

Využití enzymů pro analytické a výzkumné účely

- **Enzymy jako analytická činidla**
- **Stanovení enzymových aktivit**
 - Diagnostika (klinická biochemie)
 - Indikátory technologických a jakostních změn v potravinářství
- **Příprava vzorků k analýze**
 - Rozrušení struktury vzorku
 - Uvolnění analysované látky
 - Odstranění interferujících látek
- **Jiné aplikace**
 - Strukturní studie
 - Restriční enzymy

Enzymy jako analytická činidla

Přednosti enzymových metod

- specifita
- komplexnost vzorků
- rychlost
- citlivost

Nevýhody

- vysoká cena
- interferující látky
- inhibice
- inaktivace

Faktory ovlivňující rychlost enzymové reakce

- koncentrace substrátu
- koncentrace enzymu
- teplota
- pH
- iontová síla
- aktivátory
- inhibitory

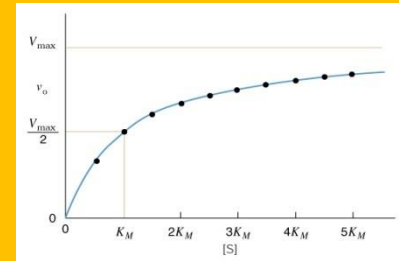
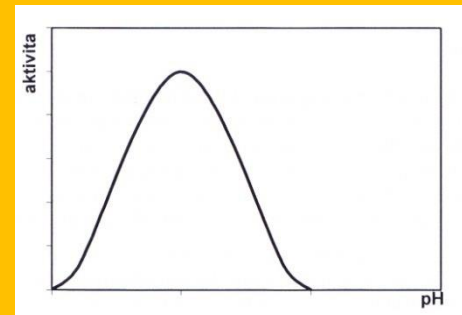
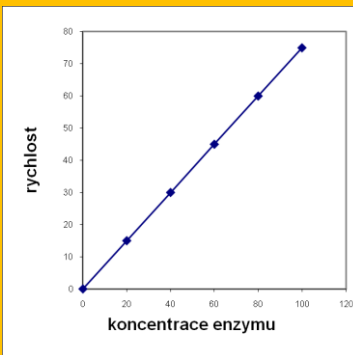


Figure 12-3. Key to Function. A plot of the initial velocity v_0 of a simple enzymatic reaction versus the substrate concentration $[S]$.
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



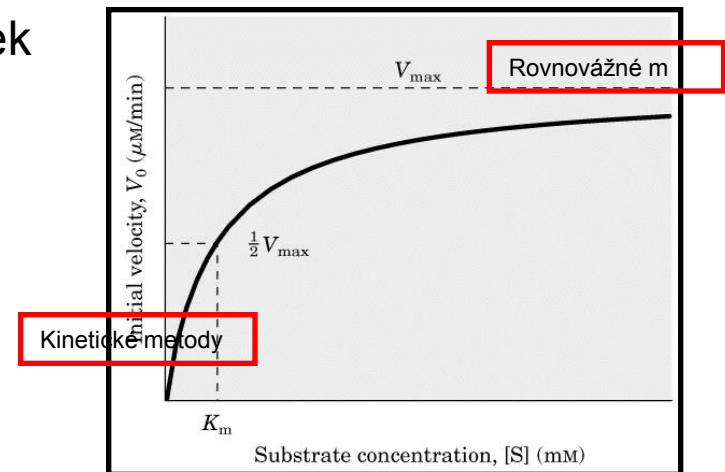
Enzymové analytické metody

Rovnovážné metody

- kinetika 0.řádu
- Enzymy s vysokou afinitou k substrátu - $\downarrow K_m$
- Není třeba striktně dodržovat reakční podmínky
- Vyšší konc. E \rightarrow kratší doba stanovení
- Lze stanovit pouze substráty

Kinetické metody

- Kinetika 1.řádu
- Enzymy s nízkou afinitou k substrátu - $\uparrow K_m$
- Rozšíření intervalu stanovení kompetitivní inhibicí
- Kratší doba stanovení
- Náročnější na dodržení reakčních podmínek
- Lze stanovit substráty, aktivátory, inhibitory



