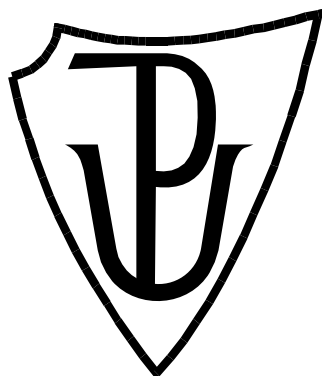


Univerzita Palackého
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



Experimentální metody studia
obranné reakce rostlin
(KBC/EMORR)

FRVŠ projekt 2043/2011/G4

1. PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

1.1. Teoretický úvod

1.1.1. Charakteristika rodu *Solanum*

Z dosavadních výzkumů vyplývá, že mezi planými druhy rodu *Solanum* byla nalezena rezistence vůči téměř všem závažným chorobám a škůdcům rajčete. Rod *Solanum* lze rozdělit na dva komplexy, tzv. esculentum-komplex a peruvianum-komplex.

Esculentum-komplex zahrnuje celkem šest druhů, tři z nich (*S. lycopersicum*, *S. cheesmanii* a *S. pimpinellifolium*) se vyznačují syntézou barevných karotenoidů v plodech, tři další druhy (*S. habrochaites*, *S. parviflorum* a *S. pennellii*) jsou zelenoplodé. Všichni zástupci tohoto komplexu jsou bez problémů křížitelní s komerčními odrůdami rajčete.

Peruvianum-komplex sestává ze dvou zelenoplodých druhů (*S. peruvianum* a *S. chilense*). Tyto dva druhy, které jsou nositeli významných vlastností, se vyznačují problematickou sexuální křížitelností s *S. lycopersicum*. Tato sexuální inkompatibilita může být překonána použitím tzv. genotypů-mostů, nebo pomocí některých moderních metod buněčné biologie, jako je např. technika "embryo-rescue" a somatická hybridizace. Také oblast molekulární biologie poskytuje další možnosti při šlechtění rajčete, zejména klonování genů odpovědných za rezistenci a možnost jejich inkorporace do genomu rajčete (Lebeda & Mieslerová, 1998).

Na katedře biochemie a botaniky se k experimentům nejčastěji používají tyto tři genotypy *Solanum* spp.: *S. lycopersicum* cv. Amateur - vysoce náchylný, *S. habrochaites* – vysoce rezistentní a *S. chmielewskii* (LA 2663) – středně rezistentní.

1.2. Experimentální vybavení

Materiál:

Květináče, perlit, plastové kelímky, rašelina, zahradnický substrát.

Rostlinný materiál:

Semena *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites*, *S. chmielewskii*

Přístroje:

Fytotron.

1.3. Pracovní postup

1.3.1 Pěstování rostlin ve skleníku (fytotronu)

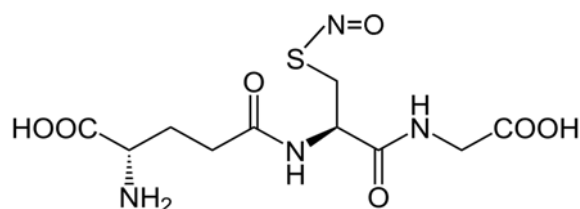
1. Semena vysejeme do plastových kelímků s perlitem o průměru 7 cm.
2. Sazenice s plně vyvinutými děložními listy přemístíme do plastových kelímků o průměru 7 cm obsahujících zahradní zeminu/rašelinu v poměru 2:1 (v:v).
3. Rostliny pěstujeme ve fytostronu při konstantní teplotě 20 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc). Pro vlastní experiment použijeme rostliny ve stáří 10, 30 a 45 dnů.

2. S-NITROSOGLUTATHIONREDUKTASA

Teoretický úvod

Oxid dusnatý (NO) je molekula s velice krátkou dobou života, přítomná v rostlinných i živočišných buňkách v podobě plynného radikálu. Jako signální molekula zastává řadu důležitých funkcí ve fyziologických i patofyziologických procesech. S-Nitrosace jako posttranslační modifikace thiolových residuí v proteinech je považována za nejdůležitější mechanismus zprostředkovávající působení NO. Jedná se o reakci probíhající bez enzymové katalýzy, o reversibilní kovalentní vazbu –NO skupiny na –SH skupinu cysteinu v cílovém proteinu (Hoffmann et al., 2003).

S-Nitrosothioly (RSNO), sloučeniny s obecnou strukturou RS-NO, jsou ve srovnání s NO stabilnější látky s delším poločasem života. *In vivo* slouží především jako zásobní a transportní formy NO. Byly detekovány v intracelulárních i extracelulárních prostorech. Nejhojněji zastoupený nízkomolekulární S-nitrosothiol představuje S-nitrosoglutathion (GSNO; Obr. 1).

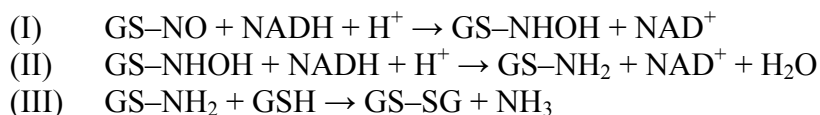


Obr. 1. S-nitrosoglutathion (GSNO)

Distribuce GSNO a obecně všech RSNO v různých tkáních je nestejněměrná. Přispívá k tomu nemožnost prostupu buněčnou membránou a S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), klíčový enzym katabolismu GSNO.

S-Nitrosoglutathionreduktasa byla dříve označována jako alkoholdehydrogenasa třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1). Enzymy z rodiny alkoholdehydrogenas se dělí do tří tříd dle preferovaných substrátů. ADH3 se jako vysoce konzervované a ubikvitinylované enzymy nalézají u prokaryot i eukaryot. Enzym je známý také jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH; EC 1.2.1.1). V posledním desetiletí bylo zjištěno, že tento enzym *in vivo* katalyzuje rozklad GSNO a byl označen jako GSNOR.

GSNO je upřednostňovaným substrátem GSNOR (Jensen et al., 1998). V extracelulárních tekutinách, kde je minimální nebo vůbec žádná aktivita GSNOR, byla detekována vyšší hladina GSNO (Gaston et al., 1993), zatímco v buňkách GSNO detekován nebyl (Liu et al., 2001). NADH-dependentní rozklad GSNO na disulfid (GS-SG) a amoniak lze popsat rovnicemi I – III (Liu et al., 2001).



Ačkoliv je tento enzym vysoce specifický pro GSNO, nepřímě kontroluje také intracelulární hladinu RSNO (Liu et al., 2001). Regulace RSNO tímto enzymem byla potvrzena u *Arabidopsis* (Feechan et al., 2005). Protože je tento enzym exprimován všude, předpokládá se jeho role v ochraně proti nitrosačnímu stresu.

GSNOR může katalyzovat také oxidaci S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS) na S-formylglutathion za účasti NAD^+ jako koenzymu. Od roku 2005 se v klasifikaci enzymů používá i označení S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284), systematický název je S-(hydroxymethyl)glutathion: NAD^+ oxidoreduktasa.

Aktuálně je označení S-nitrosoglutathionreduktasa nejběžněji používaným označením enzymu EC 1.1.1.284. Tento název doposud nebyl schválen Mezinárodní komisí pro biochemii a molekulární biologii NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), nicméně je téměř výhradně používaným názvem ve vědeckých publikacích.

2.1. Stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

2.1.1. Teoretický úvod

2.1.1.1. Spektrofotometrické stanovení

Mnoho látek pohlcuje elektromagnetické záření ve viditelné nebo ultrafialové části spektra. Míra, jakou látka pohlcuje světlo různých vlnových délek, je absorpční spektrum. Měření absorpce světla vzorkem patří mezi nejpoužívanější techniky v biochemii.

Množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem, popisuje veličina transmittance (T). Ta je definována jako podíl intenzity světla, které prošlo vzorkem (I), a

intenzity světla, které do vzorku vstoupilo (I_0) – $T = \frac{I}{I_0}$. Aby došlo k vyloučení nespecifických ztrát intenzity světla, v praxi se používá tzv. slepý vzorek (referenční vzorek, blank). Slepý vzorek je vzorek, který obsahuje všechny složky jako neznámý vzorek s výjimkou stanovované látky. Intenzita světla procházejícího neznámým a slepým vzorkem se změří za stejných podmínek a transmittance je potom definována jako podíl intenzity světla, které prošlo neznámým vzorkem (I_v), a intenzity světla, které prošlo slepým vzorkem (I_b) –

$T = \frac{I_v}{I_b}$. Transmittance roztoku, který obsahuje stanovovanou látku, závisí na vlastnostech absorbující látky, použité vlnové délce, množství absorbující látky a délce optické dráhy. Matematická závislost byla Augustem Beerem definována jako $T = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}$, kde ϵ je molární absorpční koeficient, l je délka optické dráhy, c je koncentrace absorbující látky.

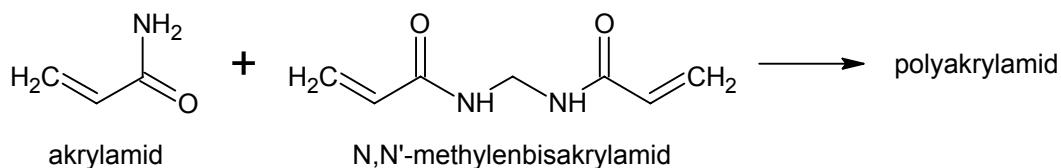
Veličinou používanou ve spektrofotometrii je absorbance (A), množství světla, které bylo pohlceno měřeným vzorkem. Na základě transmittance je absorbance definována jako $A = -\log T$. Jedná se o bezrozměrnou veličinu. Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky, jak popisuje Lambert-Beerův zákon, který má podobu $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, kde ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) je molární absorpční koeficient, l (cm) je délka optické dráhy, c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) je koncentrace.

Pro stanovení aktivity GSNOR spektrofotometricky může být využita S-nitrosoglutathionreduktasová nebo glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasová aktivita enzymu (Sakamoto et al., 2002). V obou případech je sledován úbytek/tvorba redukovaného nikotinamidadeninukleotidu (NADH). Oba přístupy umožňují také detekci aktivity GSNOR v gelech po nativní elektroforéze.

2.1.1.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza, neboli migrace iontů v elektrickém poli, se velmi často používá pro analytické dělení biologických látek. Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Používané nosiče by měly být stabilní a inertní, musí být vodivé a jejich struktura nesmí bránit putování iontů ve vodném prostředí. U běžně používaných gelů, jako je agarosa nebo polyakrylamid, je možné ovlivnit velikost jejich pórů. Separace molekul je založena jednak na elektroforetické pohyblivosti dělených látek, jednak na velikosti molekul. Při gelové elektroforéze se velké molekuly oproti malým relativně zpožďují (obtížněji pronikají gelem).

