

# C5720

# Biochemie

02b-Bílkoviny – základní metody studia

# Obsah

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

# Metody studia bílkovin

- Studium
  - struktury – molekulární vlastnosti
  - funkce – (katalytické aj. vlastnosti)
- Podle potřeby a účelu
  - izolace do potřebné čistoty
  - studium *in situ*
- Izolace – metody více či méně komplikované podle účelu
  - čisté nativní bílkoviny pro studium vlastností event. farmakologii,
  - hrubé izolace pro průmysl apod.
- Isolační postupy – separační metody
- Analýza – tytéž nebo další

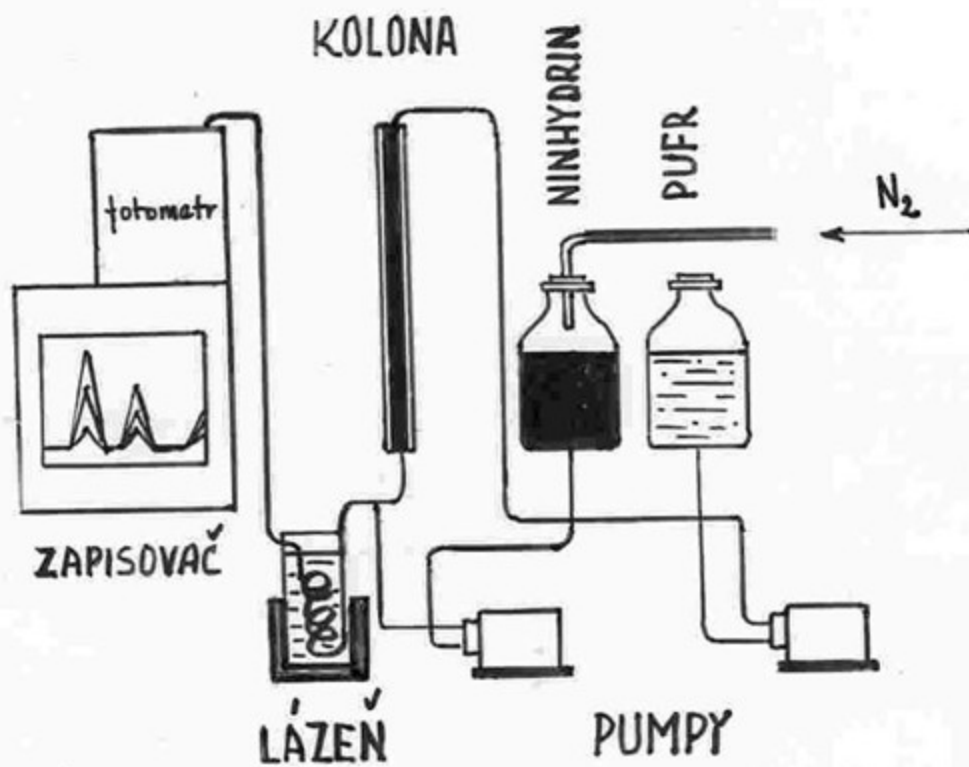
# Obecné kroky při izolaci bílkovin

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

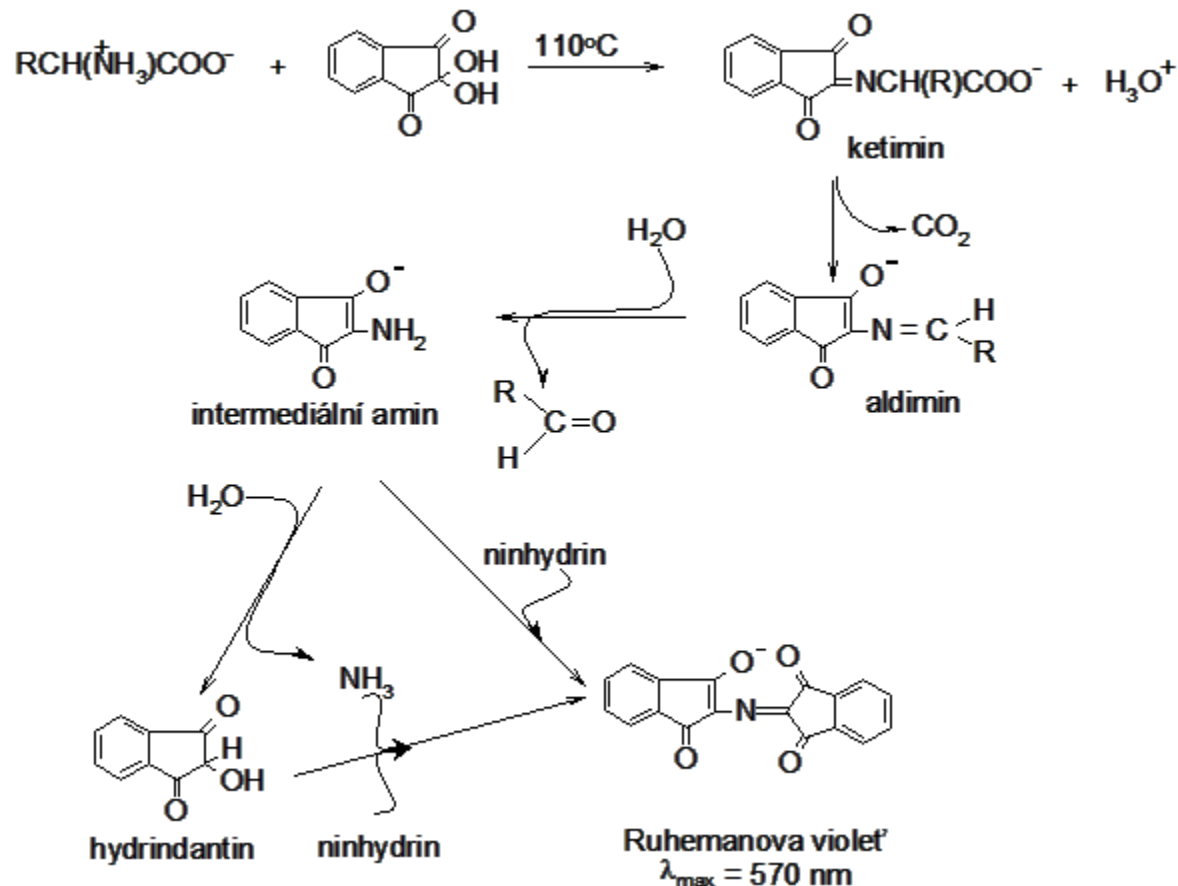
# Určení primární struktury

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

## Schéma analyzátoru aminokyselin

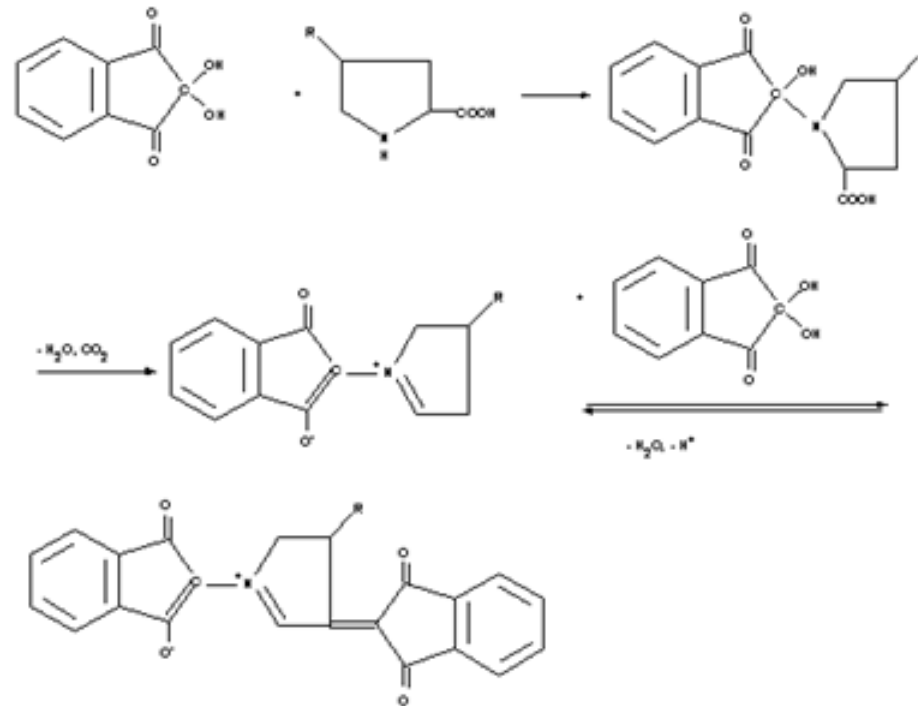


# Ninhydrinová reakce



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

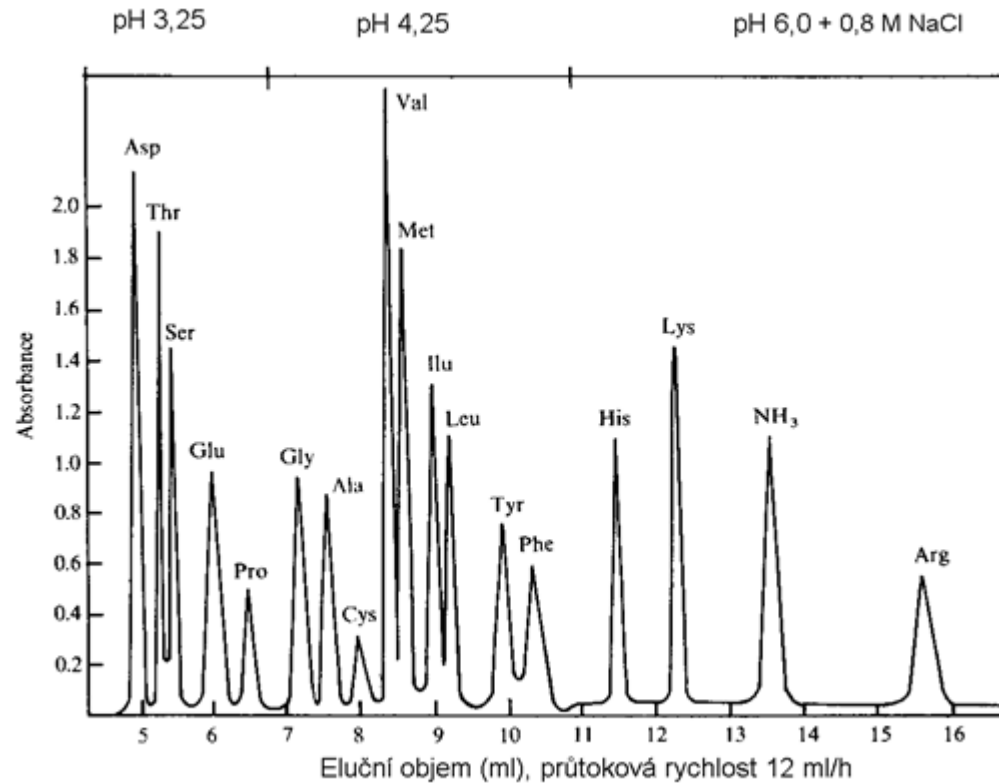
# Ninhydrinová reakce



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



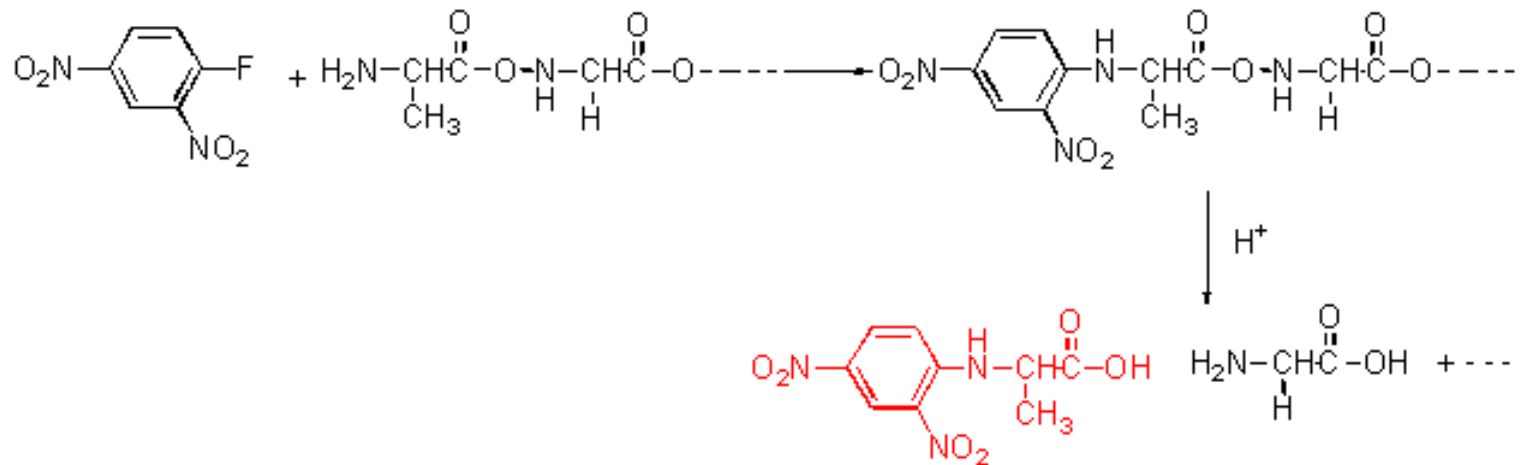
# IEC aminokyselin



- Eluční profil aminokyselin
  - Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení

# Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

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

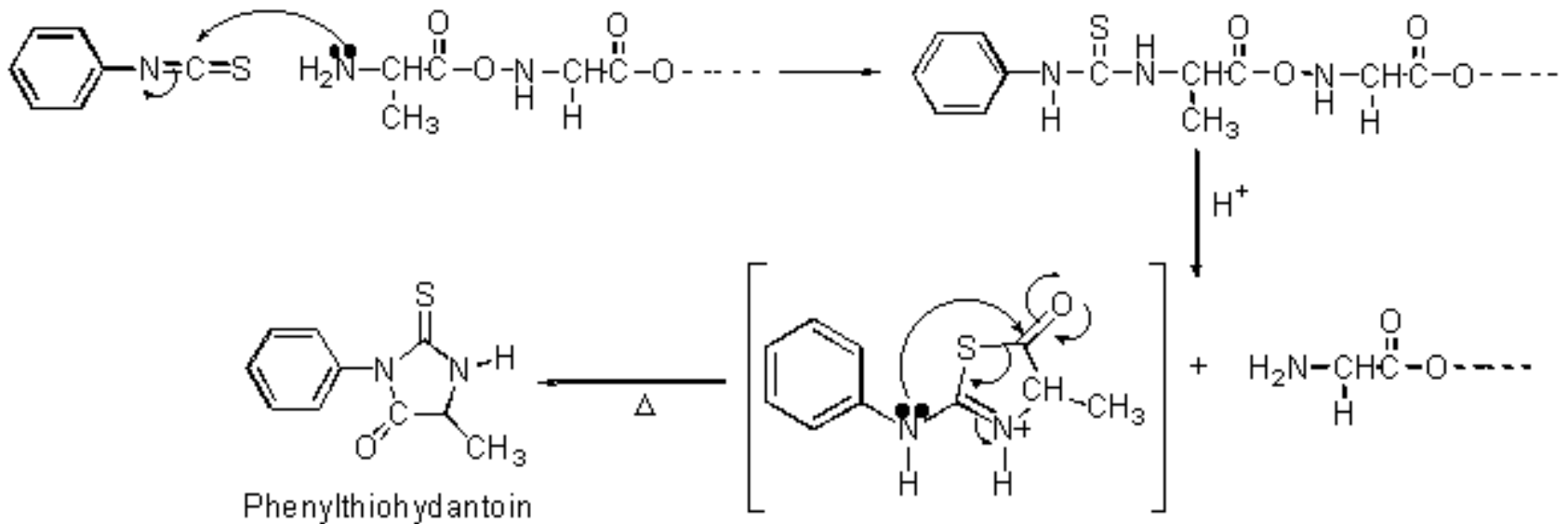


- Určení sekvence insulínu

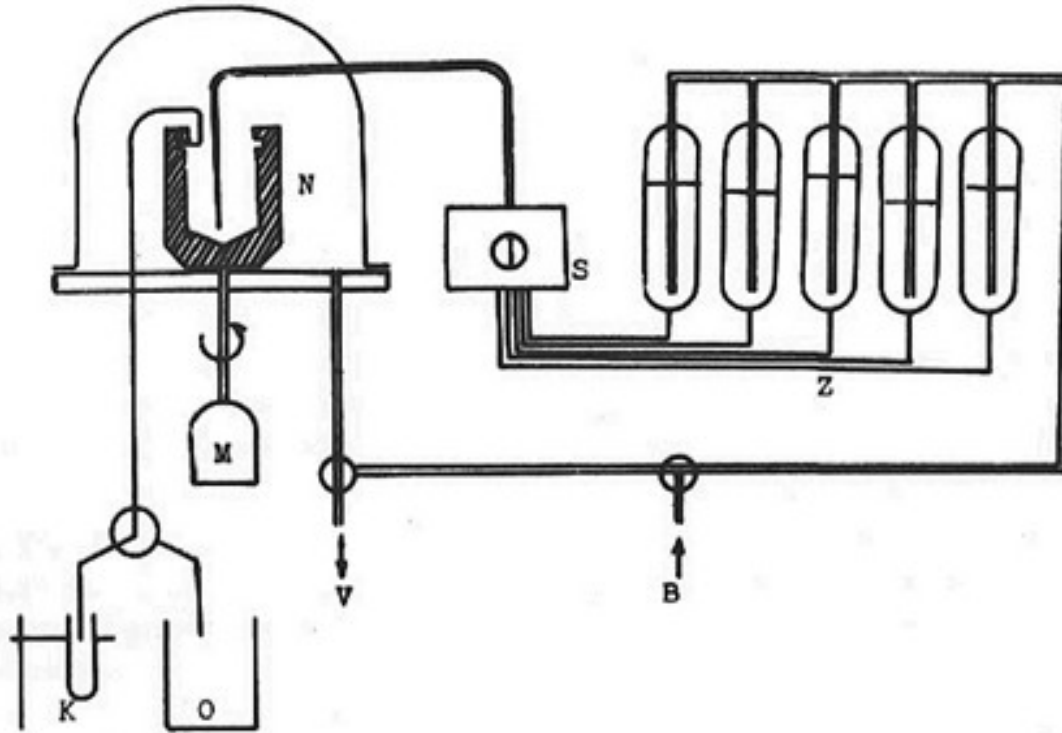
# Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

- Edmanova metoda

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



# Určení pořadí aminokyselin - sekvenace



- Schéma sekvenátoru
  - Jednotlivé kroky oddělené promýváním

# Určení pořadí aminokyselin - sekvenace

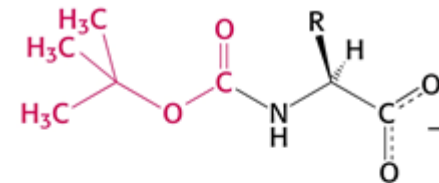
- Další speciální operace
  - Denaturace
  - Separace řetězců
  - Redukce –COOH
- Jiná specifická štěpení
  - Enzymatická
  - Chemická (BrCN – Met)
  - MS – tandemová aj. variace

# Syntéza polypeptidů

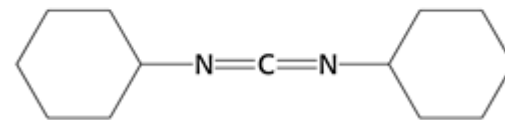
- Význam
  - Příprava velkých množství přirozených bílkovin (inzulin, HGH aj.)
  - Příprava modifikovaných a umělých bílkovin
- Možnosti – chemická či enzymová syntéza – výhody a nevýhody
- Chemická syntéza
  - Aktivované reaktanty
  - Kondenzační činidla
  - Nežádoucí reakce – ochrana skupin – blokace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

# Syntéza peptidů

- Reaktanty
  - Blokující skupina
  - Kondenzační činidlo



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



**Dicyclohexylcarbodiimide  
(DCC)**

# Sled reakčních kroků Merrifieldovy syntézy na pevné fázi