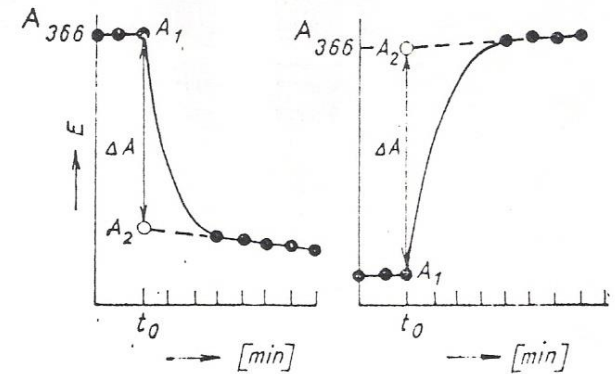
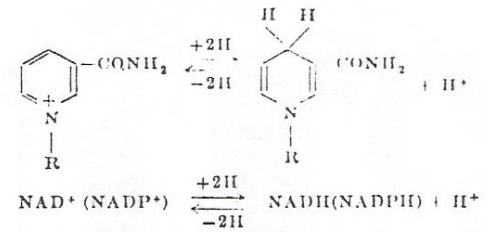
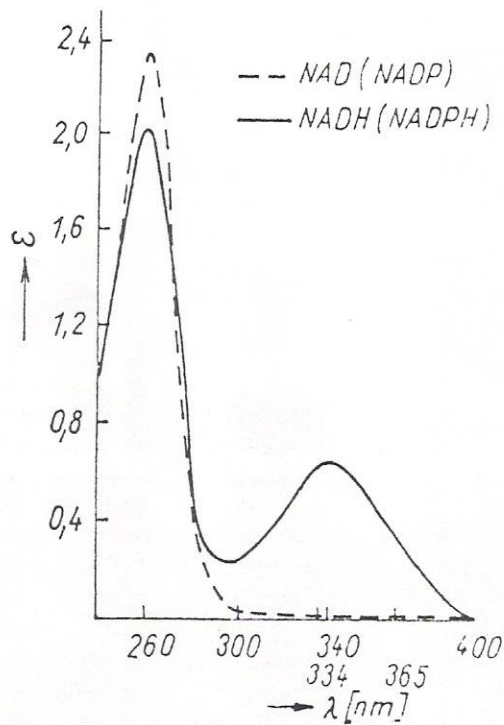
Aplikace enzymů k přímému analytickému stanovení

Lze stanovit látky jež jsou jejich:

- a) Substráty
- b) Inhibitory
- c) Aktivátory
- d) kofaktory

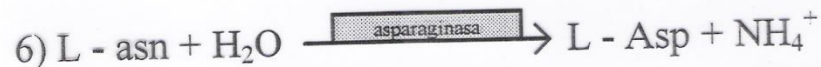
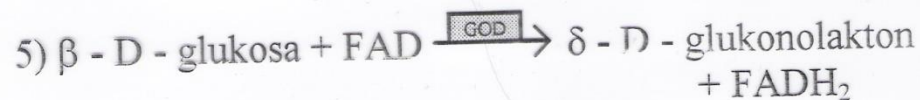
a) Substráty

Oxidoreduktasy:



b) charakter změny absorbance při oxidaci (I) a redukci (II) pyridinového koenzymu

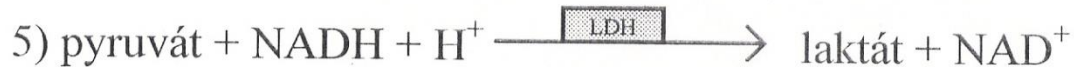
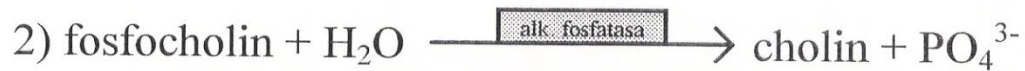
Příklady:



GOT = glutamát oxalacetát transaminasa

Pokračování...

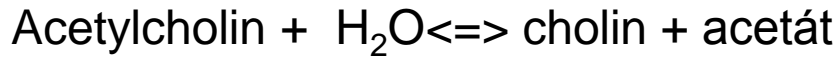
Lecithin (Boehringer)



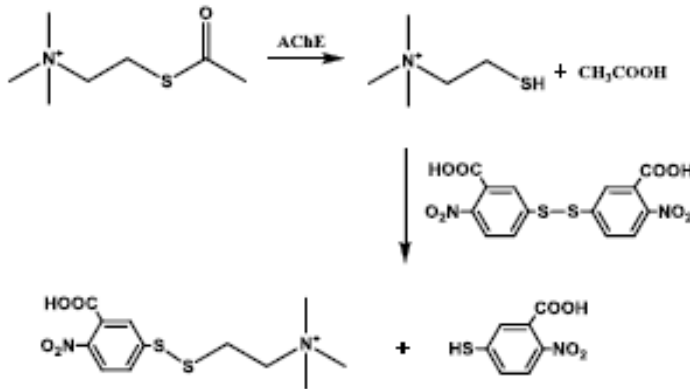
b) Inhibitory

Stanovení organofosfátů pomocí acetylcholin esterasy

(parathion 0,5 – 2 mg/ml)



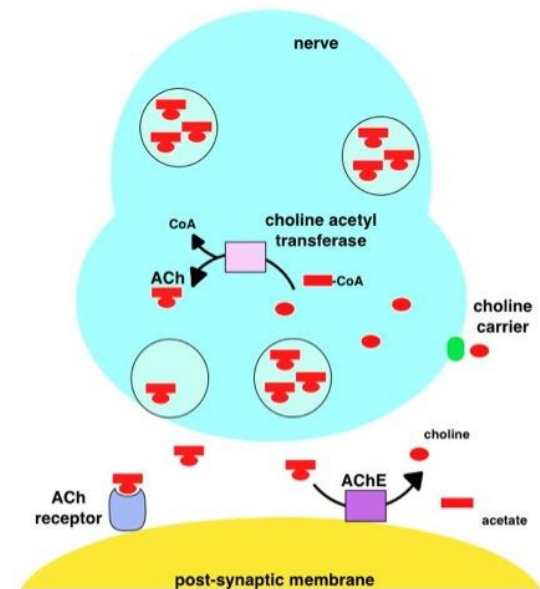
Elmannovo stanovení



Biosensory - cholinoxidasa + peroxidasa

Chemical structures of the pesticides

Pesticides	Molecular	Structure
Carbaryl	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	
Phoxim	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$	



Stanovení aktivátorů

- aktivátor přeměňuje neaktivní/málo aktivní enzymy v účinné katalyzátory
- vždy kinetická metoda
- závislost poč. reakční rychlosti na koncentraci aktivátoru
- po nasycení enzymu reakční rychlost s dalším růstem koncentrace těchto složek nestoupá

c) Aktivátory

Cu^{2+} - polyfenoloxidas

Zn^{2+} - aminopeptidasa (5 – 100 pg/ml)

d) Stanovení kofaktorů

ATP – luciferasa, hexokinasa, fosfoglycerátkinasa,
2-oxoglutarátdehydrogenasa

CoA – 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa

FAD – oxidasa D-aminokyselin

NAD^{+} - alkoholdehydrogenasa, glutamátdehydrogenasa

NADH – laktátdehydrogenasa

NADPH – glutamátdehydrogenasa, glutathionreduktasa

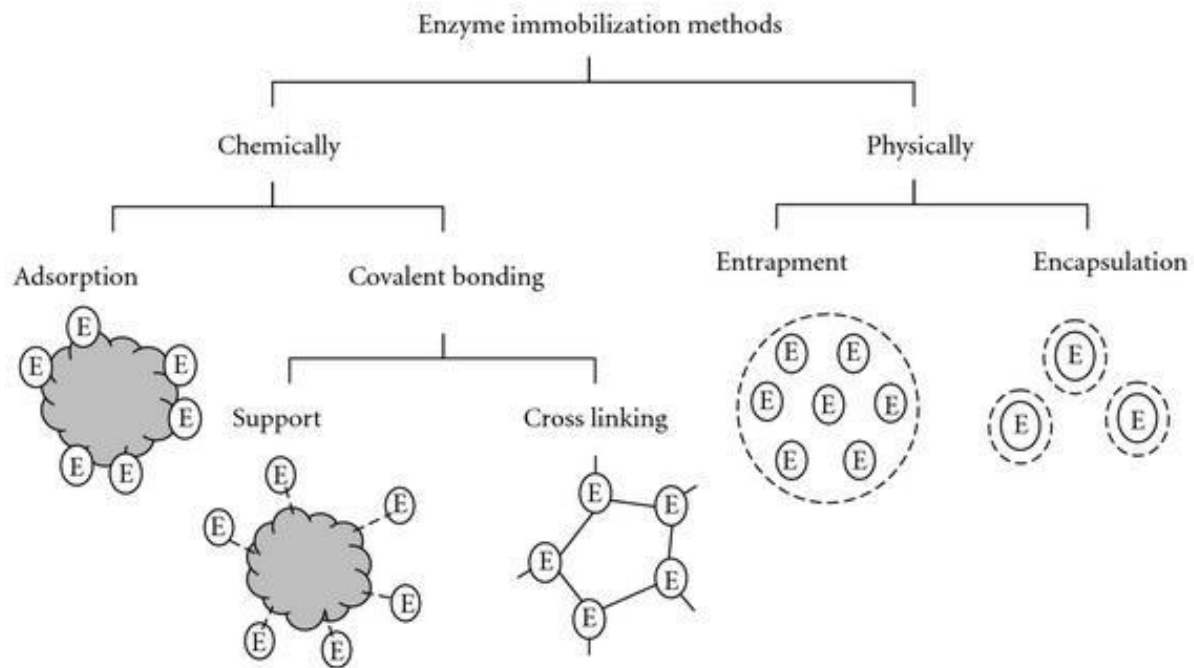
Imobilizované enzymy

- enzym, jehož mobilita je omezena fyzikálními či chemickými prostředky,
- imobilizovaný enzym si zachovává katalytickou aktivitu,
- heterogenní katalýza (enzym a substrát jsou v oddělených fázích)

Výhody imobilizovaných enzymů:

1. opakované použití (až 10 000x)
2. použití v kontinuálním procesu
3. imobilizace napodobuje přirozený stav => stabilnější, snáší větší výkyvy pH a vyšší teplotu
4. méně citlivé k aktivátorům a inhibitorům => menší riziko interferencí => analýza komplexních vzorků (např. krevní sérum)

Způsob immobilizace enzymů (proteinů)



Adsorbce

- enzymy zachycené na povrch nosiče fyzikálními silami (van der Waalsovi, iontové a vodíkové vazby, hydrofobní interakce)
- sorbenty = sklo, křemičitany, aktivní uhlí, silikagel, sloučeniny alumina, ionexové pryskyřice, bentonit, ...
- výhody: jednoduchost, minimální důsledky procesu na konformaci biokatalyzátoru
- nevýhody: malá pevnost vazby – závislá na pH, teplotě, iontové síle, koncentraci substrátu a použitém rozpouštědle => desorbce navazaného enzymu

