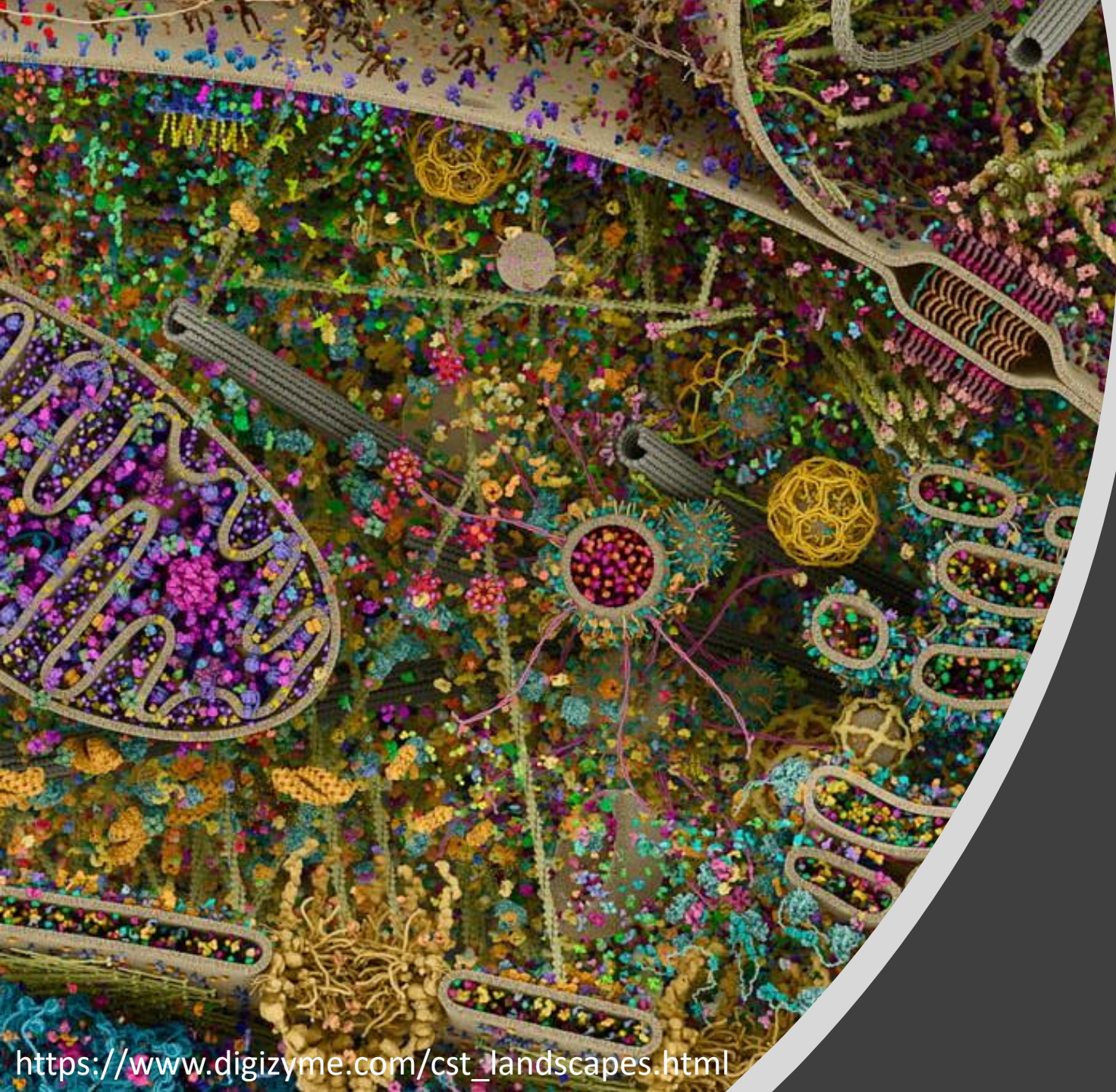




VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
V PRAZE



ÚOCHB <sup>AV</sup>  
IOCB PRAGUE

# Laboratorní metody biochemie

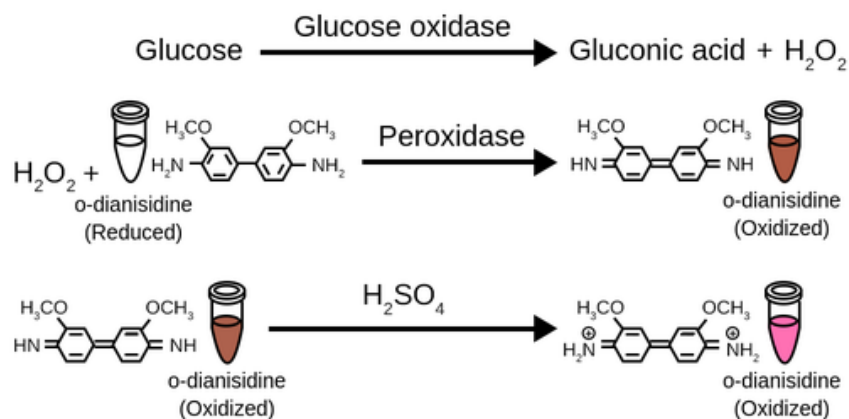
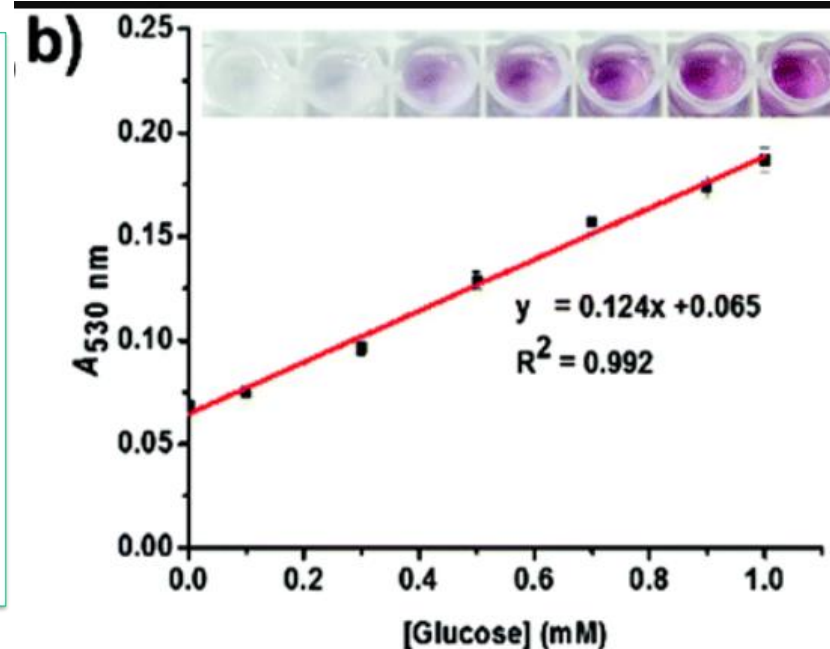
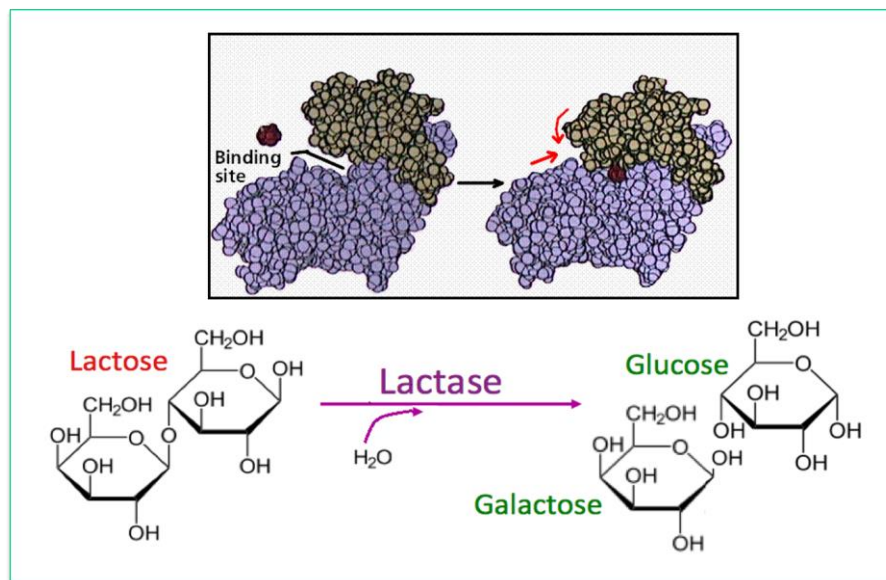
Jan Voldřich

# Obsah

- Měření aktivity enzymů
- Měření interakcí protein-ligand
- Struktura proteinů
- Elektroforetické metody
- Imunochemické metody
- PCR
- Tkáňové kultury

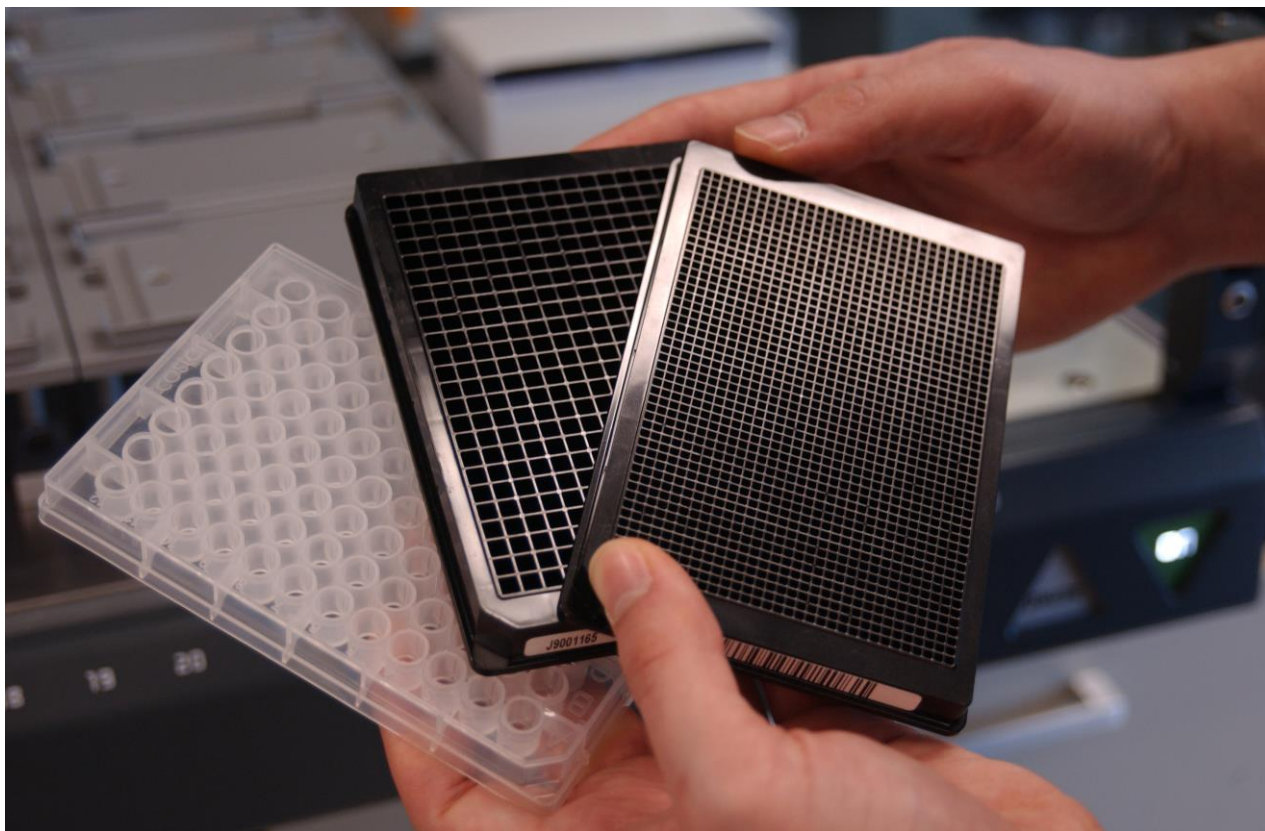
# Měření aktivity enzymů

- Vývoj léčiv
- Diagnostika
- $a = \frac{n}{t}$

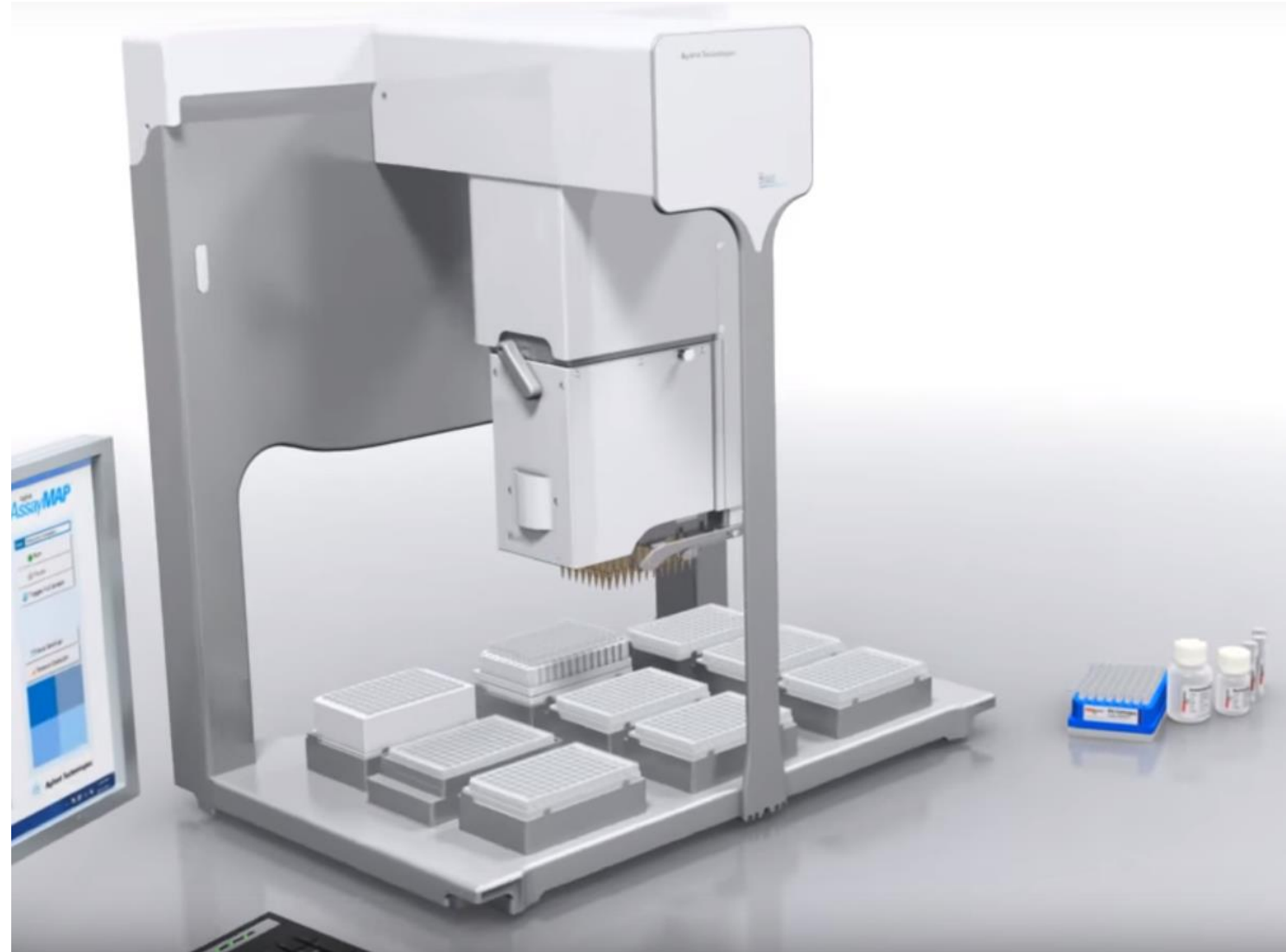


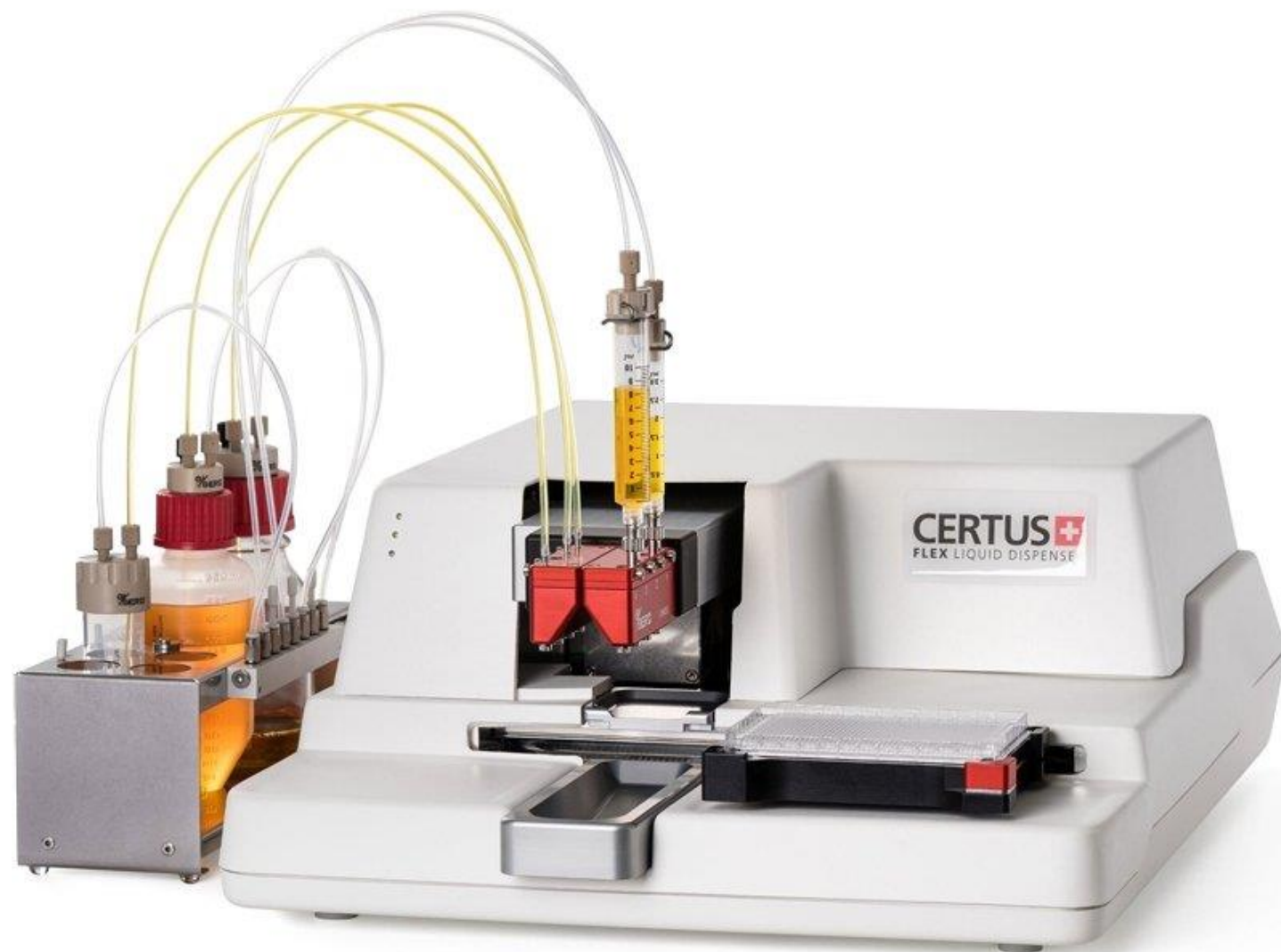
- Spektrofotometrická detekce
  - Absorbance
  - Fluorescence
  - Luminiscence

# Instrumentace



- Pipetovací stroje





ECHO



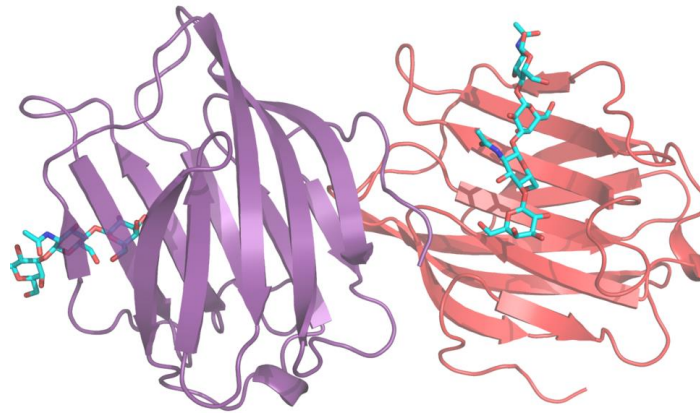
## Multiwell readery

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



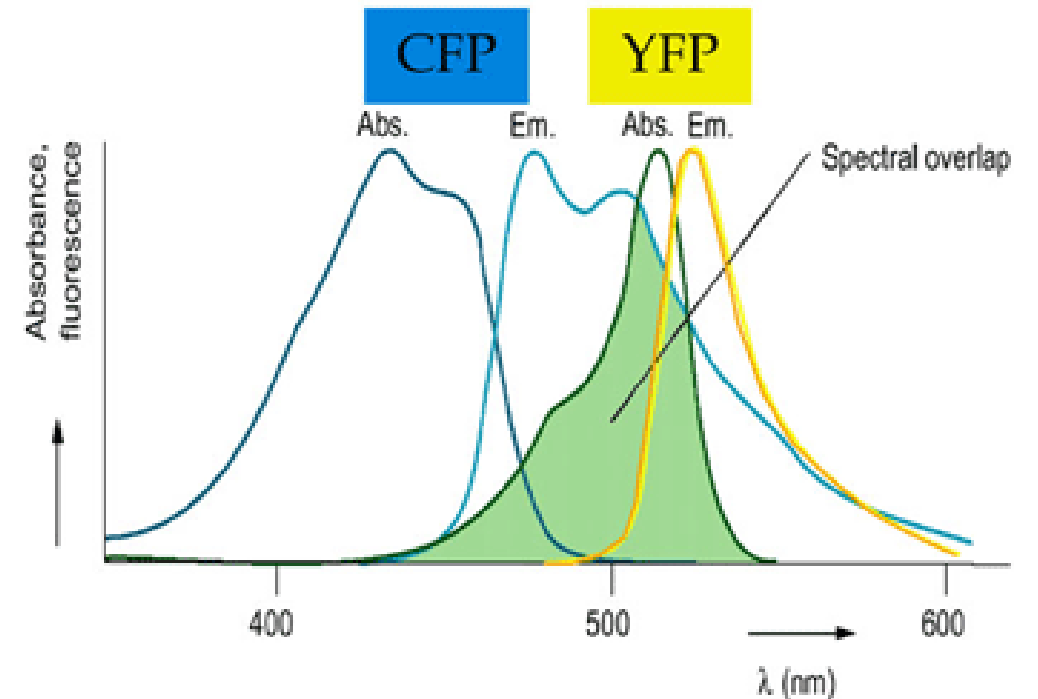
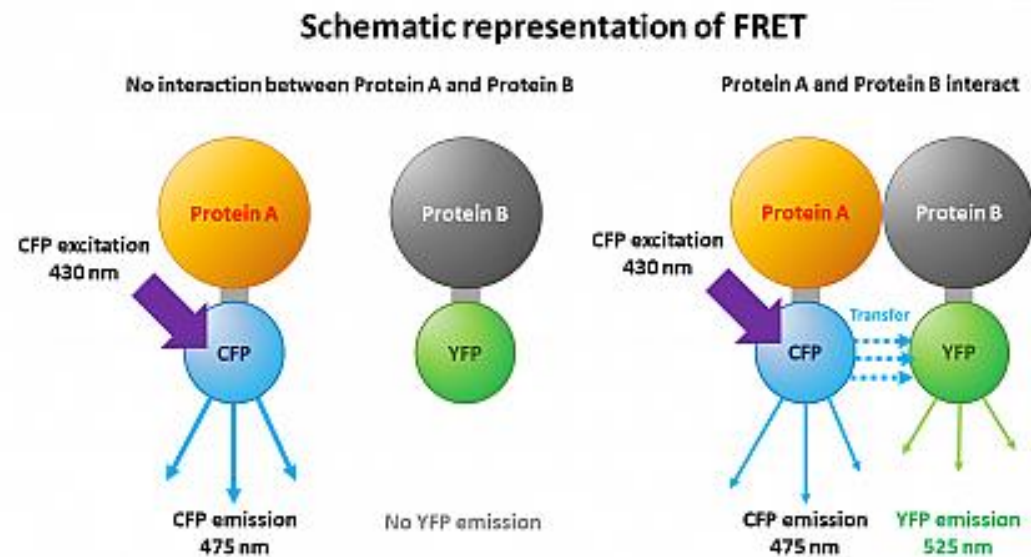
# Měření interakcí protein-ligand

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

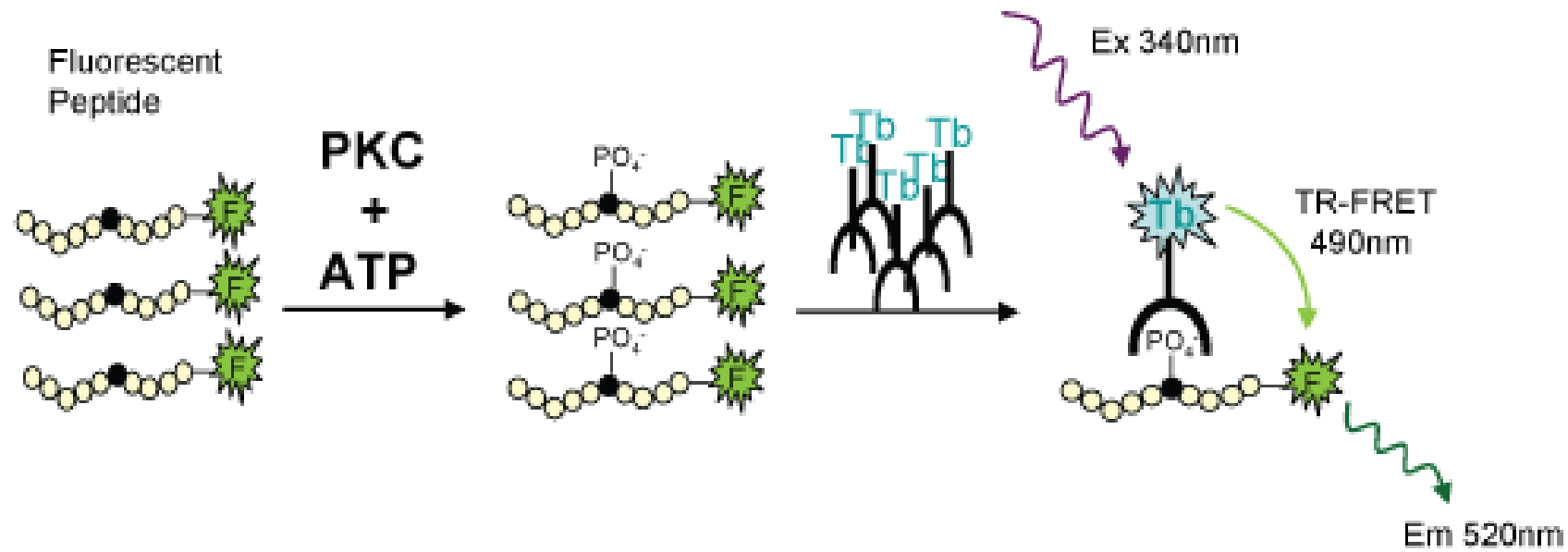


# FRET

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

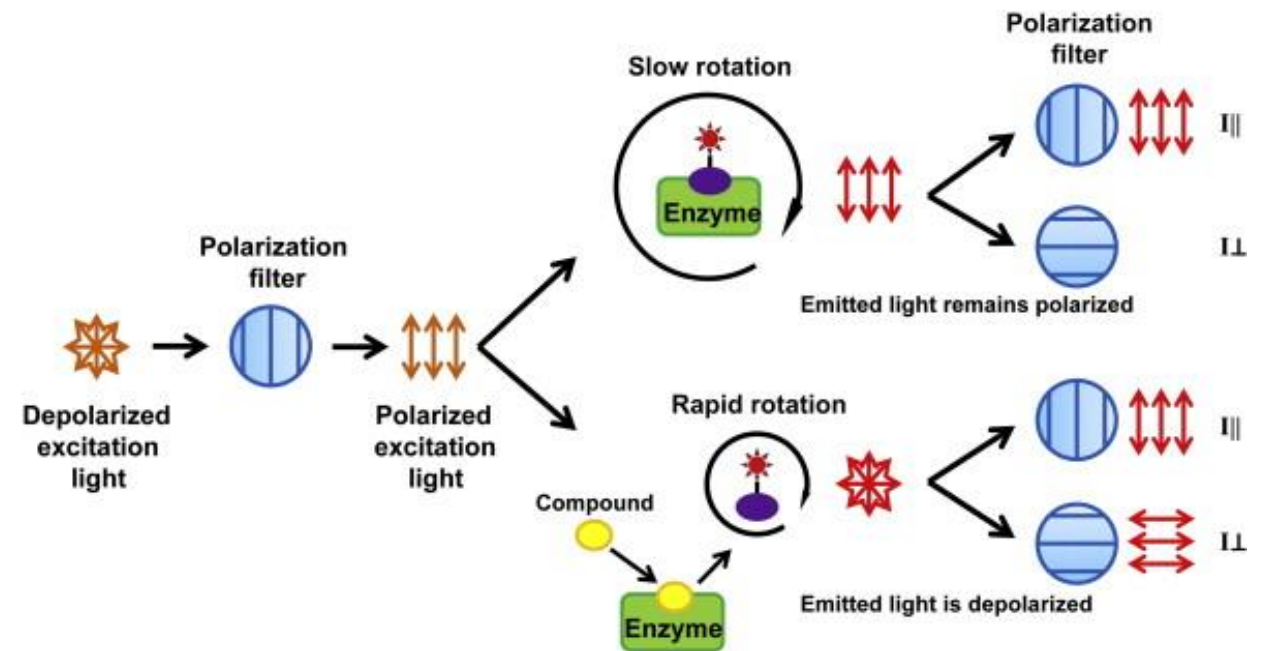
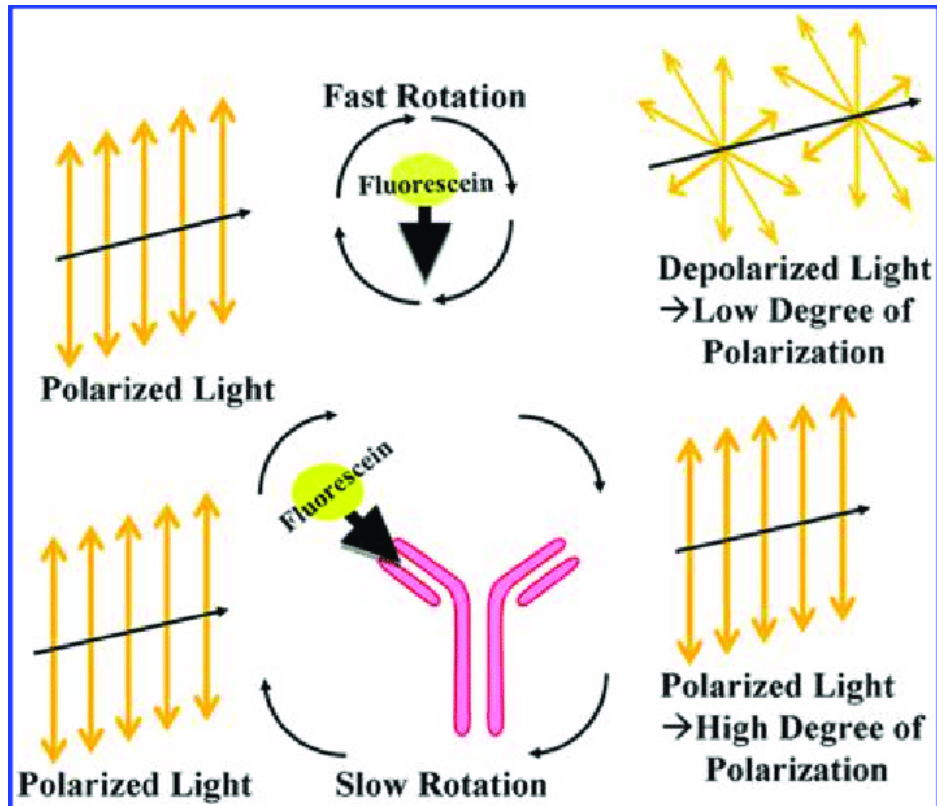


- Lanthascreen
  - Studium aktivty kináz



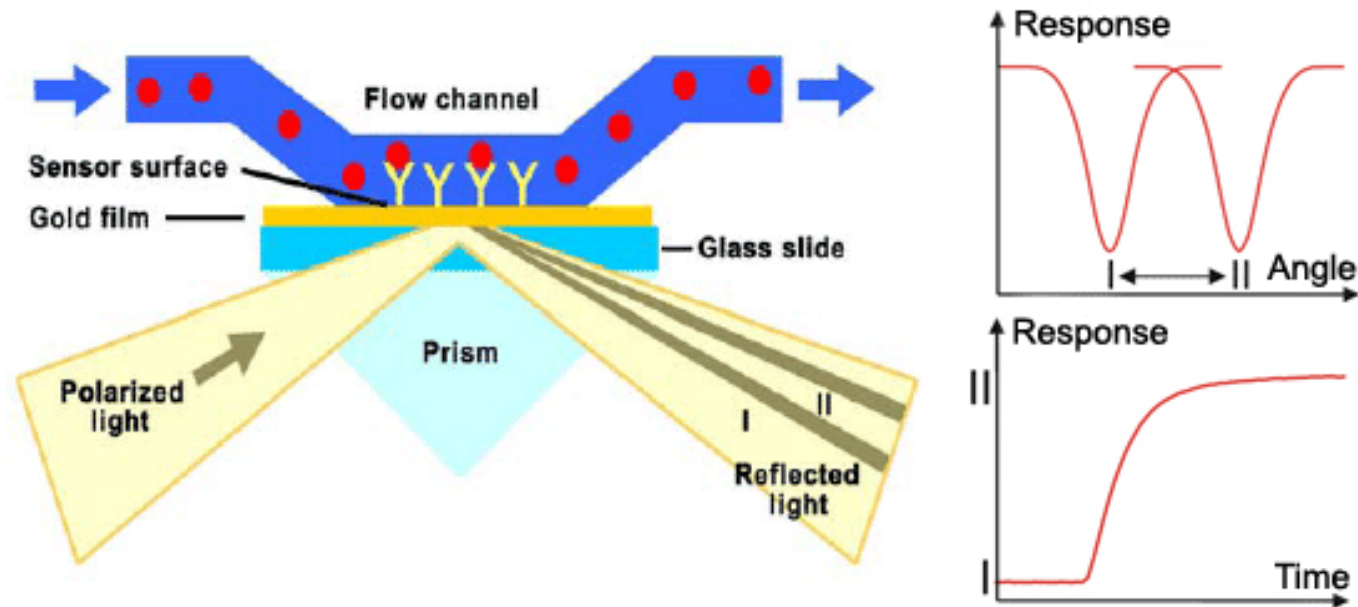
## Polarizovaná fluorescence

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



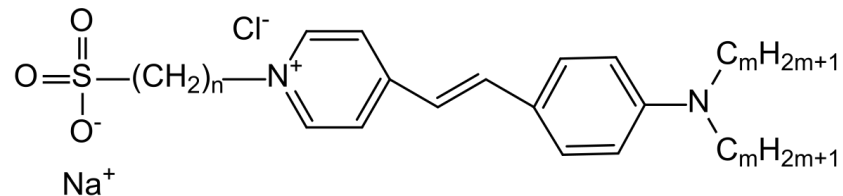
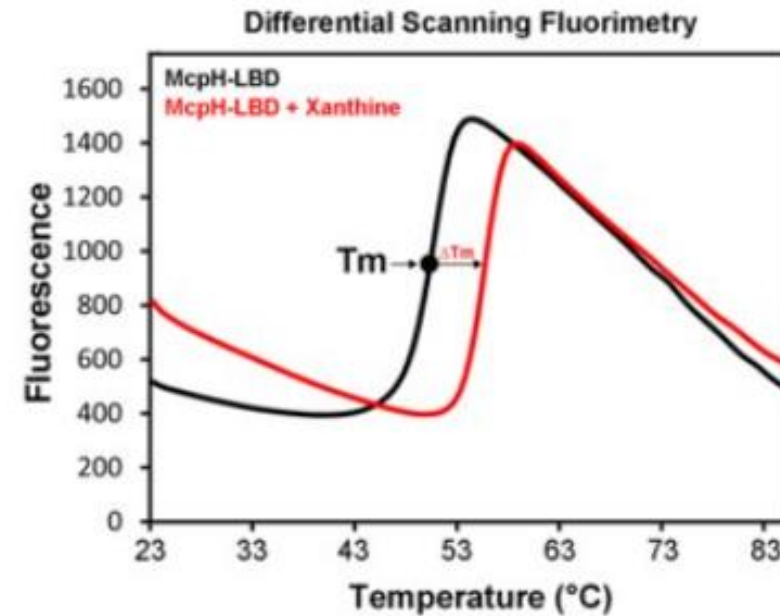
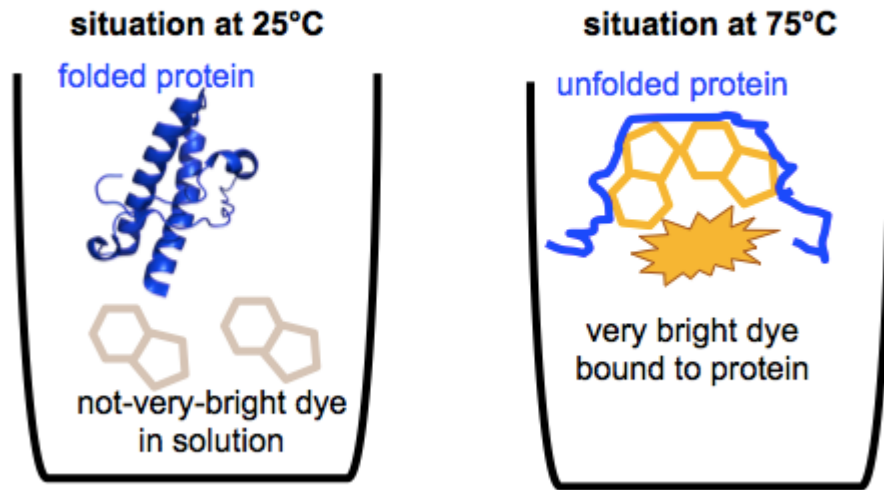
# SPR (rezonance povrchového plazmonu)

- Imobilizace jednoho partnera na zlatý povrch
- Plazmonová vlna (redukce intenzity světla po odrazu)
- SPR úhel (index lomu)
- Protein-protein, protein malá molekula, protein-DNA/RNA



# DSF (differential scanning fluorimetry)

## DSF assay principle



SYPRO orange

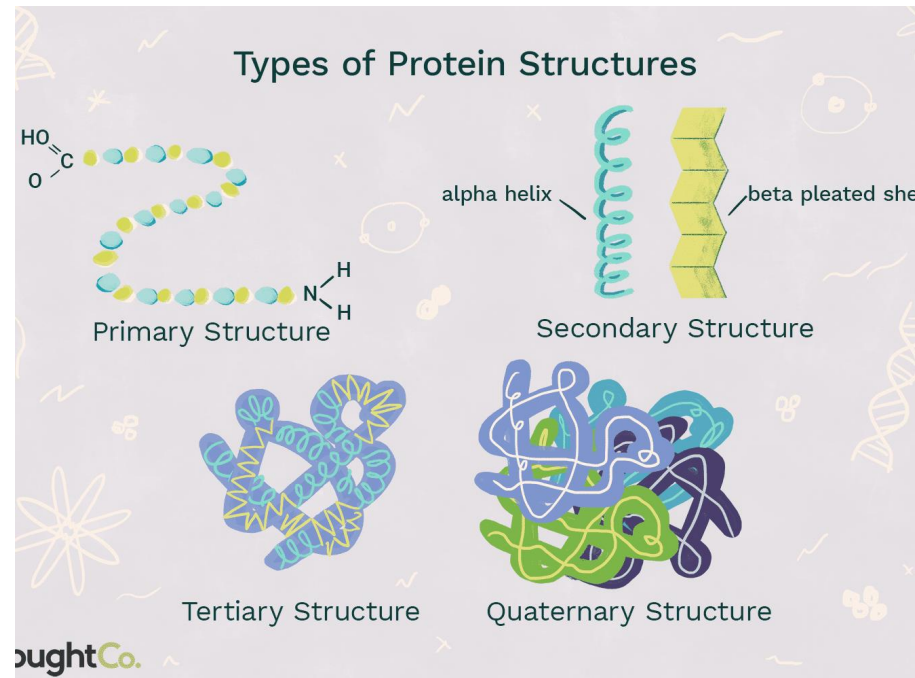
# FISH (Fluorescence in situ hybridization)

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

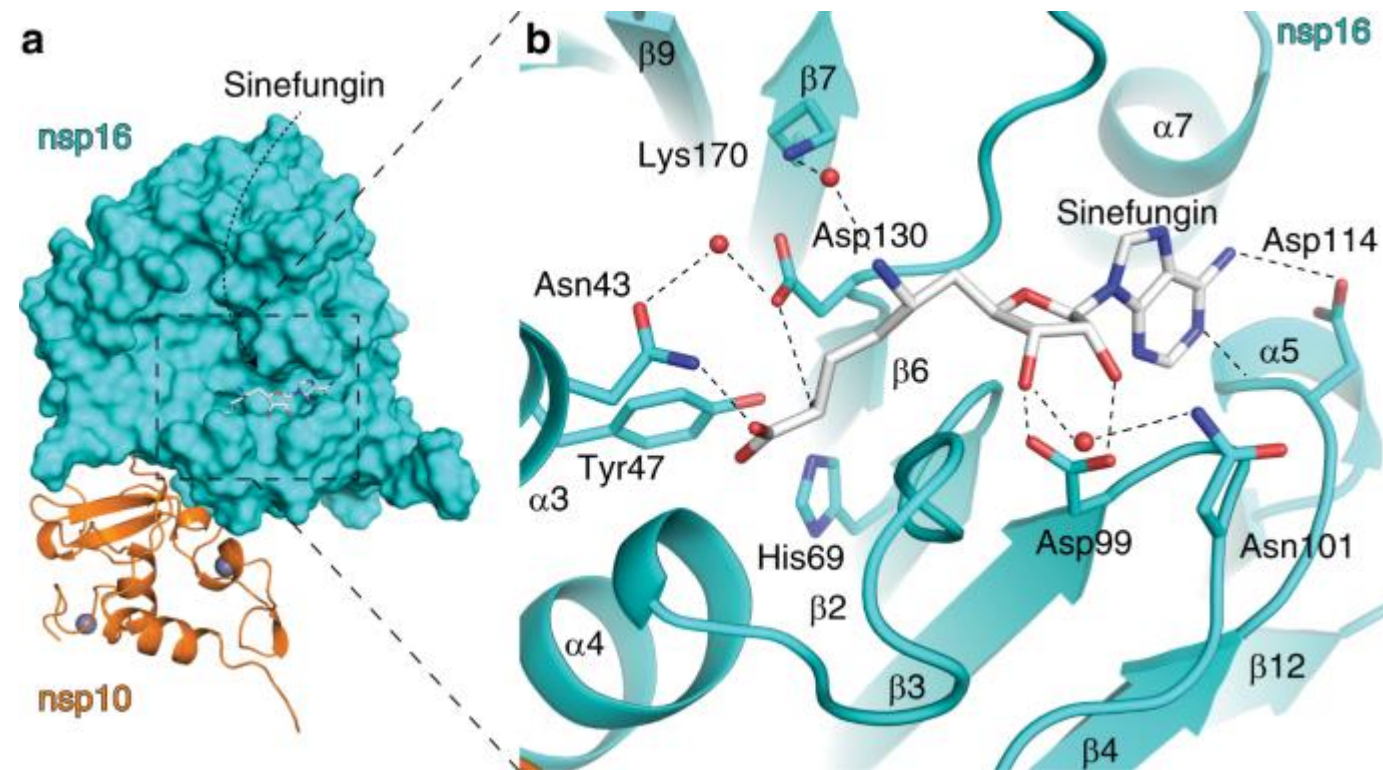
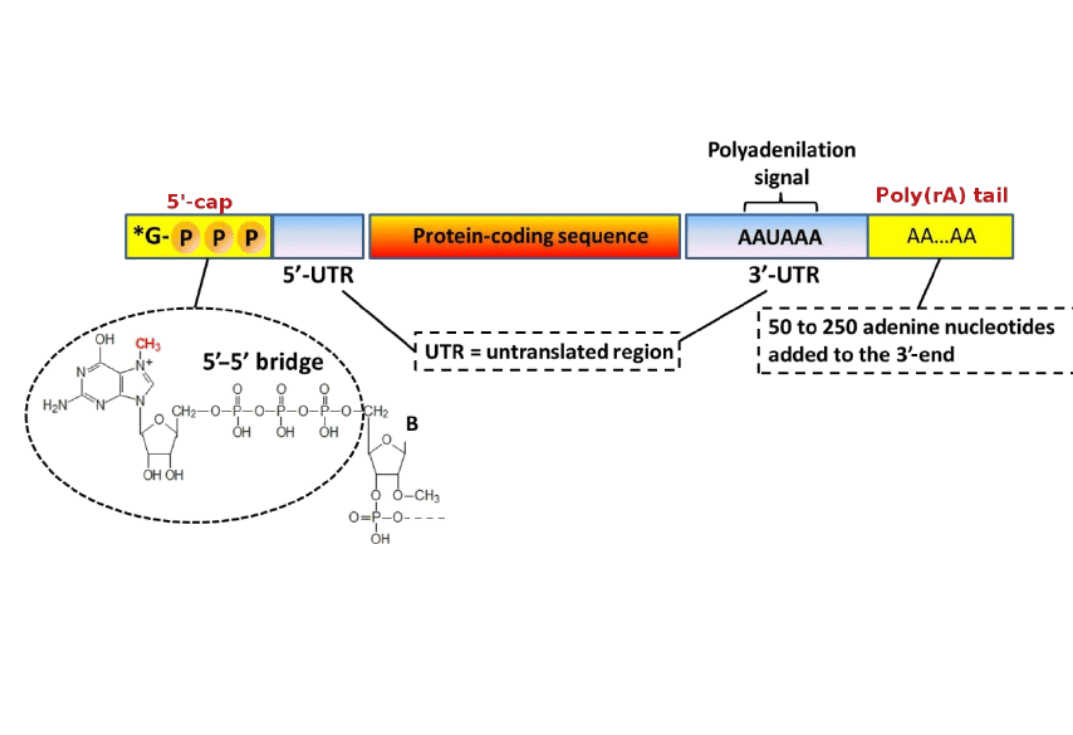


# Struktura proteinů

- 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

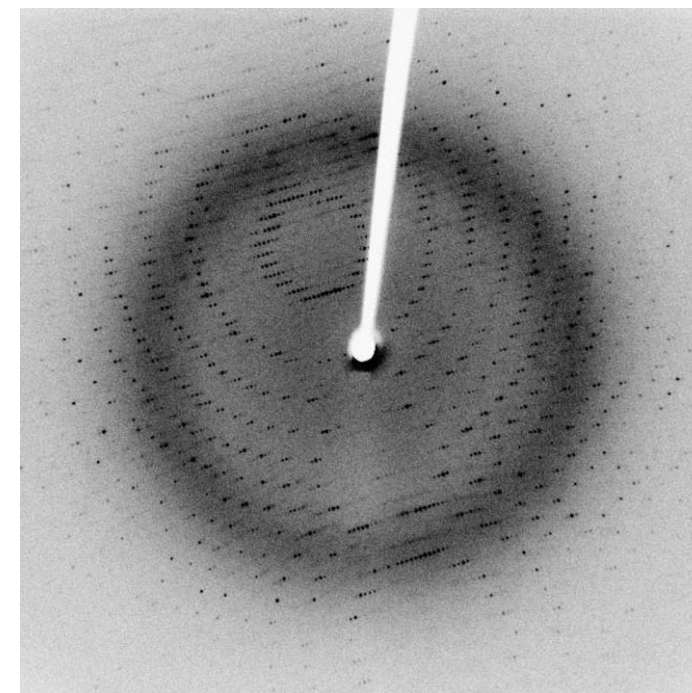
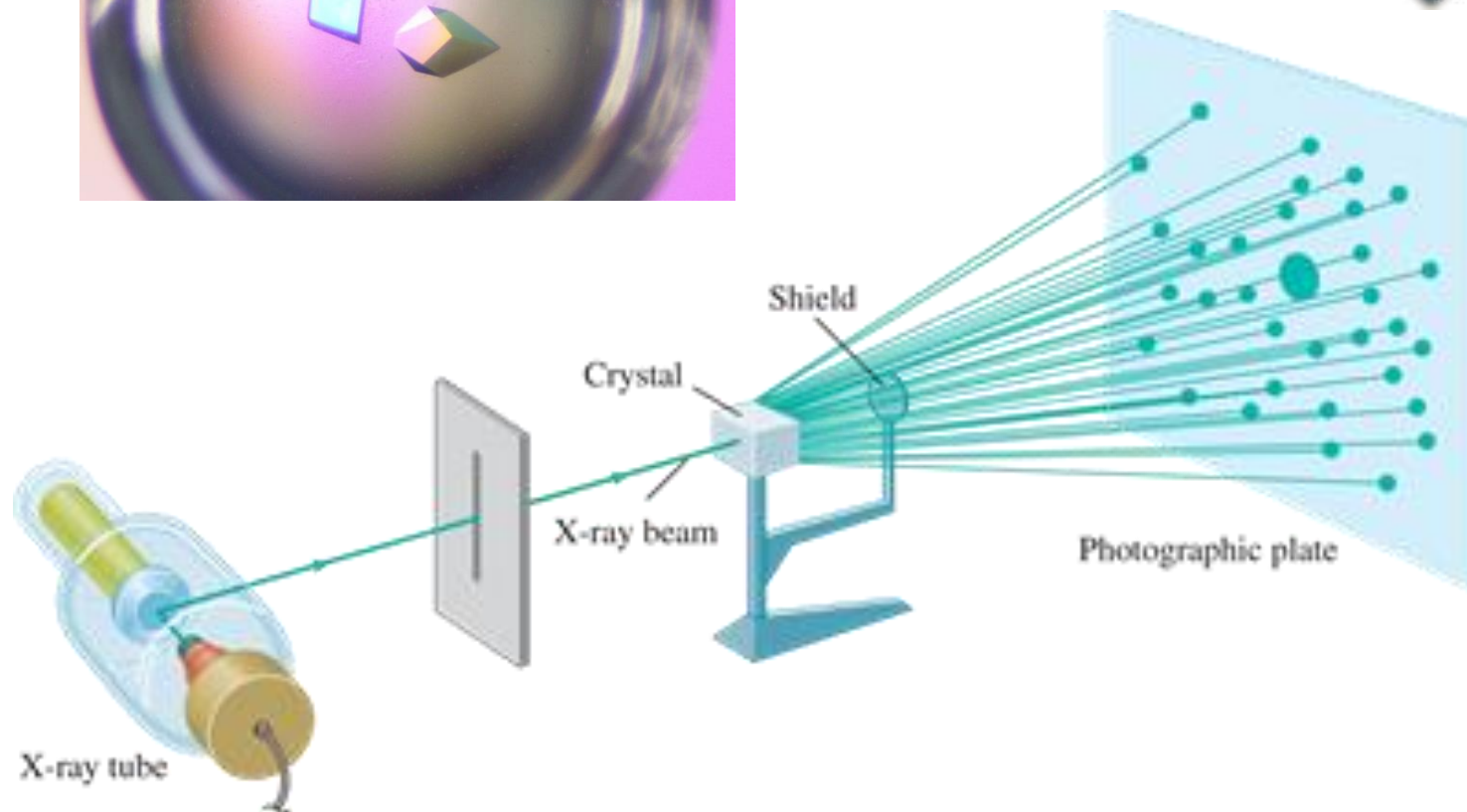
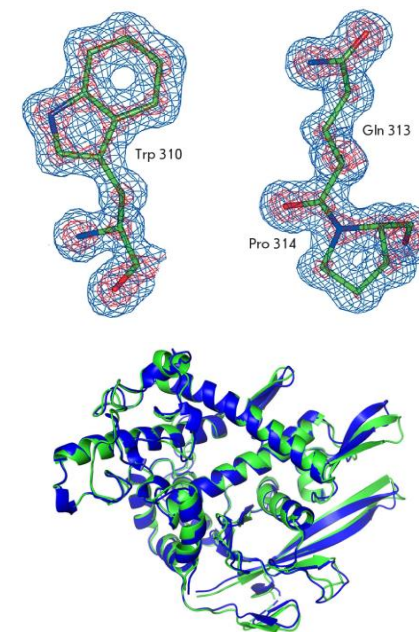
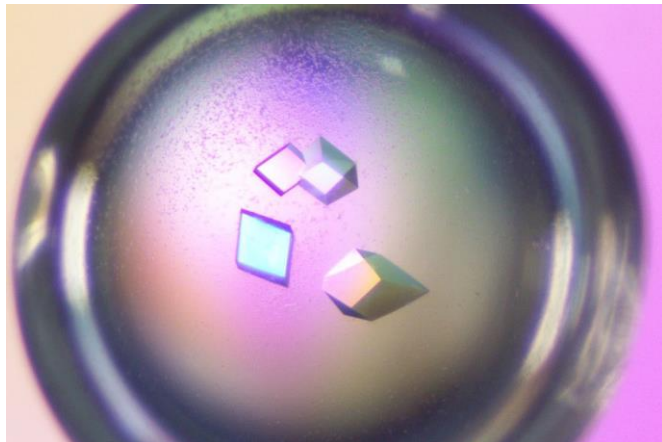


Krafčíková, P., Silhan, J., Nencka, R. *et al.* Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nat Commun* **11**, 3717 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17495-9>

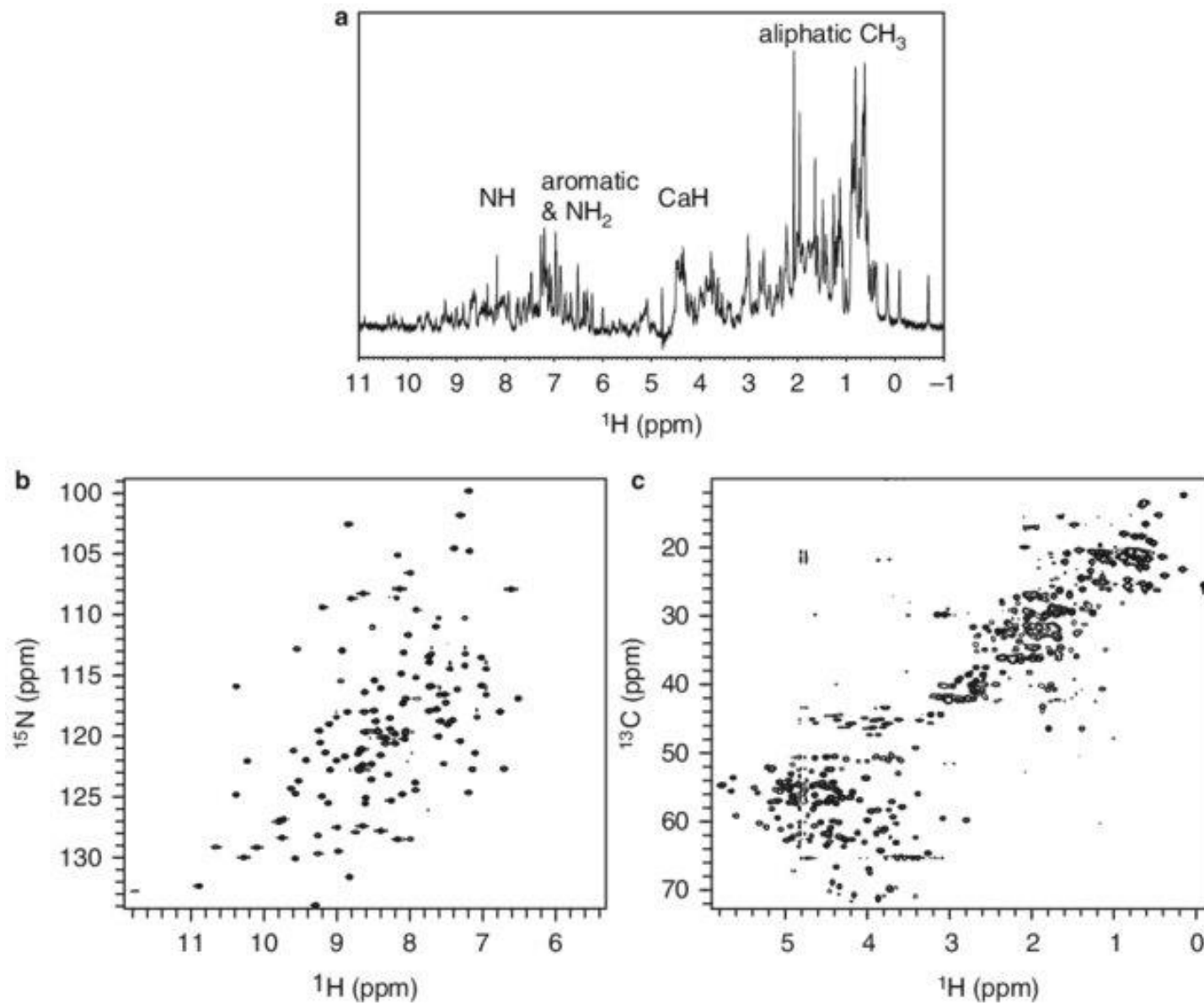
# Produkce rekombinantních proteinů

- 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

# Rentgenová krystalografie

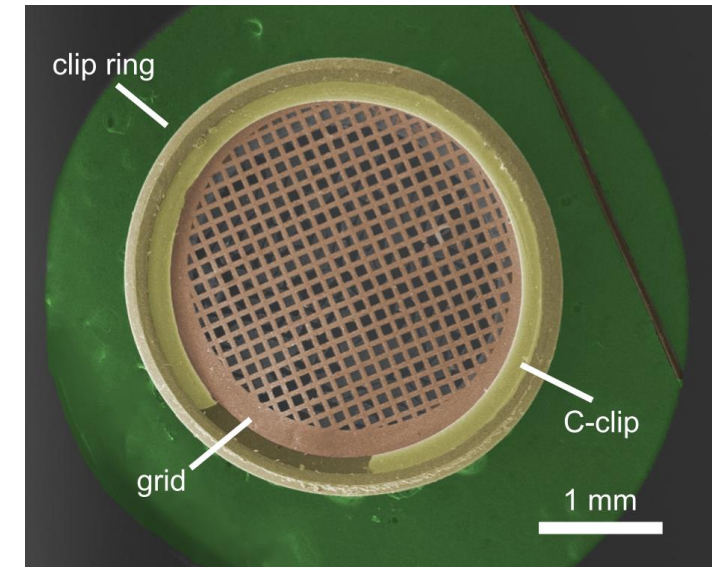
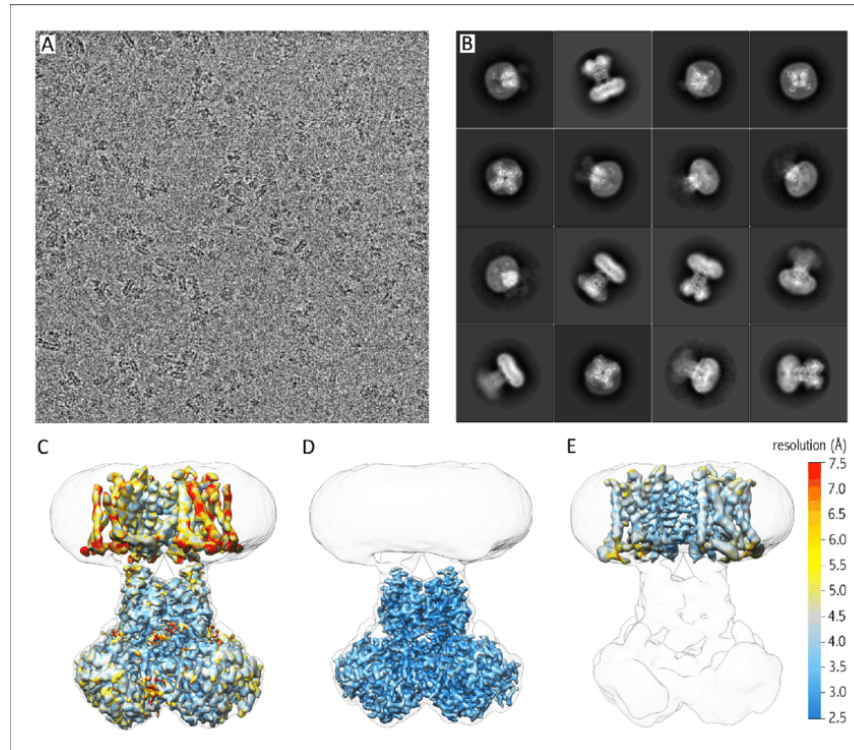


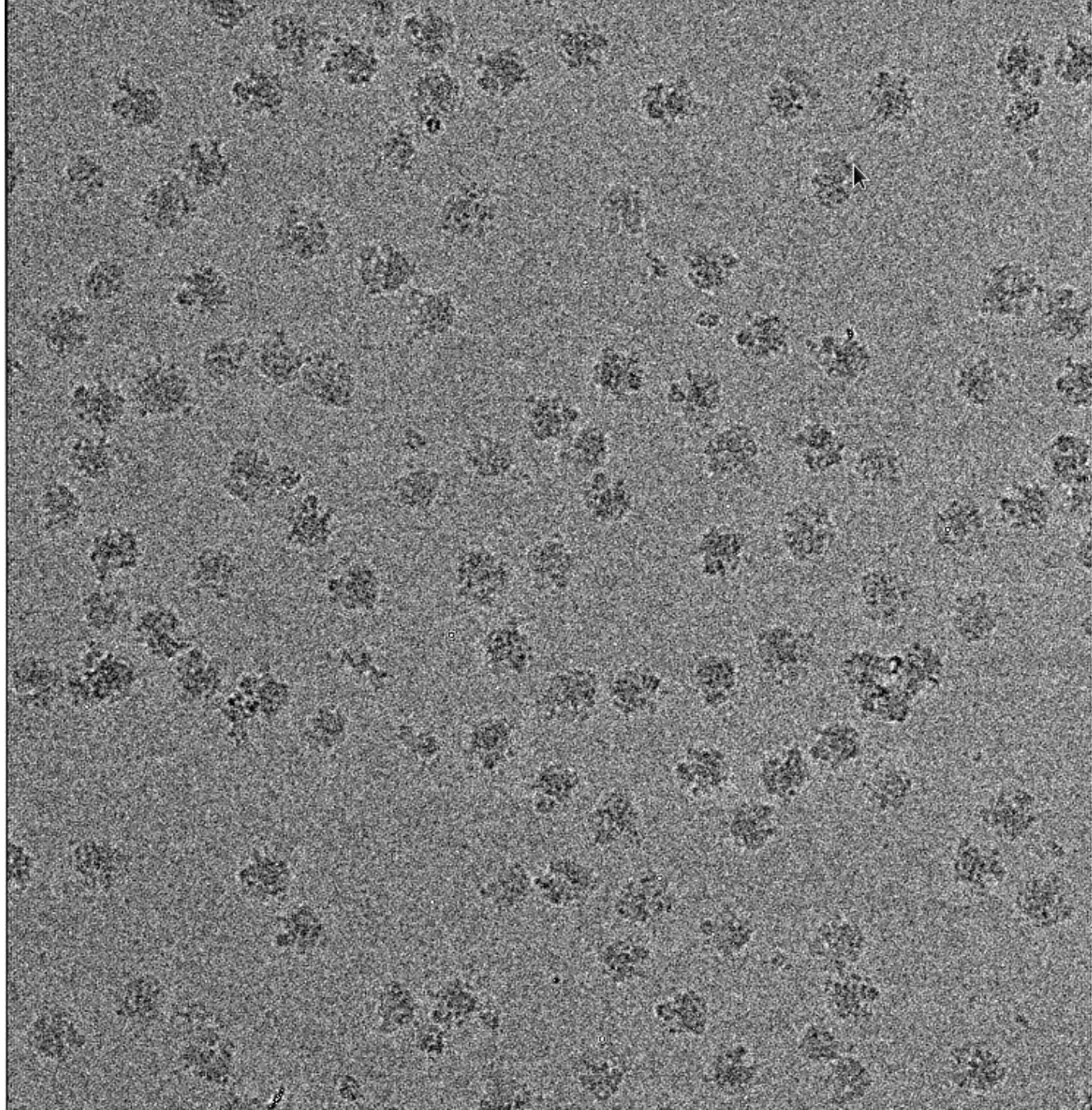
# 2D-NMR



# Cryo-EM

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





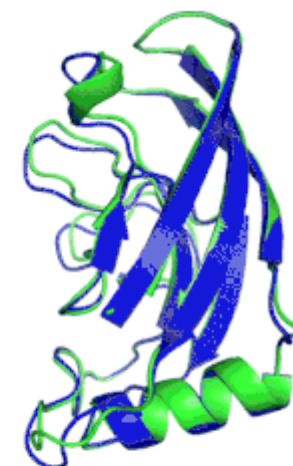
# AlphaFold

- Soutěž CASP
- Strojové učení

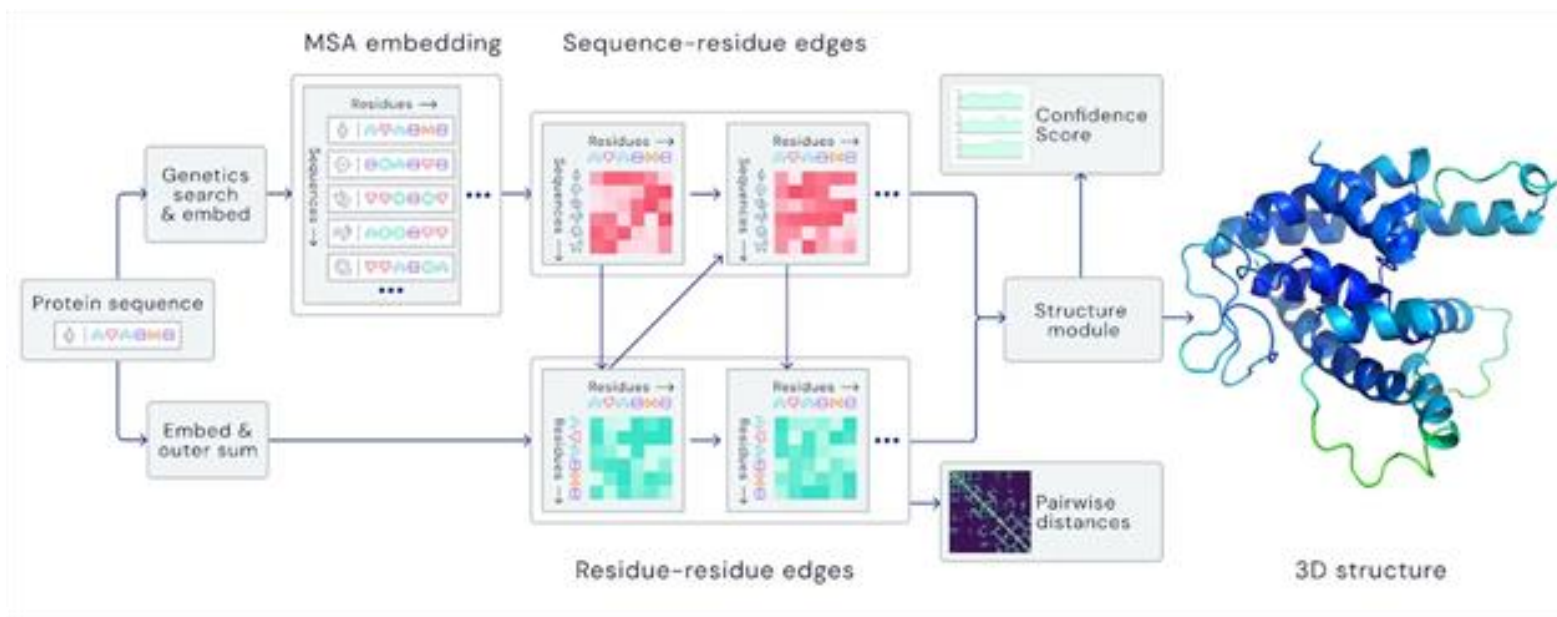
Median Free-Modelling Accuracy



T1037 / 6vr4  
90.7 GDT  
(RNA polymerase domain)



T1049 / 6y4f  
93.3 GDT  
(adhesin tip)

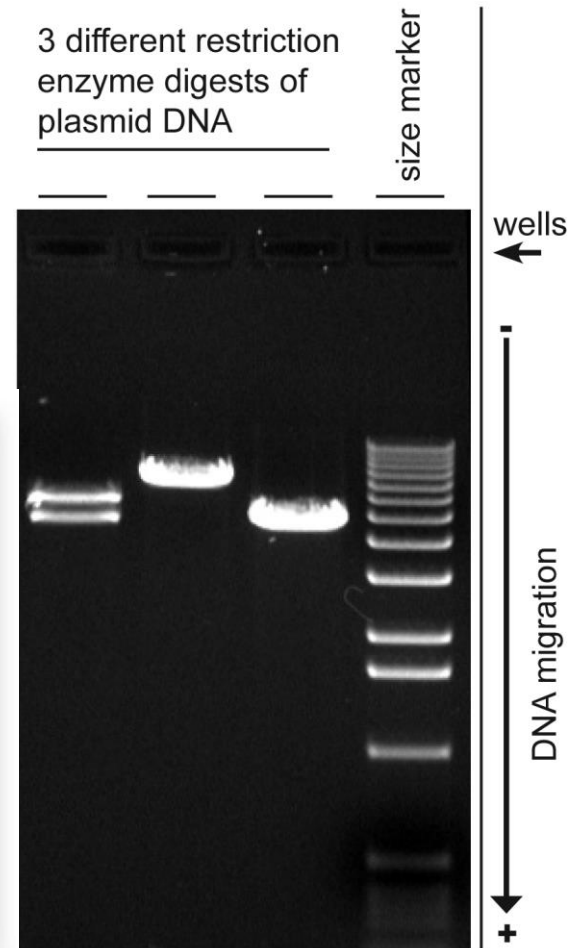
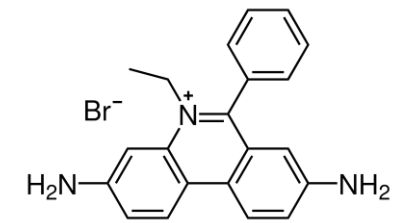
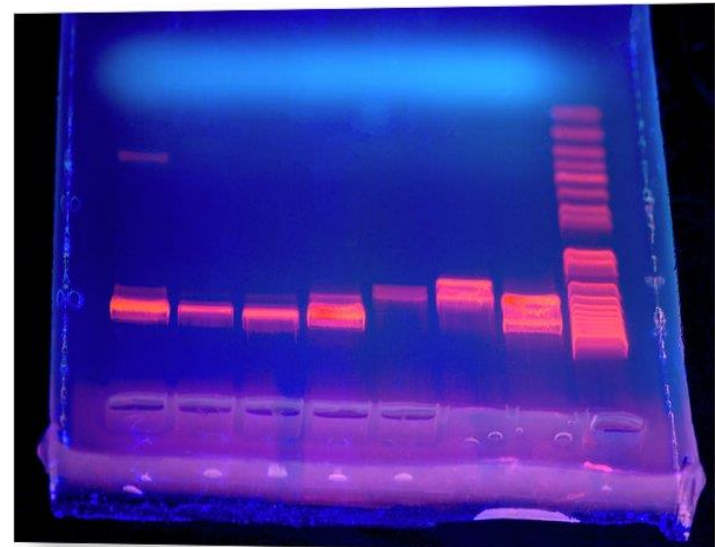
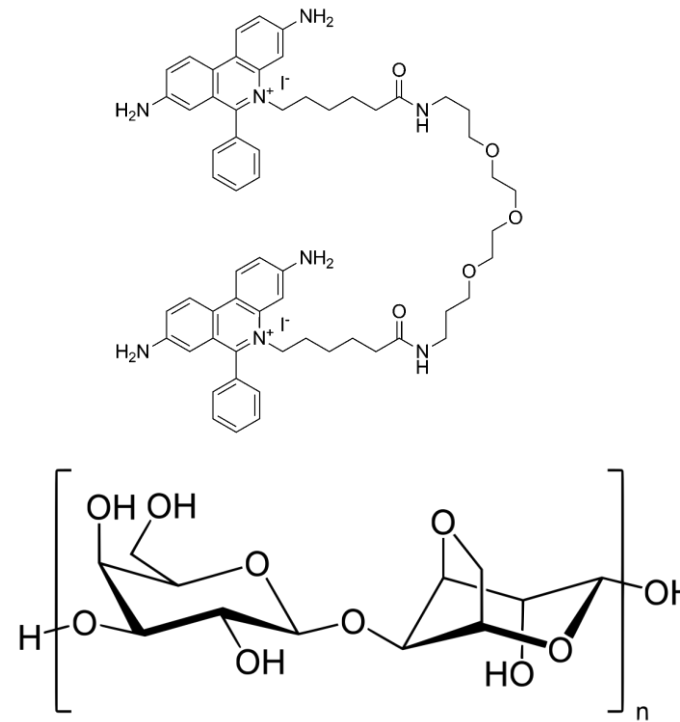
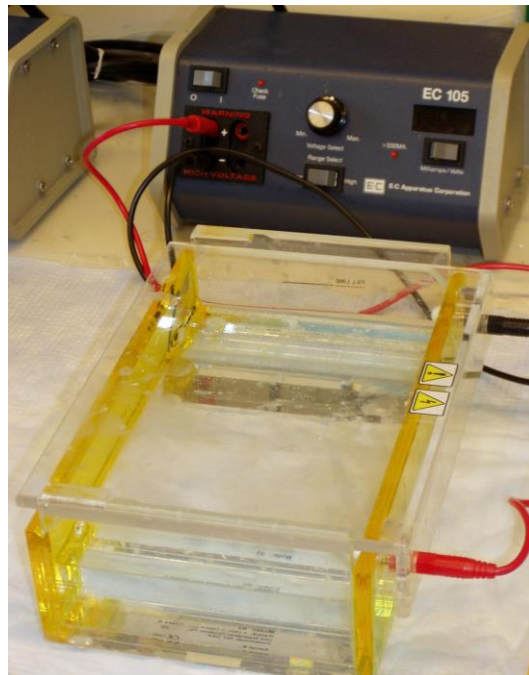


# Elektroforetické metody

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

# Agarozová elfo

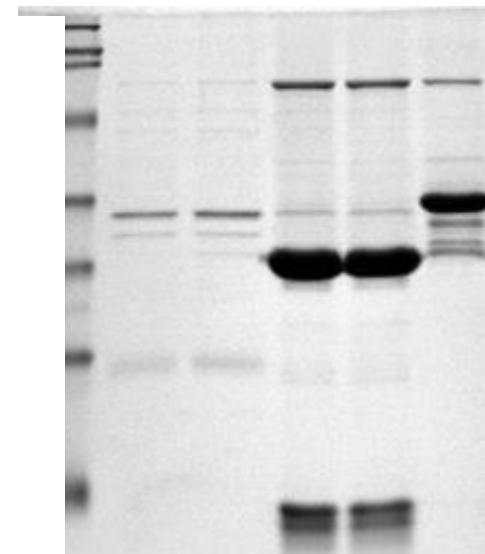
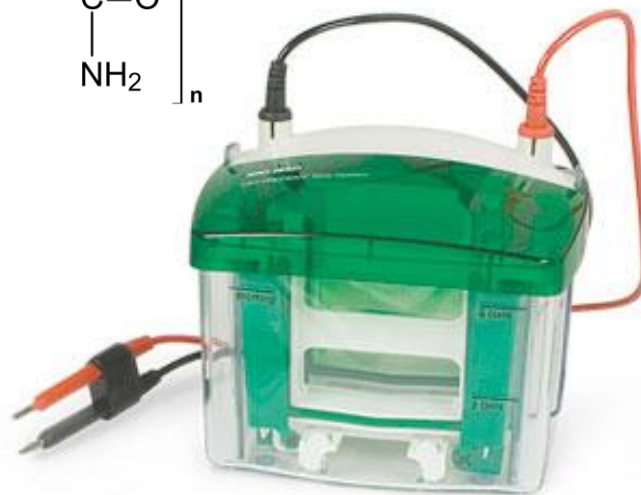
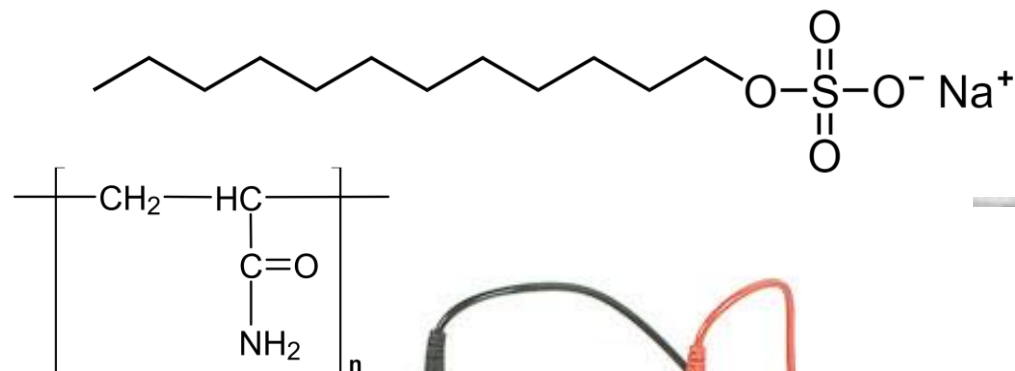
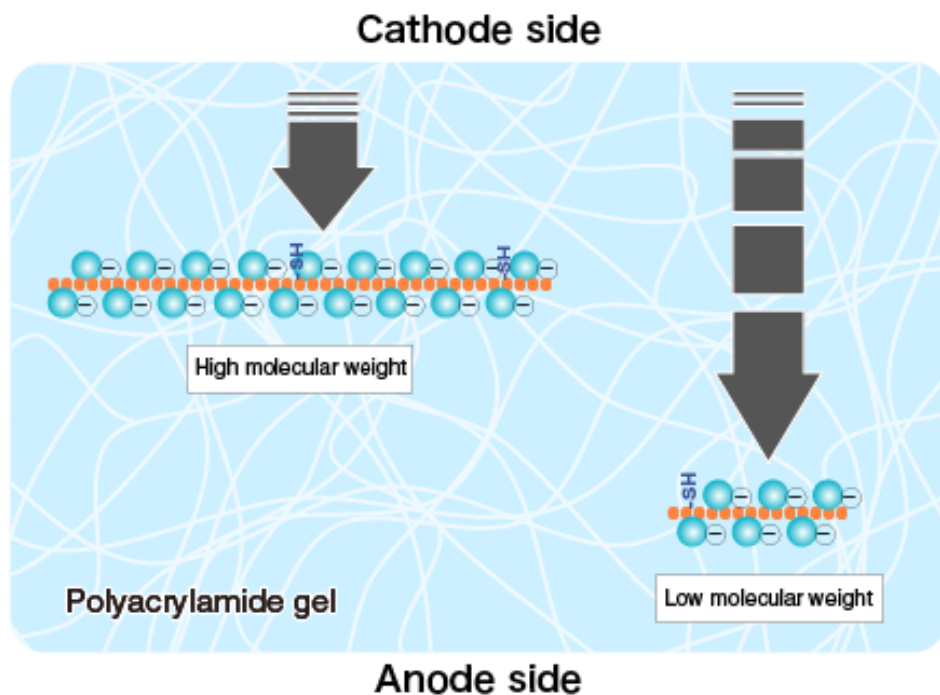
- DNA/RNA, proteiny
- 0,3%-2%



# SDS - PAGE

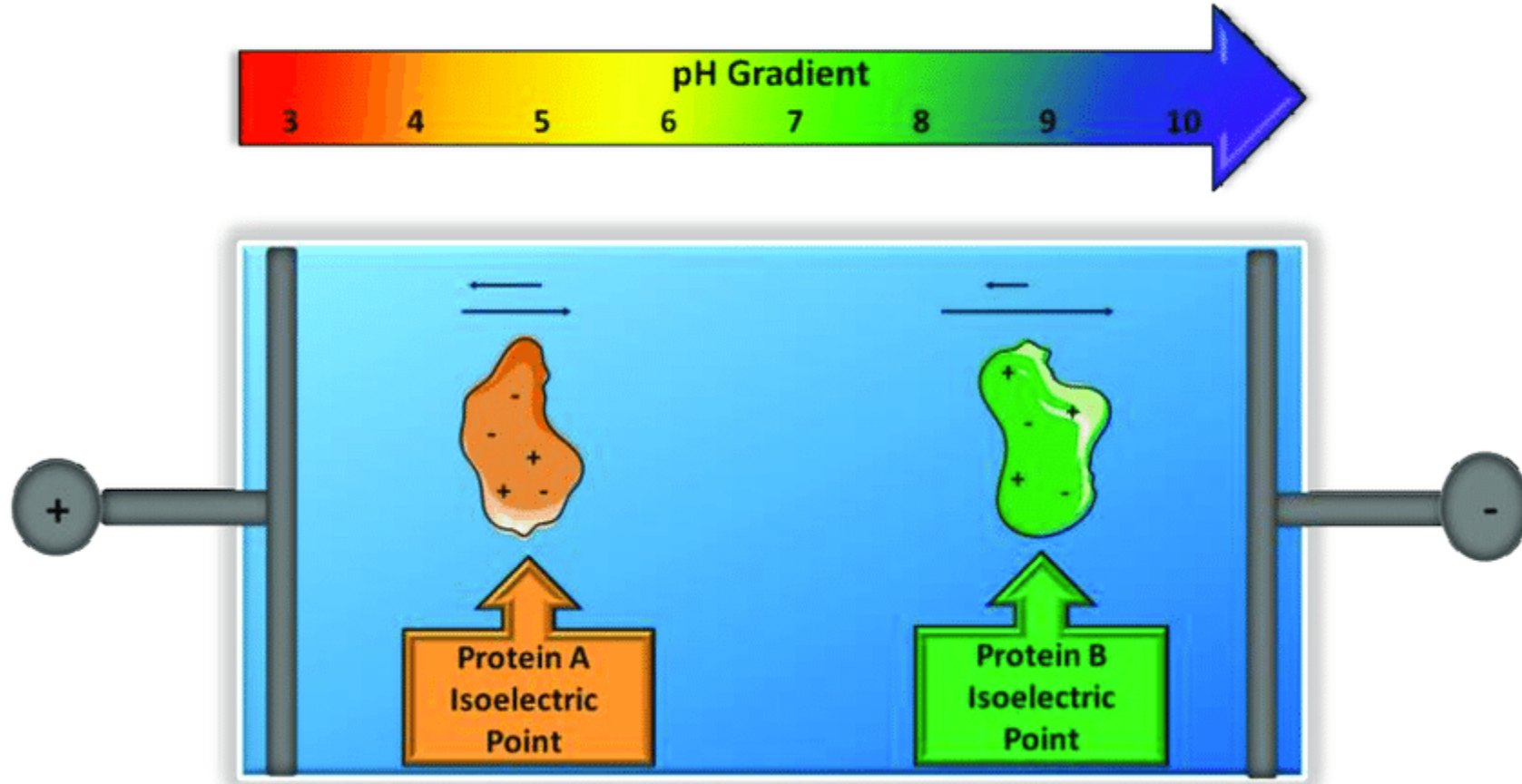
- Polyakrylamidová denaturační ELFO
- Dodecylsírán sodný
- Proteiny

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



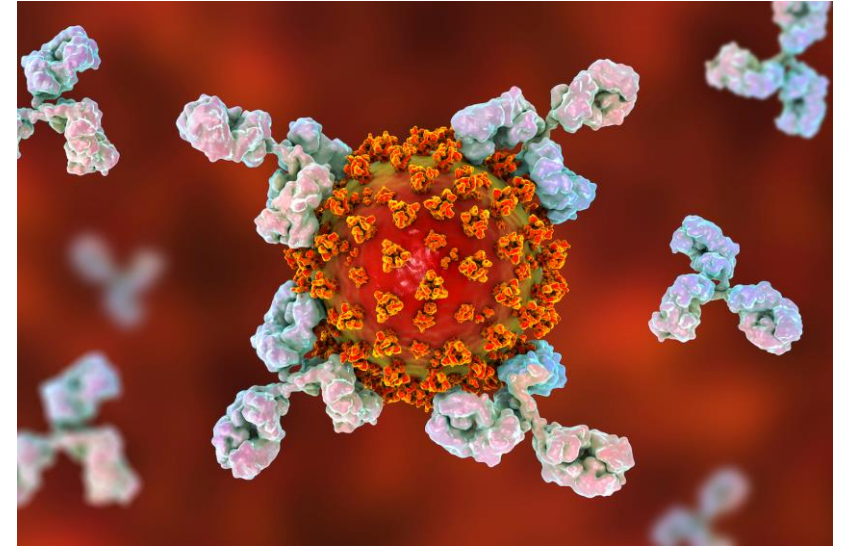
|                              | Separating gel <sup>a</sup> |      |      | Stacking gel |
|------------------------------|-----------------------------|------|------|--------------|
|                              | 7.5%                        | 10%  | 12%  | 4%           |
| 30% Acr Bis (mL)             | 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 <sub>2</sub> 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

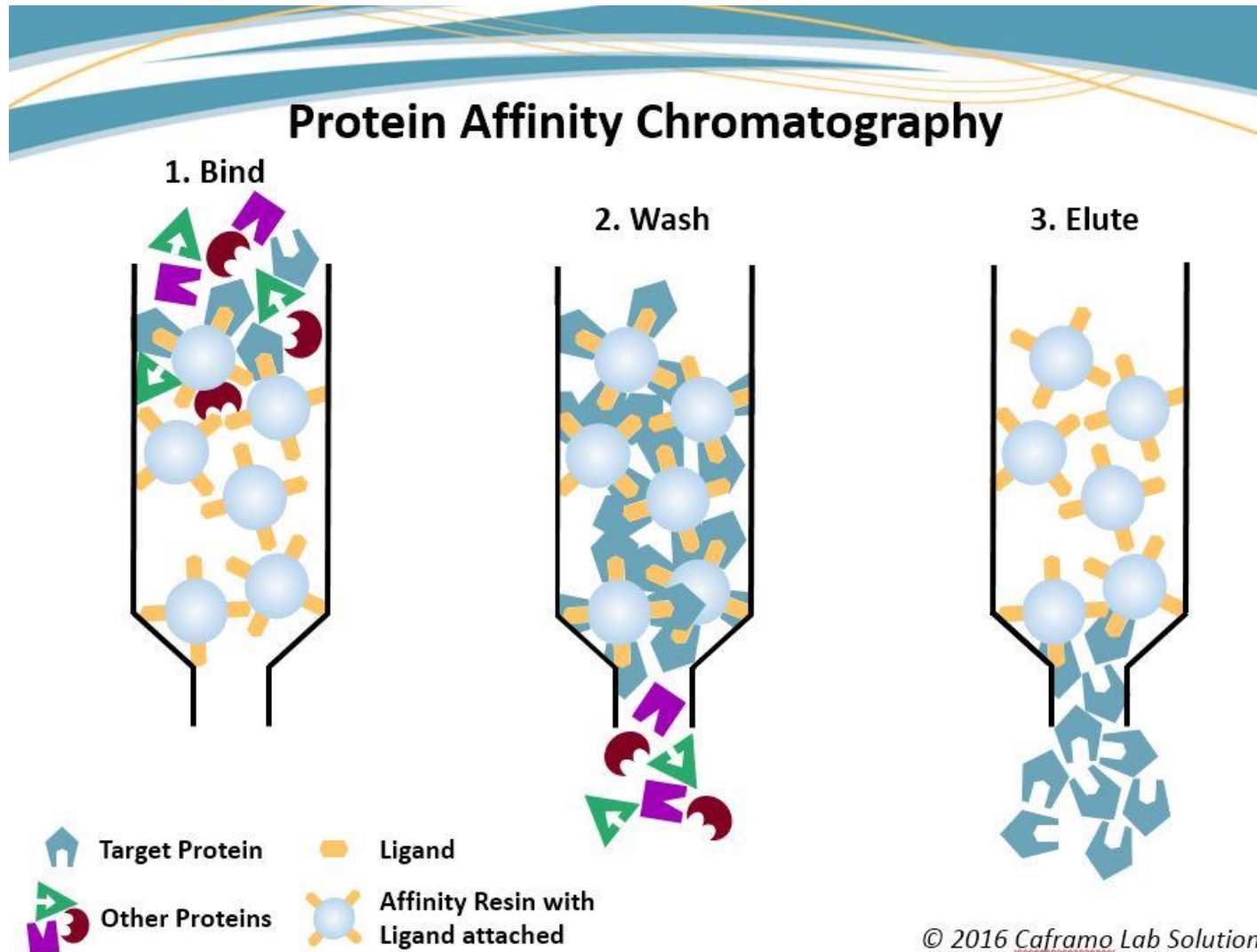


# Imunochemické metody

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

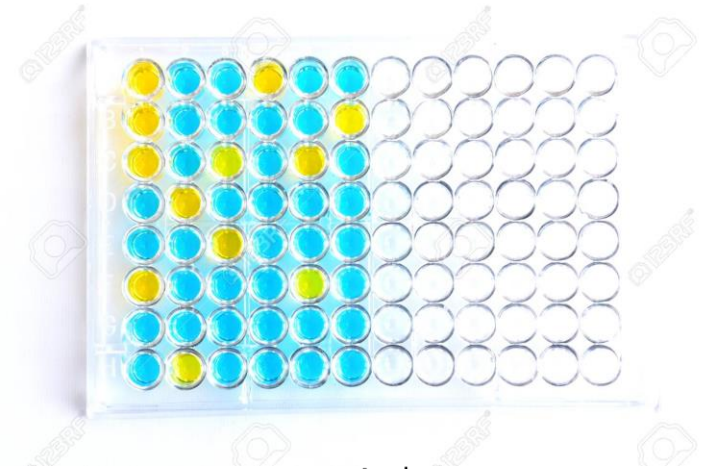


# Afinitní chromatografie

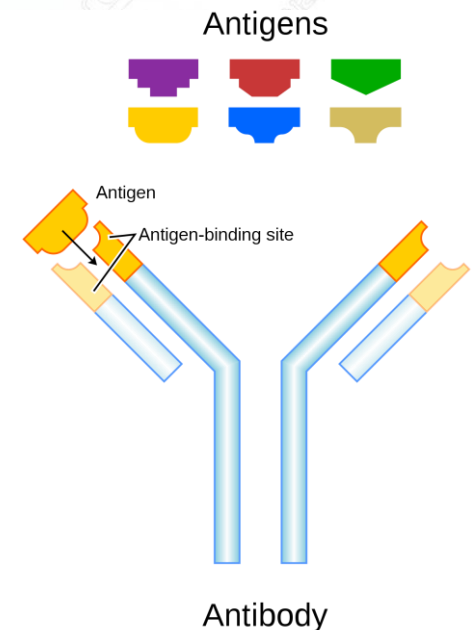
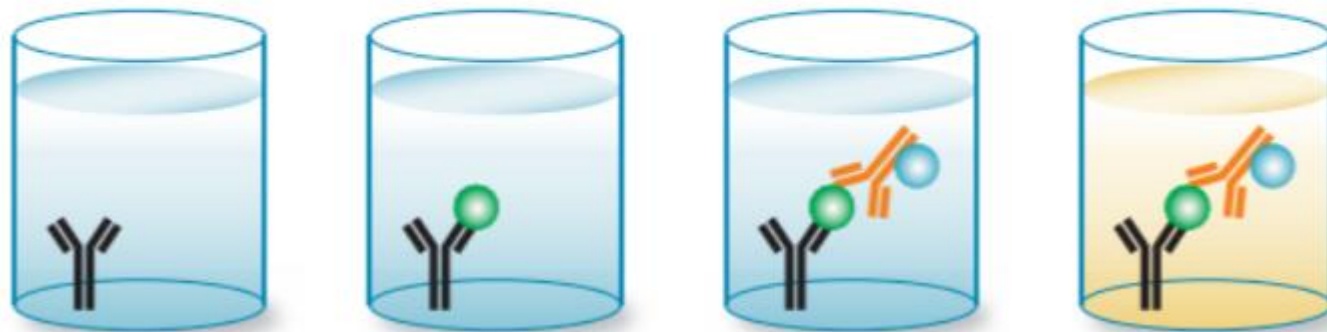


# ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

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

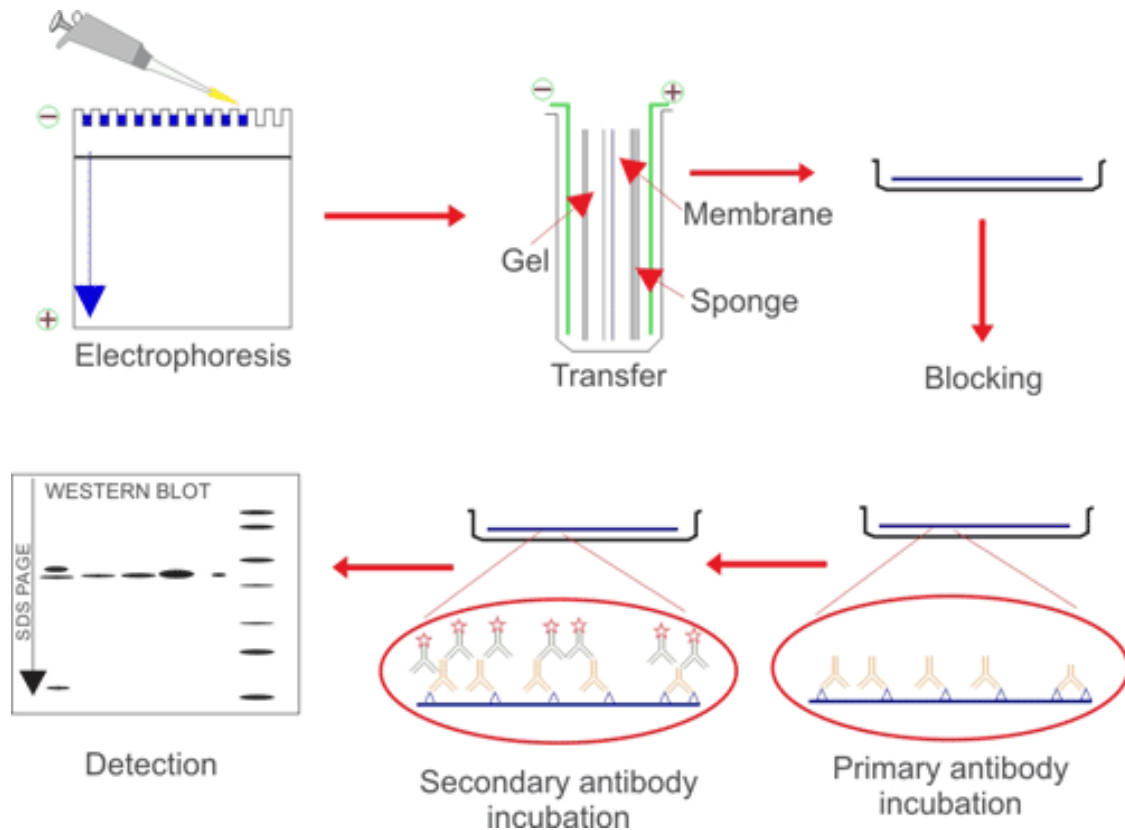


 Záchytná protilátka     Analyt/Antigen     Konjugovaná detekční protilátka

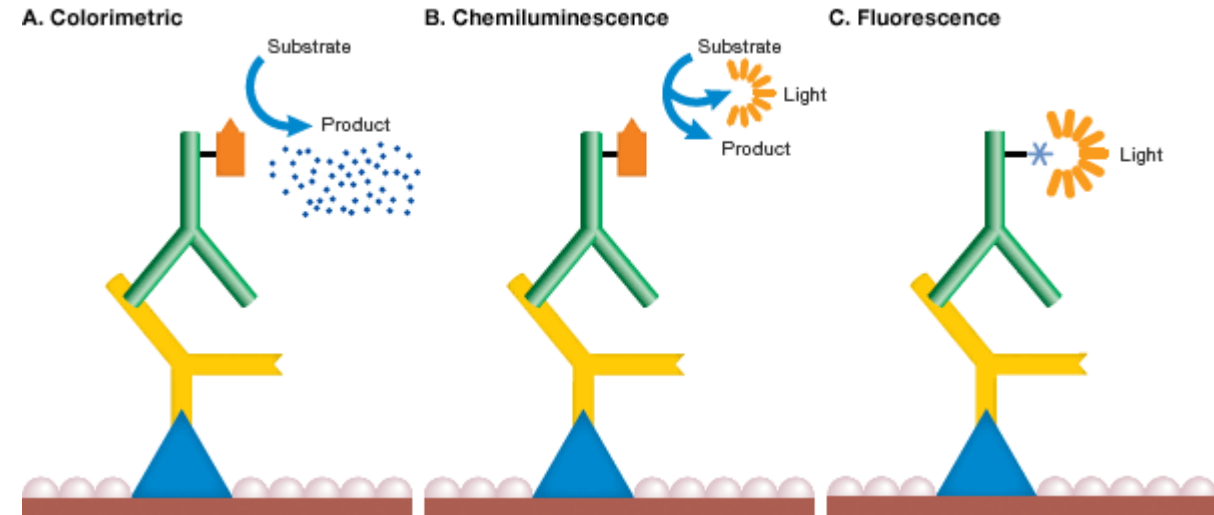


# Western blot

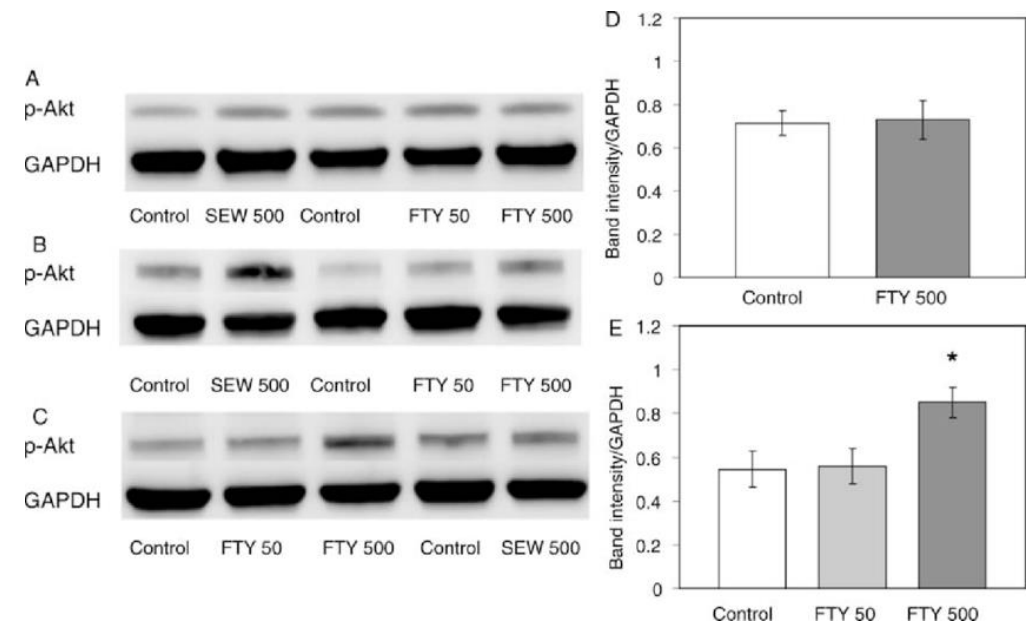
- Rozdělení proteinů SDS-PAGE, poté imunochemická detekce
- PVDF, nitrocelulózové membrány
- Blokování membrány (mléko, BSA)
- Inkubace s protilátkami



## • Detekce

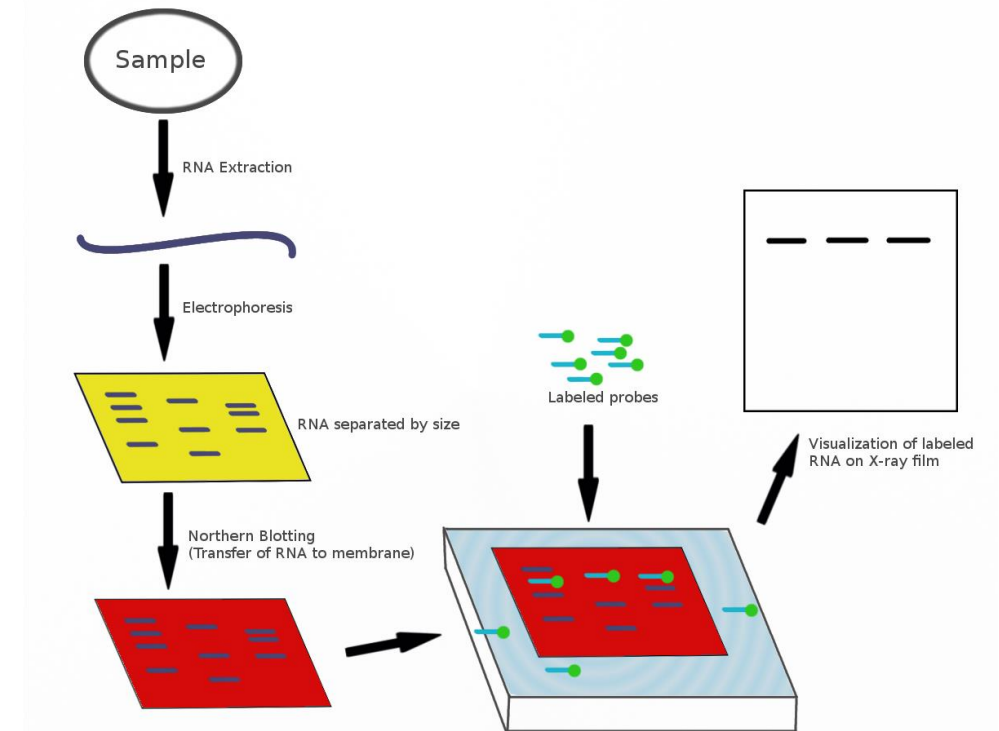
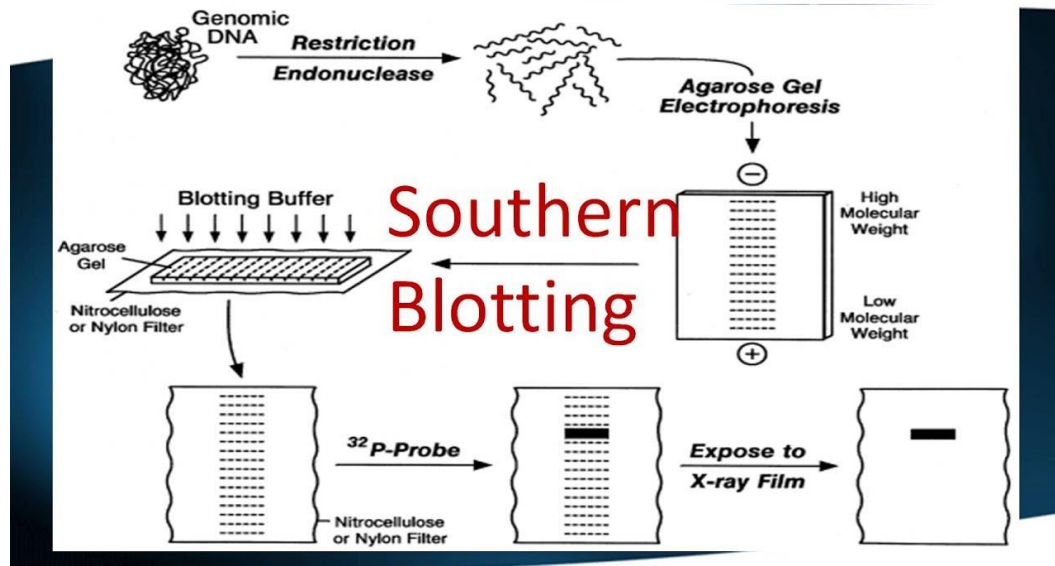


## • I kvantitativní metoda



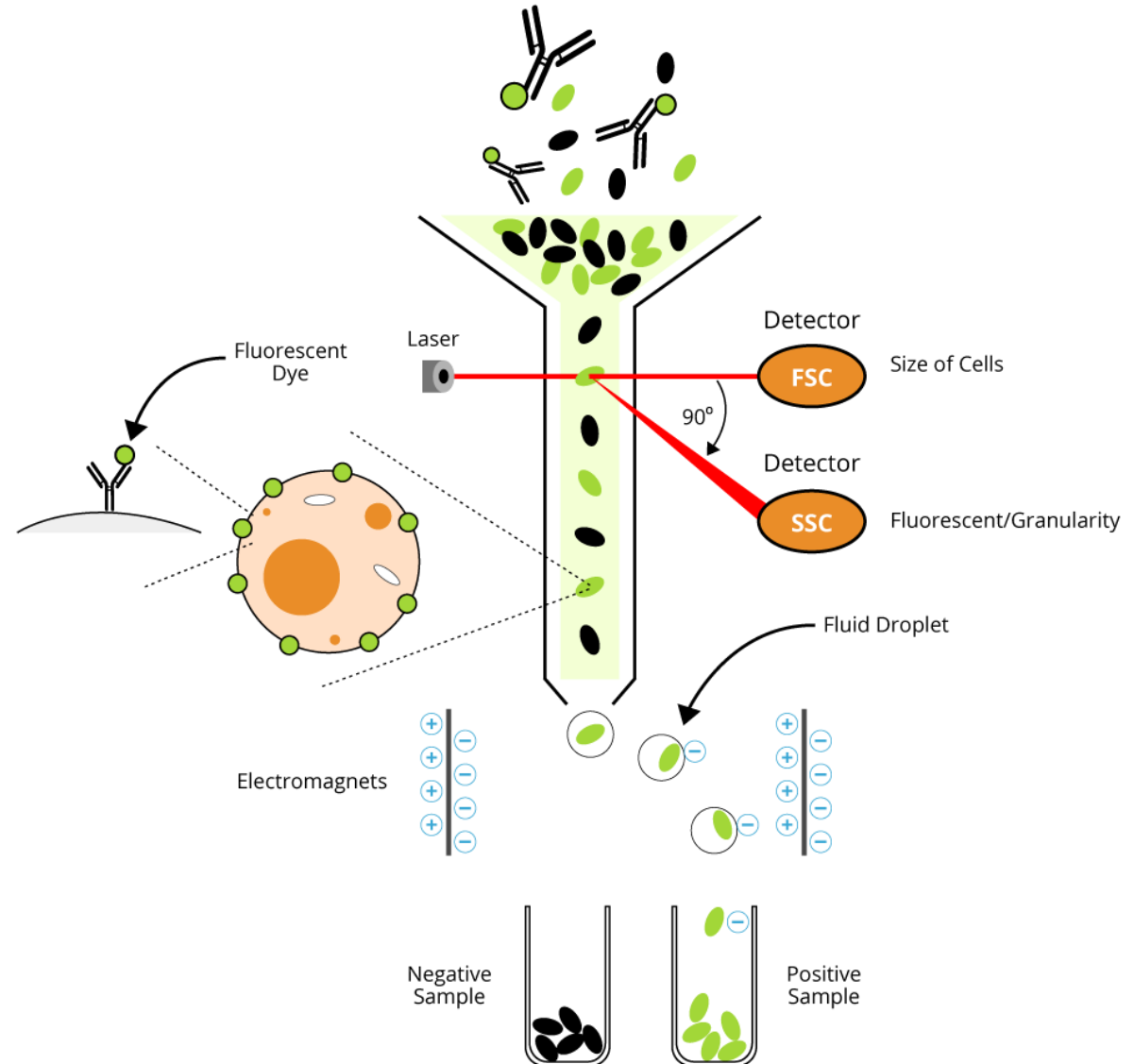
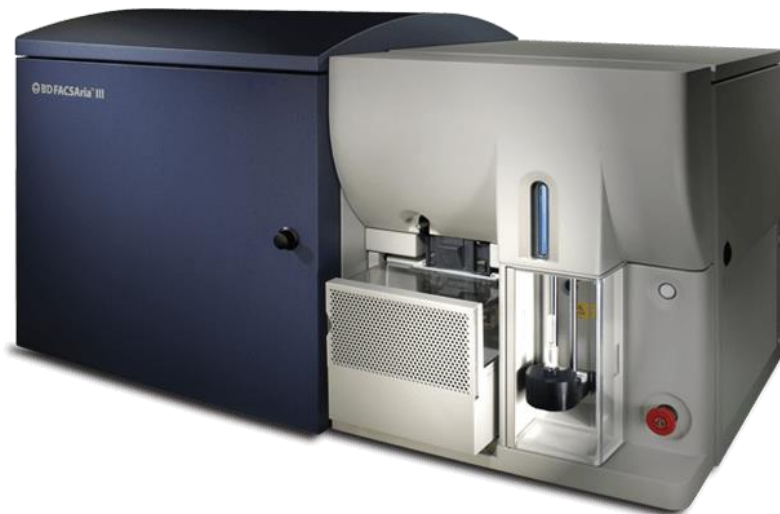
# Southern a Northern blot

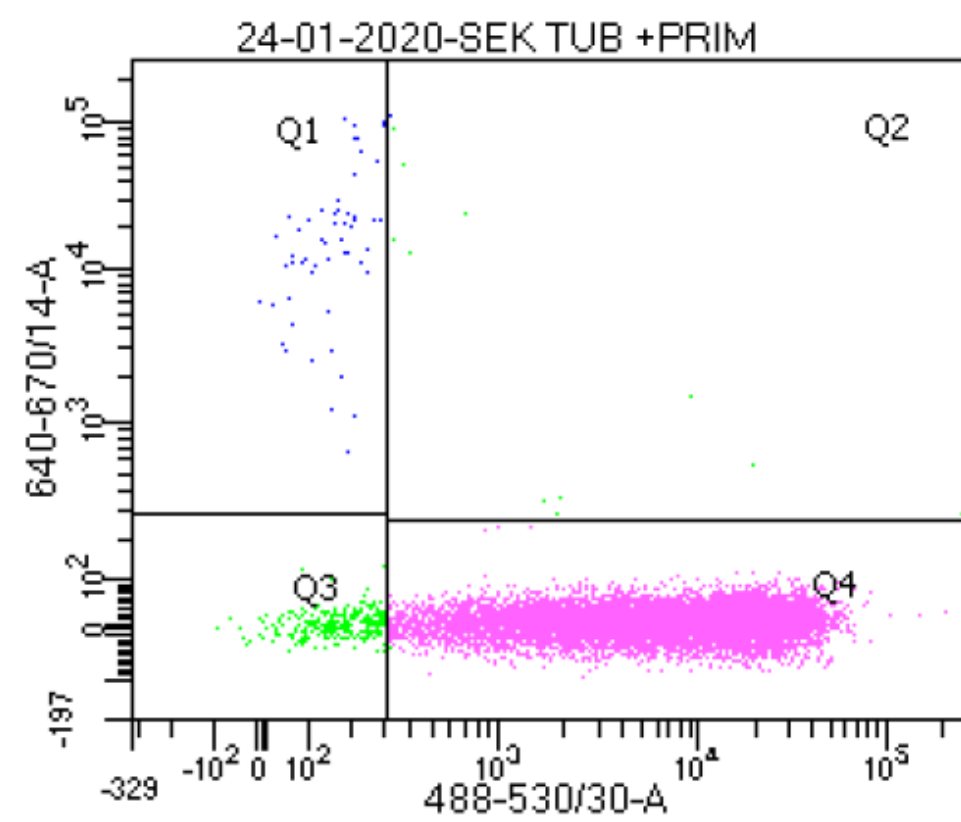
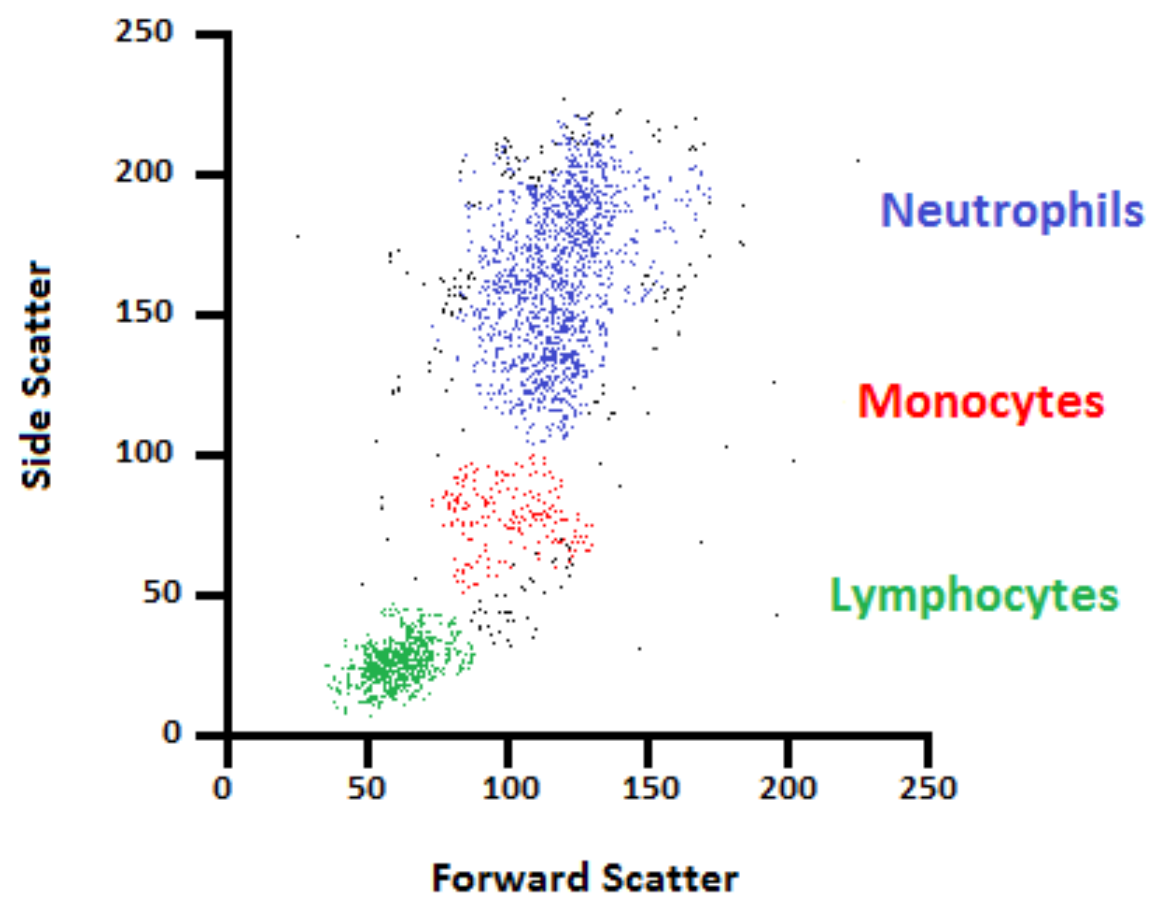
- Detekce DNA nebo RNA
- Radioaktivně značené DNA próby



# Průtoková cytometrie + sorter (FACS)

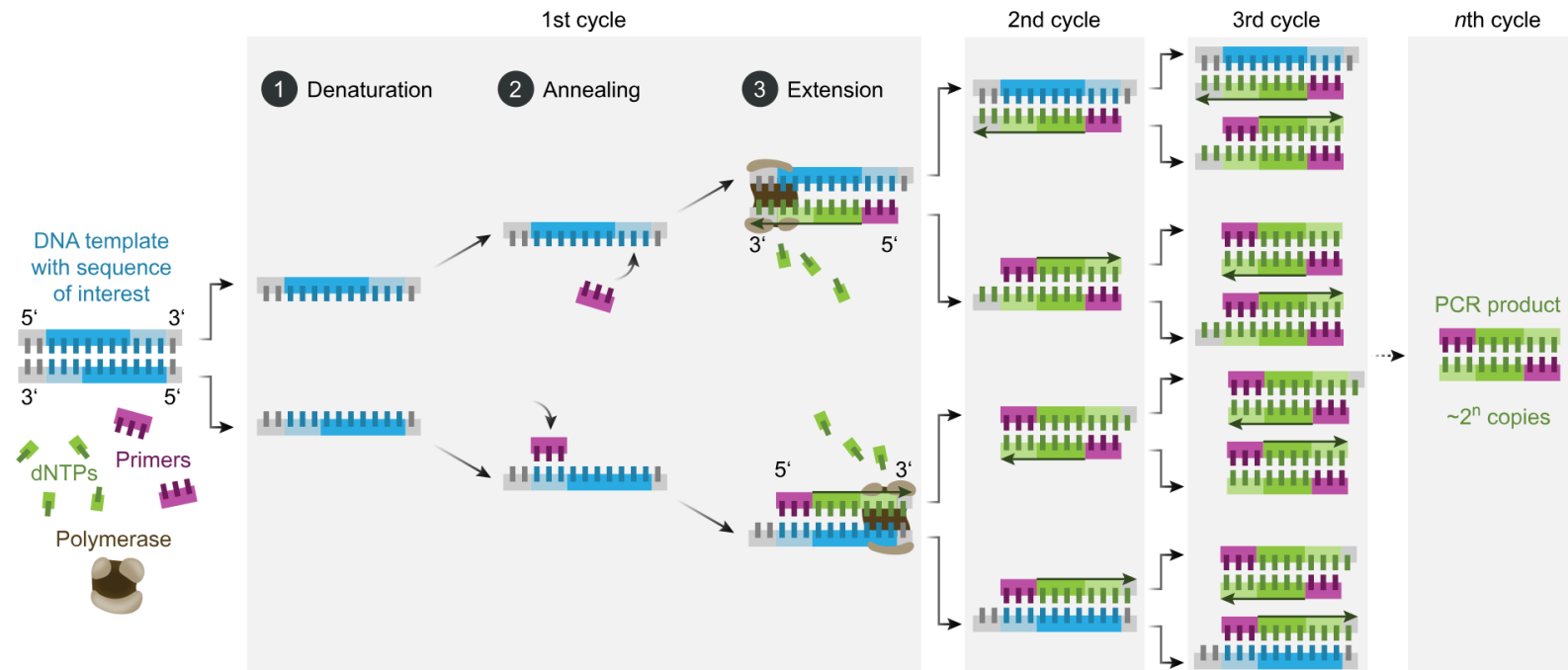
- Průtokové „měření“ buněk
- Charakterizace a kvantifikace buněk v suspenzi
- Stanovení buněčného cyklu
- Analýza krve
- Diagnostika





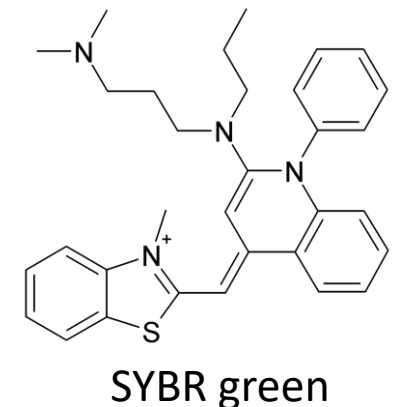
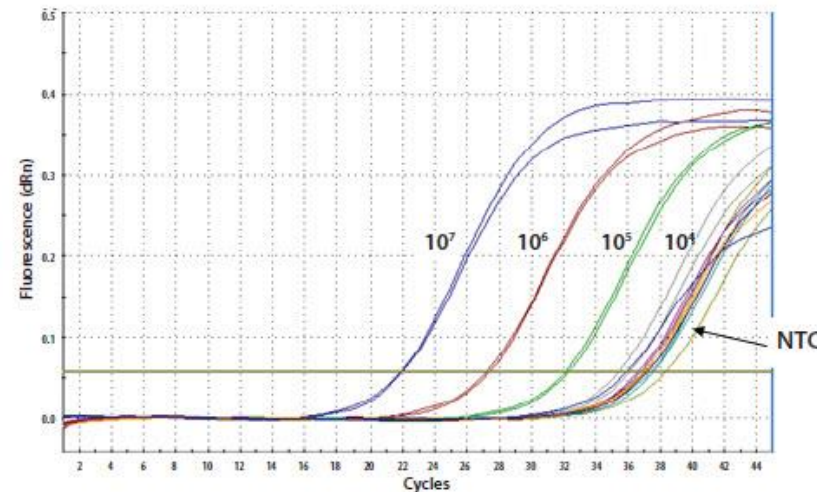
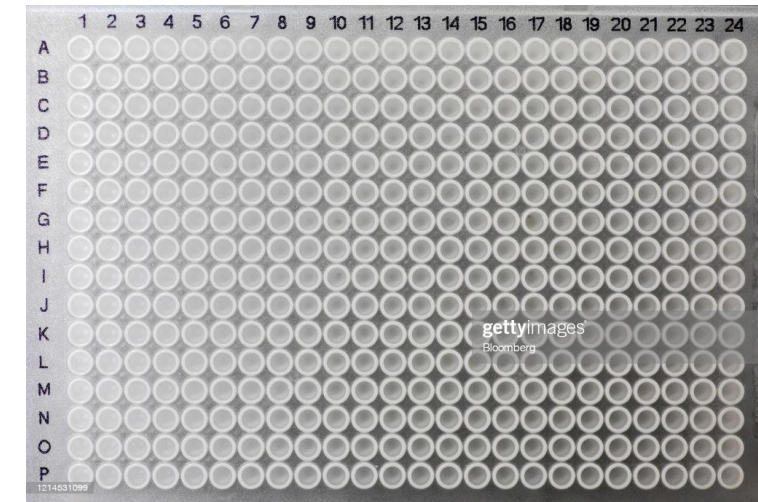
# PCR (polymerázová řetězová reakce)

- 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...

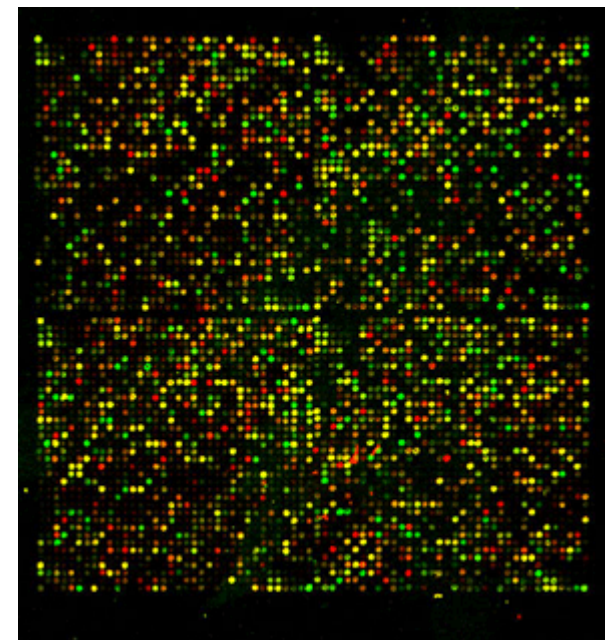
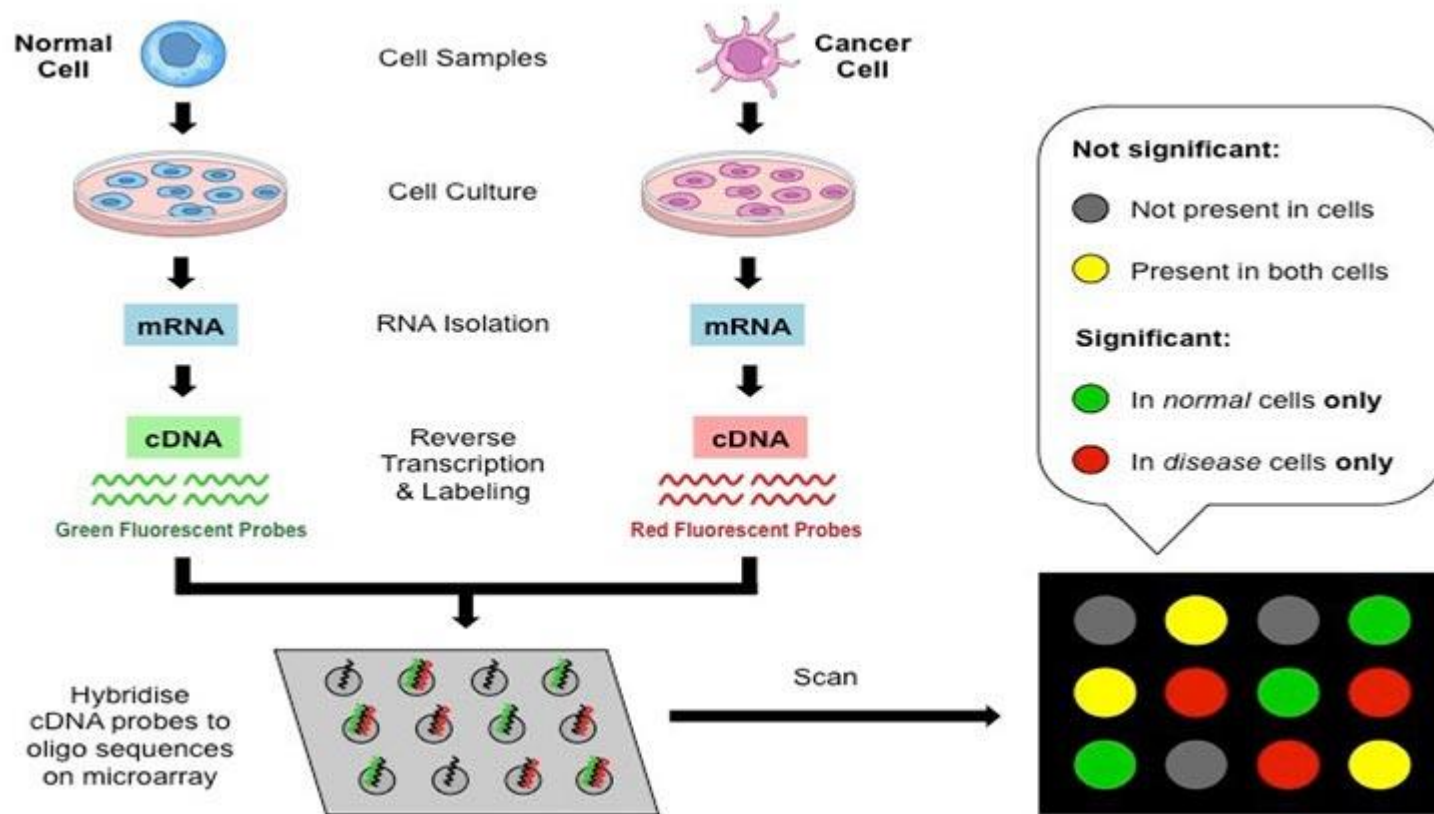


# RT - PCR

- 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“

