

# Stanovení aktivity enzymů

Obečné schema:

### **Detekce enzymu**

- chceme zjistit, jestli je ve vzorku aktivní enzym

### **Stanovení katalytické aktivity**

- chceme zjistit kolik je ve vzorku aktivního enzymu

### **Měření katalytických schopností enzymů**

- chceme zjistit kolik substrátu by dokázal enzym transformovat za určitý čas

Obecné schema:

## Jednotka aktivity

reakční rychlost

$\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$

katalytická aktivita

katal (kat)  
jednotka (U)  
ostatní jednotky

$\text{mol.s}^{-1}$   
 $\mu\text{mol.min}^{-1}$   
 $\text{mg.min}^{-1}$

specifická aktivita vztažená na objem

$\text{kat.l}^{-1}$   
 $\text{U.ml}^{-1}$

specifická aktivita vztažená na hmotnost

$\text{U.mg}^{-1}$

číslo přeměny

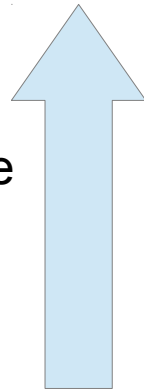
$\text{kat.mol}^{-1} = \text{s}^{-1}$

Obecné schema:

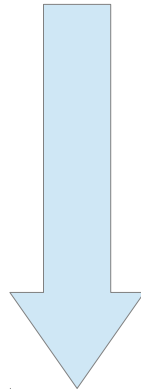
### **kontinuální**

smícháme substrát(y) s enzymem a měříme změnu koncentrace substrátů a produktů

přesnost, jistota že měříme počáteční reakční rychlost



rozsah použitelných metod paralelizovatelnost



### **„end-point“**

smícháme substrát(y) s enzymem, směs inkubujeme po vybraný čas, pak reakci zastavíme a změříme koncentrace substrátů nebo produktů

### **speciální metody**

Obecné schema:

**Nutno kontrolovat:**

- dobu reakce
- teplotu
- pH
- koncentrace substrátů
- koncentrace aktivního enzymu
- koncentrace solí, kofaktorů a podobně

### **$\alpha$ -L-Fucosidase assay**

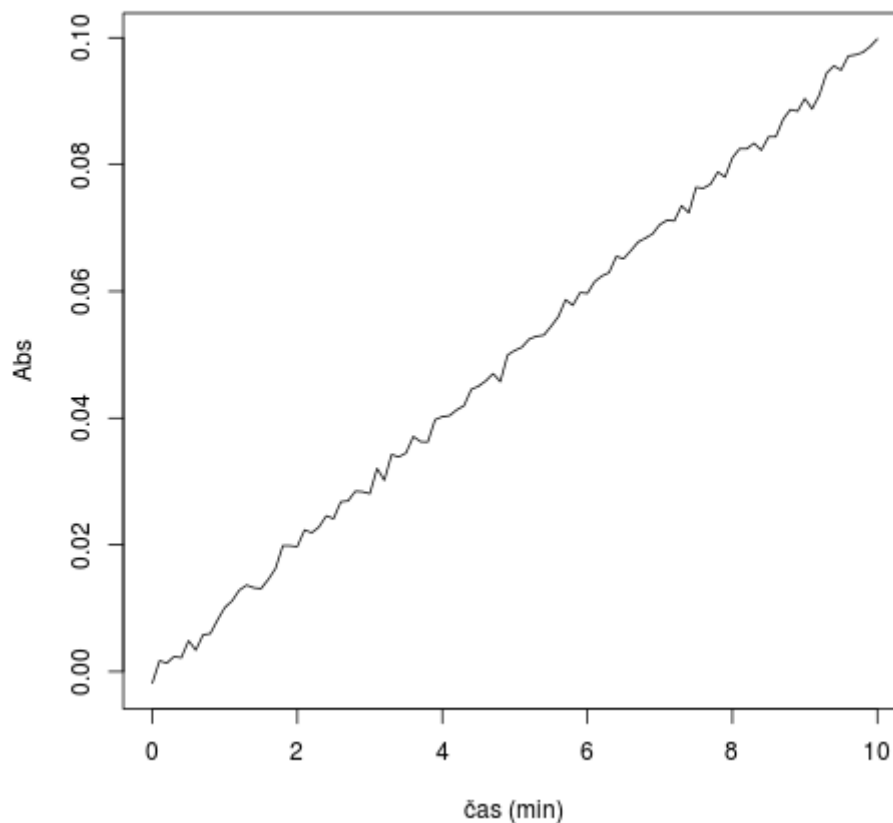
Enzymatic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase was measured in 25 mM EPPS buffer (pH 8) at 37°C for 10 min using *p*NP $\alpha$ -L-Fuc (Biosynth AG®, Switzerland) as a substrate (7 mM in the reaction mixture). An equal volume of 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was used for reaction termination and the absorbance of reaction mixture was measured at 405 nm. Calibration curve, constructed for *p*-nitrophenol in the concentration range 0–100  $\mu$ mol/L, was constructed under the same reaction conditions and served for the calculation of released amount of *p*-nitrophenol. Enzyme amount, which was able to release 1  $\mu$ mol of *p*-nitrophenol per minute at 37°C, was defined as one unit.

## Počáteční reakční rychlost:

- rychlost v čase měření  $t = 0$

- abychom jí mohli měřit, nesmí se podmínky během měření příliš měnit, konkrétně:

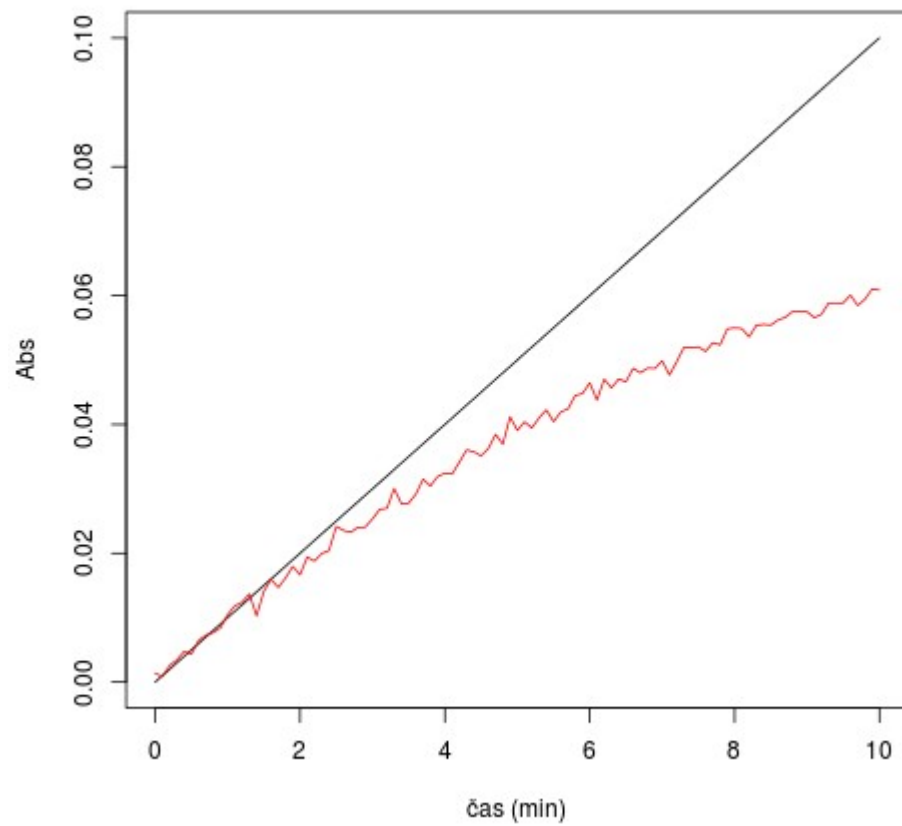
- nemění se příliš koncentrace substrátu
- nemění se pH
- nedochází k inhibici produktem
- enzym je stabilní
- ...



## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 1:

**Reakce se zpomaluje**

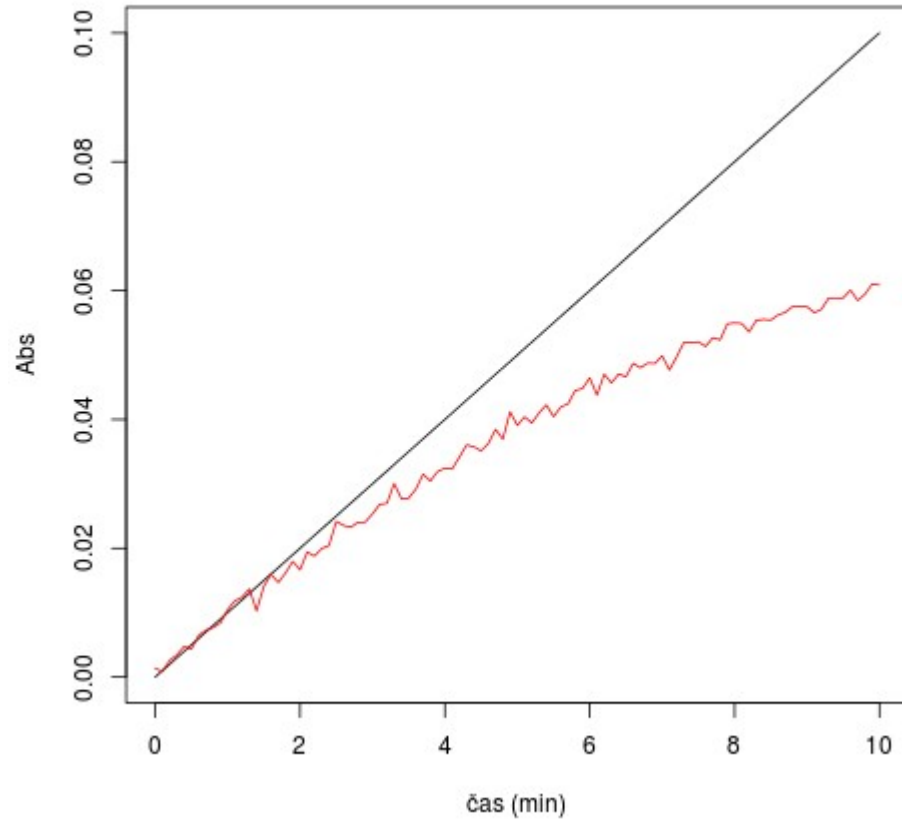


## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 1:

**Reakce se zpomaluje**

- **nedostatek substrátu/  
rovnováha**
- **inhibice produktem  
(včetně změny pH)**
- **nestabilita enzymu**
- **inhibice s pomalou rovnováhou**
- **artefakt metody**
- **jiná změna v podmínkách  
stanovení**

