

Využití enzymů v laboratorní diagnostice

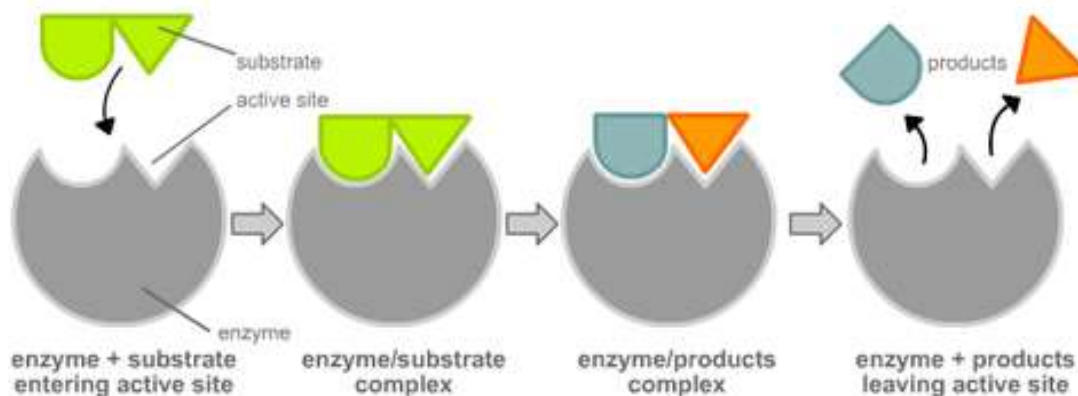
Martin Beránek

Struktura přednášky

1. Stanovení katalytické aktivity enzymů v klinické praxi
2. Možnosti získání enzymů pro diagnostiku a léčbu
3. Enzymy v přípravě substrátu pro jeho následné vyšetření
4. Klinická stanovení specifických substrátů enzymaticky
5. Enzymy jako způsob obecné vizualizace analytů

Základní charakteristika enzymu

- Enzymy svou terciální (a kvarterní) strukturou umožňují přeměnu substrátu na produkt bez působení extrémních reakčních podmínek (vysoká teplota, tlak)
- Apoenzymy (bílkoviny), koenzymy (vitaminy, NAD⁺, ATP)
- Specifičnost substrátu dána **vazebnou doménou** enzymu, tedy strukturou aktivního místa
- Oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, ligázy, izomerázy, translokázy



Interpretace zjištěného množství enzymu v biologickém vzorku

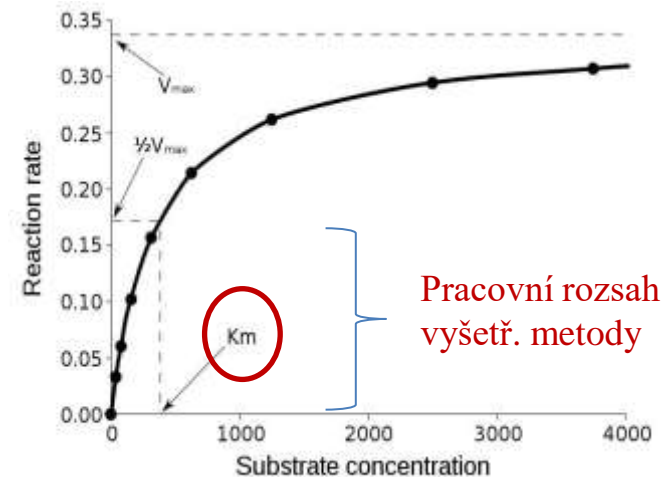
- Porovnání s referenčními (fyziologickými) hodnotami
- **Vyšší $\mu\text{kat/l}$** (= katalytická aktivita enzymu) př. **CK-MB**
Vyšší exprese genu pro enzym v dané tkáni/buněčné linii
Vyšší množství enzymu funkčního enzymu v biologické tekutině z rozpadlých buněk
- **Vyšší mg/l enzymu** př. **CK-MB mass**
Vyšší exprese funkčního nebo nefunkčního enzymu
Vyšší podíl uvolnění funkčního enzymu nebo jeho podjednotek, fragmentů do tekutiny

Stanovení **katalytické aktivity** enzymů

- **Uspořádání:** biologický vzorek obsahuje stanovovaný enzym
- Reagencie v laboratoři obsahují substrát, pufr
- Detekční systém měří absorbanci roztoku v kyvetě - absorbance při reakci roste, klesá
- Změna absorbance se týká přímo substrátu, produktu, koenzymu reakce, produktu druhé a další spřažené reakce

Michaelisova konstanta (K_m), je to taková koncentrace substrátu, při níž probíhá enzymová reakce rychlostí, rovnající se polovině maximální možné rychlosti (vliv teploty, pH, aktivátorů, Ca^{2+} ...)

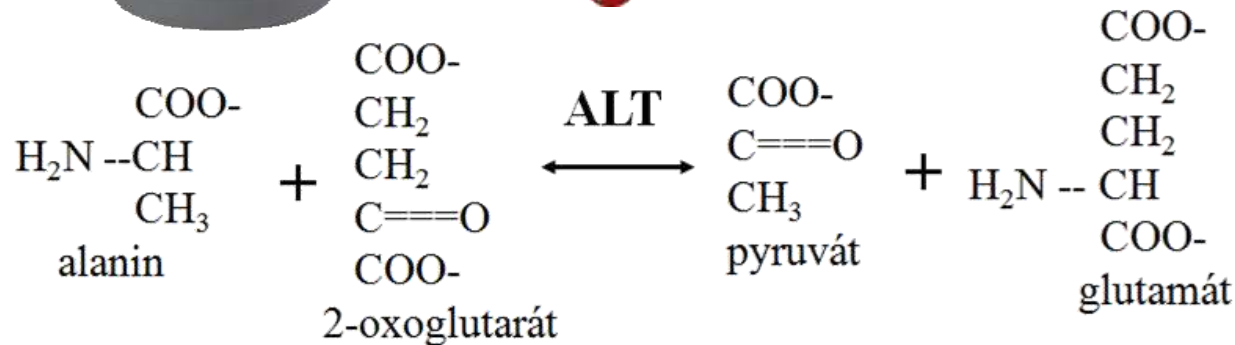
V reagiích bývá zpravidla **koncentrace substrátu** mnohem nižší než **odpovídající K_m** , je tím zaručena kinetika reakce prvního řádu a její linearita v reakčním čase v různých vzorcích



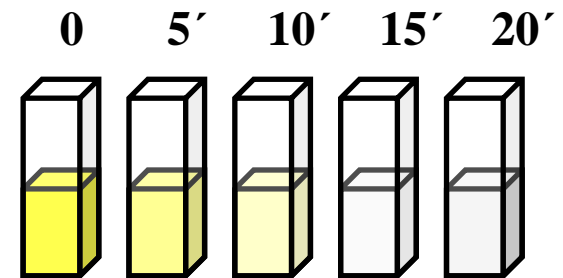
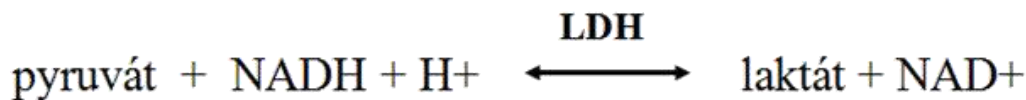
Vyšetření katalytické aktivity ALT v krevním séru



Krevní sérum s ALT katalyzuje přeměnu substrátů na produkt během 15 minut při 37 °C



V sérii vzájemně navazujících reakcí dojde ke změně barevného NADH na bezbarvý NAD⁺

