



Klinická biochemie II - MST P23

11. prosince 2023

Osnova

- Krátké seznámení s metodami – prezentace teorie
- Cvičení (2 skupiny)
- Protokol

A) Termoforéza v mikroměřítku (Microscale Thermophoresis – MST)

B) Kapičková mikrofluidika (Dropplet Microfluidics – DM)

Termoforéza v mikroměřítku (Microscale Thermophoresis – MST)

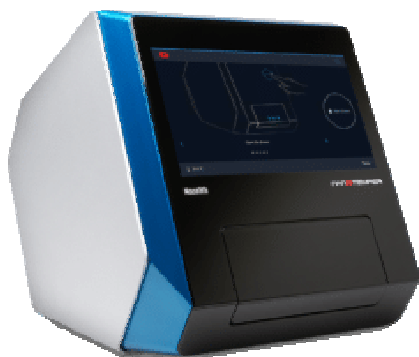
Bržezická Taťána

a přístroj Monolith X



Monolith X

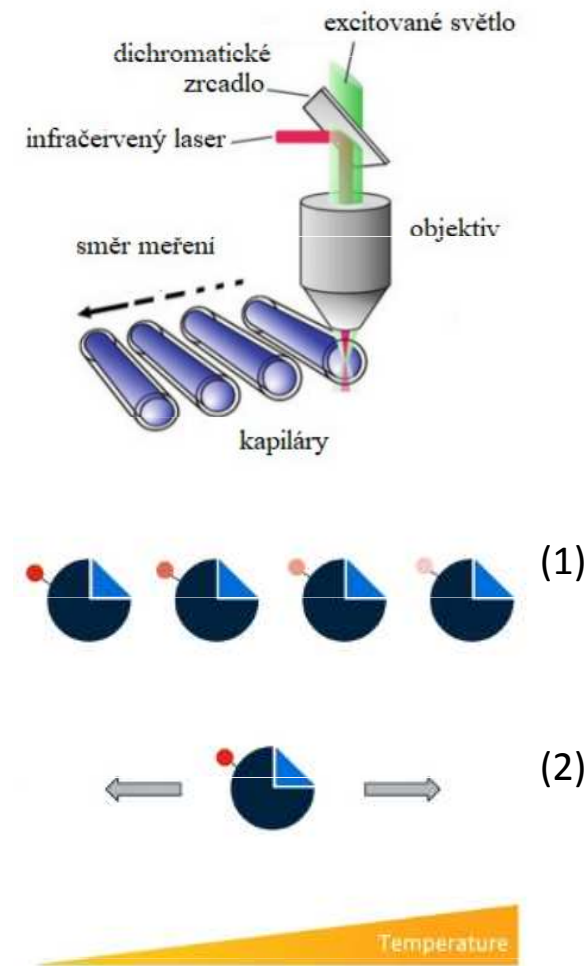
- duální technologie
- Spektrální posun + MST



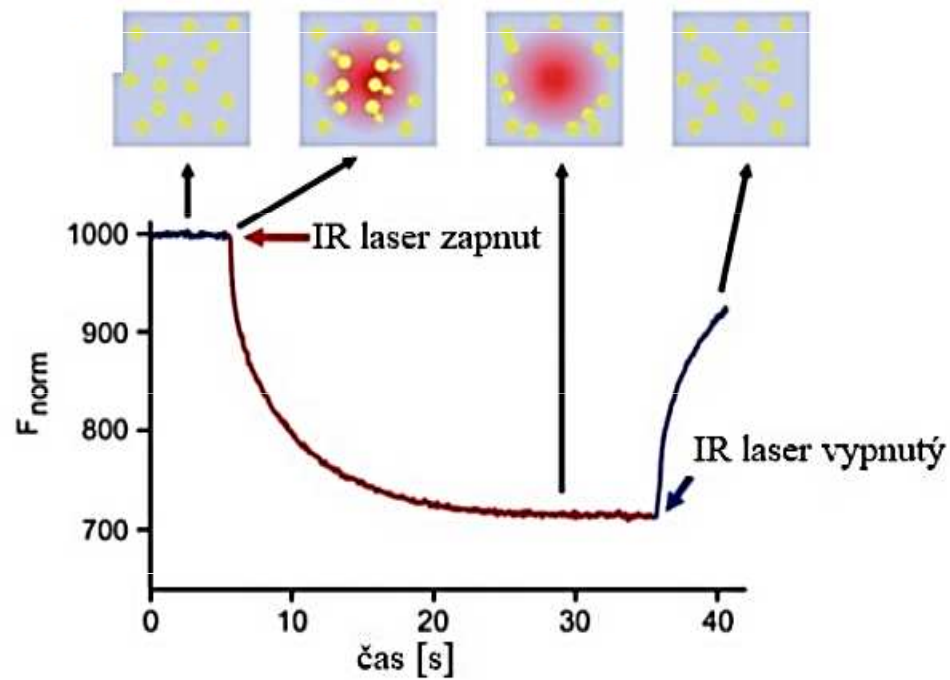
	Monolith X	Monolith
Technologie	Spektrální posun a MST	MST
Měření K_d	Přibližně 10 minut	
Dynamický rozsah	nM to mM	pM to mM
Detekovatelný rozsah molekul	10 ¹ –10 ⁷ Da	
Potřebný objem vzorku	10 µl	
Počet kapilár pro „run“	Až 24	
Teplotní kontrola	20-40 °C +/- 0.5 °C	
Fluorescenční detekce	1 / RED	1 / pico RED nebo 2 / pico RED & LabelFree (UV) nebo 2 / pico RED & BLUE
Rozměry přístroje	36 cm šířka x 40 cm výška x 58 cm délka	
Váha	27 kg	

