



Metody stanovení antioxidantů

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

Antioxidanty

Enzymatické:

- **superoxid dismutáza (SOD)**
- **kataláza (CAT)**
- **glutathion peroxidáza (GPX)**

Neenzymatické:

- **Vitamíny (A, E, C)**
- **kofaktory enzymů (koenzym Q10, ubiquinol)**
- **dusíkaté sloučeniny (kys. močová)**
- **peptidy (GSH, melatonin, flavonoidy, karotenoidy či fenolové sloučeniny rostlin)**

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

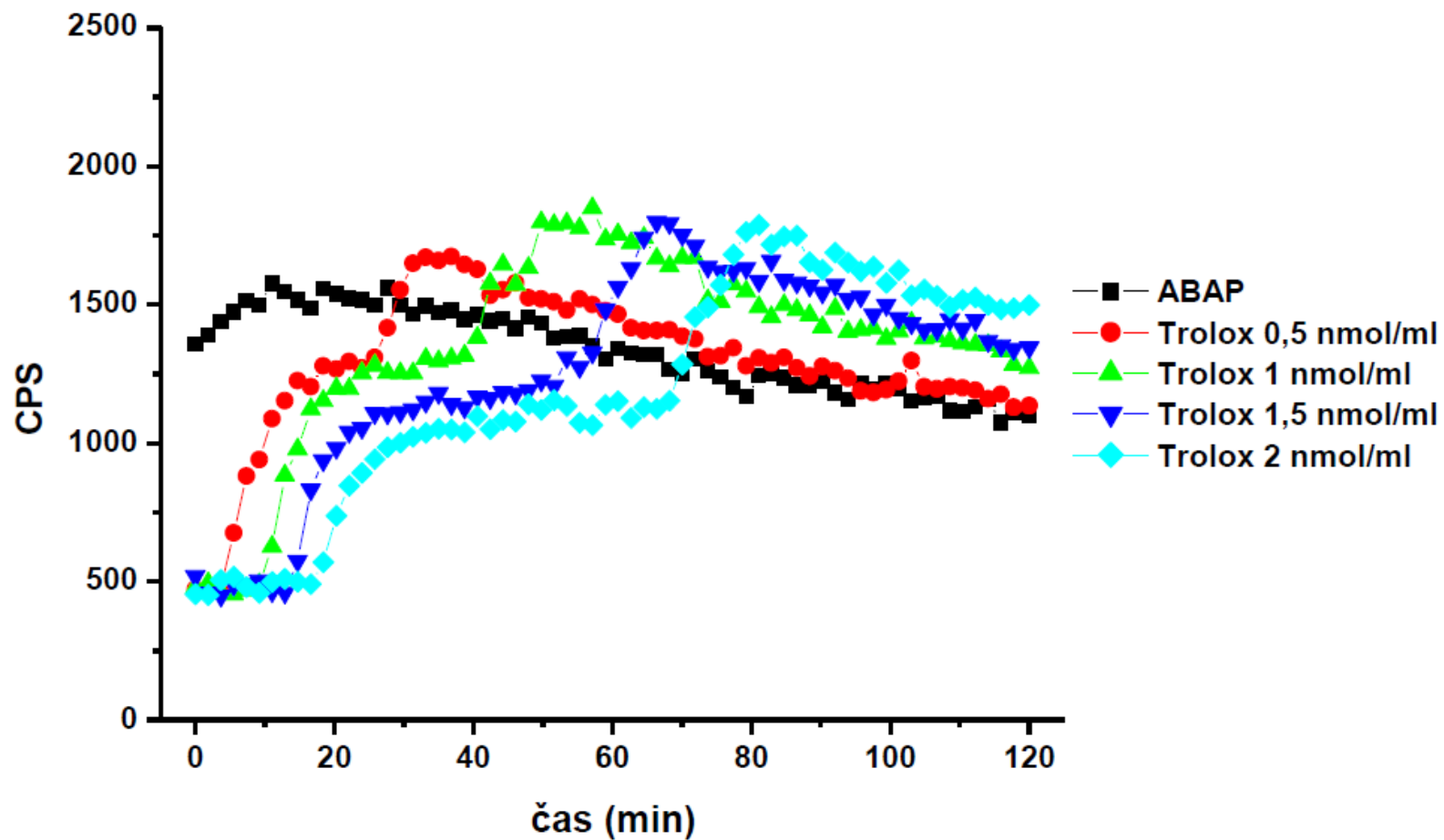
- **Spektrofotometrická** metoda
- Tmavě modrý oxidant ABTS●-
- Naředěn na $OD_{734} = 0,7$ a následně je k němu přidán vzorek o různých koncentracích či **Trolox** jako antioxidační standard
- Koncentrace vzorku dávající stejnou procentuální změnu absorbance roztoku jako 1mM Trolox je považována za TAEC.