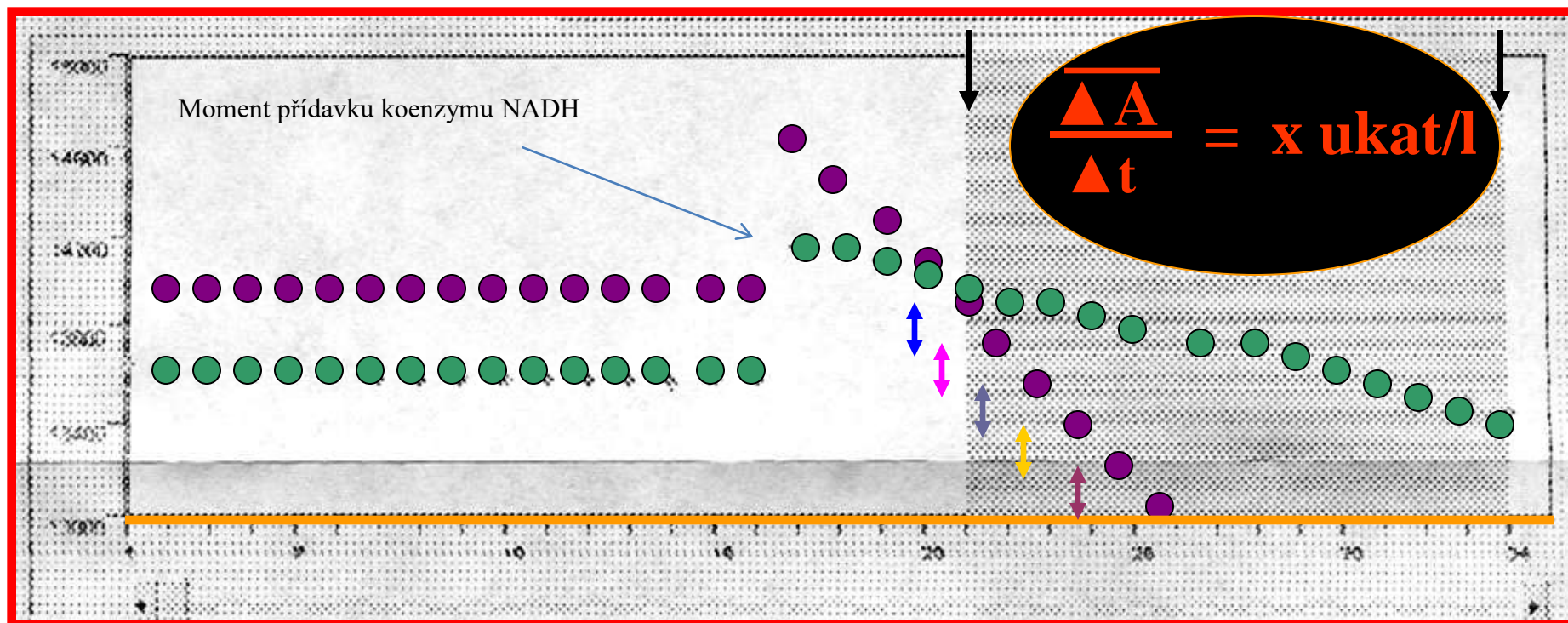


zbarvení obsahu kyvet

Měřící rozsah kinetické enzymové metody: 0 - 10 ukat/l

V oblasti K_m není průběh reakce závislý na koncentraci S a P

Fyziologické a patologicky vysoké hodnoty AST



Množství substrátu enzymu do reakční nádoby určíme z hodnoty K_m pro daný enzym

← → ↻ <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>

Login

BRENDA

GLOBAL CORE BIODATA RESOURCE **BRENDA has been selected as Global Core Biodata Resource** [More...](#)

Search term **Search BRENDA**

Enzyme, Ligand contains

[add search field](#) [delete search field](#)

- Text-based queries**
 - Full-text Search
 - Advanced Search
 - DRENDA
 - MeSH Ontology
- Structure-based queries**
 - Ligand Structure Search
 - Metabolic Pathways
 - Enzyme Structures
- Explorer**
 - Enzyme Classification
 - TaxTree
 - Protein folding: CATH, SCOPe Ontologies
- Visualization**
 - Enzyme Word Maps
 - Organism Word Maps
 - Genomes
 - Functional Parameter Statistics
 - Metabolic Pathways
- Prediction**
 - Membrane Helices
 - Localization Prediction
 - EnzymeDetector
- Supporting & External**
 - BRENDA
 - Tissue Ontology
 - Biochemical Reactions
 - MetaboMAPS
- News**
 - Introducing: Quick Feedback!** - September 23, 2022
Feedback from our users is very important to us! We want to make it as easy as possi...
 - New user system** - September 19, 2022
We have enabled a new login and user system. This should resolve problems with un...
 - BRENDA json download** - September 12, 2022
BRENDA is now available to download in json format!
The download can be found [here](#) and a documentation of the format is available ([here](#)...

- <https://www.brenda-enzymes.org>

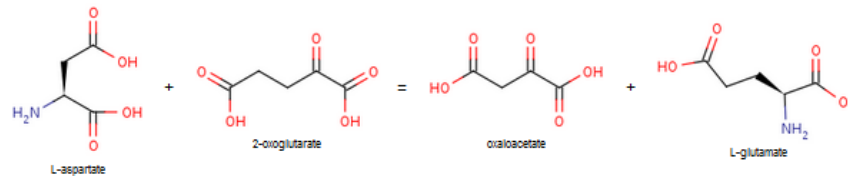
Množství substrátu enzymu do reakční nádoby určíme z hodnoty Km pro daný enzym

2.6.1.1: aspartate transaminase

This is an abbreviated version!
For detailed information about aspartate transaminase, go to the full flat file.

Word Map on EC 2.6.1.1 

Reaction



Synonyms

More, Pat, glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-aspartic transaminase, transaminase A, AAT, AspT, AspAT, aminotransferase, aspartate, 2-oxoglutarate-glutamate aminotransferase, aspartate alpha-ketoglutarate transaminase, aspartate aminotransferase, aspartate-2-oxoglutarate transaminase, aspartic acid aminotransferase, aspartic aminotransferase, aspartyl aminotransferase, AST, glutamate-oxalacetate aminotransferase, glutamate-oxalate transaminase, glutamic-aspartic aminotransferase, glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic oxalic transaminase, GOT (enzyme), GOT, L-aspartate transaminase, L-aspartate-alpha-ketoglutarate transaminase, L-aspartate-2-ketoglutarate aminotransferase, L-aspartate-2-oxoglutarate aminotransferase, L-aspartate-2-oxoglutarate-transaminase, L-aspartate-2-oxoglutarate-transaminase, L-aspartic aminotransferase, oxaloacetate-aspartate aminotransferase, oxaloacetate transferase, aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, glutamate oxaloacetate transaminase, aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, L-aspartate aminotransferase, protein TT0402, AsAT, AAT3, plastid aspartate aminotransferase, aspartate, 2-oxoglutarate aminotransferase, prephenate aminotransferase, AATase, Sar2028, aspartate/tyrosine/phenylalanine pyridoxal-5'-phosphate-dependent aminotransferase, KAT IV, mitAAT, L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, aspartate transaminase, glutamic oxaloacetic transaminase, AspATs, SsAspAT, aspB, C-S lyase, aatA, CAA1, aspartate/(R)-cysteate:2-oxoglutarate aminotransferase, aoa/coa, PAspAT, L-AspAT, L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, EcAspAT, aatB3, AST-Bb, GOT1L1, alr1039, all2340, alr2765, alr4853, Cgl0240, aspartate aminotransferase A, Tb11.02.2740, GL50803_91056, GOT1, GOT2, AAT-2, AAT-3, Rv3722c, cAST, aspartate AT, Asp AT, AtPAT, bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase, class I beta AAT, aspartate aminotransferase 1, glutamate oxaloacetate transaminase 1, PT-AAT, aspC, glutamate-oxaloacetate transaminase 1

ECTree

- └ 2 Transferases
 - └ 2.6 Transferring nitrogenous groups
 - └ 2.6.1 Transaminases
 - └ 2.6.1.1 aspartate transaminase

- <https://www.brenda-enzymes.org>

Množství substrátu enzymu do reakční nádoby určíme z hodnoty K_m pro daný enzym

https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php?ecno=2.6.1.1&table=KM_Value#TAB

△ top print □ Go to KM Value Search

KM VALUE [mM] ▲▼	SUBSTRATE ▲▼	ORGANISM ▲▼	UNIPROT ▲▼	COMMENTARY ▲▼	LITERATURE ▲▼	IMAGE ▲▼
5.84 - 12.07	2-methoxyphenylpyruvate	□ 2 entries				🔗
0.77 - 0.86	2-oxo-4-phenyl-butanoic acid	□ 2 entries				🔗
0.007 - 6.9	2-oxoglutarate	□ 67 entries				🔗
1.01 - 10.32	3,4-dimethoxyphenylpyruvate	□ 2 entries				-
4.92 - 11.56	3-methoxyphenylpyruvate	□ 2 entries				🔗
4.12 - 10.14	4-methoxyphenylpyruvate	□ 2 entries				🔗
29.4	kynurenine	Mycobacterium tuberculosis	O69689	at pH 7.4 and 37Å°C	759824	🔗
4.1 - 20.3	L-2-amino-4-methoxy-4-oxobutanoic acid	□ 2 entries				🔗
3.5 - 140	L-alanine	□ 2 entries				🔗
29	L-Asp	Escherichia coli	P00509	pH 8, mutant enzyme A12T/P13T/N34D/T109S /G261A/S285G/A293D/N297S	658035	🔗
0.039 - 37	L-aspartate	□ 68 entries				🔗
8.57 - 20.62	L-cysteine	□ 2 entries				🔗
2.05	L-cysteine sulfinic acid	Saccharolobus solfataricus	-	pH 8.5, 60Å°C, recombinant enzyme	724405	🔗
0.5 - 37	L-glutamate	□ 31 entries				🔗
0.724	L-kynurenine	Rattus norvegicus	-	at pH 7.4	675514	🔗
105 - 189	L-Lys	□ 2 entries				🔗
6.9 - 56	L-methionine	□ 2 entries				🔗
0.3	L-Phe	Escherichia coli	P00509	pH 8, mutant enzyme A12T/P13T/N34D/T109S /G261A/S285G/A293D/N297S	658035	🔗
1.1 - 6.6	L-phenylalanine	□ 3 entries				🔗
2.3 - 5	L-tryptophan	□ 3 entries				🔗
1.43 - 1.6	L-tyrosine	□ 3 entries				🔗
0.01 - 2.45	oxaloacetate	□ 32 entries				🔗
0.92 - 4.24	phenylpyruvate	□ 2 entries				🔗
0.00025	pyridoxyl 5'-phosphate	Escherichia coli	-	pH 7.6, 25Å°C	636643	🔗
additional information	additional information	□ 28 entries				-

