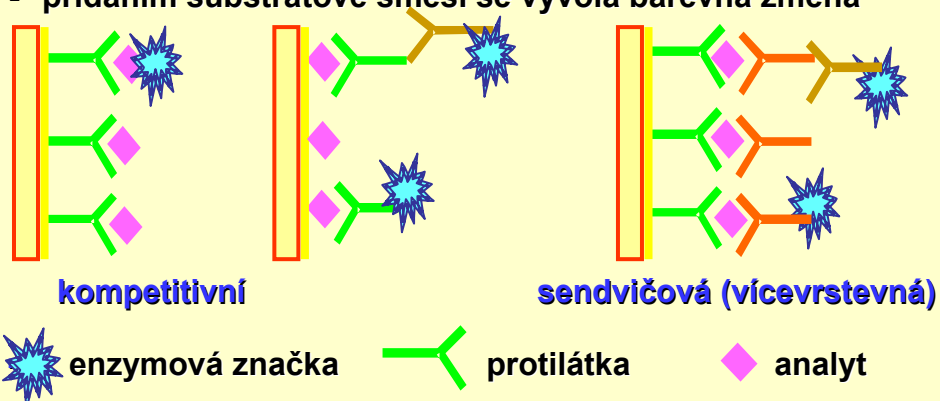


Enzymové značky

- jedna molekula značky při detekční enzymové reakci konvertuje mnoho molekul substrátu
 - chromogenní, fluorogenní nebo poskytující jiné detekovatelné produkty
- takže je zde využít jistý zesilovací mechanismus
- nejběžnější využití je v bioanalytice - v imunochemických technikách typu ELISA

ELISA

- enzyme linked immunosorbent assay“
- enzymové konjugáty („tracery“) slouží pro detekci vzniku a množství imunokomplexů
- enzymová značka se zachytí v komplexu na pevné fázi
 - povrch zkušavky, mikrotitrační destičky, imunostripu
- přidáním substrátové směsi se vyvolá barevná změna

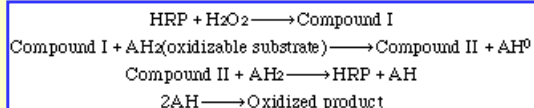


Vlastnosti enzymu vhodného pro značení

- **dostatečně vysoká aktivita**
 - vysoké číslo přeměny
- **stabilita**
- **snadná detekovatelnost**
- **skupiny vhodné pro konjugaci**
 - konjugáty lze připravit mezi zvoleným enzymem a značenou komponentou
 - výhodně lze používat univerzálně např. biotinylované enzymy nebo protein A (G) - enzymové konjugáty

Peroxidasa

- z kořenů křenu (HRP, „horse radish peroxidase“, EC 1.11.1.7)
- malý (40 kDa) oxidoredukční enzym s hemem (protohem IX) v aktivním místě, glykoprotein, katalyzuje oxidaci široké škály substrátů pomocí peroxidu vodíku (i MeOOH a EtOOH)
- donory fenolické povahy nebo aromatické aminy, které jsou bezbarvé (leukoformy) a po oxidaci vznikají intenzivně barevné produkty
- pH optimum je 5 až 7, stabilita při pH 4 až 10
- enzym je inhibován mimo jiné azidem, kyanidy a sulfidy
- mnoho isoenzymů, komerčně dostupná HRP C



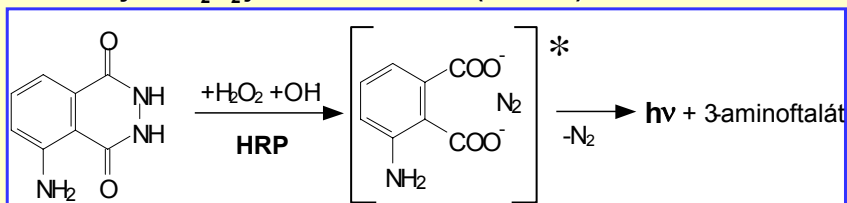
- peroxidasa ze sojových bobů (40 kDa) je termostabilní (do 90 °C) a aktivní v širokém rozsahu pH 2 až 10

