

## Inkubace enzymů se substráty

Inkubace redukčních enzymů .....	1
Inkubace oxidačních enzymů .....	2
Extrakce látek z inkubační směsi .....	2
Příprava vzorků k HPLC/UHPLC detekci .....	3
Chemikálie a roztoky .....	4
Substráty .....	5
Mobilní fáze HPLC/UHPLC .....	6
Poznámky .....	8

### Inkubace redukčních enzymů

- 1) Připravit regenerační systém a roztok substrátu dle počtu inkubovaných vzorků. Vzorky s enzymatickou aktivitou rozmrazit na ledu, moc s nimi netřepat. Zapnout termomixér na 37 °C.
- 2) Připravit reakční směs dle rozpisu. Celkový objem vzorku je 100 µl včetně substrátu.

	Objem
Enzym, resp. směs enzymů	1 až 50 µl
Regenerační systém	20 µl
0.1M Na-fosfátový pufr, pH 7.4	doplnit do 90 µl

- 3) Vzorek 5 minut preinkubovat při 37 °C.
- 4) Přidat 10 µl roztoku se substrátem = start reakce. Krátce protřepat na třepačce a ihned vrátit zpět do termomixéru. Spustit stopky.
- 5) Co 30 sekund přidávat 10 µl roztoku se substrátem.

***Inkubace trvá 30 minut. Při očekávaných nízkých aktivitách lze prodloužit.***

- 6) Připravit si dávkovací pipetu se špičkou.
- 7) Po 30 minutách ukončit inkubaci přidáním 40 µl 25% roztoku amoniaku, vzorek protřepat na třepačce a vložit do ledu.

## Inkubace oxidačních enzymů

- 1) Připravit roztok substrátu a NAD<sup>+</sup>. Vzorky s enzymatickou aktivitou rozmrazit na ledu, moc s nimi netřepat. Zapnout termomixér na 37 °C.
- 2) Připravit reakční směs dle rozpisu. Celkový objem vzorku je 100 µl včetně substrátu.

	Objem
Enzym, resp. směs enzymů	1-50 µl
5mM NAD <sup>+</sup>	20 µl
0.1M Na-fosfátový pufr, pH 7.4	doplnit do 90 µl

- 3) Vzorek 5 minut preinkubovat při 37 °C.
- 4) Přidat 10 µl roztoku se substrátem = start reakce. Krátce protřepat na třepačce a ihned vrátit zpět do termomixéru. Spustit stopky.
- 5) Co 30 sekund přidávat 10 µl roztoku se substrátem.

***Inkubace trvá 30 minut. Při očekávaných nízkých aktivitách lze prodloužit.***

- 6) Připravit si dávkovací pipetu se špičkou.
- 7) Po 30 minutách ukončit inkubaci přidáním 40 µl 25% roztoku amoniaku, vzorek protřepat na třepačce a vložit do ledu.

## Extrakce látek z inkubační směsi

- 1) Ke vzorkům na ledu přidat 1000 µl ethylacetátu a třepat 15 minut na třepačce. Připravit si pro každý vzorek jednu novou mikrozkušavku.
- 2) Vzorky centrifugovat na 13000 otáček po dobu 2 minut.
- 3) Opatrně odebrat horní ethylacetátovou vrstvu a přepipetovat ji do nových mikrozkušavek. Pozor na narušení spodní vrstvy, obsahuje nečistoty.
- 4) Zapnout koncentrátor a nastavit teplotu na 30 °C.
- 5) Otevřené mikrozkušavky s ethylacetátem vložit do koncentrátoru, přiklopit víko a zapnout. Jakmile se ozve zvuk cvaknutí, zapnout vakuovou pumpu a přitlačit víko koncentrátoru dokud se nezmění se zvuk pumpy (cca 10 sekund). Poté ověřit těsnost přizvednutím víka. Pokud lze víko nadzvednout, opět přitlačit dokud pevně nedrží.
- 6) Vzorky nechat odpařit do sucha při 30 °C po dobu cca 30 minut.
- 7) Dle potřeby lze kroky 1-6 opakovat. Ethylacetát se pak přidává do stejných mikrozkušavek.
- 8) Odpařené vzorky lze uchovávat při -20 °C.

**Příprava vzorků k HPLC/UHPLC detekci**

- 1) K odpařeným vzorkům přidat daný objem mobilní fáze dle tabulky.

	Objem	Přístroj
Anthracykliny	50 µl	UHPLC
Bupropion	100 µl	HPLC
Estron/estradiol	250 µl	HPLC
NNK/NNAL	50 µl	UHPLC
Oracin/DHO	50 µl	UHPLC
Testosteron/Adion	180 µl	HPLC
Wf-OH/warfarin/coumachlor	50 µl	UHPLC

- 2) Vzorky rozpouštět v ultrazvuku. Vizualně zkontrolovat přítomnost nerozpuštěných látek.
- 3) Připravit a popsat vialky se 400 µl inserty, víčka a těsnící septa (červenou stranou nahoru).
- 4) Rozpuštěné vzorky přepipetovat do insertů, zašroubovat víčkem se septem.

