

C3181

Biochemie I

02b-Bílkoviny – základní metody studia

FRVŠ **1647/2012**

Obsah

- Přehled obecných metod. Významné metody studia – sekvenace. Syntéza peptidů.

Metody studia bílkovin

- Studium
 - struktury – molekulární vlastnosti
 - - funkce – (katalytické aj. vlastnosti)
- Podle potřeby a účelu
 - izolace do potřebné čistoty
 - 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

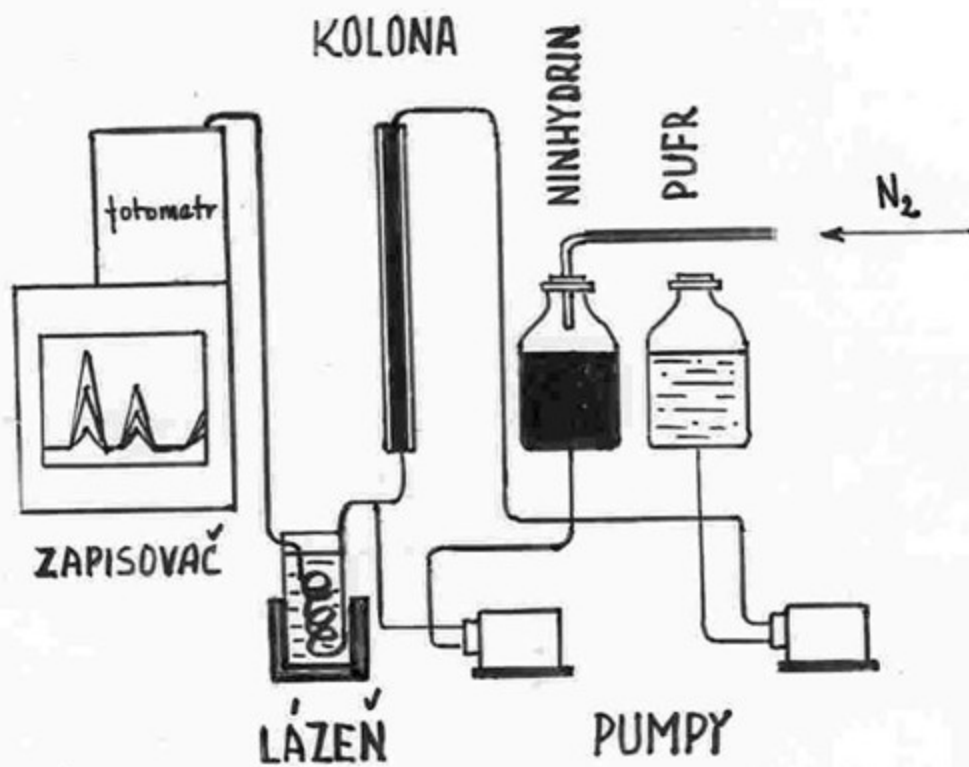
Obecné kroky při izolaci bílkovin

- Izolace – přehled metod
 - -desintegrace materiálu
 - -preparativní centrifugace
 - -srážecí metody, jsou založeny na změně rozpustnosti
 - - membránové separace
 - - chromatografie
 - - (preparativní elektromigrační metody – elektroforéza)
 - - krystalisace
- Analytické postupy – včetně metod separačních
 - elektroforéza a chromatografie v analytickém měřítku,
 - spektrální metody
 - Absorpční
 - disperzní
 - chiroptické metody
 - NMR
 - rentgenostrukturní analýza,
 - MS – moderní metoda umožňující i štěpení řetězce
 - další speciální metody

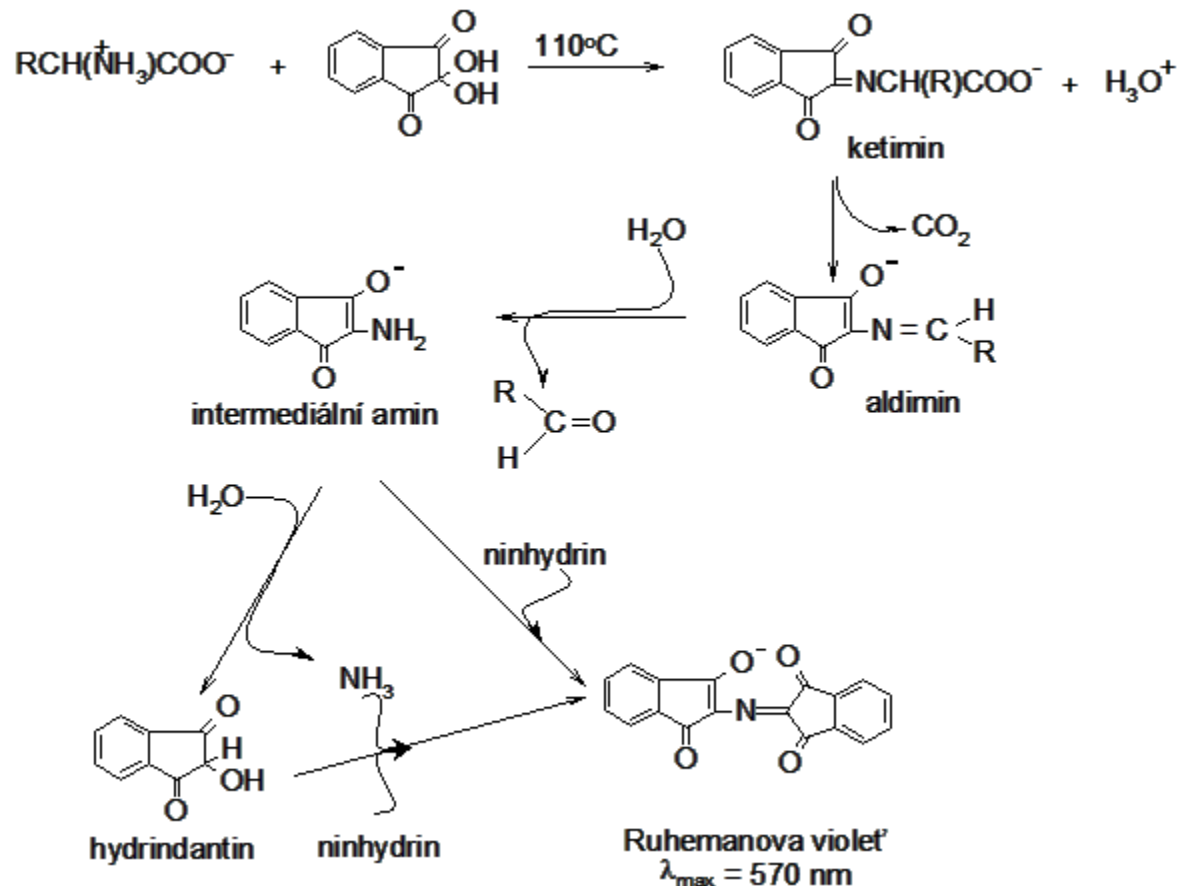
Určení primární struktury

- Analýza aminokyselinového složení.
 - Bílkovina se hydrolyzuje totálně (silně kyselé či zásadité prostředí, zatavená ampule, autokláv)
 - Směs aminokyselin se analyzuje standardními metodami
 - iontoměničovou chromatografií (analytické provedení)
 - nověji hydrofobní chromatografie nebo kapilární zonová elektroforéza.
- Kvantitativní analýza
 - Derivatizace činidlem poskytujícím barevný či fluoreskující
 - Téměř univerzální – ninhydrinová reakce – modrofialové zbarvení se všemi aminokyselinami s výjimkou Pro (a Hypro), kdy vzniká žluté zbarvení.
 - Další způsoby derivatizace (dansylace, fluorescamin aj.)

Schéma analyzátoru aminokyselin

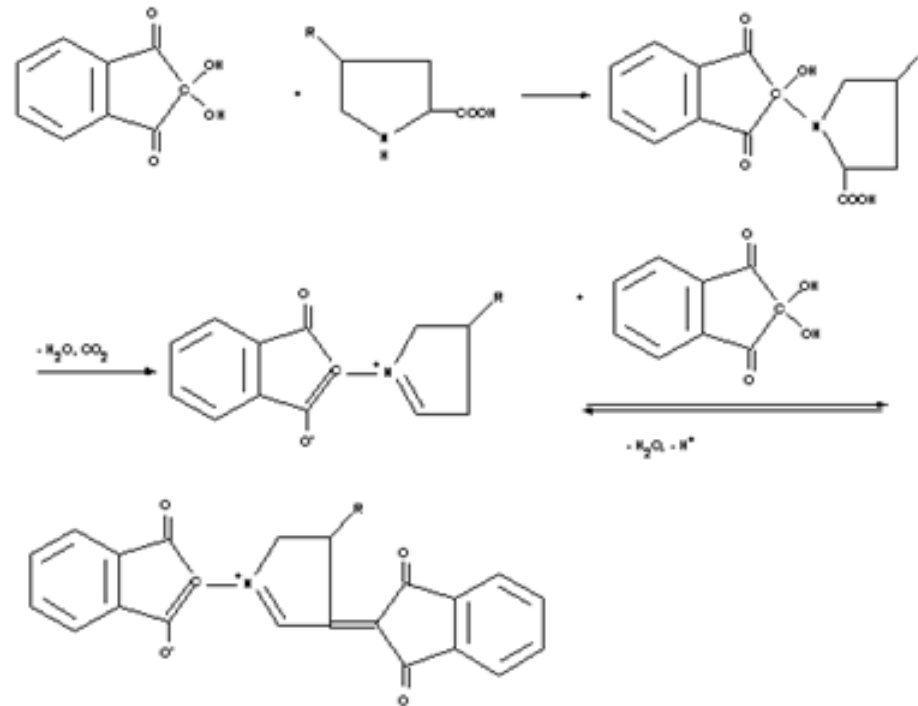


Ninhydrinová reakce



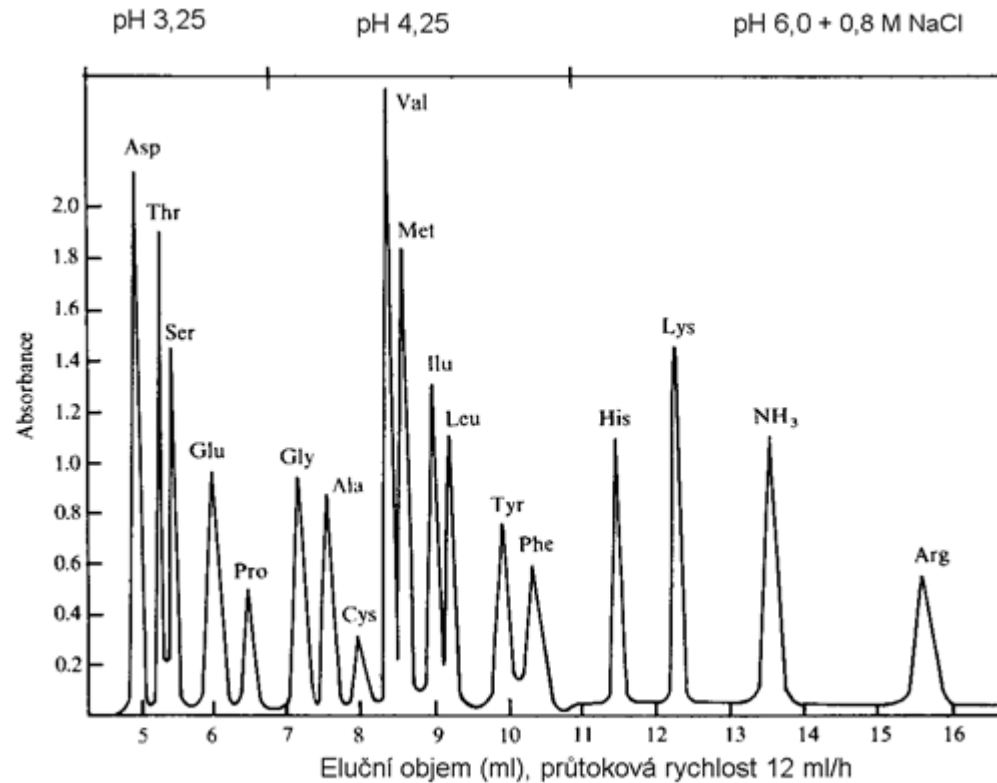
- Schéma ninhydrinové reakce obecně, $\lambda = 570 \text{ nm}$

Ninhydrinová reakce



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

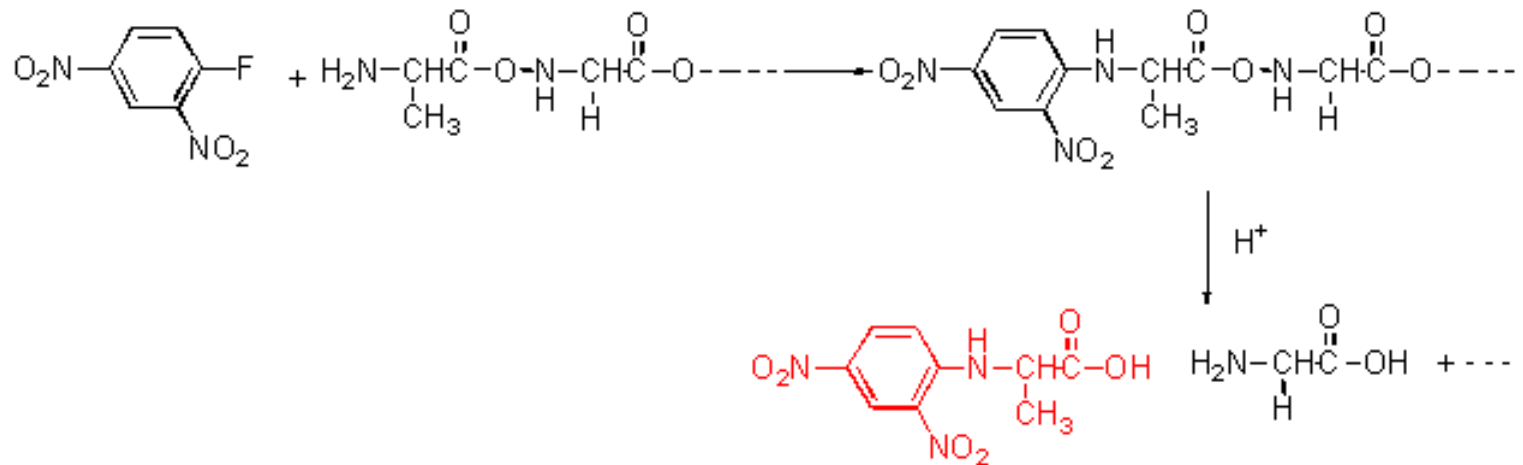
IEC aminokyselin



- Eluční profil aminokyselin
 - Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení

Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

- Sangerova metoda
 - N-koncová AK označena dinitrofluorbenzenem
 - Poté kompletní hydrolýza řetězce

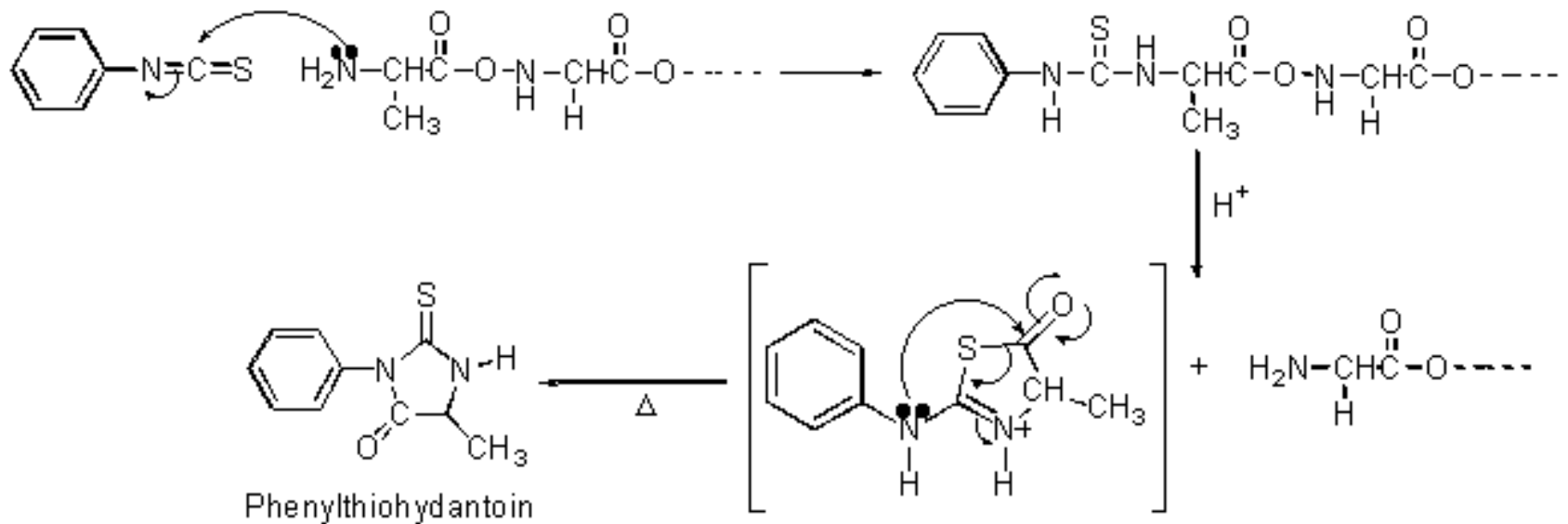


- Určení sekvence insulínu

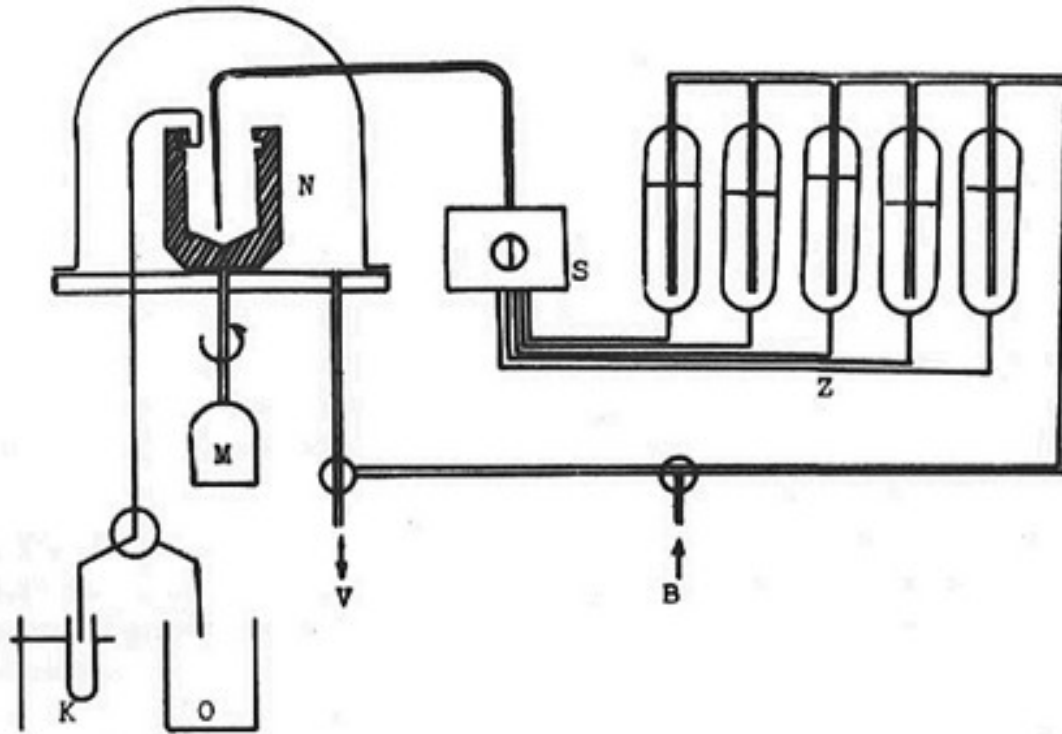
Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

- Edmanova metoda

- N-koncová AK označena fenylisotiokyanátem
- Poté mírná hydrolýza N-koncové AK, zbytek řetězce lze opětovně analyzovat (ca 30 kroků)
- Cyklický proces – automatický sekvenátor



Určení pořadí aminokyselin - sekvenace



- Schéma sekvenátoru
 - Jednotlivé kroky oddělené promýváním

Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

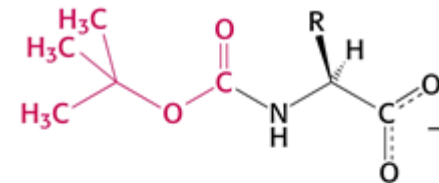
- Další speciální operace
 - Denaturace
 - Separace řetězců
 - Redukce $-COOH$
- Jiná specifická štěpení
 - Enzymatická
 - Chemická (BrCN – Met)

Syntéza polypeptidů

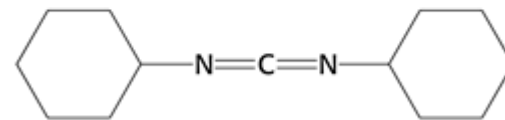
- Význam
 - Příprava velkých množství přirozených bílkovin (inzulin, HGH aj.)
 - Příprava modifikovaných a umělých bílkovin
- Možnosti – chemická či enzymová syntéza – výhody a nevýhody
- Chemická syntéza
 - Aktivované reaktanty
 - Kondenzační činidla
 - Nežádoucí reakce – ochrana skupin – blokace
 - Problém odstranění meziproductů
- Enzymová syntéza
 - Molekulárně biologické postupy

Syntéza peptidů

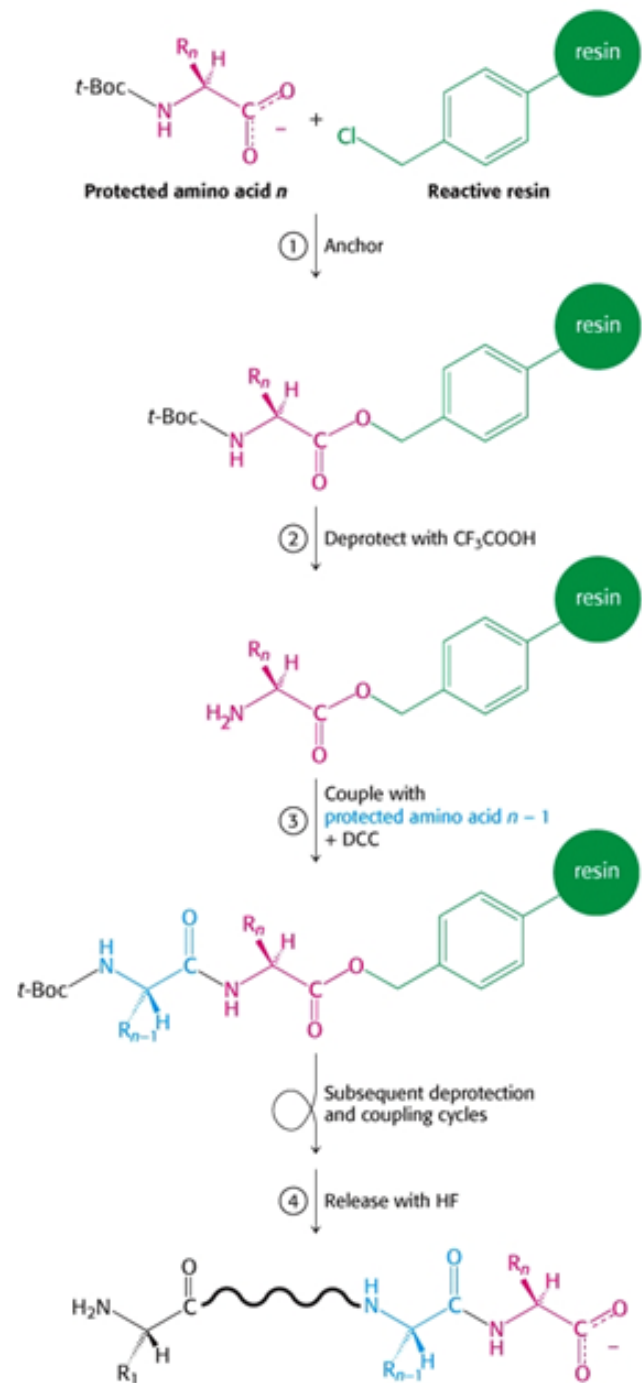
- Reaktanty
 - Blokující skupina
 - Kondenzační činidlo



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



**Dicyclohexylcarbodiimide
(DCC)**



Sled reakčních kroků
Merrifieldovy syntézy
na pevné fázi