Konjugace peroxidasy

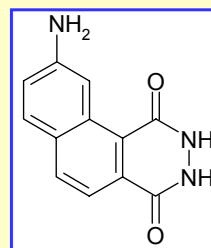
- při tvorbě konjugátů se peroxidasa může jednoduše sledovat a stanovovat na základě absorpance při 403 nm (typické pro hemoproteiny)
- poměr absorbancí při 403 a 275 nm charakterizuje čistotu enzymu
 - toto jednoduché stanovení komplikuje existence několika isoenzymů
 - velmi kvalitní preparáty mají tuto hodnotu (R.Z., reinheitszahl) mezi 3 až 3.4, nemá to ale vazbu na aktivitu
- reakce mohou využít ϵ -aminoskupiny zbytků lyzinu – ty jsou ale pouze 2, což je velmi málo
- využívají se sacharidové postranní řetězce
 - snadno se aktivují pomocí oxidace jodistanem a tak se získají aldehydové skupiny

Luminogenní substráty HRP

- pro citlivou detekci HRP se používá **luminol**
 - 5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion
- v nadbytku H_2O_2 je intenzita světla (425 nm) úměrná množství HRP

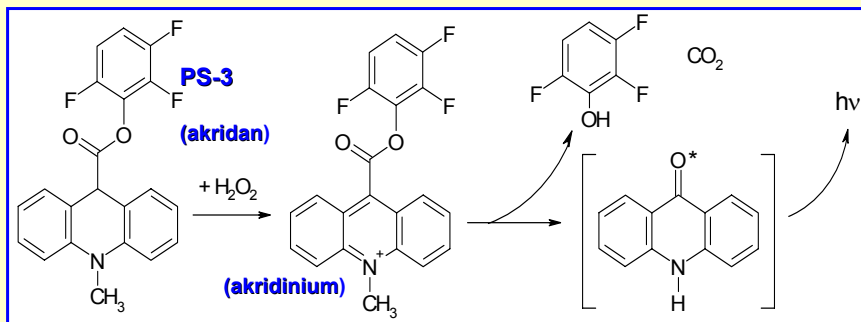


- zlepšení luminiscence (vyšší výtěžek) - přítomnost "enhancers" sloučenin - *p*-jodofenol, *p*-fenylfenol
 - nejde již o záblesk, ale o stabilnější světelný tok
 - výsledek silně závisí na podmínkách reakce
 - raději použít komerčně namíchané směsi
- vyšší výtěžek dává 7-dimethylaminonaftalen-1,2-dikarboxyhydrazid



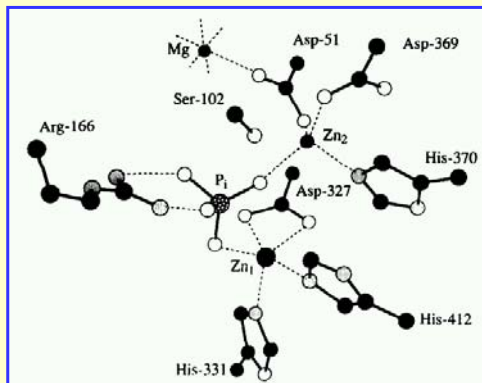
Akridanové luminogeny

- alternativní substráty pro HRP
- emise při 435 nm



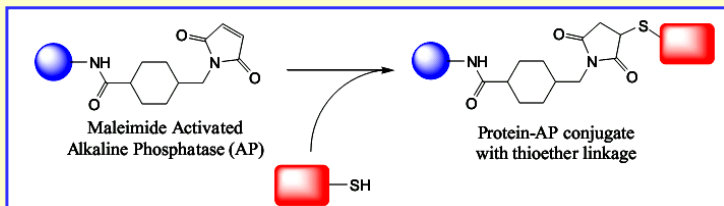
Alkalická fosfatasa

- katalyzuje štěpení ortho-esterů kyseliny fosforečné v zásadité oblasti pH (AP, EC 3.1.3.1)
- řada isoenzymů, používá se enzym izolovaný z mukosy telecích střev
 - CIAP, 140 kDa dimer, 2 Zn^{2+} na podjednotku, vysoké číslo přeměny 3500 s^{-1} při reakci kolem pH 9,8 (pH optimum je 8 až 10)
 - aktivována aminoalkoholy (diethanolamin, Tris)
- uchovává se lyofilizovaná nebo v 3 M NaCl
 - nesnáší kyselé prostředí
 - poškozuje ji opakované zmrazování / rozmrazování
- relativně dobře snáší vyšší teploty
 - např. v průběhu hybridizace
 - značka při detekci nukleových kyselin