- <https://www.brenda-enzymes.org>

Množství substrátu enzymu do reakční nádoby určíme z hodnoty K_m pro daný enzym

https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php?ecno=2.6.1.1&table=KM_Value#TAB

K_m	Organism	Accession	Conditions	Value	Unit
0.75	Rattus norvegicus	-	mitochondrial enzyme	672283	μM
0.108	Escherichia coli	P00509	at pH 7.4 and 30Å°C	759136	μM
26	Trypanosoma brucei	Q964F0, Q964F1	pH 7.5, 37Å°C	688897	μM
3.9	Oryctolagus cuniculus	-	cytosolic isozyme, pH 8.0, 37Å°C	639828	μM
2.6	Lupinus angustifolius	-	isozyme AAT-P2, pH 7.6, 25Å°C	639863	μM
2.6	Panicum miliaceum	-	isozyme pAsp-AT and cAspAT, alpha-form, pH 8.0, 25Å°C	639867	μM
0.039	Advenella mimigardefordensis	W0PFQ7	at pH 7.4 and 30Å°C	759136	μM
3.8	Arabidopsis thaliana	Q9SIE1	pH 7.5, 25Å°C, recombinant mutant A168G	759965	μM
6.7	Bacillus subtilis	Q939C9	pH 8.0, 45Å°C	722235	μM
7.5	Eleusine coracana	-	isozyme AspAT-1, 25Å°C, pH 8.0	639848	μM
0.51	Canis lupus familiaris	-	mitochondrial isozyme	639838	μM
0.96	Trichomonas vaginalis	-	30Å°C	639814	μM
4.4	Escherichia coli	-	-	636643	μM
8.5	Triticum aestivum	B0FRH4, B5B1F8	allozyme AAT-2c, pH 7.5, 25Å°C	738026	μM
37	Trypanosoma cruzi	Q4D080, Q4D1Q4	pH 7.5, 37Å°C	688897	μM
6.5	Canis lupus familiaris	-	cytosolic isozyme	639838	μM
3.2	Panicum miliaceum	-	isozyme cAspAT, beta-form, pH 8.0, 25Å°C	639867	μM
9.3	Triticum aestivum	B0FRH4, B5B1F8	allozyme AAT-3a, pH 7.5, 25Å°C	738026	μM
9.9	Triticum aestivum	B0FRH4, B5B1F8	allozyme AAT-2b, pH 7.5, 25Å°C	738026	μM
15.1	Hyalomma dromedarii	-	isozyme AST II, 37Å°C, pH 7.5	639883	μM
2.1 - 2.9	Gallus gallus	-	pH 7.4, 30Å°C	639856	μM
2.53	Chlamydomonas reinhardtii	-	pH 7.8, 25Å°C	639859	μM
22.5	Homo sapiens	-	cytosolic isozyme, pH 6.8, 37Å°C	639869	μM
2.34	Mycobacterium tuberculosis	O69689	at pH 7.4 and 37Å°C	759824	μM

- <https://www.brenda-enzymes.org>

Různé podmínky stanovení katalytické aktivity enzymu ve světě !!!



AST IFCC Multi-Purpose (MPR) Liquid Reagent

KIT SPECIFICATIONS:

Cat. No	Quantity	Reagent	Storage
GL733AS	10 x 15 ml	AST IFCC - 1	2-8°C
	2 x 15 ml	AST IFCC - 2	
GL743AS	5 x 50 ml	AST IFCC - 1	2-8°C
	1 x 50 ml	AST IFCC - 2	
GL753AS	5 x 100 ml	AST IFCC - 1	2-8°C
	1 x 100 ml	AST IFCC - 2	

INTENDED USE:

In Vitro Diagnostic reagent pack for the quantitative determination of Aspartate Aminotransferase (AST) in serum and plasma, based upon the IFCC recommendations, on automated and semi-automated analyzers.

SUMMARY AND EXPLANATION:

Aspartate aminotransferase (AST) belongs to a group of enzymes that catalyse the interconversion of amino acids to 2-oxo-acids. The enzyme is largely present in the cytoplasm of cells and highest concentrations are from heart, liver and skeletal muscle tissues. The main clinical uses are in the diagnosis and treatment of myocardial infarction and hepatic diseases. After myocardial infarction, AST level is elevated 5 to 8 hours after the onset of chest pain. It remains elevated for 4 days after which it returns to normal. Five to ten-fold elevation of AST are observed in primary metastatic carcinoma of the liver.

Pyridoxyl-5-Phosphate
Pyridoxyl-5-Phosphate functions as a co-enzyme in the aminotransferase reaction. While most patient samples contain endogenous pyridoxyl phosphate the IFCC recommendation specify the addition of the co-enzyme to supplement pyridoxyl-5-phosphate deficient samples. The pyridoxyl-5-phosphate is available as a powder vial from Glenbio Ltd. Cat. No. GL806PP (12 x 50 ml) and GL816PP (6 x 66 ml).

PRINCIPLE OF THE TEST: 1,2

The sample is pre-incubated with TRIS (hydroxymethyl) aminomethane (tris) buffer solution containing L-Aspartate, Malate Dehydrogenase (MDH) and Lactate Dehydrogenase (LDH). The reaction is initiated by the addition of NADH and measured kinetically. The rate of NADH consumption is directly proportional to the AST concentration in the patient sample.



INSTRUMENTS:

Instrument applications are available upon request.

COMPONENT COMPOSITION:

Component	Ingredients	Concentration in Tests
Reagent 1	tris Buffer pH 7.8	100 mmol/l
	L-Aspartate	300 mmol/l
	MDH	> 530 UI/l
	LDH	> 750 UI/l
	STABILISERS & PRESERVATIVES	—
Reagent 2	α -Ketoglutarate	75 mmol/l
	NADH	0.25 mmol/l
	PRESERVATIVES	—

REAGENT PREPARATION AND STABILITY:

Before use, mix reagent by gently inverting each bottle. If stored and handled properly, unopened components are stable until the expiry date stated on the label.

Monoreagent procedure: Add 1 volume of Reagent 2 to 5 Volumes of Reagent 1.

Working reagent is stable 5 weeks at 2-8°C.

Bireagent procedure: Liquid reagent 1 and 2 are ready for use.

Once open, components are stable until expiry date on label if store and handled properly.

TYPE OF SPECIMEN: 1

Use serum, free of haemolysis, heparin or EDTA plasma as specimen.

It is recommended to follow NCCLS procedures (or similar standardised conditions) regarding specimen handling. Specimen should be collected in an appropriate sample container, with proper specimen identification. Serum/plasma should be separated from cells within 48 hours after collection.

Stability: up to 5 days at 2-8°C³.

TEST PROCEDURE:

Materials required but not supplied:

Description	Catalog No.	Description	Catalog No.
General Chemistry Calibrator	GL983	Photometer	NA
General Chemistry Control Level 1	GL922	General Laboratory Equipment	NA
General Chemistry Control Level 2	GL932		

Assay procedure:

Wavelength: λ : 340 nm (Hg 334-Hg 365)

Temperature: 30°C or 37°C

Optical path: 1 cm light path.

CALCULATION:

340 nm: UI = AOD/min x 1746 334 nm: UI = AOD/min x 1780 365 nm: UI = AOD/min x 3235
(Conversion factor: Qty in μ Kat/l = Qty in UI x 0.0167).

EXPECTED VALUES:

IFCC reference method	30°C* UI	30°C* μ Kat/l	37°C* UI	37°C* μ Kat/l
Men	Up to 25	Up to 0.42	Up to 37	Up to 0.63
Women	Up to 21	Up to 0.36	Up to 31	Up to 0.53

*Calculated values *Temperature conversion factor from 37°C to 30°C: 0.67⁴
Each laboratory should establish its own reference range. AST results should always be reviewed with the patient's medical examination and history.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

Performance results can vary with the instrument used. Data obtained in each individual laboratory may differ from these values.

Linearity:

Linear up to 412 UI (6.8 μ Kat/l).

For samples with a higher concentration, dilute 1:1 with 0.9% NaCl (9g/l) and re-assay. Multiply result by 2.

Interfering substances:

Bilirubin (mixed isomers): 12% interference up to 200 μ mol/l Bilirubin.
Haemolysis: 12% interference up to 1.25 g/l Haemoglobin.
Lipemia: Less than 10% interference up to 5 g/l Intralipid.

Sensitivity:

The Lowest Detectable Level was estimated at 3 UI (0.05 μ Kat/l).

Precision:

Within Run	Mean (UI)	SD	% CV	Between Run	Mean (UI)	SD	% CV
N = 20				N = 20			
Level 1	35.6	0.624	1.74	Level 1	40	1.09	2.74
Level 2	122.6	0.88	0.72	Level 2	133	2.94	2.22

Method Comparison:

Using 50 samples, a comparison, between this AST test (y) and another commercially available test (x), gave the following results:

$y = 1.014x - 0.219$	$r = 0.999$	Sample range: 9 to 355 UI.
----------------------	-------------	----------------------------

BIBLIOGRAPHY:

1. Bergmeyer HU et al. Clin Chem. 1971; 24:88 & Burles CA, Ashwood ER. Tetz Fund. Df Clin. Chem. 9th ed: 30-54 and 352-393.
2. Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1996: 76-77.
3. Fischbach F, Zawta B. Age-dependent Ref Limits of Several Etc in Plasma at Diff Measuring Temp. Klin Lab 1992; 38:585-591.
4. Zawta B, Klein G, Bialon W. Temperature Conversion in Clinical Enzymology Klin Lab 1994; 40:33-42.
5. IFCC Scientific Committee Clin. Chem. Biochem. 1990; 18:521-534.

Nejdůležitější příklady stanovení katalytické aktivity enzymů v klinické praxi

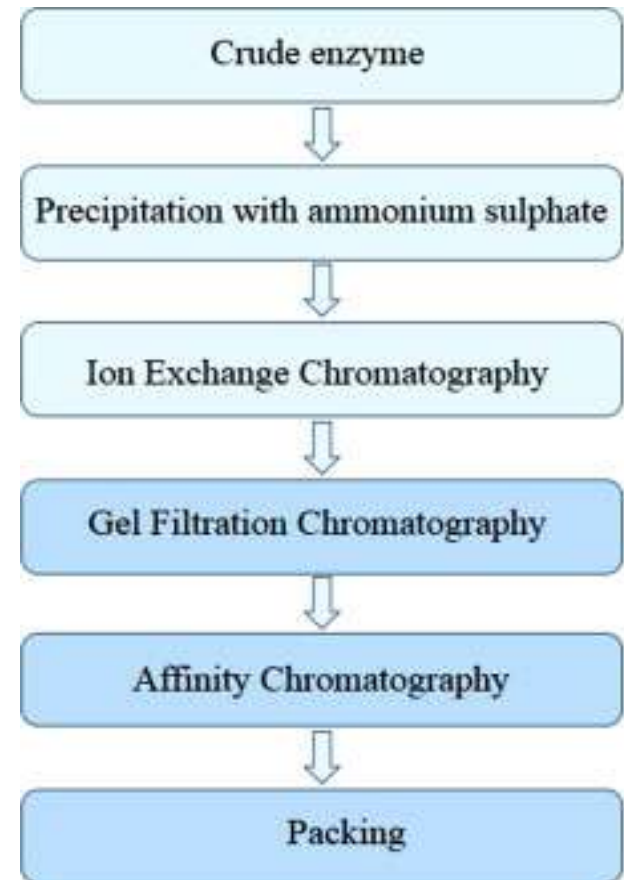
AST	intracelulární (IC)	zdroj svaly, erytrocyty, játra (65% mitochondr.)	strukturní poškození
ALT	IC	zejména játra, méně svaly	strukt.
CK	IC	svaly izoenzym CK-MB !!!	strukt.
LD	IC	mnoho tkání, tetramer H a M	strukt.
GMT (GGT)	IC	v krvi jaterní buňky, žlučovody v moči tubulární enzym ledvin	strukt.
GMD	IC	mitochondriální hepatocytů	strukt.
ALP	IC	žlučovody, kost, placenta – isoEE	strukt.
ACP	IC	prostata (tartrát lab.), osteoklasty, ery, tro	strukt.
AMYL	EC	slinné žlázy a pankreas izoformy	strukt.
Lipáza	EC	pankreas	strukt.
CHE	EC	pseudocholinesteráza z jater	funkční pošk.

Struktura přednášky

1. Stanovení katalytické aktivity enzymů v klinické praxi
2. **Možnosti získání enzymů pro diagnostiku a léčbu**
3. Enzymy v přípravě substrátu pro jeho následné vyšetření
4. Klinická stanovení specifických substrátů enzymaticky
5. Enzymy jako způsob obecné vizualizace analytů

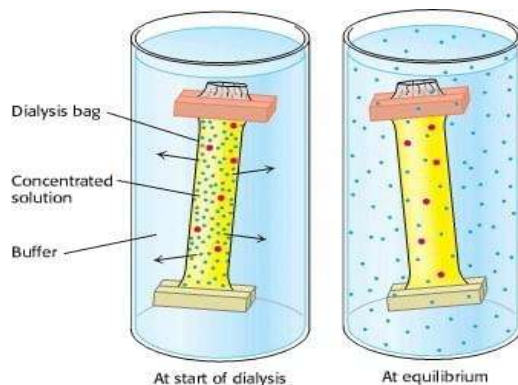
Jak získat čistý enzym pro stanovení substrátu (I)

- Rekombinantní techniky s expresními vektory = > bakteriální hostitelé genu nebo nižší houby, kvasinky, **možnost GMO**
- Přirozený původ = rostliny, živočišné druhy
- **Osmotická lýza, sonikace, mechanická homogenizace buněk**
- **Opakované zamrazení-rozmrazení**
- **Odstranění NK a buněčné debris**
- **Precipitace bílkovin (salting out, rozpouštědla) a dialýza (odstranění solí) nebo ultrafiltrace**



Jak získat čistý enzym pro stanovení substrátu (II)

- Purifikace - iontoměničová chromatografie pryskyřice podle hodnoty pI enzymu nebo gelová filtrace nebo afinitní chromatografie s navázaným substrátem nebo inhibitorem na kolonu
- Čistota enzymu až 95 %
- Dodávky v roztocích, lyofilizáty nebo vázané na PEG kvůli možné alergizaci
- Imobilizace: agar, aktivní uhlí, iontoměniče, membránové systémy (viz POCT).



Příklady enzymů produkovaných biotechnologicky pro klinickou diagnostiku

Analytic reagents

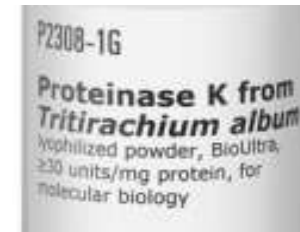
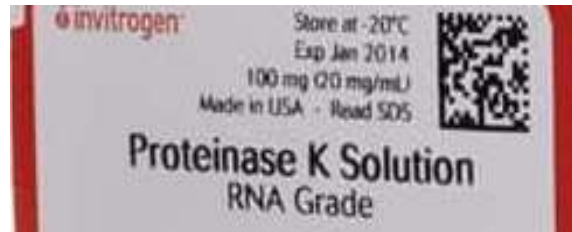
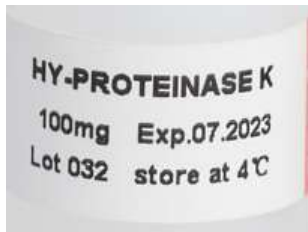
Glucose oxidase	Glucose oxidation	<i>Aspergillus niger</i>	Detection of glucose in blood
Luciferase	Bioluminescence	Marine bacteria or firefly	Bioluminescent assays involving ATP
Peroxidase	Dye oxidation using H ₂ O ₂	Horseradish	Quantification of hormones and antibodies
Urease	Hydrolysis of urea to CO ₂ and NH ₃	Jack bean	Urea quantification in body fluids

Manipulative tools

Lysozyme	Hydrolysis of 1–4 glycosidic bonds	Hen egg white	Disruption of mucopeptide in bacterial cell walls
Nucleases	Hydrolysis of phosphodiester bonds	Various bacteria	Restriction enzymes used in genetic manipulation to cut DNA
DNA polymerases	DNA synthesis	<i>Thermus aquaticus</i>	DNA amplification used in the polymerase chain reaction

Jak u enzymů vyjadřovat jejich množství

- Purifikovaný lyofilizovaný enzym: mg
- Rozpuštěný purifikovaný enzym v roztoku: mg/ml mg/5 ml...



- **mg nebo mg/l** enzymu tam *budou i po převaření (!!!)*, jde o odhad **koncentrace** bílkoviny biuretovou reakcí nebo jinou metodou (imunochemicky protilátkou, HPLC-MS)
- **Množství aktivního enzymu** se odhaduje funkčními zkouškami – po přidání substrátu jeho přeměnou za definovaných podmínek (teplota, pH, pufr, čas, aktivátory, detekce produktu)
- Množství aktivního enzymu závisí na výrobní šarži, transportu, uložení, expiraci...
- Množství aktivního enzymu se vyjadřuje **v $\mu\text{kat/l}$** nebo v mezinárodních jednotkách (U, IU/l)
- **$\mu\text{kat/l}$** = takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 μmolu substrátu za 1 s, a to za definovaných podmínek
- **U, IU/l** = byla definována obdobně, ale vztahovala se na přeměnu 1 μmolu substrátu za 1 min

$60 \text{ units/L} = 1.0 \mu\text{kat/L}$
--

Struktura přednášky

1. Stanovení katalytické aktivity enzymů v klinické praxi
2. Možnosti získání enzymů pro diagnostiku a léčbu
3. **Enzymy v přípravě substrátu pro jeho následné vyšetření**
4. Klinická stanovení specifických substrátů enzymaticky
5. Enzymy jako způsob obecné vizualizace analytů

Enzymy jako součást reagensí pro úpravu vyšetřovaného substrátu

- Lipidy

lipoproteinová lipáza: hydrolýza TAG na MK a glycerol
cholesterol esteráza: hydrolýza esterifikovaného CHOL

