

snímek 1

BIOCHEMIE

Studijní literatura :
P. Karlson - Základy biochemie Academia 1981
Z. Šipal a kol. - Biochemie SPN 1992
Z. Vodrážka - Biochemie 1 - 3. Academia 1992
D. Voet - Biochemie Victoria Publishing 1990

Biochemie -chemická disciplína, která studuje chemické složení živé hmoty a chemické procesy, které v ní probíhají
- je hraniční vědní disciplínou, na pomezí mezi chemi a biologií, zkoumá biologické objekty chemickými metodami

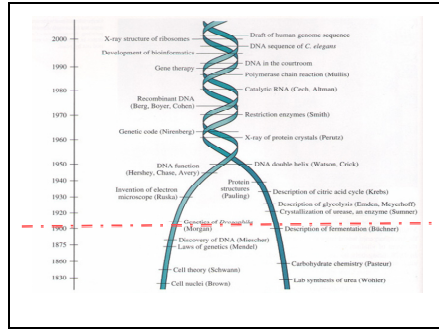
snímek 2

Historický úvod

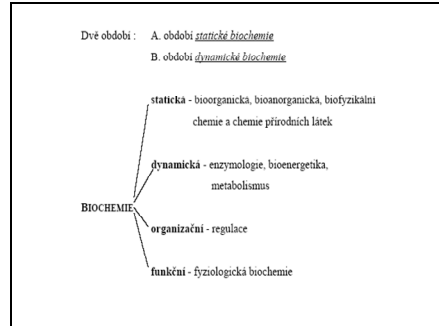
fyzologie a lékařství }
organická chemie } **biochemie** Hoppe Seyler 1903

Synonyma : Biological Chemistry
Physiologische Chemie

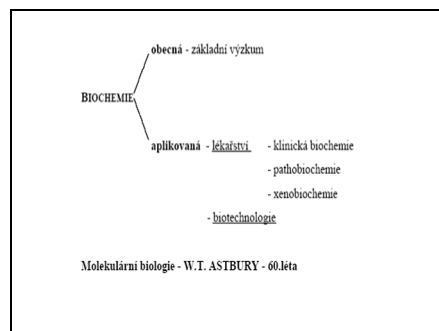
snímek 3



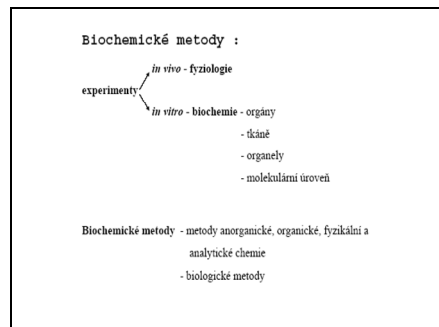
snímek 4



snímek 5



snímek 6



snímek 7

Problémy se vzorkem - práce s komplexními vzorky
 - práce s labilním biologickým materiálem
 - práce s malým množstvím látek

P. Anzenbacher, J. Kovář - Metody chemického výzkumu pro
 biochemiky - Dočasná vysokoškolská
 učebnice 1986

M. Ferenčík, B. Škárka - Biochemické laboratorní metody, SNTL
 1981

snímek 8

Látkové složení

snímek 9

LÁTKOVÉ SLOŽENÍ ORGANISMŮ

| Látka | člověk | rostliny | bakterie |
|--------------|--------|----------|----------|
| voda | 60 | 75 | 70 |
| bílkoviny | 18 | 4 | 15 |
| nukleové k. | 1.5 | 1 | 7 |
| sacharidy | 0.5 | 16 | 3 |
| lipidy | 16 | 1 | 2 |
| org. látky | 1 | 1 | 2 |
| anorg. látky | 3 | 2 | 1 |

snímek 10

Anorganické látky - voda
 - Na, K, Cl, SO₄²⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻,
 Ca, Mg, Fe, Zn, Va, Cu, Mo, Ni, Mn, Se
 - plyny - O₂, N₂, CO₂, NO

Organické látky - vysokomolekulární - biopolymery
 - bílkoviny
 - nukleové kyseliny
 - sacharidy
 - lipidy

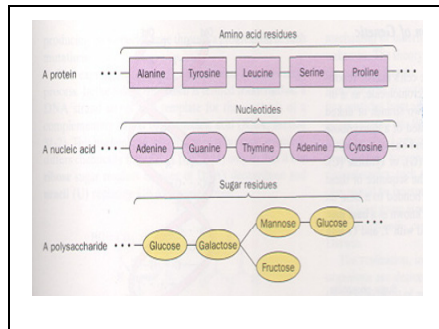
snímek 11

Obecný princip výstavby biopolymerů :

1. Jsou tvořeny monomery
2. Monomery vytvářejí lineární řetězce
3. Monomery jsou spojovány jedním typem vazby
 mono, di-, tri-, tetra-....
 oligo < 10
 poly > 10

| | bílkoviny | nukleové kyseliny | polysacharidy |
|----------|---------------|-------------------|---------------|
| monomery | aminokyseliny | nukleonidy | monosacharidy |
| vazba | peptidická | 3,5-diesterová | glykosidická |

snímek 12



snímek 13

- nízkomolekulární - produkty meziproduktů
metabolismu
- sekundární metabolity
- regulační látky

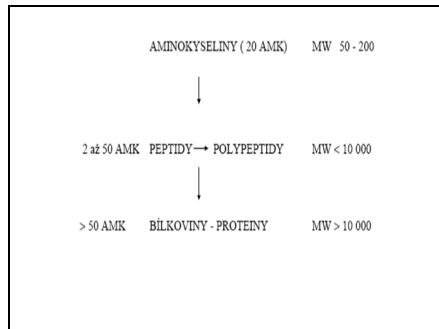
snímek 14

BÍLKOVINY - PROTEINY

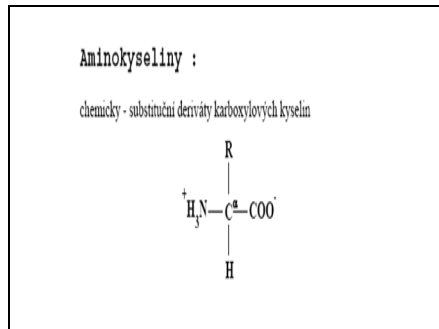
Protein - MULDER, BERZELIUS (1838)
protein - „zaujímající první místo“

Funkce - katalýza
transport
pohyb
podpora
imunita
regulace
vznik a přenos nervového vzruchu

snímek 15



snímek 16



snímek 17

I. Kódované aminokyseliny

Rozdělení :


A. Nepolární aminokyseliny - Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro

B. Polární aminokyseliny
OH skupinu - Ser, Thr, Tyr
SH skupinu - Cys, Met
indolovou skupinu - Try
CONH₂ skupinu - AspNH₂, GlnNH₂

C. Nabitě
- kyselé COOH skupinu - Asp, Glu
- basické NH₂ skupinu - Lys
guanidinovou skupinu - Arg
imidazolovou skupinu - His

snímek 18

a) aminokys. s nepolárním R ve vzorci:
 $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$

| Název | Zkratka | 3 | R |
|----------------|---------|---|---|
| 1. GLYCIN | Gly | G | - H |
| 2. ALANIN | Ala | A | - CH ₃ |
| 3. VALIN | Val | V | - CH(CH ₃) ₂ |
| 4. LEUCIN | Leu | L | - CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ |
| 5. ISOLEUCIN | Ile | I | - CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃ |
| 6. FENYLALANIN | Phe | F | - CH ₂ -C ₆ H ₅ |
| 7. PROLIN | Pro | P |  |

snímek 19

Amino acids with nonpolar side chains

| | | | | | |
|------------|--|-------|-----|------|------|
| Glycine | COO^- | 57.0 | 6.8 | 2.15 | 9.79 |
| Gly | $\text{H}-\text{C}-\text{H}$ | | | | |
| G | NH_3^+ | | | | |
| Alanine | COO^- | 71.1 | 7.6 | 2.35 | 9.87 |
| Ala | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_3$ | | | | |
| A | NH_3^+ | | | | |
| Valine | COO^- | 91.1 | 6.8 | 2.29 | 9.74 |
| Val | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | | | | |
| V | NH_3^+ | | | | |
| Leucine | COO^- | 133.2 | 9.5 | 2.33 | 9.74 |
| Leu | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ | | | | |
| L | NH_3^+ | | | | |
| Isoleucine | COO^- | 133.2 | 5.8 | 2.92 | 9.76 |
| Ile | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ | | | | |
| I | NH_3^+ | | | | |

snímek 20

| | | | | | |
|---------------|---|-------|-----|------|-------|
| Methionine | COO^- | 133.2 | 2.4 | 2.13 | 9.29 |
| Met | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ | | | | |
| M | NH_3^+ | | | | |
| Proline | COO^- | 97.1 | 5.8 | 1.95 | 10.84 |
| Pro | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ | | | | |
| P | NH_3^+ | | | | |
| Phenylalanine | COO^- | 147.2 | 4.1 | 2.20 | 9.31 |
| Phe | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ | | | | |
| F | NH_3^+ | | | | |
| Tyrosine | COO^- | 188.2 | 1.2 | 2.46 | 9.41 |
| Tyr | $\text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ | | | | |
| W | NH_3^+ | | | | |

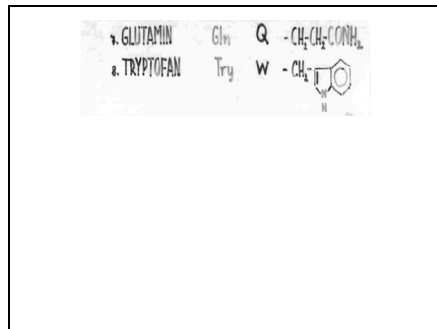
(continued)

snímek 21

b) 5 polární skupinová v R :

| | | | |
|--------------|----------|---|---|
| 1. SERIN | Ser | S | $-\text{CH}_2\text{OH}$ |
| 2. THREONIN | Thr | T | $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ |
| 3. TYROSIN | Tyr | Y | $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ |
| 4. CYSTEIN | Cys (SH) | C | $-\text{CH}_2\text{SH}$ |
| 5. METHIONIN | Met | M | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ |
| 6. ASPARAGIN | Asn | N | $-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$ |

snímek 22

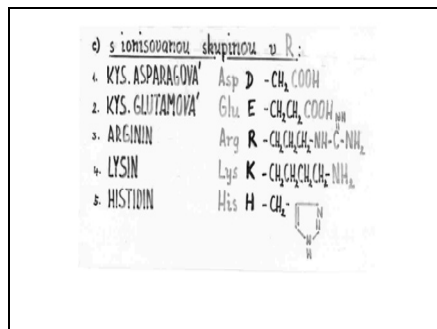


snímek 23

Amino acids with uncharged polar side chains

| Amino acid | Structure | pI | pKa | pKa | pKa |
|------------|--|------|-----|------|--------------------|
| Serine | $\text{H}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{OH}$ | 5.7 | 7.1 | 2.19 | 9.21 |
| Threonine | $\text{H}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ | 10.1 | 5.9 | 2.09 | 9.10 |
| Asparagine | $\text{H}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ | 11.1 | 4.3 | 2.14 | 8.72 |
| Glutamine | $\text{H}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ | 12.1 | 3.9 | 2.17 | 9.13 |
| Tyrosine | $\text{H}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ | 10.2 | 3.2 | 2.20 | 9.21 (phenol) |
| Cysteine | $\text{H}-\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{SH}$ | 10.1 | 1.6 | 1.92 | 10.70 (sulfhydryl) |

snímek 24



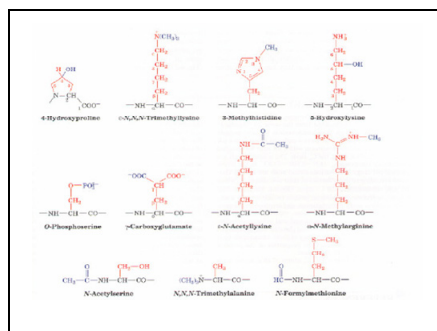
snímek 28

II. Nekódované aminokyseliny

A. γ bilkovinách postranní modifikaci AMK

OH-Lys
OH-Pro
fosfo-Ser

snímek 29

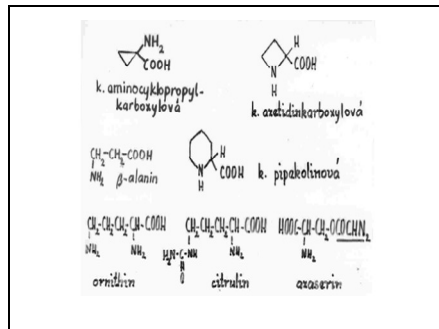


snímek 30

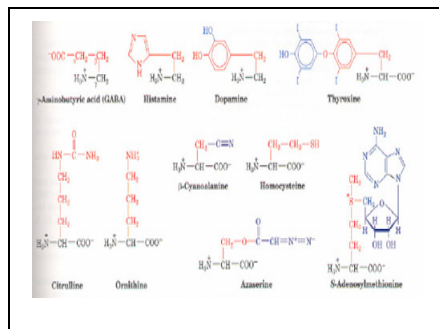
B. volné s biologickou funkcí

β alanin
ornitin a citrulin
γ aminomáselná
antibiotika - azaserin, cykloserin, chloramfenikol
nervové mediatory - DOPA, dopamin, adrenalin
hormony - thyroxin, trijodthyronin

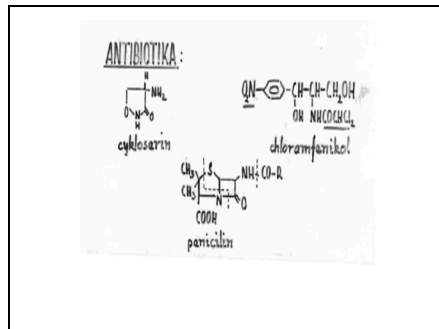
snímek 31



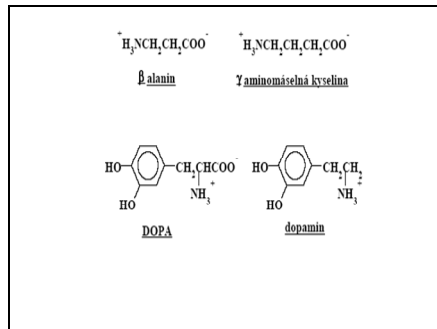
snímek 32



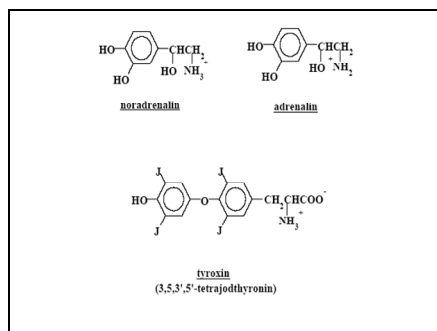
snímek 33



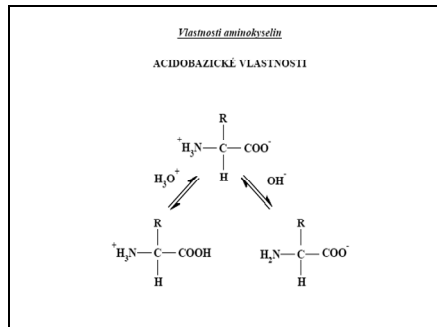
snímek 34



snímek 35



snímek 36



snímek 37

Izoelektrický bod $pI = \frac{pK_{COOH} + pK_{NH_2}}{2}$

Tabulka pK

| Skupina | pK | Skupina | pK | Skupina | pK |
|--------------------------|-----------|----------------------------|------|---------------|------|
| α COOH | 1.8 - 2.5 | β COOH | 3.9 | γ COOH | 4.1 |
| α NH ₂ | 9 - 10 | ϵ NH ₂ | 10.8 | guanidin | 12.5 |
| imidazol | 6.0 | SH | 8.3 | OH | 10.1 |

Puŕační kapacita

Titrační křivky

snímek 38

HENDERSON-HASSELBALCHOVA ROVNICE

$$\frac{[H^+] \cdot [Ac^-]}{[HAc]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K$$

$$\log \frac{[Ac^-]}{[HAc]} + \log [H^+] = \log K$$

$$\log \frac{[Ac^-]}{[HAc]} - \log K = -\log [H^+]$$

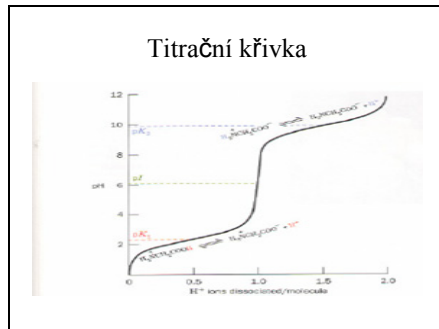
$$\log \frac{[Ac^-]}{[HAc]} + pK = pH$$

snímek 39

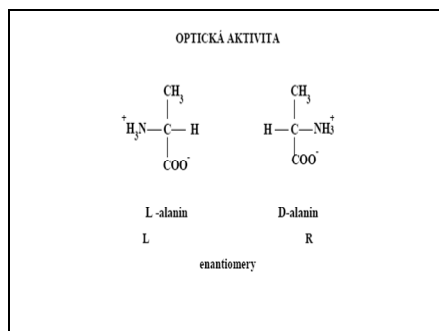
TITRAČNÍ KŘIVKA

Titration curve showing pH vs. titration volume. Key points are marked: pK₁ (1.8-2.5), pI (5.9), and pK₂ (9-10). Chemical structures are shown for the fully protonated form (H₃N⁺-CH(R)-COOH), the zwitterion (H₃N⁺-CH(R)-COO⁻), and the fully deprotonated form (H₂N-CH(R)-COO⁻).