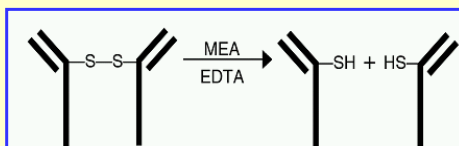


Konjugace ALP

- příprava konjugátů není snadná a často dochází ke ztrátám aktivity
- pomocí glutaraldehydu nebo lépe
- heterobifunkčními činidly SMCC a SPDP
 - je dobré provádět konjugaci ve fosfátovém pufru, který chrání aktivní místo jako reverzibilní inhibitor
- komerčně dostupná je ALP s maleimidem (EZ-link od Pierce):

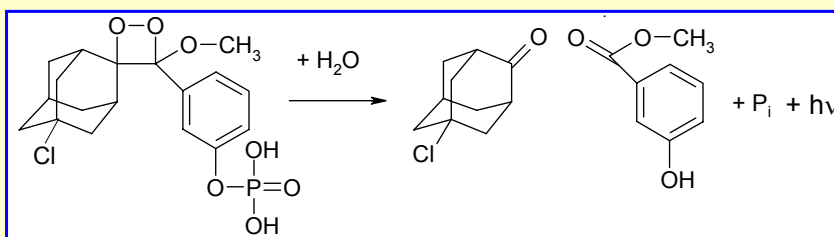
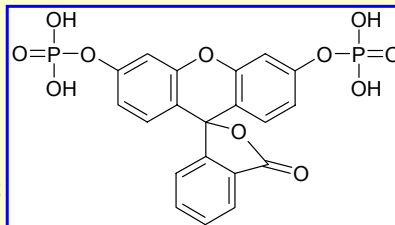


- protilátky se redukuje merkaptoethanolem a po dialýze lze provést konjugaci
- pro zavedení -SH slouží SATA

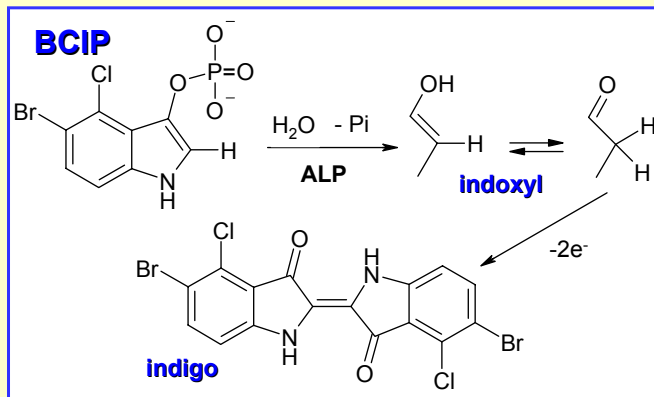


Měření aktivity

- **p-nitrofenylfosfát (PNPP, 405 nm)**, hydrolyzou vzniká nitrofenol
 - intenzivně žlutý v alkalickém prostředí
- deriváty fluoresceinu, **fluoresceindifosfát**
- **4-MUP** (methylumbelliferylfosfát)
- luminogenní substrát - **Lumigen PPD**
 - chloro-4-methoxy-4-(3-fosfátophenyl)spiro[1,2-dioxetan-3,2'-adamantan]
 - patří do skupiny dioxetanových luminogenů
 - substituce halemgenem v adamantanovém skeletu zlepšuje citlivost detekce (už 600 molekul ALP, zeptomoly)
 - 477 až (dle enhanceru) 620 nm



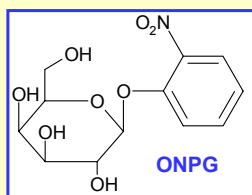
5-bromo-4-chloro-indolylfosfát (BCIP)



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

Galaktosidasa

- β -galaktosidasa (β Gal, EC 3.2.1.23) je velký enzym (540 kDa, 4 podjednotky po 135 kDa) a je tedy snadno inaktivován
- katalyzuje hydrolyzu galaktosidů, pI 4,6, pH optimum má 7 až 7,5 (enzym z *Escherichia coli*)
- má dostatek sulfhydrylových skupin pro konjugační reakce, takže lze jednoduše spojit s protilátkami aktivovanými předem SMCC
- chromogen. substrátem je ONPG
 - o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid
 - v hydrolytické reakci nitrofenol
- Xgal produkuje indigo



Gal jako reporter genové exprese

- enzym může být rozdělen na dva peptidy LacZ α a LacZ Ω
 - samy o sobě nemají aktivitu
 - ale spontánně se spojí do funkčního enzymu
- využívá se v mnoha klonovacích vektorech pro dosažení α -komplementace u speciálních lab. kmenů *E. coli*
 - malý LacZ α peptid je kodován v plasmidu
 - velký LacZ Ω je kodován bakteriálním chromosomem
 - když se DNA fragment vpraví do vektoru a produkce LacZ α se přeruší, ztratí se β -galaktosidasová aktivita
 - základem pro modro/bílý screening rekombinantních klonů

Glukosa oxidasa

- (β -D-glukosa:O₂-1-oxidoreduktasa, EC 1.1.3.4, GOD)
- dostupná z plísni *Aspergillus niger* nebo *Penicillium notatum*
- 160 kDa, dimer se dvěma FAD kovalentně vázanými na podjednotky
- obsahuje asi 16% glykosylových zbytků
- specifická aktivita preparátů přesahuje 200 IU/mg
- velmi stabilní
- v imunostanoveních často "spolupracuje" s HRP, pro kterou generuje peroxid vodíku oxidací glukosy
 - tunelovací stanovení, imunosensory

Ureasa

- **substrátem je močovina**
 - změna pH vyvolaná hydrolysou, měří se
 - pomocí indikátoru bromkresolová modř při 588 nm
 - potenciometricky (light addressable potentiometric sensor, na bázi pH ISFETu) - pro imunosensory

Lakasa

- z choroše *Coriolus hirsutus*, Cu-dependentní 1,4-benzendiol oxidasa (EC 1.10.3.2)
- oxiduje fenolické substráty pomocí kyslíku
 - alternativa k peroxidase
 - menší problémy s dlouhodobou stabilitou substrátové směsi

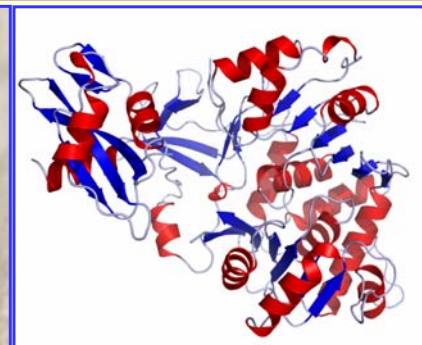
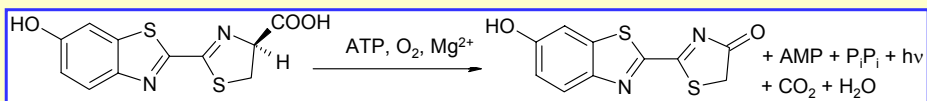
Acetylcholinesterasa

- vysoké číslo přeměny (10^5 s^{-1})
- z elektrického úhoře
- vysoká citlivost stanovení
- substrát acetylthiocholin a DTNB
 - dithiobis(nitrobenzoová kyselina), Ellmanovo činidlo
 - poskytuje žluté zbarvení



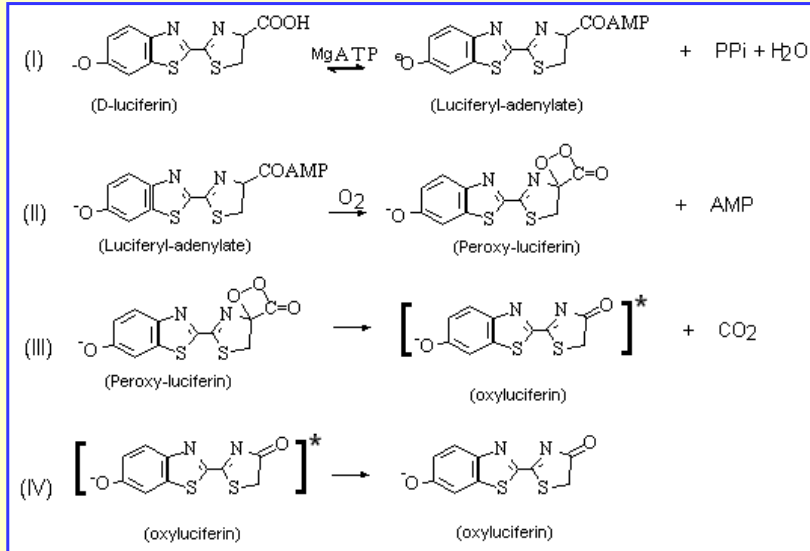
Luciferasy

- patří mezi oxygenasy, štěpí substrát luciferin za účasti ATP
 - meziproductem je luciferyladenylát, ten je poté oxidován
 - luciferin-4-monooxygenasa, 61 kDa, 550 aa
 - dochází k emisi světla při 560 nm (žlutozelené světlo), výtěžek asi 0.88 !
- zdrojem světluška (firefly, *Photinus pyralis*), (EC 1.13.12.7)



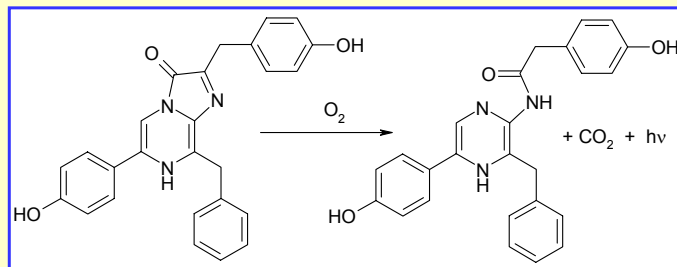
Reakce luciferasy

- kroky I a II jsou enzymové (ligace a oxygenace)



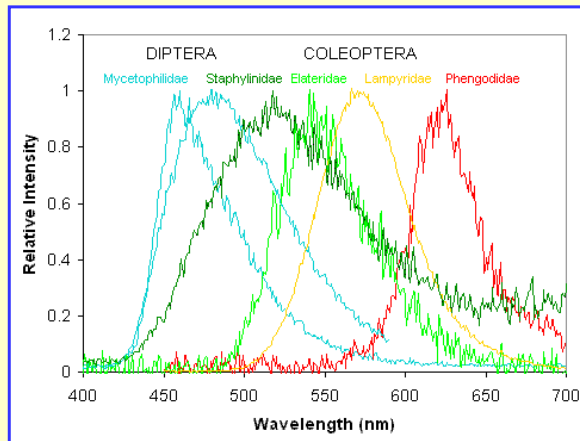
Luciferasa z *Renilla*

- mořská sasanka ("sea pansy", *Renilla reniformis*) svítí při dráždění
- emituje modré světlo 480 nm, přenosem na GFP vzniká zelené záření
- 36 kDa monomer
- luciferinem je **coelenterazin**



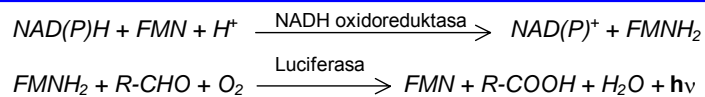
Luciferasa z brouků

- zdrojem je "click-beetle", *Pyrophorus plagiophthalmus*
- různé enzymy emitující od 544 do 593 nm (zeleně až oranžově)
 - byly geneticky upraveny pro emisi při 611 nm a 544 nm
 - *lucRD* červená emise ("Chroma-Glo"), *lucGR* zelená emise (nebo *CBRluc*, *CBGluc*)



Luciferasa z bakterií

- mořské bakterie - luciferasa (EC 1.14.14.3) oxiduje aldehydy (>C8, dekanal, tetradekanal)
 - *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum*
- nemají význam pro použití v eukaryotických buňkách, pouze u prokaryot

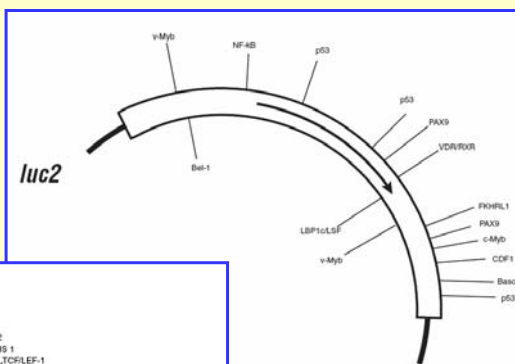
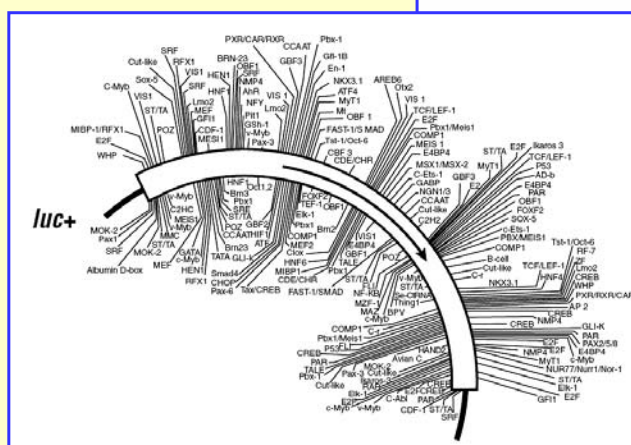


Geneticky upravené luciferasy

- **světlušky:**
 - *luc* nativní varianta, *luc+* "enhanced", zvýšená luminiscence (vyšší svítivost) - vyžadují zlyzování buněk před přidáním substrátů
 - *hLuc+* optimalizované kodony pro expresi v savčích buňkách, svítí déle, poločas přes 5 hod, "Steady-Glo", *hLucP+* zkrácená stabilita uvnitř buňky, poločas 30 min, "Bright-Glo", *hLucCP+* velmi krátká živostnost - svítí přímo v buněčné kultuře, vhodné pro mikrodestičkový formát
 - nahrazení C-terminální sekvence Ser-Lys-Leu cílové pro peroxisomy za Ile-Ala-Val
- u *Renilla* obdobné: *Rluc*, *hRluc*, *hRlucP*, *hRlucCP*, nemá C-term. cílovou sekvenci
- "Dual-Luciferase" - použijí se oba typy luciferas, lyze buněk, dva substráty, postupné měření emise
 - "Dual-Glo" - stejné, ale přímo v buněčné kultuře
- optimalizace kodonů pro dobrou expresi v savčích buňkách
- odstranění skrytých ("cryptic") regulačních a potenciálních sestřihových sekvencí
- www.promega.com

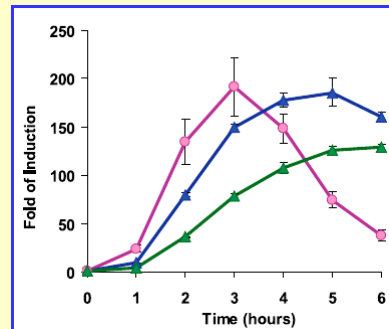
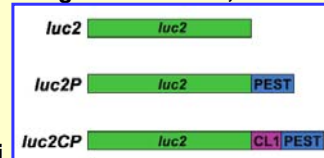
Vylepšené luciferasy

- z *luc+* na *luc2* - mnohem vyšší exprese
- odstranění konsenzuálních sekvencí pro vazbu transkr. faktorů - vyšší specifita



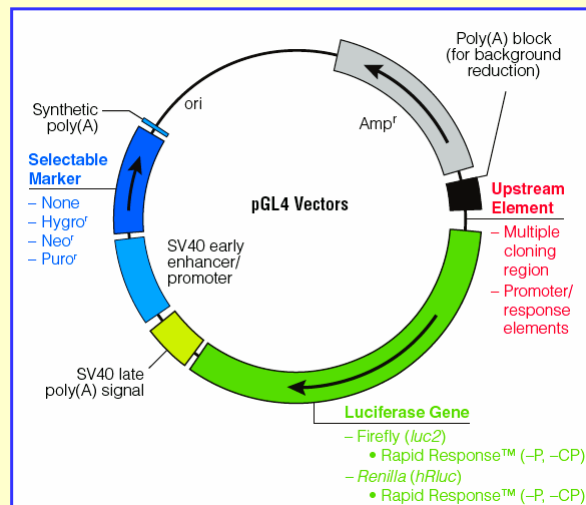
Reportery genové exprese

- molekul luciferasy je pro zobrazení potřeba mnohem méně než např. GFP (musí mít silnější promotor, je velmi stabilní)
 - rychlejší metabolismus (začlenění sekvence pro degradaci - PEST, Pro-Glu-Ser-Thr)
 - lepší pro zobrazení dynamiky exprese
 - efektorová specifita, uniformní a optimální exprese v hostitelských buňkách
- zobrazení žádané linie po úspěšné transfekci
 - hledání a studium účinku nových léčiv
 - efekty cizorodých látek na buněčné procesy
- identifikace interagujících proteinů - společně spustí přepis reporter. genu
- studium interakcí biomolekul a vzdáleností mezi nimi - BRET
 - fúze studovaného proteinu s luciferasou (Rluc) a druhého partnera s vhodným fluoroforem (GFP)



Luciferasový reporterový vektor pGL4

- pro přenos reporterového genu do hostitelských buněk, obsahuje:
 - promotorové sekvence (HSV-TK, SV-40, CMV)
 - savčí selekční sekvence (Hygr - resistance k hygromycinu)
 - poly(A) úseky
 - klonovací místa
 - *luc* gen (dle volby),
 - *luc2*
 - *RlucNeo*



Přehled variant luciferas

Vector	Reporter Gene	Multiple Cloning Region	Protein Degradation Sequence	Gene Promoter	Mammalian Selectable Marker
pGL4.10	<i>luc2</i>	Yes	No	No	No
pGL4.11	<i>luc2P</i>	Yes	hPEST	No	No
pGL4.12	<i>luc2CP</i>	Yes	CLI-hPEST	No	No
pGL4.13	<i>luc2</i>	No	No	SV40	No
pGL4.14	<i>luc2</i>	Yes	No	No	Hyg ^r
pGL4.15	<i>luc2P</i>	Yes	hPEST	No	Hyg ^r
pGL4.16	<i>luc2CP</i>	Yes	CLI-hPEST	No	Hyg ^r
pGL4.70	<i>hRluc</i>	Yes	No	No	No
pGL4.71	<i>hRlucP</i>	Yes	hPEST	No	No
pGL4.72	<i>hRlucCP</i>	Yes	CLI-hPEST	No	No
pGL4.73	<i>hRluc</i>	No	No	SV40	No
pGL4.74	<i>hRluc</i>	No	No	HSV-TK	No
pGL4.75	<i>hRluc</i>	No	No	CMV	No
pGL4.76	<i>hRluc</i>	Yes	No	No	Hyg ^r
pGL4.77	<i>hRlucP</i>	Yes	hPEST	No	Hyg ^r
pGL4.78	<i>hRlucCP</i>	Yes	No	No	Hyg ^r

BRET

- **bioluminescence resonance energy transfer**
 - neradiační přenos energie z luminiscentního donoru na fluorescentní akceptor
 - vyskytuje se také in vivo (rod *Renilla* obsahuje luciferasu emitující modré světlo, BRET přenosem na GFP se ale mění na zelené)
 - účinnost BRET se stanovuje jako poměr intenzit emise akceptoru a emise donoru - eliminují se tak vlivy techniky měření, počtu buněk, prostředí
- **aplikace in vivo - studium interagujících biomolekul**
 - jeden z partnerů se na úrovni DNA sfúzuje s genem luciferasy (*rluc*), druhý partner pak s genem GFP
- **výhody**
 - není problém s fotorozkladem
 - lze studovat buňky citlivé na světlo, případně buňky s vysokou přirozenou autofluorescencí
- **při sterických problémech lze použít velmi malou luciferasu z rodu *Gaussia* (20 kDa)**

Bioluminescence vs. fluorescence

- **F** - vysoký jas, excitované stavy mohou vznikat rychle díky masivnímu excitačnímu záření (napumpování energie)
 - ale zvyšuje se i signál pozadí, rozhoduje poměr signál/šum
 - detektory nerozliší excitační a emitované fotony (geometrická diskriminace ani filtry nejsou 100% účinné)
 - emitují i nežádoucí fluorofory přítomné v komplexním biomateriálu
 - uplatní se při zobrazování detailů - rozhraní, kdy S/N nemá takový vliv
 - mikroskopie, cytometrie, kdy stejně optická konstrukce limituje citlivost detektoru
- **BL** - nižší intenzita světla, ale současně prakticky nulové pozadí
 - uplatní se při "větších" vzorcích, kdy je pouze jednoduchá optika (žádné filtry) a detekce fotonů je tedy efektivnější (detektor blíže vzorku)
 - stanovení ve zkumavkách, v mikrodestičkách, detaily u větších organismů (myši, ...)
 - široká lineární oblast (6 až 8 koncentračních řádů)
 - při bioanalytických stanoveních dosahuje 10 až 1000x vyšší citlivosti a limity detekce (10^{-20} mol, cca 10^4 molekul/vzorek, několik molekul v buňce)
 - luminofor je chráněn při emisi uvnitř bílkovinného obalu

Acetátkinasa

- jako značka pro vysoce citlivá imunostanovení
- generuje ATP z acetylfosfátu a ADP
- vzniklé ATP se pak použije pro vyvolání bioluminescence luciferinu s luciferasou
- citlivost až 10^{-22} mol

