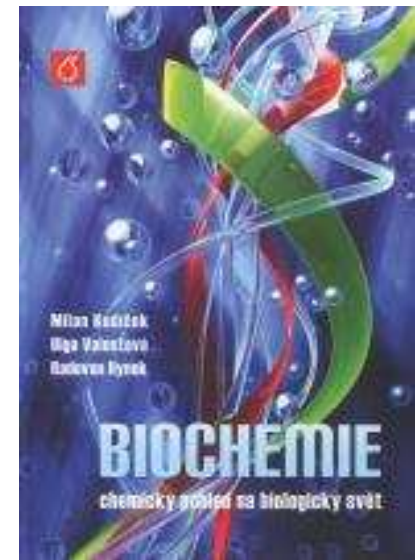


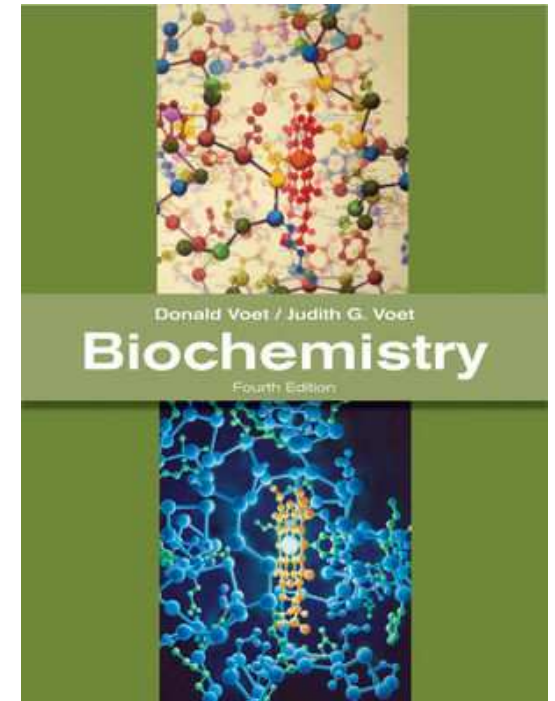
# Biochemie



## Česká studijní literatura

- Milan Kodlíček, Olga Valentová, Radovan Hynek *Biochemie*. VŠCHT, 2015
- Zdeněk Vodrážka. *Biochemie*. 3. opr. vyd. Praha : Academia, 2007.
- Šípal, Zdeněk. *Biochemie*. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1992.
- Voet, Donald - Voet, Judith G. *Biochemie*. Translated by Arnošt Kotyk. 1. vyd. Praha : Victoria Publishing, 1995.

# Biochemie



## Anglická studijní literatura

- Voet, Donald - Voet, Judith G.  
*Biochemistry*. 4th ed. Hoboken :  
John Wiley & Sons, 2011
- Voet, Donald - Voet, Judith G. - Pratt, Charlotte  
W. *Fundamentals of biochemistry : life at the  
molecular level*. 3rd ed. Hoboken, N.J. : John  
Wiley & Sons, 2008.
- Boyer, Rodney. *Concepts in biochemistry*. 2nd ed.  
New York : John Wiley & Sons, 2002.

# Biochemie

1. ÚVOD

2. BÍLKOVINY - Struktura, vlastnosti a funkce

3. NUKLEOVÉ KYSELINY - Struktura, vlastnosti a funkce

4. SACHARIDY - Struktura, vlastnosti a funkce

5. LIPIDY - Struktura, vlastnosti a funkce

6. ENZYMOLOGIE

7. METABOLISMUS A BIOENERGETIKA

8. METABOLISMUS SACHARIDŮ

9. FOTOSYNTÉZA

10. METABOLISMUS LIPIDŮ

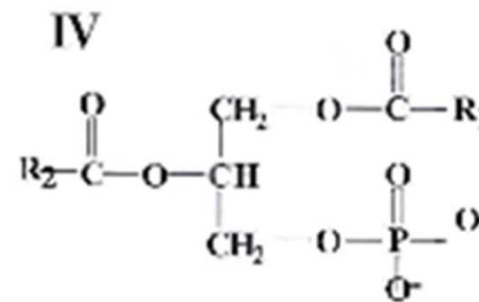
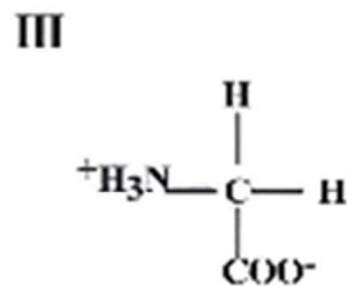
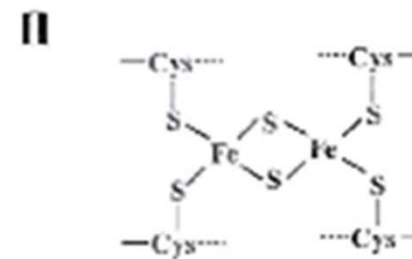
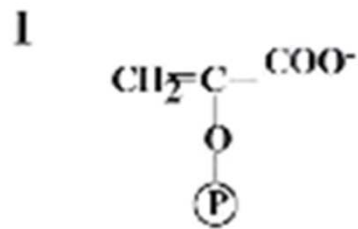
11. METABOLISMUS BÍLKOVIN

12. REGULACE BIOCHEMICKÝCH PROCESŮ

13. MOLEKULÁRNÍ FYZIOLOGIE

14. XENOBIOCHEMIE

# Zkouška z biochemie



1. Metody purifikace bílkovin
2. Kinetika jednosubstrátové enzymové reakce
3. Biosyntéza mastných kyselin

# Otázky ke zkoušce z biochemie

## Statická biochemie

1. Chemické složení živých organismů.

Prvkové složení, anorganické látky – voda, organické látky, biopolymery.

2. Aminokyseliny – přehled a rozdělení.

Kódované – rozdělení (nepolární, polární, nabité) a nekódované.

3. Aminokyseliny - chemické a fyzikální vlastnosti.

Acidobazické, optická aktivita, chemické reakce, analýza.

4. Peptidy – nejdůležitější biologicky aktivní.

Názvosloví, biosyntéza, GSH, oxytocin vasopresin, inzulín.

# Otázky ke zkoušce z biochemie

## Statická biochemie

1. Chemické složení živých organismů.
2. Aminokyseliny – přehled a rozdělení.
3. Aminokyseliny - chemické a fyzikální vlastnosti.
4. Peptidy – nejdůležitější biologicky aktivní.
5. Peptidická vazba a její vlastnosti.
6. Bílkoviny – rozdělení podle tvaru (struktury) a funkce atd.
7. Bílkoviny a jejich struktura, metody studia struktury.

# Biochemie

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

# Historický úvod

fysiologie a lékařství

Studium tělních tekutin pro klinickou diagnostiku  
+ procesy v organismu probíhající

organická chemie

**biochemie** Hoppe Seyler

Molekulové složení organismů

Synonyma : Biological Chemistry

Physiologische Chemie



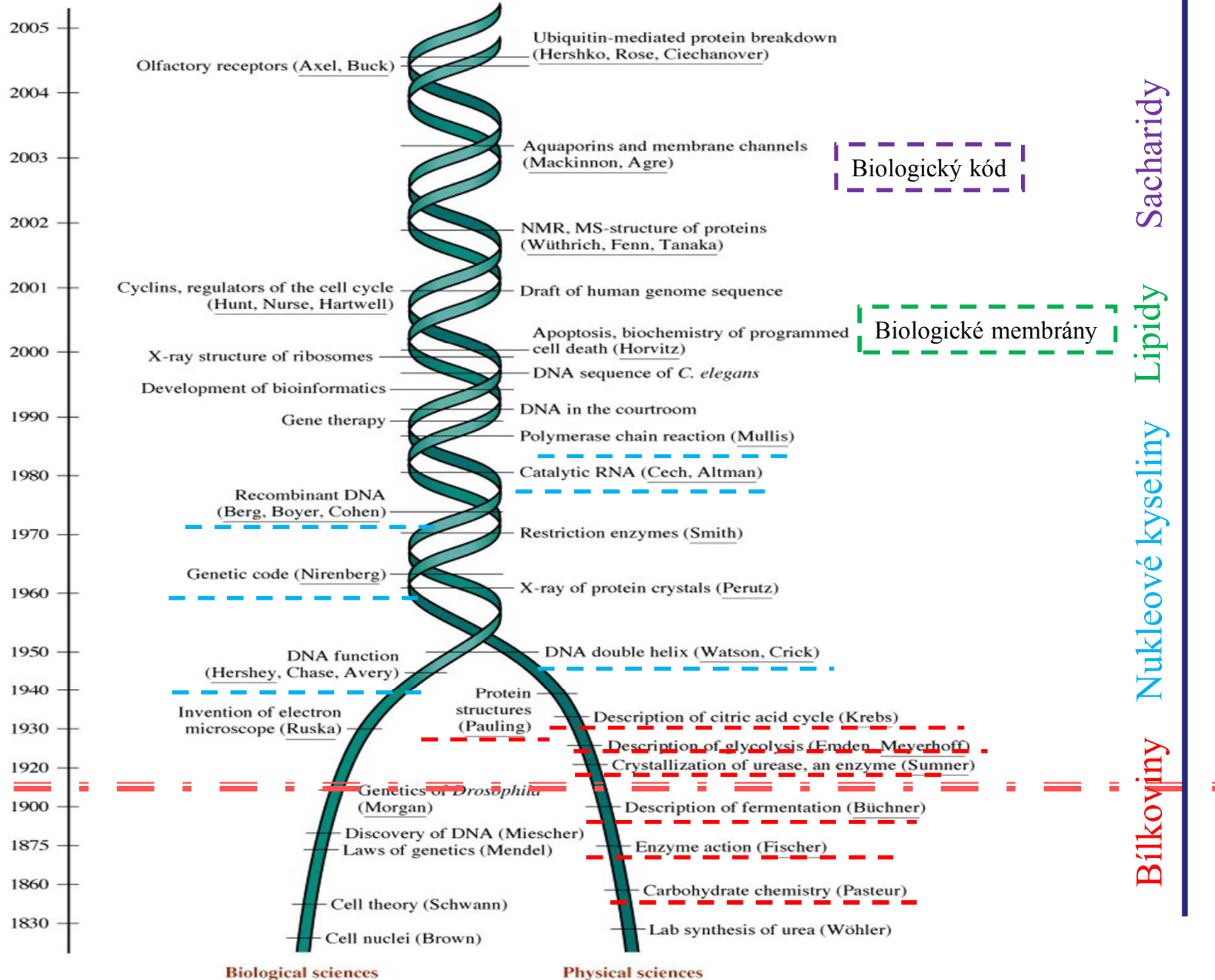
**BIOCHEMIE**

**Hoppe Seyler**

**1877**

**Neuberg**

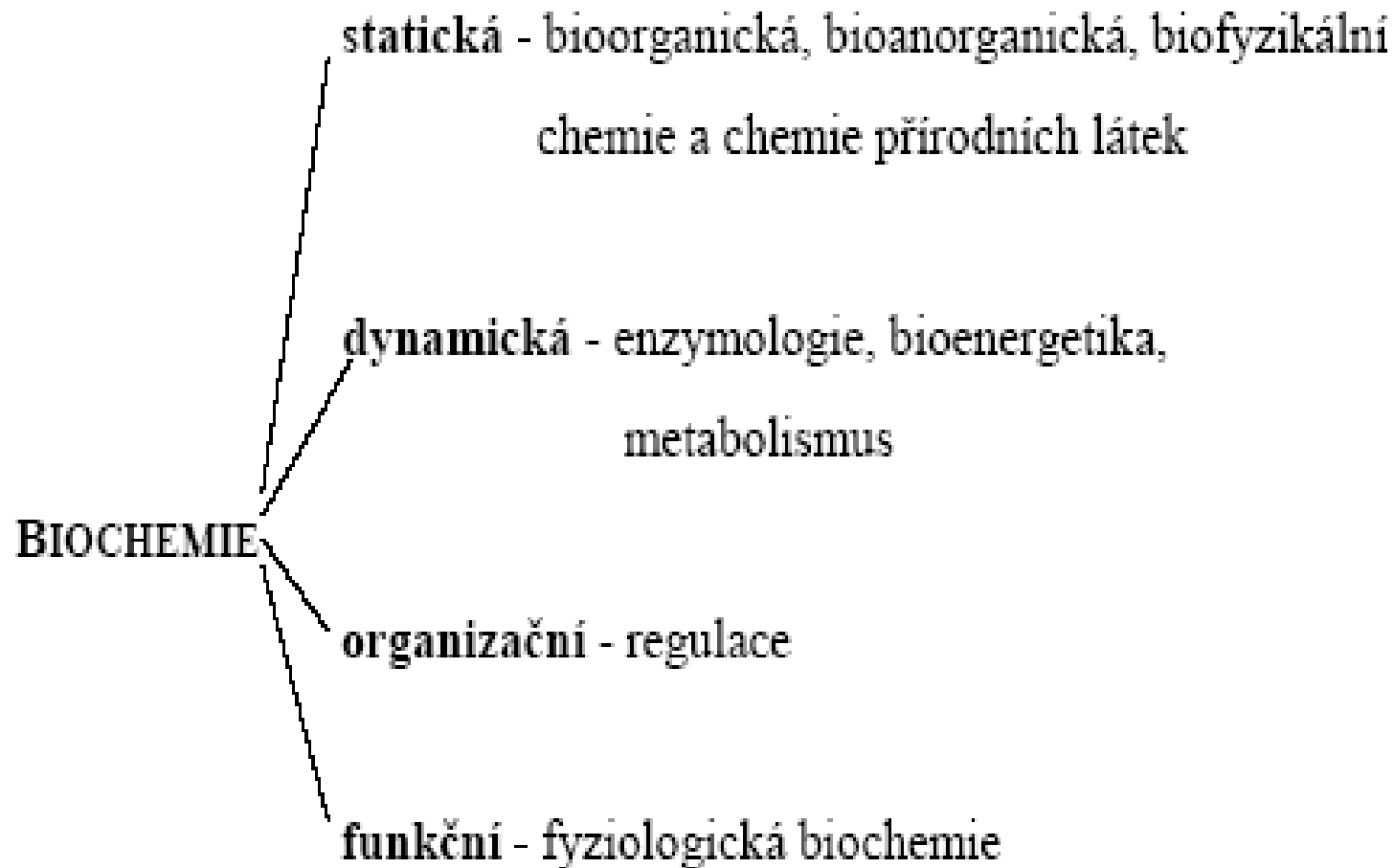
**1903**

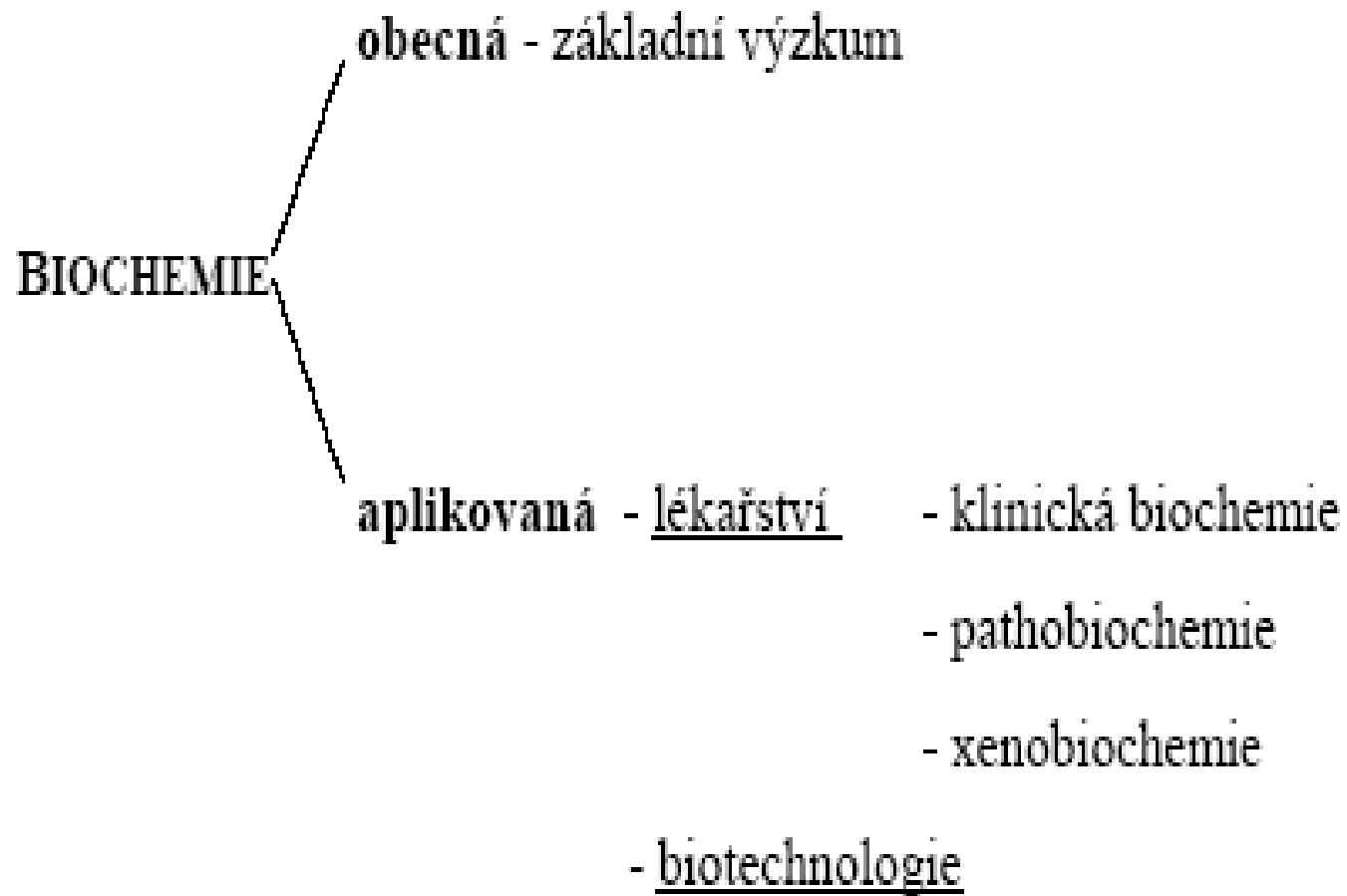


**Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e**  
 © 2006 John Wiley & Sons

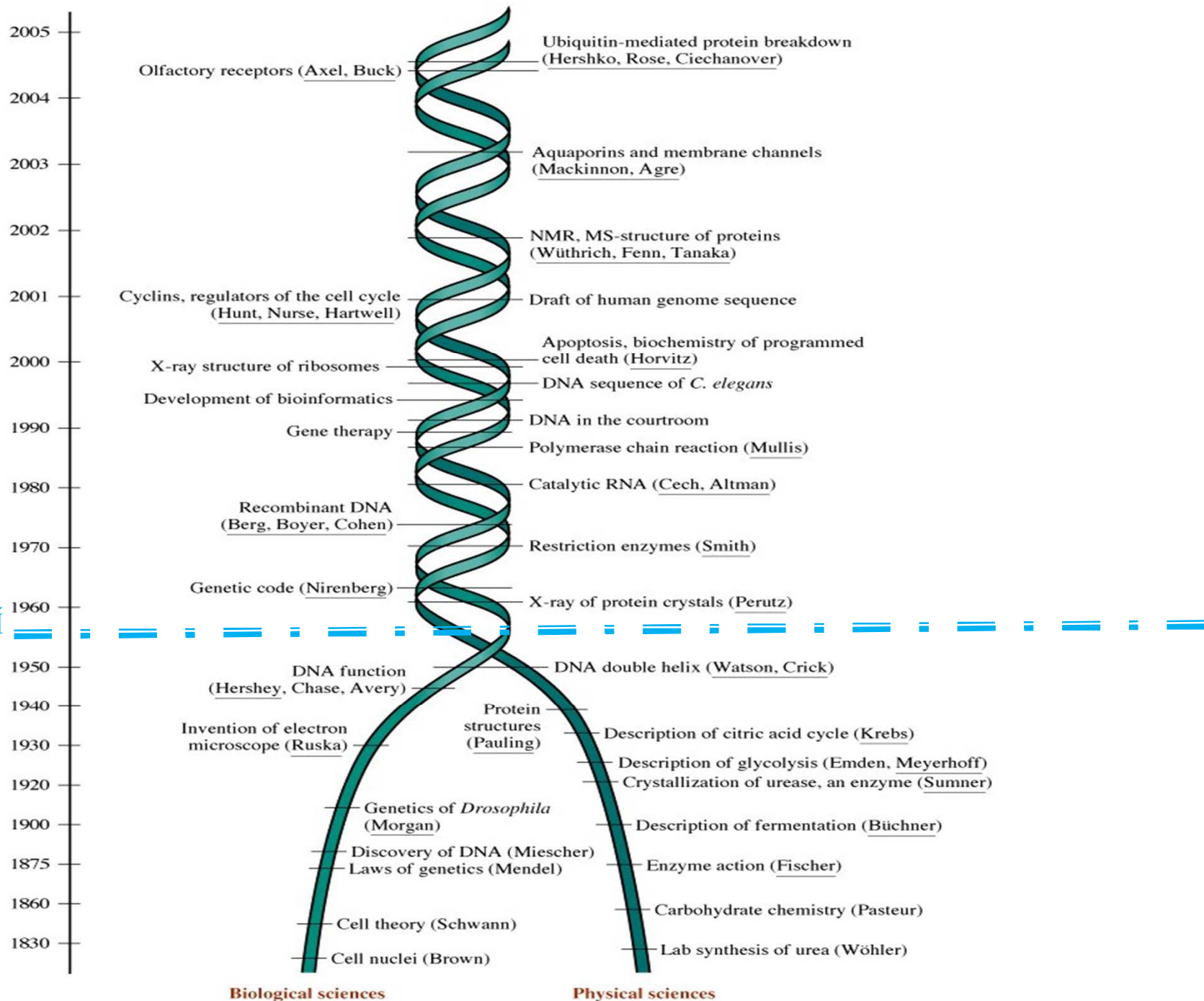
Dvě období : A. období statické biochemie

B. období dynamické biochemie

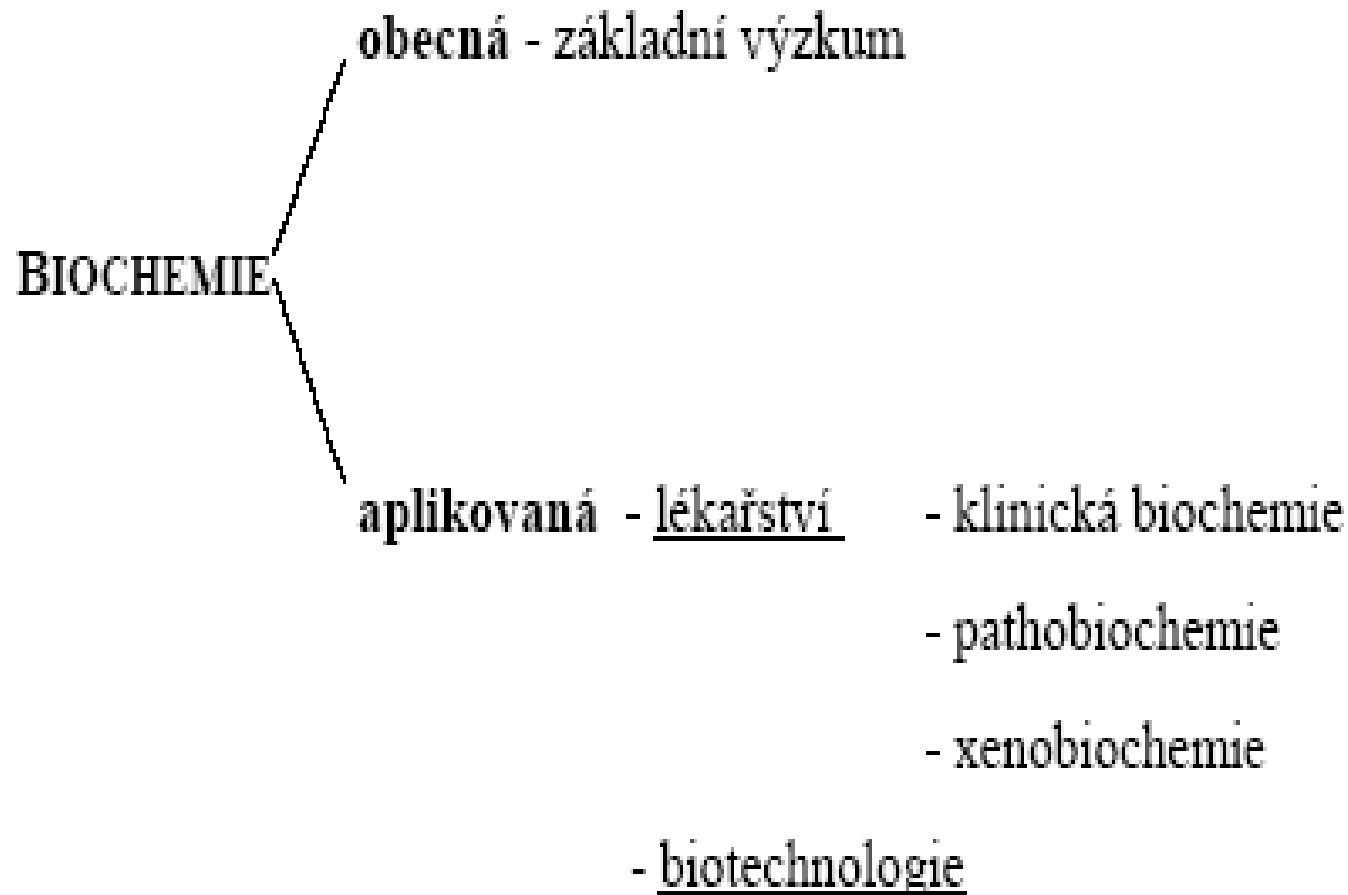




**MOLEKULÁRNÍ  
BIOLOGIE**  
Astbury  
1961



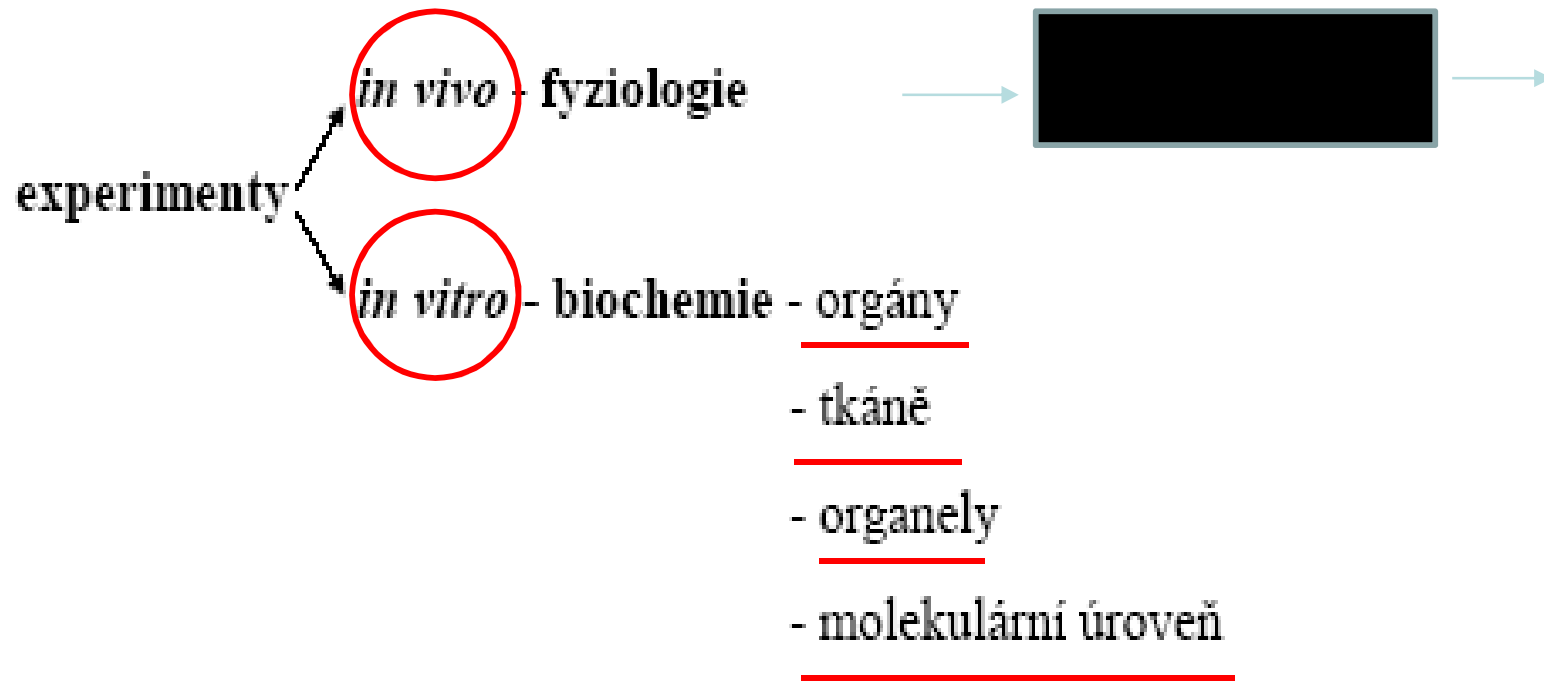
**Figure 1-2 Concepts in Biochemistry, 3/e**  
© 2006 John Wiley & Sons



**Molekulární biologie - W.T. ASTBURY - 60.léta**

- Interpretace genetiky na základě struktury NK
- Trojrozměrná struktura biomolekul

# Biochemické metody :



O. von Warburg (NC 1931) Výsledky pokusu *in vitro* nesmí být v rozporu se situací *in vivo*

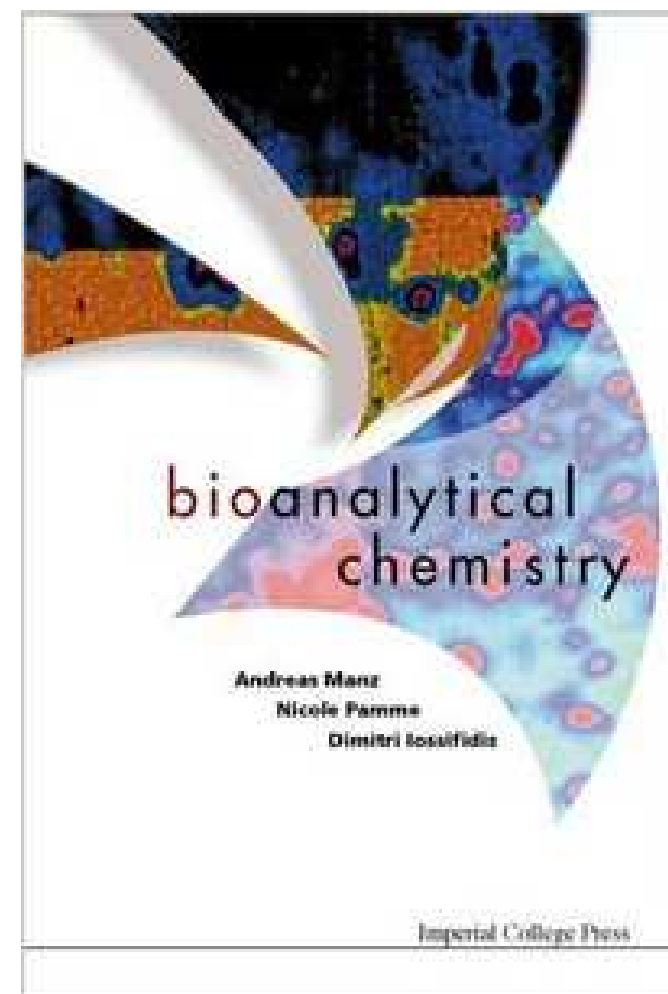
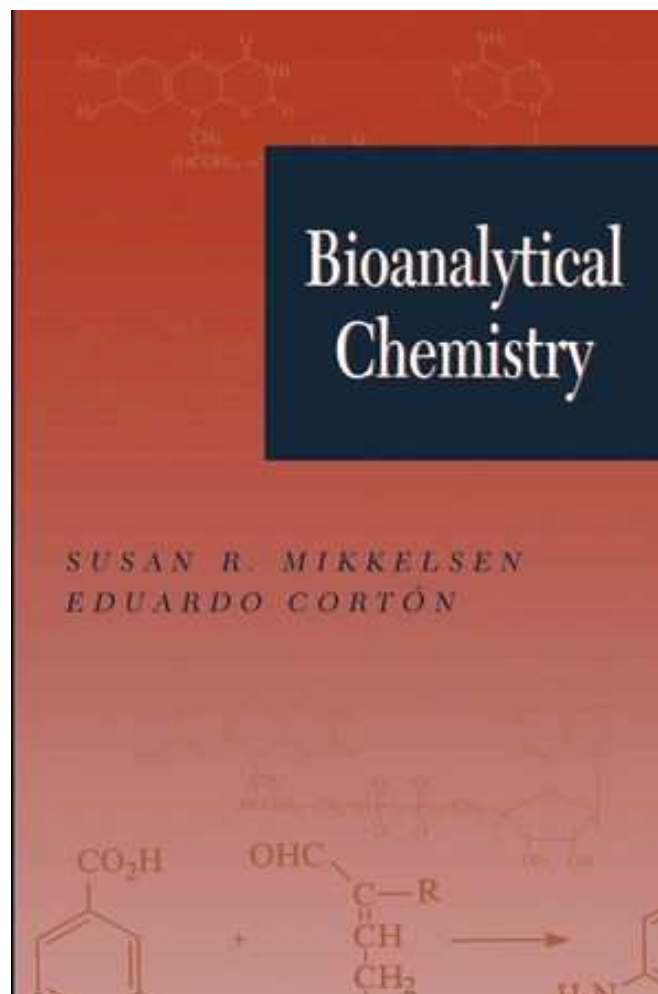
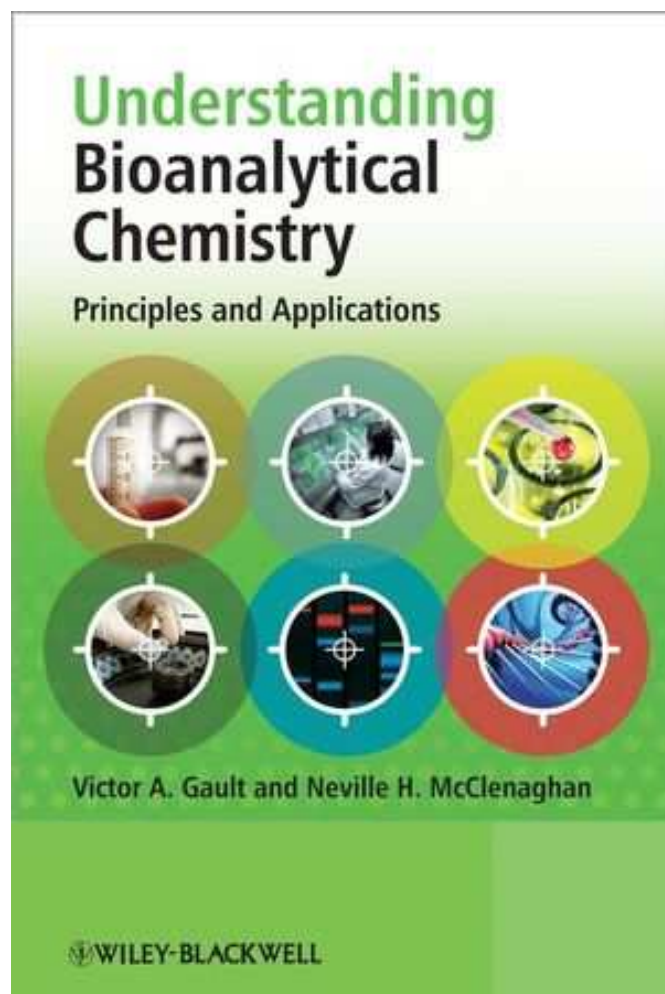
**Problémy se vzorkem - práce s komplexními vzorky**

- 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 laboratorné metody, SNTL  
1981**

# Literatura





# Látkové složení

	Group IA	Group IIA	TRANSITION METALS								Group IIIB	Group IVB	Group VB	Group VIB	Group VIIB	Group 0		
Period 1	1 <b>H</b> hydrogen																2	
Period 2	3	4									5 <b>B</b> boron	6 <b>C</b> carbon	7 <b>N</b> nitrogen	8 <b>O</b> oxygen	9 <b>F</b> fluorine		10	
Period 3	11 <b>Na</b> sodium	12 <b>Mg</b> magnesium									13 <b>Al</b> aluminum	14 <b>Si</b> silicon	15 <b>P</b> phosphorus	16 <b>S</b> sulfur	17 <b>Cl</b> chlorine		18	
Period 4	19 <b>K</b> potassium	20 <b>Ca</b> calcium	21	22	23 <b>V</b> vanadium	24 <b>Cr</b> chromium	25 <b>Mn</b> manganese	26 <b>Fe</b> iron	27 <b>Co</b> cobalt	28 <b>Ni</b> nickel	29 <b>Cu</b> copper	30 <b>Zn</b> zinc	31 <b>Ga</b> gallium	32	33 <b>As</b> arsenic	34 <b>Se</b> selenium	35 <b>Br</b> bromine	36
Period 5						42 <b>Mo</b> molybdenum						48 <b>Cd</b> cadmium					53 <b>I</b> iodine	
Period 6						74 <b>W</b> tungsten												
Period 7																		

Figure 1-3 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

- **XXX** základní makroprvky (makrobiogenní)
- **YYY** další makroprvky (mikrobiogenní)
- **ZZZ** mikroprvky (stopové)

# Prvkové složení vesmíru, zemské kůry a člověka

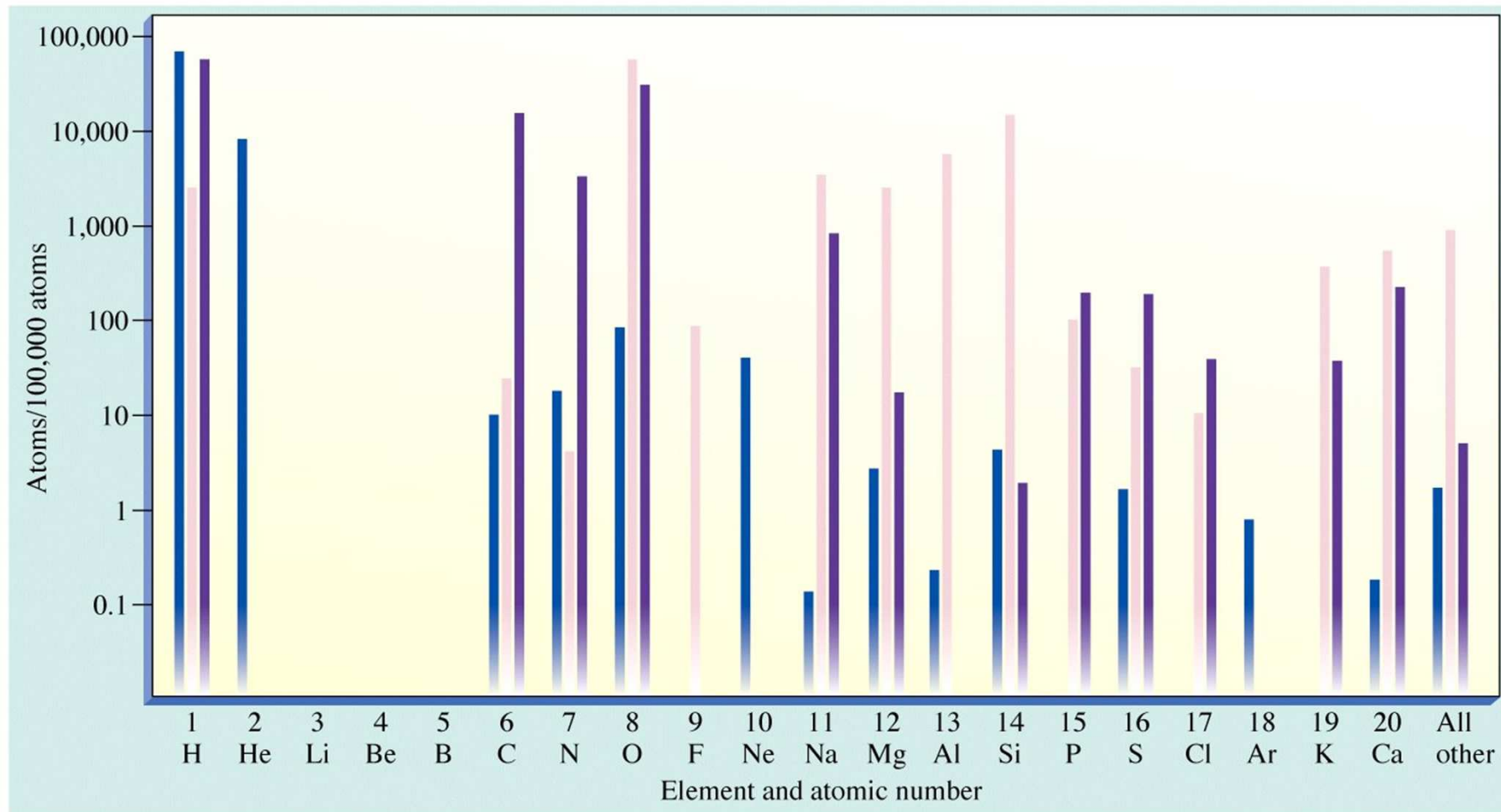


Figure 1-4 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Porovnání zastoupení základních biogenních prvků v živé a neživé hmotě

<b>Chemický prvek</b>	<b>Průměrné zastoupení v živé hmotě (v %)</b>	<b>Průměrné zastoupení v neživé hmotě (v %)</b>
Uhlík	19,37 %	0,18 % (Si)
Kyslík	62,80 %	49,40 %
Vodík	9,31 %	0,95 %
Dusík	5,14 %	0,63 %

# 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

Anorganické látky - voda

- Na, K, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,

Ca, Mg, Fe, Zn, Va, Cu, Mo, Ni, Mn, Se

- plyny - O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NO

Organické látky - vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy ??

# Voda

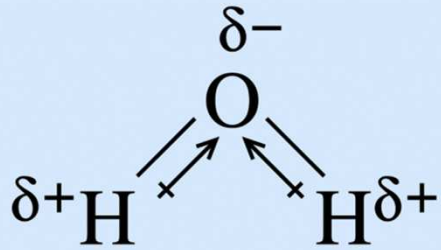


Figure 2-1b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

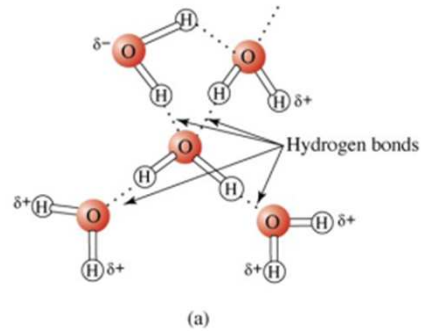
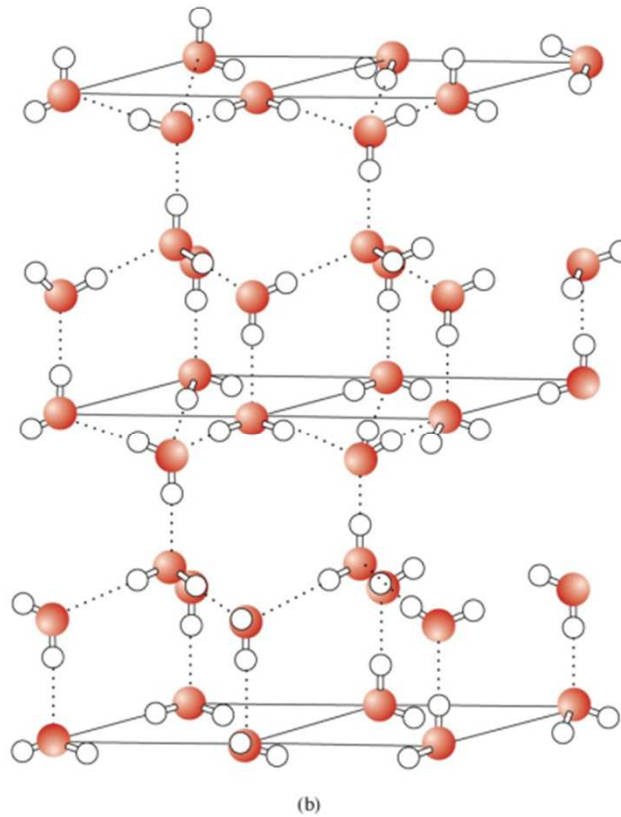
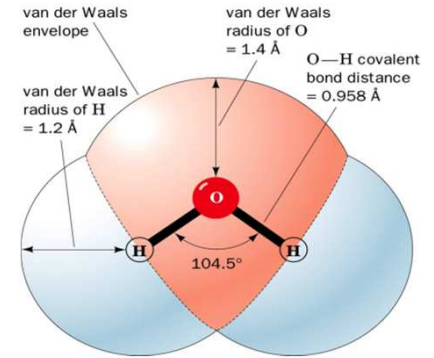


Figure 2-5 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Voda

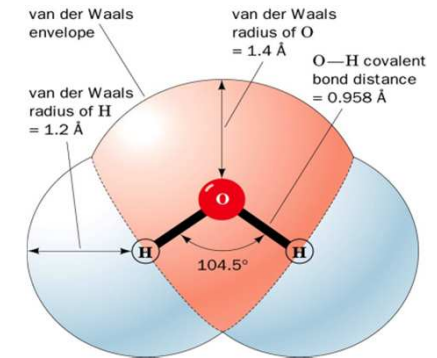
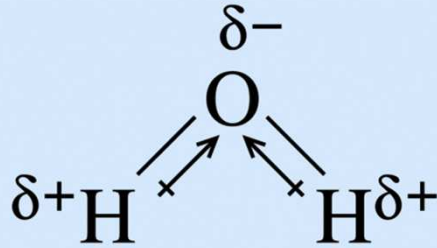


Figure 2-1b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

## Table 2.3

A comparison of some physical properties of water with hydrides of other nonmetallic elements: N, C, and S

Property	H <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> S
Molecular weight	18	17	16	34
Boiling point (°C)	100	-33	-161	-60.7
Freezing point (°C)	0	-78	-183	-85.5
Viscosity <sup>a</sup>	1.01	0.25	0.10	0.15

<sup>a</sup> Units are centipoise.

Table 2-3 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Voda

- Na vodu vázán vznik života
- Je rozpouštědlo
- Má transportní funkci
- Účastní se chemických reakcí
- Udržuje stálost vnitřního prostředí –I, pH, T



## Anorganické látky

- Na, K, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,

Ca, Mg, Fe, Zn, Va, Cu, Mo, Ni, Mn, Se

- plyny - O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NO

## Organické látky

- vysokomolekulární - biopolymery

- bílkoviny

- nukleové kyseliny

- sacharidy

- lipidy

**S  
u  
š  
i  
n  
a**

5 %

95 %

## Obecný princip výstavby biopolymerů :

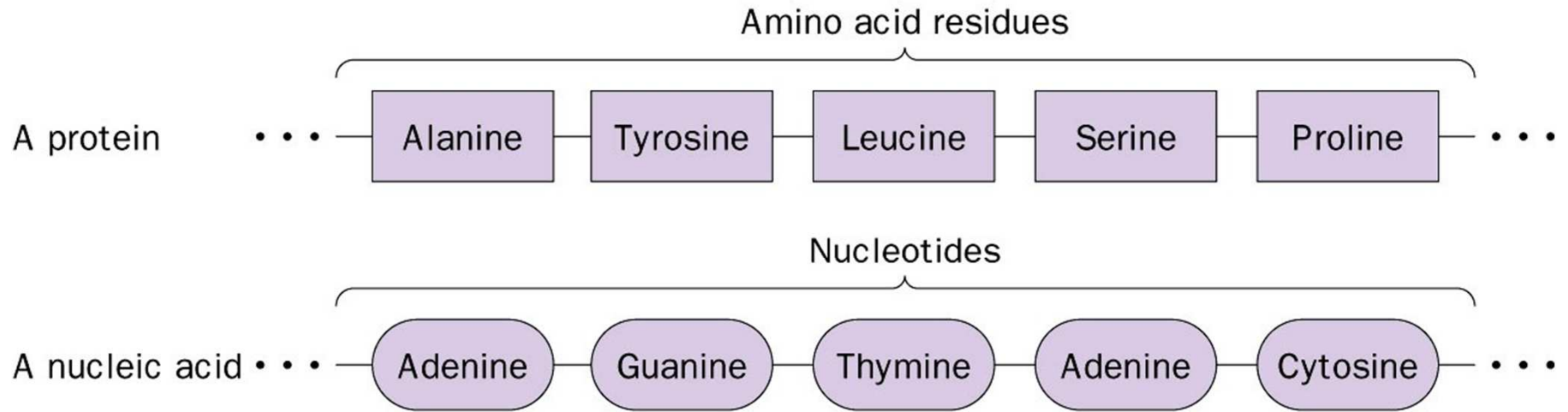
1. Jsou tvořeny monomery
2. Monomery vytvářejí lineární řetězce
3. Monomery jsou spojovány jediným typem vazby

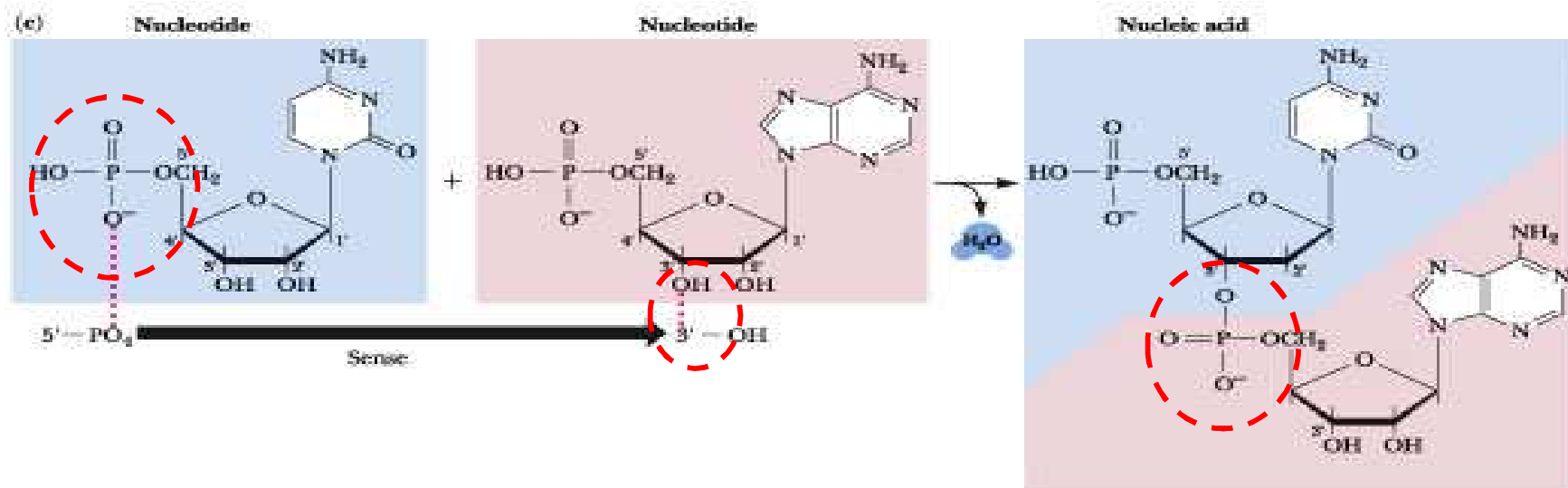
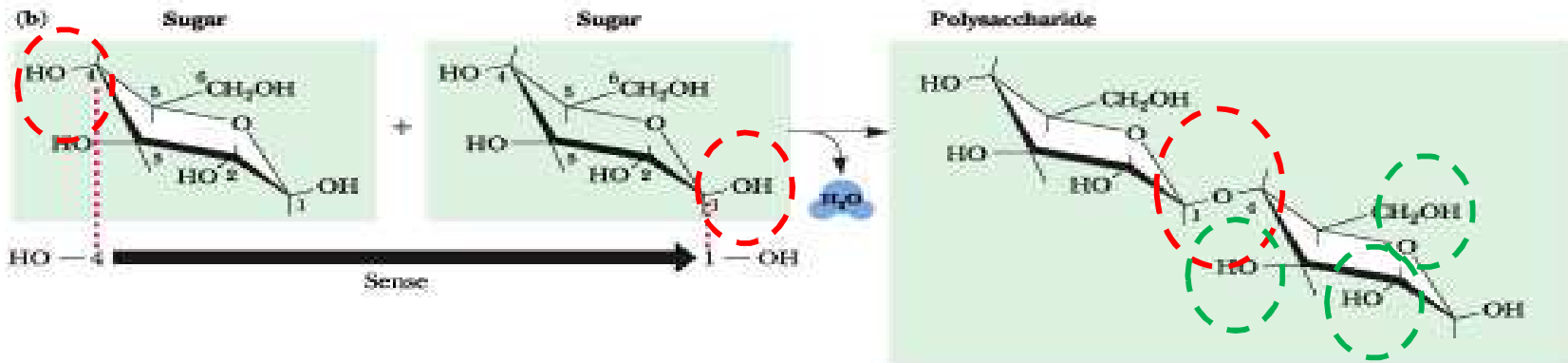
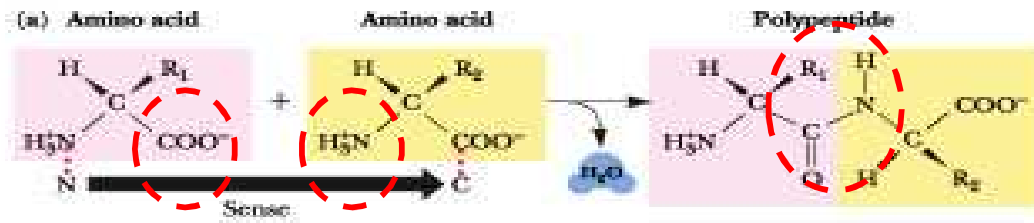
mono, di-, tri- , tetra-,...

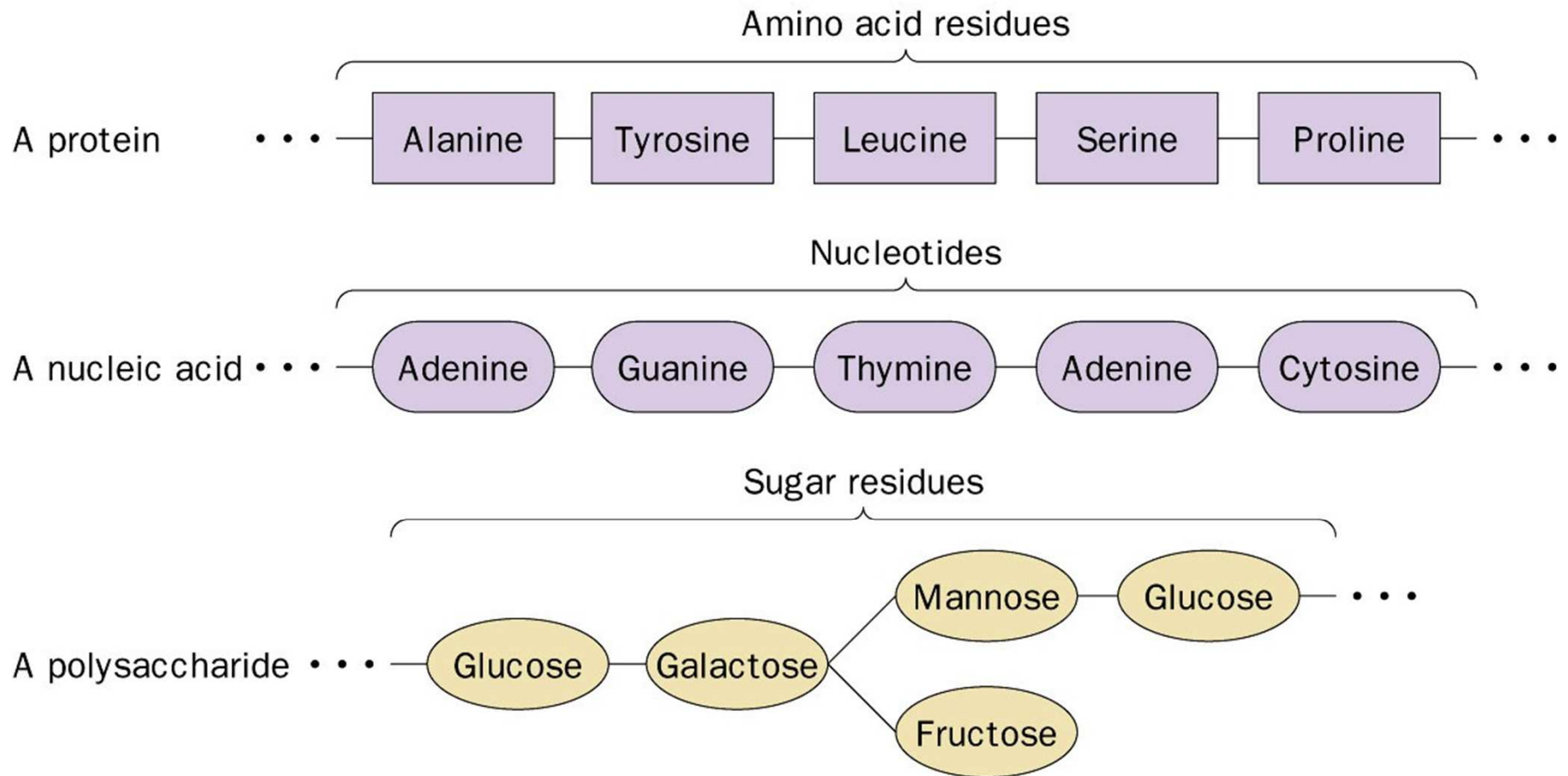
oligo < 10

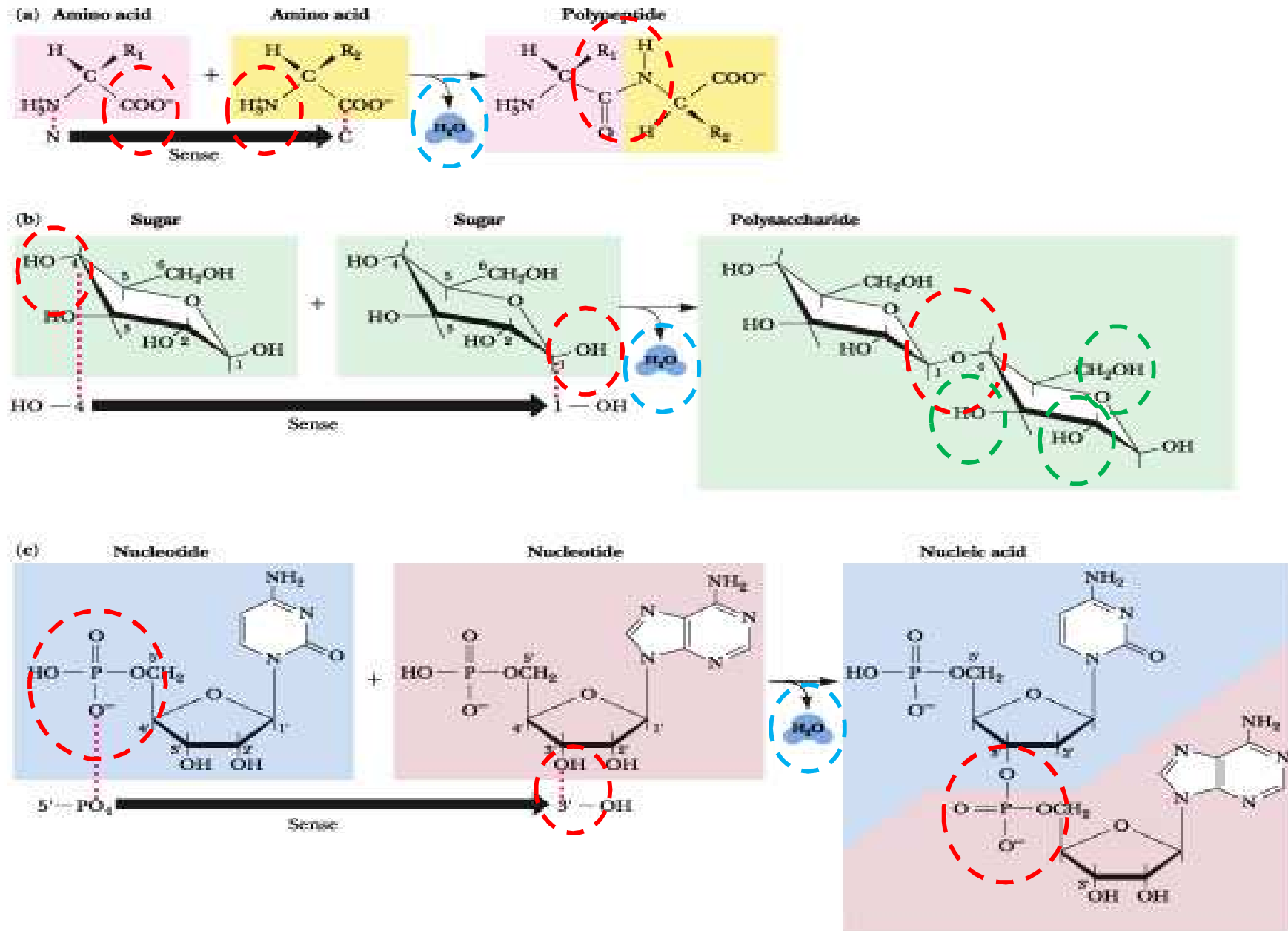
poly > 10

	<b>bílkoviny</b>	<b>nukleové kyseliny</b>	<b>polysacharidy</b>
<b>monomery</b>	aminokyseliny	nukleotidy	monosacharidy
	20	4	5
<b>vazba</b>	peptidická	3,5-diesterová	glykosidická





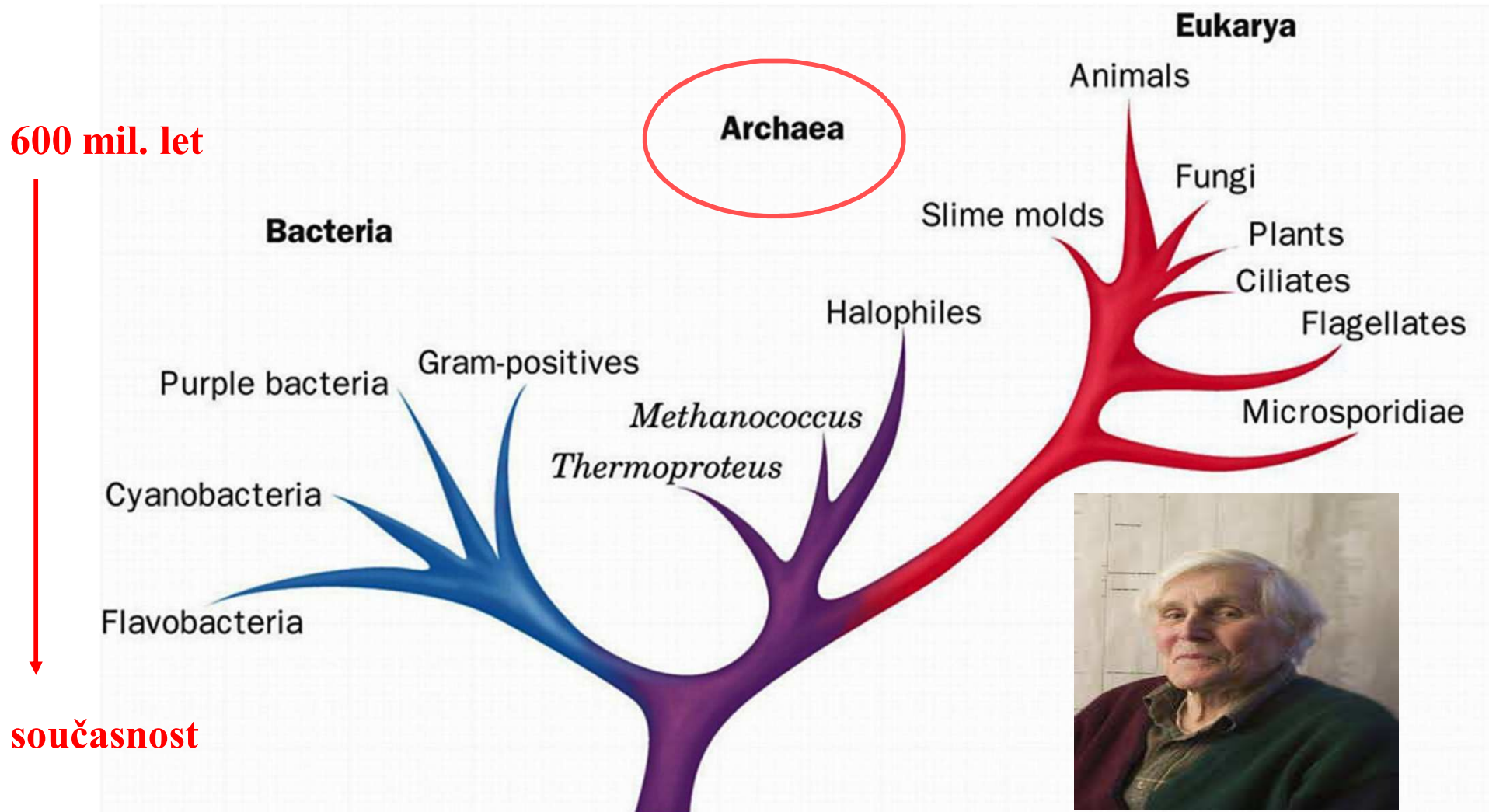




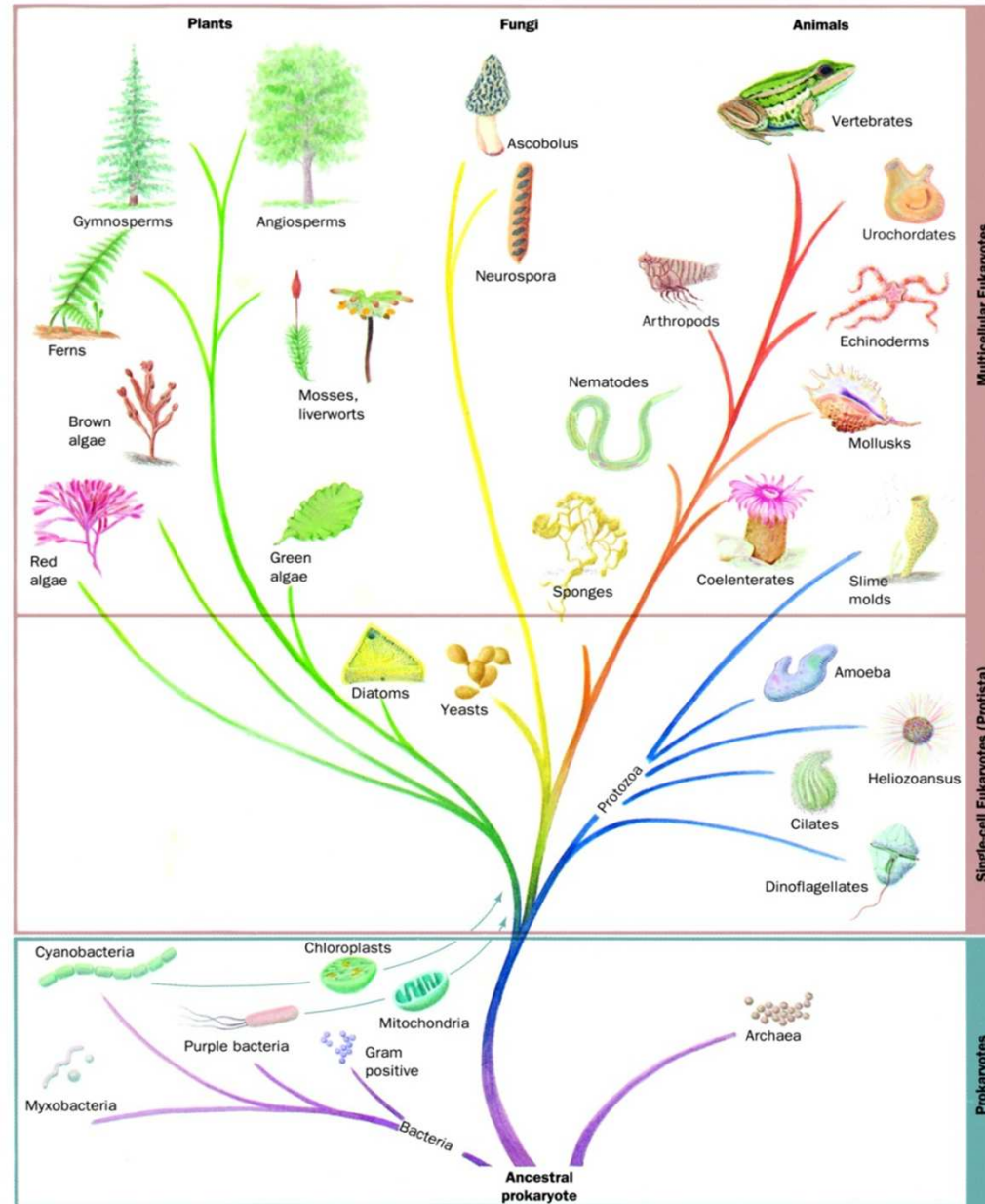
Kondenzační reakce - uvolňování H<sub>2</sub>O → rovnováha posunuta ve směru opačném



# Sledování rozdílů mezi biopolymery - vývoj života Fylogenetický strom (rRNA)



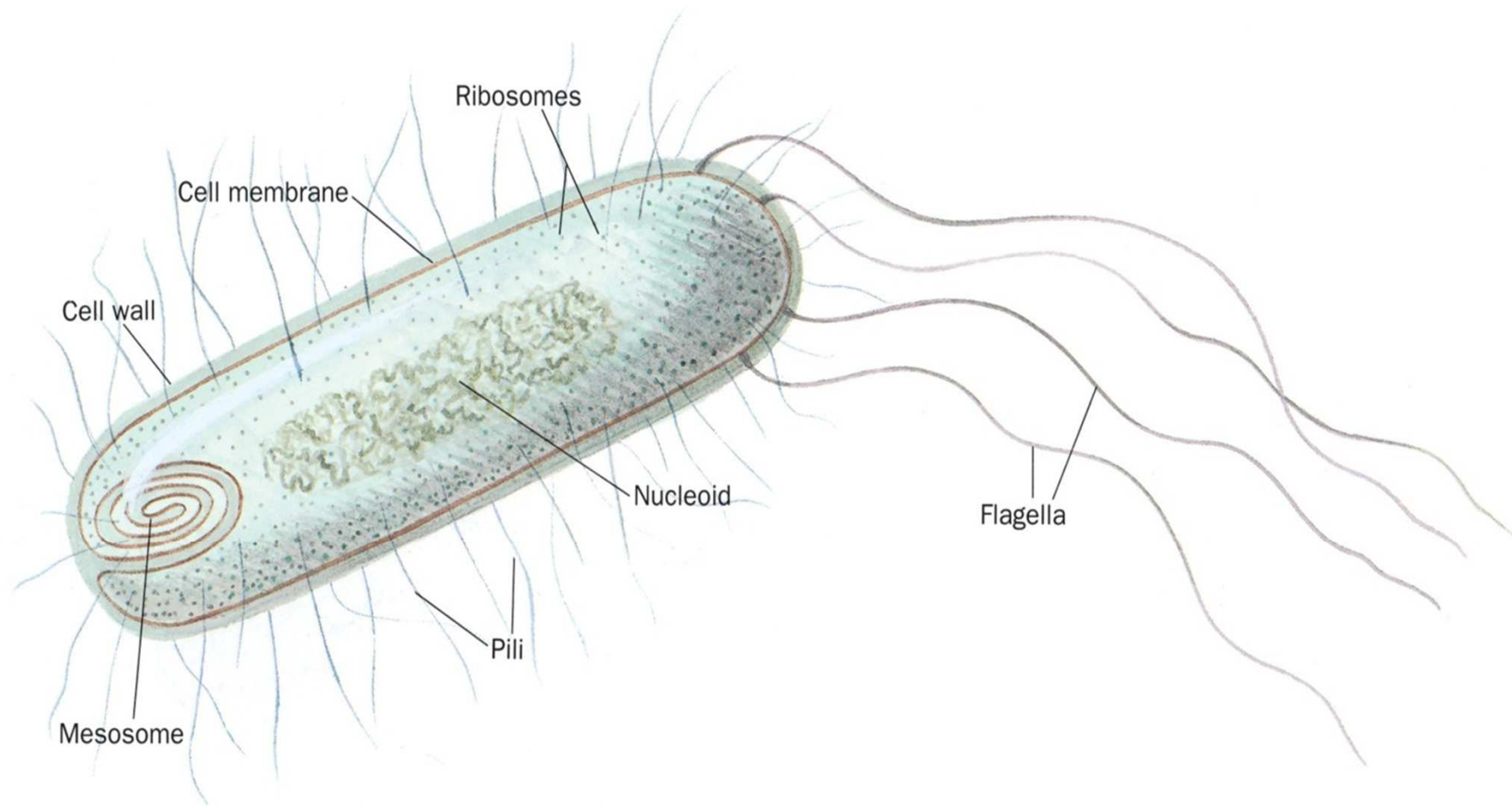
# Fylogenetický strom





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

# Prokaryontní bakteriální buňka



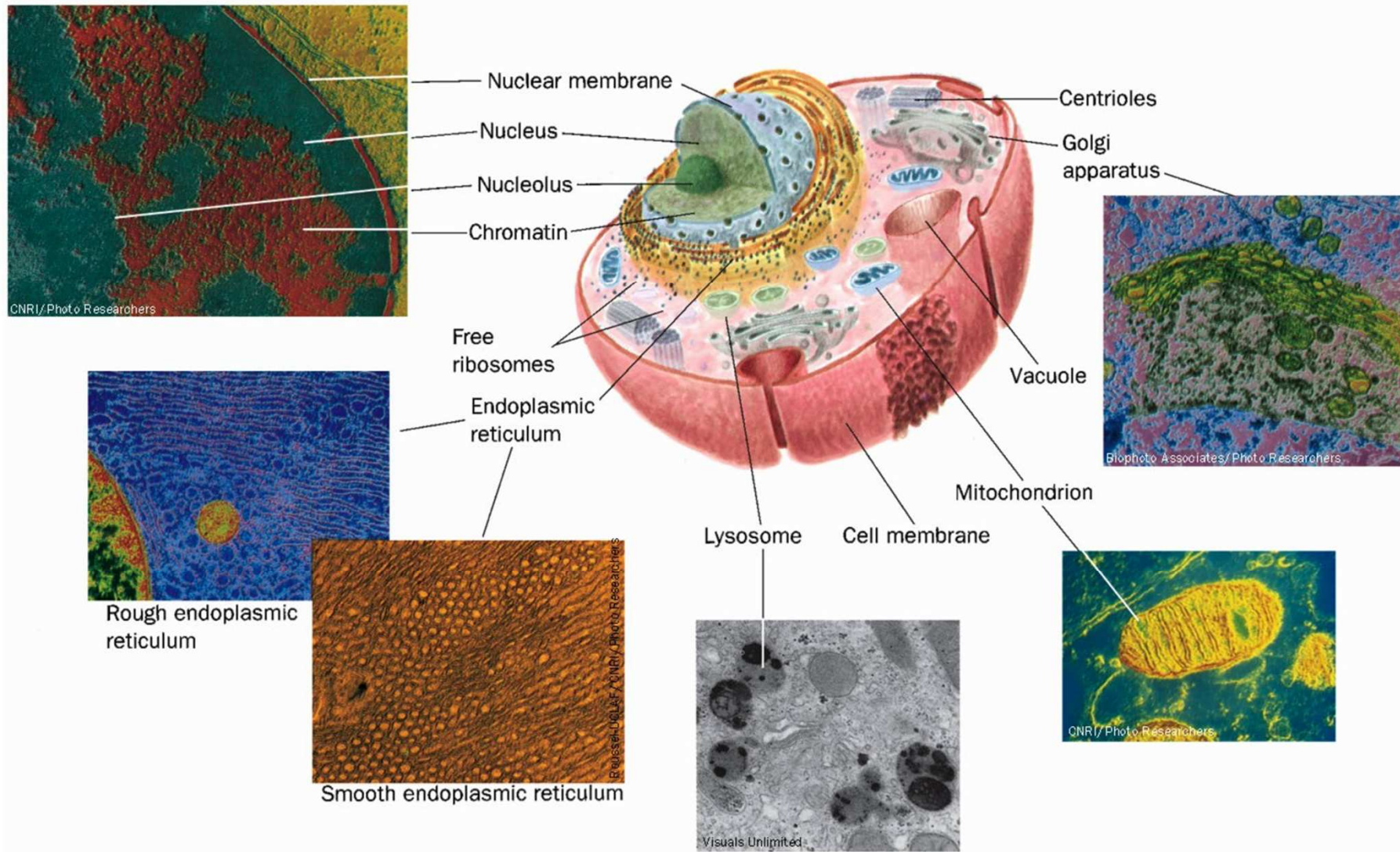
# Prokaryontní bakteriální buňka

**Table 1.1**

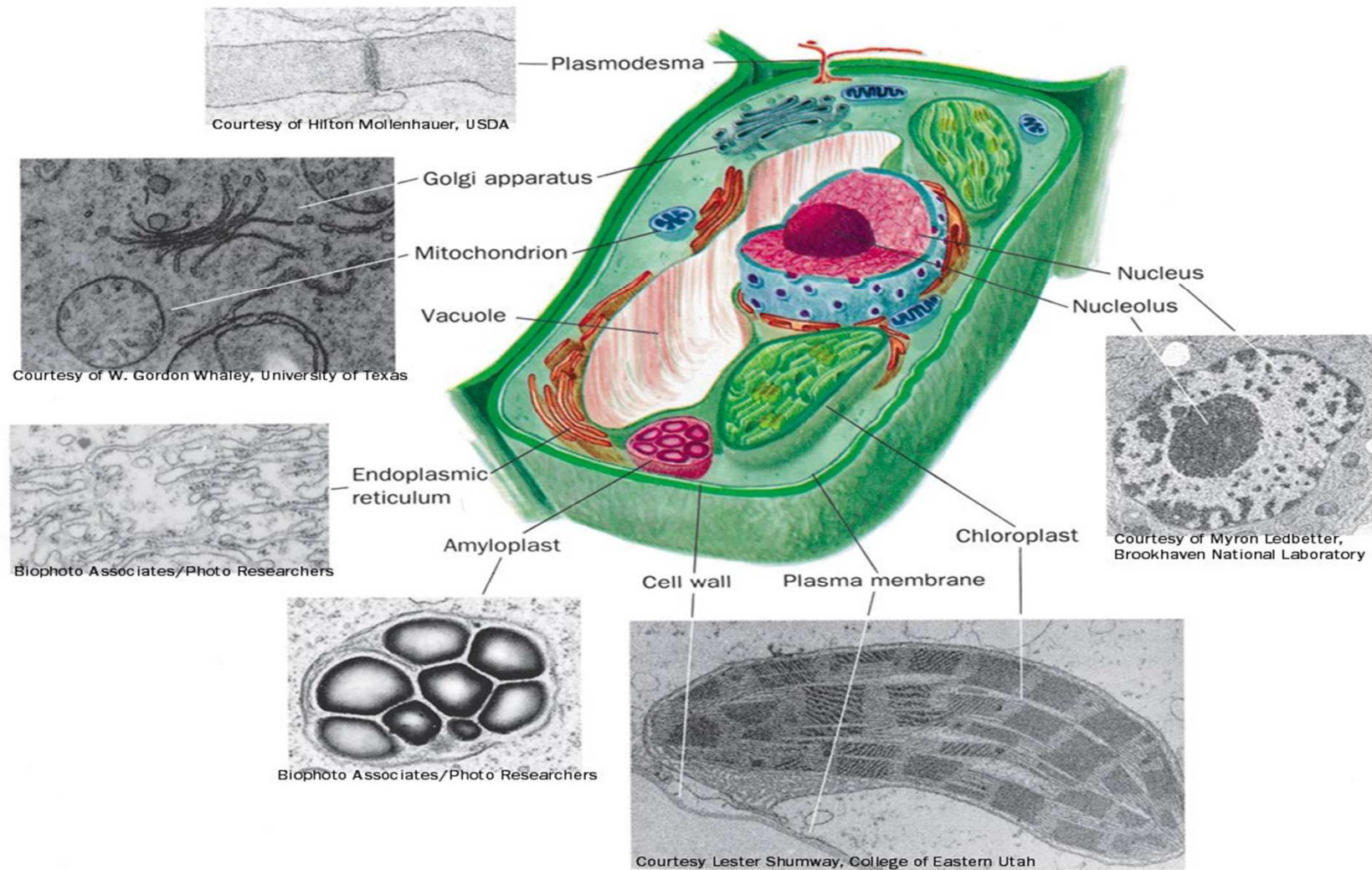
**Molecular composition and biological function of prokaryotic cell components**

Structural Feature	Molecular Composition	Biological Function
Cell wall, pili, and flagella	Polysaccharide chains cross-linked by proteins; coated with lipopolysaccharide; pili and flagella are extensions of the cell wall	Protection against mechanical and hypertonic stress; flagella assist in movement; pili assist in sexual conjugation
Cell membrane, mesosome	Bilayer of 40% lipid, 60% protein, perhaps some carbohydrate; mesosome is infolded membrane	Permeable boundary that allows for entry and exit of nutrients, waste; mesosome may play role in DNA replication
Nucleoid region	Contains chromatin, a complex of chromosomal DNA and histone proteins	The genome; storage of genetic information; site of DNA replication
Ribosomes	Complexes of RNA (65%) and protein (35%)	Sites of protein synthesis
Vacuoles	Nutrients stored as small molecules or polymers	Storage of fuel molecules for energy metabolism
Cytoplasm	Small molecules, soluble proteins, enzymes, nutrients, inorganic salts; dissolved in aqueous solution	Region where many metabolic reactions occur

# Eukaryontní živočišná buňka



# Eukaryontní rostlinná buňka



# Eukaryontní buňka

**Table 1.2**

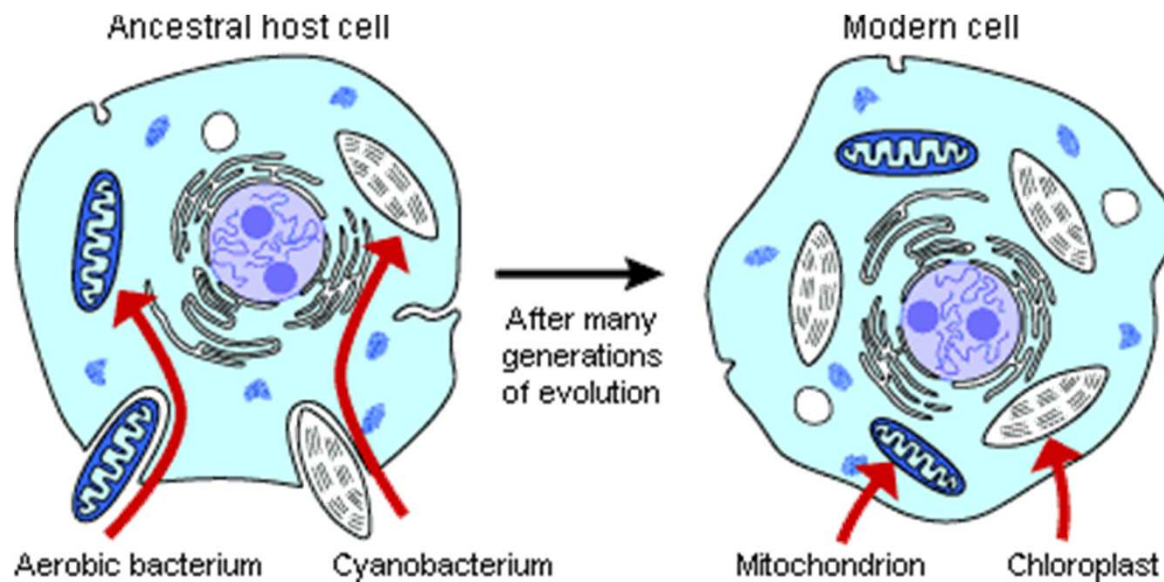
**Eukaryotic organelles, their constituent biomolecules, and biological function**

Structural Feature	Molecular Composition	Biological Function
Cell membrane	Bilayer of proteins (50%) and lipids (50%) and some carbohydrate	Selectively permeable boundary for entry and exit of nutrients and waste; some important enzyme activities; location of receptors for signaling
Nucleus	Contains genomic DNA, and histone proteins as chromatin; RNA	Storage of genetic information; site of DNA replication and transcription to RNA
Endoplasmic reticulum with ribosomes	Flat, single-membraned vesicles of lipid and protein; ribosomes consist of RNA and proteins	Surfaces on which ribosomes bind for protein synthesis
Golgi apparatus	Flattened vesicles of lipid, protein, and polysaccharide	Secretion of cell waste products; site of protein processing
Mitochondria	Double-membraned with protein and lipids; interior (matrix) contains soluble and insoluble enzymes, RNA, and DNA	Site of energy metabolism and synthesis of high-energy ATP
Lysosomes (animal)	Single-membraned vesicles containing enzymes for hydrolysis	Metabolism of materials ingested by endocytosis
Peroxisomes (animal) or glyoxysomes (plant)	Single-membraned vesicles containing catalase and other oxidative enzymes	Oxidative metabolism of nutrients using O <sub>2</sub> to generate H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Chloroplasts (plant)	Double-membraned organelles containing protein, lipid, chlorophyll, RNA, DNA, and ribosomes	Sites of photosynthesis; convert light energy into chemical energy (ATP)
Cytoplasm	Cytoskeleton made of proteins; small molecules, soluble proteins, enzymes, nutrients, and salts in aqueous solution	Provides shape to cell; region where many metabolic reactions occur

# Vznik eukaryotních buněk

## Lynn Margulis – 1960, 1981

### endosymbiotická teorie



# Organizace biologických struktur

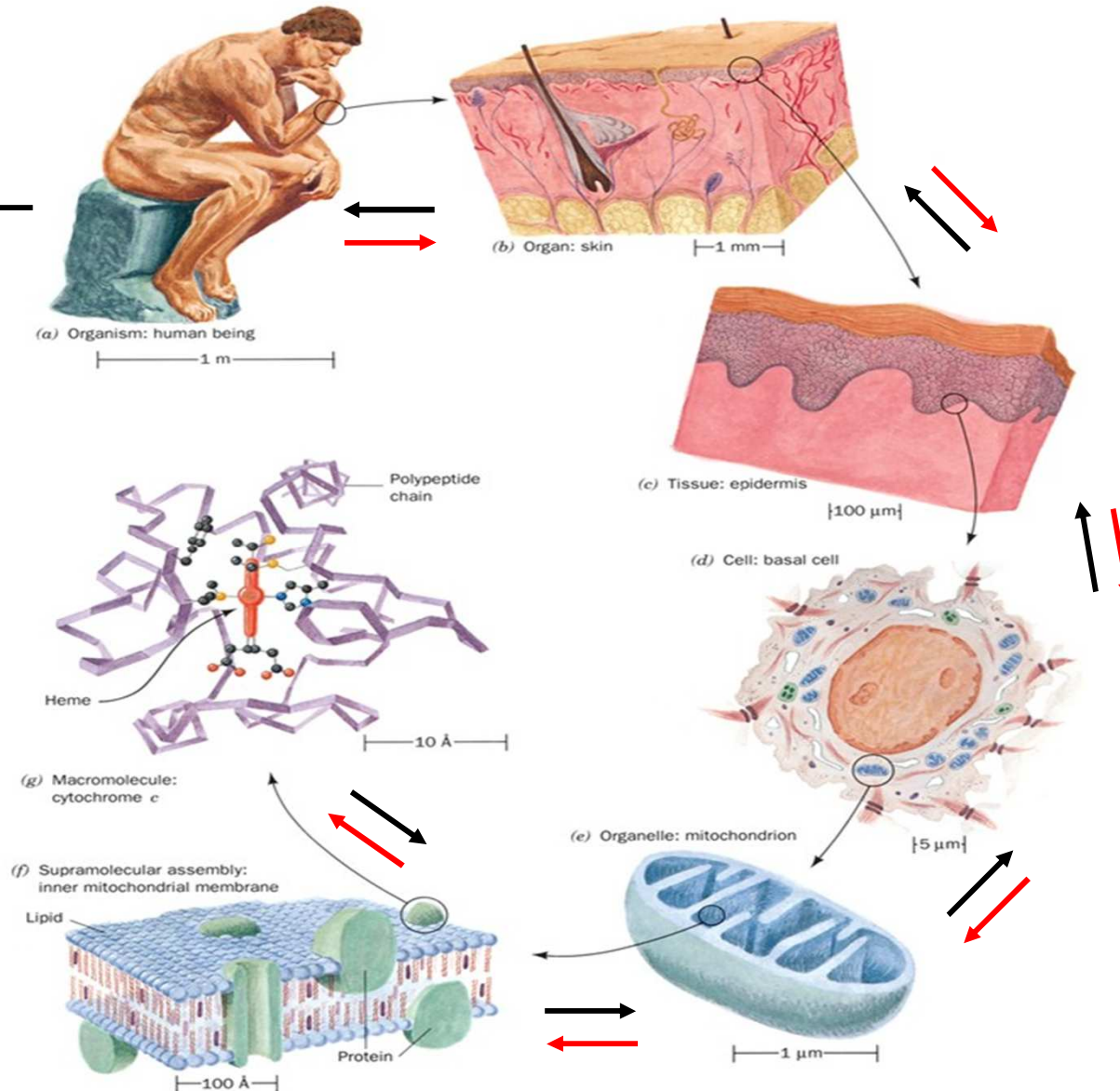
Populace



Biocenoza  
společenství

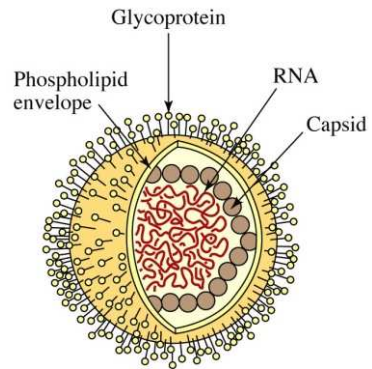


Biosféra



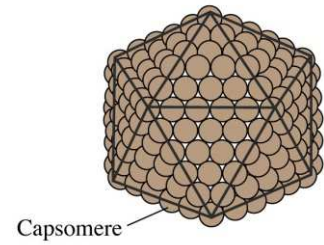
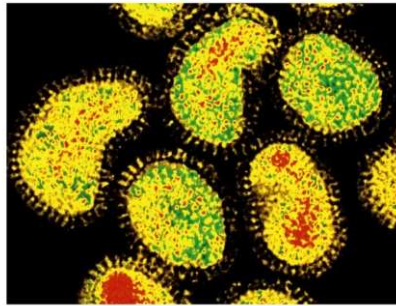


# Viry



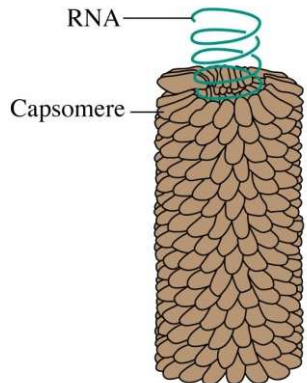
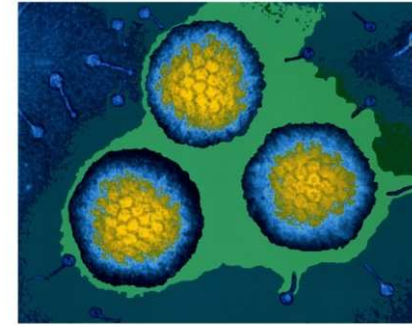
(a) Influenza virus (globular)

Figure 1-7a Concepts in Biochemistry, 3/e



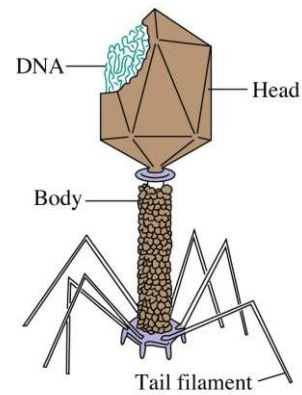
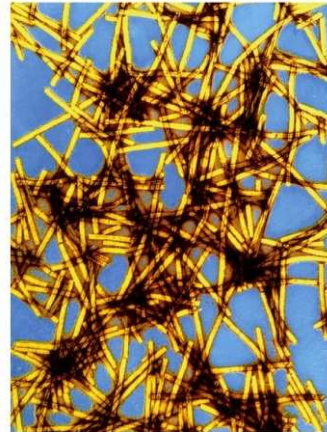
(b) Adenovirus (polyhedral)

Figure 1-7b Concepts in Biochemistry, 3/e



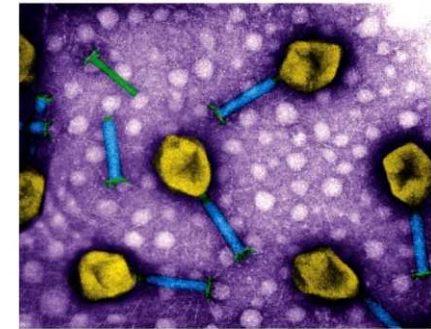
(c) Tobacco mosaic virus (cylindrical)

Figure 1-7c Concepts in Biochemistry, 3/e

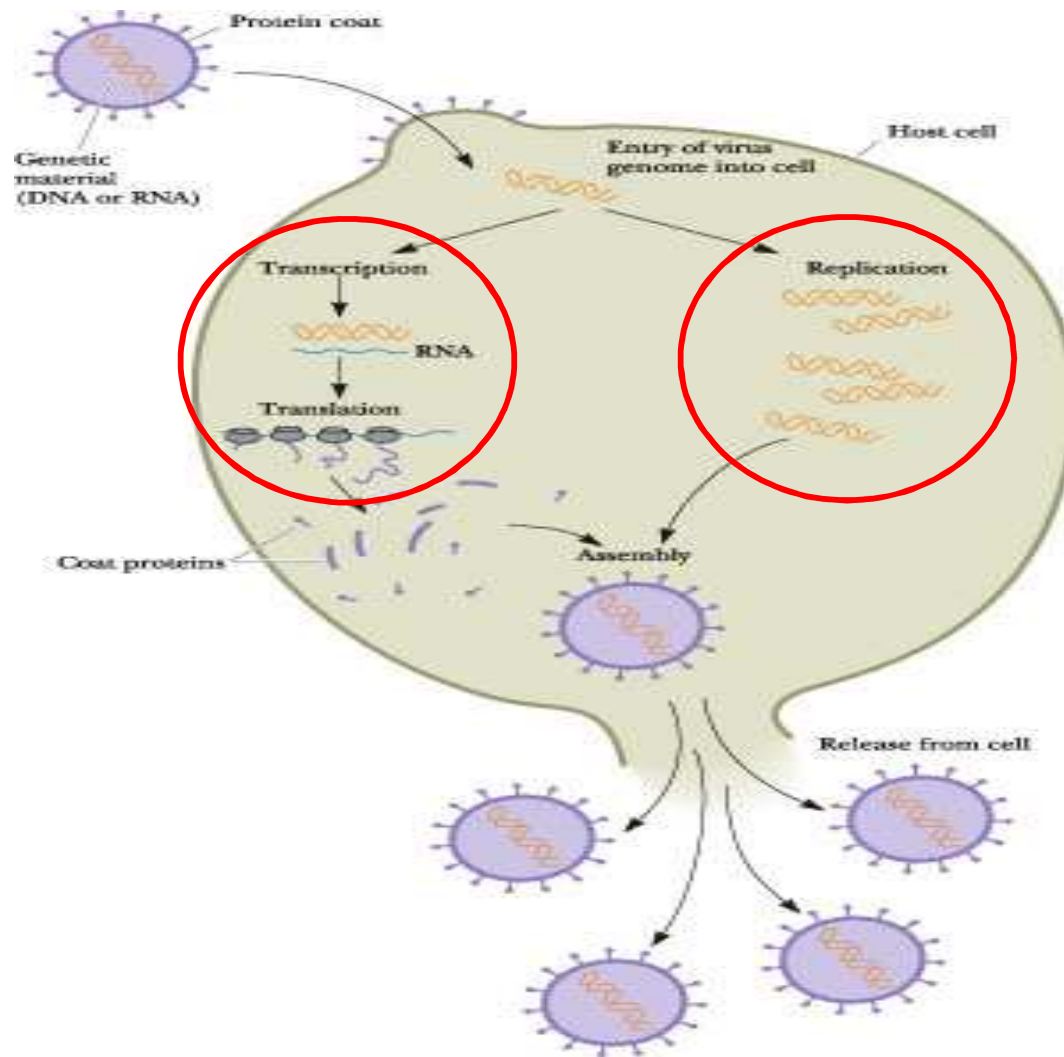


(d) Bacteriophage (complex shape)

Figure 1-7d Concepts in Biochemistry, 3/e



# Viry

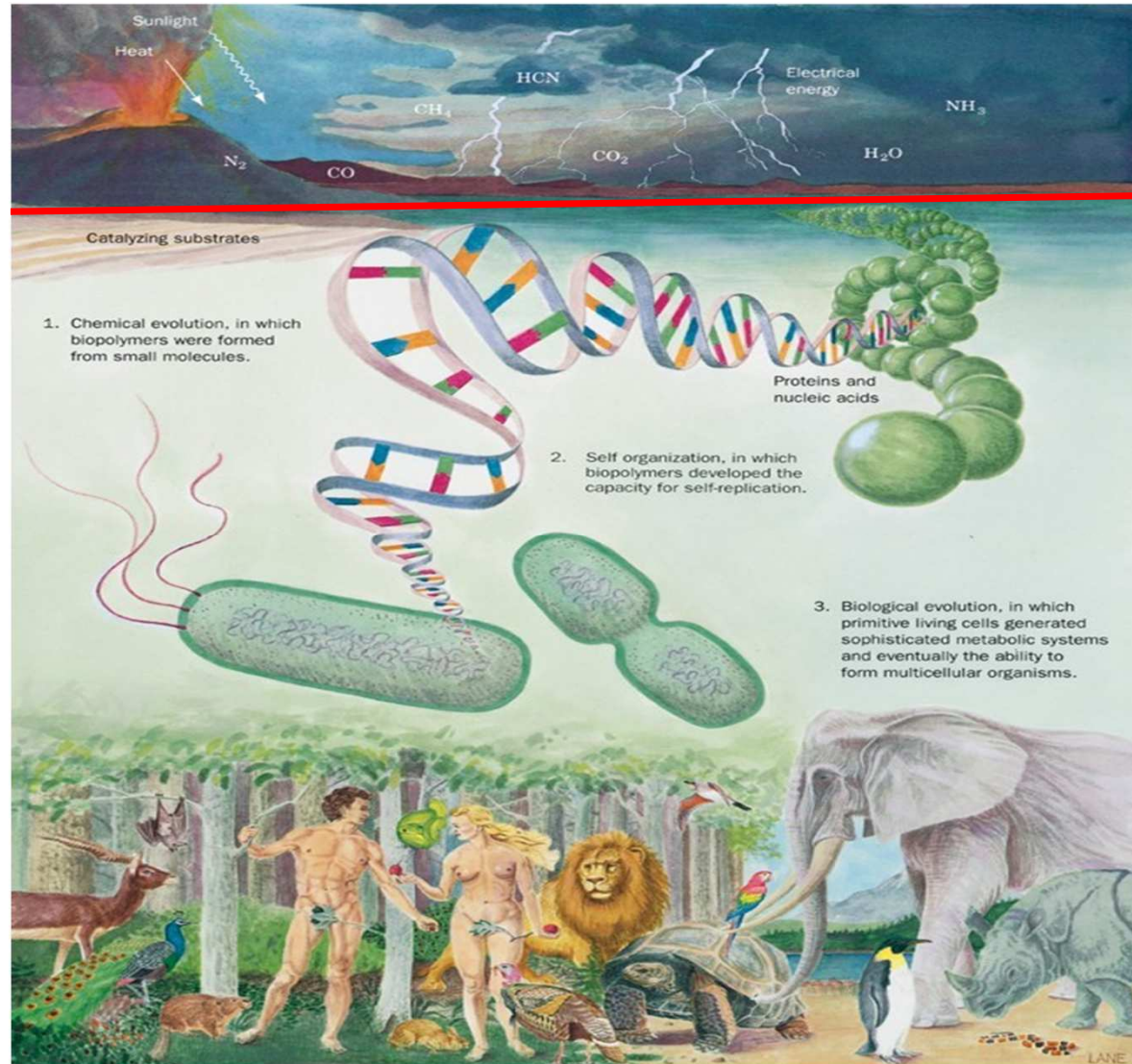


# Evolve života na zemi

1. Chemická evolve — jednoduché anorganické molekuly dávají vznik organickým polymerům
2. Vznik uspořádaných struktur biopolymerů — ty jsou schopná autoreplikace- RNA
3. Biologická evolve — evolve od jednobuněčných k mnohobuněčným živočichům

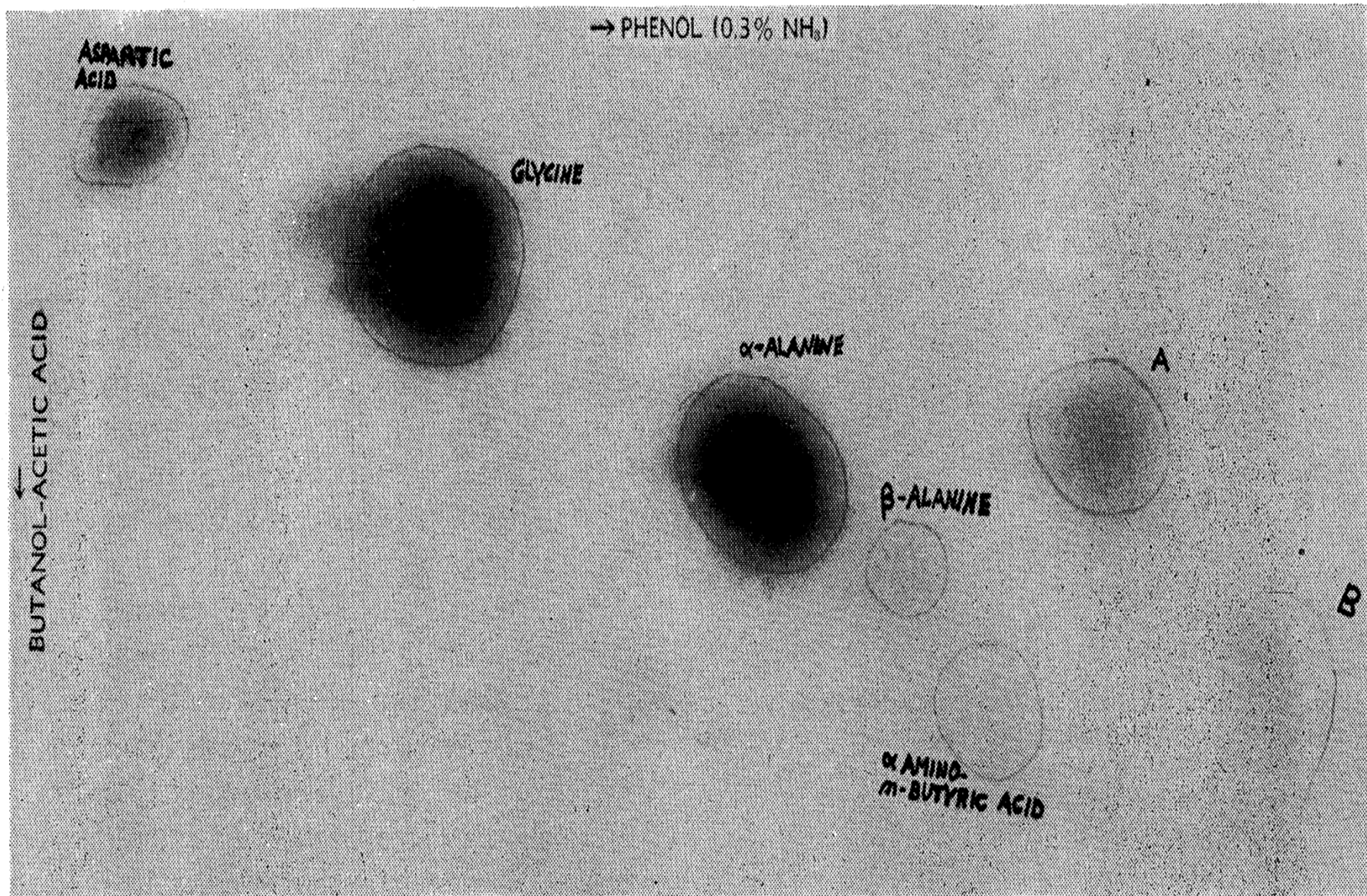
# Evolve života na zemi

## Chemická evoluce



# Evolve života na zemi

## Miller Orgel



# Evolve života na zemi

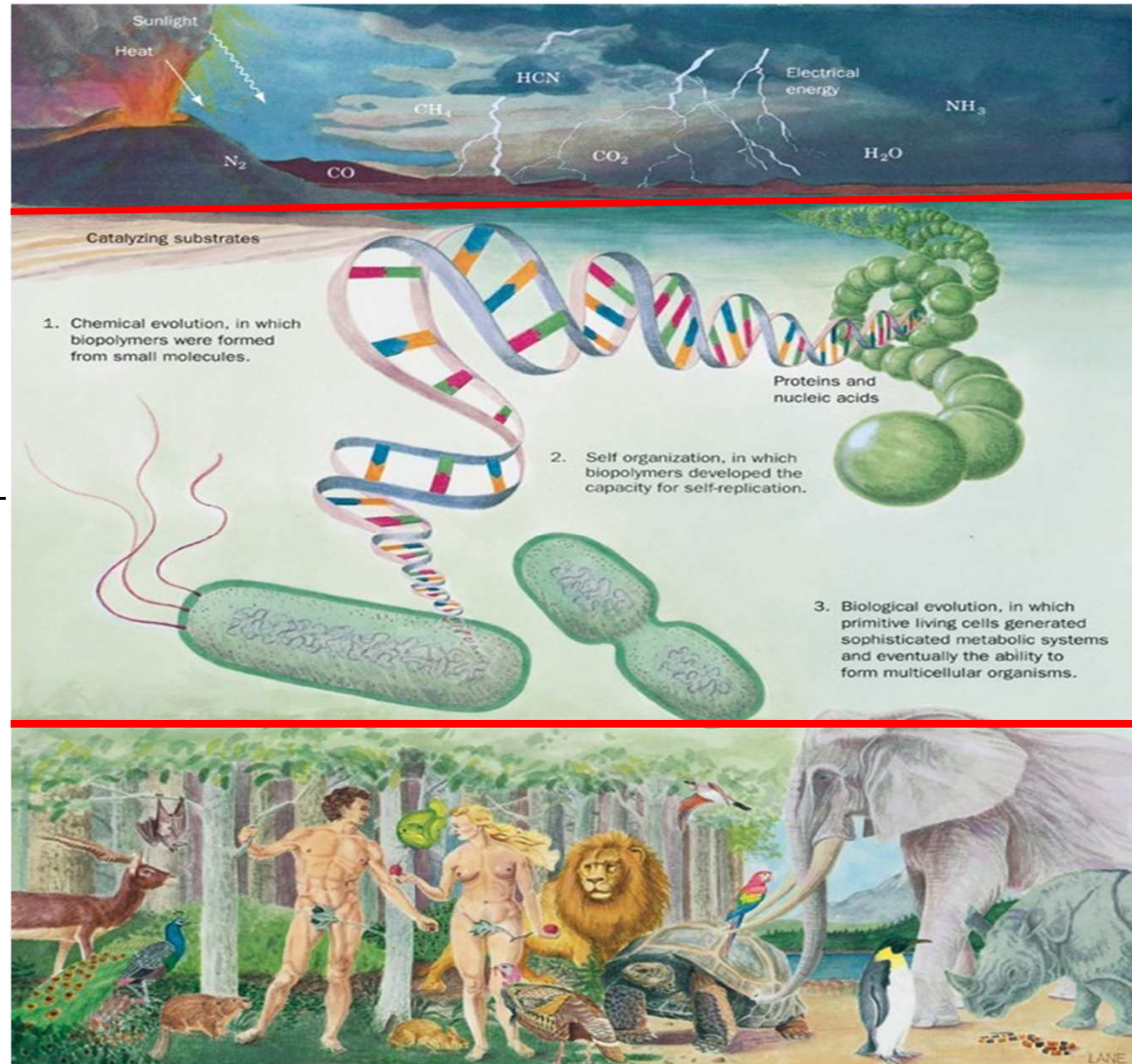
Compound	Yield (%)
Glycine <sup>a</sup>	2.1
Glycolic acid	1.9
Sarcosine	0.25
Alanine <sup>a</sup>	1.7
Lactic acid	1.6
<i>N</i> -Methylalanine	0.07
$\alpha$ -Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.34
$\alpha$ -Aminoisobutyric acid	0.007
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	0.34
$\beta$ -Alanine	0.76
Succinic acid	0.27
Aspartic acid <sup>a</sup>	0.024
Glutamic acid <sup>a</sup>	0.051
Iminodiacetic acid	0.37
Iminoaceticpropionic acid	0.13
Formic acid	4.0
Acetic acid	0.51
Propionic acid	0.66
Urea	0.034
<i>N</i> -Methylurea	0.051

<sup>a</sup> Amino acid constituent of proteins.

Source: Miller, S.J. and Orgel, L.E., *The Origins of Life on Earth*, p. 85, Prentice-Hall (1974).

# Evolution of life on Earth

## Chemical evolution



## Vznik uspořádaných struktur biopolymerů

# Vědci spočítali, jak vznikal život na Zemi



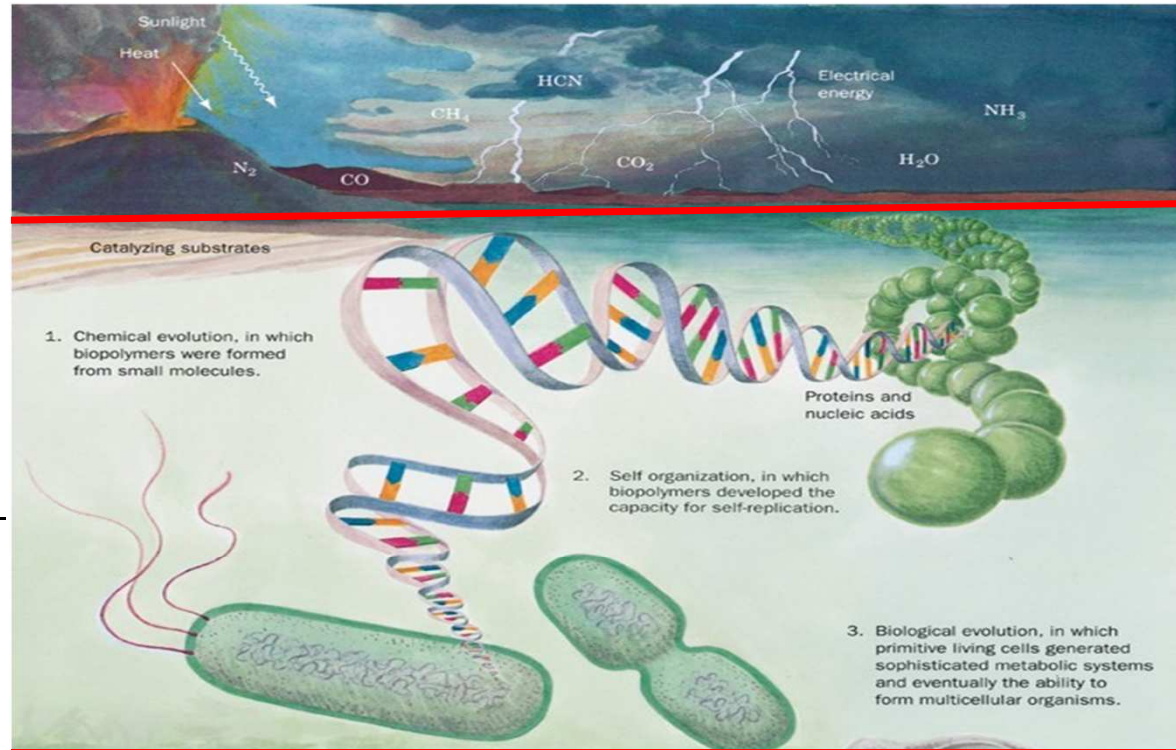
31. ledna 2015 | redakce





# Evoluce života na zemi

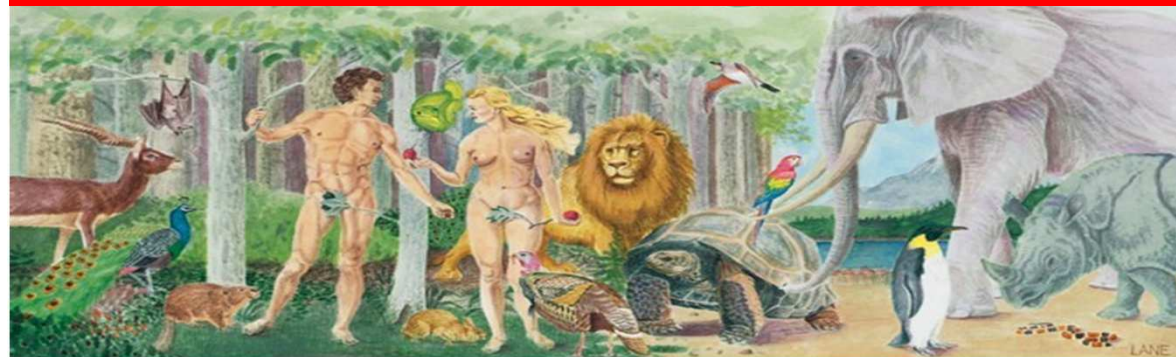
## Chemická evoluce



## Vznik uspořádaných struktur biopolymerů

RNA

## Biologická evoluce



# BÍLKOVINY - PROTEINY

**Protein** - MULDER, BERZELIUS (1838)

πρωτεΐνη - „zaujímající první místo“

# Bílkoviny

Jsou to biomakromolekuly s nejlépe poznanými a definovanými vlastnostmi :

- Fyzikálními – MW, spektra, pI,
- Chemickými - složení a struktura
- Biologickými - funkce

# Bílkoviny

Proč:

- Zřetelná biologická funkce
- Je jednodušší je izolovat i charakterizovat než NK, polysacharidy či lipidy

# BÍLKOVINY - PROTEINY

**Protein** - MULDER, BERZELIUS (1838)

πρωτεΐνη - „zaujímající první místo“

**Funkce** - katalýza

transport

pohyb

podpora

imunita

regulace

vznik a přenos nervového vzruchu

~~Přenos genetické informace NK~~

Výkonná moc

Zákonná moc

AMINOKYSELINY ( 20 AMK)

MW 50 - 200



2 až 50 AMK PEPTIDY → POLYPEPTIDY

MW < 10 000

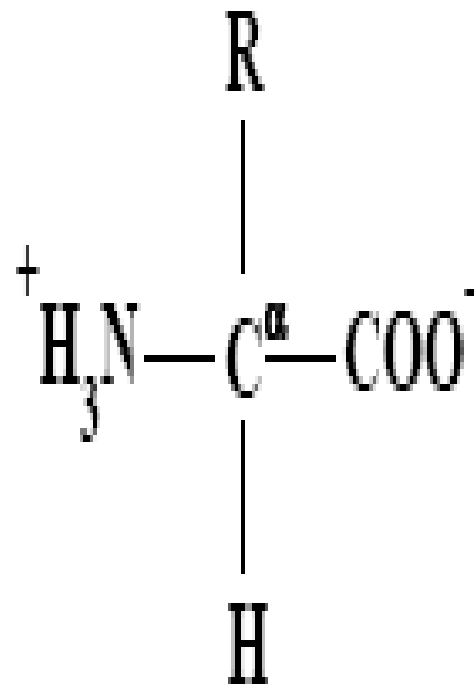


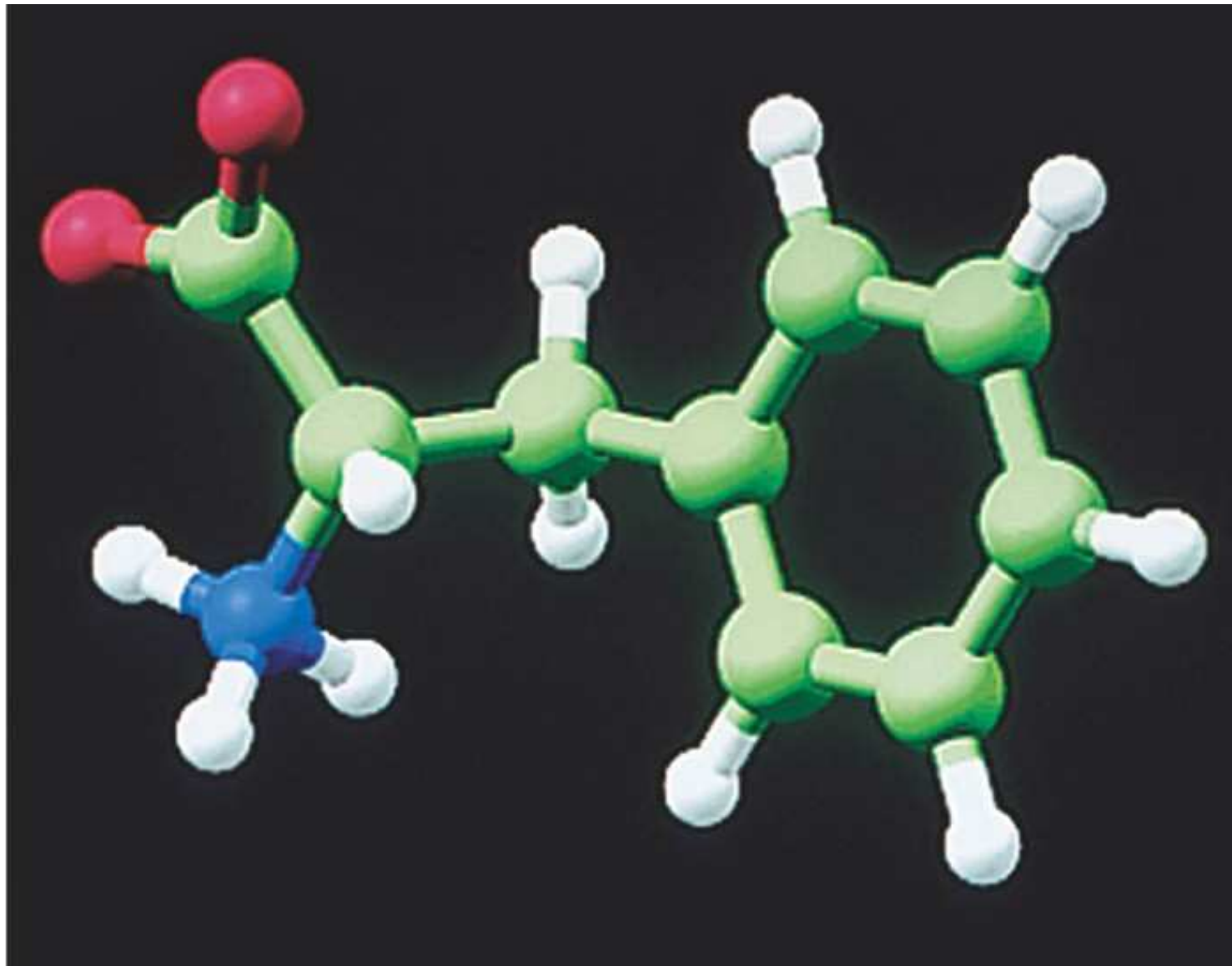
> 50 AMK BÍLKOVINY - PROTEINY

MW > 10 000

# Aminokyseliny :

chemicky - substituční deriváty karboxylových kyselin









## I. Kódované aminokyseliny

20, 21, 22

### **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

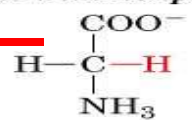
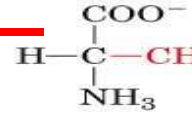
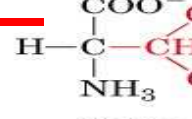
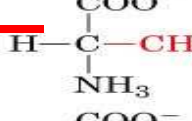
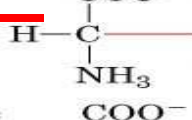
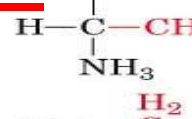
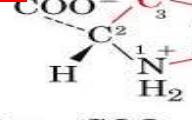
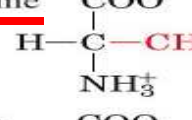
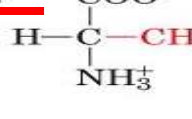
CONH<sub>2</sub> skupinu - AspNH<sub>2</sub>, GluNH<sub>2</sub>

C. Nabité - kyselé COOH skupinu - Asp, Glu

- basické NH<sub>2</sub> skupinu - Lys

guanidinovou skupinu - Arg

imidazolovou skupinu - His

Name, Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula <sup>a</sup>	Residue Mass (D) <sup>b</sup>	Average Occurrence in Proteins (%) <sup>c</sup>	pK <sub>1</sub> α-COOH <sup>d</sup>	pK <sub>2</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sup>d</sup>	pK <sub>R</sub> Side Chain <sup>d</sup>
<b>Amino acids with nonpolar side chains</b>						
<u>Glycine</u> Gly G		57.0	6.8	2.35	9.78	
<u>Alanine</u> Ala A		71.1	7.6	2.35	9.87	
<u>Valine</u> Val V		99.1	6.6	2.29	9.74	
<u>Leucine</u> Leu L		113.2	9.5	2.33	9.74	
<u>Isoleucine</u> Ile I		113.2	5.8	2.32	9.76	
<u>Methionine</u> Met M		131.2	2.4	2.13	9.28	
<u>Proline</u> Pro P		97.1	5.0	1.95	10.64	
<u>Phenylalanine</u> Phe F		147.2	4.1	2.20	9.31	
<u>Tryptophan</u> Trp W		186.2	1.2	2.46	9.41	

(continued)

<sup>a</sup>The ionic forms shown are those predominating at pH 7.0 (except for that of histidine<sup>e</sup>), although residue mass is given for the neutral compound. The C atoms, as well as those atoms marked with an asterisk, are chiral centers with configurations as indicated according to Fischer projection formulas. The standard organic numbering system is provided for heterocycles.

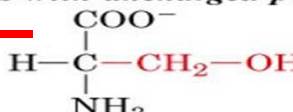
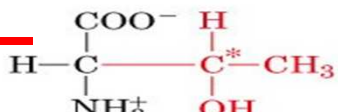
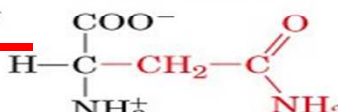
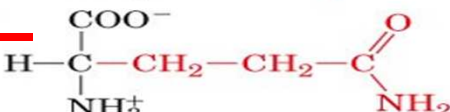
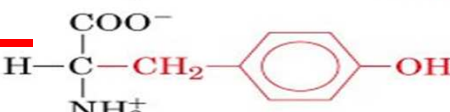
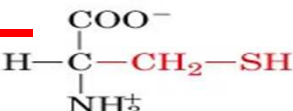
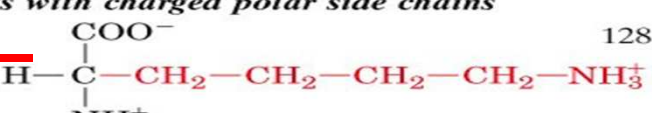
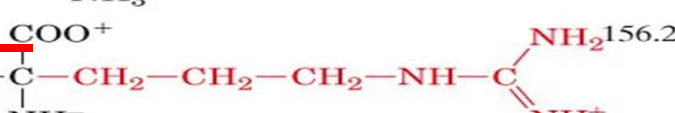
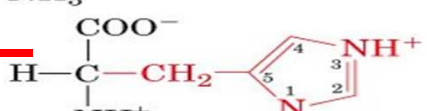
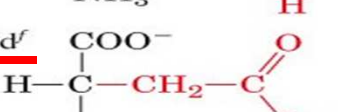
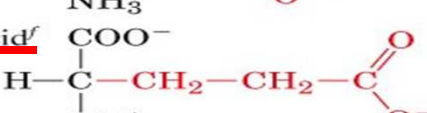
<sup>b</sup>The residue masses are given for the neutral residues. For molecular masses of the parent amino acids, add 18.0 D, the molecular mass of H<sub>2</sub>O, to the residue masses. For side chain masses, subtract 56.0 D, the formula mass of a peptide group, from the residue masses.

<sup>c</sup>The average amino acid composition in the complete SWISS-PROT database (<http://www.expasy.ch/sprot>), Release 40.7.

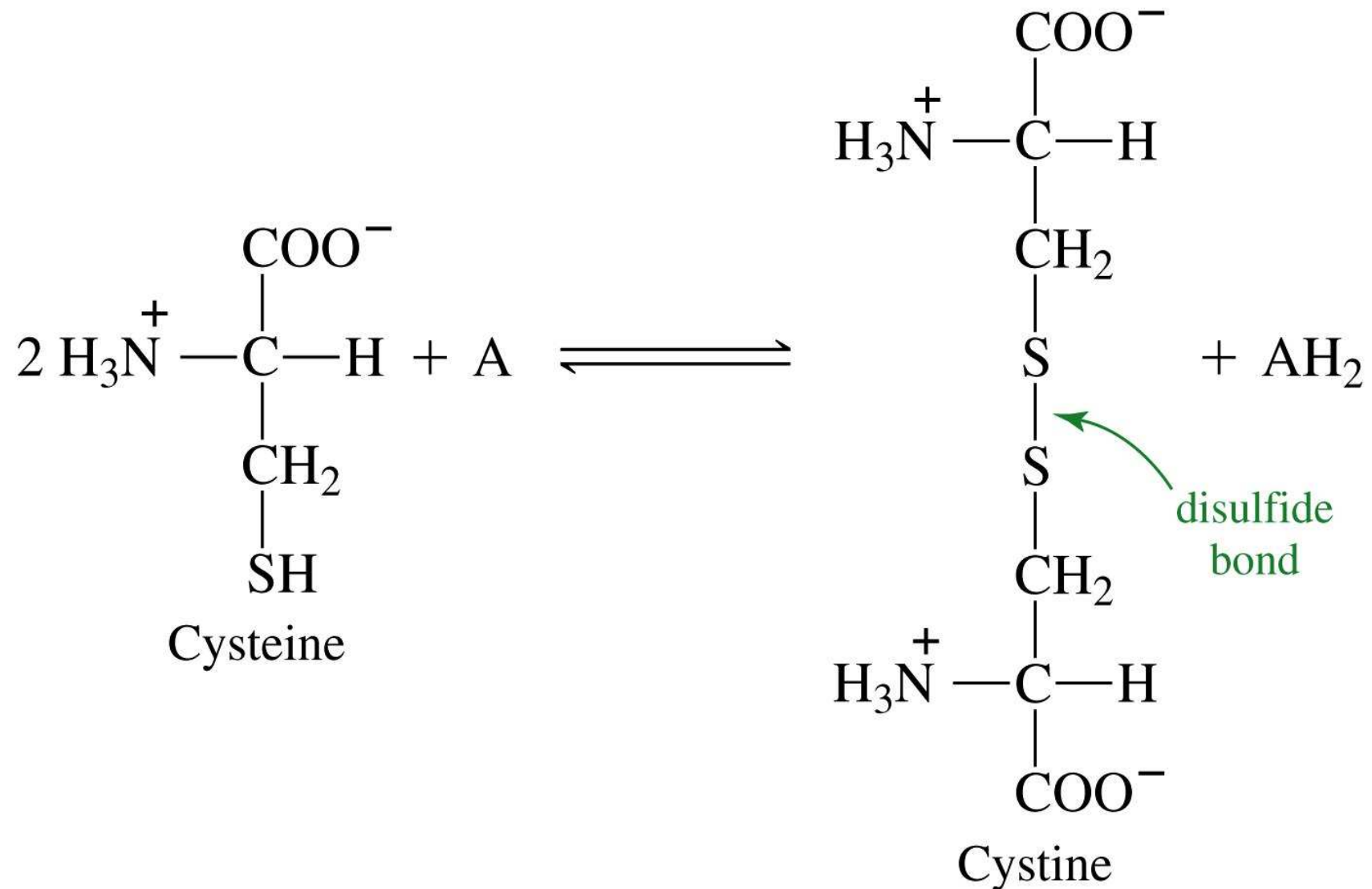
<sup>d</sup>From Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M., *Data for Biochemical Research* (3rd ed.), pp. 1–31, Oxford Science Publications (1986).

