

FRAKCIONACE BUNĚK / SEPARAČNÍ A ANALYTICKÉ TECHNIKY / PROTEINY / LIPIDY / NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY /

- ◆ **HOMOGENIZACE TKÁNÍ, BUNĚK, CENTRIFUGAČNÍ
TECHNIKY**
- ◆ **KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE, SEPARACE A
ANALYTICKÁ STANOVENÍ, MALDI TOF**
- ◆ **PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE**

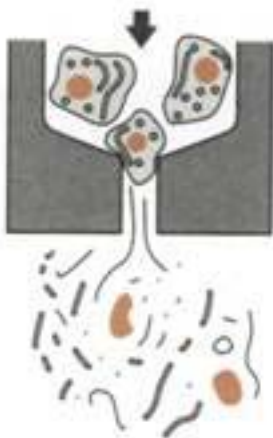
HOMOGENIZACE TKÁNÍ / BUNĚK



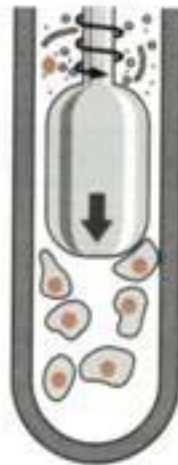
- ① rozbití buněk ultrazvukem



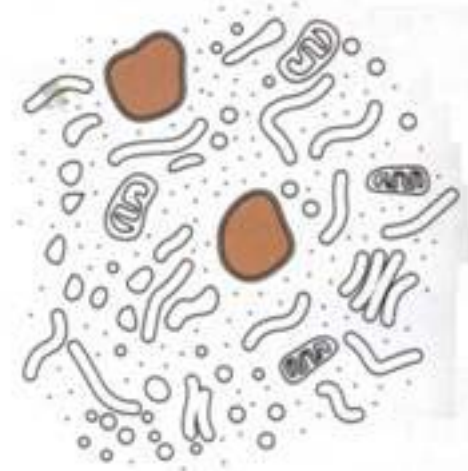
- ② použití mírného detergentu na perforaci plasmatické membrány



- ③ protlačení buněk malým otvorem

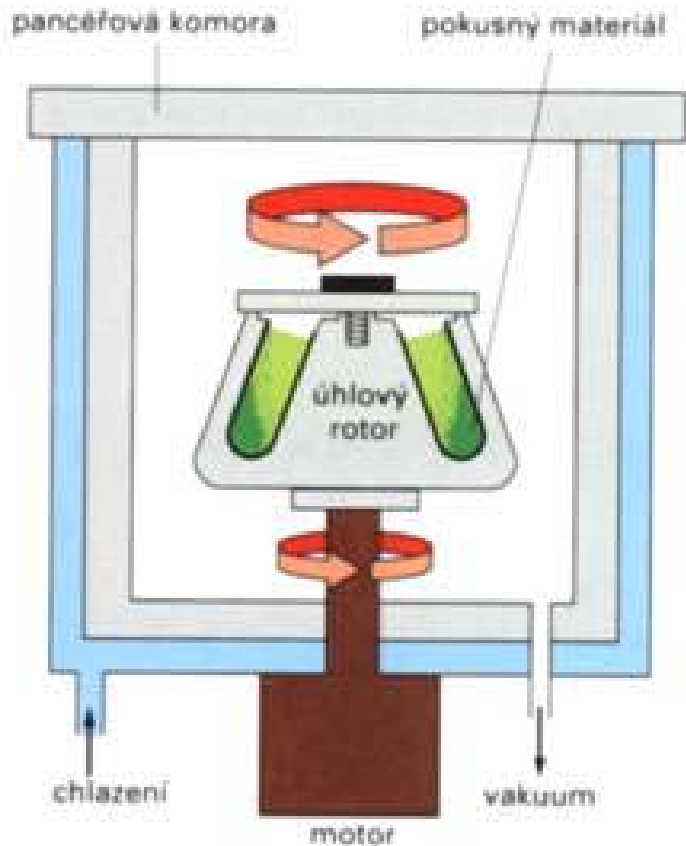


- ④ rozbití buněk dobře těsnícím rotačním pístem v tlustostěnné

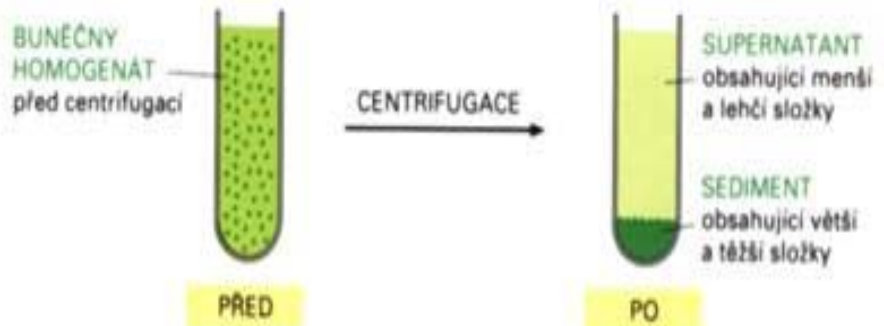
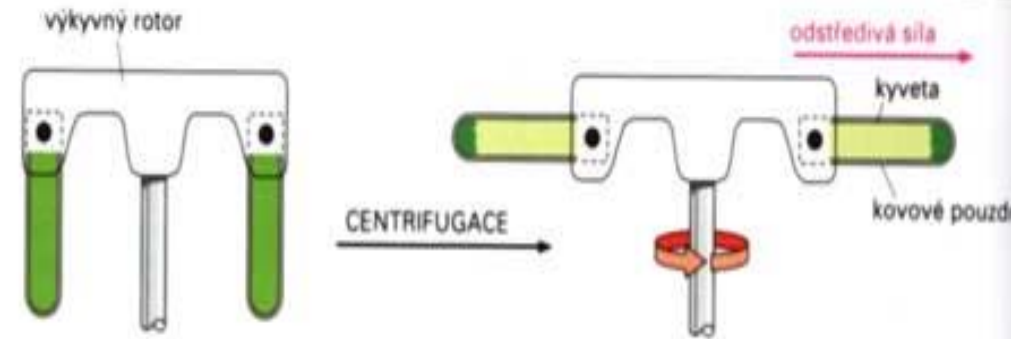


CENTRIFUGACE / ULTRACENTRIFUGACE:

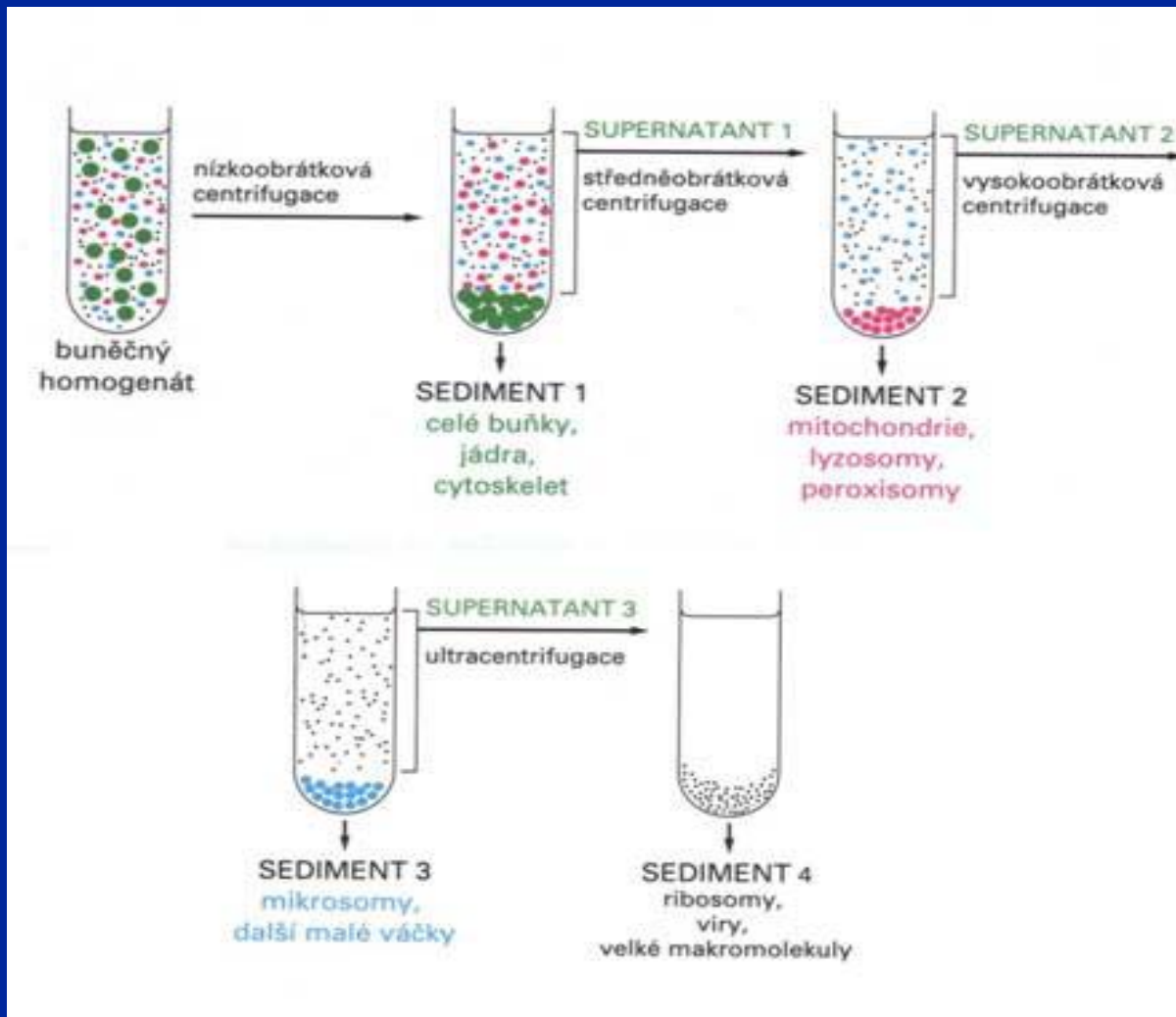
úhlový rotor



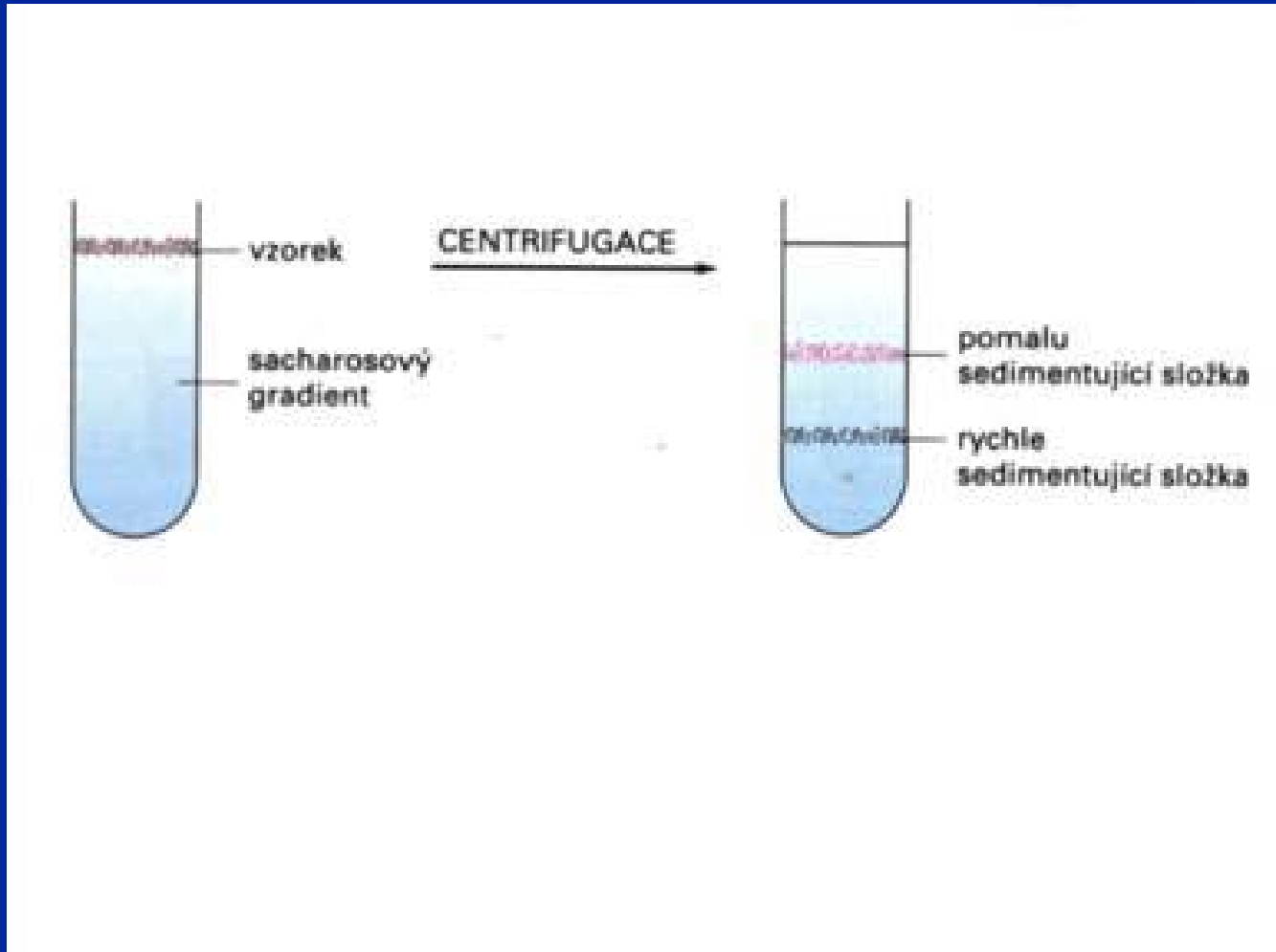
výkyvný rotor



DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE: izolace subcelulárních frakcí

