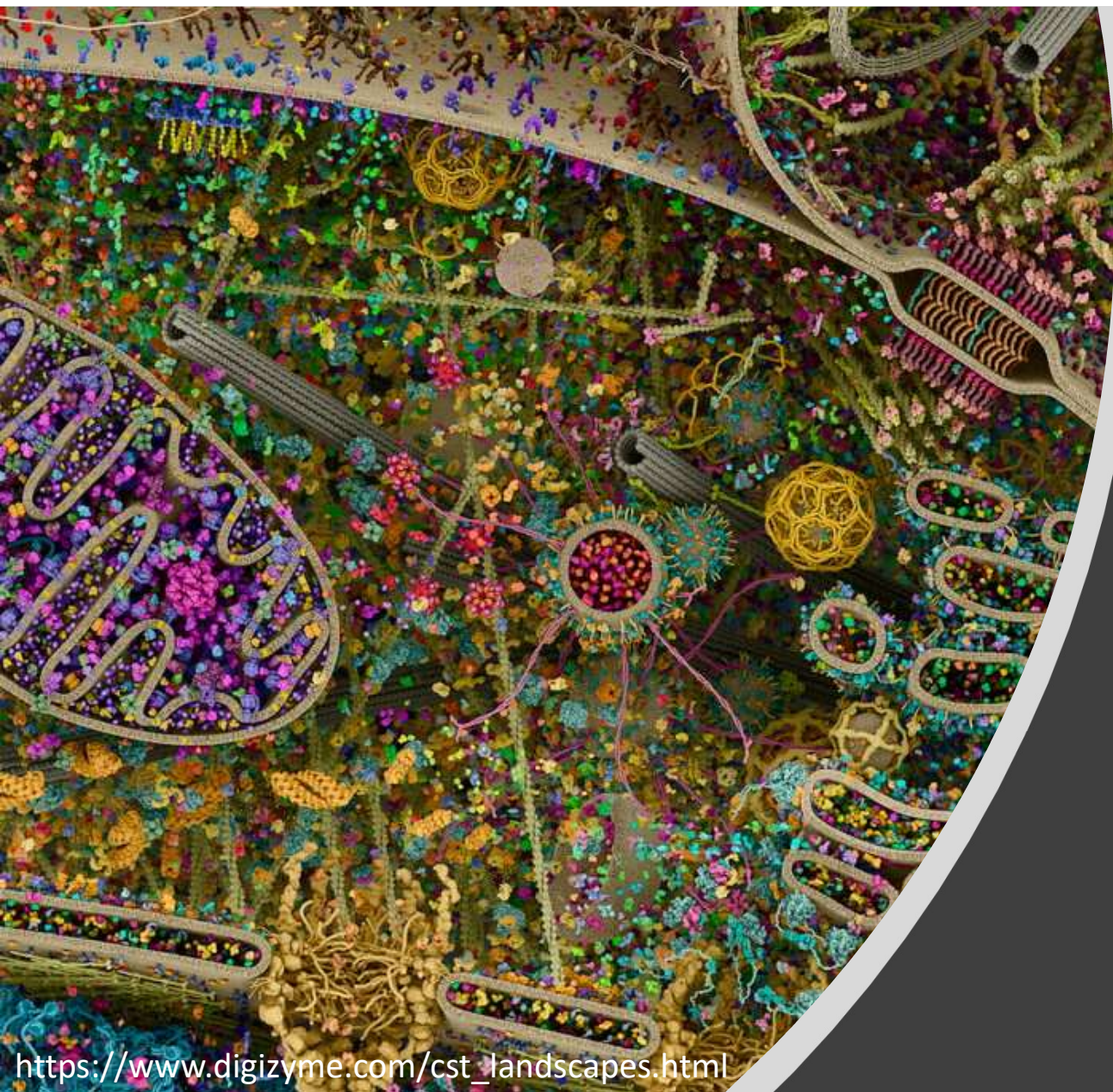




VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



ÚOCHB AV
ČR
IOCB PRAGUE

Laboratorní metody biochemie

Jan Voldřich

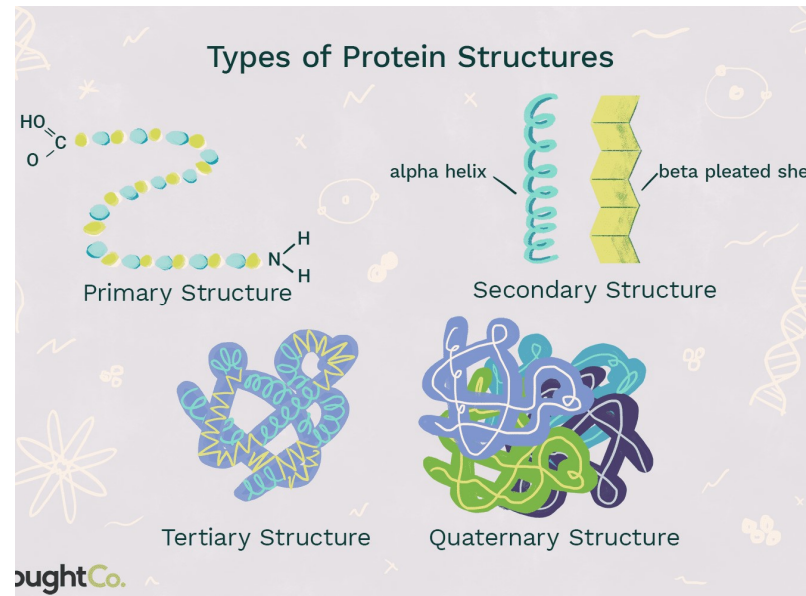
https://www.digizyme.com/cst_landscapes.html

Obsah

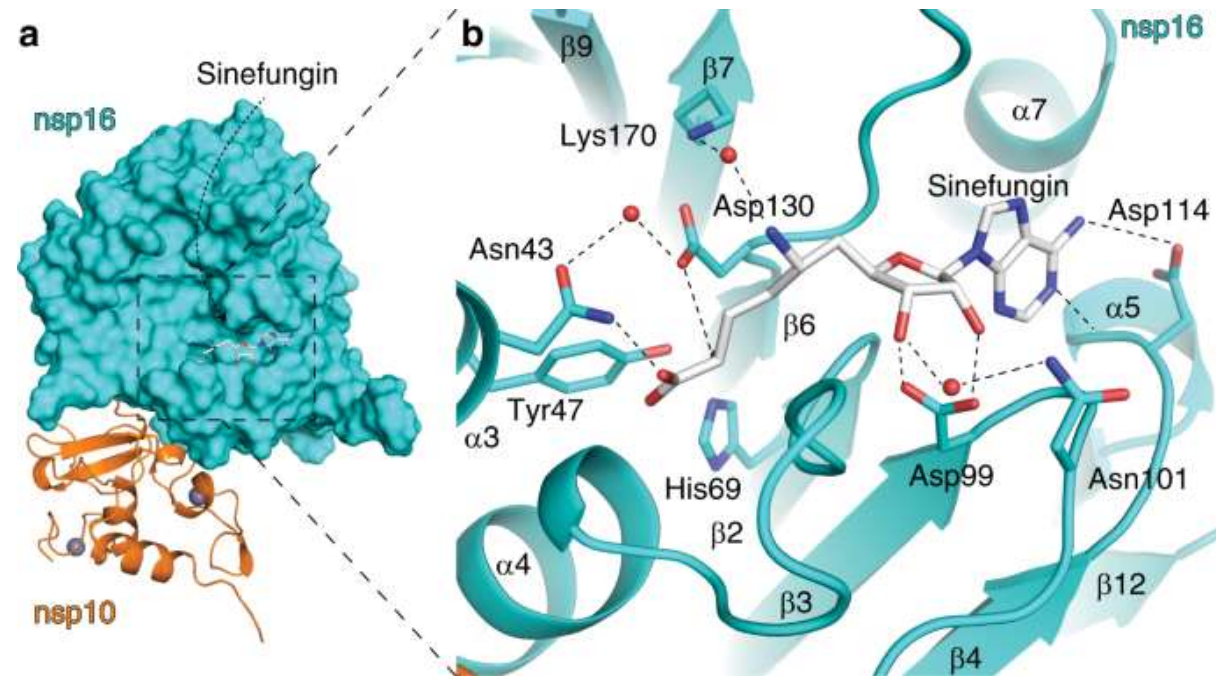
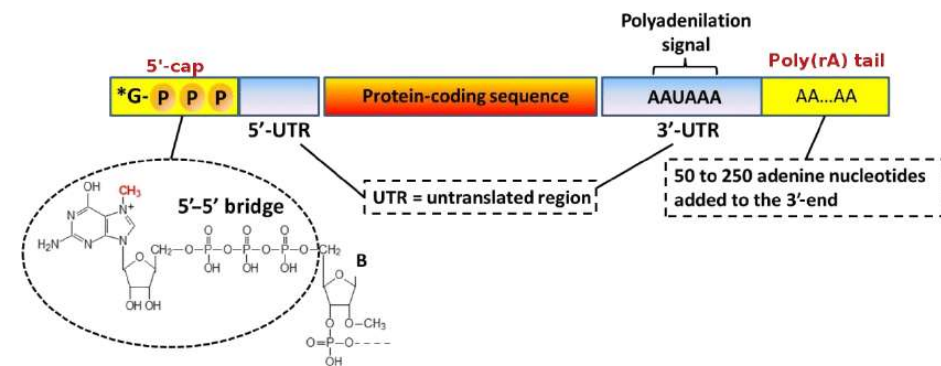
- Struktura proteinů
- Separační techniky biopolymerů
 - Precipitační metody
 - Membránové separace
 - Elektromigrační metody
- Instrumentace moderní biochemické laboratoře
- Měření aktivity enzymů
- Měření interakcí protein-ligand
- Imunochemické metody
- PCR
- Tkáňové kultury

Struktura proteinů

- Studium prostorové struktury proteinů (určení primární je jednoduché)
- Studium vazebných míst pro ligandy
- Rentgenová krystalografie, NMR, Cryo EM, umělá inteligence!



Studium struktury methyltransferázy SARS-CoV-2

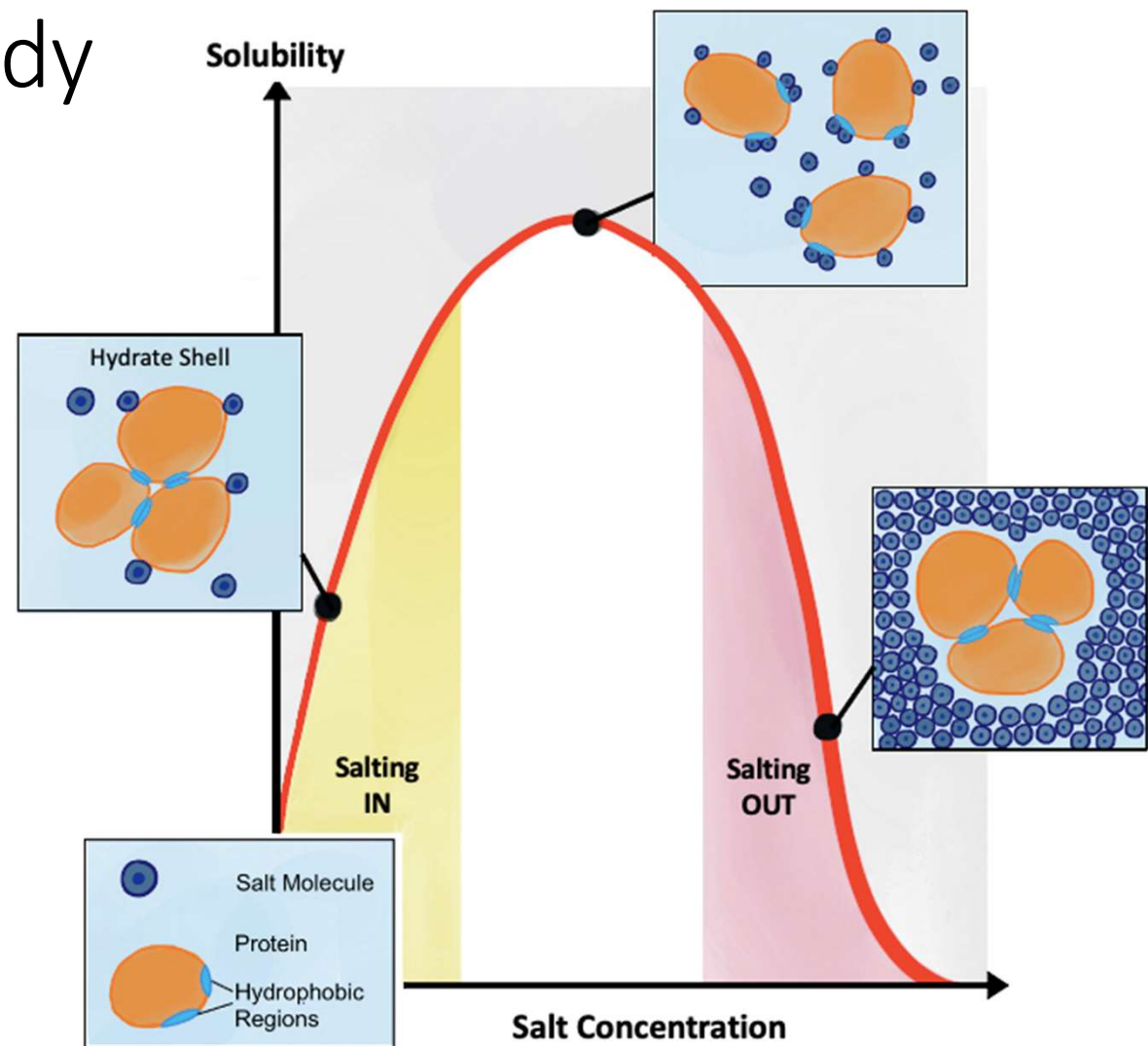


Krafcikova, P., Silhan, J., Nencka, R. *et al.* Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nat Commun* **11**, 3717 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17495-9>