- Proteiny

ribonukleázy: uvolnění proteinů, snížení viskozity směsi

- Nukleové kyseliny

proteínázy: rozbití komplexů proteinů a NK
restriktázy: zkrácení DNA před sekvenováním
DNA ligázy: rekombinantní DNA molekuly
DNA polymerázy: zdvojení řetězce a oprava DNA
reverzní transkriptázy: tvorba komplementární DNA (cDNA)

Struktura přednášky

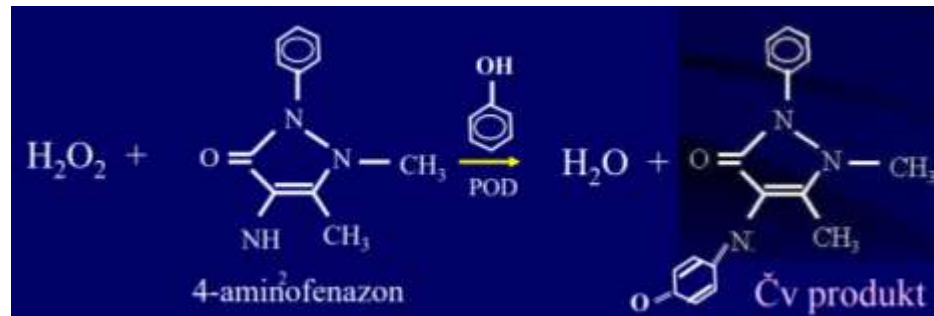
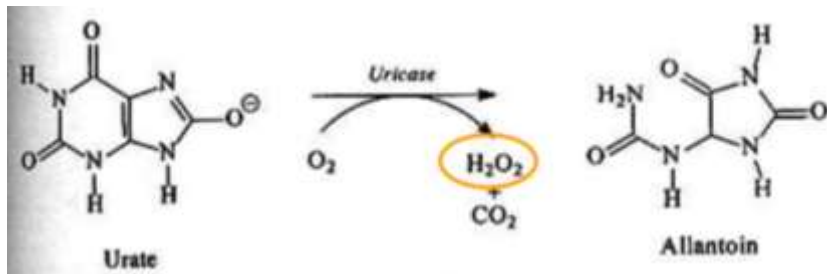
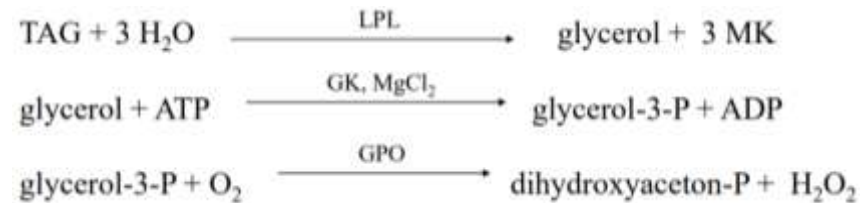
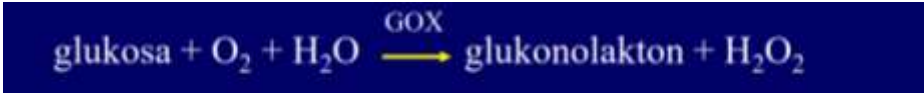
1. Stanovení katalytické aktivity enzymů v klinické praxi
2. Možnosti získání enzymů pro diagnostiku a léčbu
3. Enzymy v přípravě substrátu pro jeho následné vyšetření
4. ***Klinická stanovení specifických substrátů enzymaticky***
5. Enzymy jako způsob obecné vizualizace analytů

Enzymy pro vyšetření biochemického substrátu

- Enzym zde slouží ke stanovení substrátu díky své specifitě
- Zpravidla přímo nevzniká barevný nebo jinak viditelný produkt
- **Spřažení dvou či více enzymových reakcí**
- Zabarvení se generuje:
 - Vznikem finálního komplexu (přes peroxid vodíku)
 - Změnou oxidačního stavu koenzymu (NADH, NAD⁺)
- **Výhody:** specifitě reakce, žádná agresivní chemická činidla či přísné fyzikální podmínky, nemusí se upravovat biologický vzorek, snadná automatizace a rychlost reakce do hodiny
- **Nevýhody:** vyšší cena oproti chemickým reakcím (kreatinin, bilirubin...), instrumentální zařízení (BCH analyzátor)

Příklady stanovení substrátů v KBCH

- Oxidace substrátu za vzniku H_2O_2 a následného barevného komplexu
 - glukóza (enzymy glukosooxidáza a peroxidáza)
 - glycerol-3-fosfát (enzym G-3-P oxidáza) při stanovení TAG
 - cholesterol (enzym cholesteroloxidáza)
 - kyselina močová (enzym urikáza)



Příklady stanovení substrátů v KBCH

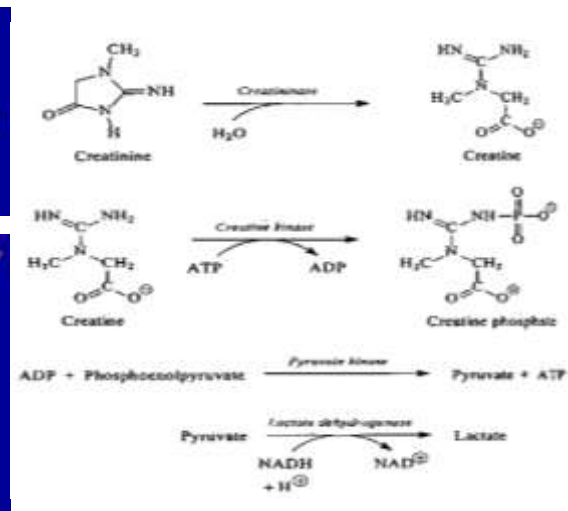
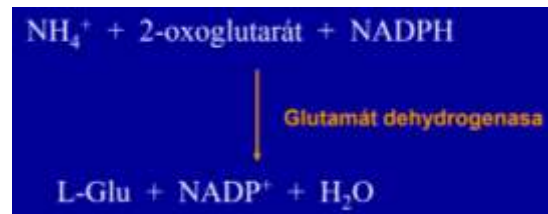
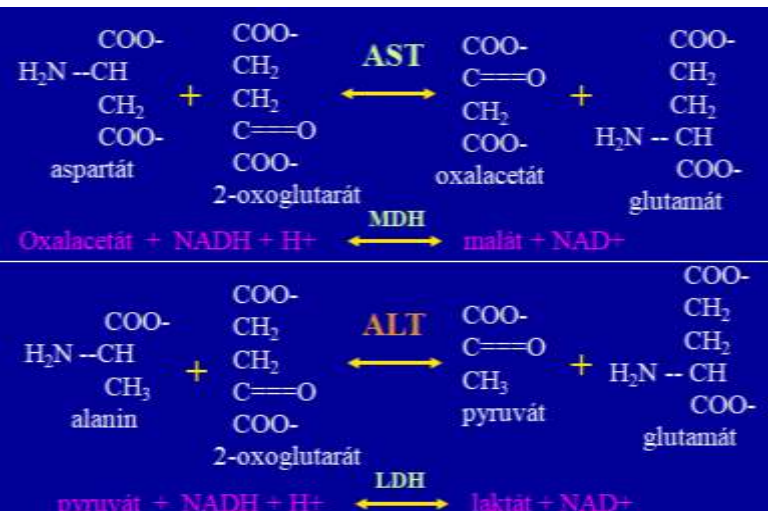
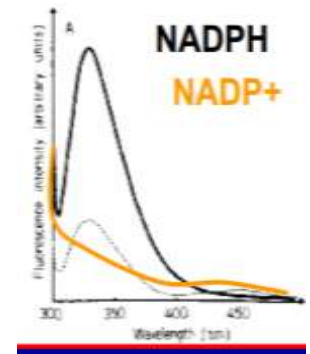
- Redukce ketokyseliny za vzniku oxidované formy NAD⁺/NADP⁺ a vymizení barvy

oxalacetát, pyruvát (enzymy malátdehydrogenáza a LDH)

kreatinin (LDH po sérii reakcí od kreatininu a tvorbě pyruvátu)

amoniak (enzym glutamátdehydrogenáza)

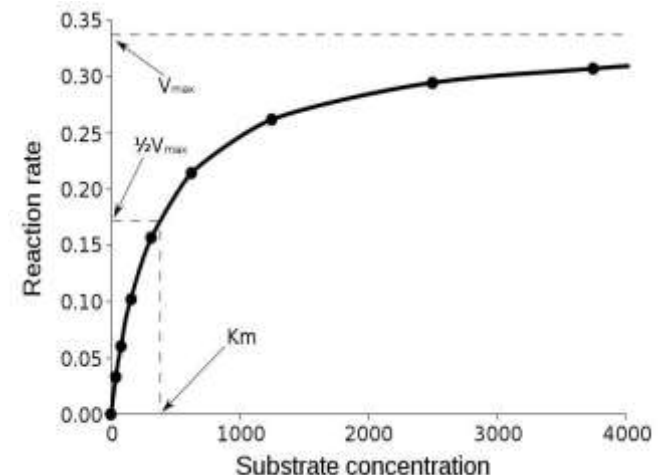
močovina (enzym glutamátdehydrogenáza po převodu močoviny na amoniak ureázou)



Klinická **stanovení substrátů** enzymaticky

- **Uspořádání:** biologický vzorek obsahuje substrát
- Reagencie v laboratoři obsahují enzym, pufr
- Detekční systém měří absorbanici roztoku v kyvetě - absorbance při reakci roste, klesá
- Změna absorbance se týká přímo substrátu, produktu, koenzymu reakce, produktu druhé a další spřažené reakce

V reagencích bývá zpravidla **10x vyšší koncentrace substrátu** než odpovídá K_m , je tím zaručena kinetika reakce nultého řádu a maximální rychlost v reakčním čase v různých vzorcích
Produkt bývá okamžitě odčerpáván pro spřaženou reakci

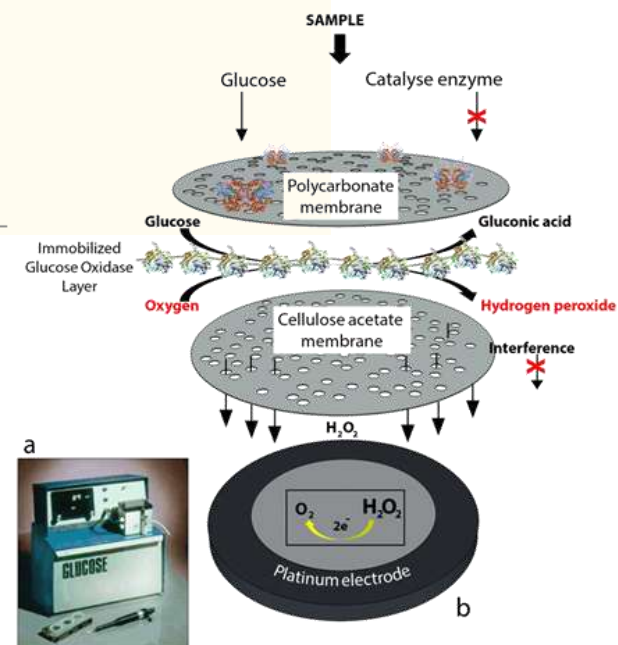


POCT a membránově vázané enzymy pro elektrochemické stanovení substrátů

Composition of enzyme membranes available for analysers with a peroxide-sensitive electrode as the transducer.

Analyte	Enzyme	Reaction
Glucose	Glucose oxidase	$\beta\text{-D-glucose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{gluconic acid} + \text{H}_2\text{O}_2$
Alcohol	Alcohol oxidase	$\text{Ethanol} + \text{O}_2 \rightarrow \text{acetaldehyde} + \text{H}_2\text{O}_2$
Lactic acid	Lactate oxidase	$\text{L-lactate} + \text{O}_2 \rightarrow \text{pyruvate} + \text{H}_2\text{O}_2$
Lactose	Galactose oxidase	$\text{Lactose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{galactose dialdehyde derivative} + \text{H}_2\text{O}_2$

Biosensors = self-contained integrated devices which incorporate a biological recognition component (usually an immobilized enzyme) and an electrochemical detector (known as a transducer).



Struktura přednášky

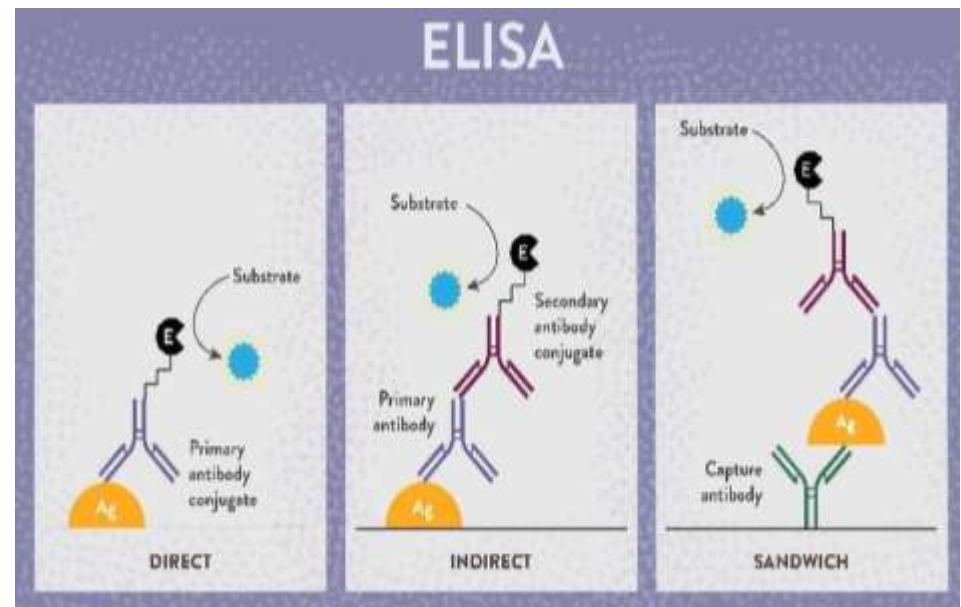
1. Stanovení katalytické aktivity enzymů v klinické praxi
2. Možnosti získání enzymů pro diagnostiku a léčbu
3. Enzymy v přípravě substrátu pro jeho následné vyšetření
4. Klinická stanovení specifických substrátů enzymaticky
5. Enzymy jako způsob obecné vizualizace analytů

Enzymy jako způsob obecné vizualizace analytů

- Enzymy díky své specifitě hrají také významnou úlohu v imunochemických a molekulárně biologických vyšetřeních
- Sendvičové uspořádání testování
- Nejstarší aplikace jsou známy jako ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)

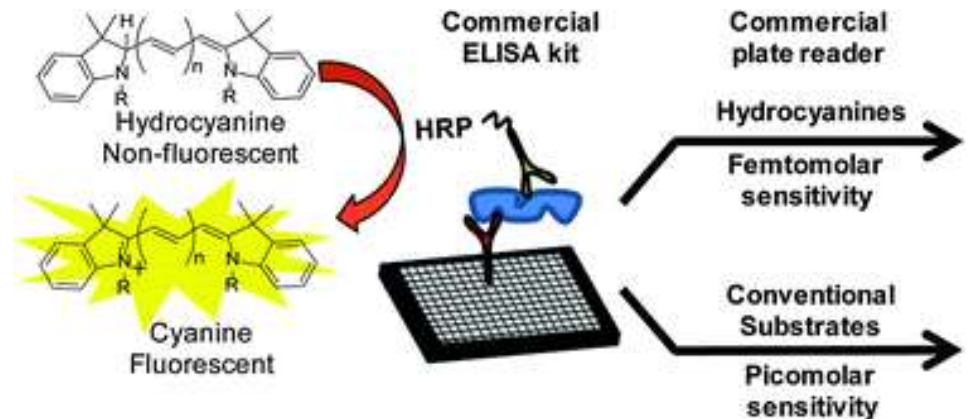
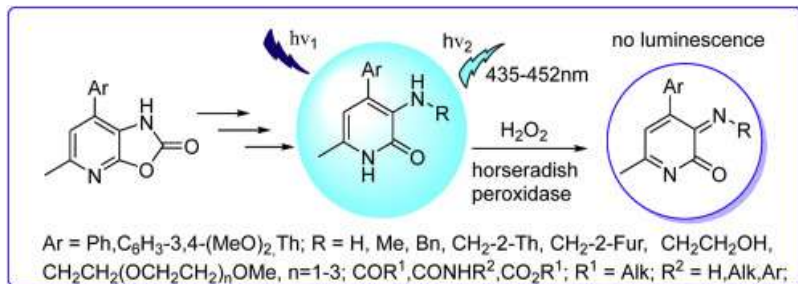
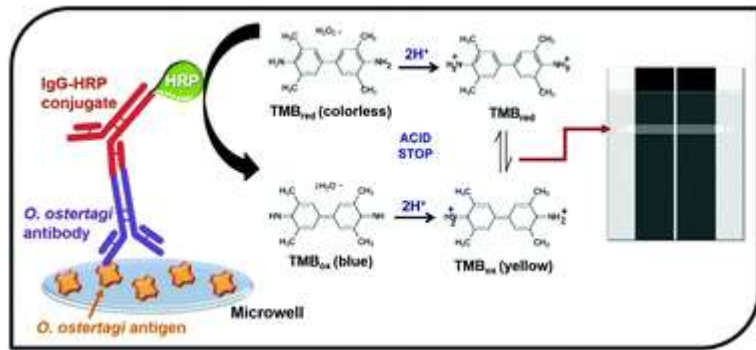
ELISA

- Enzym je vázán do komplexu se sekundární protilátkou, po odmytí nespotřebovaných komponent a přidání substrátu dochází díky enzymu ke vzniku barevného produktu
- Křenová peroxidáza
- Alkalická fosfatáza
- Luciferáza



Systemy s křenovou peroxidázou

- monoclonal horseradish peroxidase (HRP)
- TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)



Strategické cíle systémů s křenovou peroxidázou

Horseradish Peroxidase Market: Segmentation

Grade

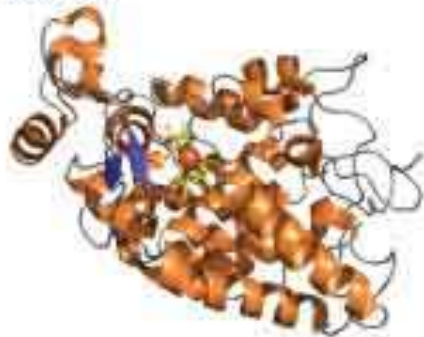
- *Grade I*
- *Grade II*
- *Grade III*

Application

- *Immunoassays*
 - *ELISA*
 - *Blot Test*
 - *Others*
- *Biosensors*

End User

- *Biopharmaceutical Companies*
- *Academic and Research Centers*
- *Others*



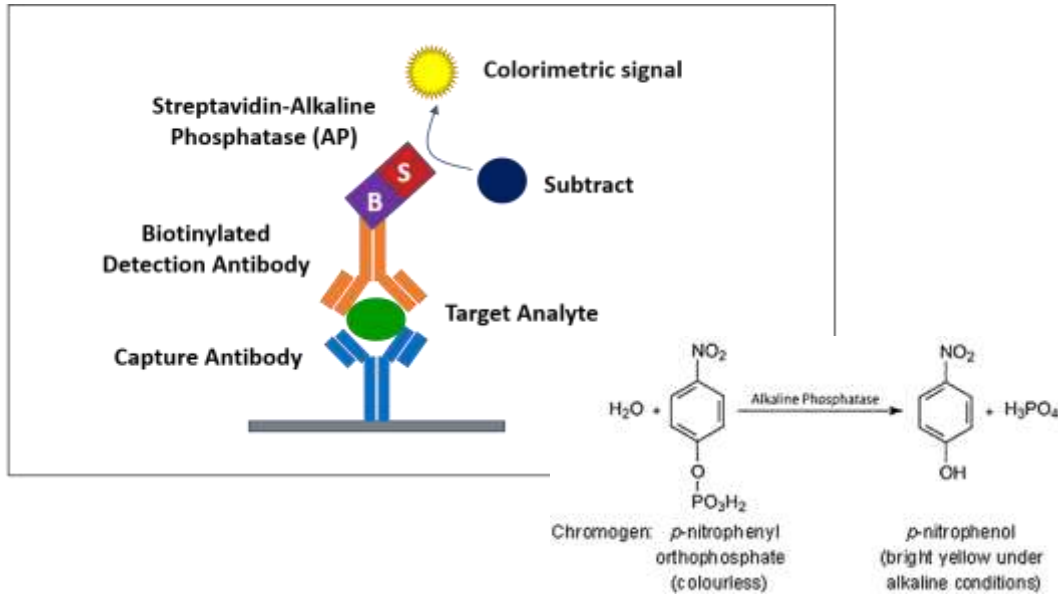
Substrate

- *ABTS*
(2,2'-Azinabis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] -diammonium salt)
- *OPD*
(ophenylenediamine dihydrochloride)
- *TMB*
(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
- *Others*

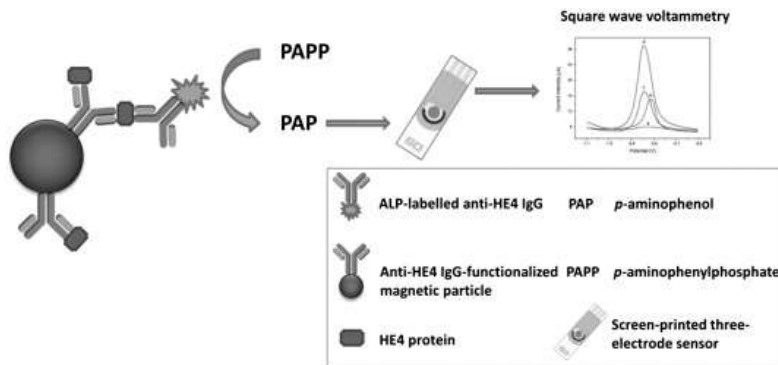
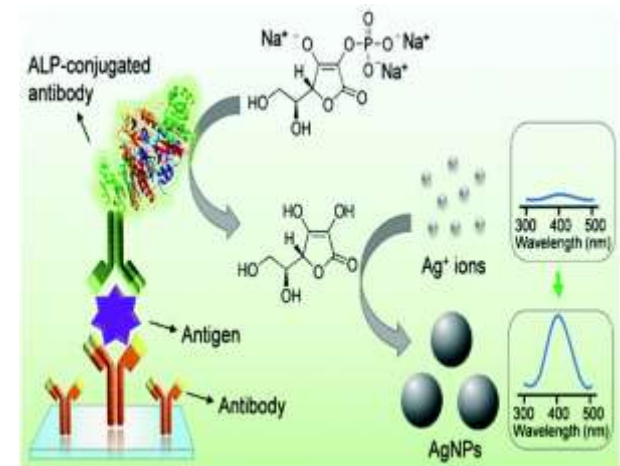
Region

- *North America*
- *Europe*
- *Asia Pacific*
- *Latin America*
- *Middle East & Africa*

Systemy s alkalickou fosfatázou



Plasmonic ELISA based on the controlled growth of silver nanoparticles

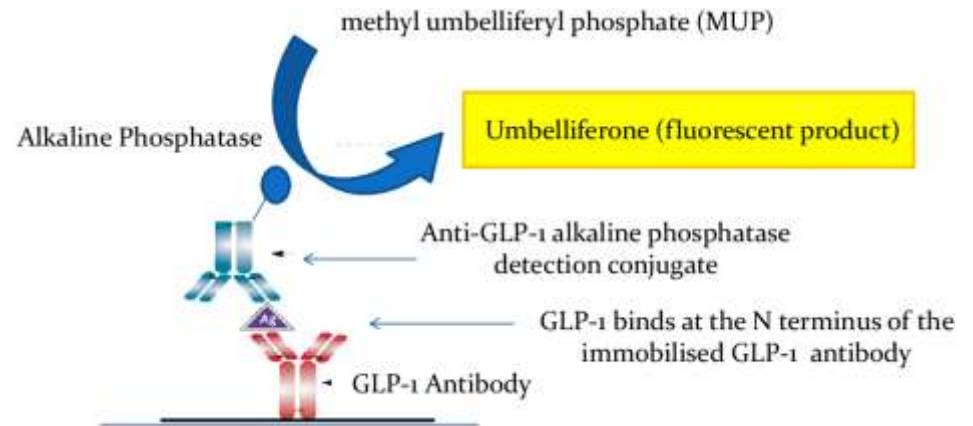


Alkaline phosphatase labeled antibody-based electrochemical biosensor for sensitive HE4 tumor marker detection

Novější systémy s ALP pro automatickou ICH analýzu

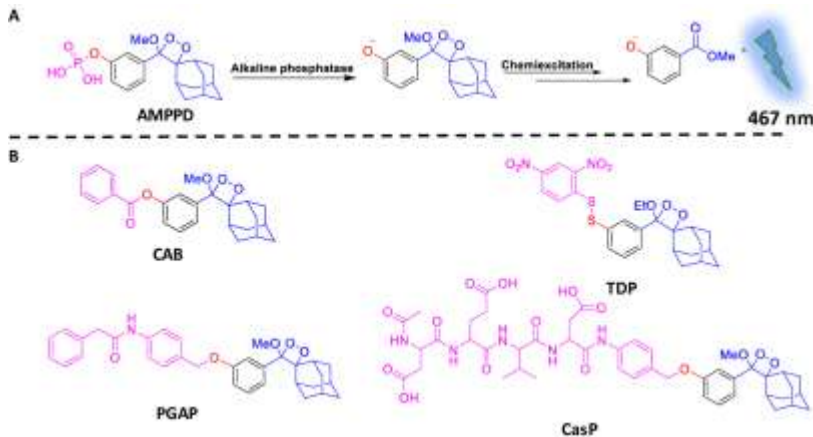
Assay components

- The components of **MEIA** include the following, all suspended in a specific buffer optimized for the assay:
 - Microparticle-Antibody Solid Phase:** Latex microparticles that are coated with antibody to bind the specific analyte being measured;
 - Antibody-Enzyme Conjugate:** Alkaline Phosphatase enzyme conjugated to antibody;
 - Enzyme Substrate:** Fluorescent 4-Methyl Umbelliferyl Phosphate (MUP) in solution that is available for a reaction with the enzyme on the antibody.

