



Τμήμα Χημείας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Department of Chemistry

University of Crete

3^ο Σεμινάριο Δημιουργία ενός high-throughput assay

Μανασσάκη Ελένη (AM:1301)

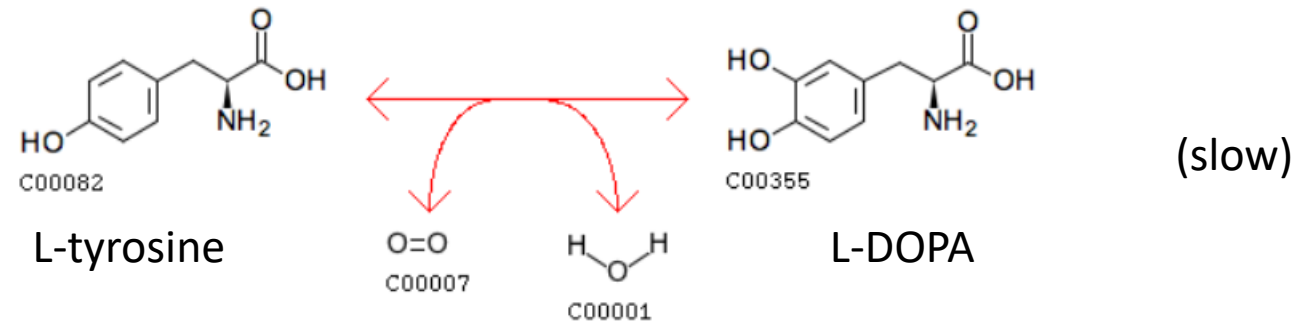
Καλφόγλου Παύλος Παναγιώτης (AM:1293)

Ημερομηνία: 29/5/2026

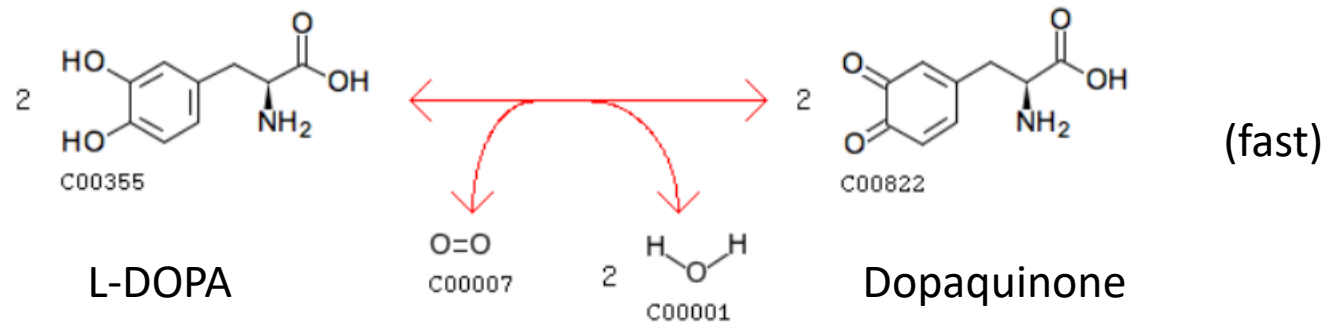
Tyrosinase [EC:1.14.18.1]

- Καταλύει τα δύο πρώτα βήματα της βιοσύνθεσης της μελανίνης
- Συμπαράγοντας: Cu^{2+}