<sup>e</sup>Both the neutral and protonated forms of histidine are present at pH 7.0 because its pK<sub>R</sub> is close to 7.0. The imidazole ring of histidine is numbered here according to the biochemistry convention. In the IUPAC convention, N3 of the biochemistry convention is designated N1 and the numbering increases clockwise around the ring.

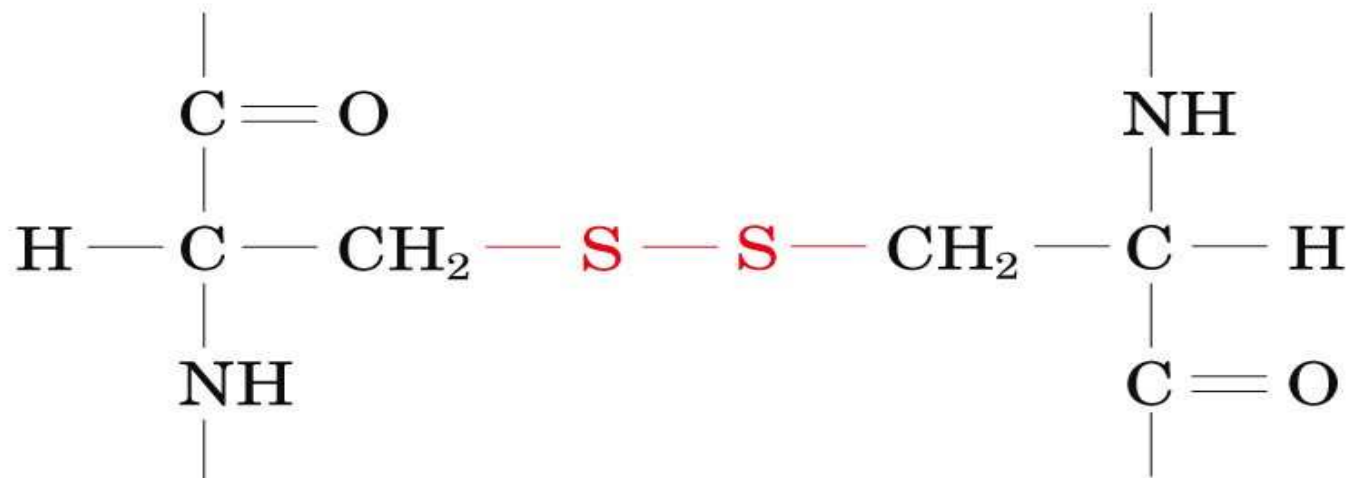
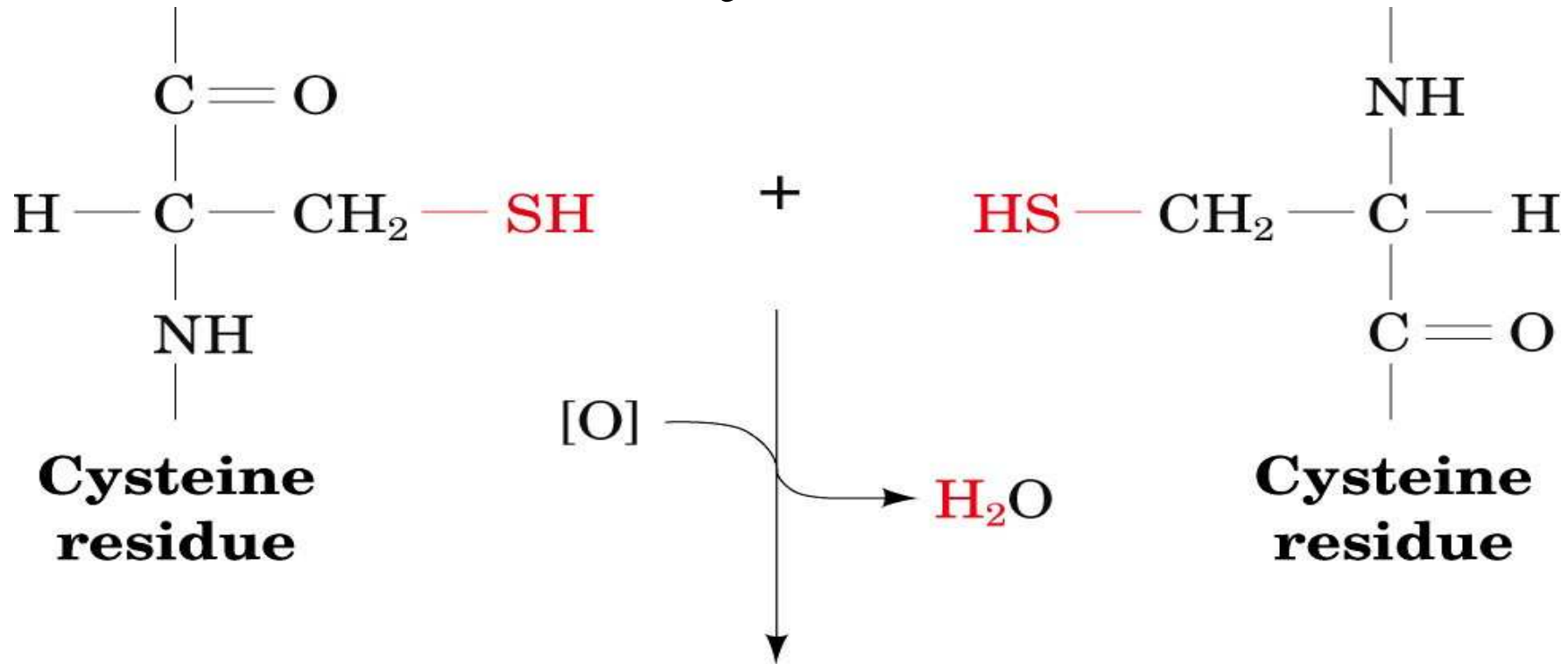
<sup>f</sup>The three- and one-letter symbols for asparagine *or* aspartic acid are Asx and B, whereas for glutamine *or* glutamic acid they are Glx and Z. The one-letter symbol for an undetermined or “nonstandard” amino acid is X.

Name Three-letter Symbol, and One-letter Symbol	Structural Formula <sup>a</sup>	Residue Mass (D) <sup>b</sup>	Average Occurrence in Proteins (%) <sup>c</sup>	pK <sub>1</sub> -COOH <sup>d</sup>	pK <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sup>d</sup>	pK <sub>R</sub> Side Chain <sup>d</sup>
<b><i>Amino acids with uncharged polar side chains</i></b>						
<b>Serine</b> Ser S		87.1	7.1	2.19	9.21	
<b>Threonine</b> Thr T		101.1	5.6	2.09	9.10	
<b>Asparagine<sup>f</sup></b> Asn N		114.1	4.3	2.14	8.72	
<b>Glutamine<sup>f</sup></b> Gln Q		128.1	3.9	2.17	9.13	
<b>Tyrosine</b> Tyr Y		163.2	3.2	2.20	9.21	10.46 (phenol)
<b>Cysteine</b> Cys C		103.1	1.6	1.92	10.70	8.37 (sulfhydryl)
<b><i>Amino acids with charged polar side chains</i></b>						
<b>Lysine</b> Lys K		128.2	6.0	2.16	9.06	10.54 ( -NH <sub>3</sub> )
<b>Arginine</b> Arg R		156.2	5.2	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
<b>Histidine<sup>e</sup></b> His H		137.1	2.2	1.80	9.33	6.04 (imidazole)
<b>Aspartic acid<sup>f</sup></b> Asp D		115.1	5.2	1.99	9.90	3.90 ( -COOH )
<b>Glutamic acid<sup>f</sup></b> Glu E		129.1	6.5	2.10	9.47	4.07 ( -COOH )

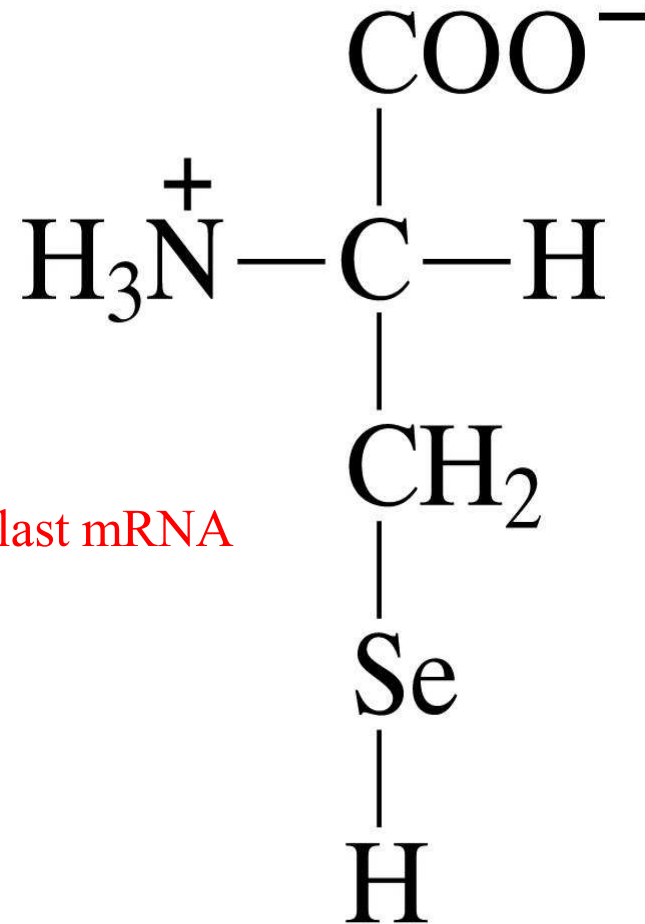
# Cystin



# Cystin



# Selenocystein (UGA) SECIS (60 Nukl.)

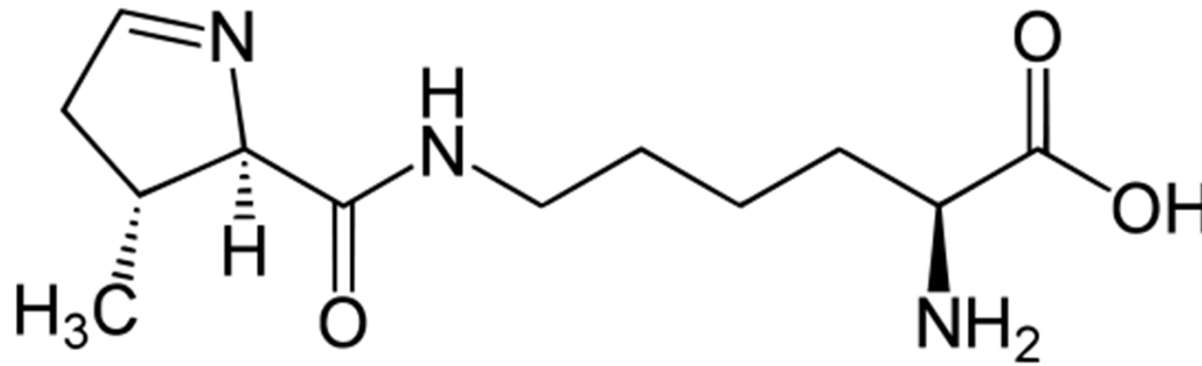


- Prokaryota – za UGA
- Eukaryota – netranslační oblast mRNA

Selenocysteine

# Pyrrolysine (UAG) PYLIS

*Desulfitobacterium hafniense*





# Názvosloví

- Triviální – vlastnost, místo + in
  - Glycin
  - Tyrosin
  - Asparagová kyselina
- Systematické
  - 2-aminoethanová kyselina

Používané zkratky

- třípísmenkové
- jednopísmenkové

AMK	Symboly		AMK	Symboly	
glycin	Gly	G	methionin	Met	M
alanin	Ala	A	glutamová k.	Glu	E
valin	Val	V	asparagin	Asn	N
leucin	Leu	L	glutamin	Gln	Q
izoleucin	Ile	I	lysin	Lys	K
serin	Ser	S	arginin	Arg	R
threonin	Thr	T	tyrosin	Tyr	Y
cystein	Cys	C	fenylalanin	Phe	F
histidin	His	H	tryptofan	Trp	W
prolin	Pro	P	asparagová k.	Asp	D

# Esenciální AMK

- Rostliny + mikroorganismy 0
- Člověk – biosyntéza -12

esenciální - 8 Lys, Try, Phe, Met,  
Thr, Ile, Leu, Val,  
*Arg, His?*

**Semiesenciální - mláďata**

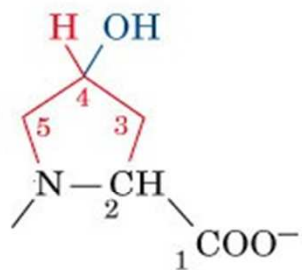
## II. Nekódované aminokyseliny

### A. v bílkovinách posttranslační modifikací AMK

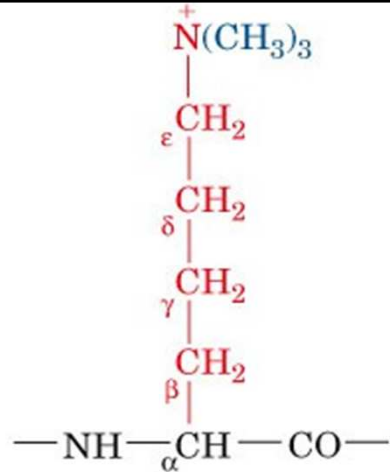
OH-Lys

OH-Pro

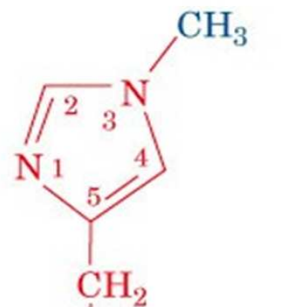
fosfo-Ser



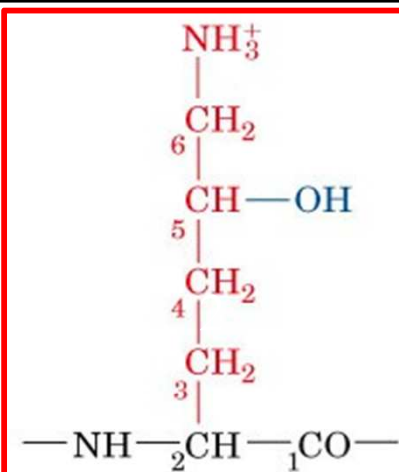
**4-Hydroxyproline**



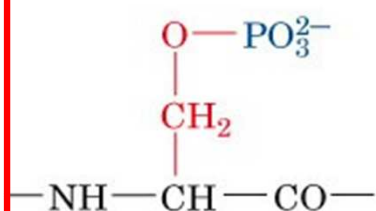
**ε-N,N,N-Trimethyllysine**



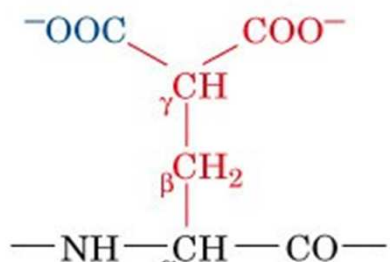
**3-Methylhistidine**



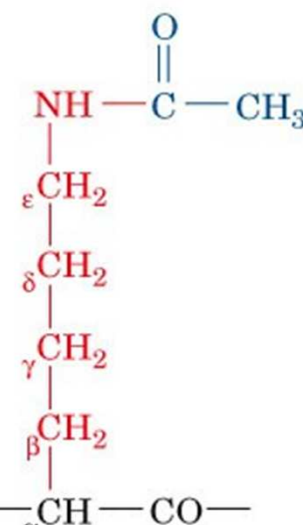
**5-Hydroxylysine**



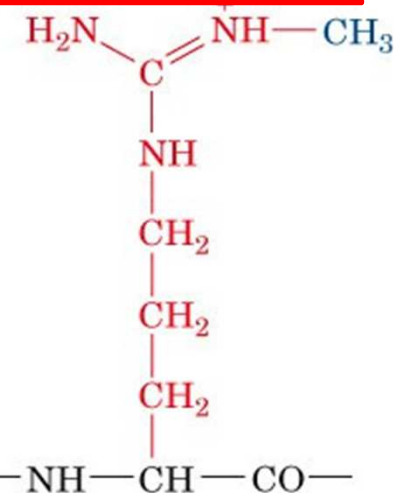
**O-Phosphoserine**



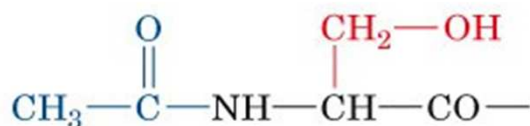
**γ-Carboxyglutamate**



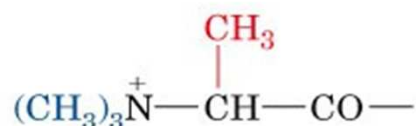
**ε-N-Acetyllysine**



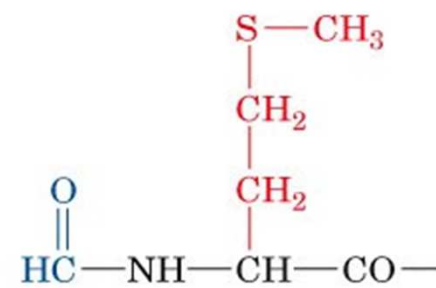
**ω-N-Methylarginine**



**N-Acetylserine**



**N,N,N-Trimethylalanine**



**N-Formylmethionine**

## B. volné s biologickou funkcí

### $\beta$ alanin

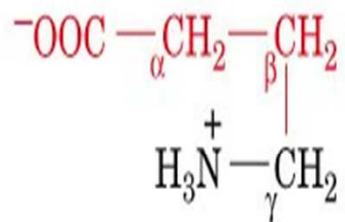
ornitin a citrulin

$\gamma$  aminomáselná

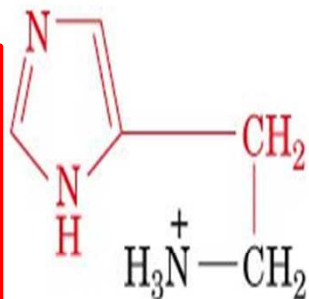
antibiotika - azaserin, cykloserin, chloramfenikol

nervové mediátory - DOPA, dopamin, adrenalin

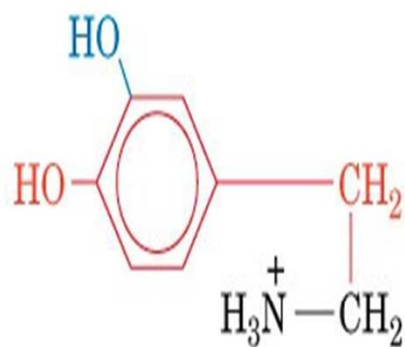
hormony - thyroxin, trijodthyronin



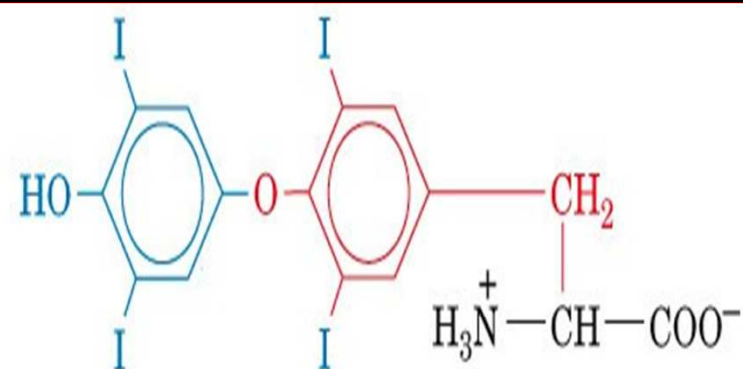
**$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)**



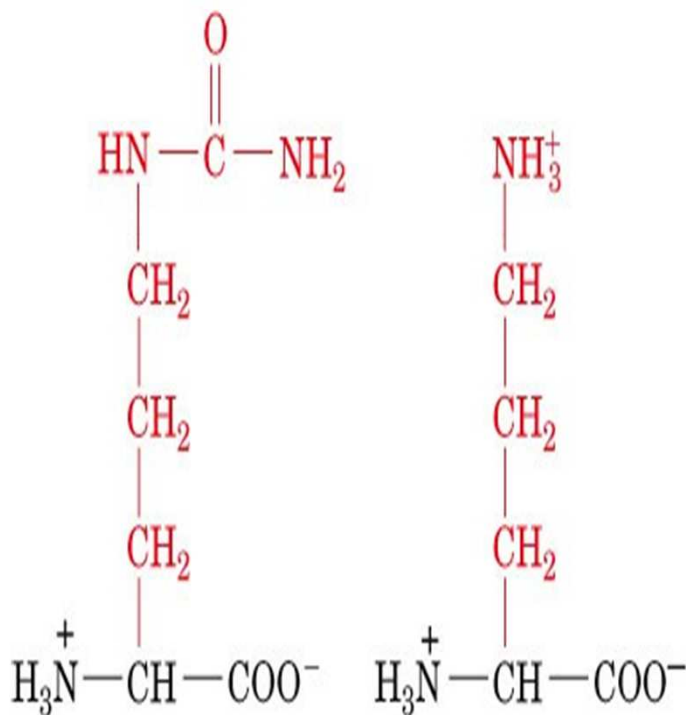
**Histamine**



**Dopamine**

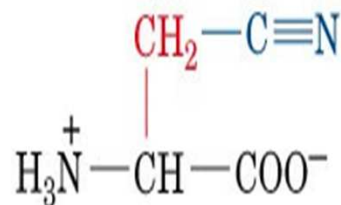


**Thyroxine**

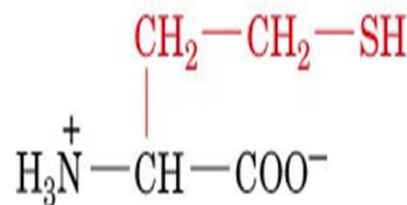


**Citrulline**

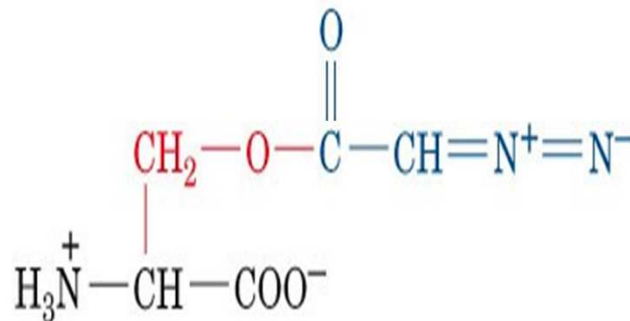
**Ornithine**



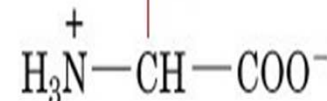
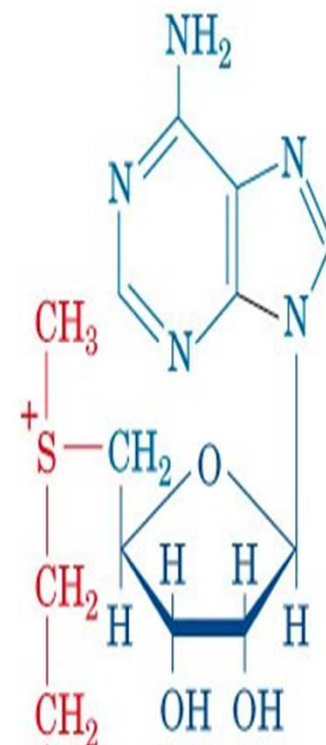
**$\beta$ -Cyanoalanine**



**Homocysteine**

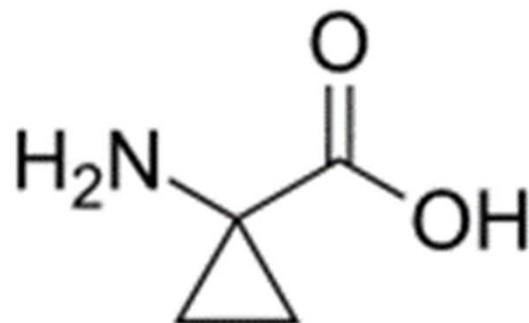


**Azaserine**



**S-Adenosylmethionine**

# Aminocyclopropan-1-karboxylová kyselina





## Ethylene Biosynthesis in Plants

### Enzymes

- 1 SAM synthetase
- 2 ACC synthase
- 3 ACC oxidase
- 4 ACC N-malonyl-transferase
- 5 MTA nucleosidase
- 6 MTR kinase
- 7 Transaminase
- S Spontaneous reaction

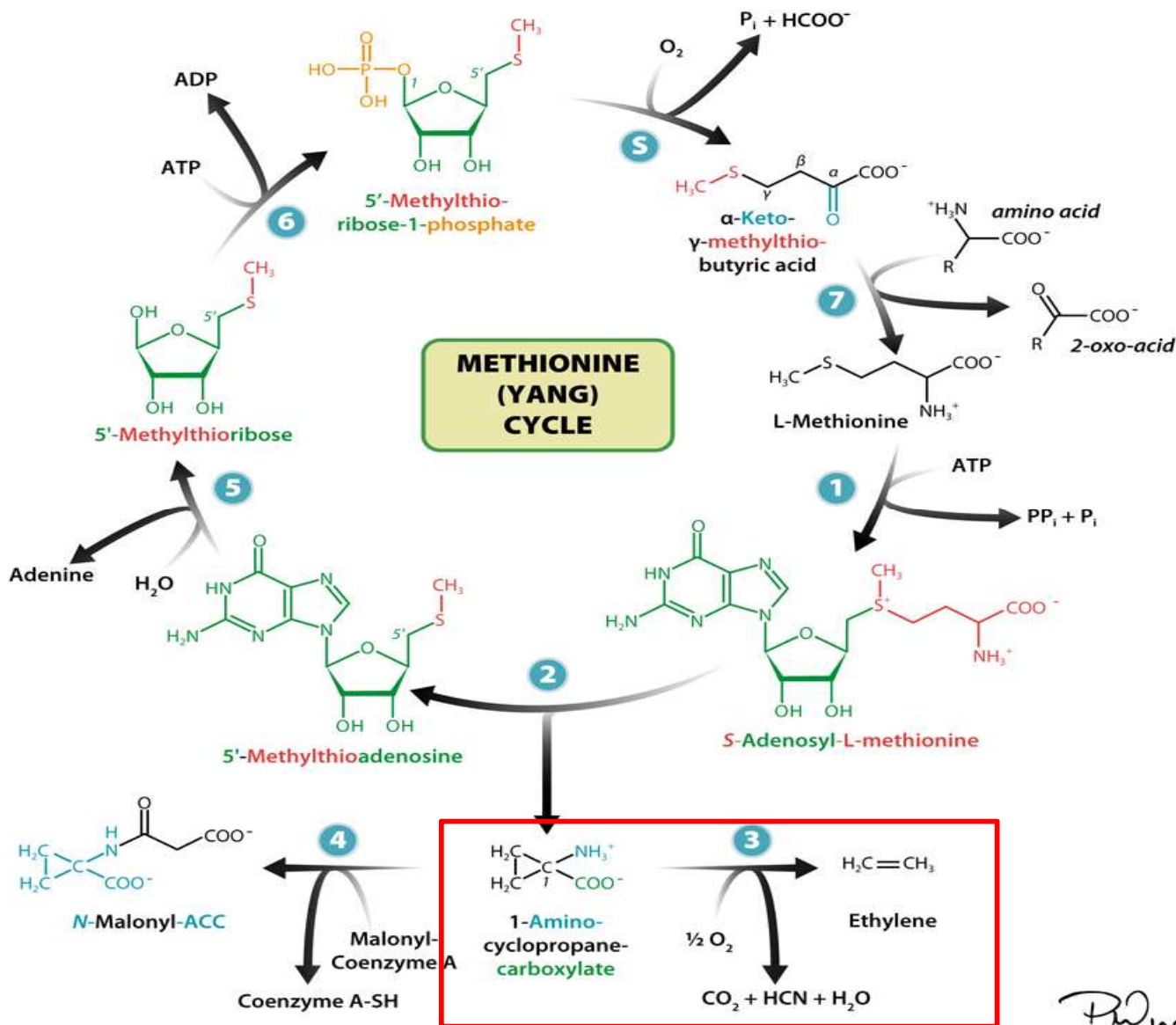
### Abbreviations

ATP	Adeninnucleotidtriphosphate
ADP	Adeninnucleotiddiphosphate
ACC	1-Aminocyclopropane-carboxylate
HCN	Hydrocyanide acid
MTA	5'-Methylthioadenosin
MTR	5'-Methylthioribose
PP <sub>i</sub>	Diphosphate (Pyrophosphate)
P <sub>i</sub>	Phosphate
SAM	S-Adenosyl-L-methionine

### Sources

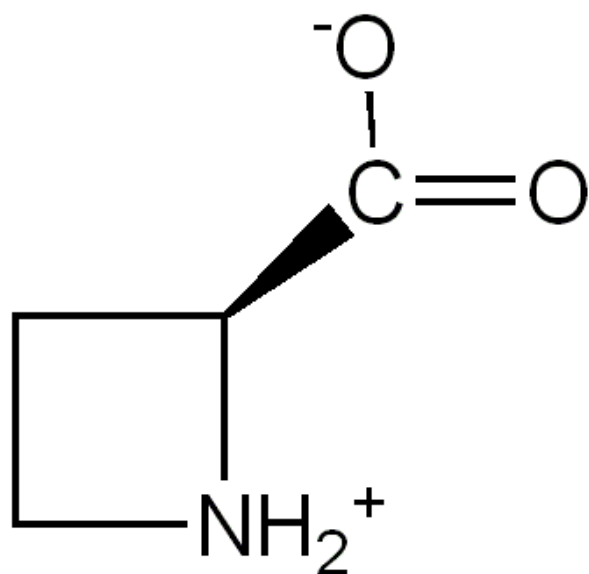
Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Am Soc Plant Phys (Rockville).

Wang K C-L, Li H, Ecker JR (2002). Ethylene Biosynthesis and Signalling Networks. Plant Cell (Supplement) S131-S151.



PW<sub>108</sub>

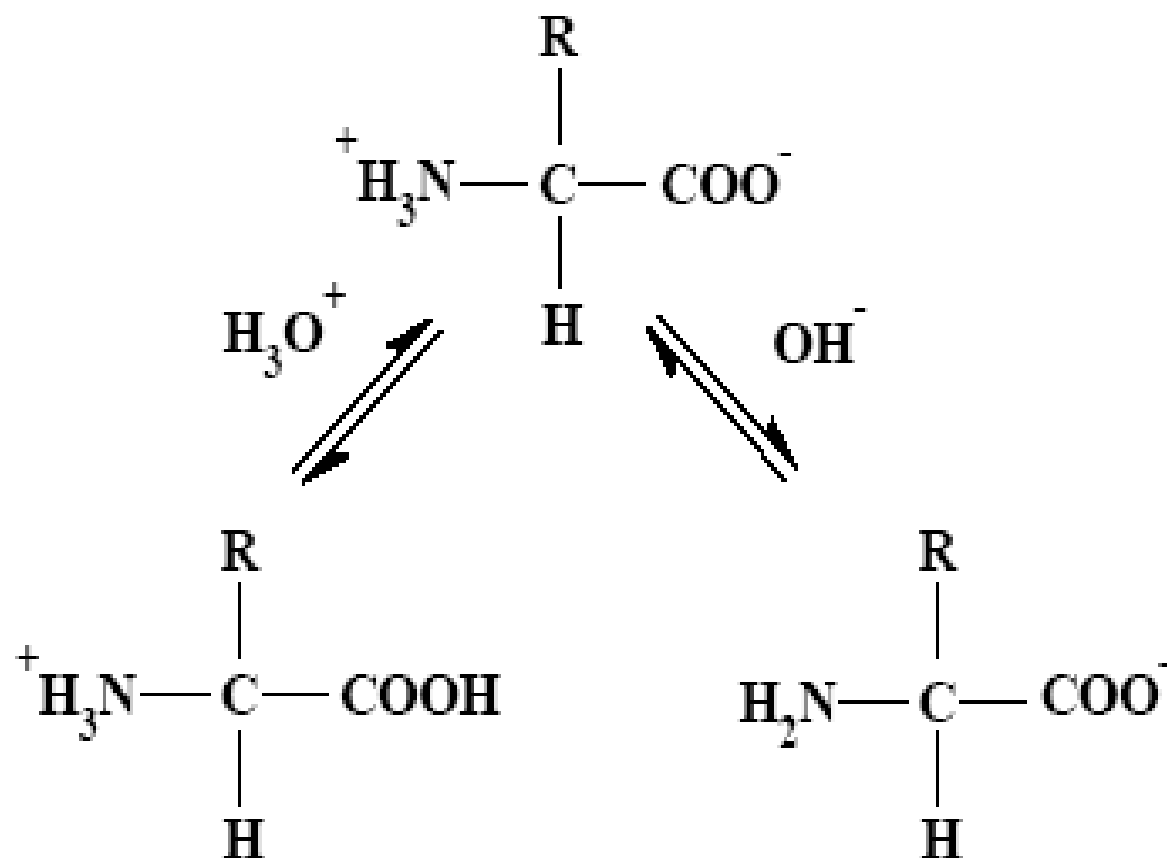
# Azetidine-2-karboxylová kyselina



## Vlastnosti aminokyselin

### ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI

#### Amfoterní charakter - zwitterionty



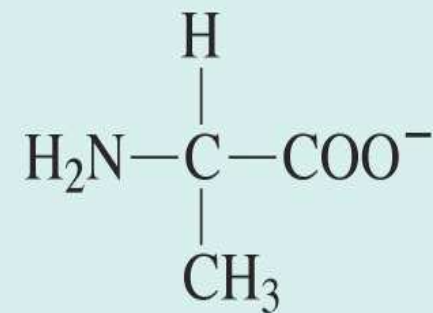
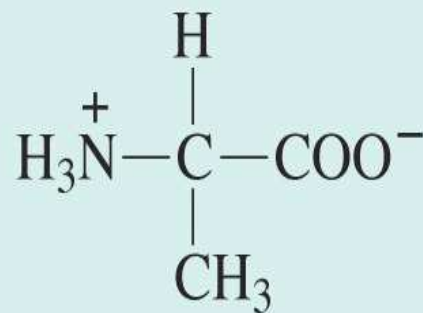
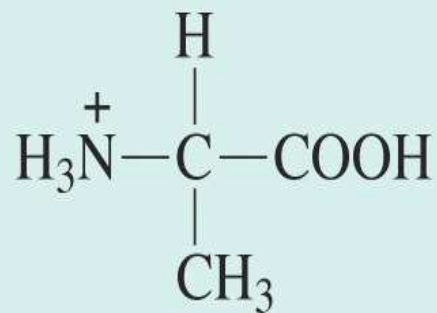
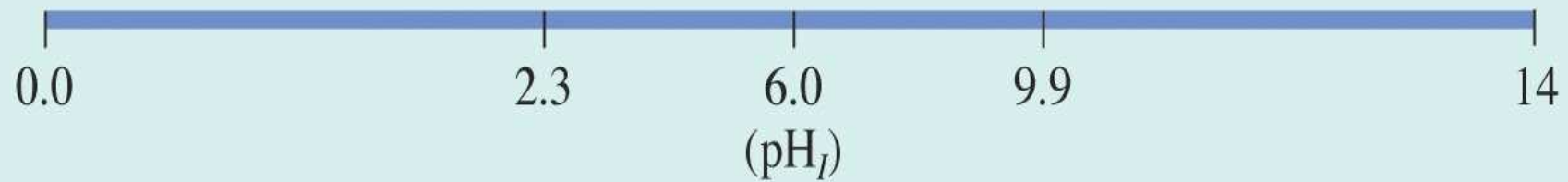
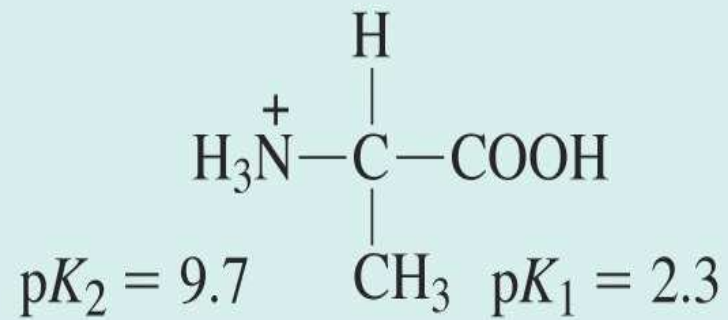


Figure 3-4b Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

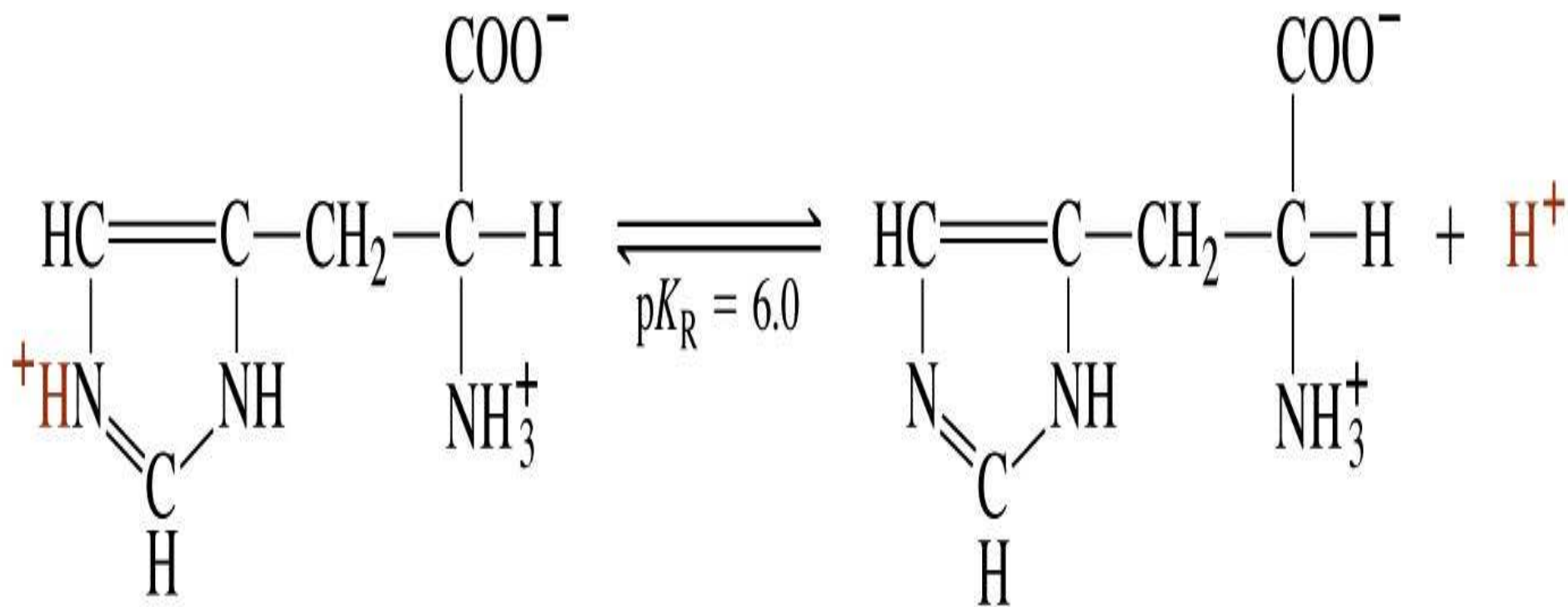
Izoelektrický bod  $pI = \frac{pK_{COOH} + pK_{NH_2}}{2}$

Tabulka pK

Skupina	pK	Skupina	pK	Skupina	pK
$\alpha$ COOH	1.8 - 2.5	$\beta$ COOH	3.9	$\gamma$ COOH	4.1
$\alpha$ NH <sub>2</sub>	9 - 10	$\epsilon$ NH <sub>2</sub>	10.8	guanidin	12.5
imidazol	6.0	SH	8.3	OH	10.1

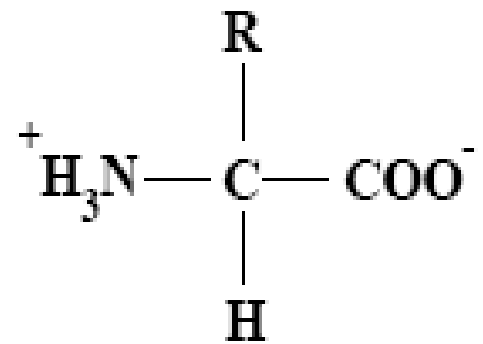
Pufrační kapacita

Titrační křivky

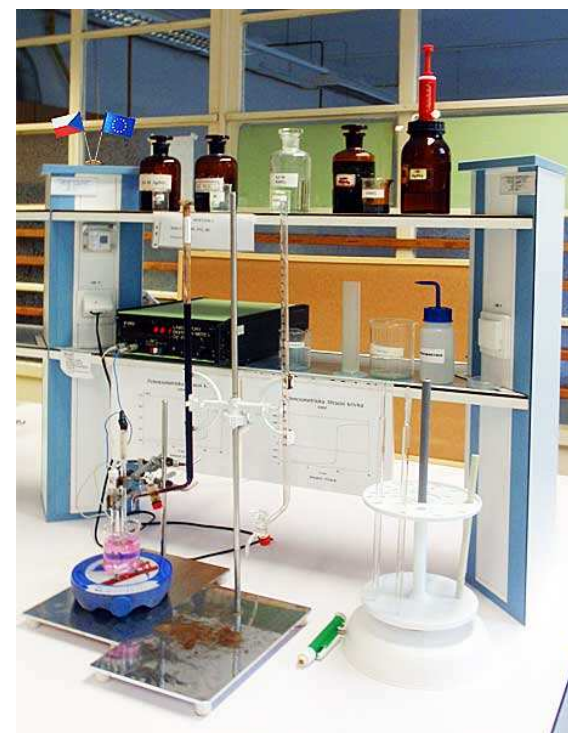
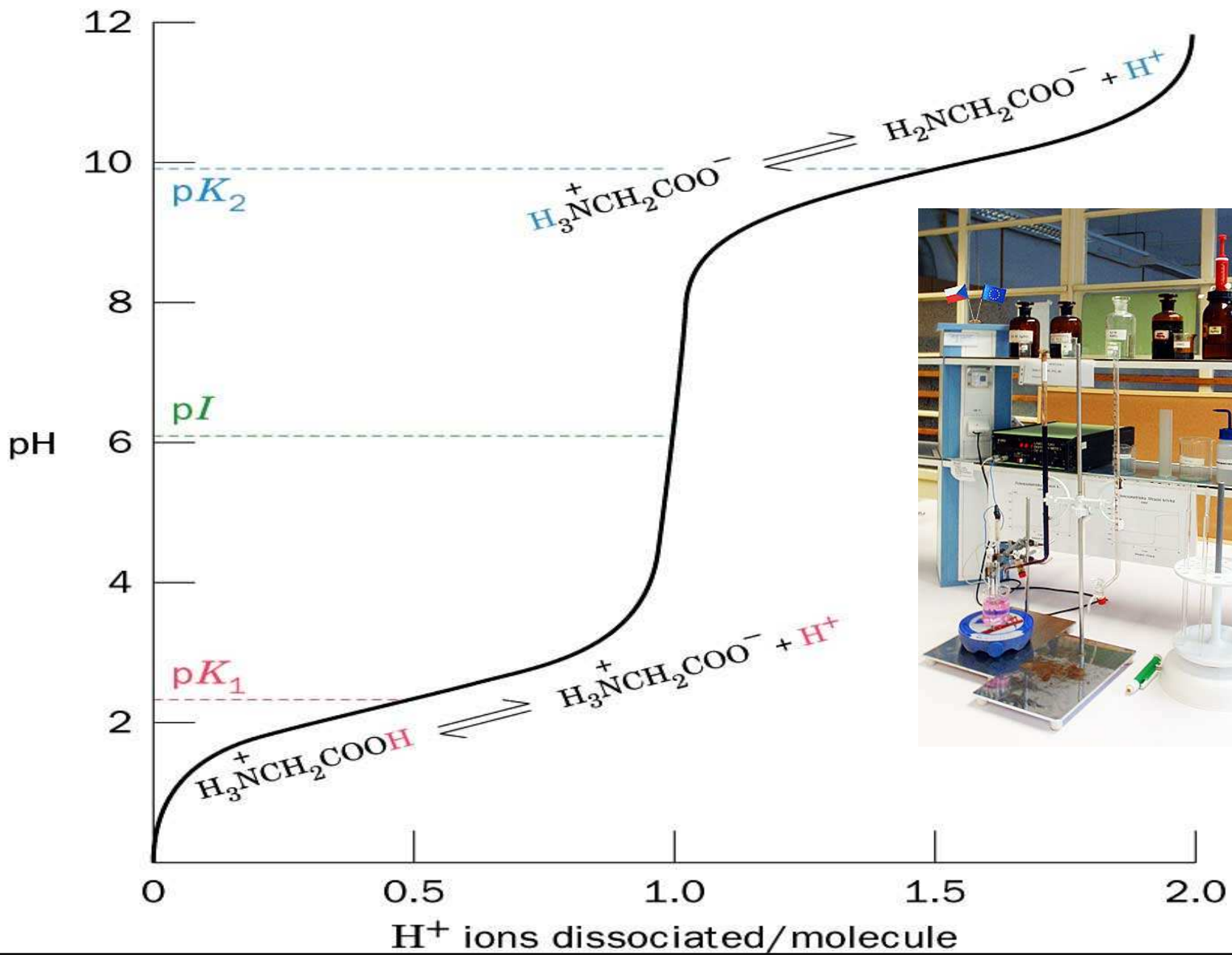


Histidine (His)

# Pufrační kapacita

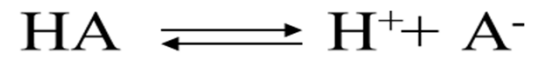


# Titrační křivka glycinu



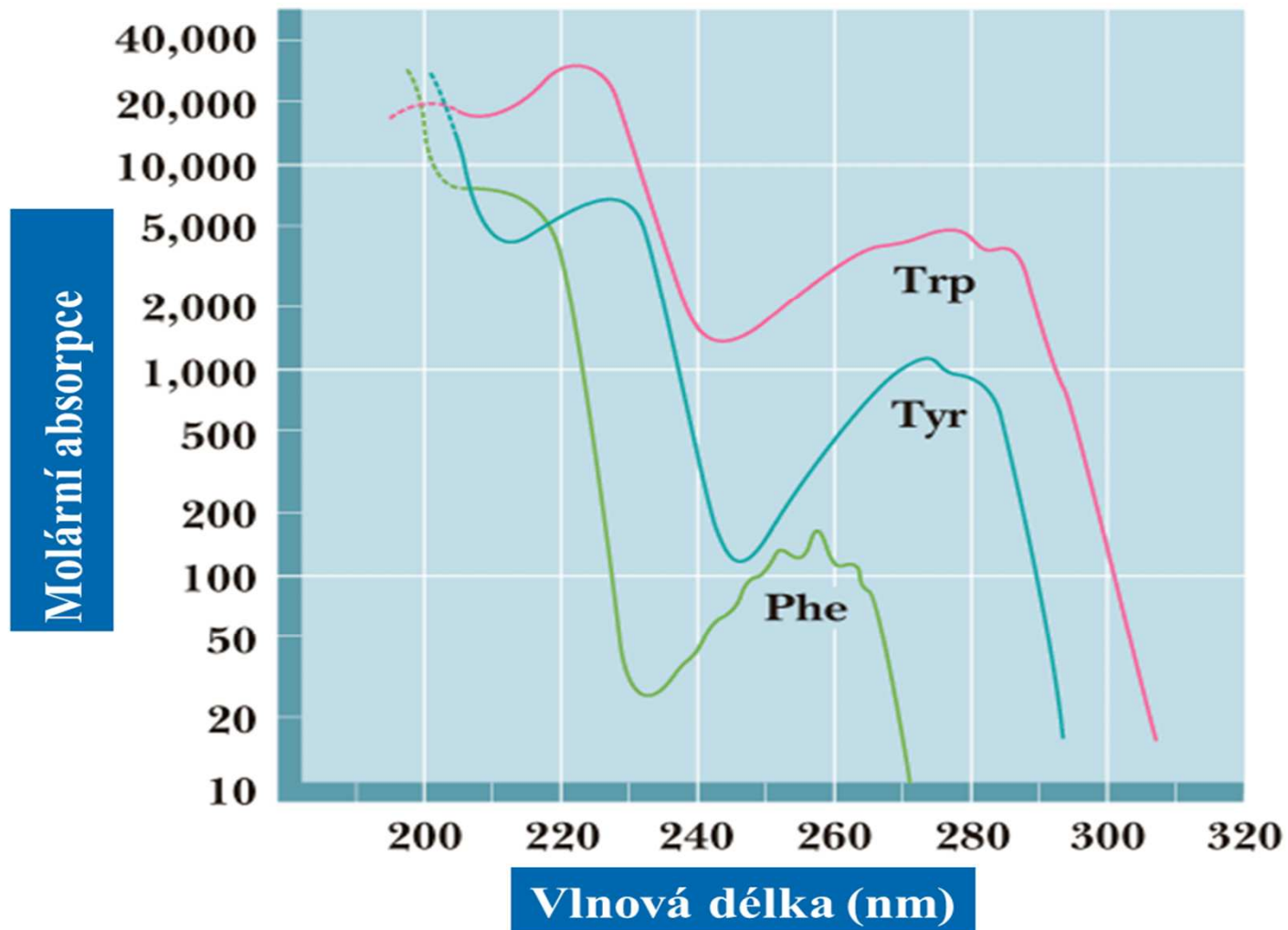


# Henderson-Hasselbachova rovnice

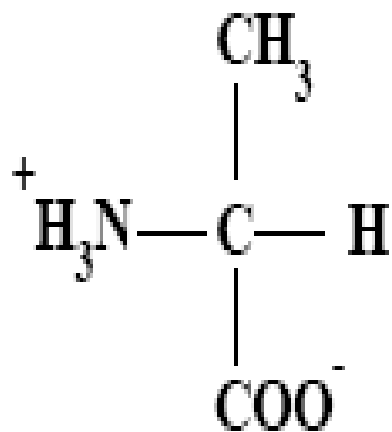


$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

# Optické vlastnosti

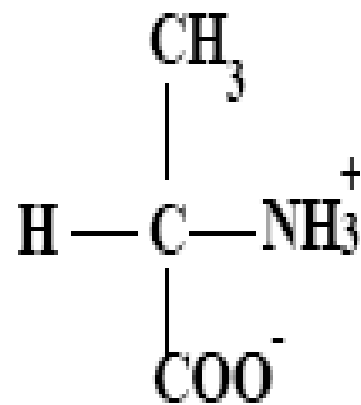


# OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

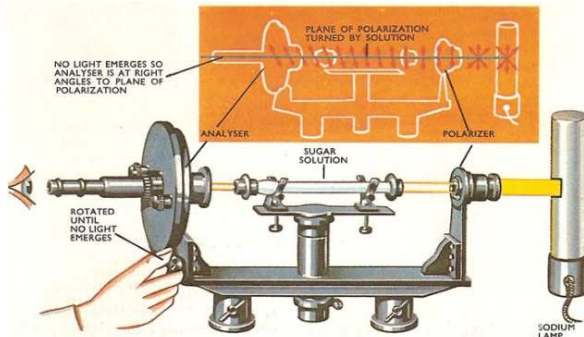
L



D-alanin

R

enantiomery



Analyzer  
(can be rotated)

Degree scale  
(fixed)

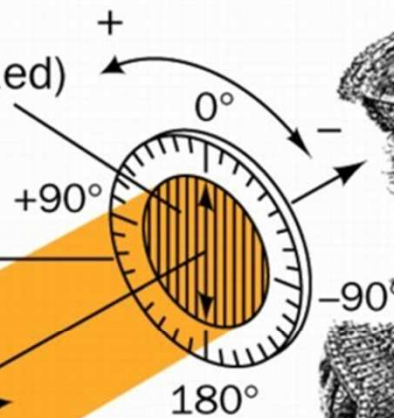
Polarimeter  
tube

Fixed  
polarizer

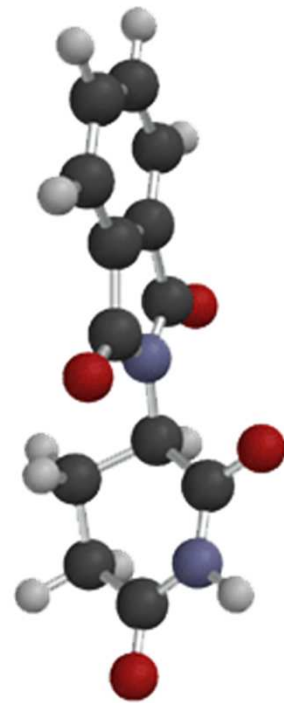
Light  
source

Optically active  
substance in solution  
in the tube causes  
the plane of the polarized  
light to rotate

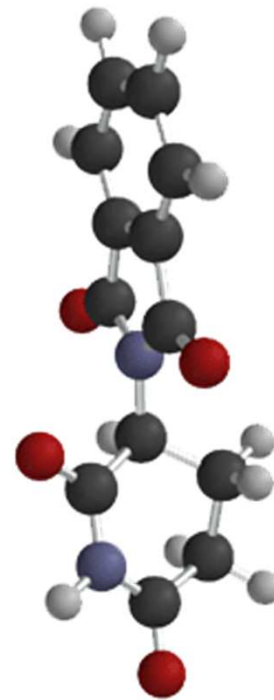
Plane of polarization  
of the emerging light  
is not the same as  
that of the entering  
polarized light



# Thalidomid



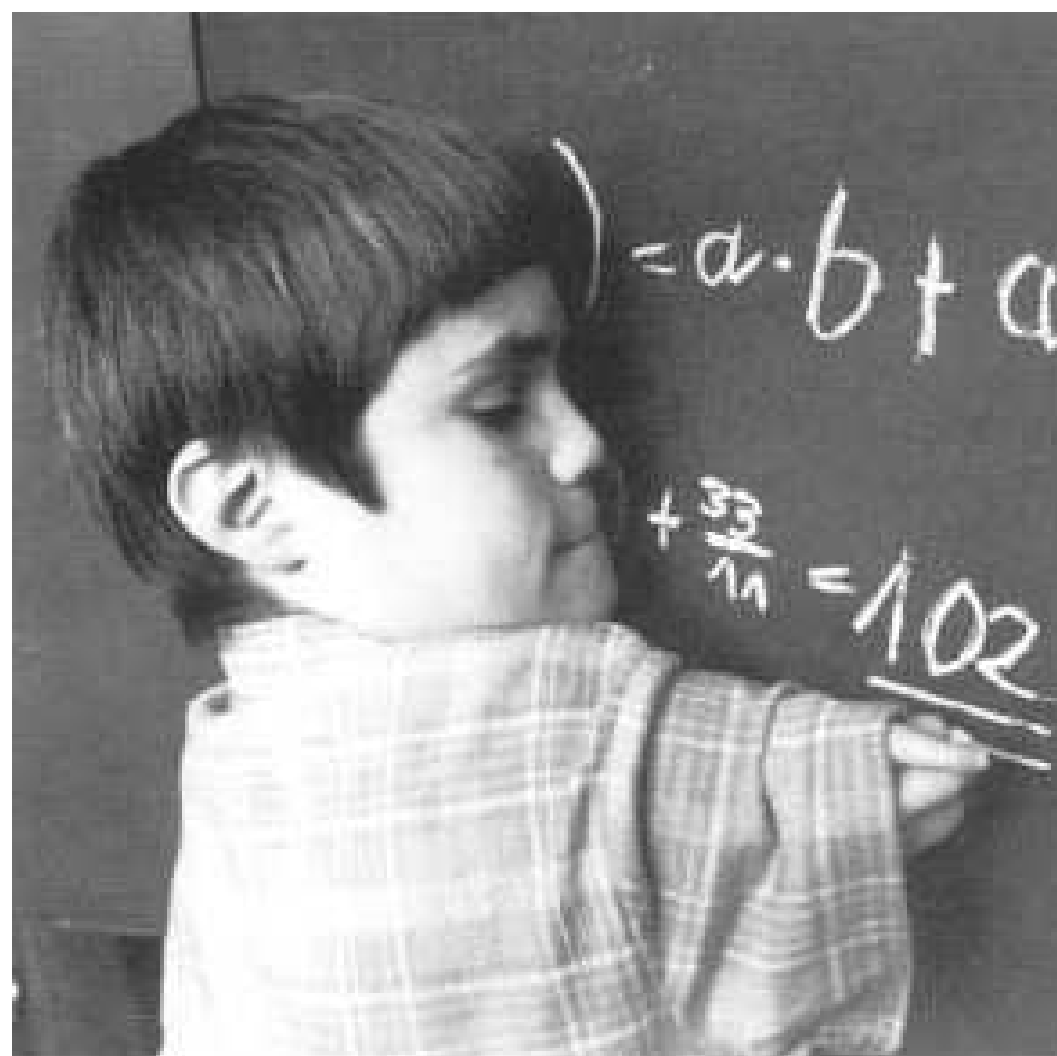
*(R)*-(+)-Thalidomide



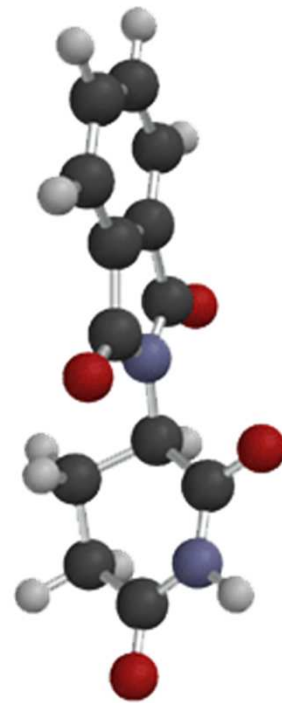
*(S)*-(-)-Thalidomide

# Thalidomid



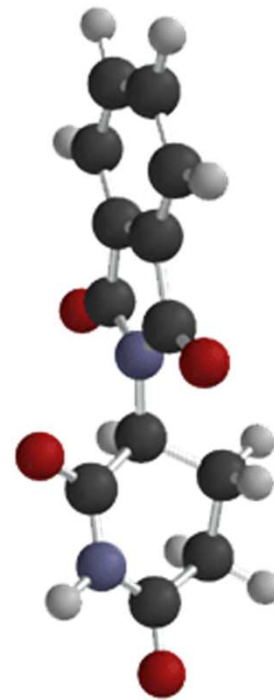


# Thalidomid



*(R)-(+)-Thalidomide*

Léčivo

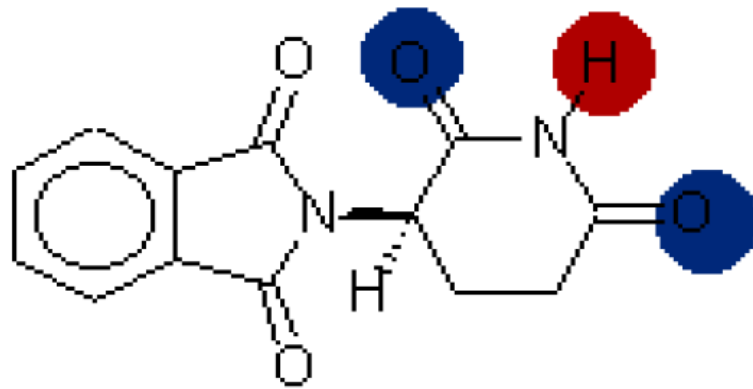


*(S)-(-)-Thalidomide*

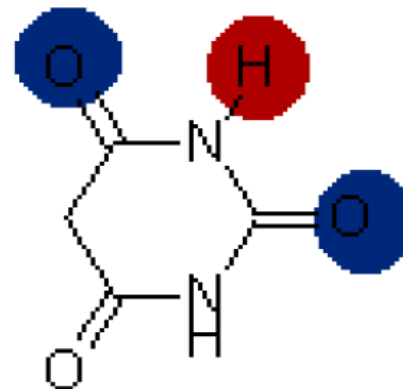
Teratogen



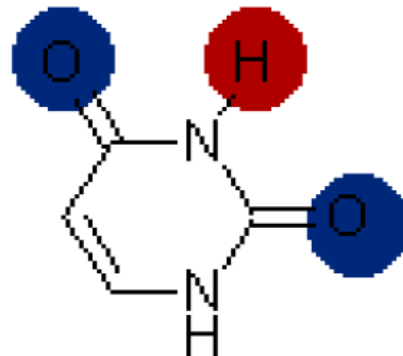
# Thalidomid



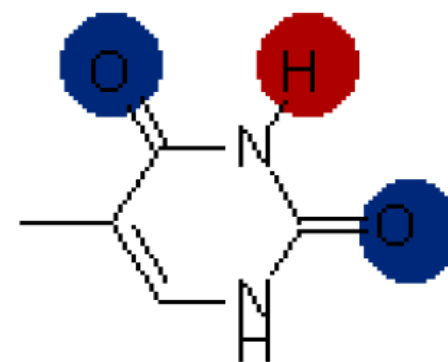
Thalidomid



Barbitursäure

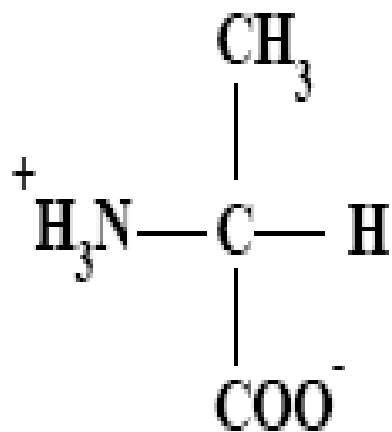


Uracil



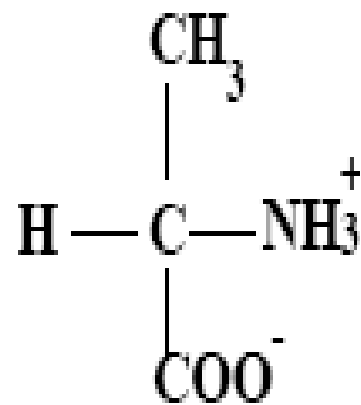
Thymin

# OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

L

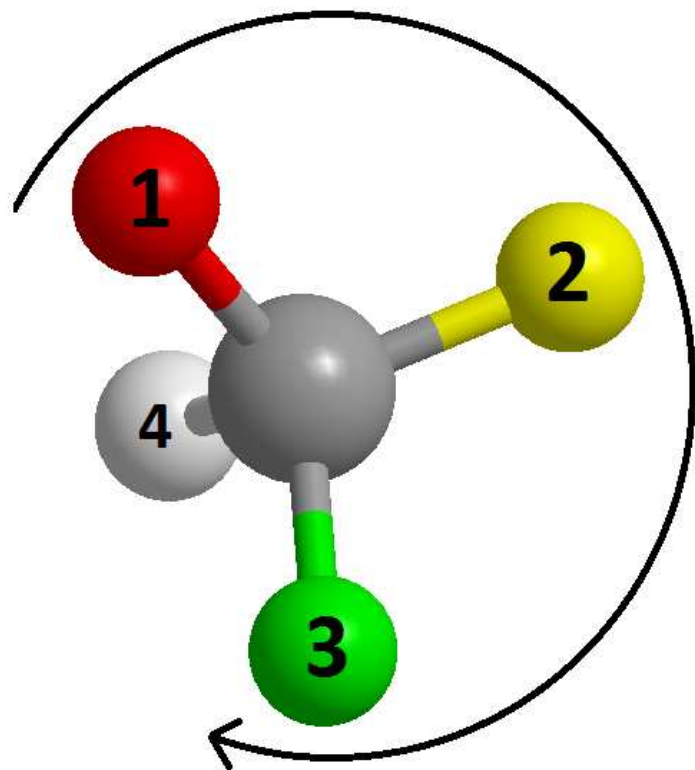


D-alanin

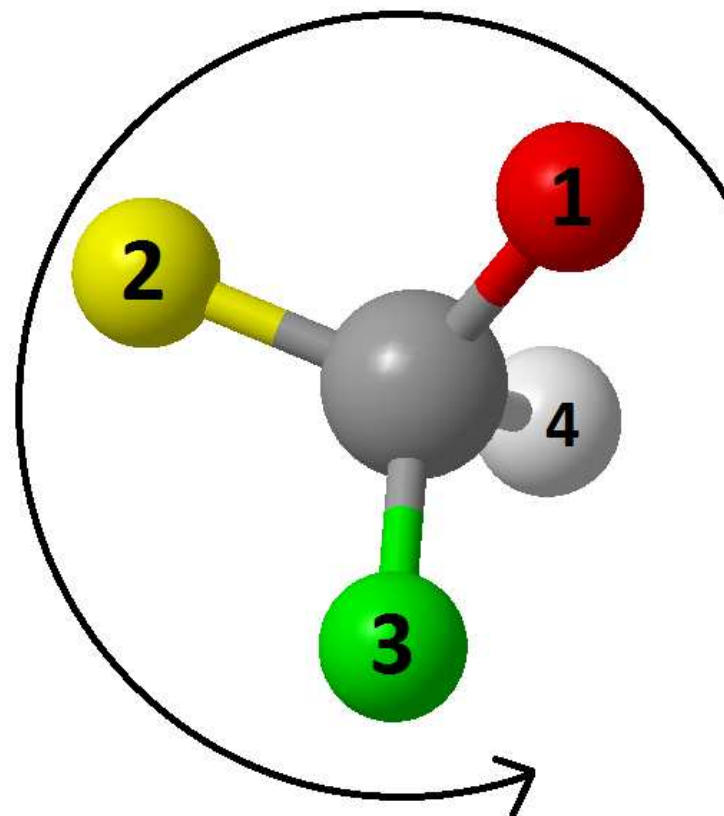
R

enantiomery

# Cahn-Ingold-Prelogova pravidla pro určování R/S; číslování od nejtěžšího k nejlehčímu

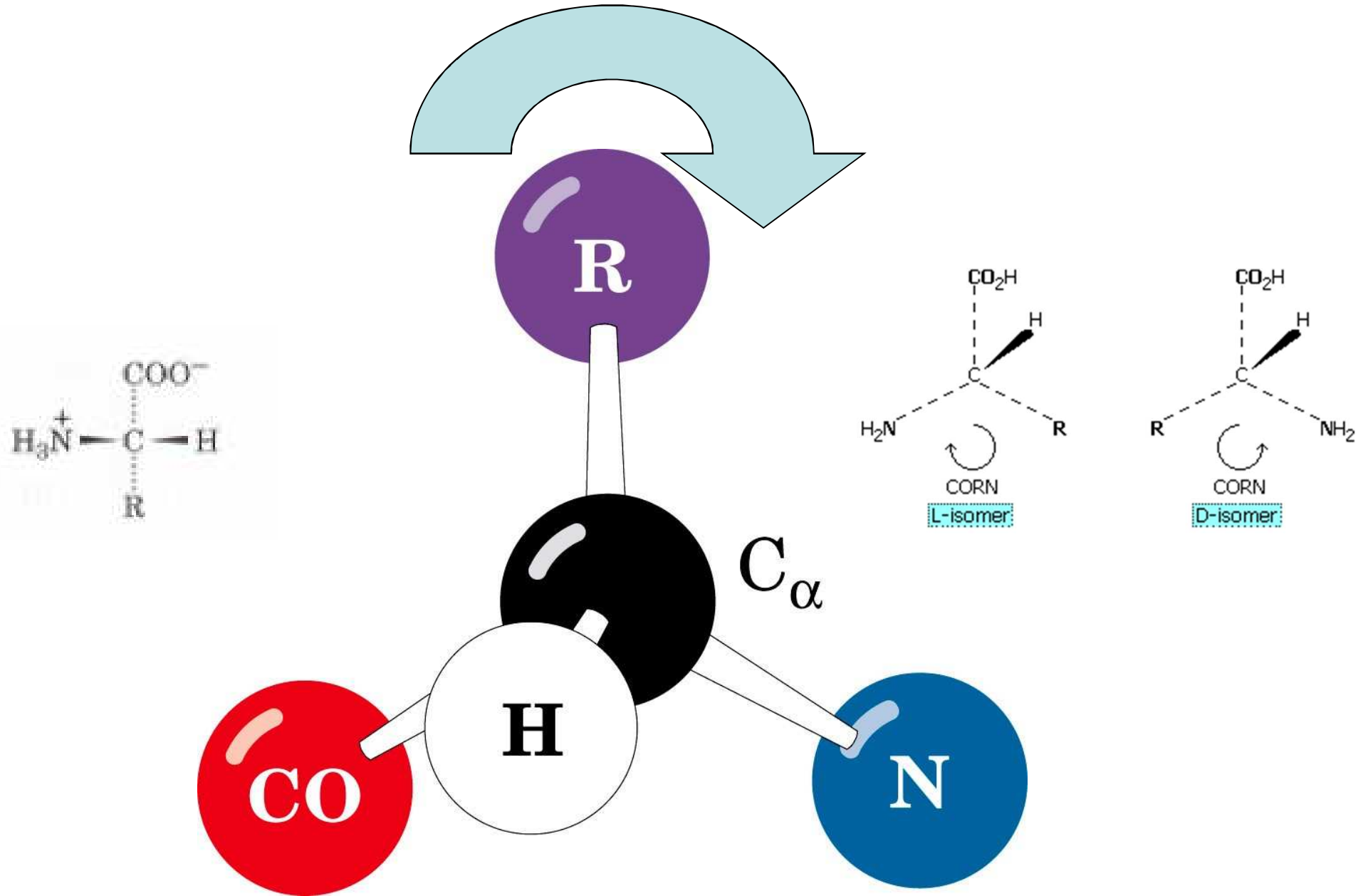


**R**ectus

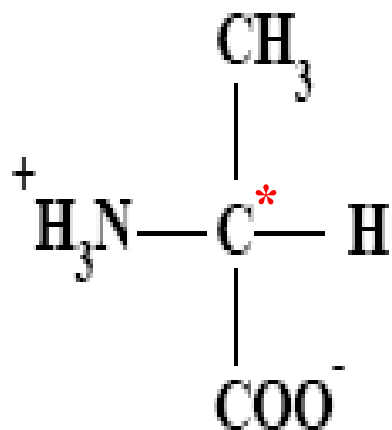


**S**inister

# L AMK - CO-R-N

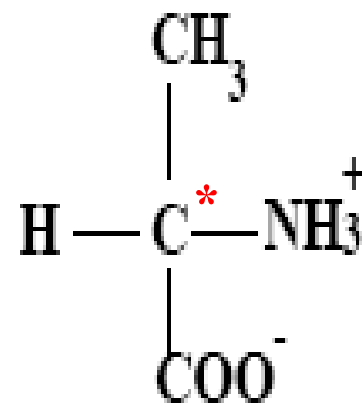


# OPTICKÁ AKTIVITA



L -alanin

L



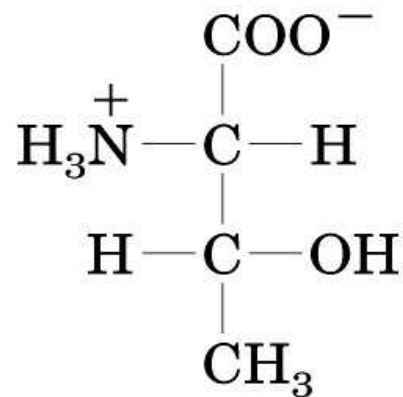
D-alanin

R

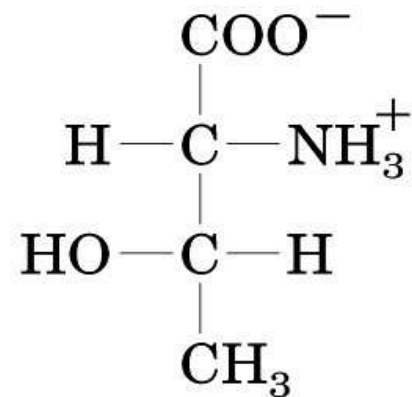
enantiomery

$n^{\text{C}^*}$

# Diastomery threoninu (Ile) – 2C\*

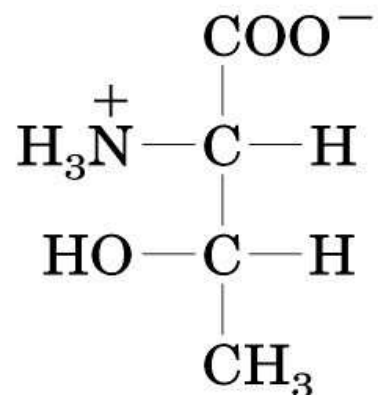


**L-Threonine**

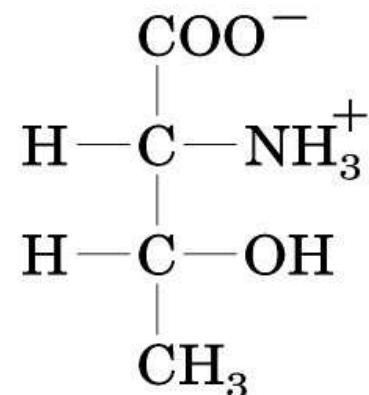


**D-Threonine**

Mirror  
plane



**L-*allo*-Threonine**



**D-*allo*-Threonine**

## CHEMICKÉ VLASTNOSTI

- reakce dané přítomností COOH a NH<sub>2</sub> skupin

ninhydrinová reakce - NH<sub>2</sub>

- reakce vedlejších skupin

reakce Sakaguchiho - guanidinová skupina

xantoproteinová reakce - aromatické aminokyseliny

Paulyho reakce - tyrosin

Adamkiewiczova reakce - indol

# Ninhydrinová reakce

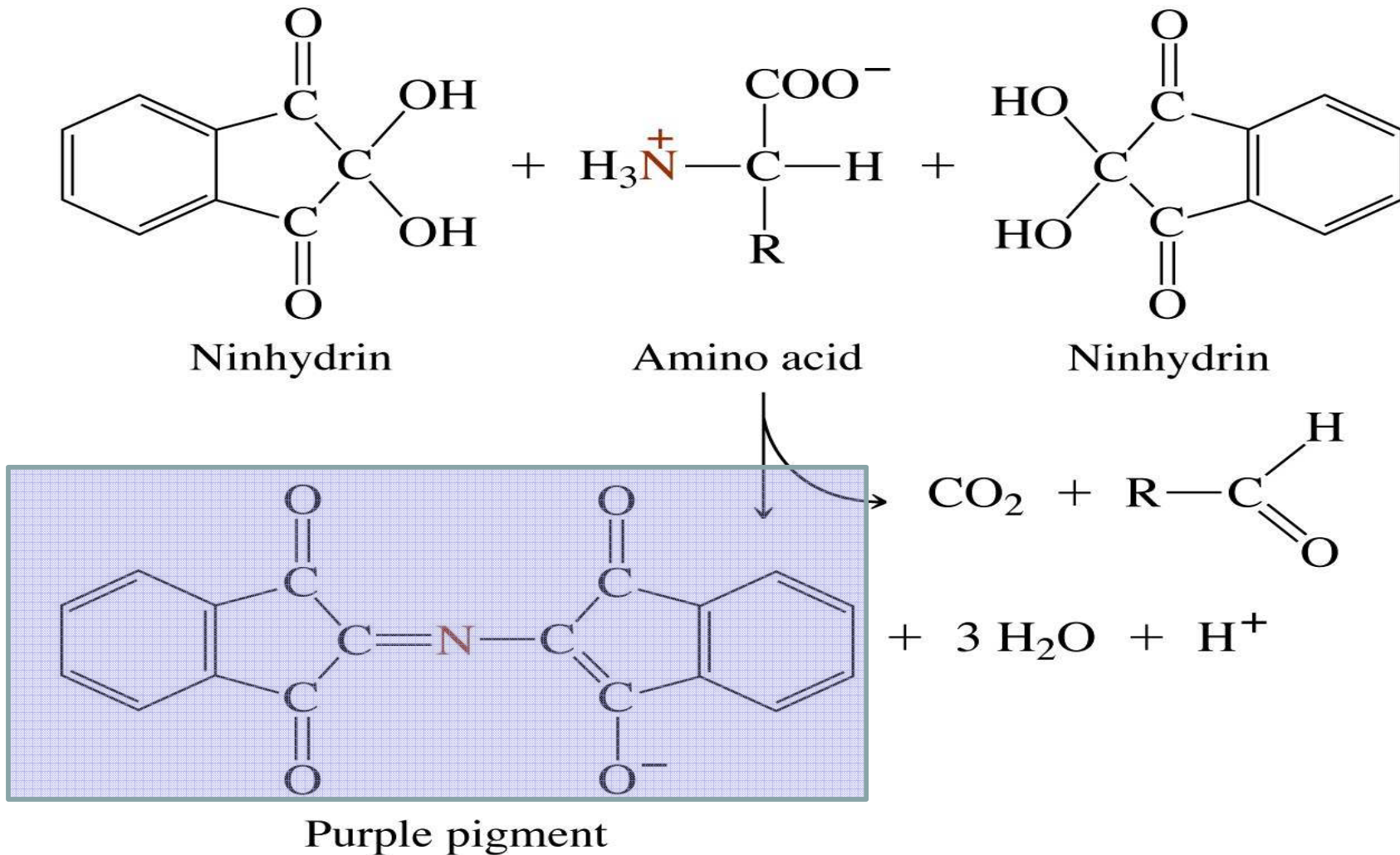
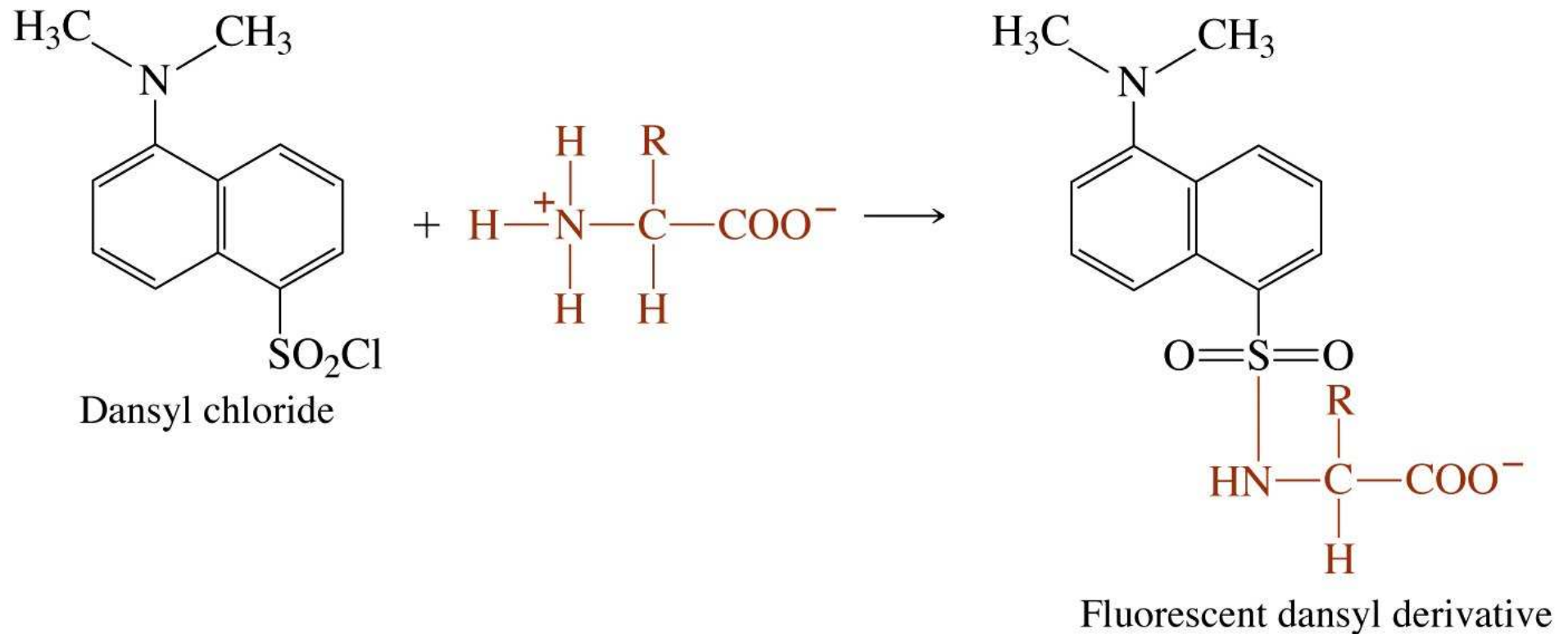


Figure 3-9a Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



# Reakce AMK s dansylchloridem

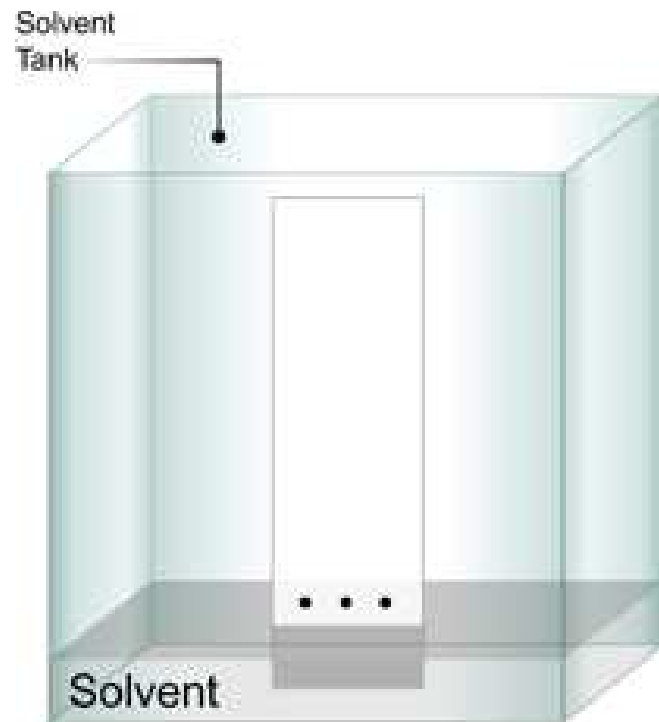


## *Analýza aminokyselin*

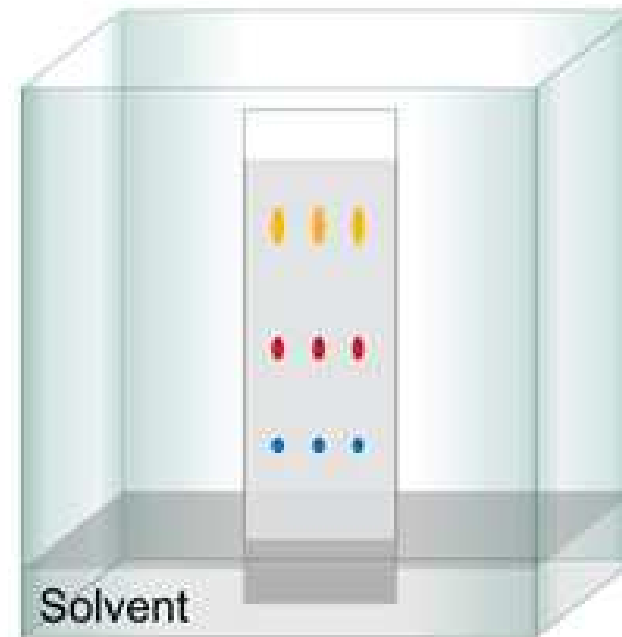
- papíroví a tenkovrstvá chromatografie
- ionexová chromatografie
- reverzně fázová chromatografie

# Papírová chromatografie AMK

Martin Sygne Nobelova cena za chemii 1952



Time Zero



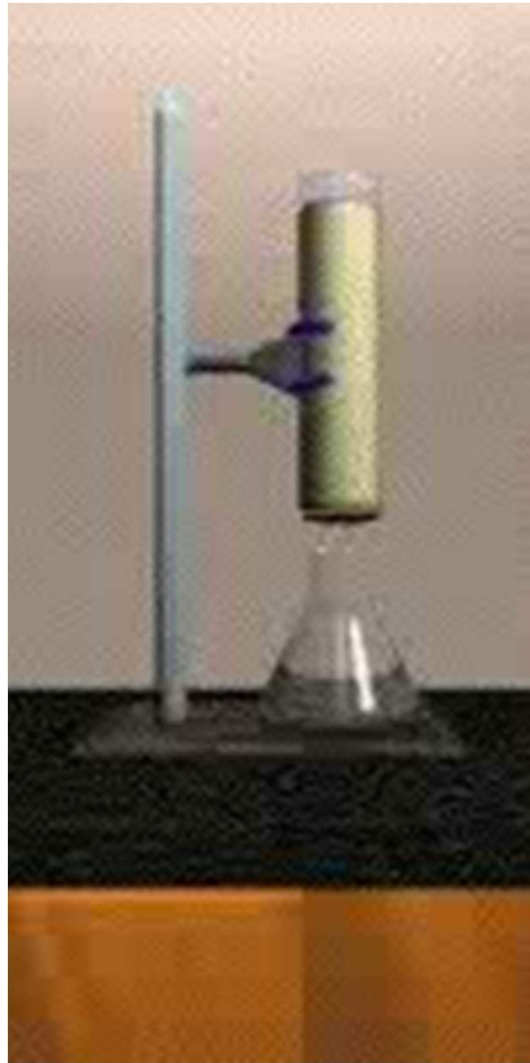
After Ten Minutes

# Papírová chromatografie AMK

Martin Sygne Nobelova cena za chemii 1952

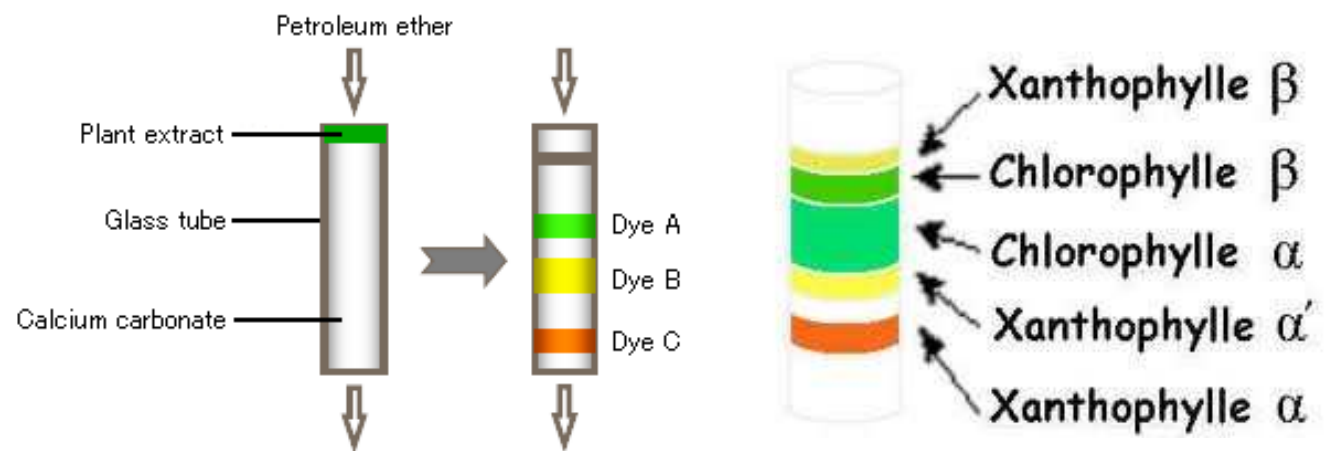
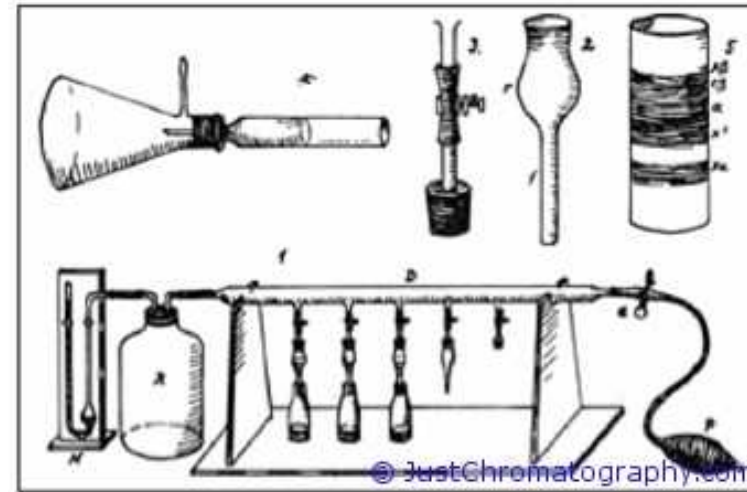


# Kolonová chromatografie

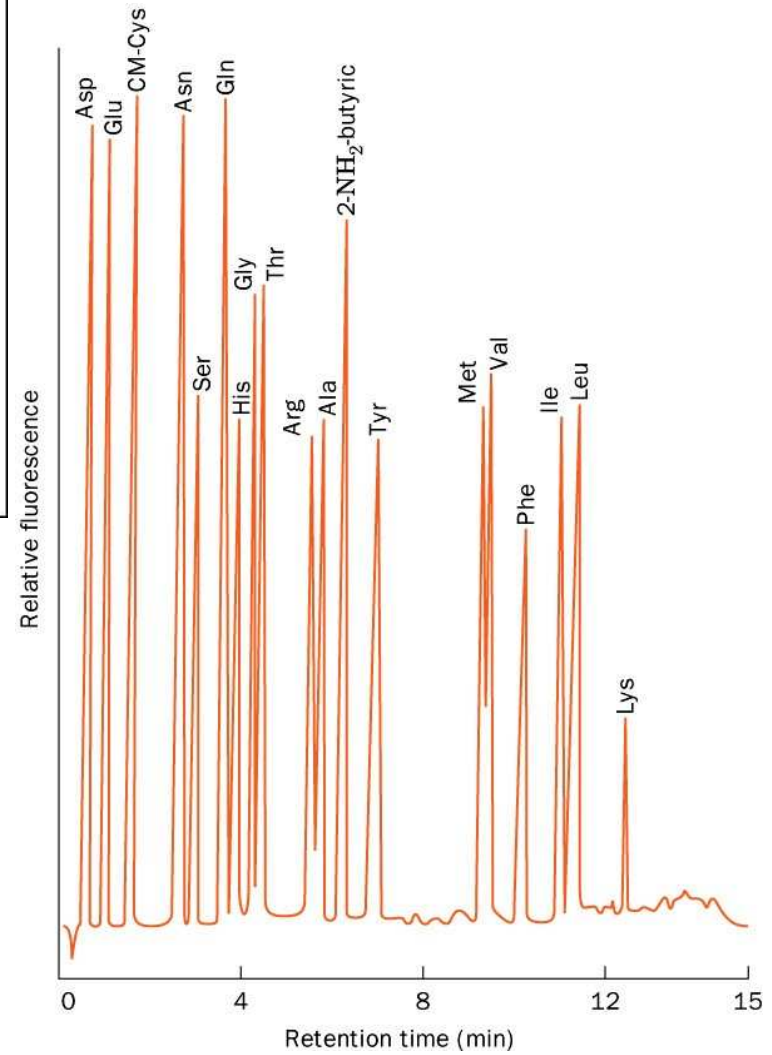
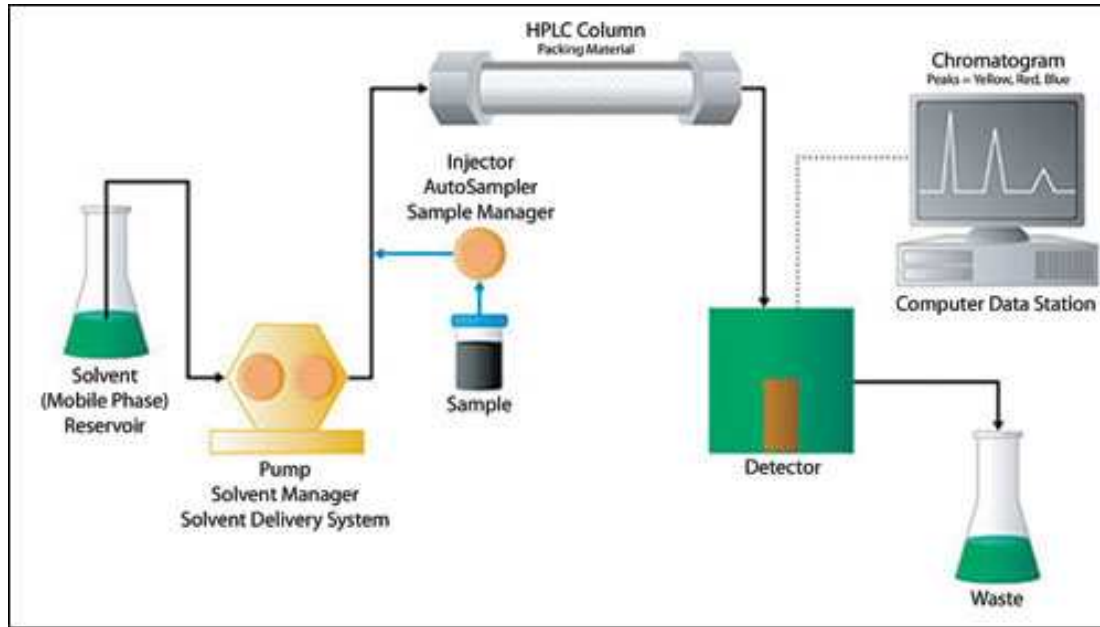


# Mikhail Semyonovich Tsvet

## Chromatographia 1906

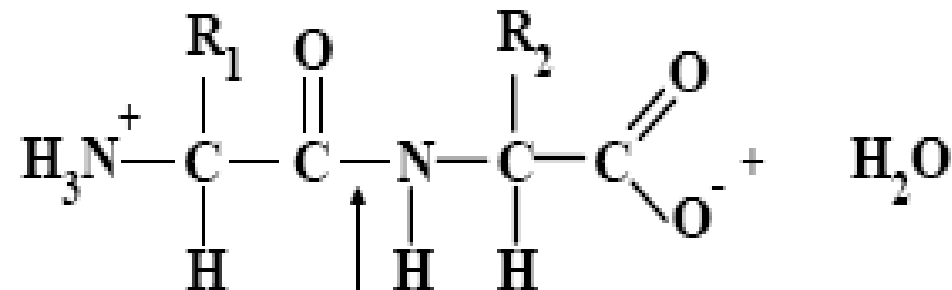
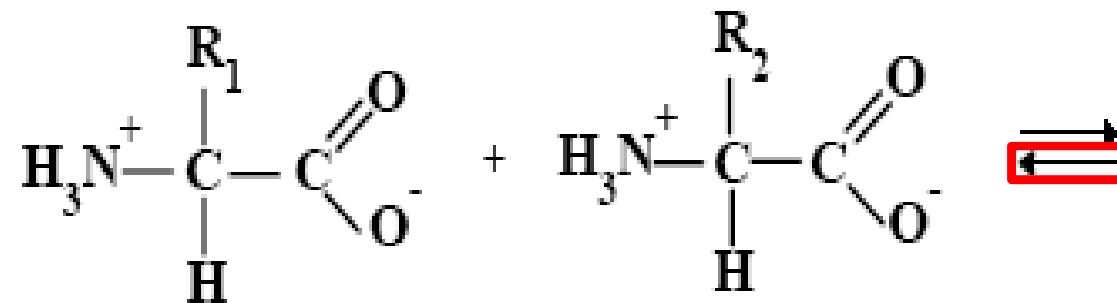


# RP HPLC AMK



# PEPTIDY :

(E.FISHER 1902)



↑  
Peptidická vazba - amidová vazba



di, tri, tetra ..... oligopeptidy ..... polypeptidy

### Názvosloví peptidů



glycyl-arginyl-histidin

**Biosyntéza peptidů** - meziprodukty odbourávání bílkovin

- jednoduchá biosyntéza bez proteosyntézy

Přírodní peptidy:

Di - karnosin  
anserin

Ve svalech

Tri - glutathion GSH

Ve všech buňkách



Peptidové hormóny - oxytosin  
vasopresin

Zadní lalok hypofýzy

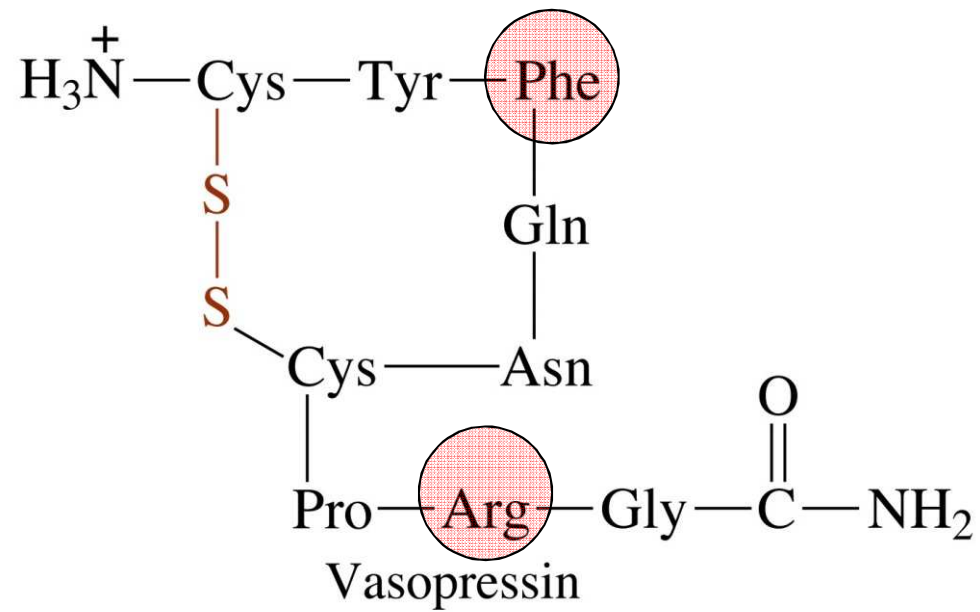


Figure 3-11c Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

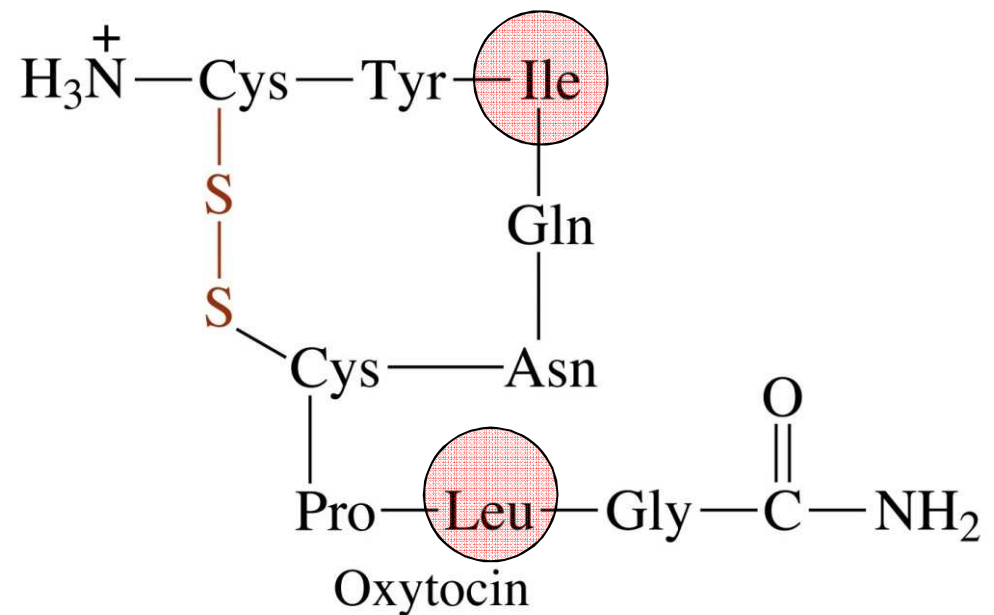


Figure 3-11b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

Peptidové hormóny - oxytosin

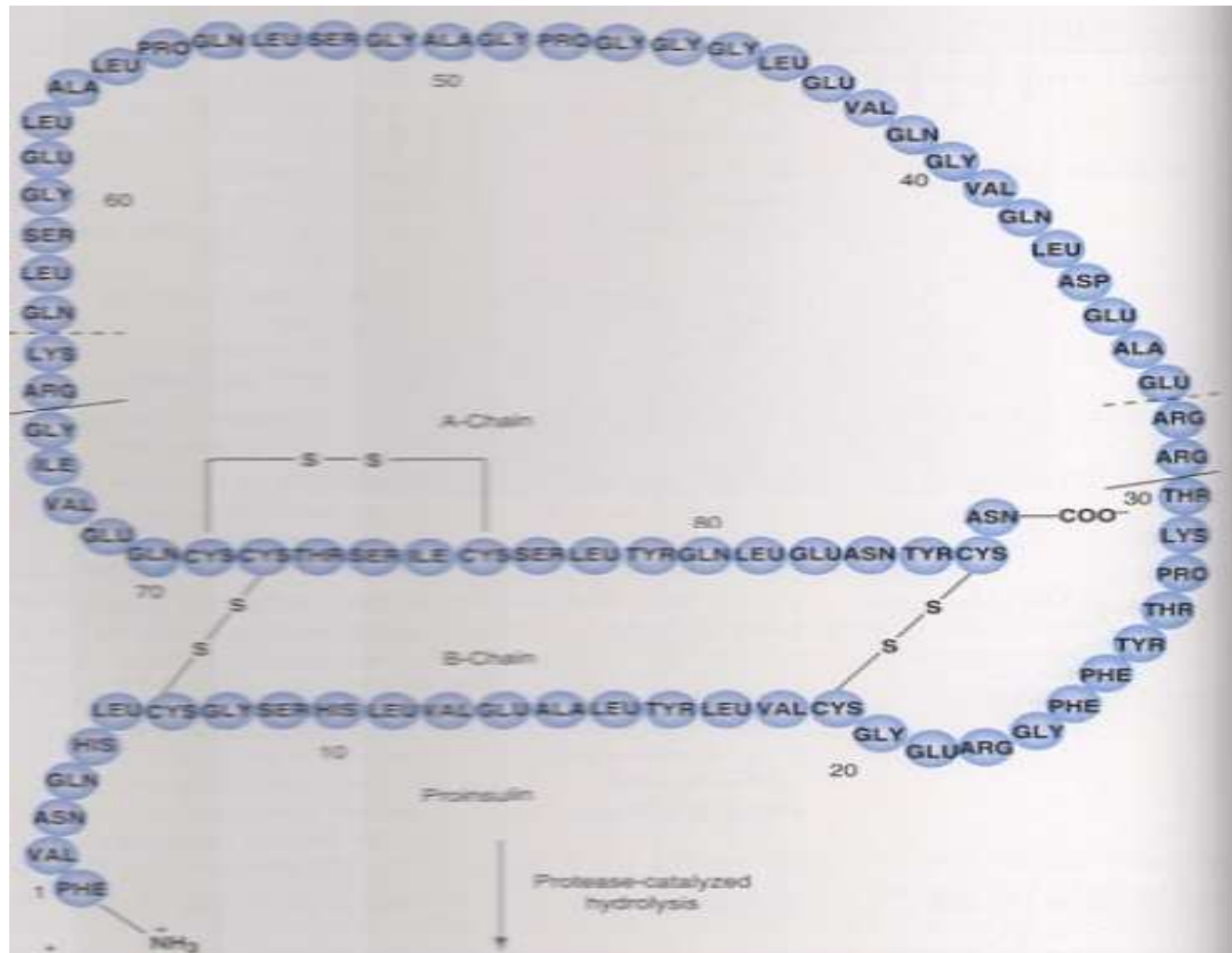
vasopresin

inzulin

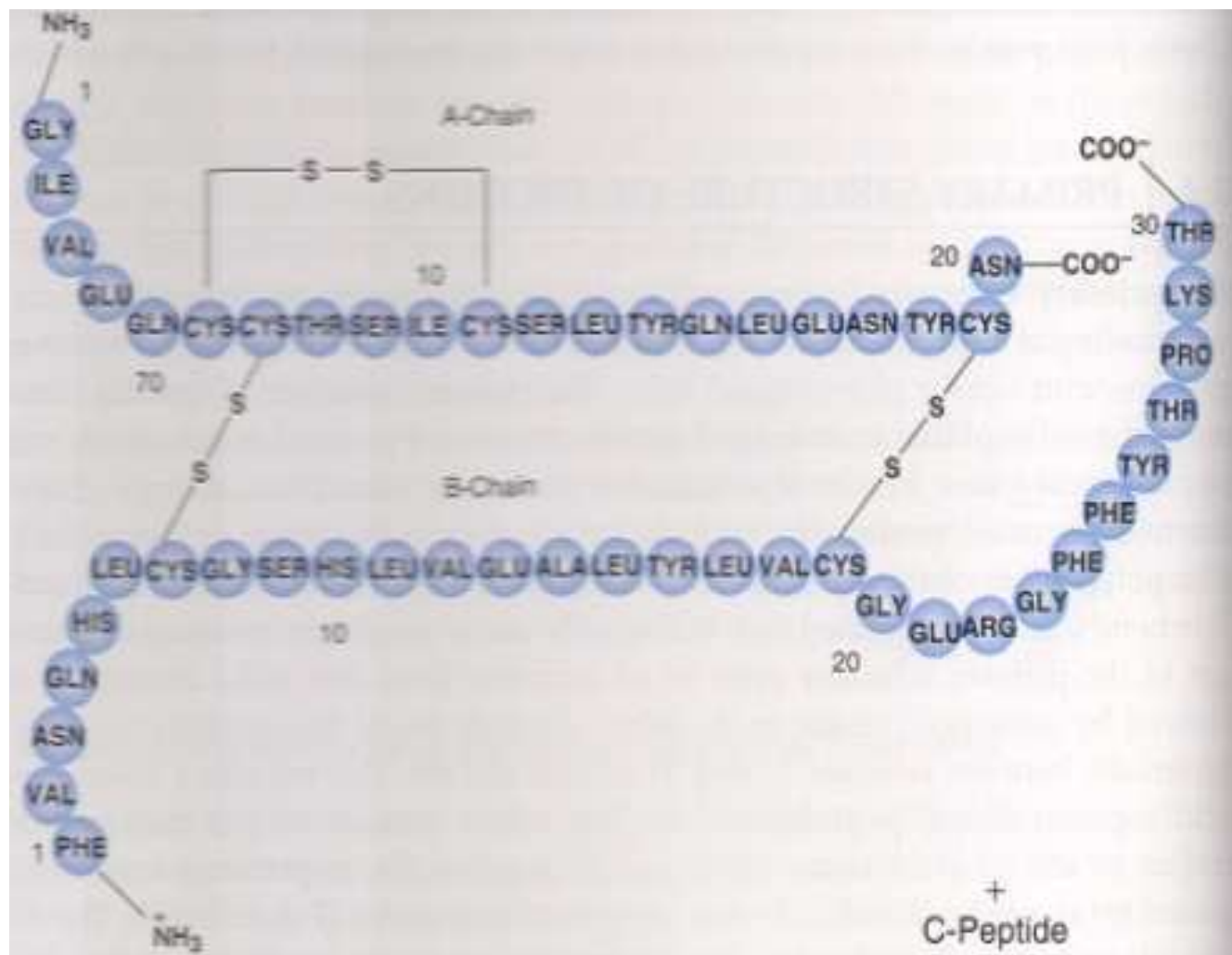
glukagon

pankreas

# Proinzulín 84 AMK



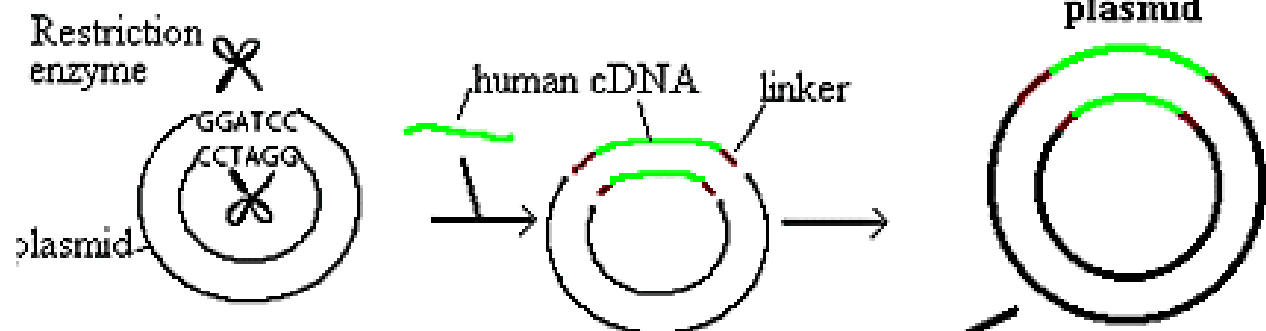
# Inzulín – 51 AMK



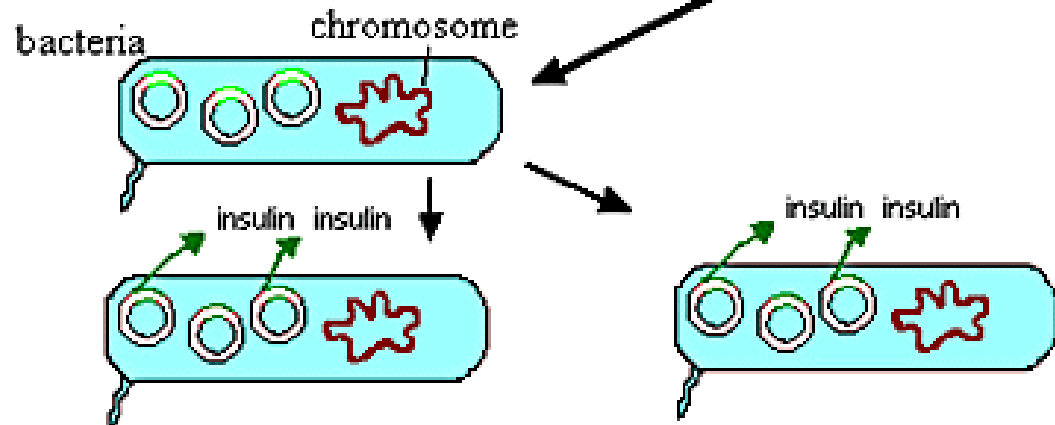


# Genetické inženýrství

## Transfer of the Insulin gene



## Cloning the Insulin Gene



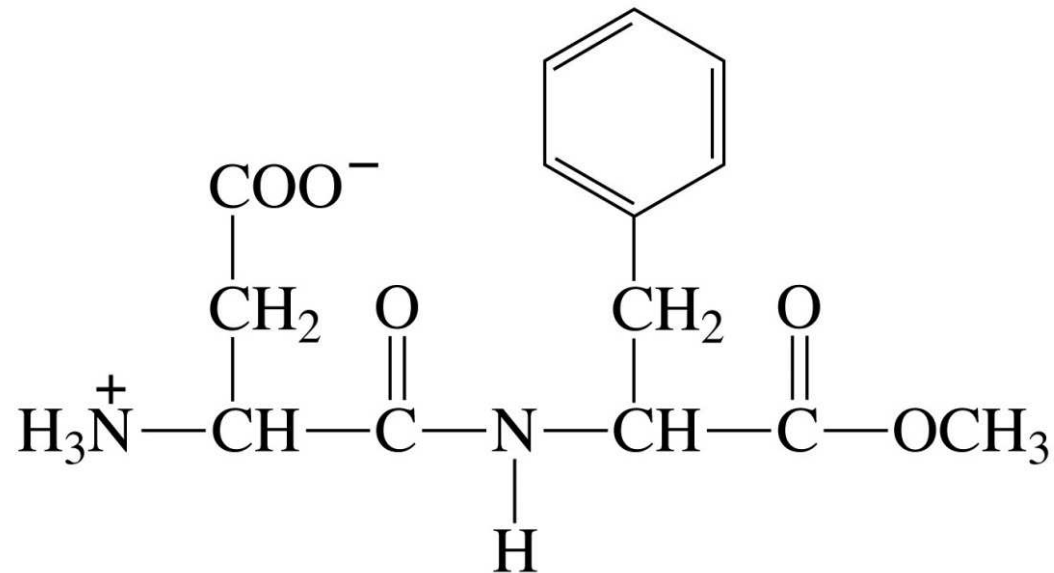
Peptidové neuromodulátory

- enkefaliny 5 AMK  
endorfiny 15-32 AMK

Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu  
Leucine enkephalin

Tyr—Gly—Gly—Phe—Met  
Methionine enkephalin

Figure 3-11e Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester  
(aspartame)

Figure 3-11f Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

Peptidové neuromodulátory - enkefaliny  
endorfiny

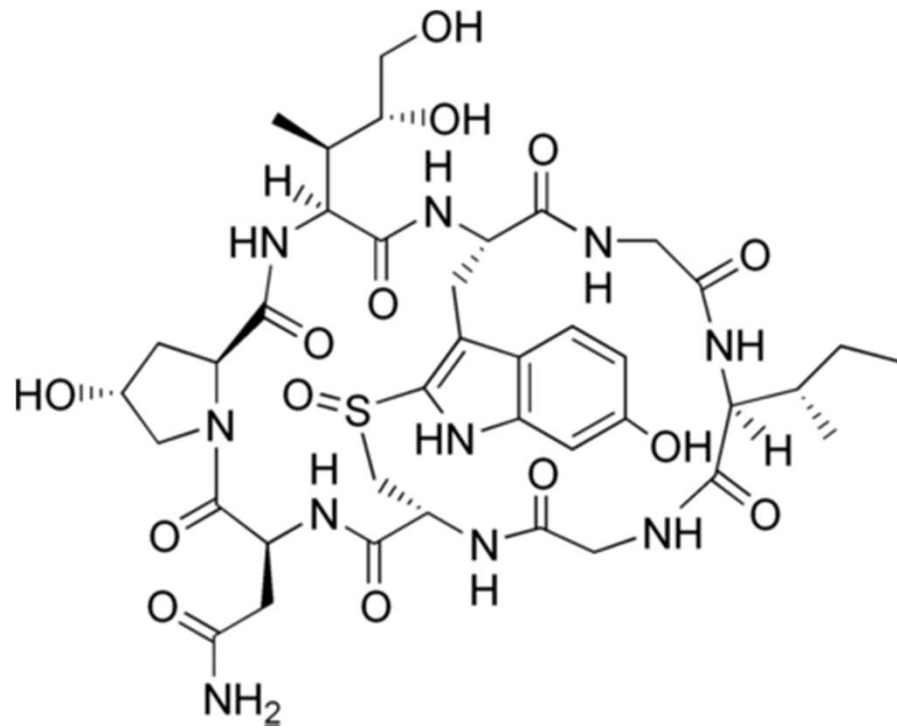
Peptidová antibiotika - penicilín  
gramicidin  
valinomicin  
aktinomycin

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

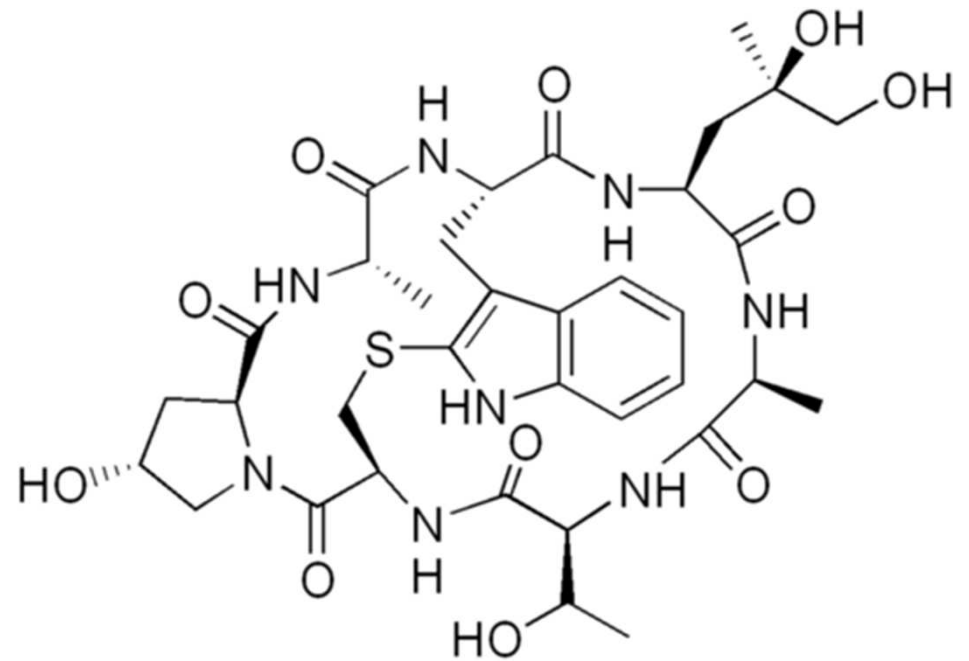
Polypeptidy - protaminy

# Falotoxiny

**Amanitin**

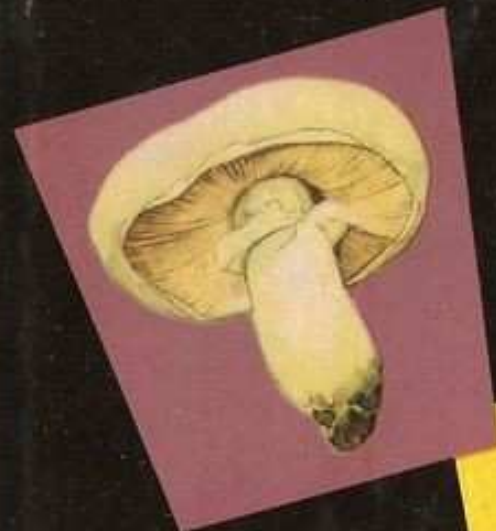


**Faloidin**



*Amanita phalloides*





A. PILÁT  
O. UŠÁK



*Kapesní*  
**ATLAS  
HUB**

SPN

můrka hlizovitá obsahuje několik jedovatých látek. Roku 1937 podařilo se Lynenovi a Wielandovi izolovat z ní v krytalované podobě jedovatou látku, zvanou phalloidin. Oba badatelé zjistili, že  $\frac{1}{10}$  miligramu této látky usmrtí myš ve 12 hodinách. V roce 1941 izolovali

Wieland a Hallermayer hlavní jed muchomůrky hlizovité, tzv. amanitin, který je tak prudce jedovatý, že jedna dvousestina miligramu usmrtí myš ve 2–3 dnech. Je to dávka tak neopatrná, že množství jedu, které bychom nabrali na špičku nože (o váze  $\frac{1}{2}$  g), usmrtilo by 100 000 myší, které, seřazený za sebou, vytvořily by řadu 18 km dlouhou, podle níž bychom si vykračovali  $4\frac{1}{2}$  hodiny vojenským krokem. Otrava muchomůrkou hlizovitou obyčejně končí smrtí.



# Microcystiny



# Microcystins

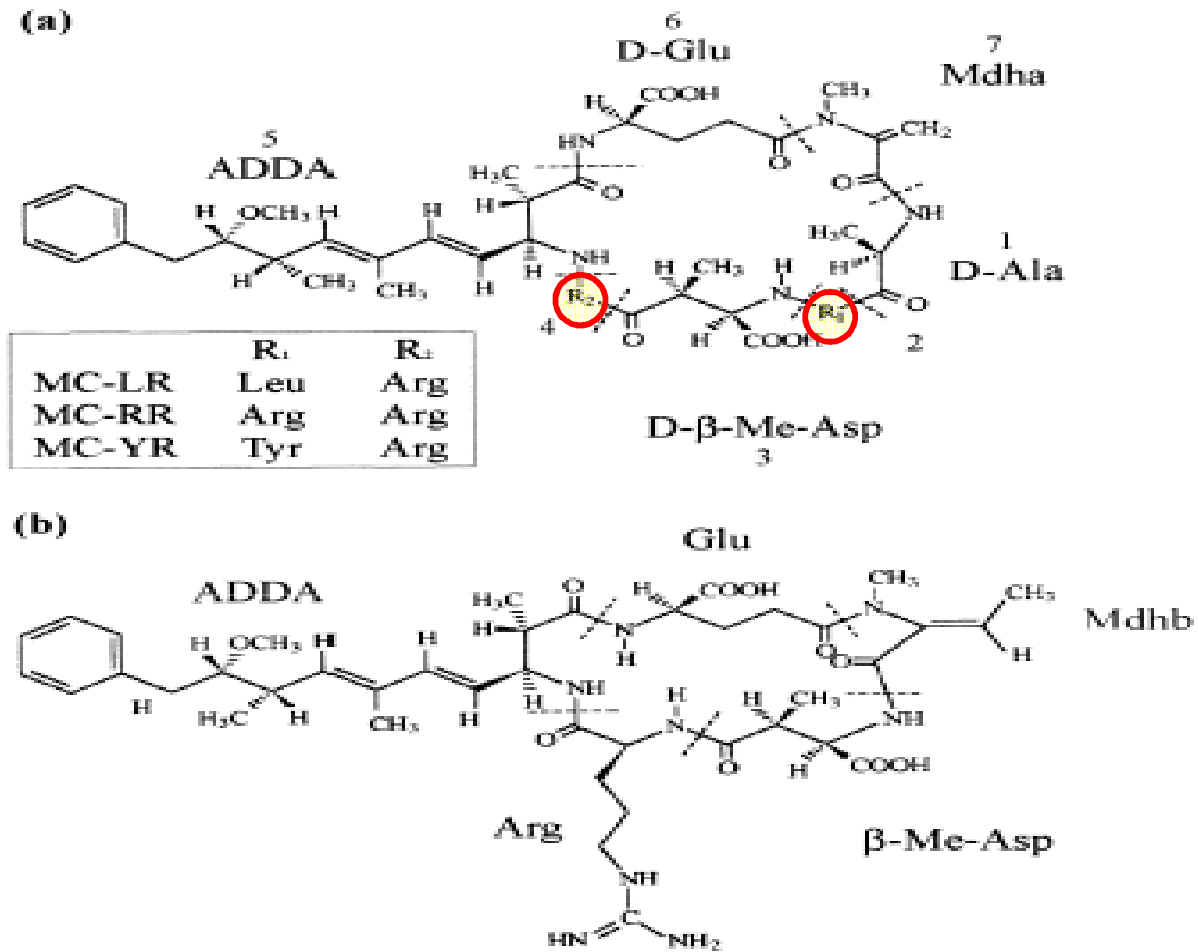


Fig. 1. General chemical structure of (a) microcystins and (b) nodularins.