Iontová vazba

- založeno na elektrostatické přitažlivosti opačně nabitých skupin nosiče a enzymu
- nosiče - komerční iontoměniče - DEAE-celulosa a DEAE-Sephadex
- anex - vazba negativně nabitých skupin enzymu a opačně u katexu
- výhody: snadnost, šetrné podmínky, snadná regenerace biokatalyzátoru
- nevýhody: změna podmínek (pH) a ionty s větší afinitou k ionexu = desorbce navázaného enzymu

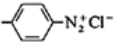




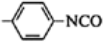

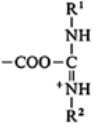
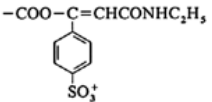
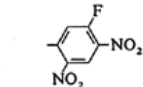
Kovalentní vazba na nerozpustný nosič


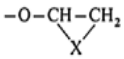
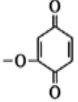


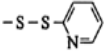
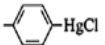
- nosiče – organické látky, přirozené i syntetické polymery
- vlastnosti – nerozpustné, mechanicky stabilní a hydrofobní či hydrofilní povrch
- k vazbě se využívají α - a ϵ -aminoskupiny, karboxylové, sulfhydrylové, hydroxylové, imidazolové a fenolové skupiny bílkovin
- vazba přes funkční skupiny enzymu, které nejsou důležité pro katalytickou funkci
- výhody: podobná situace v organismu – efektivnější, vyšší stabilita (nepodléhá změnám pH, teplotě, koncentraci substrátu a použitém rozpouštědle)
- nevýhody: podmínky reakce => koncentrační změny => snižování aktivity

Kovalentní prokřížení bi- a multifunkčními činidly

- jednotky biokatalyzátoru se navzájem spojují pomocí bi-event. multifunkčních činidel a vytvářejí vysokomolekulární nerozpustné agregáty bi- (event. multi.) činidla poskytují dvě (event. více) skupin pro vazbu biokatalyzátoru
- homobifunkční činidla - vazba prostřednictvím dvou (event. více) stejných skupin (př. Hexymethylendiisokyanát, glutaraldehyd)
- heterobifunkční činidla - vazba prostřednictvím odlišných funkčních skupin (př. trichloro-o-triazin)
- výhody: jednoduchost, stabilita imobilizovaného biokatalyzátoru => kovalentní vazba
- nevýhody: citlivost enzymů k vazebným činidlům => inaktivace, rosolovitá konzistence

Imobilizační reakce

Reactive group of carrier	Reacting group of enzyme	Coupling reaction
 Diazonium salt	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ 	diazo coupling
 Acid anhydride	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
$-\text{CH}_2\text{CON}_3$ Acylazide	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ 	peptide bond formation
 Imidocarbonate	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
$-\text{R}-\text{NCS}$ Isothiocyanate	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
 Isocyanate	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
$-\text{CH}_2\text{COCl}$ Acyl chloride	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
 Cyclic carbonate	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
 O-Acylisourea	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
 Woodward's reagent K derivative	$-\text{NH}_2$	peptide bond formation
 5-Fluoro-2,4-dinitroanilide	$-\text{NH}_2$	arylation

Reactive group of carrier	Reacting group of enzyme	Coupling reaction
 Triazinyl	$-\text{NH}_2$	arylation
 $\text{X} = \text{NH}, \text{O}, \text{S}$	$-\text{NH}_2$	alkylation
$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ Vinylsulfonyl	$-\text{OH}$ $-\text{SH}$	alkylation
 Vinylketo	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ $-\text{OH}$	Schiff's base formation
$-\text{CHO}$ Aldehyde	$-\text{NH}_2$	
 Imine	$-\text{COOH}$ $-\text{NH}_2$	Ugi reaction
 Imidoester	$-\text{NH}_2$	amidation
$-\text{CN}$ Cyanide	$-\text{NH}_2$	amidation
 Disulfide residue	$-\text{SH}$	thiol-disulfide interchange
 Mercury derivative	$-\text{SH}$	mercury-enzyme interaction
Matrix radical	enzyme radical	γ -radiation induced coupling
$-\text{NH}_2$ Amine	$-\text{NH}_2$ $-\text{COOH}$	peptide bond formation (in presence of condensing reagents)
$-\text{CONHNH}_2$ Acylhydrazide	$-\text{NH}_2$ $-\text{COOH}$	peptide bond formation (in presence of condensing reagents)

Zapolymerování do matrice gelu - entrapment

- gelové materiály – polyakrylamidový gel, agar, želatina, algináty, karageenan, ...
- substrát i produkt enzymu prostoupí póry gelové matrice (jen nízkomolekulární látky)
- výhody: mírné reakční podmínky, bez změny konformace enzymu=> imobilizace libovolného enzymu, použití ve formě filmu (např. na potažení elektrody), sloupce nebo i mechanicky dispergovaný
- nevýhody: tvorba volných radikálů při polymeraci => nepříznivé ovlivnění enzymové aktivity

Enkapsulace

Vytvoření polopropustné membrány na povrchu enzymu ve vodném prostředí – mikroemulze

Enzym v krystalickém stavu

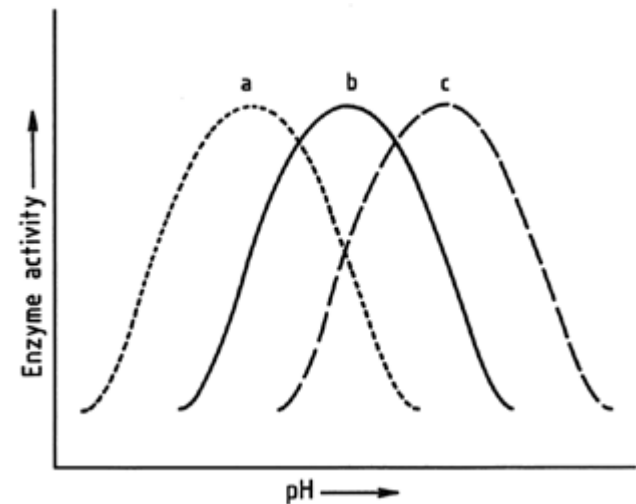
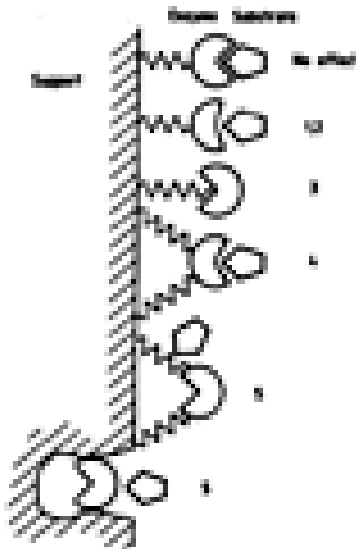
Požadavky na vlastnosti nosiče

- biokompatibilita
- dostatečně velký povrch
- dostatečný počet funkčních skupin
- Hydrofilní charakter
- nerozpustnost ve vodném prostředí
- chemická a teplotní stabilita
- mechanická odolnost a vhodný tvar částic
- resistance k mikroorganismům
- regenerovatelnost
- (ne) toxicita
- nízká nebo opodstatněná cena

Reakční podmínky imobilizačních reakcí - nedenaturující

Vliv immobilizace na vlastnosti enzymů:

1. Inaktivace reaktanty nebo produkty immobilizační reakce
2. Podmínky immobilizační reakce (pH, teplota, polarita prostředí)
3. Vazebné síly fixují enzym v neaktivní konfiguraci
4. vazebná reakce s fčními skupinami AK v aktivním centru
5. Orientace enzymové molekuly na povrchu limituje přístup substrátu
6. Vliv funkčních skupin nosiče



- a) Nosič s kladným nábojem
- b) Nativní enzym
- c) Nosič se záporným nábojem

Nové trendy ?nanotechnologie?

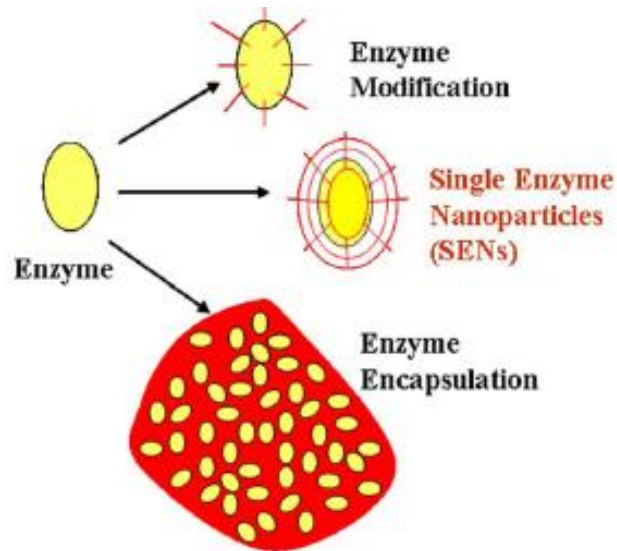


Fig. 3. Schematic comparison of SEN approach with enzyme modification and encapsulation approaches.

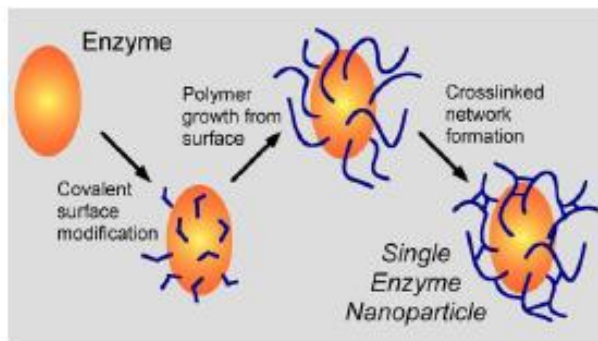


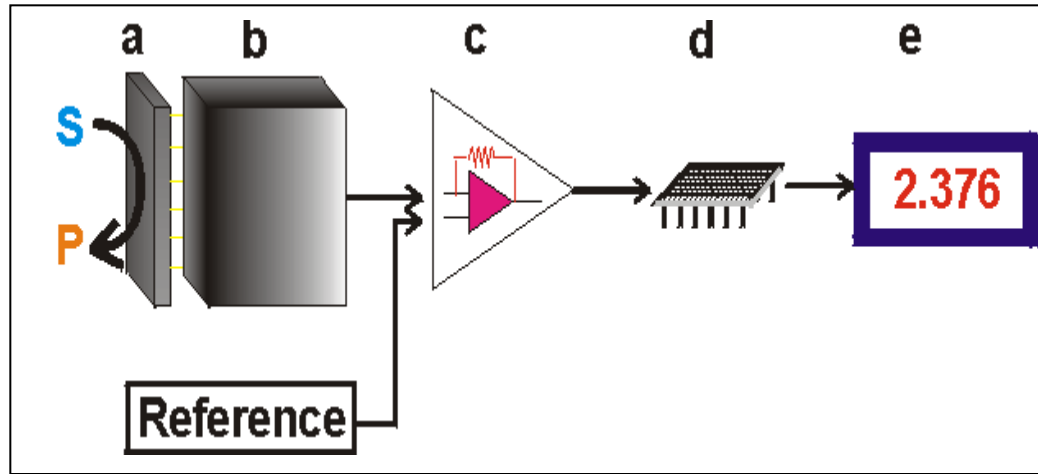
Fig. 4. Schematic for SEN synthesis.

- Stabilizace enzymu
- limitace difusí

Analytické využití imobilisovaných biologických systémů, enzymů zvláště

- a) Enzymové reaktory - detekční systém fyzicky oddělen - FIA
- b) Biosensory
- c) různé

Biosensor: analytické zařízení převádějící biologický signál na elektrický (nebo jiný)



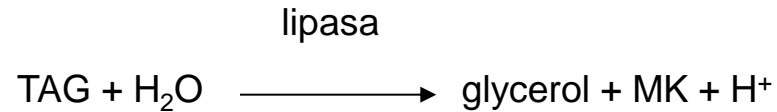
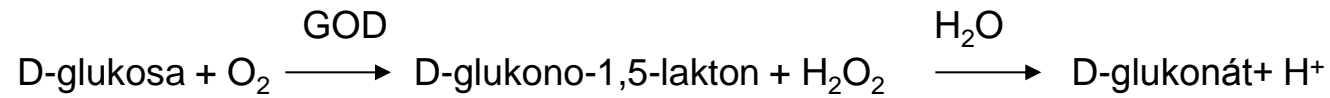
- a) Biokatalyzátor
- b) Detektor
- c) Amplifikace signálu
- d) Zpracování signálu
- e) záznam

Biosensory musí splňovat několik předpokladů:

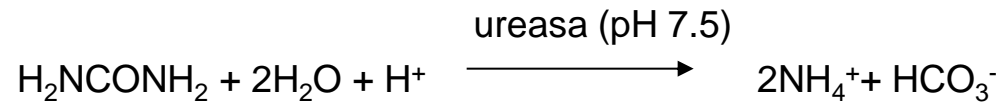
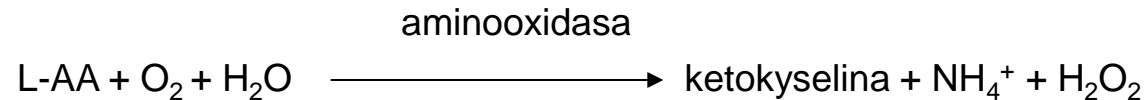
- a) specifita, stabilita skladovací a operační
- b) Katalysovaná reakce co nejméně závislá na vnějších podmínkách (míchání, pH, teplota atd..)
- c) Odpověď rychlá, přesná, reprodukovatelná a lineární v požadovaném rozmezí
- d) Pro invazivní aplikace -
 - klinické: biokompatibilní, nealergenní, miniaturní
- e) cena, přenosnost, jednoduchost
- f) Schopnost konkurovat „klasickým“ analytickým postupům

