

Stanovení parametrů enzymové reakce pomocí kapičkové mikrofluidiky s fluorogenním substrátem

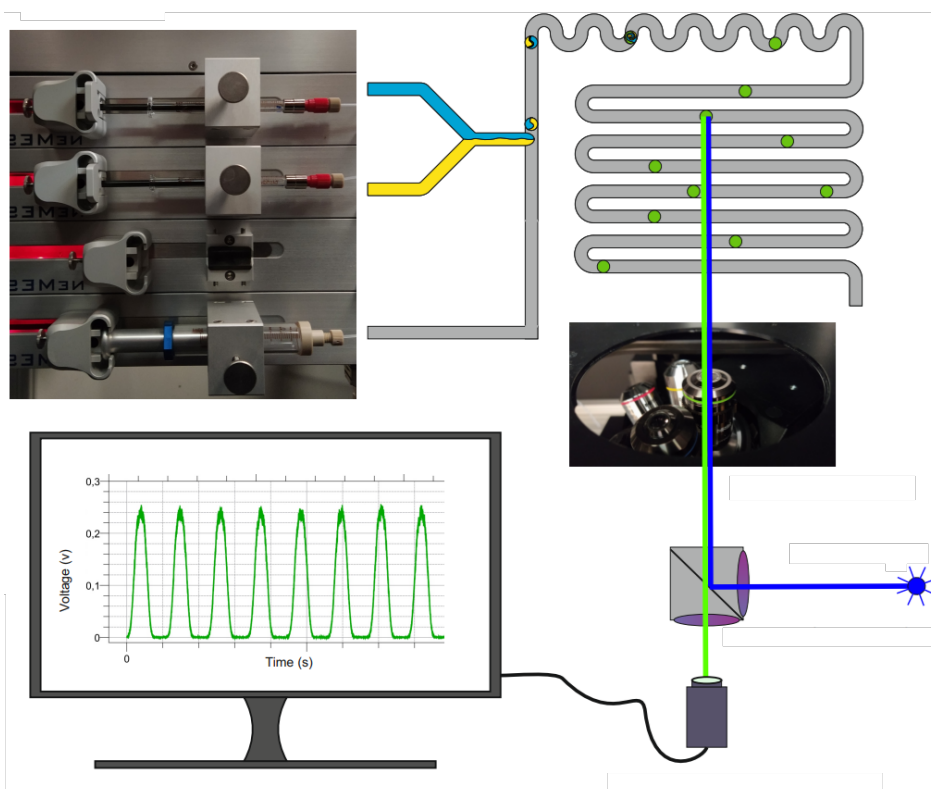
Teorie:

Mikrofluidika

Mikrofluidní systémy přinášejí zajímavé možnosti pro analytickou chemii, biochemii i klinické aplikace. Jejich výhodou je obecně nízká spotřeba látek a zároveň získání velkého množství dat. Základem aparatury mohou být trubičky nebo mikrokanálky v různých materiálech, jejichž konkrétní design a kombinace s detekčními a separačními technikami umožňuje široké spektrum aplikací. Častým materiálem bývají „čipy“ vyrobené z PDMS (polydimethylsiloxan) pro svoje mechanické vlastnosti, relativní inertnost a jednoduchost výroby.

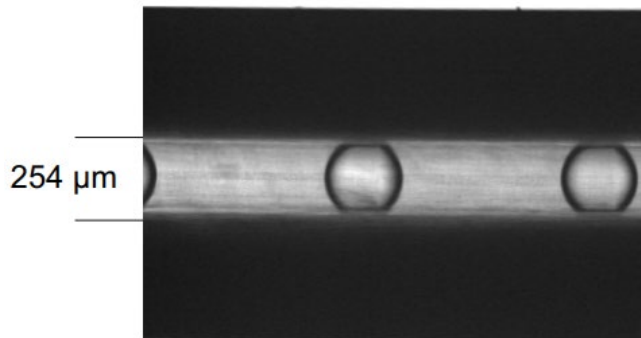
Jako mikrofluidní metody lze namátkou zmínit průtokovou cytometrii (třídění a analýza vlastností buněk), „microarrays“ (DNA nebo protilátkové próby na povrchu), digitální PCR, elektroforéza na čipu, nebo kapičková mikrofluidika (převedení reakcí do jednotlivých kapek v oleji, sloužících jako jednotlivé mikroreaktory).