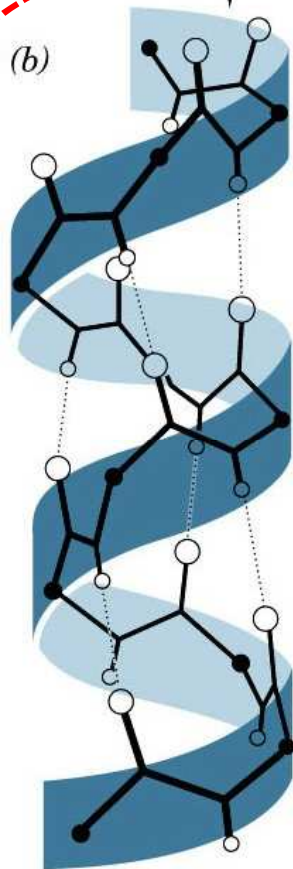
**BÍLKOVINY :**

**Funkce**

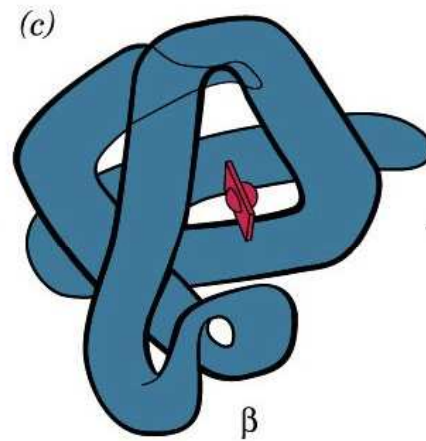


(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –  
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)

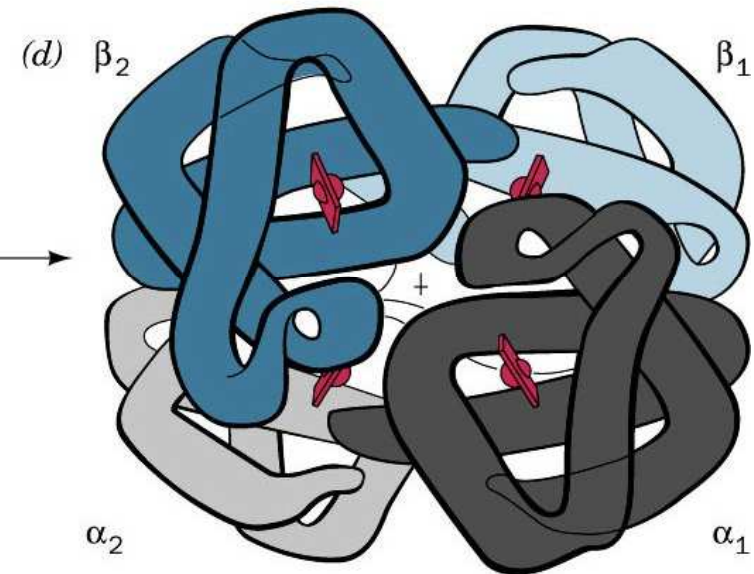
## Konformace



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein

## 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 - Pronasa
3. Aminokyselinová analýza -RP, IEX

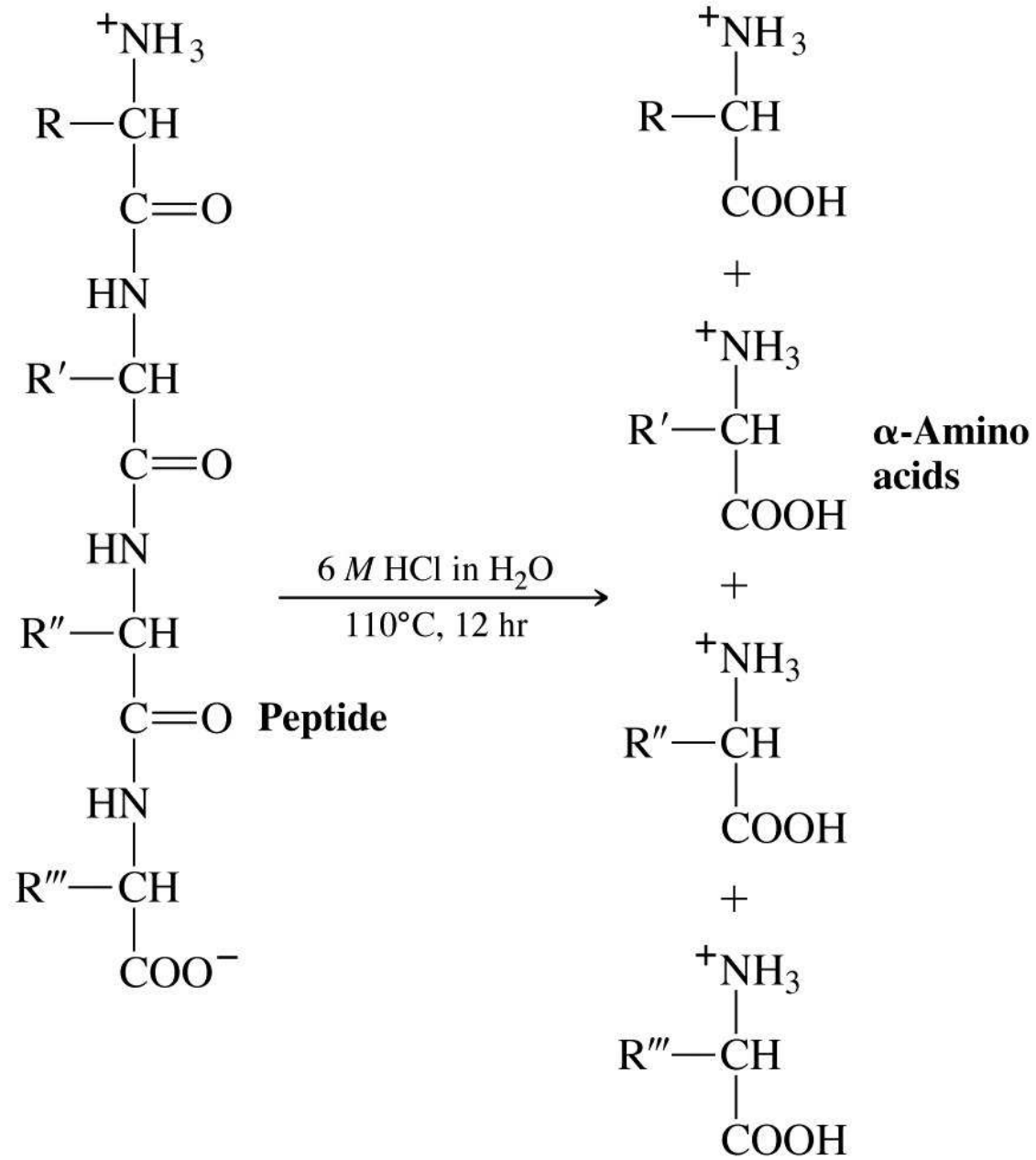
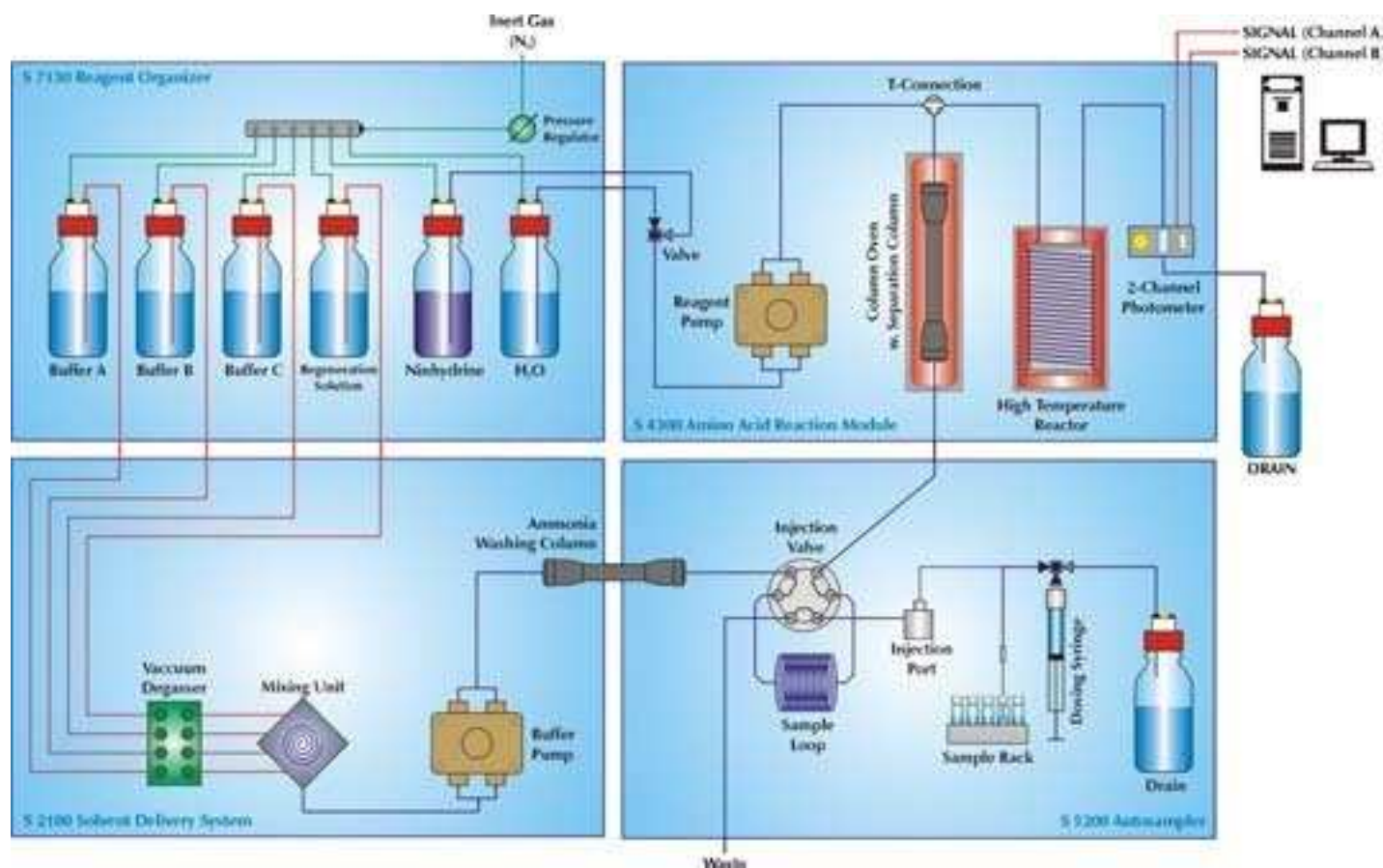


Figure 3-15 Concepts in Biochemistry, 3/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

# AMK analyzátor

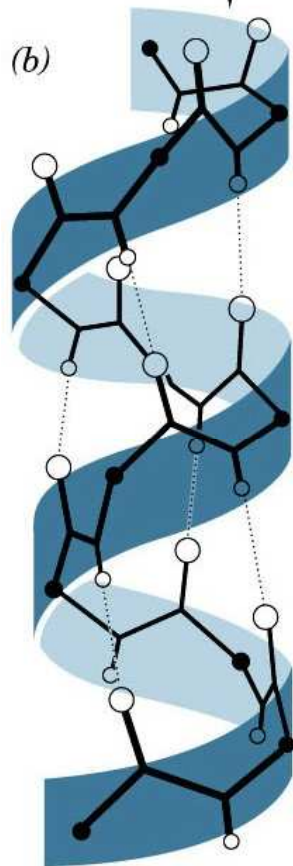


# AMK analizátor

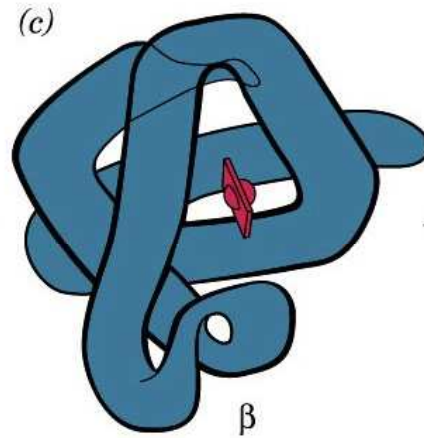




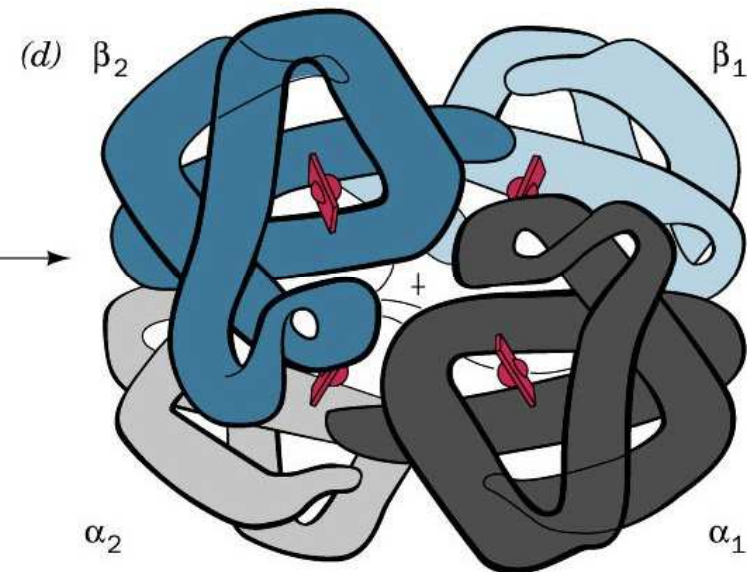
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –  
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein

## Primární struktura

### Sekvence AMK

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

⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 -  $\beta$ - galaktosidasa (1028 AMK),  $\mu$ g materiálu, dny

--

**Stanovení sekvence** - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

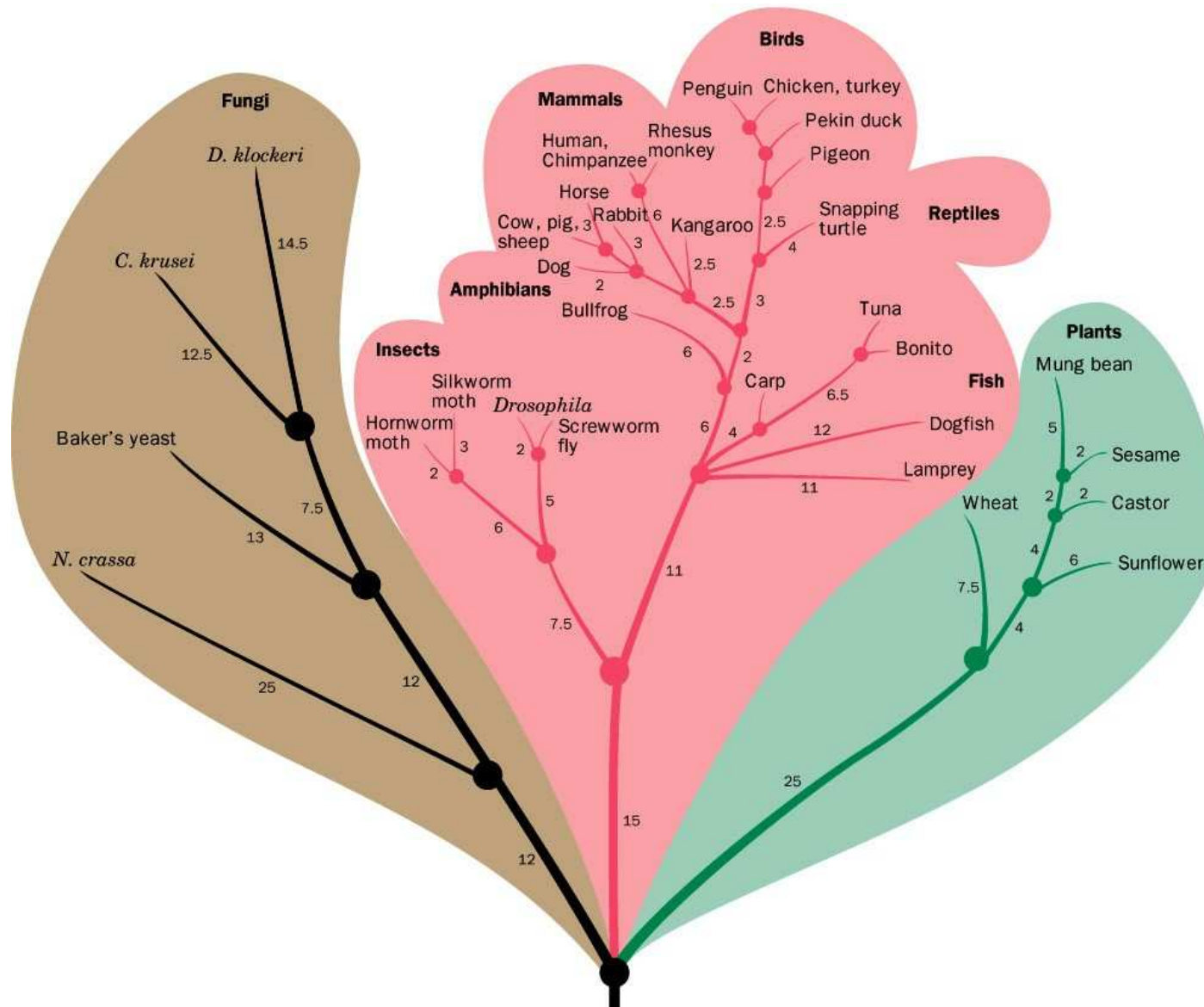
MS – hmotnostní spektrometrie

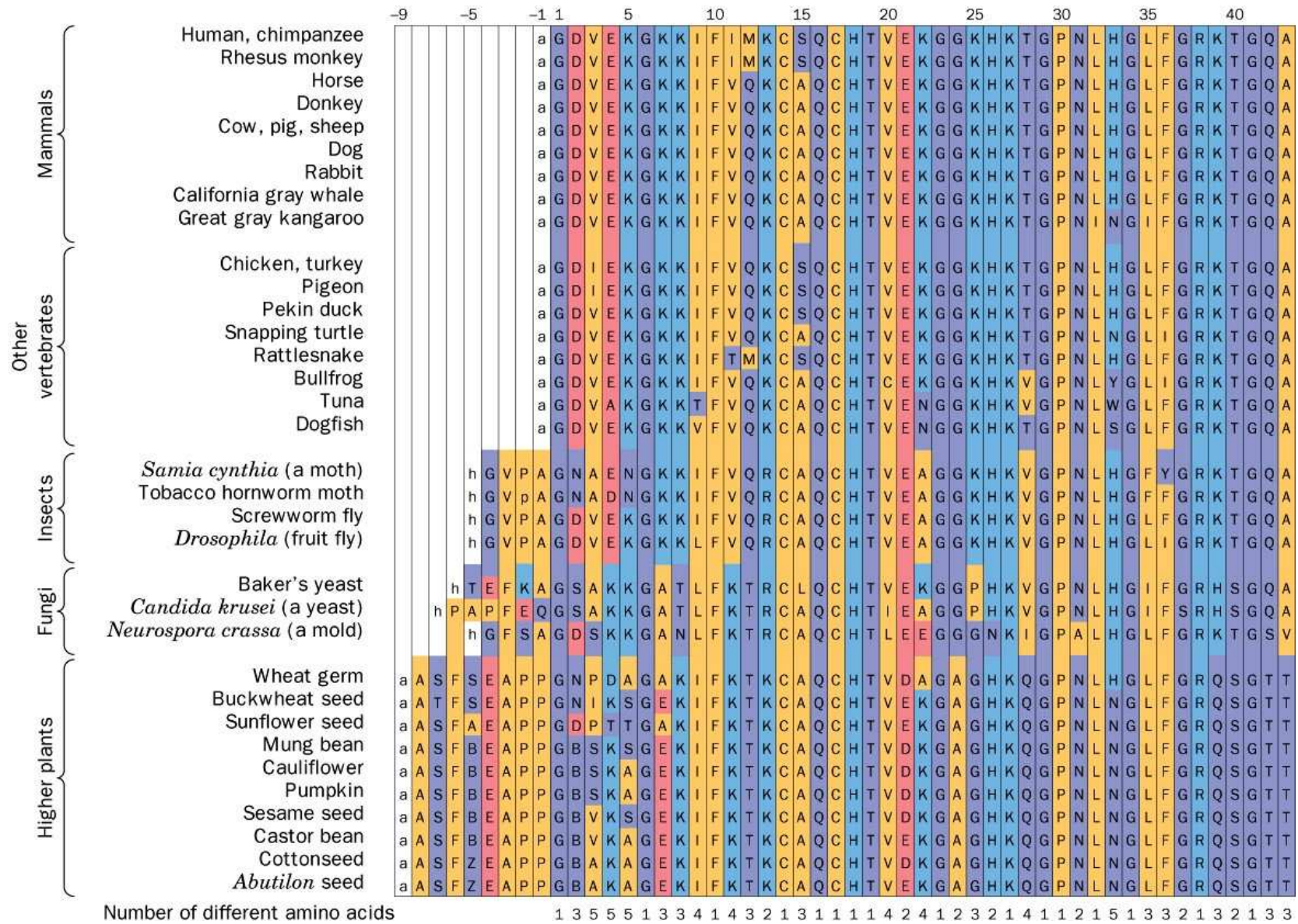
# Proč je nutné znát primární strukturu

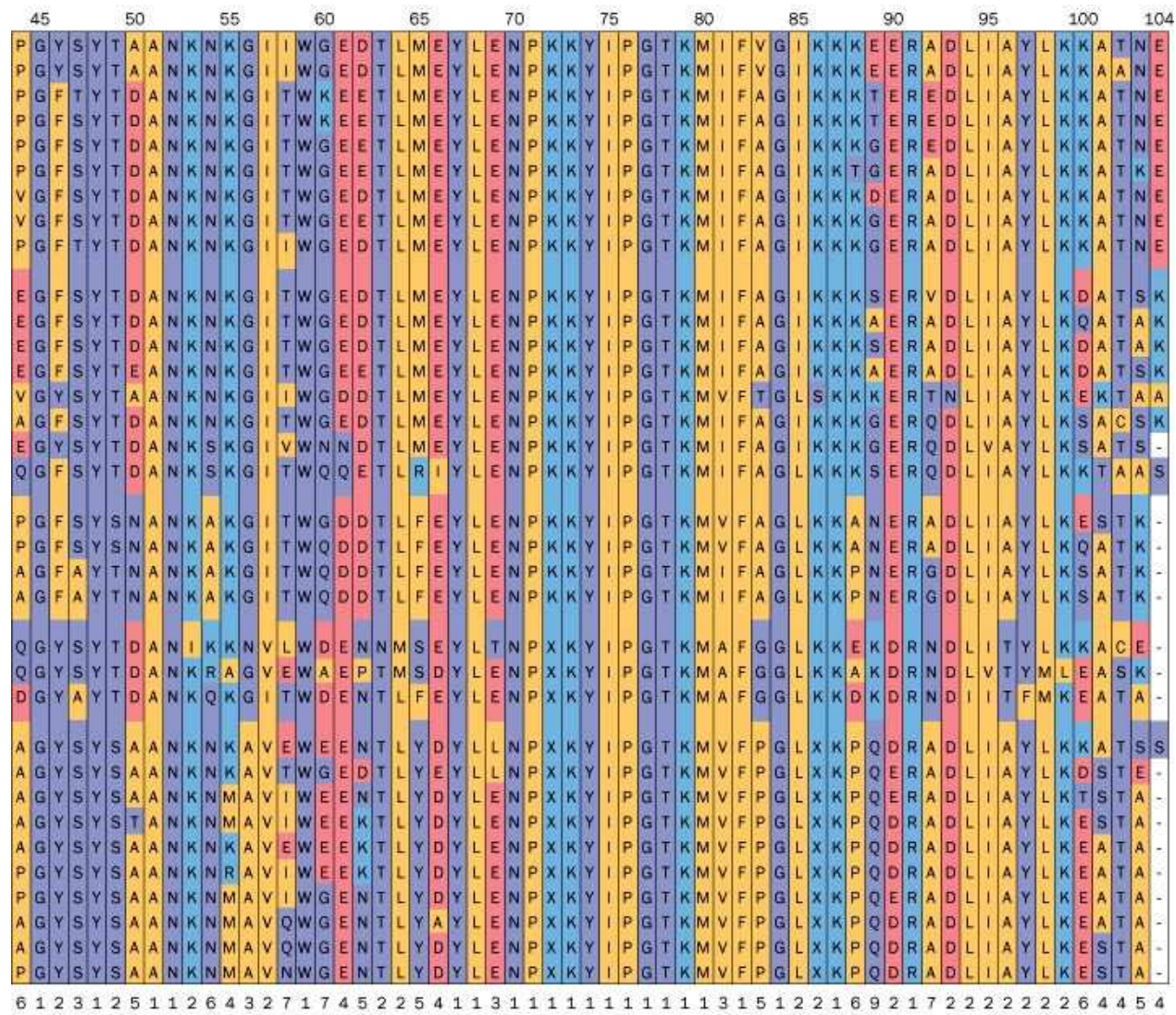
- Pro objasnění vyšších struktur
- Pro porozumění jejich funkce
- Taxonomické evoluční studie

# Taxonomické evoluční studie

## Cytochrom c

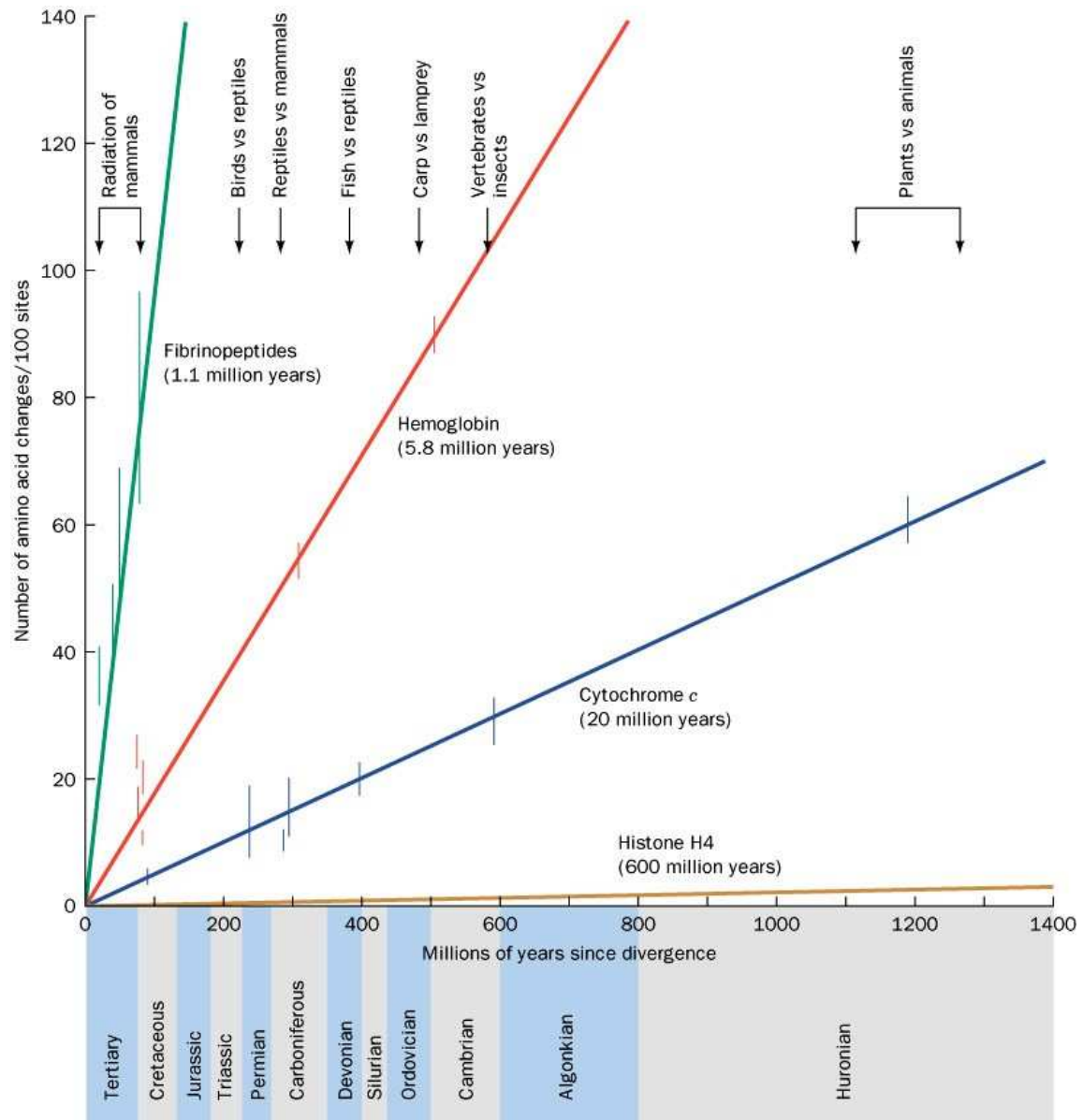






- Hydrophilic, acidic: D Asp E Glu
- Hydrophilic, basic: H His K Lys R Arg X TrimethylLys
- Polar, uncharged: B Asn or Asp G Gly N Asn Q Gln  
S Ser T Thr W Trp Y Tyr Z Gln or Glu
- Hydrophobic: A Ala C Cys F Phe I Ile L Leu  
M Met P Pro V Val





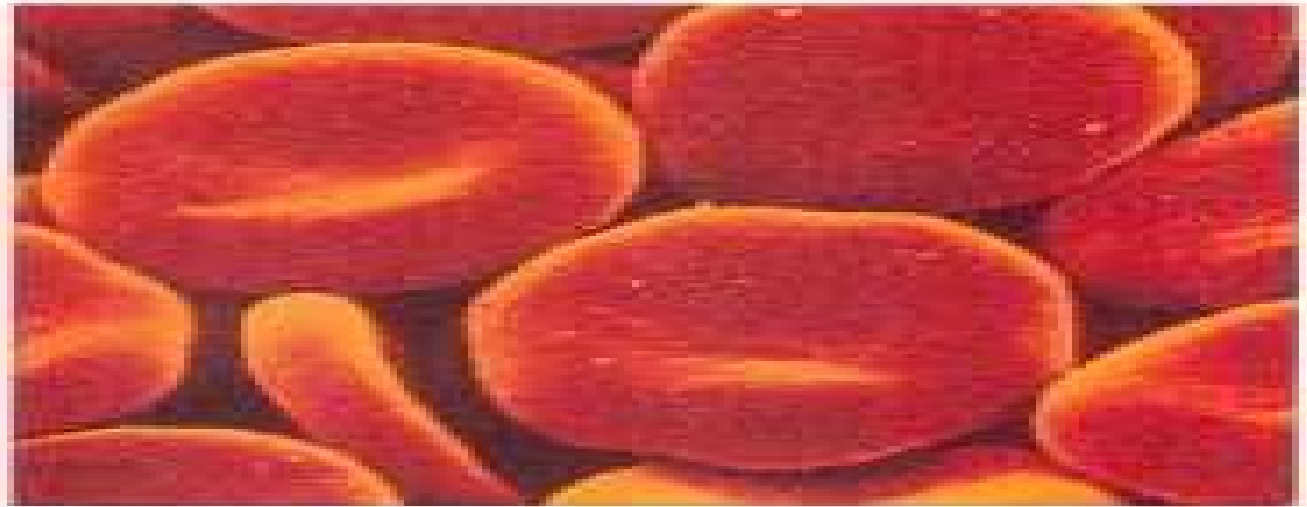
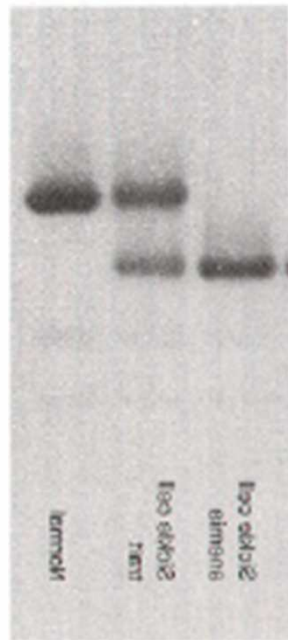


# Proč je nutné znát primární strukturu

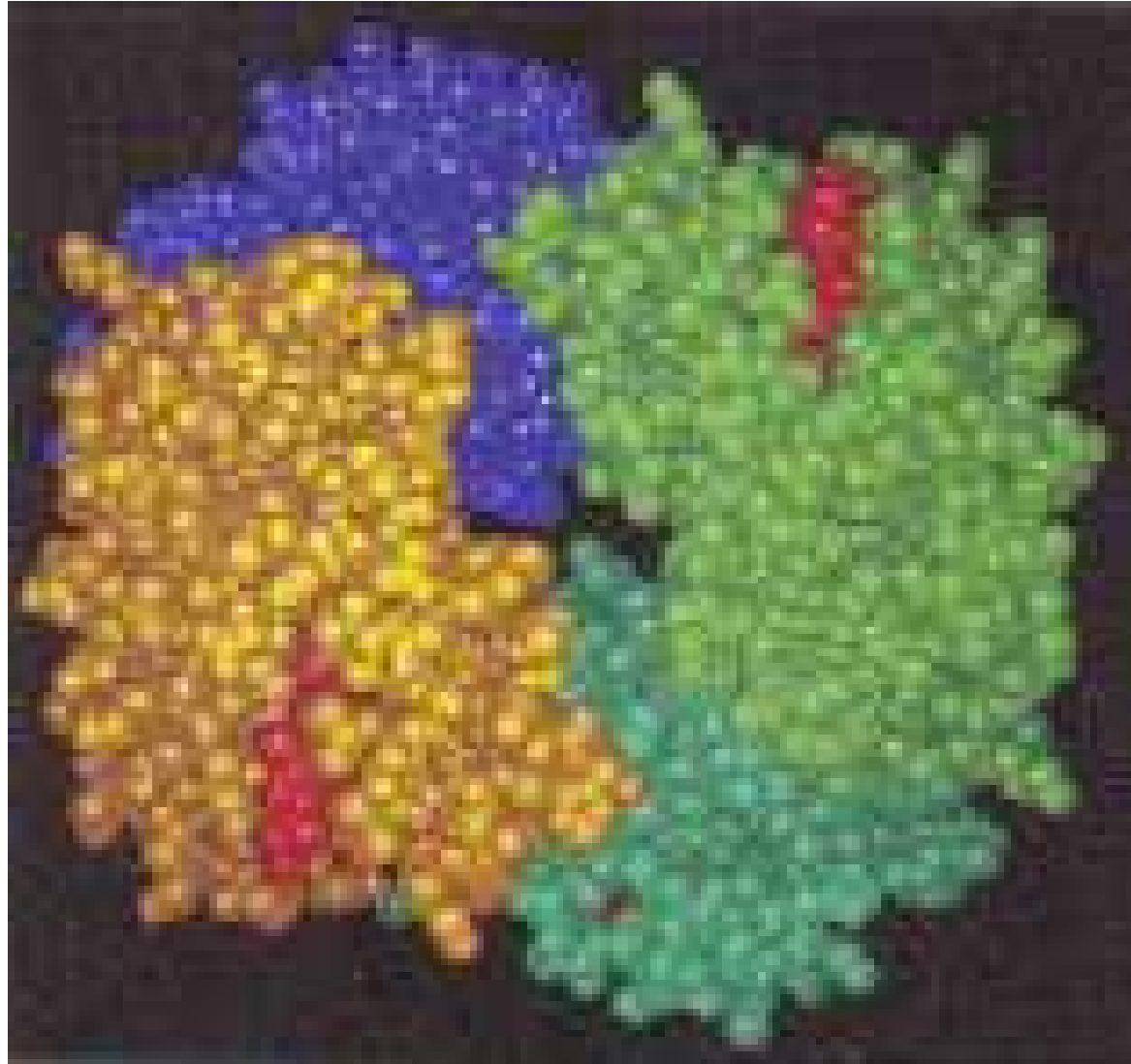
- Pro objasnění vyšších struktur
- Pro porozumění jejich funkce
- Taxonomické evoluční studie
- Klinický význam

# Srpkovitá anémie

HbA HbS

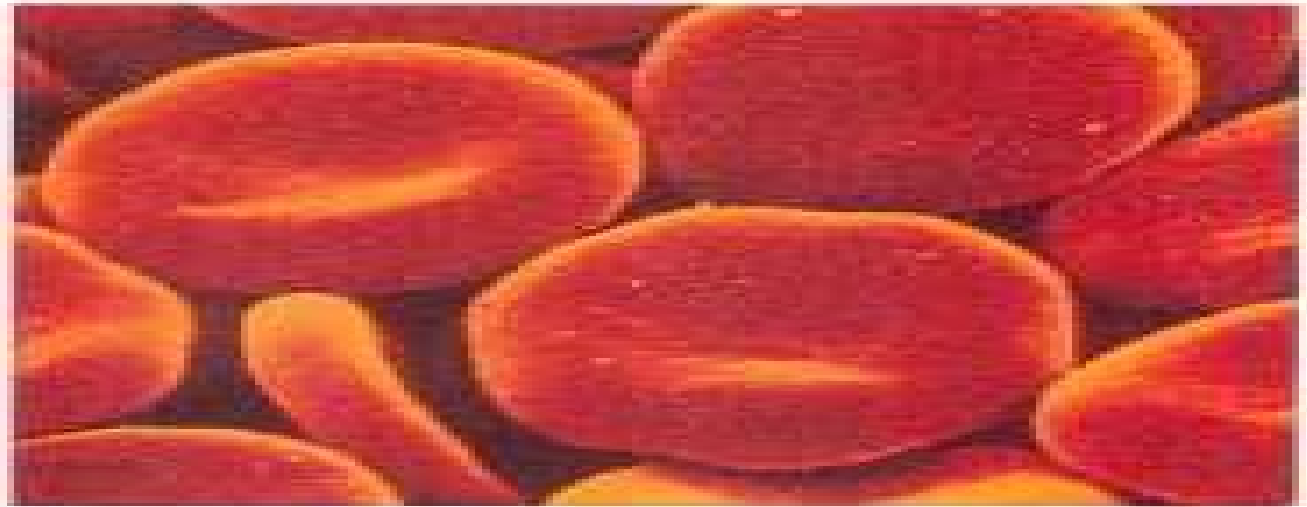
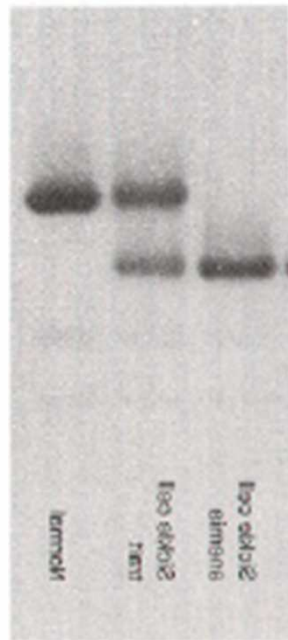


# Hemoglobin



# Srpkovitá anémie

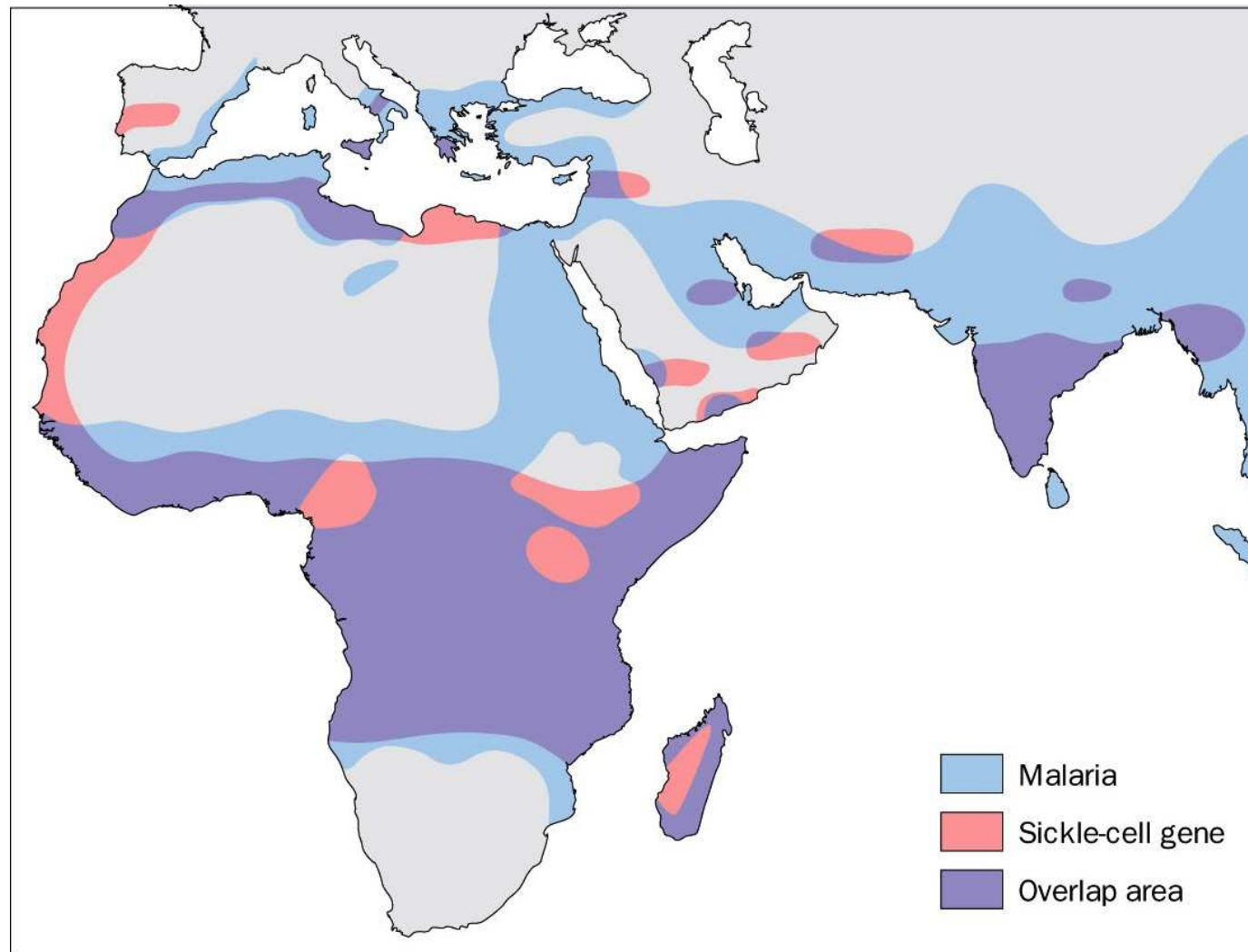
HbA HbS



# Srpkovitá anémie

- Krvinky srpkovité, špatně procházejí kapilárami
- Křehčí – snížené životnost z 7 na 3 měsíce
- Homozygot 100 % srpkovitost  
Heterozygot 40% srpkovitost
- Jedinci se nedožívají dospělosti

# Srpkovitá anémie versus malárie



# Srpkovitá anémie versus malárie

- 40% srpkovitosti v kapilárách 2 % (nízká koncentrace O<sub>2</sub>)
- *Plasmodium* snižuje pH v erytrocytu o 0.4 – zvýšení přilnavosti ke stěnám cév – neprochází slezinou
- Snížení pH vyvolává zvýšení srpkovitosti na 40 %
- Normální erytrocyt – vysoká koncentrace K<sup>+</sup> nezbytná pro prvoka
- Srpkovitý erytrocyt propouští K<sup>+</sup>
- Prvok umírá

Přírodní výběr ??????

## Primární struktura

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

⇒ aminokyselinový sekvenátor

1978 -  $\beta$ - galaktosidasa (1028 AMK),  $\mu$ g materiálu, dny

--

**Stanovení sekvence** - Edmanovo odbourávání

na základě sekvence nukleových kyselin

MS – hmotnostní spektrometrie



# Určování primární struktury AMK sekvenátorem

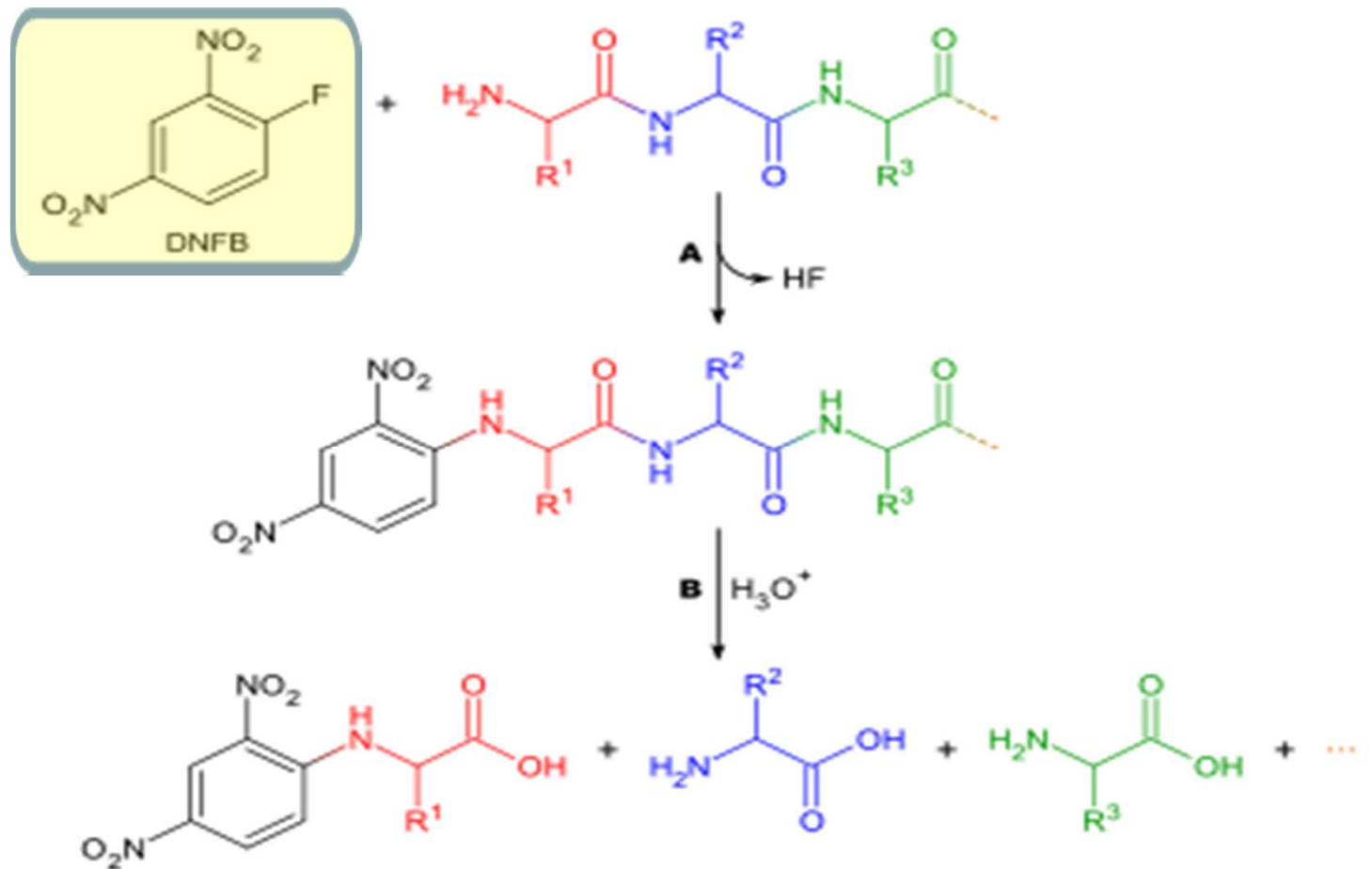
- A. **Purifikace bílkoviny** – získání homogenní bílkoviny
- B. **Aminokyselinové složení** – určení počtu jednotlivých AMK zbytků (kyselá hydrolyza 6N HCl, 100 –110 °C, 24 h)
- C. **Pořadí aminokyselin:**
  1. Oddělit a izolovat jednotlivé řetězce(redukce nebo oxidace disulfidických můstků)
  2. Určit N-konec a C-konec – počet řetězců
  3. Určit pořadí aminokyselin Edmanovým odbouráváním (kam až to jde) – 60-70 AMK
  4. 2 nezávislá specifická štěpení → izolovat štěpy (peptidy)
  5. Opakovat bod 3.
  6. Sestavit primární strukturu řetězce
  7. Určit způsob propojení původních řetězců

# Zjišťování N-koncových AMK

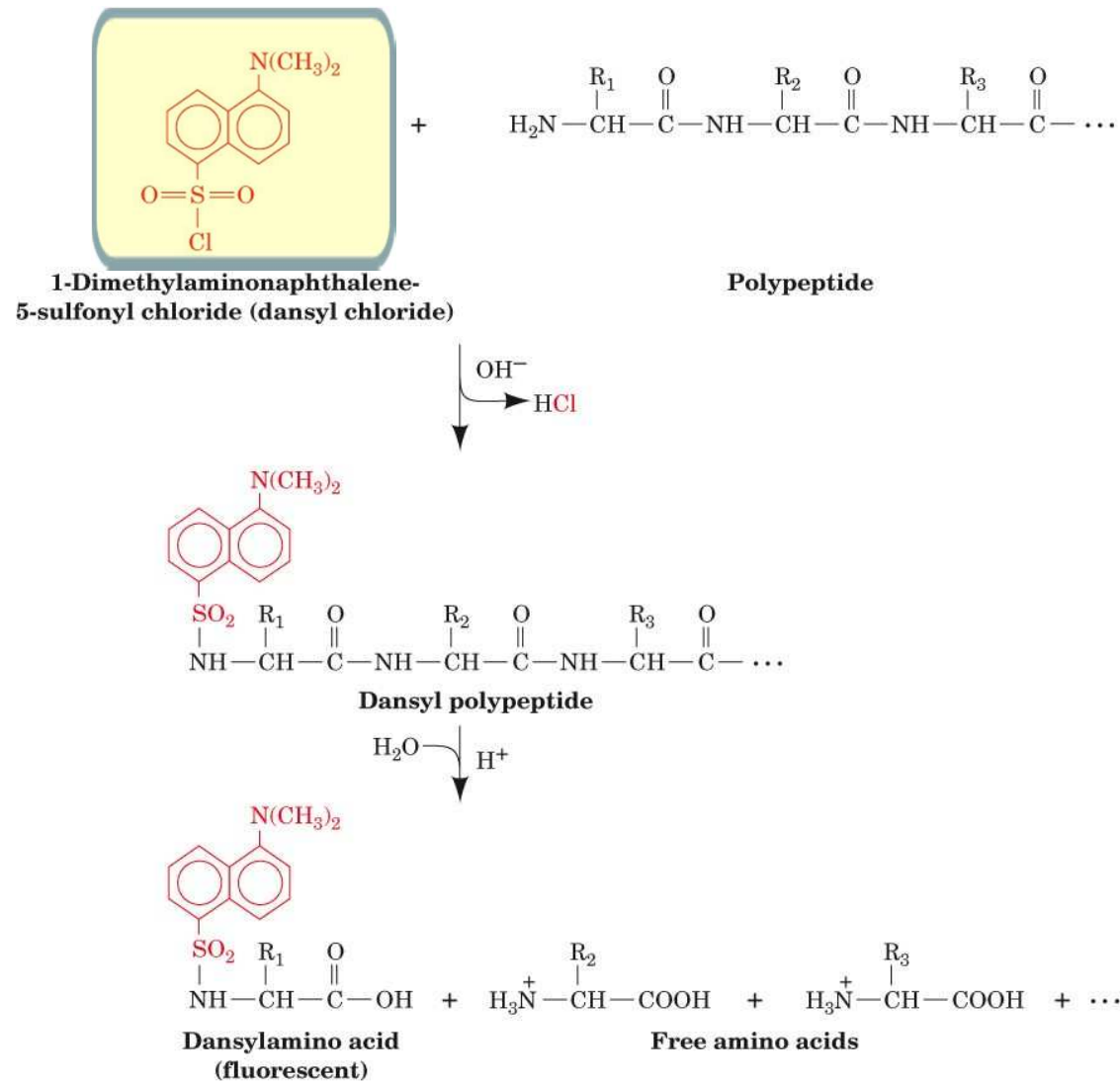
$$X + A-B-C = \textcircled{X-A} \textcircled{+ B} \textcircled{+ C}$$

# Zjišťování N-koncových AMK

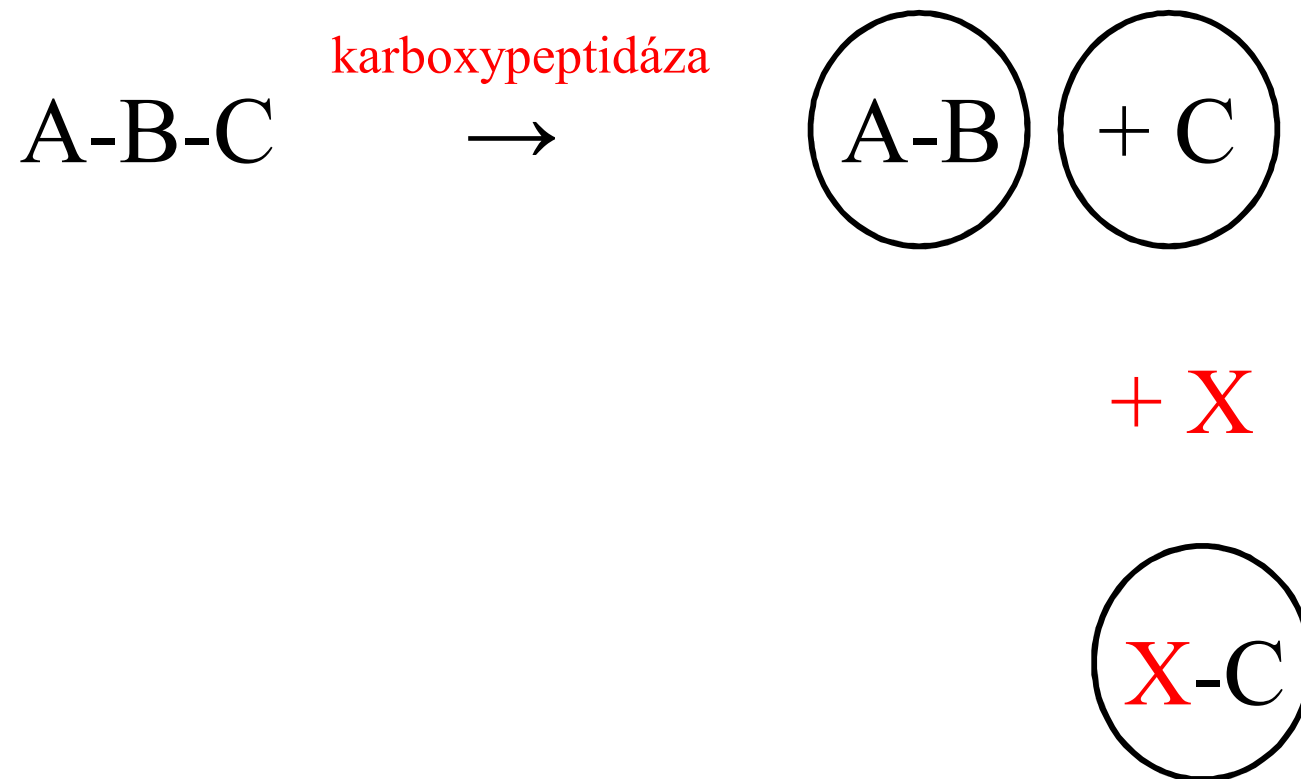
Frederick Sanger



# Zjišťování N-koncových AMK

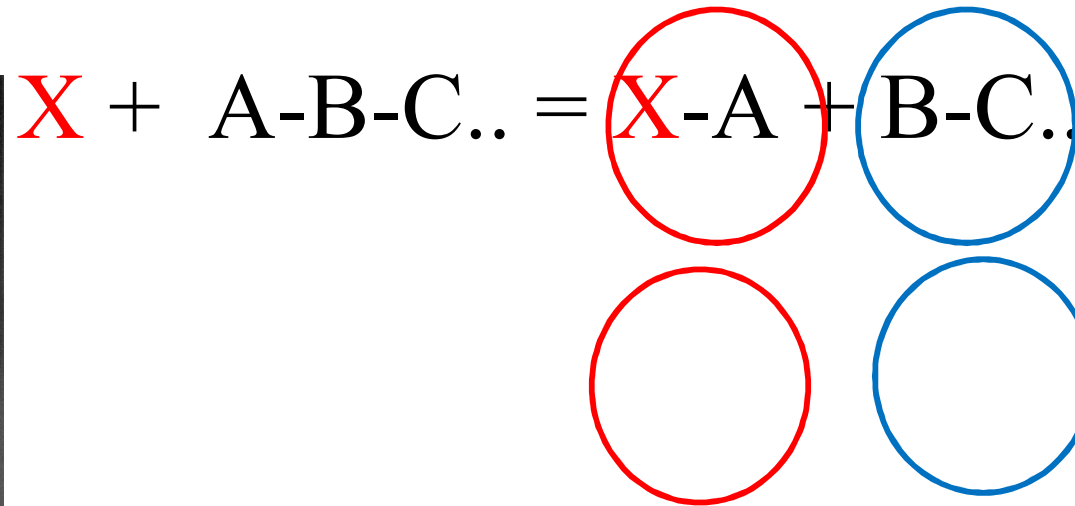


# Zjišťování C-koncových AMK

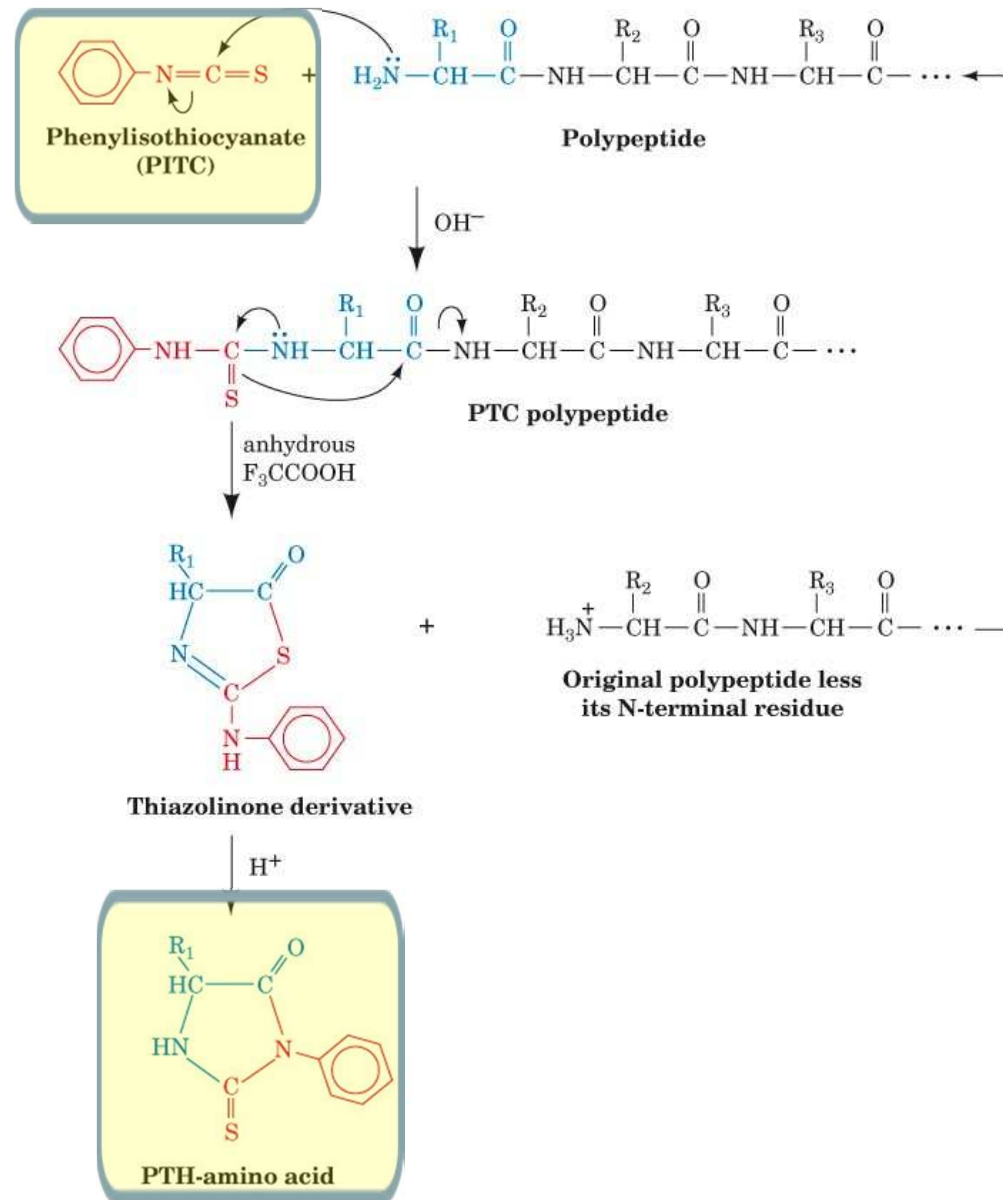


# Edmanovo sekvenování

**Pehr Victor Edman**



# Edmanovo sekvenování



# Možnosti štěpení

Trypsin

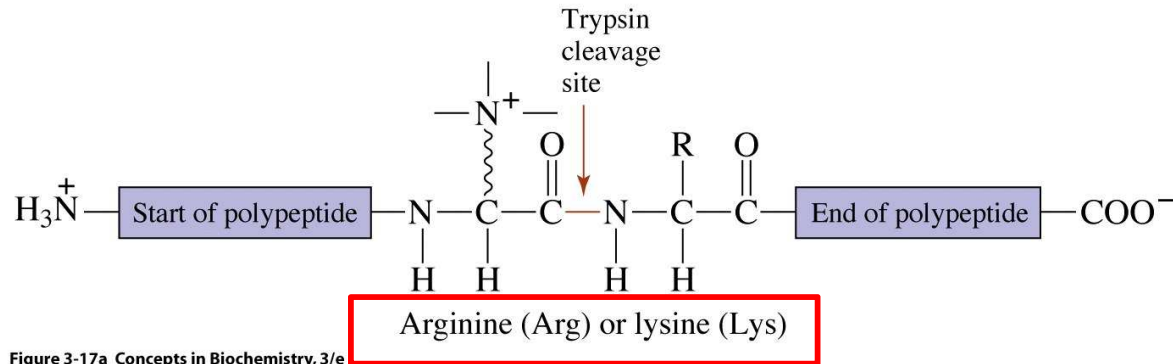


Figure 3-17a Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

Chymotrypsin

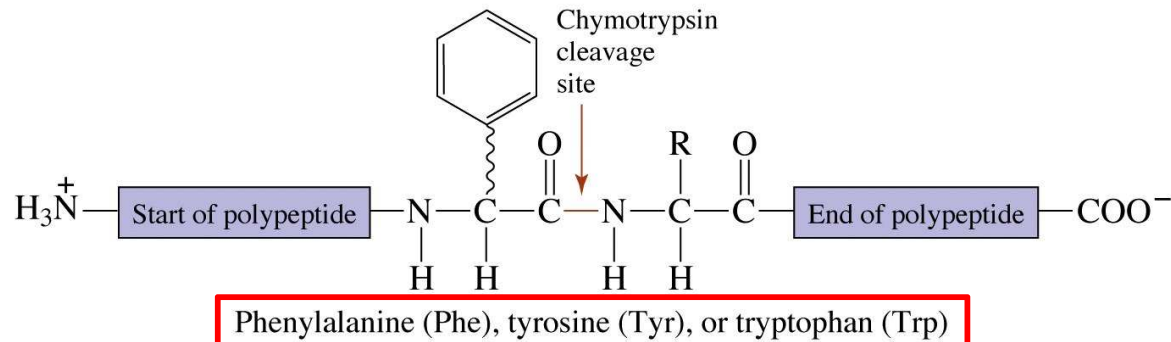


Figure 3-17b Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

CNBr

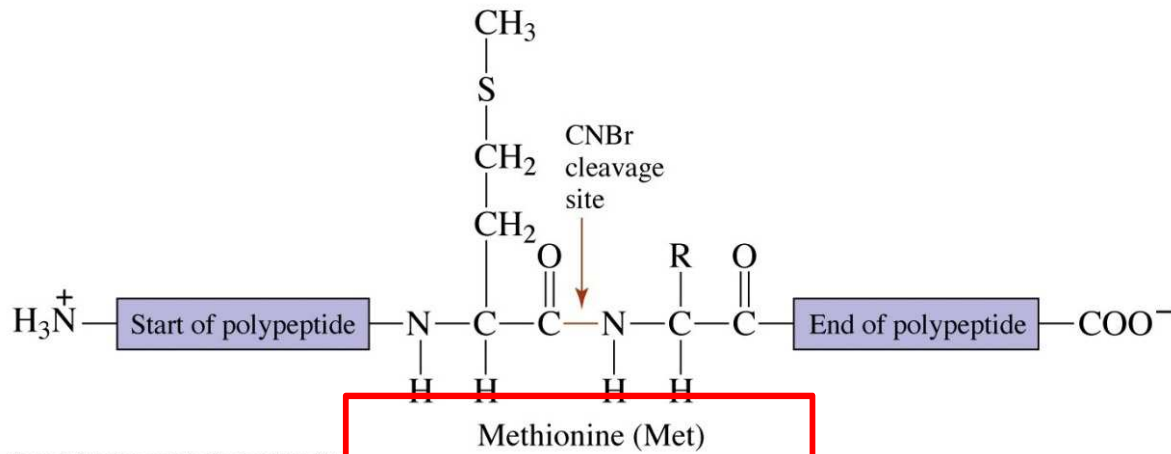


Figure 3-17c Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



# Metoda překrývajících se štěpů

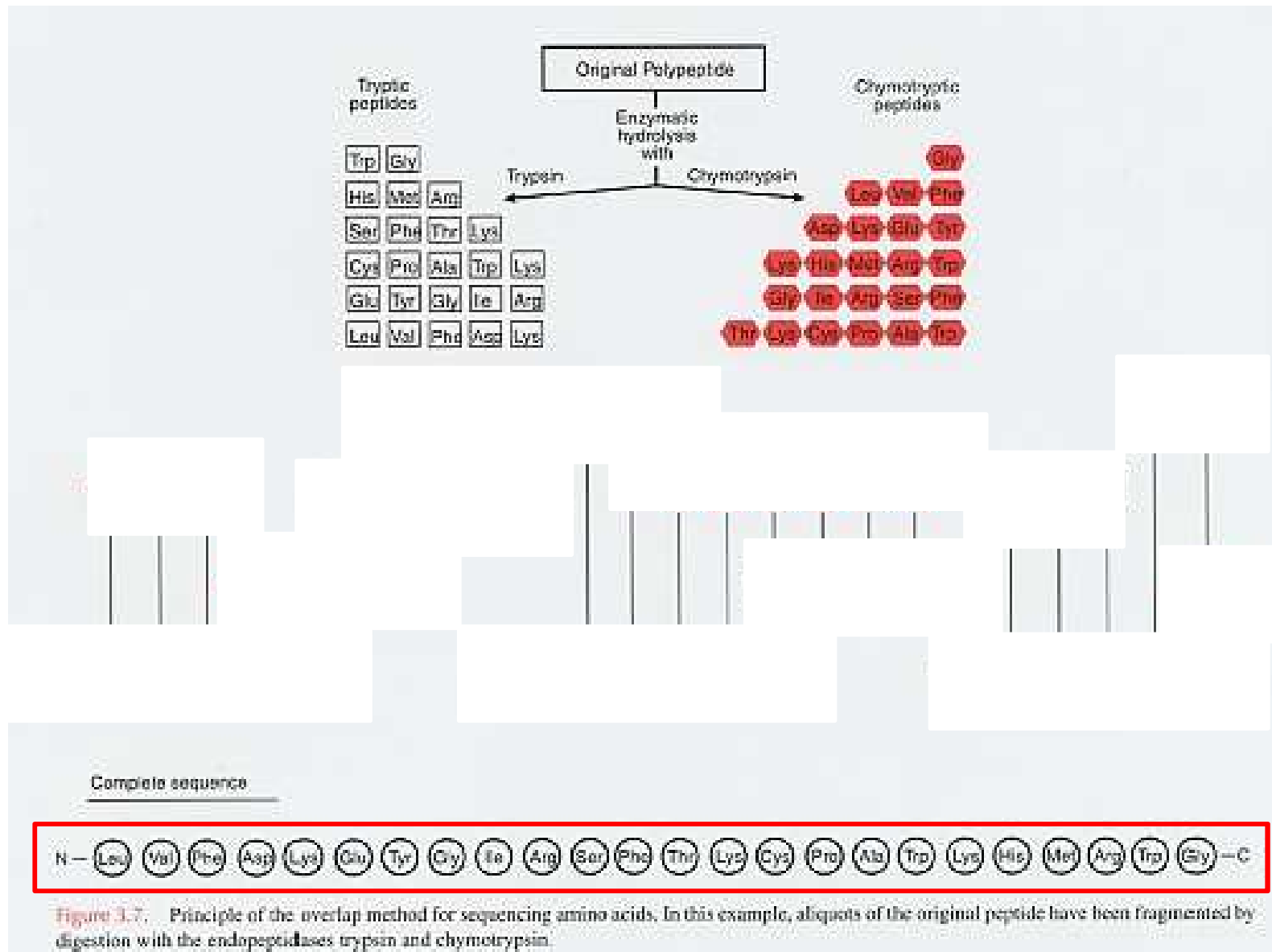


Figure 3.7. Principle of the overlap method for sequencing amino acids. In this example, aliquots of the original peptide have been fragmented by digestion with the endopeptidases trypsin and chymotrypsin.

# Primární struktura

## Stanovení na základě sekvenace NK

- Není snadné identifikovat gen kódující daný protein (introny a exony)
- Nelze takto zjistit posttranslační modifikace
- V genetickém kódu mohou být chyby
- Genetický kód není universální

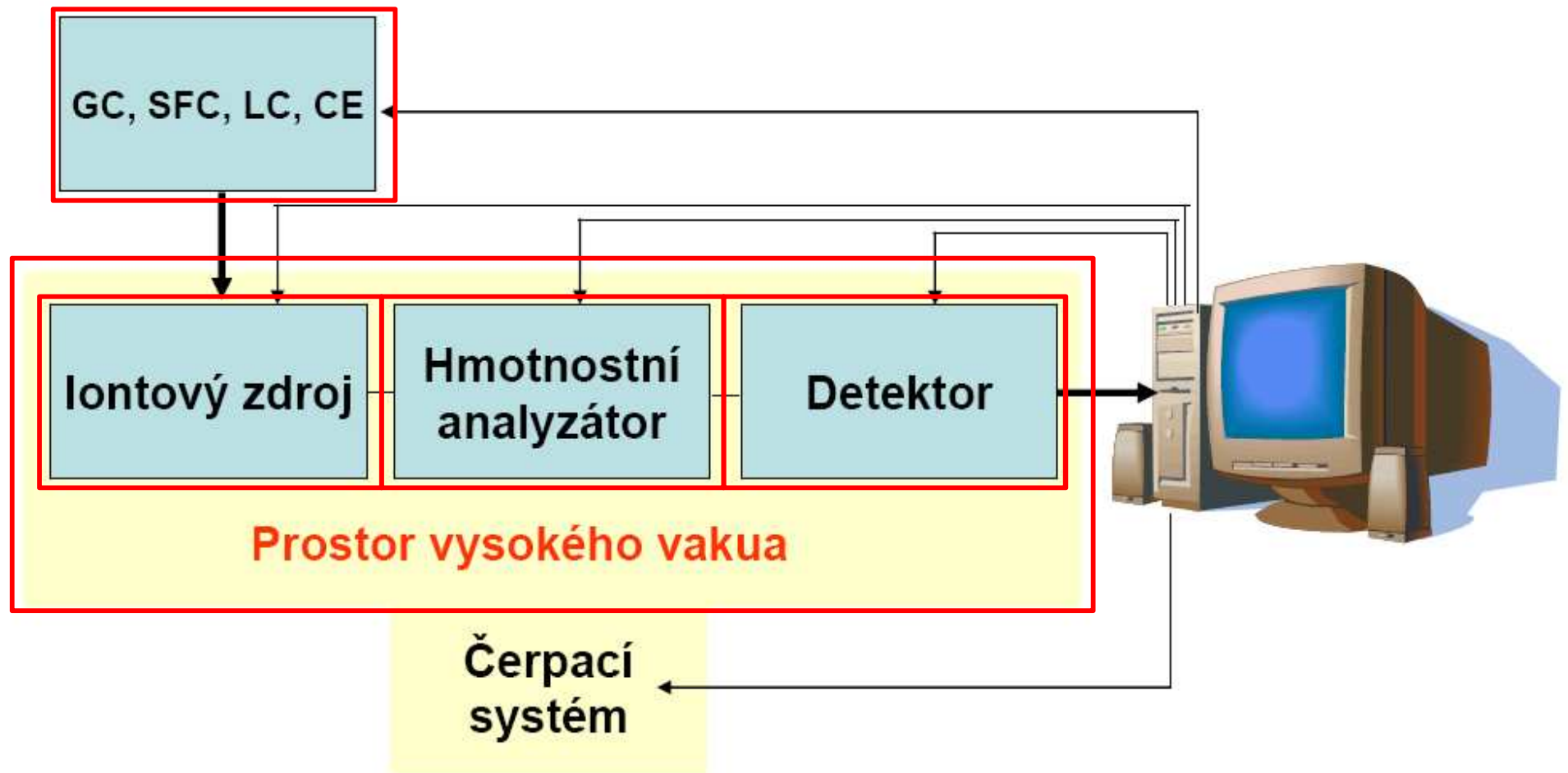
## Primární struktura

### Pomocí hmotnostní spektrometrie - MS

## Hmotnostní spektrometr

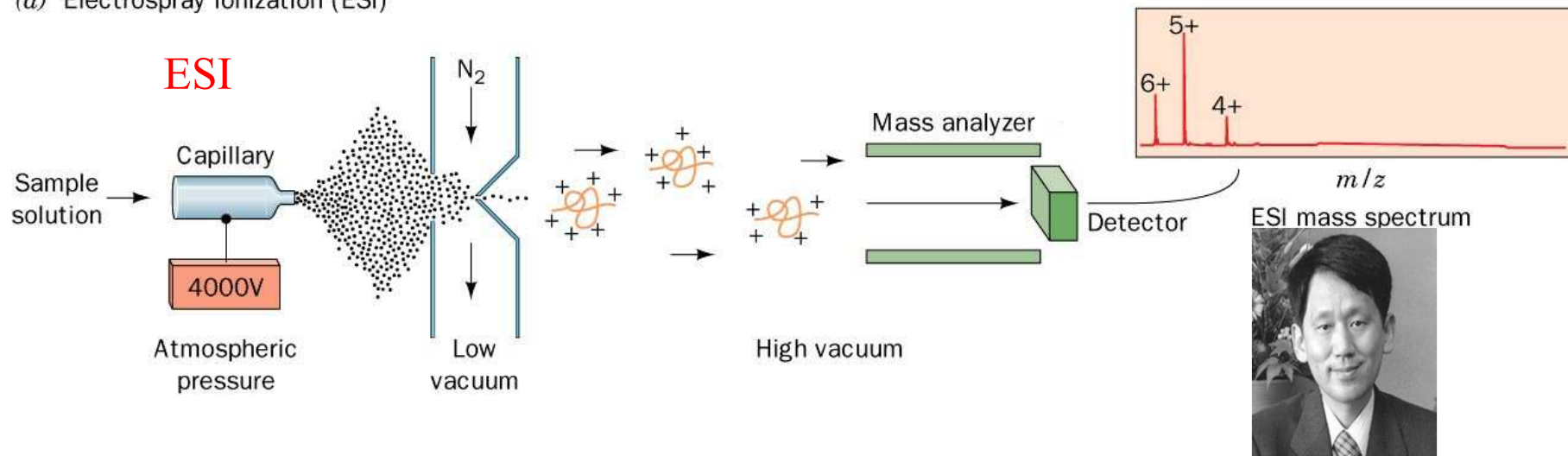
Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich  $m/z$ .

# Blokové schéma MS

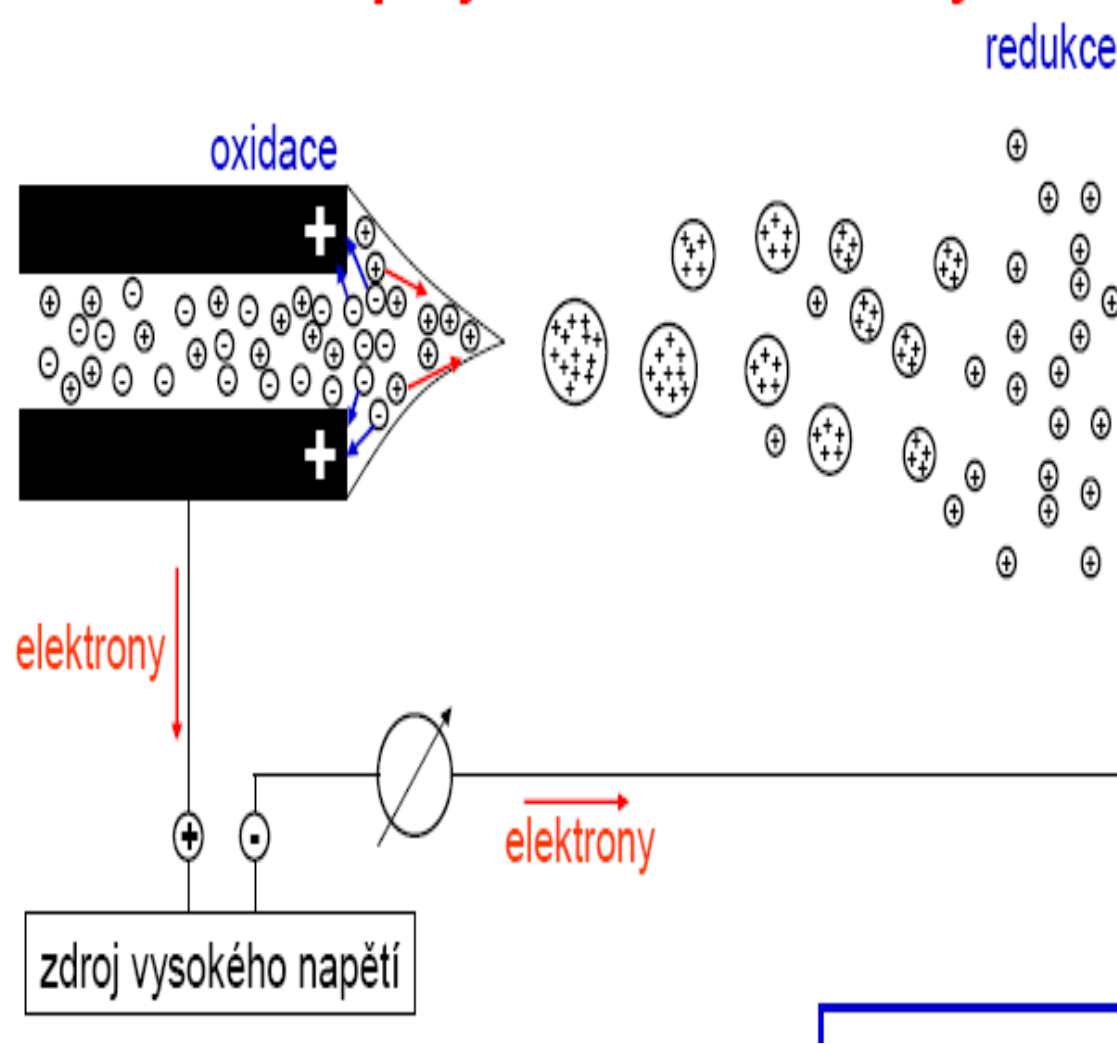


# MS – NC 2002 (Tanaka, Fen)

(a) Electrospray ionization (ESI)



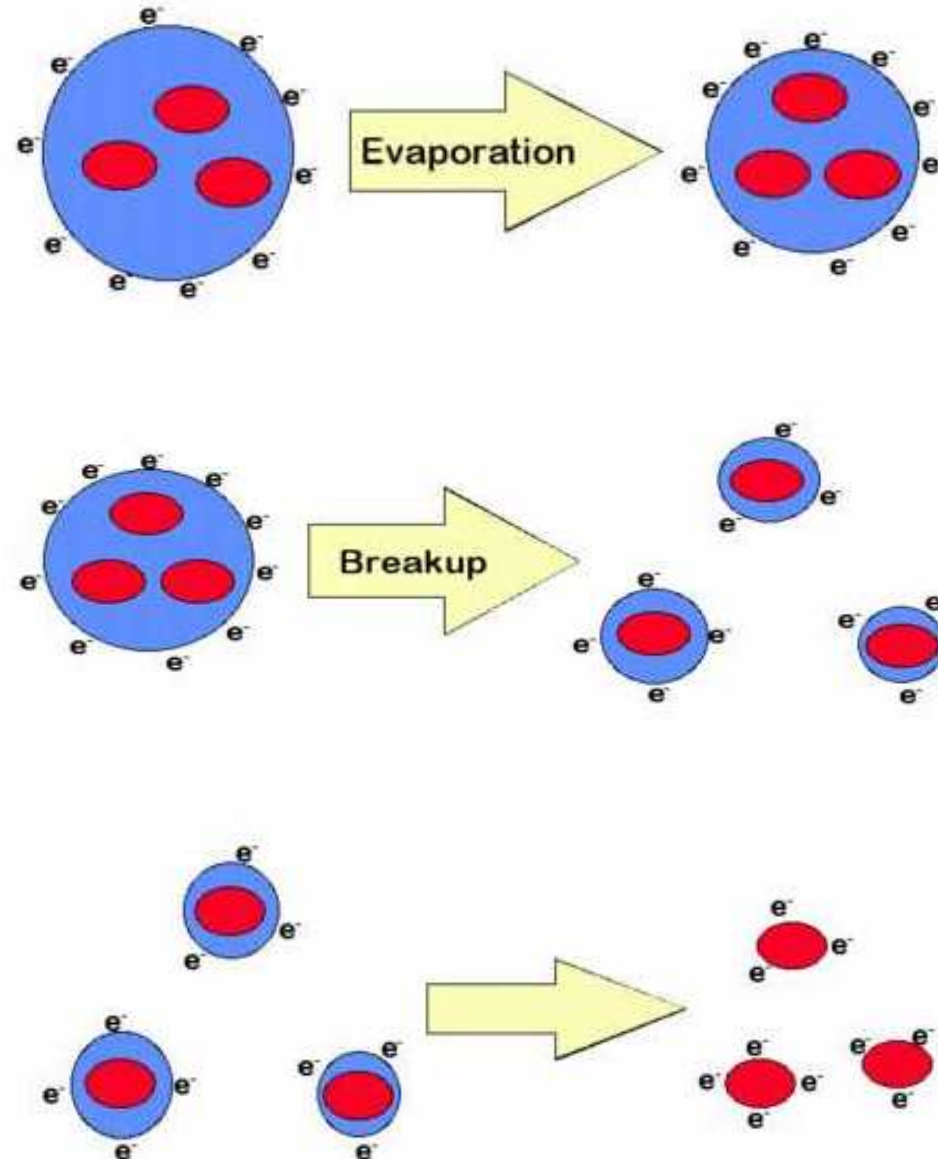
# Electrospray (ESI) Tanaka



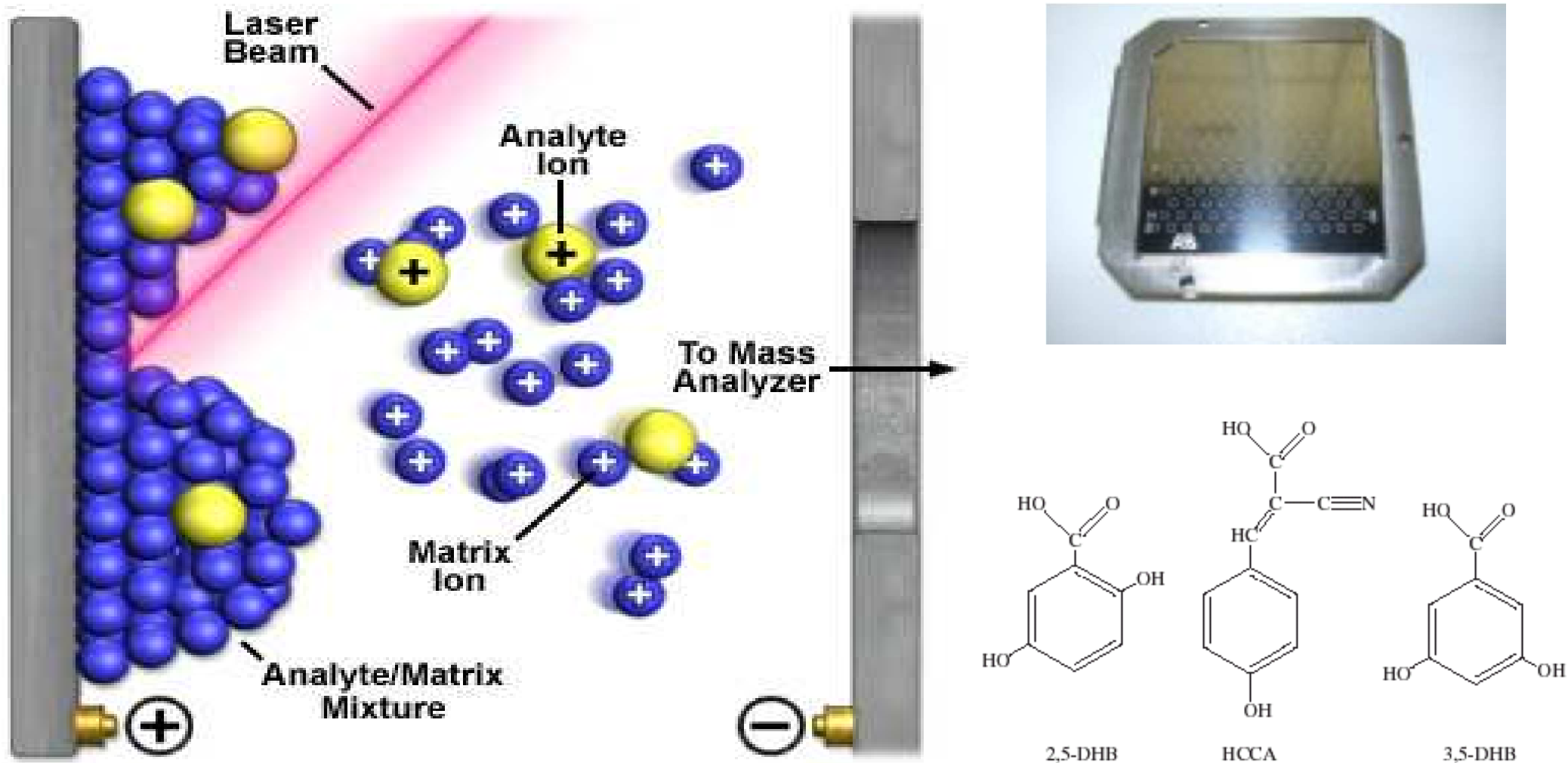
$[M+H]^+$   
 $[M+NH_4]^+$   
 $[M-H]^-$   
 $[M \pm zH]^{z \pm}$

$t_{N_2} \approx 50 - 400 \text{ }^\circ\text{C}$  (přidatné)  
Napětí: 2 - 8 kV  
Průtok m. f. 0,001 - 1 ml/min  
Ionizace za atmosférického tlaku  
Těkavé přísady: octan amonný, mravenčí k.  
Netěkavé přísady: fosfátové pufry

# Ionizace



# Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Fen

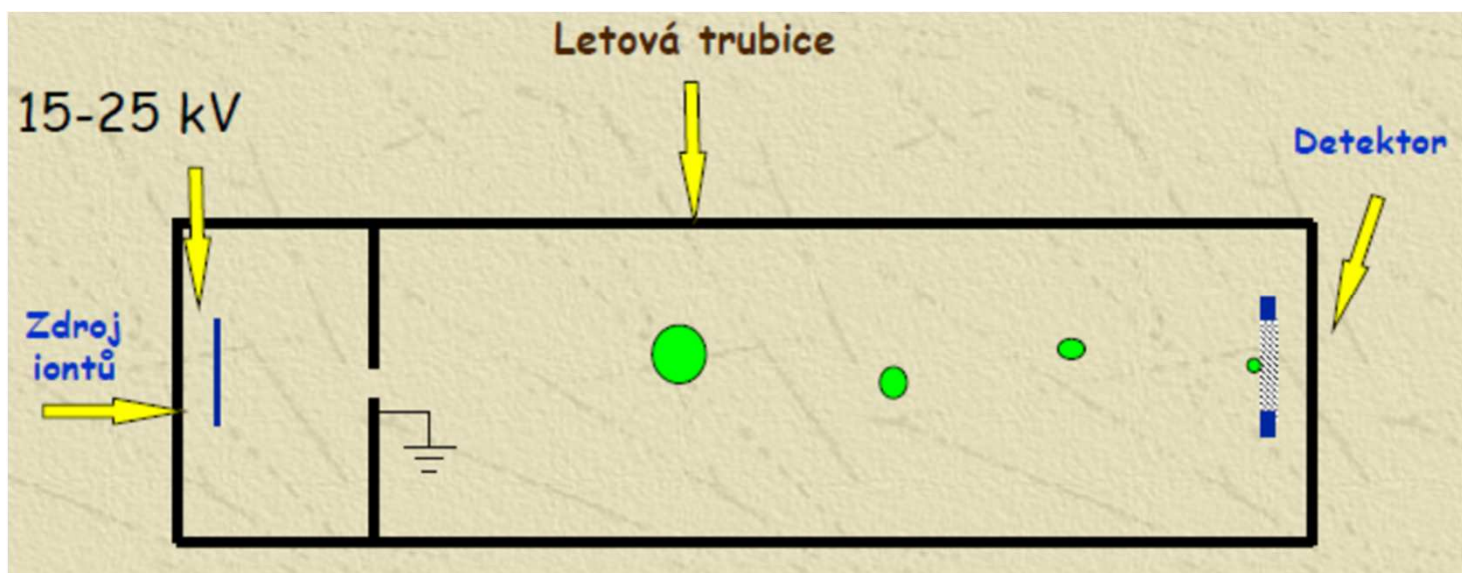




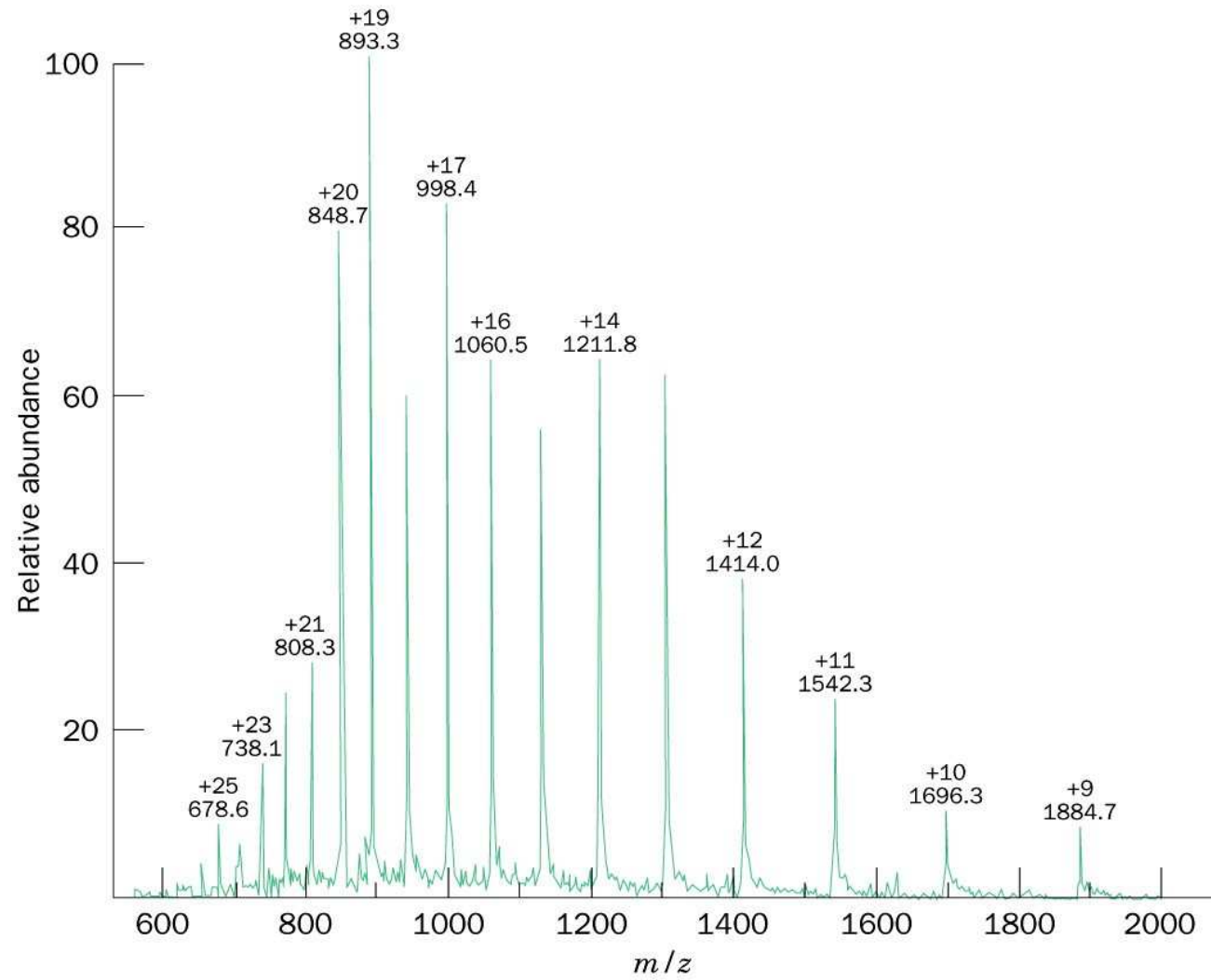
# Analyzátor doby letu (TOF)



# Analyzátor doby letu (TOF)



# MS



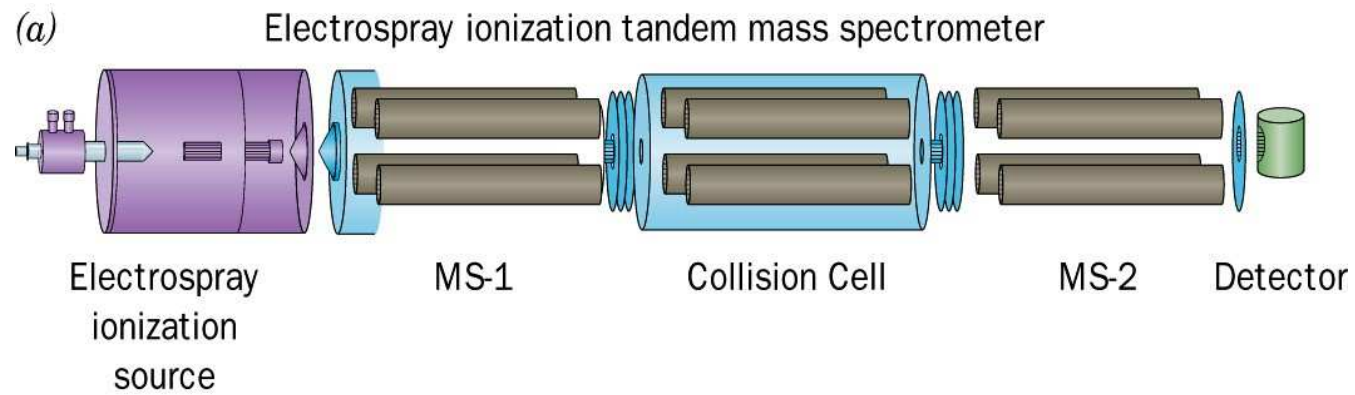
# Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



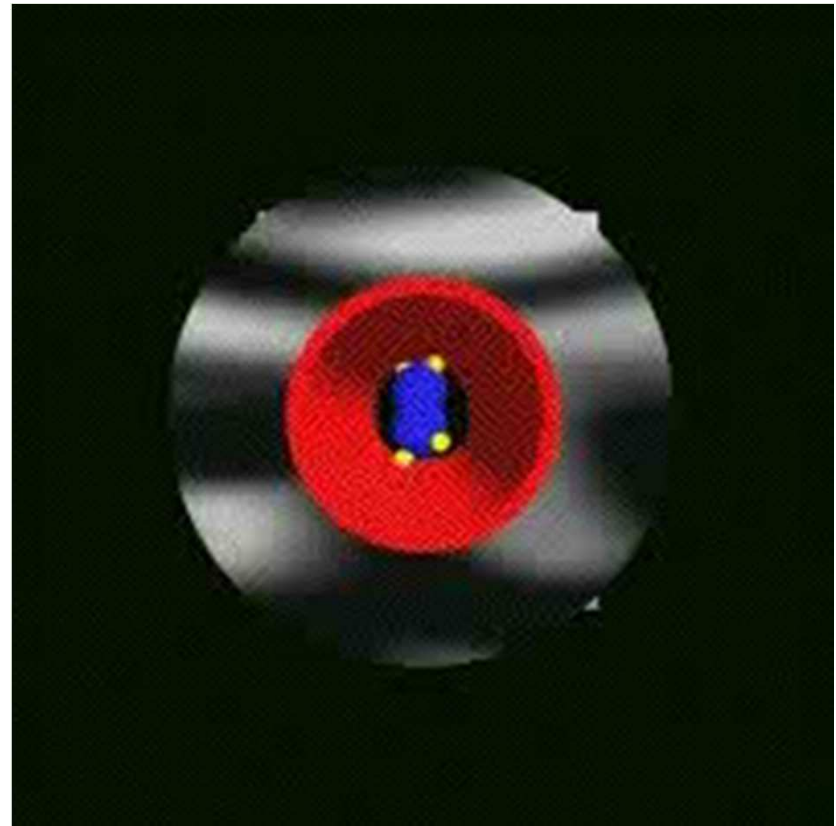
# Analyzátor doby letu (TOF)



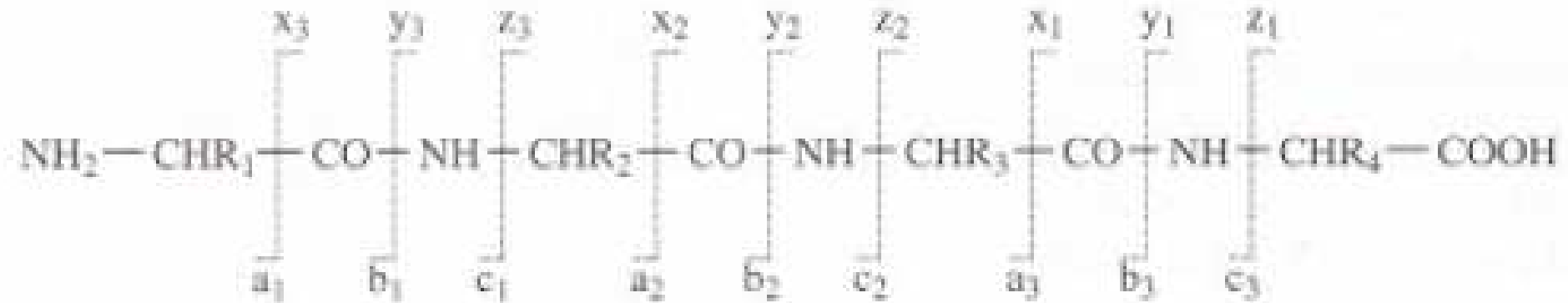
# Tandemová MS-MS



# Kvadrupol



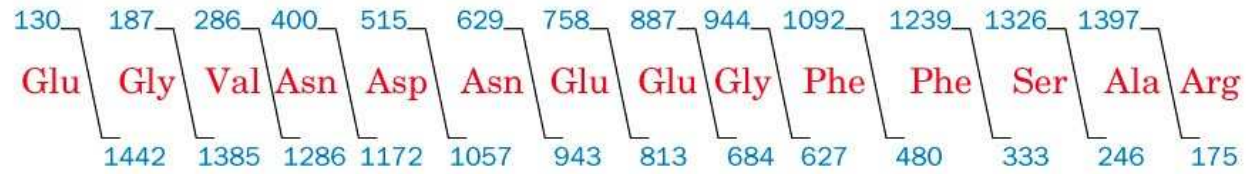
# Tandemová MS-MS



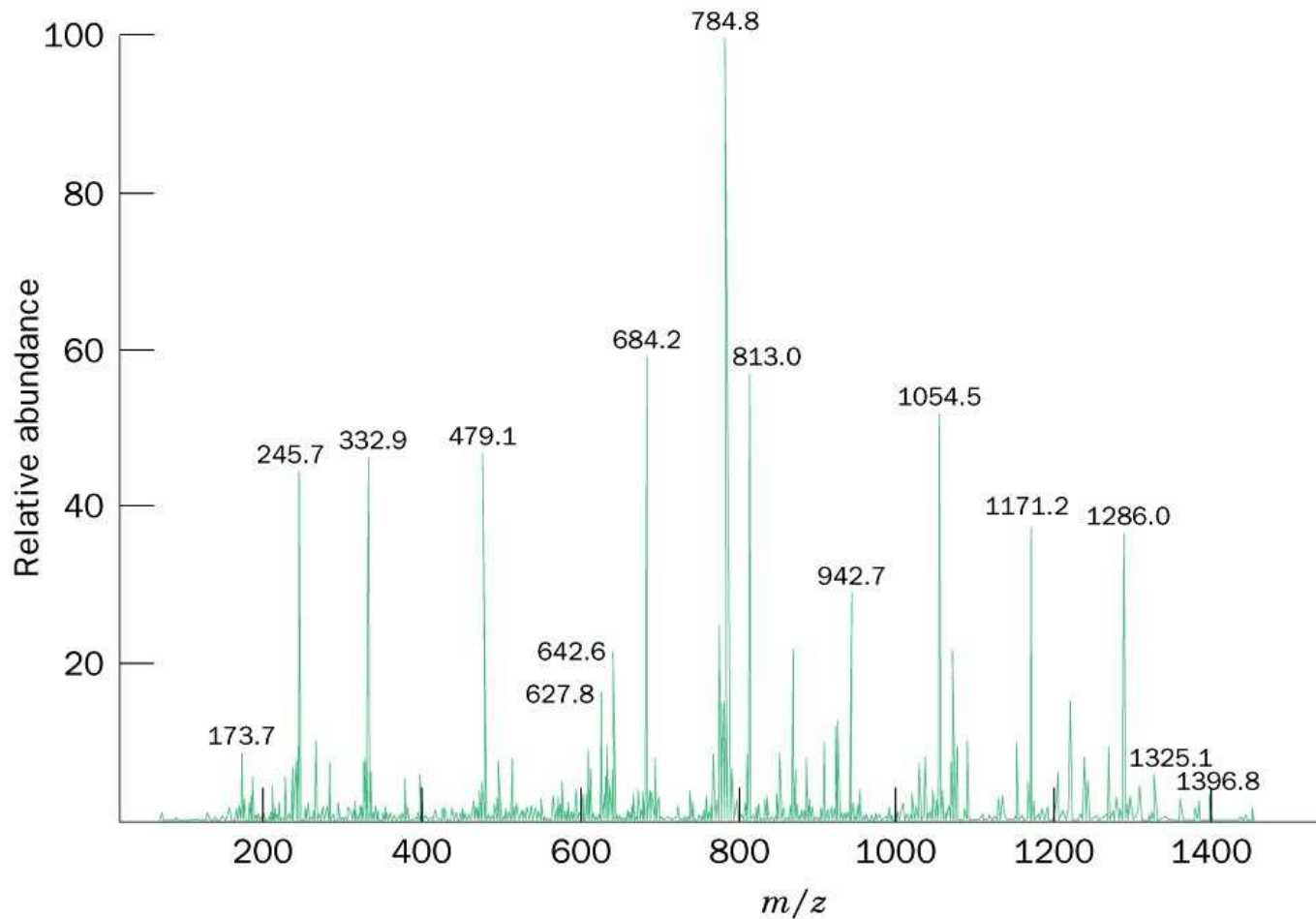


# Tandemová MS-MS

(a)



(b)



## Syntéza peptidů

1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

# Proč syntéza peptidů

- Proteinové inženýrství
- Příprava modifikovaných peptidů
- Příprava peptidových léčiv a vakcín

# Pravidla syntézy

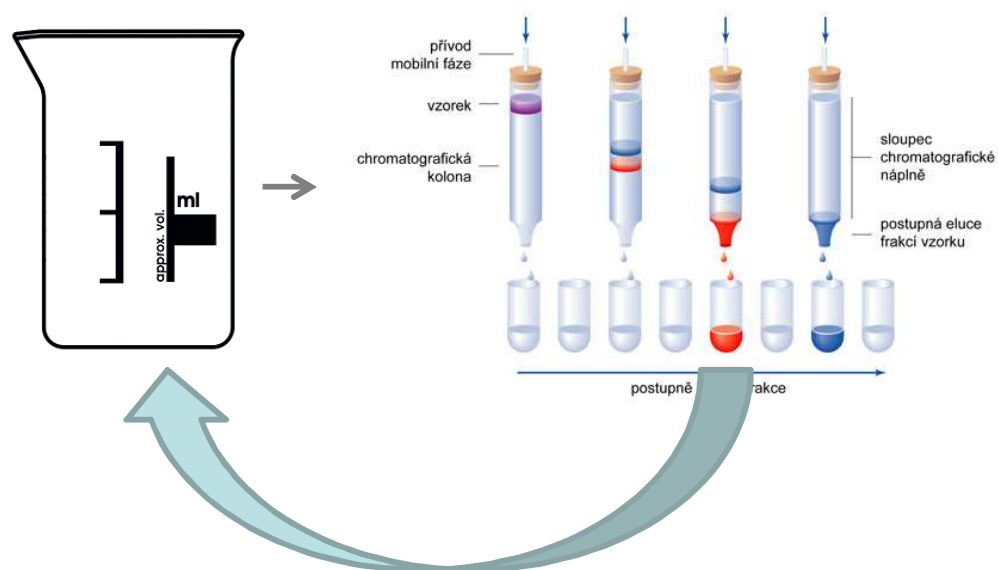
- Pořadí AMK je dáno genetickým kódem
- COOH málo reaktivní, musí se aktivovat
- Je nutné blokovat další skupiny aby se zabránilo vedlejším reakcím, blokace musí být reverzibilní
- Nesmí být narušena L-konfigurace
- Co největší výtěžek (90 % u dekapeptidu = celkový 39%)

# V ROZTOKU

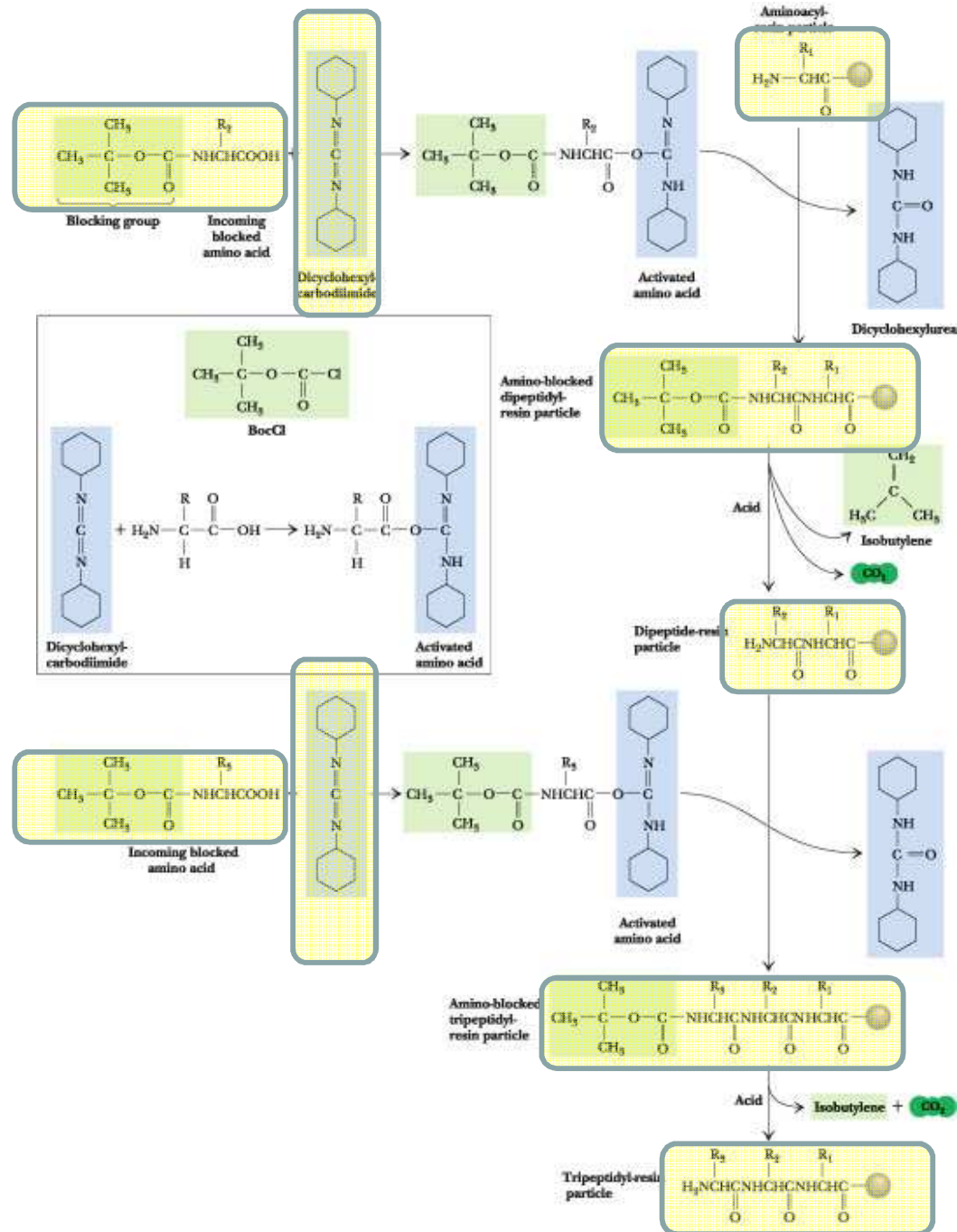


X – chránicí skupina

Y – aktivační skupina



Bruce Merrifield  
1962



Imobilizovaná AMK

Volná aktivovaná AMK  
s blokovanou aminoskupinou

Aktivace

Reakce - dipeptid

Odstranění blokování

Atd.

Atd.

Tripeptid

# Syntetizátor peptidů



## Syntéza peptidů

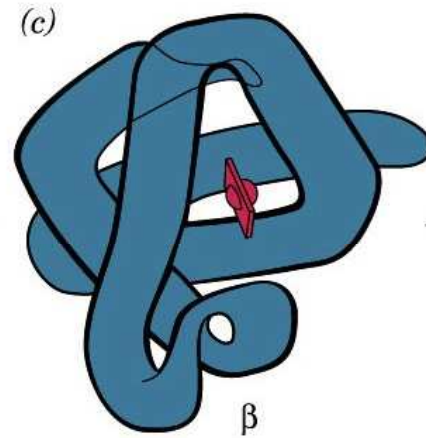
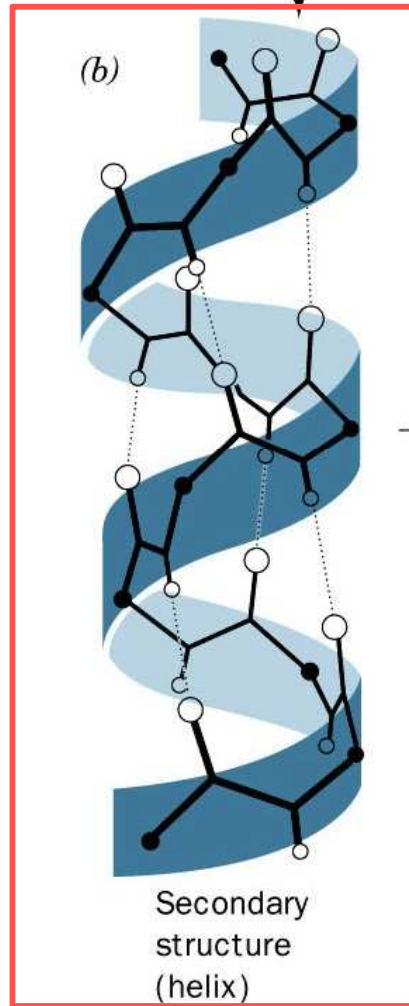
1953 - oxytosin (9 AMK) DE VIGNEAND

1962 - syntéza na pevné fázi - MERRIFIELD

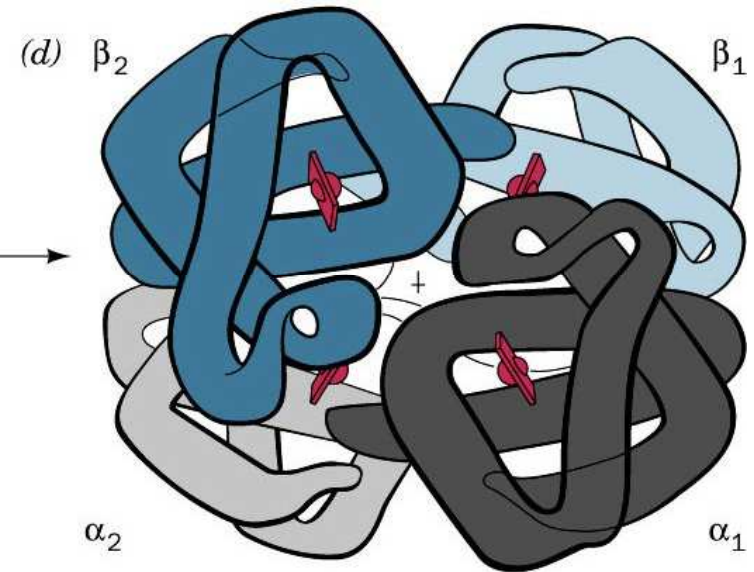
**1971 Merrifield syntetizoval RNAsu - 128 AMK z 80 % aktivní  
(výtěžek 3 % na původní množství valinu)**



(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –  
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



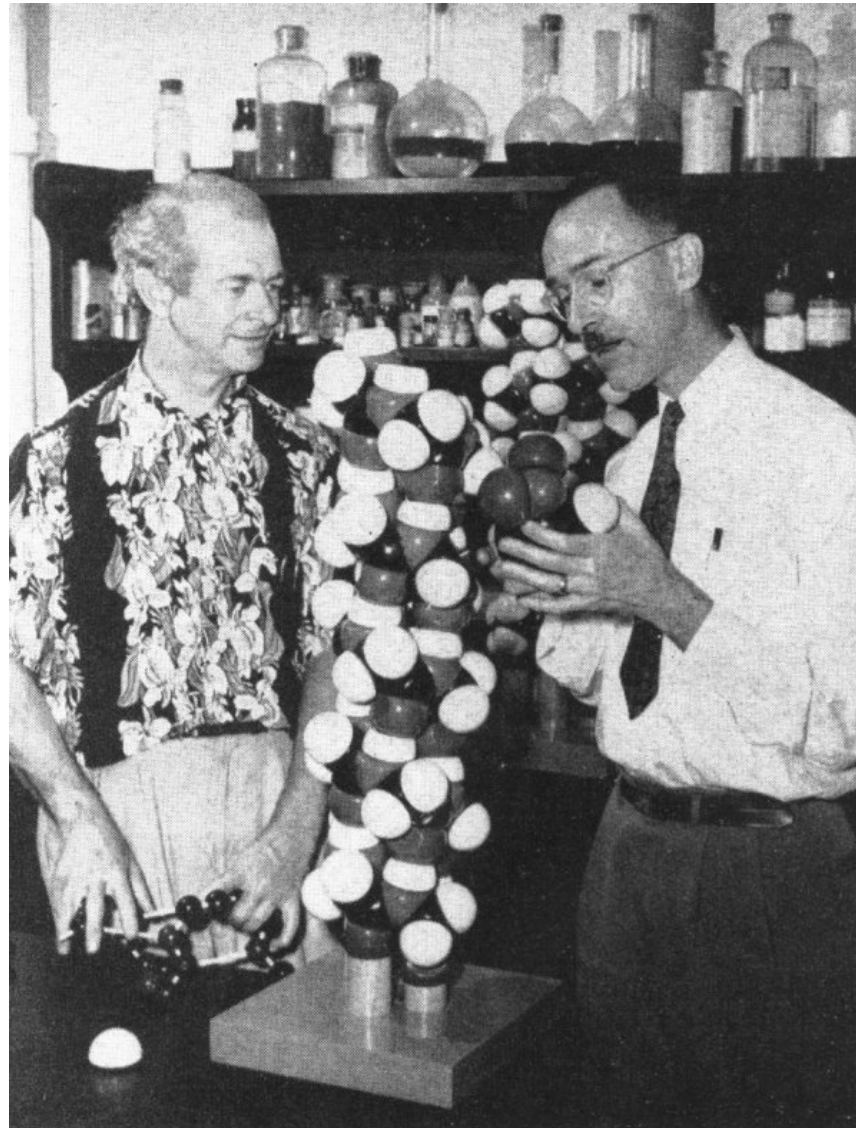
Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein

# Sekundární struktura

## Polypeptidový skelet

peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta



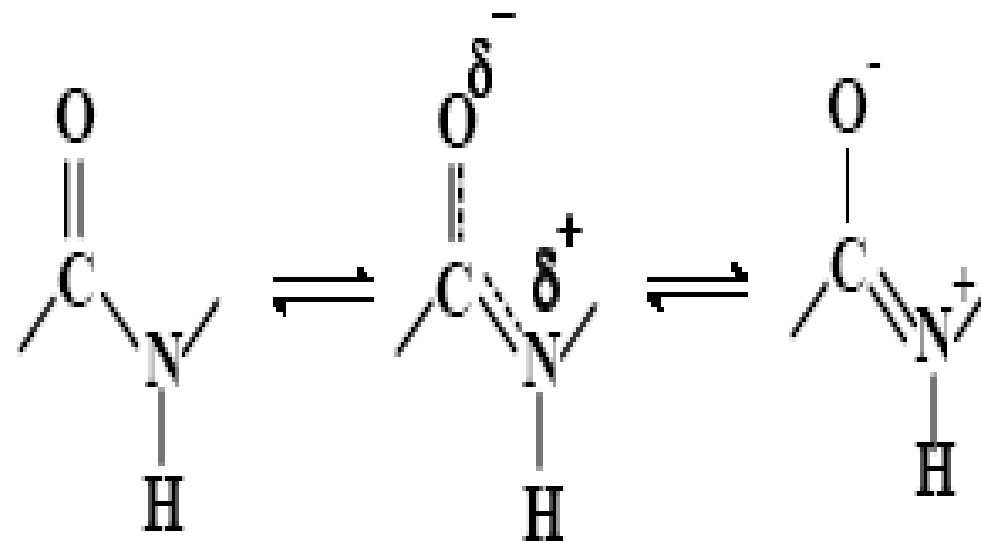
L.P. NC chemie 1954  
NC mír 1962

## Sekundární struktura

peptidická vazba - PAULING a COREY

30 až 40.léta

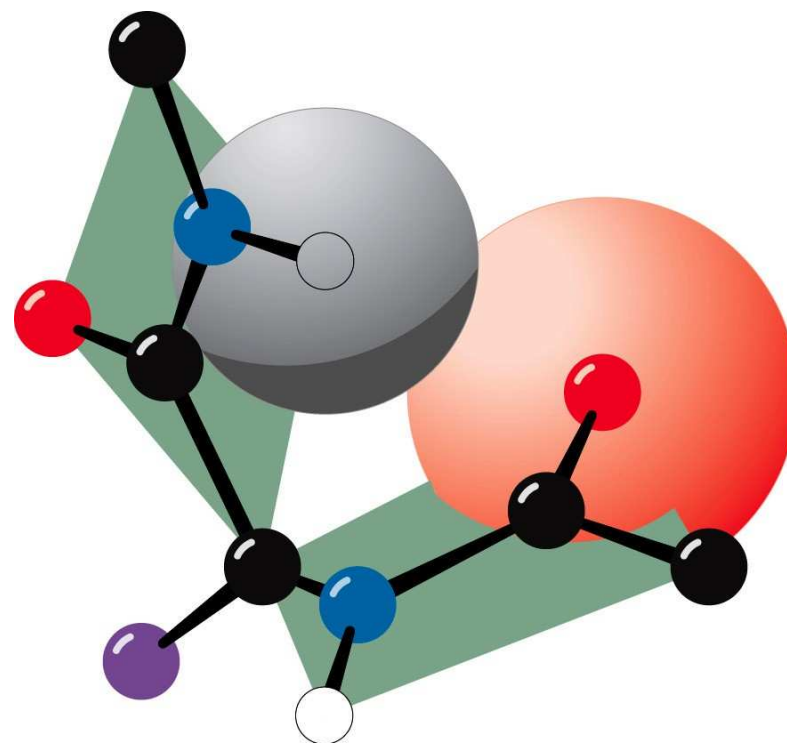
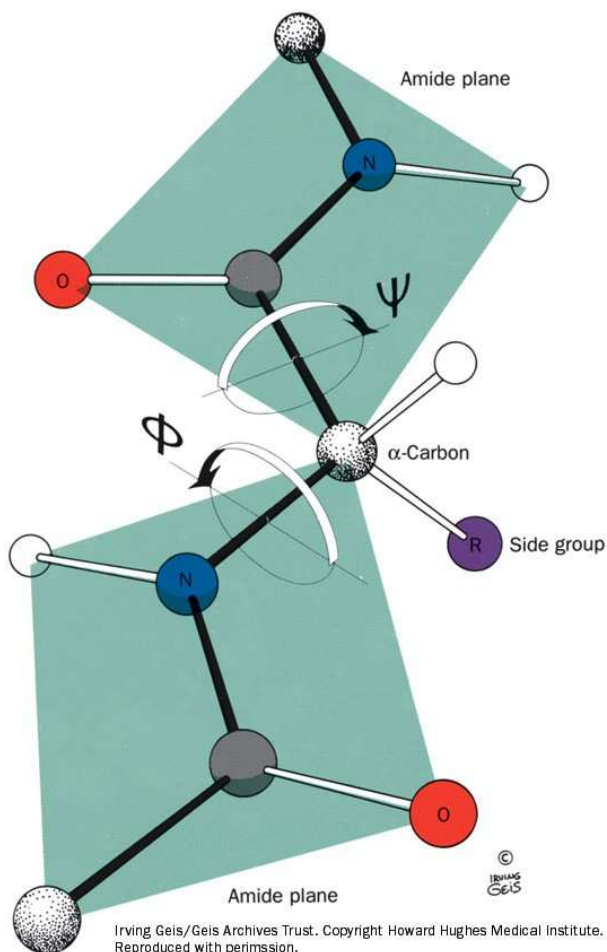
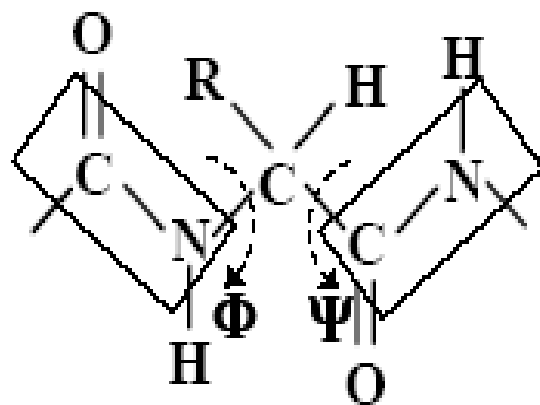
A. Peptidická vazba leží v rovině





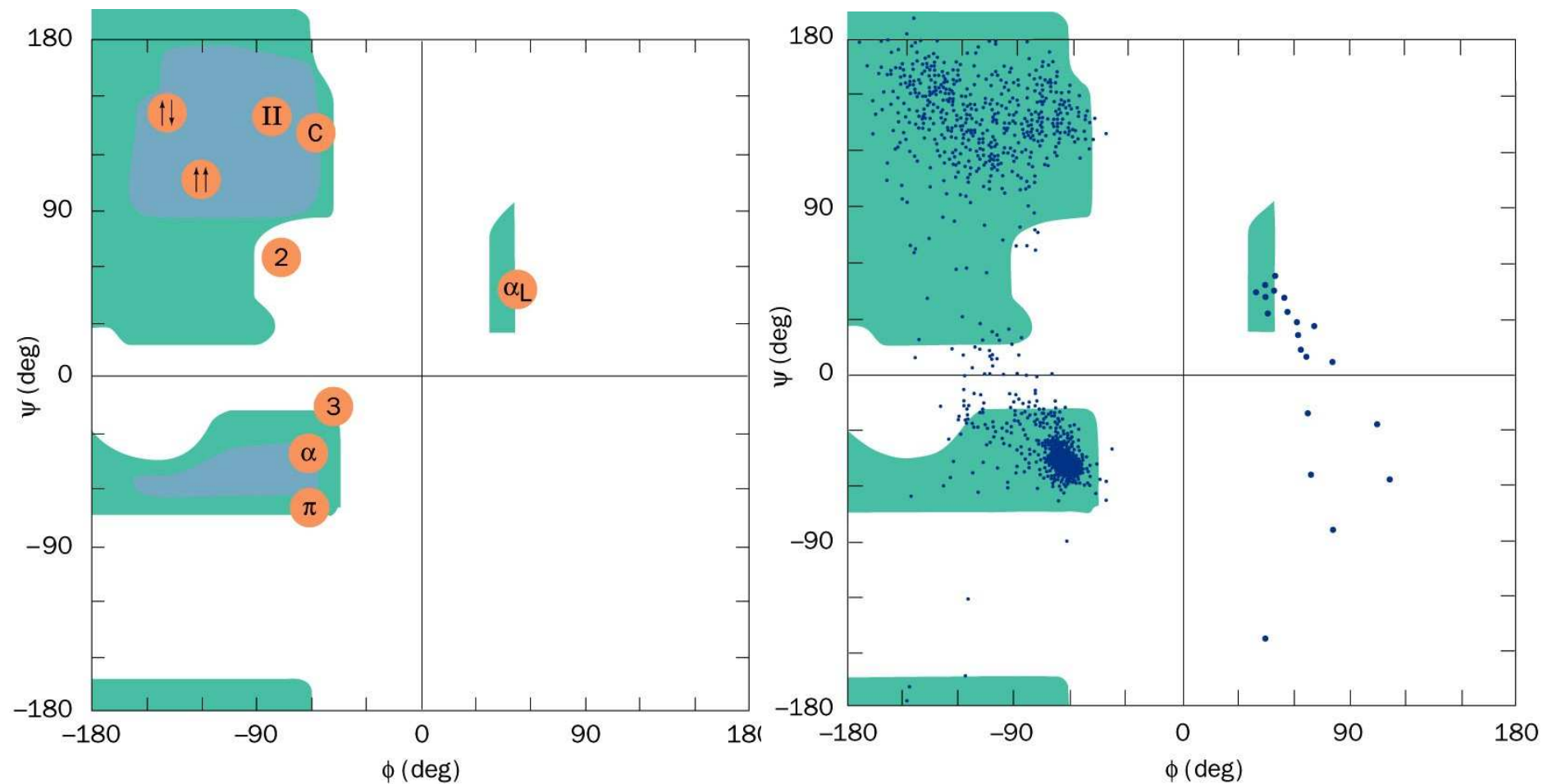
# C. Peptidické vazby ležící v rovině mohou svírat určité torzní uhly

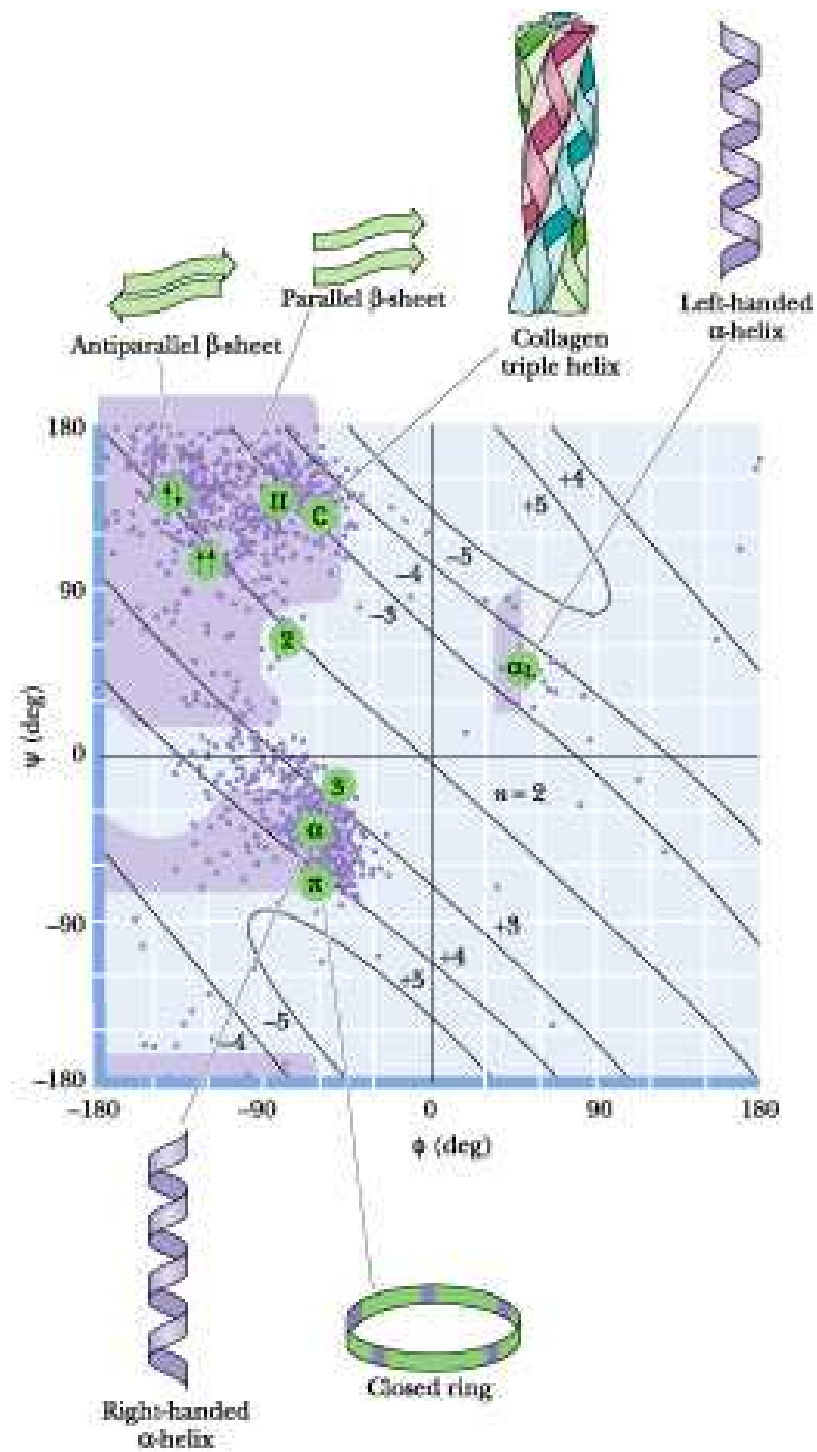
$\phi, \psi$



Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

# Ramachandrov diagram stability sekundárných struktur białkovin





D. Řetězec musí umožňovat maximální počet vodíkových vazeb mezi peptidickými vazbami



Typy sekundárních struktur :

A. Pravidelné - helikální struktury -  $\alpha$  helix (-56, -47)

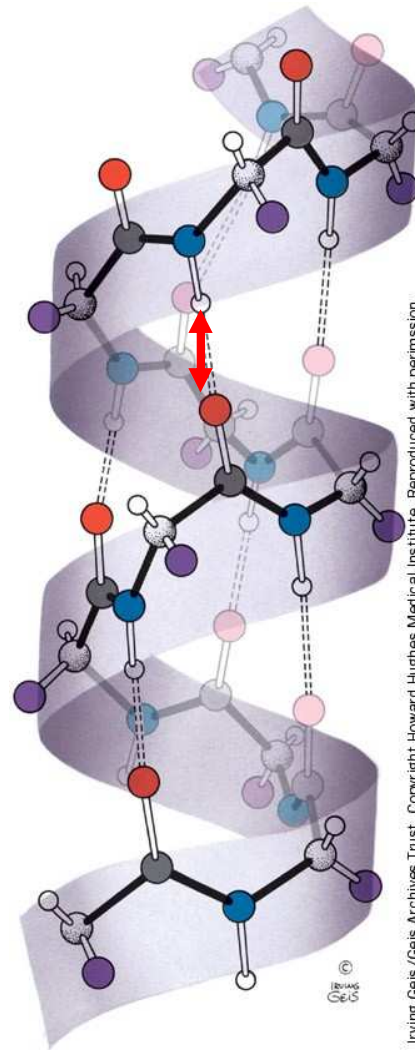
-  $\beta$  struktury - skládaný list - paralelní (-139, +135) a  
antiparalelní (-119, +113)

