

SPEKTRÁLNÍ METODY

- ◆ **SPEKTROFOTOMETRIE / TURBIDIMETRIE / FLUORIMETRIE / LUMINOMETRIE**
- ◆ **STANOVENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT**
 - stanovení hladin enzymů;
 - sledování genové exprese (reportérový gen);
 - aktivace enzymů (např. PLC v signální transdukci)
 - vizualizace proteinů a NA na gelech
- ◆ **IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ**
 - proteiny, nukleové kyseliny;
 - barvení organel; morfologie buněk
- ◆ **DALŠÍ INTRACELULÁRNÍ EFEKTY**
 - stanovení koncentrace Ca^{2+} , thiolových skupin (GSH, proteiny); membránový potenciál, pH;
 - cytotoxicita / viabilita / proliferace / apoptóza

TYPY SPEKTER

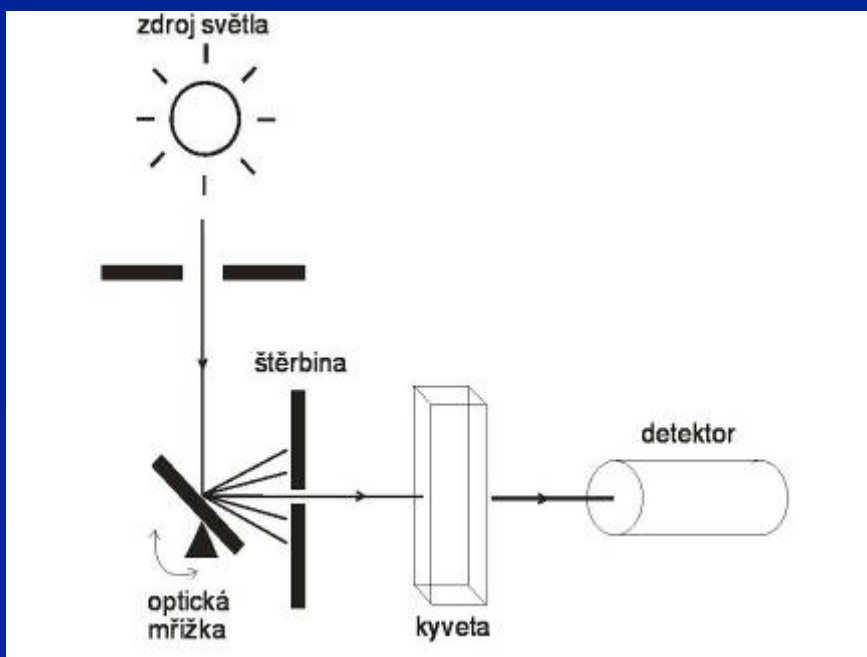
- ◆ **Absorpční spektrum: spektrum vnějšího záření je ochuzeno o frekvence (vln. délky), které odpovídají rozdílům energií buzených atomů (např. žlutá barva látky odpovídá absorpčnímu pásu 435-480 nm, červená 490-500 nm, modrá 580-595 nm)**
- ◆ **Energii molekuly lze vyjádřit součtem energie elektronové, energie vibrační a energie rotační ($E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$):**
 - **UV + VIS (absorpce - excitace valenčních elektronů), event. absorpce a emise (luminiscence);**
 - **IR absorpce - excitace rotač. a vibr. stavů molekuly (IR absorpční spektrum);**
 - **mikrovlny - excitace rotač. stavů molekuly (mikrovlnná abs. spektra) a excitace nepárových elektronů v magn. poli (paramagnetická rezonanční spektra)**
 - **radiovlny - excitace atomových jader (NMR spektra)**

SPEKTROFOTOMETRIE

Mnoho chem. látek pohlcuje elektromagnetické záření ve viditelné a ultrafialové oblasti (např. žluté pohlcené světlo – cca 580-595 nm; barva látky: modrá)

Absorbance (= jak mnoho světla bylo pohlceno látkou / měřeným roztokem):

$$A = \varepsilon \text{ (konstanta) } \times \text{ délka průchodu kyvetou } \times \text{ koncentrace látky}$$



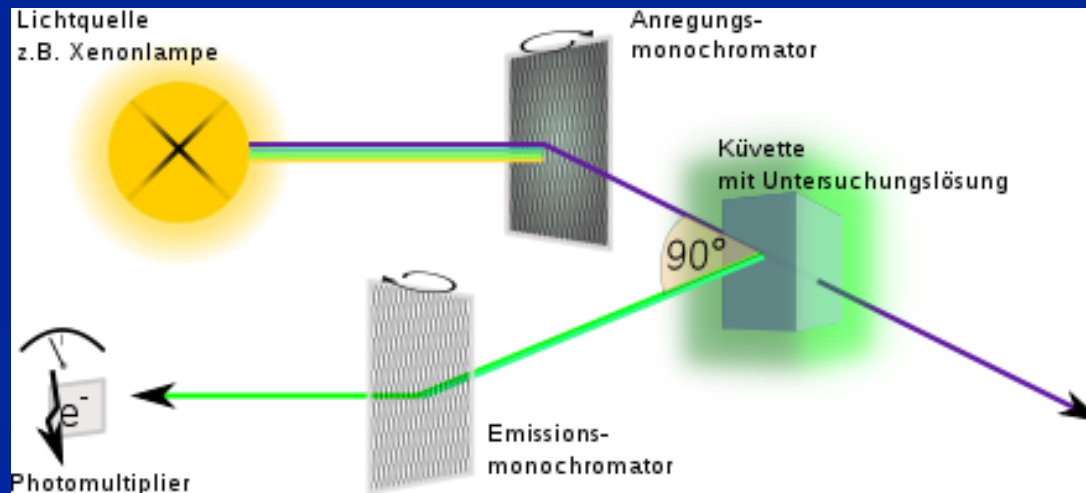
(koncentrace je úměrná absorbanci)

Varianty detekce:

- diodové pole (diode array);
- mikrodestička;
- užití jako detektor
v kapalinové chromatografii

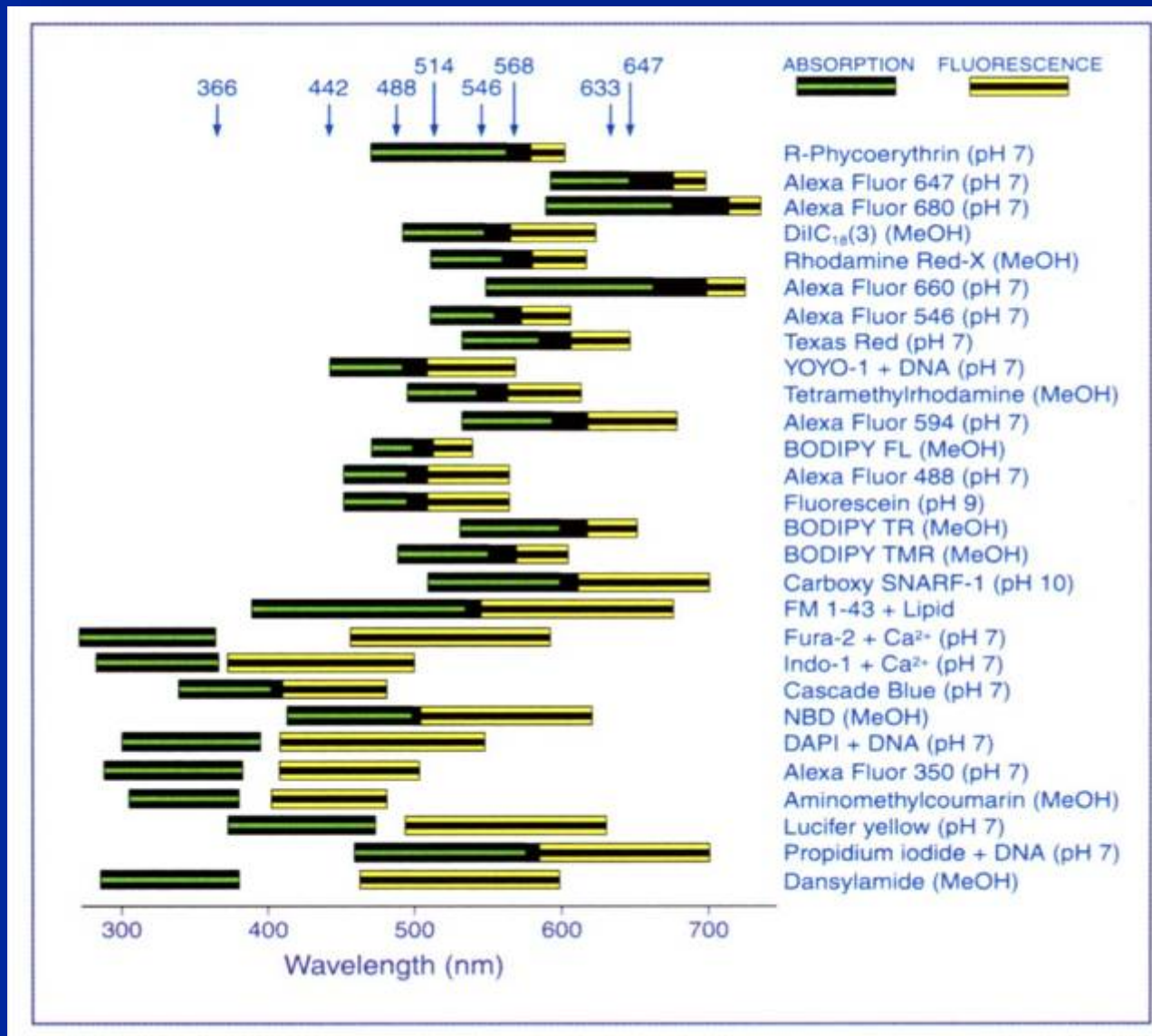
FLUORIMETRIE

Princip: elektrony chem. látky jsou excitovány světlem určité vlnové délky; při návratu excitovaných elektronů se část energie promění v teplo, část je vyzářena ve formě světla o nižší energii (= vyšší vlnové délce). Měří se intenzita vyzářeného světla v úhlu 90 stupňů; v určitém rozmezí úměrná koncentraci - použití standardního roztoku event. kalibrační křivky (více známých koncentrací měřené látky).