1. Monophenolase activity:



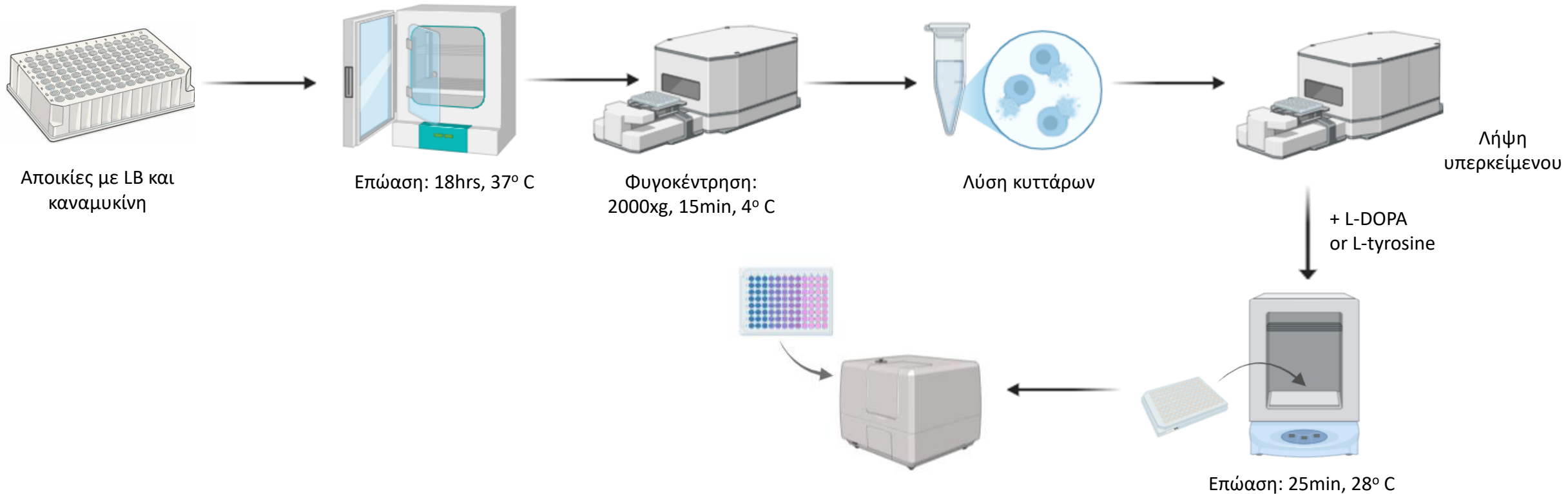
2. Diphenolase activity:



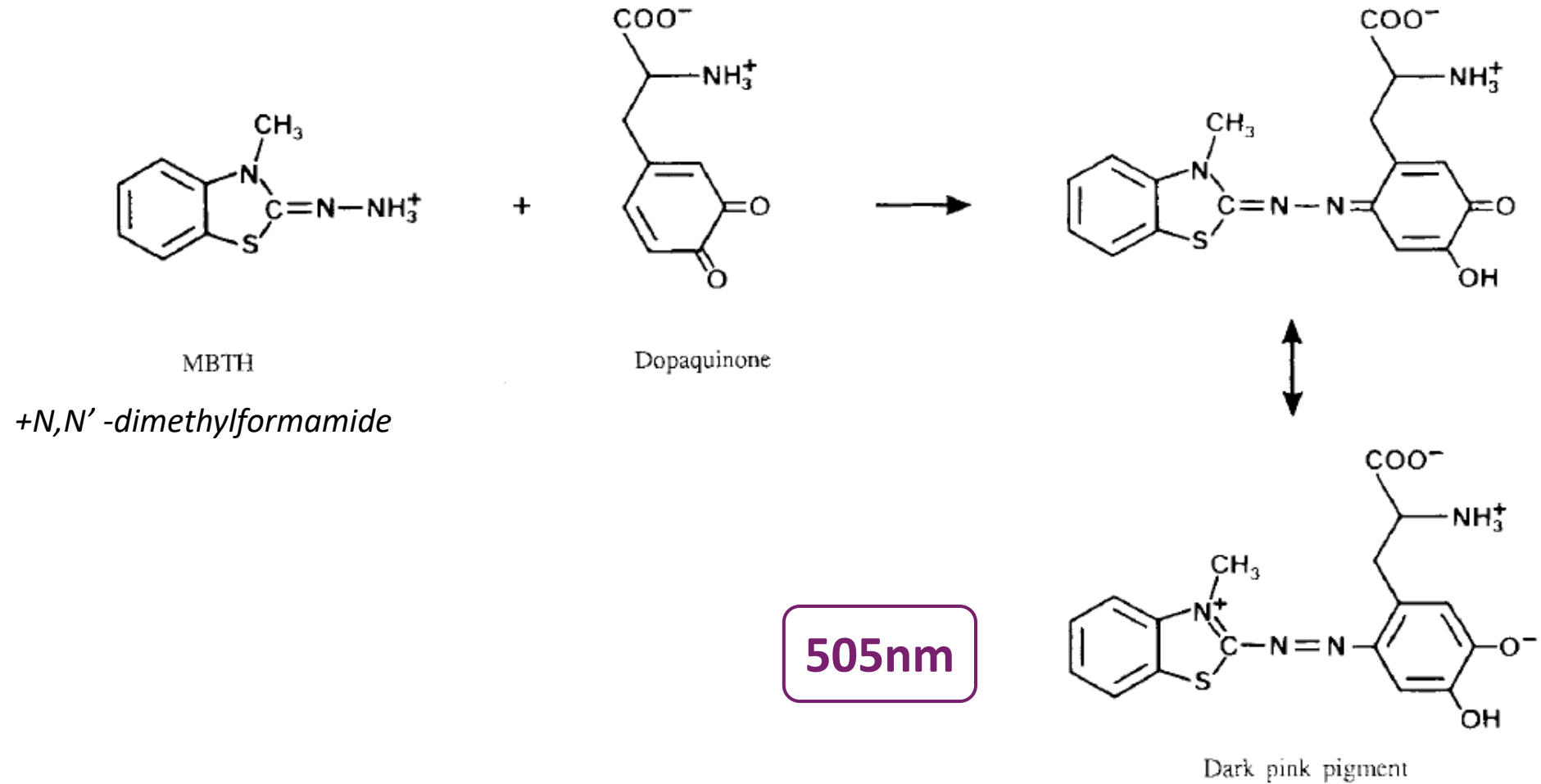
Dopachrome protocol

L-Tyrosine → L-DOPA → Dopaqueinone → Dopachrome

475nm

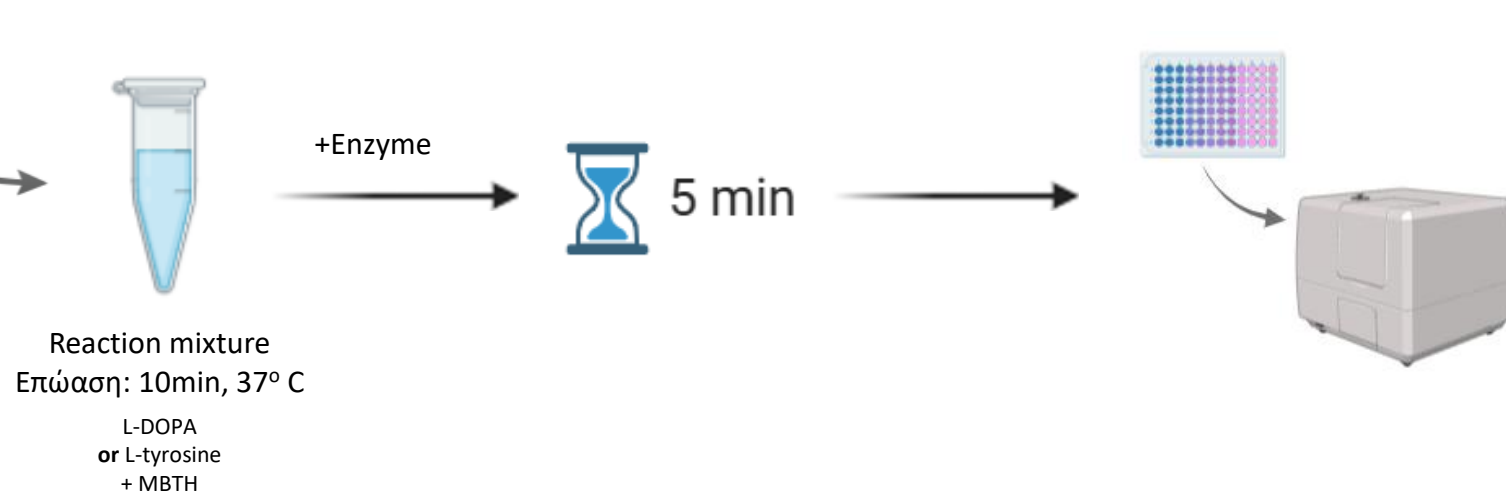


MBTH protocol



MBTH protocol

Λύση κυττάρων



Κοινά χαρακτηριστικά – Πλεονεκτήματα

High throughput screening

Colorimetric readout → χαμηλό κόστος → εύκολο

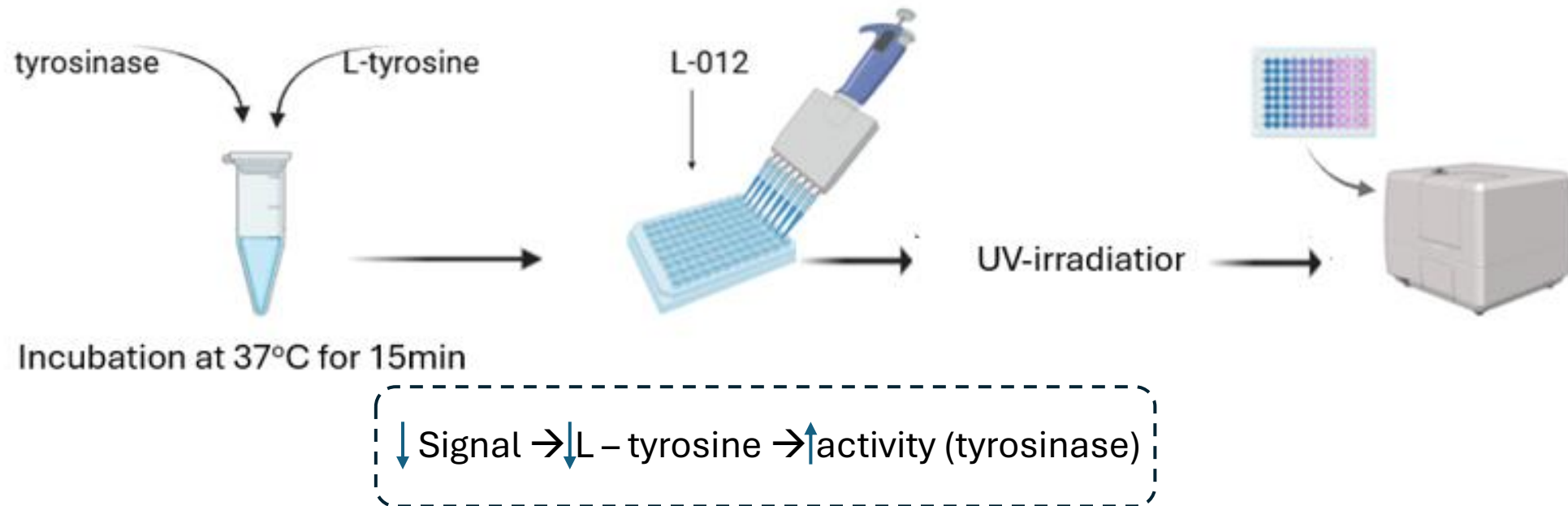
Crude lysates → μειώνει χρόνο & κόστος

Direct screening μεταλλαγμάτων

Selectivity

MBTH product	Dopachrome
Μετράει μία σκούρα ροζ χρωστική (505nm)	Μετράει dopachrome (475nm)
Η αντίδραση είναι πλήρης και ελεγχόμενη	Υπόθεση ότι η αντίδραση προς dopachrome είναι πλήρης
Σταθερό προϊόν σε μεγάλο εύρος pH και θ	Ασταθές σε υδατικό περιβάλλον
Δεν αντιδράει περεταίρω	Πολυμερισμός μελανίνης
Υψηλότερη ευαισθησία	Χαμηλή ευαισθησία μεθόδου

