

## Okruhy z “Biochemických metod“ ke SZZ - magisterské studium

1. Zásady práce s biologickým materiálem. Homogenizace tkání a extrakce obsahu buněk. Použití detergentů. Dialýza, diafiltrace a ultrafiltrace. Afinitní ultrafiltrace. Koncentrování a konzervace roztoků.
2. Precipitační metody. Kosmotropní a chaotropní ionty. Přehled precipitantů. Deproteinace. Teorie centrifugace. 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. Pojmy selektivita, účinnost a kapacita. Rozdělovací chromatografie. Adsorpční chromatografie. Iontoměničová chromatografie. Chromatofokusace. Chelatační chromatografie. Gelová permeační chromatografie. Afinitní chromatografie. Perfúzní chromatografie.
4. Síla elektrického pole. Elektroforetická mobilita. Elektroendoosmóza. Nosiče pro elektroforézu. Zónová elektroforéza v diskontinuálním gradientu. Isoelektrická fokusace. Elektroforéza v teplotním gradientu. Nativní elektroforéza proteinových superkomplexů. 2-D elektroforéza. Vícerozměrné separace membránových proteinů.
5. Vizualizace molekul po elektroforéze. Kapilární elektroforéza a její varianty. Výhody kapilární elektroforézy. Řešení problému elektroendoosmózy. Přenos - blotting. Druhy blottingu podle pro vedení a typu vzorku. Detekce molekul po blottingu.
6. Metody pro stanovení koncentrace proteinů. Analýza aminokyselinového složení a aminokyselinové sekvence. Peptidové mapování. Analýza obsahu disulfidových vazeb. Studium proteinové glykosylace a fosforylace.
7. Chemické modifikace proteinů. Radioaktivní značení, skupinově specifická činidla. Afinitní značení proteinů. Biotinylace a vytvoření křížové vazby. Syntéza peptidů in vitro. Studium stability proteinů.
8. Stanovení nukleových kyselin. Stanovení molekulové hmotnosti nukleových kyselin. Enzymové štěpení polynukleotidů. Mapování restrikcními enzymy. Polymerasová řetězová reakce (PCR). Aplikace PCR. Kvantitativní PCR.
9. Sekvenční analýza nukleových kyselin. Maxam-Gilbertova a Sangerova metoda. Pyrosekvencování. Shotgun sekvencování genomů. MALDI-TOF sekvencování oligonukleotidů. Elektroforéza DNA. Chemická syntéza oligonukleotidů.
10. Chemická struktura protilátek. Polyklonální a monoklonální protilátky a jejich purifikace. Nanoprotilátky. Imunodifúze. Imunoelektroforéza. Radioimunoanalýza. ELISA. Imunoblotting a imunomikroskopie. Průtoková cytometrie, využitích imunitních reakcí pro třídění buněk (FACS).
11. Definice hmotnostní spektrometrie. Měkké ionizační techniky MALDI a ESI. Hmotnostní analyzátoři. Hybridní hmotnostní spektrometry. Fungování kvadrupólu, MRM měření. MALDI-TOF peptidové mapování. Data dependent analysis a tandemová hmotnostní spektrometrie. De novo sekvencování peptidů. MSIA a SELDI. MALDI imaging.

12. Spektrofotometrie. Spektrofluorimetrie, polarizace fluorescence a jejich aplikace. Vibrační spektroskopie, principy měření IR a Ramanových spekter, instrumentace. Resonanční Ramanova spektroskopie a její využití v biochemii. Mössbauerova spektroskopie. Chiroptické metody a jejich využití pro studium DNA a proteinů.
13. NMR. Podmínky vzniku spekter. Instrumentace, NMR spektra a informace z nich získávané. Vícerozměrné NMR experimenty. COSY, NOESY a TOCSY spektra. ESR spektroskopie, instrumentace. ESR spektrum, význam g hodnoty, hyperjemné štěpení. Spinové značky.
14. Rentgenová strukturní analýza. Krystalizace proteinů. RTG difrakce. Synchrotron. Pattersonova funkce a mapa elektronové hustoty. Braggova rovnice. Millerovy indexy. Synchrotron. Databáze 3-D struktur.
15. Kalorimetrie (ITC a DSC). Studium rychlých reakcí. Polarografie biomolekul. Princip polarografie, polarografické metody se superpozicí střídavého napětí. Cyklická voltametrie. Brdičkova reakce. Statický a dynamický rozptyl světla. Studium interakcí – rovnovážná dialýza a SPR.