Běžně používaným nosičem je polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a skýtá možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu aj.). Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu (AA) a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného (APS; $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2 \text{SO}_4^{\bullet-}$) nebo při rozložení riboflavinu působením světla za přítomnosti malého množství O_2 . Do směsi se vždy přidává stabilizátor volných radikálů TEMED (N,N,N',N'-tetramethylendiamin).



Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm zesíťování (lineární řetězce vznikají spojováním monomerů AA, příčné vazby mezi nimi jsou tvořeny BIS – stupeň zesíťování lze ovlivnit změnou poměru AA/BIS). Nejčastější celkové koncentrace AA jsou 3-15 % (značí se % T), přičemž koncentrace BIS obvykle odpovídá 5 % z celkového množství akrylamidu (značí se % C).

$$V = \frac{(a + b) \times 100}{\%T} \qquad (a + b) = \frac{b \times 100}{\%C}$$

a - hmotnost akrylamidu v g, b - hmotnost N,N'-metylenbisakrylamidu v g,
 V - objem v ml

Uspořádání elektroforézy může být v trubičkách nebo v tenké vrstvě (mezi dvěma skleněnými deskami). Zásadní dělení technik elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE) není podle typu gelu či jeho tvaru, ale podle toho, zda je v kontinuálním nebo diskontinuálním systému. Diskontinuita může být jak v koncentracích gelu, tak především v pH a iontové síle.

Velmi ostré zóny získáme při diskontinuální elektroforéze, která používá dva různé gely a několik odlišných pufrů o různém pH. Dělicí (separační, dolní) gel se překryje asi jednocentimetrovou vrstvou tzv. zaostřovacího (koncentračního, horního) gelu s velkými póry. Zaostřovací gel a vzorkovací pufr obsahují Tris-chloridový pufr, jehož pH (6,8) je asi o dvě jednotky nižší než má pufr dělicího gelu (9,2). Elektrodotový roztok obsahuje Tris-glycinátový pufr pH 8,3. V prostředí zaostřovacího gelu je nejpohyblivějším aniontem chloridový, pohyblivost komponent vzorku (bílkovin) je menší. Za zónou chloridů následují zóny bílkovin seřazené podle elektroforetických pohyblivostí. Poslední zónu tvoří glycin. Hodnota intenzity proudu je nastavena na určitou konstantní velikost. Seřazené zóny se pohybují stejnou rychlostí, dochází ke vzniku ostře ohraničených za sebou těsně následujících zón iontů (uvedený princip je základem elektromigrační metody – izotachoforézy). Vzhledem k tomu, že rychlost pohybujících se zón je konstantní, vytváří se stupňovitý gradient potenciálu. Projevuje se tzv. „samozaostřující efekt“. Zpozdí-li se některý z iontů za „svou“ zónou, tj. zónou odpovídající příslušné pohyblivosti, octne se v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho okamžitě urychlí tak, aby „dohnal“ svou zónu (a naopak). Po vstupu seřazených iontů do dělicího gelu, který má vyšší hodnotu pH, se glycin stává druhým nejpohyblivějším iontem po chloridových iontech a současně v důsledku různé pohyblivosti v gelové matici dochází k rozdělení zón od sebe (dělení podle náboje a velikosti molekul). Pohyb čela se indikuje přidáním nízkomolekulárního barviva (bromfenolové modři) ke vzorku, které vytváří ostrý pruh putující s čelem.

Častou variantou PAGE je elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny a udílí jim uniformní náboj. Přesná povaha vzniklých asociátů není známá, předpokládá se micelární struktura, uvnitř které dochází k nekovalentním interakcím mezi uhlovodíkovými řetězci dodecylsulfátu a hydrofobními oblastmi bílkoviny. Nabité skupiny na povrchu micely jsou pak v kontaktu s pufrům. Celkový náboj částice je přitom záporný. Aby tyto komplexy mohly vzniknout, je nutné rozštěpit disulfidové můstky mezi řetězci bílkovin, nebo uvnitř těchto

řetězců pomocí látek redukujících tyto můstky (např. merkaptoethanol, dithiothreitol). Některé bílkoviny je nutné ještě zahřát na 60 či 100°C po několik minut, proto se tento krok provádí ve všech případech. Vzniklé asociáty mají uniformní náboj a tvar tyčinky o konstantním průměru a délce úměrné relativní molekulové hmotnosti (SDS musí být přítomen ve vzorku i v gelu). Z kalibračního grafu (závislost relativní vzdálenosti R_f na logaritmu relativní molekulové hmotnosti ($\log M_r$) standardů) lze stanovit molekulovou hmotnost neznámého vzorku. Nevýhodou této metody je skutečnost, že nepodává informace o nativním stavu bílkoviny.

Elektroforetická separace probíhající v nedenaturujícím prostředí, kdy si proteiny zachovávají své přirozené vlastnosti (např. enzymatickou aktivitu, sérologické vlastnosti) a jsou děleny podle svého tvaru/velikosti a náboje se využívá při detekci enzymové aktivity, stanovení isoenzymových spekter a separaci biologicky aktivních molekul. Z důvodu zachování enzymatické aktivity je nutné při přípravě vzorku (extrakci) provádět všechny kroky při nízké teplotě, poměrně rychle, a případně používat látky blokuující proteasy.

2.1.1.2. Western-blotting a imunochemická detekce proteinů

Metoda otisků (z anglického blotting) je analytická metoda, která umožňuje přenos molekul z mobilní fáze (např. agarózový nebo polyakrylamidový gel, ale také běžný roztok) do pevné fáze, na kterou jsou fixovány. Tuto pevnou fázi může představovat např. nitrocelulosaová membrána. Přenos lze uskutečnit běžnou difúzí přiložením membrány na gel, což připomíná odsávání skvrn pomocí savého papíru a odtud také název blotting, pomocí jednosměrného proudu (electroblotting) nebo filtrací roztoku přes membránu (dot blotting) pomocí speciálních zařízení. Molekuly přenesené a fixované na pevné fázi se zviditelňují přímo po fixaci různými barevnými reakcemi, autoradiografií nebo reakcí se specifickými protilátkami (imunoblotting).

Otiskové metody se používají především pro přenos molekul DNA, RNA, proteinů a glykoproteinů po jejich předcházející separaci elektroforézou nebo izoelektrickou fokusací na gelových nosičích. Na druhé straně nacházejí stále více uplatnění imunodotovací techniky (DIBA - dot immunobinding assay), kdy jsou na membránách imobilizovány čisté antigeny, které pak mohou sloužit ke screeningovému průkazu protilátek v analyzovaných vzorcích. Tyto techniky našly uplatnění např. v diagnostice specifických IgE, autoprotilátek, infekční sérologii apod. Na membrány mohou však být navázány také specifické protilátky, které pak slouží naopak k průkazu antigenů v analyzovaných vzorcích. Výhodou těchto technik je jejich jednoduchost, dobrá reprodukovatelnost, malá spotřeba vzorku a poměrně vysoká citlivost. Např. dolní hranice stanovitelnosti imunoglobulinů pomocí těchto technik je 1-5 ng. Význam DIBA vzrůstá v poslední době také s rozvojem techniky biočipů, která umožňuje současnou detekci a semikvantifikaci desítek analytů v mikrolitrových objemech jednoho vzorku.

Přenos fragmentů DNA z agarózového gelu na nitrocelulosaovou membránu popsal poprvé roku 1975 E. M. Southern. Odtud dostala tato technika název „Southern blot“. V roce 1977 tuto metodu vylepšili použitím diazobenzylmetylovaného papíru J. C. Alvine a kol. Tato varianta, umožňující přenos RNA, dostala název „Northern blot“. Roku 1979 J. Renart a kol. a H. Towbin a kol. obě metody adaptovali na analýzu proteinů (immunoblotting). A roku 1981 W. N. Burnette použil na detekci imobilizovaných antigenů specifické protilátky a radioaktivně značený protein A ve funkci druhého ligandu. Tato metoda dostala název „Western blot“, přestože jako předchozí varianty nemá se zeměpisnými stranami žádnou souvislost.

Otiskové metody mají tyto kroky:

- Zkoumaná směs antigenů se rozdělí pomocí jednorozměrné případně dvourozměrné elektroforézy na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo se purifikované antigeny případně protilátky naředí na vhodnou koncentraci ve vhodném pufru.

- Pomocí vhodné blotovací aparatury se přenesou antigeny z gelu na membránu (matrici).
- Po imobilizaci antigenů se membrána inkubuje s blokujícím agens, čímž se vysytí (zablokují) nespecifická vazebná místa, aby v následných krocích nedocházelo k nespecifickým interakcím mezi detekční sondou a matricí. Detekčními sondami mohou být protilátky, specifické vazebné proteiny nebo jiné ligandy.
- Posledním krokem je vizualizace použitím detekční sondy (např. autoradiograficky, barevnou reakcí, fluorescenčně apod.), která může mít také několik kroků.

Detekce proteinů na membráně, nejčastěji nitrocelulosové (NC) nebo polyvinilidendifluoridové (PVDF), je velmi univerzální, rychlou a často používanou laboratorní metodou současnosti. Pro přenos proteinů na membránu byla vypracována řada technik. V praxi se setkáme s metodou Western blotting, kdy jsou proteiny imobilizovány na membránu pomocí elektrického jednosměrného proudu následně po elektroforetickém rozdělení v gelu. Jednodušší metodou, často využívanou zejména ve screeningových studiích, je tzv. „dot blotting“, kdy je vzorek bílkoviny aplikován v kapkách přímo na membránu. Jinou variantou této metody, vhodnější pro densitografické vyhodnocení, je tzv. „slot blotting“. Názvy metod jsou odvozeny od tvaru jednotlivých vzorků nanesených na membránu: dot - velmi pravidelný okrouhlý tvar, slot - velmi pravidelný protáhlý tvar. Tato technika je používána jako kvalitativní metoda pro rychlý screening velkého množství vzorků, případně „semi-kvantitativní“ stanovení koncentrace proteinů v surovém extraktu. Přenos se uskuteční buď prostou difúzí na základě kapilárních sil nebo za pomoci vakua či působením elektrického proudu (electroblotting).

