

Abstrakt

Využití kapilární elektroforézy pro studium enzymů

Mgr. Soňa Vytisková, Ph.D.

Enzymy jsou biologické katalyzátory, které hrají významnou roli v biochemických reakcích důležitých pro normální růst, zrání a reprodukce všech organismů. Enzymy katalyzují všechny chemické reakce v živých systémech a stanovení jejich aktivity je v biochemii a molekulární biologii pravděpodobně nejčastěji prováděným procesem vůbec. Kapilární elektroforéza (CE) je významná a relativně nová analytická metoda. Malé rozměry CE separačních systémů jsou hlavní výhodou v biologickém výzkumu. V současnosti se kapilární elektroforéza používá na poli imunoanalýzy a enzymového stanovení právě díky rychlé analýze a minimálnímu množství vzorku potřebného k analýze. "Electrophoretically mediated microanalysis" (elektroforézou zprostředkovaná mikroanalýza) neboli EMMA je metoda, při které enzymová reakce probíhá přímo v kapiláře ve vlastním průběhu elektroforézy, přičemž všechny kroky nutné k provedení enzymového stanovení jsou integrovány do jediné metody a množství analytů je zde redukováno řádově na nanolity. Cílem této práce bylo vyvinout novou EMMA metodu pro stanovení různých enzymů. Klinicky důležité enzymové systémy zahrnuté v této studii byly rozdílné z hlediska typu a počtu substrátů, produktů a kofaktorů. Pro studium těchto enzymů byly použity modelové substráty, po jejichž konverzi vznikal produkt, který bylo možno detekovat pomocí UV detektoru. Pro enzymové systémy byly stanoveny elektroforetické parametry (složení základního elektrolytu, inkubační protokol, velikost aplikovaného napětí, délka, průměr a teplota kapiláry), které byly nejvýhodnější z hlediska provedení enzymové reakce a separace produktů přímo v CE kapiláře. Prvním studovaným enzymem byla rhodanasa, dalším angiotensin konvertující enzym a posledním fenol sulfotransferasa. Vyvinuté CE metody pak byly využity pro stanovení kinetických parametrů daných enzymových reakcí, a dále u enzymu rhodanasa, angiotensin konvertujícího enzymu byl studován vliv inhibitorů. V tomto projektu byly zkoumány možnosti kapilární elektroforézy, které vedly k vypracování nových metod stanovení kinetických parametrů rhodanasy, angiotensin konvertujícího enzymu, fenol sulfotransferasy; a celá práce byla zakončena obecnějšími závěry. Vypracované metody spojují všechny výhody CE, rychlost a jednoduchost provedení, minimální potřeba analytů, vysoká účinnost a kompletní automatizace. Tyto výhody minimalizují riziko kontaminace a značně redukuje cenu analýzy.

Tato práce byla sponzorována grantem č. 766/200 MŠMT ČR, grantem č. 525/00/0785 GA ČR a "Institute for the Promotion of Innovation by Science and Technology in Flanders (IWT) 993194".