Princip metody MST

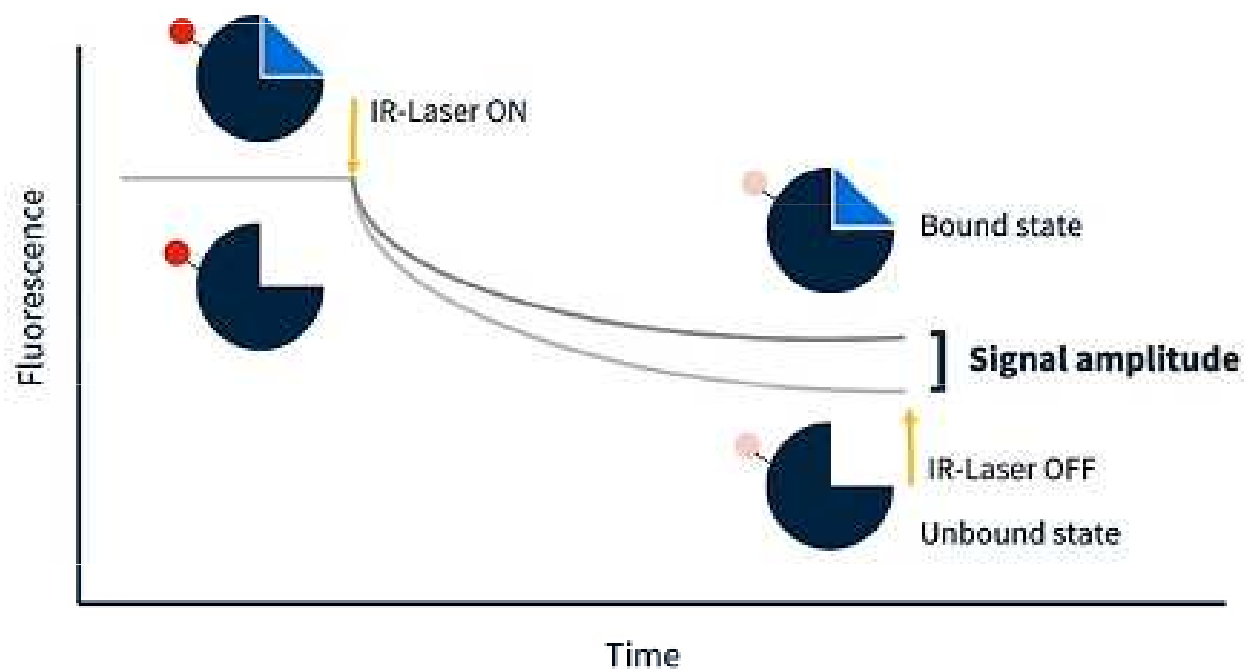
- fyzikální jev **TRIC (1) + termoforéza (2) + teď navíc spektrální posun (dále)**
- TRIC - teplotně závislé změny intenzity fluoroforu
- teplotní gradient vzorku (IR laser – 1480nm) vyvolá pohyb molekul, který je závislý na třech parametrech molekuly: **velikosti, náboji a hydratačním obalu**
- fluorescenční detekce - **optický systém**
 - **nativní fluorescence** proteinů/ značené **fluorofory**
- vazebné parametry jsou určeny ze změn termoforetických vlastností vzorku se vzrůstající koncentrací vazebného partnera (konc. proteinu konstantní)
- precizní a velmi citlivá metoda, analýza v malých objemech (μl)



Pohyb molekul při termoforéze v 1 kapiláře

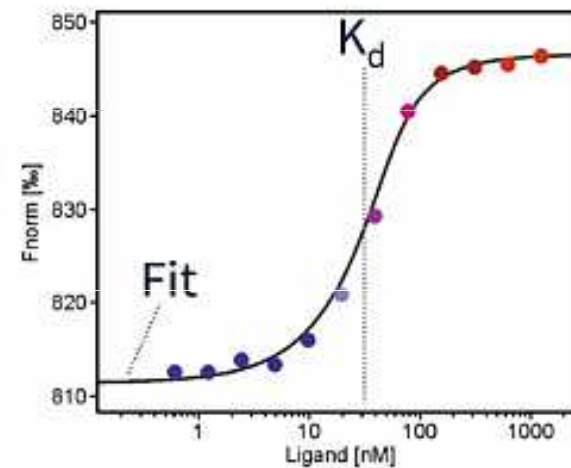
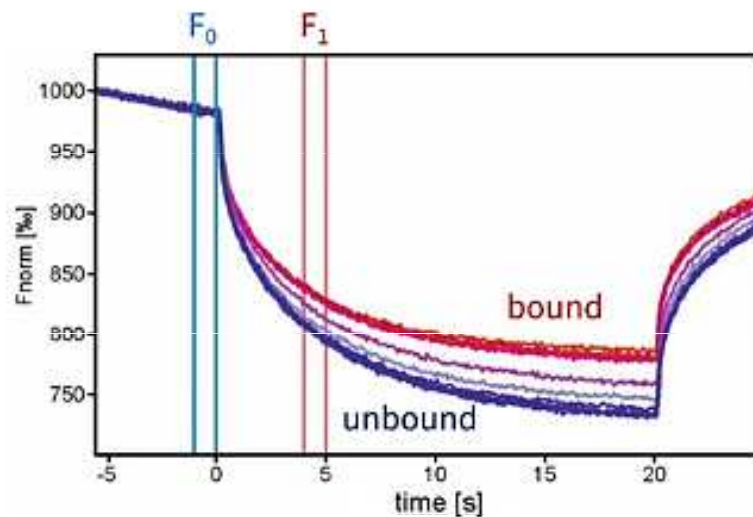