B. Ohybové -  $\beta$  ohyb

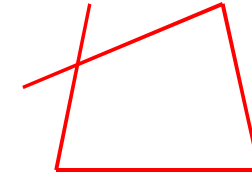
C. Nepravidelné

# $\alpha$ - helix

- Torzní úhly
- Počet AMK na závit
- Výška závitu



3,6 AMK na závit

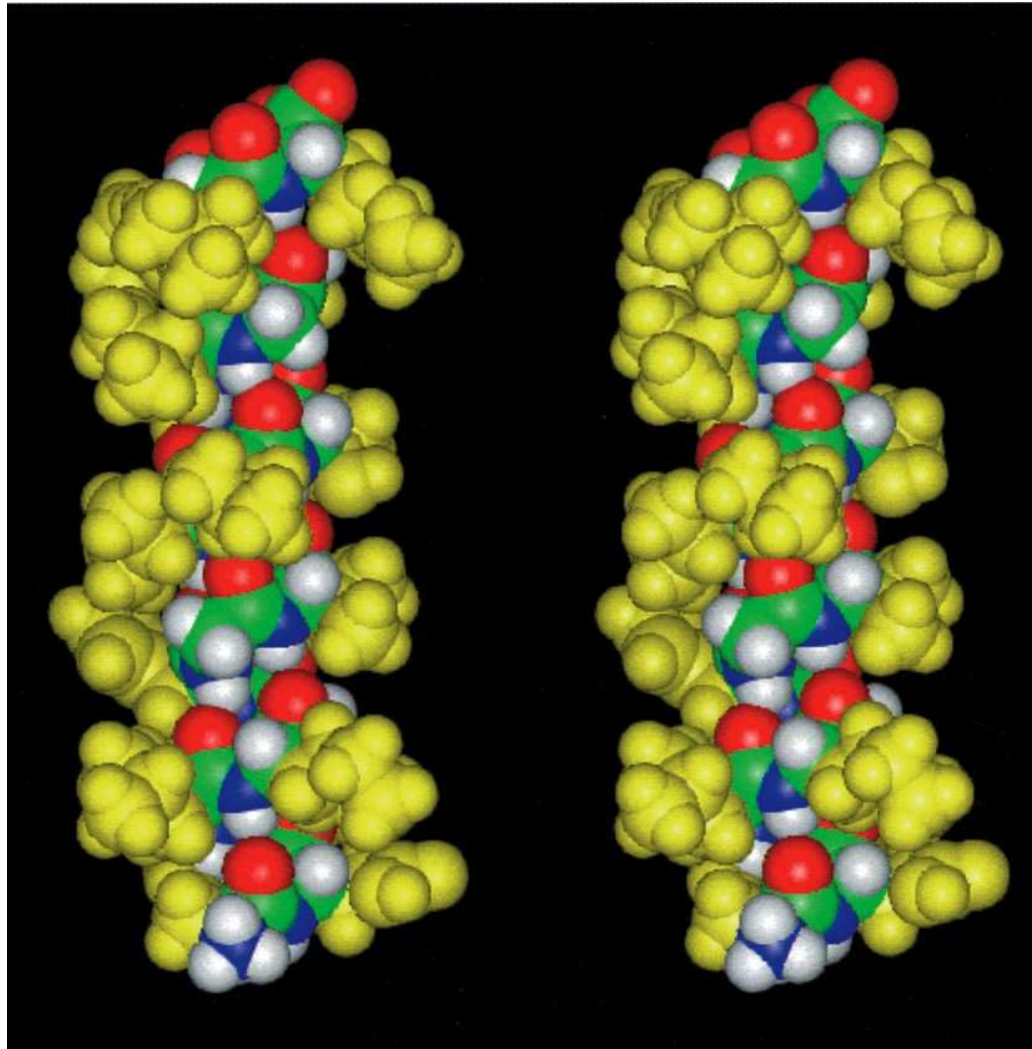


H můstek mezi C=O n-té peptidické vazby a N-H n+4 peptidické vazby



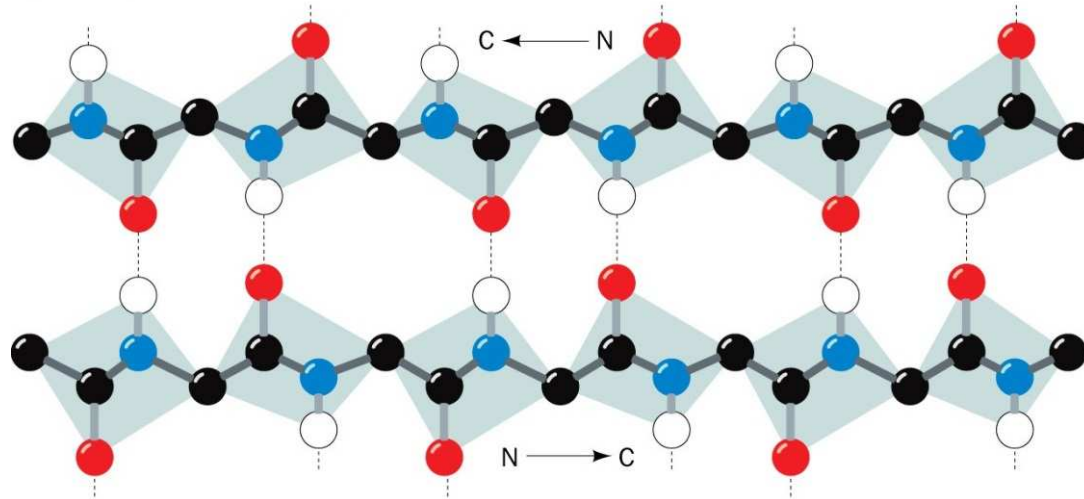
Optimální vzdálenost 0,28 nm

# $\alpha$ - helix



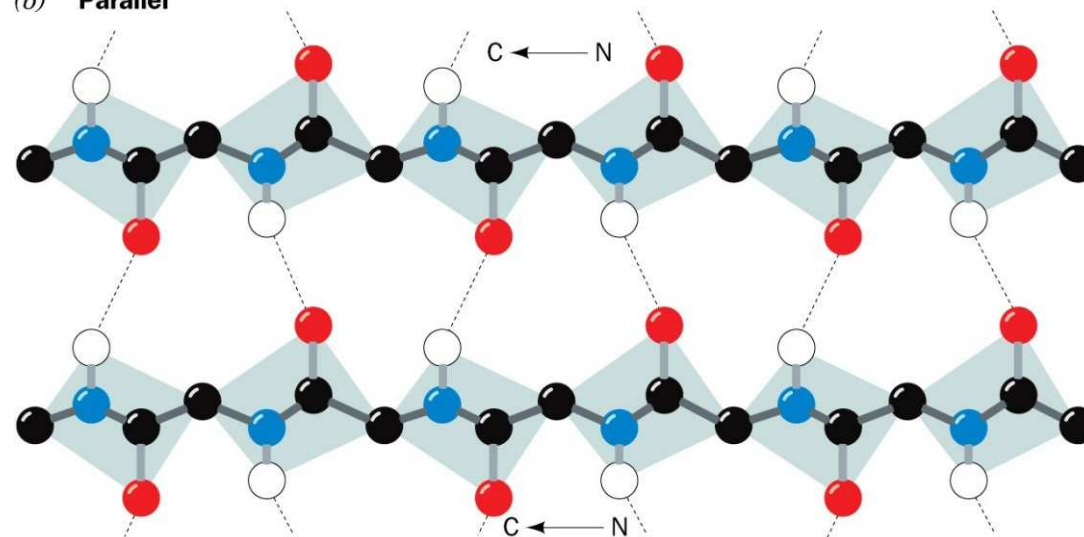
# $\beta$ - sheet

(a) Antiparallel



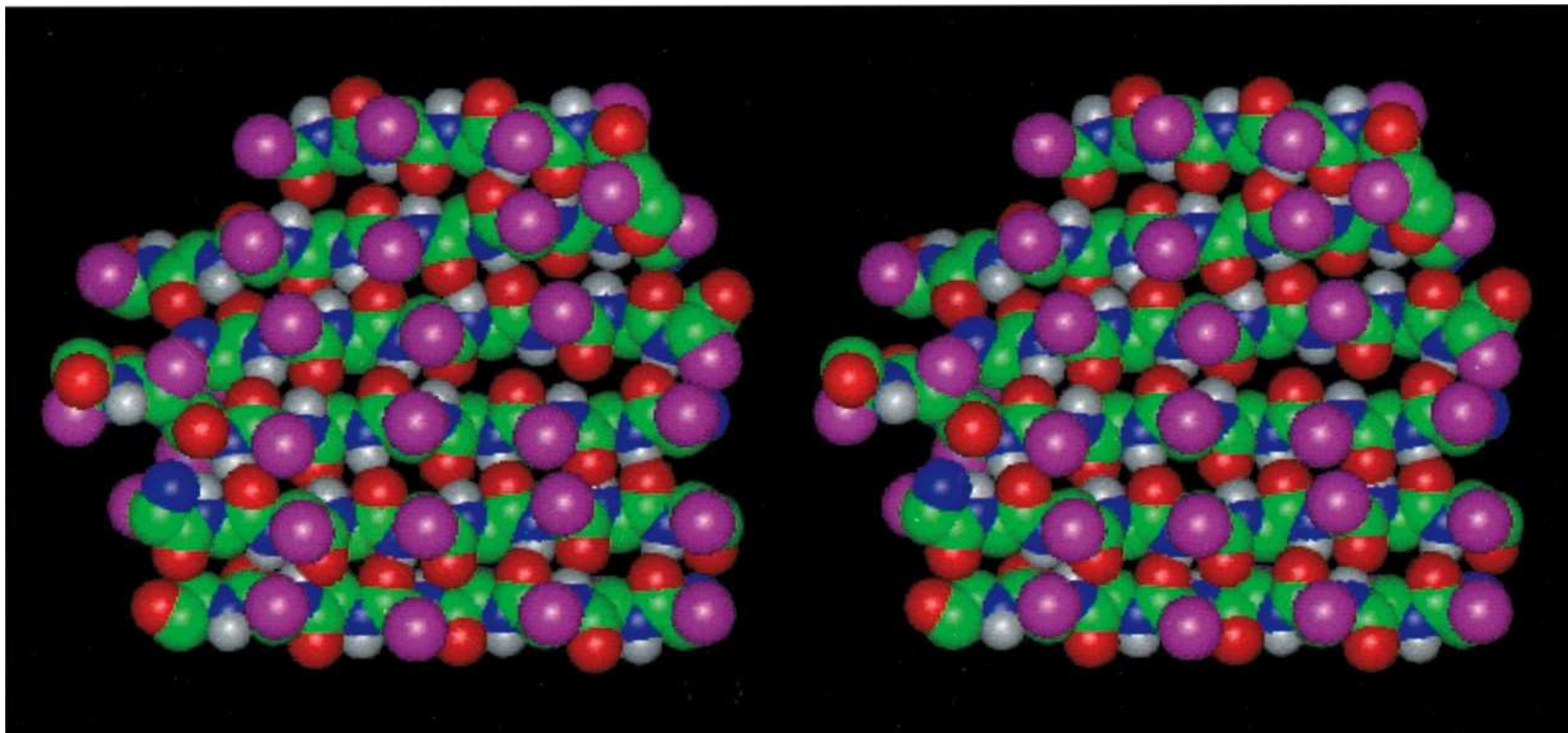
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

(b) Parallel



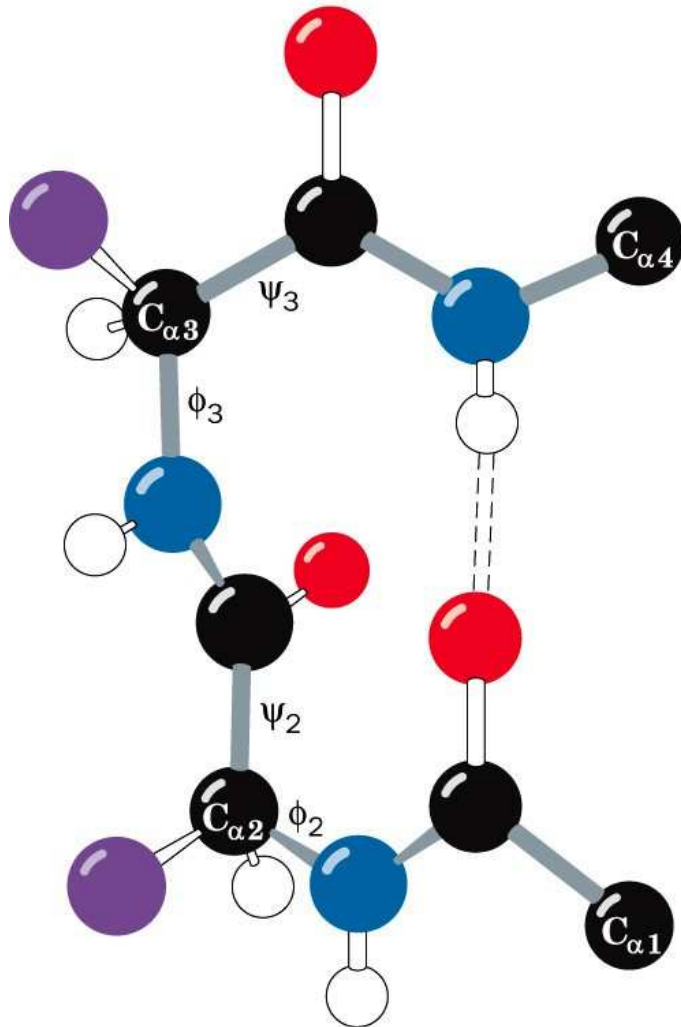
Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

# $\beta$ - sheet

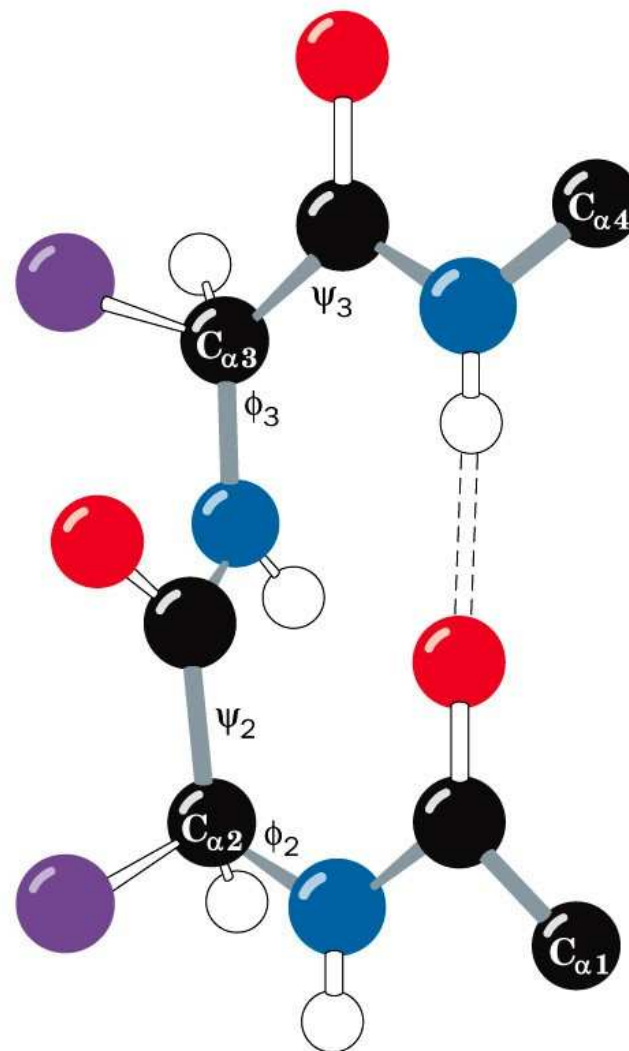


# $\beta$ - turn

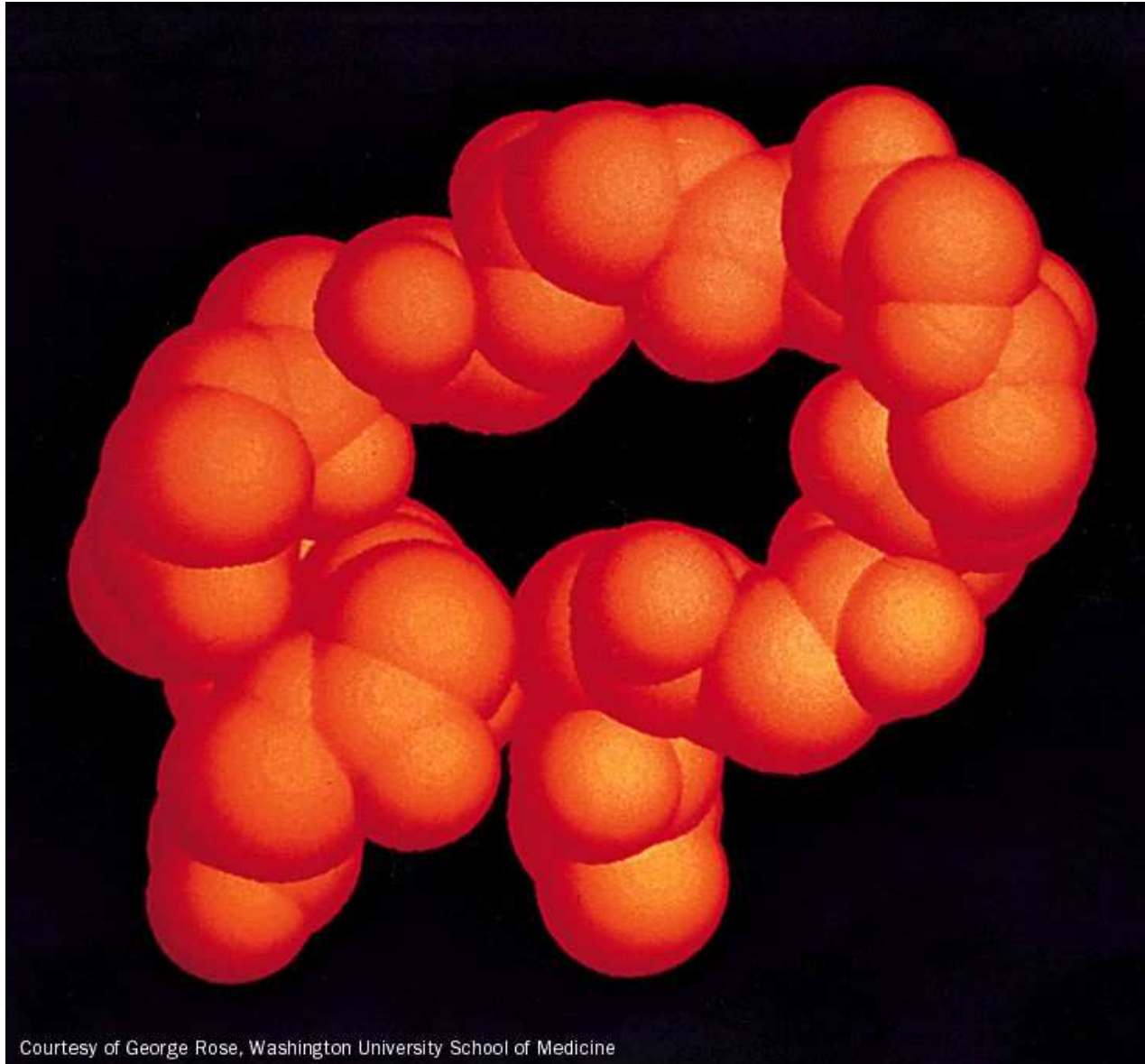
(a) Type I  $\beta$  bend



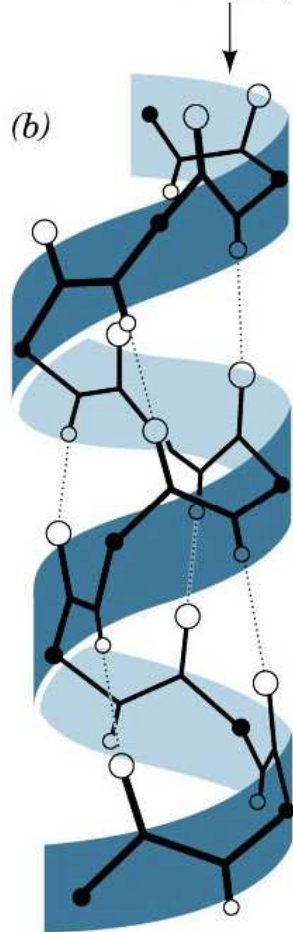
(b) Type II  $\beta$  bend



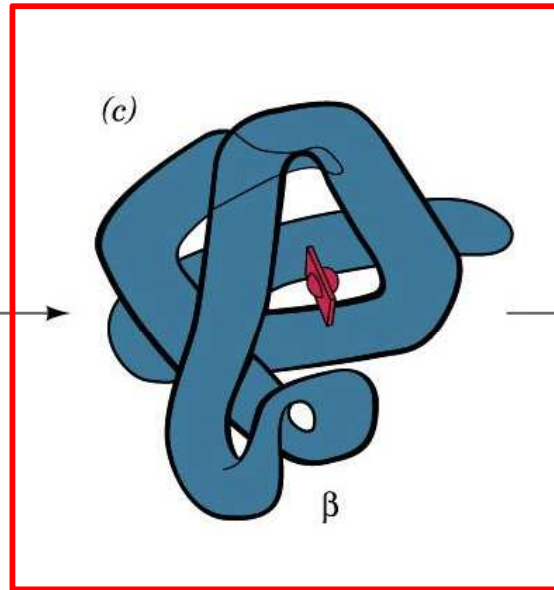
# $\beta$ - turn



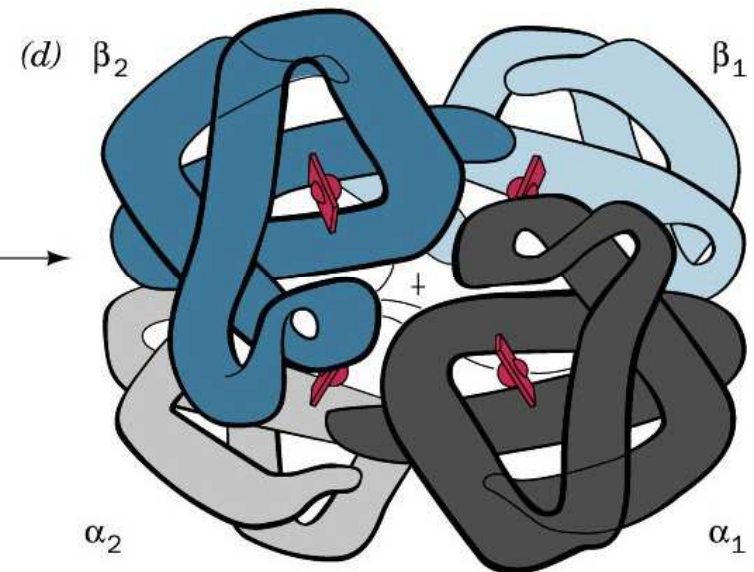
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –  
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



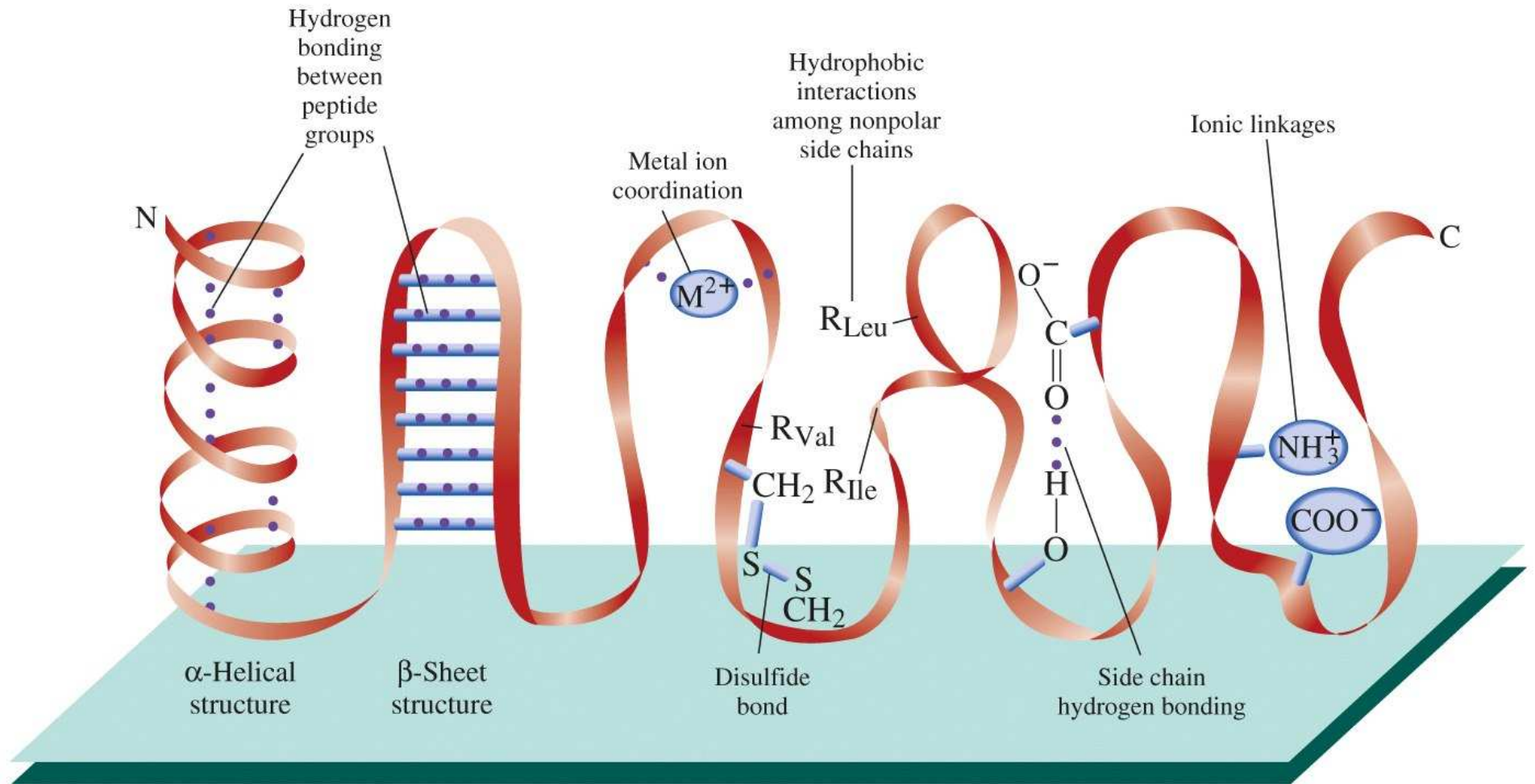
Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein



## Terciální struktura

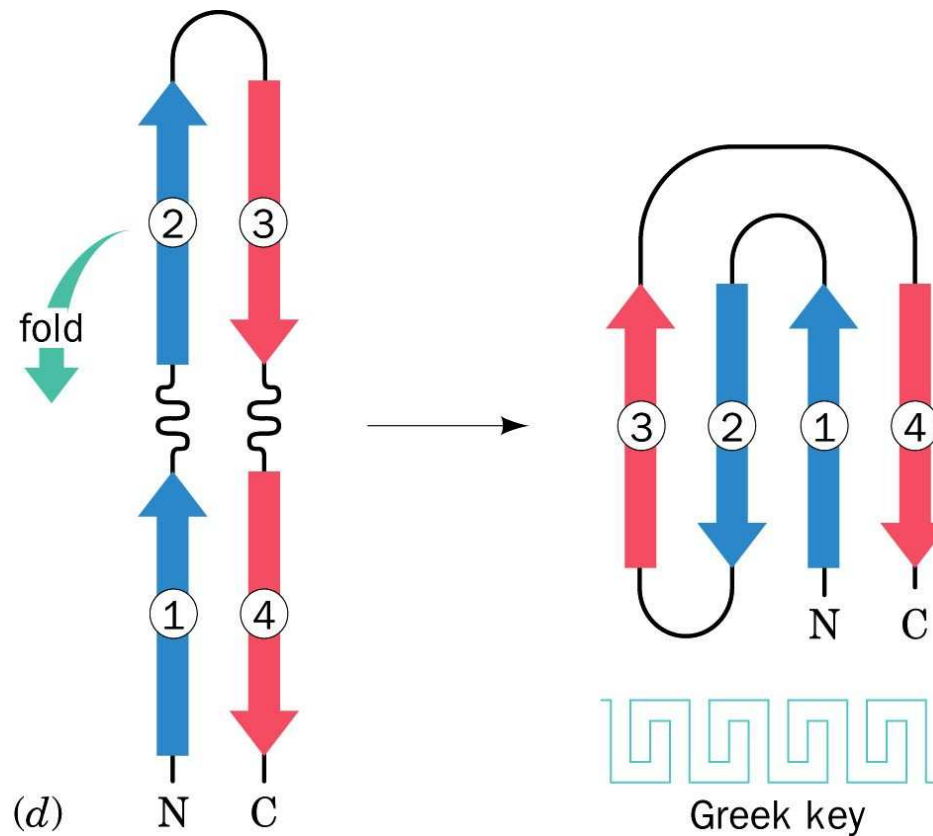
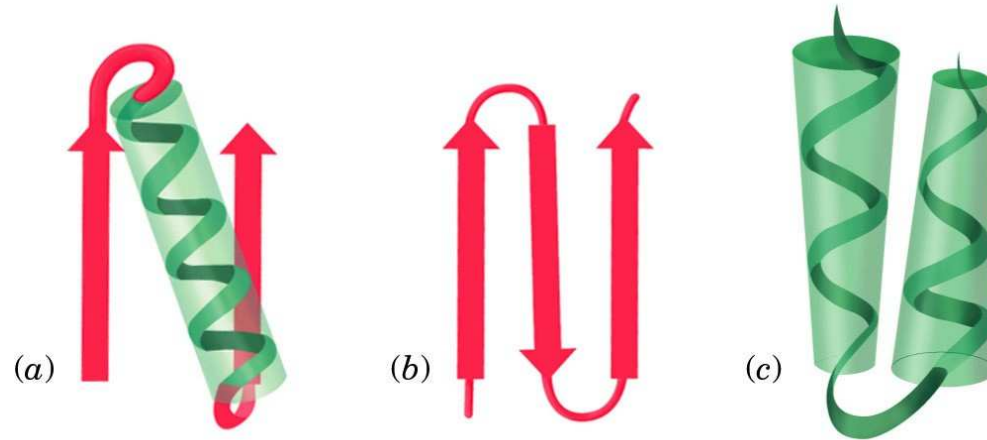
### **Polypeptidový skelet + vedlejší řetězce AMK**

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

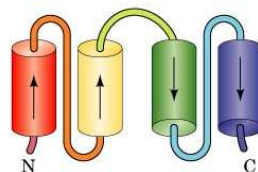
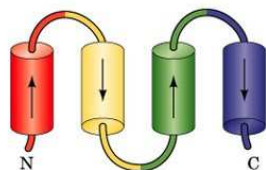
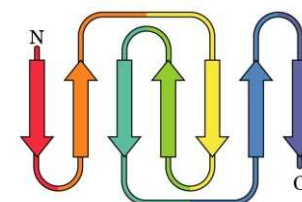
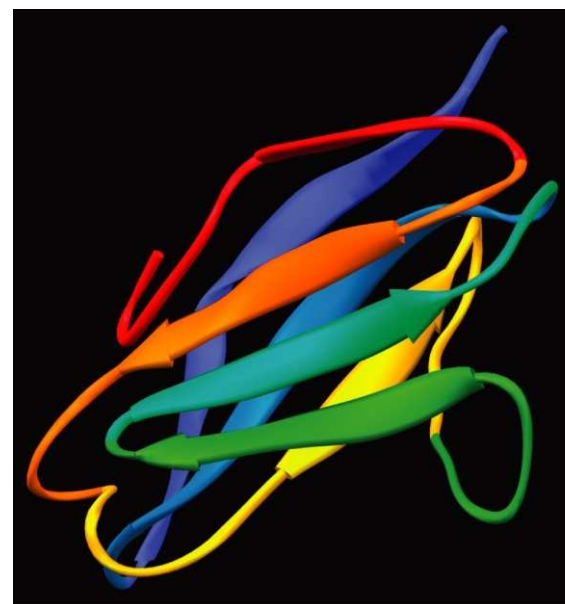
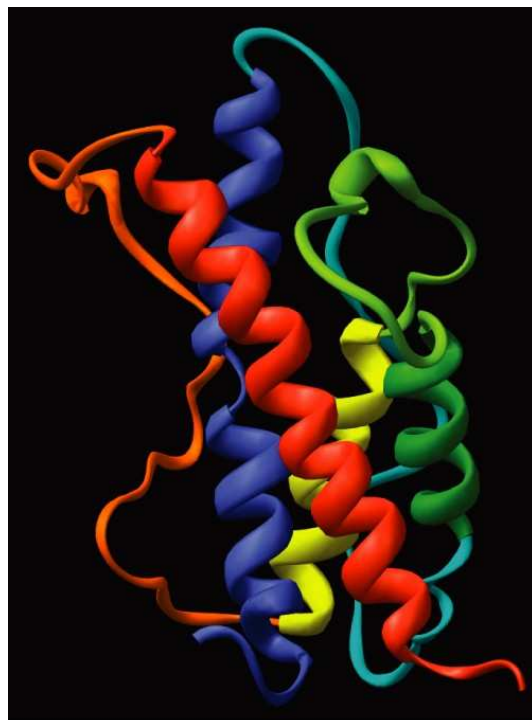
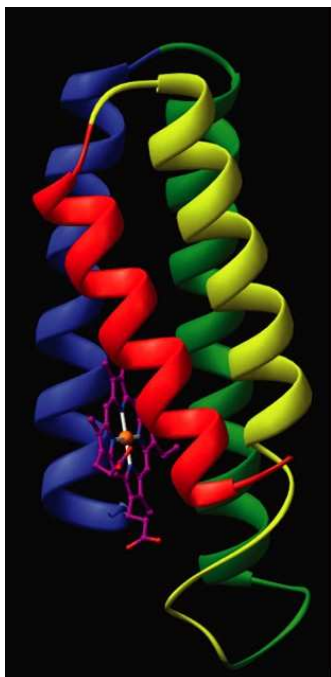


**Figure 4-3 Concepts in Biochemistry, 3/e**  
 © 2006 John Wiley & Sons

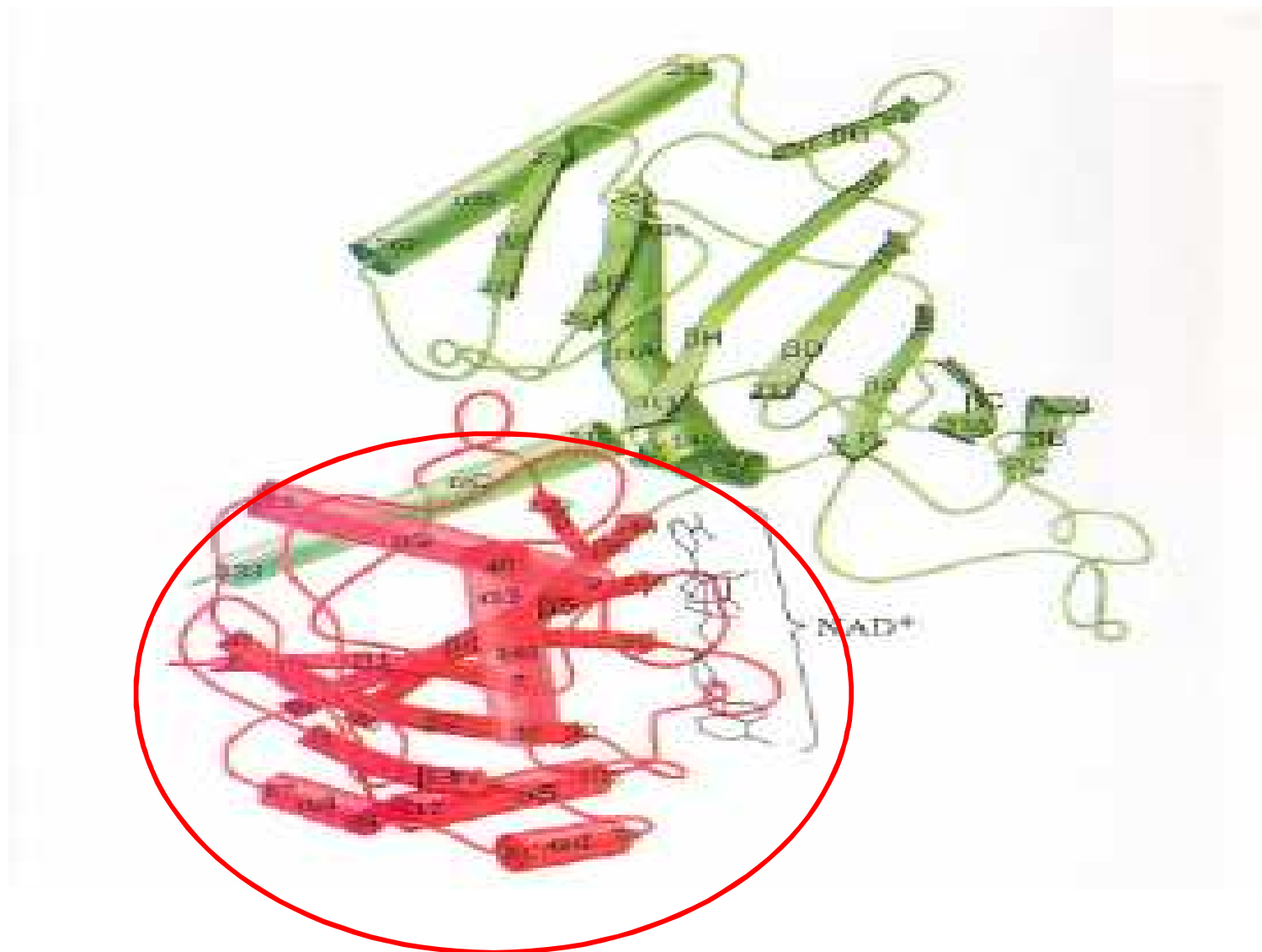
# Strukturní motivy

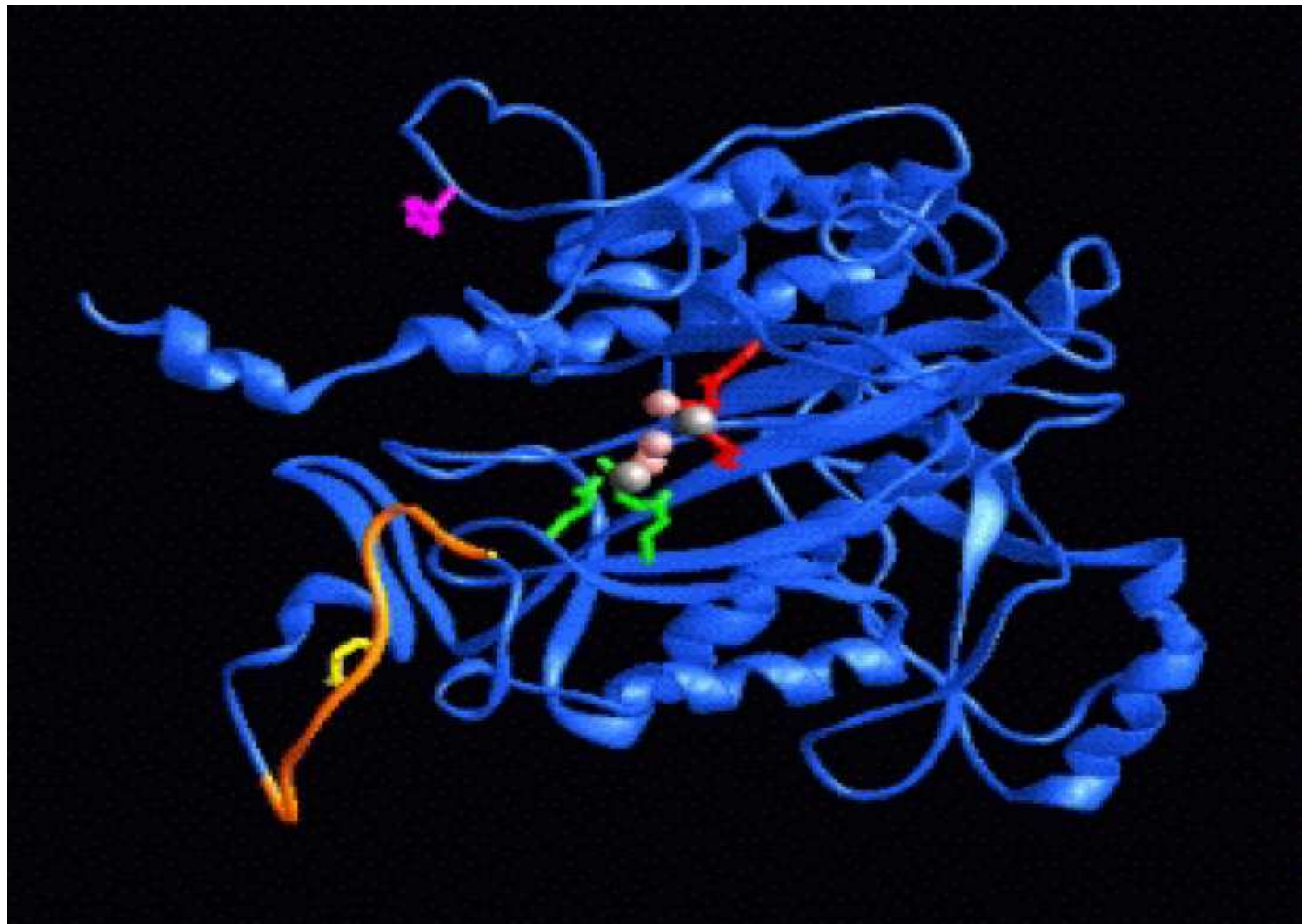


# Strukturní motivy

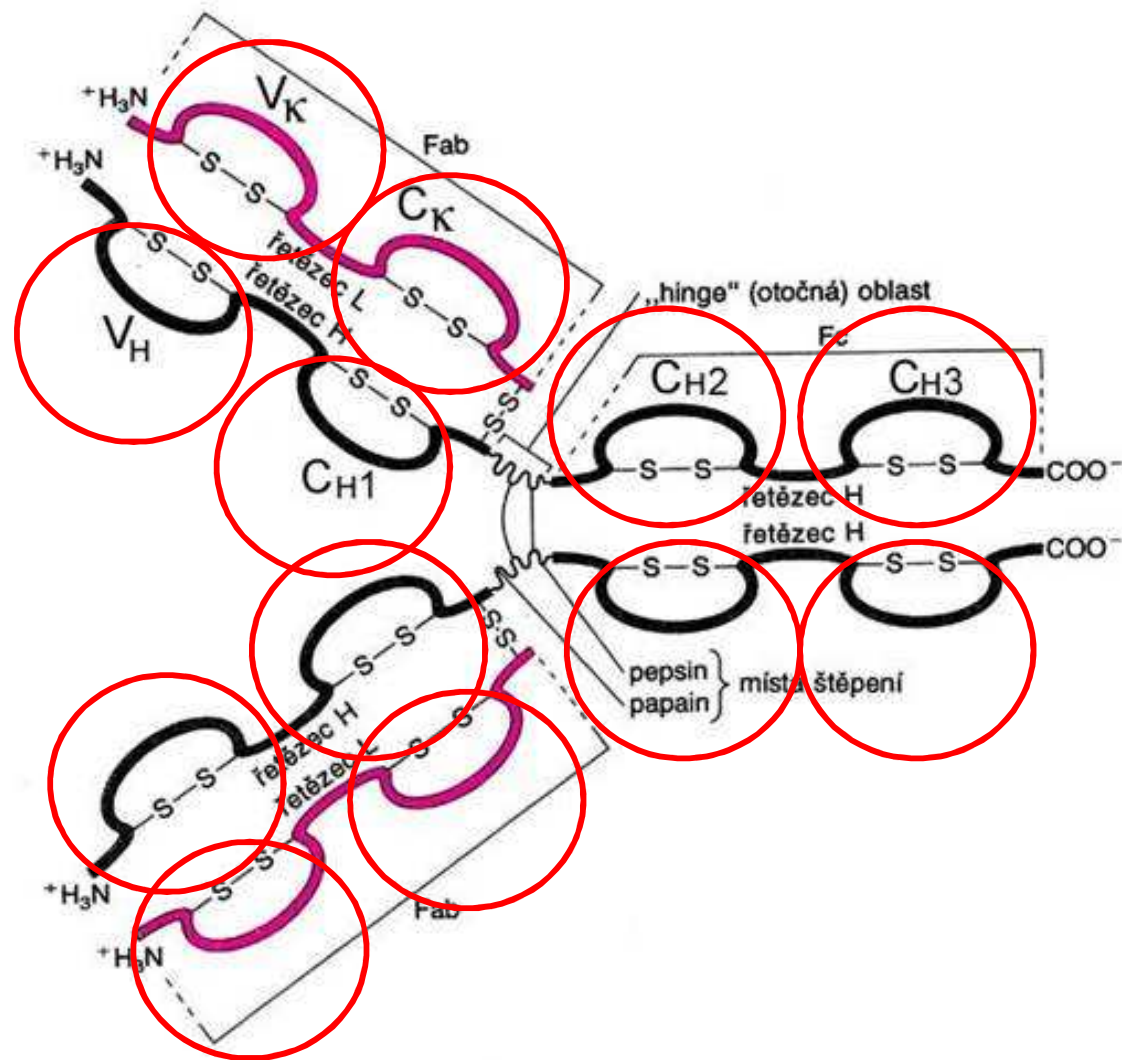


# Strukturní domény – NAD<sup>+</sup>

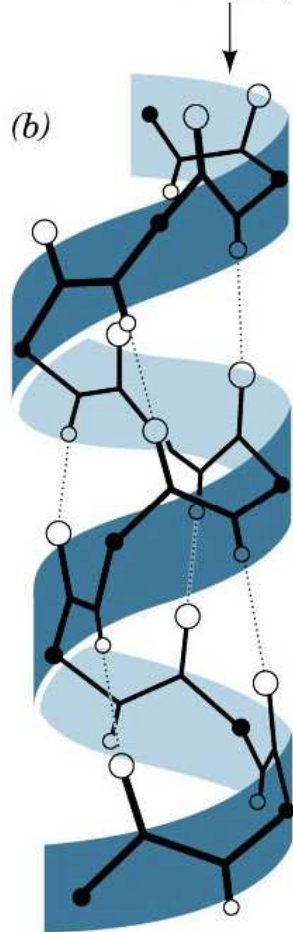




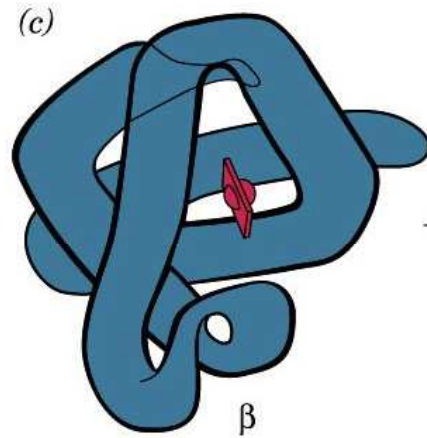
# Strukturní domény IgG



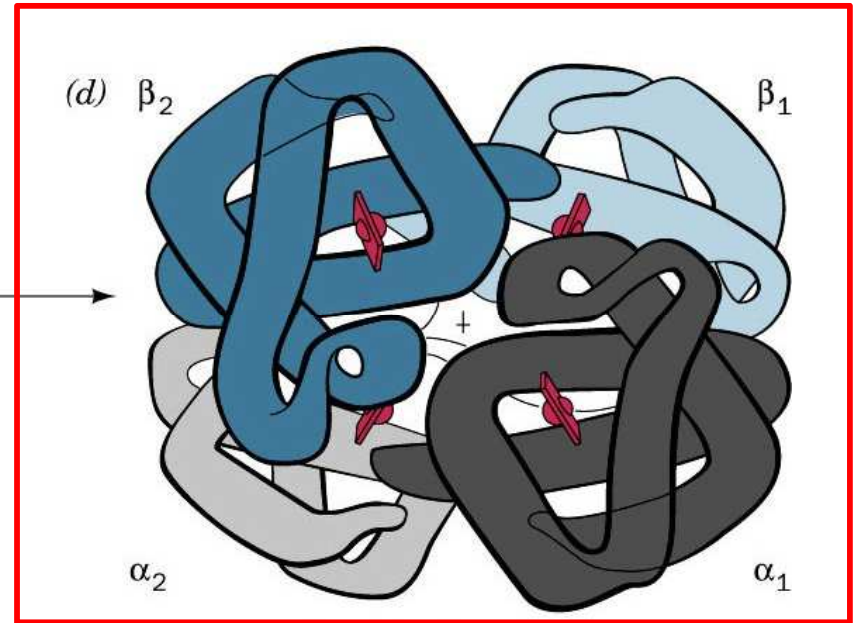
(a) – Lys – Ala – His – Gly – Lys – Lys – Val – Leu – Gly – Ala –  
Primary structure (amino acid sequence in a polypeptide chain)



Secondary structure (helix)



Tertiary structure:  
one complete protein chain  
( $\beta$  chain of hemoglobin)



Quaternary structure:  
the four separate chains  
of hemoglobin assembled  
into an oligomeric protein

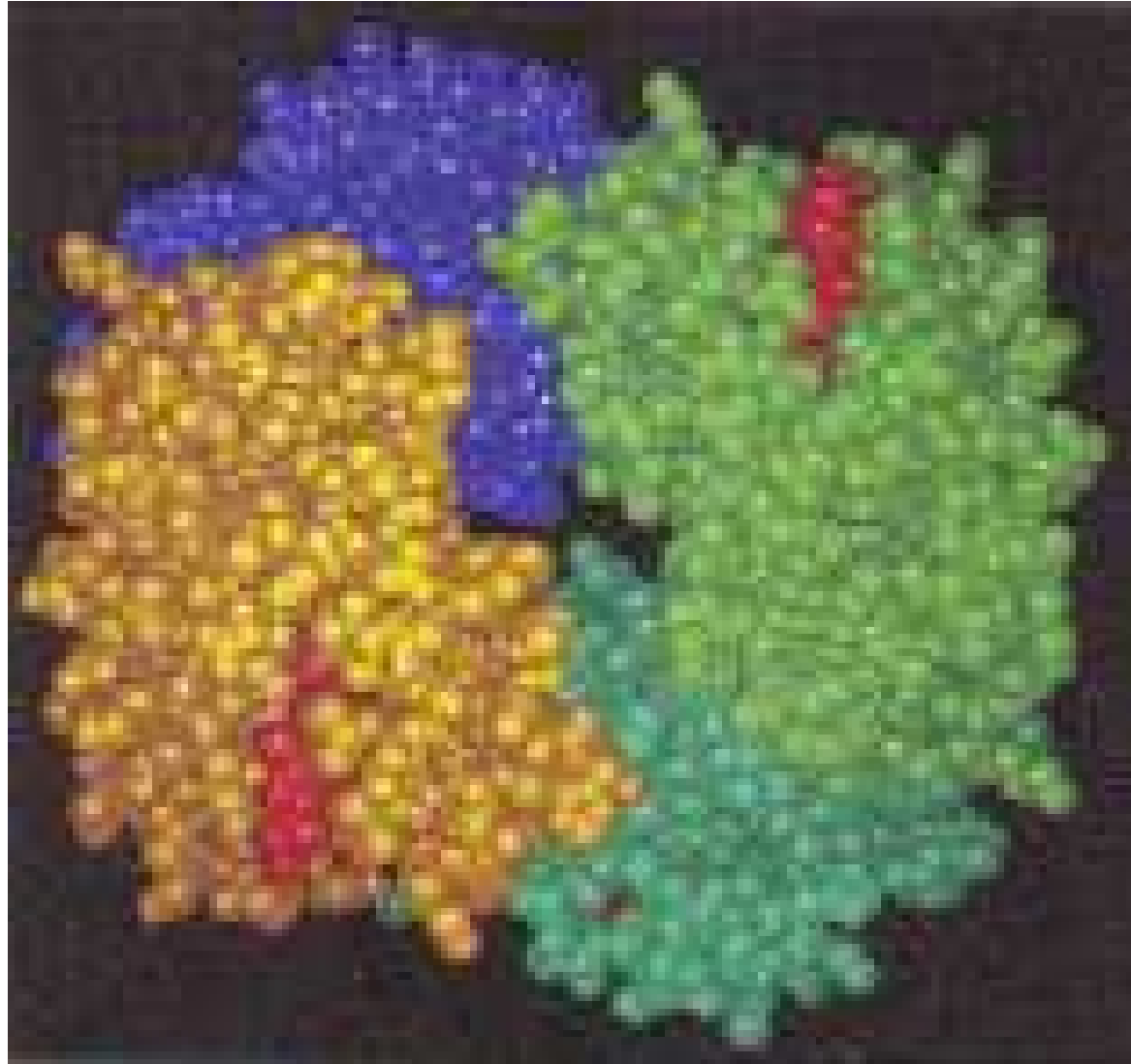


## Kvarterní struktura

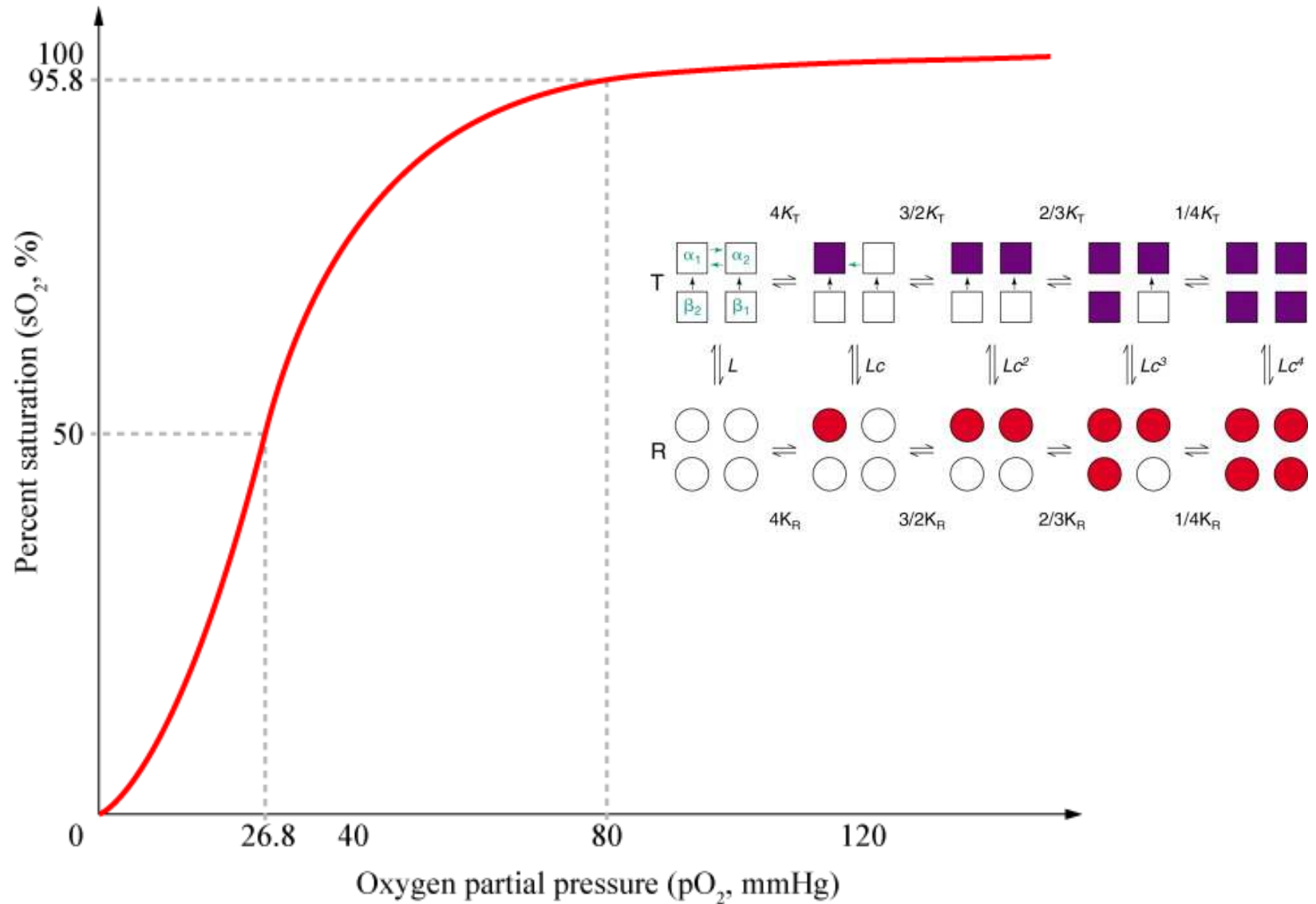
### **Podjednotkové složení – více polypeptidických řetězců**

- **Usnadnění proteosyntézy**
- **Možnost regulací – allosterie, izoenzymy**
- **Multienzymové komplexy – enzymové továrny**

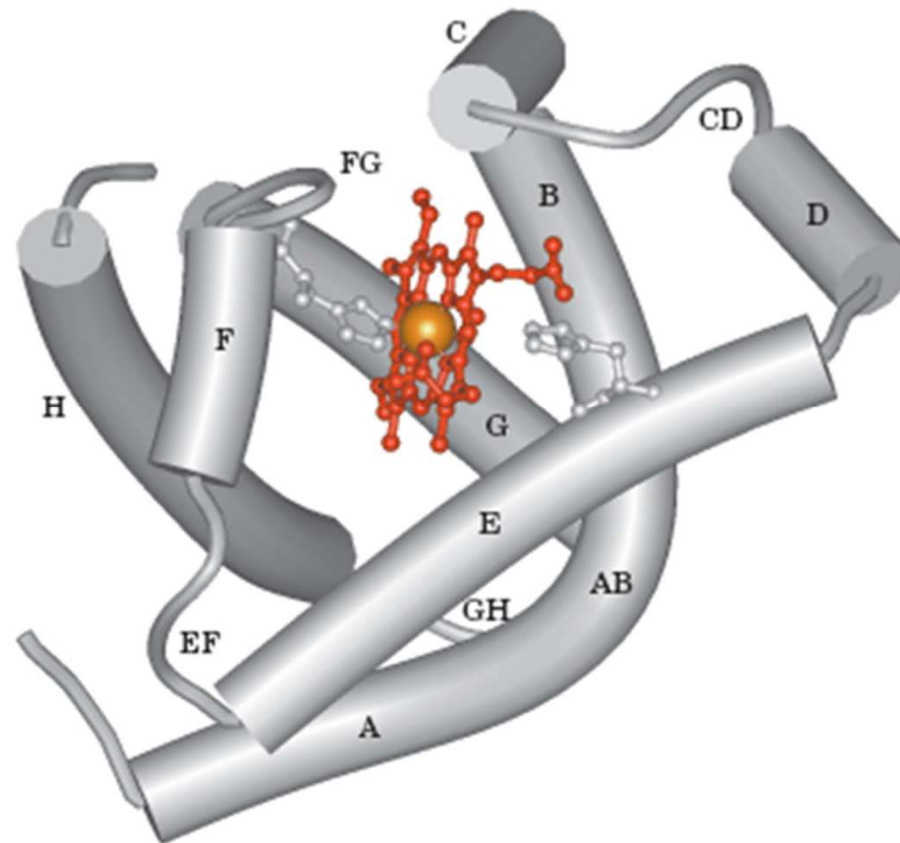
# Hemoglobin



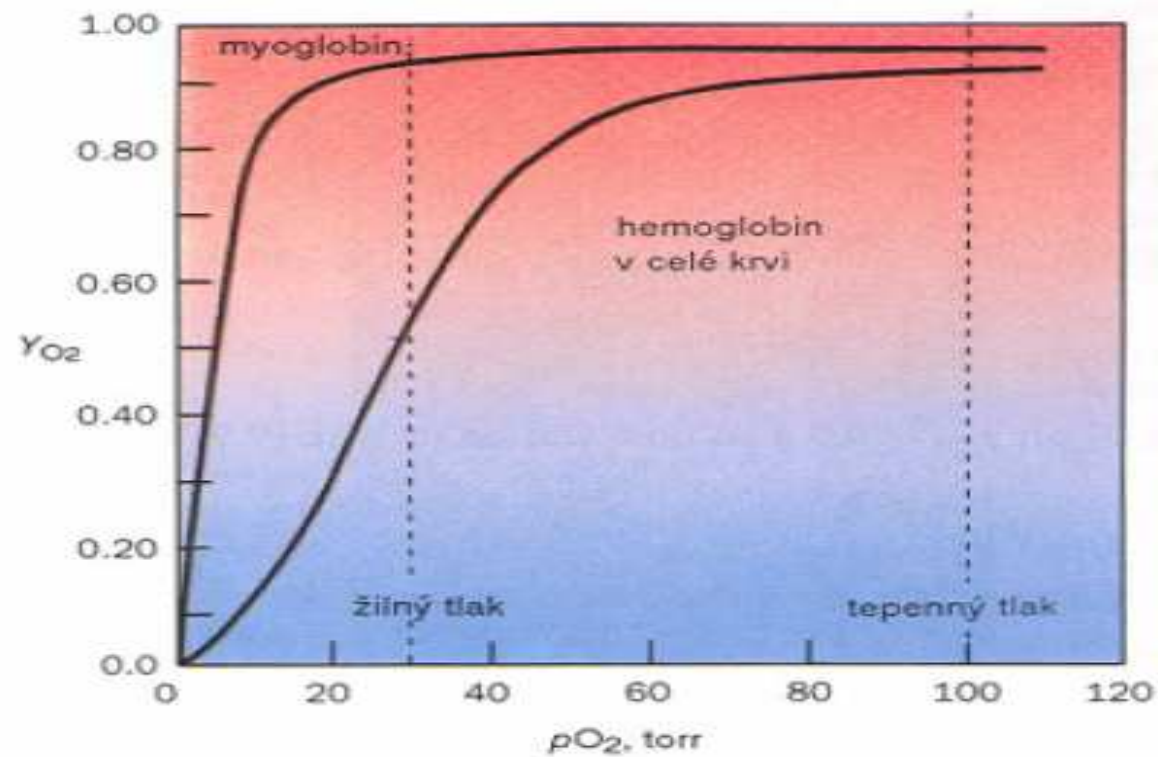
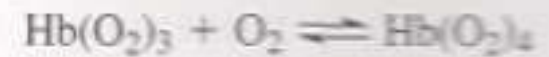
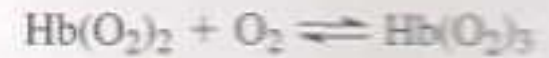
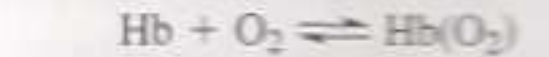
# Hemoglobin allosterie



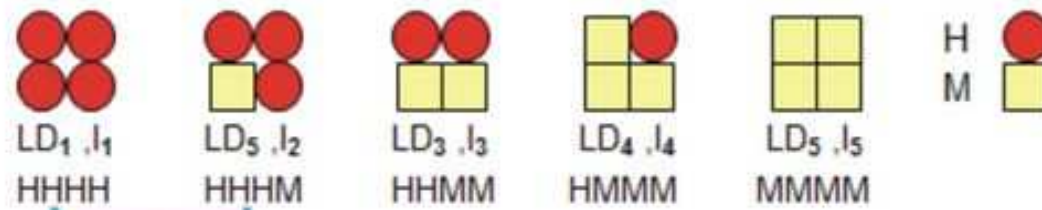
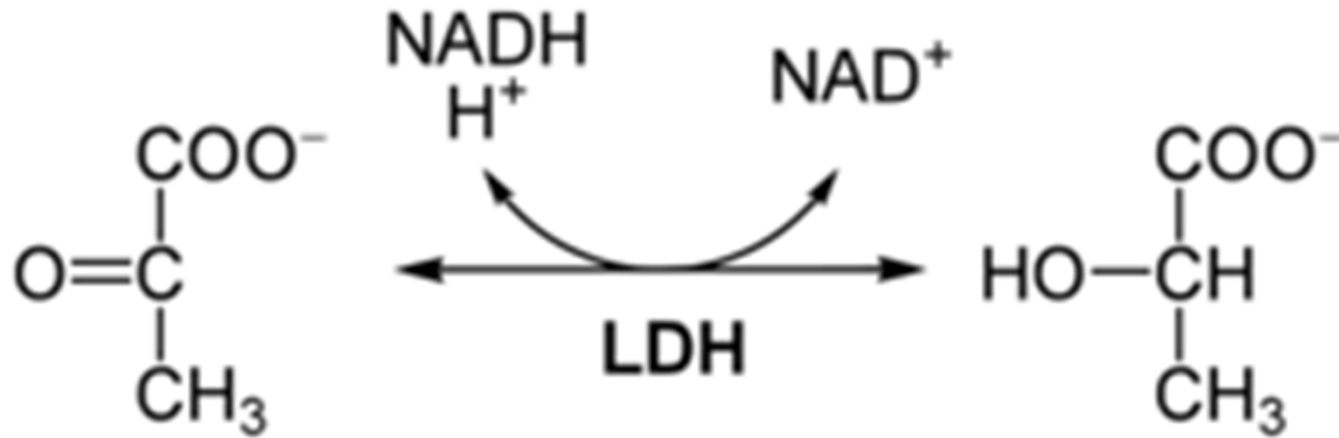
# Myoglobin



# Hb versus Mb



# Laktátdehydrogenáza



**Sátra**



# GLYKOLÝZA



glukosa

$2\text{ADP} + 2\text{P}_i$

$2\text{NAD}^+$

fruktosa-1,6-bisfosfát

$2\text{ATP}$

$2\text{NADH}$

2 pyruvát

anaerobní mléčné kvašení

aerobní oxidace

anaerobní alkoholové kvašení

CITRÁTOVÝ CYKLUS

$2\text{NADH}$

$2\text{NADH}$

$6\text{O}_2$

$2\text{NADH}$

$2\text{NAD}^+$

$2\text{NAD}^+$

$2\text{NAD}^+$

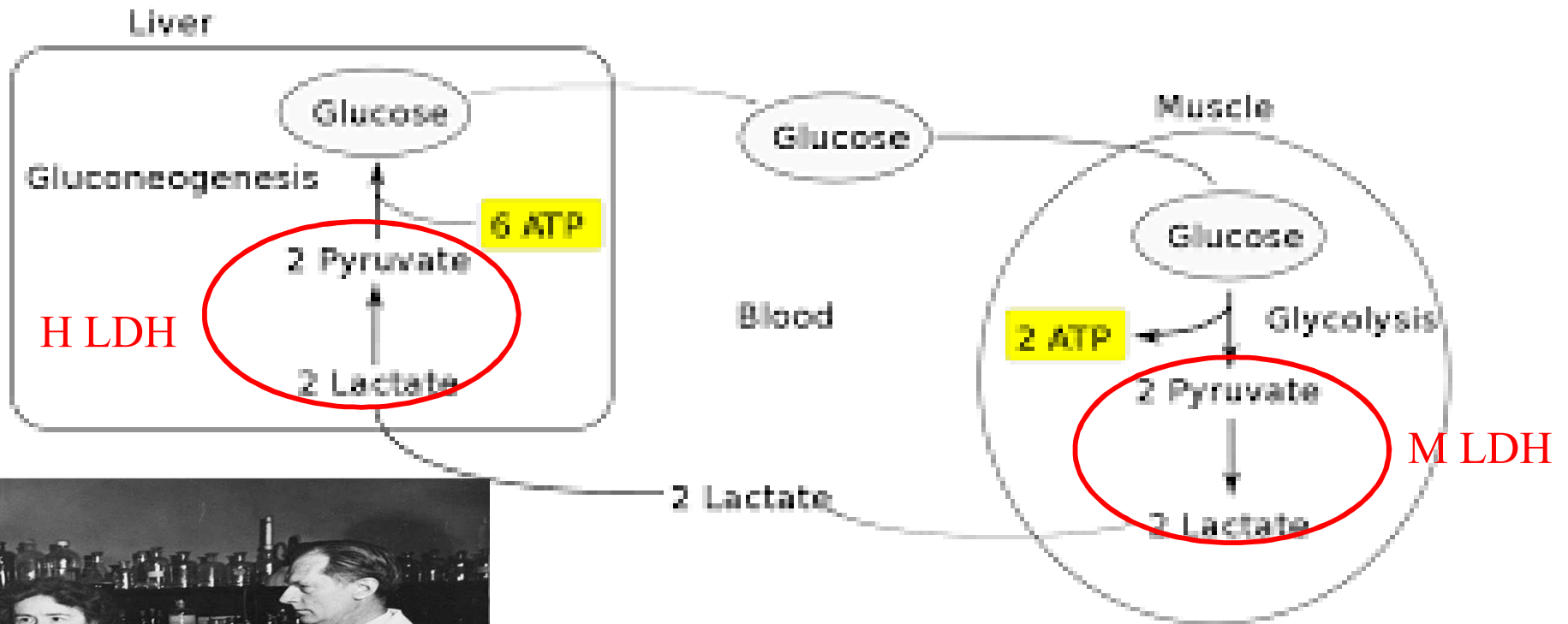
2 laktát

$6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$

$2\text{CO}_2 + 2\text{ethanol}$

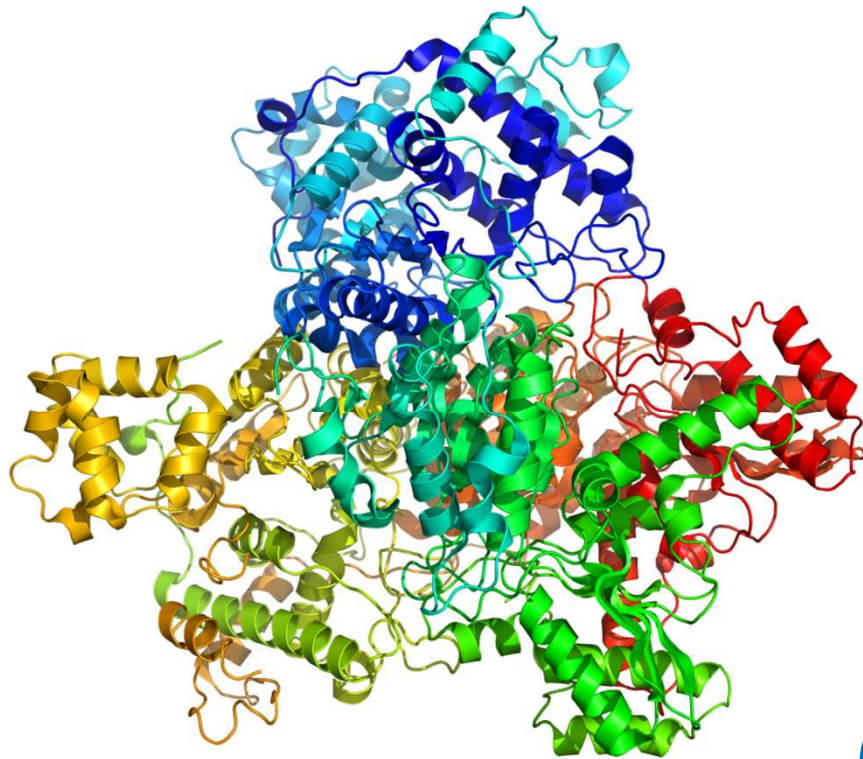
oxidační fosforylace

# Corriho cyklus

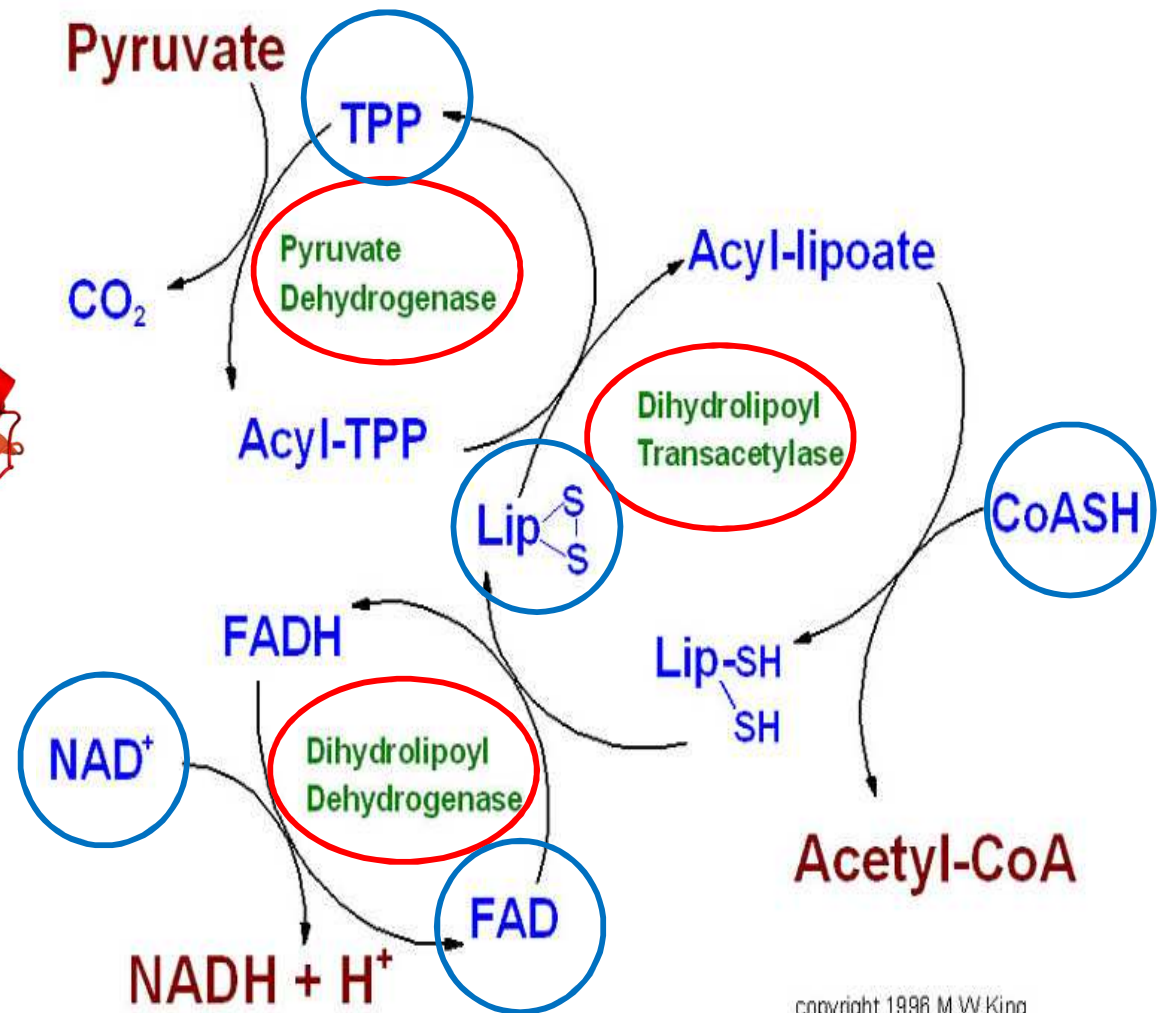




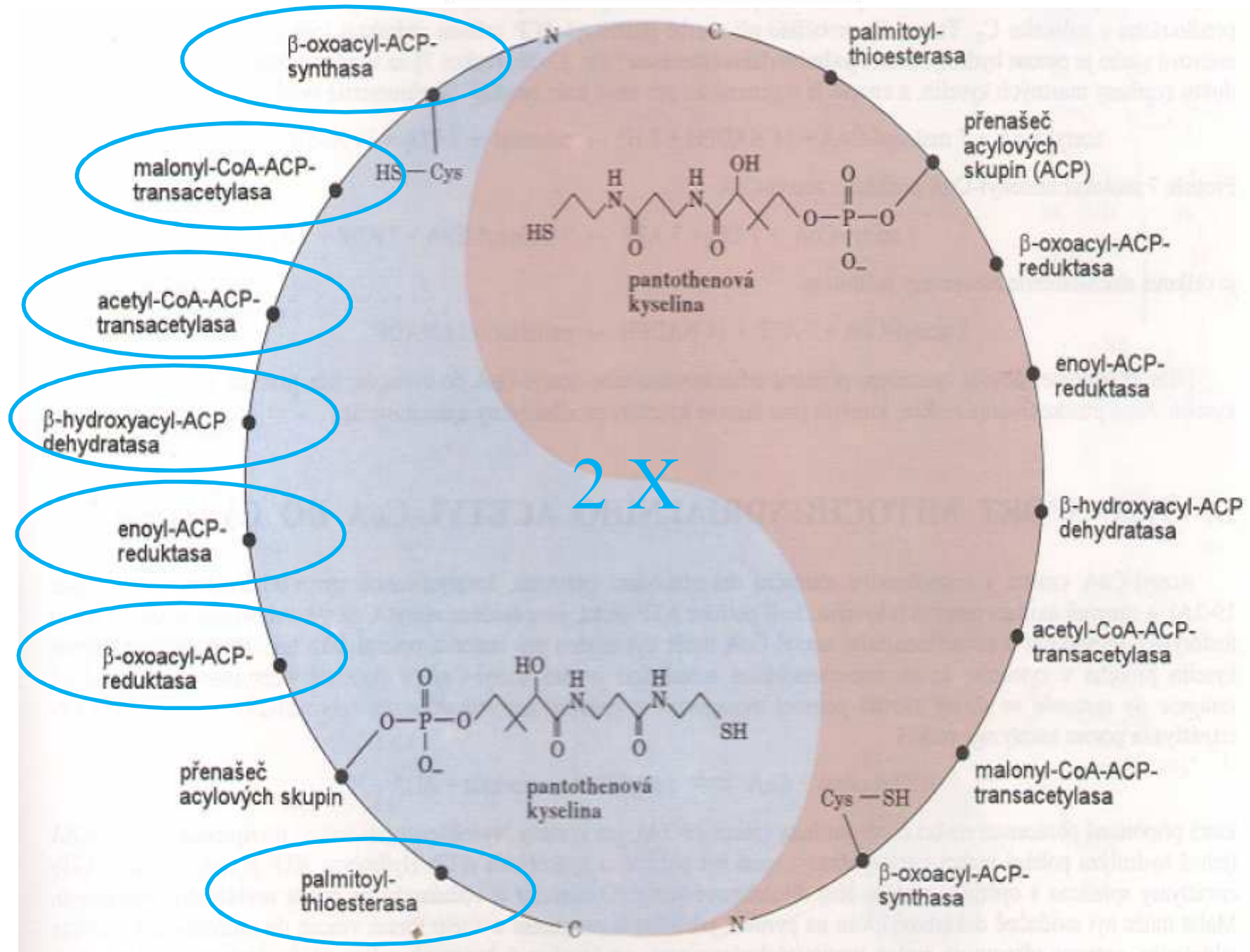
# Pyruvátdehydrogenáza



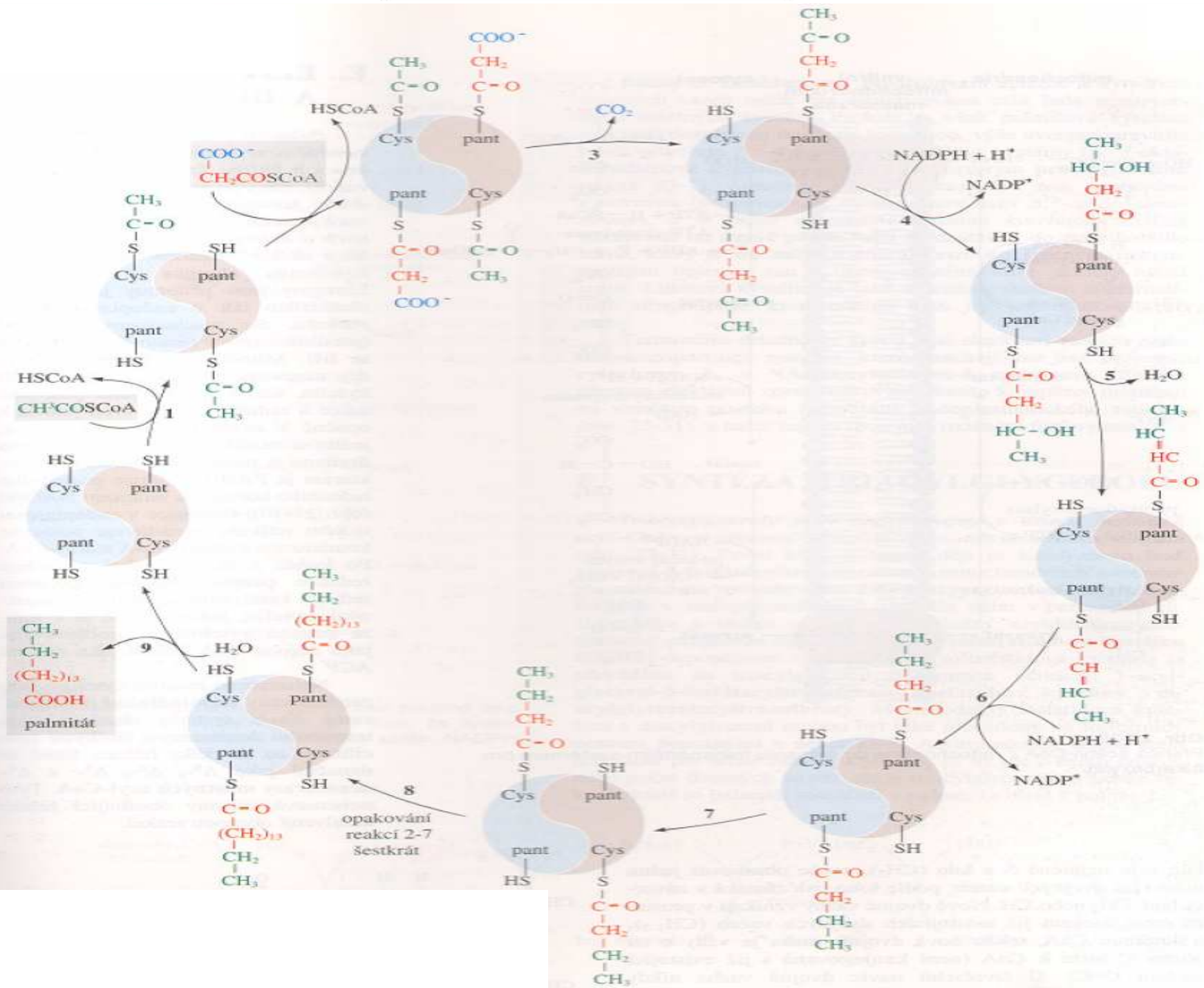
- 3 enzymy
- 5 kofaktorů



## Synthasa mastných kyselin



# Synthasa mastných kyselin



## Kvarterní struktura

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

Stanovení podjednotkového složení - SDS PAGE

## **Studium konformace bílkovin**

RTG difrakce - studium krystalů - BRAGG 1913

NMR - dvoj- a trojrozměrné - studium roztoků - posledních 15.let

# Rtg difrakce

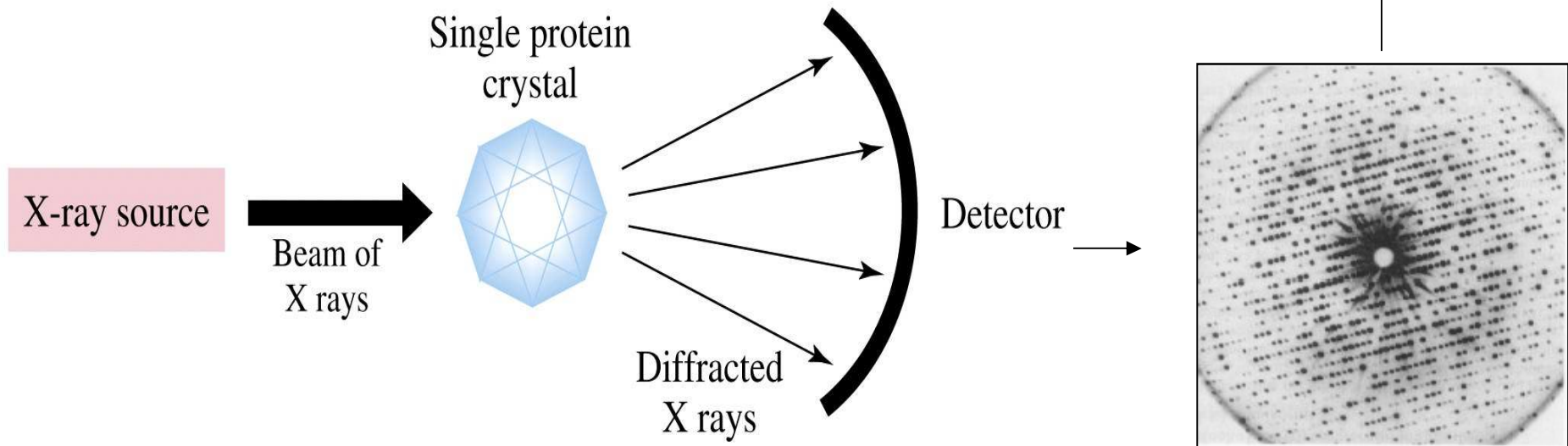
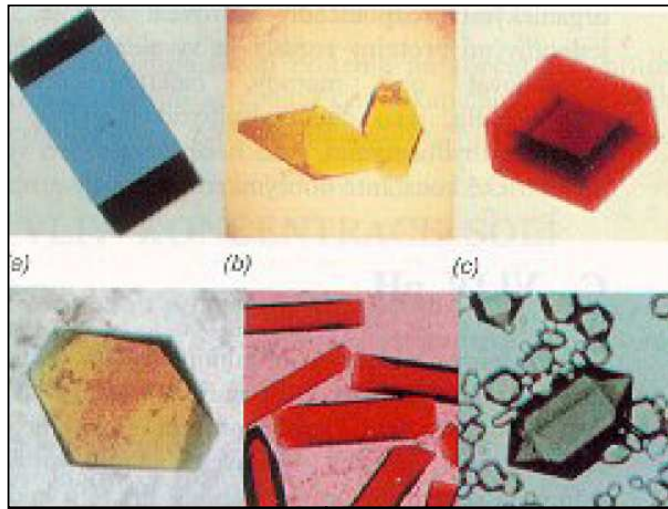
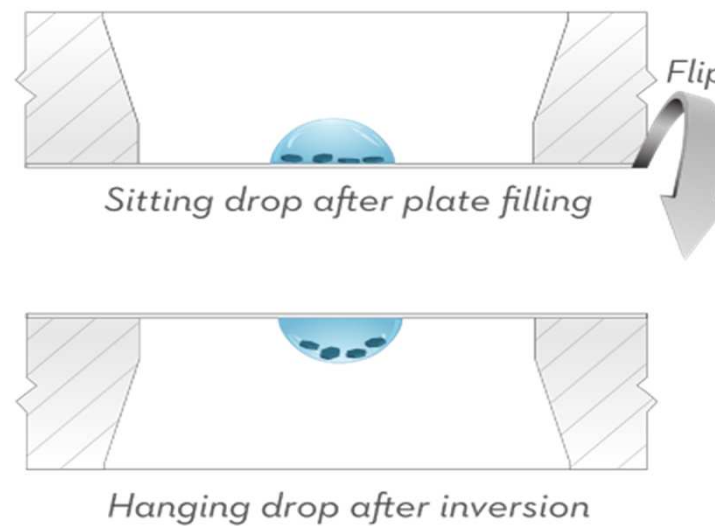
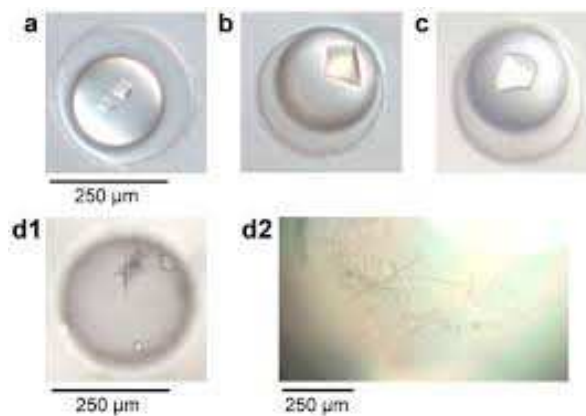
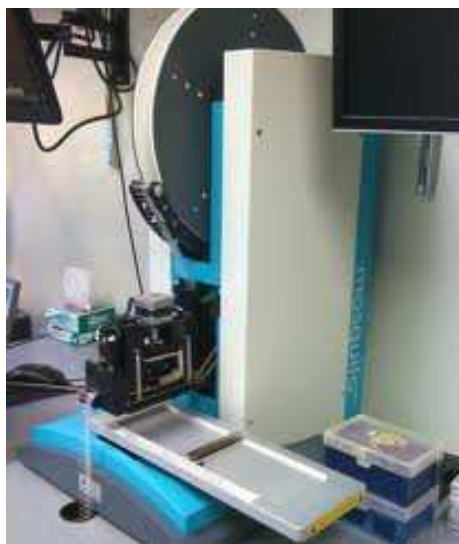
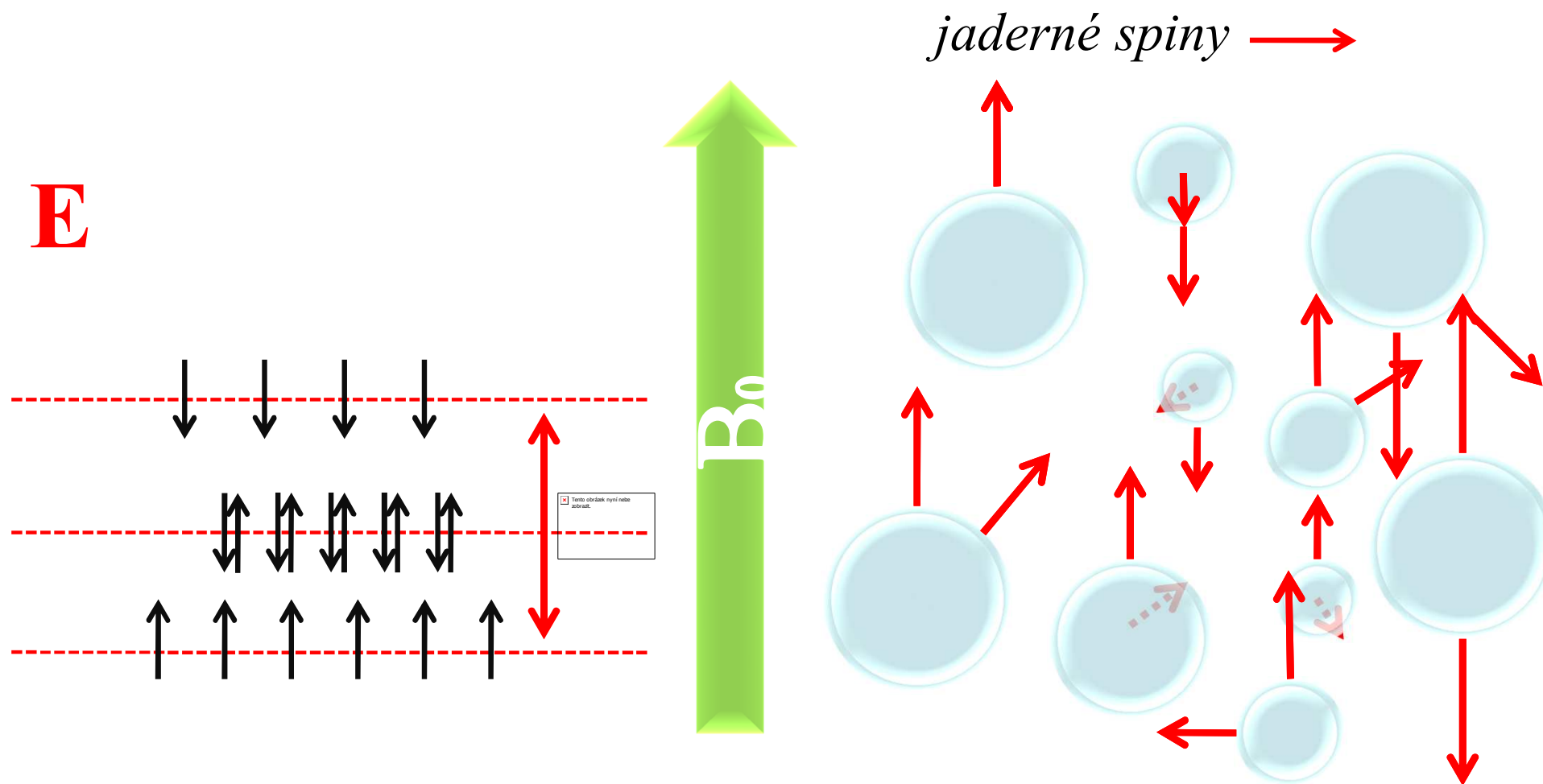


Figure 4-15 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

# Rtg difrakce

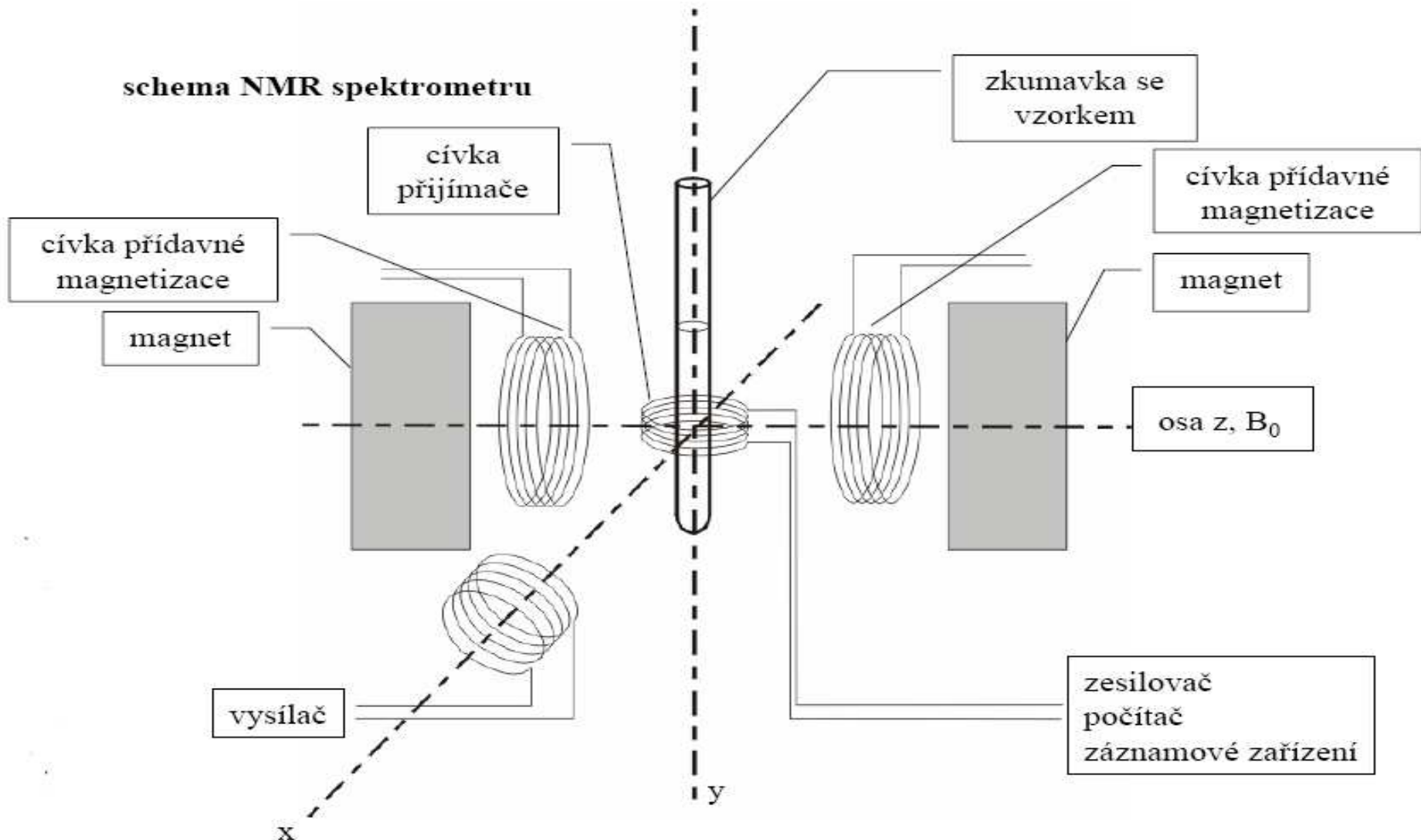


# NMR podstata – $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{31}\text{P}$

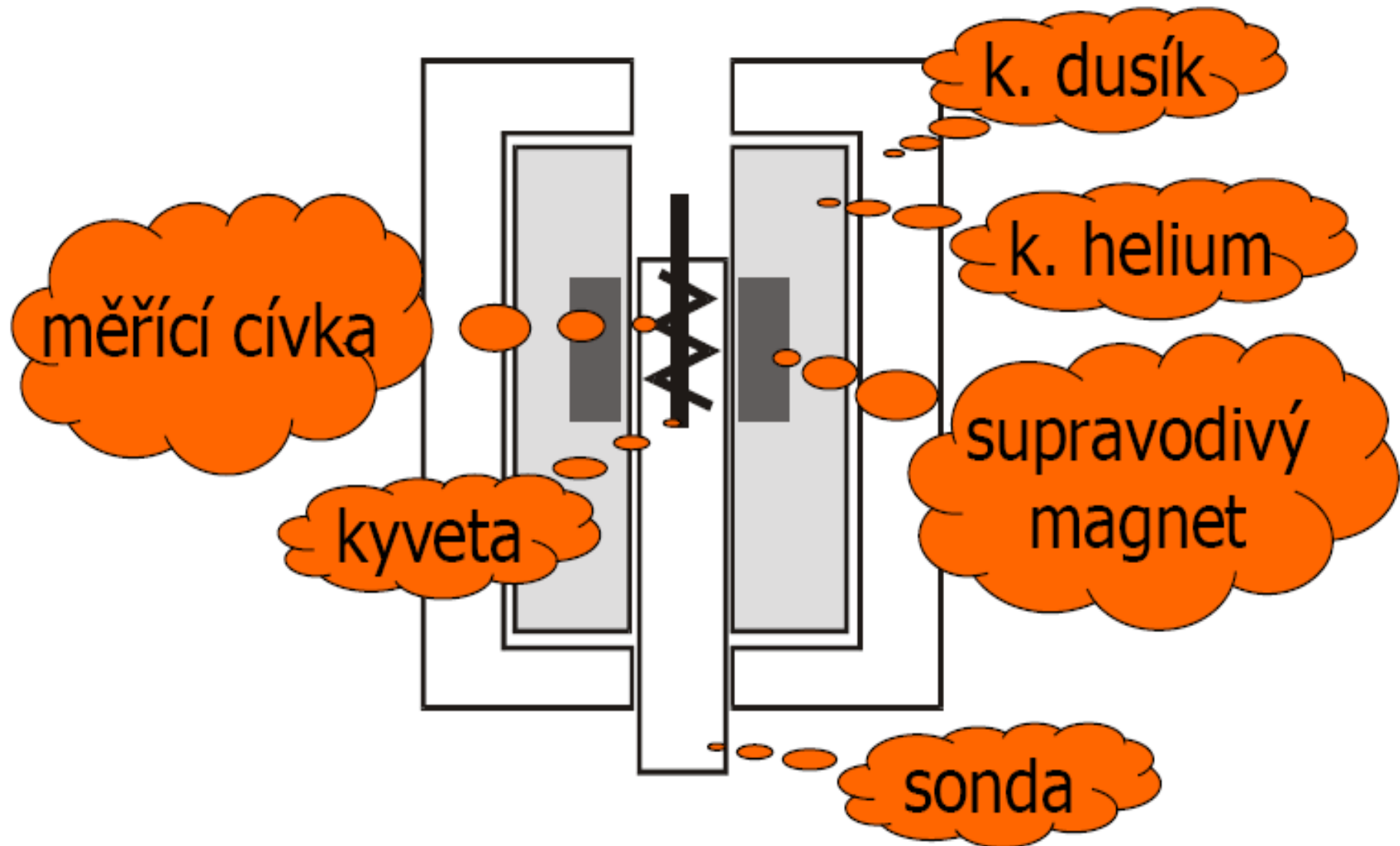




# NMR



# Blokové schéma



# NMR

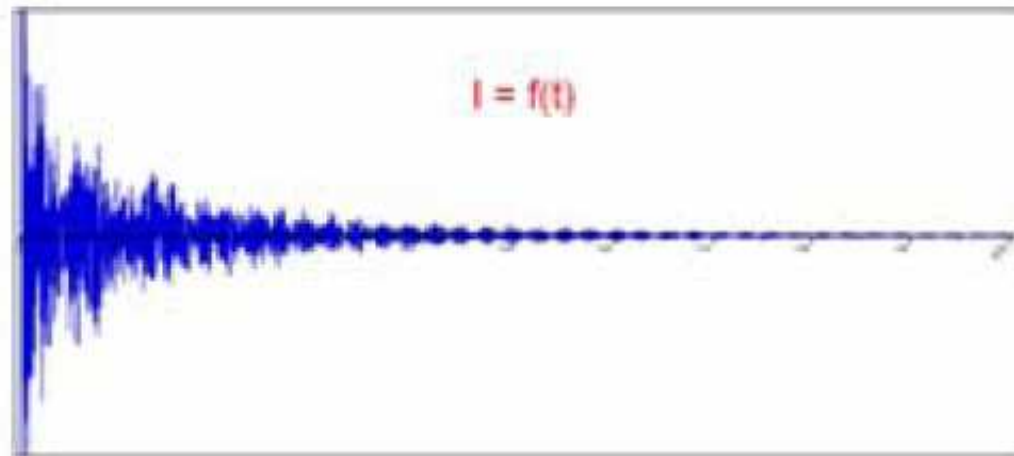
počítač

elektronika

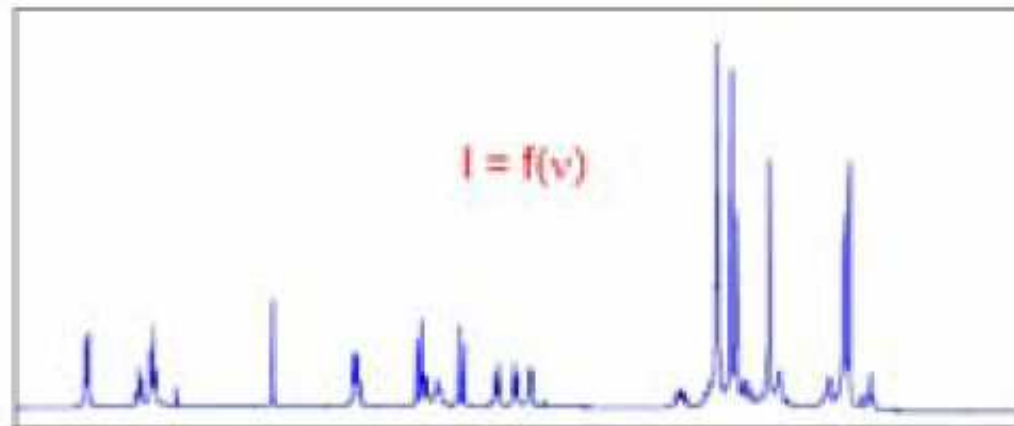
supra-  
vodivý  
magnet



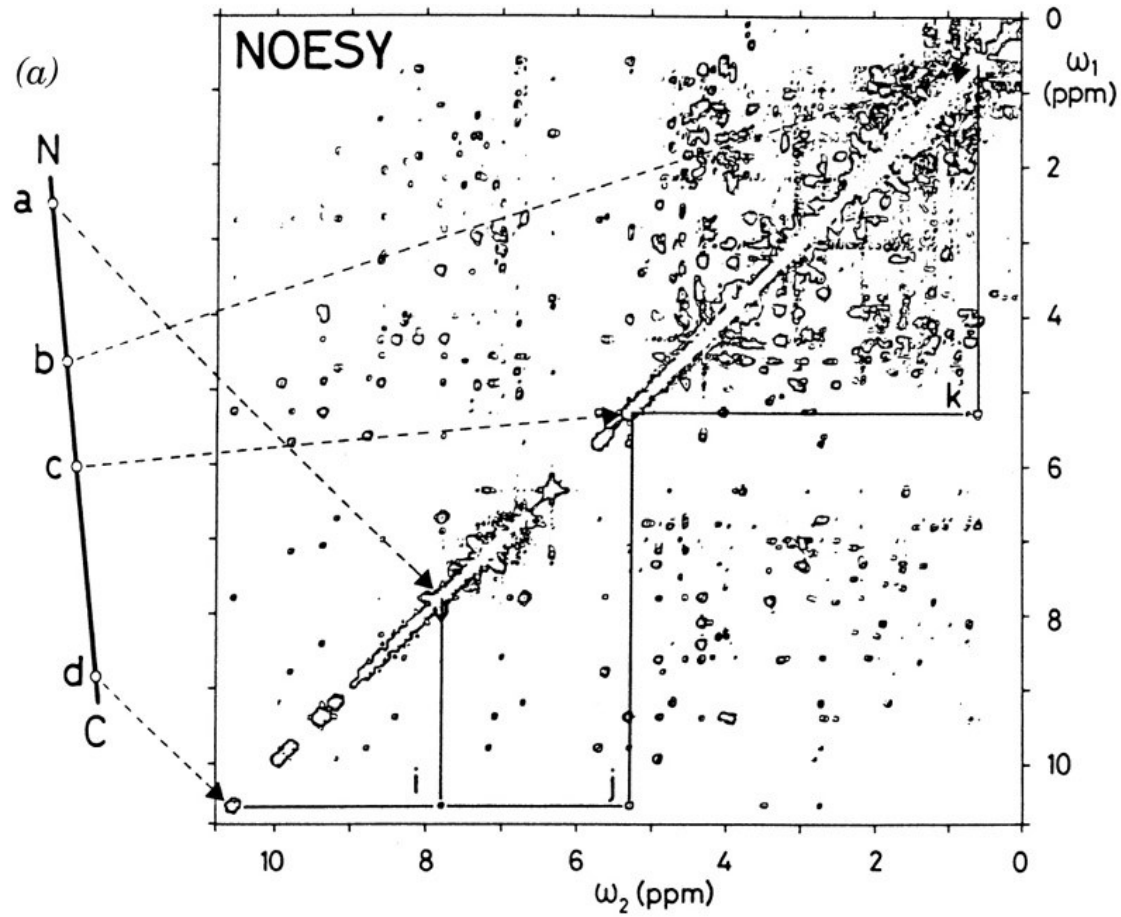
# NMR spektrum



Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:

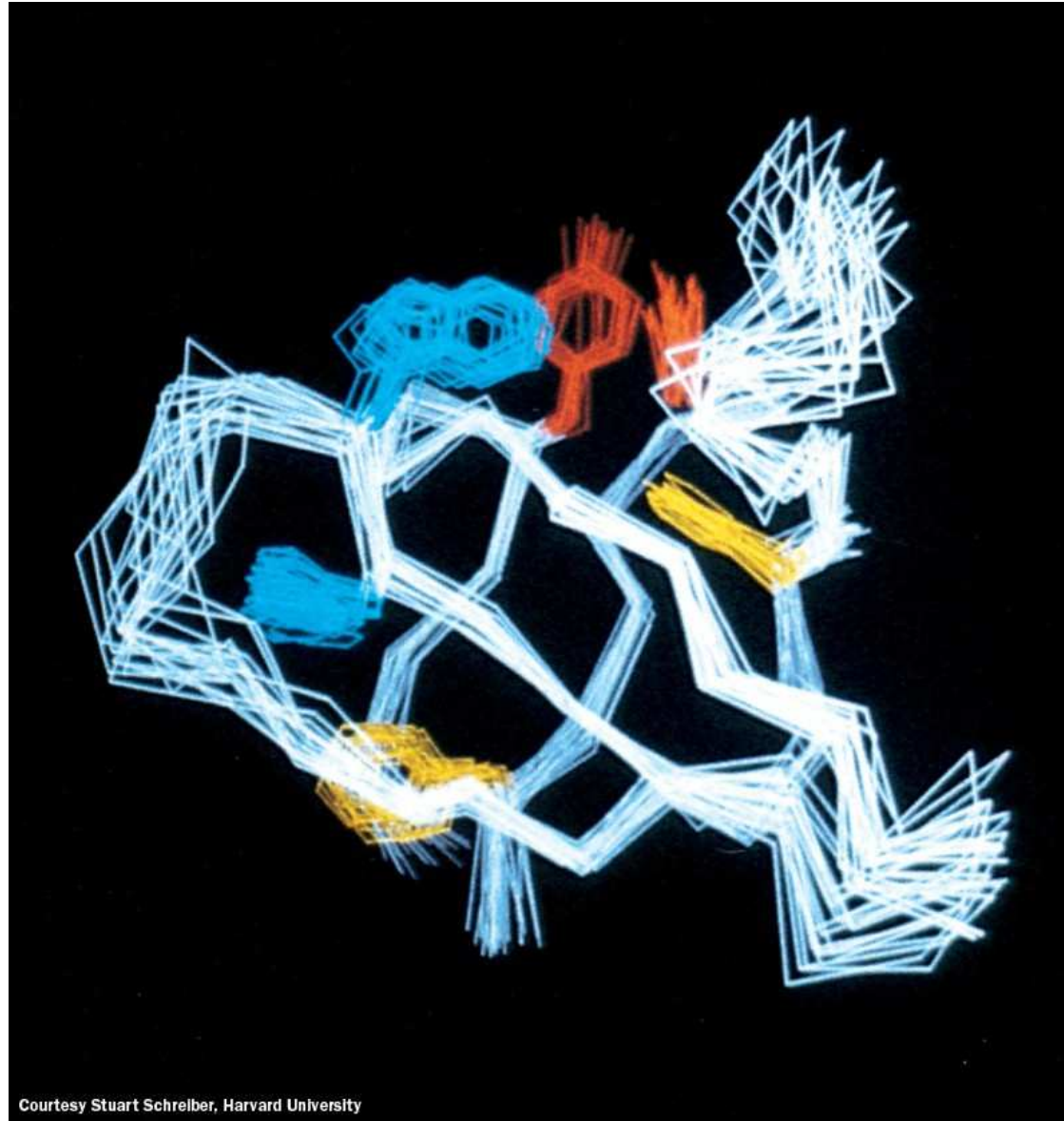


# NMR spektrum



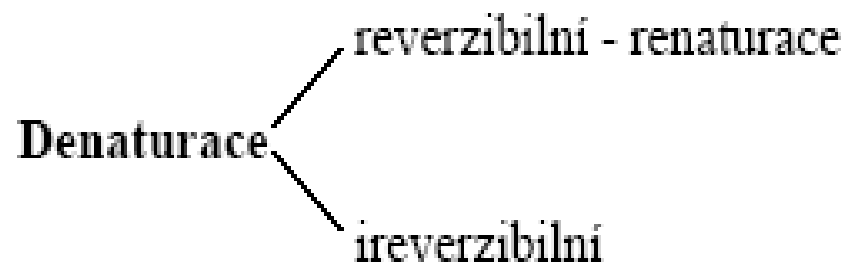
After Wuthrich, K. *Science* **243**, 45 (1983)

# NMR



## Stabilita konformace

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



# Denaturace - renaturace

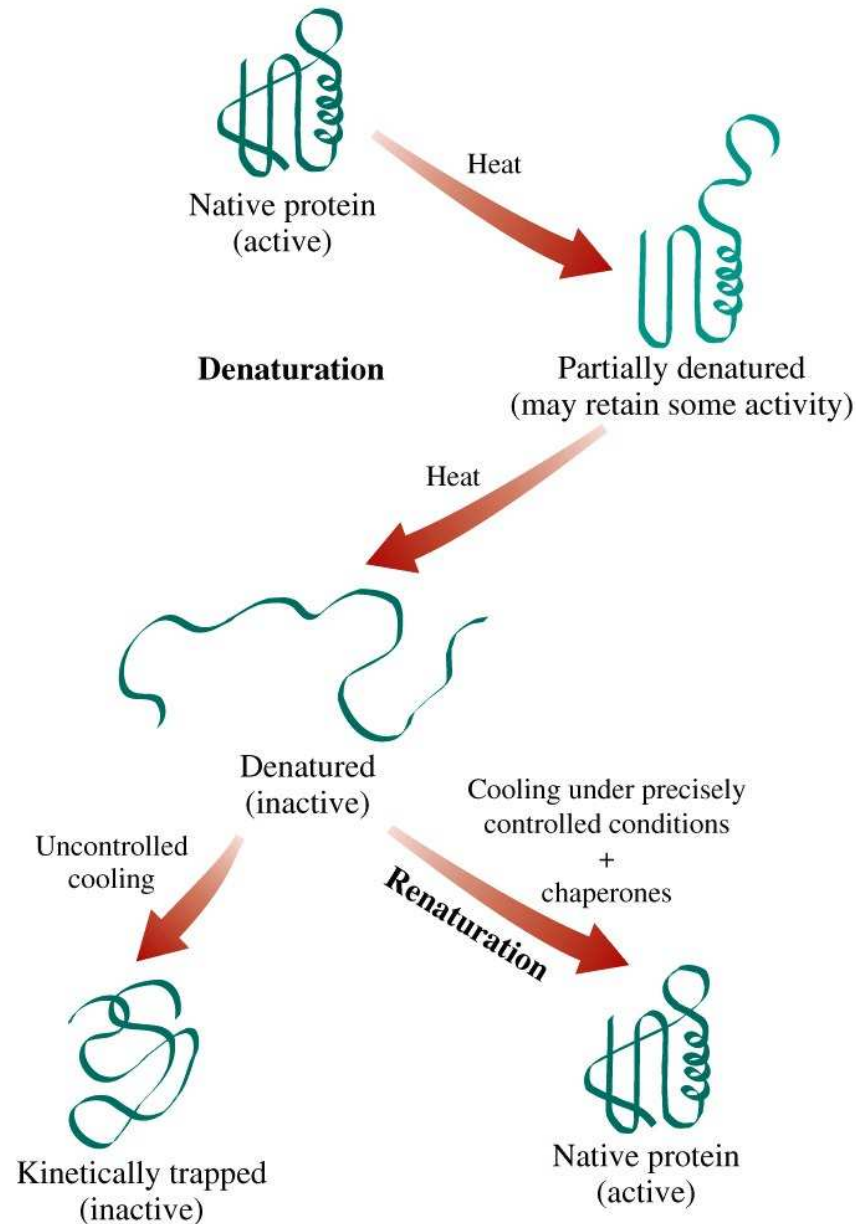
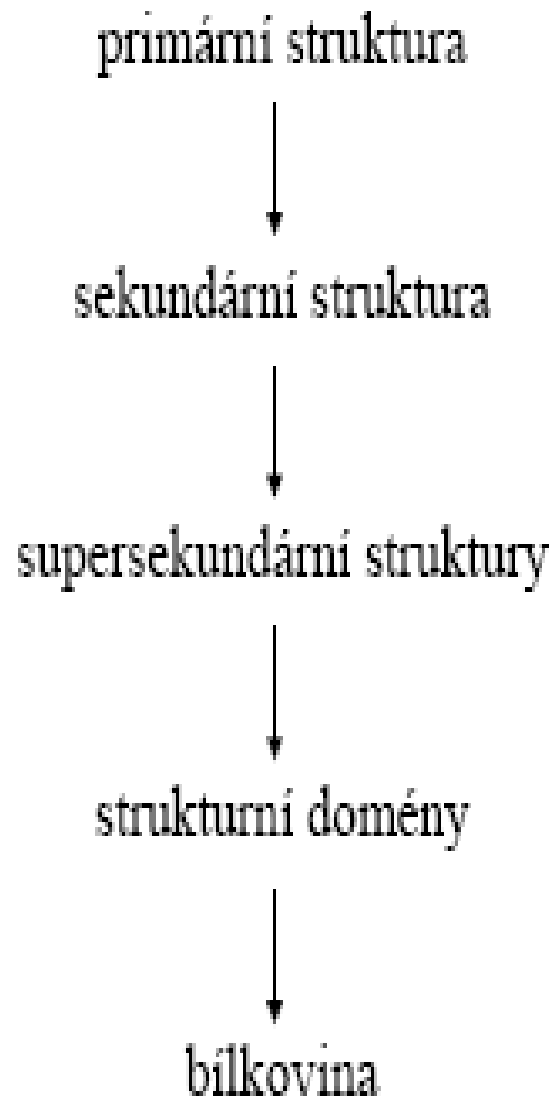


Figure 4-14 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons



## Vznik prostorové struktury - skládání, svinutí - „FOLDING“



# Skládání – folding bílkovin

- Bílkoviny se za fyziologických podmínek skládají do svých nativních konformací spontánně – informace musí být v primární struktuře

# Levinthal Paradox

(Cyrus Levinthal)

- We assume that there are three conformations for each amino acid(ex.  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random coil). If a protein is made up of 100 amino acid residues, a total number of conformations is :

$$3^{100} = 515377520732011331036461129765621272702107522001 \\ \approx 5 \times 10^{47}.$$

- If 100 psec( $10^{-10}$ sec) were required to convert from a conformation to another one, a random search of all conformations would require

$$5 \times 10^{47} \times 10^{-10} \text{ sec} \approx 1.6 \times 10^{30} \text{ years}.$$

- However, **folding of proteins takes place in msec to sec order.** Therefore, proteins fold not via a random search but a more sophisticated search process.