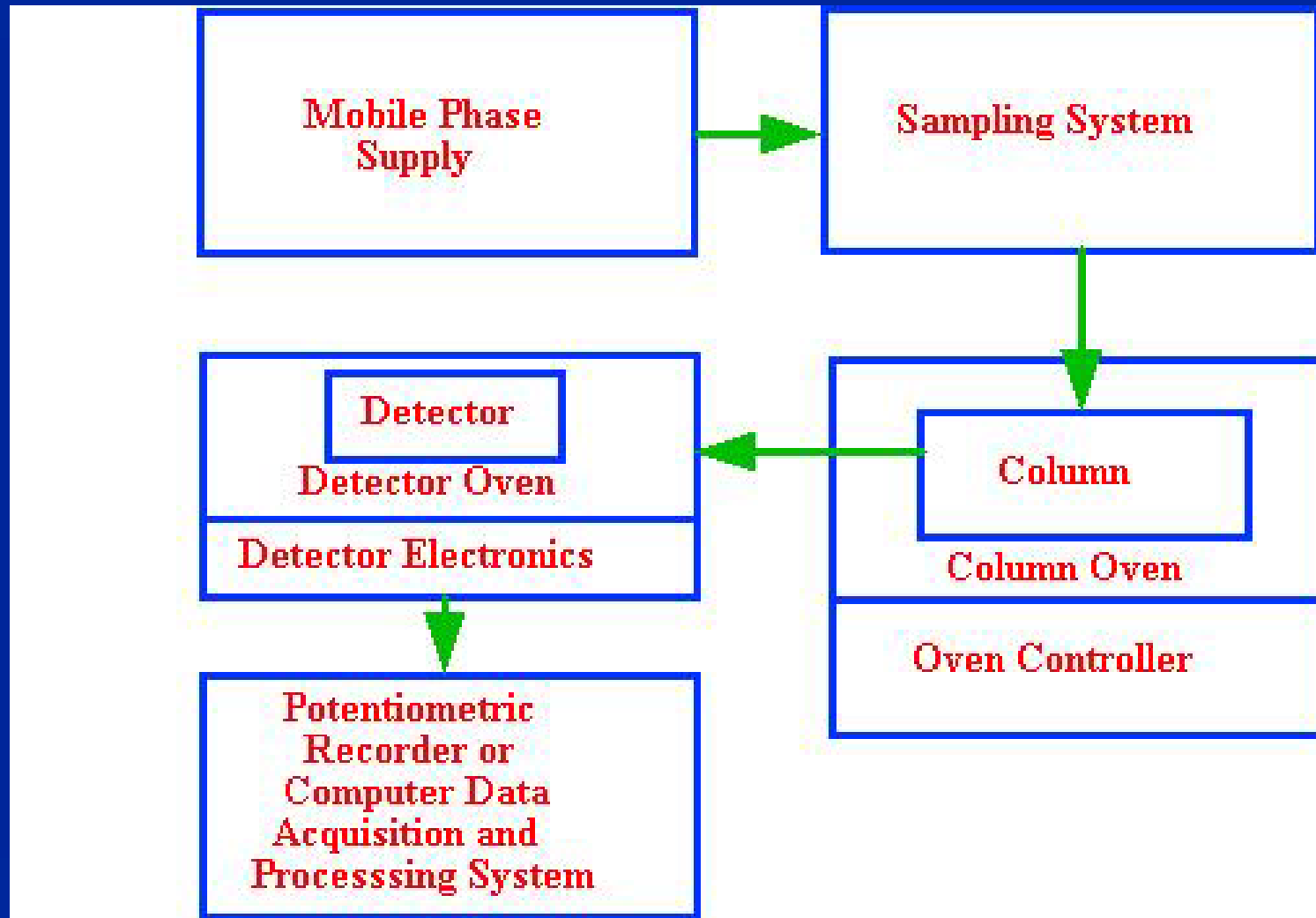


CENTRIFUGACE V SACHARÓZOVÉM GRADIENTU (např. izolace nukleárního receptoru s navázaným ligandem)



Kapalinová chromatografie (LC, HPLC)

PUMPA
↓
DÁVKOVÁNÍ
↓
KOLONA
↓
DETEKTOR



HPLC /LC/SPE: typy stacionárních a mobilních fází

◆ REVERSNÍ FÁZE

nepolární stacionární fáze (C18, C8, fenyl) vs. mobilní fáze se snižující se polaritou (voda/metanol, voda/acetonitril/THF)

◆ NORMÁLNÍ FÁZE / IONEXOVÁ CHROMATOGRRAFIE

polární stacionární fáze (amino-, OH-) vs. mobilní fáze se zvyšující se polaritou

◆ GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

◆ AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

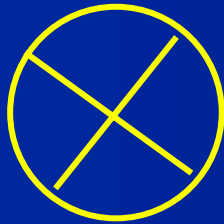
specifické zakončení stacionární fáze (protilátka, SH- apod.), rozdělení na základě specifických interakcí

HPLC /LC: typy detektorů

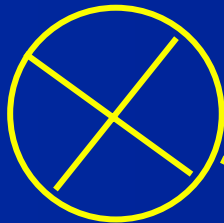
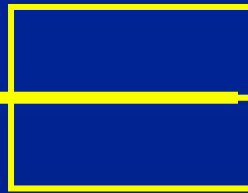
- ◆ **FOTOMETRICKÝ** (změna absorpce, jedna vln. délka nebo diode array detektor → spektrum analytu)
- ◆ **FLUORIMETRICKÝ** (změna fluorescence, jedna excitační a jedna emisní vln. délka nebo diode array)
- ◆ **RADIOMETRICKÝ** (sloučeniny značené ^3H , ^{13}C , ^{32}P , ^{33}P)
- ◆ **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR** (stanovení m/z)
- ◆ **další detektory**

Uspořádání spektrofotometrického a fluorimetrického detektoru

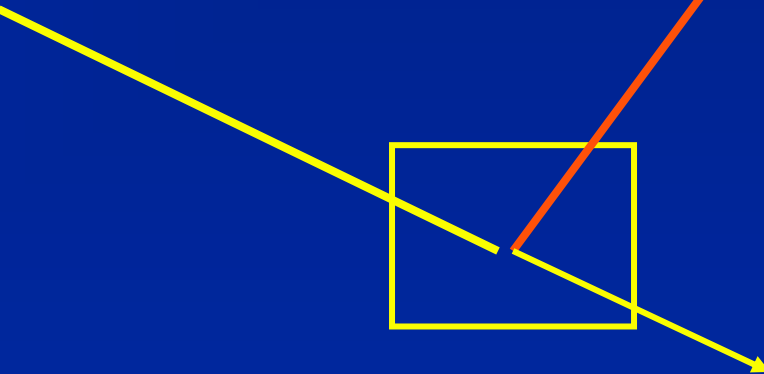
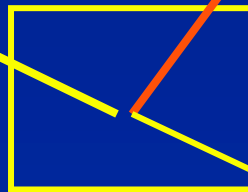
zdroj světelného paprsku



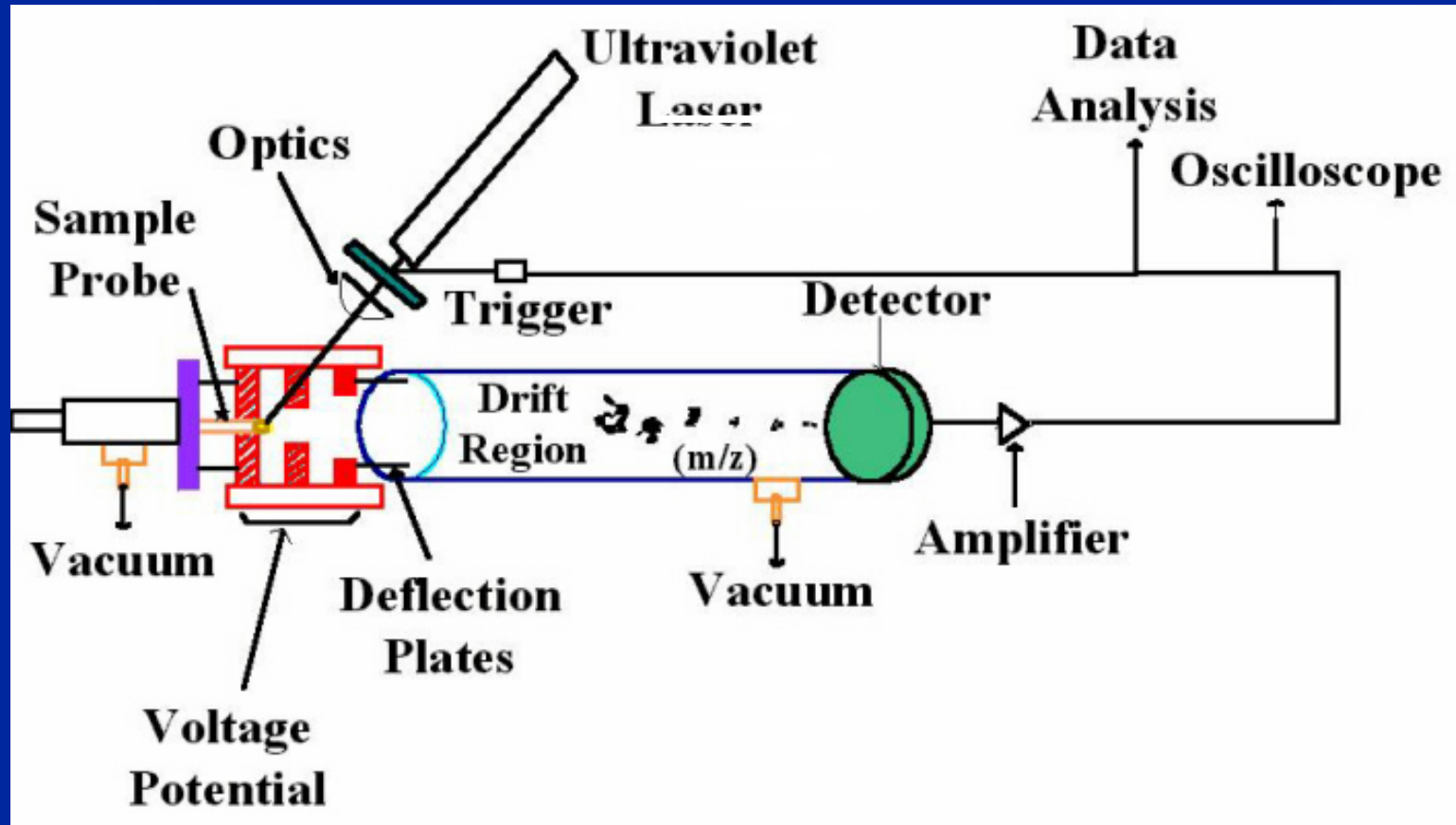
absorpce světla



emise fluorescence

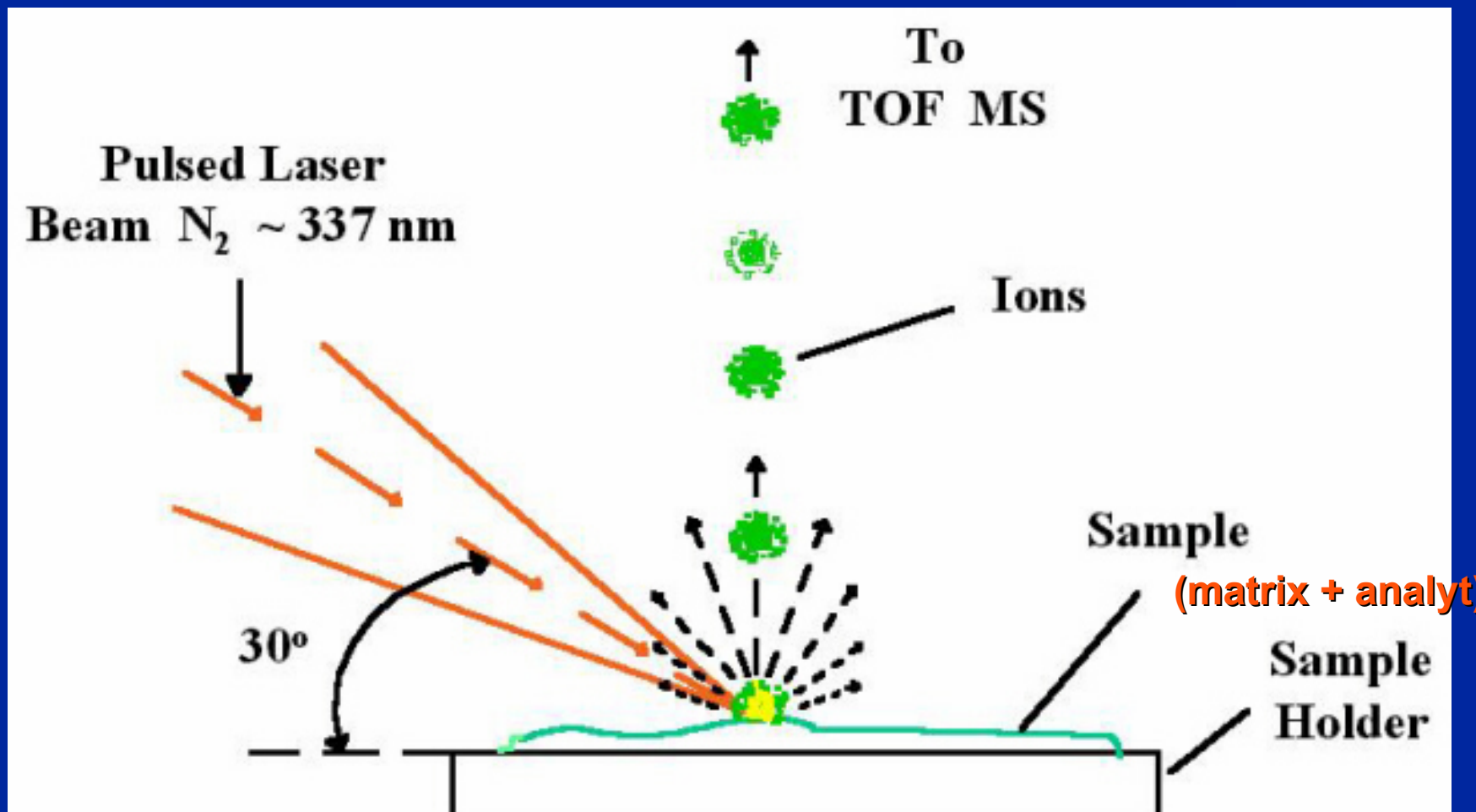


MALDI TOF-MS (Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry): základní uspořádání

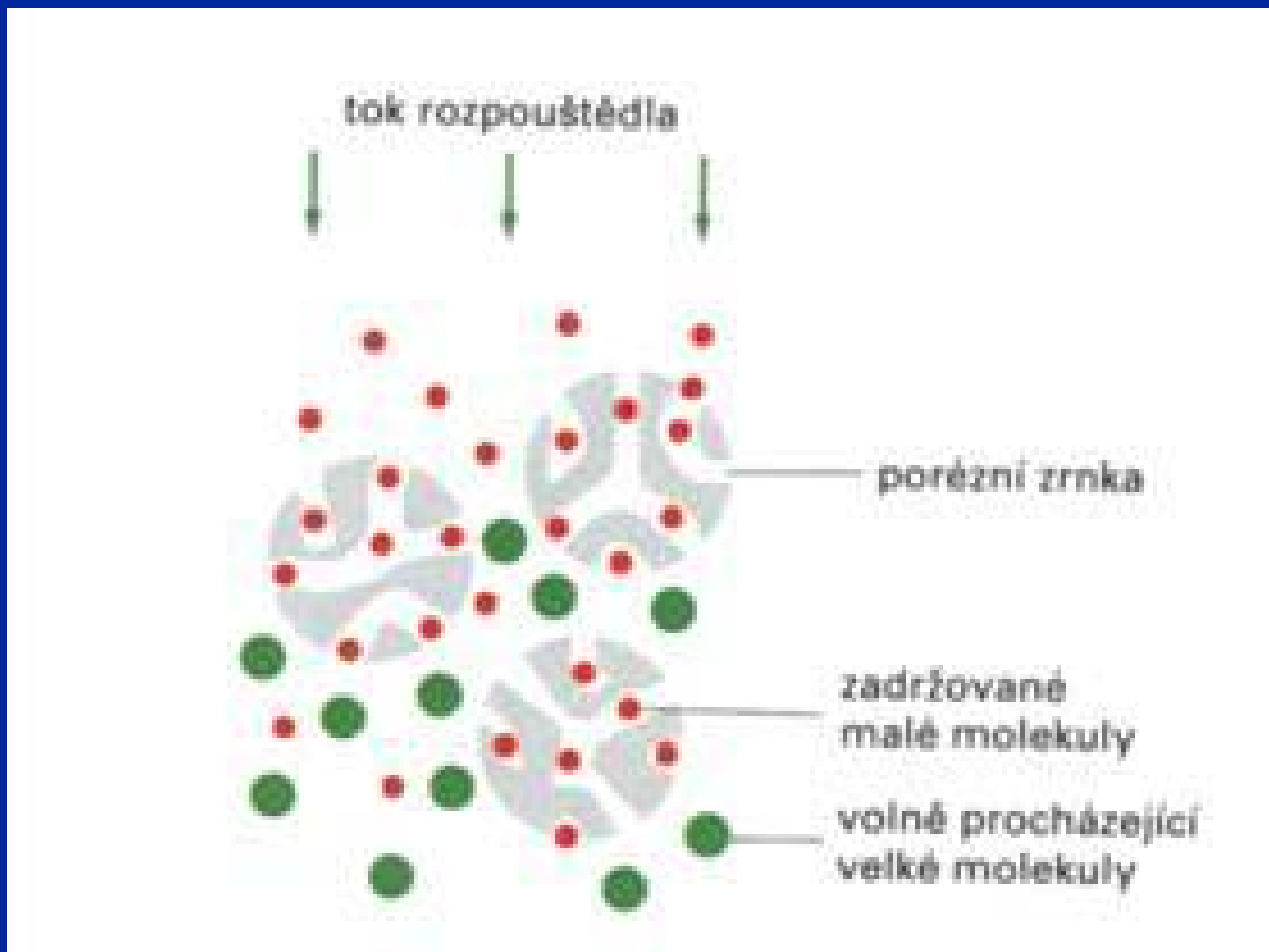


konverze dat: TOF spektrum ($t = (m/z)^{1/2}$) \longrightarrow hmotnostní spektrum

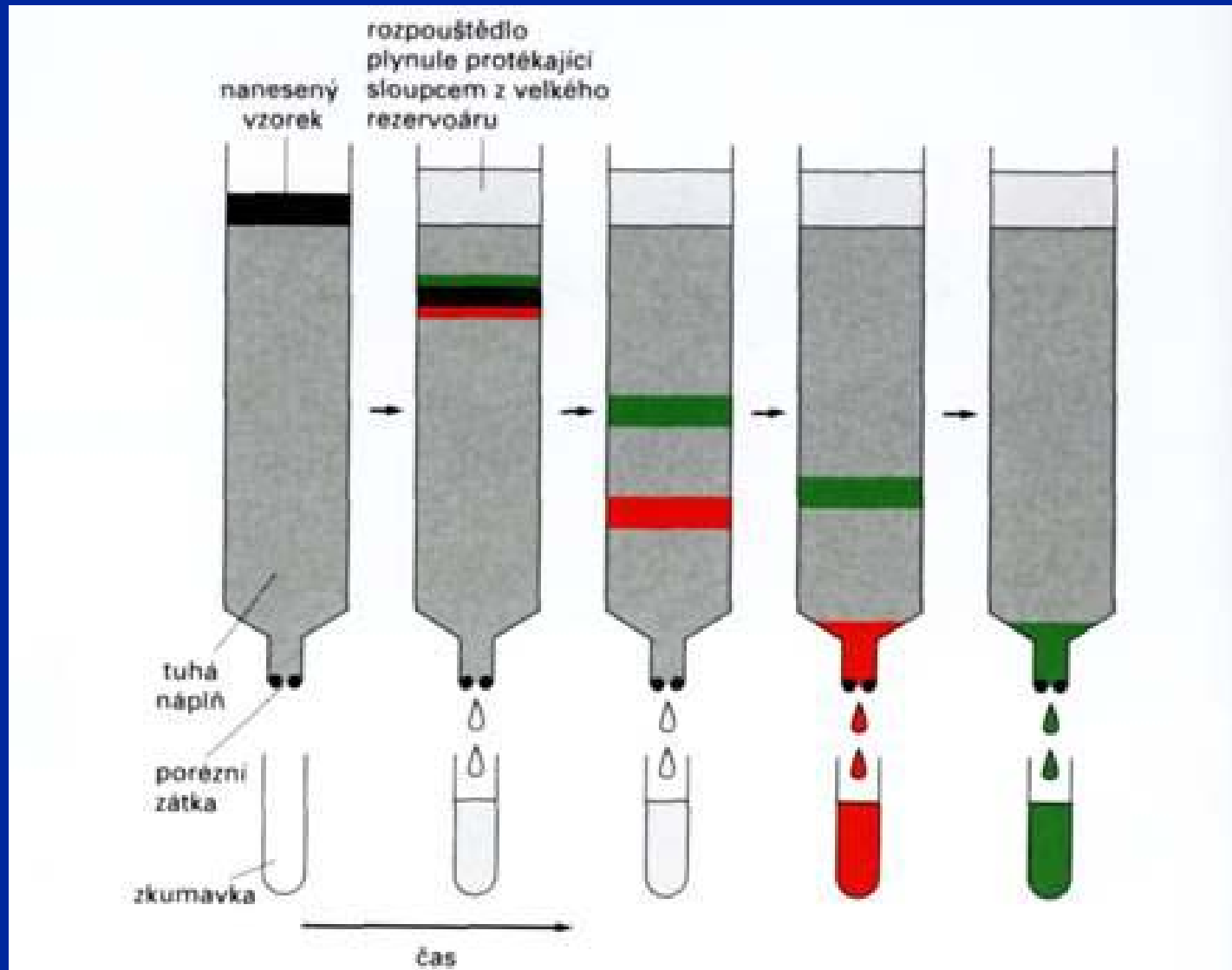
MALDI TOF-MS (Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry): ionizace vzorku



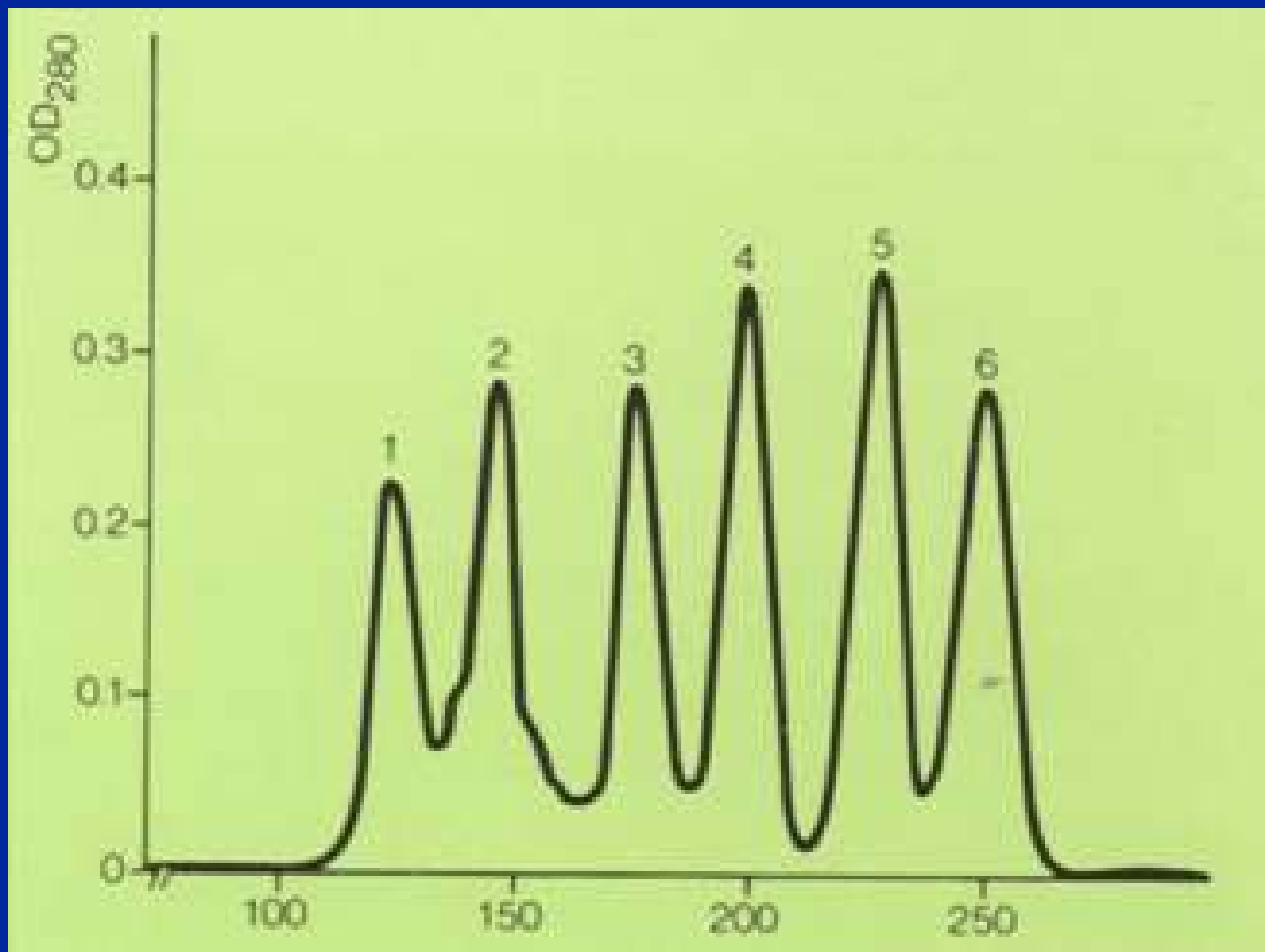
Gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)



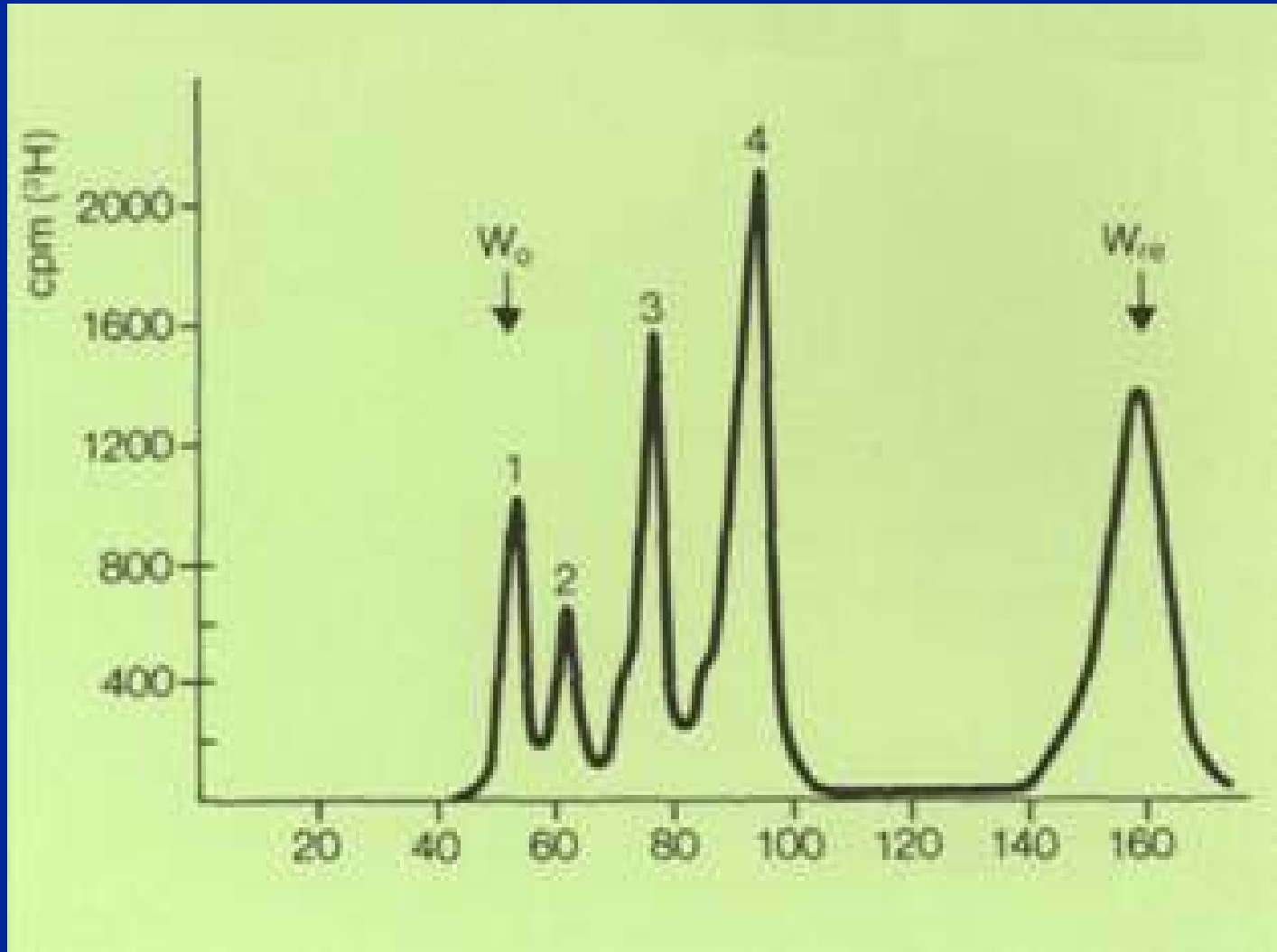
nízkotlaká LC, SPE: separace bílkovin a nízkomolekulárních látek (nukleotidy, metabolity, xenobiotika)



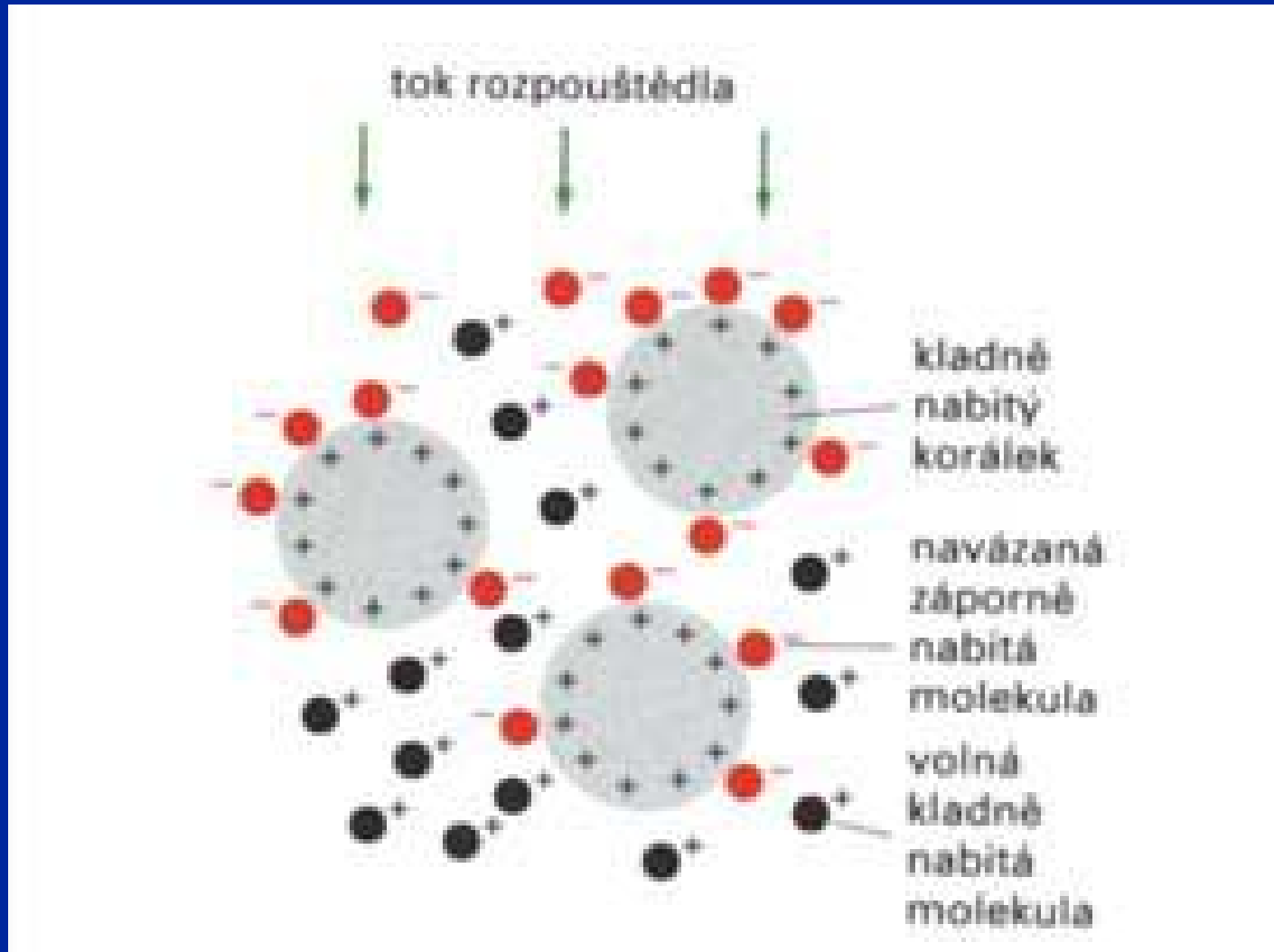
Gelová filtrace: separace standardních bílkovin / spektrofotometrická detekce



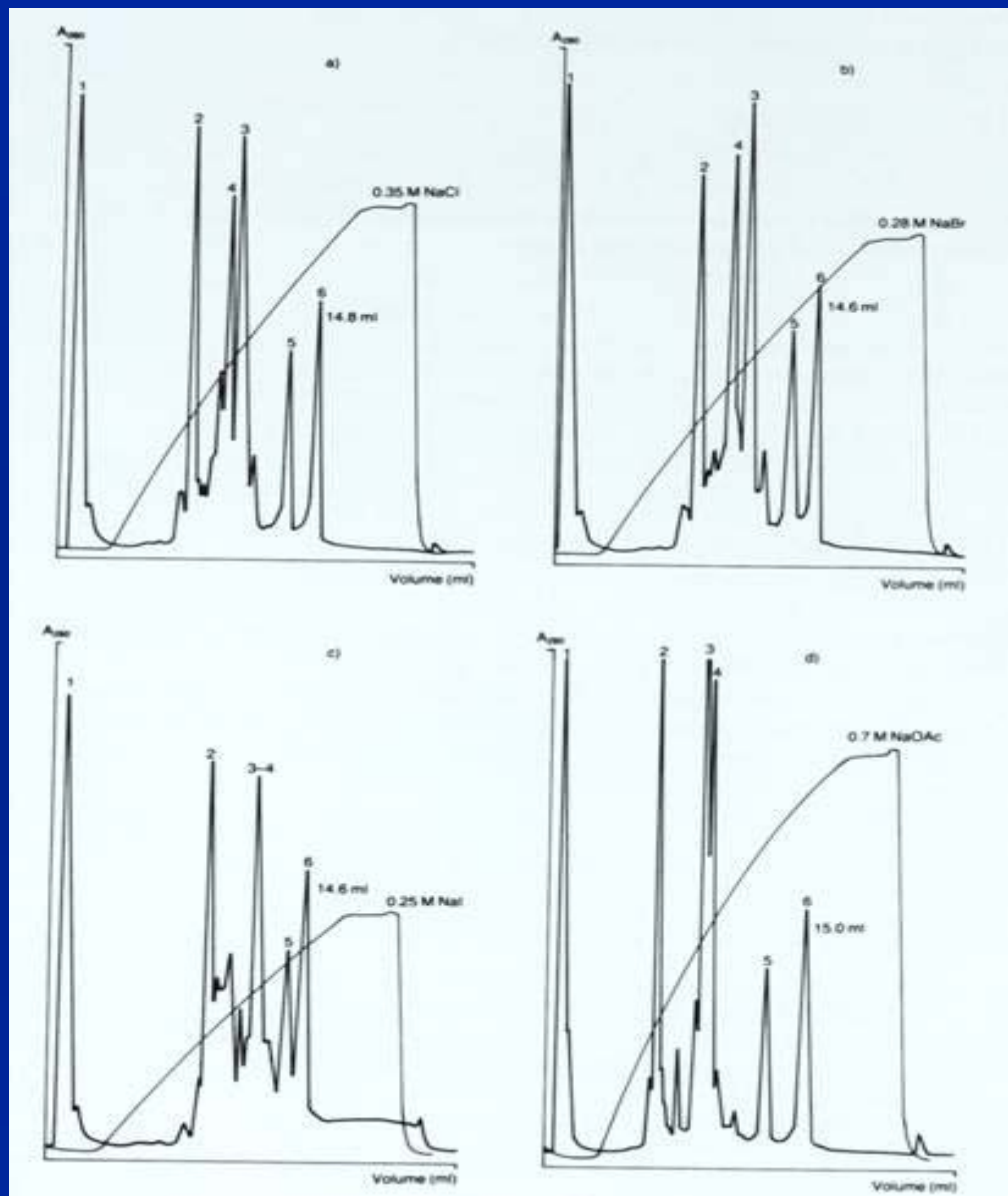
Gelová filtrace s radiometrickou detekcí specifickou pro značený substrát a metabolity



Iontová chromatografie

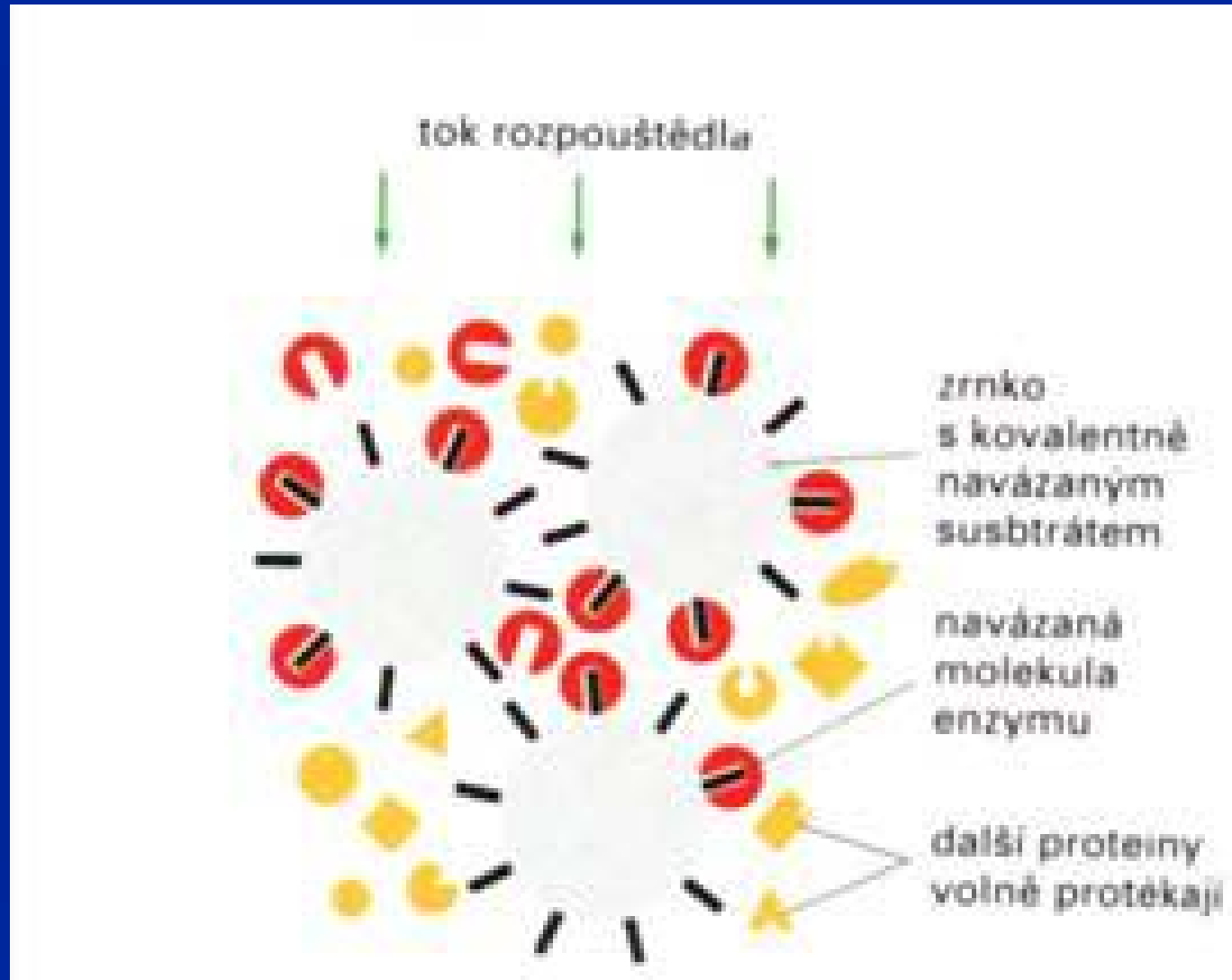


Ionexová HPLC: rozdělení proteinů zvyšující se iontovou silou mobilní fáze



Afinitní chromatografie

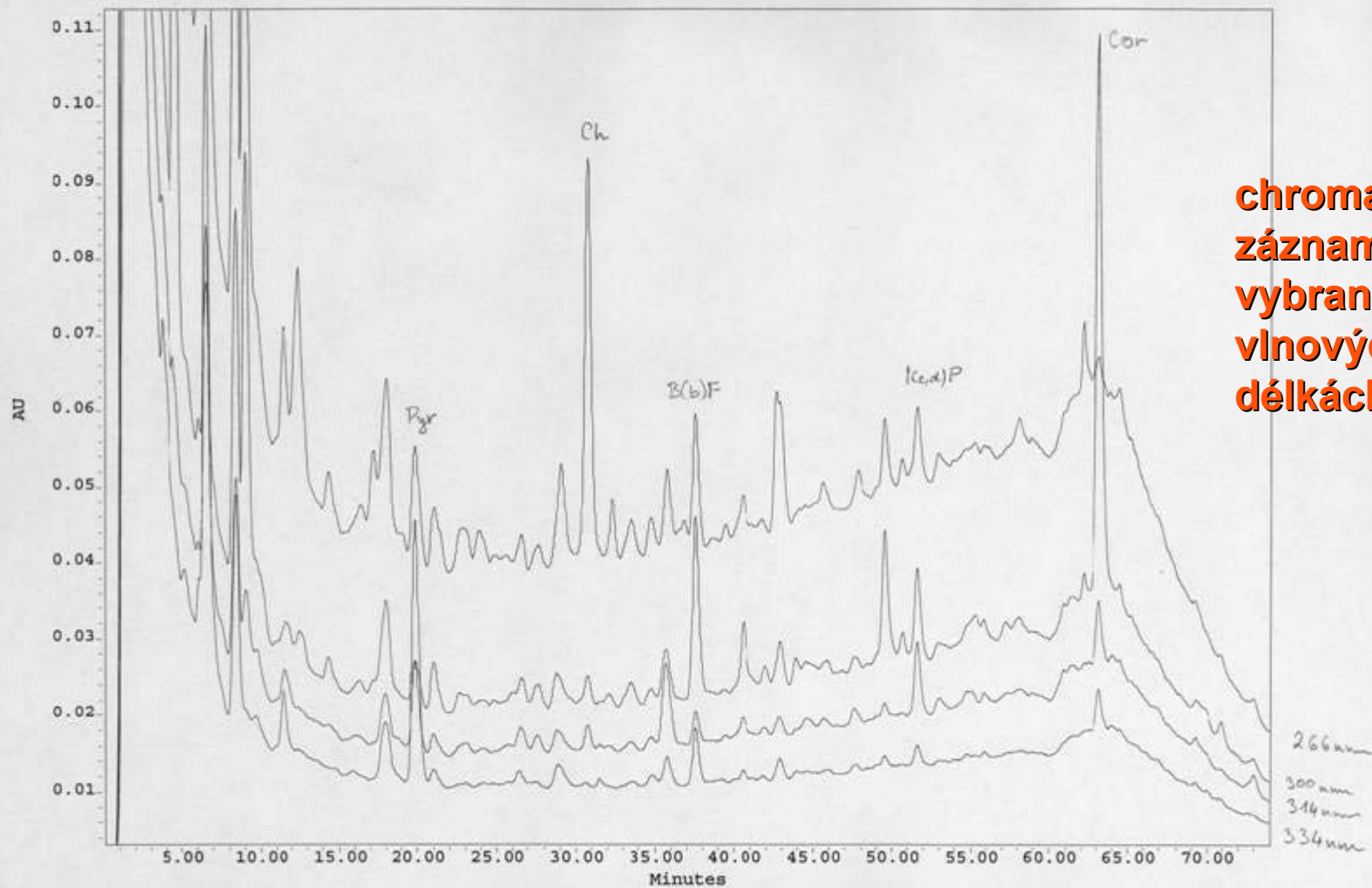
Na sorbentu
navázaný
substrát,
protilátka,
koenzym
apod.



PŘÍKLADY HPLC ANALÝZ

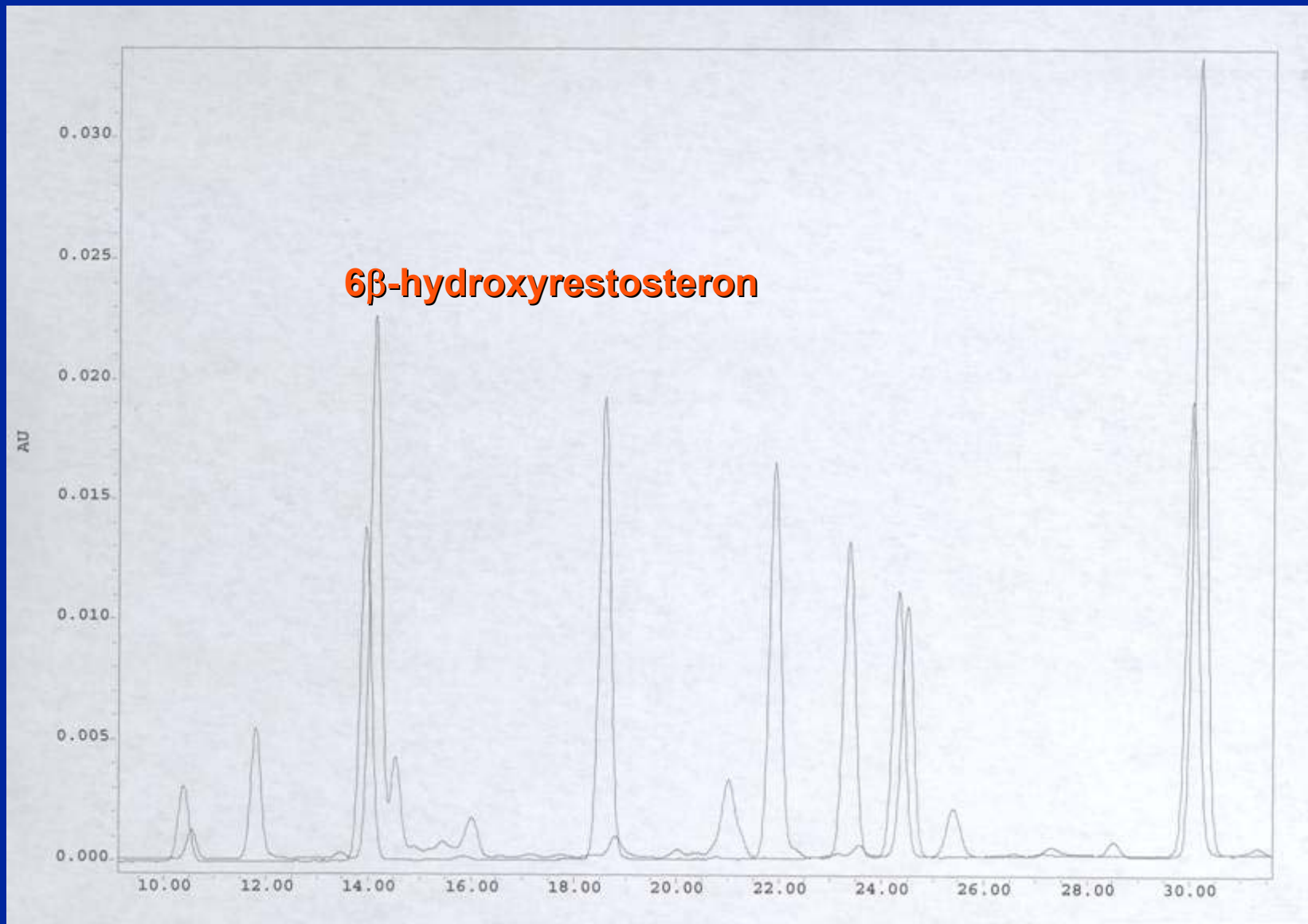
- ◆ Koncentrace steroidního hormonu, stanovení aktivity CYP3A isoenzymů (6beta-OH-T), CYP19 (T → E2)
- ◆ Koncentrace mastných kyselin, stanovení aktivity PLA, COX, LOX apod.
- ◆ Stanovení cizorodých látek, které se obtížně zplyňují nebo jsou termolabilní (vysokomolekulární PAHs)
- ◆ Preparativní HPLC (izolace nukleotidů, metabolitů, peptidů, protilátek atd.)
- ◆ MALDI-TOF (LC-MS velkých molekul – fragmentovaných bílkovin)

Reversní HPLC analýza PAHs: detekce pomocí diode-array detektoru (DAD)

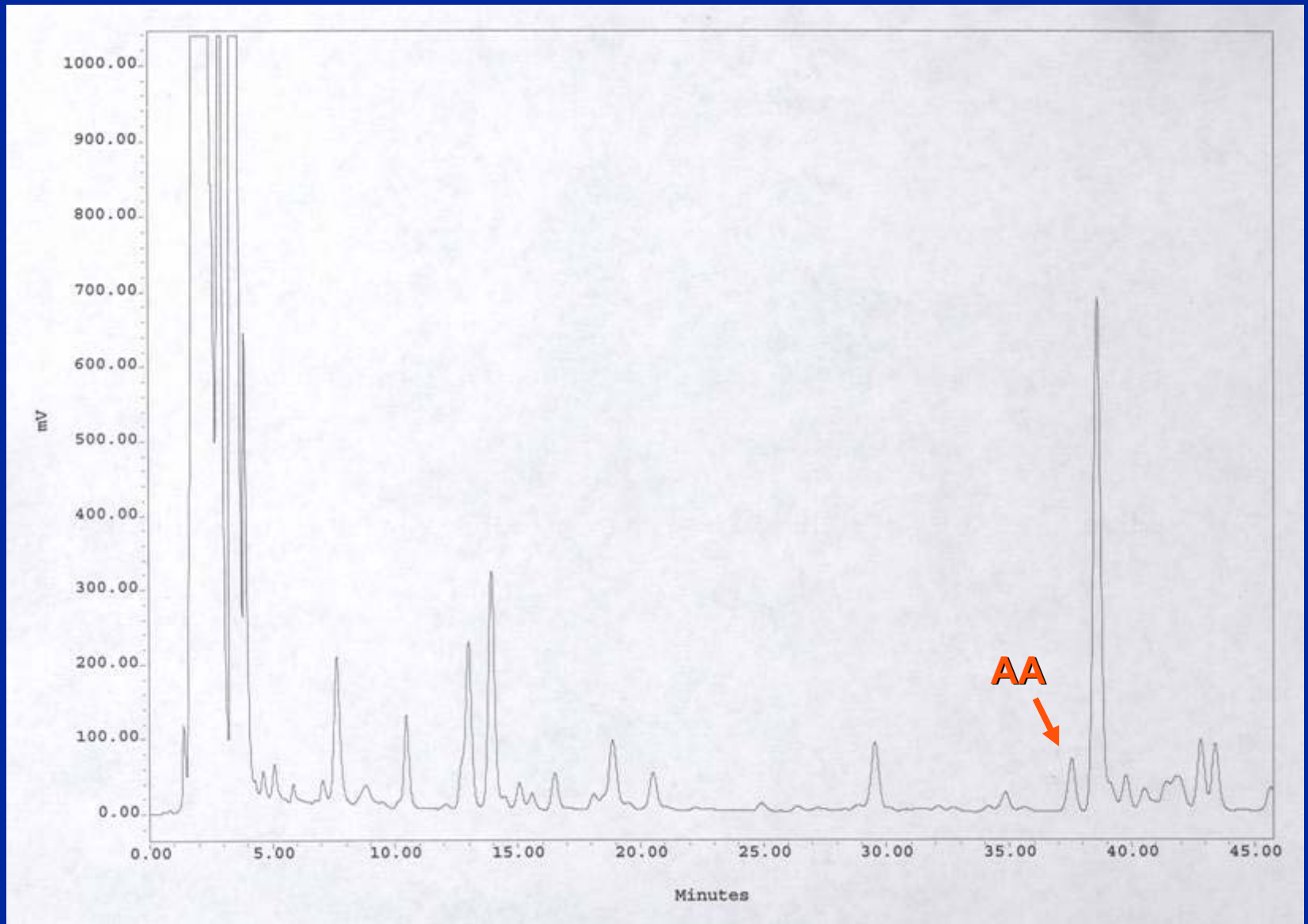


chromatogr.
záznam při
vybraných
vlnových
délkách

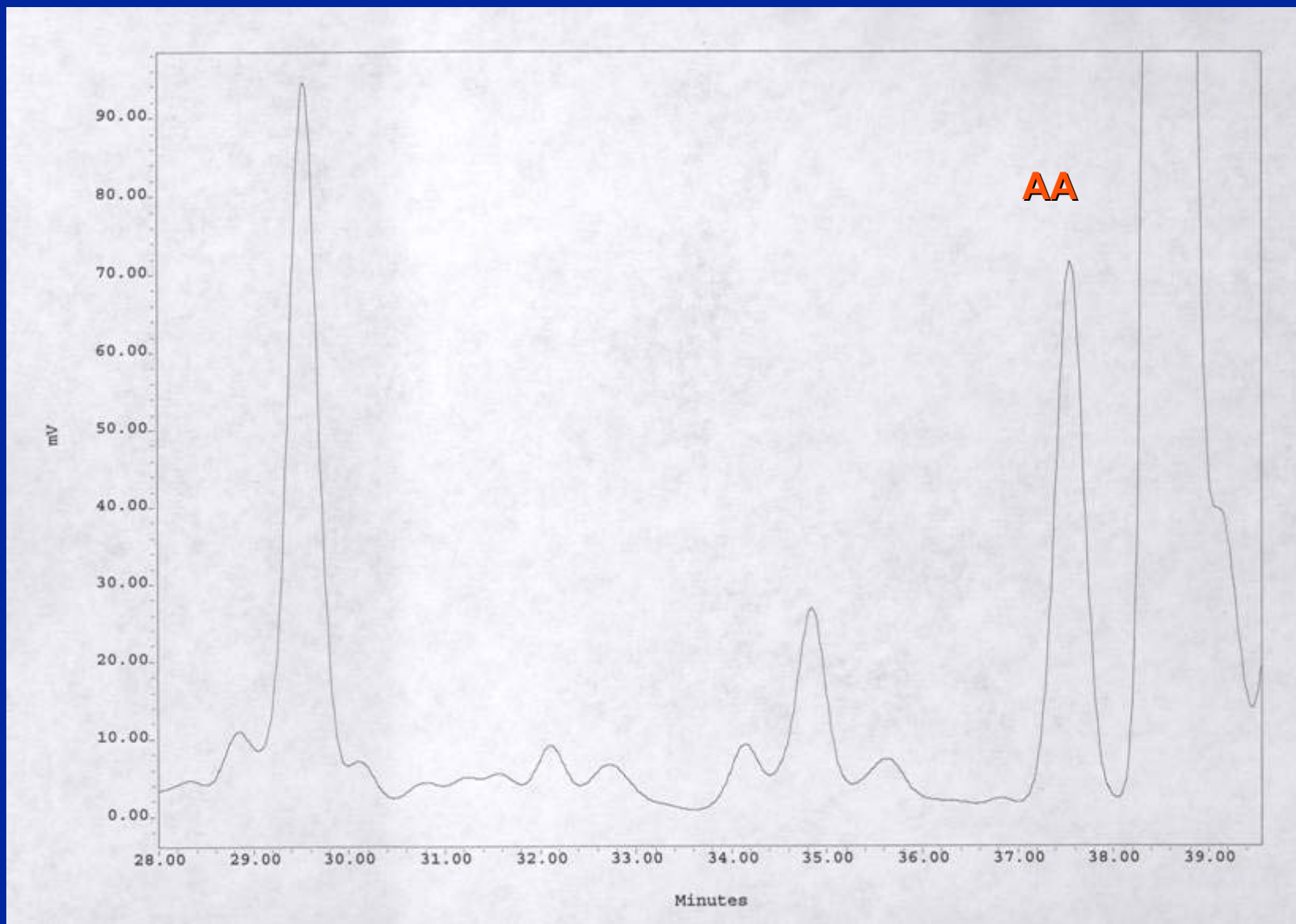
HPLC analýza hydroxylovaných metabolitů testosteronu (spektrofotometr. det.)



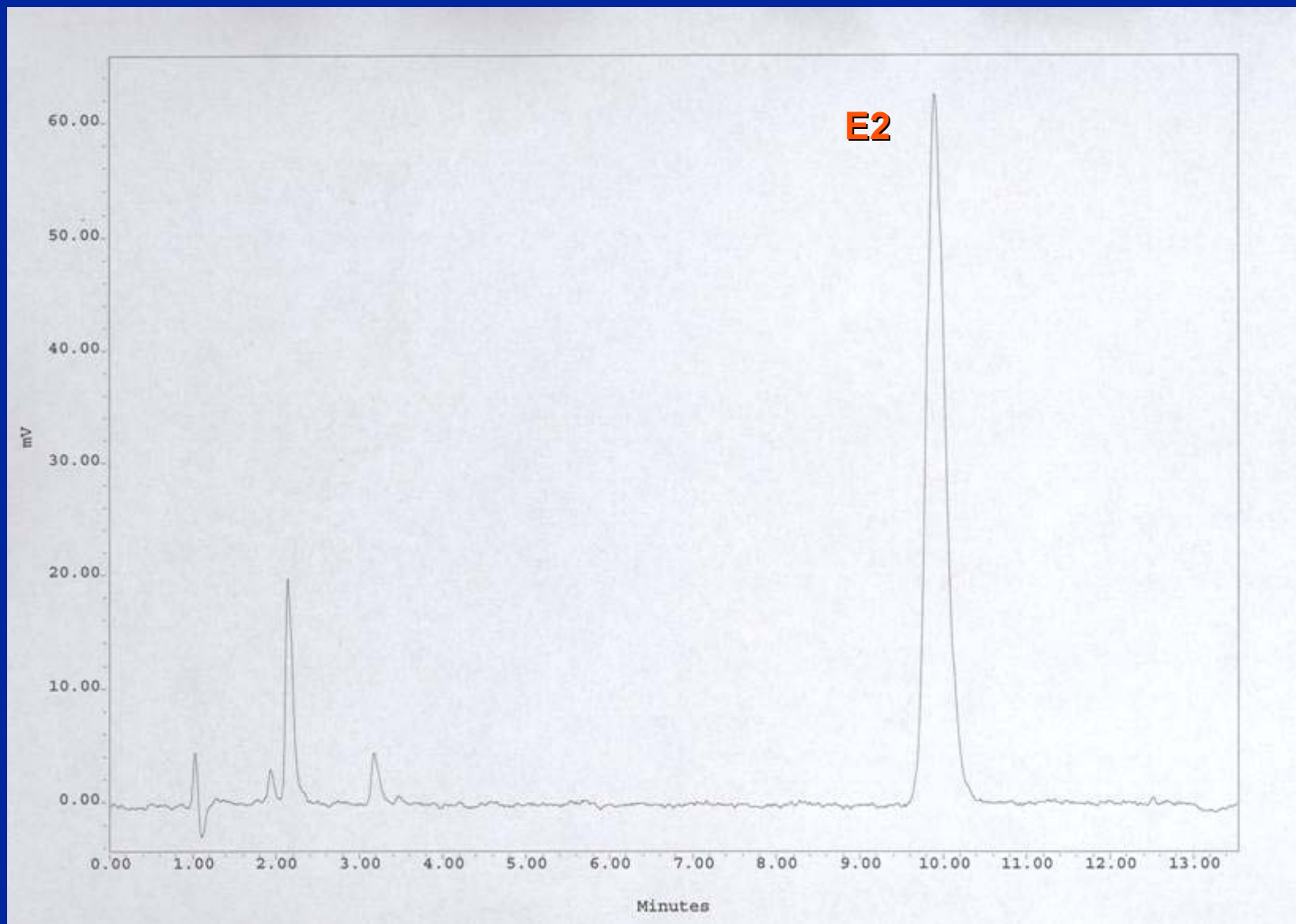
HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci pyrenyldiazomethanem



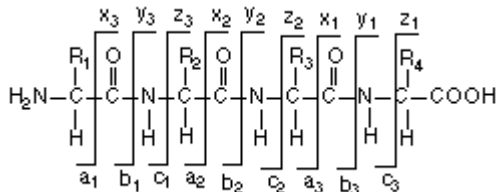
HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci PDAM (fluor. detekce)



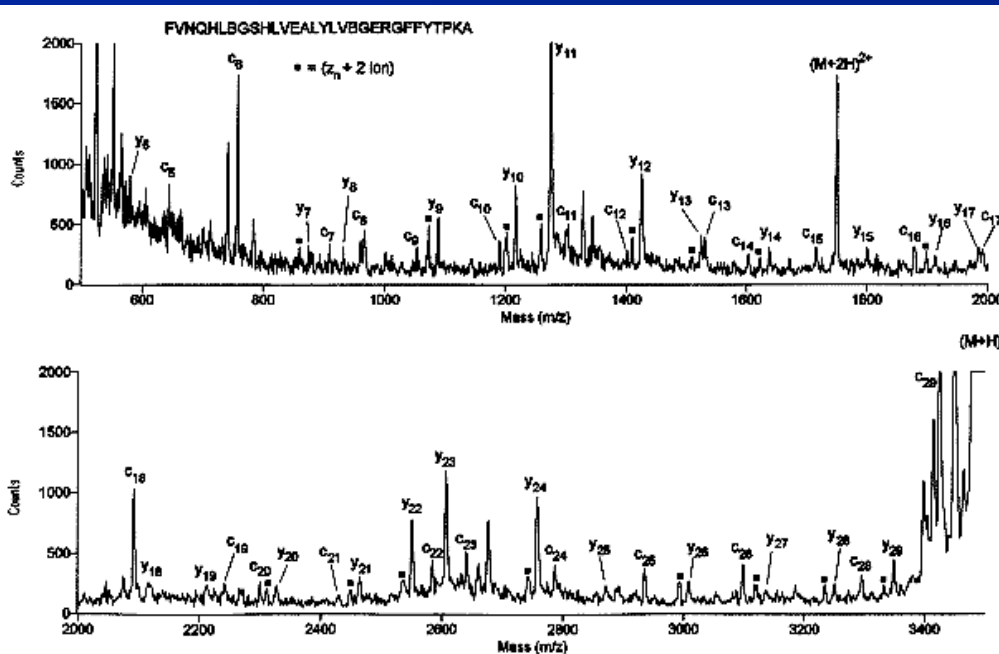
Stanovení aromatázové aktivity (HPLC analýza koncentrace produktu - E2)



MALDI TOF-MS (Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry): příklad stanovení peptidových fragmentů



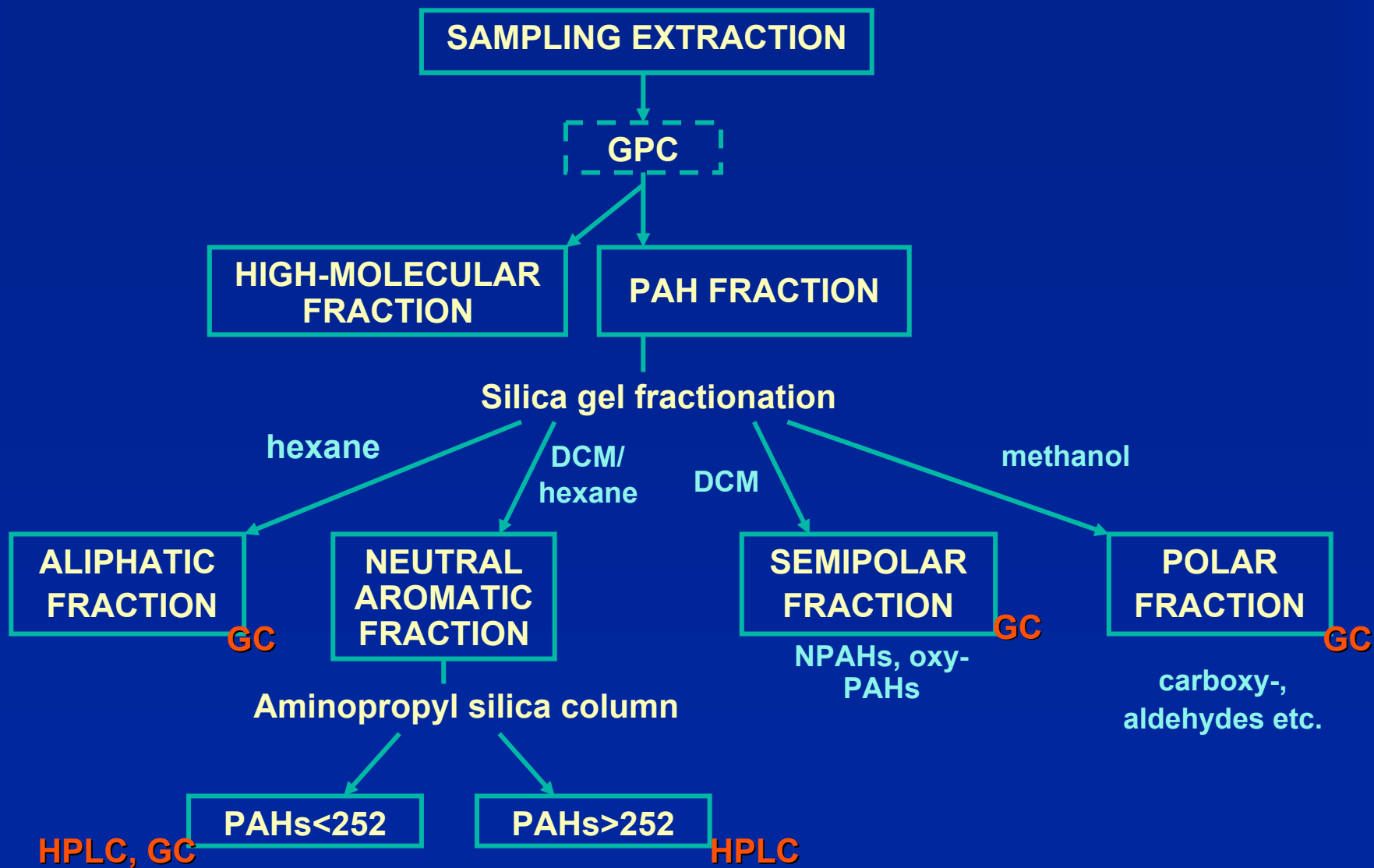
Fragmenty po rozštěpení vazeb peptidů



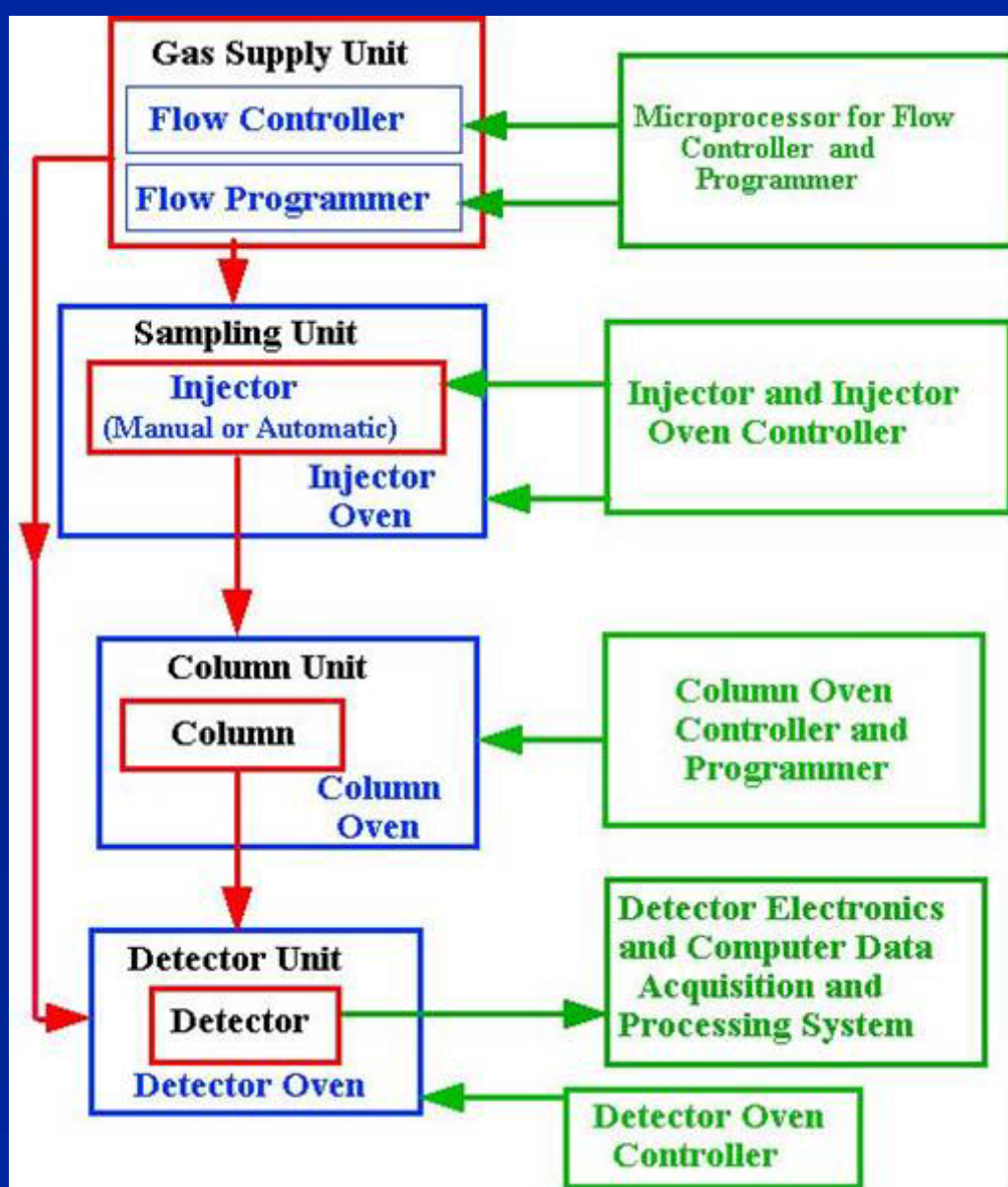
Ionová fragmentace peptidu
(ion decay mass spectrum):

- přesné stanovení mol. hmotnosti;
- primární sekvence

UŽITÍ LC PRO FRAKCIONACI VZORKŮ - PŘÍKLAD STANOVENÍ ORGANICKÝCH CIZORODÝCH LÁTEK



Uspořádání plynového chromatografu (GC)



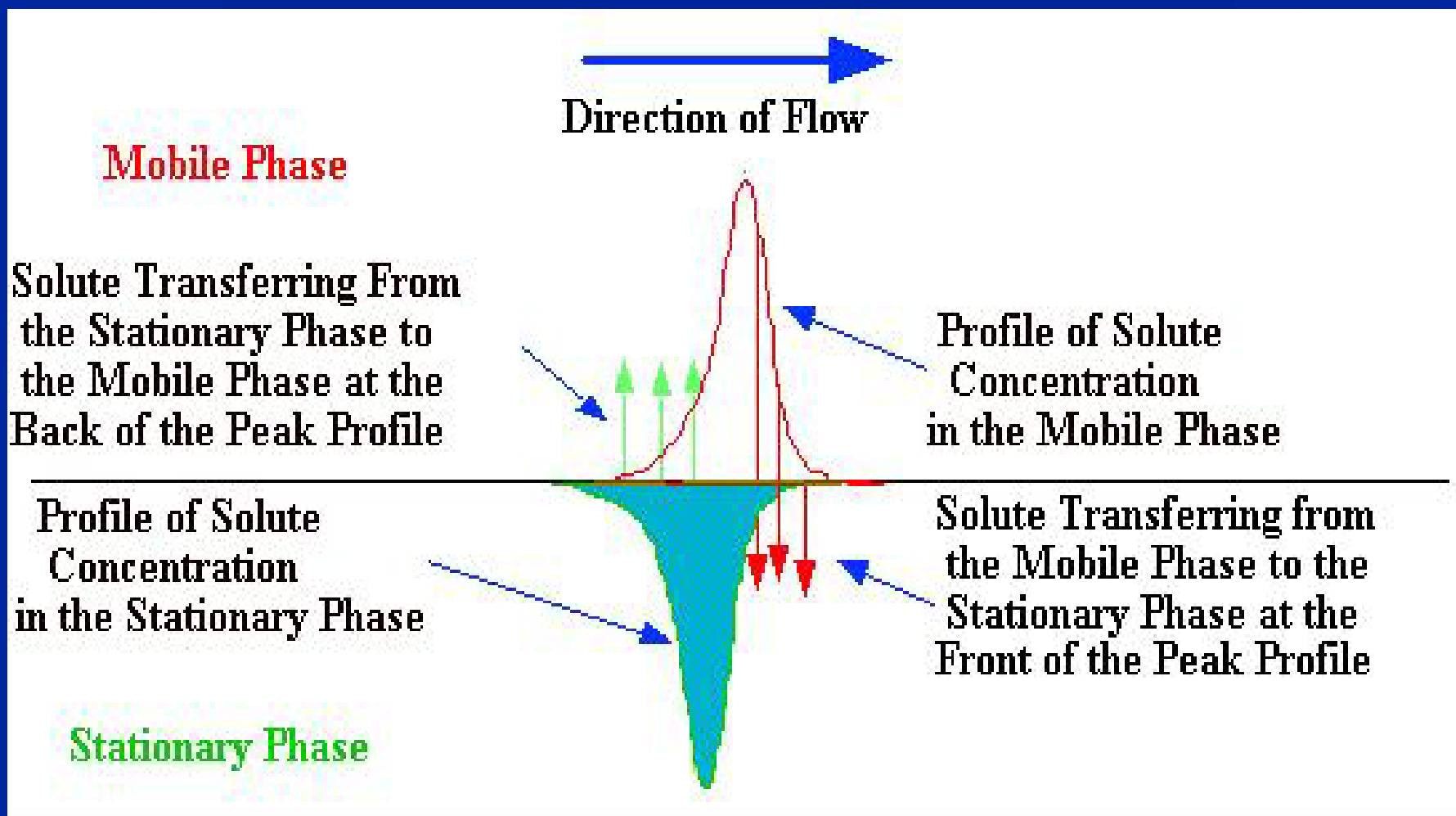
Detektory:

FID

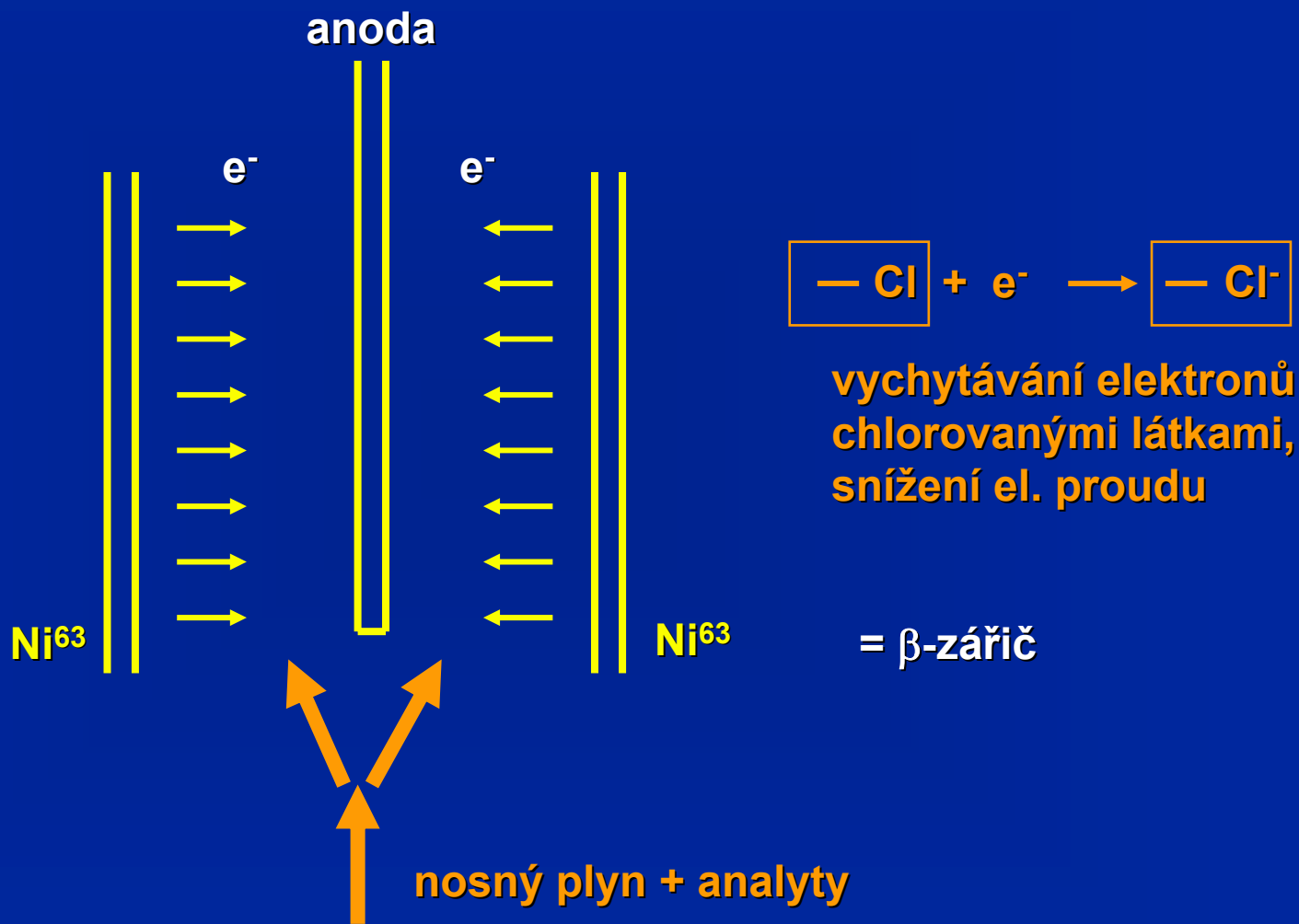
ECD (chlor. látky)

MS (rozdělení podle hmotností fragmentů)

GC: Přejchod látek mezi stacionární a mobilní fází



GC/ECD (electron capture detector): princip detekce



GC/MS:

analýza PAHs
(SIM – fragmenty M⁺
= různé MW)

MW 202

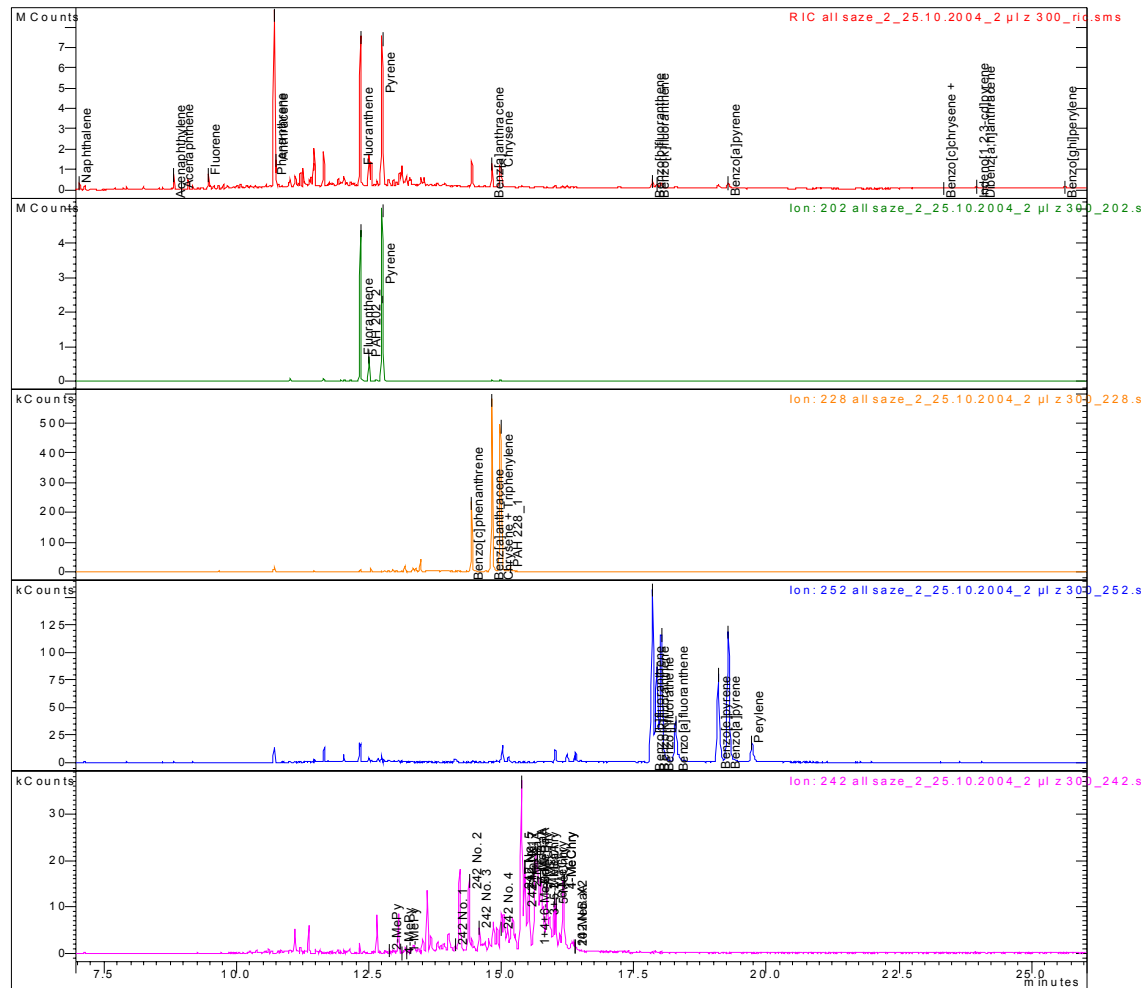
MW 228

MW 252

MW 242

Chromatogram Plots

Plot 1: c:\... \saze_2_25.10.2004_2 µl z 300_ric.sms RIC all
Plot 2: c:\... \saze_2_25.10.2004_2 µl z 300_202.sms Ion: 202 all
Plot 3: c:\... \saze_2_25.10.2004_2 µl z 300_228.sms Ion: 228 all
Plot 4: c:\... \saze_2_25.10.2004_2 µl z 300_252.sms Ion: 252 all
Plot 5: c:\... \saze_2_25.10.2004_2 µl z 300_242.sms Ion: 242 all



STANOVENÍ ENZYMATICKÉ AKTIVITY / ENZYMOVÁ KINETIKA



◆ Stanovení produktu:

koncentrace produktu / čas . prot.

= pmol produktu / min. (mg prot./ml)

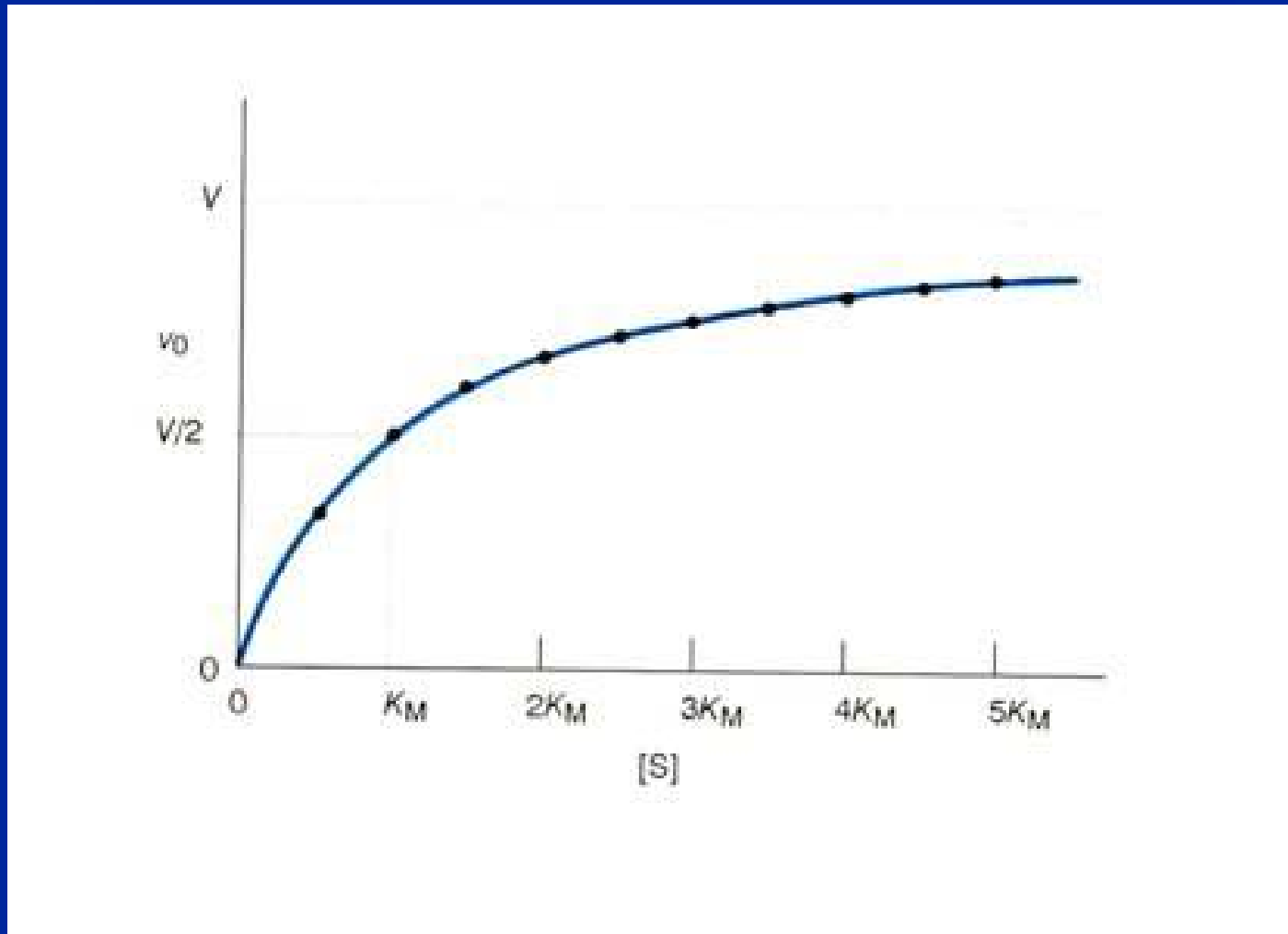
◆ Příklady stanovení:

- fluorimetrické stanovení produkce resorufinu (EROD, MROD, PROD, BROD);

- HPLC stanovení metabolitů mastných kyselin, např. 5-OH-FA (5-LOX);

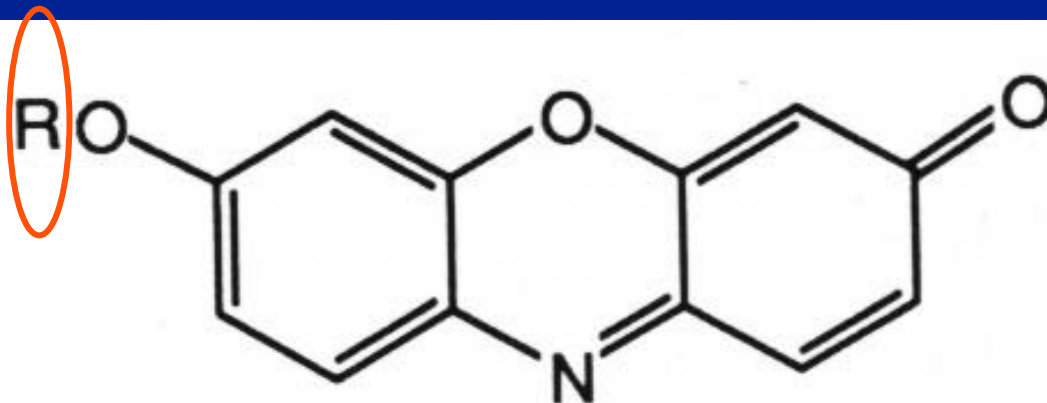
- chemiluminiscenční stanovení luciferázy

Enzymová kinetika: $[ES] = (E + ES) \cdot [S] / K_M + [S]$
(počáteční rychlost: $v_0 = V \cdot [S] / (K + [S])$)



SUBSTRATY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

spektrofluorimetrická detekce produktu enzymové reakce –
silně flureskujícího resorufinu (exc. 530-570, em. 585 nm)



Alkylresorufins
(alkoxyphenoxazones)

Enzymová kinetika: dvojitě reciproké vynesení (Lineweaver – Burke: $1/v_0 = (K_M/V)(1/[S]) + 1/V$)