## Chemikálie a roztoky

### 0.1M Na-fosfátový pufr pH 7.4 (100 ml) – slévaný

0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.58 g do 100 ml ultračisté vody

0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.39 g do 25 ml ultračisté vody

Slévat oba roztoky na pH 7.4.

### 0.1M MgCl<sub>2</sub>

0.1M MgCl<sub>2</sub> 1.017 g rozpustit v 50 ml ultračisté vody

### Regenerační systém (připravovat v čas potřeby)

Rozpis na 10 vzorků.

NADP<sup>+</sup> 2 mg

glukosa-6-fosfát 6 mg

0.1M MgCl<sub>2</sub> 100 μl

0.1M Na-fosfátový pufr, pH 7.4 100 μl

Rozpustit na třepačce.

0.35 j. glukosa-6-fosfátdehydrogenasa 5 μl

Již netřepat

### 5 mM NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup> (663.43 g/mol) 3.32 mg rozpustit v 1 ml 0.1M Na-fosf. Pufu

## Substráty

### 10mM anthracykliny (připravovat dle počtu vzorků)

Daunorubicin HCl (563.98)	2.82 mg rozpustit v 500 µl ultračisté vody
Doxorubicin HCl (579.98)	2.90 mg rozpustit v 500 µl ultračisté vody
Idarubicin hydrochlorid (533.96)	2.67 mg rozpustit v 500 µl ultračisté vody

Uchovávat při -20 °C. Pracovat v ochranných rukavicích.

### 5mM bupropion

Bupropion HCl (276.2)	1.38 mg rozpustit v 1 ml ultračisté vody
-----------------------	--

Citlivé na světlo. Připravovat v tmavé mikrozkušavce.

### 10mM estron/estradiol

Estron (270.37)	1.35 mg rozpustit v 500 µl ethanolu
β-estradiol (272.38)	1.36 mg rozpustit v 500 µl ethanolu

### 1.2mM estron/estradiol (připravovat dle počtu vzorků)

10mM estron	12 µl doplnit 88 µl ultračisté vody
10mM β-estradiol	12 µl doplnit 88 µl ultračisté vody

### 50mM NNK (připravovat dle počtu vzorků)

NNK (207.23)	1.04 mg rozpustit ve 100 µl ultračisté vody
--------------	---

### 5mM oracin

Oracin HCl (370 g/mol)	1.85 mg rozpustit v 1 ml ultračisté vody
------------------------	--

Uchovávat v lednici. Pracovat v ochranných rukavicích.

### 10mM testosteron/adion

Testosteron (288.43)	1.44 mg rozpustit v 500 µl ethanolu
4-androsten-3,17-dion (286.41)	1.43 mg rozpustit v 500 µl ethanolu

### 1.2mM testosteron/adion (připravovat dle počtu vzorků)

10mM testosteron	12 µl doplnit 88 µl ultračisté vody
10mM adion	12 µl doplnit 88 µl ultračisté vody

## Mobilní fáze HPLC/UHPLC

*Všechny mobilní fáze je ještě před smícháním s organickou částí (acetonitril, methanol) nutno přefiltrovat 0.45 µm membránovým filtrem.*

### Anthracykliny (UHPLC)

	<b>DOX</b>	<b>DAUN</b>	<b>IDA</b>
Ultračistá voda s 0.1% kys. mravenčí	76 %	74 %	73 %
Acetonitril HPLC Grade	24 %	26 %	27 %

### Bupropion (HPLC)

20mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, pH 5.45 (TEA)	80 %
Acetonitril HPLC Grade	20 %

### Estron/estradiol (HPLC)

Ultračistá voda	62 %
Acetonitril HPLC Grade	38 %

### NNK/NNAL (UHPLC)

<b>10mM Na-fosfátový pufr, pH 7.4</b>	<b>90 %</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	1.43 g do 400 ml ultračisté vody
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.156 g do 100 ml ultračisté vody
Slévat oba roztoky na pH 7.4.	
<b>Acetonitril HPLC Grade</b>	<b>10%</b>

### Oracin/dihydrooracin (UHPLC)

<b>10mM hexansulfonan. pufr, pH 3.27</b>	<b>78%</b>
1-hexansulfonan sodný (206.24)	1.03 g
Triethylamin (101.19, ρ=0.727)	6.96 ml
Rozpustit ve 450 ml ultračisté vody. Upravit pH na 3.27 pomocí kyseliny orthofosforečné.	
Doplnit ultračistou vodou do 500 ml.	
<b>Acetonitril HPLC Grade</b>	<b>22%</b>

### Testosteron/adion (HPLC)

Methanol	70 %
Ultračistá voda	30 %

**Warfarin-OH/warfarin/coumachlor (UHPLC)**

10mM octan amonný	70%
Methanol	30 %

## Poznámky



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Publikace je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.