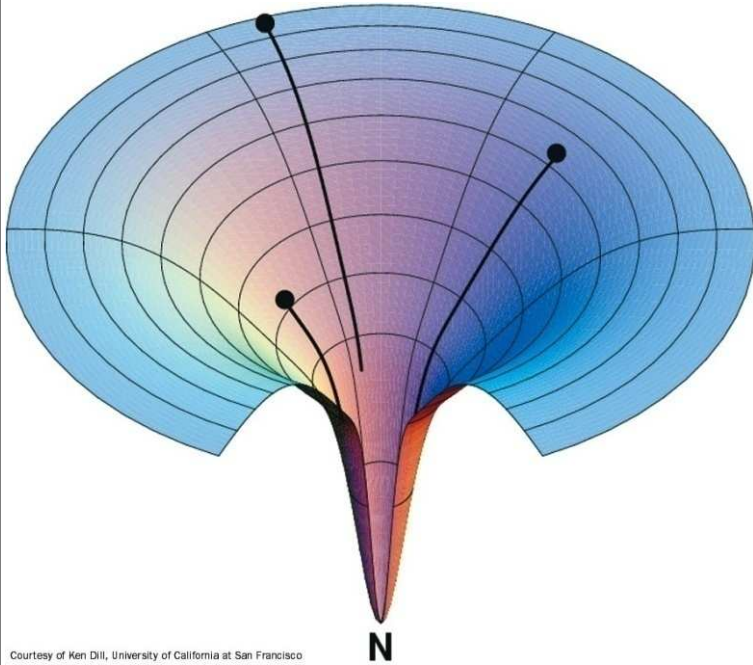
# Skládání – folding bílkovin

- Bílkoviny se za fyziologických podmínek skládají do svých nativních konformací spontánně – informace musí být v primární struktuře
- Nativní konformace odpovídá minimu Gibsovy energie

Ideální

# Landscape theory

Hledání

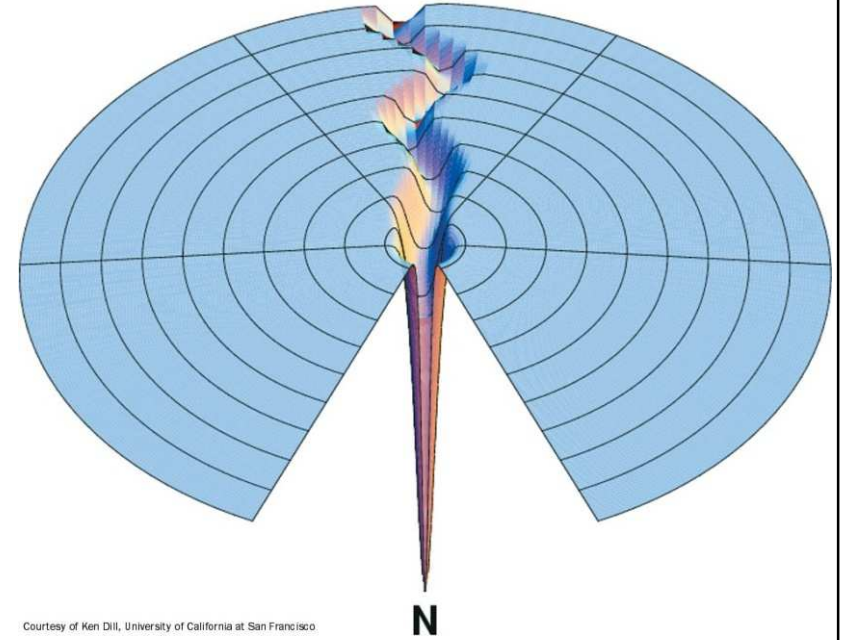


Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco

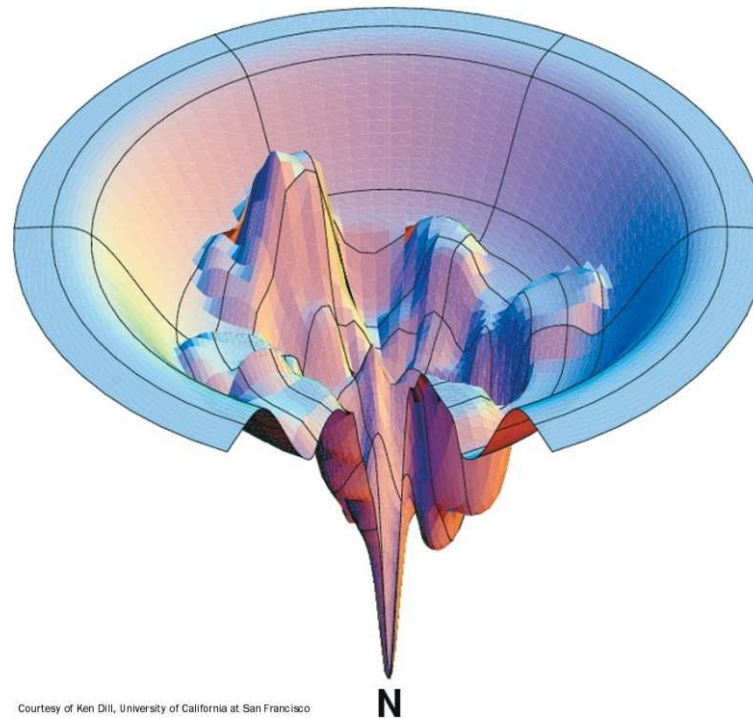


Peter Wolynes

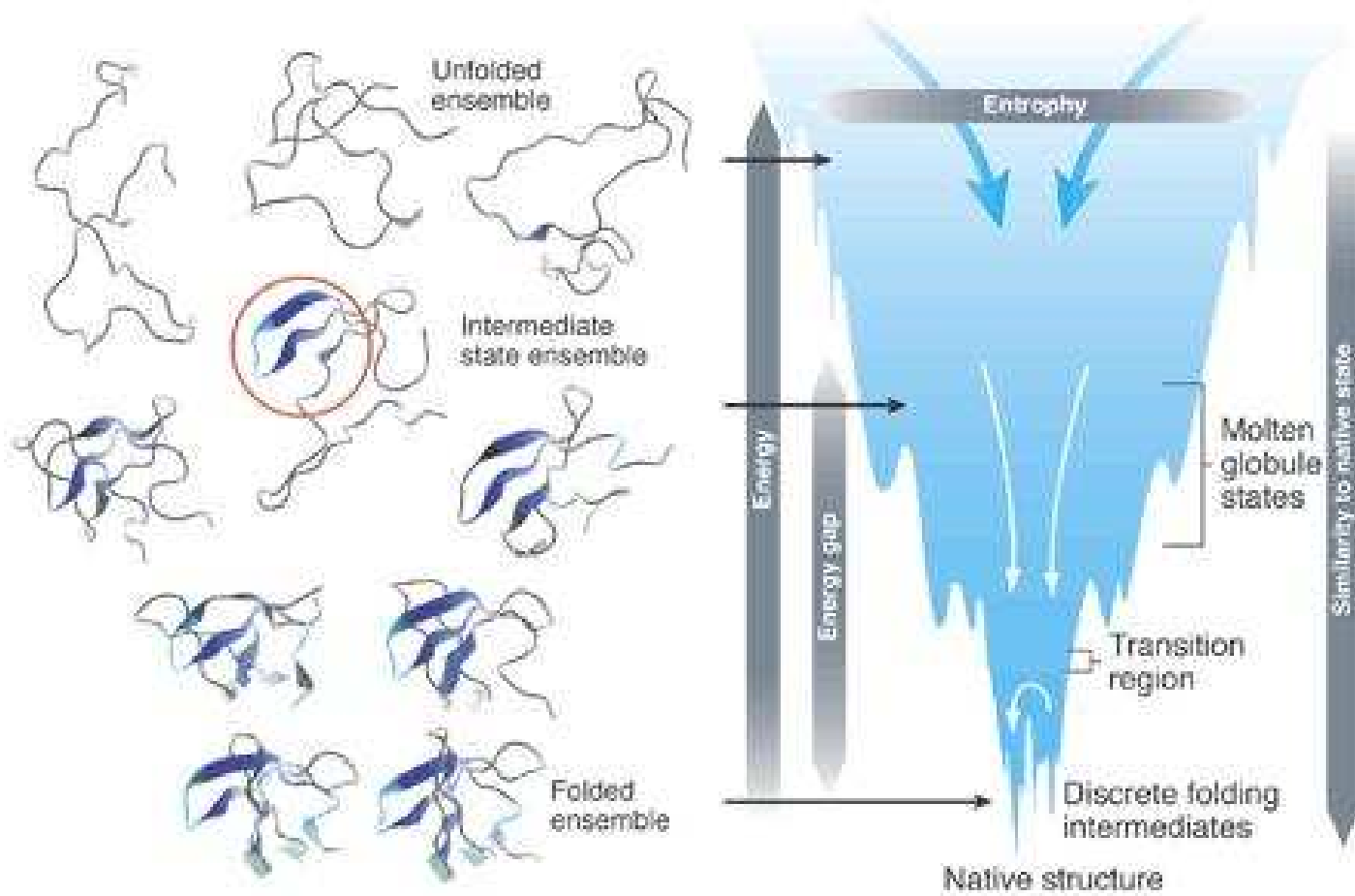
Přes intermediáty

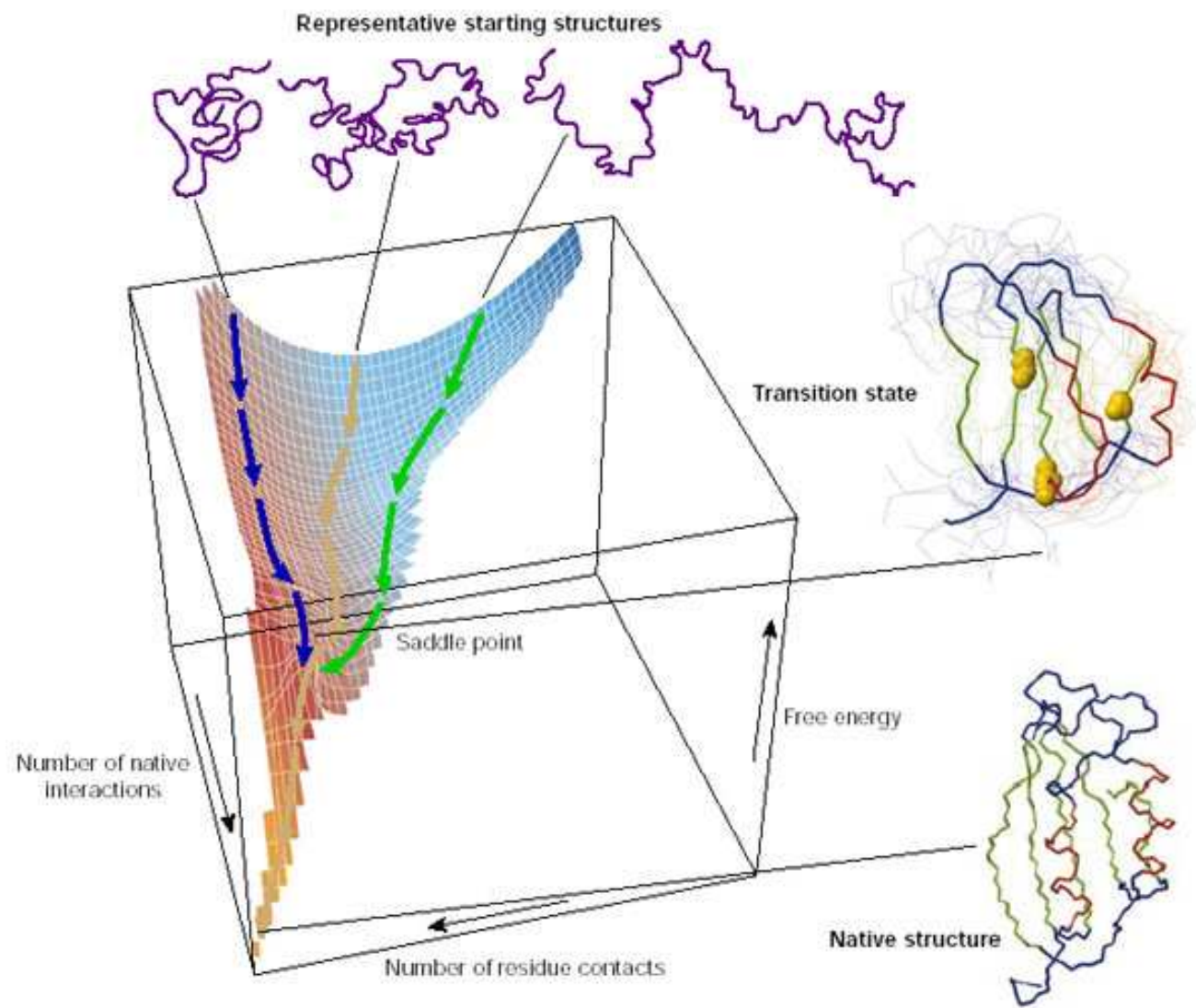
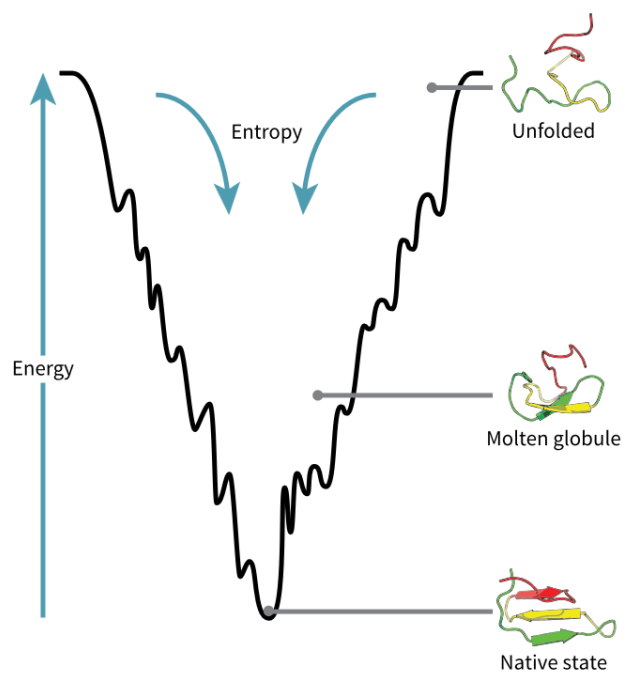


Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



Courtesy of Ken Dill, University of California at San Francisco



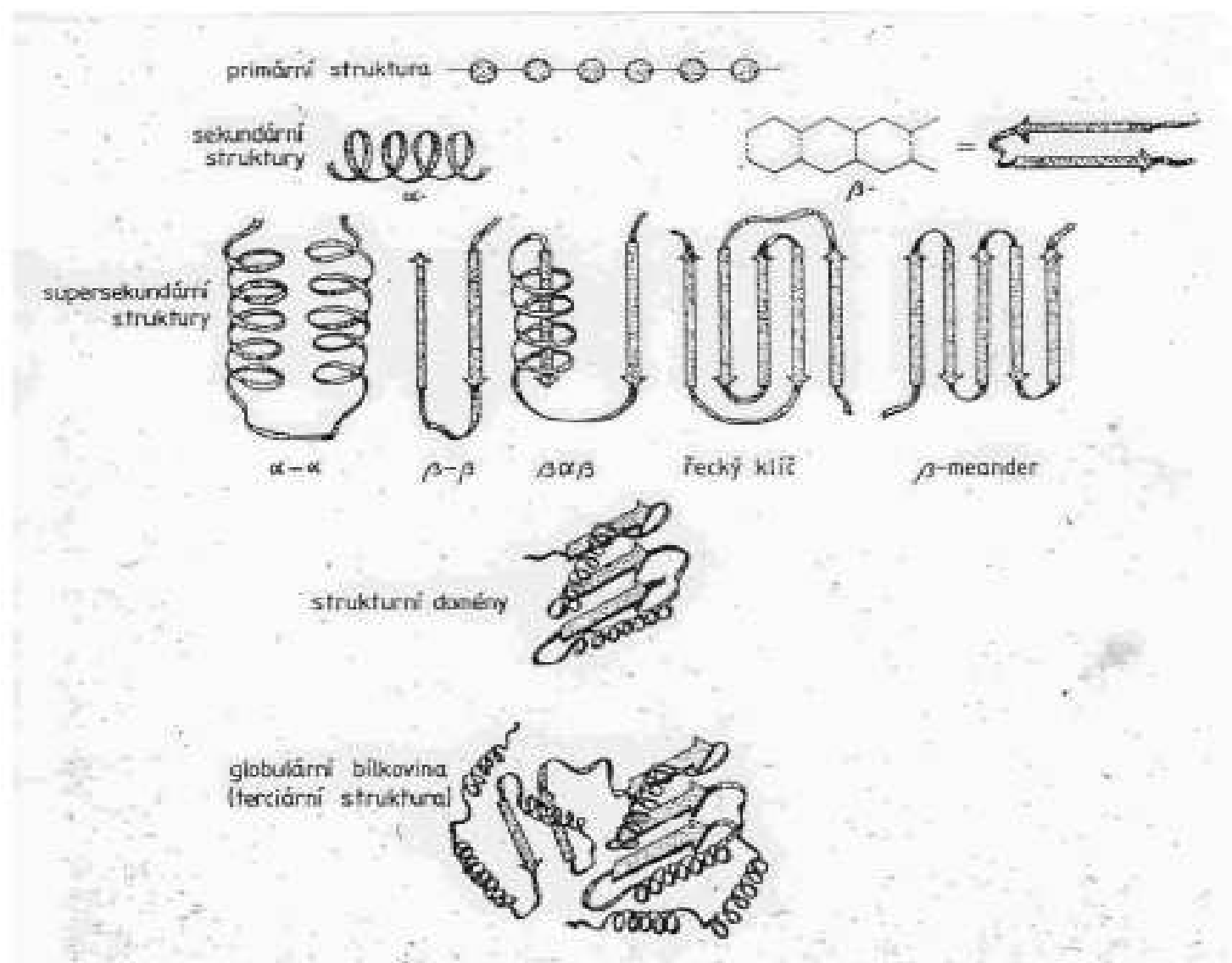


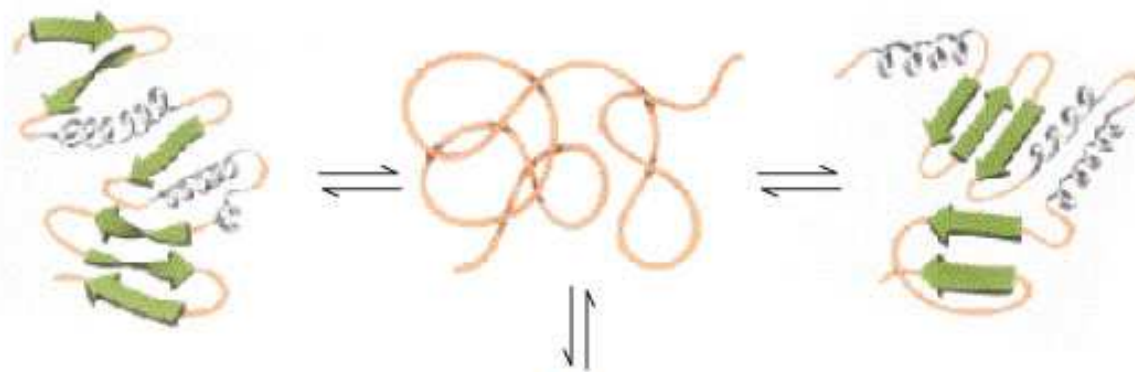
# Skládání – folding bílkovin

- Neprobíhá náhodným způsobem
- Probíhá postupně:
  - a. malé dočasné periodické struktury
  - b. supersekundární struktury
  - c. strukturní domény a "roztavená" globule
  - d. závěrečné úpravy za účasti enzymů

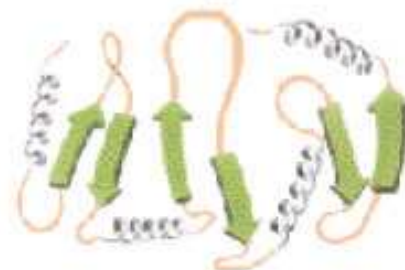


# POSTUP SKLÁDÁNÍ BÍLKOVIN

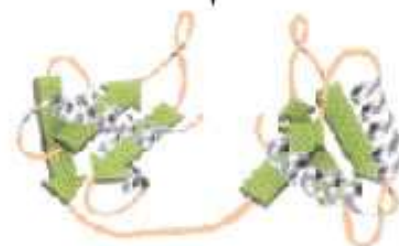




(1) The rapid and reversible formation of local secondary structures



(2) Formation of domains through the cooperative aggregation of folding nuclei



(3) "Molten globule" formation of the assembled domains

(4) An adjustment in the conformation of the domains



(5) Final protein monomer

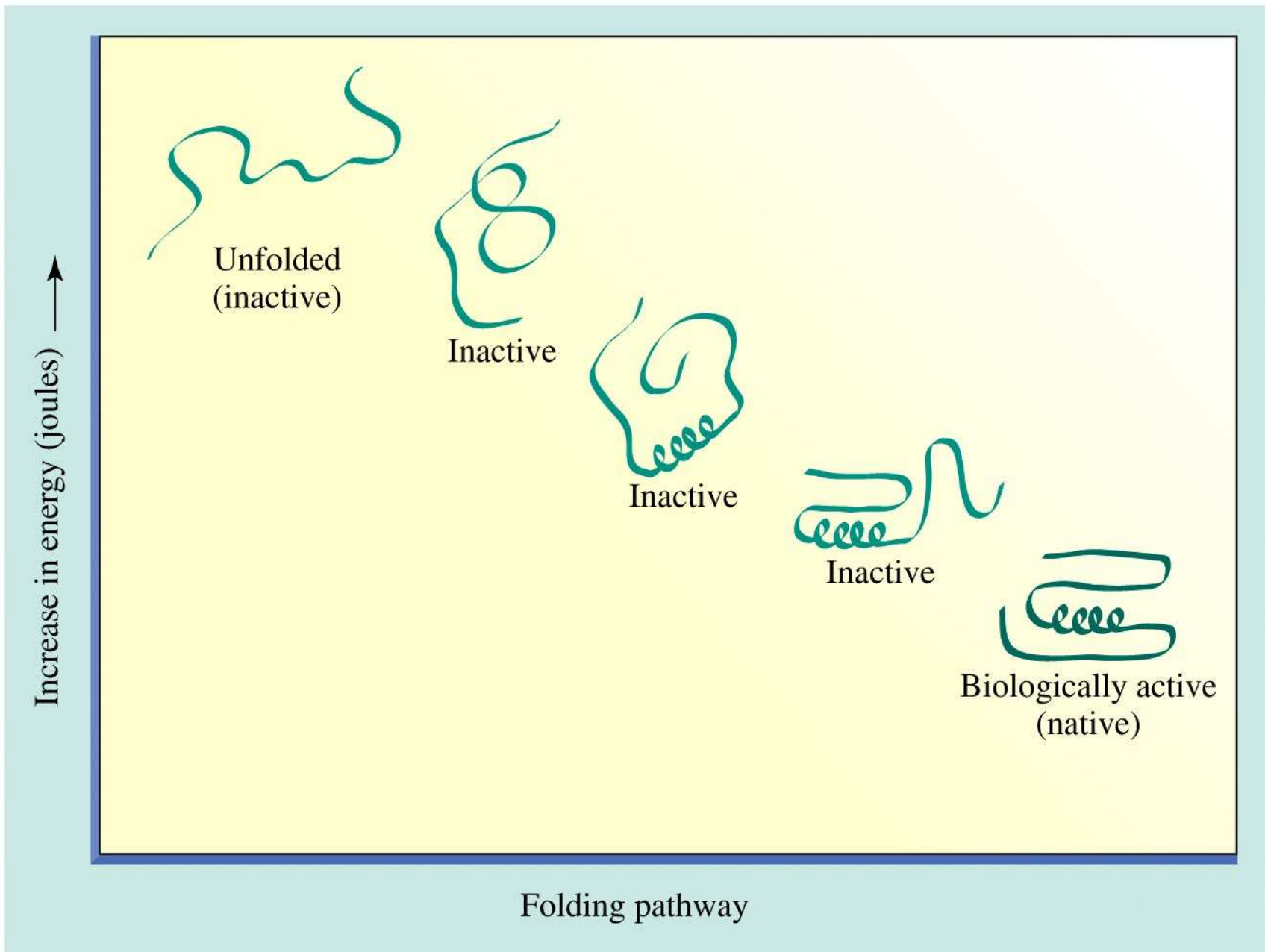


Figure 4-13 Concepts in Biochemistry, 3/e  
© 2006 John Wiley & Sons

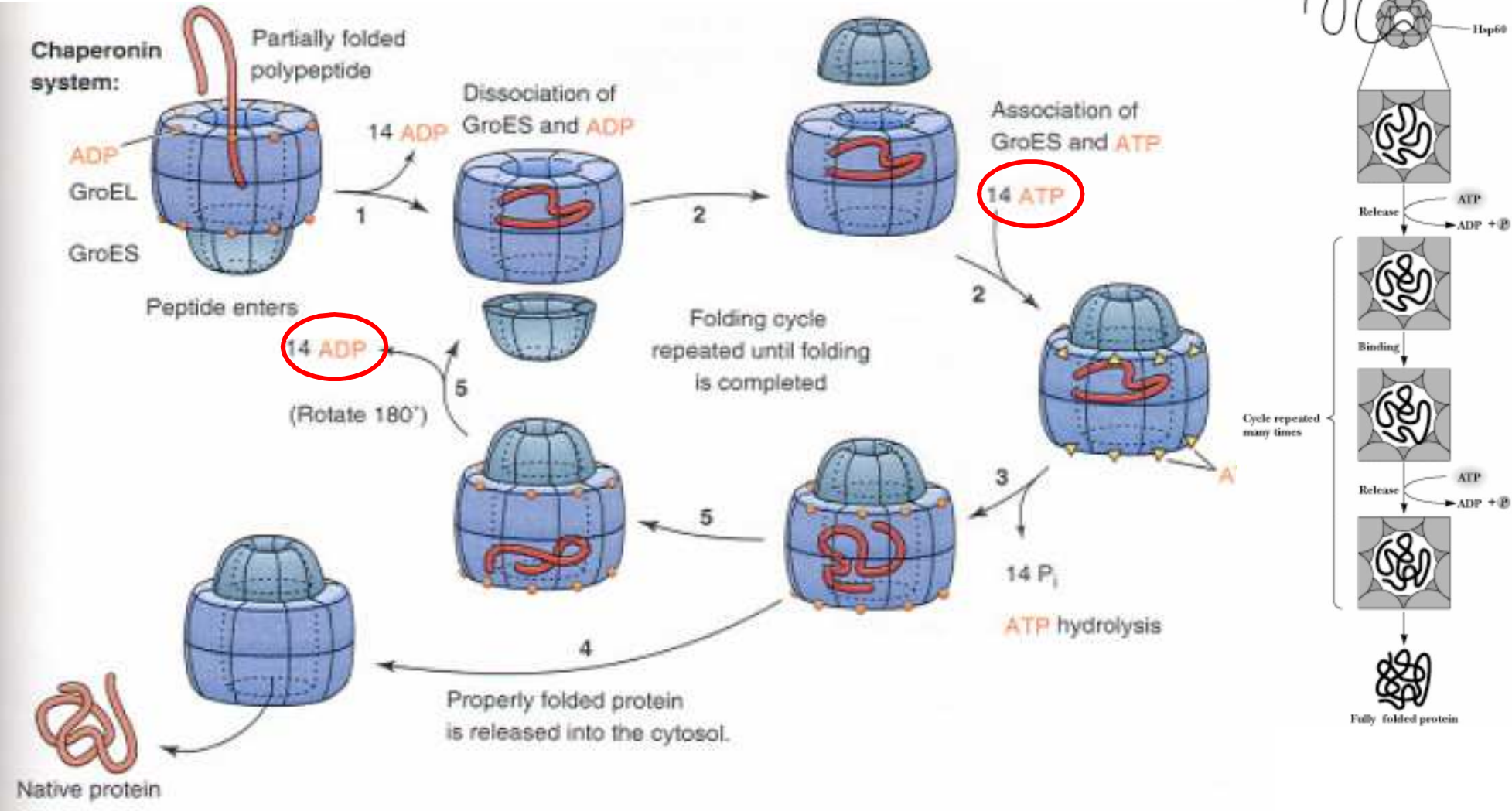
# Skládání – folding bílkovin

- Neprobíhá náhodným způsobem
- Probíhá postupně:
  - a. malé dočasné periodické struktury
  - b. supersekundární struktury
  - c. strukturní domény a "roztavená" globule
  - d. závěrečné úpravy za účasti enzymů
- Potřebují bílkoviny ke svinování pomocníky?

# Chaperony (Heat shock proteins)

- Proteiny jsou skládány do aktivní formy molekulárními chaperony a chaperoniny
- Chaperony *E. coli* Hsp70, rozpoznává nesložené hydrofobní části peptidového řetězce
- Váže se na tyto části a ochraňuje je dokud nedojde ke správnému složení
- GroES-GroEL komplex – hlavní chaperonin u *E. coli* - GroEL 2 kruhy, každý 7 x 60 kDa podjednotek (Hsp60)
- Nesložený protein se váže dovnitř komplexu a jeho skládání je řízeno energií

# Chaperony

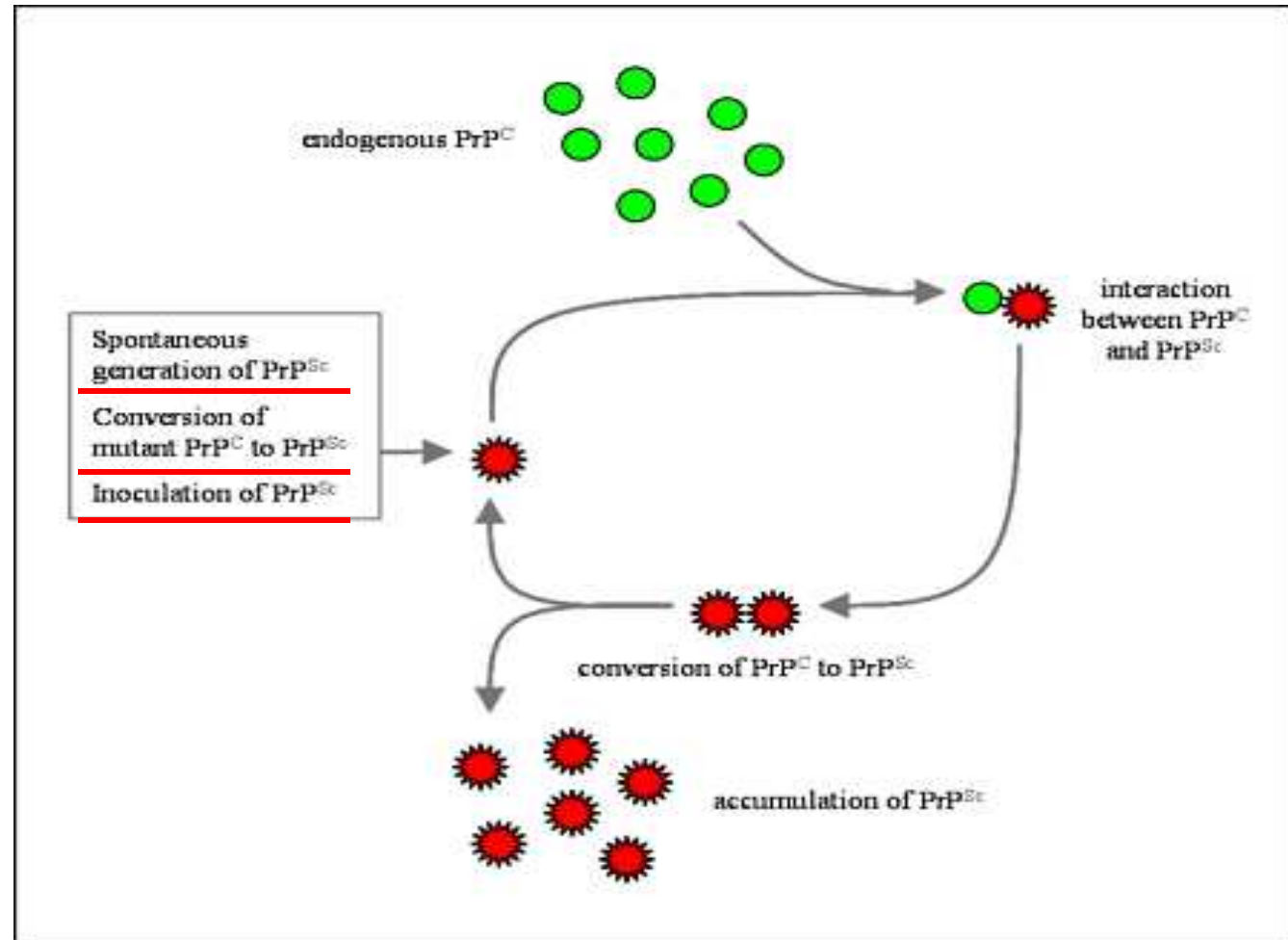
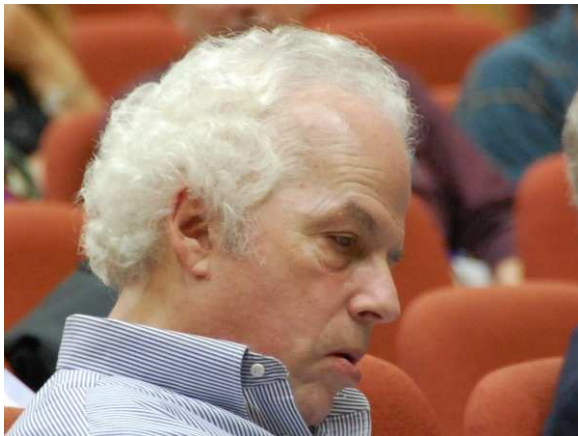


**ATPasa**

# Scrapie - BSE – CJD – Kuru

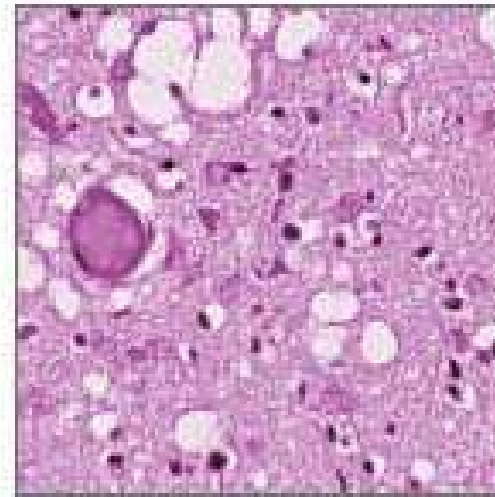
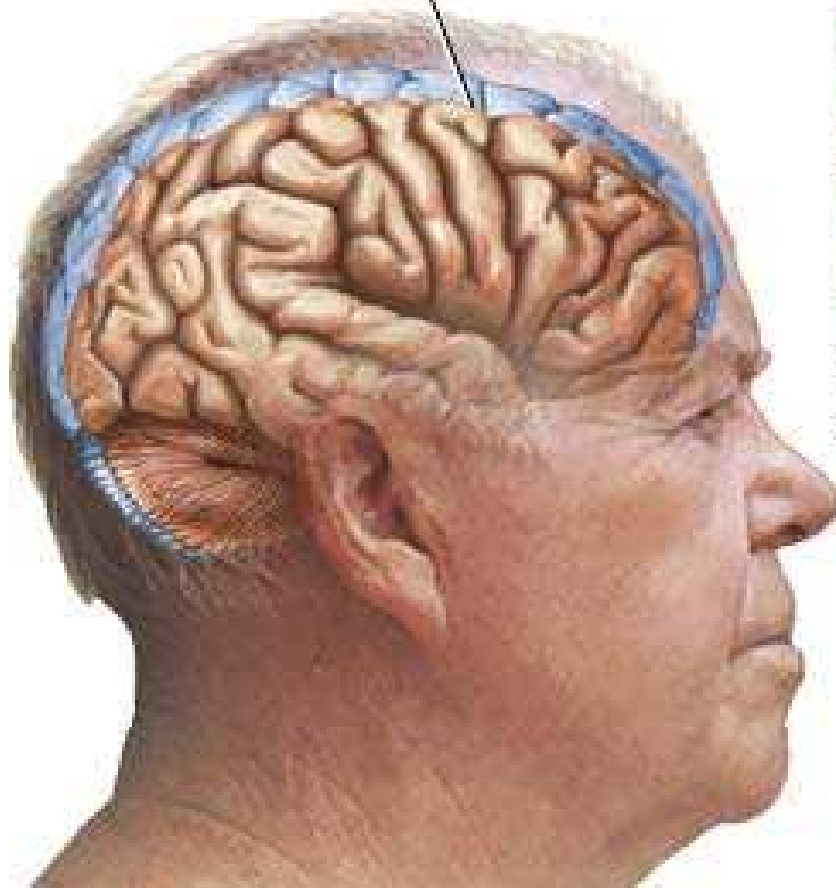
## Priony (Proteinaeous infectious particles)

Stanley B. Prusiner  
PT 1982 NC 1997



# CJD

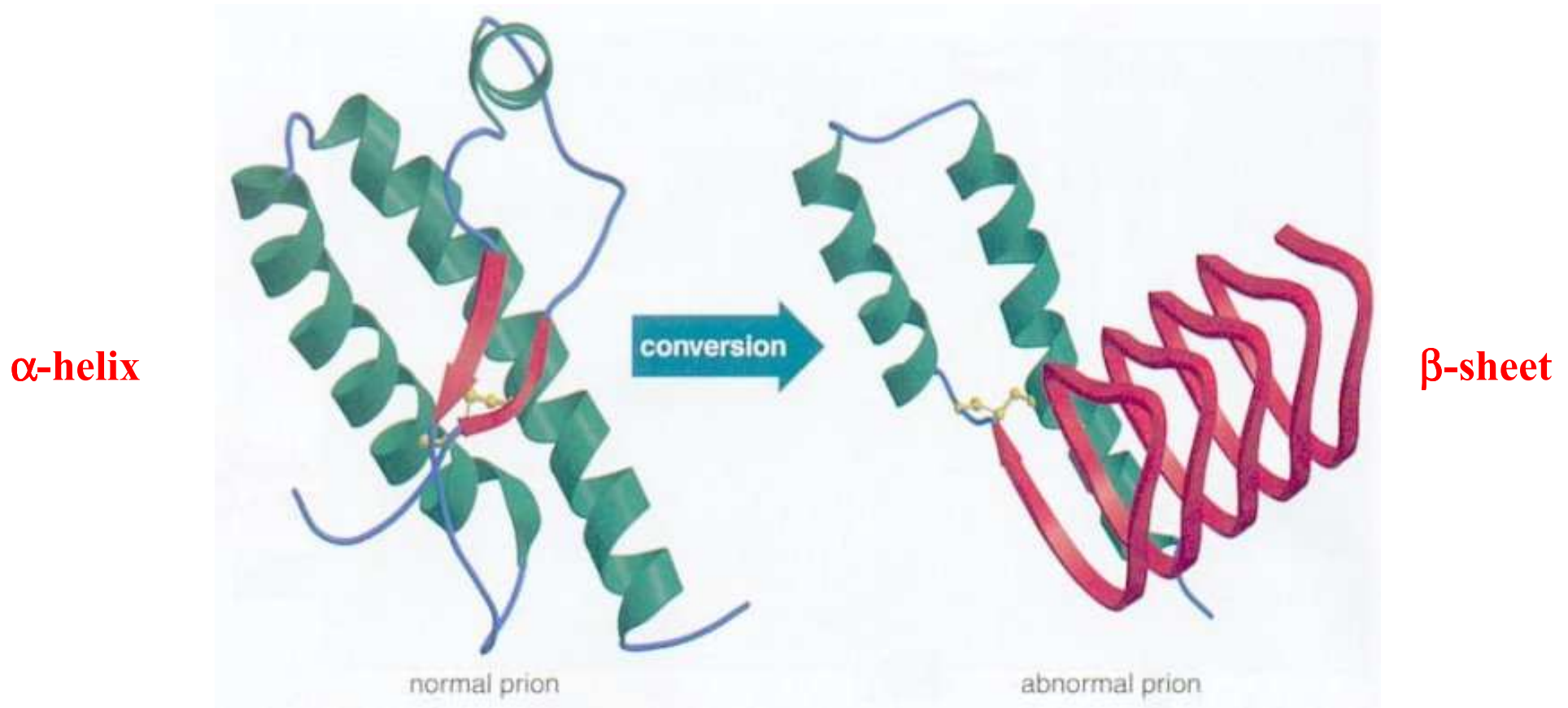
Brain shrinkage and deterioration occurs rapidly



Brain section showing spongiform pathology characteristic of Creutzfeldt-Jakob



# PrP<sup>C</sup> - PrP<sup>Sc</sup>

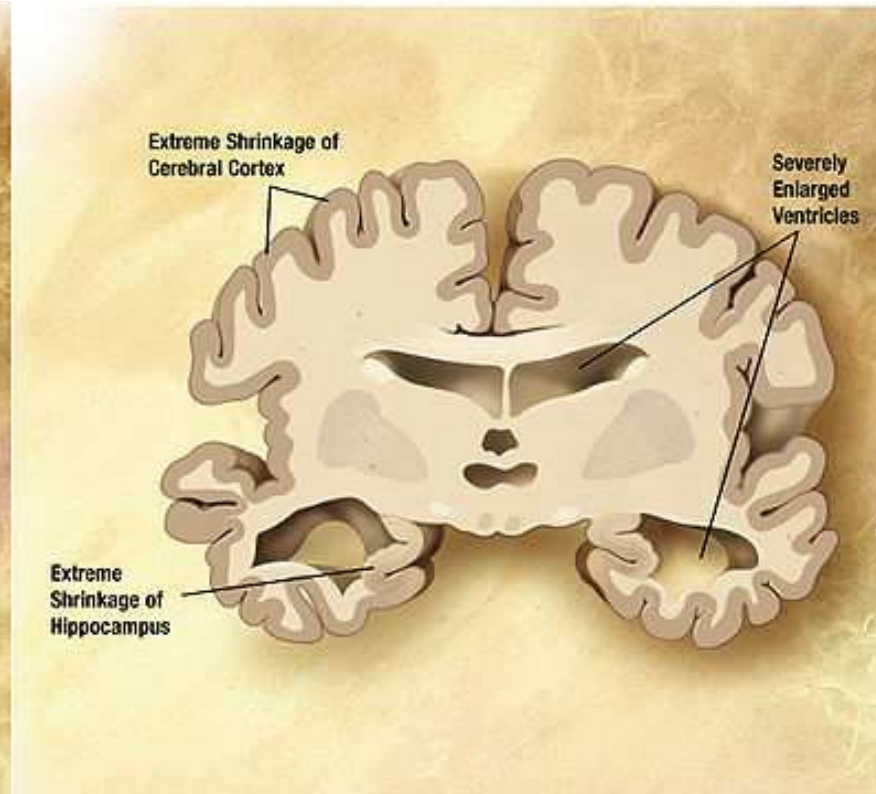
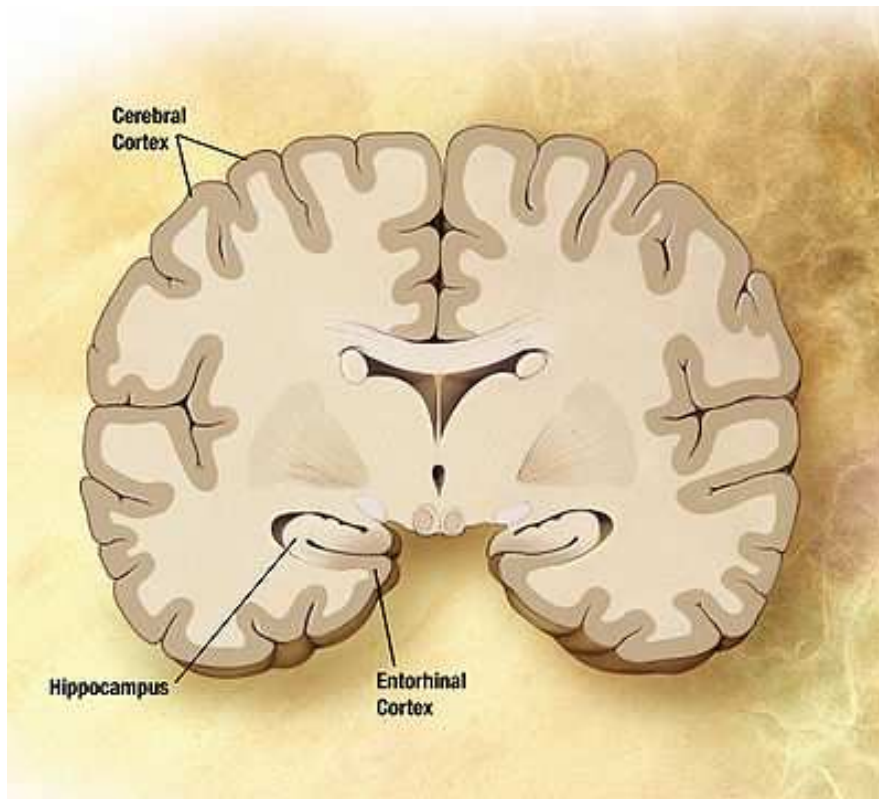


**Odolný proteolýze**

Dělal se pokus se spálením mozku postižených zvířat při 600 °C,  
popel se infikovala asi 1/3 exponovaných zvířat

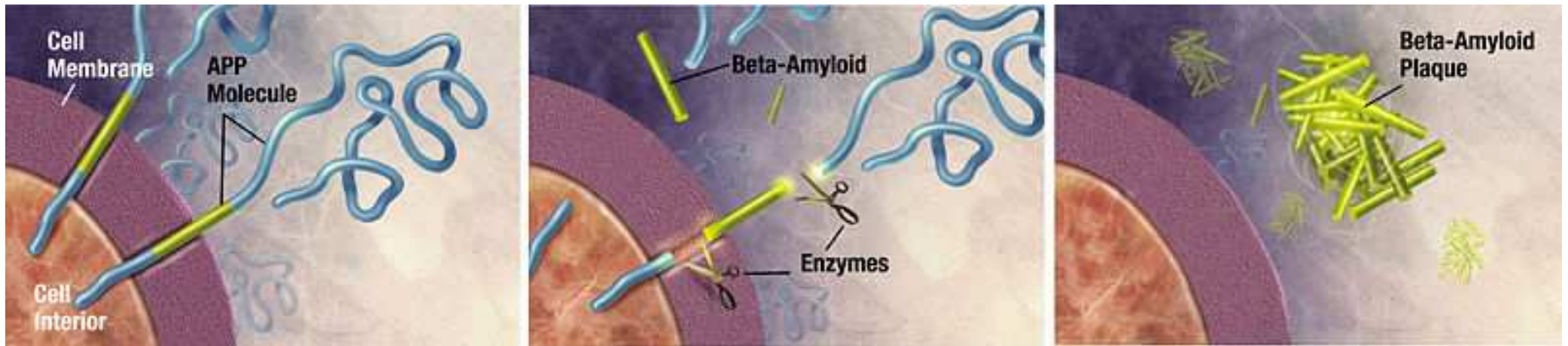
# Alzheimer (1906 Alois Alzheimer)

tvorba  $\beta$ -amyloidu, formace plaku



# Alzheimer

tvorba  $\beta$ -amyloidu, formace plaku

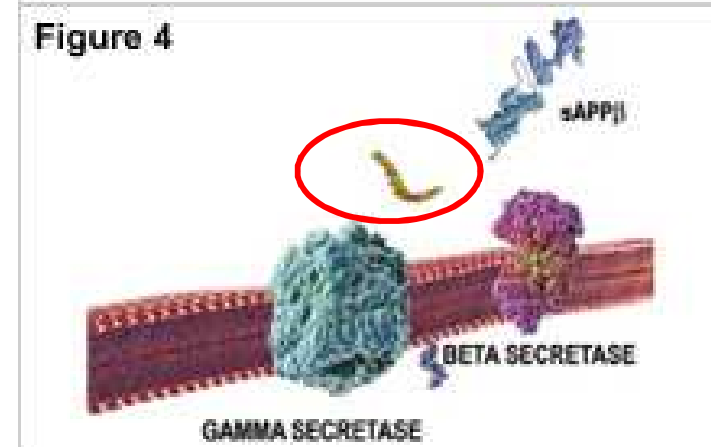
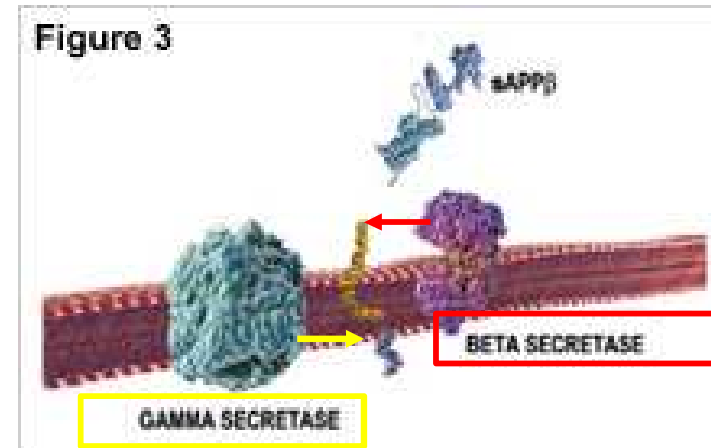
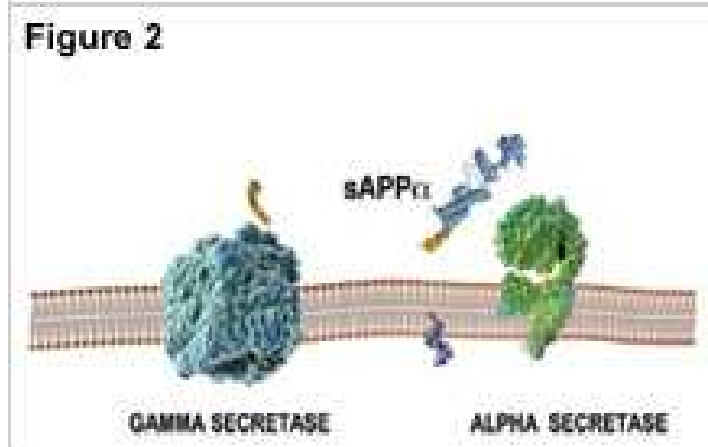
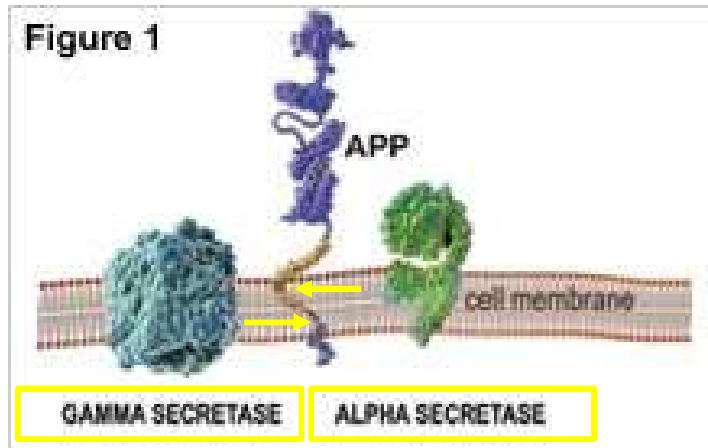


# Alzheimer

tvorba  $\beta$ -amyloidu, formace plaku

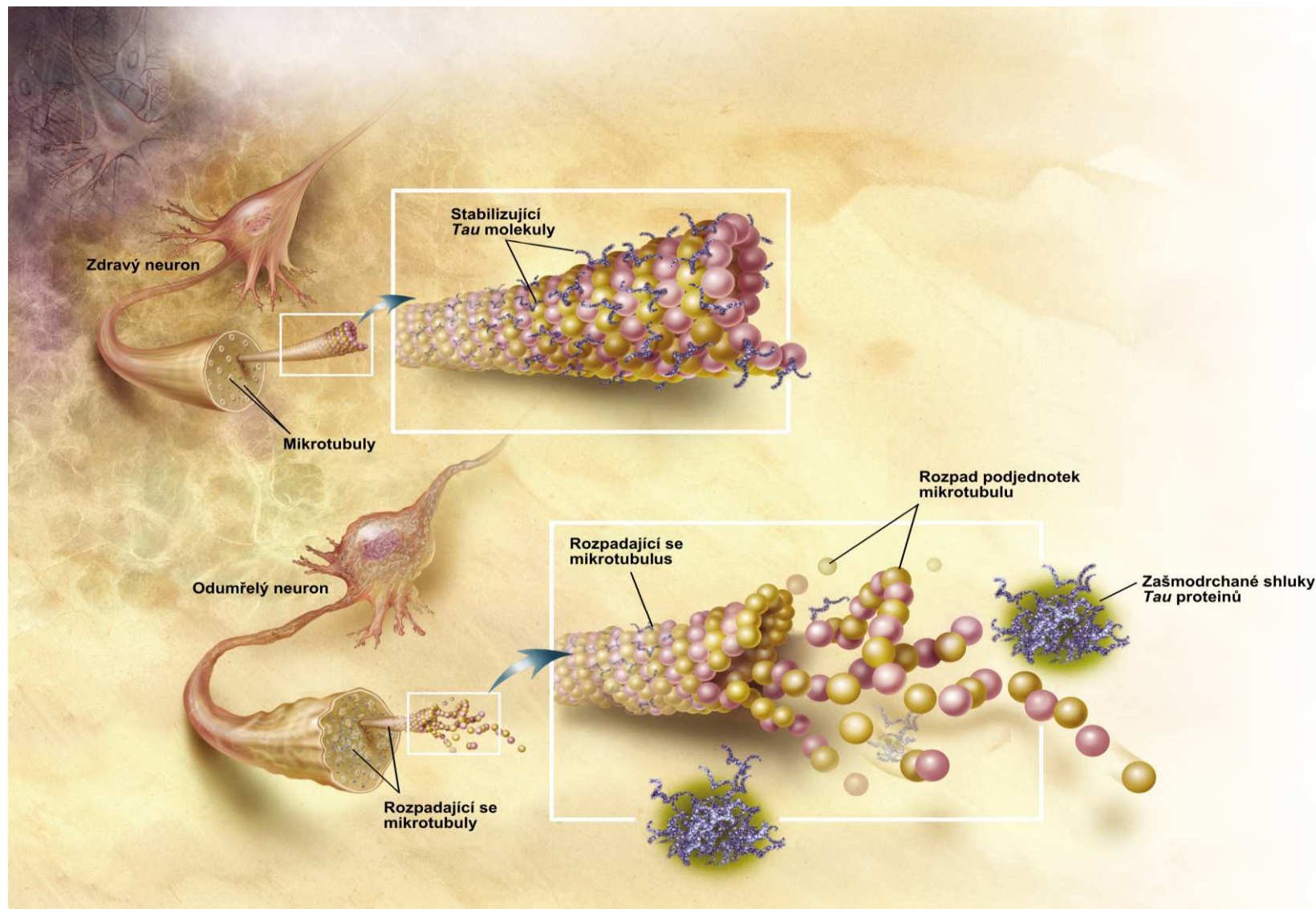
**Normální**

**Patologický**



# Alzheimer

zánik acetylcholinergních neuronů,  
hyperfosforylace Tau proteinů



# Izolace bílkovin

1. Účel
  - výzkum - studium struktury, studium biologické aktivity
  - průmyslové použití - farmakologie, čisticí prostředky,

2. Volba vstupního materiálu

3. Extrakce

## 4. Purifikace

Srážecí metody - srážení neutrálními solemi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- srážení organickými rozpouštědly
- pH srážení

Chromatografie - ionexová

- hydrofobní
- gelová permeační
- afinitní

Elektromigrační metody - elektroforéza nativní nebo SDS

- izoelektrická fokusace

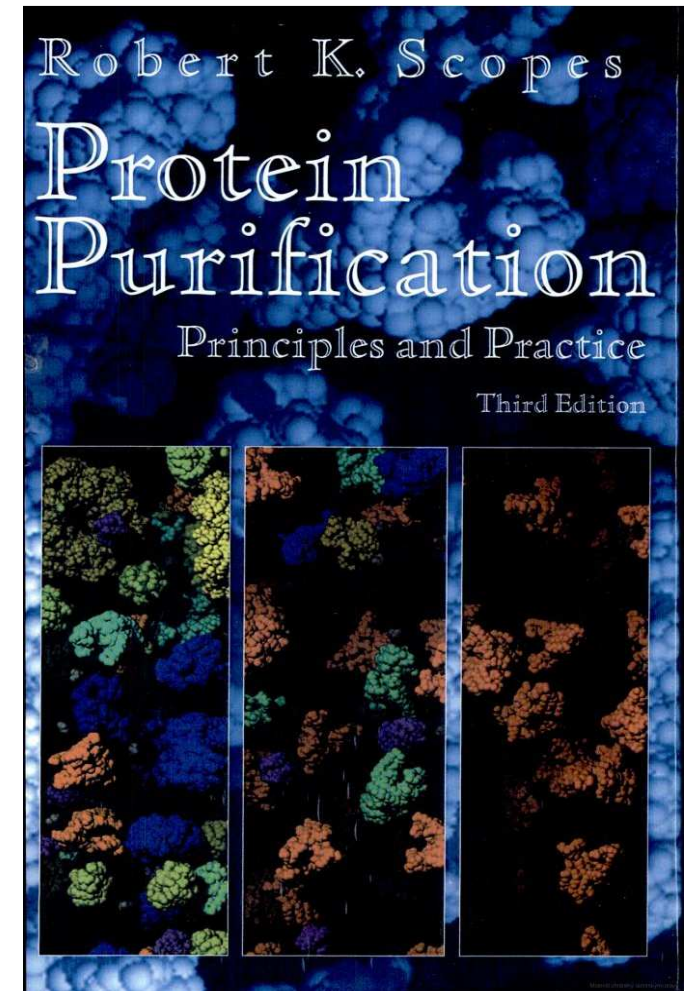
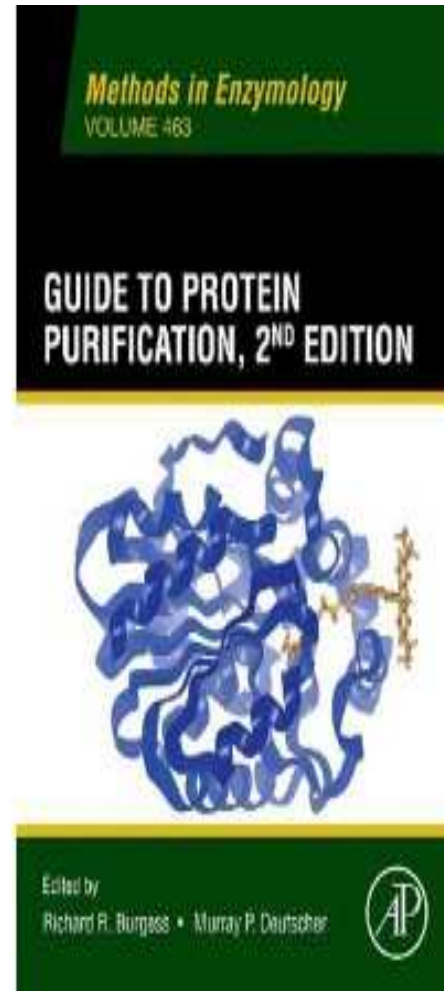
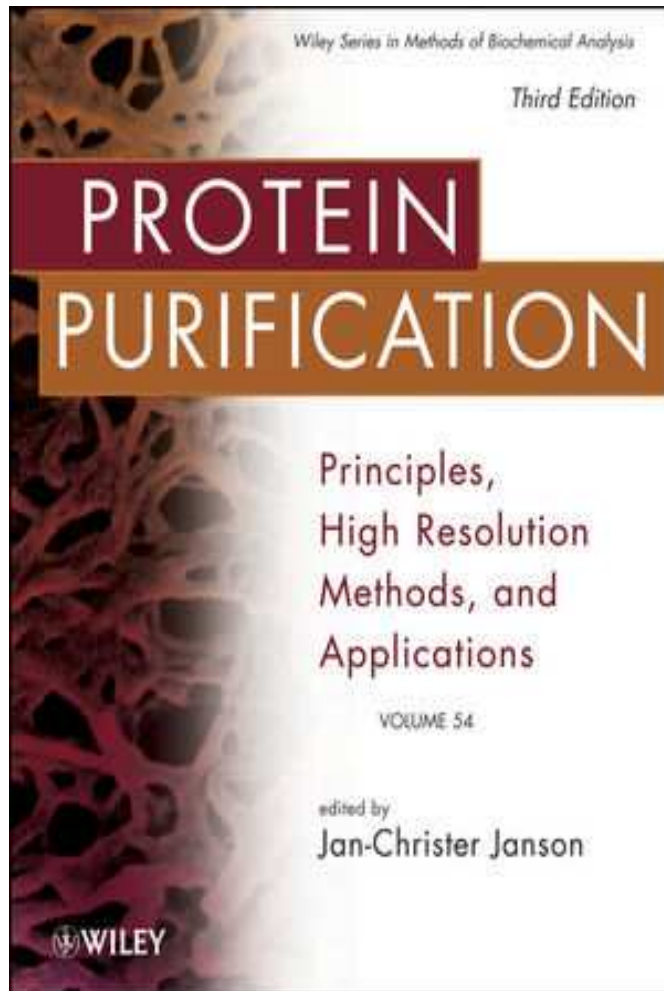
# Izolace proteinů



# Literatura

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

# Literatura



# Metody separace proteinů

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

# Problémy se vzorkem

- Komplexnost
- Malá množství
- Labilita

# Plánování separace bílkovin

# Cíl izolace

- Získání homogenní bílkoviny
- Zachování biologické aktivity
- Čistota



Závěr : získat vzorek o patřičné  
čistotě s vynaložením  
patřičného úsilí

# Volba vstupního materiálu

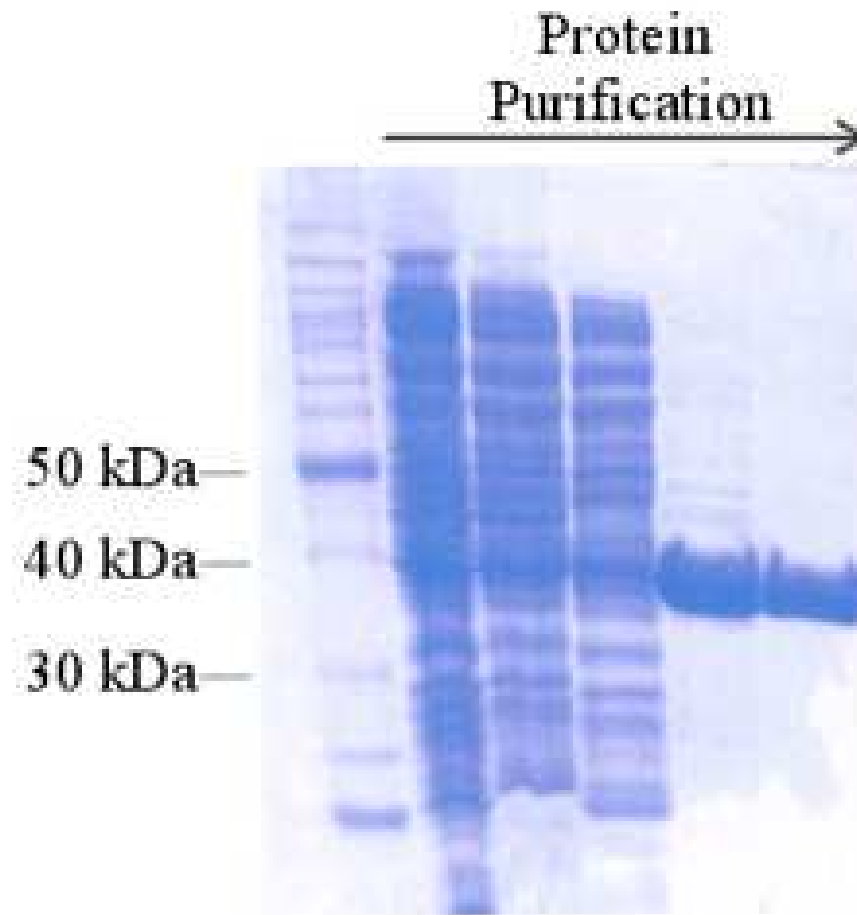
- Preparát z daného organismu
- Preparát s největším obsahem dané bílkoviny
- Preparát s nejmenším obsahem nečistot

# 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 %



# SDS PAGE



# Stanovení koncentrace bílkoviny

Metoda založená

na stanovení  
koncentrace dusíku

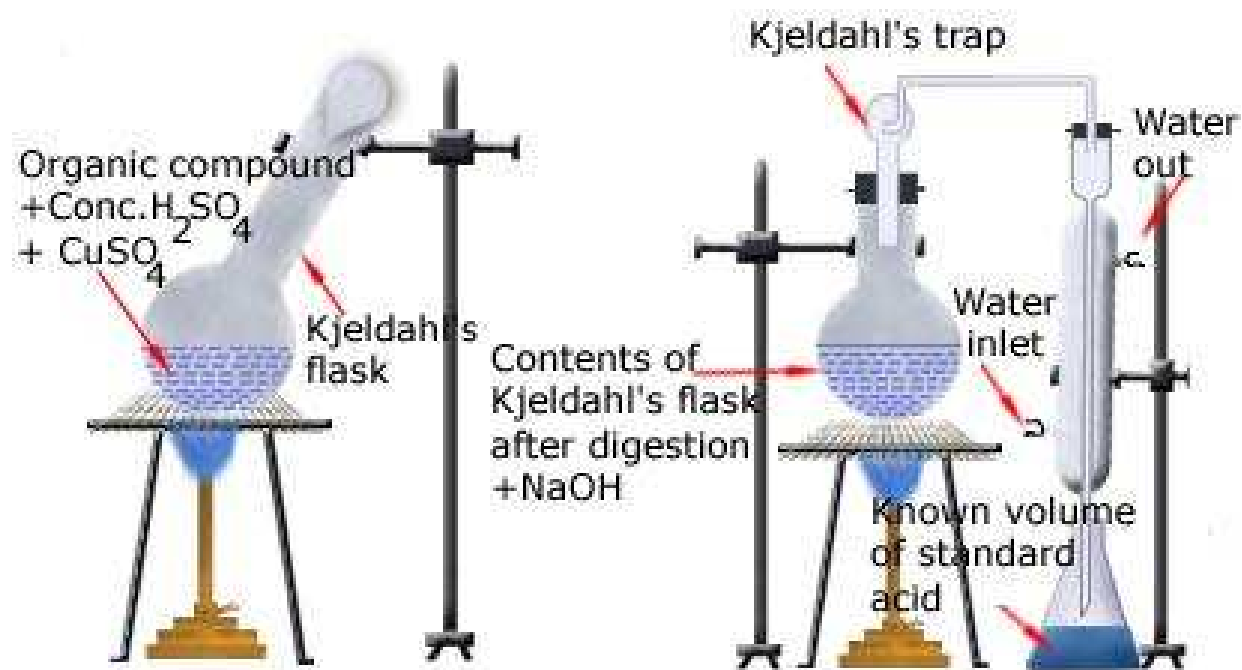
na základě  
optických vlastností

na základě  
elektrochemických vlastností

# Kjeldahlova metoda – stanovení N<sub>2</sub>

- Mineralizace vzorku – převedení organického N na NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- Stanovení NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - titrace, fotometrie, ionotvě selektivní elektrody

# Kjeldahlova metoda – stanovení $N_2$

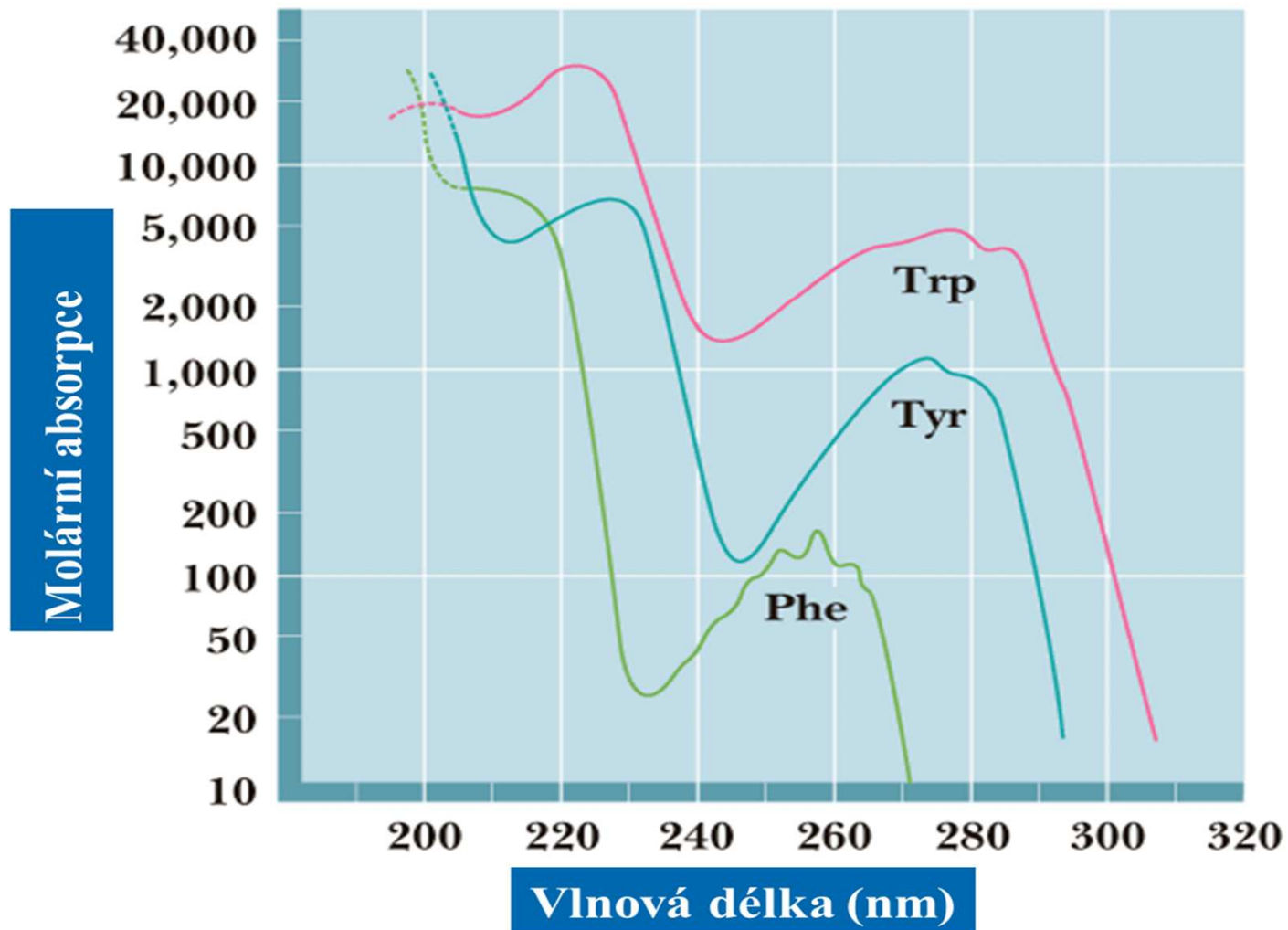


# UV spektrofotometrie

- 280 nm – aromatické AMK  
interference nukleotidů
- 180 - 230 nm – peptidická vazba

Výhody - nedestruktivní metoda  
- není třeba kalibrace

# UV spektrofotometrie



# UV spektrofotometrie

## Vzorce pro přímé UV stanovení:

$$c \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{235} - A_{280})/2.51$$

$$c \text{ (mg/mL)} = (A_{224} - A_{233})/5.01$$

$$c \text{ (mg/mL)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

# UV spektrofotometrie

## Edelchova metoda

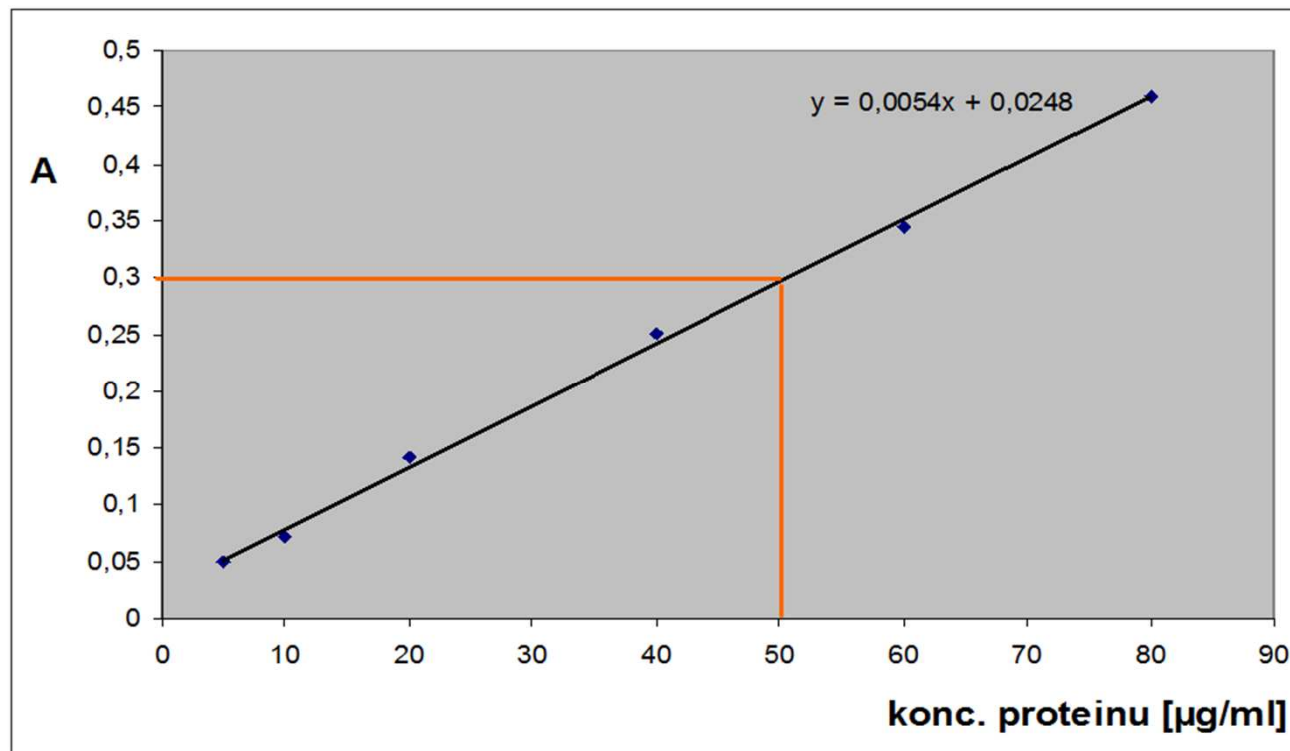
**při znalosti aminokyselinového složení** je možné spočítat extinkční koeficient proteinu  $e_{280}$ . Podmínkou je přítomnost tryptofanu nebo tyrosinu v molekule.

$$e_{280} = n\text{Trp}.5500 + n\text{Tyr}.1490 + n\text{Cys}.125 \text{ (M}^{-1}\text{.cm}^{-1}\text{)}$$



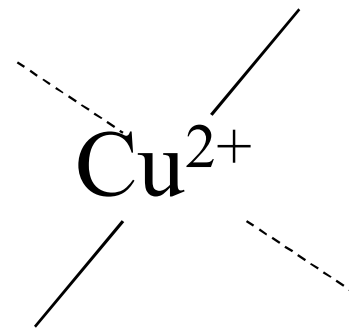
# VIS spektrofotometrie

- Přídavek činidla → barevný derivát
- Destruktivní metoda
- Nutná kalibrační závislost

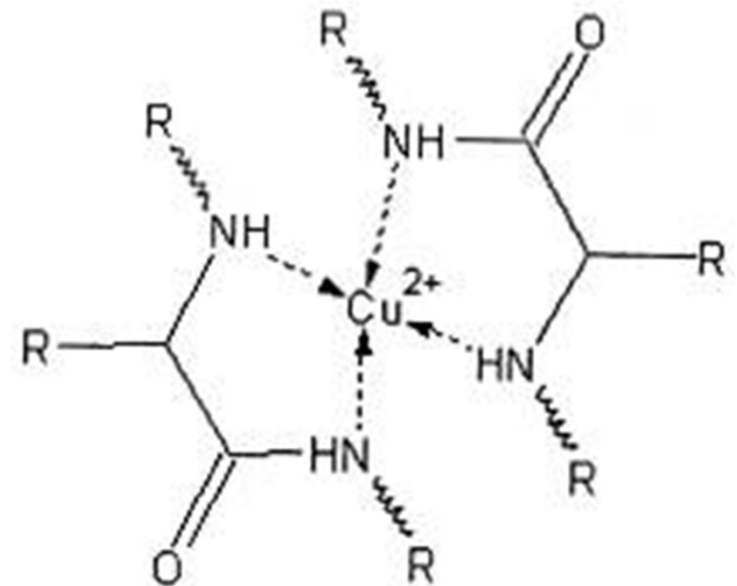


# Biuretová metoda

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



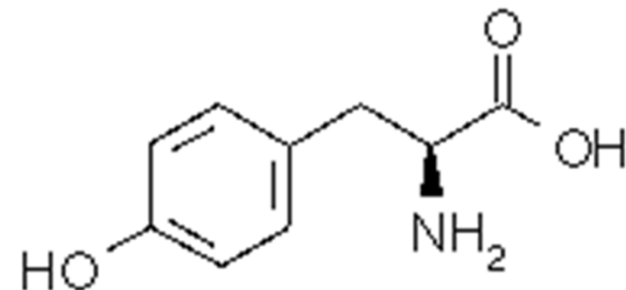
Měření : 540 – 560 nm  
310 nm



# Folinova metoda

Princip : hydroxyfenolová skupina tyrosinu redukuje fosfomolybdenany (Folin Ciocalteovo reagens) na molybdenovou modř

Měření : 725 nm



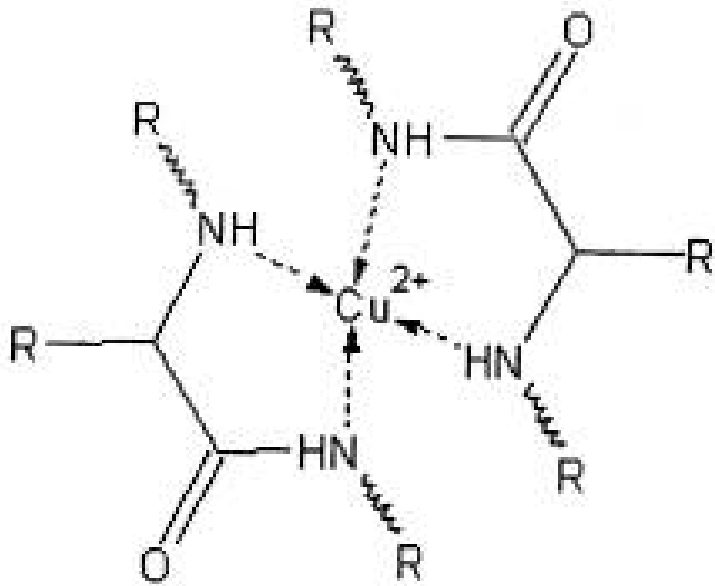
tyr y Tyrosin

# Lowryho metoda

Princip : kombinace Folinovy a Biuretové metody

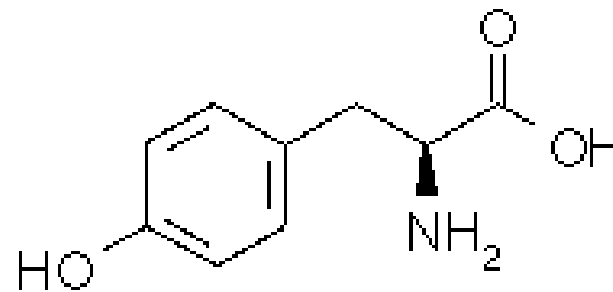
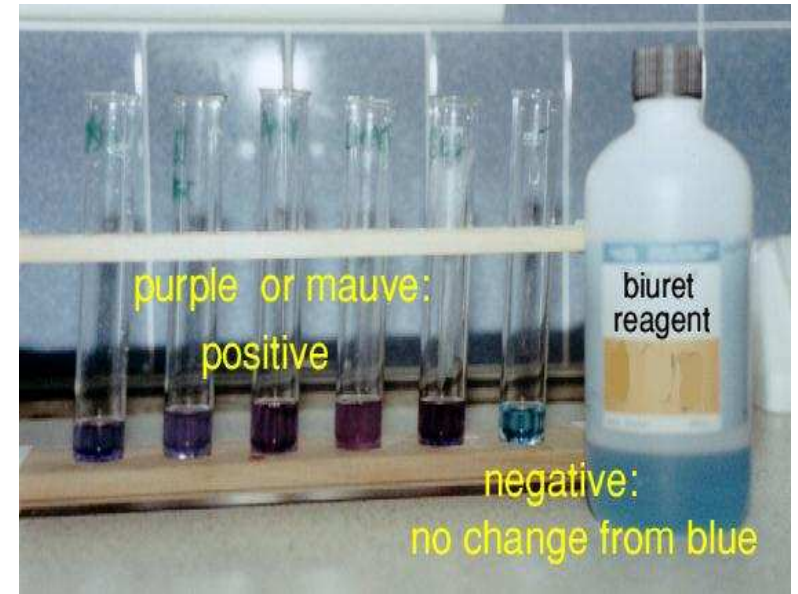
Měření : 600 nm

# Lowryho metoda



biuret  $\uparrow$

Lowry  $\downarrow$

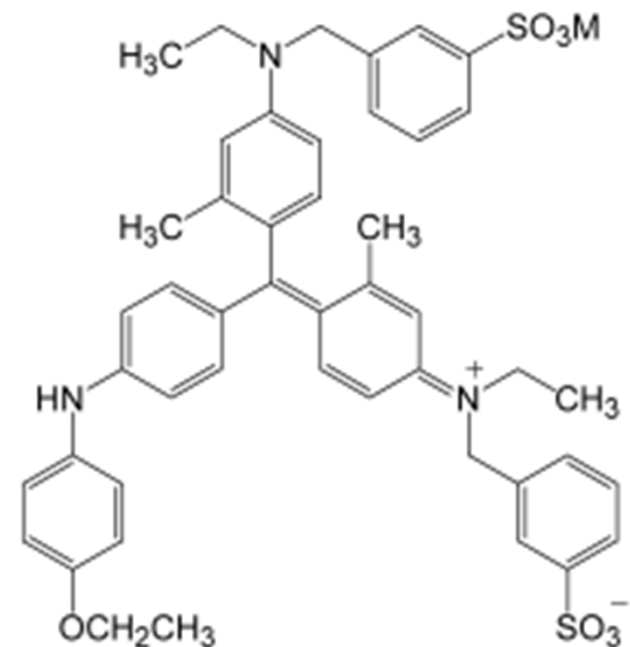


tyr y Tyrosin

# Metoda dle Bradfordové

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

Meření : 595 nm

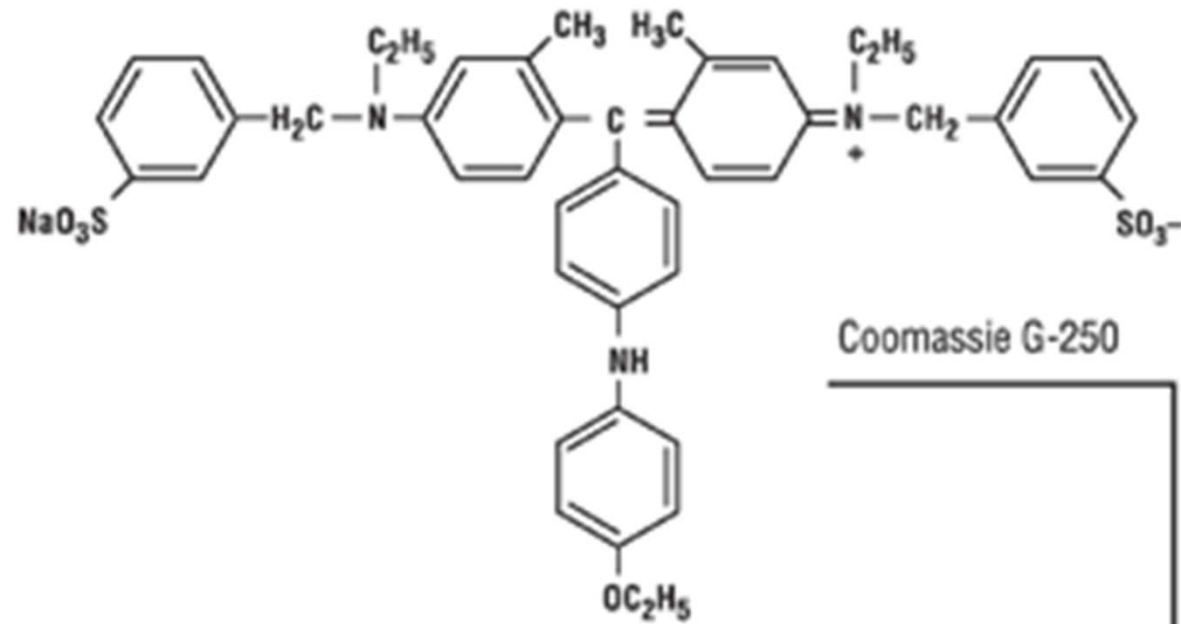


# Metoda dle Bradfordové

**PROTEIN**

Basic and Aromatic  
Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm

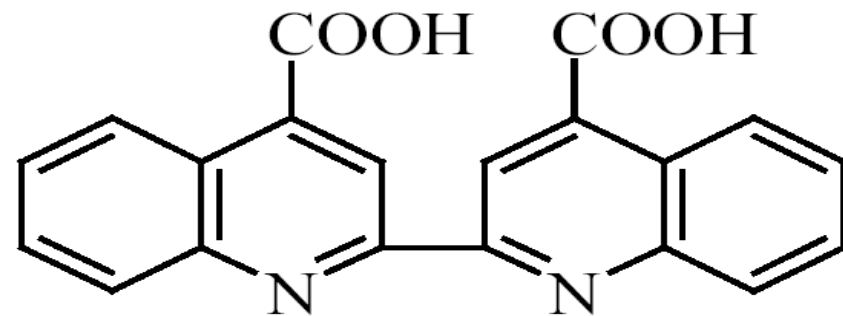


A<sub>max</sub> = 595 nm

Protein-Dye Complex

# BCA metoda

Princip :  $\text{Na}^+$  sůl k. bicinchoninové (BCA),  
komplexuje  $\text{Cu}^+$  tvořené reakcí peptidové  
vazby s  $\text{Cu}^{2+}$

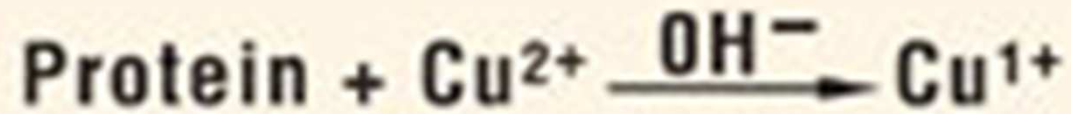


Měření : 562 nm

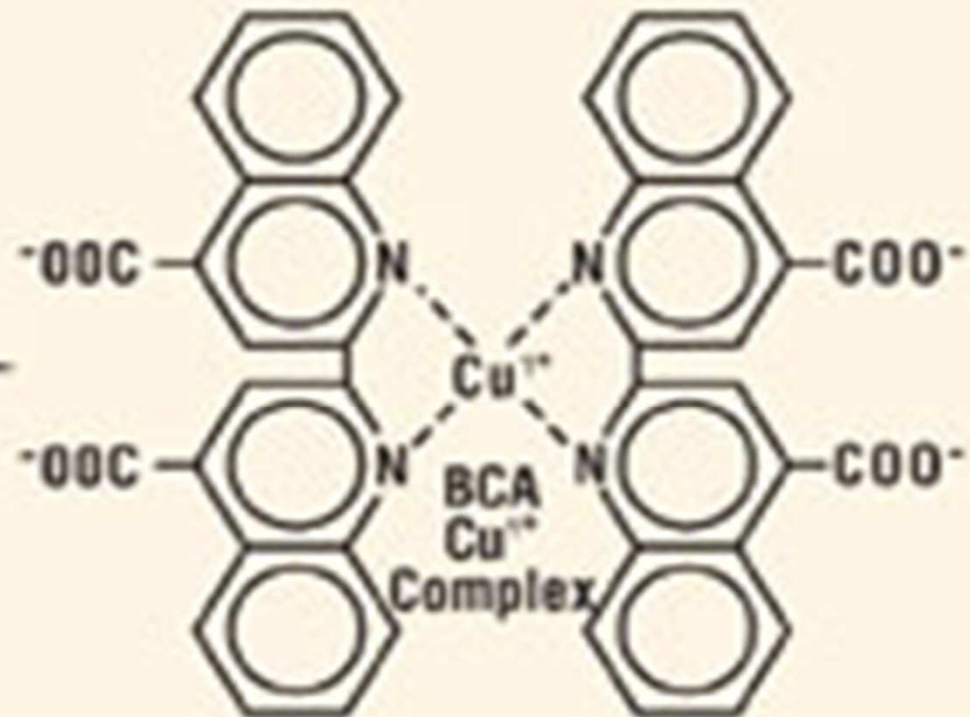
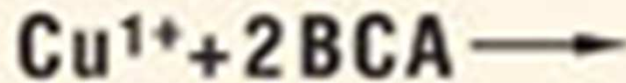


# BCA metoda

**STEP 1.**



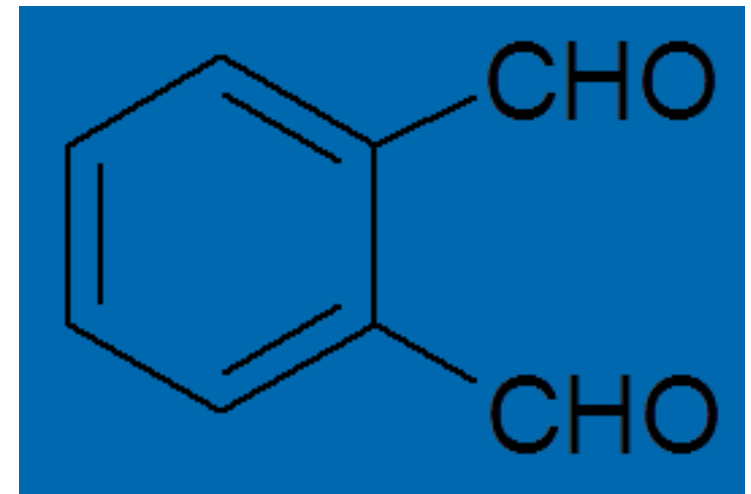
**STEP 2.**



# Fluorescence

Princip : - vazba fluoroforu na  
bílkovinu → měření vzniklé  
fluorescence (OPA)

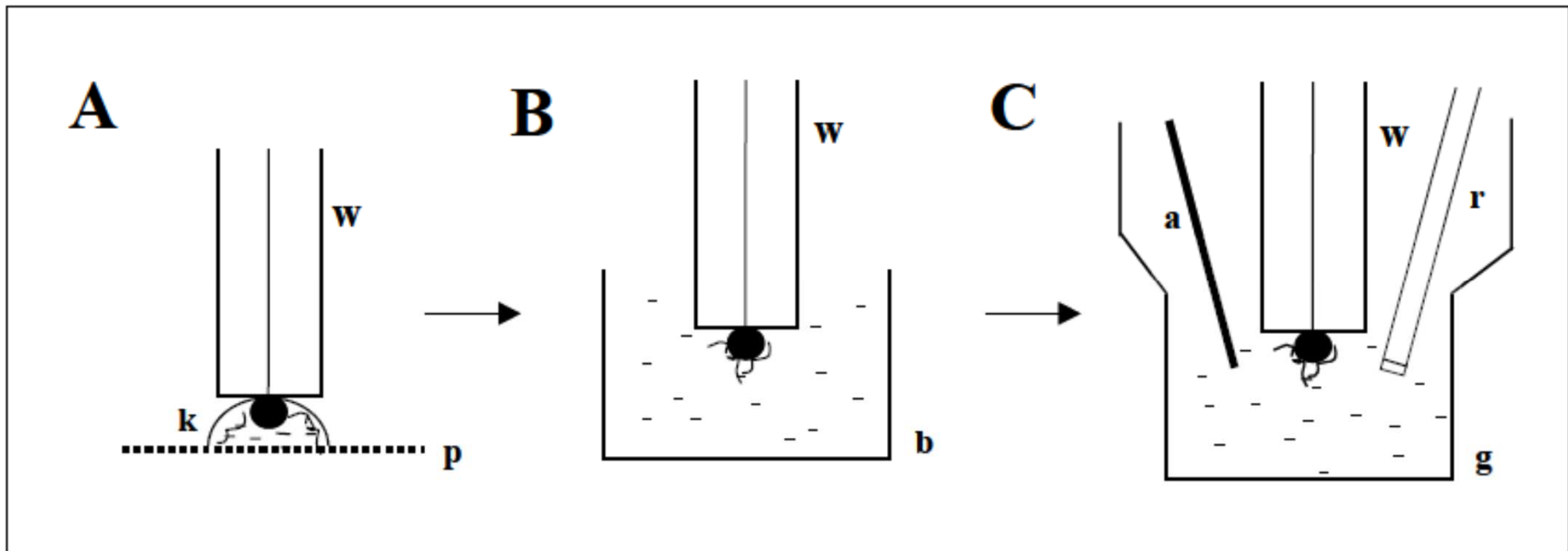
Měření : exc.340 nm  
em.440 nm



- zhášení fluorescence přidavkem  
bílkoviny

# Polarografie

Princip : Brdičkova reakce – SH skupiny bílkoviny vstupují v přítomnosti  $\text{Co}^{2+}$  katalytické reakce na Hg elektrodě  $\rightarrow$  proud



# Nejčastěji používané metody

<b>Metoda</b>	<b>Rozsah (ng)</b>	<b>Poznámka</b>
<b>Biuretová</b>	0.5 - 5	okamžitý vývoj
<b>Lowryho</b>	0.05 - 0.5	pomalý vývoj
<b>UV - 280 nm</b>	0.05 - 2	interference
<b>UV – 205 nm</b>	0.01 - 0.05	interference
<b>Bradfordové</b>	0.01 - 0.05	sorpce barviva

# Stanovení biologické aktivity

Enzymatické, imunologické, toxické,  
hormonální receptorové atd.

# Vlastní separace

# Obecné schéma

Získání vstupního materiálu



Rozrušení buněk



Separace

# Vstupní materiál



# Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, řasy

- Výhody - lze je snadno získat v dostatečné množství
- selekce mutantů o požadovaných vlastnostech
  - genetické inženýrství
  - termofilní organismy

# Bezobratlí

Hmyz, plži, mlži

Nevýhody - málo se používá, nesnadno se získává

# Živočišné tkáně

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

# Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách, tabák  
huseníček (*Arabidopsis*)

Nevýhoda – problematický růst za  
definovaných podmínek

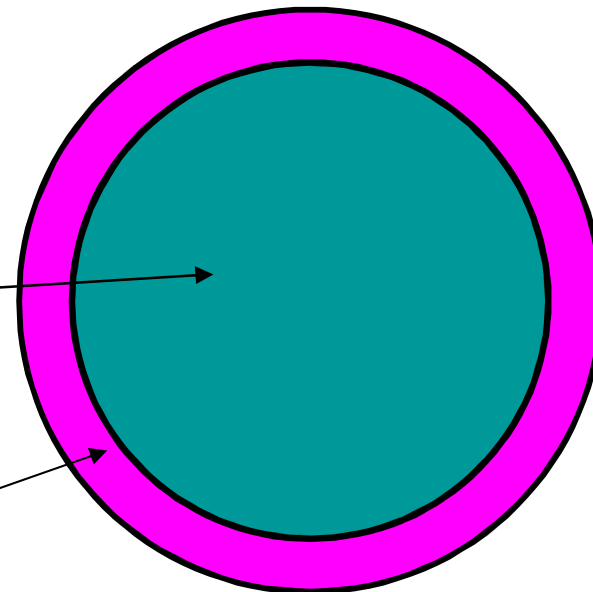
# Rozbití a extrakce

# Bakterie

- Záleží na lokalizaci
  - Extracelulární
  - Intracelulární
    - Cytoplasma
    - Periplazma

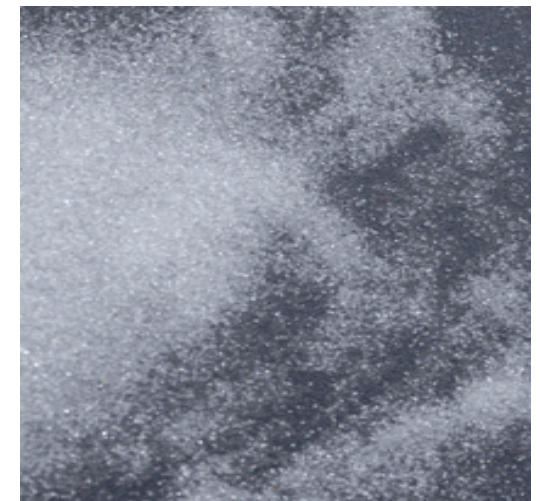
cytoplasma

periplasma



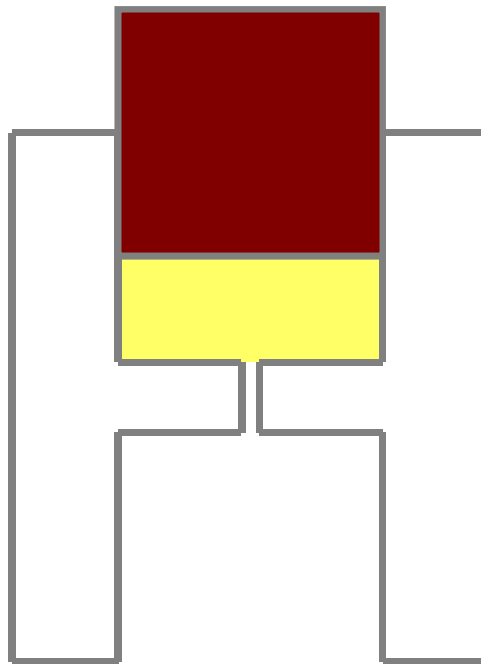
# Balotina

Princip – jemné skleněné kuličky přidány do bakteriální suspenze a rychle třepány nebo míchány – nutno chladit



# French (X) press

Princip – zmražená bakteriální suspenze  
protlačována malým otvorem, přičemž  
dochází k rekrystalizaci a rozrušení  
buněk





# French (X) press

Pressure Cells

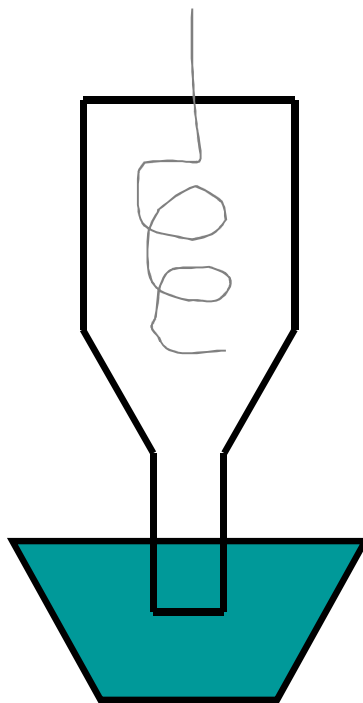


Mechanical Press



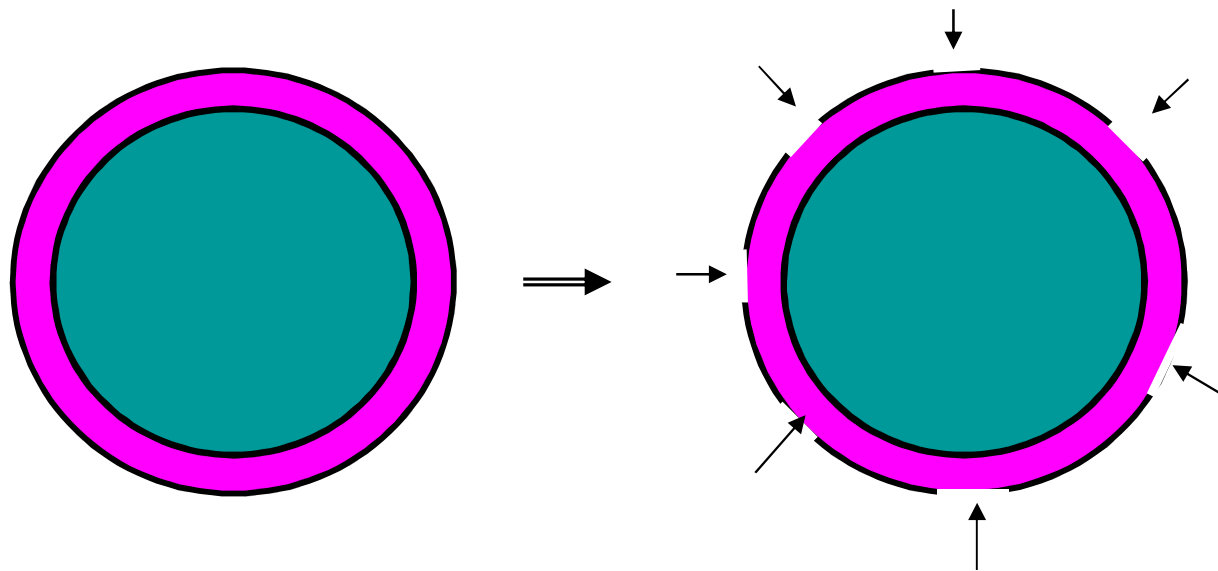
# Ultrazvuk

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



# Lysozym + osmotický šok (mírný osmotický šok)

Princip – lysozym rozruší buněčnou stěnu,  
následně je bakteriální suspenze zředěna  
destilovanou  $H_2O$  – bakterie popraskají

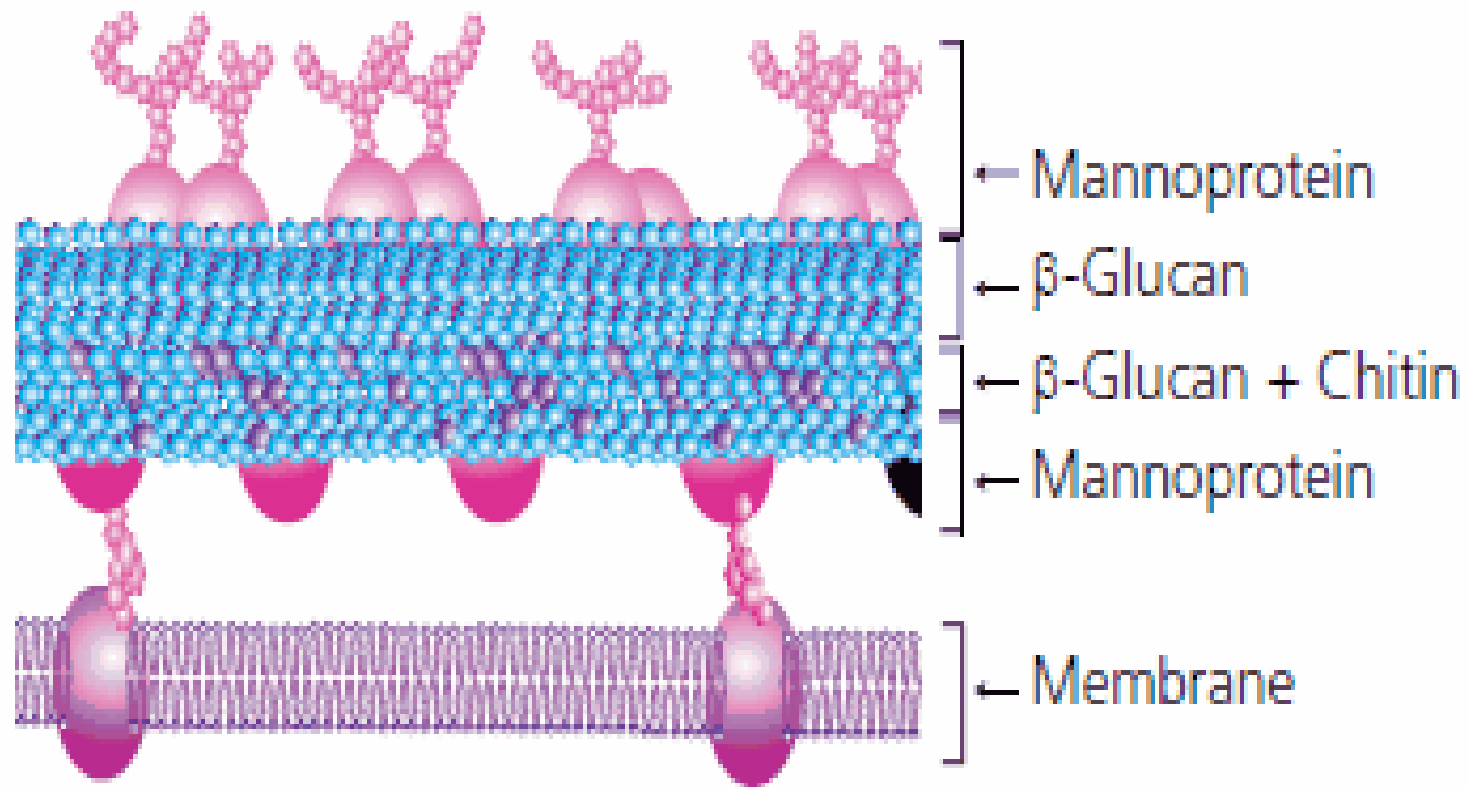


# Další

- Alumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – roztírání v třecí misce
- Opakované zmrazování a rozmrazování

# Kvasinky

## Yeast Cell Wall



# Kvasinky

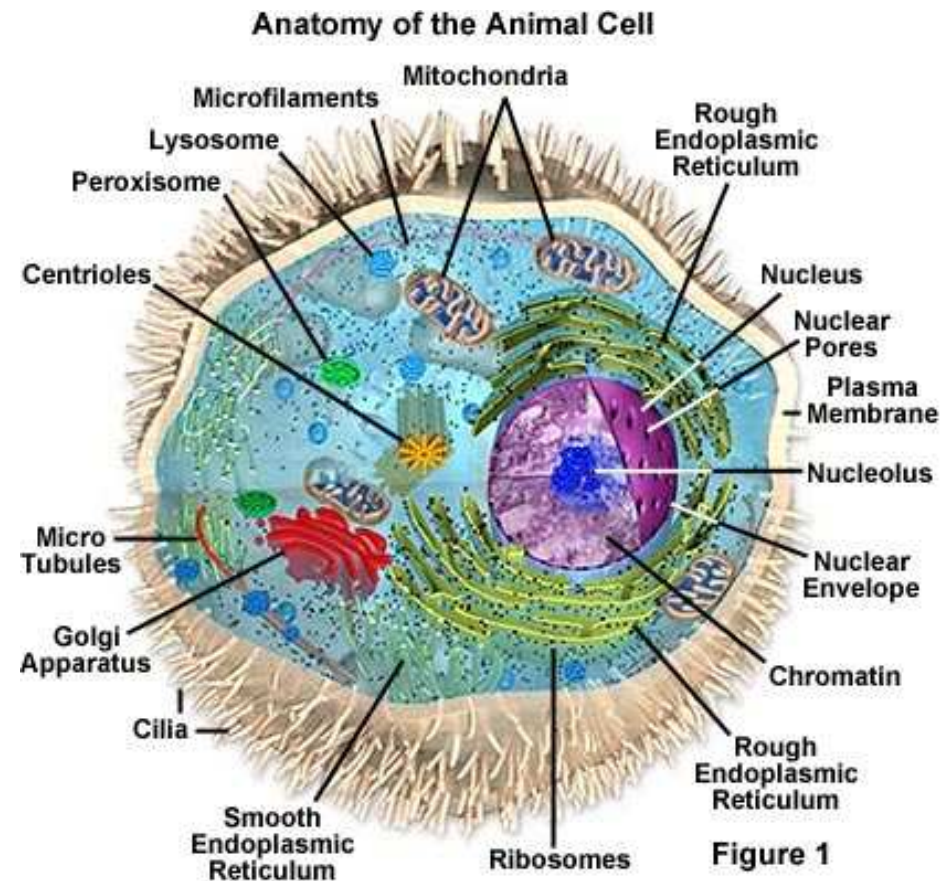
Toluenová autolýza

Princip – toluen extrahuje při 35 –40 °C  
fosfolipidy buněčné stěny →  
osmotický šok → enzymová autolýza

Balotina, French press,

# Živočišné tkáně

- Bez buněčné stěny
- Velmi křehké
- Tkáňové kultury

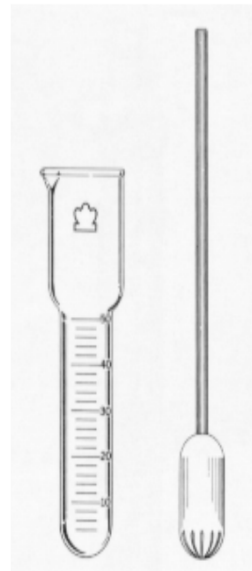


# Živočišné tkáně

- Třecí miska s pískem



- Ruční homogenizatory – Potter – Elvehjemův



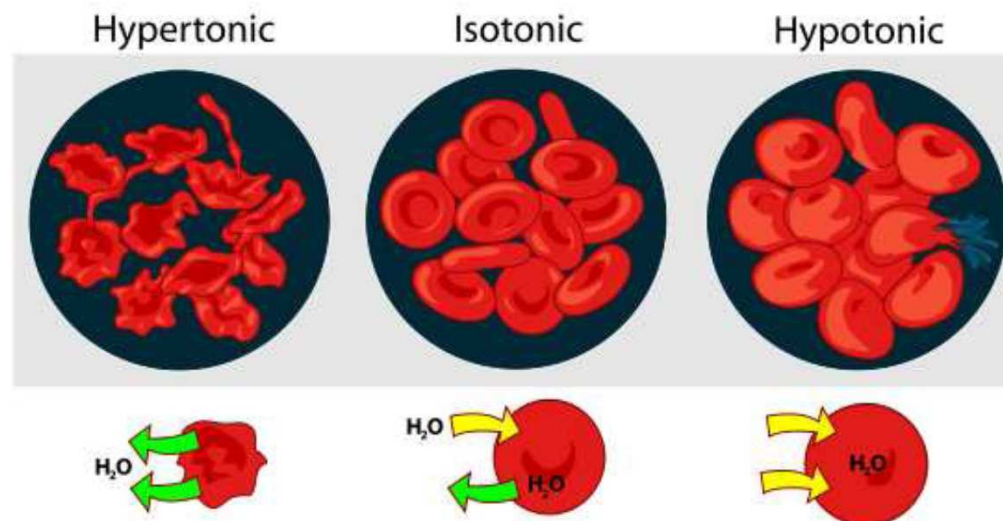


# Živočišné tkáně

- Mixery

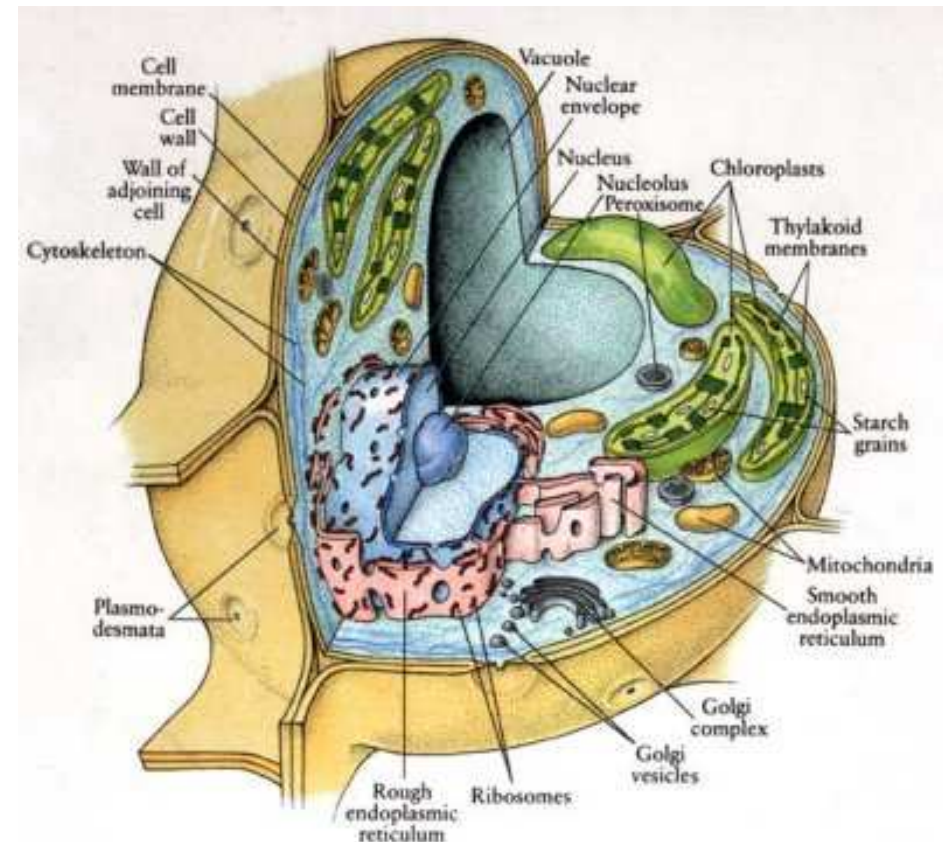


- Osmotická lyse - erythrocyty



# Rostlinné tkáně

- Silná buněčná stěna - celuloza
- Tkáňové kultury křehké



# Rostlinné tkáně

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

# Optimalizace extrakce

- Teplota – 4 - 6 °C chlazení
- pH – optimální pro danou bílkovinu – práce v pufrech
- I – v prostředí o definované iontové síle
- Přídavky látek – EDTA,  $\beta$ -merkaptoethanol, kovové ionty, inhibitory proteas

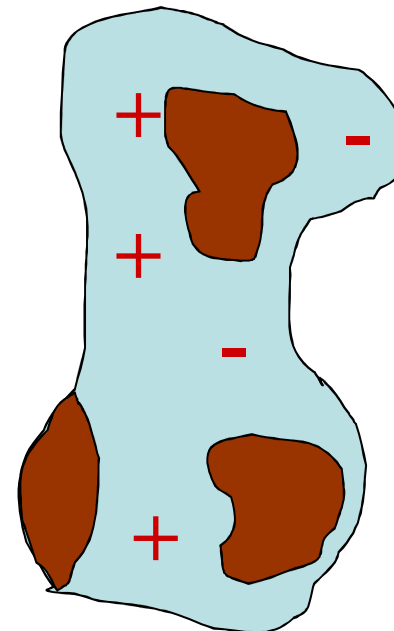
# Srážecí metody

# 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

# Rozpusťnost bílkoviny

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

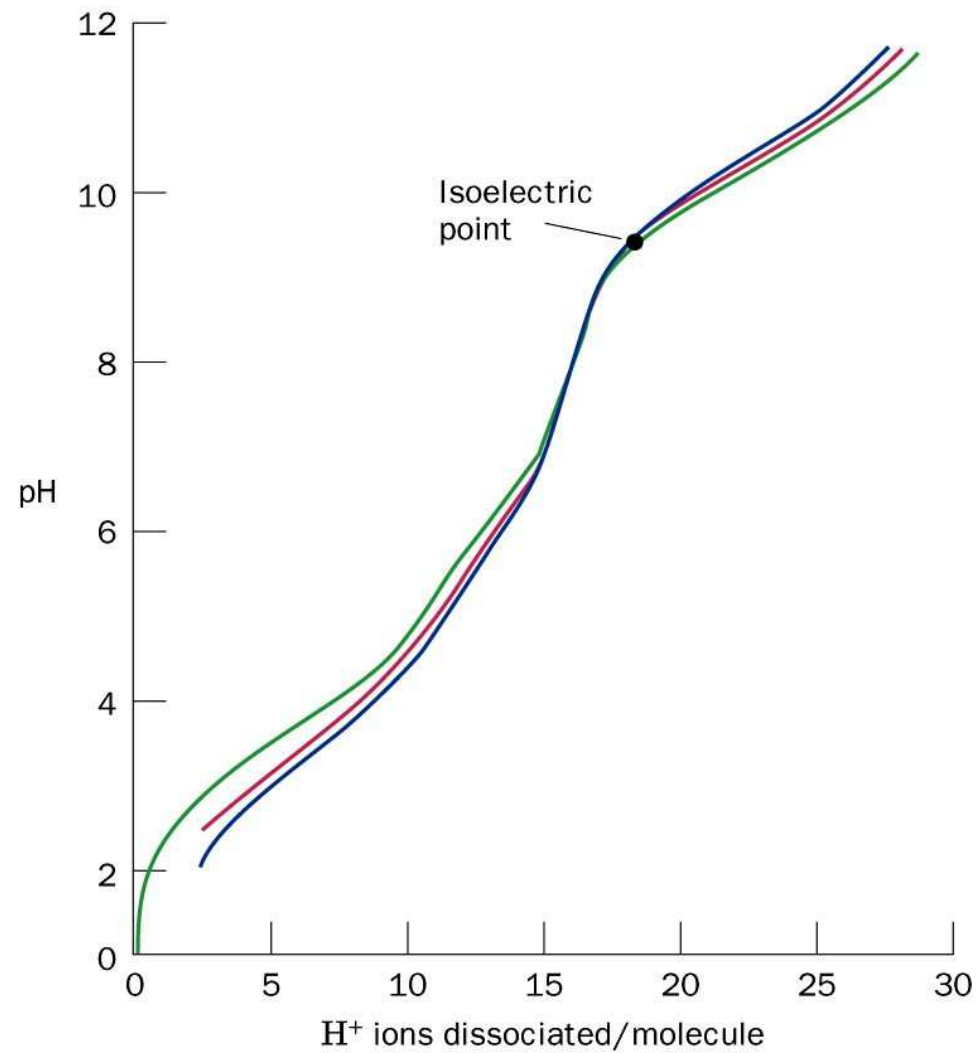


# Rozpustnost bílkoviny

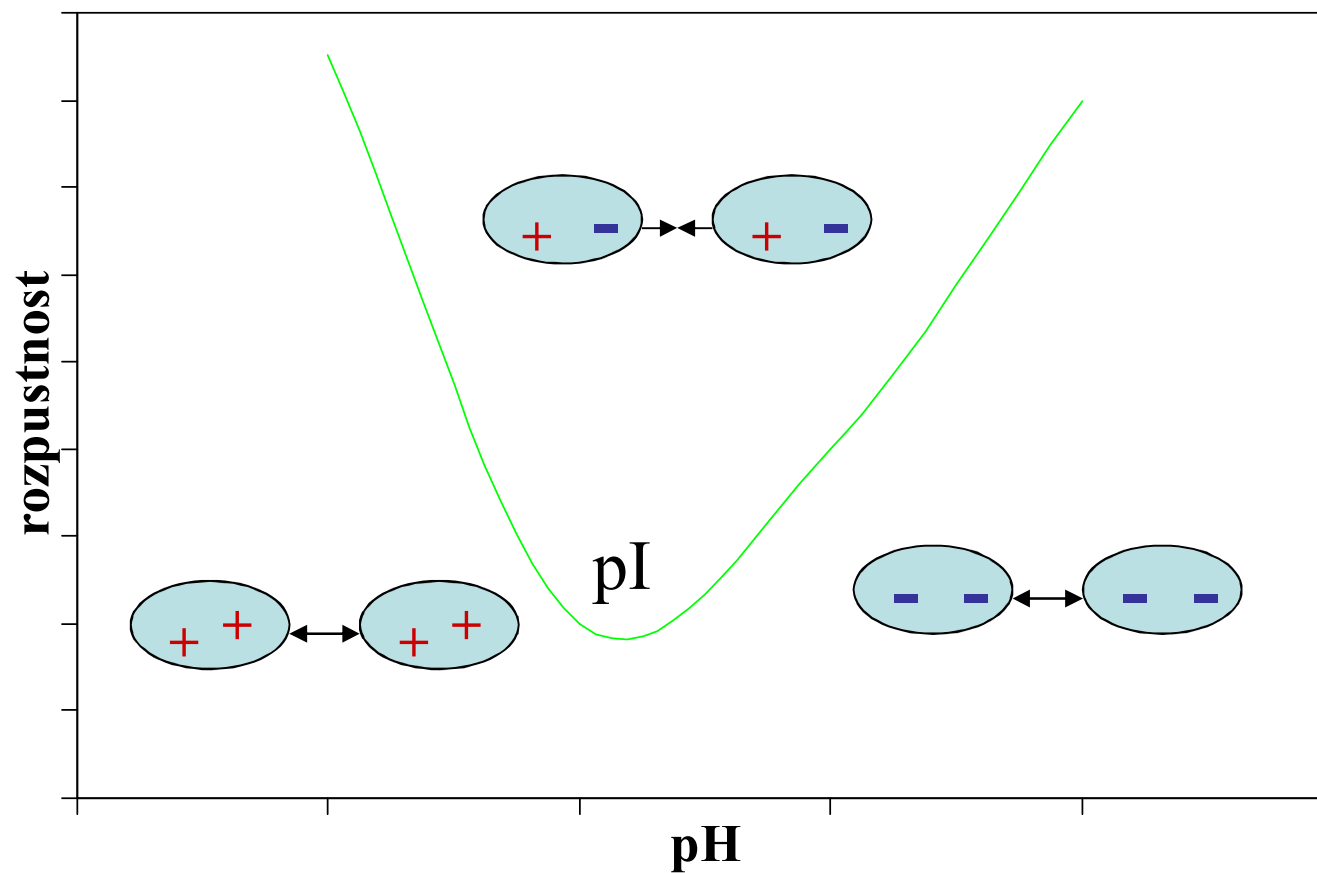
- Vlastnostmi roztoku – pH, iontová síla, org. rozpouštědla, org. polymery, teplota



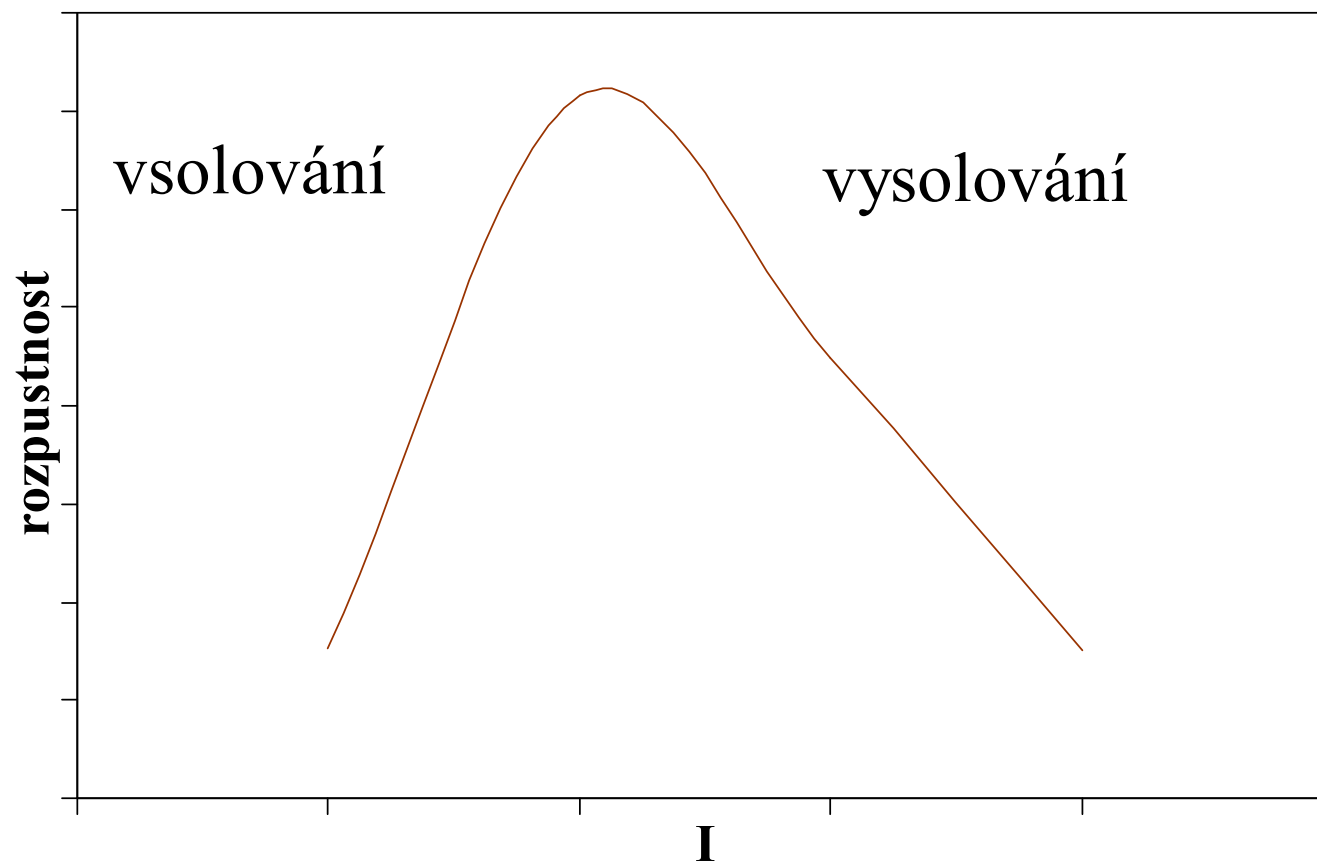
# Titrační křivka



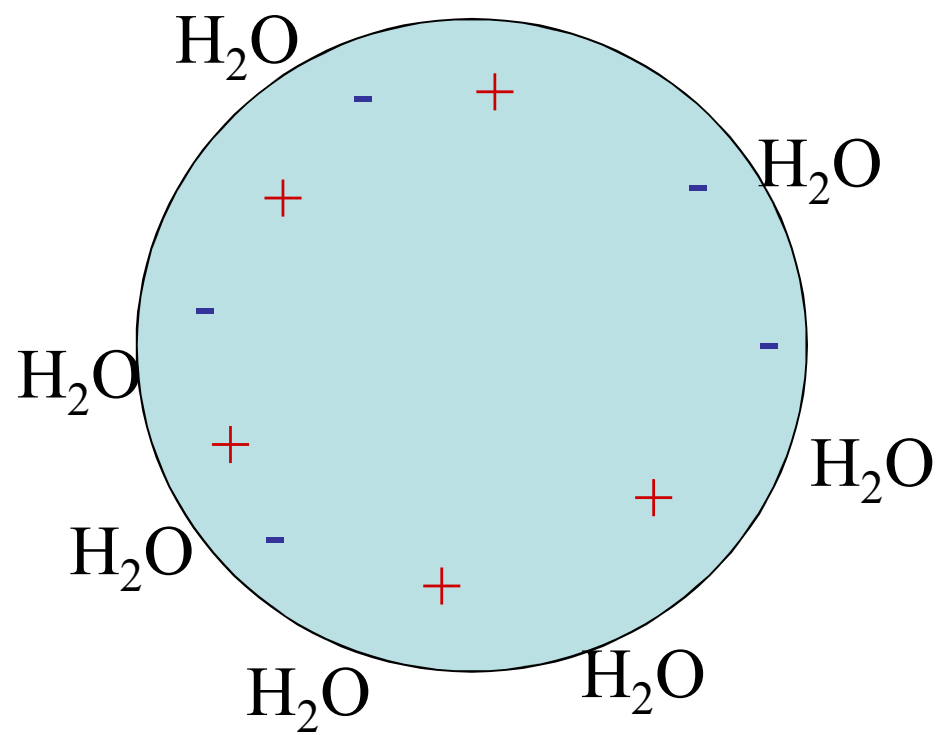
# Izoelektrická precipitace



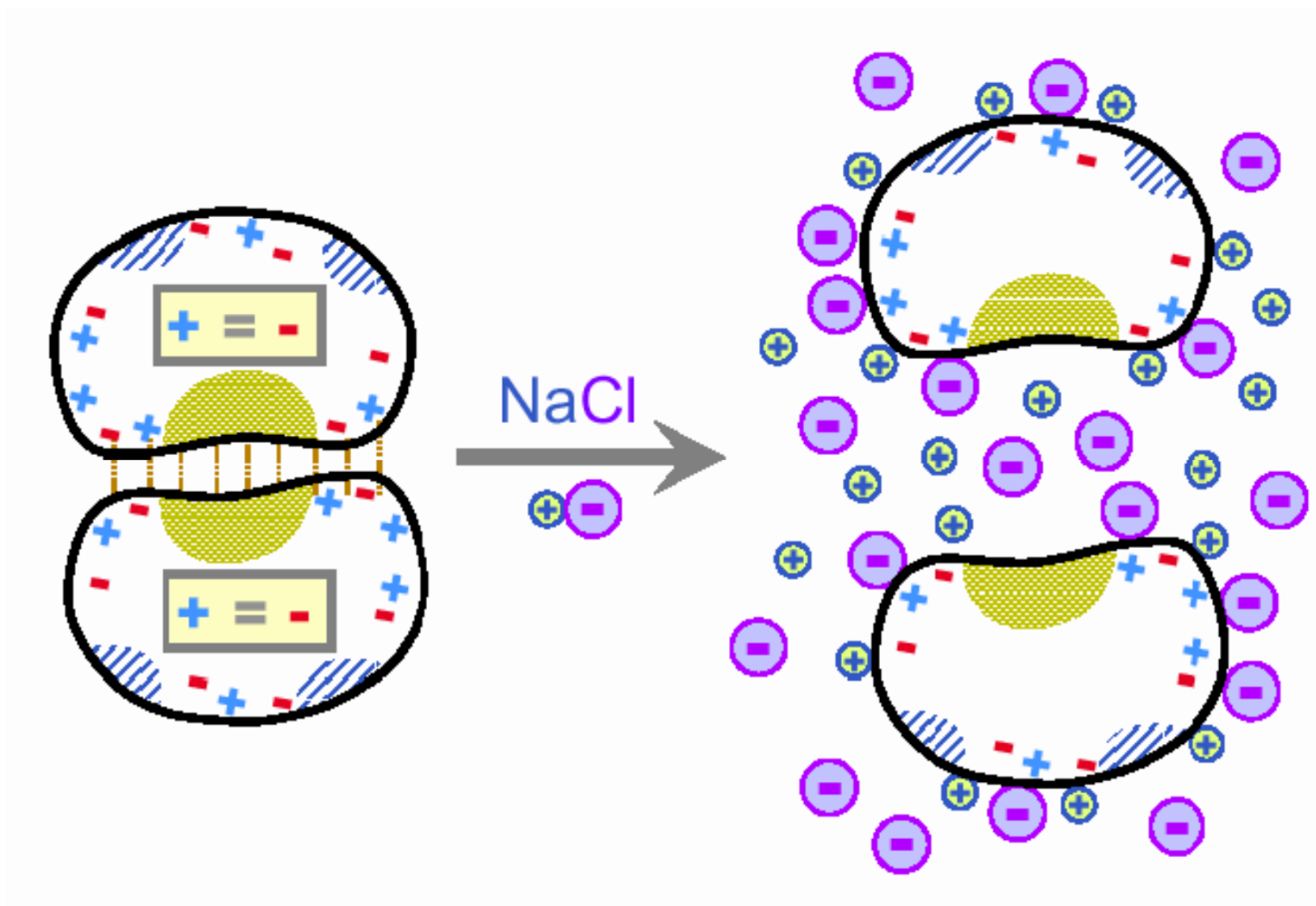
# Srážení neutrálními solemi



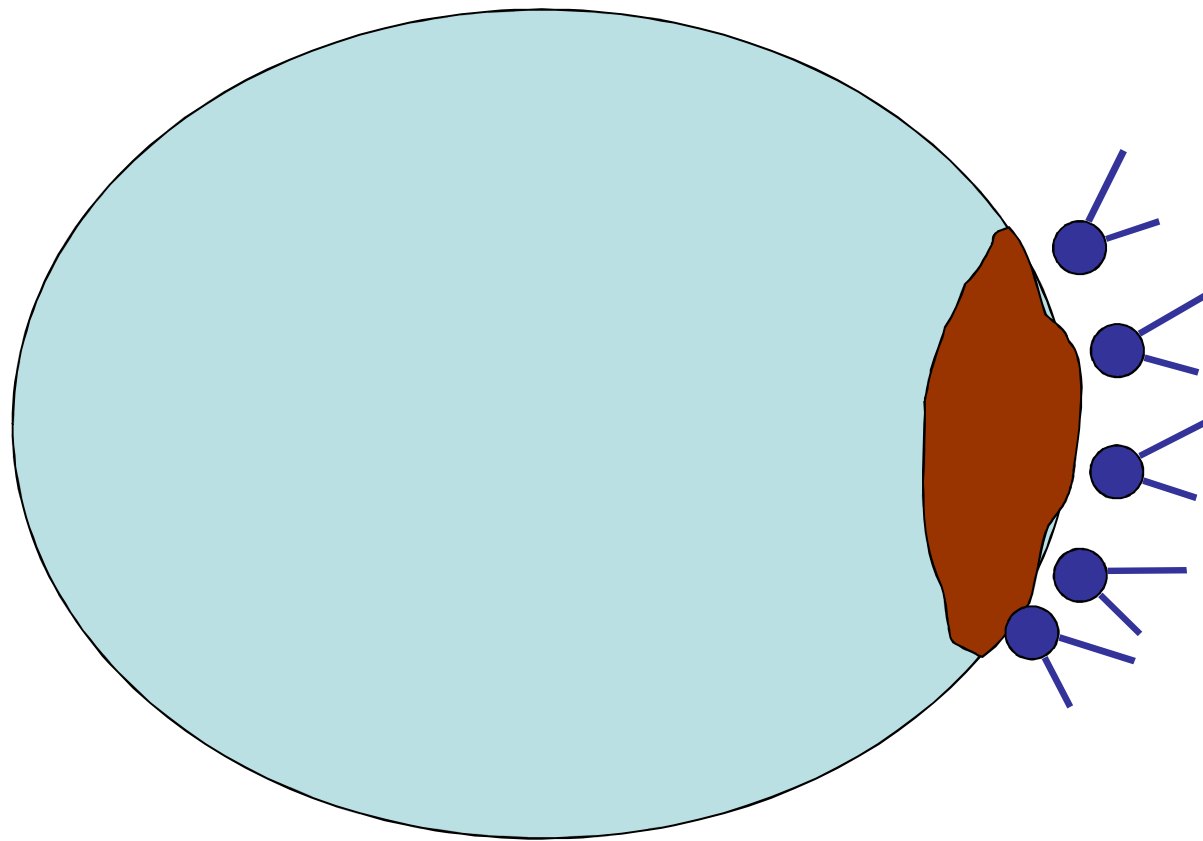
# Vsolování



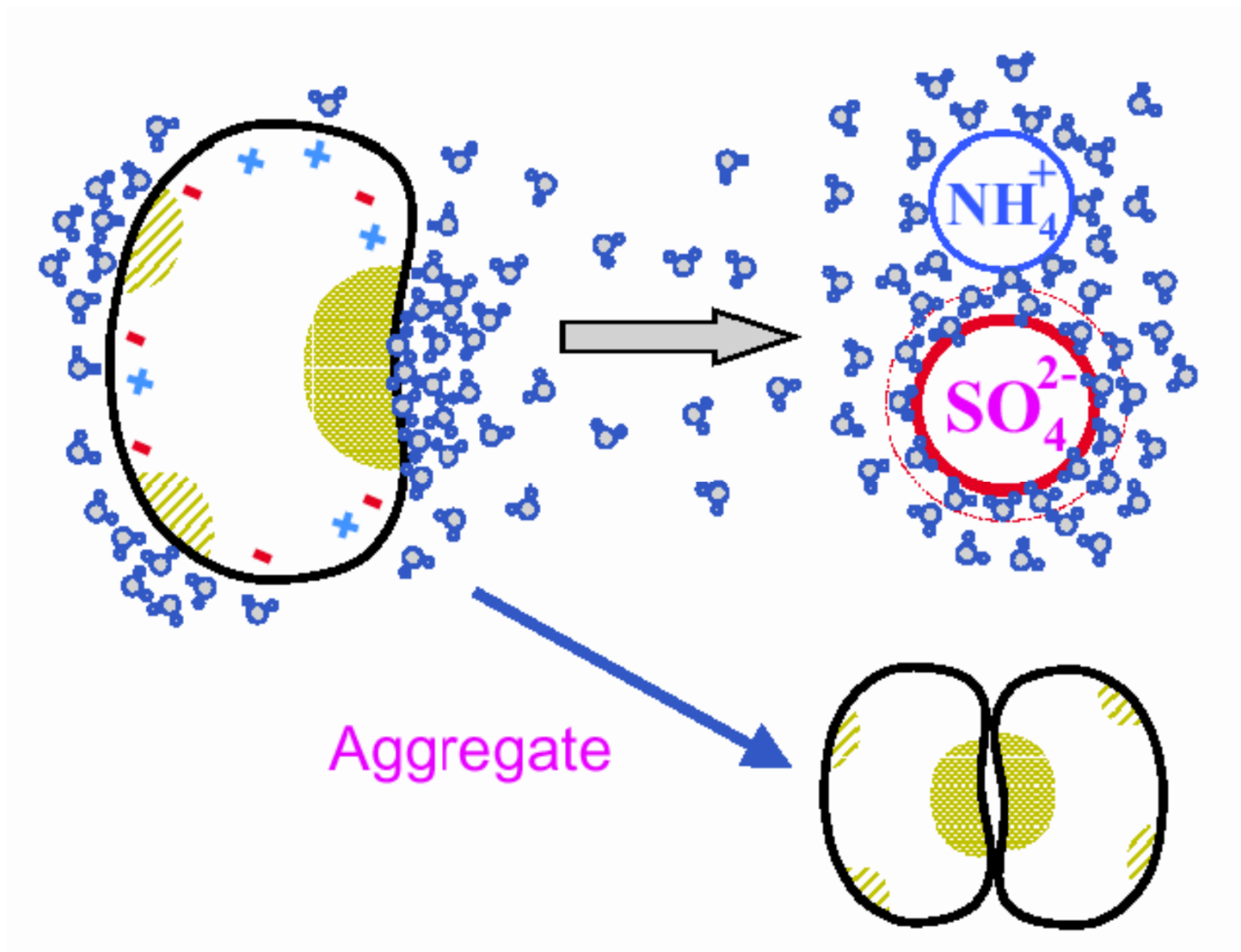
# Vsolování

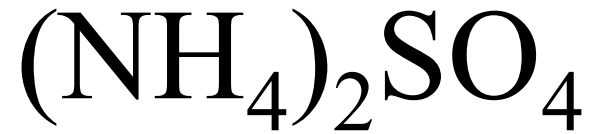


# Vysolování



# Vysolování

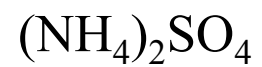




- Rozpustnost se málo mění s teplotou
- Saturevaný roztok 4 M - hustota 1,235g/cm<sup>3</sup> umožňuje centrifugaci agregovaných bílkovin (hustota 1,29 g/cm<sup>3</sup>)
- Levný
- Stabilizuje bílkoviny
- Relativně čistý