Záznam TRIC



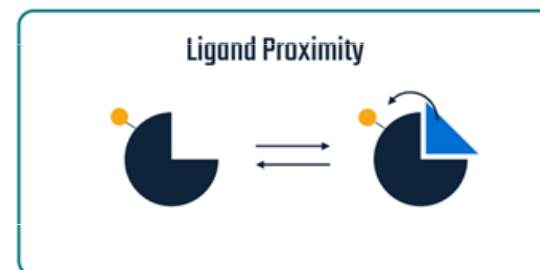
Příklad měření

- scan kapilár se zvedající se koncentrací ligandu (koncentrace proteinu konstantní)
- K_d je automaticky derivováno z MST grafů
- F_1 následně děleno $F_0 \rightarrow F_{\text{norm}}$

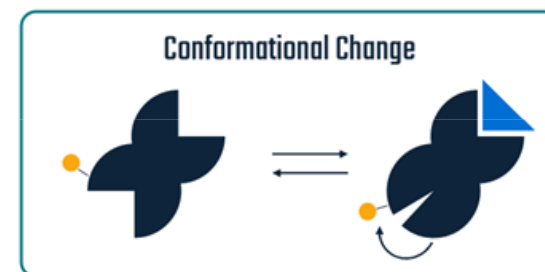


Spektrální posun

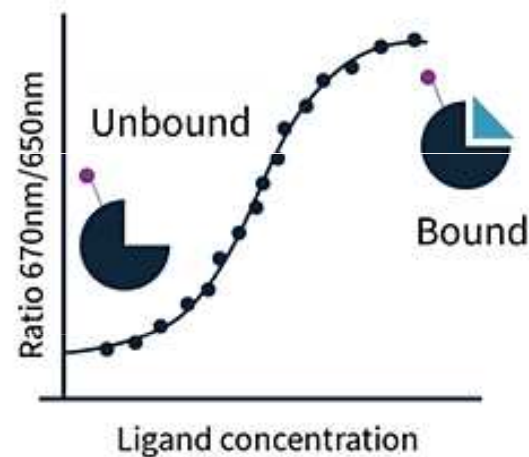
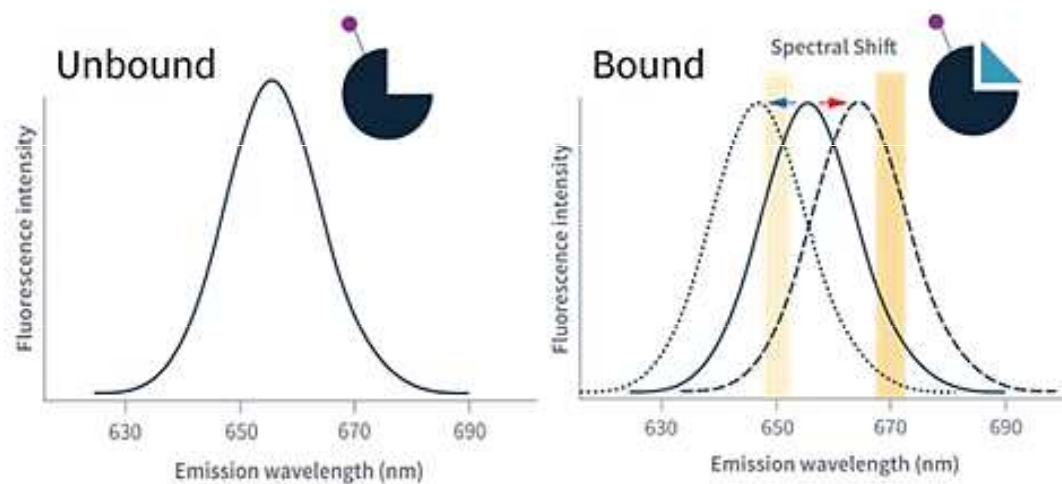
- vazba ligandu způsobuje spektrální posun
 - modrý posun, červený posun
- Ligandy, které se vážou blízko fluoroforu, mohou přímo ovlivňovat chemické prostředí fluoroforu (1).
- Ligandy, které se vážou ve vzdálené poloze od fluoroforu, mohou vést ke konformačním změnám (2).
- měření 2 vlnových délek – 650 nm a 670 nm



(1)



(2)

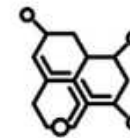


Afinitní interakce

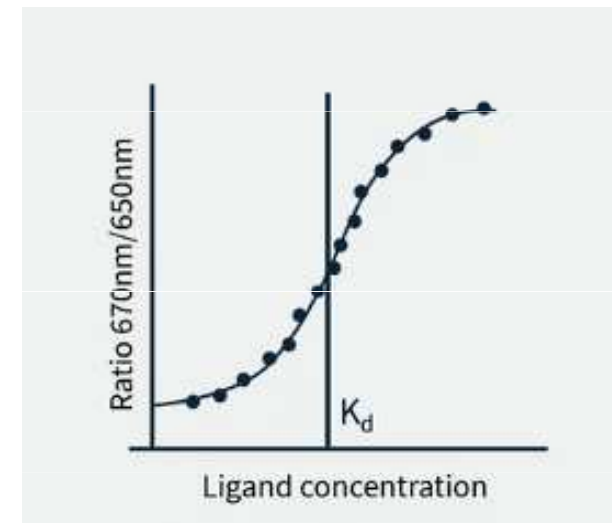
- Síla interakce
- terminologie: target - ligand
- Disociační konstanta K_d
- pM – nM – silná afinita nebo těsná vazba
- μ M – mM – slabá interakce
- Plazmatické proteiny – léčiva (slabé)