Pro blotovací metody je nutné dodržet několik zásad:

- Pufry by neměly obsahovat více než 0,05% detergentu (detergenty inhibují vazbu proteinů na membránu).
- Při volbě množství nanášeného vzorku je nutné nepřekročit vazebnou kapacitu membrány.
- Velké částice nebo vysoká viskozita mohou způsobit zanesení membrány. Před aplikací takového vzorku je nutná centrifugace (nanášení pouze supernatantu), případně snížení viskozity zředěním vzorku vhodným pufrem.
- Membrána musí být před použitím správně ošetřena (na povrch membrány je nanesen methanol na 15 s, poté je membrána opatrně ponořena na 2 min do vody a 5 min do vhodného pufru).

Při vakuové filtrační metodě jsou do blotovací komůrky umístěny dva listy membrány mezi speciální filtrační papíry navlhčené stejným pufrem jako membrána. Nadbytek pufru je odstraněn ve vakuu. Na vlhkou membránu jsou poté aplikovány vzorky ve formě kapek. Ve vakuu je vzorek přefiltrován přes membránu. Každá jamka s aplikovaným vzorkem je propláchnuta pufrem (opět filtrace ve vakuu). Pokud detekce proteinů nepožaduje jejich nativní konformaci, je membrána vyňata z blotovací komůrky a na filtračním papíru vysušena.

Metoda přenosu pomocí kapilárních sil není náročná na přístrojové uspořádání. Na vlhký papírový ručník na pracovním stole je umístěn filtrační papír zvlhčený rovněž pufrem a vlhká membrána. Po aplikaci vzorků na membránu a jejich adsorpci je membrána vysušena. U tohoto postupu je nutné dodržet správnou vlhkost membrány tak, aby se vzorek adsorboval jen v omezeném prostoru.

Třetí velmi jednoduchou metodou je tlakové nanášení vzorků. Pomocí injekční stříkačky je pod tlakem nanášen vzorek přímo na vlhkou membránu.

Proteiny fixované na membráně metodou Western blotting, případně „dot/slot blotting“ mohou být detekovány imunochemicky (immunoblotting). Podstatou všech imunochemických metod je interakce mezi antigenem a protilátkou *in vitro*. Termín antigen

se užívá pro jakoukoliv substanci, se kterou specificky reaguje protilátka. Termínem imunogen se označuje substance schopná vyvolat v organismu obratlovce obrannou reakci imunitního systému, jejíž součástí je produkce protilátek aktivovanými lymfocyty. Imunogen má vždy také vlastnosti antigenu, zatímco ne všechny antigeny indukují tvorbu protilátek. Makromolekula imunogenu obsahuje obvykle řadu menších oblastí, které jsou rozpoznávány imunitním systémem, tzv. determinantní místa (determinanty). Právě jejich prostřednictvím následně interaguje molekula antigenu s vazebným místem na molekule protilátky. Protilátky jsou bílkoviny (glykoproteiny) krevního séra i jiných tělních tekutin, vykazující specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu, na jehož podnět se v organismu vytvořily. Jsou součástí globulinové frakce bílkovin krevního séra, a proto se nazývají imunoglobuliny (Ig). Podle rozdílných fyzikálně-chemických i biologických vlastností se rozdělují do pěti tříd: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE.

Většina protilátek používaných při imunochemických reakcích *in vitro* je ze třídy IgG (relativní molekulová hmotnost okolo 150 000). Tyto imunoglobuliny mají na své molekule pro většinu antigenů dvě identická (rovnocenná) vazebná místa. Je to dáno symetrií molekuly IgG, která je složena především ze dvou identických těžkých (delších) a dvou identických lehkých (kratších) polypeptidových řetězců. Ty jsou vzájemně spojeny disulfidovými vazbami a vytvářejí charakteristickou strukturu ve tvaru písmene ypsilon. Vazebná místa jsou tvořena společně úseky lehkého a těžkého řetězce na N-koncích ypsilonových ramének. Při interakci antigenu s protilátkou se vytvoří nekovalentní vazby mezi determinantním místem antigenu a specificky komplementárním vazebným místem protilátky. V imunochemii se setkáváme s pojmem polyklonální protilátky a monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky můžeme stručně charakterizovat jako směs protilátek různé afinity a specifity, které jsou vytvořeny v organismu po vpravení cizorodého imunogenu. Nehomogenost takto připravených protilátek je způsobena jednak existencí řady determinantních míst na molekule antigenu (proti každé determinantě se tvoří specifické Ig, které pak neinteragují s jinými determinantami) a jednak složitostí imunitního systému (na každou determinantu reaguje více mateřských buněk lymfocytů). Kromě toho má protilátková odpověď každého jedince do značné míry individuální charakter. Naproti tomu monoklonální protilátky představují chemické individuum. Všechny molekuly produkovaných Ig jsou naprosto identické, vykazují shodnou afinitu i specifitu při interakci s antigenem. Zatímco polyklonální protilátky se připravují poměrně jednoduchou procedurou imunizace zvířete (injekční vpravení antigenu, izolování krevního séra – antiséra, popřípadě imunoglobulinové frakce), zahrnuje příprava monoklonálních protilátek vedle imunizace i vysoce náročnou technologii přípravy a selekce tzv. hybridomů. Slezinné buňky imunizovaného zvířete (produkují protilátky) se *in vitro* fúzí s nádorovými buňkami (mají výjimečnou schopnost se dělit). Vyselektovaná hybridomová buňka (má vlastnosti obou mateřských buněk) je pak základem pro homogenní klon buněk použitelných k produkci homogenních protilátek. V případě polyklonálních protilátek se většinou nepracuje s izolovanými imunoglobuliny proti antigenu použitému k imunizaci, ale s celým krevním sérem (směs spousty imunoglobulinů a dalších bílkovin), popř. s IgG-frakcí (i v ní představují IgG reagující se zmíněným antigenem jen malou část ze všech přítomných IgG).

Imunochemické metody využívají interakce antigenu se specifickými protilátkami *in vitro* za tvorby imunokomplexu antigen-protilátka. Imunochemická detekce proteinu na membráně se provádí pomocí série dvou protilátek. První protilátka reaguje imunochemicky s detekovaným proteinem za tvorby komplexu. Takto vytvořený komplex je rozpoznán druhou protilátkou značenou detekovatelnou sondou (např. vázaná alkalická fosfatasa, atom izotopu atd.).

2.1.2. Experimentální vybavení

Biologický materiál:

10-denní semenáčky; kořeny, stonky a listy 30-ti a 45-ti denní rostliny *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites*, *S. chmielewskii*

Laboratorní materiál:

alobal, automatické pipety, blotovací kazeta, blotovací porézní houbičky, elektroforetická komůrka, filtrační papír, hřebínek, kádinky, míchadla, mikrotitrační destička, mikrozkuhavky, miska s ledem, nádoba na kapalný dusík, nalévací stojan na skla na elektroforézu, nitrocelulosaová membrána, odsolovací kolonky NAP-5, Pasteurova pipeta, Petriho miska, plastová špachtle, rukavice, skla pro elektroforézu, skleněná tyčinka, stojánek na mikrozkuhavky, stojan na kolonky, stříčka s ethanolem, stříčka s destilovanou vodou, špachtlička, špičky na pipety, třecí miska s tloučkem, vanička, váženka

Chemikálie:

- akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid (30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) bisakrylamid)
- barvicí pufr (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)
- blotovací pufr (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glycin, 20% (v/v) methanol)
- bromfenolová modř zásobní (0,4 mg bromfenolové modři, 2 ml vody, 1 ml 60% glycerolu)
- činidlo Bradfordové zásobní (50 mg Coomassie Blue G250, 25 ml methanolu, 50 ml 85% H₃PO₄, doplnit vodou do 100 ml)
- destilovaná voda
- dithiothreitol (DTT)
- dodecylsírán sodný (SDS)
- elektrodotový pufr pro nativní elektroforézu (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glycin)
- elektrodotový pufr pro SDS-PAGE elektroforézu 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS)
- extrakční pufr zásobní (50 mM Tris pH 7,5, 0,2% (v/v) Triton X-100)
- fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)
- glycerol
- kalibrační standardy hovězího sérového albuminu (BSA)
- 50 mM K-fosfátový pufr pH 7,8
- luminol
- molekulové standardy
- 10 mM Na-fosfátový pufr pH 6,8
- NBT-BCIP
- n-butanol
- nikotinamidadenindinukletotid (NADH)
- N,N'-tetramethyldiamin (TEMED)
- persírán amonný (APS)
- Ponceau S
- primární protilátka (α -GSNOR)
- sekundární protilátka (křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa)
- S-nitrosoglutathion (GSNO)
- S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)
- standardy molekulové hmotnosti

- TBS (20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl)
- tekutý dusík
- 20 mM Tris pH 8
- 0,5 M Tris pH 6,8
- 1,5 M Tris pH 8,8
- Tween-20
- Tween v TBS (0,05 ml Tween-20 do 100 ml TBS)
- vzorkovací pufr (0,425 M Tris pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% glycerol, bromfenolová modř 4 mg/ml)
- 1% želatina v TBS
- 3% želatina v TBS

Přístroje:

analytické váhy, destičkový reader, digitální předvážky, dokumentační systém UVP, elektromagnetická míchačka, chlazená centrifuga, ledová lázeň, termoblok, třepačka, zdroj pro elektroforézu

2.1.3. Pracovní postup

2.1.3.1. Příprava a přečištění rostlinného extraktu

Z rostlinného extraktu přečištěním na odsolovací kolonce odstraníme endogenní GSNO. Odsolovací kolonka nesmí vyschnout!

- Pro extrakci použijeme zásobní extrakční pufr (50 mM Tris pH 7,5, 0,2% (v/v) Triton X-100), ke kterému se těsně před použitím přidá DTT (výsledná koncentrace 2 mM) a PMSF (výsledná koncentrace 1 mM).
- V třecí misce s tloučkem zhomogenizujeme v tekutém dusíku na prach 0,5 g rostlinného materiálu (kořen, stonek, list).
- Extrakci provedeme v poměru 1:1 (w:v). K 0,5 g rozetřeného rostlinného materiálu přidáme 0,5 ml extrakčního pufru a rozetřeme. Pracujeme v třecí misce umístěné na ledové lázni.
- Homogenát centrifugujeme 20 min při 16 000 g, 4°C.
- Supernatant přepipetujeme do čistých zkumavek a umístíme do ledové lázně.
- Odsolovací kolonku NAP-5 ekvilibrujeme 7,5 ml 10 mM Na-fosfátového pufru pH 6,8 – na kolonku nanese 3x 2,5 ml pufru a vždy necháme vsáknout na úroveň gelového sloupce.
- Na kolonku nanese 0,5 ml rostlinného extraktu a necháme vsáknout na úroveň gelového sloupce.
- Pod kolonku umístíme mikrozkušavku, na kolonku nanese 1,5 ml 50 mM K-fosfátového pufru pH 7,8 a začneme jimat 1 ml eluátu.
- Po vsáknutí pufru na úroveň gelového sloupce kolonku promyjeme několika cykly nanesení a vsáknutí 2,5 ml destilované vody.
- Extrakty během dalšího pracovního postupu stále udržujeme v ledové lázni!