# Srážecí křivka



0

10

20

30

40

50

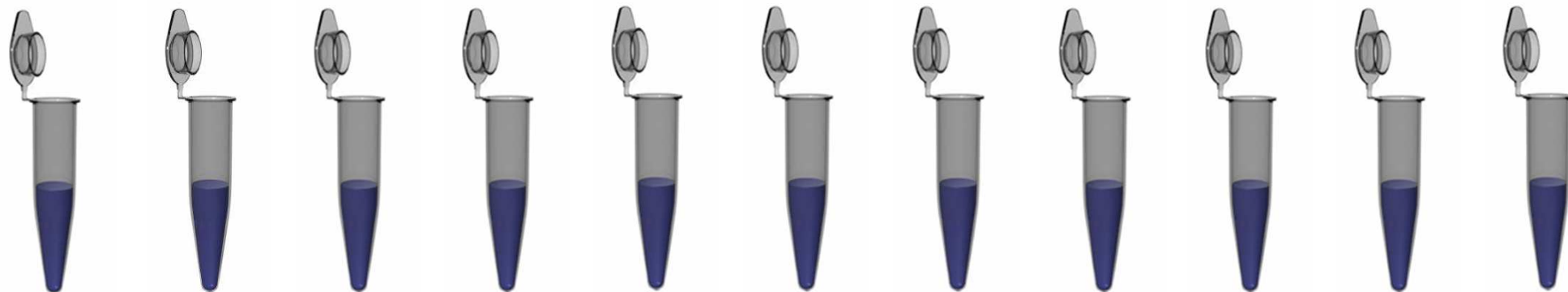
60

70

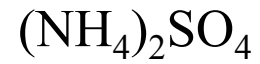
80

90

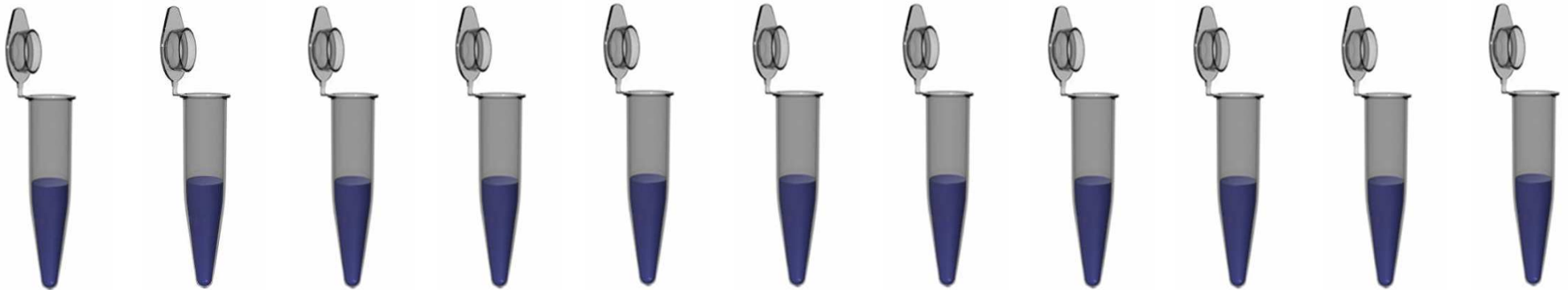
100 %



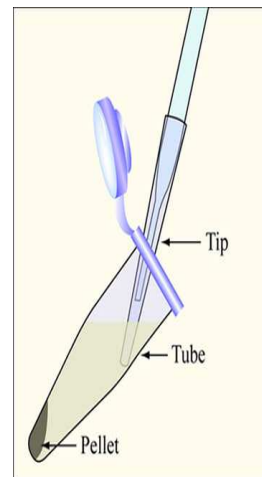
# Srážecí křivka



0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 %

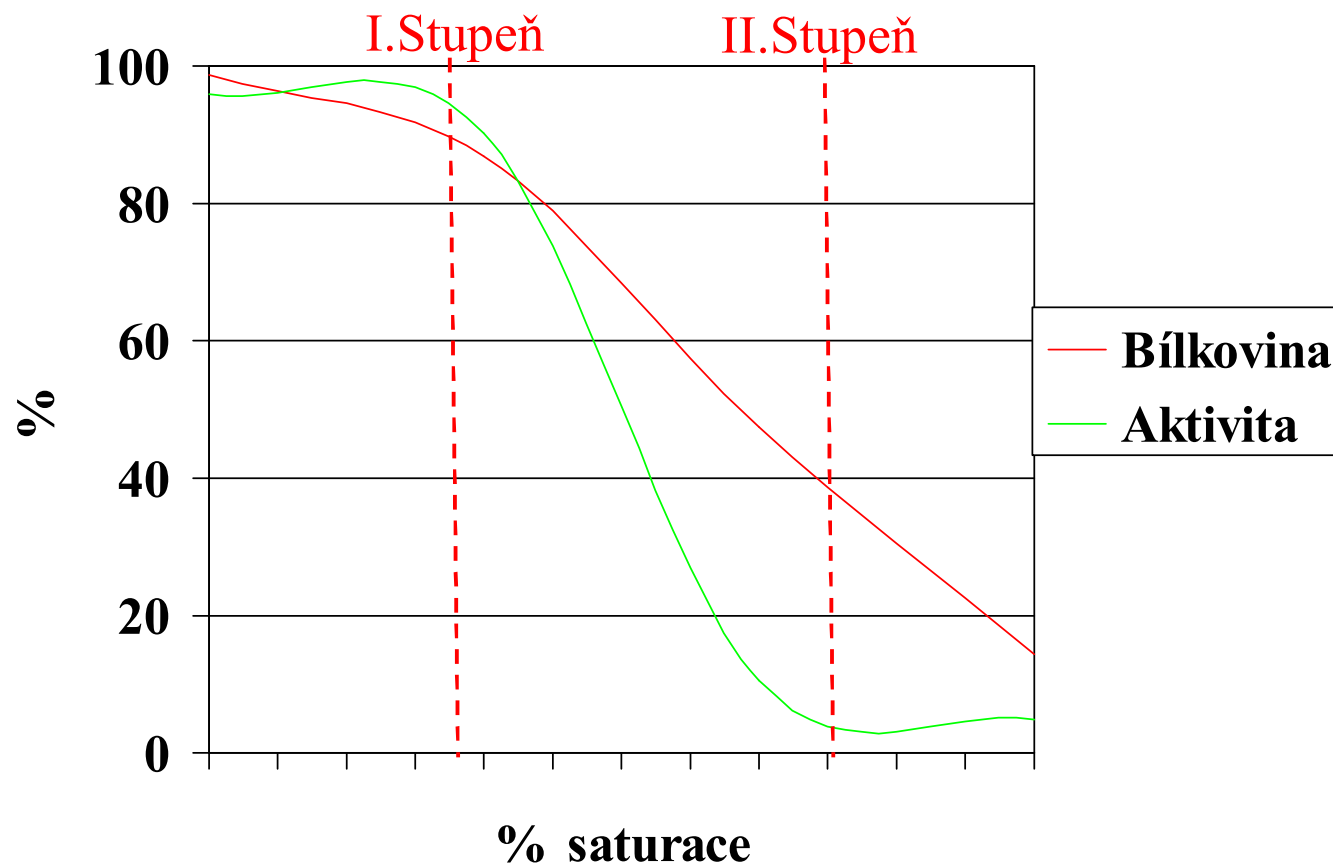


Koncentrace bílkoviny ←



→ Aktivita bílkoviny

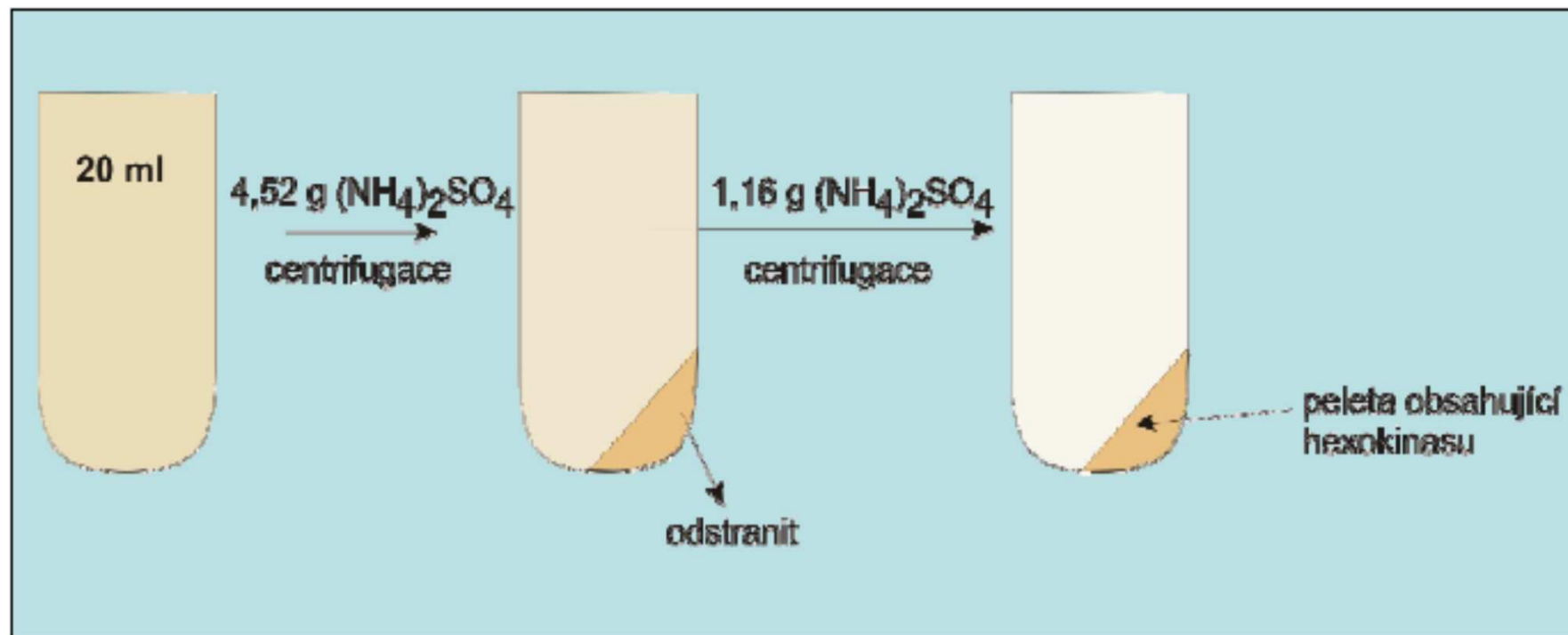
# Srážení - dvojstupňově



# Srážení - dvojstupňově

I. Stupeň

II. Stupeň





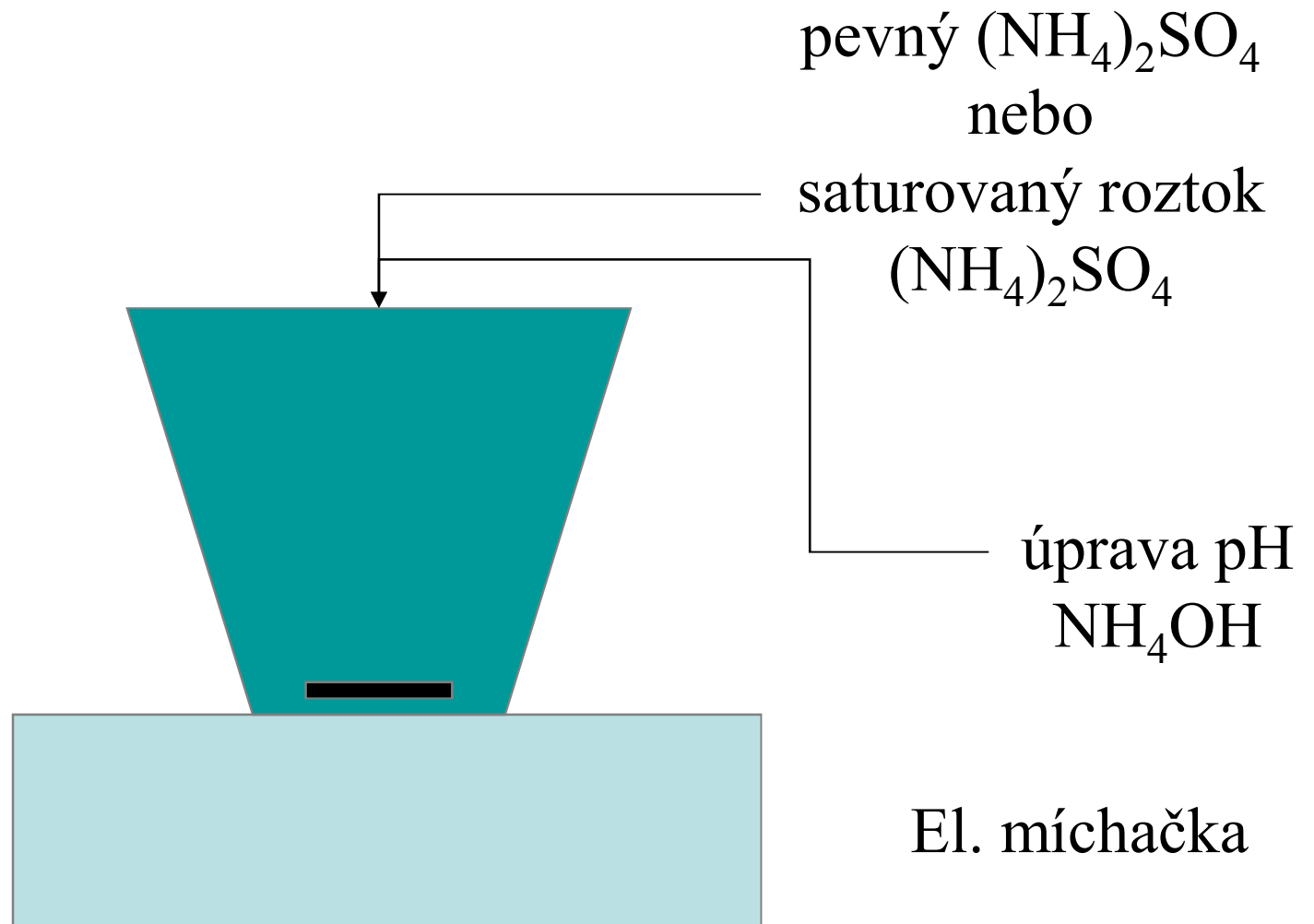
# Přidané množství

- Tabulky
- Vzorce

$$g/l = \frac{533 \cdot (S_2 - S_1)}{100 - 0.3 \cdot S_2}$$

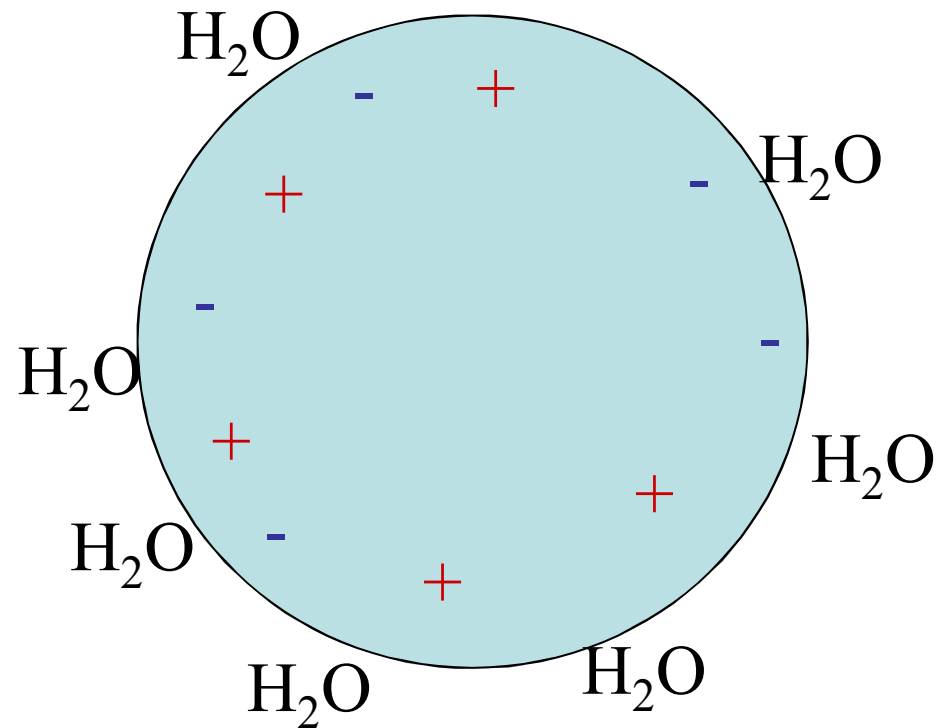
# Provedení

Chlazení  
Míchání 10-30'  
Centrifugace



# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- Rozpouštědla ruší solvatační obal bílkoviny





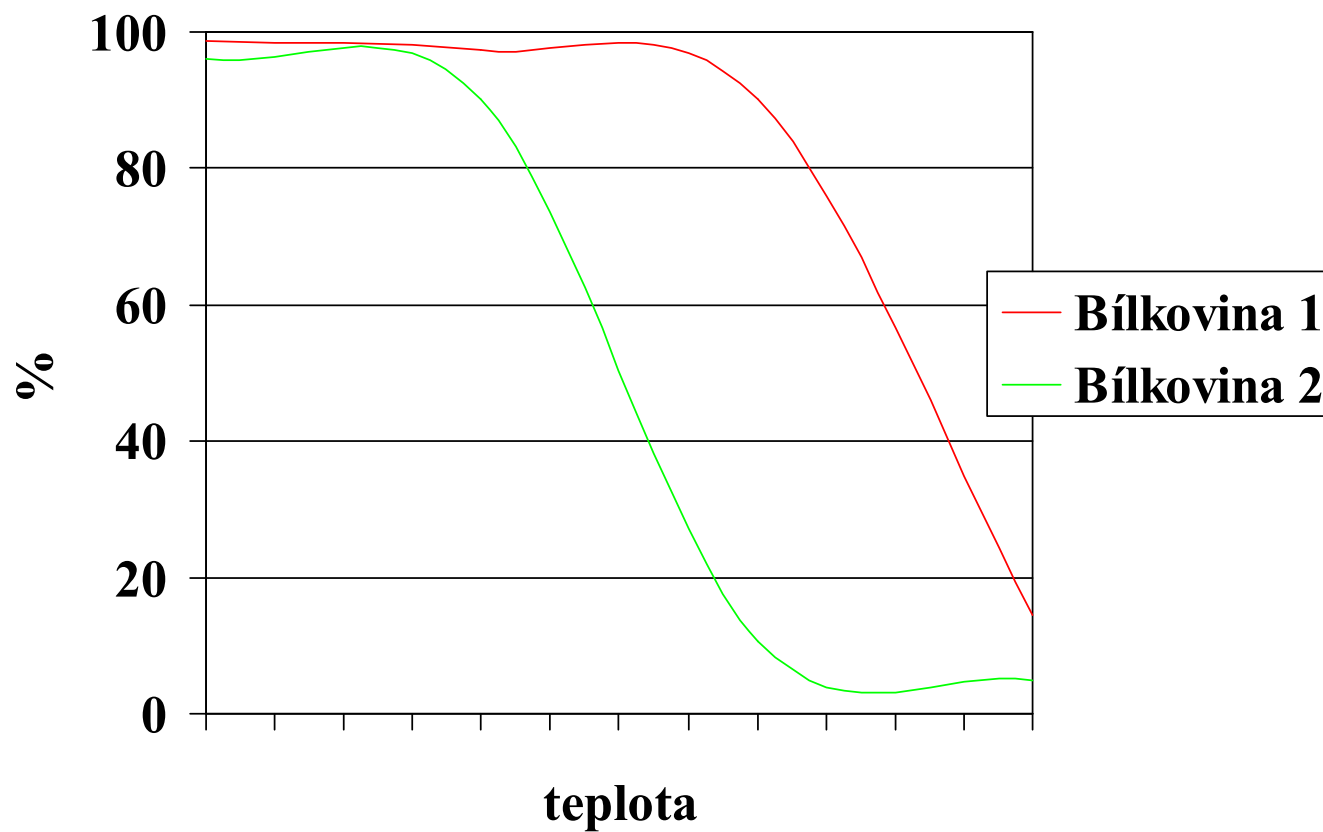
# Srážení org.rozpouštědly mísitelnými s vodou

- 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

# Srážení selektivní denaturací

- 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

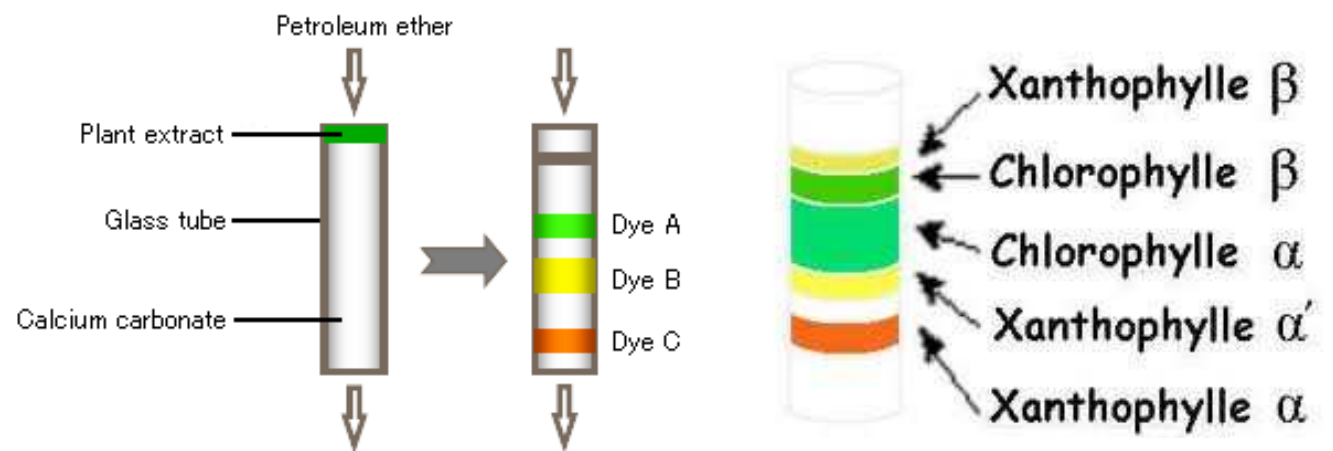
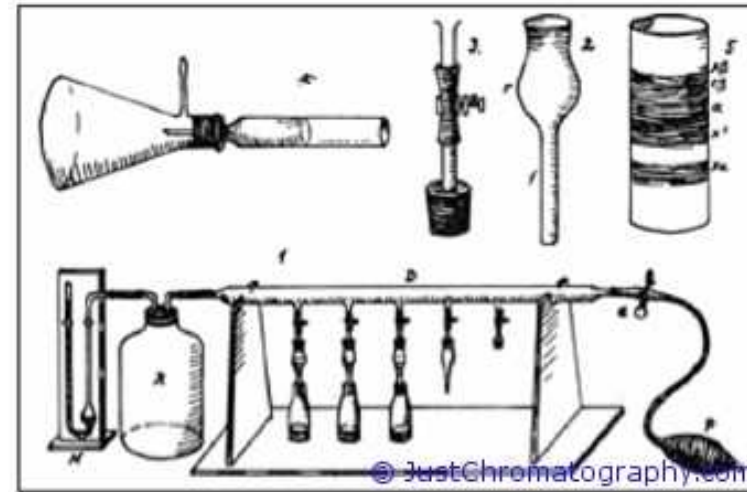
# Tepelná denaturace



# Chromatografické metody

# Mikhail Semyonovich Tsvet

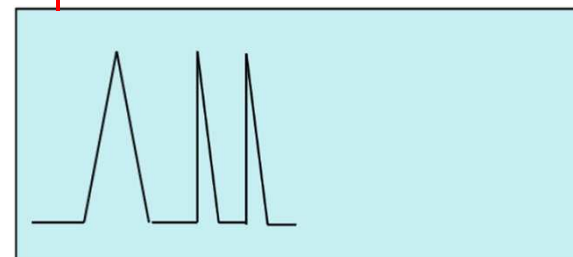
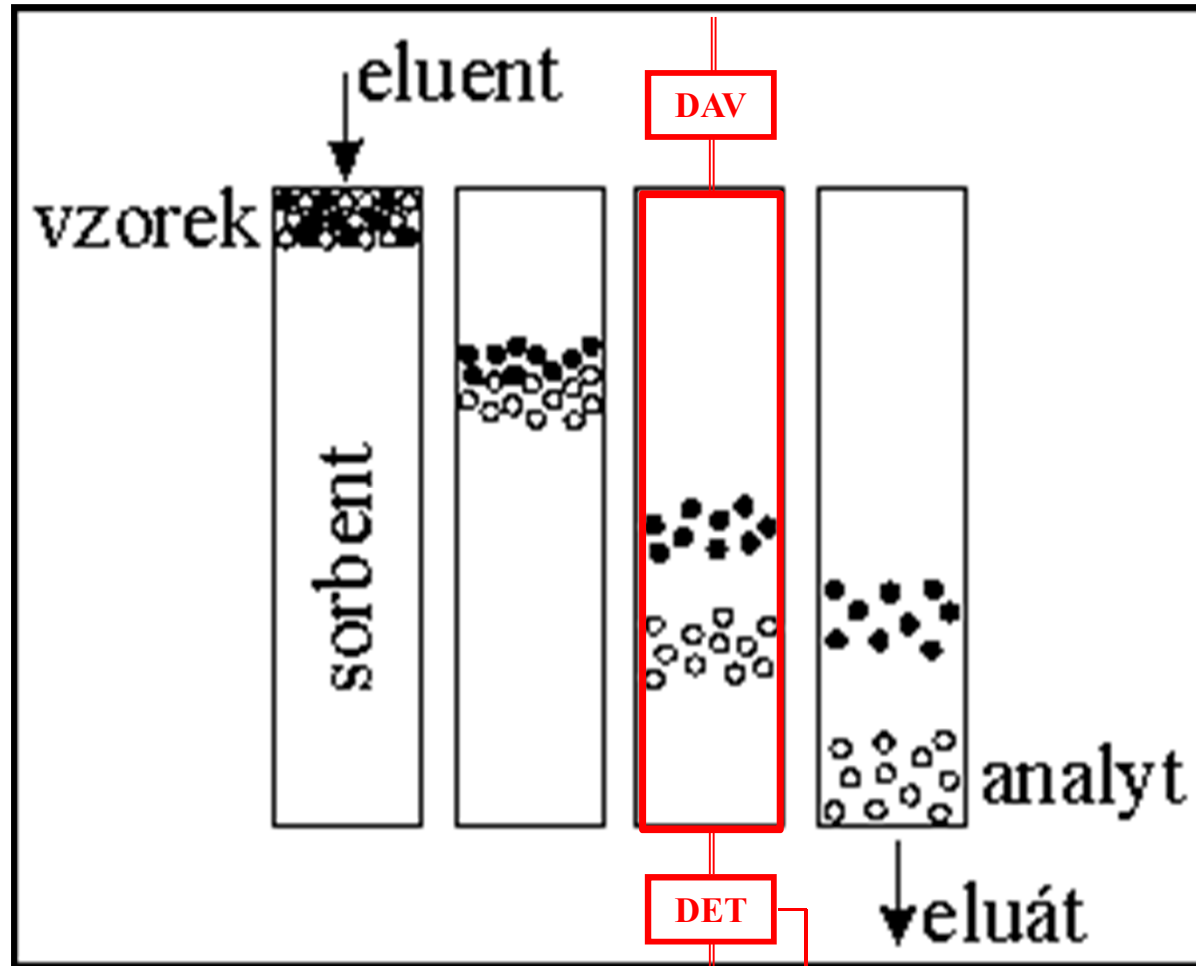
## Chromatographia 1906



# Podstata

*„Při chromatografii dochází  
k neustálému vytváření  
rovnovážných stavů separované látky  
mezi dvě fáze – stacionární a  
mobilní.“*

# Chromatografie



# Chromatografie

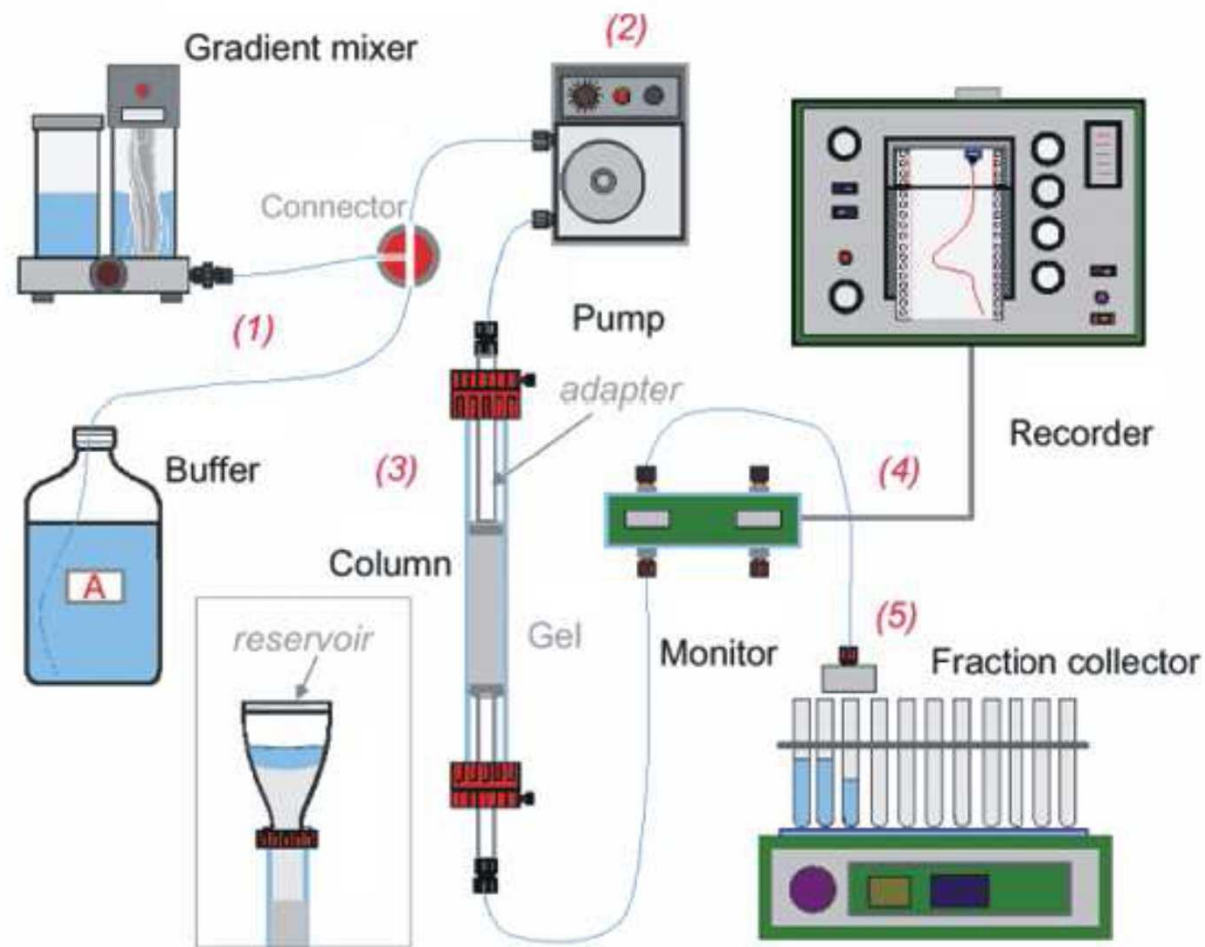
Mobilní fáze ↙  
↘ izokratická eluce  
gradientová eluce



← Stacionární fáze



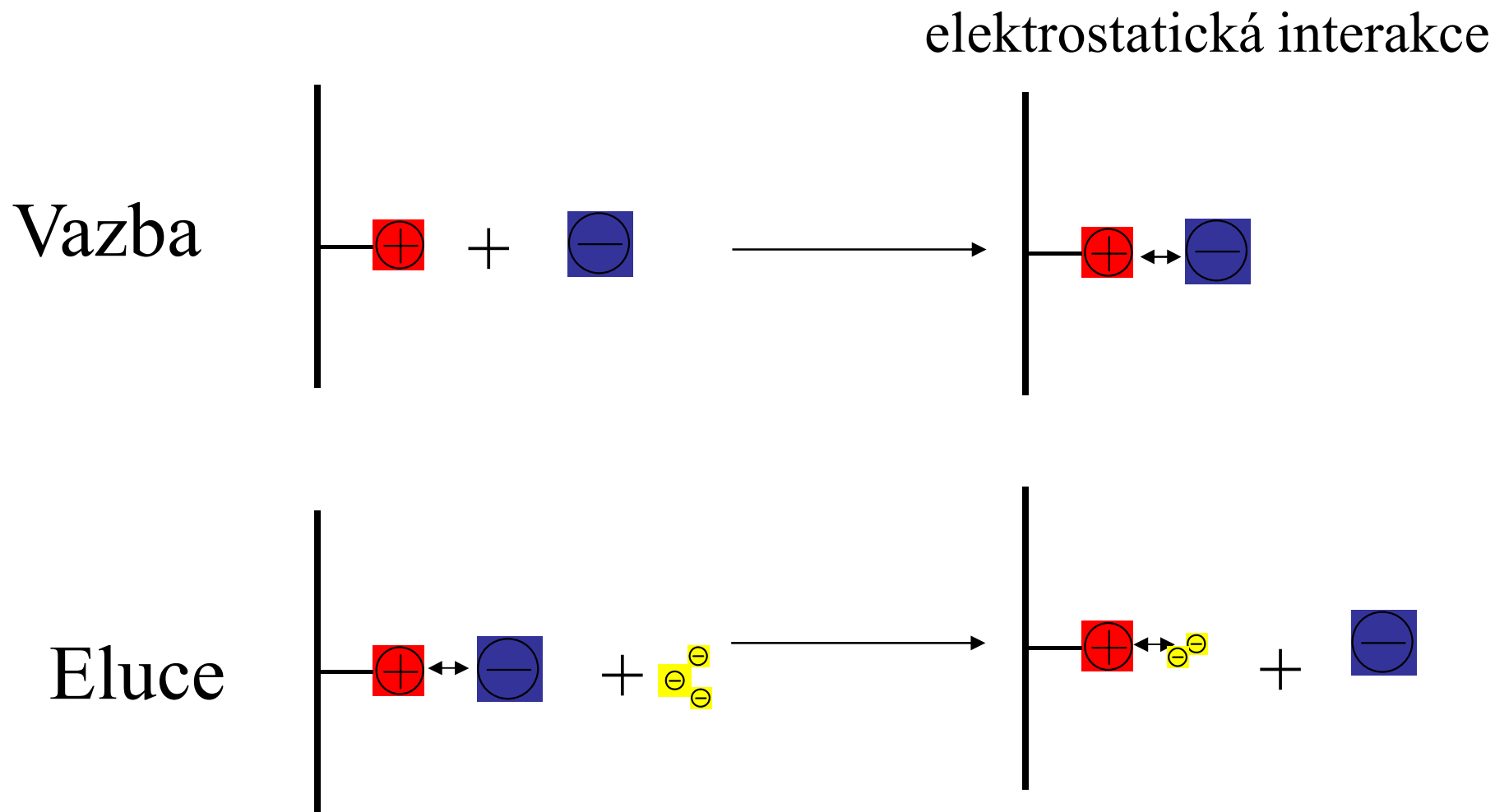
# Zařízení pro LPC



# Zařízení pro LPC



# Ionexová chromatografie



# Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP)  $\text{OSO}_3^-$

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM)  $\text{COO}^-$

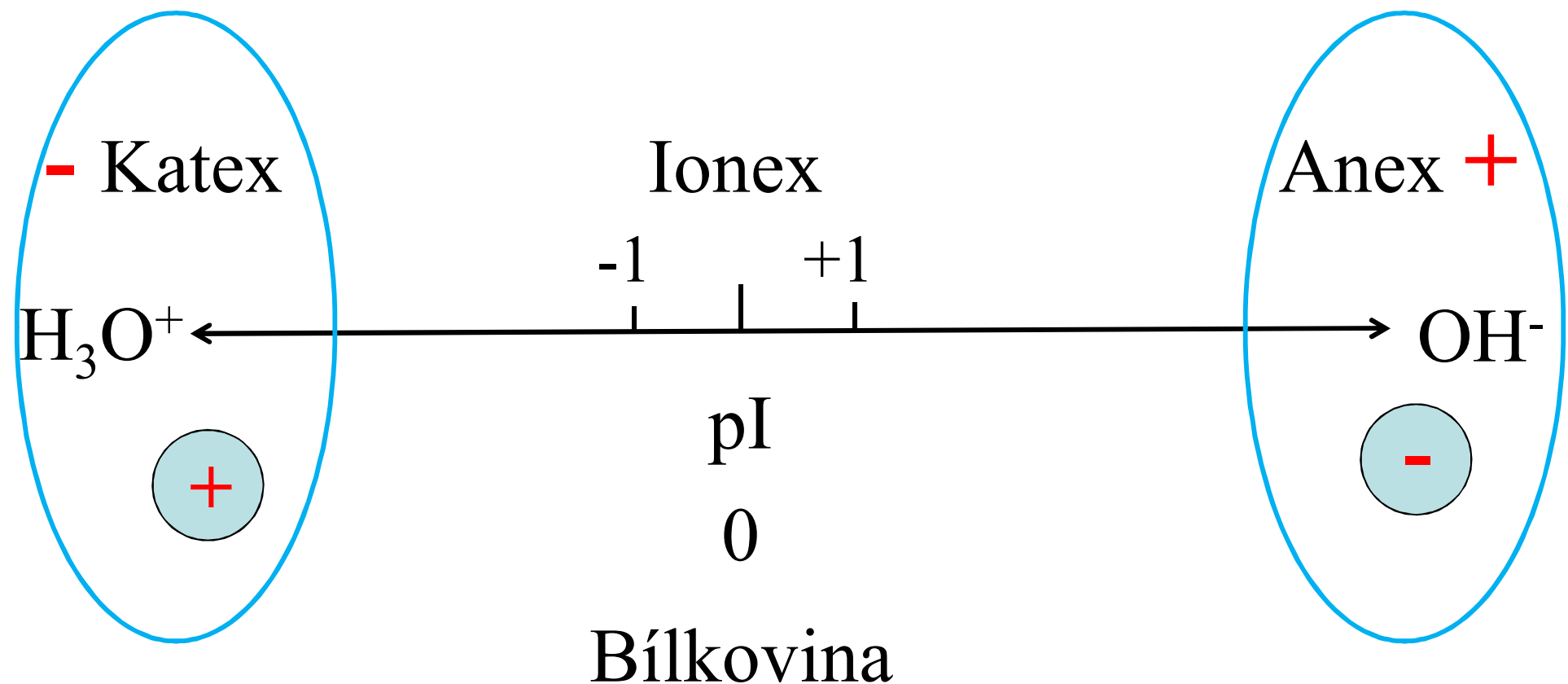
- Anexy - + vazba aniontů

silné - dietylaminoetyl(DEAE)

slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

# Volba podmínek – pH + typ ionexu

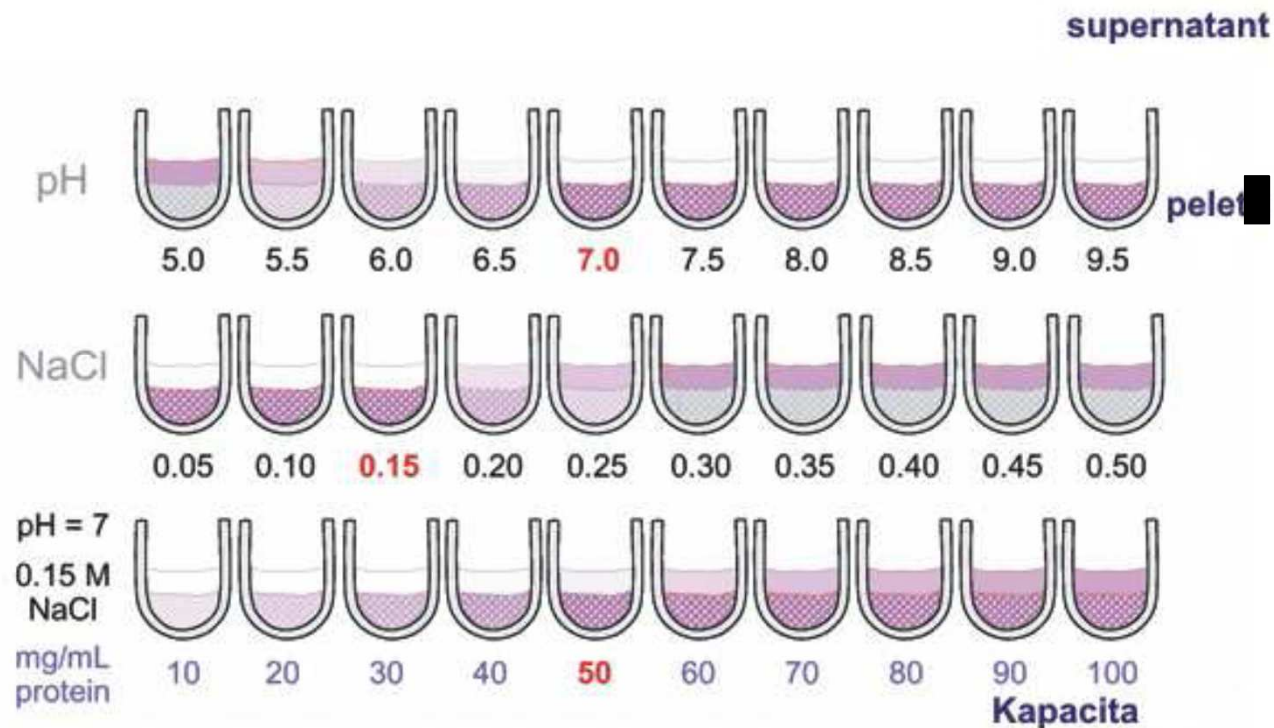
pI bílkoviny je znám



# Volba podmínek – pH + typ ionexu

pI bílkoviny není znám

- Metoda pokusů a omylů

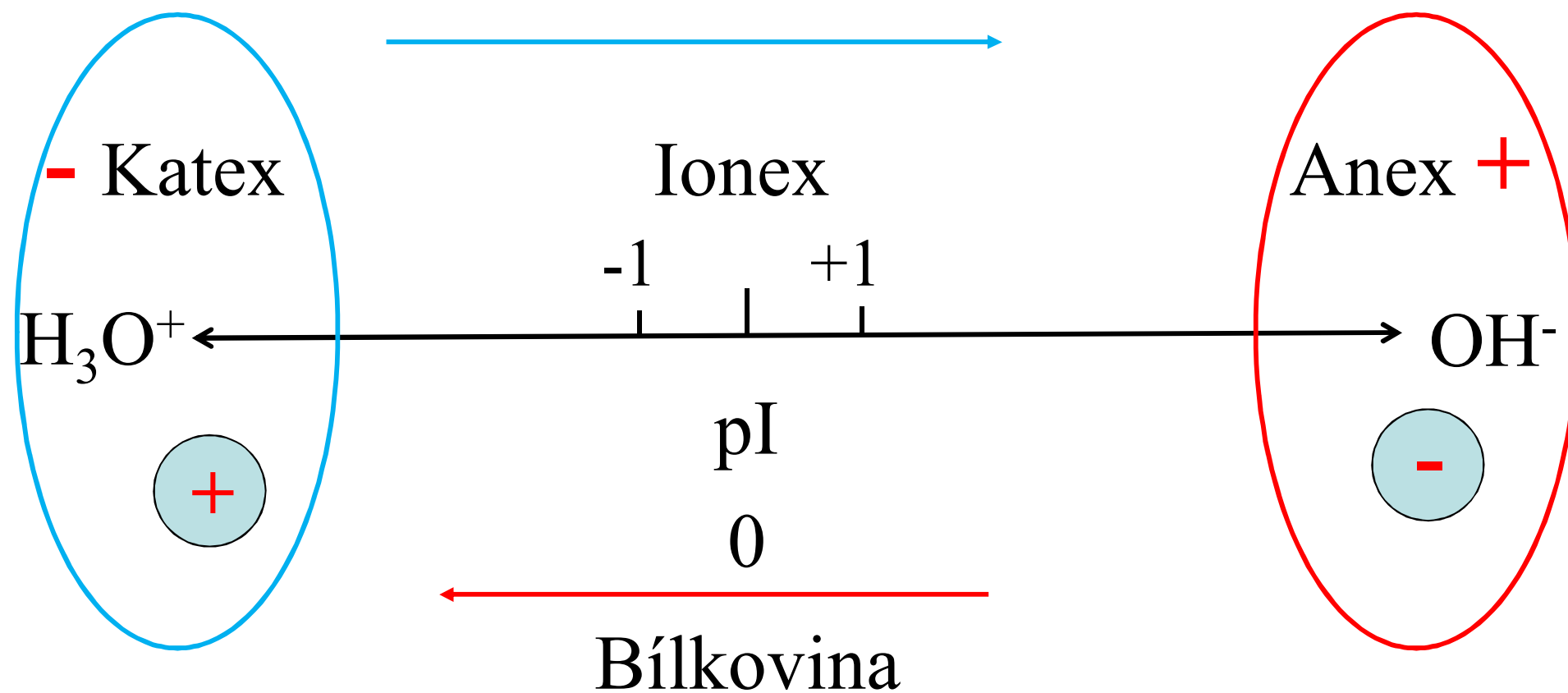


- Metoda titračních křivek

# Ionexová chromatografie

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – gradientová
  - Zvyšováním iontové síly
  - Změnou pH
  - Afinitní eluce

Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufu





# Ionexová chromatografie

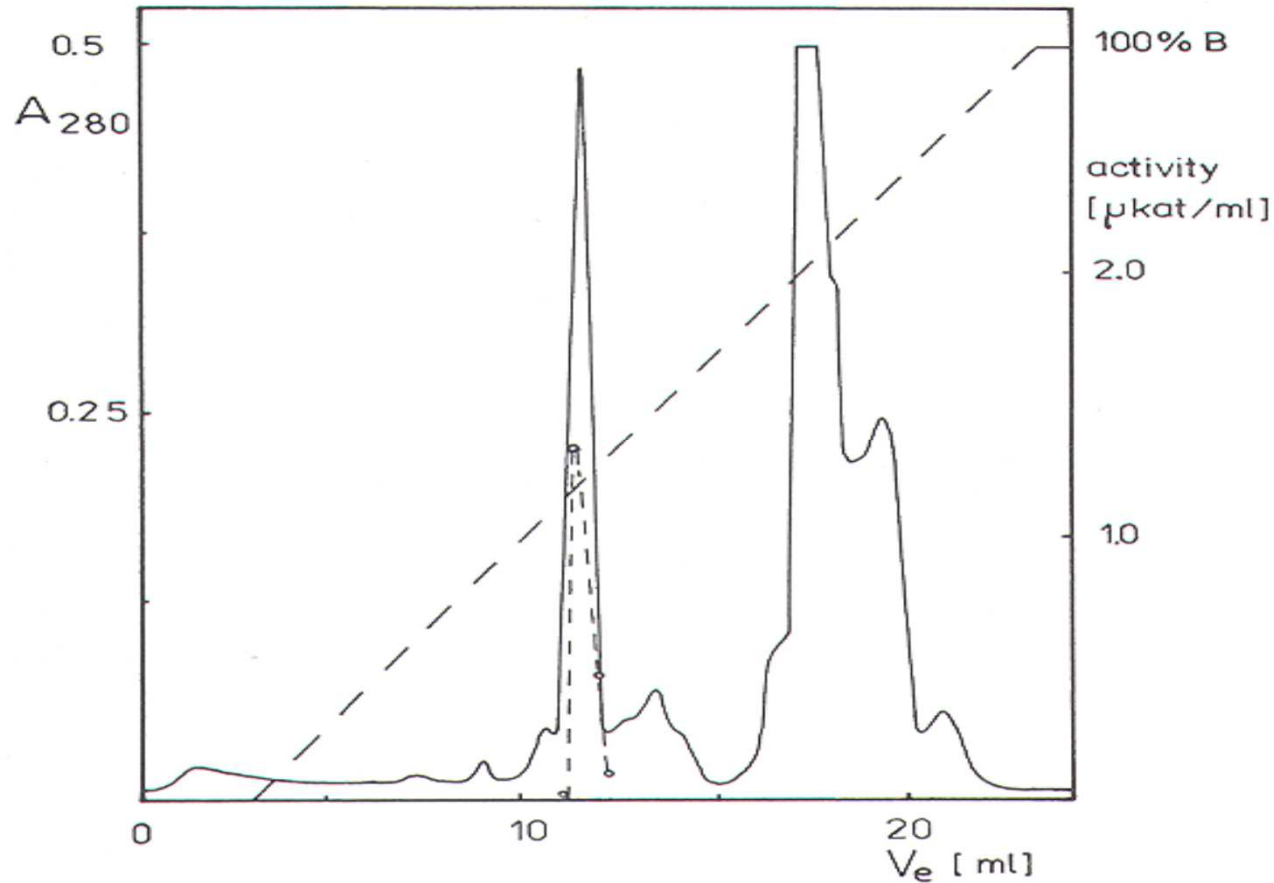


Fig. 2. Chromatography of partially purified G6P-DH on a Mono Q column. Buffers: (A) 0.05 M sodium phosphate (pH 7.4); (B) same as A but with 1 M sodium chloride; flow-rate, 1 ml/min. Lines symbol as in Fig. 1. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

# Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C<sub>8</sub>, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky  
1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

# Hydrofobní chromatografie

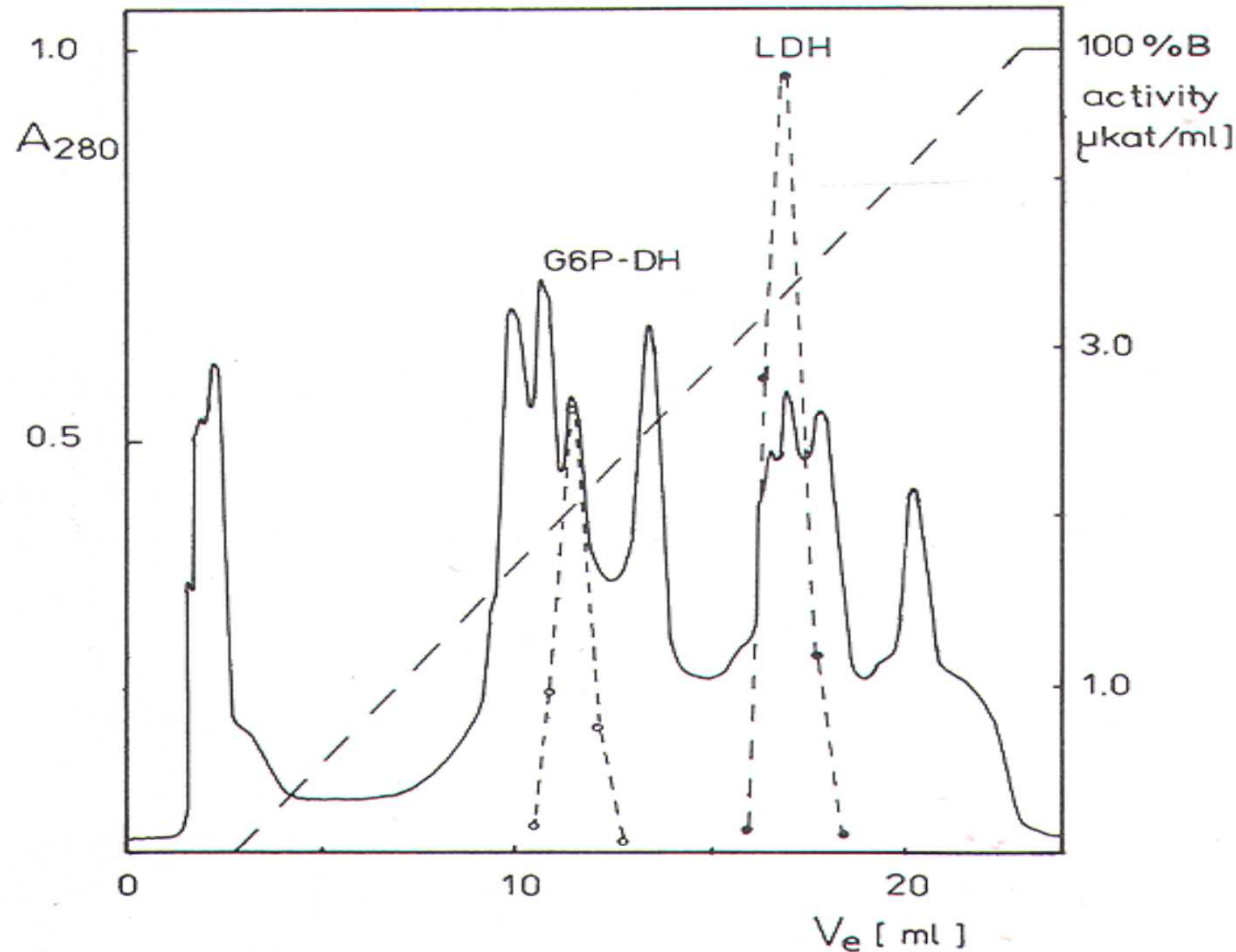
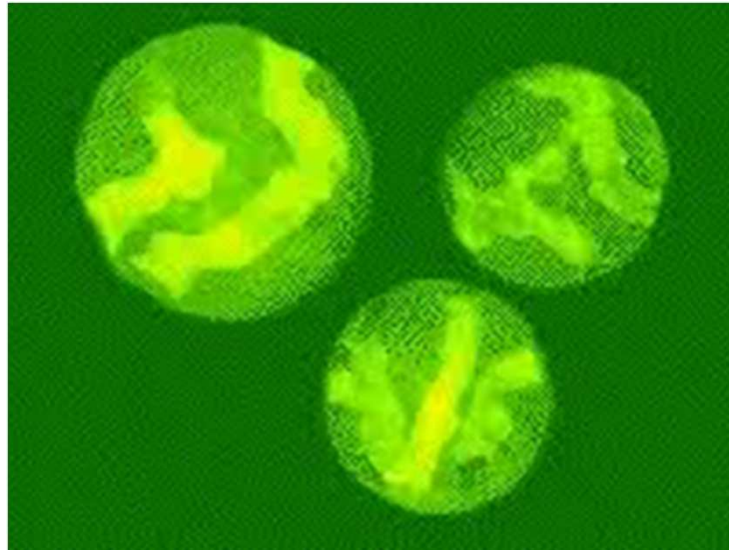


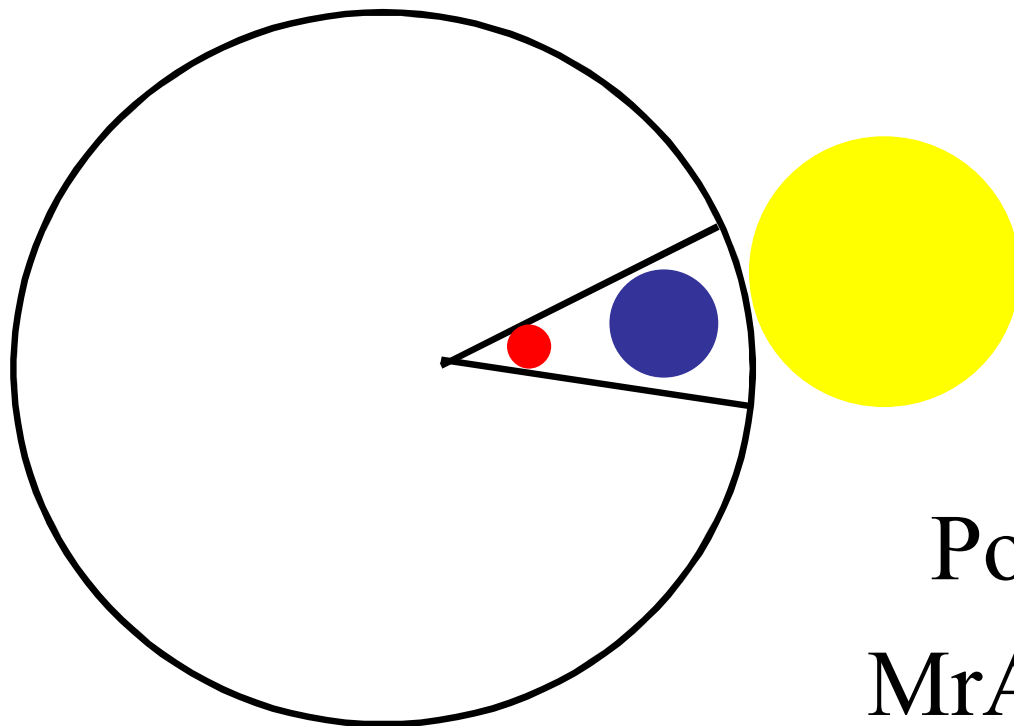
Fig. 1. Chromatography of crude enzyme preparation on a Phenyl-Superose column. Buffers: (A) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4) with 1.7 *M* sodium sulphate and 1 *mM* EDTA; (B) 0.05 *M* sodium phosphate (pH 7.4); flow-rate, 0.5 ml/min.  $V_e$ , elution volume; solid line, absorbance at 280 nm ( $A_{280}$ ); dashed lines, gradient; (○) G6P-DH activity; (●) LDH activity. Approximately 10 mg of protein were applied to the column.

# Gelová permeační chromatografie



# Gelová permeační chromatografie

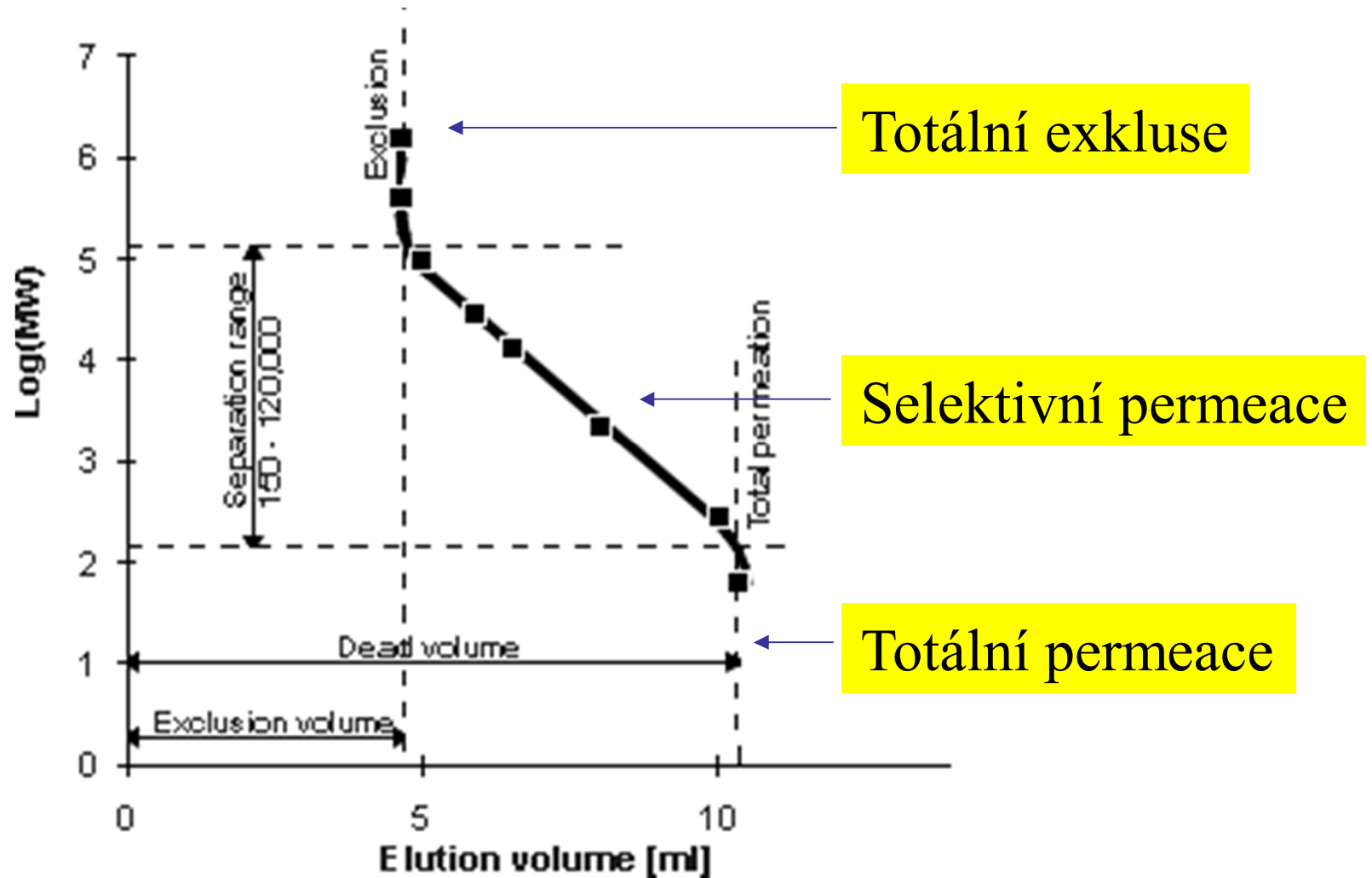
Princip - stérická exkluze  
- omezená difuze



Pořadí eluce :

$MrA > MrB > MrC$

# Gelová permeační chromatografie



# Gelová permeační chromatografie

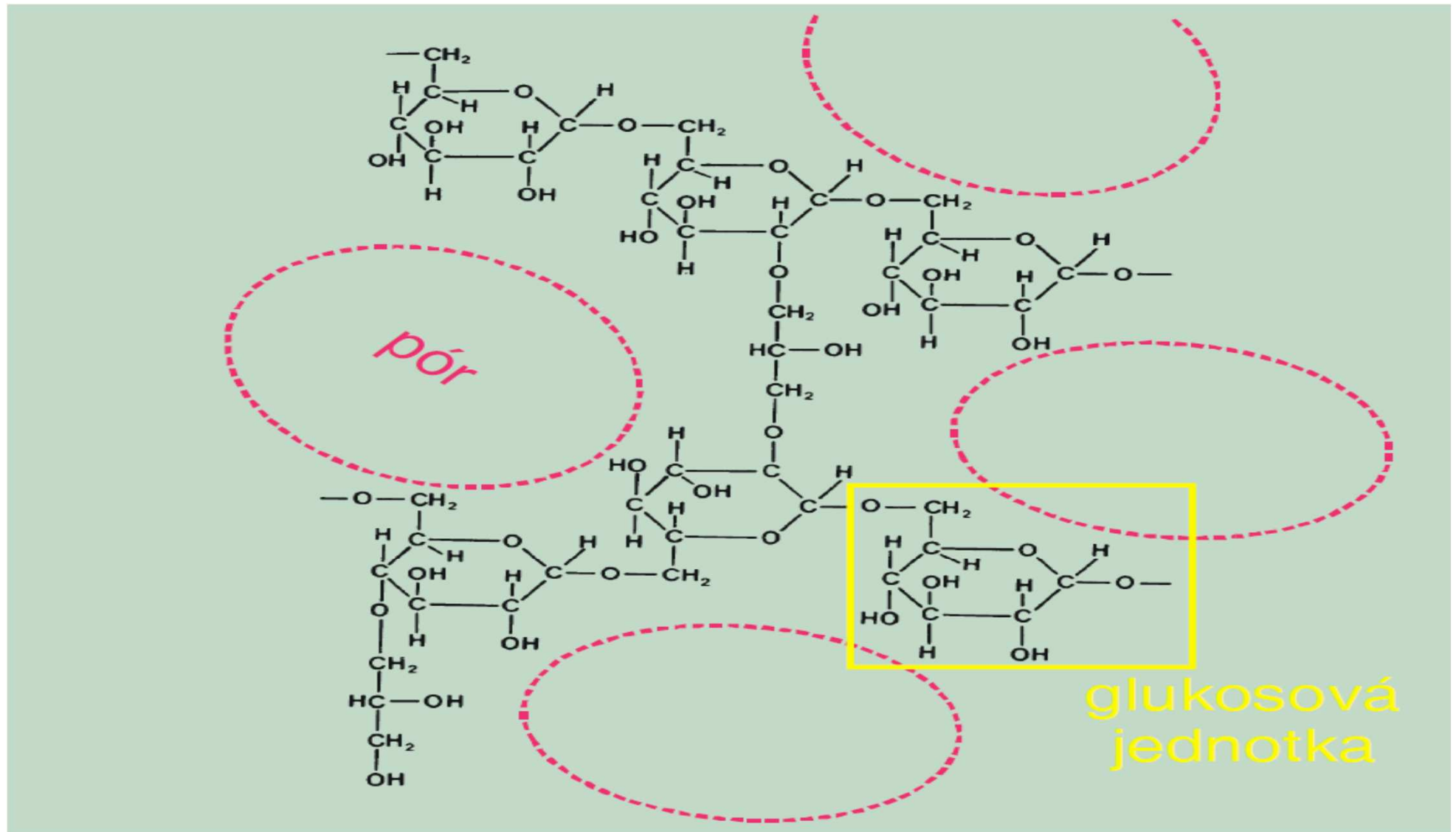
## Pharmacia LPC

- **Sephadex** dextran
- **Sepharose** agarosa
- **Sephacryl** glukosa + akryamid
- **Sephacel** cellulosa

## Pharmacia FPLC

- **Superose** agarosa
- **Superdex** síťovaná agarosa a dextran

# Sephadex

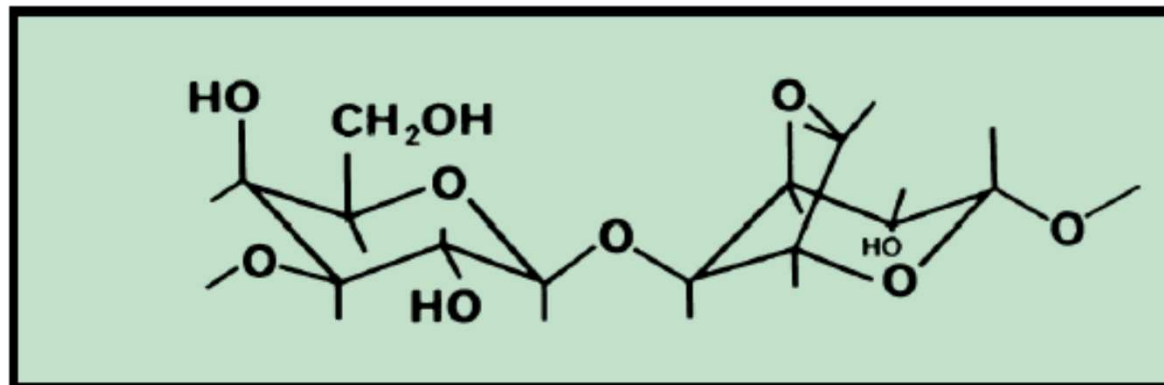
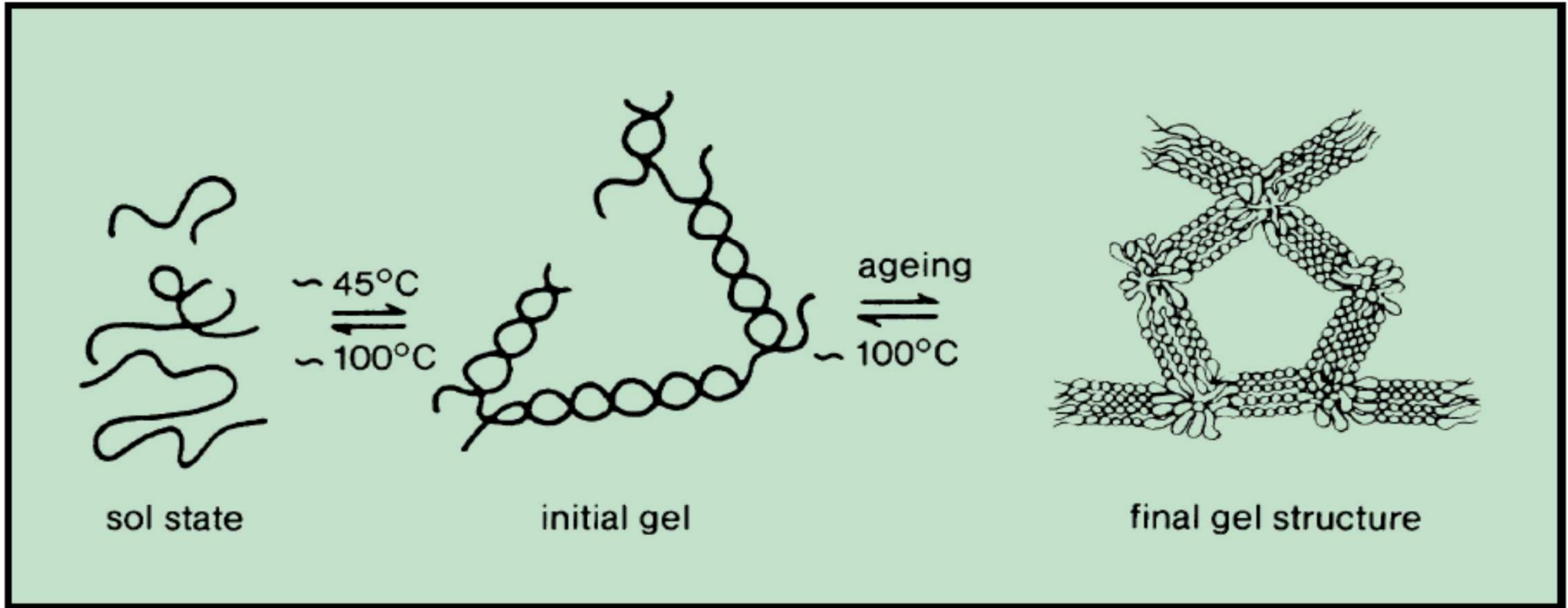




# Sephadex

Gel type	Dry bead size µm	Fractionation range		Fractionation range		Swelling factor ml/g
		Globular proteins		Dextrans		
Sephadex G-10	40 – 120	–	700	–	700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	–	1 500	–	1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 –	5 000	100 –	5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 –	30 000	500 –	10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 –	80 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 –	70 000	1 000 –	50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 –	150 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 –	100 000	1 000 –	100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 –	300 000	1 000 –	150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 –	150 000	1 000 –	150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 –	600 000	1 000 –	200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 –	250 000	1 000 –	150 000	20 – 25

# Sepharosa



# Sepharosa

Gel type	Approx. % agarose	Bead size $\mu\text{m}$	Fractionation range Globular proteins.	Fractionation range Dextrans
Sepharose 6B	6	45 – 165	10 000 – 4 000 000	10 000 – 1 000 000
Sepharose 4B	4	45 – 165	60 000 – 20 000 000	30 000 – 5 000 000
Sepharose 2B	2	60 – 200	70 000 – 40 000 000	100 000 – 20 000 000

Gel type	Bead size $\mu\text{m}$	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans
Superose 12 prep grade	20 – 40	1 000 – 300 000	ND
Superose 12	8 – 12	1 000 – 300 000	ND
Superose 6 prep grade	20 – 40	5 000 – 5 000 000	ND
Superose 6	11 – 15	5 000 – 5 000 000	ND

# Gelová permeační chromatografie

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

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

# Gelová permeační chromatografie

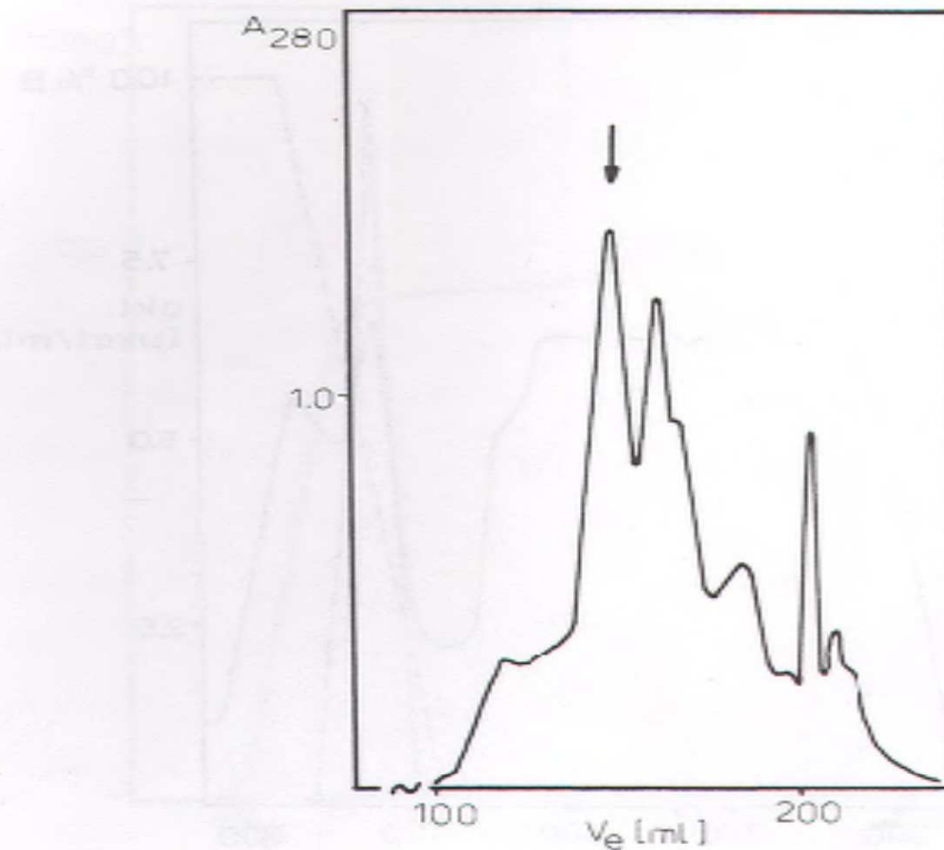
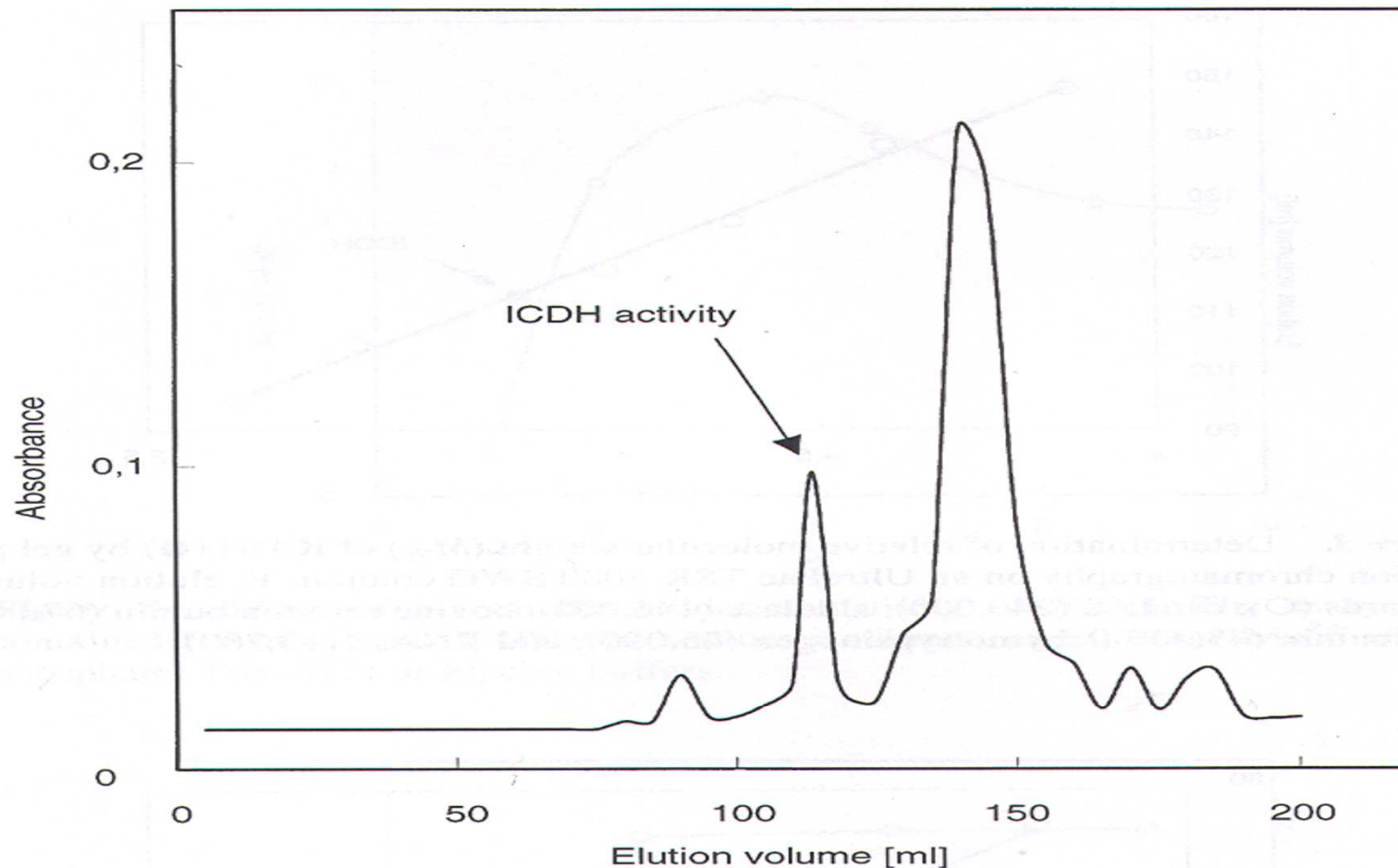


Figure 3

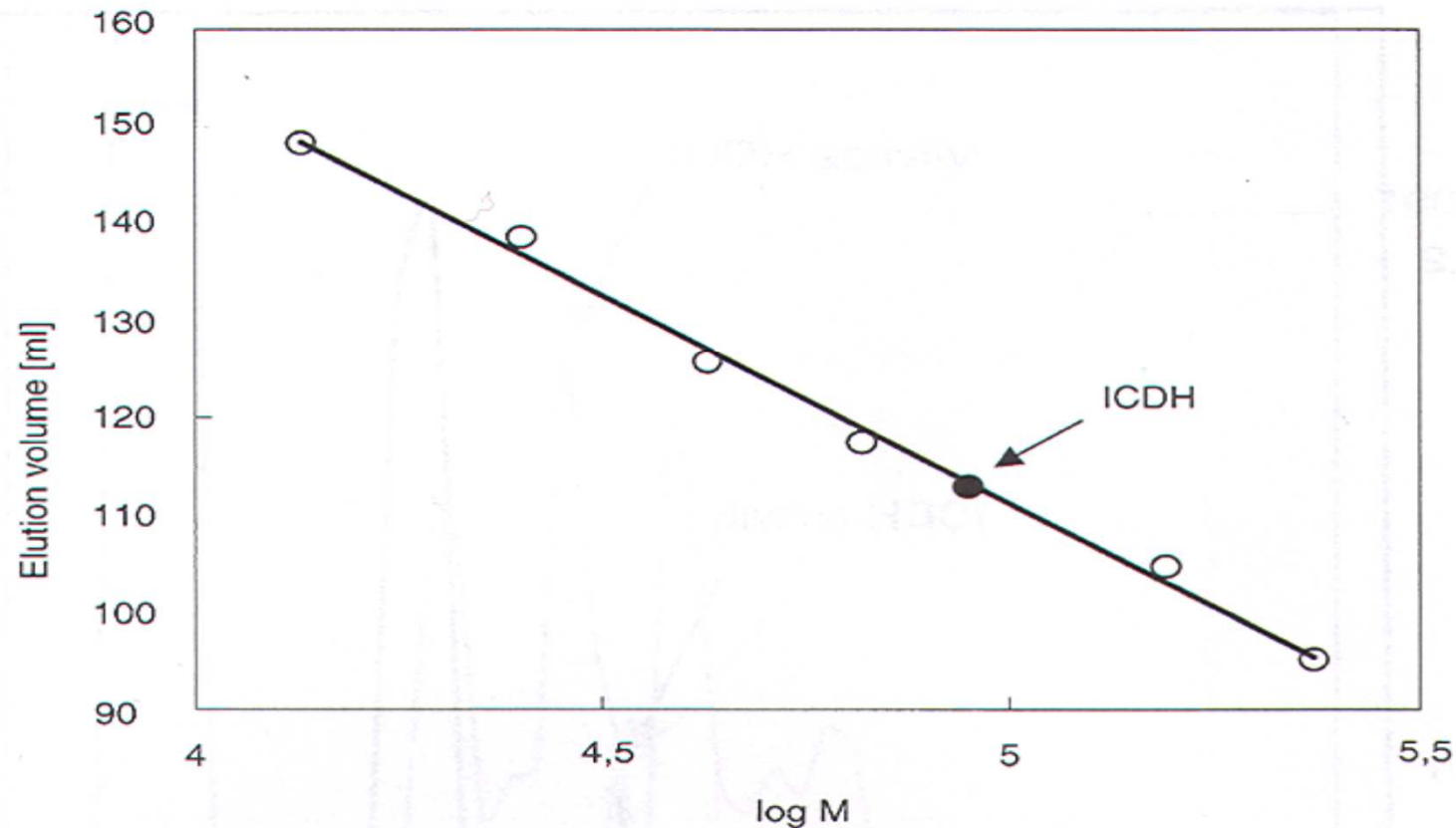
Chromatography of partially purified LAO on TSK 3000 SWG column. Buffer: 0.05 M potassium phosphate (pH 6.5) with 0.15 M sodium chloride; flow rate 5 ml/min. The symbols are as in Fig. 1. DAO activity is indicated by an arrow. Approximately 100 mg of protein were applied to the column.

# Gelová permeační chromatografie



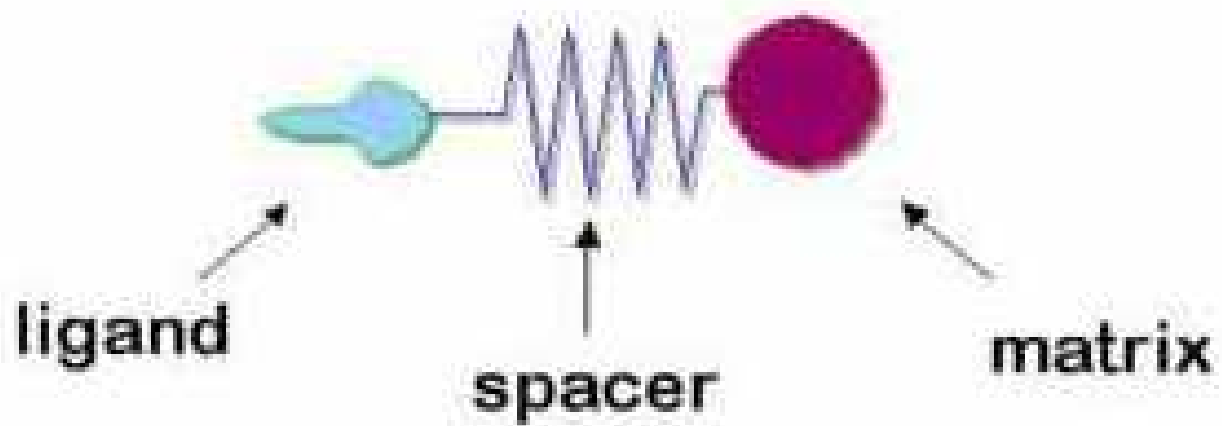
**Figure 2.** Chromatography of partially purified ICDH (after ammonium sulphate fractionation and ion exchange chromatography) on an UltraPac TSK G3000 SWG column. Buffer—20 mM sodium phosphate, pH 6.8; flow-rate 5 mL/min. ( $V_e$ ) elution volume; (—)  $A_{280}$ ; (---) ICDH activity. Approximately 10 mg of protein was loaded onto the column.

# Gelová permeační chromatografie



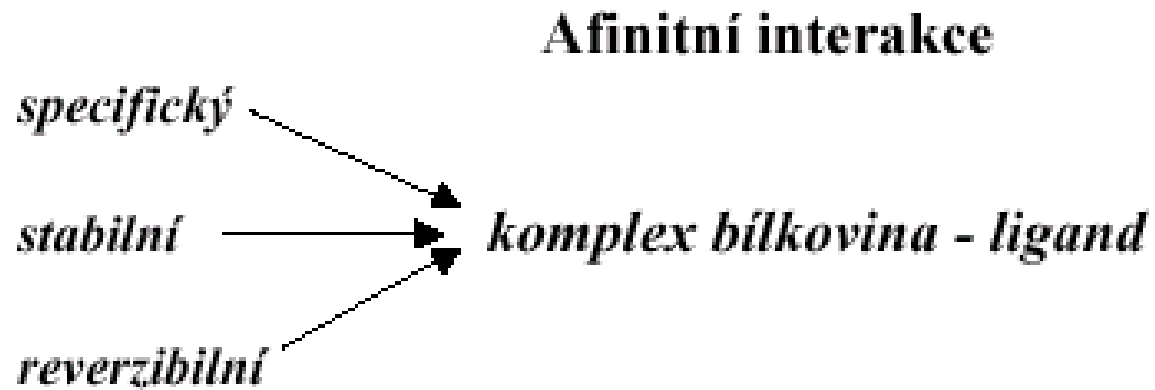
**Figure 3.** Determination of relative molecular weight ( $M_w$ ) of ICDH (●) by gel permeation chromatography on an UltroPac TSK 3000 SWG column.  $V_e$  elution volume; standards (○): catalase (240,000), aldolase (146,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen (25,000), and RNase (13,700).

# Afinní chromatografie





# Afinní interakce

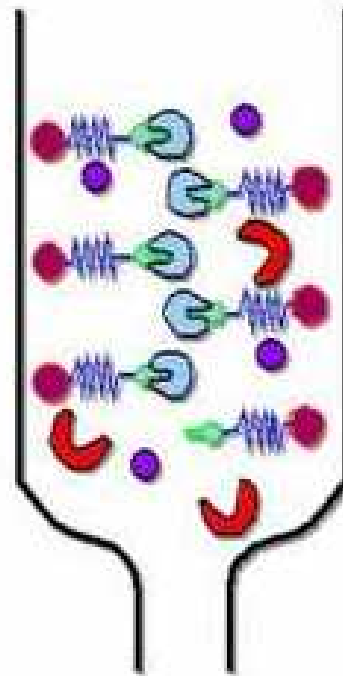


# Afinní chromatografie nanesení vzorku



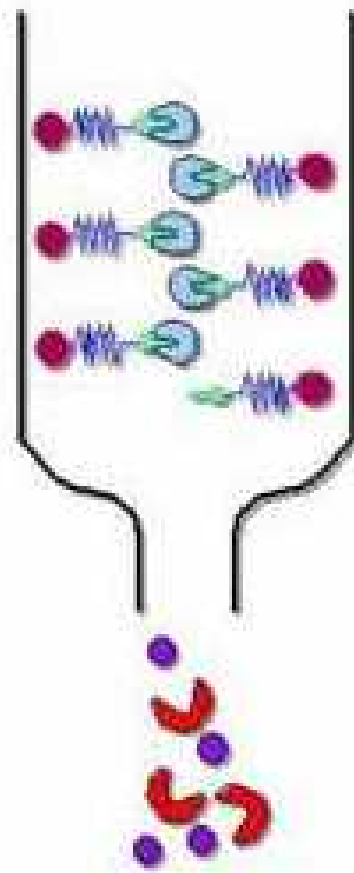
# Afinní chromatografie vznik interakce

SPECIFICITA



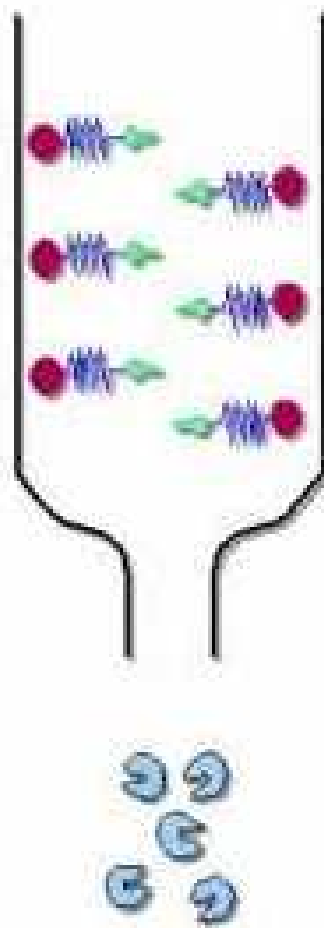
# Afinní chromatografie vymytí balastů

STABILITA

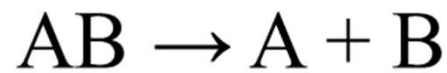


# Afinní chromatografie eluce

REVERZIBILITA



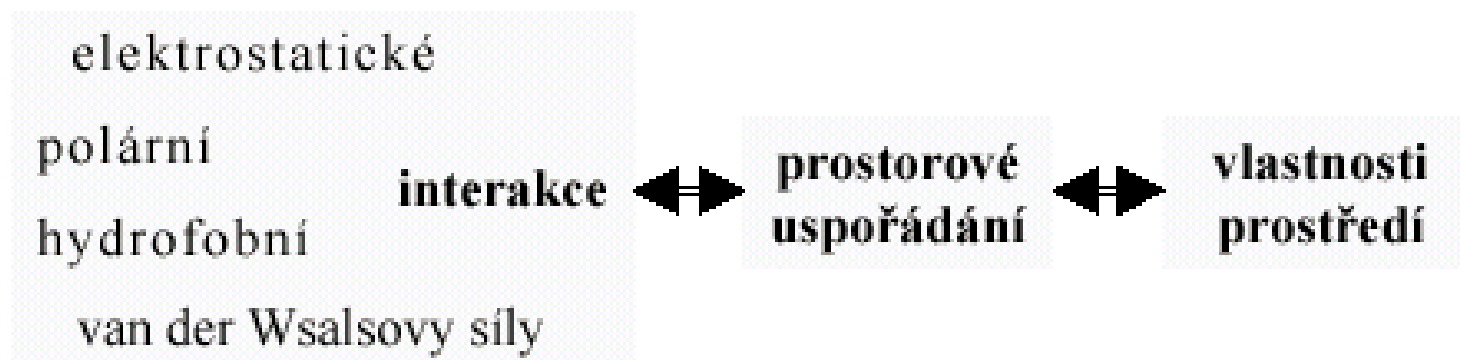
# Afinní páry



$$K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

Ligand	Bílkovina	$K_D$ (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	$10^{-15}$
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

# Afinní interakce



# Předpoklady pro vznik komplexu

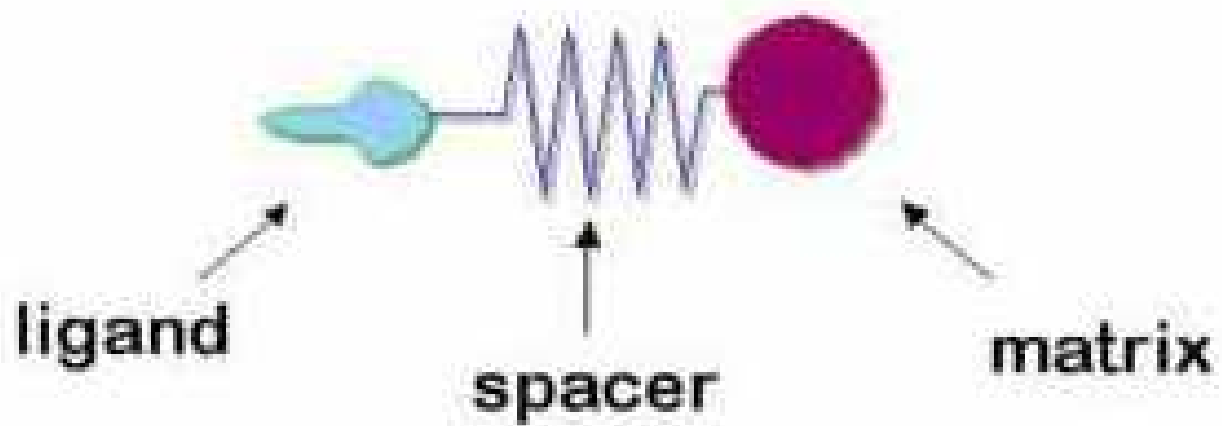
- Sterické – použití raménka (spacer)



- Optimální pH, iontová síla

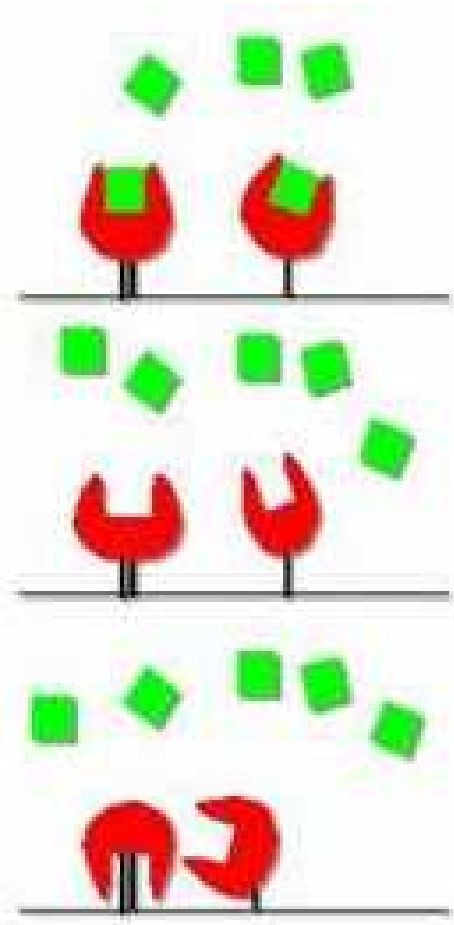


# Afinní chromatografie



# Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační



# Ligandy

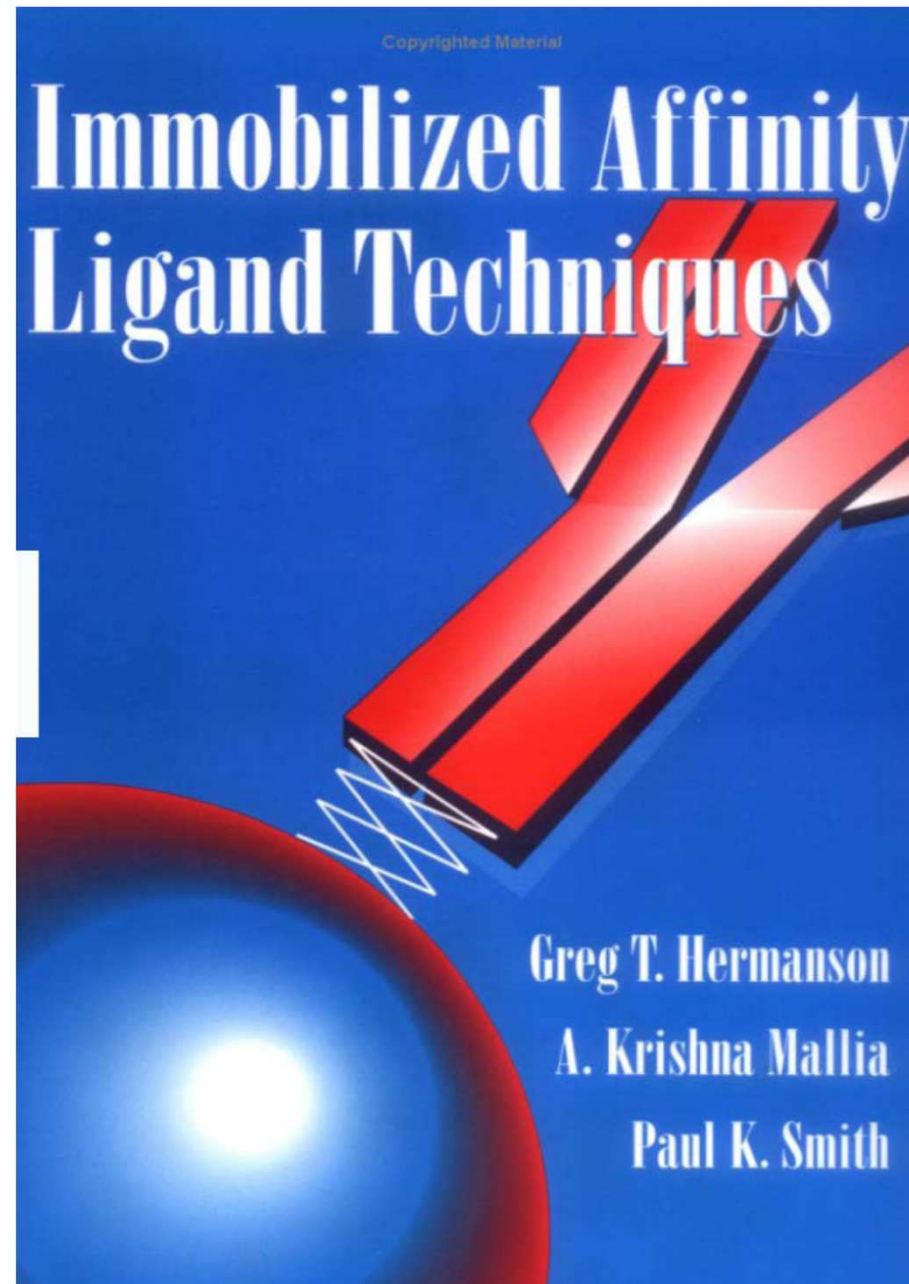
## **Monospecifické**

- váží pouze jedinou biomakromolekulu
- nutné si připravovat individuálně

## **Skupinově specifické**

- váží biomakromolekuly s podobnými vlastnostmi
- komerčně dostupné

# Imobilizace ligandů



# Skupinově specifické ligandy

skupinově specifický ligand	specifita
Protein A	Fc region IgG
Protein G	Fc region IgG
Lektiny	glukopyranosylové a mannopyranosylové skupiny
Cibacron Blue	široká skupina enzymů, NAD <sup>+</sup> dependentní enzymy, sérový albumin
Procion Red	NADP <sup>+</sup>
Lysin	plasminogen, rRNA
Arginin	serinové proteasy
Benzamidin	serinové proteasy
Kalmodulin	proteiny regulované kalmodulinem
Heparin	kolagulační faktory, lipoproteiny, lipasy, hormony, steroidní receptory, nukleové kyseliny vázající enzymy
Streptavidin	Biotin a biotinylované látky
Oligo (dT, dA, ...)	mRNA, nukleasy
Kovové ionty	proteiny a peptidy obsahující dostupný His

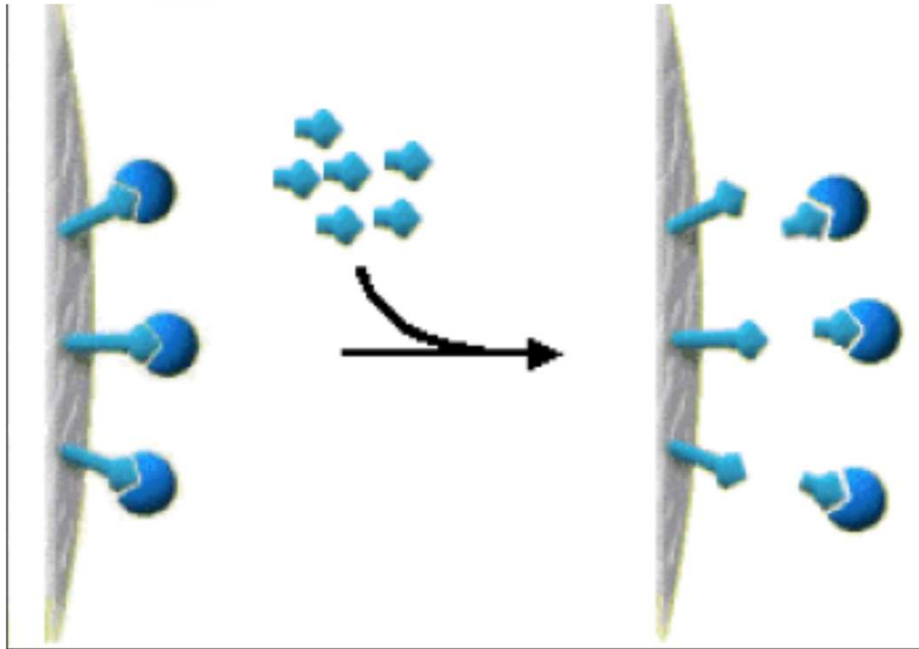
# Provedení

- Nanesení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – selektivní - volným ligandem
  - neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity

Použití : analytické (stanovení  $K_D$ ), purifikace

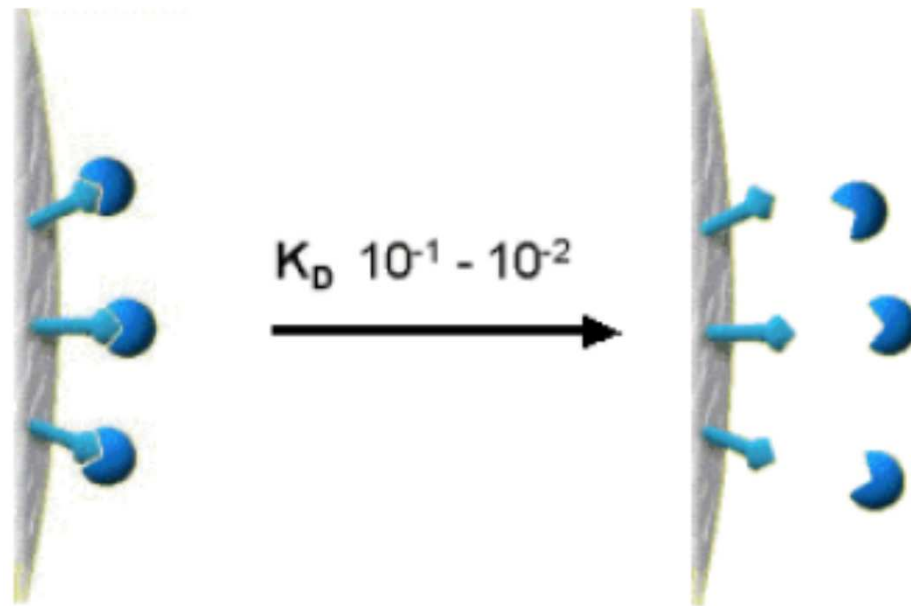
# Eluce

- Eluce – selektivní - volným ligandem  
nebo kompetičním činidlem



# Eluce

- Eluce – neselektivní - změna pH,  
iontové síly,  
polarity







# Skupinově specifické ligandy

## Cibacron Blue F4G-A

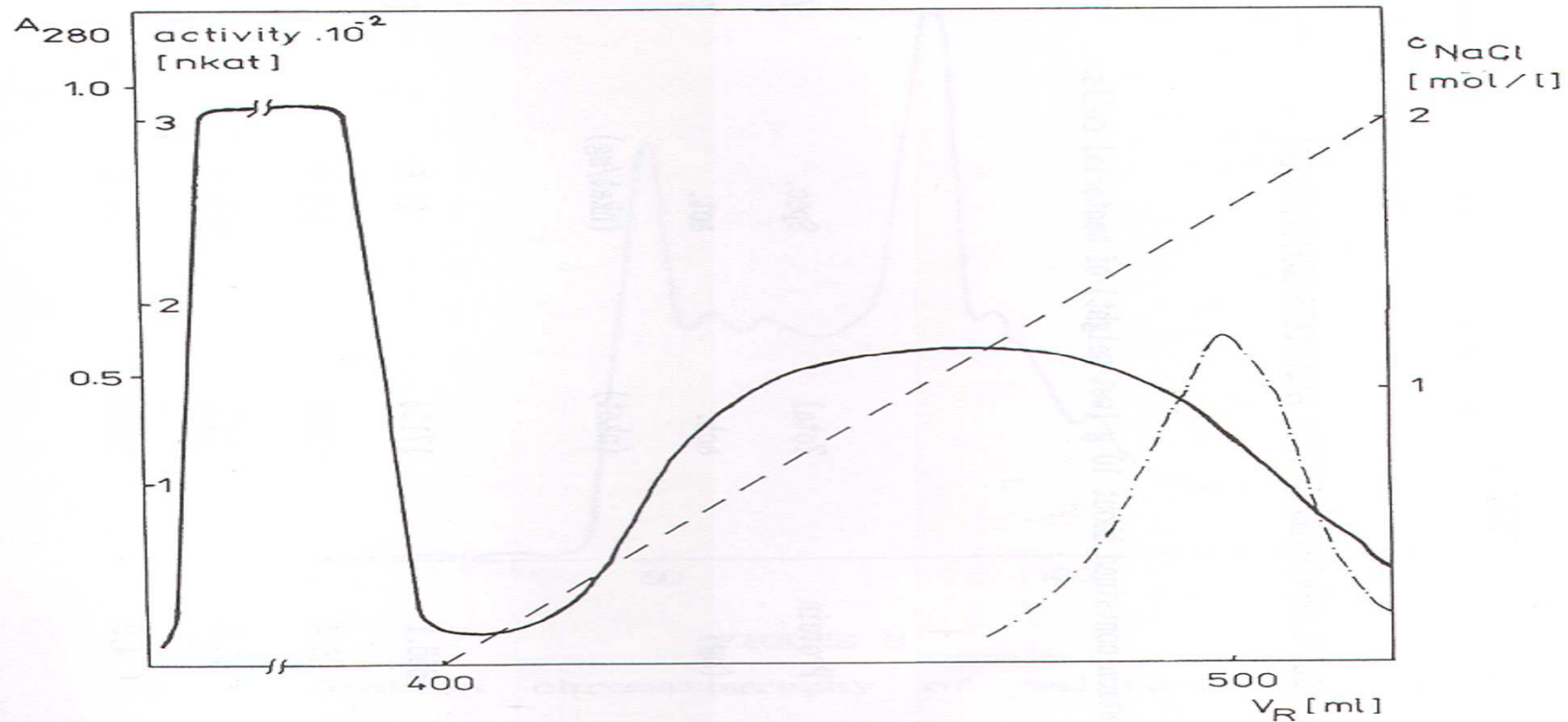
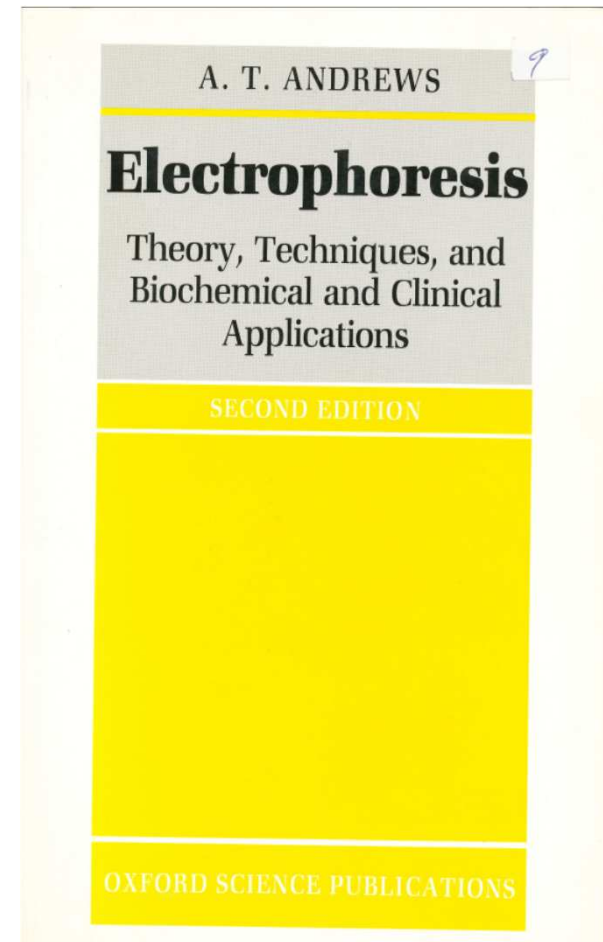
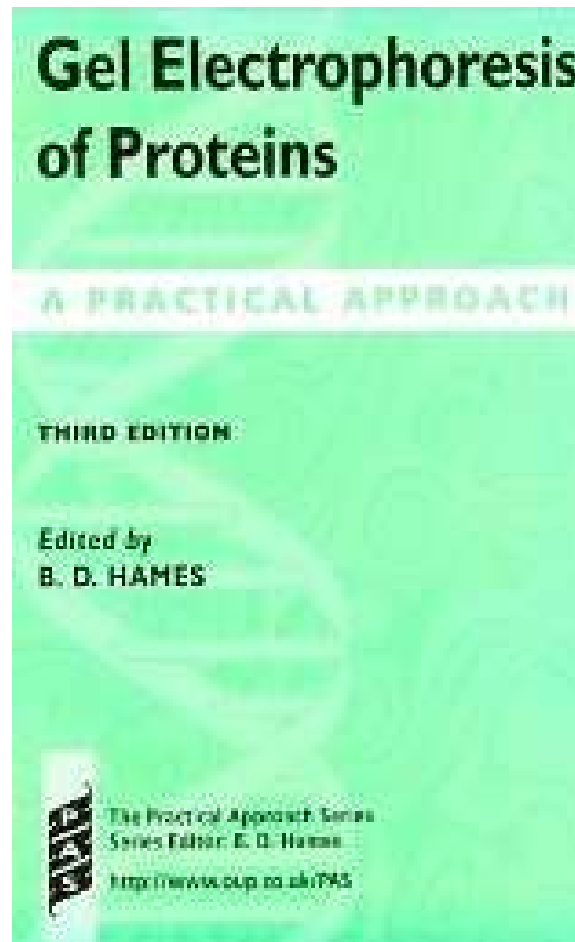
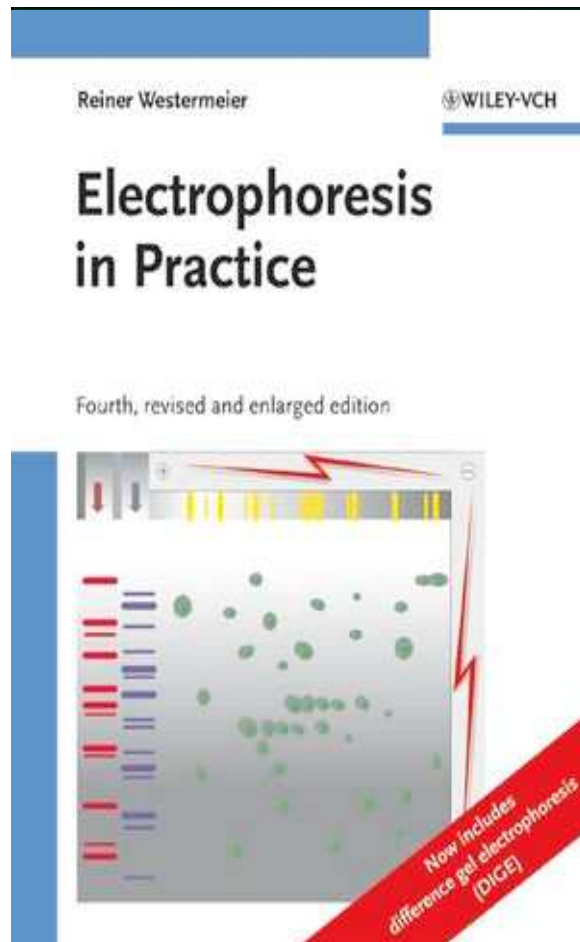


FIGURE 1

Affinity chromatography of malate dehydrogenase from *P. denitrificans* on Matrex Gel Blue A (step 2).  $V_e$ , elution volume; —, absorbance at 280 nm ( $A_{280}$ ); -·-, enzyme activity; ----, NaCl gradient (buffer A, 0.02 mol/l sodium phosphate (pH 8.0); buffer B, the same as buffer A but with 1.8 mol/l NaCl and 5% ethylene glycol); flow rate, approx. 0.7 ml/min.

# Elektromigrační metody

# Literatura



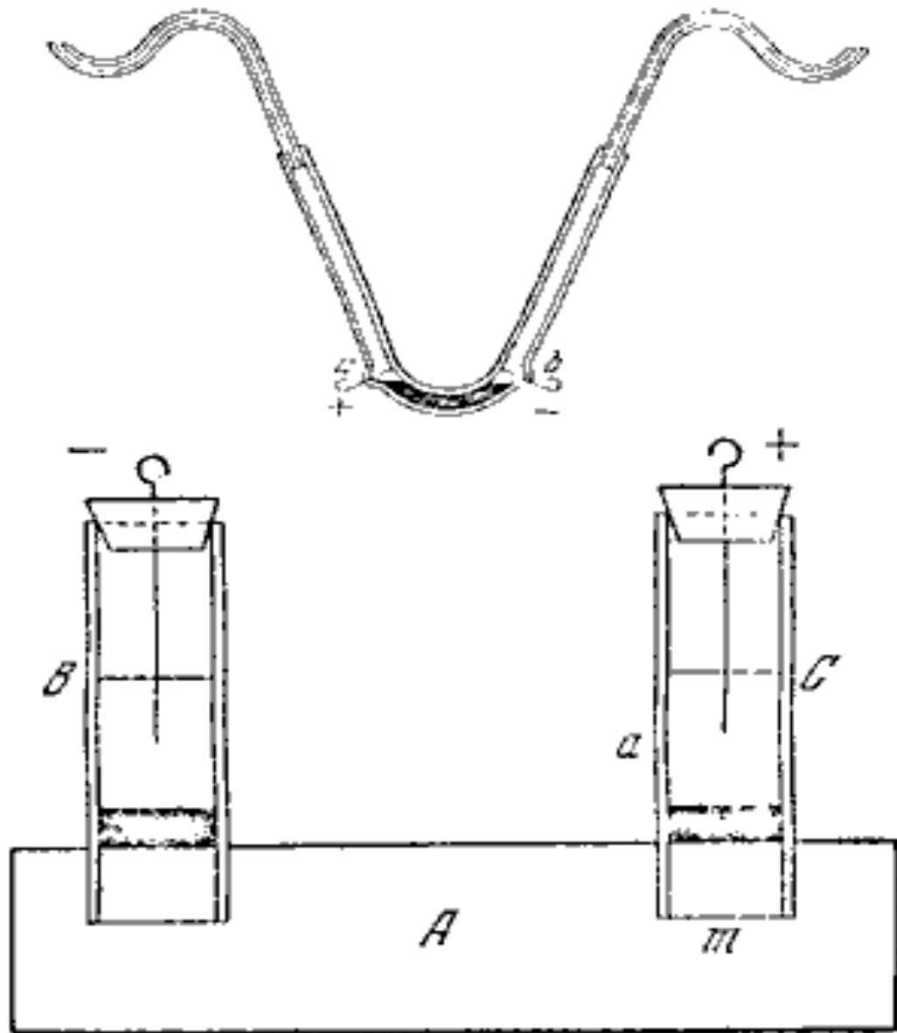
# Podstata

*„Pohyb elektricky nabitých částic  
v elektrickém poli“*

# Frederic Reuss

(1807)

## Katoforéza



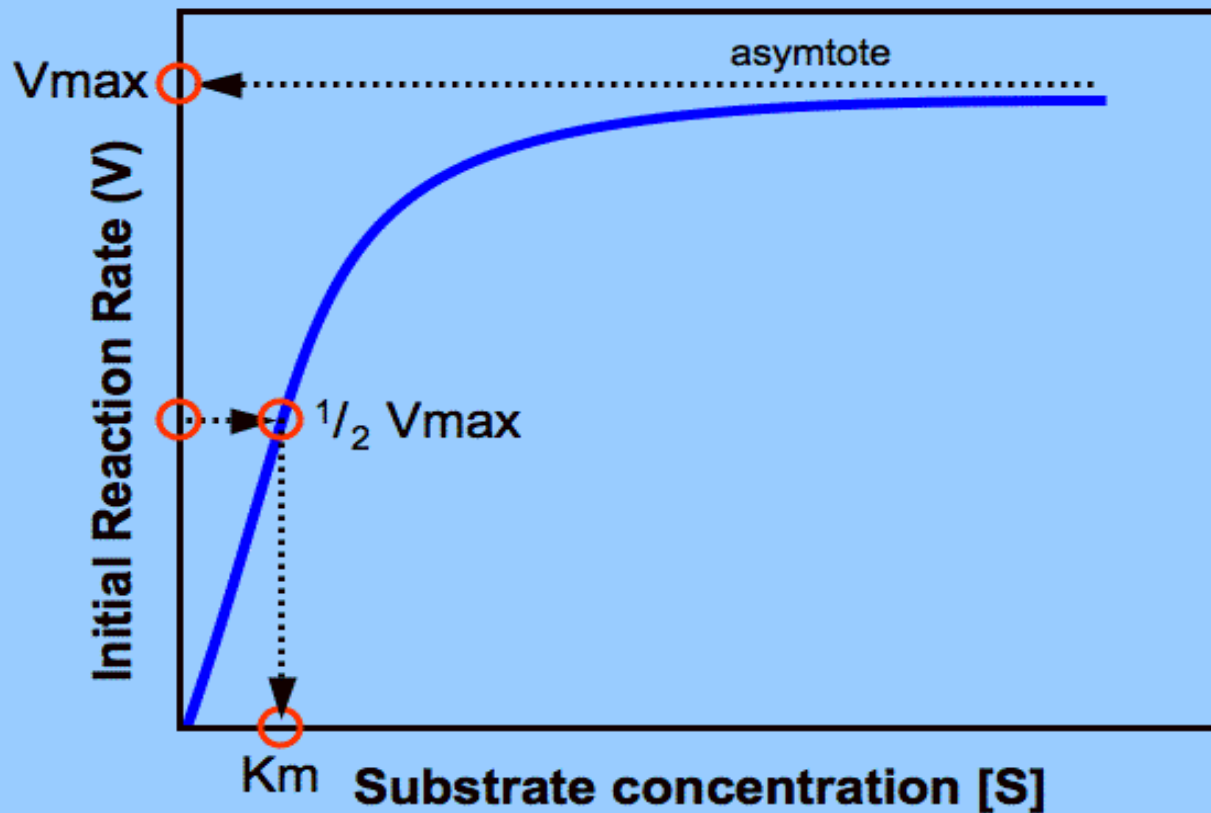
# Elektroforéza

(1909)

Leonor Michaelis

**Michaelis Menten Plot**

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

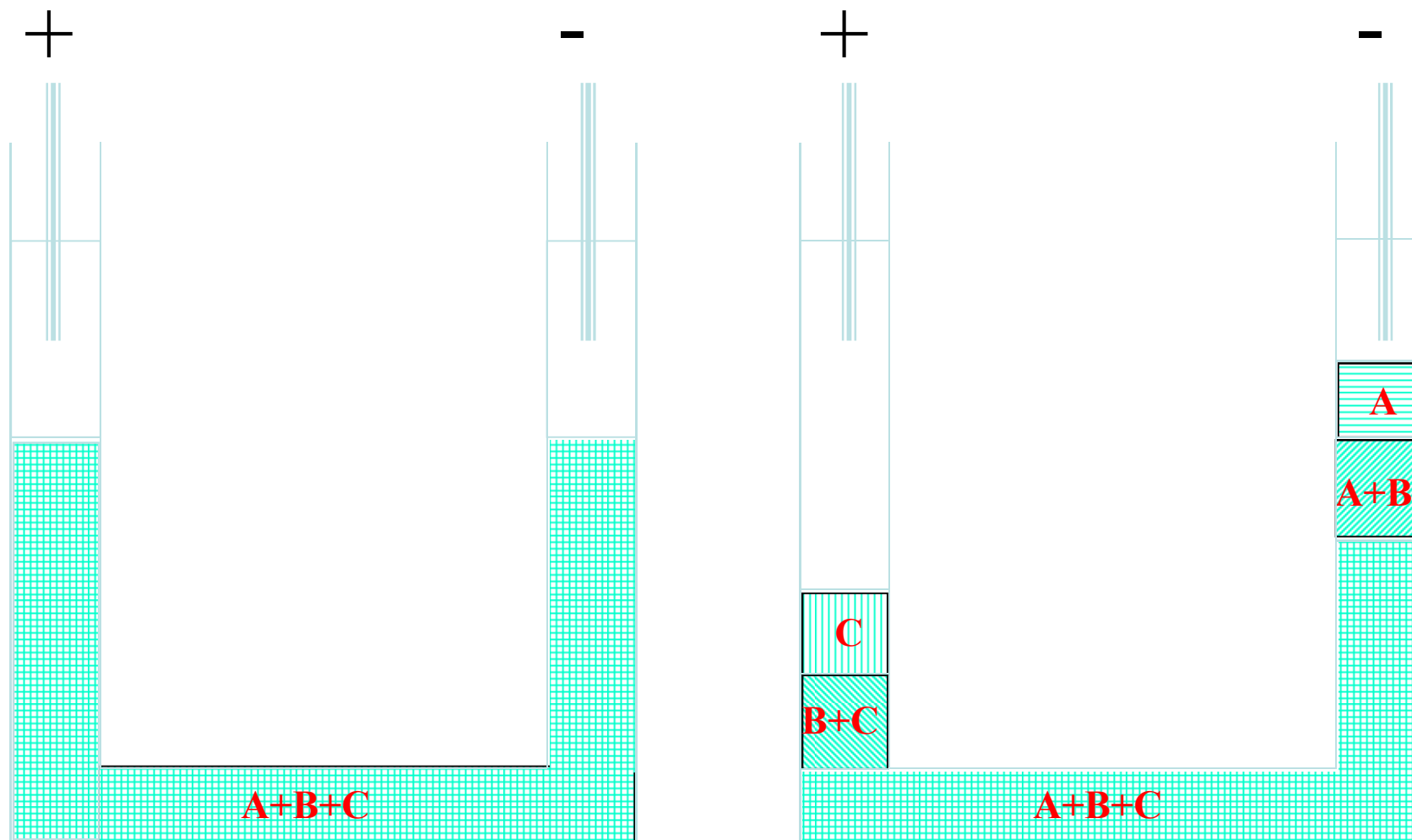


# Elektroforéza

- Volná
- Zónová



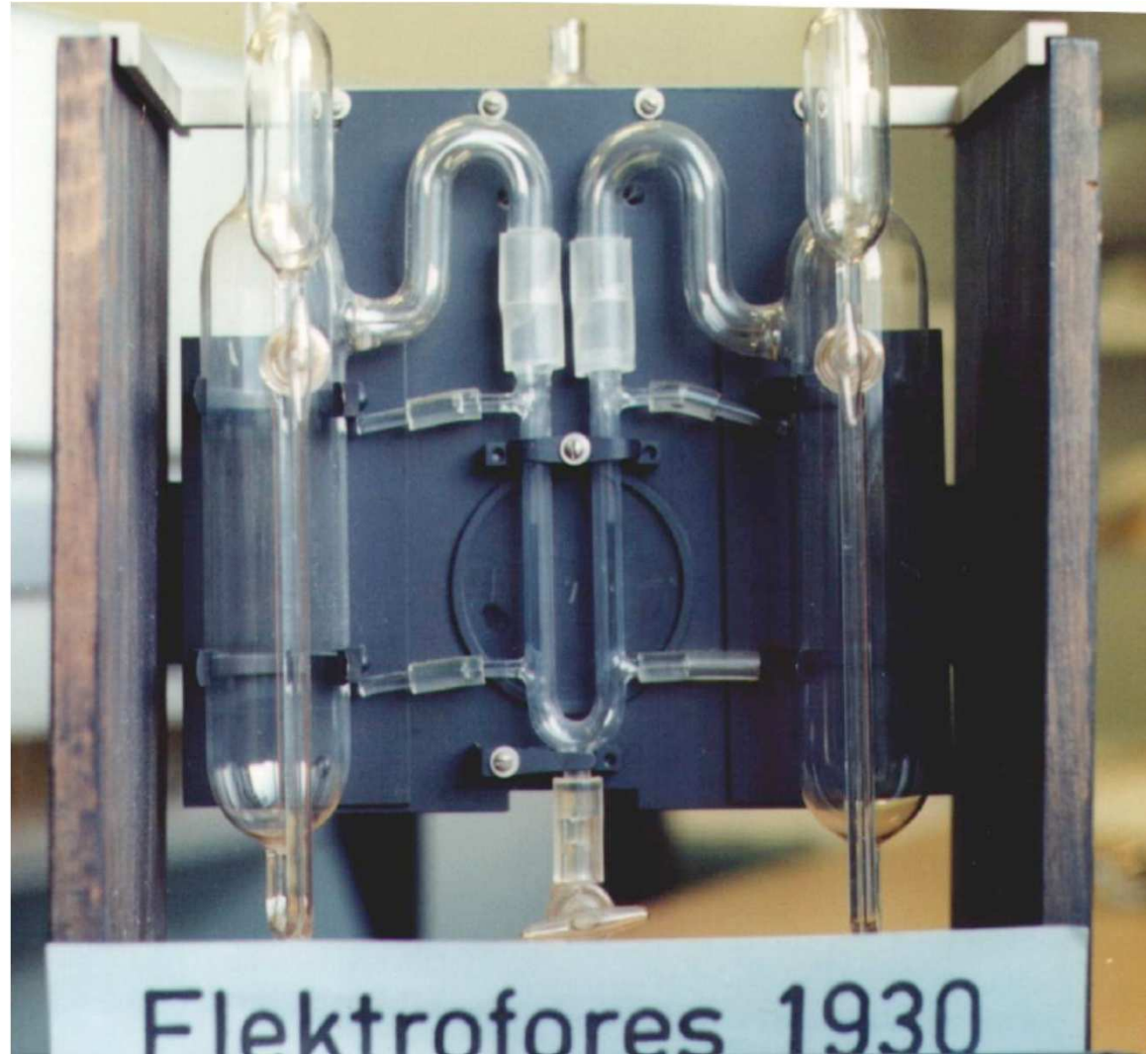
# Volná elektroforéza



$$\mu_A > \mu_B > \mu_C$$

# Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)



# Volná elektroforéza

## Arne Tiselius

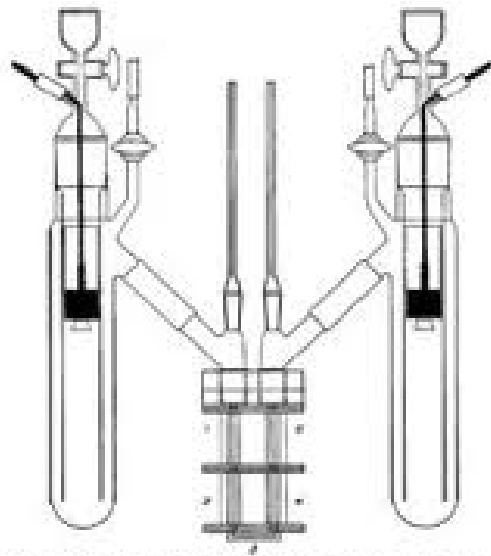
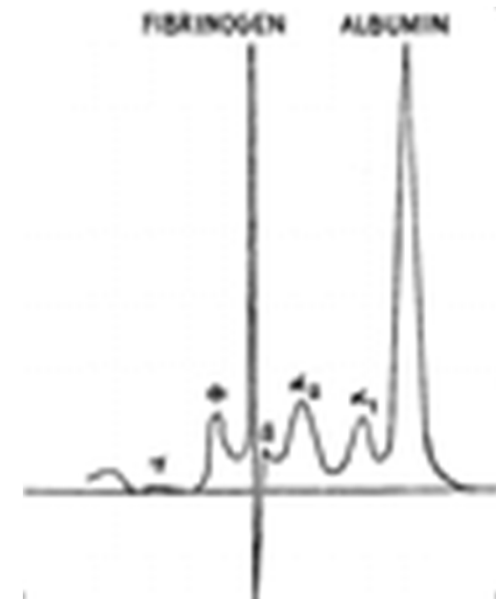


Fig. 3. Electrophoresis U-tube assembled with electrode containers for reversible electrodes.