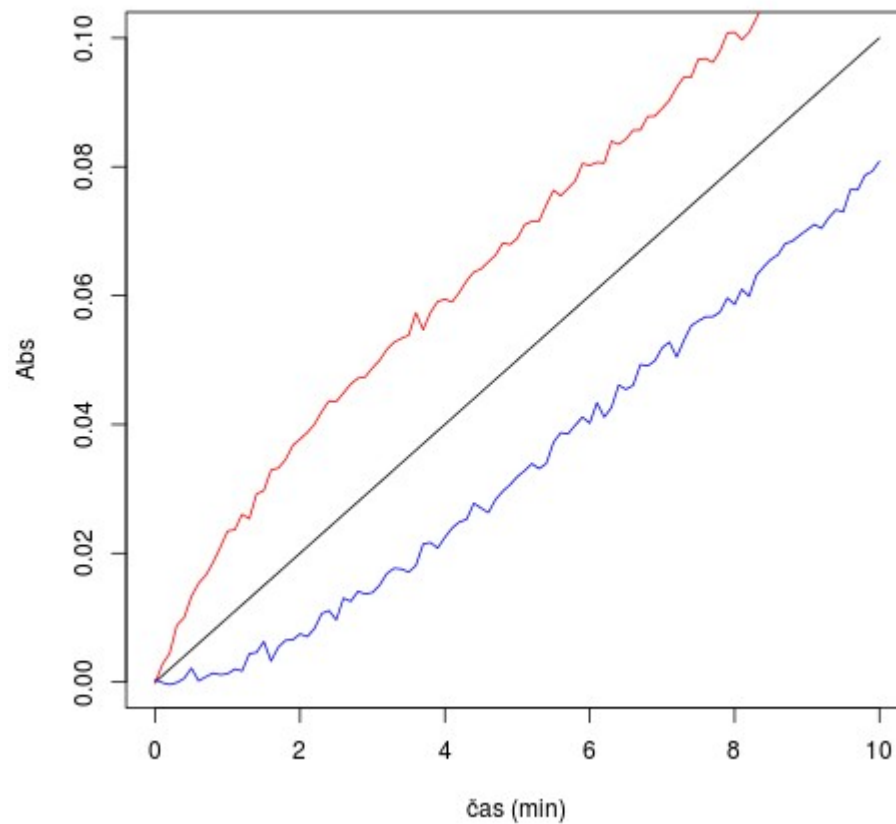




## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 2:

„lag-fáze“ nebo zrychlení na začátku

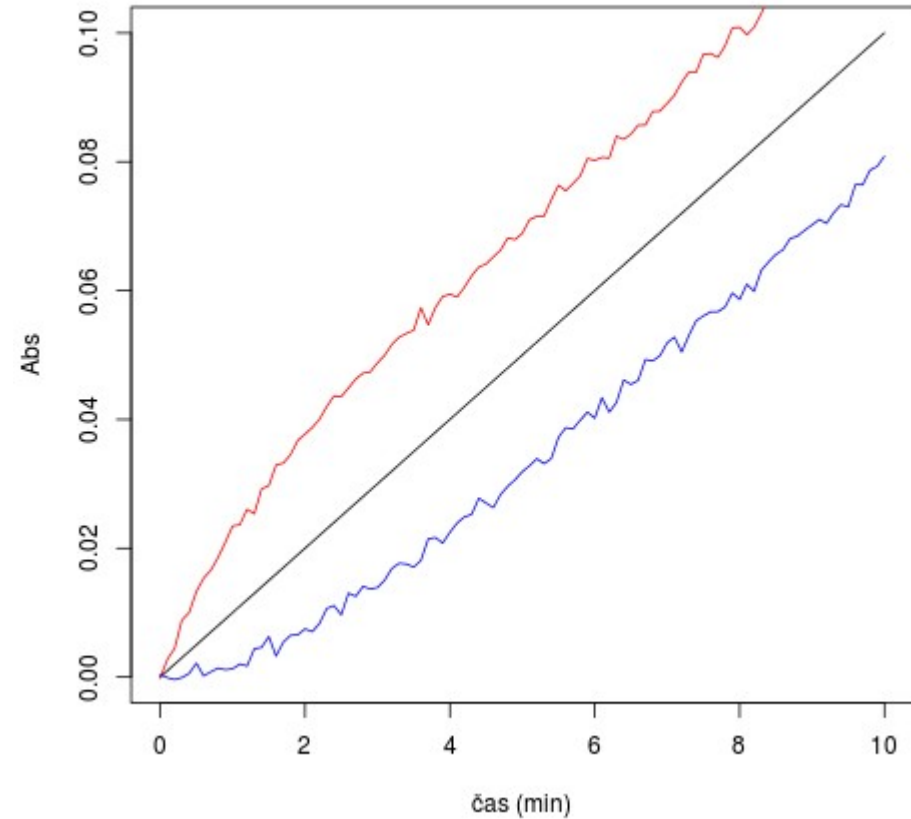


## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 2:

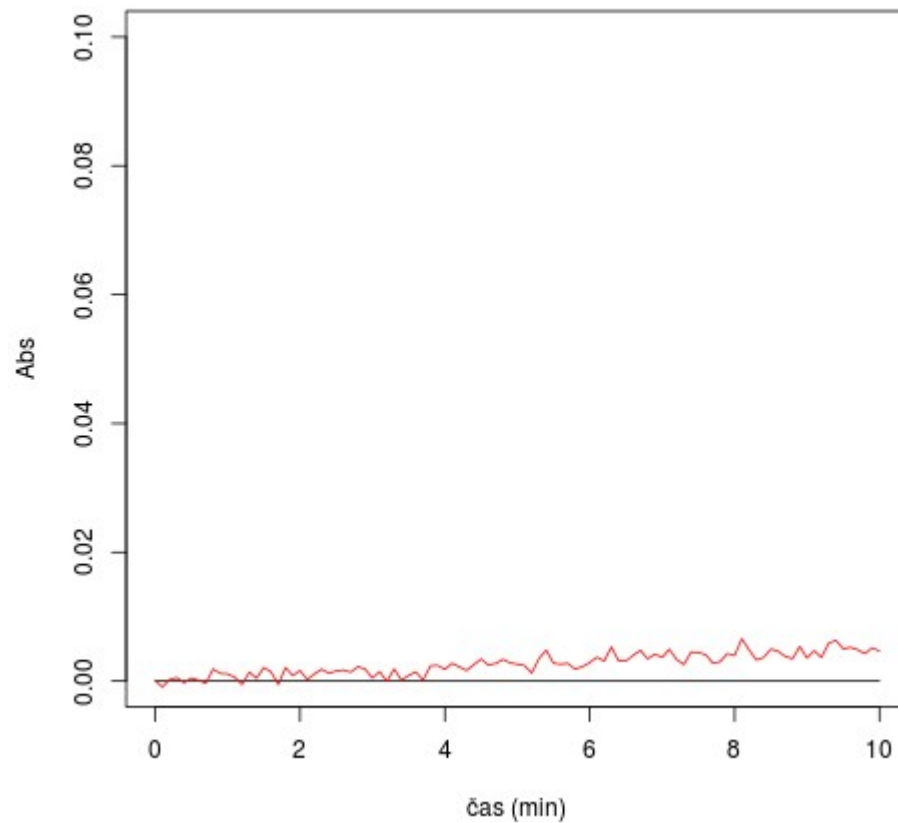
„lag-fáze“ nebo zrychlení na začátku

- pomalé smíchání roztoků
- špatná regulace teploty
- usazování částic
- pomalá odezva detektoru
- pomalé ustalování ustáleného stavu
- inhibice s pomalou rovnováhou
- inhibice substrátem
- aktivace produktem
- přeměna mezi formami substrátu



## Počáteční reakční rychlost:

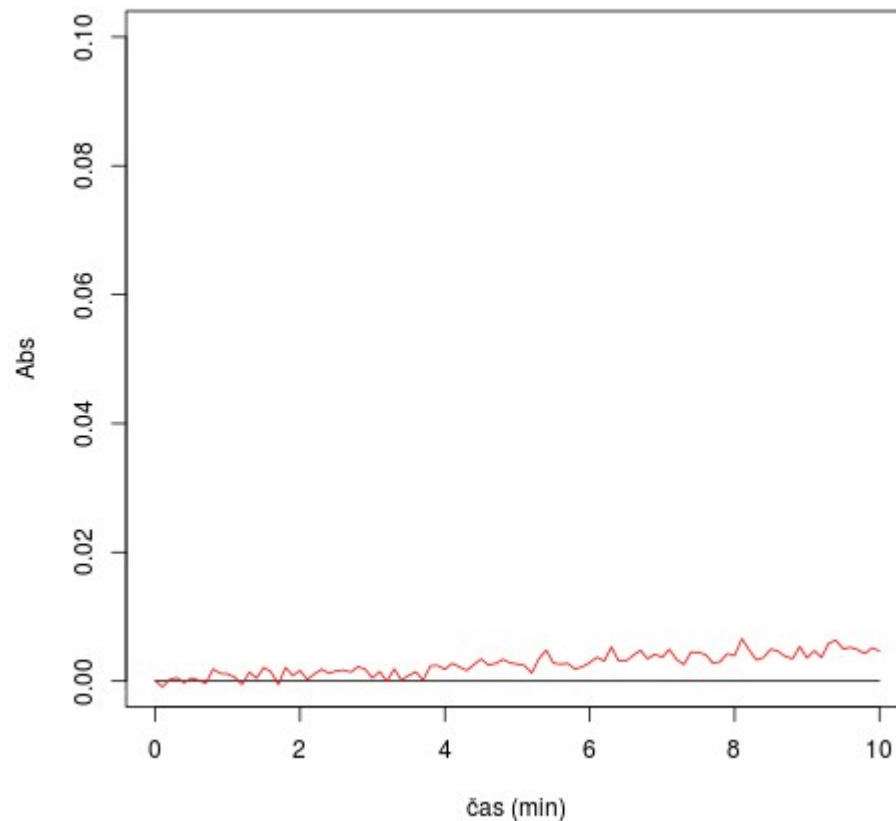
Problém č. 3:  
**nenulový slepý pokus**



## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 3:  
**nenulový slepý pokus**

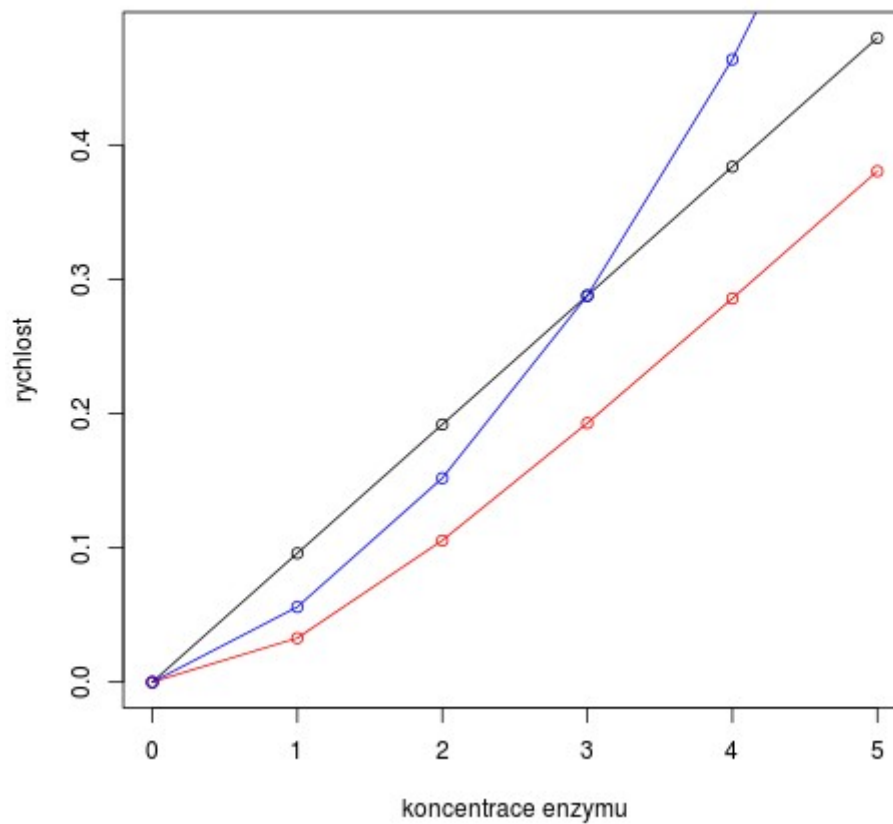
- precipitace
- usazování částic
- kontaminace substrátem
- kontaminace jiným enzymem
- adsorbce na stěny nádoby
- neenzymatické reakce



## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 4:

**Nelineární závislost rychlosti  
na koncentraci enzymu**



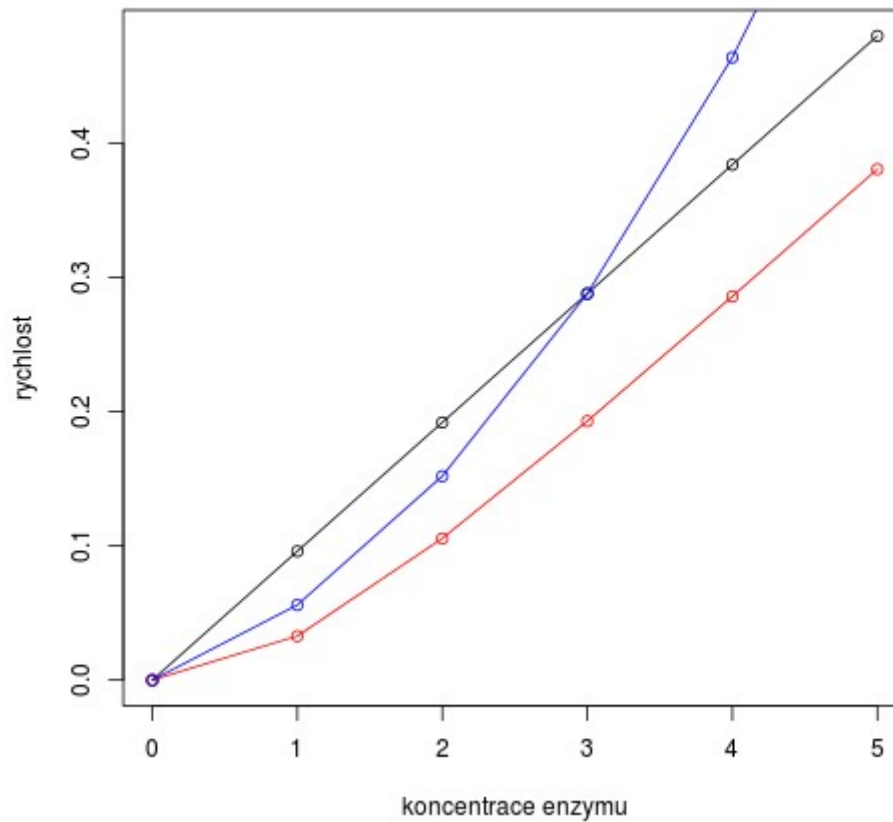
## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 4:

**Nelineární závislost rychlosti  
na koncentraci enzymu**

- kovalentní inhibitor

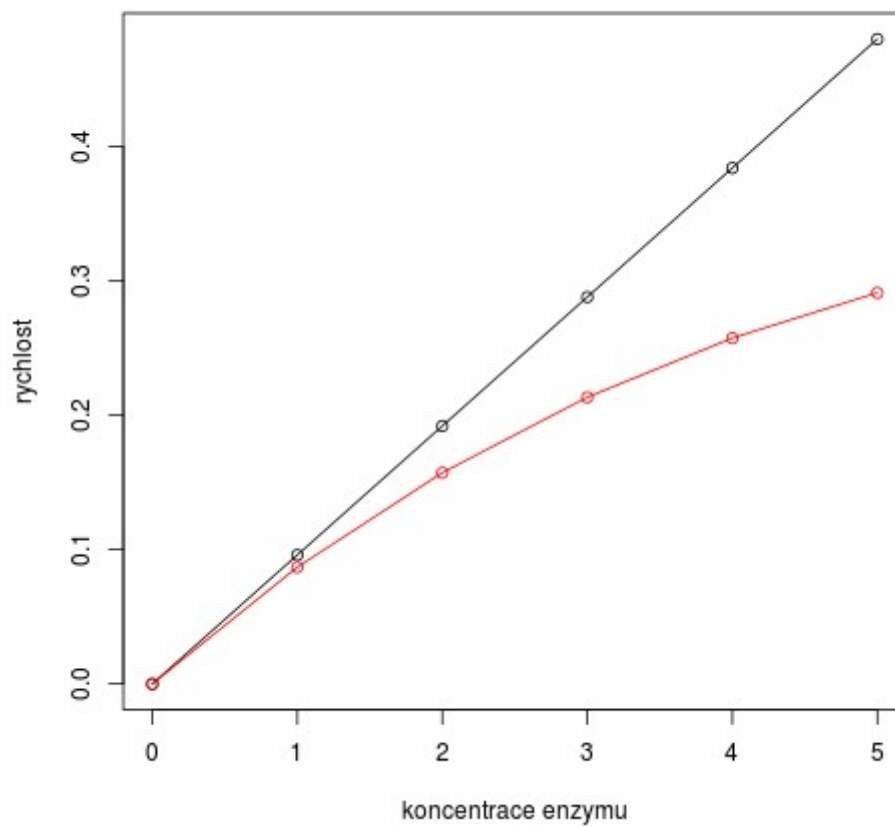
- aktivátor



## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 5:

**Nelineární závislost rychlosti  
na koncentraci enzymu**

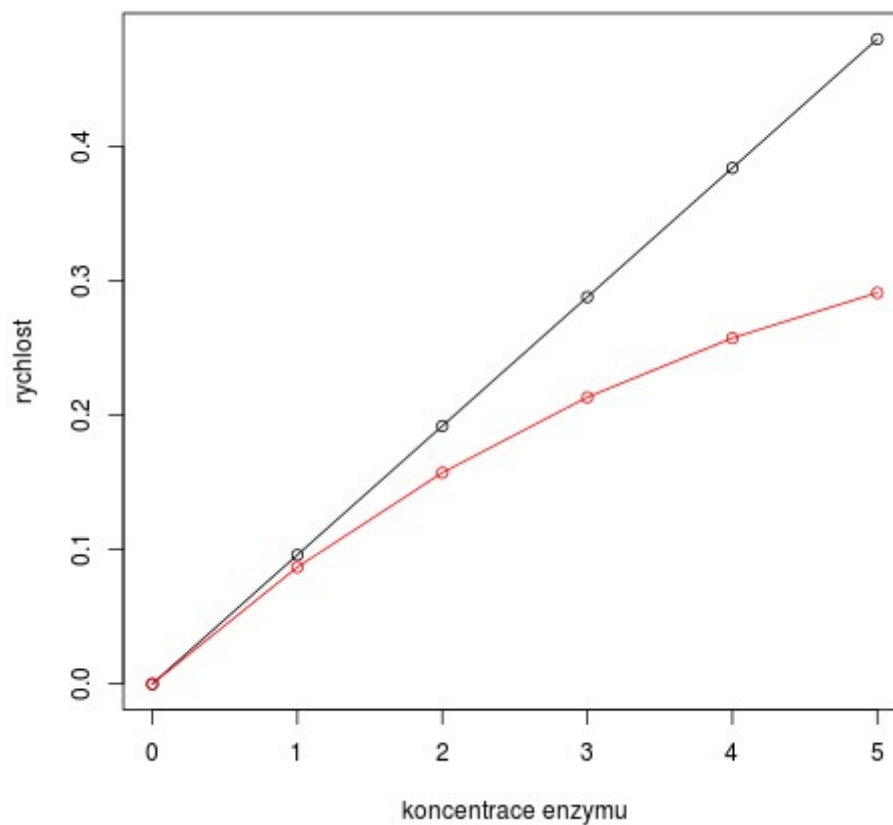


## Počáteční reakční rychlost:

Problém č. 5:

### Nelineární závislost rychlosti na koncentraci enzymu

- viz problém 1
- pomalá spřažená reakce
- přítomnost inhibitoru  
v preparátu enzymu





## **Analytické metody používané při stanovování aktivity:**

- spektrofotometrie
- spektrofluorimetrie
- luminimetrie
  
- radiometrické metody
  
- chromatografie
- elektroforesa
  
- potenciometrie, měření pH, pH-stat
- polarografie, voltametrie, amperometrie
- coulometrie

## Spektrofotometrie

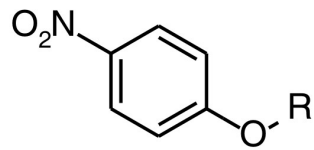
Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon c l$$

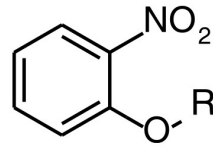
# Spektrofotometrie

Chromogenní substráty  
hydrolasy

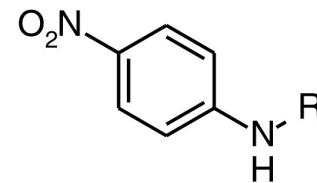
Deriváty:



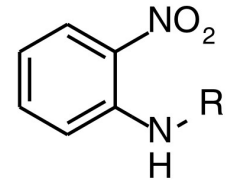
*p*-nitrofenolu



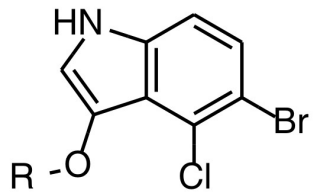
*o*-nitrofenolu



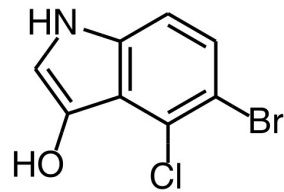
*p*-nitroanilinu



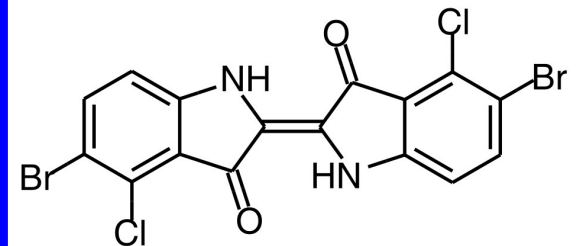
*o*-nitroanilinu



hydrolasa

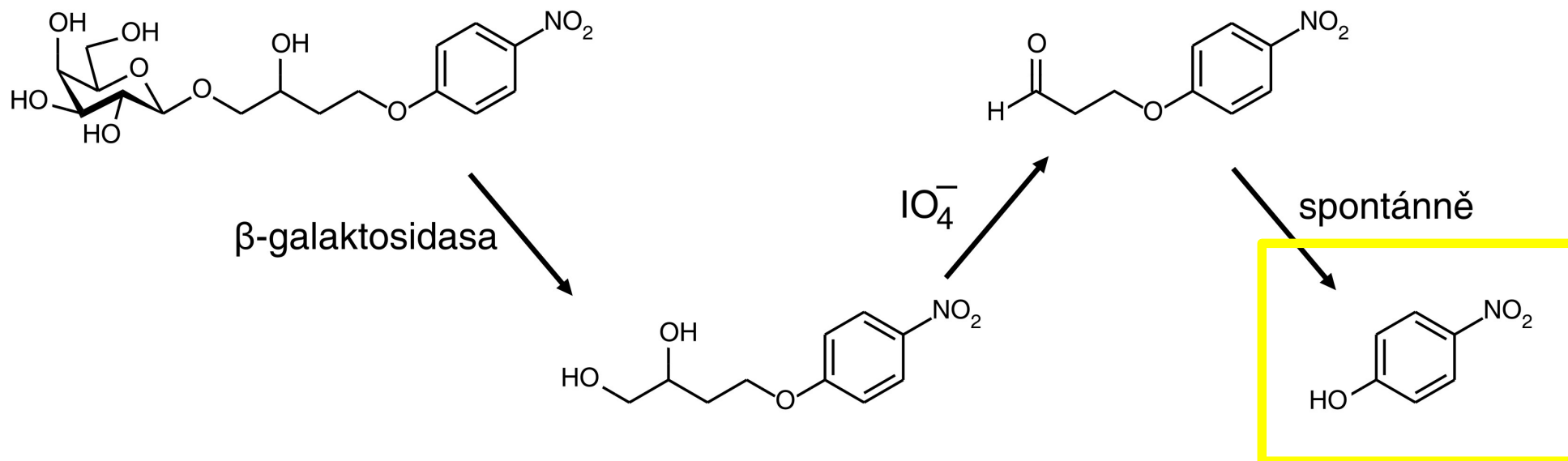


oxidace kyslíkem



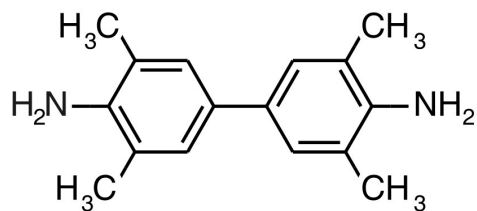
# Spektrofotometrie

Chromogenní substráty  
hydrolasy

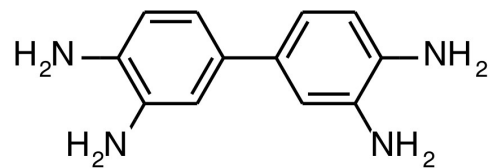


# Spektrofotometrie

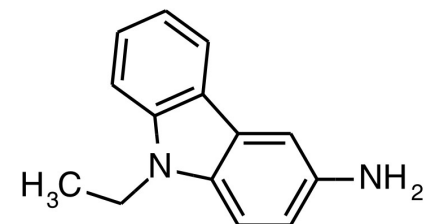
Chromogenní substráty  
peroxidasa



3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)



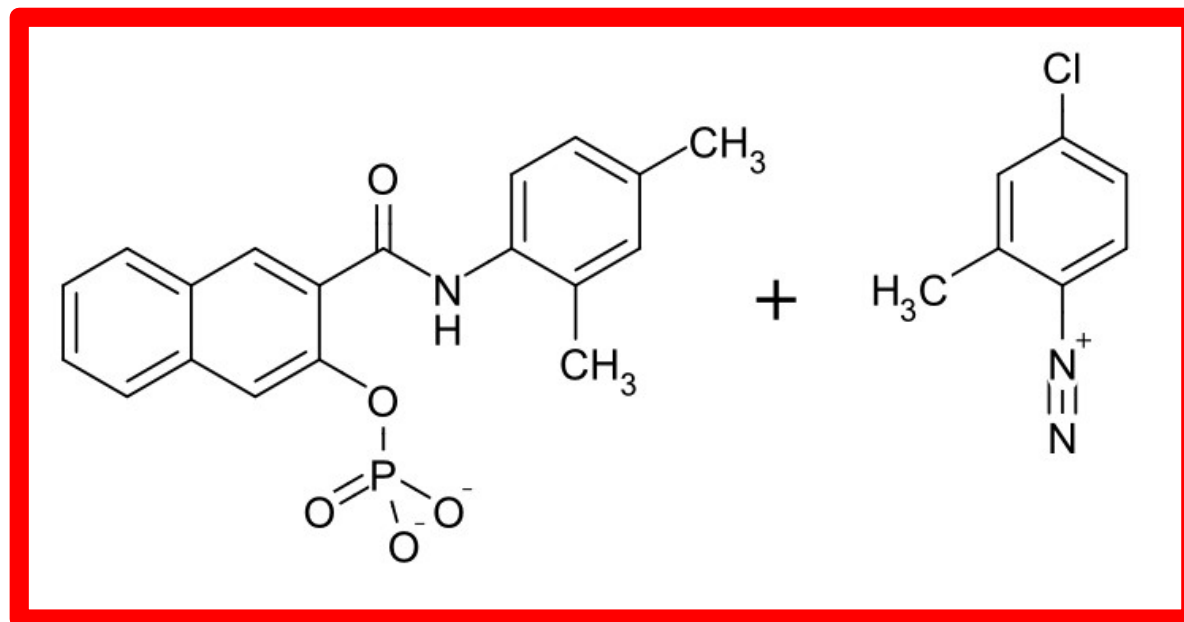
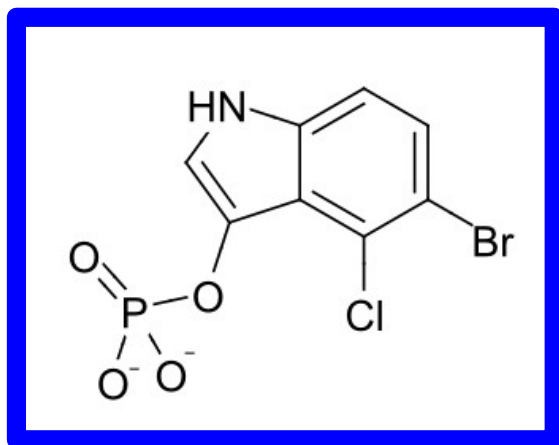
3,3'-diaminobenzidin (DAB)



3-amino-9-ethylkarbazol

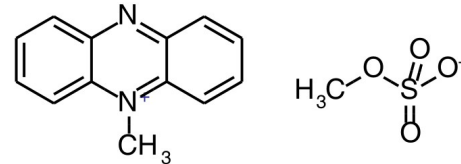
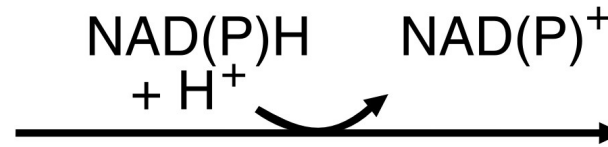
# Spektrofotometrie

Chromogenní substráty  
alkalická fosfatasa

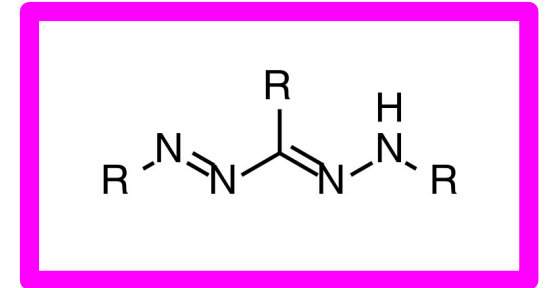
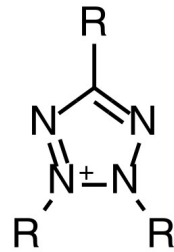


# Spektrofotometrie

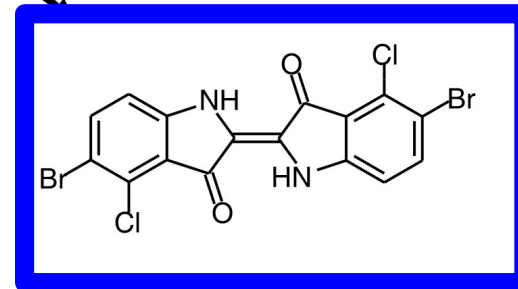
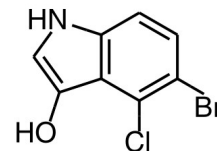
Chromogenní substráty  
využití tetrazoliových solí



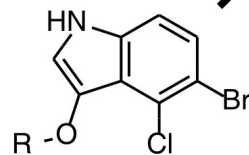
fenazin methosulfát



nebo

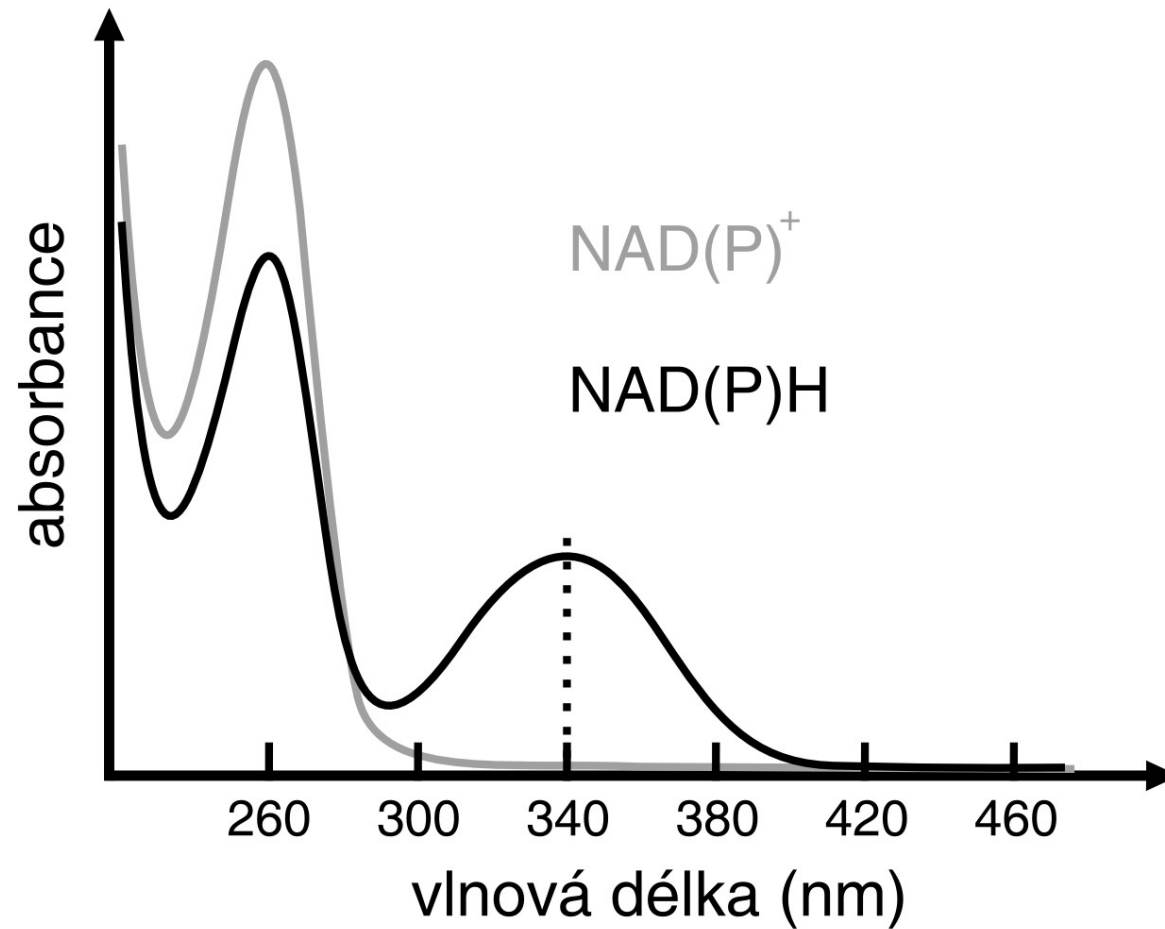


hydrolasa



# Spektrofotometrie

NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H jako „přírodní“ chromogenní substrát