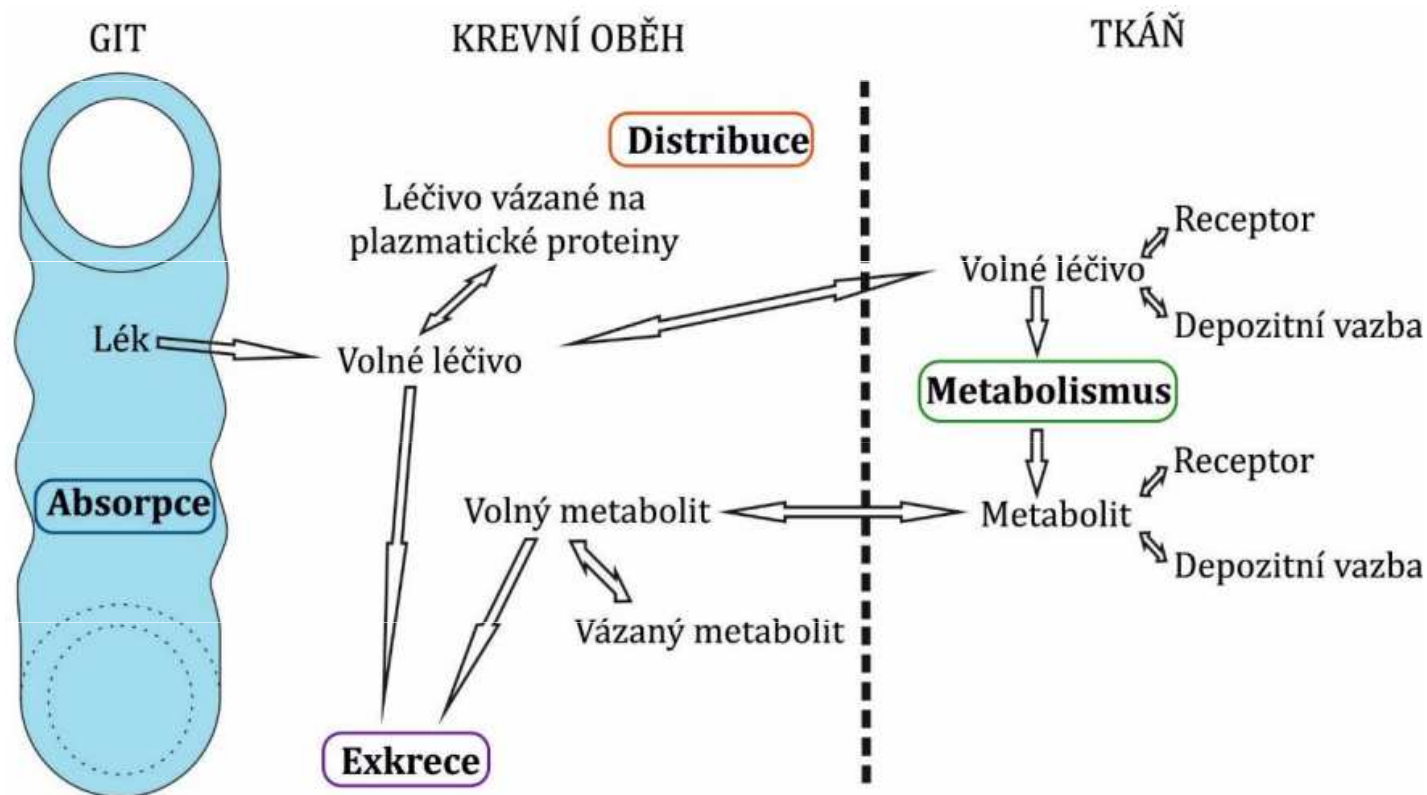


TARGET → Fluorescently labeled molecule



LIGAND → Unlabeled binding partner





Podle tzv. " **teorie volné frakce** " je pouze volné léčivo schopno transportu (přemístění) z krevního řečiště skrz membrány do cílových tkání a orgánů, kde působí farmakologických efektem. Cyklus léčiva v organismu je zjednodušeně ilustrován na obrázku výše. Vazba léčiv na plazmatické proteiny patří mezi faktory ovlivňující celkový farmakologický profil léčiva.

Výhody

- **rychlé a flexibilní** nastavení testů
- měření v roztoku bez imobilizace
- **integrovaná kontrola kvality** - umožňuje detekci agregačních a srážecích procesů během měření
- termoforéza molekul závisí kromě jejich velikosti také na náboji a hydratačním obalu (více informací)
- **malá spotřeba vzorku**
- variabilita pufru, dokonce i komplikované směsi (krevní plasma či buněčný lyzát)