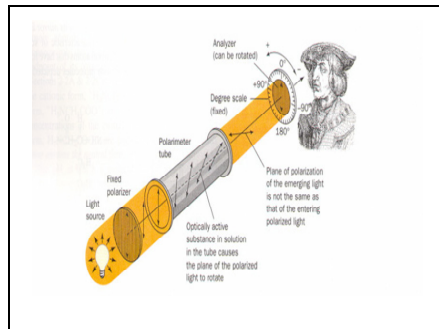
snímek 40



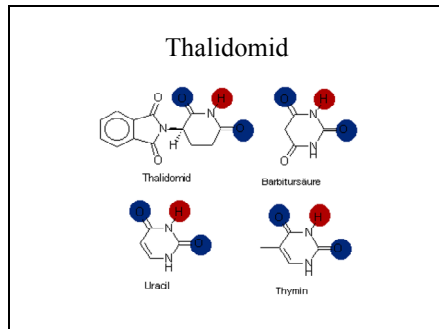
snímek 41



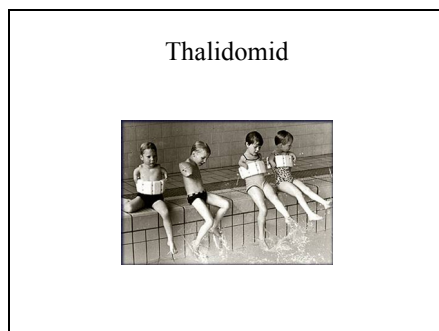
snímek 42



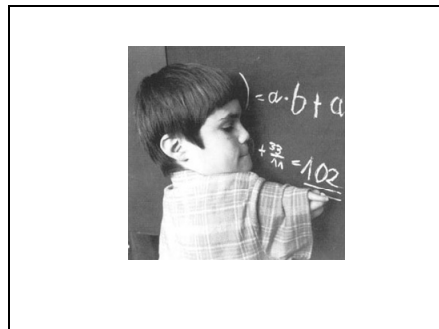
snímek 43



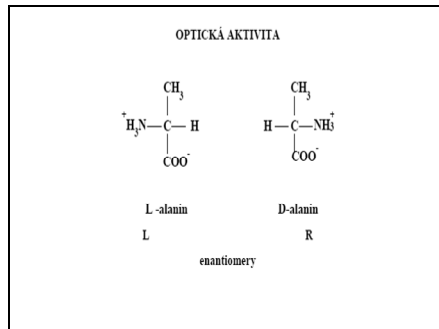
snímek 44



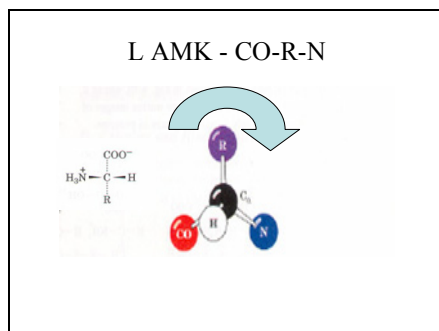
snímek 45



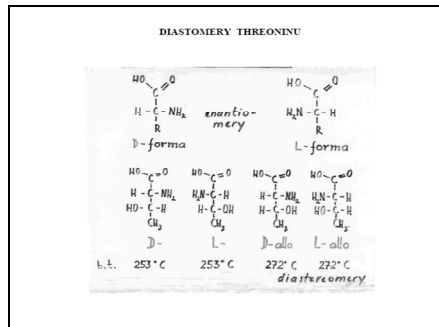
snímek 46



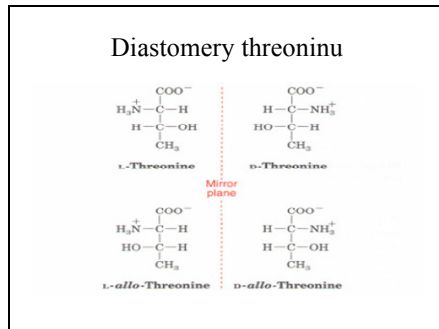
snímek 47



snímek 48



snímek 49

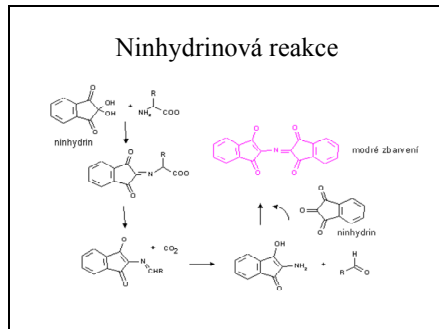


snímek 50

CHEMICKÉ VLASTNOSTI

- reakce dané přítomností COOH a NH₂ skupin
- ninhydrinová reakce - NH₂
- reakce vedlejších skupin
- reakce Sakaguchio - guanidinová skupina
- xantoproteinová reakce - aromatické aminokyseliny
- Paulyho reakce - tyrosin
- Adamkiewiczova reakce - indol

snímek 51



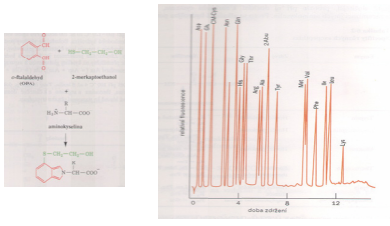
snímek 52

Analyza aminokyselin

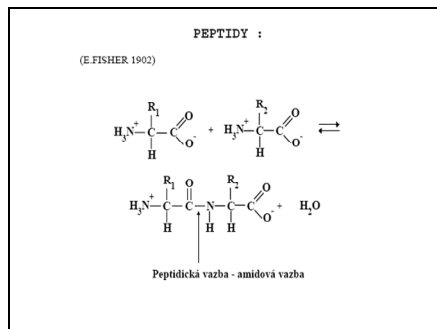
- papíroví a tenkovrstvá chromatografie
- ionexová chromatografie
- reverzní fázová chromatografie

snímek 53

RP HPLC AMK



snímek 54



snímek 55

di, tri, tetra oligopeptidy polypeptidy

Názvoslovi peptidů

H_3N^+ -Gly-Arg-His-COO⁻ → glycyl-arginyl-histidin

Biosyntéza peptidů - meziprodukty odbourávání bílkovin
- jednoduchá biosyntéza bez proteosyntézy

snímek 56

Přirodní peptidy:

Di - karnosin
anserin

Tri - glutathion GSH

Peptidové hormony - oxytocin
vasopresin
inzulin
glukagon

snímek 57

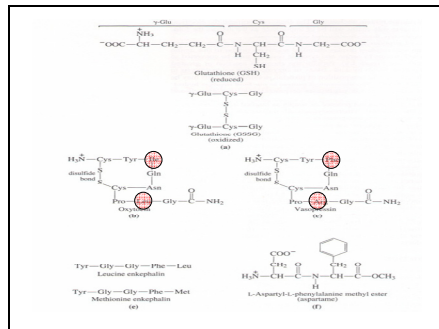
Peptidové neuromodulátory - enkefaliny
endorfiny

Peptidová antibiotika - penicilin
gramicidin
valinomycin
aktinomycin

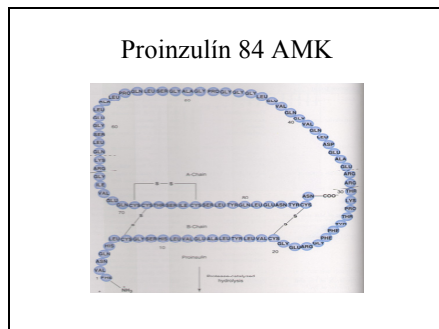
Peptidové fyto a zootoxiny - neurotoxiny hadů štírů a včel
mikrocystiny
falloidin
amanitin

Polypeptidy - protaminy

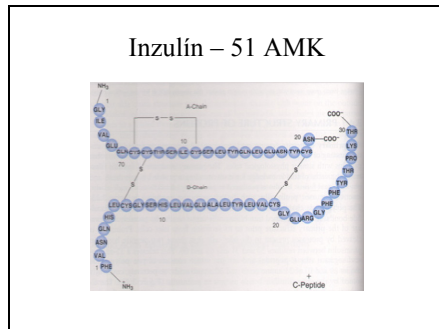
snímek 58



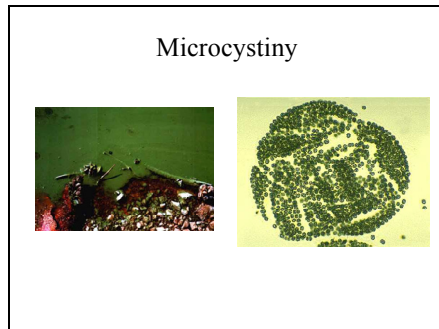
snímek 59



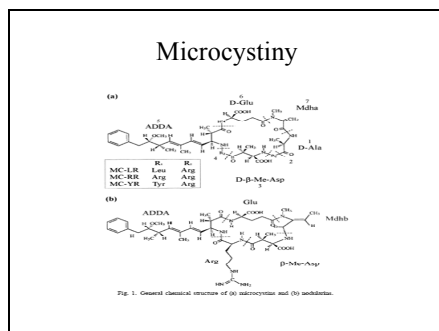
snímek 60



snímek 64



snímek 65



snímek 66

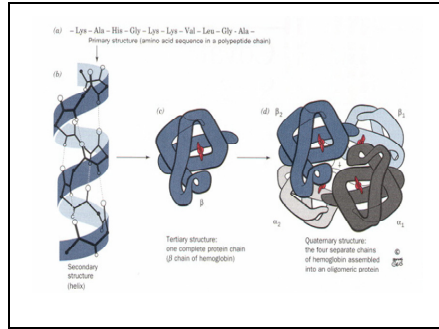
BÍLKOVINY :

Struktura bílkovin

1. primární - sekvence aminokyselin
2. sekundární - uspořádání polypeptidického řetězce
3. terciální - uspořádání polypeptidického řetězce s vedlejších řetězců
4. kvartetní struktura - podjednotkové složení

sekundární, terciální, kvartetní struktura ⇒ konformace

snímek 67

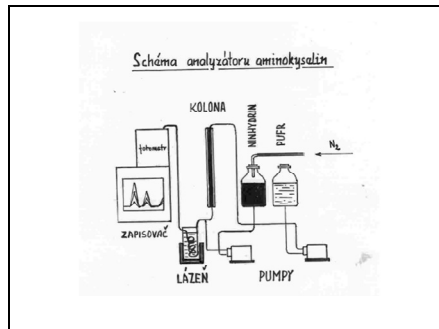


snímek 68

Aminokyselinová analýza

1. Izolace homogenní bílkoviny
2. Úplná hydrolyza - kyselá - 6 M HCl, 100 - 120 °C, 10 - 100 hod.
- bazická - 2 - 4 M NaOH, 100 °C, 4 - 8 hod.
- enzymová - Pepsin
3. Aminokyselinová analýza - RP, IEX

snímek 69



snímek 70

Primární struktura

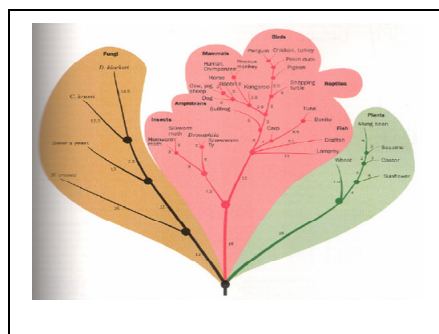
1953 - Sanger - inzulin (51 AMK), 100 g materiálu, 10 let
⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 - β-galaktosidasa (1028 AMK), μg materiálu, dny

--

Stanovení sekvence - Edmanovo odbourávání
na základě sekvence nukleových kyselin

snímek 71

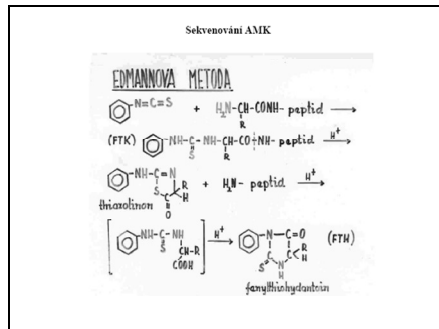


snímek 72

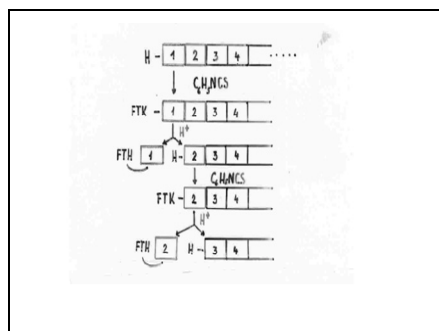
Srpkovitá anémie

Two microscopic images of red blood cells. The top image shows normal, biconcave disc-shaped red blood cells. The bottom image shows sickle-shaped red blood cells, characteristic of sickle cell anemia.

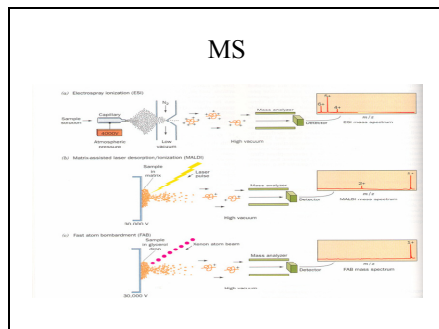
snímek 76



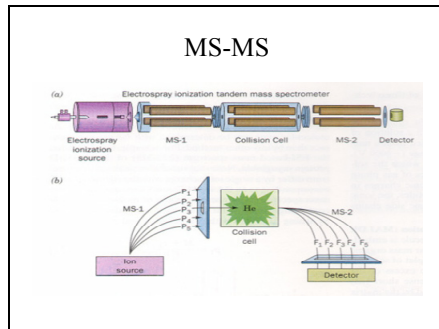
snímek 77



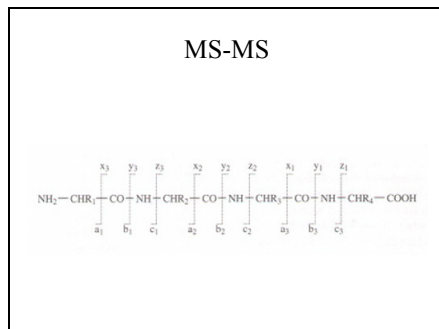
snímek 78



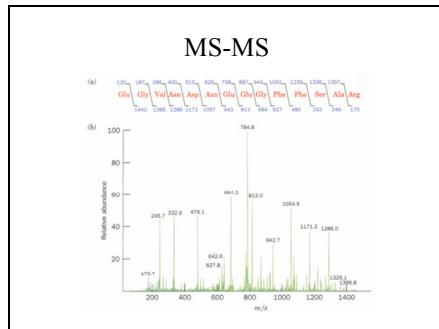
snímek 79



snímek 80



snímek 81



snímek 82

Syntéza peptidů
1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND
1962 - syntéza na pevné fázi - MERRIFIELD

snímek 83

SYNTEZA PEPTIDŮ

$$X-NH-CH(R_1)-CO-Z + H_2N-CH(R_2)-CO-Y \rightarrow X-NH-CH(R_1)-CO-NH-CH(R_2)-CO-Y + H_2O$$

X, Y = ochranní skupiny
Z = aktivace karboxylu: -Cl, -N₃, -O-C₆H₄-NO₂

snímek 84

MERRIFIELD 1965

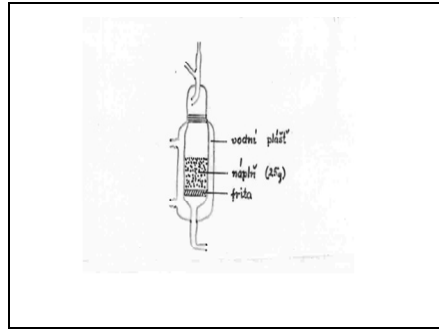
$$\text{Resin-CH}_2\text{-NH}_2 + \text{Cl-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-Cl} \rightarrow \text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-Cl} + \text{HCl}$$

$$\text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-Cl} + \text{HOOC-CH(R)-NH-X} \xrightarrow{\text{triethylamine}} \text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH(R)-NH-X} + \text{HCl}$$

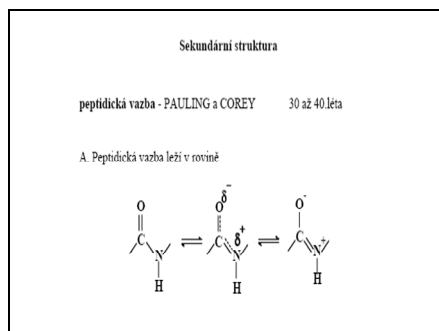
$$\text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH(R)-NH-X} + \text{HOOC-CH(R')-NH-X} \xrightarrow{\text{DCC}} \text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH(R)-NH-CO-CH(R')-NH-X} + \text{HCl}$$

$$\text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH(R)-NH-CO-CH(R')-NH-X} + \text{HOOC-CH(R'')-NH-X} \xrightarrow{\text{DCC}} \text{Resin-CH}_2\text{-NH-CO-CH(R)-NH-CO-CH(R')-NH-CO-CH(R'')-NH-X} + \text{HCl}$$

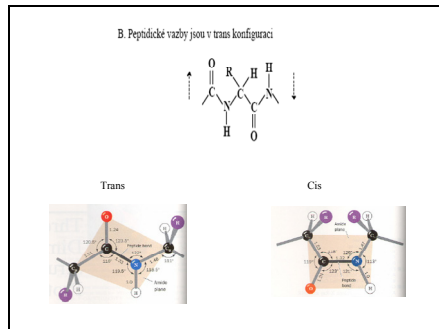
snímek 85



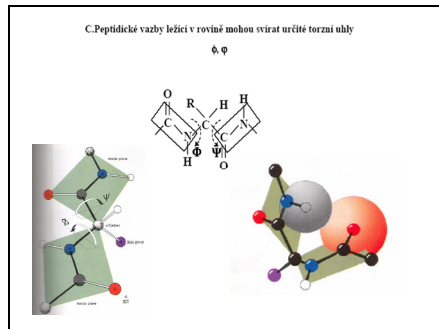
snímek 86



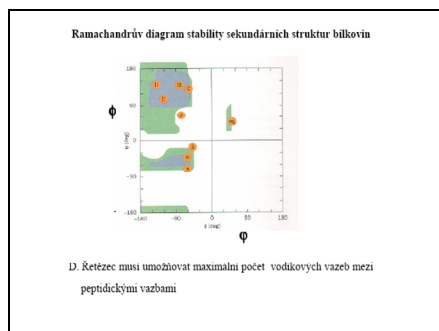
snímek 87



snímek 88



snímek 89



snímek 90

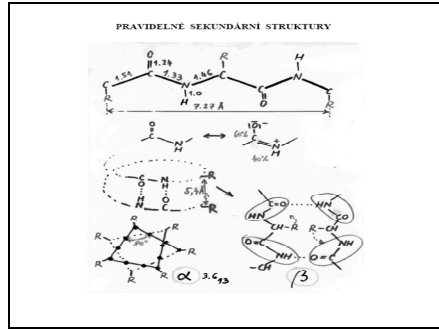
Typy sekundárních struktur :

A. Pravidelné - helikální struktury - α helix (-56, -47)
 - β struktury - skládaný list - paralelní (-139, +135) a antiparalelní (-119, +113)

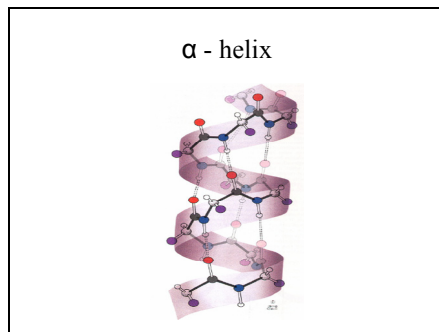
B. Ohybové - β ohyb

C. Nepravidelné

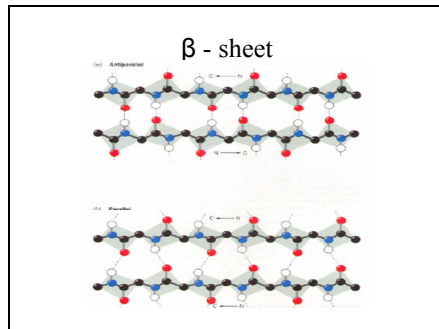
snímek 91



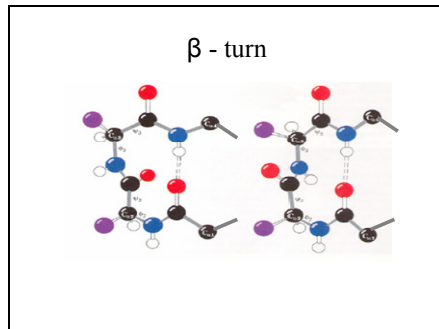
snímek 92



snímek 93



snímek 94



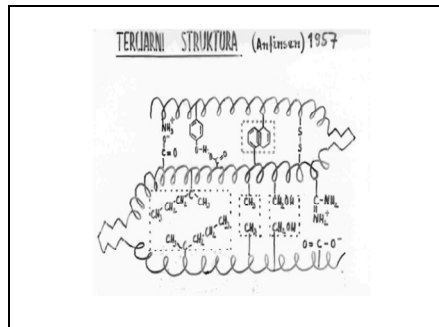
snímek 95

Terciální struktura

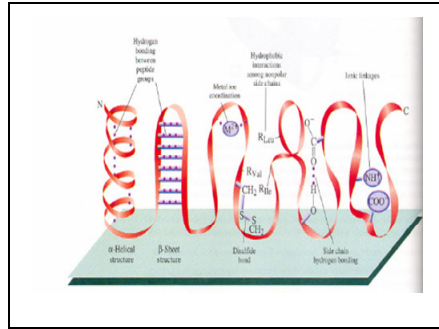
1. Iontové interakce
2. Dipolové interakce
3. Vodíkové můstky
4. Hydrofobní interakce
5. Bisulfidické můstky

Strukturní motivy - domény

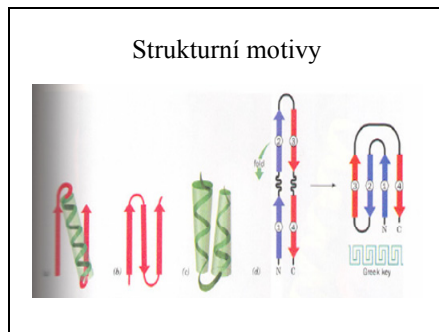
snímek 96



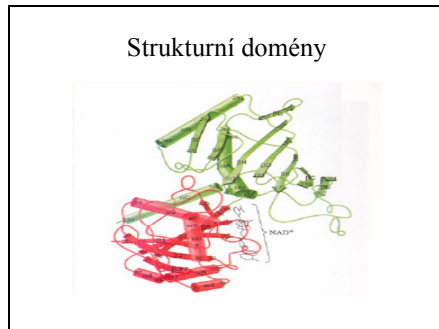
snímek 97



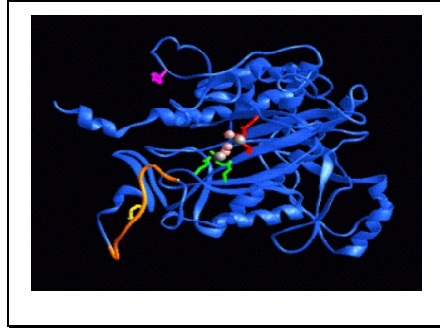
snímek 98



snímek 99



snímek 100



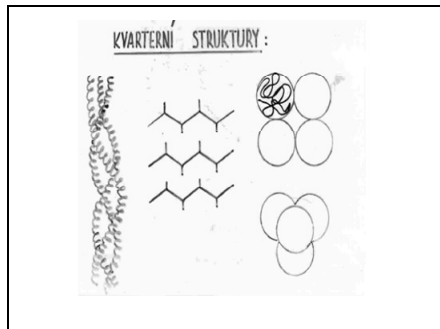
snímek 101

Kvaterní struktura

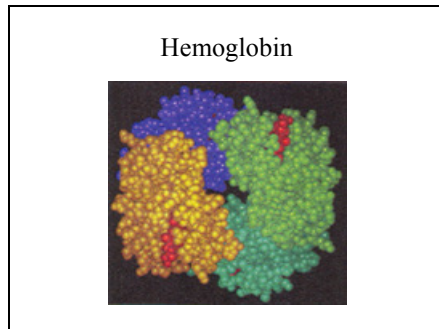
Podjednotkové složení - nekovalentní spojení - vodíkové můstky
- kovalentní spojení - bisulfidické můstky

Stanovení podjednotkového složení - SDS PAGE

snímek 102



snímek 103



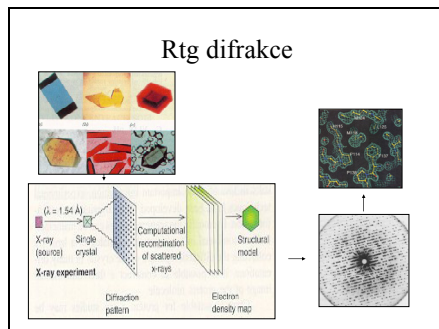
snímek 104

Studium konformace bílkovin
XIG difrakce - studium krystalů - BRAGG 1913
NMR - dvoj- a trojrozměrné - studium roztoků - posledních 15 let

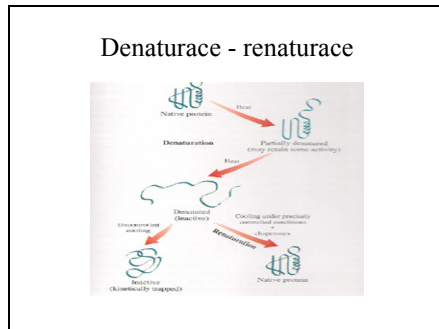
Stabilita konformace
Denaturace - fyzikální faktory - T, záření, tlak,
- chemické faktory - pH, organická rozpouštědla,
detergenty, těžké kovy, močovina.

Denaturace $\begin{cases} \text{reverzibilní - renaturace} \\ \text{ireverzibilní} \end{cases}$

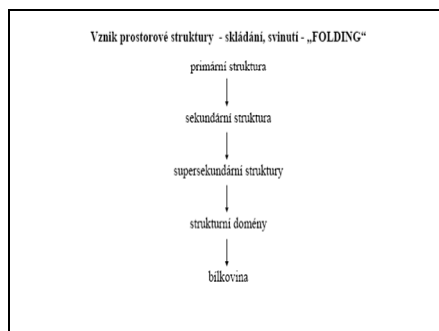
snímek 105



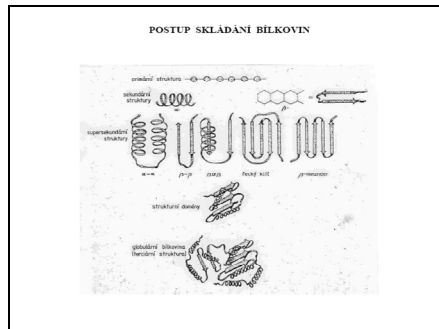
snímek 106



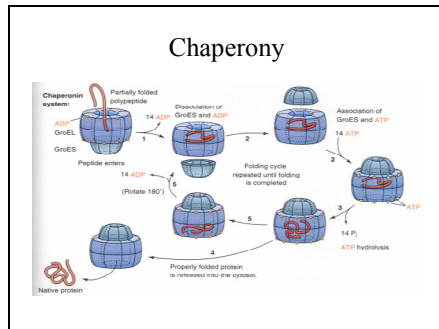
snímek 107



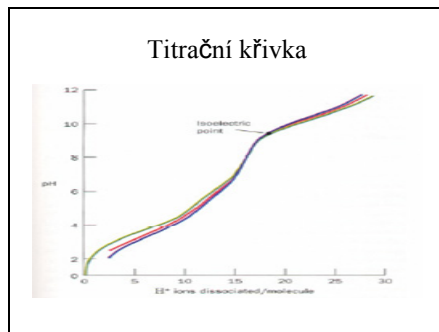
snímek 108



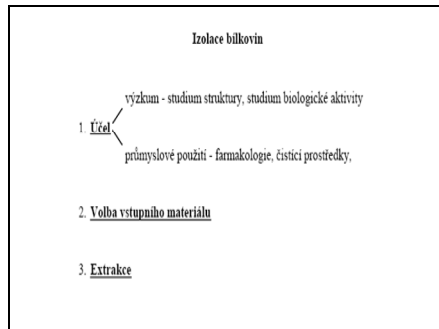
snímek 109



snímek 110



snímek 111



snímek 112

4. Purifikace

Srážecí metody - srážení neutrálním solem ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

- srážení organickými rozpouštědly
- pH srážení

Chromatografie - ionexová

- hydrofobní
- gelová permeační
- afinitní

Elektromigrační metody - elektroforéza nativní nebo SDS

- izoelektrická fokusace

snímek 113

Izolace proteinů

snímek 114

Literatura

- *Scopes* : Protein Purification
- *Harris* : Protein Purification Methods – Practical Approach
- *Deutcher* : Guide to Protein Purification
- *Janson* : Protein Purification
- *Kastner* : Protein Liquid Chromatography

snímek 115

Metody separace proteinů

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

snímek 116

Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

snímek 117

Plánování separace bílkovin

snímek 118

Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota

Závěr: získat vzorek o patřičné čistotě s vynaložením patřičného úsilí

snímek 119

Volba vstupního materiálu

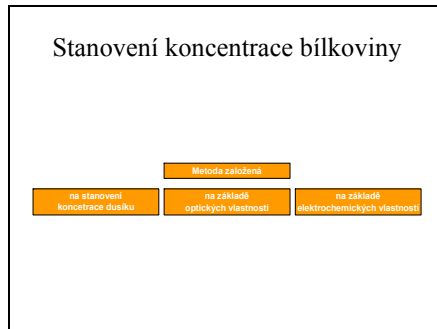
- Preparát z daného organismu
- Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- Preparát s nejmenším obsahem nečistot

snímek 120

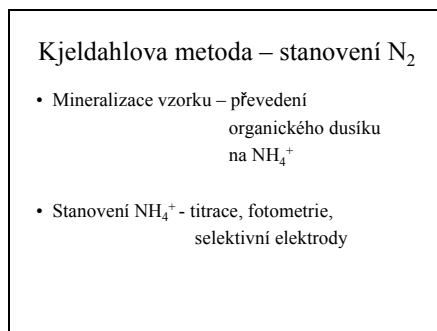
Sledování průběhu separace

| 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 % |
| | | | | | |

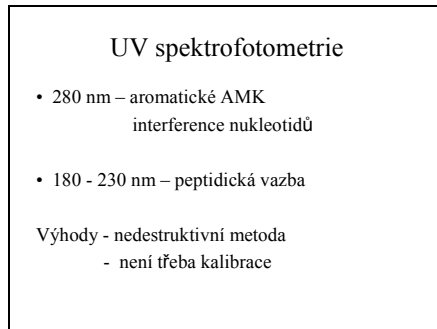
snímek 121



snímek 122



snímek 123



snímek 124

VIS spektrofotometrie


Přidavek činidla → barevný derivát

- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

snímek 125

Biuretová metoda

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



Měření : 540 – 560 nm
310 nm

snímek 126

Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany na molybdenovou modř

Měření : 725 nm

snímek 127

Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

Měření : 600 nm

snímek 128

Metoda dle Bradfordové

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

Měření : 595 nm

snímek 129

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 |

snímek 130

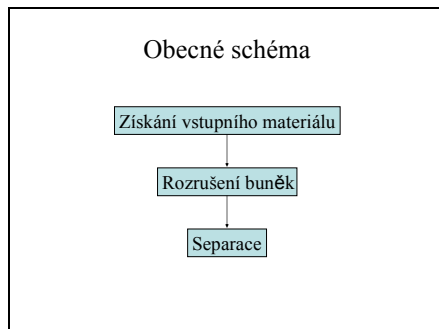
Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,
hormonální receptorové atd.

snímek 131

Vlastní separace

snímek 132



snímek 133

Vstupní materiál

snímek 134

Mikroorganismy
Bakterie, kvasinky, plísně, řasy
Výhody - lze je snadno získat v dostatečném množství
- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
- genetické inženýrství
- termofilní organismy

snímek 135

Bezobratlí
Hmyz, plži, mlži
Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

snímek 136

Živočišné tkáně

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

snímek 137

Rostlinné tkáně

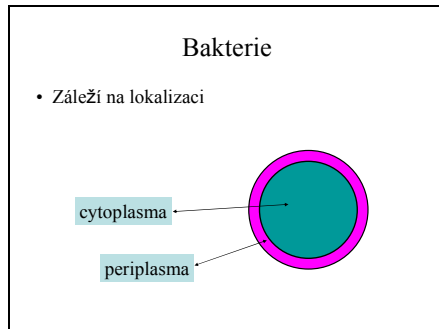
Špenát, řepa, hrách

Nevýhoda – problematický růst za
definovaných podmínek

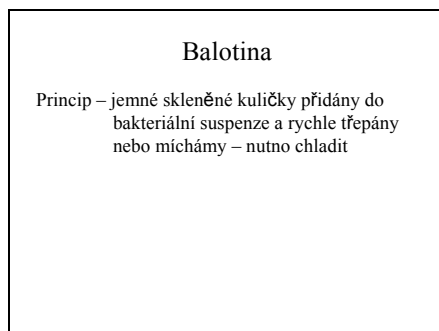
snímek 138

Rozbití a extrakce

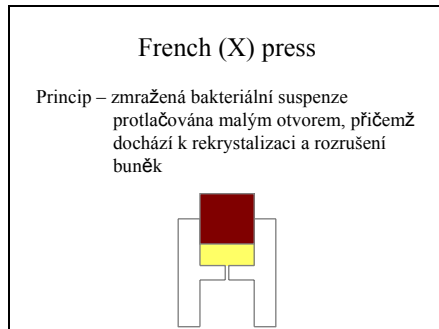
snímek 139



snímek 140



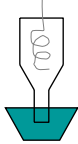
snímek 141



snímek 142

Ultrazvuk

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

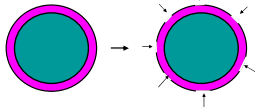


The diagram shows a glass beaker partially filled with a blue liquid. A vertical probe with a coiled wire at its tip is inserted into the liquid, with the tip submerged.

snímek 143

**Lysozym + osmotický šok
(mírný osmotický šok)**

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu,
následně je bakteriální suspenze zředěna
destilovanou H₂O – bakterie popraskají



The diagram illustrates a cell undergoing osmotic shock. On the left, a cell is shown as a solid blue circle with a pink outer boundary. An arrow points to the right, where the cell is shown as a larger, more irregular blue circle with a pink outer boundary. Small arrows point outwards from the pink boundary, indicating the cell is bursting.

snímek 144

Živočišné tkáně

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



The diagram shows a Potter-Elvehjem homogenizer, which consists of a glass mortar with a pestle and a glass homogenizer tube with a T-shaped bottom.

snímek 145

Rostlinné tkáně

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

snímek 146

Srážecí metody

snímek 147

Srážení

- Nezaměňovat s denaturací – bílkoviny zůstávají v nativním stavu
- První metody používané pro separaci bílkovin – EtOH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Filtrace nahrazena centrifugací

snímek 148

Rozpustnost bílkoviny

- Vlastnostmi bílkoviny – distribuce hydrofobních a hydrofilních skupin na povrchu bílkoviny



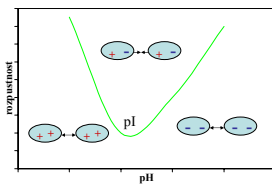
snímek 149

Rozpustnost bílkoviny

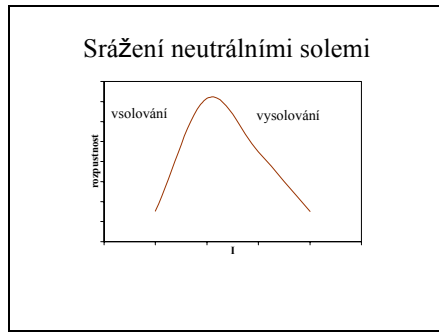
- Vlastnostmi roztoku – pH, iontová síla, org. rozpouštědla, org. polymery, teplota

snímek 150

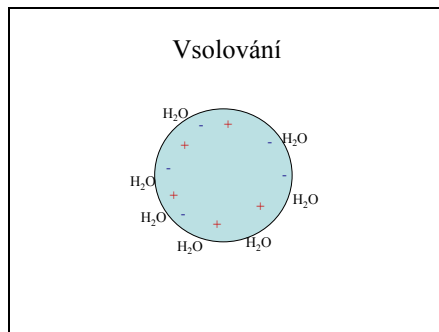
Izoelektrická precipitace



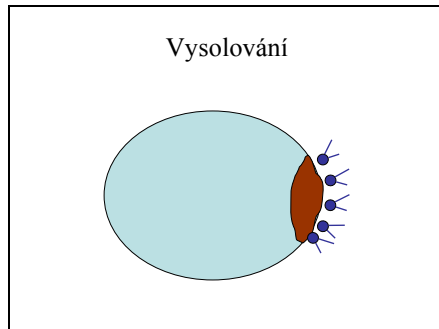
snímek 151



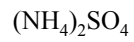
snímek 152



snímek 153



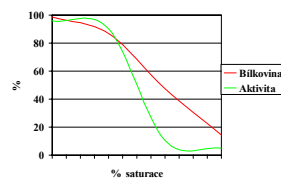
snímek 154



- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm³ umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota 1,29 g/cm³)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý

snímek 155

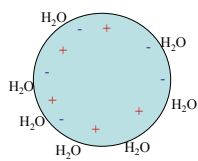
Srážení - dvojstupňově



snímek 156

Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny



snímek 157

Srážení org.rozpouštědly misitelnými s vodou

- COHN – separace plazmatických bílkovin EtOH
- Nutno provádět při $T < 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, při větší teplotě dochází k denaturaci
- Dvojstupňově
- Přídavky z tabulky nebo podle vzorce

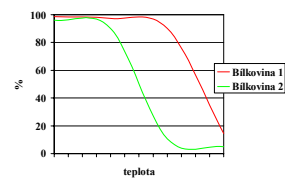
snímek 158

Srážení selektivní denurací

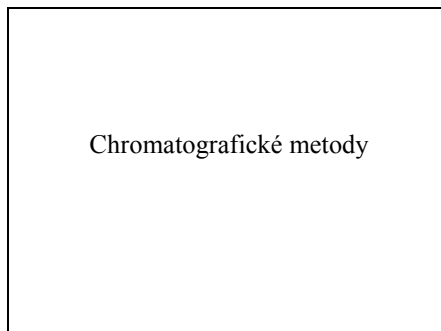
- Při této metodě denaturujeme balastní bílkoviny, cílová bílkovina musí zůstat z 85 - 90 % v nativním stavu.
- Denaturační vlivy – T, pH, org. rozpouštědla
- Bílkovina musí nejen denaturovat i precipitovat

snímek 159

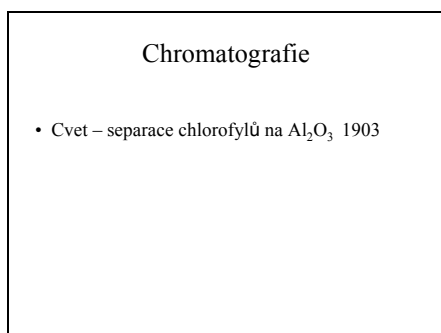
Tepelná denaturace



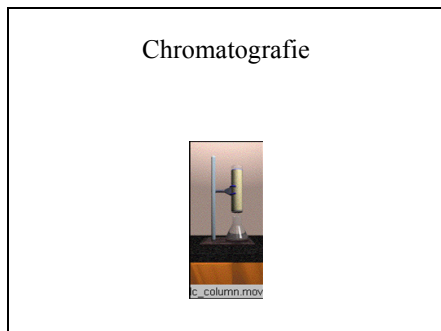
snímek 160



snímek 161



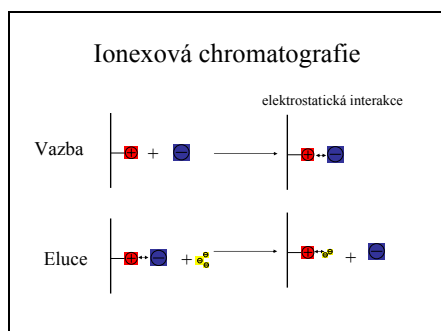
snímek 162



snímek 163



snímek 164



snímek 165

Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů
silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) OSO_3^-
slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM) COO^-
- Anexy - + vazba aniontů
silné - diethylaminoetyl(DEAE)
slabé - triethylaminoetyl(TEAE)

snímek 166

Ionexová chromatografie

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
 - Eluce – gradientová
 - Zvyšováním iontové síly
 - Změnou pH
 - Afinitní eluce
- Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufru

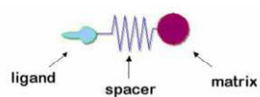
snímek 167

Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C₈, -fenyl
 - Mobilní fáze – vodné roztoky
1.7 M (NH₄)₂SO₄
 - Eluce – snížením iontové síly
- Použití : purifikace bílkovin

snímek 168

Afinitní chromatografie



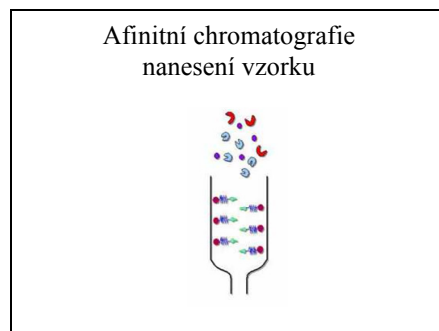
snímek 169

Afinitní páry

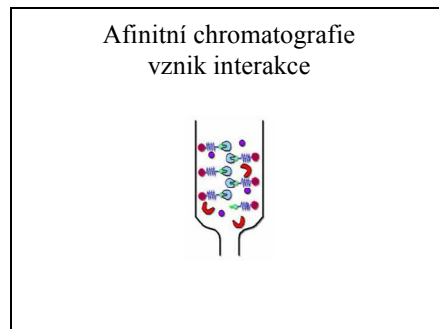
| Ligand | Bílkovina | K_D (M) |
|---------------|-------------------------|------------------|
| antigen | polyklonální protilátka | $10^8 - 10^{10}$ |
| antigen | monoklonální protilátka | $10^{12} - 10^8$ |
| biotin | avidin | 10^{15} |
| sacharid | lektin | $10^6 - 10^3$ |
| hormon, toxin | vazebný protein | $10^7 - 10^{12}$ |
| substrát | enzym | $10^7 - 10^3$ |
| inhibitor | enzym | $10^{14} - 10^6$ |

$K_D = 10^8 - 10^6$ M

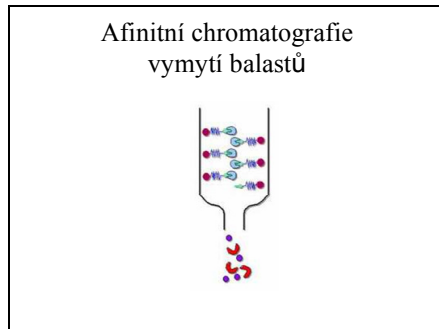
snímek 170



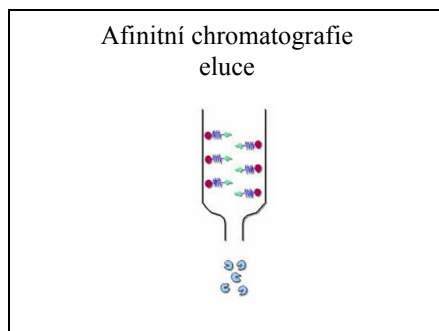
snímek 171



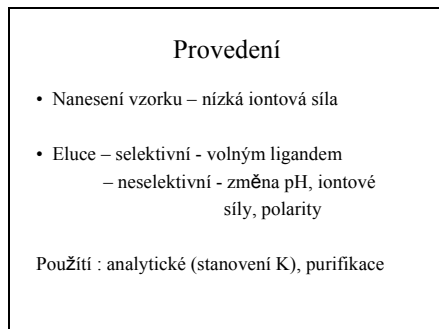
snímek 172



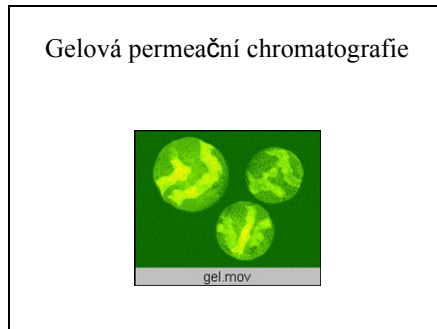
snímek 173



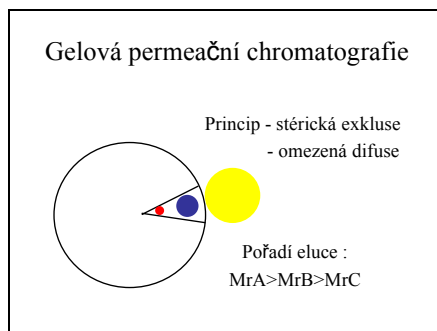
snímek 174



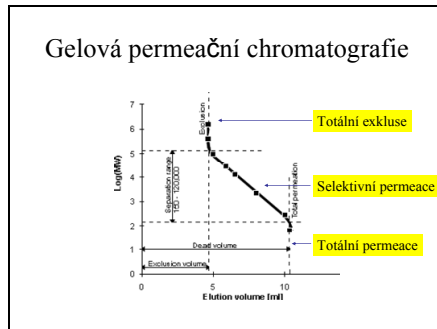
snímek 175



snímek 176



snímek 177



snímek 178

Gelová permeační chromatografie

- Nanášení vzorku – objem vzorku < 2% objemu kolony
- Eluce – izokratická

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

snímek 179

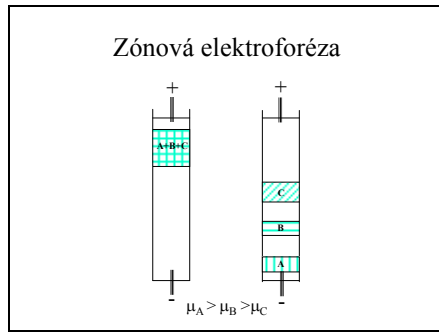
Elektromigrační metody

snímek 180

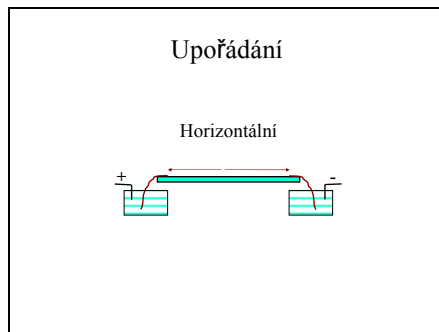
Podstata

*„Pohyb elektricky nabitých částic
v elektrickém poli“*

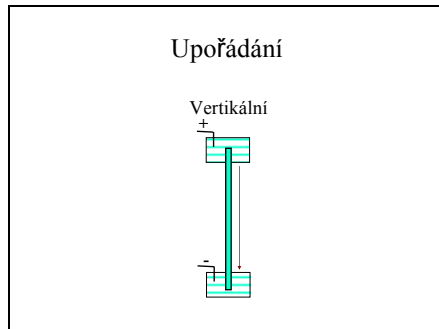
snímek 181



snímek 182



snímek 183



snímek 184

Polyakrylamid

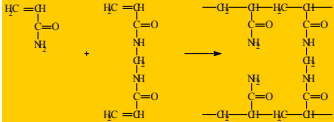
Složení – kopolymer akrylamidu a
N,N'-metylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky
- **Monomery jsou neurotoxiny !!!!!**

Použití : analýza bílkovin

snímek 185

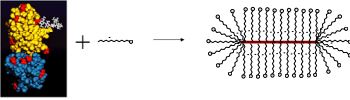
Polyakrylamid



snímek 186

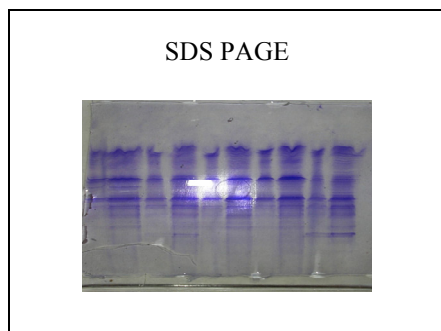
SDS PAGE

$\text{CCCCCCCCCCCCCCCCOSO}_3\text{Na}^+$

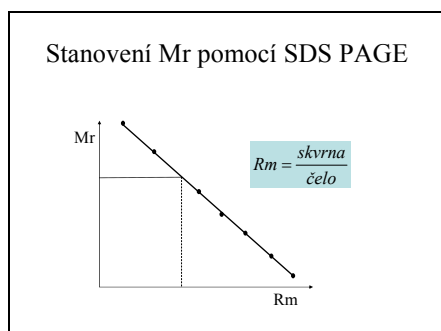


1 g bílkoviny váže 1.4 g SDS \Rightarrow
uniformní náboj na jednotku MW

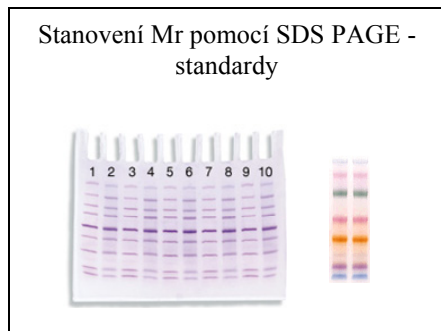
snímek 187



snímek 188



snímek 189

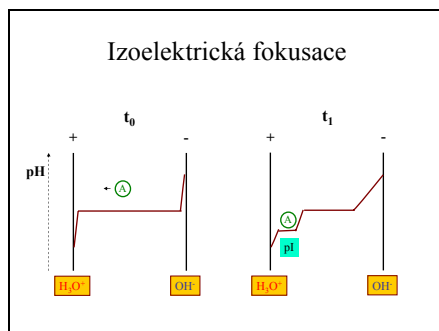


snímek 190

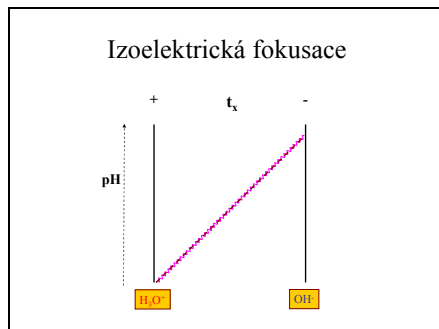
Izoelektrická fokusace

„Elektroforéza v gradientu pH, Částice jsou separovány podle svých pI“

snímek 191



snímek 192



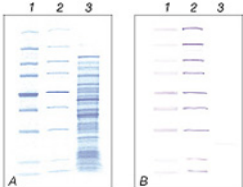
snímek 193

Izoelektrická fokusace analytická

- **Provedení** - v gelech – PAGE, agarosa
- **Použití** - sledování komplexních směsí
 - izoenzymové složení
 - stanovení pI – rozřezání a eluce
 - μpH elektrody
 - pI standardy

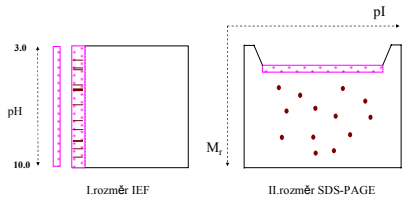
snímek 194

Izoelektrická fokusace analytická

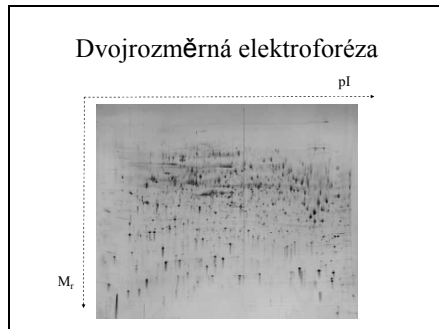


snímek 195

Dvojměrná elektroforéza



snímek 196



snímek 197

5. Charakterizace - stanovení pI, MW, UV VIS spektra, CD spektra,
fluorescenční spektra, AMK analýza a sekvenace, krystalizace -
RTG analýza, NMR spektra

snímek 198

Rozdělení bílkovin

Podle celkového tvaru molekul

A. Vláknité - fibrilární bílkoviny - SKLEROPROTEINY
kolagen, $\alpha + \beta$ keratin, elastin

B. Kulovité - globulární bílkoviny - SFEROPROTEINY

Bílkoviny $\left\{ \begin{array}{l} \text{globulární} - \text{katalýza, transport, pohyb, imunita,} \\ \text{vzruch} \\ \text{fibrilární} - \text{podpora} \end{array} \right.$

snímek 199

Podle chemického složení

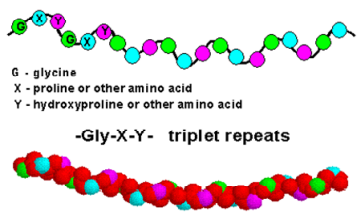
A. Jednoduché

B. Složené ⇒ prosthetická skupina + apoprotein

Fosfoproteiny - H_2PO_4
Glykoproteiny - cukry
Metaloproteiny - kovy
Lipoproteiny - lipidy
Nukleoproteiny - nukleové kyseliny

snímek 200

Collagen α -chain primary structure

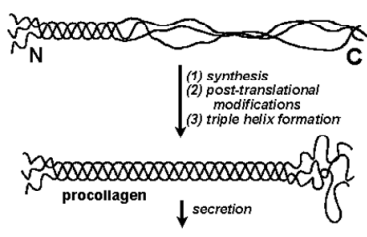


G - glycine
X - proline or other amino acid
Y - hydroxyproline or other amino acid

-Gly-X-Y- triplet repeats

snímek 201

Formation of collagen: intracellular processing

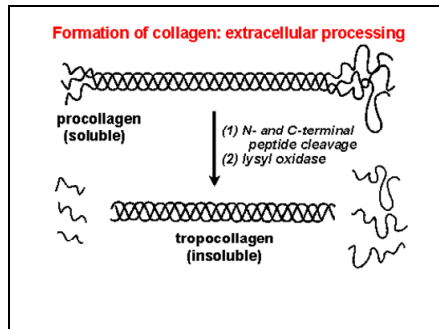


(1) synthesis
(2) post-translational modifications
(3) triple helix formation

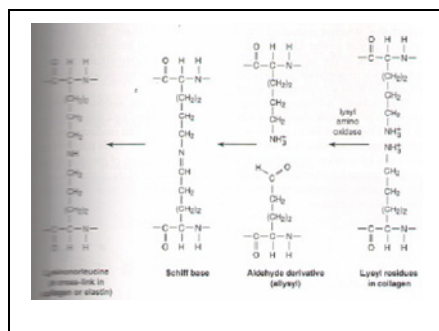
procollagen

secretion

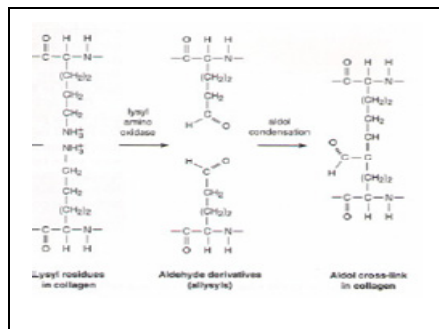
snímek 202



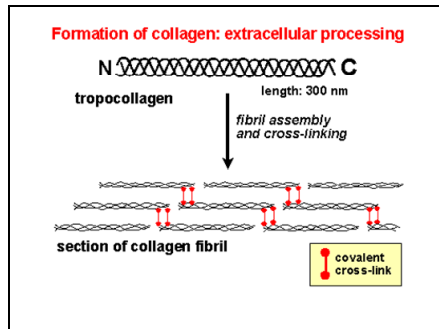
snímek 203



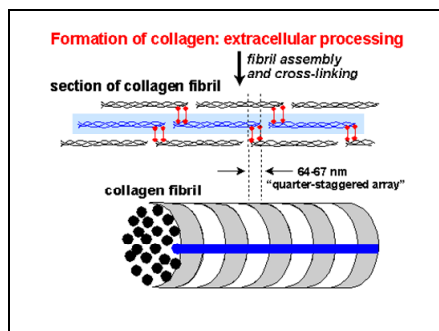
snímek 204



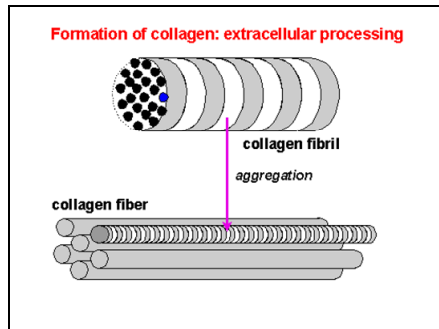
snímek 205



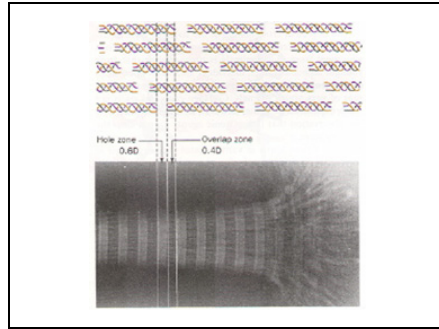
snímek 206



snímek 207



snímek 208



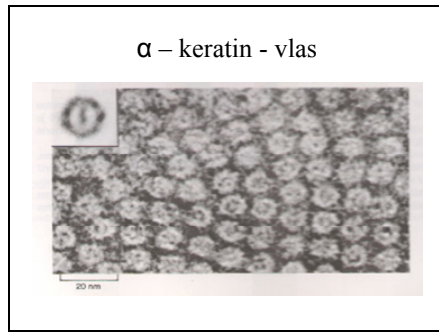
snímek 209



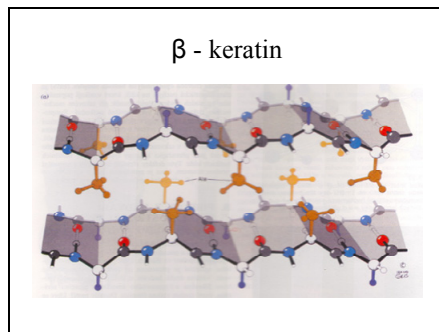
snímek 210



snímek 211



snímek 212



snímek 213