Potenciometrické biosensory

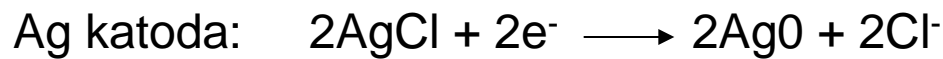
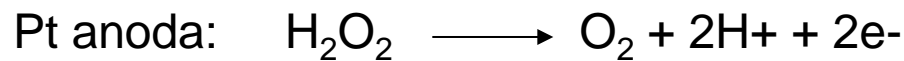
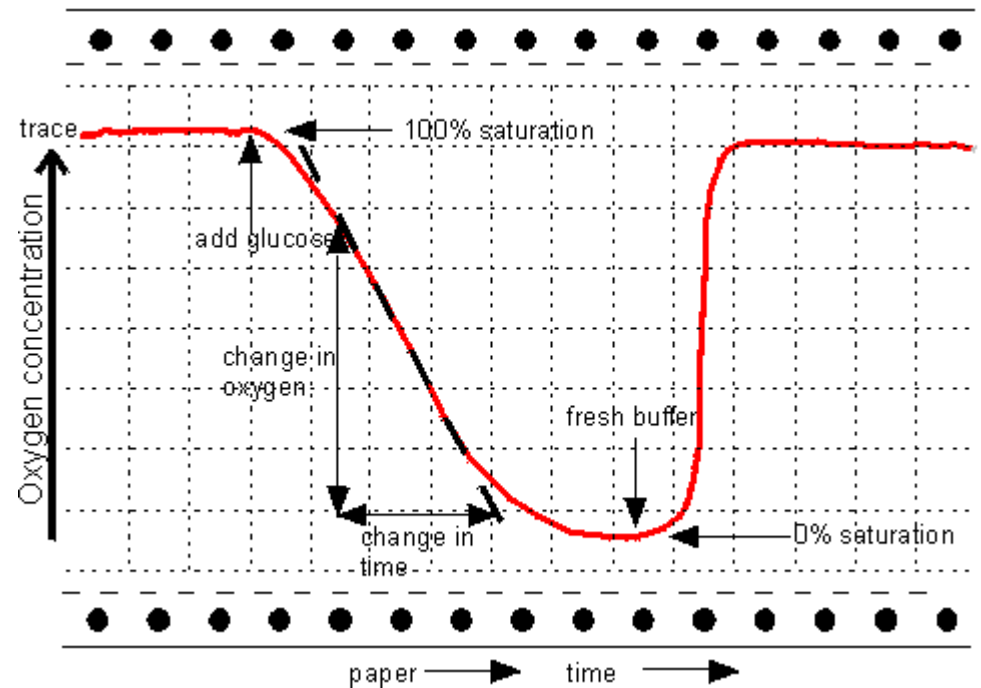
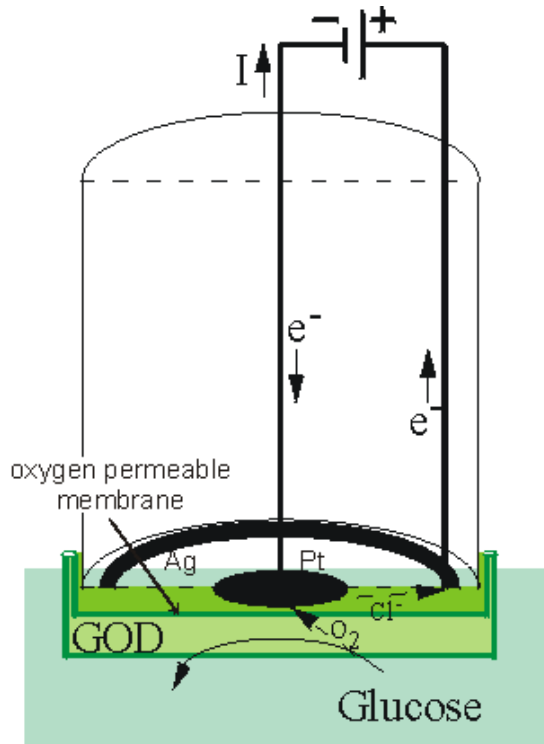
(a) H⁺



(b) NH₄⁺



Amperometrické biosensory (glukosový sensor, cholinový sensor)



Flavinové oxidasy

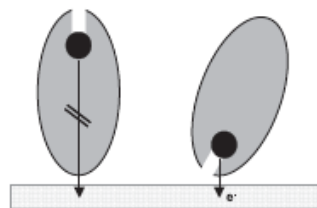
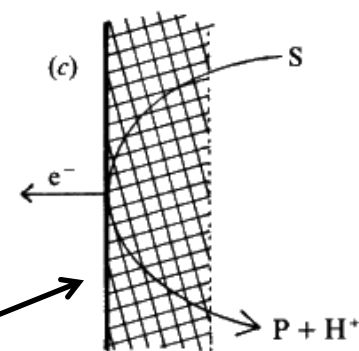
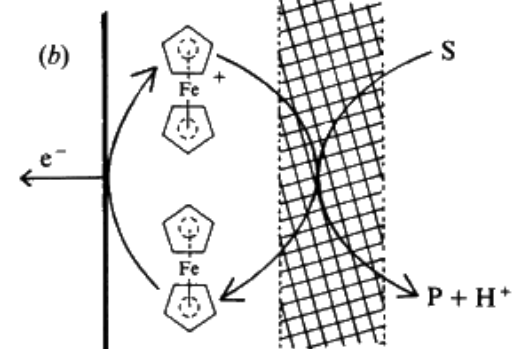
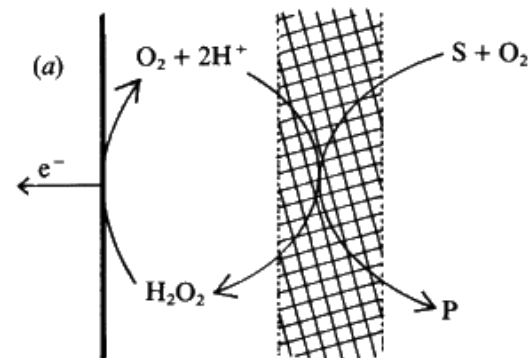
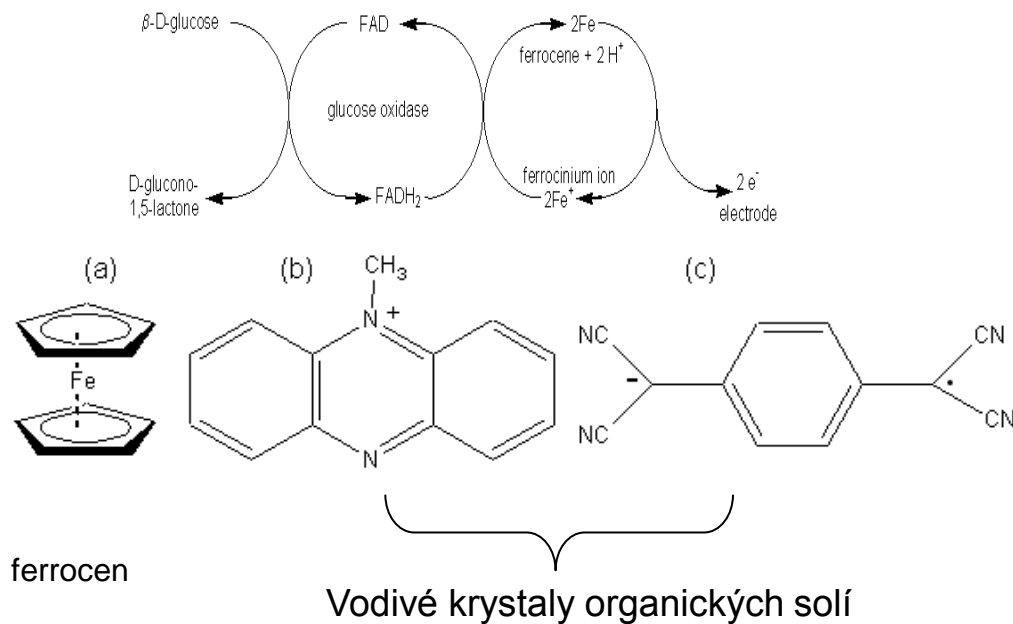
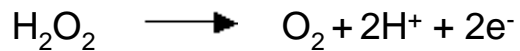
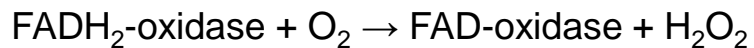
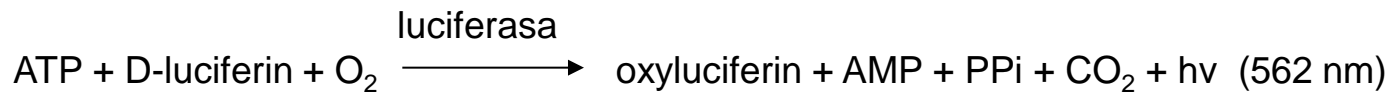
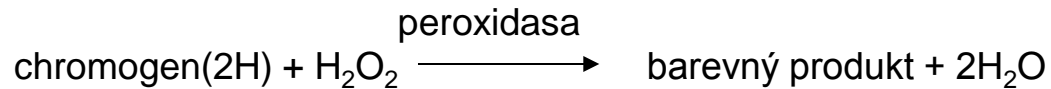


Figure 3. Effect of immobilized enzyme orientation on direct electron transfer.

„Optické“ biosenzory

- a) Změna absorpce světelného záření
- b) Emise světelného záření - luminiscence



Různé: např. diagnostické papírky

Enzymová imunoanalýza

Využití:

1. Lokalisace buněčných komponent – imunohistochemie
2. měření velmi nízkých koncentrací látek v biologických materiálech
3. imunodetekce na gelech nebo membránách

Kriteria pro výběr enzymu:

- malá M_h
- možnost vazby na protilátky – funkční skupiny
- vysoká specifická aktivita
- vysoká stabilita
- vysoká čistota preparátu
- snadná detekovatelnost produktu
- cena

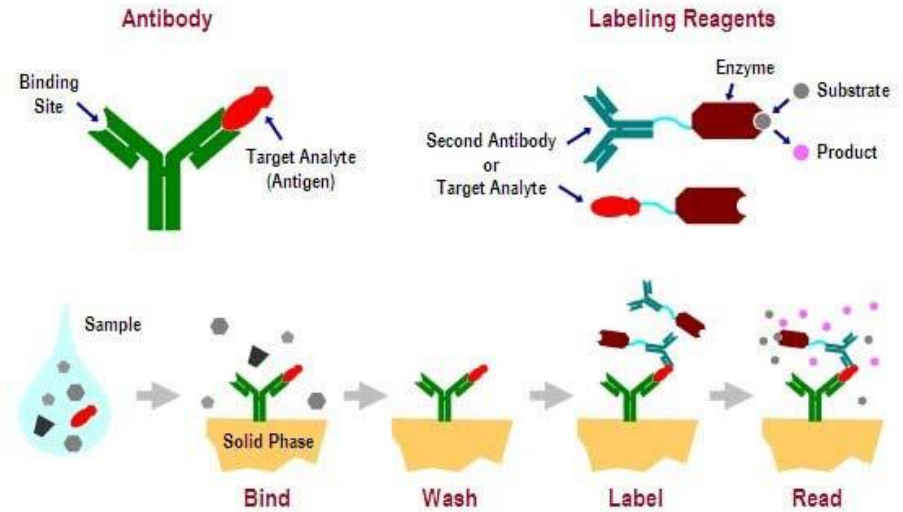
Příklady:

peroxidasa, alkalická fosfatasa

β-D-galaktosidasa, glukosaoxidasa

Imunodetekční metody

ELISA



Imunoblot