Převedení laboratorních postupů do čipového formátu se nazývá „lab-on-a-chip“, tedy laboratoře na čipu, kde je možné produkovat velké množství dat s malou spotřebou reagentů. S tím souvisí automatizace, zpracování dat a obecně výzvy spojené s miniaturizací, jak technologie výroby, tak chování kapalin v mikroměřítku.



Obr. 1 Schéma přístroje s fluorescenční detekcí použitého ve cvičení:

Roztoky jsou dávkovány pomocí přesných pump, kapky reakční směsi vznikají oddělováním pomocí proudu oleje v pravouhlé spojce (jedna z možností tvorby kapek). Při průchodu ostře zatočeným kanálkem se reakční směs uvnitř kapek díky silám, působícím na kapky promíchá. Průběh reakce v čase lze pozorovat detekcí signálu v různých místech inkubačního kanálku. Detekční část je zdroj excitačního světla, soubor filtrů, detektor (fotonásobič) a software. Celá aparatura je umístěna na mikroskopu.



Obr. 2 Kapky reakční směsi oddělené olejem:

Velikost a vzdálenost kapek lze měnit změnou poměru průtoku vodné a olejové fáze. Vnitřní průměr trubičky: 254 μm.

Enzymová kinetika

Enzymy jsou v organismech nepostradatelné biomolekuly, katalyzující různorodé reakce ve spoustě metabolických a signalizačních drah. Poznání jejich chování je důležité pro porozumění biologickým procesům a aplikaci v biotechnologii stejně jako pro pochopení a léčbu některých onemocnění, na kterých se podílejí. Stanovení jejich aktivity je tedy nedílnou součástí klinické diagnostiky. Enzymová kinetika obecně zkoumá katalytickou funkci enzymů vůči jejich přirozeným nebo umělým substrátům, chování v různém prostředí (teplota, pH, iontová síla...) nebo jejich inhibici například pro terapeutické účely.

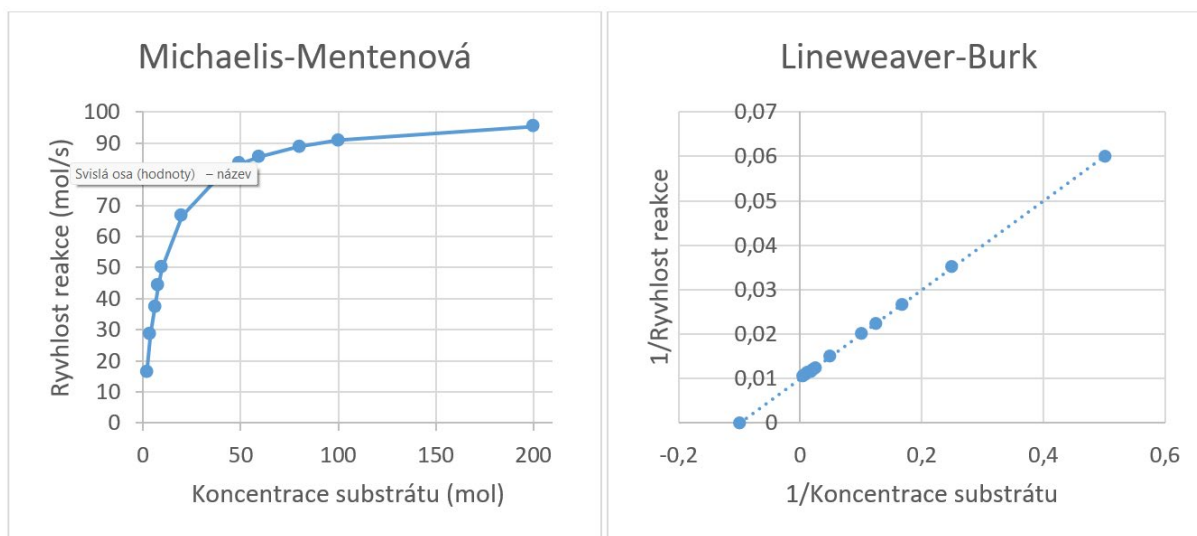
Základní rovnicí popisující reakci katalyzovanou enzymem je rovnice Michaelise-Mentenové (1),

