

ENZYMOVÉ BIOSENSORY II

Měření enzymových aktivit

Produkt měřeného enzymu slouží jako substrát indikačního enzymu imobilizovaného v biokatalytické vrstvě.

Výhoda: nevadí zákal

Příklady stanovení:

laktátdehydrogenasa

α -amylasa

transaminasy

arginasa

Laktátdehydrogenasa

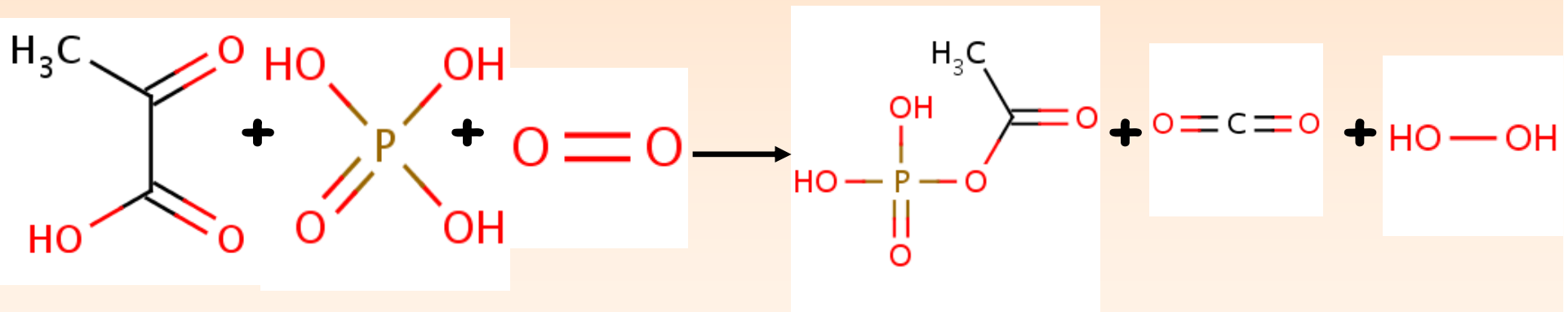
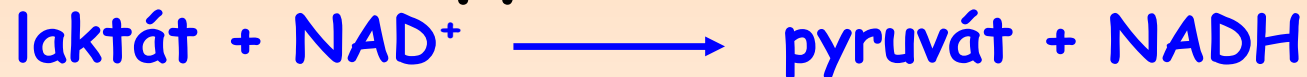
Význam: klinická praxe

normální hodnoty: muži: 63 až 155 U/l

ženy: 62 až 131 U/l

vzrůstá při hepatitidě nebo infarktu

Měření: substrátem je laktát a měří se produkce pyruvátu pomocí sensoru s pyruvátoxidásou



α -amylasa

- Význam:** klinická praxe: v séru
normální hodnoty: 60 až 150 U/l
vzrůstá při akutní pankreatitidě
potravinářský průmysl
výroba pracích prášků
- Měření:** substrát maltopentaosa a na biosensor
je imobilizována glukosaoxidas
nebo je substrátem škrob a pro detekci
je imobilizována glukosaoxidas +
 α -glukosidas

Transaminasy

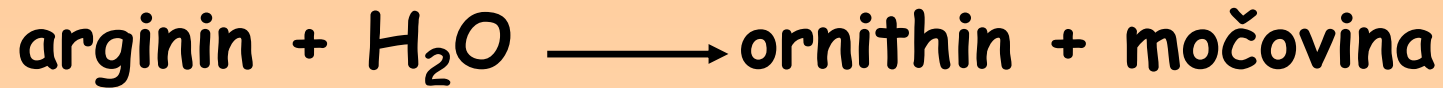
Význam: indikují funkci jater a objevují se i při infarktu
aspartátaminotransferasa (AST):

$L\text{-aspartát} + 2\text{-oxoglutarát} \longrightarrow \text{oxalacetát} + L\text{-glutamát}$

$\text{oxalacetát} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow L\text{-malát} + \text{NAD}^+$

Norma: do 0,67 $\mu\text{kat/l}$
při patologických stavech
(hepatitida, alkoholismus)
100 x až 1000x vyšší hodnoty

Arginasa



Stanovení pomocí sensoru na stanovení močoviny

(ureasa) NH_3

potenciometrie

konduktometrie

Glukosový sensor

Glukosaoxidas (H₂O₂)

Ize stanovit následující enzymy:

- alkalická/kyselá fosfatasa (glukoso-6-fosfát)
- β-glukosidas (glukoso-6-fosfát)
- glukoamylasa (maltosa)
- invertasa (sacharosa)
- trehalasa (α,α' -trehalosa)

Fenolový sensor

tyrosinasou (O_2)

- alkalická/kyselá fosfatasa (fenylfosfát)
- β -galaktosidasa (fenyl- β -D-galaktosid)
- β -glukosidasa (fenyl- β -D-glukosid)
- β -glukuronidasa (fenyl- β -D-glukuronid)

Stanovení inhibitorů

Reakce inhibitor + enzym = snížení aktivity imobilizovaného indikačního enzymu.

Měření inhibitorů je velmi citlivé:

molekula analytu zablokuje molekulu enzymu (molekula enzymu pak nepřemění mnoho molekul substrátu)

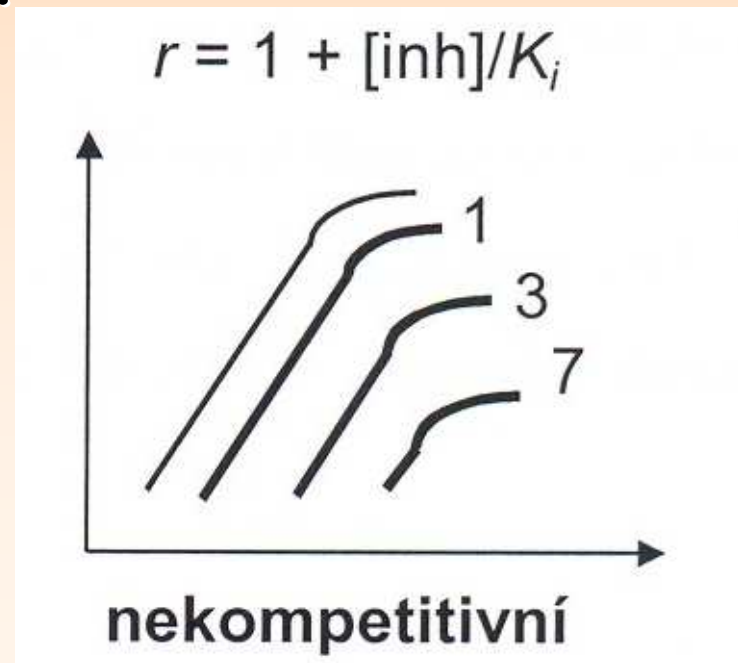
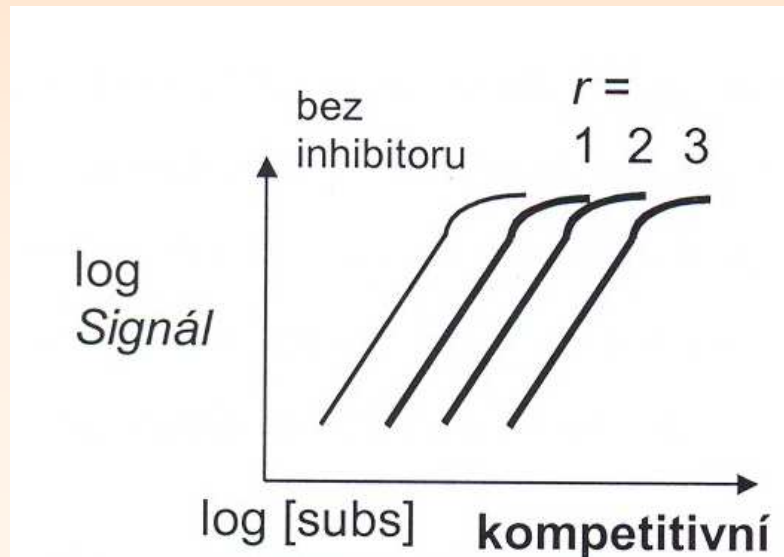
Stanovení inhibitorů:

- ✓ reverzibilní
- ✓ irreverzibilní

Jak zjistit typ inhibice?

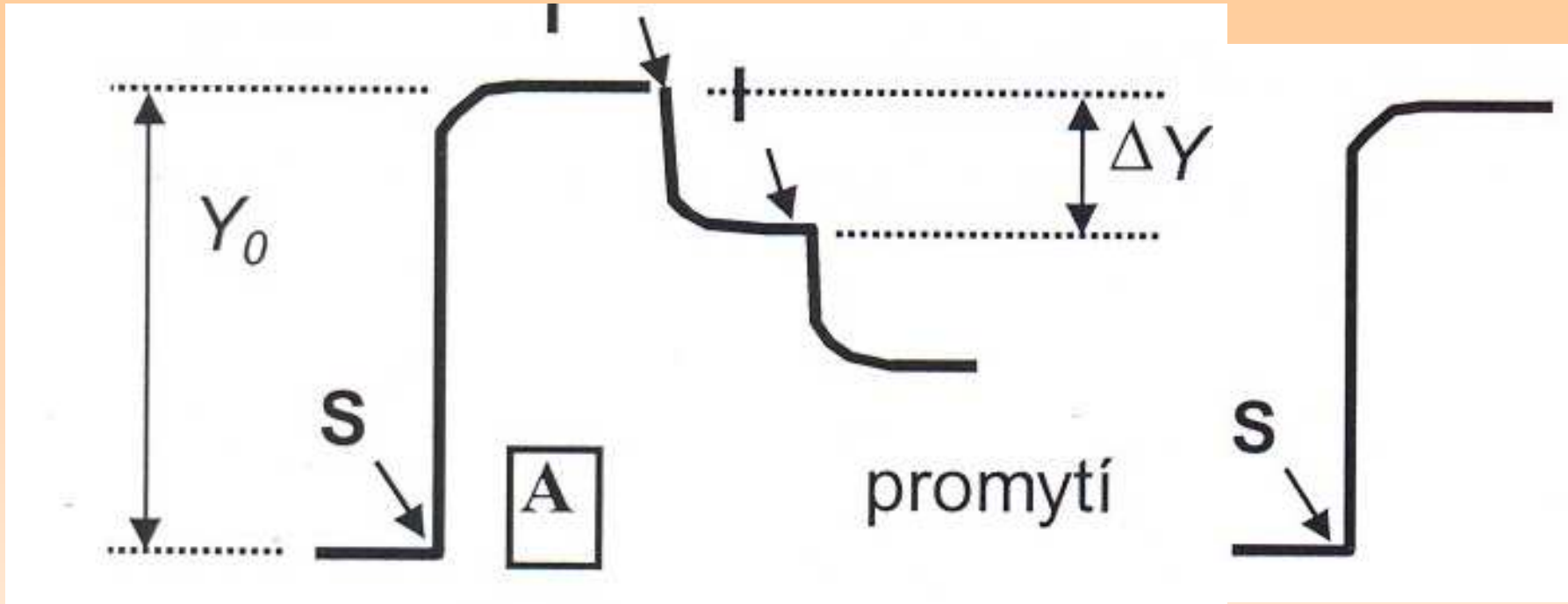
odezva sensoru na substrát
v přítomnosti rostoucích koncentrací
inhibitoru.

Podle tvaru kalibračních křivek
v dvojitém logaritmickém zobrazení
lze zjistit jak se inhibitor
s imobilizovaným enzymem váže.



Stanovení reverzibilních inhibitorů

- ✓ Výchozí signál Y_0 biosensoru se substrátem
- ✓ Do reakční směsi přidá vzorek s inhibitorem = pokles signálu ΔY , který je přímo úměrný koncentraci inhibitoru.
Změna signálu je obvykle rychlá a brzy dosáhne ustáleného stavu.
- ✓ Po promytí je možné celý proces opakovat, přitom výchozí signál se substrátem je beze změny, nedošlo k poklesu aktivity v biorekogniční vrstvě.

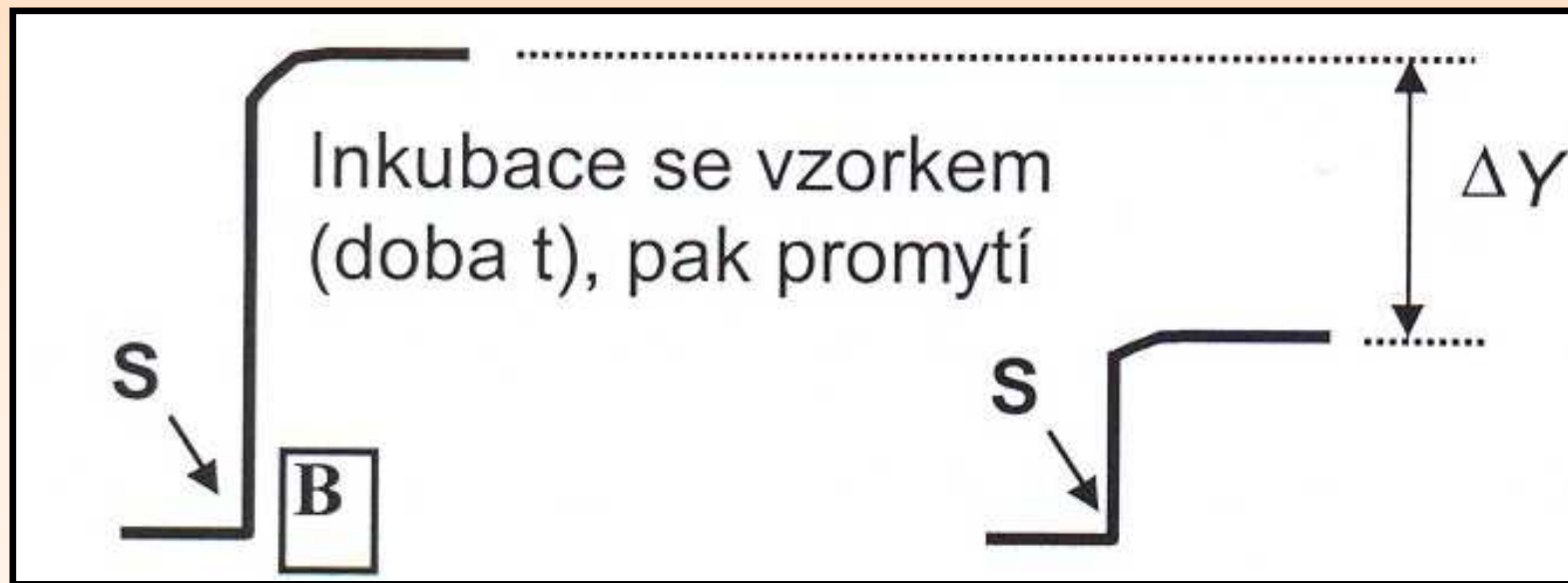


S substrát
I inhibitor
 ΔY signál

Stanovení irreverzibilních inhibitorů

Inkubační postup

- ✓ Stanoví výchozí signál
- ✓ Následuje inkubace s inhibitorem
- ✓ Stanoví se zbytkový signál ΔY

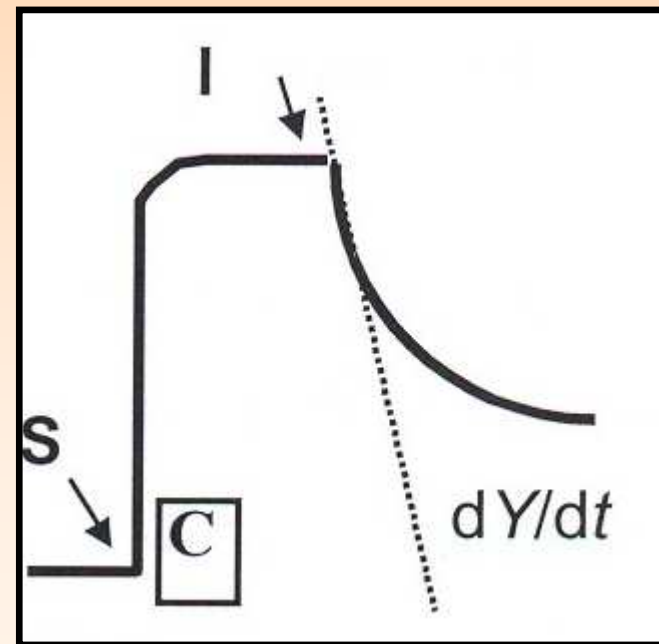


Kinetické měření

Inhibitor se přidá přímo do směsi se substrátem a sleduje se časový pokles signálu dY/dt

Nevýhoda:

opakované použití biosensoru není neomezené, aktivita postupně klesá, až dojde k úplnému poklesu signálu.



Analytické vyhodnocení signálu

transformace vedoucí k linearizaci

$\log \Delta Y$ na $\log [I]$

$1/\Delta Y$ na $1/\log [I]$

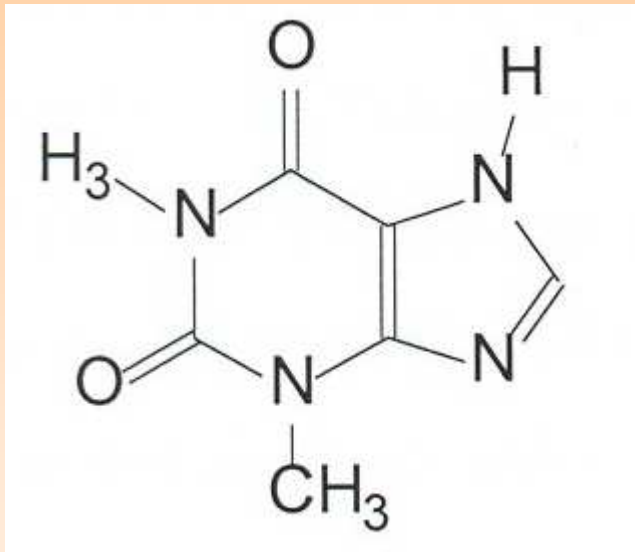
ΔY aproximace polynomem

nebo lze používat relativní změny signálu $\Delta Y/Y_0$

$(dY/dt)/Y_0$, tak se dá kompenzovat postupný úbytek aktivity při měření.

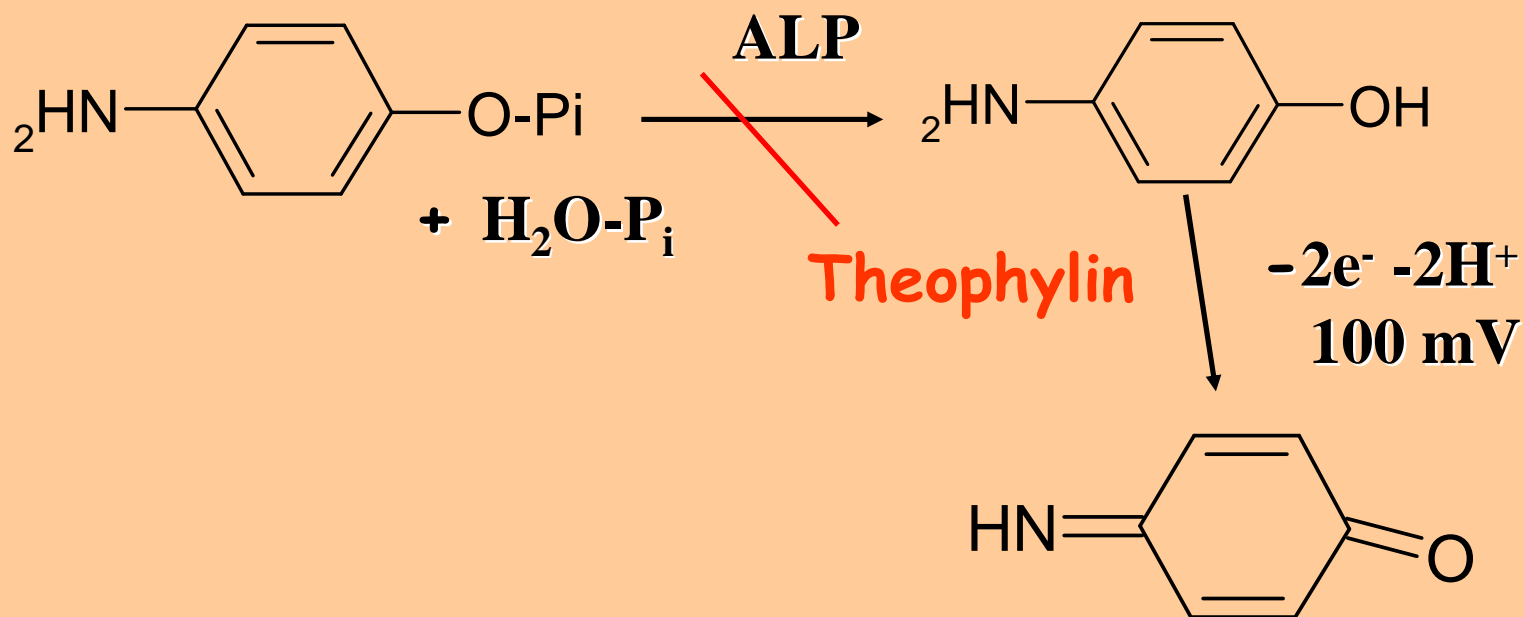
- ✓ vysoká citlivost = použití malého množství enzymů
- ✓ ale musí být dobře měřitelné signály se substrátem.
- ✓ koncentrace substrátu bude ovlivňovat stanovení kompetitivních inhibitorů.
- ✓ zlepšení detekce = prodloužení inkubačního intervalu.

Aplikace stanovení inhibitorů biosensory Alkalická fosfatasa (EC 3.1.3.1, ALP)



THEOPHYLIN účinkuje jako stimulátor centrální nervové soustavy, používá se jako bronchodilátátor (látka rozšiřující průdušky) k respirační stimulaci. Terapeutická hladina v krvi: (10 až 20 mg/kg), je třeba sledovat, aby nedošlo k předávkování.

Stanovení theophylinu



Biosensor s ALP (hovězí jaterní isoenzym),

substrát: *p*-aminofenylfosfátu (PAPP)

Je akompetitivní. Pufr: tris nebo diethanolamin.

Stanovení ve vzorcích krve (přímo), mez detekce je $5\ \mu\text{M}$

Stanovení anorganického fosfátu

- ✓ stanovení v přírodě (životní prostředí)
znečišťování vodních toků
(podporuje nadměrný růst řas a sinic)

enzym alkalická fosfatasa (ALP)
substrát: glukoso-6-fosfát
inhibitor: anorganický fosfát P_i (kompetitivně)

vzniká glukosa

glukosaoxidasa imobilizované ve stejné vrstvě jako ALP.

Mez detekce: asi 10 mM.

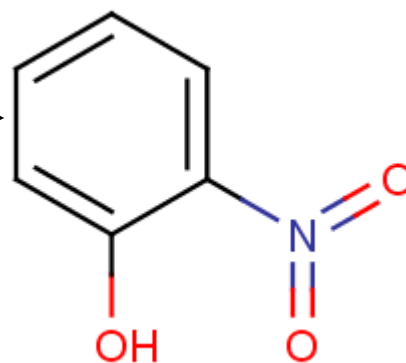
Stanovení síranu

Arylsulfatasa (EC 3.1.6.1)

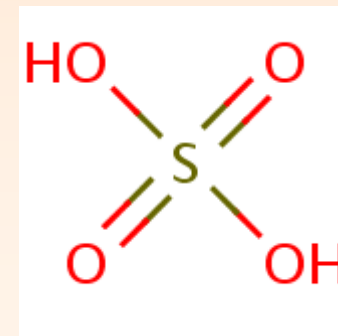
Substrát: 4-nitrokatecholsulfát je hydrolyzován hydrolýzou vzniká 4-nitrokatechol, který je anodicky oxidován na chinon

Inhibitor: síran - KOMPETITIVNĚ

4-nitrofenylsulfát + H₂O →



+



Detekce inhibitorů cholinesterasy

acetylcholinesterasa (AChE, EC. 3.1.1.7)

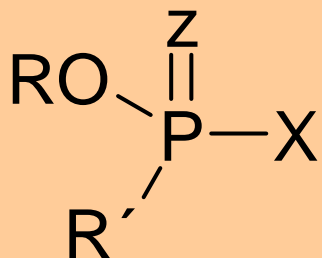
získává se z elektrického úhoře nebo membrán erythrocytů

butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8)

získává se z koňského séra

- ✓ detekce zemědělsky důležitých pesticidů (organofosforových a karbamátových)
- ✓ detekce bojových otravných látek (sarin, soman, tabun, VX)

organofosfáty



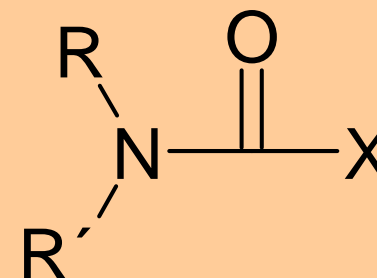
R alkyl, aryl

R' alkyloxy, aryloxy, subst. amin

X odcházející skupina –CN, F,
p-nitrofenyl, fosfodiester

Z = O nebo S

karbamáty



R, R'H, alkyl, aryl

irreverzibilní inhibice
u karbamátů částečně reverzibilní

Princip stanovení organofosfátů a karbamátů

Volný enzym EH tvoří komplex s inhibitorem PX, který rozpadem poskytuje fosforylovaný enzym EP (fosforyluje se nebo karbamoyluje se hydroxyl serinového zbytku v aktivním místě cholinesterasy).

První krok charakterizuje rovnovážná konstanta $K_D = k_1/k_{-1}$, druhý pak rychlostní konstanta k_2 :



V praxi se používá bimolekulární inhibiční konstanta $k_i = k_2/K_D$, hodnoty známé pro desítky pesticidů = citlivost cholinesterazových pesticidů

Inkubační způsob měření

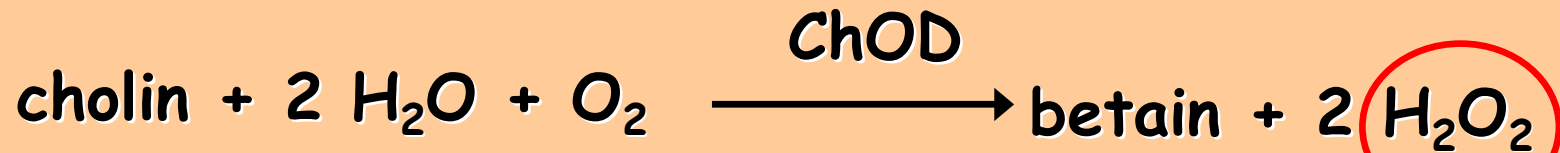
$$\Delta \ln Y = k_i [PX] t$$

Odezva je určována koncentrací a inhibičními účinky dané látky.

Mez detekce je proměnlivá, pro silné inhibitory i pod 100 ng/l.

Možnosti měření s cholinesterázovými sensory:

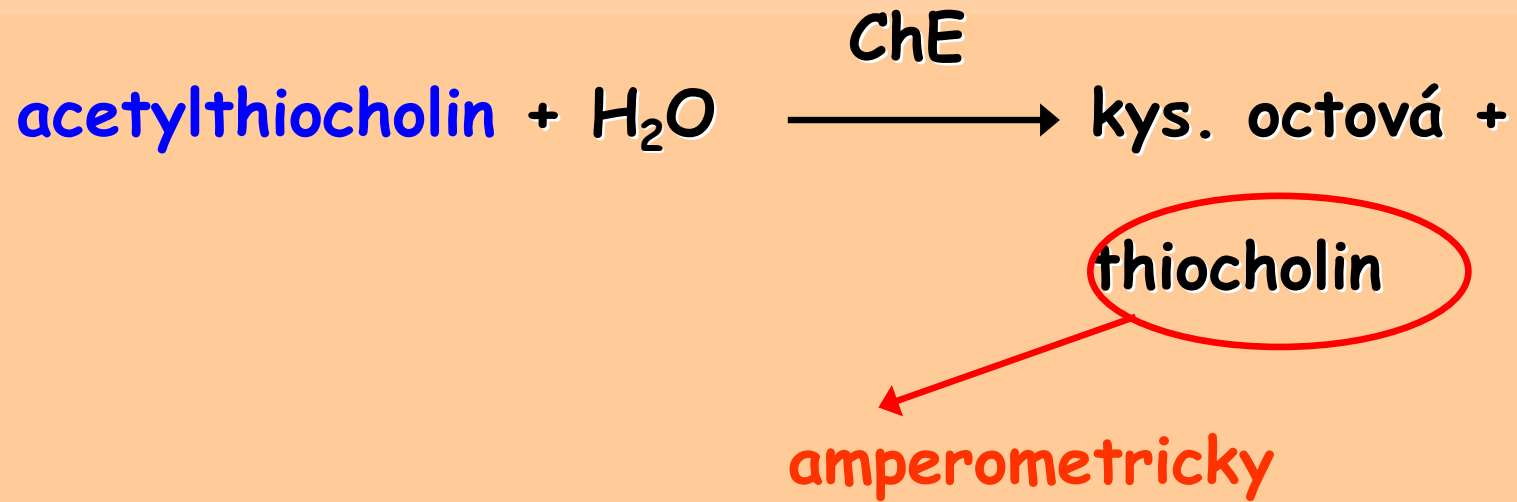
1.



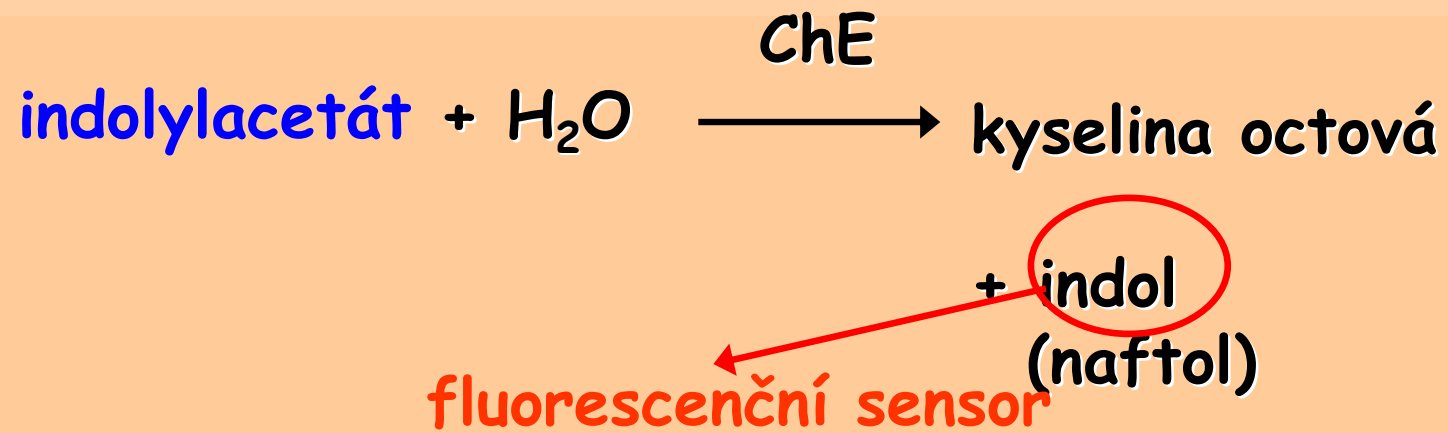
amperometricky

pH-sensory

2.



3.



Různé varianty enzymových elektrod.....

potenciometrické (měření pH,
redoxní potenciál thiosloučenin)

amperometrické (oxidace H_2O_2 z následné reakce
cholinoxidasy, oxidace thiocholinu)

konduktometrické

optické systémy se světlovodnými vlákny (fluorogenní
substráty, barevné pH,
redoxní indikátory, chromogenní
substráty)

Význam stanovení:

- ✓ životní prostředí (ve vodách)
- ✓ potravinářství + zemědělství (kontrola ovoce a zeleniny)
- ✓ vojenská oblast: bojové použití
likvidace chem. zbraní
terroristické útoky (nervovými plyny)

Inhibitory tyrosinasy

Význam stanovení:

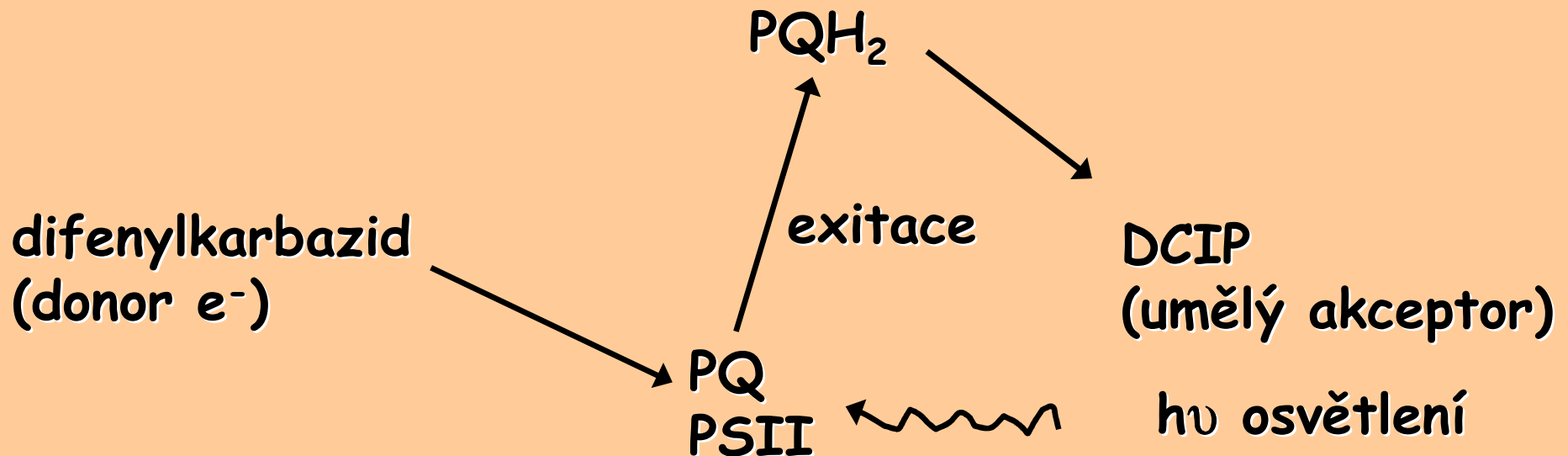
- ✓ kyselina benzoová konzervační činidlo
(dříve používané)
- ✓ kyselina salicylová vzniká odbouráváním
acylpirinu (acetylsalicylové)
- ✓ subst. thimočoviny vznikají z glukosinolátů
způsobují nepříjemné chuťové
vlastnosti výrobků z řepkového
oleje

Stanovení těžkých kovů (inhibitory ureasy)
potenciometrické enzymové elektrody

Stanovení herbicidů jako inhibitorů fotosystému

Thylakoidy chloroplastů špenátu nebo fotosyntetické mikroorganismy (*Rhodobacter*) se využívají k detekci herbicidů v zemědělství:

triaziny
karbamáty
fenylmočoviny
nitrofenol



zablokuje se přenos elektronů na umělý akceptor

Zesilovací biochemické systémy

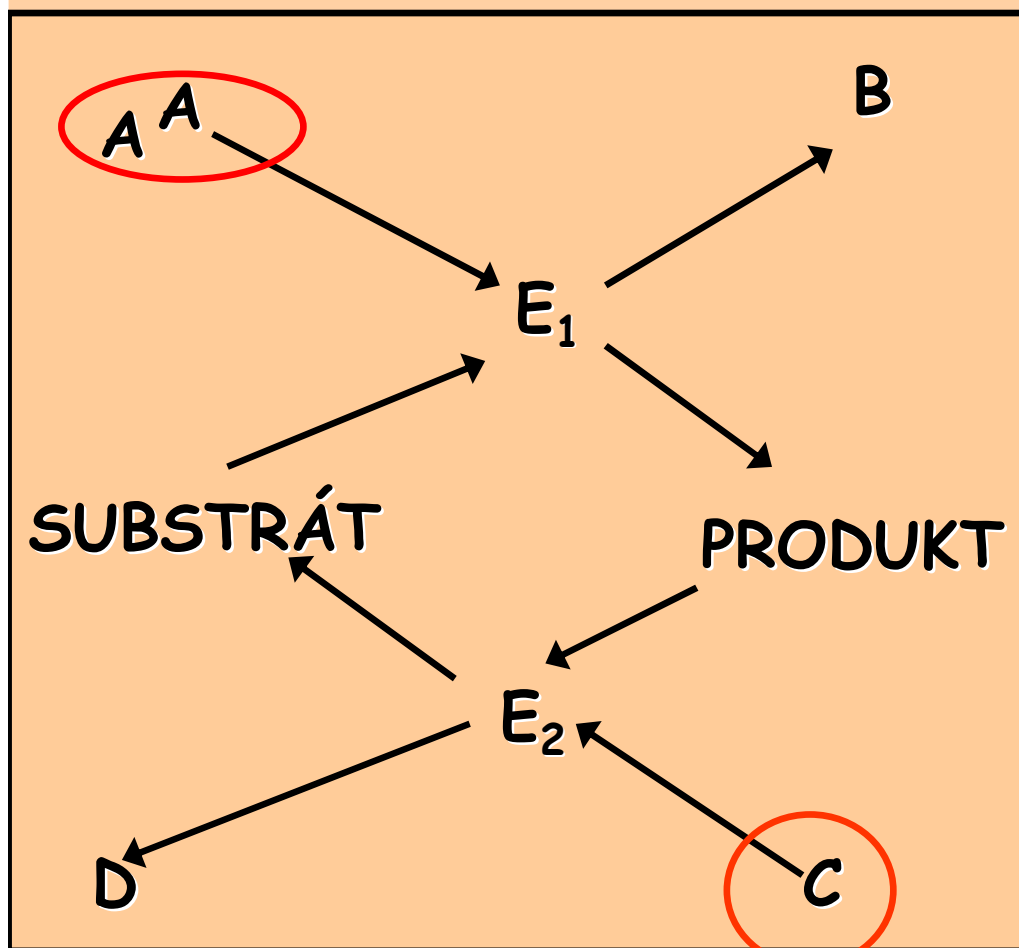
1 molekula = 1 jednotka měřeného signálu

Cílem zesílení (amplifikace) je:

z 1 jednotky analytu získat G jednotek signálu
= zvýšení citlivosti stanovení.

Parametr G - zesilovací (amplifikační) faktor.

Princip zesílení:



A a C recyklaci zapínají,
v nepřítomnosti neprobíhá.