MUNI
SCI

Kapičková mikrofluidika – aplikace v enzymologii

Sedlák Michal

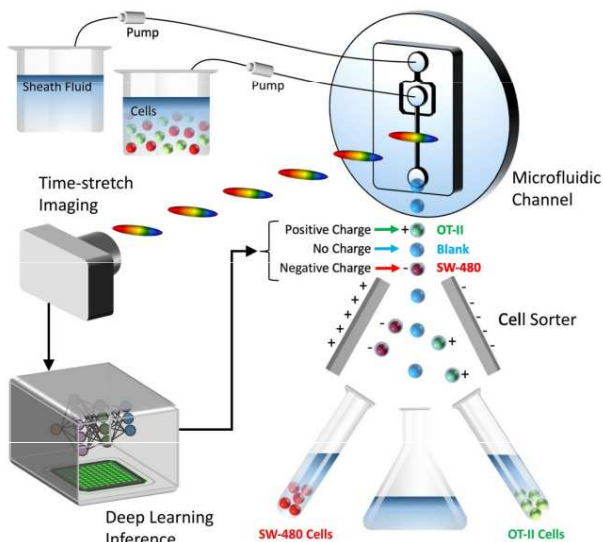
Teorie

- Mikrofluidika
- Enzymová kinetika
- Dnes ve cvičení

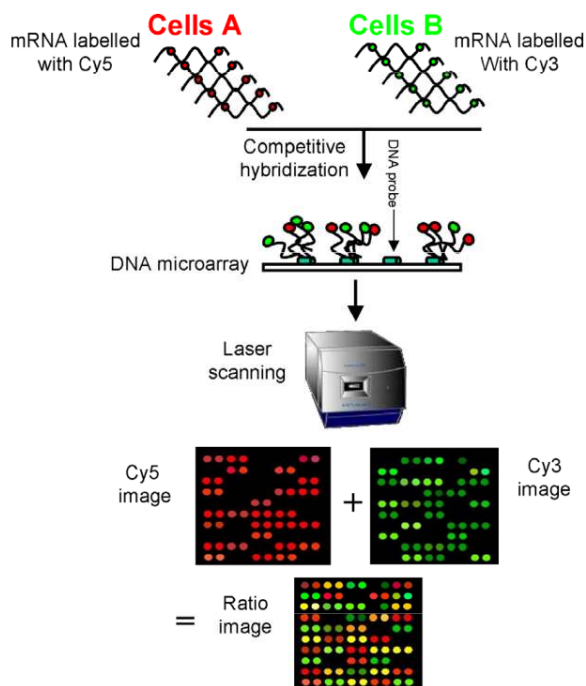
Mikrofluidika - příklady

- Miniaturizace laboratorních postupů
- Nižší spotřeba látek, velké množství dat

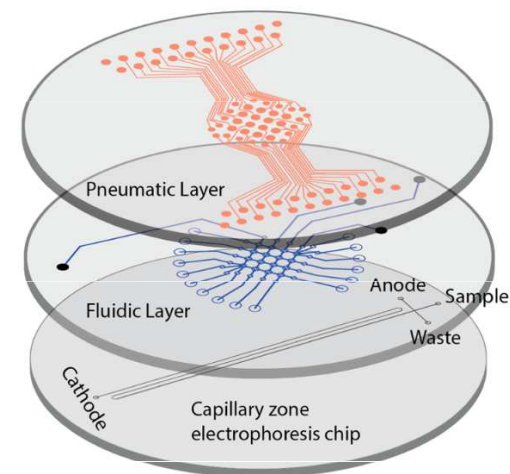
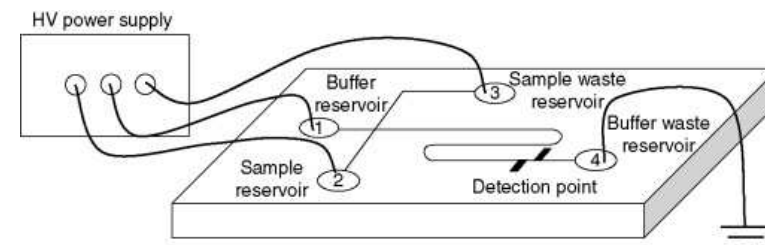
Průtoková cytometrie



DNA čipy



Elektroforéza na čipu



Guardia M, Armenta S., Downizing the Methods. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Volume 57, 2011

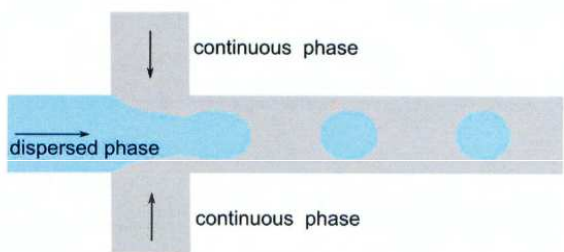
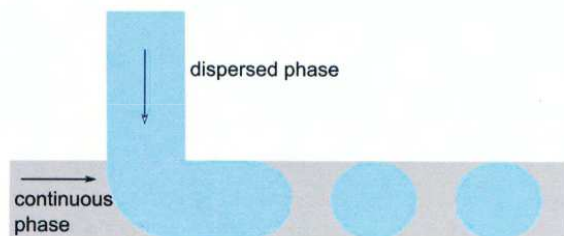
Kim J, Jensen EC, Stockton AM, Mathies RA. Universal microfluidic automaton for autonomous sample processing: application to the Mars Organic Analyzer. *Anal Chem*. 2013 Aug 20;85(16):7682-8. doi: 10.1021/ac303767m. Epub 2013 Jul 29. PMID: 23675632.

Li, Y., Mahjoubfar, A., Chen, C.L. et al. Deep Cytometry: Deep learning with Real-time Inference in Cell Sorting and Flow Cytometry. *Sci Rep* 9, 11088 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47193-6>

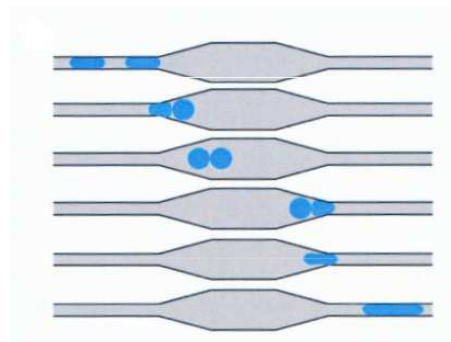
Lamartine, J. The benefits of DNA microarrays in fundamental and applied bio-medicine. *Materials Science and Engineering: C*, Volume 26, Issues 2–3, 2006, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.10.068>.