Dioxetan a jeho deriváty

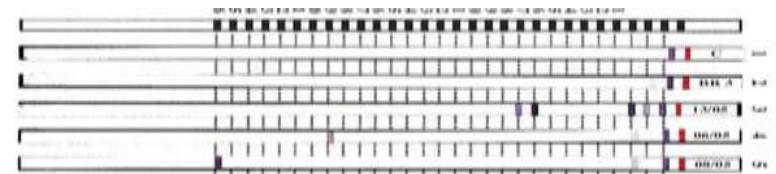
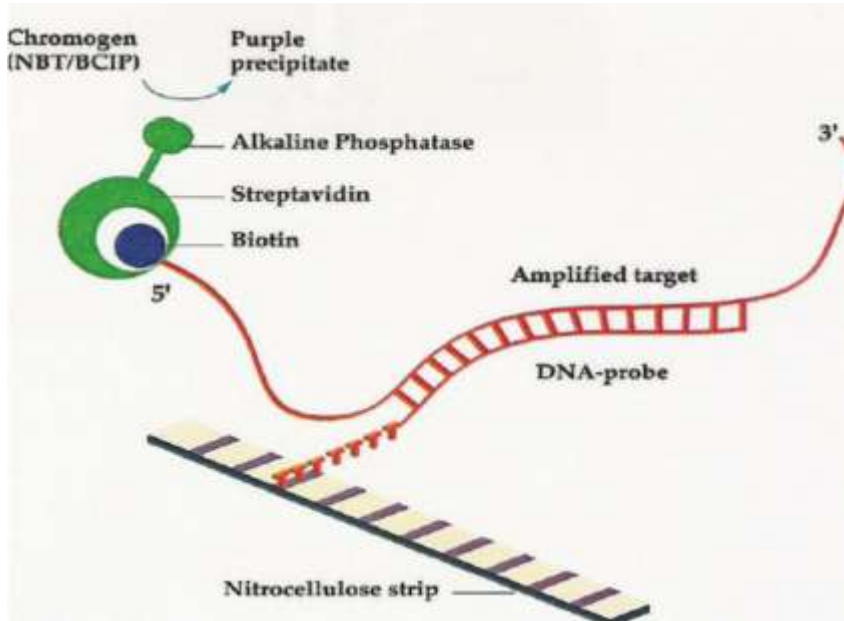
Umbelliferon



Systemy s ALP v molekulární biologii

- Reverzní blotting (Innolipa nebo ViennaLab) pro detekci ampliconu PCR značeného biotinem
- *NBT* nitro-blue tetrazolium and *BCIP* 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate

RNA viru HPV



TENDIGO™

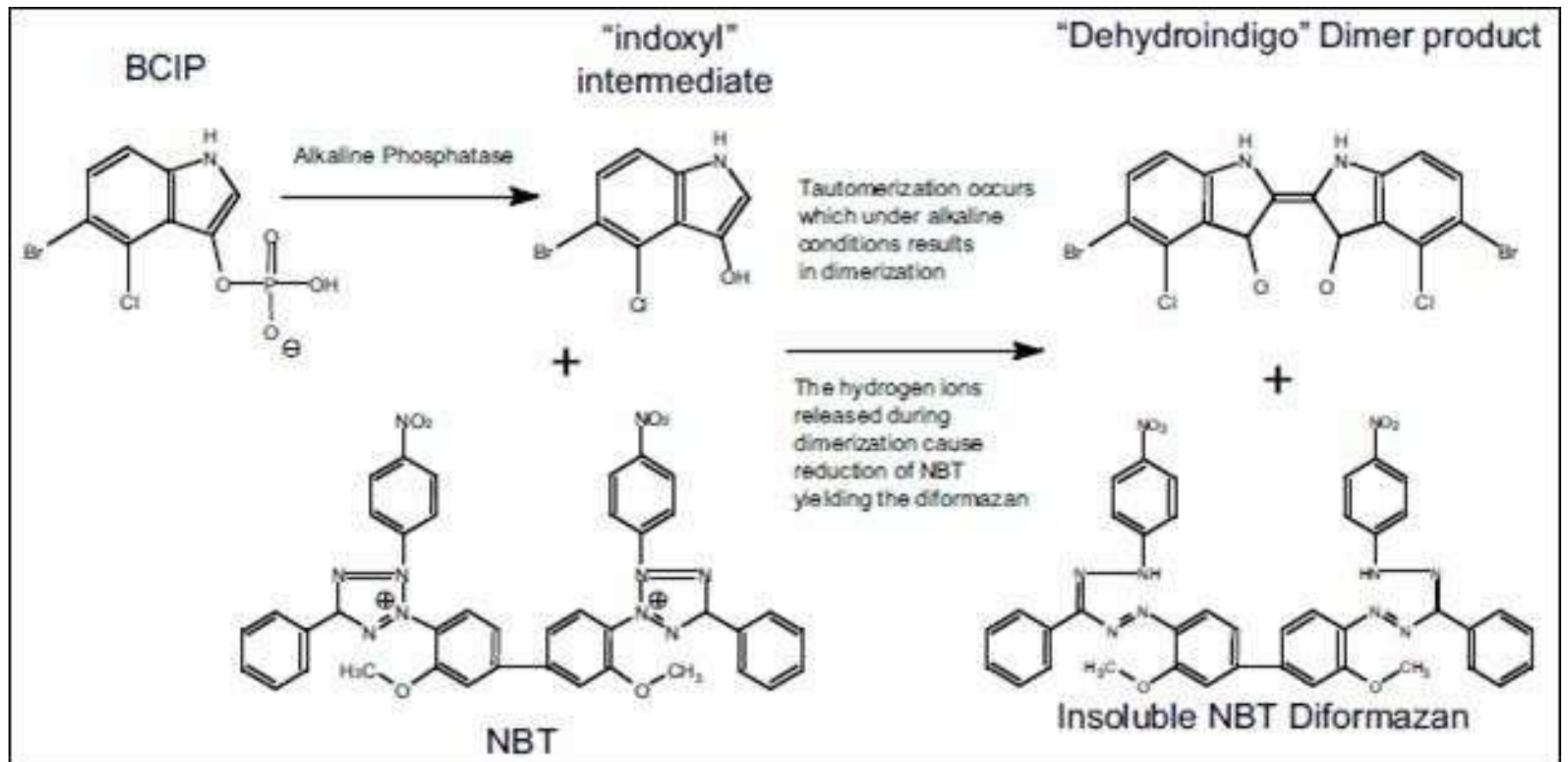
Automation made easy

Dry heating on board

Accurate



Systemy s ALP v molekulární biologii



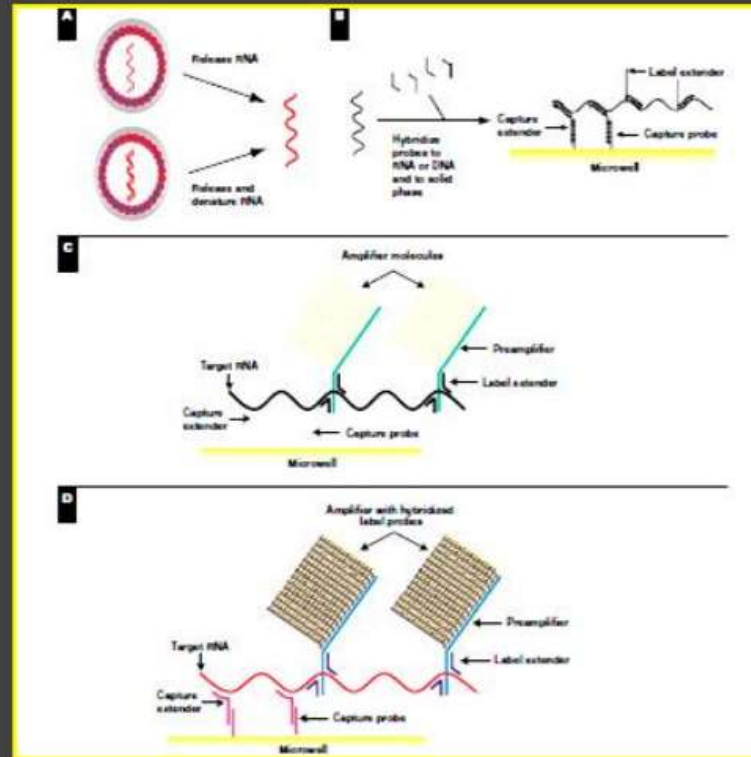
Systemy s ALP v molekulární biologii

bDNA (branched DNA)

- Neamplifikuje se sekvence NK, nýbrž výsledný detekční signál.
- V principu jde o systém vzájemně hybridizujících DNA specifických sond, větvených sond a koncových sond značených enzymem, např. ALP.
- Navázáním komplexu sond na hledaný úsek NK v mikrotitrační destičce dojde po přidání substrátu k chemické reakci a k emisi fluorescence nebo chemiluminiscence.
-
- Intenzita záření je úměrná množství templátové NK přítomné ve vzorku.
-
- HIV, HCV
- HBC, CMV



Image 11 Bayer System 240 bDNA (branched chain DNA) Analyzer.



Závěry

1. Kinetické stanovení enzymů patří mezi základní vyšetření v KBCH a slouží k **potvrzení strukturního a funkčního poškození** tělesných orgánů
2. Produkce purifikovaných enzymů (včetně referenčních vzorků) se dnes provádí téměř výhradně **biotechnologicky** (rekombinantními technikami)
3. Enzymy významně pomáhají **v preanalytické fázi** vyšetření biochemických analytů, včetně vyšetření DNA
4. Vyšetření substrátů v KBCH enzymaticky je sice dražší než klasické chemické vyšetření, ale je snáze **automatizovatelné a specifitější**
5. Enzymy společně s fluorofory slouží **v citlivé detekci imunochemických analytů** v roztoku, na pevném podkladu i jako součást **elektrochemických biosenzorů**