

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

PEROXIDASY A STANOVENÍ JEJICH AKTIVITY

Bakalářská práce

Vypracovala: Lenka Sulanová

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2008

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně.
Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou
uvedeny v SEZNAMU LITERATURY a v práci řádně citovány“

Velice děkuji své vedoucí bakalářské práce

Doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za trpělivost, užitečné rady, připomínky a odbornou pomoc s neřešitelnými úkony v laboratoři i během psaní bakalářské práce samotné.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Úloha volných radikálů v organismu	7
2.2. Vlastnosti peroxidas	7
2.3. Významné peroxidasy	8
2.4. Metody stanovení peroxidas	9
2.4.1. Použití substrátu 3,5,3'5'-tetramethylbenzidinu	9
2.4.2. Stanovení HRP chemiluminiscencí	11
2.4.3. Stanovení aktivity křenové peroxidasy pomocí chromogenů pyrokatechol - anilin a fenol – aminoantipyrin	13
2.4.4. Stanovení aktivity myeloperoxidasy ve slinách	15
2.4.5. Voltametrické stanovení aktivity HRP s použitím 3-indoxylfosfátového substrátu	16
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1. Materiál	18
3.2. Pomůcky a přístrojové vybavení	18
3.3. Příprava pracovních roztoků	19
3.4. Popis pracovních postupů	22
3.4.1. Stanovení aktivity peroxidasy pomocí OPD	22
3.4.1.1. Návod	22
3.4.1.2. Optimalizace metody - ředění cytosolu	23
3.4.1.3. Optimalizace metody - ředění substrátu	24
3.4.1.4. Optimalizace metody - ředění peroxidu	26
3.4.2. Stanovení aktivity peroxidasy pomocí Guajakolu	28
3.4.2.1. Návod	28
3.4.2.2. Optimalizace metody - ředění cytosolu	28
3.4.2.3. Optimalizace metody - ředění substrátu	30
3.4.2.4. Optimalizace metody - ředění peroxidu	31

4. VÝSLEDKY	33
4.1. Použití substrátu OPD	33
4.1.1. Optimalizace ředění cytosolu	33
4.1.2. Optimalizace ředění substrátu	34
4.1.3. Optimalizace ředění peroxidu	36
4.2. Použití substrátu Guajakolu	38
4.2.1. Optimalizace ředění cytosolu	38
4.2.2. Optimalizace ředění substrátu	39
4.2.3. Optimalizace ředění peroxidu	41
5. DISKUSE	43
6. ZÁVĚR	45
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	46
8. SEZNAM LITERATURY	47

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Peroxidasy představují nedílnou součást antioxidačního obranného systému organismu. Jsou to enzymy řadící se do skupiny oxidoreduktas, které např. katalyzují přeměnu peroxidu vodíku nebo dalších cizorodých látek a zabraňují tak jejich akumulaci v organismu a jeho poškození. Kromě jiného jsou často využívány při metodách ELISA ke značení antigenu nebo protilátky a v mnoha dalších enzymatických stanoveních.

Cílem bakalářské práce bylo v dostupné literatuře nalézt metody pro stanovení peroxidas a vybrat dvě jednoduché metody, které by mohly být využívány na Katedře biochemických věd FaFUK.

Úkolem experimentální části bakalářské práce bylo vyzkoušet, částečně optimalizovat a porovnat dvě vybrané metody stanovení peroxidas v cytosolu, získaném z potkaních jater.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Úloha volných radikálů v organismu

Volné radikály jsou atomy, molekuly, nebo ionty schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Snaží se proto získat další elektron a doplnit si tak elektronový pár do stabilní konfigurace. Jsou to látky velmi reaktivní s omezenou dobou existence. Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku. Nejčastěji se objevujícím radikálem v organismu je pravděpodobně superoxid. Ten vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku. Superoxid sám o sobě není příliš reaktivní tudíž ani škodlivý, ale jeho nebezpečí tkví v tom, že se spontánně může přeměňovat v mnohem škodlivější reaktivní formy kyslíku, jako jsou např. peroxid vodíku, hydroxylový radikál, peroxynitrit, kyselina chlorná atd. Organismy využívají volné radikály k ničení fagocytovaných mikroorganismů, při ovulaci a oplodnění vajíčka, mají signalizační význam v buňce, ale na druhé straně mohou organismus vážně poškodit. Mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy, bílkoviny, enzymy a to může vést k těžkému poškození tkání, orgánů a ke vzniku různých onemocnění jako jsou např. ateroskleróza, diabetes mellitus, zhoubné novotvary, záněty aj. Proto organismus vyvinul účinné mechanismy obrany proti volným radikálům známé jako antioxidační ochrana, mezi jejíž složky se řadí i peroxidasy. [1] [3]

2.2. Vlastnosti peroxidas

Peroxidas jsou enzymy, které se řadí do skupiny oxidoreduktas. Jejich přítomnost byla prokázána v rostlinách, mléce, erythrocytech, leukocytech, trombocytech a dalších tkáních. Jejich prosthetickou skupinou je hem. Při reakcích katalyzovaných peroxidasami je peroxid vodíku redukován za současné oxidace jiného substrátu. Tím je předcházeno akumulaci peroxidu, produkci volných radikálů, poškození membrán či vzniku aterosklerózy nebo rakoviny. Tyto enzymy mohou oxidovat i některé cizorodé látky - xenobiotika. Peroxidas se dělí na specifické (potřebují k reakci určitý substrát) a nespecifické (oxidují více různých substrátů). Užívají se při metodách ELISA ke značení

antigenu nebo protilátky a v mnoha dalších enzymatických stanoveních, při nichž vzniká peroxid vodíku. [1] [2]

2.3. Významné peroxidasy

Glutathionperoxidasa je enzym, který katalyzuje štěpení peroxidu vodíku a současnou oxidaci cystein obsahujícího glutathionu. Je to tetramerní glykoprotein obsahující selen (právě na přítomnosti selenu závisí antioxidační funkce GPX) v aktivním místě molekuly. Vyskytuje se ve třech různých formách (= izoenzýmech - je možné je odlišit imunochemicky), které se liší substrátovou specifitou a umístěním v buňce. První typ se nachází v cytoplazmě buněk (cGSHPx), druhý v extracelulární tekutině (eGSHPx) a třetí typ je vázán v membráně – fosfolipidová glutathionperoxidasa (pGSHPx), tento typ redukuje kromě peroxidu vodíku i lipidové hydroperoxydy, které přeměňuje na příslušné hydroxylové deriváty lipidů. Tím chrání fosfolipidy buněčných membrán a přerušuje řetězovou reakci poškození lipidů volnými radikály. [4]

Myeloperoxidasa je obsažena v azurofilních granulech neutrofilních granulocytů, v lysozomech monocytů a makrofágů. Uplatňuje se při fagocytóze jako látka schopná zabít bakterie, plísňe, parazity a nádorové buňky. Katalyzuje reakci peroxidu vodíku s chloridovými ionty. Vzniká při tom látka s mohutným oxidačním účinkem - kyselina chlorná, která umožní vznik dalších reaktivních forem kyslíku - hydroxylový radikál, singletový kyslík. Při nadměrné tvorbě kyseliny chlorné dochází k chloraci bílkovin (vznikají chloraminy), syntéze cholesterolu a může být zahájen proces lipoperoxidace. MPO je tetramer obsahující dva těžké a dva lehké řetězce. Každý z těchto řetězců váže jednu molekulu hemu. Hemový pigment způsobuje zelené zbarvení sekretu neutrofilů, jako je hnis nebo sliz. Jsou známy tři izoformy, které se liší pouze ve velikostech těžkých řetězců. V molekule je obsažen vápník, který je důležitý pro strukturu aktivního místa. MPO se využívá při metodách jako je např. sandwich ELISA. [5]

Křenová peroxidasa (HRP) je přítomna v křenu. V molekulární biologii se využívá její schopnosti zesílit slabý signál a zvýšit odhalitelnost cílové molekuly. Používá se k určení malých množství specifických proteinů ve western blot dále v ELISA metodách v imunohistochemii. Výhodou HRP je její velikost - je menší, stabilnější a levnější než např. alkalická fosfatasa, kterou lze u těchto metod také použít. [6]

Askorbátperoxidasa je nejčastěji přítomna u rostlin. Funkcí je detoxikace peroxidů za použití kyseliny askorbové jako substrátu. Pro tuto reakci je nezbytná přítomnost hemu jako kofaktoru. [7]

Laktátperoxidasa se nachází v mléce. Má antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Je tepelně odolná a široce se využívá jako indikátor správné či špatné pasterizace. [8]

Thyropoxidasa se vyskytuje hlavně ve štítné žláze, kde katalyzuje včlenění jódu do thyroglobulinu a následnou produkci thyroxinu a trijódthyroninu. Tato reakce je zprostředkována pomocí peroxidu vodíku. TPO je stimulována TSH a inhibována thioamidovými drogami např. propylthiouracilem nebo methimazolem. [9]

Cytochrom c peroxidasa je ve vodě rozpustný enzym, který obsahuje hem. Je to monomer. Poprvé byla izolována z pekařských kvasinek. Kromě peroxidu reaguje i s jinými hydroperoxydy, ale v těchto případech je reakce mnohem pomalejší než s peroxidem vodíku. [10]

Eosinofilová peroxidasa, je peroxidáza cytotoxická vůči bakteriím. [11]

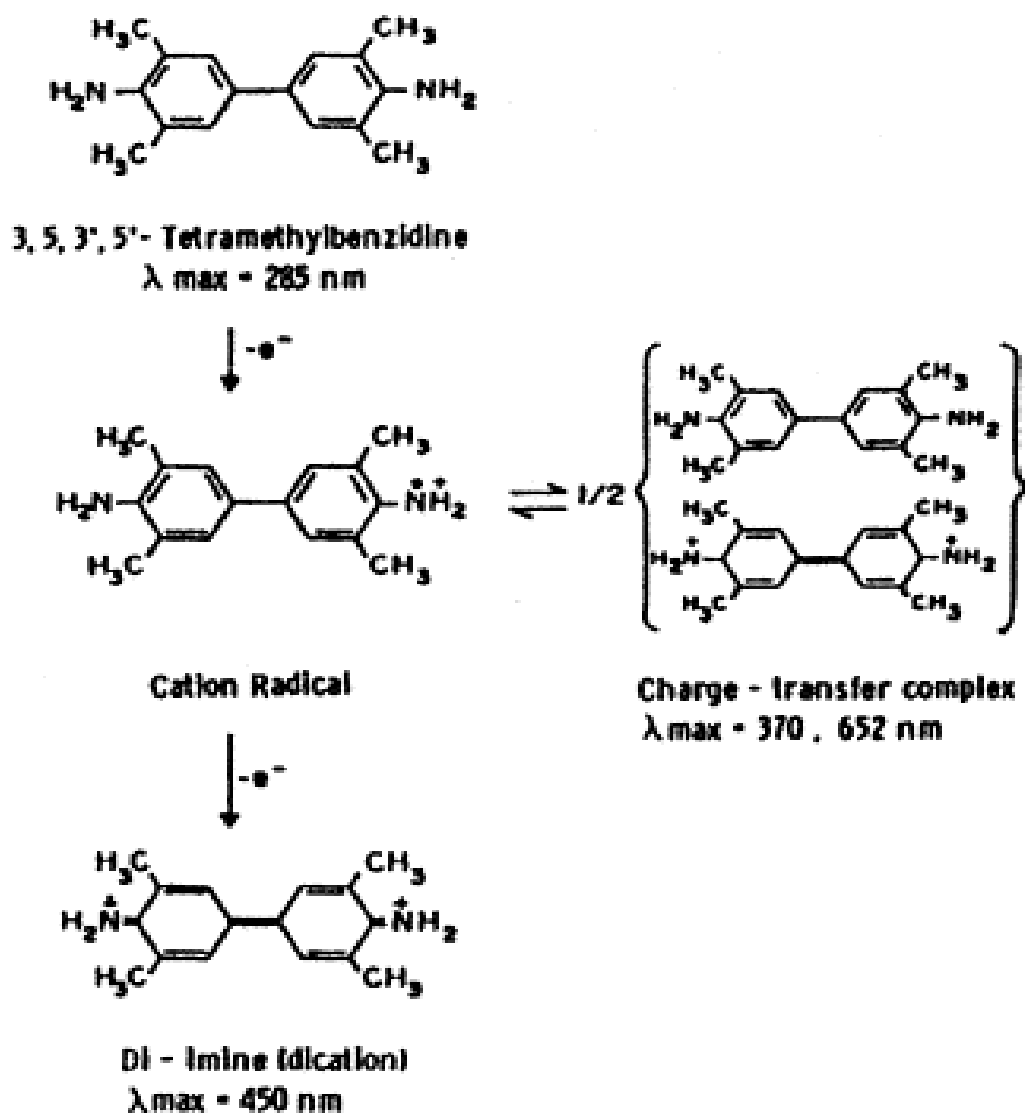
2.4. Metody stanovení peroxidas

2.4.1. Použití substrátu 3,5,3'5'-tetramethylbenzidinu

Principem reakce je redukce peroxidu vodíku účinkem HRP a současná oxidace TMB. Po inkubaci a přidání stop činidla je měřena hodnota absorbance vzniklého produktu na spektrometru.

