

### Enzymy

- Biokatalyzátory
- Snižují aktivační energii potřebnou pro chemickou reakci
- V klinické biochemii se enzymy používají:
  - ▶ pro diagnostické účely
  - ▶ jako reagensie

#### Názvosloví

- ▶ triviální / historické TRYPSIN
- ▶ obecně užívané  $\alpha$ -AMYLASA (AMS)
- ▶ vědecké 1,4- $\alpha$ -D-glukanglukanohydrolasa EC 3.2.1.1.

#### ▶ faktory ovlivňující enzymovou reakci :

TEPLOTA, pH, koncentrace SUBSTRÁTU, koE,...

**často se volí kompromis mezi optimálními podmínkami, cenou, technickými požadavky**

---

---

---

---

---

---

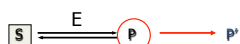
---

---

---

---

### Enzymy jako analytická činidla

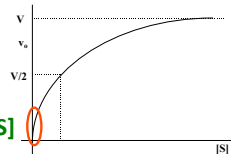


- End-point (reakce musí být rychlá a citlivá)
- Kineticky (většinou metoda konstantního času)

Rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$[S] \ll K_m, \quad v = \frac{V \cdot [S]}{K_m} = \text{konst.} \cdot [S]$$




---

---

---

---

---

---

---

---

---

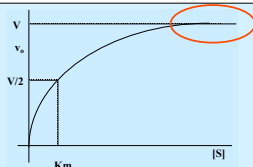
---

### Enzymy diagnostické markery

Rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$[S] \gg K_m, \quad v = V_{\text{lim}}$$



Ideálně:  $[S] \geq 100 K_m$

cena, rozpustnost, inhibice nadbytkem substrátu, ...

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Možnost sledování enzymové aktivity

- **Substrát či produkt dokážeme specificky detegovat přímo**

Pokud ne, následuje druhá.. (obvykle opět enzymová) detekční (indikátorová) reakce

- **Indikátorová reakce NESMÍ** určovat (limitovat) rychlost vzniku/zániku detekovaného produktu/substrátu !!!

musí být vždy „rychlejší“ než primární reakce, která určuje původní koncentraci substrátu či aktivitu stanovovaného enzymu

---

---

---

---

---

---

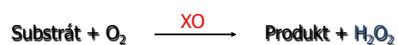
---

---

## Možnost sledování enzymové aktivity

- **Nejčastěji používané (indikátorové) reakce**

1)  $\text{H}_2\text{O}_2$  – vzniká při reakcích oxidas (využívají k oxidaci  $\text{O}_2$ )



V klinické diagnostice nejčastěji 4-aminoantipyrin + subst. fenol  $\Rightarrow$  CHINONIMIN (červený, 555 nm)




---

---

---

---

---

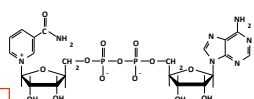
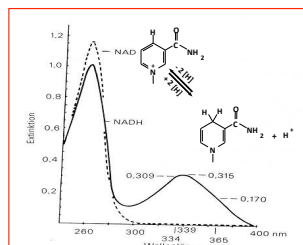
---

---

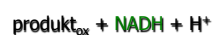
---

## Možnost sledování enzymové aktivity

2) **NADH, NADPH- Warburgův optický test 340 nm**



oxidoreduktasa  
(dehydrogenasa)




---

---

---

---

---

---

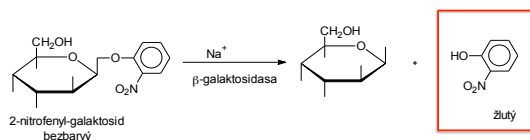
---

---

## Možnost sledování enzymové aktivity

## 2) využití hydrolyzovatelného chromogenního substrátu (pro hydrolasy)

většinou nitrofenylderiváty → intenzivně žluté nitrofenoly




---

---

---

---

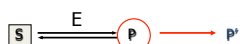
---

---

---

---

## Enzymy jako analytická činidla

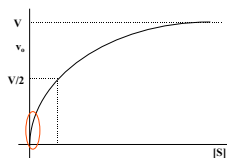


- End-point (reakce musí být rychlá a citlivá)
- Kineticky (většinou metoda konstantního času)

Rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$[S] \ll K_m \quad v = \text{konst} \cdot [S]$




---

---

---

---

---

---

---

---

## Enzymy - stanovení

## 1) Dvoubodové stanovení („metoda zastaveného času“)

fotometrické sledování změny absorbance (přírůstek produktu nebo úbytek substrátu) za časovou jednotku (**nevíme, co se v reakční směsi děje!**), většinou v daném čase zastavujeme enzymovou reakci (např. denaturace a kolorimetrické vybarvení produktů)

$$\Delta A / \Delta t = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1} \quad A_1, t_1 \text{ většinou rovny } 0 \text{ (počátek)}$$

---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy - stanovení

- 1) Dvoubodové stanovení („metoda zastaveného času“) fotometrické sledování změny absorbance (A) za časovou jednotku
- 2) „KINETICKÁ“ stanovení („metoda tangenti“) fotometrické sledování tvorby produktu nebo úbytku substrátu v čase (dA/dt)

podmínka:

- ▶ konstantní rychlost ( kinetika 0.řádu)
- ▶ **vždy kontrolovat průběh reakce !**

t.j. rychlost reakce

---

---

---

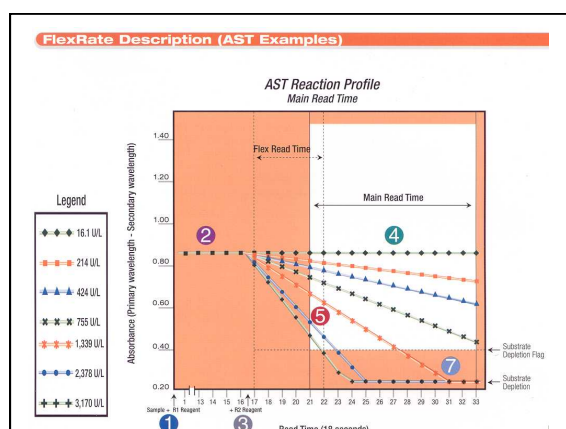
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---