Kapičková mikrofluidika

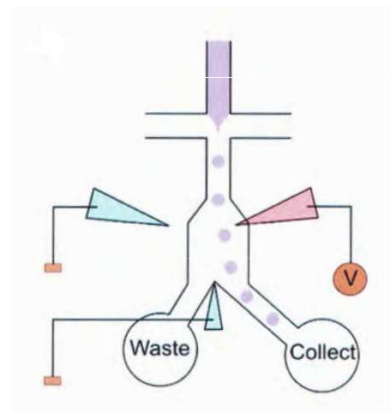
Tvorba kapek



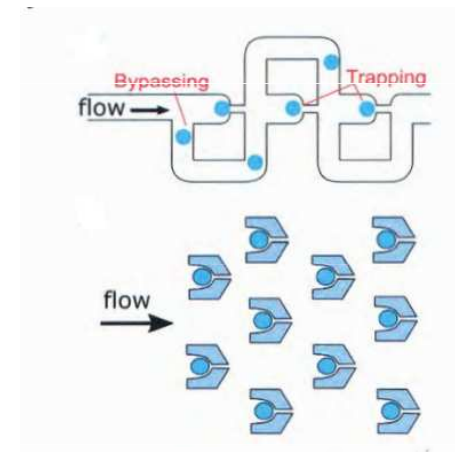
Spojování



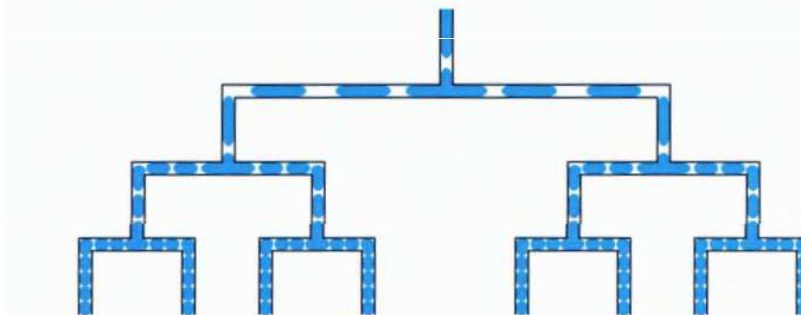
Třídění



Zachycení na čipu



Dělení



Enzymy

- Biokatalyzátory, metabolismus, signalizace
- Rovnice Michaelise-Mentenové

$$v = \frac{d(P)}{dt} = \frac{V_{max} (S)}{K_M + (S)}$$

v ... rychlost reakce

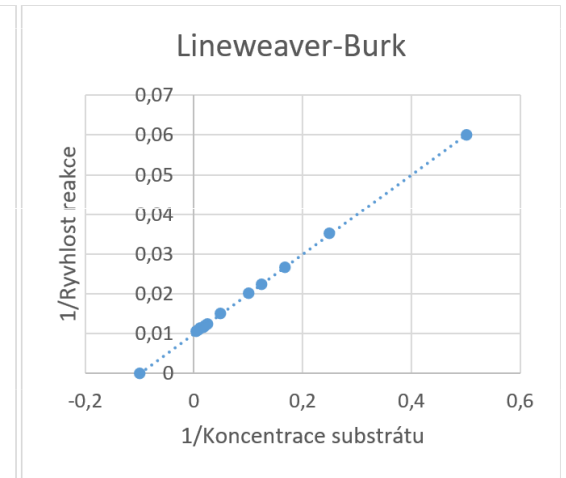
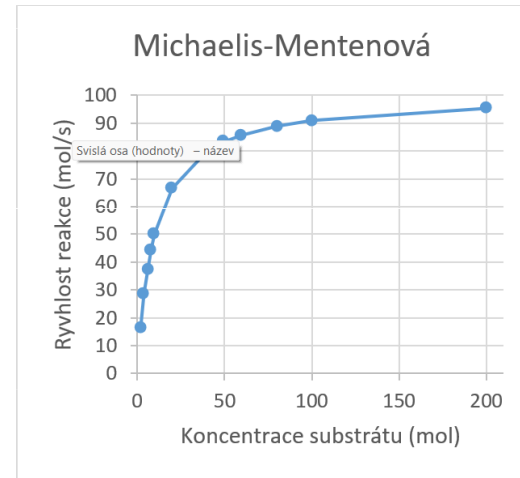
P ... koncentrace produktu

t ... čas

V_{max} ... limitní rychlost

S ... koncentrace substrátu

K_m ... michaelisova konstanta



Linearizace ($y = ax + b$)

