KBC/SZZMB Biochemické a molekulárně biologické metody

1. Příprava vzorku pro biochemickou analýzu. Obecná pravidla pro práci s biologickým vzorkem, sterilizace biologického materiálu. Homogenizace tkání a extrakce obsahu buněk. Lyofilizace. Selektivní rozbití buněčné membrány, použití detergentů. Membránové separace – dialýza, diafiltrace a ultrafiltrace. Afinitní ultrafiltrace. Koncentrování a konzervace roztoků.

2. Precipitační metody. Hofmeisterovy řady iontů, kosmotropní a chaotropní ionty. Organické precipitanty. Deproteinace. Svedbergova rovnice. Centrifugy a rotory. Relativní centrifugační síla. Analytická ultracentrifugace. Určení sedimentačního koeficientu a molekulové hmotnosti biomolekul pomocí centrifugace. Centrifugace v hustotním gradientu a preparativní centrifugace.

3. Chromatografické metody – přehled. Klasifikace variant. Pojmy účinnost, kapacita a rozlišení. Nosiče používané v chromatografii. Principy a použití chromatografických technik: rozdělovací chromatografie, adsorpční chromatografie, iontoměničová chromatografie, gelová chromatografie, chelatační chromatografie afinitní chromatografie, chromatofokusace. Pojem perfúzní chromatografie. Využití kapalinové chromatografie pro purifikaci biomolekul. Kontrola čistoty purifikovaných proteinů.

4. Elektromigrační metody, jejich rozdělení, princip a použití. Síla elektrického pole. Elektroforetická mobilita. Elektroendoosmóza. Nosiče pro elektroforézu. Kapilární elektroforéza a příbuzné techniky. Elektroforéza proteinů a nukleových kyselin. Zónová elektroforéza v diskontinuálním gradientu. Isoelektrická fokusace, amfolyty, imobiliny. Nativní elektroforéza proteinových superkomplexů. 2-D elektroforéza. Vícerozměrné separace membránových proteinů. Vizualizace separovaných biomolekul. Metody přenosu („blottingu“), jejich rozdělení a principy detekce a vizualizace.

5. Analýza proteinů. Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku. Stanovení molekulové hmotnosti proteinů, určení aminokyselinového složení, analýza obsahu disulfidových vazeb. Studium stability proteinů. Sekvenční analýza proteinů a její historický vývoj. Analýza posttranslačních modifikací proteinů (zejména fosforylace a glykosylace). Cílená chemická modifikace proteinů. Afinitní značení proteinů – biotinylace a její využití. Studium aktivních míst enzymů s použitím specifických modifikačních činidel. Činidla pro vytvoření příčné vazby a jejich význam. Syntéza peptidů in vitro.

6. Analýza nukleových kyselin. Stanovení koncentrace nukleových ve vzorku. Stanovení molekulové hmotnosti (velikosti) nukleových kyselin. Teplota tání dsDNA. Enzymové štěpení polynukleotidů. Mapování restrikčními enzymy. PCR reakce, její princip a použití. Kvantitativní PCR. In vitro syntéza oligonukleotidů. Sekvenční analýza nukleových kyselin: Sangerova metoda, pyrosekvencování, Ilumina a nejnovější metody bez PCR. Shotgun sekvencování genomů.

7. Analýza sacharidů a lipidů. Barevné reakce v roztoku pro detekci a stanovení sacharidů. Pojem glykované proteiny a možnosti jejich analýzy. Deglykosylační enzymy. Glykosylace proteinů a principy její analýzy v roztoku a gelu. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie glykoproteinů a glykopeptidů. Extrakce a separace lipidů. Analýza lipidů pomocí kvadrupólového hmotnostního spektrometru.

8. Hmotnostní spektrum, monoizotopová a průměrná hmotnost. Měkké ionizační techniky MALDI a ESI. Součásti hmotnostního spektrometru, hmotnostní analyzátory a jejich fungování, hybridní přístroje. MALDI-TOF peptidové mapování. Tandemová hmotnostní spektrometrie peptidů. De novo sekvencování peptidů. MALDI imaging. Využití hmotnostní spektrometrie v proteomice a metabolomice. Principy identifikace a kvantifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Použití hmotnostní spektrometrie pro určování struktury proteinů, měření enzymové aktivity a identifikaci mikroorganismů. Expresní, diferenční a funkční proteomika.