Výhodou tohoto systému je stabilita oxidačního produktu TMB při kyselém pH a také aktivita HRP v širokém rozmezí pH. V této kolorimetrické metodě, pomocí které je detekována aktivita endogenních peroxidas v krvi nebo v průmyslu při syntéze barviv, se dříve jako substrát používal benzidin, ale kvůli karcinogenním vlastnostem tohoto aromatického aminu je nyní nahrazován bezpečnějším 3,5,3'5'-tetramethylbenzidinem. Tento fakt a vysoká citlivost řadí TMB mezi vhodné chromogenní substráty používané v ELISA metodě.

Metoda je charakterizována linearitou, správností, přesností, je spolehlivá, finančně nenáročná a jednoduchá.

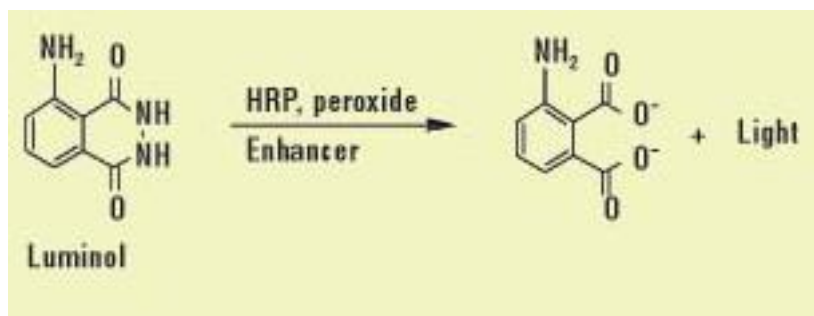


Obr. 1. Chemická struktura TMB a jeho oxidační stavy (charge-transfer complex je v průběhu oxidace modře zbarven; di-imin žlutě)

Tato metoda byla např. využita ve studii, která se zabývala otázkou zvýšení celkového antioxidačního stavu přidáním jodidu k lidskému séru, protože u některých pacientů s degenerativními chorobami, kteří byli léčeni solnými roztoky s jódem byla přítomna zvýšená aktivita plasmatické glutathionperoxidasy. Po přidání NaI docházelo ke zvýšení peroxidasové aktivity ve srovnání s kontrolním sérem (ke kterému se NaI nepřidává). Po přidání NaCl dochází ke slabému poklesu peroxidasové aktivity ve srovnání s kontrolním sérem. [12]

2.4.2. Stanovení HRP chemiluminiscencí

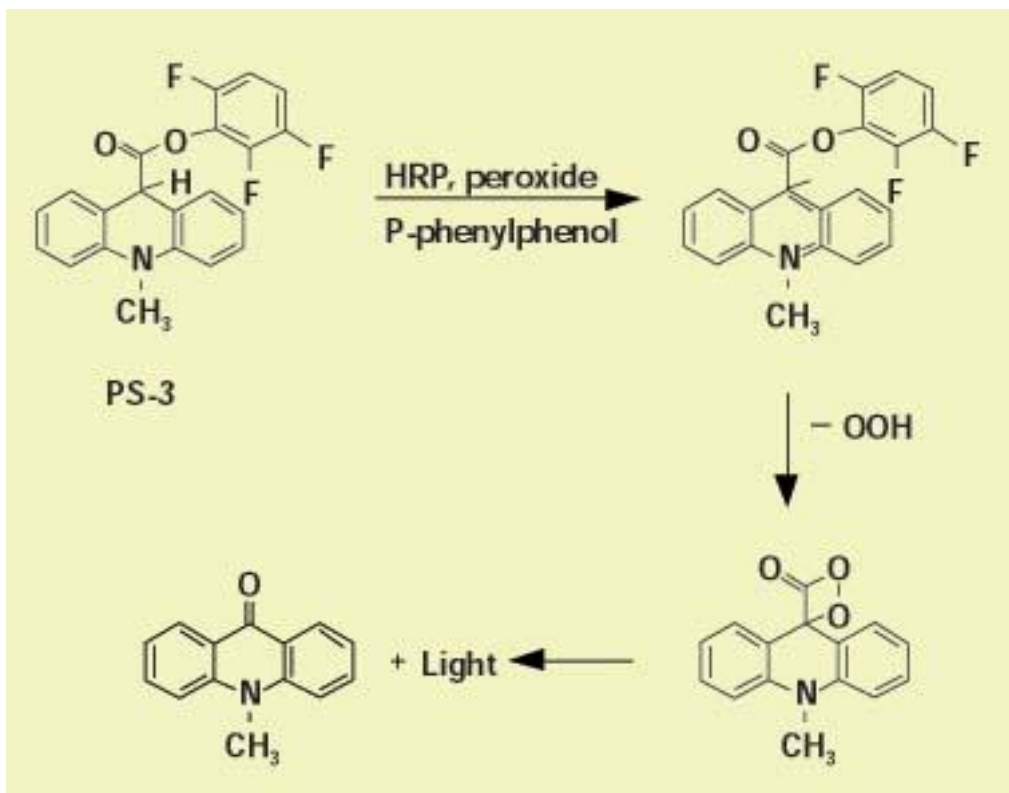
V současnosti je při chemiluminiscenčních analýzách jako substrát hojně využíván cyklický hydrazid – Luminol.



Obr. 2. Reakce přeměny luminolu působením HRP, peroxidu a enhanceru

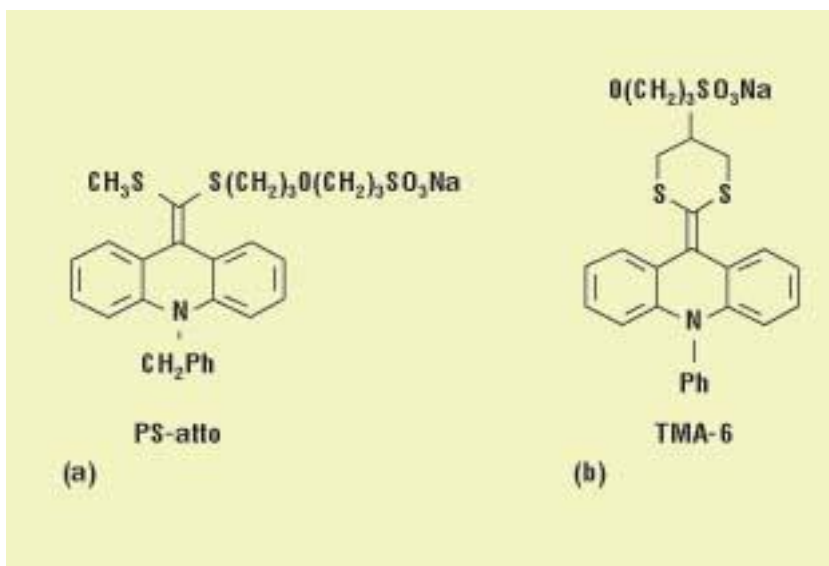
Mezi reagenty pro detekci peroxidase aktivity se řadí PS-1 a PS-3. Obsahují substrát akridan, který podléhá enzymatické oxidaci a přeměňuje se na akridinium ester, ten reaguje s peroxidem vodíku (přítomným v reagentii) a vzniká nestabilní meziproduct dioxetanon. Enhancer včleněný do reakce urychluje a prodlužuje enzymatickou oxidaci akridanového substrátu. Na konci reakce je enhancer redukován zpět do svého původního stavu a je připraven k další oxidaci akridanu.

Nevýhodou této metody je, že se pracovní roztok musí připravovat denně. Reakce mezi jednotlivými komponentami je velice pomalá a dochází k vysoké spotřebě reaktantů. Z těchto důvodů je komplikováno použití tohoto substrátu na automatických analyzátořech.

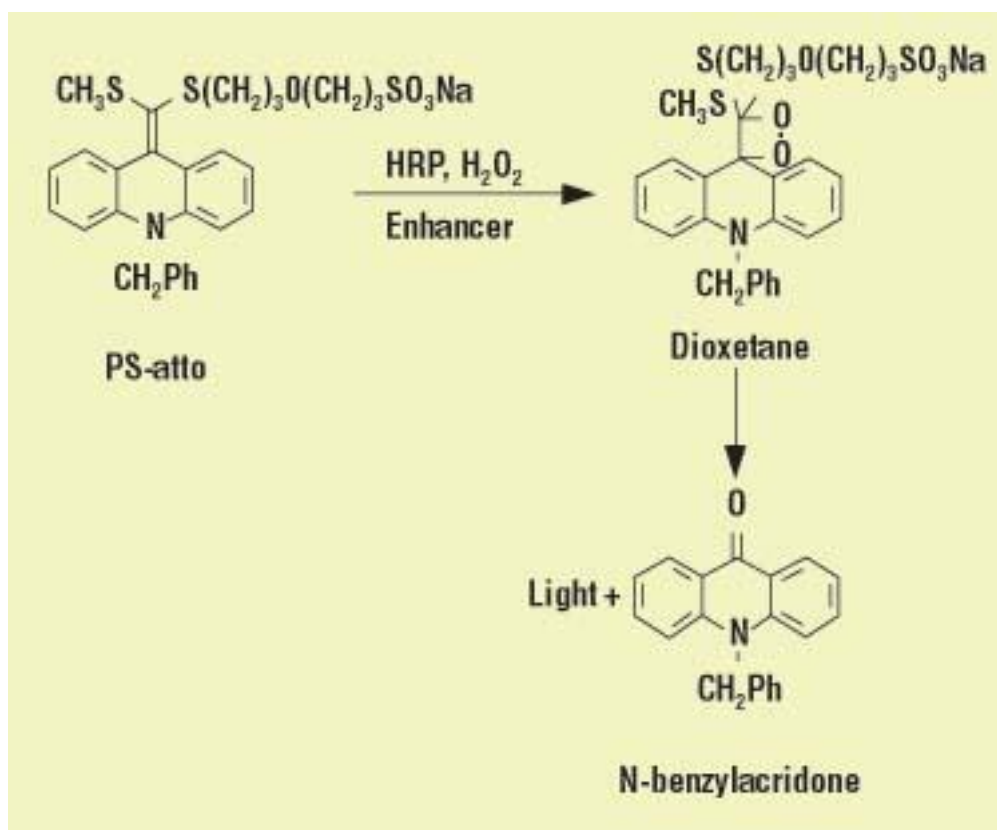


Obr. 3. Průběh reakce substrátu PS-3

Ovšem tento problém byl vyřešen objevením nových reagensů PS-atto a TMA-6. PS-atto je využíván pro detekci při stanovení v roztocích a TMA-6 se používá v blotting aplikacích.



Obr. 4. Vzorce reagensů PS-atto a TMA-6

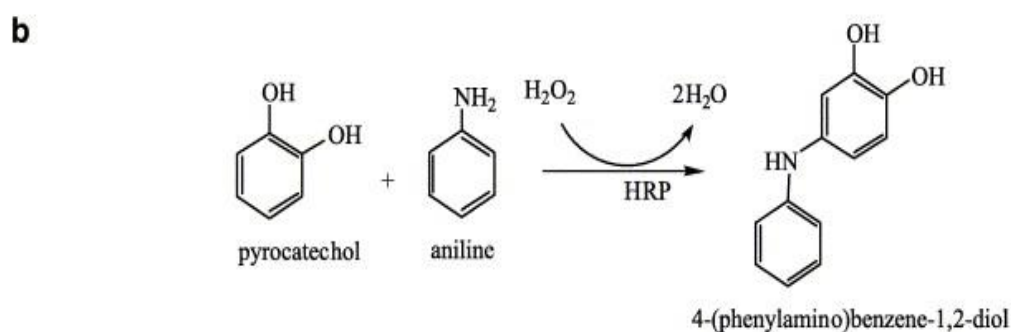
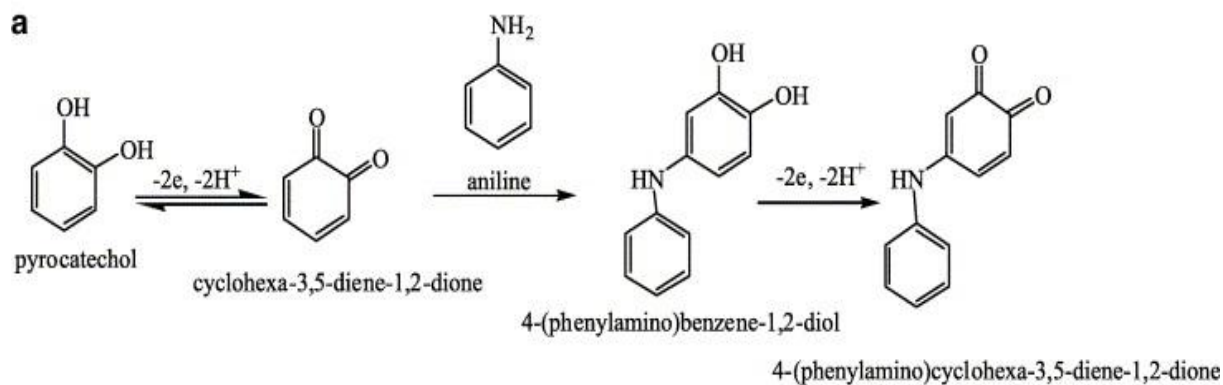