$$v = \frac{d(P)}{dt} = \frac{V_{max}(S)}{K_M + (S)} \quad (1)$$

kde rychlost enzymové reakce v (množství produktu vytvořeného za 1 s) je definovaná maximální rychlostí reakce při plném nasycení substrátem V_{max} , Michaelisovou konstantou K_M a aktuální koncentrací substrátu S .

Parametry V_{max} a K_M lze experimentálně získat stanovením rychlosti reakce při různých koncentracích substrátu a následně nelineární regresí nebo linearizací.

Při linearizaci podle Lineweavera a Burka vynášíme jako osu y $1/v$ a jako osu x $1/(S)$. Výsledkem je přímka (v ideálním případě), jejíž směrnice odpovídá K_M / V_{max} a úsek na ose y $1 / V_{max}$.



Obr. 3 Příklad výnosu reakční rychlosti proti koncentraci substrátu:

Vlevo: Křivka pro $K_m = 10$ mol a $V_{max} = 100$ mol/s; vpravo: stejná data, linearizovaná forma

Praktická část:

- Stanovení K_m a V_{max} ze závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu

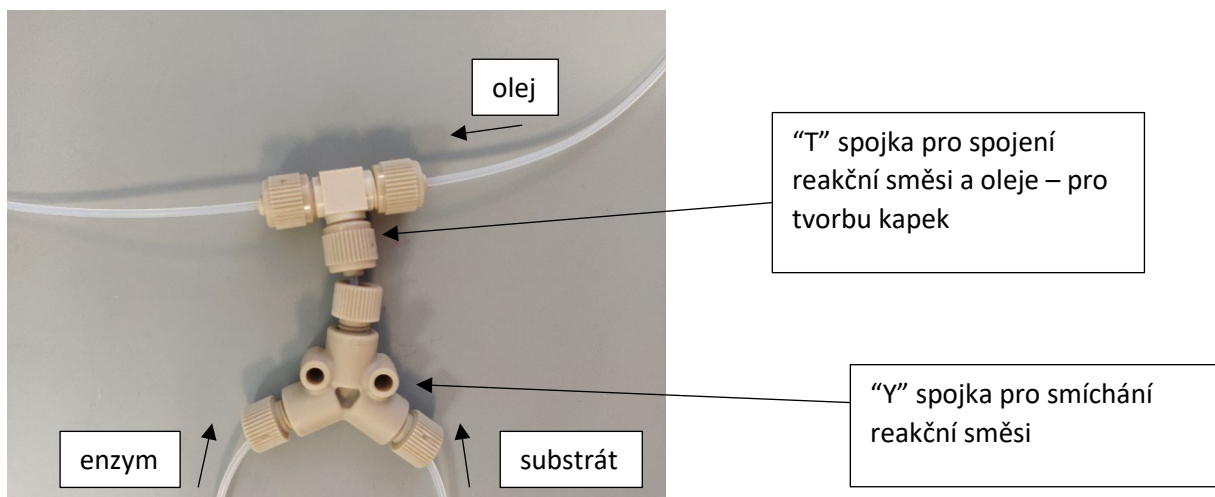
Materiál a vybavení:

- Enzym β -galaktosidáza E.coli v inkubačním pufru, koncentrace
- 2 mM fluorogenní substrát Fluorescein Di- β -D-Galactopyranosid (FDG) v dimethylsulfoxidu (DMSO)
- Inkubační pufr: 100 mM fosfátový pufr pH 7.3 obsahující 1 mM $MgCl_2$ a 112 mM 2-merkaptoethanol
- 100 nM roztok fluoresceinu v inkubačním pufru
- Fluorinert FC-40 (olejová fáze)
- Instrumentace kapičkové mikrofluidiky (mikroskop Olympus, zdroj excitačního záření Cooled pE-300, PMT detektor Hamamatsu, stříkačkové pumpy Nemesys, stříkačky Hamilton, trubičky a spojky)
- Nastavení detekčního systému: excitační vlnová délka: 450 nm; emisní filtr: 510 – 560 nm; nastavená intenzita exc. záření na ovladači: 100; gain 5,5; zvětšení okuláru: 20 X; interval záznamu: 0,004 s

Pracovní postup:

A: Postup analýz, sestavení aparatury

1. Sestavíme trubičky a spojky podle obrázku; stříkačky vyfoukáme stlačeným vzduchem a plochy pístů a těsnění spojek očistíme lepicí páskou od prachu.



Obr. 4 Trubičky spojené pomocí spojek:

Zjednodušené zapojení bez míchacích kliček, smíchaná reakční směs je proudem olejové fáze „utrhována“ na kapky, které jsou unášeny směrem k detektoru

2. Do stříkaček naplníme daný objem roztoků a Fluorinert FC-40 jako olejovou fází, dbáme aby ve stříkačkách ani trubičkách nezůstávaly bublinky vzduchu, ze stříkačky je případně opatrně vyklepeme.
3. V ovládacím softwaru nastavíme odpovídající objemy roztoků ve stříkačkách, stříkačky vložíme do pumpy a všechny spoje přiměřeně utáhneme rukou
4. Spustíme počáteční průtoky pro ustálení toku po dobu 1 minuty: 12 μl /min pro olej a celkově 12 μl /min pro reakční směs
5. Poté průtoky změňme v poměru (reakční směs : olej) na:

Stříkačka č.	Obsah stříkačky	Dávkovací průtok
1		
2		
3		
4		

- Po ustálení toku (cca 2 až 5 minut) spustíme záznam signálu po dobu 40 s (přibližně 50 kapek)
- Odečteme intenzitu fluorescence vrcholů píků (záznam středu kapky)

B: Kalibrační závislost

- Zásobní 100 nM fluorescein naředíte pomocí ředící řady na koncentrace podle tabulky do finálního objemu 500 μl . Používejte tmavé zkumavky aby se zabránilo znehodnocení fluoresceinu světlem („photobleaching“)

Finální koncentrace fluoresceinu (nM)	Objem 100 nM roztoku fluoresceinu (μl)	Přenášený objem (μl)	Objem inkubačního pufu (μl)
100	500		
50		250	250
20		200	300
10		250	250
5		250	250
1		100	400
0,2		100	400

- Sestavte trubičky a spojky podle obrázku 4
- Začněte koncentrací 0,2 nM a postupujte k vyšším koncentracím
- Roztok naplňte do stříkačky, a postupujte podle postupu popsaného v části A
- Zaznamenejte 40 s odezvy kapiček pro jednotlivé kalibrační roztoky a záznam vyhodnoťte
- Ze závislosti průměrné hodnoty intenzity fluorescence na koncentraci fluoresceinu zjistěte vynesáním do grafu kalibrační závislost.

Rovnice kalibrační závislosti	
-------------------------------	--

C: Stanovení závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu

Příprava roztoků

- Při ředění FDG použijte tmavé zkumavky a roztoky držte na ledu až do měření, aby se zabránilo samovolné hydrolýze substrátu
- Ze zásobního 2 mM FDG připravte 500 μl 200 μM roztoku naředěním inkubačním pufrem.
- Podle tabulky připravte ředící řadou roztoky substrátu FDG. Roztoky včetně enzymu nechávejte do doby měření chladit.

