

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



AUTOMATIZACE TOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich CSc.

Hradec Králové 2018

Bc. Klára Žižková

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce paní Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph. D. za její vedení, pomoc, ochotu, vstřícnost a věcné rady při zpracování diplomové práce, kdykoli bylo potřeba, kolektivu v laboratoři SIA metod za příjemné prostředí a rodině za podporu po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Klára Žižková

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Automatizace toxikologických testů

Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu stanovení luciferázy I. a II. typu pomocí metody sekvenční injekční analýzy a optimalizovat podmínky stanovení. Hlavním cílem bylo automatizovat analýzu v sériích vzorků připravených v rámci testování různých látek, které mohou ovlivnit zejména hladinu sekretované luciferázy (II. typ) při interakci buněk s testovanými látkami v toxikologických studiích. V teoretické části je popsána luminiscence, její typy a využití. Dále jsou zmíněny typy luciferáz a činidla, se kterými probíhá chemická reakce. Jsou popsány principy průtokových technik. Byla provedena rešerše na dané téma – stanovení luciferázy.

Měření byla prováděna za pomoci metody sekvenční injekční analýzy. V experimentální práci byly použity tři přístroje. Jeden průtokový injekční analyzátor, který pracuje na principu SIA a jeden sekvenční injekční analyzátor se dvěma způsoby detekce – detektor s neprůtokovou celou a s průtokovou spirální celou. Byla provedena optimalizace měření – zejména koncentrace a objem vzorků a činidel, pořadí jejich aspirace a také průtoková rychlost průchodu detektorem, vhodné pracovní napětí. Kvůli nízké opakovatelnosti a vyššímu šumu signálu staršího typu přístroje bude optimalizace pokračovat v rámci navazující diplomové práce s novým detektorem.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Klára Žižková

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Automation of toxicology tests

The aim of this diploma thesis was to find suitable method for determination of luciferase of the I₁ and I₂ types using the sequential injection method and optimize the assay conditions. The main aim was to automate analysis in a series of samples prepared for the testing of various substances, which, in particular, may affect the level of secreted luciferase (type II) upon the interaction of cells with tested substances in toxicological studies. The theoretical part describes luminescence, its types and applications. In addition, the types of luciferases and reagents with which a chemical reaction takes place are mentioned and principles of flow techniques are described. The review of luciferase determinations was carried out.

Measurements were performed using the sequential injection method. Three instruments were used for the measurement. One flow injector analyser and one sequential injection analyser with two detection methods - batch-flow spiral detection cells were used. Measurement optimization was performed based on concentration and volume of samples and reagents, their aspiration order and also flow rate of measurement together with suitable working voltage. But due to the low repeatability and higher signal noise of the older device type, optimization will continue within the framework of the following diploma thesis with the new detector.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	4
1 Úvod	5
2 Cíl a popis zadání práce	6
3 Teoretická část	7
3.1 Luminiscence	7
3.1.1 Typy luminiscence	8
3.1.2 Chemiluminiscence	9
3.1.3 Bioluminiscence	9
3.1.4 Využití luminiscenčních metod	9
3.2 Luciferáza	10
3.2.1 Luciferáza I. typu	10
3.2.2 Luciferáza II. typu	13
3.2.3 Porovnání obou typů luciferáz	15
3.3 Stanovení luciferázy	15
3.4 Rešerše – stanovení luciferázy	17
3.5 Průtokové metody	20
3.5.1 Průtoková injekční analýza (FIA)	20
3.5.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)	20
4 Experimentální část	23
4.1 Použité přístroje a pomůcky	23
4.2 Použité chemikálie	24
4.3 Popis přístroje	26
4.3.1 Detektor s neprůtokovou celou („batch“ cela)	27
4.3.2 Detektor s průtokovou spirální celou	27
4.3.3 Detektor u systému FIAlab	28
4.4 Příprava roztoků	28

4.4.1	Příprava roztoku ATP	28
4.4.2	Směs luciferinu a luciferázy z komerčního kitu	28
4.4.3	Luciferin a luciferáza v samostatných roztocích	28
4.4.4	Příprava roztoku QuantiLuc.....	29
4.4.5	Příprava lyzátu z buněčných kultur	29
4.4.6	Uchovávání roztoků.....	29
4.5	Postupy při měření	29
4.5.1	Analýza s neprůtokovou celou (KIT)	30
4.5.2	Analýza s průtokovou spirální celou - KIT	32
4.5.3	Analýza s průtokovou spirální celou – aspirace luciferinu a luciferázy ...	32
4.5.4	Analýza na přístroji FIAlab	33
5	Výsledky a diskuze	35
5.1	Analýza s neprůtokovou "batch" celou (přístroj č. 1).....	35
5.1.1	Měření směsi z komerčního kitu.....	35
5.1.2	Stanovení ATP	35
5.2	Analýza s průtokovou celou (přístroj č. 2 - FIAlab).....	36
5.2.1	Stanovení pomocí komerčního kitu	36
5.2.2	Stanovení ATP pomocí komerčního kitu.....	37
5.2.3	Stanovení pomocí roztoků luciferázy a luciferinu	39
5.2.4	Stanovení luciferázy II. typu z lyzátu buněk	41
5.3	Stanovení s průtokovou spirální celou (přístroj č. 3).....	41
5.3.1	Stanovení pomocí komerčního kitu	41
5.3.2	Stanovení pomocí samostatných činidel luciferázy a luciferinu	43
5.3.3	Stanovení luciferázy II. typu z lyzátu buněk	46
6	Souhrn.....	54
7	Závěr	56
8	Použitá literatura	57

9	Seznam obrázků.....	62
10	Seznam tabulek.....	64
11	Seznam rovnic.....	65

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP – adenosintrifosfát

AMP – adenosinmonofosfát

DMSO – dimethylsulfoxid

FIA – průtoková injekční analýza

HepG2 – buněčná linie lidských jaterních buněk

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)

MPV – vícecestný ventil (multi port valve)

PMT – fotonásobič (photomultiplier tube)

PTFE – polytetrafluorethylen

SIA – sekvenční injekční analýza

SIC – Sekvenční injekční chromatografie

RTG – rentgenové záření

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné světlo

1 ÚVOD

Bioluminiscence je proces, při kterém vzniká záření. V přírodě je to široce rozšířený jev, známý již od 300 let před n. l. Reakce, při které vzniká toto záření, je katalyzována enzymy, které se nazývají luciferázy. Jedny z nejznámějších živočichů produkující luciferázu a tím i záření jsou světlušky. I další organismy jako jsou bakterie, houby, červi, hmyz, ryby a žahavci (medúzy, korály, sasanky) jsou schopny bioluminiscence.

V této diplomové práci je popsáno automatizované stanovení luciferázy produkované v rámci toxikologických testů metodou sekvenční injekční analýzy. Sekvenční injekční analýza je rozvíjející se metoda schopná automatizovat různé druhy chemických reakcí včetně těch, které jsou založené na emisi bioluminiscenčního resp. chemiluminiscenčního záření, jak v testování kvality životního prostředí (půd, vod, ovzduší), potravinářském průmyslu, tak i u klinických aplikací v medicíně.

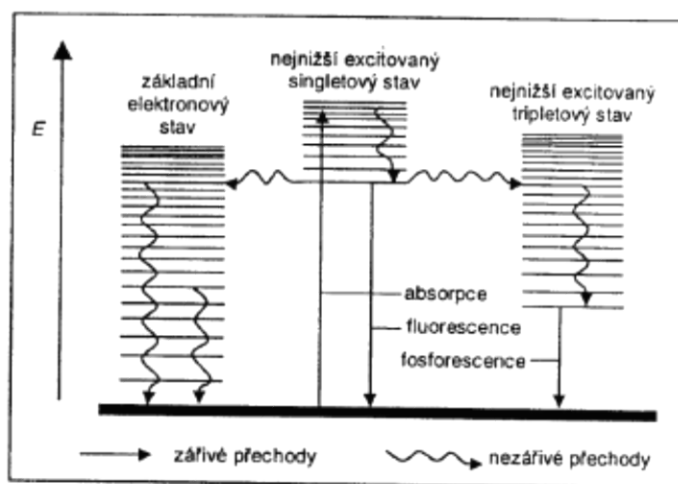
2 CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo optimalizovat vhodnou metodu stanovení luciferázy I. a II. typu pomocí metody sekvenční injekční analýzy a optimalizovat podmínky stanovení. Cílem bylo vyvinout metodu stanovení luciferázy pro automatizovanou analýzu v sériích vzorků připravených v rámci testování různých látek, které mohou ovlivnit zejména hladinu sekretované luciferázy (II. typ) při interakci buněk s testovanými látkami v toxikologických studiích. Automatizace bude provedena v systému sekvenční injekční analýzy s několika typy fotonásobičů, které budou v práci porovnávány.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Luminiscence

Měření luminiscence se řadí k emisním optickým instrumentálním metodám. Při luminiscenci dochází k emisi elektromagnetického záření. Děje se tak po předchozím dodání energie primárním zářením – RTG, UV, VIS. K emisi luminiscenčního záření dochází spontánně, kdy molekula přijme energii ve formě tepla, světla (fotonu) nebo v jiné formě a jeden nebo více elektronů se dostane na vyšší energetickou hladinu – do excitovaného stavu. Poté dochází k deaktivaci a elektrony přechází zpět do základního stavu, protože excitovaný stav je nestabilní. Při přechodu do nižší energetické hladiny dochází k emisi sekundárního záření - přebytečná energie se vyzáří ve formě světla (fotonu), část z ní se přemění na teplo. Tento jev je popsán na obrázku č. 1, na kterém jsou znázorněny energetické hladiny, absorpce záření a excitace elektronů, přechod na nižší hladinu excitovaného stavu a deaktivace s emisí záření přebytečného množství energie [1-2].



Obrázek 1: Popis přechodu elektronů v energetických hladinách [1]

Absorbované světlo má vyšší energii a nižší vlnovou délku, emitované záření má nižší energii a větší vlnovou délku. Část molekuly analyzované látky schopná luminiscence se nazývá luminofor [3].

Rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou popisuje Stokesův posun. Obrázek č. 2 znázorňuje odlišné vlnové délky absorbovaného a emitovaného záření látkou [4].



Obrázek 2: Stokesův posun [4]

3.1.1 Typy luminiscence

Luminiscenci je možné rozdělit na dva typy – fluorescenci a fosforescenci.

Fluorescence probíhá během několika málo nanosekund (10^{-6} až 10^{-9} s) a vyhasíná po odstranění zdroje excitace elektromagnetickým zářením. Projevuje se zejména u kapalin. Naopak fosforescence je luminiscence, která probíhá pomalu (10^{-3} až 10^2 s) a dochází při ní k postupnému vyzáření až během několika minut [1].

Další možný způsob, jak rozdělit luminiscenci je podle zdroje energie, které luminiscenci vyvolá. Může jít o energii světelnou – tedy záření, chemickou nebo například tepelnou. Rozdělení různých druhů luminiscence uvádím v tabulce č. 1 [1,3].

Tabulka 1: Druhy luminiscence [1,3]

Typ luminiscence	Budící energie
Fotoluminiscence	Světelné záření, např. UV
Chemiluminiscence	Chemická reakční energie
Bioluminiscence	Chemická vyzářována živými organismy
Termoluminiscence	Tepelná
Elektroluminiscence	Elektrická
Radioluminiscence	Krátkovlnné elektromagnetické záření
Sonoluminiscence	Ultrazvuk

3.1.2 Chemiluminiscence

Chemiluminiscence je jev, kdy dochází k produkci světla během chemické reakce. Při reakci spolu reagují dvě látky, které vytvoří excitovaný nestabilní meziprodukt s vysokou energií. Poté se tento meziprodukt rozpadá a při tom se uvolní energie ve formě fotonů a je emitováno záření. Vzniká stabilní produkt s nízkou hladinou energie [5-6].

3.1.2.1 Přímé a nepřímé systémy chemiluminiscenční analýzy

Chemiluminiscenční analýzu je možné provést dvěma způsoby měření. Může být využito měření v přímém systému nebo nepřímém. U přímého chemiluminiscenčního systému dochází k emisi záření díky přímé reakci mezi analytem a chemiluminiscenčním činidlem. Nepřímý systém měření chemiluminiscence je založen pouze na ovlivnění chemické reakce analytem – analyt funguje jako inhibitor nebo zesilovač dané reakce.

Nejstarší nepřímý systém je reakce s luminolem. Luminol je nejčastější užívané chemiluminiscenční činidlo. K chemiluminiscenci dochází díky oxidaci peroxidu vodíku H_2O_2 nebo manganistanu draselného $KMnO_4$. ATP je možné měřit reakcí s luminolem [1,3].

3.1.3 Bioluminiscence

U našeho experimentu byla využita bioluminiscence – jedná se o typ chemiluminiscence v živých organismech, kdy je využita jako zdroj energie makroergní molekula ATP. Tento jev můžeme pozorovat u suchozemských živočichů - jako jsou: bakterie, houby, červi nebo hmyz, anebo mořští živočichové - ryby, žahavci (medúzy, sasanky, korály). Obecně je jev bioluminiscence více rozšířen mezi mořskými organismy [7].

3.1.4 Využití luminiscenčních metod

Chemiluminiscence se využívá ve farmaceutických a klinických aplikacích u analýzy biomolekul, léčiv a jejich metabolitů. Dále je možné využít luminiscenci jako značení u analýzy DNA a proteinů například pro fluorescenční mikroskopii nebo průtokovou cytometrii a při detekci toxických látek v zemědělství a životním prostředí (pesticidy, herbicidy, organofosfáty, oxidy dusíku a síry). Neméně důležité využití nachází luminol v kriminalistice při detekci krevních stop a dalších tělních tekutin. Další využití je možné u svítících tyčinek při potápění nebo nočním rybolovu [1,3].

3.2 Luciferáza

Luciferáza je souhrnný název pro více enzymů s oxidoreduktázovou aktivitou, které po reakci s luciferinem nebo jinou látkou umožňují živočichům bioluminiscenci. Jedná se o jev, při němž dochází k produkci světla živými organismy. Reakce, kterou katalyzuje luciferáza, je exergonická a dochází při ní tudíž k uvolňování energie ve formě světla. Toto světlo se označuje jako studené, protože se většina energie přemění na světlo. Enzymy luciferázy se využívají v oblasti medicíny např. bioinženýrství, jako biosenzory a buněčné biologii [8-9].

3.2.1 Luciferáza I. typu

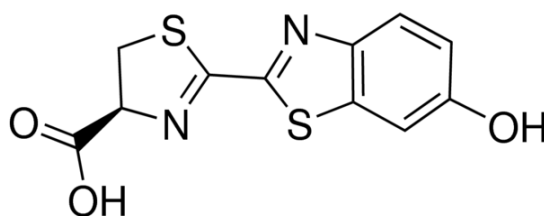
Luciferáza I. typu (neseekretovaná) se vyskytuje u hmyzu. *Elateroidea* je nadčeleď brouků, do které patří čeledi *Lampyridae* (světluškovití), *Elateridae* (kovaříkovití) a *Phengodidae*. Tyto tři čeledi brouků se vyznačují produkcí bioluminiscenčního záření. Produkují různé barvy luminiscenčního záření od zelené po červenou. Významný zástupce je živočich *Photinus pyralis* (světluška), brouk patřící do čeledi *Lampyridae* [8-9].



Obrázek 3: *Photinus Pyralis* – světluška [6]

3.2.1.1 *Luciferin*

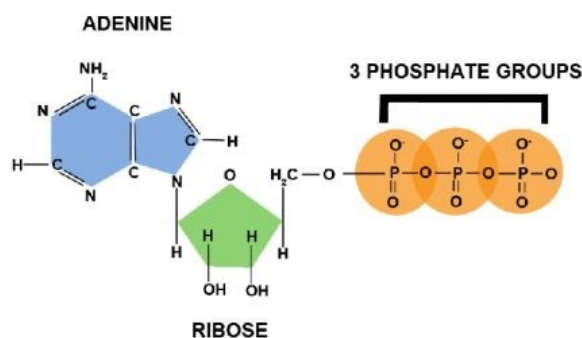
Jedná se o bioluminiscenční zářič – substrát pro enzym luciferázu I. typu. Nachází se v buňkách nebo mezibuněčných prostorech organismů, které jsou schopné vyvolat luminiscenční záření. Po jeho oxidaci dochází ke světelnému záření. Luciferin je optický izomer, tedy enantiomer – látka obsahující chirální atom. Ten způsobí možnost výskytu látky ve dvou formách (L a D) o stejném sumárním vzorci, ale jiné prostorové orientaci atomů v molekule. Luciferin se tedy vyskytuje se v L a D formě. Syntetický D-luciferin využitý v experimentální části této diplomové práce má chemický název (*S*)-2-(6-Hydroxy-2-benzothiazolyl)-2-thiazolin-4-karboxylová kyselina, nebo také 4,5-Dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)-4-thiazolkarboxylová kyselina. L forma luciferinu způsobuje inhibici reakce s luciferázou [6,10-12].