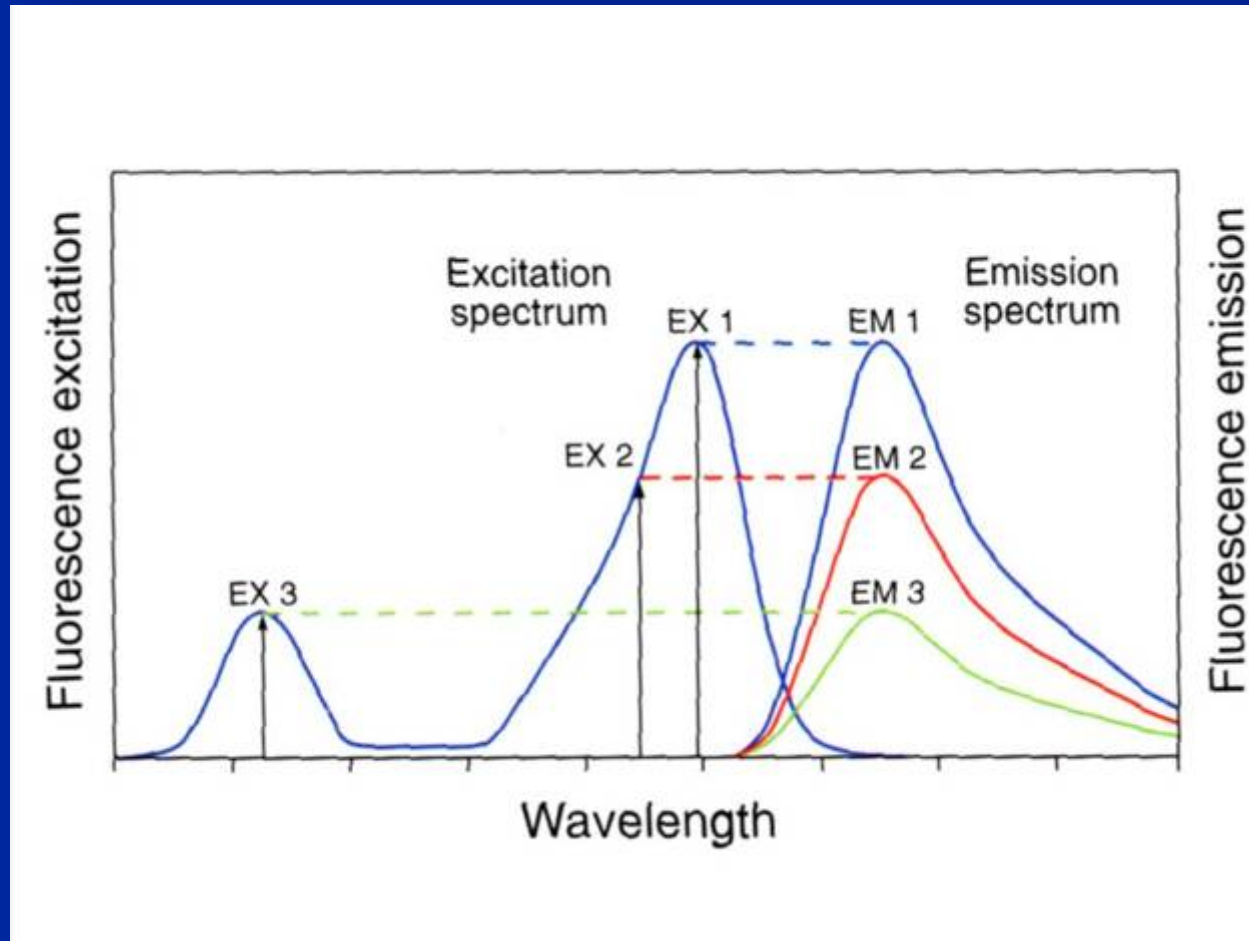
- spektrofluorimetr;
- fluor. microreader;
- fluor. detektor v HPLC;
- fluor. mikroskop
- atd.

FLUORIMETRICKÁ DETEKCE

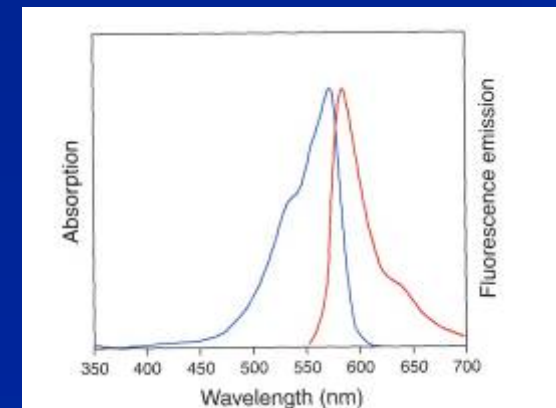


- enzymové aktivity
(fluorogenní substráty)
- histochemická detekce
- koncentrace látek
(Ca²⁺, DNA, NH₂-, SH-)
- pH
- membránový potenciál
- fluidita membrán
- derivatizace analytů
pro detekci v HPLC

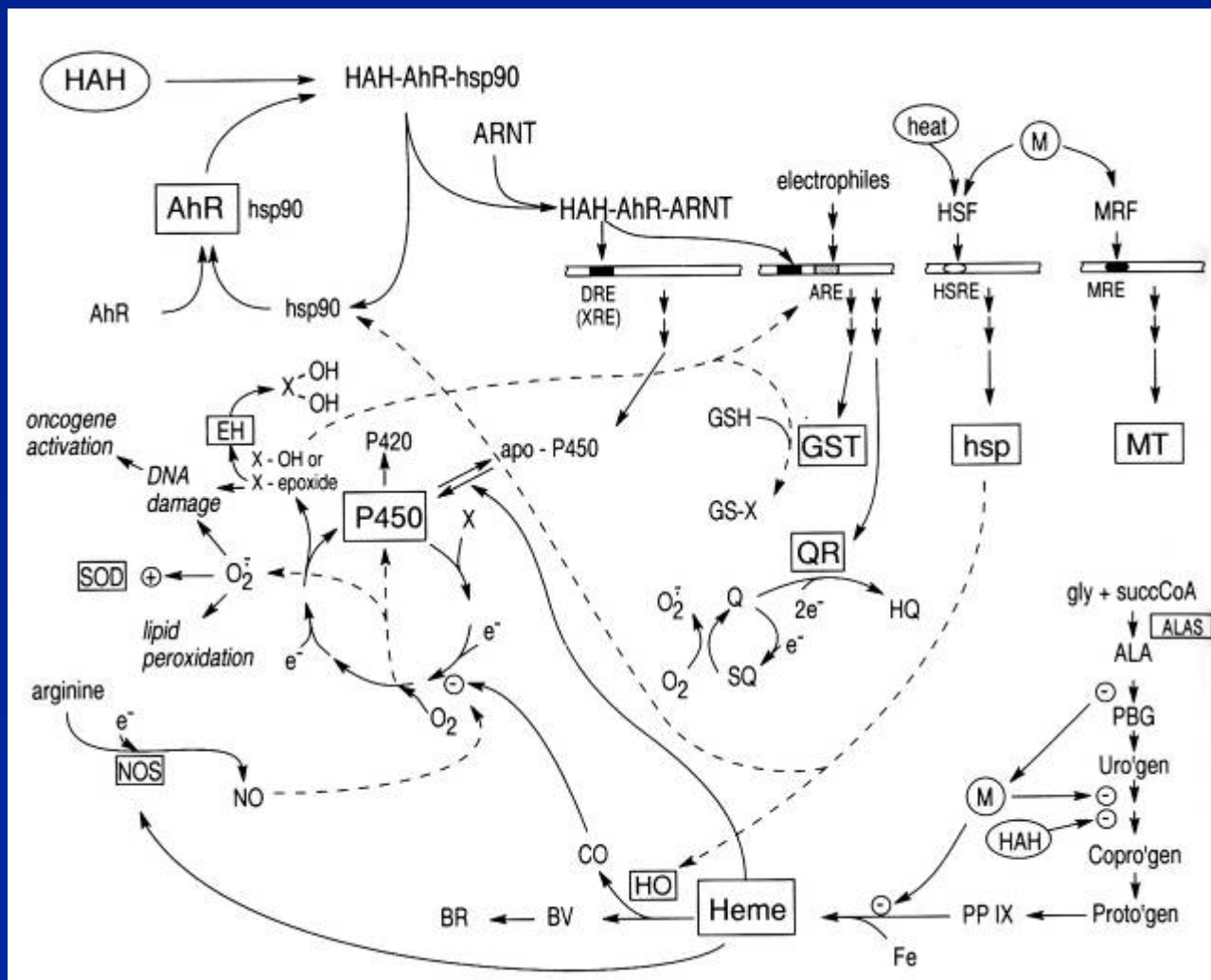
PŘÍKLAD EXCITAČNÍHO A EMISNÍHO SPEKTRA FLUORIMETRICKÝCH ČINIDEL



Příklad užití:
exc. a emisní spektrum
resorufinu



SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ / PŘÍKLAD STANOVENÍ BIOMARKERŮ OX. STRESU



Biotransformační
enzymy

Antioxidanty
(enzymy a
nízkomol. látky – GSH)

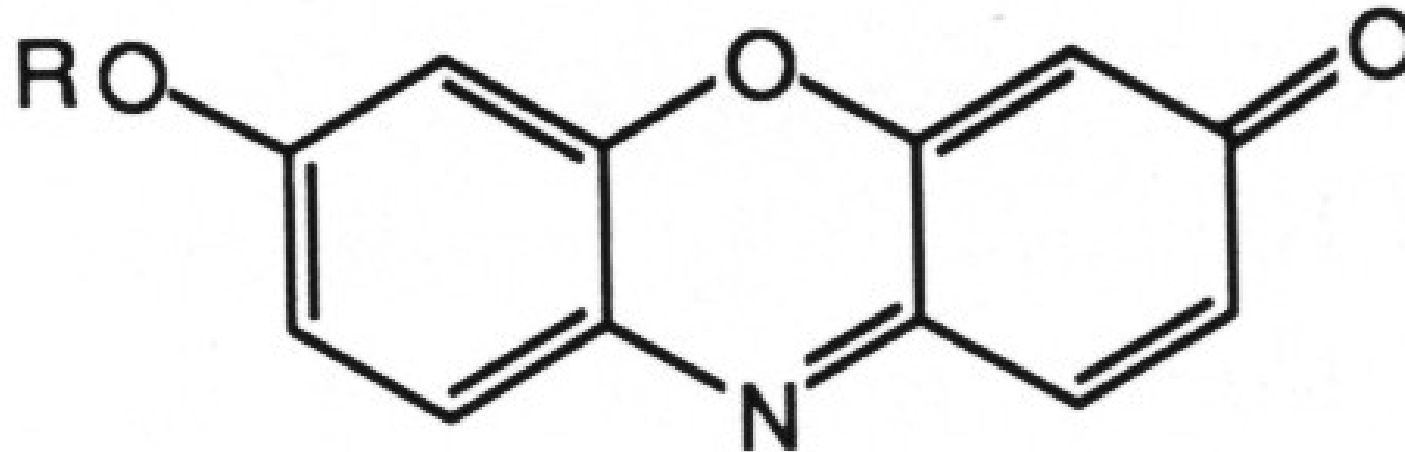
Produkce ROS

Produkty oxid. stresu
(lipidní peroxidace)

Zánětlivé procesy
(LOX, COX, cytokiny aj.)

SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

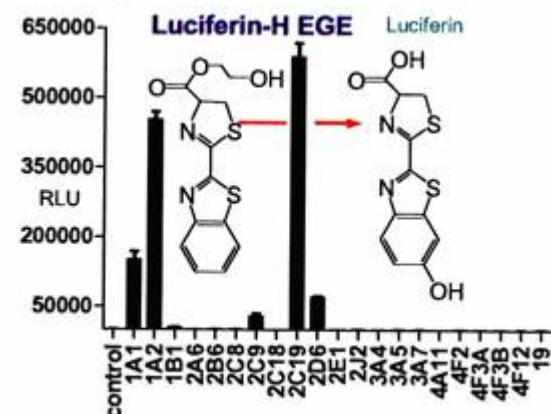
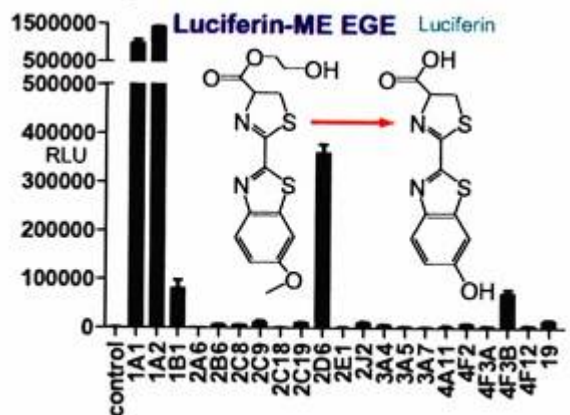
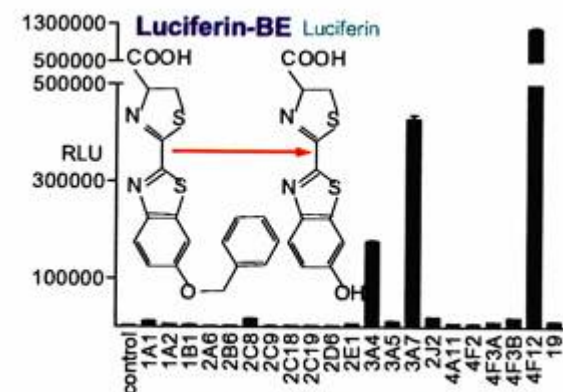
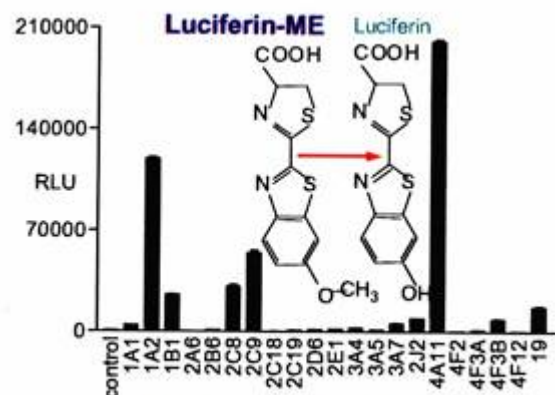
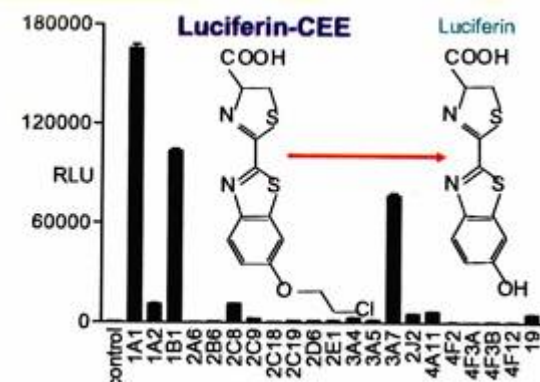
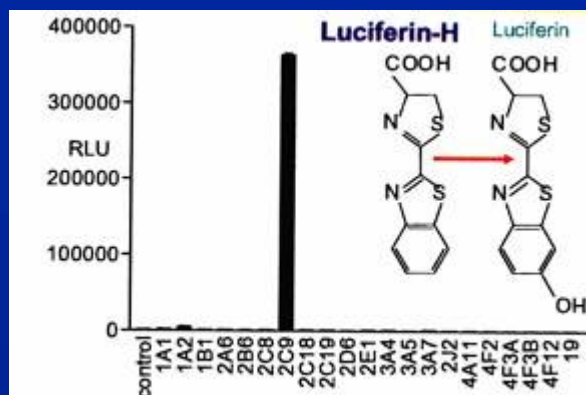
CYP1A1/1A2/1B1 (Ethyl-, Methyl-), CYP2B/3A (Pentyl-, Benzyl-)
spektrofluorimetrická detekce resorufinu (exc. 530-570, em. 585 nm)



**Alkylresorufins
(alkoxyphenoxazones)**

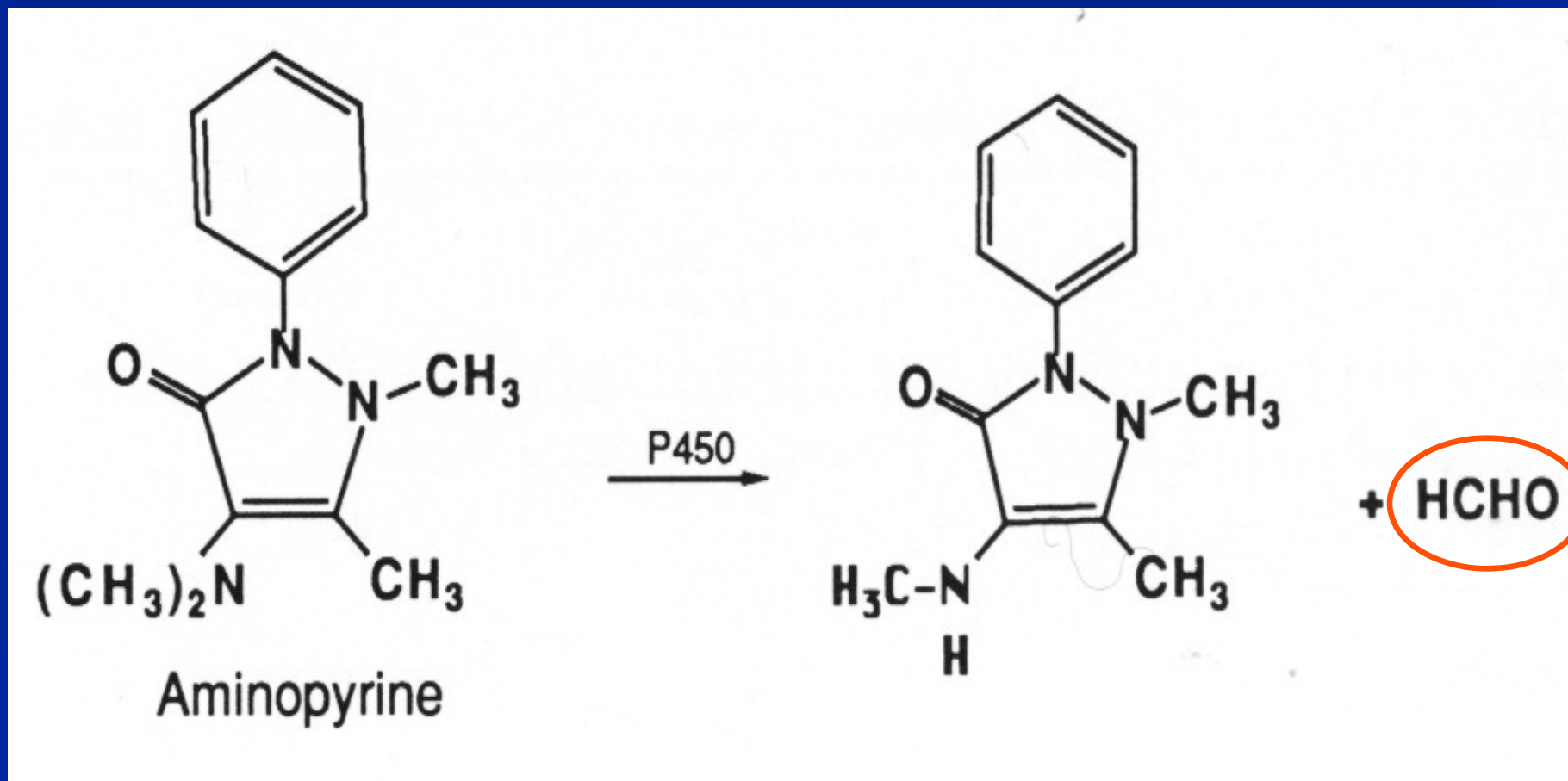
Stanovení aktivit CYP enzymů založené na chemiluminiscenční detekci luciferinu

(chemiluminiscence =
přímá přeměna chem.
energie na světelnou;
na rozdíl od fluorescence
není třeba vnější zdroj
světla)



SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

CYP3A4 (detekce: spektrofotometrické stanovení HCHO)



SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Glutathion-S-transferázy (GST); spektrofotometrická detekce; různá substrátová specifita jednotlivých isoenzymů; neselektivní substrát CDNB:



**1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
(CDNB)**

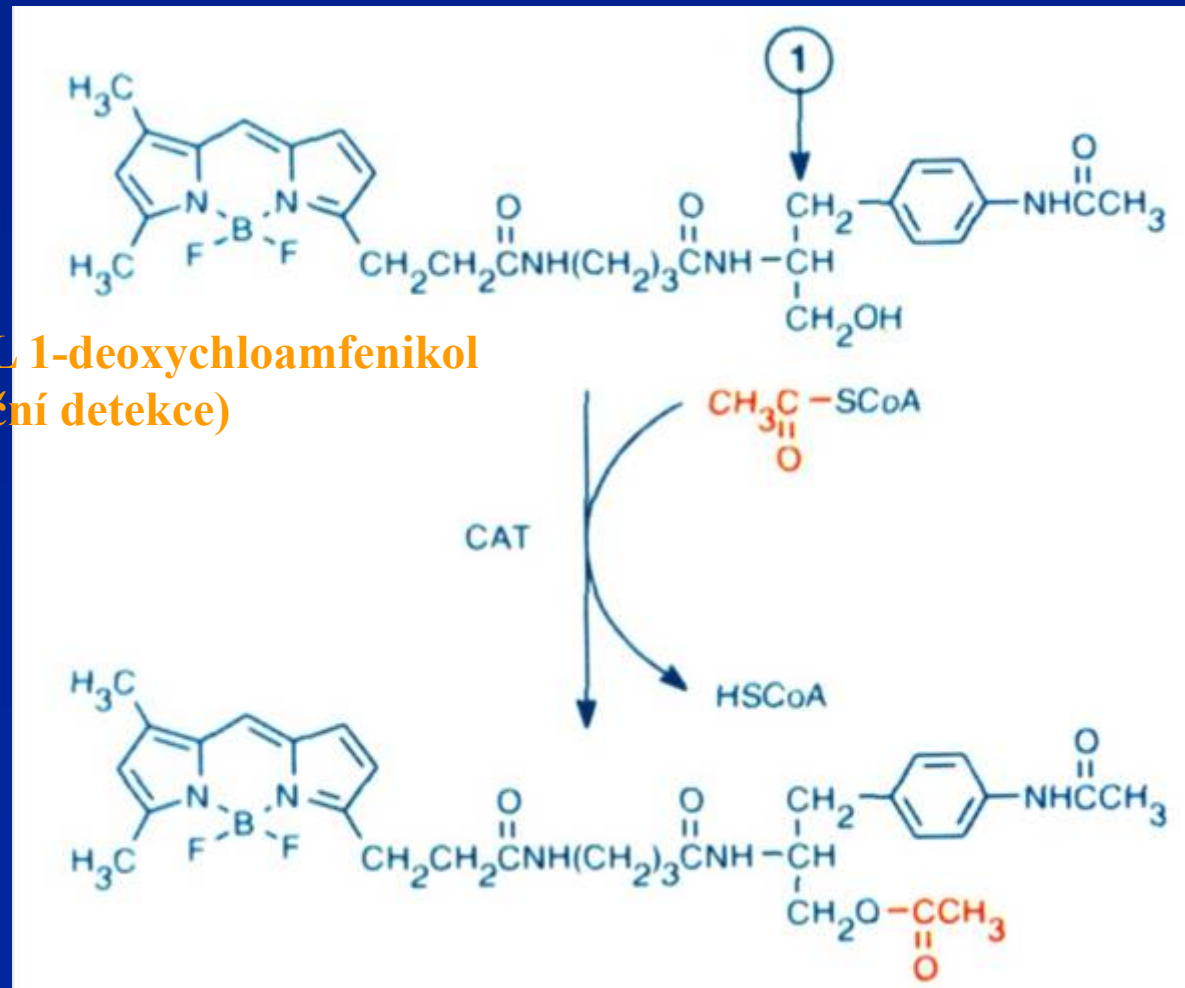
STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY REPORTÉROVÝCH PROTEINŮ

- ◆ **Chloramfenikolacetyltransferáza (CAT):**
 - separace ^{14}C -chloramfenikolacetátu pomocí TLC;
 - substrát značený BODIPY
- ◆ **β -Galaktosidáza (β -D-Gal) pomocí značeného fluorogenního substrátu:**
 - 4-methylumbelliferyl- β -D-Gal (360/449 nm, modrý produkt);
 - fluorescein- β -D-Gal (490/514 nm, zelený produkt);
 - resorufin- β -D-Gal (571/585 nm, červený produkt)
- ◆ **Luciferáza: chemiluminiscence (luciferin + ATP)**
- ◆ **Green Fluorescent Protein (GFP) - autofluorescence, pro stanovení hladiny exprese není třeba vnější substrát**
- ◆ **Alkalická fosfatáza (p-nitrofenylfosfát, 4-methylumbelliferylfosfát)**

SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

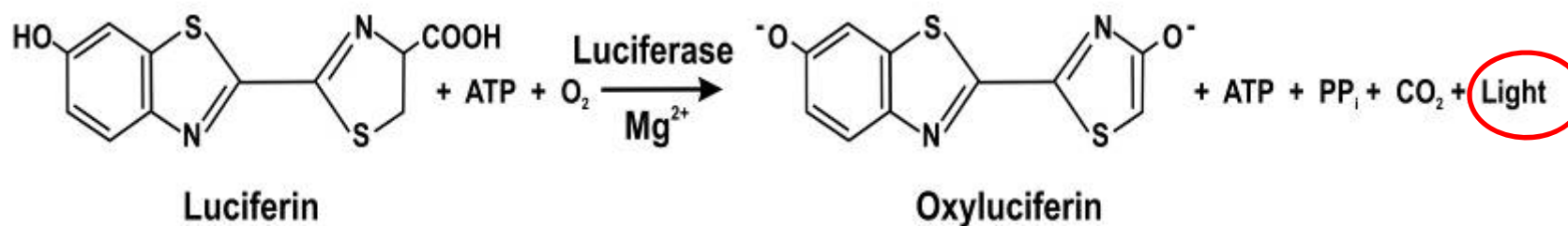
STANOVENÍ EXPRESE REPORTÉROVÉHO GENU **CAT**

BODIPY FL 1-deoxychloamfenikol
(fluorescenční detekce)



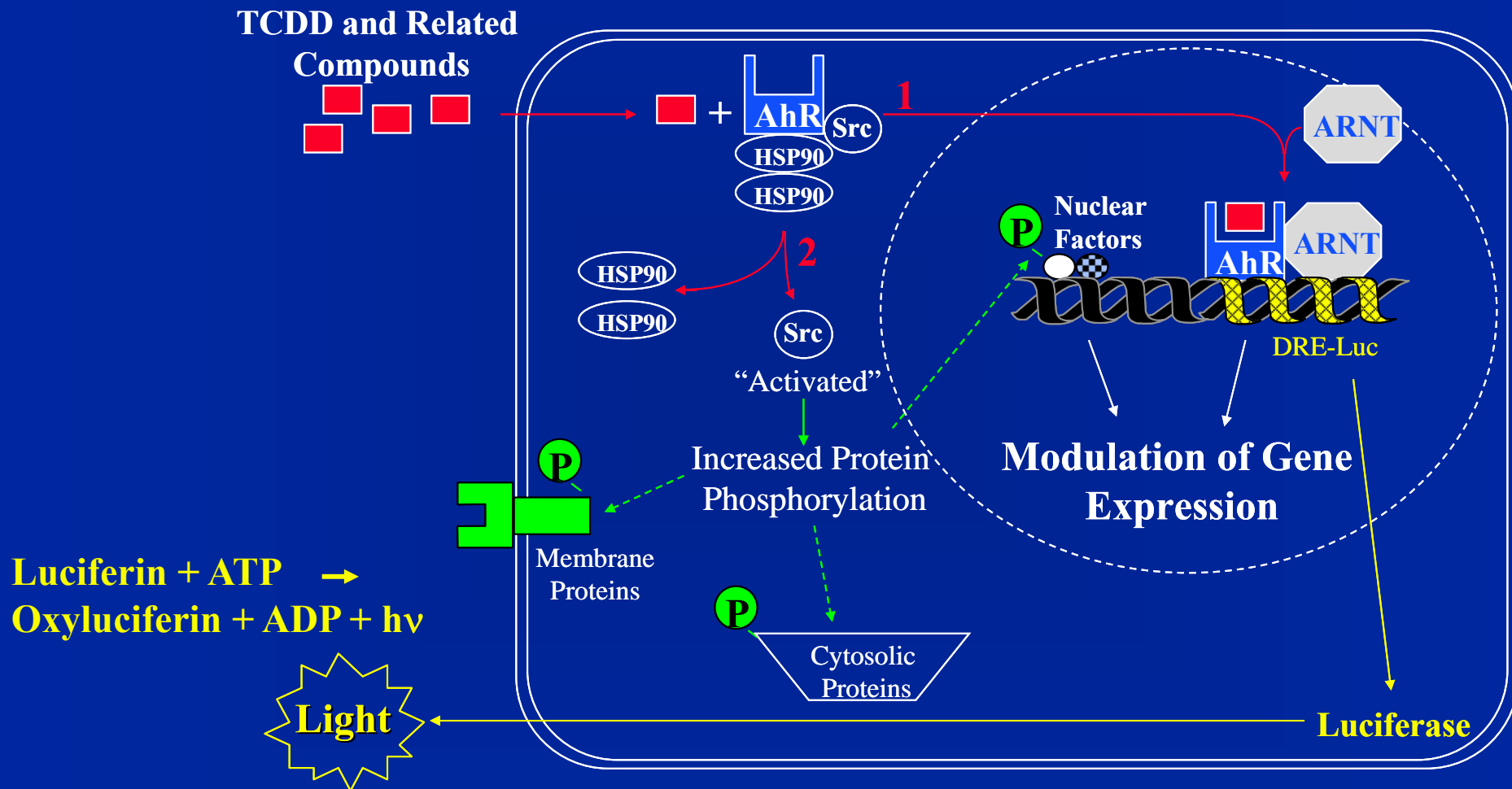
SUBSTRÁTY ENZYMOVÝCH REAKCÍ

STANOVENÍ EXPRESE (AKTIVITY) REPORTÉROVÉHO GENU **LUCIFERÁZY**



chemiluminiscenční detekce

AKTIVITA REPORTÉROVÉHO GENU - LUCIFERÁZY INDIKUJI AKTIVACI RECEPTORU: AhR-dependentní genová exprese

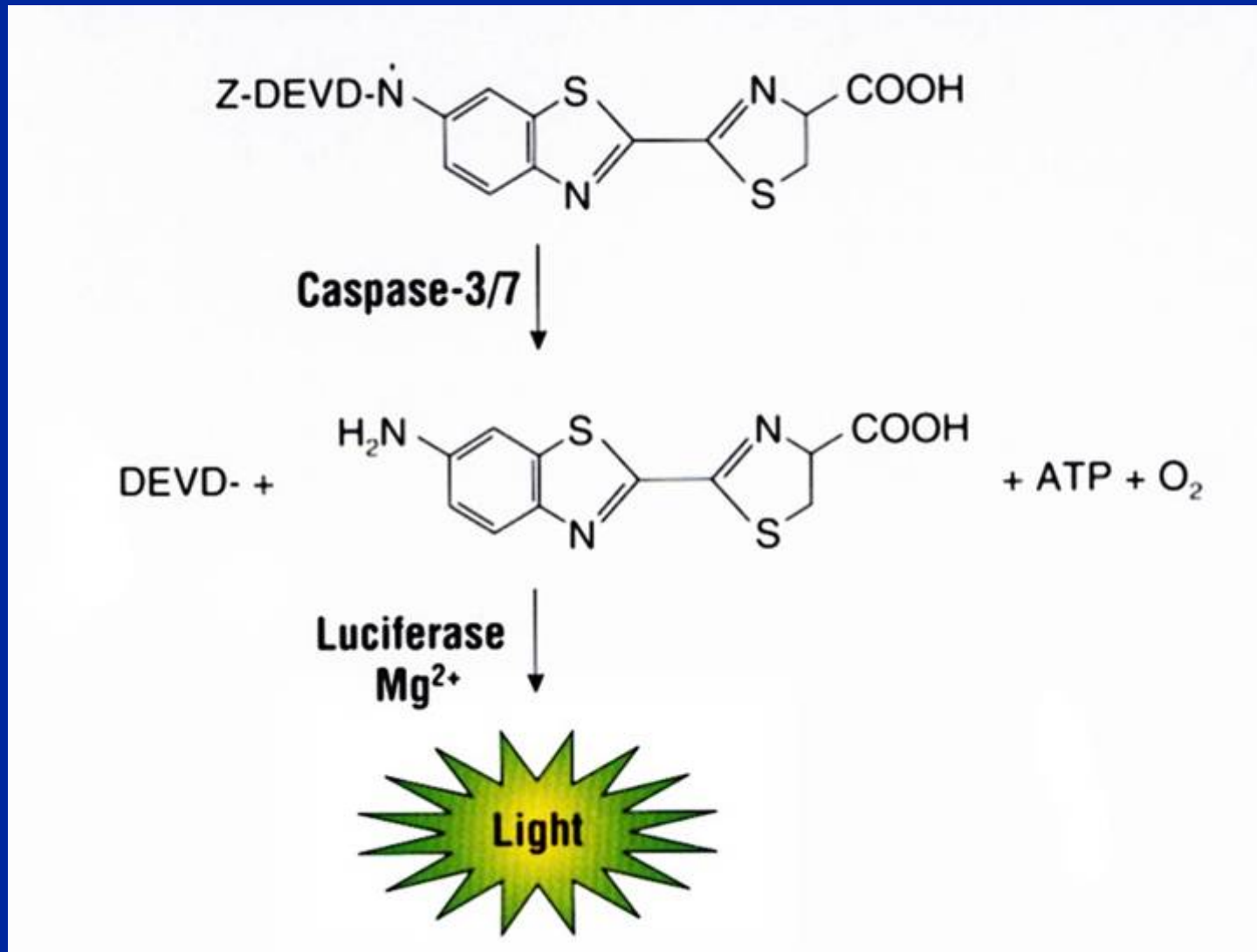


Adapted from Blankenship (1994)

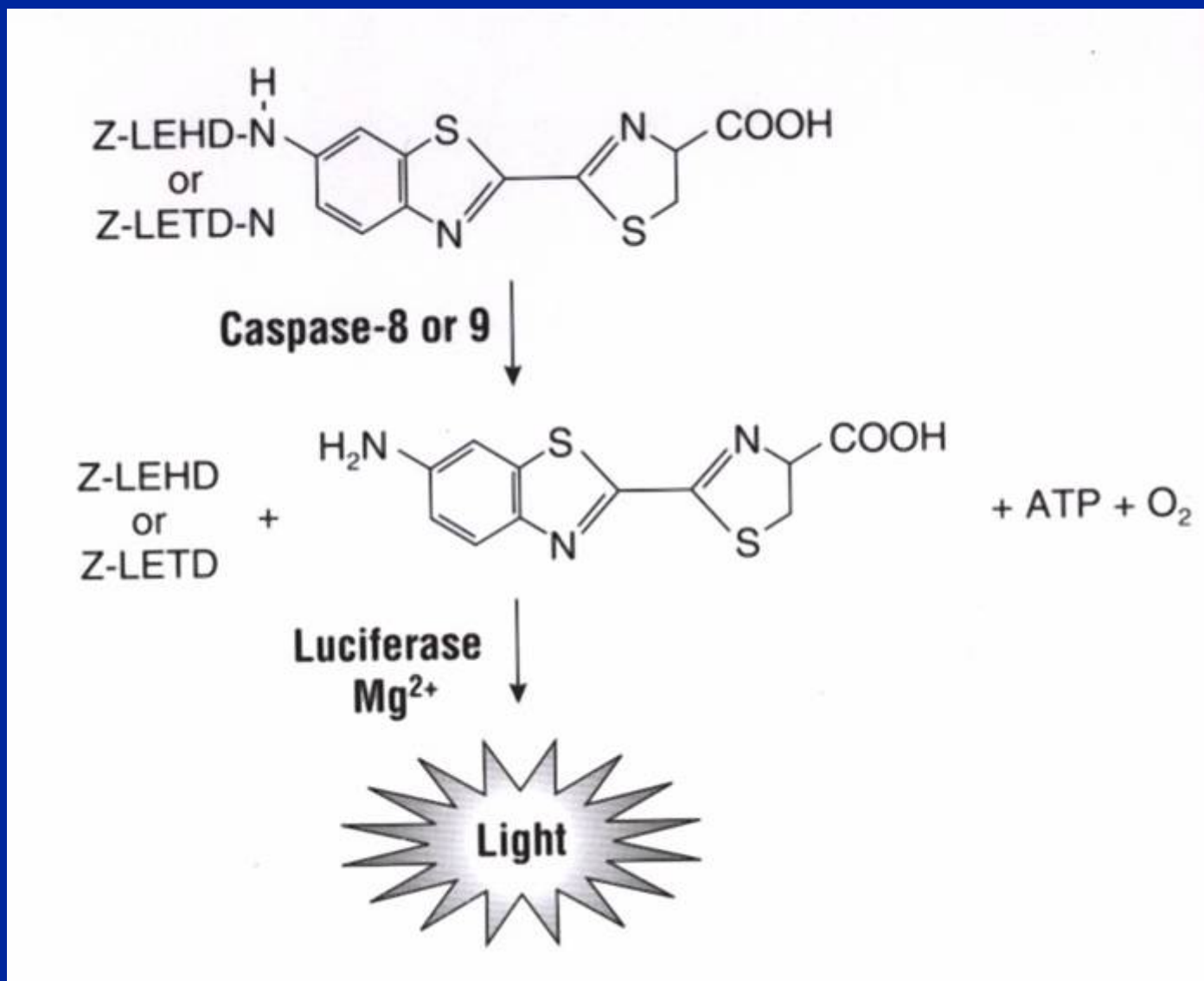
JAK MŮŽEME STANOVIT INDUKCI GENOVÉ EXPRESE ?

- ◆ **Příklad - stanovení transaktivace AhR:**
 - **exprese reportérového genu, chemiluminiscentní stanovení luciferázové aktivity (DR-CALUX)**
 - **stanovení exprese CYP1A1 mRNA (RT-PCR)**
 - **stanovení hladiny proteinu CYP1A1 (Western blot)**
 - **stanovení enzymové aktivity CYP1A1 (EROD)**

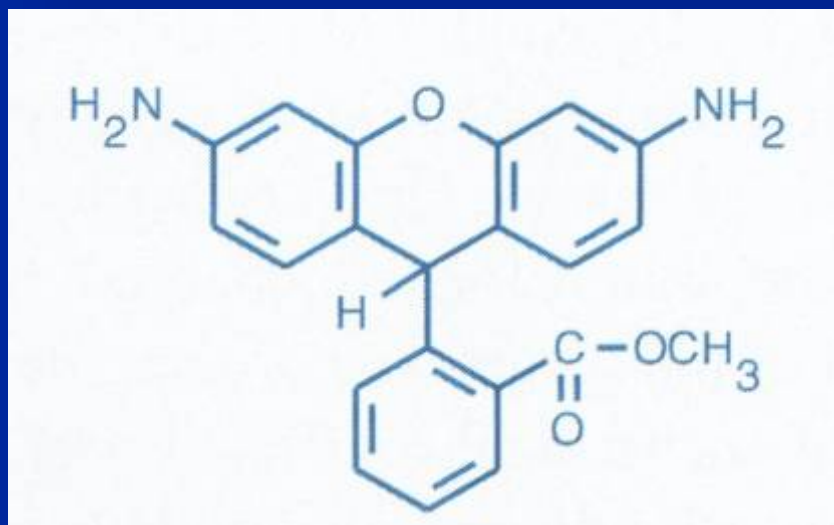
STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ APOPTÓZY



STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ APOPTÓZY



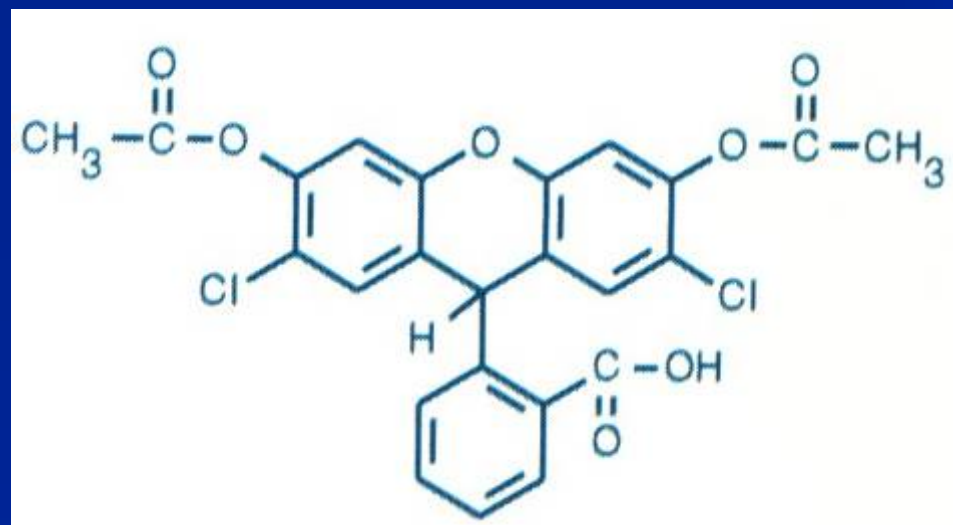
PRODUKCE ROS



Dihydrorhodamine 123
difunduje přes buněčné
membrány a je oxidován
na fluorescenční

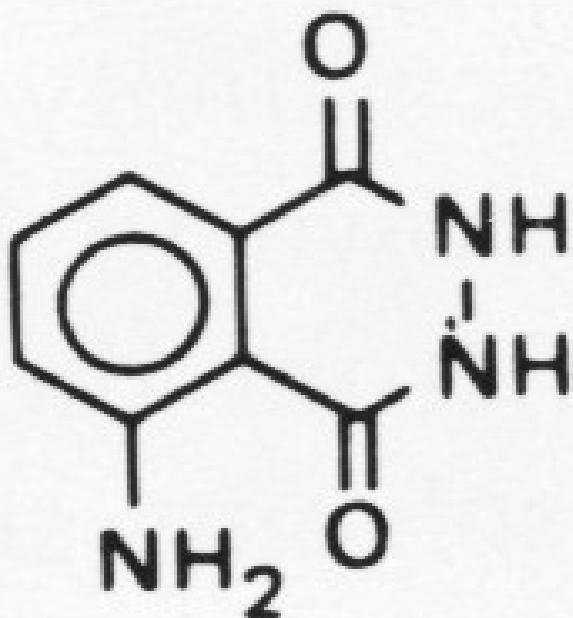
Rhodamine 123

(citlivý především na H_2O_2 ,
dále peroxynitrit a HOCl)