2.1.3.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

A) Aktivita GSNOR

Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR provedeme na mikrodestičkovém readeru Synergy-HT. Měření všech vzorků provedeme ve třech opakováních. Každý rostlinný extrakt bude mít vždy svůj blank.

- Těsně před měřením připravíme čerstvé roztoky 2 mM NADH a 4 mM GSNO. Oba roztoky uchováváme ve tmě.

- Do jamek mikrotitrační destičky napipetujeme 195 μ l 20 mM Tris pH 8, 45 μ l rostlinného extraktu a 30 μ l 2 mM NADH.
- Reakci zahájíme přidáním 30 μ l 4 mM GSNO. Do blanku místo toho pipetujeme 30 μ l dH₂O.
- Zaznamenáváme pokles absorbance při 340 nm po dobu 10 min při laboratorní teplotě.
- V jamkách s blankem a vzorky změříme absorbanci při vlnové délce 900 a 970 nm (tyto hodnoty použijeme při výpočtu). Měření provedeme hned po ukončení desetiminutového měření při 340 nm.

B) Stanovení proteinů metodou Bradfordové

- Před měřením ze zásobního roztoku činidla Bradfordové připravíme pracovní roztok činidla Bradfordové v poměru 1 díl zásobního roztoku a 4 díly dH₂O.
- Pro kalibraci použijeme kalibrační standardy hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentracích 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 – 1,2 – 1,4 mg/ml.
- Do jamky mikrotitrační destičky v trojím opakování postupně napipetujeme: 45 μ l dH₂O, 5 μ l standardu nebo vzorku proteinu (jako blank dH₂O), 200 μ l pracovního roztoku činidla Bradfordové.
- Destičku jemně protřepeme a necháme 5 min (maximálně 30 min) vyvíjet zbarvení.
- Na destičkovém readeru změříme absorbanci při 595 nm.

2.1.3.3. Stanovení aktivity GSNOR v gelu po nativní elektroforéze

A) Nativní elektroforéza

Akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid jsou neurotoxicke látky. S jejich roztoky vždy pracujeme s největší opatrností a v gumových rukavicích!!!

Příprava skel pro nalévání gelů

- Obě skleněné desky důkladně odmastíme lihem a připravíme skla k nalévání gelu (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení).
- Mezi skla vložíme hřebínek a na skleněnou desku popisovačem označíme vzdálenost 1 cm od konce zubů hřebínku. Poté hřebínek odstraníme.

Nalévání gelů a sestavení elektroforetické komůrky

- Přichystáme si dvě označené kádinky na přípravu zaostřovacího a dělicího gelu. Podle následující tabulky (Tabulka 1) napipetujeme jednotlivé roztoky do příslušných kádinek.
- APS připravíme čerstvý a přidáváme až těsně před naléváním gelu mezi skla!

Tabulka 1: Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro nativní elektroforézu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	H ₂ O	TEMED	10% APS
8% dělicí	5,2	5	-	9,2	0,02	0,12
4% zaostřovací	1,3	-	2,5	5,9	0,02	0,12

- Přídavkem APS do kádinky obsahující komponenty pro dělicí gel je zahájena polymerace gelu. Připravenou směs po promíchání rychle přeneseme pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla. V roztoku mezi skly se nesmí objevit

vzduchové bubliny. Gel naléváme až po značku na skle. Gel převrstvíme *n*-butanolem a necháme cca 15 min polymerovat.

- Po ztuhnutí gelu odstraníme *n*-butanol, povrch gelu opláchneme destilovanou vodou a osušíme filtračním papírem.
- Přídavkem APS do kádinky obsahující komponenty pro zaostřovací gel je zahájena polymerace gelu. Připravenou směs po promíchání rychle přeneseme pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla na již zpolymerovaný dělicí gel. Do gelu vložíme opatrně hřebínek. Pod zuby hřebínku se nesmí dostat vzduchové bubliny. Stane-li se tak, hřebínek rychle vyjmeme a znovu vsuneme. Gel necháme 30 min polymerovat.
- Skla s připraveným gelem vložíme do elektroforetické komůrky (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení). Popisovačem vyznačíme zuby hřebínku. Hřebínek opatrně vyjmeme.
- Do elektroforetické komůrky nalijeme elektrodotový pufr.

Příprava a aplikace vzorků.

- 85 µl extraktu smísíme s 15 µl glycerolu.
- Do krajních jamek aplikujeme 20 µl zásobního roztoku bromfenolové modři.
- Do dalších jamek aplikujeme a 45 µl vzorku a standardní enzym GSNOR (objem upřesní vedoucí cvičení).

Průběh elektroforézy

- Elektroforetickou komůrku uzavřeme víkem, umístíme do lednice a připojíme ke zdroji.
- Na zdroji nastavíme konstantní napětí 100 V.
- Jakmile zóna bromfenolové modři doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, nastavíme na zdroji konstantní napětí 200 V.
- Po doputování zóny bromfenolové modři na úroveň dolního okraje skla vypneme zdroj napětí.
- Odstraníme víko elektroforetické komůrky a elektrodotový pufr vylijeme do odpadu.

B) Vizualizace

- Pomocí plastové špachtle oddělíme od gelu sklo, gel označíme odkrojením levého dolního rohu a sklo s gelem přeneseme do velké Petriho misky.
- Ustříháme filtrační papír velikosti gelu. Na papír postupně napipetujeme a necháme vsáknout 3 ml čerstvě připraveného 2 mM NADH.
- Gel přikryjeme filtračním papírem s NADH, odstraníme bubliny, misku zabalíme do alobalu a inkubujeme 30 min v lednici.
- Po uplynutí doby inkubace odstraníme filtrační papír. Gel převrstvíme 1,5 ml čerstvě připraveného 4 mM GSNO.
- Misku zabalíme do alobalu a inkubujeme 30 min v lednici.
- Po uplynutí doby inkubace odstraníme filtrační papír a provedeme fotodokumentaci v dokumentačním systému UVP (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení).

2.1.3.4. Imunochemická detekce GSNOR

A) SDS-PAGE elektroforéza

- Pracovní postup je shodný s postupem pro nativní elektroforézu v následujících bodech: Příprava skel pro nalévání gelů, Nalévání gelů a sestavení elektroforetické komůrky, Průběh elektroforézy. Liší se Příprava a aplikace vzorků.

- Liší se složení zaostřovacího a dělicího gelu, které budeme pipetovat podle následující tabulky (Tabulka 2).
- APS připravíme čerstvý a přidáváme až těsně před naléváním gelu mezi skla!

Tabulka 2: Složení dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE elektroforézu.
Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	H ₂ O	SDS	TEMED	10% APS
10% dělicí	6,6	5	-	8,2	0,2	0,02	0,2
4% zaostřovací	1,3	-	2,5	6,1	0,1	0,01	0,1

Příprava a aplikace vzorků.

- K zásobnímu vzorkovacímu pufru přidáme čerstvě připravený DTT. K 500 μ l vzorkovacího pufru přidáme 40 μ l 0,5 M DTT.
- K 45 μ l extraktu přidáme 15 μ l vzorkovacího pufru.
- Směs dobře promícháme a 5 min inkubujeme při 100°C.
- Po ochlazení v ledové lázni vzorek centrifugujeme 5 min při 6 000 g.
- Do krajních jamek aplikujeme 20 μ l zásobního roztoku bromfenolové modři.
- Do dalších jamek aplikujeme 40 μ l vzorku, molekulový standar a standardní enzym GSNOR (objem upřesní vedoucí cvičení).

B) Western blotting v uspořádání „tank-blotting“

Sestavení blotovací komůrky

- Připravíme si blotovací nitrocelulosovou membránu o velikosti gelu (zapišeme si rozměry membrány). Membrány se nedotýkáme bez rukavic! Odstříhneme jeden rožek membrány.
- Membránu, gel, filtrační papíry a blotovací porézní houbičky ponoříme na 15 – 60 min do blotovacího pufru.
- Do blotovací kazety budeme následovně skládat jednotlivé vrstvy:

Černá deska kazety	porézní houbička
	filtrační papír
	gel
	membrána (odstřižené rožky stejně orientované!)
	filtrační papír
Průsvitná deska kazety	porézní houbička
- Pomocí skleněné tyčinky odstraníme vzduchové bubliny mezi gelem a membránou.
- Kazetu uzavřeme a vložíme do blotovací komůrky. Černa strana kazety směřuje vždy k černé straně blotovací komůrky (katoda /-/)!
- Do blotovací komůrky nalijeme blotovací pufr.

Průběh blotování

- Blotovací komůrku uzavřeme víkem. Pozor na orientaci elektrod! Blotovací komůrku umístíme do lednice a připojíme ke zdroji.
- Na základě velikosti membrány si spočítáme proud, který na zdroji nastavíme (0,8 mA.cm⁻²).
- Blotování ukončíme po 2 h. Vypneme zdroj napětí.
- Vyjmeme blotovací kazetu. Blotovací pufr nalijeme zpět do zásobní lahve!

Barvení molekulových markerů

- Odstrháme část membrány obsahující molekulové standardy a vložíme ji na 30 min do roztoku Ponceau S (detekce proteinů).
- Opláchneme destilovanou vodou a vysušíme.

Imunochemická detekce GSNOR na membráně

- Membránu umístíme na třepačku do vaničky a budeme inkubovat podle následujícího postupu:

krok	objem	doba
inkubace s 3% želatinou v TBS	25 ml	2 h
promytí roztokem Tweenu v TBS	25 ml	10 min
promytí roztokem Tweenu v TBS	25 ml	10 min
inkubace s primární protilátkou v 1% želatině v TBS	5 ml	přes noc
promytí roztokem Tweenu v TBS	25 ml	10 min
promytí roztokem Tweenu v TBS	25 ml	10 min
inkubace se sekundární protilátkou v 1% želatině v TBS	5 ml	2 h
promytí roztokem Tweenu v TBS	25 ml	10 min
promytí roztokem Tweenu v TBS	25 ml	10 min
detekce, vizualizace		

Detekce NBT-BCIP

- Jako primární protilátku použijeme α -GSNOR, ředění 1:1 000.
- Jako sekundární protilátku použijeme alkalickou fosfatasy, ředění 1:4 000.
- Připravíme si barvicí roztok: k 10 ml barvicího pufru napipetujeme 150 μ l NBT-BCIP.
- Membránu inkubujeme s barvicím roztokem cca 5 min.
- Po vybarvení bandů membránu promyjeme destilovanou H₂O a vysušíme.
- Provedeme fotodokumentaci (i části membrány s molekulovými standardy) v dokumentačním systému UVP (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení).

