

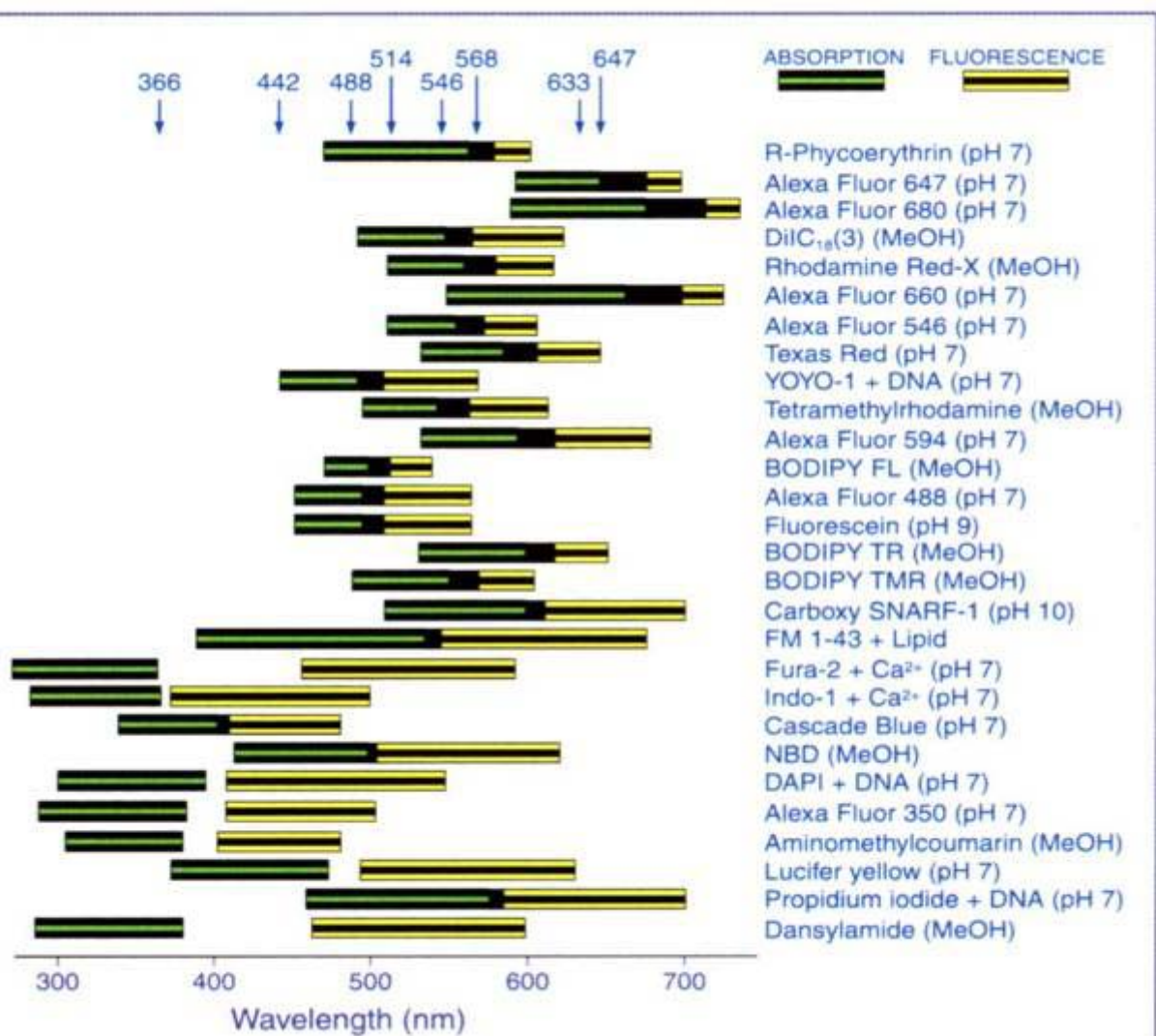
SPEKTRÁLNÍ METODY

- ◆ **SPEKTROFOTOMETRIE / TURBIDIMETRIE / FLUORIMETRIE / LUMINOMETRIE**
- ◆ **STANOVENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT**
 - stanovení hladin enzymů;
 - sledování genové exprese (reportérový gen);
 - aktivace enzymů (např. PLC v signální transdukci)
 - vizualizace proteinů a NA na gelech
- ◆ **IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ**
 - proteiny, nukleové kyseliny;
 - barvení organel; morfologie buněk
- ◆ **DALŠÍ INTRACELULÁRNÍ EFEKTY**
 - stanovení koncentrace Ca^{2+} , thiolových skupin (GSH, proteiny); membránový potenciál, pH;
 - cytotoxicita / viabilita / proliferace / apoptóza

TYPY SPEKTER

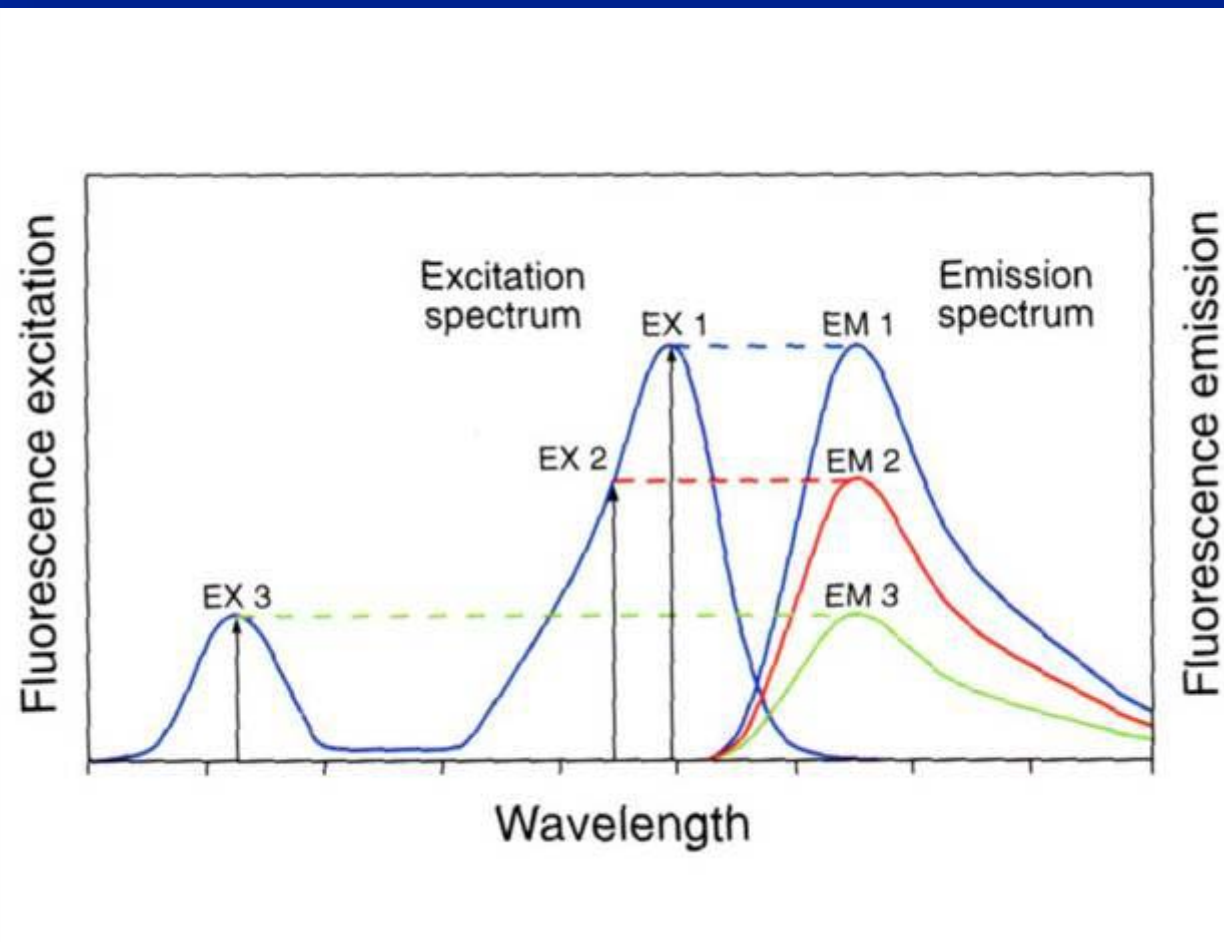
- ◆ **Absorpční spektrum:** spektrum vnějšího záření je ochuzeno o frekvence (vln. délky), které odpovídají rozdílům energií buzených atomů (např. žlutá barva látky odpovídá absorpčnímu pásu 435-480 nm, červená 490-500 nm, modrá 580-595 nm)
- ◆ **Energii molekuly lze vyjádřit součtem energie elektronové, energie vibrační a energie rotační ($E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$):**
 - UV + VIS (absorpce - excitace valenčních elektronů), event. absorpce a emise (luminiscence);
 - IR absorpce - excitace rotač. a vibr. stavů molekuly (IR absorpční spektrum);
 - mikrovlny - excitace rotač. stavů molekuly (mikrovlnná abs. spektra) a excitace nepárových elektronů v magn. poli (paramagnetická rezonanční spektra)
 - radiovlny - excitace atomových jader (NMR spektra)

FLUORIMETRICKÁ DETEKCE

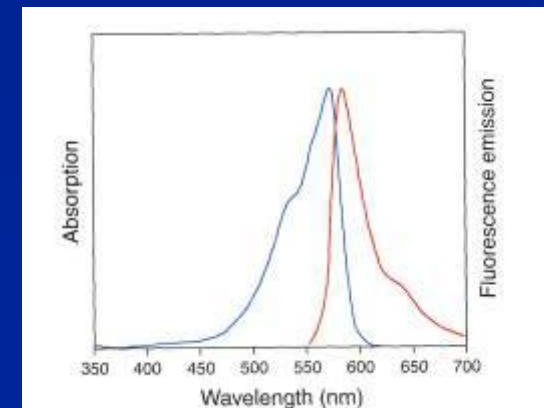


- enzymové aktivity (fluorogenní substráty)
- histochemická detekce
- koncentrace látek (Ca²⁺, DNA, NH₂-, SH-)
- pH
- membránový potenciál
- fluidita membrán
- derivatizace analytů pro detekci v HPLC

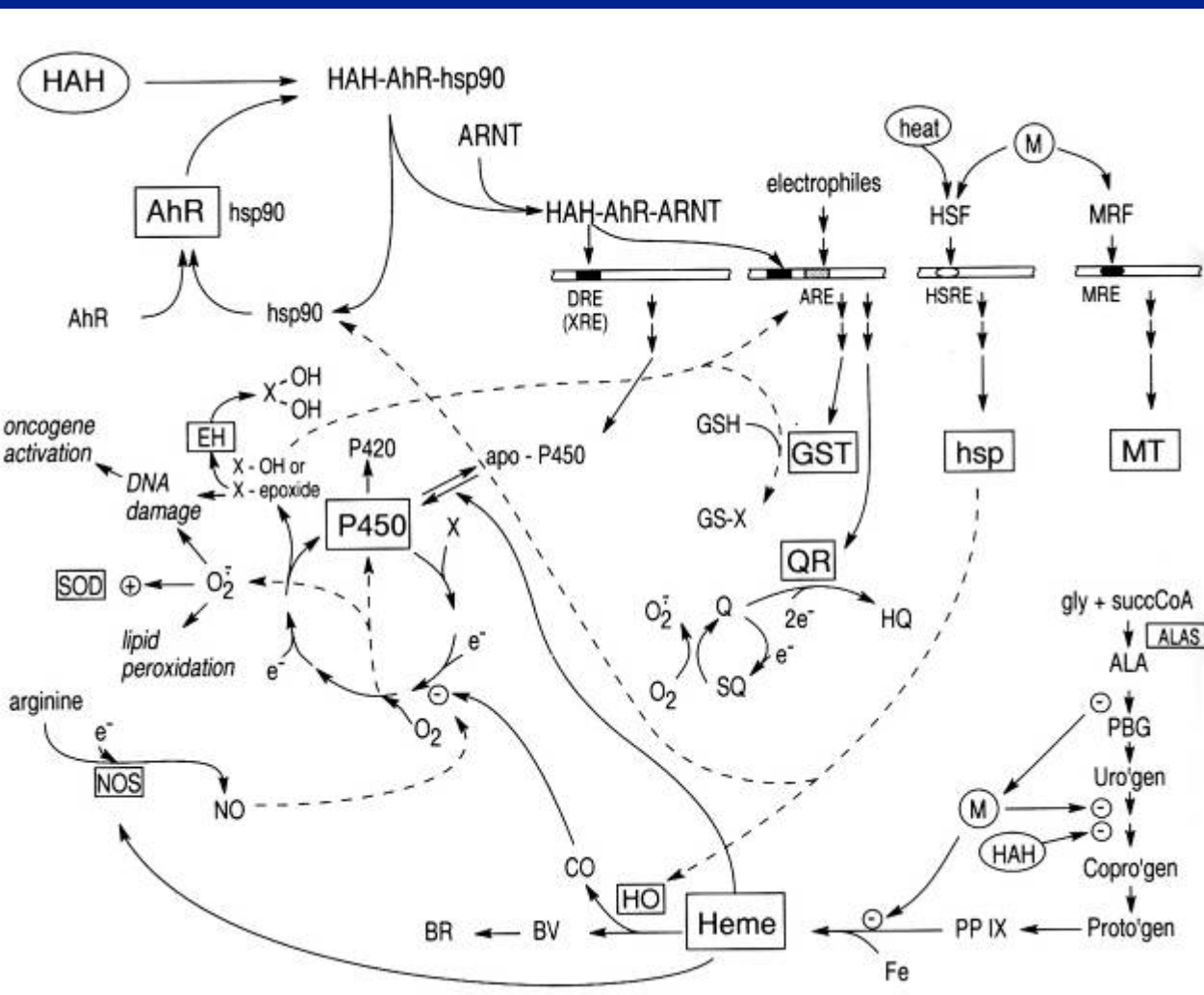
PŘÍKLAD EXCITAČNÍHO A EMISNÍHO SPEKTRA FLUORIMETRICKÝCH ČINIDEL



Příklad užití:
exc. a emisní spektrum
resorufinu



SUBSTRÁTY ENZYMŮVÝCH REAKCÍ / PŘÍKLAD STANOVENÍ BIOMARKERŮ OX. STRESU



**Biotransformační
enzymy**

**Antioxidanty
(enzymy a
nízkomol. látky – GSH)**

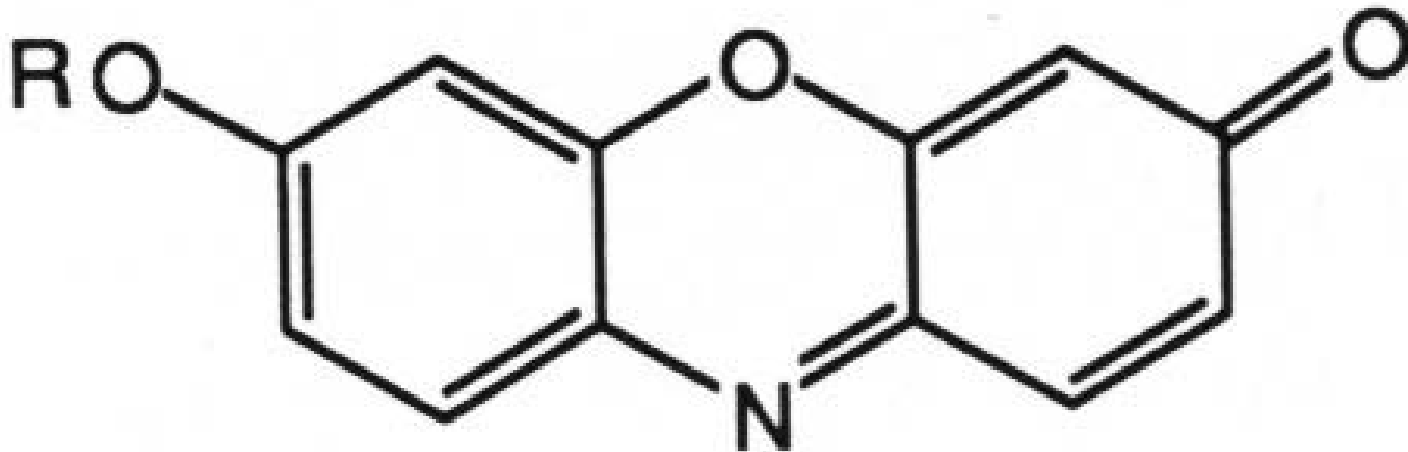
Produkce ROS

**Produkty oxid. stresu
(lipidní peroxidace)**

**Zánětlivé procesy
(LOX, COX, cytokiny aj)**

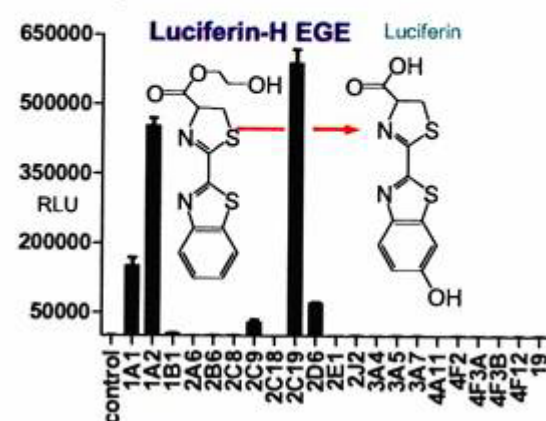
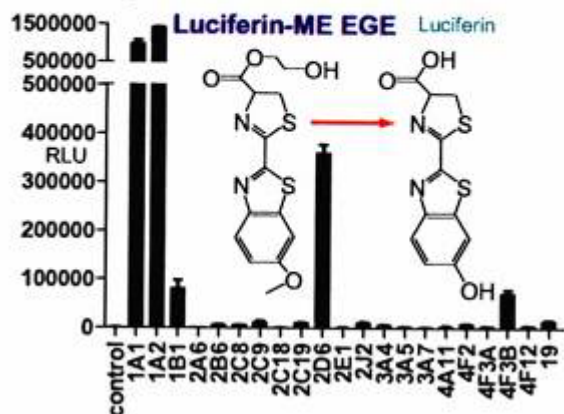
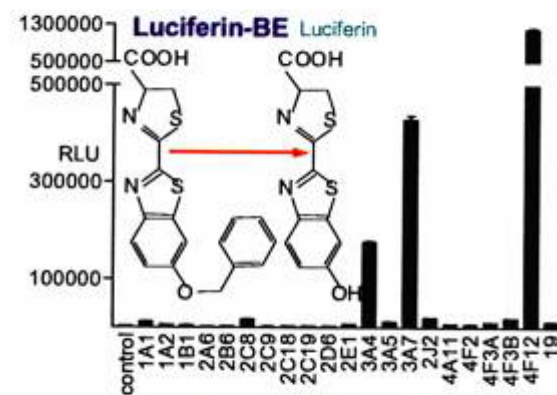
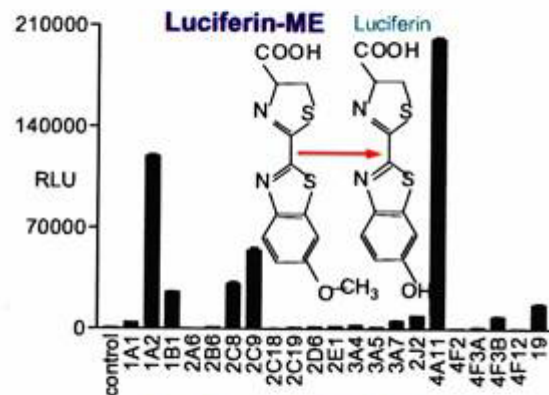
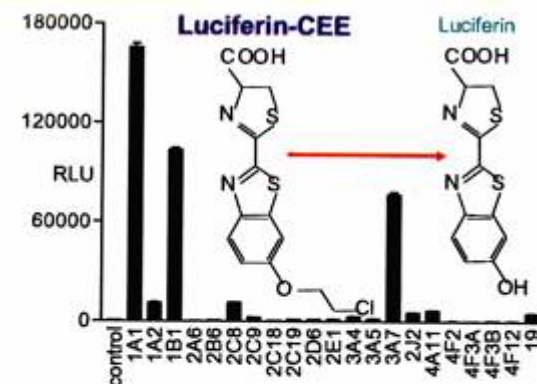
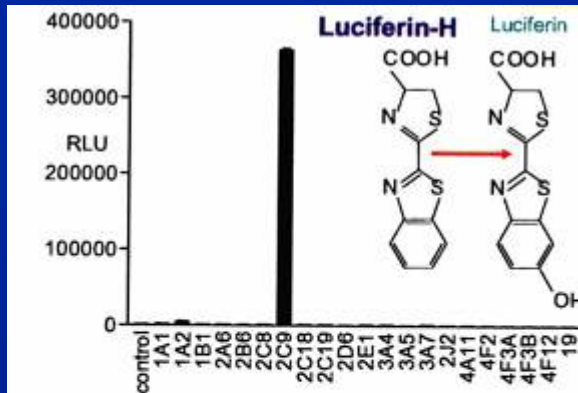
SUBSTRATY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

CYP1A1/1A2/1B1 (Ethyl-, Methyl-), CYP2B/3A (Pentyl-, Benzyl-)
spektrofluorimetrická detekce resorufinu (exc. 530-570, em. 585 nm)



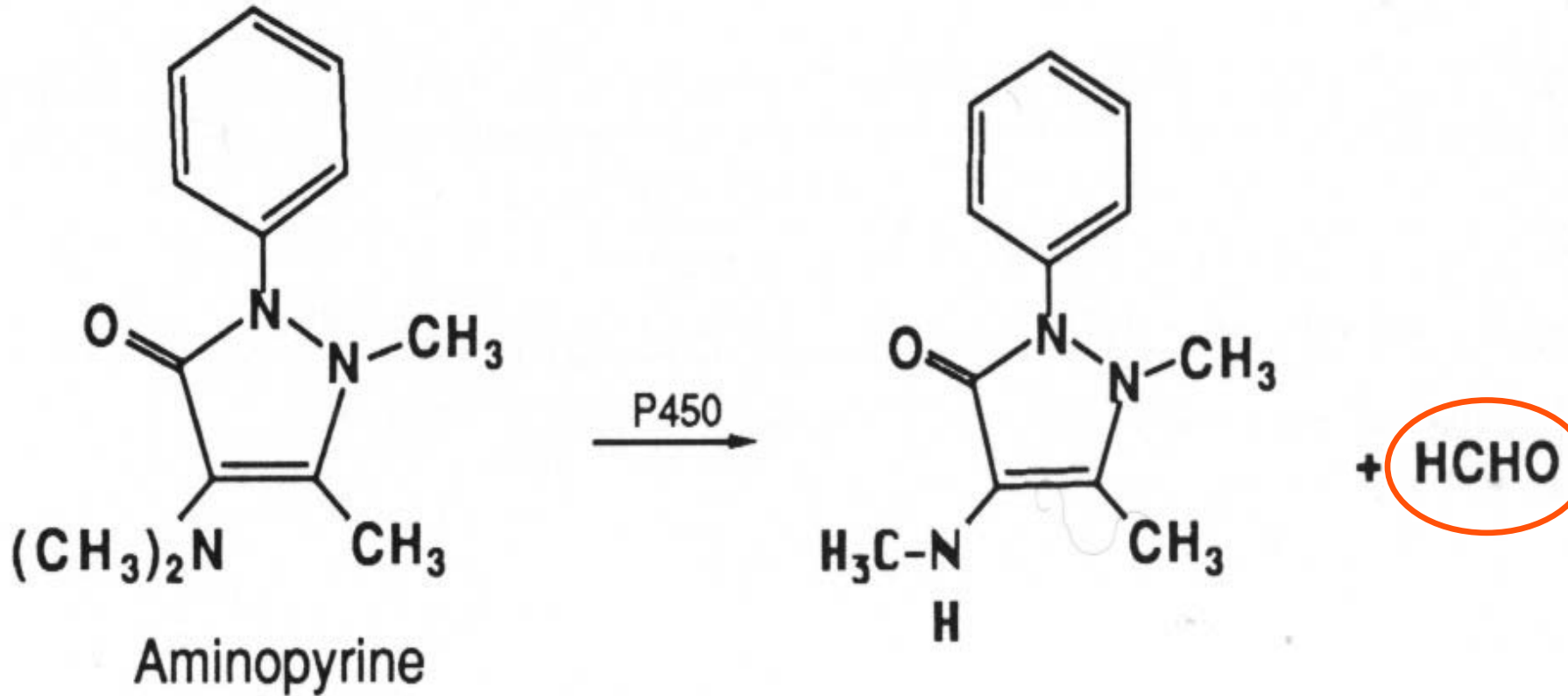
**Alkylresorufins
(alkoxyphenoxazones)**

**Stanovení aktivit
CYP enzymů
založené na
chemiluminiscenční
detekci luciferinu**



SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

CYP3A4 (detekce: spektrofotometrické stanovení HCHO)



SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Glutathion-S-transferázy (GST); spektrofotometrická detekce; různá substrátová specifita jednotlivých isoenzymů; neselektivní substrát CDNB:



**1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
(CDNB)**

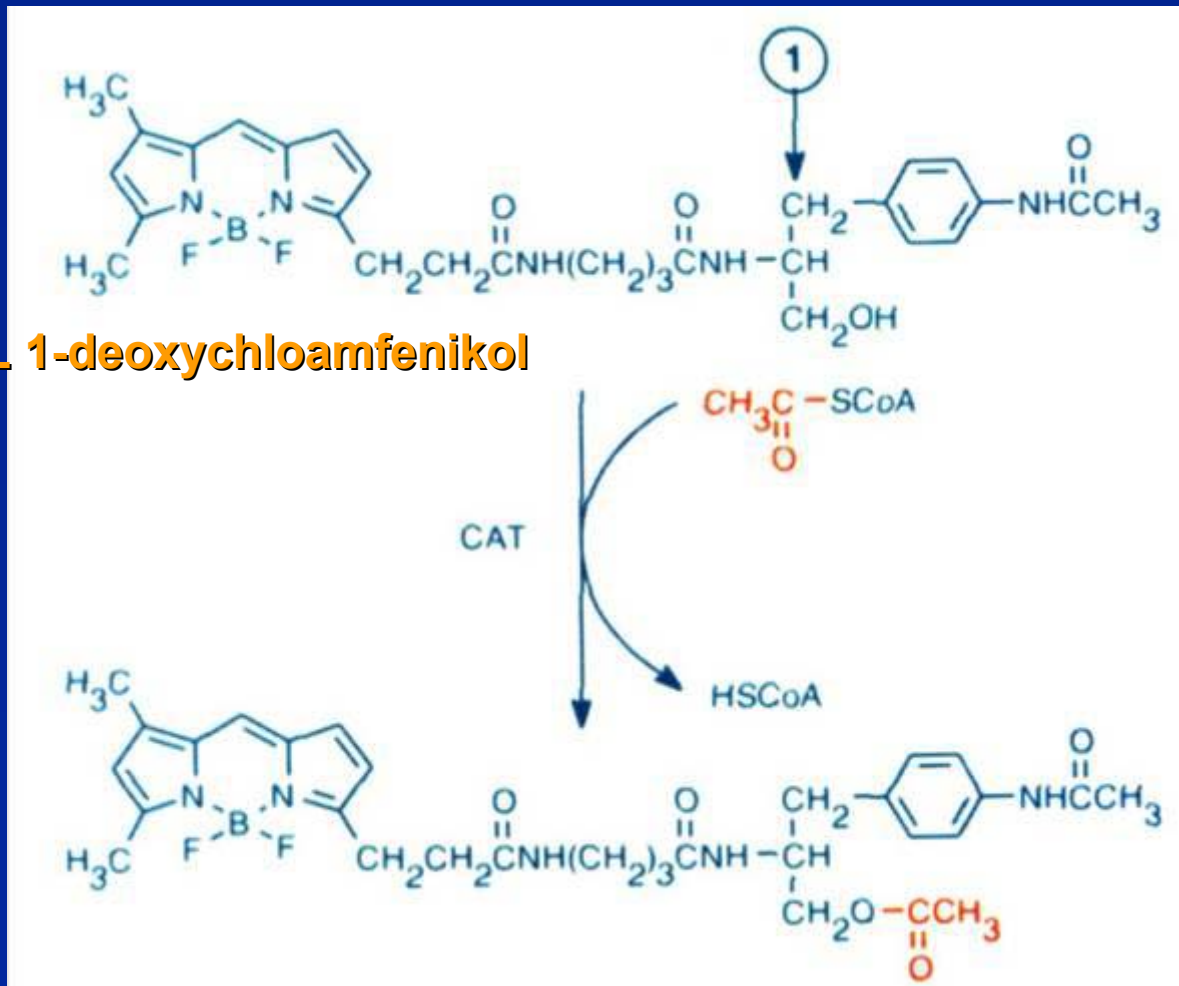
STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ

- ◆ Chloramfenikolacetyltransferáza (CAT):
 - separace ^{14}C -chloramfenikolacetátu pomocí TLC;
 - substrát značený BODIPY
- ◆ β -Galaktosidáza (β -D-Gal) pomocí značeného fluorogenního substrátu:
 - 4-methylumbelliferyl- β -D-Gal (360/449 nm, modrý produkt);
 - fluorescein- β -D-Gal (490/514 nm, zelený produkt);
 - resorufin- β -D-Gal (571/585 nm, červený produkt)
- ◆ Luciferáza: CL (luciferin + ATP)
- ◆ Green Fluorescent Protein (GFP) - autofluorescence, pro stanovení hladiny exprese není třeba vnější substrát
- ◆ Alkalická fosfatáza (p-nitrofenylfosfát, 4-methylumbelliferylfosfát)

SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

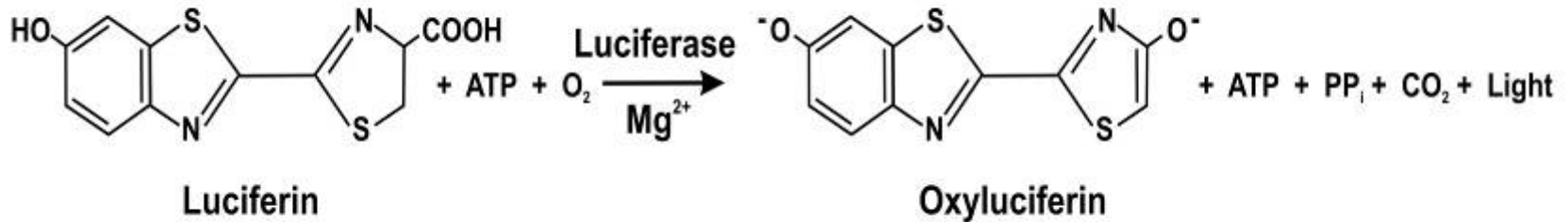
STANOVENÍ EXPRESE REPORTÉROVÉHO GENU **CAT**

BODIPY FL 1-deoxychloamfenikol

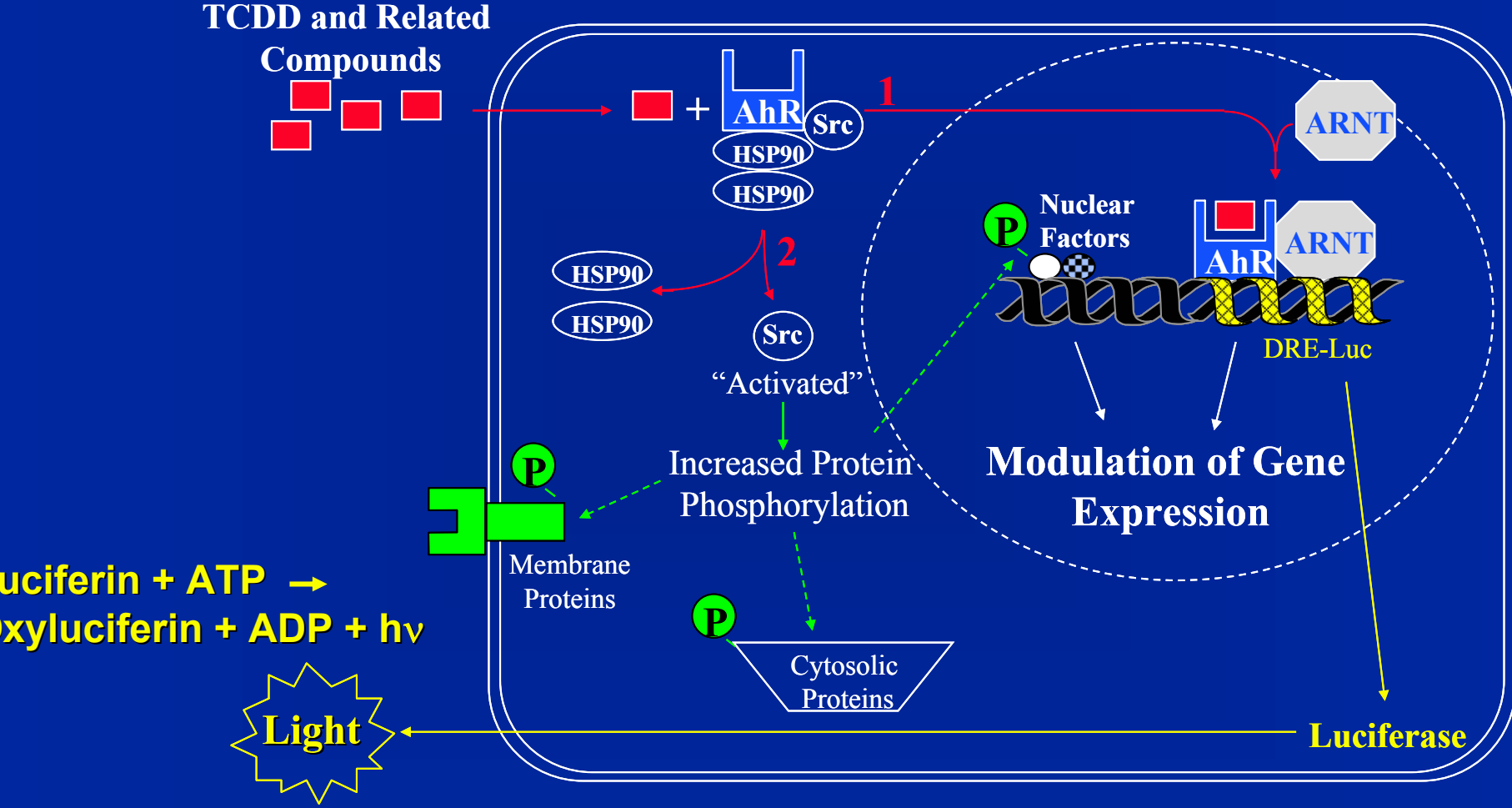


SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

STANOVENÍ EXPRESE (AKTIVITY) REPORTÉROVÉHO GENU **LUCIFERÁZY**



AKTIVITA REPORTÉROVÉHO GENU - LUCIFERÁZY INDIKUJÍ AKTIVACI RECEPTORU: AhR-dependentní genová exprese



Adapted from Blankenship (1994)

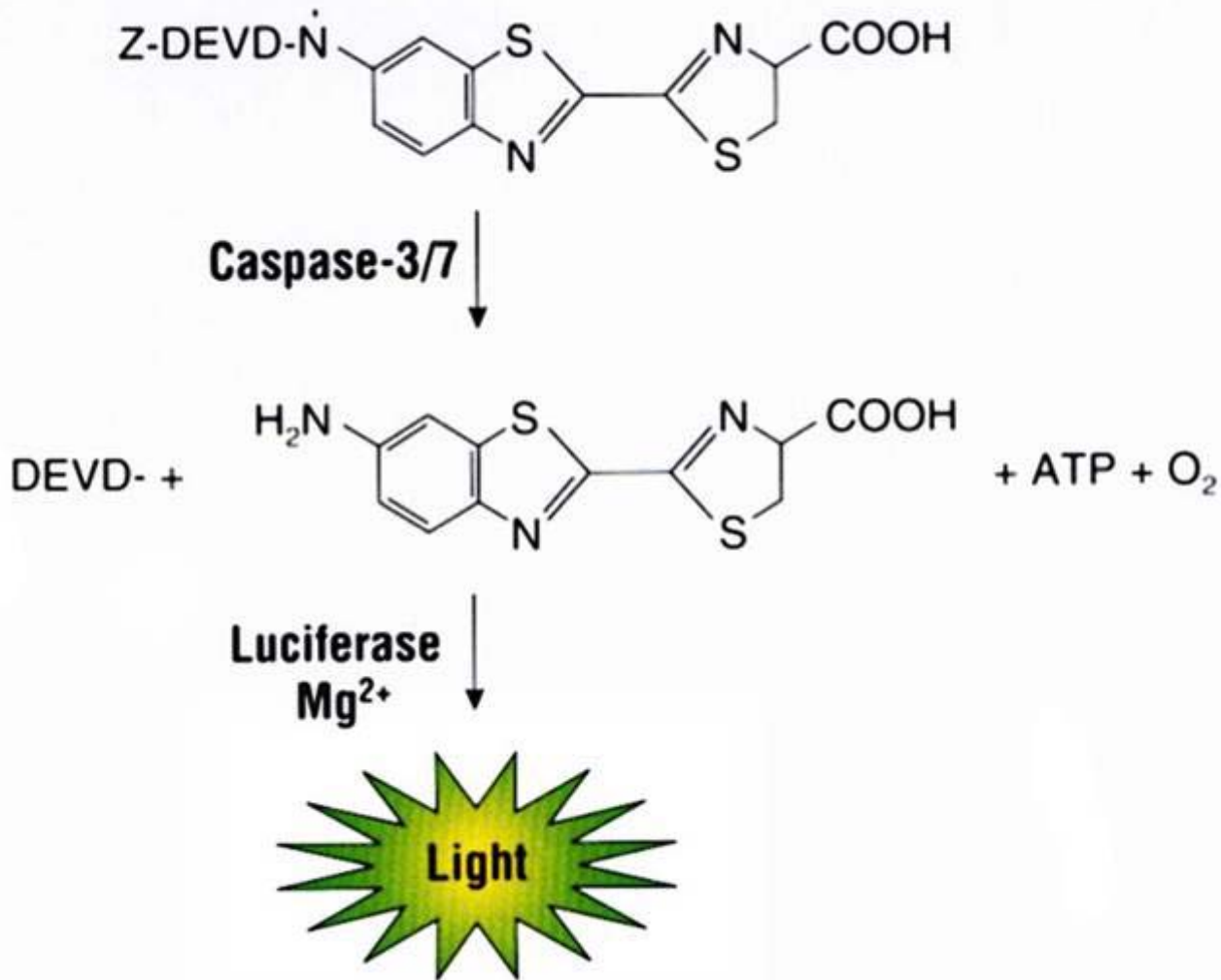


JAK MŮŽEME STANOVIT INDUKCI GENOVÉ EXPRESE ?

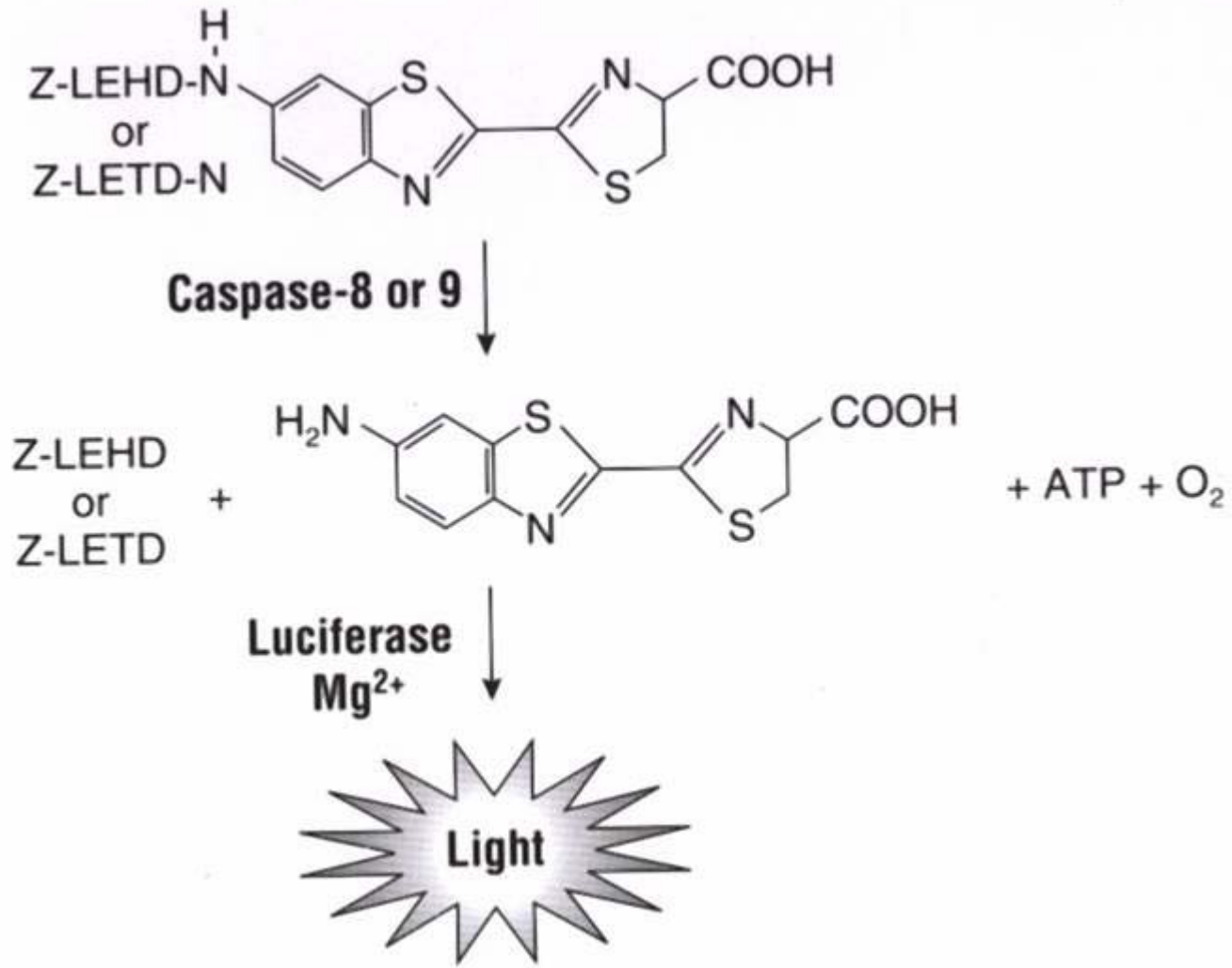
◆ Příklad - stanovení transaktivace AhR:

- exprese reportérového genu, chemiluminiscentní stanovení luciferázové aktivity (DR-CALUX)
- stanovení exprese CYP1A1 mRNA (RT-PCR)
- stanovení hladiny proteinu CYP1A1 (Western blot)
- stanovení enzymové aktivity CYP1A1 (EROD)

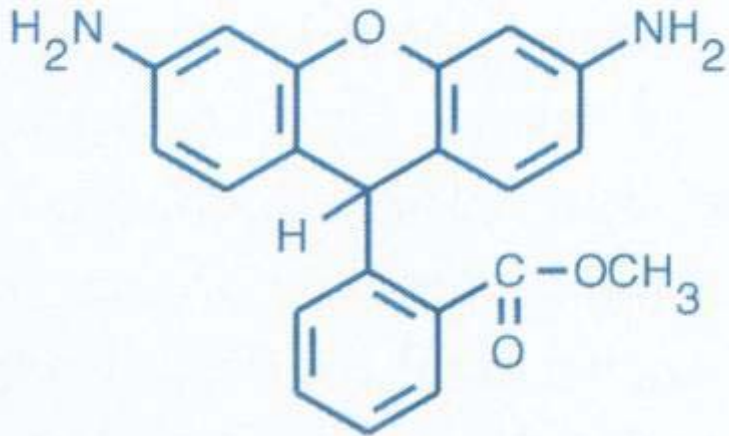
STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ APOPTÓZY



STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ APOPTÓZY

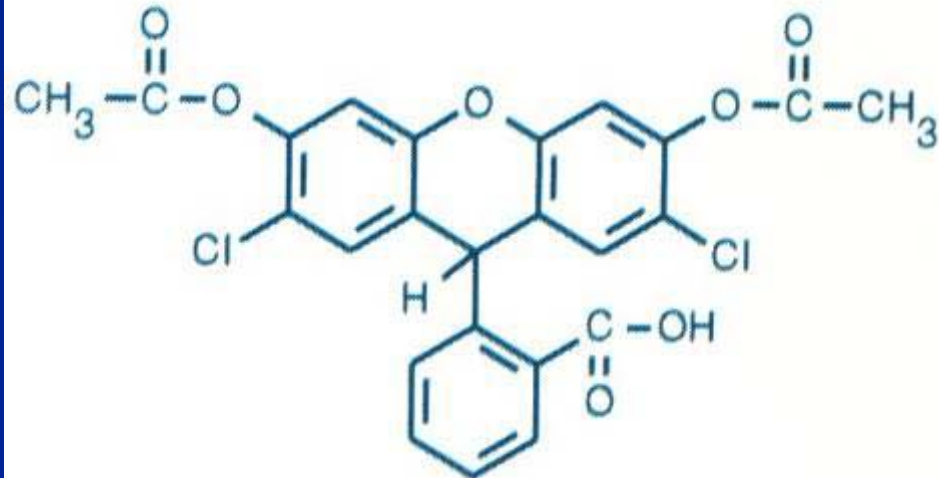


PRODUKCE ROS



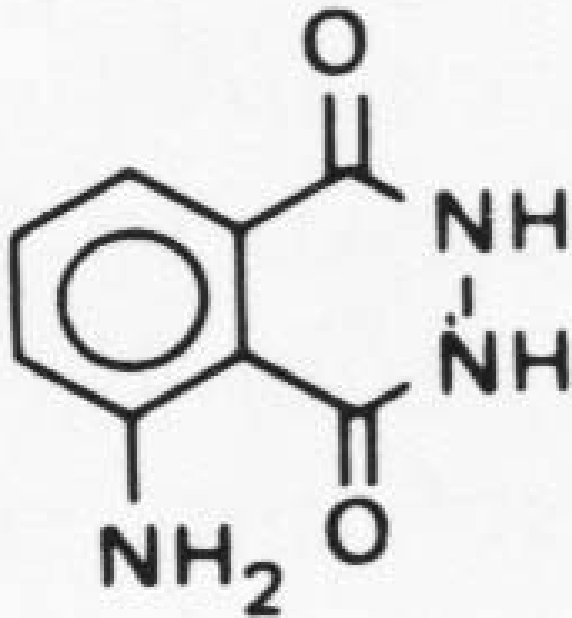
Dihydrorhodamine 123
difunduje přes buněčné
membrány a je oxidován
na fluorrescenční

Rhodamine 123
(citlivý především na H₂O₂,
dále peroxynitrit a HOCl)



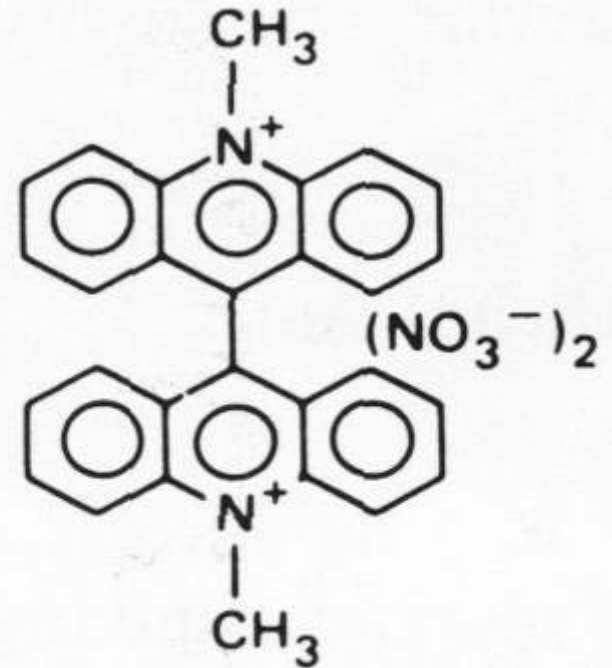
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
(dichlorofluoresceindiacetát) je po vstupu
do buňky podroben esterázové reakci;
detekuje ROS včetně NO (H₂O₂, superoxi
peroxyl HOO[•])

PRODUKCE ROS



Luminol

H₂O₂, superoxid, HO·,
HOCl, NO, HOO·



Dimethylbisacridinium
Nitrate (Lucigenin)

H₂O₂, superoxid

STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

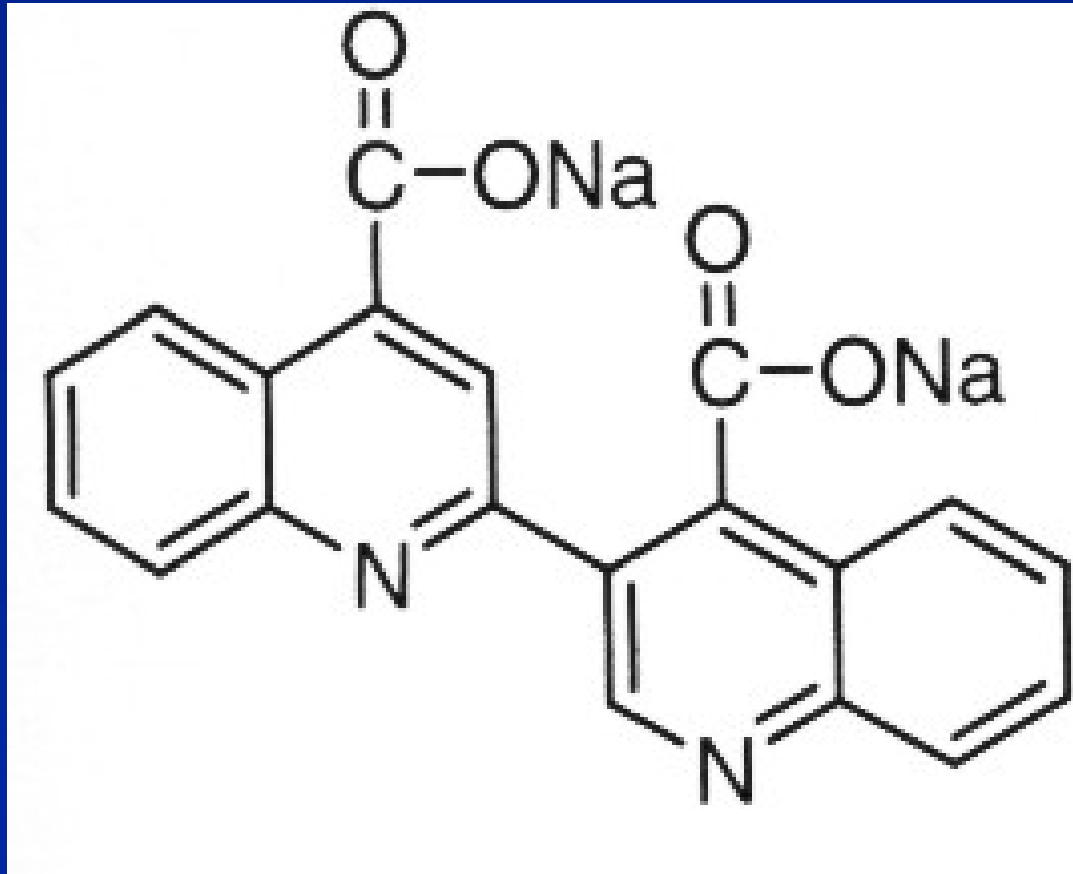
- spektrofotometricky (absorbance 280 nm);
- různá činidla selektivní na aminokyselinové zbytky, nejužívanější je stanovení pomocí kyseliny bicinchoninové (bicinchoninic acid, BCA):

Primární substrát:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$;

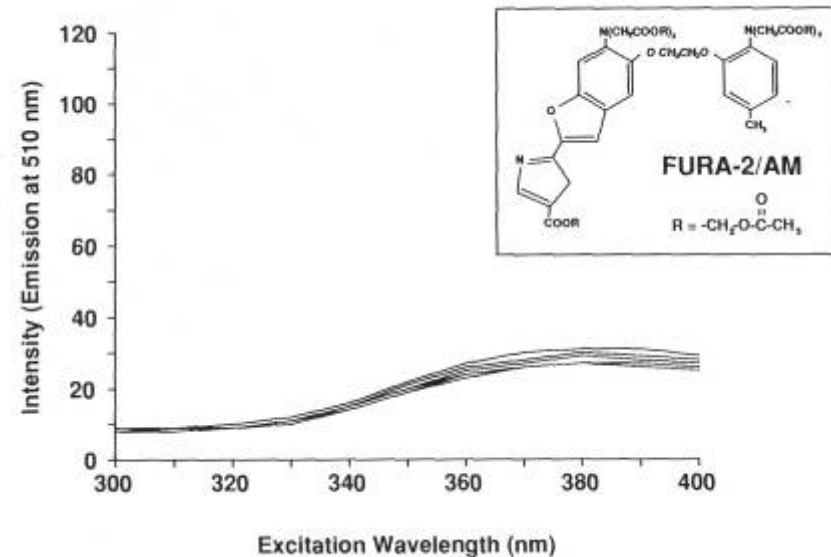
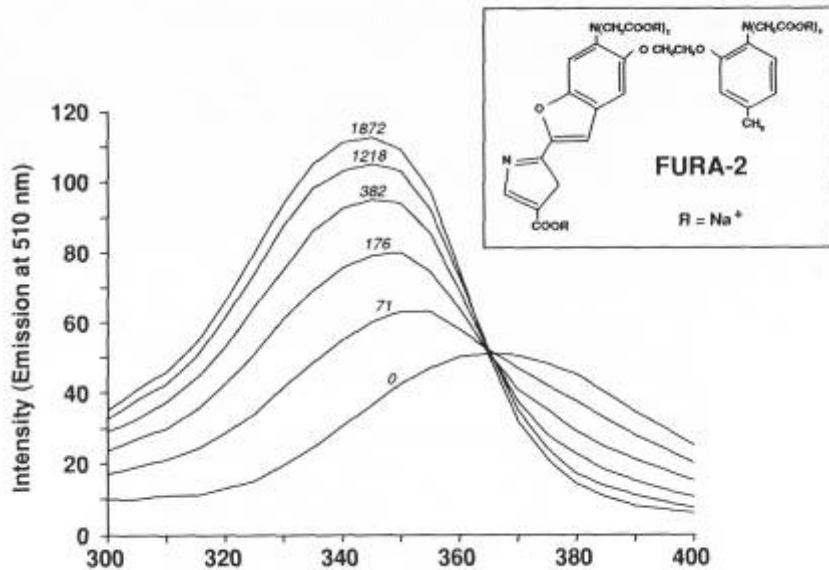
Cu(II) je proteiny redukován na Cu(I) a ten je detekován pomocí BCA;

fotometrické stanovení,
i v 96-jamkových destičkách;
kalibrace na BSA;
nízká citlivost metody na
přítomnost detergentů



STANOVENÍ KONCENTRACE Ca^{2+}

Existuje řada fluorogenních sond, klasickým příkladem je Fura-2:

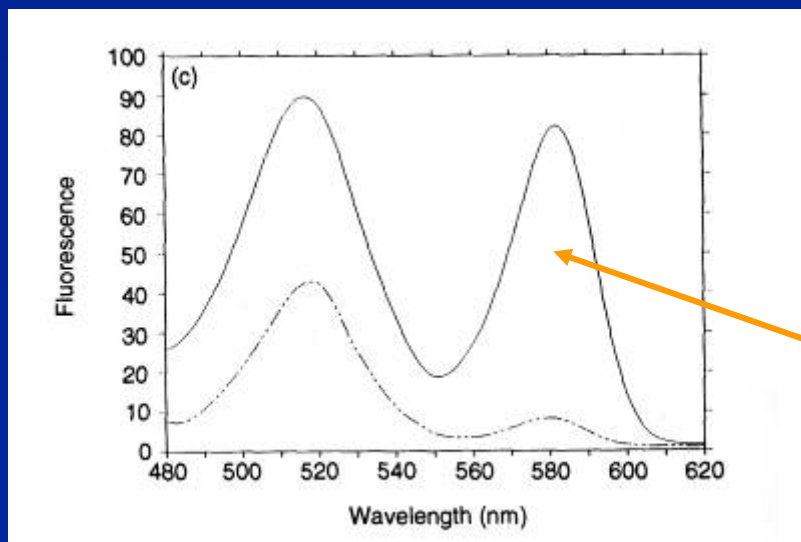
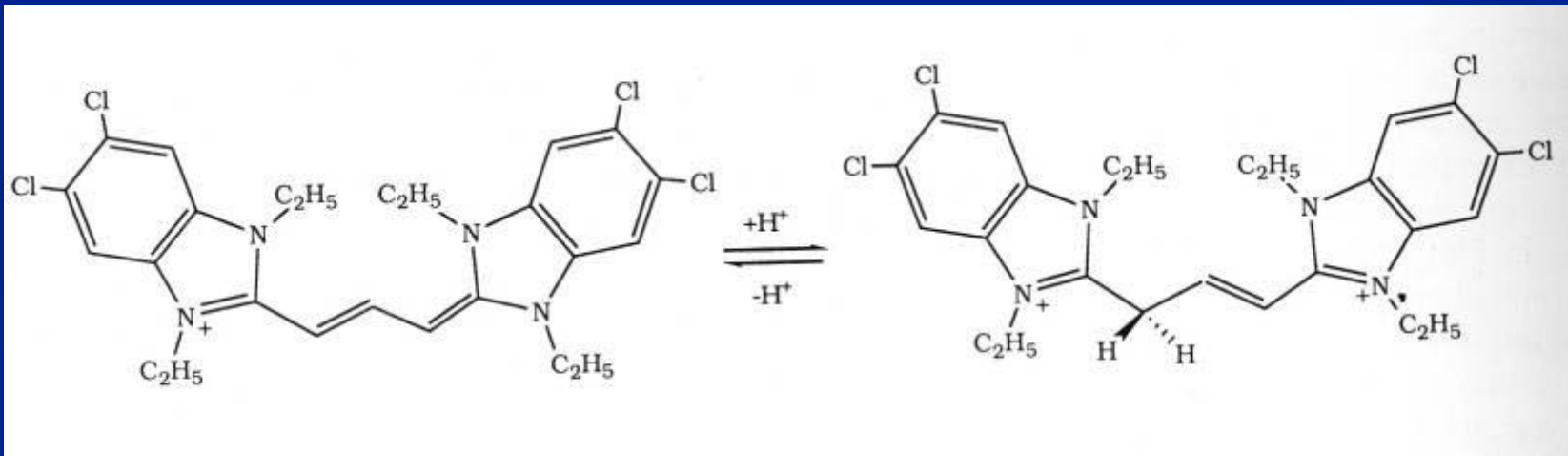


Calcium-senzitivní chemická sonda (zvyšující se koncentrace Ca^{2+} zvyšuje fluorescenci při excitaci 340 nm; detekce 510 nm)

Fura-2/AM (acetoxymethylester) má nízkou fluorescenci; po vstupu do buňky je hydrolyzován esterázami na Fura-2)

STANOVENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

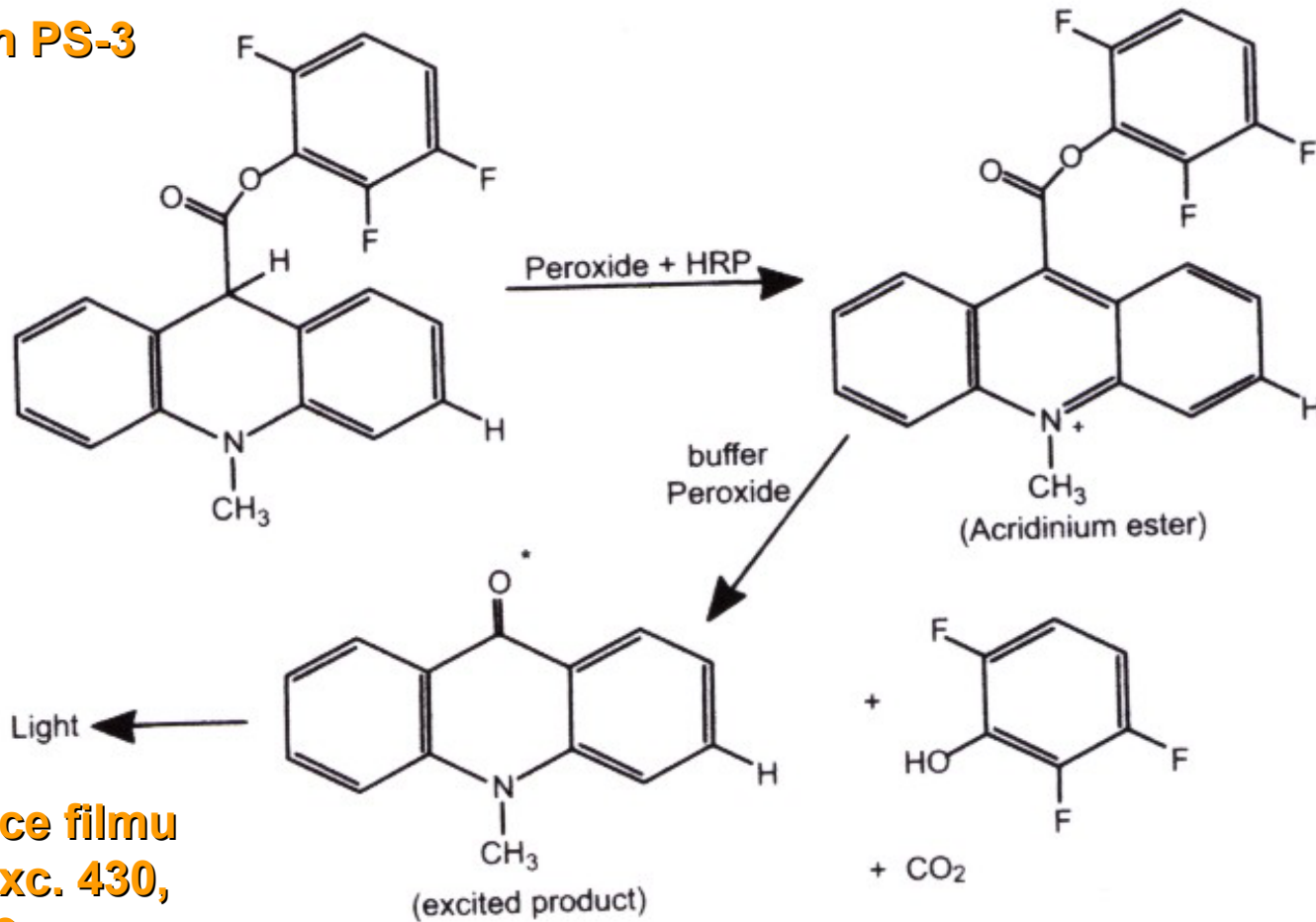
JC-1



závislost na pH
červený agregát JC-1

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents

Lumigen PS-3



Expozice filmu
nebo exc. 430,
em. 503 nm

DAŠÍ DŮLEŽITÉ SPEKTRÁLNÍ METODY

- ◆ Fotometrická detekce lipidní peroxidace pomocí kyseliny thiobarbiturové (detekuje hydroperoxydy lipidů)
- ◆ Stanovení aktivity NADPH oxidáz a „konzumace“ NADPH v buňkách (snížení absorpce při 340 nm)
- ◆ Stanovení cytotoxicity, viability, proliferace buněk
 - MTT (methylthiazoltetrazoliumbromid) se v mitochondriích přeměňuje na barevný nerozpustný formazan (pro kvantitativní stanovení je rozpustěn po inkubaci buněk s SDS)
 - XTT produkuje rozpustnou formu formazanu (opět fotometrická detekce)
 - Neutrální červeň - příjem do buněk
 - Kombinace calcein AM (fluorogenní esterázový substrát - zelený produkt) + ethidium homodimer-1 (ten vstupuje jen do mrtvých buněk a barví NA červeně)
- ◆ Další informace např. v užitečném katalogu firmy Molecular Probes (www.probes.com)