Obr. 5. Průběh reakce substrátu PS-atto

Průběh reakce je velmi rychlý. Chemiluminiscenční emise se objevuje ihned po smíchání PS-atto nebo TMA-6 s HRP a maximální intenzitu lze naměřit po několika minutách. Nejdůležitější vlastností těchto činidel je, že mohou být skladovány v jednotlivých nádobách a jsou přímo připraveny k reakcím. Pracovní roztoky lze skladovat 3 týdny při laboratorní teplotě a 4 měsíce při 4 °C. Výhodou těchto substrátů je možnost použití u automatických analyzátorů na základě jejich stability, rychlého vzniku signálu a vysoce citlivé detekci. [13]

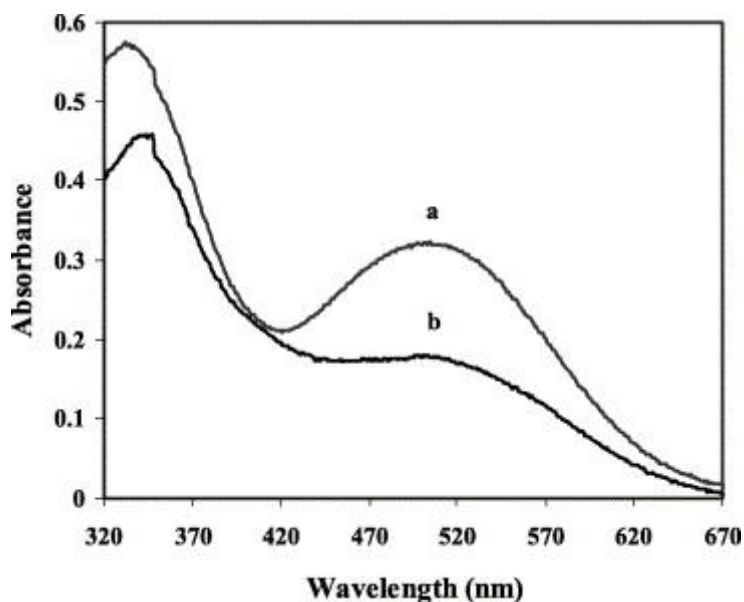
2.4.3. Stanovení aktivity křenové peroxidasy pomocí chromogenů pyrokatechol - anilin a fenol - aminoantipyrin

Principem metody je reakce HRP s chromogenem za vzniku růžového zbarvení produktu, jehož koncentraci lze stanovit spektrofotometricky, pomocí HPLC analýzy nebo elektrochemické analýzy.



Obr. 6. Průběh reakcí elektrochemické metody a enzymatického stanovení

- a) Průběh reakce mezi anilinem a pyrokatecholem v průběhu elektrochemické metody
- b) Průběh reakce mezi anilinem a pyrokatecholem v průběhu enzymatického stanovení



Obr. 7. Srovnání UV–VIS spekter enzymatického a elektrochemického produktu

- a) absorpční spektrum produktu enzymatické reakce
- b) absorpční spektrum produktu elektrochemické reakce

Metoda při použití směsi pyrokatechol–anilin vykazuje vyšší citlivost a nižší mez detekce než při použití směsi fenol–aminoantipyrin. Prozkoumány byly i jiné dvojice vodíkových donorů např. pyrokatechol–aminoantipyrin, pyrokatechol–fenol, fenol–anilin atd., ale barevné produkty těchto párů nebyly dostatečně stabilní k získání reprodukovatelných výsledků měřitelných pomocí UV–VIS spektroskopie. Dalšími pozitivy uvedené metody jsou uspokojivá reprodukovatelnost, snadná proveditelnost, rychlost, nízké finanční náklady. Nevýhodou je práce s fenolem, který vykazuje určité karcinogenní účinky. [14]

2.4.4. Stanovení aktivity myeloperoxidasy ve slinách

Substrátem je směs 3 různých látek DAB (3,3'-diaminobenzidin), guajakol a dapson (4,4'-diaminodifenylylsulfon). K určení aktivity MPO je použit “Sandwich test-disk“. Disk byl vytvořen z DEAE-celulózového papíru a celulózového chromatografického papíru. Papíry byly uloženy do hliníkového kolečka. Na disk bylo aplikováno 0,1ml vzorku slin a bylo přidáno 0,1 ml substrátu, následovala inkubace při pokojové teplotě. Denzita zabarvení byla měřena optickým analyzátozem, který obsahuje LED (light – emitting diode = světlo emitující dioda) při 460 nm a fotodetektor.

Výhodou směsi DAB + Guajakol je, že tato kombinace zvyšuje enzymatickou reakci 2-3x ve srovnání s použitím každého zvlášť. Substrát DAB není vhodné používat samotný z důvodu, že se jím dají stanovit pouze nízké hladiny peroxidase aktivity. Hladina dapsonu do 2,2mM má drobné inhibiční účinky na aktivitu MPO a 95% inhibiční účinek na aktivitu slinné peroxidasy. Proto se tedy přidává k dvěma předešlým substrátům – z důvodu, aby byla potlačena aktivita slinné peroxidasy a mohla být změřena aktivita MPO. Tato metoda je citlivá, jednoduchá a finančně nenáročná. Měření MPO metodou ELISA (jako screeningovým vyšetřením) je nevhodné z důvodu, že ve skutečnosti během ELISA stanovení (kdy je měřena celková - aktivní a inaktivní) MPO může interferovat s HRP, která je konjugována se sekundární protilátkou. Dále může interferovat s aktivitou MPO, která byla zachycena protilátkami. Další nevýhodou je, že peroxidasy jsou silně adsorbovány z vodných roztoků na sklo, sklovinu a buněčné povrchy.

Peroxidasa vyskytující se v dutině ústní představuje komplex složený ze slinné peroxidasy (syntetizována a sekretována slinnými žlázami) a z myeloperoxidasy (ta se

sem dostává z leukocytů migrujících do dutiny ústní). MPO je primárně skladována v neutrofilech a její funkcí je nejen zabíjení nežádoucích mikroorganismů, ale také iniciace a propagace akutních a chronických zánětlivých reakcí. Tato metoda poukazuje na využití MPO jako biomarkeru paradontózy. [15]



Obr. 8. Zastoupení aktivity MPO ve slinách u osob s a bez paradontózy

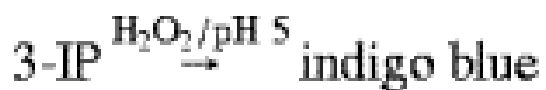
- 1) MPO (40ng proteinu) z lidských leukocytů
- 2) 100 μ l slin od pacienta s onemocněním
- 3) 100 μ l slin od zdravé osoby
- 4) Blank - 100 μ l destilované vody

2.4.5. Voltametrické stanovení aktivity HRP s použitím

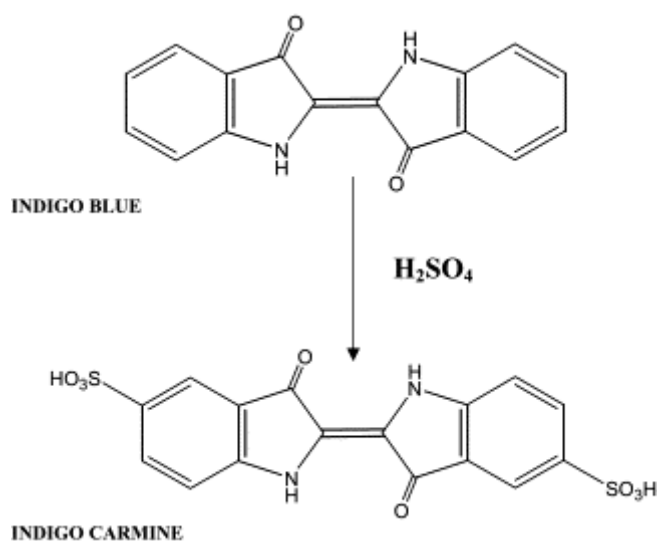
3–indoxylfosfátového substrátu

Principem metody je použití 3-indoxylfosfátu jako elektrochemického substrátu pro měření aktivity HRP v roztoku. Na enzymatickou změnu substrátu upozorní indigo blue (nerozpustné ve vodném roztoku). Tento enzymatický produkt je přidáním dýmavé kyseliny sírové (do reakční směsi) rozpuštěn za vzniku elektroaktivního detekovatelného produktu indigo carmine (= disodium 5,5' – indigotindisulfonát). K detekci je použita

cyklická voltametrie s použitím SPCEs (screen-printed carbon electrodes = uhlíkové tištěné elektrody).



Obr. 9. Popis redoxní reakce katalyzované HRP



Obr. 10. Reakce vzniku Indigo carmine

Výhodou této metody je rychlost, správnost, přesnost a jednorázové použití SPCEs řeší problémy spojené s kontaminací mezi vzorkem a usazeninami na detekčním povrchu. Výhodou je nízký detekční limit a vysoká sensitivita. Indigo carmine je ve vodě rozpustná sloučenina, která se hojně využívá v potravním, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu). [16]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

- 50mM pufr Tris/HCl s 0,1% Tritonem X-100 (pH = 8,00)
- 10mM OPD (Sigma P1526)
- 1mM H₂O₂
- 4M H₂SO₄
- cytosol (připravený z homogenátu potkaních jater diferenční centrifugací)
- 50mM pufr Tris/HCl/Igepal (pH = 7,14)
- 0,2M H₂O₂
- 0,035M Guajakol
- 0,1M fosfátový pufr (pH = 7,4)
- redestilovaná voda
- led

3.2. Pomůcky a přístrojové vybavení

- kádinky
- mikrozkuhavky
- poloautomatické pipety
- špičky
- 96-jamkové mikrotitrační destičky
- jehličky na propichování bublinek
- lžička
- nádoba na led
- analytické váhy Scaltex
- pH metr Variomag
- třepačka
- Thermomixer comfort (Eppendorf 1 MTP)
- čtečka Bio-Rad model 550 Microplate reader
- digestoř

3.3. Příprava pracovních roztoků

1. Pufr – Tris/HCl 50mM s 0,1% Tritonem X-100, pH = 8,00, byl připraven následujícím způsobem:

a) Výpočet navážky Tris; M_r (Tris) = 121,1 g/mol; $c = 50\text{mM}$

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,05 \cdot 0,5 \cdot 121,1$$

$$\underline{m = 3,0275 \text{ g}}$$

Toto množství bylo rozpuštěno v malém množství redestilované vody.

b) Příprava 1M HCl [100 ml]; 35% HCl; M_r (HCl) = 36,47 g/mol; $\rho = 1,18 \text{ g/cm}^3$;

$$c = 1\text{M}; V = 100 \text{ ml}$$

$$m = c \cdot V \cdot M \qquad 3,647\text{g} \dots\dots 100\% \qquad V = m/\rho$$

$$m = 1 \cdot 0,1 \cdot 36,47 \qquad x \text{ g} \dots\dots\dots 35\% \qquad V = 10,42 / 1,18$$

$$m = 3,647\text{g} \qquad x = 10,42 \text{ g} \qquad \underline{V = 8,83 \text{ ml}}$$

8,83 ml 35% HCl bylo doplněno do 100 ml redestilovanou vodou.

c) Příprava směsi Tris/HCl o pH = 8,00 [500 ml]

Do kádinky byl nalit obsah viz krok a). Následovalo postupné přidávání 1M HCl až do úpravy pH na 8,00 (průběžné měření pH na pH metru). Odměrná baňka byla doplněna na 500 ml redestilovanou vodou. Obsah baňky byl promíchán.

d) Příprava pufru [100 ml]

Bylo smícháno - 99,9 ml směsi Tris/HCl/redestilované vody

- 0,1 ml 100% Tritonu X - 100

2. Příprava substrátu OPD

a) příprava 1mM H₂O₂ z 29% H₂O₂ ($M_r = 34 \text{ g / mol}$)

$$29\% \dots\dots\dots 29\text{g} \dots\dots\dots 100\text{ml}$$

$$1\text{mM} \dots\dots\dots 34\text{mg} \dots\dots\dots 1000\text{ml}$$

$$1\text{mM} \dots\dots\dots 3,4\text{mg} \dots\dots\dots 100\text{ml}$$

$$1\text{mM} \dots\dots\dots 0,0034\text{g} \dots\dots\dots 100\text{ml}$$

29g.....100ml	H ₂ O ₂	Tris (= H ₂ O)
0,0034g.....100ml	29	0
		0,0034
	0,0034	28,9966

0,0034 : 28,9966 ⇒ 0,00034 ml H₂O₂ : 2,89966 ml Tris

Bylo smícháno 0,34μl H₂O₂ a 2899,66μl pufru (Tris/HCl/Triton X - 100).

b) Výpočet navážky OPD

$M_r (OPD) = 181 \text{ g/mol} ; c = 10 \text{ mM}; V = 2 \text{ ml}$

$m = c \cdot V \cdot M$

$m = 0,01 \cdot 0,002 \cdot 181$

$m = 0,00362 \text{ g}$

Skutečná navážka OPD byla 0,00378g

c) Příprava substrátu – byla smíchána navážka OPD se 2 ml 1mM H₂O₂ .