Koncentrace FDG (μM)	Objem 200 μM roztoku FDG (μl)	Přenášený objem (μl)	Objem inkubačního pufu (μl)
200	500		
120		300	200
60		250	250
30		250	250
15		250	250

! koncentrace substrátu i enzymu v reakční směsi bude poloviční (míchání 1:1)

4. Sestavte trubičky a spojky podle obrázku
5. Nechejte při laboratorní teplotě pomalu rozmrazitroztok enzymu a rozvortexujte ho
6. Začněte s nejnižší koncentrací FDG
7. Roztok substrátu i enzymu naplňte do dvou stříkaček a postupujte podle postupu popsaného v části A
8. Zznamenejte 40 s odezvy kapiček pro jednotlivé koncentrace substrátu ve 3 měřících oknech, jejichž vzdálenost od smíchání enzymu se substrátem si запиšte.
9. Pořídte snímek kapek v reakční trubičce pomocí kamery integrované v mikroskopu, graficky odečtěte vzdálenost mezi kapkami (trojčlenkou, kdy jako měřítko použijeme vnitřní průměr trubičky: 0,254 mm); ze záznamu odečtěte časovou mezeru (jestliže víme že body záznamu se odečítají po 0,004 s) mezi průchodem jednotlivých kapek a z těchto hodnot vypočtete reakční čas v daných vzdálenostech od místa smíchání reakční směsi

Vzdálenost kapek (cm)	Čas mezi kapkami (s)	Rychlost kapek (cm/s)

10. Do tabulky запиšte reakční časy vypočítané pro jednotlivá měřící okna, průměrné hodnoty intenzity fluorescence naměřené pro jednotlivé koncentrace FDG (n=60) v jednotlivých měřících časech a pomocí směrnice přímky získané z kalibrační závislosti je přepočítejte na koncentraci fluoresceinu

FDG v reakční směsi (μM)	Reakční čas (s)					
	cm	cm	cm	cm	cm	cm
	Intenzita fluorescence			Koncentrace fluoresceinu (nmol/l)		
100						
60						
30						
15						
7,5						

Linearizace dle Lineweavera-Burka; výpočet K_m a V_{lim}

11. Koncentraci fluoresceinu (osa y) v závislosti na čase (osa x) pro jednotlivé koncentrace FDG vynesete do grafu v Excelu a získané směrnice přímek ($y=ax+b$), odpovídající změně koncentrace fluoresceinu za 1 s (její jednotky jsou nmol/l.s) запиšte do tabulky níže; vypočítejte rychlost reakce při jednotlivých koncentracích FDG vztaženou na 1 mg enzymu (podíl směrnice v nmol/l.s a koncentrace enzymu (finální koncentrace po smíchání v mg/l) se rovná reakční rychlosti v nmol/s.mg)
12. Následně vypočítejte $1/C_{FDG}$ a $1/v_0$ které použijte jako hodnoty x a y resp. pro linearizaci podle Lineweavera-Burka a získaný graf vložte pod tabulku (výsledkem by měla být lineární závislost, na ose x hodnoty $1/C_{FDG}$ a na ose y $1/v_0$)

C_{FDG} : konc. FDG v reakční směsi (μM)	Směrnice (nmol/l.s)	V_0 : Rychlost reakce (nmol/s.mg)	$1/C_{\text{FDG}}$	$1/v_0$
100				
60				
30				
15				
7,5				

Graf linearizace dle Lineweavera-Burka:

13. Hodnota směrnice přímky odpovídá K_m/V_{lim} a úsek $1/V_{\text{lim}}$. Vypočítejte K_m a V_{lim} reakce a hodnoty запиšte do tabulky

K_m	
V_{lim}	

Závěr: