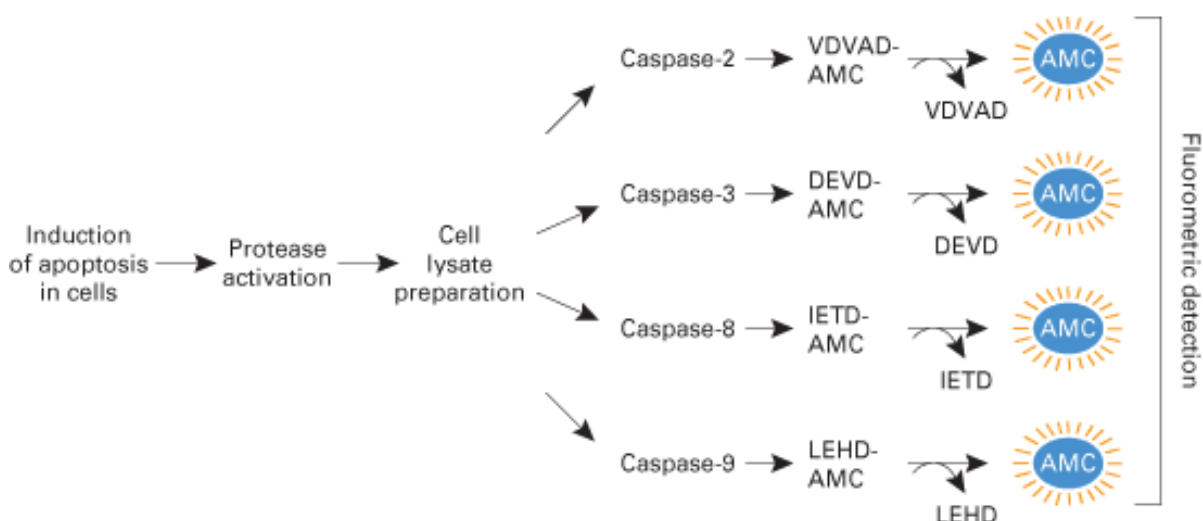


Technika fluorescencyjnego oznaczania aktywności enzymów

Wstęp:

Wśród technik biologii molekularnej jedną z najczęściej stosowanych jest technika fluorescencyjna. Stosując technikę fluorescencyjną można oznaczyć aktywność enzymów, wykorzystując substraty fluorogeniczne tzw. prefluorofory, które po wnikięciu do komórki pod wpływem działania enzymu przekształcają się w emitujące światło – fluorofory.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie aktywności enzymatycznej kaspazy – 3 wykorzystując fluorogeniczny substrat Ac-DEVD-AMC (N-Acetyl – Asp – Glu – Val – Asp – amino-4-methylcoumarin) dla kaspazy - 3. Podczas testu, aktywna kaspaza-3 „tnie” substrat zawierający specyficzną sekwencję aminokwasową, rozpoznawaną właśnie przez ten enzym (między DEVD i AMC), generując wysoce fluorescencyjny 7 – amino-4-methylcoumarin (AMC), który wykrywany jest przy użyciu czytnika fluorescencji dla wzbudzenia przy 380 nm i emisji pomiędzy 420 - 460 nm. Rozszczepienie substratu występuje tylko w lizatach komórek apoptotycznych; Dlatego też, ilość AMC jest proporcjonalna do liczby komórek apoptotycznych w próbce.



Kaspazy są enzymami należącymi do rodziny proteaz cysteinowych (ang. cysteine-dependent aspartate-directed proteases) biorących udział zarówno w fazie indukcji, jak i w fazie wykonawczej procesu apoptozy. Apoptoza jest aktywnym, zaprogramowanym genetycznie i ewolucyjnie konserwatywnym procesem, w którym dochodzi do autodestrukcji komórek. Są to enzymy z grupy proteaz, których funkcją jest degradacja (rozcinięcie) specyficznych białek komórkowych. Kaspazy istnieją w komórce w formie proenzymu i są aktywowane podczas kaskady zdarzeń związanych z apoptozą. Proteazy podobne do kaspaz w sposób specyficzny rozpoznają białka posiadające specyficzne reszty aminokwasowe na C-końcu. Aktywacja kaspaz gra kluczową rolę w inicjacji początkowych etapów apoptozy. Oznaczanie aktywności kaspaz opiera się na reakcji w której enzym tnie substrat zawierający specyficzną dla siebie sekwencję aminokwasową. W wyniku rozcięcia substratu uwalniana jest część fluorescencyjna, której ilość proporcjonalna jest do ilości aktywnej kaspazy. Metoda ta jest czulsza 10-20 razy od metody kolorymetrycznej.

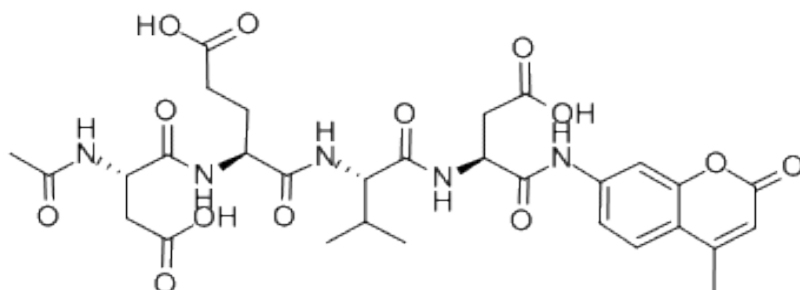
Tabela 1: Rodzina kaspaz i specyficzne substraty.

New name	Old name(s)	Molecular weight (kDa) ^b			Preferred small substrates ^c	
		Pr	Lg	Sm		
Caspase-1	ICE	45	24 20	14 10	YEVD/X	WEHD/X
Caspase-2	Ich-1L, NEDD2	48	32 18	14 12	VDVAD/X	DEHD/X
Caspase-3	CPP32, YAMA, Apopain	32	20 17	12	DMQD/X	DEVVD/X
Caspase-4	Tx, Ich-2, ICE _{rel} II				LEVVD/X	(W/L)EHD/X
Caspase-5	ICE _{rel} III, Ty				Unknown	(W/L)EHD/X
Caspase-6	Mch2	34	21 18	13 11	VEVD/X	VEHD/X
Caspase-7	Mch3, CMH-1, ICE-LAP3	34	20	12	DEVVD/X	DEVVD/X
Caspase-8	Mch5, FLICE, MACH	53 55	43 18	12 11	IETD/X	LETD/X
Caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	50	37	12	Unknown	LEDH/X
Caspase-10	Mch4, FLICE-2	55	43 17	12	IEAD/X	Unknown
Caspase-13	ERICE				Unknown	Unknown
Caspase-14	MICE	29	18	10	Unknown	Unknown

Opis procedury ćwiczeń:

Na zajęciach studenci wykonają analizę oznaczania aktywności enzymatycznej kaspazy – 3 używając fluorescencyjnego substratu (AC-DEVD-AMC).

AC-DEVD-AMC



Synonimy: Ac-Devd;AC-DMQD-AMC;AC-DEVD-MCA;AC-DEVD-AMC;ACETYL-DEVD-AMC;AC-ASP-MET-GLN-ASP-AMC;AC-ASP-GLU-VAL-ASP-MCA;AC-ASP-GLU-VAL-ASP-AMC;AC-DEVD-AMC AMMONIUM SALT;CASPASE-3 FLUOROGENIC SUBSTRATE

W trakcie wykonywania doświadczenia odczynniki oraz płytkę trzymamy na lodzie.

1. Płytkę z komórkami wyciągamy 10 min przed rozpoczęciem analizy z zamrażarki -70°C.
2. Do dołków płytki 96 dołkowej z posianymi komórkami dajemy po 100 µl buforu lizującego CAB na 5 min.
3. Przygotowujemy substrat do kaspazy – 3:
Roztwór roboczy w CAB -----> przeliczenia na płytkę 96 dołkową
10 mM x 1000 – 10 µM
10 µl substratu + 10 ml CAB
4. Następnie dodajemy po 100 µl roztworu roboczego zawierającego 10 µM substratu kaspazy – 3. Pamiętajmy o kontroli negatywnej – BLANK
5. Inkubacja w ciemności 37°C przez 30 min.
6. Odczyt powtarzamy co 10 min, aż do uzyskania maksymalnej aktywności enzymu przy długości fali 360/460 nm.
7. Po zakończeniu pomiaru oznaczamy zawartość białka dodając 10 µl roztworu fluorescaminy do prób, blanku i krzywej białkowej. Fluorescaminę rozpuszczamy w acetonitrylu przed samym odczytem (5 mg fluorescaminy na 1 ml acetonitrylu).

Krzywa białkowa:

Stężenie białka	BSA (1mg/ml)	H ₂ O destylowana
0 µg	0 µl	200 µl
50 µg	10 µl	190 µl
100 µg	20 µl	180 µl
250 µg	50 µl	150 µl
500 µg	100 µl	100 µl
1000 µg	200 µl	0 µl

8. Analiza wyników: porównanie analizowanych prób do krzywej kalibracyjnej.

Literatura

Nicholson D, Ali A, Thornberry N, Vaillancourt J, Ding C, Gallant M, Gareau Y, Griffin P, Labelle M, Lazebnik Y: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995; 376: 37–43.

Korzeniewska-Dyl I. Kaspazy – struktura i funkcja. *Pol. Merk. Lek.*, 2007, XXIII, 138, 403.

Protokół oznaczenia:

Data.....

Próby.....

Zakres krzywej białkowej.....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
B	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
C	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
D	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
E	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
F	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
G	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
H	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