3. Příprava 4M H₂SO₄ [250 ml]; 97% H₂SO₄; M (H₂SO₄) = 98,08 g/mol;

$\rho = 1,8364 \text{ g/cm}^3 ; c = 4\text{M}; V = 250 \text{ ml}$

$m = c \cdot V \cdot M$	98,08g100%	$V = m/\rho$
$m = 4 \cdot 0,25 \cdot 98,08$	x g 97%	$V = 101,11 / 1,8364$
$m = 98,08 \text{ g}$	$x = 101,11 \text{ g}$	<u>$V = 55,06 \text{ ml}$</u>

55,06 ml 97% H₂SO₄ bylo doplněno do 250 ml redestilovanou vodou

4. Příprava fosfátového pufru 0,1M ; pH = 7,4 (použití na ředění vzorku)

a) Příprava 0,1M Na₂HPO₄ · 12H₂O - Navážka 35,8g byla smíchána s 1000ml redestilované vody

b) Příprava 0,1M NaH₂PO₄ · 2H₂O - Navážka 3,9g byla smíchána s 250 ml redestilované vody

c) Oba roztoky byly slity dohromady za stálého míchání (elektrická míchačka)
a kontrolování hodnoty pH.

5. Pufir – Tris/HCl/Igepal 50mM , pH = 7,14 byl připraven následujícím způsobem :

a) Výpočet navážky Tris; M_r (Tris) = 121,1 g/mol; $c = 50\text{mM}$

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,05 \cdot 0,5 \cdot 121,1$$

$$m = 3,0275 \text{ g}$$

Toto množství bylo rozpuštěno v malém množství redestilované vody.

b) Příprava 1M HCl [100 ml]; 35% HCl; M_r (HCl) = 36,47 g/mol; $\rho = 1,18 \text{ g/cm}^3$;

$$c = 1\text{M}; V = 100 \text{ ml}$$

$$m = c \cdot V \cdot M \qquad 3,647\text{g} \dots\dots 100\% \qquad V = m/\rho$$

$$m = 1 \cdot 0,1 \cdot 36,47 \qquad x \text{ g} \dots\dots\dots 35\% \qquad V = 10,42 / 1,18$$

$$m = 3,647\text{g} \qquad x = 10,42\text{g} \qquad \underline{V = 8,83 \text{ ml}}$$

8,83 ml 35% HCl bylo doplněno do 100 ml redestilovanou vodou

c) Příprava směsi Tris/HCl o pH = 7,14 [500 ml]

Do kádinky byl nalit obsah viz krok a). Následovalo postupné přidávání 1M HCl až do úpravy pH na 7,14 (průběžné měření pH na pH metru). Odměrná baňka byla doplněna na 500 ml redestilovanou vodou. Celý obsah baňky byl promíchán.

d) Příprava pufiru [100 ml]

Bylo smícháno - 99,9 ml směsi Tris/HCl/redestilované vody

- 0,1 ml Igepalu

6. Příprava substrátu Guajakolu

a) Příprava 0,2M H₂O₂ ; 29% H₂O₂; M_r (H₂O₂) = 34 g/mol; $c = 0,2 \text{ mol / l}$

$$29\% \dots\dots 29\text{g} \dots\dots 100\text{ml} \qquad 29\text{g} \dots\dots 100 \text{ ml}$$

$$0,2\text{M} \dots\dots 6,8\text{g} \dots\dots 1000\text{ml} \qquad 0,68\text{g} \dots\dots 100 \text{ ml}$$

$$0,2\text{M} \dots\dots 0,68\text{g} \dots\dots 100 \text{ ml}$$

H ₂ O ₂	Tris
29	0
	0,68
0,68	28,32

0,68 : 28,32 \Rightarrow 0,068ml H₂O₂ : 2,832 ml Tris

Bylo smícháno 68 μ l H₂O₂ a 2 832 μ l Tris

b) Výpočet navážky Guajakolu; c = 0,035 mol/l; M_r = 124,1 g/mol; V = 2 ml

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,035 \cdot 0,002 \cdot 124,1$$

$$m = \underline{0,008687 \text{ g}}$$

Pozn : Byla zvážena prázdná mikrozkuhavka a postupně do ní bylo pipetováno různé množství Guajakolu, které bylo opětovně váženo. Tak bylo dosaženo poznatku, že vypočítané množství odpovídá přibližně 7,5 μ l.

c) Příprava substrátu

Bylo smícháno - 7,5 μ l Guajakolu

- 1992,5 μ l 0,2 M H₂O₂

7. **Vzorek** byl předředěn fosfátovým pufrem v poměru 1 : 6

3.4. Popis pracovních postupů

3.4.1. Stanovení aktivity peroxidasy pomocí OPD

(O – fenylendiaminu dihydrochloridu)

3.4.1.1. Návod

Byl připraven **puf**r Tris/HCl 50mM s 0,1% Tritonem X-100, pH = 8,00. Dále byl připraven **substrát** smícháním složek OPD (Sigma P1526) 10mM; H₂O₂ 1mM, který byl rozpuštěn v pufru (substrát je nutno připravit vždy čerstvý těsně před použitím). Reakce probíhala v 96 - jamkové destičce. Do 1 jamky bylo napipetováno 0,05 ml biologického

vzorku a 0,05 ml substrátu. Jako blank bylo použito 0,05 ml pufru Tris. Destička byla inkubována 30 min při 37 °C a poté bylo do jamiček přidáno 0,025 ml stop činidla - 4M H₂SO₄. Na čtečce byla změřena absorbance při 490 nm.

Optimalizace metody :

- 1) Ředění cytosolu
- 2) Ředění substrátu
- 3) Ředění peroxidu

3.4.1.2. Ředění cytosolu

Pracovní roztoky byly připraveny viz předchozí popis. Cytosol byl ředěn fosfátovým pufrem, pH = 7,4 podle **Tab. 1.**

Tab. 1. Ředění cytosolu fosfátovým pufrem, pH = 7,4

Označení keříku	Cytosol [μl]	Pufr [μl]
Vz1	300	0
Vz2	240	60
Vz3	180	120
Vz4	120	180
Vz5	60	240
Vz6	30	270
Vz7	15	285

Reagující složky byly napipetovány do mikrotitrační destičky podle **Tab. 2.**

Tab. 2. Schéma pipetování reagujících složek do mikrotitrační destičky

Sloupek č.		
2	BL - 125 μl pufru Tris	
	Cytosol [μl]	Substrát [μl]
3	50 Vz1	50
4	50 Vz2	50
5	50 Vz3	50
6	50 Vz4	50
7	50 Vz5	50
8	50 Vz6	50
9	50 Vz7	50
10	BL - 50 H ₂ O	50

Obsah destičky byl inkubován 30 minut při 37 °C. Po uběhnutí inkubační doby bylo do všech jamiček přidáno stop činidlo - 25 μl H_2SO_4 a na čtečce byla změřena absorbance při 490 nm. Získané hodnoty byly přepočítány na enzymovou aktivitu a výsledné hodnoty byly spolu s jednotlivým množstvím cytosolu zaneseny do grafu.

Výpočet enzymové aktivity

A (byly použity průměrné hodnoty po odečtení blanku); $\epsilon_{\text{OPD}} = 1,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

$l = 1 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}$; $t = 30 \text{ minut (doba inkubace)} = 1800 \text{ s}$

Např. : **Vz 7**

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$n = c \cdot V$$

$$0,761 = 1,1 \cdot c \cdot 1$$

$$n = 0,692 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$$

$$c = 0,692 \text{ mmol/l}$$

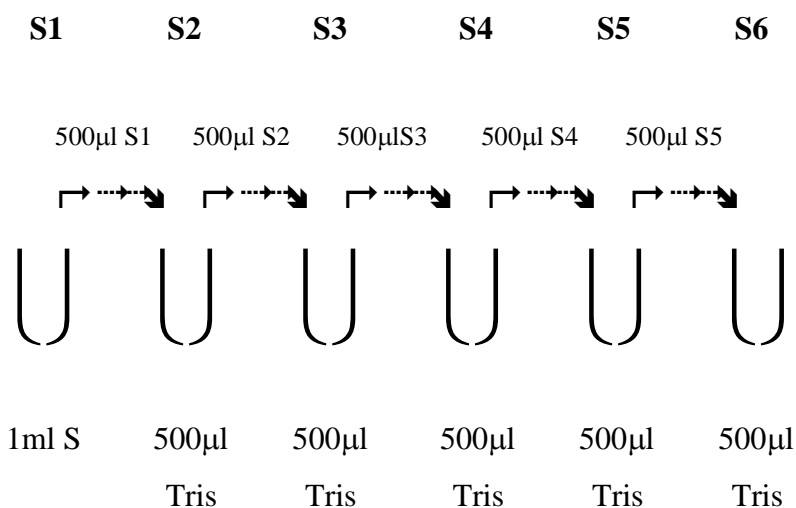
$$n = 3,4 \cdot 10^{-5} \text{ mmol} = \underline{3,4 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}$$

$$\text{mol/s} = 3,4 \cdot 10^{-8} / 1800 = 1,89 \cdot 10^{-11} \text{ kat} = \underline{\underline{18,9 \text{ pkat}}}$$

3.4.1.3. Ředění substrátu

Pracovní roztoky byly připraveny viz předchozí popis. Substrát byl ředěn pufrem Tris/HCl/Triton X-100, pH = 8,00 podle **Obr. 11**.

Obr. 11. Ředění substrátu pufrem Tris/HCl/Triton X – 100, pH = 8,00



Naředěný substrát byl z mikrozkuvek dále pipetován do mikrotitrační destičky podle **Tab. 3**.

Tab. 3. Schéma pipetování reagujících složek do mikrotitrační destičky

Sloupek č.		
2	BL - 125 μ l Pufro Tris	
	Cytosol [μ l]	Substrát [μ l]
3	50	50 S ₁
4	50	50 S ₂
5	50	50 S ₃
6	50	50 S ₄
7	50	50 S ₅
8	50	50 S ₆
9	50	BL – 50 μ l H ₂ O

Obsah destičky byl inkubován 30 minut při 37 °C. Po uběhnutí inkubační doby bylo do všech jamiček přidáno stop činidlo - 25 μ l H₂SO₄ a na čtečce byla změřena absorbance při 490 nm. Získané hodnoty byly přepočítány na enzymovou aktivitu. Dále byly vypočítány koncentrace jednotlivých substrátů a výsledné hodnoty byly spolu s enzymovou aktivitou zaneseny do grafu.

Výpočet enzymové aktivity:

A (byly použity průměrné hodnoty bez odečtení blanku); $\epsilon_{\text{OPD}} = 1,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

$l = 1 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}$; $t = 30 \text{ minut (doba inkubace)} = 1800 \text{ s}$

Např.: **S6**

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$n = c \cdot V$$

$$0,128 = 1,1 \cdot c \cdot 1$$

$$n = 0,116 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$$

$$\underline{c = 0,116 \text{ mmol/l}}$$

$$n = 5,8 \cdot 10^{-6} \text{ mmol} = \underline{5,8 \cdot 10^{-9} \text{ mol}}$$

$$\text{mol/s} = 5,8 \cdot 10^{-9} / 1800 = 3,2 \cdot 10^{-12} \text{ kat} = \underline{\underline{3,2 \text{ pkat}}}$$

Výpočet koncentrace substrátu:

$c_{\text{OPD}} = 10 \text{ mM} = 0,01 \text{ M}$; $m_{\text{OPD}} = 0,00385 \text{ g}$; $M_r (\text{ OPD }) = 181 \text{ g/mol}$; $V_{\text{OPD}} = x (\text{ l })$

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$V = m / c \cdot V$$

$$V = 0,00385 / 0,01 \cdot 181 = \underline{0,00213 \text{ l}}$$

$$c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \text{ mM} = 0,001 \text{ M}; V_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2 \text{ ml} = 0,002 \text{ l}$$

$$c_{\text{OPD}} \cdot V_{\text{OPD}} + c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}_2} = c (V_{\text{OPD}} + V_{\text{H}_2\text{O}_2})$$

$$0,01 \cdot 0,00213 + 0,001 \cdot 0,002 = c (0,00213 + 0,002)$$

$$c_{\text{S}} = 0,005642 \text{ mol/l} = \mathbf{5,642 \text{ mM}} \text{ (S1)}$$

Např : **S2**

$$c_{\text{S}} \cdot V_{\text{S}} = c_{\text{S2}} (V_{\text{S}} + V_{\text{Tris}})$$

$$5,642 \cdot 0,005 = 0,01 c_{\text{S2}}$$

$$c_{\text{S2}} = \mathbf{2,821 \text{ mM}}$$

3.4.1.4. Ředění peroxidu

Pracovní roztoky byly připraveny viz výše uvedený popis. Peroxid byl v mikrozkuvkách ředěn pufrům Tris/HCl/Triton X-100, pH = 8,00 podle **Tab. 4**.

Tab. 4. Ředění peroxidu pufrům Tris/HCl/Triton X – 100, pH = 8,00

Označení kepíku	H ₂ O ₂ [μl]	Tris [μl]
P1	170	0
P2	160	10
P3	150	20
P4	140	30
P5	130	40
P6	120	50

Následně byla do každé mikrozkuvky přidána směs OPD + pufr a promíchána na třepačce. Tato směs byla dále rozpipetována do mikrotitrační destičky podle **Tab. 5**.

Tab. 5. Schéma pipetování reagensů do mikrotitrační destičky

Sloupek č.		
2	BL - 125 μl pufru Tris	
	Cytosol [μl]	Substrát [μl]
3	50	50 P1
4	50	50 P2
5	50	50 P3
6	50	50 P4
7	50	50 P5
8	50	50 P6
9	50	BL – 50 μl H ₂ O

Obsah destičky byl inkubován 30 minut při 37 °C. Po uběhnutí inkubační doby bylo do všech jamiček přidáno stop činidlo - 25 μl H_2SO_4 a na čtečce byla změřena absorbance při 490 nm. Získané hodnoty byly přepočítány na enzymovou aktivitu. Dále byly vypočítány koncentrace jednotlivých peroxidů a výsledné hodnoty byly spolu s enzymovou aktivitou zaneseny do grafu.

Výpočet enzymové aktivity :

A (byly použity průměrné hodnoty po odečtení blanku); $\epsilon_{\text{OPD}} = 1,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

$l = 1 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}$; $t = 30 \text{ minut (doba inkubace)} = 1800 \text{ s}$

Např. : P6

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$n = c \cdot V$$

$$0,154 = 1,1 \cdot c \cdot 1$$

$$n = 0,14 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$$

$$\underline{c = 0,14 \text{ mmol/l}}$$

$$n = 7,0 \cdot 10^{-6} \text{ mmol} = \underline{7,0 \cdot 10^{-9} \text{ mol}}$$

$$\text{mol/s} = 7,0 \cdot 10^{-9} / 1800 = 3,9 \cdot 10^{-12} \text{ kat} = \underline{\underline{3,9 \text{ pkat}}}$$

Výpočet koncentrace peroxidu :

Např. : P6

$$c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \text{ mM} \quad c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}_2} = c_{\text{P}_6} (V_{\text{H}_2\text{O}_2} + V_{\text{Tris}})$$

$$1 \cdot 0,00012 = 0,00017 c_{\text{P}_6}$$

$$c_{\text{P}_6} = \underline{\underline{0,706 \text{ mM}}}$$

3.4.2. Stanovení aktivity peroxidasy pomocí Guajakolu

(1 – hydroxy – 2 – methoxybenzen)

3.4.2.1. Návod

Byl připraven **puf**r Tris/HCl 50 mM s Igepalem, pH = 7,14. Dále byl připraven **substrát** smícháním složek Guajakolu 0,035 M ($M_r = 124,1$ g/mol) a H_2O_2 0,2 M (který byl ředěn připraveným pufrem). Reakce probíhala v 96 - jamkové destičce. Do 1 jamky bylo napipetováno 0,05 ml biologického vzorku a 0,05 ml substrátu. Jako blank bylo použito 0,05 ml pufru Tris. Destička byla inkubována 30 min při 37 °C a poté bylo do jamiček přidáno 0,025 ml stop činidla - 4M H_2SO_4 . Na čtečce byla změřena absorbance při 595 nm.

Optimalizace metody :

- 1) Ředění cytosolu
- 2) Ředění substrátu
- 3) Ředění peroxidu

3.4.2.2. Ředění cytosolu

Pracovní roztoky byly připraveny viz předchozí popis. Cytosol byl ředěn fosfátovým pufrem, pH = 7,4 podle **Tab. 6**.

Tab. 6. Ředění cytosolu fosfátovým pufrem, pH = 7,4

Označení kepíku	Cytosol [μ l]	Pufr [μ l]
Vz 1	300	0
Vz 2	150	150
Vz 3	100	200
Vz 4	75	225
Vz 5	60	240
Vz 6	50	250
Vz 7	45	270
Vz 8	35	245

Jednotlivé vzorky byly rozpipetovány do mikrotitrační destičky podle **Tab. 7**.

Tab. 7. Schéma pipetování reagentů do mikrotitrační destičky

Sloupek č.		
2	BL – 125 μ l pufru Tris	
	Cytosol [μ l]	Substrát [μ l]
3	50 Vz 1	50
4	50 Vz 2	50
5	50 Vz 3	50
6	50 Vz 4	50
7	50 Vz 5	50
8	50 Vz 6	50
9	50 Vz 7	50
10	50 Vz 8	50
11	BL - 50 μ l H ₂ O	50

Obsah destičky byl inkubován 30 minut při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do všech jameček přidáno stop činidlo - 25 μ l H₂SO₄ a na čtečce byla změřena absorbance při 595 nm. Získané hodnoty byly přepočítány na enzymovou aktivitu a výsledné hodnoty byly spolu s jednotlivým množstvím cytosolu zaneseny do grafu.

Výpočet enzymové aktivity :

A (byly použity průměrné hodnoty po odečtení blanku); $\epsilon_{\text{GUAJ}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

$l = 1 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}$; $t = 30 \text{ minut (doba inkubace)} = 1800 \text{ s}$

Např. : **Vz8**

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$n = c \cdot V$$

$$0,166 = 26,6 \cdot c \cdot 1$$

$$n = 0,00624 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$$

$$\underline{c = 0,00624 \text{ mmol/l}}$$

$$n = 3,1 \cdot 10^{-7} \text{ mmol} = \underline{3,1 \cdot 10^{-10} \text{ mol}}$$

$$\text{mol/s} = 3,1 \cdot 10^{-10} / 1800 = 1,7 \cdot 10^{-13} \text{ kat} = \underline{\underline{0,17 \text{ pkat}}}$$

3.4.2.3. Ředění substrátu

Pracovní roztoky byly připraveny viz předchozí popis. Substrát byl ředěn pufrem Tris/HCl/Igepal, pH = 7,14 podle **Tab. 8**.

Tab. 8. Ředění substrátu pufrem Tris/HCl/ Igepal, pH = 7,14

Označení keřpiku	Substrát [μl]	Puřr [μl]
S1	160	0
S2	140	20
S3	120	40
S4	100	60
S5	80	80

Naředěný substrát byl rozřpipetován do mikrotitrační destičky podle **Tab. 9**.

Tab. 9. Šchéma pipetování reagentů do mikrotitrační destičky

Sloupek ř.		
2	BL - 125 μl puřru Tris	
	Cytosol [μl]	Substrát [μl]
3	50	50 S1
4	50	50 S2
5	50	50 S3
6	50	50 S4
7	50	50 S5
8	50	BL - 50 μl H ₂ O

Obsah destičky byl inkubován 30 minut ři 37 °C. Po uběhnutí inkubační doby bylo do všech jamiček řřidáno stop řinidlo - 25 μl H₂SO₄ a na řteřce byla změřena absorbance ři 595 nm. Získané hodnoty byly řřepočítány na enzymovou aktivitu. Dále byly vypočítány koncentrace jednotlivých substrátů a výsledné hodnoty byly spolu s enzymovou aktivitou zaneseny do grafu.

Výpočet enzymové aktivity :

A (byly používány průměrné hodnoty po odečtení blanku); $\epsilon_{\text{GUAJ}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $l = 1 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}$; $t = 30 \text{ minut (doba inkubace)} = 1800 \text{ s}$

Např. : S5

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$n = c \cdot V$$

$$0,072 = 26,6 \cdot c \cdot 1$$

$$n = 0,00271 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$$

$$c = 0,00271 \text{ mmol/l}$$

$$n = 1,35 \cdot 10^{-7} \text{ mmol} = \underline{1,35 \cdot 10^{-10} \text{ mol}}$$

$$\text{mol/s} = 1,35 \cdot 10^{-10} / 1800 = 7,52 \cdot 10^{-14} \text{ kat} = \underline{\mathbf{0,075 \text{ pkat}}}$$

Výpočet koncentrací substrátu :

$c_{\text{GUAJ}} = 0,035 \text{ M}$; $V_{\text{GUAJ}} = 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ l}$; $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,2 \text{ M}$; $c_{\text{S}} = x \text{ (mol/l)}$

$$c_{\text{GUAJ}} \cdot V_{\text{GUAJ}} + c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}_2} = c \cdot (V_{\text{GUAJ}} + V_{\text{H}_2\text{O}_2})$$

$$c_{\text{S}} = 0,199 \text{ mol/l (S1)}$$

Např. : S2

$$c_{\text{S}} \cdot V_{\text{S}} = c_{\text{S2}} \cdot (V_{\text{S}} + V_{\text{Tris}})$$

$$0,199 \cdot 0,00014 = 0,00016 c_{\text{S2}}$$

$$c_{\text{S2}} = \underline{\mathbf{0,174 \text{ mol/l}}}$$

3.4.2.4. Ředění peroxidu

Pracovní roztoky byly připraveny viz výše uvedený popis. Peroxid byl v mikrozkuvkách ředěn pufrům Tris/HCl/Igepal pH = 7,14 podle **Tab. 10**.

Tab. 10. Ředění peroxidu pufrům Tris/HCl/Igepal, pH = 7,14

Označení kepíku	H ₂ O ₂ [μl]	Pufr [μl]
P1	34	0
P2	30	4
P3	26	8
P4	22	12
P5	18	16

Následně byla do každé mikrozkuvky přidána směs OPD + pufr a promíchána na

třepače. Tato směs byla dále rozpipetována do mikrotitrační destičky podle **Tab. 11**.

Tab. 11. Schéma pipetování reagensů do mikrotitrační destičky

Sloupek č.		
2	BL - 125 μ l pufru Tris	
	Cytosol [μ l]	Substrát [μ l]
3	50	50 P1
4	50	50 P2
5	50	50 P3
6	50	50 P4
7	50	50 P5
8	50	BL - 50 μ l H ₂ O

Obsah destičky byl inkubován 30 minut při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do všech jameček přidáno stop činidlo - 25 μ l H₂SO₄ a na čtečce byla změřena absorbance při 595 nm. Získané hodnoty byly přepočítány na enzymovou aktivitu. Dále byly vypočítány koncentrace jednotlivých peroxidů a výsledné hodnoty byly spolu s enzymovou aktivitou zaneseny do grafu.

Výpočet enzymové aktivity :

A (byly použity průměrné hodnoty po odečtení blanku); $\epsilon_{\text{GUAJ}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

$l = 1 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}$; $t = 30 \text{ minut (doba inkubace)} = 1800 \text{ s}$

Např.: **P5**

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$n = c \cdot V$$

$$0,024 = 26,6 \cdot c \cdot 1$$

$$n = 0,000902 \cdot 5 \cdot 10^{-5}$$

$$c = 0,000902 \text{ mmol/l}$$

$$n = 4,5 \cdot 10^{-8} \text{ mmol} = 4,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol}$$

$$\text{mol/s} = 4,5 \cdot 10^{-11} / 1800 = 2,5 \cdot 10^{-14} \text{ kat} = \mathbf{0,025 \text{ pkat}}$$

Výpočet koncentrací peroxidu :

$$c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,2 \text{ M}$$

Např.: **P5**

$$c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}_2} = c_{\text{P5}} (V_{\text{H}_2\text{O}_2} + V_{\text{TRIS}})$$

$$0,2 \cdot 0,000018 = 0,000034 c_{\text{P5}}$$

$$c_{\text{P5}} = \mathbf{0,106 \text{ mol/l}}$$

4. VÝSLEDKY

4.1. Použití substrátu OPD

4.1.1. Optimalizace ředění cytosolu

Byla změřena absorbance různě naředěných vzorečků cytosolu fosfátovým pufrům, pH = 7,4. Ředění bylo provedeno podle **Tab. 1.** a následovalo pipetování složek reakční směsi do mikrotitrační destičky podle **Tab. 2.** Měření probíhalo na čtečce při 490 nm. Naměřené hodnoty absorbancí viz. **Tab. 12.**

Tab. 12. Optimalizace ředění cytosolu - výsledky naměřených hodnot absorbancí

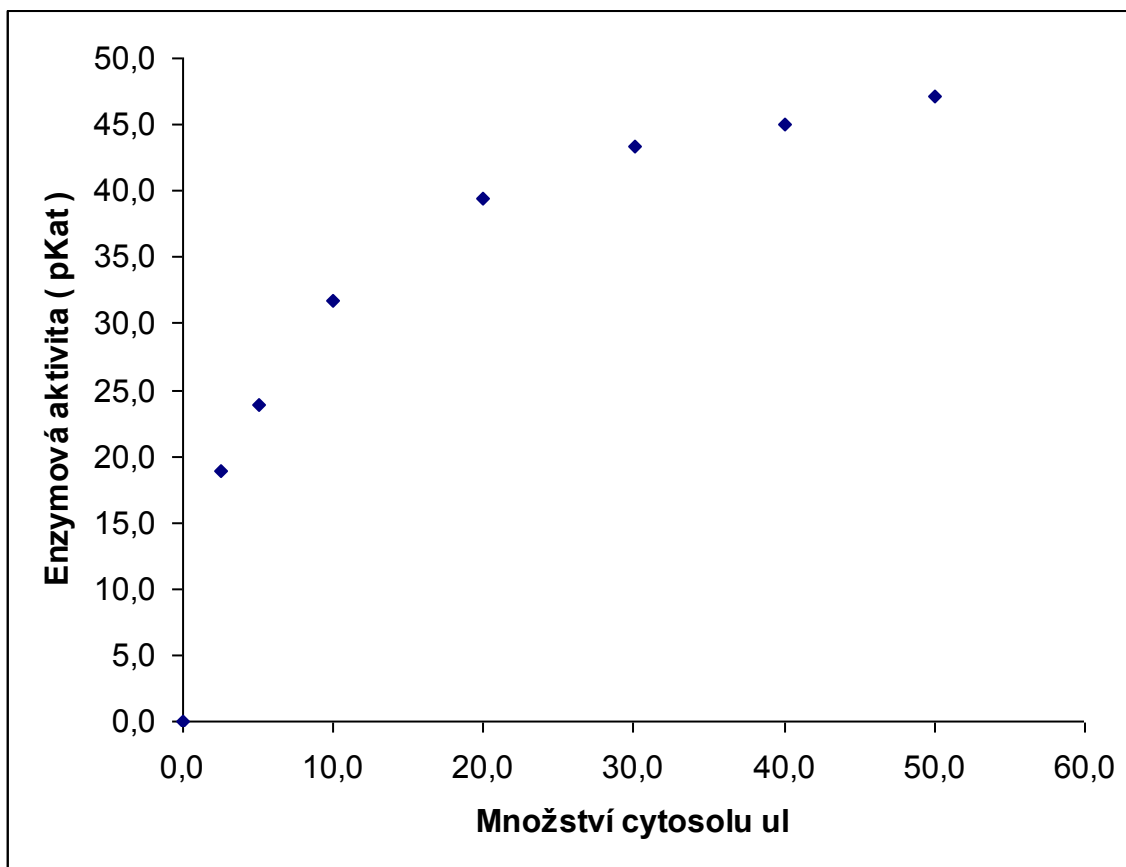
Sloupek č.	3	4	5	6	7	8	9	10
	2,104	2,034	1,926	1,837	1,456	1,221	1,159	0,263
	2,110	2,069	2,031	1,845	1,558	1,125	1,041	0,312
	2,196	2,119	2,081	1,828	1,548	1,232	1,026	0,260
	2,229	2,048	1,912	1,795	1,566	1,333	0,906	0,253
Průměrné hodnoty	2,160	2,068	1,988	1,826	1,532	1,228	1,033	0,272

Naměřené hodnoty absorbancí byly zprůměrovány a po odečtení blanku (redestilovaná voda + substrát) z nich byla vypočítána enzymová aktivita. Výsledky viz. **Tab. 13.**

Tab. 13. Optimalizace ředění cytosolu – průměrné hodnoty absorbancí po odečtení blanku, vypočtené hodnoty enzymové aktivity

	Hodnoty absorbancí po odečtení blanku	Enzymová aktivita [pkat]	Množství cytosolu [μl]
BL	0	0,0	0,0
Vz7	0,761	18,9	2,5
Vz6	0,956	23,9	5,0
Vz5	1,260	31,7	10,0
Vz4	1,554	39,4	20,0
Vz3	1,716	43,3	30,0
Vz2	1,796	45,0	40,0
Vz1	1,888	47,2	50,0

Z vypočtených hodnot enzymové aktivity a z množství cytosolu, které bylo obsaženo v jednotlivých vzorečkách byl sestaven graf viz. **Obr.12.**



Obr. 12. Znázornění závislosti vzrůstající enzymové aktivity peroxidasy (pKat) na množství cytosolu (μ l) v měřené směsi

4.1.2. Optimalizace ředění substrátu

Byla změřena absorbance různě naředěných vzorečků substrátu pufrům Tris/HCl/Triton X-100, pH = 8,00. Ředění bylo provedeno podle **Obr. 11.** a následovalo pipetování složek reakční směsi do mikrotitrační destičky podle **Tab. 3.** Měření probíhalo na čtečce při 490 nm. Naměřené hodnoty absorbancí viz. **Tab. 14.**

Tab. 14. Optimalizace ředění substrátu – výsledky naměřených hodnot absorbancí

Sloupek č.	3	4	5	6	7	8	9
	0,519	0,356	0,220	0,160	0,143	0,130	0,169
	0,920	0,342	0,229	0,185	0,143	0,112	0,181
	0,571	0,336	0,212	0,170	0,147	0,143	0,175
	0,844	0,345	0,209	0,175	0,149	0,128	0,173
Průměrné hodnoty	0,714	0,345	0,218	0,173	0,146	0,128	0,178

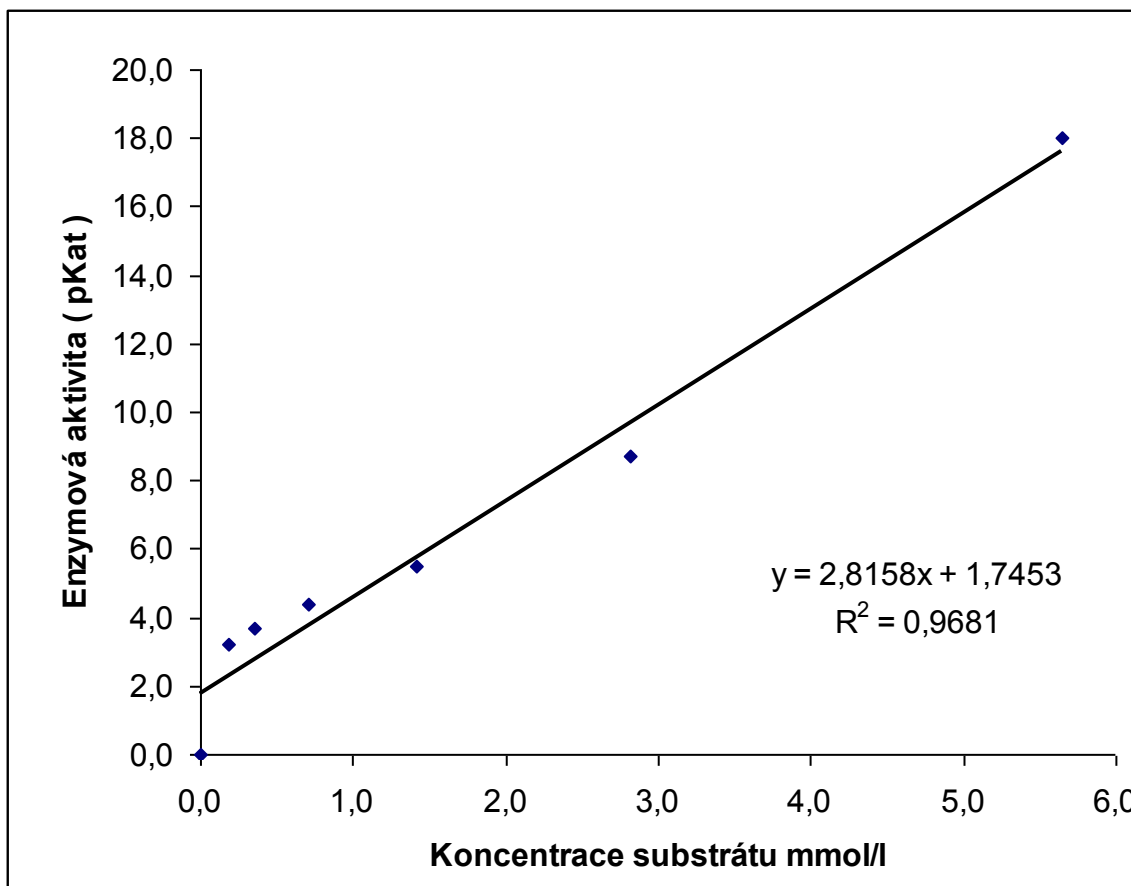
Naměřené hodnoty absorbancí byly zprůměrovány, ale z důvodu, že byla hodnota blanku (redistilovaná voda + cytosol) vyšší než některé hodnoty u měřených vzorků,

nebyl blank od vzorků odečítán. Ze získaných hodnot absorbancí byla vypočítána enzymová aktivita a dále byly vypočítány jednotlivé koncentrace různě řaděných vzorečků substrátů. Výsledky viz. **Tab. 15**.

Tab. 15. Optimalizace ředění substrátu – průměrné hodnoty absorbancí, výsledky výpočtů enzymové aktivity a koncentrací substrátů

	Průměrné hodnoty absorbancí	Enzymová aktivita [pKat]	Koncentrace substrátu [mM]
BL	0,178	0,0	0,00
S6	0,128	3,2	0,18
S5	0,146	3,7	0,35
S4	0,173	4,4	0,71
S3	0,218	5,5	1,41
S2	0,345	8,7	2,82
S1	0,714	18,0	5,64

Z vypočtených hodnot enzymové aktivity a koncentrací substrátů v jednotlivých vzorečcích byl sestrojen graf viz. **Obr. 13**.



Obr. 13. Znázornění závislosti vzrůstající enzymové aktivity peroxidasy (pKat) na koncentraci substrátu (mmol/l) v měřené směsi

4.1.3. Optimalizace ředění peroxidu

Byla změřena absorbance různě naředěných vzorečků peroxidu pufrům Tris/HCl/Triton X-100, pH = 8,00. Ředění bylo provedeno podle **Tab. 4.** a následovalo pipetování složek reakční směsi do mikrotitrační destičky podle **Tab. 5.** Měření probíhalo na čtečce při 490 nm. Naměřené hodnoty absorbancí viz. **Tab. 16.**

Tab. 16. Optimalizace ředění peroxidu – naměřené hodnoty absorbancí

Sloupek č.	3	4	5	6	7	8	9
	1,016	0,864	0,751	0,441	0,279	0,371	0,166
	0,920	0,747	0,384	0,670	0,368	0,300	0,180
	1,080	0,877	0,793	0,228	0,492	0,329	0,158
	0,965	0,736	0,441	0,467	0,321	0,260	0,141
Průměrné hodnoty	0,995	0,806	0,592	0,452	0,365	0,315	0,161

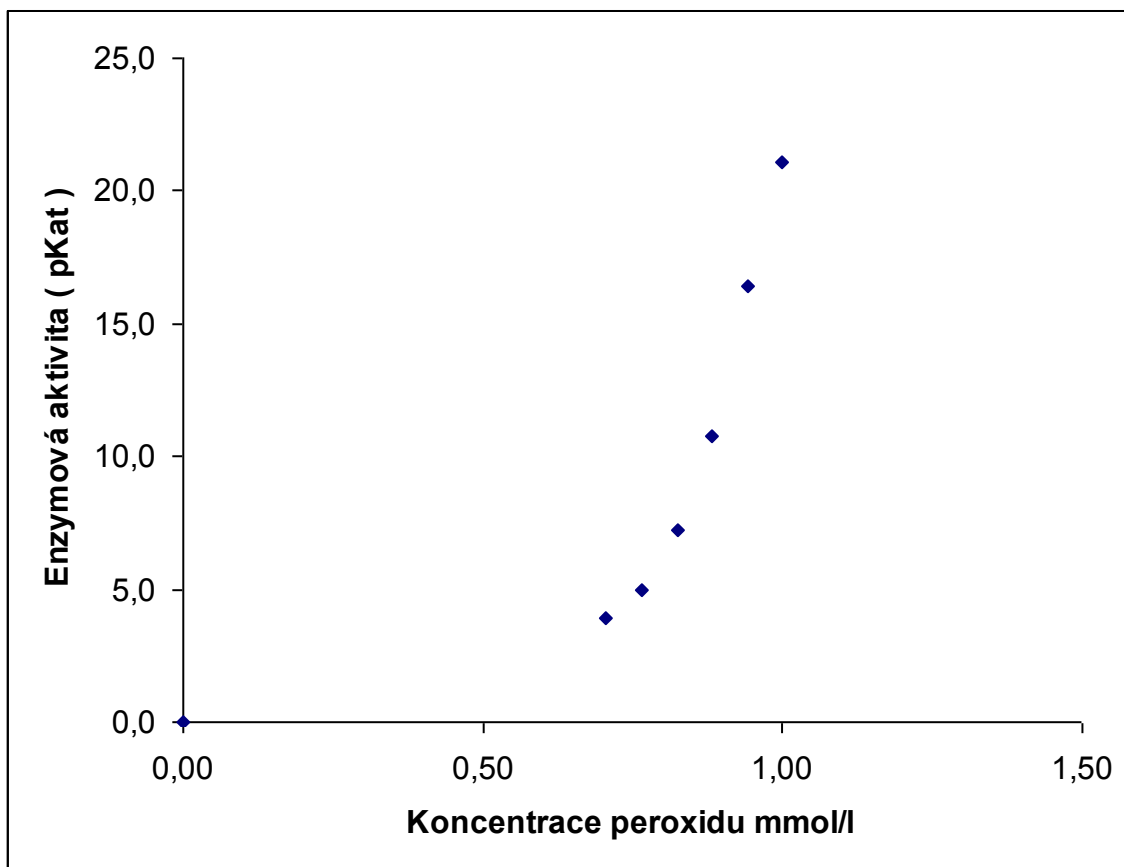
Naměřené hodnoty absorbancí byly zprůměrovány a po odečtení blanku (redestilovaná voda + cytosol) z nich byla vypočítána enzymová aktivita a dále byly vypočítány jednotlivé koncentrace různě ředěných vzorečků substrátů. Výsledky viz.

Tab. 17.

Tab. 17. Optimalizace ředění peroxidu – hodnoty absorbancí po odečtení blanku, vypočítané hodnoty enzymové aktivity a koncentrací peroxidu

	Hodnoty absorbancí po odečtení blanku	Enzymová aktivita [pkat]	Koncentrace peroxidu [mM]
BL	0	0,0	0
P6	0,154	3,9	0,706
P5	0,204	5,0	0,765
P4	0,291	7,2	0,824
P3	0,431	10,8	0,882
P2	0,645	16,4	0,941
P1	0,834	21,1	1,000

Z vypočtených hodnot enzymové aktivity a koncentrací peroxidů v jednotlivých vzorečkách byl sestrojen graf viz. **Obr. 14.**



Obr. 14. Zobrazení závislosti vzrůstající enzymové aktivity peroxidasy (pKat) na koncentraci peroxidu (mmol/l) v měřené směsi

4.2. Použití substrátu Guajakolu

4.2.1. Optimalizace ředění cytosolu

Byla změřena absorbance různě naředěných vzorečků cytosolu fosfátovým pufrům, pH = 7,4. Ředění bylo provedeno podle **Tab. 6.** a následovalo pipetování složek reakční směsi do mikrotitrační destičky podle **Tab. 7.** Měření probíhalo na čtečce při 595 nm. Naměřené hodnoty absorbancí viz. **Tab. 18.**

Tab. 18. Optimalizace ředění cytosolu - naměřené hodnoty absorbancí

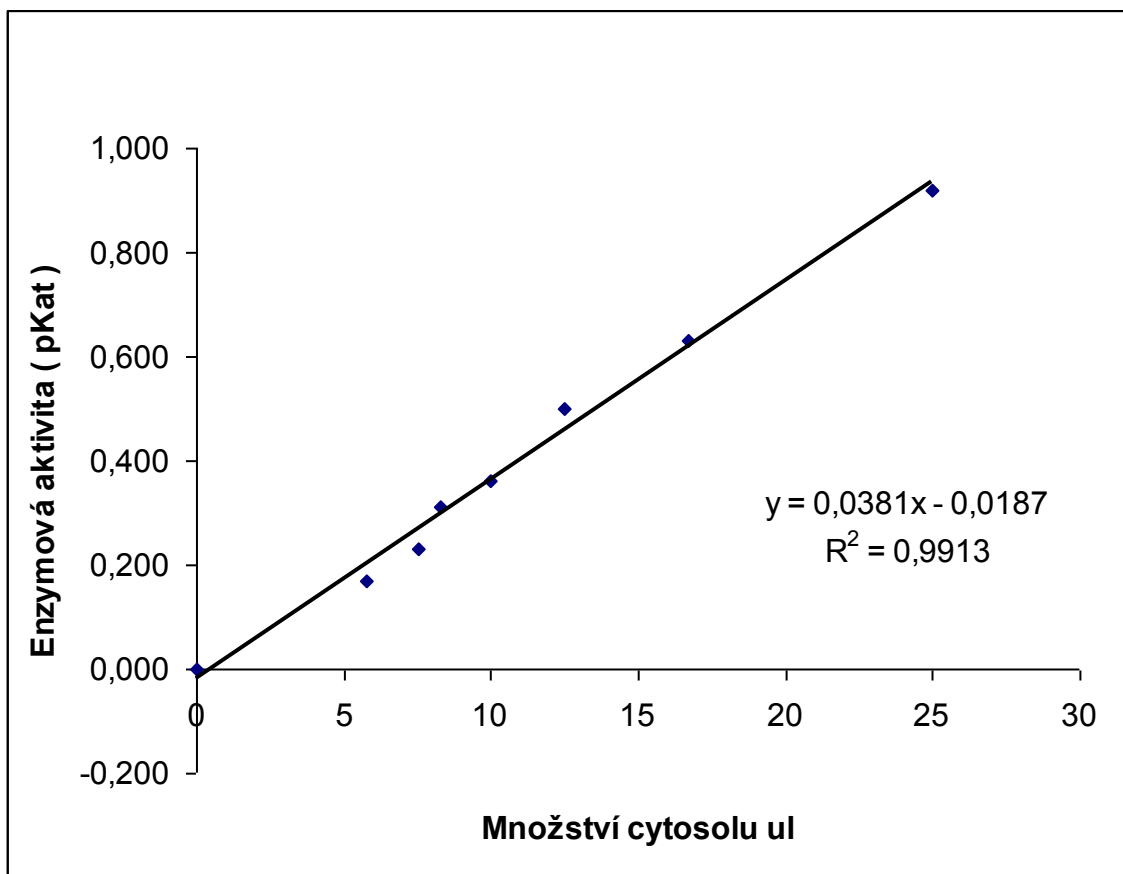
Sloupek č.	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	1,506	0,882	0,593	0,491	0,338	0,281	0,220	0,176	0,002
	1,499	0,880	0,605	0,455	0,359	0,308	0,217	0,169	0,002
	1,448	0,893	0,610	0,496	0,336	0,308	0,219	0,158	0,002
Průměrné hodnoty	1,484	0,885	0,603	0,481	0,344	0,299	0,219	0,168	0,002

Naměřené hodnoty absorbancí byly zprůměrovány a po odečtení blanku (redestilovaná voda + substrát) z nich byla vypočítána enzymová aktivita. Výsledky viz. **Tab. 19.**

Tab. 19. Optimalizace ředění cytosolu – průměrné hodnoty absorbancí po odečtení blanku, vypočtené hodnoty enzymové aktivity

	Hodnoty absorbancí po odečtení blanku	Enzymová aktivita [pkat]	Množství cytosolu [μl]
BL	0	0	0
Vz 8	0,166	0,17	5,8
Vz 7	0,217	0,23	7,5
Vz 6	0,297	0,31	8,3
Vz 5	0,342	0,36	10,0
Vz 4	0,479	0,50	12,5
Vz 3	0,601	0,63	16,7
Vz 2	0,883	0,92	25,0
Vz 1	1,482	1,54	50,0

Z vypočtených hodnot enzymové aktivity a z množství cytosolu, které bylo obsaženo v jednotlivých vzorečkách byl sestaven graf viz. **Obr. 15.**



Obr. 15. Zobrazení závislosti vzrůstající enzymové aktivity peroxidasy (pKat) na množství cytosolu (μl) v měřené směsi

4.2.2. Optimalizace ředění substrátu

Byla změřena absorbance různě naředěných vzorečků substrátu pufrém Tris/HCl/Igepal, pH = 7,14. Ředění bylo provedeno podle **Tab. 8.** a následovalo pipetování složek reakční směsi do mikrotitrační destičky podle **Tab. 9.** Měření probíhalo na čtečce při 595 nm. Naměřené hodnoty absorbancí viz. **Tab. 20.**

Tab. 20. Optimalizace ředění substrátu - naměřené hodnoty absorbancí

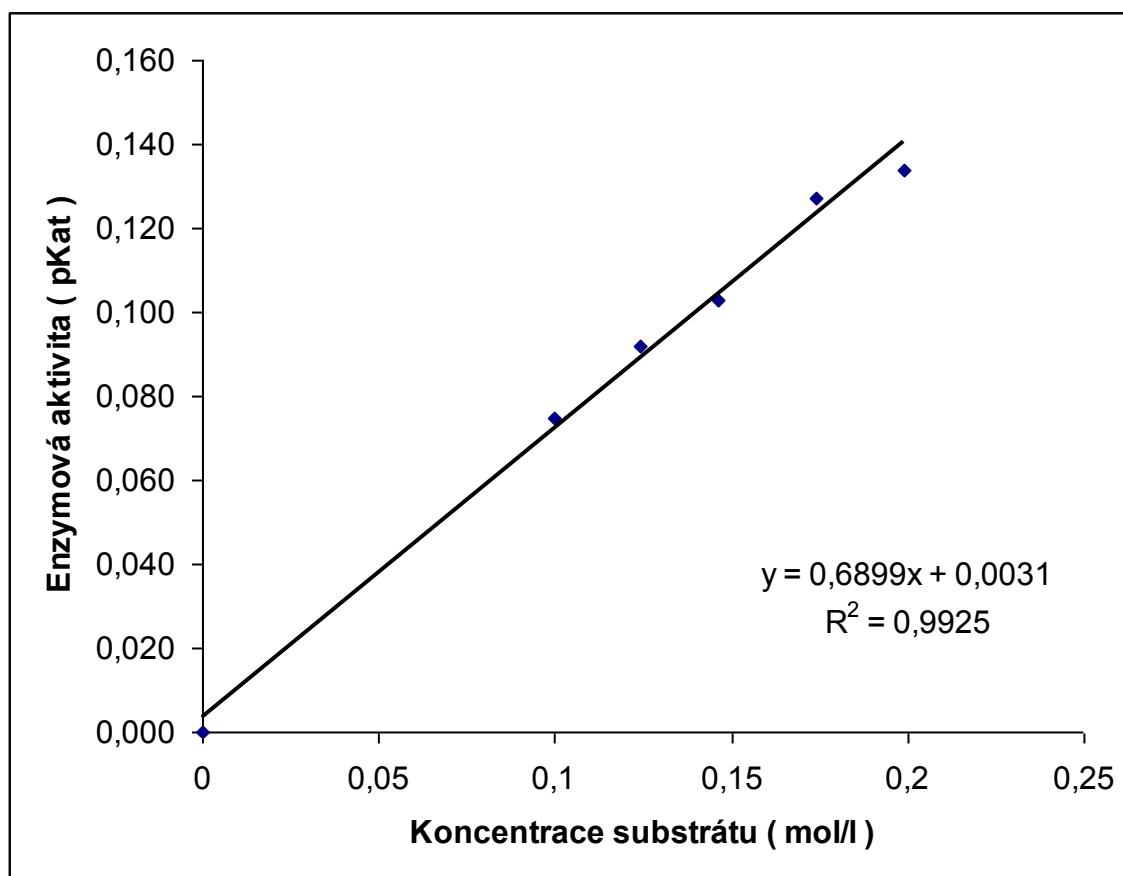
Sloupek č.	3	4	5	6	7	8
	0,440	0,441	0,409	0,400	0,364	0,319
	0,448	0,432	0,425	0,411	0,402	0,316
	0,444	0,443	0,412	0,401	0,399	0,314
Průměrné hodnoty	0,444	0,439	0,415	0,404	0,388	0,316

Naměřené hodnoty absorbancí byly zprůměrovány a po odečtení blanku (redestilovaná voda + cytosol) z nich byla vypočítána enzymová aktivita a dále byly vypočítány jednotlivé koncentrace různě ředěných vzorečků substrátů. Výsledky viz. **Tab. 21**.

Tab. 21. Optimalizace ředění substrátu – průměrné hodnoty absorbancí po odečtení blanku, vypočítané hodnoty enzymové aktivity a koncentrace substrátu

	Hodnoty absorbancí po odečtení blanku	Enzymová aktivita [pKat]	Koncentrace substrátu [mol/l]
BL	0	0	0
S5	0,072	0,075	0,100
S4	0,088	0,092	0,124
S3	0,099	0,103	0,146
S2	0,122	0,127	0,174
S1	0,128	0,134	0,199

Z vypočtených hodnot enzymové aktivity a koncentrací substrátů v jednotlivých vzorečcích byl sestrojen graf viz. **Obr. 16**.



Obr. 16. Zobrazení závislosti vzrůstající enzymové aktivity peroxidasy (pKat) na koncentraci substrátu (mol/l) v měřené směsi

4.2.3. Optimalizace ředění peroxidu

Byla změřena absorbance různě naředěných vzorečků peroxidu pufrém Tris/HCl/Igepal, pH = 7,14. Ředění bylo provedeno podle Tab. 10. a následovalo pipetování složek reakční směsi do mikrotitrační destičky podle Tab. 11. Měření probíhalo na čtečce při 595 nm. Naměřené hodnoty absorbancí viz. Tab. 22.

Tab. 22. Optimalizace ředění peroxidu - naměřené hodnoty absorbancí

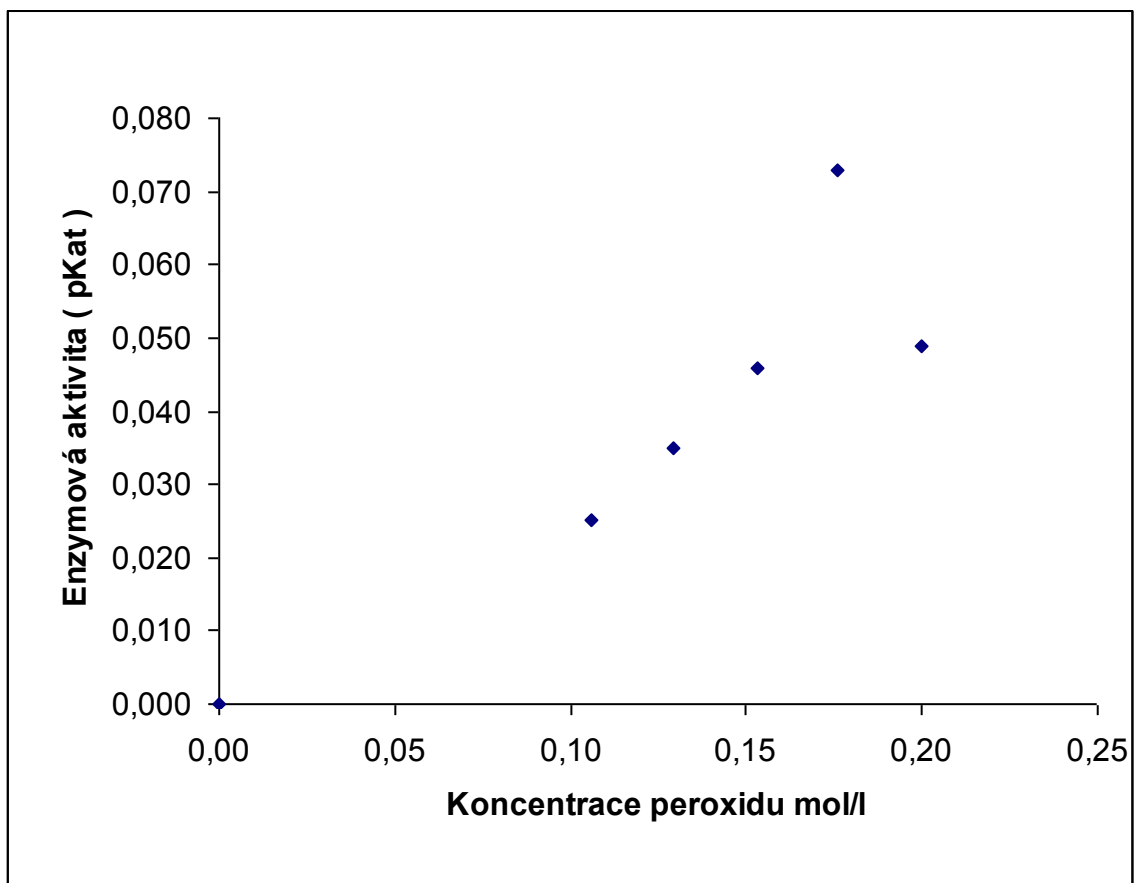
Sloupek č.	3	4	5	6	7	8
	0,289	0,290	0,259	0,256	0,256	0,246
	0,238	0,261	0,282	0,274	0,252	0,223
	0,276	0,320	0,252	0,234	0,226	0,192
Průměrné hodnoty	0,268	0,290	0,264	0,255	0,245	0,220

Naměřené hodnoty absorbancí byly zprůměrovány a po odečtení blanku (redestilovaná voda + cytosol) z nich byla vypočítána enzymová aktivita a dále byly vypočítány jednotlivé koncentrace různě ředěných vzorečků peroxidů. Výsledky viz. Tab. 23.

Tab. 23. Optimalizace ředění peroxidu – průměrné hodnoty absorbancí po odečtení blanku, vypočítané hodnoty enzymové aktivity a koncentrace peroxidu

	Hodnoty absorbancí po odečtení blanku	Enzymová aktivita [pkat]	Koncentrace peroxidu [mol/l]
BL	0	0,000	0,00
P5	0,024	0,025	0,11
P4	0,034	0,035	0,13
P3	0,044	0,046	0,15
P2	0,070	0,073	0,18
P1	0,047	0,049	0,20

Z vypočtených hodnot enzymové aktivity a koncentrací peroxidů v jednotlivých vzorečkách byl sestrojen graf viz. Obr. 17.



Obr. 17. Zobrazení závislosti vzrůstající enzymové aktivity peroxidasy (pKat) na koncentraci peroxidu (mol/l)

5. DISKUSE

Cílem bakalářské práce bylo v dostupné literatuře nalézt metody pro stanovení peroxidasy a vybrat dvě jednoduché metody, které by mohly být využívány na Katedře biochemických věd FaFUK.

Úkolem experimentální části bakalářské práce bylo srovnání dvou vybraných metod pro stanovení aktivity peroxidasy. Každá metoda využívá odlišný substrát. Aktivita peroxidasy byla testována v cytosolu získaného z potkaních jater. Úlohu donorů elektronů představovaly substráty O-fenylendiamin dihydrochlorid (OPD) v jedné metodě a guajakol (1-hydroxy-2-methoxybenzen) v druhé metodě. Inkubace reakčních směsí u obou metod probíhala v mikrotitračních destičkách. Po skončení inkubace bylo množství oxidačních produktů stanoveno spektrofotometricky. Ze známých molárních absorpčních koeficientů byly vypočítány aktivity peroxidasy.

Prvním substrátem byl OPD (o-fenylendiamin dihydrochlorid). Je to krystalická látka bílé barvy. Je řazena mezi substráty vhodné k použití u ELISA metod. Konečný produkt má oranžově hnědou barvu a vykazuje v UV/VIS spektru absorpční maximum při 490 nm. Příprava samotného substrátu byla ztížena navažováním velmi malého množství této látky. Hodnota na analytických vahách se stále měnila pravděpodobně z důvodu, že na sebe OPD váže vodu.

Druhým používaným substrátem byl guajakol. Je to bezbarvá kapalina silně páchnoucí, proto bylo nutné pracovat s ním po celou dobu v digestoři. Stejně jako u již zmiňovaného OPD, zde docházelo k určitým problémům, co se týče navažování. Z důvodu, že se jedná o kapalinu těkavou se hmotnost navážky na analytických vahách rychle měnila. Bylo nutné při vážení guajakolu pipetovat do předem zvážené mikrozkušavky, která byla ihned pevně uzavřena.

V obou testovaných metodách zdrojem chyb může být i příprava 1mM H_2O_2 z důvodu velmi malého množství peroxidu, se kterým se zde pracuje. Vzhledem k nízké stabilitě musí být substrát vždy připravován čerstvě před měřením.

Jedním z úkolů bakalářské práce bylo pro obě metody stanovení peroxidasy najít optimální složení reakční směsi. Bylo postupně měněno množství jednotlivých složek reakční směsi cytosolu, substrátu nebo peroxidu a měřena aktivita peroxidasy.

U metody s OPD, aktivita peroxidasy s rostoucím množstvím cytosolu lineárně rostla pouze v rozsahu 0–15 μ l cytosolu na jamku. Dalším zvyšováním množství cytosolu

již zvýšení aktivity peroxidasy bylo méně výrazné. Při použití guajakolu jako substrátu byla závislost aktivity peroxidasy na množství cytosolu lineární v celém testovaném rozsahu (0–50 µl cytosolu na jamku). Při testování enzymových aktivit je vhodné použít saturační koncentrace substrátů. Sledovali jsme tedy závislost aktivity peroxidasy na koncentraci OPD (nebo guajakolu) a koncentraci peroxidu vodíku. Bohužel, ve zvoleném rozsahu testovaných koncentrací byl průběh závislosti aktivity peroxidasy na koncentraci OPD i guajakolu lineární. Závislost aktivity peroxidasy na koncentraci peroxidu vodíku dokonce vykazovala exponenciální průběh. Navíc bylo zjištěno, že nelze použít peroxid o vyšších koncentracích (např. 1M) neboť poté směs bouřlivě vyubílá z jamiček mikrotitrační destičky, spojí se jejich obsah a naměřené hodnoty jsou zcela zkresleny.

Při porovnání hodnot aktivit naměřených pomocí OPD a pomocí guajakolu je zřejmé, že při použití substrátu OPD byla aktivita výrazně vyšší než při použití substrátu guajakolu. Např. v reakčních směsích s 50 µl cytosolu byla aktivita peroxidasy vůči OPD 47,2 pkat, zatímco vůči guajakolu jen 1,54 pkat. Podobně tomu bylo i u reakčních směsí s 50 µl neředěného substrátu, kde byla aktivita peroxidasy vůči OPD 18,0 pkat, vůči guajakolu pouze 0,134 pkat. A v neposlední řadě u reakčních směsí s 50 µl neředěného peroxidu, byla naměřena aktivita peroxidasy vůči OPD 21,1 pkat a vůči guajakolu 0,049 pkat. Z těchto výsledků je zřejmé, že peroxidasy v potkaním cytosolu preferují jako substrát OPD.

6. ZÁVĚR

Závěrem lze shrnout, že v literárních zdrojích byla nalezena řada metod pro stanovení peroxidasy v různém biologickém materiálu. Pro testování byly vybrány dvě nejjednodušší metody. Obě testované metody pro stanovení peroxidasy však lze použít jen omezeně. Problematická je příprava roztoků substrátů o přesné koncentraci, což ještě více komplikuje skutečnost, že stanovení aktivit neprobíhá v saturačních koncentracích substrátu. Obě metody lze proto doporučit pouze pro předběžné testování přítomnosti peroxidasy v biologických vzorcích a nikoli pro přesné kvantitativní stanovení aktivit či pro výpočet kinetických parametrů peroxidasy.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

OPD	o-fenylendiamin dihydrochlorid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
GPX	glutathionperoxidasa
cGSHPx	glutathionperoxidasa nacházející se v cytoplazmě
eGSHPx	glutathionperoxidasa nacházející se v extracelulární tekutině
pGSHPx	fosfolipidová glutathionperoxidasa
MPO	myeloperoxidasa
HRP	horseradish peroxidase = křenová peroxidasa
TPO	thyroperoxidasa
TSH	thyreotropin
TMB	3,5,3'5'-tetramethylbenzidin
UV	ultrafialové spektrum světla
VIS	viditelné spektrum světla
HPLC	high performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DEAE	diethylaminoethyl
LED	light – emitting diode = světlo emitující dioda
3-IP	3-indoxylfosfát
SPCEs	screen-printed carbon elektrodes = uhlíkové tištěné elektrody
IC	indigo carmine

8. SEZNAM LITERATURY

- [1] MURRAY, K. Robert a kol. *Harperova biochemie*. 23.vyd. nakl. H+H, 1998, s.121-122, ISBN 80-7319-013-3
- [2] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. Praha 2004, s. 130, ISBN 80-7080-551-X
- [3] RACEK, J., HOLEČEK, V. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* [online], 1999, č.93, s. 774 – 780, Dostupné z < http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_12_774-780.pdf >.
- [4] Wikipedia, The free Encyclopedia, Dostupné z < http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_peroxidase >.
- [5] Wikipedia, The free Encyclopedia, Dostupné z < <http://en.wikipedia.org/wiki/Myeloperoxidase> >.
- [6] Wikipedia, The free Encyclopedia, Dostupné z < http://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish_peroxidase >.
- [7] Wikipedia, The free Encyclopedia, Dostupné z < http://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbate_peroxidase >.
- [8] Wikipedia, The free Encyclopedia, Dostupné z < <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactoperoxidase> >.
- [9] Wikipedia, The free Encyclopedia, Dostupné z < http://en.wikipedia.org/wiki/Thyroid_peroxidase >.

- **[10]** Wikipedia, The free Encyclopedia,
Dostupné z < http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c_peroxidase >.

- **[11]** Wikipedia, The free Encyclopedia,
Dostupné z < http://en.wikipedia.org/wiki/Eosinophil_peroxidase >.

- **[12]** TATZBER, F. et al. Dual method for the determination of peroxidase activity and total peroxides-iodide leads to a significant increase of peroxidase activity in human sera. *Elsevier Science* [online]. May 2003, vol. 316, iss. 2.
Dostupné z < <http://sciencedirect.com/> >.

- **[13]** AKHAVAN-TAFTI, H. et al. Robust new chemiluminescent peroxidase substrates. *Medical Device link* [online] May 2004.
Dostupno z < <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/04/05/010.html> >.

- **[14]** RAD MOLAEI, A. et al. Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol–aniline coupling hydrogen donor. *Elsevier* [online]. March 2007, vol.362, iss.1. Dostupné z < <http://www.sciencedirect.com> >.

- **[15]** SAKAMOTO, W. et al. A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva. *Elsevier* [online]. May 2008, vol.41, iss.7-8. Dostupné z < <http://www.sciencedirect.com> >.

- **[16]** BOLADO-FANJUL, P. et al. Voltammetric determination of alkaline phosphatase and horseradish peroxidase activity using 3-indoxyl phosphate as substrate Application to enzyme immunoassay. *Elsevier* [online]. October 2004, vol.64, iss.2.
Dostupné z < <http://www.sciencedirect.com> >.