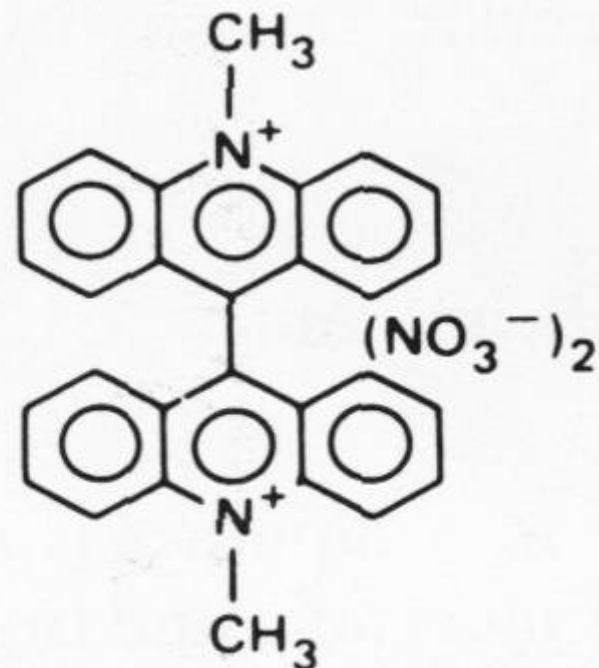
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
(dichlorofluoresceindiacetát) je po vstupu
do buňky podroben esterázové reakci;
detekuje ROS včetně NO (H_2O_2 , superoxid,
peroxyl $HOO\cdot$)

PRODUKCE ROS



Luminol

H₂O₂, superoxid, HO·,
HOCl, NO, HOO·



Dimethylbisacridinium
Nitrate (Lucigenin)

H₂O₂, superoxid

STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

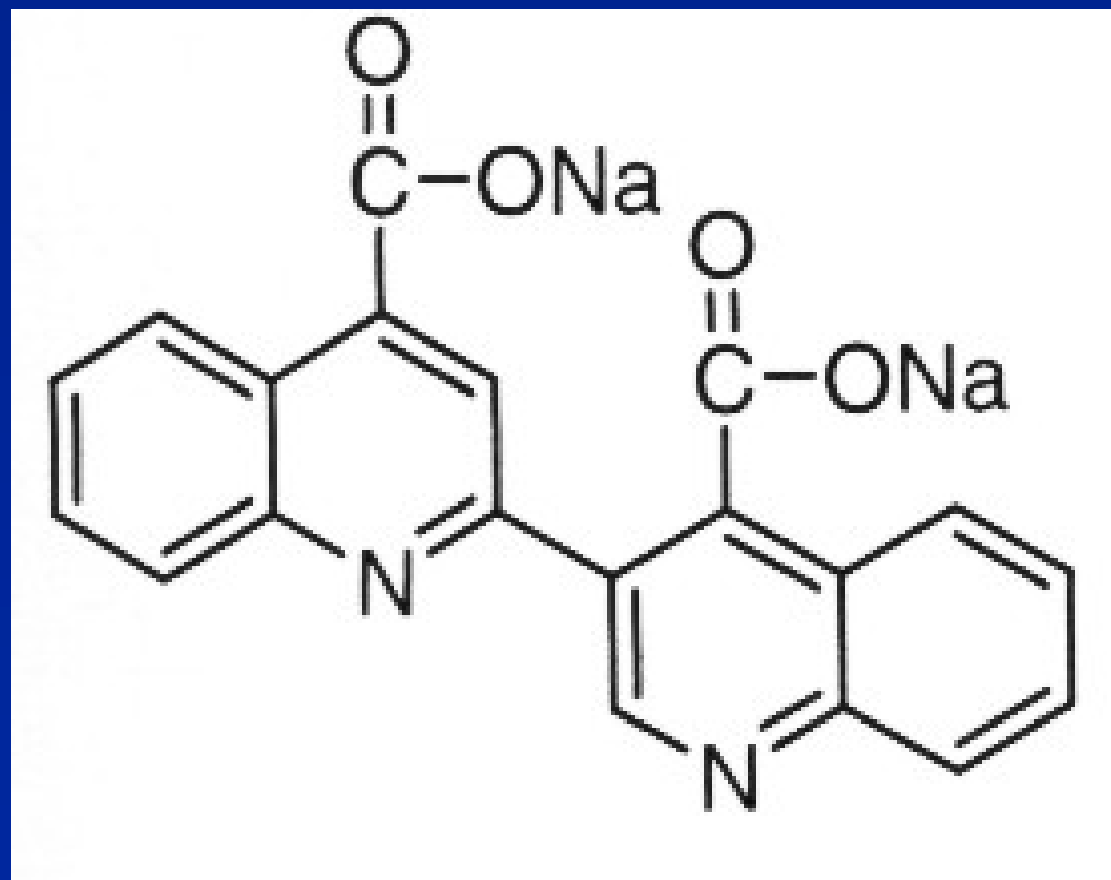
- spektrofotometricky (absorbance 280 nm);
- různá činidla selektivní na aminokyselinové zbytky, nejužívanější je stanovení pomocí kyseliny bicinchoninové (bicinchoninic acid, BCA):

Primární substrát:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$;

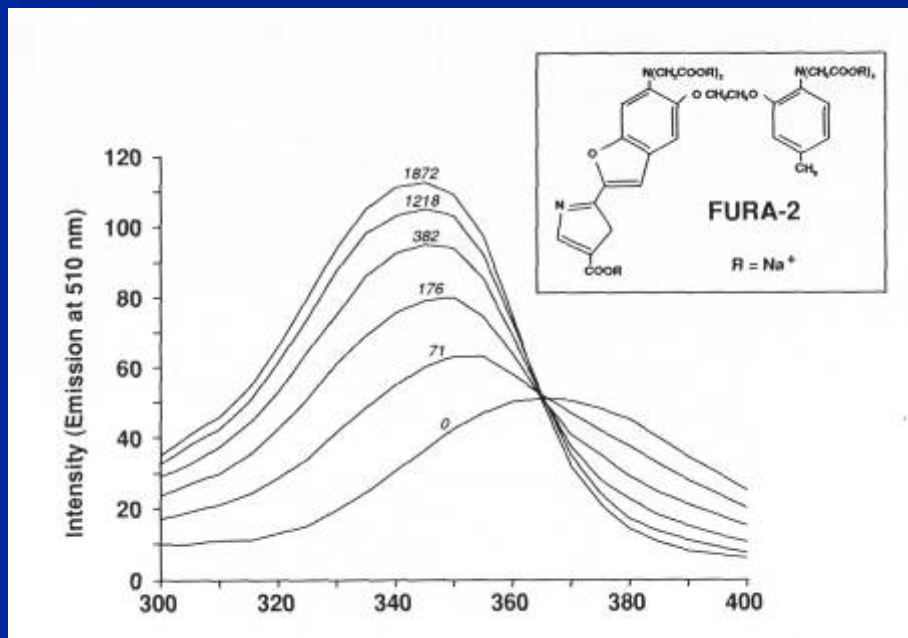
Cu(II) je proteiny redukován na Cu(I) a ten je detekován pomocí BCA;

fotometrické stanovení,
i v 96-jamkových destičkách;
kalibrace na BSA;
nízká citlivost metody na
přítomnost detergentů

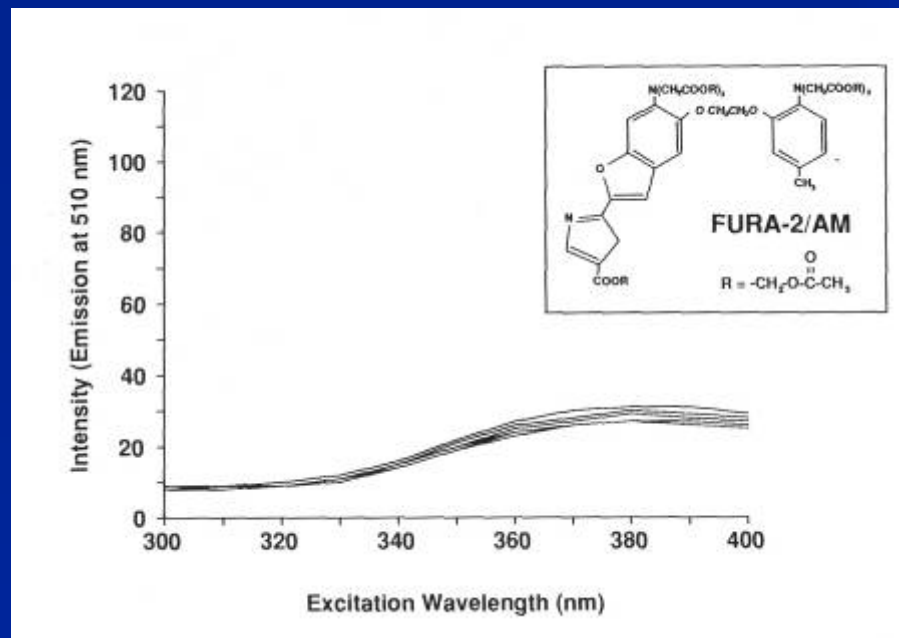


STANOVENÍ KONCENTRACE Ca^{2+}

Existuje řada fluorogenních sond, klasickým příkladem je Fura-2:



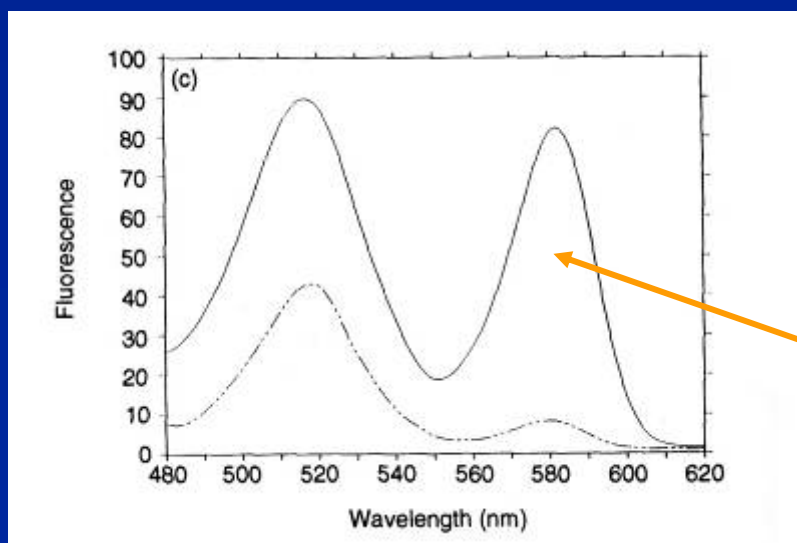
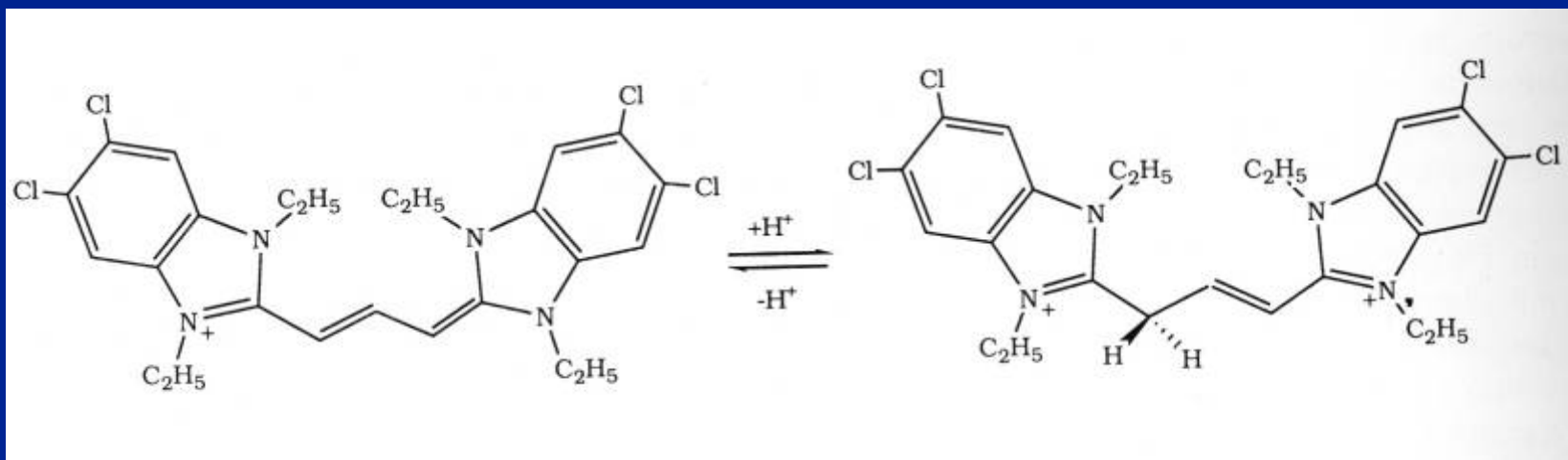
Calcium-senzitivní chemická sonda (zvyšující se koncentrace Ca^{2+} zvyšuje fluorescenci při excitaci 340 nm; detekce 510 nm)



Fura-2/AM (acetoxymethylester) má nízkou fluorescenci; po vstupu do buňky je hydrolyzován esterázami na Fura-2)

STANOVENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU

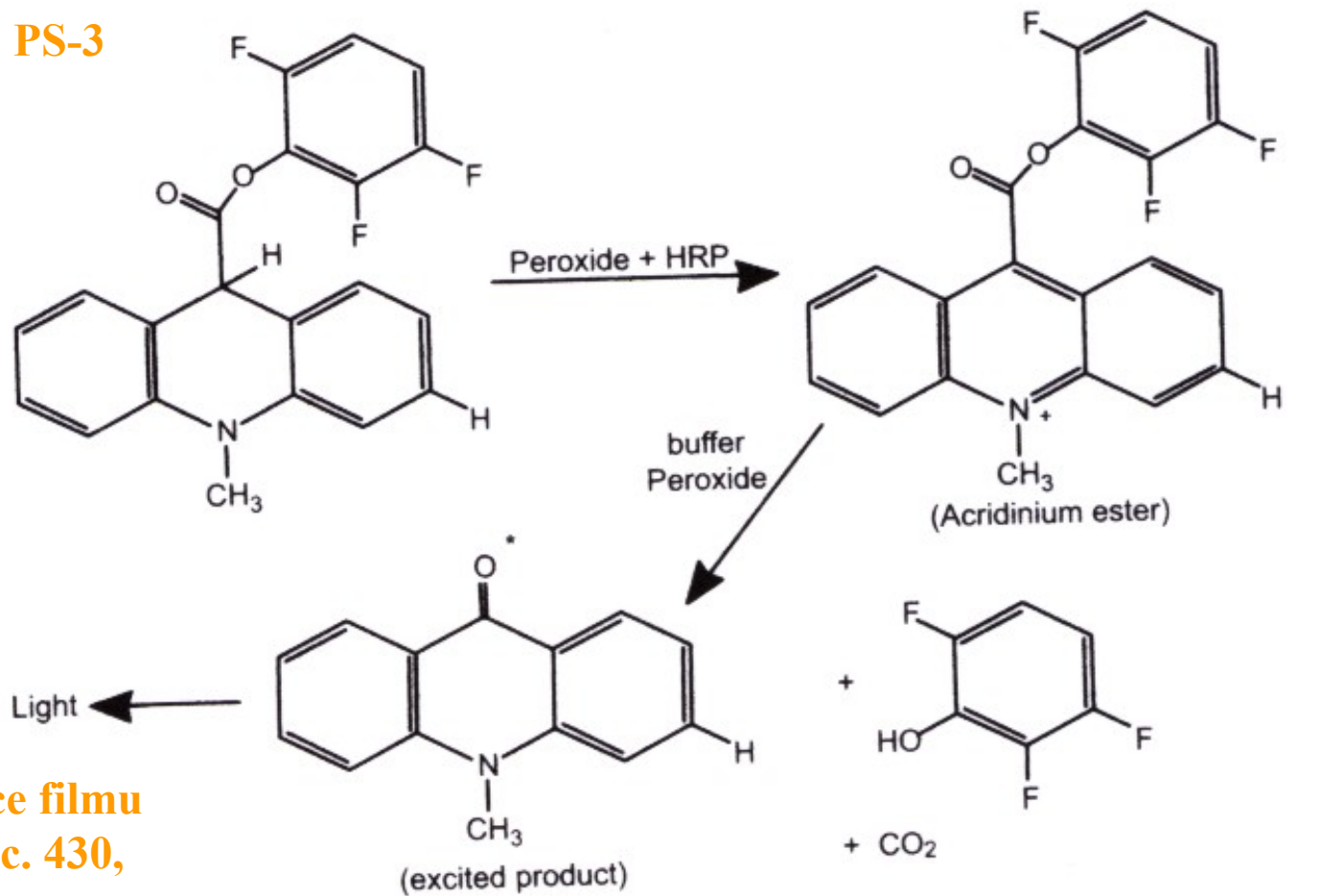
JC-1



závislost na pH
červený agregát JC-1

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents

Lumigen PS-3



Expozice filmu
nebo exc. 430,
em. 503 nm

DALŠÍ DŮLEŽITÉ SPEKTRÁLNÍ METODY

- ◆ Fotometrická detekce lipidní peroxidace pomocí kyseliny thiobarbiturové (detekuje hydroperoxydy lipidů)
- ◆ Stanovení aktivity NADPH oxidáz a „konzumace“ NADPH v buňkách (snížení absorpce při 340 nm)
- ◆ Stanovení cytotoxicity, viability, proliferace buněk
 - MTT (methylthiazoltetrazoliumbromid) se v mitochondriích přeměňuje na barevný nerozpustný formazan (pro kvantitativní stanovení je rozpustěn po inkubaci buněk s SDS)
 - XTT produkuje rozpustnou formu formazanu (opět fotometrická detekce)
 - Neutrální červeň - příjem do buněk
 - Kombinace calcein AM (fluorogenní esterázový substrát - zelený produkt) + ethidium homodimer-1 (ten vstupuje jen do mrtvých buněk a barví NA červeně)
- ◆ Další informace např. v užitečném katalogu firmy Molecular Probes (www.probes.com)