Produkce rekombinantních proteinů

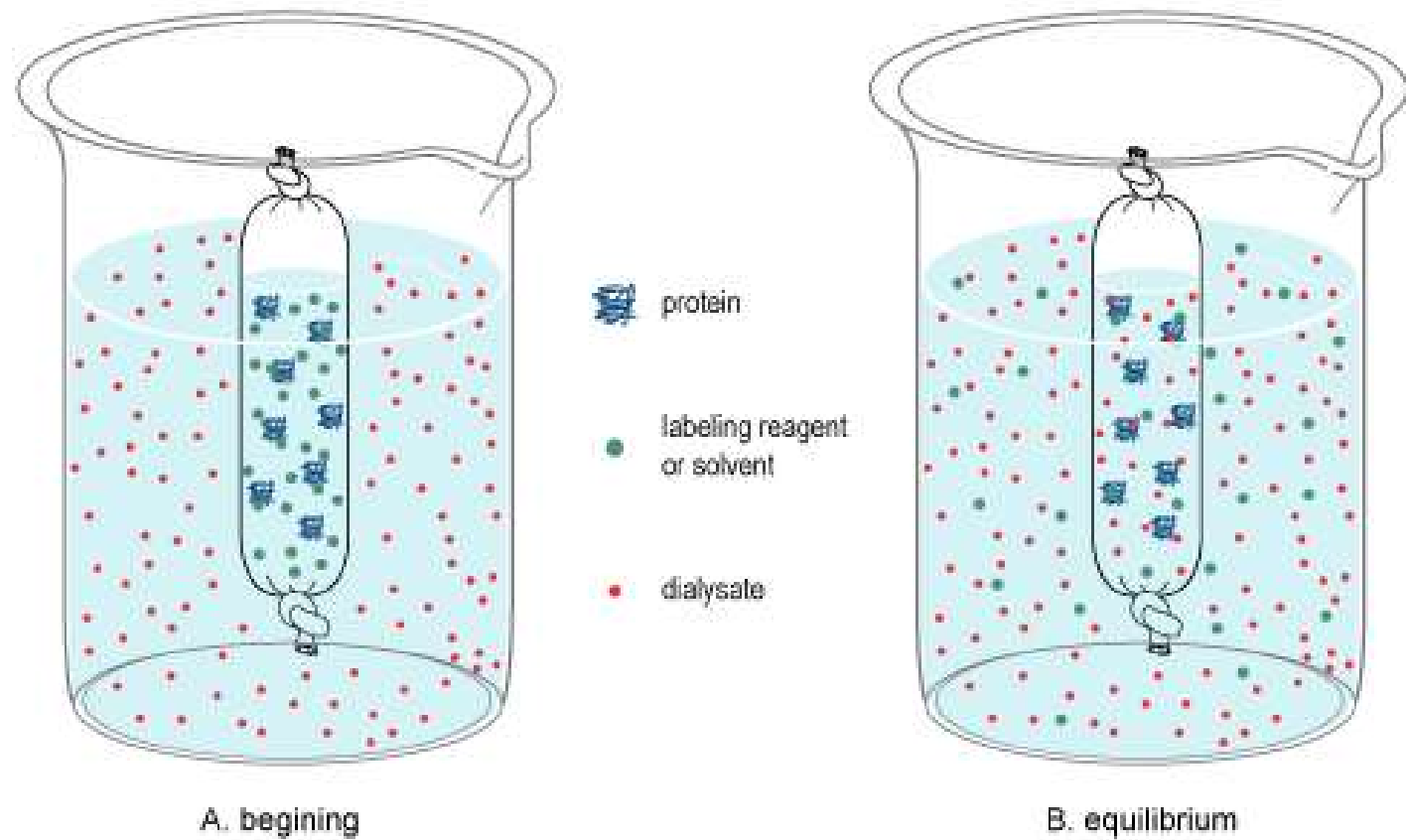
- Klonování (tvorba plazmidu)
- Transformace / transfekce do buněk (bakterie/kvasinky/tkáňové kultury)
- Exprese (samovolná/indukovaná)
- Izolace (lýze buněk/odebrání média)
- Purifikace (IMAC, gelová chromatografie...)
- Dialýza/zakoncentrování

Precipitační metody

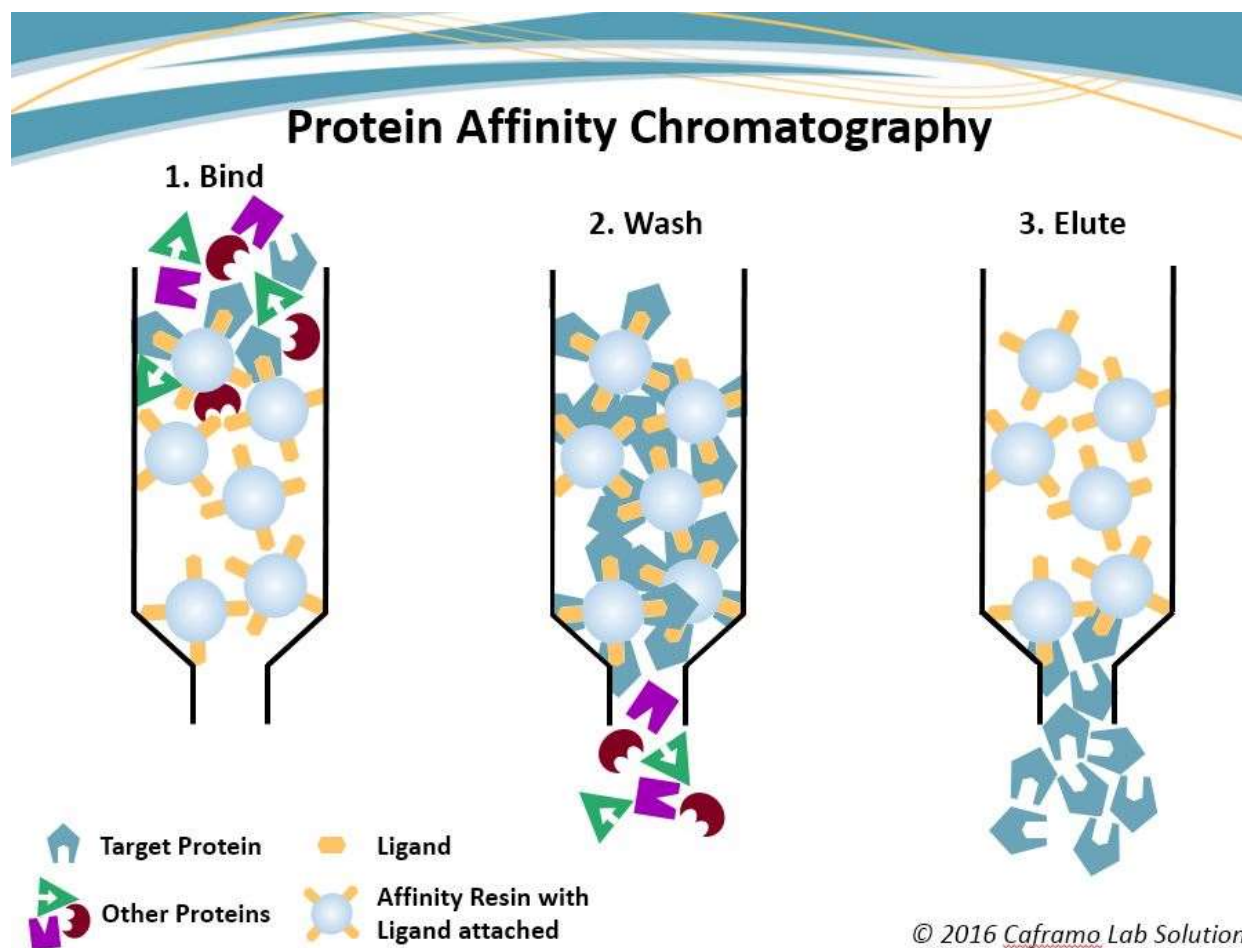


Membránové separace

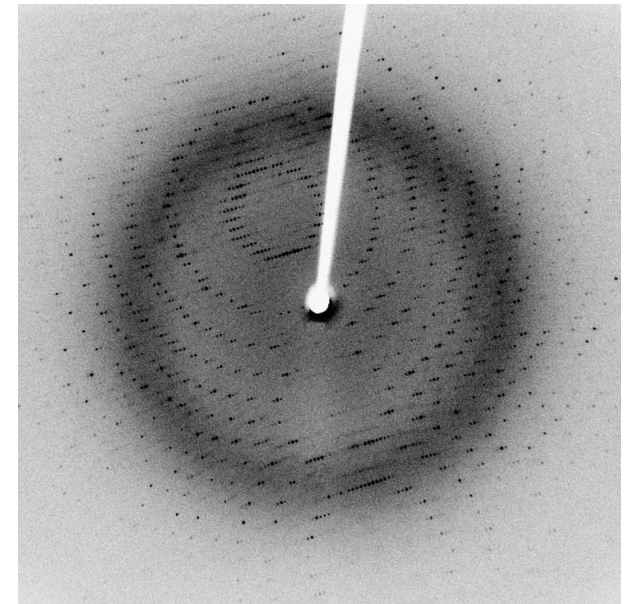
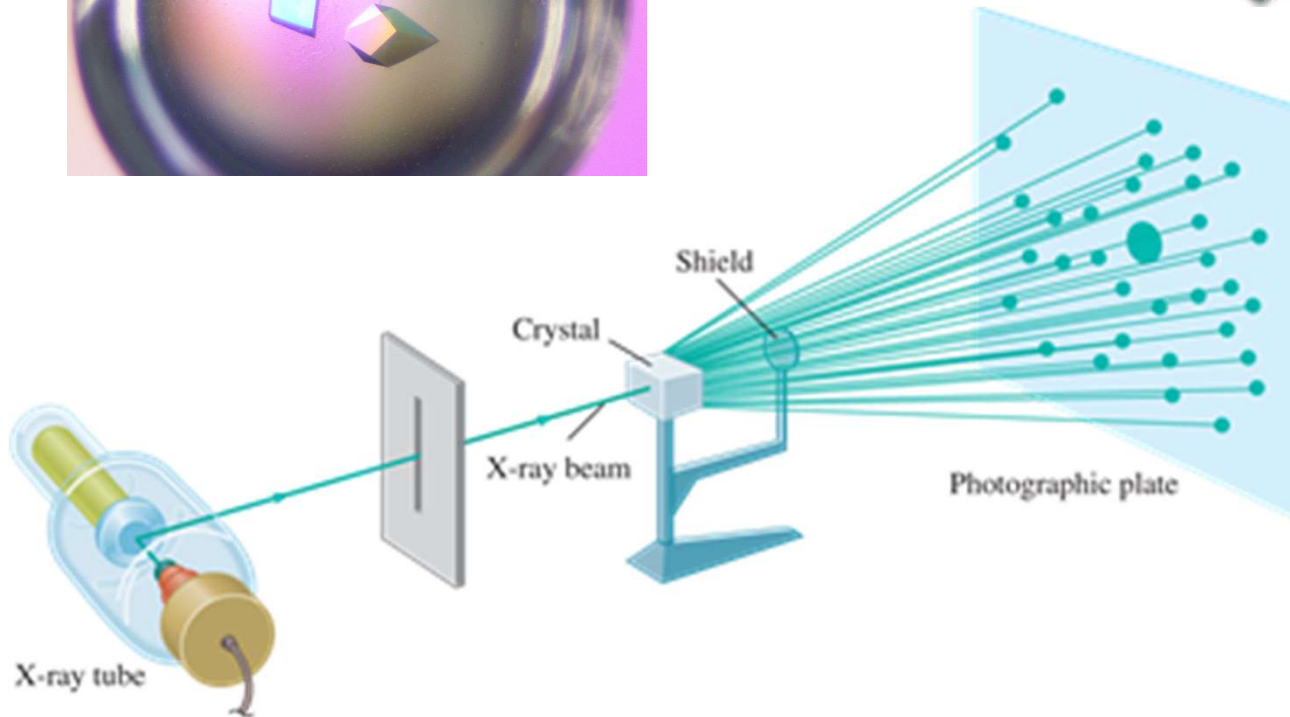
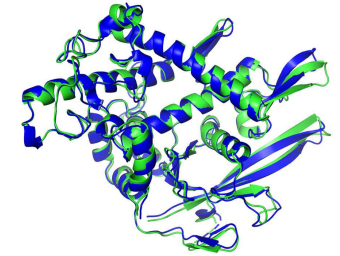
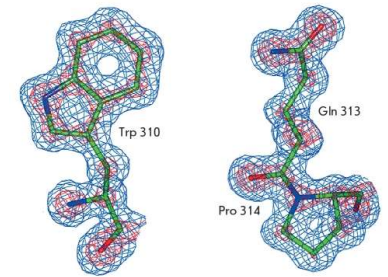
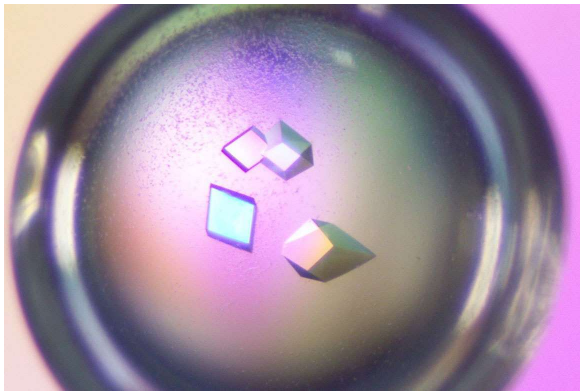
- Dialýza



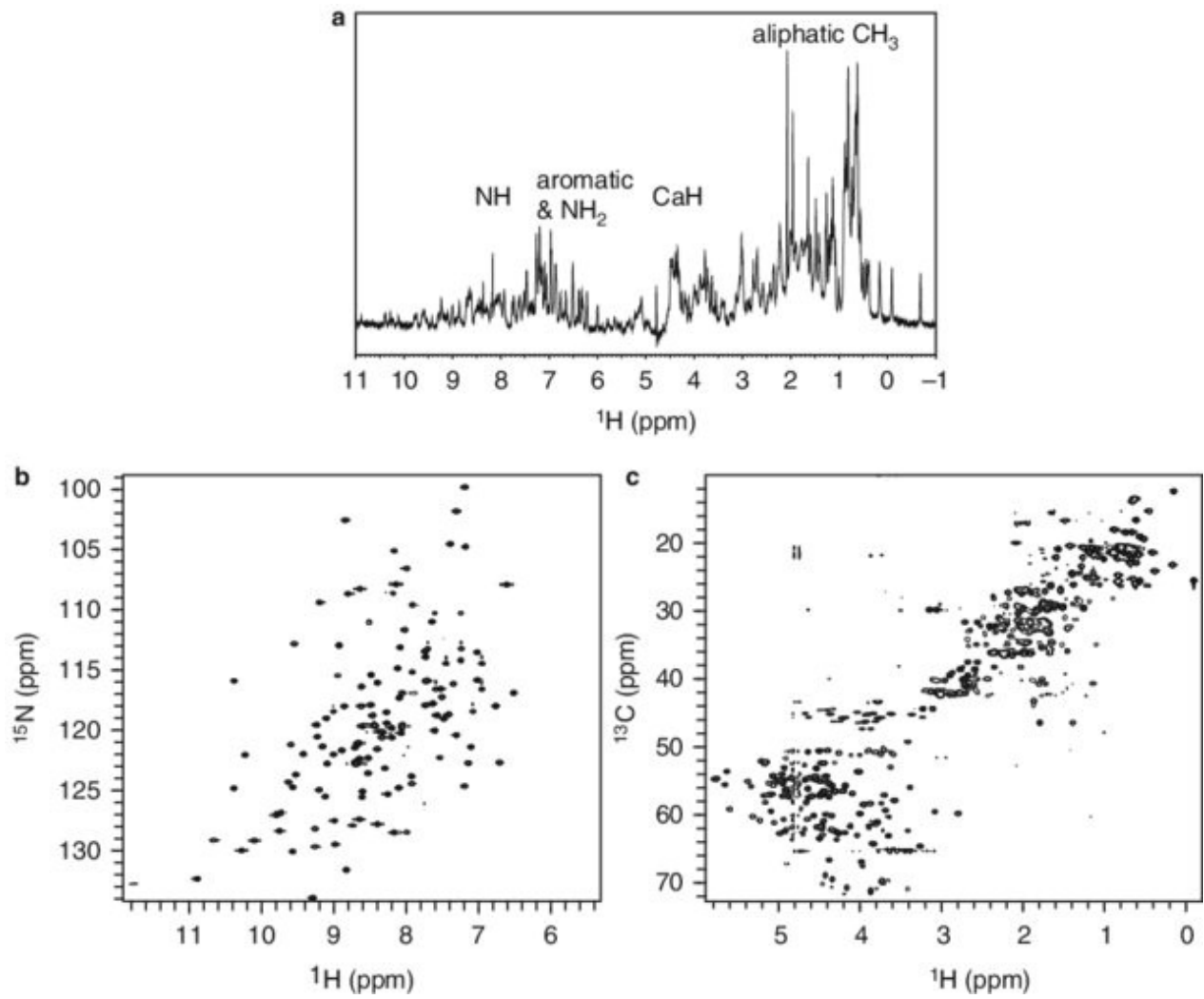
Afinitní chromatografie



Rentgenová krystalografie

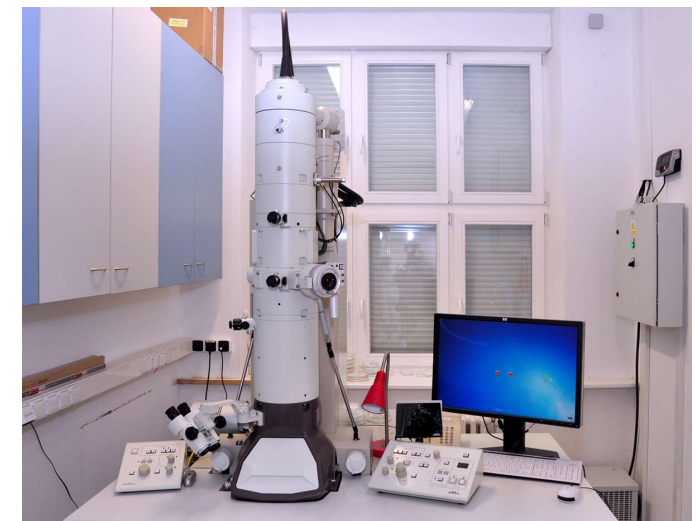
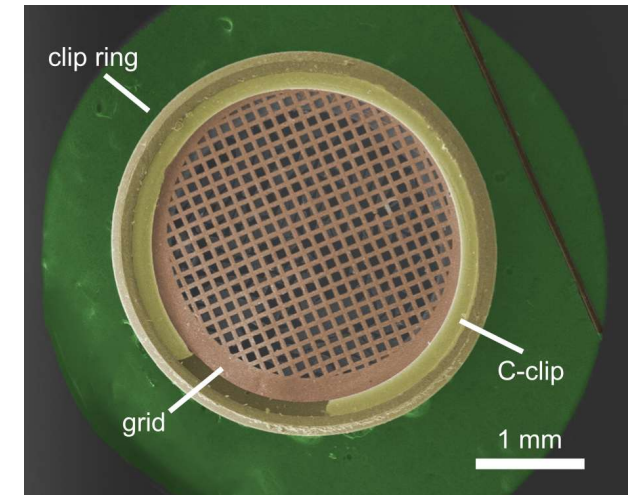
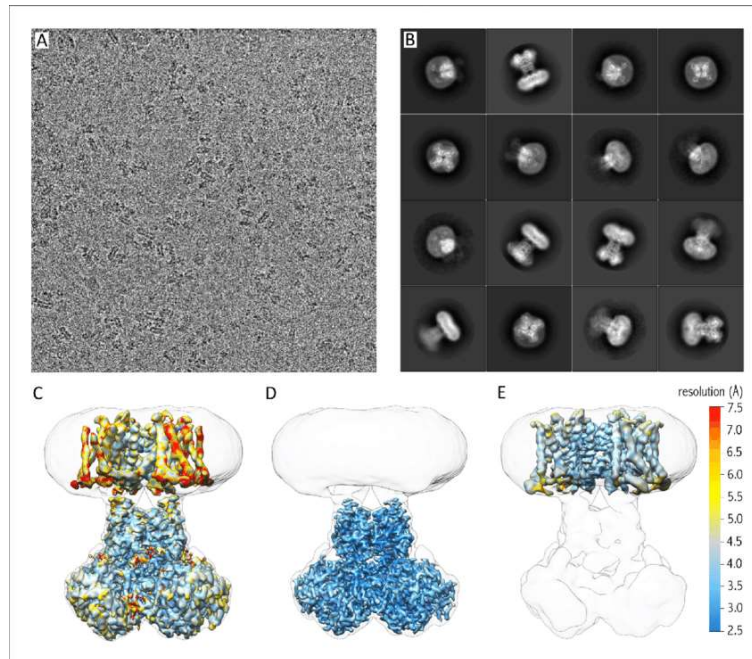


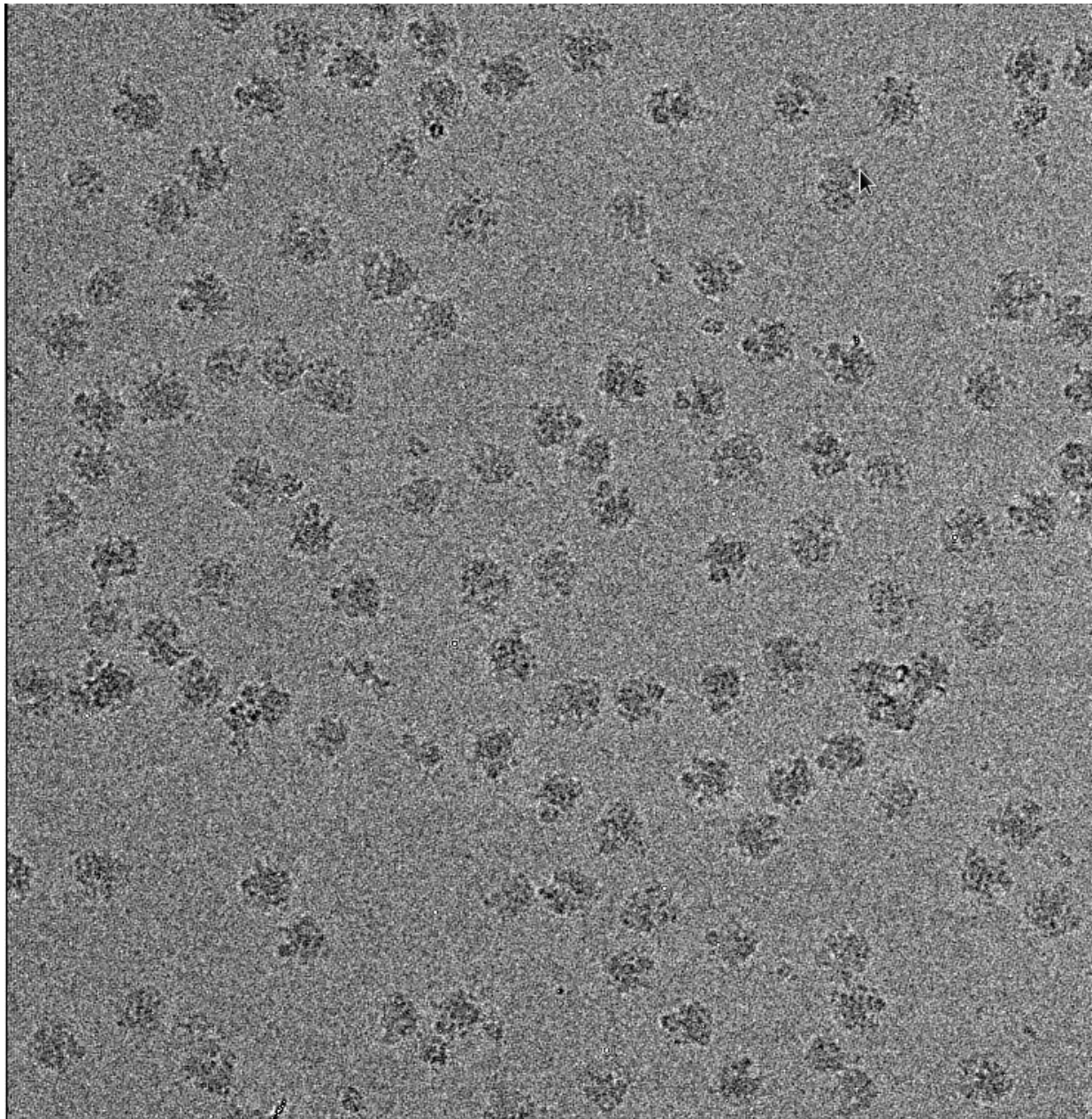
2D-NMR



Cryo-EM

- 2017 – Nobelova cena - Jacques Dubochet, Joachim Frank, and Richard Henderson
- Elektronová mikroskopie
- Vitřifikace vzorku (kapalný ethan/dusík)
- Výpočetně náročná analýza dat
- Velké proteinové komplexy

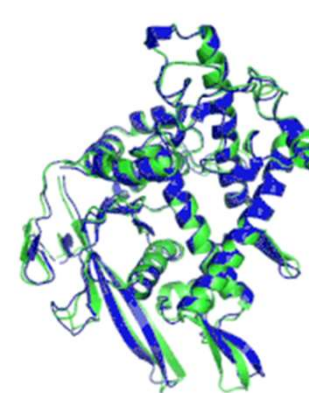




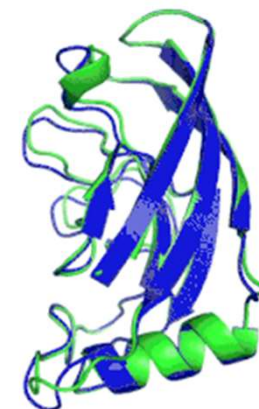
Alphafold

- Strojové učení

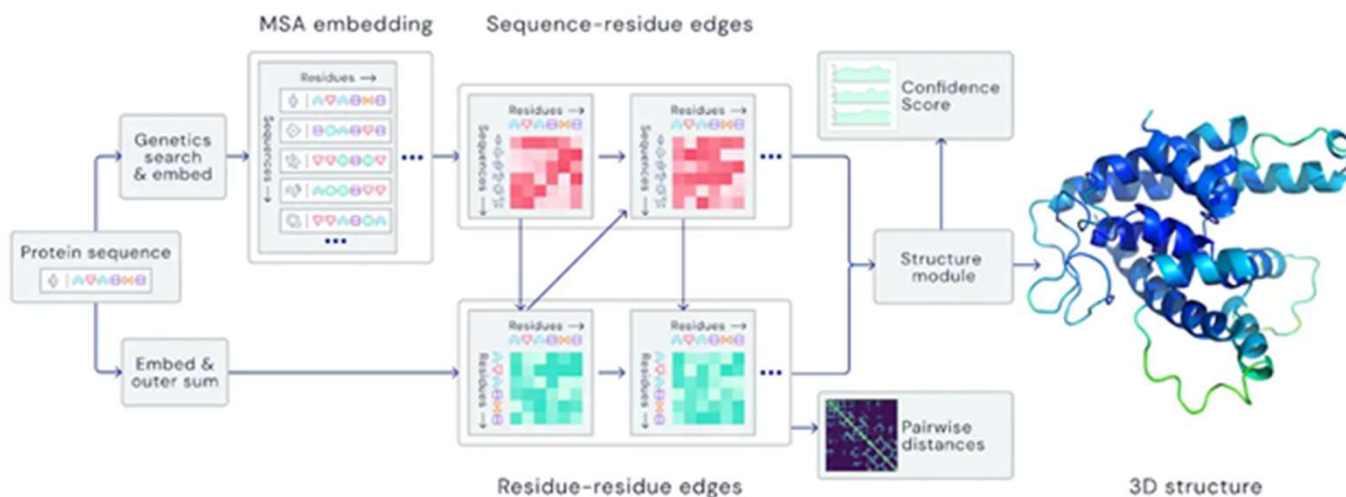
Median Free-Modelling Accuracy



T1037 / 6vr4
90.7 GDT
(RNA polymerase domain)



T1049 / 6y4f
93.3 GDT
(adhesin tip)

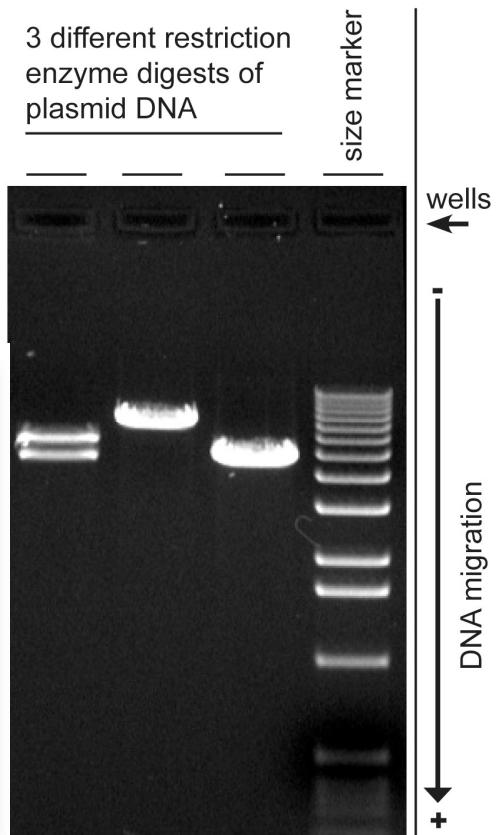
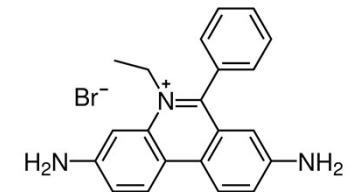
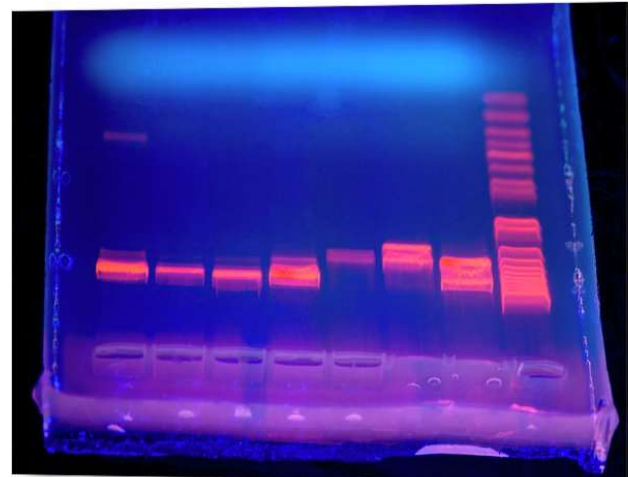
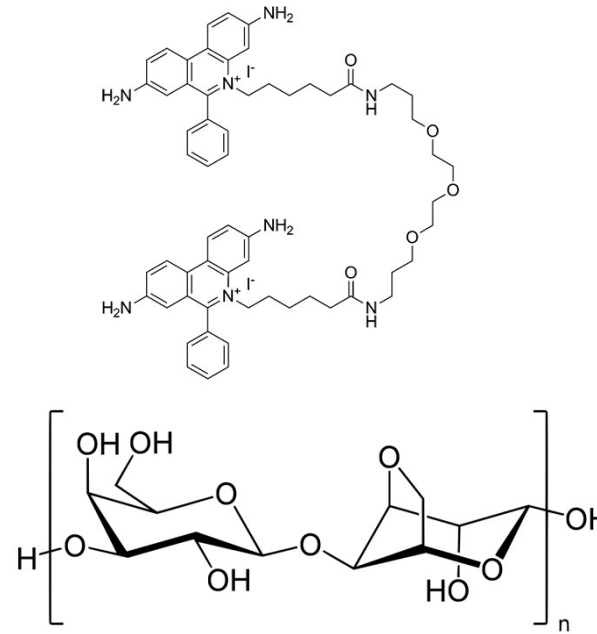
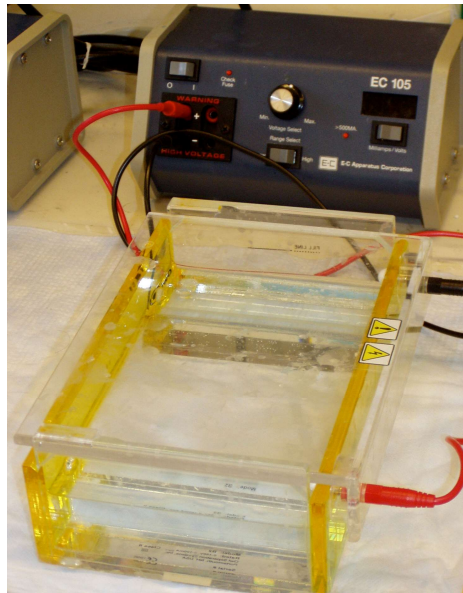


Elektromigrační metody

- Separační metody využívající stejnosměrné elektrické pole
- Volná, na nosičích, gelová, dvourozměrná

Agarozová elfo

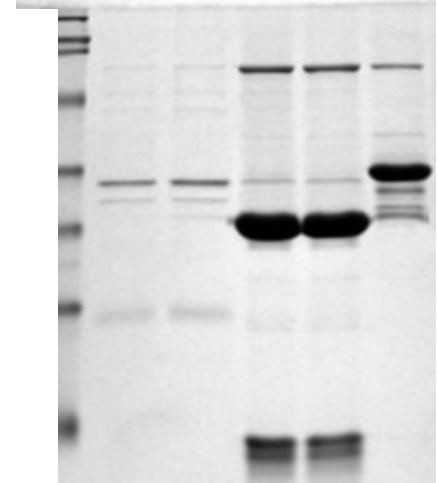
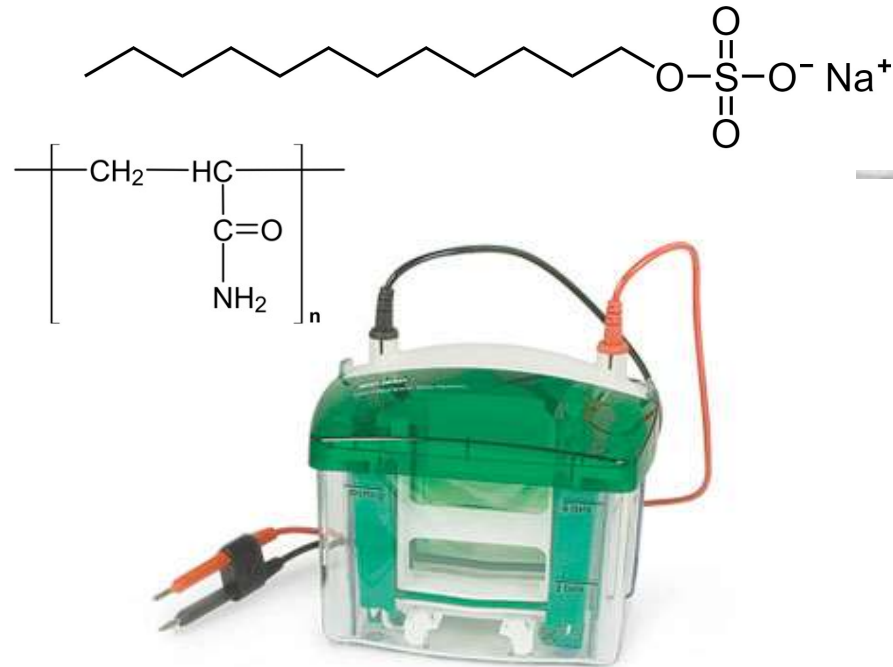
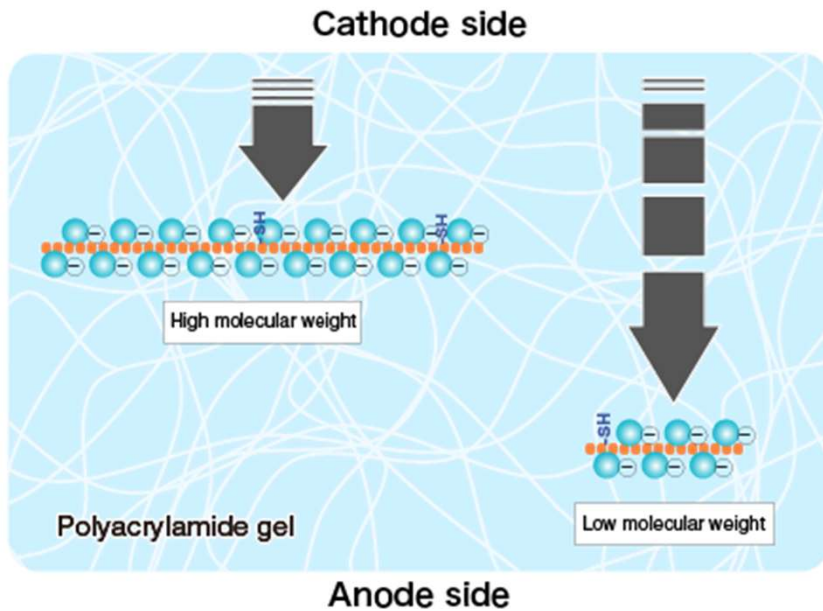
- DNA/RNA, proteiny
- 0,3%-2%



SDS - PAGE

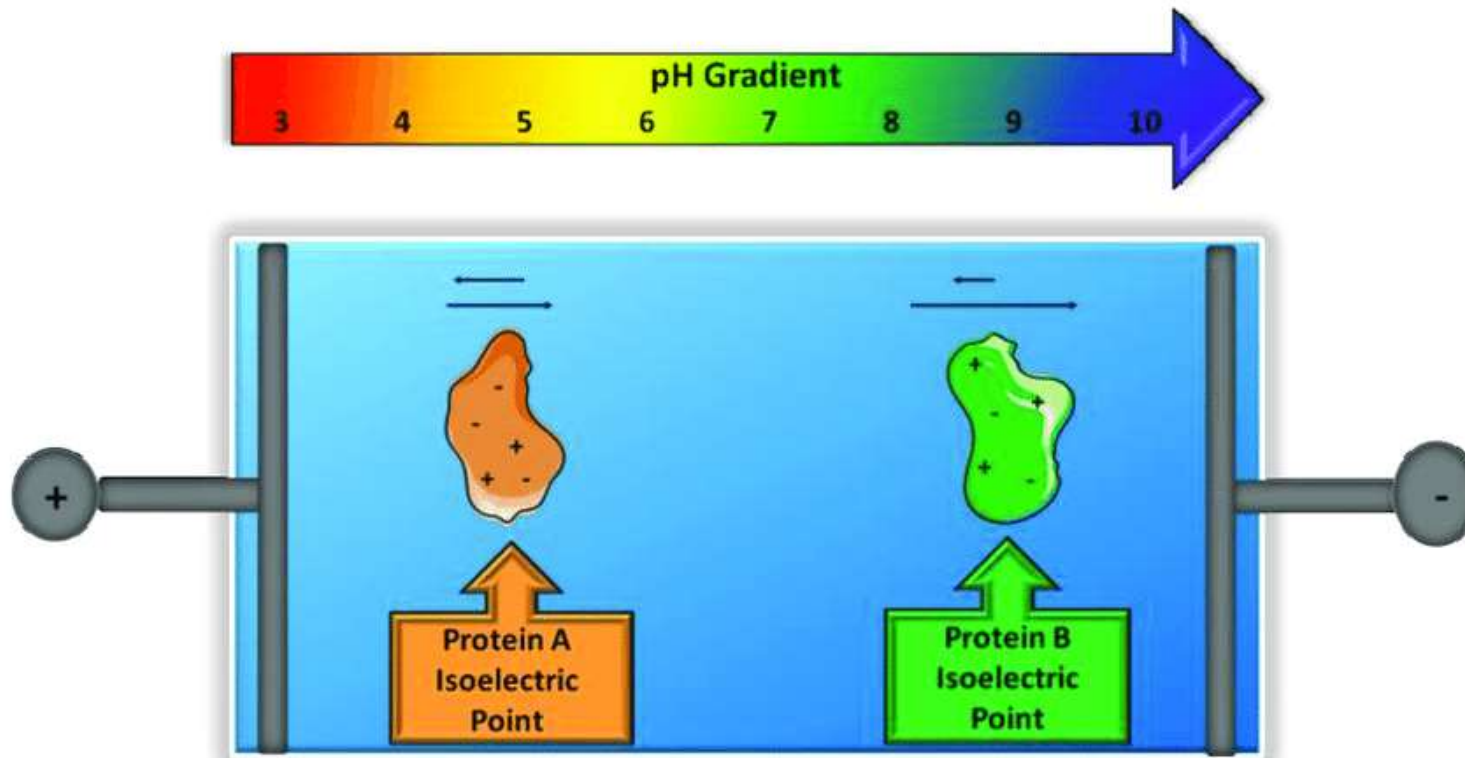
- Polyakrylamidová denaturační ELFO
- Dodecylsírán sodný
- Proteiny

Proteins are separated based on their polypeptide chain length by electrophoresis in a polyacrylamide gel with an appropriate mesh size.



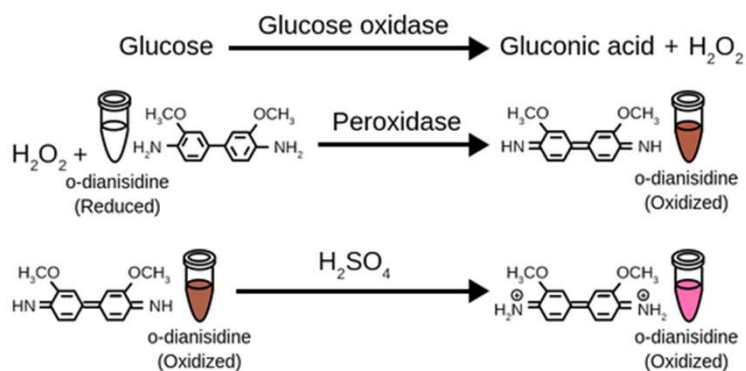
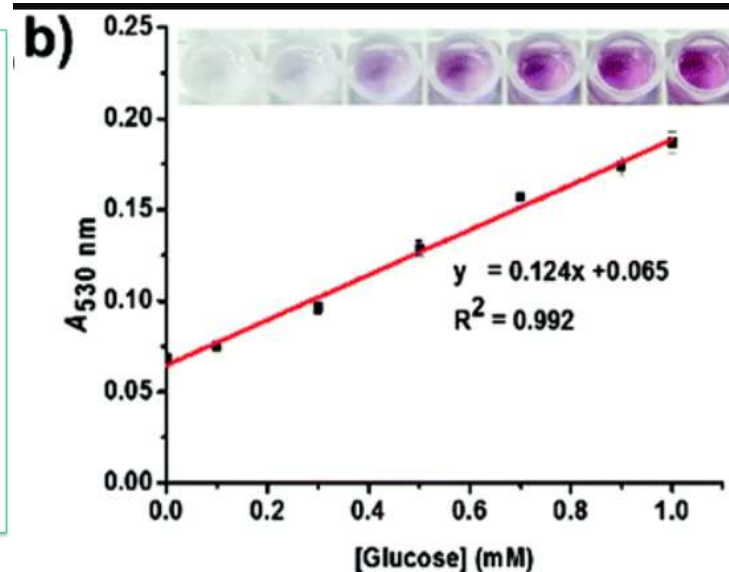
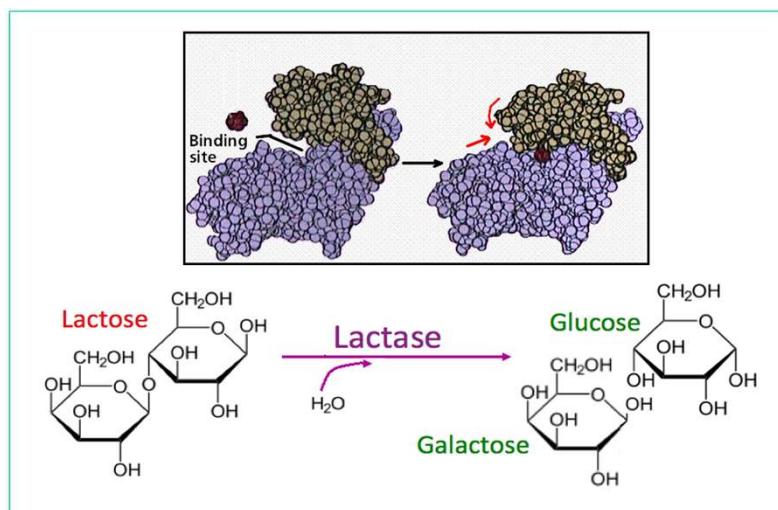
	Separating gel ^a			Stacking gel
	7.5%	10%	12%	4%
30% Acr Bis (mL)	2.5	3.3	4	0.33
1.5 M Tris (pH 8.7) (mL)	2.5	2.5	2.5	—
0.5 M Tris (pH 6.8) (mL)	—	—	—	0.63
10% SDS (μL)	100	100	100	25
MilliQ H ₂ O (mL)	4.85	4.05	3.35	1.59
APS (10%) (μL)	50	50	50	12.5
TEMED (μL)	5	5	5	2.5

Isoelectric Focusing of Proteins



Měření aktivity enzymů

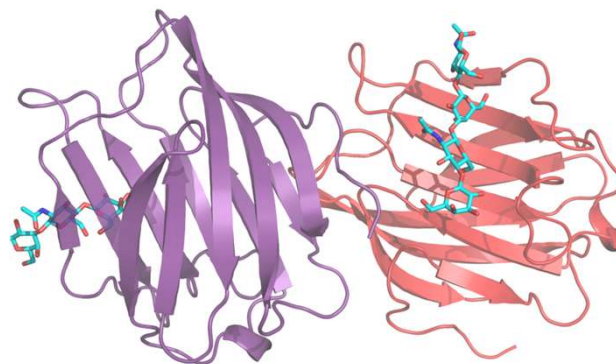
- Vývoj léčiv
- Diagnostika



- Spektrofotometrická detekce
 - Absorbance
 - Fluorescence
 - Luminiscence

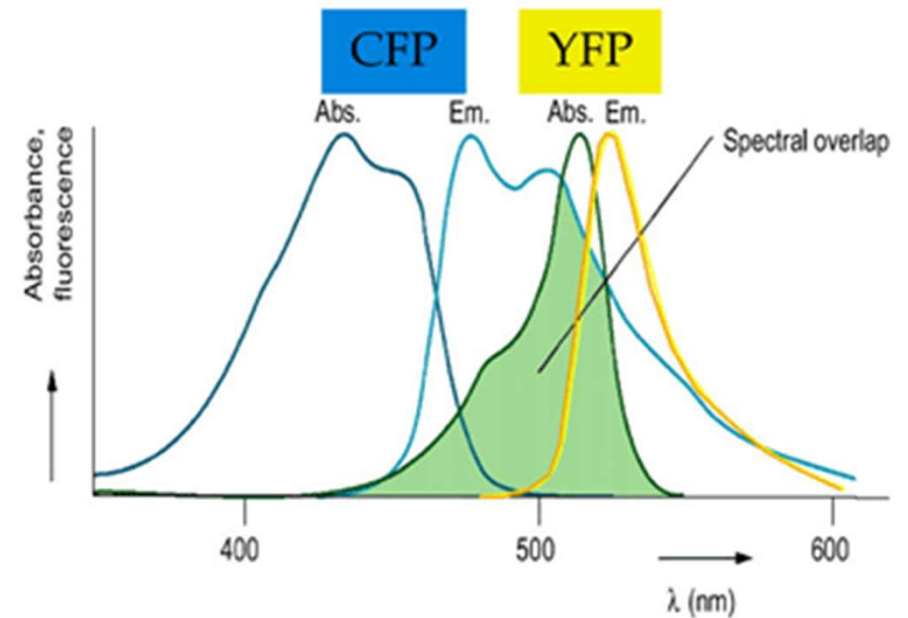
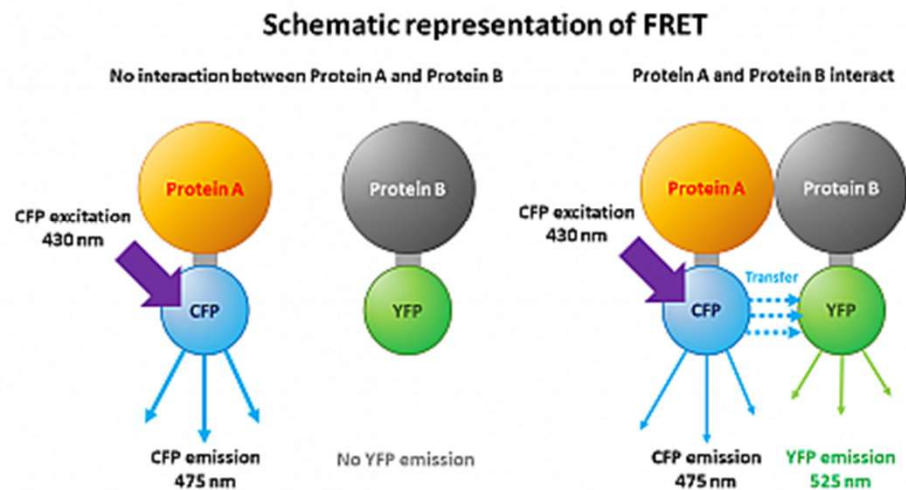
Měření interakcí protein-ligand

- Interakce protein-protein, protein-DNA/RNA, protein-malá molekula
- Studium biochemických procesů a mechanismů, vývoj léčiv
- FRET, polarizovaná fluorescence, SPR, radioligandové metody, DSF...



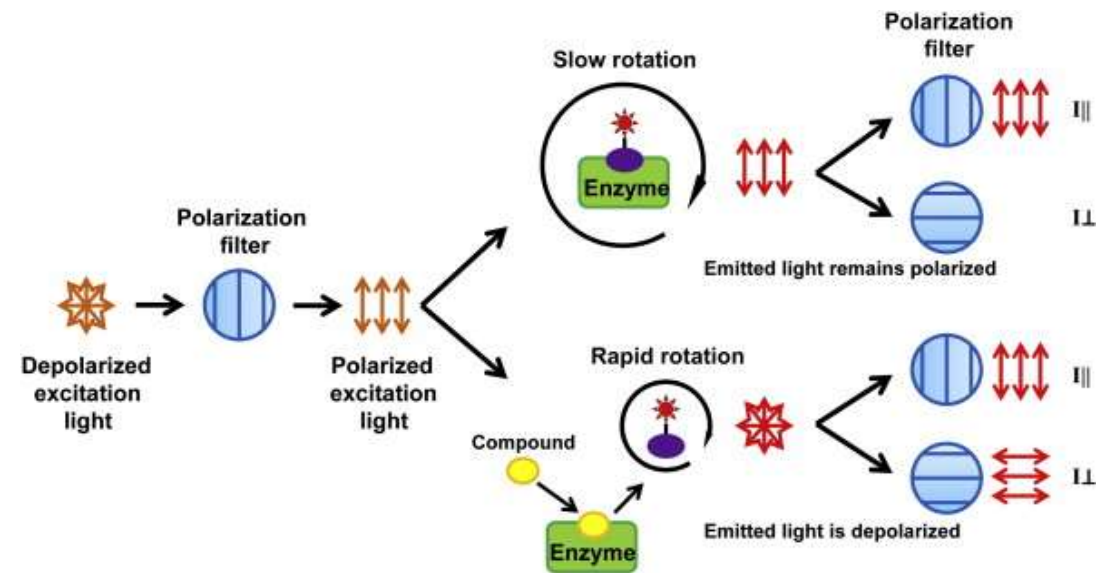
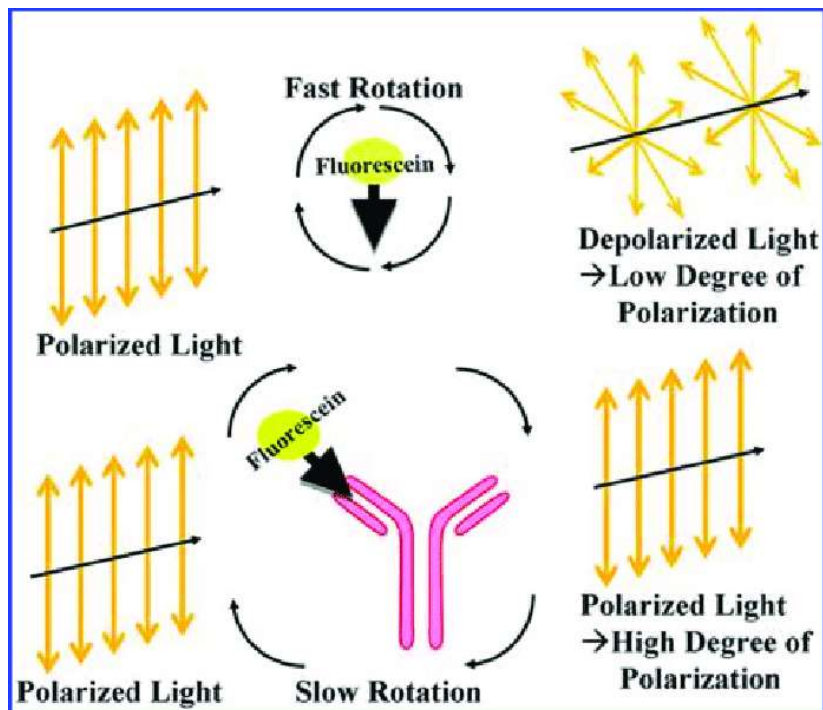
FRET

- Försterův rezonanční přenos energie
- Přenos energie z donoru na akceptor
- Struktura proteinů, interakce protein-ligand, NK, RT-PCR, studium receptorů...



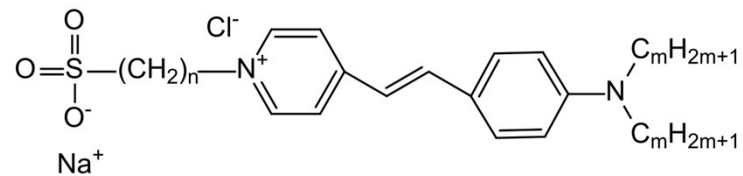
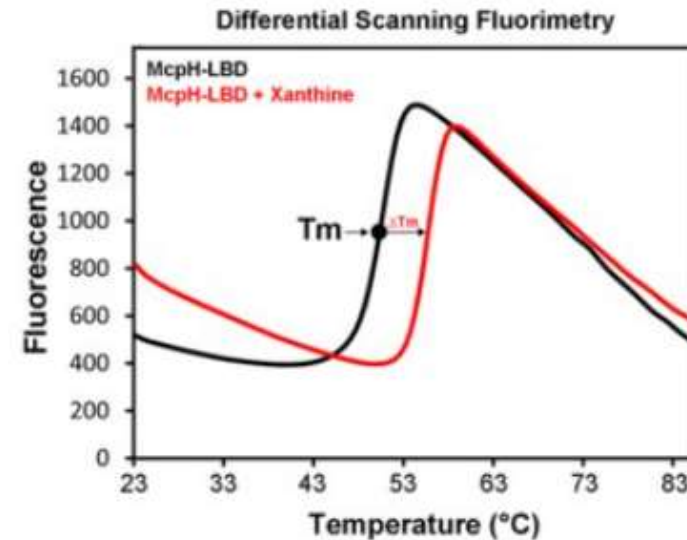
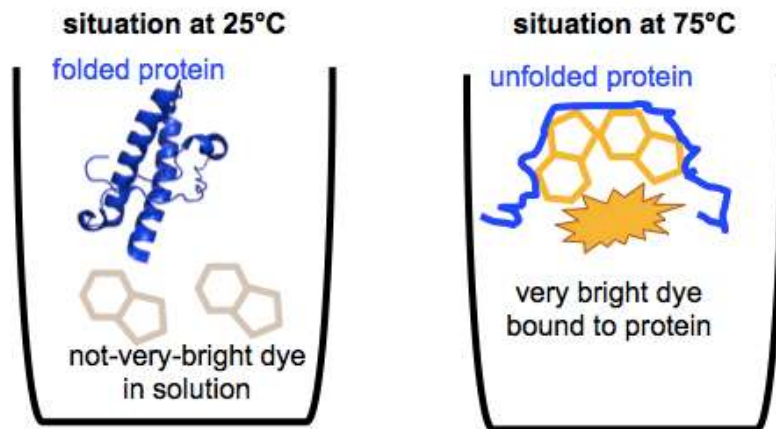
Polarizovaná fluorescence

- Např. studium vazeb sacharidů na galektiny
- Studium vazeb ligandů na receptory



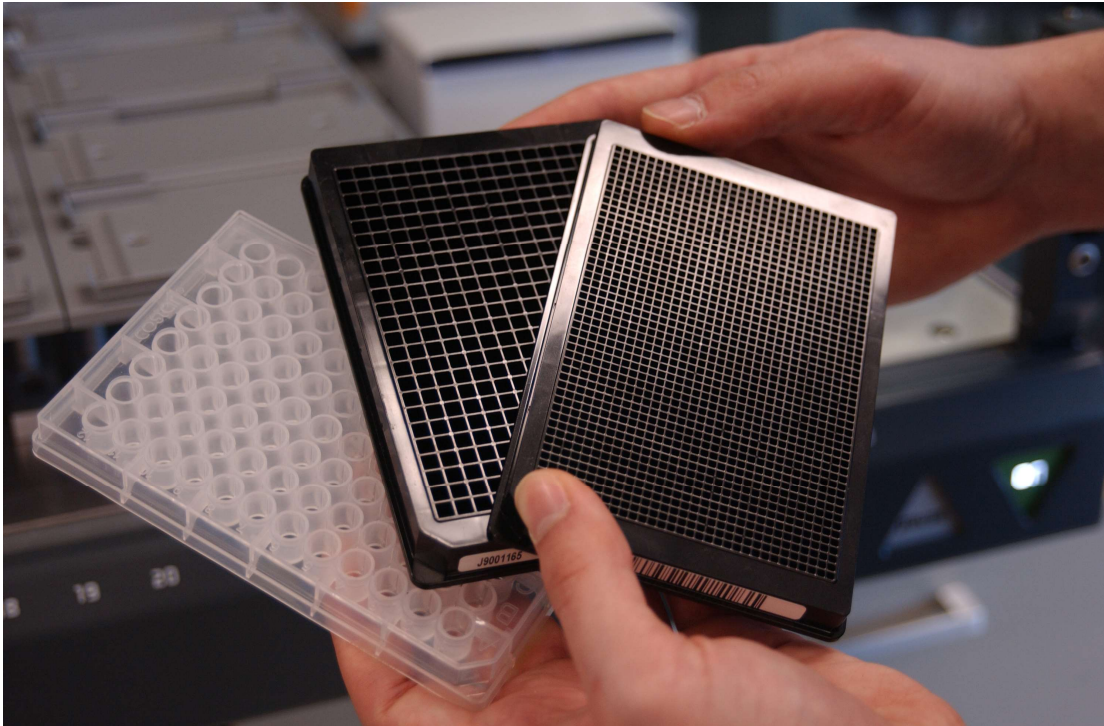
DSF (differential scanning fluorimetry)

DSF assay principle

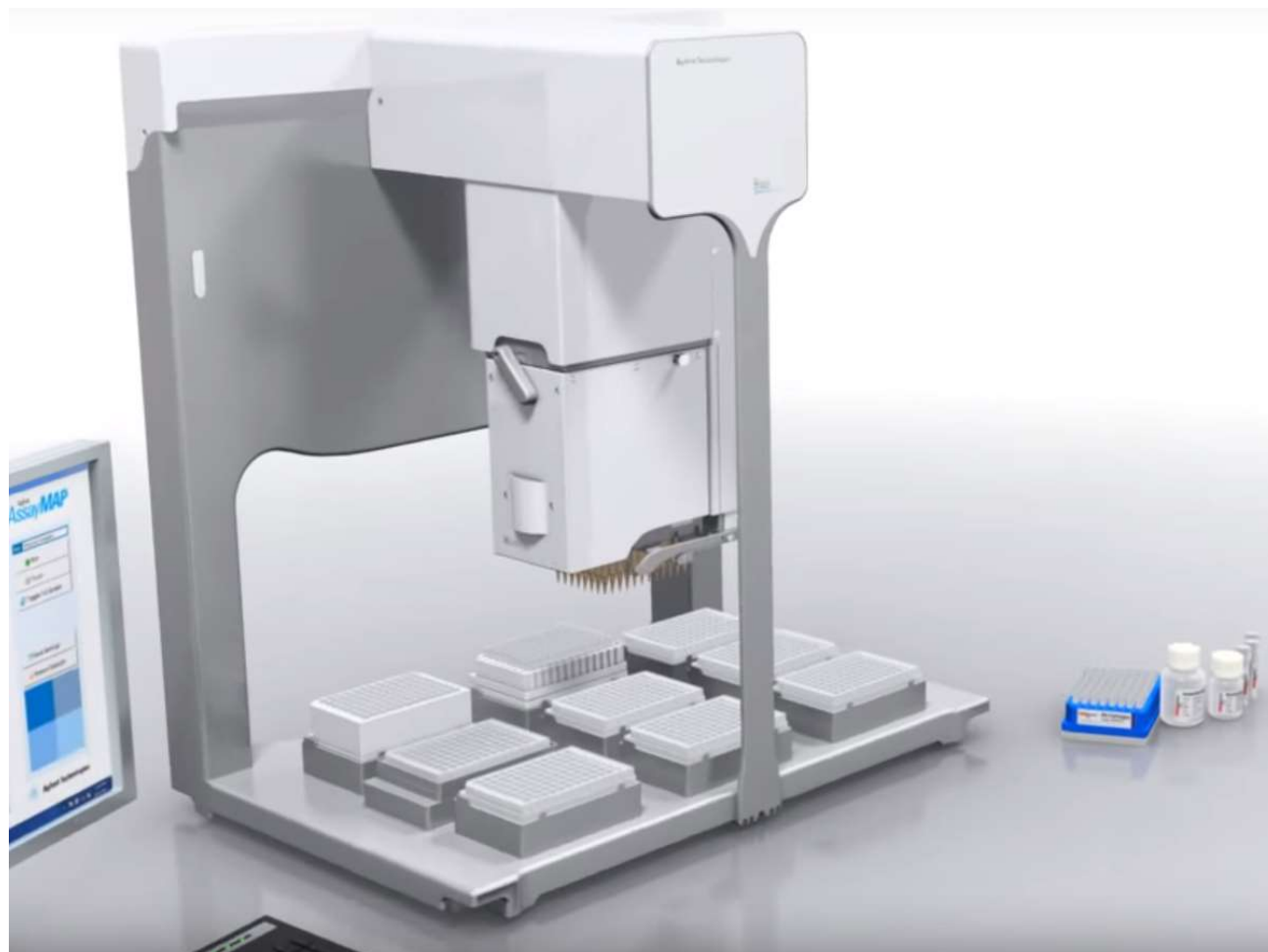


SYPRO orange

Instrumentace



- Pipetovací stroje



ECHO



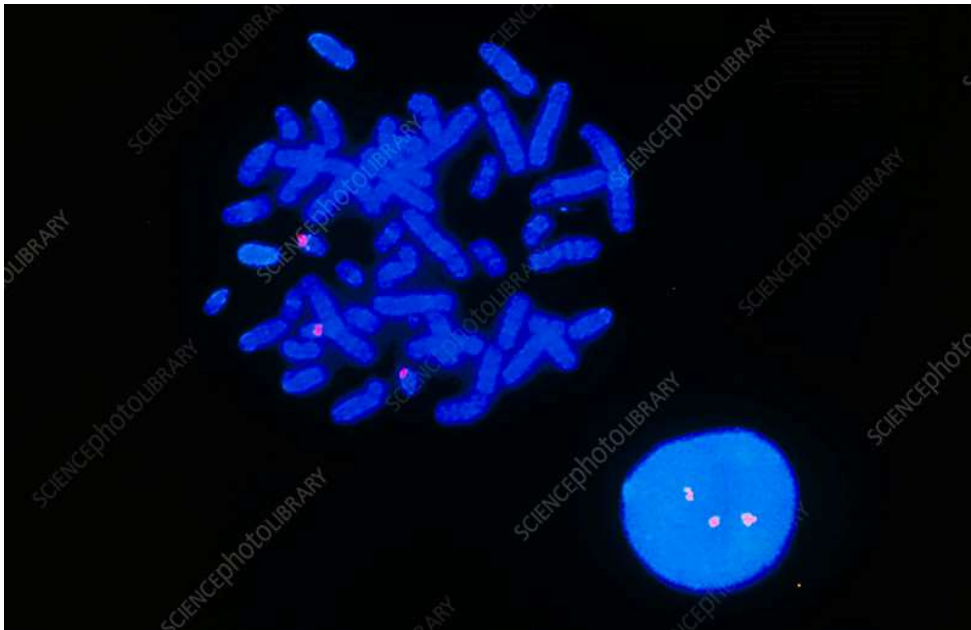
Multiwell readery

- Absorbance
- Fluorescence
- Luminiscence
- Polarizovaná fluorescence
- Kinetika
- Dispensing



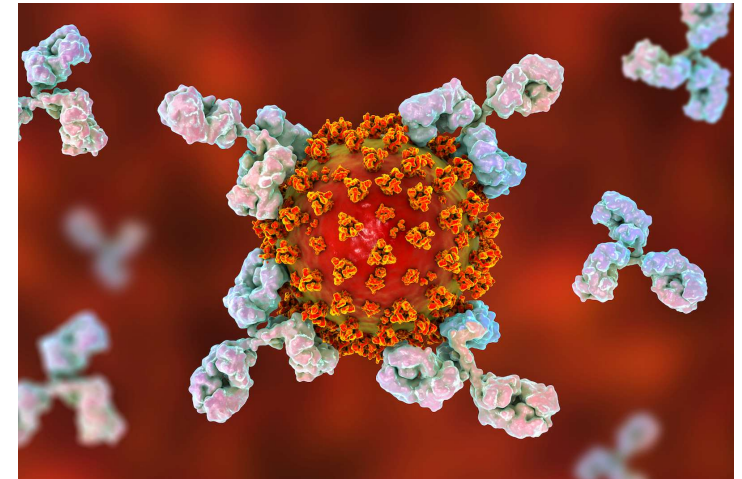
FISH (Fluorescence in situ hybridization)

- Hybridizace DNA (chromozom) s fluorescenčně značeným oligonukleotidem, mikroskopická analýza
- Diagnostika např. Downova syndromu



Imunochemické metody

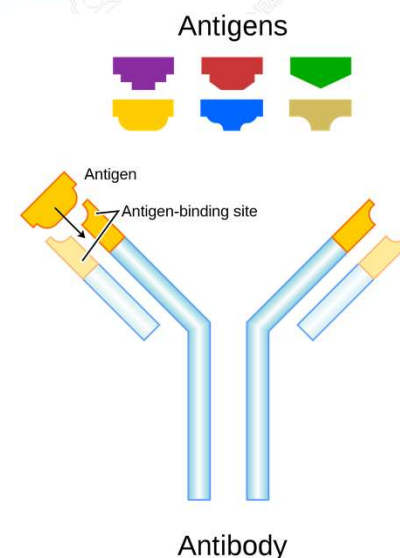
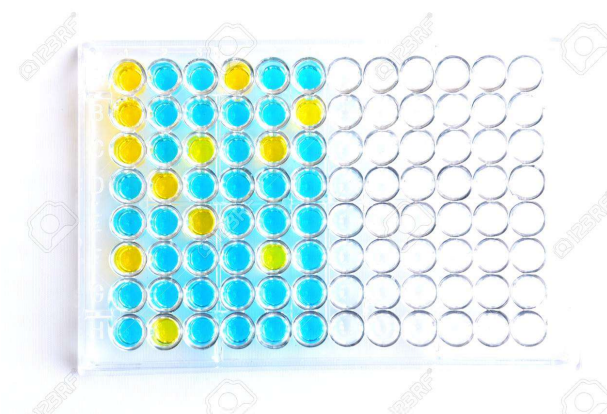
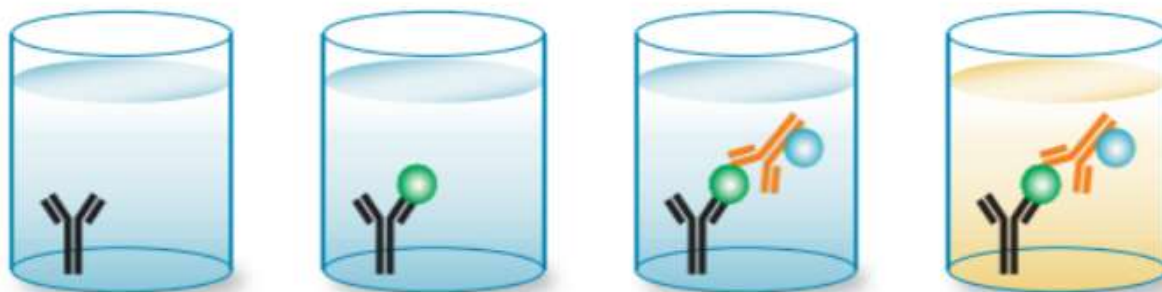
- Interakce antigen-protilátka
- Immunoprecipitační metody
- Afinitní chromatografie
- Značené protilátky (imunoblot, ELISA, radiometrické metody, průtoková cytometrie)
- Diagnostika, stanovení a purifikace proteinů



ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

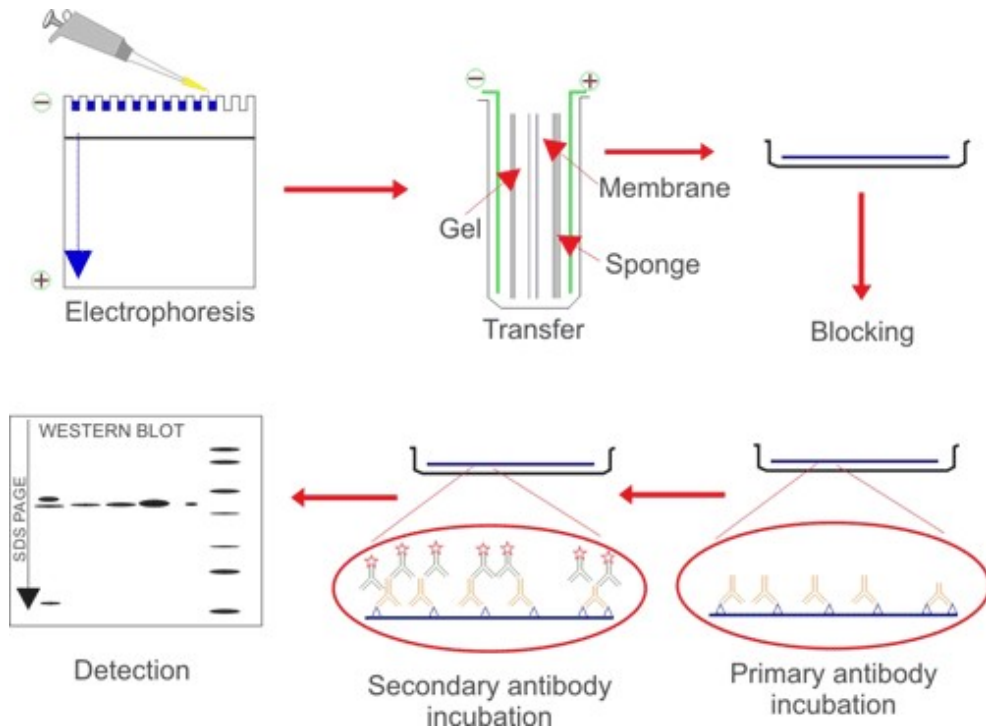
- Diagnostika (detekce protilátek, antigenů)
- Detekce toxinů, hormonů, proteinů..

 Záchytná protilátka  Analyt/Antigen  Konjugovaná detekční protilátka

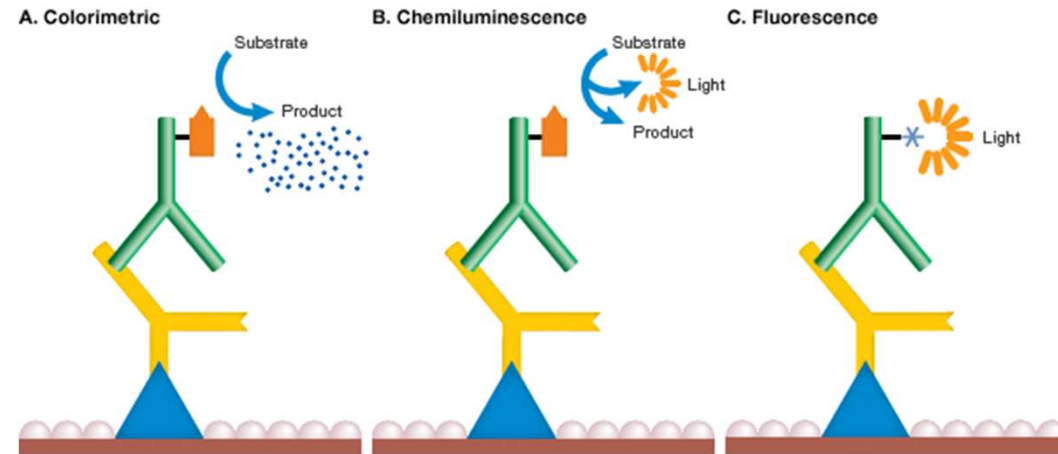


Western blot

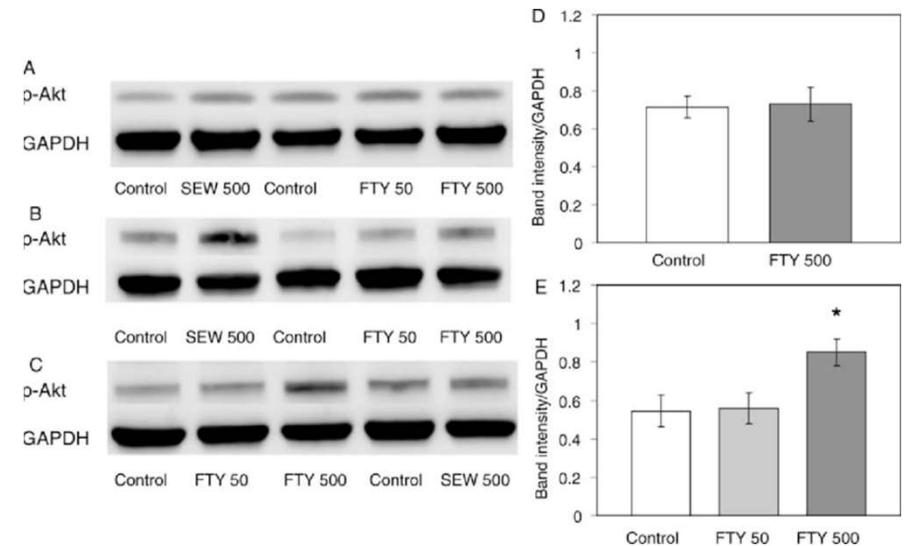
- Rozdělení proteinů SDS-PAGE, poté imunochemická detekce
- PVDF, nitrocelulózové membrány
- Blokování membrány (mléko, BSA)
- Inkubace s protilátkami



• Detekce

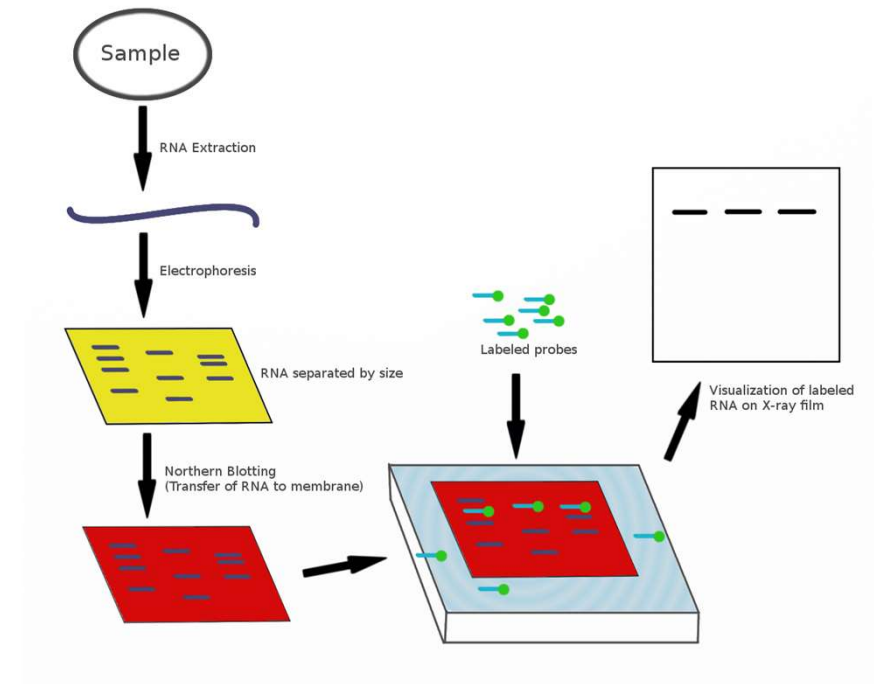
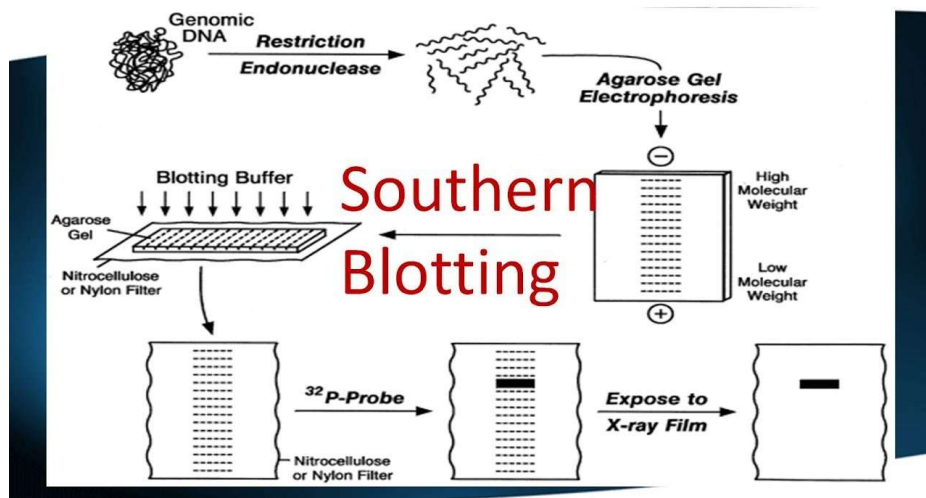


• I kvantitativní metoda



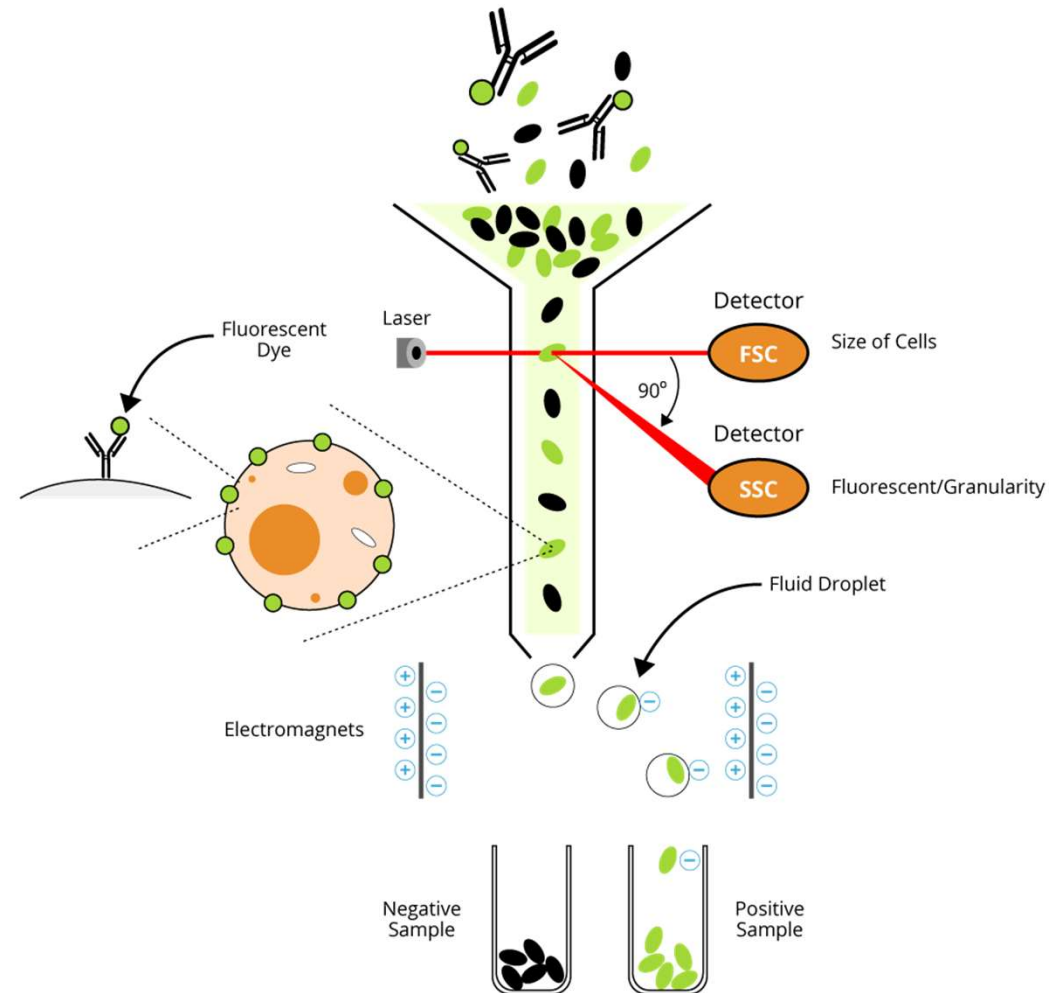
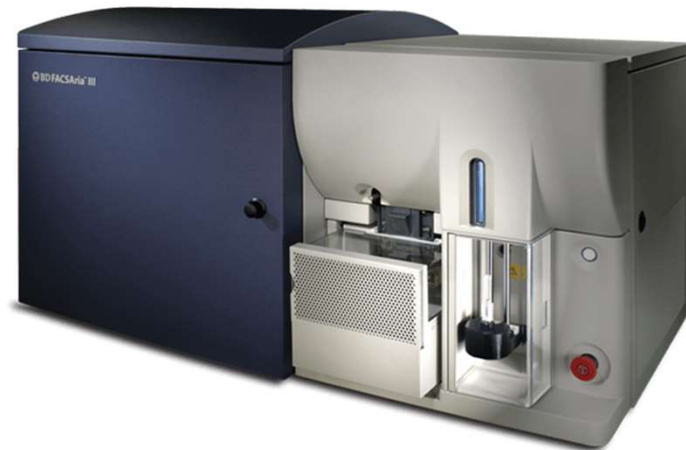
Southern a Northern blot

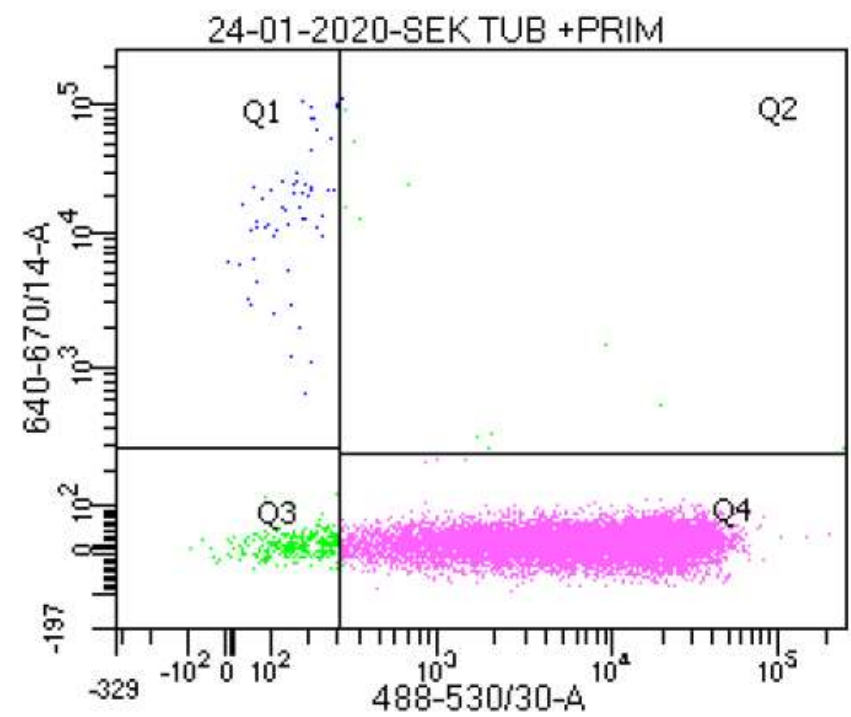
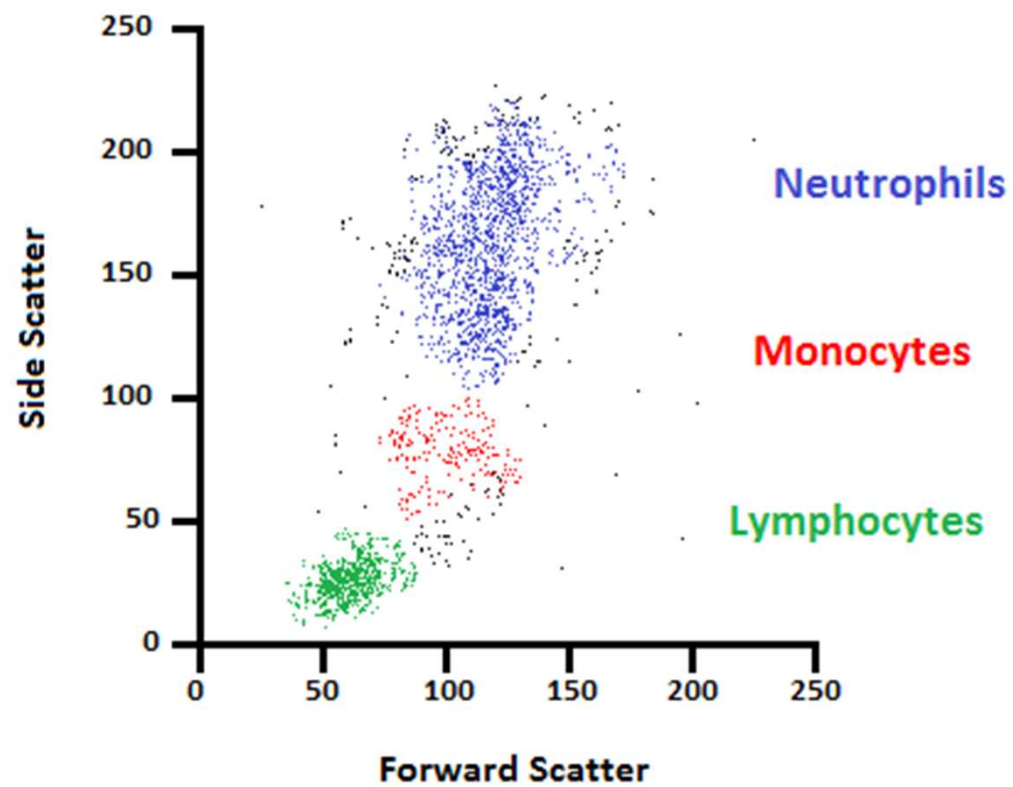
- Detekce DNA nebo RNA
- Radioaktivně značené DNA próby



Průtoková cytometrie + sorter (FACS)

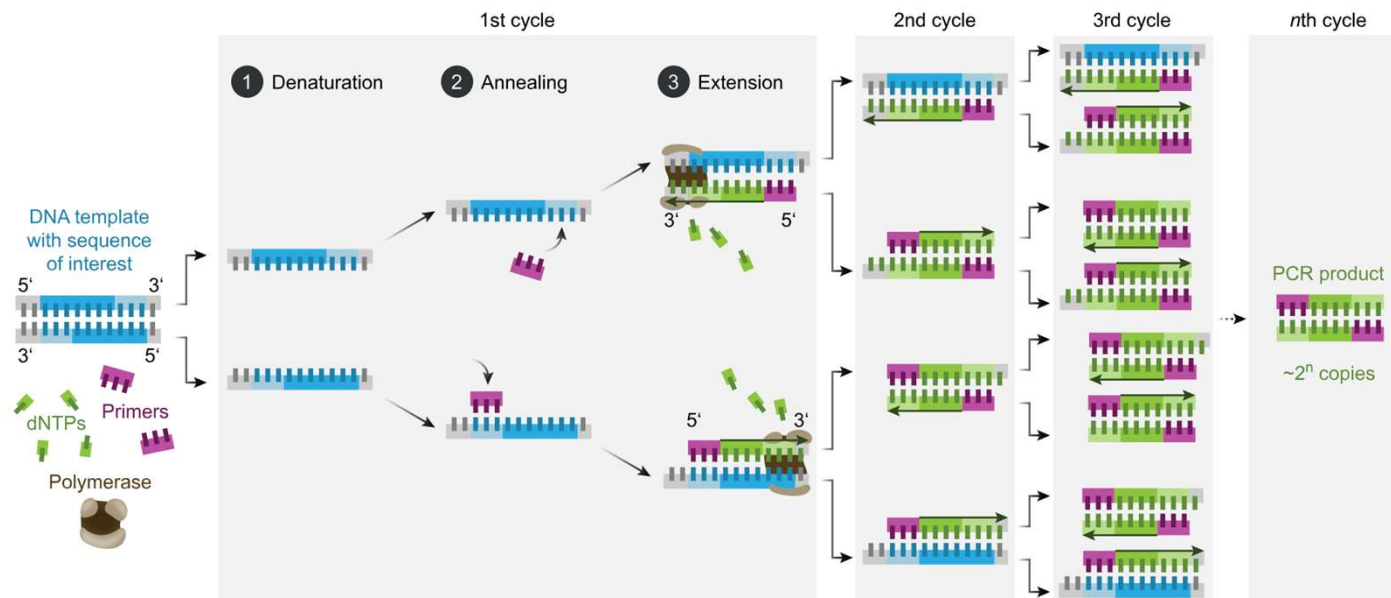
- Průtokové „měření“ buněk
- Charakterizace a kvantifikace buněk v suspenzi
- Stanovení buněčného cyklu
- Analýza krve
- Diagnostika





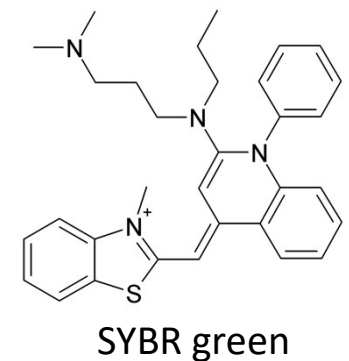
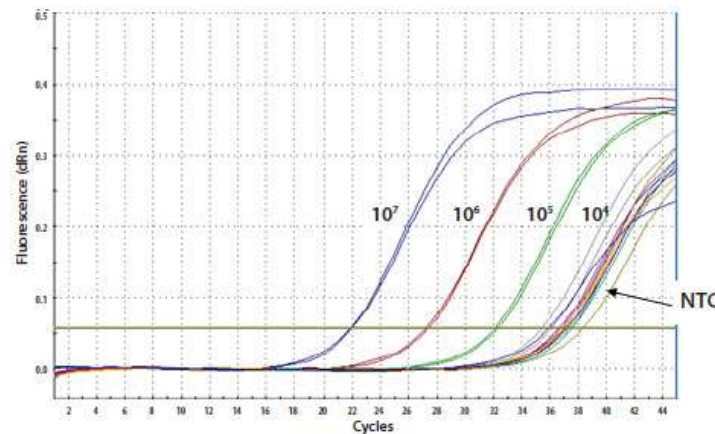
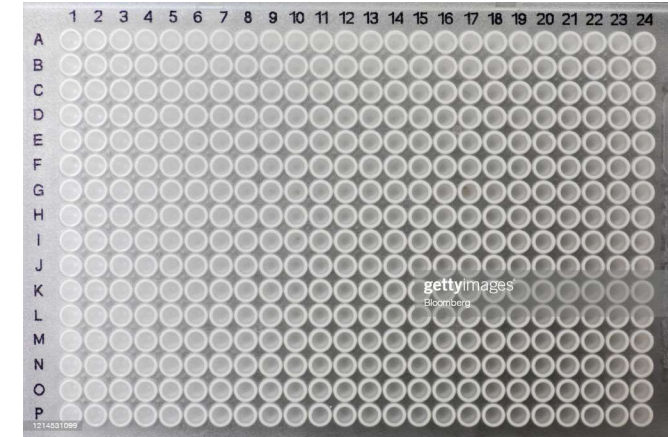
PCR (polymerázová řetězová reakce)

- Amplifikace specifického úseku DNA „ve zkumavce“
- Termostabilní DNA polymeráza (první - *Thermus aquaticus* = Taq)
- Sekvenování, analýza genů, mutageneze, genová exprese (qPCR), klonování, diagnostika, identifikace osob, paternitní test...

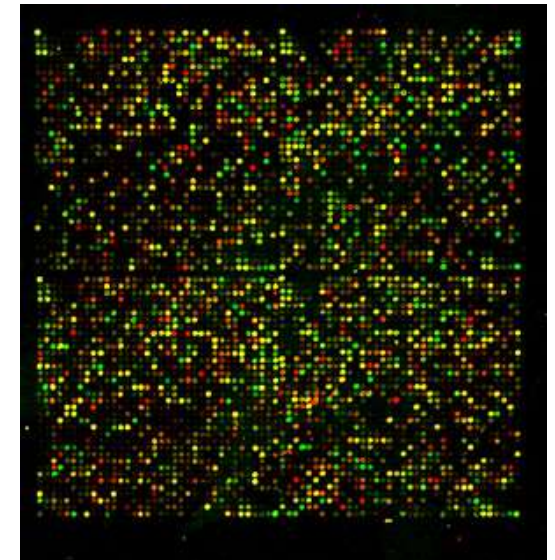
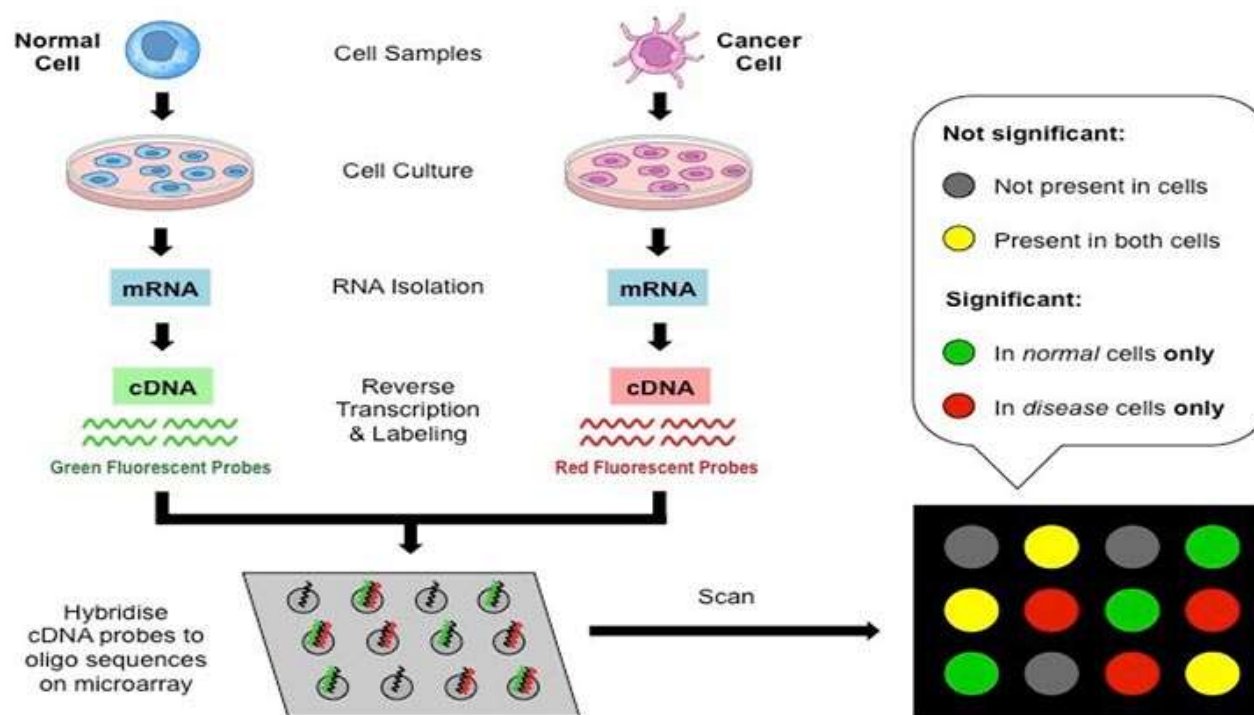


RT - PCR

- Kvantifikace RNA (absolutní x relativní)
- Izolace RNA
- Přepis do cDNA (reverzní transkripce)
- Přidání reakční směsi (pufr, polymeráza, nukleotidy, Mg^{2+} , primery, DNA – vázající fluorescenční barvička)
- qPCR přístroj (termoblok + kontinuální čtení fluorescence)
- Studium genové exprese
- Diagnostika (SARS-Cov2, rakovina...)
- Přítomnost patogenů
- Detekce GMO



DNA čipy



Tkáňové kultury

- Kultivace nejčastěji savčích buněčných „imortalizovaných“ nebo primárních kultur
- Buněčné (*in vitro*) experimenty
- Vývoj léčiv, exprese proteinů



Reportérové „eseje“