$a = K_m / V_{max}$

$b = 1 / V_{max}$

Inibitory enzymů jako léčiva

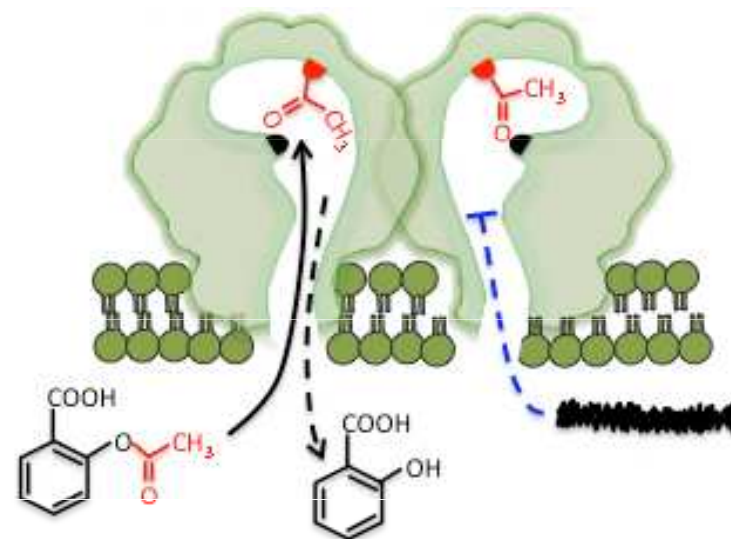
snížení aktivity cílového enzymu



terapeutický efekt

Př.: Aspirin

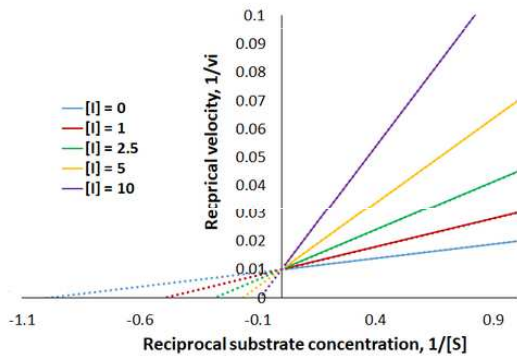
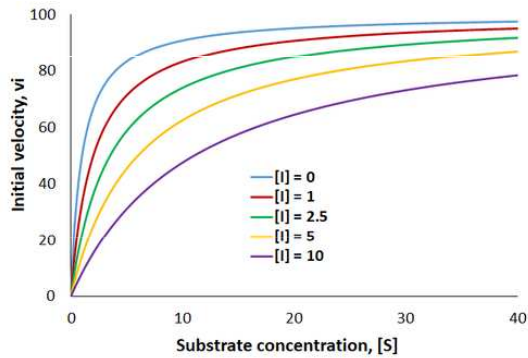
enzym cyklooxygenáza



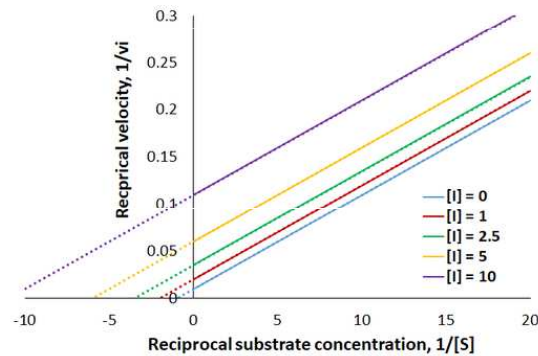
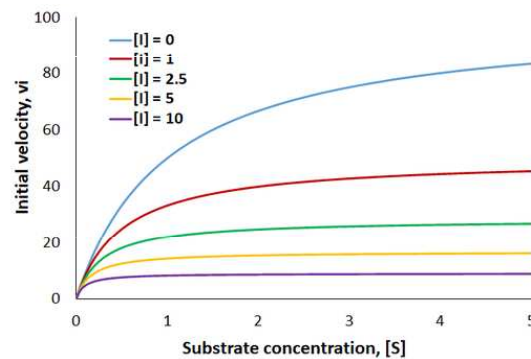
k. acetylsalicylová k. salicylová

Inhibice aktivity enzymu

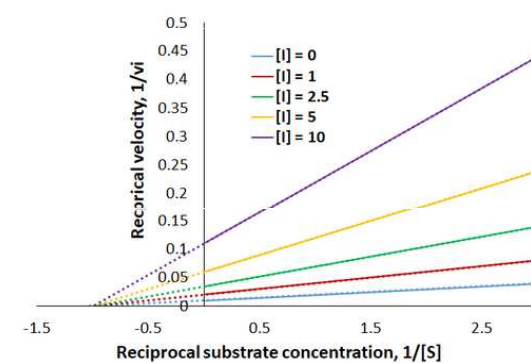
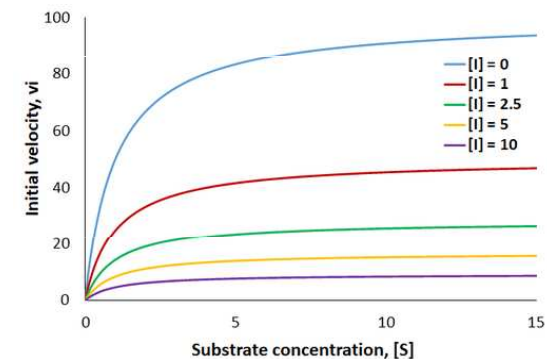
Kompetitivní



Akompetitivní

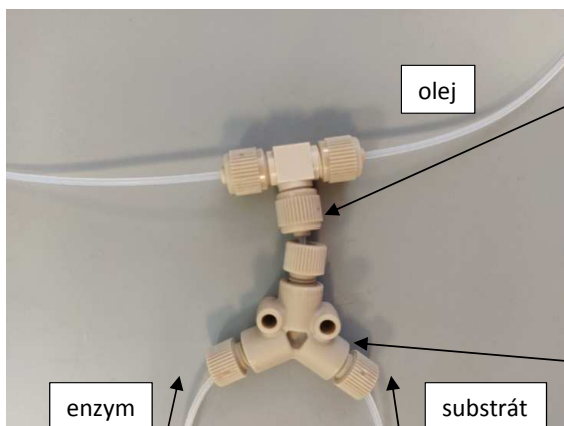


Směsná a nekompetitivní



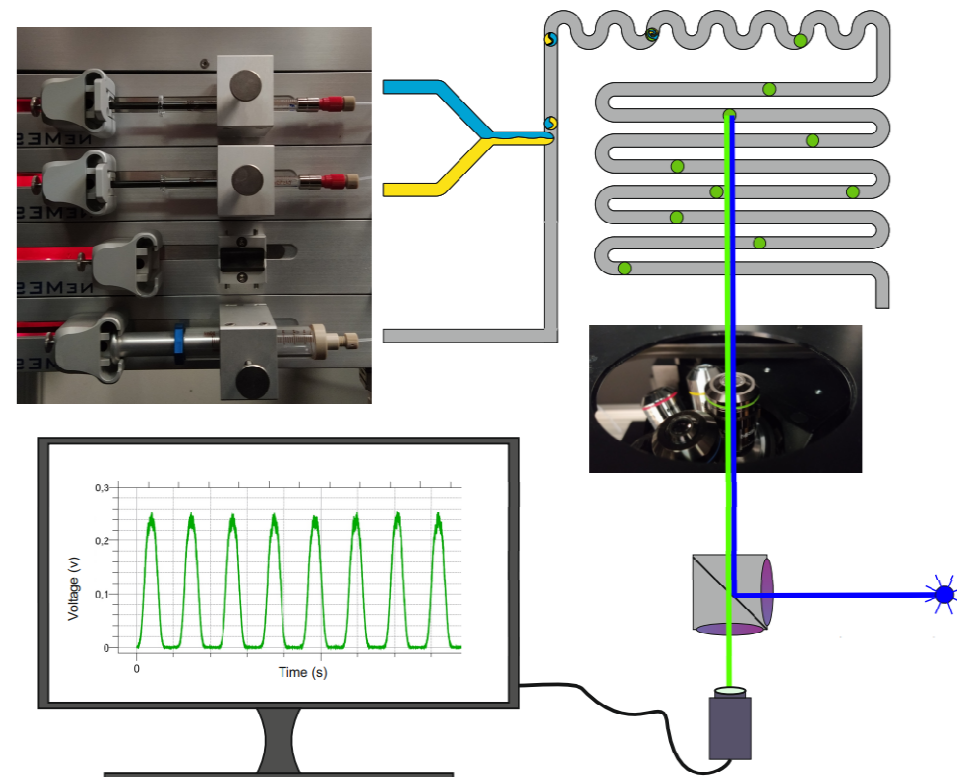
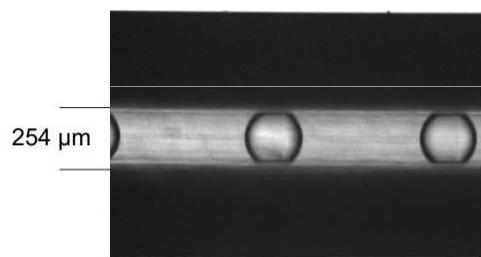
<https://www.sciencesnail.com/science/category/enzymology>

Obsah cvičení



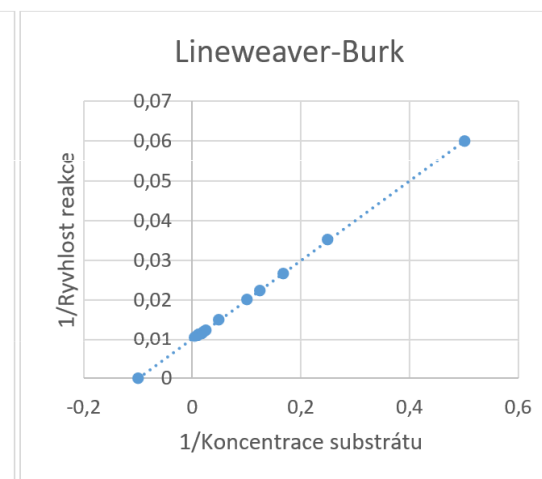
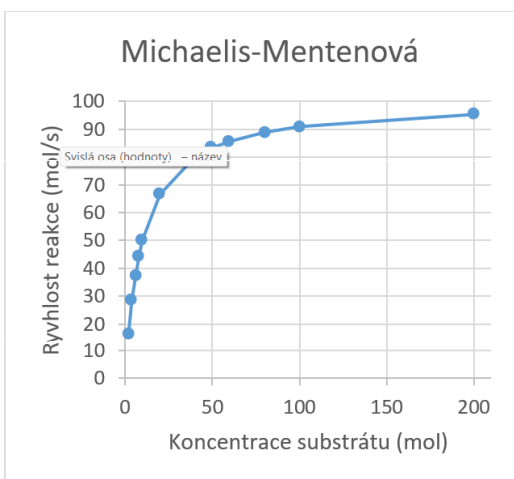
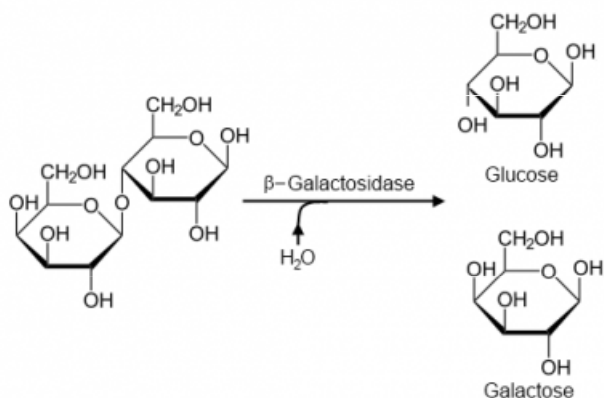
"T" spojka pro spojení reakční směsi a oleje – pro tvorbu kapek

"Y" spojka pro smíchání reakční směsi

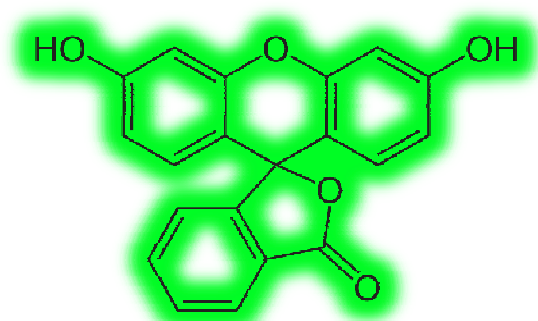


Obsah cvičení

β-galaktosidáza E.coli



Odštěpení fluoresceinu z umělého substrátu β-gal.



Fluorescein

- Excitace: 498 nm
- Emise: 517 nm

Děkuji za pozornost