Obrázek 4: Struktura luciferinu [10]

3.2.1.2 *ATP*

ATP neboli adenosin trifosfát je látka, která se přirozeně vyskytuje v těle člověka a dalších organismech. Je nezbytný při regulaci buněčného metabolismu. Je produktem oxidačních reakcí. Skládá se ze z nukleotidu adeninu, ribózy a tří fosfátových skupin. Fosfát je připojen pomocí fosfodiesterové vazby. Tato vazba je makroergní – při jejím rozštěpení se uvolní značné množství energie, kterou je možno využít například pro mechanickou práci svalů nebo další metabolické procesy [1,13].



Obrázek 5: Struktura ATP [14]

U světluškové luciferázy je nezbytná přítomnost molekuly ATP k tomu, aby došlo k záření. Díky tomu je možné stanovit ATP chemiluminiscenční reakcí s luciferázou. ATP je důležitá molekula v těle člověka ovlivňující mnohé biochemické procesy a metabolismus. ATP je využíváno jako indikátor buněčného poškození a životaschopnosti buněk. Dále také ke zjištění bakteriálního znečištění v životním prostředí. Bioluminiscenční stanovení ATP je založeno na reakci s luciferázou [1,13].

3.2.1.3 Reakce luciferáza – luciferin

Reakce mezi světluškovou luciferázou a luciferinem je jedna z nejprostudovanějších. Luciferáza, kterou disponují brouci, má dvě funkce – je to CoA-ligáza a oxygenáza. Světlušková luciferáza sestává z 550 aminokyselin a má molekulovou hmotnost kolem 60 kDa. Katalyzuje – tedy usnadňuje a urychluje reakci - mezi luciferinem, adenosin trifosfátem (ATP), hořčnatými ionty a molekulárním kyslíkem. Při reakci dochází k oxidační dekarboxylaci luciferinu za produkce oxyluciferinu, anorganického pyrofosfátu, adenosin monofosfátu (AMP), oxidu uhličitého (CO₂) a světla. Toto světlo je emitováno při vlnové délce 550-570 nm, jedná se tedy o světlo z viditelného spektra. Reakce světluškové luciferázy probíhá podle následující rovnice [9,15,16].

Rovnice 1: Přeměna luciferinu na oxyluciferin a vznik bioluminiscenčního záření [16]



Tato reakce je využitelná pro stanovení ATP. Reakce luciferinu s luciferázou je velmi využívaná v analytické praxi díky její vysoké citlivosti a jednoduché instrumentaci [15].

Optimalizace reakce spočívá ve znalosti reakčních podmínek, vhodné volbě množství substrátu a eliminaci možných inhibitorů reakce. K optimalizaci reakce a intenzity emitovaného bioluminiscenčního záření se využívá různého objemu luciferázy a luciferinu o stejné nebo různé koncentraci. Důležité je i množství ATP a Mg^{2+} a stabilní pH pufovaného roztoku. Mezi inhibitory ovlivňující tuto reakci patří sloučeniny podobné substrátu (tedy luciferinu), intermediáty a produkty této reakce, mastné kyseliny, hormony a léčiva jako např. anestetika, antivirotika [9,17].

3.2.2 Luciferáza II. typu

Další druh luciferázy, je luciferáza sekretovaná - tedy luciferáza II. typu, která je schopná emitovat bioluminiscenční záření o vlnové délce 480-490 nm po oxidaci koelenterazinu. Luciferáza II. typu se nachází převážně u mořských živočichů, jako jsou žahavci (medúzy, korály, sasanky). U experimentů v laboratořích je součástí buněčných kultur, do kterých je uměle zanesen genetický vektor produkující tuto luciferázu, a které jsou při různých podnětech schopné luciferázu uvolňovat.

Typickými zástupci obsahující luciferázu II. typu, které jsou schopné reagovat s koelenterazinem, jsou mořští živočichové *Renilla reiniformis*, *Oplophorus gracilorostris*, *Gaussia princeps*, *Aequorea victoria* a *Metridia longa* [18-19].

3.2.2.1 *Gaussia princeps*

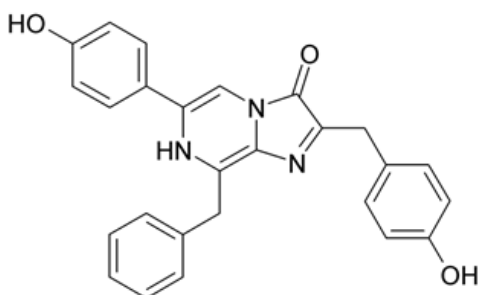
Tento živočich patří do třídy korýšů a vyskytuje se v teplých mořích po celém světě. Luciferáza *Gaussia* byla využita v této práci pro měření bioluminiscence s luciferázou II. typu (sekretovanou) [20].



Obrázek 6: *Gaussia princeps* [21]

3.2.2.2 Koelenterazin

Koelenterazin je látka vyskytující se v tělech mořských organismů. Je to látka, která funguje jako substrát pro enzym luciferázu II. typu. Luciferáza katalyzuje reakci koelenterazinu, dochází při ní k jeho oxidaci na koelenteramid a následnému záření světla modré barvy o vlnové délce 460-490 nm. Strukturální název koelenterazinu je 3,2-dihydro-2-(p-hydroxybenzyl)-6-(p-hydroxyphenyl)-8-benzylimidazolo[1,2-a]pyrazin-3 a je znázorněn na obrázku č. 8 [18-19,21-22].

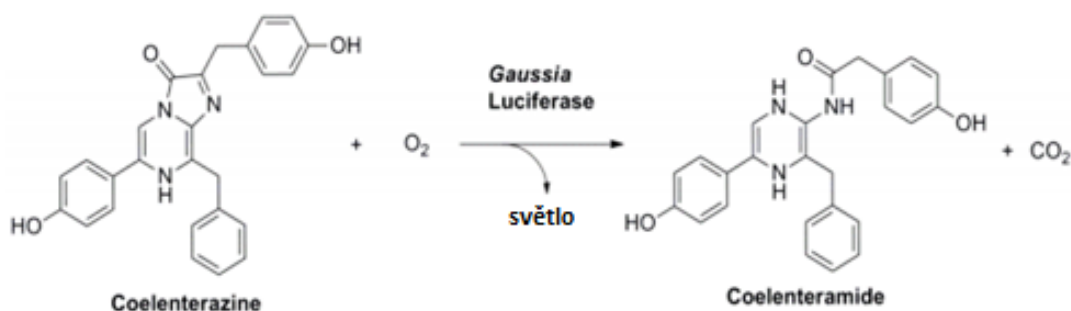


Obrázek 7: Struktura koelenterazinu [22]

3.2.2.3 Reakce luciferázy II. typu s koelenterazinem

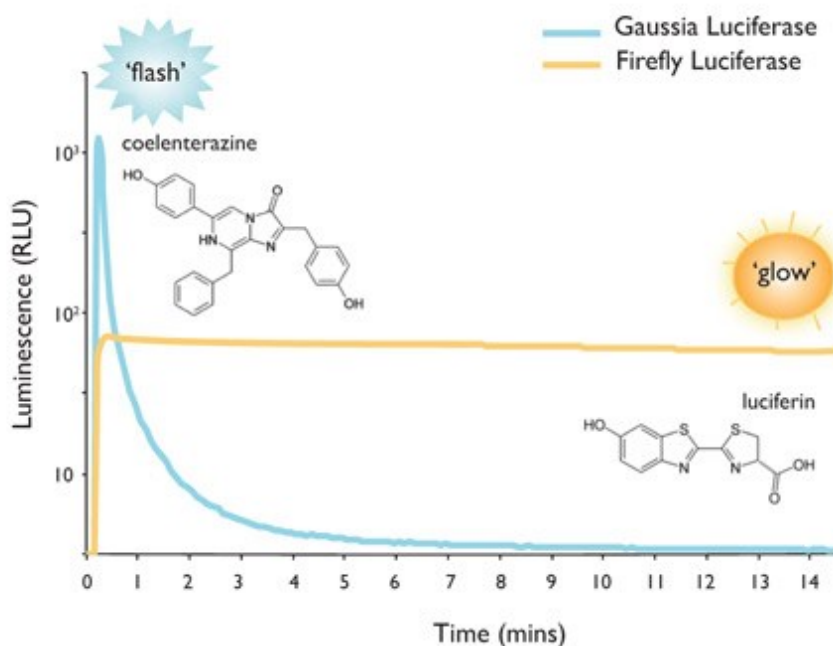
Koelenterazin je za přítomnosti kyslíku luciferázou II. typu přeměněn na nestabilní peroxidovou sloučeninu, která se přeměňuje na koelenteramid za vzniku oxidu uhličitého a emisi záření o vlnové délce 480-490 nm. Pro chemickou reakci je důležitá přítomnost Ca^{2+} iontů. Tato reakce je charakteristická pro *Gaussia* luciferázu. U optimalizace reakce se využívá obdobných postupů jako u luciferázy I. typu [19,23].

Rovnice 2: Reakce znázorňující přeměnu koelenterazinu na koelenteramid [23]



3.2.3 Porovnání obou typů luciferáz

Na obrázku č. 10 je znázorněna rozdílná emise záření mezi luciferázou I. a II. typu. Světlušková luciferáza reagující s luciferinem vydává záření nižší intenzity, ale je emitováno delší čas. Naopak luciferáza II. typu reagující s koelenterazinem způsobuje záblesk světla s větší intenzitou po dobu několika sekund [23].



Obrázek 8: Porovnání obou typů luciferáz [23]

3.3 Stanovení luciferázy

V tabulkách č. 2 a 3 je shrnutí stanovení luciferázy pomocí komerčních kitů. Jsou uvedeny informace o luciferázách a podmínkách jejich měření z firemních produktových brožur. První brožura od firmy Sigma Aldrich uvádí informace o světluškové luciferáze I. typu. Druhá firemní brožura na kit na stanovení Gaussia Luciferázy od firmy Thermo Fisher Scientific se zabývala měřením bioluminiscence a optimálními podmínkami pro koelenterazin dependentní luciferázu II. typu [16, 24].

Tabulka 2: Stanovení luciferázy I. typu [16]

Typ luciferázy	Firefly luciferáza I. typu
Živočich	<i>Photinus pyralis</i>
Detekční limit luciferázy	5 fg
Lineární rozmezí firefly luciferázy	10 fg – 10 ng (10^{-16} – 10^{-19} g)
Měření luminiscence	Luminometry in tube, mikrotitrační destičky
Vlnová délka – emisní maximum	560 nm
Doba záření	20 s
Složení pufru	Luciferin, ATP, CoA a další složky
pH pufru	7,8
Činidlo je stabilní	12 měsíců při -60 °C
	1 měsíc při -15 °C až -25 °C
	1 týden při +2 °C až +8 °C
Objem činidla pro jedno měření	50 – 100 μ l
Vyhnout se	Opakovanému zamrazování a rozmrazování
Skladování	Chránit před světlem a teplem

Tabulka 3: Stanovení luciferázy II. typu [24]

Typ luciferázy	Gaussia luciferáza II. typu
Živočich	<i>Gaussia princeps</i>
Vlnová délka - emisní maximum	485 nm
Měření luminiscence	96 jamkové mikrotitrační destičky
Pracovní roztok	50 μ l koelenterazinu do 5 ml Gaussia pufru
Činidlo je stabilní	Při -80 °C
Pracovní roztok	Musí být při pokojové teplotě 20-25 °C
Koelenterazin	Na světle nestálý
Vyhnout se	Opakovanému zamrazování a rozmrazování
Skladování	Chránit před světlem a teplem
Měření	Přidat 50 μ l pracovního roztoku k 20 μ l lyzátu buněk

3.4 Rešerše – stanovení luciferázy

Součástí této diplomové práce je rešerše na téma stanovení luciferázy z odborných článků, ve kterých se stanovení luciferázy používá pro sledování interakce buněk s různými testovanými látkami, pro toxikologické účely a vývoj nových léčiv v bioanalytických aplikacích nebo prezentují nové testy vhodné pro budoucí měření interakce buněk s danými látkami a léčivy. Testované látky mohou na buňky působit cytotoxicky, nebo naopak mohou podporovat proliferaci a jejich růst. V článcích jsou použity buněčné linie, které buď obsahují uměle zavedený gen, který produkuje luciferázu, která může být stanovena díky měření bioluminiscenčního záření, nebo s ní buňky interagují. Využití těchto toxikologických testů může být např. u léčby rakoviny. Tyto testy mají za cíl nalézt jednoduchou metodu screeningových testů cytotoxického poškození buněk. Do článků jsem zahrнула i články, které neprováděly interakci buněk s testovanými látkami, ale v budoucnu by se mohly použít na takové testování. Rešerše byla omezena na odborné články publikované od roku 2007. Rešeršní informace z článků jsou shrnuty v následující tabulce č. 4.

Tabulka 4: Rešerše na stanovení luciferázy

Testovaná látka	Koncentrace a objemy činidel	Buněčná linie	Typ luciferázy	Kit	Měření aktivity luciferázy	Citace
Nanočástice hliníku Al ⁰ , Al ₂ O ₃ , AlCl ₃ , Al ₂ (SO ₄) ₃	Pufr obsahující luciferázu s roztokem buněčné suspenze 1:1; 1 μM ATP	Buňky intestinálního adenokarcinomu	Světlušková luciferáza	Testovací souprava pro stanovení ATP	Čtecí jednotka pro mikrotitrační destičky	[26]
Antiretrovirotika u infekce HIV – Maraviroc, Zidovudin, nelfinavir a další	Koncentrace léčiv 0 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM	Linie T-buněk s genem pro světluškovou luciferázu infikované virem HIV a lidské embryonální buňky	Světlušková luciferáza a Renilla luciferáza	Duální luciferázový screeningový test	Destičková čtečka	[27]
Nanočástice stříbra (velikost 5, 50 a 75 nm)	Koncentrace nanočástic stříbra 12,5; 25; 50; 100; 200 μg/ml	Lidské jaterní buňky a buňky od nich odvozené, buňky epitelu plic, lidské buňky epiteliální bronchiální	Luciferázový plazmid vnesen do buněk	Testovací kit pro luciferázový genový test	Čtečka mikrotitračních destiček	[28]
Test spotřeby ATP u měření aktivit dvou izoform kreatinkinázy	Luciferin 100 μM, luciferáza 1 μM, ATP 1 μM v pufru pH 8,0, 0,8% DMSO	E. Coli	Luciferáza z červa <i>Phrixotrix Hirtus</i>	Není uvedeno	Čtecí zařízení, mód měření luminiscence	[29]

Temozolomid – chemoterapeutické léčivo pro léčbu pacientů s gliomem	10 μ L lyzátu z buněk a 25 μ L činidla pro stanovení luciferázy	Nádorové gliomové buněčné linie	Genetický vektor světluškové luciferázy	Není uvedeno	Detekční systém pro světluškovou luciferázu	[30]
Stanovení ATP u infikovaných buněk virem	Testovací pufr s luciferázou a luciferinem, koncentrace není uvedena	Buňky kolorektálního karcinomu	Světlušková luciferáza	Kit pro stanovení ATP	Čtečka mikrotitračních destiček	[31]
Sledování účinku retroviru pro vývoj chemoterapeutických léčiv	Buněčný lyzát (20 μ l), pufr pro testování luciferázy (100 μ l)	Myší jaterní buňky s vektorem kódující gen pro luciferázu	Světlušková luciferáza	Kit pro testování světluškové luciferázy	Luminometr	[32]
Estrogenové a glukokortikoidní látky	Pufr obsahující 10 μ M nativního koelenterazinu; 100 μ l supernatantu buněk a 50 μ l pufru na jamku destičky	Lidské embryonální buňky ledvin; buňky rakoviny tlustého střeva	Gaussia luciferáza	Duální testovací systém fluorescence s excitací při 570 nm a emisí při 610 nm a s následnou luminiscencí	Čtečka mikrotitračních destiček	[33]

3.5 Průtokové metody

Průtokové metody jsou známy už od roku 1975. Nejdříve byla použita průtoková injekční analýza. Sekvenční injekční analýza patří již do druhé generace průtokových metod. Průtokové metody díky jejich zvyšující se citlivosti a robustnosti mohou najít široké uplatnění např. ve farmakologii při testování léčiv, dále také v oblasti výzkumu životního prostředí při testování půd a vod, oceánografii a dalších oblastech [34-35].