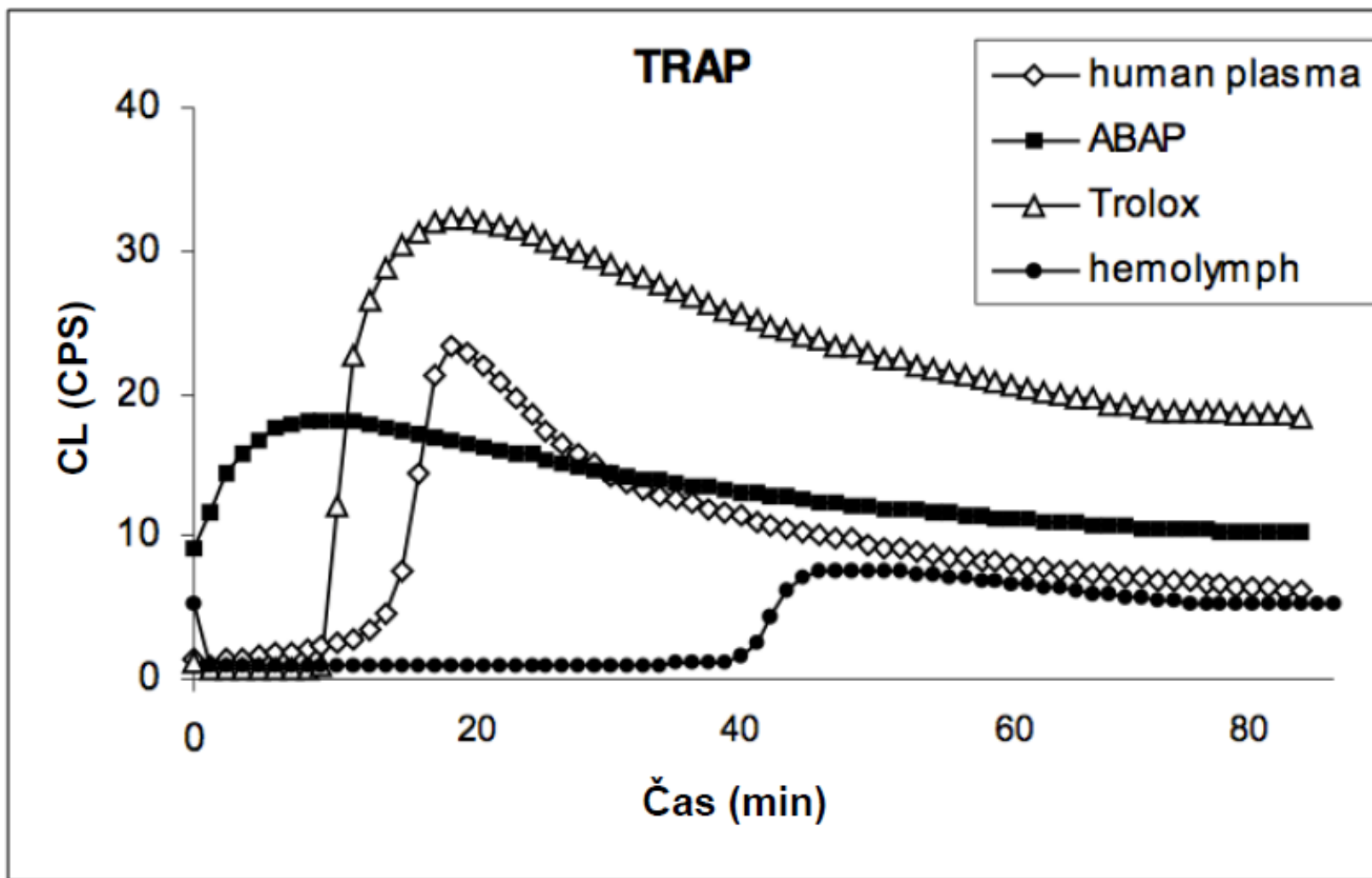
Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)


- **Spektrofotometrická metoda**
- Využívá redukčního potenciálu antioxidantů v působení na tripyridyltriazin železitý ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$), který je za nízkého pH redukován na svou železnatou formu (Fe^{II}) spolu s tvorbou intenzivního modrého zbarvení
- Změna absorbance po přidání vzorku je měřena při 593 nm a výsledky jsou následně porovnávány proti změně absorbance standardního roztoku železnaté formy TPTZ
- Jedna jednotka FRAP je definovaná jako redukce 1 mol Fe^{III} na Fe^{II} .

Total Radical-trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

- **Luminometrická** metoda
- založena na termální dekompozici látky **ABAP**, která při 37 °C produkuje stálou hladinu peroxylového radikálu > odstraňování peroxylových radikálů antioxidanty ve vzorku > po vyčerpání antioxidantů oxidace **luminolu** > skokový nárůst signálu
- Pro hodnocení se používají různé koncentrace **Troloxu** (standard)
- Hodnotí se čas potřebný k dosažení nejvyššího bodu křivky (píku)



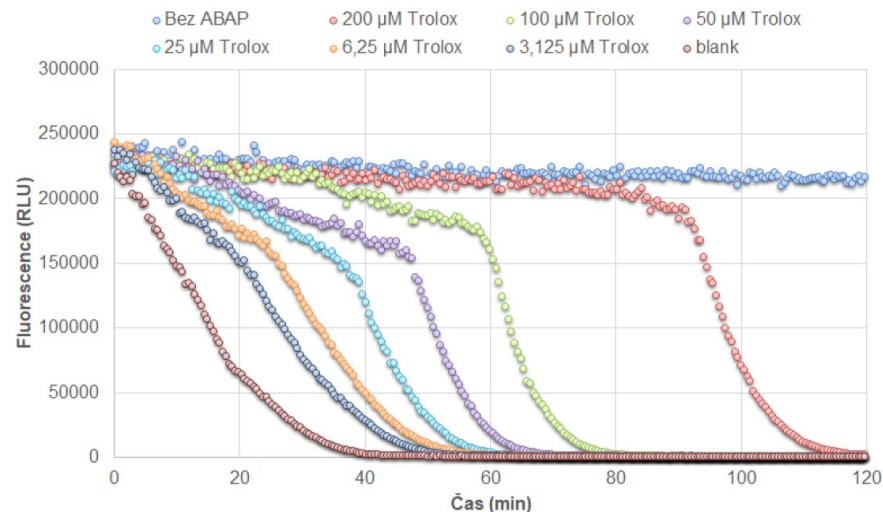




VI. Úloha – Stanovení antioxidační kapacity metodou ORAC

Princip

- Fluorescenční metoda
- Měření vychytávání peroxylového radikálu antioxidanty obsaženými ve vzorku
- ABAP – produkuje peroxylové radikály při 37 C
- Fluorescein – peroxylové radikály neodstraněné antioxidanty oxidují fluorescenční próbu > úbytek signálu
- Trolox – antioxidant, standard (1 molekula Troloxu vychytává 2 molekuly peroxylového radikálu)



Chemikálie a roztoky

- **PBS**
- **Trolox** (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; Mr = 250,29); **400 μM** zásobní roztok v PBS
- **ABAP** (2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride; Mr = 271,2); **0,1 M** roztok v PBS
- **Fluorescein** (Fluorescein sodium salt; Mr = 376,27); **100 nM** v PBS
- Měřený vzorek – myší plazma, hemolymfa z bource morušového ♂

Přístroje a pomůcky

- Fluorimetr
- Černá plastová 96-jamková destička
- 10 ml zkumavky, ...

Postup

1. Rozpustíme **27,1 mg ABAP v 1 ml PBS** a do použití **uchováváme při 4 °C**. Do jamek jej pipetujeme až těsně před započítím měření ve fluorimetru.
2. K **37 mg fluoresceinu** napipetujeme **10 ml PBS** a rozmícháme na vortexu. Vzniklý 10mM zásobní roztok dále 100x ředíme v Eppendorf zkumavce na 100µM (**10 µl zásobního roztoku + 990 µl PBS**). Nakonec 100µM roztok zředíme ve třetí zkumavce 1000x na pracovní 100nM fluorescein (**10 µl zásobního roztoku + 9990 µl PBS**). Do použití **uchováváme ve tmě**.

Postup

- Podle následujícího schématu si připravíme několik ředění **Troloxu** pro vytvoření kalibrační křivky: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 a 3,125 μM standard.

Zkumavka	zásobní	1	2	3	4	5	6	7
Koncentrace Troloxu (μM)	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125
PBS (μl)	0	100	100	100	100	100	100	100
Přidáváme (μl)	0	100 (ze zásobní zk.)	100 (ze zk. č. 1)	100 (ze zk. č. 2)	100 (ze zk. č. 3)	100 (ze zk. č. 4)	100 (ze zk. č. 5)	100 (ze zk. č. 6)

- Připravíme si čtyři testovací ředění měřených vzorků (10x, 100x, 500x a 1000x). Celkem budeme potřebovat 20 μl roztoku od každého ředění.

Postup

5. Do jamek na černé destičce napipetujeme po 10 μ l standard Trolox v duplikátech, PBS jako blank bez antioxidantů a jednotlivé vzorky. Řídíme se následujícím schématem uspořádání jamek na destičce:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trolox 200	Trolox 200	Vz. 1 10x	Vz. 1 100x	Vz. 1 500x	Vz. 1 1000x	9	9	9	9		
B	Trolox 100	Trolox 100	Vz. 2 10x	Vz. 2 100x	Vz. 2 500x	Vz. 2 1000x	10	10	10	10		
C	Trolox 50	Trolox 50	Vz. 3 10x	Vz. 3 100x	Vz. 3 500x	Vz. 3 1000x	11	11	11	11		
D	Trolox 25	Trolox 25	4	4	4	4	12	12	12	12		
E	Trolox 12,5	Trolox 12,5	5	5	5	5	13	13	13	13		
F	Trolox 6,25	Trolox 6,25	6	6	6	6	14	14	14	14		
G	Trolox 3,125	Trolox 3,125	7	7	7	7	15	15	15	15		
H	Blank (PBS)	Blank (PBS)	8	8	8	8	16	16	16	16		

Postup

6. Do každé jamky přidáme **170 μ l 100nM fluoresceinu**. Destičku po přidání fluoresceinu držíme ve tmě, např. přikrytou alobalem!
7. Zapneme a vytemperujeme fluorimetr na 37 °C (bude připraveno vyučujícím před cvičením). Destičku umístíme do fluorimetru a **inkubujeme 10 min při 37 °C**.

Postup

6. Měření bude probíhat při **37 °C** po dobu **2 hodin** v pravidelných intervalech cca **30 s**. Využijeme nastavení pro ORAC s následujícími parametry:
 - Počet měřících cyklů: **240**
 - Excitační vlnová délka: **460 nm**
 - Emisní vlnová délka: **535 nm**

7. Do všech jamek napipetujeme 20 μ l roztoku ABAP a zapneme měření.

Hodnocení a výstup

Pro každou jamku známe hodnoty fluorescence měřené v relativních fluorescenčních jednotkách (RLU) v závislosti na čase a integrál, tj. plochu pod křivkou

1. Zprůměrujte hodnoty duplikátů jednotlivých ředění Troloxu a blanku (+ integrály)
2. **Graf** – závislost fluorescence na čase (Trolox + blank)
3. **Graf** – závislost fluorescence na čase (měřené vzorky + blank)
4. **Graf** – kalibrační křivka Trolox (závislost **integrálu** fluorescence na koncentraci Troloxu)
5. **Tabulka** - dosazením hodnot integrálu fluorescence vzorků do rovnice kalibrační přímky dopočtete **množství antioxidantů v měřených vzorcích** (pozor na ředění!)