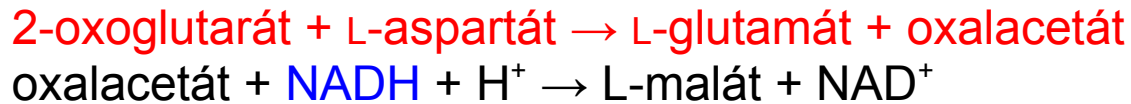




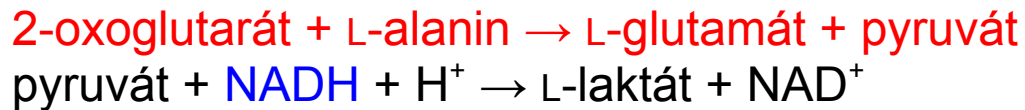
# Spektrofotometrie

NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H jako „přírodní“ chromogenní substrát

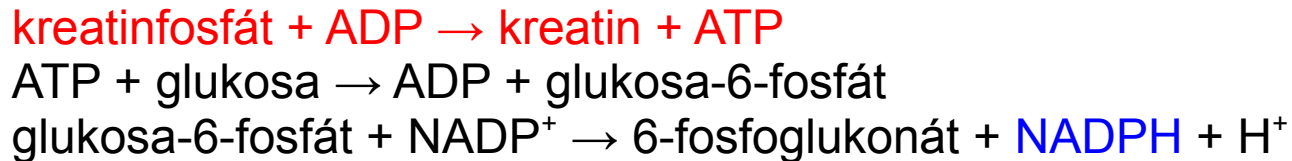
Aspartátaminotransferasa



Alaninaminotransferasa



Kreatinkinasa



# Spektrofotometrie

NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H jako „přirodní“ chromogenní substrát

## ATP

**ATP** + glukosa → ADP + glukosa-6-fosfát

glukosa-6-fosfát + NADP<sup>+</sup> → 6-fosfoglukonát + **NADPH** + H<sup>+</sup>

**ATP** + fosfoglycerát → 1,3-bisfosfoglycerát + ADP

1,3-bisfosfoglycerát + **NADH** + H<sup>+</sup> → glyceraldehyd-3-fosfát + NAD<sup>+</sup> + Pi

glyceraldehyd-3-fosfát → dihydroxyacetonfosfát

dihydroxyacetonfosfát + **NADH** + H<sup>+</sup> → glycerol-3-fosfát + NAD<sup>+</sup>

## ADP

fosfoenolpyruvát + **ADP** → pyruvát + ATP

pyruvát + **NADH** + H<sup>+</sup> → L-laktát + NAD<sup>+</sup>

## AMP

**AMP** + ATP → 2 ADP

ADP ...

# Spektrofotometrie

NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H jako „přirodní“ chromogenní substrát

## Pi

glykogenn + Pi → glukosa-1-fosfát  
glukosa-1-fosfát → glukosa-6-fosfát  
glukosa-6-fosfát ...

## PPi

PPi + H<sub>2</sub>O → 2 Pi

Pi ...

## HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + fosfoenolpyruvát → oxalacetát + Pi

oxalacetát + NADH + H<sup>+</sup> → malát + NAD<sup>+</sup>

# Spektrofotometrie

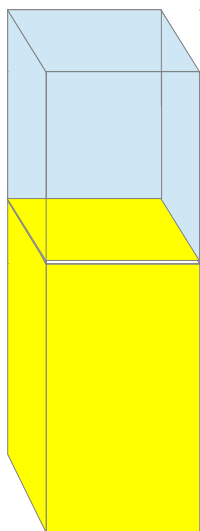
rozpustné

vs.

nerozpustné produkty

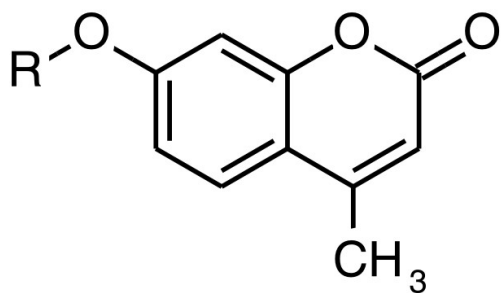
+ spektrofotometrie

+ detekce v gelu, v mikroskopických preparátech a na agarových miskách

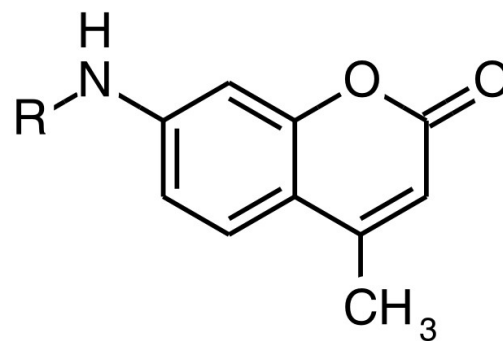


## Spektrofluorimetrie

fluorogenní substráty hydrolas



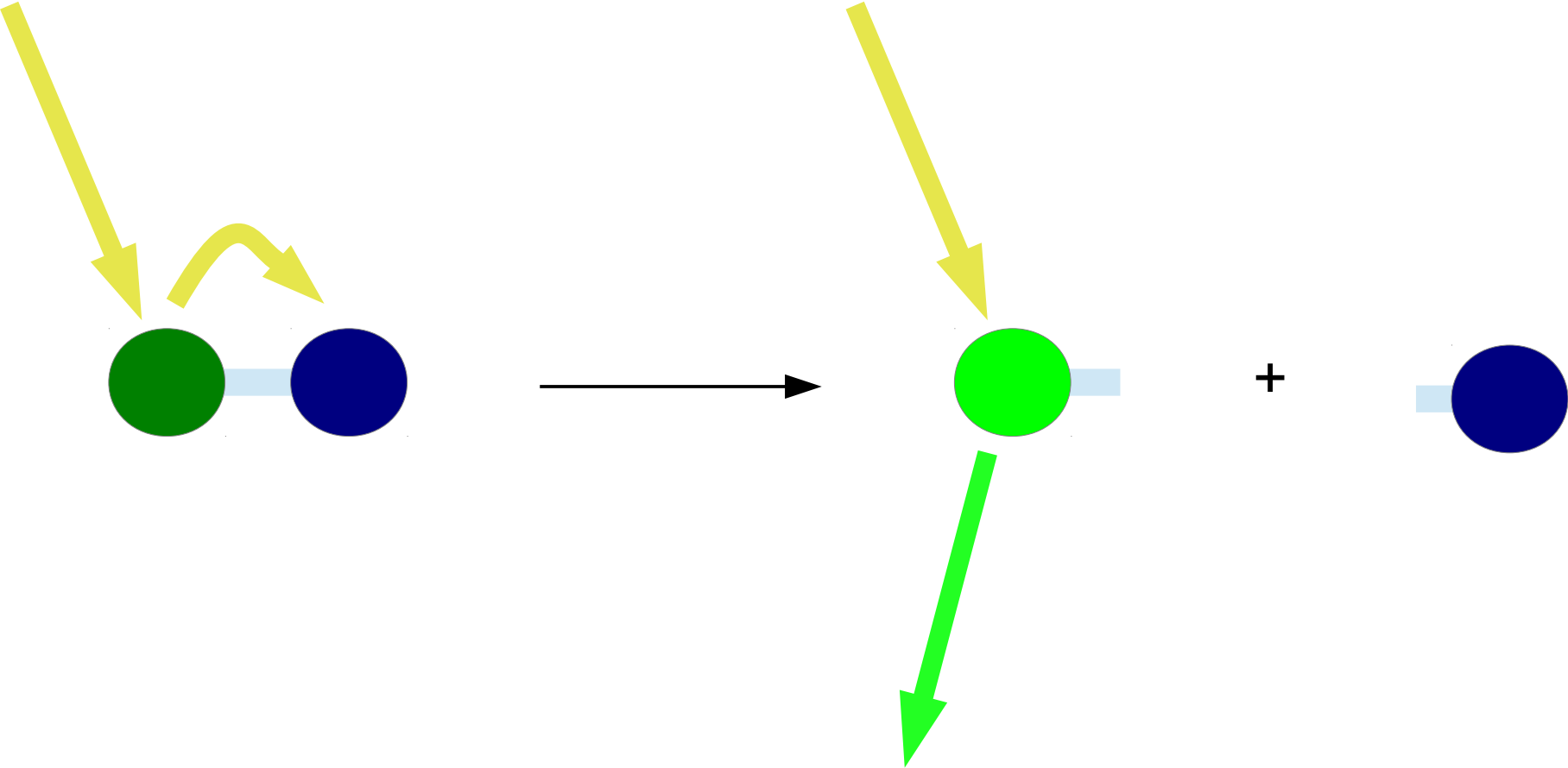
4-methylumbelliferyl



4-methyl-7-aminokumarinyl

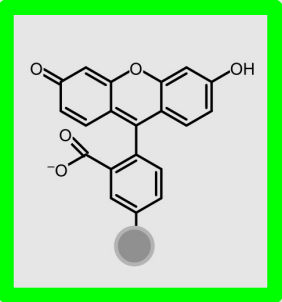
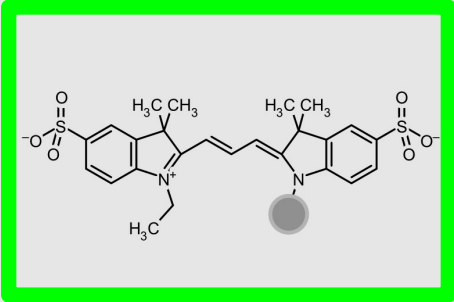
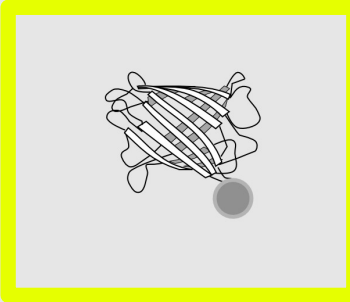
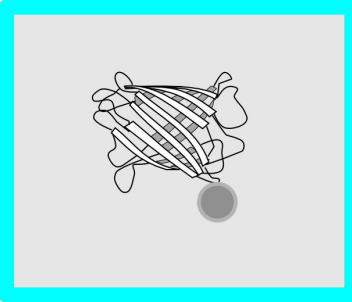
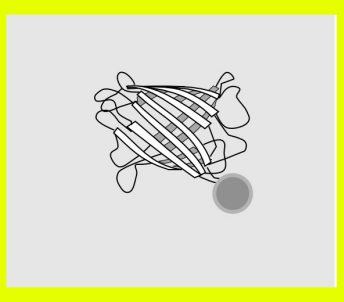
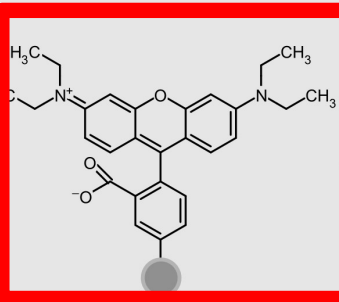
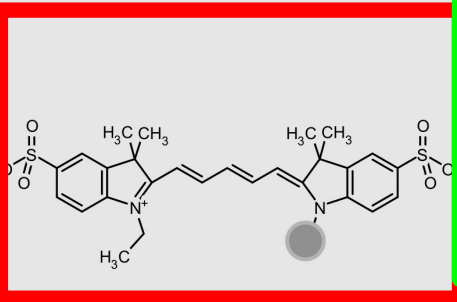
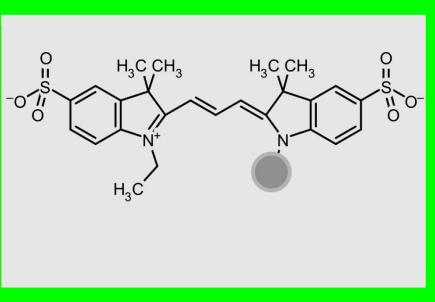
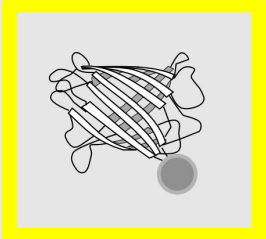
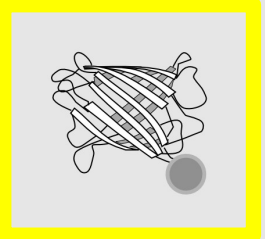
# Spektrofluorimetrie

FRET – fluorescence (Förster) resonance energy transfer



# Spektrofluorimetrie

FRET – fluorescence (Förster) resonance energy transfer

	Fluorescein (520 nm)	Indokarbokyanin (Cy3) (566 nm)	enhanced GFP (508 nm)	cyan fluorescent protein (477 nm)	enhanced GFP (508 nm)
<b>Donor</b> (emisní vlnová délka)					
<b>Akceptor</b> (excitační vlnová délka)					
	Tetraethylrhodamin (550 nm)	Indodikarbokyanin (Cy5) (650 nm)	Indokarbokyanin (Cy3) (554 nm)	yellow fluorescent protein (514 nm)	yellow fluorescent protein (514 nm)

## Luminimetrie

Bioluminescence – produkce a emise světla živými systém

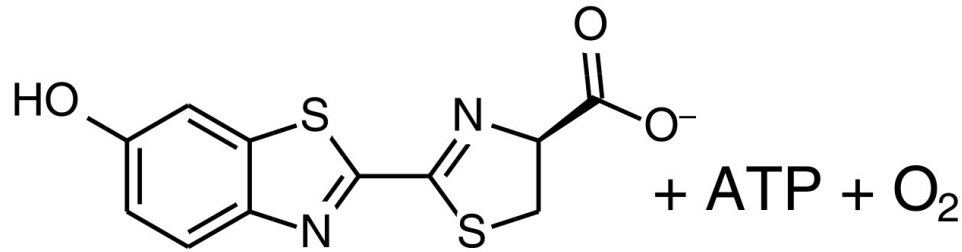
Chemiluminescence – reakce emitující světlo, včetně enzymových reakcí se syntetickými substráty



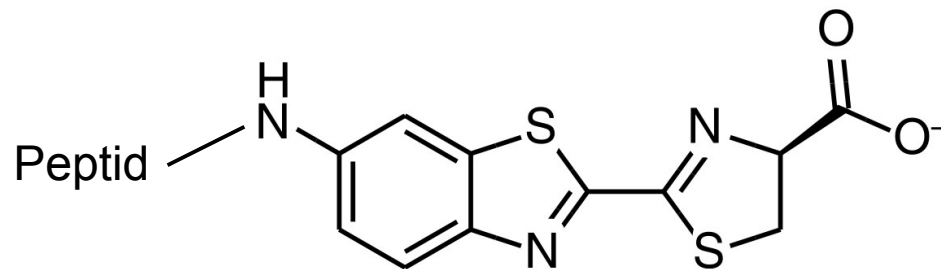
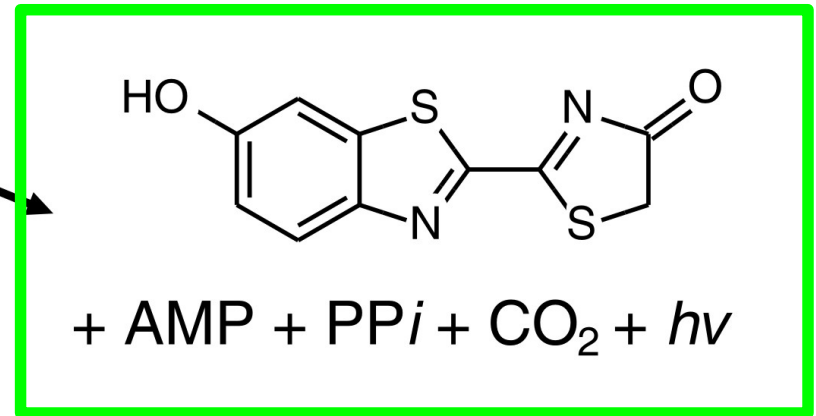


# Luminimetrie

Luciferin + luciferasa



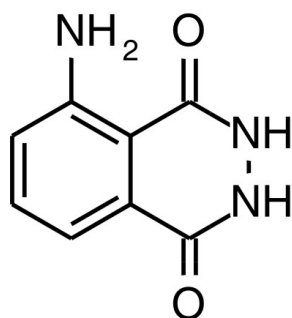
*Photinus pyralis* luciferin



# Luminimetrie

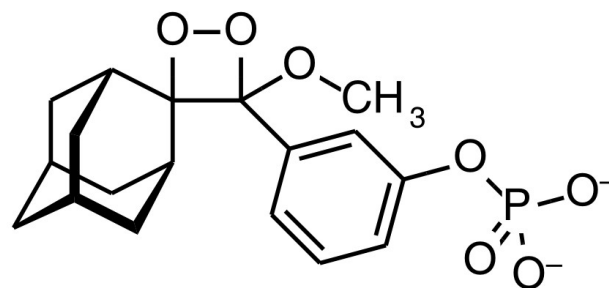
## Chemiluminiscence

Peroxidasa



luminol

Alkalické fosfatasa



CDP-*Star*

## Radiometrie

<b>Nuklid</b>	<b>Rozpad</b>	<b>Poločas</b>	<b>Použití</b>
$^3\text{H}$	$\beta^-$	12,3 roků	Měření aktivity, studium kinetiky studium metabolismu
$^{14}\text{C}$	$\beta^-$	5 700 let	Měření aktivity, studium kinetiky studium metabolismu
$^{32}\text{P}$	$\beta^-$	14,3 dnů	Měření aktivity a studium kinetiky kinas, fosfatas atd., značení DNA/RNA
$^{35}\text{S}$	$\beta^-$	87 dní	značení proteinů
$^{125}\text{I}$	$\gamma$	57,4 dní	značení protilátek při RIA, značení proteinů

## Radiometrie

### Popis sloučenin

- jednoduché ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ,  $^{14}\text{CO}_2$ )
- uniformě značené ( $[^{14}\text{C}]$  alanin)
- specificky značené (L-[methyl- $^{14}\text{C}$ ] methionin, [methyl- $^3\text{H}$ ] thymidin)

### Jednotky

Bequerel – jeden rozpad za sekundu

Curie – radioaktivita 1 g  $^{226}\text{Ra}$

### Detekce

- ionizační detektor (Geiger-Müllerova trubice)
- scintilační – pevné nebo tekuté „koktejly“
- fotografická média
- polovodiče (scannery)
- tomografie (PET, SPECT)

## Radiometrie

### Separace produktů

- chromatografie, např. ionexový papír

Thymidinkinasa:

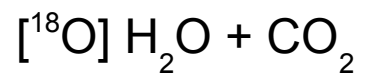


- zachycení radioaktivního TMP na ionexový papír a změření radioaktivity

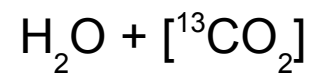
- precipitace (DNA/RNA – isopropanol, proteiny – TFA,  $\text{HClO}_4$ )
- měření radioaktivity ve vznikajícím plynu nebo těkavé látce
- extrakce
- elektroforesa, TLC, papírová chromatografie

## Použití stabilních izotopů

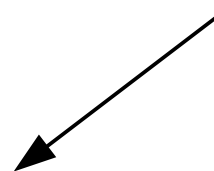
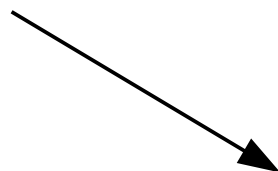
karbonáthydrolyasa:



rovnováha



rovnováha



rovnováha

# **Chromatografie**

## **Typ**

GC, LC, TLC, HPLC

## **Stacionární fáze**

Silikagel, ionex, reversní fáze, size exclusion, afinitní, atd.

## **Detektor**

UV-vis, fluorescenční, index lomu, elektrochemický, MS, atd.

## **Příprava vzorků**

Odstranění proteinů:  $\text{HClO}_4$ , TFA, solid phase extraction

## **Kvantifikace**

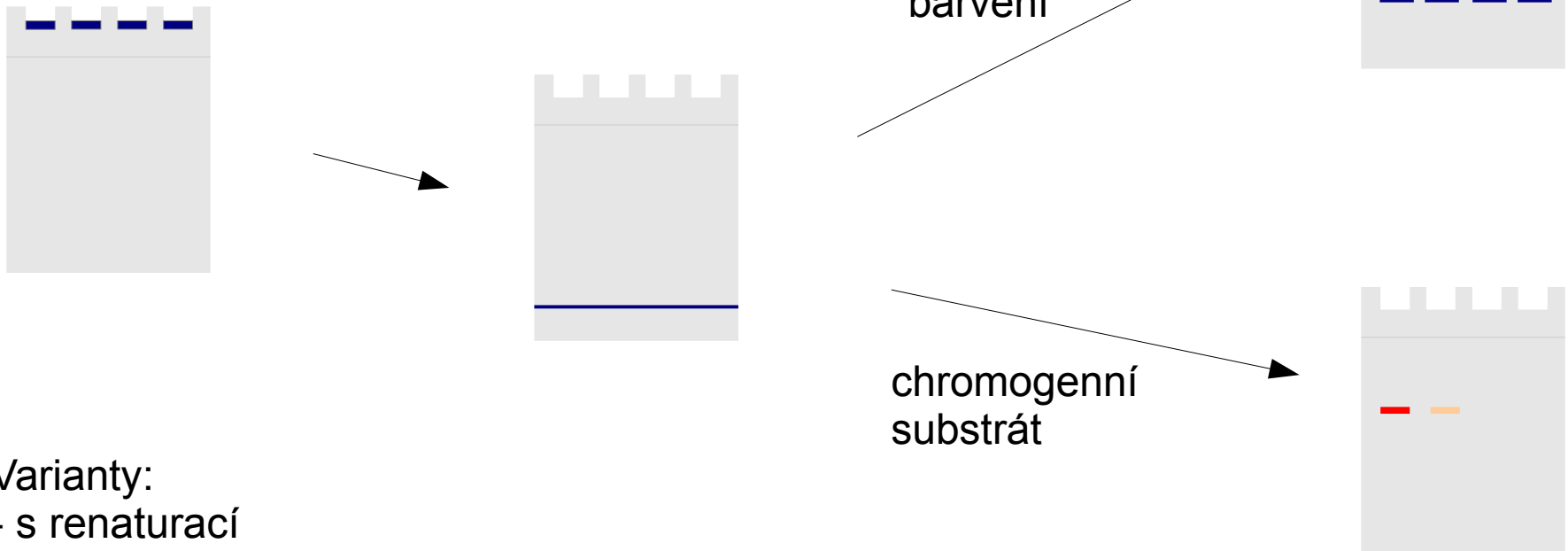
Kalibrační křivka, vnitřní standart

# Elektroforesa

## Typ

PAGE, SDS-PAGE, Tricine-PAGE, agarosová, IEF

## Zymogram



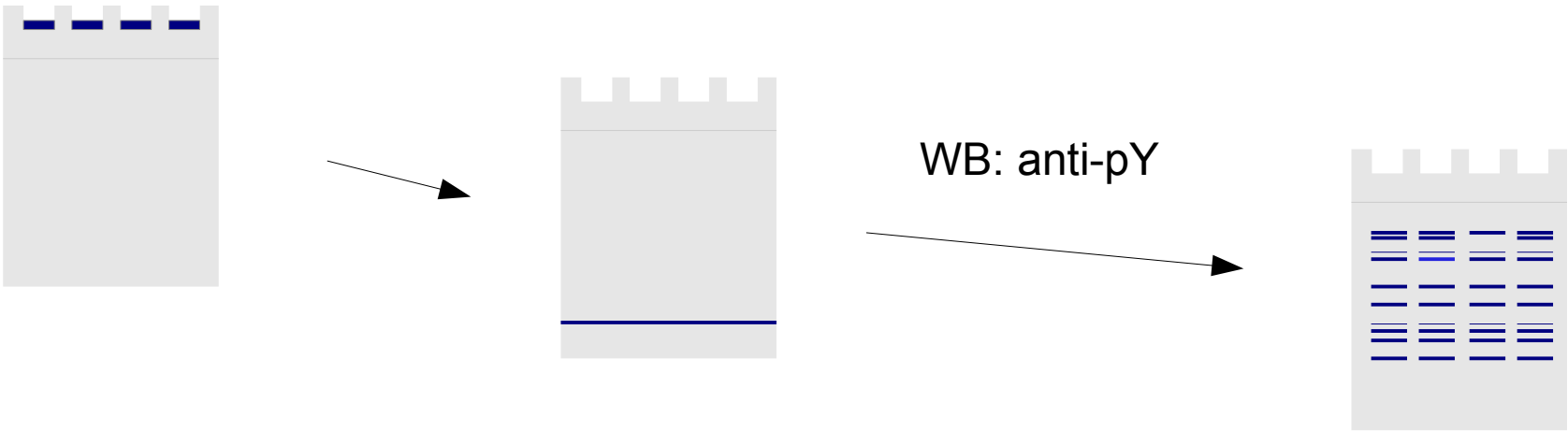
## Varianty:

- s renaturací
- s blottingem
- se sandwichovým gelem
- vyříznutí proužku, elektroeluce



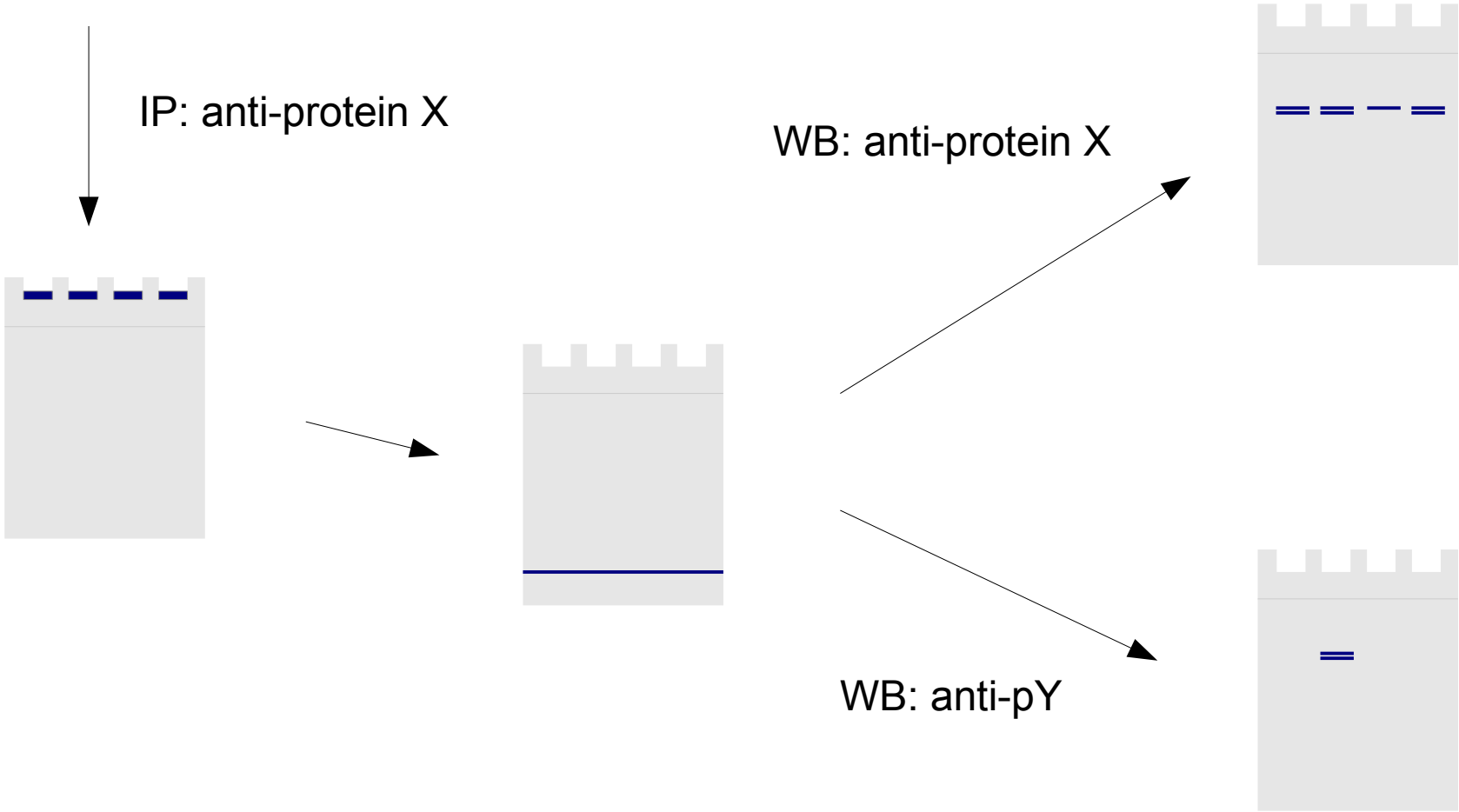
# Elektroforesa + Western blot

## Proteinkinasy



# Elektroforesa + Western blot

## Proteinkinasy



## Elektrochemické metody

Metoda	Měřené veličina	Přiváděné napětí	Vztah s koncentrací
Potenciometrie	Napětí	žádné	$U \sim \log(c)$
Coulometrie	Náboj	stejnoseměrné	$Q \sim n$
Voltametrie Polarografie Amperometrie	Proud	stejnoseměrné konstantní nebo proměnlivé	$I \sim c$
Konduktometrie	Vodivost	střídavé	$G \sim c$

# Elektrochemické metody

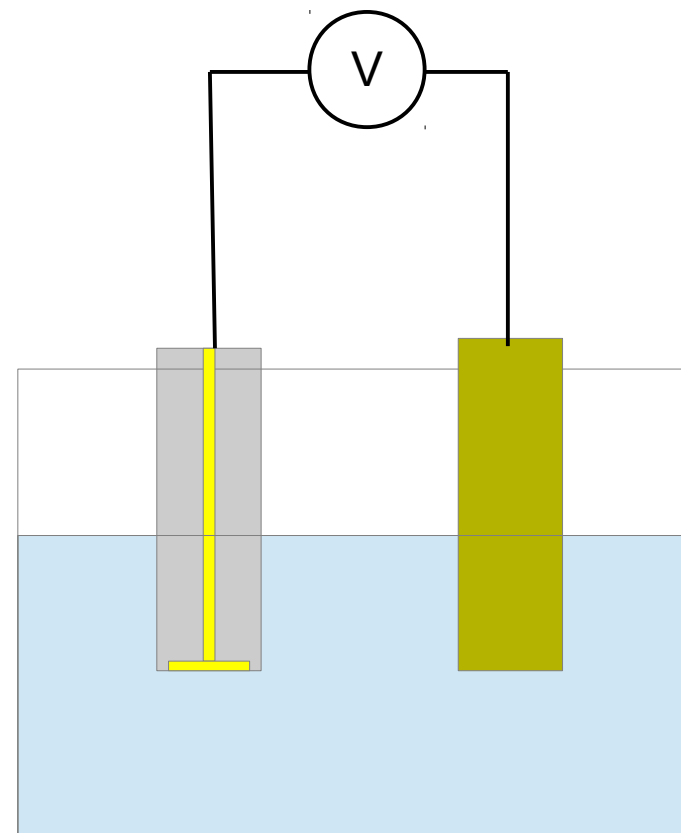
## Potenciometrie

amoniak (iontově selektivní elektroda)

hexakynoželeznatan/hexakynoželezitan

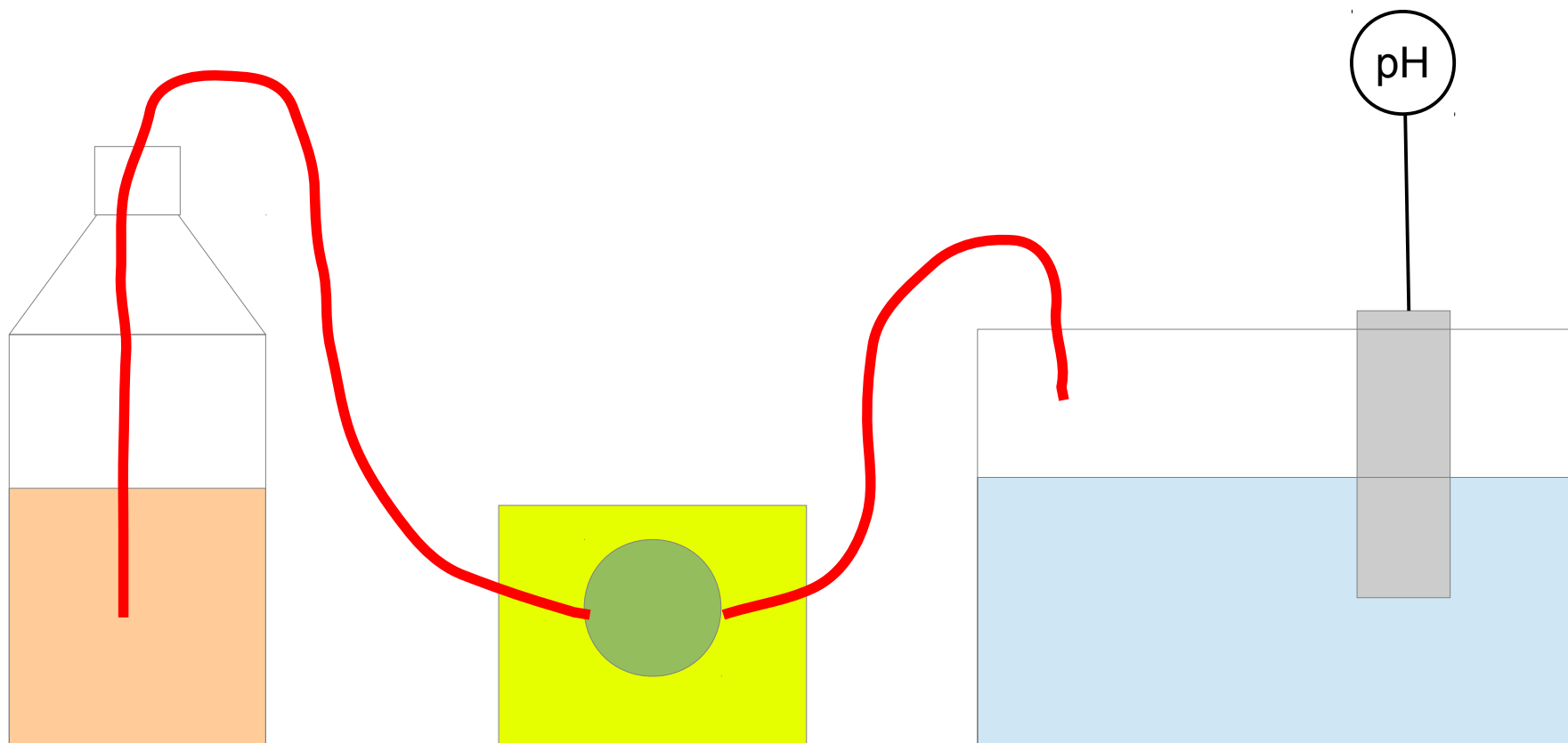
pH

Halogenidy, kovy



# Elektrochemické metody

pH-stat



+ coulometrické provedení

# Elektrochemické metody

Voltametrie, Polarografie, Amperometrie

$\text{H}_2\text{O}_2$

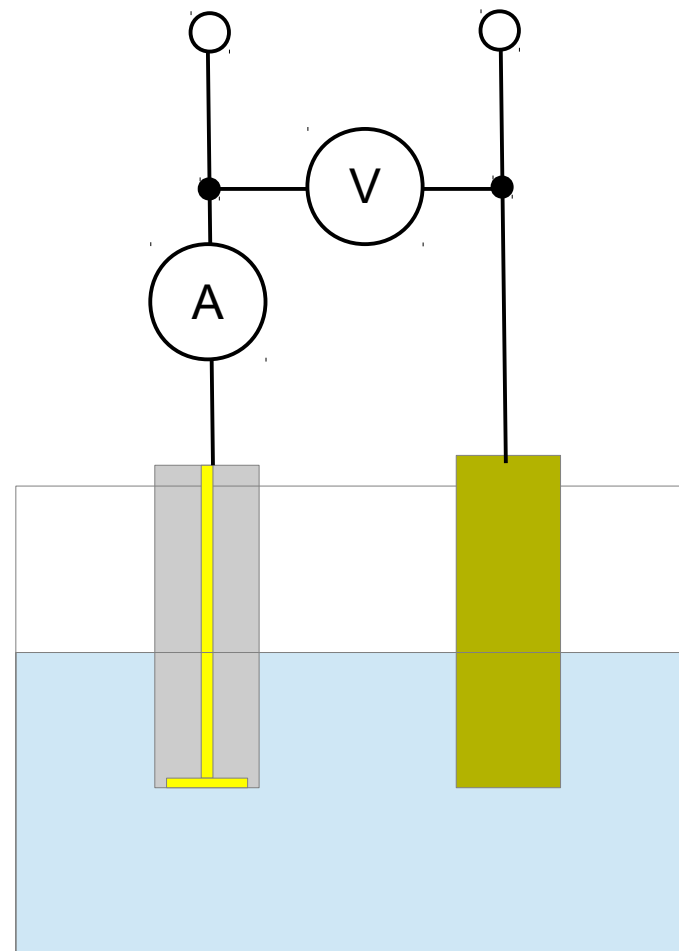
R-S-H

C=O (např. pyruvát)

NAD<sup>+</sup>

S polopropustnou membránou

Kyslík



# Elektrochemické metody

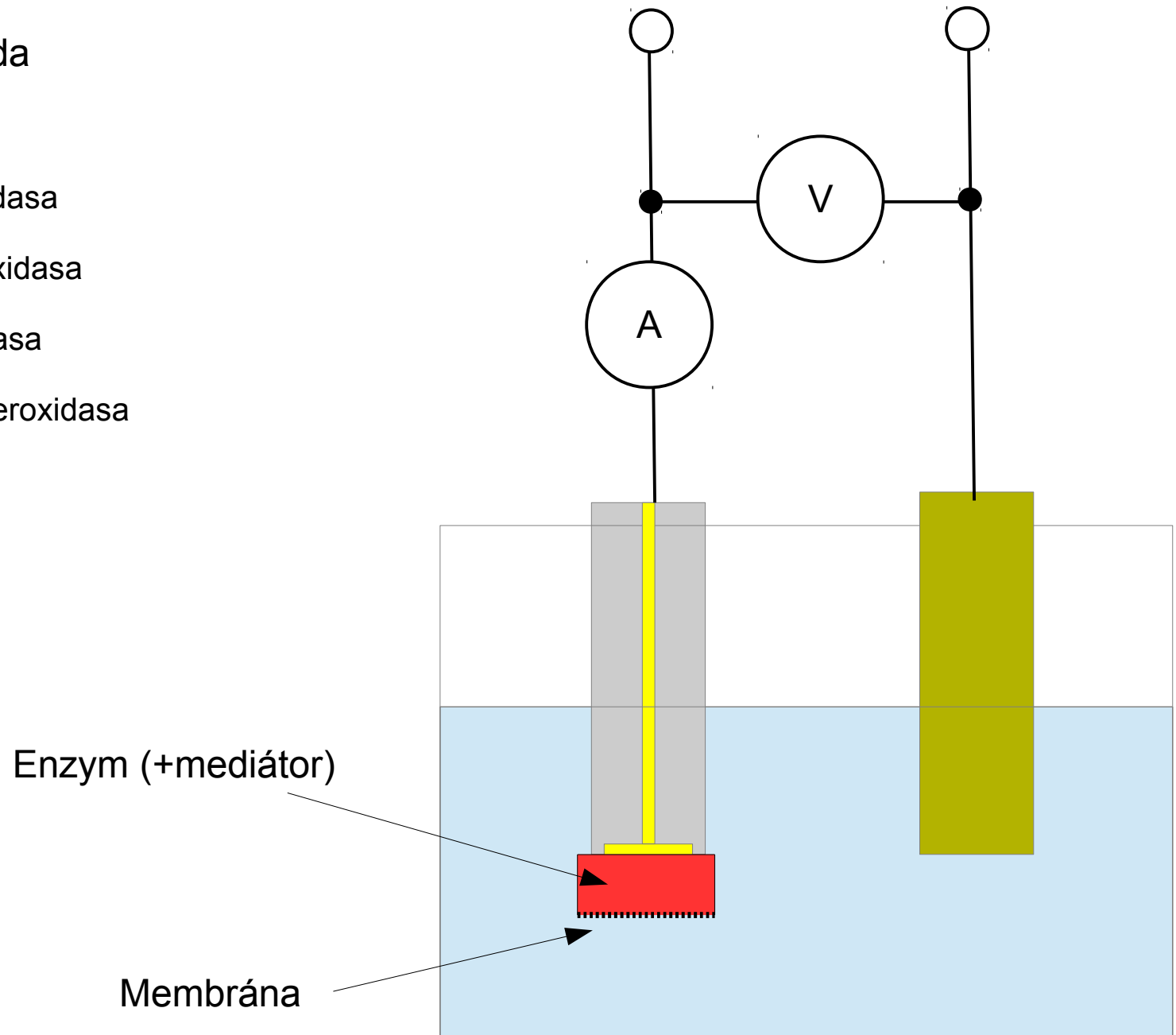
## Enzymová elektroda

Glukosa – glukosaoxidas

Glutamát – glutamátoxidas

Xanthin – xanthinoxidas

Různé sloučeniny – peroxidasa



## High-throuput screening

Mikrotitrační destičky – 96, 384, 1536 a 3456 (uHTS – více než 100 000 za den)

Chromogenní substráty, fluorogenní substráty, FRET, ...

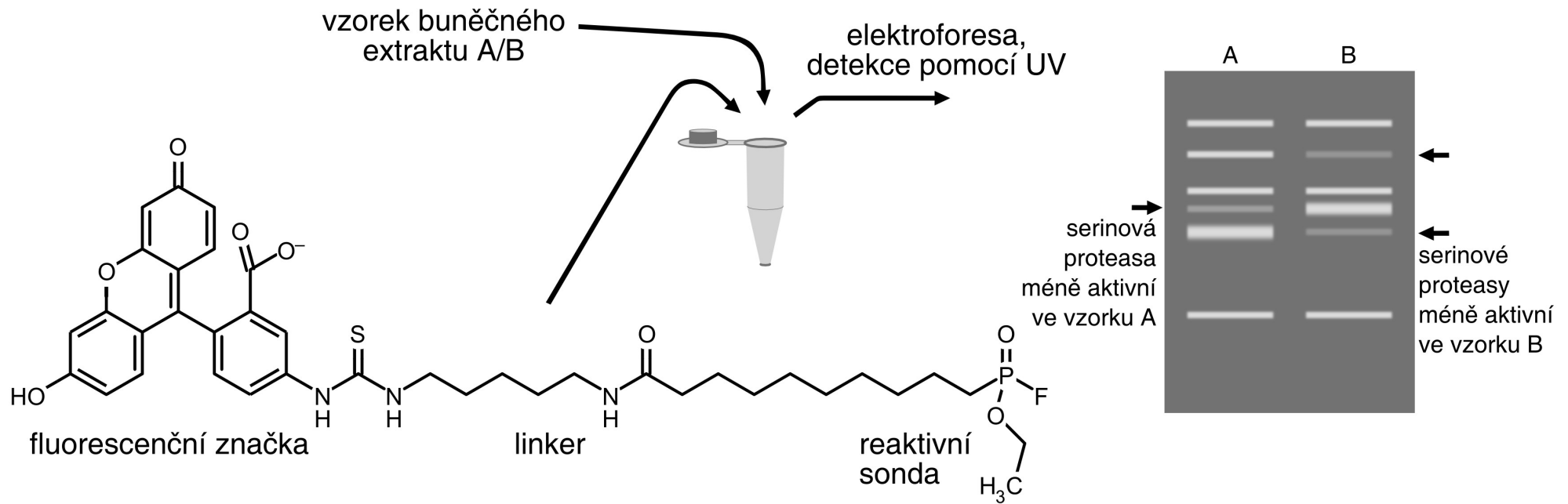


<http://www.openscreen.cz/>



# Profilování enzymů

## Activity-based enzyme profiling



# Jednomolekulární enzymologie