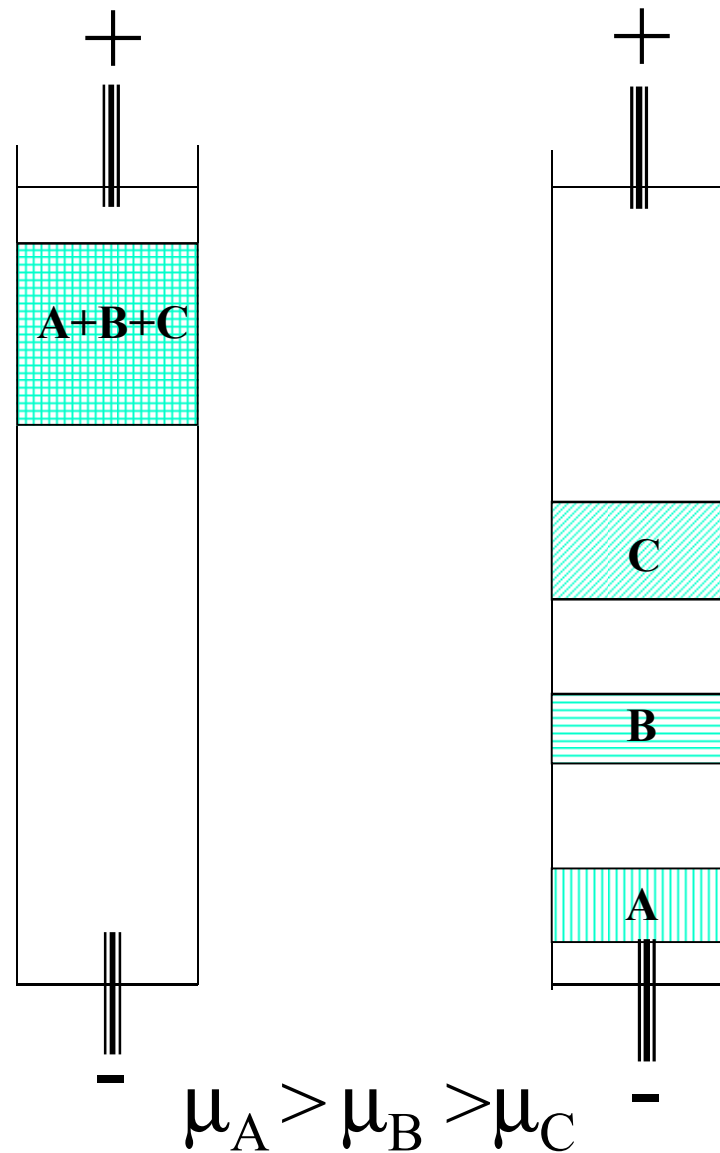
# Volná elektroforéza

Arne Tiselius (1902 – 1971)

Nobelova cena 1948

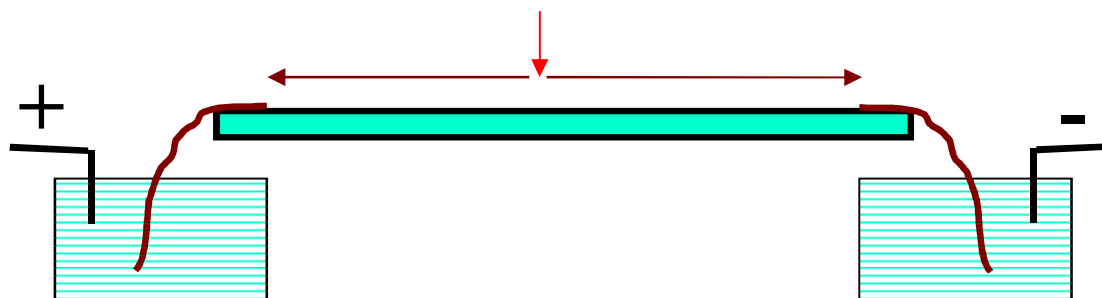


# Zónová elektroforéza



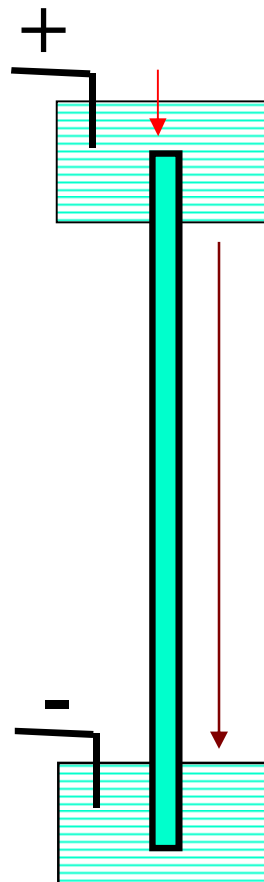
# Upořádání

## Horizontální



# Upořádání

Vertikální

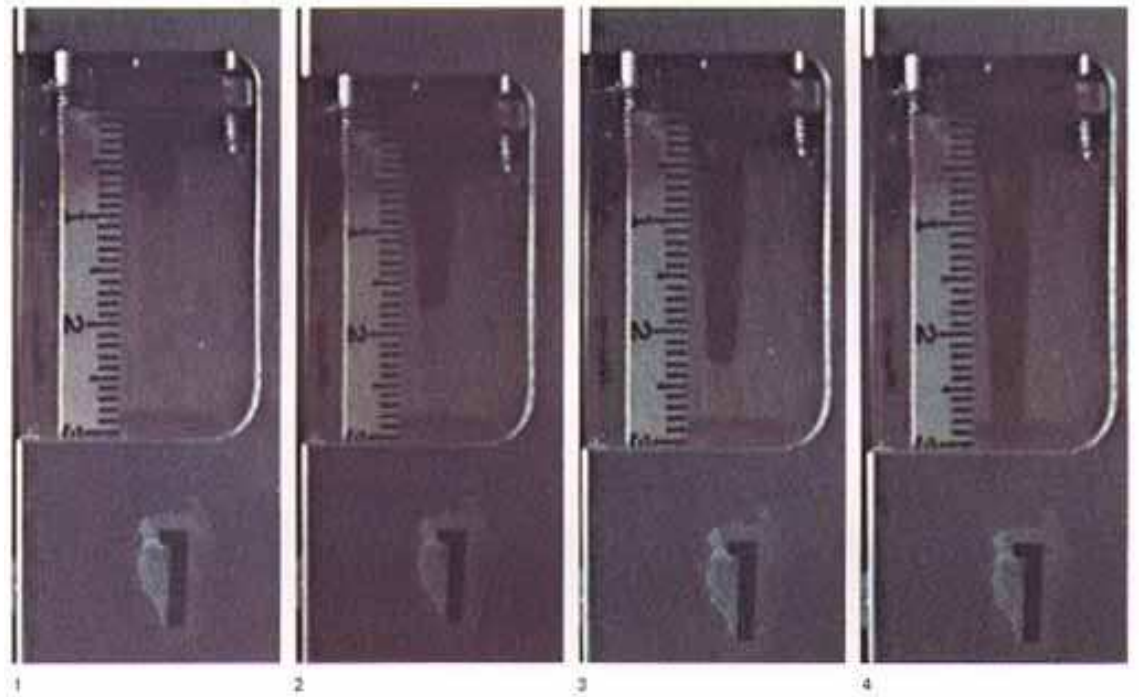
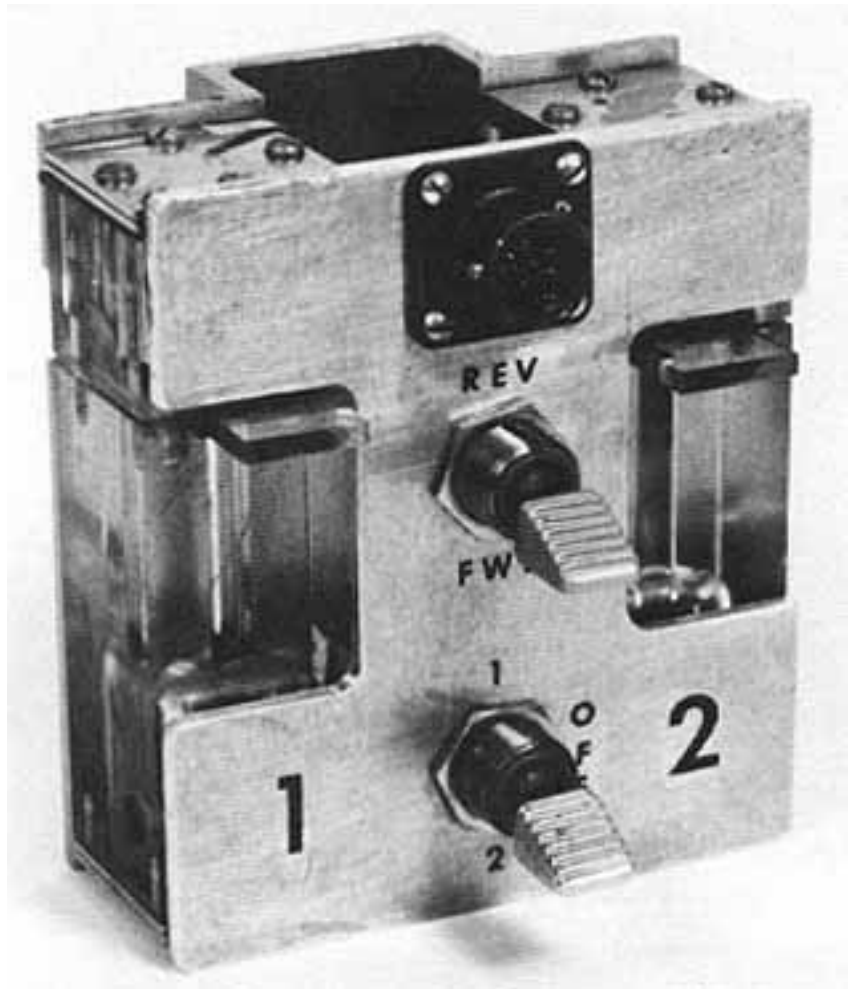


# Skylab





# Skylab



# Stabilizace

- Rotací
- Gradienty hustoty
- **Porézními medii**
- **Kapilárou**

# Porézní media

- 1939 *Papír*
- 1950 *Agarový gel*
- 1955 *Škrobový gel*
- **1957 Acetát celulosy**
- **1959 Polyacrylamidový gel**
- **1979 Agarosový gel**

# Polyakrylamid

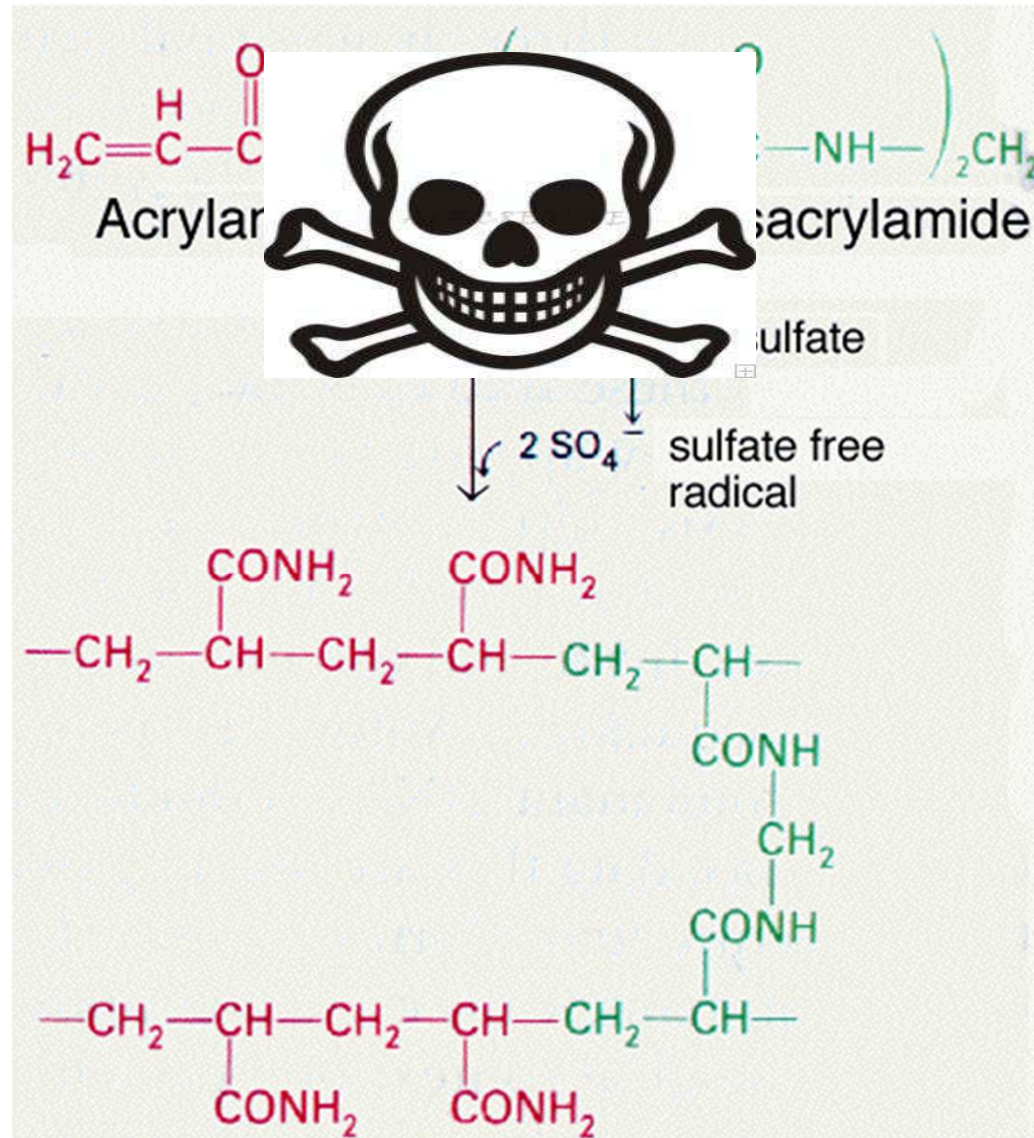
Složení – kopolymer akrylamidu a  
N,N,- methylenbisakrylamidu

+ plně splňuje požadavky

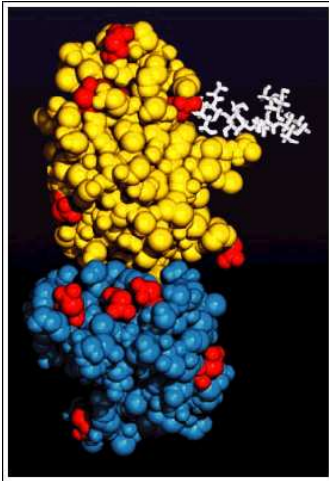
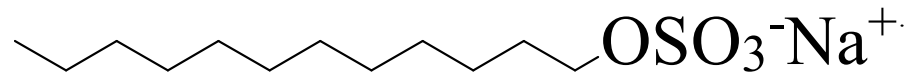
- **Monomery jsou neurotoxiny !!!!!**

Použití : analýza bílkovin

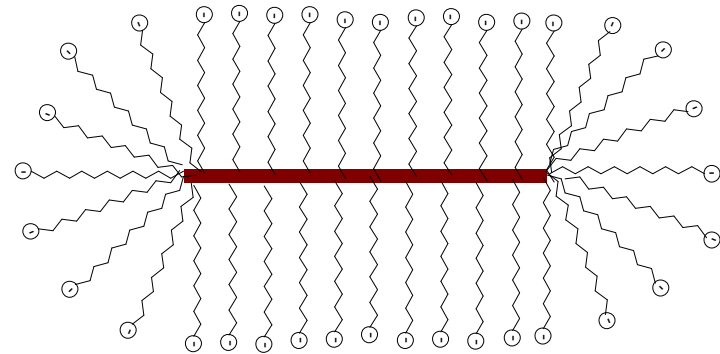
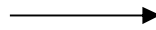
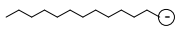
# Polyakrylamid



# SDS PAGE

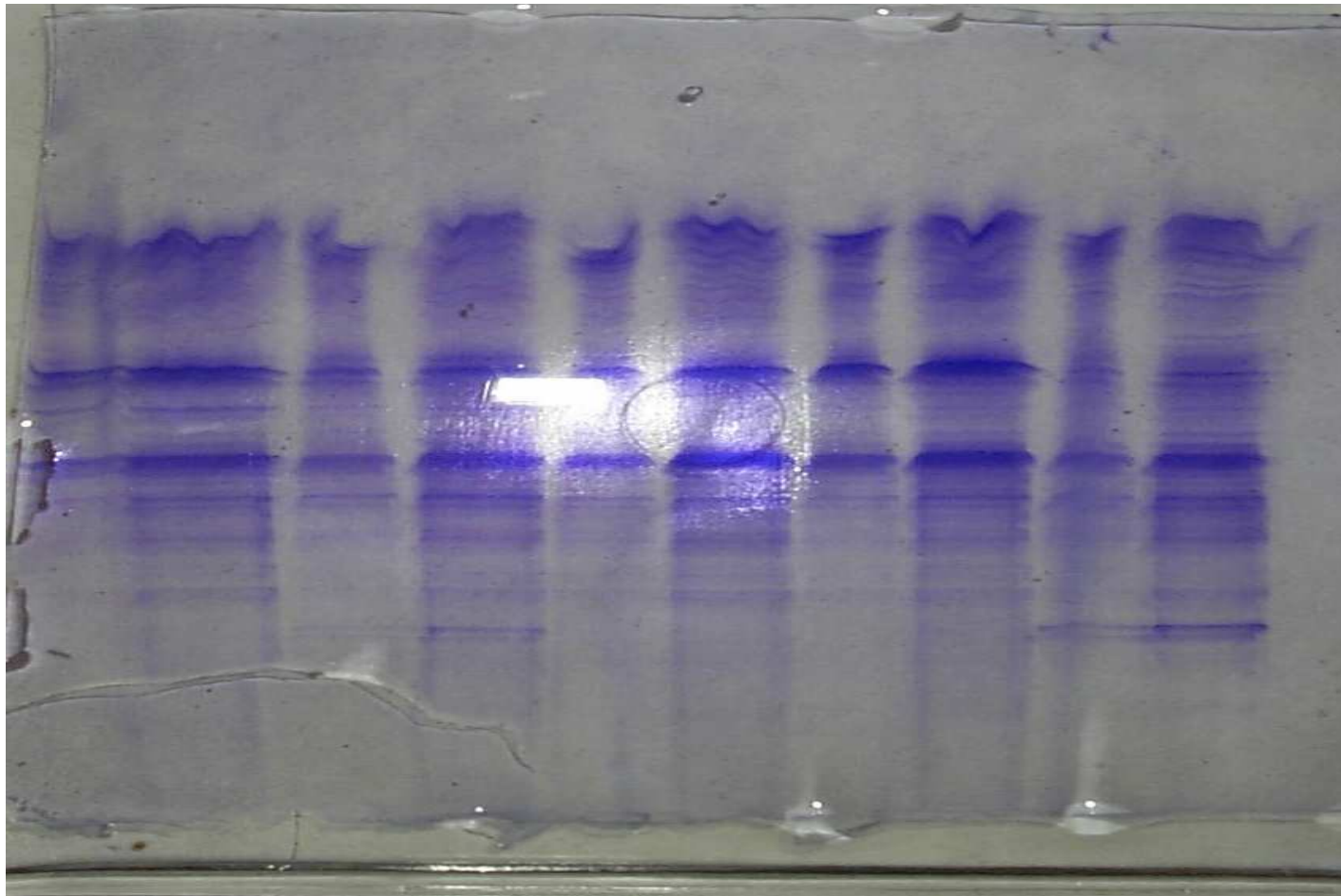


+



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

# SDS PAGE

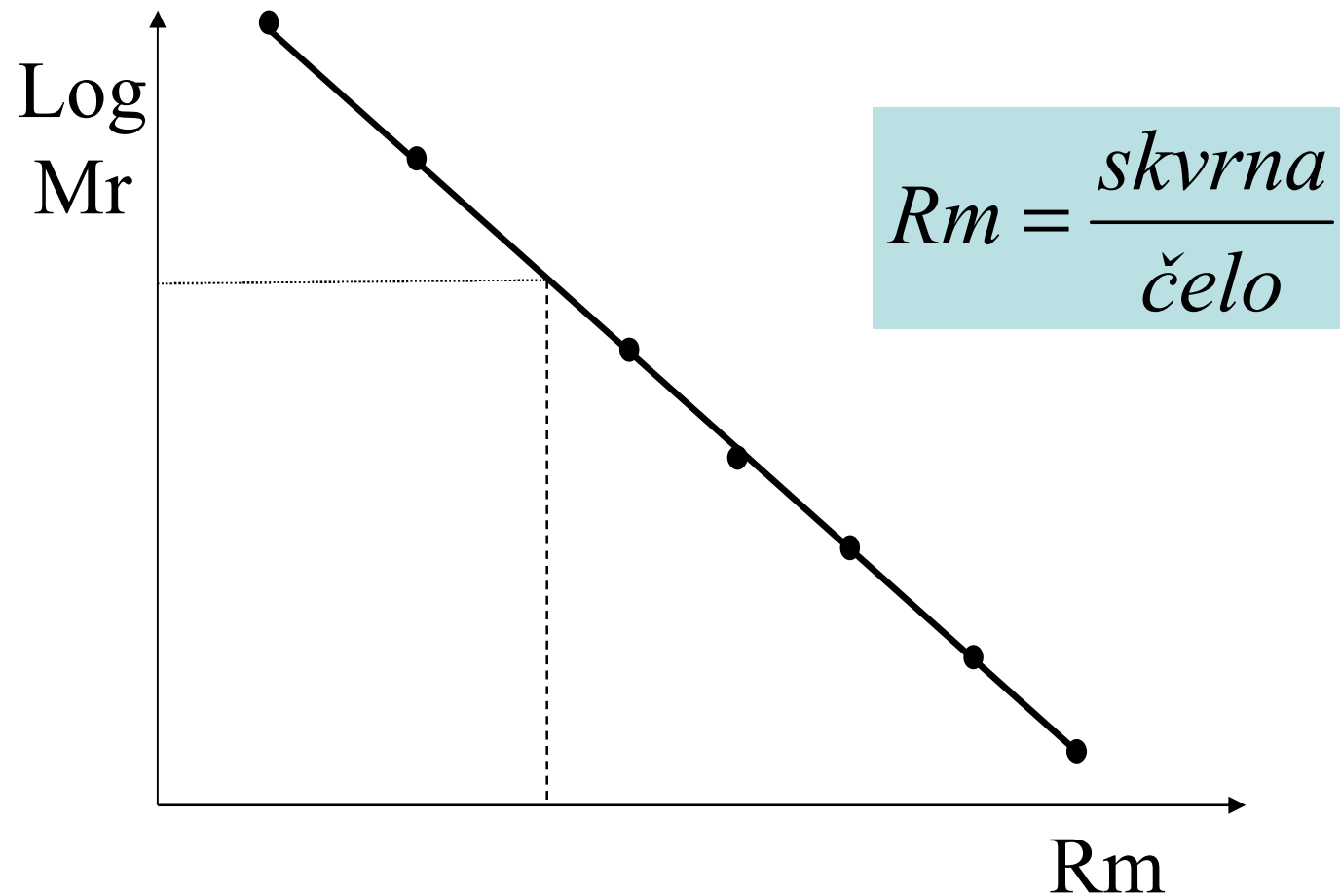


# Použití SDS PAGE

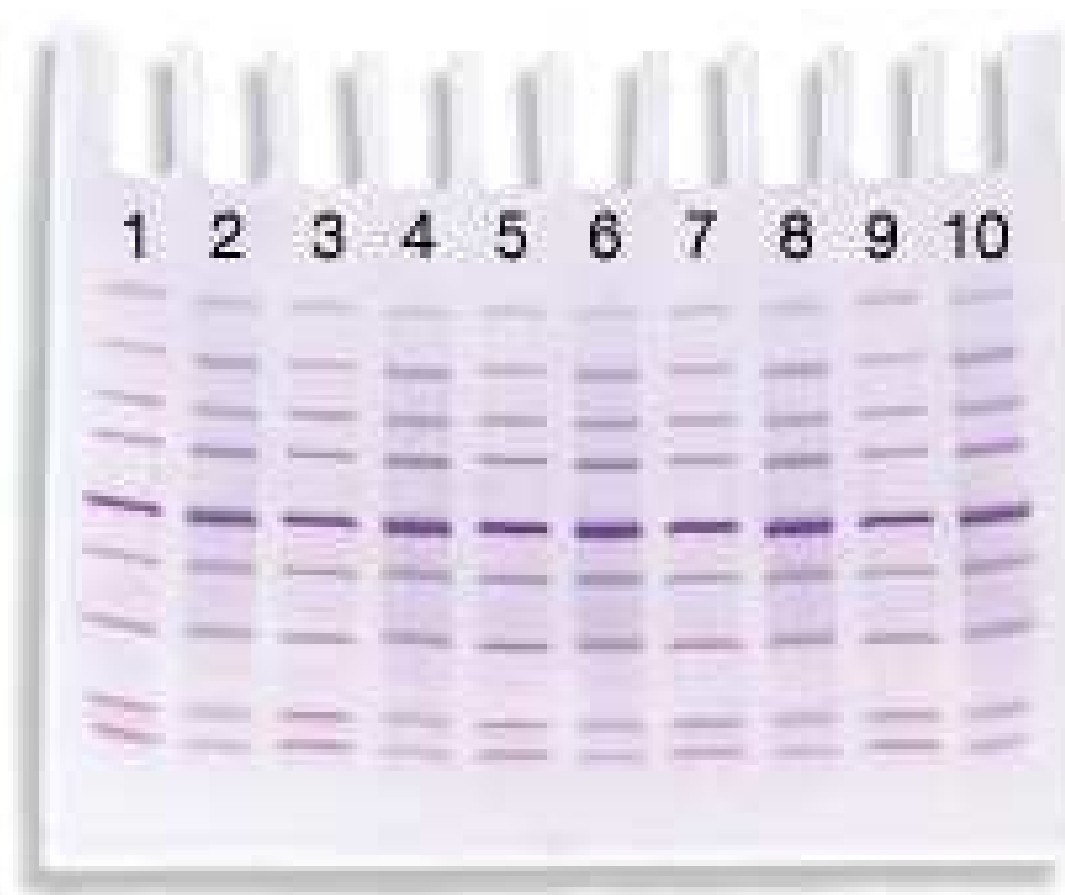
- Stanovení Mr
- Analýza komplexních směsí
- Sledování purifikace bílkovin



# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE

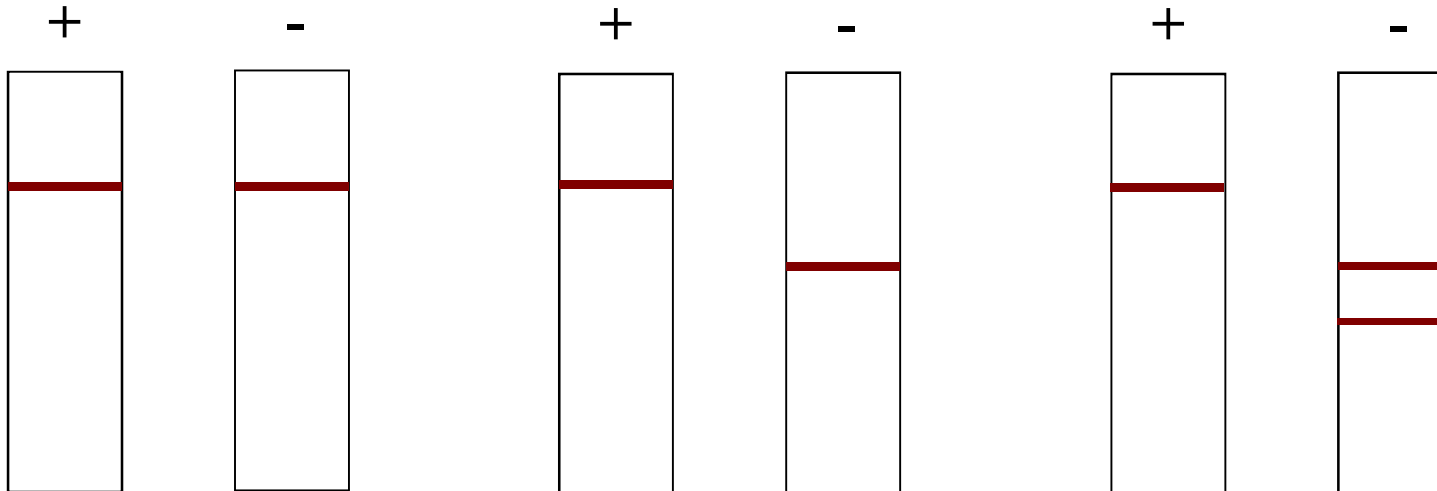


# Stanovení Mr pomocí SDS PAGE - standardy

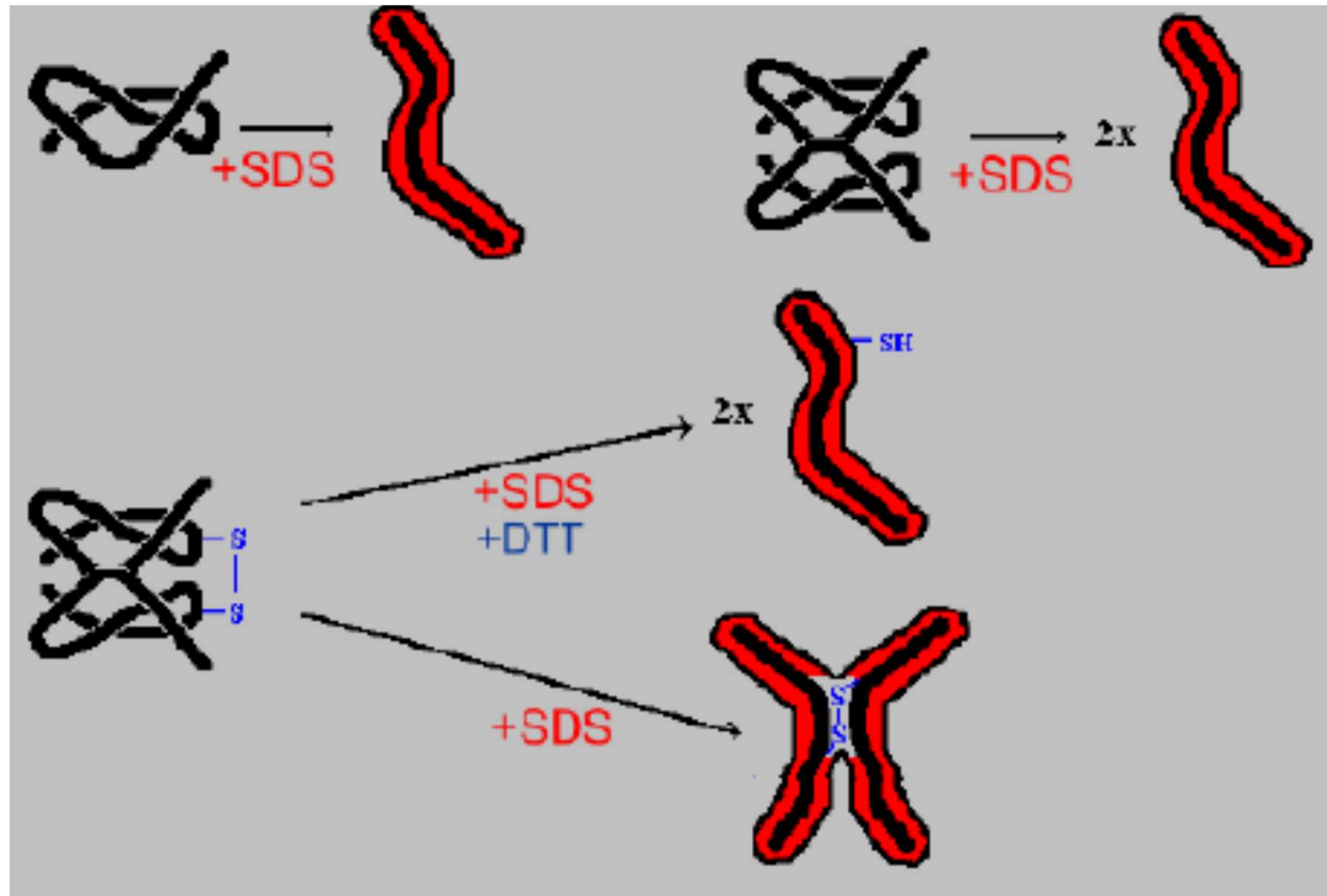


# Použití SDS PAGE

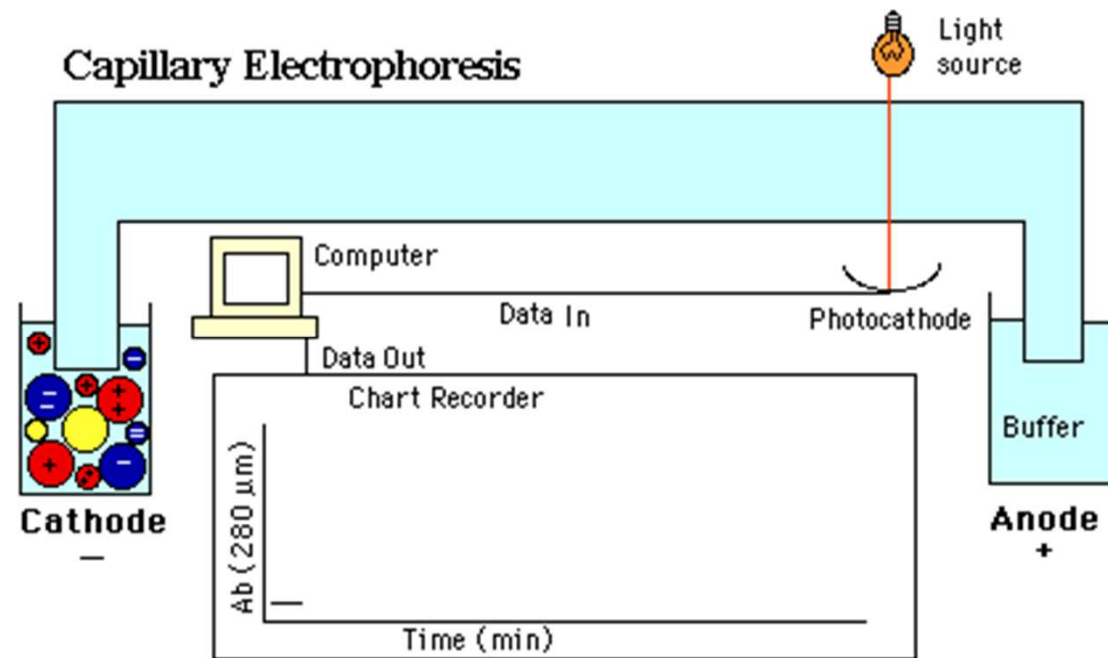
- Stanovení Mr
- Analýza komplexních směsí
- Sledování purifikace bílkovin
- Stanovení podjednotkového složení



# Stanovení Mr pomocí SDS redukující x neredukující

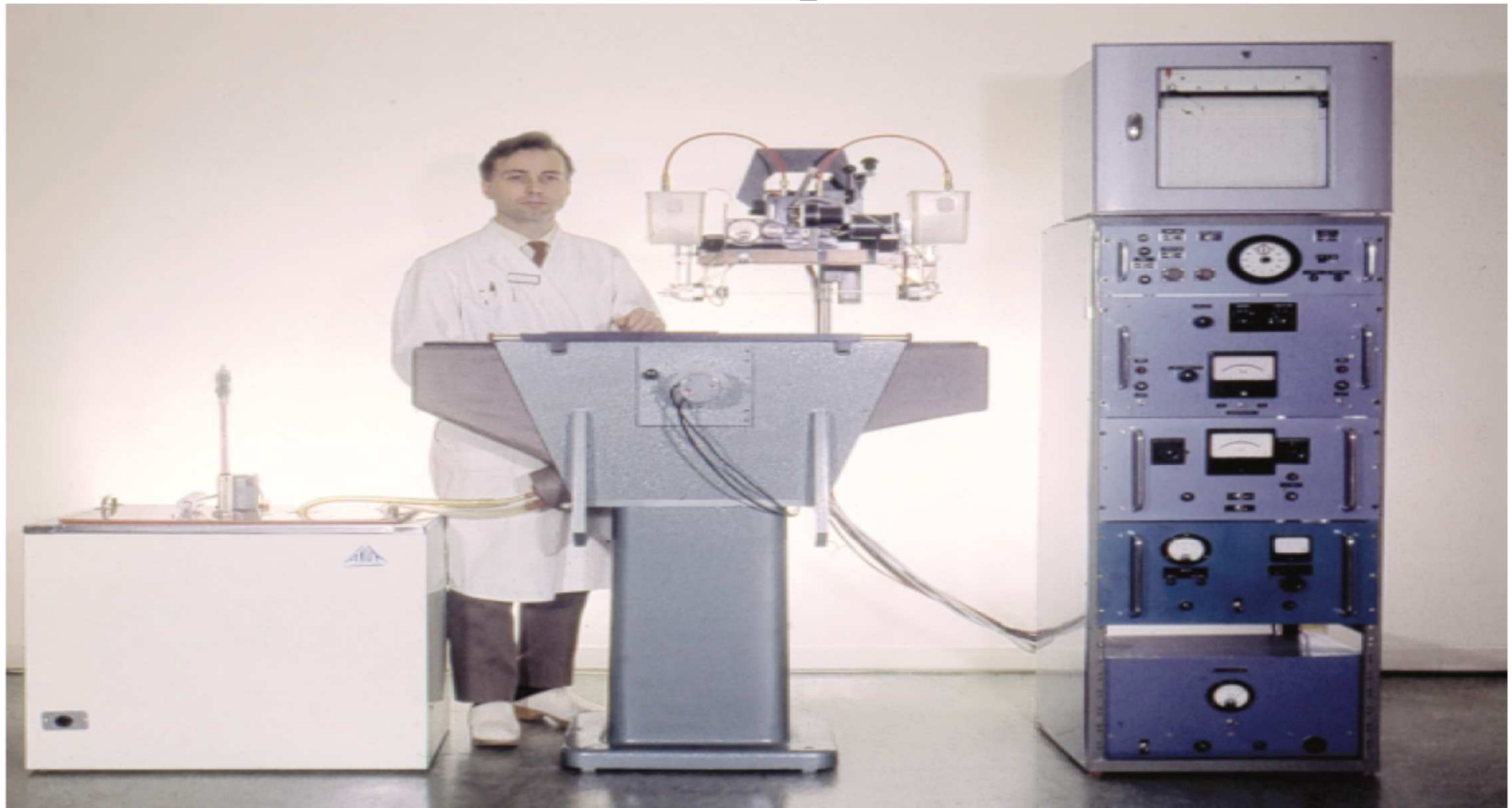


# Kapilární elektroforéza



# Kapilární elektroforéza

1967 - Hjerten  
3 mm kapilára



# Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová

75  $\mu\text{m}$  kapilára

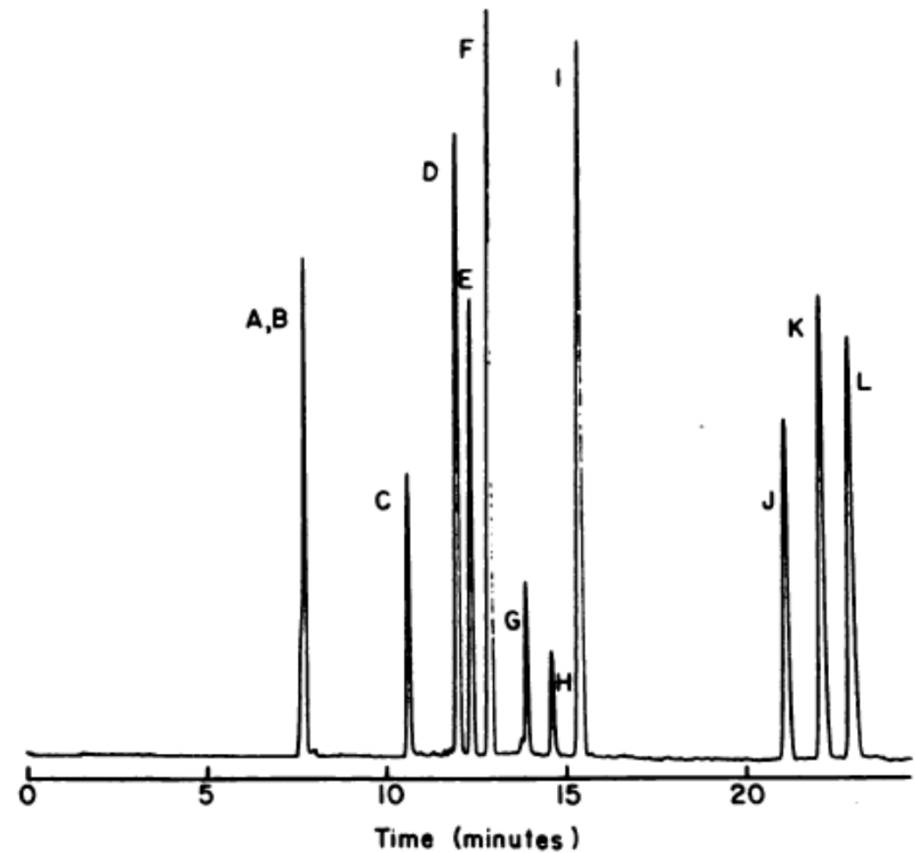
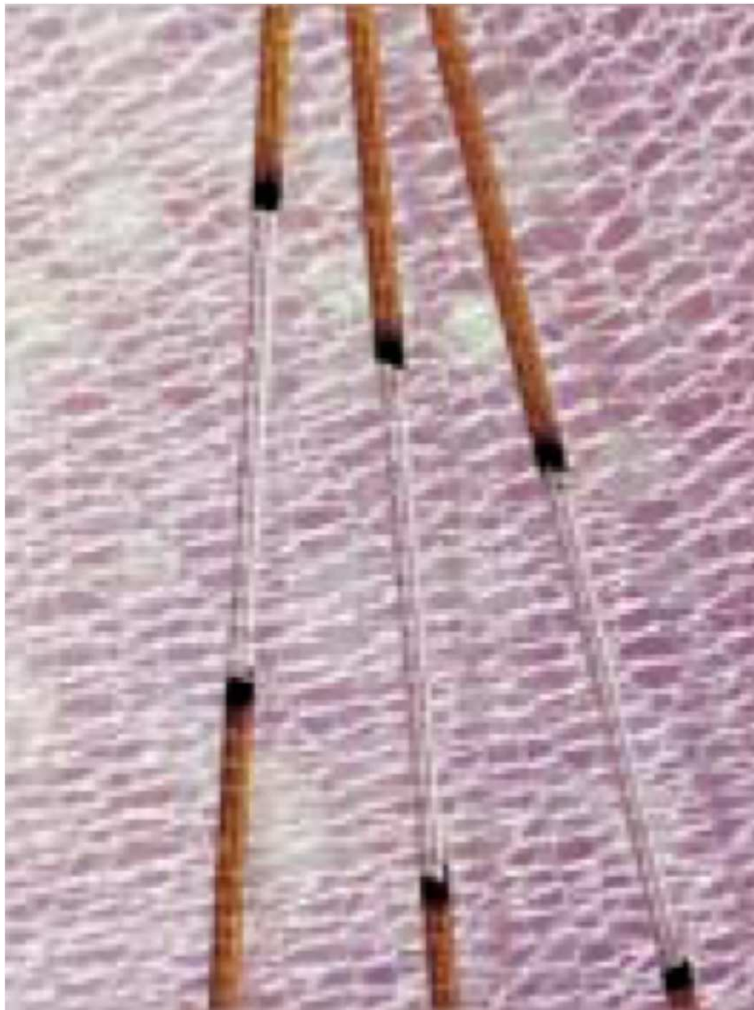


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

# Beckman 1987





# Výhody CE

- **Aplikační diverzita**

nabité i neutrální látky

nízkomolekulární i vysokomolekulární látky

chirální i achirální látky

bakterie i viry

# Výhody CE

- Aplikální diverzita
- Jednoduchá instrumentace

# Výhody CE

- Aplikační diverzita
- Jednoduchá instrumentace

CZE, MEKC,  
CIEF, CITP  
NACE, MEEKC,  
CGE, ChCE



CEC

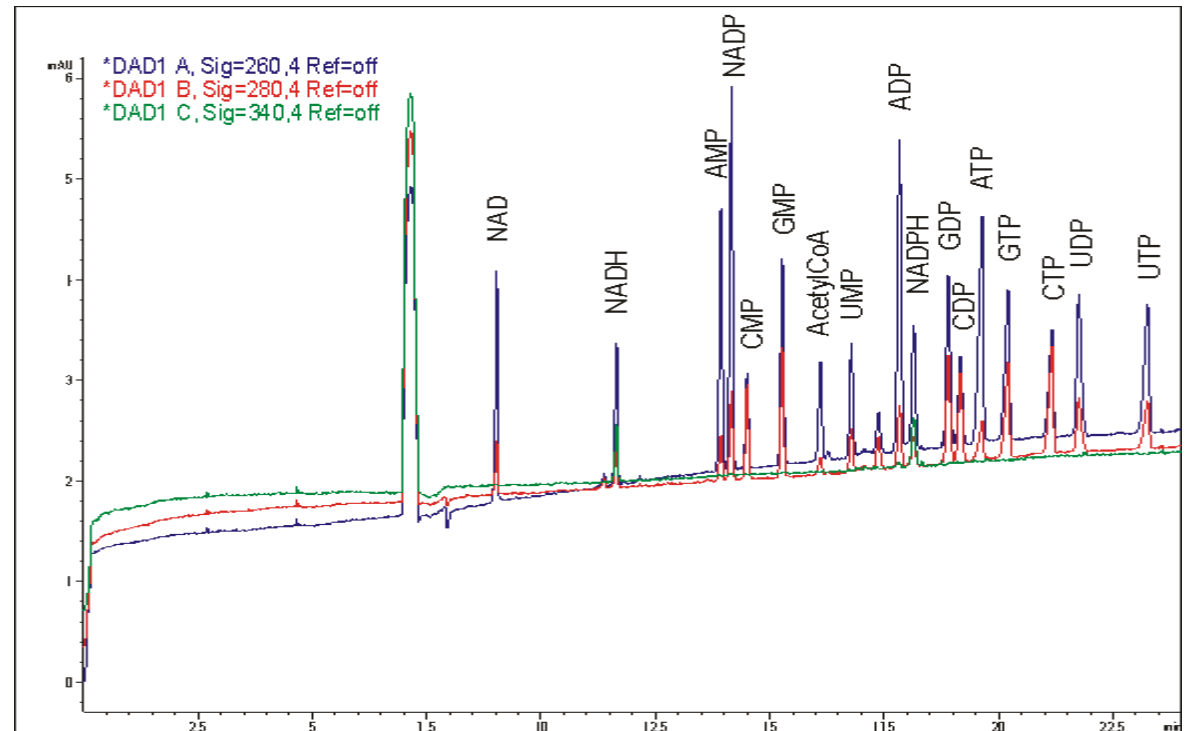
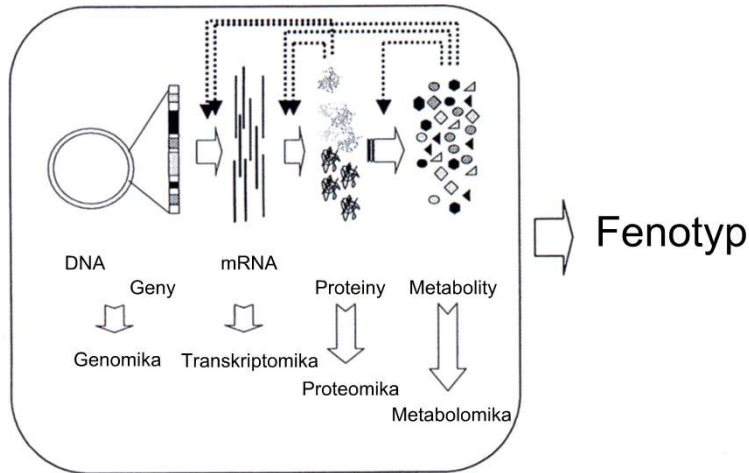
# Výhody CE

- Aplikální diverzita
- Jednoduchá instrumentace
- Vysoké rozlišení a účinnost separací
- Malá spotřeba vzorku
- Rychlost analýzy
- Malá spotřeba chemikálií a malé množství odpadů

# Quo vadis Glatz & CE ?

## Metabolomika v systémové biologii

mikrobiální, rostlinná a živočišná metabolomika

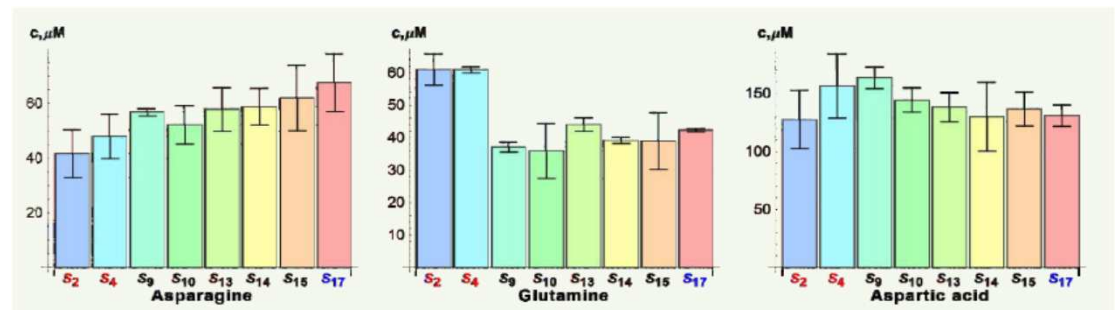
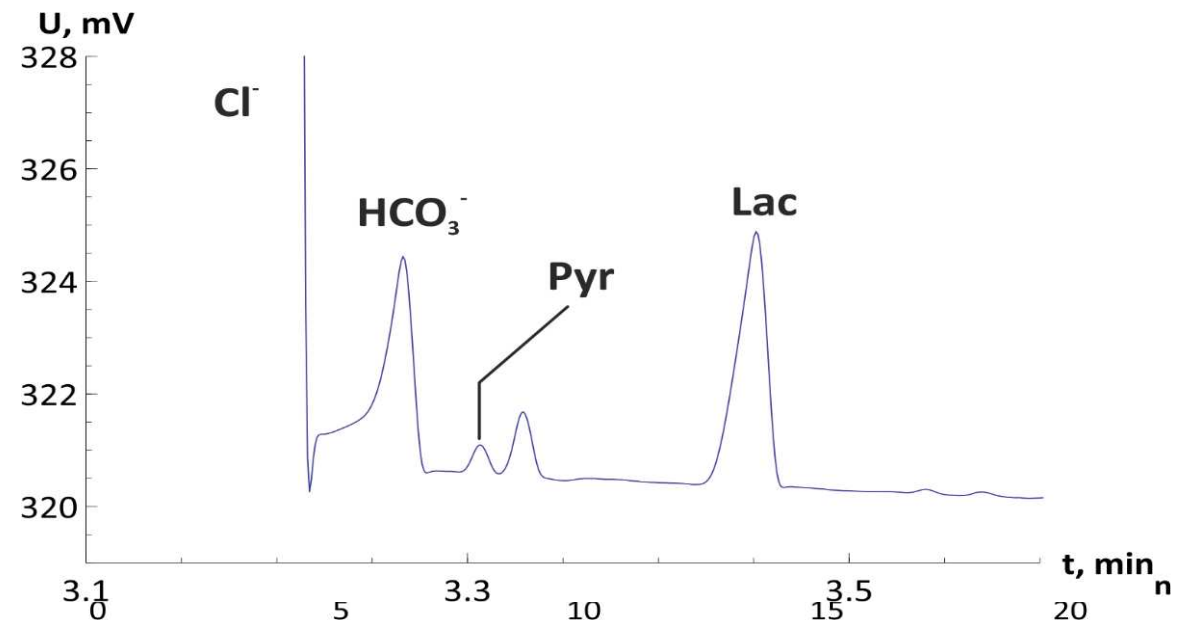
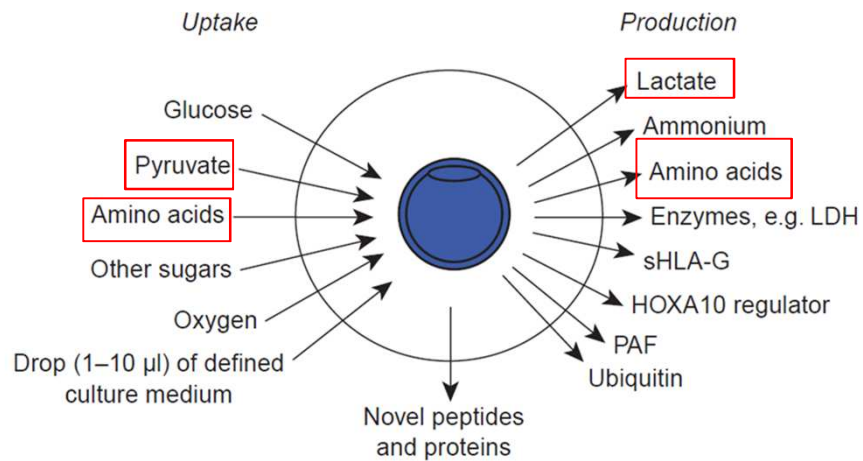


„Metabolome Targeting“  
(Nucleotides and coenzymes)

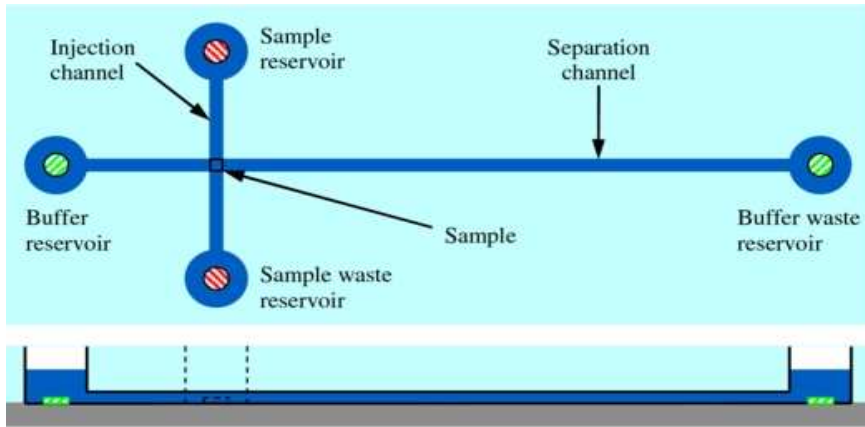
# Quo vadis Glatz & CE ?

## Metabolomika a biomarkery

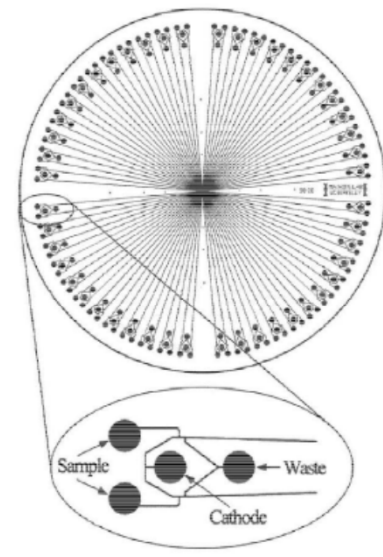
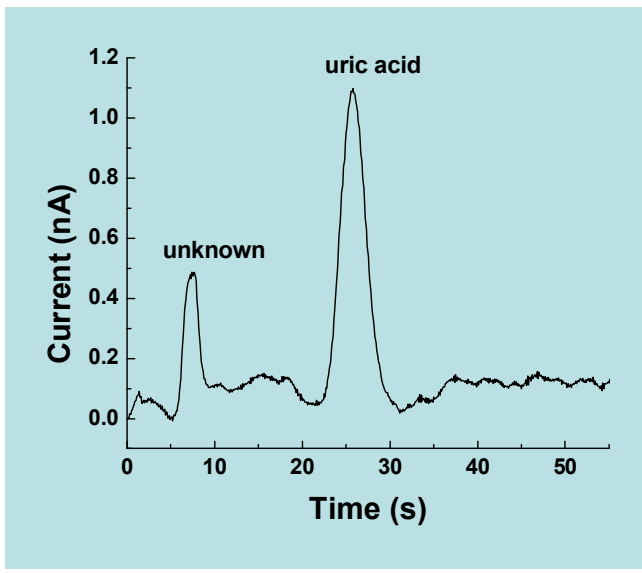
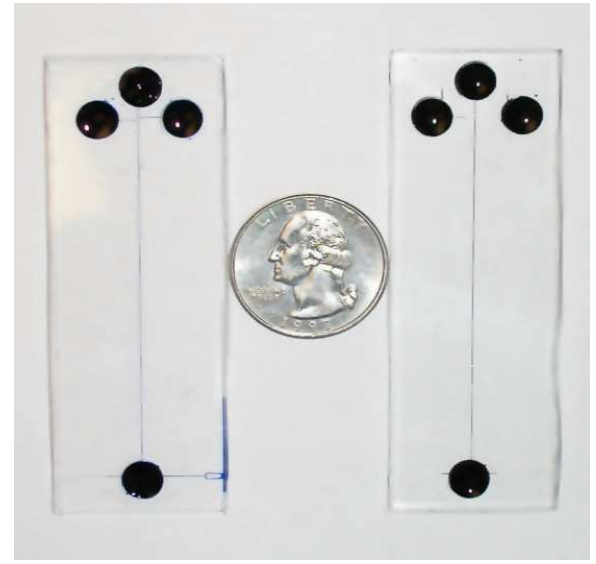
v asistované reprodukci amino- a karboxylové kyseliny



# 1997 $\mu$ CE

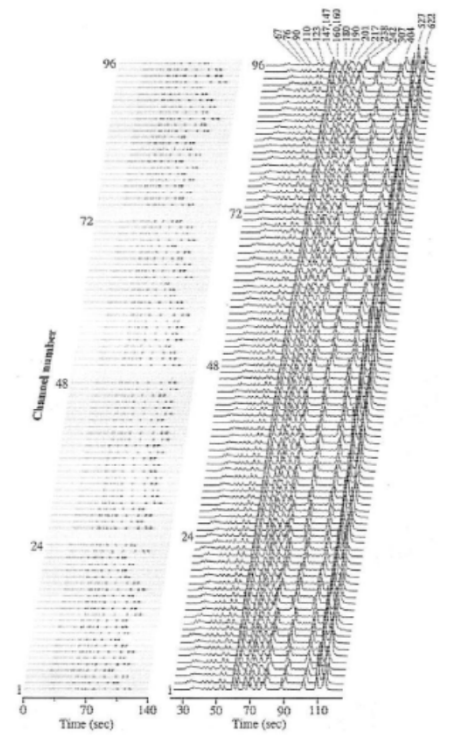


- Substrate
- Support material
- Channel
- Electrodes for electrophoresis in separation channel
- Optional electrodes for electrokinetic sample injection



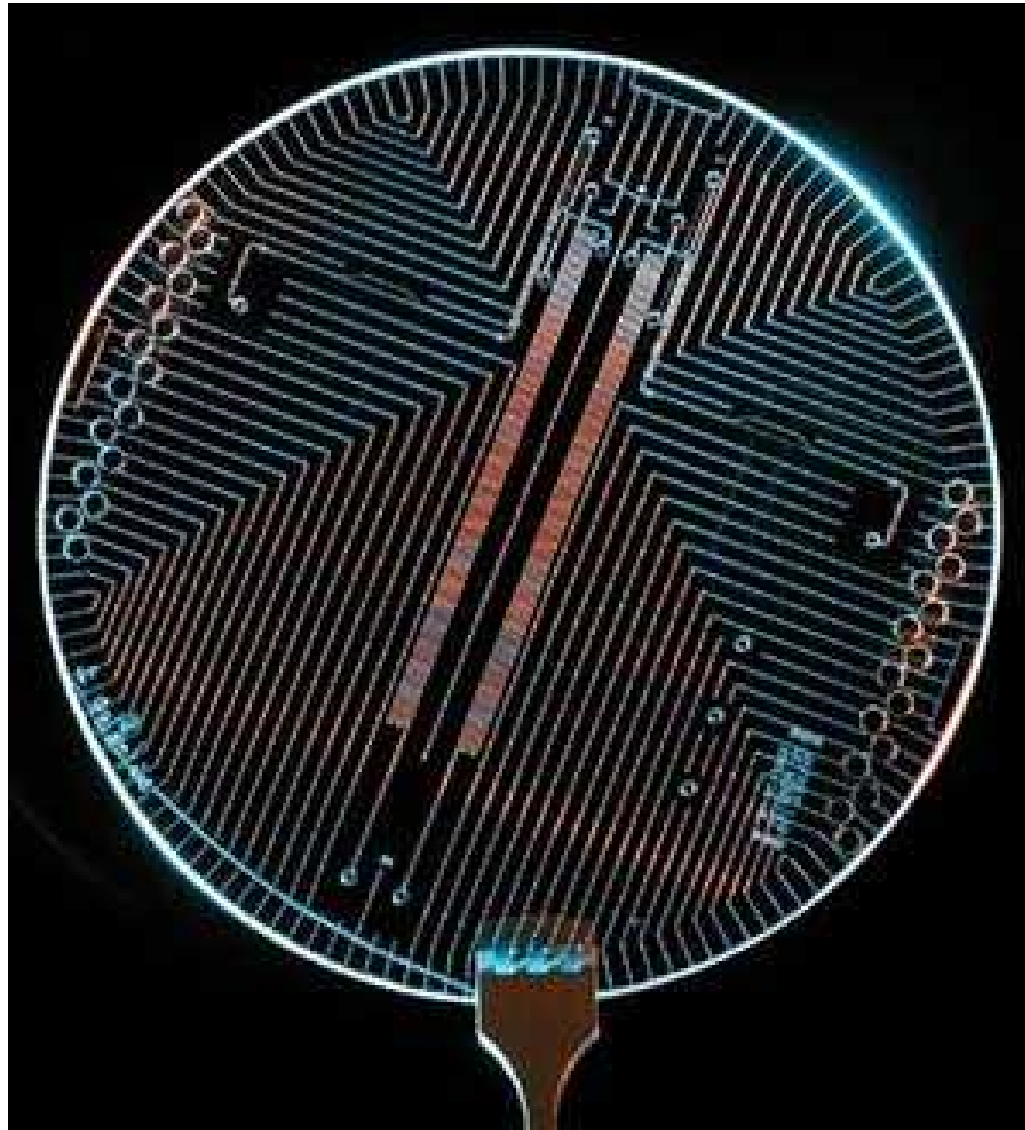
(b)

(a)



(c)

# 2013 NASA - Mars





# Bioanalyser Agilent 2100

**1. Add sample**



**2. Start chip run**



**3. Watch real-time data**

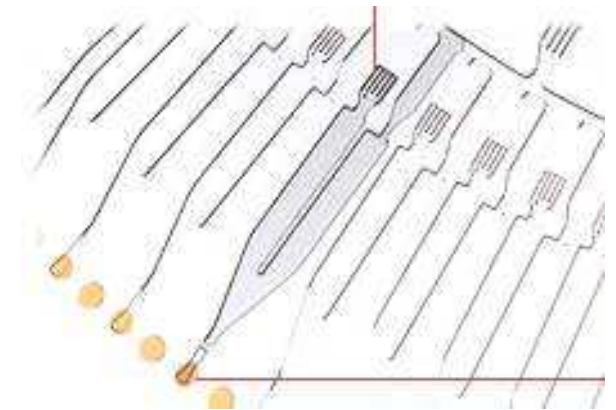
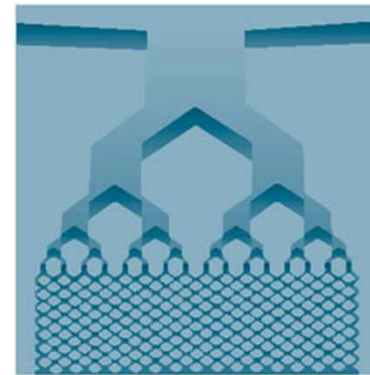
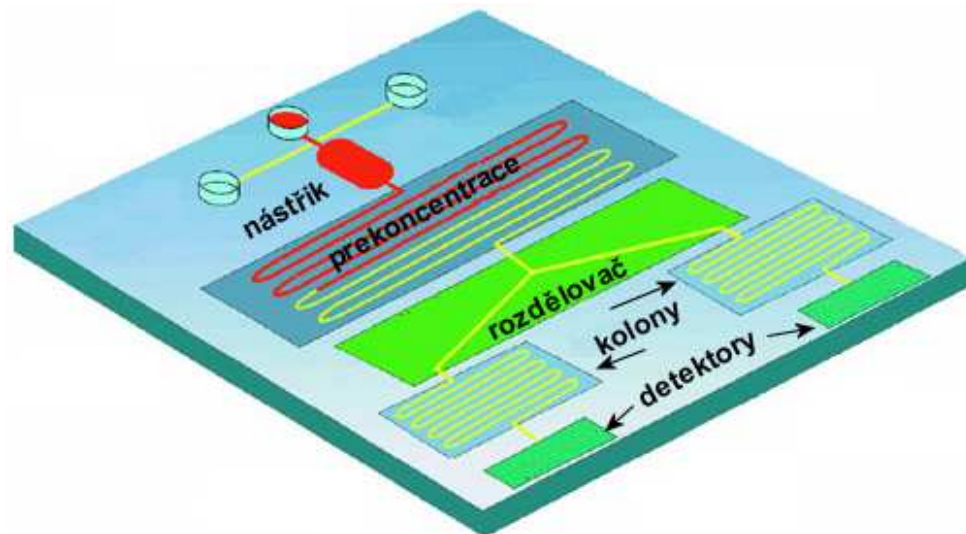


# Bioanalyser Agilent 2100



# Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

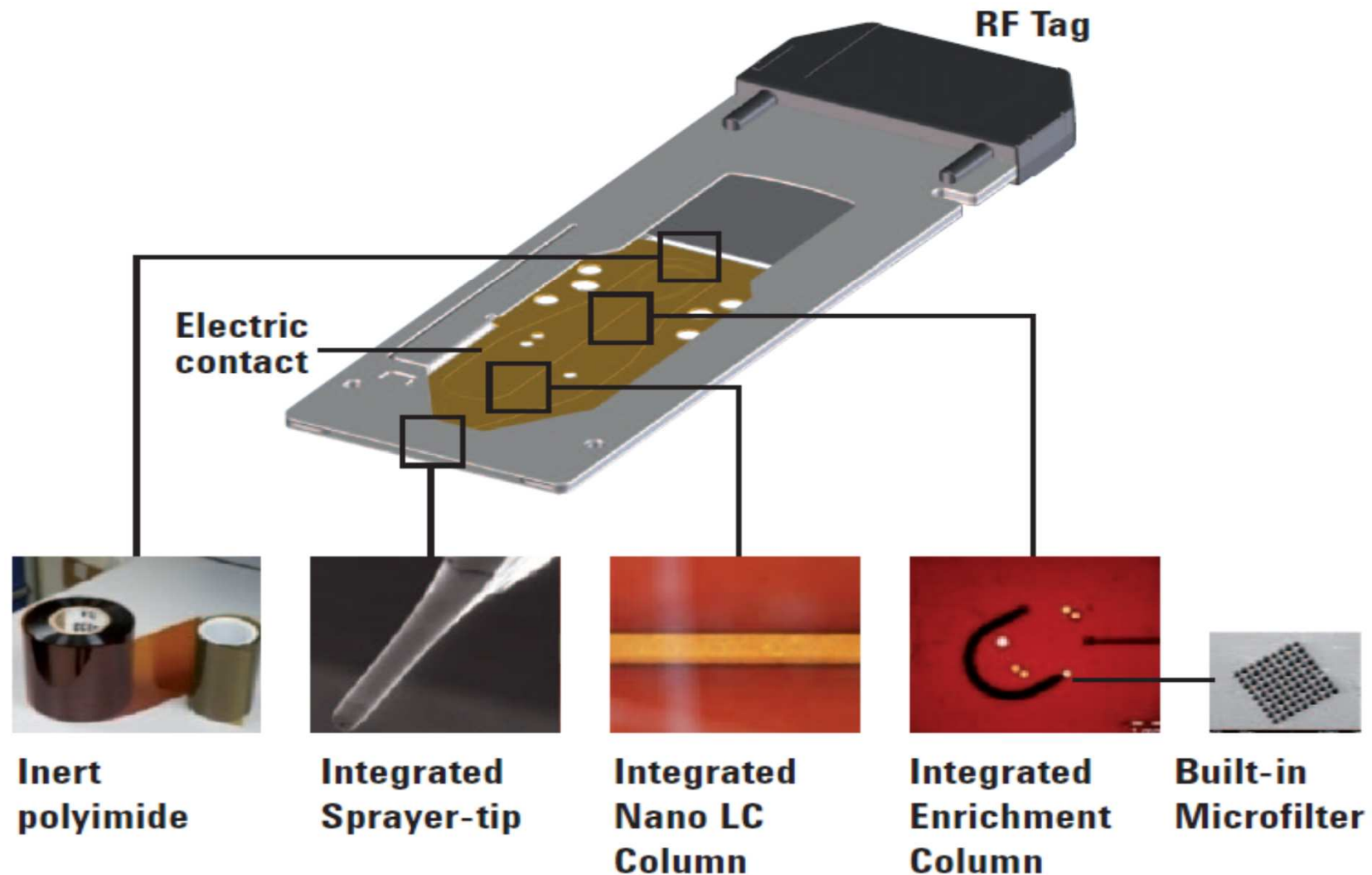


**doprava MF:** pumpa, odstředivá síla, el. staticky

**výhody:** rychlost analýzy, velikost,  
malá spotřeba vzorku (< nl !)

**nevýhody:** práce s malými objemy  
(povr. napětí, elektrostatické interakce)

# Chipová chromatografie Agilent



# Izoelektrická fokusace

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

# Izoelektrická fokusace

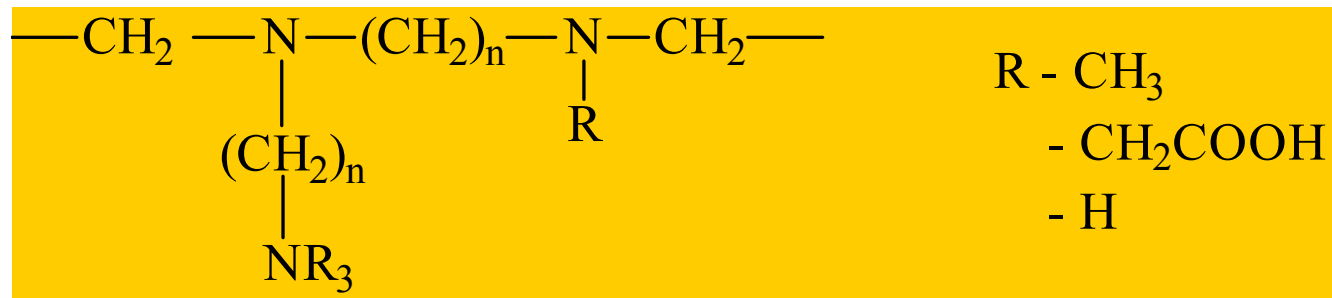
1961 Svensson – Rilbe (1968)



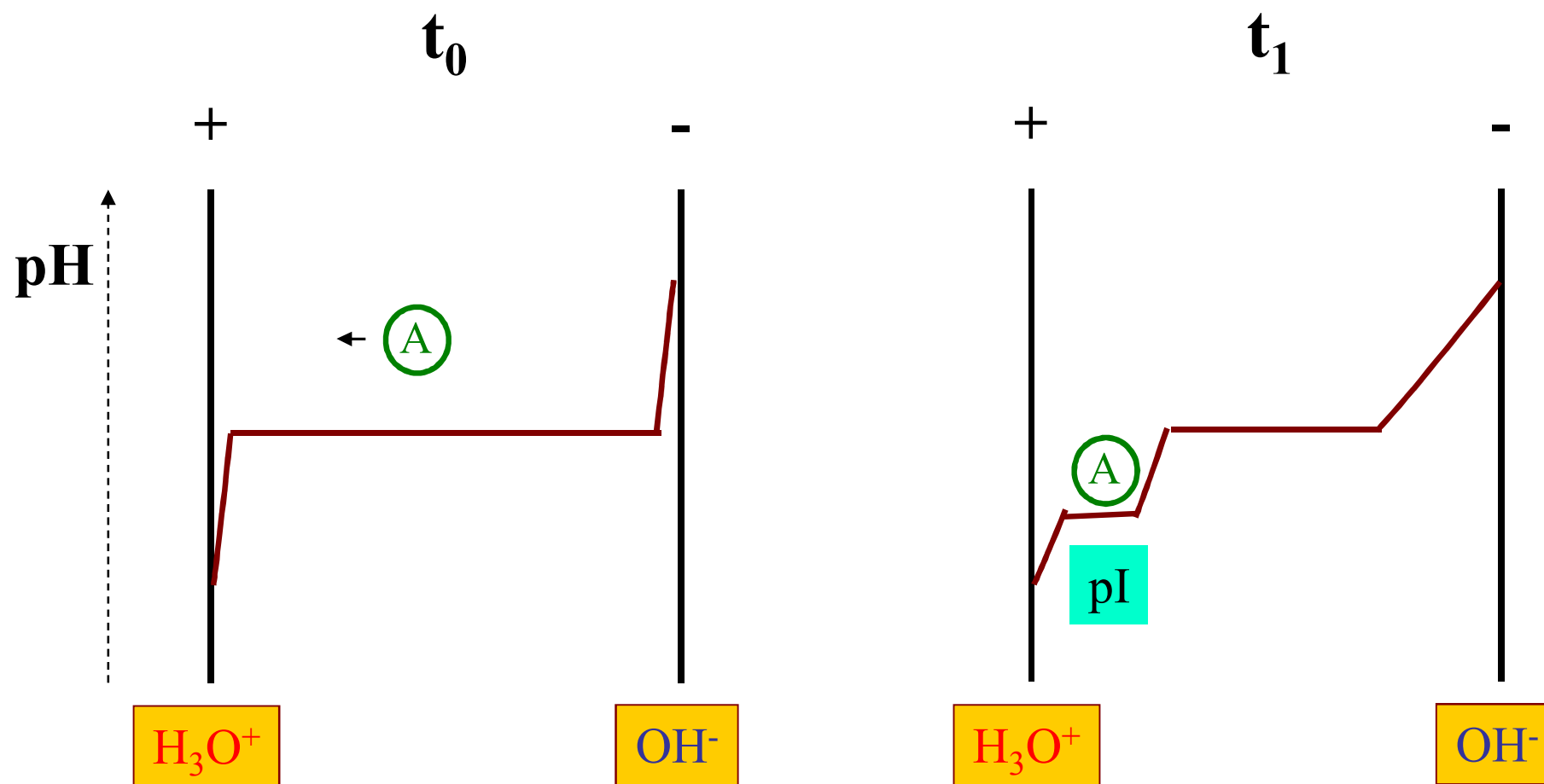
# Tvorba gradientu



## Ampholyty

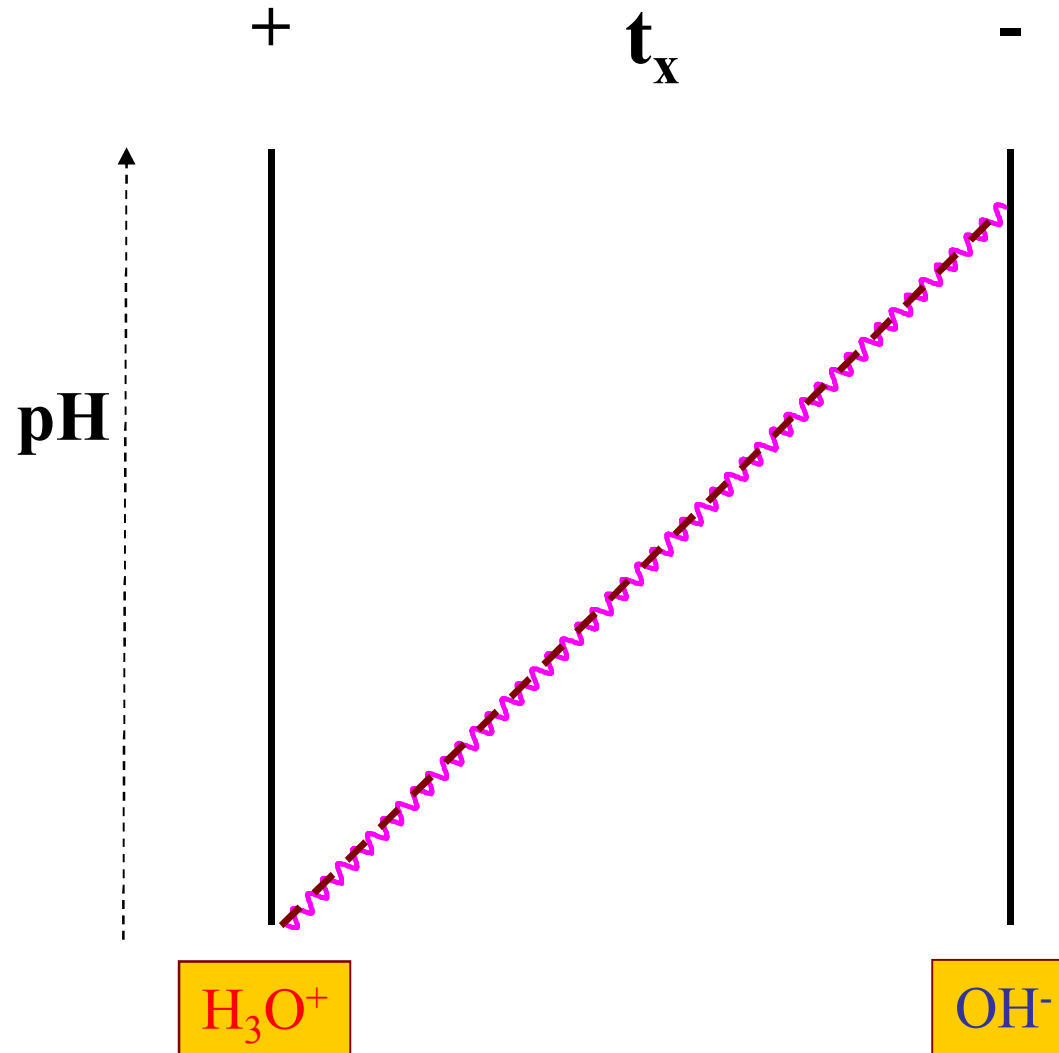


# Izoelektrická fokusace





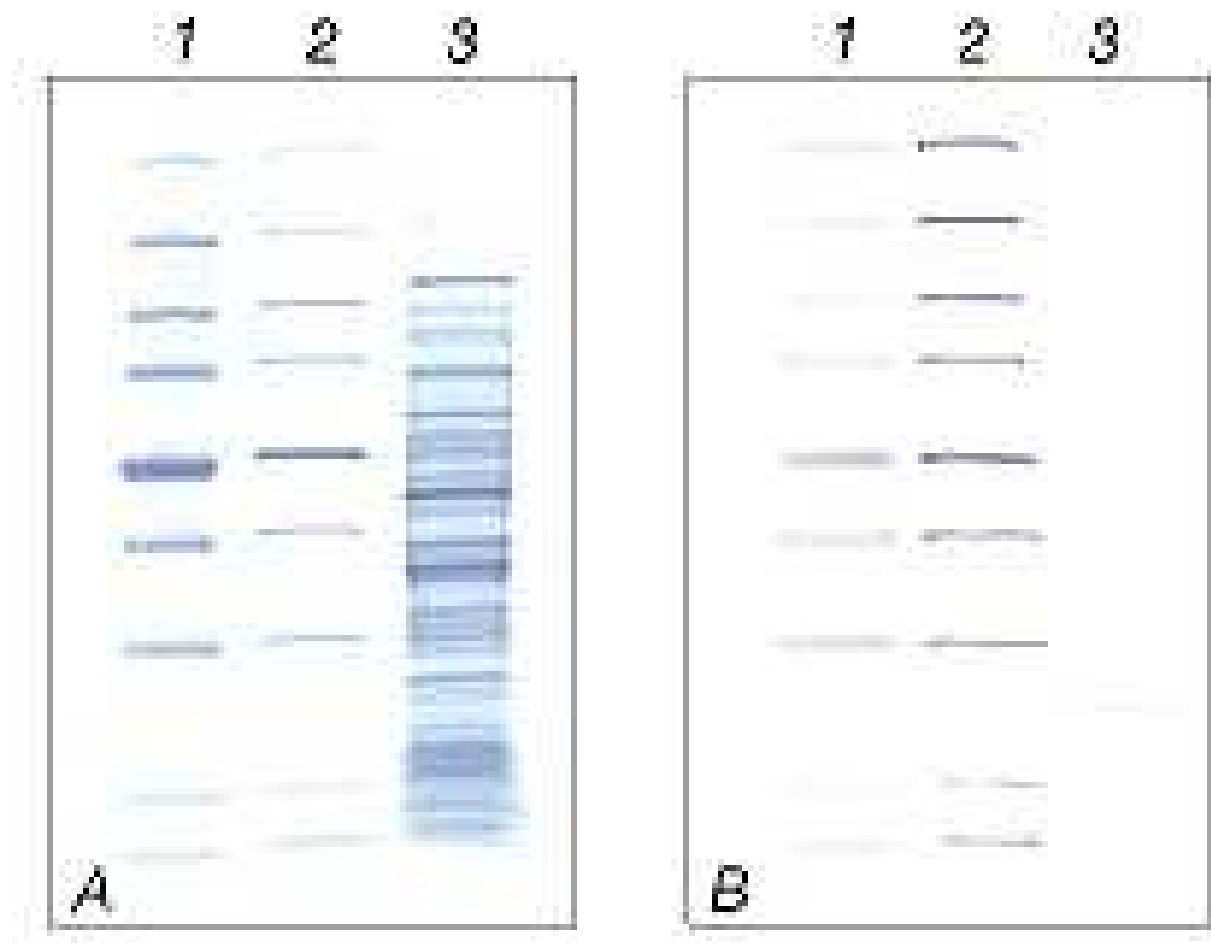
# Izoelektrická fokusace



# Izoelektrická fokusace analytická

- Provedení - v gelech – PAGE, agarosa
- Použití - sledování komplexních směsí
  - izoenzymové složení
  - stanovení pI – rozřezání a eluce
    - $\mu$ pH elektrody
    - pI standardy

# Izoelektrická fokusace analytická

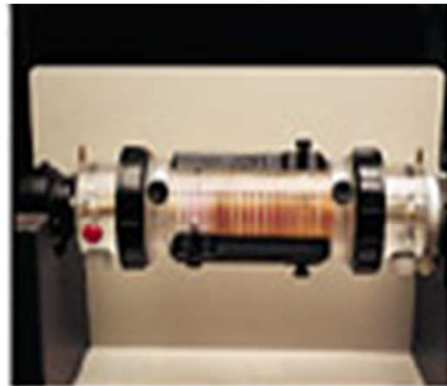


# Izoelektrická fokusace preparativní

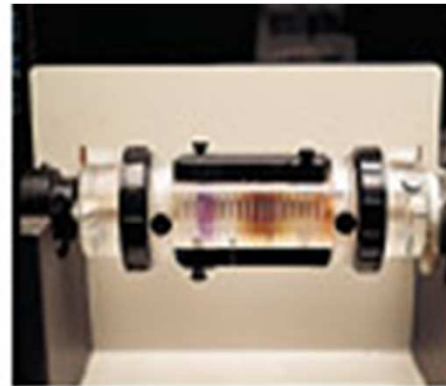
- Provedení - rotací – Rotofor (BioRad)



A



B



C

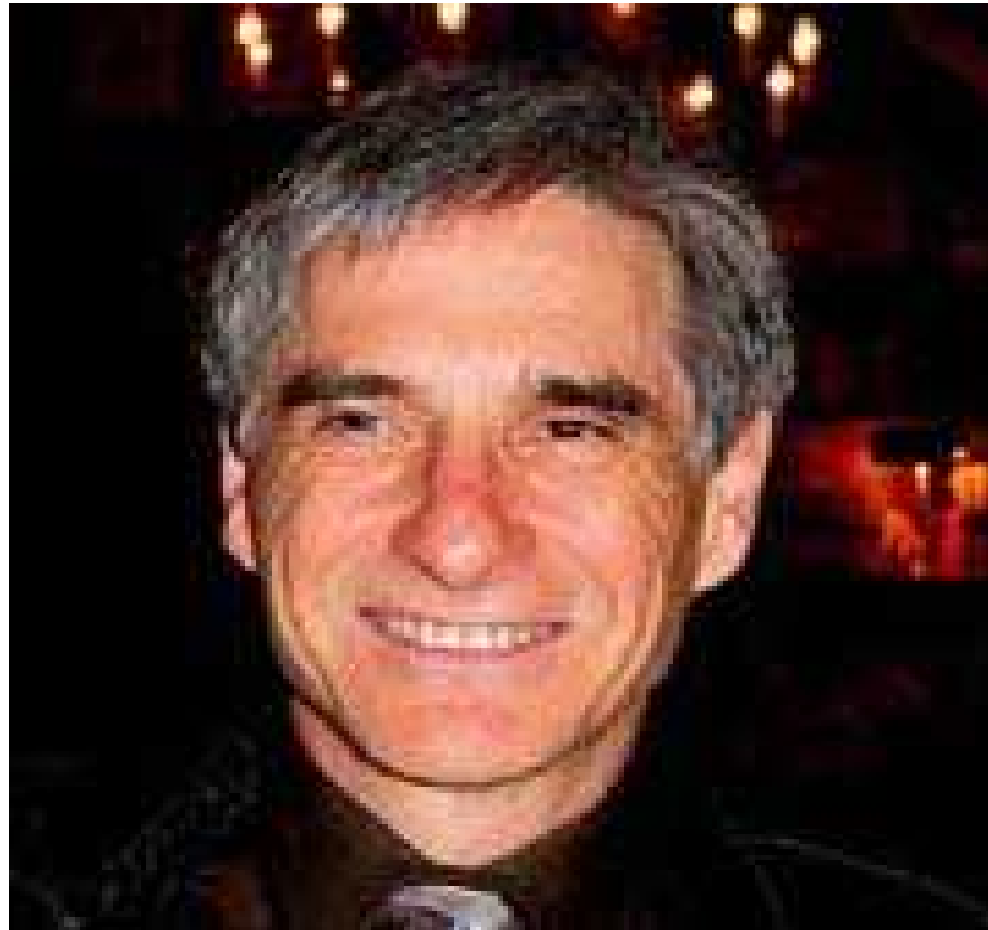


D

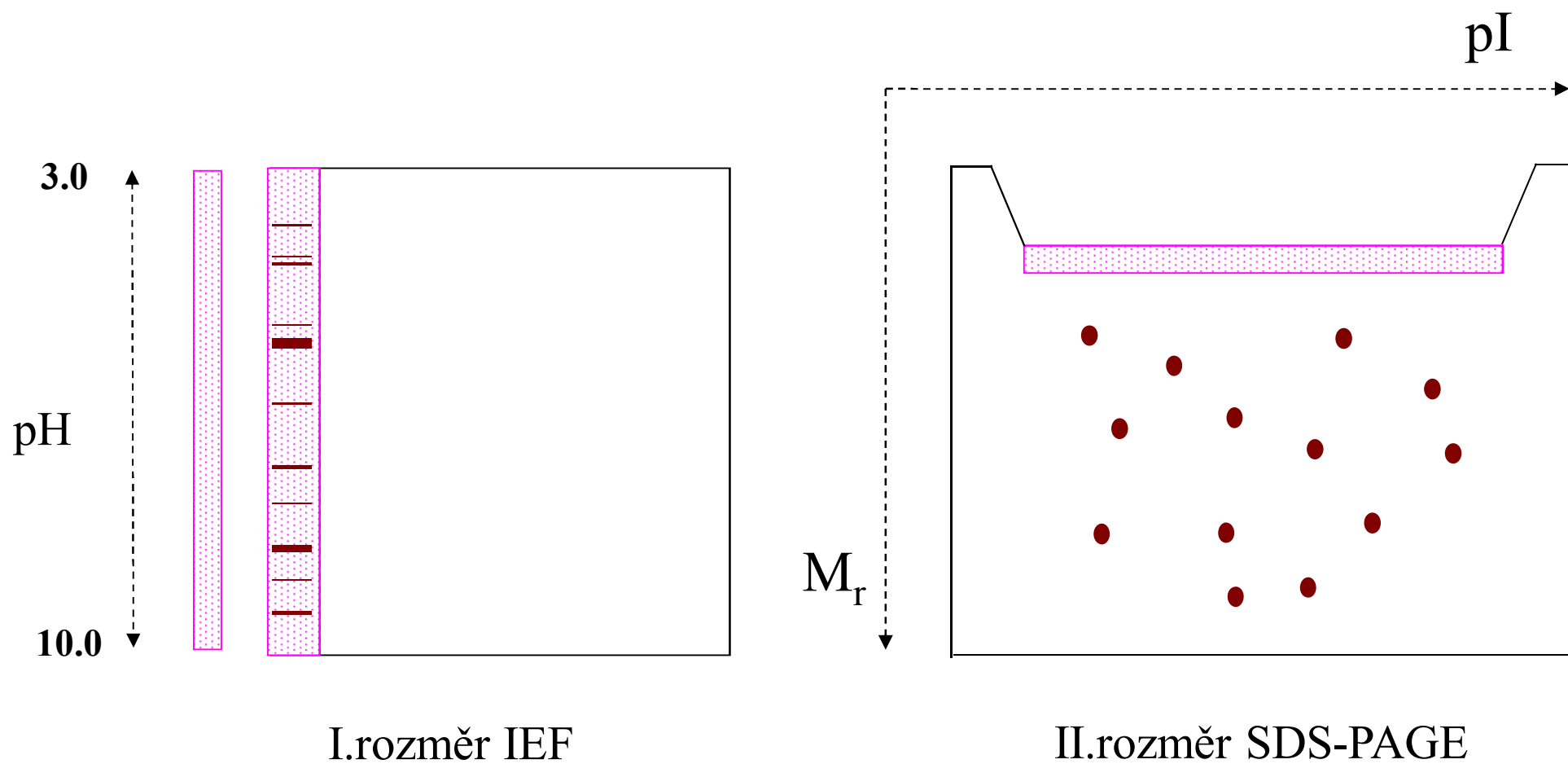
- Použití – izolace bílkovin

# Dvojrozměrná elektroforéza

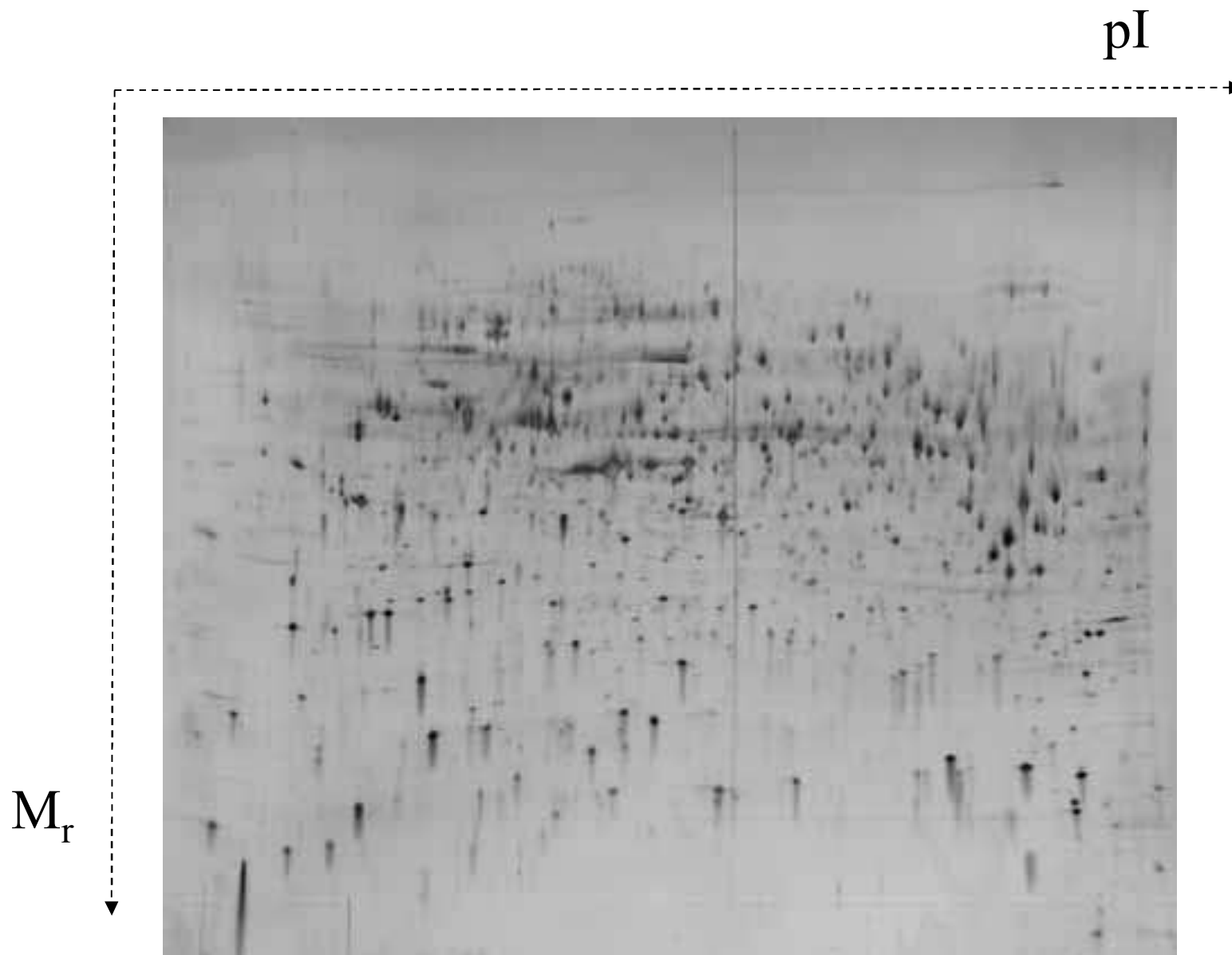
1975 O'Farrell



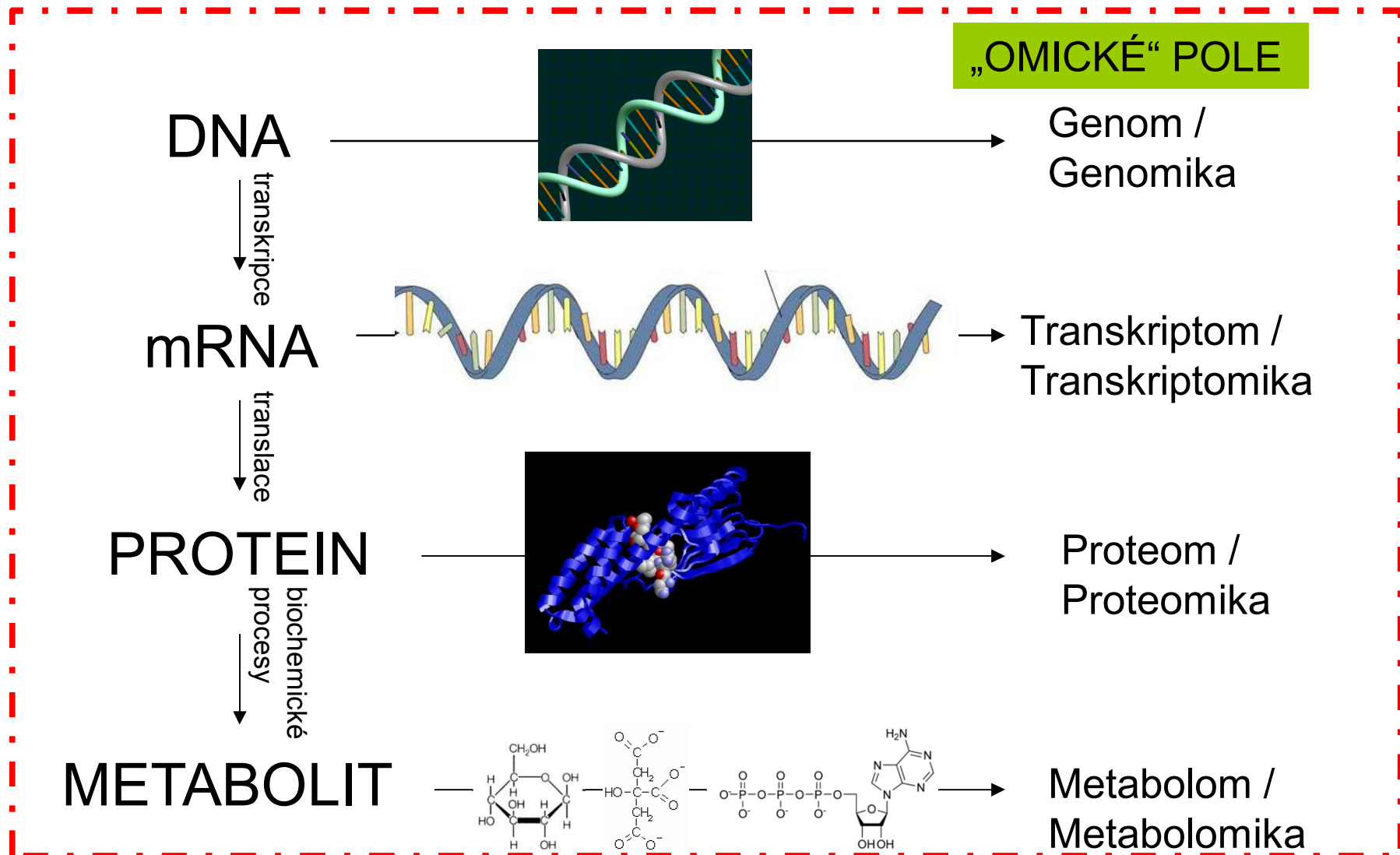
# Dvojrozměrná elektroforéza



# Dvojrozměrná elektroforéza



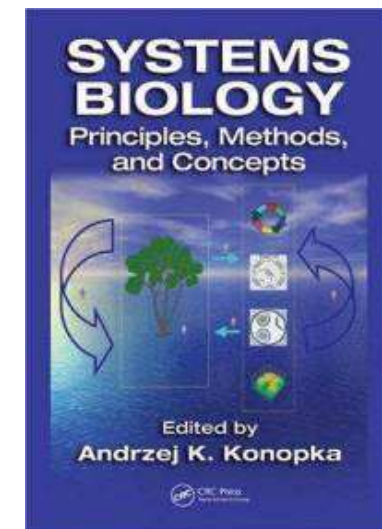
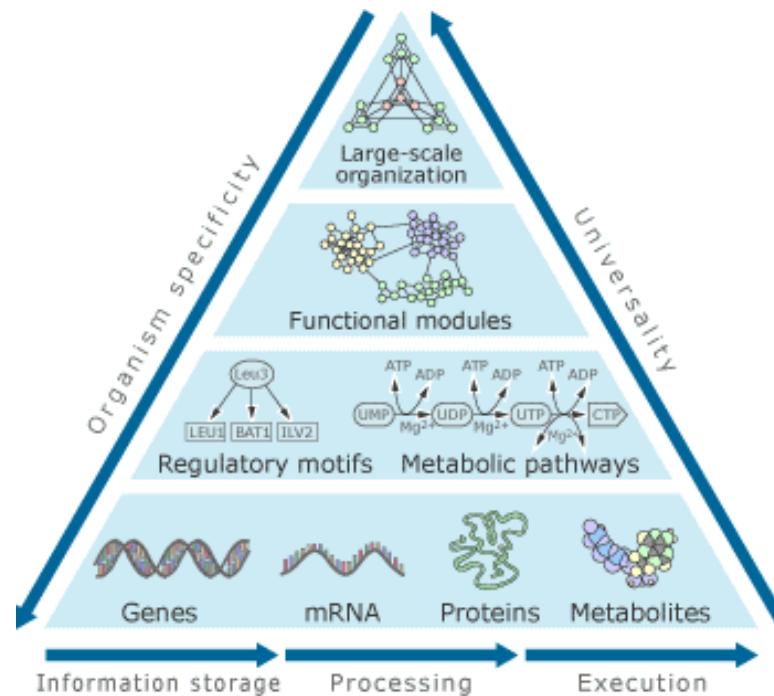
# Studium procesů probíhajících v živých organismech



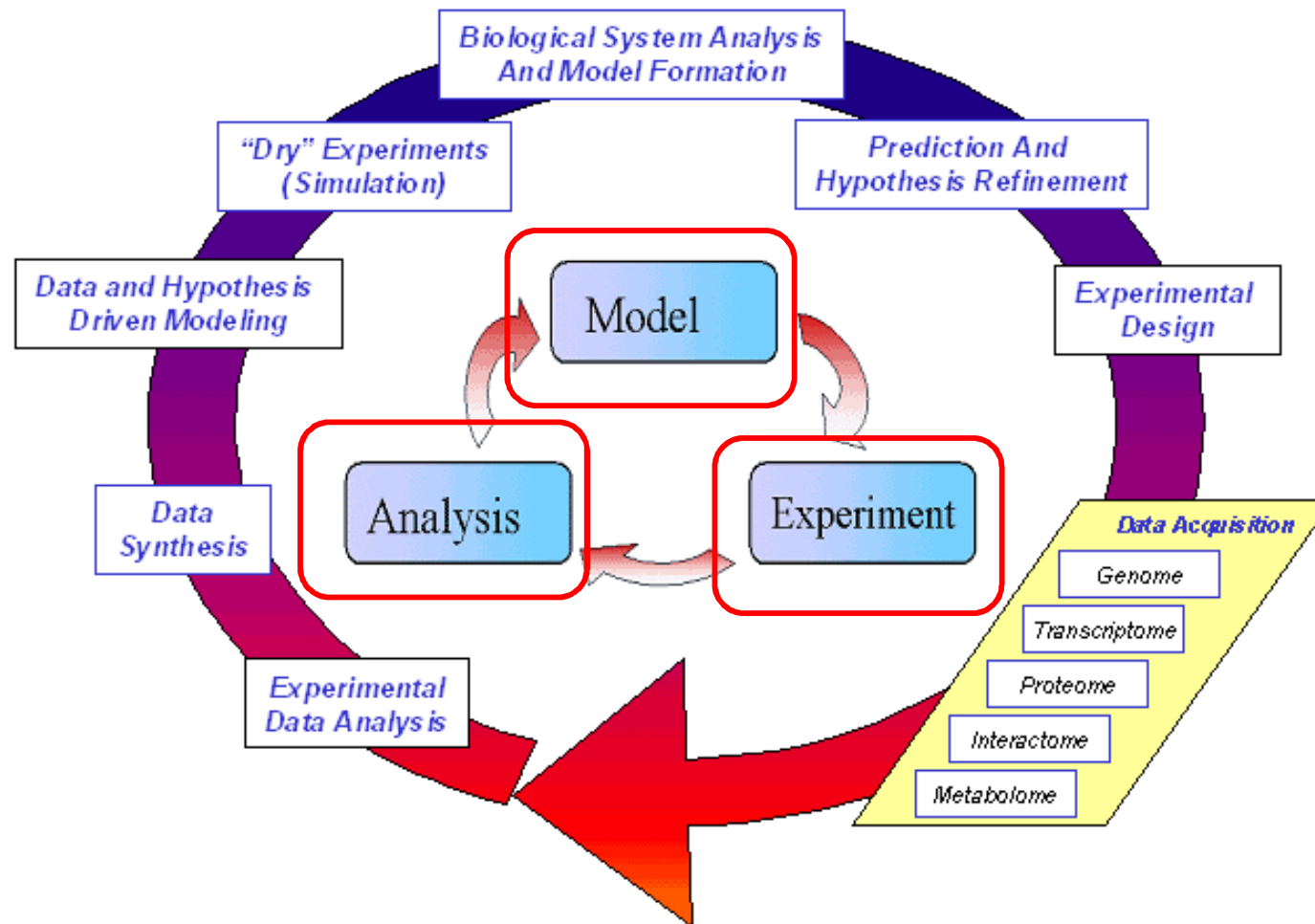
Systemová biologie



# Systemová biologie



# Systemová biologie





## **PROTEIN**

**J. J. Berzelius 1838**

*Proteios*

## **PROTEOMIKA**

**Marc Wilkins 1994**

## **PROTEOM**

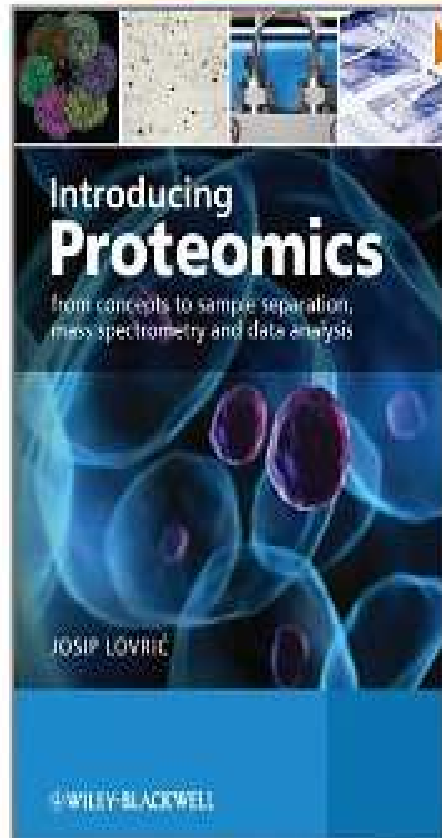
**Kompletní sada bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizaci a metabolický obrat.**

## **PROTEOMIKA**

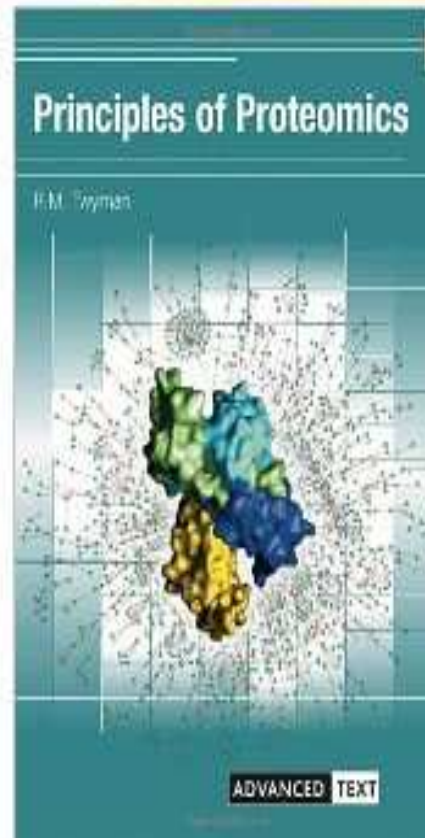
- **kvantitativní a kvalitativní charakterizace úplné sady bílkovin organely, buněčné linie, tkáně nebo organismu**
- **kvantitativní a kvalitativní porovnání proteomů za různých podmínek**

# Literatura

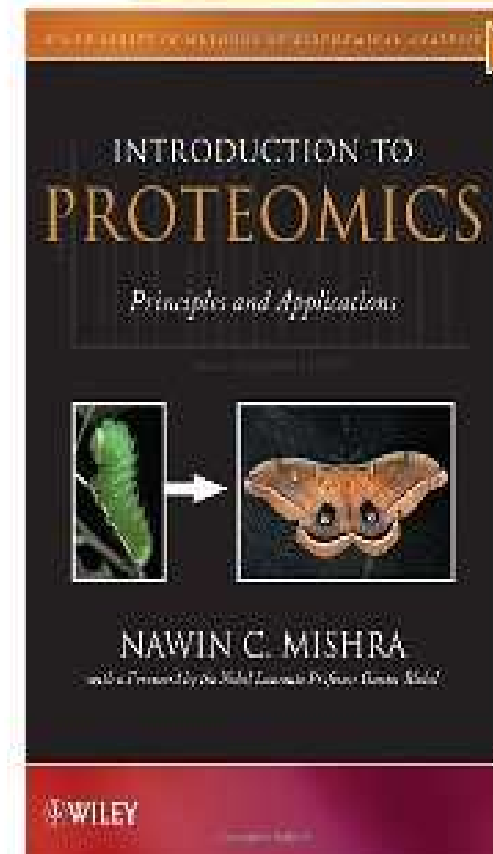
Click to **LOOK INSIDE!**



Click to **LOOK INSIDE!**



Click to **LOOK INSIDE!**



# Cíl proteomiky

- Cílem je nejen identifikovat všechny bílkoviny, ale zároveň pochopit jejich funkci a strukturu a vytvořit 3D mapu buňky (určit lokalizaci jednotlivých bílkovin).

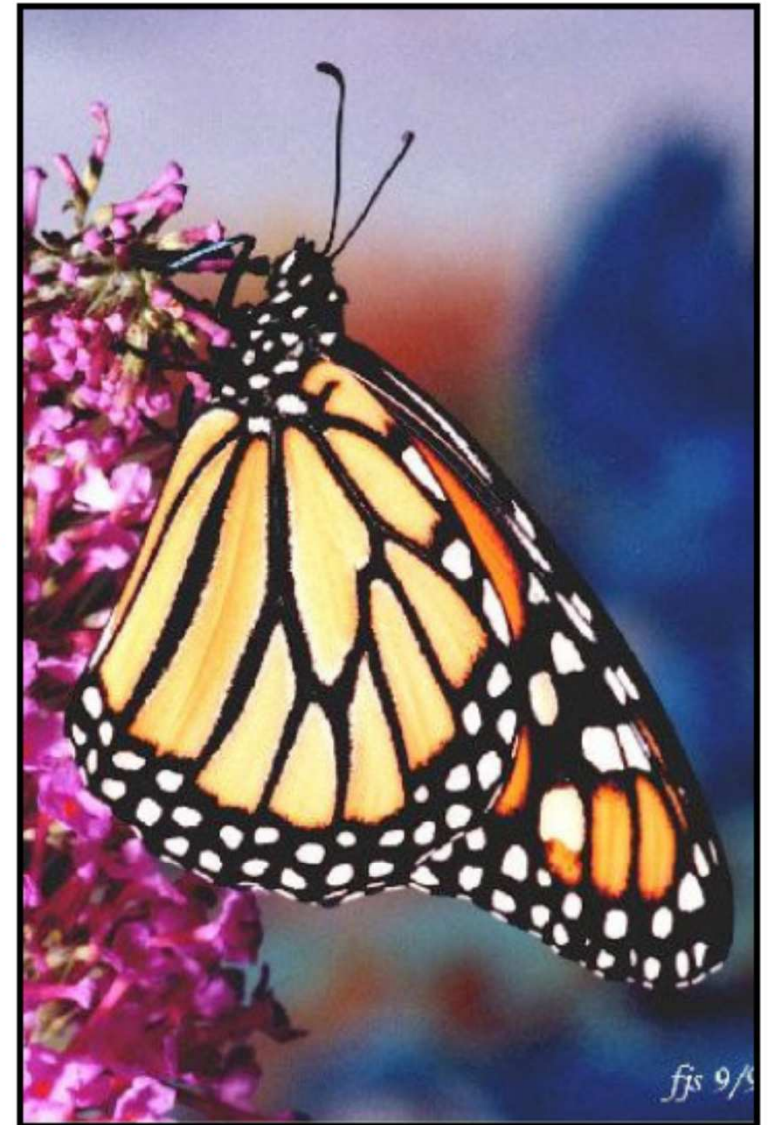
# Proč proteomika když máme genomiku ?

- nelze určit funkci proteinu na základě sekvence DNA nebo mRNA
- !!!! špatná korelace hladin mRNA a skutečných hladin bílkovin !!!
- nelze popsat molekulární mechanismy pomocí studia genomu
- 200 typu posttranslačních modifikací
- existuje alternativní translace

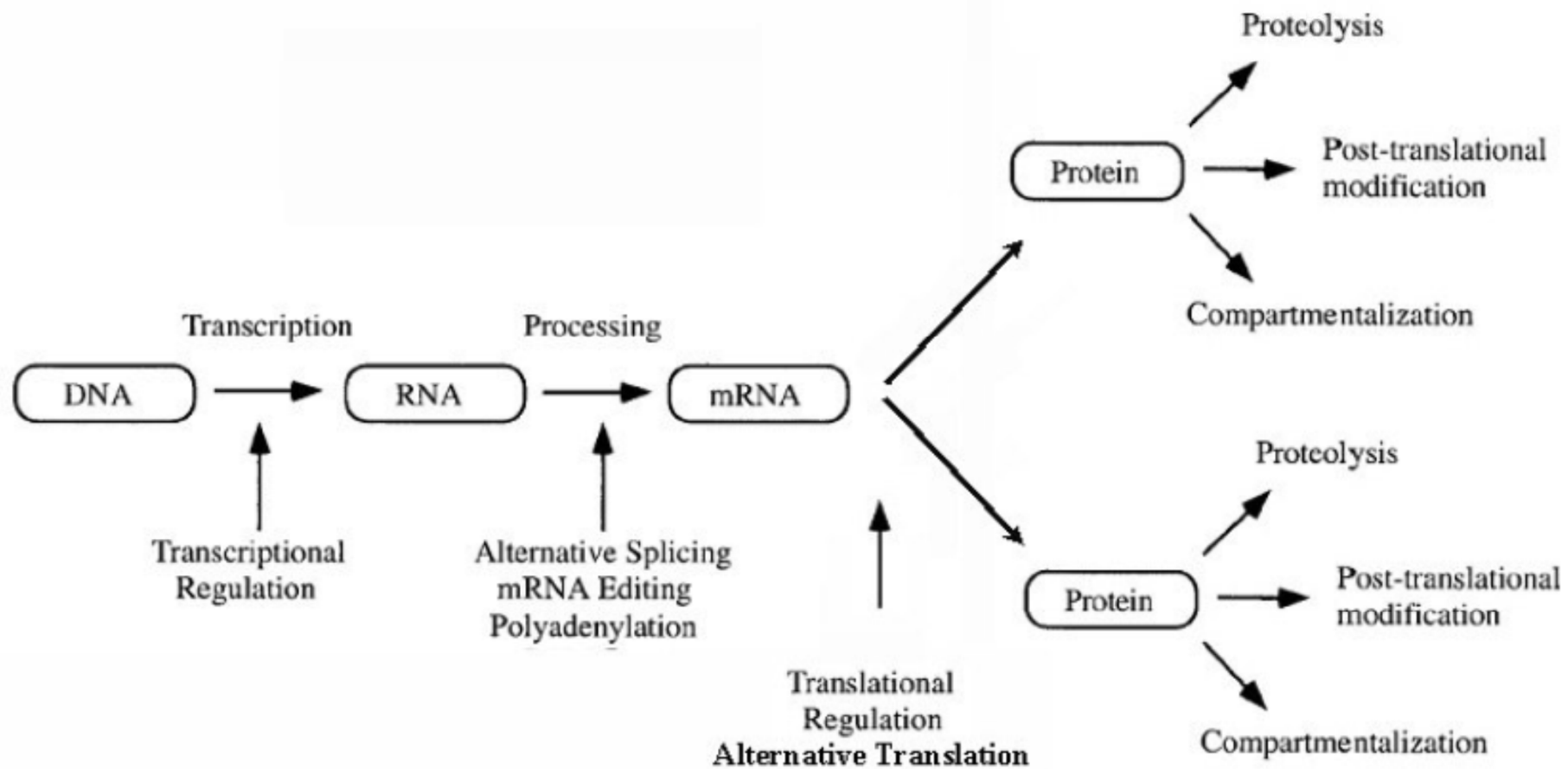
**PROTOŽE PROTEINY A NIKOLIV GENY VYTVÁREJÍ FENOTYP !**



**JEDEN GENOM  
DVA PROTEOMY**



# JEDEN GEN, MNOHO BĚLKOVIN

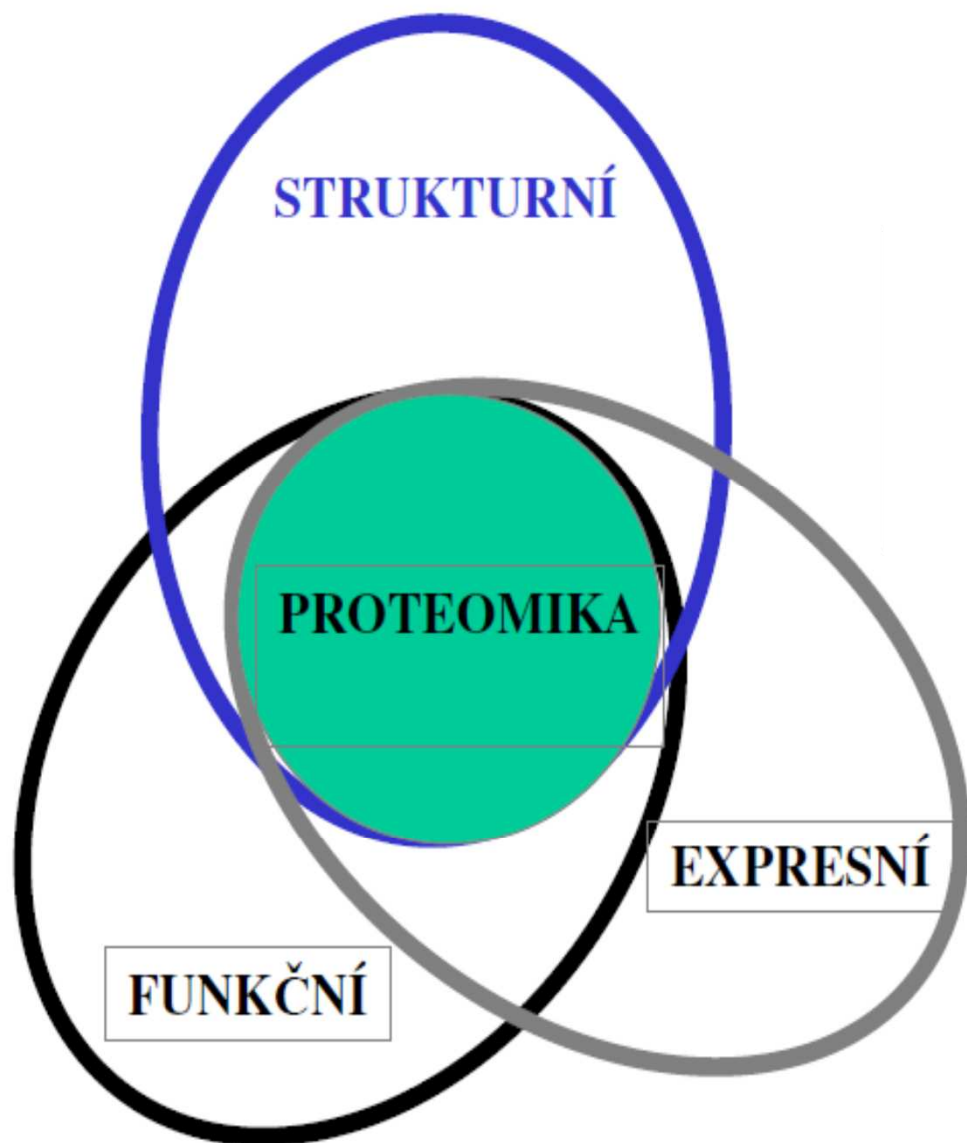


Cca 25-30 000 genů



Několik set tisíc bílkovin



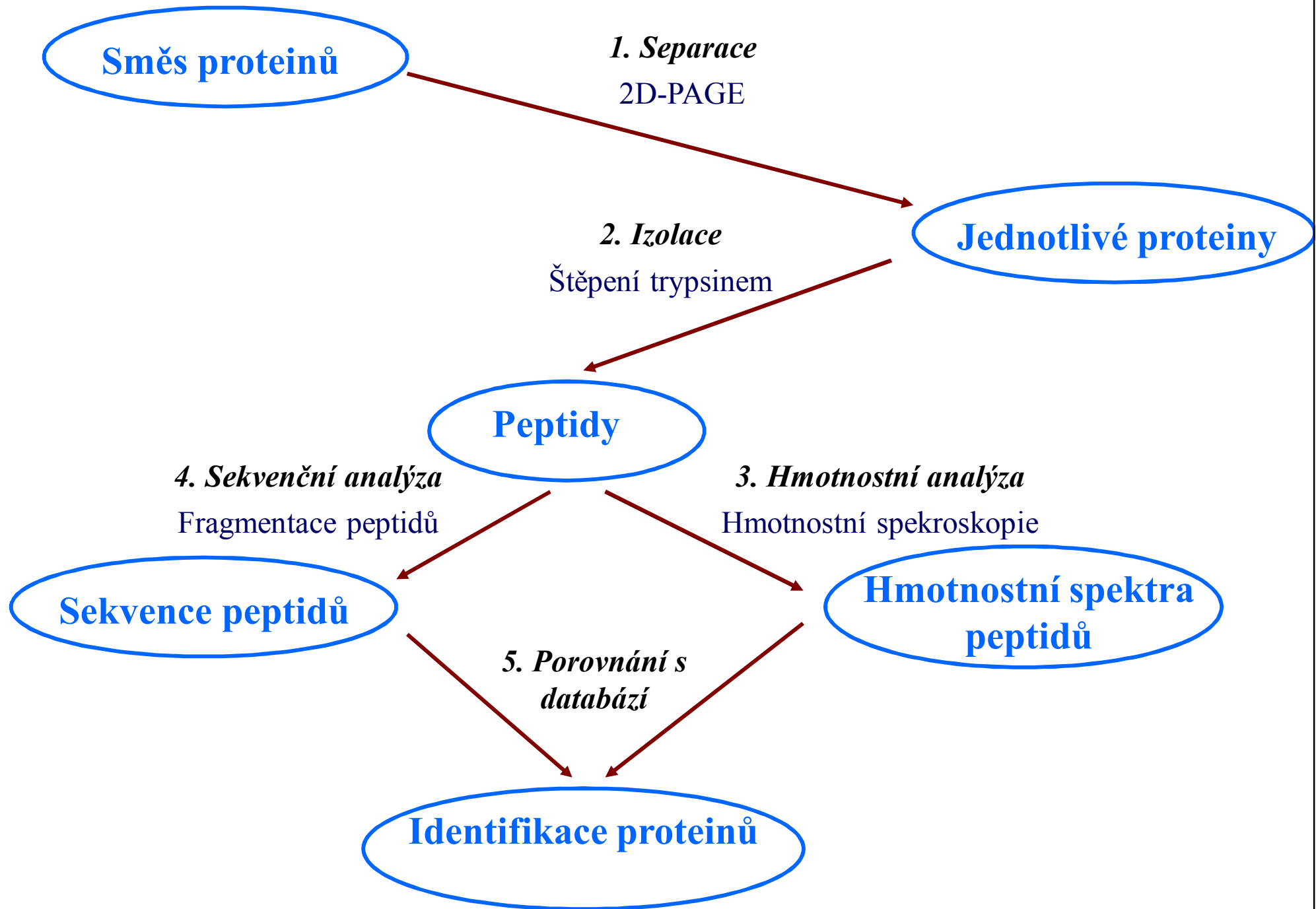


# Aplikace proteomiky v medicíně (proteomika nemocí)

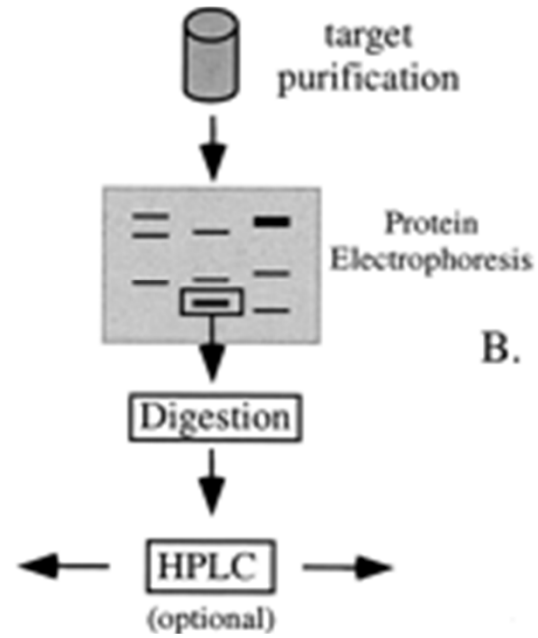
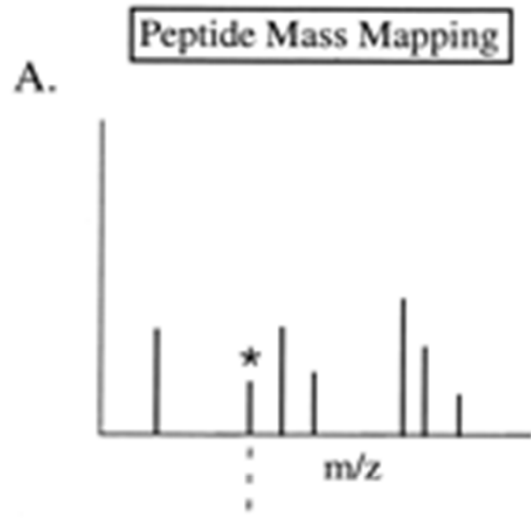
**Úloha proteinů ve vzniku  
nemocí**

**Exprese proteinů u nemocí**

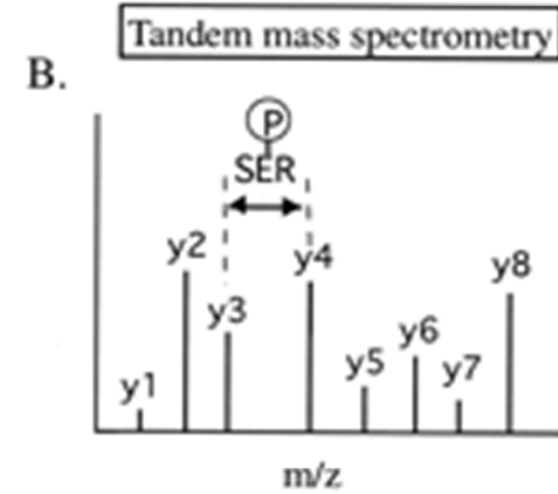
# Základní schéma analýzy užívané v proteomice

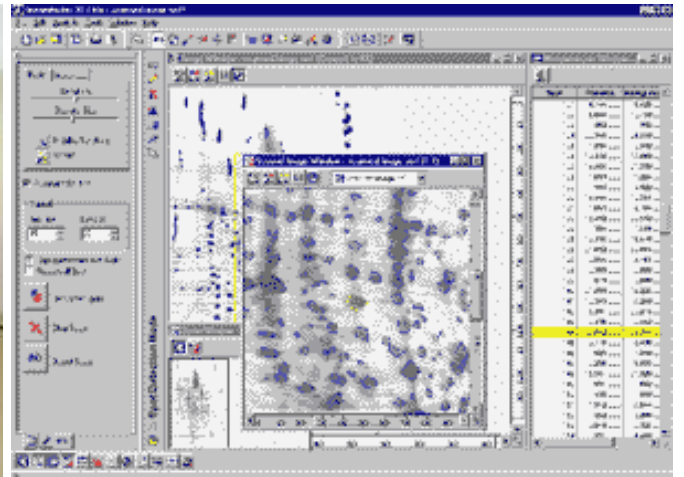


## Peptide fingerprinting

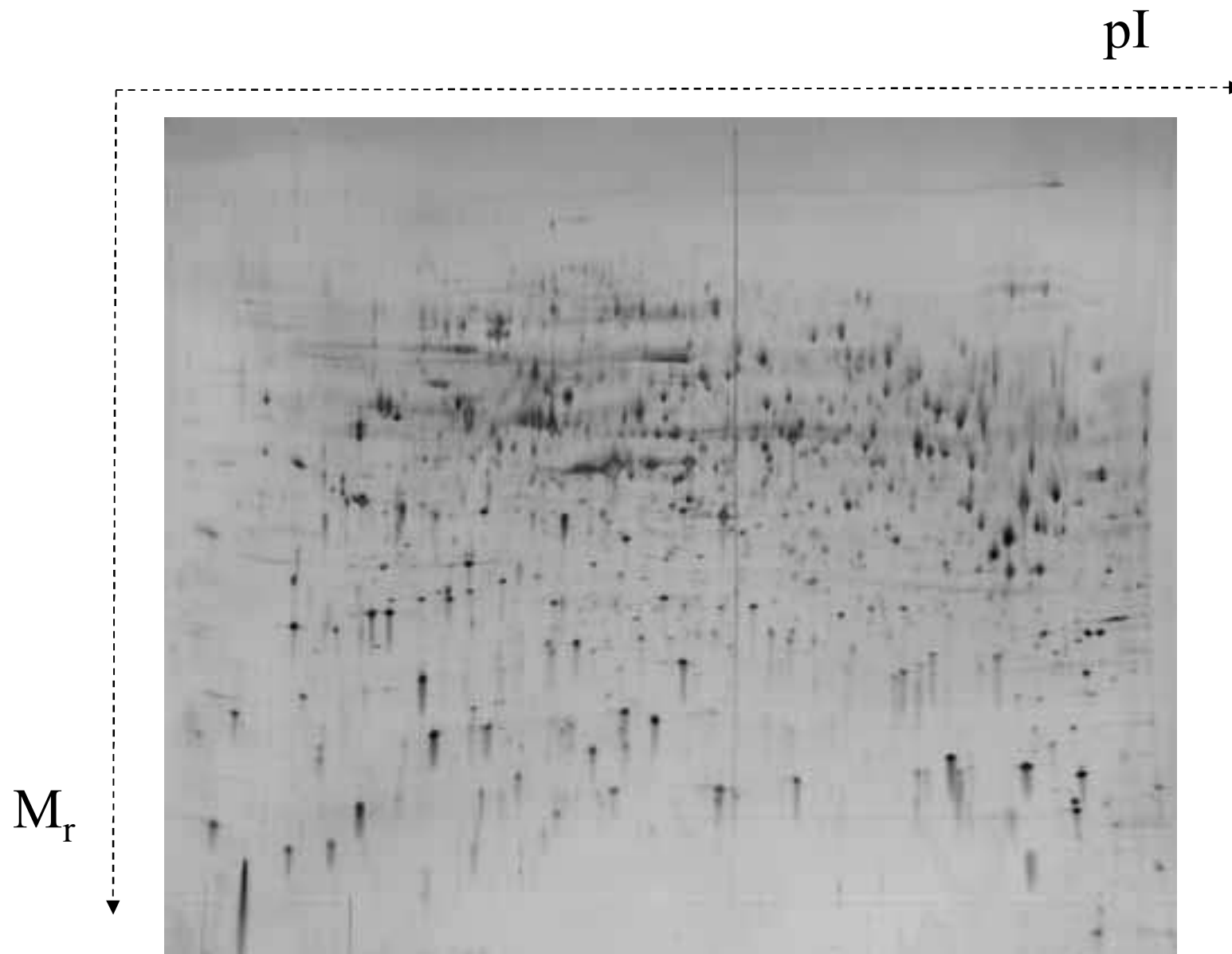


## De novo sequencing





# Dvojrozměrná elektroforéza



CompuGen Z3 DeskTop v.1.11.Beta

File Edit Image Spots Align View Analysis Window Log Help

[1st] 2small [2nd] 1small

Layered View: 2small vs. 1small

Matching Data Table

The gels in the table are enumerated as follows:

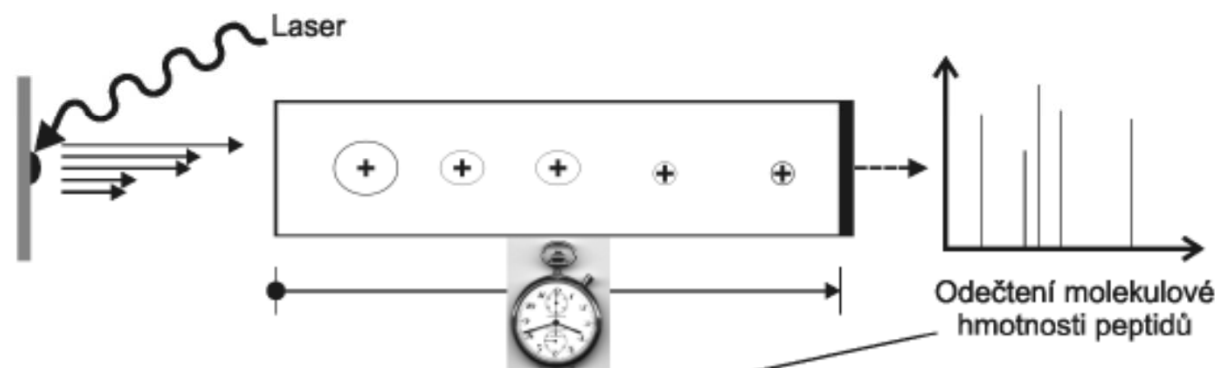
1. 2small
2. 1small

ID	X1	Y1	RE1	X2	Y2	RE2	std	baseline
1016	346	39	6031	337	43	11053	2511.0	0.588
1022	255	45	3712	250	51	3745	16.5	0.009
1023	242	48	2206	237	53	2821	357.5	0.279
1024	119	49	584	125	53	1076	246.0	0.593
1025	100	50	3290	108	54	4738	724.0	0.361
1027	183	50	2104	183	53	3515	705.5	0.502
1029				95	52	1150		
1030	221	52	5409	217	56	4496	456.5	-0.184
1032				264	52	4886		
1033				275	52	1422		
1034	147	53	3078	151	59	1281	898.5	-0.825
1038	290	56	1992					
1040				35	57	1006		

[142, 129] -> [1st: 127 2nd: 184]

# PEPTIDOVÉ MAPOVÁNÍ (PEPTIDE MASS FINGERPRINT)

## Identifikace proteinů peptidovým mapováním (MALDI TOF)



1059.5  
1491.7  
1591.8  
1607.8  
2359.0

Vyhledání  
v databázích

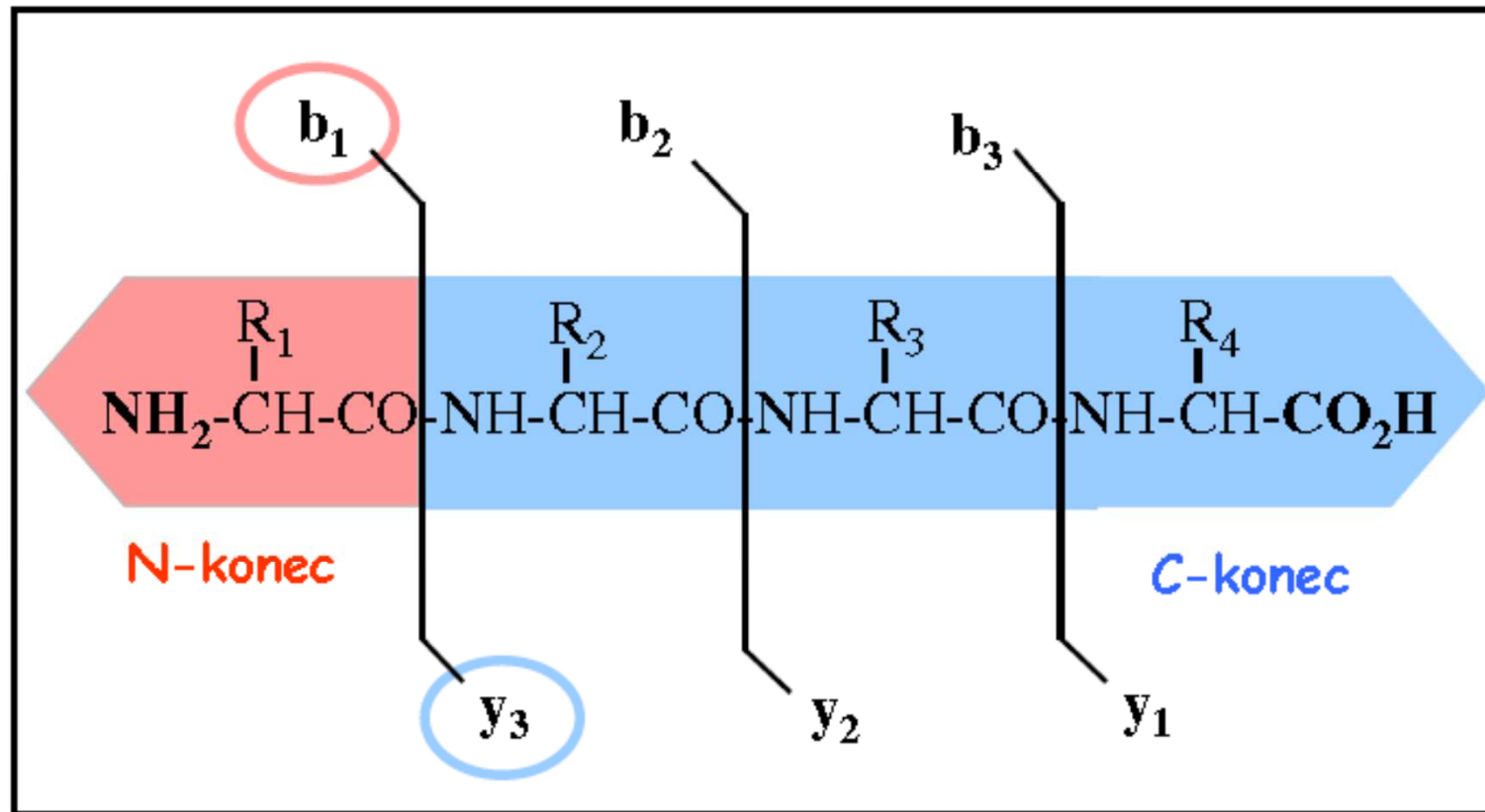
1059.5111 (K)KPAEDEW GK (T)  
1491.7232 (R)DDVALEGVSHFFR (E)  
1607.8069 (R)LGGPEAGLGEYLFER (L)  
2359.0916 (R)TDPHLCDFLETHFLDEEVK (L)

**Ferritin  
(lehká  
podjednotka)**

*SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL  
GSA RTDPHLCDFLETHFLDEEVKL IKKMGDHLTNLHRLGGPEAG LGEYLFER LTLKHD*



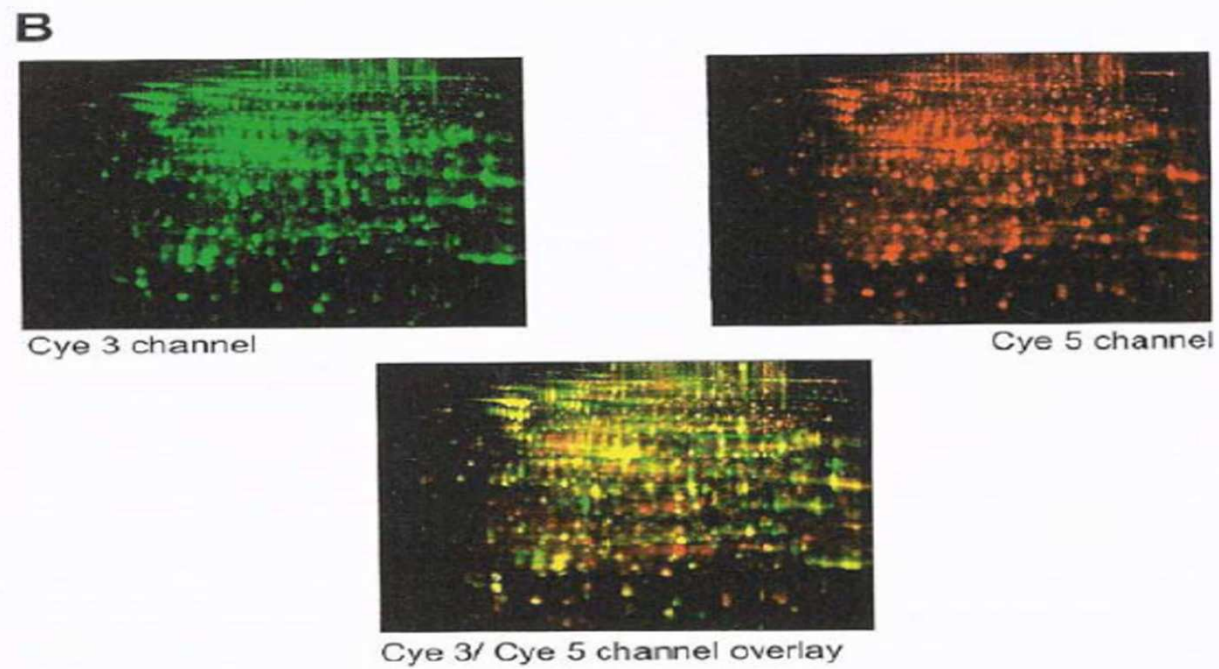
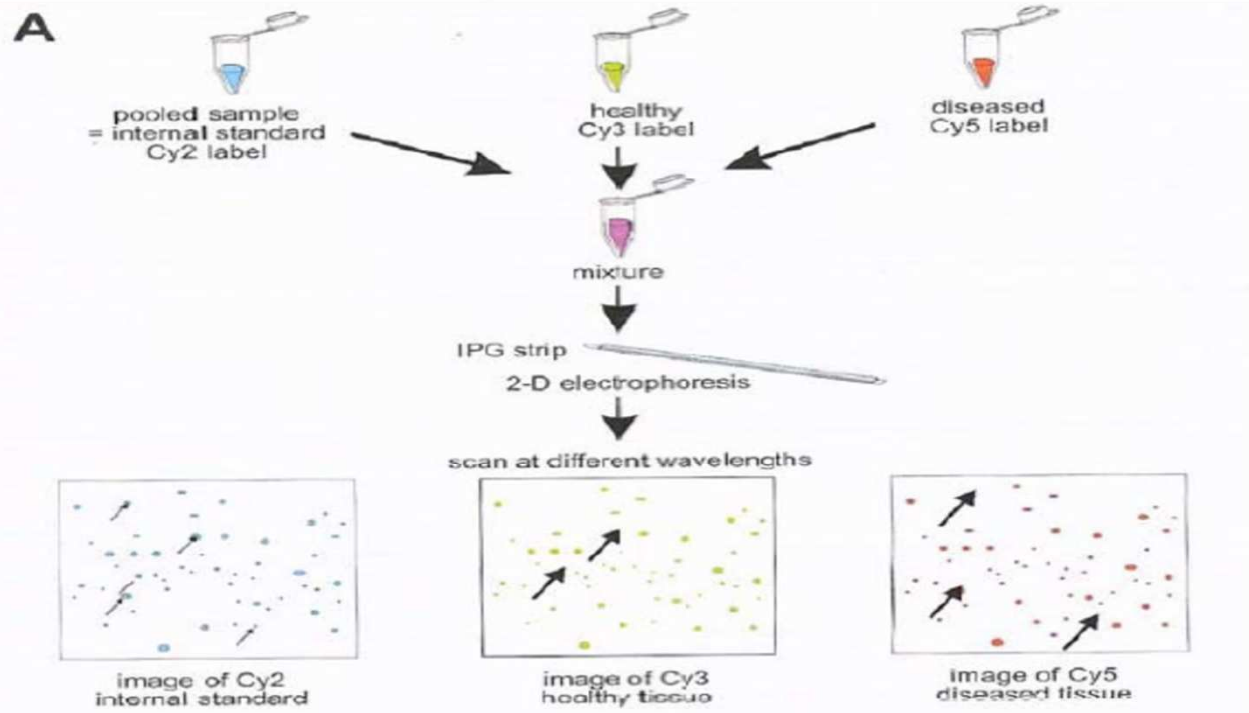
## FRAGMENTACE PEPTIDU

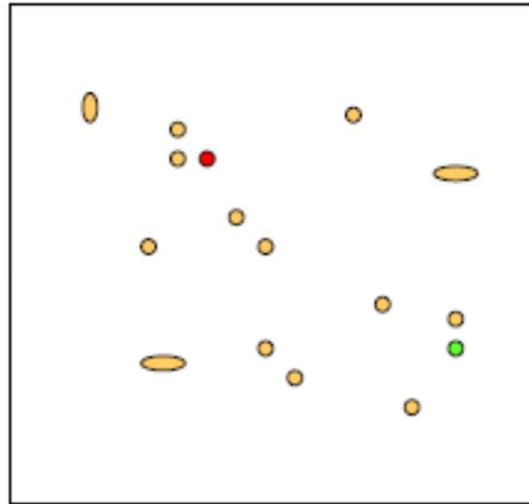
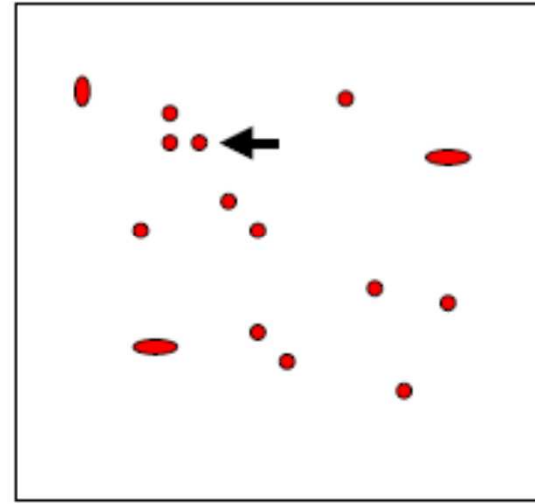
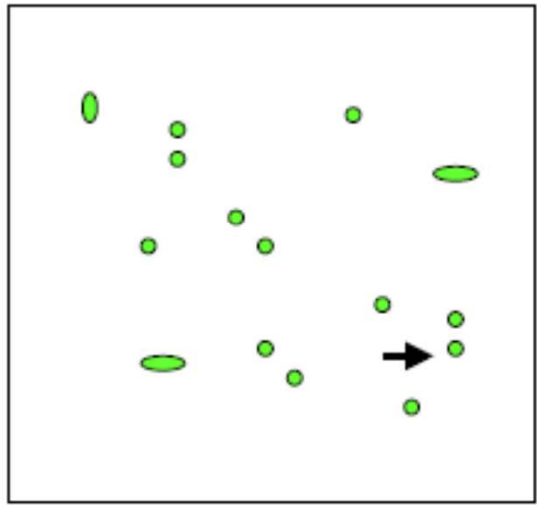


# Databáze

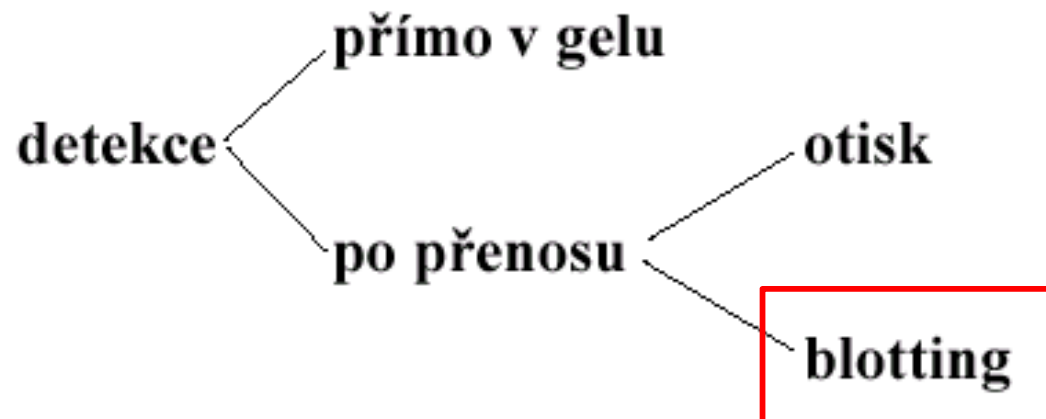
- <http://www.expasy.org/>







# Detekce po elektroforéze a izoelektrické fokusaci



# Nespecifická detekce

## Reakce s barvičkou

Postup :    **A. Fixace**  
              **B. Barvení**  
              **C. Odbarvování**

Používané barvičky

*Amido Black 10 B*

**Coomassie Brilliant Blue R 250**

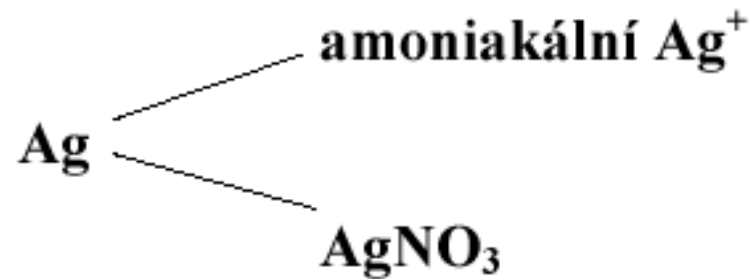
*Coomassie Brilliant Blue G 250*

*Fast Green*

*Panceau S*

# Nespecifická detekce

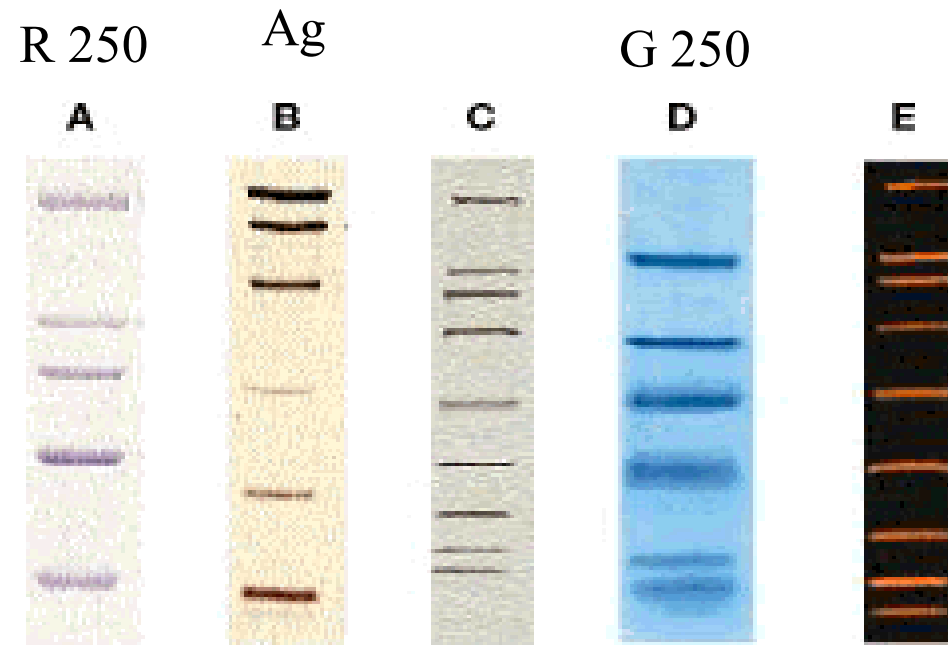
## Barvení Ag



Postup :    A. Navázání  $\text{Ag}^+$  na bílkovinu  
              B. Redukce  $\text{Ag}^+$  na  $\text{Ag}^0$



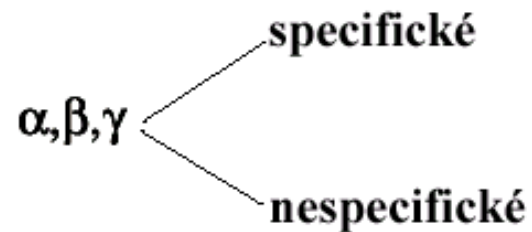
# Nespecifická detekce



**SDS-PAGE Standards provide accurate molecular weight determinations. A. High range SDS-PAGE Standards run on a 7.5% gel and stained with Coomassie blue R-250 dye, B. Low range Silver Stain SDS-PAGE Standards run on a 12% gel and stained with Bio-Rad's Silver Stain Kit, C. Broad range Biotinylated SDS-PAGE standards run on a 4–20% gradient gel, blotted to nitrocellulose, and detected with Avidin-AP. D. Polypeptide SDS-PAGE Standards run on a 16.5% tricine gel and stained with Coomassie blue G-250 dye. E. Broad range SDS-PAGE standards for SYPRO Orange staining run on a 4–20% gel and stained with SYPRO Orange.**

# Specifická detekce

## Radioaktivní značení



**A. Autoradiografie**

$^{32}\text{P}, ^{125}\text{I}$

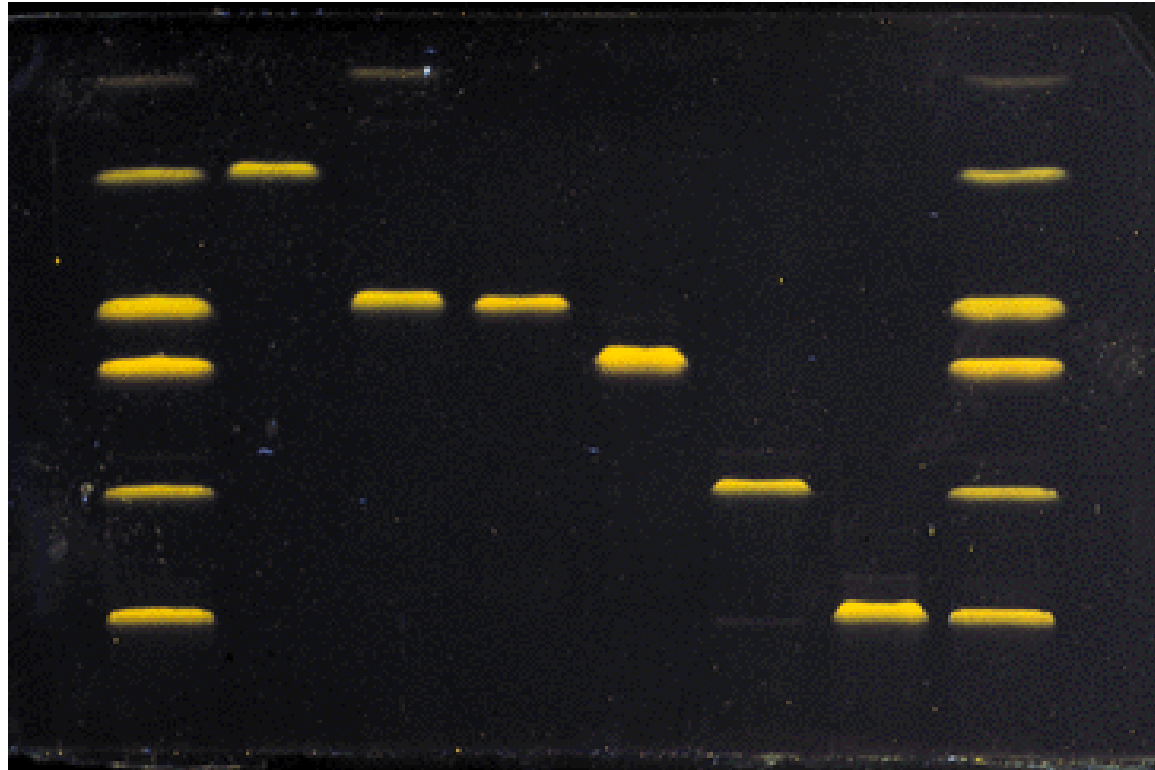
značený protein  $\longrightarrow$  rentgenový film

**B. Fluorografie**

$^3\text{H}, ^{14}\text{C}, ^{35}\text{S}$

značený protein  $\longrightarrow$  fluorofor  $\longrightarrow$  rentgenový film

# Autoradiografie



# Specifická detekce

## Detekce různých skupin bílkovin

glykoproteiny	-	Schiffova reakce (oxidace s $\text{HJO}_4$ , reakce s Schiffovým činidlem - bazický fuchsin)
lipoproteiny	-	Sudan B
hemoproteiny	-	peroxidázová aktivita (hem + benzidin + $\text{H}_2\text{O}_2$ )
$\text{Cu}^{2+}$	-	alizarin
$\text{Fe}^{3+}$	-	fenantrolin

# Detekce na základě biologické aktivity

## Detekce na základě enzymové aktivity

### Rozdělení

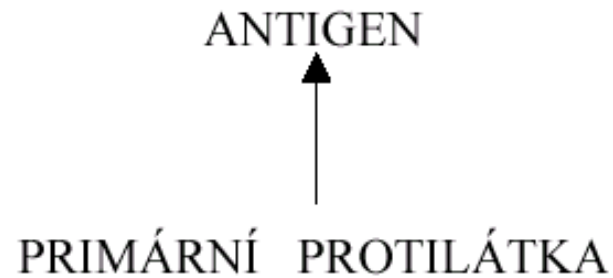
- A. bezbarvý substrát → barevný produkt
- B. barevný substrát → bezbarvý produkt
- C. bezbarvý substrát → bezbarvý produkt  
→ barevný produkt
- D. auxiliární enzymy → barevný produkt

### Detekce

- přímo v gelu
- přímo v gelu se zapolymerovanými substráty
- otisk - zymogram
- indikátorové gely

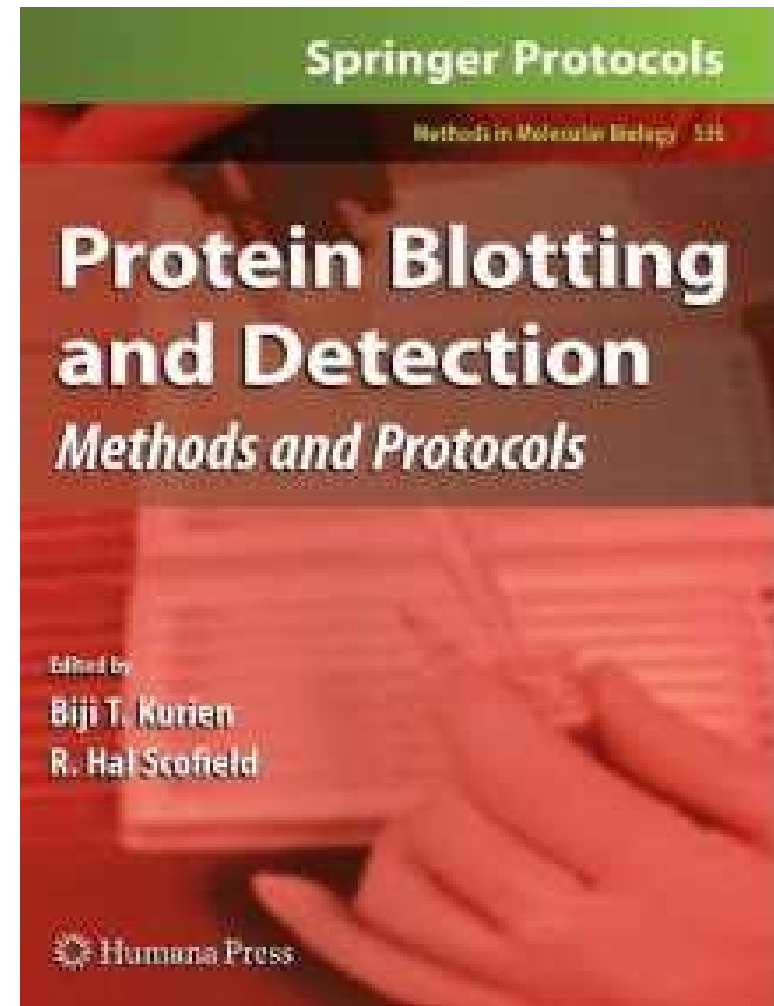
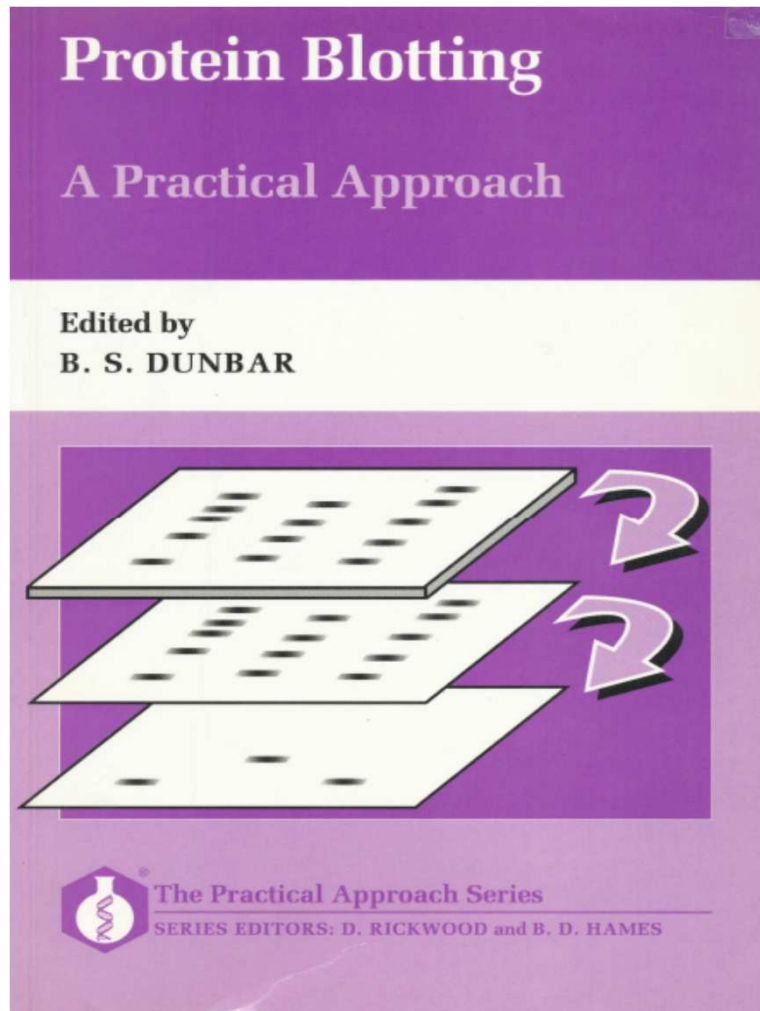
# Detekce na základě biologické aktivity

## Imunodetekce



radioaktivní ( $^{125}\text{I}$ ) fluorescenční enzymové avidin-biotin koloidní Au  
značení

# Blotting



# Blotting

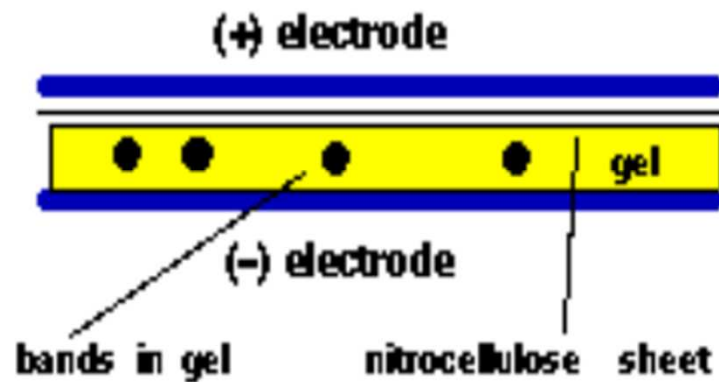
- Southern – DNA
- Northern – RNA
- Western - bílkoviny



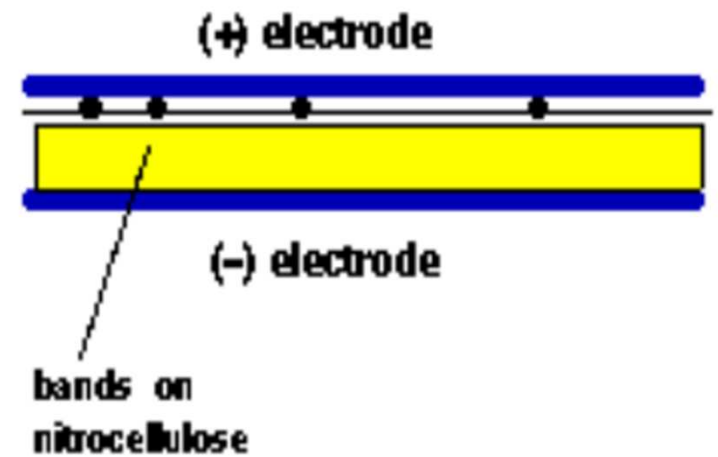
# Blotting

Side View:

Before Transfer:



After Transfer:

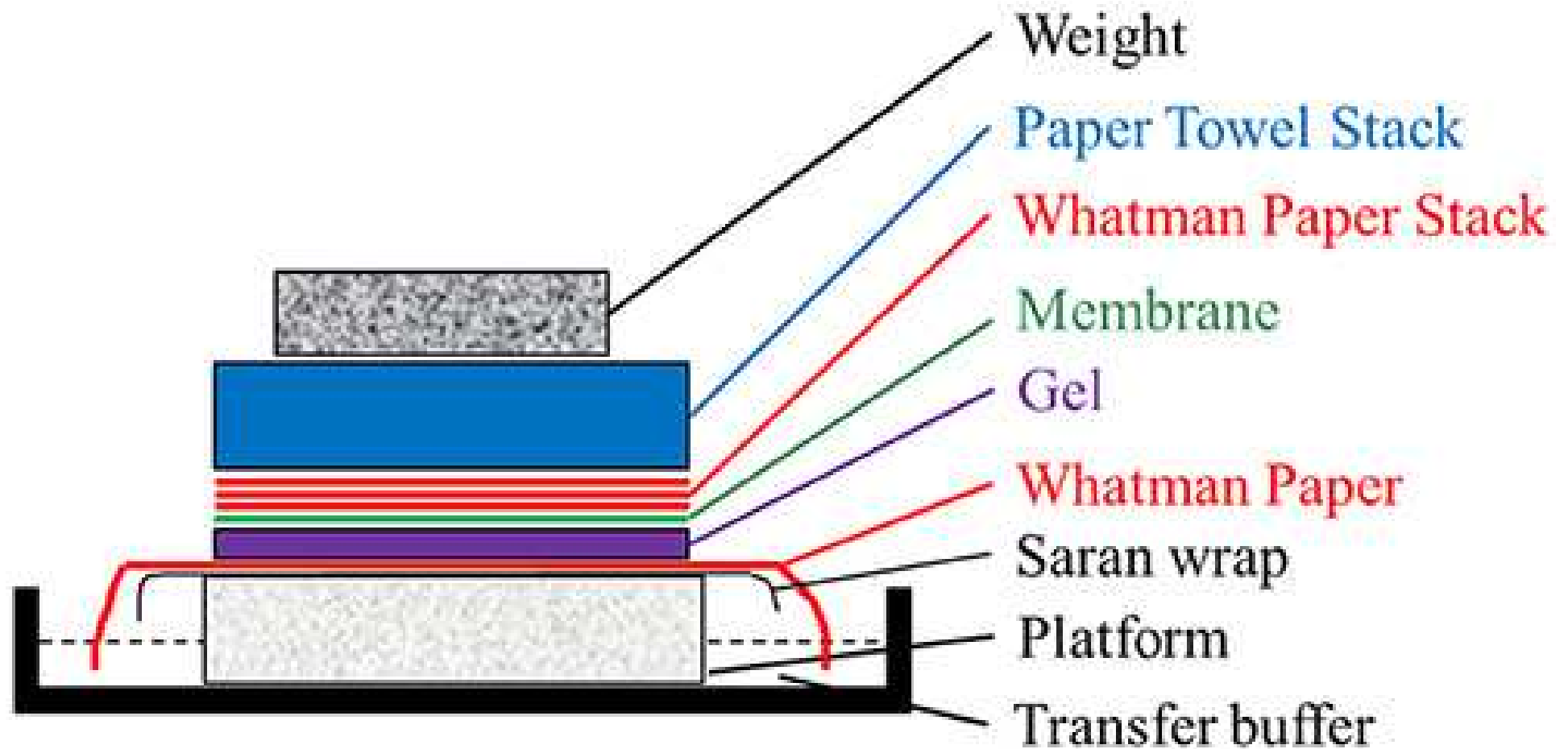


Note: All the layers are pressed tightly together.

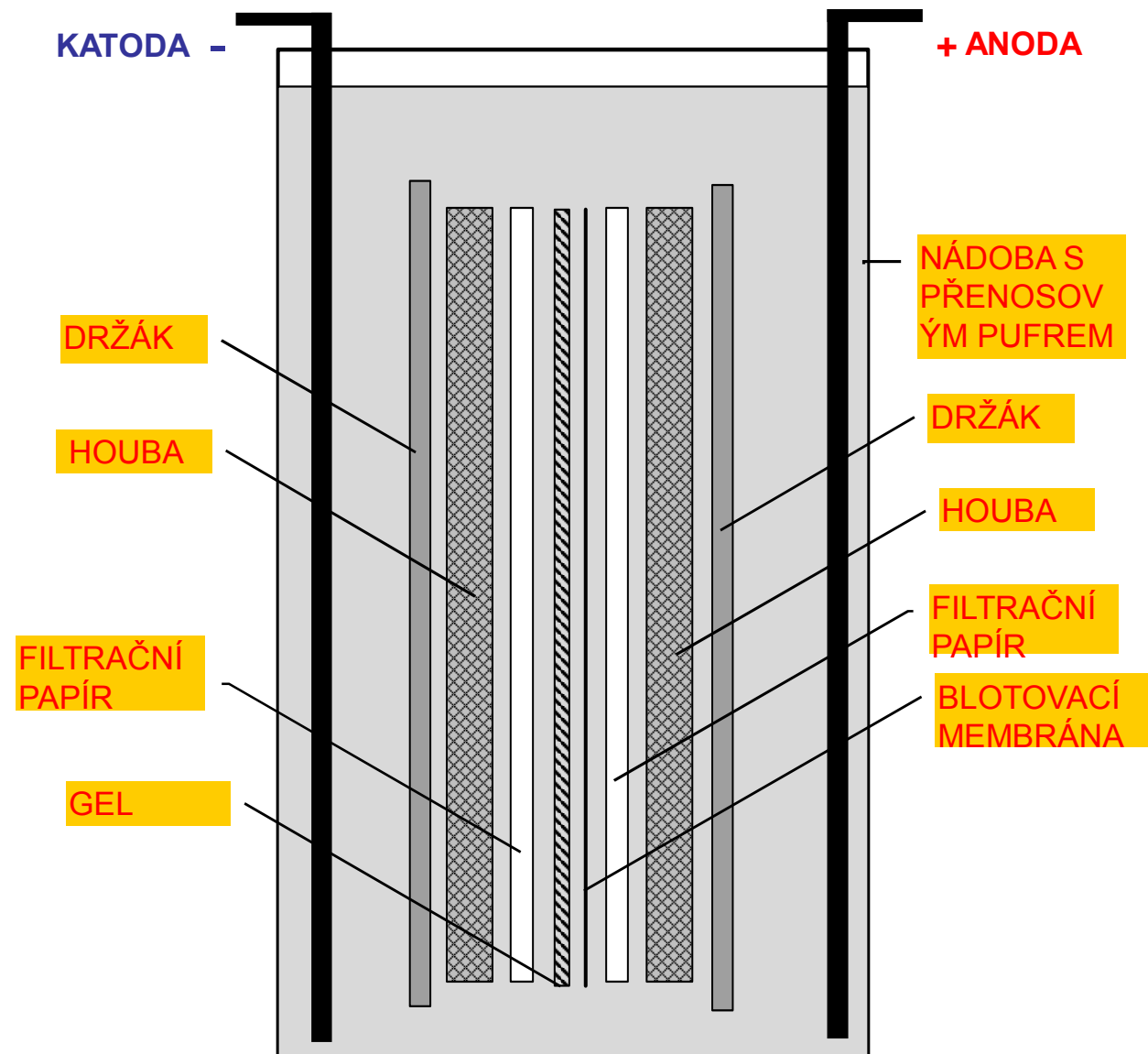
# Výhody blottingu

- Dostupnost biomakromolekul
- Zakoncentrování biomakromolekul
- Redukce doby a množství potřebných chemikálií
- Imobilizace biomakromolekul – možnost uchovávání
- Možnost vícenásobné detekce
- Mechanická stabilita

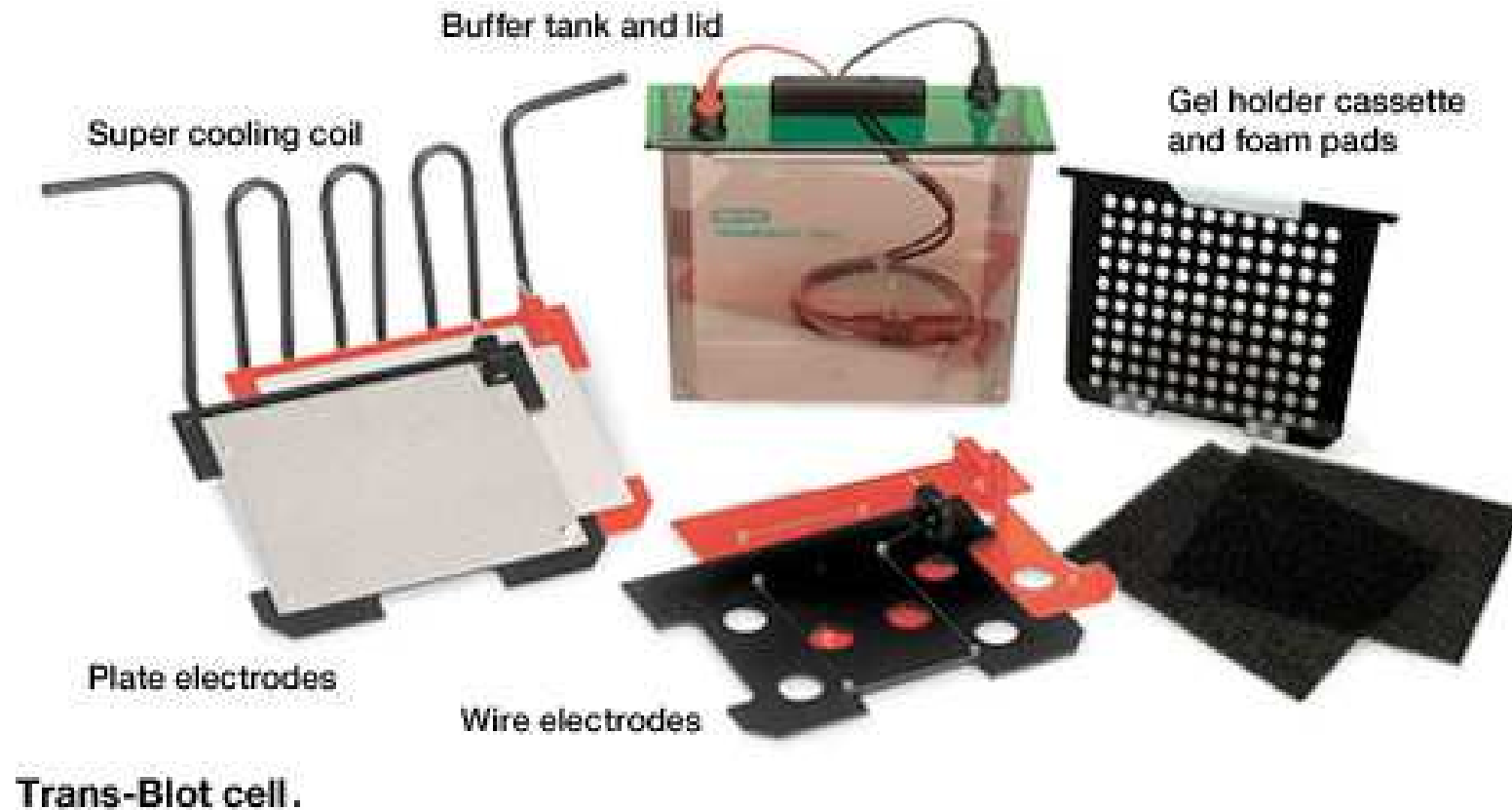
# Kapilární blotting



# Tankový elektroblotting



# Tankový elektroblotting

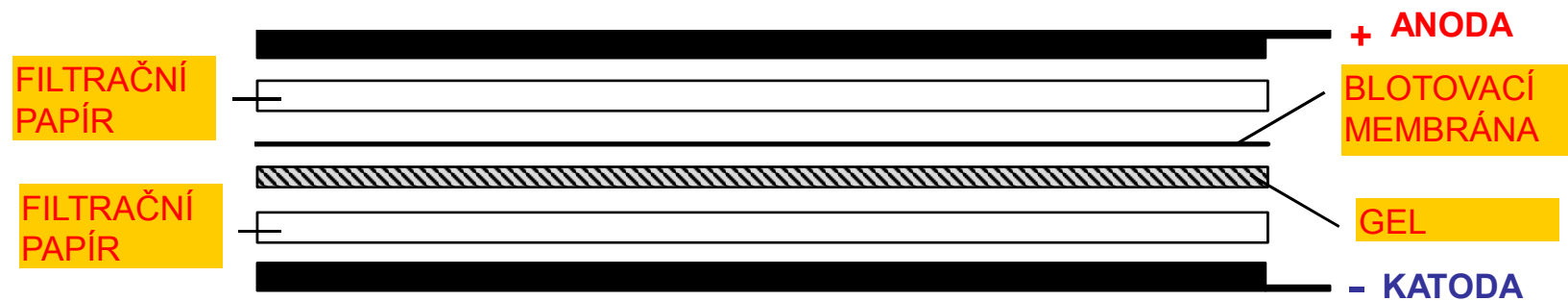


# Tankový elektroblotting

## Mini Protean Trans Blot Cell



# „Semi dry“ blotting

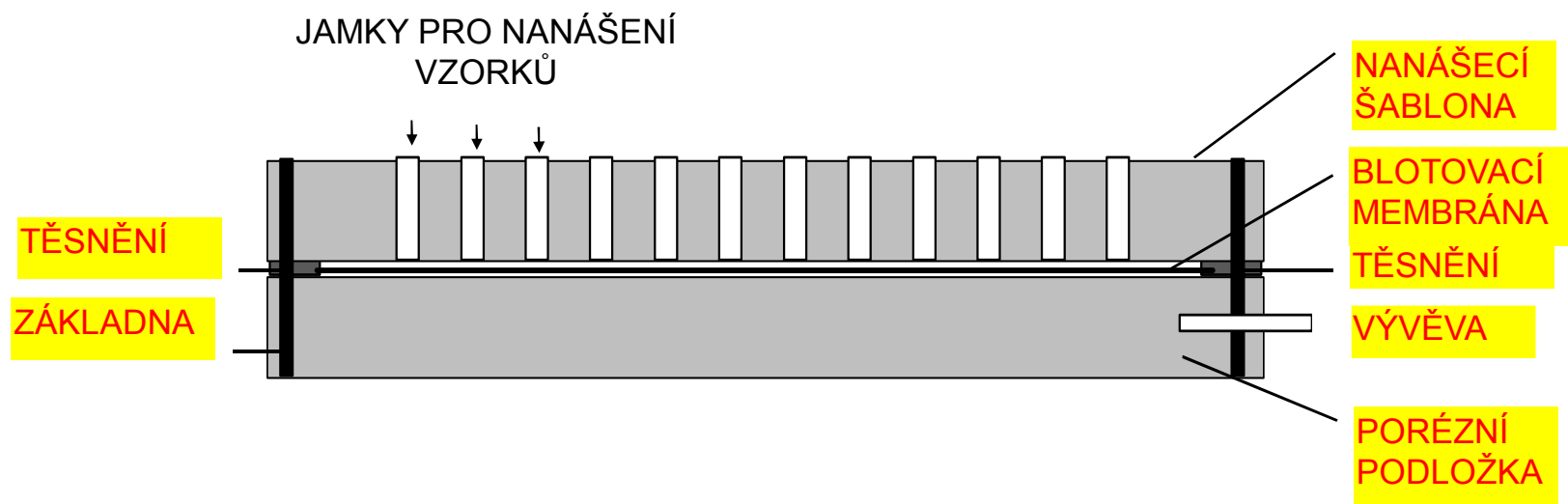


# „Semi dry“ blotting

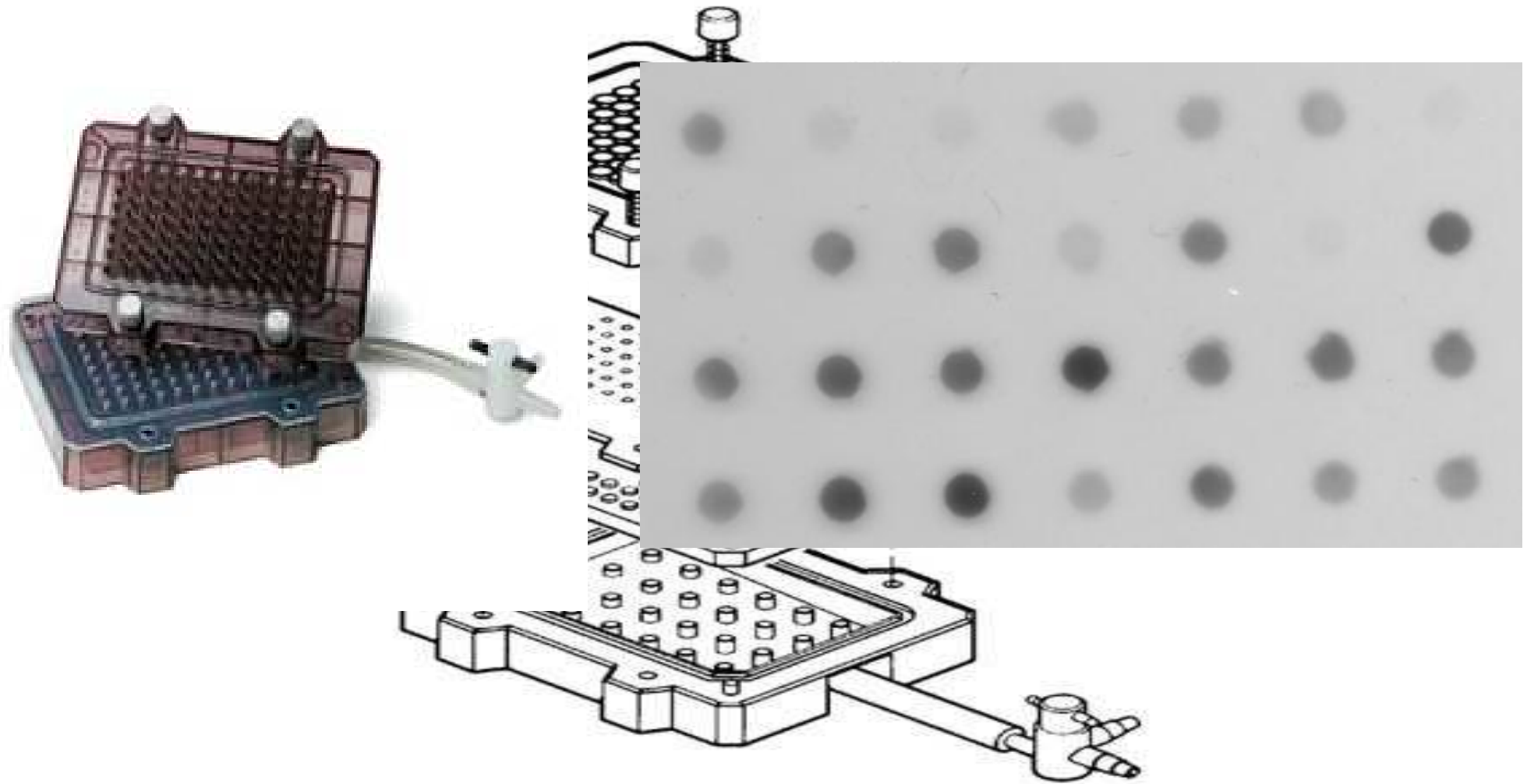




# Kapkovací dot blotting



# „Dott“ blotting



# Membrány

- nitrocelulosa - nejběžnější
- polyviniliden difluorid – vysoká vazebná kapacita
- diazobenzoyloxymethyl – chemická aktivace
- ionexové membrány - preparativní
- aktivovaná skleněná vlákna – pro přímou sekvenaci

# Detekce

## Proteiny

REAKCE SE SUBSTRÁTEM    nativní enzym, nedifundující substrát

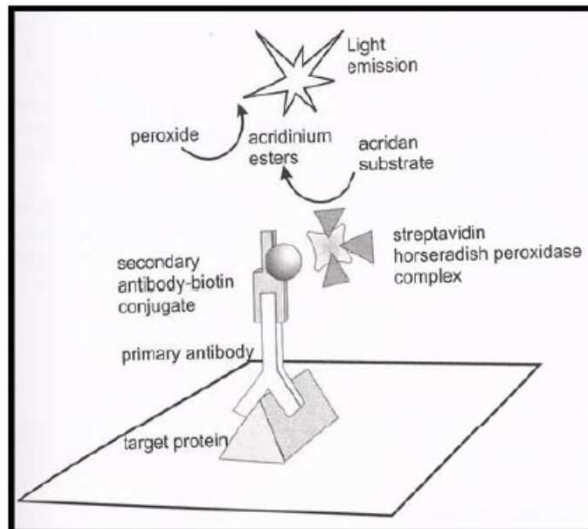
“IMUNOBLOTTING“

$^{125}\text{I}$ -protein A

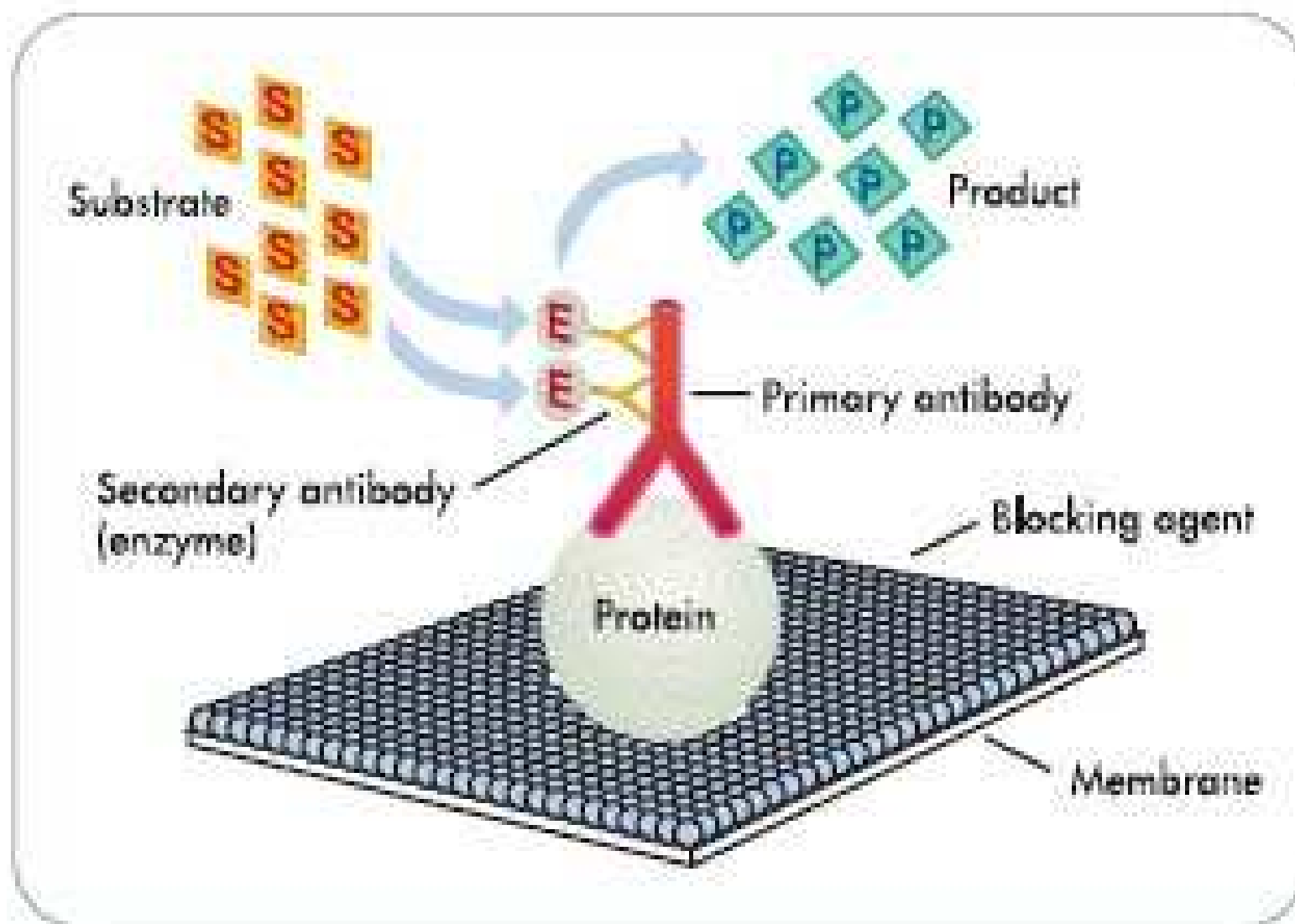
enzymem značená sekundární protilátka – konjugace s peroxidasou (tetrazoliová sůl), **alkalickou** fosfatasou

zlatem značená sekundární protilátka (100 pg)

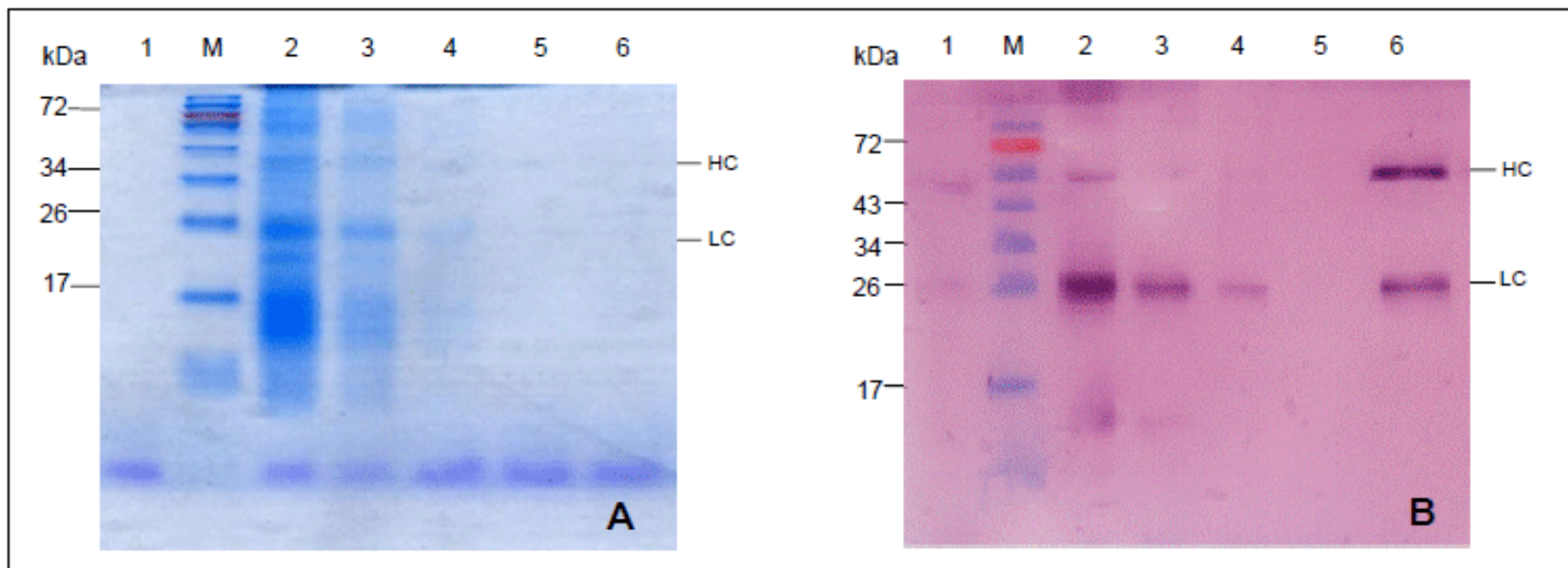
chemiluminiscence – nejcitlivější



# Detekce proteinů



# Blotting



Lane 1, human IgG standard; Lane M, protein molecular weight marker; Lane 2, crude extract; Lane 3, flow through fraction; Lane 4, 1st wash fraction; Lane 5, 2nd wash fraction; Lane 6, purified extract.

**FIGURE 3**

Affinity purification of 2G12 with Protein A, where **A** shows the fractions of 2G12 taken during purification resolved in a 12% SDS-PAGE gel with Coomassie blue staining and **B** the western blot probed with anti-human light chain (LC) and heavy chain (HC) antibodies

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

## Podle chemického složení

A. Jednoduché

B. Složené ⇒ prosthetická skupina + apoprotein

Kvantitativní poměr mezi oběma složkami může být různý !!

Fosfoproteiny -  $H_3PO_4$

Glykoproteiny - cukry

Metaloproteiny - kovy

Lipoproteiny - lipidy

Nukleoproteiny - nukleové kyseliny



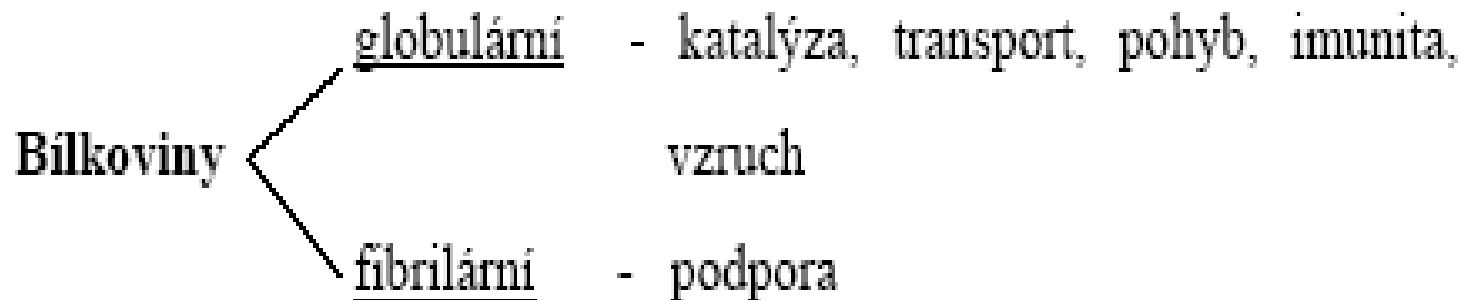
# Rozdělení bílkovin

## Podle celkového tvaru molekuly

A. Vláknité - fibrilární bílkoviny - SKLEROPROTEINY **NEROZPUSTNÉ**

kolagen,  $\alpha + \beta$  keratin, elastin

B. Kulovité - globulární bílkoviny - SFEROPROTEINY **ROZPUSTNÉ**

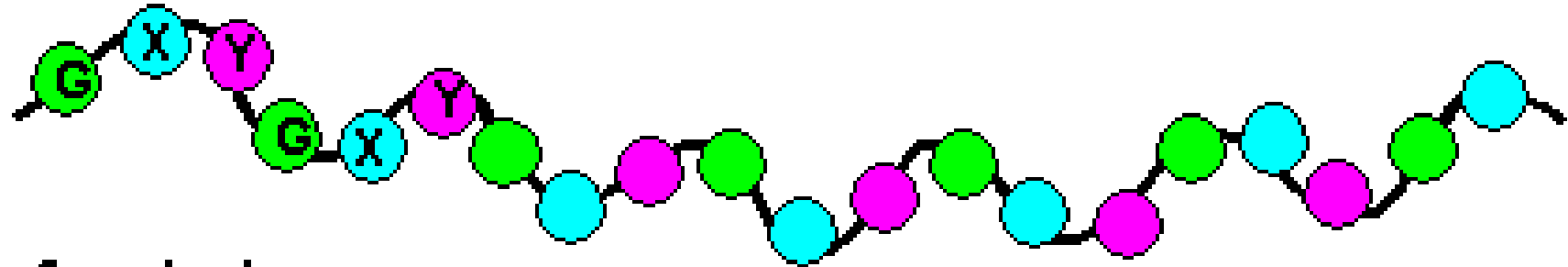


# Kolagen (28 druhů)

<i>Typ</i>	<i>Molekulární složení</i>	<i>Lokalizace</i>
<b>I</b>	$[\alpha 1(\text{I})_2\alpha 2(\text{I})]$	kost, kůže, šlacha, ligamenta rohovka, cévy
<b>II</b>	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	chrupavka, sklivec, nukleus pulposus
<b>III</b>	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	kůže, cévy, retikulární vlákna v mnoha tkáních (plíce, játra, slezina, atd.)
<b>V</b>	$\alpha 1(\text{V})\alpha 2(\text{V})\alpha 3(\text{V})$	plíce, rohovka, kost, fetální membrány, doprovází kolagen I
<b>XI</b>	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$	chrupavka, sklivec

Délka molekuly je 300 nm,  $\alpha$ -řetězec obsahuje 1000 aminokyselin.

# Collagen $\alpha$ -chain primary structure

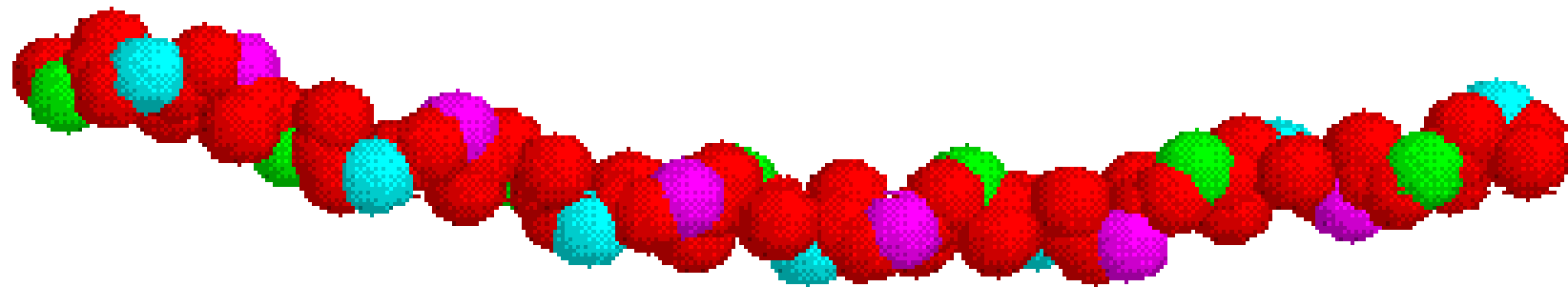


G - glycine

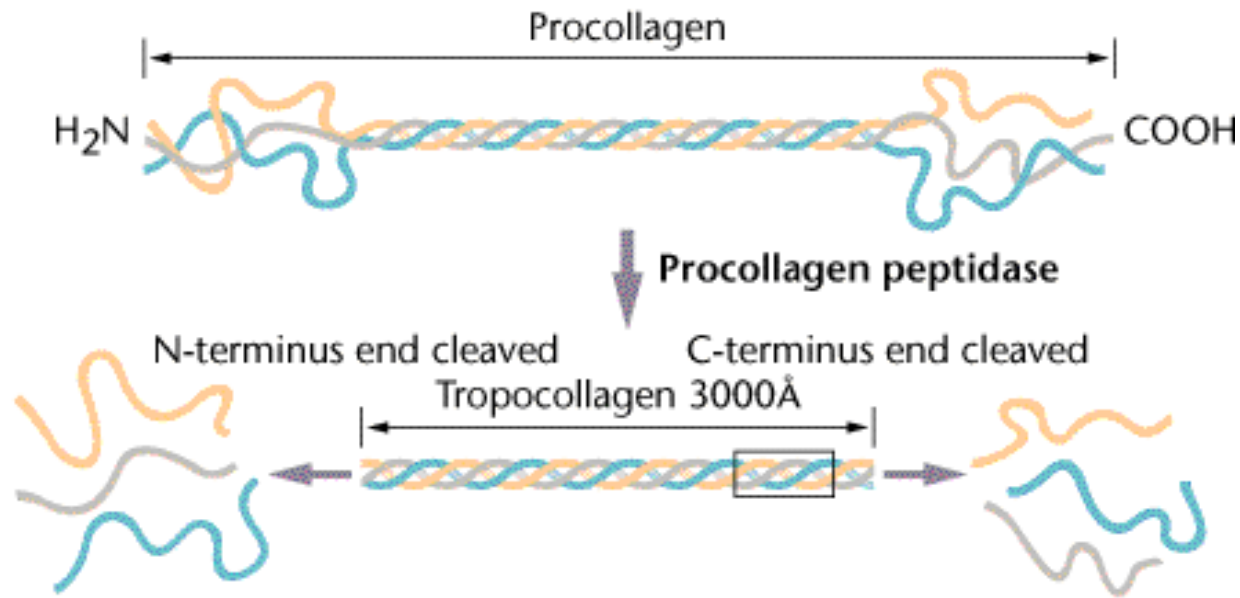
X - proline or other amino acid

Y - hydroxyproline or other amino acid

**-Gly-X-Y- triplet repeats**



# Molekulární struktura fibrilárních kolagenů



- pravotočivá trojitá šroubovice - 3  $\alpha$ -řetězce (levotočivá šroubovice s odstupem 18 aminokyselin na jednu otáčku)

## Posttranslační modifikace

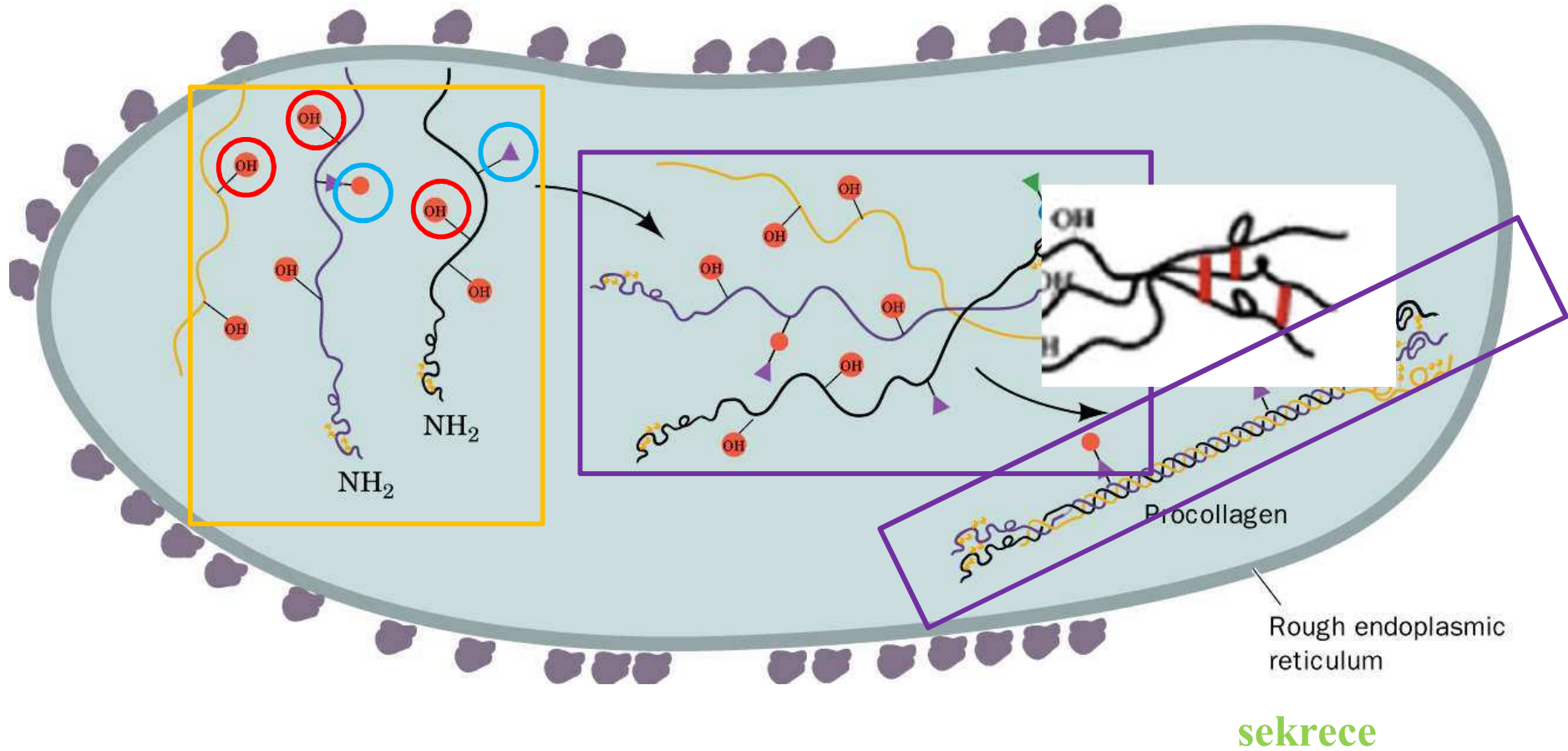
syntéza peptidů

hydroxylace

glykosylace

tvorba bisulfidických můstků

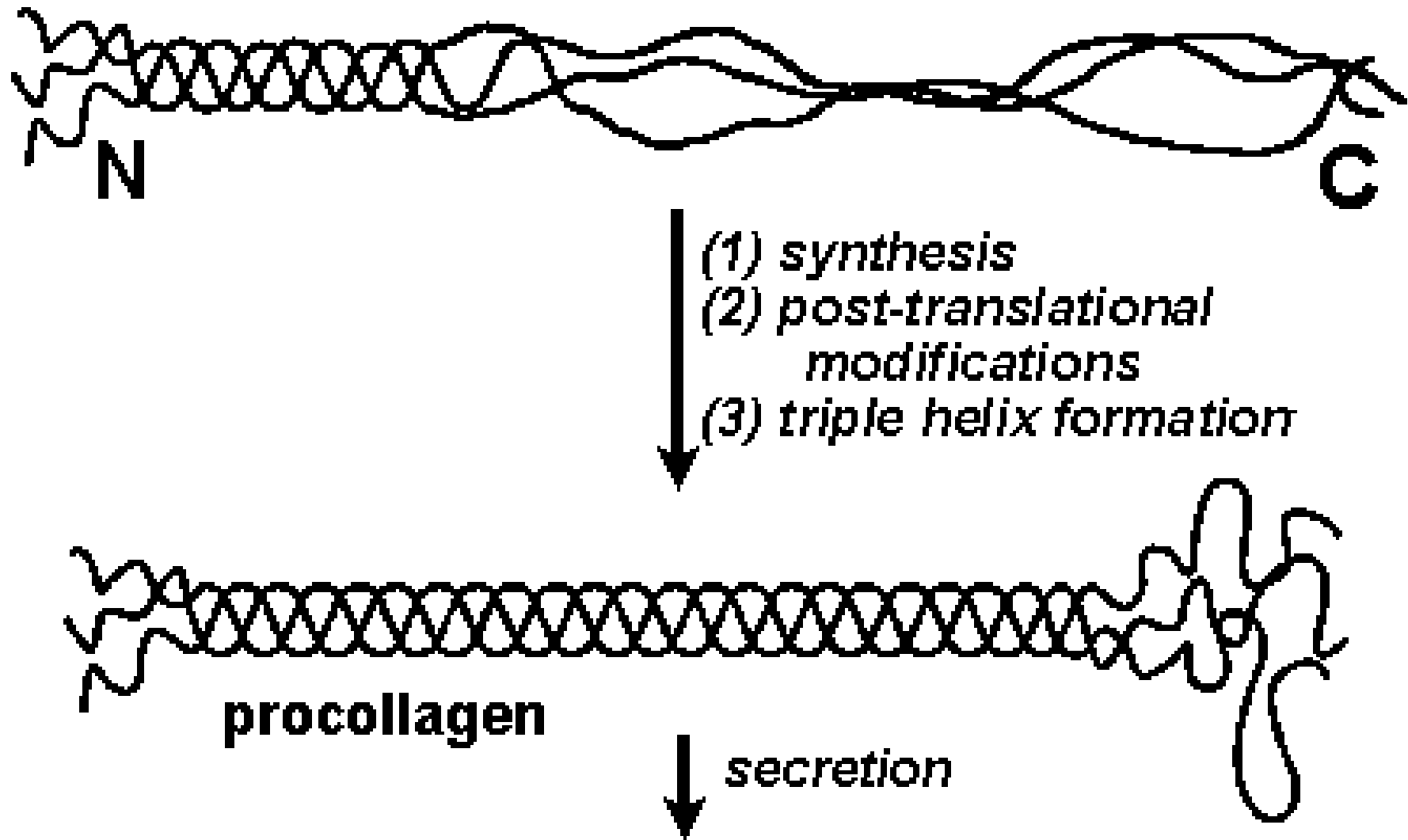
svinutí



Buňky pojivových tkání

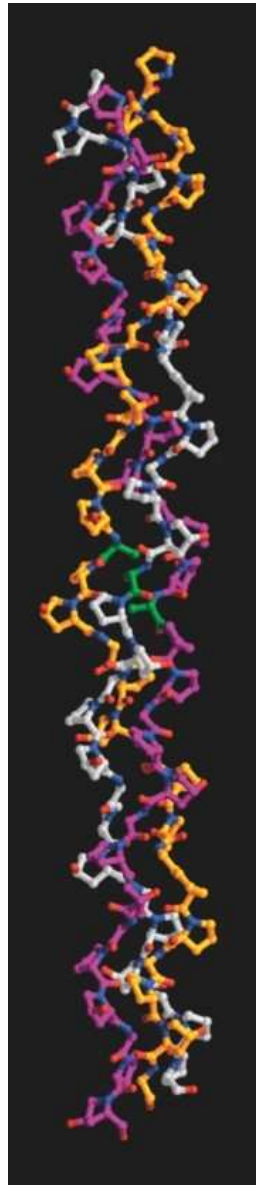
- Fibroblasty
- Chondroblasty
- Osteoblasty

# Formation of collagen: intracellular processing

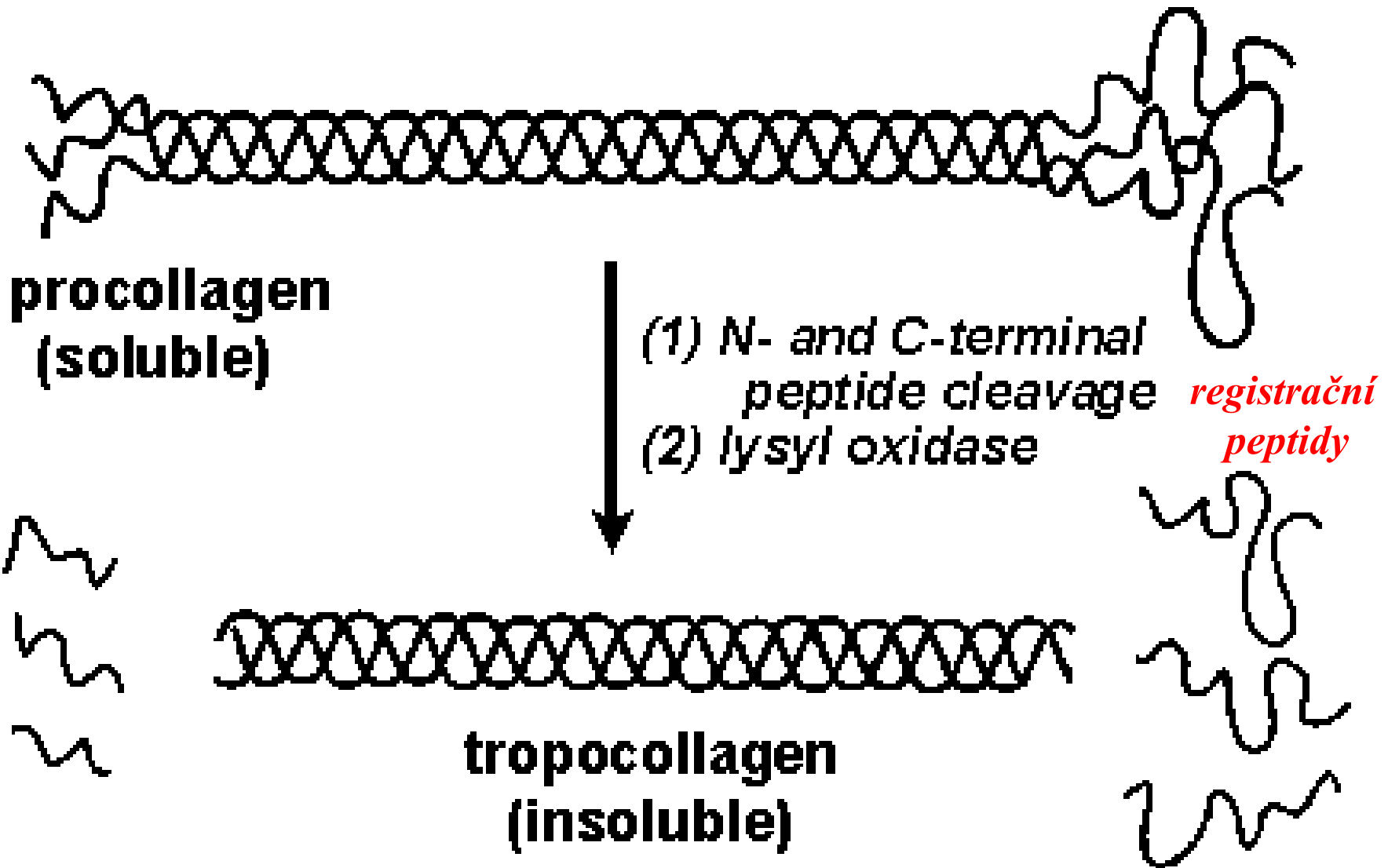




Irving Geis/Geis Archives Trust. Copyright Howard Hughes Medical Institute. Reproduced with permission.

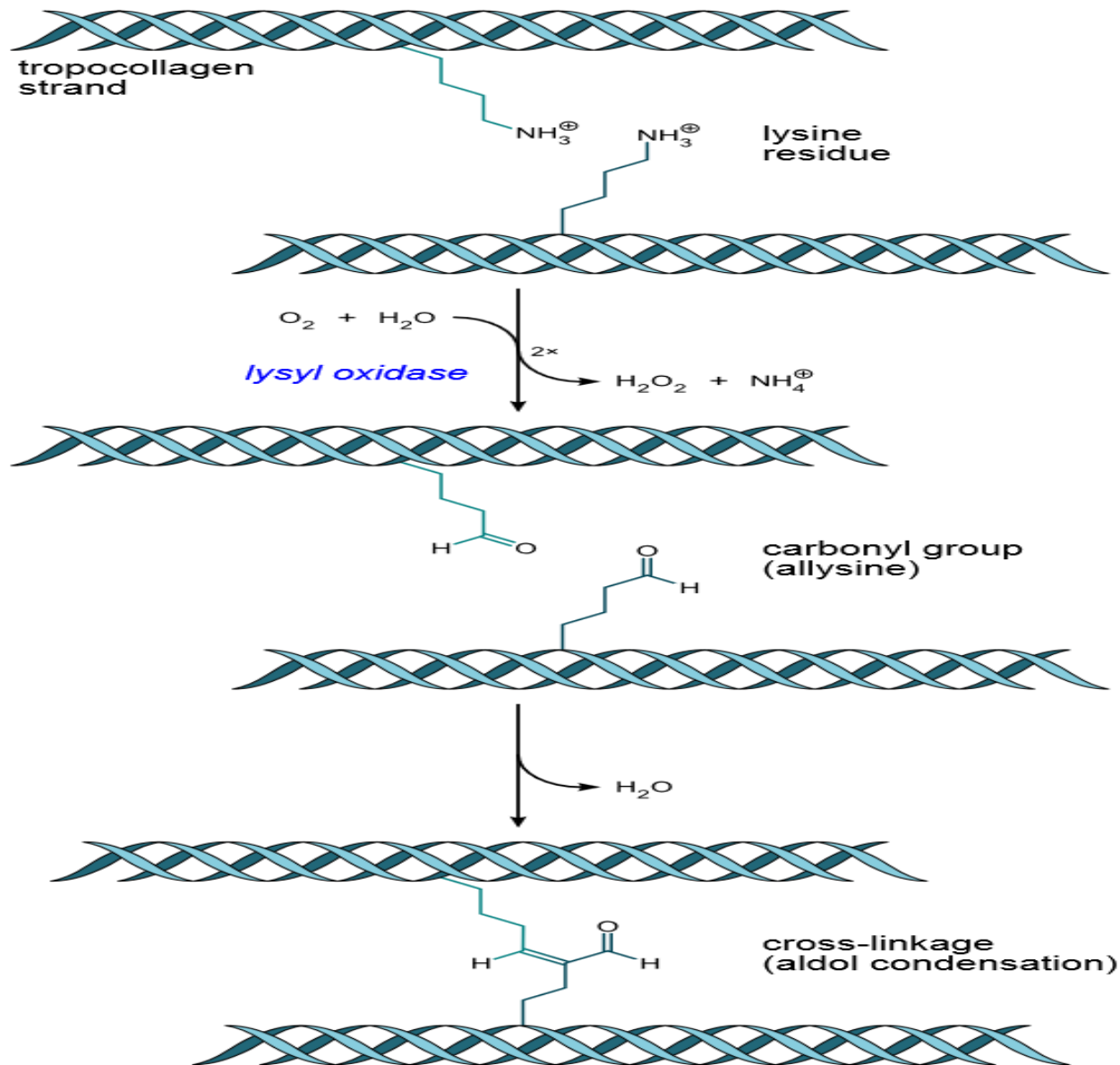


# Formation of collagen: extracellular processing

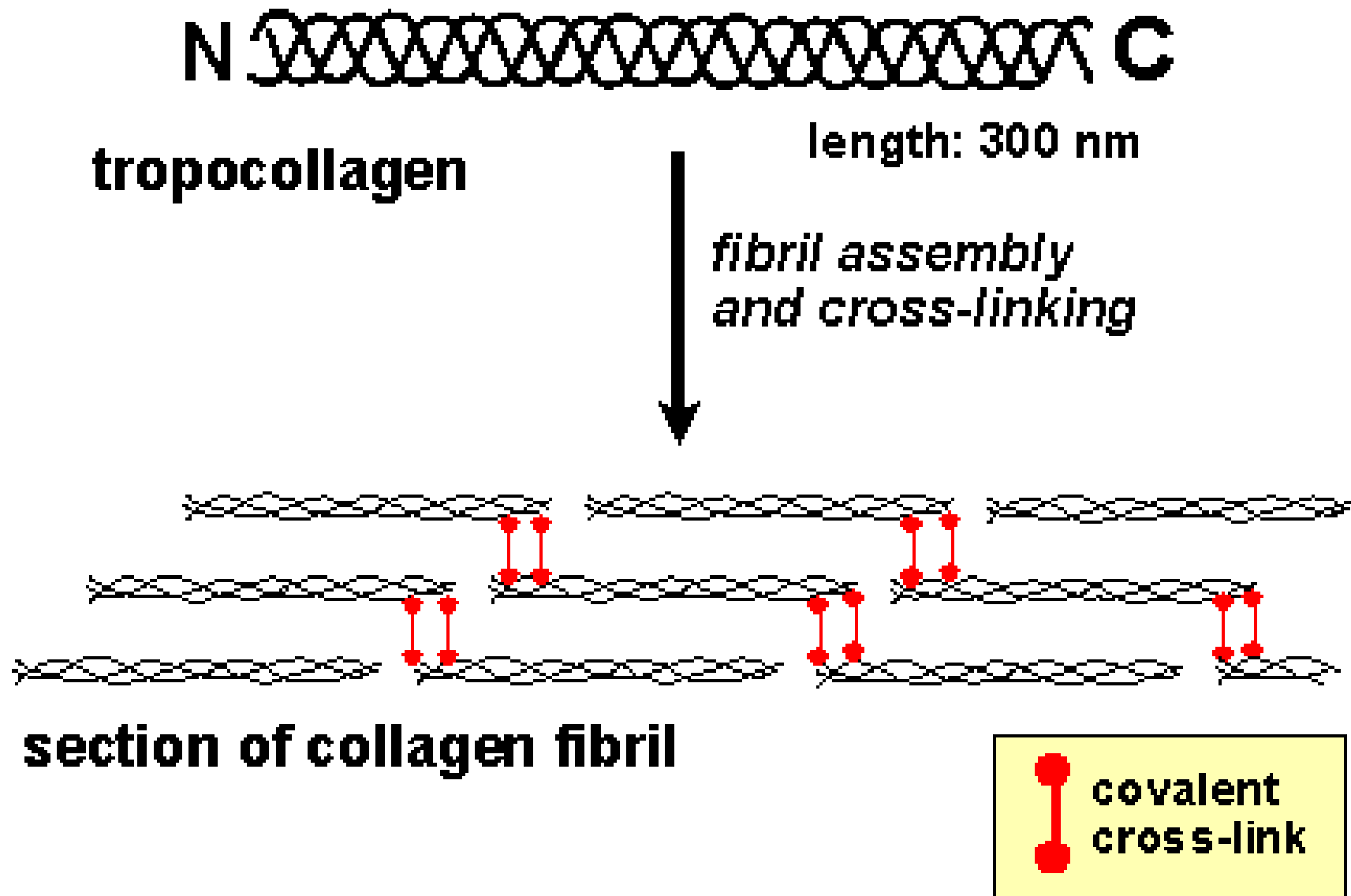




# Lysyloxidáza



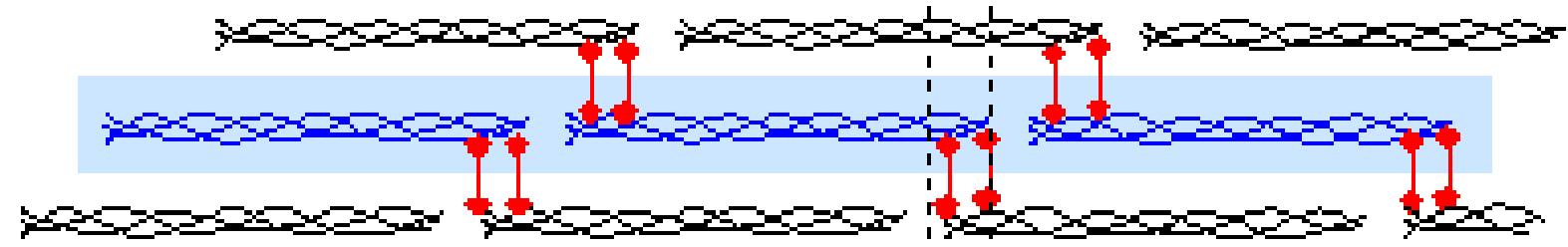
# Formation of collagen: extracellular processing



# Formation of collagen: extracellular processing

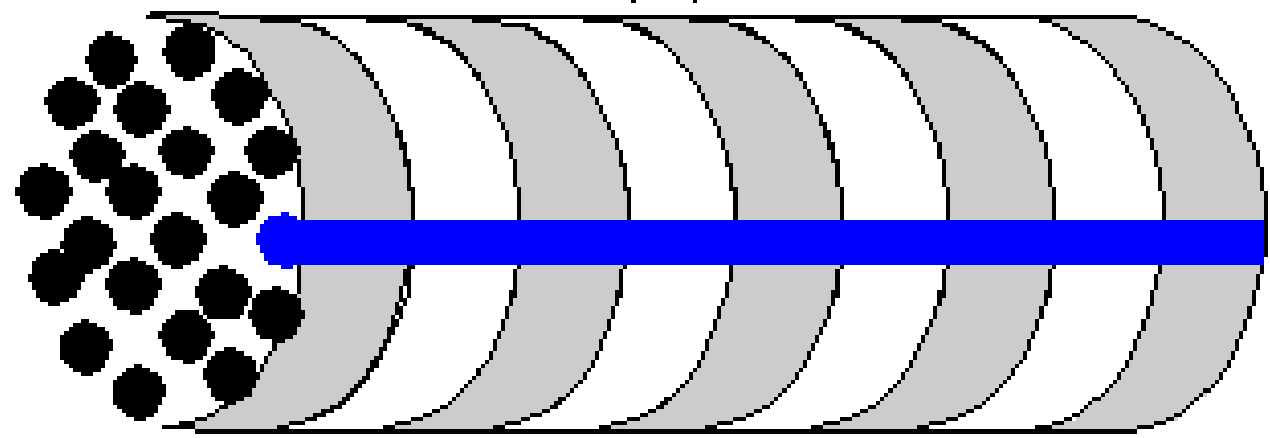
fibril assembly  
and cross-linking

section of collagen fibril

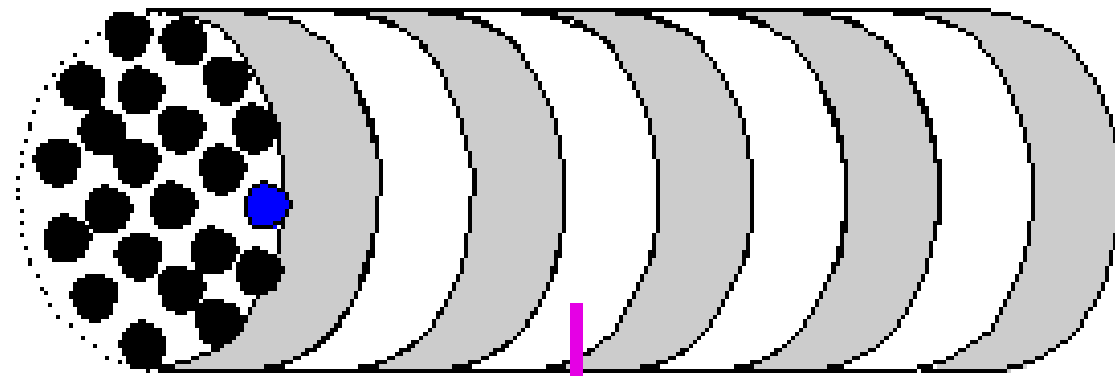


← 64-67 nm  
"quarter-staggered array"

collagen fibril



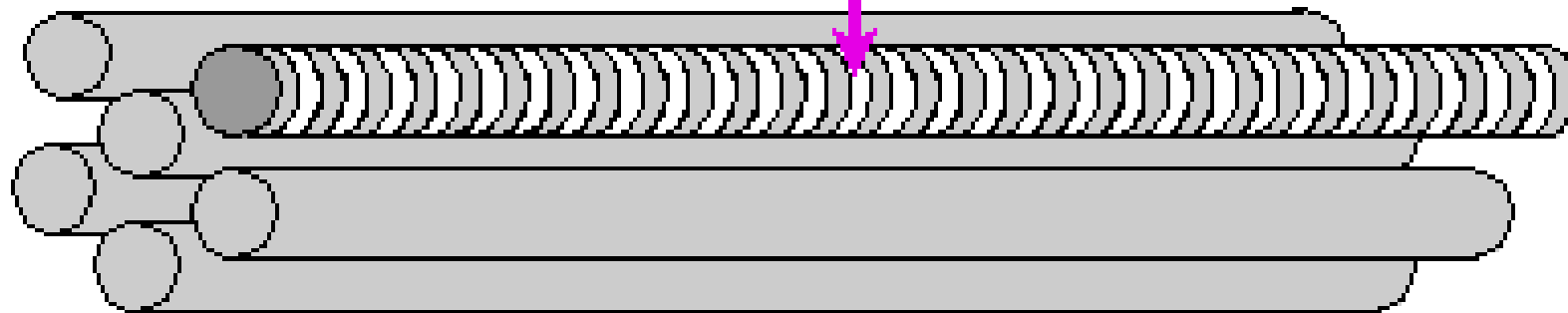
# Formation of collagen: extracellular processing



**collagen fibril**

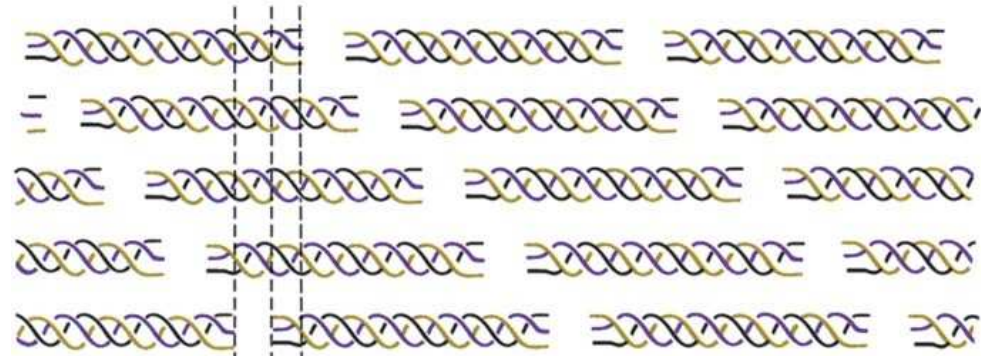
*aggregation*

**collagen fiber**

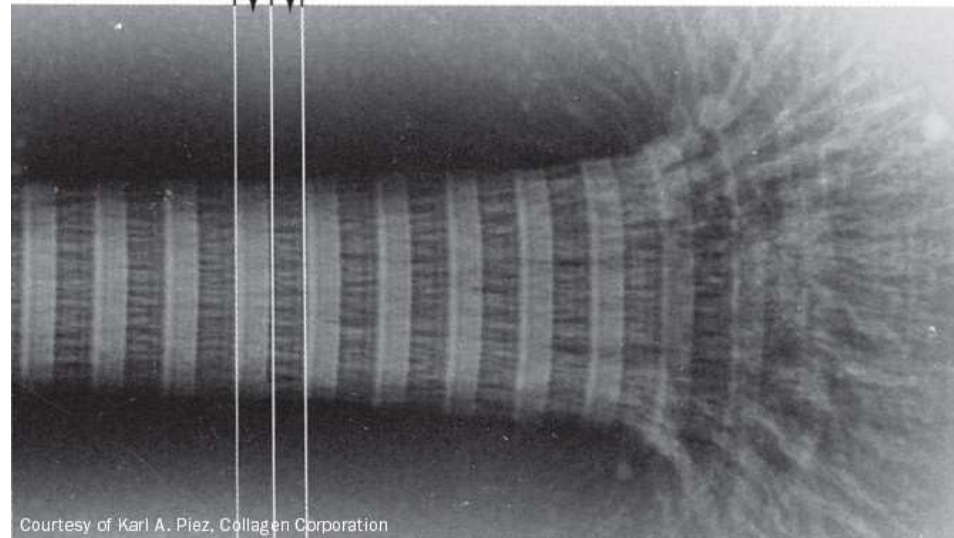


Collagen molecule 

Packing of molecules

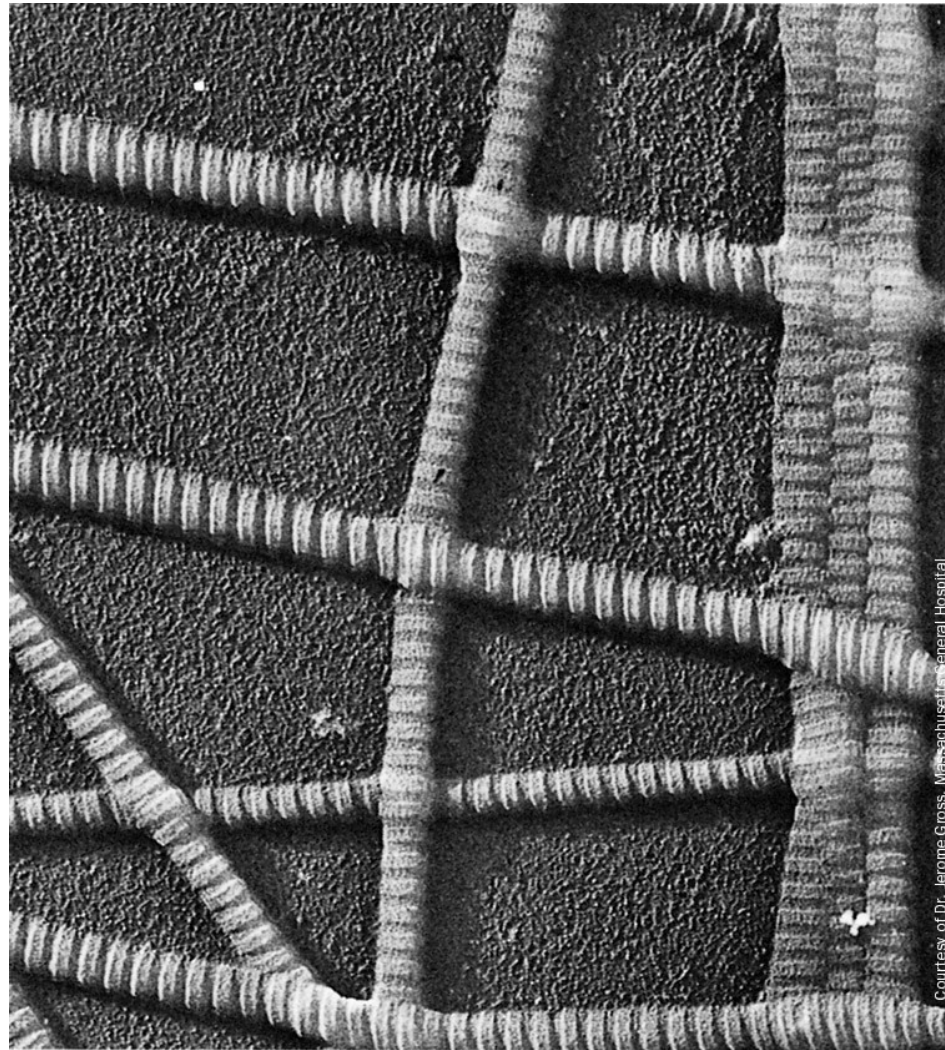


Hole zone ———— 0.6D  
Overlap zone ———— 0.4D



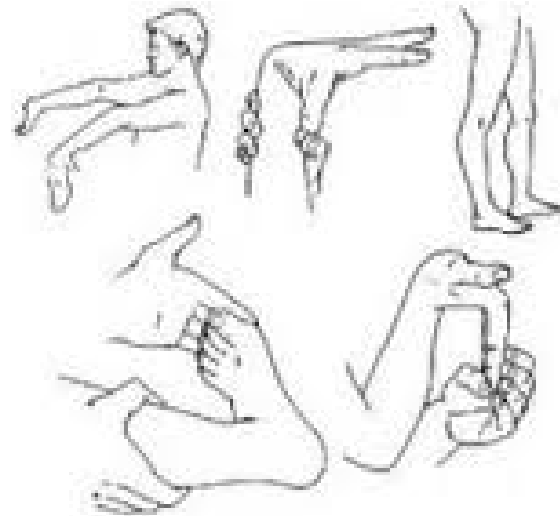
Courtesy of Karl A. Piez, Collagen Corporation

# Kolagen v kůži

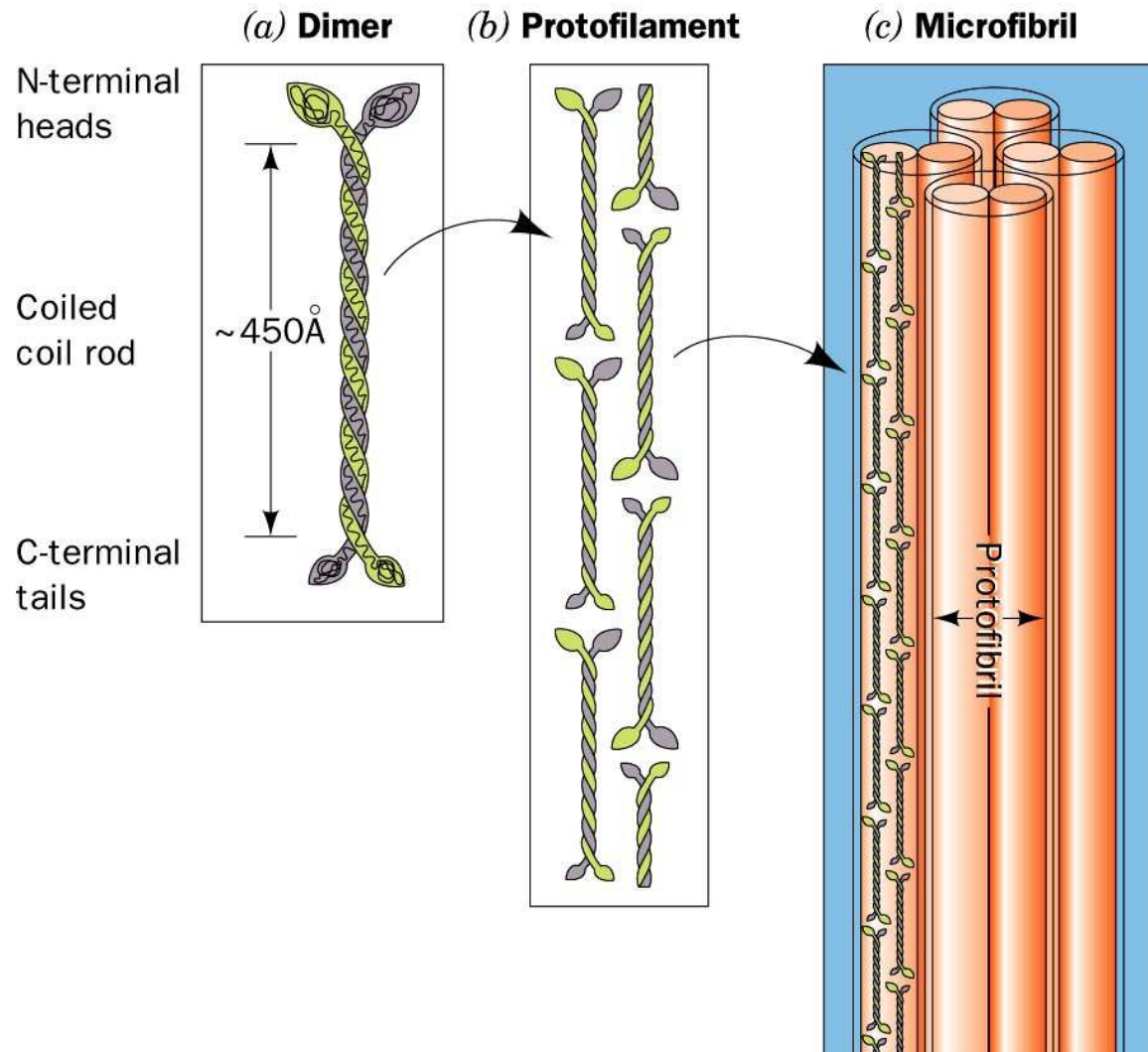


Courtesy of Dr. Jerome Gross, Massachusetts General Hospital

# Ehlers–Danlos syndrom (EDS)

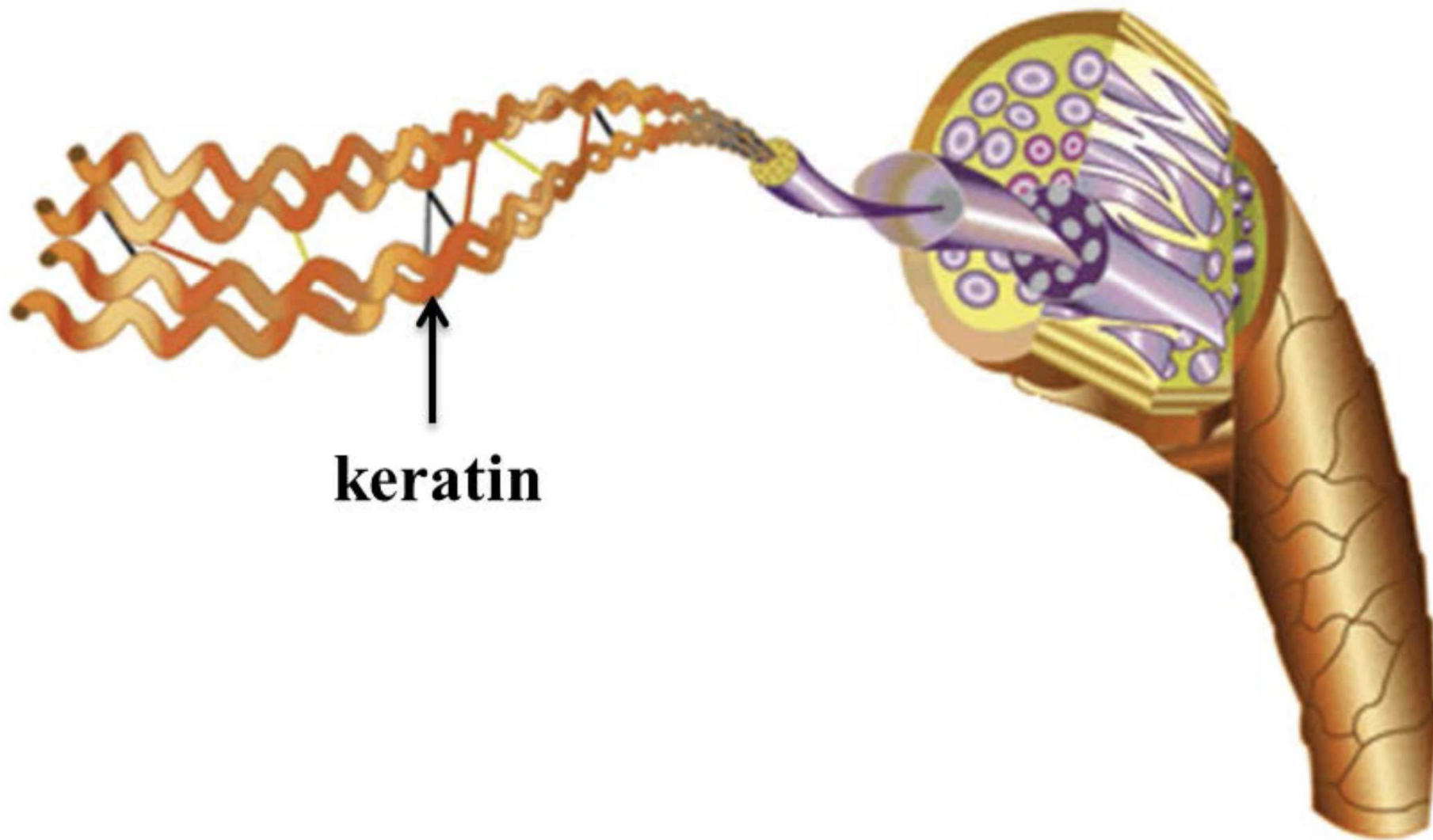


# $\alpha$ - keratin





# $\alpha$ – keratin - vlas

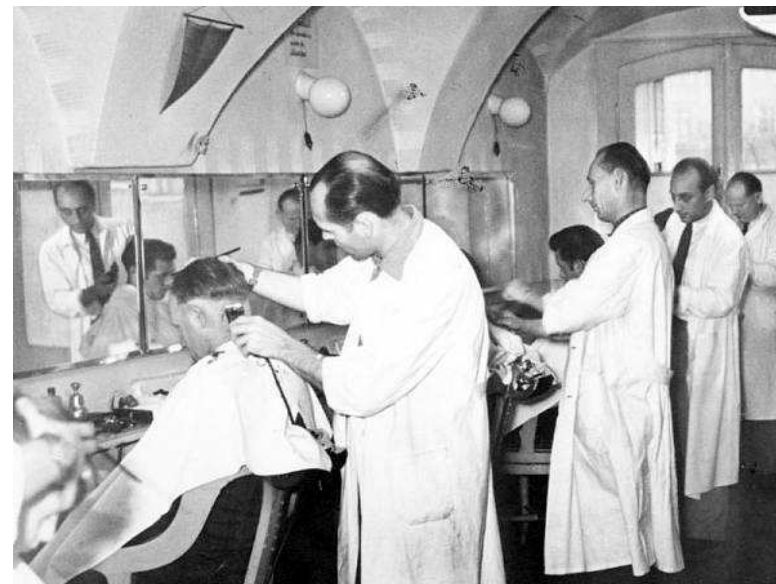


**keratin**

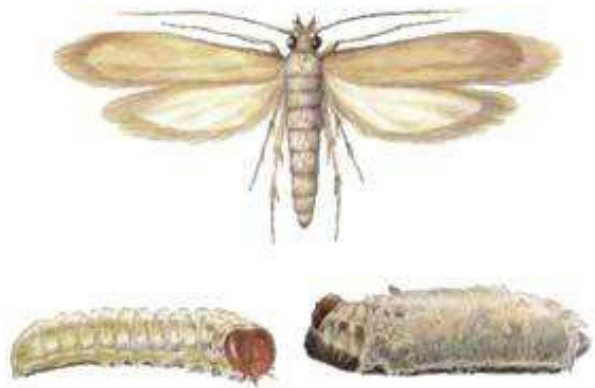
# Trvalá ondulace



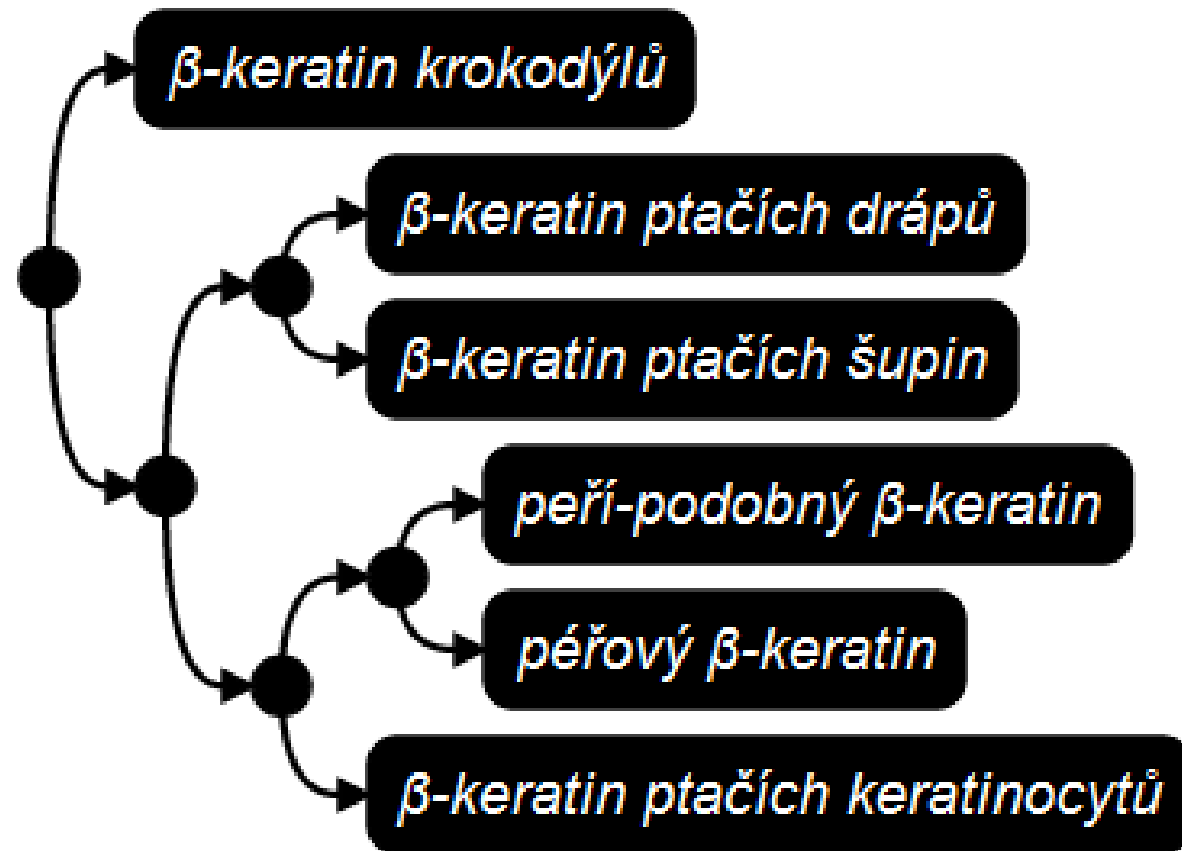
Keratin hair extension



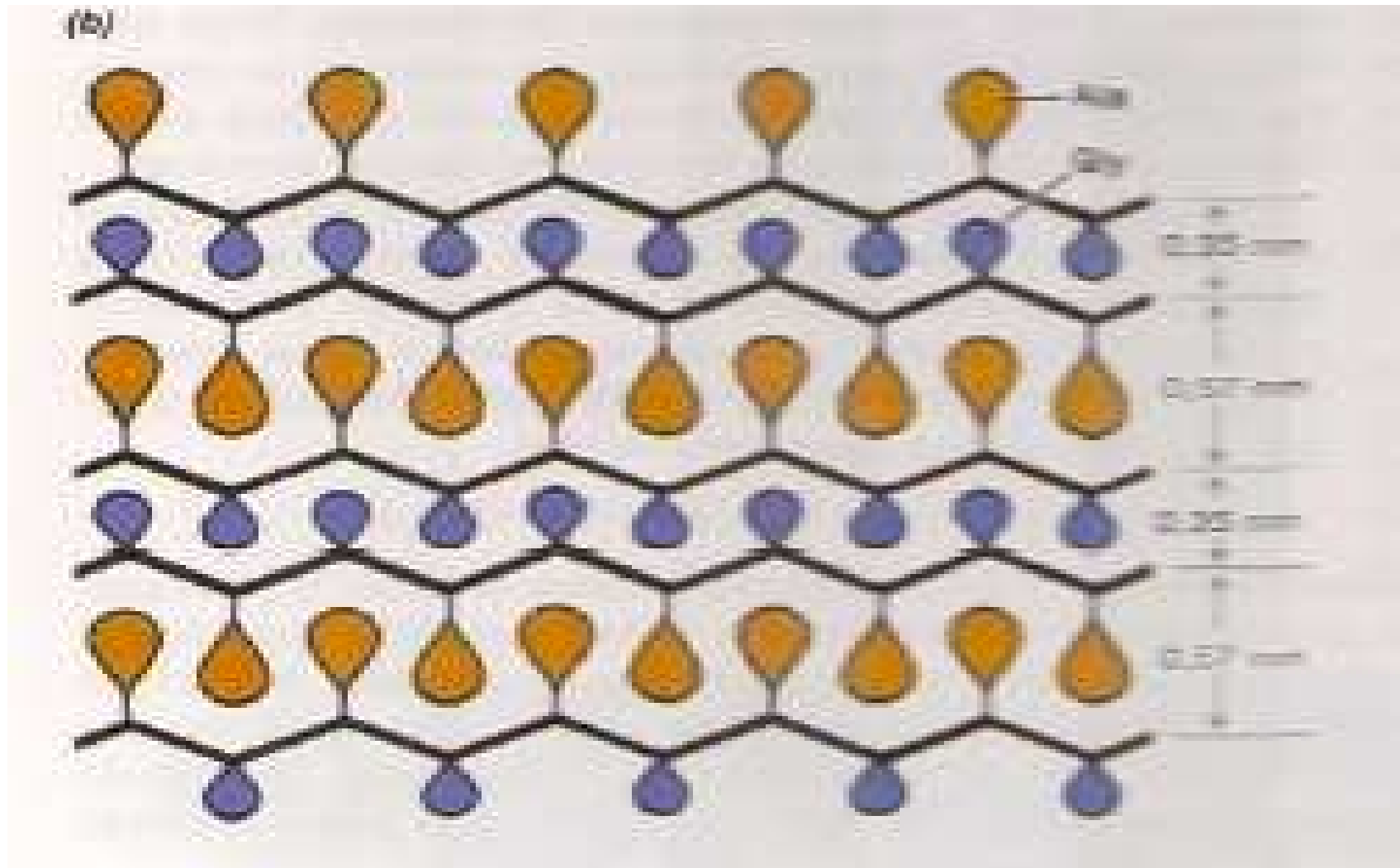
# Mol šatní



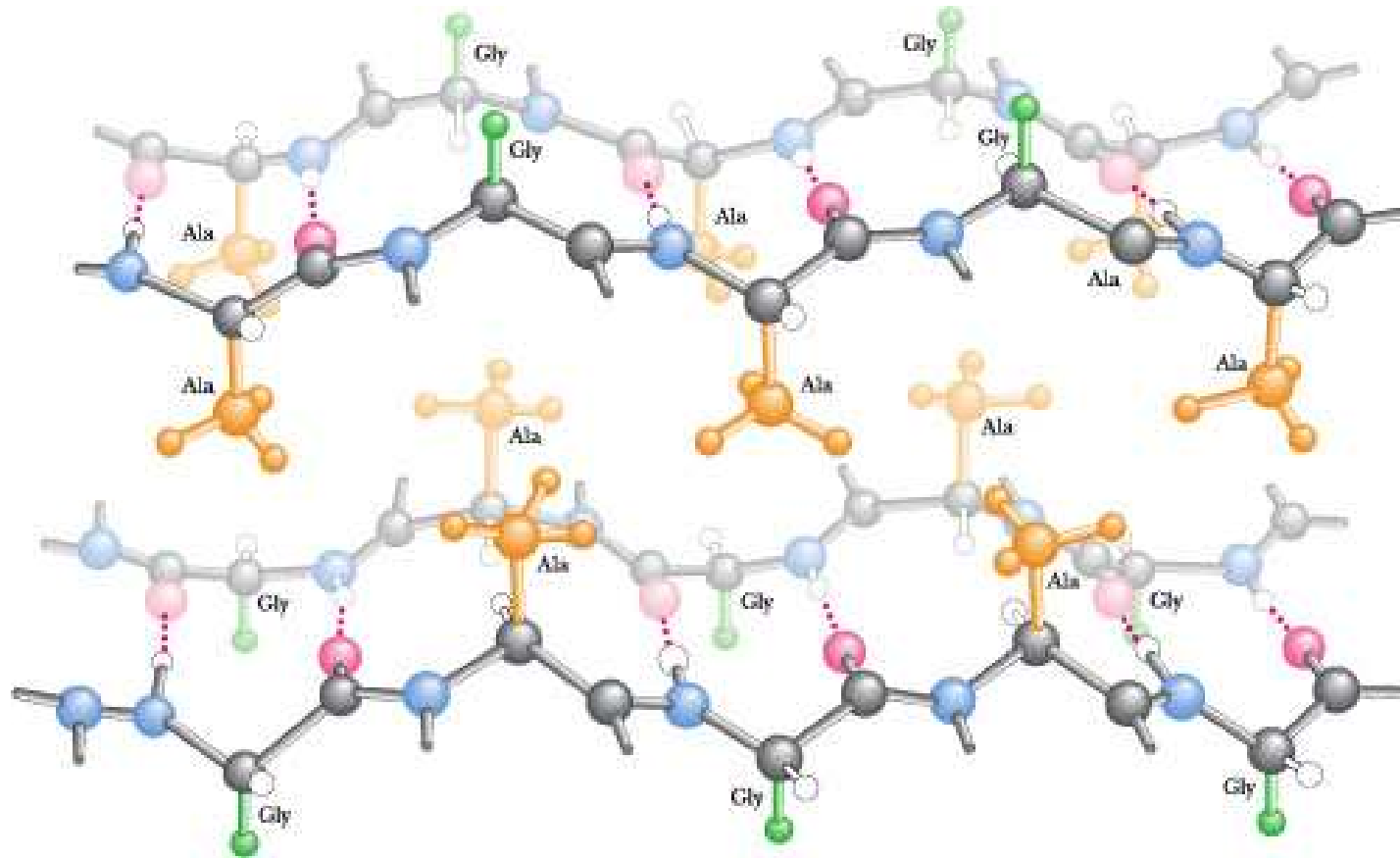
# Peří



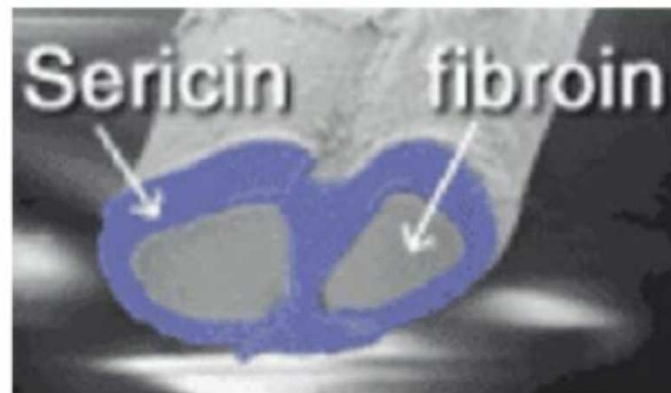
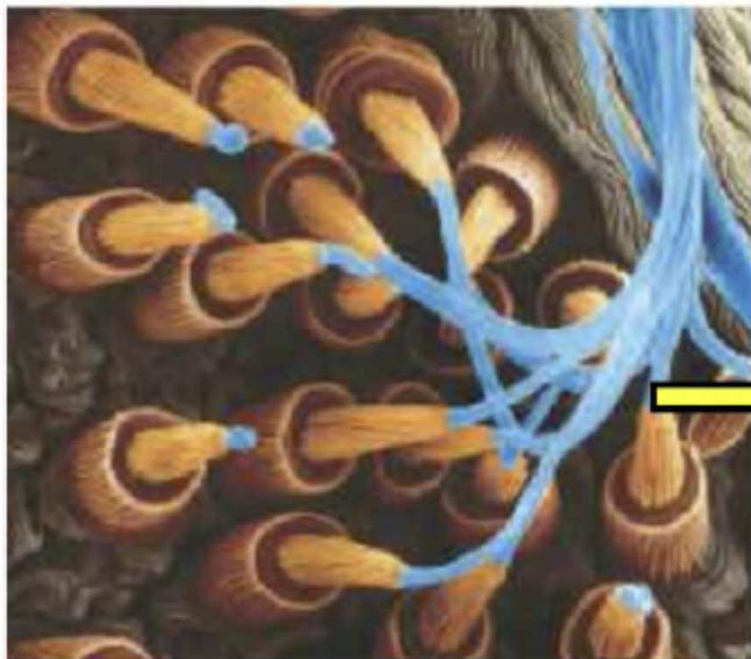
# $\beta$ - keratin



# $\beta$ - keratin



# Hedvábí



# Elastin

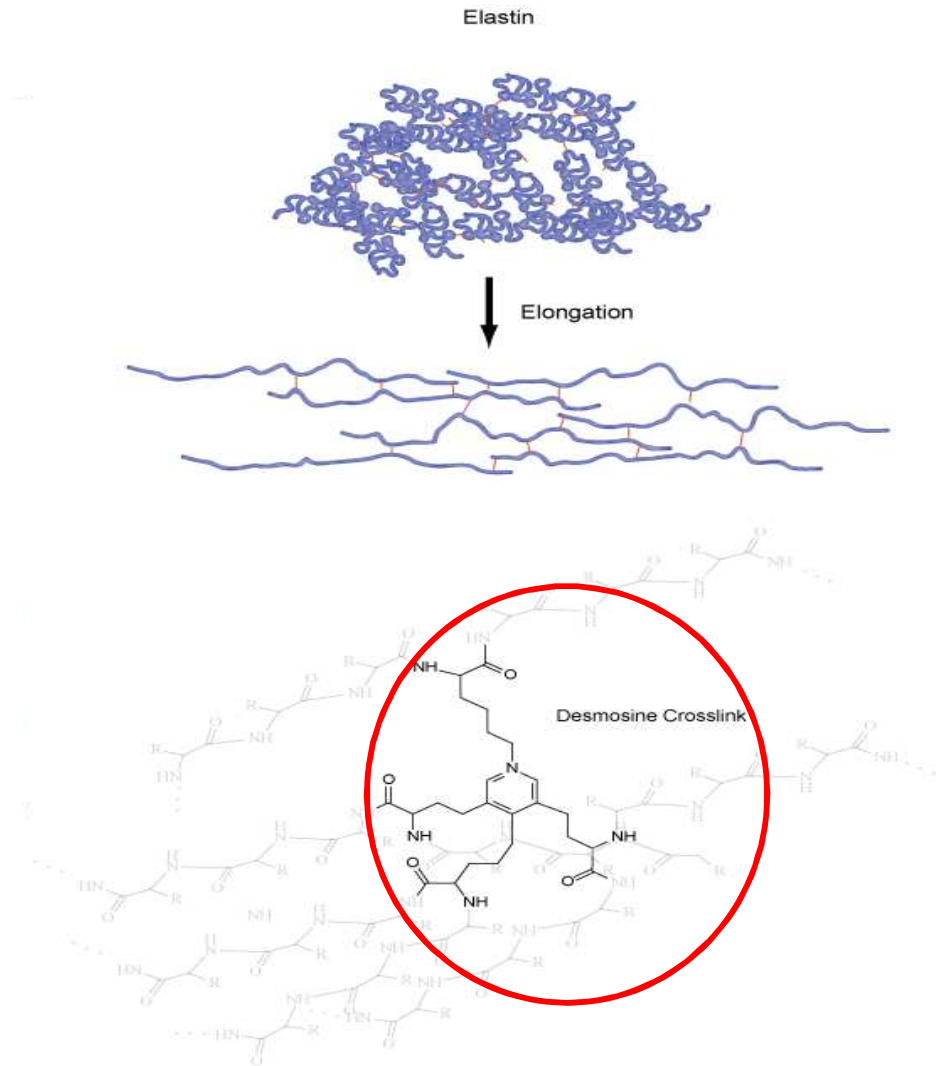
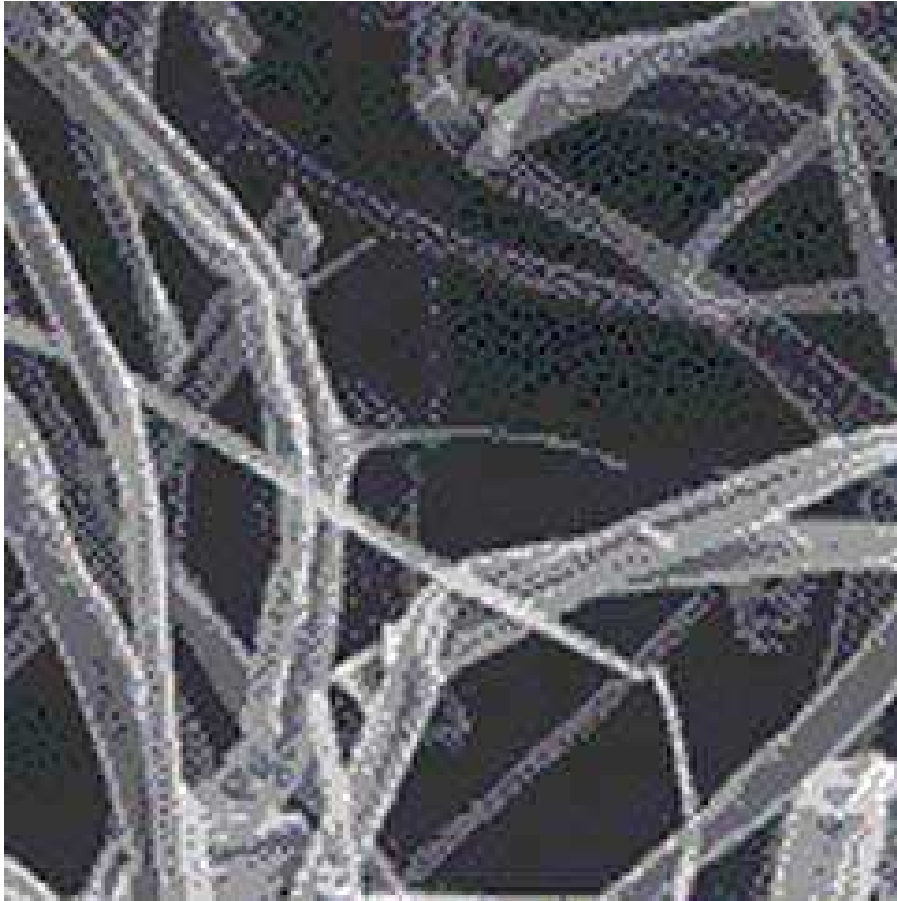


Figure 4-28 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)