

## **KBC/SZZMB Biochemické a molekulárně biologické metody**

*Zkouška bude vyžadovat především znalosti získané v předmětu Experimentální metody biochemie a Metody molekulární biologie, dále z předmětů Pokročilé biochemické metody, Experimentální metody studia obranných reakcí rostlin, Forenzní chemie, Proteomika.*

- 1) Příprava vzorku pro biochemickou analýzu. Obecná pravidla pro práci s biologickým vzorkem, sterilizace biologického materiálu. Homogenizace a extrakce. Lyofilizace. Selektivní rozbití buněčné membrány. Hofmeisterovy řady iontů. Precipitační metody, použití pro purifikaci a frakcionaci. Membránové separace. Preparativní a analytická centrifugace. Svedbergova rovnice. Centrifugace v hustotním gradientu.
- 2) Chromatografické metody. Klasifikace, pojmy účinnost, kapacita a rozlišení. Nosiče používané v chromatografii. Gradientová chromatografie. Principy a použití chromatografických technik: rozdělovací chromatografie, adsorpční chromatografie, iontoměničová chromatografie, gelová chromatografie, afinitní chromatografie. Využití kapalinové chromatografie pro purifikaci biomolekul. Kontrola čistoty purifikovaných proteinů. Pojem perfüzní chromatografie.
- 3) Elektromigrační metody, jejich rozdělení, princip a použití. Nosiče pro elektroforézu, elektroendoosmotický tok Elektroforéza proteinů a nukleových kyselin. Isoelektrická fokusace, amfolyty, imobiliny. Vizualizace separovaných biomolekul. Barvení v gelu na enzymovou aktivitu. Metody přenosu („blottingu“), jejich rozdělení a principy vizualizace. Kapilární elektroforéza a příbuzné techniky.
- 4) Analýza proteinů. Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku. Analýza posttranslačních modifikací proteinů (zejména fosforylace a glykosylace). Stanovení molekulové hmotnosti proteinů, určení aminokyselinového složení, sekvenční analýza proteinů a její historický vývoj. Cílená chemická modifikace proteinů. Biotinylace a její využití. Studium aktivních míst enzymů s použitím specifických modifikačních činidel. Činidla pro vytvoření příčné vazby a jejich význam. In vitro syntéza peptidů.
- 5) Analýza nukleových kyselin. Stanovení koncentrace nukleových ve vzorku. Stanovení molekulové hmotnosti (velikosti) nukleových kyselin. Teplota tání dsDNA. Restrikční štěpení. PCR reakce, její princip a použití. In vitro syntéza oligonukleotidů.
- 6) Hmotnostní spektrometrie v biochemii a biologii. Měkké ionizační techniky. Součásti hmotnostního spektrometru, hmotnostní analyzátoři, hybridní přístroje. Hmotnostní spektrum, monoizotopová a průměrná hmotnost. 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.
- 7) Elektrochemické metody. Principy a použití polarografie a voltametrie. Rtuťová elektroda. Difúzní a kapacitní proud. Pulsní polarografická měření. Brdičkova reakce. Strippingová voltametrie. Měření pH pomocí pH elektrody – princip. Clarkova elektroda, její konstrukce a použití pro měření aktivity enzymů.
- 8) Absorpční a fluorescenční spektroskopie, používané přístroje a jejich části. Pojmy absorbance, monochromátor, polarizace světla. Využití absorpční a fluorescenční spektroskopie v biochemii. Měření polarizace fluorescence a jeho význam. Infračervená (IR) a Ramanova spektroskopie, principy vzniku signálu a běžné použití. Stanovení koncentrace proteinů pomocí IR. Využití NIR. Resonanční

spektroskopické metody: NMR a EPR. Princip vzniku signálu. Pojmy chemický posun, multiplicita signálu. Vícerozměrná NMR měření.

- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Určování prostorové struktury biomakromolekul. Rentgenová strukturní analýza: krystalizace proteinu, difrakce rentgenových paprsků, synchrotron, mapa elektronové hustoty, fázový problém, kritéria pro posuzování kvality získané struktury. Ostatní metody strukturní analýzy proteinů: NMR a základní principy použití pro strukturní analýzu; elektronová mikroskopie. Modelování proteinových struktur.
- 12) Vizualizace buněk a buněčných struktur. Světelná a fluorescenční mikroskopie. Využití značení fluorescenčními proteiny. Elektronová mikroskopie. Vizualizace komponent v živých buňkách. Přehled metod a jejich principů pro analýzu interakcí biomakromolekul s ligandy včetně protein-proteinové interakce.
- 13) Procedury ohledání a zacházení se vzorky pro forenzní analýzu. Rozklad těla; zkoumání příčin smrti. Znalec a soud. Kvantifikace síly důkazu: rozdíl ve vědeckém a soudním nahlížení na pravdu. Hierarchie důkazu, zákony pravděpodobnosti, věrohodnostní poměr a Bayesova věta. Záměna příčiny a důsledku.
- 14) Forenzní metody s DNA: Genom; Nepřímé a přímé testy; Požadavky na genotypizační vyšetření; Uplatnění DNA profilování; Procesní kroky DNA profilování; Ztotožnění. Určení otcovství a příbuznosti.
- 15) Daktyloskopie: Odběr a zviditelnění otisku prstů. Sérologie: krev a ejakulát. Odorologie. Drogy a jedy: Reakce na jed; Rozdělení jedů; Drogy; Rozdělení drog u nás a v Anglii; Metody zkoumání.
- 16) Oheň, výbuch, výstřel: Oheň; Požár uvnitř a venku; Žhářství; Ohnisko a příčina požáru; Exploze a imploze; Iniciátory výbuchu; spontánní vzplanutí; Parametry výbušnin; Povýstřelové zplodiny.