9. Měření pH pomocí pH elektrody – princip. Clarkova elektroda, její konstrukce a použití pro měření aktivity enzymů. Enzymová analýza. Kinetická měření, „end-point“ metody, spřažené reakce. Enzymové amplifikační reakce. Chromogenní a fluorogenní enzymové substráty. Barvení v gelu na enzymovou aktivitu. Pojem imobilizovaný enzym. Pojem proteinové inženýrství enzymů.

10. Absorpční a fluorescenční spektroskopie a spektrofotometrie, používané přístroje a jejich části. Pojmy absorbance, monochromátor, polarizace světla. Využití absorpční a fluorescenční spektroskopie v biochemii. Měření polarizace fluorescence a jeho význam. Vibrační spektroskopie – infračervená (IR) a Ramanova spektroskopie, principy vzniku signálu a běžné použití. Stanovení koncentrace proteinů pomocí IR. Využití NIR. Resonanční Ramanova spektroskopie a její využití v biochemii. Mössbauerova spektroskopie. Resonanční spektroskopické metody: NMR a EPR. NMR – princip vzniku signálu, pojmy chemický posun, multiplicita signálu. Vícerozměrná NMR měření, příklady a využití. ESR – instrumentace. ESR spektrum, význam *g* hodnoty, hyperjemné štěpení. Spinové značky. Chiroptické metody a jejich využití pro studium DNA a proteinů.

11. Metody studia exprese a funkce genů. Klonování genu, příprava knihoven. Techniky genetické transformace organismů. Příprava a využití mutantů. Přímá a reverzní genetika. Metoda PCR a její využití. Metody studia interakce protein-protein a protein-DNA. Techniky editování genomu.

12. Sekven(c)ování DNA, genu a genomů organismů. Sangerova metoda sekven(c)ování DNA pomocí syntézy. Využití kapilární elektroforézy pro sekven(c)ování genů. Využití shotgun techniky pro sekven(c)ování genomů. Princip sekven(c)ování technikou Illumina. Další nové metody určení sekvence DNA. De novo a komparativní sekven(c)ování. Sekven(c)ování transkriptomu.

13. Určování prostorové struktury biomakromolekul. Rentgenová strukturní analýza: krystalizace proteinu, difrakce rentgenových paprsků, synchrotron. Pattersonova funkce a mapa elektronové hustoty, fázový problém, kritéria pro posuzování kvality získané struktury. Braggova rovnice a Millerovy indexy. Ostatní metody strukturní analýzy proteinů: NMR a základní principy použití pro strukturní analýzu; elektronová mikroskopie. Modelování proteinových struktur a databáze 3-D struktur.

14. Vizualizace buněk a buněčných struktur. Světelná a fluorescenční mikroskopie. Využití značení fluorescenčními proteiny. Elektronová a kryoelektronová mikroskopie. Vizualizace komponent v živých buňkách. Přehled metod a jejich principů pro analýzu interakcí biomakromolekul s ligandy včetně protein-proteinové interakce.

15. Kalorimetrie – izotermální titrační kalorimetrie (ITC) a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Polarografie biomolekul. Princip polarografie, polarografické metody se superpozicí střídavého napětí. Cyklická voltametrie. Brdičkova reakce. Statický a dynamický rozptyl světla. Studium rychlých reakcí. Studium interakcí – rovnovážná dialýza, SPR, termoforéza.

16. Chemická struktura protilátek. Polyklonální a monoklonální protilátky a jejich purifikace. Nanoprotilátky. Imunodifúze. Imunoelektroforéza. Radioimunoanalýza. ELISA – varianty. Imunoblotting a imunomikroskopie. Průtoková cytometrie, využitích imunitních reakcí pro třídění buněk (FACS).