V dnešní době se průtokové techniky dělí na [36]:

- Průtoková injekční analýza (FIA)
- Sekvenční injekční analýza (SIA)
- „Bead injection“
- Sekvenční injekční chromatografie (SIC)

3.5.1 Průtoková injekční analýza (FIA)

FIA patří do první generace průtokových technik. V průtokové injekční analýze se využívá kontinuálního toku nosného proudu, ve kterém je zpravidla obsaženo činidlo. Do tohoto toku je vstřikován vzorek, u něhož dochází k disperzi a reakci s činidlem. Na rozhraní mezi vzorkem a činidlem dochází ke vzniku produktu, který je následně dopraven do detektoru (průtokové cely) a ten zaznamená signál. Nevýhodou FIA systému jsou vyšší objemy odpadních roztoků [1,37].

3.5.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

SIA je metoda, kterou v roce 1990 poprvé použil Růžička a jeho kolektiv. Tato metoda je plně automatizovaná analytická metoda ovládaná počítačem. Výhodou SIA je její univerzálnost a snadná automatizace různých postupů. Při naprogramování parametrů analýzy mohou být analyzovány série vzorků. Proto je tato metoda vhodná pro dlouhodobé sledování koncentrace analytů v různých médiích.

Výhodou SIA metody je také nízká spotřeba vzorků a činidel – řádově v mililitrech a finanční dostupnost oproti např. kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí. Jedná se o průtokovou analytickou metodu využívající sekvenční techniky dávkování vzorků, činidel a dalších roztoků. Principem SIA metody je dávkování přesného množství

(objemu) vzorku a činidla do průtokového systému a následně vytvořený produkt, který vzniká díky disperzi vzorku a činidla je transportován do detektoru.

Průtokové techniky pracují na obdobném principu jako separační systémy. V průtokových metodách však nedochází k separaci a analýza v nich probíhá za nízkého tlaku. Odezva detektoru se odvíjí od množství analytu ve vzorku – čím více analytu vzorek obsahuje, tím je zpravidla vyšší odezva detektoru. Záleží také na objemu dávkovaného vzorku do systému, vnitřních průměrech hadiček průtokového systému a také na průtokové rychlosti. Všechny tyto parametry musí být poté při vývoji dané metody optimalizovány [1, 34-35].

Na obrázku č. 11 je znázorněn princip vzniku produktu v tenké hadičce. Do hadičky je pístovým čerpadlem dávkován vzorek (A) a poté činidlo (B) pomocí vícecestného ventilu. V hadičce dochází k reakci mezi analytem a činidlem (C). Poté se změni směr toku (D), což je charakteristické u SIA metody, oproti FIA. Následně je vzniklý produkt tokem nosného proudu unášen do detektoru, kde je detekován daný signál (E) [1].



Obrázek 9: Princip SIA metody [26]

Velkou výhodou SIA metody je možnost jednoduše měnit nastavené parametry analýzy pomocí ovládacího programu [1].

3.5.2.1 Využití SIA techniky v praxi

SIA technika je vhodná pro automatické stanovení látek v analýze životního prostředí. Zjišťuje se tak kvalita životního prostředí – například kontrola kvality různých typů vod (pitná, povrchová, odpadní). Výhodou této techniky je možnost stanovení analytů bez nároků na předchozí separaci z analyzovaného vzorku, tak jako u chromatografie. Příkladem stanovovaných analytů jsou: vápenaté, hořečnaté nebo železité ionty, které vytvářejí barevné komplexy a tak je možné je detekovat spektrofotometricky. Další možné analyty jsou: chloridy, fluoridy, sírany, fosfáty, amonné soli nebo pesticidy a herbicidy nebo také těžké kovy.

Další možné využití je v potravinářské průmyslu pro stanovení glukózy ve víně a pivu a dále také v bioanalytické a farmaceutické praxi pro klinickou medicínu. Využívá se ke stanovení průběhu imunoanalytických reakcí – stanovení imunoglobulinu G a dalších látek vyskytujících se v těle člověka. Další možností je stanovení léčiv jako například penicilin, bromazepam, ciprofloxacin a norfloxacin [1,39].

3.5.2.2 Nové trendy v SIA

SIA technika je vhodná k analýze velkých sérií vzorků - automatizace u rutinních analýz vod potravin, krve nebo moče. Je možné i monitorování hladin léčivých látek a jejich metabolitů v tělních tekutinách pacientů. Uplatnění SIA metody je možné dále u imunoanalýz a při kontrole kvality léčiv – např. obsah účinné látky v léčivém přípravku a disoluční testy, které určují uvolňování léčiva z lékové formy a jeho rychlost [39].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a pomůcky

Při provádění experimentů byly použity k měření tyto tři přístroje:

Přístroj č. 1

Systém SIA s neprůtokovou celou a nízkonapětovým fotonásobičem

- Pístové čerpadlo Cavro XL-3000 (2,5 ml)
- 10 kanálový selekční ventil Vici Valco
- Mísící cívka vyrobená z PTFE hadičky (objem 1,2 ml; průměr 0,75 mm)
- Počítač s PCIe 6251 kartou (National Instruments) pro získávání dat a PCI 232.2 kartou (Netmos) pro komunikaci se SIA systémem
- neprůtoková cela vyrobená z plexiskla s průhledným dnem umístěná na fotosenzoru nízkonapětového fotonásobiče
- Nízkonapětový fotonásobič, H5784-01, napětí 4 V, Hamamatsu Photonics K. K., Japonsko

Přístroj č. 2

FIALab 3500 systém se spirální celou před fotonásobičem (bez UV zdroje, bez fluorescenční průtokové cely), FIALab Instruments Inc., Bellevue, USA

- Cavro pístová pumpa, objem 5 ml
- 8 kanálový selekční ventil
- mísící cívka vyrobená z PTFE hadičky (objem 0,8 ml; průměr 0,75 mm)
- Hadičky z PTFE (průměr 0,75 mm)
- Před detektorem
- Průtokový fluorimetrický detektor, fotonásobič, FIALab[®] instruments, USA

Systém byl řízen softwarovým programem FIALab[®] software pro Windows 5.0 (FIALab[®] instruments, USA), systém byl využit jako SIA systém – měření probíhalo s přerušovaným tokem nosného proudu.

Přístroj č. 3

System SIA se spirální celou a vysokonapěťovým fotonásobičem

- Pístové čerpadlo Cavro XL-3000 (2,5 ml)
- 10 kanálový selekční ventil Vici Valco
- Mísící cívka vyrobena z PTFE hadičky (objem 1,2 ml; průměr 0,75 mm)
- Počítač s PCIe 6251 kartou (National Instruments) pro získávání dat a PCI 232.2 kartou (Netmos) pro komunikaci se SIA systémem
- Spirální cela s kontinuálním průtokem vyrobena z PTFE hadičky průtokového systému (průměr 0,5 mm). Prochází v bloku z plexiskla a je umístěna místo emisního filtru fluorimetrického detektoru
- Fluorimetrický detektor, vysokonapěťový fotonásobič, napětí 250 V, Schoeffel Instruments, Německo

U obou SIA přístrojů (přístroj č. 1 a č. 3) probíhalo měření za pomoci ovládacího programu LabVIEW® FaFSIA, verze 1.1. Všechny kroky analýzy jsou řízeny tímto programem – ovládá se jím čerpadlo, selekční ventil a zpracování signálu. Program se skládá z několika modulů – program kroků měření, vlastní měření a detekce píku. V programu se nastavují parametry pro dané kroky měření a v modulu detekce píku se vyhodnocují změřená data a zjišťují hodnoty píků (výška, plocha) [1, 40].

4.2 Použité chemikálie

Kit od firmy BioThema, luminiscent assay

- ATP Biomass Kit HS
 - ATP Reagent HS (lyofilizát obsahující luciferin a luciferázu)
 - Diluent B (pufr pro rozpuštění ATP reagentu HS)

Tento Kit je použitelný pro ultra citlivé stanovení celkového množství ATP.

Firma Sigma - Aldrich

- ATP standard, Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt
Mw = 507,18 g/mol, šarže A9187
- Sodná sůl D-Luciferinu - lyofilizovaný syntetický prášek, D-Luciferin sodium salt
Mw = 280,32 g/mol, šarže L6882
- Luciferáza z Photinus pyralis – rekombinantní, exprimovaná v E. Coli ve vodném pufovaném roztoku, šarže L9420

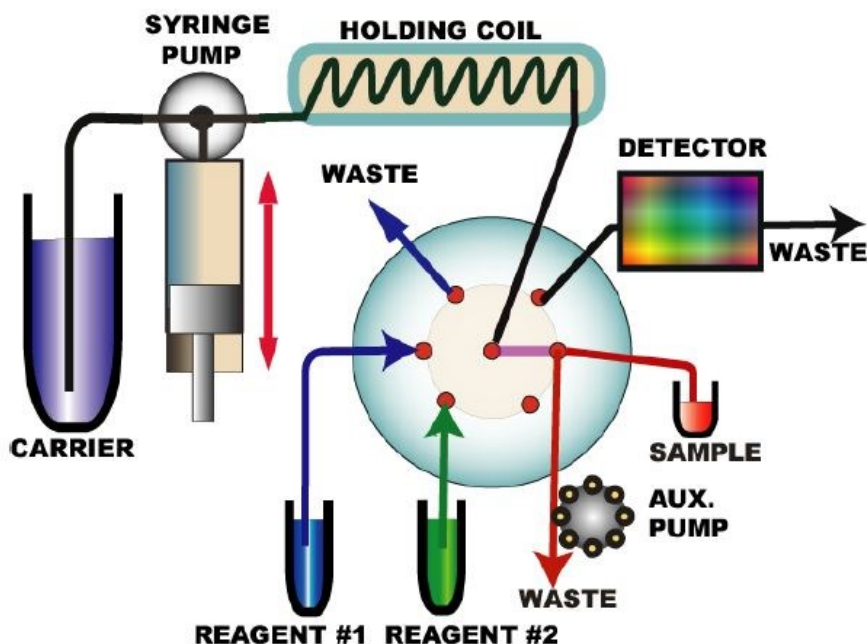
Firma InvivoGen

- QUANTI-LucTM – lyofilizovaný prášek (čínidlo) s obsahem koelenterazinu pro stanovení luminiscence luciferázy II. typu

Buňky HepG2 – lidské hepatocelulární buňky

- Geneticky upravené buňky, do jejichž genetické informace byl zaveden DNA vektor kódující luciferázu II. typu. Buňky pak sekretují luciferázu II. typu (Gaussia) v přítomnosti různých testovaných látek nebo jiných podnětů, např. testosteronu, léčiv.

4.3 Popis přístroje



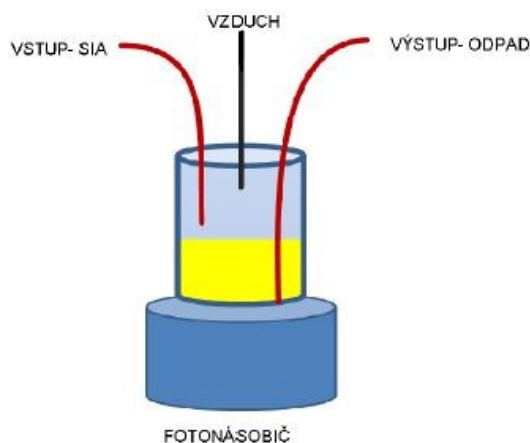
Obrázek 10: Schéma přístroje [1]

Přístroj znázorněný na obrázku č. 12 pracuje na principu sekvenční injekční analýzy a obsahuje oboustranné pístové čerpadlo pro dávkování nosného proudu – nejčastěji destilované vody. Pístové čerpadlo je zakončeno dvoucestným ventilem, který slouží k přepínání portů na hlavě čerpadla a následně k nasávání nebo vyprazdňování pumpy. Toto pístové čerpadlo je hadičkou stočenou do mísící cívky připojeno k vícecestnému selekčnímu ventilu, který mění pozice obvodových portů pro dávkování, vzorků, standardů a činidel. Tímto způsobem se dávkuje vzorky a činidlo do nosného proudu a poté se transportují do mísící cívky o určité délce, kde probíhá promísení a požadovaná reakce mezi vzorkem a činidlem. Tato mísící cívka je většinou kruhově zatočena, aby bylo dosaženo efektivního promíchání díky turbulentnímu proudění. Může se zvolit i několikanásobné promíchání změnou směru toku, kdy dojde k efektivnějšímu promíchání dávkovaných zón. Poté je produkt reakce transportován do průtokové cely detektoru, kde probíhá měření signálu. Po měření je průtoková cela promyta nosným proudem a vzorek, produkt a zbylé činidlo se jímají do odpadní nádoby.

Pro měření se používají různé poměry aspirovaného objemu vzorků, zpětného toku k promísení aspirovaných zón a rychlostí průtoku, aby bylo dosaženo co nejoptimálnějších podmínek měření [1].

4.3.1 Detektor s neprůtokovou celou („batch“ cela)

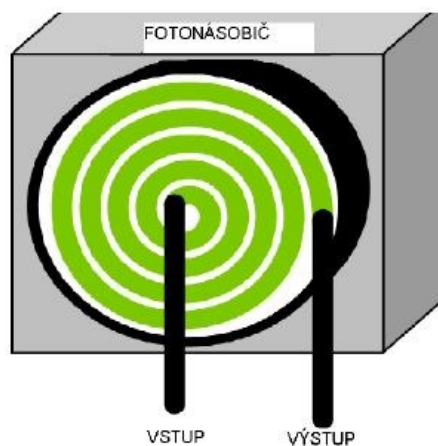
U tohoto typu detektoru dochází k reakci v uzavřené "batch-flow" cele. Jednotlivé vzorky jsou do ní dávkovány oddělené bublinkami vzduchu, které oddělují jednotlivé zóny, pomáhají promíchat vzorek s činidly a zároveň odchází přidanou hadičkou. Reakci je takto možné sledovat od začátku, protože k promísení jednotlivých zón dochází přímo v cele [1].



Obrázek 11: Neprůtoková cela [1]

4.3.2 Detektor s průtokovou spirální celou

Do tohoto detektoru přitéká proud reakční směsi hadičkou do středu spirály a vychází z okrajové části spirály. V tomto uspořádání je potřeba přivést reagující zóny do průtokové cely velmi rychle, k transportu je tedy využívána vyšší průtoková rychlost. Průměr spirály odpovídá průměru okénka fotonásobiče vlastního detektoru, který dokáže zachytit emitující záření z reakční zóny [1].



Obrázek 12: Průtoková spirální cela [1]

4.3.3 Detektor u systému FIALab

U tohoto přístroje byla využita místo detekční cely stočená hadička před fotonásobičem PMT detektoru. Stočená hadička kopírovala detekční okénko detektoru, takže došlo k efektivnímu zachycení emitovaného záření.

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 Příprava roztoku ATP

Roztok ATP byl připraven rozpuštěním vypočítané navážky standardu do patřičného objemu destilované vody. Molární hmotnost ATP je 507,18 g/mol. Výpočtem bylo zjištěno, že pro přípravu 20 ml je potřeba navážit 2,028 mg. Rozpuštěním byl získán zásobní roztok ATP o koncentraci 200 μM . K měření byl poté použit roztok 10 krát ředěný, tedy o koncentraci 20 μM .

4.4.2 Směs luciferinu a luciferázy z komerčního kitu

Kit obsahuje standardní směs luciferinu a luciferázy ve formě lyofilizátu. Diluent B byl z lahvičky opatrně přelit do lahvičky s lyofilizovanou směsí luciferázy a luciferinu. Poté byl roztok několikrát převeden z jedné lahvičky do druhé, z důvodu lepšího promísění. Následně byla lahvička uzavřena víčkem a řádně promíchána a poté zabalena do alobalu, aby byl roztok chráněn před světlem.

4.4.3 Luciferin a luciferáza v samostatných roztocích

Lahvička luciferinu obsahovala lyofilizovaný prášek synteticky vyrobeného D-luciferinu. Množství luciferinu v lahvičce bylo 5 mg. Obsah lahvičky (tableta lyofilizátu) byl převeden do lahvičky, rozpuštěn superčistou vodou, doplněn na objem 5 ml a důkladně promíchán. Výsledná koncentrace roztoku byla 1 mg/ml.

Roztok luciferázy byla připravena stejným způsobem, ale pro analýzu se využilo ředění 1:50 – do lahvičky bylo odpipetováno 100 μl a doplněno superčistou vodou do 5 ml.

4.4.4 Příprava roztoku QuantiLuc

Obsah sáčku QuantiLuc byl převeden do lahvičky o objemu 50 ml a sáček byl vymyt destilovanou vodou. Objem destilované vody byl doplněn na objem 25 ml. Obsah sáčku QuantiLuc byl ve vodě řádně promíchán a rozpuštěn v ultrazvukové lázni.

4.4.5 Příprava lyzátu z buněčných kultur

Vzorky lyzátu v mikrotitračních deskách byly dodány z laboratoře Katedry farmakologie a toxikologie. Médium, ve kterém byly buňky kultivovány, obsahovalo 0,1 % DMSO. Kultivace buněk probíhala za teploty 37 °C. Poté byly buňky lyzovány pasivním lyzačním pufrem 5X od firmy Promega a zamrazeny. Buňky byly rozmrazeny a pipetou byl postupně ze všech jamek odpipetován obsah lyzátu do předem označené lahvičky, která byla zabalena do alobalu pro ochranu před světlem.

4.4.6 Uchovávání roztoků

Všechny roztoky obsahující luciferin, luciferázu a lyzáty buněk byly uchovávány v lahvičkách zabalených do alobalu, aby se předešlo jejich případnému rozkladu, protože jsou fotosenzitivní. ATP bylo uchováváno v odměrných baňkách bez alobalu. Všechny roztoky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

Mikrotitrační destičky z Katedry farmakologie a toxikologie a nerozpuštěné komerční lyofilizáty byly uchovávány v mrazáku při -20 °C.

4.5 Postupy při měření

Po přípravě vzorků a roztoků činidel byly na používaném přístroji nastaveny v ovládacím programu podmínky analýzy, jako jsou – průtoková rychlost, množství přiváděného nosného proudu, množství přiváděných vzorků a činidel, jejich pořadí, čísla portů, ze kterých se bude hadičkou aspirovat daný roztok. Kroky analýzy jsou uvedeny v tabulkách v textu s postupy analýz na jednotlivých přístrojích.

Při měření se využívá normálního uspořádání - aspirace činidla a analytu za sebou - nebo se také dá využít tzv. „sandwichová“ metoda, u které je činidlo dávkováno před i za vzorkem v polovičním objemu. Tím se zajistí efektivnější promísení analytu s činidlem při zachování stejného poměru objemů vzorku a činidla.

4.5.1 Analýza s neprůtokovou celou (KIT)

Každé měření bylo nastavováno samostatně dle požadovaných podmínek analýzy. Jako příklad uvádím měření dle tabulky č. 5. Nejdříve byl připraven ovládací program. Pracovní napětí bylo nastaveno na 0,450 V. Nejdříve byla zvolena rychlost toku 50 $\mu\text{l/s}$ pro aspiraci 100 μl nosného proudu, poté přepnutím vícecestného ventilu do pozice 8 nasáno 10 μl vzduchu a přepnutím do pozice 2 bylo aspirováno 50 μl směsi luciferázy I. typu s luciferinem a poté přepnutím dalších pozic byl opět nasát vzduch a vzorek ATP. Poté byla směs transportována do neprůtokové cely. Po proběhlé reakci, která byla sledována po dobu 20 s, byla směs odvedena do odpadu. Po měření byl proveden krok promytí detekční cely, aby nedošlo k nežádoucímu mísení zbytku předchozích zón činidel a vzorků v cele, které by mohly ovlivnit další měření.

Tabulka 5: Ovládací program pro přístroj s neprůtokovou celou

Část přístroje	Příkaz	Objem nebo rychlost	Aspirovaná zóna
Čerpadlo	Inicializace		
Čerpadlo	Pozice IN		
Čerpadlo	Průtoková rychlost	50 [μl/s]	
Čerpadlo	Aspirace	100 [μl]	Voda
Detektor	Zapnout		
Čerpadlo	Pozice OUT		
Čerpadlo	Průtoková rychlost	30 [μl/s]	
Vícecestný ventil	Pozice 8		
Čerpadlo	Aspirace	10 [μl]	Vzduch
Vícecestný ventil	Pozice 2		
Čerpadlo	Aspirace	50 [μl]	Směs z kitu
Vícecestný ventil	Pozice 8		
Čerpadlo	Aspirace	10 [μl]	Vzduch
Vícecestný ventil	Pozice 3		
Čerpadlo	Aspirace	50 [μl]	ATP
Vícecestný ventil	Pozice 8		
Čerpadlo	Aspirace	10 [μl]	Vzduch
Vícecestný ventil	Pozice 7		
Čerpadlo	Aspirace	50 [μl]	Voda
Čerpadlo	Průtoková rychlost	60 [μl/s]	
Vícecestný ventil	Pozice 9 - cela IN		
Čerpadlo	Vyprázdnit čerpadlo		
Časovač	Pauza	20 [s]	
Vícecestný ventil	Pozice 10 - cela OUT		
Čerpadlo	Aspirace	300 [μl]	Voda
Vícecestný ventil	Pozice 5 - odpad		
Čerpadlo	Průtoková rychlost	60 [μl/s]	
Čerpadlo	Vyprázdnit čerpadlo		
Čerpadlo	Pozice IN		
Čerpadlo	Aspirace	500 [μl]	Promytí
Čerpadlo	Pozice OUT		
Vícecestný ventil	Pozice 9 - cela IN		
Čerpadlo	Transport do detekční cely	250 [μl]	
Vícecestný ventil	Pozice 10 - cela OUT		
Čerpadlo	Aspirace	300 [μl]	
Vícecestný ventil	Pozice 5		Odpad
Čerpadlo	Vyprázdnit čerpadlo		

4.5.2 Analýza s průtokovou spirální celou - KIT

Měření s detektorem s průtokovou celou probíhalo obdobným způsobem. Nastavení tohoto detektoru bylo o něco složitější. Na detektoru bylo nastaveno pracovní napětí 350 V. Kromě napětí zde byl nastaven i rozsah stupnice detektoru, který se pohyboval v hodnotách 0,01; 0,02; 0,05 a 0,1. Z rozsahu stupnice výšky píku lze vypočítat intenzitu změřeného signálu v nA. Hodnoty vyhodnocené přístrojem lze přepočítat dle následující rovnice [30].

Rovnice 3: Rovnice pro přepočet změřeného signálu na nA [40]

$$x = \frac{\text{rozsah} * 1000 * \text{hodnota signálu}}{2,5}$$

U tohoto detektoru jsme předpokládali, že jeho odezva bude citlivější, proto bylo zvoleno ředění enzymu 1:4. Koncentrace ATP byla 20 μM.

U tohoto přístroje byl použit stejný ovládací software. Kroky měření byly následující: Byla zvolena pozice ventilu IN a průtoková rychlost pro aspiraci 500 - 1500 μl destilované vody. Následně byla zvolena pozice ventilu OUT a přístroj aspiroval z pozice 7 selekčního ventilu určitý objem enzymu, z pozice 8 bylo aspirováno určitý objem ATP. Poté byly z pozice 9 selekčního ventilu obráceným směrem pohybu pístového čerpadla reagující zóny transportovány do průtokové cely a následně do odpadu. Poté došlo k promytí systému nosným proudem. U této cely nebylo potřeba aspirovat vzduch.

4.5.3 Analýza s průtokovou spirální celou – aspirace luciferinu a luciferázy

Při měření byla testována optimální průtoková rychlost. Průtok byl testován od 30 μl/s až po průtok 150 μl/s. Rychlost průtoku se zvyšovala po 10 μl/s. Optimální rychlost byla hodnocena ze dvou opakovaných měření.

Při měření 3 složek (ATP, luciferin, luciferáza) je možné aspirovat v různém pořadí:

1. ATP, luciferáza, luciferin
2. Luciferáza, ATP, luciferin
3. Luciferáza, luciferin, ATP

4.5.4 Analýza na přístroji FIAlab

Program na ovládání přístroje FIAlab byl softwarově odlišný. Na tomto přístroji byly nastaveny dva parametry - integrační čas v ms a skenovací rychlost v Hz. Při všech měřeních byl na přístroji zvolen integrační čas 50 ms a skenovací rychlost 4 Hz. Detekce měřeného signálu neprobíhá kontinuálně, ale skenování je jedním z kroků ovládacího programu.

Analýza na tomto přístroji probíhala obdobně, jak je uvedeno v následující tabulce č. 6. Jeden cyklus měření zahrnoval aspiraci nosného proudu, činidel a analytu, a následně byl obsah hadičky veden do detektoru a poté do odpadu. Po cyklu měření byl systém promyt vodou.

Tabulka 6: Program na ovládání přístroje FIALab

Aspirace

Start cyklu

	1		
Pístové čerpadlo	Ventil	IN	
Pístové čerpadlo	Průtok	100	[μ l/s]
Pístové čerpadlo	Aspirace	1500	[μ l]

Měření

ATP

Pístové čerpadlo	Ventil	OUT	
Vícecestný ventil	Pozice	5	
Pístové čerpadlo	Průtok	50	[μ l/s]
Pístové čerpadlo	Aspirace	100	[μ l]

Analyt luciferáza

Pístové čerpadlo	Ventil	OUT	
Vícecestný ventil	Pozice	6	
Pístové čerpadlo	Průtok	50	[μ l/s]
Pístové čerpadlo	Aspirace	100	[μ l]

Luciferin

Pístové čerpadlo	Ventil	OUT	
Vícecestný ventil	Pozice	7	
Pístové čerpadlo	Průtok	50	[μ l/s]
Pístové čerpadlo	Aspirace	100	[μ l]

Vyprázdnění

Fotonásobič	Začátek měření		
Vícecestný ventil	Pozice	8	
Pístové čerpadlo	Průtok	50	[μ l/s]
Pístové čerpadlo	Vyprázdnit		
Fotonásobič	Konec měření		

Konec cyklu

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza s neprůtokovou "batch" celou (přístroj č. 1)

5.1.1 Měření směsi z komerčního kitu

První měření se týkalo linearitu kalibrace stanovení pomocí komerčního kitu, který obsahoval směs luciferázy a luciferinu. Nejdříve byl testován vliv snižujícího se množství činidla luciferinu a luciferázy ke konstantní hodnotě objemu ATP. Byl testován objem roztoku směsného činidla od 80 μl do 20 μl po 5 μl za konstantního objemu ATP 50 μl o koncentraci 200 μM . Napětí bylo nastaveno na 0,620 V. Zvolená průtoková rychlost byla 30 $\mu\text{l/s}$. V tabulce č. 7 jsou zaznamenány výsledky měření.

Tabulka 7: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu směsného činidla z komerčního kitu

Objem směsi z kitu [μl]	Intenzita chemiluminiscence [μA]
80	0,32
75	0,58
70	0,44
65	0,50
60	0,45
55	0,31
50	0,52
45	0,35
40	0,36
35	0,27
30	0,13
25	0,19
20	0,21

Z důvodů velkých odchylek naměřených hodnot (nízké opakovatelnosti) tyto výsledky nebyly vyhodnoceny.

5.1.2 Stanovení ATP

Při dalším měření bylo konstantní množství roztoku činidla z kitu 50 μl a měnilo se množství ATP od 50 μl do 5 μl o koncentraci 200 μM . Pracovní napětí bylo zvoleno 0,470 V, průtoková rychlost 30 $\mu\text{l/s}$. V době, kdy reakce probíhala v detekční cele, byl

zastaven pohyb pístového čerpadla na dobu 10 s, aby bylo možné zjistit, zda chemiluminiscence probíhá okamžitě nebo je emitováno dlouhodoběji.

Tabulka 8: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na množství ATP

Objem ATP [μ l]	Intenzita chemiluminiscence [μ A]
50	3,47
45	3,58
40	1,41
35	3,10
30	3,47
25	1,79
20	2,20
15	1,19
10	1,91
5	0,92

Linearita druhého měření také nebyla vyhodnocena. Opět při něm došlo k velkým odchylkám naměřených hodnot (nízká opakovatelnost). Detekční cela nebyla vhodná pro toto měření. Bylo to způsobeno tvorbou bublinek v detekční cele, které by se za standardních podmínek vytvářet neměly. Za tvorbu bublinek je pravděpodobně zodpovědné složení protékající směsi (ředící pufr obsahuje povrchově aktivní látky). Další nevýhodou byla nízká robustnost metody. Tudiž bylo měření přeneseno na další přístroj - FIAlab.

5.2 Analýza s průtokovou celou (přístroj č. 2 - FIAlab)

5.2.1 Stanovení pomocí komerčního kitu

Měření probíhalo za těchto podmínek:

V ovládacím programu byla zvolena průtoková rychlost 30 μ l/s. Při vyšší průtokové rychlosti (50 μ l/s) byla snížena odezva detektoru. Objem aspirované směsi z komerčního kitu byl 100 μ l a u každé další analýzy se objem snižoval o 10 μ l a objem ATP byl konstantní 100 μ l. Při hodnocení závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu činidla odezva detektoru stoupá, ale u hodnot 80 μ l, 90 μ l a 95 μ l byl pozorován propad naměřených hodnot.

Tabulka 9: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu směsi činidla z komerčního kitu

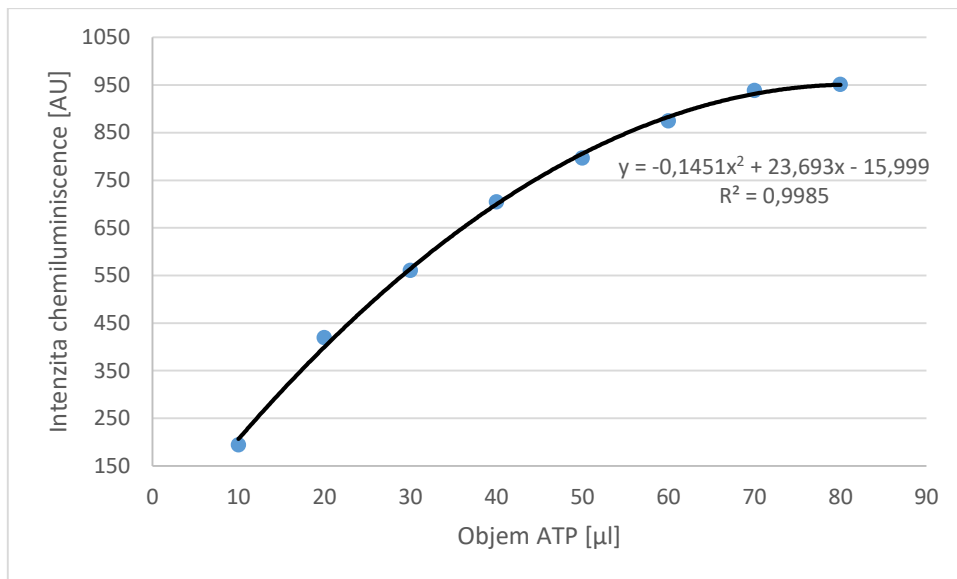
Objem směsi z kitu [μ l]	Intenzita chemiluminiscence [AU]
100	1204,17
95	752,28
90	659,15
80	664,84
70	957,08
60	776,60
50	449,57

5.2.2 Stanovení ATP pomocí komerčního kitu

Opět byla zvolena průtoková rychlost 30 μ l/s. Byla sledována závislost snižujícího se objemu ATP při konstantním množství směsi luciferinu a luciferázy z komerčního kitu 100 μ l. Bylo potvrzeno, že při zvyšování objemu ATP roste odezva detektoru. Při vyšším objemu ATP již signál nevzrůstá, protože dochází k nasycení reakce (vzhledem k objemu směsi činidel) a signál zůstává stejný.

Tabulka 10: Měření závislosti chemiluminiscence na množství ATP

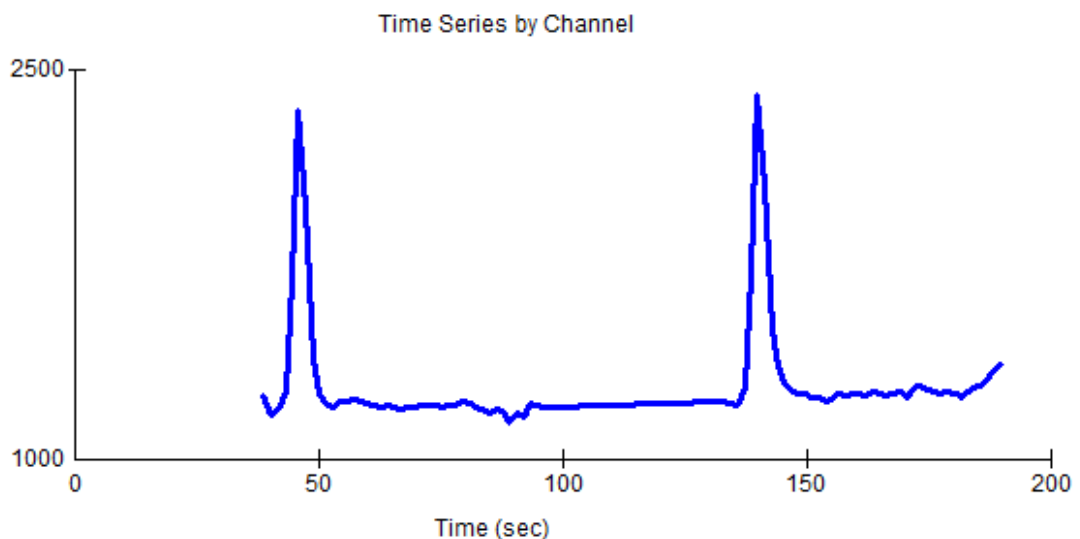
Objem ATP [μ l]	Intenzita chemiluminiscence [AU]
100	1204,17
90	996,42
80	951,64
70	938,58
60	874,89
50	796,66
40	704,89
30	561,02
20	419,57
10	194,01



Obrázek 13: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na množství ATP

Výsledné hodnoty v grafu byly proloženy polynomickou spojnicí trendu. Hodnota R^2 je 0,9985 a získaná závislost tedy může sloužit jako kalibrační (nelineární kalibrace).

Na obrázku č. 15 je záznam z měření pro stanovení ATP pomocí komerčního kitu. Na ose x je znázorněn čas v sekundách a na ose y je intenzita chemiluminiscenčního signálu. Záznam byl získán z měření, kdy byla průtoková rychlost 30 $\mu\text{l/s}$, objem enzymu byl 100 μl a objem ATP bylo 100 μl .



Obrázek 14: Záznam z měření z ovládacího programu pro stanovení ATP pomocí komerčního kitu

5.2.3 Stanovení pomocí roztoků luciferázy a luciferinu

Měření probíhalo za stejných podmínek: rychlost toku 30 $\mu\text{l/s}$. Opět při vyšší rychlosti byla zjištěna nižší odezva detektoru. Byl použit roztok ATP o koncentraci 20 μM , použitý objem 100 μl . U tohoto měření byly použity luciferáza a luciferin zvlášť v roztocích, každý samostatně. Luciferinu jsme použili 50 μl na každé měření. Luciferáza byla ředěná 100 μl na 1 ml, protože při měření s neředěným roztokem byl signál příliš vysoký.

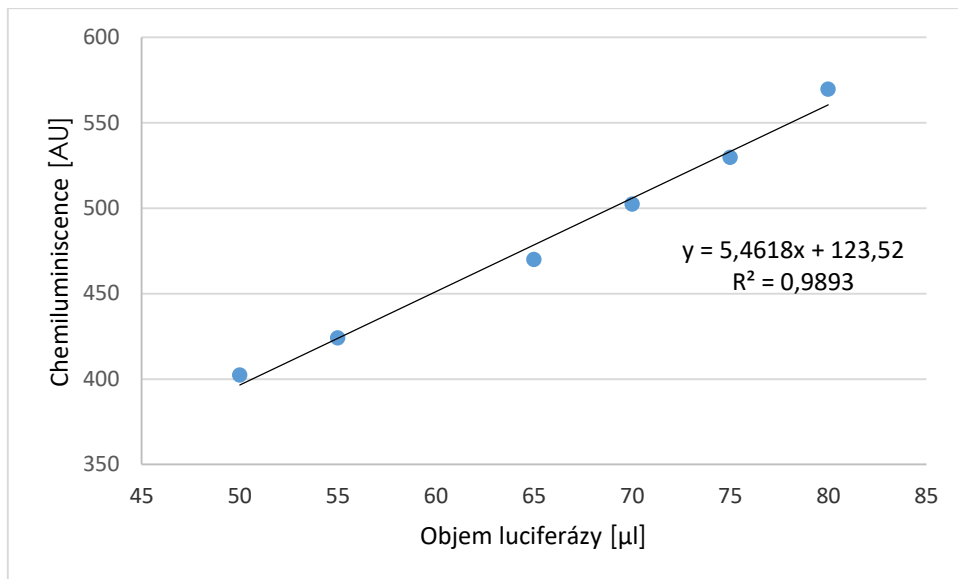
Nejdříve bylo vyzkoušeno orientační měření nejvhodnějšího pořadí aspirovaných složek. Bylo zvoleno pořadí ATP (100 μl), luciferáza (100 μl), luciferin (50 μl) a voda pro promísení změnou směru toku (50 μl) jako nejvhodnější pro měření dle hodnocené výšky signálu. Následně byl testován snižující se objem luciferázy od 100 μl do 50 μl po 5 μl při konstantním množství ATP a luciferinu. Při dalším snižování objemu luciferázy pod hodnotu 50 μl , již nebyla zaznamenána odezva (negativní píky).

Při měření byl u některých hodnot zjištěn výrazný rozdíl v měřeních, a proto byla k vyhodnocení použita pouze jedna hodnota.

Tabulka 11: Intenzita chemiluminiscence v závislosti na objemu luciferázy

Objem luciferázy [μl]	1. měření	2. měření	Intenzita chemiluminiscence [AU] Průměr
100	-	468,53	468,53
95	532,14	486,22	509,18
90	631,51	497,65	564,58
85	572,24	490,46	531,35
80	570,53	569,08	569,80
75	546,97	512,51	529,74
70	502,48	-	502,48
65	454,90	485,02	469,96
60	409,29	-	409,29
55	441,19	407,11	424,15
50	426,51	378,28	402,40

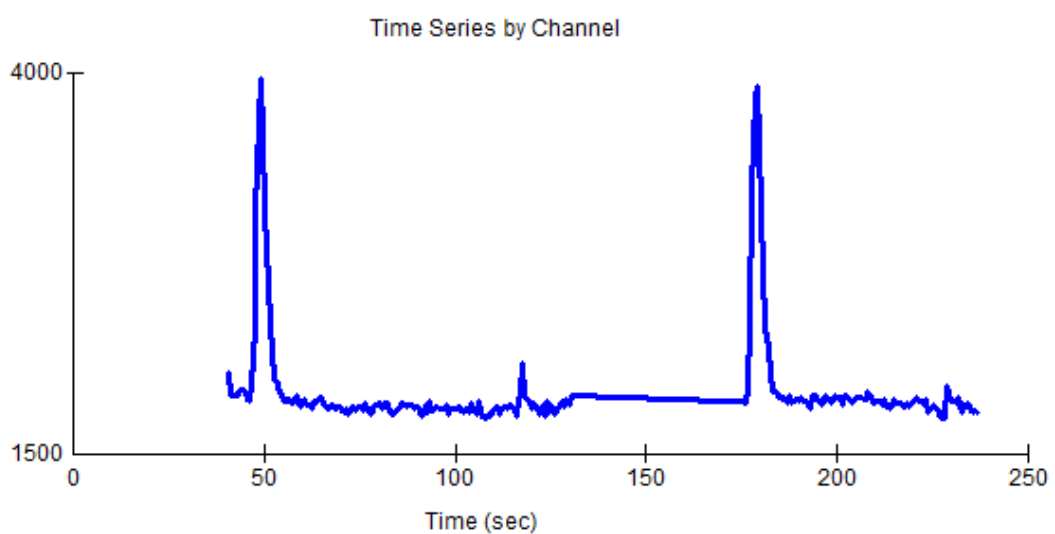
V grafu byla vypuštěna hodnota 60 μl z důvodu nízké hodnoty naměřeného signálu.



Obrázek 15: Graf závislosti změny objemu luciferázy na intenzitě chemiluminiscence

Z naměřených hodnot v grafu je vidět trend zvyšující se intenzity chemiluminiscence v závislosti na zvyšujícím se množství luciferázy.

Záznam z měření je znázorněn na obrázku č. 19 pro stanovení chemiluminiscence luciferázy I. typu. Na ose x je znázorněn čas v sekundách a na ose y je intenzita chemiluminiscenčního signálu. Tento záznam odpovídá následujícím podmínkám – ATP 100 μl o koncentraci 20 μM, luciferáza 50 μl ředěná 100 μl na 1 ml, luciferin 50 μl neředěný, průtoková rychlost 30 μl/s.



Obrázek 16: Záznam z měření pro stanovení intenzity chemiluminiscence luciferázy I. typu

5.2.4 Stanovení luciferázy II. typu z lyzátu buněk

Dalším měřením na tomto přístroji bylo stanovení luciferázy II. typu z lyzovaných buněk z Katedry farmakologie a toxikologie. Reakční podmínky měření byly následující – byla zvolena vyšší průtoková rychlost 50 $\mu\text{l/s}$ – 100 $\mu\text{l/s}$, protože byla podle údajů výrobce očekávána rychlejší emise záření. K měření byly použity 2 roztoky – lyzát z buněk s obsahem sekretované luciferázy II. typu a činidlo QuantiLuc. Při testování průtokové rychlosti 50 $\mu\text{l/s}$ ani 150 $\mu\text{l/s}$ nebyl zaznamenán žádný signál. Byly také vyzkoušeny možnosti:

lyzát 100 μl + QuantiLuc 100 μl + lyzát 100 μl

QuantiLuc 100 μl + lyzát 100 μl + QuantiLuc 100 μl

Také nebylo dosaženo žádné odezvy; ani v případě průtoku 150 $\mu\text{l/s}$.

Charakter reakce koelenterazinu s luciferázou II. typu je pro tento přístroj pravděpodobně příliš rychlý. Dochází při ní k rychlé emisi záření a přístroj byl příliš pomalý na zachycení signálu z použité reakce – než byla reakční směs dopravena systémem hadiček do detektoru, tak už byl chemiluminiscenční signál příliš nízký.

5.3 Stanovení s průtokovou spirální celou (přístroj č. 3)

5.3.1 Stanovení pomocí komerčního kitu

Podmínky analýzy – bylo nastaveno pracovní napětí 350 V a byl použit rozsah stupnice 0,5-0,05. Předpokládali jsme, že tento detektor je citlivější díky fotonásobiči s vysokým napětím, proto byl použit enzym ředěný 1:4 a ATP o koncentraci 20 μM .

5.3.1.1 Stanovení ATP

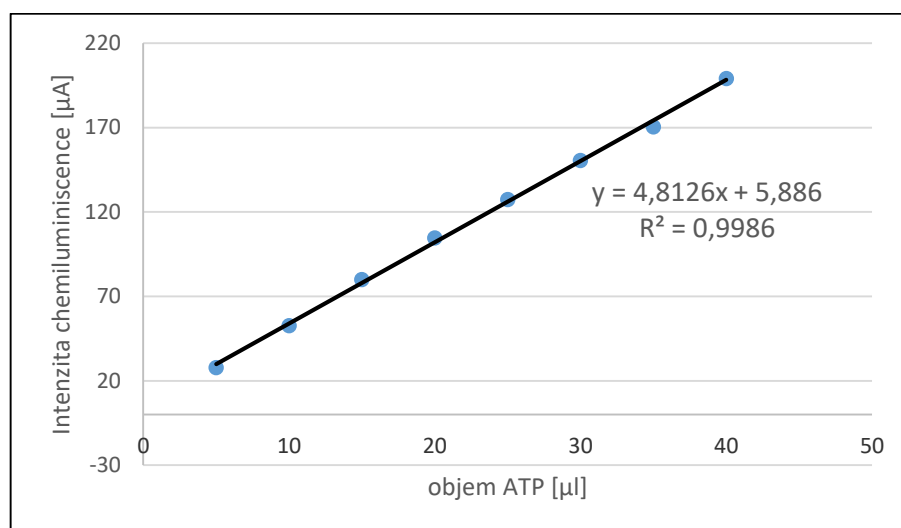
Při měření byla testována změna objemu ATP. Byla využita „sandwichová“ metoda, kdy byla směs luciferázy a luciferinu z komerčního kitu před i za aspirovaným ATP v objemu 100 μl . Tedy byl zvolen konstantní objem luciferázy 200 μl rozdělených do dvou aspirovaných zón a byla snižována hodnota objemu ATP od 40 μl do 5 μl po 5 μl . Průtoková rychlost byla zvolena na 50 $\mu\text{l/s}$.

V tabulce č. 12 jsou zaznamenány výsledky z měření a přepočtené hodnoty intenzity chemiluminiscence dle daného rozsahu přístroje.

Tabulka 12: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu ATP

ATP objem [μl]	hodnota	rozsah	Intenzita chemiluminiscence [μA]
40	1,00	0,5	199,20
35	0,85	0,5	170,54
30	0,75	0,5	150,54
25	0,64	0,5	127,40
20	1,31	0,2	104,81
15	1,00	0,2	80,10
10	1,32	0,1	52,79
5	1,40	0,05	27,97

V grafu byla vyhodnocena lineární závislost, kdy hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9986.



Obrázek 17: Závislost intenzity chemiluminiscence na objemu ATP

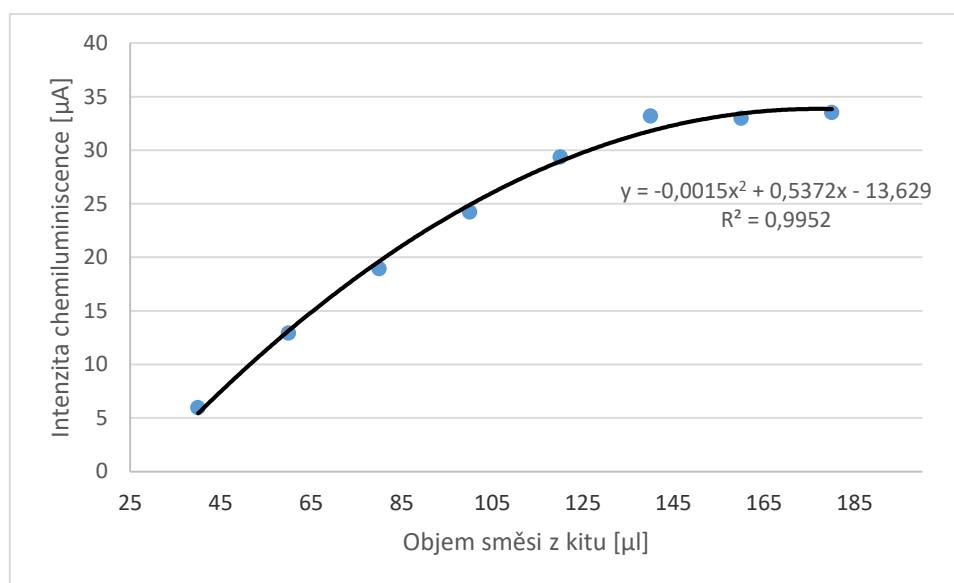
5.3.1.2 Stanovení pomocí komerčního kitu

V dalším měření jsme vyzkoušeli opět „sandwichovou“ metodu. Nyní byla testována změna objemu činidla z komerčního kitu ke konstantnímu objemu ATP, kterého bylo 40 μl o $c = 20 \mu\text{M}$. Pořadí aspirovaných zón bylo: směs činidla – ATP – směs činidla.

Tabulka 13: Měření závislosti chemiluminiscence na změně objemu komerčního kitu ke konstantnímu množství ATP

Objem luciferázy [μl]		Hodnota	Rozsah	Intenzita chemiluminiscence [μA]
100+100	200	1,00	0,50	199,20
90+90	180	0,84	0,10	33,52
80+80	160	1,65	0,05	32,98
70+70	140	1,66	0,05	33,20
60+60	120	1,47	0,05	29,36
50+50	100	1,21	0,05	24,24
40+40	80	0,95	0,05	18,93
30+30	60	1,62	0,02	12,94
20+20	40	0,75	0,02	5,96

V grafu byly použity hodnoty do 180 μl , protože hodnota u 200 μl byla velmi vysoká, a proto nebyla vyhodnocena, pravděpodobně z důvodu chyby měření.



Obrázek 18: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu směsi činidla z komerčního kitu

V grafu byla vyhodnocena polynomická nelineární závislost, kdy hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9952.

5.3.2 Stanovení pomocí samostatných činidel luciferázy a luciferinu

Měření probíhalo při průtoku 120 $\mu\text{l/s}$, pracovním napětí 350 V, rozsah byl zvolen na 0,05. U analýzy byl použit krok promísení změnou směru toku s objemem 20 μl vody

z důvodu lepšího promíchání aspirovaných zón a lepší odezvy detektoru. Byly vyzkoušeny 3 typy pořadí aspirovaných činidel:

1. ATP, luciferáza, luciferin
2. Luciferáza, ATP, luciferin
3. Luciferáza, luciferin, ATP

Jako nejvhodnější pořadí složek se ukázalo ATP, luciferáza, luciferin – u měření byla viditelná nejlepší odezva detektoru a nejvyšší chemiluminiscenční signál. Tyto podmínky byly testovány při průtokové rychlosti 120 $\mu\text{l/s}$.

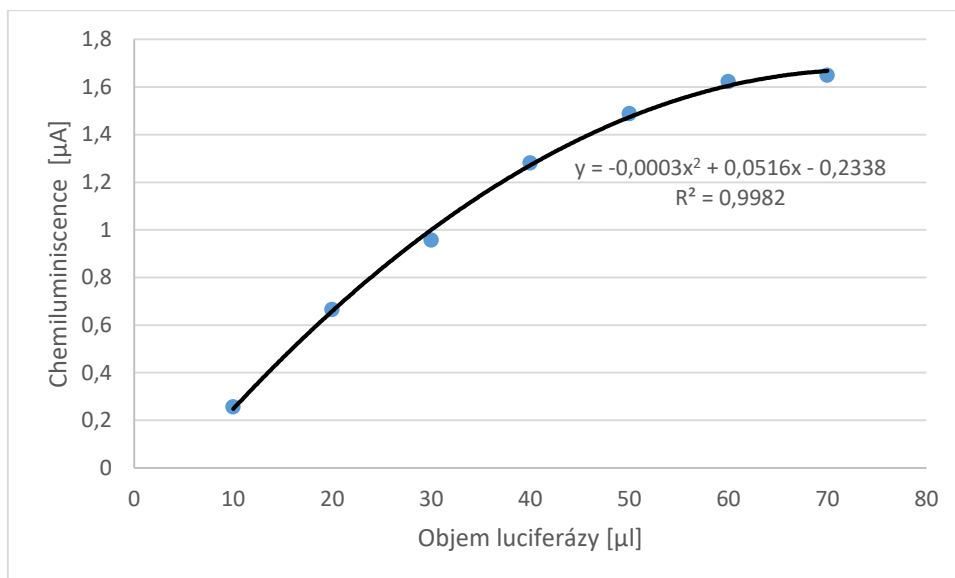
5.3.2.1 Stanovení luciferázy I. typu

U analýzy byla použita činidla: ATP $c = 20 \mu\text{M}$, 100 μl ; luciferáza, ředěná 100 μl na 5 ml, 10-100 μl ; luciferin, neředěný (obsah lahvičky do 5 ml), 50 μl . Průtoková rychlost 110 $\mu\text{l/s}$, napětí 350 V, rozsah 0,05; krok promísení 20 μl .

Tabulka 14: Měření závislosti chemiluminiscence na změně objemu luciferázy

Objem luciferázy [μl]	1. hodnota	2. hodnota	Průměr	Chemiluminiscence [μA]
100	1,57	1,58	1,58	31,57
90	1,62	1,69	1,66	33,11
80	1,66	1,84	1,75	35,01
70	1,61	1,69	1,65	33,00
60	1,62	1,63	1,62	32,47
50	1,49	1,49	1,49	29,78
40	1,31	1,26	1,28	25,63
30	0,90	1,02	0,96	19,14
20	0,65	0,68	0,67	13,31
10	0,25	0,26	0,26	5,13

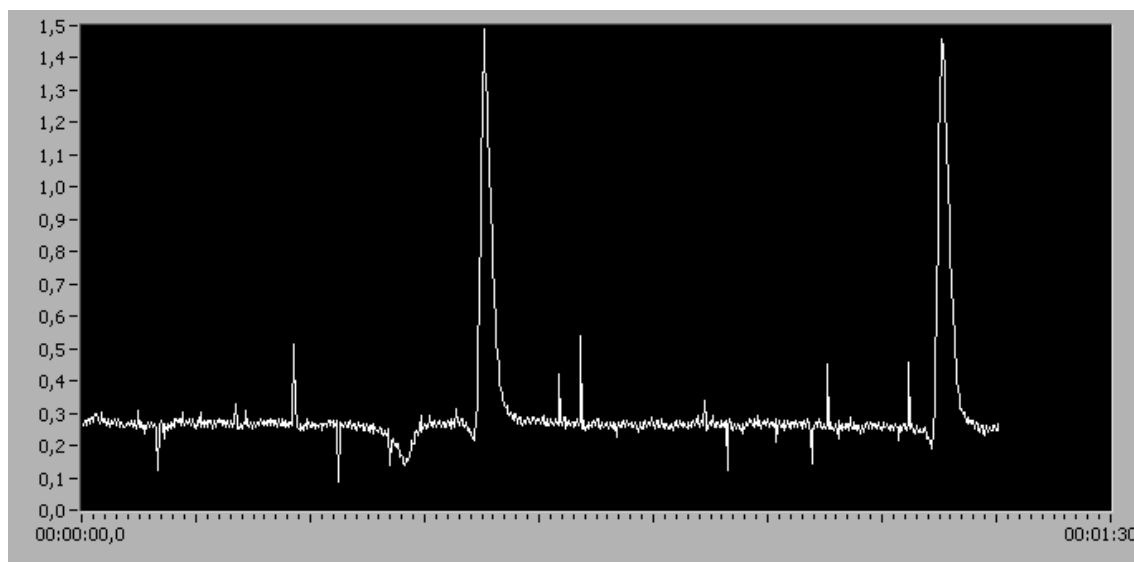
Graf byl vyhodnocen do hodnoty 70 μl , další hodnoty již nebyly zahrnuty.



Obrázek 19: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na změně objemu luciferázy

V grafu byla vyhodnocena lineární závislost, kdy hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9982.

Záznam z měření na přístroji je zaznamenán na obrázku č. 23. Na ose x je znázorněn čas a na ose y je znázorněna intenzita chemiluminiscence.



Obrázek 20: Záznam z měření chemiluminiscence pomocí samostatných roztoků luciferinu a luciferázy

5.3.3 Stanovení luciferázy II. typu z lyzátu buněk

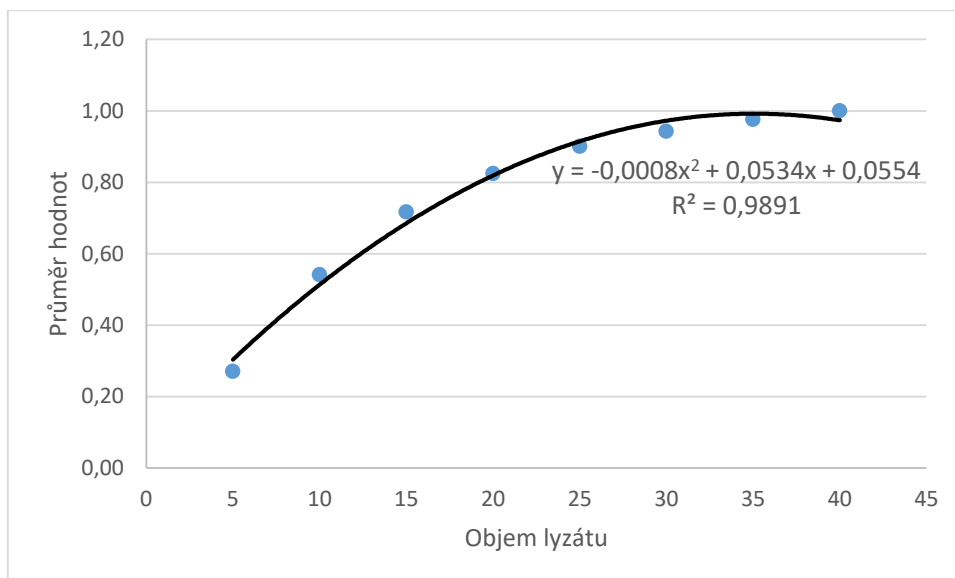
Měření probíhalo s činidlem QuantiLuc, ke kterému byl aspirován lyzát z buněk sekretujících luciferázu II. typu.

Podmínky analýzy: aspirace roztoků – 50 $\mu\text{l/s}$, aspirován QuantiLuc 100 μl a poté lyzát z buněk, průtok – 200 $\mu\text{l/s}$, napětí 350 V; rozsah 0,02; krok s promísením 20 μl .

Tabulka 15: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na změně objemu luciferázy II. typu

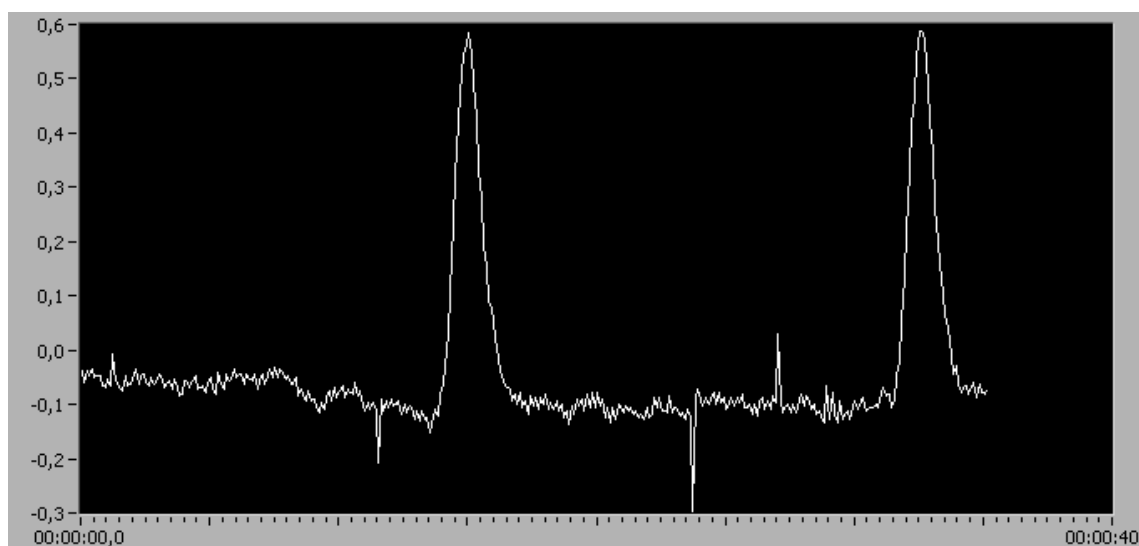
Objem lyzátu [μl]	1. hodnota	2. hodnota	Intenzita chemiluminiscence Průměr [AU]
100	0,92	0,92	0,92
95	0,94	0,89	0,91
90	0,92	0,90	0,91
85	0,93	0,90	0,91
80	0,93	0,92	0,93
75	0,94	0,94	0,94
70	0,95	0,91	0,93
65	0,93	0,94	0,93
60	0,97	0,98	0,98
55	0,95	0,96	0,95
50	0,98	0,97	0,97
45	0,98	0,95	0,97
40	0,99	1,01	1,00
35	0,98	0,98	0,98
30	0,96	0,92	0,94
25	0,91	0,89	0,90
20	0,83	0,82	0,82
15	0,72	0,72	0,72
10	0,54	0,54	0,54
5	0,27	0,27	0,27

Hodnoty byly proloženy polynomicou křivkou, kdy hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9891. V grafu jsou znázorněny hodnoty pouze do 40 μl z důvodu kolísání naměřeného signálu ve vyšších objemech aspirovaného roztoku lyzátu.



Obrázek 21: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu luciferázy II. typu z lyzátu buněk

Na obrázku č. 25 se nachází záznam z měření luciferázy II typu. Na ose x je vyznačen čas v sekundách a na ose y je intenzita chemiluminiscence. Na záznamu jsou píky za podmínek – QuantiLuc 100 μ l, lyzát 45 μ l, průtok 200 μ l/s, napětí 350 V, rozsah 0,02; krok promísení 20 μ l.



Obrázek 22: Záznam z měření luciferázy II. typu

5.3.3.1 Stanovení luciferázy II. typu pomocí sandwichové metody

U stanovení luciferázy II. typu byla využita také sandwichová metoda: činidlo - enzym - činidlo (QuantiLuc 100 μ l – luciferáza II. typu z lyzátu 100 μ l - QuantiLuc 100 μ l)

Podmínky analýzy byly – průtoková rychlost 200 μ l/s, napětí 350 V, rozsah 0,02, promíchávací krok 20 μ l.

Tabulka 16: Výsledky měření chemiluminiscence sandwichovou metodou - stanovení luciferázy II. typu

Objem lyzátu [μ l]	1. hodnota [AU]	2. hodnota [AU]	Průměr [AU]
100	0,68	0,65	0,66
95	0,73	0,68	0,71
90	0,72	0,70	0,71
85	0,69	0,69	0,69
80	0,60	0,62	0,61
75	0,69	0,64	0,67
70	0,64	0,66	0,65
65	0,67	0,61	0,64
60	0,62	0,64	0,63
55	0,67	0,63	0,65
50	0,65	0,68	0,67
45	0,69	0,67	0,68
40	0,65	0,66	0,66
35	0,28	0,23	0,26
30	0,26	0,26	0,26
25	0,25	0,24	0,24
20	0,23	-	0,23
15	0,22	0,25	0,24
10	0,23	-	0,23
5	0,22	0,22	0,22

Toto měření nebylo vyhodnoceno z důvodu skokového zvýšení naměřeného signálu. To bylo způsobeno rozsvícením nebo odtažením žaluzií. Detektor je velmi citlivý na okolní světlo. Měření jsme nezopakovali z důvodu nedostatku lyzátu z mikrotitračních destiček.

5.3.3.2 Stanovení luciferázy II. typu pomocí sandwichové metody ředěním lyzátu

U této sandwichové metody bylo využito měření, při kterém je konstantní objem činidla a snižuje se objem lyzátu, který je ale doplněn odpovídajícím množstvím vody, aby celkový

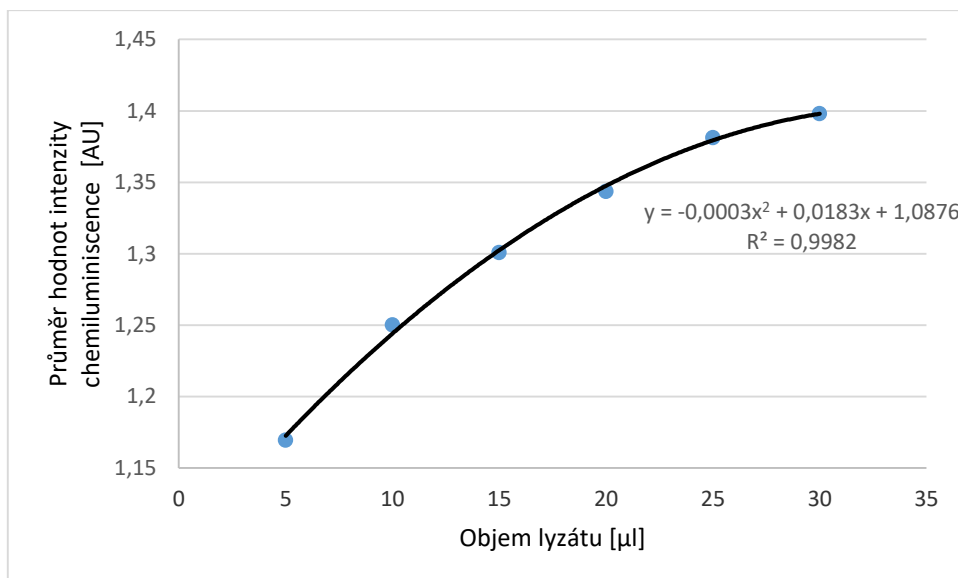
objem lyzátu s vodou byl 60 μl . Měření probíhalo za stejných podmínek jako předchozí měření. Uspořádání aspirovaných roztoků byl následující:

QuantiLuc (100 μl) + lyzát s vodou (60 μl) + QuantiLuc (100 μl)

Tabulka 17: Výsledky měření závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění obsahu luciferázy II. typu sandwichovou metodou

Lyzát [μl]	Voda [μl]	1. hodnota	2. hodnota	Intenzita chemiluminiscence Průměr [AU]
5	55	1,22	1,12	1,17
10	50	1,25	1,25	1,25
15	45	1,30	1,30	1,30
20	40	1,36	1,33	1,34
25	35	1,41	1,35	1,38
30	30	1,40	1,40	1,40
35	25	1,30	1,32	1,31
40	20	1,32	1,31	1,32
45	15	1,31	1,28	1,30
50	10	1,31	1,30	1,31
55	5	1,29	1,28	1,29
60	0	1,36	1,36	1,36

V grafu jsou znázorněny hodnoty pouze do 30 μl z důvodu kolísání naměřeného signálu ve vyšších objemech aspirovaného roztoku lyzátu. Hodnoty byly proloženy polynomicou křivkou, kdy hodnota spolehlivosti R^2 je 0,9982.



Obrázek 23: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na obsahu luciferázy II. typu - sandwichová metoda

5.3.3.3 Stanovení luciferázy II. typu pomocí ředění lyzátu

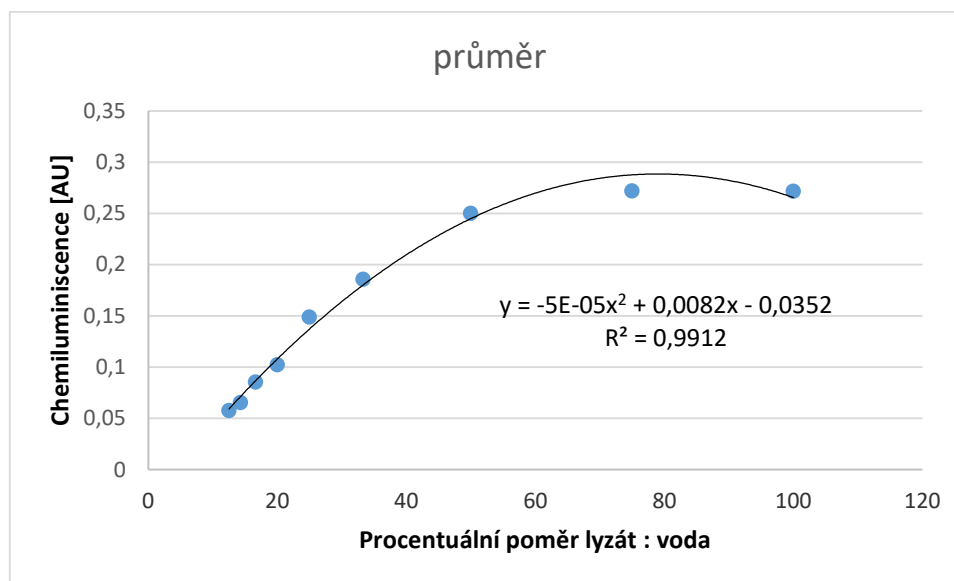
Měření chemiluminiscence luciferázy II. typu při ředění lyzátu z buněk – tedy snižování koncentrace luciferázy. Objem luciferázy 50 μl (ředěný vodou od 1:0 do 1:8) a QuantiLuc 100 μl. Podmínky analýzy byly - průtok 50 μl/s, bez promíchávacího kroku, napětí 350 V, rozsah 0,01.

V tabulce je zaznamenán procentuální poměr při ředění lyzátu z buněk a vody, hodnoty naměřené přístrojem a jejich průměrná hodnota.

Tabulka 18: Výsledky měření intenzity chemiluminiscence za pomoci ředění luciferázy II. typu - bez promíchání

Procentuální poměr lyzátu s vodou	1. hodnota	2. hodnota	3. hodnota	4. hodnota	Intenzita chemiluminiscence Průměr [AU]
100,00	0,26	0,28	0,30	0,25	0,27
75,00	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27
50,00	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25
33,33	0,19	0,18	0,19	0,18	0,19
25,00	0,13	0,16	0,15	0,16	0,15
20,00	0,09	0,11	0,10	0,11	0,10
16,66	-	0,08	0,08	0,09	0,09
14,29	0,06	0,07	-	0,07	0,07
12,50	0,06	-	0,06	-	0,06

Na obrázku č. 27 je v grafu znázorněna křivka závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu.



Obrázek 24: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu z buněk

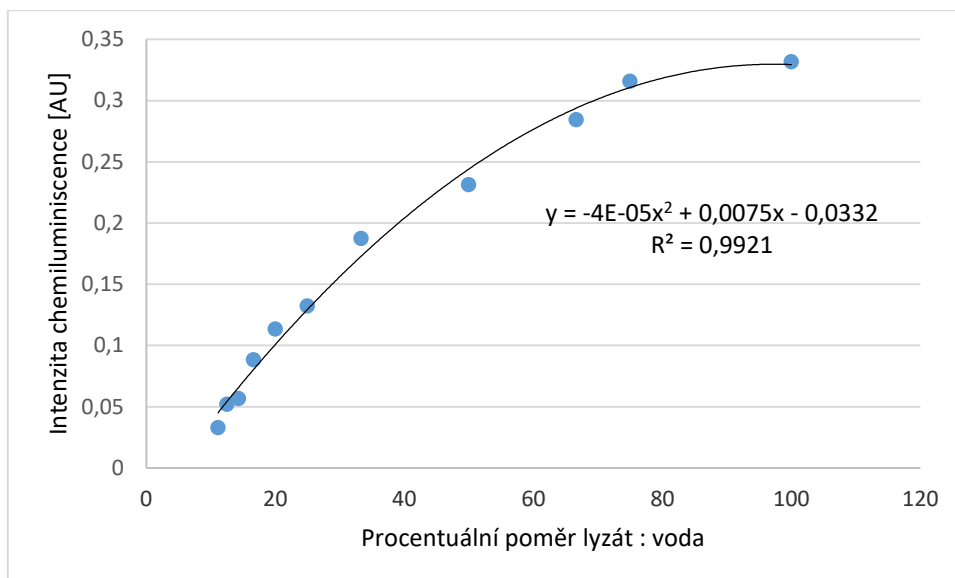
5.3.3.4 Stanovení luciferázy II. typu pomocí ředění lyzátu s vodou s promícháním

U tohoto měření byly nastaveny stejné podmínky analýzy, navíc byl použit pouze krok promísení s 20 μ l vody.

V tabulce a grafu je zaznamenán procentuální poměr ředění lyzátu a vody.

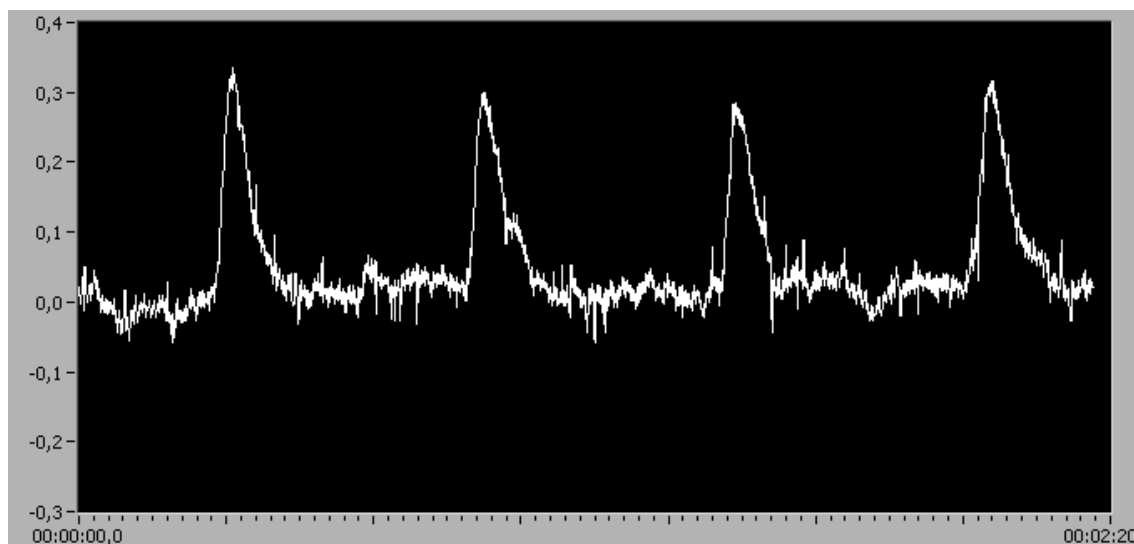
Tabulka 19: Výsledky měření intenzity chemiluminiscence za pomoci ředění luciferázy II. typu - s promícháním

Procentuální poměr lyzátu s vodou	1. hodnota	2. hodnota	3. hodnota	4. hodnota	Intenzita chemiluminiscence Průměr [AU]
100,00	0,31	0,35	0,32	0,35	0,33
75,00	0,32	0,33	0,32	0,30	0,32
66,66	0,30	0,28	0,27	0,29	0,28
50,00	0,25	0,22	0,24	0,21	0,23
33,33	0,22	0,18	0,18	0,17	0,19
25,00	0,12	0,15	0,14	0,12	0,13
20,00	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11
16,66	0,09	0,09	0,11	0,07	0,09
14,29	-	0,06	0,06	-	0,06
12,50	0,06	0,05	-	-	0,05
11,11	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03



Obrázek 25: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu - s promícháním

Na obrázku č. 29 se nachází záznam z měření luciferázy II. typu. Toto měření bylo provedeno pomocí ředění lyzátu buněk vodou. Podmínky měření byly – 4 opakování, luciferáza ředěná 1:2 (tedy 33,33 %), objem aspirovaného enzymu s vodou 50 μ l, objem QuantiLucu 100 μ l, průtoková rychlost 50 μ l/s, napětí 350 V, rozsah 0,01.



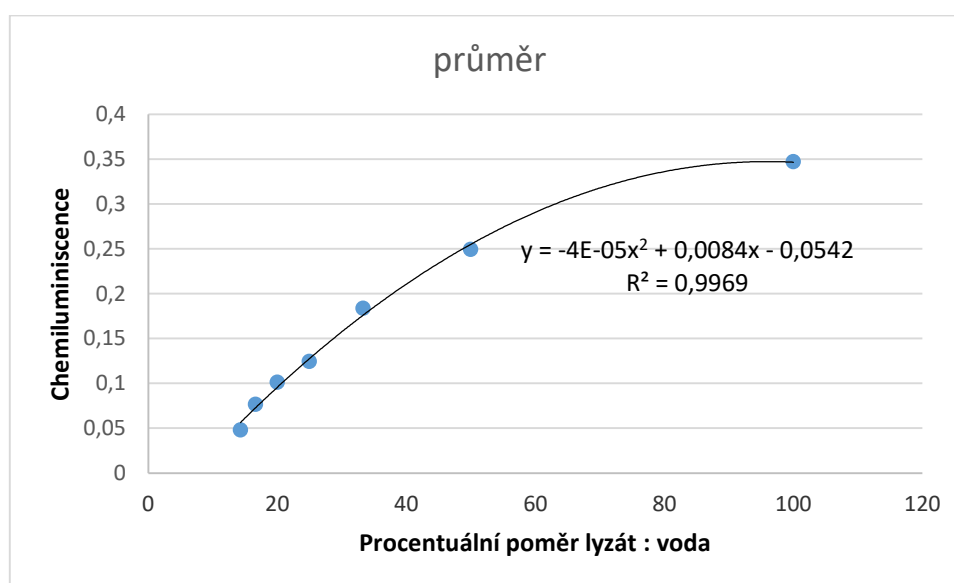
Obrázek 26: Záznam měření luciferázy II. typu pomocí ředění lyzátu

5.3.3.5 Stanovení luciferázy II. typu pomocí sandwichové metody ředěním lyzátu

Při měření bylo využito ředění s vodou 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6. U tohoto měření byla využita sandwichová metoda - QuantiLuc (100 μ l) + Lyzát (60 μ l) + QuantiLuc (100 μ l). Podmínky analýzy byly zvoleny - napětí 0,350 V, rozsah 0,01; průtok 50 μ l/s, promíchávací krok 20 μ l. V tabulce a grafu je zaznamenána závislost intenzity chemiluminiscence na procentuálním poměru ředění lyzátu.

Tabulka 20: Výsledky měření intenzity chemiluminiscence za pomoci ředění luciferázy II. typu

%	1. hodnota [AU]	2. hodnota [AU]	3. hodnota [AU]	4. hodnota [AU]	Průměr [AU]
100	0,36	0,34	0,35	0,34	0,35
50	0,25	0,24	0,26	-	0,25
33,33	0,19	0,17	0,19	-	0,18
25	0,13	0,13	-	0,11	0,13
20	0,11	0,09	0,10	0,11	0,10
16,66	0,06	0,07	0,09	0,08	0,08
14,29	0,05	0,05	0,05	-	0,05



Obrázek 27: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu sandwichovou metodou

6 SOUHRN

Porovnání přístrojů

Přístroj č. 1 – neprůtoková cela

Neprůtoková cela s nízkonapětovým detektorem se ukázala jako nevhodná pro měření z důvodu nízké citlivosti a malé robustnosti metody. Při analýze docházelo k tvorbě bublin v detekční cele a tím došlo k interferenci naměřeného signálu a k ovlivnění výsledků analýzy.

Přístroj č. 2 – FIAlab

Při testování luciferázy I. typu byla zvolena optimální průtoková rychlost 30 $\mu\text{l/s}$. Při vyšším průtoku (50 $\mu\text{l/s}$) docházelo k rozmývání reakční zóny a snižování odezvy detektoru. Byl sledován trend nasycení reakce. Determinační koeficient R^2 u stanovení ATP za pomoci komerčního kitu je 0,9985. U stanovení luciferázy I. typu zvlášť v roztoku s luciferinem je determinační koeficient R^2 0,9893.

Není vhodný pro stanovení luciferázy II. typu (sekretované, reagující s koelenterazinem), Charakter reakce koelenterazinu s QuantiLucem je pro tento přístroj pravděpodobně příliš rychlý, protože intenzita emitovaného světla je sice vyšší, ale probíhá kratší dobu. Prodlevy mezi jednotlivými příkazy programu zpomalují transport reakční zóny do reakční cely a reakce proběhne dříve, než detektor stihne signál zachytit. Tudíž nebyl naměřen žádný signál.

Přístroj č. 3 – průtoková spirální cela

U měření s komerčním kitem byla využita sandwichová metoda měření, kdy u stanovení byla zvolena průtoková rychlost 50 $\mu\text{l/s}$. U stanovení ATP byl determinační koeficient R^2 0,9986 a u stanovení luciferázy z komerčního kitu byl determinační koeficient R^2 0,9952.

Při měření samostatných roztoků luciferázy a luciferinu bylo nejvhodnější pořadí složek ATP, luciferáza, luciferin. Optimální průtoková rychlost byla stanovena na 120 $\mu\text{l/s}$. determinační koeficient byl R^2 0,9982.

Nejllepších výsledků u měření s QuantiLucem a luciferázou II. typu se dosahuje při nižších objemech. Při vyšších objemech píky chvostují a dochází k rozmývání zón. U stanovení luciferázy s QuantiLucem byl determinační koeficient R^2 0,9891. Aspirace

vzorků při 50 $\mu\text{l/s}$ a průtoková rychlost reakční směsi do detektoru byla 200 $\mu\text{l/s}$. U měření luciferázy s doplněním objemu do 60 μl probíhala aspirace roztoků při 50 $\mu\text{l/s}$ a průtoková rychlost měření byla 200 $\mu\text{l/s}$. Determinační koeficient byl R^2 0,9982. U měření s ředěním lyzátu buněk bez promísení byl R^2 0,9912. Průtoková rychlost byla 50 $\mu\text{l/s}$. U měření s ředěním lyzátu buněk s promísením (20 μl) byl determinační koeficient R^2 0,9969. Průtoková rychlost byla 50 $\mu\text{l/s}$. Sandwichové měření s ředěním lyzátu probíhalo za průtokové rychlosti 50 $\mu\text{l/s}$ s promísením 20 μl .

7 ZÁVĚR

Při měření byly použity dva typy enzymu luciferázy.

Luciferáza I. typu (nesekretovaná) se nachází ve světluškách. Reaguje s luciferinem, ATP a Mg^{2+} ionty za vzniku oxyluciferinu a dochází k emisi chemiluminiscence o vlnové délce 550-570 nm. Emise chemiluminiscenčního záření má nižší intenzitu, ale trvá déle až v řádech několika minut.

Luciferáza II. typu (sekretovaná) je přítomna u mořských živočichů. V práci byla využita luciferáza, jejíž vektor byl zaveden do geneticky upravených buněk HepG2. Reaguje s koelenterazinem za vzniku koelenteramidu. Při reakci dochází k emisi chemiluminiscenčního záření o vlnové délce 480-490 nm a o vyšší intenzitě, ale probíhá kratší dobu - pouze jako záblesk po dobu maximálně několika vteřin.

Determinační koeficient R^2 se u naměřených analýz pohyboval od hodnoty 0,9891 do 0,9986. Tato práce byla využita k experimentálnímu stanovení luciferázy I. a II. typu v rámci toxikologických testů. Je to první práce na toto téma. Cíl práce byl splněn. Přístroj a metoda mají potenciál do budoucnosti, ale metoda potřebuje ještě zdokonalit, aby mohla být využívána rutinně pro standardní testování. To je úkolem budoucích diplomových prací, které se touto tematikou budou zabývat.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČECHUROVÁ, P. *Automatizace chemiluminiscenčního stanovení ATP pomocí reakce s luciferázou*. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova. Vedoucí práce PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.
- [2] KRIST, J., F. GÉLA, F. FRONČEK a M. KUBALA. Luminiscence v běžném životě i v laboratoři. *Chemické Listy* [online]. 2008, (102), 1012-1016 [cit. 2018-03-31]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_11_1012-1016.pdf
- [3] ŠIMSÁ, D. a J. SKOPAL. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické listy* [online]. 2008, 1017-1019 [cit. 2017-11-27]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_11_1017-1019.pdf
- [4] Fluorescenční mikroskop. In: *Wikiwand* [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: http://www.wikiwand.com/cs/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop
- [5] WELSH, E. What is chemiluminescence?. *Science in school* [online]. 2011, (19), 62-68 [cit. 2018-03-31]. Dostupné z: <http://www.scienceinschool.org/2011/issue19/chemiluminescence>
- [6] GARCÍA-CAMPAÑA, Ana M. a Willy R. G. BAEYENS. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker, c2001. ISBN 08-247-0464-9.
- [7] MARKOVA, S. V. a E. S. VYSOTSKI. Coelenterazine-dependent luciferases. *Biochemistry (Moscow)*. 2015, **80**(6), 714-732. DOI: 10.1134/S0006297915060073. ISSN 0006-2979. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S0006297915060073>
- [8] Luciferáza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Lucifer%C3%A1za>
- [9] MARINA PEREZ, A., B. AQUINO, V. VIVIANI a J. KOBARG. Use of a special Brazilian red-light emitting railroad worm Luciferase in bioassays of NEK7 protein Kinase and Creatine Kinase. *BMC Biochemistry*. 2017, **18**(1), -. DOI: 10.1186/s12858-017-0087-z. ISSN 1471-2091. Dostupné také z: <http://bmcbiochem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12858-017-0087-z>

- [10] D-luciferin: synthetic. In: *Sigma-aldrich* [online]. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/19504?lang=en&ion=CZ>
- [11] Luciferin. In: <https://cis.vscht.cz/> [online]. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/luciferin.html
- [12] JANEČKOVÁ, A. a P. KLOUDA. *Organická chemie: studijní text pro SPŠCH*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2001. ISBN 80-863-6904-8.
- [13] PÉREZ-RUIZ, T., C. MARTÍNEZ-LOZANO, V. TOMÁS a J. MARTÍN. Determination of ATP via the photochemical generation of hydrogen peroxide using flow injection luminol chemiluminescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, **377**(1), 189-194. DOI: 10.1007/s00216-003-2071-2. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-2071-2>
- [14] What is ATP and what does it do?. In: *Socratic* [online]. 2017 [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://socratic.org/questions/what-is-atp-and-what-does-it-do>
- [15] LUNDIN, Arne. Use of firefly luciferase in atp-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Bioluminescence and Chemiluminescence Part C*. Elsevier, 2000, 2000, 346-370. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/S0076-6879(00)05499-9. ISBN 9780121822064. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687900054999>
- [16] Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity. In: *Www.sigmaaldrich.com* [online]. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/lucassyrobul.pdf>
- [17] LEITÃO, J. M.M. a J. C.G. ESTEVES DA SILVA. Firefly luciferase inhibition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010, **101**(1), 1-8. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.06.015. ISSN 10111344. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134410001557>
- [18] MIN, Ch., P. FERREIRA a L. PINTO DA SILVA. Theoretically obtained insight into the mechanism and dioxetanone species responsible for the singlet chemiexcitation of Coelenterazine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017, **174**, 18-26. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.07.012. ISSN 10111344. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417304384>

- [19] INOUE, S., Y. SAHARA-MIURA, J. SATO, R. IIMORI, S. YOSHIDA a T. HOSOYA. Expression, purification and luminescence properties of coelenterazine-utilizing luciferases from *Renilla*, *Oplophorus* and *Gaussia*: Comparison of substrate specificity for C2-modified coelenterazines. *Protein Expression and Purification*. 2013, **88**(1), 150-156. DOI: 10.1016/j.pep.2012.12.006. ISSN 10465928. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104659281200335X>
- [20] *Gaussia princeps*. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Gaussia_princeps_\(copepod\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Gaussia_princeps_(copepod))
- [21] *Gaussia*. In: *The Bioluminescence Web Page* [online]. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://biolum.eemb.ucsb.edu/organism/pictures/gaussia.html>
- [22] SIGMA Coelenterazine, native. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2230?lang=en&ion=CZ>
- [23] Introducing Lucia: a new secreted luciferase - Review. *InvivoGen* [online]. 2012 [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-lucia>
- [24] Pierce™ *Gaussia* Luciferase Flash Assay Kit. In: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html> [online]. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011779_Pierce_Gaussia_Luciferase_Flash_Asy_UG.pdf
- [25] LOURENÇO, J. M., J. C. G. ESTEVES DA SILVA a L. PINTO DA SILVA. Combined experimental and theoretical study of Coelenterazine chemiluminescence in aqueous solution. *Journal of Luminescence*. 2018, **194**, 139-145. DOI: 10.1016/j.jlumin.2017.10.025. ISSN 00222313. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231317311961>
- [26] LEHMANN, C., H. SIEG, A. LAMPEN a A. BRAEUNING. Disturbance of firefly luciferase-based bioassays by different aluminum species. *Analytical Biochemistry*. 2016, **504**, 27-29. DOI: 10.1016/j.ab.2016.03.019. ISSN 00032697. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269716300100>
- [27] MITSUKI, Y., T. YAMAMOTO, F. MIZUKOSHI, M. MOMOTA, K. TERAHARA, K. YOSHIMURA, S. HARADA a Y. TSUNETSUGU-YOKOTA. A

novel dual luciferase assay for the simultaneous monitoring of HIV infection and cell viability. *Journal of Virological Methods*. 2016, **231**, 25-33. DOI:

10.1016/j.jviromet.2016.02.006. ISSN 01660934. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016609341600029X>

[28] XIN, L., J. WANG, L. W. ZHANG, B. CHE, G. DONG, G. FAN a K. CHENG. Development of HSPA1A promoter-driven luciferase reporter gene assays in human cells for assessing the oxidative damage induced by silver nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016, **304**, 9-17. DOI: 10.1016/j.taap.2016.05.010. ISSN 0041008X. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X16301168>

[29] MARINA PEREZ, A., B. AQUINO, V. VIVIANI a J. KOBARG. Use of a special Brazilian red-light emitting railroad worm Luciferase in bioassays of NEK7 protein Kinase and Creatine Kinase. *BMC Biochemistry*. 2017, **18**(1), -. DOI: 10.1186/s12858-017-0087-z. ISSN 1471-2091. Dostupné také z:

<http://bmcbiochem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12858-017-0087-z>

[30] MIN, Z., Y. TING, G. MINGTAO, T. XIAOFEI, Y. DONG, Z. CHENGUANG a D. WEI. Monitoring autophagic flux using p62/SQSTM1 based luciferase reporters in glioma cells. *Experimental Cell Research*. 2018, **363**(1), 84-94. DOI:

10.1016/j.yexcr.2017.12.027. ISSN 00144827. Dostupné také

z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482717306808>

[31] O'LEARY, M. P., S. G. WARNER, S.-I. KIM, et al. A Novel Oncolytic Chimeric Orthopoxvirus Encoding Luciferase Enables Real-Time View of Colorectal Cancer Cell Infection. *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2018, **9**, 13-21. DOI:

10.1016/j.omto.2018.03.001. ISSN 23727705. Dostupné také

z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2372770518300056>

[32] LI, Y., M. LIU, J. CUI, et al. Hepa1-6-FLuc cell line with the stable expression of firefly luciferase retains its primary properties with promising bioluminescence imaging ability. *Oncology Letters*. 2018. DOI: 10.3892/ol.2018.8132. ISSN 1792-1074.

Dostupné také z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8132>

[33] WIDER, D., D. PICARD a W. NISHIMURA. Secreted dual reporter assay with Gaussia luciferase and the red fluorescent protein mCherry. *PLOS ONE*. 2017, **12**(12),

e0189403-. DOI: 10.1371/journal.pone.0189403. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0189403>

[34] RŮŽIČKA, J., E. H. HANSEN a A. STARZYNSKI. Flow injection analysis. *Http://www.flowinjectiontutorial.com/* [online]. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/>

[35] LEGNEROVA, Z., H. SKLENAROVA a P. SOLICH. Automated sequential injection fluorimetric determination and dissolution studies of Ergotamine Tartrate in pharmaceuticals. *Talanta*. 2002, **58**(6), 1151-1155. DOI: 10.1016/S0039-9140(02)00416-2. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914002004162>

[36] CHARVÁTOVÁ, M. *Automatizace extrakce na tuhé fázi pomocí lab-on-valve techniky*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta v HK. Vedoucí práce P. Chocholouš.

[37] KOBLASA, L. *Extrakce na tuhou fázi metodou lab-on-valve*. Hradec králové, 2011. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v HK. Vedoucí práce P. Chocholouš.

[38] Sekvenční injekční analýza: (Stanovení obsahu dusitanů rivanolovou metodou). In: *Www.natur.cuni.cz*[online]. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/pprakt/sia.pdf>

[39] PASEKOVÁ, H., M. POLÁČEK a P. SOLICH. Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*. 1999, (93), 354-359.

[40] HOMOLOVÁ, Z. *Stanovení verapamilu metodou sekvenční injekční analýzy s chemiluminiscenční detekcí*. Hradec Králové, 2008. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v HK. Vedoucí práce H. Sklenářová.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Popis přechodu elektronů v energetických hladinách [1]	7
Obrázek 2: Stokesův posun [4]	8
Obrázek 3: Photinus Pyralis – světluška [6]	10
Obrázek 4: Struktura luciferinu [10]	11
Obrázek 5: Struktura ATP [14]	12
Obrázek 7: <i>Gaussia princeps</i> [21]	13
Obrázek 8: Struktura koelenterazinu [22]	14
Obrázek 10: Porovnání obou typů luciferáz [23]	15
Obrázek 11: Princip SIA metody [26]	21
Obrázek 12: Schéma přístroje [1]	26
Obrázek 13: Neprůtoková cela [1]	27
Obrázek 14: Průtoková spirální cela [1]	27
Obrázek 16: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na množství ATP	38
Obrázek 17: Záznam z měření z ovládacího programu pro stanovení ATP pomocí komerčního kitu	38
Obrázek 18: Graf závislosti změny objemu luciferázy na intenzitě chemiluminiscence	40
Obrázek 19: Záznam z měření pro stanovení intenzity chemiluminiscence luciferázy I. typu	40
Obrázek 20: Závislost intenzity chemiluminiscence na objemu ATP	42
Obrázek 21: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu směsi činidla z komerčního kitu	43
Obrázek 22: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na změně objemu luciferázy	45
Obrázek 23: Záznam z měření chemiluminiscence pomocí samostatných roztoků luciferinu a luciferázy	45
Obrázek 24: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu luciferázy II. typu z lyzátu buněk	47
Obrázek 25: Záznam z měření luciferázy II. typu	47
Obrázek 26: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na obsahu luciferázy II. typu - sandwichová metoda	50
Obrázek 27: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu z buněk	51
Obrázek 28: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu – s promícháním	52

Obrázek 29: Záznam měření luciferázy II. typu pomocí ředění lyzátu	52
Obrázek 30: Graf závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění lyzátu sandwichovou metodou	53

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Druhy luminiscence [1,3]	8
Tabulka 2: Stanovení luciferázy I. typu [16]	16
Tabulka 3: Stanovení luciferázy II. typu [24].....	16
Tabulka 4: Rešerše na stanovení luciferázy.....	18
Tabulka 5: Ovládací program pro přístroj s neprůtokovou celou.....	31
Tabulka 6: Program na ovládání přístroje FIAlab	34
Tabulka 7: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu směsného činidla z komerčního kitu	35
Tabulka 8: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na množství ATP.....	36
Tabulka 9: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu směsi činidla z komerčního kitu	37
Tabulka 10: Měření závislosti chemiluminiscence na množství ATP.....	37
Tabulka 11: Intenzita chemiluminiscence v závislosti na objemu luciferázy	39
Tabulka 12: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na objemu ATP	42
Tabulka 13: Měření závislosti chemiluminiscence na změně objemu komerčního kitu ke konstantnímu množství ATP	43
Tabulka 14: Měření závislosti chemiluminiscence na změně objemu luciferázy	44
Tabulka 15: Měření závislosti intenzity chemiluminiscence na změně objemu luciferázy II. typu.....	46
Tabulka 16: Výsledky měření chemiluminiscence sandwichovou metodou - stanovení luciferázy II. typu.....	48
Tabulka 17: Výsledky měření závislosti intenzity chemiluminiscence na ředění obsahu luciferázy II. typu sandwichovou metodou.....	49
Tabulka 18: Výsledky měření intenzity chemiluminiscence za pomoci ředění luciferázy II. typu - bez promíchání.....	50
Tabulka 19: Výsledky měření intenzity chemiluminiscence za pomoci ředění luciferázy II. typu - s promícháním	51
Tabulka 20: Výsledky měření intenzity chemiluminiscence za pomoci ředění luciferázy II. typu.....	53

11 SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Přeměna luciferinu na oxyluciferin a vznik bioluminiscenčního záření [16]	12
Rovnice 2: Reakce znázorňující přeměnu koelenterazinu na koelenteramid [23].....	14
Rovnice 3: Rovnice pro přepočítání změřeného signálu na nA [40]	32