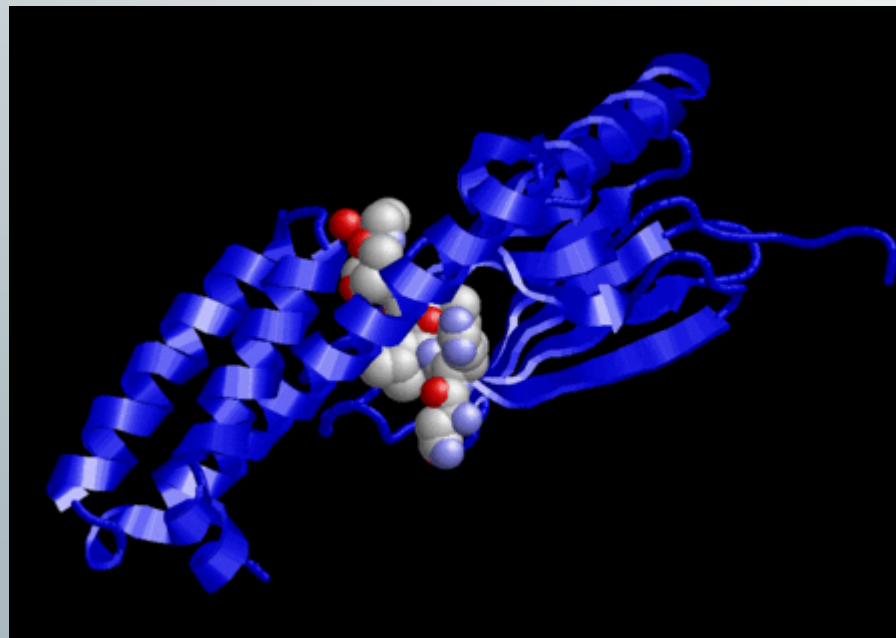
## PROBLÉMY SE VZORKEM

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

# ZÁSADY PRÁCE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM

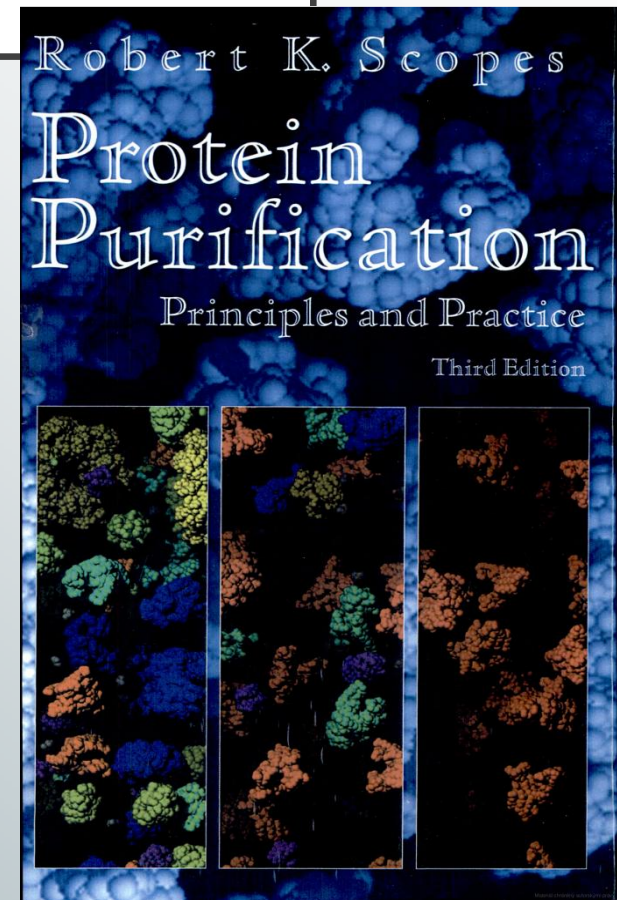
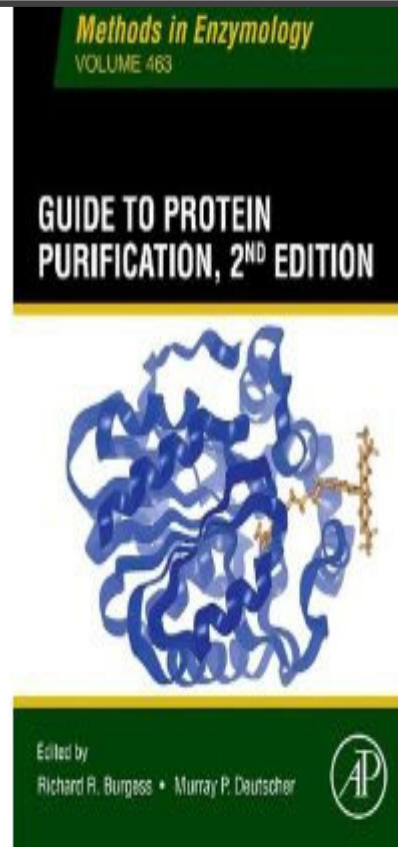
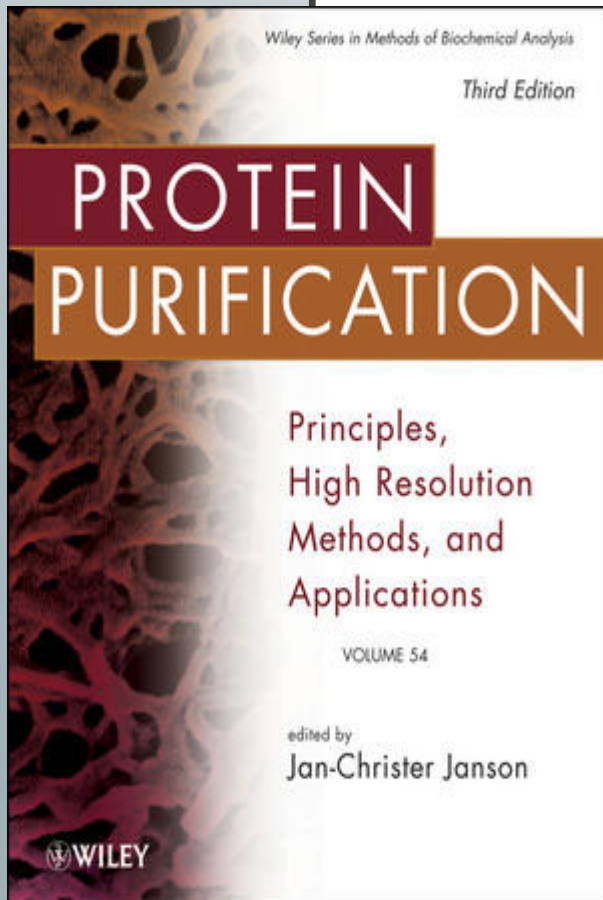
1. Teplota
2. pH + iontová síla
3. Koncentrace
4. Pěnění
5. Lokální přebytky
6. Proteasy, RNAsy, DNAsy

# SEPARACE BÍLKOVIN





# LITERATURA

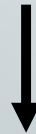


SCI

# PLÁNOVÁNÍ SEPARACE

## 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

- Selektivita
- Rozlišovací schopnost
- Kapacita
- Zpětný výtěžek
- Náklady – materiál, přístroje, člověk
- Stupeň zředování a koncentrace
- Slučitelnost mezi metodami
- Znalosti o dané bílkovině (pI, MW)

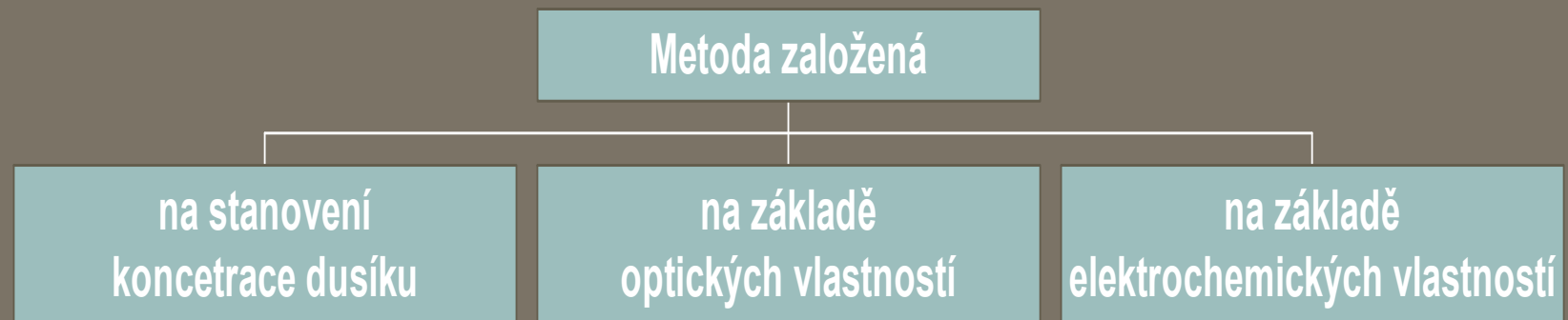
# ZÁKLADNÍ ZÁSADY

- Na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením  
→ velké množství levného vstupního materiálu
- Později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná  
→ ve 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

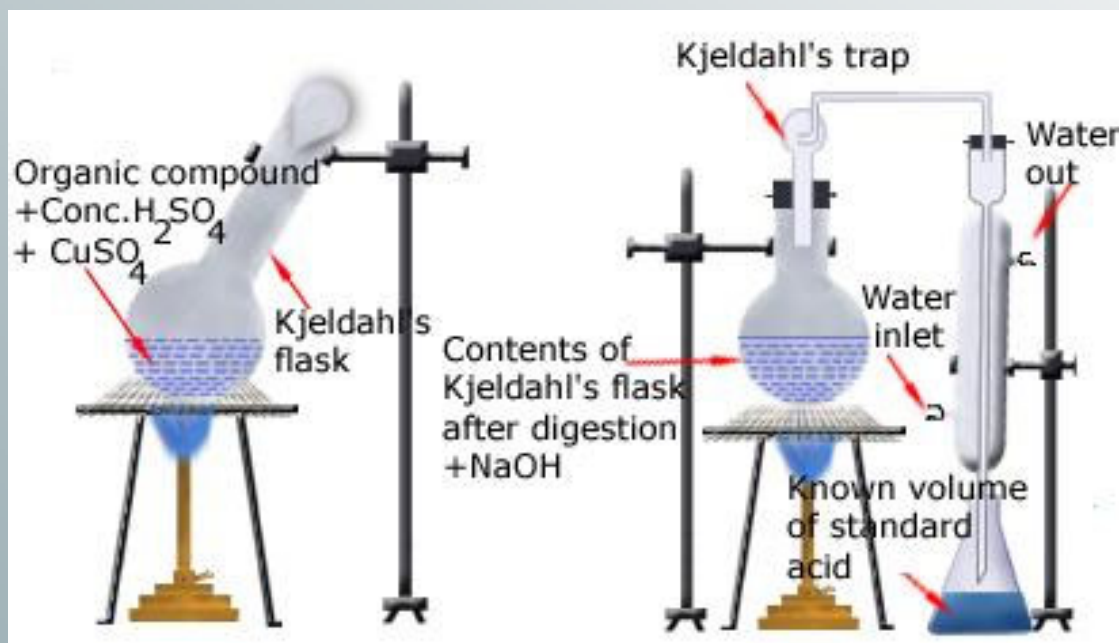




## KJELDAHLOVA METODA – STANOVENÍ N<sub>2</sub>

- Mineralizace vzorku – převedení organického N na NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- Stanovení NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - titrace, fotometrie, selektivní elektrody

# KJELDAHLOVA METODA – STANOVENÍ N<sub>2</sub>



# UV SPEKTROFOTOMETRIE

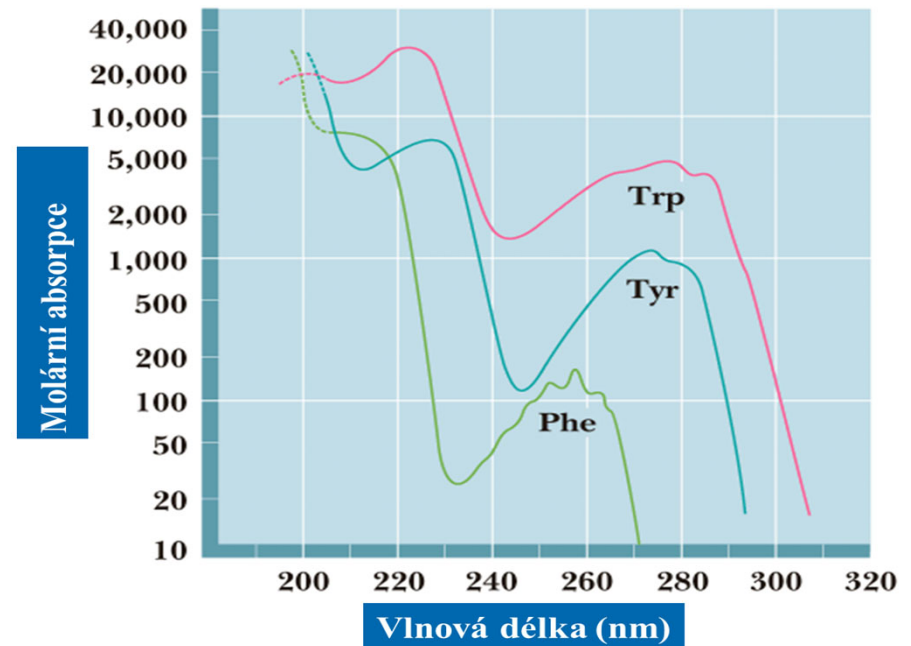
- 280 nm – aromatické AMK (Try, Tyr)

interference nukleotidů

- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda

- není třeba kalibrace



# UV SPEKTROFOTOMETRIE

## Vzorce pro přímé UV stanovení:

$$c \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{235} - A_{280})/2.51$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{224} - A_{233})/5.01$$

$$c \text{ (mg/mL)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

# UV SPEKTROFOTOMETRIE

## Edelchova metoda

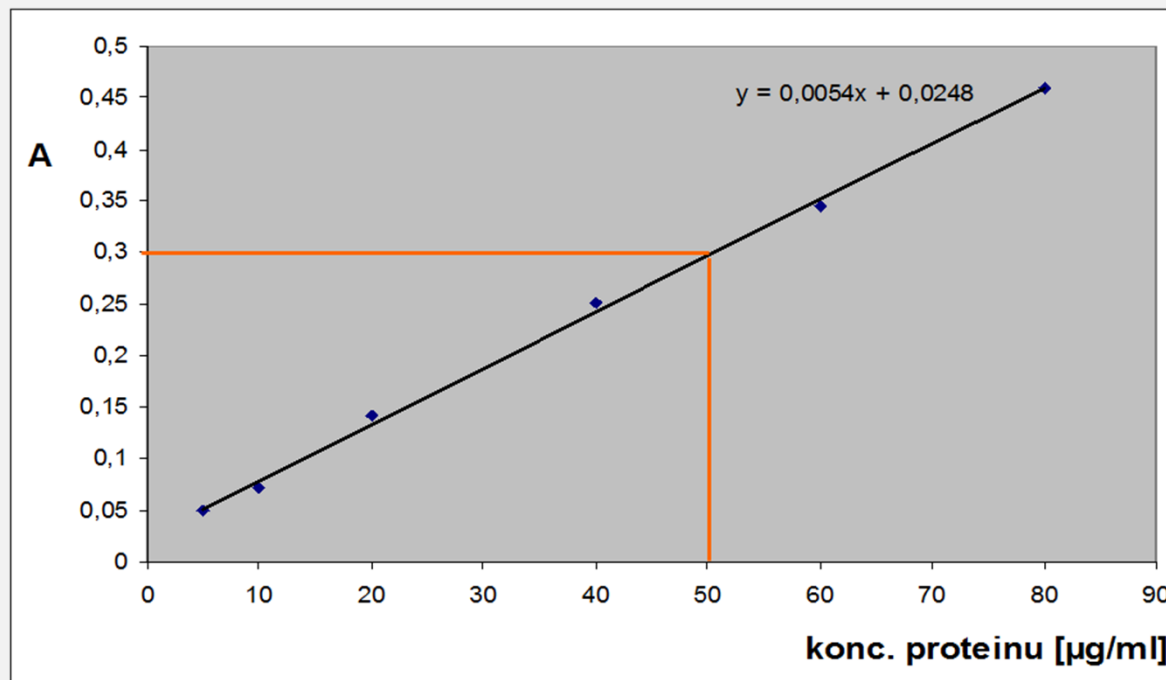
### při znalosti aminokyselinového složení

je možné spočítat extinkční koeficient proteinu  $e_{280}$ .  
Podmínkou je přítomnost tryptofanu  
nebo tyrosinu v molekule.

$$e_{280} = n\text{Trp}.5500 + n\text{Tyr}.1490 + n\text{Cys}.125 \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$$

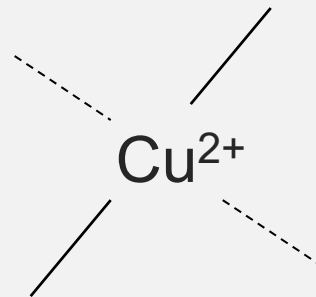
# VIS SPEKTROFOTOMETRIE

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

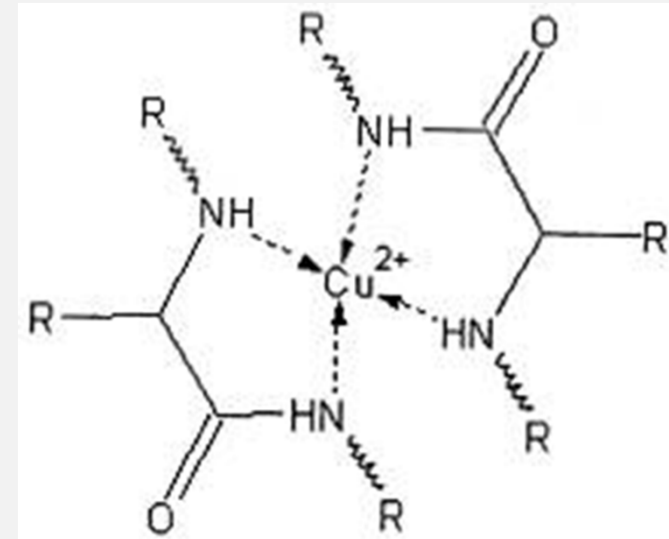


## BIURETOVÁ METODA

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



Měření : 540 – 560 nm  
310 nm



## FOLINOVA METODA

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany (Folin Ciocalteovo reagens) na molybdenovou modř

Měření : **725 nm**



Tyrosin (Tyr;Y)

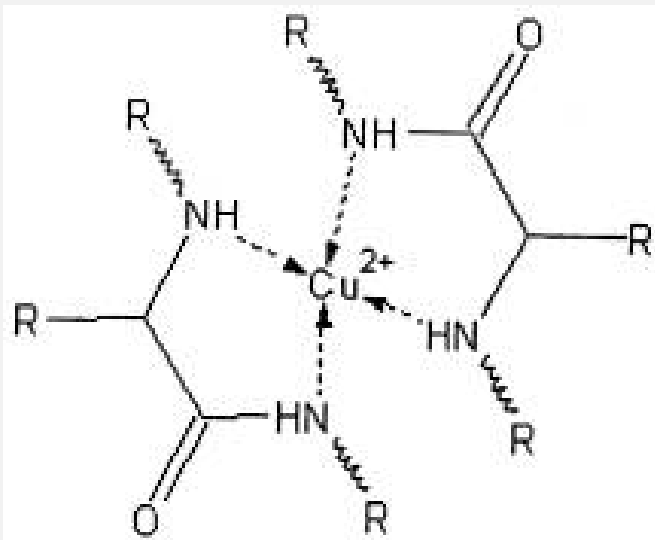


# LOWRYHO METODA

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

# LOWRYHO METODA



•biuret ↑

•Lowry ↓



MUNI  
SCI

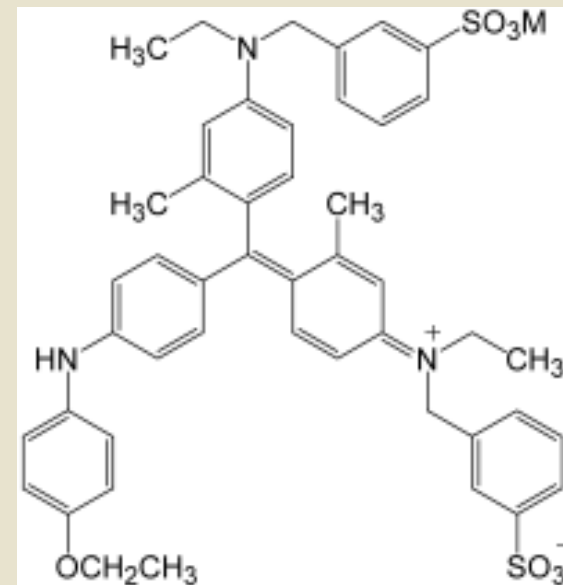


Tyrosin (Tyr;Y)

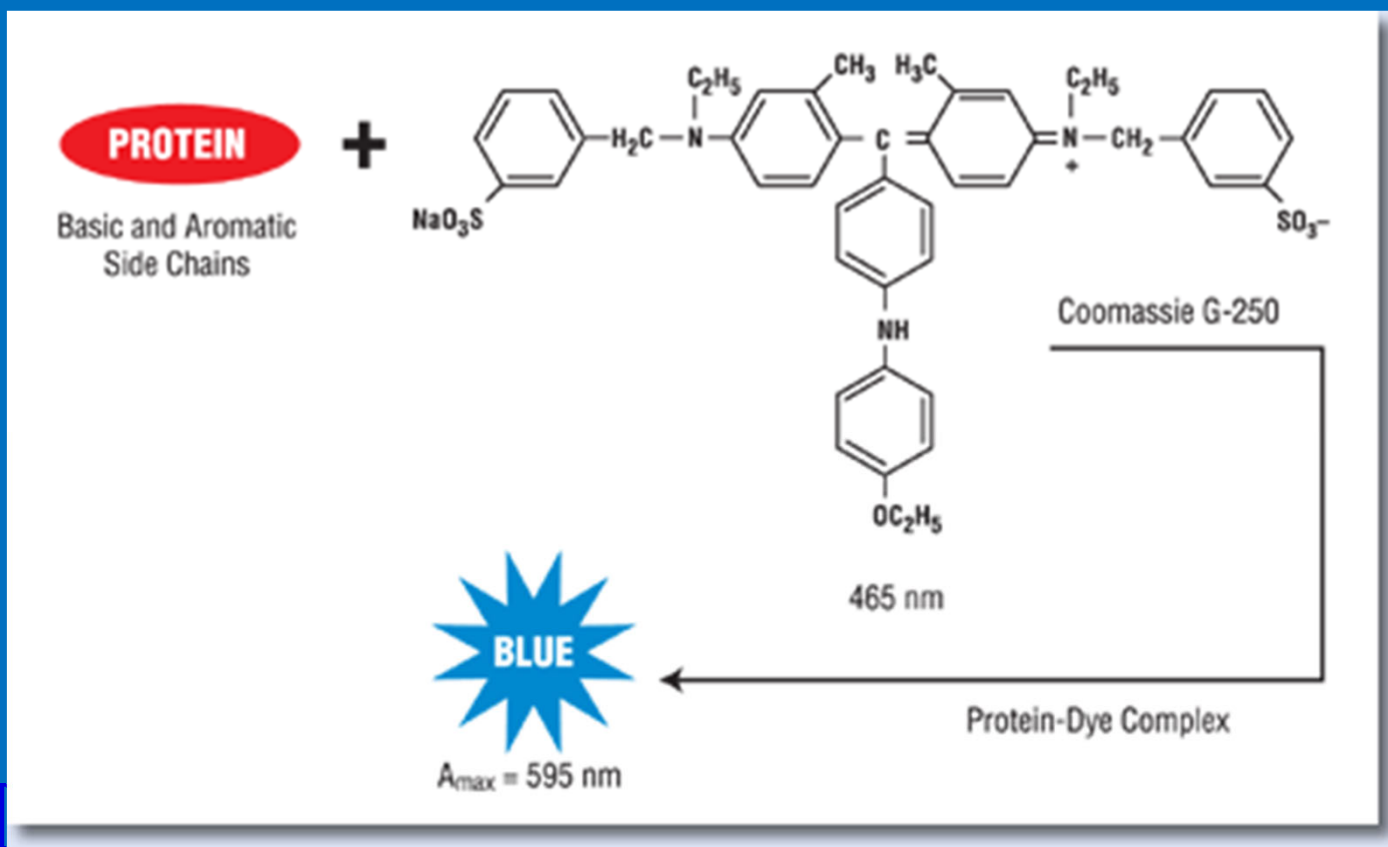
# METODA DLE BRADFORDOVÉ

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

Meření : **595 nm**



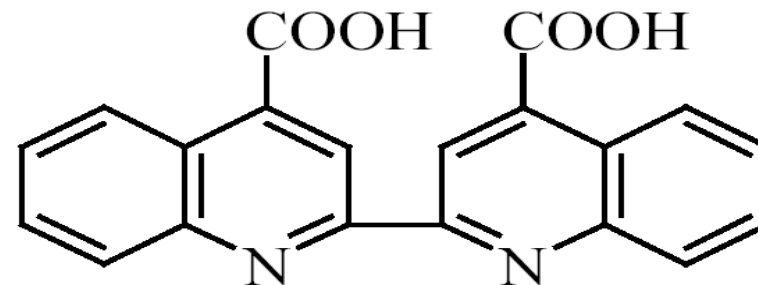
# METODA DLE BRADFORDOVÉ



# BCA METODA

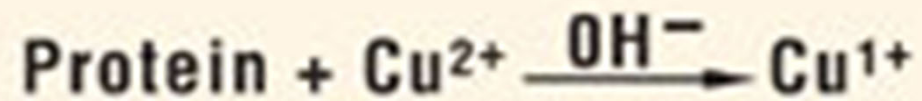
Princip :  $\text{Na}^+$  sůl k. bincinoninové (BCA),  
komplexuje  $\text{Cu}^+$  tvořené reakcí peptidové  
vazby s  $\text{Cu}^{2+}$

Měření : **562 nm**

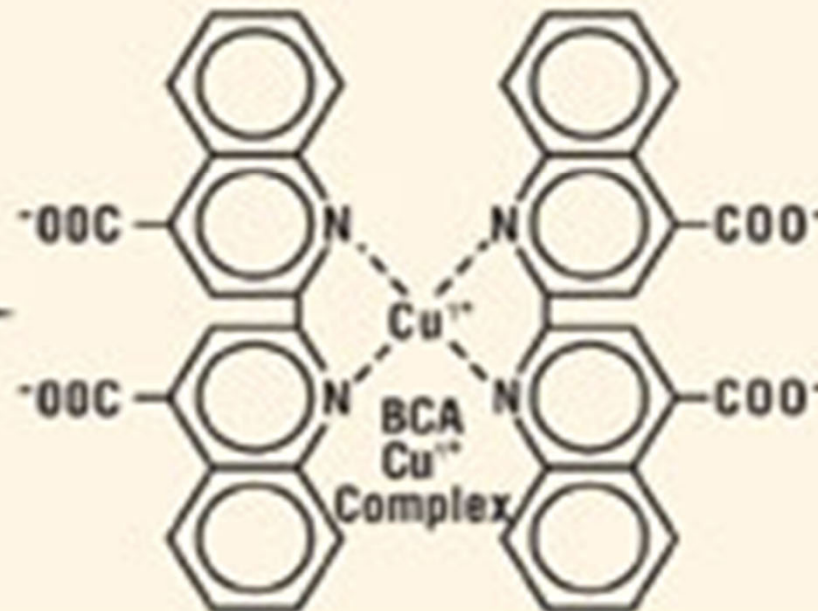
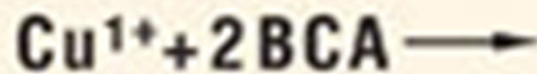


# BCA METODA

STEP 1.



STEP 2.

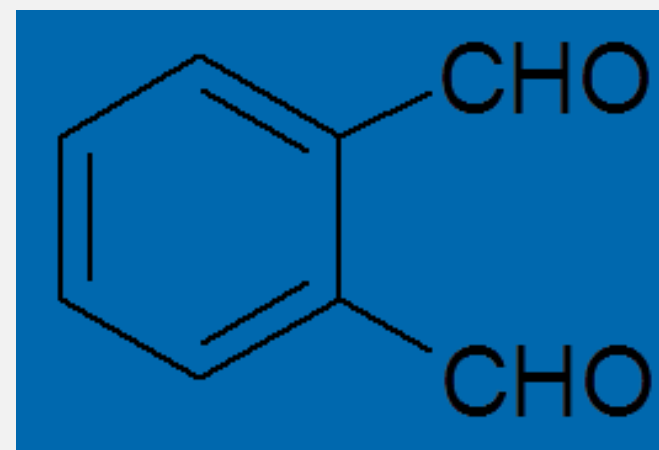


# FLUORESCENCE

Princip : vazba fluoroforu na bílkovinu → měření vzniklé fluorescence (OPA)

Měření : **exc. 340 nm**  
**em. 440 nm**

- zhášení fluorescence přidavkem bílkoviny



## NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ METODY

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



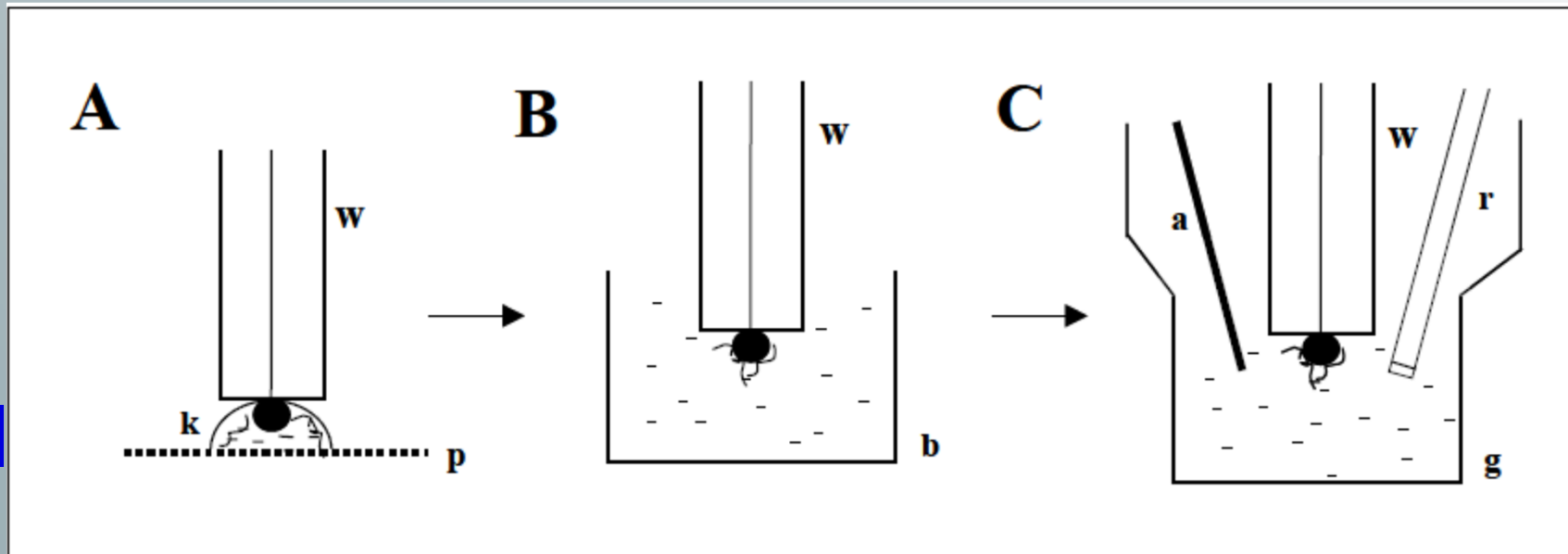
## NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ METODY

Stanovení	Citlivost	Přesnost	Interference
<b>Biuret</b>	0 – 1 mg	Vysoká, nezávislá na aminokyselino- vém složení	Aminoskupiny [Např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]
<b>Lowry</b>	0 – 0.1 mg	Částečně závislá na aminokyselino- vém složení	Kyseliny, chelátory (EDTA), reduktanty (DTT, phenol), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
<b>Bradford</b>	0 – 0.01 mg	Závislá na aminokyselino- vém složení	Detergenty (SDS, Triton X100, mýdlo)
<b>BCA</b>	0 – 0.05 mg	Většinou nezávislá na aminokyselino- vém složení	Redukující látky (2-merkapt ethanol, DTT), chelátory (EDTA)

# POLAROGRAFIE

Princip :

Brdičkova reakce – **SH** skupiny bílkoviny vstupují  
v přítomnosti  $\text{Co}^{2+}$  katalytické reakce  
na Hg elektrodě → proud



# 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
- termofilní organismy, psychrofilní organismy
- genetické inženýrství



## MIKROORGANISMY



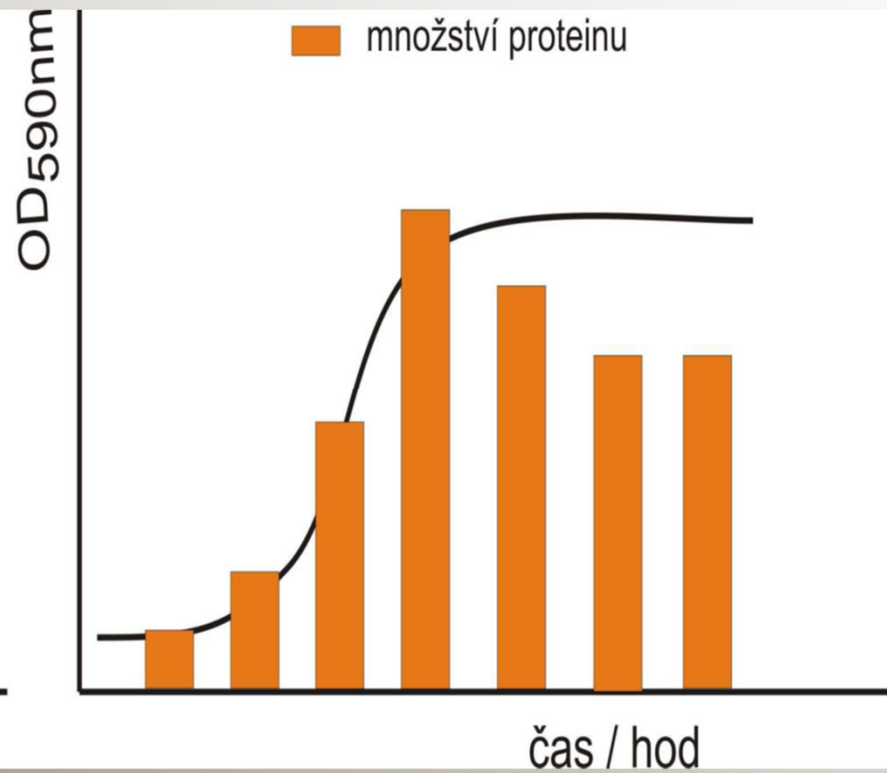
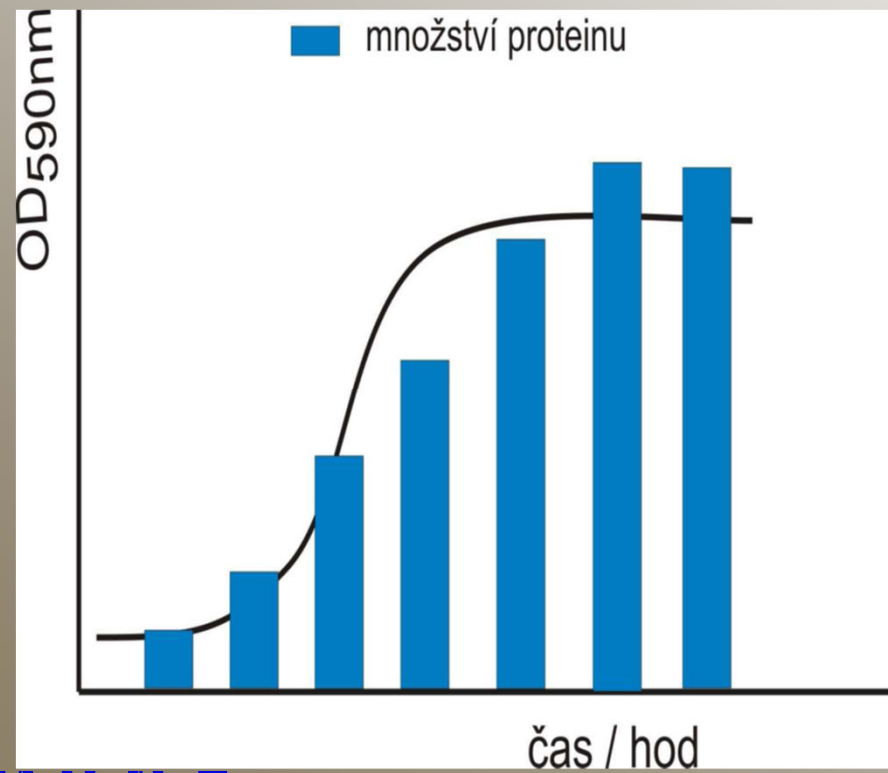
- CCM uchovává více než 3000 kmenů bakterií (asi 1 400 druhů) a 800 kmenů vláknitých hub (přibližně 550 druhů), které nabízí ve svém Katalogu kultur.
- Specializovaná sbírka vodních hyfomycetů obsahuje asi 500 kmenů (60 rodů se 130 druhy).



## SELEKCE OPTIMÁLNÍCH PRODUCENTŮ

- maximální produkce enzymu
- optimální vlastnosti enzymu
- snadné získání producenta
- snadnost purifikačního postupu

# MIKROORGANISMY



# BEZOBRATLÍ

Hmyz (*Drosophila melanogaster*),

Háďátko obecné (*Caenorhabditis elegans*)

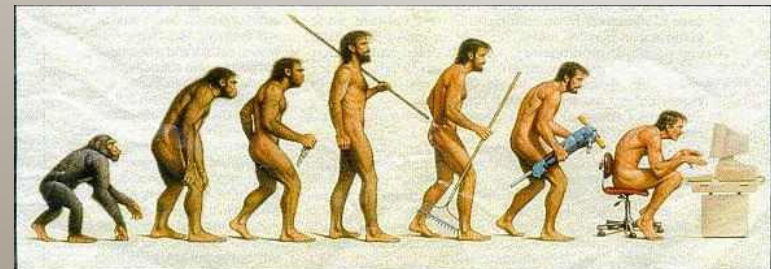
plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává



# ŽIVOČIŠNÉ TKÁNĚ

- Laboratorní zvířata – myši ( *Mus musculus* ), potkan ( *Rattus norvegicus*, *Wistar albino rat* ), králíci
- Jateční zvířata – orgány, krev
- Člověk – tělní tekutiny



Somehow, something went terribly wrong

MUNI  
SCI

# ROSTLINNÉ TKÁNĚ

špenát, řepa, hrách,  
tabák viržinský (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana  
benthamiana*),  
huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Nevýhoda – problematický růst za  
definovaných podmínek



## MANIPULACE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM

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



# ROZBITÍ A EXTRAKCE

Způsoby dezintegrace:

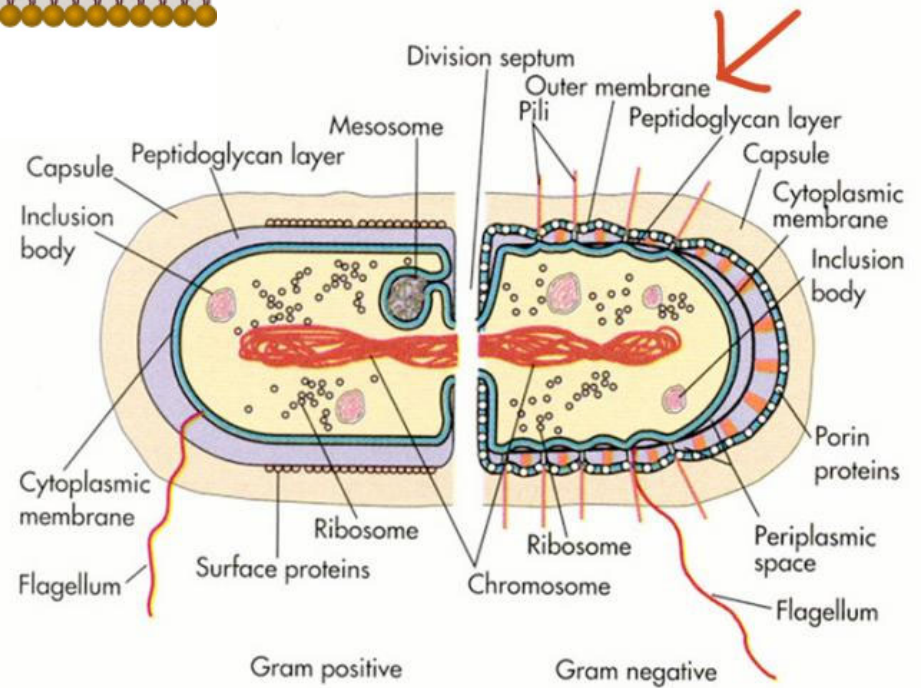
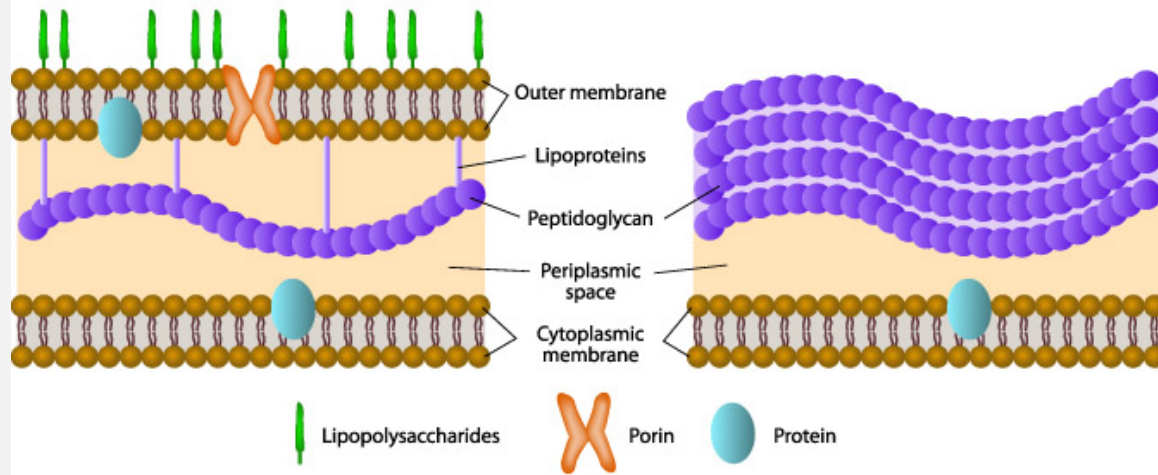
- Mechanicky (fyzikálně)
- Chemicky
- Enzymaticky



# BAKTERIE

## GRAM-NEGATIVE

## GRAM-POSITIVE





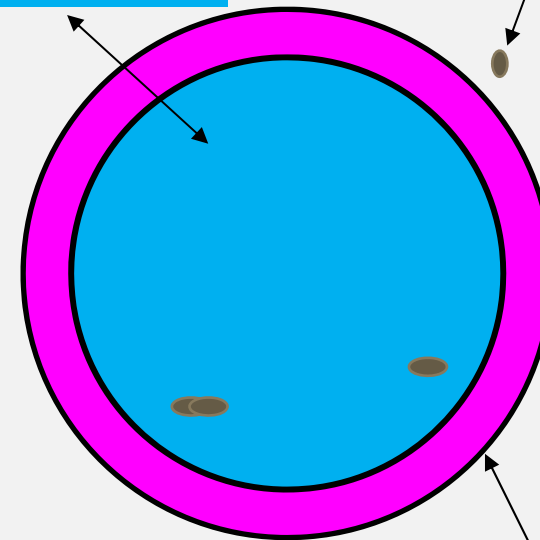
# BAKTERIE

Záleží na **lokalizaci**

- extracelulární
- intracelulární
  - cytoplasma
  - periplazma

extracelulární

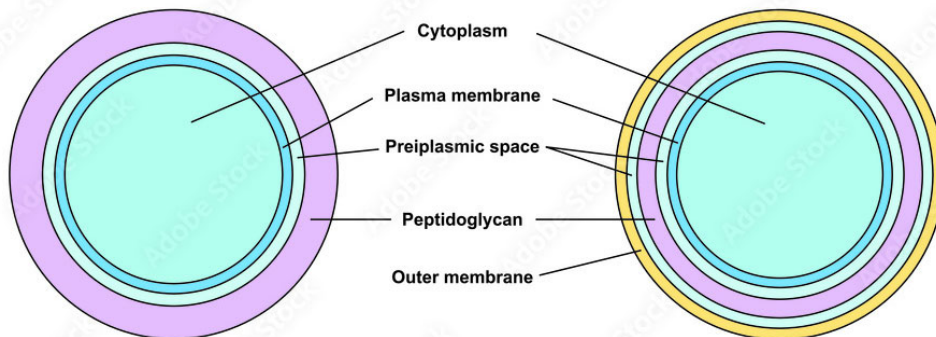
cytoplasma



periplasma

Gram Positive Bacteria

Gram Negative Bacteria



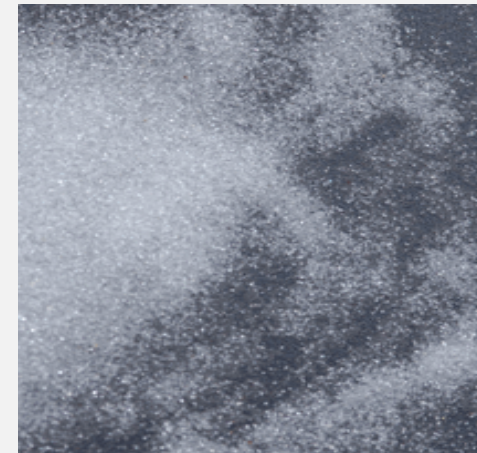
# MECHANICKÁ DEZINTEGRACE

## Princip

- jemné skleněné kuličky (Balotina) přidány do bakteriální suspenze a rychle třepány nebo míchány
- nutno chladit

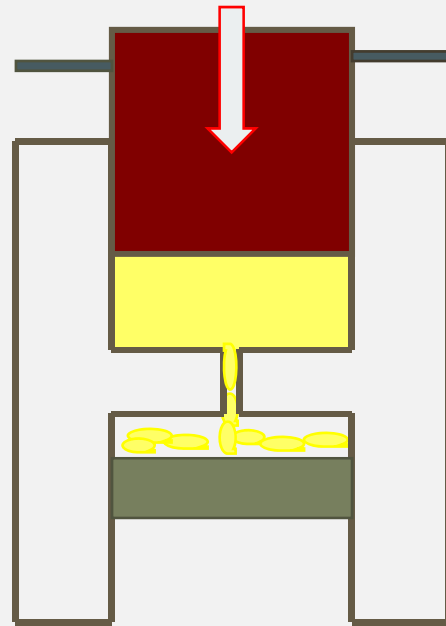


Přístroj BeadBeater



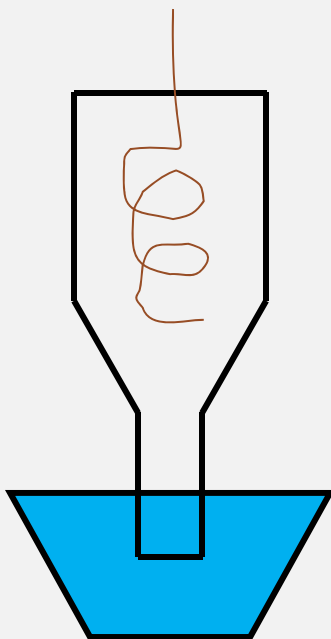
# FRENCH (X) PRESS

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



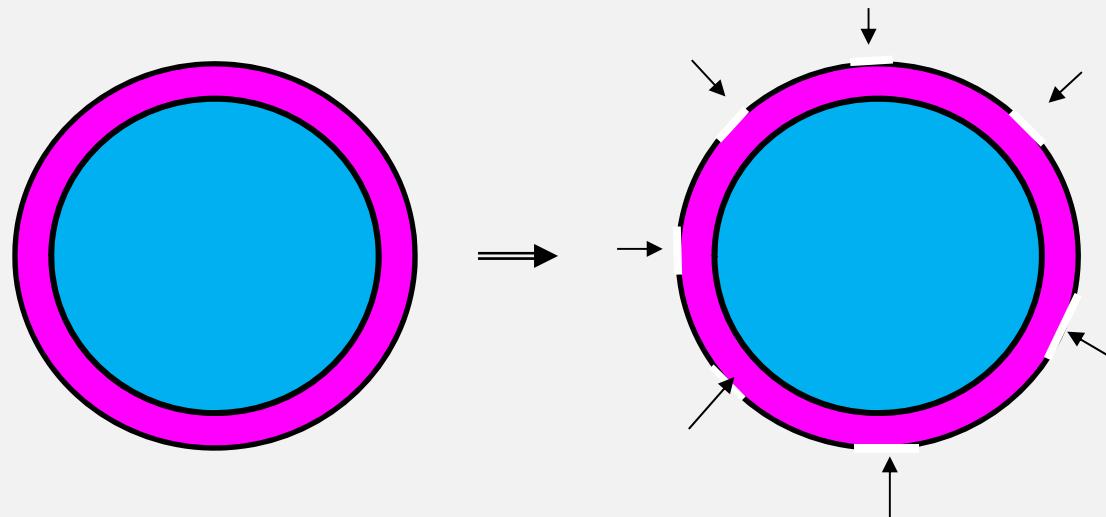
# ULTRAZVUK

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



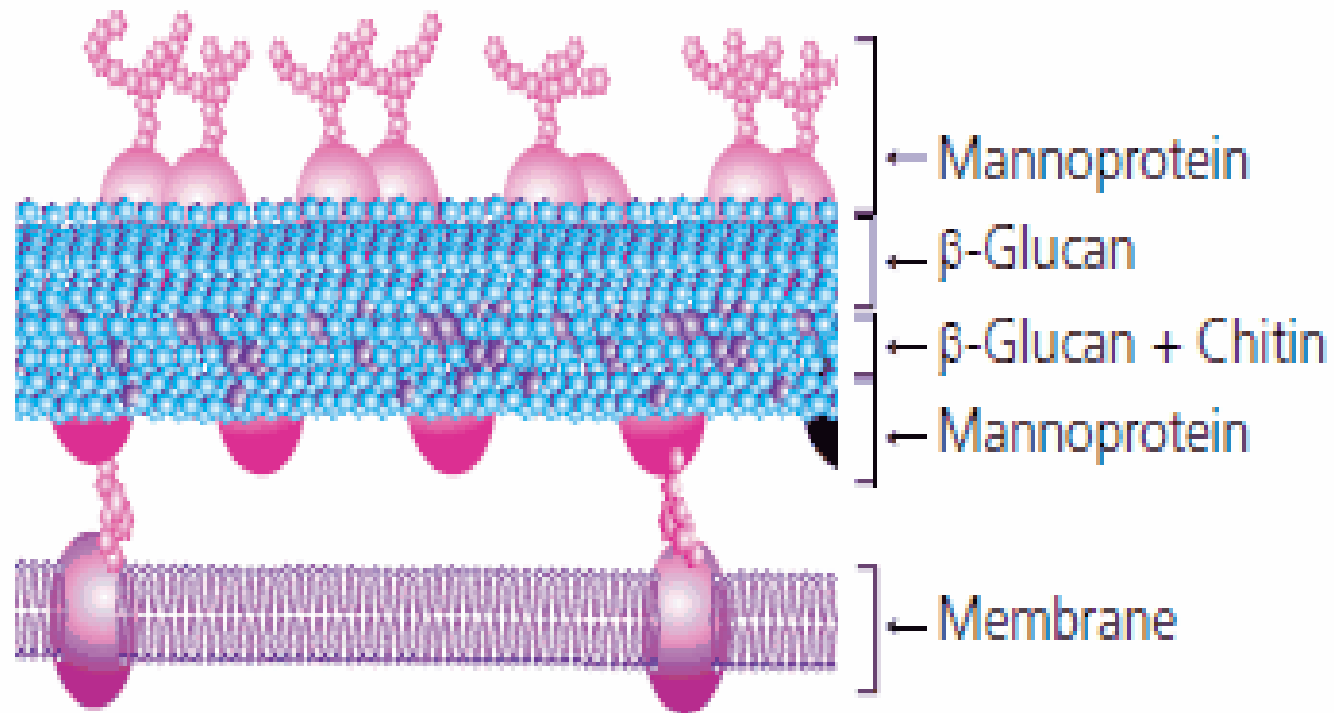
## LYSOZYM + OSMOTICKÝ ŠOK (MÍRNÝ OSMOTICKÝ ŠOK)

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu,  
následně je bakteriální suspenze zředěna  
destilovanou H<sub>2</sub>O – bakterie popraskají



# KVASINKY

## Yeast Cell Wall



# KVASINKY

## Toluenová autolýza

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

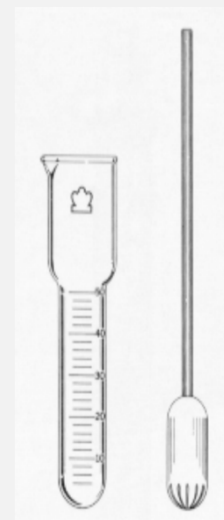
Balotina, French press,

# ŽIVOČIŠNÉ TKÁNĚ

- Třecí miska s pískem



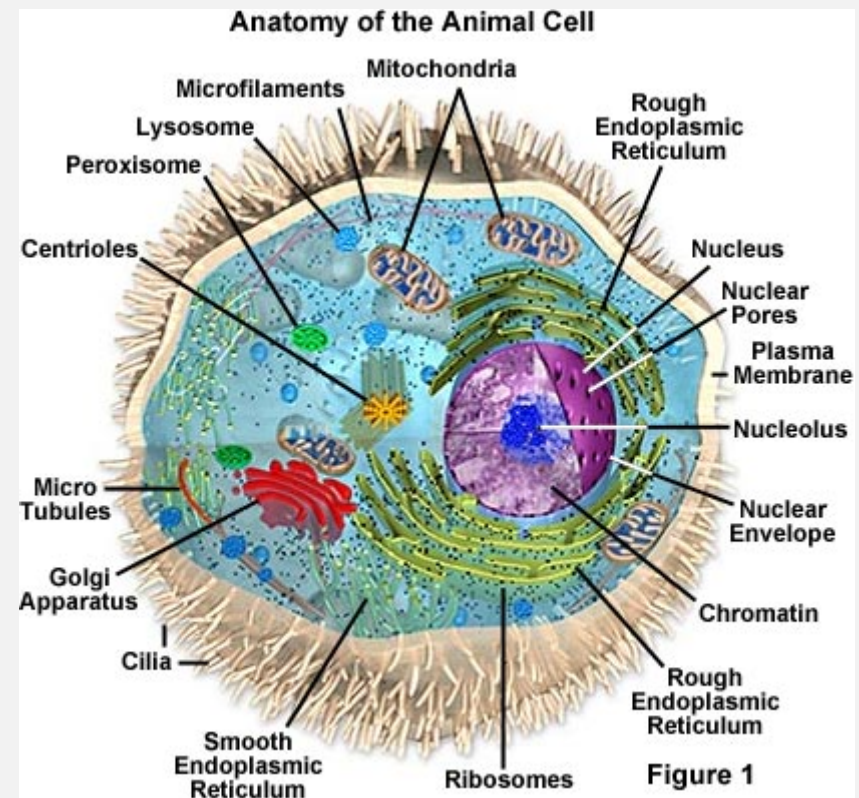
- Ruční homogenizatory – Potter –  
Elvehjemův





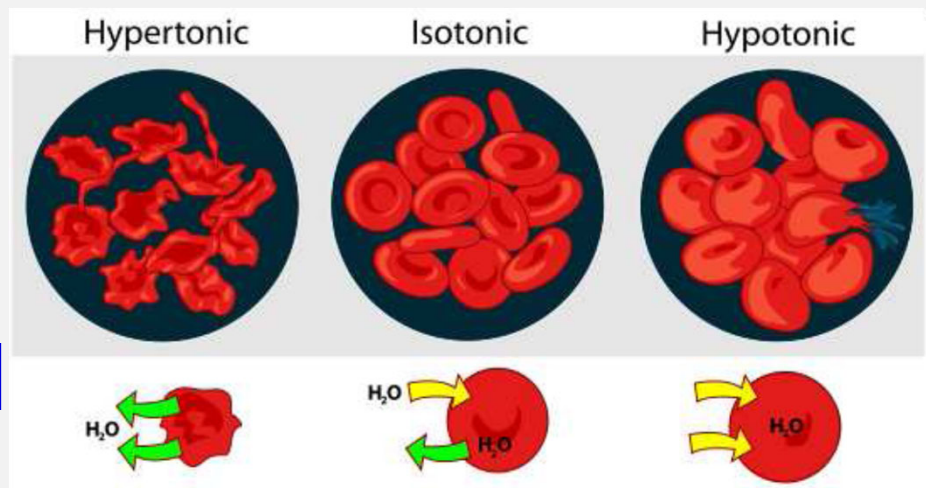
# ŽIVOČIŠNÉ TKÁNĚ

- Bez buněčné stěny
- Velmi křehké
- Tkáňové kultury



# ŽIVOČIŠNÉ TKÁNĚ

- Mixery
- Osmotická lyse - erythrocyty

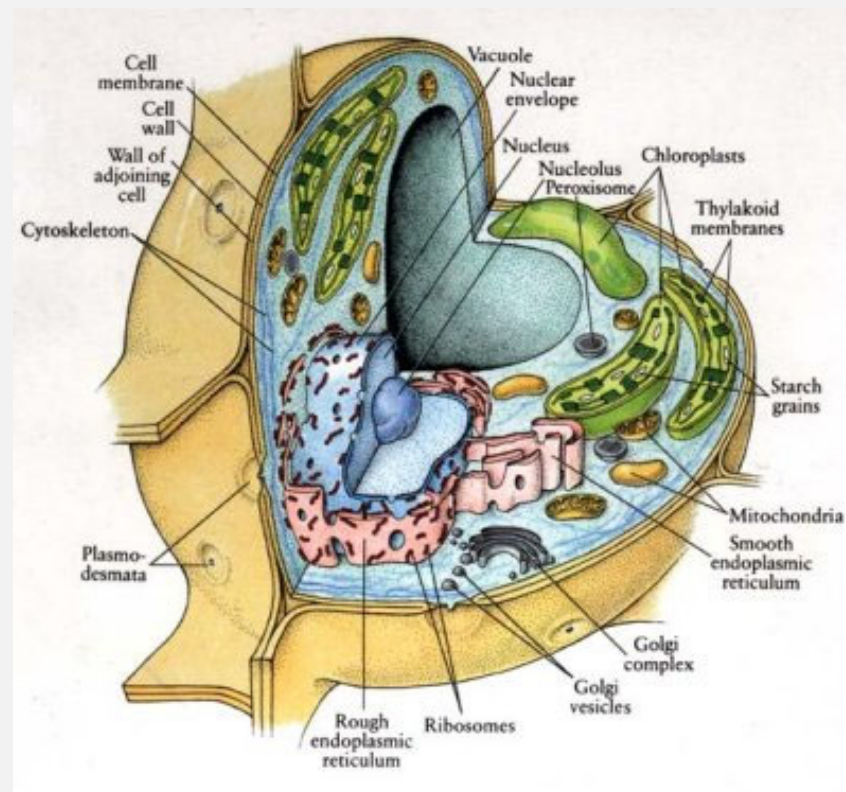


MUN  
SCI



# ROSTLINNÉ TKÁNĚ

- Silná buněčná stěna - celuloza
- Tkáňové kultury křehké



## 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,  $\beta$ -merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteas

# INHIBITORY PROTEAS

Protease Inhibitor	General inhibitors for			
	Serine proteases <sup>a</sup>	Cysteine proteases <sup>b</sup>	Metallo-proteases <sup>c</sup>	Aspartic proteases <sup>d</sup>
Aprotinin		E-64	Phosphoramidon	Pepstatin
Pefabloc SC and Pefabloc SC PLUS			Bestatin (aminopeptidases)	
Leupeptin ( <i>inhibits serine and cysteine proteases with trypsin-like specificity</i> )				
PMSF				
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
$\alpha_2$ -Macroglobulin				

Inhibitors included in the set	Specificity of inhibition	Quantity Supplied
<b>Antipain-dihydrochloride</b>	Papain, Trypsin, Cathepsin A and B	3 mg
<b>Aprotinin</b>	Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Kallikrein	0.5 mg
<b>Bestatin</b>	Aminopeptidases	0.5 mg
<b>Chymostatin</b>	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -Chymotrypsin	1 mg
<b>E-64</b>	Cysteine Proteases	3 mg
<b>EDTA-Na<sub>2</sub></b>	Metalloproteases	10 mg
<b>Leupeptin</b>	Serine and Cysteine Proteases such as Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0.5 mg
<b>Pefabloc SC</b>	Serine Proteases	20 mg
<b>Pepstatin</b>	Aspartic Proteases	0.5 mg
<b>Phosphoramidon</b>	Metalloproteinases, specifically Thermolysin	3 mg

M  
S

## SEPARACE SUBCELULÁRNÍCH ORGANEL

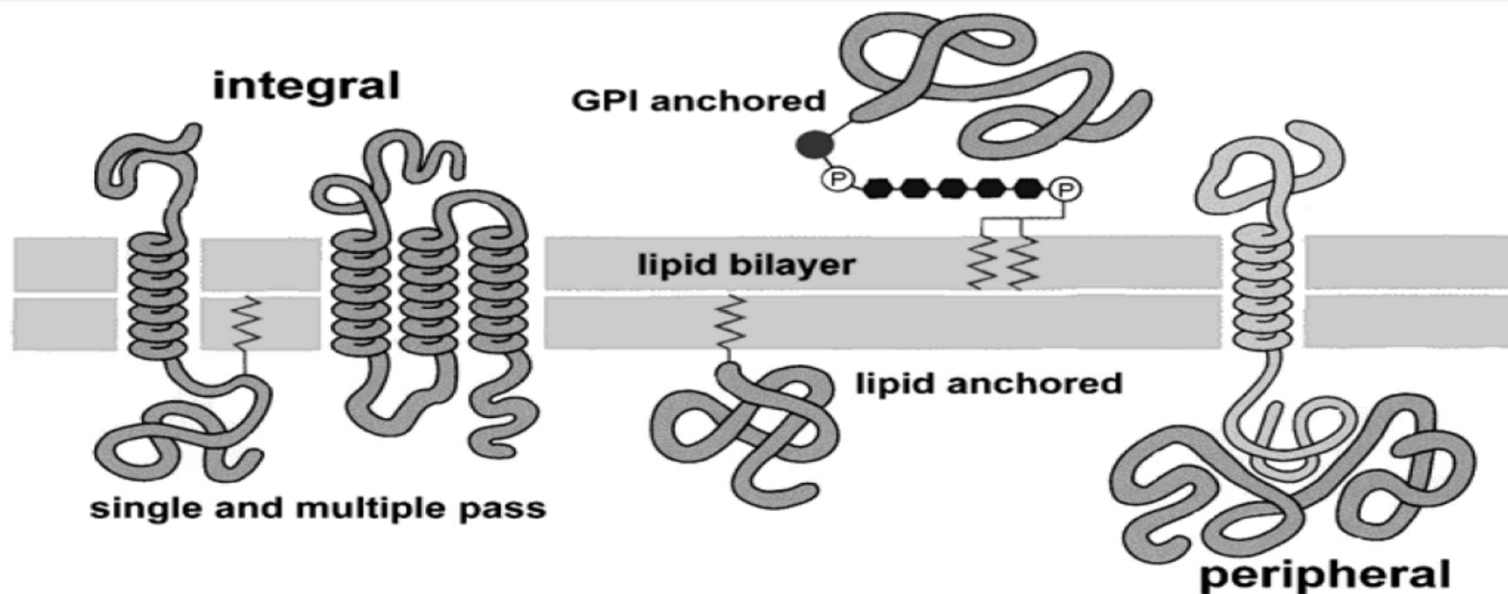
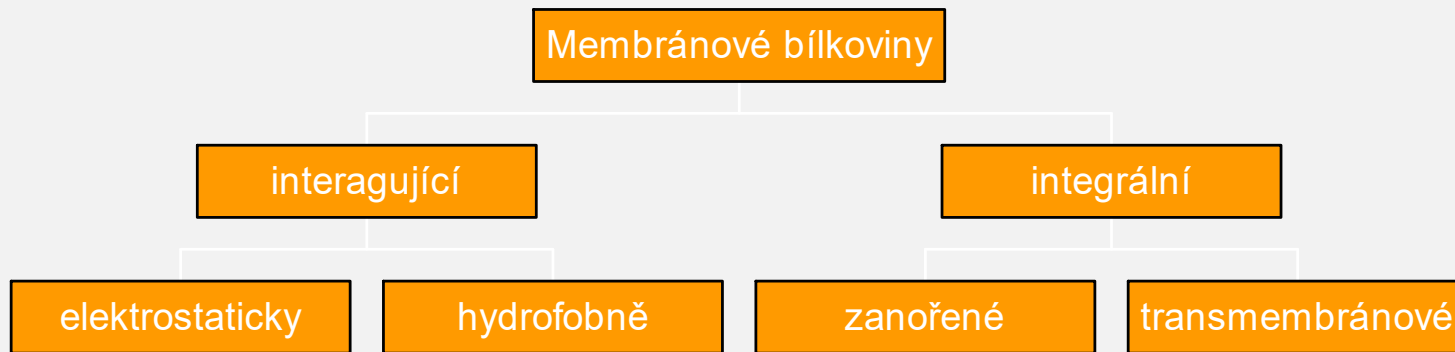
<b>Organela</b>	<b>Tíhové zrychlení</b>	<b>Čas</b>
Eukar.buňky	1 000 g	5'
Jádra, chloroplasty	4 000 g	10'
Mitochondrie, bakterie	15 000 g	20'
Lysozomy, membrány	30 000 g	30'
Ribozomy, fragmenty end.retikula a Gold.system	100 000 g	60'

## ENZYMY - MARKERY

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



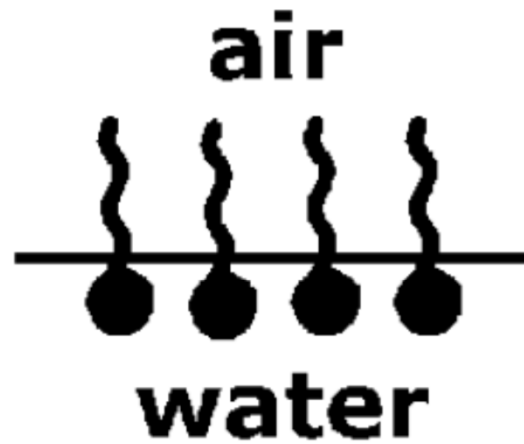
# MEMBRÁNOVĚ VÁZANÉ BÍLKOVINY









# IZOLACE MEMBRÁNOVÝCH BÍLKOVIN

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

# DETERGENTY

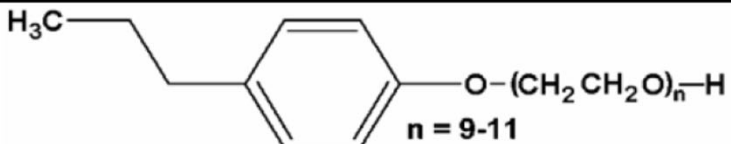
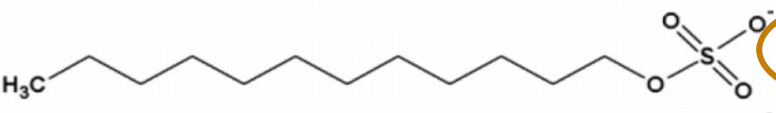
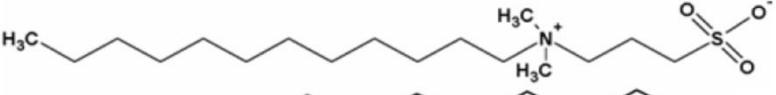
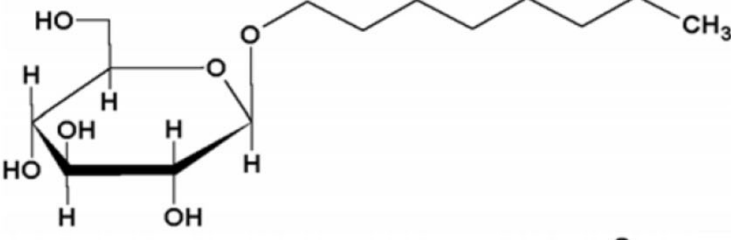
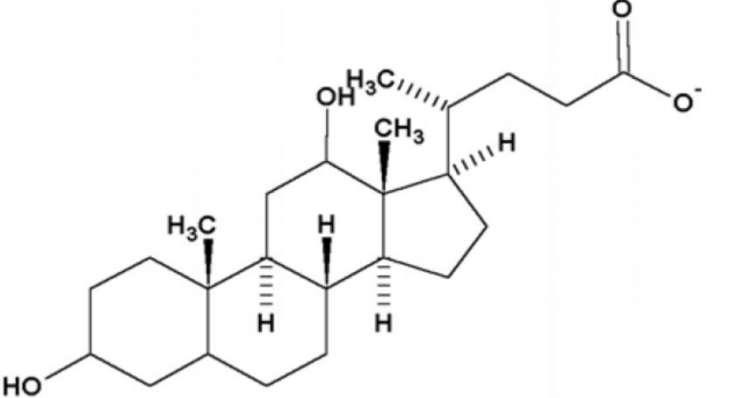


# DETERGENTY

Detergent	CMC mM	MMW Da	koncentrace	odstranění	aplikace
<b>ANIOGENNÍ</b>					
SDS(dodecylsulfát sodný)	8,3	288,4	> 10 mg/mg prot.		denaturace proteinů, použití pro DNA, PAGE
DOC(deoxycholát sodný)	1-4	416,6	0,1-10 mg membr. lipidů		solubilizace membránových proteinů
N-lauroylsarkosin	7	488	0,1 -1,5 %		solubilizace membr. prot., příprava antigenů
<b>KATIOGENNÍ</b>					
CTAB (hexadecyltrimethyl amonium bromide)	4-5	337	0,1 – 1 %	???	rozpuštění membrány, tvoří komplex s DNA, odstranění polysacharidů
<b>NEIONOGENNÍ</b>					
Triton X-100 [octylphenolpoly(ethylenglyco lether) <sub>n</sub> ]	0,2	647 n=10	1 – 5 mM		solubilizace proteinů
Tween 20 [poly(oxyethylene) <sub>n</sub> sorbitan- monolaurate]	0,06		> 10 mg/mg membr. lipid;		imunoblotty, ELISA
<b>AMFOTERNÍ</b>					
CHAPS (3-[(3- cholamidopropyl)dimethylam onio]-1-propanesulfonate)	4	614,9	6,5-13 mM		solubilizace membránových proteinů

# DETERGENTY

## Examples of Detergents and Their Properties

Name	Structure	CMC	N (MW)
Nonidet <sup>®</sup> (N) P-40		0.3 mM	100-155 (647)
sodium dodecyl sulfate (SDS)		8.3 mM	62 (288)
sulfobetaine (SB12)		3.6 mM	55 (336)
n-octylglucoside		14.5 mM	20-25 (292)
deoxycholate		20 mM	3-12 (417)