Detekce luminolem

- Jako primární protilátku použijeme α -GSNOR, ředění 1:1 000.
- Jako sekundární protilátku použijeme křenovou peroxidasy, ředění 1:10 000.
- Připravíme si roztok luminolu z komerčních roztoků: smícháme 0,5 ml roztoku A a 0,5 ml roztoku B. Oba roztoky nabíráme čistou špičkou!
- Připravený roztok nanese na membránu a provedeme fotodokumentaci v dokumentačním systému UVP (konkrétní postup vysvětlí vedoucí cvičení).

2.1.4. Vyhodnocení výsledků

2.1.4.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

- Vynesením absorbancí kalibračních standardů BSA proti jejich koncentraci vytvoříme kalibrační graf.
- Do tabulky přehledně uvedeme naměřené a vypočítané hodnoty:
 - Změna absorbance (ΔA). Zvolíme takový časový interval, ve kterém je pokles absorbance lineární (shodný u všech vzorků, obvykle 5 – 10 min).
 - Délka optické dráhy (l), jednotka cm. Vypočteme z naměřených hodnot

absorbance při 900 a 977 nm podle vzorce
$$l = \frac{A_{977} - A_{900}}{0,18}$$

- Koncentrace proteinů ve vzorku, jednotka mg/ml.
- Aktivita (a), jednotka $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Vypočteme dosazením hodnot do vzorce
$$a = \frac{A \cdot V}{\epsilon \cdot c \cdot l}$$
 je změna absorbance ve sledovaném čase, V (l) je objem reakční směsi, ϵ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) je molární absorpční koeficient (pro NADH $[\epsilon_{340} = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$), t (s) je čas, za který došlo k uvedené změně absorbance, l (cm) je délka optické dráhy.
- Aktivitu převedeme na jednotku $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ a výslednou aktivitu vztáhneme na 1 mg proteinu ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu) a 1 g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu (FW; $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) a dále uvádíme v těchto jednotkách.
- Aktivitu jednotlivých vzorků v jednotkách $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu a $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FW vyneseme do grafu.

2.1.4.2. Stanovení aktivity GSNOR v gelu po nativní elektroforéze

- Obrazový dokument z dokumentačního systému popíšeme.
- Porovnáme mobilitu standardní GSNOR a GSNOR v rostlinných vzorcích.
- Porovnáme intenzitu bandů a aktivitu GSNOR stanovenou spektrofotometricky.

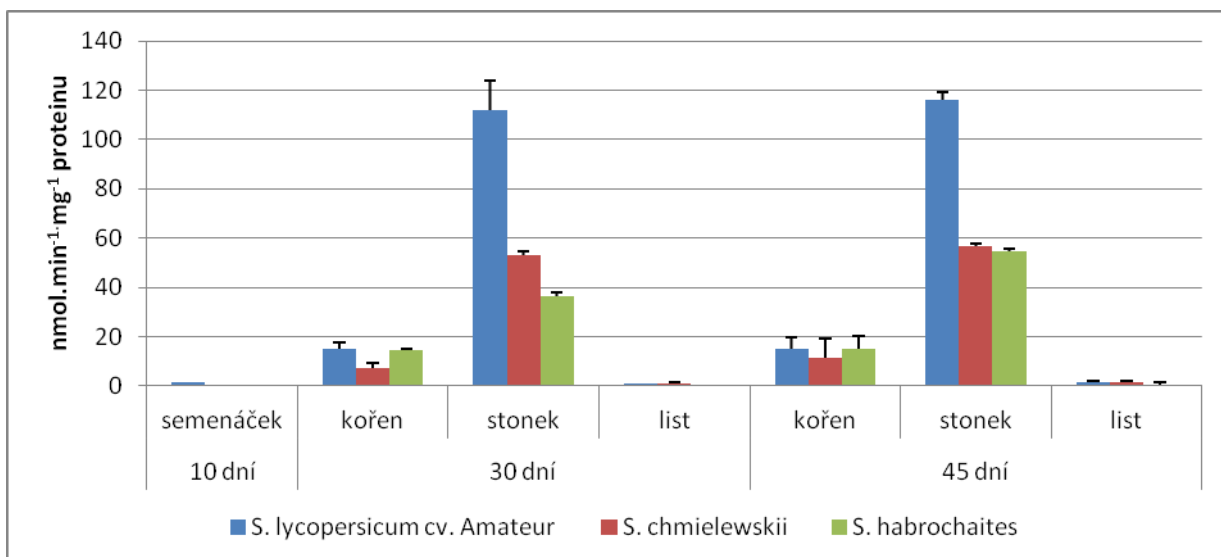
2.1.4.3. Imunochemická detekce GSNOR

- Obrazový dokument z dokumentačního systému popíšeme.
- Zaznamenáme mobilitu molekulových standardů a GSNOR v rostlinných vzorcích.
- Do grafu vyneseme mobilitu proteinu (cm) proti logaritmu molekulové hmotnosti příslušného molekulového standardu (molekulové hmotnosti dodá vedoucí cvičení).
- Z grafu stanovíme molekulovou hmotnost GSNOR v rostlinných vzorcích.
- Porovnáme intenzitu bandů a aktivitu GSNOR stanovenou spektrofotometricky a v gelu po nativní elektroforéze.

2.1.5. Příklady výsledků a možné problémy

2.1.5.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

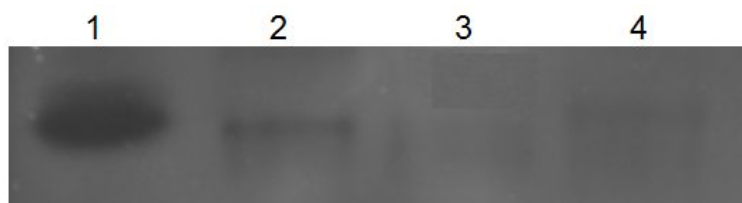
- Aktivita GSNOR byla stanovena v různých orgánech a vývojových stádiích rostlin *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. chmielewskii*.
- Aktivita enzymu byla vyjádřena v jednotkách $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu a byla vynesena do grafu (Obr. 2).



Obr. 2. Graf aktivity GSNOR v různých orgánech a vývojových stádiích rostliny.

2.1.5.2. Stanovení aktivity GSNOR v gelu po nativní elektroforéze

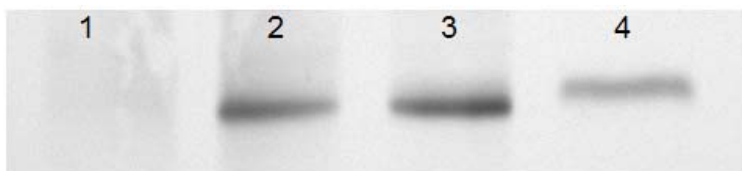
- V gelech po nativní elektroforéze byla detekována aktivita GSNOR desetidenních semenáčků rostlin *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. chmielewskii*.
- Fotodokumentace gelu byla pořízena v dokumentačním systému UVP. Obrazový dokument byl zpracován a popsán (Obr. 3).



Obr. 3. Aktivita GSNOR v desetidenních semenáčcích rostlin rajčete. 1 – standardní enzym; 2 – *S. lycopersicum* cv. Amateur; 3 – *S. habrochaites*; 4 – *S. chmielewskii*.

2.1.5.3. Imunochemická detekce GSNOR

- Imunochemická detekce GSNOR byla provedena ve stoncích třicetidenních rostlin rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites* a *S. chmielewskii*.
- GSNOR byla detekována pomocí NBT-BCIP po označení alkalickou fosfatase (Obr. 4) chemiluminiscenčně po označení křenovou peroxidase (Obr. 5).



Obr. 4. GSNOR v třicetidenních stoncích rostlin rajčete. Detekce pomocí NBT-BCIP po označení alkalickou fosfatase. 1 – *S. chmielewskii*; 2 – *S. habrochaites*; 3 – *S. lycopersicum* cv. Amateur; 4 – standardní enzym.



Obr. 5. GSNOR v třicetidenních stoncích rostlin rajčete. Detekce chemiluminiscenčně po označení křenovou peroxidasou. 1 – *S. chmielewskii*; 2 – *S. habrochaites*; 3 – *S. lycopersicum* cv. Amateur; 4 – standardní enzym.

2.1.6. Kontrolní otázky

- Jaký je princip spektrofotometrického stanovení koncentrace látek?
- Co popisuje a jakou podobu má Lambert-Beerův zákon?
- Na jakém principu dochází k zaostření vzorku v zaostřovacím gelu při diskontinuální elektroforéze?
- Při SDS-PAGE elektroforéze budou rychleji putovat malé nebo velké molekuly?
- Jaké kroky mají otiskové metody?
- V čem spočívá imunochemická detekce proteinu na membráně?

2.2. Změny exprese S-nitrosoglutathionreduktasy v průběhu vývoje rostliny

2.2.1. Teoretický úvod

Důležitým aspektem studia oboru biochemie je získat zkušenosti s novými metodikami molekulární biologie. V této úloze je použita metoda kvantitativní real-time PCR – qRT-PCR (polymerase chain reaction) k zjištění exprese genu GSNOR v průběhu vývoje rostliny a v různých orgánech. qRT-PCR jako moderní technika molekulární biologie umožňuje rychlou, spolehlivou a citlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Pro svou vysokou specifitu a rychlost se tato metoda stala silným nástrojem využívaným v široké praxi nejen laboratorní diagnostiky.

qRT-PCR jako nástroj k měření genové exprese (screening exprese genů) je variantou PCR, jíž předchází reverzní transkripce izolované RNA a získaná cDNA slouží jako templát pro DNA polymerasu se dvěma genově specifickými primery v real-time PCR reakci, která je založena na sledování průběhu PCR reakce přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných termocyklery, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.

PCR probíhá ve třech fázích: 1) tepelná denaturace dvouvláknové dsDNA, 2) navázání primerů na specifické sekvence ochlazením a 3) narůstání řetězců DNA prodlužováním primerů. Tyto tři kroky jsou nazývány jeden cyklus a PCR je založena na opakování takového cyklu, při němž dochází k exponenciálnímu nárůstu (2^n , kde n je počet cyklů) množství specifického úseku DNA ohraničené primery. V každém cyklu dochází v ideálním případě ke zdvojení amplifikované sekvence, jejíž množství tak exponenciálně roste.

Prvním krokem qRT-PCR je vždy enzymová konverze mRNA nebo celkové RNA do jednovláknové cDNA, kdy je deoxyribonukleotidový primer hybridizován s RNA a řetězec DNA následně prodloužen RNA-dependentní DNA polymerasou (reverzní transkriptasa). Deoxyribonukleotidové primery použité pro přepis cDNA mohou být trojího typu:

- oligo(dT) primer

- genově specifický primer
- náhodné hexanukleotidové primery (random hexamers).

Klíčovým enzymem RT-PCR je reverzní transkriptasa přepisující genetickou informaci z RNA do DNA. V současné době se v molekulární biologii využívají reverzní transkriptasy ze tří zdrojů:

- AMV RT
- MoMLV RT
- Termostabilní Tth DNA polymerase.

Nejčastějším problémem molekulární biologie je izolace kvalitní RNA. Jednovláknová molekula RNA je daleko méně stabilnější než DNA a proto je i její životnost velice limitována. Navíc specifické RNA endonukleasy (RNAsy) jsou velice aktivní enzymy, které pracují v široké škále pH a teplot bez přítomnosti kofaktoru a jsou přítomny téměř všude (např. na lidských dlaních). Během izolace a při následné RT reakci (reverzní transkripce) je proto nutno vzorek RNA před vlivem těchto enzymů chránit dodržováním specifických podmínek manipulace a používáním pouze speciálně ošetřeného skla a plastů.

Přesto často dochází k degradaci a fragmentaci mRNA populace a to hlavně od 5' konce, který není tak dobře chráněn a stabilizován polyA sekvencí jako 3' konec. U některých genů je proto velice těžké získat a amplifikovat genetickou informaci jejich počátku. Pokud chceme pomocí RT-PCR kvantifikovat sílu exprese jednotlivých genů, tzn. zjistit množství molekul mRNA přepisovaných pro specifické geny zastoupených v populaci mRNA izolované z určitého ontogenetického stádia organismu či specifického pletiva, je nutné společně se specifickou amplifikací kvantifikovaného genu provést současně amplifikaci genu srovnávacího. Jako srovnávací geny se nejčastěji používají tzv. „house-keeping“ geny. Jsou to geny kódující proteiny, které jsou v organismech esenciální a zastoupeny ve všech stádiích života organismu ve všech pletivech. Tyto geny jsou vždy exprimovány pod konstitutivními promotery, tzn. že jejich exprese je za všech podmínek stejná a nebývá ničím ovlivňována. Nejčastěji používanými srovnávacími geny v rostlinné říši jsou geny kódující aktin, glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH), ubiquitin nebo tubulin.

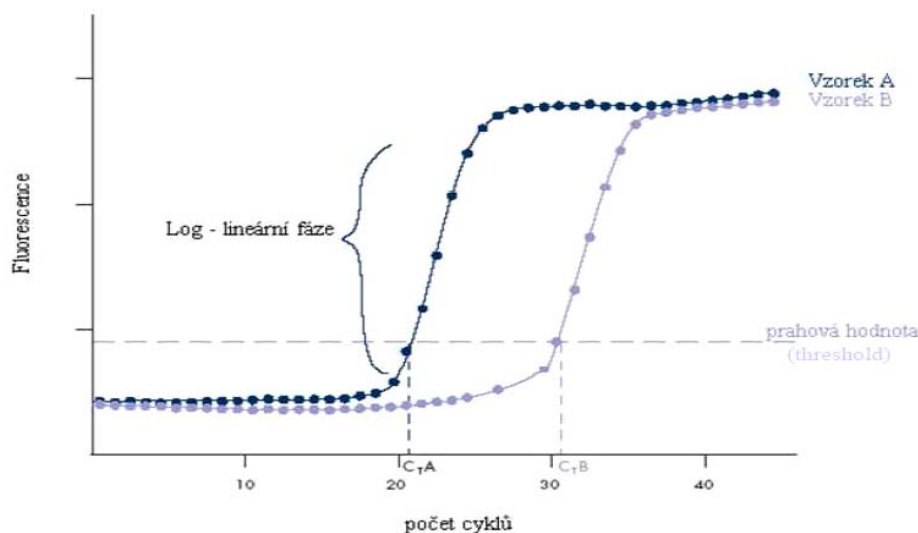
Výhodou qRT-PCR oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Detekce fluorescence se provádí v každém cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy **amplifikačních křivek** vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu.

Typická **amplifikační křivka** (Obr. 6) má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části: 1) „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot; 2) **exponenciální fázi**, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4-8 cyklů) a 3) fázi plató, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. **Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce.** Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_T („*threshold cycle*“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce.

Absolutní kvantifikace, která se používá např. při detekci specifických mikroorganismů, přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul. Je založena na zjištění, že existuje lineární vztah mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a C_T příslušné amplifikační křivky. Pokud tedy amplifikujeme vzorek o neznámé koncentraci

společně s diluční sérií standardů o známé koncentraci, získáme kalibrační přímku („*standard curve*“), ze které lze odečíst výchozí koncentraci neznámého vzorku.

Relativní kvantifikace, která se používá ke stanovení míry genové exprese, zpravidla nevyžaduje sestavení kalibrační přímky. Porovnává se relativní změna genové exprese (*relativní expresní poměr*) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku. C_T amplifikační křivky daného genu se vždy normalizuje oproti C_T housekeeping genu.



Obr. 6. Stanovení prahového cyklu z grafu real-time PCR. Graf je záznamem real-time PCR pro vzorky A a B, kdy vzorek A obsahuje vyšší počet molekul v templátu než vzorek B. C_T je prahový cyklus, jehož hodnota je získána vytvořením průsečíku s amplifikační křivkou v její exponenciální fázi, kdy nárůst signálu koreluje s akumulací produktu. Hodnota C_T může být desetinné číslo. (Upraveno podle QuantiTect SYBR Green PCR Handbook 08/2003).

Interkalační barviva jako ethidium bromid nebo SYBR[®] Green I se používají pro detekci akumulace produktu a jejich fluorescenční aktivita vzrůstá po vazbě na dvouřetězcovou DNA, čímž lze sledovat průběh amplifikace. Velkou nevýhodou interkalačních barviv je skutečnost, že detekují veškerou dsDNA přítomnou v reakční směsi včetně nespecifických produktů amplifikace (jako jsou např. tzv. primer-dimer artefakty), které i při velmi pečlivé optimalizaci metody velmi často vznikají. Specifita detekce je navíc dána pouze sekvencemi primerů. Elegantní řešení co se týče detekce nespecifických produktů nabízejí často využívané **oligonukleotidové sondy – próby (např. TaqMan sondy)**. Jedná se o fluorescenčně značené oligonukleotidy, které hybridizují s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu a výrazně přitom zvyšují svou fluorescenční aktivitu. Jejich výhodou je vysoká specifita, jelikož **detekce cílové sekvence probíhá ve 2 stupních** - na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhasěčem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymerasa sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase.

Sondy či interkalační barviva pro real-time PCR lze rozdělit dle specifčnosti k požadovanému PCR amplionu:

- Nespecifické - interkalační a „minor groove binding“ látky
 - SYBR[®] Green I
 - LC Green[®]
 - Eva Green

- BEBO
- Ethidium-bromid
- Specifické - krátký oligonukleotid hybridizující s PCR amplikonem
 - Hydrolyzační sondy (TaqMan™)
 - Hybridizační sondy FRET
 - Molecular Beacons
 - Scorpions®

Po ukončení real-time PCR reakce se ke zjištění povahy produktů PCR používá metody analýza křivky tání (T_m calling). Ve spojení s oligonukleotidovými sondami lze s její pomocí provádět detekci SNP polymorfismů, při použití interkalačních barviv se metoda používá k odlišení specifických a nespecifických produktů PCR reakce.

Tání DNA (proces separace komplementárních řetězců dsDNA indukovaný zvyšováním teploty) můžeme po skončení real-time PCR reakce sledovat tak, že roztok dsDNA ochladíme na teplotu nižší než je očekávaná T_m produktů, postupně ohříváme na teplotu vyšší než je očekávaná T_m a měříme přitom fluorescenci. Platí, že fluorescenční aktivita oligonukleotidové sondy nebo interkalačního barviva je přímo úměrná množství dsDNA přítomné v reakční směsi. Pokud vyneseme naměřenou intenzitu fluorescence proti příslušné teplotě, dostaneme tzv. křivku tání, která náhle strmě klesá v okolí T_m . Teplota v inflexním bodě křivky se rovná teplotě tání a lze ji snadno zjistit zderivováním křivky tání, kde se v grafu objeví jako vrchol „peaku“. Detekce nespecifických produktů při použití interkalačních barviv využívá předpokladu, že nespecifické produkty mají odlišnou (obvykle nižší) T_m než produkty specifické.

2.2.2. Experimentální vybavení

Biologický materiál:

10-denní semenáčky; kořeny, stonky a listy 30-ti a 45-ti denní rostliny *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. habrochaites*, *S. chmielewskii*; různé orgány 30-ti denní rostliny

Laboratorní materiál:

Automatické pipety, alobal, gumové rukavice, chladicí stojánek, křemenná kyveta, nádoba na kapalný dusík, třecí miska s tloučkem, kovová špachtle, pinzeta, stojan na zkumavky, mikrozkušavky 1,5-0,5-0,2 ml (ependorfky), stripy pro real-time PCR, špičky s filtrem

Chemikálie:

- AMV reverzní transkriptasa
- DEPC RNase free voda (deionizovaná voda s 0,1% diethyl pyrokarbonátem, autoklavováno)
- DNAsa
- ethanol (vychlazený v mrazničce na -20°C)
- chloroform
- isopropanol
- komerční kit NucleoSpin RNA Plant
- 3M octan sodný
- 50 μM oligo(dT) primer
- 10 mM dNTP mix
- primery (dle Tab. 3; 3 μM)
- 5x pufr pro AMV reverzní transkriptasu
- 10x pufr pro DNAsu
- RNA inhibitor

- RNase inhibitor
- SYBR Green ROX Mix
- tekutý dusík
- Trizol (Tri-Reagent)

Tabulka 3: Sekvence použitých primerů pro qRT-PCR detekci GSNOR a kontrolního genu GAPDH.

Úsek DNA	Název	Sekvence	T _m (°C)	Velikost pásu (bp)
GSNOR	GSNORfw	5'-CTGGAGTGGGAGTTATGATGAA-3'	60	279
	GSNORrev	5'-CCTCCGCCACAGCAAGACCAACT-3'	60	
GAPDH	GAPDHfw	5'-AACCGGTGTCTTCACTGACAAGGA-3'	60	110
	GAPDHrev	5'-CACCCACAACAAACATGGGAGCAT-3'	60	

Přístroje:

analytické váhy, autokláv, flow box, chlazená laboratorní centrifuga, pikofuga, termoblok na 37°C, termocykler Stratagene Mx3000P, UV spektrofotometr, vortex, zásobník ledu

2.2.3. Pracovní postup

Po dobu celé úlohy pracujeme vždy v rukavicích pouze na vytyčeném místě, používáme pouze speciálně ošetřené sklo a plastik a špičky na automatické pipety s filtrem (vše sterilní)!

2.2.3.1. Homogenizace rostlinného materiálu

- Ve třecí misce s tloučkem zhomogenizujeme na prach asi 1,0 g rostlinného materiálu (dodá vedoucí cvičení) za pomoci kapalného dusíku.
- Vzorky nesmí během homogenizace rozmznout – hrozí degradace RNA!
- Do sterilní podchlazené mikrozkušavky přesně odvážíme 0,1 g zmrazeného rostlinného prachu a takto připravené vzorky mohou být pro další experimenty uchovány při -80°C nebo ihned použity k izolaci RNA.

2.2.3.2. Izolace RNA

A) Trizolovou metodou (Tri-Reagent, Sigma)

- Do sterilní mikrozkušavky s 0,1 g zmrazeného rostlinného prachu ihned přidáme 1 ml Trizolu, vortexujeme a inkubujeme 5 min při laboratorní teplotě.
- Přidáme 0,2 ml chloroformu/ 1 ml Trizolu, vzorek promícháme převrácením a inkubujeme 3 min při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí inkubace centrifugujeme 15 min, 12000g, 4°C.
- Horní vodnou fázi (supernatant) opatrně odpipetujeme do nové mikrozkušavky (radši obětujeme část vzorku, než aby se nabralo i jen sebemenší množství chloroformové fáze obsahující gDNA) a přidáme 0,5 ml isopropanolu/ 1 ml Trizolu.
- Inkubujeme 10 min při laboratorní teplotě.
- Centrifugujeme 10 min, 12000g, 4°C a supernatant odlijeme.
- Promyjeme pelet 0,3 ml 75%-ním ethanolem (ledový) a centrifugujeme 5 min, 7500g, 4°C, supernatant odlijeme.
- Zbytky supernatantu krátce stočíme na pikofuze a opatrně odsajeme pipetou.
- Výslednou sedimentinu (průsvitný pelet) vysušíme na vzduchu asi 15 minut (případně ve flow boxu) a posléze rozpustíme v 50 – 100 µl DEPC H₂O (dle velikosti peletu).

- Vzorek zamrazíme na -80°C , pokud budeme ihned pokračovat s RT reakcí ponecháme na ledu.

Ošetření RNA DNAsou (postup na 100 μl vyizolované RNA)

- K vyizolované RNA přidáme 10 μl DNase pufru, 2 μl DNasy a 0,5 μl RNase inhibitoru, promícháme a inkubujeme 30 min při 37°C .
- Ke vzorku přidáme 100 μl směsi fenol/chloroform 5:1 (pH 4,7) pro zastavení reakce, intenzivně vortexujeme 15 sec a centrifugujeme 10 min, 12000g, 4°C .
- Horní vodnou fázi přeneseme do nové mikrozkušavky a přidáme 2,5 objemu 96% isopropanolu nebo ethanolu (vychlazený) a 0,1 objemu 3M octanu sodného.
- Vortexujeme a poté centrifugujeme 20 min, 12000g, 4°C .
- Supernatant opatrně odlijeme do odpadu a zkontrolujeme přítomnost peletu.
- K peletu přidáme 500 μl 75% ethanolu (vychlazený), vortexujeme a centrifugujeme 5 min, 12000g, 4°C .
- Supernatant odlijeme a přidáme 500 μl 96% ethanol (vychlazený), vortexujeme a centrifugujeme 5 min, 12000g, 4°C .
- Opatrně odlijeme ethanol, stopy ethanolu na stěnách zkumavky stočíme v pikofuze a zbytky odebereme pipetou tak, aby se neporušil pelet.
- Pelet vysušíme na vzduchu asi 15 minut (případně ve flow boxu) a posléze rozpustíme v 25 – 50 μl DEPC H_2O (dle velikosti peletu).

B) Pomocí komerčního kitu na kolonkách (NucleoSpin RNA Plant, Macherey-Nagel)

- Do sterilní mikrozkušavky s 0,1 g zmraženého rostlinného prachu přidáme 0,35 ml RA1 pufru a 3,5 μl β -merkaptoethanolu k lýzi buněk a prudce vortexujeme.
- Umístíme fialový NucleoSpin filtr do sběrné zkumavky a aplikujeme lyzát.
- Centrifugujeme 1 min, 11000g při laboratorní teplotě.
- Filtrát bez poškození peletu přepipetujeme do nové 2 ml zkumavky a přidáme 0,35 ml 70% ethanolu, vortexujeme.
- Vzniklý lyzát aplikujeme na světle modrou NucleoSpin kolonu ve sběrné zkumavce včetně možného precipitátu.
- Centrifugujeme 30 s, 8000g při laboratorní teplotě.
- Umístíme kolonu no nové 2 ml sběrné zkumavky a přidáme 0,35 ml MDB (membráně desalting buffer).
- Centrifugujeme 1 min, 11000g při laboratorní teplotě k vysušení membrány.
- Ve sterilní zkumavce připravíme DNAsa reakční směs: pro každou reakci smícháme 10 μl DNasy a 90 μl DNAsa reakčního pufru. Promícháme opatrným překlápěním zkumavky.
- Přímo na střed silikátové membrány kolonky aplikujeme 95 μl DNasy reakční směsi (štípání DNA) a inkubujeme 15 min při pokojové teplotě.
- K promytí membrány přidáme 0,2 ml RA2 na kolonku k inaktivaci DNasy, centrifugujeme 30 s, 8000g.
- Umístíte kolonku do nové zkumavky.
- Přidáme 0,6 ml RA3 na kolonku a centrifugujeme 30 s, 8000g.
- Odstraníme filtrát a umístíme kolonku zpět do sběrné zkumavky.
- Přidáme 0,25 ml RA3 na kolonku a centrifugujeme 2 min, 11000g.
- Umístíme kolonku do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a přidáme 50 μl DEPC H_2O (RNase free) na střed silikátové membrány.
- K vymytí vysoce čisté RNA z kolonky centrifugujeme 1 min, 11000g.

- Vzorek zamrazíme na -80°C , pokud budeme ihned pokračovat s RT reakcí ponecháme na ledu.

2.2.3.3. Spektrofotometrické stanovení čistoty RNA

Míru čistoty vyizolované RNA určíme spektrofotometrickým stanovením celkové RNA při 260 a 280 nm. Bude-li hodnota $A_{260/280} \geq 1,8$, je čistota vzorku uspokojivá a hodnotu A_{260} bude možno použít pro výpočet koncentrace RNA.

- Odebereme 5 μl z celkové vyizolované RNA a vhodně naředíme do kyvety (100x), měříme absorbanci při 260 a 280 nm.
- Pokud je RNA preparát čistý, poměr $A_{260/280}$ dosahuje hodnoty okolo 2.
- Přibližnou koncentraci RNA určíme z jednoduché úměry, pokud je $A_{260} = 1$, pak je v kyvetě 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.
- Pro reverzní transkripci naředíme vzorky na stejnou koncentraci.

2.2.3.4. Reverzní transkripce (přepis RNA do cDNA)

- Jednotlivé komponenty použité pro přípravu reakce rozmrazíme na ledu a po celou dobu uchováváme na ledu.
- Dbáme na to, aby ve všech připravovaných vzorcích pro kvantitativní RT-PCR bylo stejné výchozí množství RNA (tj. 1 μg).
- Do malé mikrozkušavky pipetujeme 1 μg celkové RNA (maximálně v objemu 10 μl) a přidáme 0,8 μl 50 μM oligo(dT) primeru, doplníme celkový objem sterilní vodou na 15 μl .
- Necháme inkubovat 5 min v termocykleru na 70°C a poté ochladíme na 5 min na ledu.
- Ke vzorku přepipetujeme 8 μl 5x koncentrovaného pufru pro AMV polymerasu, 2,5 μl 10 mM dNTP mixu, 1 μl RNA inhibitoru a 1 μl AMV polymerasy. Doplníme celkový objem vodou na 25 μl .
- Mikrozkušavku krátce stočíme v pikofuze a inkubujeme v termocykleru 60 min při 42°C – probíhá reverzní transkripce do cDNA.
- Vzniklou cDNA zamrazíme na -20°C nebo uložíme na led a pokračujeme v qRT-PCR.

2.2.3.5. Kvantifikace genové exprese GSNOR metodou real-time PCR

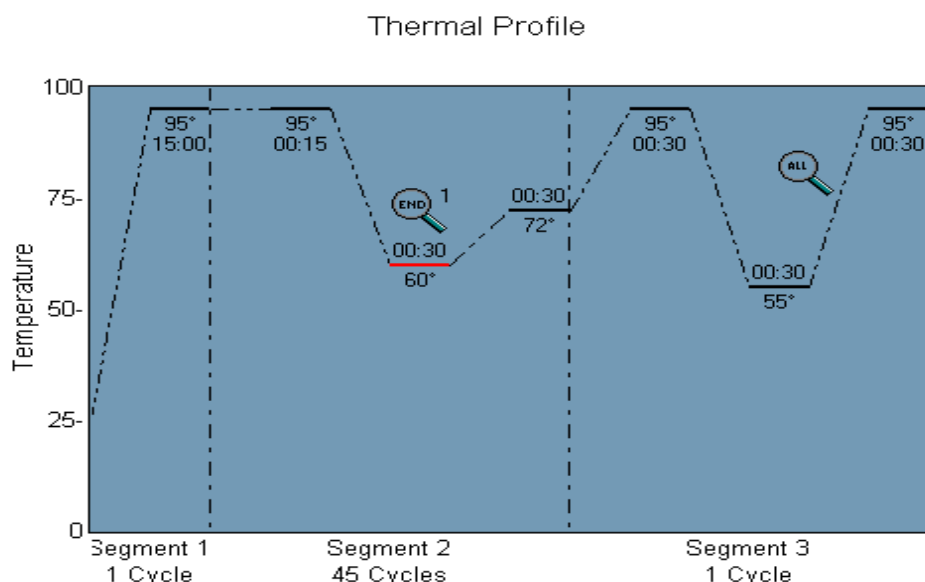
- Nejdříve se seznámíme se softwarem (MxProTM QPCR software) obsluhujícím real-time termocykler Mx3000P (Stratagene) a se samotnou obsluhou termocykleru.
- Jako templát pro PCR reakci použijeme 1 μl RT reakce (vytvořená cDNA).
- Jako templát v kontrolní – negativní PCR použijeme 1 μl nepřepsané RNA.
- Pro reakce použijeme genově specifické primery (Tab.1) a SYBR Green próbu (ABgene, ThermoScientific, UK) s pasivní referenční barvičkou ROX k normalizaci dat.
- Každou reakci provedeme ve dvou technických replikátech.
- Pro přípravu 25 μl reakční směsi použijeme komponenty v množstvích uvedených v následující tabulce (Tabulka 4; pipetujeme pečlivě v tomto daném pořadí do PCR zkumavek - stripů uložených v chladicím stojánku):

