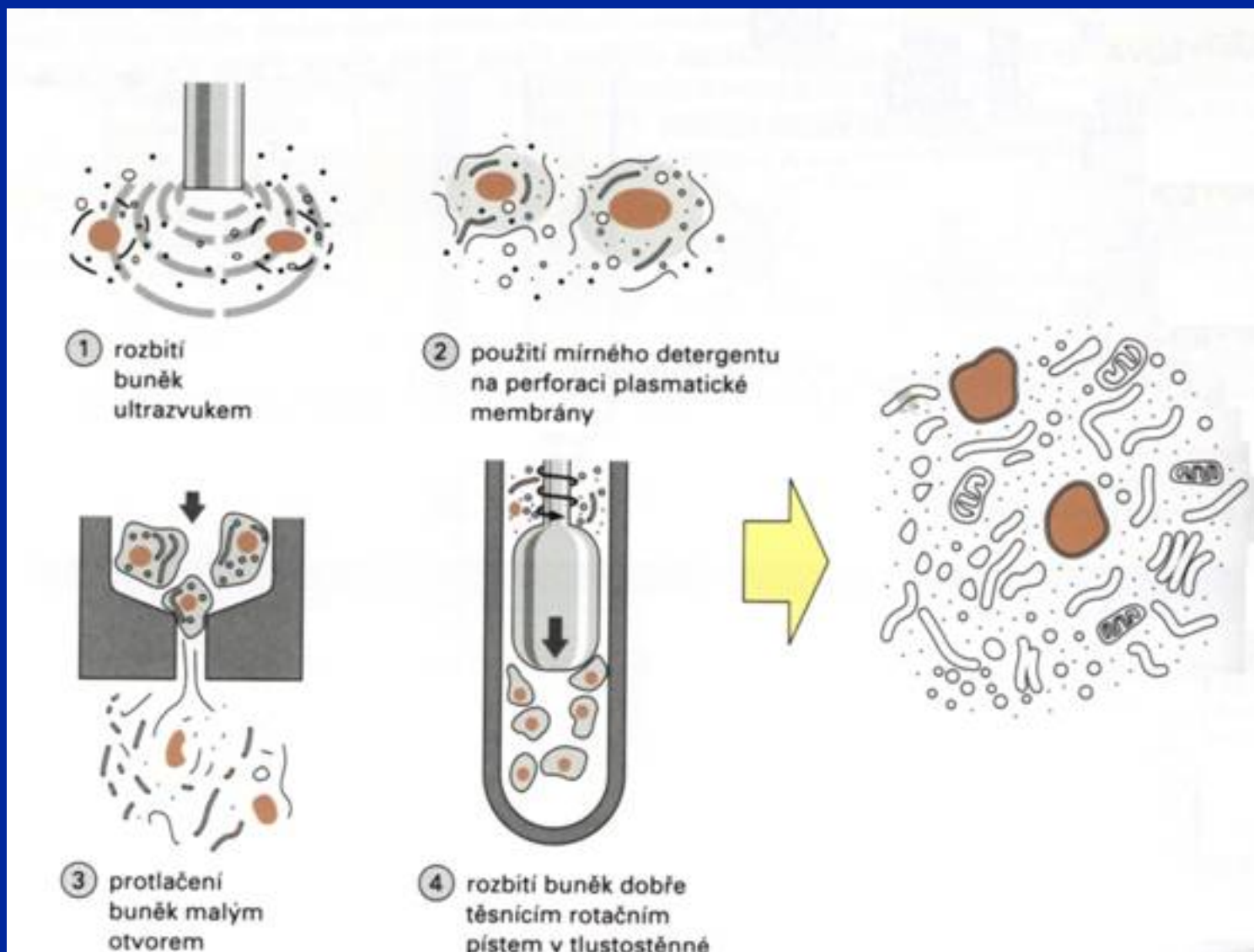


FRAKCIONACE BUNĚK / SEPARAČNÍ A ANALYTICKÉ TECHNIKY / PROTEINY / LIPIDY / NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY /

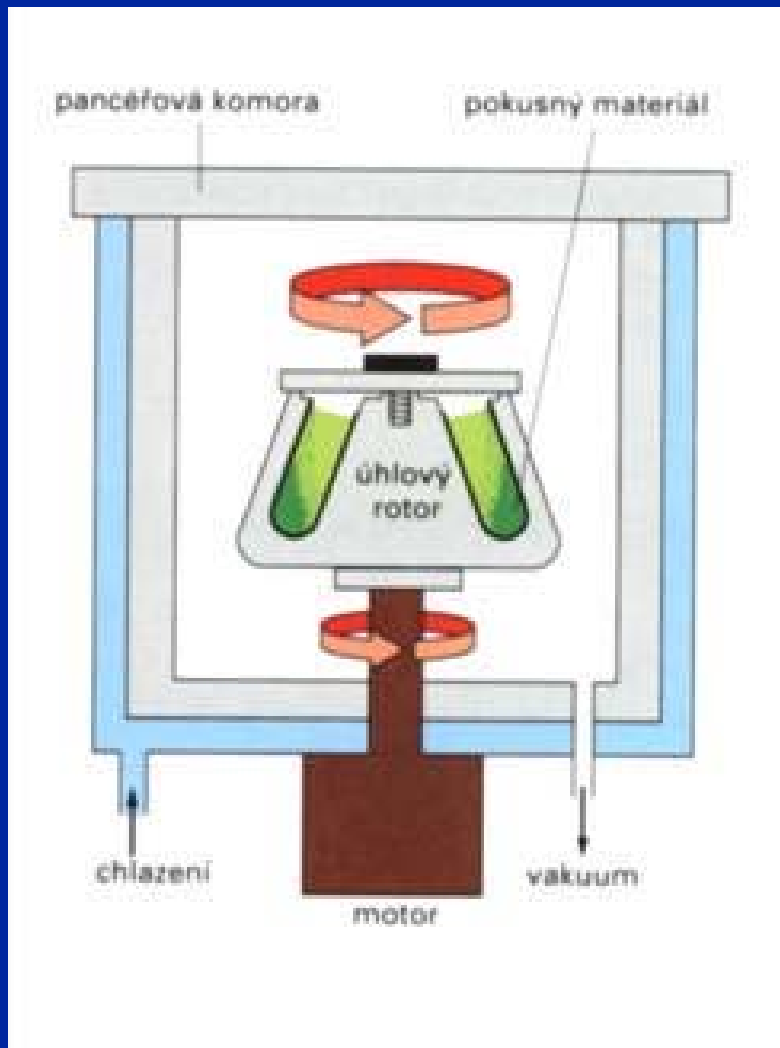
- ◆ **HOMOGENIZACE TKÁNÍ, BUNĚK, CENTRIFUGAČNÍ
TECHNIKY**
- ◆ **KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE, SEPARACE A
ANALYTICKÁ STANOVENÍ, MALDI TOF**
- ◆ **PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE**

HOMOGENIZACE TKÁNÍ / BUNĚK

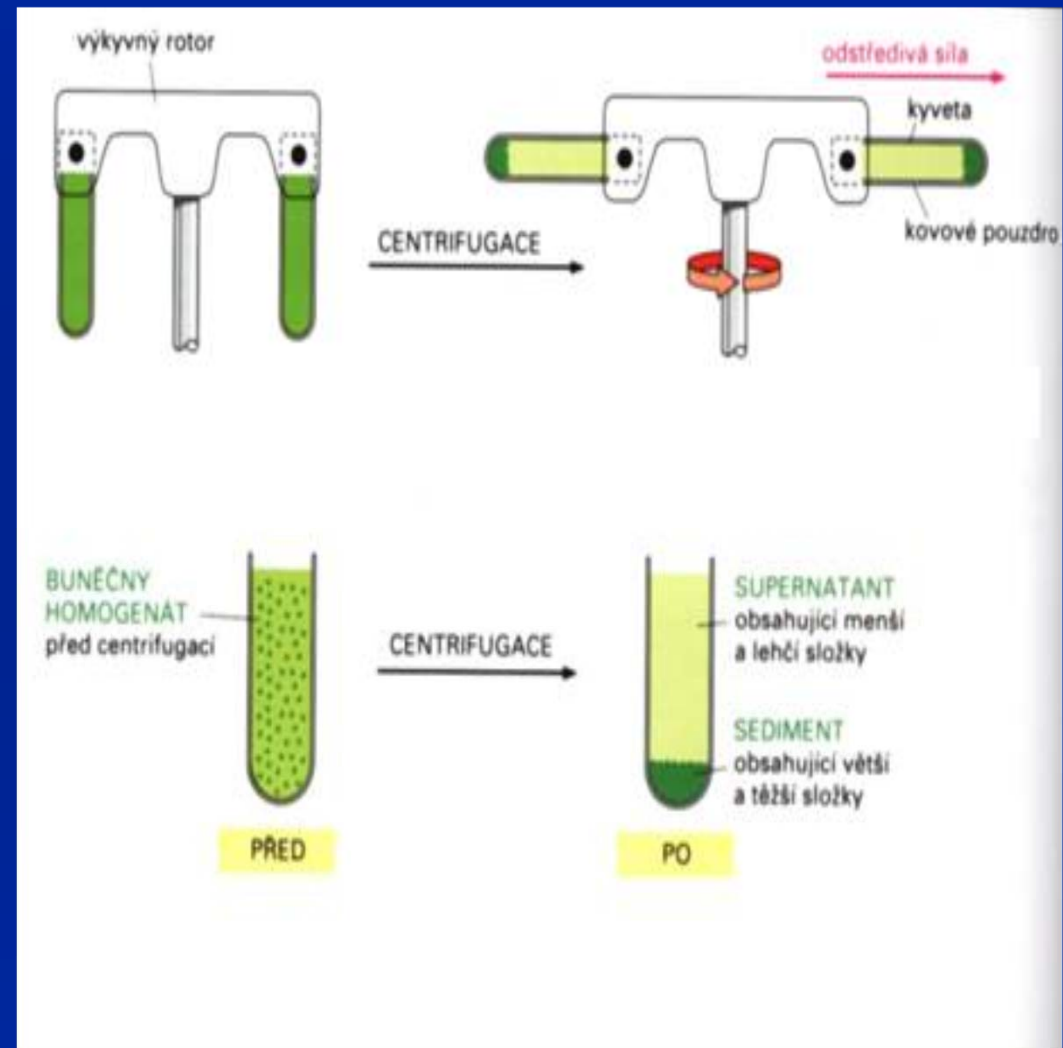


CENTRIFUGACE / ULTRACENTRIFUGACE:

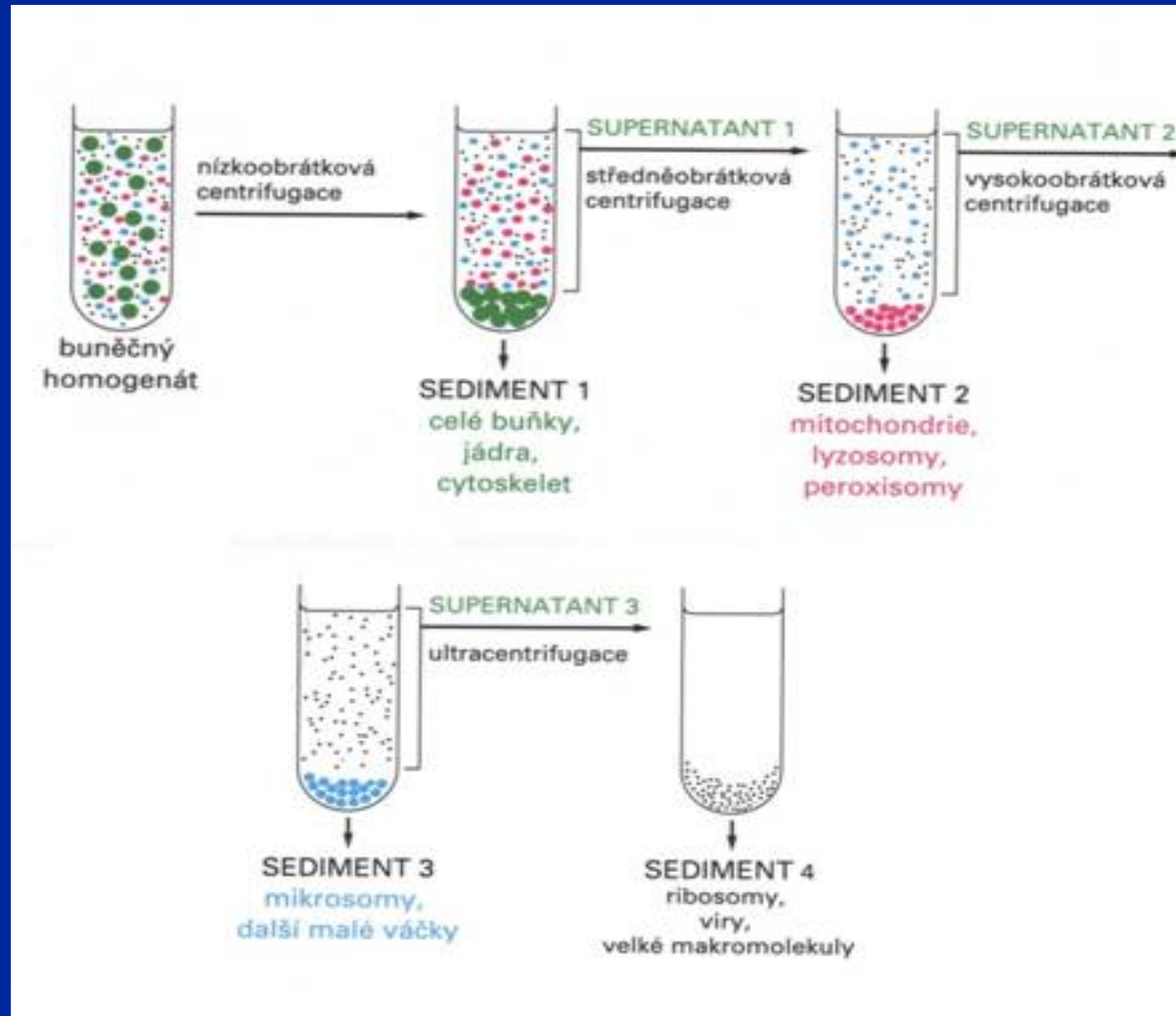
úhlový rotor



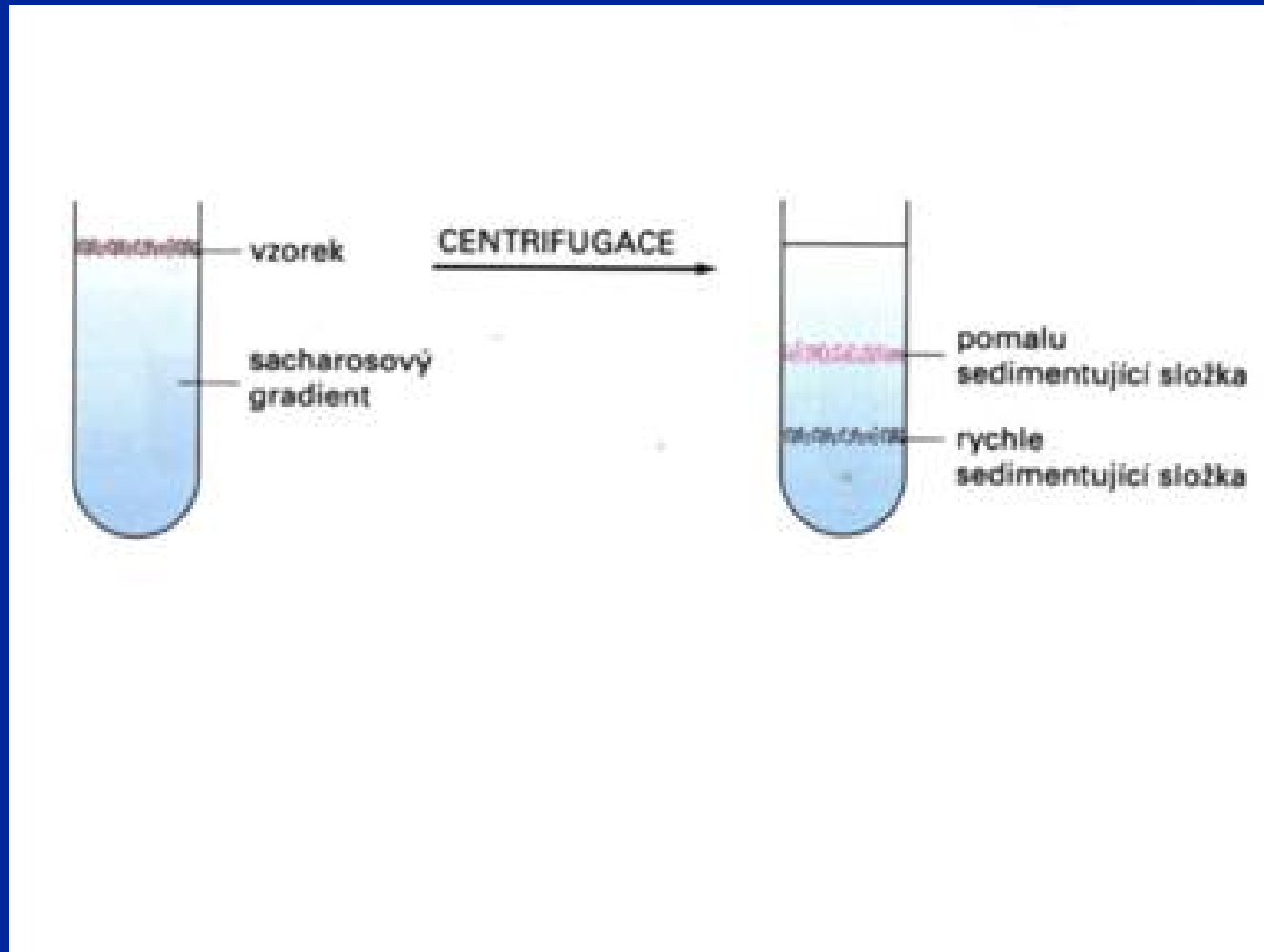
výkyvný rotor



DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE: izolace subcelulárních frakcí



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



Kapalinová chromatografie (LC, HPLC)

PUMPA



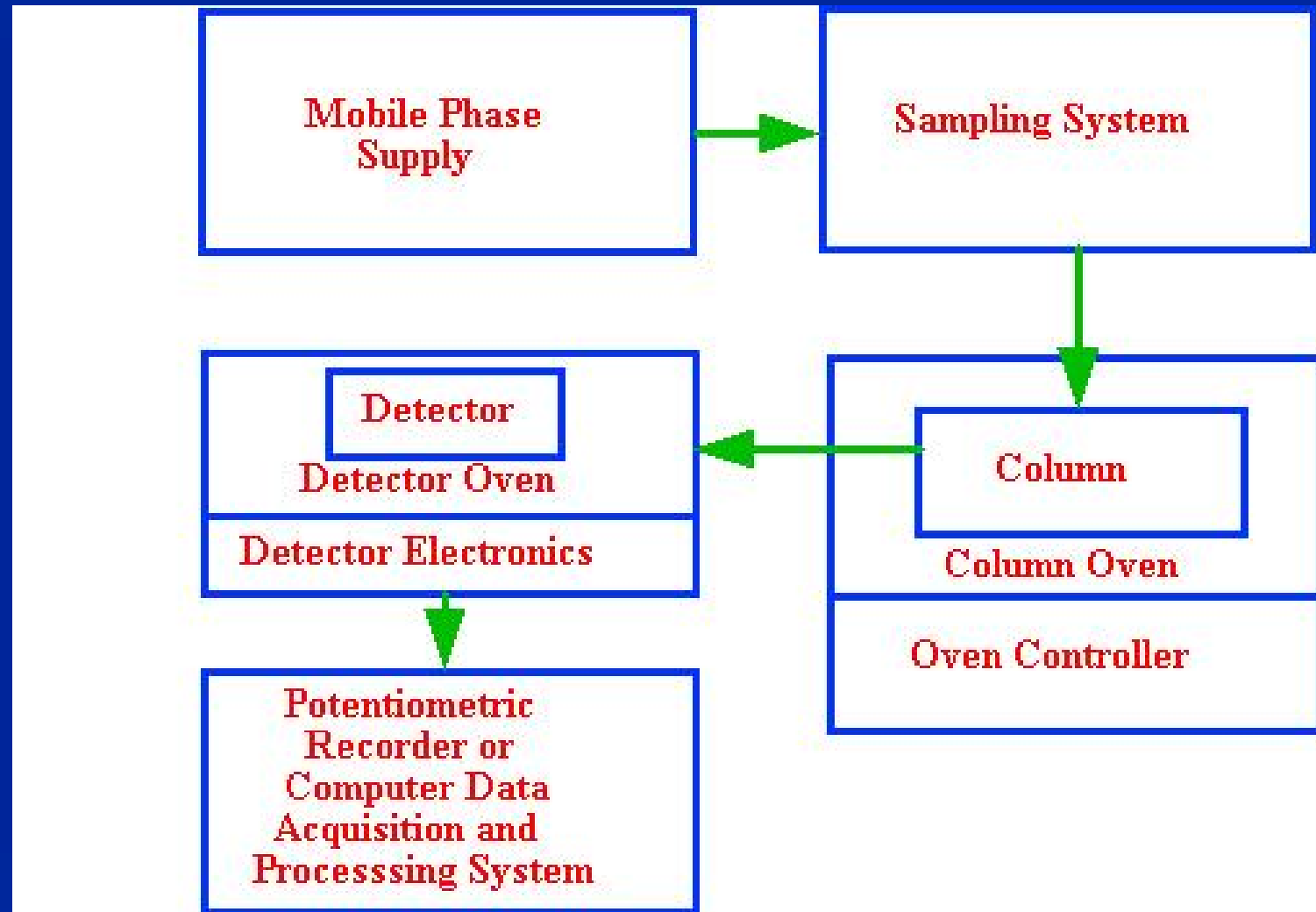
DÁVKOVÁNÍ



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

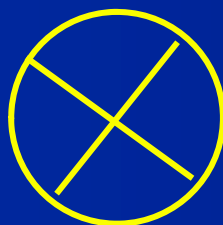
specifické zakončení stacionární fáze (protilátka, SH- apod.), rozdělení na základě specifických interakcí

HPLC /LC: typy detektorů

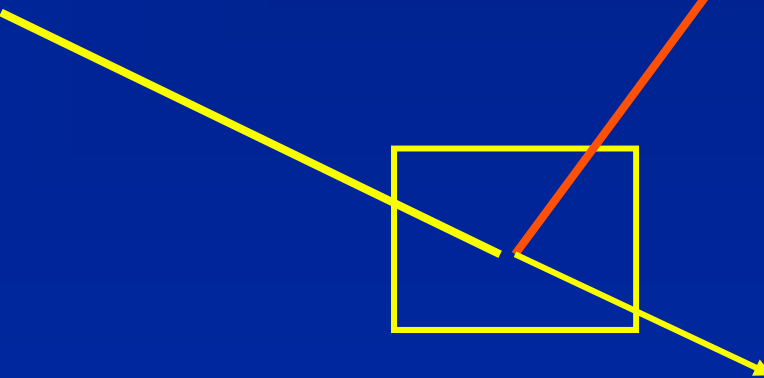
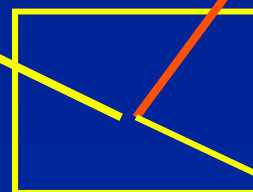
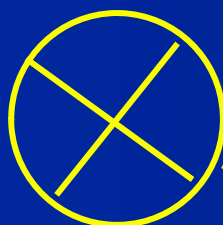
- ◆ **FOTOMETRICKÝ** (změna absorpce, jedna vln. délka nebo diode array detektor → spektrum analytu)
- ◆ **FLUORIMETRICKÝ** (změna fluorescence, jedna excitační a jedna emisní vln. délka nebo diode array)
- ◆ **RADIOMETRICKÝ** (sloučeniny značené ^3H , ^{13}C , ^{32}P , ^{33}P)
- ◆ **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR**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

Uspořádání spektrofotometrického a fluorimetrického detektoru

zdroj světelného paprsku



absorpce světla

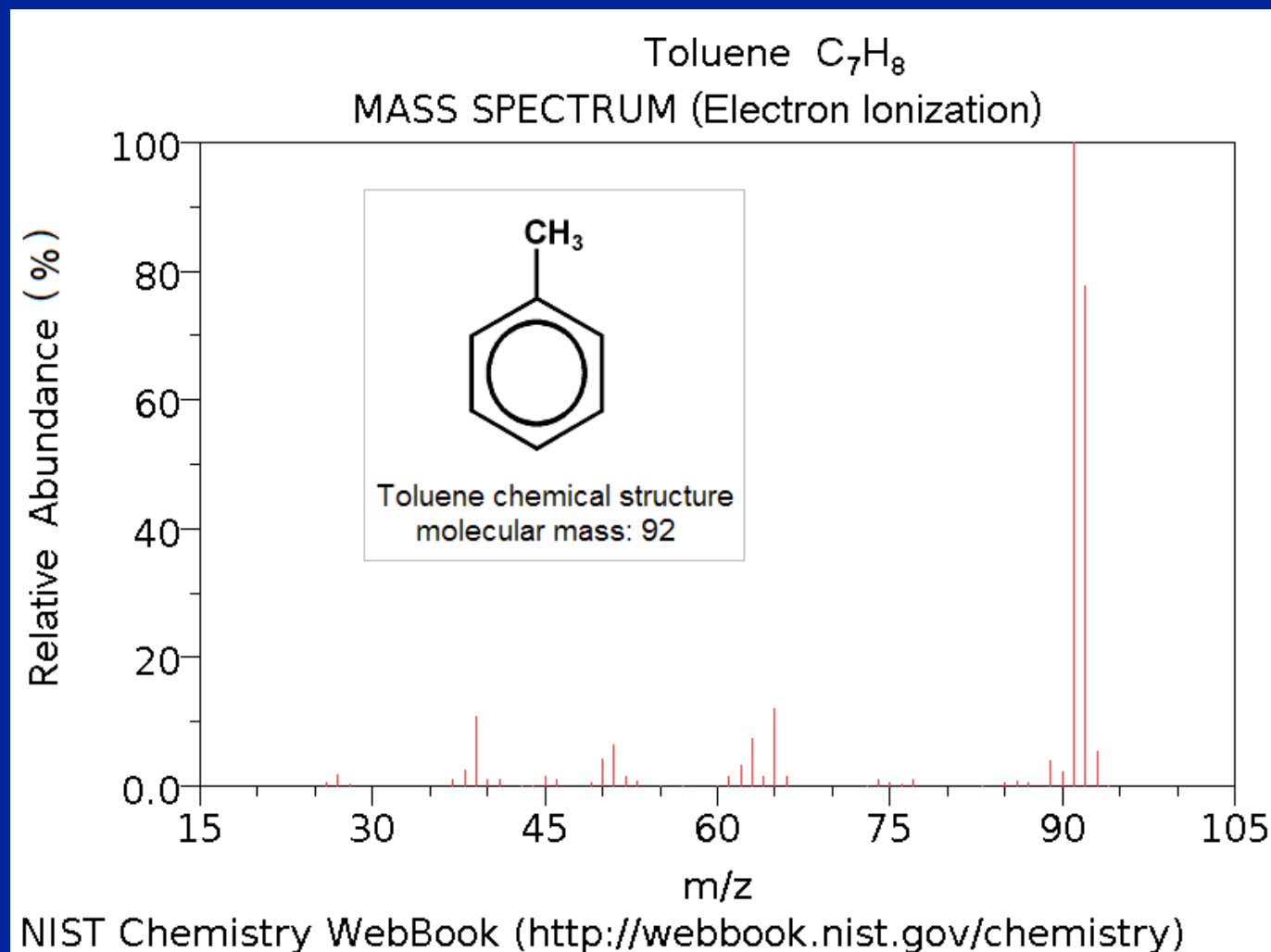


emise fluorescence

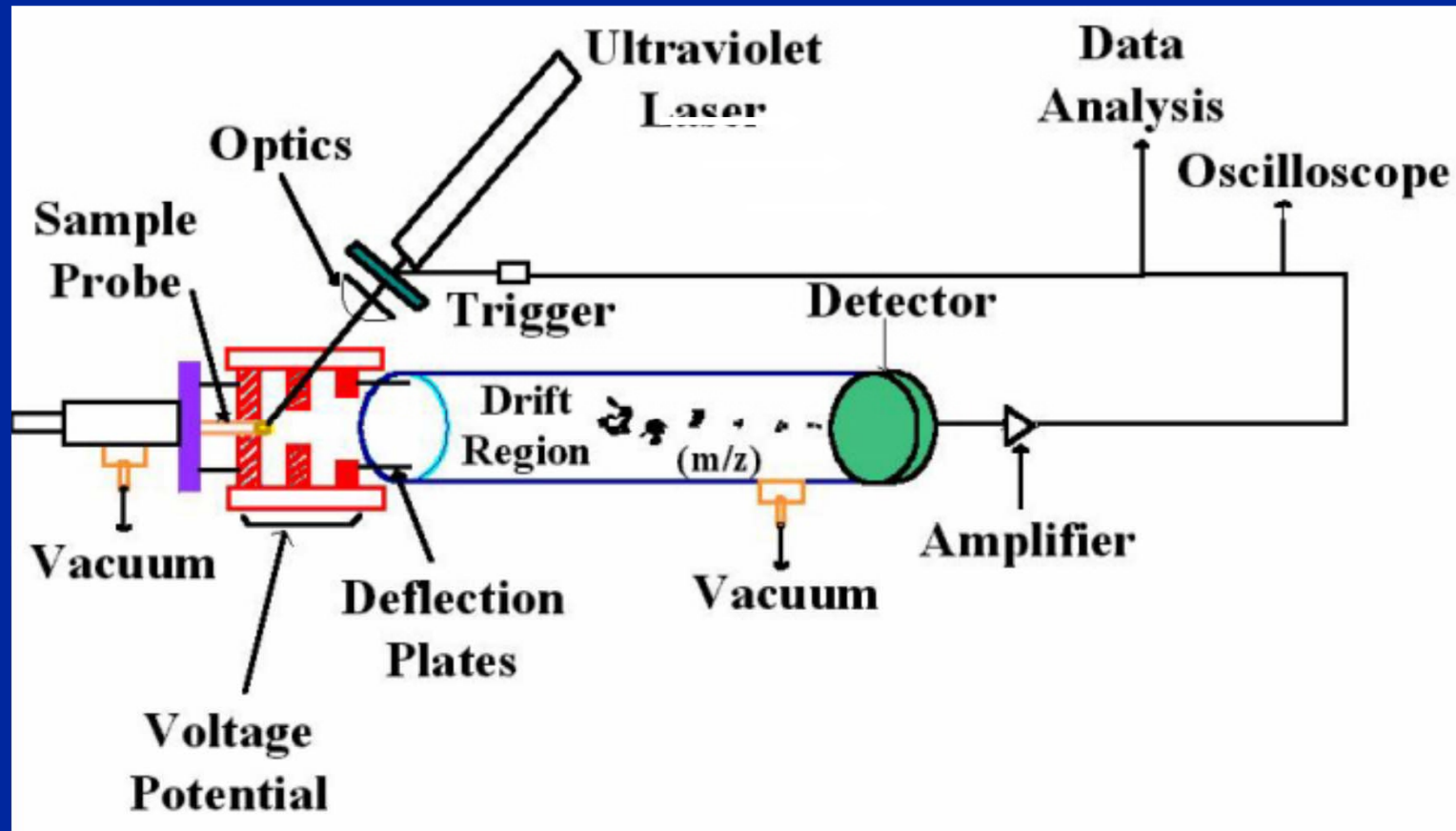
Hmotnostní spektrometrie

- ◆ generování iontů (ionizace elektronovým paprskem aj.)
- ◆ separace iontů podle poměru hmotnost / náboj (m/z)
 - nejčastěji ionizace, vznik pozitivních iontů (M^+) a event. specifická fragmentace molekul;
 - chemická ionizace (nepřímá ionizace reakčním plynem jako je metan, amoniak) – vznik intenzivního iontu $M+1$;
 - separace iontů, např. kvadrupólový analyzátor
- ◆ měření množství jednotlivých iontů – hmotnostní spektrum v daném časovém bodě; chromatogram: osa x: čas, osa y: vybraný parametr, např. m/z .

Typické spektrum z MS

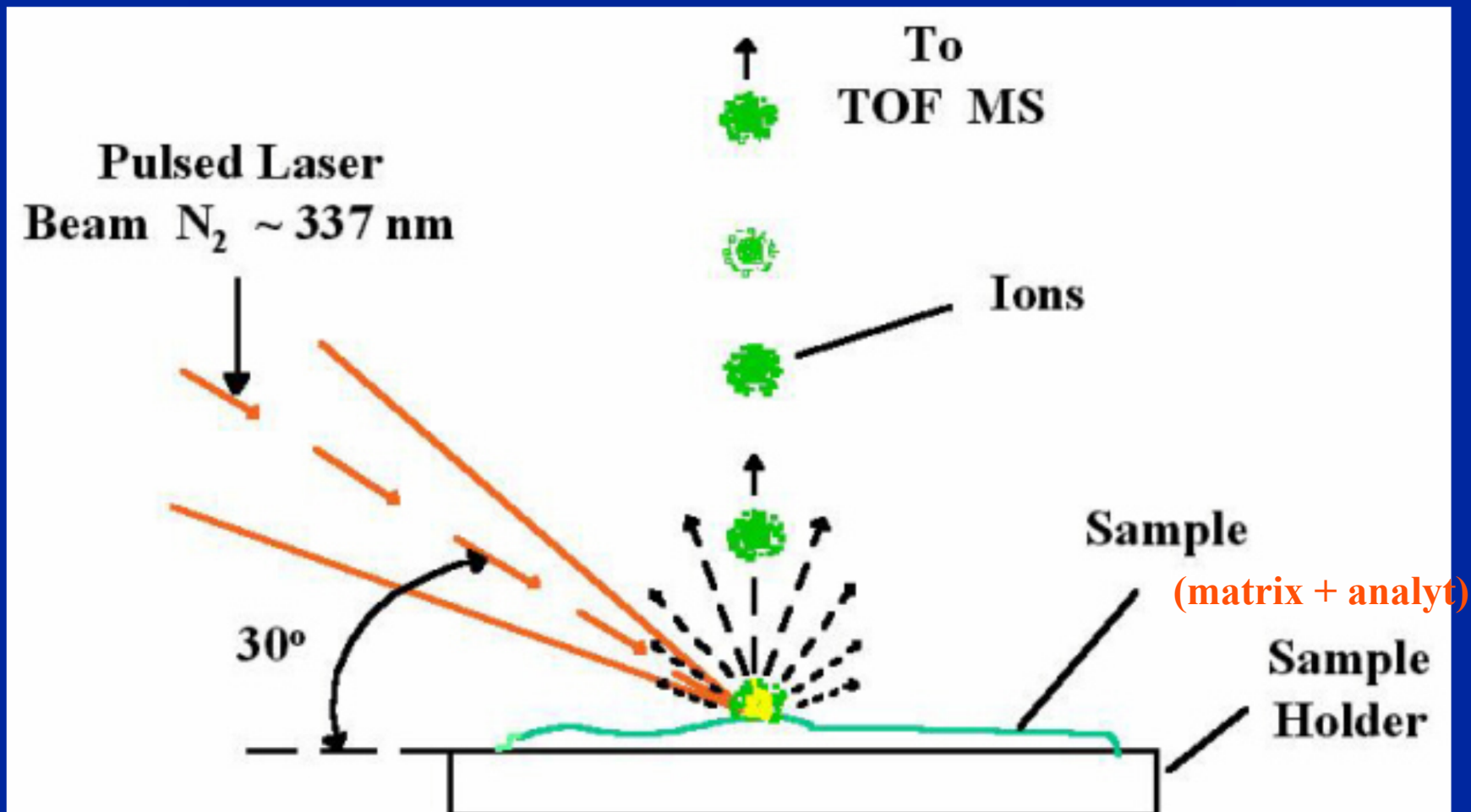


MALDI TOF-MS (Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry): základní uspořádání

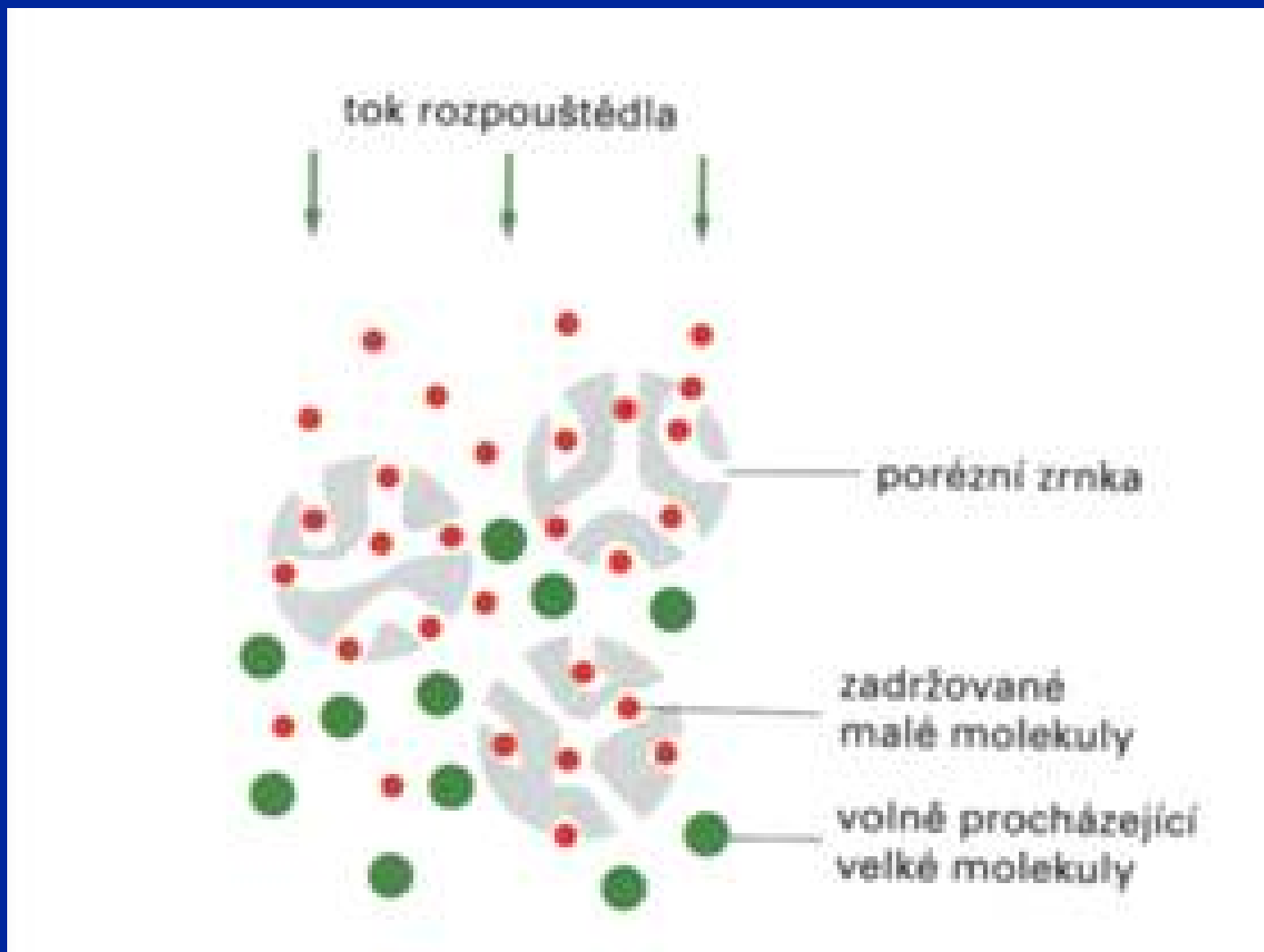


konverze dat: TOF spektrum ($t = (m/z)^{1/2}$) \longrightarrow hmotnostní spektrum

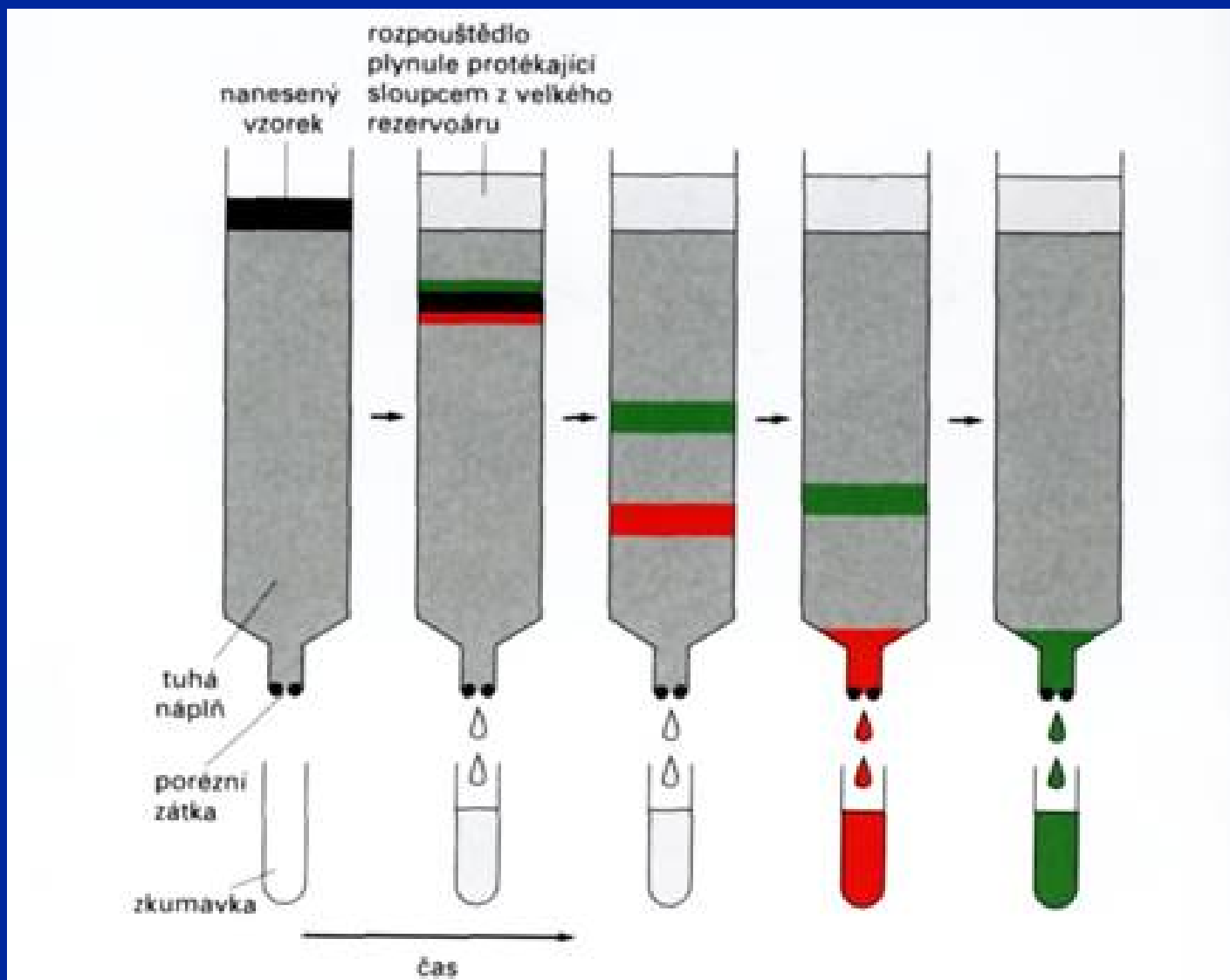
MALDI TOF-MS (Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry): ionizace vzorku



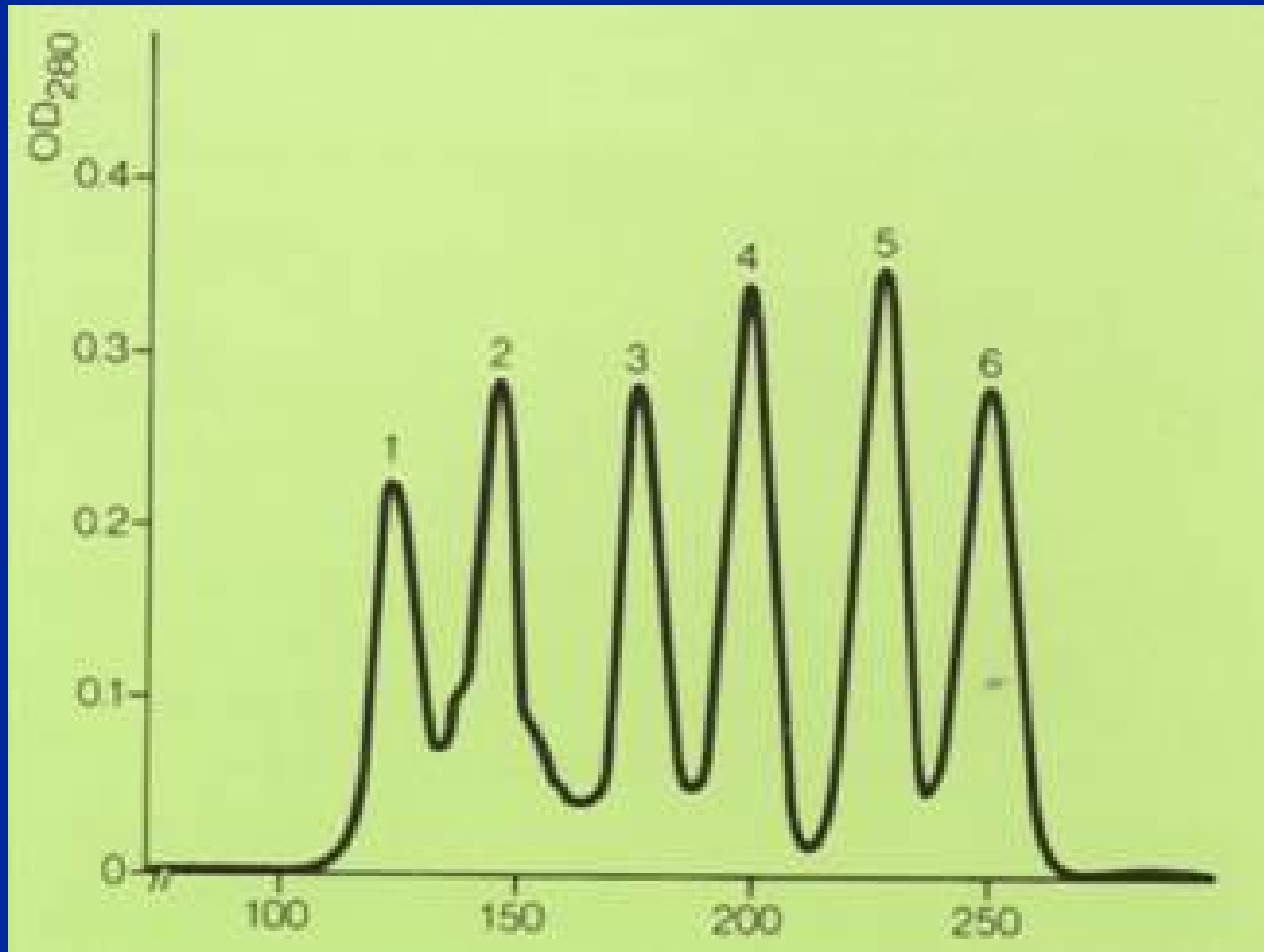
Gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)



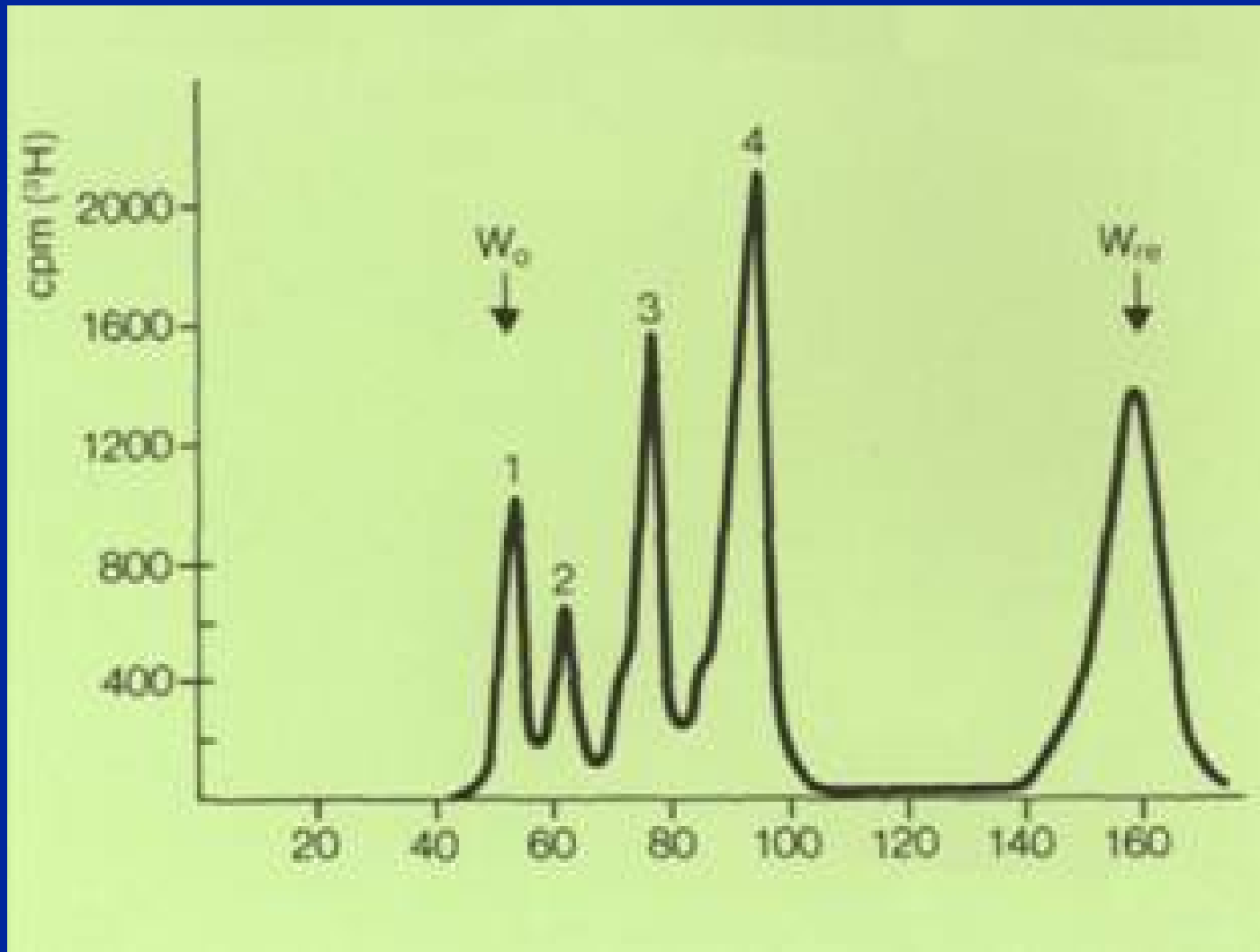
nízkotlaká LC, SPE: separace bílkovin a nízkomolekulárních látek (nukleotidy, metabolity, xenobiotika)



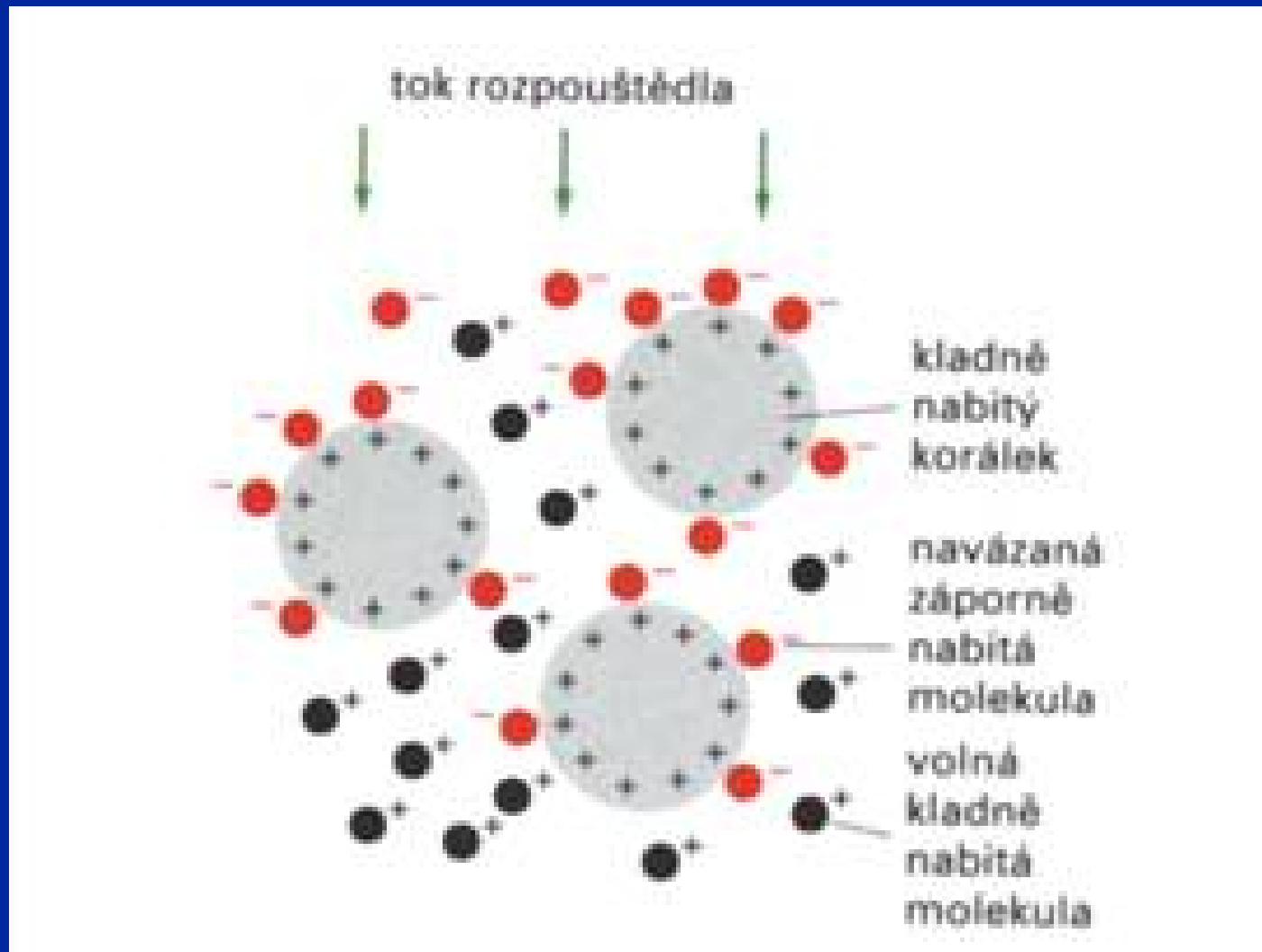
Gelová filtrace: separace standardních bílkovin / spektrofotometrická detekce



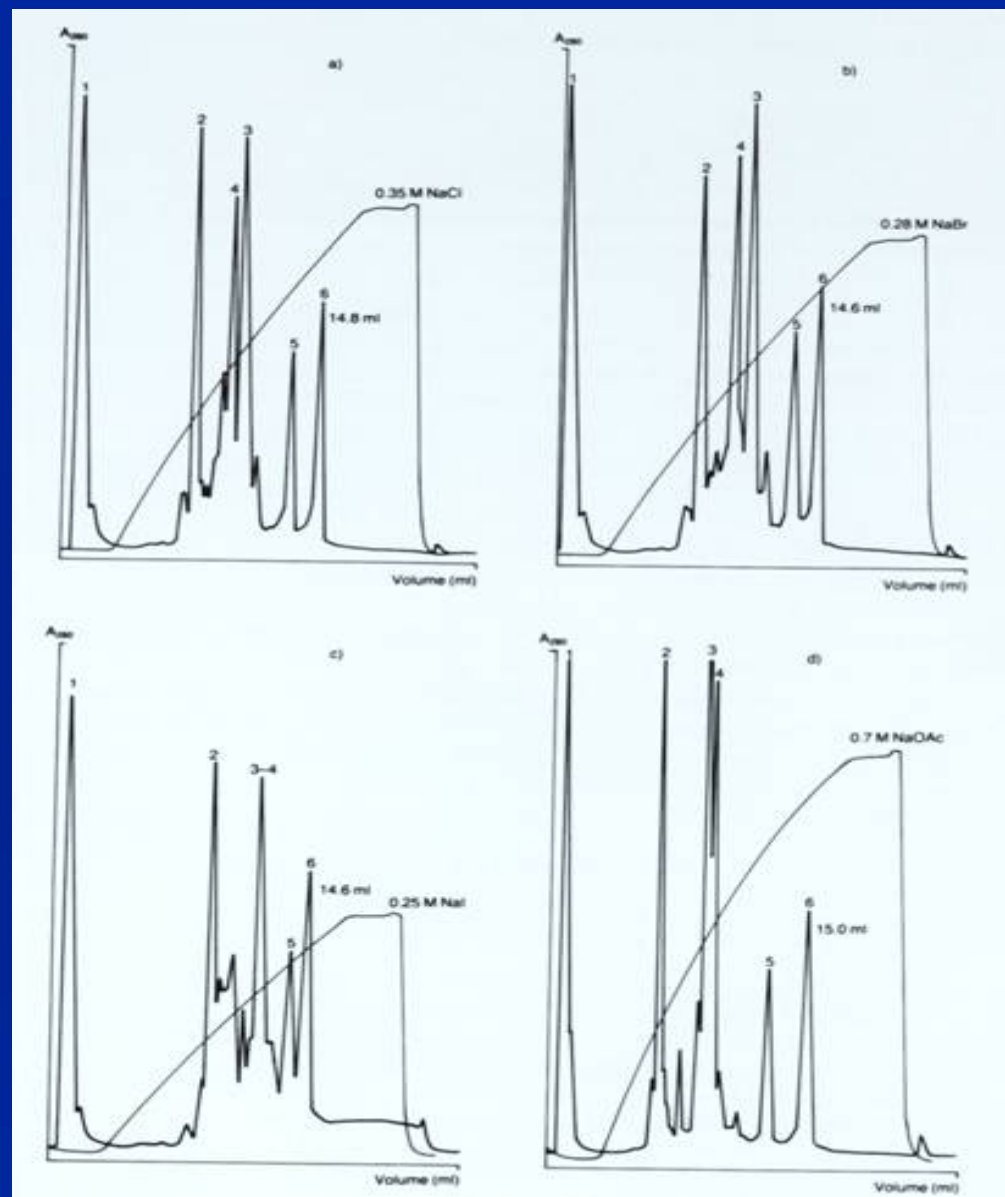
Gelová filtrace s radiometrickou detekcí specifickou pro značený substrát a metabolity



Iontová chromatografie



**Ionexová HPLC:
rozdělení proteinů
zvyšující se iontovou
silou mobilní fáze**



Afinitní chromatografie

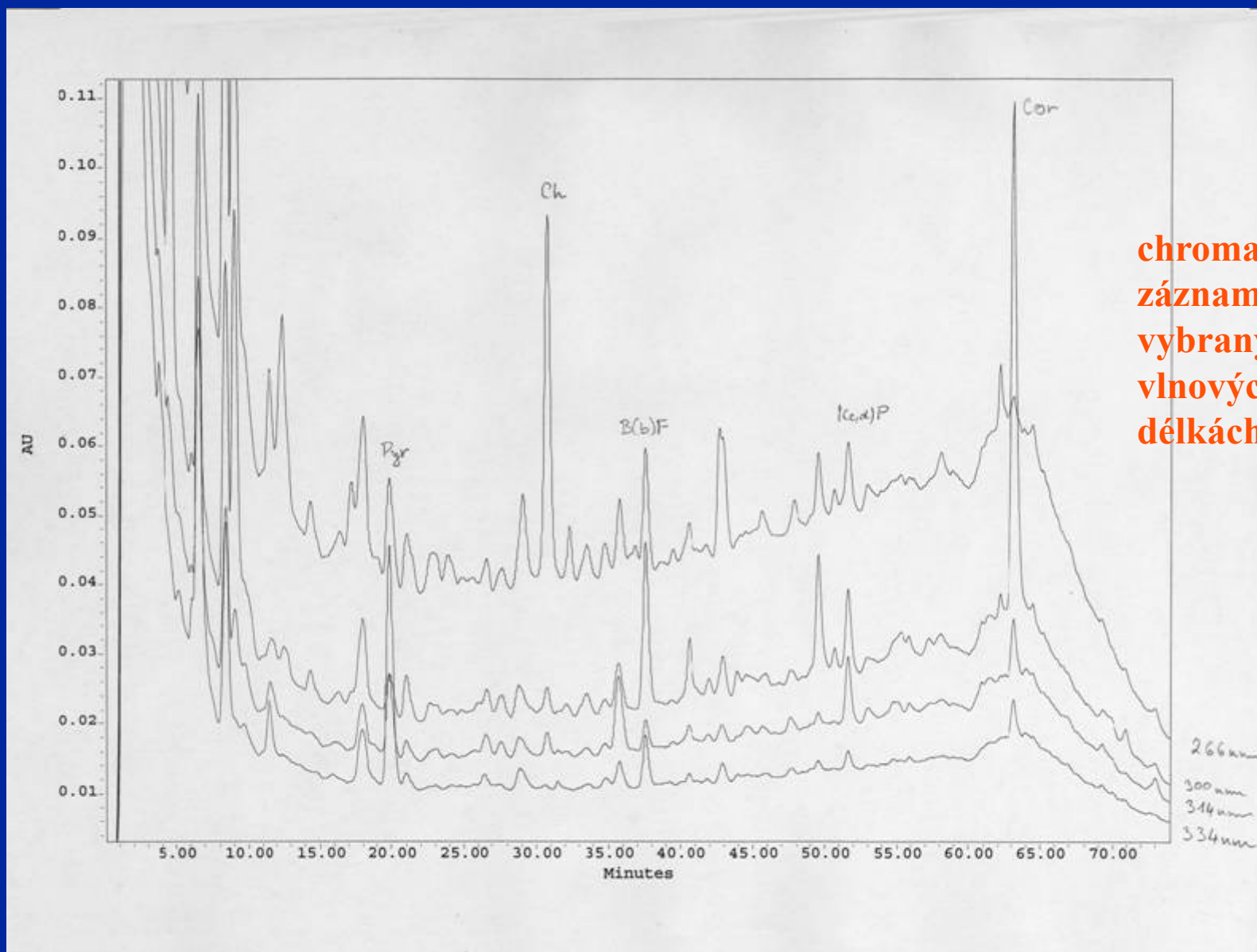
Na sorbentu
navázaný
substrát,
protilátka,
koenzym
apod.



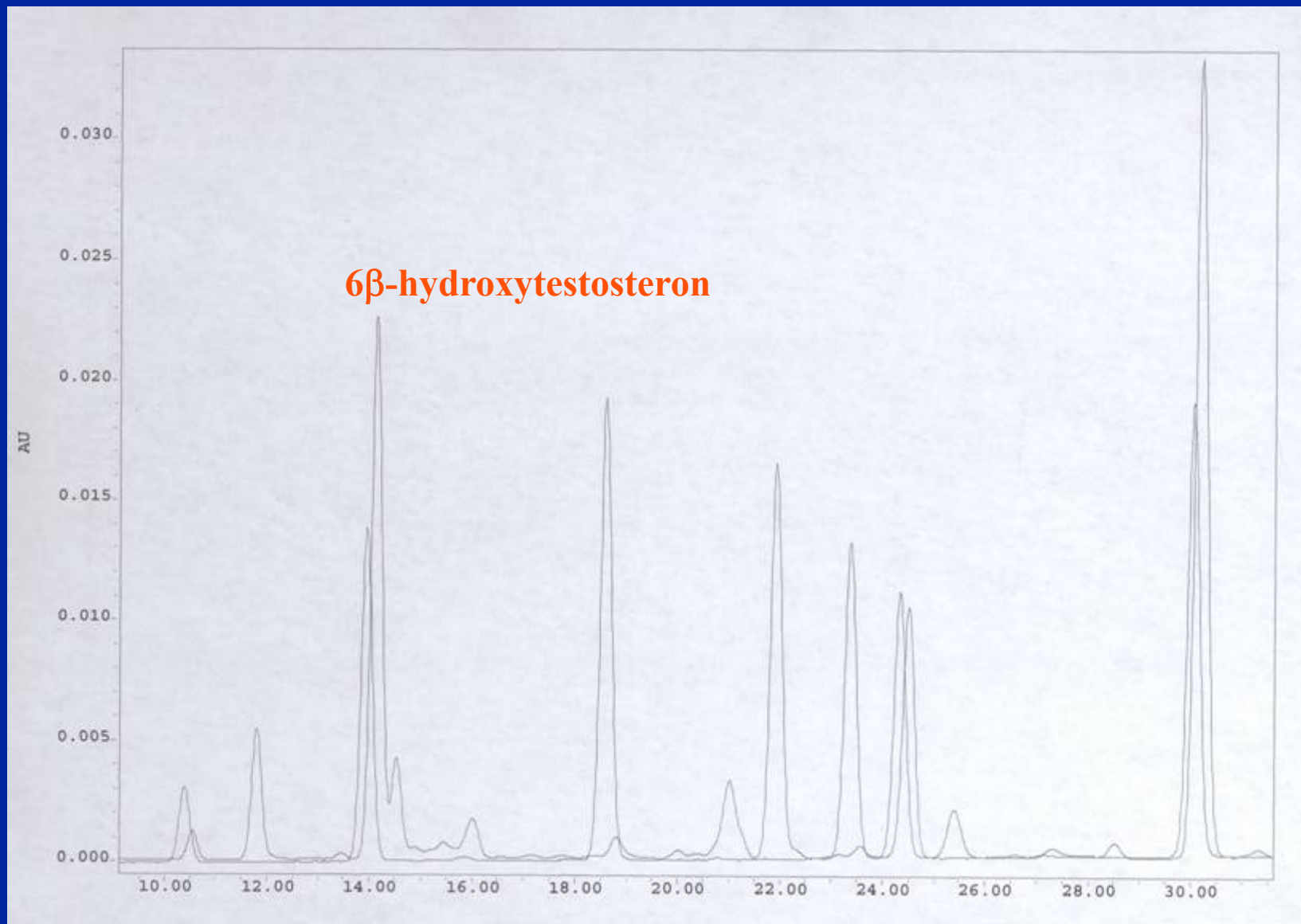
PŘÍKLADY HPLC ANALÝZ

- ◆ **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)**

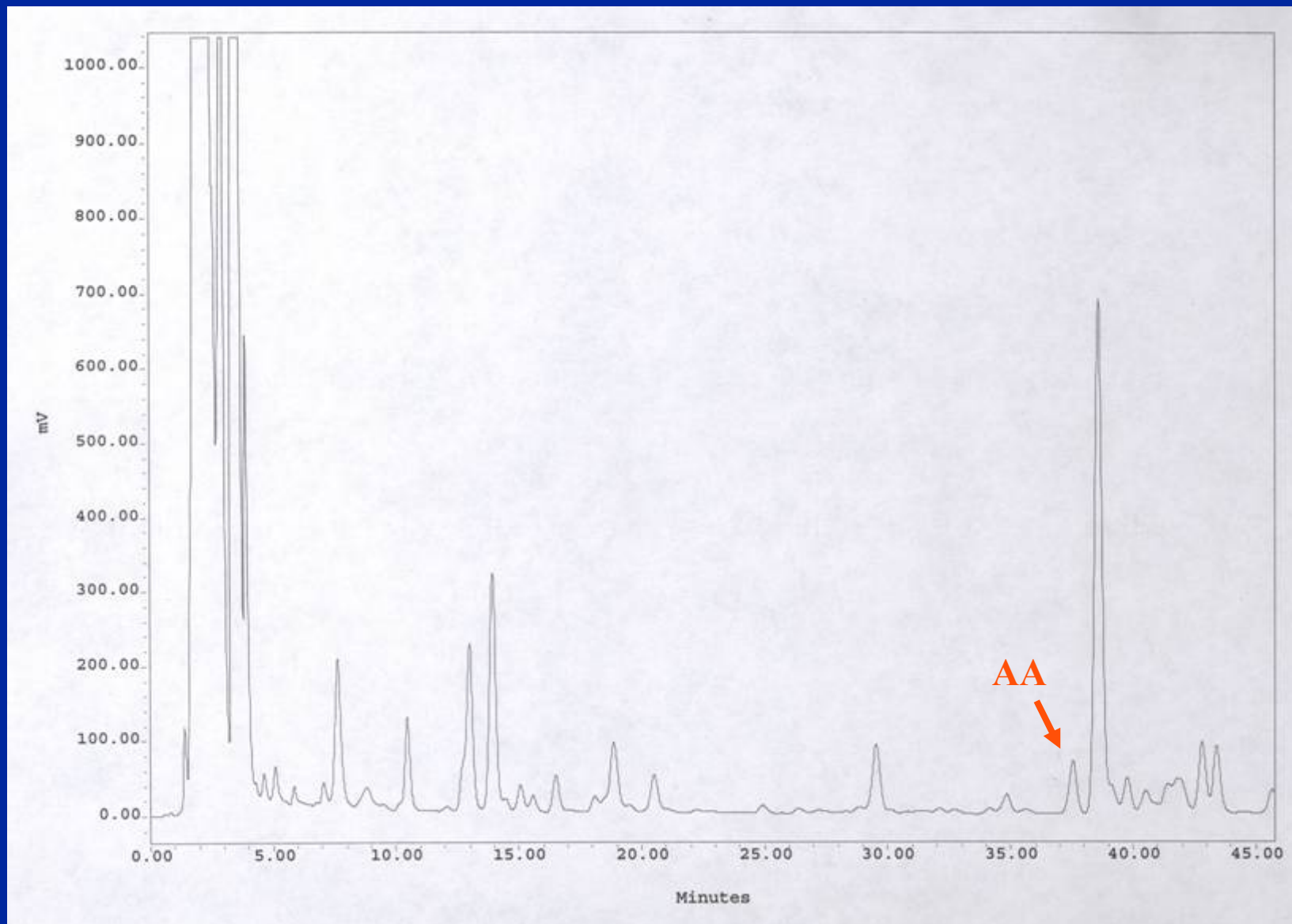
Reversní HPLC analýza PAHs: detekce pomocí diode-array detektoru (DAD)



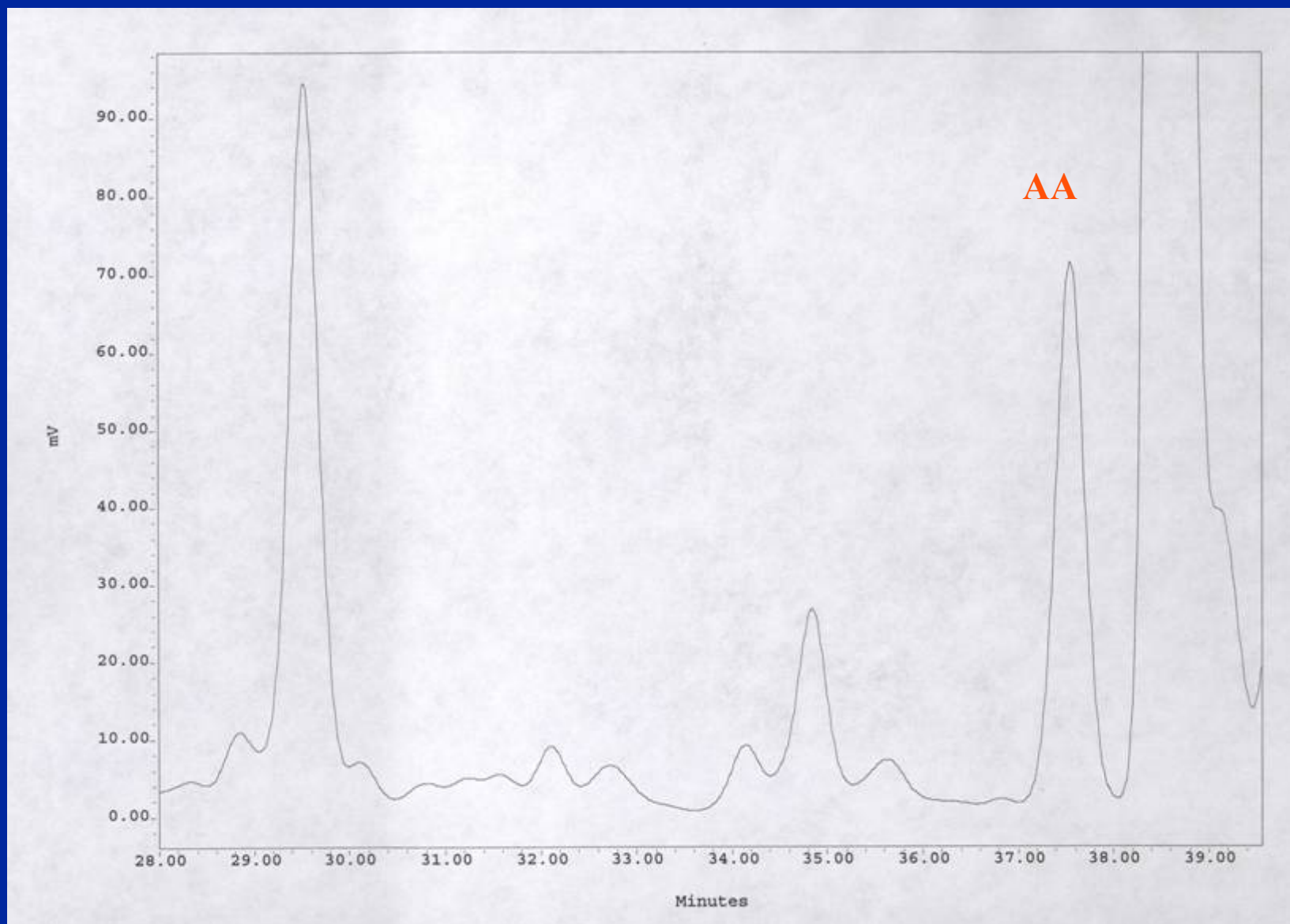
HPLC analýza hydroxylovaných metabolitů testosteronu (spektrofotometr. det.)



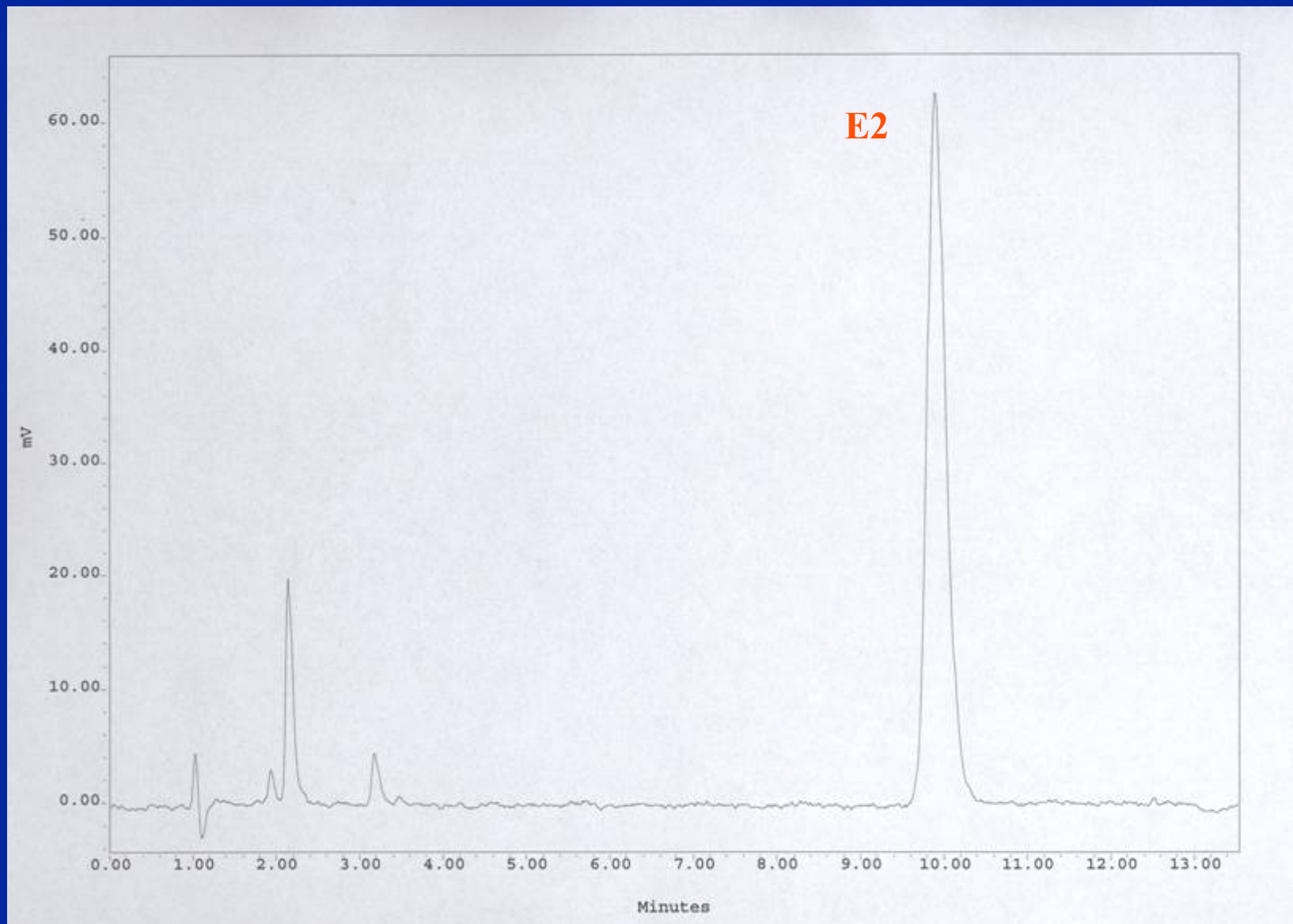
HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci pyrenyldiazomethanem



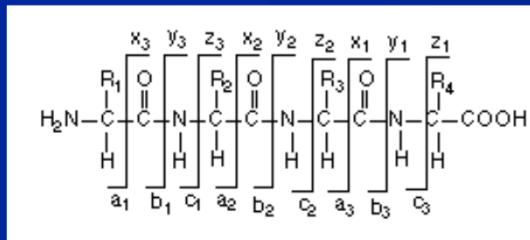
HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci PDAM (fluor. detekce)



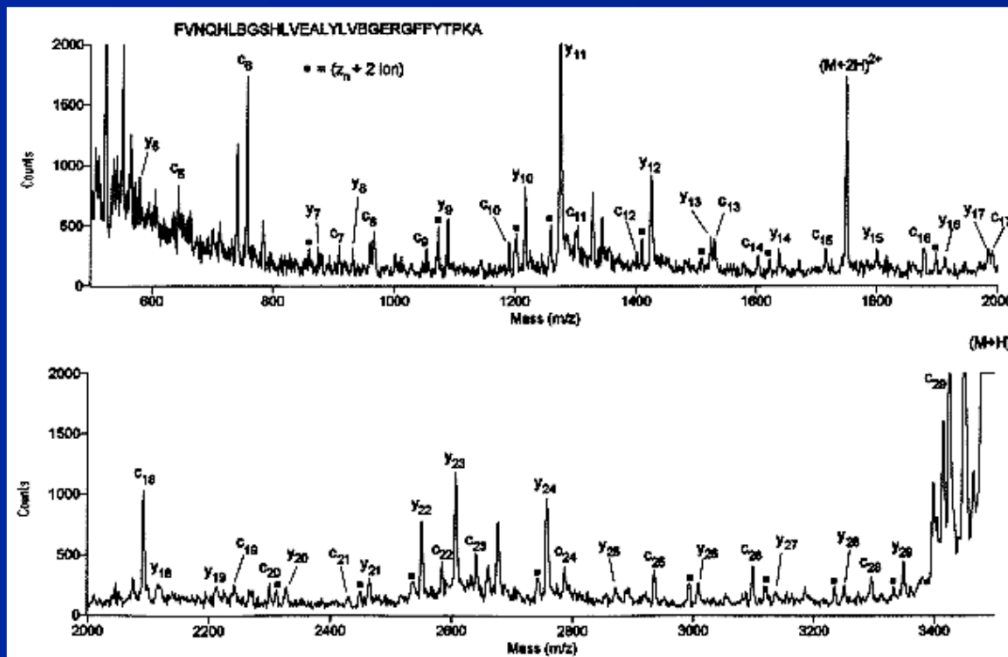
Stanovení aromatázové aktivity (HPLC analýza koncentrace produktu - E2)



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



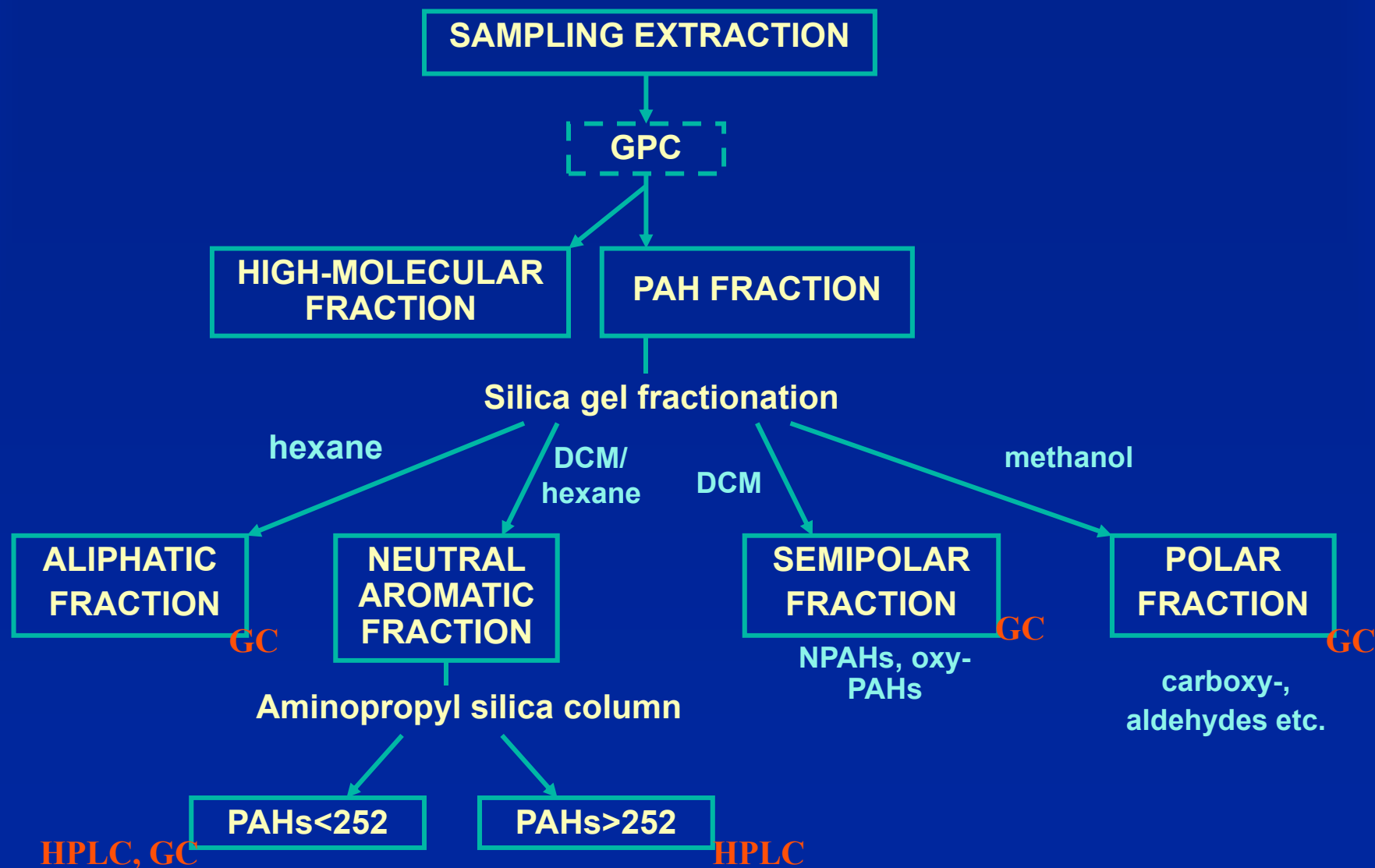
Fragmenty po rozštěpení vazeb peptidů



Iontová fragmentace peptidu
(ion decay mass spectrum):

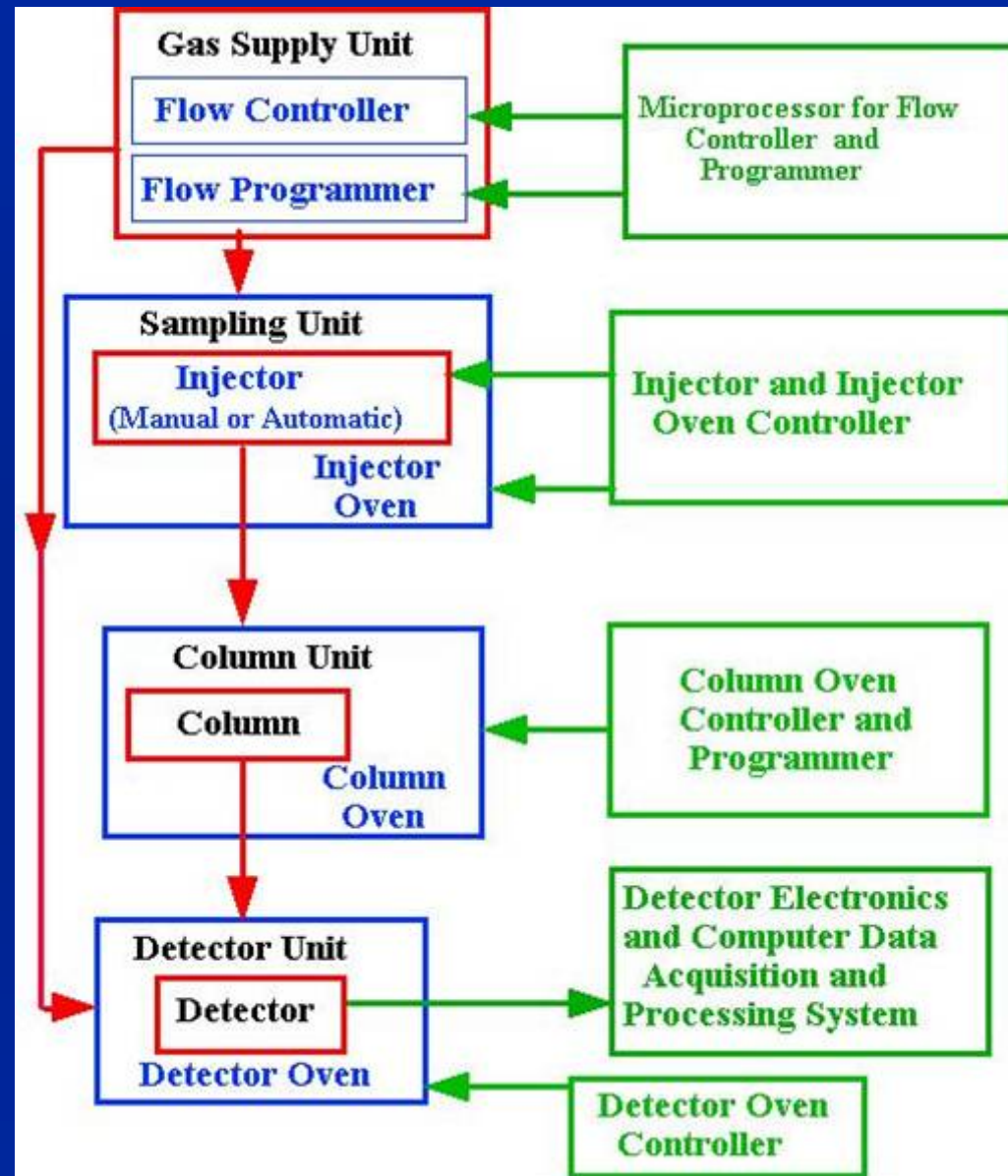
- přesné stanovení mol. hmotnosti;
- primární sekvence

UŽITÍ LC PRO FRAKCIONACI VZORKŮ - PŘÍKLAD STANOVENÍ ORGANICKÝCH CIZORODÝCH LÁTEK

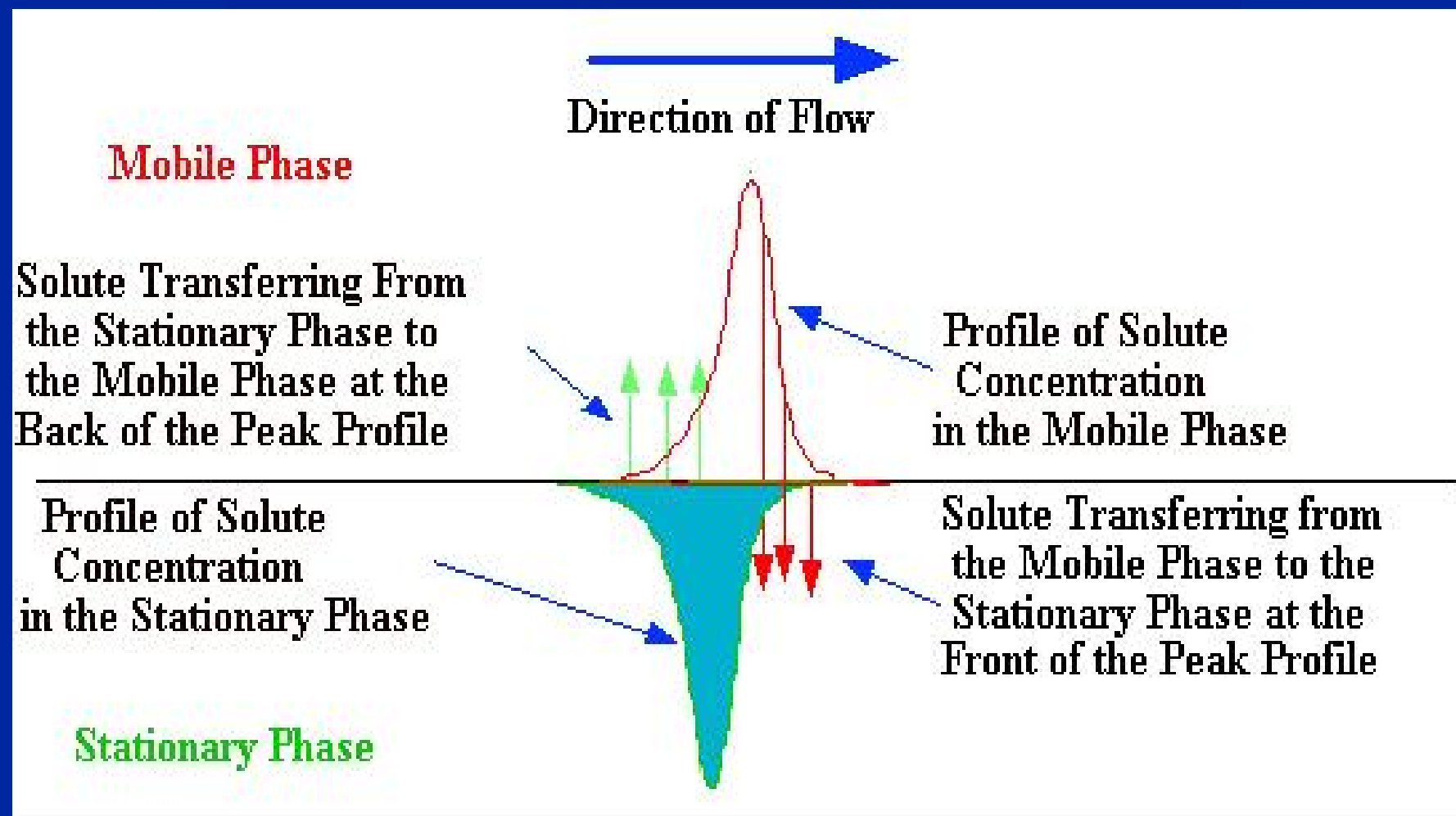


Uspořádání plynového chromatografu (GC)

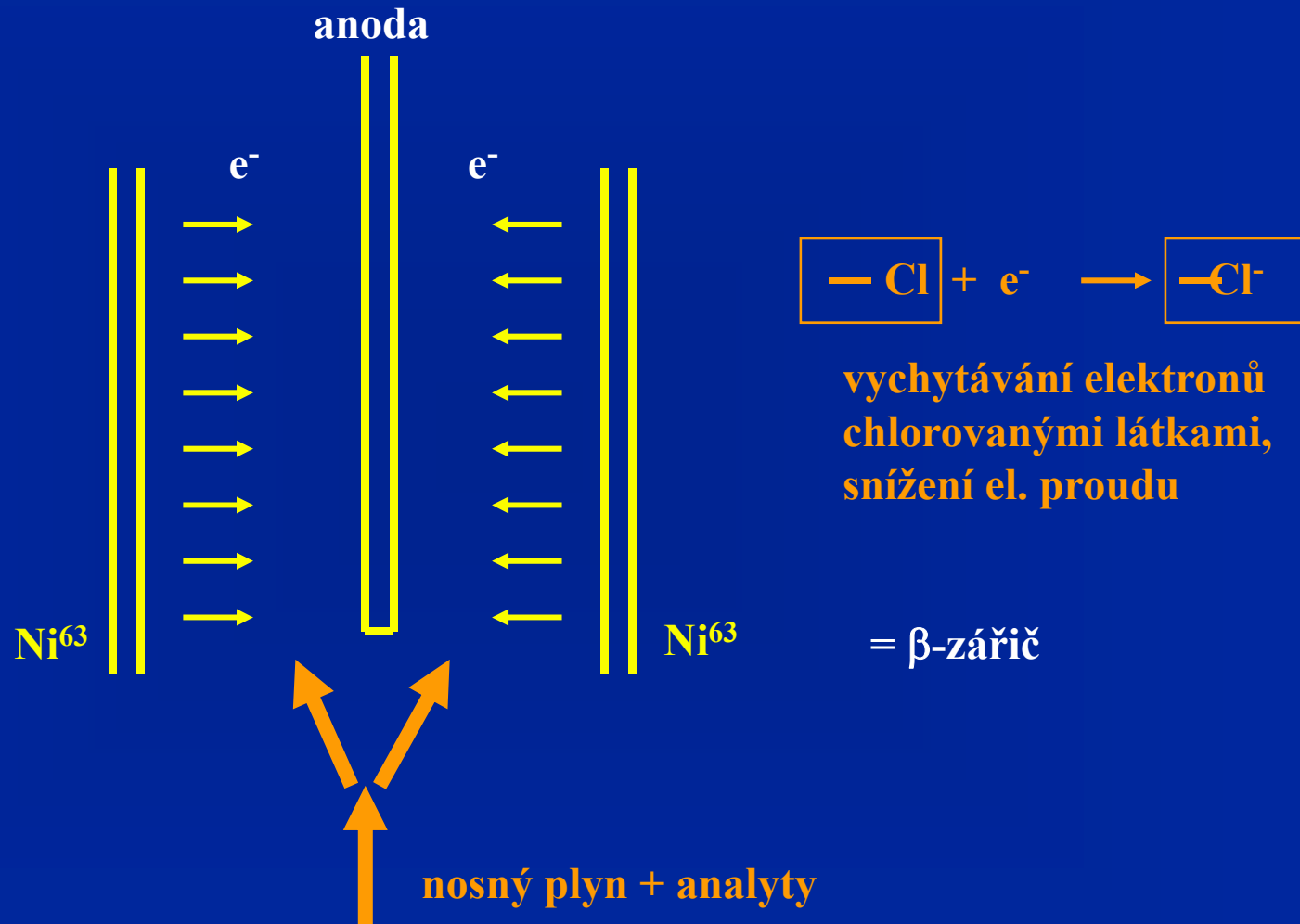
Detektory:
FID
ECD (chlor. látky)
MS (rozdělení podle hmotností fragmentů)



GC: Přechod látek mezi stacionární a mobilní fází



GC/ECD (electron capture detector): princip detekce



GC/MS:

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

MW 202

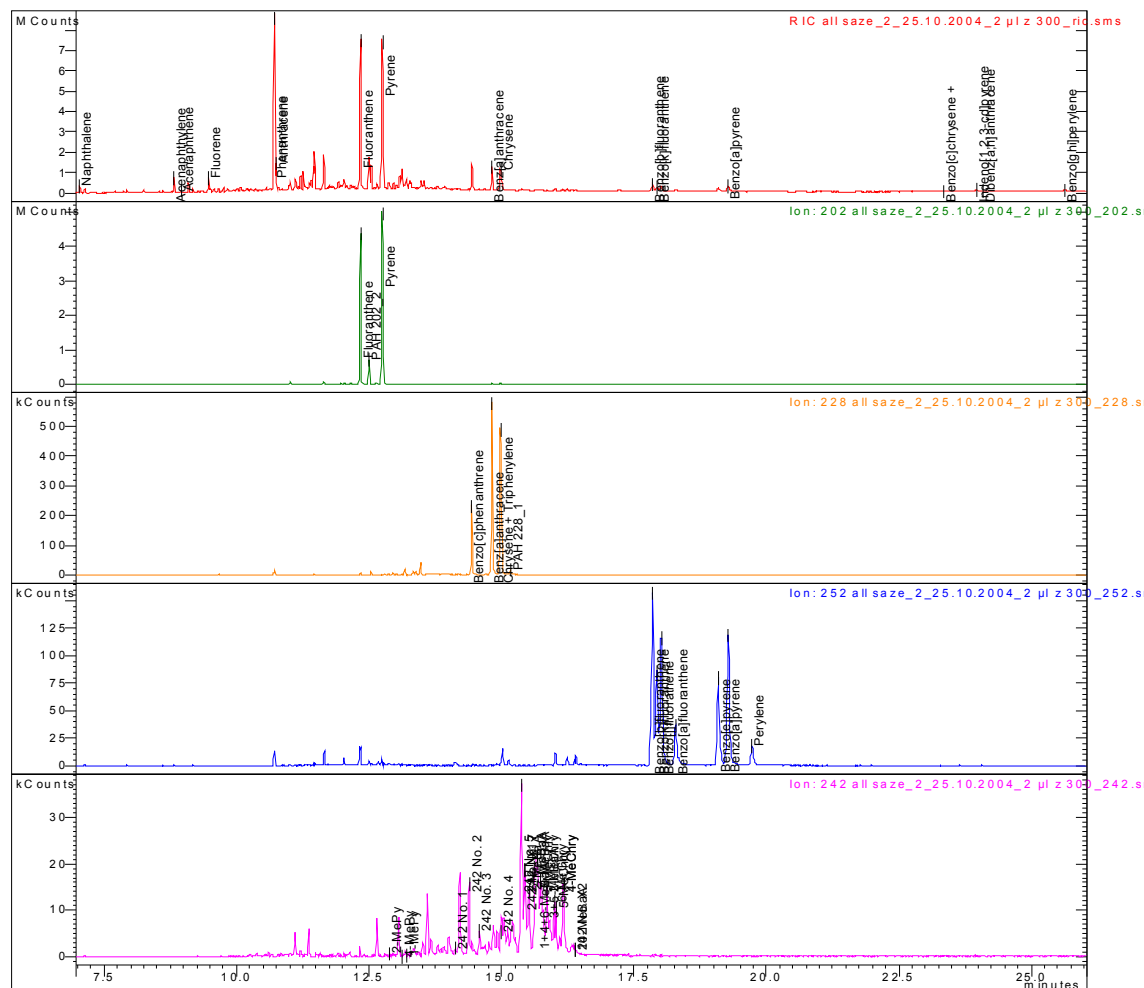
MW 228

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)

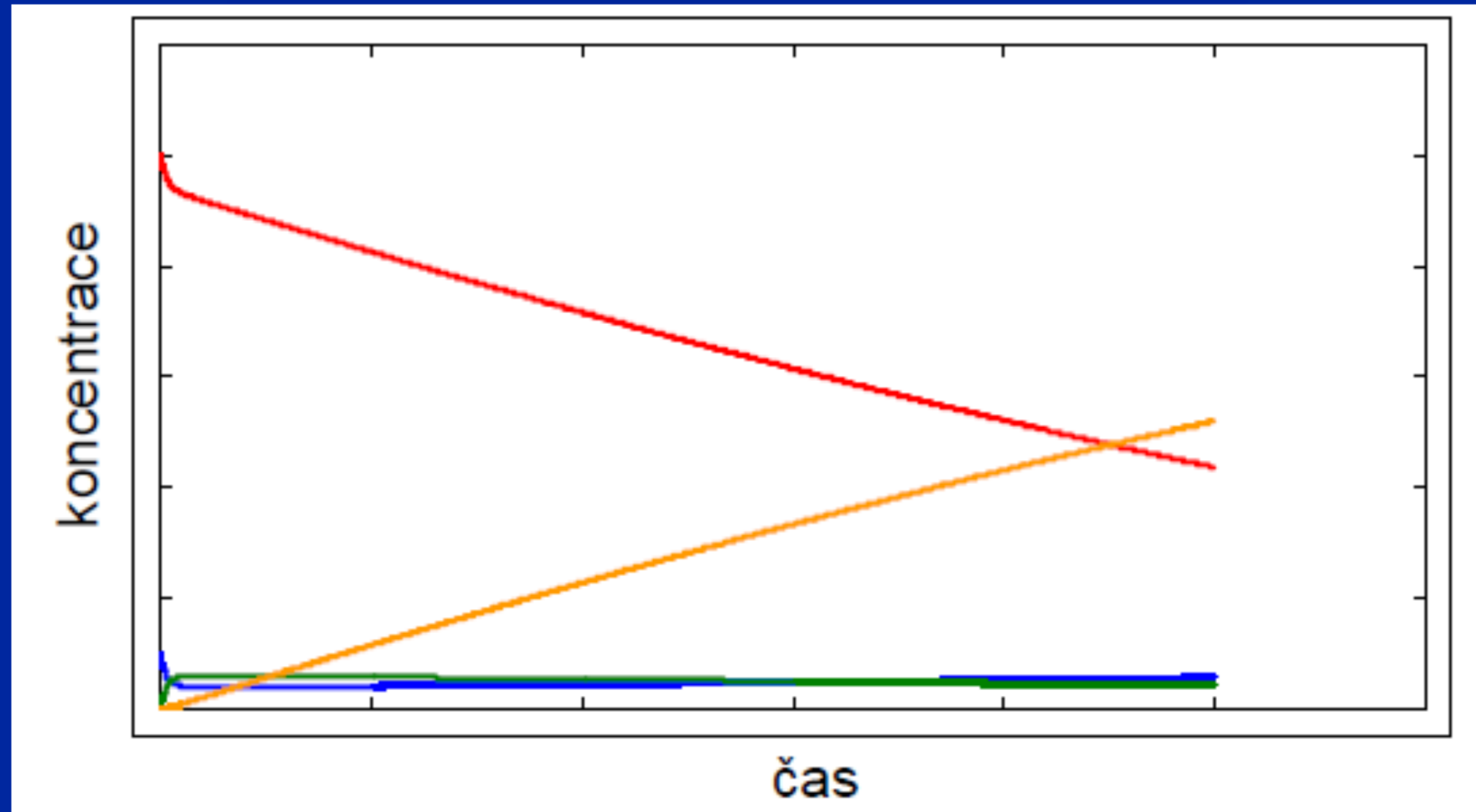
◆ **Příklady stanovení:**

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

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

- chemiluminiscenční stanovení luciferázy

Enzymová kinetika: ustálený stav (steady state)



SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

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