Chemiluminescence-based HTS assay



Πλεονεκτήματα:

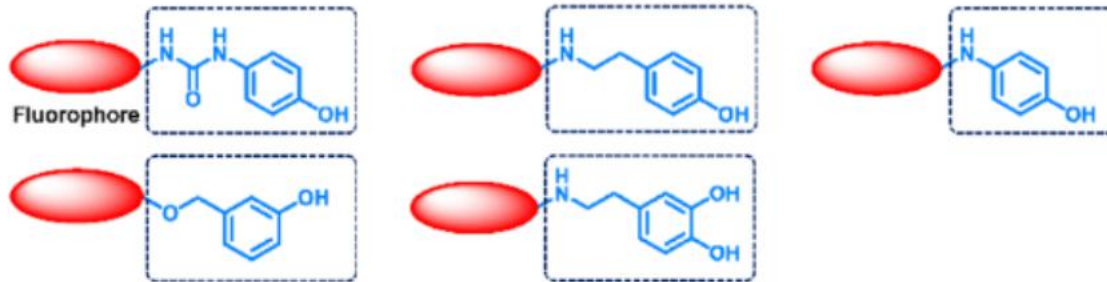
- Γρήγορη ανάλυση (<1min/sample)
- Υψηλής ευαισθησίας chemiluminescence detection
 - Χαμηλή κατανάλωση αντιδραστηρίων
 - Αξιόπιστη μέθοδος

Μειονεκτήματα:

- Απαιτείται εξοπλισμός ακτινοβολίας UV
 - Το σήμα είναι έμμεσο
- Artifacts στο σήμα chemiluminescence λόγω της απομάκρυνσης των ROS

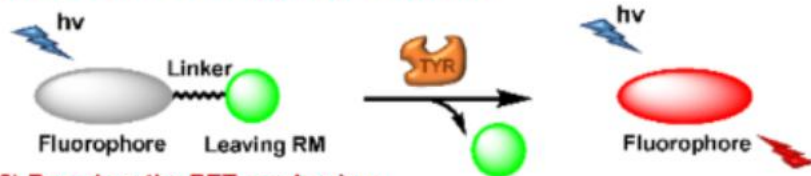
Fluorescence method

(a) Recognition moieties (RM)

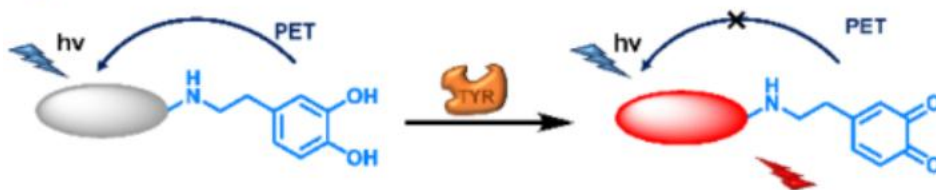


(b) Design strategies for OFF-ON probes

(1) Based on the leaving group mechanism



(2) Based on the PET mechanism



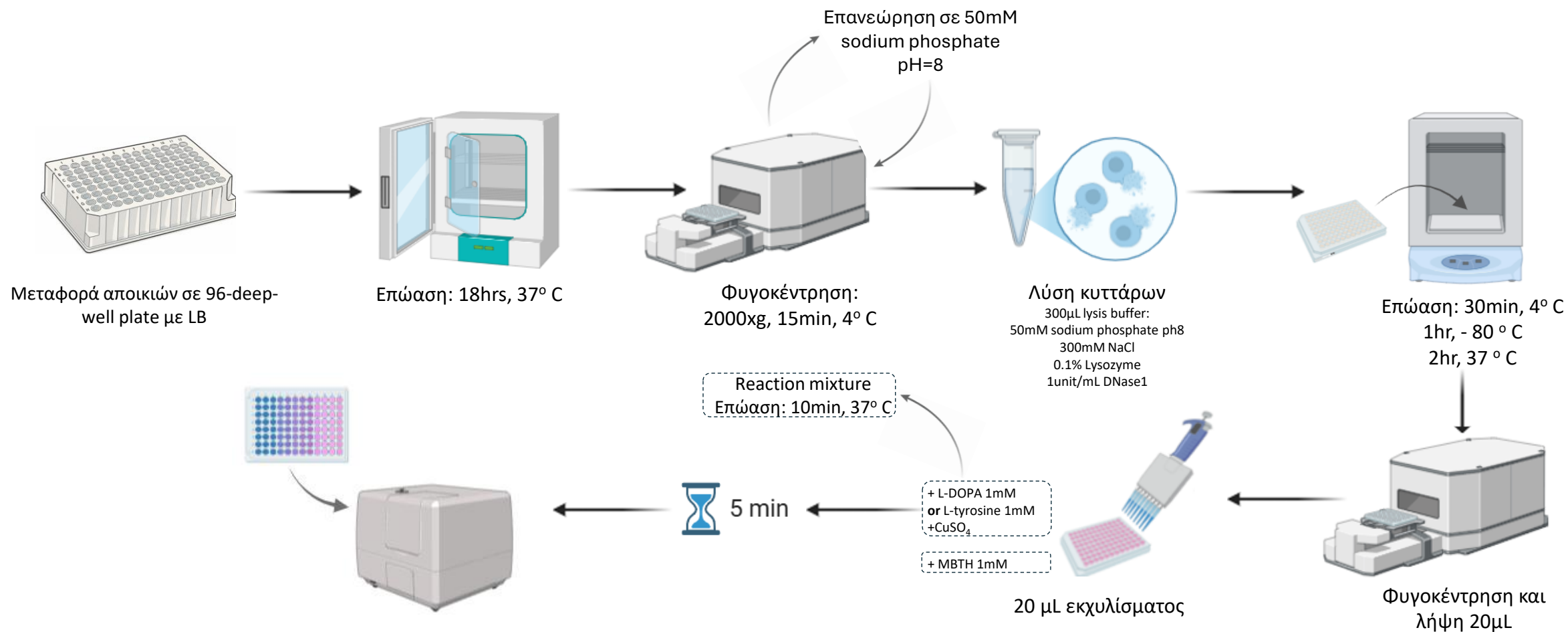
Πλεονεκτήματα:

Υψηλή ευαισθησία
Υψηλή χωροχρονική ανάλυση
In vitro & in vivo
Real time monitoring
Δεν απαιτείται καθαρισμός
Δεν απαιτούνται επιπλέον αντιδραστήρια

Μειονεκτήματα:

Περισσότερη προετοιμασία
Κατασκευή ή αγορά probes
Υψηλότερο κόστος

HTS assay για την εύρεση μεταλλάγματος με αυξημένη δραστικότητα στην αντίδραση



Thermostability protocol

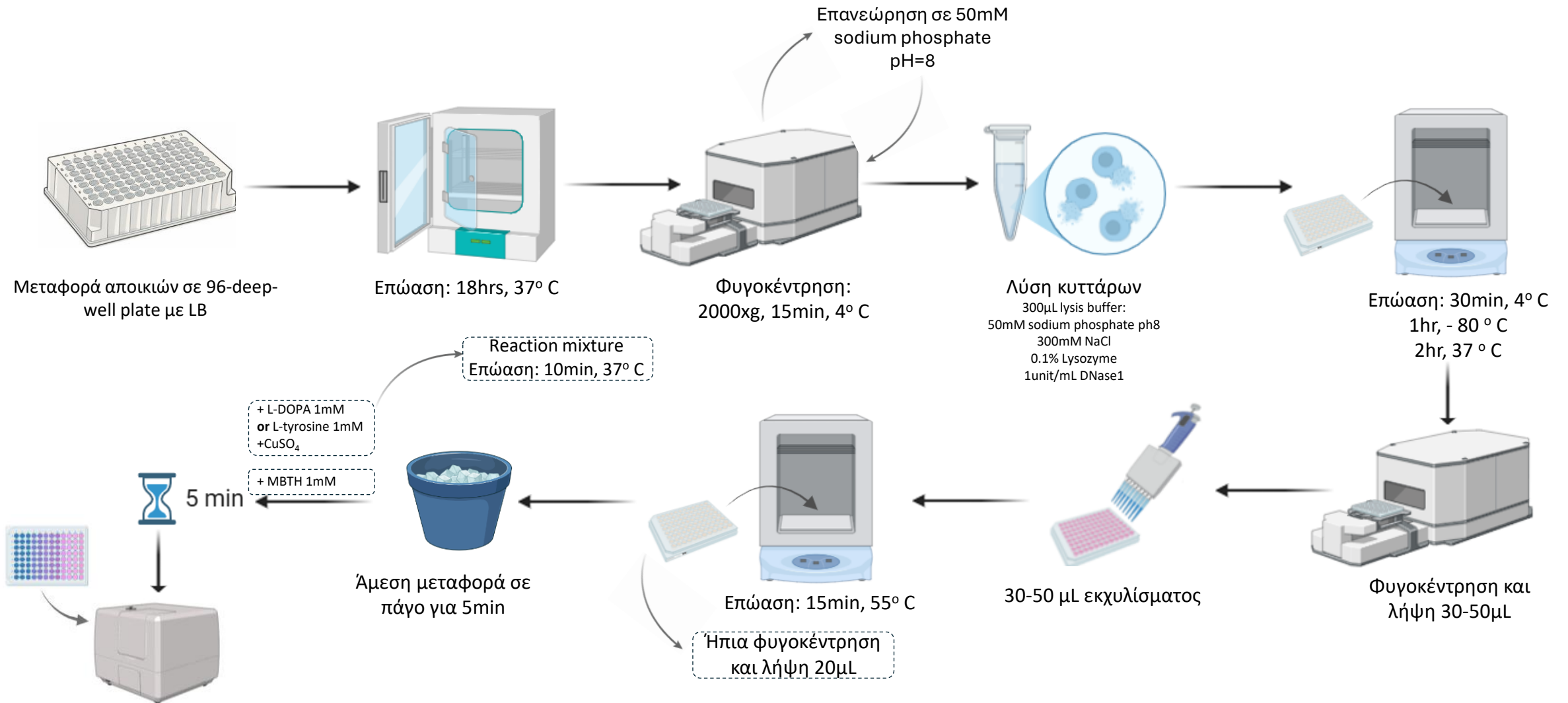


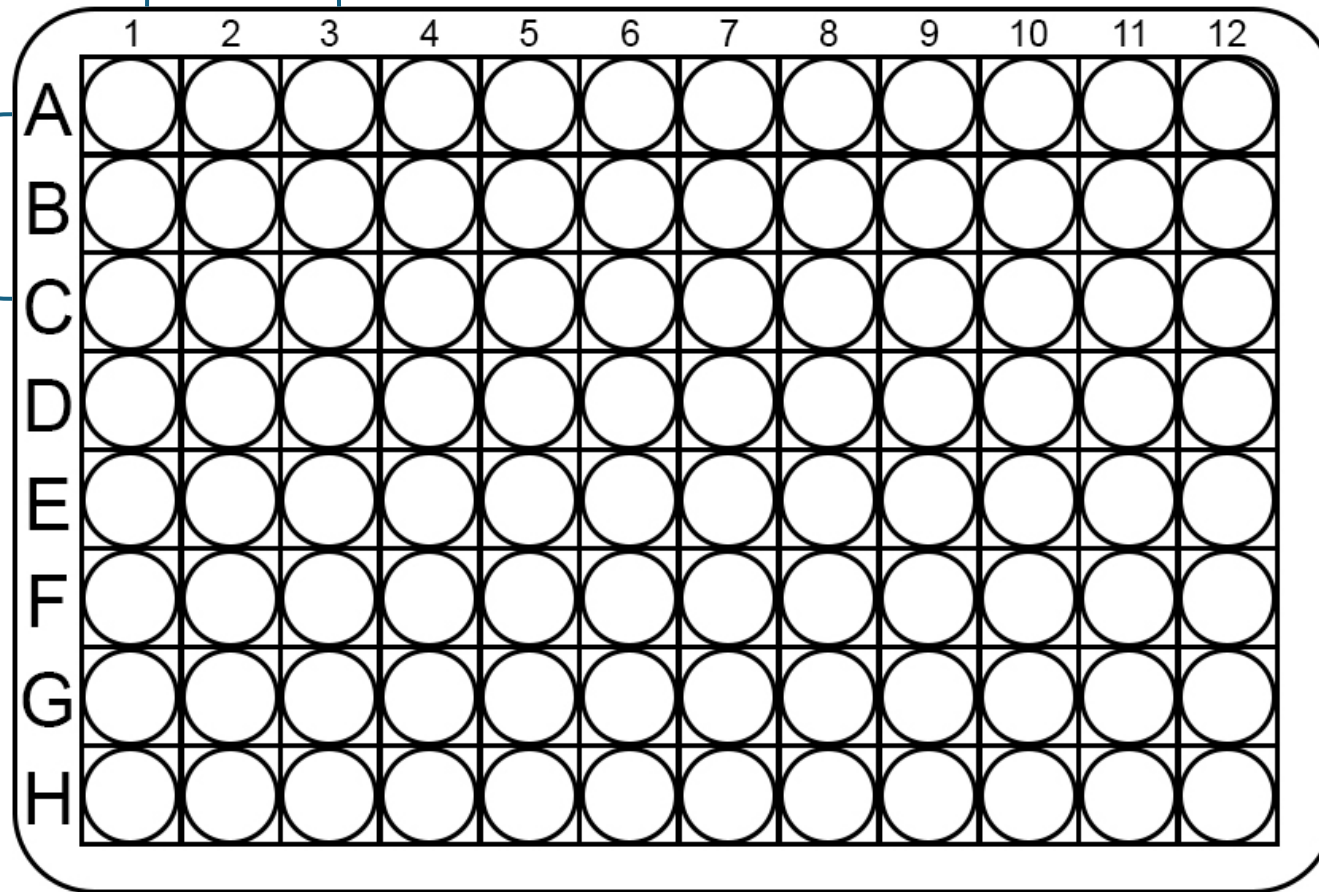
Plate map

Τριπλέτες
(βιολογικές επαναλήψεις)

Τριπλέτες
Τεχνικές
επαναλήψεις

+ WT control

+ Blank



+ Κανονικοποίηση

+ Προσθήκη οξέος ή
απορρυπαντικού για να
σταματήσει η αντίδραση

Βιβλιογραφία

- Abdel-Hakim, A., El-Maghrabey, M., Tsubokami, A., Belal, F., Hammad, M. A., Kuroda, N., & Kishikawa, N. (2026). Applying pulse UV irradiation-induced chemiluminescence approach for high-throughput screening assay of tyrosinase inhibitors. *Talanta*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128560>
- Fan, Y. F., Zhu, S. X., Hou, F. Bin, Zhao, D. F., Pan, Q. S., Xiang, Y. W., Qian, X. K., Ge, G. B., & Wang, P. (2021). Spectrophotometric assays for sensing tyrosinase activity and their applications. In *Biosensors* (Vol. 11, Number 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios11080290>
- García-Molina, F., Muñoz, J. L., Varón, R., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & Tudela, J. (2007). A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 55, Number 24, pp. 9739–9749). <https://doi.org/10.1021/jf0712301>
- Shuster Ben-Yosef, V., Sendovski, M., & Fishman, A. (2010). Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(7), 372–376. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.08.008>
- WINDER, A. J., & HARRIS, H. (1991). New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, 198(2), 317–326. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16018.x>
- Xiao, H., Bao, Z., & Zhao, H. (2015). High throughput screening and selection methods for directed enzyme evolution. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 54(16), 4011–4020. <https://doi.org/10.1021/ie503060a>

Ευχαριστούμε για την προσοχή σας!