Molekula analytu nashoduje jednu nebo několik cyklicky probíhajících reakcí, přitom neustále přechází mezi dvěma formami (substrát produkt), které jsou přeměňovány dvěma komplementárními enzymy E₁ a E₂ (např. oxidasa a dehydrogenasa).

Recyklačního cyklu se účastní dvě pomocné látky A a C a vystupují z něj látky B a D.

- ✓ Rychlost recyklace musí být limitována koncentrací analytu.
- ✓ Ostatní složky musí být v dostatečném nadbytku

- ❖ dvouenzymové recyklace
- ❖ chemickou recyklaci
(dolní část cyklu probíhá bez E2)
- ❖ elektrochemická recyklace
(schází E2 probíhá, redoxní děj na elektrodě)

Příklady recyklací:

Vysoce citlivé stanovení laktátu

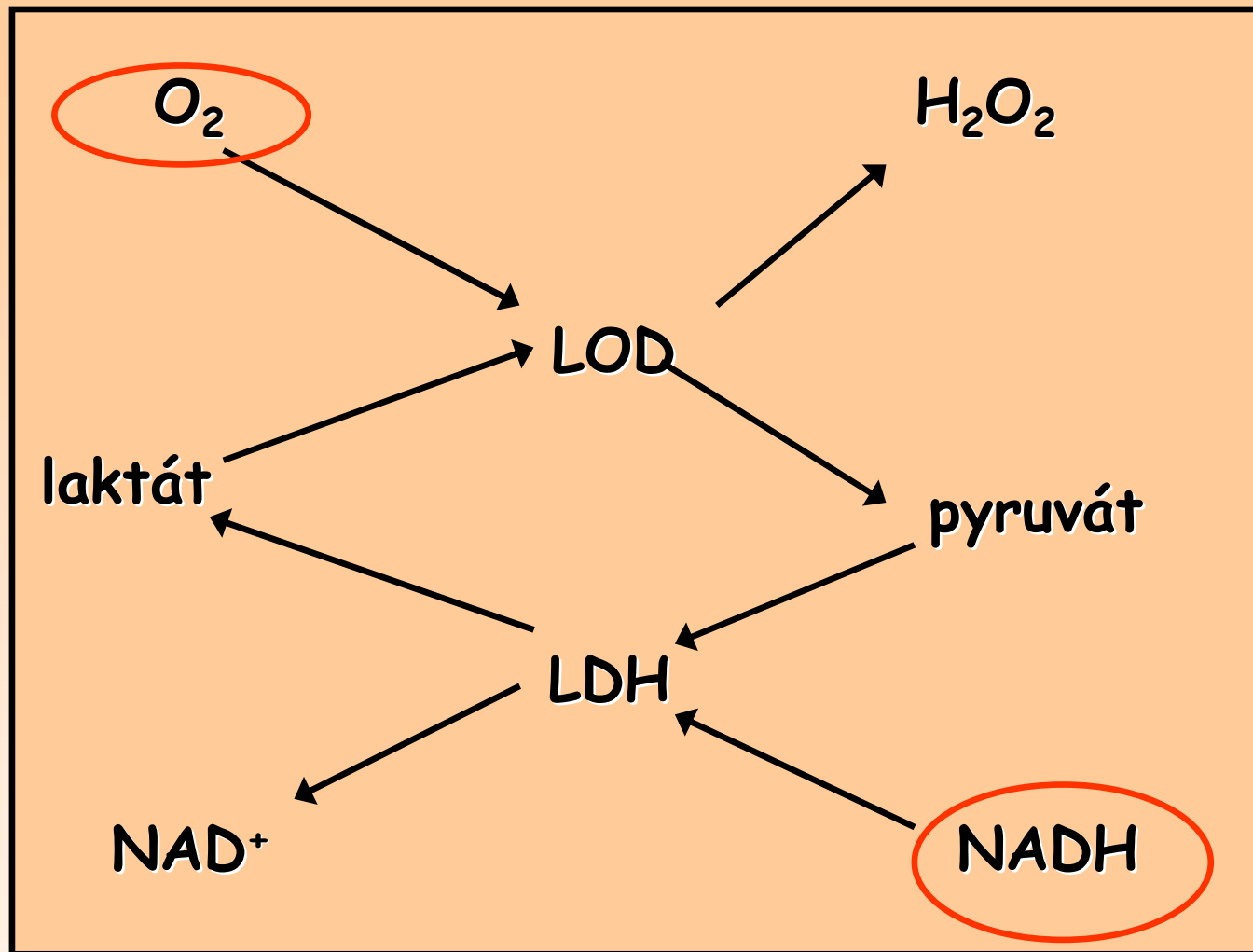
enzymy:

laktát oxidasy a laktát dehydrogenasy

(imobilizace v jedné biokatalytické vrstvě)

- ✓ Pro systém LOD/LDH bylo dosaženo G převyšující 4000,
- ✓ Mez detekce pro laktát (nebo pyruvát) činí 1 nM.

Laktátový systém lze využít pro citlivou detekci enzymů produkujících pyruvát, např. alaninaminotransferasy



Několikanásobná recyklace

Pro citlivou **detekci ATP/ADP**
(několikanásobný recyklační systém):

hexokinasa (HK)

pyruvátkinasa (PK)

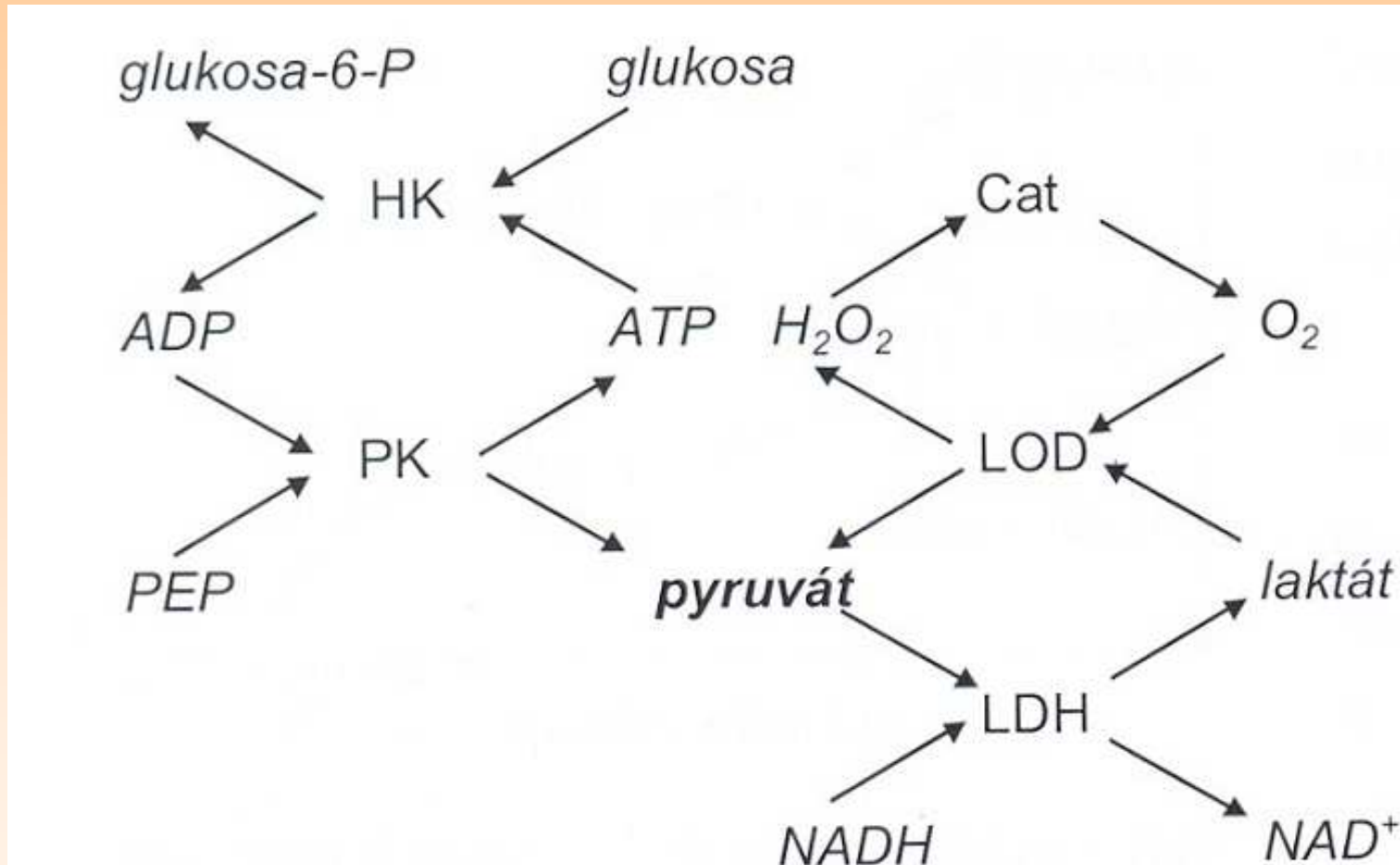
laktát oxidasa (LOD)

laktát dehydrogenasa (LDH)

katalasa (Cat)

Cykly byly propojeny pomocí pyruvátu.
Postupným „zapínáním“ jednotlivých cyklů byly zlepšovány parametry stanovení.

Několikanásobná recyklace



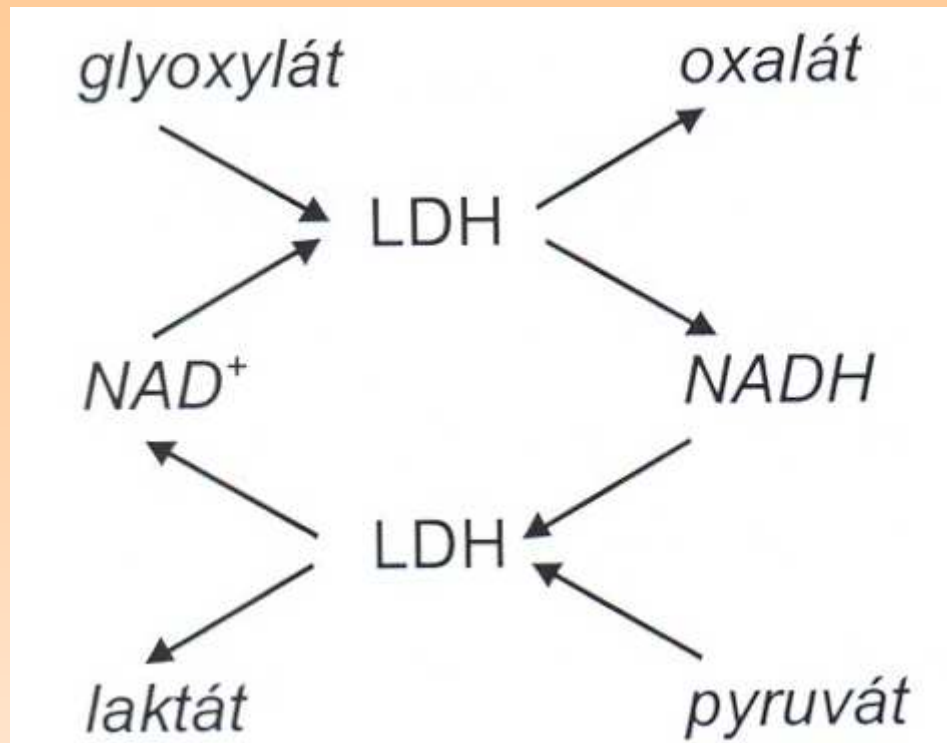
Závěrečný detekční stupeň

- ✓ Optické sledování úbytku NADH
- ✓ Vynechat katalasu a amperometricky H_2O_2
nebo O_2
- ✓ Přídavek katalasy umožňuje zvýšit produkci tepla (termistor)

Látky	Enzym	G	C_{\min}
	HK	1	$60\mu\text{M}$
+PEP	PK	30	$2\mu\text{M}$
+NADH	LOD/LDH	1700	10 nM

HK-hexokinasa, PK pyruvátkinasa, Cat-katalasa

PEP-fosfoenolpyruvát



Recyklační systém
využívající aktivity
jedinného enzymu
laktátdehydrogenasa

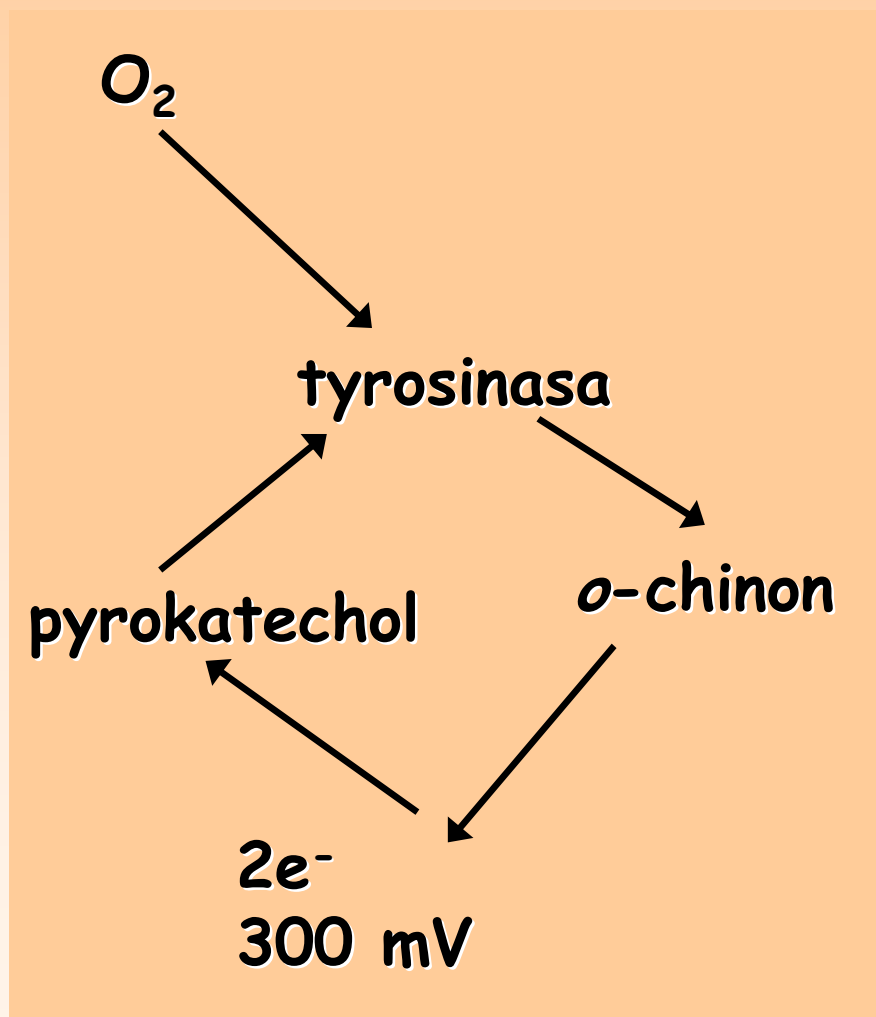
Další kombinace:

- ✓ glutamátoxidasa/dehydrogenasa (glutamát, amoniak)
- ✓ alkoholoxidasa/dehydrogenasa (alkohol)
- ✓ glutamátoxidasa/alaninaminotransferasa (α -oxoglutarát, glutamát)
- ✓ lakasa/cytochrom b2 (benzochinon)
- ✓ laktátmonooxygenasa/malátdehydrogenasa (malát, oxalacetát, AST)

Chemická recyklace

Ke zvýšení citlivosti detekce kyseliny askorbové pomocí kyslíkové elektrody s askorbát oxidasou. Zpětná redukce kyseliny dehydroaskorbové probíhala v přítomnosti cysteinu.

Elektrochemická recyklace



Tyrosinový sensor
stanovení fenolu,
který po oxidaci
tyrosinase
poskytne recyklující
pyrokatechol

Obdobně:
pro lakasu a recyklující pár
hydrochinon/benzochinon

Mikrobiální a tkáňové elektrody

- ✓ mikrobiální
- ✓ rostlinné
- ✓ živočišné (buňky nebo orgány nebo celé tkáně či orgány)

Výhody:

- ✓ biokomponenta je v přirozeném prostředí
- ✓ místo jednoho enzymu použít celé metabolické reakční sekvence
- ✓ odpadá purifikace, což se odrazí na ceně.
- ✓ může dojít ke spontánní obnově enzymové aktivity

Hybridní biosensor:

obsahuje vedle mikrobiální či tkáňové složky navíc izolovaný enzym

Mikrobiální systémy

buňky bakterií, sinic, kvasinek:

- imobilizace na povrchu převodníku
- forma předřazeného reaktoru

Životnost: zajištění životních podmínek pro buňky
zlepšení lze dosáhnout pomocí

Problém: existence řady enzymových systémů v buňce

Indukce: přidavek potenciálního analytu =
substrátu vyvolá zvýšenou tvorbu
komponent metabolické dráhy

Inhibice: potlačí se funkce nežádoucích aktivit

Imobilizace

- ❖ Zachycení buněk přefiltrováním přes vhodnou membránu ve formě pasty nebo filmu (buňky jsou zachyceny uvnitř porů membrány, filtrační papír, polyamid, celuloza)

Vlastnosti závisí: na tloušťce a porozitě membrány
na vlastnostech buněčné stěny mikroba

- ❖ Zachycení buněk uvnitř gelu

Tvorba gelu probíhá v přítomnosti buněk, nelze tedy použít příliš drastické podmínky

Materiály: agar, kolagen, želatina, polyakrylamid, polyvinylalkohol (PVA)

kovalentní vazba není vhodná, neboť obvykle dojde ke zničení buněčné stěny.

Typy biosensorů s mikrobiální složkou

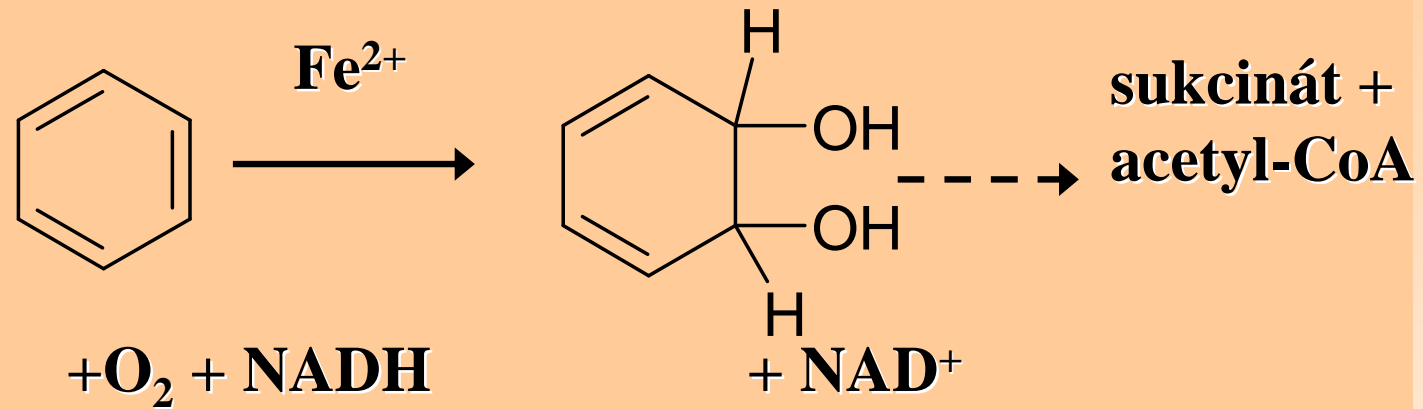
- ✓ spojení s kyslíkovou elektrodou
- ✓ sensory pro CO_2
- ✓ sensory pro NH_3
- ✓ mediátory přenosu elektronů (ferrikyanid)

Peroxid obvykle není produkován, neboť je pro buňky toxický

Použití:

- ❖ stanovení substrátů (glukosa, fruktosa, sacharosa)
- ❖ sensor pro detekci benzenu
(pomocí kmene *Pseudomonas* obsahujícího benzendioxygenasu)
- ❖ biochemická spotřeba kyslíku

Sensor pro detekci benzenu aromatů



Sensor obsahuje buňky kmene *Pseudomonas*, obsahující enzym benzendioxygenasu

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK)

(anglicky: BOD, biochemical oxygen demand)

- ❖ Klasické stanovení: BSK5 (rozdíl koncentrace O_2 ve vzorku po 5 denní biochemické oxidaci organických látek, probíhá aerobně v uzavřeném systému v přítomnosti mikroorganismů a ve tmě),
- ❖ Pomocí biosensoru s kyslíkovou elektrodou a mikrobiální vrstvou - *Trichosporon cutaneum*, *Bacillus subtilis* a *licheniformis*.

Měří se: měří se rychlost respirace (několik minut) hodnoty stanovení BOD biosensorem jsou úměrné parametru BSK5, převodní vztah se určí kalibrací.

Kalibrace: směs glukosy a kyseliny glutamové

Detekce toxických látek ve vodních tocích:

(azidy, kyanidy, pesticidy, fenoly, těžké kovy)

Využívá se inhibice respiračního řetězce nebo fotosyntézy vhodného indikačního mikroorganismu (např. *Sinococcus*, aktivovaný kal)

monitorovací systémy jsou vhodné pro nepřetržité sledování, ale nejsou příliš specifické a nevýhodou je také malá citlivost.

Tkáňové řezy rostlin a hub

Zdrojem biorekogniční složky mohou být také **rostliny** nebo **houby**.

Je třeba otestovat, **v které části** se vyskytuje enzymová aktivita:

- ✓ rostoucí části: (mladé listy)
- ✓ zásobní části (plody, ovoce, zelenina)

Způsob použití:

- ✓ tenký řez přichycený pomocí řídké síťky
- ✓ tenký řez přichycený pomocí celofánu
- ✓ rozmělněný materiál vpravit do kompozitní směsi pro přípravu uhlíkové pastové elektrody (snadná obnova aktivního povrchu- vytlačit kousek pasty, uhladit a hned lze měřit)

Kromě přirozených rostlinných tkání se používají i uměle připravené buněčné kultury

Stabilita biosensorů: řádově týdny až měsíce

Limit detekce: 10 μM

Problém: selektivita, protože jsou přítomné nejrůznější enzymové systémy.

Příklady biosensorů s rostlinami

Rostlina (použitá část)	Enzym	analyt
žampion (plodnice)	tyrosinasa	fenoly
brambor (hlíza)	tyrosinasa	fenoly
banán (dužina)	tyrosinasa	dopamin
okurek, tykev (řez plodu, šťáva)	askorbát oxidasa	vitamin C cystein
křen	peroxidasa	peroxid vodíku
sója	ureasa	močovina
chryzantémy (okvětní lístky)		aminokyseliny

Příklady biosensorů s živočišnými tkáněmi

Stabilita byla nižší ve srovnání s rostlinnými systémy.
Uvedené systémy jsou vesměs spojeny s NH_3 elektrodou.

Použitá část	Enzym	Analyt
ledvina (vepřová)	katalasa	glutamin glukosamin-6-fosfát peroxid vodíku
játra (králík)	monoaminoxidasa	katecholaminy guanin
sval (králík)		AMP
střevo (myš)		adenosin