

Metody studia bílkovin

Studium struktury – molekulární vlastnosti
- funkce – (katalytické aj. vlastnosti)

Podle potřeby a účelu – izolace x studium *in situ*

- Izolace – metody více či méně komplikované podle účelu (čisté nativní bílkoviny pro studium vlastností event. farmakologii, hrubé izolace pro průmysl apod.)

Isolační postupy – separační metody:

Isolace pomocí metod více či méně komplikovaných podle účelu (čisté nativní bílkoviny pro studium vlastností event. farmakologii, hrubé izolace pro průmysl apod.)

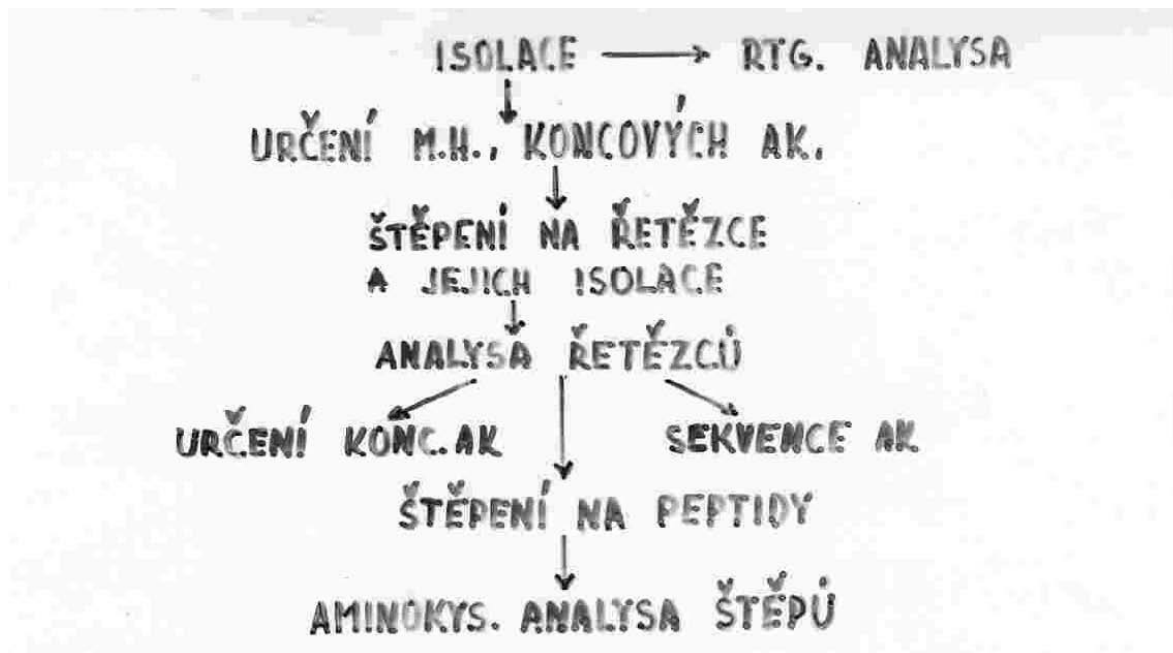
Obecné kroky při izolaci bílkovin

- desintegrace materiálu
- preparativní centrifugace
- srážecí metody, jsou založeny na
 - membránové separace,
 - chromatografie,
 - (preparativní elektromigrační metody – elektroforéza),
 - krystalisace.

Analytické postupy – včetně metod separačních:

Elektroforéza a chromatografie v analytickém měřítku,

- spektrální metody,
- chiroptické metody,
- rentgenostrukturní analýza,
- NMR,
- MS
- další speciální metody



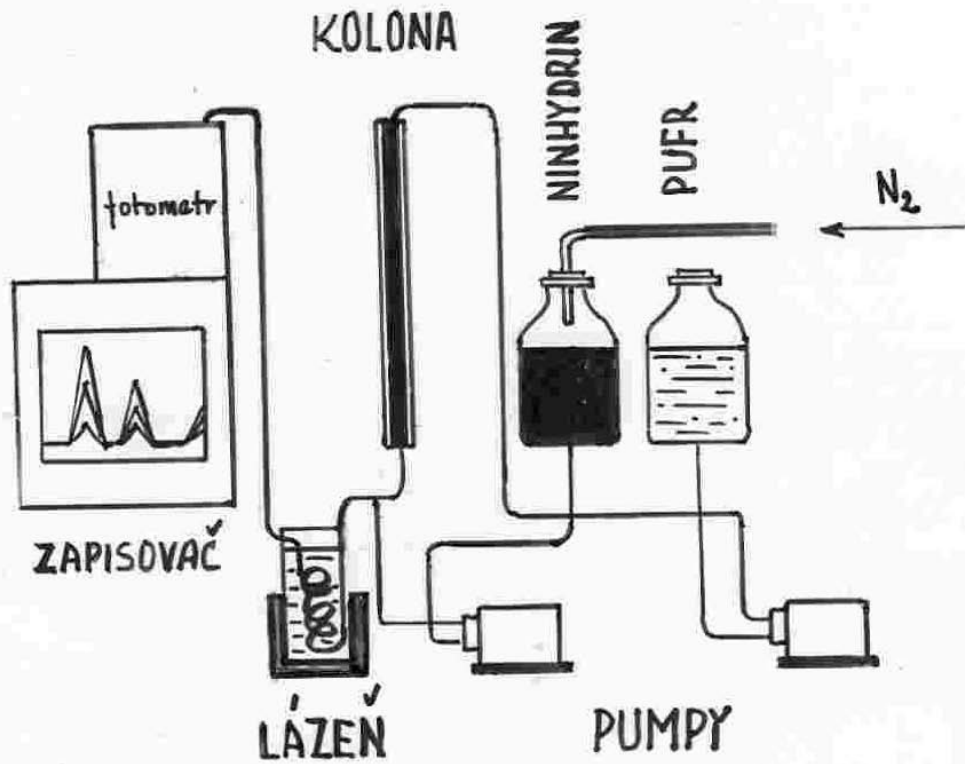
Určení primární struktury

Analýza aminokyselinového složení.

Bílkovina se hydrolyzuje totálně (silně kyselé či zásadité prostředí, zatavená ampule, autokláv). Směs aminokyselin se analyzuje standartními metodami, **klasicky iontoměničovou chromatografií (analytické provedení)**, nověji se užívá hydrofobní chromatografie nebo kapilární zonová elektroforéza.

Obsah aminokyselin se zjišťuje vhodnou metodou, nejčastěji reakcí s činidlem poskytujícím barevný produkt. Aminokyseliny poskytují řadu specifických reakcí v závislosti na bočním substituentu (viz laboratorní cvičení), které nejsou vhodné pro tuto analýzu. Vhodnou reakcí je taková, kterou poskytují všechny aminokyseliny – tuto podmínku téměř splňuje reakce ninhydrinová. Činidlo (roztok ninhydrinu) poskytuje modrofialové zbarvení se všemi aminokyselinami s výjimkou Pro (a Hypro), kdy vzniká žluté zbarvení.

Schéma analyzátoru aminokyselin



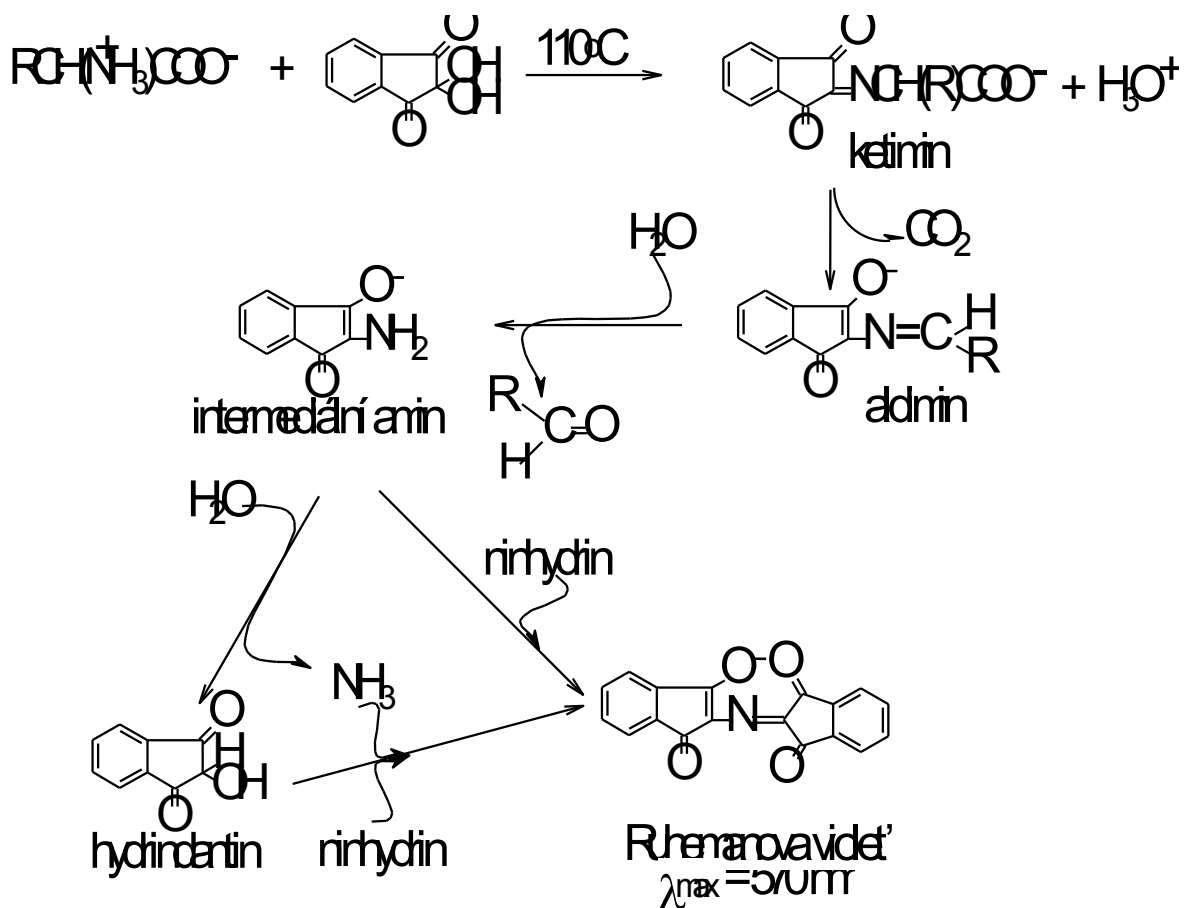
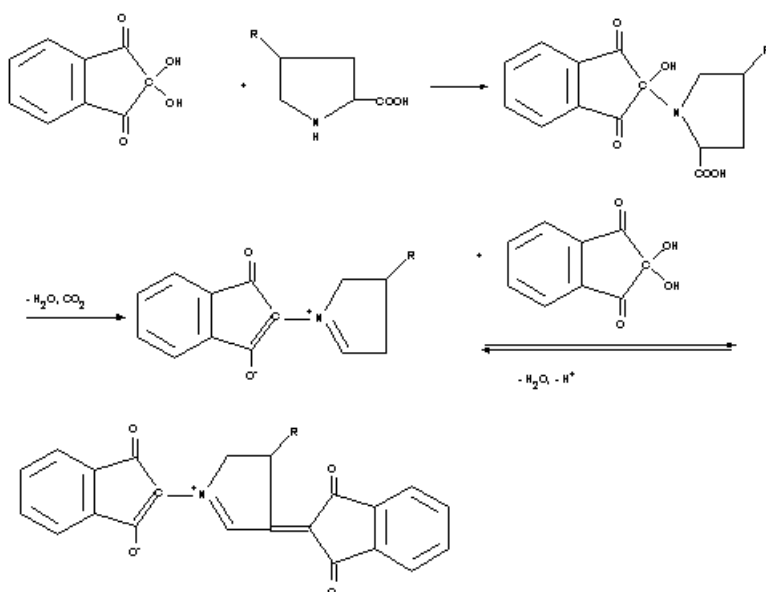
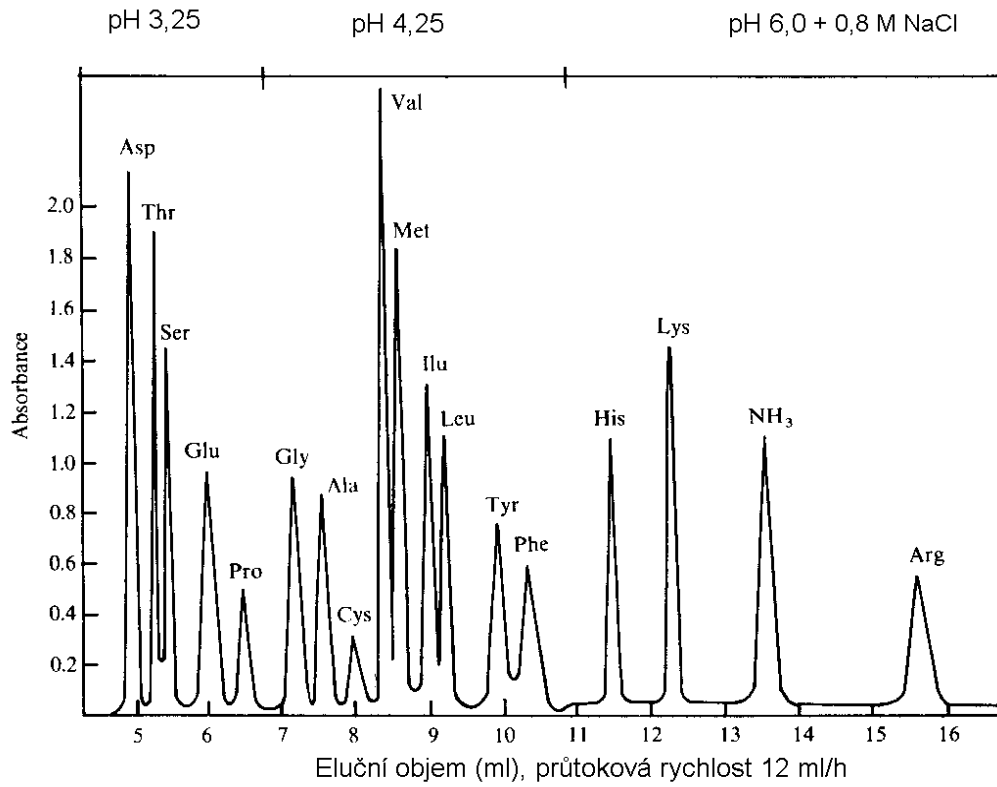


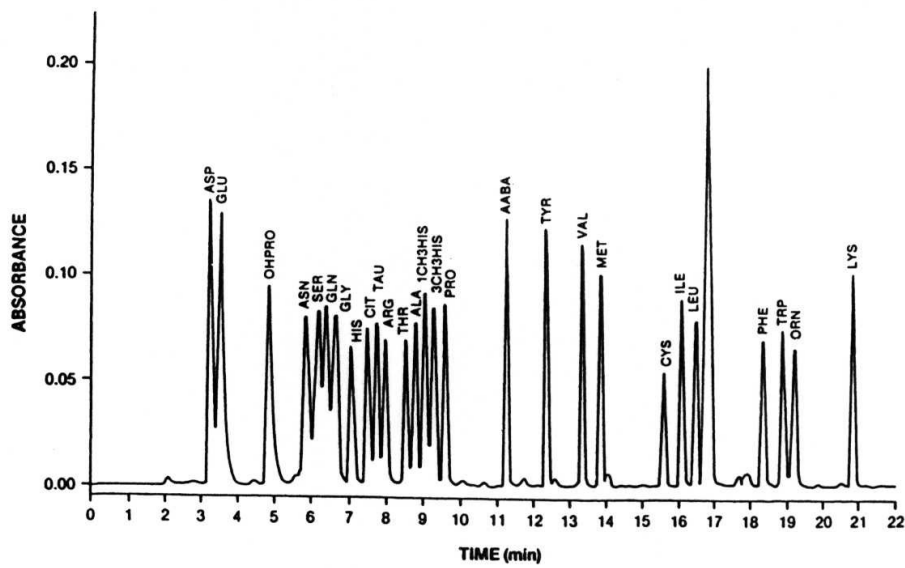
Schéma ninhydrinové reakce obecně, $\lambda = 570 \text{ nm}$



Ninhydrinová reakce s prolinem, $\lambda = 440 \text{ nm}$



Iontoměničová chromatografie aminokyselin

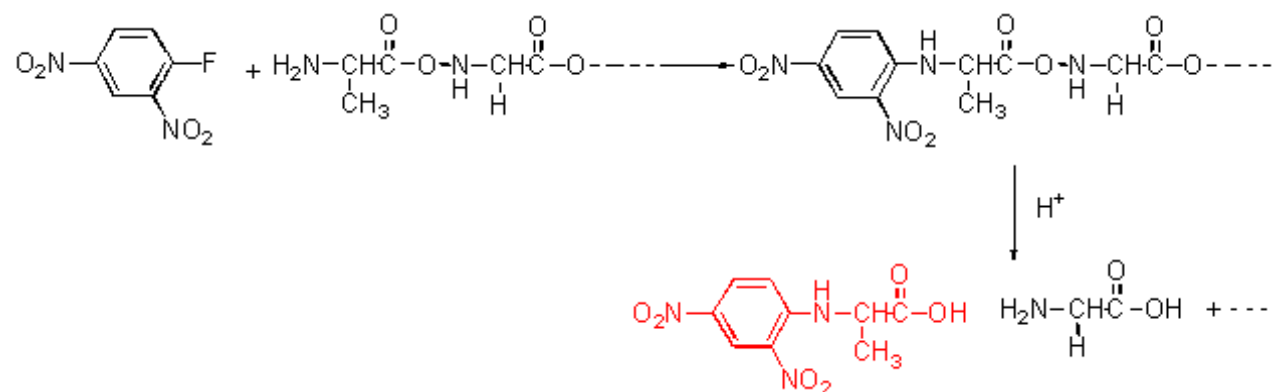


Hydrofobní chromatografie aminokyselin

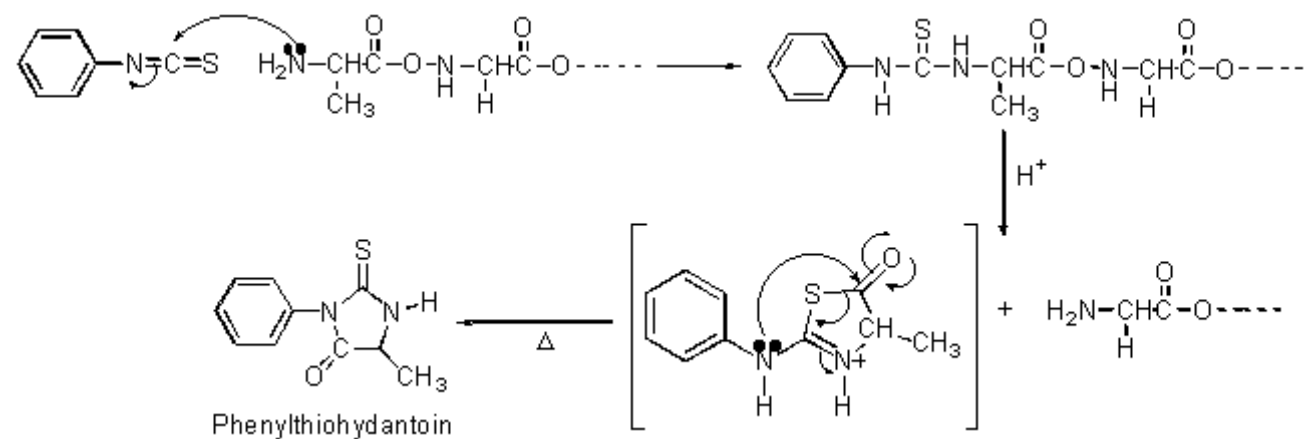
Další způsoby derivatizace

Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

Sangerova metoda



Edmanovo odbourání



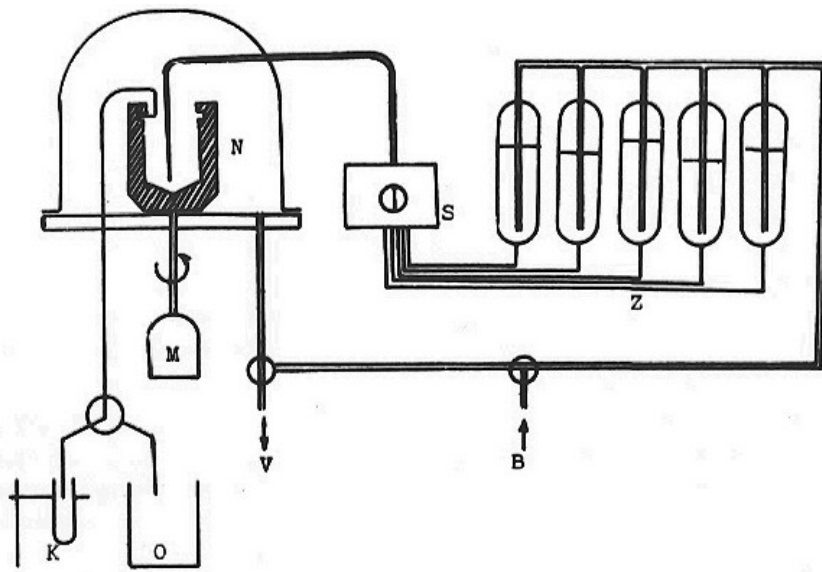
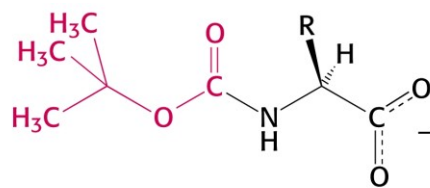


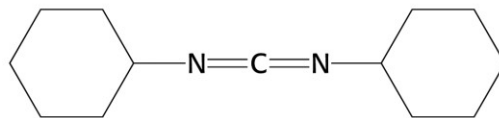
Schéma sekvenátoru

Syntéza polypeptidů

Ačkoli se postupně rozvinula řada efektivních molekulárně biologických metod přípravy bílkovin, z nichž mnohé jsou průmyslově využívány (insulin), příprava chemickou syntézou má stále opodstatnění. Vychází z obvyklých syntetických postupů, kdy reagují aminokyseliny s aktivovanými skupinami, které mají vytvořit peptidovou vazbu, naopak se chrání skupiny, které spolu reagovat nemají. Hlavním problémem bylo čištění meziproductů, které v roztoku vede ke značným ztrátám a tím znemožní syntézu delších řetězců.



t-Butyloxycarbonyl amino acid
(t-Boc amino acid)



Dicyclohexylcarbodiimide
(DCC)