Tabulka 4: Příprava reakční směsi

složka	objem v μl/1 reakce
SYBR Green Mix 2x	12,5
forward primer 3 μM	1,75
reverse primer 3 μM	1,75
deionizovaná voda	8

cDNA	1
celkem	25

- Mikrozkuřavky – stripy dobře uzavřeme víkem, krátce centrifugujeme v pikofuze (eliminace bublinek) a okamžitě vložíme do termocyklieru.
- Termocyklier Mx3000P předem nastavíme na PCR program (Obr. 7):
 1. aktivace enzymu 95°C, 15 min
 2. denaturace 95°C, 15 sec
 3. navázání primerů (annealing) 60°C, 30 sec
 4. růst řetězce (elongace) 72°C, 30 sec
 5. kroky 2-4 opakovat 40x
 6. kroky 7-9 jsou pro program „analýza křivky tání“
 7. denaturace 95°C, 30 sec
 8. startovací teplota 60°C, 30 sec
 9. analýza T_m (melting step) 60°C, 10 sec (80 cyklů)
- Spustíme amplifikaci dle předem nastaveného programu a sledujeme průběh reakce v analytickém okně softwaru, po skončení reakce vyhodnotíme.



Obr. 7. Ukázkové okno MxProTM QPCR softwaru ilustrující možné parametry a cyklování pro real-time PCR.

2.2.4. Vyhodnocení výsledků

Vyhodnocení změn exprese GSNOR

- Pro výpočet normalizované exprese použijeme parametr prahového cyklu C_T (threshold cycle) pro kontrolní mRNA GAPDH a příslušnou mRNA GSNOR. V tomto případě je základním předpokladem, že exprese kontrolní GAPDH je konstantní ve všech rostlinách za různých situací, tedy že se chová jako „housekeeping“ gen.
- V softwaru zkontrolujeme proložení „threshold“ přímek tak, že procházejí lineární oblastí všech amplifikačních křivek.
- Odečteme výsledné C_T hodnoty pro všechny vzorky.
- K porovnání exprese (R – relative quantity) GSNOR v různých orgánech a v průběhu vývoje rostliny můžeme normalizovanou expresi námi sledovaného genu, a to

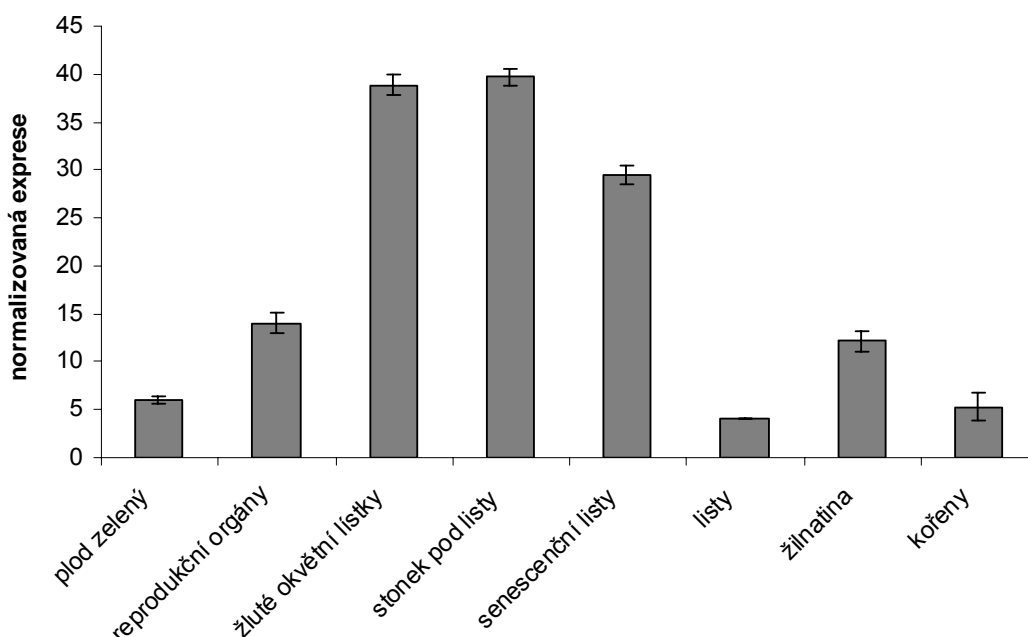
GSNOR, pro příslušný vzorek vzhledem ke kontrolní GAPDH vypočítat takzvanou „metodou delta delta C_T “ podle rovnic:

- (1) $R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$
- (2) $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ vzorek} - \Delta C_T \text{ kontrola}$
- (3) $\Delta C_T = C_T \text{ studovaný gen (GSNOR)} - C_T \text{ gen provozní (GAPDH)}$

- Zkontrolujeme denaturační křivky produktů a porovnáme získané denaturační teploty. Liší-li se denaturační křivky, ověříme velikost ampliconů pomocí agarosové elektroforézy.

2.2.5. Příklady výsledků a možné problémy

- Jako příklad výsledku je zde uvedeno porovnání exprese GSNOR v různých orgánech *S. lycopersicum* cv. Amateur.
- Z různých orgánů rostliny byla vyizolována celková RNA, která byla následně v RT-PCR přepsána do cDNA. Tato cDNA byla následně použita jako templát pro real-time PCR, kde provozní gen GAPDH byl použit jako referenční marker a studovaným genem byla GSNOR.
- Před vyhodnocením je důležité stanovit společnou mez detekce „threshold“ pro všechny vzorky, a to tak, že se nejprve přepne okno softwaru do logaritmického modu a naleznou se lineární fáze všech amplifikačních křivek, do které se mez detekce umístí.
- Z výsledku (Obr. 8) je patrné, že míra exprese sledovaného genu GSNOR je vyšší u žlutých okvětních lístků a stonku pod listy oproti jiným orgánům.



Obr. 8. Porovnání exprese GSNOR v různých orgánech *S. lycopersicum* cv. Amateur.

Možné problémy

- Při manipulaci s RNA i cDNA pracuj pouze s RNase free sterilním materiálem za neustálého chlazení materiálu a používej rukavice k zabránění degradace RNA.
- Před započítáním práce s real-time termocyklerem se řádně seznam s obsluhou přístroje a s příslušným softwarem.

- U denaturačních křivek se mohou vyskytovat dvě maxima, případně teplota denaturace se liší u různých vzorků stejného genu – může docházet k nespecifické amplifikaci. Lze ověřit na agarosovém gelu nebo ověřit PCR produkt sekvenací, v případě potvrzení nespecifické amplifikace potřeba navrhnout nové primery na jiné místo sekvence detekovaného genu. Další z možností je zvýšení teploty annealingu o 2°C nebo optimalizace pomocí teplotního gradientu.
- Měl by být patrný rozdíl v amplifikaci u vzorku s cDNA a u negativní kontroly s RNA. C_T vzorku se pohybuje okolo 22 cyklu, u negativního vzorku by mez detekce měla stěží překročit 38 cyklus. Obecně lze amplifikaci nad C_T 35 brát jako nevěrohodnou. Pokud však amplifikace vzorků cDNA je jen stěží vyšší než u negativní kontroly RNA, je špatně přepsaná RNA. Potřeba znovu přepsat RNA do cDNA reverzní transkripcí.

2.2.6. Kontrolní otázky

1. Co znamená, že data jsou sbírána „real-time“ během celého PCR procesu?
2. Jaký je rozdíl mezi vazbou nespecifického a specifického fluorescenčního substrátu na DNA?
3. Vysvětli princip FRET (fluorescence resonance energy transfer), na základě kterého pracují specifické fluorescenční sondy.
4. Jak lze prokázat, že během amplifikace vzniklo více produktů – tzn. nespecifická amplifikace?

3. LITERATURA

1. Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8054-8059.
2. Frébort I., Galuszka P. (2006) Laboratorní cvičení z molekulární biologie. Katedra biochemie PřF UP, Olomouc.
3. Gaston B., Reilly J., Drazen J. M., Fackler J., Ramdev P., Arnette D., Mullins M. E., Sugarbaker D. J., Chee C., Singel D. J. (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10957-10961.
4. Hoffmann J., Dimmeler S., Haendeler J. (2003) Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Lett* **551**, 153-158.
5. Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J* **331**, 659-668.
6. Lebeda, A., Mieslerová, B. (1998) Genové zdroje rodu *Lycopersicon* a jejich využití při šlechtění rajčete na rezistenci (Genetic resources of genus *Lycopersicon* and their exploitation in tomato resistance breeding). *Hort. Sci.* **25**, 53-65.
7. Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
8. Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002) Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* **515**, 20-24.

4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
ADH3	alkoholdehydrogenasa třídy III
APS	persíran amonný
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	„complementary“ komplementární DNA
C _T	cycle treshold
DIBA	dot immunobindig assay
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dsDNA	„double-stranded“ dvouvláknová DNA
DTT	dithiothreitol
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
gDNA	genomová DNA
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GS-SG	oxidovaný glutathion, disulfid
HMGS	S-(hydroxymethyl)glutathion
Ig	imunoglobulin
mRNA	mediátorová RNA
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NC	nitrocelulosoová membrána
NO	oxid dusnatý
oligo(dT)	oligodeoxythymidylic acid (primer)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	„polymerase chain reaction“ polymerázová řetězová reakce
PVDF	polyvinilidendifluoridová membrána
qRT-PCR	kvantitativní real-time PCR „PCR v reálném čase“
RNA	ribonukleová kyselina
RNAse/sy	RNA endonukleasa/sy
RNAse-free	„ribonuclease-free“ zbavená ribonukleas
RSNO	S-nitrosothioly
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně transkripční PCR
SDS	dodecylsíran sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin