

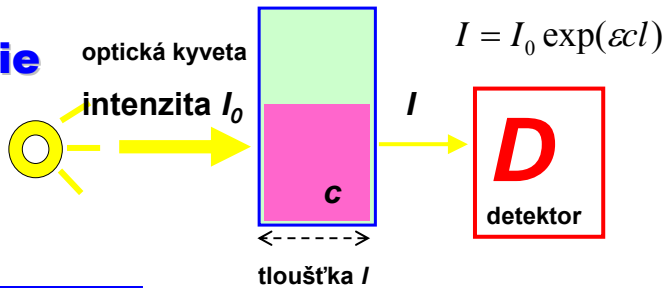
Měření enzymové aktivity

- optické
- elektrochemické
- manometrické
- vhodné substráty
- příklady stanovení nejdůležitějších enzymů

Měření aktivity

- podmínky konstantní (složení pufru, pH, teplota, tlak)
- rychlost reakce limituje enzym (ostatní reagentie v nadbytku)
- rychlost změny signálu v čase by měla být konstantní (lineární oblast, saturace enzymu substráty, tj. $[S] \gg K_{M,S}$ protože pak platí $v \approx V_{lim}$)

Fotometrie



$$\ln(I_0 / I) = \boxed{A = \epsilon cl} \quad \text{Lambert-Beerův zákon}$$

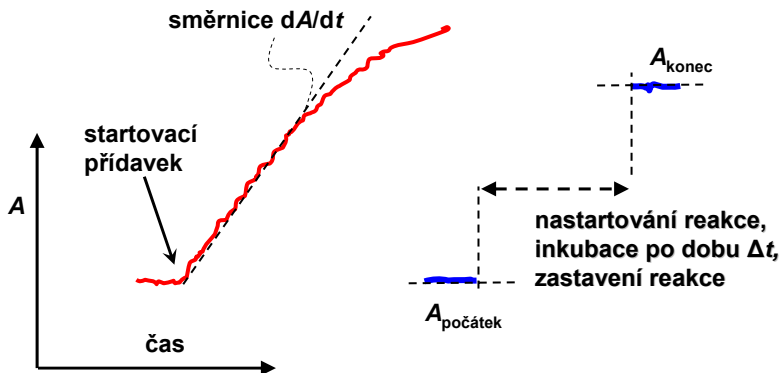
- pokles intenzity (absorbce) světelného paprsku po průchodu kyvetou s barevnou látkou je úměrný koncentraci stanovované látky
- v praxi se používá **absorbance A**, která je přímo úměrná koncentraci **c** (extinkční koeficient ϵ při dané vlnové délce je konstantou úměrnosti) a velikosti l kyvety
- absorbance je bezrozměrná veličina
- (rozptyl světla se obvykle zanedbává)

Výpočet aktivity

$$\boxed{a = \frac{dn}{dt} = \frac{V}{\epsilon l} \left(\frac{dA}{dt} \right)} \approx \frac{V \Delta A}{\epsilon l \Delta t}$$

- dA/dt ... u přístrojů s kontinuálním záznamem
- ΔA ... změna absorbance při ručním odečtu ($\Delta A = A_{\text{konec}} - A_{\text{počátek}}$) za dobu inkubace Δt
- V ... objem reakční směsi v kyvetě při měření (celkový, včetně všech přísad)
- l ... délka optické dráhy v kyvetě (obvykle 1 cm)
- ϵ ... extinkční koeficient, udává se obvykle při určité vlnové délce (např. ϵ_{280}) pozor na jeho jednotky

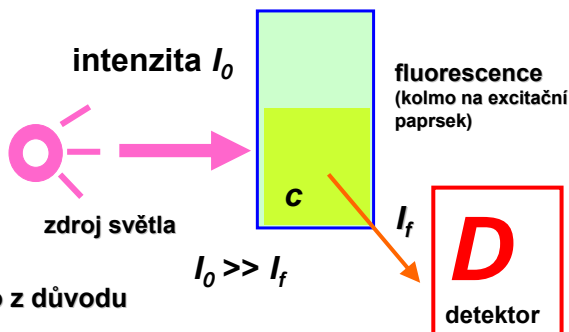
Ukázka záznamu



- **kontinuální** a **diskontinuální** měření absorbance

Fluorescence

$$I_f = k\Phi \varepsilon cl$$



- je využívána velmi často z důvodu vysoké citlivosti
- absorbcí energie přechází molekula do excitovaného stavu, návrat do základního stavu je provázen emisí záření – fluorescence
- intenzita fluorescence I_f závisí na absorpci a kvantovém výtěžku Φ
- emisní spektrum látky je oproti excitačnímu posunuto k vyšším vlnovým délkám (Stokesův posuv)
- pro budící záření se často používá světlo laseru, je také výhodné používat polarizované záření
- vztah mezi fluorescencí a látkovým množstvím substrátu či produktu se určí kalibrací (není extinkční koeficient - podmínky měření málo reprodukovatelné)

Luminiscence



aktivace rozpad

- je to emise světla z molekuly v excitovaném stavu, který vznikl jako důsledek chemických reakcí
- kvantový výtěžek luminiscence odpovídá podílu počtu vyzařených fotonů a excitovaných molekul, u přírodních systémů může dosahovat až 90%
- intenzita I vyzařovaného světla je závislá na čase, v určitém okamžiku prochází maximum (t_{max})

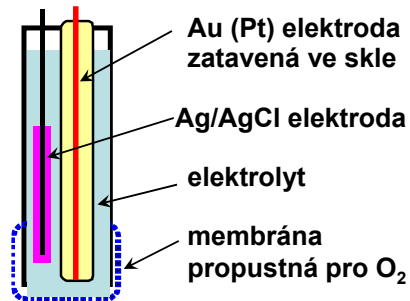
$$I \approx [A_0] \frac{k_1 k_2}{k_1 - k_2} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)]$$

$$t_{max} = \frac{\ln \frac{k_2}{k_1}}{k_2 - k_1}$$

- vztah mezi luminiscencí a látkovým množstvím substrátu či produktu se určí kalibrací

Měření kyslíku

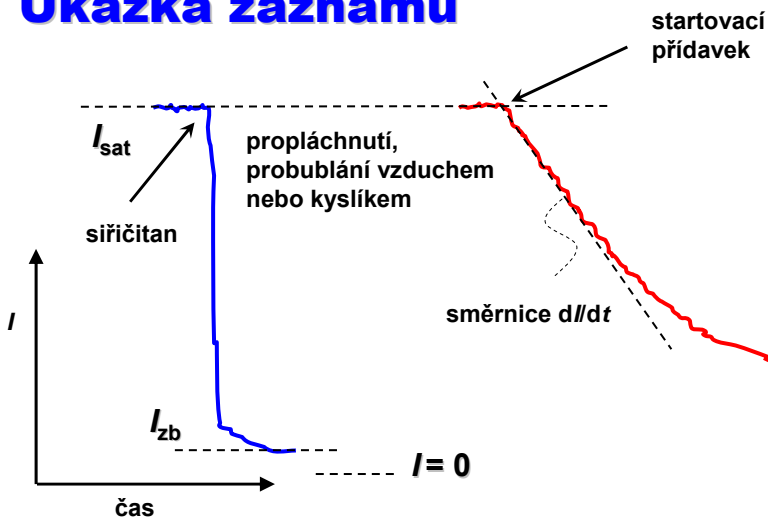
- provádí se elektrochemicky pomocí Clarkova článku
- elektrodová redukce kyslíku (-750 mV, katoda) je 4-elektronový proces:



- $O_2 + 2 H_2O + 2 e^- \longrightarrow H_2O_2 + 2 OH^-$
- $H_2O_2 + 2 e^- \longrightarrow 2 OH^-$



Ukázka záznamu



- nejprve se provede jednorázová **kalibrace** sensoru, pak vlastní **měření**
- měřicí nádobka uzavřená - aby tam nešel kyslík z okolí

Výpočet aktivity

$$a = \frac{dn_{O_2}}{dt} = \frac{c_{0,O_2} V}{I_{sat} - I_{zb}} \frac{dI}{dt}$$

- c_{0,O_2} ... výchozí koncentrace kyslíku v roztoku za daných podmínek (typ pufru, teplota, tlak) - určí se z tabulek
- dI/dt ... rychlost úbytku proudu v přítomnosti enzymové reakce
- I_{sat} - maximální velikost proudu při saturující koncentraci kyslíku
- I_{zb} - zbytkový proud sensoru v mediu bez kyslíku (vyčerpá se chemickou reakcí se siřičitanem - kalibrace)
- někdy sensor přímo měří koncentraci kyslíku

Acidobazické titrace

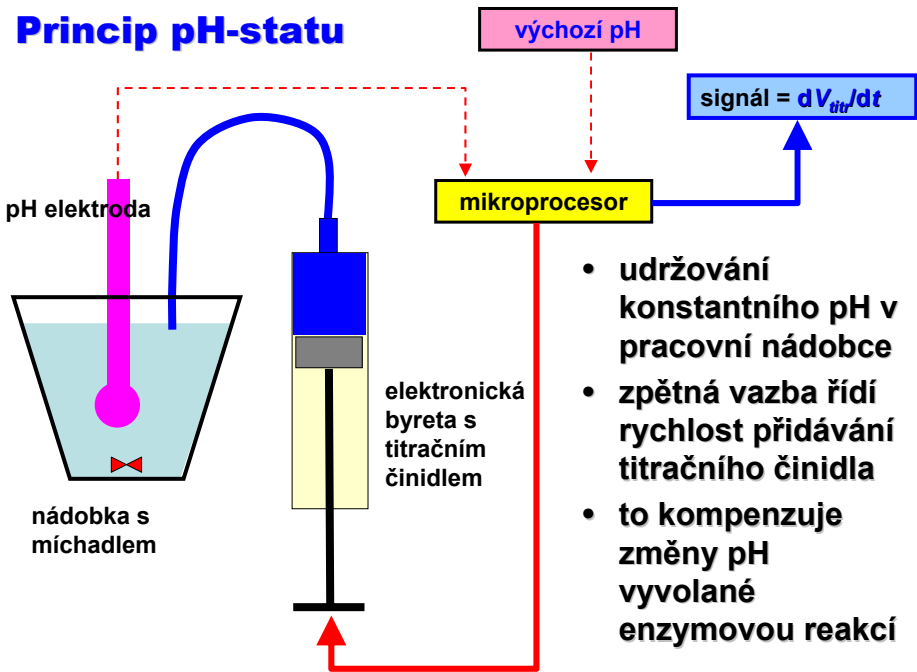
- enzymové reakce zahrnující **změnu pH** - zejména hydrolasy (štěpení konjugátů poskytuje kyselinu jako jeden z produktů)
- oxidace substrátů pomocí NAD^+
- vznikající kyselina (**báze**) je průběžně titrována standardním roztokem báze (**kyseliny**) o známé koncentraci tak, aby pH roztoku bylo pořád stejné jako při zahájení reakce - zařízení **pH-stat**
- rychlost "odebírání" ("**dodávání**") iontů H^+ pak určuje aktivitu enzymu

Výpočet aktivity

$$a = \frac{dn}{dt} = c_{\text{titr}} \frac{dV_{\text{titr}}}{dt}$$

- c_{titr} ... koncentrace standardního roztoku titračního činidla; pozor na stechiometrii, např. $c_{\text{titr}} = [\text{H}^+] = 2[\text{H}_2\text{SO}_4]$
- dV_{titr}/dt ... rychlost přítoku titračního činidla do měřicí nádoby

Princip pH-statu



Ukázka pH statu



Manometrické metody

- měří se objem plynu vyvinutého (nebo spotřebovaného) v enzymové reakci za normálních podmínek (25 °C, 101 kPa)
- konstanta úměrnosti - molární objem plynu, $V_m = 22,4 \text{ dm}^3/\text{mol}$

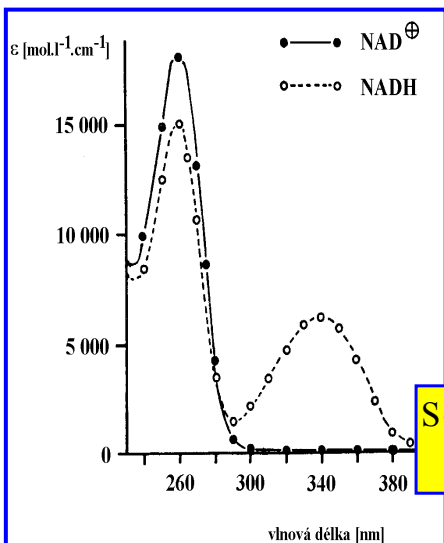
Výpočet aktivity

$$a = \frac{dn}{dt} = \frac{1}{V_m} \frac{dV}{dt}$$

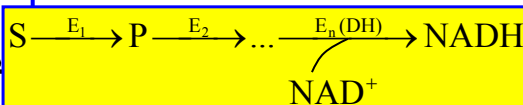
nejsou-li normální podmínky, určí se látkové množství plynného produktu ze stavové rovnice:

$$\Delta n = \frac{p\Delta V}{RT}$$

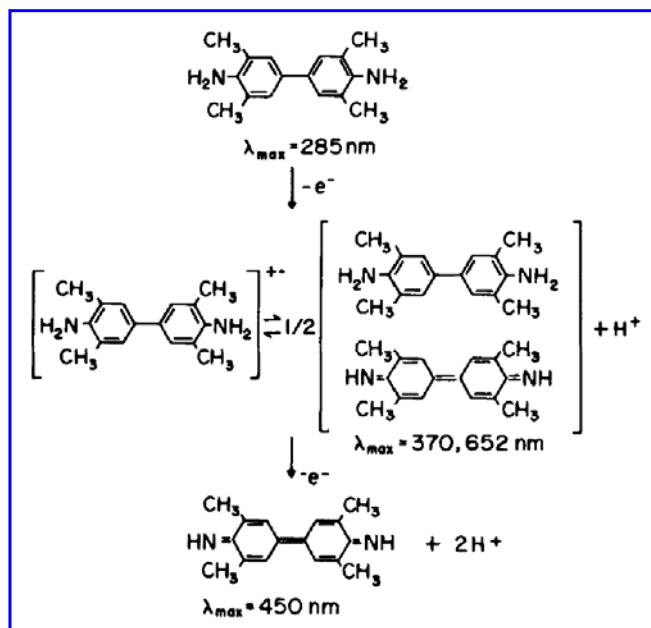
NAD(P)⁺ / NAD(P)H - Wartburgův optický test



- přirozený substrát, který při enzymové reakci mění barvu (chromogenní) - při 340 nm
- univerzální pro stanovení dehydrogenas (xDH)
- často funguje jako koncový krok "zviditelňující" předcházející "nebarevné" enzymové reakce

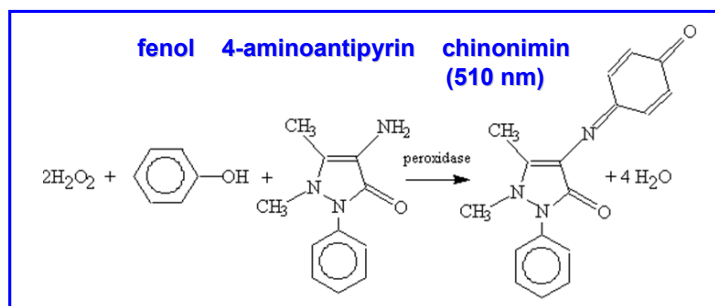


TMB



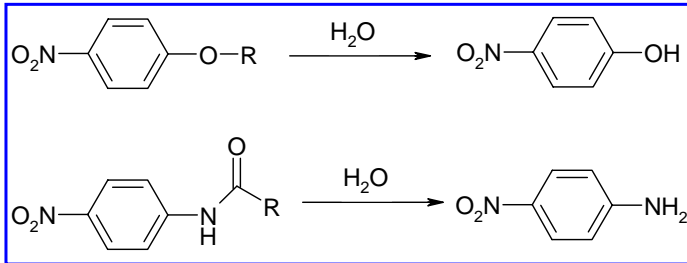
- 3,5,3',5'-tetramethylbenzidin

4-aminoantipyrin

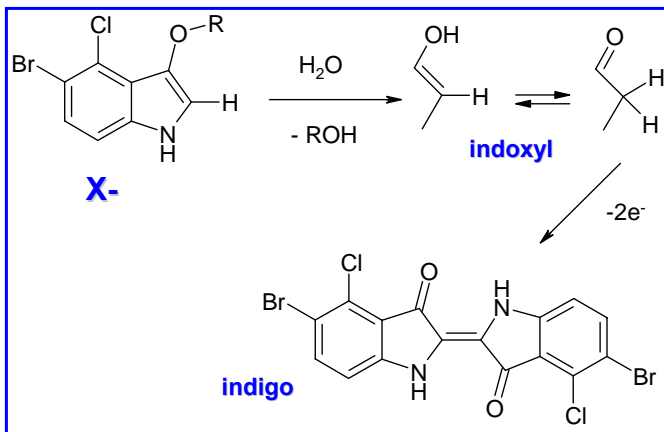


Hydrolasy

- použití derivátů 4- nebo 2-nitrofenolu a 4-nitroanilidu
- po hydrolyse vzniká intenzivní žluté zbarvení

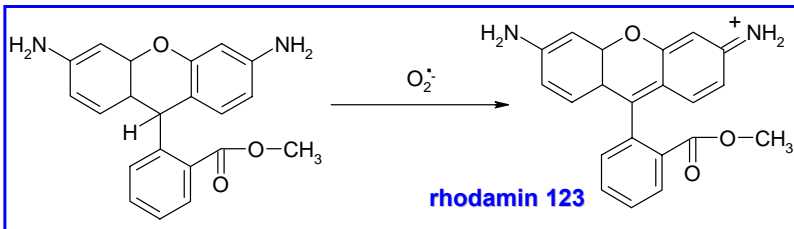


5-bromo-4-chloro-indolyl (X-)



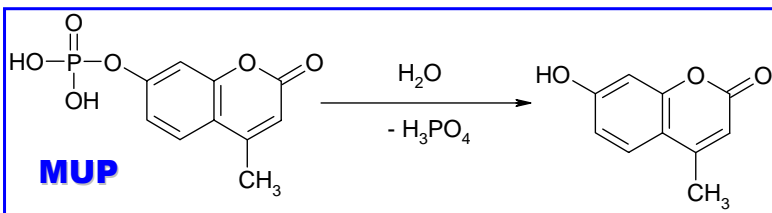
- hydrolytickou reakcí vzniká indoxyl, který po oxidaci (např. tetrazolium) přechází na modré indigo

Fluorogenní substráty oxidoreduktas

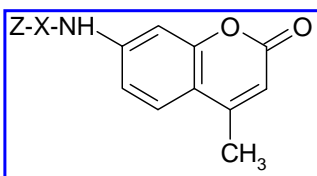


dihydrorhodamin oxiduje superoxidový radikál na rhodamin 123, zelená fluorescence, $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 505 / 534\text{nm}$)

Fluorogenní substráty hydrolas



4-methylumbelliferylfosfát (**MUP**), po hydrolyse fosfatasou vzniká 4-methyl-7-hydroxykumarin (methylumbelliferol), modrá fluorescence, $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 360 / 450\text{ nm}$)

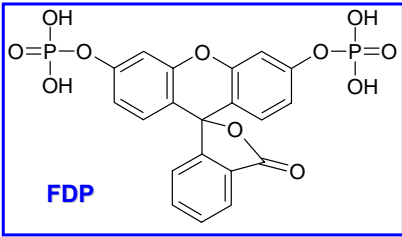


deriváty 7-amino-4-methylumbelliferolu (**Z-X-AMC** nebo **Z-X-MCA**), AMC produkt $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ při 342 / 441 nm, např. 7-amino-4-methylkumarin *N*-CBZ-L-fenylalanyl-L-argininamid (**Z-FR-AMC**) pro stanovení serinových proteinas a plasminu, kalikreinu, katepsinu), nebo 7-amino-4-methylkumarin, *N*-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparagylamid (**Z-DEVD-AMC**) pro kaspasu 3

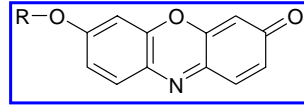
alternativně deriváty 7-amino-4-trifluoromethylkumarinu, např. **Z-DEVD-AFC**

N-CBZ- je *N*-benzyloxykarbonyl-

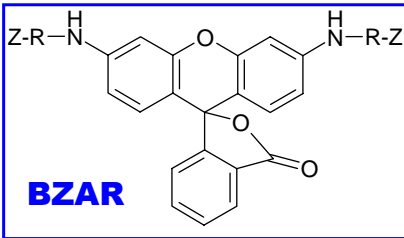
Fluorogenní substráty hydrolas



deriváty fluoresceinu, např.
fluoresceindifosfát pro ALP



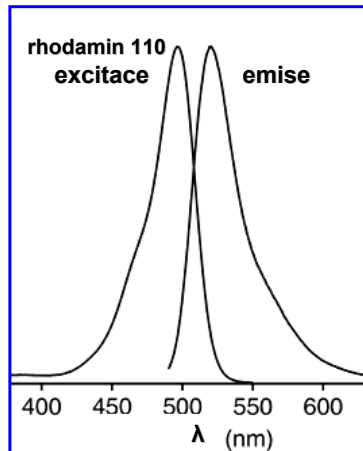
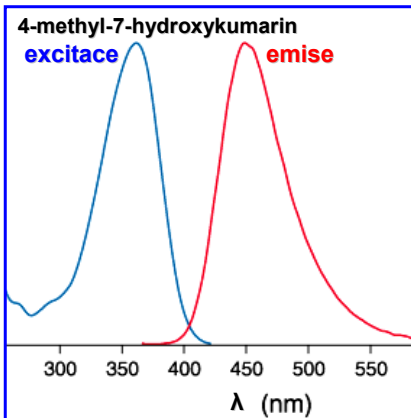
deriváty resorufinu



rhodamin 110, bis-(*N*-CBZ-L-argininamid) (**BZAR**), pro serinové proteínasy, (496 / 520 nm) cca 100x citlivější než sloučeniny založené na AMC

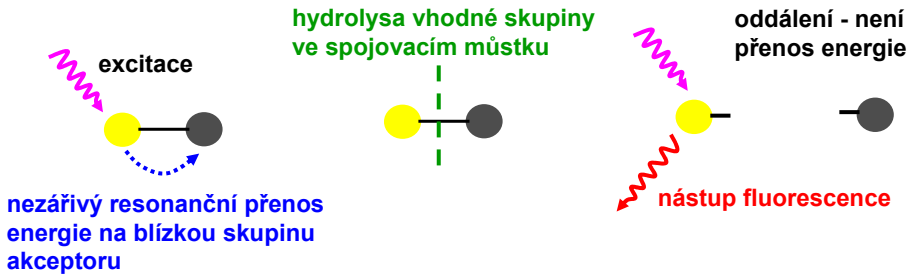
jiný příklad - rhodamin 110, bis-(*N*-CBZ-L-fenylalanyl-L-arginin amid) (**Z-FR-R110**) pro cysteinové proteínasy katepsin B a L

Srovnání spektrálních vlastností



FRET fluorescence energy resonance transfer

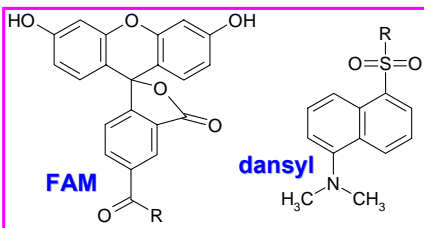
● fluorescenční skupina (fluorofor) ● zhášející skupina (quencher)



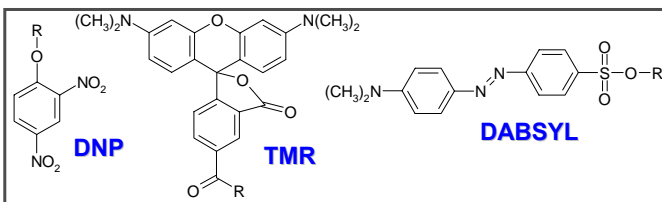
ŽÁDNÁ FLUORESCENCE

- citlivá detekce hydrolas, např. proteinas
- v můstku je peptidová vazba

FRET - vhodné skupiny



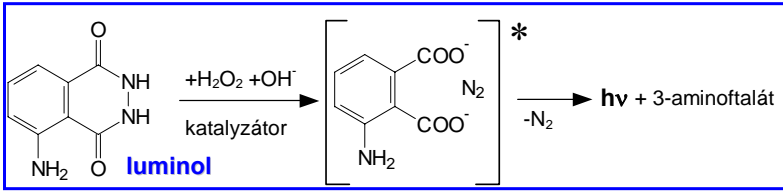
fluorofory (donory, R značí napojení na další část molekuly)



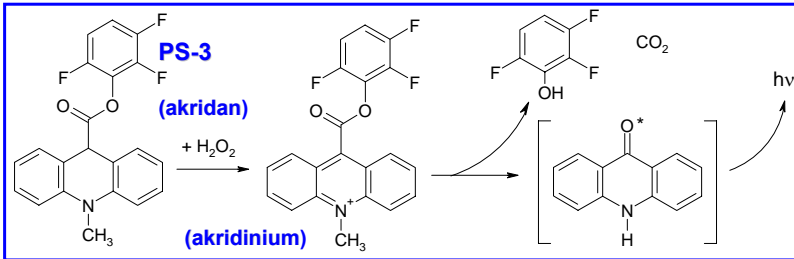
zhášedce (akceptory)

Luminogenní substráty

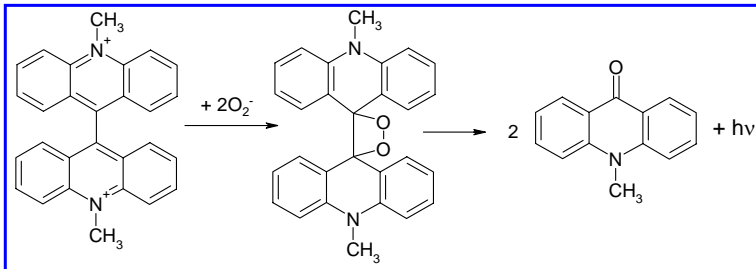
- pro citlivou detekci peroxidu vodíku se používá **luminol** (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion), celkový výtěžek je pouze 0.01 (špatná fluorescence)
- intenzita světla je úměrná koncentraci H_2O_2 , katalyzuje peroxidasa



- alternativa - akridanové luminogeny

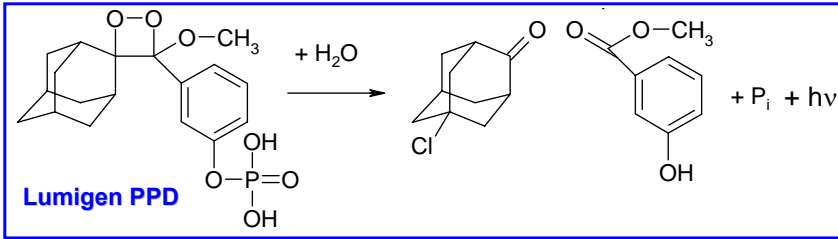


Měření superoxidového radikálu



- **lucigenin**

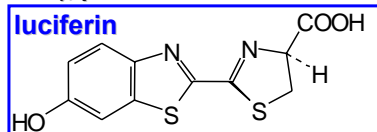
Fosfatasy



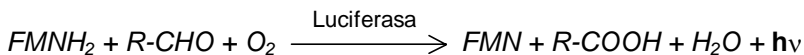
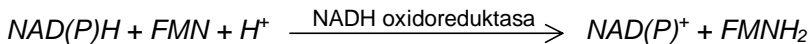
- Lumigen PPD (chloro-4-methoxy-4-(3-fosfátophenyl)spiro[1,2-dioxetan-3,2'-adamantan]) - vhodný luminogenní substrát pro měření alkalické fosfatasy (ALP)

Luciferasy (ATP resp. NAD(P)H)

- štěpí substrát luciferin (různé dle organismu), přičemž dochází k emisi světla
- **světluška** (firefly, *Photinus pyralis*) luciferasa (EC 1.13.12.7) oxiduje příslušný luciferin za účasti ATP, emise při 560 nm, výtěžek asi 0.88 !
- měření enzymů produkujících ATP



- **mořské bakterie** (*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *Photobact. phosphoreum*) luciferasa (EC 1.14.14.3) až 5% obsahu buňky, oxiduje aldehydy (>C₈, dekanal, tetradekanal); v buňce obsahují i NAD(P)H:FMN oxidoreduktasu:



- měření dehydrogenas

Radiometrie

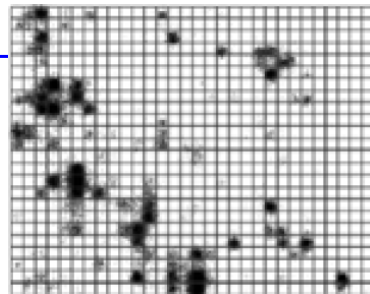
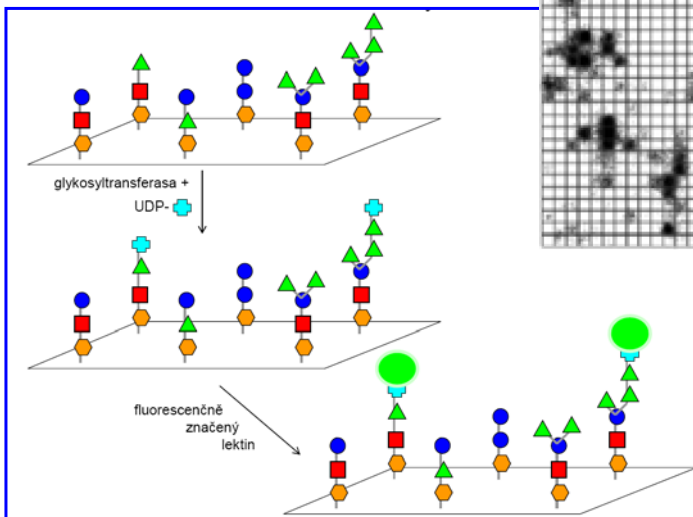
- sledování radioaktivně označeného substrátu nebo produktu
- používané sloučeniny:
 - jednoduché - $^{14}\text{CO}_2$, $^3\text{H}_2\text{O}$, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$
 - uniformě značené - ^{14}C alanin, ^{14}C ethanol
 - specificky značené L-[methyl- ^{14}C] methionin, [methyl- ^3H] thymin
- jednotky: Becquerel $\sim \text{s}^{-1}$ (dle SI), Curie $\sim 1 \text{ g } ^{226}\text{Ra}$, ($\mu\text{Ci} - \text{mCi}$ v praxi)
- detektory
 - ionizační (Geiger-Mullerova trubice)
 - scintilační
 - polovodičové skenery
 - fotografický materiál
- separace rad. produktu
 - precipitací, extrakce
 - vývoj nebo inkorporace rad. plynu nebo těkavé látky
 - elektroforesa, papírová nebo tenkovrstevná chromatografie

výhody

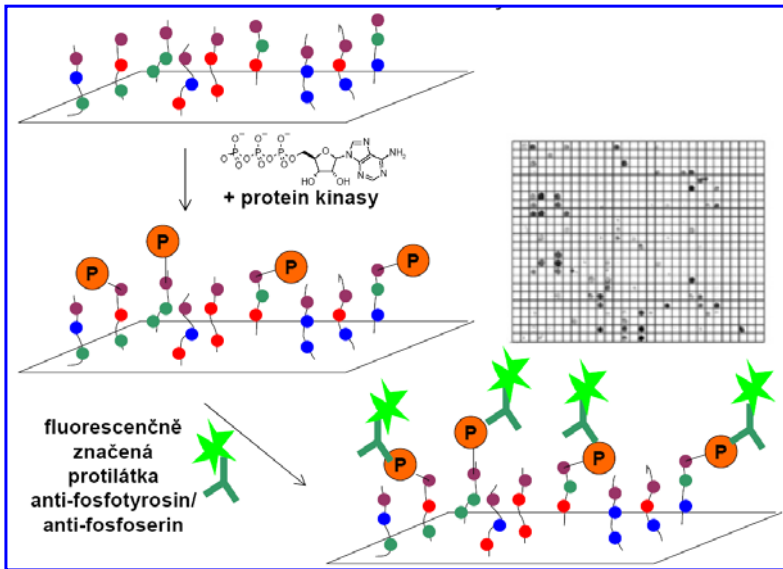
 - přesnost, chemická identita, měření radioaktivity nezávisí na formě a podmínkách
- problémy
 - nákladné vybavení i reagentie, pracovní rizika

Microarrays

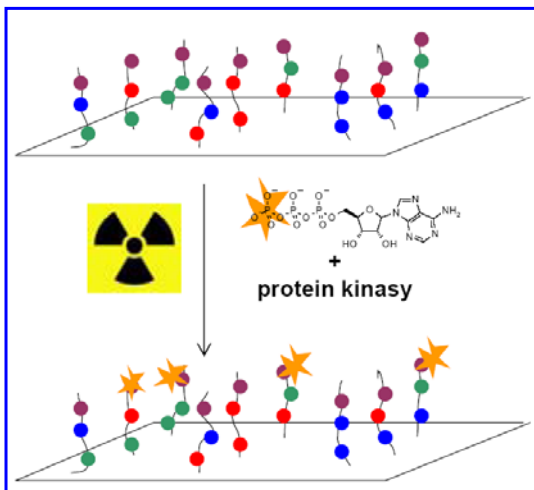
- screening enzymů použitím mnoha různých substrátů (array) zakotvených na nosiči



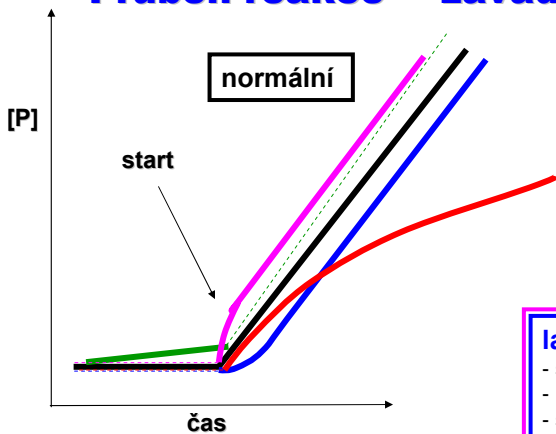
Screening kinas



... radioaktivní značení



Průběh reakce - "závady"



zpomalování reakce

- málo substrátu, vznik rovnováhy
- inhibice produktem
- nestabilní enzym
- inhibice s pomalou rovnováhou
- nedokonalá metoda
- změněné podmínky stanovení

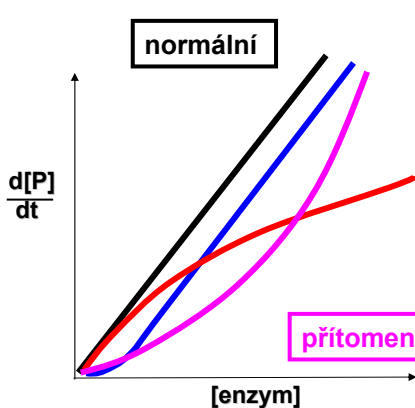
lag fáze / rychlejší počátek

- špatná regulace teploty
- usazování částic
- špatné promíchání
- pomalý ustálený stav
- pomalá odezva detektoru
- inhibice substrátem
- aktivace produktem

reaguje i bez enzymu (či substrátu)

- precipitace
- usazování částic
- kontaminace substrátu enzymem (enzymu substrátem)
- neenzymový rozklad substrátu
- usazování na stěny reakčních nádob

Rychlost vs. enzym



přítomen kovalentní inhibitor

zpomalování rychlosti

- neměří se počáteční rychlost
- pomalá spřažená reakce
- přítomen nekovalentní inhibitor

přítomen aktivátor